

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09531

研究課題名(和文) IgG4関連肺疾患の病変形成に關与するTh2サイトカイン阻害の影響

研究課題名(英文) Effect of Th2 cytokine inhibition involved in the pathogenesis of IgG4-related lung disease

研究代表者

早稲田 優子 (Waseda, Yuko)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号：80536037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：LAT Y136F変異マウスにおいては、肺病変におけるBAL中のIFN- γ 低下、IL-4増加、IL-13増加、Eotaxin増加、TGF- β 1増加を認めた。次に抗IL-4抗体、抗IL-5抗体、抗IL-13抗体、さらに既存治療薬とされているステロイドを単独または組み合わせて投与し同様に検討する予定だったが、これらの抗体の購入または作成ができなかったこと、研究代表者の異動によりフランスのMalissen教授の施設においてMTAを取るのに時間を要したために、マウスの移動に3年要し、さらに受精卵で移動したことより体外受精ならびに継代するのに時間を要し、研究を予定通り勧めることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LAT Y136F変異マウスは肺に関してもTh2のサイトカイン、ケモカインが発現することがこれまでの研究により明らかになっている。また、ステロイドを投与することで、臓器への細胞浸潤が減少することも分かっており、本疾患の治療として、Th2サイトカインであるIL-4、IL-5、IL-13の阻害薬を使用すること、またステロイドとの併用を行うことで、細胞浸潤や線維化が抑えられるのではないかと考えた。本マウスはIgG4関連疾患モデルとなりうるため、実際の臨床においても本疾患の治療薬の候補として挙げられると考えている。今後もこの可能性を考えて、研究を続けていくつもりである。

研究成果の概要(英文)：In BALF of LAT Y136F mutant mice, IFN- γ was significantly decreased compared with wild type, and IL-4, IL-13, Eotaxin, and TGF- β 1 were significantly increased. Next, we planed to examine how cytokine and chemokine expression is altered by administering anti-IL-4 antibody, anti-IL-5 antibody, anti-IL-13 antibody, and steroids to mice. However, it took 3 years to move the mouse of the research institute and to perform in vitro fertilization and subculture from fertilized eggs of LAT mice due to the transfer of the investigator. Thus, the research could not proceed as planned.

研究分野：呼吸器

キーワード：IgG4関連疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は、血清 IgG4 高値、病変組織への IgG4 陽性細胞浸潤および線維化を特徴とする全身疾患である。その病変局所では、Th2 優位のサイトカイン産生と、IL-10、TGF- β 等のサイトカイン産生が認められており(Zen Y. Hepatology 2007)、臨床的には喘息や鼻炎などアレルギー症状を伴う、好酸球増多や高 IgE 血症が認められる(Matsui S. Mod Rheumatol 2012)。

このように、IgG4 関連疾患は共通の所見を認める一方で、臓器毎に様々な病変を呈することが報告されている。肺病変の場合は、気管支血管束周囲の炎症、偽腫瘍、間質性肺炎(主に NSIP パターン)、胸膜病変など多様な病態を呈することが知られている。しかしこのように多彩な病態を形成する要因は依然として不明であり、また臨床的にもステロイド漸減に伴う再発など治療に難渋する症例が多いため、本疾患の病態解明と治療法の確立は急務である。

現在、IgG4 関連疾患の病態として何らかの抗原刺激による宿主の Th2 反応と、その抗炎症性制御が働いた結果により IgG4 産生と線維化病変が生じる、という仮説を立てている。従って、この発症機序の解明や治療法の確立には、動物モデルによる各臓器病変の詳細な検討が必要である。

申請者らはこれまで IgG4 関連疾患の臨床および研究に携わってきた。臨床では IgG4 関連肺疾患の診断基準作成の主要メンバーとして、多数例の IgG4 関連疾患を検討してきた。また、研究においては、T 細胞活性化リンカー(Linker for activation of t cell; LAT)の 136 番目のチロシンがフェニルアラニンに変異した LAT Y136F 変異マウスが、Th2 優位の免疫反応を有する新規の IgG4 関連肺疾患のモデル動物であることを報告した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ナイーブ CD4 T 細胞から Th2 細胞に分化する際に必要な IL-4 をターゲットとした抗 IL-4 抗体を LAT Y136F 変異マウスに投与し、Th1/Th2 バランスを変化させることにより、本病態にどのような影響が生じるか、また Th2 サイトカインである、IL-4、IL-5、IL-13 をターゲットとし、抗 IL-4 抗体、IL-5 抗体、抗 IL-13 抗体を LAT Y136F 変異マウスに組み合わせて投与することにより、血中の IgG1 (マウスの IgG1 はヒトの IgG4 に対応) や IgE、ならびに BALF 中のサイトカインがどう影響されるか、またそれにより肺組織がどのように変化することを見ることにより、本疾患の発生における、Th1/Th2 バランスの役割についての解明を行い、同時に新規治療薬を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) IgG4 関連肺疾患の病変形成に關与する Th2 サイトカイン阻害の影響

申請者らは、LAT Y136F 変異マウスは少なくとも 4 週齢から肺病変が出現すること、ステロイド反応性を有することを確認した。

そこで、4 週齢から 20 週齢まで経時的にサイトカイン、ケモカインの発現ならびに病理学的検討を行う。

(2) LAT Y136F 変異マウスに対する抗 IL-4 抗体(Dupilumab)投与の検討

ナイーブ CD4 T 細胞から Th2 細胞に分化する際に必要な IL-4 をターゲットとした抗 IL-4 抗体を LAT Y136F 変異マウスに 4 週齢より 20 週齢まで週に 1 回の皮下投与を行った上で以下の項目の検討を行う。

気管支肺胞洗浄液を用いたサイトカイン、ケモカイン発現の検討

4 週齢、6 週齢、10 週齢、20 週齢の LAT Y136F 変異マウスそれぞれに対して、150ml

の生理食塩水にて経気管支肺胞洗浄 (BAL) を行う。その際に回収された気管支肺胞洗浄液 (BALF) の細胞数を数えたあと、サイトスピン標本を作製の上、細胞分画を評価する。

残りの BALF を用いて Th1 サイトカインである IFN- γ 、Th2 サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13、制御性 T サイトカインである IL-10、TGF- β 1、Th17 サイトカインである IL-17 について評価する。

ケモカインに関しては Eotaxin、Rantes の測定を行う。

TGF- β 1 以外は multiplex cytokine assay にて施行し、TGF- β 1 のみは ELISA キットを用いて測定する。

肺の病理学的検討

4 週齢、6 週齢、10 週齢、20 週齢の LAT Y136F 変異マウスにおいて肺の病理学的検討を行う。肺のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、H-E 染色、アザンマロリー染色、免疫染色 (IgG1、IgG) 等を行い、浸潤細胞の特定、線維化の有無について確認する。

線維化については、Ashcroft score やハイドロキシプロリンによる線維化の測定を行う。線維化が幼弱な場合はコラーゲンアッセイを行い、コラーゲン量を半定量する。

- (3) LAT Y136F 変異マウスに対する抗 IL-5 抗体 (mepol izumab) 投与の検討
- (4) LAT Y136F 変異マウスに対する抗 IL-13 抗体 (lebr ikizumab) 投与の検討
- (5) LAT Y136F 変異マウスに対する抗 IL-4 抗体、抗 IL-5 抗体、抗 IL-13 抗体を組み合わせた検討
- (6) 上記にステロイドを同時投与を組み合わせた検討
検討内容は上記抗 IL-4 抗体と同様である。

4 . 研究成果

LAT Y136F 変異マウスを用いて、肺病変におけるサイトカイン、ケモカインの発現について検討を行った。LAT マウスにおいては、IFN- γ 低下、IL-4 増加、IL-13 増加、Eotaxin 増加、TGF- β 1 増加を認めた。次に抗 IL-4 抗体、抗 IL-5 抗体、抗 IL-13 抗体をそれぞれ単独または組み合わせて投与することにより同様にサイトカイン、ケモカインの発現がどのように変化するかを検討するために、マウスに対するこれらの抗体の購入または作成を行った上で研究を行うことが必要であった。さらに既存治療薬とされているステロイドと上記抗体との組み合わせの投与も行い、それらによる治療効果の検討も同様に行う予定であった。しかしながら、研究代表者の異動により LAT マウスを異動するために、元々本マウスを使用していた、フランスの Malissen 教授の施設において MTA を取るのに多大なる時間を要したために、マウスの移動に 3 年要し、さらに、受精卵で移動したことより体外受精ならびに継代を行っていくことに時間を要し、研究を予定通り勤めることができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 早稲田優子
2. 発表標題 Lat Y136F knock-inマウス (IgG4関連肺疾患モデルマウス)の肺病変の解析
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Waseda
2. 発表標題 Evaluation of Lung Lesions in LATY136F Mutant Mice
3. 学会等名 American Thoracic Society 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川野 充弘 (Kawano Mitsuhiro) (20361983)	金沢大学・附属病院・講師 (13301)	
研究分担者	松井 祥子 (Matsui Shoko) (40334726)	富山大学・学術研究部教育研究推進系・教授 (13201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山田 和徳 (Yamada Kazunori) (90397224)	金沢大学・医学系・協力研究員 (13301)	