

図4

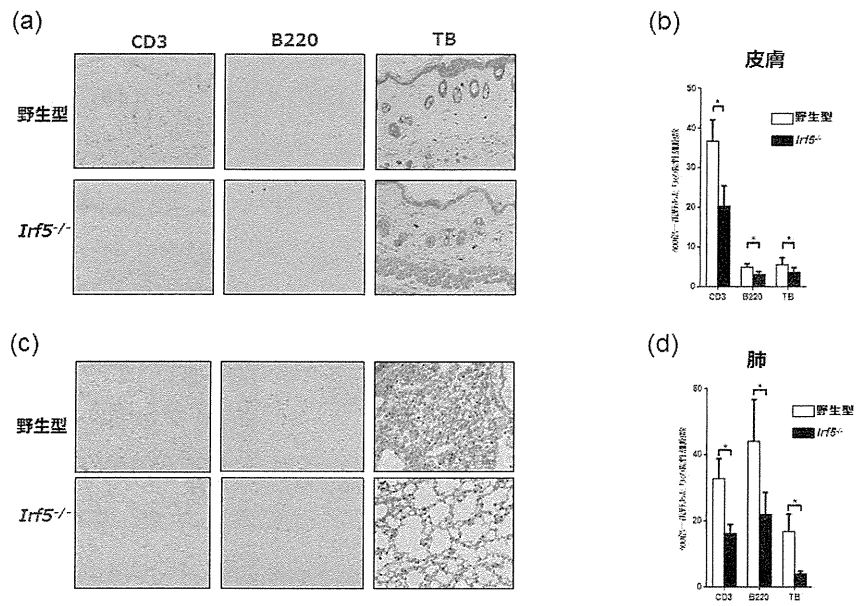


図 4: *Irf5*^{-/-} マウスでは BLM 投与による炎症細胞浸潤が抑制される

a. BLM1 週間投与後の *Irf5*^{-/-} マウスおよび野生型マウスの皮膚組織における CD3 および B220 による免疫染色およびトルイジンブルー染色の結果。

b. a における各染色の 400 倍一視野あたりの陽性細胞数の検討(*P=0.05)。

c. BLM1 週間投与後の *Irf5*^{-/-} マウスおよび野生型マウスの肺組織における CD3 および B220 による免疫染色およびトルイジンブルー染色の結果。

d. b における各染色の 400 倍一視野あたりの陽性細胞数の検討(*P=0.05)。

図5

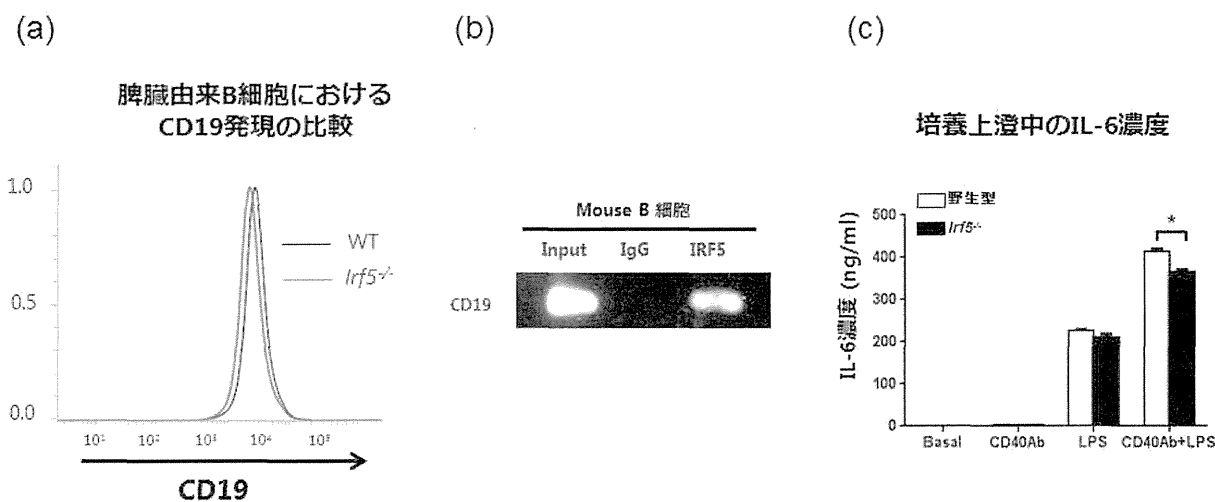


図5: *Irf5*^{-/-}マウスではBLM投与によるB細胞の活性化が抑制されている

a. BLM投与した *Irf5*^{-/-} マウスおよび野生型マウスの脾臓B細胞におけるCD19発現量をflow cytometryで比較した。

b. マウス脾臓B細胞および抗IRF5抗体を用いてクロマチン免疫沈降法を施行した。

c. *Irf5*^{-/-} マウスおよび野生型マウスの脾臓B細胞を抗CD40抗体(CD40ab) and/or LPSで刺激し、培養液中におけるIL-6分泌量をELISA法で測定した。

図6

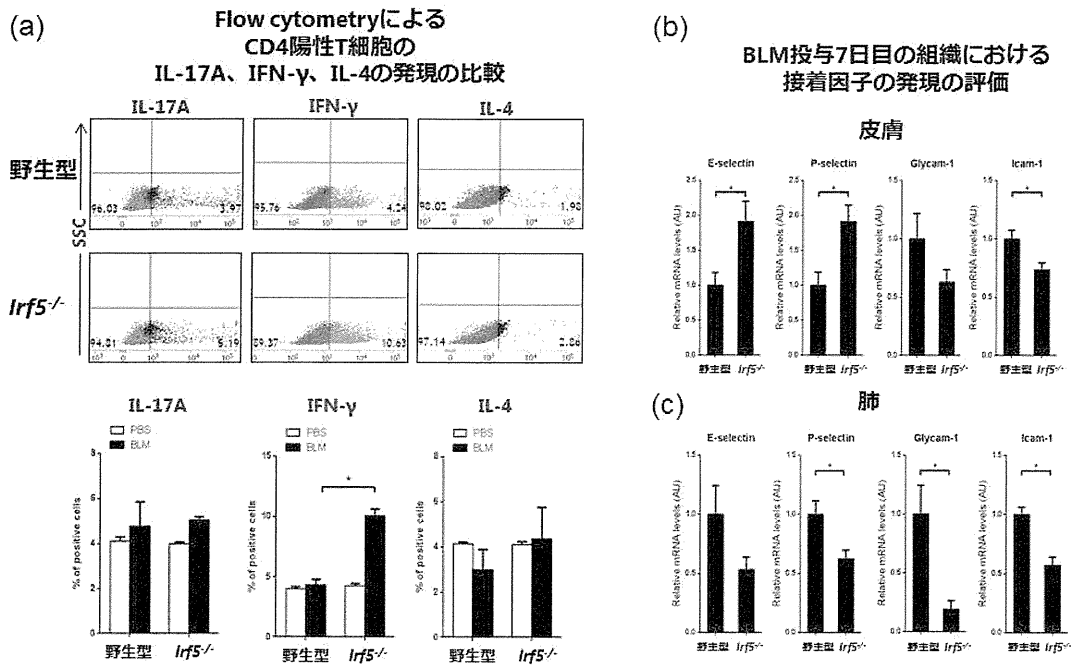


図6: *Irf5*^{-/-}マウスでは BLM 刺激により Th1 優位な炎症環境が誘導される

a. *Irf5*^{-/-} マウスおよび野生型マウスに BLM を1週間投与し、末梢リンパ節からリンパ球を回収した後、CD4と各種サイトカインをそれぞれ細胞表面免疫染色、細胞内免疫染色し、flow cytometryを用いて検討した(*P=0.05)。

b, c. *Irf5*^{-/-} マウスおよび野生型マウスに BLM を1週間投与し、皮膚組織(b)および肺組織(c)における細胞接着分子の発現量を定量的 real-time PCR 法で検討した(*P=0.05)。

図7

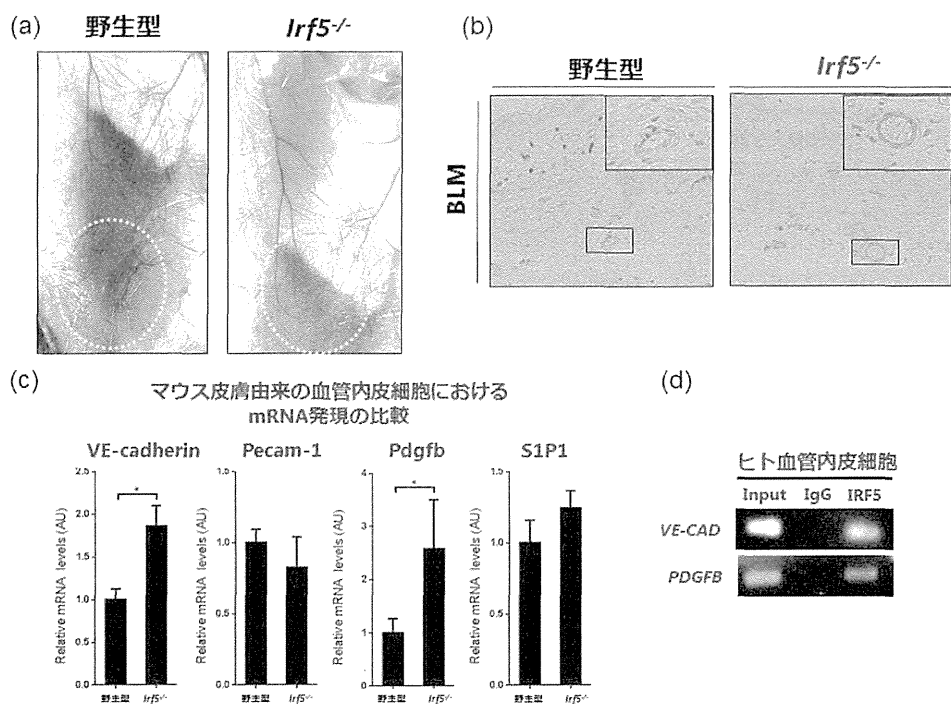


図 7: *Irf5^{-/-}*マウスは BLM 投与による血管の不安定化に対して抵抗性である

- BLM 投与開始後、7 日目に尾静脈から PBS に溶解させた 0.5%濃度の Evans blue 色素を 200 μ l 投与し、30 分後に皮膚における血管透過性の評価を行った。
- a と同じ条件下で、皮膚組織における α -SMA の免疫染色を行った。
- Irf5^{-/-}* マウスおよび野生型マウスから皮膚微小血管内皮細胞を単離し、血管の安定化に関連する各種遺伝子の発現量について、定量的 real-time PCR で検討した。
- HDMECs と抗 IRF5 抗体を用いてクロマチン免疫沈降法を行った。

図8

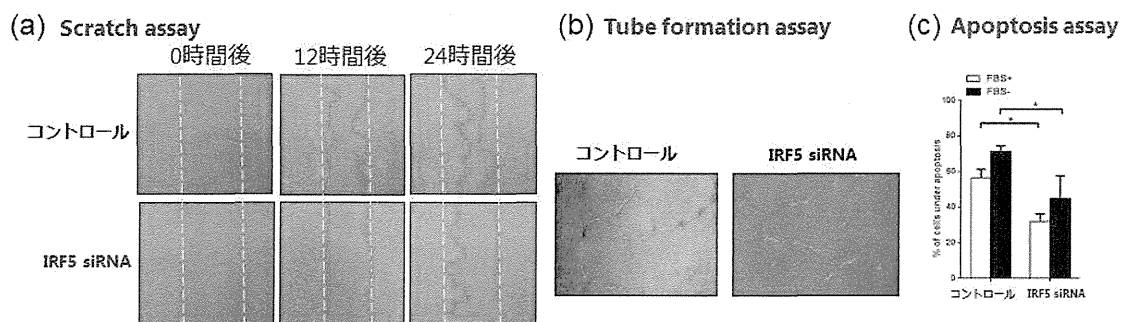


図 8: IRF5 の発現低下は血管内皮細胞において **angiostatic** な形質を誘導する

a. HDMECs を 24 well plate で subconfluent まで培養し、IRF5 siRNA あるいは scrambled non-silencing RNA を transfection させた。confluent になるまで培養し、mytomycin C で処理して細胞分裂を抑制した後、200 μ l 用の yellow chip で細胞を scratch して線状に wound を作成し、6 時間後、12 時間後、24 時間後に HDMECs の migration を観察した。

b. HDMECs を 6 well plate で subconfluent まで培養し、IRF5 siRNA あるいは scrambled non-silencing RNA を transfection させた。その後、confluent になるまで培養し、その細胞を 24well plate に 30% confluent になるように撒き、細胞が plate に接着したのを確認した後、matrigel を overlay した。

c. HDMECs を 24 well plate で confluent になるまで培養し、IRF5 siRNA あるいは scrambled non-silencing RNA を transfection させた。1% serum 存在下あるいは serum free の条件下で HDMECs を培養し、7-AAD で染色し FACS を用いて apoptosis を生じている細胞の割合を観察した。

図9

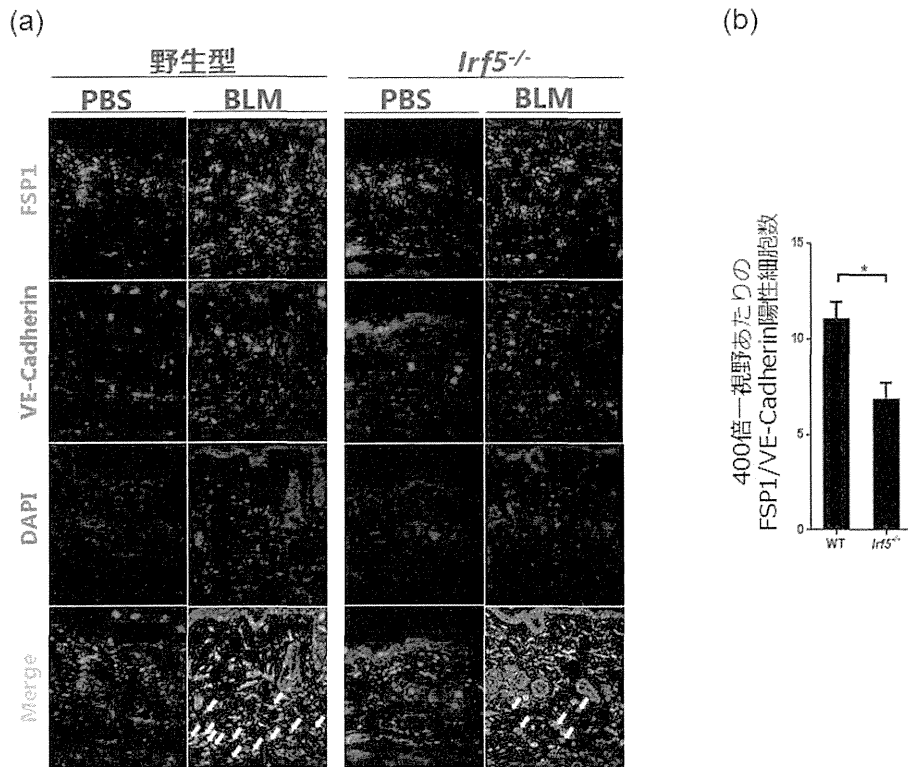


図9: *Irf5*^{-/-}マウスでは BLM 投与による内皮間葉移行が抑制される

a. *Irf5*^{-/-} マウスおよび野生型マウスに PBS あるいは BLM を 1 週間投与した後、皮膚検体を採取し、

抗 FSP1 抗体および抗 VE-Cadherin 抗体を用いた蛍光二重染色を行った。

b. a の検体において、400 倍一視野あたりの二重陽性細胞数をカウントして比較した(* $P < 0.05$)。

ブレオマイシン誘発性間質性肺炎モデルマウスにおける $\gamma\delta$ T 細胞の機能解析

担当責任者	後藤大輔	筑波大学医学医療系内科	准教授
協力者	瀬川誠司	筑波大学医学医療系内科	助教
協力者	飯塚 晃	筑波大学医学医療系内科	大学院生
協力者	松本 功	筑波大学医学医療系内科	准教授
協力者	住田孝之	筑波大学医学医療系内科	教授
業務主任者	尹 浩信	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学	教授

研究要旨

間質性肺炎 (IP) は、全身性強皮症 (SSc) 患者において重篤な合併症の 1 つである。これまでに我々は、SSc と $\gamma\delta$ T 細胞に着目した解析を行ってきた。その結果、ヒトにおいて CD161 を発現した V δ 1 陽性細胞 $\gamma\delta$ T 細胞 (CD161 陽性 V δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞) が SSc に合併した IP 病態への関与を示唆する結果を得ている。しかしながら、 $\gamma\delta$ T 細胞の組織線維化に対する作用機序は不明な点が多い。今回、代表的な肺線維化モデルであるブレオマイシン誘発性 IP モデルマウスを用いて、 $\gamma\delta$ T 細胞の IP 病態形成に対する作用機序を解析した。その結果、ブレオマイシン投与後の $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウスでは野生型マウスに比べて、①体重減少率の有意な亢進、②肺組織線維化部位の増大、③肺組織および気管支肺胞洗浄液中のコラーゲン産生が増大した。さらに、野生型マウス由来肺組織に存在する $\gamma\delta$ T 細胞のサブセットを解析した結果、IFN- γ 産生および IL-17A 産生の異なる 3 つのサブセットに分かれることを見出した。以上の結果より、 $\gamma\delta$ T 細胞はブレオマイシン誘発性 IP 病態に対して抑制的に作用すること、また異なる $\gamma\delta$ T 細胞サブセットが IP 病態に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は、いまだに難治性の疾患であることに変わりがなく、他の膠原病疾患の多くがステロイドを初めとした免疫抑制療法が有効であるのとは対照的に、決定的な有効治療がないことが問題となっている。皮膚の硬化病変もさることながら、予後を左右する内臓病変が問題となるが、特に最近、SSc 患者の死因の中で間質性肺炎 (interstitial pneumonia; IP) が

占める割合が顕著に増えてきている [1]。従って、SSc 患者の生命予後を改善する為には、IP の病態を明らかとし、その治療法を検討することが最も重要なことと考えられる。

我々は、IL-2 と IL-18 によって誘導されるヒト IP の初期像に類似した非線維化間質性肺炎モデルマウスを用いて、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が IP 増悪に関与することを報告してきた [2]。さらに、マウス NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞に相当する細胞として知られる、ヒト CD161 陽

性 V δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が SSc 患者における IP 病態に関与する可能性を示唆する結果を得ている[3]。しかしながら、ヒトでの解析は、末梢血単核球由来 $\gamma\delta$ T 細胞が中心であり、実際の肺組織での線維化形成における $\gamma\delta$ T 細胞の解析は困難である。そこで、本検討ではブレオマイシン誘発性 IP モデルを用いて、肺組織線維化形成過程における $\gamma\delta$ T 細胞の機能解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) ブレオマイシン誘発性間質性肺炎

C56BL/6 (野生型) マウス、8~10 週齢の雌(日本チャールス・リバー株式会社、横浜)を用いた。C57BL/6 バックグラウンドの TCR δ 鎖欠損 ($\gamma\delta$ T 細胞欠損) マウス[4]は、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研バイオリソースセンターより提供を受けた。ブレオマイシン(日本化薬、1.25mg/kg)を経気管内投与し、間質性肺炎を誘導した。コントロールとして、PBS を投与した群を用いた。

2) 組織染色

ブレオマイシンおよび PBS 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[5]。

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 (Biocolor, County Antrim, UK) を用いた。

4) RNA 抽出と定量的リアルタイム PCR

ブレオマイシンおよび PBS 投与 21 日後に、肺組織より total RNA を抽出し、RevertAid First-strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, Burlington, ONT, Canada) を用いて cDNA に逆転写した。定量的リアルタイム PCR には、Fast qPCR Mastermix Plus (eurogentec, Liege, Belgium)、ABI prism 7000 (Life technologies) を使用した。GAPDH をリファレンス遺伝子として用いた。

5) フローサイトメトリー

肺組織より得られたリンパ球は、以下のモノクローナル抗体を用いて染色した。Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-TCR $\gamma\delta$ 、phycoerythrin (PE)- and allophycocyanin (APC)- conjugated anti-NK1.1、PerCP-conjugated anti-CD3 ϵ 、PE-conjugated anti-T-bet、APC-conjugated anti-ROR γ t mAbs は Biolegend (San Diego, CA) から購入した。染色した細胞は、FACS Verse (Becton Dickinson, Mountain View, CA) で測定し、データ解析には FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR) を用いた。

6) サイトカイン産生解析

肺組織より得られたリンパ球は、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma, St Louis, MO) + ionomycin (Sigma) + GolgiStop (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) 存在下、6 時間培養を行った。培養後の細胞は以

下のモノクローナル抗体を用いて染色した。FITC- anti-conjugated anti- TCR $\gamma\delta$ 、PE- and APC- conjugated anti- NK1.1、PerCP- conjugated anti- CD3 ϵ 、APC- conjugated anti- IFN- γ 、PE/Cy7- conjugated anti- IL-17A mAbs は Biolegend (San Diego, CA) から購入した。染色した細胞は、FACS Verse (Becton Dickinson, Mountain View, CA) で測定し、データ解析には FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR) を用いた。

7) 統計解析

統計解析には統計解析ソフト (SPSS Statistics, IBM, NY) を使用した。2群間の有意差の検定は Student-t 検定を使用した。多群間の有意差検定には oneway ANOVA 検定を使用した。P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判断した。

なお、本研究を行うにあたり、「動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「筑波大学動物実験取扱規定」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議)」に従って動物実験計画書を提出し、筑波大学の動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウスを用いたブレオマイシン誘発性間質性肺炎の解析

まず始めに、ブレオマイシン投与後の野生型および $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウスでの病態解析を行った。 $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウスでは、ブレオマイシン投与 20、21 日後に野生型マウスと比較して著大な体重減少を認めた (図 1)。組織学的な解析の結果、ブレオマイシン投与後の $\gamma\delta$ T

細胞欠損マウスでは肺胞壁肥厚、炎症細胞浸潤増加を認め、線維化部位の増大を認めた (図 2A, 2B)。次に、肺組織および気管支肺泡洗浄液 (BALF) 中のコラーゲン産生量を解析した。その結果、野生型マウスに比べて $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウスでは、肺組織・BALF 中のコラーゲン産生量が著名に亢進していた (図 3)。さらに、ブレオマイシン投与後の肺組織における *Tgf- β* および *coll1a1* mRNA 発現を解析した結果、 $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウスで野生型マウスに比べて著名に亢進していた (図 4)。

2) 肺組織中 $\gamma\delta$ T 細胞の解析

次に、ナイーブ野生型マウス由来肺組織を用いた $\gamma\delta$ T 細胞の解析を行った。肺組織中 $\gamma\delta$ T 細胞は、過去の報告に一致して、NK1.1 陰性 (NK1.1⁻) および NK1.1 陽性 (NK1.1⁺) サブセットに分けられ (図 5A)、それぞれ IL-17A、IFN- γ を高産生することを確認した (図 5A)。さらに、本検討では肺組織中 $\gamma\delta$ T 細胞は 3 つのサブセットに分けられることを見出した。NK1.1 と $\gamma\delta$ TCR の発現によって、NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞、NK1.1⁻ $\gamma\delta$ TCR^{lo} 細胞、NK1.1⁻ $\gamma\delta$ TCR^{hi} 細胞に分けられた (図 5B)。NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞は IFN- γ 産生、T-bet 発現が著名に高かった。NK1.1⁻ $\gamma\delta$ TCR^{hi} 細胞は IL-17A 産生、ROR γ t 発現が高かった (図 6A, 6B, 7A, 7B)。一方で、NK1.1⁻ $\gamma\delta$ TCR^{lo} 細胞は、IFN- γ 、IL-17A 産生が見られたが、共産生細胞は認められず、それぞれ別々の細胞からの産生であることが考えられた。以上の結果より、NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞は $\gamma\delta$ T1、NK1.1⁻ $\gamma\delta$ TCR^{lo} 細胞は $\gamma\delta$ T1/17、NK1.1⁻ $\gamma\delta$ TCR^{hi} 細胞は $\gamma\delta$ T17 と定義した。

3) ブレオマイシン誘発性間質性肺炎誘導後

の肺組織中 $\gamma\delta T$ 細胞の検出

間質性肺炎病態形成における各 $\gamma\delta T$ 細胞サブセット($\gamma\delta T1$ 、 $\gamma\delta T1/17$ 、 $\gamma\delta T17$)の働きを解析するために、野生型マウスへブレオマイシン投与後、肺組織中の $\gamma\delta T1$ 、 $\gamma\delta T1/17$ 、 $\gamma\delta T17$ 細胞の経時的な解析を行った(図 8)。その結果、ブレオマイシン投与 3 日、7 日目において肺組織中の $\gamma\delta T1$ 細胞数は著明に増加した(図 9)。一方で、 $\gamma\delta T1/17$ および $\gamma\delta T17$ 細胞数はブレオマイシン投与 7 日目で著明に増加した。さらに、ブレオマイシン投与 3 日、7 日目における各 $\gamma\delta T$ 細胞サブセットからの IFN- γ および IL-17A 産生を検討した。その結果、IFN- γ 産生 $\gamma\delta T1$ 細胞数は、ブレオマイシン投与 3 日、7 日目で著明に増加していた。一方で、IL-17A産生 $\gamma\delta T1/17$ および $\gamma\delta T17$ 細胞数は、ブレオマイシン投与 3 日、7 日目で著明に増加していた(図 10)。ブレオマイシン投与後の $\gamma\delta T1$ 細胞からの IL-17A 産生および $\gamma\delta T17$ 細胞からの IFN- γ 産生は認められず、各細胞のサイトカイン産生能は保たれていた。

D. 考案

現在までに我々は、SSc に合併した IP 病態において、 $\gamma\delta T$ 細胞サブセットの病態への関与を示唆する結果を報告してきた [3]。本検討では、代表的な IP モデルである、ブレオマイシン誘発性 IP モデルを使用し、 $\gamma\delta T$ 細胞の IP 病態への関与を検討した。

$\gamma\delta T$ 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、生体防御に深くかかわっている細胞である。近年、ブレオマイシン、bacillus subtilis、silica 等によ

て誘導される IP モデルにおいて、 $\gamma\delta T$ 細胞が病態抑制能を有する可能性が報告された [6-9]。しかしながら、その詳細なメカニズムは不明のままである。本検討においても、ブレオマイシン投与後の $\gamma\delta T$ 細胞欠損マウスでは、肺胞壁肥厚、細胞浸潤増加、コラーゲン過産生等が認められ、IP 病態の増悪を確認した。

マウス $\gamma\delta T$ 細胞は、IFN- γ 産生を主とした $\gamma\delta T1$ 細胞と IL-17A 産生を主とした $\gamma\delta T17$ 細胞に分類されることが報告されている [10]。 $\gamma\delta T1$ 細胞の代表的なマーカーとして、NK1.1、CD27 あるいは CD122 が知られている [11,12]。一方、 $\gamma\delta T17$ 細胞上には、CCR6 発現が認められる [13]。本検討においても、肺組織中の NK1.1⁺ $\gamma\delta T$ (= $\gamma\delta T1$)細胞は、IFN- γ 産生が高く、NK1.1⁻ $\gamma\delta T$ 細胞は IL-17A 産生が高いことを確認した。さらに、NK1.1⁻ $\gamma\delta T$ 細胞は、 $\gamma\delta TCR$ の発現強度により NK1.1⁻ $\gamma\delta TCR^{\text{hi}}$ 細胞と NK1.1⁻ $\gamma\delta TCR^{\text{lo}}$ 細胞に分けられた。非常に興味深いことに、NK1.1⁻ $\gamma\delta TCR^{\text{hi}}$ (= $\gamma\delta T17$)細胞は、IL-17A 産生が非常に高いことが分かった。NK1.1⁻ $\gamma\delta TCR^{\text{lo}}$ (= $\gamma\delta T1/17$)細胞は IFN- γ 、IL-17A 産生が認められるが、共発現する細胞は認められないことから、 $\gamma\delta T1$ と $\gamma\delta T17$ 細胞が混在する集団であると考えられた。T-bet および ROR γ t はそれぞれ、Th1、Th17 細胞の転写因子として知られており、 $\gamma\delta T$ 細胞においても発現が認められている。サイトカイン産生パターンと同様に、 $\gamma\delta T1$ 細胞では、T-bet 発現が高く、 $\gamma\delta T17$ 細胞では ROR γ t 発現が高いことが分かった。

IFN- γ および IL-17A は、IP 病態形成に重要であることが知られている。IFN- γ は線維芽細胞の増殖抑制、線維化関連因子発現を抑制すること

で線維化抑制的に働く [14-19]。一方、IL-17A は、線維化促進的に作用することが、種々の間質性肺炎モデルマウスで報告されている [20,21]。そこで、ブレオマイシン投与後の肺組織中の $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの解析を行った。その結果、IFN- γ 産生 $\gamma\delta$ T1 細胞数はブレオマイシン投与 3 日目で著大な増加が認められた。その一方で、IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T17 細胞数はブレオマイシン投与 7 日目で著大な増加が認められた。この結果から、IFN- γ 産生 $\gamma\delta$ T1細胞と IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T17 細胞はブレオマイシン誘発 IP 病態形成においてそれぞれ異なる時期に作用することが考えられるが、詳細は不明である。

本検討より、 $\gamma\delta$ T 細胞はブレオマイシン誘発性 IP 病態形成に対して、抑制的に働くことが考えられた。その一方で、肺組織中の $\gamma\delta$ T 細胞には、サイトカイン産生の異なる集団が混在しており、線維化病態形成に影響を与えていることが考えられる。今後は、各 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットのより詳細な解析を行うことで、肺線維化形成における $\gamma\delta$ T 細胞の役割が明らかになると考えられる。

E. 結論

サイトカイン産生能の異なる $\gamma\delta$ T 細胞は、ブレオマイシン誘導間質性肺炎病態形成に対して重要な働きをすることが示唆された。

F. 文献

1. Steen VD, Medsger TA. : Change in cause of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:940-944
2. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Horikoshi M, Sugihara M, Hayashi T et al. : Involvement of

NK 1.1-positive $\gamma\delta$ T cells in interleukin-18 plus interleukin-2-induced interstitial lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45:659-666

3. Segawa S, Goto D, Horikoshi M, Kondo Y, Umeda N, Hagiwara S, Yokosawa M, Hirota T, Miki H, Tsuboi H, Ogishima H, Suzuki T, Matsumoto I, Sumida T. Involvement of CD161+ V δ 1+ $\gamma\delta$ T cells in systemic sclerosis: association with interstitial pneumonia. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 12: 2259-2269
4. Itohara S, Mombaerts P, Lafaille J, Iacomini J, Melson A, Clarke A, L.Hopper, Farr A, Tonegawa S. T cell receptor δ gene mutant mice: independent generation of $\gamma\delta$ T cells and programmed rearrangements of $\gamma\delta$ TCR gene. *Cell* 1993; 72: 337-348
5. Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 2002; 83: 111-119
6. Braun RK, Ferrick C, Neubauer P et al. IL-17 producing gammadelta T cells are required for a controlled inflammatory response after bleomycin-induced lung injury. *Inflammation* 2008;31:167-79
7. Simonian PL, Wehrmann F, Roark CL et al. $\gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J Exp Med* 2010;207:2239-53
8. Simonian PL, Roark CL, Diaz del Valle F et al. Regulatory Role of $\gamma\delta$ T Cells in the Recruitment of CD4+ and CD8+ T Cells to Lung and Subsequent Pulmonary Fibrosis. *J*

- Immunol 2006; 177:4436-43
9. Pociask DA, Chen K, Choi SM, Oury TD, Steele C, Kolls JK. $\gamma\delta$ T cells attenuate bleomycin-induced fibrosis through the production of CXCL10. *Am J Pathol* 2011;178:1167-1176
 10. Korn T and Petermann F. Development and function of interleukin 17- producing $\gamma\delta$ T cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci* 2012;1247:34-45
 11. Kisielow J M. Kopf and Karjalainen K. SCART scavenger receptors identify a novel subset of adult gammadelta T cells. *J Immunol* 2008; 181: 1710–1716
 12. Ribot, J.C. et al. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* 2009; 10:427–436
 13. Haas JD, Gonzalez FH, Schmitz S, Chennupati V, Fohse L, Kremmer E, Forster R, Prinz I. CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma-producing gammadelta effector T cells. *Eur J Immunol* 2009;39:3488-3497
 14. Duncan MR and Berman B. Gamma interferon is the lymphokine and beta interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. *J Exp Med* 1985; 162: 516-527
 15. Gillery P, Serpier H, Polette M, Bellon G, Clavel C, Wegrowski Y et al. Gamma-interferon inhibits extracellular matrix synthesis and remodeling in collagen lattice cultures of normal and scleroderma skin fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 1992; 57: 244-253
 16. Yuan W, Yufit T, Li L, Mori Y, Chen SJ, Varga J. Negative modulation of alpha1(I) procollagen gene expression in human skin fibroblasts: transcriptional inhibition by interferon-gamma. *J Cell Physiol* 1999; 179: 97-108
 17. Kimura T, Ishii Y, Morishima Y, Shibuya A, Shibuya K et al. Treatment with α -Galactosylceramide attenuates the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2004; 172: 5782-5789
 18. Kim JH, Kim HY, Kim S, Chung JH, Park WS, Chung DH. Natural killer T (NKT) cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by producing interferon- γ . *Am J Pathol* 2005; 167: 1231-1241
 19. Keane MP, Belperio JA, Burdick MD, Strieter RM. IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281;L92-L97
 20. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 2010; 207: 1293-1305
 21. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, Wynn TA. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J*

G. 研究発表

1. 論文発表

Segawa S, Goto D, Horikoshi M, Kondo Y, Umeda N, Hagiwara S, Yokosawa M, Hirota T, Miki H, Tsuboi H, Ogishima H, Suzuki T, Matsumoto I, Sumida T. Involvement of CD161+ Vδ1+ γδT cells in systemic sclerosis: association with interstitial pneumonia. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 12: 2259-2269

2. 学会発表

- 1) 瀬川誠司, 後藤大輔, 堀越正信, 飯塚 晃、松本 功, 住田孝之: 間質性肺炎合併強皮症患者におけるγδNKT細胞の機能解析、第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014年
- 2) Seiji Segawa¹, Daisuke Goto¹, Masanobu Horikoshi¹, Akira Iizuka¹, Isao Matsumoto¹, Takayuki Sumida¹: The role of TCR Vα1⁺ NKT cells in systemic sclerosis patients with interstitial pneumonitis. 第43回日本免疫学会総会・学術集会、2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

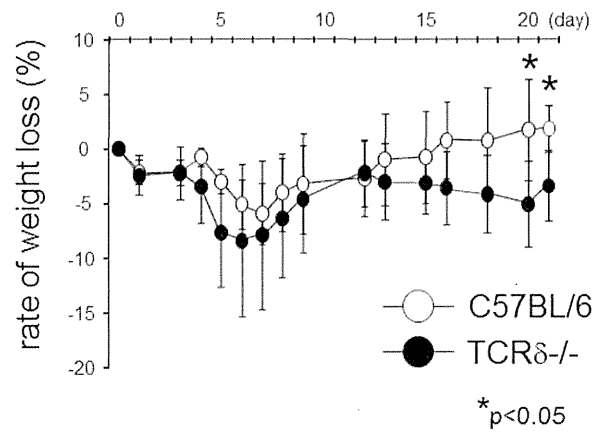


図 1: プレオマイシン投与後の経時的な体重減少率の測定

野生型(n=4)および $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウス(n=6)にプレオマイシン投与後、21 日目までの体重減少率を測定した。

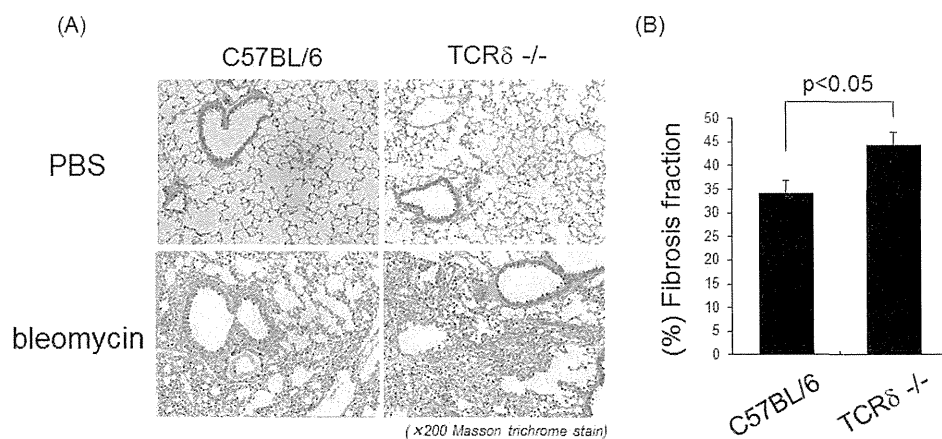


図 2: プレオマイシン投与後の肺組織線維化の評価

野生型(n=3)および $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウス(n=4)に PBS あるいはプレオマイシンを投与し、21 日目の肺組織を採取した。

(A) 採取した肺組織より、パラフィン切片を作成後、Masson's trichrome 染色を行った。

(B) Masson's trichrome 染色後のスライドを使用し、肺組織中の線維化部位の陽性率を算出した。

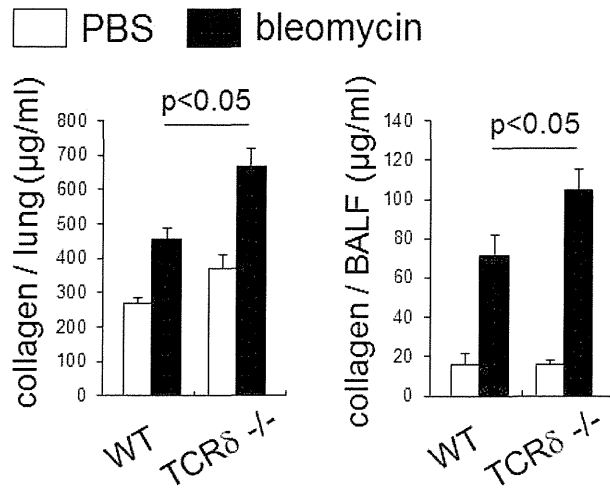


図 3: プレオマイシン投与後の肺組織・BALF 中のコラーゲン産生量の測定
 野生型(n=4)およびγδT 細胞欠損マウス(n=6)に PBS あるいはプレオマイシンを投与した。21 日後の肺組織および BALF を採取し、コラーゲン産生量の測定を行った。

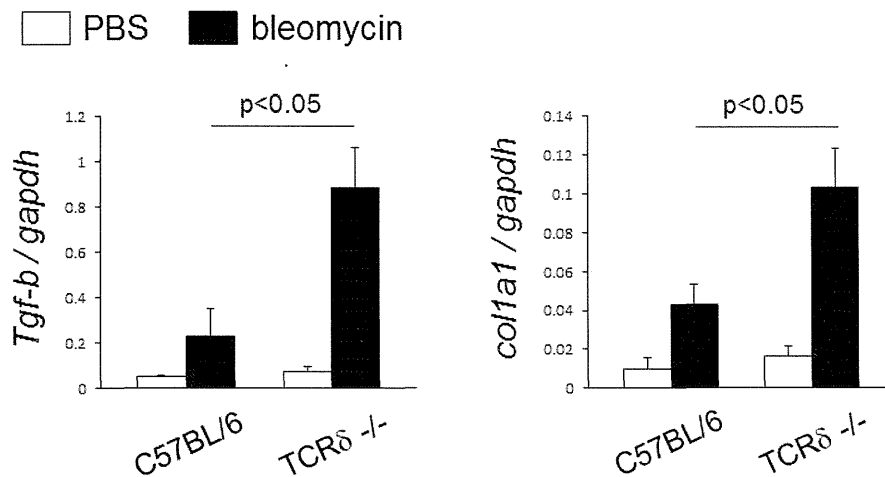


図 4: プレオマイシン投与後の肺組織における線維化関連因子発現解析
 野生型(n=4)およびγδT 細胞欠損マウス(n=6)に PBS あるいはプレオマイシンを投与した。21 日後の肺組織を採取し、Tgf-βおよび col1a1 mRNA 発現量を解析した。

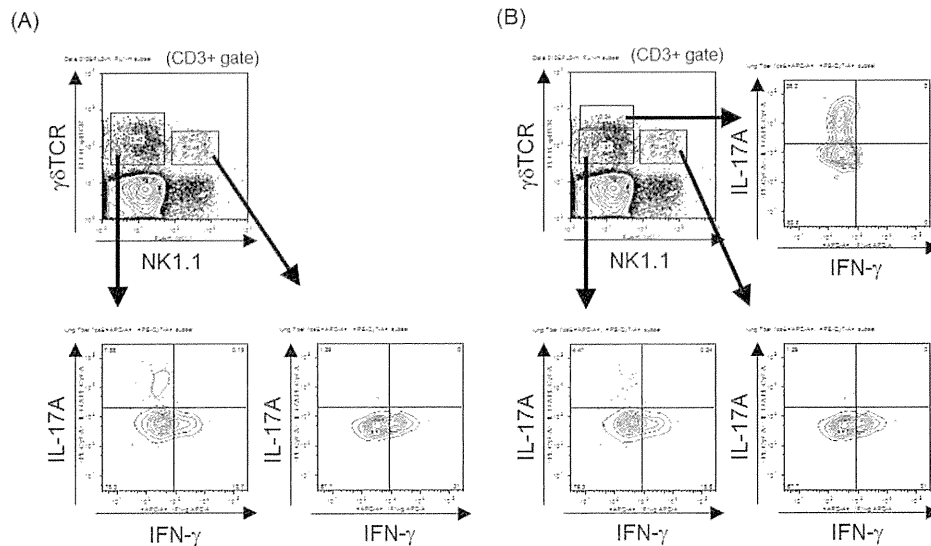


図 5: 肺組織中 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの解析

野生型マウス由来肺組織よりリンパ球を単離した。In vitro において、PMA+ionomycin 刺激を行い、 $\gamma\delta$ T 細胞からの IFN- γ 、IL-17A 産生を FCM で解析した。

(A) 肺リンパ球中の NK1.1⁻ $\gamma\delta$ T および NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞からの IFN- γ および IL-17A 産生を解析した。

(B) 肺リンパ球中の NK1.1⁻ $\gamma\delta$ TCR^{hi}、NK1.1⁻ $\gamma\delta$ TCR^{lo} および NK1.1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞からの IFN- γ および IL-17A 産生を解析した。

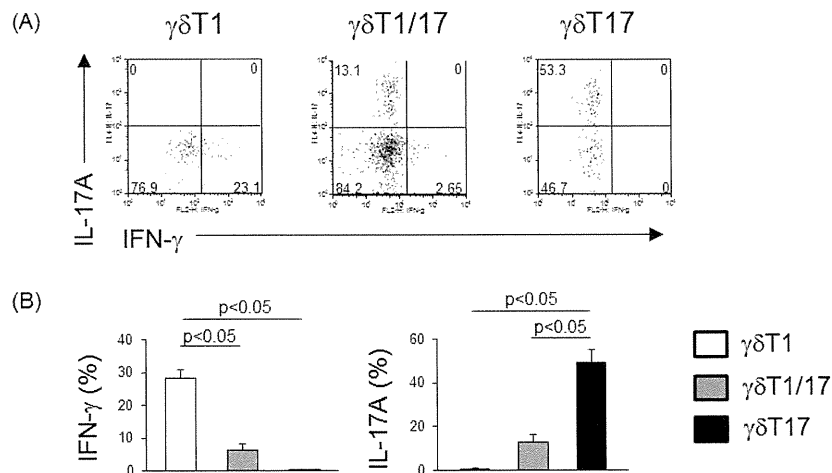


図 6: 肺組織中 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットからのサイトカイン産生解析

(A) (B) 野生型マウス(n=3)より肺組織を採取後、リンパ球を単離した。In vitro において、PMA+ionomycin 刺激を行い、各 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットからの IFN- γ 、IL-17A 産生を FCM で解析した。

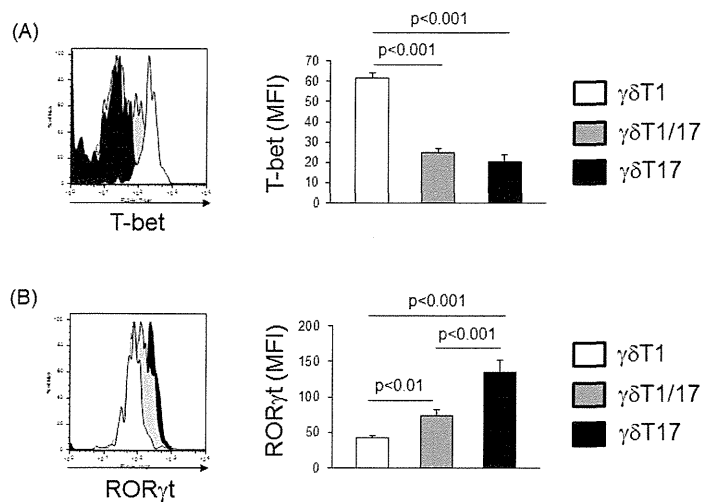


図7: 肺組織中 $\gamma\delta T$ 細胞サブセット転写因子発現解析

(A) (B) 野生型マウス(n=3)より肺組織を採取後、リンパ球を単離した。各 $\gamma\delta T$ 細胞サブセットにおける T-bet および ROR γ t 発現を FCM で解析した。

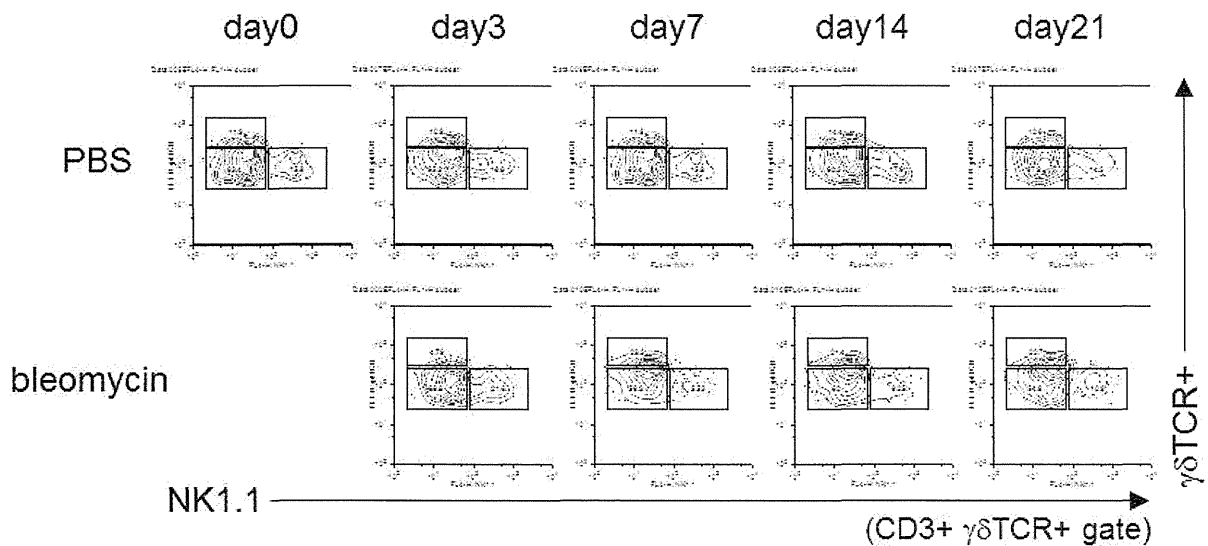


図 8: ブレオマイシン投与後の肺組織中 $\gamma\delta T$ 細胞サブセットの経時的解析

野生型(n=3) に PBS あるいはブレオマイシンを投与した。投与後 0、3、7、14、21 日後の肺組織を採取し、各 $\gamma\delta T$ 細胞サブセットを FCM で検出した。

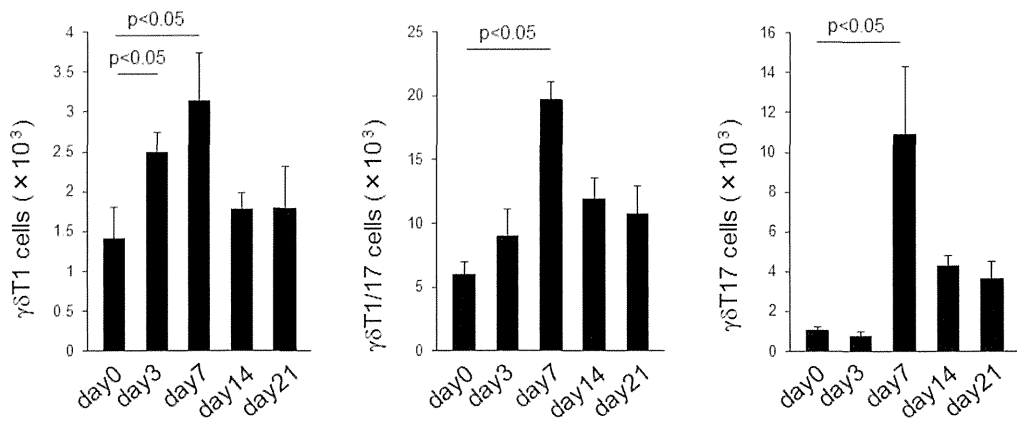


図 9: プレオマイシン投与後の肺組織中 $\gamma\delta T$ 細胞サブセットの経時的解析

野生型(n=3) を用いてプレオマイシン投与後 0、3、7、14、21 日後の肺組織を採取した。各 $\gamma\delta T$ 細胞サブセットを FCM で検出し、細胞数をグラフで示した。

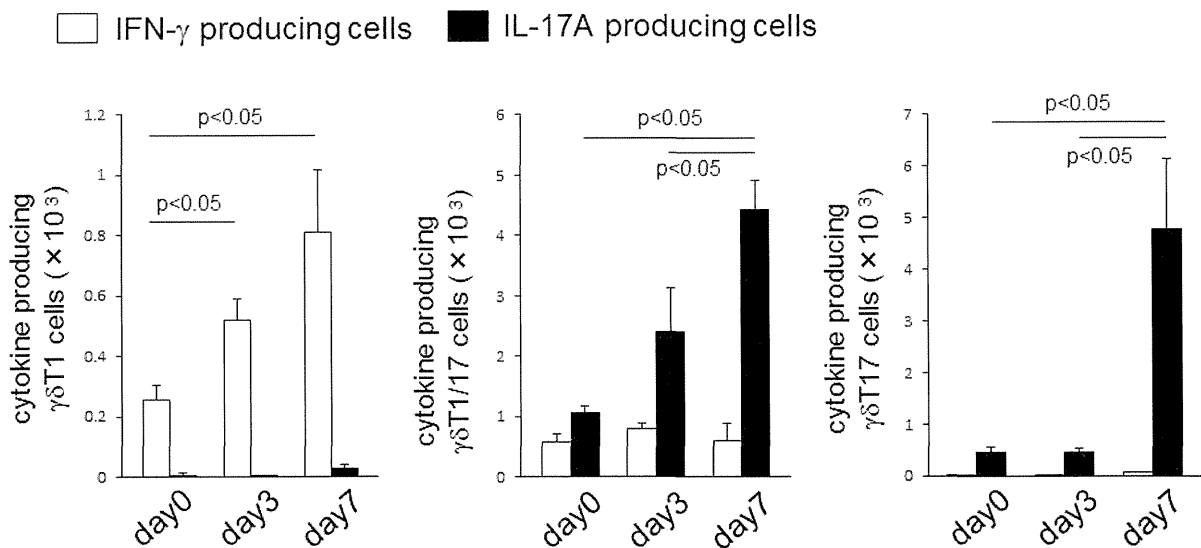


図 10: プレオマイシン投与後の肺組織中 $\gamma\delta T$ 細胞サブセットからのサイトカイン産生の解析

野生型(n=3) を用いてプレオマイシン投与後 0、3、7、14、21 日後の肺組織を採取した。リンパ球を単離後、in vitro において、PMA+ionomycin 刺激を行った。各 $\gamma\delta T$ 細胞サブセットからの IFN- γ 、IL-17A 産生を FCM で解析し、細胞数をグラフで示した。

強皮症の血管病変形成における Pentraxin 3 (PTX3) の役割

担当責任者 桑名 正隆 日本医科大学大学院医学研究科アレルギー-膠原病内科 教授
協力者 白井悠一郎 日本医科大学大学院医学研究科アレルギー-膠原病内科 助教
業務主任者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 教授

研究要旨

Pentraxin 3 (PTX3) は Fibroblast growth factor-2 (FGF2) 抑制等の多様な機能を持つことが知られているが、強皮症 (SSc) 患者組織中での発現亢進が報告されていることから、SSc の病態における PTX3 の意義について追究した。SSc175 例と健常人 19 例を対象に、血中 PTX3 濃度を ELISA 法にて測定したところ、PTX3 濃度は健常人に比べて SSc で増加し、手指潰瘍 (DU)、肺動脈性肺高血圧症を有する例で特に高値であった。また、PTX3 濃度高値は将来の DU 発症の予測に有用であった。さらに、PTX3 濃度は循環血液中の血管内皮前駆細胞 (EPC) 数と逆相関し、PTX3 の添加は *in vitro* でのマウス骨髄細胞の EPC への分化を抑制した。従って、PTX3 は脈管形成抑制を介して血管病変形成に寄与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

強皮症 (SSc) は末梢循環障害と諸臓器の線維化を特徴とする全身性疾患である。様々な液性因子の病態への関与が考えられているが、その病態は未だ不明な点が多い。

Pentraxin 3 (PTX3) は自然免疫におけるパターン認識分子の一つで、炎症局所のマクロファージ、血管内皮細胞、線維芽細胞等で産生される。さらに炎症、細胞外マトリックス蓄積、血管新生因子 Fibroblast growth factor-2 (FGF2) 抑制等の多様な機能も知られている [1, 2]。近年、SSc 患者皮膚組織中の血管内皮細胞や線維芽細胞での PTX3 発現亢進や SSc 患者血管内皮細胞の血管新生障害における PTX3 の関与が報告されているが [3-6]、SSc の病態機序における役割は明らかでない。そこで本研究では、SSc の病態における PTX3 の意義について追究することを目

的とした。

B. 研究方法

1. 対象

2013 年の米国リウマチ学会/欧州リウマチ会議の分類基準 [7] を満たす SSc 患者 171 例 (男性 15 例、女性 156 例)、年齢・性別をマッチさせた健常人 19 例 (男性 4 例、女性 15 例) を対象とした。研究登録時にヘパリン使用下で末梢血を採取し、血漿、血清、単核球に分離した。血漿・血清は使用時まで -80°C で保存し、単核球は血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cells; EPC) の分離に用いた。

2. 臨床評価項目

対象患者の研究登録時から病歴、身体所見、検査所見を取り、2013 年 12 月までの新規手指潰瘍 (DU)、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 発

症を追跡した。臨床情報のうち、年齢、性別、病型、非レイノー症状発症からの罹病期間、レイノー症状発症からの罹病期間、スキンスコア、SSc 関連臓器病変 (DU、間質性肺疾患、PAH、心病変、上部消化管病変、下部消化管病変、腎病変) を収集した。また、治療内容、動脈硬化の危険因子 (高血圧、脂質異常症、糖尿病、喫煙歴) も収集した。

3. SSc 関連自己抗体

間接免疫抗体法や免疫沈降法にて、抗セントロメア抗体、抗 topoisomerase I 抗体、抗 RNA polymerase III 抗体、抗 U1 RNP 抗体、抗 U3 RNP 抗体、抗 U11/U12 RNP 抗体、抗 Th/To 抗体、抗 PM-Scl 抗体、抗 Ku 抗体、抗 RuvBL1/2 抗体の検出を行った [8]。

4. 血中 PTX3、FGF2 濃度測定

血漿 PTX3 濃度と血清 FGF2 濃度を、各検体 2 回ずつ ELISA キットを用いて測定した (Perseus Proteomics 社、R&D Systems 社)。また、一部の解析で、FGF2 シグナルの血管新生抑制・促進活性の指標として FGF2 濃度に対する PTX3 濃度の比 (PTX3/FGF2 比) を使用した。

5. 末梢血中 EPC 数定量

末梢血 1ml 中の CD34⁺CD133⁺CD309⁺細胞数をフローサイトメトリーによって定量化した [9]。

6. EPC コロニー形成アッセイ

マウスの骨髄幹細胞からの EPC 分化を評価する *in vitro* アッセイを用いて PTX3 添加の影響を検討した [10]。10-12 週齢のオス C57BL/6J マウスから骨髄単核球を採取し、Pronectin でコートしたディッシュで 10%FBS を含む DMEM を用いて 24 時間培養した。非付

着細胞を、マウスリコンビナント PTX3 を非添加、添加 (5 または 20nM) 条件下で、2%FBS を含む EGM-2 で 6 日間培養した。その後、付着細胞を MethoCult で 14 日間培養し、血管内皮細胞コロニー形成単位 (CFU-EC) と骨髄系細胞コロニー形成単位 (CFU-GEMM) を計測した。

7. 統計学的解析

連続変数の 2 群間の比較には Wilcoxon test または Mann-Whitney U test を用いた。名義変数の 2 群間の比較には Fisher 正確確率検定またはカイ二乗検定を用いた。相関解析には Pearson's regression model を用いた。DU と PAH と関連する因子の解析にはロジスティック回帰分析を行った。将来の DU の新規発症との関連する因子の解析には Cox 比例ハザードモデルを用いた。2 群を識別する至適カットオフ値の設定には ROC 解析を用いた。生存解析には Kaplan-Meier 法を用い、2 群間の検定には log rank test を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では臨床検体を使用することから、ヘルシンキ宣言に則り、学内の倫理委員会での承認を得ている。検体採取に当たってはインフォームドコンセントの上で文書による同意を得た。

C. 研究結果

1. SSc 患者の血中 PTX3・FGF2 濃度

本研究の対象である SSc 患者 171 例の背景因子を表 1 に示す。この SSc 患者と年齢・性別をマッチさせた健常人 19 例の血漿 PTX3 濃度および血清 FGF2 濃度を測定したところ、