

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15454

研究課題名（和文）新規モデルを用いた非自己免疫性肺胞蛋白症の病態解明と治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of T-bet-mediated induction of pulmonary alveolar proteinosis

研究代表者

石井 幸雄 (Ishii, Yukio)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80272194

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000 円

研究成果の概要（和文）：肺胞蛋白症は肺胞内にサーファクタント様物質が蓄積し呼吸不全に至る稀な疾患である。T細胞特異的転写因子を高発現するマウスが肺胞蛋白症を自然発症することを発見し、同マウスを用いて発症メカニズムを解析した。T細胞におけるT-bet高発現が持続的なTh1環境をもたらし、骨髄および末梢血単球系細胞の成熟を抑制し、肺組織におけるマクロファージのフェノタイプを変化させることが、同マウスにおける肺胞蛋白症形成の一因であることを明らかにした。M-CSFが単球系細胞の成熟を促進すること、ヒト続発性肺胞蛋白症の肺組織で実際にT-bet発現が更新していることを合わせて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人に発症する肺胞蛋白症は特発性と続発性に分けられる。近年特発性肺胞蛋白症の多くの症例で抗GM-CSF抗体が証明され、自己免疫性肺胞蛋白症として、その病態の理解も進んだ。一方、血液疾患等に伴う続発性肺胞蛋白症の病態生理は今尚不明であり、原疾患と相まってその予後は不良である。T-bet高発現マウスの肺胞蛋白症はGM-CSF非依存的であること、骨髄の異常を伴うこと、肺に炎症を伴うことなど、続発性肺胞蛋白症と類似する点が多く、今回解明した発症機構は続発性肺胞蛋白症の病態を理解する上で極めて重要と考える。続発性肺胞蛋白症は極めて稀な疾患で製薬会社の関心も薄く、同領域の研究はアカデミアの責務でもある。

研究成果の概要（英文）：Pulmonary alveolar proteinosis (PAP) is a rare lung disorder characterized by abnormal surfactant accumulation in the alveoli. Here we show a novel mechanism by which acquired PAP develops without dysregulation of GM-CSF signaling. Mice carrying T cells overexpressing T-bet spontaneously developed PAP with pulmonary inflammation. PAP development was found to associate with dysregulation of bone marrow monopoiesis that led to accumulation of bone marrow-driven inflammatory macrophages into the lung while reducing the number of alveolar macrophages. Administration of macrophage colony-stimulating factor restored the impairment of monocytic differentiation. Higher expression of T-bet was observed in the lung lesions of human secondary PAP. These findings suggest that unresolved pulmonary inflammation initiated by T-bet overexpressing T cells reorganizes the subpopulation of macrophages in the lung that results in a reduction of surfactant clearance in alveoli and thus development of PAP.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺胞蛋白症 転写因子 T-bet リンパ球 マクロファージ M-CSF インターフェロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺胞蛋白症は肺胞内にサーファクタント様物質が蓄積し呼吸不全に至る疾患である。同症は先天性と後天性があり、さらに後天性は特発性と続発性に分けられる。近年特発性の多くの症例で抗 GM-CSF 自己抗体が証明され、これらは自己免疫性肺胞蛋白症と呼ばれるようになった。一連の研究より、自己免疫性肺胞蛋白症では GM-CSF の作用が抑制されることで肺胞マクロファージの成熟不全が起こり、サーファクタント除去が障害されることが判明した。一方で、続発性肺胞蛋白症を始めとした非自己免疫性肺胞蛋白症の病態生理は今尚不明であり、原疾患とも相まってその予後は不良である。非自己免疫性肺胞蛋白症は非常に稀な疾患で製薬会社の関心も薄く、このような疾患の病態生理解明や創薬指標の探索はアカデミアの責務と考えられた。

2. 研究の目的

T-bet は Th1 細胞の分化誘導を司る転写因子である。我々は、呼吸器疾患の病態生理との関連を明らかにする目的で T-bet 高発現マウスを作製、解析していたところ、30 週令くらいから肺胞蛋白症を自然発症することを偶然発見した。同マウスでは GM-CSF の低下は無く、単球系細胞の分化障害や、骨髄における myeloid hyperplasia が生じており、GM-CSF 非依存的な、特に血液異常を伴う肺胞蛋白症の発症機構の解明に大変有用なツールと考えられた。本研究では、同マウスにおける肺胞蛋白症発症の機序を分子細胞レベルで明らかにし、同様の発症機序がヒトでも起こりうるかについて臨床検体を用いて検討する。更に同マウスにおける T-bet 修飾や M-CSF 投与の肺胞蛋白症治療効果を検証し、治療標的としての可能性を模索することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

- ・ T-bet 高発現マウスのフェノタイプ解析：同マウスより経時的に肺、腎臓、肝臓、脾臓、腸、リンパ組織、および骨髄を採取し、病理像の観察を行った。
- ・ 気管支肺胞洗浄液の解析：経時的に気管支肺胞洗浄を行い、初回回収液中の GM-CSF、および Th1 サイトカイン濃度を測定するとともに、得られた細胞に対し FACS を用いてマクロファージのフェノタイプ (分化) 解析を行った。
- ・ 末梢血細胞の解析：経時的に血液を採取し、白血球分画を行うとともに、FACS を用いて単球系細胞のフェノタイプ (分化) 解析を行った。
- ・ 骨髄細胞の解析：経時的に骨髄より細胞を採取し、造血系統細胞の解析 (コロニーアッセイ) を行うとともに、単球系コロニーの成熟の程度を解析した。
- ・ 変動遺伝子の網羅解析：マウスより肺組織、および T 細胞を採取、total RNA を抽出し、マイクロアレイ法による全ゲノムレベルの変動遺伝子解析を行った。
- ・ リンパ球特異的 T-bet 発現修飾によるフェノタイプ変化の確認：T-bet 高発現マウスより採取した T 細胞を Rag2 欠損マウスに移植し、肺胞蛋白症が発症するか確認した。
- ・ M-CSF による肺胞蛋白症抑制効果の確認：M-CSF は骨髄単球系細胞の成熟を促すことから、T-bet 高発現による単球系細胞分化障害は M-CSF で是正できるとの仮設のもと、T-bet 高発現マウスにシリンジポンプを用いて M-CSF を持続投与し、肺胞蛋白症の発症が抑制されるか確認した。
- ・ ヒト続発性肺胞蛋白症検体における T-bet 発現レベルの検討：ヒト続発性肺胞蛋白症患者の病理標本を用い、T 細胞における T-bet 発現、および T-bet 陽性 T 細胞の浸潤を PCR、免疫染色で確認した。

4. 研究成果

T-bet 高発現マウスの肺組織では、生後 20 週以降にマクロファージ、リンパ球の高度の浸潤とともに、PAS、および SP-A 陽性の肺胞腔内滲出物を認め、ヒトの続発性肺胞蛋白症に類似する病

理像と思われた。同マウスの気管支肺胞洗浄液では IFN γ 、TNF α 、MCP-1 が野生型マウスに比べ増加しており、Th1 タイプの炎症が高じているものと思われた。同液中の GM-CSF 濃度は野生型マウスと差を認めなかった。同液より回収したマクロファージは、野生型マウスでは CD11^{mid}、CD11c 陽性の肺胞マクロファージであったのに対し、T-bet 高発現マウスでは CD11b 陽性、CD11c 陰性で NOS2、IL-12、IFN γ を高発現する炎症性 (M1) マクロファージであった。同マクロファージはイムノビーズの取り込みや、PPAR α 、ABCG1 の発現が低下しており、貪食能、脂質処理能の低下したマクロファージであることが明らかとなった。

T-bet 高発現マウスの末梢血では野生型マウスに比べ、CD11b 陽性、Ly6c 陽性を示す未熟な炎症性単球が有意に増加していた。また、同マウス骨髄の細胞数は野生型マウスと変わらなかったが、CD11b 陽性細胞の割合が有意に増加しており、Myeloid 系細胞の過形成が生じていることが示された。骨髄細胞のコロニー形成アッセイにおいて、単球系細胞のコロニー形成は両マウスで同様であったが、T-bet 高発現マウスの単球系細胞は未熟な形態を示すものが有意に増加しており、同マウスの骨髄において単球系細胞の成熟が抑制されていることが示された。

T-bet 高発現マウスより単離した T 細胞を Rag2 欠損マウスに移植し、末梢血中にドナー由来の T 細胞が安定して出現していることを 50 週まで確認した。移植マウスでは末梢血で炎症性単球の増加を認め、肺組織では肺胞蛋白症が形成されており、肺胞蛋白症が T-bet-高発現 T 細胞のみで再構成されることが明らかになった。

T-bet 高発現マウスより得られた骨髄単球系コロニーに M-CSF 投与すると、同コロニーの未熟細胞は有意に減少した。さらに同マウスに M-CSF を持続投与することにより、肺組織炎症細胞数が減少し、肺胞蛋白症が抑制されることが明らかとなった。

以上より、T 細胞における T-bet 高発現が持続的な Th1 環境をもたらし、骨髄および末梢血単球系細胞の成熟を抑制し、肺組織におけるマクロファージのフェノタイプを変化させることが、同マウスにおける肺胞蛋白症形成の一因であるものと思われた。また、M-CSF が T-bet 高発現による肺胞蛋白症を抑制する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Shigen, Matsuno Yosuke, Tsunoda Yoshiya, Sakurai Hirofumi, Kiwamoto Takumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Yoh Keigyou, Takahashi Satoru, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Transcription Factor T-bet Attenuates the Development of Elastase-induced Emphysema in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 525 ~ 536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2018-01090C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakurai Hirofumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Yoshida Kazufumi, Nakajima Masayuki, Tsunoda Yoshiya, Hayashi Shih-Yuan, Kiwamoto Takumi, Matsuno Yosuke, Kawaguchi Mio, Yamamoto Masayuki, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 129
2. 論文標題 Sulforaphane ameliorates steroid insensitivity through an Nrf2-dependent pathway in cigarette smoke-exposed asthmatic mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 473 ~ 485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuno Yosuke, Kiwamoto Takumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki, Hogaboam Cory M.	4. 巻 97
2. 論文標題 Notch signaling regulates cell density-dependent apoptosis of NIH 3T3 through an IL-6/STAT3 dependent mechanism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 512 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2018.09.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima Masayuki, Kawaguchi Mio, Matsuyama Masashi, Ota Kyoko, Fujita Jun, Matsukura Satoshi, Huang Shau-Ku, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Satoh Hiroaki, Sakamoto Tohru, Hizawa Nobuyuki.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Transcription elongation factor P-TEFb is involved in IL-17F signaling in airway smooth muscle cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Arch Allergy Immunol	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000488154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Masayuki, Kawaguchi Mio, Ota Kyoko, Fujita Junichi, Matsukura Satoshi, Huang Shau-Ku, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Satoh Hiroaki, Sakamoto Tohru, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 IL-17F induces IL-6 via TAK1-NF B pathway in airway smooth muscle cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immun Inflamm Dis	6. 最初と最後の頁 124 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iid3.149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ano S, Panariti A, Allard B, O'Sullivan M, McGovern TK, Hamamoto Y, Ishii Y, Yamamoto M, Powell WS, Martin JG	4. 巻 102
2. 論文標題 Inflammation and airway hyperresponsiveness after chlorine exposure are prolonged by Nrf2 deficiency in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Haraguchi N, Kikuchi N, Morishima Y, Matsuyama M, Sakurai H, Shibuya A, Shibuya K, Taniguchi M, Ishii Y	4. 巻 46
2. 論文標題 Activation of murine invariant NKT cells promotes susceptibility to candidiasis by IL-10 induced modulation of phagocyte antifungal activity.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1691-1703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201545987	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuyama M, Ishii Y, Sakurai H, Ano S, Morishima Y, Yoh K, Takahashi S, Ogawa K, Hizawa N	4. 巻 11
2. 論文標題 Overexpression of ROR t enhances pulmonary inflammation after infection with Mycobacterium Avium.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0147064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0147064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Yoshida K, Morishima Y, Sakurai H, Sherpa M, Tsunoda Y, Nakajima M, Matsuyama M, Kiwamoto T, Matsuno Y, Ishii Y, Hizawa N.
2. 発表標題 Deletion of Elovl6 alters fatty acid composition in lung tissue and enhances allergic airway inflammation.
3. 学会等名 2019 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakajima M, Matsuyama M, Kawaguchi M, Sherpa M, Yoshida K, Kiwamoto T, Matsuno Y, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N.
2. 発表標題 Role of PD-1 pathway in pulmonary MAC infection using mice model.
3. 学会等名 2019 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sherpa M, Kiwamoto T, Tsunoda Y, Yoshida K, Osawa H, Nakajima M, Matsuyama M, Matsuno Y, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N.
2. 発表標題 Hyaluronan synthase 2 (HAS2) mediates airway inflammation and remodeling in chronic ovalbumin model of asthma.
3. 学会等名 2019 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshida K, Morishima Y, Sakurai H, Tsunoda Y, Nakajima M, Matsuyama M, Kiwamoto T, Matsuno Y, Ishii Y, Hizawa N.
2. 発表標題 The role of elongation of very long chain fatty acids family member 6 in allergic airway inflammation.
3. 学会等名 2018 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Matsuno Y, Matsuyama M, Kiwamoto T, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N
2 . 発表標題 ROS-Nrf2 pathway mediates the development of TGF-b1-induced epithelial-mesenchymal transition through the interaction with notch signaling.
3 . 学会等名 2018 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Kiwamoto T, Tsunoda Y, Sherpa M, Sakurai H, Lin S, Matsuyama M, Matsuno Y, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N
2 . 発表標題 Hyaluronan synthase 2 dysfunction induce severe eosinophilic airway inflammation via inflammatory cytokines and chemokines.
3 . 学会等名 2018 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hayashi S, Matsuno Y, Tsunoda Y, Sakurai H, Kiwamoto T, Kawaguchi M, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N.
2 . 発表標題 The role of T-bet in emphysema.
3 . 学会等名 2017 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Ano S, Panariti A, Allard B, O' Sullivan M, McGovern TK, Hamamoto Y, Ishii Y, Powell WS, Martin JG.
2 . 発表標題 The effect of sulforaphane on airway dysfunction in mice after chlorine gas exposure.
3 . 学会等名 2017 International Conference of American Thoracic Society
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 阿野哲士、菊池教大、石井幸雄
2. 発表標題 異常活性化T細胞による肺胞蛋白症発症機構の解明
3. 学会等名 第25回 P n e u m o F o r u m
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----