

氏名(本籍)	まつ の よう すけ (茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第4784号		
学位授与年月日	平成20年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Overexpression of GATA-3 Protects Against the Development of Hypersensitivity Pneumonitis</b> (GATA-3の過剰発現は過敏性肺炎を抑制する)		
主査	筑波大学教授	医学博士	久武幸司
副査	筑波大学准教授	医学博士	鬼塚正孝
副査	筑波大学准教授	理学博士	中村二郎
副査	筑波大学講師	博士(医学)	鈴川和己

## 論文の内容の要旨

### (目的)

過敏性肺炎(HP)は環境中の様々な抗原を反復吸入することで発症し、病理学的には慢性炎症細胞浸潤と肉芽腫形成により特徴づけられる。HPの病態にはTリンパ球が関与し、とくにTh1タイプの免疫反応が重要であることが動物モデルの解析などから明らかになってきている。転写因子GATA-3はTh2への分化・Th2サイトカインの発現において重要な役割を果たす一方、Th1サイトカインの発現を抑制する作用があり、Th1が関与する疾患においてGATA-3は病態の抑制に関わっている可能性が考えられる。今回GATA-3過剰発現マウスを用い、GATA-3の過剰発現がマウスの過敏性肺炎に及ぼす影響を検討した。

### (対象と方法)

野生型C57BL/6マウス及び同系のGATA-3過剰発現マウスを用いた。ヒト農夫肺の原因抗原であるSaccharopolyspora rectivirgula(SR)を週に3日間経鼻投与し、これを3週間繰り返してHPの動物モデルを作成した。最終曝露から4日後にマウスを屠殺し、肺組織の病理学的評価、肺重量/体重比の測定、気管支肺胞洗浄を行った。全肺よりRNAを抽出しRT-PCRにてT-bet、GATA-3、Th1・Th2サイトカインの発現を評価した。全肺より細胞を単離しフローサイトメトリーにてリンパ球サブセット、細胞内IFN- $\gamma$ 陽性細胞の解析を行った。またGATA-3過剰発現マウスにSR曝露とともにIFN- $\gamma$ の補充療法を行い、HPに対する影響を評価した。さらにBL/6のヌードマウスに対し、野生型またはGATA-3過剰発現マウスの脾臓より分離したCD4+T細胞を移植して再構築を行った上でSRの曝露を行いHPの評価を行った。

### (結果)

コントロール群のGATA-3過剰発現マウスのGATA-3 mRNAの発現は野生型マウスに較べ約3.5倍であった。SR曝露にて野生型マウスではT-betの発現が有意に増加したが、GATA-3過剰発現マウスではT-betの発現には変化がなく、GATA-3の発現はさらに増加した。

病理組織標本では、血管・気管支周囲を中心としたリンパ球主体の炎症細胞浸潤はGATA-3過剰発現マウスのほうが野生型マウスと較べ減弱していた。肺重量/体重比、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、マクロ

ファージ数, リンパ球数は野生型と比べ GATA-3 過剰発現マウスで低下していた。SR 曝露にて野生型マウスでは IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  の発現が増加したが GATA-3 過剰発現マウスでは変化がなく, Th2 サイトカインについては GATA-3 過剰発現マウスのみで IL-5 と IL-13 の発現が増加した。

肺細胞のリンパ球サブセットの解析では, 野生型, GATA-3 過剰発現マウスともに, SR 曝露後は主に CD4+T 細胞の増加を認めた。IFN- $\gamma$  産生 CD4+T 細胞の割合は野生型マウスと比べて GATA-3 過剰発現マウスで低下していた。

GATA-3 過剰発現マウスに対し IFN- $\gamma$  の補充療法を行ったところ, 病理組織, 気管支肺胞洗浄において野生型と同程度まで HP の増強を認めた。GATA-3 過剰発現マウスの CD4+T 細胞を移植されたヌードマウスでは, 野生型マウスの CD4+T 細胞を移植されたヌードマウスに比べて, 病理組織上 HP の程度が減弱し, 肺組織での IFN- $\gamma$  mRNA の発現が低下していた。

(考察)

GATA-3 過剰発現マウスでは IFN- $\gamma$  mRNA の発現が低下していた。GATA-3 が Th1 サイトカインの発現を抑制する可能性が示唆されるが, Th1 サイトカインが重要な役割を担う疾患において GATA-3 は治療のターゲットになりうると考えられた。また, GATA-3 過剰発現マウスでは SR 曝露後 IL-5 と IL-13 mRNA の発現が増加したが, 好酸球増加や粘液の過分泌等は認められず, これらのサイトカインの増加の意義は Th1 サイトカインの抑制と比し限定的と考えられた。一方, 野生型マウスでは SR 曝露後 T-bet の発現が増加した。IFN- $\gamma$  は T-bet の発現を増加させることが知られており, 両者の間でのポジティブフィードバックループにより Th1 反応が増強される可能性が考えられた。GATA-3 過剰発現マウスでは T-bet の発現の誘導がみられなかったが, GATA-3 による Th1 の抑制は T-bet を介さないとの報告があり, IFN- $\gamma$  の抑制を介した GATA-3 の間接的な影響による可能性が考えられた。

IFN- $\gamma$  の補充により GATA-3 過剰発現マウスにて HP が増強し, IFN- $\gamma$  が HP の重症度の決定に重要であると考えられた。HP の早期では主に好中球が IFN- $\gamma$  を産生し, 続いて IP-10 等のケモカイン産生を介して肺に CXCR3+CD4+T 細胞等が遊走するとされるが, HP 後期での IFN- $\gamma$  産生は主にこの CD4+T 細胞によると考えられる。GATA-3 過剰発現マウスでの好中球の遊走や IFN- $\gamma$  産生は野生型マウスと比べて差を認めなかったことから, GATA-3 の効果は主に CD4+T 細胞の IFN- $\gamma$  産生を介したものと考えられた。CD4+T 細胞を再構築したヌードマウスを用いた実験により, HP の病態形成には CD4+T 細胞が重要であることが示された。CD4+T 細胞の特性の調節により HP は制御しうると考えられた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では, 環境中の様々な抗原の反復吸入が原因となり慢性炎症細胞浸潤と肉芽腫形成を特徴とする過敏性肺炎 (HP) の病態を解明する目的で, GATA-3 過剰発現マウスを用いて GATA-3 が過敏性肺炎に及ぼす影響を検討した。具体的には, GATA-3 過剰発現マウスに *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR) を経鼻投与し, 肺組織の病理学的評価, 肺重量/体重比の測定, 肺 T-bet, GATA-3, Th1・Th2 サイトカインの発現等を評価した。また全肺より細胞を単離しフローサイトメトリーにてリンパ球サブセット, 細胞内 IFN- $\gamma$  陽性細胞の解析を行った。

その結果, GATA-3 過剰発現マウスの GATA-3 mRNA の発現は野生型マウスに比べ約 3.5 倍であり, SR 曝露にて野生型マウスでは T-bet の発現が有意に増加した。病理組織標本から, 炎症細胞浸潤は GATA-3 過剰発現マウスのほうが野生型マウスと比べ減弱していた。肺重量/体重比, 気管支肺胞洗浄液中の総細胞数, マクロファージ数, リンパ球数は野生型と比べ GATA-3 過剰発現マウスで低下していた。また, SR 曝露にて野生型マウスでは IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  の発現が増加したが, GATA-3 過剰発現マウスでは変化がなかった。さ

らにGATA-3過剰発現マウスのみでIL-5とIL-13の発現が増加した。肺細胞のリンパ球サブセットの解析では、IFN- $\gamma$ 産生CD4+T細胞の割合は野生型マウスと較べてGATA-3過剰発現マウスで低下していた。GATA-3過剰発現マウスに対しIFN- $\gamma$ の補充療法を行ったところ、病理組織、気管支肺胞洗浄において野生型と同程度までHPの増強を認めた。GATA-3過剰発現マウスのCD4+T細胞を移植されたヌードマウスでは、野生型マウスのCD4+T細胞を移植されたヌードマウスに較べて、病理組織上HPの程度が減弱し、肺組織でのIFN- $\gamma$  mRNAの発現が低下していた。以上の研究成果は、GATA-3がIFN- $\gamma$ の発現を介してTh1反応を抑えてHPを抑制することを示唆しており、特にHPの病態を分子レベルで明らかにした点が高く評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。