

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20932

研究課題名(和文) 間質性肺炎の進行予防に関わる新たな治療標的因子の解析

研究課題名(英文) The analysis of new therapeutic targets involved in the progression of interstitial pneumonia

研究代表者

瀬川 誠司 (Segawa, Seiji)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60632239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、間質性肺炎に対する T細胞の機能解析を行った。T細胞欠損マウスでは野生型マウスに比べて、ブレオマイシン誘導性間質性肺炎の増悪および肺組織Th17細胞の増加を認めた。in vitroにおいて、T細胞から産生されるIFN- γ がTh17細胞分化を抑制した。in vivoにおいて、IFN- γ 産生 T細胞の移入により、間質性肺炎の減弱、Th17細胞の減少を認めた。T細胞はIFN- γ 産生を介したTh17細胞抑制により、間質性肺炎を抑制していることが明らかとなった。以上の結果から、T細胞が間質性肺炎病態制御に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Interstitial pneumonia (IP) is a chronic progressive interstitial lung disease associated with poor prognosis and high mortality. However, the pathogenesis of IP remains to be elucidated. The aim of this study was to clarify the role of pulmonary T cells in IP. In TCR α deficient mice, bleomycin-induced IP was more severe than WT mice. And, pulmonary Th17 cells were more expanding in TCR α deficient mice than in WT mice after bleomycin treatment. In vitro, Th17 cell differentiation was suppressed in the presence of IFN- γ producing T cells. Pulmonary fibrosis was attenuated by IFN- γ -producing T cells through the suppression of pulmonary Th17 cells. These results suggested that pulmonary T cells seem to play a regulatory role in the development of bleomycin-induced IP mouse model via the suppression of IL-17A production.

研究分野：膠原病学

キーワード：間質性肺炎 T細胞 Th17細胞

1. 研究開始当初の背景

間質性肺障害 (Interstitial pneumonia, IP) は、肺組織の線維化を伴う予後不良の難治性疾患である。

現在までの研究から、組織線維化病態形成には、様々な細胞因子あるいは液性因子が関与していると考えられている [Semin Arthritis Rheum. 2008;38:132-160]。近年、 $\gamma\delta T$ 細胞の炎症性肺疾患における役割が注目されている。 $\gamma\delta T$ 細胞は、T 細胞に分類され、末梢血、リンパ組織、肺や皮膚等の上皮組織に多く存在し、生体防御に深く関わっている細胞である。

全身性強皮症 (Systemic sclerosis, SSc) は、皮膚の線維化を主症状とし内臓諸臓器の線維化によって特徴づけられる自己免疫疾患である。全身性強皮症および間質性肺障害は、それぞれ皮膚、肺組織の線維化を主病態とするものであるが、全身性強皮症患者では間質性肺障害を合併する頻度が他の疾患に比べると特に高い。さらに近年の疫学調査の結果、全身性強皮症患者の死因の中で、間質性肺障害の占める割合が 30 年前の約 6 倍に増加していることが報告されており [Ann Rheum Dis. 2007;66:940-944]、全身性強皮症患者の生命予後において間質性肺障害は重大な合併症である。しかしながら、全身性強皮症、間質性肺障害共に有効な治療法が確立されておらず早期の病態解明および治療法の確立が望まれている。

これまでの研究から、ヒト間質性肺障害発症初期像に類似する、インターロイキン (IL)-2+IL-18 投与マウスモデルにおいて、Natural Killer (NK) 細胞マーカー (マウス: NK1.1、ヒト: CD161) を発現したユニークな $\gamma\delta T$ 細胞 (= $\gamma\delta NKT$ 細胞) が炎症増悪作用を有することが報告されている [Am J Respir Cell Mol Biol. 2011;45:659-666]。さらに、全身性強皮症患者においても、 $\gamma\delta NKT$ 細胞が間質性肺炎病態に関与する可能性を示唆することも報告されている [Rheumatology (Oxford). 2014;53:2259-2269]。しかしながら、 $\gamma\delta T$ 細胞の肺線維化に対する作用機序は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、ブレオマイシン誘導性間質性肺炎モデルを用いて、 $\gamma\delta T$ 細胞の肺線維化形成に対する機能解析を検討する。具体的には以下の事柄を検討する。

(1) 野生型マウスと $\gamma\delta T$ 細胞欠損マウスでのブレオマイシン誘導性間質性肺炎の解析

(2) $\gamma\delta T$ 細胞による Th17 細胞分化抑制能の検討 (in vitro)

(3) Th17 細胞分化抑制能を有する $\gamma\delta T$ 細胞分画の解析及び肺線維化に対する検討

上記を介して、肺線維化形成に対する $\gamma\delta T$ 細胞の機能解析を行い、新規治療法へ繋がる基盤研究の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) ブレオマイシン誘導性間質性肺炎の病態解析

野生型 (C57BL/6)、 $\gamma\delta T$ 細胞欠損マウス、IL-17A 欠損マウス、IL-17A/ $\gamma\delta T$ 細胞欠損マウスへブレオマイシンを投与した (気管内投与)。ブレオマイシン投与後 21 日目の肺線維化部位の割合、線維化関連因子発現を解析した。

(2) 組織染色

ブレオマイシン投与 21 日後に、各マウス肺組織を採取し、ホルマリン固定を行った。パラフィン切片作製後、Masson's trichrome 染色を行った。切片作成後の線維化部位の定量には、既に論文に報告されている方法である Quantitative image analysis (QIA) を用いた。

(3) コラーゲン産生量測定

ブレオマイシンおよび PBS 投与 21 日後に、肺組織および気管支肺胞洗浄液を回収した。コラーゲン産生量の測定には、Sircol 測定キットを用いた。

(4) 肺組織中 Th17 細胞の解析

野生型および $\gamma\delta T$ 細胞欠損マウスへブレオマイシン投与後、肺組織中の Th17 細胞をフローサイトメトリーを用いて解析した。

(5) $\gamma\delta T$ 細胞による Th17 細胞分化抑制能の検討

野生型マウス脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞と野生型および IFN- γ 欠損マウス肺組織由来 $\gamma\delta T$ 細胞を Th17 細胞分化条件下で共培養した。Th17 細胞分化能をフローサイトメトリーを用いて解析した。

(6) $\gamma\delta T$ 細胞の表現型解析

野生型マウス肺組織より NK1.1⁻、NK1.1⁺ $\gamma\delta T$ 細胞をフローサイトメトリーを用いて単離した。単離した各 $\gamma\delta T$ 細胞を TCR 刺激後、培養上清中の IFN- γ 、IL-17A 産生を ELISA 法で解析した。

(7) $\gamma\delta T$ 細胞移入の検討

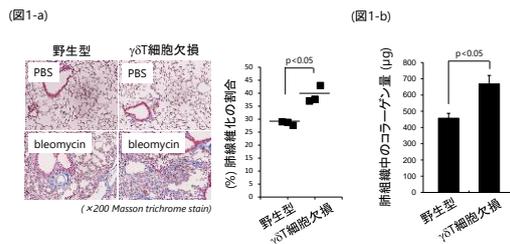
野生型および IFN- γ 欠損マウス由来肺組織 $\gamma\delta T$ 細胞をフローサイトメトリーを用いて単離した。単離した $\gamma\delta T$ 細胞の増殖を目的に、IL-2+IL-7+IL-15 存在下で 12 日間培養した。増殖後の $\gamma\delta T$ 細胞を、 $\gamma\delta T$ 細胞欠

損マウスへ移入後、肺線維化の程度を解析した。同様に、野生型および IFN- γ 欠損マウス由来肺組織 NK1.1⁺ γ δ T 細胞をフローサイトメトリーを用いて単離した。単離した γ δ T 細胞の増殖を目的に、IL-2+IL-7+IL-15 存在下で12日間培養した。増殖後の γ δ T 細胞を、 γ δ T 細胞欠損マウスへ移入後、肺線維化の程度を解析した。

4. 研究成果

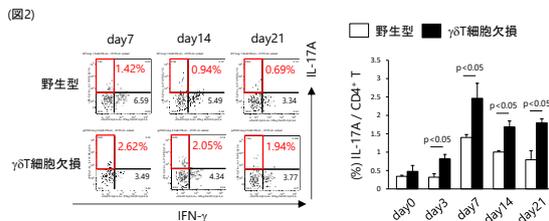
(1) γ δ T 細胞欠損マウスでは肺線維化が増悪した

野生型および γ δ T 細胞欠損マウスを用いて、ブレオマイシン投与後、21 日目の肺組織線維化を比較検討した。 γ δ T 細胞欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、肺組織線維化の増悪を認めた(図 1-a)。また、 γ δ T 細胞欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、肺組織中の線維化関連因子の一つと考えられている、コラーゲン産生の増加を認めた(図 1-b)。以上の結果から、 γ δ T 細胞は肺線維化抑制能を有する可能性が考えられた。



(2) γ δ T 細胞欠損マウスでは肺組織 Th17 細胞が増加した

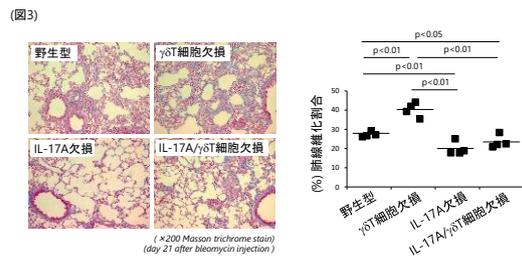
次に、肺線維化増悪に関与する Th17 細胞の割合を解析した。ブレオマイシン投与後、3 日、7 日、14 日、21 日目において、 γ δ T 細胞欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、肺組織中の Th17 細胞の増加を認めた(図 2)。以上の結果から、 γ δ T 細胞は、Th17 細胞の抑制を介して、肺線維化に関わる可能性が考えられた。



(3) γ δ T 細胞欠損マウスにおける肺線維化増悪には IL-17A が必須である

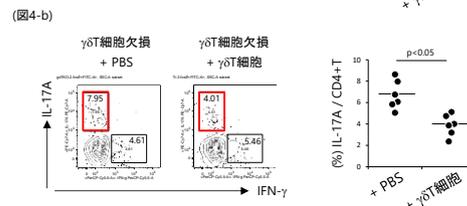
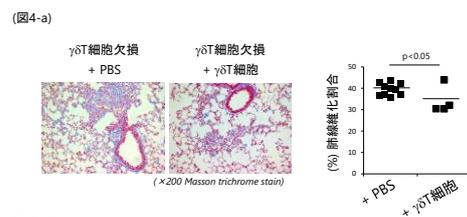
γ δ T 細胞欠損マウスで確認された肺線維化病態の亢進が IL-17A 依存性か否かを検討する目的で、IL-17A 欠損マウスさらに IL-17A 欠損 γ δ T 細胞欠損マウスを用いた。IL-17A

欠損マウスでは、野生型および γ δ T 細胞欠損マウスに比べて肺組織線維化部位の割合の著明な減少を認めた(図 3)。この結果から、ブレオマイシン誘発 IP 病態形成において IL-17A は増悪因子の一つであることを確認した。次に、IL-17A 欠損 γ δ T 細胞欠損マウスを用いた解析の結果、肺線維化部位の割合は野生型および γ δ T 細胞欠損マウスに比べて著明な減弱を認めたが、IL-17A 欠損マウスとの間に著明な差は認めなかった(図 3)。以上の結果から、 γ δ T 細胞欠損マウスで認められた肺線維化増悪は、IL-17A 依存性であることが明らかとなった。



(4) γ δ T 細胞移入により肺線維化が抑制された

次に、肺線維化に対する γ δ T 細胞の機能を解析する目的で、細胞移入実験を行った。 γ δ T 細胞欠損マウスに、野生型マウス由来 γ δ T 細胞を移入した群では、コントロール群に比べてブレオマイシン投与後の肺線維化の減弱を認めた(図 4-a)。さらに、野生型マウス由来 γ δ T 細胞を移入した群では、コントロール群に比べて、ブレオマイシン投与後の肺組織 Th17 細胞の割合が減少した(図 4-b)。以上の結果から、in vivo において γ δ T 細胞が肺線維化抑制能を有することが明らかとなった。

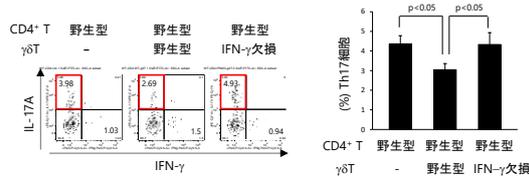


(5) γ δ T 細胞は IFN- γ 産生を介して Th17 細胞分化を抑制した

細胞移入の結果より、 γ δ T 細胞が肺組織での Th17 細胞の抑制に関与することが考えられた。次に、in vitro において、 γ δ T 細胞の Th17 細胞分化への関与を解析した。野

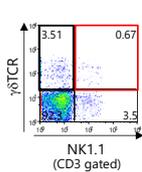
生型マウス由来 CD4⁺T 細胞を用いて、Th17 細胞分化誘導時に γ δ T 細胞を共培養し、Th17 細胞分化能を解析した。その結果、野生型マウス由来 γ δ T 細胞と共培養した時は、Th17 細胞分化の抑制を認めた (図 5)。その一方で、IFN- γ 欠損マウス由来 γ δ T 細胞と共培養した時は、Th17 細胞分化の抑制を認めなかった (図 5)。以上の結果から、 γ δ T 細胞は IFN- γ 産生を介して Th17 細胞分化抑制に関与することが明らかとなった。

(図 5)

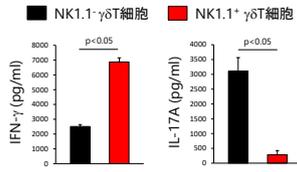


(6) NK1.1⁺ γ δ T 細胞は IFN- γ 産生能が高い
次に、IFN- γ を高産生する γ δ T 細胞の解析を行った。野生型マウス肺組織由来 NK1.1⁻、NK1.1⁺ γ δ T 細胞を単離、TCR 刺激後の IFN- γ 、IL-17A 産生能を解析した。その結果、NK1.1⁺ γ δ T 細胞では、NK1.1⁻ γ δ T 細胞に比べて、IFN- γ の高産生を認めた (図 6)。その一方で、IL-17A 産生は、NK1.1⁻ γ δ T 細胞で高かった。以上の結果から、IFN- γ を高産生する、NK1.1⁺ γ δ T 細胞が、プレオマイシン投与後の肺線維化抑制に関与している可能性が考えられた。

(図 6-a)



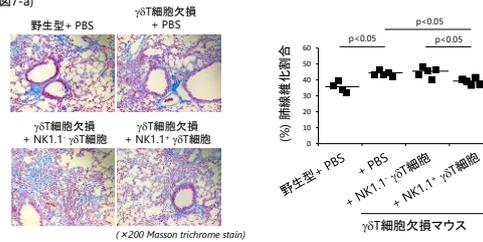
(図 6-b)



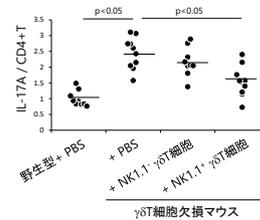
(7) NK1.1⁺ γ δ T 細胞移入により肺線維化が抑制された

次に、肺線維化に対する NK1.1⁺ および NK1.1⁺ γ δ T 細胞機能を解析する目的で、細胞移入実験を行った。その結果、NK1.1⁺ γ δ T 細胞を移入した群では、NK1.1⁻ γ δ T 細胞を移入した群よりも、プレオマイシン投与後の肺線維化が減弱した (図 7-a)。さらに、NK1.1⁺ γ δ T 細胞を移入した群では、NK1.1⁻ γ δ T 細胞を移入した群よりも、プレオマイシン投与後の肺組織中の Th17 細胞割合の減少も確認された (図 7-b)。以上の結果から、NK1.1⁺ γ δ T 細胞が肺線維化抑制に重要であることが明らかとなった。

(図 7-a)



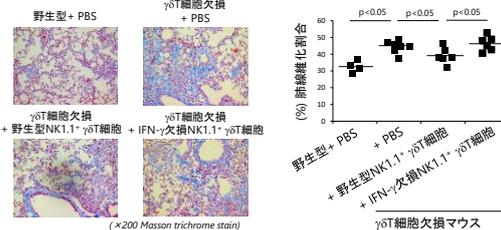
(図 7-b)



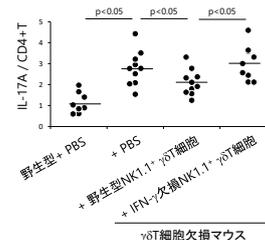
(8) IFN- γ 欠損 NK1.1⁺ γ δ T 細胞移入により肺線維化は抑制されなかった

次に、肺線維化に対する IFN- γ 産生 NK1.1⁺ γ δ T 細胞機能を解析する目的で、野生型および IFN- γ 欠損マウス由来の細胞を用いた細胞移入実験を行った。野生型および IFN- γ 欠損マウス肺組織より NK1.1⁺ γ δ T 細胞を単離後、 γ δ T 細胞欠損マウスへ移入し肺線維化に対する効果を検討した。その結果、IFN- γ 欠損マウス由来 NK1.1⁺ γ δ T 細胞を移入した群では、野生型マウス由来 NK1.1⁺ γ δ T 細胞を移入した群よりも、プレオマイシン投与後の肺線維化が増悪した (図 8-a)。さらに、IFN- γ 欠損マウス由来 NK1.1⁺ γ δ T 細胞を移入した群では、野生型マウス由来 NK1.1⁺ γ δ T 細胞を移入した群よりも、プレオマイシン投与後の肺組織中の Th17 細胞割合の増加も確認された (図 8-b)。以上の結果から、NK1.1⁺ γ δ T 細胞が産生する IFN- γ が Th17 細胞抑制を介して、肺線維化抑制に重要であることが明らかとなった。

(図 8-a)



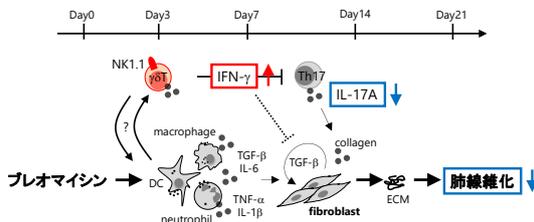
(図 8-b)



(9)まとめ

以上の研究結果より、 $\gamma\delta$ T細胞はブレオマイシン誘発性肺線維化病態形成に対して、抑制的に働くことが示唆された(図9)。その抑制機序として、ブレオマイシン投与後の肺組織において $\gamma\delta$ T細胞はIFN- γ 産生依存的にTh17細胞分化を抑制し、肺線維化病態を抑制していることが示唆された。

(図9)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①S. Segawa, D. Goto, A Iizuka, S Kaneko, M Yokosawa, Y Kondo, I Matsumoto, T Sumida. The regulatory role of IFN- γ producing gammadelta T cells via the suppression of Th17 cell activity in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Clinical Experimental Immunology*. 2016; 185: 348-360. doi: 10.1111/cei.12802. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

①Segawa S et al. The regulatory role of $\gamma\delta$ T cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016年4月21-23日、横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀬川 誠司 (SEGAWA, Seiji)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：60632239