

難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発

岡山吉道¹⁾, 佐野有隆¹⁾, 豊島翔太¹⁾, 三木寿美²⁾, 武富芳隆²⁾, 坂本朋美¹⁾, 李賢鎬¹⁾, 齋藤修¹⁾, 村上誠²⁾, 田杭真帆¹⁾, 伊東真奈¹⁾, 遠藤嵩大¹⁾, 丹羽悠介¹⁾, 葉山惟大¹⁾, 藤田秀樹¹⁾, 高橋宏通¹⁾, 三浦勝浩¹⁾, 濱田岳志¹⁾, 中川優¹⁾, 飯塚和秀¹⁾, 内野慶人¹⁾, 入山規良¹⁾, 小池隆¹⁾, 栗原一也¹⁾, 都築広¹⁾, 長澤洋介¹⁾, 長塚靖子¹⁾, 岩田光浩¹⁾, 北村登¹⁾, 丸岡秀一郎¹⁾, 福田麻佐美¹⁾, 山田志保¹⁾, 黒澤雄介¹⁾, 伊藤亮治³⁾, 八田善弘¹⁾, 中山智祥¹⁾, 武井正美¹⁾, 徳橋泰明¹⁾, 權寧博¹⁾, 照井正¹⁾

Development of new therapeutic strategy and investigation of the pathogenesis of severe immunological and allergic diseases

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Yutaka SANNO¹⁾, Shota TOYOSHIMA¹⁾, Yoshimi MIKI²⁾, Yoshitaka TAKETOMI²⁾, Tomomi SAKAMOTO¹⁾, Kenko Li¹⁾, Shu SAITO¹⁾, Makoto MURAKAMI²⁾, Maho TAGUI¹⁾, Mana ITOU¹⁾, Takahiro ENDO¹⁾, Yusuke NIWA¹⁾, Koremasa HAYAMA¹⁾, Hideki FUJITA¹⁾, Hiromichi TAKAHASHI¹⁾, Katsuhiko MIURA¹⁾, Takashi HAMADA¹⁾, Masaru NAKAGAWA¹⁾, Kazuhide IIZUKA¹⁾, Yoshihito UCHINO¹⁾, Noriyoshi IRIYAMA¹⁾, Takashi KOIKE¹⁾, Kazuya KURIHARA¹⁾, Hiroshi TSUZUKI¹⁾, Yosuke NAGASAWA¹⁾, Yasuko NAGATSUKA¹⁾, Mitsuhiro IWATA¹⁾, Noboru KITAMURA¹⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾, Asami FUKUDA¹⁾, Shiho YAMADA¹⁾, Yusuke KUROSAWA¹⁾, Ryoji ITO³⁾, Yoshihiro HATTA¹⁾, Tomohiro NAKAYAMA¹⁾, Masami TAKEI¹⁾, Yasuaki TOKUHASHI¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾

要旨

1. 整形外科領域

変形性関節症(OA)患者と比較すると、関節リウマチ(RA)患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。炎症の増悪が抗炎症性脂質メディエーターも増加させている可能性が示唆された。これら脂質メディエーターの中で5-HETE, 12-HETE, 8,9-EET, LXA4, PD1, 12-HEPE, 4-HDoHEおよび17-HdoHEは、RAとOAを区別するバイオマーカーとなることが示唆された。

2. 皮膚科領域

慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者では、血漿中の炎症性脂質メディエーターである5-HETEおよびLTE4が健康人(NC)と比較し有意に高値である一方で、抗炎症性脂質メディエーターであるLXA4, PD1およびRVD2が有意に低値であった。炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常がCSUの病態に関与している可能性が示唆された。また、12-HETEとLXA4においては、CSUの重症度と有意な相関関係を認め、重症度を決定する有用なバイオマーカーになる可能性が示唆された。

3. 血液膠原病内科領域

- ①血管内B細胞リンパ腫(IVL)ではMYCの高発現が予後不良の原因である可能性がある。
- ②免疫系ヒト化HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid, IL-2R γ nullマウスを用いて、新たなxeno-graft versus host diseaseモデルを作成した。

4. 呼吸器内科領域

気管支喘息は、いまだに不明な点が多く、現行の治療に抵抗性を示す重症患者も少なくない。新規治療薬となる標的分子や新たな病態解明について研究を行なっている。

1) 日本大学医学部

2) 東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター健康環境医工学教室

3) 公益財団法人実験動物中央研究所

照井 正 : terui.tadashi@nihon-u.ac.jp

岡山吉道 : okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

I. はじめに

罹率が増加し社会問題にもなっている免疫・アレルギー疾患は、遺伝因子と環境因子が複雑に関与した多因子疾患である。近年、疾患モデル動物の解析により免疫・アレルギー疾患の病態の解明が進み治療法の開発が進んでいるが、未だに既存の治療法では効果が少ない難治例が存在する。難治例の病態解明には、個々の疾病の臨床検体からの取り組みが必須である。本事業は、免疫・アレルギー疾患を扱う4つの臨床各科のベットサイドから得られた臨床検体を基に臨床医、免疫・アレルギー学者と生物学者が連携し研究拠点を形成し、難治性免疫・アレルギー疾患の予防と治療に資する研究を行うことを目的とした。具体的な目的は、1. 免疫・アレルギー疾患の病態におけるマスト細胞の役割の解明 2. 感染による関節リウマチ、気管支喘息の発症と増悪の機序の解明である。

また各分野の研究に際して倫理的配慮を行っている。生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている。安全対策に関しては、日本大学遺伝子組換え実験実施規定に定める学長の確認を受けて実施している。

以下に各領域の研究の概要について述べる。

II. 整形外科領域

重症関節リウマチ (RA) 患者の膝関節滑液中の炎症性および抗炎症性脂質メディエーターは、重症変形性関節症 (OA) 患者に比較して活性化が亢進している

1. 背景

関節リウマチ (RA) は、複数の遺伝的要因に環境因子が加わり自己免疫応答が惹起され、結果として慢性の炎症が複数の滑膜組織に生じ、進行性の破壊性関節炎に至る疾患と考えられている。エイコサノイド経路は、RAの病態において重要な役割を果たしている。RA患者の滑液中のPGD₂、PGE₂およびLTB₄は変形性関節症 (OA) 患者と比較して有意に高いこと¹⁾、PGE₂とLTB₄は炎症の増悪に関与していること^{1), 2)}が報告されている。RAの病態においては、cyclooxygenase (COX) と5-lipoxygenase (5-LO) の経路の過剰な発現が認められ、これらの過剰発現は、methotrexateなどのDMARDs、抗TNF- α 抗体治療やB細胞除去療法では、抑制できないこと

が報告されており、^{3), 4)} 亜臨床的な炎症や再発に関与していると示唆されている。また、抗炎症性脂質メディエーターの関節炎への関与が示唆されるが、DHAやEPA代謝物に関しては解析がほとんどされてなく、OA患者と比較した脂質メディエーターの網羅的比較解析はなされていない。

2. 目的

RAにおいて、関節液中の脂質メディエーターの量的、質的な変化をリポドミクス手法を用いて解析し、プロファイルを明らかにすることを目的とした。

3. 対象及び方法

3-1 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている (RK-160112)。

3-2 対象

人工膝関節置換術時に18例のRA患者の関節滑液と26例のOA患者の関節滑液を採取し、滑液をヒアルロニダーゼで処理した。

3-3 リポドミクス

関節液は20mM Tris-HCl (pH 7.4) にて10倍に希釈した。固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出した。4000Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer (AB Sciex) と液体クロマトグラフィー (liquid chromatography [LC] ; NexeraX2 system; Shimadzu) を用いて網羅的に酸化脂肪酸を比較解析した。脂質メディエーター量は、multiple reaction monitoring (MRM) transitionのピークの下面積から算出した。標準量が手に入るものは絶対量を算出した。

3-4 統計解析

臨床データの2群間の統計学的解析は、Kruskal-wallis testを用いた。相関の評価には、Spearmanの順位相関係数を用いた。p値が0.05未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan) を使用した。

4. 結果

アラキドン酸由来の脂質メディエーターでは、PGF₂ α 、5-HETE、LTB₄、12-HETEおよび8,9-EETが、OA患者よりもRA患者において有意に高値であった。抗炎症性の脂質メディエーターであるAA由来

の脂質メディエーターでは、LXA4およびLXB4、DHA由来の脂質メディエーターでは、PD1、RvD2および10-HDoHE等が、EPA由来の脂質メディエーターでは、5, 8, および 12-HEPEs および LTB5がOA患者よりもRA患者において有意に高値であった。

5. 考 察

ROC曲線から特異度、感度を検定したところ17の脂質メディエーターがOA患者よりもRA患者において有意に高値であった。陽性尤度比が10以上を示す脂質メディエーターは、5-HETE, 12-HETE, 8, 9-EET, LXA4, PD1, 12-HEPE, 4-HDoHE および 17-HdoHEであった。これらの脂質メディエーターが重症RAの病態に関与していることが示唆された。OA患者と比較すると、RA患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。炎症の増悪が抗炎症性脂質メディエーターも増加させている可能性が示唆された。

6. 結 論

OA患者と比較すると、RA患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。これら脂質メディエーターの中で5-HETE, 12-HETE, 8,9-EET, LXA4, PD1, 12-HEPE, 4-HDoHEおよび17-HdoHEは、RAとOAを区別するバイオマーカーとなることが示唆された。⁵⁾

参考文献

- 1) Korotkova M, Jakobsson PJ: Persisting eicosanoid pathways in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2014; 10: 229-241.
- 2) Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, et al: Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *J Exp Med*. 2006; 203: 837-842.
- 3) Korotkova M, Westman M, Gheorghe KR, af Klint E, Trollmo C, Ulfgrén AK, Klareskog L, Jakobsson PJ: Effects of antirheumatic treatments on the prostaglandin E2 biosynthetic pathway. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 3439-3447.
- 4) Gheorghe KR, Thurlings RM, Westman M, Boumans MJ, Malmström V, Trollmo C, Korotkova M, Jakobsson PJ, Tak PP: Prostaglandin E2 synthesizing enzymes in rheumatoid arthritis B cells and the effects of B cell depleting therapy on enzyme expression. *PLoS One*. 2011; 6: e16378.
- 5) Sano Y, Toyoshima S, Miki Y, Taketomi Y, Ito M, Lee H, Saito S, Murakami M, Okayama Y: Activation of inflammation and resolution pathways of lipid mediators in synovial fluid from patients with severe rheumatoid arthritis compared with severe osteoarthritis. *Asia Pacific Allergy*. 2020; In press.

Ⅲ. 皮膚科領域

リピドミクスを用いた慢性特発性蕁麻疹 (CSU) 患者血漿中の脂質メディエーターのプロファイル

1. 背 景

近年、リピドミクスを用いた解析によって、脂質メディエーターの量的・質的な変化が生体の恒常性やアレルギー疾患の発症に関与していることが明らかになってきている。

蕁麻疹とは、そう痒を伴う一過性の紅斑と膨疹が出没を繰り返す皮膚疾患であり、特定の誘因がなく6週間以上症状が続くものを慢性特発性蕁麻疹 (chronic spontaneous urticarial, 以下CSU) という。その重症度は、患者自身が膨疹の数と痒みの程度をスコア化することで決定されており、重症度を示す客観的なバイオマーカーは存在しない。

2. 目 的

リピドミクスを用いて、CSUにおける脂質メディエーターのプロファイルを明らかにし、病態や重症度に関連する脂質メディエーターを探索することを目的とした。

3. 方 法

3-1 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている (RK-15908-12およびRK-160112-2)。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

3-2 対 象

CSU患者67例、健常人 (NC) 27例の血漿から固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出し、LC-MSを用いて脂質メディエーターの解析を行った。

3-3 リピドミクス

血漿は20 mM Tris-HCl (pH 7.4) にて10倍に希釈した。固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出した。4000Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer (AB Sciex) と液体クロマトグラフィー (liquid chromatography [LC] ; NexeraX2 system; Shimadzu) を用いて網羅的に酸化脂肪酸を比較解析した。脂質メディエーター量は、multiple reaction monitoring (MRM) transitionのピークの下面積から算出した。標準量が手に入るものは絶対量を算出した。¹⁾

3-4 統計解析

臨床データの2群間の統計学的解析は、Mann-Whitney U test を用いた。相関の評価には、Spearmanの順位相関係数を用いた。p値が0.05未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan) を使用した。

4. 結果

CSUにおいては、アラキドン酸 (AA) 代謝産物の5-HETE, LTE4がNCと比較して有意に高値であった。また、PGF2 α , LXA4はNCと比較して有意に低値であった。エイコサペンタエン酸 (EPA) とドコサヘキサエン酸 (DHA) の代謝物では5-HEPE, PD1, RVD2がNCと比較して有意に高値であった。

12-HETEとLXA4ではCSUの重症度 (UAS7とUCT両者) と有意な相関関係が認められたが、12-HETEが高値ほど軽症であり、LXA4が高値ほど重症であった。5-HETEおよび12-HETEと末梢血好塩基球数との間には正の相関が認められた。

5. 考察

CSUで高値であったLTE4は、CysLT3受容体を介して気管支収縮作用や血管透過性作用を及ぼす炎症性脂質メディエーターである。またTh2細胞の活性化を増強し、好中球の機能を亢進させる。²⁾ 5-HETEは、IgE依存性の刺激で好塩基球およびマスト細胞が産生することが報告されている。³⁾ リポキシン (LX) は、好中球、好酸球の遊走抑制、樹状細胞における炎症性サイトカインの産生抑制等の抗炎症作用を持つ。⁴⁾ これらのことから、CSUでは、炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常が病態に関与している可能性が示唆された。

CSUの重症度と有意な相関があった12-HETEは、好塩基球数とも有意な正の相関関係があり、好塩基球数の減少 (basopenia) は重症であるとの報告⁵⁾があり、今回の私達の報告とも合致している。今後好塩基球数と12-HETEの関連について検討していく。

6. 結論

CSU患者の血漿においては、炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常がCSUの病態に関与している可能性が示唆された。また、12-HETEとLXA4においては、CSUの重症度と有意な

相関関係を認め、重症度を決定する有用なバイオマーカーになる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Sano Y, Toyoshima S, Miki Y, Taketomi Y, Ito M, Lee H, Saito S, Murakami M, Okayama Y: Activation of inflammation and resolution pathways of lipid mediators in synovial fluid from patients with severe rheumatoid arthritis compared with severe osteoarthritis. *Asia Pacific Allergy*. 2020; In press.
- 2) Taketomi Y, Murakami M: Immunological Regulation by Bioactive Lipids. *Yakugaku Zasshi*. 2017; 137: 503-515.
- 3) Warner JA, Peters SP, Lichtenstein LM, Hubbard W, Yancey KB, Stevenson HC, Miller PJ, MacGlashan Jr DW: 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *J Leukoc Biol*. 1989; 45 (6) : 558-571.
- 4) Seran C, Maddox J, Petasis N, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady H, Colgan S, Madara J: Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry*. 1995; 34: 14609-14615.
- 5) Magen E, Mishal J, Zeldin Y, Schlesinger M: Clinical and laboratory features of antihistamine-resistant chronic idiopathic urticaria. *Allergy Asthma Proc*, 2011; 32 : 460-466.

IV. 血液膠原病内科領域

難治性血液疾患の癌遺伝子解析とヒト化マウスを用いた慢性GVHDの自己免疫機序

1. 背景

血管内B細胞リンパ腫 (intravascular B cell lymphoma: IVL) は主に血管内に腫瘍性病変が局限するびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (DLBCL) の亜型である¹⁾。DLBCLではmyc遺伝子再構成やMYCタンパクの発現亢進が予後不良因子との報告があるが²⁾、IVLにおけるmyc遺伝子再構成やMYCタンパクの発現に関する報告はほとんどない。

近年、ヒト免疫系の研究ツールとしてヒト免疫化マウスの重要性が高まっている。特に2002年に作製された重症免疫不全マウスモデルNOD/SCID/IL-2R γ nullマウス (NOGマウス) は、ウイルス感染やアレルギー・自己免疫疾患の研究に役立ってきた³⁾。しかし、ヒト免疫化NOG (hNOG) マウスには液性免疫系の機能が不十分であるという欠点がある。⁴⁾ 重症免疫不全マウス (HLA-DR4 Tgマウス) にHLA-DR4陽性のヒト造血幹細胞を移植してヒト免疫化したマウスモデルでは液性免疫系が機能していることが報告され、hNOGマウスの欠点を補う新たなヒト免疫化マウスとして期待されている。⁵⁾

2. 目的

本研究ではIVL患者の臨床的特徴、予後、MYCタンパクの発現、myc遺伝子の再構成を評価する。

ヒト免疫化HLA-DR4 Tgマウスについて、造血幹細胞移植に関連する有害事象、特に移植片対宿主病graft versus host disease (GVHD) についてはまだ解明されておらず、今回の研究ではヒト免疫化HLA-DR4 Tg (hDR4) マウスに生じる生体反応を検討した。

3. 方法

当院の17例のIVLの臨床経過、Cell of Origin (COO) (CD10, BCL6, MUM1の発現)、Double-Expressor Lymphoma (DEL) (MYC, BCL2の発現) を評価した。また、一部の症例でc-mycのbreak apartをFISH法で解析しmyc遺伝子再構成を評価した。

HLA-DR4陽性凍結臍帯血を融解し、磁気細胞分離によりCD34陽性細胞を抽出した。生後8週のhDR4マウスに尾静脈から投与した(1頭あたり2~3×10⁵ cells)。移植後、マウスの体重や全身状態を観察し、移植26週後に解剖した。各臓器(皮膚、脾臓、肺など)の組織標本を作製し、移植hDR4マウス8匹、非移植hDR4マウス7匹で比較・検討した。

4. 結果

骨髄浸潤が76%に認められ、続いて脾臓、皮膚浸潤が多かった。中枢神経浸潤は29%に認められた。3年無病生存率51%、3年全生存率74%であり平均的なDLBCLと比較し予後不良の傾向であった。COOはすべてがnon-germinal center B-cell-like typeであり、CD5は27%に陽性、EBERはすべて陰性であった。MYC陽性率は82%の症例で≥40%の陽性率であり、BCL2も71%の症例で陽性で、DELに該当するものは53%であった。一部の症例でc-mycのbreak apartが認められた。

hDR4マウスでは体重減少や脱毛、円背などの全身状態不良の所見を認めなかった。組織所見ではhDR4マウスで皮膚真皮の肥厚と細気管支周囲に線維化を認めた。

5. 考察

本研究結果からIVLの大部分がMYCタンパク高発現であったことが確認された。IVLが予後不良である原因としてMYCタンパクが関与している可能性がある。また、MYCタンパクの高発現が組織浸潤性や中枢神経浸潤率に影響を与えており、IVLの

中枢神経浸潤率の高さにもMYCが関与しているかもしれない。

hDR4マウスでは体重減少や全身状態不良などの有害事象は見られなかったが、病理組織学的には皮膚真皮の肥厚が見られた。臨床では皮膚硬化性病変が慢性GVHDの診断的特徴とされており、今回見られた皮膚病変は慢性GVHD所見を示していることが示唆される。ヒトの慢性GVHDを証明したモデルマウスはまだ存在しないが、hDR4マウスがヒトのGVHD反応を引き起こしていることが証明されれば慢性GVHDの病態の解明につながる可能性があると思われた。

6. 結論

一部の症例でmyc遺伝子の再構成を示唆する結果が得られたが遺伝子レベルでどのようにMYCタンパクの発現に関与しているかは今後の検討課題である。

hDR4マウスでのGVHD反応を検討し、病理組織学的に皮膚真皮の肥厚がみられた。皮膚硬化性病変が慢性GVHDの診断的特徴とされており、GVHDの病態の解明につながる可能性があると思われた。

参考文献

- 1) Shimada K, Kinoshita T, Naoe T, Nakamura S: Presentation and management of intravascular large B-cell lymphoma. *Lancet Oncol.* 2009; 10:895-902.
- 2) Rosenthal A, Younes A: High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Rev.* 2017; 31:37-42.
- 3) Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, et al: NOD/SCID/gamma (c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood.* 2002; 100: 3175-3182.
- 4) Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, et al: The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac (null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int Immunol.* 2009; 21: 843-858.
- 5) Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, et al: Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/γ cnull mouse. *Int Immunol* 2012; 24: 243-252.

V. 呼吸器内科領域

① ダニアレルゲン (HDM) によるマウス喘息モデルにおけるアンジオテンシン変換酵素2 (angiotensin converting enzyme 2; ACE2) の役割

1. 研究背景

気管支喘息 (以下, 喘息) の病態は, ハウスダストダニアレルゲン (house dust mite; HDM) に代表される環境因子により誘導されるアレルギー性気道炎症といわれているが, いまだに不明な点が多く, 現行の治療に抵抗性を示す重症患者も少なくない。新たな治療につながる病態解明は急務である。これまでHDM誘導性マウス喘息モデルを用いて, HDM感作によるアレルギー性気道炎症の増幅機序を解明してきたが¹⁾, 治療標的となりうる分子の同定には至っていない。

2. 目的

本研究の目的は, HDMによるアレルギー性気道炎症の増幅過程で発現が変動する分子群から, 新たな治療標的となりうる分子を同定し, 新規喘息治療薬を見出すことである。

3. 方法

C57BL/6JマウスにHDMを3回 (第0, 7, 14日) 経気道的に投与した。第0, 3, 7, 10, 14, 17日にマウス肺組織を採取し, そこから全RNAを抽出し, マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い, 発現が変動する標的分子を同定した。同様にHDMを3回経気道的に投与したC57BL/6Jマウスに, 同定した標的分子に作用する薬剤を第10~16日に腹腔内投与し, 第17日に解剖を行い, HDMによるアレルギー性気道炎症への影響を検証した。

4. 結果

マイクロアレイのチップに実装されている28944遺伝子から, 網羅的遺伝子発現解析を行い, 第17日のコントロール群とHDM群を比較し, 有意に変動している遺伝子を9293同定した。5倍以上発現が減少していた17遺伝子の1つとして, ACE2を同定した。ACE2はアンジオテンシンIIをアンジオテンシン(1-7)へ変換する酵素であり, アンジオテンシン(1-7)/Mas receptor経路を介して抗炎症作用や抗線維化作用を示す。^{2), 3)} ACE2の活性化物質であるdiminazene aceturate (DIZE)⁴⁾の腹腔内投与群は, コントロール群と比較してHDMによる気管支肺胞洗浄液中の好酸球浸潤を抑制し, 肺組織への炎症細

胞の浸潤や粘液産生細胞の過形成, 気道過敏性を有意に抑制した。また, DIZE投与群では, 気管支肺胞洗浄液中のHDM誘導性のIL-5, IL-13産生の増加およびIL-10の減少を抑制し, 肺組織のIL-33, CCL20産生の増加を抑制した。

5. 考察

本研究の結果から, ACE2はHDM誘導性気道炎症抑制に関与することが明らかになり, 活性化薬であるDIZEは喘息の新規治療薬となりうると考えられた。気道上皮細胞由来のIL-33およびCCL20の上昇をDIZEが抑制したことから, DIZEは気道上皮細胞に作用している可能性が推測された。また, 制御性T細胞から産生されるIL-10が増加していたことから, DIZEがアレルギー性気道炎症における獲得免疫系抑制機構を賦活化させる可能性も示唆された。

6. 結論

HDM誘導性マウス喘息モデルを用いて, 網羅的遺伝子発現解析から治療標的分子としてACE2を同定した。ACE2活性化薬であるDIZEが, HDM誘導性のアレルギー性気道炎症を獲得免疫系および自然免疫系を介して抑制していることを証明した。DIZEは喘息の新規治療薬となる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Koyama D, Maruoka S, Gon Y, et al: Myeloid differentiation-2 is a potential biomarker for the amplification process of allergic airway sensitization in mice. *Allergol Int.* 2015; 64 Suppl: S37-45.
- 2) Tan WSD, Liao W, Zhou S, et al: Targeting the renin-angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2018; 40: 9-17.
- 3) Simoes e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, et al: ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2013; 169 (3): 477-492.
- 4) Shenoy V, Gjymishka A, Jarajapu YP, et al: Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 187 (6): 648-657.

② ヒト化マウスを用いた難治性喘息モデルの開発

1. 研究背景

気管支喘息 (以下, 喘息) は慢性の気道炎症が主な病態であり, 吸入ステロイドは治療管理において有効な薬剤であるが, その一方でステロイド抵抗性を有する難治性喘息患者が約10%存在している。

そのため難治性喘息の分子病態を解明し、新規治療薬を開発することは本疾患の克服において重要な課題である。近年、気道上皮由来のサイトカインであるIL-33及びThymic stromal lymphopoietin (TSLP)が喘息の難治化(ステロイド抵抗性)に関与していることが報告され¹⁾、自然免疫を介した難治性喘息の分子病態が注目されている。

2. 目的

ヒトにおいて難治性喘息の病態を再現し、難治性気道炎症を経時的に解析することは非常に困難であるため我々はヒト免疫系細胞(好酸球, 好塩基球, マスト細胞など)を有するIL3/G-CSF/IL5トリプルトランスジェニックマウス(トリプルTgマウス)^{2), 3)}を用いて喘息モデルを構築し、ヒト免疫細胞の難治化病態を解明することを試みた。

3. 方法

トリプルTgマウスに、第1-3日にhIL-33及び、humanTSLP (hTSLP)を気管内投与、ステロイドを第0-3日に経腹腔内投与し、第7日に肺胞洗浄液中のヒト好酸球浸潤を検証し、ステロイド抵抗性の有無を評価した。

4. 結果

hIL-33単独投与により肺胞洗浄液中のヒト好酸球浸潤, 杯細胞過形成を認め、好酸球の気道炎症を再

現した。hIL-33投与による肺胞洗浄液中のヒト好酸球浸潤, 杯細胞過形成はステロイド投与によって抑制された。一方でhIL-33, hTSLP投与による肺胞洗浄液中のヒト好酸球浸潤は、ステロイド投与後も抑制されず、ステロイド抵抗性を示した。

5. 考察

hIL-33投与によってヒト好酸球由来の気道炎症を再現した。また、hIL-33及びhTSLP投与によってステロイド抵抗性を示し、ヒト化マウスを用いたヒト難治性喘息モデルを構築することができた。

6. 結論

ヒト難治性喘息の新たな分子病態の解明や新規薬剤開発に応用できる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Kabata H, Moro K, Fukunaga K, Suzuki Y, Miyata J, Masaki K, et al: Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. *Nat Commun.* 2013; 4: 2675.
- 2) Ito R, Maruoka S, Soda K, Katano I, Kawai K, Yagoto M, et al: A humanized mouse model to study asthmatic airway inflammation via the human IL-33/IL-13 axis. *JCI Insight.* 2018; 3 (21) .
- 3) Ito R, Takahashi T, Katano I, Kawai K, Kamisako T, Ogura T, et al: Establishment of a human allergy model using human IL-3/GM-CSF-transgenic NOG mice. *J Immunol.* 2013; 191 (6) : 2890-2899.