

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461178

研究課題名(和文)慢性炎症性呼吸器疾患におけるヘルパーT細胞と炎症性マクロファージのクロストーク

研究課題名(英文)Cross-talk between Th cells and inflammatory macrophages in chronic inflammatory respiratory diseases

研究代表者

森島 祐子 (MORISHIMA, YUKO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10375511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Th1細胞の分化誘導を司る転写因子T-betが高発現するマウスでは、T-betが単球・マクロファージの遊走、分化、活性化を制御することでヒト肺胞蛋白症に類似した病態を生じることが明らかになった。一方、M. avium感染モデルでは、T-bet欠損マウスや、Th17細胞の分化誘導を司る転写因子ROR $\gamma$ tが高発現するマウスにおいて、肺組織での炎症が増強していた。以上より、T細胞特異的転写因子は、Th炎症フェノタイプ、炎症性マクロファージの動態を制御し、各疾患の病態生理に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of T-bet, a master transcription factor in Th1 cells, induced pulmonary alveolar proteinosis (PAP)-like disease in T-bet-transgenic mice (T-bet-tg). T-bet-tg alveoli with PAP phenotype showed remarkable reorganization of alveolar mononuclear phagocyte subpopulations and impaired function, in addition to augmented T-cell infiltration. PAP development in T-bet-tg was also found to be associated with increased migration of myeloid cells from the bone marrow into the peripheral blood.

We next investigated the role of Th1/Th17 balance in host responses against Mycobacterium avium complex (MAC) infection. Neutrophilic pulmonary inflammation following MAC infection was enhanced in T-bet-deficient mice and in mice overexpressing ROR $\gamma$ t, a master regulator for Th17 cell development.

Our results suggest that imbalance of Th lineage-specific master regulatory transcription factors may be critical determinants for the development of PAP and host resistance to MAC infection.

研究分野：炎症性呼吸器疾患

キーワード：Th1 Th17 T-bet ROR $\gamma$ t 肺胞蛋白症 非結核性抗酸菌

### 1. 研究開始当初の背景

多くの慢性呼吸器疾患では肺の慢性炎症を伴っており、近年の研究では組織損傷修復や抗炎症のために炎症局所に動員される骨髄由来細胞が病態形成に関与することが示唆されている。一方、ヘルパーT(Th)細胞は刺激に応じた転写応答により異なったエフェクターT細胞に分化し、炎症のフェノタイプを決定する。我々はこれまでの検討のなかで、幾つかの疾患動物モデルで肺組織への骨髄由来細胞の動員を確認し、その程度や種類が、肺局所のTh炎症タイプにより異なることを見出した。とくにT細胞特異的転写因子は細胞分化だけでなく、Thサイトカインの発現調節も司っており、外来刺激に対するTh反応のタイプを決定する最も重要な宿主因子であると考え、本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究では動物モデルを用い、T細胞特異的転写因子、Th炎症フェノタイプ、炎症性マクロファージの動態、および細胞間の相互作用を解析し、T細胞特異的転写因子のバランスが各疾患病態生理に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肺胞蛋白症モデルでの検討

実験にはB57BL/6のT-betを高発現する遺伝子改変マウス、対照群として同系の野生型マウスを用いた。

10、20、30、および50週齢の各時点で肺組織を採取し、HE染色とともに、PAS染色、および抗サーファクタントタンパク抗体を用いた免疫染色を行い、肺胞蛋白症の発症を確認した。

気管支肺胞洗浄液中のマクロファージを単離し、蛍光ビーズ貪食能も評価するとともに、フローサイトメトリー解析により肺胞マクロファージと炎症性マクロファージ、マイクロアレイ解析によりM1マクロファージとM2マクロファージをそれぞれ識別した。加えて、肺胞マクロファージにおけるGM-CSF受容体とそのシグナリングの下流に存在するPU.1の発現も検討した。さらに各マウスから末梢血単核球を採取し、リンパ球サブセット、および単球サブセットを解析した。

#### (2) 抗酸菌感染モデルでの検討

B57BL/6のT-betあるいはROR $\gamma$ tを高発現する遺伝子改変マウス、対照群として同系の野生型マウスを用い、*Mycobacterium avium* (*M. avium*) 曝露により、非結核性抗酸菌感染動物モデルを作成した。

*M. avium* 曝露2か月後に肺組織を採取し、肺炎症や肉芽腫形成の程度、*M. avium* 感染感受性、肺組織サイトカインやケモカイン発現レベルについて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 肺胞蛋白症における細胞特異的転写因子の役割

我々はこれまでにTh1細胞の分化誘導を司る転写因子T-betの遺伝子改変マウスを作製し、様々な呼吸器疾患の病態における細胞特異的転写因子の役割について解析してきた。その過程で、T-bet過剰発現マウスは、無菌環境下で何の刺激を加えなくとも生後30週くらいより死亡し始め、肺胞蛋白症に類似した病態が生じていることを偶然に発見した。

本研究では、T-bet転写調節系の異常と肺胞蛋白症の発症との関連を分子レベルで明らかにすることを目的に検討を行った。T-bet高発現マウスでは加齢に伴い、気管支肺胞洗浄液は米のとぎ汁様の外観を呈し、肺組織では肺胞腔内に著明なTリンパ球浸潤およびPAS陽性・SP-A陽性の滲出物が認められ、ヒト肺胞蛋白症に類似した所見がみられることを確認した(図1、2)。

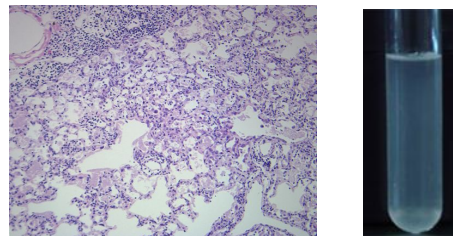


図1: 肺胞腔内に好酸性の無構造物 図2: 米のとぎ汁様の肺胞洗浄液

しかし、GM-CSFシグナリングの下流に存在するPU.1の発現がT-bet-tg高発現マウスの肺胞マクロファージにおいて野生型と同等であったことから、この病態成立にはヒトで示唆されているGM-CSFシグナル伝達の異常とは異なったメカニズムが推察された。

T-bet-tgマウスにおいては、骨髄から末梢血への骨髄球の遊走が亢進していた。また気管支肺胞洗浄液中のマクロファージ分画の増加がみられたが、肺胞マクロファージよりも炎症性マクロファージ、M2マクロファージよりもM1マクロファージの肺内集積が顕著であった。それらマクロファージは大型で泡沫状であり、蛍光ビーズ貪食能が低下していた。以上より、Th細胞におけるT-betの高発現が、単球・マクロファージの遊走、分化、活性化の制御を介して、肺胞蛋白症状の病態成立に関与する可能性が示唆された。

#### (2) 抗酸菌感染症におけるT細胞特異的転写因子の役割

肉芽腫形成は非結核性抗酸菌症において生体防御反応の一つと考えられ、その成立にはマクロファージのほか、Tリンパ球活性化による免疫反応が関与することが示唆されている。

我々は、Th1、Th17細胞の分化誘導をそれぞれに制御する転写因子T-betの遺伝子改変マウス、ROR $\gamma$ tの遺伝子改変マウス、そして野生型マウスそれぞれに*M. avium*を曝露し、

Th1/Th17 フェノタイプが非結核性抗酸菌症の病態にどのように影響するか解析した。T-bet 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して肺組織での *M. avium* 増殖や炎症が著しく、また感染後の死亡も高率であった。さらに同マウスの肺組織では IFN- $\gamma$  は低下し、IL-17 および IL-6 が増加していた。また、ROR $\gamma$ t 高発現マウスに *M. avium* を曝露すると、肺組織での炎症が増強した (図 3A, B)。

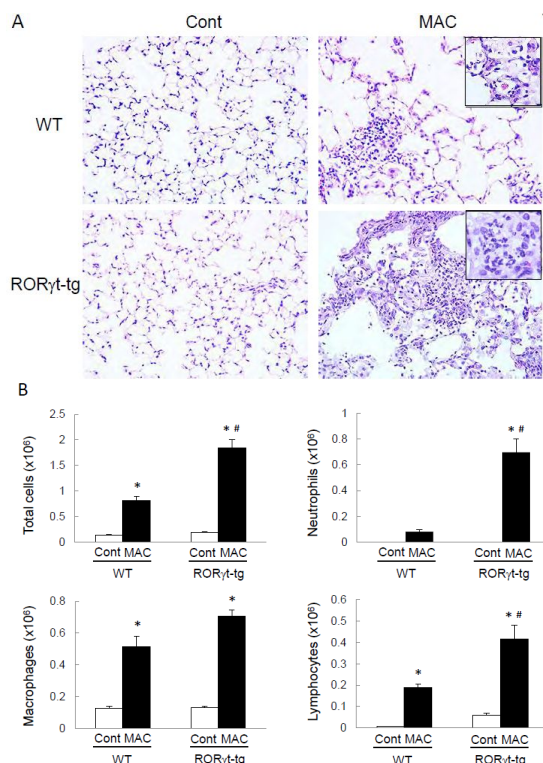


図 3: ROR 高発現マウスでは、*M. avium* 曝露後の肺組織で炎症細胞の浸潤が顕著であった

以上より、Th1/Th17 細胞環境が非結核性抗酸菌感染症の病態を制御する宿主因子の一つであることが示唆された。今後は Th17 細胞環境と炎症性マクロファージとのクロストークについてさらに検討を加える予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Fujita K, Morishima Y, Aida Y, Tsunoda Y, Hida N, Shiozawa T, Nakazawa K, Sekine I, Hizawa N: Afatinib-Induced Severe Interstitial Lung Disease Successfully Treated with High-Dose Corticosteroid Therapy: A Case Report. *J Thorac Oncol*, 査読あり 12:e11-e13, 2017  
DOI: 10.1016/j.jtho.2016.10.011

Haraguchi N, Kikuchi N, Morishima Y, Matsuyama M, Sakurai H, Shibuya A, Shibuya K, Taniguchi M, Ishii Y. Activation of Murine Invariant NKT Cells Promotes Susceptibility to Candidiasis by IL-10 Induced Modulation of Phagocyte

Antifungal Activity.

*Eur J Immunol*, 査読あり 46: 1691-1703, 2016

DOI: 10.1002/eji.201545987

Matsuyama M, Ishii Y, Sakurai H, Ano S, Morishima Y, Yoh K, Takahashi S, Ogawa K, Hizawa N. Overexpression of ROR $\gamma$ t Enhances Pulmonary Inflammation after Infection with Mycobacterium Avium. *PLoS One*, 査読あり 11:e0147064, 2016  
DOI: 10.1371/journal.pone.0147064

Iriguchi S, Kikuchi N, Kaneko S, Noguchi E, Morishima Y, Matsuyama M, Yoh K, Takahashi S, Nakauchi H, Ishii Y: T-cell-restricted T-bet overexpression induces aberrant hematopoiesis of myeloid cells and impairs function of macrophages in the lung. *Blood*, 査読あり 125: 370-382, 2015

DOI: 10.1182/blood-2014-05-575225

森島祐子、石井幸雄、檜澤伸之: 喘息と COPD における遺伝子改変マウスを用いたトランスレショナルリサーチ. *呼吸*, 査読なし 34: 312-324, 2015

<https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=aj0kkyud&ye=2015&vo=34&issue=3>

〔学会発表〕(計 5 件)

櫻井啓文、森島祐子、角田義弥、林士元、際本拓未、松野洋輔、川口未央、石井幸雄、檜澤伸之: 喫煙曝露により誘導されるステロイド抵抗性アレルギー性気道炎症に対するスルフォラフェンの有効性. 第 66 回 日本アレルギー学会学術大会、2017 年 6 月 17 日、東京国際フォーラム、東京、千代田区

Fujii T, Takuwa C, Kikuchi N, Ano S, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N: Clinical significance of KL-6 and surfactant protein D as serum markers in idiopathic interstitial pneumonia. 米国内科学会日本支部年次総会 2017、2017 年 6 月 10 日、京都大学百周年時計台記念館、京都、京都

Sakurai H, Morishima Y, Tsunoda Y, Lin S, Kiwamoto T, Matsuno Y, Kawaguchi M, Ishii Y, and Hizawa N: Sulforaphane Abrogates Steroid Insensitivity in Cigarette Smoke-Induced Airway Inflammation through Nrf2 Dependent Pathway. 2017 International Conference of American Thoracic Society, 2017 年 5 月 23 日, Walter E. Washington Convention Center, U.S.A., Washington, DC

櫻井啓文、森島祐子、角田義弥、林士元、際本拓未、松野洋輔、川口未央、石井幸雄、檜澤伸之: 転写因子 Nrf2 活性化を介した難治性喘息へのアプローチ. 第 57 回 日本呼吸器学会学術講演会、2017 年 4 月 23 日、東京国際フォーラム、東京、千代田区

第 57 回 日本呼吸器学会学術講演会(東京)、池口 文香、中嶋真之、會田有香、森島祐

子、塩澤利博、中澤 健介、増子裕典、小川  
良子、坂本 透、檜澤伸之：抗 IL-6 受容体抗  
体による関節リウマチ治療中に発症した  
Mycobacterium avium complex 胸膜炎の 1 例 .  
第 159 回 日本呼吸器内視鏡学会関東支部会、  
2016 年 11 月 26 日、京王プラザホテル、新宿、  
東京

〔図書〕(計 1 件)

Morishima Y, Hizawa N : Pathogenesis of  
Comorbidities in COPD. In Chronic  
Obstructive Pulmonary Disease; Systemic  
Inflammatory Disease. Edited by H Nakamura  
and K Aoshiba. Springer Science+Business  
Media Singapore Pte Ltd., 115-133, 2016

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

森島 祐子 (MORISHIMA, Yuko)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：10375511

### (2)研究分担者

石井 幸雄 (ISHII, Yukio)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：80272194