

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870092

研究課題名(和文) T細胞による間質性肺障害の新たな治療戦略の構築

研究課題名(英文) The role of gammadelta T cells in the pathogenesis of interstitial pneumonia

## 研究代表者

瀬川 誠司 (Segawa, Seiji)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60632239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、全身性強皮症に合併した間質性肺障害病態に対する  $\gamma\delta$  T細胞の機能解析を行った。間質性肺障害合併全身性強皮症患者では、末梢血中  $\gamma\delta$  T細胞の割合は有意に低下しており、これらの細胞割合は血中KL-6値と有意な負の相関関係を示した。全身性強皮症患者由来  $\gamma\delta$  T細胞では、線維化関連因子発現(IFN- $\gamma$ 、CCL3)が健康人と比べて異なっており、肺線維芽細胞増殖を促進することが分かった。全身性強皮症患者において  $\gamma\delta$  T細胞がIFN- $\gamma$  やCCL3の産生を介して、間質性肺障害病態へ関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Interstitial pneumonia (IP) is a chronic progressive interstitial lung disease associated with high mortality and poor prognosis. However, the pathogenesis of IP remains to be elucidated. The goal of this study is to clarify the role of  $\gamma\delta$  T cells in systemic sclerosis (SSc) patients with IP. The proportion of gammadelta T cells was significantly higher in SSc than healthy controls (HC), and correlated negatively with serum KL-6 levels in IP-positive SSc patients.  $\gamma\delta$  T cells in IP-positive SSc patients showed higher production of CCL3 and lower production of IFN- $\gamma$  than that in HC. Culture supernatant derived from IP-positive SSc patients promoted fibroblast proliferation, whereas that from HC did not. These findings suggest that  $\gamma\delta$  T cells may play a regulatory role in the pathogenesis of IP in SSc patients, via IFN- $\gamma$  production.

研究分野：膠原病学

キーワード：全身性強皮症 間質性肺障害 T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

間質性肺障害 (Interstitial pneumonia, IP) は、肺組織の線維化を伴う予後不良の難治性疾患である。全身性強皮症 (Systemic sclerosis, SSc) は、皮膚の線維化を主症状とし内臓諸臓器の線維化によって特徴づけられる自己免疫疾患である。全身性強皮症および間質性肺障害は、それぞれ皮膚、肺組織の線維化を主病態とするものであるが、全身性強皮症患者では間質性肺障害を合併する頻度が他の疾患に比べると特に高い。さらに近年の疫学調査の結果、全身性強皮症患者の死因の中で、間質性肺障害の占める割合が30年前の約6倍に増加していることが報告されており [Ann Rheum Dis.2007;66:940-944]、全身性強皮症患者の生命予後において間質性肺障害は重大な合併症である。しかしながら、全身性強皮症、間質性肺障害共に有効な治療法が確立されておらず早期の病態解明および治療法の確立が望まれている。

現在までの研究から、組織線維化病態形成には、様々な細胞因子あるいは液性因子が関与していると考えられている [Semin Arthritis Rheum.2008;38:132-160]。近年、 $\gamma\delta$ T 細胞の炎症性肺疾患における役割が注目されている。 $\gamma\delta$ T 細胞は、T 細胞に分類され、末梢血、リンパ組織、肺や皮膚等の上皮組織に多く存在し、生体防御に深く関わっている細胞である。ヒトにおいて、 $\gamma\delta$ T 細胞は T 細胞受容体 V $\delta$ 鎖の違いにより 2 種類 (V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞と V $\delta$ 2 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞) に大別される。特に V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞は肺組織や気道上皮に豊富に存在することから種々の肺疾患に関与すると考えられている。

これまでの研究から、ヒト間質性肺障害発症初期像に類似する、インターロイキン (IL)-2+IL-18 投与マウスモデルにおいて、Natural Killer (NK) 細胞マーカー (マウス: NK1.1、ヒト: CD161) を発現したユニークな  $\gamma\delta$ T 細胞 (=  $\gamma\delta$ NKT 細胞) が炎症増悪作用を有することが報告されている [Am J Respir Cell Mol Biol.2011;45:659-666]。このことから、 $\gamma\delta$ NKT 細胞がヒト間質性肺障害病態においても重要な働きを有する可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、間質性肺障害病態形成に対する  $\gamma\delta$ NKT 細胞の関与をヒトおよびモデルマウスを用いて検討する。具体的には以下の事柄を検討する。

(1) 健常人と間質性肺障害を合併した自己免疫疾患患者末梢血中の  $\gamma\delta$ NKT (=CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T) 細胞の比較検討

(2) 間質性肺障害病態と末梢血中 CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞割合との比較検討

(3) 健常人および間質性肺障害を合併した自己免疫疾患患者由来 CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T

細胞を用いた肺線維芽細胞増殖能に対する検討

(4) 間質性肺障害モデルマウスにおける  $\gamma\delta$ T 細胞の機能解析

上記を介して、間質性肺障害病態における  $\gamma\delta$ T 細胞の機能解析を行い、新規治療法へ繋がる基盤研究の構築を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) PBMC 中 CD161 陽性 V 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞割合の解析

健常人 (HC: 22 名)、関節リウマチ (RA: 17 名)、多発性筋炎筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM: 14 名)、全身性強皮症 (SSc: 35 名) 患者より、末梢血単核球 (PBMC) を単離後、CD161 陽性 V 1 陽性  $\gamma\delta$ T (CD161<sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T) 細胞割合をフローサイトメトリーを用いて検討した。同時に、間質性肺障害合併の有無による上記細胞割合の違いについても検討した。

(2) 血清 KL-6 値と血中 CD161 陽性 V 1 陽性細胞割合との相関

間質性肺障害を合併した SSc 患者 (14 名) に着目し、血中 CD161<sup>+</sup> V 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 細胞割合と間質性肺障害病態マーカーである血中 KL-6 値との相関を検討した。

(3) 遺伝子発現解析

HC (n=3) 由来 PBMC より、CD161<sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 細胞と CD161<sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 細胞をフローサイトメトリーを用いて単離後、遺伝子発現解析を行った。

(4) CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞株を用いたケモカイン・サイトカイン産生の検討

間質性肺障害合併 SSc (n=3)、間質性肺障害非合併 SSc 患者 (n=4) および HC (n=3) 由来 PBMC より、CD161<sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 細胞をフローサイトメトリーを用いて単離後、細胞株の樹立を行った。樹立した細胞株を用いて、T 細胞受容体 (TCR) 刺激後のケモカイン・サイトカイン産生量を検討した。

(5) CD161<sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 細胞株培養上清を用いた肺線維芽細胞増殖能の解析

上記 (4) で樹立した、CD161<sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 細胞株を TCR 刺激後、培養上清を回収した。回収した培養上清を用いて、肺由来線維芽細胞株 (WI-38) に対する増殖能の検討を行った。

(6) 間質性肺障害モデルマウスを用いた解析

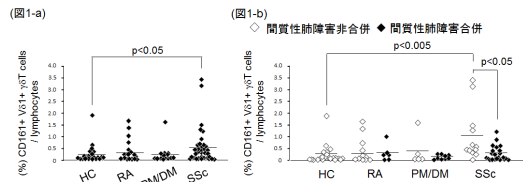
$\gamma\delta$ T 細胞と間質性肺障害病態との関連をさらに詳しく調べるために、プレオマイシン誘導間質性肺障害モデルマウスを用いた。野生型 (C57BL/6) および  $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウス (TCR $\delta^{-/-}$ ) へプレオマイシンを投与後、病態の

比較を行った。

#### 4. 研究成果

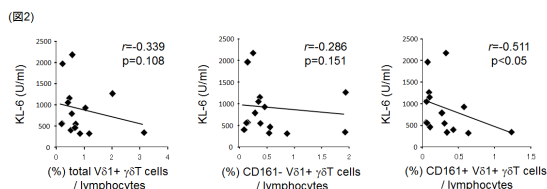
##### (1) PBMC 中 CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞割合の解析

SSc 患者では、HC に比べて PBMC 中 CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞の割合および細胞数が著明に増加していた(図 1a)。RA、PM/DM 患者では、著明な差は認められなかった。さらに、間質性肺障害非合併 SSc 患者では、PBMC 中 CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞の割合および細胞数が著明に増加していた(図 1b)。



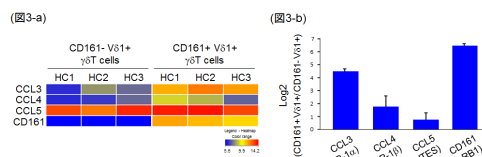
##### (2) 血清 KL-6 値と血中 CD161 陽性 V $\delta$ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞割合との相関

間質性肺障害合併 SSc 患者における、血清 KL-6 値と PBMC 中 CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞割合との相関を解析した。その結果、間質性肺障害合併 SSc 患者では、血清 KL-6 値と PBMC 中 CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞割合との間に、有意な負の相関を認めた(図 2)。また、血清 KL-6 値と PBMC 中 V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞、CD161 $^{-}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞割合との間に、有意な相関は確認出来なかった(図 2)。間質性肺障害合併 PM/DM 患者においては、血清 KL-6 値といずれの V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞割合について、有意な相関は認められなかった。

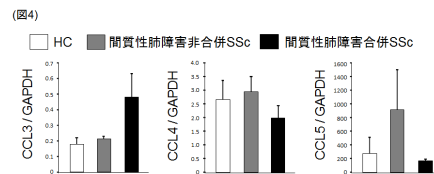


##### (3) 遺伝子発現解析

HC 由来細胞を用いたマイクロアレイの結果、CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞で CD161 $^{-}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞に比べて発現が高い遺伝子として 192 遺伝子を見出した。その中でも、線維化関連遺伝子と考えられている CCL3 発現が著名に亢進していた(図 3a)。CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞では、CCL4 発現も CCL3 同様に著名に亢進していたが、CCL5 発現には著名な差は認められなかった(図 3b)。また、間質性肺障害病態への関与が数多く報告のある CCL2 発現は CD161 $^{-}$  V $\delta$ 1 $^{+}$ 、CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞共に低値であった。

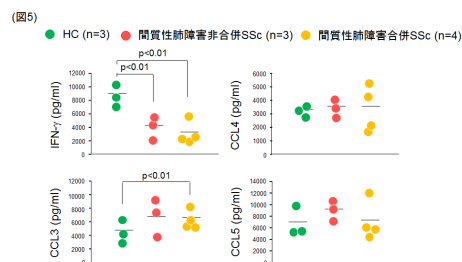


次に、HC、間質性肺障害非合併 SSc 患者、間質性肺障害合併 SSc 患者由来細胞におけるケモカイン mRNA 発現解析を行った。HC および間質性肺障害非合併 SSc 患者由来 CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞では、CD161 $^{-}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞に比べて CCL3 および CCL4 mRNA 発現が亢進していた。一方で、間質性肺障害合併 SSc 患者由来 CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞では、CD161 $^{-}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞に比べて、CCL4 及び CCL5 mRNA 発現が亢進していた。しかしながら、健康人、間質性肺障害非合併 SSc、間質性肺障害合併 SSc 患者末梢血由来 CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞の間で、各ケモカイン mRNA 発現量に著名な差は認められなかった(図 4)。



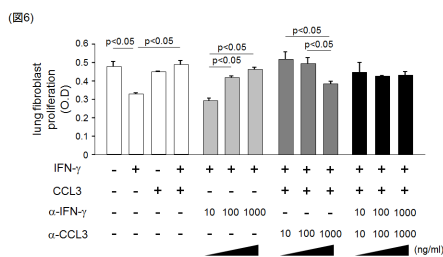
##### (4) CD161 $^{+}$ V $\delta$ 1 $^{+}$ $\gamma\delta$ T 細胞株を用いたケモカイン・サイトカイン産生の検討

in vitro での解析を目的に、HC、間質性肺障害非合併 SSc、間質性肺障害合併 SSc 患者末梢血由来 CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞を単離し、細胞株を作製した。CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞株を抗 TCR V $\delta$ 1 抗体刺激した結果、間質性肺障害合併 SSc 患者由来細胞株では、健康人、間質性肺障害非合併 SSc 患者由来細胞株に比べて、CCL3 産生量が亢進していた。一方で、CCL2、CCL4、CCL5 産生量には各群で差を認めなかった(図 5)。さらに、間質性肺障害非合併 SSc 患者、IP 合併 SSc 患者由来 CD161 $^{+}$  V $\delta$ 1 $^{+}$   $\gamma\delta$ T 細胞株では、健康人に比べて IFN- $\gamma$  産生量が著名に減弱していた(図 5)。

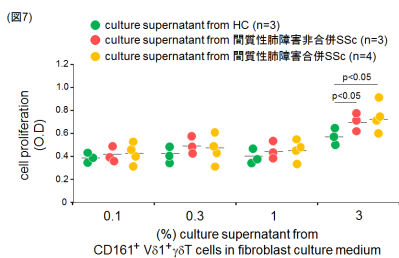


##### (5) CD161 $^{+}$ V $\delta$ 1 $^{+}$ 細胞株培養上清を用いた肺線維芽細胞増殖能の解析

次に、IFN- $\gamma$  および CCL3 存在下における肺線維芽細胞株(WI-38)増殖能の解析を行った。初めに、WI-38 線維芽細胞に CCL3 受容体(CCR1 および CCR5)、IFN- $\gamma$  受容体(IFN- $\gamma$ R)が発現することを確認した。WI-38 線維芽細胞増殖能は、IFN- $\gamma$  存在下では、有意に減少していた。CCL3 は WI-38 線維芽細胞増殖能に影響を与えなかった。一方で、CCL3 共培養下では、IFN- $\gamma$  は WI-38 線維芽細胞増殖を抑制しなかった(図 6)。また、同様の結果は、抗 IFN- $\gamma$  抗体、抗 CCL3 抗体を用いた検討でも確認された(図 6)。

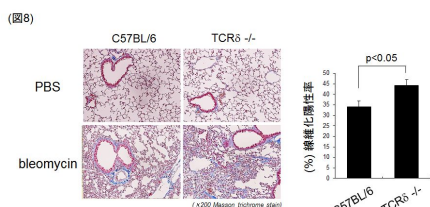


さらに、CD161<sup>+</sup> Vδ1<sup>+</sup> γδT 細胞株培養上清を用いた検討を行った。SSc 患者由来細胞培養上清は、HC 由来細胞培養上清に比べて、WI-38 線維芽細胞増殖能が優位に亢進した(図7)。間質性肺障害合併 SSc 患者由来、間質性肺炎非合併 SSc 患者由来培養上清では有意な差は確認出来なかった。



#### (6) γδT 細胞欠損マウスを用いたプレオマイシン誘発性間質性肺障害の解析

プレオマイシン投与後の野生型(C57BL/6)およびγδT 細胞欠損(TCRδ<sup>-/-</sup>)マウスでの病態解析を行った。γδT 細胞欠損マウスでは、プレオマイシン投与 20、21 日後に野生型マウスと比較して著大な体重減少を認めた。組織学的な解析の結果、プレオマイシン投与後のγδT 細胞欠損マウスでは肺胞壁肥厚、炎症細胞浸潤増加を認め、線維化部位の増大を認めた(図8)。次に、肺組織および気管支肺胞洗浄液(BALF)中のコラーゲン産生量を解析した。その結果、野生型マウスに比べてγδT 細胞欠損マウスでは、肺組織・BALF 中のコラーゲン産生量が著名に亢進していた。さらに、プレオマイシン投与後の肺組織における TGF-β および col1a1 mRNA 発現を解析した結果、γδT 細胞欠損マウスで野生型マウスに比べて著名に亢進していた。現在、さらなる解析を行っている。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

S. Segawa, D. Goto, M. Horikoshi, Y.

Kondo, N. Umeda, S. Hagiwara, M. Yokosawa, T. Hirota, H. Miki, H. Tsuboi, H. Ogishima, T. Suzuki, I. Matsumoto, T. Sumida. Involvement of CD161<sup>+</sup> Vδ1<sup>+</sup> γδT cells in systemic sclerosis: Association with interstitial pneumonia. *Rheumatology (Oxford)* (2014) 53, 2259-2269. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

Segawa S et al. The role of TCR Vδ1<sup>+</sup> NKT cells in systemic sclerosis patients with interstitial pneumonitis. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、2014 年 12 月 10-12 日、京都

Segawa S et al. The regulatory role of γδNKT cells in systemic sclerosis patients with interstitial pneumonia. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014 年 4 月 24-26 日、東京

Segawa S et al. Involvement of TCR Vδ1<sup>+</sup> NKT cells in systemic sclerosis: Association with interstitial pneumonia. 第 57 回日本免疫学会総会・学術集会、2013 年 12 月 11-13 日、千葉

Segawa S et al. Involvement of TCR Vδ1<sup>+</sup> NKT cells in systemic sclerosis: Association with interstitial pneumonia. ACR/ARHP Annual Meeting 2013 October 26-30. San Diego, USA.

Segawa S et al. Interstitial pneumonia (IP) is a serious complication in systemic sclerosis (SSc). However, the exact mechanism of IP remains elusive. The purpose of this study is to clarify the role of TCR Vδ1<sup>+</sup> NKT cells in SSc patients with IP. 15th International Congress of Immunology 2013 August 22-27. Milan, Italy

Segawa S et al. The analysis of TCR Vδ1<sup>+</sup> NKT cells in systemic sclerosis patients with interstitial pneumonitis. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2013 年 4 月 18-20 日、京都

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

瀬川 誠司(SEGAWA, Seiji)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号：60632239