

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17641

研究課題名(和文) ヒトCD25刺激によるヒト化マウスを用いた新規間質性肺炎モデルの病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of a novel acute lung injury model using humanized mice with human CD25 stimulation

研究代表者

為近 真也 (Tamechika, Shinya)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：00638603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト化マウスにhIL-2と抗hIL-2抗体によるhIL-2 complex(hIL-2cx)でのCD25刺激にて急性肺障害(ALI)が生じるモデルを用いてALIの解析を行った。ヒト化マウスにPBS、hIL-2cx、hIL-2cx+デキサメタゾン(Dex)を投与した所、hIL-2cxにより、PBS群と比べhT細胞での炎症性サイトカインの産生増加、マウス生存率の低下や肺病理での肺炎像の増悪を認め、Dex併用では改善しなかった。そこで、hIL-2cx+Dexに加え、JAK1/2阻害薬を追加した所、Dex追加では抑制されなかったhCD4+T細胞でのSTATが抑制され、ALIの改善を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性肺障害(ALI)は、COVID-19をはじめとして、様々な原因により生じ、未だ発症機序も不明な点が多く、難治性で、致命的となることもあり、新しい治療法の確立が急がれる。本研究では、ヒト化マウスによるヒトCD25刺激誘導性ALIモデルを用いて、肺に浸潤したヒトT細胞のヒト炎症性サイトカインのプロファイルを検討し、デキサメタゾン(Dex)では炎症を制御できなかった炎症を、JAK1/2阻害薬を用いることで制御できることが分かった。本研究の成果は、新しいALI治療法の開発に向けて、治療ターゲットの発見にもつながり、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：This study investigated acute lung injury (ALI) in a murine model induced by CD25 stimulation in a humanized mouse using hIL-2/anti-hIL-2 antibody (clone 5344) complex (hIL-2cx). Humanized mice were administered PBS, hIL-2cx, or hIL-2cx plus dexamethasone (Dex). hIL-2cx elevated the production of human inflammatory cytokines in hT cells, decreased mouse survival, and exacerbated lung pathology, compared to PBS, which didn't ameliorate by the combination of hIL-2cx and Dex. Then, the addition of a JAK1/2, baricitinib, inhibitor to hIL-2cx and Dex suppressed STAT in hCD4+ T cells, resulting in improved ALI outcomes.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：ヒト化マウス ヒトIL-2 complex 抗ヒトIL-2抗体(clone 5344) デキサメタゾン バリシチニブ 急性肺障害 炎症性サイトカイン STAT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

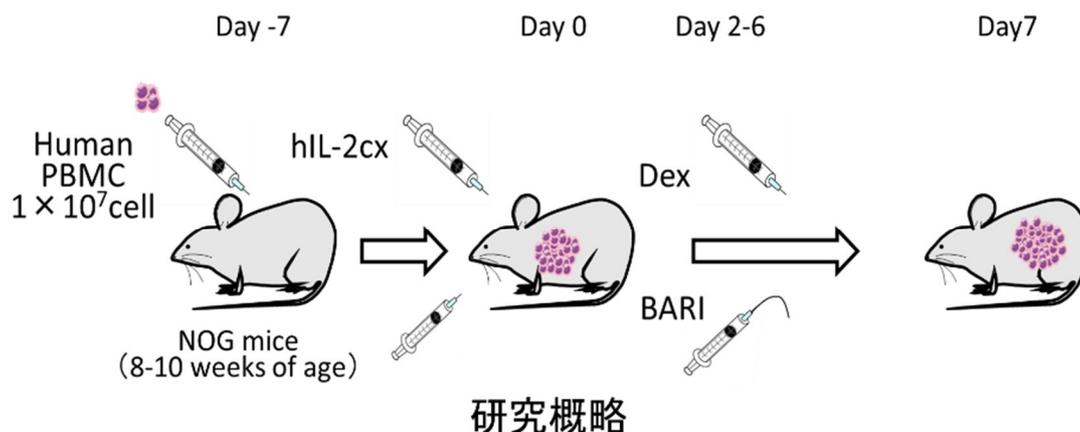
急性肺障害 (ALI) は、重症肺炎、敗血症や外傷などの様々な疾患が原因で引き起こされる重度の呼吸不全で、有効な治療方法が確立されておらず、予後不良のため、新しい治療法の確立が急がれる。申請者等は、これまでにヒト化マウスで利用される NOG マウス (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/ShiJic, Ito M et al., Curr Top Microbiol Immunol. 2008.) にヒト末梢血単核球 (PBMC) を移入後に生じる Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease (X-GVHD) を発症させる系を用いて、human IL-2 (hIL-2) と抗 hIL-2 抗体による hIL-2 complex (hIL-2cx) を用いたヒト CD25 刺激によるヒト T 細胞への影響を調べていた。その後、ヒト CD25 刺激により、ヒト化マウスの肺に ALI が生じることがわかった。そこで、このモデルを用いることで、in vivo において、ALI でのヒト免疫細胞の動向をみることはできないか、という着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、NOG マウスにヒト PBMC を移入し、CD25 刺激として hIL-2cx を投与することで ALI が生じるモデルを用いて、肺病理の検討に加えて、マウス肺に浸潤するヒト T 細胞を FACS にて解析し、ヒト化マウスで生じている ALI の病態を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

NOG マウスにヒト PBMC 1×10^7 細胞を静注後、7 日目に、hCD25 刺激をする hIL-2 3 μ g と抗 hIL-2 抗体 (clone 5344) 30 μ g からなる hIL-2cx または PBS を腹腔内に投与した。投与後 2 日目から 6 日目まで、デキサメタゾン (Dex) 5mg/kg/day または生食を腹腔内に連日投与、さらに Dex に加えて JAK1/2 阻害薬であるバリシチニブ (BARI) 10mg/kg/day を連日経口投与し、投与後 7 日目にマウスを解剖し、マウス肺に浸潤したヒト T 細胞を FACS 解析、肺病理を検討した。さらに、各薬剤投与後のヒト化マウスの生存率を調査した。



4. 研究成果

(1). ヒト化マウス肺でのヒト T 細胞の FACS 解析

PBS、hIL-2cx を腹腔内に投与後、7 日目にマウスを解剖し、マウス肺からヒト PBMC を採取し、ヒト T 細胞の FACS 解析を行った。その結果、マウス肺において、PBS 群と比べて、hIL-2cx 群では hCD4⁺T 細胞は有意な増加を認めたが、hCD8⁺T 細胞の増加は認めなかった。さらに、hCD4⁺T 細胞では、hIL-2cx の投与により、Tconv (hCD4⁺CD25⁺Foxp3⁻T 細胞) が増加し、Treg (hCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞) は増加していないことが分かった。

次に、ヒト T 細胞の細胞内サイトカインの検出を行うために、ヒト PBMC を採取後、PMA (Phorbol ester) / Ionomycin にて刺激し、Golgistop (BD Bioscience) を追加後、FACS 解析を行った。その結果、hIL-2cx の投与により、肺に浸潤する hCD4⁺T 細胞のうち hIFN- γ 、hIL-8、hTNF- α 、hGM-CSF の産生細胞、hCD8⁺T 細胞のうち hIFN- γ 、hIL-8、hGM-CSF の産生細胞の細胞数が増加していることがわかった。しかし、これらのサイトカイン産生は、Dex により抑制されなかった。

さらに、ヒト T 細胞のリン酸化 STAT (pSTAT) 1・3・5 の発現を FACS にて解析した。リン酸化 STAT の FACS 解析をするために、細胞を Fixation Buffer (BD Biosciences) にて incubate 後、さらに -20℃ で True-Phos™ Perm Buffer (BioLegend) にて incubate 後、FACS 解析を行った。これらの解析にて、PBS 群と比べて、hIL-2cx 群では、hCD4⁺T 細胞での pSTAT 1、3、5 の発現が有意に増加していることが明らかとなった。

そこで、Dexに加えて、JAK1/2 阻害薬であるバリシチニブ(BARI)も併用し、経口投与すると、hCD4⁺T 細胞での pSTAT 1、3、5 の発現が抑制された。さらに、hIL-2cx 投与にて上昇していた hCD4⁺T 細胞での hGM-CSF の産生、hCD8⁺T 細胞での hIFN- γ 、hIL-8、hGM-CSF の産生が抑制されることが分かった。

(2). ヒト化マウスの生存率

PBS 投与群と比べて、hIL-2cx 投与群では、有意にマウスの生存率が低下した。hIL-2cx 投与後 2-6 日目に Dex を連日投与しても、生存率の改善を認めなかった。Dex に加えて、BARI を経口的に追加併用すると、マウスの生存率は著明に改善した。

(3). ヒト化マウスの肺病理

PBS または hIL-2cx 投与後、7 日目にマウスを解剖し、マウスの肺病理を検討した。HE 染色にて、hIL-2cx 投与群では、PBS 投与群と比べて、多くのヒトリンパ球の浸潤を認め、ALI の評価で用いられる ATS ALI score (Matute-Bello G, et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011.) や、DAD スコア (Schmidt ME, et al. PLoS Pathog. 2018.) にて、増悪を認めた。Dex 追加では、これらのスコアは改善を認めず、BARI の追加投与にて改善を認めた。これらの結果は、生存率の結果と一致していた。

また肺の線維化の状態を評価するために、マウスの肺病理を Elastica Masson 染色にて検討した。その結果、PBS 群と比べて hIL-2cx 群にて肺胞中隔の肥厚や線維化を認め、Dex + BARI にて改善を認めた。

(4). 結語

本研究により、NOG マウスにヒト PBMC を移入し、CD25 刺激として hIL-2cx を投与することで ALI が生じる本モデルでは、マウス肺において hCD25 刺激によりエフェクター細胞である Tconv (hCD4⁺CD25⁺Foxp3⁻T 細胞) が増加し、hT 細胞での hIFN- γ 、IL-8、GM-CSF などのヒト炎症性サイトカインの産生が増加し、ALI が生じていることが明らかとなった。これらの炎症は、高用量のデキサメタゾンの投与では抑制することができず、マルチターゲットにサイトカイン受容体の JAK/STAT 経路を抑制する JAK1/2 阻害薬であるバリシチニブを併用することで、マウスの肺細胞に浸潤するヒト T 細胞での STAT のリン酸化が抑制され、炎症性サイトカインの産生も低下し、マウス肺に浸潤するヒトリンパ球の浸潤も軽減し、ヒト化マウスの生存率が改善した。

ALI は未だに予後が悪い病態である。近年、問題となっていた covid-19 での ALI では JAK 阻害薬の臨床試験が行われ、有効性が示され保険適応となっているが (Kalil AC et al. N Engl J Med. 2021.) その他の原因の ALI ではまだ有効性や安全性のデータが少なく、今後の実臨床での応用が期待される。

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 0件）

1. 発表者名 為近真也
2. 発表標題 Analysis of the effect of baricitinib on acute lung injury induced by selective human CD25 stimulation in humanized mice.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 為近真也
2. 発表標題 ヒトCD25刺激によるヒト化マウスを用いた 急性肺障害の解析
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------