

氏名（本籍）	松山 政史（東京都）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 7053 号		
学位授与年月	平成26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	Role of Th1/Th17 Balance Regulated by T-bet in Pulmonary Mycobacterium avium Complex infection （肺MAC感染における、T-bet が規定する Th1/Th17 バランスの役割）		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	渋谷 彰
副査	筑波大学教授	博士（医学）	人見 重見
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	齋藤 慎二
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	松本 功

### 論文の内容の要旨

#### （目的）

Mycobacterium avium complex(MAC)は代表的な非結核性抗酸菌である。肺 MAC 症は MAC によってひきおこされる慢性肺感染症であり、抗結核薬などの治療に抵抗性を示す難治性感染症である。近年、肺 MAC 症の罹患率が著増しており、社会的にも問題になりつつある。肺 MAC 症は、やせ形の閉経後女性に好発し、発症進展に個人差があることから、何らかの宿主側因子が関与することが推測されているが、宿主側因子の解明を含めた病態生理の詳細は未だ不明である。

結核の感染防御には Th1 細胞や Th1 サイトカインであるインターフェロン(IFN)- $\gamma$  が重要である。T-bet は Th1 細胞への分化や IFN- $\gamma$  の産生を制御する転写因子であり、その欠損は結核感染を増悪させることが知られている。しかしながら、MAC 感染症と T-bet との関係については今までに報告がない。本研究では、T-bet 遺伝子改変マウスを用いて肺 MAC 症マウスモデルを作成し、MAC 感染や病態形成におよぼす T-bet の役割について個体、細胞、および分子レベルで解析を行った。

#### （対象と方法）

動物は Balb/c 野生型マウス、および同系統の T-bet 欠損(T-bet<sup>-/-</sup>)マウス、T-bet 過剰発現(T-bet<sup>tg/tg</sup>)マウスを用いた。マウスに肺 MAC 症患者からの臨床分離株 (*Mycobacterium avium subsp. hominissuis*)を  $1 \times 10^7$  CFU 気管内投与することで、肺 MAC 症モデルを作成した。各マウスから腹腔マクロファージ、樹状細胞、CD4 陽性リンパ球を採取し、細胞レベルの解析を行った。

(結果)

T-bet<sup>+/+</sup>マウスでは、野生型、および T-bet<sup>tg/tg</sup> マウスに比べ、MAC 感染後の死亡率、および、肺、脾臓、肝臓など主要臓器の MAC 生菌数が有意に高値であった。MAC 感染後の野生型マウス肺組織では、気管支血管周囲に肉芽腫を伴う炎症細胞浸潤を認め、肺 MAC 症の病理像に類似していた。T-bet<sup>+/+</sup>マウスでは、野生型マウスに比べ、感染後の炎症所見が高度で、肺胞領域まで及んでいた。一方、T-bet<sup>tg/tg</sup> マウスでは、野生型マウスに比べ炎症所見が軽微であった。MAC 感染後の気管支肺胞洗浄液好中球数は、野生型マウスに比べ T-bet<sup>+/+</sup>マウスでは顕著に増加し、一方 T-bet<sup>tg/tg</sup> マウスでは低下していた。これらの結果から、T-bet は MAC の増殖進展を抑制し、さらに肺好中球性炎症を抑制することが示された。

MAC 感染後の IFN $\gamma$  の発現は、肺組織、CD4 陽性 T 細胞ともに T-bet<sup>+/+</sup>マウスでは野生型マウスに比べ低下し、逆に T-bet<sup>tg/tg</sup> マウスでは増加していた。一方、Th17 サイトカインであるインターロイキン(IL)-17、および IL-6 の各発現は肺組織、CD4 陽性 T 細胞ともに T-bet<sup>+/+</sup>マウスでは増加し、逆に T-bet<sup>tg/tg</sup> マウスでは減少していた。誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の肺組織における発現は IFN $\gamma$ 同様 T-bet<sup>+/+</sup>マウスで低下し、T-bet<sup>tg/tg</sup> マウスでは増加していた。Th2 サイトカインである IL-4 の発現は各マウス間で有意な変化を認めなかった。

MAC 感染 T-bet<sup>+/+</sup>マウスに IFN $\gamma$ を投与すると、非投与マウスと比べ主要臓器の生菌数が減少したが、気管支肺胞洗浄液の炎症細胞数には変化を認めなかった。一方、MAC 感染 T-bet<sup>+/+</sup>マウスに抗 IL-17 抗体を投与すると、非投与マウスと比べ気管支肺胞洗浄液の炎症細胞数は減少したが、主要臓器の生菌数には変化を認めなかった。

各マウスから採取した腹腔マクロファージ、樹状細胞に MAC を感染させ、これらの細胞における、T-bet の役割を解析した。腹腔マクロファージにおける MAC 殺菌能は、外因性に IFN $\gamma$ を投与することで野生型、T-bet<sup>+/+</sup>、T-bet<sup>tg/tg</sup> マウスいずれも亢進したが、3 群間で差は認めなかった。MAC 曝露に伴う Th1 誘導サイトカイン (IL-12)、Th17 誘導サイトカイン(IL-6, IL-23)の各発現は腹腔マクロファージ、樹状細胞ともに野生型、T-bet<sup>+/+</sup>、T-bet<sup>tg/tg</sup> マウス間で差を認めなかった。これらの結果より、T-bet は腹腔マクロファージにおける IFN $\gamma$ 誘導性殺菌能や、MAC 曝露に伴う抗原提示細胞のサイトカイン産生能に直接の影響を与えないことが示された。

各マウスより採取した CD4 陽性 T 細胞と野生型マウスから採取した樹状細胞を MAC 曝露下に共培養し、培養上清中の IFN $\gamma$ 、IL-17 濃度を比較した。T-bet<sup>+/+</sup>マウス由来 CD4 陽性 T 細胞共培養群では、野生型、および T-bet<sup>tg/tg</sup> 由来 CD4 陽性 T 細胞共培養群に比べ、IFN $\gamma$ 濃度の低下、IL-17 濃度の増加を認めた。T-bet<sup>+/+</sup>マウス由来 CD4 陽性 T 細胞共培養群では、iNOS 発現量も他群に比べ低下していた。T-bet<sup>+/+</sup>マウス由来 CD4 陽性 T 細胞共培養群に NO 供与体である SNAP を加えると、同培養上清中の IL-17 濃度は顕著に低下した。これらの結果から、T-bet は iNOS 発現誘導を介した NO 産生を増強することで、MAC 感染後の Th17 分化を抑制していることが推測された。

(考察)

MAC 臨床分離株を経気道感染させることで、緩徐に進行する MAC 慢性感染症マウスモデルを作成した。T-bet<sup>+/+</sup>マウスでは野生型マウスに比べ好中球集積を特徴とする肺炎症が高度であった。肺組織におけるサイトカイン解析から、T-bet<sup>+/+</sup>マウスでは感染後の Th1 抑制とともに、Th17 偏移が生じていることが明らかとなり、このことが好中球性炎症を惹起する一因と考えられた。T-bet

は感染後の IFN $\gamma$  の産生、NO の産生を中心とした Th1 反応を亢進するとともに、Th17 反応抑制による過剰炎症抑制をもたらすことで肺 MAC 症の発症進展、および重症化を防御する宿主側因子である可能性が示された。

今回の研究により、MAC 感染においては Th1/Th17 バランスが感受性を規定することが示された。また、このバランスを NO が制御していることが推測された。NO が肺 MAC 症患者の気道の線毛機能を亢進させることにより、粘液線毛クリアランスを改善することが最近報告されている。Th1/Th17 バランスを調節するだけでなく、粘液線毛クリアランスも改善することで、NO 誘導剤が肺 MAC 症の新たな治療薬につながる可能性があり研究を継続していきたい。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本論文は非結核性抗酸菌である MAC の肺感染症における免疫病態を解析し、Th1/Th17 細胞のバランスが MAC 感染の感受性を規定していることを初めて明らかにした価値の高い論文である。

平成 25 年 12 月 27 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。