

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17436

研究課題名(和文) Th1細胞型重症喘息に適応した治療薬の喘息マウスモデルによる選択

研究課題名(英文) Adaptation of therapeutic agents for Th1 cell dependent severe asthma using asthmatic murine model

研究代表者

神山 智 (Kouyama, SatoshiSatoshi)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)・先端技術開発研究部・研究員

研究者番号：20626783

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)：治験中および承認済みの既知の分子標的治療薬より選出した候補に、遅発型喘息反応を誘発するT細胞クローンと好酸球炎症を誘発するT細胞クローンの活性抑制が確認された。これらはグルココルチコイドと相加的に抑制効果が働くことを明らかにした。しかし、動物モデルにおける細胞診断として、Th2の肺胞内好酸球浸潤は大きく抑制されたが、Th1クローンの好中球浸潤抑制は極めて限定的だった。また、Th1移入マウスモデルは、いずれも有意な呼吸指標の改善を示さなかった。細胞指標および呼吸指標において効果は限定的と言える。これらからTh1の抗原提示に依存しない生存性が喘息の難治化につながっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国において、成人人口の3～4%の有病率とされる喘息は、新たな治療薬やガイドラインの改定が奏功しつつある一方、依然、年間およそ2000人の死者をもたらす重大な疾患である。一方で、我が国で承認された新薬の15%は腫瘍用薬とその他の代謝性医薬品すなわちがん治療の医薬である。抗腫瘍の分子標的治療薬には、喘息と機序の一部を共通する細胞表面および細胞内シグナル経路ターゲットを持つものも含まれる。我々は、複合的な喘息の病因・病態の中でもTh1細胞がマウス喘息モデルで難治性かつ重症化する性質を報告している。動物モデルから喘息治療への有効性を明らかにし、重症喘息治療への適応の足掛かりとなることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Drug candidates were selected from known investigational and approved molecular targeted drugs. Inhibition of activity was observed in T-cell clones that induce late asthmatic response and in T-cell clones that induce eosinophilic inflammation. These were found to have additive inhibitory effects with glucocorticoids. As a cellular diagnosis in animal models, Th2 eosinophil infiltration in the alveoli was greatly suppressed. However, inhibition of neutrophil infiltration of Th1 clones was very limited. None of the Th1-transfected mouse models showed significant improvement in respiratory indices.

As a result, the effect on cellular and respiratory indices is limited.

In addition, we observed that Th1, which is not dependent on antigen presentation, exhibited very high survival in response to steroids and molecularly targeted therapies. Thus, these findings suggest that Th1's antigen presentation-independent viability may be responsible for its refractoriness in asthma.

研究分野：分子生物学

キーワード：T細胞 気管支喘息 アレルギー反応

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、マウスから多数の T 細胞クローン株を樹立し、喘息反応との因果関係を解析してきた。重症性とステロイド抵抗を示す T 細胞クローン株が Th1 型であり、従来の知見に基づく Th2 ターゲットの治療とは異なるアプローチが求められることに着目し、この研究を計画した。そこで近年開発が加速し、新たな治療ターゲットとして期待されている分子標的治療薬の投与効果を検証する。喘息の機序に特異性の高い分子標的治療薬の中には、白血病など他分野で治験が進められているものから承認済みのものまで多数存在するが、アレルギー疾患への適応は多くが未開である。T 細胞クローンとその動物モデルから治療効果を調査し、治験への足掛かりを目指した。

### 2. 研究の目的

重症・難治性の喘息症状において、その特徴の一つにステロイドによるコントロール不良が挙げられる。従来、喘息は拮抗する 2 種類のヘルパー T 細胞(Th1/Th2)の内、Th2 の関与する疾患とされてきたが、近年認知されている Th1 型喘息は、重症難治化とステロイド抵抗性の因果関係をはじめ、研究途上にある課題も多い。ステロイド抵抗性の Th1 型喘息において、T 細胞活性化の細胞内シグナル伝達経路は重要な標的である。我々が樹立したステロイド抵抗性 Th1 クローンとマウス喘息モデルに対し、新規のキナーゼ阻害剤を中心に分子標的治療薬による抑制効果を *in vivo*, *in vitro* 両面から探る。Th1 型喘息への治療効果を解明・検証することは、とりわけ重症喘息病態をコントロールする上で、きわめて重要である。特に他の疾患で承認されている薬剤の有効性の検証は、安全性と効率の観点からも適応を目指す上で有望である。

### 3. 研究の方法

研究計画としてまず、T 細胞内の主要なシグナル伝達経路のうち、標的とする上流調節因子の候補を選出し、利用可能な薬剤を検索・選択して治療薬候補とした。キナーゼは細胞種間およびシグナル経路におけるファミリーの発現の特異性が高く、また特定のファミリーおよびサブタイプに極めて選択性の高い阻害剤の開発が活発という経緯がある。すでに試薬として購入可能なもの、喘息以外の他の疾患で治験が開始しているものなど、現在利用可能な薬剤から、標的への選択性が高く副作用の低い、治療効果の期待できるものをリスト化した。適応外の薬剤または現在入手可能かつ治験成績の有望な薬剤から候補を選出して試験した。マイクロプレート上で抗原刺激した T 細胞を治療薬候補とともに培養し、細胞増殖とサイトカイン産生を測定して T 細胞活性化への抑制効果を調査した。3 系統のステロイド抵抗性かつ遅発型喘息 (LAR) 誘発性 Th1 クローン (T6-2, T6-4, T6-7)、1 系統のステロイド感受性・LAR 誘発性 Th1 クローン (T5-1)、3 系統以上のステロイド感受性・LAR 非誘発性 Th2 クローン (T5-4, T6-1, T6-8, T6-10, BF7) ほか数系統を供試した。BrdU 取り込み法による細胞増殖試験と培養上清中のサイトカイン産生の測定から、薬剤ごとの作用量およびステロイド併用の相乗効果を評価し、喘息モデルへの適用の指標とした。細胞培養上清から ELISA 法により各種サイトカイン濃度を測定する。次に *in vitro* 実験の評価をもとに *in vivo* 実験 (喘息モデル) に使用する治療薬候補を選出した。T 細胞クローン移入マウス喘息モデルへ投与し、喘息症状に対する治療効果を呼吸機能解析と組織病理およびバイオマーカーから診断・評価を試みた。T 細胞クローンをマウスに尾静脈より注入し、24 時間後に抗原を経鼻チャレンジし、各種呼吸機能解析、組織病理診断に用いた (T 細胞移入喘息モデル)。 *in vitro* の試験結果を踏まえ、治療薬候補の種類・投与量・投与方法について検討・評価した。呼吸機能解析として、全身無拘束プレチスモグラフ測定装置による肺抵抗 (Penh) 及び、麻酔下マウスをレスピレータ接続する呼吸抵抗測定装置による気道抵抗 (RL) を経時的に測定した。Penh は呼吸パターンとしてのインダイレクトな指標であるが非侵襲性かつ長時間フォロー、RL はダイレクトに気道の抵抗性 (弾性) を測定し、気管支平滑筋の収縮、すなわち気流閉塞を示す指標として有用である。また、気管支肺胞洗浄液を採取し、気道・肺胞内への細胞浸潤およびサイトカイン産生を観察・測定した。さらに、コラーゲンゲル中に気管支平滑筋細胞を包埋した収縮アッセイシステムを用いて、T 細胞クローン培養上清の収縮アッセイを行った。喘息症状の呼吸機能および気道過敏性試験と病理診断より、候補治療薬の投与による喘息症状の治療効果を *in vivo* スケールで観測・評価した。また、実験の経過とともにステロイド抵抗性 T 細胞クローンにステロイド感受性の傾向が見られたため、よりステロイド抵抗性の高い系統の選抜を行った。

### 4. 研究成果

マウス T 細胞クローンによる増殖試験とサイトカイン測定を行った。CAL-101、IPI-145 および BMS-509744 において、Th2 クローン T6-1, T6-8, T6-10, BF7 に対する極めて高い細胞増殖抑制とサイトカイン産生効果が見られた。抗原提示細胞による活性化について、いずれも IC50 が 10 nM 以下を示し、さらに 90%以上抑制することができた。これらの薬剤は高容量デキサメタゾン下でもデキサメタゾンとの相乗効果を示した。Th1 クローンにおいても同様に、T5-1, T6-2, T6-4, T6-7 いずれも 10 nM 以下による抑制効果が確認されたが、細胞の活性化の状態によりその効果は不安定化し、特に旺盛な活性化を示す場合、IC50 が 100 nM を超えることや、用量をさらに増加させても完全に抑制しないケースが見られた。特に、抗原提示刺激および IL-2 添加に非依存的に増殖する Th1 クローン亜系統( 活性持続型 Th1 )において、この性質は顕著となった。活性持続型 Th1 は、細胞を継代しても形質が復帰することがなかったため、亜系統として保持した。高い細胞増殖活性が永続的に持続する状態で、炎症性サイトカインの産生が抑制されているが、抗原刺激に应答して各種サイトカインの産生と炎症の惹起の性質を保持していることを確認した。また、ステロイド抵抗性が増強されていることを確認した。この活性持続型 Th1 の T6-2R, T6-4R, T6-7R は、薬剤の抑制効果は大きく減弱し、通常の抗原提示細胞または抗 CD3 抗体による活性化より IC50 で 10~1000 倍の薬剤耐性を示した。活性持続型 Th1 の T6-4R において、1  $\mu$ M 以上の BMS-509744 およびデキサメタゾン併用は、細胞増殖活性が全く減少しなかった。好酸球炎症をもたらす BF7 移入動物モデルにおいて、IPI-145 および CAL-101 は用量依存的 (1~3mg/kg) に、投与群において有意に好酸球浸潤を抑制した。また、デキサメタゾン併用にわずかに相乗効果の傾向が見られたが、用量依存的に完全な抑制に至らなかった。一方で T5-1, T6-2, T6-4, T6-7 の動物モデルにおいて、好中球浸潤を指標とする BALF 細胞診断と Penh の呼吸指標に有意な治療効果を認められなかった。結果として、副次的に同一クローン内でステロイド感受性の多様性が得られたことは、遺伝子発現解析の際、遺伝的バックグラウンドのノイズを削減する上で有用であると考えられる。さらに 2 か月以上の期間に渡り細胞の継代維持が可能であることを確認したが、T 細胞クローンの系統ごとに固相化抗 CD3 抗体の至適濃度が異なり、それ以上でアポトーシスを引き起こすことが示唆された。これらの所見は T 細胞のステロイド抵抗性を詳細に研究する上で有用である。また、より広範な細胞系統を拡充することができた。

治験中および承認済みの既知の分子標的治療薬より選出した候補に、遅発型喘息反応を誘発する T 細胞クローンと好酸球炎症を誘発する T 細胞クローンへの活性化抑制能力が確認された。これらはグルココルチコイドと相加的・相乗的に抑制効果が働くことを明らかにした。しかし、動物モデルにおける細胞診断として、Th2 クローンによる気管支・肺胞内好酸球浸潤は大きく抑制されたが、Th1 クローンによる好中球浸潤抑制への改善効果は限定的だった。また、Th1 移入マウスモデルは、投与群においていずれも有意な呼吸指標の改善効果を示さなかった。細胞指標および呼吸指標において効果は限定的と言える。此度の研究において、強いステロイド抵抗性を示す Th1 クローンが、抗原提示の不在下でも細胞の長期間生存と分裂増殖を維持することが確認された。我々は Th1 移入マウスが 1 年以上抗原暴露されていない状態でも、再度の抗原暴露でこれらから Th1 の抗原提示に依存しない生存性が喘息の難治化につながっている可能性が示唆された。我が国において、成人人口の 3~4%の有病率とされる喘息は、新たな治療薬やガイドラインの改定が奏功しつつある一方、依然、年間おおよそ 2000 人の死者をもたらす重大な疾患である。一方で、我が国で承認された新薬の 15%は腫瘍用薬とその他の代謝性医薬品すなわちがん治療の医薬品である。抗腫瘍の分子標的治療薬には、喘息と機序の一部を共通する細胞表面および細胞内シグナル経路ターゲットを持つものも含まれる。

我々は、Th1 細胞性のマウス喘息モデルが難治性かつ重症化する性質を報告している。動物モデルから喘息治療への有効性を明らかにし、重症喘息治療への適応の足掛かりとなることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 森 晶夫, 神山 智, 大友 暁美, 山口 美也子, 組谷 智恵美, 岩本 圭右, 矢野 光一, 藤田 教寛, 岩田 真紀, 永山 貴紗子, 劉 楷, 中村 祐人, 濱田 祐斗, 渡井 健太郎, 上出 庸介, 福富 友馬, 関谷 潔史, 松元 幸一郎, 谷本 安, 小林 信之, 大友 隆之, 神沼 修	4. 巻 157(5)
2. 論文標題 重症喘息のステロイド抵抗性とその制御	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 293-298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.22027	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 13件）

1. 発表者名 Mori, A., Kouyama, S., Ohtomo-Abe, A., Iwamoto, K., Yano, K., Fujita, N., Iwata, M., Nagayama, K., Nakamura, Y., Hamada, Y., Watai, K., Kamide, Y., Sekiya, K., Fukutomi, Y., Ohtomo, T., Kaminuma, O
2. 発表標題 T cell-dependent steroid-resistant asthma is mediated by tyrosine kinases of costimulatory signal
3. 学会等名 European Academy of Allergy and Clinical Immunology Hybrid Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Ohtomo-Abe, A., Iwamoto, K., Yano, K., Fujita, N., Iwata, M., Nagayama K., Ryu, K., Nakamura, Y., Hamada, Y., Watai, K., Kamide, Y., Sekiya, K., Fukutomi, Y., Ohtomo, T., Kaminuma, O.
2. 発表標題 Control of T cell-dependent steroid-resistant asthma model by several kinase inhibitors
3. 学会等名 European Respiratory Society International Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mori, A., Kouyama, S., Ohtomo-Abe, A., Kawasaki, Y., Iwata, M., Nakamura, Y., Hamada, Y., Kamide, Y., Sekiya, K., Fukutomi, Y., Ohtomo, T., Kaminuma, O.
2. 発表標題 Pharmacological characterization of T cell-dependent steroid-resistant asthma model using several kinase inhibitors
3. 学会等名 The 26th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森晶夫、神山智、大友暁美、山口美也子、組谷千恵美、岩本圭右、矢野光一、藤田教寛、岩田真紀、永山貴紗子、劉楷、中村祐人、濱田祐斗、渡井健太郎、上出庸介、福富友馬、関谷潔史、松元幸一郎、谷口安、小林信之、大友隆之、神沼修
2. 発表標題 重症喘息のステロイド抵抗性とその制御
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kouyama, S., Yamaguchi, M., Kunitani, C., Ohtomo-Abe, A., Kawasaki, Y., Iwamoto, K., Yano, K., Iwata, M., Nagayama, K., Ryu, K., Nakamura, Y., Hamada, Y., Watai, K., Kamide, Y., Sekiya, K., Fukutomi Y, Ohtomo, T., Kaminuma, O, and Mori, A.
2. 発表標題 Molecular characterization of bronchoconstriction induced by activated T cells
3. 学会等名 European Respiratory Society 2021 International Congress (London, on line) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mori, A., Kouyama, S., Ohtomo-Abe, A., Ryu, K., Nakamura, Y., Hamada, Y., Watai, K., Kamide, Y., Sekiya, K., Ohtomo, T., Kaminuma, O.
2. 発表標題 Possible mechanisms of T cell-induced bronchoconstriction
3. 学会等名 Asia Pacific Association of Allergy, Asthma and Clinical Immunology International Conference 2021 (Taipei, on line) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, Y., Kunitani, C., Ohtomo-Abe, A., Kawasaki, Y., Iwamoto, K., Yano, K., Iwata, M., Nagayama, K., Ryu, K., Nakamura, Y., Hamada, Y., Watai, K., Kamide, Y., Sekiya, K., Fukutomi, Y., Ohtomo, T., and Kaminuma, O
2. 発表標題 Pharmacological characterization of T cell-induced bronchoconstriction in vivo and in vitro
3. 学会等名 European Academy of Allergy and Clinical Immunology Hybrid Congress 2021 (Madrid 8211; Krakow, on line) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mori A, Kouyama S.
2. 発表標題 Pharmacological analysis of helper T cell-dependent, steroid-resistant asthma
3. 学会等名 european academy of allergy and clinical immunology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mori A, Kouyama S.
2. 発表標題 Pharmacological analysis of T cell-dependent, steroid-resistant asthma.
3. 学会等名 european respiratory society international congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kouyama, S., Ohtomo-Abe, A., Kawasaki, Y., Iwata, M., Nakamura, Y., Kamide, Y., Sekiya, K., Fukutomi, Y., Ohtomo, T., Kaminuma, O. and Mori, A.
2. 発表標題 Pharmacological characterization of T cell-induced bronchoconstriction
3. 学会等名 World Allergy Congress 2023, Program p. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kouyama, S., Ohtomo-Abe, A., Kawasaki, Y., Nakamura, Y., Hamada, Y., Kamide, Y., Sekiya, K., Fukutomi, Y., Ohtomo, T., Kaminuma, O. and Mori, A.
2. 発表標題 Cellular and molecular analysis of T cell-dependent steroid-resistant asthma model
3. 学会等名 Asia Pacific Society of Respiriology 2023 International Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kouyama, S., Ohtomo-Abe, A., Kawasaki, Y., Nakamura, Y., Kamide, Y., Sekiya, K., Ohtomo, T., Kaminuma, O. and Mori, A.
2. 発表標題 Cellular Analysis of T cell-dependent steroid-resistant asthma
3. 学会等名 Asia Pacific Association of Allergy, Asthma and Clinical Immunology International Conference 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kouyama, S., Ohtomo-Abe, A., Kawasaki, Y., Iwata, M., Nakamura, Y., Hamada, Y., Kamide, Y., Sekiya, K., Fukutomi, Y., Ohtomo, T., Kaminuma, O. and Mori, A.
2. 発表標題 Biological and biochemical analysis of T cell derived bronchoconstriction
3. 学会等名 European Respiratory Society 2023 International Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kouyama, S., Ohtomo-Abe, A., Kawasaki, Y., Iwata, M., Nakamura, Y., Hamada, Y., Kamide, Y., Sekiya, K., Fukutomi, Y., Ohtomo, T., Kaminuma, O. and Mori, A.
2. 発表標題 Biochemical characterization of T cell derived bronchoconstrictor
3. 学会等名 European Academy of Allergy and Clinical Immunology Hybrid Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------