

Abstract of Doctoral Thesis

Name DHASIA RAMANDANI

Title: Pathological study of eosinophil-driven mechanisms in novel murine models of allergic and fibrotic pulmonary disease

(アレルギー性および線維性肺疾患の新規マウスモデルにおける好酸球誘導性機序の病理学的研究)

Abstract of thesis:

This doctoral thesis presents two novel eosinophil-driven murine models for allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) employing the spontaneously eosinophilic Yama mouse strain. ABPA and IPF, despite being triggered by distinct causes—fungal hypersensitivity and repetitive epithelial injury, respectively—exhibit shared clinical characteristics, such as chronic inflammation, abnormal tissue remodeling, and advancing fibrosis. Eosinophils have become essential mediator cells in both allergic and non-allergic pulmonary disorders. Although, their specific role in chronic lung fibrosis remains insufficiently understood.

The Yama strain, distinguished by persistent, IL-5-independent peripheral eosinophilia, offers a distinctive biological background to examine eosinophil function without dependence on genetic modification or external cytokine activation. These investigations were conducted to elucidate the role of intrinsic eosinophilia in modulating inflammatory pathways, Th2-mediated immune responses, epithelial damage, and fibrotic remodeling in two separates yet physiologically related disease models. This dissertation utilizes the Yama mouse in an allergen-induced ABPA model and a repeated bleomycin-induced IPF model to clarify prominent eosinophil-dependent pathways contributing to chronic pulmonary diseases and to identify potential TGF- β -independent mechanisms of fibrosis relevant to human disease.

The ABPA study demonstrated that sensitization and challenge with the *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f1 resulted in sustained peripheral eosinophilia, increased serum IgE levels, and significant airway remodeling in Yama mice. In comparison to BALB/c mice, Yama mice demonstrated significantly heightened goblet cell hyperplasia, mucus obstruction, peribronchial inflammation, and collagen accumulation. Differential gene expression analysis demonstrated substantial elevation of Th2-associated cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13) and Col1a1, but TGF- β expression exhibited minimal change. The data suggest that airway fibrosis in Yama mice primarily occurs via TGF- β -independent mechanisms, possibly facilitated by IL-13 and eosinophil-derived mediators, including eosinophil cationic protein. The findings confirm the Yama strain as a reliable and physiologically optimal model that mirrors the immunopathological characteristics of severe human ABPA.

In the IPF model, repeated intranasal administration of bleomycin resulted in enduring and progressive lung fibrosis in Yama mice, exceeding the temporary and self-resolving fibrotic response seen

(About 800 words in English)

(Appended form No. 3)

in C57BL/6 controls. Yama mice exhibited significant interstitial thickening, many fibroblastic foci, alveolar collapse, and considerably elevated collagen deposition. In accordance with the ABPA findings, Yama mice exhibited significant overexpression of Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13), sustained elevation of IL-6, and increased expression of Col1a1. Notably, although fibrosis was severe, TGF- β expression rose only marginally, indicating that fibrogenesis in this model is primarily influenced by alternate profibrotic pathways involving eosinophil-derived proteins and Th2/IL-6 signaling, rather than traditional TGF- β -dependent processes. This observation illustrates the variability of pathogenic mechanisms in human IPF, where TGF- β activity does not consistently correspond with disease severity.

These investigations collectively illustrate that spontaneous eosinophilia markedly enhances both allergic and non-allergic fibrotic processes, emphasizing eosinophils as pivotal effector cells that connect inflammation with the structural remodeling of pulmonary tissue. The Yama mouse serves as a robust and adaptable preclinical model for investigating eosinophil-mediated pathways in chronic lung illness, potentially aiding in the formulation of targeted therapies approaches for eosinophil-related fibrosis.

(About 800 words in English)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	DHASIA RAMANDANI
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 森本 将弘
	副 査：鹿児島大学 教授 三好 宣彰
	副 査：山口大学 教授 度会 雅久
	副 査：山口大学 教授 日下部 健
	副 査：山口大学 准教授 櫻井 優
題 目	Pathological study of eosinophil-driven mechanisms in novel murine models of allergic and fibrotic pulmonary disease アレルギー性および線維性肺疾患の新規マウスモデルにおける好酸球誘導性機序の病理学的研究

審査結果の要旨：

DHASIA RAMANDANI 氏の博士課程における研究は、好酸球が肺における線維化を促進するかどうかを検討することを目的としている。さらに、好酸球が線維化を促進する場合には、好酸球増多マウスを用い、既存の線維性肺疾患モデルマウスでは線維化が一過性かつ軽度であるため、ヒト疾患モデルとして線維化機構の解析には不十分であるという問題点を補完する、新規モデルマウス系の作成を目指している。

好酸球増多症（血中好酸球数の増加）は、蠕虫感染やアレルギーによって引き起こされることがよく知られている。好酸球の組織浸潤により、アトピー性皮膚炎では皮膚の苔癬化を来し、病態が重篤化することが報告されている。また、創傷治癒過程においては、好酸球が病変部へ浸潤することで結合組織増生を促進し、治癒を早めるとされている。このように、皮膚における好酸球浸潤は線維化を促進すると考えられており、他臓器における線維化についても報告はあるものの、その数は限られており、肺に関する報告はごくわずかである。さらに、これらの報告の多くは間接的な証拠にとどまり、好酸球増多を直接誘導して検証した研究は少ない。その理由として、好酸球増多を誘導する方法の多くが IL-5 投与やトランスジェニック動物に依存しており、IL-5 そのものの作用と好酸球による作用とを厳密に区別することが困難である点が挙げられる。

本研究室で確立した Yama マウスは、好酸球増多を呈する一方で、IL-5 を含む多くのサイトカインに変化が認められず、組織学的異常も示さない。この特性から、Yama マウスは種々の抗原刺激や薬剤誘導性モデルへの応用が可能であると考えられる。

そこで、第 1 章では、Yama マウスを線維性肺疾患モデルとして、慢性過敏性肺炎の代表例である実験的アスペルギルス肺炎モデルに応用し、重篤な線維化を誘導し得るか、またヒト

疾患モデルとしての有用性を有するかを検討した。その結果、Yama マウスは Asp f1 刺激により、IgE の上昇、粘液過剰産生、肺線維化を示すとともに、IL-4、IL-6、IL-13 などの Th2 型線維化関連サイトカインおよび Col1a1 の顕著な増加を示した。一方、TGF- β の発現は Asp f1 投与群と対照群との間で有意な差を認めなかった。これらの結果から、Yama マウスは TGF- β 非依存性の好酸球駆動性線維化を伴う重症 ABPA の免疫病態を再現する有用な新規動物モデルであることが示唆された。

第 2 章では、Yama マウスにおいて、特発性肺線維症のモデルであるとされているブレオマイシン投与モデルにて、ブレオマイシン投与後に強く持続的な肺線維化が誘導されることを示した。通常のマウスと比較してコラーゲン沈着が顕著であり、ヒト特発性肺線維症に類似した病理組織像が観察された。また、好酸球および線維化関連分子の発現も高値を示した。これらの結果から、好酸球が重度肺線維化の進行に深く関与していることが示されるとともに、TGF- β に依存しない線維化機構によって引き起こされることが示唆された。ヒトでは TGF- β 非依存性の線維化が慢性期には重要であると考えられていることから、本モデルは、ヒト特発性肺線維症に近い動物モデルとして有用であると考えられる。

以上の結果は、線維性肺疾患における好酸球の重要性を示すとともに、ヒト線維性肺疾患の病態に類似した新規モデルを確立したことを示している。本モデルは、ヒトにおける線維性肺疾患での線維化の機構を解析する上で有用なツールとなると考えられる。さらに、Yama マウスの応用により、獣医学領域における諸臓器の好酸球性炎症など、好酸球の病変部浸潤を伴う難治性疾患における好酸球機能の解析にも寄与することが期待される。

以上より、本論文は博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。