

氏 名	林 士元				
学 位 の 種 類	博士（医学）				
学 位 記 番 号	博甲第 8277 号				
学位授与年月	平成 29 年 3 月 24 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	肺気腫形成における T-bet の役割について				
主 査	筑波大学教授	医学博士	高橋	智	
副 査	筑波大学准教授	医学博士	鬼塚	正孝	
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	坪井	洋人	
副 査	筑波大学助教	博士（医学）	川崎	綾	

論文の内容の要旨

林氏の学位論文は、肺気腫形成における T-bet の機能を検討したものである。その要旨は以下の通りである。

（目的）

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、たばこ煙などの有害物質の吸入により引き起こされる異常な免疫反応が関連した、慢性進行性の呼吸器疾患である。病理学的に気腫と末梢気道の炎症を認め、各患者で様々な割合で両者が混在している。COPD の主要な原因は喫煙であるが、COPD を発症する喫煙者は 20% 程度にとどまり、その発症や進展、病型の決定に寄与する宿主側因子の存在が示唆される。転写因子 T-bet は Th1 細胞への分化を誘導する転写因子として発見され、その後自然免疫と獲得免疫の両方で重要な役割を担うことがわかってきた。T-bet は免疫細胞の分化や機能調節を介して COPD の病態に関与している可能性があるがその役割はまだ不明である。著者は、気腫形成における T-bet の役割の解明を目的として本研究を行なったものである。

（対象と方法）

著者は、エラスターゼ誘導マウス肺気腫モデルを用い、野生型マウスと T-bet 欠損マウスの病態を比較検討している。肺の炎症を気管支肺胞洗浄（BAL）にて、気腫の形成を病理学的、形態学的、機能的な方法で解析している。肺のサイトカイン発現を定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応と細胞内サイトカインアッセイにて、プロテアーゼ活性をザイモグラフィにて評価している。骨髓由来マクロファージ（BMDM）、マウス肺胞マクロファージ MH-S 細胞を用い、ex vivo、in vitro にて T-bet によるサイトカインの発現調節機構を解析している。また BMDM と CD4⁺T 細胞の共培養にて、エラスターゼ投与後の獲得免疫形成における T-bet の役割を解析している。

（結果）

著者は、気腫形成は T-bet 欠損マウスにおいて、いずれの解析方法においても有意に増強していることを確認にしている。T-bet 欠損マウスでは、エラスターゼ投与後の BAL 液中の好中球数、MMP-2・

MMP-9 活性がいずれも野生型マウスと較べて増強していることを明らかにしている。サイトカインの解析では、急性期の IL-6 発現と 5 日目の IL-17 発現は両群のマウスで増加したが、いずれも T-bet 欠損マウスでより顕著であることを確認している。細胞内サイトカインの解析では、IL-17 を産生する CD4⁺T 細胞の割合は T-bet 欠損マウスのほうが高値であることを明らかにしている。BMDM をエラスターゼとともに培養すると IL-6 発現が誘導され、その程度は野生型マウス由来の BMDM と較べ T-bet 欠損マウス由来の BMDM の方が高値であることを確認している。MH-S 細胞において siRNA で T-bet の発現を抑制すると IL-6 を含む複数の M1 サイトカインの発現が増加することを明らかにしている。逆にマウス T-bet cDNA を過剰発現させると、これらのサイトカインの発現は低下することを確認している。野生型マウスと T-bet 欠損マウスより、脾臓由来 CD4⁺T 細胞と BMDM をそれぞれ用意し、エラスターゼとともに共培養したところ、上清の IL-17 濃度は CD4⁺T 細胞の遺伝子系にのみ影響され、BMDM の遺伝子系とは無関係であることを明らかにしている。IL-17 濃度は、野生型に比べて T-bet 欠損マウス由来 CD4⁺T 細胞においてより高値であることを明らかにしている。

(考察)

著者は、肺組織と同様、T-bet 欠損マウス由来の BMDM ではエラスターゼ存在下での IL-6 発現がより高値であることを明らかにしている。T-bet による IL-6 産生の制御は、これまでリンパ球や組織レベルでの報告はあるが、マクロファージでの報告はなく、著者らによる新規の知見と考えられる。今後その分子メカニズムの解明、T-bet がこの作用を発揮する細胞の同定を目指した研究が必要であると考えられる。著者らは、siRNA にて T-bet の発現が抑制された MH-S 細胞は、一部の M1 サイトカインの発現が増加していることを明らかにしている。これらは独特に分化した細胞集団、または不完全に分化した M1 細胞と考えられ、その区別には詳細なフェノタイプと、サイトカインの発現調節機序の解明が必要と考えられるとしている。著者は、T-bet の過剰発現はこれらのサイトカインの発現を抑制し、T-bet はサイトカインの発現制御を目標とした治療の標的となる可能性があると考えられている。本論文で、BMDM と MH-S 細胞において、T-bet によるサイトカイン発現調節の仕方に一部違いをあることを明らかにしているが、その理由として周囲の微小環境に適応するべくマクロファージが機能的に多様性を示す事、BMDM を作成するために用いた L929 細胞の培養上清 (M-CSF を含む) の影響、などが考えられるとしている。著者は、エラスターゼ投与後の Th17 反応は、T-bet 欠損マウスでより増強しており、他の疾患モデルにおける同マウスのフェノタイプと同様であることを明らかにしている。T-bet 欠損マウス由来の BMDM は IL-6 の発現がより増加していたが、共培養実験では IL-17 産生はマクロファージに依存せず、T-bet による Th17 分化調節は T 細胞に依存すると考察している。マクロファージからの MMP-9 の発現誘導は IL-6 や IL-17 に依存するとされている。T-bet 欠損マウスではこれらサイトカインの発現が増加しており、気管支肺胞洗浄液中の MMP-9 活性増加を引き起こした可能性があると考えられている。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は、T-bet はマクロファージとリンパ球の機能制御を通じてサイトカインやプロテアーゼ産生を調節し、エラスターゼ投与で誘導される肺の急性炎症と、それに続く気腫形成を制御していることを明らかにしている。T-bet を標的とする治療は、自然免疫と獲得免疫の両方の反応を制御して治療効果を示す可能性が期待され、新たな治療法の確立につながる可能性があり、学位論文として評価できる。

平成 28 年 12 月 22 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。