

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 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：26461483

研究課題名(和文) 間質性肺炎発症におけるヒトCD161陽性 陽性T細胞の関与

研究課題名(英文) The role of human CD161+gamma delta T cells in interstitial lung disease

研究代表者

後藤 大輔 (GOTO, Daisuke)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50344891

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)：以前からマウスの研究で注目していたNK1.1陽性 T細胞に相当するヒトCD161陽性 T細胞に焦点を当てて研究を行った結果、特に強皮症患者群で末梢血中のCD161陽性 T細胞が減少し、間質性肺炎マーカーのKL-6値と逆相関していた。さらに、間質性肺炎合併患者のCD161陽性 T細胞ではIFN- $\gamma$ の産生能が低下していた。

この現象の意味をモデルマウスで検証した結果、間質性肺炎の病態悪化にはIL-17Aが重要な役割を担っており、このIL-17Aを制御しているのが、T細胞が産生するIFN- $\gamma$ であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：I have reported the inflammatory role of T cells that expressed NK1.1 in PBMCs in interstitial lung disease (ILD) mice models. In humans, mouse NK1.1 is homologous with CD161.

The proportion of CD161+ T cells was significantly higher in systemic sclerosis (SSc) than healthy controls (HCs) and correlated negatively with serum KL-6 levels in ILD-positive SSc patients. CD161+ T cells in ILD-positive SSc patients showed lower production of IFN- $\gamma$  than in HCs. These findings suggest that CD161+ T cells may play a regulatory role in the pathogenesis of ILD in SSc patients via IFN- $\gamma$  production.

In bleomycin-induced ILD model mice, pulmonary T cells were expanded and produced large amounts of IFN- $\gamma$  and IL-17A. Th17 cell differentiation was suppressed in the presence of IFN- $\gamma$  producing T cells. These results suggested that pulmonary T cells seem to play a regulatory role in the development of ILD via the suppression of IL-17A production.

研究分野：膠原病リウマチ学

キーワード：間質性肺炎 T細胞 インターフェロン インターロイキン17A

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 膠原病疾患の臓器障害の中で、間質性肺炎での死亡する例が多い。間質性肺炎を対象とした基礎研究ではプレオマイシン誘導間質性肺炎モデルマウスを用いられることが多いが、線維化を主体としたこのモデルから、現在のところ、治療に結びつく病因は明らかにされていない。

(2) IL-2+IL-18 誘導間質性肺炎モデル<sup>1</sup>は細胞浸潤を主とした間質性肺炎像を呈し、肺以外に炎症を生じない間質性肺炎研究に適したモデルを用いて、NK1.1 陽性 T 細胞が間質性肺炎発症に重要な役割を担っている可能性を明らかとしている。

(3) マウス NK1.1 陽性 T 細胞は、ヒトでは CD161 陽性 T 細胞に相当するが、間質性肺炎発症メカニズムにおいて、この細胞群の関与は不明である。

### 2. 研究の目的

NK1.1 陽性 T 細胞を中心としたマウスの間質性肺炎モデルでの基礎解析をもとに、CD161 陽性 T 細胞を中心としたヒトの膠原病合併間質性肺炎での病態解明と、新規治療標的の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 膠原病患者検体を用いた研究

1 対象患者群として強皮症(SSc) 34 例、関節リウマチ(RA) 17 例、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM) 14 例を用いた。また、健康人(HC) 22 例をコントロールとして用いた。

2 各群の末梢血単核球を抗体で染色し、FACS Calibur flow cytometer で測定し、データ解析には FlowJo software を用いて解析した。

3 各疾患群の間質性肺炎の有無と KL-6 値は、通院カルテを参照した。

4 健康人(n=1)、IP 非合併 SSc 患者(n=1) および IP 合併 SSc 患者(n=1)由来 PBMCs より、CD161 陽性 V $\alpha$ 1 陽性細胞を単離後、IL-2、PHA と feeder 細胞と共培養し、CD161 陽性 V $\alpha$ 1 陽性細胞株を樹立した。抗 TCR V $\alpha$ 1 抗体で刺激後、培養上清中の CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 及び IFN- $\gamma$  産生量を測定した。

(2) ヒトでの研究結果を受けて、マウスモデルを用いた研究

1 プレオマイシン誘発性間質性肺炎 C56BL/6 (野生型) マウス、8~10 週齢の雌を用いた。C57BL/6 バックグラウンドの TCR 鎖欠損 (T 細胞欠損) マウスは理研バイオリソースセンターより提供を受けた。プレオマイシンを経気管内投与し、間質性

肺炎を誘導した。コントロールとして、PBS を投与した群を用いた。

2 肺組織より得られたリンパ球は PMA + ionomycin + GolgiStop 存在下、6 時間培養を行った。培養後の細胞は各種抗サイトカインモノクローナル抗体を用いて染色した。

3 野生型マウスに IL-2+IL-18 を腹腔内投与後、3, 6, 12, 24, 48hr 後の肺組織を採取した。採取した肺組織は PBS に保存し、多検体細胞破砕機を用いて組織破砕後、遠心し、上清を回収した。上清中の IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  産生量の測定には、ELISA kit を用いた。

### 4. T 細胞移入実験

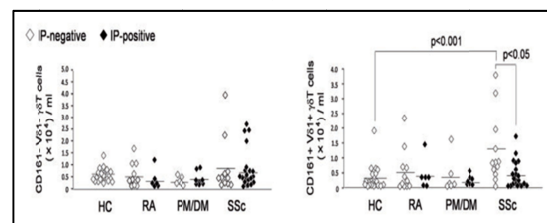
野生型マウス肺組織よりリンパ球を単離後、細胞を染色して CD3 陽性 TCR 陽性 (T) 細胞を単離した。単離した T 細胞は、IL-2、IL-7 および IL-15 存在下で 12 日間培養を行った。増殖した T 細胞は、前日にプレオマイシン処置を行った T 細胞欠損マウスへ移入( $1 \times 10^5$  個/匹)した。

### 4. 研究成果

(1) 膠原病患者検体を用いた研究

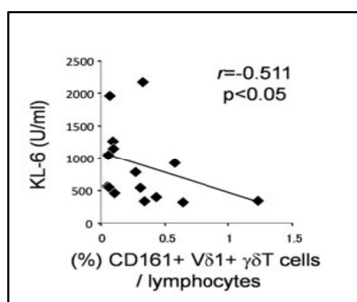
1 マウスで注目した NK1.1 陽性 T 細胞は、ヒトでは CD161 陽性 T 細胞に相当し、その機能を解析したところ IFN- $\gamma$  と IL-17 の産生能が高いことが明らかとなった。

2 膠原病患者の中でも、特に強皮症患者において、予想とは異なり、間質性肺炎合併群より、むしろ間質性肺炎非合併群で、間質性肺炎発症に重要と考える CD161 陽性 T 細胞が末梢血中で増加していた。さらに、間質性肺炎のマーカーとして知られる KL-6 値と末梢血中 CD161 陽性 T 細胞数とは負の相関を示した。



3 上記の理由を解析するため、強皮症患者と健康人の CD161 陽性 T 細胞の細胞株を樹立して比較した結果、強皮症患者由来の細胞株では抗線維化作用のある IFN- $\gamma$  の産生が低下し、また IFN- $\gamma$  の抑制作用を持つ CCL-3 の産生能が低下していることが明らかとなった。つまり強皮症患者では通常とは性質の異なる CD161 陽性 T 細胞が

増加し、線維化を促進している可能性が示唆された。



(2) ヒトでの研究結果を受けて、マウスモデルを用いた研究

ヒト検体での解析には限界があり、ヒト検体で得られたデータから、線維化傾向の強い強皮症病態を考え、プレオマイシン誘導間質性肺炎モデルマウスでの解析を行った。

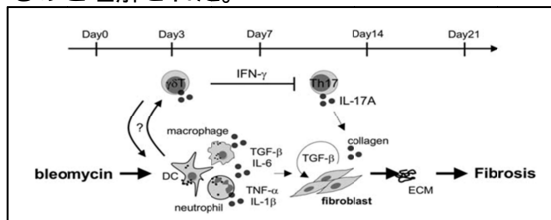
1 間質性肺炎モデルマウスでの肺組織には T細胞が増加し、その T細胞を解析すると、ヒトの末梢血中 CD161 陽性 T細胞と同様に IFN- と IL-17 の産生能が高かった。

2 IFN- と IL-17 と、どちらが間質性肺炎病態に重要であるかを、それぞれの欠損マウスを用いて解析したとこと、どちらの欠損マウスにおいても、肺でのコラーゲン産生が低下していた。

3 T細胞欠損マウスを用いて間質性肺炎を誘導すると、野生型マウスよりも間質性肺炎病態は悪化し、肺組織内に IL-17A 産生 T細胞が増加していることを見出した。

4 IL-17A 欠損マウスを用いたところ、野生型マウスでも、さらに間質性肺炎病態が増悪する T細胞欠損マウスでも、肺の繊維化病態は改善した。

5 T細胞欠損マウスを用いた研究から、T細胞が産生する IFN- により IL-17A 産生 T細胞の分化が制御されることが明らかとなった。そのため、3の事象が生じたものと理解された。



< 引用文献 >

1 Okamoto M, *et al.* Interleukin 18 (IL-18) in synergy with IL-2 induces lethal lung injury in mice: a potential role for cytokines, chemokines, and natural killer cells in the pathogenesis of interstitial pneumonia. *Blood* 2002; 99:1289-1298

## 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2件)

1 Segawa S, Goto D, Iizuka A, Kaneko S, Yokosawa M, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T. The regulatory role of interferon-producing gamma delta T cells via the suppression of T helper 17 cell activity in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol.* 2016; 185(3): 348-60. (査読有)

DOI: 10.1111/cei.12802.

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

DOI: 10.1093/rheumatology/keu246.

[学会発表] (計11件)

1 瀬川誠司、後藤大輔、飯塚 晃、松本 功、住田孝之、サイトカイン阻害による間質性肺炎病態制御機構の検討、厚生労働省「強皮症の病態解明および革新的医薬品開発の研究」研究班 2016 年度班会議・第 20 回強皮症研究会議、アステラス製薬株式会社 本

社別館 8 階、東京都、中央区、2017 年 1 月 14 日

2 瀬川誠司、後藤大輔、飯塚 晃、金子駿太、横澤将宏、近藤裕也、松本 功、住田孝之、 NKT 細胞によるブレオマイシン誘導間質性肺炎病態抑制能の解析、第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市、2016 年 4 月 21-23 日

3 瀬川誠司、後藤大輔、飯塚 晃、松本 功、住田孝之、 T 細胞による間質性肺炎病態抑制機序の解析、厚生労働省「強皮症の病態解明および革新的医薬品開発の研究」研究班 2015 年度班会議・第 19 回強皮症研究会議、大正富山製薬株式会社 上原記念ホール、東京都、豊島区、2016 年 1 月 16 日

4 Segawa S, Goto D, Iizuka A, Kaneko S, Yokosawa M, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T. The role of T cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sapporo, Japan, 18-20. Nov. 2015

5 Segawa S, Goto D, Iizuka A, Kaneko S, Yokosawa M, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T. The regulatory role of T cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. ACR 79<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, San Francisco, CA, USA, Nov.6-11, 2015

6 瀬川誠司、後藤大輔、飯塚晃、近藤裕也、松本功、住田孝之、 T 細胞による間質性肺炎病態制御機構の解析、第 2 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、東京大学 医学部教育研究棟 鉄門記念講堂、東京都、文京区、2015 年 10 月 2-3 日

7 瀬川誠司、後藤大輔、飯塚晃、近藤裕也、松本功、住田孝之、ブレオマイシン誘導間質性肺炎における T 細胞の機能解析、第 30 回自己免疫研究会、京王プラザホテル、東京都、新宿区、2015 年 7 月 11 日

8 瀬川誠司、後藤大輔、飯塚 晃、松本 功、住田孝之、ブレオマイシン誘導間質性肺炎における NKT 細胞の機能解析、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市、2015 年 4 月 23-25 日

9 瀬川誠司、後藤大輔、飯塚 晃、松本 功、住田孝之、ブレオマイシン誘発性間質性肺炎モデルマウスにおける T 細胞の機能解析、厚生労働省「強皮症の病態解明および革新的医薬品開発の研究」研究班 2014 年度班会議、第一三共株式会社東京支店 第一三共日本橋ビル、東京都、中央区、2015 年 1 月 17 日

10 Segawa S, Goto D, Iizuka A, Matsumoto I, Sumida T. The role of TCR Vdelta1+ gammadeltaT cells in systemic sclerosis patients with interstitial pneumonitis. The 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Kyoto, Japan, 10-12. Dec.2014

11 瀬川誠司、後藤大輔、堀越正信、飯塚 晃、松本 功、住田孝之、間質性肺炎合併強皮症患者における NKT 細胞の機能解析、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、東京国際フォーラム、東京都、千代田区、2014 年 4 月 24-26 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 大輔 (GOTO, Daisuke)  
筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50344891

(4)研究協力者

瀬川 誠司 (SEGAWA, Seiji)