

ヒト化マウスを用いた
ステロイド抵抗性喘息モデルの作製
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系呼吸器内科学専攻

山田 志保

修了年 2021 年

指導教員 権 寧博

I. 緒言

気管支喘息（以下喘息）は気道の慢性炎症を本態とし、変動性をもった気道狭窄による喘鳴や呼吸困難を臨床症状として呈する疾患である。治療の第一選択は吸入ステロイド（inhaled corticosteroid : ICS）であり、ICSによって患者の症状は大きく改善する(1)。一方で、高用量のICS吸入にも関わらず反応性が乏しい重症 / 難治性患者が喘息患者の5~10%ほど存在する(2)。難治性喘息患者の喀痰中には高容量のICS投与下でも好酸球が残存することが知られている(2-6)。近年、Kabataらによってステロイド抵抗性喘息の分子病態として、気道上皮由来サイトカインであるインターロイキン（interleukin : IL）-33 及び thymic stromal lymphoprotein（TSLP）によって、2型自然リンパ球（Group 2 innate lymphoid cell : ILC2）が活性化しアポトーシスが抑制されることが報告された(7)。しかし、喘息難治化の原因は依然不明な点が多く、その原因解明や治療法の確立が課題として残っている。

喘息病態の解明にマウスモデルが汎用されてきたが、ヒ

トとマウスでは免疫細胞が発現する表面分子やサイトカインの相同性が低い分子も多く，マウスで得られた結果がそのままヒトに反映しないことも少なくない．この問題を解決するツールとしてヒト化マウスが広く用いられている．

ヒト化マウスとはヒトの細胞や臓器を移植すると，マウスに生着させ，個体レベルでそれらの細胞や臓器の役割や機能を解析することができる動物モデルである．

本研究では，ヒト幹細胞移植によってヒト好酸球が分化可能な NOG IL-3/GM-CSF/IL-5 Transgenic (Tg) マウス

(Tri-Tg マウス) (8)を用いて，ステロイド抵抗性（難治性）喘息モデルを作製すること，及びそのモデルを用いて難治化に関わる機序を解析することを試みた．

II. 対象と方法

ヒト免疫細胞の応答を解析するために，8週齢の Tri-Tg マウスに 2.5Gy の放射線を照射し，翌日にヒト臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を移植し Tri-Tg ヒト化マウスを作製した．Tri-Tg ヒト化マウスに対して気道上皮由来サイト

カインのヒト IL (human IL : hIL) -33 及びヒト TSLP (human TSLP : hTSLP) を Tri-Tg ヒト化マウスへ経気道投与し，ステロイド抵抗性喘息モデル作製を試みた。Tri-Tg ヒト化マウスに対し，第 1～3 日の 3 日間 hIL-33 及び hTSLP を経気道投与し，第 0～3 日の 4 日間デキサメタゾン (Dexamethasone : Dexa) を腹腔内投与した後，第 7 日に肺胞洗浄液及び肺組織を採取し解析した。

Ⅲ. 結果

このマウスの末梢血中では約 55%がヒト CD45 陽性であり，B 細胞，好酸球，単球の順に多く，T 細胞やナチュラルキラー (natural killer : NK) 細胞もわずかに認めた。また，肺内のヒト CD45 陽性細胞は約 50%であり，そのうち好酸球，マスト細胞の分化を認め，T 細胞や ILC2 もわずかに認めた。以上から末梢血及び肺内で喘息の病態に関わるヒト免疫細胞が分化していることを確認した。本マウスでステロイド抵抗性喘息モデル作製を試みた。

BALF 中のヒト好酸球浸潤は PBS 群と比較し，hIL-33 投

与群と hIL-33+hTSLP 投与群で有意に増加していた。

この好酸球浸潤は hIL-33 投与群と比べ hIL-33+Dexa 投与群で有意に抑制された。一方，hIL-33+hTSLP 投与群と hIL-33+hTSLP+Dexa 投与群では有意差を認めなかった。

すなわち，hIL-33+hTSLP 経気道投与によって，ステロイド投与後も好酸球性気道炎症が残存したことから，Tri-Tg ヒト化マウスにおいてステロイド抵抗性気管支喘息が誘導された。肺組織においても，炎症性細胞の浸潤は hIL-33 投与群と比較し hIL-33+Dexa 投与群では有意に抑制されたが，hIL-33+Dexa 投与群と比較し，hIL-33+hTSLP+Dexa 投与群では炎症性細胞の浸潤は抑制されなかった。粘液産生細胞過形成は hIL-33 投与群に比べて hIL-33+Dexa 投与群では抑制される傾向にあったが，hIL-33+hTSLP 投与群と hIL-33+hTSLP+Dexa 投与群の粘液産生細胞の過形成に顕著な変化は見られなかった。BALF 中の hIL-5 はコントロール群と比較し hIL-33 投与群及び hIL-33+hTSLP 投与群で有意に上昇したが，hIL-33+hTSLP 投与群と比較し，hIL-33+hTSLP+Dexa 投与群では有意には抑制されなかった。す

なわち、hIL-5 は hIL-33+hTSLP 投与によってステロイド投与後も BALF 中に残存した。hIL-13 はコントロール群と比較し hIL-33 経気道投与群及び hIL-33+hTSLP 経気道投与群で有意に上昇したが、hIL-33+hTSLP と比較し hIL-33+hTSLP+Dexa 群では有意に減少した。

以上から IL-3/GM-CSF/IL-5 Tri-Tg ヒト化マウスを用いてヒト好酸球が気道に残存するステロイド抵抗性喘息モデルを作製することができた。

IV. 考察

本研究では作製した Tri-Tg ヒト化マウスに IL-33 及び TSLP に加えステロイドを投与しても好酸球が残存していたことから、ステロイド抵抗性好酸球性喘息を誘導することができた。臨床においても、高用量の吸入ステロイド使用下でも難治性喘息の患者の喀痰中には好酸球が検出されることから、臨床病態を模したステロイド抵抗性モデルが作製できた。

好酸球の活性化や生存延長には IL-5 が重要であるこ

とが知られている。本研究でも IL-33 + TSLP 投与では Dexa で IL-5 が有意には抑制されなかったことが好酸球の生存延長に影響したことが推察される。IL-5 産生細胞として、Th2 細胞や ILC2, マスト細胞がある。本研究では自然免疫系のサイトカインである IL-33 と TSLP を直接経気道投与しており、これらは ILC2 やマスト細胞上の IL-33 受容体である ST2 に結合し、2 型サイトカインを産生する(9)。一方で Th2 細胞は樹状細胞から抗原提示を受け、抗原特異的な応答を示す獲得免疫系を介して ST2 を発現することから(10, 11)、Th2 細胞ではなく、主に ILC2 やマスト細胞が IL-33 及び TSLP に反応して、IL-5 を産生していると考えられる。

近年、Kabata らによってステロイド抵抗性喘息の分子病態に ILC2 が関わることが報告された(7)。この報告によると TSLP が ILC2 の TSLP 受容体に結合することで、STAT5 の活性化を引き起こし、抗アポトーシス因子である Bcl-xL 発現を増強させ、ILC2 のアポトーシスを抑制する。その結果、IL-5 産生が持続することで好酸球の生存が延長し、気

道炎症が持続する。したがって、ILC2 からの IL-5 産生の持続がステロイド抵抗性に寄与することが示唆された。本研究の Tri-Tg ヒト化マウスを用いたモデルでは、肺内の ILC2 は全細胞中約 0.14%とわずかであることから ILC2 の関与は低い可能性があると考えられた。肺内のマスト細胞は約 8.27%存在し、IL-33 や IL-33+TSLP の刺激で増加し、Dexa によってその細胞数は減少しなかった。したがって、マスト細胞がステロイド抵抗性に関わっている可能性があると考えた。臨床においても高用量の吸入ステロイド投与下でも難治性喘息患者の気道や肺ではマスト細胞の増加を認め、その表現型が変化することが知られている(12)。マスト細胞はプロテアーゼの違いから Tryptase を発現する MC_T と Tryptase と Chymase を発現する MC_{TC} に分類され、通常肺内では 90%が MC_T で 10%が MC_{TC} である。しかし重症気管支喘息患者の気道粘膜下および気道上皮内では活性化した MC_{TC} 数の有意な増加を認める。Oskeritzian らは補体 C5a の受容体である CD88 は肺の MC_{TC} には発現し、MC_T には発現しないことを報告している(13)。また、C5a によって MC_{TC}

は脱顆粒が惹起される(14). さらに卵白アルブミン喘息マウスモデルにステロイドを投与しても, 肺内において C5a の発現が低下しない(15). 本研究では気道炎症部位に Chymase 陽性のマスト細胞の浸潤を認めた (図 10). 以上のことから増加した MC_{TC} は C5a 等によって活性化することで IL-5 などの好酸球浸潤, 生存を制御する因子を産生し, 好酸球の肺内への浸潤, 生存を持続している可能性が考えられた.

TSLP はマスト細胞, 好酸球, NK 細胞, ILC2, 樹状細胞などに作用し, アレルギー疾患の引き金となっていることが知られている(16, 17). また, TSLP がマスト細胞の増加や成熟に関わる報告がある(18). TSLP は腫瘍増殖因子としても知られる mouse double minute 2 と STAT6 を活性化しマスト細胞の成熟を起こす. 本研究では IL-33 単独投与群と比べ, IL-33+TSLP 投与群において数に有意な違いは認められなかった. したがって本モデルでは, TSLP はマスト細胞数の増加ではなく, 性質に影響を及ぼしていることが考えられた. Dexa 投与下において, TSLP がマスト細胞にどの

ような機序で性質に影響を及ぼしているのかはさらなる検証が必要である。

Tri-Tg ヒト化マウスでは *in vivo* でヒトの免疫細胞の応答が見られたが、気道上皮や血管などの肺を構成する細胞はマウスに由来するため、免疫細胞と組織を構成する細胞の相互作用が十分に発揮されていない可能性があり、病態の発症は弱くなることがある。本研究においても hIL-13 によって粘液産生細胞の過形成を認めたが、マウスと比べると予測される反応は弱かった。また、CD34 陽性細胞のドナーの違いに由来する、生着率や反応の個体差なども認めた。

V. 結論

IL-3/GM-CSF/IL-5 Tri-Tg ヒト化マウスを用いてヒト好酸球が気道に残存するステロイド抵抗性喘息モデルを世界で初めて作製することができた。また、*in vivo* でヒト好酸球やヒトマスト細胞などを含むヒト免疫細胞の解析が可能であることを明らかにした。

ステロイド投与下でもヒト好酸球やヒトサイトカインの

残存を認めたことから，これらを対象とした抗体医薬の臨床前モデルとしての使用にも応用できると考える．

VI. 引用文献

1. 喘息予防・管理ガイドライン 2018 作. 喘息予防・管理ガイドライン 2018. 2018.
2. Busse WW, Banks-Schlegel S, Wenzel SE. Pathophysiology of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(6):1033-42.
3. Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanović R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(1):9-16.
4. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Merendino A, Reina C, et al. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(4):563-73.

5. Hansbro PM, Kim RY, Starkey MR, Donovan C, Dua K, Mayall JR, et al. Mechanisms and treatments for severe, steroid-resistant allergic airway disease and asthma. *Immunol Rev.* 2017;278(1):41-62.
6. Yancey SW, Keene ON, Albers FC, Ortega H, Bates S, Bleecker ER, et al. Biomarkers for severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(6):1509-18.
7. 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.
8. 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).
9. Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(11):676-89.
10. Kotsiou OS, Gourgoulialis KI, Zarogiannis SG. IL-33/ST2

- Axis in Organ Fibrosis. *Front Immunol.* 2018;9:2432.
11. Nakayama T, Hirahara K, Onodera A, Endo Y, Hosokawa H, Shinoda K, et al. Th2 Cells in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:53-84.
 12. Balzar S, Fajt ML, Comhair SA, Erzurum SC, Bleecker E, Busse WW, et al. Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma. Data from the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(3):299-309.
 13. Oskeritzian CA, Zhao W, Min HK, Xia HZ, Pozez A, Kiev J, et al. Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(6):1162-8.
 14. Venkatesha RT, Berla Thangam E, Zaidi AK, Ali H. Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and PI3 kinase. *Mol Immunol.* 2005;42(5):581-7.

15. Wang CN, Lin YC, Chang BC, Chen CH, Wu R, Lee CC. Targeting the phosphorylation site of myristoylated alanine-rich C kinase substrate alleviates symptoms in a murine model of steroid-resistant asthma. *Br J Pharmacol.* 2019;176(8):1122-34.
 16. Lai JF, Thompson LJ, Ziegler SF. TSLP drives acute T(H)2-cell differentiation in lungs. *J Allergy Clin Immunol.* 2020.
 17. Liu YJ, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang YH, Malefyt Rde W, et al. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:193-219.
 18. Han NR, Oh HA, Nam SY, Moon PD, Kim DW, Kim HM, et al. TSLP induces mast cell development and aggravates allergic reactions through the activation of MDM2 and STAT6. *J Invest Dermatol.* 2014;134(10):2521-30.
-
