

## 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<sup>1)</sup>, 豊島翔太<sup>1)</sup>, 佐野有隆<sup>1)</sup>, 都築 広<sup>1)</sup>, 高橋恭子<sup>2)</sup>, 浅野正岳<sup>3)</sup>, 李 賢鎬<sup>1)</sup>, 斎藤 修<sup>1)</sup>, 松本健治<sup>4)</sup>, 村上 誠<sup>5)</sup>, 武富芳隆<sup>5)</sup>, 三木寿美<sup>5)</sup>, 伊東真奈<sup>1)</sup>, 伊崎聡志<sup>1)</sup>, 西盛信幸<sup>1)</sup>, 遠藤嵩大<sup>1)</sup>, 葉山惟大<sup>1)</sup>, 藤田英樹<sup>1)</sup>, 坂本朋美<sup>1)</sup>, 鐘ヶ江佳寿子<sup>1)</sup>, 羅 智靖<sup>1)</sup>, 岩田光浩<sup>1)</sup>, 内野慶人<sup>1)</sup>, 濱田高志<sup>1)</sup>, 入山規良<sup>1)</sup>, 高橋宏通<sup>1)</sup>, 北村 登<sup>1)</sup>, 福田麻佐美<sup>1)</sup>, 山田志保<sup>1)</sup>, 丸岡秀一郎<sup>1)</sup>, 八田善弘<sup>1)</sup>, 中山智祥<sup>1)</sup>, 武井正美<sup>1)</sup>, 徳橋泰明<sup>1)</sup>, 権 寧博<sup>1)</sup>, 照井 正<sup>1)</sup>

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

Yoshimichi OKAYAMA<sup>1)</sup>, Shota TOYOSHIMA<sup>1)</sup>, Yutaka SANNO<sup>1)</sup>, Hiroshi TSUZUKI<sup>1)</sup>, Kyoko TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Masatake ASANO<sup>3)</sup>, Kenko Li<sup>1)</sup>, Shu SAITO<sup>1)</sup>, Kenji MATSUMOTO<sup>4)</sup>, Makoto MURAKAMI<sup>5)</sup>, Yoshitaka TAKETOMI<sup>5)</sup>, Yoshimi MIKI<sup>5)</sup>, Mana ITOU<sup>1)</sup>, Satoshi IZAKI<sup>1)</sup>, Nobuyuki NISHIMORI<sup>1)</sup>, Takahiro ENDO<sup>1)</sup>, Koremasa HAYAMA<sup>1)</sup>, Hideki FUJITA<sup>1)</sup>, Tomomi SASAKI-SAKAMOTO<sup>1)</sup>, Kazuko KANEGAE<sup>1)</sup>, Chisei RA<sup>1)</sup>, Mitsuhiro IWATA<sup>1)</sup>, Yoshihito UCHINO<sup>1)</sup>, Takashi HAMADA<sup>1)</sup>, Noriyoshi IRIYAMA<sup>1)</sup>, Hiromichi TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Noboru KITAMURA<sup>1)</sup>, Asami FUKUDA<sup>1)</sup>, Shiho YAMADA<sup>1)</sup>, Shuichiro MARUOKA<sup>1)</sup>, Yoshihiro HATTA<sup>1)</sup>, Tomohiro NAKAYAMA<sup>1)</sup>, Masami TAKEI<sup>1)</sup>, Yasuaki TOKUHASHI<sup>1)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1)</sup>

## 要旨

## 1. 整形外科分野

変形性関節症患者と関節リウマチ患者滑液中の脂質メディエーターを網羅的に比較すると、関節リウマチ患者では、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有意に高値であり、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。

## 2. 皮膚科分野

CSUにおけるシクロスポリンの治療反応性のバイオマーカーとして自己血清皮内テスト (ASST) が陽性であること、血清IgE値が低値であることが示唆された。

## 3. 血液膠原病内科分野

①MHCマウスにヒトHLA-DR4陽性造血幹細胞を移植し、作製した免疫系ヒト化MHCマウスでのGVHDモデルを作成した。

②特徴的な染色体転座を有するALL細胞の解析によりZNF362/MAML3という新たなキメラ遺伝子が同定された。

## 4. 呼吸器内科分野

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。

## I. はじめに

罹患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

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

3) 日本大学歯学部

4) 独立行政法人国立成育医療研究センター

5) 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター

照井 正: terui.tadashi@nihon-u.ac.jp

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つの臨床各科のベツ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

### 関節リウマチにおける滑膜マスト細胞の特徴

#### 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PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>およびLTB<sub>4</sub>は変形性関節症 (OA) 患者と比較して有意に高いこと<sup>1)</sup>、PGE<sub>2</sub>とLTB<sub>4</sub>は炎症の増悪に関与していること<sup>2)</sup>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- $\alpha$ 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<sup>3,5)</sup> 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の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

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)。

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。

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。

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、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、15-HETE、5,6-EETおよび11-HETE等が、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DHA由来の脂質メディエーターでは、RvD2および10-HDoHE等が、EPA由来の脂質メディエーターでは、PGE<sub>3</sub>およびPGF<sub>3 $\alpha$</sub> 等がOA患者よりもRA患者において有意に高値であった。

#### 5. 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。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。

1) Bombardieri S, et al: Br J Pharmacol 73:893-901, 1981

2) Ricciotti E, FitzGerald GA: Arterioscler Thromb

Vasc Biol 31:986-1000, 2011

- 3) Korotkova M, et al: Arthritis Rheum 52:3439-47, 2005
- 4) Gheorghie KR, et al: PLoS One 6:e16378, 2011
- 5) Gheorghie KR, et al: Arthritis Res Ther 14:R121, 2012

### Ⅲ. 皮膚科領域

#### 慢性特発性蕁麻疹患者に対するシクロスポリンの治療効果を評価するバイオマーカー

##### 1. 背景

慢性特発性蕁麻疹 (chronic spontaneous urticaria, CSU) 患者の一部は自己の血清を皮内に注射する自己血清皮内テスト (autologous serum skin test, ASST) を行うと陽性になり, 血清中に誘発因子が存在すると考えられている<sup>1)</sup>。抗ヒスタミン薬の治療抵抗性の患者においてシクロスポリンやオマリズマブが用いられる。オマリズマブの治療反応性のバイオマーカーとしてASST陰性や血清IgE値が高値であることなどが報告されている。しかし, シクロスポリンの治療の効果を予測するバイオマーカーはまだ明らかになっていない。

##### 2. 目的

本研究では, CSUのシクロスポリンの治療効果を予測するためのバイオマーカーを調べることを目的とした。

##### 3. 方法

抗ヒスタミン薬の2倍量の加療にて効果不十分のCSU患者34名 (女性20人, 男性14人) を対象とした。シクロスポリンは3mg/kg/dayで約4週間の投与を行った。治療前後の蕁麻疹の重症度はUrticaria Activity Score 7 (UAS7) を用いて評価した。治療後のUAS7が6以下を効果ありとした。男女比, 年齢, 重症度 (UAS7), 罹患期間, ASST, 血清IgE値, 末梢血好塩基球数, 抗核抗体陽性率, 抗サイログロブリン抗体陽性率, 抗マイクロゾーム抗体陽性率を比較した。抗FcεRI α鎖自己抗体および抗IgE抗体自己濃度をELISA, これら自己抗体のFcεRI架橋能をIgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE) 法で測定し<sup>2)</sup>, 比較した。統計学的解析はMann-Whitney-U testまたはFisher's exact testを用いた。p < 0.05を統計学的に有意とした。

本研究は日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫

理審査委員会に承認されている (RK-150908-12: 慢性蕁麻疹の病態解明のための研究)。

##### 4. 結果

シクロスポリン投与によってASST陽性群のUAS7 ≤ 6になった割合は, ASST陰性群よりも有意に高値であった (p = 0.0048)。シクロスポリンの治療後UAS7 ≤ 6群では治療後UAS7 > 6群と比較し, 血清IgEが有意に低値であった (p = 0.0003)。ROC曲線から得られた最適なカットオフ値は88.5 IU/mLであった。血清IgE値 ≤ 88.5群と血清IgE値 > 88.5群のASST陽性率を比較したが, 両群において有意な差はみられなかった (p = 0.727)。

##### 5. 考察

CSU患者においてASST陽性と血清IgE値がカットオフ値以下であることがシクロスポリンの治療効果の予測のバイオマーカーになることが新たに判明した。CSUの治療においてASST陽性・血清IgE低値群はシクロスポリン, ASST陰性・血清IgE高値群はオマリズマブが勧められる。<sup>3)</sup>

- 1) Sabroe RA, et al: J Allergy Clin Immunol 110: 492-9, 2002
- 2) Nakamura R, et al: Allergy 65: 1266-73, 2010
- 3) Endo T et al: Allergol Int 68:270-3, 2019

### Ⅳ. 血液膠原病内科領域

#### ① HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid, IL-2Rγ null マウスとGVHD

##### 1. 背景と目的

近年, ヒト免疫系の研究ツールとして免疫系ヒト化マウスの重要性が高まっている。特に, HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid/IL-2Rγ null マウス (以下MHCマウス) にヒトHLA-DR4陽性造血幹細胞を移植し作製した免疫系ヒト化MHCマウスでは細胞性免疫と液性免疫系の両者を再現することができる。造血幹細胞移植の合併症では移植片対宿主病 (以下GVHD) が重要で, 特に慢性GVHDは移植後の晩期死亡原因の第4位 (11%) を占める重要な合併症であり, 最近の研究から発症に液性免疫系の関与が重要であることが分かった。慢性GVHDの動物モデルの報告はマウス間で脾臓や骨髄細胞を移植する系のみで, 病態の解明や治療の発展のために新たな動物モデルの確立が必要と考える。免疫系ヒト化マウスの作製には造血幹細胞移植が必要であり, 免疫系

ヒト化マウスにGVHDを発症するかどうかは興味深い。免疫系ヒト化マウスがGVHDを発症するかどうかは明らかにされていないが、液性免疫系が機能している免疫系ヒト化MHCマウスでは慢性GVHDを発症する可能性がある。今回我々は免疫系ヒト化MHCマウスに慢性GVHD様の生体反応が起きるかどうかを検討した。

## 2. 方法

HLA-DR4陽性ヒト臍帯血から採取したCD34陽性細胞を、生後8週のMHCマウスに経尾静脈的に投与して移植した。移植後の体重変化や全身状態を観察し、26週後に解剖した。移植後の経過や各臓器の組織所見を非移植MHCマウスと比較、検討した。本研究は日本大学本部動物実験委員会に承認されている(動物実験承認番号;AM18MED009-2, AM18MED010-1)。

## 3. 結果

免疫系ヒト化MHCマウスと非移植MHCマウスで移植後の体重の推移に差を認めなかった。免疫系ヒト化MHCマウスの組織像では、皮膚に硬化性変化、細気管支周囲に線維化を認めた。

## 4. 考察

皮膚硬化性病変や細気管支周囲の線維化などは慢性GVHDに矛盾のない所見であり、免疫系ヒト化MHCマウスはGVHDを発症すると考えた。免疫系ヒト化MHCマウスを利用したGVHDモデルの報告はこれまでになく、今後は免疫系ヒト化MHCマウスについて臓器病変の経時変化、自己抗体の有無についてさらなる検討を行う予定である。

## 5. 結語

HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid/IL-2R $\gamma$  null マウス(以下MHCマウス)にヒトHLA-DR4陽性造血幹細胞を移植し作製した免疫系ヒト化MHCマウスでのGVHDモデルを作成した。

## ② 急性リンパ性白血病における新規融合遺伝子の解明

### 1. 背景

急性リンパ性白血病は成人において予後不良な造血器悪性腫瘍の一つであり、現在も化学療法単独での長期生存率は満足のいくものではない。一方、一部の急性白血病においては、腫瘍増殖に関わるシグナルを阻害する分子標的治療薬の登場により予後の

改善が認められており、腫瘍化の機序のより詳細な解明が待たれる。

今回我々は、これまで報告の無い染色体転座を伴った急性リンパ性白血病を経験し、発症機序の解明を行っている。

## 2. 症例

50代男性。20XX年8月、発熱で近医を受診した際に汎血球減少を認め、血液内科にて骨髄穿刺し、ペルオキシターゼ陰性の芽球が骨髄有核細胞の20%以上を占めていたことから急性白血病の診断で加療目的に当院紹介受診となった。当院にて再度施行した骨髄穿刺により得られた芽球細胞の表面マーカー解析結果よりB細胞性急性リンパ性白血病の診断となった。この際同時に提出した骨髄染色体分析の結果で46, XY, t(1;4)(p34;q31)の染色体異常を20細胞中15細胞で認めた。この染色体異常はBFM骨格による寛解導入療法以降、完全に消失し、骨髄染色体分析の結果は正常核型となった。

## 3. 考察

白血病の寛解達成に伴い、発症時に認めていた染色体異常が消失していることから、この染色体異常は白血病細胞に由来するものと考えられた。次世代シーケンサーを用いた解析により、この染色体異常により産生されるキメラ遺伝子の候補としてZNF362/MAML3が挙げられた。さらにPCRダイレクトシーケンス法によりこのキメラ遺伝子が実際に転写されていることが確認された。

## 4. 結語

新規の染色体転座を伴った急性リンパ性白血病を経験した。さらに解析を進めることにより、新たな白血病発症機序の解明に結びつけたい。

## 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, 目的

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、治療標的となりうる分子の同定には至っていない。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。

## 2. 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。

本研究は日本大学本部動物実験委員会に承認されている（動物実験承認番号：AP17M061-1, AP18MED065-1, AP19MED011-1）。

## 3. 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)/Mas receptor経路を介して抗炎症作用や抗線維化作用を示す。ACE2の活性化物質であるdiminazene aceturate (DIZE)の腹腔内投与群は、コントロール群と比較してHDMによる肺胞洗浄液中の好酸球浸潤やIL-5の発現、肺組織への炎症細胞の浸潤や粘液産生細胞の過形成を有意に抑制した。

## 4. 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ACE2を同定した。ACE2は

HDM誘導性のアレルギー性気道炎症を抑制的に制御している可能性が示唆された。ACE2活性化薬であるDIZEは喘息の新規治療薬となる可能性がある。

## ② NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tgマウスを用いたIL-33, ダニ誘導型ヒト喘息モデルの開発

### 1. 目的

喘息病態の再現や特定のアレルギー吸入がどのようにアレルギー性気道炎症を誘導しているのかを経時的に解析することはヒトにおいては非常に困難であるため、ヒトの免疫系を有した動物モデルが必要不可欠である。我々はこれまで、hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg NOGマウス（トリプルTg）を作製し、自然免疫型喘息に重要なIL-33によるヒト好酸球性気道炎症誘導を検討してきた。今回、hIL-33誘導性ヒト喘息モデルの病態を詳細に検証するとともに、HDMによるヒト好酸球性気道炎症誘導についても検討した。

### 2. 方法

ヒト造血幹細胞を移入してヒト化したトリプルTgに、hIL-33を3日連続で気管内投与し、24時間後の気道過敏性、肺組織中ヒト細胞浸潤（2型自然リンパ球（ILC2）など）などを検証した。また、HDMを第0,7,14日に気管内投与し、第17日に好酸球性気道炎症の有無を評価した。

本研究は日本大学本部動物実験委員会に承認されている（動物実験承認番号：AP13M003-3, AP17M044-2, AP18MED077-2）。

### 3. 結果

hIL-33投与により気道過敏性亢進、肺組織における軽度のILC2浸潤を認めた。HDM投与によりBALF中のヒトIL-5やヒトIL-13が上昇し、ヒト好酸球浸潤を誘導し、喘息患者に特徴的な好酸球性気道炎症像を再現することができた。

### 4. 考察

トリプルTgは、hIL-33だけではなくHDM投与でもヒト好酸球浸潤を伴う喘息病態を再現でき、抗喘息薬の創薬に応用できる可能性が示唆された。