

筑波大学

博士(医学)学位論文

**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

2013

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

松山政史

目次

略語	4
背景	5
・肺 MAC 症の発症進展	
・MAC 感染症、肺 MAC 症と宿主免疫	
目的	8
方法	9
結果	14
・MAC 感染感受性に及ぼす T-bet の影響	
・MAC 感染後肺炎症に及ぼす T-bet の影響	
・MAC 感染後の Th 反応に及ぼす T-bet の影響	
・Th 細胞の Th1、Th17 サイトカイン産生に及ぼす T-bet の役割	
・全身性の Th1/Th17 反応に及ぼす T-bet の役割	
・T-bet ^{-/-} マウスの MAC 感受性に及ぼす IFN- γ の効果	
・T-bet ^{-/-} マウスの MAC 感受性に及ぼす IL-17 の効果	
・マクロファージ、および樹状細胞における T-bet の役割	
・MAC 感染後の NO 産生に及ぼす T-bet の影響	
考察	19
結論	23
Tabel・Figures	24
参考文献	35
謝辞	40
参考論文	41

略語

BAL, bronchoalveolar lavage

CFU, colony forming unit

HIV, human immunodeficiency virus

HLA, human leukocyte antigen

IFN γ , interferon-gamma

IL, interleukin

iNOS, inducible NO synthase

MOI, multiplicity of infection

MAC, *Mycobacterium avium* complex

NTM, nontuberculous mycobacteria

NO, nitric oxide

SNAP, S-nitroso-*N*-acetylpenicillamine

T-bet, T-box expressed in T cells

T-bet^{-/-} mice, T-bet knockout mice

T-bet^{tg/tg} mice, T-bet-overexpressing transgenic mice

Th, helper T

Th1, type 1 helper T

Th2, type 2 helper T

Th17, type 17 helper T

Treg, regulatory T cells

TNF- α , tumor necrosis factor- α

TGF- β , transforming growth factor- β

背景

・肺 MAC 症の発症進展

抗酸菌とはマイコバクテリウム属に属する細菌グループの総称である。このうち、結核菌と、らい菌を除く抗酸菌が非結核性抗酸菌である。非結核性抗酸菌は主に土や水などの自然環境に広く存在しており、ヒトからヒトへは感染しないが、環境から直接にヒト感染症を引き起こす。肺非結核性抗酸菌感染症はいまだ決定的な治療法が存在しない難治性感染症である。非結核性抗酸菌感染症の 8 割を、*Mycobacterium avium complex* (MAC) が占める。肺結核の罹患率が減少する一方で、肺 MAC 症の罹患率は過去 20 年で著しく増加しており、早急な対策が必要である。MAC 感染症の病型は、1) 結節・気管支拡張型、2) 線維空洞型 (結核類似型)、3) 孤立肺結節型、4) 全身播種性型、5) 過敏性肺炎型 (hot tub lung) の 5 つに分けられる。近年の肺 MAC 症の罹患率増加の最大要因は、結節・気管支拡張型の増加によるものであり、明らかな免疫不全のない閉経後の中老年女性に急増している。環境常在菌の MAC がなぜ肺感染症を引き起こすのか、その病態生理の詳細は未だ不明であるが、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。臨床検体を用いた疾患感受性遺伝子探索研究からは、*HLA*、*NRAMP1*、*CFTR*、*MICA* 等の遺伝子多型が肺 MAC 症の疾患感受性と関連することが報告されている²⁷。*CFTR* は、気道の粘液線毛クリアランスに関係する分子であり、他はいずれも免疫細胞の機能に関わる遺伝子である。また、閉経後女性に罹患しやすいという点に関連して、エストロゲンが自然免疫に影響を及ぼすことがマウスモデルの実験から指摘されている⁸。家族内発症した肺 MAC 症の解析から、女性、閉経が肺 MAC 症の発症、糖尿病、*HLA-A26* が同増悪のそれぞれ危険因子であることが示された⁹。以上より、免疫担当細胞の機能的差異は肺 MAC 症の発症や増悪に関わる重要な宿主側因子であることが実地臨床研究から推測される。

・MAC 感染症、肺 MAC 症と宿主免疫

一般的に抗酸菌はマクロファージのファゴライゾーム内で発育する細胞内寄生菌である。Th1 反応は細胞内寄生菌に対する防御において重要であると考えられている。Th1 サイトカインの IFN- γ はマクロファージ内における NO 産生を亢進し、殺菌活性を高め

る¹⁰。IL-12はTh1細胞分化を誘導するサイトカインで、自然免疫と獲得免疫の橋渡しを担っている^{10,11}。また、IFN- γ はマクロファージ、樹状細胞上のIFN- γ 受容体を介し、これらの細胞からのIL-12産生を促進する。このIL-12とIFN- γ による、自然免疫と獲得免疫の活性化におけるポジティブフィードバック機構は、IFN- γ /IL-12軸と呼ばれる。

上述した全身播腫型のMAC症については、このIFN- γ /IL-12軸を中心としたTh1免疫が重要であることが今迄の研究より明らかとなっている。メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症(MSMD)はまれな先天的免疫不全疾患であり、BCGやMACなどの弱毒抗酸菌に易感染性を呈することを特徴とする。MSMDにおけるMAC症は、全身性、播種性の形態をとることが多い。家族性発症がみられ、両親の血族結婚の頻度が高く、ほとんどは常染色体劣性遺伝形式をとるが、伴性劣性遺伝や常染色体優性遺伝形式をとるものもある。IFN- γ 受容体、IL-12受容体、およびそのシグナル伝達分子の遺伝的欠損が同疾患において高頻度で認められる^{12,13}。さらに、播種性MAC症の発症原因の1つとして、IFN- γ に対する自己抗体産生が最近報告された¹⁴。また、HIV感染患者では、CD4陽性T細胞の減少に伴い細胞性免疫が破綻するため、抗酸菌に対し易感染性となる。MAC症は後天性免疫不全症候群(AIDS)の指標疾患の1つにも挙げられるHIV感染患者の代表的合併症である¹⁵。AIDSに伴うMAC症は他の免疫不全患者と同様に播種性MAC症の病型をとるのが一般的である。ただし、侵入門戸は気道ではなく消化管であり、血行性に全身臓器(肝、脾、骨、皮膚、リンパ節)に感染巣を形成する^{16,17}。

このように、播種性MAC症においては、IFN- γ /IL-12軸を中心としたTh1応答が重要であることは疑う余地がない。しかしながら、明らかな免疫不全を有さない肺MAC症において、Th1を主体とする細胞性免疫の役割がどれだけ重要であるかは不明である。刺激後の末梢血単核球におけるIL-12、TNF- α 、IFN- γ 産生能は健常者と比較して、肺MAC症患者で減少していたとする報告があり^{18,19}、これらの結果からはTh1免疫が肺MAC症においても重要であることが示唆される。一方、IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α 、およびIFN- γ のサイトカイン産生に、肺MAC症患者と健常者の間で有意な差はないという報告もあり²⁰、肺MAC症とTh1免疫についてはさらなる研究が必要である。

ナイーブCD4陽性T細胞は抗原や微生物の曝露により、それぞれの特異的な転写因子が活性化されることでTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞、Treg細胞など、様々なヘル

パーT細胞に分化する^{21,22}。T-betはTh1細胞分化のマスター調節因子であり、Th1サイトカインの産生に必須の転写因子である²³。T-betはTh1細胞の分化を促進するだけでなく、Th2細胞特異的転写因子であるGATA-3に拮抗的に作用しTh2細胞分化を抑制することでTh1/Th2バランスを制御する^{23,24}。実際、T-bet欠損マウス(*T-bet*^{-/-})マウスではリーシュマニア、結核菌、サルモネラ・チフス菌などの細胞内寄生菌に対する感受性が亢進することが報告されている²⁵⁻²⁷。

目的

Th1 反応は細胞内寄生菌に対する主要免疫応答であり、それを制御する T-bet は細胞内寄生菌感染の感受性を規定する重要な宿主側因子であると考えられる。しかしながら、MAC 感染、および肺 MAC 症に対する T-bet の役割は全くわかっていない。従って、本研究の目的は MAC 感染、肺 MAC 症における T-bet の役割を明らかにし、将来の治療応用へ向けた基礎的情報として役立てることである。本研究では、肺 MAC 症動物モデルを確立し、T-bet 遺伝子改変マウスを感染モデルに使用することで、MAC 感染、および肺 MAC 症の発症進展におよぼす T-bet の役割を明らかにした。

方法

MAC 菌

肺 MAC 症患者由来 MAC 菌株、*M. avium subsp. Hominissuis* (国立病院機構東名古屋病院呼吸器内科、小川賢二博士より供与) を使用した。同菌を 7H9 液体培地で 14 日間培養後菌量を調整し、使用するまで -80°C で保存した。

マウス、および MAC 感染

Human CD2 プロモーター下に T-bet を発現する T-bet 過剰発現 (*T-bet^{tg/tg}*) マウスは共同研究者より供与された²⁸。同マウスを Balb/c マウスで 8 代にわたり戻し交配し、Balb/c *T-bet^{tg/tg}* マウスを作成した。Balb/c *T-bet^{+/+}* マウスと野生型 Balb/c マウスは The Jackson Laboratory から購入した。実験には 8 週から 12 週齢の雌マウスを使用した。上記菌株 (1×10^7 CFU) を生理食塩水で 50 μl に溶解し、ポリエチレンチューブを用いて気管内に投与した。対照群には生理食塩水 50 μl を投与した。

生存率

野生型、*T-bet^{+/+}*、および *T-bet^{tg/tg}* 各マウスにおける MAC 感染後の生存を 10 ヶ月まで観察した。各群それぞれ 20 匹のマウスを用いた。

臓器内菌数の測定

感染マウスから無菌的に、肺、脾臓、肝臓を摘出し、臓器内の生菌数を還元培養法により求めた。すなわち、各臓器をガラスホモジナイザーで磨砕し、0.02% tween 20 入り滅菌蒸留水で 10 倍に希釈した。同臓器懸濁液を、10 倍づつ段階希釈し、それぞれの希釈液を 100 μL づつ 10% OADC enrichment 添加 7H10 agar に接種した。37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 週間培養後、形成されたコロニー数を計測し、臓器当たりの生菌数 (CFU) を算定した。実験には各群 8 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

病理組織

マウスから肺を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定後、パラフィンに包埋し

た。同標本を薄切、脱パラフィンの後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理像を観察した。抗酸菌の同定のために、Ziehl-Neelsen 染色も行った。

気管支肺胞洗浄(BAL)

マウス気管にカニューレを挿入し、結紮固定した。同カニューレより 1ml の生理食塩水を注入、回収することで気管支肺胞洗浄を行った。マウス毎に計 6 回の洗浄を施行し、得られた細胞数を、血球計算盤で測定した。サイトスピンを用いてスライドグラスに細胞を接着後、Diff-Quick 染色を施行し細胞分画を算定した。実験には各群 4 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

RT-PCR

肺組織、脾臓由来 CD4 陽性リンパ球、培養腹腔マクロファージ、および脾臓由来樹状細胞から RNeasy kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写を行い cDNA を作成した。リアルタイム定量 PCR は、Table 1 に示したプライマーを用い、ABI 7500 (Applied Biosystems) で行った。各遺伝子の発現は対応する GAPDH の遺伝子発現で標準化した。実験には各群 4 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

T 細胞サイトカイン発現解析

感染 2 か月後の肺組織を摘出、細切後、75 U/ml のコラゲナーゼ (type 1; Sigma) 添加 10% FBS-RPMI1640 溶液に 37°C、90 分間浸漬した。分離された細胞を 20- μ m のナイロンメッシュで分離後、25 ng/ml PMA (Sigma), 1 μ g/ml ionomycin (Sigma), 組み換え型マウス IL-2 (Peprotech), および 10 μ g/ml brefeldin A (Epicentre) 溶液で 37°C、4 時間処理した。細胞を抗 CD4 抗体 (Biolegend)、抗 TCR β 抗体 (Biolegend) で染色、固定後、IntraPrep permeabilization reagent (Beckman Coulter) を用いて膜透過処理を行った²⁹。更に細胞を抗 IFN- γ 抗体 (Biolegend) または、抗 IL-17 抗体 (BD PharMingen) 抗体で染色し、T 細胞における IFN- γ および IL-17 の産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。実験には各群 4 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

脾臓内 CD4 陽性リンパ球の活性化

MAC 感染 2 月後のマウスより脾臓を摘出、スライドガラスによる破碎後、上述のコラゲナーゼ溶液に 37°C、90 分間浸漬した。分離された細胞をナイロンメッシュで分離後、抗 CD4 モノクローナル抗体を用いた MACS system (Miltenyi Biotec) により CD4 陽性 T 細胞を単離した。24 穴培養プレート中で (2×10^5 cells/well) 同細胞を T cell activation kit (Miltenyi Biotec) により 24 時間刺激後、培養上清中の IFN- γ , IL-4, IL-17 各濃度をそれぞれの ELISA kit (R&D Systems) を用いて測定した。CD4 陽性リンパ球より total RNA を上述の方法で抽出し、遺伝子発現レベルをリアルタイム定量 RT-PCR 法で測定した。実験には各群 4 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

マクロファージの単離および MAC 感染

各マウスの腹腔に 2ml の 4% チオグリコレート培地を投与し、4 日後に 10% FBS-RPMI1640 で洗浄し腹腔浸出細胞を回収した。同培養液で、5% CO₂ 下 37°C、2 時間培養し、非付着細胞を除去しマクロファージ単層培養を得た。同細胞を 96 穴培養プレートに移し (1×10^5 cells/well)、MAC を MOI=10 で 1 時間感染させた。その後、5 回 10% FBS-RPMI1640 培地で洗浄し、IFN- γ (800 U/ml) を添加または不添加にて 5 日間培養した。培養後、0.02% tween 20 入り滅菌蒸留水を加え細胞を破碎し 10 倍希釈の懸濁液を作成した。マクロファージ内の生菌数 (CFU) を上述の還元培養法により計測した。実験には各群 4 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

遺伝子発現解析のために、マクロファージを 24 穴培養プレート (3×10^5 cells/well) にて MAC に MOI=10 で 6 時間感染させた。マクロファージより total RNA を上述の方法で抽出し、遺伝子発現レベルをリアルタイム定量 RT-PCR 法で測定した。実験には各群 4 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

樹状細胞の単離、培養、および MAC 感染

非感染マウスの脾臓を摘出し、上述の方法で脾細胞を採取後、CD11c モノクローナル抗体 (Miltenyi Biotec) を用いた MACS system で CD11c 陽性樹状細胞を単離した。樹状細胞

を 24 穴培養プレート (2×10^5 cells/well) にまき、MAC を MOI=50 で 72 時間感染後、樹状細胞より total RNA を上述の方法で抽出し、遺伝子発現レベルをリアルタイム定量 RT-PCR 法で測定した。実験には各群 4 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

樹状細胞とナイーブ CD4 陽性 T 細胞を共培養することで、T 細胞分化を *in vitro* で誘導した。樹状細胞は野生型マウス脾細胞より、またナイーブ CD4 陽性 T 細胞は、各未感染マウスの脾細胞よりそれぞれ上述の方法で単離した。樹状細胞 (2×10^5 cells/well) とナイーブ CD4 陽性 T 細胞 (1×10^6 cells/well) を 24 穴培養プレートに共培養し、MAC を 1×10^7 CFU/well で 72 時間感染させた。感染後、培養上清のサイトカイン濃度を ELISA kit で測定するとともに、培養細胞の遺伝子発現レベルをリアルタイム定量 RT-PCR 法で測定した。実験には各群 4 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

共培養細胞に NO 供与体である S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)、200 μ M を投与し、培養上清の IL-17 濃度を ELISA kit で測定した。実験には各群 4 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

IFN- γ 投与

T-bet^{-/-} マウスに対し、MAC 感染 から 2 ヶ月の間、組み換え型マウス IFN- γ (10 μ g/500 μ l PBS, PeproTech) を週 3 回 腹腔投与した。対照群には PBS を腹腔内投与した。MAC 感染 2 ヶ月後に肺、脾臓、および肝臓を採取し、MAC 菌数を測定した。また、上述の方法で BAL を行い、回収液中の全細胞、マクロファージ、好中球、およびリンパ球数を測定した。実験には各群 4 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

抗 IL-17 抗体投与

T-bet^{-/-} マウスに対し、MAC 感染 から 1 ヶ月の間、900 μ g のウサギ由来抗 IL-17 ポリクローナル抗体(ミシガン大学、Pam Lincoln 博士および Steven L. Kunkel 博士より供与) を、週 3 回 腹腔投与した。対照群には免疫前 IgG を腹腔内投与した。MAC 感染 1 ヶ月後に肺、脾臓、および肝臓を採取し、MAC 菌数を測定した。また、上述の方法で BAL を行い、回収液中の全細胞、マクロファージ、好中球、およびリンパ球数を測定した。実験には各群 4 匹のマウスを用いた。2 回繰り返し、再現性を確認した。

統計解析

データは平均値 ± 標準誤差 (SEM) で記載した。各群の比較は、1 元配置分散分析の後、Tukey 法、または Games-Howell 法で多重比較を行った。生存率は Kaplan-Meier 法で解析し、log-rank test で検定を行った。統計解析ソフトは Statistical Package for Social Science (version 18; SPSS Inc, Chicago, IL) を使用した。p < 0.05 を統計学的に有意差ありと判定した。

結果

MAC 感染感受性に及ぼす T-bet の影響

MAC の感染感受性に及ぼす T-bet の影響を評価するため、野生型、*T-bet*^{-/-}、および *T-bet*^{tg/tg} マウスに MAC を経気道感染させ、感染 10 か月までの生存を調べた。感染 10 か月の時点で、約 70% の野生型および *T-bet*^{tg/tg} マウスが生存していたのに対し、全ての *T-bet*^{-/-} マウスが死亡した (Fig. 1A)。MAC 感染後の *T-bet*^{-/-} マウスの生存率は、野生型マウス、*T-bet*^{tg/tg} マウスと比べて有意に低下していた (Fig. 1A)。生理食塩水を投与した対照マウスに死亡例は見られなかった。

続いて MAC 感染 2 月後の野生型、*T-bet*^{-/-}、および *T-bet*^{tg/tg} マウスの肺組織における MAC の菌増殖を調べた。Ziehl-Neelsen 染色標本では、*T-bet*^{-/-} マウス肺のマクロファージと肉芽腫病変内に MAC を示唆する抗酸菌が顕著に認められたが、野生型、および *T-bet*^{tg/tg} マウスの肺組織では、ほとんど確認されなかった (Fig. 1B)。肺、脾臓、肝臓等の主要臓器内の菌数は、*T-bet*^{-/-} マウスで野生型マウス、*T-bet*^{tg/tg} マウスと比較して有意に増加していた (Fig. 1C)。これらの結果から、T-bet 欠損マウスでは MAC 感染の感受性が亢進していることが示された。

MAC 感染後肺炎症に及ぼす T-bet の影響

MAC 感染後の肺組織を野生型、*T-bet*^{-/-}、および *T-bet*^{tg/tg} マウスで観察した。MAC 感染 2 月後の野生型マウスでは、肉芽腫を伴う炎症細胞浸潤が気管支血管周囲に観察された (Fig. 2A)。*T-bet*^{-/-} マウスでは炎症細胞浸潤が顕著であり、気管支血管周囲だけでなく肺胞領域まで広く進展していた。一方、*T-bet*^{tg/tg} マウスではこれらの変化は軽微であった (Fig. 2A)。生理食塩水を投与した対照マウスでは、特記すべき異常所見は見られなかった (Fig. 2A)。

BAL 液中の炎症細胞数、特に好中球数は、非感染マウスに比べ MAC 感染後に全てのマウスで増加していた。*T-bet*^{-/-} マウスでは、野生型マウスと比較して、BAL 液中の好中球数、およびマクロファージ数が有意に高値であり、一方 *T-bet*^{tg/tg} マウスでは野生型マウスに比べ低値であった (Fig. 2B)。リンパ球数は *T-bet*^{-/-} マウスで、他のマウスと比較して有意に高値であった (Fig. 2B)。これらの結果から、MAC 感染による肺炎症は T-bet

で制御されていることが示された。

MAC 感染後の Th 反応に及ぼす T-bet の影響

続いて、MAC 感染後の野生型、*T-bet*^{-/-}、および *T-bet*^{tg/tg} マウスの各肺組織における Th サイトカインの発現を解析した。IFN- γ の発現は、すべてのマウスで MAC 感染後に亢進していたが、*T-bet*^{-/-} マウスではその発現レベルは野生型マウスに比べ有意に低値であり、一方、*T-bet*^{tg/tg} マウスでは高値であった (Fig. 3A)。誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現は、*T-bet*^{-/-} マウスでは野生型マウスに比べ低く、*T-bet*^{tg/tg} マウスでは高値であり (Fig. 3A)、IFN- γ と同様の变化であった。TNF- α の発現は、*T-bet*^{-/-} マウスにおいて、他のマウスと比較して有意に低下していた (Fig. 3A)。Th2 サイトカインである IL-4 の発現は、いずれのマウスでも MAC 感染後に誘導されなかった (Fig. 3A)。Th17 サイトカインである IL-17 と IL-6 の発現は、すべてのマウスで MAC 感染後に増加した。IL-17 発現は、*T-bet*^{-/-} マウスでは、野生型マウスと比較して有意に高値であり、一方 *T-bet*^{tg/tg} マウスでは低値であった。IL-6 の発現は、*T-bet*^{-/-} マウスにおいて、他のマウスと比較して有意に高値であった (Fig. 3A)。IL-10 の発現も、*T-bet*^{-/-} マウスで、他のマウスと比較して有意に高値であった (Fig. 3A)。これらの結果から、Th1 サイトカインは MAC 感染後の *T-bet*^{tg/tg} マウス肺組織において、より強く誘導されることが示された。反対に Th17 サイトカインが MAC 感染後の *T-bet*^{-/-} マウス肺組織でより強く誘導された。また、これらのサイトカインの発現、およびバランスは T-bet によって調節されていることが推測された。

Th 細胞の Th1、Th17 サイトカイン産生に及ぼす T-bet の役割

Th1、および Th17 サイトカインの産生細胞を調べる目的で、野生型、*T-bet*^{-/-}、および *T-bet*^{tg/tg} マウスの各肺組織から採取された CD4 陽性 T 細胞の IFN- γ と IL-17 の産生を解析した。IFN- γ を産生する CD4 陽性 T 細胞は MAC 感染後のすべてのマウス肺で増加していた (Fig. 3B)。*T-bet*^{tg/tg} マウスでは、野生型マウスに比べ、MAC 感染後肺組織中の IFN- γ 産生 CD4 陽性 T 細胞が有意に増加し、一方 *T-bet*^{-/-} マウスでは有意に低下していた (Fig. 3B)。IL-17 を産生する CD4 陽性 T 細胞は、MAC 感染後の野生型、および *T-bet*^{-/-} マウスの肺組織では増加していたが、*T-bet*^{tg/tg} マウス肺では増加していなかった (Fig. 3B)。*T-bet*^{-/-} マウスで

は、野生型マウスに比べ、MAC 感染後肺組織中の IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞が有意に増加し、一方 *T-bet*^{tg/tg} マウスでは有意に低下していた (Fig. 3B)。これらの結果から、MAC 感染肺において、CD4 陽性 T 細胞による Th1、Th17 サイトカイン産生は T-bet によって制御されていることが示された。

全身性の Th1/Th17 反応に及ぼす T-bet の役割

MAC 感染後の Th 反応が肺組織だけでなく全身に生じているか、また全身の Th 反応に及ぼす T-bet の役割を明らかにするため、MAC 感染後の野生型、*T-bet*^{-/-}、および *T-bet*^{tg/tg} マウスの脾臓から CD4 陽性細胞を単離し、Th 細胞分化、および Th サイトカイン産生について調べた。Th 細胞分化の指標として、各細胞特異的な転写因子の発現を解析した。T-bet の発現は野生型、および *T-bet*^{tg/tg} マウス脾細胞で MAC 感染後に亢進していたが、*T-bet*^{-/-} マウス脾細胞では発現を認めなかった (Fig. 4A)。*T-bet*^{tg/tg} マウス脾細胞では、野生型マウスに比べ、T-bet の発現が有意に亢進していた (Fig. 4A)。反対に Th17 特異的転写因子である ROR γ t の発現は、MAC 感染後の *T-bet*^{-/-} マウス脾細胞において、他マウスと比べ著明に亢進していた (Fig. 4A)。GATA-3 の発現誘導はどのマウス脾細胞でも見られなかった (Fig. 4A)。Treg 細胞の特異的転写因子である Foxp3 の発現は、*T-bet*^{-/-} マウス脾細胞で他マウスに比べ亢進していた (Fig. 4A)。

続いて、MAC 感染後の野生型、*T-bet*^{-/-}、および *T-bet*^{tg/tg} マウスの各脾臓から採取された CD4 陽性細胞の培養上清における IFN- γ 、IL-4、および IL-17 の濃度を測定した。すべてのマウスの脾細胞において、MAC 感染後の IFN- γ 産生は増加していたが、その程度は *T-bet*^{tg/tg} マウス脾細胞では野生型マウスと比較して有意に高く、一方 *T-bet*^{-/-} マウス脾細胞では低値であった (Fig. 4B)。反対に、IL-17 産生は、MAC 感染後の *T-bet*^{-/-} マウス脾細胞で顕著に亢進し、*T-bet*^{tg/tg} マウス脾細胞では抑制されていた (Fig. 4B)。IL-4 はすべてのマウス脾細胞で変化を認めなかった (Fig. 4B)。これらの結果から、MAC 感染後の Th1 細胞および Th17 細胞分化は肺局所だけでなく全身の反応として生じていることが示された。*T-bet*^{-/-} マウス脾細胞で ROR γ t の発現が顕著であったことより、T-bet は ROR γ t の発現を何らかの機序で抑制し、Th17 細胞分化を抑制しうる可能性が示唆された。

T-bet^{-/-}マウスの MAC 感受性に及ぼす IFN- γ の効果

MAC 感染後の T-bet^{-/-} マウスで IFN- γ の産生が減弱していたことより、T-bet^{-/-} マウスの MAC 感受性に及ぼす IFN- γ の効果について検討した。MAC 感染後の肺、脾臓、および肝臓における MAC 菌数は、IFN- γ を投与した T-bet^{-/-} マウスでは PBS 投与対照群と比較して有意に低下していた (Fig. 5A)。

一方、MAC 感染後 BAL 液中の全細胞、マクロファージ、好中球、およびリンパ球数は、IFN- γ の投与に関わらず差を認めなかった (Fig. 5B)。これらの結果より、T-bet^{-/-} マウスにおける IFN- γ の投与は、MAC の菌増殖を抑制するが、肺炎症には影響を及ぼさないことが示された。

T-bet^{-/-}マウスの MAC 感受性に及ぼす IL-17 の効果

MAC 感染後の T-bet^{-/-} マウスで IL-17 の産生が亢進していたことより、T-bet^{-/-} マウスの MAC 感受性に及ぼす IL-17 の効果について検討した。T-bet^{-/-} マウスに対する抗 IL-17 抗体の投与は、MAC 感染後の BAL 液中炎症細胞数、特に好中球数の有意な減少をもたらした (Fig. 6B)。マクロファージ数、リンパ球数もまた、抗 IL-17 抗体の投与により減少した (Fig. 6B)。一方、抗 IL-17 抗体は、MAC 感染後の肺、脾臓、および肝臓における MAC 菌数に影響を与えなかった (Fig. 6A)。これらの結果より、T-bet^{-/-} マウスにおける IL-17 の中和は、MAC 感染による肺炎症を抑えるが、MAC の増殖には影響を与えないことが示された。

マクロファージ、および樹状細胞における T-bet の役割

マクロファージは MAC 感染の標的細胞として知られており、また抗酸菌殺菌の担当細胞でもある。T-bet はマクロファージにも発現するため、マクロファージの MAC 殺菌に対する T-bet の影響を検討した。野生型、T-bet^{-/-}、および T-bet^{tg/tg} マウスから採取された腹腔マクロファージに MAC を感染させ、菌増殖の程度を比較した。全てのマクロファージにおいて、IFN- γ 投与により有意な菌量の低下を認めたが、3 群間での差は認めなかった (Fig. 7A)。

樹状細胞は、代表的な抗原提示細胞であり、抗原刺激を感知して免疫調節サイトカインを産生することでヘルパー T 細胞の分化を誘導する。樹状細胞サイトカイン産生におよ

ばずT-betの影響を明らかにするため、未感染の野生型、*Tbet*^{-/-}、および*Tbet*^{tg/tg}マウス脾臓より得られた樹状細胞にMACを感染させ、Th1誘導サイトカインであるIL-12、Th17誘導サイトカインであるIL-6、IL-23、およびTGF-βの発現を測定した。MAC感染によって、すべてのマウスの樹状細胞でIL-6とIL-12の発現が有意に増加したが、各マウス間での差は認めなかった (Fig. 7B)。IL-23とTGF-βの発現は、いずれのマウスでもMAC感染で誘導されなかった (Fig. 7B)。これらのサイトカイン発現について、腹腔マクロファージで同様に検討した。MAC感染によって、すべてのマウスのマクロファージでIL-6、IL-12、IL-23、TGF-βの発現が有意に増加したが、マウス間での差は見られなかった (Fig. 7C)。これらの結果から、マクロファージにおけるIFN-γ依存的殺菌能や、抗原提示細胞におけるTh誘導サイトカインの発現にT-betは直接には影響を及ぼさないことが示された。

MAC感染後のNO産生に及ぼすT-betの影響

Th細胞の分化誘導をIn vitroで評価するため、未感染の野生型、*Tbet*^{-/-}、および*Tbet*^{tg/tg}マウス由来のCD4陽性リンパ球と、野生型マウス由来の樹状細胞をMAC曝露下に共培養し、培養上清中のIFN-γ、IL-17濃度を測定した。全ての共培養上清でMAC曝露によりIFN-γ、IL-17濃度ともに有意な増加を認めたことから、MAC感染により、ナイーブT細胞はTh1細胞とTh17細胞の両方に分化誘導されることが示された (Fig. 8A)。*Tbet*^{-/-}マウス由来CD4陽性T細胞共培養群では、野生型、および*Tbet*^{tg/tg}由来CD4陽性T細胞共培養群に比べ、IFN-γ濃度の低下、およびIL-17濃度の増加を認めた。このことは、*Tbet*^{-/-}マウス由来のナイーブT細胞はMAC感染によって、Th1細胞でなく、Th17細胞に分化誘導する傾向にあることを示している (Fig. 8A)。肺組織での結果と同様に、*Tbet*^{-/-}マウス由来CD4陽性T細胞共培養群では、MAC曝露後のiNOS発現量が他群に比べ低下していた (Fig. 8B)。*Tbet*^{-/-}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、MAC感染によるIL-17濃度の増加を顕著に抑制した (Fig. 8C)。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示された。

考察

本研究では、*M. avium* の気管内投与により、肺感染症を主体とした MAC 感染動物モデルを作成した。今迄に報告されている MAC 感染マウスモデルは殆んどが静脈投与による播種性感染モデルであり、今回作成したモデルは肺 MAC 症の動物モデルとして有用であると思われた。T-bet 遺伝子改変マウスを今回の感染モデルに使用することで、MAC 感染、および肺 MAC 症における T-bet の役割を解析した。その結果、T-bet は MAC 感染に対する感受性形成と MAC 感染に伴う肺炎症のフェノタイプ形成の両方に関与していることが明らかになった。今までにリーシュマニア、結核菌、サルモネラ・チフス菌などの細胞内寄生菌に対する感受性が *T-bet*^{-/-}マウスで亢進することが報告されてきた。*T-bet*^{-/-}マウスにリーシュマニアを感染させると、IL-4 と IL-5 の増加を伴った Th2 偏移をきたすことが示されている²⁵。しかしながら、結核菌とサルモネラ・チフス菌を *T-bet*^{-/-}マウスに感染させた時は、完全な Th2 偏移ではなく IL-10 の増加が特徴的に認められた^{26,27}。一方で、リステリア・モノサイトゲネスを *T-bet*^{-/-}マウスに感染させても感受性が亢進しないことが報告されている。リステリア感染は、T-bet 非依存的な経路でナチュラルキラー細胞と CD8 陽性 T 細胞が代償的に IFN- γ を産生することがその理由として挙げられている³¹。これらの知見は、T-bet 依存の宿主免疫反応は菌種によって全く異なるということを示している。

本研究において、*T-bet*^{-/-}マウスは MAC に対する感受性が亢進することが示された。サイトカインの解析より、MAC 感染後の *T-bet*^{-/-}マウス肺で IFN- γ の誘導が抑制されていることが示された。IFN- γ が、抗酸菌感染の防御に重要な役割を果たしているのは良く知られている。IFN- γ に対する自己抗体を有する患者が播種性または肺外の MAC 感染症を引き起こすことから、IFN- γ の欠損や減少は、全身 MAC 感染の感受性を亢進させる可能性が示唆されていた¹⁴。本研究において、感染後の *T-bet*^{-/-}マウスの主要臓器で MAC の菌数が増加していたこと、外因性に投与した IFN- γ は MAC の増殖を抑制したことは、臨床例から得られた推測を裏図けるものと思われる。感染後の *T-bet*^{-/-}マウス肺では TNF- α の誘導も抑制されていた。TNF- α もまた抗酸菌感染に対する宿主抵抗因子として重要であると報告されている。実際、TNF- α 阻害剤の副作用として抗酸菌感染症が認識されている³²。TNF- α の欠損マウスでは結核菌に対しての感受性が亢進し、感染臓器で肉芽腫

の形成不全をきたすことが報告されている³³。MAC 感染後の *T-bet*^{-/-} マウス肺では肉芽腫形成が見られず、これに合致した結果であった。以上より、Th1 サイトカインの誘導因子である T-bet は、全身 MAC 感染の防御に必要な不可欠な宿主側因子であるものと思われた。

抗酸菌感染の感受性は、Th2 サイトカインである IL-4 と IL-13 が Th1 依存的な抗酸菌殺菌を抑制することから、Th1/Th2 バランスで説明できると提唱されてきた³⁴。実際に、T-bet の欠損は容易に Th2 優位の状況を作り出すことが他の感染症モデルでは示されているが²⁵、抗酸菌感染においては特異的 Th2 細胞の存在を証明できていない^{35,36}。本研究においても、MAC 感染後の *T-bet*^{-/-} マウスにおいて、IL-4 の産生や GATA-3 の発現で定義される優位な Th2 誘導は確認されなかった。同様の結果は、結核感染後の *T-bet*^{-/-} マウスでも示されている²⁶。従って、典型的な Th2 反応の活性化は、Th1 免疫の抑制された状況における MAC 感染の宿主感受性を規定する主要因ではないと考えられる。

反対に、MAC 感染後の *T-bet*^{-/-} マウス肺において IL-6 と IL-17 の発現が強く誘導され、CD4 陽性 T 細胞内では ROR- γ t の発現が顕著であった。このことは、MAC 感染後の *T-bet*^{-/-} マウスでは Th17 偏移が生じていることを意味している。Th17 免疫は、細胞外の病原体に対して、重要な防御因子であるが³⁷、細胞内寄生菌に対しての役割は十分に分かっていない。結核感染においても、IL-17 が感染巣に Th1 細胞を遊走させることで結核感染防御に重要な役割を果たしているという報告がある一方³⁸、結核感染マウスに高用量の結核抗原を曝露すると Th17 反応が促進され、著明な好中球遊走の誘導の結果肺傷害がひき起こされるとする報告もあり³⁹、IL-17 と Th17 細胞の役割については一定の見解を得ていない。本研究では、IL-17 の中和は感染 *T-bet*^{-/-} マウスの菌量に影響を与えておらず、今回のモデルにおいては、IL-17 は MAC の殺菌に関しては直接的な働きを有していないと推測された。

MAC 感染 *T-bet*^{-/-} マウスでは、肺好中球性炎症が顕著であった。IL-17 は、炎症部位に好中球を誘導する様々なサイトカインやケモカインを炎症細胞や上皮細胞から産生させる重要なサイトカインである⁴⁰。これに合致して、IL-17 の中和は MAC 感染 *T-bet*^{-/-} マウスにおける好中球性炎症を明らかに改善させた。従って、*T-bet*^{-/-} マウスにおける著明な好中球性炎症は IL-17 の増加と関連した変化と考えられた。肺 MAC 症患者の BAL

液中細胞分画は好中球とリンパ球が主体である⁴¹。また、肺MAC症患者のBAL所見で、CD4陽性リンパ球が低値で、好中球炎症が顕著な症例は増悪しやすいことも報告されている⁴²。好中球は感染防御の中心的細胞であるが、*T-bet*^{-/-}マウスではむしろMAC菌量が増加していたことより、好中球はMACの殺菌に必要不可欠ではないものと考えられた。従って、Th17細胞に誘導された好中球は、Th1免疫が抑制された状況においては、防御的な働きよりむしろ、病態増悪に関与している可能性が示された。

MAC感染*T-bet*^{-/-}マウスでTh17偏移が生じたことから、*T-bet*がTh17細胞への分化を抑制している可能性が示唆された。どのように*T-bet*がTh17細胞の分化を抑制しているかは不明であるが、T細胞特異的転写因子が他のヘルパーT細胞への分化を抑制しうることはよく知られている。*T-bet*^{-/-}マウスにおいて強いTh17反応が生じることは、同種移植拒絶反応、自己免疫性心筋炎、寄生虫感染症のモデルでも示されている⁴³⁻⁴⁵。*Runx1*はROR γ tのプロモータ領域に結合し、ROR γ tの発現を亢進する転写因子である。Lazarevicらは、*T-bet*が*Runx1*に直接結合することで、ROR γ tの発現を抑制することを報告している⁴⁶。今回の研究で*T-bet*^{-/-}マウス脾細胞でROR γ tの発現が顕著であったことは、本報告を間接的に支持するものと思われる。一方で、活性化T細胞のiNOS由来のNOがROR γ tのチロシン残基をニトロ化することでTh17細胞分化を抑制することが最近報告された³⁰。これに応じるように、*T-bet*が保たれているマウスにMACを感染させると、iNOSの発現が亢進しROR γ tの発現が低下していた。また、我々はNO供与体を加えることでMAC感染によって誘導されたTh17細胞の分化が抑制されることを示した。NOの産生、すなわちiNOSの発現は、細胞内寄生菌の感染時にIFN- γ によって促進されることから¹⁰、NOはMAC感染後のTh1/Th17分化を決定づける*T-bet*の下流にある重要な分子と考えられた。

樹状細胞は代表的な抗原提示細胞であり、微生物などの抗原曝露によってナイーブT細胞とクロストークを行うことで獲得免疫を賦活化する。Th細胞の分化はサイトカインを介して誘導されるが、これらの中でIL-12はTh1細胞分化に、IL-6とIL-23はTh17細胞にそれぞれ不可欠なサイトカインである^{11,47}。TGF- β は、Th17細胞とTreg細胞の両方の分化に必要とされている²²。*T-bet*は、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞にも発現しているが²³、本研究の結果からはこれらの細胞におけるサイトカイン産生制

御に T-bet は直接に関与しないことが示された。

以上の結果より、MAC 感染に伴い、抗原提示細胞は T-bet 非依存的に Th1 誘導サイトカインと Th17 誘導サイトカインの両方を産生し、T 細胞レベルでの T-bet の差異が Th1, Th17 細胞分化への運命を決定づけるものと考えられた。また、T 細胞における T-bet の欠損や不全は IFN- γ や iNOS の産生低下、さらには ROR γ t の脱抑制を招き、Th17 偏移を促進するものと思われた。今回の研究より予想される MAC 感染に対する T-bet を介した宿主反応のメカニズムを Fig.9 に示した。

結論

本研究では、T-bet が MAC に対する感染感受性と MAC 感染に伴う肺炎症を制御していることを明らかにした。T-bet 欠損マウスでは Th1 反応の減弱に加え、Th17 偏移が生じていた。Th1 反応の減弱は全身 MAC 感染の感受性を亢進し、Th17 偏移は過剰な肺好中球性炎症を惹起した。これらは、Th1 反応と Th17 反応の適切なバランスが、MAC 感染の病態を決定するのに重要であることを意味しており、同バランスの調節を司る T-bet は MAC 感染に対する重要な宿主側因子であることが証明された。

本研究の結果を実地臨床で検証することが次の課題である。肺 MAC 症における Tbet の量的、機能的異常を解析し、同疾患の感受性因子であるかどうかを検証したい。肺 MAC 症例で Th1/Th17 サイトカインや Th1/Th17 細胞を測定し、Th1/Th17 バランスの差異が肺 MAC 症病態形成に実際に関与しているかについても検証していきたい。

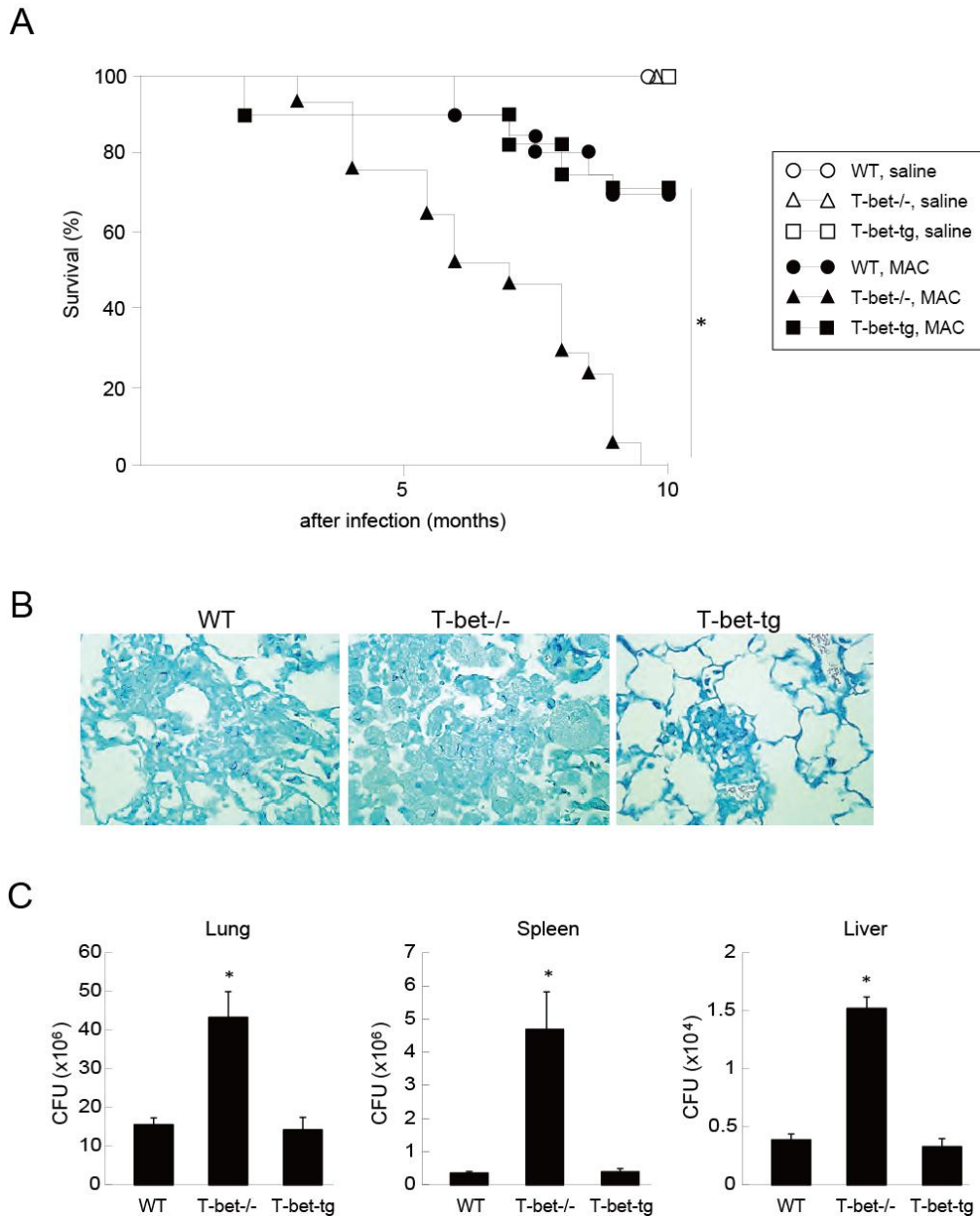
MAC 感染における NO の病態生理への関与は、大変興味深い結果であった。NO が肺 MAC 症患者の気道の線毛機能を亢進させることにより、粘膜線毛クリアランスを改善することが最近報告された⁴⁸。NO 誘導剤が、肺 MAC 症において Th バランスを調節するだけでなく、粘膜線毛クリアランスも改善するならば、新たな治療薬として非常に魅力的である。私の今後の研究テーマの1つとしてその可能性を追求して行きたい。

Table 1. Primers used for RT-PCR

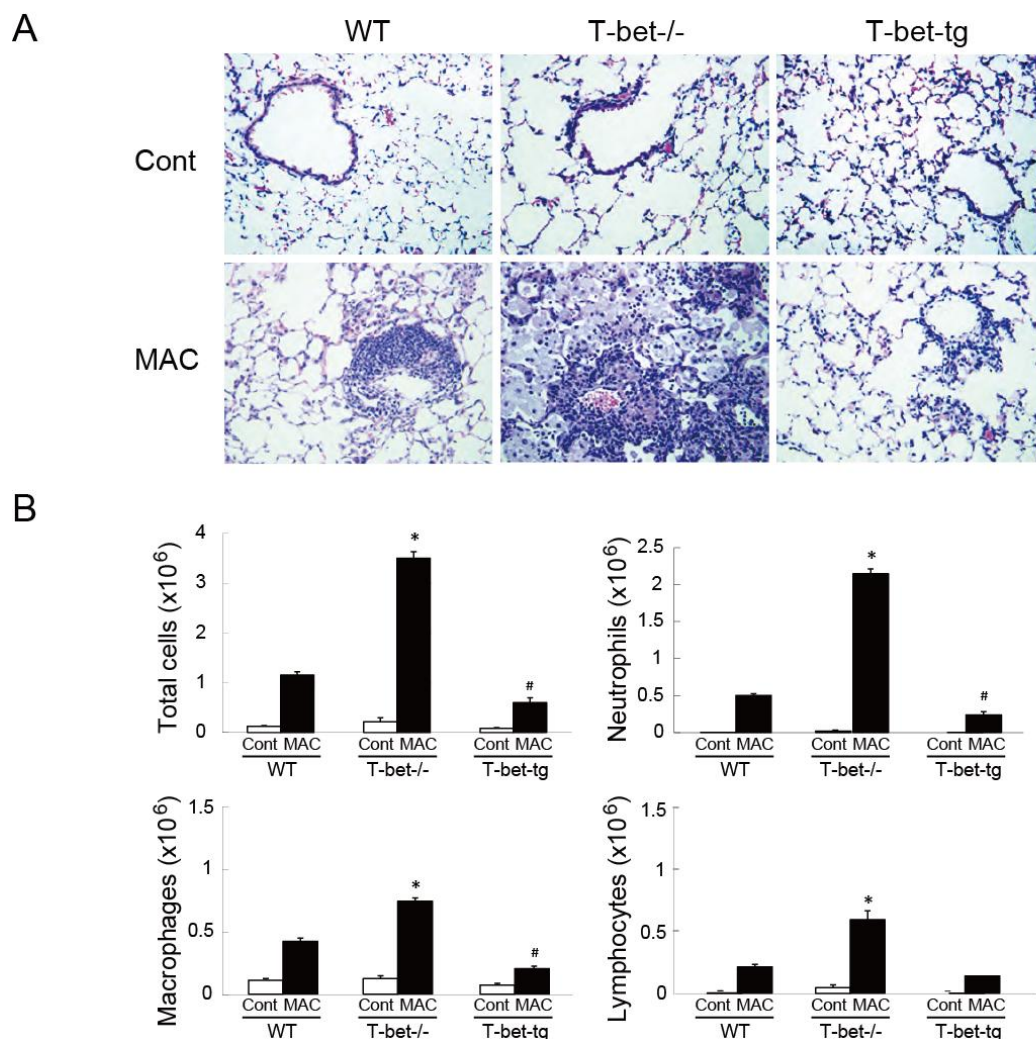
Primer target	Sequence
GAPDH	5'-CCGCATCTTCTTGTGCAGTG-3' (forward), 5'-CGTTGATGGCAACAATCTCC-3' (reverse)
IFN- γ	5'-CACGGCACAGTCATTGAAAG-3' (forward), 5'-TCTGGCTCTGCAGGATTTTC-3' (reverse)
IL-17	5'-AAAGCTCAGCGTGTCCAAAC-3' (forward), 5'-TGGAACGGTTGAGGTAGTCTG-3' (reverse)
IL-4	5'-ACGGAGATGGATGTGCCAAAC-3' (forward), 5'-AGCACCTTGGAAGCCCTACAGA-3' (reverse)
IL-6	5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3' (forward), 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3' (reverse)
IL-10	5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3' (forward), 5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3' (reverse)
iNOS	5'-CCGAAGCAAACATCACATTCA-3' (forward), 5'-GGTCTAAAGGCTCCGGGCT-3' (reverse)
IL-12	5'-CTGTGCCTTGGTAGCATCTATG-3' (forward), 5'-GCAGAGTCTCGCCATTATGATTC-3' (reverse)

IL-23	5'- ATGCTGGATTGCAGAGCAGTA -3' (forward), 5'- ACGGGGCACATTATTTTTAGTCT -3' (reverse)
TNF- α	5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' (forward), 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3' (reverse)
TGF- β	5'- GTGTGGAGCAACATGTGGA ACTCTA-3' (forward), 5'- CGCTGAATCGAAAGCCCTGTA-3' (reverse)
T-bet	5'-AGCAAGGACGGCGAATGTT-3' (forward), 5'-GGGTGGACATATAAGCGGTTC-3' (reverse)
ROR γ t	5'-TGAGGCCATTCAGTATGTGG-3' (forward), 5'-CTTCCATTGCTCCTGCTTTC-3' (reverse)
GATA-3	5'-GGAAACTCCGTCAGGGCTA-3' (forward), 5'-AGAGATCCGTGCAGCAGAG-3' (reverse)
Foxp3	5'-CCTGCCTTGGTACATTCGTG-3' (forward), 5'-TGTTGTGGGTGAGTGCTTTG-3' (reverse)

Figure 1



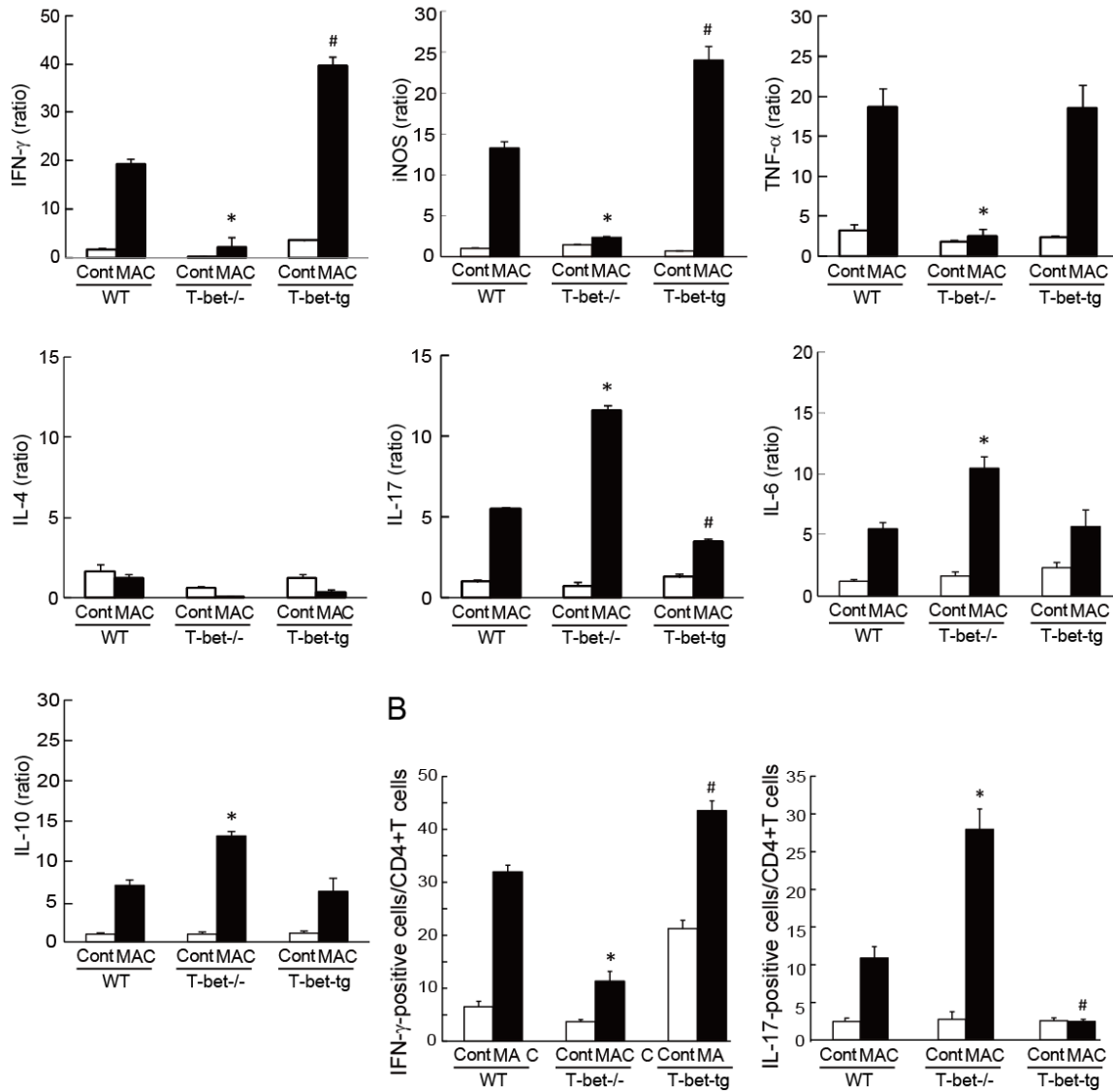
Susceptibility to MAC is regulated by T-bet. **(A)** Survival of wild-type, *T-bet*^{-/-}, and *T-bet*^{tg/tg} mice after intratracheal inoculation of 1×10^7 CFU of MAC or saline (n=20 in each group). **(B)** Representative photographs of Ziehl-Neelsen staining of lungs (x200), and **(C)** mycobacteria outgrowth in the lung, spleen, and liver of wild-type, *T-bet*^{-/-}, and *T-bet*^{tg/tg} mice 2 months after intratracheal inoculation of 1×10^7 CFU of MAC. The results are expressed as CFU per organ. The experiments were performed in duplicate with eight mice in each group. *Significant difference between *T-bet*^{-/-} mice and other groups after MAC infection (p<0.05). Data are expressed as the mean \pm SEM.



MAC-induced pulmonary inflammation is enhanced in *T-bet*^{-/-} mice. **(A)** Representative microphotographs of the lungs from wild-type, *T-bet*^{-/-}, and *T-bet*^{tg/tg} mice 2 months after intratracheal inoculation of 1×10^7 CFU of MAC or saline (Cont) (x200). **(B)** The number of total cells, neutrophils, macrophages, and lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluids of wild-type, *T-bet*^{-/-}, and *T-bet*^{tg/tg} mice 2 months after intratracheal inoculation of 1×10^7 CFU of MAC or saline (Cont). All experiments were performed in duplicate with four mice in each group. *Significant difference between *T-bet*^{-/-} mice and other groups following MAC infection ($p < 0.05$). #Significant difference between *T-bet*^{tg/tg} mice and other groups after MAC infection ($p < 0.05$). Data are expressed as the mean \pm SEM.

Figure 3

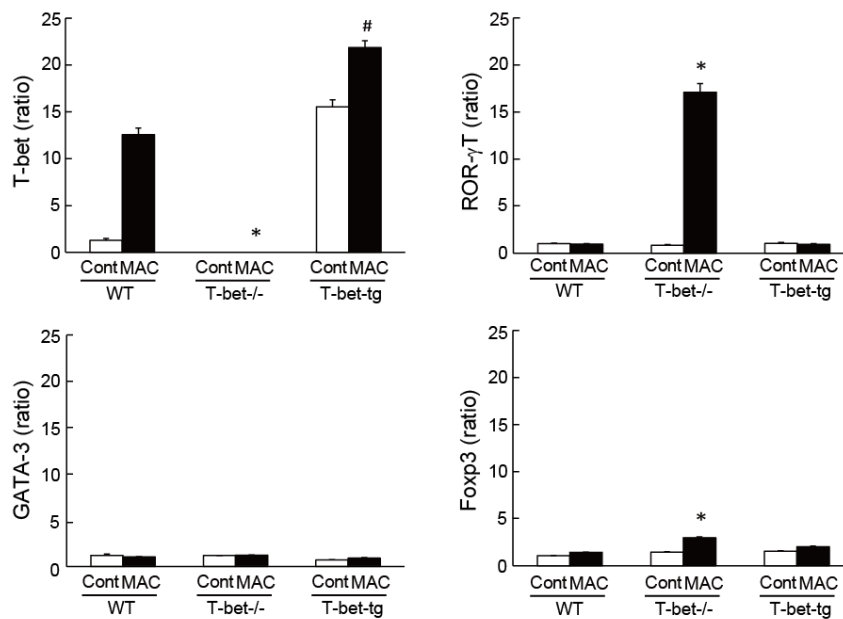
A



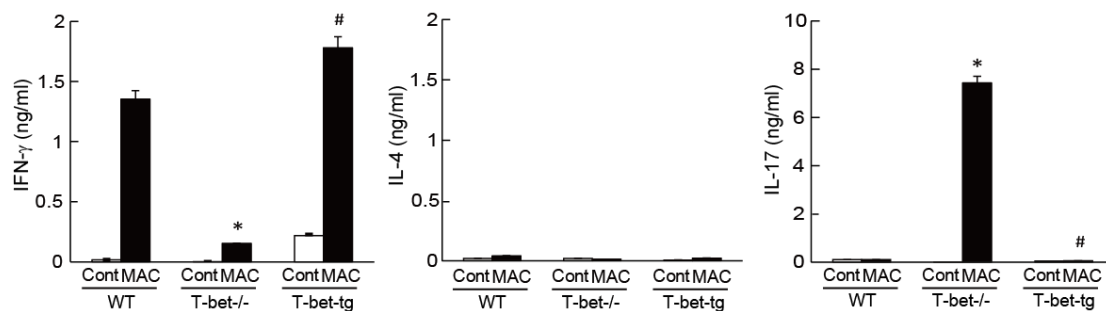
Pulmonary cytokine expression is regulated by T-bet following MAC infection. (A) The expression of IFN- γ , iNOS, TNF- α , IL-4, IL-17, IL-6, and IL-10 in the lung of wild-type, *T-bet*^{-/-}, and *T-bet*^{tg} mice 2 months after intratracheal inoculation of 1×10^7 CFU of MAC (solid bars). Control mice were administered saline (open bars). (B) The proportion of IFN- γ -producing cells (left panel) or IL-17-producing cells (right panel) in CD4-positive cells obtained from a lung of wild-type, *T-bet*^{-/-}, and *T-bet*^{tg} mice 2 mo after intratracheal inoculation of 1×10^7 CFU of MAC or saline (Cont). Experiments were performed in duplicate with four mice in each group. *Significant difference between *T-bet*^{-/-} mice and other groups after MAC infection ($p < 0.05$). #Significant difference between *T-bet*^{tg} mice and other groups after MAC infection ($p < 0.05$). Data are expressed as the mean \pm SEM.

Figure 4

A

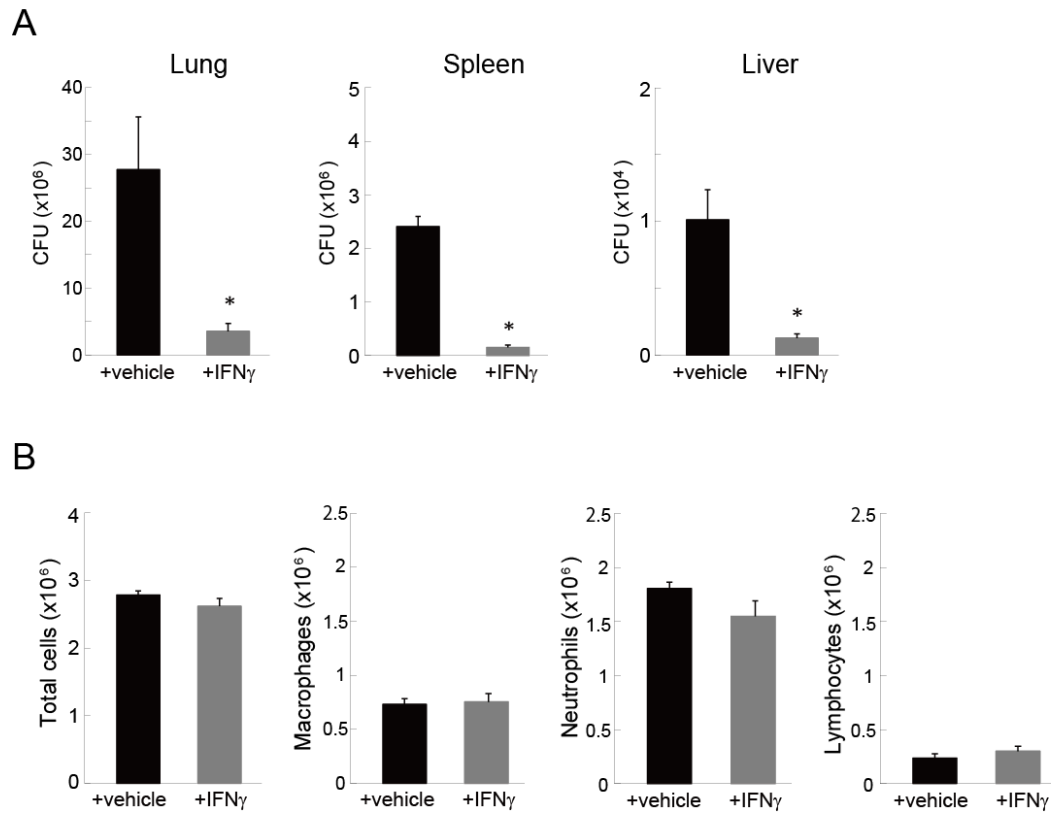


B



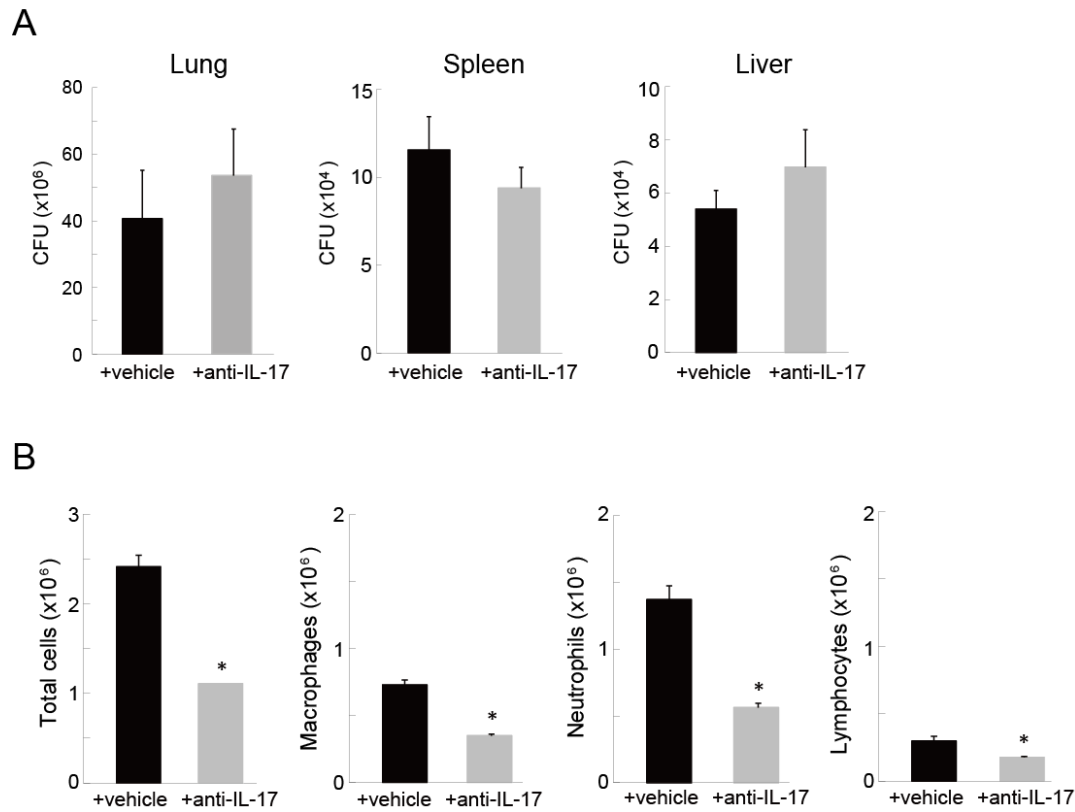
Th1/Th17 cell differentiation is regulated by T-bet following MAC infection. **(A)** The expression of T-bet, ROR γ T, GATA-3, and Foxp3 in CD4-positive splenocytes. **(B)** Production of IFN- γ , IL-4, and IL-17 in CD4-positive splenocytes. All data obtained from wild-type, *T-bet*^{-/-}, and *T-bet*^{tg/tg} mice after intratracheal inoculation of MAC or saline following stimulation with bead-bound anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 24 h. Experiments were performed in duplicate with four mice in each group. *Significant difference between *T-bet*^{-/-} mice and other groups after MAC infection ($p < 0.05$). #Significant difference between *T-bet*^{tg/tg} mice and other groups after MAC infection ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SEM.

Figure 5



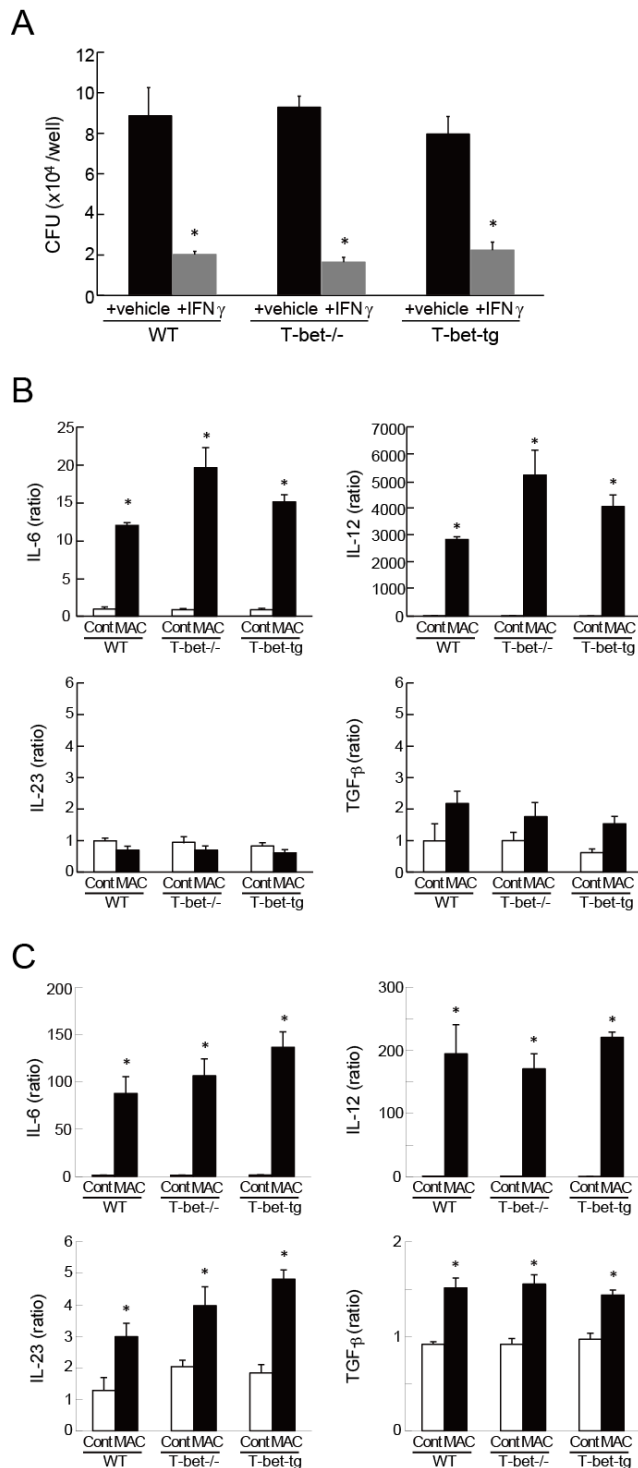
IFN- γ supplementation decreases mycobacterium growth. **(A)** Mycobacterial outgrowth in the lung, spleen, and liver of *T-bet*^{-/-} mice 2 months following MAC infection and treatment with 10 μ g IFN- γ or PBS (vehicle) 3 times a week. *Significant difference between IFN- γ and vehicle treatments ($p < 0.05$). **(B)** The number of total cells, macrophages, neutrophils, and lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid of *T-bet*^{-/-} mice 2 months following MAC infection and treatment with 10 μ g IFN- γ or PBS (vehicle) 3 times a week. All experiments were performed in duplicate with four mice in each group. Data are expressed as the mean \pm SEM.

Figure 6



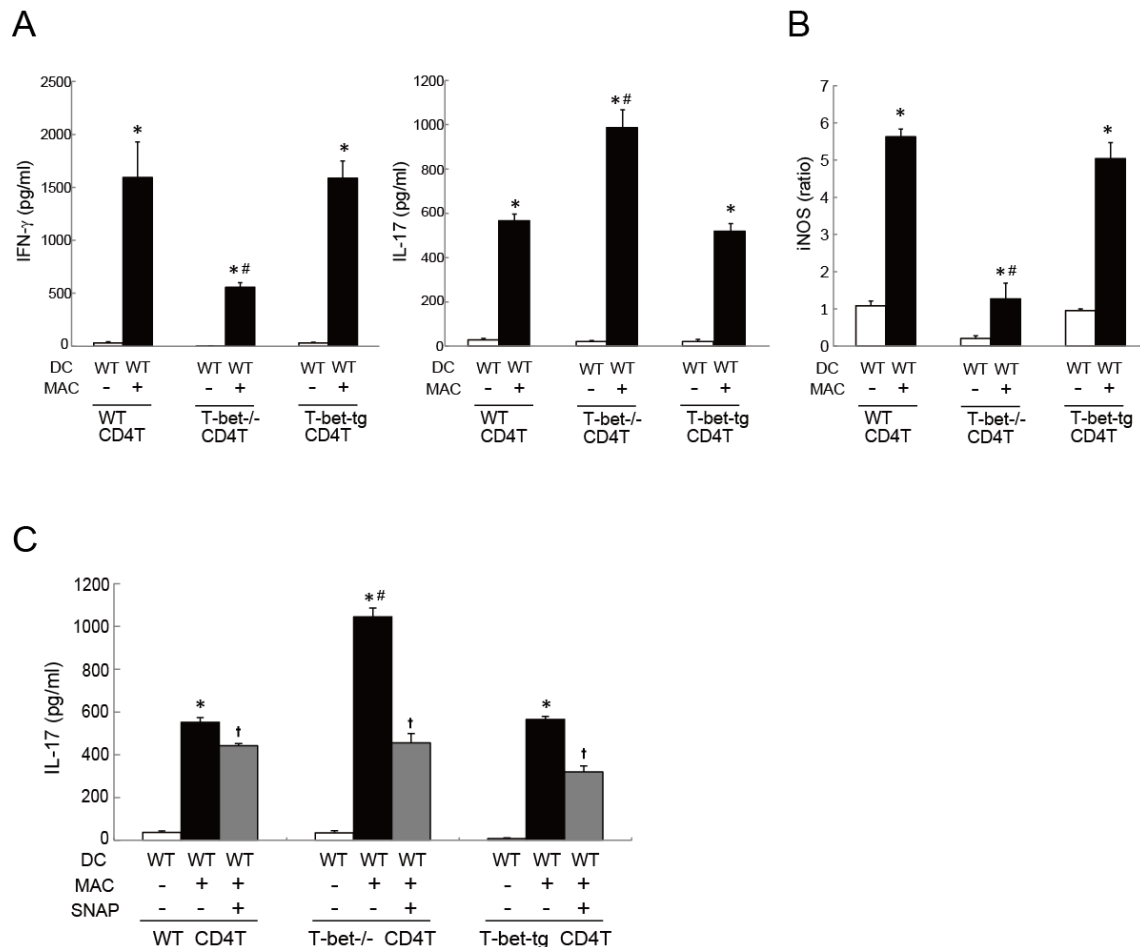
Treatment with anti-IL-17 antibody decreases MAC-induced pulmonary inflammation. **(A)** Mycobacteria outgrowth in the lung, spleen, and liver of *T-bet*^{-/-} mice. **(B)** The number of total cells, macrophages, neutrophils, and lymphocytes in BAL fluid of *T-bet*^{-/-} mice. Data obtained after 1 month of MAC infection and treatment with an anti-IL-17 antibody or isotype control antibody (vehicle) 3 times a week. Experiments were performed in duplicate with four mice in each group. *Significant difference between anti-IL-17 antibody and vehicle treatments ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SEM.

Figure 7



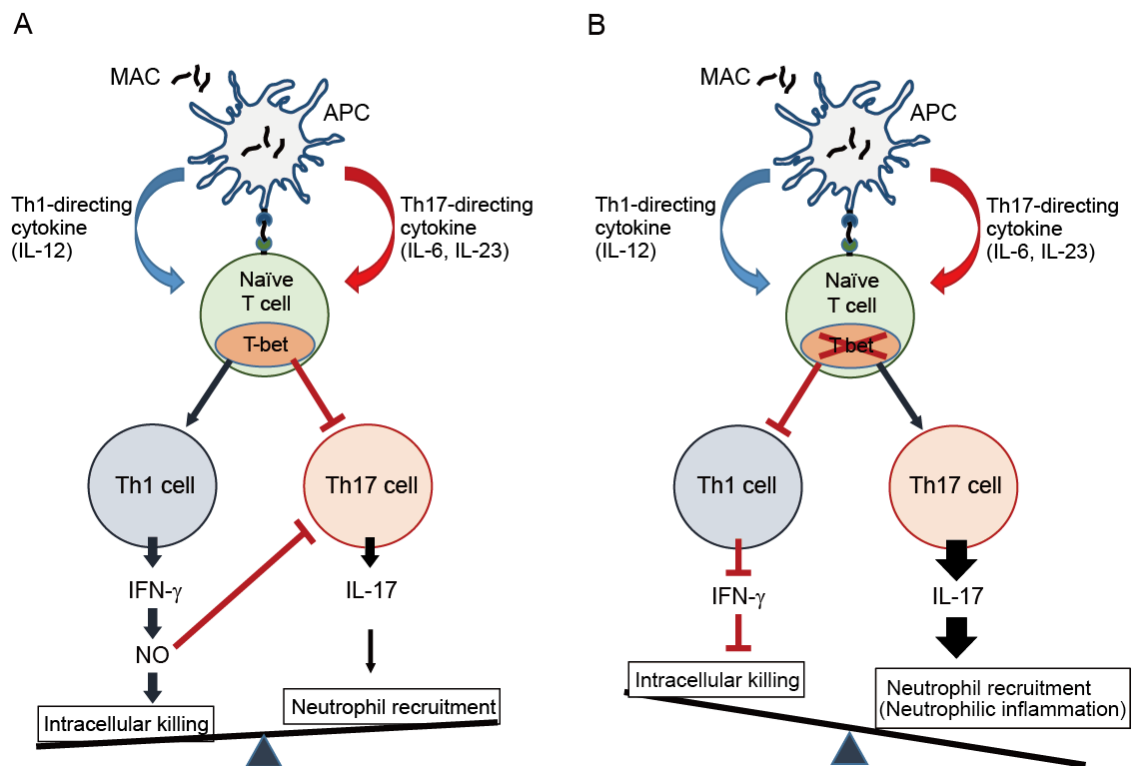
T-bet does not affect intrinsic ability of macrophages and dendritic cells. **(A)** Mycobacterial growth in cultured peritoneal macrophages from wild-type mice, $T\text{-bet}^{-/-}$, and $T\text{-bet}^{tg/tg}$ mice incubated with MAC in the absence (vehicle) or presence of IFN- γ . Data are expressed as the means \pm SEM (n =8). **(B-C)** The expression of IL-6, IL-12, IL-23, and TGF- β in cultured dendritic cells **(B)** and cultured macrophages **(C)** obtained from wild-type, $T\text{-bet}^{-/-}$, and $T\text{-bet}^{tg/tg}$ mice, following exposure to MAC or saline. All experiments were performed in duplicate with four mice in each group. Data are expressed as the means \pm SEM. *Significant difference between MAC- and vehicle-treated groups ($p < 0.05$).

Figure 8



NO suppresses Th17 cell differentiation by MAC exposure. **(A)** Concentration of IFN- γ and IL-17 in the co-culture media of dendritic cells from uninfected wild-type mice and CD4-positive T cells from uninfected wild-type mice, *T-bet*^{-/-}, and *T-bet*^{tg/tg} mice with or without exposure to MAC. All experiments were performed in duplicate with four mice in each group. *Significant difference between MAC- and vehicle-treated groups ($p < 0.05$). #Significant difference from other genotypes ($p < 0.05$). Data are expressed as the means \pm SEM. **(B)** The expression of iNOS in the co-culture cells with or without exposure to MAC. All experiments were performed in duplicate with four mice in each group. *Significant difference between MAC- and vehicle-treated groups ($p < 0.05$). #Significant difference from other genotypes ($p < 0.05$). Data are expressed as the means \pm SEM. **(C)** Concentration of IL-17 in the co-culture media of wild-type dendritic cells and CD4-positive cells from indicated genotypes with or without exposure to MAC in the presence or absence of 200 μ M SNAP for 72 hours. All experiments were performed in duplicate with four mice in each group. *Significant difference between MAC- and vehicle-treated groups ($p < 0.05$). #Significant difference from other genotypes ($p < 0.05$). †Significant difference between SNAP-treated and SNAP-untreated groups ($p < 0.05$). Data are expressed as the means \pm SEM.

Figure 9



Schematic presentation of the role of Th1/Th17 balance regulated by T-bet following MAC infection. Antigen-presenting cells (APC), such as macrophages and dendritic cells, can produce both Th1- and Th17-directing cytokines T-bet-independently by stimulation with MAC. **(A)** When T-bet is expressed in helper T cells, T-bet enhances host mycobactericidal activities by promoting Th1 cell differentiation and IFN- γ production, followed by NO production. T-bet also suppresses aberrant inflammatory cell recruitment by controlling Th17 cell differentiation directly or indirectly by NO production. **(B)** If T-bet is not expressed in helper T cells, naïve T cells can not differentiate to Th1 cells but easily differentiate to Th17 cells. Reduced Th1 responses increase susceptibility to systemic MAC infection, and Th17 development causes excessive neutrophilic pulmonary inflammation. Thus, fine balance between Th1 and Th17 responses, maintained by T-bet, is critical to determine susceptibility and inflammatory responses to MAC.

参考文献

1. Marras, TK., P. Chedore, A. M. Ying, and F. Jamieson. 2007. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997–2003. *Thorax*. 62: 661-666.
2. Kubo, K., Y. Yamazaki, M. Hanaoka, H. Nomura, K. Fujimoto, T. Honda, M. Ota, Y. Kamijou. 2000. Analysis of HLA antigens in *Mycobacterium avium-intracellulare* pulmonary infection. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 161: 1368-1371.
3. Takahashi, M., A. Ishizaka, H. Nakamura, K. Kobayashi, M. Nakamura, M. Namiki, T. Sekita, S. Okajima. 2000. Specific HLA in pulmonary MAC infection in a Japanese population. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 162: 316-318.
4. Tanaka, G., J. Shojima, I. Matsushita, H. Nagai, A. Kurashima, K. Nakata, E. Toyota, N. Kobayashi, K. Kudo, N. Keicho. 2007. Pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection: association with *NRAMP1* polymorphisms. *Eur. Respir. J.* 30: 90-96.
5. Mai, H.N., M. Hijikata, Y. Inoue, K. Suzuki, M. Sakatani, M. Okada, K. Kimura, N. Kobayashi, E. Toyota, et al. 2007. Pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the *CFTR* gene. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 11: 808-813.
6. Ziedalski, T.M., P. N. Kao, N. R. Henig, S. S. Jacobs, S. J. Ruoss. 2006. Prospective analysis of cystic fibrosis transmembrane regulator mutations in adults with bronchiectasis or pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. *Chest*. 130: 995-1002.
7. Shojima, J., G. Tanaka, N. Keicho, G. Tamiya, S. Ando, A. Oka, Y. Inoue, K. Suzuki, M. Sakatani, M. Okada, et al. 2009. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection. *J Infect Dis.* 199: 1707-1715.
8. Tsuyuguchi, K., K. Suzuki, H. Matsumoto, E. Tanaka, R. Amitani, F. Kuze. 2001. Effect of estrogen on *Mycobacterium avium* complex pulmonary infection in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 123: 428-434.
9. Matsuyama, M., Y. Miura, T. Kiwamoto, A. Moriya, N. Kokuho, K. Shimizu, M. Hijikata, N. Keicho, K. Hayashihara, T. Saito, et al. 2010. A case of familial pulmonary mycobacterium avium complex disease. *Intern Med.* 49: 949-953.
10. Trinchieri, G. 1997. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular

- infection (IL-10, IL-12, IFN gamma). *Curr. Opin. Immunol.* 9: 17-23.
11. Méndez-Samperio, P. 2010. Role of interleukin-12 family cytokines in the cellular response to mycobacterial disease. *Int. J. Infect. Dis.* 14: e366-e371.
 12. Altare, F., E. Jouanguy, S. Lamhamedi, R. Döffinger, A. Fischer, J. L. Casanova. 1998. Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. *Curr Opin Immunol.* 10: 413-417.
 13. Altare, F., A. Durandy, D. Lammass, J. F. Emile, S. Lamhamedi, F. Le Deist, P. Drysdale, E. Jouanguy, R. Döffinger, F. Bernaudin, et al. 1998. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science.* 280: 1432-1435.
 14. Patel, S. Y., L. Ding, M. R. Brown, L. Lantz, T. Gay, S. Cohen, L. A. Martyak, B. Kubak, and S. M. Holland. 2005. Anti-IFN-gamma autoantibodies in disseminated nontuberculous mycobacterial infections. *J. Immunol.* 175: 4769-4776.
 15. Horsburgh, C. R. Jr., R. M. Selik. 1989. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am Rev Respir Dis.* 139: 4-7.
 16. Rigsby, M. O., A.M. Curtis. 1994. Pulmonary disease from nontuberculous mycobacteria in patients with human immunodeficiency virus. *Chest.* 106: 913-919.
 17. Salama, C., M. Policar, M. Venkataraman. 2003. Isolated pulmonary Mycobacterium avium complex infection in patients with human immunodeficiency virus infection: case reports and literature review. *Clin Infect Dis.* 37: e35-40.
 18. Vankayalapati, R., B. Wizek, B. Samten, D. E. Griffith, H. Shams, M. R. Galland, C. F. Von Reyn, W. M. Girard, R. J. Jr. Wallace, P. F. Barnes. 2001. Cytokine profiles in immunocompetent persons infected with Mycobacterium avium complex. *J Infect Dis.* 183: 478-484
 19. Kwon, Y. S., E.J. Kim, S. H. Lee, G. Y. Suh, M. P. Chung, H. Kim, O. J. Kwon, W. J. Koh. 2007. Decreased cytokine production in patients with nontuberculous mycobacterial lung disease. *Lung.* 185: 337-341.
 20. Kim, R. D., D. E. Greenberg, M. E. Ehrmantraut, S. V. Guide, L. Ding, Y. Shea, M. R. Brown, K. N. Olivier, J. Moss, S. M. Holland, et al. 2008. Pulmonary nontuberculous mycobacterial

- disease: prospective study of a distinct preexisting syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 178: 1066-1074.
21. Sundrud, M. S., and M. A. Nolan. 2010. Synergistic and combinatorial control of T cell activation and differentiation by transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 286-292.
 22. Zhu, J., H. Yamane, and W. E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell population. *Annu. Rev. Immunol.* 28: 445-489.
 23. Lazarevic, V., and L. H. Glimcher. 2011. T-bet in disease. *Nat. Immunol.* 12: 597-606.
 24. Hwang, E.S., S. J. Szabo, P. L. Schwartzberg, and L.H. Glimcher. 2005. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science.* 307: 430-433.
 25. Szabo, S. J., B. M. Sullivan, C. Stemmann, A. R. Satoskar, B. P. Sleckman, and L. H. Glimcher. 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science.* 295: 338-342.
 26. Sullivan, B. M., O. Jobe, V. Lazarevic, K. Vasquez, R. Bronson, L. H. Glimcher, and I. Kramnik. 2005. Increased susceptibility of mice lacking T-bet to infection with *Mycobacterium tuberculosis* correlates with increased IL-10 and decreased IFN- γ production. *J. Immunol.* 175: 4593-4602.
 27. Ravindran, R., J. Foley, T. Stoklasek, L. H. Glimcher, and S. J. McSorley. 2005. Expression of T-bet by CD4 T cells is essential for resistance to Salmonella infection. *J. Immunol.* 175: 4603-4610.
 28. Ishizaki, K., A. Yamada, K. Yoh, T. Nakano, H. Shimohata, A. Maeda, Y. Fujioka, N. Morito, Y. Kawachi, K. Shibuya, et al. 2007. Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *J. Immunol.* 178: 605-612.
 29. Murphy, E., K. Shibuya, N. Hosken, P. Openshaw, V. Maino, K. Davis, K. Murphy, and A. O'Garra. 1996. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long term stimulation. *J. Exp. Med.* 183:901-913.
 30. Yang, J., R. Zhang, G. Lu, Y. Shen, L. Peng, C. Zhu, M. Cui, W. Wang, P. Arnaboldi, M. Tang, et al. 2013. T cell-derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation.

- J. Exp. Med.* 210: 1447-1462.
31. Way, S. S., and C. B. Wilson. 2004. Cutting edge: immunity and IFN- γ production during *Listeria monocytogenes* infection in the absence of T-bet. *J. Immunol.* 173: 5918-5922.
 32. Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W. D. Schwieterman, J. N. Siegel, and M. M. Braun. 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor α -neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.* 345: 1098-1104.
 33. Bean, A. G., D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick, and W. J. Britton. 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J. Immunol.* 162: 3504-3511.
 34. Rook, G.A. 2007. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr. Mol. Med.* 7: 327-337.
 35. North, R. J. 1998. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.* 113: 55-58.
 36. Jung, Y. J., R. LaCourse, L. Ryan, and R. J. North. 2002. Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection in mice. *Infect. Immun.* 70: 6436-6443.
 37. Happel, K. I., P. J. Dubin, M. Zheng, N. Ghilardi, C. Lockhart, L. J. Quinton, A. R. Odden, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, et al. 2005. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J. Exp. Med.* 202: 761-769.
 38. Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, et al. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4-positive T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat. Immunol.* 8: 369-377.
 39. Cruz, A., A. G. Fraga, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, E. Torrado, M. Saraiva, D. R. Pereira, T. D. Randall, J. Pedrosa, A. M. Cooper, et al. 2010. Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 207: 1609-1616.
 40. Wang, Y. H., and Y. J. Liu. 2008. The IL-17 cytokine family and their role in allergic

- inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 697-702.
41. Yamazaki, Y., K. Kubo, M. Sekiguchi, and T. Honda. 1998. Analysis of BAL fluid in *M. avium-intracellulare* infection in individuals without predisposing lung disease. *Eur. Respir. J.* 11: 1227-1231.
 42. Yamazaki, Y., K. Kubo, A. Takamizawa, H. Yamamoto, T. Honda, and S. Sone. 1999. Markers indicating deterioration of pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* infection. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 160: 1851-1855.
 43. Yuan, X., J. Paez-Cortez, I. Schmitt-Knosalla, F. D'Addio, B. Mfarrej, M. Donnarumma, A. Habicht, M. R. Clarkson, J. Iacomini, L. H. Glimcher, et al. 2008. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J. Exp. Med.* 205: 3133-3144.
 44. Rangachari, M., N. Mauermann, R. R. Marty, S. Dirnhofer, M. O. Kurrer, V. Komnenovic, J. M. Penninger, and U. Eriksson. 2006. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J. Exp. Med.* 203: 2009-2019.
 45. Guo, S., D. Cobb, and R. B. Smeltz. 2009. T-bet inhibits the in vivo differentiation of parasite-specific CD4-POSITIVE Th17 cells in a T cell-intrinsic manner. *J. Immunol.* 182: 6179-6186.
 46. Lazarevic, V., X. Chen, J. H. Shim, E. S. Hwang, E. Jang, A. N. Bolm, M. Oukka, V. K. Kuchroo, and L. H. Glimcher. 2011. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat. Immunol.* 12: 96-104.
 47. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 485-517.
 48. Fowler, C. J., K. N. Olivier, J. M. Leung, C. C. Smith, A. G. Huth, H. Root, D. B. Kuhns, J. H. Shelhamer, C. E. Bryant, S. M. Holland. 2013. Abnormal nasal nitric oxide production, ciliary beat frequency, and Toll-like receptor response in pulmonary nontuberculous mycobacterial disease epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* 187: 1374-1381.

謝辞

本研究にあたり終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました筑波大学大学院呼吸器内科檜澤伸之教授に深い謝意を表します。

適切な御指導と御示唆をいただきました筑波大学医療医学系石井幸雄教授に深く感謝いたします。

研究その他多方面にわたり御指導いただきました筑波大学医療医学系大塚盛男教授、同坂本透准教授、水戸地域医療教育センター佐藤浩昭教授、ひたちなか社会連携教育センター寺本信嗣教授に深く感謝いたします。

菌株の分与、菌の解析について多大なる御協力、御指導をいただきました国立病院機構東名古屋病院の小川賢二医学博士に感謝いたします。

また、研究において様々な御協力、御教示をいただきました、森島祐子講師、栗島浩一講師、川口未央講師、本間晋介講師、松野洋輔講師、齋藤武文医学博士、菊池教大医学博士、原口典博医学博士、谷下田雄一医学博士、山鳥忠弘医学博士、金子美子医学博士、阿野哲士医学博士、藤田純一医学博士、大塚茂男医学士、太田恭子医学士、谷田貝洋平医学士に感謝いたします。