

筑波大学

博士（医学）学位論文

肺気腫形成における T-bet の役割について

2016

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

林 士元

目次

第1章 序章

1. COPDの疾患概念	2
2. COPDの病態	2
3. COPDの炎症細胞と炎症性メディエーター	5
4. 転写因子 T-bet	10
5. COPDの治療	11
6. COPDの動物モデル	12
参考文献	13

第2章 肺気腫形成における T-bet の役割について

1. 目的	23
2. 対象と方法	24
3. 結果	29
4. 考察	35
表・図	42
参考文献	63

第3章 総括

謝辞

参考論文

第1章 序章

1. COPD の疾患概念

慢性閉塞性肺疾患（Chronic obstructive pulmonary disease ; COPD）はタバコ煙を主とする有害物質を長期吸入することで発症する肺の炎症性疾患である。末梢気道病変や気腫性病変により進行性の気流閉塞が生じ、慢性の咳、痰、労作時呼吸困難の原因となる。大規模疫学調査である PLATINO study[1]、BOLD study[2]や日本の NICE study[3]などにより、COPD の有病率は 10%前後と世界的に高いレベルにあることが示されている。WHO の試算では、2020 年には COPD は世界の全死因の第 3 位になると予測されている[4]。

タバコ煙は COPD の最大の危険因子である。COPD 患者の約 90%には喫煙歴があり[5]、その発生率は年齢や喫煙量とともに増加し、60 pack-years 以上の重喫煙者では約 70%に COPD が認められている[6]。一方、喫煙者の約 15~20%程度しか COPD を発症しておらず、60 pack-years 以上の重喫煙者でも、約 30%は正常な呼吸機能に留まっている[7, 8]。従って喫煙者のすべてが COPD を発症するわけではなく、COPD の発症しやすさ、すなわち疾患感受性を規定する宿主側因子の存在が示唆されている。

2. COPD の病態

COPD では中枢から末梢にわたるすべての気道、肺胞、さらに肺血管に病変がみられる。これらの病変はタバコ煙などの有害物質の吸入による炎症が原因と考えられ、主として好中球、マクロファージ、CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞が関与する特異的な炎症パターンを示す。これらの炎症細胞や上皮細胞は、サイト

カインやケモカインなどの炎症性メディエーターを産生して炎症反応を増強させ[9-11]、さらにオキシダントやプロテアーゼなどを放出し、肺胞破壊や末梢気管支の傷害が惹起されることで COPD の病態形成へとつながっていく。また上皮細胞からは TGF- β などの成長因子が産生され、気道リモデリングの原因となる[12]。COPD の炎症は肺にとどまらず、全身にも波及することが知られている。COPD 患者の末梢血液中には、IL-6、TNF- α 、IL-1 β などの炎症性メディエーターやCRPが上昇しており、こうした全身性の炎症を背景に体重減少、筋力低下、心血管疾患、骨粗鬆症、糖尿病、抑うつなど様々な全身併存症が引き起こされることから、近年では COPD は全身性の炎症性疾患としてとらえている。COPD でみられる慢性炎症は禁煙した後も消退しないという特徴があり、自己免疫もしくは持続感染などの内因性の機序が炎症に寄与している可能性がある[13]。

COPD の発症メカニズムとして、古くからプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説とオキシダント・アンチオキシダント不均衡説の二つの仮説が提唱されており、さらに近年ではアポトーシスと細胞老化がもう一つの仮説として、注目されつつある。COPD の病態においては、これらの発症機序は相互に影響しあうと考えられており、今日までに多くの研究がなされているが、未だにすべてを説明づけるには至っていない。

[1] オキシダント・アンチオキシダント不均衡説

酸化ストレスは、オキシダントとアンチオキシダントの均衡が破綻することによって引き起こされる。たばこ煙に含まれる高濃度の活性酸素(オキシダント)自体が肺を傷害するほか、喫煙により肺内に集積する好中球やマクロファージなどの炎症細胞から活性酸素が放出される。様々なオキシダントは NF- κ B を介した炎症反応を起こす。一方 COPD 患者では、これらの活性酸素を分解する

スーパーオキシド (SOD) やカタラーゼ、非特異的抗酸化物質であるグルタチオンなどのアンチオキシダントが減少しているか、あるいは過剰なオキシダントに対して十分でないと考えられている。COPD 患者の肺胞マクロファージでは、アンチオキシダント遺伝子の発現を誘導する転写因子である Nrf2 の発現が減少していることが報告されている[14, 15]。また Nrf2 遺伝子欠損マウスに喫煙させると急性炎症に対する感受性が増大し、アポトーシス、肺気腫が増加すると報告されている[16]。酸化ストレスは、炎症性遺伝子の発現増加、アンチプロテアーゼの不活化、粘液分泌や血管透過性の亢進などを引き起こす。さらに酸化ストレスによるヒストン脱アセチル化酵素活性の低下は、炎症性遺伝子の発現増強やステロイドによる抗炎症作用の抑制に関与するとされている[17]。

[2] プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説

COPD 患者の炎症細胞や気道上皮細胞からは様々なプロテアーゼが放出されるが、特にエラスターゼ活性のあるプロテアーゼにより肺胞を構成する主な結合組織であるエラスチンが破壊され、気腫病変が形成される。エラスターゼ活性を有するプロテアーゼには、好中球エラスターゼ、カテプシン、プロテアーゼ 3、マトリックス・メタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase : MMP) がある。特に肺胞マクロファージなどから産生されるマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMPs) -1、-2、-9、-12 は気腫形成に大きく関与しており、これまで動物およびヒトについて複数の報告がある[18-21]。

[3] アポトーシスと細胞の老化

肺障害の修復機能は人によって様々であるが、その違いが COPD のフェノタイプや重症度の違いに関連すると考えられている。マウスに VEGF

(vascular endothelial growth factor) 受容体阻害薬を投与して肺血管内皮細胞にアポトーシスを誘導すると気腫病変が生じること[22]と、ヒトの気腫肺において VEGF や VEGF 受容体の発現が減少していること[23]が報告されており、血管内皮細胞のアポトーシスが肺気腫の原因となる可能性が示唆されている。一方、肺胞細胞のアポトーシスが増加しても、細胞増殖により補充されれば気腫病変は形成されないが、COPD では肺胞細胞の老化によりアポトーシスと細胞増殖に不均衡が存在している可能性が考えられている[24]。喫煙が肺胞上皮細胞や肺線維芽細胞の老化を誘導すること、ヒトの気腫肺では肺胞上皮細胞、血管内皮細胞が老化していることが報告されており[24-27]、気腫肺では肺胞細胞老化によって肺の修復能力が低下している可能性が示唆されている。また喫煙曝露した加齢マウスは若年マウスに比べて NF κ B が高発現するように変化しており、CXC ケモカインである KC (Keratinocyte-derived chemokine)、MIP-2 (Macrophage inflammatory protein-2) の発現増加とそれに伴う好中球性炎症の増強がみられ、加齢による喫煙に対する宿主感受性の増大が示唆されている[28]。

3. COPD の炎症細胞と炎症性メディエーター

COPD 患者の肺ではマクロファージ、リンパ球、好中球などの炎症細胞が増加しており、その発症や進行に関与している。これらの炎症細胞や上皮細胞はケモカインやサイトカインなどの炎症性メディエーターを産生して、炎症反応を増強させ、プロテアーゼやオキシダントを介して、気道や肺を傷害する。さらに TGF- β など増殖因子を産生して組織のリモデリングの原因となる。以下、気道炎症に関する細胞および炎症性メディエーターについて概説する。

[1] 気道炎症に関与する細胞

(a) マクロファージ

マクロファージは COPD 患者の気道内腔、肺胞系、気管支肺胞洗浄液で顕著に増加している。マクロファージは血中の単球に由来しており、これらは CCL2 や CXCL1 といったケモカインに反応して肺に遊走してきたものである[29]。マクロファージはケモカインを産生して好中球、単球、T リンパ球を肺に遊走させ、また MMP-9 などのプロテアーゼを産生し、COPD の病態形成において重要な役割を果たしている[30]。

マクロファージは周囲の微小環境に従い特異的なフェノタイプを獲得する。2 つの分化したフェノタイプが確立しており、それぞれ M1 マクロファージ（古典的活性化マクロファージ）、M2 マクロファージ（選択的活性化マクロファージ）と呼ばれている。M1 マクロファージは IFN- γ 、GM-CSF、LPS などの刺激により分化し、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-12、IL-23 などの炎症性サイトカインや活性酸素を産生し、Th1/Th17 反応を誘導する[31, 32]。一方 M2 マクロファージは IL-4 や IL-13 といった Th2 サイトカインによって分化し、Fizz1、arginase-1、Ym1 などを発現し、Th2 反応を誘導する[32, 33]。マクロファージの分化には特異的な転写因子が作用しており、M1 への分化には STAT1、STAT5、IRF5、NF- κ B などが、M2 には C/EBP β 、IRF4、STAT6 などの転写因子が関わっている[34]。こうした転写因子の同定は現在も進んでいるもののまだ不明な点が多く残っている。また多様なマクロファージを M1/M2 に分けるのは単純すぎるとも考えられている。COPD 患者の肺胞マクロファージについては特定の分化したマクロファージが優位であることを示す根拠はない[35]。また COPD 患者肺での獲得免疫反応の形成におけるマクロファージの役割についても明らかになっていない。

(b) 好中球

好中球は活性酸素、エラスターゼとサイトカインを放出し、気道粘液の過分泌、気腫形成と炎症の誘導に関与している。正常喫煙者の喀痰中の中でも増加しているが、COPD 患者ではさらに増加しており、喀痰中好中球数は COPD の重症度と相関していたとの報告がある[30]。

(c) 好酸球

COPD の増悪時、気道壁中の好酸球が上昇を認められている[30]。COPD における好酸球の役割は不明であるが、喀痰や気管支肺胞洗浄液中の好酸球上昇とステロイド治療の有効性に相関が認められている[36]。

(d) CD8⁺T 細胞

COPD 患者では CD8⁺T 細胞が増加しており、増加している T リンパ球の中でも主要な成分を占める。CD8⁺T 細胞の数は COPD が重症になるにつれ増加する[37]。これらが分泌するパーフォリンやグライザイム B は気道上皮細胞などにアポトーシスを誘導すると考えられている[38-40]。

(e) CD4⁺ T 細胞

CD4⁺T 細胞は特に重症 COPD 患者の肺と気道で増加していることが報告されている。Th1 細胞は Tc1 細胞とともに INF- γ を産生し、ケモカイン受容体 CXCR3、CCR5 を発現し、MMPs の産生に関与している[41]。Th17 細胞は CD4⁺細胞のひとつのサブセットであり、IL-6 と TGF- β によりナイーブ T 細胞から転写因子である ROR- γ t (retinoic acid orphan receptor- γ t) の発現が誘導され、Th17 細胞へ分化する。Th17 細胞は炎症性疾患、自己免疫性疾患や細菌感染防御に重要であることが近年の研究で明らかになってきている[42, 43]。COPD 肺では Th17 関連サイトカインの発現が増加しており[44, 45]、またエラスターゼ誘導肺気腫モデルにおいて IL-17 欠損マウスでは気腫形成が減弱していたとの

報告があり[46]、COPDにおけるTh17細胞の役割が注目されている。

[2] 炎症に関与するメディエーター

(a) TNF- α

TNF- α は上皮細胞、マクロファージ、リンパ球などで産生され、IL-6、IL-1 β とともに炎症惹起性サイトカインと呼ばれ、NF- κ Bを介して、様々な炎症性遺伝子を活性化させ、さらなる炎症を引き起こす[47]。TNF- α はCOPD患者の喀痰中で増加しており、特にCOPDの増悪時にその上昇が顕著である[48, 49]。喫煙誘導肺気腫マウスモデルの病態においてTNF- α が重要な役割を担うことが報告されている[50]。抗TNF- α 薬によるCOPDの治療効果が期待されたが、実際インフリキシマブによる治療はCOPDにおいて有効性は確認されなかった[51]。

(b) IL-6

IL-6はリンパ球、マクロファージ、樹状細胞、気道上皮細胞などから産生され、通常、他のサイトカインと共同に作用し、自然免疫および獲得免疫の橋渡し役として重要な役割を果たしている。IL-6はCOPD患者の喀痰や呼気、末梢血液中に上昇しており、特にCOPDの増悪時に増加が確認されている[52, 53]。重症COPD患者を対象とした研究では、血中IL-6とCRPの値と一秒量の低下に関連が認められた[54]。エラスターゼ誘導マウス肺気腫モデルにおいて、IL-6遺伝子欠損マウスでは肺気腫の形成、肺細胞のアポトーシス、肺でのMMP-12の産生が抑制されていた[55]。またIL-6は肝臓でCRP (C-reactive protein) を産生させ、内皮細胞機能の傷害、インスリン抵抗性、骨粗鬆症、抑うつなどのCOPDの全身合併症へ関与することが示唆されている[56]。

(c) IL-1 β

主に単球やマクロファージで産生される。マクロファージを活性化し IL-1 β 自身、IL-6、TNF- α 、IL-17、MMP-9 など様々な炎症性メディエーターの発現を誘導する[57]。COPD 患者の喀痰中では IL-1 β の増加がみられ、これが IL-1 レセプターと IL-1 β レセプターアンタゴニストの減少や COPD の重症度に相関していたと報告されている[58]。

(d) IFN- γ

主に Th1 と Tc1 細胞で産生される。IFN- γ はマクロファージなどの免疫細胞を活性化し、細胞性免疫を促進する。さらに STAT1 活性化することにより Tbet の発現を誘導し、Th1 細胞の分化を促進する。一方で STAT6、GATA3、IL-4 レセプターを抑制して Th2 細胞への分化を、また STAT3 の阻害による IL-6、IL-21、IL-23 のシグナル抑制を介して ROR γ t を阻害し、Th17 細胞への分化を抑える。IFN- γ 過剰発現マウスにおいてマクロファージと好中球浸潤が起こり、プロテアーゼの活性化を介して肺気腫が形成されたと報告されている[59]。COPD 患者の気道内に IFN- γ を産生する T 細胞が増加していると報告されており[60]、IFN- γ はケモカイン誘導を介して、COPD の病態形成に関与していると考えられている[47]。

(e) IL-17

Th17 から産生され線維芽細胞や上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージなどに作用し、IL-6 や TNF- α などのサイトカインや、CXCL1、CXCL8 などのケモカインの発現を誘導し、好中球の遊走を促進する。気道上皮においてムチンをコードする遺伝子 (*MUC5AC* と *MUC5B*) の発現を増加させる[61]。COPD 患者の喀痰中で増加している[62]。

(f) IL-12

活性化マクロファージや気道上皮細胞より産生され、Th1細胞の分化と活性化に重要である。STAT4をリン酸化させてその効果を発揮する。

(g) IL-10

抗炎症性サイトカインで、TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインやMMP-9などのプロテアーゼの産生を抑制する。COPD患者の喀痰中ではIL-10の濃度は低下していた[63]。

(h) Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

多様な機能を有し、線維芽細胞や気道平滑筋細胞の増殖、細胞外基質の沈着、上皮の修復などに関わる。免疫調整機能もあり、調節性T細胞を介して、Th1、Th2、Th17反応を抑制する[64]。COPD患者の末梢気道の上皮細胞、マクロファージではTGF- β の発現が増加していた[12]。喫煙曝露したマウスではTGF- β と下流のリン酸化Smad2の増加とともに末梢気道におけるコラーゲンの沈着が増加しており[65]、気道リモデリングへの関与が示唆されている。

4. 転写因子 T-bet

T-betはT-BOXファミリーに属する転写因子であり、主にTh1細胞で発現しており、Th1への分化を誘導する。また、CD8⁺細胞、樹状細胞や自然免疫リンパ球などにも発現しており、獲得免疫のみならず、自然免疫においても重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。ナイーブT細胞からTh1細胞への分化は、IL-12がSTAT4を活性化することによって、INF- γ の産生を誘導する。INF- γ はSTAT1を活性化することによりT-betの発現を誘導し、Th1細胞特異的な遺伝子の発現が誘導される。同時にINF- γ はTh2やTh17への分化を阻害する。CD8⁺細胞においては、T-betはEOMES (Eomesodermin) と共

同に作用し、エフェクターCD8⁺T細胞を感染部位に移動させ、INF- γ やTNF- α などのサイトカインを産生させ、あるいは、グランザイムBやパーフォリン産生を介して、感染細胞を傷害する[66]。自然免疫におけるT-betの役割は近年認識されるようになった。樹状細胞におけるTh1活性化への関与[67]や腸管の恒常性維持[68]に重要であると報告されている。自然リンパ球は自然免疫と獲得免疫の中間的性格をもつ細胞として注目されている。自然リンパ球は抗原受容体の非存在下において刺激に対して速やかに反応し、サイトカイン産生などにより生体防御の初動部隊として機能すると同時に獲得免疫の発現に寄与する。T-bet、GATA-3、ROR γ tは自然リンパ球の分化においても必須な転写因子として知られているがTh分化ほどは理解されていない[69, 70]。T-betはマクロファージにおいても発現が確認されており[71-73]、IFN- γ [71]やLPS[72]で発現が誘導されているが、その役割についてはまだ不明な点が多い。

5. COPD の治療

COPD の治療は安定期と急性増悪期にわけて考えられる。安定期に行われる治療は、長時間作用性気管支拡張薬を中心とした薬物療法と、禁煙指導、インフルエンザワクチン接種、呼吸リハビリテーションといった非薬物療法を含めて、症状の軽減、肺機能低下の進行抑制、合併症、増悪の予防を管理目標としている[30]。現存治療の中で、禁煙はCOPDの発症リスクを減少させ、進行を抑制する最も効果的かつ経済的な方法である。しかし、禁煙後も肺の炎症や進行性の肺機能低下は継続し、現存治療では確実に肺機能低下を食い止め、機能改善には至らないのが現状である。気腫や気道病変の発症・進行を抑制する新たな治療方法の確立が求められており、このため、COPDの発症機序を解明することが必要不可欠であると考えられる。

8. COPD の動物モデル

COPD の詳細な発症メカニズムは明らかになっておらず、また COPD には少なくとも 4 つの異なる病態（肺気腫、慢性気管支炎、気道リモデリング、肺血管病変）、さらに急性増悪という病態が存在している。これらすべてを反映する動物モデルの作成は複雑で困難である。今日までに用いられている COPD 動物モデルは、喫煙誘導肺気腫モデル[74]、エラスターゼ誘導肺気腫モデル[75]、アポトーシス誘導肺気腫モデル[76]、LPS 誘導肺気腫モデル[77]などがある。喫煙誘導肺気腫モデルはヒトの COPD と同じ原因からなり、四つの病態をすべてみられ、最もヒトに近い生理学変化を来すとされている。しかし臨床で主な治療対象である重症の肺気腫を誘導することが困難であるだけでなく、長期（六か月）にわたる喫煙曝露が必要であることが難点であり、禁煙後に病変が進行しない点もヒトの COPD と異なる。エラスターゼ誘導肺気腫モデルは、マウスにエラスターゼ 3 から 5 単位投与し、3 週間という短期間でほぼすべてのマウスに肺胞破壊を伴う肺気腫を形成させることができる[46, 78]。さらに投与した量に応じた重症度の肺気腫を誘導でき、組織学的解析に頼らなくても呼吸機能で十分に評価することができる。エラスターゼによる肺気腫の誘導には、投与したエラスターゼの酵素活性による直接の肺構造の破壊よりも、続いて引き起こされた炎症による機序の関与が主であると考えられており、エラスターゼ投与後も炎症が持続するという点で病態は進行性である。欠点としては、エラスターゼ誘導肺気腫モデルは COPD のすべての病態を反映しているわけではないことや、ヒトにおける肺気腫形成と喫煙誘導肺気腫のメカニズムとの関連が不明であることが挙げられる[75]。

参考文献

1. Menezes, A.M., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study*. Lancet, 2005. 366(9500): p. 1875-81.
2. Buist, A.S., et al., *International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study*. Lancet, 2007. 370(9589): p. 741-50.
3. Fukuchi, Y., et al., *COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study*. Respirology, 2004. 9(4): p. 458-65.
4. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study*. Lancet, 1997. 349(9064): p. 1498-504.
5. Snider, G.L., *Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis*. Annu Rev Med, 1989. 40: p. 411-29.
6. Kuperman, A.S. and J.B. Riker, *The variable effect of smoking on pulmonary function*. Chest, 1973. 63(5): p. 655-660.
7. *Cigarette smoking and health*. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med, 1996. 153(2): p. 861-5.
8. Fletcher, C. and R. Peto, *The natural history of chronic airflow obstruction*. Br Med J, 1977. 1(6077): p. 1645-8.
9. Hogg, J.C., *Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease*. Lancet, 2004. 364(9435): p. 709-21.
10. Freeman, C.M., et al., *Cytotoxic potential of lung CD8(+) T cells increases with chronic obstructive pulmonary disease severity and*

- with in vitro stimulation by IL-18 or IL-15.* J Immunol, 2010. 184(11): p. 6504-13.
11. Freeman, C.M., et al., *Basal gene expression by lung CD4+ T cells in chronic obstructive pulmonary disease identifies independent molecular correlates of airflow obstruction and emphysema extent.* PLoS One, 2014. 9(5): p. e96421.
 12. Takizawa, H., et al., *Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).* Am J Respir Crit Care Med, 2001. 163(6): p. 1476-83.
 13. Cosio, M.G., M. Saetta, and A. Agusti, *Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease.* N Engl J Med, 2009. 360(23): p. 2445-54.
 14. Boutten, A., et al., *NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease.* Trends Mol Med, 2011. 17(7): p. 363-71.
 15. Suzuki, M., et al., *Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. 39(6): p. 673-82.
 16. Rangasamy, T., et al., *Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice.* J Clin Invest, 2004. 114(9): p. 1248-59.
 17. Ito, K., et al., *Decreased histone deacetylase activity in chronic*

- obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2005. 352(19): p. 1967-76.
18. Segura-Valdez, L., et al., *Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD*. Chest, 2000. 117(3): p. 684-94.
 19. Molet, S., et al., *Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Inflamm Res, 2005. 54(1): p. 31-6.
 20. D'Armiento, J., et al., *Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema*. Cell, 1992. 71(6): p. 955-61.
 21. Hautamaki, R.D., et al., *Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice*. Science, 1997. 277(5334): p. 2002-4.
 22. Kasahara, Y., et al., *Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema*. J Clin Invest, 2000. 106(11): p. 1311-9.
 23. Kasahara, Y., et al., *Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. 163(3 Pt 1): p. 737-44.
 24. Tsuji, T., K. Aoshiba, and A. Nagai, *Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 174(8): p. 886-93.
 25. Tsuji, T., K. Aoshiba, and A. Nagai, *Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004.

- 31(6): p. 643-9.
26. Nyunoya, T., et al., *Cigarette smoke induces cellular senescence*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. 35(6): p. 681-8.
 27. Muller, K.C., et al., *Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro*. Respir Res, 2006. 7: p. 32.
 28. Moriyama, C., et al., *Aging enhances susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation through bronchiolar chemokines*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. 42(3): p. 304-11.
 29. Traves, S.L., et al., *Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2*. J Leukoc Biol, 2004. 76(2): p. 441-50.
 30. *From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2016*. Available from: <http://goldcopd.org/>.
 31. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections*. J Immunol, 2008. 181(6): p. 3733-9.
 32. Mantovani, A. and M. Locati, *Orchestration of macrophage polarization*. Blood, 2009. 114(15): p. 3135-6.
 33. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. 32(5): p. 593-604.
 34. Lawrence, T. and G. Natoli, *Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity*. Nat Rev Immunol, 2011. 11(11): p. 750-61.
 35. Hiemstra, P.S., *Altered Macrophage Function in Chronic Obstructive*

- Pulmonary Disease*. Annals of the American Thoracic Society, 2013. 10(Supplement): p. S180-S185.
36. Pizzichini, E., et al., *Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. 158(5 Pt 1): p. 1511-7.
 37. Saetta, M., et al., *CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. 157(3 Pt 1): p. 822-6.
 38. O'Shaughnessy, T.C., et al., *Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. 155(3): p. 852-7.
 39. Hodge, S., et al., *Increased airway granzyme b and perforin in current and ex-smoking COPD subjects*. Copd, 2006. 3(4): p. 179-87.
 40. Majo, J., H. Ghezzi, and M.G. Cosio, *Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema*. Eur Respir J, 2001. 17(5): p. 946-53.
 41. Saetta, M., et al., *Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 165(10): p. 1404-9.
 42. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. 441(7090): p. 231-4.
 43. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*.

- Nature, 2008. 453(7198): p. 1051-7.
44. Di Stefano, A., et al., *T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients*. Clin Exp Immunol, 2009. 157(2): p. 316-24.
 45. Doe, C., et al., *Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD*. Chest, 2010. 138(5): p. 1140-7.
 46. Kurimoto, E., et al., *IL-17A is essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice*. Respir Res, 2013. 14: p. 5.
 47. Barnes, P.J., *The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. J Clin Invest, 2008. 118(11): p. 3546-56.
 48. Keatings, V.M., et al., *Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. 153(2): p. 530-4.
 49. Aaron, S.D., et al., *Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. 163(2): p. 349-55.
 50. Churg, A., et al., *Tumor necrosis factor-alpha drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. 170(5): p. 492-8.
 51. Rennard, S.I., et al., *The safety and efficacy of infliximab in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care

- Med, 2007. 175(9): p. 926-34.
52. Bhowmik, A., et al., *Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations*. Thorax, 2000. 55(2): p. 114-20.
 53. Bucchioni, E., et al., *High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD*. Respir Med, 2003. 97(12): p. 1299-302.
 54. Broekhuizen, R., et al., *Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD*. Thorax, 2006. 61(1): p. 17-22.
 55. Tasaka, S., et al., *Role of interleukin-6 in elastase-induced lung inflammatory changes in mice*. Exp Lung Res, 2010. 36(6): p. 362-72.
 56. Barnes, P.J. and B.R. Celli, *Systemic manifestations and comorbidities of COPD*. Eur Respir J, 2009. 33(5): p. 1165-85.
 57. Culpitt, S.V., et al., *Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 167(1): p. 24-31.
 58. Sapey, E., et al., *Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonists in stable COPD*. J Clin Immunol, 2009. 29(4): p. 508-16.
 59. Wang, Z., et al., *Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung*. J Exp Med, 2000. 192(11): p. 1587-600.
 60. Di Stefano, A., et al., *STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J, 2004. 24(1): p. 78-

- 85.
61. Chen, Y., et al., *Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop*. J Biol Chem, 2003. 278(19): p. 17036-43.
 62. Traves, S.L. and L.E. Donnelly, *Th17 cells in airway diseases*. Curr Mol Med, 2008. 8(5): p. 416-26.
 63. Takanashi, S., et al., *Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers*. Eur Respir J, 1999. 14(2): p. 309-14.
 64. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Regulatory T cells, transforming growth factor-beta, and immune suppression*. Proc Am Thorac Soc, 2007. 4(3): p. 271-6.
 65. Churg, A., et al., *Cigarette smoke drives small airway remodeling by induction of growth factors in the airway wall*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 174(12): p. 1327-34.
 66. Lazarevic, V., L.H. Glimcher, and G.M. Lord, *Tbet: a bridge between innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. 13(11): p. 777-89.
 67. Lugo-Villarino, G., et al., *Tbet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(13): p. 7749-54.
 68. Powell, N., et al., *Transcriptional regulation of the mucosal immune system mediated by Tbet*. Mucosal Immunol, 2010. 3(6): p. 567-77.
 69. Serafini, N., C.A. Vosshenrich, and J.P. Di Santo, *Transcriptional*

- regulation of innate lymphoid cell fate. Nat Rev Immunol, 2015. 15(7):*
p. 415-28.
70. Ebihara, T., et al., *Runx3 specifies lineage commitment of innate lymphoid cells. Nat Immunol, 2015. 16(11):* p. 1124-33.
71. Lighvani, A.A., et al., *T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(26):* p. 15137-42.
72. Liu, C.F., et al., *Innate immune response of alveolar macrophage to house dust mite allergen is mediated through TLR2/4 co-activation. PLoS One, 2013. 8(10):* p. e75983.
73. Kriegova, E., et al., *T-helper cell type-1 transcription factor Tbet is upregulated in pulmonary sarcoidosis. Eur Respir J, 2011. 38(5):* p. 1136-44.
74. Churg, A., M. Cosio, and J.L. Wright, *Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. 294(4):* p. L612-31.
75. Wright, J.L., M. Cosio, and A. Churg, *Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. 295(1):* p. L1-15.
76. Tudor, R.M., S. McGrath, and E. Neptune, *The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common? Pulm Pharmacol Ther, 2003. 16(2):* p. 67-78.
77. Vernooij, J.H., et al., *Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent*

pathology. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. 26(1): p. 152-9.

78. Moreno, J.A., et al., *High-density lipoproteins potentiate alpha1-antitrypsin therapy in elastase-induced pulmonary emphysema*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. 51(4): p. 536-49.

第2章 肺気腫形成における T-bet の役割について

1. 目的

COPD は有毒なガスや粒子の吸入によって引き起こされた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。COPD の病理学的な特徴としては肺胞壁の破壊（気腫）と末梢気道の炎症が挙げられ、各患者においては様々な割合で両者が混在している。また COPD の主要な原因は喫煙であるが、喫煙者のうちで COPD を発症するのは 20%程度にとどまっている[1]。従って COPD の発症や進展、病型の決定に寄与する宿主側の因子の存在が示唆されている。その一例が $\alpha 1$ -アンチトリプシン欠損であり、患者はプロテアーゼ・アンチプロテアーゼバランスの不均衡により COPD を発症する。しかしこれ以外に宿主側因子の分子メカニズムの解明は現状ではほぼ不明のままである。

COPD の肺で認められる炎症反応は、気道と肺胞壁への好中球、マクロファージ、T リンパ球の浸潤が特徴づけられる[2]。これまでの様々な報告により、マクロファージが IL-6、IL-1 β 、TNF- α などのサイトカイン、ケモカイン、脂質、メディエーター、プロテアーゼなどの放出を通じ、COPD の進行において重要な役割を演じていることが示されている[3]。マクロファージは、特定の転写因子の活性化によって、その微小環境に応じた特定のフェノタイプに分化する。M1 マクロファージ（古典的活性化マクロファージ）は炎症を促進し、M2 マクロファージ（選択的活性化マクロファージ）は炎症を制御するよう機能する。COPD において認める獲得免疫反応は Tc1、Th1、Th17 細胞の浸潤を特徴とするが[4, 5]、マクロファージについてはある特定の分化したマクロファージの病態への関与は示されていない[6]。また確認されている獲得免疫の形成において

マクロファージが果たす役割についても明らかになっていない。

転写因子 T-bet は、当初は Th1 細胞への分化を調節する T 細胞の転写因子として発見された[7]。現在、T-bet は自然免疫と獲得免疫の両者において重要な役割を担っており、IFN- γ の誘導を通した Th1 反応を促進させ、かつ Th2、Th17 反応への分化を抑制している[8]。しかしマクロファージにおいてその分化や機能調節に T-bet が及ぼす影響は不明のままである。T-bet はこれら免疫細胞の分化や機能の調節を介して、COPD の進展において重要な役割を担っている可能性がある。

本研究では、T-bet 遺伝子欠損マウスを用い、エラスターゼで誘導される肺気腫形成において T-bet が担う役割を明らかにすることを目的とする。

2. 対象と方法

使用動物

Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) より購入した T-bet 遺伝子欠損 BALB/c マウスを筑波大学生命科学動物資源センター内で飼育繁殖させた。野生型 BALB/c マウスは、日本チャールズ・リバー (株) から購入した。本研究では、週齢 8 から 12 週の雌を使用し、また、筑波大学の動物実験倫理規定を遵守して行った。

エラスターゼ誘導肺気腫マウスモデル

ペントバルビタール (50 mg/kg・体重) を腹腔内投与し、一時的に麻酔された野生型および T-bet 欠損 BALB/c マウスの気管を露出させ、27 ゲージ針を用い、豚膵エラスターゼ (porcine pancreatic peptide ; PPE) (Sigma Aldrich) 3.75 単位を気管内投与した。コントロール群には滅菌された生理食塩水を投与

した。エラスターゼの投与量は過去の報告に従い、野生型マウスで投与から3週後に中等度の気腫が形成される用量とした[9, 10]。

組織学的評価法

エラスターゼ投与後21日目に気管と肺を一緒にマウスから摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液を気管より注入し、一定の圧力でゆっくり拡張させた。パラフィン包埋させた肺組織を厚さ2 μ mの切片に切断し、ヘマトキシリン-エオジンで染色した。顕微鏡にて20視野をランダムに選択し、各視野に5本の200 μ mの線を引き、両端の点と肺胞壁との交差点の数から平均肺胞壁間距離(Lm; Indirect method)を算出し、肺胞腔の拡張の評価とした[11]。

肺機能

エラスターゼ投与後21日目のマウスにケタミン塩酸塩(100 mg/kg・体重)とキシラジン(10 mg/kg・体重)を用いて麻酔をかけ、気管を露出させ、呼吸器(Fine-pointe; Buxco)に接続し、動的肺コンプライアンスを測定した。

気管支肺胞洗浄(BAL)

エラスターゼ投与後6時間、24時間、3日目、5日目、21日目の気管支肺胞洗浄を行った。麻酔されたマウスの気管より1mlの生理食塩水を注入、回収し、これを5回繰り返した。1回目のBAL液は遠心し、上澄みを別のエッペンチューブに保存し、ゼラチン・ザイモグラフィに使用した。残った細胞成分およびBAL液は、遠心し、1mlのリン酸緩衝生理食塩水に懸濁させた。この懸濁液から血球計算盤を用いて、総細胞数の算定を行い、またサイトスピンによる浮遊細胞標本をDiff-Quick染色(Polysciences)し、細胞分画の比率を算定した。

ゼラチン・ザイモグラフィ

1 回目の BAL 液（エラストアーゼ投与後 24 時間）の上澄みから、ゼラチン・ザイモグラフィ キット（AK47、コスモバイオ）を用いて、同社のプロトコールに従い、マトリックスメタロプロテアーゼ-9（潜在型；proMMP-9）、とマトリックスメタロプロテアーゼ-2（潜在型；proMMP-2、活性型；MMP-2）の活性を評価した。

定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

(Quantitative reverse transcription-Polymerase Chain Reaction; qRT-PCR)

RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて、マウスより分離した肺組織から、総 RNA を抽出し、遺伝子定量装置 (ABI7700; Applied Biosystems) を用いて qRT-PCR を行った。本研究に使用した PCR プライマーは(table1)に示した。各 mRNA 発現レベルは、比較 CT 法 ($\Delta \Delta CT$) にて評価した。コントロール遺伝子は glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を使用した。

免疫細胞化学 (Immunocytochemistry)

BAL 液から作製したサイトスピンによる浮遊細胞標本を冷やした 100%エタノールで固定後、界面活性剤である 0.4%トリトン X-100 を用いて細胞膜を破壊させた。0.3%過酸化水素含有メタノール溶液にて内因性ペルオキシダーゼをブロッキングし、洗浄後、抗 T-bet 抗体(Cell Signaling)を加え、4°C下で一晩、さらにヒストファイン シンプルステイン MAX-PO(M) (ニチレイバイオサイエンス) で 2 次抗体反応させた。染色にはジアミノベンジジン(DAB)を用いた。

細胞内サイトカイン

エラスターゼ投与後 5 日目のマウスから肺を摘出し、はさみでミンチ状とし、10%の牛胎児血清、400 単位/ml のコラゲナーゼ (Sigma Aldrich) を加えた RPMI1640 に懸濁し、37°Cにて 45 分間、振盪培養機を用いて培養した。細胞は 20 μm のナイロンメッシュに通した後、その後 50 ng/ml の Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA, Merck)、500 ng/ml の Ionomycin、40 $\mu\text{g/ml}$ の BrefeldinA (Sigma Aldrich)を含んだ RPMI1640 を加え、37°Cにて 5 時間培養した。洗浄後、抗 CD4 抗体、抗 TCR β 抗体 (BioLegend) にて表面染色 (暗所、30 分間) を行った後、IntraPrep 試薬(Beckman Coulter)を用い、製造元のプロトコールに従い、細胞の固定・膜透過処理を行った。続いて PE 標識抗 IL-17 マウス抗体 (BioLegend) にて細胞内染色を行い (暗所、30 分間)、洗浄した後 500 μl の PBS に細胞を浮遊させ、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。

骨髄由来マクロファージ (Bone marrow derived macrophages (BMDM))

L929 細胞はマウス線維芽細胞由来の線維肉腫株で、マクロファージの分化を誘導する Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) を培養上清中に大量に分泌することが知られている。L929 細胞を 10%の牛胎児血清を加えた RPMI1640 にて、5%CO₂、37°Cにて 10 日間培養して上清を回収し、1500 rpm で 5 分間遠心した後 -80°C下で保存した。

マウスの大腿骨より骨髄細胞を回収し、1500 rpm、5 分間遠心して上清を除き、細胞を 20%の牛胎児血清、30%の L929 細胞の培養上清を含む RPMI1640 中で、5%CO₂、37°Cで、6 日間培養し、骨髄中の前駆細胞を骨髄由来マクロファージに分化させた。なお、これらの細胞のうち 95%以上が F4/80 陽性のマクロファージであることをフローサイトメトリーで確認した。

以上の方法にて野生型および T-bet 欠損マウスより BMDM を誘導し、PPE (5 u/ml) または生理食塩水とともに、5%CO₂、37°Cにて 24 時間培養した。トライゾール (TRIzol, Thermo Fisher) を用いて RNA を抽出し、qRT-PCR にて遺伝子発現の解析を行った。

Small interfering RNA (siRNA) による T-bet 遺伝子の発現抑制

T-bet 遺伝子をターゲットとした siRNA と、ネガティブコントロール siRNA をインビトロジェン社 (Invitrogen) より購入した。Lipofectamine RNAiMAX 試薬 (Invitrogen) を用いて、同社のプロトコールに従い、20 nM の siRNA をマウス肺胞マクロファージ由来細胞株である MH-S 細胞 (DS ファーマバイオメディカル) に一時的に導入し、5%CO₂、37°Cにて 48 時間培養した。続いて、5 u/ml のエラスターゼまたは生理食塩水とともに 5%CO₂、37°Cにて 24 時間培養し、トライゾールを用いて RNA を抽出し、qRT-PCR にて遺伝子発現の解析を行った。

プラスミド構築と遺伝子導入による T-bet 遺伝子の過剰発現

T-bet cDNA コンストラクト、pJ4.5mT-bet は 2.1 kbp の T-bet cDNA 全長を含んでおり、筑波大学 高橋智先生のご好意によりご提供いただいた。同コンストラクトより EcoRI を用いて T-bet cDNA を pcDNA3.1 発現ベクターにサブクローンし、pcDNA3.1-T-bet を作成した。Lipofectamine LTX 試薬 (Invitrogen) を用いて、同社のプロトコールに従い、MH-S 細胞に、1.0μg の empty ベクターあるいは pcDNA3.1-T-bet を導入し、5%CO₂、37°Cにて 48 時間培養後にトライゾールにて RNA 抽出し RT-PCR にて遺伝子発現の解析を行った。

BMDM と CD4⁺T リンパ球の共培養

マウスの脾臓を摘出しスライドガラスによる破碎後、CT4⁺T cell アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) を用いて、CD4⁺T 細胞を単離した。96 穴培養プレート中で、野生型あるいは T-bet 欠損マウスより誘導した、BMDM (2 x 10⁵ cells/well) と CD4⁺T 細胞(1 x 10⁶ cells/well) を PPE (5u/ml) と抗 CD3e 抗体、抗 CD28 抗体 (T cell activation kit, Miltenyi Biotec) とともに 5%CO₂、37°C にて 48 時間培養後、培養上清中の IL-17 濃度を ELISA (R&D systems) にて測定した。

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。統計解析ソフトは IBM SPSS Statistics (version 22) を使用した。P<0.05 を統計学的に有意差ありと判定した。

3. 結果

T-bet はエラストラーゼ誘導肺気腫の形成に重要な役割を担っている。

T-bet がエラストラーゼ誘導肺気腫マウスモデルの気腫形成に及ぼす影響を明らかにするため、野生型 (WT) および T-bet 欠損マウス (*T-bet*^{-/-}) にエラストラーゼ(PPE)、あるいは生理食塩水を気管より投与し、21 日目に病理学的、形態学的、機能的な方法にて気腫の評価を行った。生理食塩水投与では、野生型および T-bet 欠損マウスにおいて気腫の形成が見られず、一方、PPE 投与により、野生型マウスにおいて肺胞壁の破壊および肺胞腔の拡大を認めた。この変化は

T-bet 欠損マウス PPE 投与群においてさらに強く認められた (Fig.1)。同様に、野生型マウス PPE 投与群の平均肺胞壁間距離 (Lm) ($51.23 \pm 0.63 \mu\text{m}$, $n=4$) は野生型マウス生理食塩水投与群の Lm ($42.45 \pm 1.94 \mu\text{m}$, $n=4$) よりも有意に大きく ($p < 0.05$)、T-bet 欠損マウス PPE 投与群の Lm ($72.67 \pm 7.87 \mu\text{m}$, $n=4$) は野生型マウス PPE 投与群よりもさらに増大していた ($p < 0.05$) (Fig.2)。

続いて、気腫形成の程度をさらに評価するために、PPE あるいは生理食塩水投与後 21 日目の動肺コンプライアンス (dynamic lung compliance ; Cydn) を測定した (Fig.3)。Cydn は、野生型マウス生理食塩水投与群 ($0.031 \pm 0.0010 \text{ ml/cmH}_2\text{O}$, $n=4$) と T-bet 欠損マウス生理食塩水投与群 ($0.030 \pm 0.0013 \text{ ml/cmH}_2\text{O}$, $n=4$) の両群間に明らかな差はなかった。PPE 投与によって野生型マウスの Cydn ($0.034 \pm 0.0013 \text{ ml/cmH}_2\text{O}$, $n=4$) は増大傾向を認めたが、野生型マウス生理食塩水投与群と比べて有意な差はなかった。一方、T-bet 欠損マウス PPE 投与群の Cydn ($0.043 \pm 0.0026 \text{ ml/cmH}_2\text{O}$, $n=4$) は、野生型マウス PPE 投与群と比較し有意な増大を認めた ($p < 0.05$)。以上の結果から、T-bet はエラストラーゼ誘導肺気腫マウスモデルにおいて、気腫形成を制御する役割を担うことが示された。

T-bet はエラストラーゼにて誘導される肺の炎症を抑制する

エラストラーゼ投与後に肺で惹起される炎症を評価するため、エラストラーゼあるいは生理食塩水を投与後 6 時間 (Fig.4-A)、24 時間 (Fig.4-B)、3 日 (Fig.4-C) 後に気管支肺胞洗浄を行った。エラストラーゼ投与により野生型および T-bet 欠損マウスのいずれにおいても炎症細胞の増加を認めた。マクロファージの数は両群間に差はなかったが、エラストラーゼ投与 6 時間と 24 時間後において、T-bet 欠損マウスにおける好中球数 (6 時間 $65.66 \pm 13.78 \times 10^4$, $n=5$ 、24 時間 77.03

$\pm 8.2 \times 10^4$, n=5) は野生型マウス (6 時間 $22.33 \pm 2.6 \times 10^4$, n=5、24 時間 $18.73 \pm 2.6 \times 10^4$, n=5) に比べて有意に高値であった ($P < 0.05$)。エラスターゼ投与 3 日後、T-bet 欠損マウスにおけるリンパ球 ($11.63 \pm 3.87 \times 10^4$, n=5) は野生型マウス ($0.85 \pm 0.21 \times 10^4$, n=5) に比べて有意に多くみられた ($P < 0.05$)。これらの結果より T-bet はエラスターゼ曝露による肺の炎症の制御に関与していると考えられた。

エラスターゼに誘導されるプロテアーゼは T-bet によって制御される。

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、エラスターゼ誘導肺気腫の形成に重要な役割を果たすことが示唆されている [12]。MMP-2、MMP-9 はマクロファージなどから潜在型 (proMMP-2、proMMP-9) として産生され、プロペプチド部分が切断されることにより活性化される。ゼラチン・ザイモグラフィを用いて、エラスターゼあるいは生理食塩水投与 24 時間後の気管支肺胞洗浄液中の MMP-2、proMMP-2、proMMP-9 (それぞれ 62、66、92kDA の位置にバンドを示す) の活性を測定した (Fig.5)。野生型マウスでは、エラスターゼ投与により生理食塩水投与と比べて MMP 活性の増加が認められた。T-bet 欠損マウスのエラスターゼ投与後の MMP 活性は野生型マウスと比較しさらに増強していた。この結果から、T-bet は、エラスターゼ曝露によって誘導される MMP-2 と MMP-9 の活性化に対し抑制的に作用することが示唆された。

T-bet はエラスターゼで誘導される肺での急性炎症および Th17 反応を制御する

気管支肺胞洗浄の解析から示されたように、エラスターゼ曝露で引き起こされた急性炎症は T-bet 欠損マウスでは野生型マウスと較べより増強していた。この機序をさらに詳しく究明するため、エラスターゼ投与 24 時間後の肺での炎

症性サイトカイン (IL-6、TNF- α 、IL-1 β) の mRNA 発現を評価した (Fig.6)。エラスターゼ投与後、IL-6 の発現は野生型および T-bet 欠損マウス両群で増加していたが、T-bet 欠損マウスの方が野生型マウスと較べて有意に増加していた。一方、TNF- α 、IL-1 β はエラスターゼによって誘導されず、また、両群間においても有意な差は認めなかった。これらの結果から IL-6 発現の程度はエラスターゼ曝露後の急性炎症の程度と関連していることが示唆された。エラスターゼ誘導肺気腫の病態形成には Th17 による免疫反応の関与も報告されている[9]。そこでエラスターゼ投与 5 日目の肺における Th 細胞サイトカインの発現の解析を行った。エラスターゼ投与により肺での IFN- γ 発現は抑制されたが、野生型および T-bet 欠損マウスの両群間に有意な差はなかった (Fig.7)。IL-4 と IL-5 発現も同様に抑制され、両群間においても明らかな差がみられなかった。一方、肺での IL-17 発現はエラスターゼ投与により両遺伝子型で大きく増加していたが、T-bet 欠損マウスのほうが野生型マウスより有意に高値であった (Fig.8)。IL-17 の産生源を明らかにするため、フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカインの解析にて、野生型および T-bet 欠損マウスの肺における CD4⁺T 細胞の IL-17 産生を評価した。エラスターゼを投与された野生型マウスにおいて、IL-17 を産生する CD4⁺T 細胞の存在が確認された (Fig.9、左)。T-bet 欠損マウスにおいては、IL-17 を産生する CD4⁺T 細胞の割合が野生型マウスより多く認められ (Fig.9、右)、T-bet はエラスターゼ投与後の Th17 反応の誘導を抑制していることが示唆された。以上の結果より、T-bet はエラスターゼ投与後、肺での急性期の IL-6 とそれに続く IL-17 の発現を制御していることが示された。

T-bet は骨髄由来マクロファージにおいてエラスターゼで誘導される IL-6 の発現を制御する

マクロファージは IL-6 を含む炎症性サイトカイン等の産生を通して、肺での炎症病態の形成に中心的な役割を果たしていると考えられている。そこで、T-bet は、マクロファージの IL-6 産生調節を介して、エラスターゼ曝露による急性肺障害を制御している可能性が考えられる。そこでマクロファージの機能調節における T-bet の役割を明らかにするため、野生型および T-bet 欠損マウスから誘導した骨髄由来マクロファージ (BMDM) を用いて、エラスターゼ曝露によるサイトカイン発現を解析した (Fig.10)。生理食塩水投与群において、IL-6 は、野生型マウスより T-bet 欠損マウスで僅かに高い発現を認めた。エラスターゼ投与により両遺伝子型で IL-6 の発現が誘導されるが、T-bet 欠損マウスの IL-6 発現レベルは野生型と比較し有意に高値であった (Fig.10-A)。TNF- α は、野生型および T-bet 欠損マウスの両群においてエラスターゼ投与で誘導されず、両群間に差もなかった (Fig.10-B)。IL-1 β はいずれの群でもエラスターゼ投与で上昇したが両群間に差は認めなかった (Fig.10-C)。以上の結果から、T-bet は骨髄由来マクロファージにおいてエラスターゼによる IL-6 発現誘導を制御していることが示された。

T-bet は MH-S 細胞におけるサイトカイン発現を調節する

マクロファージの機能調節における T-bet の役割をさらに解析するため、T-bet の発現を遺伝的に操作したマウス肺胞マクロファージ細胞株である MH-S 細胞において、サイトカインの発現を解析した。まず、siRNA を用いて T-bet の発現を抑制した。T-bet mRNA の発現抑制は qRT-PCR にて確認した (Fig11-A)。エラスターゼ非存在下で、T-bet の発現が抑制された MH-S 細胞での IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-12 の発現レベルは、コントロール siRNA を遺伝子導入された細胞に較べて、有意に高かった。エラスターゼ曝露にてこれらのサイトカイン

の発現は増加したが、コントロール群と比較し、T-bet siRNA を遺伝子導入した群においてこれらサイトカインの発現レベルは有意に増加していた (Fig11-B, D, E, F)。IL-23 の発現は、エラスターゼ投与下でのみ、T-bet siRNA 抑制群で有意な上昇を認めた (Fig11-C) エラスターゼ存在下で、T-bet siRNA を投与された群では、IL-10 が低下していた一方、TGF- β の発現は増加していた (Fig11-G)。つづいて、T-bet とマクロファージ産生サイトカインの関係をさらに究明するため、T-bet cDNA を MH-S 細胞に一時的に導入し、上記サイトカインの発現を評価した。T-bet mRNA の過剰発現をリアルタイム RT-PCR で確認した (Fig12-A)。前記の結果とは対照的に、T-bet を過剰発現させた MH-S 細胞において、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、さらに IL-12 の mRNA 発現は抑制された (Fig.12-B, D, E, F)。また、IL-10、IL-23、TGF- β の発現は T-bet 過剰発現 MH-S 細胞とコントロール細胞において差を認めなかった (Fig.12-C, G)。以上より、MH-S 細胞において、T-bet の発現は、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-12 の発現を抑制している可能性が示唆された。

T-bet はマクロファージではなく、リンパ球への作用を通して **Th17** 反応を制御している。

T-bet は CD4⁺T 細胞からの IL-17 産生を直接抑制することが報告されている [13, 14]。IL-6 は TGF- β や他のサイトカインとともに、転写因子 ROR γ t の発現誘導を介して、Th17 への分化に重要な役割を果たしている。T-bet はマクロファージにおいてサイトカイン環境を調節することにより Th17 分化に関与している可能性があるが、これまで十分な検討はなされていない。エラスターゼ曝露で誘導される Th17 反応において、マクロファージとリンパ球における T-bet が担う役割を個別に明らかにするために共培養実験を行った。野生型と T-bet 欠

損マウスの脾臓よりナイーブ CD4⁺T 細胞を分離し、野生型と T-bet 欠損マウスから得られた BMDM とエラスターゼを含んだ培液にて培養し培養上清中の IL-17 を測定した (Fig.13)。CD4⁺T 細胞なしで BMDM 単独で培養した群では、上清中の IL-17 濃度は他群より明らかに低く、培養液中の IL-17 濃度は CD4 陽性 T 細胞の遺伝子型にのみ影響され、BMDM の遺伝子型とは無関係であった。IL-17 濃度は、野生型に比べて T-bet 欠損マウス由来 CD4⁺T 細胞群において有意に高値であった (BMDM-WT・Lym-T-bet(-/-):108.08±10.5pg/ml vs BMDM-WT・Lym-WT:68.03±7.07pg/ml, n=3, P<0.05) (BMDM-T-bet(-/-)・Lym-T-bet(-/-):108.98±12.11pg/ml vs BMDM-T-bet(-/-)・Lym-WT:68.17±3.2pg/ml, n=3, P<0.05) (Fig.13)。本実験からは、T-bet はマクロファージのサイトカインの発現に直接関与しているが、T-bet によるエラスターゼ誘導 Th17 反応の制御は、マクロファージではなくリンパ球に依存することが明らかとなった。

4. 考察

COPD はタバコ煙に含まれる様々な有害な物質やガスに対する異常な免疫反応によって生じ、好中球、マクロファージ、リンパ球などが関与している [2]。これまで COPD の病態におけるマクロファージの重要性は認識されていたが [15, 16]、近年獲得免疫反応も病態へ寄与することが報告されてきている [5, 17]。従って、これらの細胞の機能分化を規定する免疫調節因子は、COPD の病型や宿主の感受性に関わっている可能性がある。本研究では、エラスターゼ誘導肺気腫マウスモデルにおいて、Th1 分化を誘導する転写因子 T-bet が、急性炎症および気腫病態の形成を制御していることを明らかにした。T-bet はエラスターゼ曝

露後の肺での急性期の IL-6 の発現と、それに続く IL-17 の発現を制御していた。ex vivo と in vivo の実験により、T-bet はマクロファージの IL-6 を含むサイトカイン産生を調節したが、共培養実験では T-bet による Th17 分化の制御は、マクロファージではなくリンパ球に依存していた。これらの結果は、マクロファージの機能調節における T-bet の新たな役割を提示し、さらにエラスターゼ誘導肺気腫の病態形成において T-bet が重要な役割を果たすことを明らかにするものである。

エラスターゼ誘導肺気腫モデルは広く用いられてきた COPD の動物モデルで、病理学的には急性期の出血と炎症、それに続く気腫形成で特徴付けられる [18]。いくつかの研究から気腫形成へのアポトーシスの関与が示唆されているが [19, 20]、これまでの多くの報告で気腫の形成と炎症反応に密接な関連があることが示されている。IL-6 欠損マウス [21]、TNF- α /IL-1 β レセプター欠損マウス [22] では気腫病変が著明に軽減しており、また、IL-17A 欠損マウスでは、気管支肺胞洗浄液中の好中球数、炎症性サイトカインやケモカインの発現の低下とともに気腫病変の軽減が認められた [9]。これらの報告は、エラスターゼにて誘導される炎症と気腫形成の両者において、上記の炎症メディエーターが重要な役割を果たしていることを示すものである。

マクロファージはサイトカイン、ケモカインやプロテアーゼの産生を介して COPD の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられている [3]。エラスターゼ誘導肺気腫モデルにおいて、マクロファージ特異的に NADPH オキシターゼ 2 [15]、あるいは転写因子 MafB [16] の修飾を受けたマウスでは、コントロールに比べて気腫病変の形成に明らかな違いが認められたことから、マクロファージのフェノタイプが、気腫病変の程度を決定する上で重要であることが示唆される。そのため、本実験でみられた T-bet 欠損マウスにおける気腫病変の増

悪は、一部は T-bet によるマクロファージのフェノタイプの調節による可能性が考えられる。T-bet はこれまでに、自然免疫および獲得免疫に関わる様々な炎症細胞においてその機能の調節に重要な役割を担うことが報告されてきた[8]。マクロファージについても、T-bet が発現していること[23-25]、また INF- γ [23]あるいは LPS [24]によって T-bet の発現が誘導されることが報告されている。しかし、マクロファージのサイトカイン発現調節に関する T-bet の役割はまだ十分には研究されていない。マクロファージでの T-bet の役割を解析するため、野生型と T-bet 欠損マウスから BMDM を採取し、そのフェノタイプを比較検討した。エラスターゼ投与により肺で誘導された IL-6 発現と同様、BMDM においてもエラスターゼ刺激により IL-6 発現が誘導され、さらに T-bet 欠損マウス由来の BMDM においてその発現レベルが有意に高く、T-bet はマクロファージの IL-6 産生を制御していることが示唆された。T-bet と IL-6 の発現に逆相関関係は様々な病態で報告されている[13, 26-28]。我々の研究グループは、非結核性抗酸菌感染(MAC)症マウスモデルにおいて、MAC 感染後の肺での IL-6 発現が T-bet 欠損マウスで有意に上昇していたことを報告した[13]。また、喘息のマウスモデルにおいても、T-bet 欠損マウスの肺で IL-6 発現が上昇していた。これらは T-bet が IL-6 発現を制御することを示す結果であり、その分子メカニズムの解明と、T-bet がこの作用を発揮する細胞の同定のためさらなる研究が必要である。

マクロファージはそれを取り巻く微小環境に応じて特異な機能的表現型を獲得するため、特有の炎症性・抗炎症性サイトカインの発現プロファイルを有する細胞集団が形成される。M1 マクロファージは IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-12、IL-23、iNOS など炎症性サイトカインの発現が高い一方、IL-10 の発現は低く、Th1 と Th17 反応の誘導に寄与している[29, 30]。一方、M2 マクロファージは

抗炎症性サイトカインを産生し、Th2 への分化に関与している[29-31]。マクロファージの機能的分化には転写因子が作用し、その同定が進んでいる[32]。しかしマクロファージを M1、M2 の二つの亜群のみに分けることは単純すぎると考えられており、その分化のメカニズムには不明な点が多く残っている。MH-S 細胞において、一部の M1 サイトカインの発現は T-bet によって負の制御を受けている。従って siRNA によって T-bet の発現を抑制された MH-S 細胞は M1 様のフェノタイプを呈し、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-12 の発現は高いが、IL-23 と iNOS は高くなかった。この M1 様の細胞は、特定の転写因子によって分化した独特の細胞集団、あるいは不完全に分化した M1 細胞のどちらかの可能性がある。これらの細胞のフェノタイプの詳細や T-bet による一部の M1 サイトカインの発現調節機序を明らかにするためにさらなる研究が必要である。MH-S 細胞では、T-bet の過剰発現により、一部の M1 サイトカインの発現が抑制されていた。従ってこれらのサイトカインが重要な役割を担う病態や疾患において、T-bet は新規の治療標的として有用である可能性がある。Th1 への分化を誘導するという T-bet の役割を考慮すると、T-bet がマクロファージにおいて一部の M1 サイトカイン発現を抑制することはやや不自然と感じられる。しかし樹状細胞において、T-bet は TNF- α の発現を抑制し、同時に CD4⁺T 細胞においては TNF- α の発現を誘導している[33]。これらの結果は、T-bet による遺伝子制御の複雑さを物語っており、また M1/M2、Th1/Th2 分類の単純さに注意を促すものである。

本研究では、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認めた。T-bet は BMDM にて IL-6 の発現のみ制御していたが、一方 MH-S 細胞においては IL-6 の他 IL-1 β 、TNF- α 、IL-12 も調節していた。この相違についての考えられる理由として、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が挙げられる[32]。他には

骨髄由来前駆細胞をマクロファージに分化させるために使用した L929 細胞の上清中に含まれる M-CSF による影響が考えられる。M-CSF はマクロファージを M2 に誘導する可能性があることから[34]、M-CSF がエラスターゼ刺激による BMDM の M1 への分化を部分的に妨げていた可能性が考えられる。

エラスターゼ誘導肺気腫において Th17 反応の担う役割が近年報告されている[9, 35]。IL-17A 欠損マウス[9]、あるいは IL-23 欠損マウス[35]ではいずれも気腫形成が減弱していたと報告されている。Th17 反応の COPD の病態との関連も示されており、Th17 関連サイトカインの発現が COPD 患者の気管支において上昇していたと報告されている[5, 36]。我々の研究では、エラスターゼ曝露は野生型マウスの肺で IL-17 の発現を誘導し、T-bet 欠損マウスにおいてはその増加がさらに顕著であった。さらに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 欠損マウスの方が高かった。ある細胞系列に特異的な転写因子はナイーブ CD4⁺T 細胞を分化させると同時に他系統への分化を阻害する。T-bet は Th1 への分化を促進する一方、同時に Th2 や Th17 への分化を抑制する。従って T-bet 欠損マウスにおいては、Th17 反応の亢進とその病態への影響が、トリパノソーマ・クルージ原虫感染[37]、アレルギー誘発気道炎症[38]、自己免疫性脳脊髄炎[39]、自己免疫性心筋炎[40]などで報告されている。我々の研究グループは MAC 症において、T-bet が Th1/Th17 バランスを調節し、宿主の MAC 症に対する抵抗性を規定していたと報告している[13]。T-bet による Th17 分化調節は T 細胞に依存した方法で行われる[37]。そのメカニズムとしては、T-bet が転写因子 Runx1 に作用し、Runx1 による *Rorc* (ROR γ t をコードする遺伝子) プロモーターの活性化を阻害することが報告されている[39]。またゲノムワイド関連解析によると、T-bet が IFN regulatory factor-4 を直接抑制して Th17 への分化を阻害することが示されている[41]。本研究におけ

る T-bet 欠損マウスにおける Th17 反応の亢進は、これまでの T-bet 欠損マウスのフェノタイプに関する報告に矛盾しない結果となっている。T-bet による Th17 反応抑制の分子メカニズムや Th17 反応の気腫形成へ及ぼす影響の詳細については今後さらなる検討が必要である。

Th17 分化は IL-6、TGF- β と他のいくつかのサイトカインによって誘導される[42, 43]。近年、独特のフェノタイプ (IL-12⁺、IL-1 β ^{high}、IL-6⁺、TNF- α ⁺、NOS2⁺、IL-10^{high}) を有する新規のマクロファージ集団が進行期のマイコバクテリウム感染症において同定され、Th17 分化を誘導することすることが報告されている[44]。しかしながら、Th17 分化におけるマクロファージの役割については依然不明な点が多い。本研究では、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ものの、共培養実験では T-bet による Th17 分化の制御はマクロファージに依存していなかった。T-bet 欠損マウスの BMDM が Th17 への分化を誘導しなかった理由としては、BMDM から産生された IL-6 濃度が十分でなかったこと、その他 Th17 誘導に必要なサイトカインの発現が不足していたこと、などが考えられる。

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) はエラスターゼ誘導肺気腫の形成に関与している[45]。損傷を受けた肺においては、肺胞マクロファージは MMPs の主な産生源となっている[46]。マクロファージからの MMP-9 の発現誘導は IL-6[47]と IL-17[48]に依存していると報告されているが、本研究ではこれらのサイトカインはいずれも T-bet 欠損マウスで発現が増加していた。従って T-bet 欠損マウスでみられた気管支肺胞洗浄液中の MMP-9 活性の増加は、IL-6、IL-17 の増加に反応したマクロファージより MMP-9 産生が増加したことが原因として考えられる。

結論として、我々は T-bet はサイトカインやプロテアーゼの産生調節を介

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見出した。T-bet をターゲットとする治療は、自然免疫と獲得免疫の両方の反応を抑制し治療効果を示す可能性が期待される。

Table 1. Primers used in RT-PCR

GAPDH	5'-CCGCATCTTCTTGTGCAGTG-3' (forward)
	5'-CGTTGATGGCAACAATCTCC-3' (reverse)
T-bet	5'-AGCAAGGACGGCGAATGTT-3' (forward)
	5'-GGGTGGACATATAAGCGGTTC-3' (reverse)
IFN- γ	5'-CACGGCACAGTCATTGAAAG-3' (forward)
	5'-TCTGGCTCTGCAGGATTTTC-3' (reverse)
IL-4	5'-ACGGAGATGGATGTGCCAAAC-3' (forward)
	5'-AGCACCTTGGAAGCCCTACAGA-3' (reverse)
IL-5	5'-GGAGATTCCCATGAGCACAG-3' (forward)
	5'-CTCCAATGCATAGCTGGTGAT-3' (reverse)
IL-6	5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3' (forward)
	5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3' (reverse)
IL-17	5'-AAAGCTCAGCGTGTCCAAAC-3' (forward)
	5'-TGGAACGGTTGAGGTAGTCTG-3' (reverse)
TNF- α	5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' (forward)
	5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3' (reverse)
IL-1 β	5'-TGAAGCAGCTATGGCAACTG-3' (forward)
	5'-GGGTCCGTCAACTTCAAAGA-3' (reverse)
IL-23p19	5'-ATGCTGGATTGCAGAGCAGTA-3' (forward)
	5'-ACGGGGCACATTATTTTGTAGTCT-3' (reverse)
IL-12p40	5'-TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG-3' (forward)
	5'-ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT-3' (reverse)

TGF- β 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGA ACTCTA-3' (forward)
 5'-CGCTGAATCGAAAGCCCTGTA-3' (reverse)

IL-10 5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3' (forward)
 5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3' (reverse)

ROR- γ 5'-TGAGGCCATTCAGTATGTGG-3' (forward)
 5'-CTTCATTGCTCCTGCTTTC-3' (reverse)

Fig.1

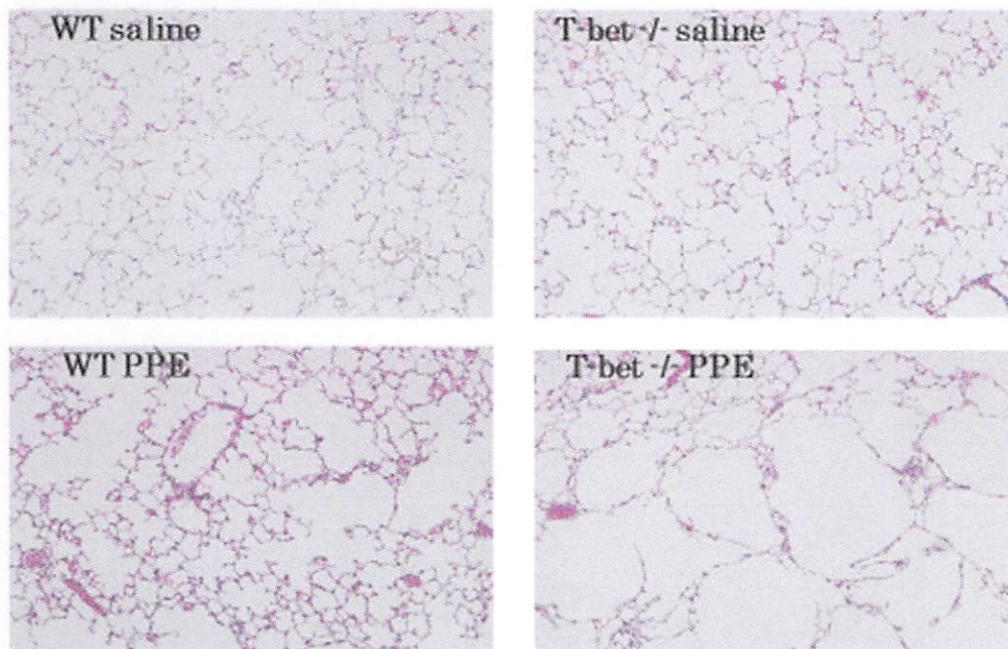


Fig1 : エラスターゼ(PPE)投与後 21 日の肺組織、(H&E ,×100)

左上 : 野生型マウス生理食塩水投与群(WT saline)

右上 : T-bet 欠損マウス生理食塩水投与群(T-bet $-/-$ saline)

左下 : 野生型マウスエラスターゼ投与群(WT PPE)

右下 : T-bet 欠損マウスエラスターゼ投与群(T-bet $-/-$ PPE)

Fig.2

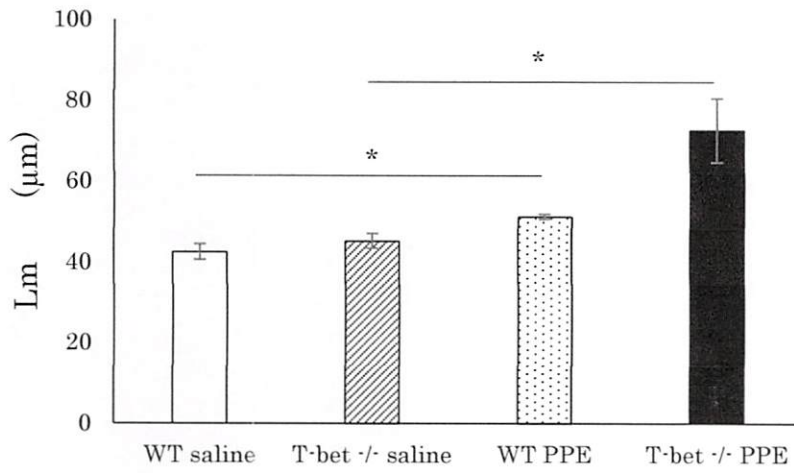


Fig.2 : エラスターゼ(PPE)投与後 21 日目の平均肺胞壁間距離(Lm)

野生型マウス生理食塩水投与群(WT saline)

T-bet 欠損マウス生理食塩水投与群(T-bet -/- saline)

野生型マウスエラスターゼ投与群(WT PPE)

T-bet 欠損マウスエラスターゼ投与群(T-bet -/- PPE)

すべての数値データは平均値±標準誤差で表記、各群 n=4 *p<0.05

Fig.3

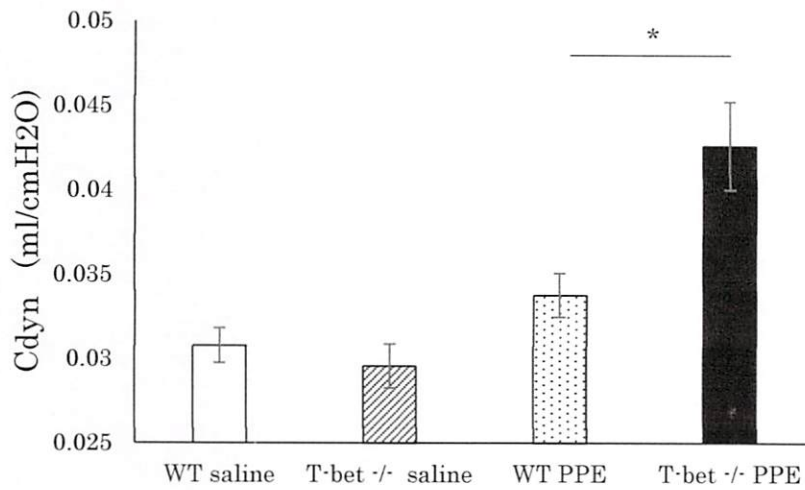


Fig.3 : エラスターゼ(PPE)投与後 21 日目の動肺コンプライアンス(Cydn)

野生型マウス生理食塩水投与群(WT saline)

Tbet 欠損マウス生理食塩水投与群(Tbet -/- saline)

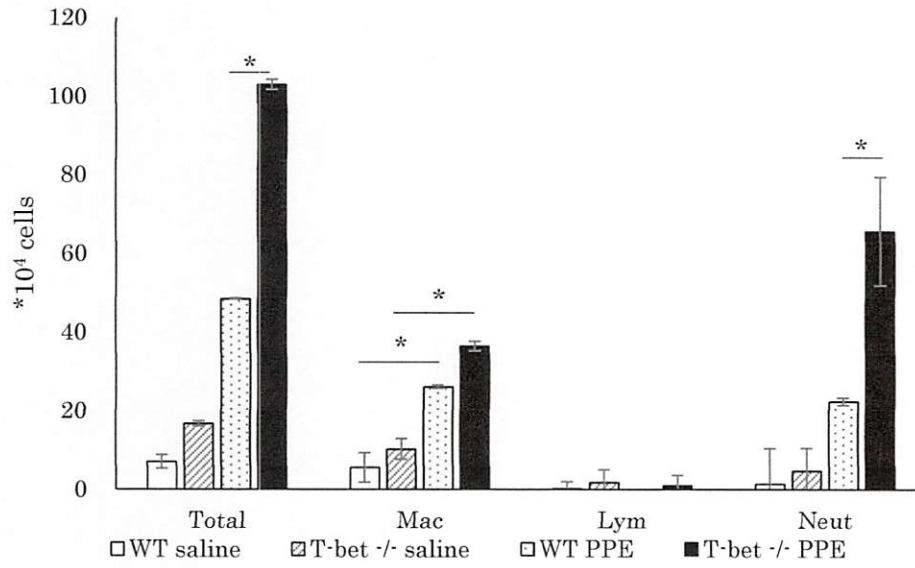
野生型マウスエラスターゼ投与群(WT PPE)

Tbet 欠損マウスエラスターゼ投与群(Tbet -/- PPE)。

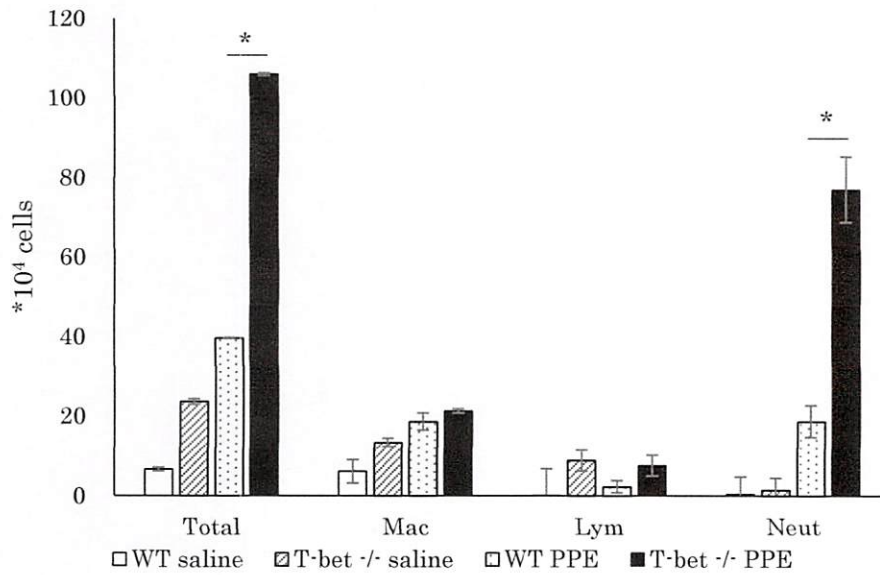
すべての数値データは平均値±標準誤差で表記、各群 n=4 *p<0.05

Fig.4

(A)



(B)



(C)

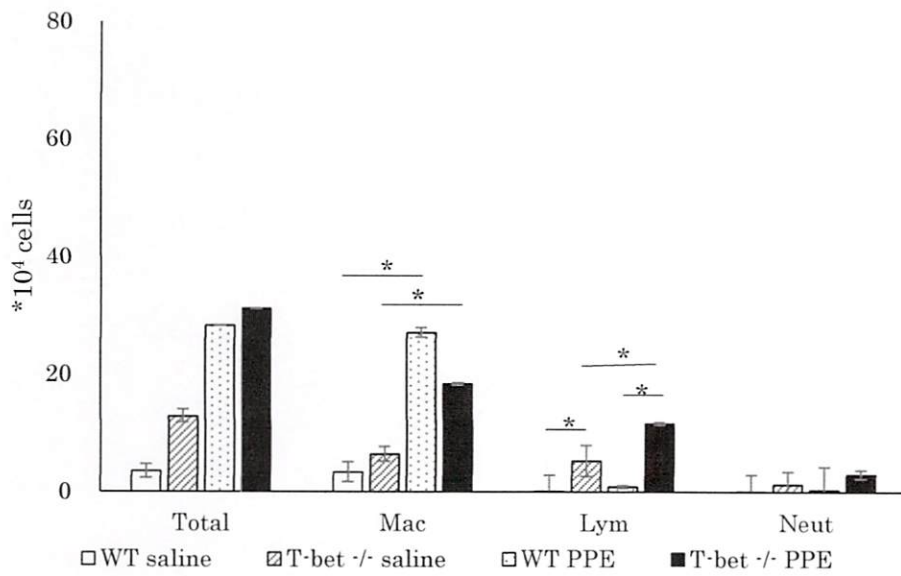


Fig.4 : エラストアーゼ (PPE) 投与後の BAL 液中の総細胞数および細胞分画

(A) PPE 投与 6 時間後 (B) 24 時間後 (C) 3 日後

総細胞数(Total)、マクロファージ(Mac)、リンパ球(Lym)、好中球(Neut)

野生型マウス生理食塩水投与群(WT saline)

Tbet 欠損マウス生理食塩水投与群(Tbet ^{-/-} saline)

野生型マウスエラストアーゼ投与群(WT PPE)

Tbet 欠損マウスエラストアーゼ投与群(Tbet ^{-/-} PPE)

すべての数値データは平均値±標準誤差で表記、各群 n=5 *p<0.05

Fig.5

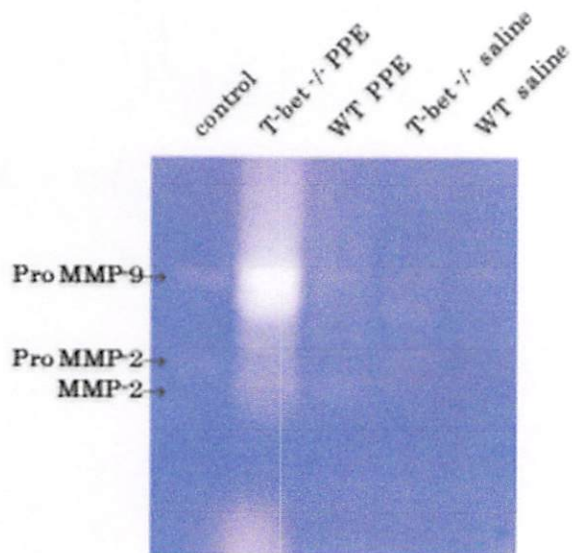


Fig.5 : ゼラチン・ザイモグラフィー

エラスターゼ、あるいは生理食塩水を野生型および T-bet 欠損マウスに投与し、24 時間後に気管支肺胞洗浄(BAL)を行った。回収した BAL 液中のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9、MMP-2 の活性。

対照群(control)

T-bet 欠損マウスエラスターゼ投与群(T-bet ^{-/-} PPE)

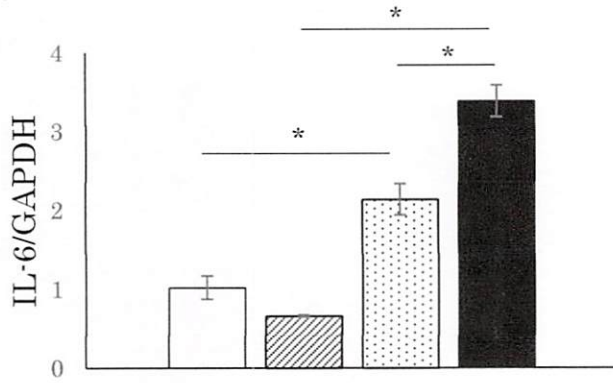
野生型マウスエラスターゼ投与群(WT PPE)

T-bet 欠損マウス生理食塩水投与群(T-bet ^{-/-} saline)

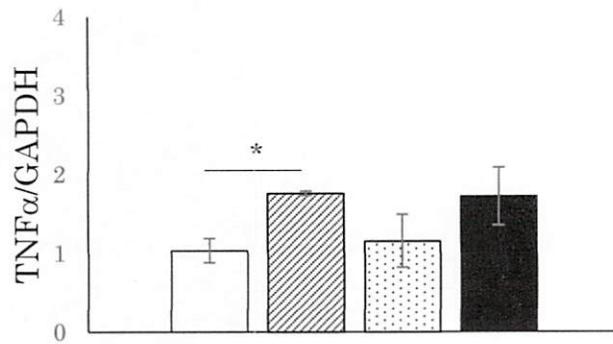
野生型マウス生理食塩水投与群(WT saline)

Fig.6

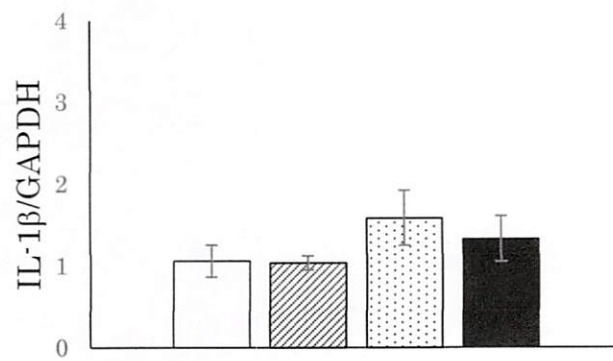
(A)



(B)



(C)



□ WT saline ▨ Tbet^{-/-} saline
▤ WT PPE ■ Tbet^{-/-} PPE

Fig.6 :

エラスターゼ投与 24 時間後、肺での IL-6、TNF α 、IL-1 β の mRNA の発現

(A) IL-6 (B) TNF α (C) IL-1 β

野生型マウス生理食塩水投与群(WT saline)

Tbet 欠損マウス生理食塩水投与群(Tbet $-/-$ saline)

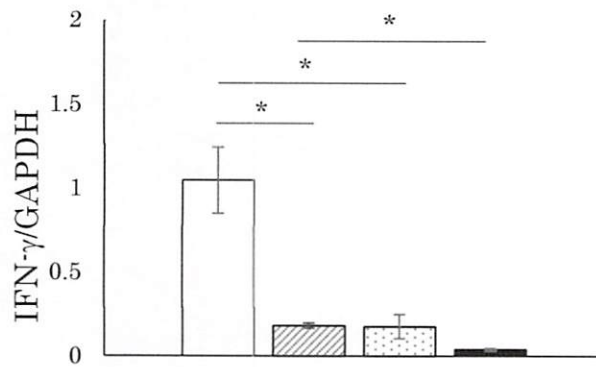
野生型マウスエラスターゼ投与群(WT PPE)

Tbet 欠損マウスエラスターゼ投与群(Tbet $-/-$ PPE)

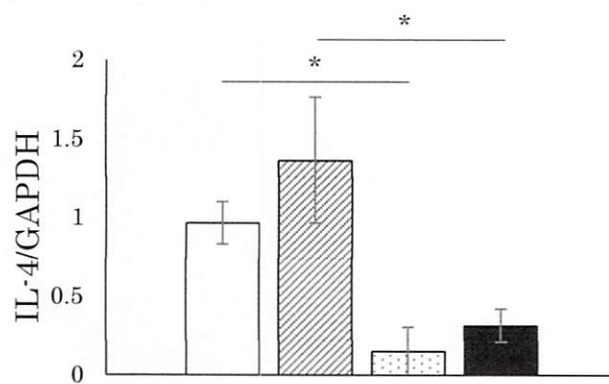
すべての数値データは平均値 \pm 標準誤差で表記、各群 n=4 *p<0.05

Fig.7

(A)



(B)



(C)

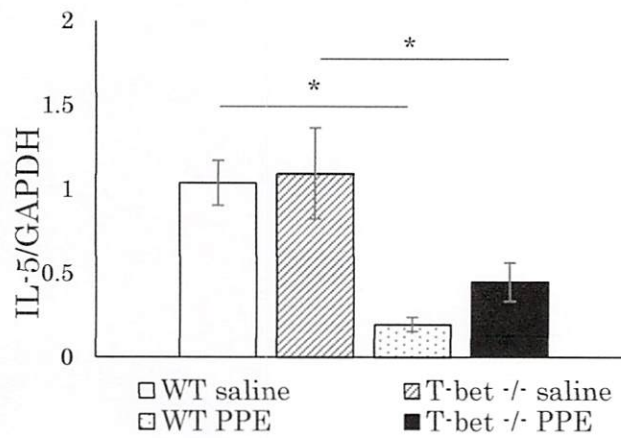


Fig.7 : エラスターゼ(PPE)投与後、5日目のサイトカインの mRNA 発現

(A) IFN- γ (B) IL-4 (C) IL-5

野生型マウス生理食塩水投与群(WT saline)

Tbet 欠損マウス生理食塩水投与群(Tbet $-/-$ saline)

野生型マウスエラスターゼ投与群(WT PPE)

Tbet 欠損マウスエラスターゼ投与群(Tbet $-/-$ PPE)

すべての数値データは平均値 \pm 標準誤差で表記、各群 n=4 *p<0.05

Fig.8

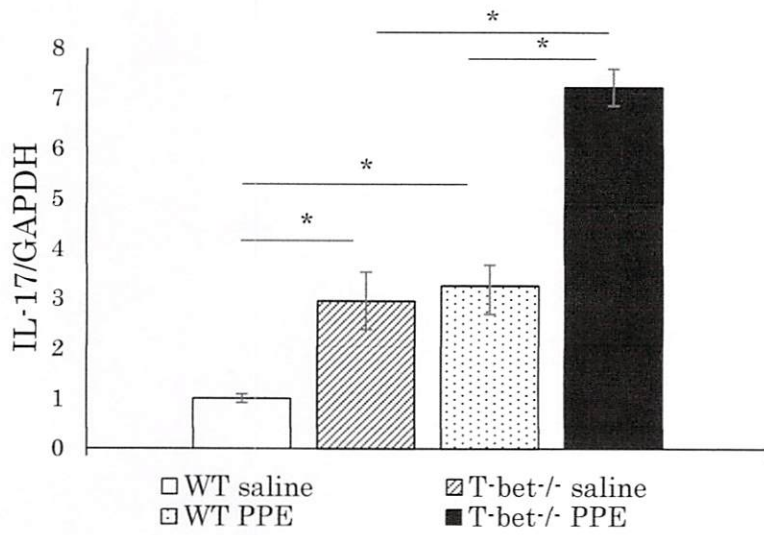


Fig.8 : エラスターゼ投与 5 日後、肺での IL-17 の mRNA の発現

野生型マウス生理食塩水投与群(WT saline)

T-bet 欠損マウス生理食塩水投与群(T-bet ^{-/-} saline)

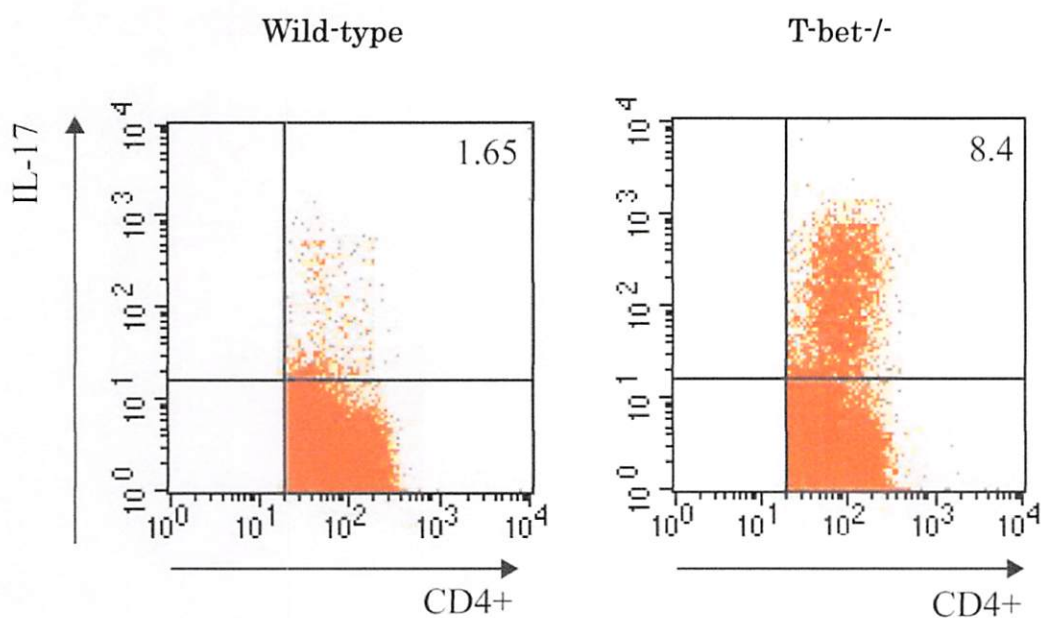
野生型マウスエラスターゼ投与群(WT PPE)

T-bet 欠損マウスエラスターゼ投与群(T-bet ^{-/-} PPE)

すべての数値データは平均値±標準誤差で表記、各群 n=4 *p<0.05

Fig.9

(A)



(B)

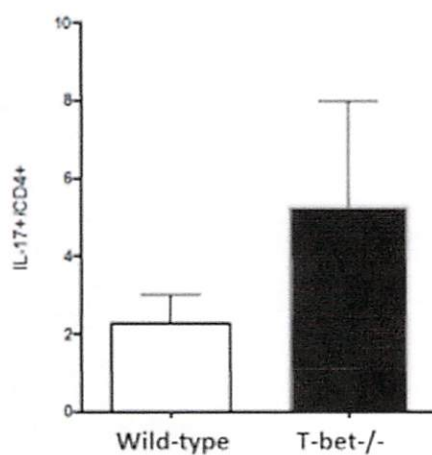


Fig.9 : フロサイトメトリーを用いた細胞内サイトカイン産生細胞の解析

マウスの肺内の CD4 陽性細胞中の IL-17 の産生細胞の割合 (%)

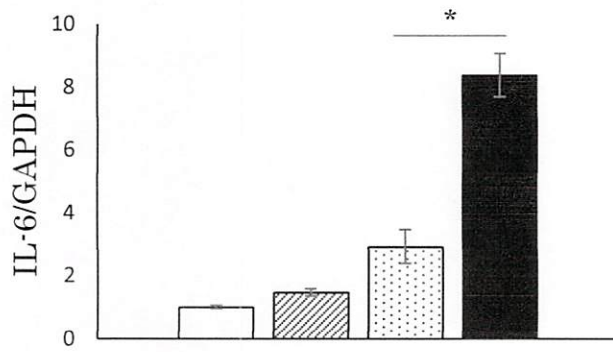
(A) (左) 野生型マウス、(右) Tbet 欠損マウス。

(B) 野生型マウス(Wild-type) : 2.283 ± 0.429%

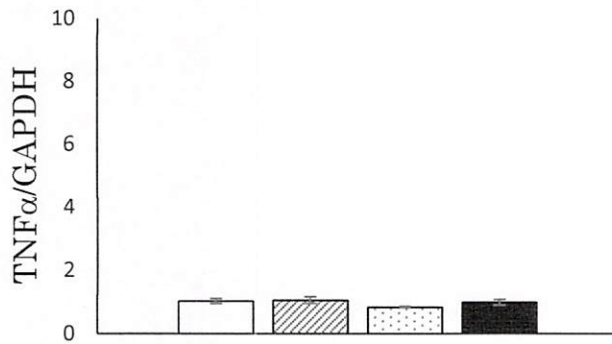
Tbet 欠損マウス(Tbet-/-) : 5.280 ± 1.560% 各群 n=3、P=0.1376

Fig.10

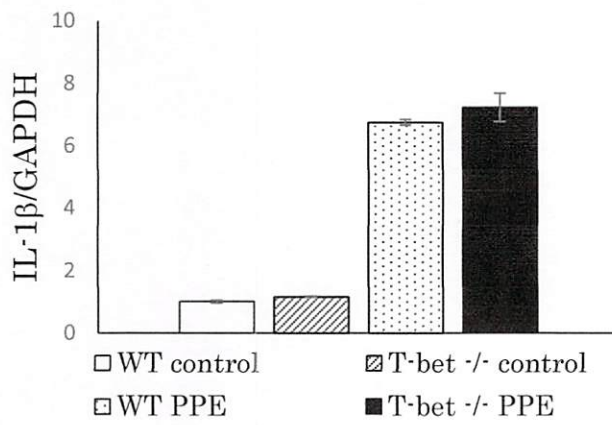
(A)



(B)



(C)



□ WT control ▨ T-bet ^{-/-} control
▤ WT PPE ■ T-bet ^{-/-} PPE

Fig.10 : 骨髄由来マクロファージ(BMDM)

野生型および T-bet 欠損マウスの BMDM をエラスターゼ (PPE) とともに 24 時間培養後の IL-6、TNF α 、IL-1 β の mRNA 発現。

(A) IL-6 (B) TNF α (C) IL-1 β

野生型マウス由来 BMDM、PPE なし群 (WT control)

T-bet 欠損マウス由来 BMDM、PPE なし群 (T-bet $-/-$ control)

野生型マウス由来 BMDM、エラスターゼ投与群 (WT PPE)

T-bet 欠損マウス由来 BMDM、エラスターゼ投与群 (T-bet $-/-$ PPE)

すべての数値データは平均値 \pm 標準誤差で表記、各群 n=6 *p<0.05

Fig.11

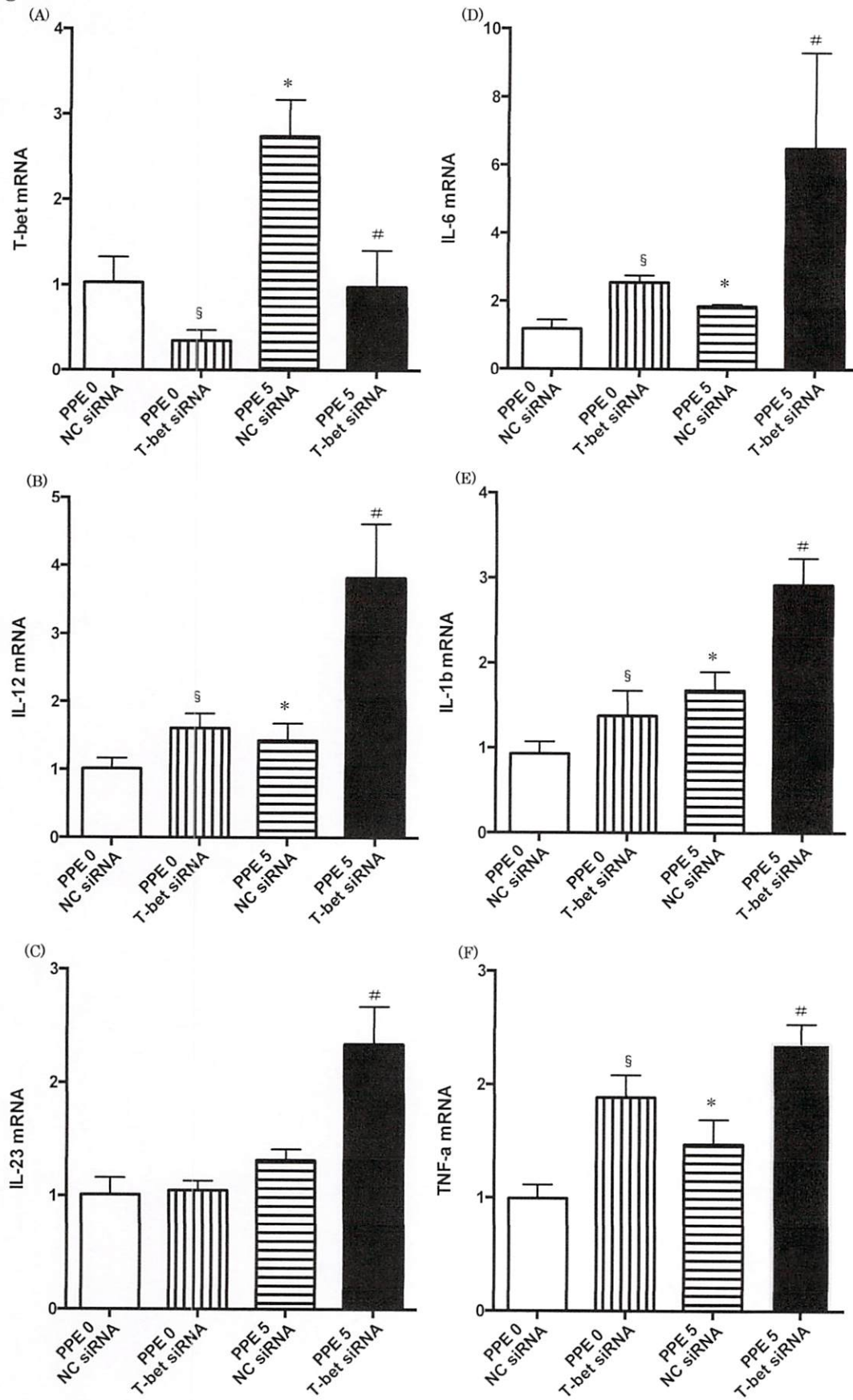


Fig.11

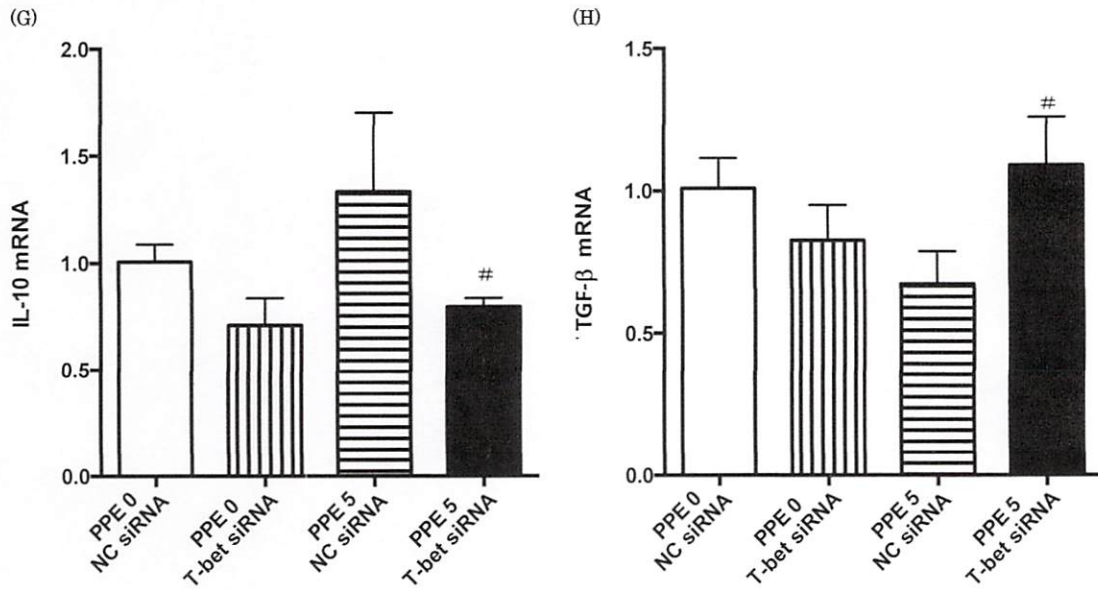


Fig.11 : T-betによるMH-S細胞でのサイトカインmRNAの発現調節

(A) T-bet (B) IL-12 (C) IL-23 (D) IL-6 (E) IL-1β (F) TNF-α (G) IL-10 (H) TGF-β

ネガティブコントロールsiRNA導入MH-S細胞エラスターゼなし群(PPE 0 NC siRNA)

T-bet干渉siRNA導入MH-S細胞エラスターゼなし群(PPE0 T-bet siRNA)

ネガティブコントロールsiRNA導入MH-S細胞エラスターゼ(5U/ml)投与群(PPE 5 NC siRNA)

T-bet干渉siRNA導入MH-S細胞エラスターゼ(5U/ml)投与群(PPE 5 T-bet siRNA)

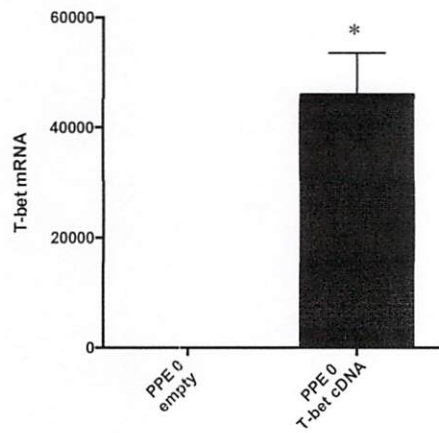
すべての数値データは平均値±標準誤差で表記

§ : PPE 0 NC siRNAと比較し、 $p < 0.05$

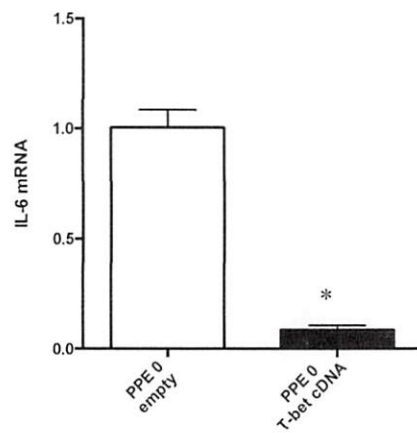
* : PPE 0 NC siRNAと比較し、 $p < 0.05$

: PPE 5 NC siRNAと比較し、 $p < 0.05$

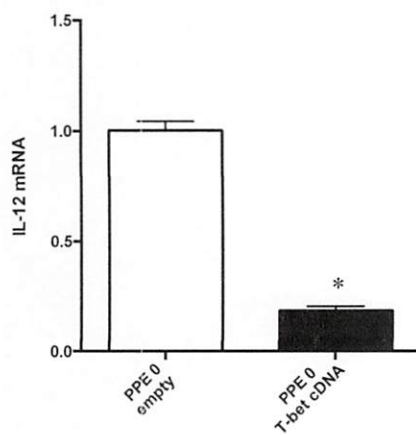
Fig.12
(A)



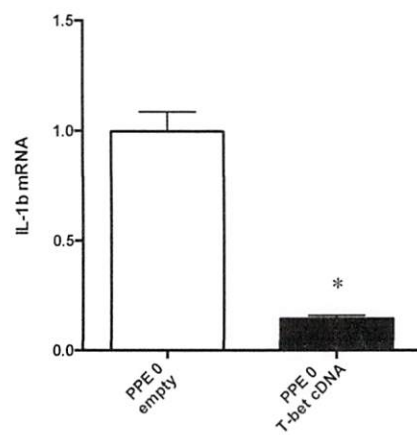
(D)



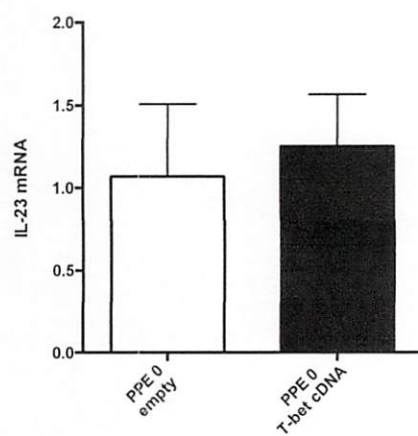
(B)



(E)



(C)



(F)

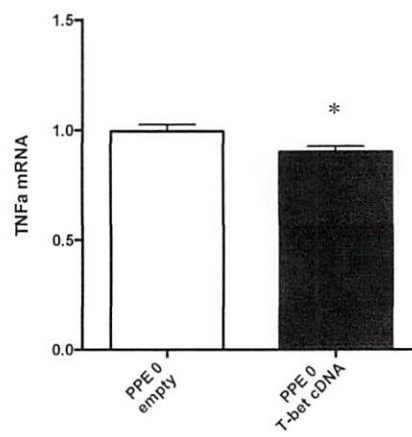
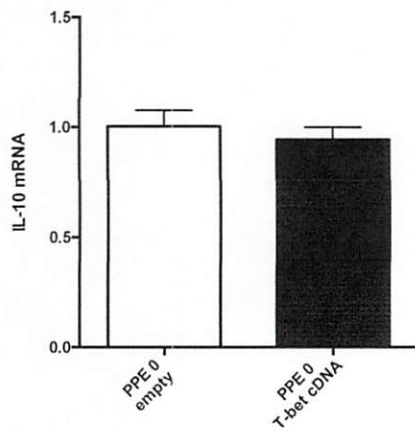


Fig.12
(G)



(H)

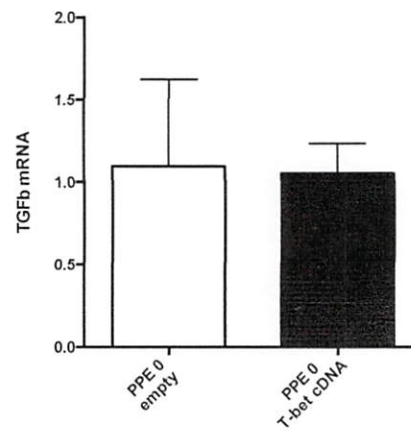


Fig.12 : T-bet に依存したMH-S細胞でのサイトカインmRNAの発現

リアルタイムRT-PCRを用いて、T-bet cDNA あるいはemptyベクターを導入したMH-S細胞でのサイトカインmRNA発現を解析した。

(A) T-bet (B) IL-12 (C) IL-23 (D) IL-6 (E) IL-1β (F) TNF-α (G) IL-10 (H) TGF-β

Emptyベクターを導入MH-S細胞群(PPE 0 empty)

T-bet cDNAを導入したMH-S細胞群(PPE0 T-bet cRNA)

すべての数値データは平均値±標準誤差で表記、*=P<0.05

Fig.13

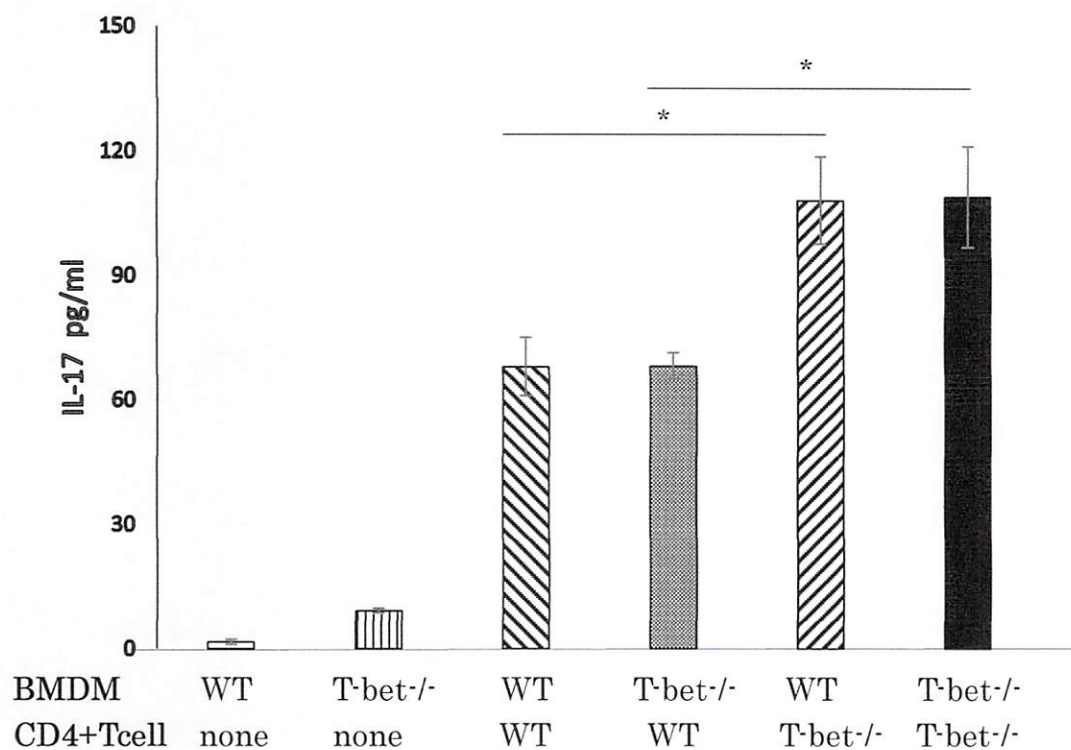


Fig.13 : 骨髄由来マクロファージと CD4 陽性 T リンパ球の共培養

野生型あるいは Tbet 欠損マウスの骨髄由来マクロファージ(BMDM)と野生型あるいは Tbet 欠損マウスの脾臓由来の CD4 陽性 T リンパ球との共培養、エラストラーゼ刺激下、48 時間後の培養上清中の IL-17 濃度 (ELISA)。

左から

- ① BMDM なし、野生型 CD4+T リンパ球のみ
- ② BMDM なし、Tbet 欠損 CD4+T リンパ球のみ
- ③ 野生型 BMDM+野生型 CD4+T リンパ球
- ④ Tbet 欠損 BMDM+野生型 CD4+T リンパ球
- ⑤ 野生型 BMDM+Tbet 欠損 CD4+T リンパ球
- ⑥ Tbet 欠損 BMDM+Tbet 欠損 CD4+T リンパ球

すべての数値データは平均値±標準誤差で表記、各群 n=3 *p<0.05

参考文献

1. Pauwels, R.A. and K.F. Rabe, *Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. Lancet, 2004. 364(9434): p. 613-20.
2. Hogg, J.C., *Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease*. Lancet, 2004. 364(9435): p. 709-21.
3. Barnes, P.J., *Alveolar macrophages as orchestrators of COPD*. Copd, 2004. 1(1): p. 59-70.
4. Grumelli, S., et al., *An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema*. PLoS Med, 2004. 1(1): p. e8.
5. Di Stefano, A., et al., *T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients*. Clin Exp Immunol, 2009. 157(2): p. 316-24.
6. Hiemstra, P.S., *Altered macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease*. Ann Am Thorac Soc, 2013. 10 Suppl: p. S180-5.
7. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, Tbet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. 100(6): p. 655-69.
8. Lazarevic, V., L.H. Glimcher, and G.M. Lord, *Tbet: a bridge between innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. 13(11): p. 777-89.
9. Kurimoto, E., et al., *IL-17A is essential to the development of elastase-*

- induced pulmonary inflammation and emphysema in mice.* Respir Res, 2013. 14: p. 5.
10. Moreno, J.A., et al., *High-density lipoproteins potentiate alpha1-antitrypsin therapy in elastase-induced pulmonary emphysema.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. 51(4): p. 536-49.
 11. Knudsen, L., et al., *Assessment of air space size characteristics by intercept (chord) measurement: an accurate and efficient stereological approach.* J Appl Physiol, 2010. 108(2): p. 412-21.
 12. Birrell, M.A., et al., *Steroid-resistant inflammation in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease is associated with a lack of nuclear factor-kappaB pathway activation.* Am J Respir Crit Care Med, 2005. 172(1): p. 74-84.
 13. Matsuyama, M., et al., *Role of Th1/Th17 balance regulated by Tbet in a mouse model of Mycobacterium avium complex disease.* J Immunol, 2014. 192(4): p. 1707-17.
 14. Kondo, Y., et al., *Overexpression of Tbet gene regulates murine autoimmune arthritis.* Arthritis Rheum, 2012. 64(1): p. 162-72.
 15. Trocme, C., et al., *Macrophage-specific NOX2 contributes to the development of lung emphysema through modulation of SIRT1/MMP-9 pathways.* J Pathol, 2015. 235(1): p. 65-78.
 16. Aida, Y., et al., *Inhibition of elastase-pulmonary emphysema in dominant-negative MafB transgenic mice.* Int J Biol Sci, 2014. 10(8): p. 882-94.
 17. Maeno, T., et al., *CD8+ T Cells are required for inflammation and*

- destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice.* J Immunol, 2007. 178(12): p. 8090-6.
18. Wright, J.L., M. Cosio, and A. Churg, *Animal models of chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. 295(1): p. L1-15.
 19. Hou, H.H., et al., *Elastase induced lung epithelial cell apoptosis and emphysema through placenta growth factor.* Cell Death Dis, 2013. 4: p. e793.
 20. Yuhgetsu, H., et al., *Beneficial effects of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation against elastase-induced emphysema in rabbits.* Exp Lung Res, 2006. 32(9): p. 413-26.
 21. Tasaka, S., et al., *Role of interleukin-6 in elastase-induced lung inflammatory changes in mice.* Exp Lung Res, 2010. 36(6): p. 362-72.
 22. Lucey, E.C., et al., *Severity of elastase-induced emphysema is decreased in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta receptor-deficient mice.* Lab Invest, 2002. 82(1): p. 79-85.
 23. Lighvani, A.A., et al., *Tbet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(26): p. 15137-42.
 24. Liu, C.F., et al., *Innate immune response of alveolar macrophage to house dust mite allergen is mediated through TLR2/4 co-activation.* PLoS One, 2013. 8(10): p. e75983.
 25. Kriegova, E., et al., *T-helper cell type-1 transcription factor Tbet is upregulated in pulmonary sarcoidosis.* Eur Respir J, 2011. 38(5): p.

- 1136-44.
26. Koch, S., et al., *IL-6 activated integrated BATF/IRF4 functions in lymphocytes are Tbet-independent and reversed by subcutaneous immunotherapy*. *Sci Rep*, 2013. 3: p. 1754.
 27. Kim, K.Y., H.J. Jeong, and H.M. Kim, *The role of Tbet in obesity: lack of Tbet causes obesity in male mice*. *J Nutr Biochem*, 2013. 24(1): p. 240-7.
 28. Hultgren, O.H., M. Verdrengh, and A. Tarkowski, *T-box transcription-factor-deficient mice display increased joint pathology and failure of infection control during staphylococcal arthritis*. *Microbes Infect*, 2004. 6(6): p. 529-35.
 29. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections*. *J Immunol*, 2008. 181(6): p. 3733-9.
 30. Mantovani, A. and M. Locati, *Orchestration of macrophage polarization*. *Blood*, 2009. 114(15): p. 3135-6.
 31. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. *Immunity*, 2010. 32(5): p. 593-604.
 32. Lawrence, T. and G. Natoli, *Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity*. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(11): p. 750-61.
 33. Garrett, W.S., et al., *Communicable ulcerative colitis induced by Tbet deficiency in the innate immune system*. *Cell*, 2007. 131(1): p. 33-45.
 34. Fleetwood, A.J., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes*

- display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation.* J Immunol, 2007. 178(8): p. 5245-52.
35. Fujii, U., et al., *IL-23 is Essential for the Development of Elastase-induced Pulmonary Inflammation and Emphysema.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2016.
36. Doe, C., et al., *Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD.* Chest, 2010. 138(5): p. 1140-7.
37. Guo, S., D. Cobb, and R.B. Smeltz, *Tbet inhibits the in vivo differentiation of parasite-specific CD4+ Th17 cells in a T cell-intrinsic manner.* J Immunol, 2009. 182(10): p. 6179-86.
38. Durrant, D.M., et al., *Development of allergen-induced airway inflammation in the absence of Tbet regulation is dependent on IL-17.* J Immunol, 2009. 183(8): p. 5293-300.
39. Lazarevic, V., et al., *Tbet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat.* Nat Immunol, 2011. 12(1): p. 96-104.
40. Rangachari, M., et al., *Tbet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17.* J Exp Med, 2006. 203(8): p. 2009-19.
41. Gokmen, M.R., et al., *Genome-wide regulatory analysis reveals that Tbet controls Th17 lineage differentiation through direct suppression of IRF4.* J Immunol, 2013. 191(12): p. 5925-32.
42. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces*

- development of the T(H)17 lineage. Nature, 2006. 441(7090): p. 231-4.*
43. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells. Nature, 2008. 453(7198): p. 1051-7.*
 44. Tatano, Y., T. Shimizu, and H. Tomioka, *Unique macrophages different from M1/M2 macrophages inhibit T cell mitogenesis while upregulating Th17 polarization. Sci Rep, 2014. 4: p. 4146.*
 45. Birrell, M.A., et al., *Role of matrix metalloproteinases in the inflammatory response in human airway cell-based assays and in rodent models of airway disease. J Pharmacol Exp Ther, 2006. 318(2): p. 741-50.*
 46. Gibbs, D.F., et al., *Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Evidence for alveolar macrophage as source of proteinases. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. 20(6): p. 1145-54.*
 47. Kothari, P., et al., *IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages. J Immunol, 2014. 192(1): p. 349-57.*
 48. Jovanovic, D.V., et al., *Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 2000. 43(5): p. 1134-44.*

第3章 総括

COPD は喫煙曝露を主体とする環境因子によって、肺を主座とする炎症性疾患であり、肺気腫、慢性気管支炎、気道リモデリング、肺高血圧、さらに急性増悪と多彩な病態を有する。その発症メカニズムについては、様々な研究はなされているが、すべて説明づけることはいまだにできていない。原因はタバコであることとわかっているが、発症に関わる宿主側因子、発症までの期間や病型、臨床症状など個体差のばらつきが大きい。このことから COPD は様々な外的要因、内的要因がかかわる多因子疾患であることがうかがえる。COPD の発症には多くの経路が関わっていることが発症機序の解明を困難にしていると考えられる。さらに COPD は栄養、代謝障害、抑うつ、心血管疾患など様々な合併症を有するが、これらがどのような病態に関連しているかも解明できていないのが現状である。

COPD の治療戦略の中では、禁煙がもっとも効果的な治療法であるが、禁煙後も肺での炎症は継続し、病態進行する。薬物治療、非薬物治療を含めた現存する治療法は、いずれも症状の緩和、機能の維持、病態の進行抑制に目標を置くもので、十分に満足できる成果は得られず、本症の進行抑制、さらに病態の正常化が達成可能である新たな治療法の確立が求められている。従って、COPD の病態、発症メカニズムの解明が急務であると考えられる。本研究では T-bet はそれぞれマクロファージと CD4 陽性リンパ球において、サイトカインやプロテアーゼの産生調節を介し、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見出した。T-bet をターゲットとする治療は、より多くの炎症性サイトカインを制御し、自然免疫と獲得免疫の両方の反応を抑制し、より強力な治療効果を示す可能性が期待される。

謝辞

本研究にあたり終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました筑波大学大学院呼吸病態医学分野の檜澤伸之教授に深い謝意を表します。

適切にご指導ご示唆を頂きました筑波大学大学院呼吸器内科松野洋輔先生に深く感謝致します。

研究その他多方面にわたりご指導いただきました筑波大学附属病院土浦市地域臨床教育ステーション石井幸雄教授、水戸地域医療教育センター佐藤浩昭教授に深く感謝いたします。

日々の研究において様々なご協力、ご教授を頂きました、坂本透教授、森島祐子准教授、川口未央講師、際本拓未講師、山本良子講師、増子裕典講師、中澤健介講師、塩沢利博病院講師、大塚茂男医学博士、松山政史医学博士、谷田貝洋平医学博士、田村智宏医学博士、山田英恵医学博士、角田義弥医学士、櫻井啓文医学士、金澤潤医学士に深く感謝致します。

そして、日々の研究、診療を続けていく上で、常に心の支えとなり、暖かく励まし続けてくれた家族に感謝したいと思います。