

罕见病IgG4 RD模型

为方便国内研究者对IgG4-RD进行更加深入研究，南模生物自主重构了Lat-Y136F模型小鼠。

免疫球蛋白G4相关疾病（immunoglobulin G4-related disease, IgG4-RD）是一种慢性、进行性炎症伴纤维化的疾病，可累及身体几乎所有器官，如中枢神经系统、泪腺、唾液腺、甲状腺、肺、乳腺、胰腺、胆管、肝脏、胃肠道、前列腺、后腹膜、皮肤和淋巴结等。根据累及组织或器官的不同，疾病名称有所不同，如唾液腺受累的米库利兹病，胰腺受累的自身免疫性胰腺炎，胆管受累的硬化性胆管炎，后腹膜受累的腹膜后纤维化等。

虽然累及的组织器官不同，IgG4-RD的临床表现各异，但是都有相同的免疫学和病理学特点，包括：1）血清IgG4水平升高；2）病变部位有大量淋巴细胞和浆细胞浸润；3）T淋巴细胞和B淋巴细胞之间相互作用，共同导致了受累器官的炎症损伤和纤维化[1]（Fig1）；4）闭塞性静脉炎；5）轻到中度嗜酸性粒细胞浸润。

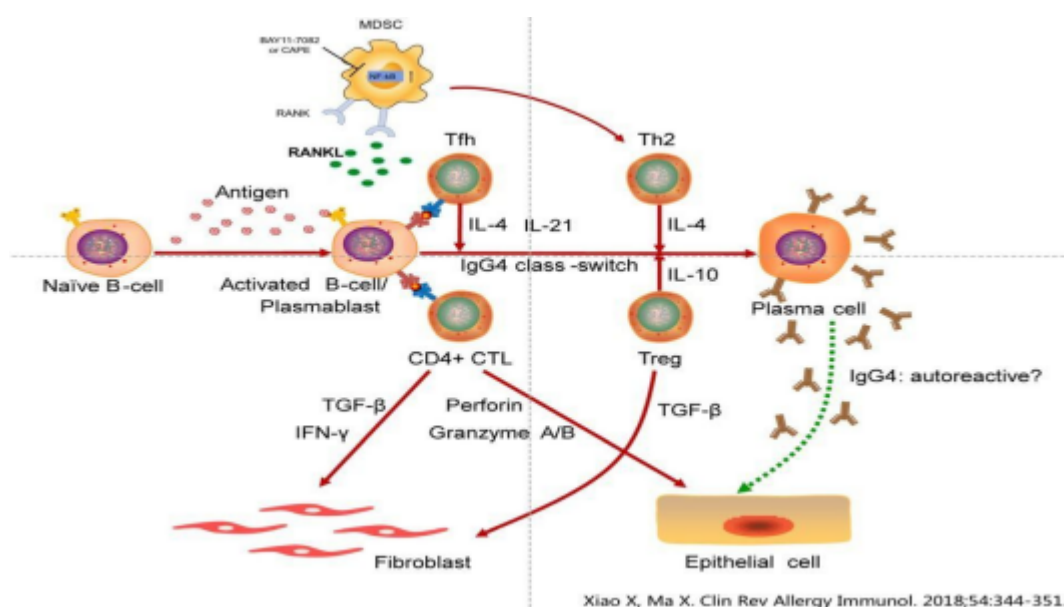


Fig1. IgG4-RD中T淋巴细胞和B淋巴细胞之间的相互作用

IgG4-RD直到2011年才获得国际统一认可的疾病命名，截止目前，IgG4-RD的致病机制尚不完全清楚，主要是因为缺乏合适和可靠动物模型。早前虽已报道了几种IgG4-RD相关研究的小鼠模型：Cd28缺陷的NOD小鼠[2]，Tgfbr2-KO小鼠[3]，Ela1-LTab小鼠[4]，Aire-KO小鼠[5]，HLA-DRB1*0405转基因小鼠[6]，但这些小鼠组织病变的发展仅限于胰腺和/或唾液腺，且Th亚群的反应模式仍未完全确定。因此，亟待开发新的动物模型帮助确定IgG4-RD的致病机制。

IgG4与Lat-Y136F小鼠模型

由于IgG4-RD是一种自身免疫性疾病，与T细胞的参与具有较强相关性，而参与T细胞活化的重要衔接蛋白

为LAT（T细胞活化连接蛋白），对Lat进行基因编辑就是科学家们探索动物模型的一种新思路。

LAT蛋白分子量大约为36-38kDa，可以在TCR发生交联后被迅速磷酸化的蛋白。LAT属于完整的跨膜衔接蛋白，并通过近膜的两个棕榈酰化序列定位于T细胞上的富含糖脂的脂筏区域，是T细胞信号转导中ZAP-70蛋白酪氨酸激酶的主要作用底物之一，并可招募和活化许多下游信号分子，诸如Gads，Grb2以及磷脂酶C- γ 1（PLC- γ 1）等，参与TCR介导的信号转到，并在T细胞发育和活化的过程中起重要作用。

Lat-Y136F敲入小鼠模型，是将小鼠第136位的酪氨酸替换为苯丙氨酸，导致其失去与PLC- γ 1的结合的能力，小鼠继而发展为淋巴细胞增殖紊乱，并表现出CD4+T细胞的扩增和多种Th2型细胞因子的高表达[7,8]，同时，B细胞大量活化，血清IgG1和IgE[9]水平升高。这些表型与IgG4-RD的病理学基础十分相似，因此，研究人员预测LatY-136F敲入小鼠是一种更加符合人类IgG4-RD研究的小鼠模型。为了证实这一观点，他们展开了一系列的表型检测实验。

1. Lat-Y136F敲入小鼠表现出与IgG4-RD患者相似的多器官累及特征

研究人员[10]对LatY-136F敲入小鼠的唾液腺、胰腺和肾脏进行了组织病理学分析。6周龄的LatY136F敲入小鼠在唾液腺、胰腺导管、胰腺的动脉和静脉，肾脏皮质和髓质周围均有明显的炎症病变（Fig2）。

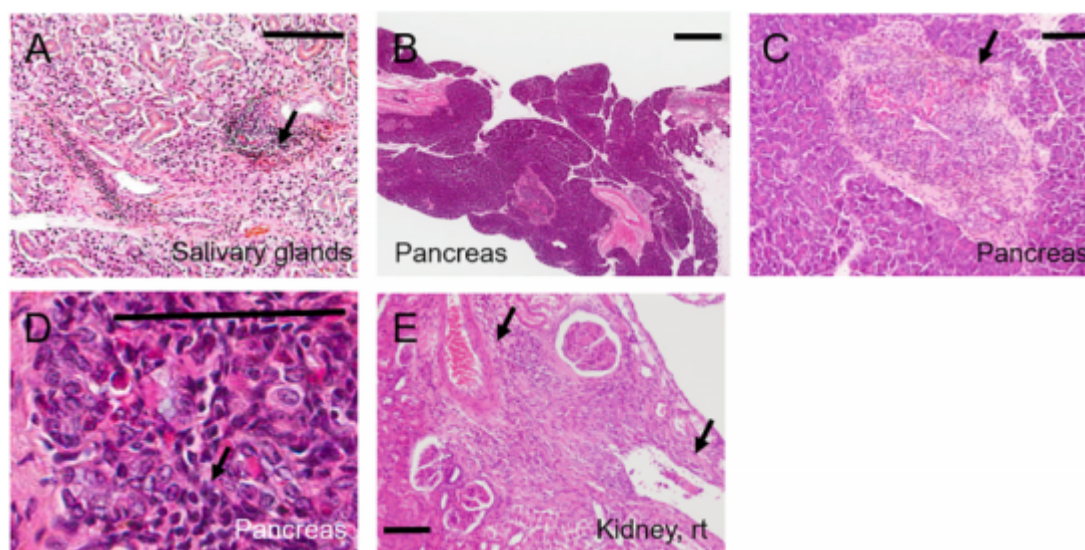


Fig2. Lat-Y136F敲入小鼠胰腺、唾液腺和肾脏的组织病理学特征

免疫染色显示Lat-Y136F敲入小鼠病变组织中主要是单核细胞浸润（Fig3）。在唾液腺、胰腺和肾脏炎症病灶可见浆细胞、CD4+T细胞和巨噬细胞的大量浸润，以及少量CD8+T细胞的浸润。值得注意的是，浸润各器官的浆细胞主要表达IgG1(人类IgG4的同源物)。

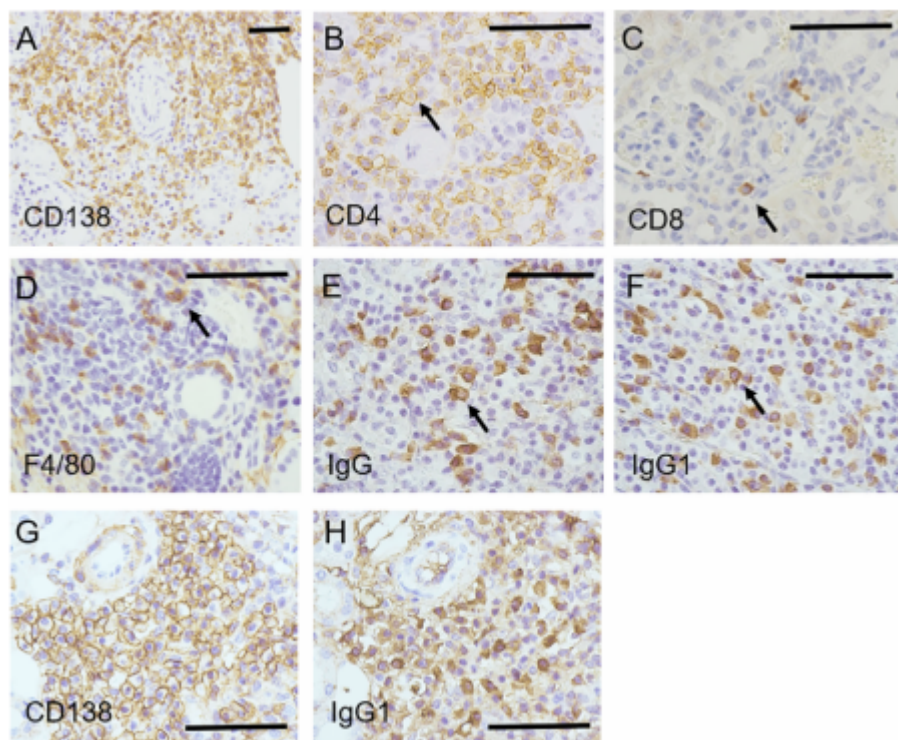


Fig3. Lat-Y136F敲入小鼠病变组织中浆细胞、T细胞和巨噬细胞的免疫染色

2. Lat-Y136F敲入小鼠可发展出纤维化和闭塞性静脉炎

除了观察到病变组织出现淋巴细胞浸润，Azan染色显示所有Lat-Y136F敲入小鼠的唾液腺、胰腺和肾脏会发展出严重的纤维化病变。6周龄后，Lat-Y136F敲入小鼠的纤维化评分显著高于对照组小鼠，并随年龄增长纤维化程度不断加重。

闭塞性静脉炎是IgG4-RD的另一特征性病变。检测发现10周龄和20周龄的Lat-Y136F敲入小鼠，肺中会出现典型的闭塞性静脉炎，胰腺中也会出现有类似的血管病变（Fig4）。

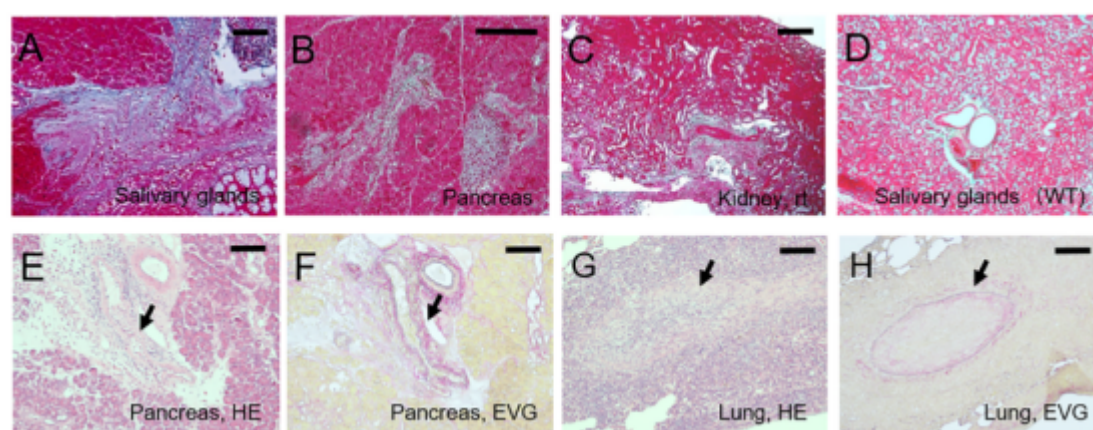


Fig4. Lat-Y136F敲入小鼠可发展出纤维化和闭塞性静脉炎

综上，Lat-Y136F敲入小鼠表现出IgG4-RD患者相同的免疫病理特征（Table1），这些数据支持了Lat-Y136F敲入小鼠可作为研究人类IgG4相关疾病的理想动物模型。

Table1. IgG4-RD患者与Lat-Y136敲入小鼠的病理特征比较

	Human IgG4-RD [2, 3, 20-25]	Lat ^{Y136F} knock-in mice (This study and [16, 17])
Major Affected organs	Salivary glands, Lacrimal glands, Pancreas, Kidney, Lung, Lymph nodes, Retroperitoneum/periaorta, Bile duct	Salivary glands, Pancreas, Kidney, Lung, lymph nodes, Spleen, Liver
Laboratory data		
Serum human IgG4 or mice IgG1 level	Elevated	Elevated
Serum IgE level	Elevated	Elevated
Type 2 cytokine production	IL-4, IL-5, and IL-13 [4, 26]	IL-4, IL-5, and IL-13
Pathological findings		
Fibrosis/Storiform fibrosis	Present/Present	Present/partially present in lung
Obliterative phlebitis	Present	Absent
Type of infiltrated cells	Plasma cells (IgG, IgG4 and IgE), B cells, Macrophages, CD4 T cells (Cytotoxic CD4 T cells), Regulatory T cells	Plasma cells (IgG, IgG1 and IgE), B cells, Macrophages, CD4 T cells
Treatment		
Corticosteroid	Effective	Effective
Immunosuppressants	Azathioprine and others	N.A.
Anti-CD20 monoclonal antibody	Effective	N.A.

N.A., not available; IL, interleukin; AIP, autoimmune pancreatitis; IFN, interferon; PMA, Phorbol 12-Myristate 13 Acetate

南模生物Lat-Y136F小鼠模型

基于以往研究基础，为方便国内研究者对IgG4-RD进行更加深入研究，南模生物自主重构了Lat-Y136F模型小鼠，目前对该小鼠进行了相关表型检测（Fig5-7）。

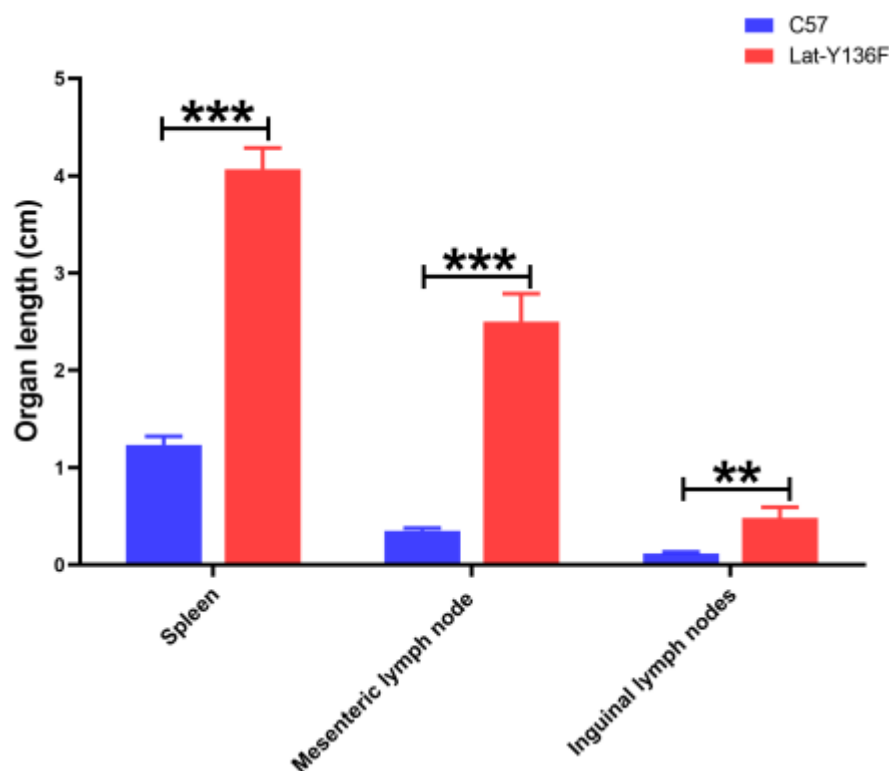


Fig5. Lat-Y136F敲入小鼠的脾脏、肠系淋巴结及腹股沟淋巴结长度显著高于WT小鼠

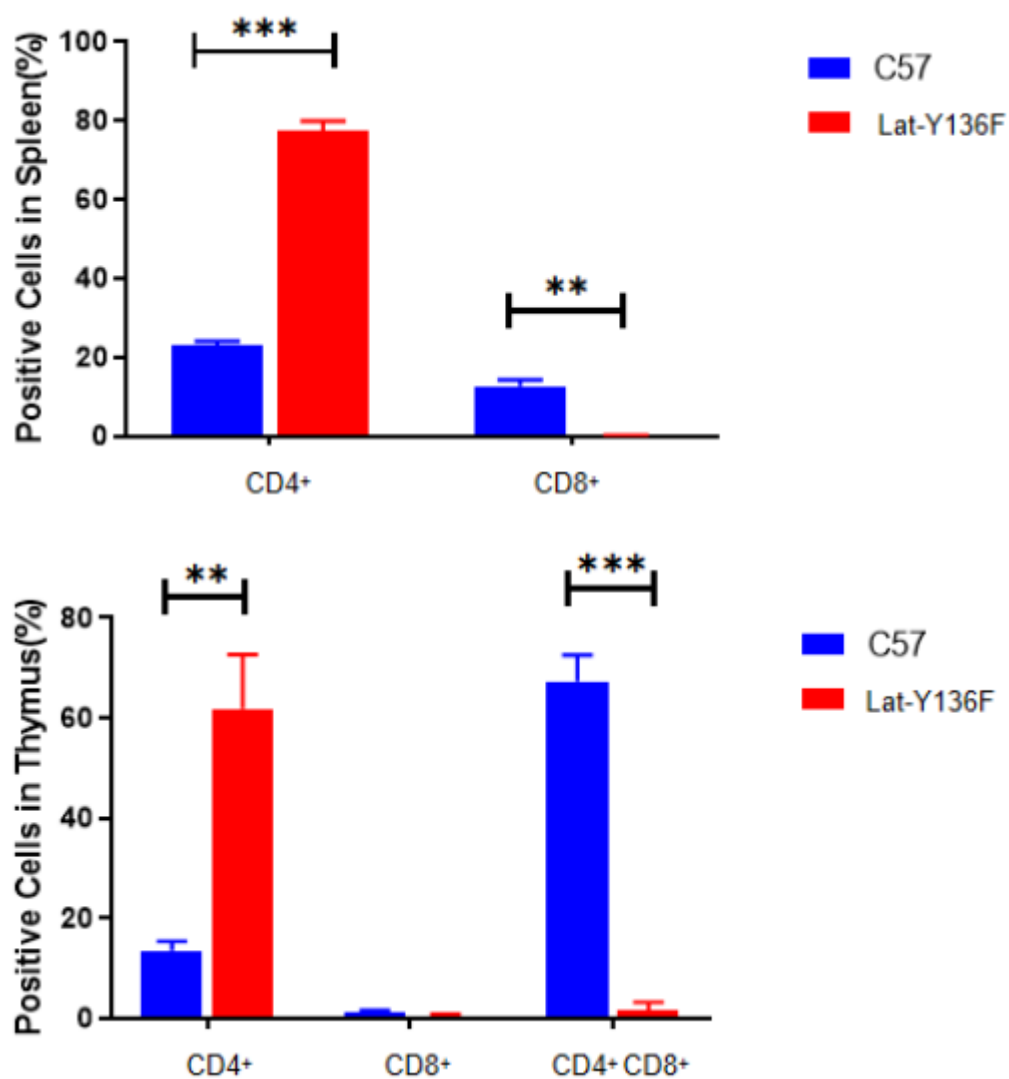


Fig6. Lat-Y136F敲入小鼠脾脏（左）与胸腺（右）中CD4+T细胞比例上调

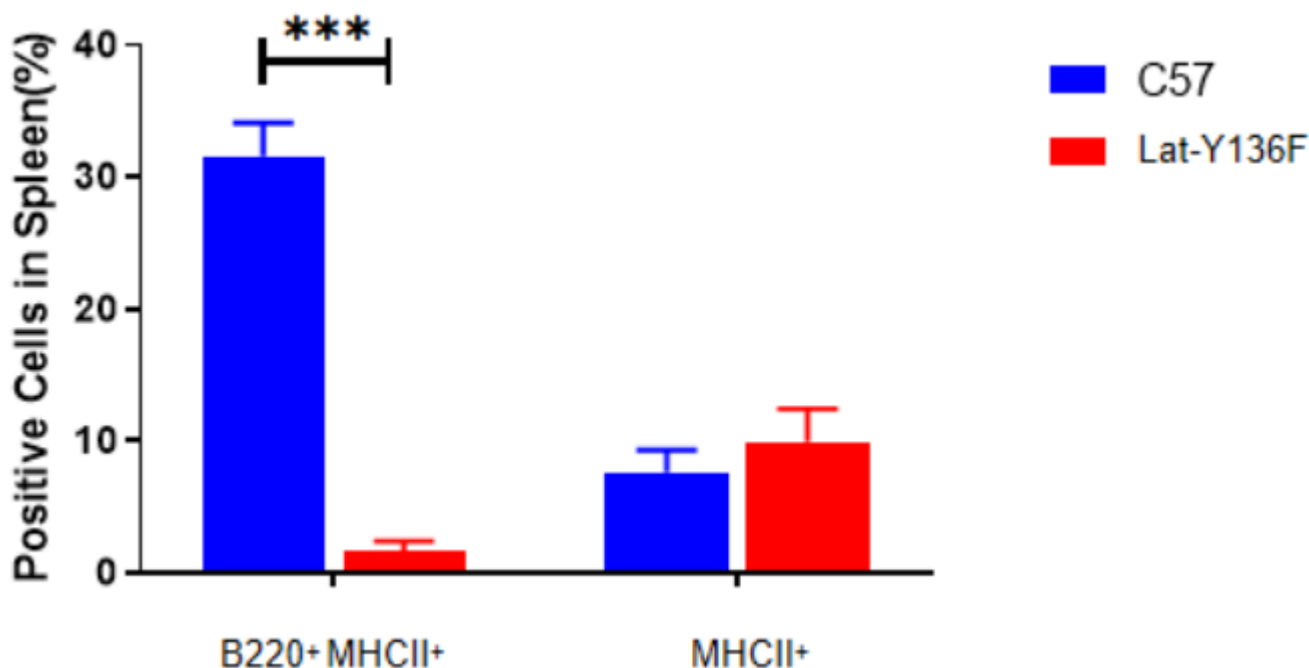


Fig7. Lat-Y136F敲入小鼠脾脏中B细胞的MHC II 类分子表达增加

南模生物深耕基因编辑领域，提供全方位模式生物服务，包括基因修饰成品模型供应、个性化模型定制、饲养繁育、表型分析、药效评价等，满足不同实验室需求。

Reference:

- [1]. Xiao X, Lian M, Zhang W, Eric Gershwin M, Ma X. The Immunologic Paradoxes of IgG4-Related Disease. Clin Rev Allergy Immunol. 2018 Apr;54(2):344-351. doi: 10.1007/s12016-018-8679-y. PMID: 29460058.
- [2]. Meagher C, Tang Q, Fife BT, Bour-Jordan H, Wu J, Pardoux C, et al. Spontaneous development of a pancreatic exocrine disease in CD28-deficient NOD mice. J Immunol. 2008; 180(12):7793-803. PMID:18523243; PubMed Central PMCID: PMC2429990.
- [3]. Boomersshine CS, Chamberlain A, Kendall P, Afshar-Sharif AR, Huang H, Washington MK, et al. Autoimmune pancreatitis results from loss of TGFbeta signalling in S100A4-positive dendritic cells. Gut.2009; 58(9):1267-74. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.170779> PMID: 19625278; PubMed Central PMCID: PMC2719085.
- [4]. Selezniek GM, Reding T, Romrig F, Saito Y, Mildner A, Segerer S, et al. Lymphotoxin beta receptor signaling promotes development of autoimmune pancreatitis. Gastroenterology. 2012;

143(5):1361–74. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.07.112> PMID: 22863765.

[5]. Kurisaki H, Nagao Y, Nagafuchi S, Mitsuyama M. Autoimmune gastro-pancreatitis with anti-protein

disulfide isomerase-associated 2 autoantibody in Aire-deficient BALB/cAnN mice. *PLoS One*. 2013; 8 (8):e73862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073862> PMID: 23991207; PubMed Central PMCID:PMCPMC3753263.

[6]. Freitag TL, Cham C, Sung HH, Beilhack GF, Durinovic-Bello I, Patel SD, et al. Human risk allele HLADRB1*0405 predisposes class II transgenic Ab0 NOD mice to autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology*. 2010; 139(1):281–91. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.03.038> PMID: 20303356; PubMed Central PMCID: PMCPMC2902648.

[7]. Aguado E, Richelme S, Nunez-Cruz S, Miazek A, Mura AM, Richelme M, et al. Induction of T helpertype 2 immunity by a point mutation in the LAT adaptor. *Science*. 2002; 296(5575):2036–40. <https://doi.org/10.1126/science.1069057> PMID: 12065839.

[8]. Genton C, Wang Y, Izui S, Malissen B, Delsol G, Fournie GJ, et al. The Th2 lymphoproliferation developing in LatY136F mutant mice triggers polyclonal B cell activation and systemic autoimmunity. *J Immunol*. 2006; 177(4):2285–93. PMID: 16887989.

[9]. Koonpaew S, Shen S, Flowers L, Zhang W. LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. *J Exp Med*. 2006; 203(1):119–29. <https://doi.org/10.1084/jem.20050903> PMID:16380508; PubMed Central PMCID: PMCPMC2118069.

[10]. Yamada K, Zuka M, Ito K, Mizuguchi K, Kakuchi Y, Onoe T, Suzuki Y, Yamagishi M, Izui S, Malissen M, Malissen B, Kawano M. LatY136F knock-in mouse model for human IgG4-related disease. *PLoS One*. 2018 Jun 14;13(6):e0198417. doi: 10.1371/journal.pone.0198417. PMID: 29902238; PMCID: PMC6002065.