

## 論文の内容の要旨

論文題目 エラスターゼ誘導マウス肺気腫モデルにおける樹状細胞と T 細胞の機能についての検討

指導教員：山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

原田 広顕

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は非可逆性の気流制限を特徴とする慢性進行性の肺疾患である。COPD の治療戦略は安定期と急性増悪期に分けて考えられるが、現在、安定期に行われている薬物療法は気管拡張薬が中心で、その他の薬物療法を含めて、症状の軽減、合併症の予防が達成目標であり、本症の進行抑制、病態の正常化を目標とした治療法の確立が求められている。この上で COPD の病態を理解することは必要不可欠である。

COPD はタバコをはじめとする有害な粒子やガスの吸入が引き金となり、肺の炎症が強く起こった結果成立する疾患であるとされている。炎症細胞として気道壁および肺胞領域にマクロファージ、好中球、T 細胞および B 細胞の集積が認められているが、マクロファージ、

好中球と共に T 細胞の CD8 陽性分画が病態形成の中心にあるとされている。CD8 陽性 T 細胞はサイトカインを産生することが明らかになり、COPD においてもサイトカイン産生について検討がなされてきたが、報告間の相違が大きい。また、CD8 陽性 T 細胞の主要な機能として細胞傷害能が挙げられ、主にアポトーシスを誘導することにより細胞傷害性を発揮する。肺気腫とアポトーシスの関連については、幾つかその重要性を示唆した報告がなされてきており、肺気腫のアポトーシスの誘導に CD8 陽性 T 細胞が何らかの役割を果たしている可能性も考えられる。

一方で、T 細胞の活性化には、通常抗原提示細胞 (Antigen Presenting Cell ; APC) の補助が必要とされる。APC の中でも樹状細胞 (Dendritic cell ; DC) は最も強力な APC であり、DC に獲得免疫応答を制御する能力があり、COPD においても DC が病態形成に重要な役割を担っている可能性が考えられるが、COPD に関して DC の役割を検討した研究は少数であり、結論も一致していない。

エラスターゼ誘導肺気腫モデルは長きに渡って研究に用いられてきた肺気腫の動物モデルである。このモデルを用いた樹状細胞・リンパ球の機能についての報告はなく、COPD における DC、T 細胞の機能についての検討はまだ十分ではない。本研究では、エラスターゼ誘導肺気腫モデルを用いて、気腫形成過程にある肺における 1) 樹状細胞の T 細胞刺激能とサイトカイン産生、および 2) T 細胞のサイトカイン産生を解析し、肺気腫の形成における樹状細胞と T 細胞の役割について検討を行った。また、肺気腫形成過程における肺の構成細胞のアポトーシスの有無についても検討した。

まず PPE 投与後 day 2、7、14 における BALF の細胞数、分画を検討した (図 1)。BALF の総細胞数は day 2 から day 7 まで有意な増加を示し、分画では day 2 において好中球の有意な増加、day 7 においてマクロファージとリンパ球の有意な増加を認めた。day 14 におい

ても、総細胞数、マクロファージは有意ではなかったものの増加傾向を認めた（総細胞数； $p = 0.058$ 、マクロファージ； $p = 0.055$ ）。

次に肺気腫の形成の評価のため、PPE 投与前と投与後 day 2、7、14 の群に対して、組織学的な評価として平均肺胞壁間距離（Lm）の算出、生理学的な評価として一定の圧の下での肺の容積の測定を行った。PPE 投与により確かに肺気腫は形成されていた（図 2A）。Lm の増加は day 7 以降で有意となり、肺胞腔の拡大が徐々に進行していることを示唆したが（図 2B）、肺容量は day 7 までは変化なく、day 14 でのみ有意な増加を認めた（図 2C）。day 7 までには気腫は形成されているものの、炎症細胞が肺に浸潤した結果肺の拡張が阻害されたことが、この 2 つの評価の違いの原因である可能性として考えられた。

肺気腫形成早期の DC の機能の解析として、同種異型の CD4 陽性 T 細胞に対する増殖刺激（Allogeneic MLR）の評価とサイトカイン産生を測定した。生理食塩水を投与したマウスの肺から分離した DC を対照とし、PPE 投与後 2 日目の肺から分離した DC を評価した。Allogeneic MLR では、気腫肺から分離した DC と T 細胞の共培養で、T 細胞の増殖がより亢進していた（図 3）。さらに、気腫肺から分離された DC では LPS または poly (I:C) いずれの刺激でも IL-10 の産生が亢進していた（図 4）。

次に、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞をそれぞれ PPE 投与後 day 5 の肺から分離し、産生されるサイトカインの濃度を測定した。生理食塩水を投与したマウスの肺から T 細胞を分離して対照群とした。CD4 陽性 T 細胞に関しては、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17 の産生亢進を認めた（図 5）。CD8 陽性 T 細胞に関しては、IFN- $\gamma$  の産生亢進を認め、また IL-17、TNF- $\alpha$  は抗 CD3e 抗体による刺激で有意に産生が亢進していた（図 6）。

最後に、エラスターゼ投与後の肺の構成細胞にアポトーシスが誘導されるかを確認するために、肺の組織切片内のアポトーシス細胞を TUNEL 法で検出した（図 7）。PPE 投与前の肺組織ではアポトーシスは所々に認めるのみであったが、PPE 投与後 day 2、day 7 の検体

では気道上皮、肺胞壁ともに多くの陽性細胞を認めた。

本研究により、PPE 投与によって肺に好中球を主体とする炎症が惹起され、肺気腫の形成が進行する過程で肺 DC の T 細胞に対する増殖刺激の亢進と IL-10 の産生が亢進していることが示された。また肺の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産生が亢進し、CD8 陽性 T 細胞は IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17 を産生することが示された。また、エラスターゼの気管内投与による肺気腫形成過程で肺の構成細胞がアポトーシスを起こすことも示された。

本研究は、気腫形成過程の肺 DC で、IL-10 の産生が亢進していることを初めて示した。T 細胞に対する増殖刺激の亢進も含め、肺気腫の形成過程では DC が活性化していると考えられた。本研究のモデルで DC が活性化する機構としては、内因性の因子（炎症性のサイトカイン、ケモカインや、炎症に伴い破壊された組織から生じる熱ショックタンパク、細胞外基質の分解産物など）に DC が反応したことが想定されるが、一方で、近年マウス、ヒトの DC にはプロテアーゼ活性化受容体（protease-activated receptors: PARs）が発現していることが示されており、エラスターゼが PARs の活性化を通じて直接 DC を活性化している可能性も否定できない。エラスターゼは COPD の病態において中心的な分子であるので、DC を通じて肺気腫の病態に与える影響についてさらなる検討が必要であると思われる。

また、エラスターゼ誘導肺気腫の気腫形成過程においては、CD4 陽性 T 細胞が活性化されていること、CD8 陽性 T 細胞では IFN- $\gamma$ 、IL-17、TNF- $\alpha$  の産生が亢進していることが明らかになった。すなわち、CD4 陽性 T 細胞は Th1/2/17 のいずれか特定の集団に偏ってはいないこと、CD8 陽性 T 細胞は主に Tc1 細胞であるが、IL-17 を産生する CD8 陽性 T 細胞が一部含まれていることが推測された。CD8 陽性 T 細胞に関して、過去には Tc1 型が増加していたとする報告と Tc2 型が増加していたとする報告がある。本研究を含めた複数の報告にみられる違いは、動物とヒトの違い、検体採取の方法や対象患者の重症度の違いなどが考えられ

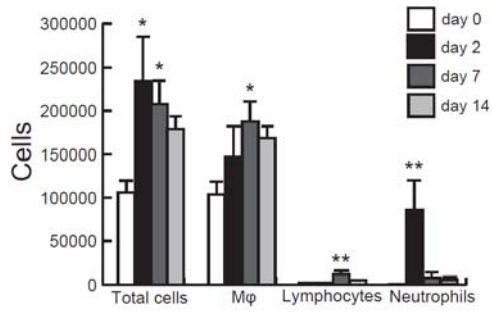
る。

本研究では CD8 陽性 T 細胞の細胞傷害性については解析していないが、肺の構成細胞にアポトーシスを認めた。これについては活性化された CD8 陽性細胞が肺の構成細胞に対してアポトーシスを誘導している可能性も考えられる。肺気腫に由来する CD8 陽性 T 細胞が肺の構成細胞に細胞傷害性を示した報告はこれまでになく、これに関してはさらなる検討が必要である。

また、本研究で認められた T 細胞による IFN- $\gamma$ 、IL-17 の産生亢進も、マクロファージや好中球の集積や活性化などを通じて、気腫形成過程に関与している可能性がある。COPD では好中球性炎症もみられるため、病態への IL-17 の関与が考えられるが、COPD と IL-17 との関連を示した報告は少なく、本研究で気腫形成過程の肺の T 細胞からの IL-17 産生を示したことは、COPD と IL-17 との関連を示唆するものとして貴重な結果と考えられる。これについても今後検討をしていく予定である。

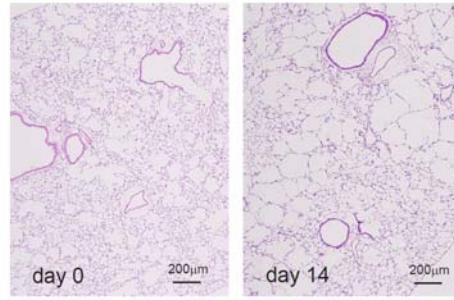
本研究では、PPE の気管内投与による肺気腫形成過程において、DC と T 細胞の機能が亢進していることを示した。よって、これらの細胞の機能を修飾することは COPD の治療となる可能性があるが、同時にこれらは感染防御にも重要な役割を担っている。従って、感染防御機構への影響を最小限にしつつ効果的な治療効果を得るために、さらに詳細な病態解析が必要である。今日、COPD の病態についてはまだ不明な点が多く、なお一層の研究の進展が望まれる。

☒ 1

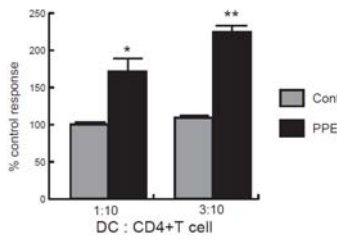


☒ 2

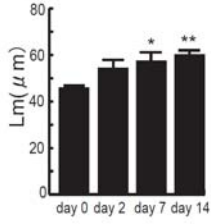
A



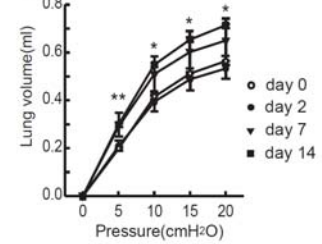
☒ 3



B



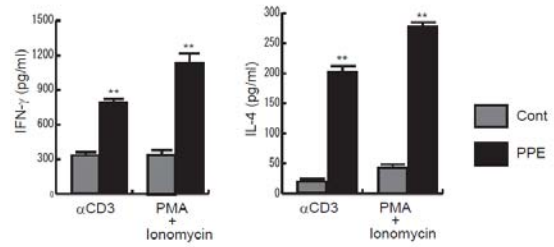
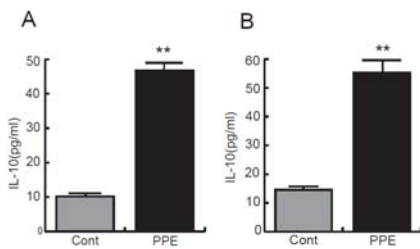
C



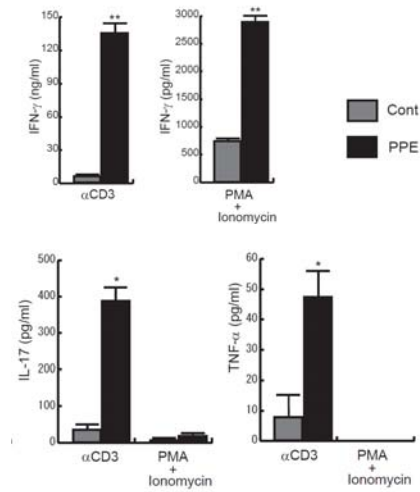
☒ 5

☒ 4

LPS poly(I:C)



☒ 6



☒ 7

