

好酸球増多症を示す新規突然変異マウス
“Yama マウス”の確立と疾患モデルへの応用

山口大学大学院共同獣医学研究科

山田 悠介

2025 年 3 月

目次

序論	1
第一章 好酸球増多症マウス“Yama マウス”の確立	4
要約.....	5
緒論.....	6
材料および方法	8
結果.....	12
考察.....	13
付図.....	16
第二章 Yama マウスのアレルギー性皮膚炎モデルへの応用.....	22
要約.....	23
緒論.....	24
材料および方法	26
結果.....	30
考察.....	33
付図.....	36
第三章 Yama マウスの慢性腎臓病モデルへの応用.....	43
要約.....	44
緒論.....	45
材料と方法	47
結果.....	50
考察.....	53
付図.....	57
総括	64

引用文献	68
謝辞	85

序論

好酸球は骨髄で分化・成熟する顆粒球の一種で、白血球中に約 1-5%程度の割合で存在する。好酸球は細胞質の中にエオジンにより赤染される好酸性顆粒を豊富に含んでいることが特徴である。好酸性顆粒には、特異的顆粒として主要塩基性タンパク質 (MBP)、好酸球ペルオキシダーゼ (EPX)、好酸球カチオン性タンパク質 (ECP)、好酸球由来神経毒 (EDN) の 4 つのカチオン性タンパク質が含まれており、これらが脱顆粒することにより組織を傷害する (Gigon et al., 2023; Fettelet et al., 2021)。一方で、近年では、組織傷害以外にもサイトカインやケモカインを分泌することによって免疫調節機構および恒常性機能に好酸球が関与していることが示唆されている (Marichal et al., 2017; Simon et al., 2020)。好酸球の活性化および増殖は、ヘルパー2 T (Th2) 細胞が産生するインターロイキン (IL) -5 を介した経路のみ報告されている (Nagase et al., 2020; Nussbaum et al., 2013)。IL-5 伝達経路もその下流に GATA1 を介していることはわかっているが (Zon et al., 1993)、それ以外の経路については解明されていない。

Th2 型免疫応答は寄生虫感染の際にみられる免疫応答であり、IL-4、IL-5、IL-13 等の Th2 サイトカインの産生により抗体産生の増強、好酸球の誘導および活性化、腸の杯細胞による粘液産生の亢進などが起こるといわれている (Kim et al., 2010; Zhu et al., 2010)。その他、Th2 型免疫応答の異常な活性化はアレルギー反応を誘発し (Ito et al., 2012)、悪性腫瘍では Th2 型免疫応答が腫瘍促進 (Zheng et al., 2021; Monte et al., 2011; Asford et al., 2007) あるいは腫瘍抑制 (Wolf et al., 2019; Simson et al., 2007; Mattes et al., 2003) に働くなど、様々な反応に関与するといわれている。また、近年、Th2 型免疫応答でみられる代表的な白血球である好酸球が産生するサイトカインが肝細胞の再生や骨格筋の再生 (Goh et al., 2013; Liu et al., 2020; Heredia et al., 2013) および創傷治癒 (Wong et al., 1993; Todd et al., 1991) 等においてこれらの反応を促進するともいわれており、再生医療への応用の可能性

も秘めている。

現在、好酸球についての研究は人為的に好酸球を増加させたモデルマウスを用いて行われている。好酸球を増加させたモデルマウスとして、蠕虫感染モデルマウス (Huang et al., 2017; Kusama et al., 1995)、アレルギー性疾患モデルマウス (McMillan et al., 2014) あるいは IL-5 を過剰発現させたトランスジェニックマウス (Masterson et al., 2014) が用いられている。蠕虫感染モデルマウスやアレルギー性疾患モデルマウスでは、好酸球の活性化が一過性であり、組織・細胞傷害による好酸球以外の反応を誘発させる可能性が排除できず、好酸球活性化の経路を経時的に捉えづらいこと等が問題点として挙げられる。蠕虫感染モデルマウスでは、末梢血中の好酸球数に大きな差が認められるため (Anibal et al., 2007; Kusama et al., 1995)、再現性について疑問が残る。アレルギー性疾患モデルマウスでは、末梢血中の好酸球数は蠕虫感染モデルマウスより少なく (Anibal et al., 2007; Wei et al., 2022)、増加した好酸球の多くはアレルギー病変に誘導されるため、末梢血中の好酸球が増加する好酸球増多症のモデルには不適である。また、これら 2 つのモデルマウスは病変を誘導することにより好酸球を増加させるため、他の疾患モデルに応用することができない。一方、IL-5 トランスジェニックマウスでは、遺伝子の挿入部位がランダムであるため (Liu, 2013)、挿入部位のゲノム環境がその発現に影響する可能性が排除できず、好酸球活性化による反応経路を正確に検証できるのか疑問が残る (Liu, 2013)。実際に、異なる IL-5 トランスジェニックマウスを用いた喘息モデルにおける気道免疫応答を調べた研究では、異なる結果が報告されている (Lee et al., 1997; Kobayashi et al., 2003)。したがって、IL-5 トランスジェニックマウスを用いた疾患モデルは結果の解釈に慎重にならなければならない。また、IL-5 トランスジェニックマウスにおいて増加した末梢血中の好酸球数は蠕虫感染モデルマウスより少ないため (Anibal et al., 2007; Masterson et al., 2014)、好酸球活性化の観察は困難である。これらの好酸球増多症の再現性への疑問や疾患モデルへの応用の問題点を克服するために、上記とは異なる好酸球の活性化を誘導するモデルマウスが求められている。さ

らに、上記 3 つのモデルマウスはいずれも Th2 型免疫応答における IL-5 の発現増強を介する好酸球の活性化を誘導している。既知の好酸球増多因子である IL-5 の発現上昇を介していない新たな好酸球増多症モデルマウスにより、未知の好酸球活性化因子が明らかになる可能性がある。好酸球の活性化メカニズムの解明は Th2 型免疫応答が関与する疾患についての病態の解明や治療薬の開発に貢献することが期待される。

我々は IL-5 の発現上昇を伴わずに好酸球増多症を示す新規近交系マウス“Yama マウス”を確立したため、その特徴を報告する。さらに、本マウスから複数の疾患モデルを作製した。一つは好酸球の関与する代表的な疾患としてアレルギー性皮膚炎モデルを、もう一つは好酸球が副次的に関与する疾患として慢性腎臓病モデルを作製した。これらマウスモデルについて、組織学および免疫学的特徴と、疾患モデルとしての有用性について報告する。

第一章 好酸球増多症マウス“Yama マウス”の確立

要約

好酸球増多症は、臓器組織および末梢血中の好酸球が増加する病態である。好酸球増多症はヘルパーT2 (Th2) 型免疫応答によって引き起こされ、Th2 細胞から分泌されるインターロイキン (IL) -5 が唯一知られている好酸球の増殖因子である。しかし、IL-5 発現増強以外に好酸球の増加メカニズムが存在するのかどうかは不明である。我々は、IL-5 発現の増強を伴わずに好酸球増多症を示す近交系マウスを確立したため、その組織学的検索およびサイトカインの発現についての検索結果を報告する。

本研究では、市販の ICR マウスから偶発的に末梢血中の好酸球数が多い個体を発見し、兄妹交配により新たな近交系マウスを確立した。”Yama マウス”と命名されたこの近交系マウスは好酸球増多症を示すことが特徴である。

6 週齢の Yama マウスにおける末梢血中の好酸球数は ICR マウスの約 30 倍であり、Yama マウスには明らかな病変は認められなかった。ICR マウスと Yama マウスの骨髓、脾臓、腸間膜リンパ節における IL-5 発現に有意差は認められなかった。

Yama マウスにおける好酸球増多症は、IL-5 発現増強以外のメカニズムによることが明らかになった。Yama マウスは人為的処置を行わずに好酸球増多症を示し、明らかな病変を形成しないため、好酸球が重要とされているアレルギー性疾患や再生医療の研究に適したモデルマウスとなり得る。

緒論

好酸球増多症は、臓器組織および末梢血中における好酸球の増加を特徴とする病態である (Kovalszki, 2016)。好酸球増多症は、アレルギー性疾患や蠕虫感染、あるいは原因不明の特発性疾患など、さまざまな疾患によって引き起こされる (Kovalszki, 2016)。2 型免疫応答は好酸球増加症を引き起こし、ヘルパー 2 T (Th2) 細胞から分泌されるインターロイキン (IL) -5 が唯一知られている好酸球の増殖因子である (Nagase et al., 2020; Nussbaum et al., 2013)。しかしながら、好酸球増加のメカニズムに関して、IL-5 受容体の下流分子である GATA-1 以外の分子は研究されていない。加えて、IL-5 シグナル経路以外に好酸球を増加させる経路があるかどうか不明である。

好酸球増多症の実験動物モデルとしては、蠕虫感染モデル (Kusama et al., 1995) やアレルギー性疾患モデル (McMillan et al., 2014)、IL-5 トランスジェニックマウスモデル (Masterson et al., 2014) などがあるが、いずれのモデルマウスも IL-5 発現の増加により好酸球増多症を示す (Kusama et al., 1995; McMillan et al., 2014; Masterson et al., 2014)。これら好酸球増多症を示すモデルマウスがあるにも関わらず、IL-5 シグナル伝達経路は IL-5 受容体の下流分子である GATA-1 以外に明らかにされていない。この理由として、蠕虫感染モデルやアレルギー性疾患モデルでは好酸球増加の程度や反応時間に個体差によるばらつきがあるためと考えられる (Kusama et al., 1995; Rayapudi et al., 2010)。そのため、好酸球増加におけるある一点を解析することが難しく、IL-5 シグナル伝達経路は不明のままである。IL-5 トランスジェニックマウスモデルは、IL-5 を過剰発現する遺伝子操作モデルである。トランスジェニックマウスでの遺伝子発現は、遺伝子の挿入部位がランダムであるため、挿入部位のゲノム環境がその発現に大きく影響する (Liu, 2013)。そのため、トランスジェニックマウスにおける IL-5 の活性化は個体間で異なる可能性があり、実際の好酸球増加や IL-5 シグナル伝達経路と一致しない可能性がある。実際に、異なる IL-5 トランスジ

ェニックマウスを用いた喘息モデルにおける気道免疫応答を調べた研究では、異なる結果が報告されている (Lee et al., 1997; Kobayashi et al., 2003)。したがって、蠕虫感染モデル、アレルギー性疾患モデル、および IL-5 トランスジェニックマウスモデルは好酸球増殖のメカニズムを解明するのには適していない。さらに、IL-5 シグナル伝達経路以外に好酸球を増加させるメカニズムが存在するかどうかは明らかになっていない。現在、IL-5 発現の上昇を伴わずに好酸球増多症を示す動物モデルは存在していないため、そのようなモデルが存在するならば IL-5 以外の好酸球増多因子を特定できる可能性がある。

我々は、遺伝的に IL-5 の過剰発現を伴わずに末梢血中の好酸球増多を示すマウスを発見し、近交系マウスとして確立した。本研究では、組織学的検索およびサイトカインの発現についての検索結果を報告する。

材料および方法

遺伝的形質の固定

無処置にて末梢血中の好酸球数が高い値を示した雌の ICR マウス (SLC Inc., Shizuoka, Japan) を雄親と戻し交配させた。交配により得られた個体の末梢血中の好酸球数をカウントし、好酸球数の高い個体を兄妹交配させた。兄妹交配を 20 世代以上繰り返し、近交系マウス (Yama マウス) を確立した。さらに、近交系の確立以降 25 世代以上の各世代の個体がすべて好酸球増多症を示す。好酸球増多症の基準は ICR マウスの末梢血中好酸球数の平均値+2SD (264/ μ l) とした。

Yama マウスは正常に繁殖し、少なくとも 1 年半は生存する。6 週齢における Yama マウスは ICR マウスと比較して発育や体重に差は認められない。しかし、加齢に伴い腹腔内脂肪組織が増加し、体重が ICR マウスよりわずかに増加する。好酸球以外の白血球や赤血球数は Yama マウスと ICR マウスに差は認められない。

動物

6 週齢および 18 週齢の ICR マウス (SLC Inc.) および Yama マウスを用いた。マウスは人工照明による明暗サイクル (12 : 12 時間の明暗サイクル) 下でエコチップおよびケージを用いて飼育した。飼料 (CE-2 ; Clea Japan, Osaka, Japan) および水 (水道水) は自由摂取とした。本実験計画は、山口大学動物使用委員会が定める規則に従って行った (実験計画書 No.401)。

末梢血の採血および組織の採取

6 週齢および 18 週齢の ICR マウスおよび Yama マウスから採血を行った。各マウスは 10mg/kg キシラジン (Bayer, Tokyo, Japan) と 80mg/kg ケタミン (Daiichi Sankyo Co., Ltd.,

Tokyo, Japan) の腹腔内投与による麻酔後、微量採血管を用いて眼窩採血を行った。

6 週齢の ICR マウスおよび Yama マウスをキシラジンおよびケタミンによる深麻酔下で心採血後、頸椎脱臼により安楽殺を行った。心採血は遠心分離 (3000rpm、10 分) 後に上清を血清として採取した。各マウスの安楽殺後、骨髓、脾臓および腸間膜リンパ節を採材し、一部を RNA 抽出用に使用し、その他は 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬させて固定した。固定後、大腿骨は 0.5M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA 溶液 [Sigma Aldrich, St Louis, MA, USA]) pH7.0 で 24 時間脱灰した。その後、すべての組織をパラフィンで包埋し、4 μ m のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

末梢血および組織好酸球数の測定

末梢血中の好酸球数は、Hinkelman's solution (0.5% w/v eosin Y, 0.5% w/v phenol and 0.185% v/v formaldehyde in distilled water) で 10 倍希釈し、穏やかに混和させた後、好酸球計算盤 (Tatai Eosinophil counter; Kayagaki Irikakogyo Co., Tokyo, Japan) を用いて測定した (Morimoto et al., 1998)。データは 1mL 中の好酸球数で示した。

骨髓切片は、好酸球のマーカーである抗 Eosinophil cationic protein (ECP) 抗体を用いて免疫組織化学を行った。キシレンにてパラフィンを除去後、抗原賦活化を 0.1% トリプシン (37°C、30 分間) にて行った。その後、内因性ペルオキシダーゼを 3% 過酸化水素水 (室温、10 分間) にて不活化させ、ブロッキング液 (10% スキムミルク、2% BSA を PBS へ溶解) にてブロッキング (室温、30 分間) を行った。Rabbit Anti-Mouse ECP IgG (Aviscera Bioscience Inc., Santa Clara, CA, USA) を 400 倍希釈して切片へ滴下し、4°C にて一晩静置した。その後 PBS で 3 回洗浄し、EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako, Glostrup, Denmark) を滴下して室温にて 30 分間静置した。PBS で 3 回洗浄後、DAB Substrate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて発色し、ヘマトキシリンで核染色を行った。光学顕微鏡を用いて対物レンズ 100 倍にて 5 つの視野で ECP 陽性細

胞の全細胞に占める割合を求めた。

RNA 抽出および RT-qPCR

RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilgen, Germany) を用いて、RNeasy® Plus Mini Kit Handbook (Qiagen, 2019) に記載されているプロトコールに従って骨髄、脾臓、腸間膜リンパ節から RNA を抽出した。RNA は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて 37°C で 15 分、50°C で 5 分、98°C で 5 分反応させ、逆転写を行った。

IFN- γ 、IL-4、IL-5 の発現量の定量化のために、4 μ l の cDNA サンプルを、CFX96 Touch リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) を用いて TaqMan Gene Expression Assays (IFN- γ : Mm01168134_m1、IL-4 : Mm00445259_m1、IL-5 : Mm04239646_m1 [Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA]) で増幅した。18s rRNA (Mm03928990_g1 [Thermo Fisher Scientific]) をハウスキーピング遺伝子として使用し、各サイトカインの標準化を行った。

ELISA

ICR マウスおよび Yama マウスの血清 IFN- γ 、IL-4、IL-5 を ELISA キット (IFN- γ 、IL-4 : Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan、IL-5 : Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて定量した。サイトカイン濃度は製品の標準品の連続希釈によって得られた標準曲線と比較して求められた。ICR マウスと Yama マウスの IFN- γ /IL-4 によって、Th1/Th2 の比率を計算した。

統計学的処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (SE) を用いて示した。有意差検定は 2 群間の比較では Mann-

Whitney U test を用い、3 群間以上の比較では Kruskal-Wallis test を行った後に Steel-Dwell test を行った。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

末梢血好酸球数

6 週齢の Yama マウスにおける末梢血中の好酸球数は ICR マウスの約 30 倍多かった (図 1)。18 週齢の Yama マウスにおける末梢血中の好酸球数は 6 週齢の Yama マウスの約 10 分の 1 に減少したが、ICR マウスより約 4 倍の多さであった (図 1)。

組織学的解析

骨髓の HE 染色および抗 ECP 抗体による免疫組織化学では、Yama マウスは ICR マウスより多くの好酸球が認められた (図 2、図 3)。骨髓の抗 ECP 抗体免疫組織化学における全細胞中の好酸球の割合は ICR マウス ($3.44 \pm 0.23\%$) よりも Yama マウス ($7.66 \pm 0.62\%$) で高かった (図 4)。HE 染色において、6 週齢の Yama マウスに胃の扁平上皮の過角化が認められたが、その他の病変は認められなかった。

サイトカイン発現解析

骨髓、脾臓、腸間膜リンパ節における IFN- γ mRNA、IL-4 mRNA、IL-5 mRNA の発現量を Fig.5 に示す。IL-5 の発現量はいずれの組織においても ICR マウスと Yama マウスに有意差は認められなかった (図 5)。IFN- γ および IL-4 の発現量もいずれの組織においても ICR マウスと Yama マウスに有意差は認められなかった (図 5)。血清 IFN- γ 、IL-4、IL-5 濃度も ICR マウスと Yama マウスに有意差は認められなかった (図 6)。血清サイトカインによる Th1/Th2 比は約 1 : 1.15 であった。

考察

本研究では、自然発症的に好酸球増多症を示す初めての近交系マウスを確立した。

IL-5 は好酸球の活性化と増殖に重要であることが知られている (Nagase et al., 2020)。これまで、いくつかの動物モデルが好酸球増多症を示したが、すべてのモデルマウスで IL-5 の発現が上昇していた (Farzaneh et al., 2006; Kusama et al., 1995; Masterson et al., 2014)。Yama マウスは好酸球増多症を示すが、骨髓、脾臓、腸間膜リンパ節における IL-5 の発現に ICR マウスと有意差は認められなかった。さらに、血清 IL-5 濃度においても Yama マウスと ICR マウスとの間に有意差は認められなかった。これらの結果は、Yama マウスにおける好酸球増多症は IL-5 以外の因子によって引き起こされていることを示唆する。Yama マウスの好酸球増多症に関与する遺伝子の変異として 3 つの可能性が考えられる。第一に、IL-5 受容体の下流因子が発現増強された。第二に、IL-5 シグナル伝達経路以外の好酸球活性化シグナル伝達経路が刺激された。最後に、抑制因子の機能不全により好酸球数が増加した。第一の可能性において、赤血球や肥満細胞などの細胞で発現している GATA-1 を除いて、IL-5 シグナル伝達経路の下流は不明である (Hirasawa et al., 2002)。GATA-1 の発現が増加すると、マウスで一過性の異常骨髓造血として黄疸や脾腫などの症状を引き起こす (Garnett et al., 2020)。しかし、これらの症状は Yama マウスでは認められておらず、IL-5 シグナル伝達経路の下流に変異が起きているとすると、GATA-1 以外の分子であることが示唆される。第二の可能性では、未知のシグナル伝達経路の刺激を意味しており、Yama マウスの好酸球増多症が好酸球活性化の新たなメカニズムにつながることを示唆する。これら二つの可能性は遺伝子変異が好酸球を増殖させる分子が活性化するというものである。第三の可能性は、好酸球の活性化を抑制する分子が変異したことにより機能不全に陥り、好酸球が増加するというものである。好酸球は Th2 型免疫応答と関連していることから、変異した分子が Th2 型免疫応答の抑制分子である可能性もある。

Yama マウスの末梢血中の好酸球数は 6 週齢と 18 週齢で ICR マウスよりも有意に多かった。しかし、18 週齢の Yama マウスの好酸球数は 6 週齢の Yama マウスよりも減少していた。Yama マウスの好酸球増多を誘導する遺伝子変異が好酸球を増殖させる分子の活性化であるならば、遺伝子変異により活性が増強した分子が経時的にその活性が低下するとは考え難いため、好酸球数が経時的に減少する理由を説明するのは困難である。つまり、好酸球増殖の抑制分子の機能不全により好酸球が過剰に増殖した可能性が高い。Th1 型免疫応答には同様の機能を有するいくつかの抑制分子が存在しているが (Li et al., 2015; Parry et al., 2005)、Th2 型免疫応答における抑制分子は未だ不明である。Th2 型免疫応答の抑制分子が複数存在し、これらの分子が Th1 型免疫応答のように相補的に関与するとすれば、Yama マウスの好酸球増加は Th2 型免疫応答の抑制分子の一部が機能不全に陥り、他の分子が低下した活性を補うように経時的に活性を高めていると考えられる。この仮説は、本研究の結果に対して最も可能性が高く、好酸球増多症の発症に関連する因子を特定するために、Yama マウスをさらに詳細に調査する必要がある。Yama マウスの変異分子が Th2 型免疫応答の抑制分子であるならば、初めての Th2 型免疫応答抑制分子であり、アレルギー性疾患や線維性疾患 (Wynn, 2004)、潰瘍性大腸炎 (Nemeth et al., 2017)、特発性好酸球増多症 (Roufosse et al., 2000) などの Th2 型免疫応答関連疾患の治療標的分子になる可能性がある。

好酸球は肝臓や筋肉の再生 (Goh et al., 2013; Liu et al., 2020; Heredia et al., 2013)、創傷治癒 (Wong et al., 1993; Todd et al., 1991) などの疾患を制御していると考えられている。しかし、その詳細な機能は未だ解明されていない。好酸球の機能を生体内で詳細に調べるためには、病変を引き起こさずに好酸球が増加するモデルが必要となる。蠕虫感染モデルは、好酸球の機能を調べるのによく用いられてきた (Kusama et al., 1995)。しかし、蠕虫の感染によって複数の白血球が複雑なネットワークを形成し同時に活性化するため、好酸球の活性化機序のみを観察するのは困難である。Yama マウスの組織学的検索では、胃の過角化以外の病変は認められなかった。Yama マウスは好酸球増多症を示す近交系マウスとして確立

された新規変異マウスであり、各個体は安定して好酸球増多を示す。さらに、Yama マウスは人為的な処置なしに好酸球増多症を発現するため、何らかの処置による影響を考慮することなく、Yama マウスを用いて生体内におけるより詳細な好酸球の機能を観察することができる。

Yama マウスと ICR マウスの骨髓、脾臓、腸間膜リンパ節における IFN- γ 、IL-4、IL-5 の発現、および血清 IFN- γ 、IL-4、IL-5 濃度に有意差は認められなかった。また、IFN- γ /IL-4 比で表される Th1/Th2 比は Yama マウスと ICR マウスにおいてほとんど同じであった。これらの結果は、Th2 型免疫応答の活性化の指標として用いられている IL-4 や IL-5 の発現が増加していないにも関わらず、Th2 型免疫応答の主要な白血球である好酸球が増加していることを示す。本研究結果が示すように、Th1/Th2 型免疫応答の上流に存在するサイトカインである IFN- γ や IL-4 を介さず、異なる経路や変異によって下流の分子が活性化された場合には、サイトカインの発現により Th1/Th2 型免疫応答の活性化を評価できない可能性がある。また、Th1 型免疫応答により媒介される IV 型アレルギー反応では IFN- γ と IL-4 の産生が増加し (Minang et al., 2005)、アスピリン増悪呼吸器疾患においては肥満細胞と好酸球により傷害されるにも関わらず IFN- γ と IL-4 の産生がいずれも増加するという報告がある (Steinke et al., 2015) など矛盾が認められる。Th1/Th2 活性化の指標としては、IFN- γ /IL-4 比による評価以外の新たな評価方法が必要であると考えられる。

Yama マウスは好酸球増多症の研究に最適なモデルであり、Yama マウスにおける好酸球増多症の調査は特発性好酸球増多症の研究の進歩につながることが期待される。さらに、Yama マウスは好酸球が重要であるアレルギー性疾患や再生分野の研究にも有用なモデルとなり得る (Kitamura et al., 2018; Heredia et al., 2013)。

付図

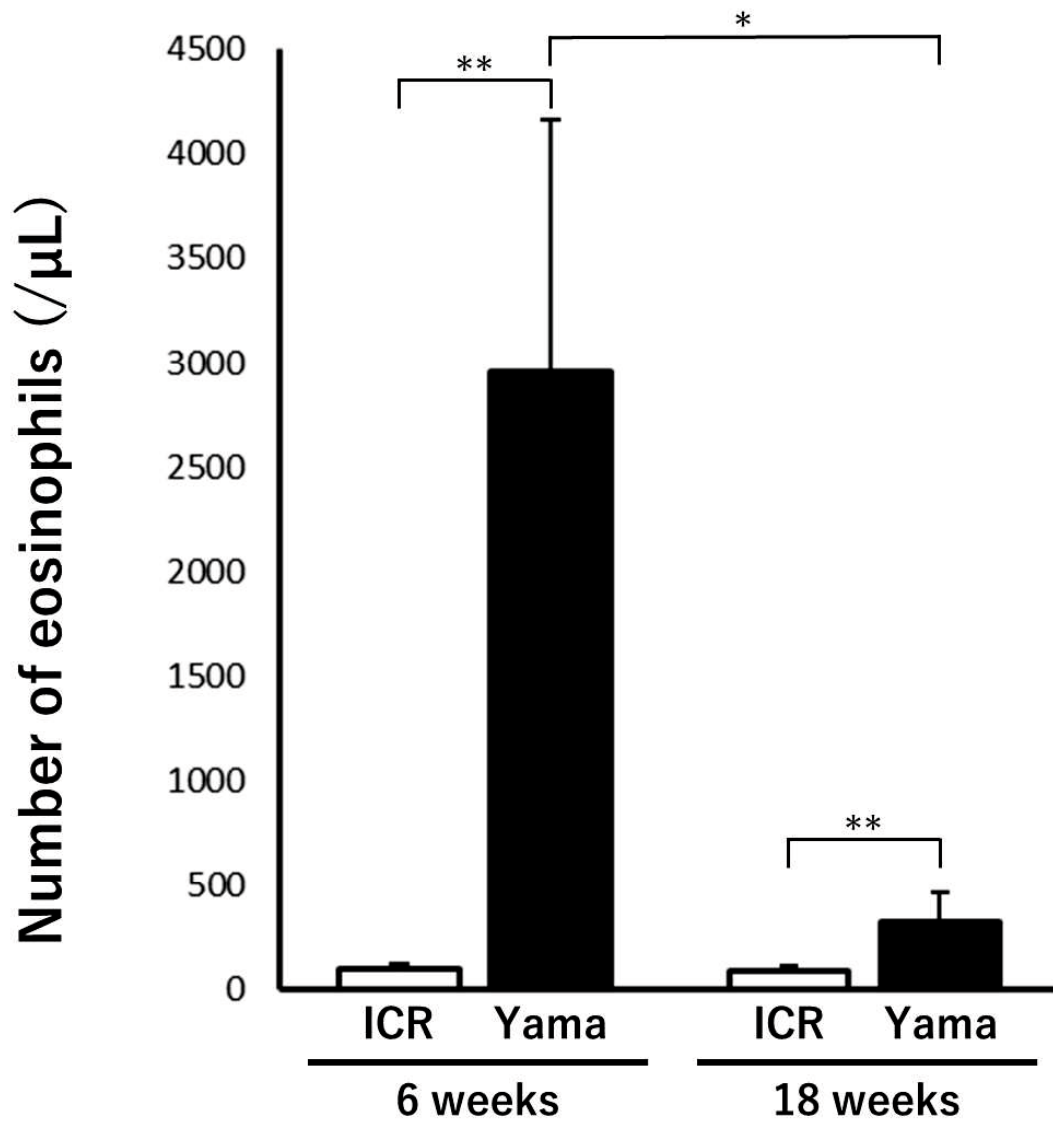


図1 ICR マウス (n=10) および Yama マウス (n=6) の 6 週齢および 18 週齢における末梢血中の好酸球数。データは平均値±SE で示す。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ 。

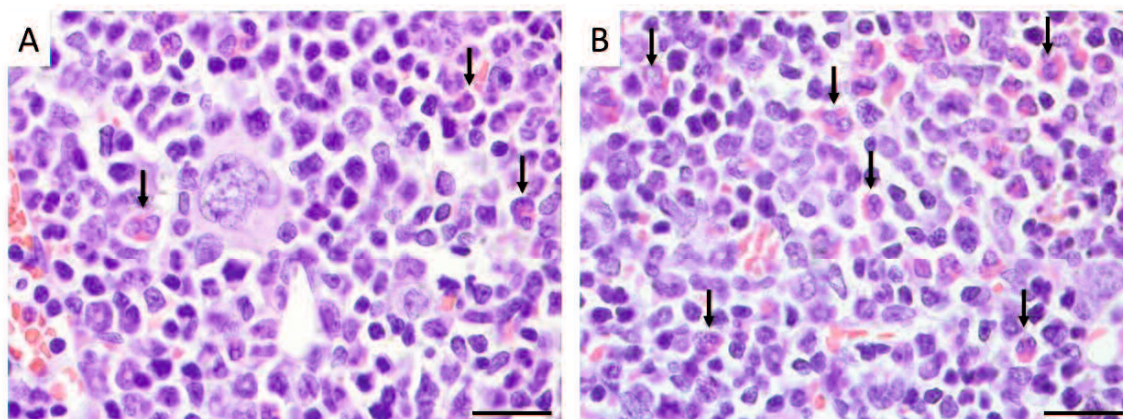


図2 6週齢のICRマウス（A）およびYamaマウス（B）の骨髄におけるHE染色像。矢印は好酸球を示す。バーは200 μm 。

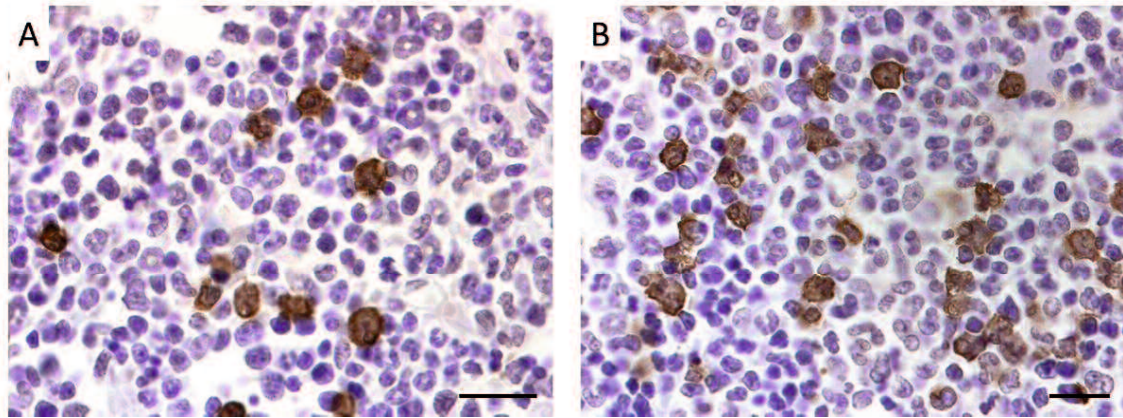


図3 6週齢のICRマウス（A）およびYamaマウス（B）の骨髄における抗ECP抗体による免疫組織化学。バーは200 μm 。

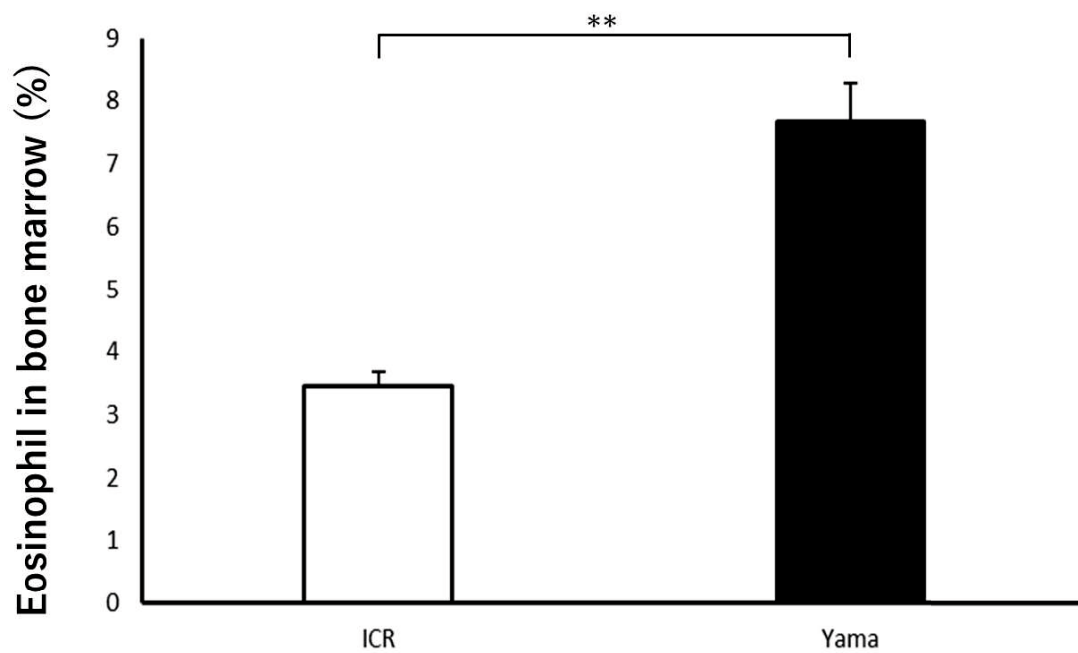


図4 6週齢のICRマウス（n=6）およびYamaマウス（n=6）の骨髄における全有核細胞に占めるECP陽性細胞の割合。データは平均値±SEで示す。**はP<0.01。

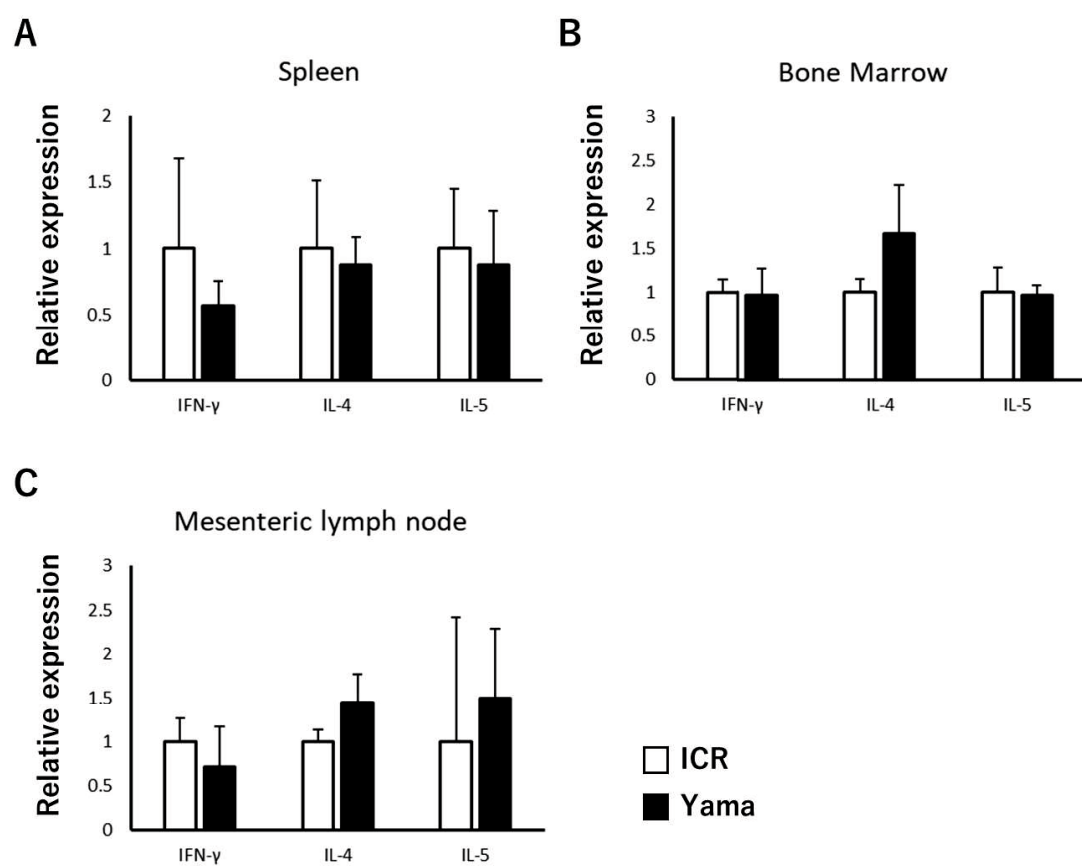


図5 6週齢のICRマウス (n=5) およびYamaマウス(n=5)の脾臓 (A)、骨髄 (B)、腸間膜リンパ節 (C) におけるIFN- γ 、IL-4、IL-5の発現量をqPCRで解析した結果。データは平均値 $\pm$ SEで示す。

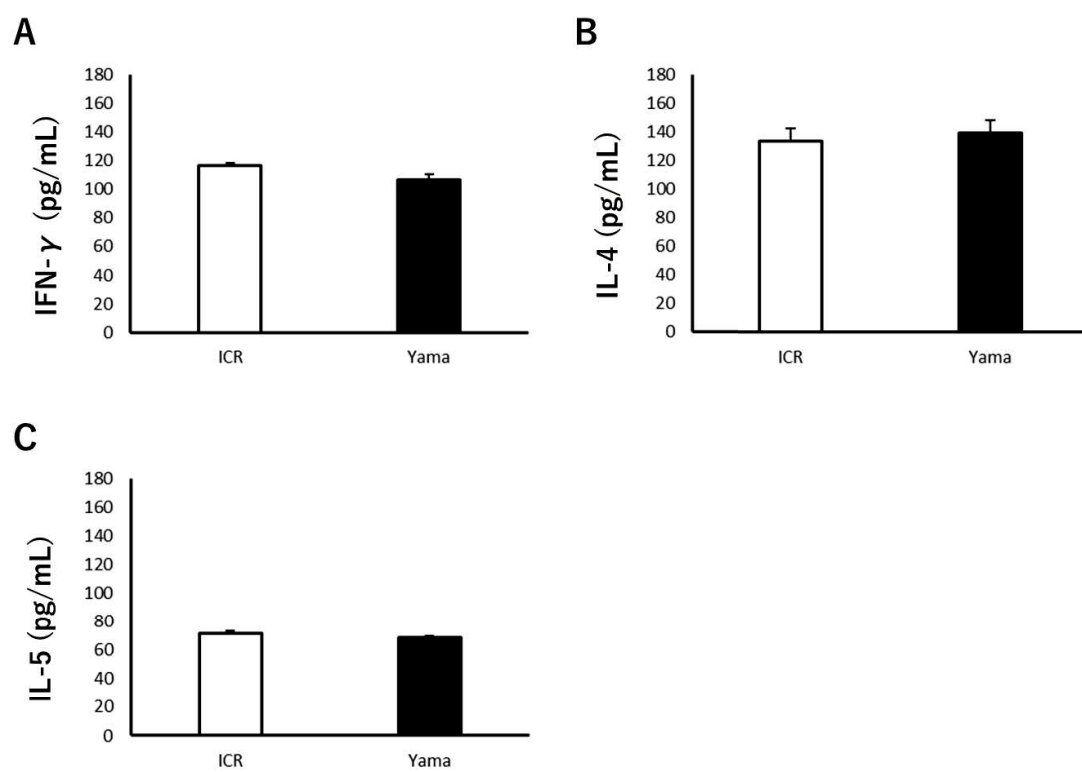


図6 6週齢のICRマウス(n=6)およびYamaマウス(n=6)における血清中のIFN- γ (A)、IL-4 (B)、IL-5 (C)濃度をELISAで解析した結果。データは平均値 $\pm$ SEで示す。

第二章 Yama マウスのアレルギー性皮膚炎モデルへの応用

要約

アレルギー性皮膚炎 (AD) は主に免疫調節異常によって引き起こされる慢性皮膚炎を特徴とする皮膚疾患である。AD では、痒み、乾燥、掻破、苔癬化、表皮肥厚、紅斑性丘疹、血清 IgE 濃度の上昇など、いくつかの特徴的な臨床症状がある。AD の線維化には肥満細胞や好酸球が関与すると報告されているが、AD における組織線維化の進行メカニズムは不明な点が多い。Yama マウスは遺伝的に好酸球増多症を示す近交系マウスである。好酸球が AD における線維化に重要であるならば、Yama マウスを用いることで顕著な真皮線維化を伴う AD モデルマウスを確立できると考えられる。本研究では、Yama マウスを用いた新たな AD モデルマウスを確立し、その組織学および免疫学的特徴を報告する。

本研究では、ジニトロフルオロベンゼンをマウスの耳介に塗布することにより AD 病変を誘発した。

Yama マウスは Balb/c マウスと Nc/nga マウスよりも重度の線維化および高度な好酸球浸潤を伴う AD を示した。線維化に重要なサイトカインである形質転換増殖因子 (TGF) - β の発現は Balb/c マウス、および Nc/nga マウスにおいて増加したのに対し、Yama マウスでは増加が認められなかった。一方で、線維化のメディエーターの 1 つとして知られているインターロイキン (IL) -4 の発現は Yama マウスで増加していた。

本研究の結果は、Yama マウスは Balb/c マウスや Nc/nga マウスより重度な線維化を伴う AD を誘導できることを示した。Yama マウスにみられた重度の線維化は IL-4 が主な線維化メディエーターであると考えられた。本モデルマウスは、慢性期の AD における線維化メカニズムの解明、および新たな治療薬の開発につながる研究に用いることができる可能性が示唆された。

緒論

アレルギー性皮膚炎（AD）は主に免疫調節異常によって引き起こされる慢性炎症を特徴とする皮膚疾患である。世界的に、AD の有病率と発症率は過去数十年にわたって増加しており、小児の有病率は 15-20%、成人の有病率は最大 10% にのぼる（Kim et al., 2021; Sonja, 2021; Sinéad et al., 2020）。AD では、痒み、乾燥、掻破、苔癬化、表皮肥厚、紅斑性丘疹、血清 IgE 濃度の上昇など、いくつかの特徴的な臨床症状がある（Avena-woods, 2017; Berke et al., 2012）。これらの症状は AD 患者の生活の質（QOL）の低下につながる（Kamata et al., 2021; Silverberg et al., 2018）。特に、苔癬化は長期にわたる AD の特徴であり、AD 患者の QOL を著しく低下させる。

AD 病変の病理組織では、好酸球や肥満細胞の蓄積、過角化、真皮線維化などの特徴が認められる。表皮肥厚と真皮線維化は苔癬化において認められる組織学的変化である。さらに、AD における真皮線維化は AD 病態の増悪と関連していると言われており（Yang et al., 2023; Berroth et al., 2013）、これは苔癬化が AD 患者の QOL を低下させる理由と考えられる。AD の線維化には肥満細胞や好酸球が関与すると報告されているが（Hügler et al., 2014; Oyoshi et al., 2012）、AD における組織線維化の進行メカニズムは不明な点が多く存在している。加えて、好酸球は喘息（Morimoto et al., 2018; Broide, 2008）や肺線維症（Cui et al., 2003; Gharaee-Kermani et al., 1998）など、いくつかの疾患において組織線維化に関連していることから、AD においても線維化に重要な働きをしていると考えられる。

AD の研究には、主に 2 つのマウスモデルが用いられている。1 つはヘルパー T2（Th2）型免疫応答を誘導しやすい Balb/c マウスを用いた AD モデルであり、外因性物質の皮膚への塗布により AD 病変が誘導される（Kim D et al., 2020）。もう 1 つは Nc/nga マウスを用いた AD モデルで、一般飼育条件下で飼育すると AD 病変を自然発症する近交系マウスとして報告されており（Matsuda et al., 1997）、Nc/nga マウスの AD 病変は Balb/c マウスの

AD 病変よりも重症である。しかし、近年、Nc/nga マウスの AD 病変は軽度になっており、AD 病変の誘導には外因性物質の皮膚への塗布が必要となっている (Kim YH et al., 2020)。AD マウスモデルである Nc/nga マウスと Balb/c マウスはいずれも真皮線維化はヒトの病変と比較して軽度であり、AD における真皮線維化のメカニズムを解明するのに最適とはいえない。真皮線維化のメカニズムが未だ解明されていない原因として、明らかな線維化を誘導する最適なモデルが存在しないことが考えられる。

Yama マウスは遺伝的に好酸球増多症を示す近交系マウスである (Yamada et al., in press)。Yama マウスは末梢血中の好酸球数が多いため、AD 病変を誘導しやすいと考えられる。特に、顕著な真皮線維化を伴う AD 病変を誘導する可能性がある。本研究では、Yama マウスを用いた新たな AD マウスモデルを確立し、組織学的および免疫学的特徴を報告する。

材料および方法

動物

6 週齢、雌の Balb/c マウス (Clea Japan, Osaka, Japan)、Nc/nga マウス (Charles River Laboratories Japan, Yokohama, Japan) および Yama マウス (Yamada et al., in press) を用いた。マウスは人工照明による明暗サイクル (12 : 12 時間の明暗サイクル) 下でエコチップおよびケージを用いて飼育した。飼料 (CE-2 ; Clea Japan) および水 (水道水) は自由摂取とした。本実験計画は、山口大学動物使用委員会が定める規則に従って行った (実験計画書 No.572)。

DNFB 塗布による AD 病変の誘導

マウスをそれぞれジニトロフルオロベンゼン塗布群 (DNFB : Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) と対照群の 2 群に分けた (n=5/群)。AD 病変誘導の実験プロトコールは以前の報告を参考に行った (Huang et al., 2019)。背部を剃毛し、感作のために 200 μ l の 0.5% DNFB (溶媒はアセトン : オリーブ油 = 3 : 1) を剃毛部位に Day1-3 に塗布した。次に、誘導のために 1% DNFB を耳介に 20 μ l、剃毛部位に 200 μ l を Day14、17、20、23、26、29、32、35、38 に塗布した。Day39 に、全てのマウスを 10mg/kg キシラジン (Bayer, Tokyo, Japan) および 80mg/kg ケタミン (Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) の腹腔内投与による深麻酔下で頸椎脱臼により安楽殺を行った。

末梢血好酸球数の測定

末梢血中の好酸球数は Day0 および Day39 に行った。末梢血中の好酸球数は、Hinkelman's solution (0.5% w/v eosin Y, 0.5% w/v phenol and 0.185% v/v formaldehyde in distilled water) で 10 倍希釈し、穏やかに混和させた後、好酸球計算盤 (Tatai Eosinophil counter; Kayagaki

Irikakogyo Co., Tokyo, Japan) を用いて測定した (Morimoto et al., 1998)。データは 1mL あたりの好酸球数で示した。

耳介の測定

耳介の厚さは Day14 における DNFB 塗布前およびすべての耳介への DNFB 塗布の 24 時間後に dial thickness gauge (Ozaki MFG, Tokyo, Japan) を用いて測定した。耳介の肥厚は Day14 における耳介の厚さと耳介への DNFB 塗布の 24 時間後の耳介の厚さの差により求められた。

組織学的検索

採材した耳介は 10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬して固定した後に、定法に従いパラフィン包埋し、厚さ 4 μ m のパラフィン切片を作成した。組織学的検索のため、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、トルイジンブルー染色、シリウス赤染色 (ScyTek Laboratories, Inc., UT, USA)、および好酸球のマーカーである抗 Eosinophilic cationic protein (ECP) 抗体を用いた免疫組織化学を行った。ECP 免疫組織化学は、キシレンにてパラフィンを除去後、抗原賦活化を 0.1%トリプシン (37°C、30 分間) にて行った。その後、内因性ペルオキシダーゼを 3%過酸化水素水 (室温、10 分間) にて不活化させ、ブロッッキング液 (10%スキムミルク、2%BSA を PBS へ溶解) にてブロッッキング (室温、30 分間) を行った。Rabbit Anti-Mouse ECP IgG (Aviscera Bioscience Inc., Santa Clara, CA, USA) を 400 倍希釈して切片へ滴下し、4°C にて一晩静置した。その後 PBS で 3 回洗浄し、EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako, Glostrup, Denmark) を滴下して室温にて 30 分間静置した。PBS で 3 回洗浄後、DAB Substrate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて発色し、ヘマトキシリンで核染色を行った。好酸球は ECP 免疫組織化学、肥満細胞はトルイジンブルー染色、膠原線維の蓄積はシリウス赤染色にて評価した。トルイジンブルー

ー染色および ECP 免疫組織化学は、400 倍の倍率にて 5 視野の陽性細胞数を測定し、高倍率 1 視野あたりの陽性細胞数を算出した。シリウス赤染色は、画像処理ソフトウェアである ImageJ (National Institutes of Health, <https://imagej.nih.gov/ij>) を用いて陽性面積の割合を算出した。

ELISA

血液は Day39 に心採血により採取し、遠心分離 (3000rpm、10 分) 後に上清を血清として採取した。血清 IgE 濃度は ELISA キット (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) を用いて定量し、製品の標準品の連続希釈によって得られた標準曲線と比較して求められた。

RNA 抽出および RT-qPCR

RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilgen, Germany) を用いて、RNeasy® Plus Mini Kit Handbook (Qiagen, 2019) に記載されているプロトコールに従って耳介から RNA を抽出した。RNA は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて 37°C で 15 分、50°C で 5 分、98°C で 5 分反応させ、逆転写を行った。

インターロイキン (IL) -5、IL-4、IL-13、IL-6、形質転換増殖因子 (TGF) - β 、Collagen type-1 (Col-1) の発現量の定量化のために、1 μ l の cDNA サンプルを、CFX96 Touch リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) を用いて TaqMan Gene Expression Assays (IL-5 : Mm04239646_m1、IL-4:Mm00445259_m1、IL-13:Mm00434204_m1、IL-6:Mm0046190 __ m 1、TGF- β : Mm01178820_m1、Col-1:Mm00801632_gH、[Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA]) で増幅した。18s rRNA (Mm03928990_g1 [Thermo Fisher Scientific]) をハウスキーピング遺伝子として使用し、各サイトカインの標準化を行った。

統計学的処理

データは平均値±標準誤差 (SE) を用いて示した。有意差検定は 2 群間の比較では Mann-Whitney U test を用い、3 群間以上の比較では Kruskal-Wallis test を行った後に Steel-Dwell test を行った。P<0.05 を有意差ありとした。

結果

Yama マウスに AD 病変を誘導

Yama マウスに AD 病変が誘導されていることを確認するために、末梢血中の好酸球数および血清 IgE の測定と HE 染色の観察を行った。全てのマウスの対照群において、実験の前後で末梢血中の好酸球数に変化は認められず（図 1）、溶媒の塗布による影響はほとんどないことを示唆する。Yama マウスにおいて、実験前の末梢血中の好酸球数は高値を示しており、DNFB 塗布による有意な変化は認められなかった（図 1）。Balb/c マウスは DNFB 塗布により末梢血中の好酸球数が有意に増加した（図 1）。Nc/nga マウスでは、DNFB 塗布により末梢血中の好酸球数が有意に減少した（図 1）。Yama マウスの血清 IgE 濃度は DNFB 塗布により有意に上昇した（図 2）。Balb/c マウスの DNFB 塗布群と Yama マウスの DNFB 塗布群および Nc/nga マウスの DNFB 塗布群と Yama の DNFB 塗布群の間に血清 IgE 濃度の有意差は認められなかった（図 2）。HE 染色では、全てのマウスの DNFB 塗布群において表皮の肥厚と高度な炎症細胞浸潤を伴う真皮の肥厚が認められた（図 3）。真皮に浸潤した炎症細胞には単核細胞と好酸球が高度に認められた（図 3）。

AD 病変における線維化

AD における線維化の指標として、耳介の厚さと組織中の膠原線維を測定した。いずれのマウスにおいても、DNFB 塗布群は対照群より有意に耳介が肥厚した（図 4）。Yama マウスの DNFB 塗布群は Day 24 を除いて Day18 以降において他の 2 つのマウスの DNFB 塗布群より有意に耳介が肥厚した（図 4）。シリウス赤染色において、Yama マウスの DNFB 塗布群は他の 2 つのマウスの DNFB 塗布群より陽性面積が増加した（図 5A）。シリウス赤染色陽性で示される線維化面積の割合は、いずれのマウスの対照群の間にも有意差は認められなかった（図 5B）。Balb/c マウスと Nc/nga マウスの DNFB 群において、線維化面積

は対照群より増加しており、約 1.5 倍に増加した (図 5B)。Yama マウスの DNFB 塗布群において、線維化面積は対照群より 3 倍以上増加しており、全体の約 50%に達していた (図 5B)。

AD 病変における好酸球と肥満細胞の浸潤

好酸球と肥満細胞は AD における組織線維化に関与するため (Hügler, 2024 ; Oyoshi et al., 2012)、病変におけるこれらの細胞の浸潤数を定量した。抗 ECP 抗体による免疫組織化学において、すべてのマウスの DNFB 塗布群は対照群と比較して好酸球の浸潤数が増加した (図 6A, B)。特に、Yama マウスの DNFB 塗布群では他の 2 つのマウスの DNFB 塗布群よりも浸潤した好酸球数が有意に増加していた (図 6A, B)。トルイジンブルー染色では、いずれのマウスにおいても、DNFB 塗布群で対照群より肥満細胞の浸潤数が増加した (図 6C, D)。一方で、各マウスの DNFB 塗布群の間では浸潤した肥満細胞数に有意差は認められなかった (図 6C, D)。

サイトカインの発現

アレルギー反応および線維化に関わるサイトカインの発現を調べた。図 7 に耳介組織における IL-5、IL-4、IL-13、IL-6、TGF- β 、および Col-1 の mRNA 発現レベルを示す。Balb/c マウスと Yama マウスにおいて、DNFB 塗布群と対照群との間に IL-5 発現レベルの有意な変化は認められなかった (図 7A)。Nc/nga マウスでは、IL-5 発現レベルは DNFB 塗布群の方が対照群より有意に低かった (図 7A)。各マウスの DNFB 塗布群の間に IL-5 発現レベルに有意差は認められなかった (図 7A)。Balb/c マウスと Nc/nga マウスでは、DNFB 塗布群と対照群との間に IL-4 発現レベルに有意差は認められなかった (図 7B)。Yama マウスでは、IL-4 発現レベルは対照群より DNFB 塗布群で有意に上昇し、他の 2 つのマウスの DNFB 塗布群より上昇した (図 7B)。IL-13 発現レベルは、Balb/c マウスと Yama マウスに

において、DNFB 塗布群は対照群より有意に上昇した (図 7C)。DNFB 塗布群の間では、Nc/nga マウスは Yama マウスより IL-13 発現レベルが有意に上昇した (図 7C)。IL-6 発現レベルは、Yama マウス、Balb/c マウスおよび Nc/nga マウスにおいて DNFB 塗布群は対照群より有意に上昇していたが、各マウスの DNFB 塗布群間に有意差は認められなかった (図 7D)。TGF- β 発現レベルは、Yama マウスの DNFB 塗布群と対照群との間に有意差は認められなかった (図 7E)。Yama マウスの DNFB 塗布群において、TGF- β 発現レベルは Nc/nga マウスの DNFB 塗布群より有意に低下しており、Balb/c マウスの DNFB 塗布群より低下した (図 7E)。Col-1 発現レベルは、Balb/c マウスおよび Nc/nga マウスの DNFB 塗布群では対照群より有意に上昇していたが、Yama マウスでは DNFB 塗布群と対照群の間に有意差は認められなかった (図 7F)。各マウスの DNFB 塗布群の間で Col-1 発現レベルに有意差は認められなかった (図 7F)。

考察

本研究では、Yama マウスを用いて新たな AD モデルマウスを確立した。このモデルは既存のモデルマウスである Balb/c マウスや Nc/nga マウスと比較して重度の線維化を誘導した。AD は血清 IgE 濃度の上昇と病変部への好酸球および肥満細胞の浸潤を特徴とする。これらの特徴のうち、AD 病変における好酸球や肥満細胞の浸潤は線維化に関与すると報告されている (Hügler, 2024 ; Oyoshi et al., 2012)。Yama マウスでは Balb/c マウスや Nc/nga マウスと同程度に血清 IgE 濃度が上昇し、同程度の肥満細胞浸潤も認められた。一方で、AD 病変部への好酸球の浸潤は Balb/c マウスや Nc/nga マウスと比較して Yama マウスで有意に増加した。つまり、AD マウスモデルにおける重度の真皮線維化は好酸球の寄与が大きいと考えられる。

好酸球が関与するサイトカインとして Th2 サイトカインである IL-4 と IL-13 が知られている。IL-4 と IL-13 は組織の線維化に関与することが報告されている (Nguyen et al., 2020; Hinz, 2016)。IL-4 と IL-13 は多くの生物学的機能を共有しており、IL-4R α /Stat6 シグナル経路を介して筋線維芽細胞を活性化することが知られている (Hinz, 2016)。本研究では、Yama マウスの DNFB 塗布群において IL-4 発現レベルは有意に上昇したのに対して、Balb/c マウスと Nc/nga マウスの DNFB 塗布群ではほとんど変わらなかった。一方で、IL-13 発現レベルに関しては、Yama マウスの DNFB 塗布群は対照群より有意に上昇していたが、Balb/c マウス DNFB 塗布群と同程度で、Nc/nga マウス DNFB 塗布群より有意に低下していた。つまり、Yama マウスの AD における線維化では IL-4 が大きな役割を担っていると考えられる。IL-4 や IL-13 以外に組織の線維化に重要な因子として TGF- β が知られている。TGF- β は線維芽細胞の活性化や膠原線維合成の促進、上皮間葉転換の促進などの作用により組織の線維化を促進する (Meng et al., 2016)。本研究では、Balb/c マウスと Nc/nga マウスの DNFB 塗布群において、対照群より有意な TGF- β の発現上昇が認められた。し

かし、Yama マウスでは DNFB 塗布群と対照群の TGF- β 発現レベル同程度であり、Yama マウスの DNFB 塗布群では Nc/nga マウスの DNFB 塗布群より TGF- β の発現は有意に低かった。このことから、Balb/c マウスと Nc/nga マウスの AD における線維化は TGF- β 介在性であるのに対して、Yama マウスの AD における線維化は TGF- β に依存しないと考えられる。実際に、TGF- β 発現上昇に伴い増加する Col-1 発現レベルは、Balb/c マウスおよび Nc/nga マウスでは対照群と比較して DNFB 塗布群で有意に上昇していたのに対し、Yama マウスでは対照群と DNFB 塗布群に有意差は認められなかった。上記以外に、IL-6 が線維化メディエーターとして報告されている (Chen et al., 2019)。IL-6 は炎症誘発性サイトカインのひとつであり、線維症に重要であると考えられている (Wynn et al., 2012)。IL-6 発現レベルは、Yama マウス DNFB 塗布群では対照群と比較して有意に上昇していたが、Balb/c マウスと Nc/nga マウスの DNFB 塗布群と同程度であった。IL-6 は I 型コラーゲンの合成を促進することが報告されている (Zeng et al., 2019)。Col-1 および TGF- β 発現レベルの結果から、Yama マウスの AD における線維化では IL-6 は Balb/c マウスおよび Nc/nga マウスの AD における線維化と同程度の寄与は示すが、線維化の重症化に対する寄与は少ないと考えられる。AD における線維化では、I 型コラーゲンだけでなく、VI 型コラーゲンも増加することが知られており、VI 型コラーゲンは IL-4 により増加する (Jung et al., 2022)。Yama マウスの AD 病変における線維化では、VI 型コラーゲンなどの I 型コラーゲン以外の膠原線維が蓄積している可能性があり、今後、蓄積する膠原線維について検討を行う必要がある。また、ヒトのアレルギー性疾患において、好酸球が産生するオステオポンチンが線維化を直接促進することが報告されている (Puxeddu et al., 2010)。本研究においても、オステオポンチンが好酸球から分泌され、線維化を誘導している可能性があり、今後、本モデルにおけるオステオポンチンを測定する必要がある。以上のことから、Yama マウスの DNFB 塗布群で観察された重度の線維化は、TGF- β に非依存的であり、IL-4 が主要な線維化メディエーターであると考えられる。

AD 病変における好酸球の浸潤数は増加していたにもかかわらず、いずれのマウスの DNFB 塗布群においても IL-5 の発現は上昇していなかった。IL-5 は好酸球の活性化因子、走化性因子、および増殖因子であり、早期の AD において炎症反応を引き起こすことが報告されている (Salimi et al., 2013)。本研究では、慢性期の AD を観察しているため、IL-5 の発現が上昇していなかったと推察される。また、Yama マウスにおいては、我々が既に報告しているように、IL-5 に非依存的経路によって末梢血中の好酸球数が増加しているため、本研究における好酸球の反応も IL-5 非依存的に起こっている可能性がある。

Balb/c マウスの DNFB 塗布群において、AD 誘導後に病変への好酸球の浸潤数および血中好酸球数が増加しており、これは通常の AD で認められる反応である。Yama マウスにおいて、末梢血中の好酸球数は DNFB 塗布群および対照群の両方で高値を示しており、DNFB 塗布後には有意差は認められなかったものの減少していた。Yama マウスは元より末梢血中の好酸球数が多いため、AD 病変に好酸球が誘導されやすく、それによる血中好酸球数への影響は小さいと考えられる。これが Yama マウスにおいて末梢血中の好酸球数の変化に有意差が認められなかった理由と考えられる。一方で、Yama マウスの対照群において末梢血中の好酸球数が実験前より実験後に減少したのは、既に我々が報告しているように、Yama マウスは加齢に伴い末梢血中の好酸球数が減少するという特徴が原因と推察される。Nc/nga マウスの DNFB 塗布群では、AD 誘導後に病変への好酸球の浸潤数は増加したが、血中好酸球数が減少した。詳細な原因は不明だが、Nc/nga マウスでは病変への好酸球の浸潤数が骨髓における好酸球の増殖数を上回り、末梢血から失われた好酸球を補充できていない可能性が考えられる。

本研究の結果から、Yama マウスにおいて従来のモデルマウスよりも重度の線維化を伴う AD を誘導できることがわかった。本モデルマウスを用いることで、慢性 AD における線維化メカニズムの解明、および新たな治療薬の開発につながる研究を行うことができる可能性が示唆された。

付図

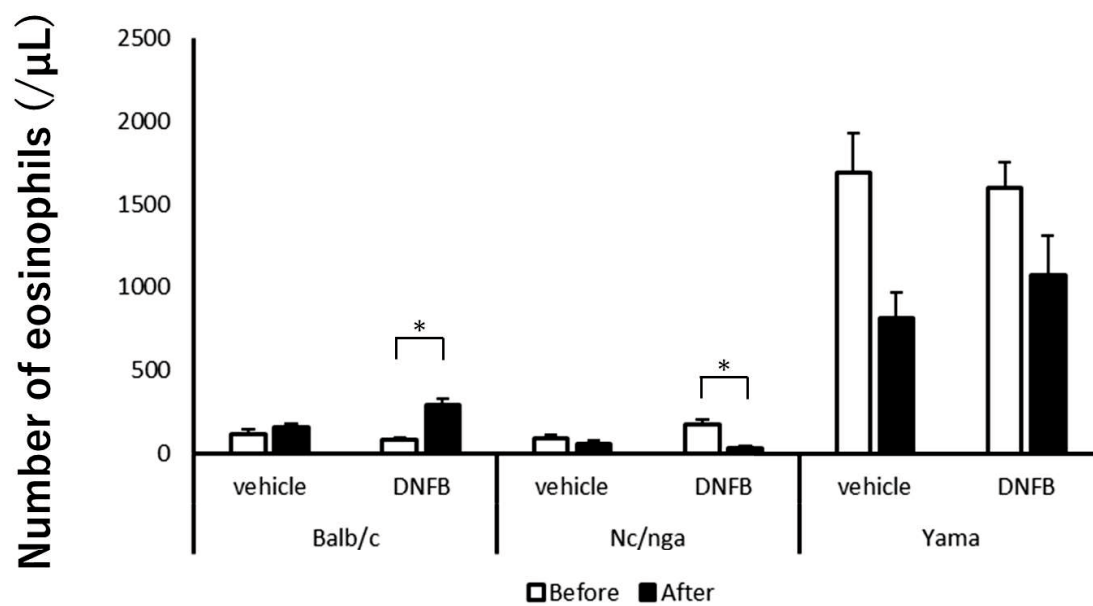


図1 実験前および実験後の末梢血中好酸球数。n=5。データは平均値±SE で示す。

*は $P < 0.05$ 。

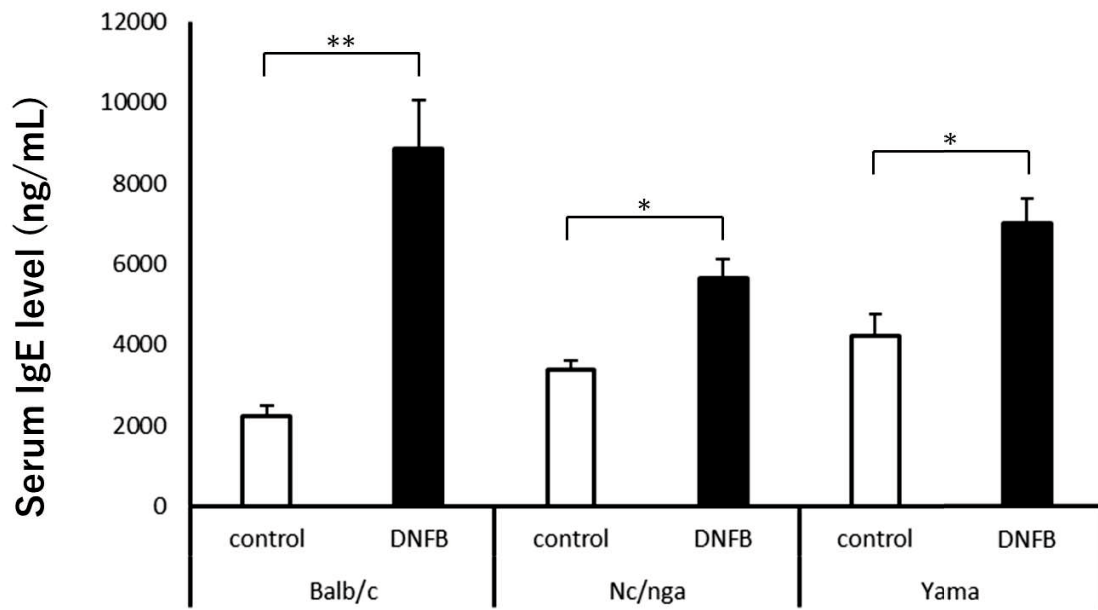


図2 血清 IgE 濃度。n=4-5。データは平均値±SE で示す。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ 。

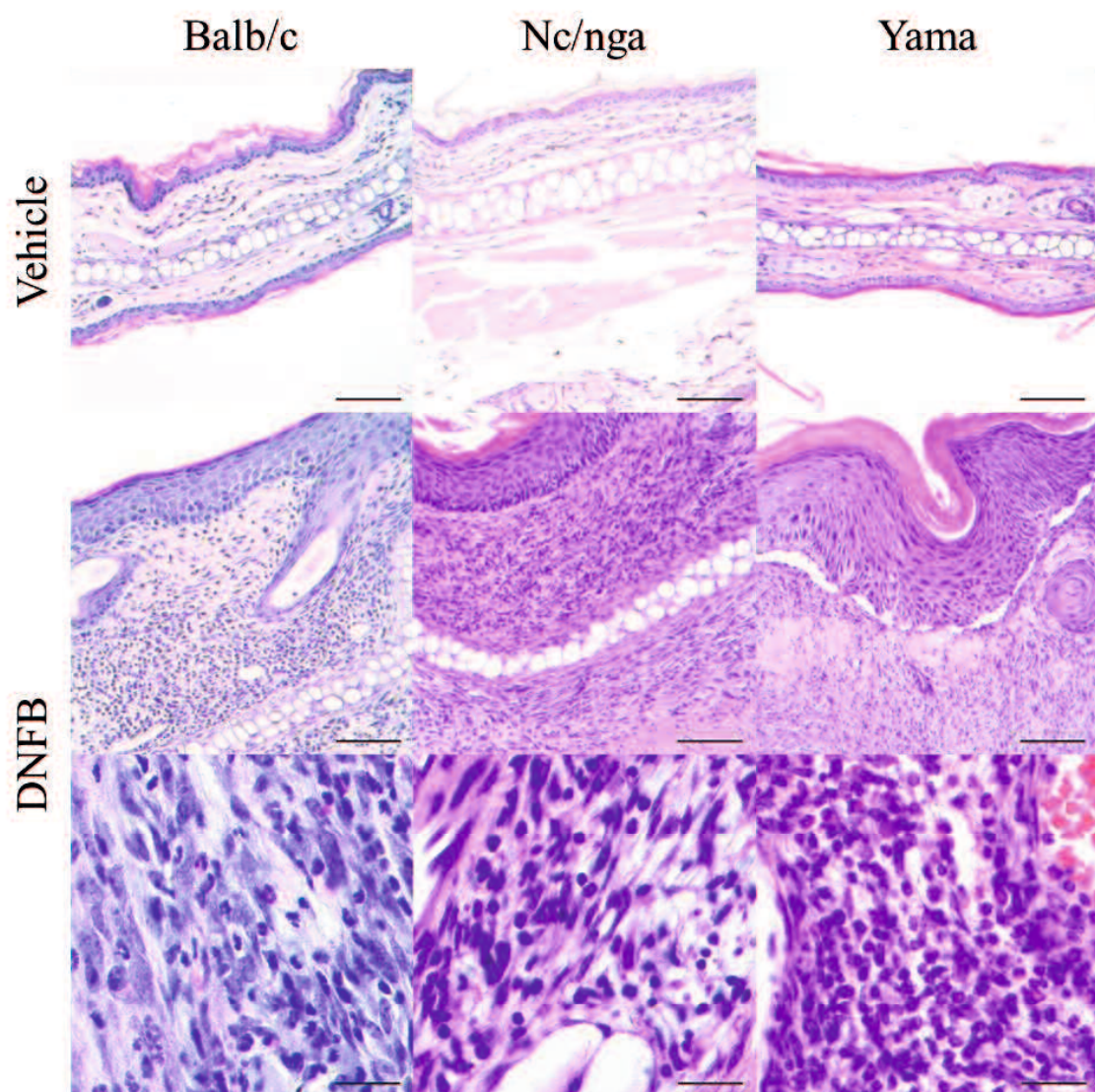


図 3 耳介の HE 染色像。上段は対照群、下段 2 段は DNFB 塗布群の組織像を示す。上段 2 段のバーは 100 μm 、下段のバーは 20 μm 。

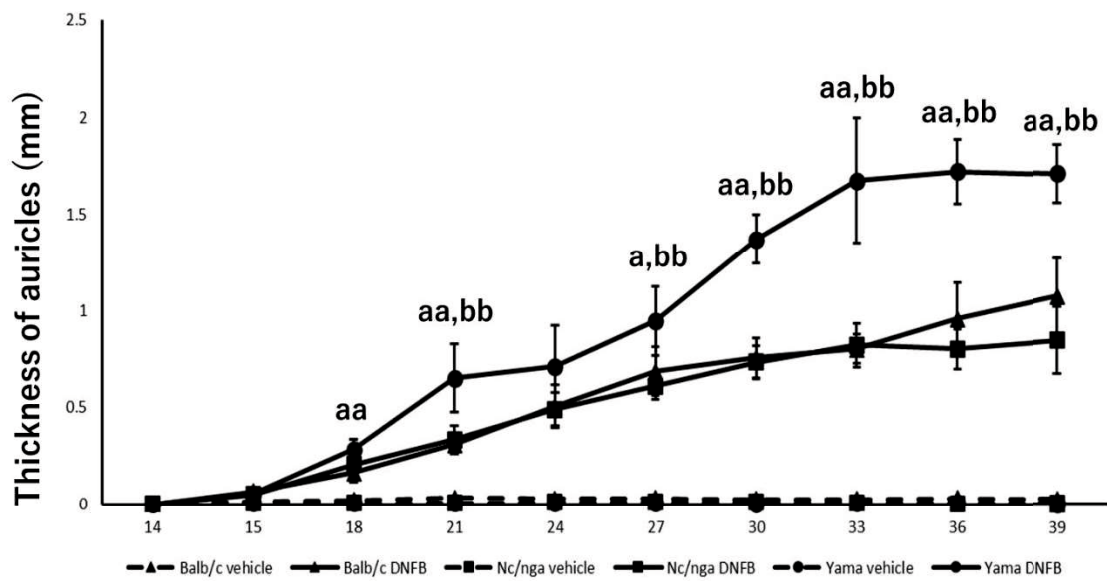


図4 耳介の厚さ。Day14におけるDNFB塗布前と耳介へのDNFB塗布の24時間後に測定し、Day14における耳介の厚さにより標準化した。n=5。データは平均値±SEで示す。
a: Balb/c マウス vs Yama マウス、b: Nc/nga マウス vs Yama マウス、a, b は $P<0.05$ 、
aa, bb は $P<0.01$ 。

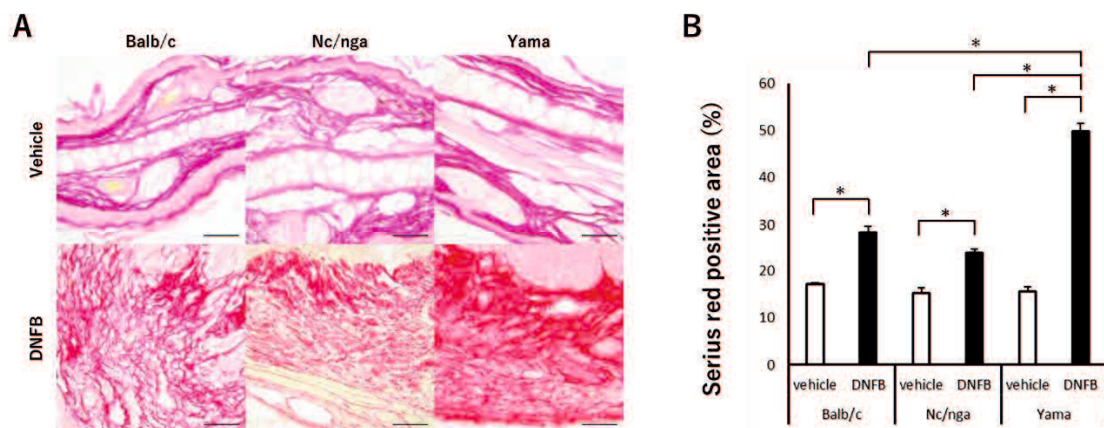


図 5 (A) 耳介におけるシリウス赤染色。バーは 50 μm 。(B) シリウス赤染色陽性面積の割合。n=5。データは平均値 $\pm$ SE で示す。*は $P<0.05$ 。

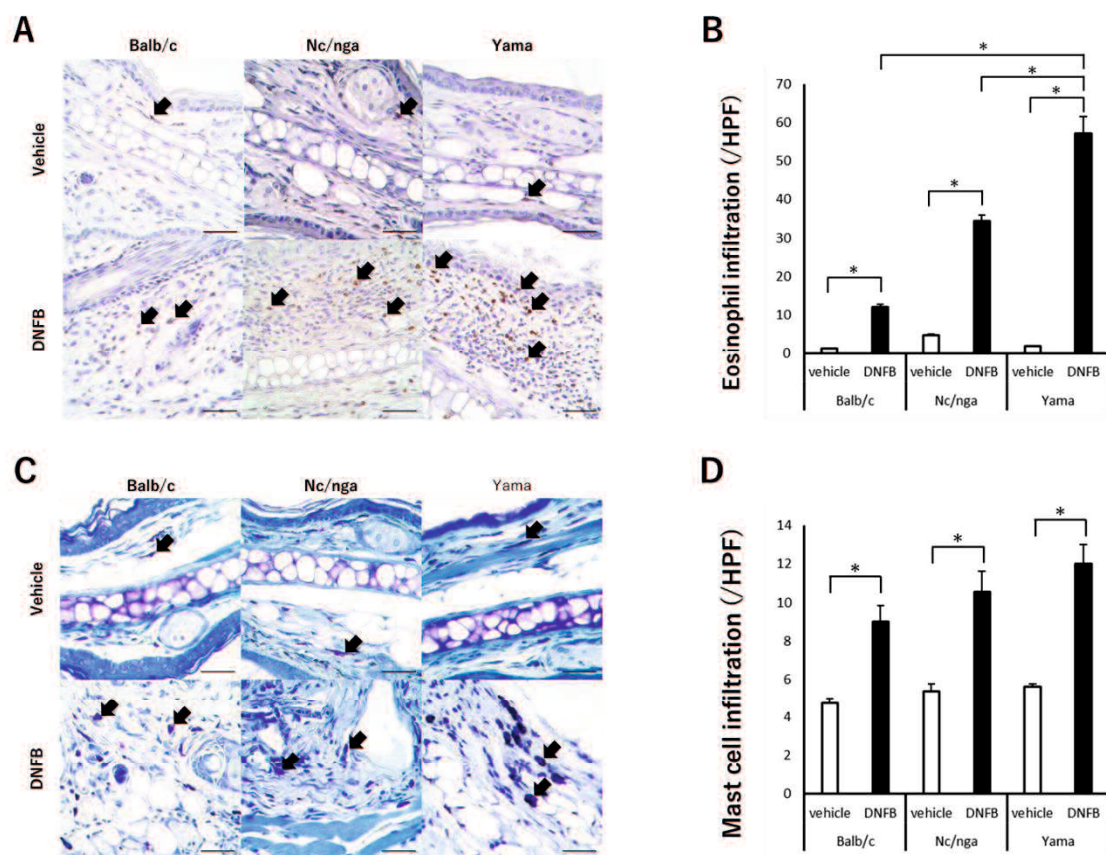


図6 (A) 耳介における抗 ECP 抗体による免疫組織化学。(B) 高倍率 1 視野における ECP 陽性細胞数。n=5。(C) 耳介におけるトリイズンブルー染色。(D) 高倍率 1 視野における 肥満細胞数。n=5。バーは 50 μ m。データは平均値 $\pm$ SE で示す。*は $P<0.05$ 。

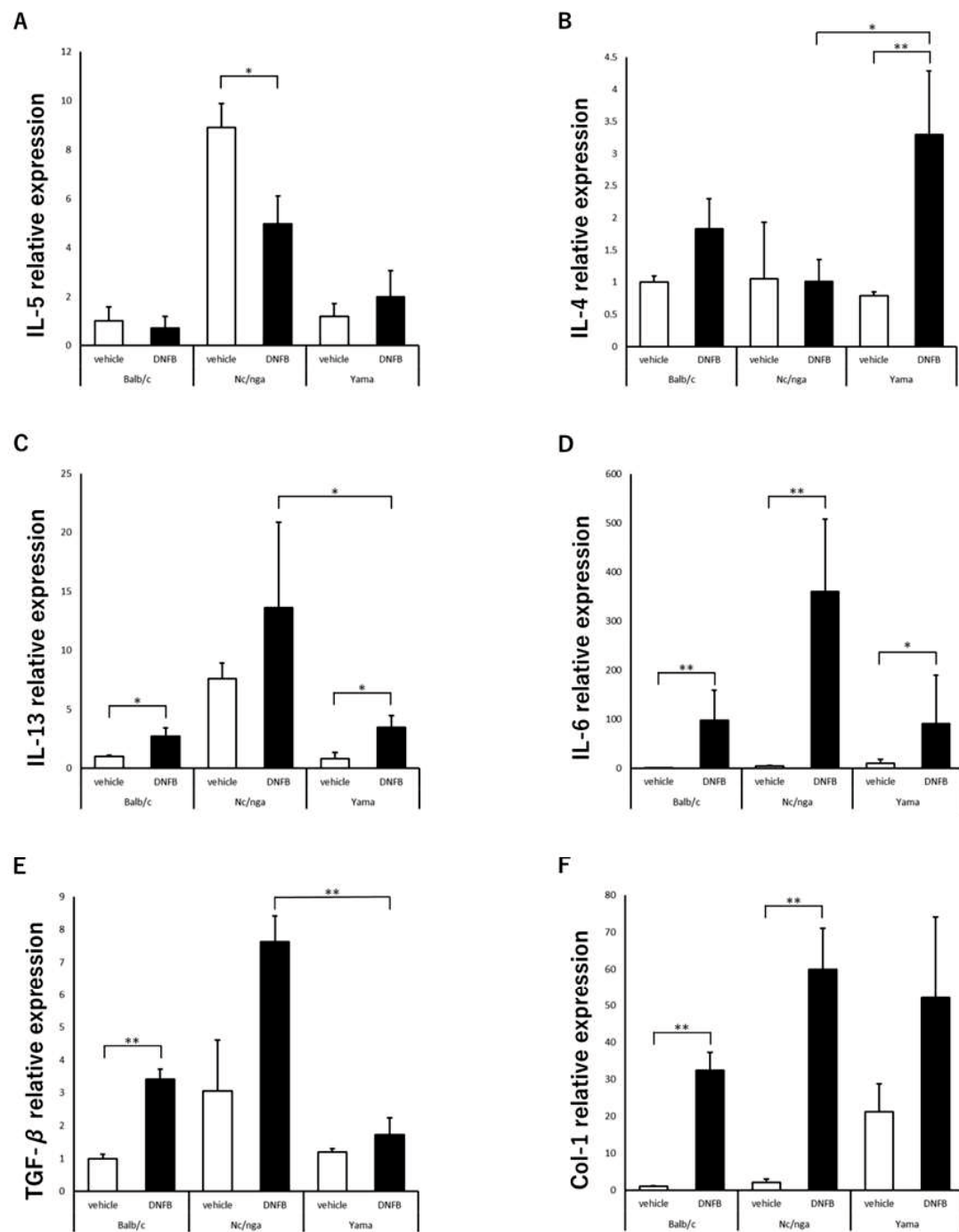


図 7 耳介組織における q PCR 結果。n=5。データは平均値±SE で示す。*は P<0.05、**は P<0.01。

第三章 Yama マウスの慢性腎臓病モデルへの応用

要約

慢性腎臓病（CKD）は様々な腎疾患の末期段階であり、心疾患や脳卒中のリスクを上昇させる。組織学的には、尿細管間質性線維症（TIF）が特徴的であり、CKD の予後の悪さと相関している。既存の薬物誘発性 CKD モデルは、ヒトの CKD と同様に血清尿素窒素(BUN) やクレアチニンの上昇が認められるが、線維化が軽症であるという欠点があった。好酸球は CKD でみられる線維症や様々な疾患において組織の線維化に関与することが報告されている。しかし、CKD における組織線維化に好酸球がどのようなメカニズムによって寄与するのか未だほとんど解明されていない。Yama マウスは遺伝的に好酸球増多症を示す新規近交系マウスである。好酸球が CKD においても線維化に寄与することから、Yama マウスに CKD を誘導することで強い線維化を伴う CKD モデルマウスを確立できると考えた。

本研究では、マウスにアデニンを週3回、4週間、腹腔内投与することにより CKD を誘導した。

Yama マウスは Balb/c マウスよりも重度の線維化および好酸球浸潤を伴う CKD を示した。血清学的検査において、Yama マウスは Balb/c マウスより BUN およびクレアチニン濃度が有意に上昇した。q RT-PCR では、線維化関連サイトカインである形質転換増殖因子 (TGF) - β 、インターロイキン (IL) -4、IL-6 の発現が Yama マウスで増加した。

本研究の結果、Yama マウスは Balb/c マウスより重度の TIF を伴う CKD を誘導できることを示した。Yama マウスの CKD モデルでは、従来の特徴をより重度に示しつつ欠点を克服したモデルマウスが確立された。本モデルマウスを用いることで、CKD における線維化メカニズムの解明、および新たな治療薬の開発につながる研究を行うことができる可能性が示唆された。

緒論

慢性腎臓病（CKD）は様々な腎疾患の末期段階であり、心疾患や脳卒中のリスクを上昇させる（Guo et al. 2022）。CKD は世界の約 10-14%の人が罹患していると考えられており（Huang et al. 2023）、その罹患率の増加が問題視されている（Bai et al. 2023）。CKD の症状として、倦怠感、疼痛、不眠、うつ症状などが挙げられ、多くの場合、患者は複数の症状を同時に経験する（Metzger et al. 2021）。これらの症状は CKD 患者の生活の質を低下させる原因となる。さらに、末期の CKD では尿毒症を引き起こし、尿毒症性脳症やうっ血性心不全、掻痒症などの症状がみられる。これらの症状にもかかわらず、CKD の治療法は限定的であり、疾患の進行を遅延させるだけである（Gu et al. 2023）。組織学的には、CKD の末期における尿細管間質性線維症（TIF）が特徴的であり、CKD の予後の悪さと相関している（Rende et al. 2023）。しかし、CKD の進行メカニズムおよび TIF のメカニズムは未だ不明な点が多い（Bao et al. 2018）。

CKD の研究には、様々なマウスモデルが用いられている。CKD モデルマウスとして、片側尿管閉塞(UUO)モデルやアデニン投与等による薬剤誘発性モデルが一般的である（Liang et al. 2023）。UUO モデルは尿細管を結紮した腎臓に CKD を誘発することができるが、反対側腎臓の代償的な働きなどの影響があり、結果の解釈は慎重に行う必要がある（Liang et al. 2023）。また、外科的手術を必要とするため、技術的な困難もある。薬物誘発性モデルは、CKD が急性腎障害（AKI）の慢性的な損傷から続発するというヒトの CKD に基づいたモデルである。このモデルではヒトの CKD と同様に血清尿素窒素（BUN）やクレアチニンの上昇が認められるが、UUO モデルより線維化が軽症である（Miguel et al. 2021）。これらのマウスモデルは、末期の CKD でみられる TIF の詳細なメカニズムを解明するのに限界がある。

ヒトの CKD において、末梢血中の好酸球の増加は CKD 進行のリスクを高める可能性が報告されている (Kielar et al. 2023; Ren et al. 2024)。また、好酸球は CKD でみられる線維症 (Colon et al. 2019) や様々な疾患において組織の線維化 (Ong et al. 2015; Aceves. 2014) に関与することが報告されている。しかし、CKD における組織線維化に好酸球がどのようなメカニズムによって寄与しているのか未だほとんど解明されていない。

Yama マウスは遺伝的に好酸球増多症を示す新規近交系マウスである。(Yamada et al., in press)。Yama マウスに薬剤誘発性 CKD を誘導することで、強い線維化を伴う CKD が誘導できる可能性があり、好酸球増多症を伴う CKD の研究に適していると考えられる。本研究では、Yama マウスを用いた新たな CKD マウスモデルを確立し、組織学的特徴を報告する。

材料と方法

動物

6 週齢、雄、Balb/c マウス (Clea Japan, Osaka, Japan) および Yama マウス (Yamada et al., in press) を用いた。マウスは人工照明による明暗サイクル (12 : 12 時間の明暗サイクル) 下でエコチップおよびケージを用いて飼育した。飼料 (CE-2 ; Clea Japan) および水 (水道水) は自由摂取とした。本実験計画は、山口大学動物使用委員会が定める規則に従って行った (実験計画書 No.588)。

CKD の誘導

CKD は薬物誘発性 CKD モデルの 1 つであるアデニン投与により誘導した。各マウスをそれぞれアデニン投与群と対照群の 2 群に分けた (n=5/群)。CKD 誘導の実験プロトコールは以前の報告を参考に行った (Horinouchi et al., 2023; Hamano et al., 2018)。アデニン投与群はアデニン硫酸塩 (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を 100 mg/kg の用量で週 3 回、4 週間、腹腔内投与した。対照群には生理食塩水を 20 μ l/g の用量で腹腔内投与した。最後の腹腔内投与の 2 日後に、全てのマウスを 10mg/kg キシラジン (Bayer, Tokyo, Japan) および 80mg/kg ケタミン (Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) の腹腔内投与による深麻酔下で頸椎脱臼により安楽殺を行った。アデニン投与前に全てのマウスの体重を測定した。

血清学的検査

安楽殺時に心採血により採取し、遠心分離 (3000rpm、10 分) 後に上清を血清として採取した。BUN およびクレアチニン濃度を富士ドライケム 3500 s (FUJIFILM Co., Tokyo, Japan) により測定した。

組織学的検索

採材した腎臓は 10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬して固定した後に、定法に従いパラフィン包埋し、厚さ 4 μm のパラフィン切片を作成した。組織学的検索のため、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、シリウス赤染色 (ScyTek Laboratories, Inc., UT, USA) を行った。シリウス赤染色は、画像処理ソフトウェアである ImageJ (National Institutes of Health, <https://imagej.nih.gov/ij>) を用いて陽性面積の割合を算出した。

免疫組織化学

HE 標本と同様に組織切片を作成し、筋線維芽細胞のマーカーである抗 α -smooth muscle actin (SMA) 抗体および好酸球のマーカーである抗 Eosinophilic cationic protein (ECP) 抗体を用いて免疫組織化学を行った。キシレンにてパラフィンを除去後、ECP は 0.1%トリプシン (37°C、30 分間) で抗原賦活を行い、 α -SMA は抗原賦活を行わずに染色を行った。内因性ペルオキシダーゼを 3%過酸化水素水 (室温、10 分間) にて不活化させ、ブロッッキング液 (10%スキムミルク、2%BSA を PBS へ溶解) にてブロッッキング (室温、30 分間) を行った。Rabbit Anti-Mouse ECP IgG (Aviscera Bioscience Inc., Santa Clara, CA, USA) は 400 倍に希釈して、Mouse Anti-Human α -SMA IgG (Dako, Glostrup, Denmark) は希釈せずに切片へ滴下し、4°Cにて一晩静置した。その後 PBS で 3 回洗浄し、ECP は EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako)、 α -SMA は EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouse (Dako) を滴下して室温にて 30 分間静置した。PBS で 3 回洗浄後、DAB Substrate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて発色し、ヘマトキシリンで核染色を行った。ECP 免疫組織化学は、400 倍の倍率にて 5 視野の陽性細胞数を測定し、高倍率 1 視野あたりの陽性細胞数を算出した。 α -SMA 免疫組織化学は、画像処理ソフトウェアである ImageJ (National Institutes of Health, <https://imagej.nih.gov/ij>) を用いて陽性面積の割合を算出した。

RNA 抽出および RT-qPCR

RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilgen, Germany) を用いて、RNeasy® Plus Mini Kit Handbook (Qiagen, 2019) に記載されているプロトコールに従って腎臓から RNA を抽出した。RNA は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて 37°C で 15 分、50°C で 5 分、98°C で 5 分反応させ、逆転写を行った。

インターロイキン (IL) -4、IL-13、IL-6、形質転換増殖因子 (TGF) - β 、Collagen type-1 (Col-1) の発現量の定量化のために、1 μ l の cDNA サンプルを、CFX96 Touch リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) を用いて TaqMan Gene Expression Assays (IL-4:Mm00445259_m1 、 IL-13:Mm00434204_m1 、 IL-6:Mm0046190__m1、TGF- β :Mm01178820_m1、Col-1:Mm00801632_gH、[Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA]) で増幅した。18s rRNA (Mm03928990_g1 [Thermo Fisher Scientific]) をハウスキーピング遺伝子として使用し、各サイトカインの標準化を行った。

統計学的処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (SE) を用いて示した。有意差検定は Kruskal-Wallis test を行った後に Steel-Dwell test を行った。P<0.05 を有意差ありとした。

結果

Yama マウスへの CKD 誘導

Yama マウスではアデニン投与群で対照群と比較して有意な体重減少が認められた(図 1)。Balb/c マウスではアデニン投与群と対照群との間で体重変化にほとんど差は認められなかった(図 1)。また、Yama マウスと Balb/c マウスのアデニン投与群間において、Yama マウスに有意な体重減少がみられた(図 1)。血清 BUN 濃度は、Yama マウスおよび Balb/c マウスはいずれも対照群よりアデニン投与群で有意に上昇した(図 2A)。血清クレアチニン濃度は、Yama マウスは対照群よりアデニン投与群で有意に上昇したが、Balb/c マウスは対照群とアデニン投与群の間に有意差は認められなかった。(図 2B)。Yama マウスのアデニン投与群における血清 BUN およびクレアチニン濃度はいずれも Balb/c マウスのアデニン投与群より約 5 倍に上昇した(図 2A, B)。解剖時における各群の腎臓では、Yama マウスのアデニン投与群のみ腎臓の退色を認めた(図 3A)。

組織学的解析

HE 染色において、Balb/c マウスのアデニン投与群では尿細管間質において軽度の単核細胞の浸潤が認められた(図 3B)。Yama マウスのアデニン投与群では Yama マウスの対照群および Balb/c マウスのアデニン投与群と比較して尿細管間質における好酸球や単核細胞などの炎症細胞の強い浸潤と線維化が認められた(図 3B, C)。さらに、Yama マウスのアデニン投与群では、腎皮質における尿細管の拡張および尿細管拡張に伴う尿細管上皮細胞の扁平化が認められた(図 3C)。シリウス赤染色において、Yama マウスおよび Balb/c マウスのアデニン投与群では対照群と比較して陽性領域が増加した(図 4)。特に、Yama マウスのアデニン投与群では Balb/c マウスのアデニン投与群よりも有意に陽性面積が増加した(図 4)。抗 α -SMA 抗体による免疫組織化学において、Yama マウスのアデニン投与群は対照群

より有意に陽性面積が増加した (図 5)。さらに、Yama マウスのアデニン投与群は Balb/c マウスのアデニン投与群よりも有意に α -SMA 陽性面積が増加した (図 5)。抗 ECP 抗体による免疫組織化学において、Yama マウスのアデニン投与群は対照群より有意に好酸球数が増加した (図 6)。アデニン投与群間では、Balb/c マウスより Yama マウスで有意に好酸球数が増加した (図 6)。

サイトカイン発現解析

図 7 に腎臓組織における IL-4、IL-13、IL-6、TGF- β 、および Col-1 の mRNA 発現レベルを示す。Yama マウスにおいて、アデニン投与群は対照群より IL-4 の発現が有意に増加した (図 7A)。Balb/c マウスでは、アデニン投与群と対照群との間に IL-4 の発現レベルに有意差は認められなかった (図 7A)。Yama マウスのアデニン投与群と Balb/c マウスのアデニン投与群との間に IL-4 の発現レベルに有意差は認められなかった (図 7A)。IL-13 の発現は Yama マウスおよび Balb/c マウスのいずれもアデニン投与群と対照群との間に有意差は認められなかった (図 7B)。Yama マウスのアデニン投与群と Balb/c マウスのアデニン投与群との間に IL-13 の発現レベルに有意差は認められなかった (図 7B)。Yama マウスのアデニン投与群では、Yama マウスの対照群および Balb/c マウスのアデニン投与群より有意な IL-6 発現の増加が認められた (図 7C)。Balb/c マウスにおいて、アデニン投与群と対照群との間に IL-6 の発現に有意差は認められなかった (図 7C)。Yama マウスにおいて、アデニン投与群は対照群より TGF- β の発現が有意に増加した (図 7D)。Balb/c マウスでは、アデニン投与群と対照群との間に TGF- β の発現レベルに有意差は認められなかった (図 7D)。Yama マウスのアデニン投与群と Balb/c マウスのアデニン投与群との間に TGF- β の発現レベルに有意差は認められなかったが、Yama マウスのアデニン投与群は Balb/c マウスのアデニン投与群より増加した (図 7D)。Yama マウスのアデニン投与群では、Yama マウスの対照群および Balb/c マウスのアデニン投与群より有意な Col-1 発現の増加が認め

られた (図 7E)。Balb/c マウスにおいて、アデニン投与群と対照群との間に Col-1 の発現に有意差は認められなかった (図 7E)。

考察

本研究では、Yama マウスを用いて重度の TIF を示す新たな CKD モデルマウスを確立した。既存の薬物誘発性 CKD モデルは、ヒトの CKD と同様に BUN やクレアチニンの上昇が認められるが、線維化が軽症であるという欠点があった (Miguel et al. 2021)。Yama マウスは既存のモデルマウスである Balb/c マウスと比較して血清中の BUN およびクレアチニンの上昇を示しており、Balb/c マウスより重度の CKD が誘導されたことを示す。さらに、Yama マウスは薬物誘導性 CKD モデルの欠点とされていた線維化が重度に誘導された。したがって、Yama マウスの CKD モデルでは、従来の特徴をより重度に示しつつ欠点を克服したモデルマウスが確立された。これは、従来のモデルマウスと比較してヒトの病態により近いことを示唆する。

尿細管拡張は急性尿細管損傷で認められる特徴であり、持続的な尿細管損傷は TIF を発症し CKD へ移行する (Pieters et al., 2019)。HE 染色において、Yama マウスでは重度の尿細管拡張が認められたのに対して、Balb/c マウスではほとんど認められなかった。薬物誘導性 CKD モデルが急性腎障害 (AKI) の慢性的な損傷から続発するというヒトの CKD に基づいたモデルであることから (Liang et al., 2023)、Yama マウスは Balb/c マウスより重度の AKI が誘導された結果、CKD が重度に誘導されたと考えられる。Yama マウスのアデニン投与群では、Balb/c マウスのアデニン投与群と比較して、シリウス赤染色において重度の線維化が認められ、筋線維芽細胞が陽性を示す抗 α -SMA 抗体による免疫組織化学において陽性面積の有意な増加が認められた。これは、線維芽細胞が活性化して筋線維芽細胞へと分化し、膠原線維の産生が亢進していることを示す。さらに、抗 ECP 抗体による免疫組織化学において、Yama マウスは Balb/c マウスのアデニン投与群よりも浸潤好酸球数が有意に増加した。組織学的検索結果から、Yama マウスにおいて重度の線維化が観察されたのは、CKD の線維化に好酸球が寄与している可能性を示している。

組織の線維化に重要な因子として TGF- β が知られている。TGF- β は線維芽細胞の活性化や膠原線維合成の促進、上皮間葉転換の促進などの作用により組織の線維化を促進する (Meng et al., 2016)。本研究では、TGF- β の発現は Yama マウスのアデニン投与群において Yama マウスの対照群より有意に増加し、Balb/c マウスのアデニン投与群より有意差は認められなかったものの増加傾向を示した ($p=0.194$)。TGF- β は損傷した尿細管上皮細胞が分泌することが報告されている (Huang et al., 2023)。本研究において Yama マウスのアデニン投与群では尿細管拡張など重度の尿細管損傷が観察され、その結果尿細管上皮細胞からの TGF- β 発現が増加したと考えられる。TGF- β 以外の組織線維化メディエーターとして、Th2 サイトカインである IL-4、IL-13 が報告されている。IL-4 と IL-13 は多くの生物学的機能を共有しており、TGF- β とは無関係に IL-4R α /Stat6 シグナル経路を介して筋線維芽細胞を活性化することが知られている (Hinz, 2016)。本研究では、IL-4 の発現は Yama マウスのアデニン投与群において、Yama マウスの対照群より有意に増加し、Balb/c マウスのアデニン投与群より有意差は認められなかったものの増加傾向を示した ($p=0.194$)。一方で、IL-13 発現レベルは、Yama マウスのアデニン投与群において増加したが、Yama マウスの対照群や Balb/c マウスのアデニン投与群との間に有意な差は認められなかった。CKD において、IL-4 は STAT6 を活性化させることで線維化を誘導することが知られており (Yan et al., 2015)、IL-4 欠損マウスでは腎線維症が改善したという報告がある (Braga et al., 2012)。好酸球が IL-4 を分泌すること (Kolbinger et al., 2023; Xu et al., 2022)、および本研究において Yama マウスの CKD において顕著な好酸球浸潤が認められたことから、好酸球の分泌する IL-4 が線維化に重要な役割を果たす可能性が示唆される。その他の線維化メディエーターとして、IL-6 が報告されている。IL-6 は炎症誘発性サイトカインのひとつであり、組織に線維化を誘導する因子と考えられている (Wynn et al., 2012)。Yama マウスのアデニン投与群において、IL-6 の発現は Yama マウスの対照群および Balb/c マウスのアデニン投与群より有意な増加が認められた。IL-6 は CKD において炎症反応を増強し (Liao

et al., 2020)、膠原線維の産生を促進する線維化促進メディエーターとして機能することが知られており (Liu et al., 2017)、CKD においても線維化を悪化させることが報告されている (Akchurin et al., 2018)。本研究においても、IL-6 は Yama マウスの CKD における強い炎症反応に寄与し、これにより重度の線維化が誘導されたと考えられる。Yama マウスのアデニン投与群において、Col-1 の発現は Yama マウスの対照群および Balb/c マウスのアデニン投与群より有意な増加を示した。CKD において、TGF- β 、IL-4 および IL-6 は Col-1 の発現を増加させることが報告されている (Wang et al., 2024; Yan et al., 2015; Liu et al., 2024)。つまり、Yama マウスの CKD において重度の線維化が認められたのは、TGF- β 、IL-4 および IL-6 の発現が増強されたことに起因すると考えられる。特に、IL-4 と TGF- β は病変部への好酸球の遊走や活性化を促進し (Nakagome et al., 2024; Zhu et al., 2024)、好酸球が IL-4 や TGF- β を産生するという報告もあり (Kolbinger et al., 2023; Xu et al., 2022; Lee et al., 2017)、本研究では、Yama マウスの CKD において、IL-6 は重度の炎症反応を誘導し、顕著に浸潤した好酸球が IL-4 や TGF- β を産生し、線維化を促進したと考えられる。今後、CKD におけるこれらのサイトカインと好酸球との関係を詳細に検討する必要がある。また、ヒトのアレルギー性疾患において、好酸球が産生するオステオポンチンが線維化を直接促進することが報告されている (Puxeddu et al., 2010)。本研究においても、オステオポンチンが好酸球から分泌され、線維化を誘導している可能性がある。さらに、オステオポンチンは CKD の発症と進行に重要であり、特に炎症と線維化に関与するといわれている (Sinha et al., 2023)。CKD におけるオステオポンチンは損傷を受けた尿細管上皮細胞に高発現すると報告されている (Stubbs et al., 2022)。今回、Yama マウスのアデニン投与群では尿細管拡張などの尿細管損傷が重度に認められたことから、尿細管上皮由来のオステオポンチンが Yama マウスの CKD における線維化に役割を果たしている可能性もある。今後、Yama マウスの CKD においてオステオポンチンが発現しているのか検討するとともに、オステオポンチンの産生細胞の解明も必要である。

本研究の結果から、Yama マウスにおいて従来のモデルマウスよりも重度の線維化を伴う CKD を誘導できることがわかった。本モデルマウスを用いることで、CKD における線維化メカニズムの解明、および新たな治療薬の開発につながる研究を行うことができる可能性が示唆された。さらに、末梢血中の好酸球の増加は CKD の進行リスクを高める可能性が近年報告されているが (Han et al., 2024; Ren et al., 2024; Kielar et al., 2023)、その詳細なメカニズムは不明である。Yama マウスは自然発生で好酸球増多症を示すため、本モデルマウスは CKD における好酸球増多症の関与を研究するのに有用である。

付図

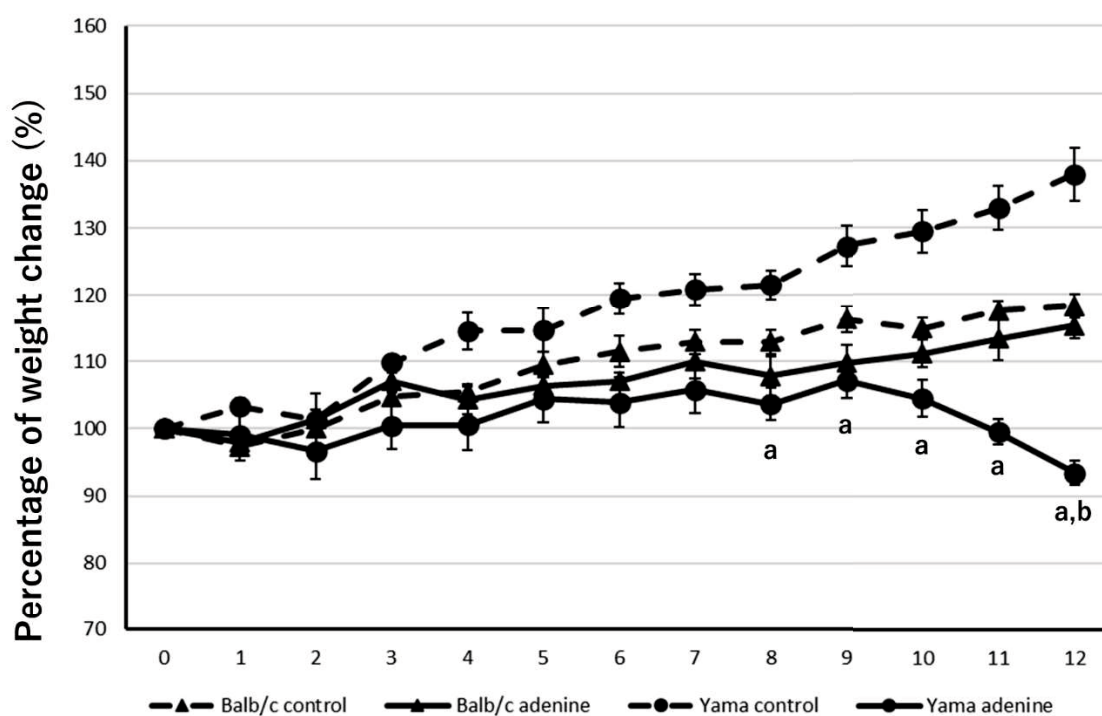


図1 体重変化。各群において、実験前の体重を100%としたときの相対値の平均を示している。n=5-6。データは平均値±SEで示す。a: Yamaマウスの対照群 vs Yamaマウスのアデニン投与群、b: Balb/cマウスのアデニン投与群 vs Yamaマウスのアデニン投与群、a, bは $P < 0.05$ 。

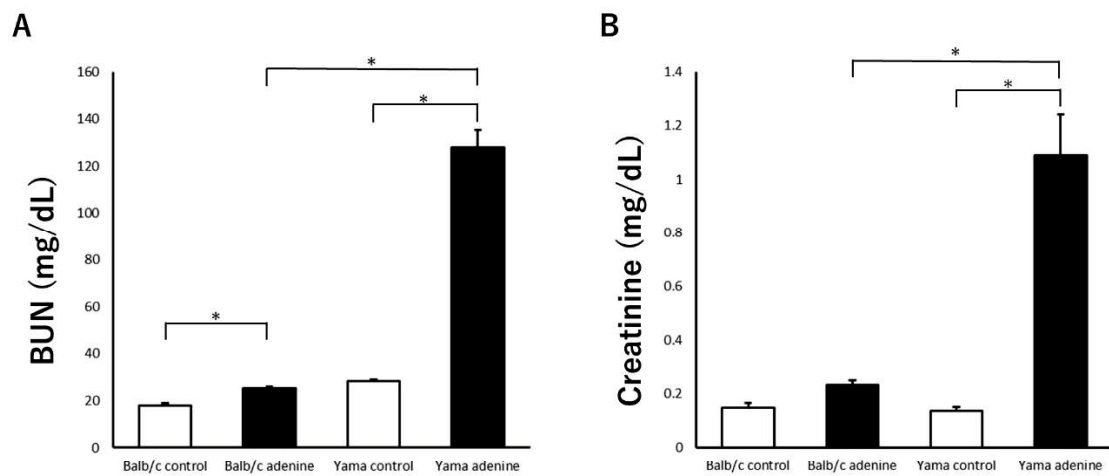


図2 血清BUN濃度（A）およびクレアチニン濃度（B）。n=5-6。データは平均値±SEで示す。*はP<0.05。

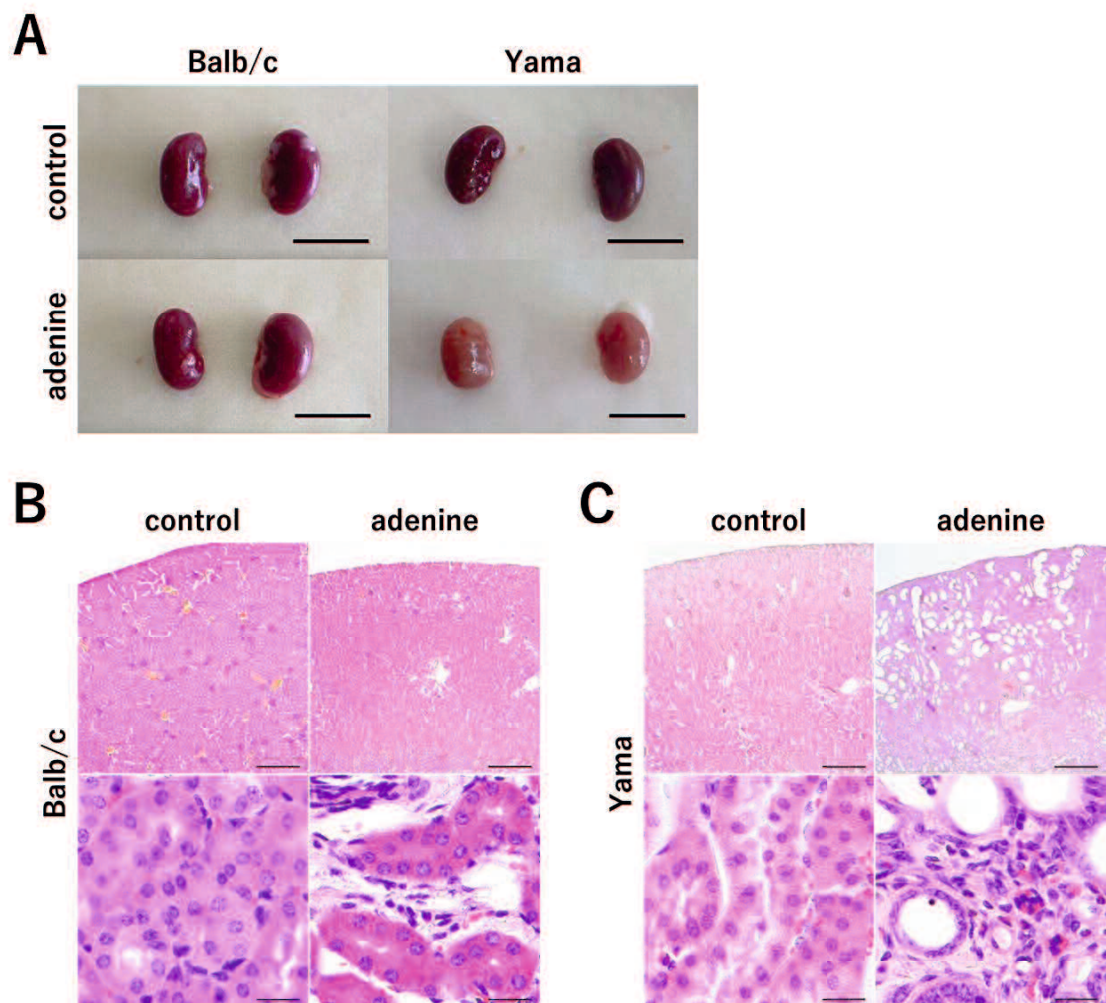


図3 (A) 各群における腎臓の肉眼写真。バーは1 cm。(B) Balb/c マウスおよび (C) Yama マウスにおける腎臓の HE 染色。上段のバーは 500 μm 、下段のバーは 20 μm 。

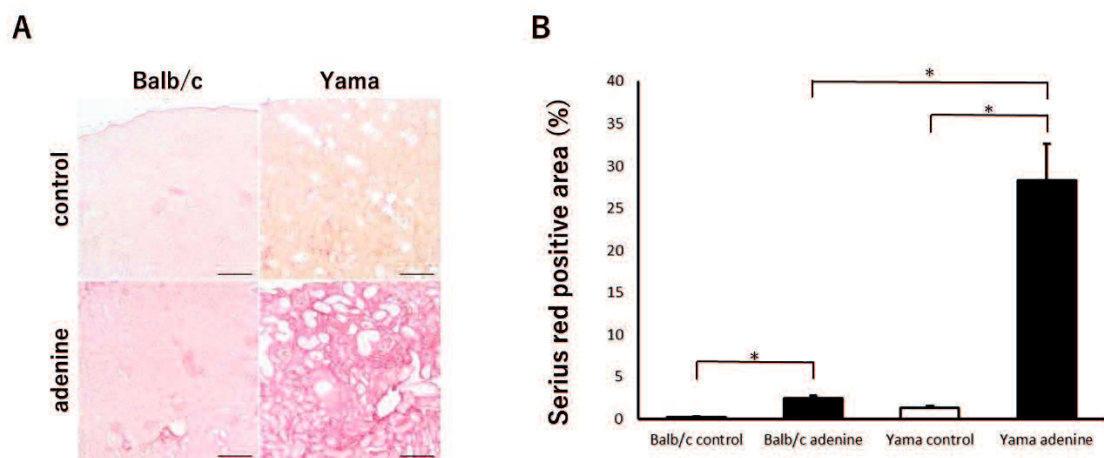


図4 (A) Balb/c マウスおよび Yama マウスにおける腎臓のシリウス赤染色。バーは 200 μm 。(B) シリウス赤染色陽性面積の割合。n=5-6。データは平均値 $\pm$ SE で示す。*は $P<0.05$ 。

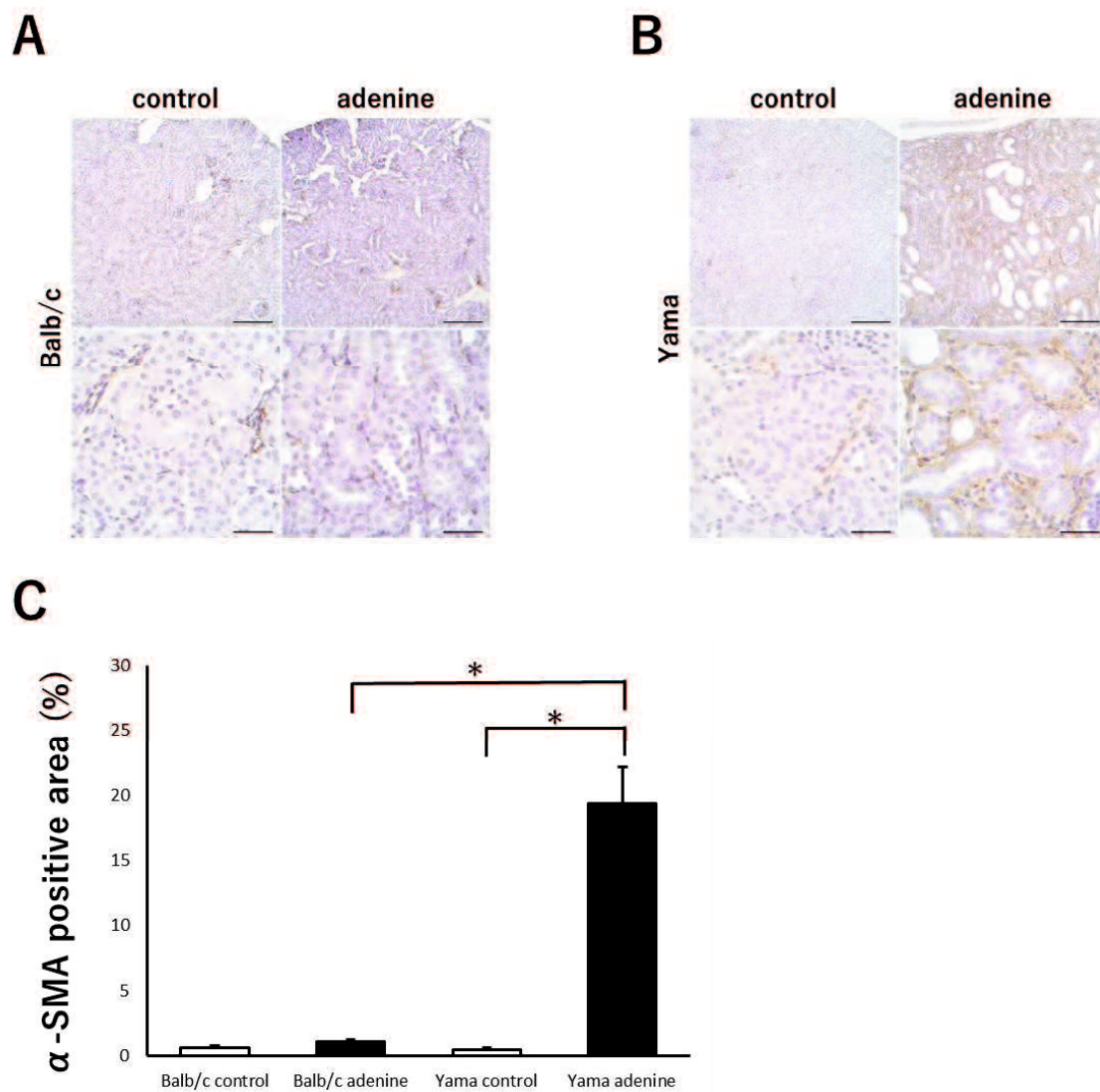


図 5 (A) Balb/c マウスおよび (B) Yama マウスの腎臓における抗 α -SMA 抗体による免疫組織化学。上段のバーは 200 μm 、下段のバーは 50 μm 。(B) α -SMA 陽性面積の割合。n=5-6。データは平均値 $\pm$ SE で示す。*は $P < 0.05$ 。

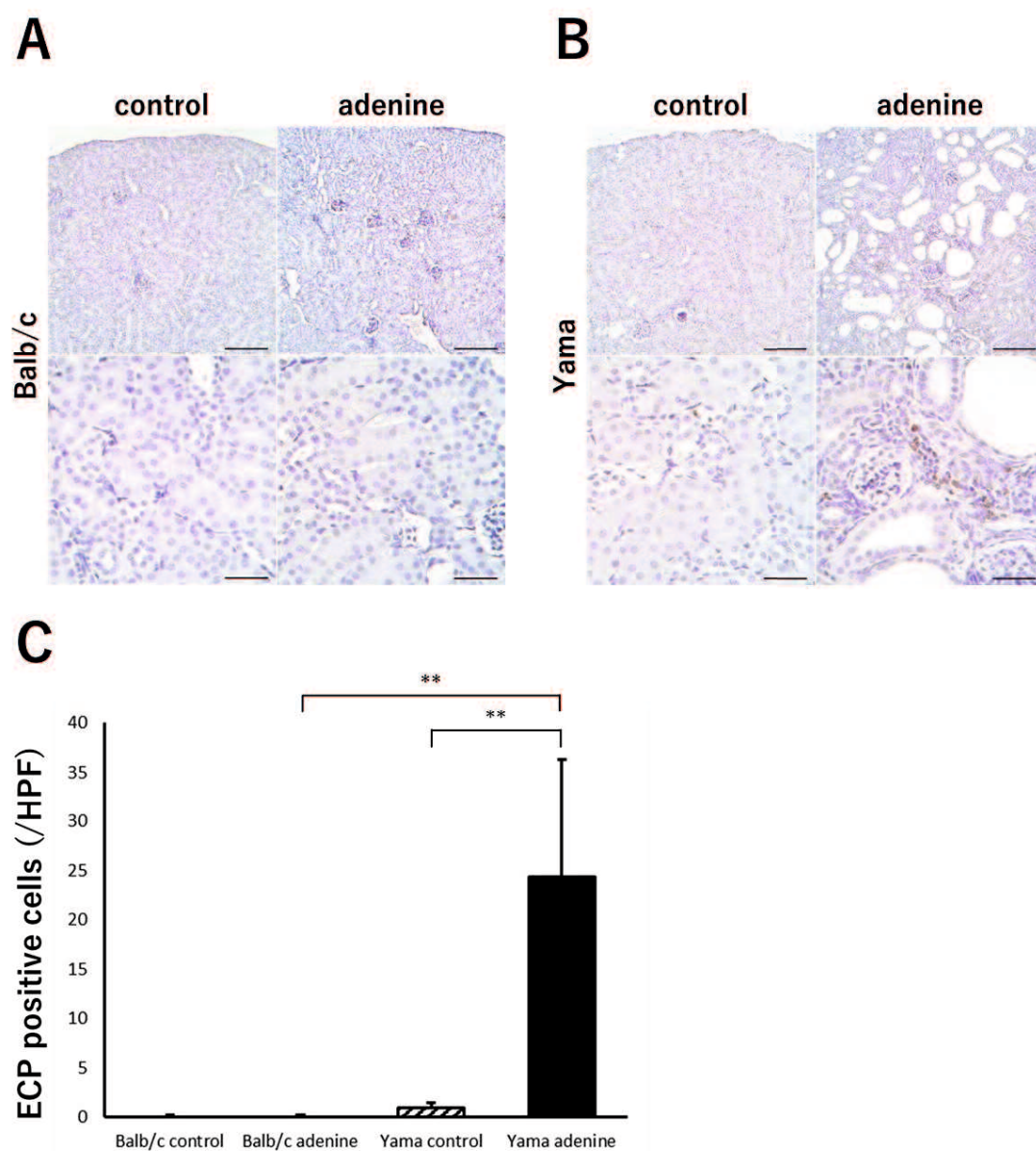


図 6 (A) Balb/c マウスおよび (B) Yama マウスの腎臓における抗 ECP 抗体による免疫組織化学。上段のバーは 200 μm 、下段のバーは 50 μm 。(B) ECP 陽性細胞数。n=5-6。データは平均値 $\pm$ SE で示す。*は $P<0.05$ 。

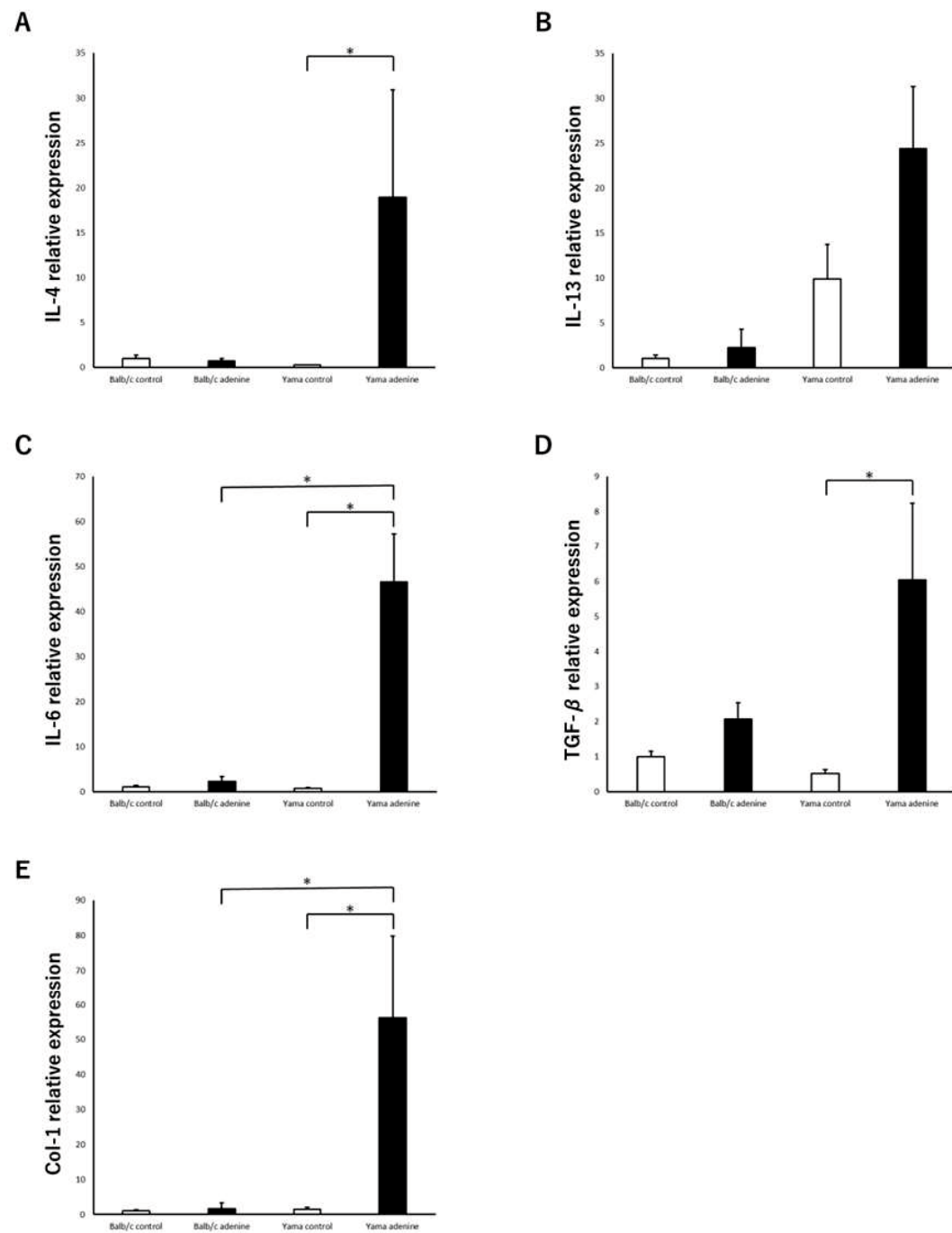


図7 腎臓組織における q PCR 結果。n=5。データは平均値±SE で示す。*は P<0.05。

総括

本論文では、好酸球増多症を示す新規突然変異マウス“Yama マウス”の確立とアレルギー性皮膚炎（AD）および慢性腎臓病（CKD）モデルへの応用の有用性を示した。

第一章では、偶発的に発見された末梢血中の好酸球数が多いマウスから好酸球増多症を示す新規突然変異マウス“Yama マウス”を確立した。Yama マウスは末梢血中の好酸球数が顕著に増加しているにも関わらず、好酸球の増殖や活性化因子として唯一報告されているインターロイキン（IL）-5 の発現上昇は認められなかった。現在、末梢血中の好酸球が増加するモデルマウスとしては蠕虫感染モデル（Kusama et al., 1995）やアレルギー性疾患モデル（McMillan et al., 2014）、IL-5 トランスジェニックマウスモデル（Masterson et al., 2014）などがあるが、いずれのモデルマウスも IL-5 発現の増加により好酸球増多症を示し（Kusama et al., 1995; McMillan et al., 2014; Masterson et al., 2014）、Yama マウスは IL-5 の発現上昇を伴わずに好酸球増多症を示す初めてのモデルマウスである。また、Yama マウスは、全身諸臓器に明らかな病変が認められておらず、遺伝的に好酸球増多症を示すことから、何らかの遺伝子変異によって好酸球が増加していると考えられる。Yama マウスの末梢血中の好酸球が増加している原因として 3 つの可能性が挙げられたが、加齢により末梢血中の好酸球数が減少していることから、好酸球の増殖を調整している抑制分子の遺伝子が変異したことで好酸球が増加した可能性が示唆された。つまり、抑制因子が機能不全に陥って好酸球が増加したが、加齢とともに他の抑制因子が代償的に働くことで好酸球の増加が抑制されたと考えられる。ヘルパーT1（Th1）型免疫応答において抑制因子が複数存在していることから（Li et al., 2015; Parry et al., 2005）、好酸球が関与するヘルパーT2（Th2）型免疫応答においても複数の抑制因子が存在している可能性は十分に高いと考えられ、本因子は Th2 型免疫応答の免疫チェックポイント分子である可能性が考えられる。Th1 型免疫応答の免疫チェックポイント分子である PD-1/PDL-1 が腫瘍などの治療標的分子と

して研究されているように、本分子もさまざまな疾患、特にアレルギー性疾患などの Th2 型免疫応答が関与する疾患の治療標的分子となり得る。今後、Yama マウスで示される好酸球増多の原因遺伝子を解明する必要がある、これにより新たな好酸球の増殖メカニズムの発見と、Th2 型免疫応答の新たな伝達経路が発見される可能性がある。

Yama マウスは全身諸臓器に明らかな変化を伴わずに末梢血中の好酸球数が多いことから、好酸球が関与する疾患を誘導しやすく、その病態の観察が容易であると考えられた。第二章では、Yama マウスにジニトロフルオロベンゼンを塗布することにより AD を誘導した。Yama マウスでは従来のモデルマウスと比較して、好酸球の浸潤が強くみられ、高度な線維化も認められたことから、好酸球が線維化に寄与することが示唆された。線維化や好酸球に関与するサイトカイン発現の分析において、Yama マウスに誘導された線維化は、従来のモデルマウスで重要な線維化因子である形質転換増殖因子 (TGF) - β に非依存적であり、IL-4 が重要な線維化メディエーターであることが示唆された。本モデルを用いることで、慢性化した AD における線維化メカニズムの解明、および新たな治療薬の開発につながる研究を行うことができる可能性が示唆された。

第二章の AD モデルにおいて、強い線維化が認められたことから Yama マウスを用いた疾患モデルでは線維化が誘導されやすいと示唆されたため、慢性疾患のモデルマウスとして Yama マウスが有用である可能性が考えられた。第三章では、Yama マウスにアデニンを投与することにより CKD を誘導した。既存の薬物誘導性 CKD モデルは、ヒトの CKD と同様に血清尿素窒素 (BUN) やクレアチニンの上昇を示すが線維化が軽症であるという欠点があったが (Miguei et al., 2021)、Yama マウスでは Balb/c マウスより BUN とクレアチニンが上昇し、高度な線維化も認められた。つまり、Yama マウスを用いた CKD モデルは従来の特徴をより重度に示しつつ欠点を克服したモデルマウスであり、ヒトの病態により近いことが示唆された。さらに、Yama マウスでは、尿細管間質への好酸球の浸潤が Balb/c マウスより強くみられたことから、CKD における線維化にも好酸球が関与していることが

示唆された。線維化や好酸球に関与するサイトカイン発現の分析において、Yama マウスでは TGF- β 、IL-4 および IL-6 の発現上昇が認められた。今後、これらサイトカインと好酸球との関係を詳細に検討する必要がある。また、ヒトの CKD では好酸球が予後不良に関与するという報告があるが (Kielar et al. 2023)、CKD マウスモデルを使用した過去の研究では好酸球に言及した報告はほとんどない。したがって、Yama マウスの CKD モデルを用いる事により CKD における好酸球の役割に関する研究を推進することが可能であり、CKD における線維化メカニズムの解明に関する研究ができることが示唆された。

第二章および第三章から、Yama マウスを用いた疾患モデルでは顕著な好酸球の浸潤と高度な線維化が共通して認められた。しかし、線維化に関与するサイトカインの発現は AD モデルにおいては IL-4 が線維化に重要であり CKD モデルにおいては TGF- β および IL-4 が線維化に重要であると示唆され、疾患により異なる結果となった。TGF- β および IL-4 は病変部への好酸球の遊走や活性化を促進するほか (Nakagome et al., 2024; Zhu et al., 2024)、好酸球が TGF- β および IL-4 を産生するという報告もある (Kolbinger et al., 2023; LeSuer et al., 2023; Xu et al., 2022; Lee et al., 2017)。したがって、疾患における線維化には好酸球が大きく寄与している可能性があるが、そのメカニズムは疾患により異なる可能性が示唆された。さらに、好酸球に関連する組織線維化因子として、オステオポンチンや好酸球ペルオキシダーゼ (EPX) が挙げられる (Sinha et al., 2023; Colon et al., 2019; Puxeddu et al., 2010)。オステオポンチンは、ヒトのアレルギー性疾患において好酸球が産生し線維化を直接促進することが報告されているが (Puxeddu et al., 2010)、CKD においては尿細管上皮細胞に高発現し線維化に関与するといわれている (Sinha et al., 2023; Stubbs et al., 2022)。EPX は好酸球に含まれる特殊顆粒の一種であり、腎線維化を促進することが報告されている (Colon et al., 2019)。本研究で作製した疾患モデルに対して、上記に挙げた因子を含めた線維化関連因子を好酸球が産生しているのか確認し、疾患ごとに詳細な検討を行う必要

がある。今後、作製した疾患モデルにおける好酸球の役割をさらに詳細に研究することで、好酸球の働きを幅広く研究できる可能性がある。

本研究により、IL-5 の発現上昇を伴わずに遺伝的好酸球増多症を示す新たな近交系マウスが確立され、本マウスはさまざまな疾患モデルマウスとして有用であることが示された。本研究の成果が、好酸球を代表とする Th2 型免疫応答のメカニズムあるいは Th2 型免疫応答が関与する疾患の病態を解明するための端緒となることを望んでいる。

引用文献

Aceves SS. 2014. Remodeling and fibrosis in chronic eosinophil inflammation. *Dig Dis*. **32**(0): 15-21.

Akchurin O, Patino E, Dalal V, Meza K, Bhatia D, Brovender Z, Zhu YS, Cunningham-Rundles S, Perelstein E, Kumar J, Rivella S, Choi ME. 2018. Interleukin-6 contributes to the development of anemia in juvenile CKD. *Kidney Int Rep*. **4**(3): 470-483.

Anibal FF, Rogerio AP, Malheiro A, Machado ER, Martins-Filho OA, Andrade MC, Soares EG, Medeiros AI, Faccioli LH. 2007. Impact of MK886 on eosinophil count and phenotypic features in Toxocariasis. *Scand J Immunol*. **65**(4): 344-352.

Aspord C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, Marches F, Banchereau J, Palucka AK. 2007. Breast Cancer Instructs Dendritic Cells to Prime Interleukin 13-Secreting CD4+ T Cells That Facilitate Tumor Development. *J Exp Med*. **204**(5): 1037-47.

Avena-woods C. 2017. Overview of atopic dermatitis. *Am J Manag Care*. **23**(8 Suppl): S115-S123.

Bai M, Wu M, Jiang M, He J, Deng X, Xu S, Fan J, Miao M, Wang T, Li Y, Yu X, Wang L, Zhang Y, Huang S, Yang L, Jia Z, Zhang A. 2023. LONP1 targets HMGCS2 to protect mitochondrial function and attenuate chronic kidney disease. *EMBO Mol Med*. **15**(2): e16581.

Bao YW, Yuan Y, Chen JH, Lin WQ. 2018. Kidney disease models: tools of identify mechanisms and potential therapeutic targets. *Zool Res.* **39**(2): 72-86.

Berke R, Singh A, Guralnick M. 2012. Atopic dermatitis: an overview. *Am Fam Physician.* **86**(1): 35-42.

Berroth A, Kuhn J, Kurschat N, Schwarz A, Stab F, Schwarz T, Wenck H, Folster-Holst R, Neufang G. 2013. Role of fibroblasts in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* **131**(6): 1547-1554.

Braga TT, Correa-Costa M, Guise YF, Castoldi A, de Oliveira CD, Hyane MI, Cenedeze MA, Teixeira SA, Muscara MN, Perez KR, Cuccovia IM, Pacheco-Silva A, Goncalves GM, Camara NO. 2012. MyD88 signaling pathway is involved in renal fibrosis by favoring TH2 immune response and activating alternative M2 macrophages. *Mol Med.* **18**(1): 1231-1239.

Broide DH. 2008. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* **121**(3): 560-570.

Chen W, Yuen H, Cao W, Wang T, Chen W, Yu H, Hu Y, Jiang B, Zhou H, Guo H, Zhao X. 2019. Blocking interleukin-6 trans-signaling protects against renal fibrosis by suppressing STAT3 activation. *Theranostics.* **9**(14): 3980-3991.

Colon S, Luan H, Liu Y, Meyer C, Gewin L, Bhavane G. 2019. Oeroxidasin and eosinophil

peroxidase, but not myeloperoxidase, contribute to renal fibrosis in the murine unilateral ureteral obstruction model. *Am J Physiol Renal Physiol.* **316**(2): F360-F371.

Cui T, Kusunose M, Hamada A, Ono M, Miyamura M, Yoshioka S, Kyotani S, Nishioka Y. 2003. Relationship between the eosinophilia of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the severity of pulmonary fibrosis induced by bleomycin in rats. *Biol Pharm Bull.* **26**(7): 959-963.

Farzaneh P, Hassan ZM, Pourpak Z, Hoseini AZ, Hogan SP. 2006. A latex-induced allergic airway inflammation model in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **99**(6): 405-411.

Fettelet T, Gigon L, Karaulov A, Yousefi S, Simon HU. 2021. The Enigma of Eosinophil Degranulation. *Int J Mol Sci.* **22**(13): 7091.

Garnett C, Hernandez DC, Vyas P. 2020. GATA1 and cooperating mutations in myeloid leukaemia of Down syndrome. *IUBMB Life.* **72**(1): 119-130.

Gharaee-Kermani M, Phan SH. 1998. The role of eosinophils in pulmonary fibrosis (Review). *Int J Mol Med.* **1**(1): 43-53.

Gigon L, Fettelet T, Yousefi S, Simon D, Simon HU. 2023. Eosinophils from A to Z. *Allergy.* **78**(7): 1810-1846.

Goh YP, Henderson NC, Heredia JE, Eagle AR, Odegaard JI, Lehwald N, Nguyen KD, Sheppard D, Mukundan L, Locksley RM, Chawla A. 2013. Eosinophils secrete IL-4 to

facilitate liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci.* **110**(24): 9914-9919.

Gu M, Jiang H, Tan M, Yu L, Xu N, Li Y, Wu H, Hou Q, Dai C. 2023. Palmitoyltransferase DHHC9 and acyl protein thioesterase APT1 modulate renal fibrosis through regulating β -catenin palmitoylation. *Nat Commun.* **14**(1): 6682.

Guo X, Xu L, Velazquez H, Chen TM, Williams RM, Heler DA, Burtness B, Safirstein R, Desir GV. 2022. Kidney-Targeted Renalase Agonist Presents Cisplatin-Induced Chronic Kidney Disease by Inhibiting Regulated Necrosis and Inflammation. *J Am Soc Nephrol.* **33**(2): 342-356.

Hamano H, Ikeda Y, Watanabe H, Horinouchi Y, Izawa-Ishizawa Y, Imanishi M, Zamami Y, Takechi K, Miyamoto L, Ishizawa K, Tsuchiya K, Tamaki T. 2018. The uremic toxin indoxyl sulfate interferes with iron metabolism by regulating hepcidin in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* **33**(4): 586-597.

Han S, Jia M, Yuan W, Wang Y, Lu Y, Xu Y, Shang L. 2024. The association between peripheral eosinophil count and chronic kidney disease: evidence from NHANES 1999-2018. *Ren Fail.* **46**(1): 2319324.

Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, Mueller AA, Deo RC, Locksley RM, Rando TA, Chawla A. 2013. Type2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell.* **153**(2): 376-388.

Hirasawa R, Shimizu R, Takahashi S, Osawa M, Takayanagi S, Kato Y, Onodera M, Minegishi N, Yamamoto M, Fukao K, Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A. 2002. Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J Exp Med*. **195**(11): 1379-1386.

Hinz B. 2016. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr Res Transl Med*. **64**(4): 171-177.

Horinouchi Y, Murashima Y, Yamada Y, Yoshioka S, Fukushima K, Kure T, Sasaki N, Imanishi M, Fujino H, Tsuchiya K, Shinomiya K, Ikeda Y. 2023. Pemafrate inhibited renal dysfunction and fibrosis in a mouse model of adenine-induced chronic kidney disease. *Life Sci*. **321**: 121590.

Huang L, Appleton JA. 2017. Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes. *Trends Parasitol*. **32**(10): 798-807.

Huang R, Fu P, Ma L. 2023. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines. *Signal Transduct Target Ther*. **8**(1):129.

Huang WC, Huang CH, Hu S, Peng HL, Wu SJ. 2019. Topical spilanthal inhibits MAPK signaling and ameliorates allergic inflammation in DNCB-induced atopic dermatitis in mice. *Int J Mol Sci*. **20**(10): 2490.

Hügler T. 2014. Beyond allergy: the role of mast cells in fibrosis. *Swiss Med Wkly*. **144**: w13999.

Ito T, Liu YJ, Arima K. 2012. Cellular and molecular mechanisms of TSLP function in human allergic disorders-TSLP programs the “Th2 code” in dendritic cells. *Allergol Int.* **61**(1): 35-43.

Jung HJ, Heo WI, Park KY, Lee MK, Ahn JY, Park MY, Seo SJ. 2022. The Role of Collagen VI α 6 Chain Gene in Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol.* **34**(1) : 46-54.

Kamata M, Tada Y. 2021. A literature review of real-world effectiveness and safety of dupilumab for atopic dermatitis. *JID Innov.* **1**(3): 100042.

Kielar D, Jones AM, Wang X, Stirnadel-Farrant H, Katial RK, Bansal A, Garg M, Sharma C, Thakar S, Ye Q. 2023. Association Between Elevated Blood Eosinophils and Clinic Kidney Disease Progression: Analyses of a Large United States Electronic Records Database. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* **16**: 269-280.

Kim D, Chae Y, Park HJ, Lee IS. 2021. A bibliometric analysis of atopic dermatitis research over the past three decades and future perspectives. *Healthcare.* **9**(12): 1749.

Kim D, Kobayashi T, Nagao K. 2020. Research techniques made simple: mouse models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* **139**(5): 984-990.e1.

Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. 2010. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* **11**: 577-584.

Kim YH, Kim TH, Kang MS, Ahn JO, Choi JH, Chung JY. 2020. Comparison of the presentation of atopic dermatitis induced by trinitrochlorobenzene and house dust mite in NC/Nga mice. *J Vet Sci*. **21**(4): e59.

Kitamura A, Takata R, Aizawa S, Watanabe H, Wada T. 2018. A murine model of atopic dermatitis can be generated by painting the dorsal skin with hapten twice 14 days apart. *Sci Rep*. **8**(1): 5988.

Kobayashi T, Iijima K, Kita H. 2003. Marked airway eosinophilia prevents development of airway hyper-responsiveness during an allergic response in IL-5 transgenic mice. *J Immunol*. **170**(11): 5756-5763.

Kolbinger A, Schäufele TJ, Steigerwald H, Friedel J, Pierre S, Geisslinger G, Scholich K. 2023. Eosinophil-driven IL-4 is necessary to establish the inflammatory structure in innate inflammation. *EMBO Mol Med*. **15**(2): e16796.

Kovalszki A, Weller PF. 2016. Eosinophilia. *Prim Care*. **43**(4): 607-617.

Kusama Y, Takamoto M, Kasahara T, Takatsu K, Nariuchi H, Sugane K. 1995. Mechanisms of eosinophilia in BALB/c-nu/+ and congenitally athymic BALB/c-nu/nu mice infected with *Toxocara canis*. *Immunology*. **84**(3): 461-468.

Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, Brenneise IE, Horton MA, Haczku A, Gelfand EW, Leikauf GD, Lee NA. 1997. Interleukin-5 expression in the lung

epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med*. **185**(12): 2143-2156.

Lee YZ, Yap HM, Shaari K, Tham CL, Sulaiman MR, Israf DA. 2017. Blockade of eosinophil-induced bronchial epithelial-mesenchymal transition with a geranyl acetophenone in a coculture model. *Front Pharmacol*. **8**: 837.

LeSuer WE, Kienzl M, Ochkur SI, Schicho R, Doyle AD, Wright BL, Rank MA, Krupnick AS, Kita H, Jacobsen EA. 2023. Eosinophils promote effector function of lung group 2 innate lymphoid cells in allergic airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol*. **152**(2): 469-485.e10.

Li J, Jie HB, Lei Y, Gildener-Leapman N, Trivedi S, Green T, Kane LP, Ferris RL. 2015. PD-1/SHP-2 inhibits Tc1/Th1 phenotypic responses and activation of T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Res*. **75**(3): 508-518.

Liang J, Liu Y. 2023. Animal Models of Kidney Disease: Challenges and Perspectives. *Kidney360*. **4**(10): 1479-1493.

Liao Y, Tan RZ, Li JC, Liu TT, Zhong X, Yan Y, Yang JK, Lin X, Fan JM, Wang L. 2020. Isoliquiritigenin attenuates UUO-induced renal inflammation and fibrosis by inhibiting Mincle/Syk/NF-Kappa B signaling pathway. *Drug Des Devel Ther*. **14**: 1455-1468.

Liu C. 2013. Strategies for designing transgenic DNA constructs. *Methods Mol Biol*. **1027**:

183-201.

Liu J, Yang C, Lui T, Deng Z, Fang W, Zhang X, Li J, Huang Q, Liu C, Wang Y, Yang D, Sukhova GK, Lindholt JS, Diederichsen A, Rasmussen LM, Li D, Newton G, Luscinskas FW, Liu L, Libby P, Wang J, Guo J, Shi GP. 2020. Eosinophils improve cardiac function after myocardial infarction. *Nat Commun.* **11**(1): 6396.

Liu M, Ning X, Li R, Yang Z, Sun S, Qian Q. 2017. Signalling pathway involved in hypoxia-induced renal fibrosis. *J Cell Mol Med.* **21**(7): 1248-1259.

Liu Y, Wu J, Liang S, Xu J, Wei M, Du Z, Qiang S. 2024. Guben xiezhuo decoction inhibits M1 polarization through the Raf1/p-Elk1 signaling axis to attenuate renal interstitial fibrosis. *J Ethnopharmacol.* **319**(Pt 2): 117189.

Marichal T, Mesnil C, Bureau F. 2017. Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Front Med.* **4**:101.

Masterson JC, McNamee EN, Hosford L, Capocelli KE, Ruybal J, Fillon SA, Doyle AD, Eltzschig HK, Rustgi AK, Protheroe CA, Lee JJ, Furuta GT. 2014. Local hypersensitivity reaction in transgenic mice with squamous epithelial IL-5 overexpression provides a novel model of eosinophilic oesophagitis. *Gut.* **63**(1): 43-53.

Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. 1997. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE

hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* **9**(3): 461-466.

Mattes J, Hulett M, Xie W, Hogan S, Rothenberg ME, Foster P, Parish C. 2003. Immunotherapy of Cytotoxic T Cell-resistant Tumors by T Helper 2 Cells. *J Exp Med.* **197**(3): 387-393.

McMillan SJ, Richards HE, Crocker PR. 2014. Siglec-F-dependent negative regulation of allergen-induced eosinophilia depends critically on the experimental model. *Immunol Lett.* **160**(1), 11-16.

Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. 2016. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* **12**(6): 325-338.

Metzger M, Abdel-Rahman EM, Boykin H, Song MK. 2021. A narrative review of management strategies for common symptoms in advanced CKD. *Kidney Int Rep.* **6**(4): 894-904.

Miguel V, Tituaña J, Herrero JI, Herrero L, Serra D, Cuevas P, Barbas C, Puyol DR, Márquez-Expósito L, Ruiz-Ortega M, Castillo C, Sheng X, Susztak K, Ruiz-Canela M, Salas-Salvadó J, González MAM, Ortega S, Ramos R, Lamas S. 2021. Renal tubule Cpt1a overexpression protects from kidney fibrosis by restoring mitochondrial homeostasis. *J Clin Invest.* **131**(5): e140695.

Minang JT, Troye-Blomberg M, Lundeberg L, Ahlborg N. 2005. Nickel elicits concomitant

and correlated in vitro production of Th1-, Th2-type and regulatory cytokines in subjects with contact allergy to nickel. *Scand J Immunol.* **62**(3): 289-296.

Monte LD, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, Braga M, Carlo VD, Doglioni C, Protti MP. 2011. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med.* **208**(3): 469-478.

Morimoto M, Yamada M, Arizono N, Hayashi T. 1998. Lactic dehydrogenase virus infection enhances parasite egg production and inhibits eosinophil and mast cell responses in mice infected with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology.* **93**(4): 540-545.

Morimoto Y, Hirahara K, Kiuchi M, Wada T, Ichikawa T, Kanno T, Okano M, Kokubo K, Onodera A, Sakurai D, Okamoto Y, Nakayama T. 2018. Amphiregulin-producing pathogenic memory T helper 2 cells instruct eosinophils to secrete osteopontin and facilitate airway fibrosis. *Immunity.* **49**(1): 134-150.

Nagase H, Ueki SH, Fujieda SH. 2020. The roles of IL-5 and anti-IL-5 treatment in eosinophilic diseases: Asthma, eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* **69**(2): 178-186.

Nakagome K, Nagata M. 2024. The possible roles of IL-4/IL-13 in the development of eosinophil-predominant severe asthma. *Biomolecules.* **14**(5): 546.

Nemeth ZH, Bogdanovski DA, Barratt-Stopper P, Paglinco SR, Antonioli L, Rolandelli RH. 2017. Crohn's disease and ulcerative colitis show unique cytokine profiles. *Cureus*. **9**(4): e1177.

Nguyen JK, Austin E, Huang A, Mamalis A, Jagdeo J. 2020. The IL-4/IL-13 axis in skin fibrosis and scarring: mechanistic concepts and therapeutic targets. *Arch Dermatol Res*. **12**(2): 81-92.

Nussbaum JC, Van Dyken SJ, von Moltke J, Cheng LE, Mohapatra A, Molofsky AB, Thornton EE, Krummel MF, Chawla A, Liang HE, Locksley RM. 2013. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature*. **502**(7470): 245-248.

Ong SF, Ligons DL, Barin JG, Wu L, Talor MV, Diny N, Fontes JA, Gebremariam E, Kass DA, Rose NR, Ciháková D. 2015. Natural killer cells limit cardiac inflammation and fibrosis by halting eosinophil infiltration. *Am J Pathol*. **185**(3): 847-861.

Oyoshi MK, He R, Kanaoka Y, ElKhal A, Kawamoto S, Lewis CN, Austen KF, Geha RS. 2012. Eosinophil-derived leukotriene C4 signals via type 2 cysteinyl leukotriene receptor to promote skin fibrosis in a mouse model of atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci*. **109**(13):4992-4997.

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB, Riley JL. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. **25**(21): 9543-9553.

Pieters TT, Falke LL, Nguyen TQ, Verhaar MC, Florquin S, Bemelman FJ, Kers J, Vanhove T, Kuypers D, Goldschmeding R, Rookmaaker MB. 2019. Histological characteristics of acute tubular injury during delayed graft function predict renal function after renal transplantation. *Physiol Rep.* 7(5): e14000.

Puxeddu I, Berkman N, Ribatti D, Bader R, Haitchi HM, Davies DE, Howarth PH, Levi-Schaffer F. 2010. Osteopontin is expressed and functional in human eosinophils. *Allergy.* 65(2): 168-174.

Rayapudi M, Mavi P, Zhu X, Pandey AK, Pablo Abonia J, Rothenberg ME, Mishra A. 2010. Indoor insect allergens are potent inducers of experimental eosinophilic esophagitis in mice. *J Leukoc Biol.* 88(2): 337-346.

Ren Y, Zhang J, Hu X, Yu R, Tu Q, Li Y, Lin B, Zhu B, Shao L, Wang M. 2024. Association of peripheral eosinophil count with chronic kidney disease progression risk: a retrospective cohort study in Chinese population. *Ren Fail.* 46(2): 2394164.

Rende U, Guller A, Goldys EM, Pollock C, Saad S. 2023. Diagnostic and prognostic biomarkers for tubulointerstitial fibrosis. *J Physiol.* 601(14): 2801-2826.

Roufosse F, Schandené L, Sibille C, Willard-Gallo K, Kennes B, Efira A, Goldman M, Cogan E. 2000. Clonal Th2 lymphocytes in patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol.* 109(3): 540-548.

Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, Huang LC, Johnson D, Scanlon ST, McKenzie AN, Fallon PG, Ogg GS. 2013. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med*. **210**(13): 2939-2950.

Silverberg JI, Gelfand JM, Margolis DJ, Boguniewicz M, Fonacier L, Grayson MH, Simpson EL, Ong PY, Fuxench ZC. 2018. Patient burden and quality of life in atopic dermatitis in US adults; a population-based cross-sectional study. *Ann Allergy Asthma Immunol*. **121**(3): 340-347.

Simon HU, Yousefi S, Germic N, Arnold IC, Haczku A, Karaulov AV, Simon D, Rosenberg HF. 2020. The Cellular Functions of Eosinophils: Collegium Internationale Allergologicum (CIA) Update 2020. *Int Arch Allergy Immunol*. **181**(1):11-23.

Simson L, Ellyard JI, Dent LA, Matthaei KI, Rothenberg ME, Foster PS, Smyth MJ, Parish CR. 2007. Regulation of Carcinogenesis by Interleukin-5 and CCL11: A Potential Role for Eosinophils in Tumour Immune Surveillance. *J Immunol*. **178**(7):4222-4229.

Sinéad ML, Irvine AD, Weidinger S. 2020. Atopic dermatitis. *Lancet*. **396**(10247): 345-360.

Sinha SK, Mellody M, Carpio MB, Damoiseaux R, Nicholas SB. 2023. Osteopontin as a biomarker in chronic kidney disease. *Biomedicines*. **11**(5): 1356.

Sonja S. 2021. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. **384**: 1136-1143.

Steinke JW, Borish L. 2015. Factors driving the aspirin exacerbated respiratory disease phenotype. *Am J Rhinol Allergy*. **29**(1): 35-40.

Stubbs JR, Zhang S, Jansson KP, Fields TA, Boulanger J, Liu S, Rowe PS. 2022. Critical role of osteopontin in maintaining urinary phosphate solubility in CKD. *Kidney360*. **3**(9): 1578-1589.

Todd R, Donoff BR, Chiang T, Chou MY, Elovic A, Gallagher GT, Wong DT. 1991. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. *Am J Pathol*. **138**(6): 1307-1313.

Wang F, Suo XG, Wang JN, Liu CY, Liu CC, Wang C, Li J, Duan ZH, Zhang FS, Xia YM, Jiang JJ, Hao YW, Li GY, Meng XM, Shao YX, Wang FC. 2024. SFN promotes renal fibrosis via binding with MYH9 in chronic kidney disease. *Eur J Pharmacol*. **979**: 176806.

Wei H, Xu L, Sun P, Xing H, Zhu Z, Liu J. 2022. Activation of STAT6 by intranasal allergens correlated with the development of eosinophilic chronic rhinosinusitis in a mouse model. *Int J Immunopathol pharmacol*. **36**: 03946320221109529.

Wong DT, Donoff RB, Yang J, Song BZ, Matossian K, Nagura N, Elovic A, McBride J, Gallagher G, Todd R, Chiang T, Chou LS, Yung CM, Galli SJ, Weller PF. 1993. Sequential expression of transforming growth factors α and β_1 by eosinophils during cutaneous wound healing in the hamster. *Am J Pathol*. **143**(1): 130-142.

Wolf MT, Ganguly S, Wang TL, Anderson CW, Sadtler K, Narain R, Cherry C, Parrillo AJ, Park BV, Wang G, Pan F, Sukumar S, Pardoll DM, Elisseff JH. 2019. A Biologic Scaffold-Associated Type 2 Immune Microenvironment Inhibits Tumor Formation and Synergizes with Checkpoint Immunotherapy. *Sci Transl Med.* **11**(477): eaat7973.

Wynn TA. 2004. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* **4**(8): 583-594.

Wynn TA, Ramalingam TR. 2012. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* **18**(7): 1028-1040.

Xu L, Yang Y, Wen Y, Jeong JM, Emontzpohl C, Atkins CL, Sun Z, Poulsen KL, Hall DR, Steve Bynon J, Gao B, Lee WM, Rule J, Jacobsen EA, Wang H, Ju C. 2022. Hepatic recruitment of eosinophils and their protective function during acute liver injury. *J Hepatol.* **77**(2): 344-352.

Yamada Y, Okamoto K, Kagimoto S, Sakurai M, Sakai Y, Hasegawa M, Imai H, Shibutani S, Morimoto M. Establishment of mutant mouse strain showing eosinophilia. *Scand J Lab Anim Sci.* in press.

Yan J, Zhang Z, Yang J, Mitch WE, Wang Y. 2015. JAK3/STAT6 stimulates bone marrow-derived fibroblast activation in renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* **26**(12): 3060-3071.

Yang L, Guo T, Chen Y, Bian K. 2023. The multiple roles of periostin in non-neoplastic

disease. *Cells*. **12**(1): 50.

Zeng YY, Hu WP, Zuo YH, Wang XR, Zhang J. 2019. Altered serum levels of type I collagen turnover indicators accompanied by IL-6 and IL-8 release in stable COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. **14**: 163-168.

Zheng Z, Li YN, Jia S, Zhu M, Cao L, Tao M, Jiang J, Zhan S, Chen Y, Gao PJ, Hu W, Wang Y, Shao C, Shi Y. 2021. Lung mesenchymal stromal cells influenced by Th2 cytokines mobilize neutrophils and facilitate metastasis by producing complement C3. *Nat Commun*. **12**(1): 6202.

Zhu C, Weng Q, Gao S, Li F, Li Z, Wu Y, Wu Y, Li M, Zhao Y, Han Y, Lu W, Qin Z, Yu F, Lou J, Ying S, Shen H, Chen Z, Li W. 2024. TGF-beta signaling promotes eosinophil activation in inflammatory responses. *Cell Death Dis*. **15**(8): 637.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*. **28**: 445-489.

Zon LI, Yamaguchi Y, Yee K, Albee EA, Kimura A, Bennett JC, Orkin SH, Ackerman SJ. 1993. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood*. **81**(12): 3234-3241.

謝辞

本研究および論文の作成をすすめるにあたり、懇切な御指導および御助言を頂いた山口大学獣医病理学研究室 森本将弘教授、櫻井優准教授、吉崎響子助教、獣医解剖学研究室 日下部 健教授、獣医発生学・実験動物学研究室 加納 聖教授、鹿児島大学獣医病理学研究室 三好 宣彰教授、国立感染症研究所感染病理部 坂井 祐介先生に心より厚く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり、懇切な御指導および御助言を頂いた山口大学獣医病理学研究室の皆様、また私を暖かく見守ってくれた妻や、支えて頂いた全ての方々に心より感謝の意を表します。

最後に、本研究で犠牲となった多くの動物たちに深く感謝するとともに、その霊が鎮められるように心からお祈りいたします。