

ニッポンハム食の未来財団 平成 29 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	ヒト化マウスを用いた食物アレルギーモデルマウスの開発とアナフィラキシー制御の研究
フリガナ	イトウ リョウジ
代表者名	伊藤 亮治
所属機関 (機関名) (役職名)	公益財団法人実験動物中央研究所 免疫研究室 室長代理
本助成金による 発表論文, 学会発表	総説 1 報 Ito, R., Takahashi, T., Ito, M. (2017). Humanized mouse models: Application to human diseases. <i>Journal of Cellular Physiology</i> , 23(1), 149-6. 平成 30 年度中に論文投稿予定 平成 31 年度に国際学会発表予定

### 研究結果要約

我々は、ヒト化マウスを用いて牛乳由来アレルゲンである $\beta$ -lactoglobulin (BLG)に対する食物アレルギーモデルを開発し、抗アレルギー治療薬の前臨床評価系確立を試みた。ヒト造血幹細胞移植によりヒト化した NOG IL-3/GM-CSF Tg マウスへヒト抗 BLG-IgE 抗体を静脈内投与し、翌日に BLG 精製タンパクを経口投与して、全身性アナフィラキシーが誘導されるか検討した。その結果、NOG IL-3/GM-CSF Tg マウスの約半数において、体温の低下およびヒトマスト細胞の活性化が認められ、アナフィラキシー様症状が観察された。しかしながら半数の個体は無症状であり、安定的な病態モデルの開発には誘導法の再検討が必要と考えられた。そこで我々は、抗 BLG 抗体投与後に、BLG タンパクを経口ではなく静脈内に投与し、全身性アナフィラキシーが誘導されるか検討した。その結果ほぼ全ての個体で体温の低下が認められ、血中へ大量のヒスタミンが放出されたことから、BLG 静脈内投与によって安定的にアナフィラキシー病態を誘導できることが示唆された。さらに、これらモデルへアナフィラキシー治療薬として使われているアドレナリン製剤を投与したところ、体温低下、死亡率、血中ヒスタミン量が顕著に抑制された。以上の結果から、当該モデルはヒトアナフィラキシー病態を標的とした創薬の前臨床試験系への応用が可能であることが示された。

## 研究目的

近年先進国ではアレルギー性疾患罹患率が増加傾向にあり、国民の健康被害だけでなく、経済活動への影響も大きく社会問題となっている。乳幼児期に多く見られる食物アレルギーは、アナフィラキシーショックという全身性の急性アレルギー反応を起こし、しばしば生命の危険を伴う重篤な疾患である。申請者は2013年にヒトアレルギー疾患を再現したヒト化マウス (NOG hIL-3/GM-CSF Tg マウス) を樹立した。このヒト化マウスはマスト細胞や顆粒球といったヒトアレルギー関連細胞がマウス体内で機能するため、花粉などのアレルゲンとヒト IgE 抗体をマウスに投与することで、アナフィラキシー反応を引き起こすことが可能である。本研究では hIL-3/GM-CSF Tg マウスを用いて、牛乳由来抗原に対する食物アレルギー応答、すなわち全身性アナフィラキシーを起こすヒト化マウスモデルを作製し、さらに、アナフィラキシー治療薬であるアドレナリン製剤の投与によりアレルギー応答の制御が可能であるかを検討することで当該モデルの有用性を示し、創薬の前臨床試験へ適用可能なヒトアレルギーモデルマウスの開発を目的としている。

本研究にて食物アレルギーへの適用が証明されれば、他のアレルギー疾患に対するモデルマウスとしての応用やその治療薬の試験などへの使用も考えられることから、本研究の医学的意義は大きい。将来的には国内、国外の製薬企業、大学などに頒布することにより多くの科学者に広範に利用されるような体制をとりたいと考えている。また、医薬品開発などの臨床試験における霊長類の使用が厳しく制限されている昨今において、ヒト化マウスはその打開策として有効な実験動物となるため、倫理的観点からも利用価値の高いモデルである。

## 研究計画及び研究手法

### 研究の方法

#### 1. ヒト化マウスの作製

8-10 週齢の NOG マウスおよび NOG hIL-3/GM-CSF Tg マウスへ 1.5Gy の放射線を全身に照射し、その翌日に臍帯血由来ヒト CD34 陽性造血幹細胞 (Stemexpress 社より購入)  $4 \cdot 5 \times 10^4$  個を尾静脈経由で移植した。

#### 2. キメラ率の測定

ヒト化マウス血中のヒト細胞キメラ率を移植後 4、8、12、16 週のポイントでフローサイトメトリーにて測定した。蛍光標識抗体は、hCD45 (白血球)、hCD19 (B 細胞)、hCD3 (T 細胞)、hCD203 (好塩基球、マスト細胞)、hCD14 (単球) を使用し、経時的なキメラ率の変化を調べた。

### 3. ヒト抗 BLG-IgE 抗体による食物アレルギー誘導

X 社から入手したヒト抗 BLG-IgE 抗体 2 $\mu$ g をヒト化 NOG, および NOG hIL-3/GM Tg マウスへ尾静脈経路で投与し、その翌日に BLG タンパク 15mg を経口または 500 $\mu$ g を尾静脈経路で投与した。BLG タンパク投与から 1 時間まで 10 分間隔で直腸温の計測を行い、投与 30 分後に採血して血漿を回収、投与 60 分後に脾臓を採取した。

### 4. 血中ヒスタミン量の計測

BLG タンパク投与後 30 分の血漿を用いて、血中ヒスタミン量を測定した。ヒスタミンの定量は、Histamine EIA Kit (Bertin Pharma 社 #A05890) により、操作手順書に従って行った。

### 5. アナフィラキシースコアリング

BLG タンパク投与後 30 分の時点で、下表のようにアナフィラキシー症状のスコアリングを行った。

Score	症状
0	症状なし
1	口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ足で耳の穴を掻く
2	活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛
3	1分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、ピクピクとする(一過性の痙攣)
4	ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣
5	死亡

### 6. アドレナリン製剤の投与

BLG タンパク投与後すぐに、10 $\mu$ g のアドレナリン製剤 (ボスミン：第一三共株式会社) を腹腔内投与し、上記アナフィラキシー症状を観察した。

当初計画からの変更について：計画当初は鶏卵及びピーナッツアレルギーも対象としていたが、これらのヒト IgE 抗体が入手困難であった。そのため、本研究では抗体の入手が可能であった牛乳アレルギーを対象とした。また、IL-3/GM/IL-33 Tg マウスを使用する予定であったが、これらの系統育成に時間を要したため、次年度以降に実施する。

## 結果と考察

### BLG 経口投与による食物アレルギーモデルの確立

代表者らが開発したヒト化 IL-3/GM-CSF Tg マウスは、造血幹細胞移植後にヒトマスト細胞や顆粒球が効率よく分化するマウスである。我々は、これらマウスへ抗ハプテンヒト IgE 抗体とハプテン抗原を投与することにより、ヒトマスト細胞を介した受動皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応の

惹起が可能であることを既に報告している<sup>1)</sup>。また昨年度の本助成研究において、抗ハプテン抗体-ハプテン抗原を介した全身性アナフィラキシーの誘導に成功したことを報告した。これらの結果は、本モデルがヒトアレルギー反応のエフェクター層を再現できることを示すが、食物由来抗原によるアナフィラキシー反応、すなわち食物アレルギーモデルとして利用できるかは未だ十分な検討がなされていないのが現状であった。X社は牛乳ホエイ成分に含まれる beta-lactoglobulin (BLG) 特異的なヒト IgE モノクローナル抗体を産生する 6 クローンのハイブリドーマの樹立に成功した。彼らはこれらの抗体がいずれも RBL-2H3 というヒトマスト細胞株の脱顆粒を *in vitro* で惹起できることを確認し、*in vitro* でのミルクアレルギー評価系を確立した<sup>2)</sup>。昨年度に代表者は、X社からこれら 6 クローンの抗体を共同研究にて入手し、BLG に対するヒト IgE 抗体を入手し、ヒト化 NOG マウスまたは IL-3/GM-CSF Tg マウスへ静脈内投与し、翌日に BLG タンパクを経口投与した。その後、10 分おきに 1 時間直腸温を測定し、アナフィラキシー症状を観察した。結果、ヒト化 NOG マウスでは体温低下が全く見られず、アナフィラキシー症状を起こさなかったのに対し、IL-3/GM-CSF Tg マウスは約半数の個体で投与 10 分後から体温低下が認められ、死亡個体も散見された (Fig.1)。しかしながら、半数の Tg マウスは体温低下を起こさず、症状もほとんど見られなかったことから、BLG 経口投与による誘導は安定性に欠ける手法であった。当該モデルを創薬の薬効評価系として応用することを考えると、5 割の成功率ではモデルとして適切ではないことは明らかであり、さらに成功率を高めるべく誘導法の検討が必要と思われる。

#### BLG 静脈内投与による食物アレルギーモデルの確立

BLG タンパクの経口投与で半数の個体が無症状であった原因は定かではないが、一因としては胃や腸内での BLG タンパクの分解または腸管からの吸収率に個体差があることが考えられる。そのため、腸管吸収過程をバイパスして血中へ直接 BLG を投与することで、より安定したアナフィラキシーモデルが構築できるのではないかと考え、BLG 静脈内投与による誘導法を検討した。ヒト化 IL-3/GM-CSF Tg マウスへ抗 BLG-IgE 抗体を静注し、翌日に BLG タンパクを経口または静脈内投与して、それぞれの群で症状を比較した。その結果、経口投与群では約半数、静脈内投与群では約 90% の個体がアナフィラキシー様の症状を示し、静脈内投与による誘導法がより安定的にアナフィラキシーを引き起こせることが確認された。さらにこの手法により、NOG マウスと IL-3/GM-CSF Tg マウスのアナフィラキシースコア及び死亡率を比較したところ、いずれも Tg マウスで顕著な亢進が認められ、一方で NOG マウスではほとんど無症状であった。

次に、ヒトマスト細胞の活性化及び脱顆粒の解析を行った。活性化ヒトマスト細胞については、活性化マーカーである CD63 タンパクの発現を指標としてフローサイトメトリーで測定し、血中のヒスタミン値は ELISA 法にて測定した。アナフィラキシー誘導 60 分後の脾臓マスト細胞を解析した

ところ、IL-3/GM-CSF Tg マウスでは CD63 発現が亢進し、NOG マウスでは極めて低レベルであった。また BLG 投与から 30 分後の血液を採取して、血中のヒスタミン量を測定したところ、IL-3/GM-CSF Tg マウスは NOG マウスに比べて 3 倍以上のヒスタミンが検出され、脱顆粒が起こっていることが確認された。さらに外観上のアナフィラキシースコアと脱顆粒の程度には正の相関が認められ、これらヒト化マウスがヒトの臨床症状を反映するモデルであることが示された。

#### アドレナリン製剤投与によるアナフィラキシー治療モデルの確立

本ヒト化マウスがアレルギー抑制薬の薬効評価や安全性試験の前臨床試験モデルとして利用されるためには、その適用性の担保すなわち既知化合物の効果を保証する必要がある。急性アナフィラキシーショックの治療薬としては、エピネフェリンなどのアドレナリン製剤が最も速効性があり効果も高く、気管支や血管に作用して呼吸困難や血圧低下を防ぐとともにマスト細胞の顆粒放出を抑制することも知られている。我々は BLG 投与により全身性アナフィラキシーを誘導したマウスへアドレナリンを投与することにより、ヒトと同様に症状が緩和されるか検討した。その結果、アドレナリン投与により体温低下、死亡率及びアナフィラキシースコアが有意に抑制され、さらに血中ヒスタミンはほとんど検出されなかった。以上の結果より、当該ヒト化マウスモデルがアレルギー抑制薬の薬効評価系に適用可能であることが示唆された。

本研究にて食物抗原を介したアナフィラキシー応答を安定的に誘導できるヒト化マウスモデルの確立に成功し、治療モデルとしての適用可能性を部分的に示すことができたが、アレルギーの経口投与による安定的な誘導が困難であったことは前臨床薬効評価モデルへの応用における障壁となると考えられる（本件に関する今後の対応については、「5.今後の研究活動について」に記載した）。

これまでの本研究結果は、平成 30 年度中に論文化し、平成 31 年度には国際学会での発表を予定しているが、今後もさらなるモデルの改良を続け、よりクオリティの高い *in vivo* 薬効評価系を実現するべく研究を進めていく。

#### 今後の研究活動について

本研究にて BLG 静脈内投与がアナフィラキシー誘導に効果的であったことが示されたが、より生理的な状態を反映するモデルとしては、経口投与によるモデルの開発が必須である。そのためには腸管の透過性を亢進させた NOG マウスの開発、すなわちクローディンファミリーなどのタイトジャンクション関連分子を欠損させたマウスを作製し、血中へのアレルギー漏出を促進させることで安定的にアナフィラキシーを起こすモデルを確立する。さらに今年度は実施できなかった鶏卵由来の OVA や小麦由来のグリアジンなどに対するアレルギーモデルを作製し、多様なアレルギーに

対応できるマウスの樹立を進めていく。将来的には当該モデルがアレルギー抑制薬や低アレルギー食品の評価系として恒常的に利用されるよう高品質な実験動物の開発を目指す。

#### 参考文献

- 1) Ito R, Takahashi T, Katano I, Kawai K, Kamisako T, Ogura T, Ida-Tanaka M, Suemizu H, Nunomura S, Ra C, Mori A, Aiso S, Ito M. Establishment of a human allergy model using human IL-3/GM-CSF-transgenic NOG mice. *J Immunol.* 2013 Sep 15;191(6):2890-9
- 2) Knipping K, Simons PJ, Buelens-Sleumer LS, Cox L, den Hartog M, de Jong N, Teshima R, Garssen J, Boon L, Knippels LM. Development of  $\beta$ -lactoglobulin-specific chimeric human IgE $\kappa$  monoclonal antibodies for in vitro safety assessment of whey hydrolysates. *PLoS One.* 2014 Aug 25;9(8):e106025

以上