

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

原 田 広 顕

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

目次

	頁
緒言	1
方法	6
結果	11
考察	22
結語	31
参考文献	32
謝辞	43

緒言

慢性閉塞性肺疾患（Chronic obstructive pulmonary disease ; 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。成人における COPD の罹患率、死亡率は世界でも高く[1]、なお増加し続ける結果、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[2]。本邦においても COPD の死亡率は増加しており、COPD の疫学調査である NICE study によると、40 歳以上の日本人では COPD の罹患率は少なく見積もっても約 8.6%にのぼるとのデータが得られた[3]。従って本疾患に対する治療戦略の確立は極めて重要である。

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。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、合併症の予防を目標としており、本症の特徴である進行性の肺機能低下を抑制するとされる治療法は未だないのが現状である[1、4]。COPD の誘引となる危険因子の回避（すなわち禁煙など）が有効でありまず第一に行われるべき治療であるが[1]、禁煙を徹底しても本症の呼吸機能障害が改善するには至らず[1、5]、また現実には依存性等の問題で禁煙がなかなか達成されないケースや、非喫煙者で COPD を発症するケース[3]も存在する。従って現在行われている治療で十分に満足できる成果は得られておらず、本症の進行抑制、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。この上で、COPD の病態を理解することは必要不可欠であると考えられる。

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、一部

の人で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[1]。COPD患者でみられる肺の炎症についてはこれまで数多くの報告がなされてきた。報告間で多少の違いはあるものの、炎症細胞として気道壁および肺胞領域に主にマクロファージ[6、7]、好中球[6]、T細胞[6-8]およびB細胞[7]の集積が指摘されてきたが、マクロファージとT細胞のCD8陽性分画は、集積した細胞数と気流制限の程度に正の相関関係があることが示されており[8、9]、特に注目されている。このことはもう一つの主要な気道閉塞性疾患である気管支喘息においては好酸球とCD4陽性T細胞が病態形成の中心にあることと対照的である。さらに、COPDの重症度とリンパ濾胞の増加との関連も指摘されている[7]。これは重症患者に多い不顕性を含む感染症に対する免疫応答であると考えられることもできるが、獲得免疫応答がCOPDの進行に積極的に関わっている証左であるとする見方もある[10-12]。

CD4陽性ヘルパーT細胞は、産生するサイトカインのパターンによってTh1、Th2、Th17等に分類され、それぞれが炎症病態の形成に異なった役割を担っている[13、14]。同様にCD8陽性T細胞もサイトカインを産生することが明らかになり、Tc1、Tc2といった産生パターンによる分類がなされている[13、15、16]。この分類と実際に引き起こされる免疫応答との関連は明らかになってはいないが、COPDにおいても、CD8陽性T細胞の重要性から、そのサイトカイン産生について検討がなされてきた。COPD患者の手術肺から得られたCD8陽性T細胞でIFN- γ の産生増加を認めたという報告[17、18]がある一方、気管支肺胞洗浄(BAL)から得られたCD8陽性T細胞ではIL-4、13などのTh2サイトカインの産生細胞が増加しているとの報告[19、20]があり、また喫煙の有無・既往で分類した中での一部のCOPD患者においてTNF- α 、IFN- γ の産生細胞が増加していたとの報告[21]も

あるなど、CD8 陽性 T 細胞の産生するサイトカインについては報告間の相違が大きい。これは対象症例の重症度の違いや検体の採取部位・方法の違いなど幾つかの条件の違いによることが考えられる。一方で、臨床症例の検体は肺全体に対してごく一部の細胞を採取したものであるため、必ずしも肺全体の病態が十分に反映されていない可能性も考えられる。

肺気腫におけるアポトーシスの持つ役割が近年注目されてきている。これまでに、エラスターゼ誘導肺気腫モデル及び COPD 患者において肺胞隔壁の細胞のアポトーシスが増加しているとする報告や [22-24]、肺胞隔壁の細胞にアポトーシスを誘導することで顕著な炎症所見を伴うことなく肺気腫が形成されたという報告がある[25]。一方、CD8 陽性 T 細胞の主要な機能の一つに細胞傷害能があり、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とされている。そこで CD8 陽性 T 細胞が肺気腫のアポトーシスに何らかの役割を果たしている可能性も考えられる。これまでの報告で、喫煙者の COPD 患者において肺胞隔壁のアポトーシスと CD8 陽性 T 細胞の数との並行した増加[26]、重症 COPD 患者において血中の可溶性 Fas リガンドの濃度の上昇[27]、喀痰中の CD8 陽性細胞のパーフォリンの発現の上昇[28]、2 型肺胞上皮細胞のグランザイム A の発現の上昇[29]が示されてきた。しかしながら、CD8 陽性 T 細胞が肺胞隔壁の細胞に対してアポトーシスを促すことで肺気腫を誘導することを証明した報告はない。

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 は抗原を認識・獲得した後ペプチドに分解して T 細胞に提示する[30]。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ることについては、これま

で繰り返し強調されてきた[31、32]。抗原を獲得した DC は成熟しながら 2 次リンパ組織に移動し、そこでナイーブ T 細胞と相互作用し活性化刺激を与えられている一方[33]、肺を含む末梢組織においても DC は T 細胞の刺激に重要な役割を担っているとする報告もある[33、34]。従って 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、気管支喘息、肺癌、移植肺の拒絶などと比較すると、COPD に関して DC の役割を検討した研究は少数であり[35]、またその結論も一致していないのが現状である。COPD 患者における肺組織中の DC の数については、健常喫煙者と比較して増加しているとの報告[36]と同等である[37]との報告がある。DC の機能の検討については動物モデルに限られるものの、喫煙マウスの肺の DC で MHC クラス II と共刺激分子の発現が増加していたとの報告と[38]、反対に喫煙マウスの縦隔リンパ節の DC でこれらの発現が低下していたとの報告がある[39]。この相違についても条件の違いによると思われるが、今のところこの問題に関して十分な意見の一致はみえていない。

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。エラスターゼによる肺気腫の誘導には、酵素活性による直接の肺構造の破壊だけでなく、炎症による機序も関与していることは過去の報告において示唆されている[40]。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、更にその他の肺気腫モデルおよび COPD 患者の検討を含めても、樹状細胞のサイトカイン産生を検討した報告はこれまでにない。以上の背景に立脚して、本研究において私は、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) CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 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。

方法

エラストアーゼ肺気腫モデル

雄 C57BL/6J マウスと雄 Balb/c マウスを日本チャールズ・リバー（株）から購入し、7～13 週齢のマウスを使用した。C57BL/6J マウスに豚膵エラストアーゼ（porcine pancreatic peptide ; PPE）（Elastin Products Co., Inc, Missouri , USA）30 μ g を気管内投与し肺気腫を誘導した。PPE の気管内投与前と投与 2、7、14 日後（day 0、2、7、14）のマウスに対し気管支肺胞洗浄（bronchoalveolar lavage ; BAL）と肺気腫の形成の評価を行った。肺 DC の解析は day 2、肺 T 細胞の解析は day 5 に行い、生理食塩水の気管内投与群を対照群として用いた。本研究は東京大学の動物実験倫理規定を遵守して行われた。

生理学的評価法

大動脈切断によりマウスを脱血死させた後、気管切開を置き 22 ゲージカテーテルを挿入し糸で固定、これに 1 ml シリンジと圧トランスデューサー（Baxco Research Systems Japan, Osaka, Japan）を接続した。肺の拡張・収縮はシリンジの手動によって行い、圧が 0 cm 水柱のときの肺容量を 0 とした。肺を 25 cm 水柱まで拡張させた後、5 cm 水柱ずつ圧を下げ、その時の肺容量を 10 μ L 単位で記録することで圧・容量関係を得た。測定は最低 2 回行い、各容量はその平均値として記録した。

気管支肺胞洗浄液 (BALF) 分析

総細胞数と細胞分画の算定は過去の報告と同様の方法で行った[41]。肺を 0.5 ml の生理食塩水で 4 回洗浄することで BALF を回収した。BALF の細胞成分を 300G、10 分間の遠心で分離し、1%牛胎児アルブミン (Bovine serum albumin ; BSA) を含む生理食塩水 1 ml で懸濁させた。この懸濁液から総細胞数の算定を行い、またサイトスピンを作製し分画比率の算定を行った。

組織学的評価法

肺を 10%ホルマリン溶液で一定の圧でゆっくり拡張させ、24 時間以上固定した後パラフィンに包埋した。切片を厚さ 4 μm 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、各視野ごとに一辺 400 μm の十字を置いて、その各辺と肺胞壁との交点の数から平均肺胞壁間距離 (Lm) を算出し、肺胞腔の拡張の評価とした[38、42]。

肺 DC および脾 CD4 陽性 T 細胞の分離

以下の方法で DC を分離した。すなわち、肺を剪刀で細かく刻み、0.033%コラゲナーゼ (Sigma -Aldrich, St. Louis, USA) 含有 complete DMEM 溶液で 37°C、30 分間処置した後、肺組織をすりつぶし、径 70 μm のナイロンフィルターに通した。さらに赤血球を溶血させ 2 回洗浄することで肺の細胞懸濁液を得た。これに対し MACS CD11c マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,

Germany) で CD11c 陽性細胞を標識し、LS カラム (Miltenyi Biotec) を用いて陽性分画を磁氣的に選択することで肺の DC を得た。

脾臓からの CD4 陽性 T 細胞の分離には、まず脾臓を 0.1% コラゲナーゼ含有 complete DMEM 溶液で 37°C、15 分処置した後、脾臓をすりつぶし、上記と同様の処置を行った。得られた細胞懸濁液に対し、抗マウス CD4 磁気粒子 (BD Biosciences, San Jose, USA) で標識し、IMagnet (BD Biosciences) を用いて陽性分画を磁氣的に選択することで CD4 陽性 T 細胞を得た。

肺 CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の分離

肺の細胞懸濁液は前項の記載と同様に行い、引き続き MACS Dead Cell Removal Kit (Miltenyi Biotec) を製造元のプロトコールに従い使用し、死細胞を除去した。CD4 陽性 T 細胞の分離は MACS CD4+T 細胞単離キット (Miltenyi Biotec) を使用し、製造元のプロトコールに従い行った。CD8 陽性 T 細胞は、まずビオチン結合抗マウス CD8 抗体 (BD Biosciences) で標識し、抗ビオチンマイクログロビーズ (Miltenyi Biotec) を結合させて、LS カラムで陽性分画を磁氣的に選択することで得られた。

肺 DC による T 細胞の増殖刺激の評価

肺 DC による同種異型 T 細胞に対する増殖刺激の評価 (同種異系リンパ球混合反応 ; allogeneic mixed lymphocyte reaction) のため、C57BL/6J (H-2^b) マウス由来の肺 CD11c 細胞と Balb/c (H-2^d) マウス由来の脾 CD4 陽性 T 細胞とを共培

養し、T 細胞の増殖を測定した。細胞数は肺 CD11c 細胞が 2×10^4 個または 6×10^4 個とし、CD4 陽性 T 細胞は 2×10^5 個として、細胞の比率が 1 : 10 または 3 : 10 となるようにした。96 穴の平底プレートにて 2 日間培養し、細胞増殖を BrdU の取り込み (cell proliferation ELISA, BrdU ; Roche, Basel, Switzerland) によって測定した。

細胞によるサイトカイン産生の評価

肺 DC によるサイトカイン産生の評価には、 1×10^5 個の肺 DC を $1 \mu\text{g/ml}$ の LPS (Sigma-Aldrich) または $50 \mu\text{g/ml}$ のポリイノシン酸 - ポリシチジル酸 (poly (I:C) ; Sigma-Aldrich) 投与下にて 2 日間培養し、培養上清の IL-10、IL-12p70 濃度を ELISA にて (mouse IL-10 ELISA set、mouse IL-12p70 ELISA set ; BD Biosciences) 測定した。

肺 CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産生の評価には、それぞれ 6×10^4 、 8×10^4 個の T 細胞をプレート固着の抗 CD3e 抗体 (BD-Biosciences) による刺激で 2 日間培養、もしくは PMA (1 ng/ml ; Sigma-Aldrich) とイオノマイシン ($1 \mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich) を添加した培地で 24 時間培養し、培養上清のサイトカインを ELISA にて測定した。CD4 陽性 T 細胞については IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-17 を、CD8 陽性 T 細胞については IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-17 を測定した。IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 の測定には BD Biosciences 社のマウス用の ELISA キットを使用した。IL-17 についても同じく ELISA 法にて過去の報告と同様の方法で行った[43]。補足抗体、検出抗体にはそれぞれ抗マウス IL-17 抗体

(BD-Biosciences)、ビオチン結合抗マウス IL-17 抗体 (BD-Biosciences) を使用し、酵素としてストレプトアビジン結合セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) (BD-Biosciences) を検出抗体に結合させることによって測定を行った。

肺組織切片のアポトーシス細胞の検出

組織内切片のアポトーシス細胞の検出には、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) により断片化した DNA 末端を dUTP で標識する方法 (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling ; TUNEL) で行った。In situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa, Kyoto, Japan) を使用し、製造元のプロトコールに従い、パラフィン包埋した組織から 4 μ m で切り出した切片をフルオロセイン-dUTP で標識し、HRP 結合抗フルオロセイン抗体により検出し、3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) を基質として発色させた。

統計学的分析

全ての数値データは平均値 \pm 標準誤差で表記した。2 群間の比較にはスチューデントの t 検定を行った。3 群以上の比較にはまずクラスカル・ウォリスの検定で群間に有意な差があるかを検討し、有意差を認めた場合事後比較としてシェッフェの検定を行った。p < 0.05 を有意と判定した。

結果

PPE 投与による肺の炎症と気腫形成の評価

まずエラストラーゼ誘導肺気腫のモデルで肺に炎症が惹起されるか確認するために、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量の測定を行った。PPE 投与により確かに肺気腫は形成されていた (図 2A)。Lm は day 7 以降に有意な増加を認め、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。以上から PPE の気管内投与により、早期から肺気腫が形成されることが示された。

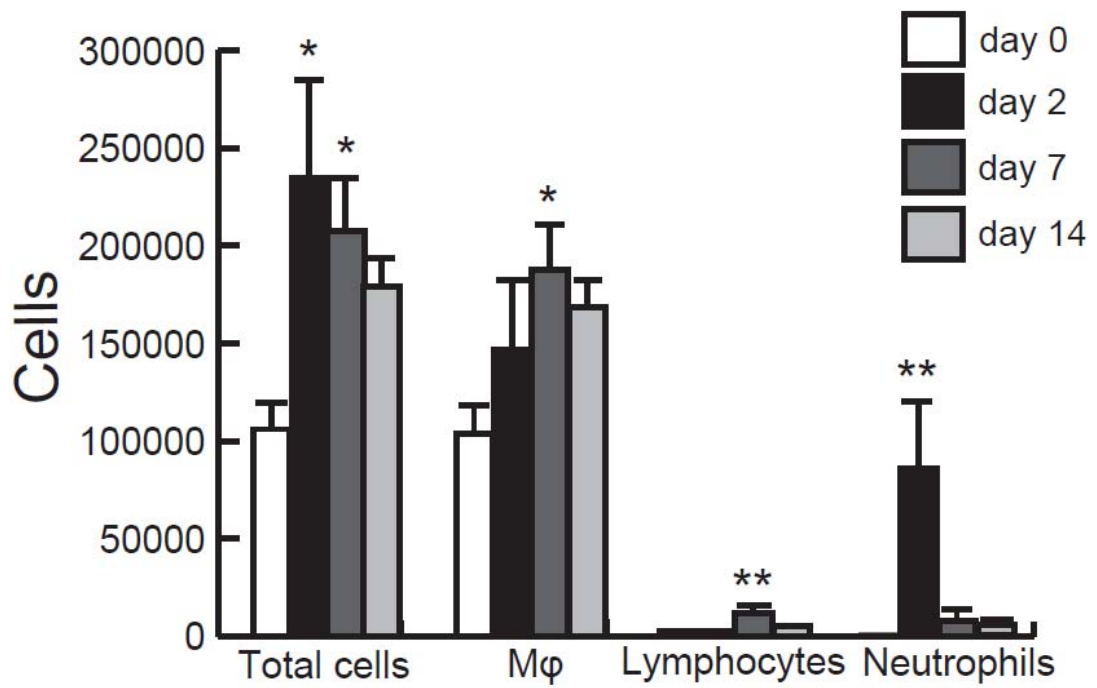


図1 対照群 (day 0) と PPE 投与群 (day 2、7、14) の BALF の総細胞数と分画
 画 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (day 0 との比較)

A

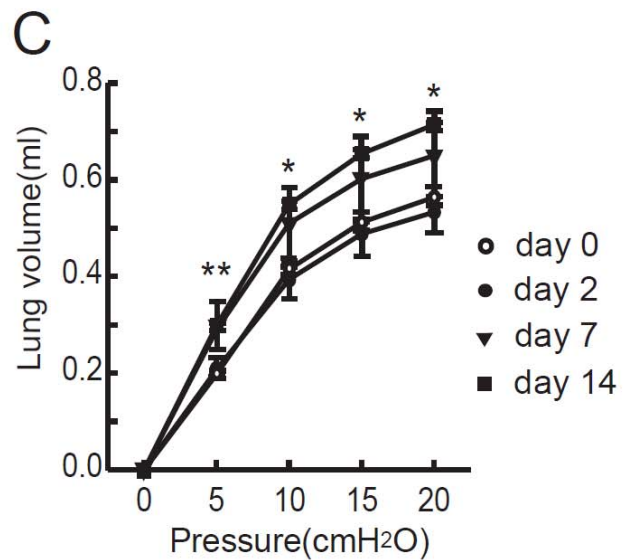
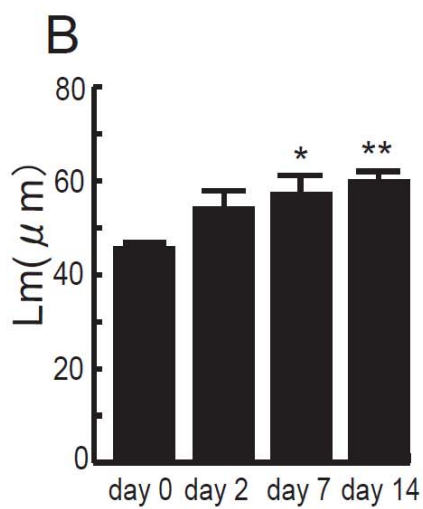
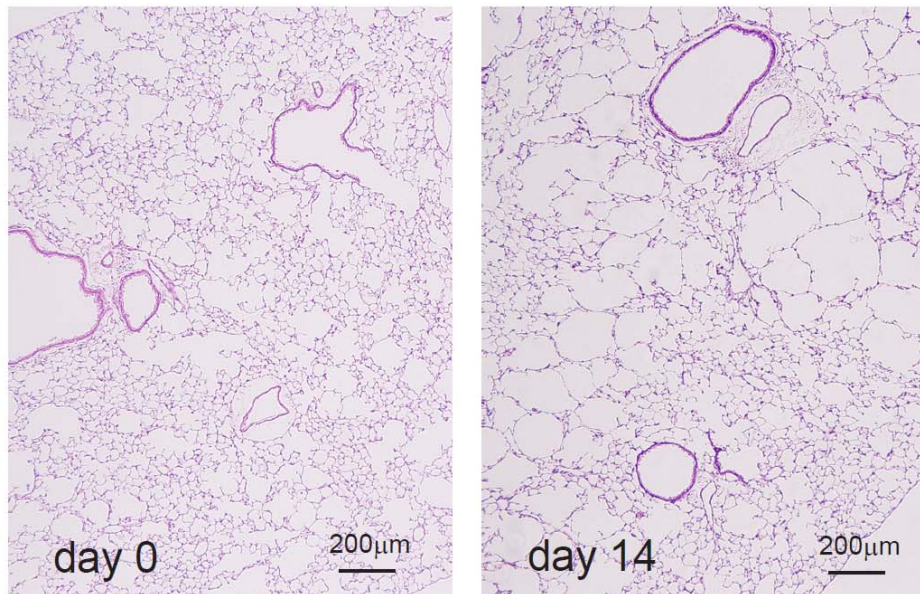


図 2 PPE 誘導肺気腫の組織学的・生理学的評価

(A) 対照群 (day 0) と PPE 投与群 (day14) の代表的な病理所見。4 μm の切片をヘマトキシリン - エオジンで染色した。(B) 対照群と PPE 投与群の平均肺胞壁間距離。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (day 0 との比較) (C) 対照群と PPE 投与群の圧 - 容量関係。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (day 0 対 day 14)

エラスターゼ誘導肺気腫における DC の機能の評価

肺気腫形成早期の DC の機能の解析として、同種異系の 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の測定を行った。サイトカインの産生に関して、刺激として培地中に LPS (TLR4 リガンド) あるいは poly (I:C) (TLR3 リガンド) を添加した。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)。IL-12p70 はいずれの刺激でも検出感度以下のことが多く、両群間で有意な差は認めなかった (data not shown)。

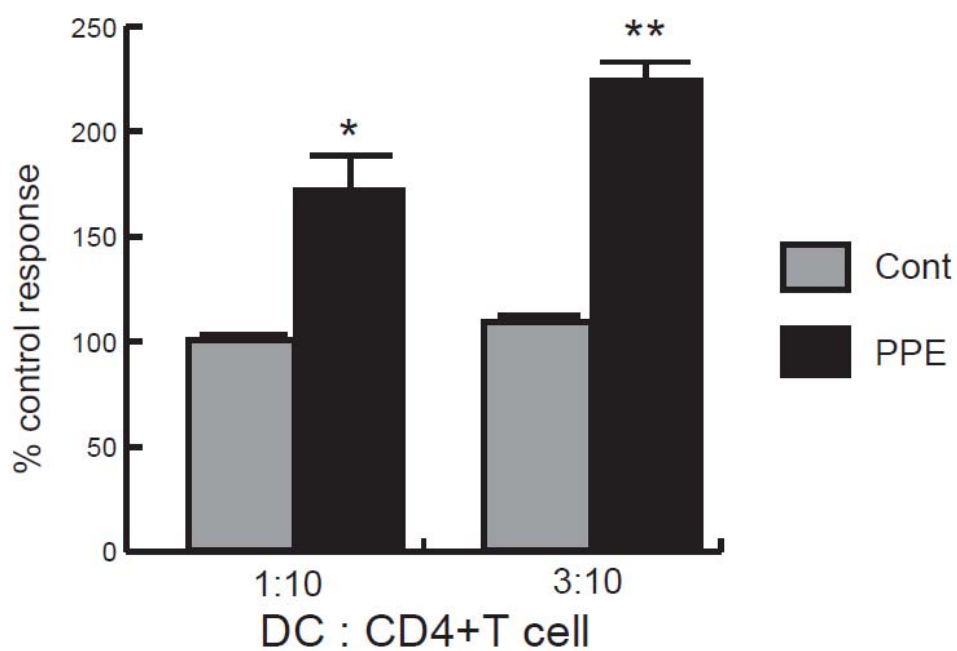


図3 DCによる同種異型T細胞の増殖反応

DCは対照群またはPPE投与群のday2の肺(C57BL/6J由来:H-2^b)から分離し、脾CD4陽性T細胞(Balb/c由来:H-2^d)と上記の比率で2日間共培養し、T細胞の増殖をBrdUの取り込みによって評価した。* p < 0.05、** p < 0.01 (いずれも対照群との比較)

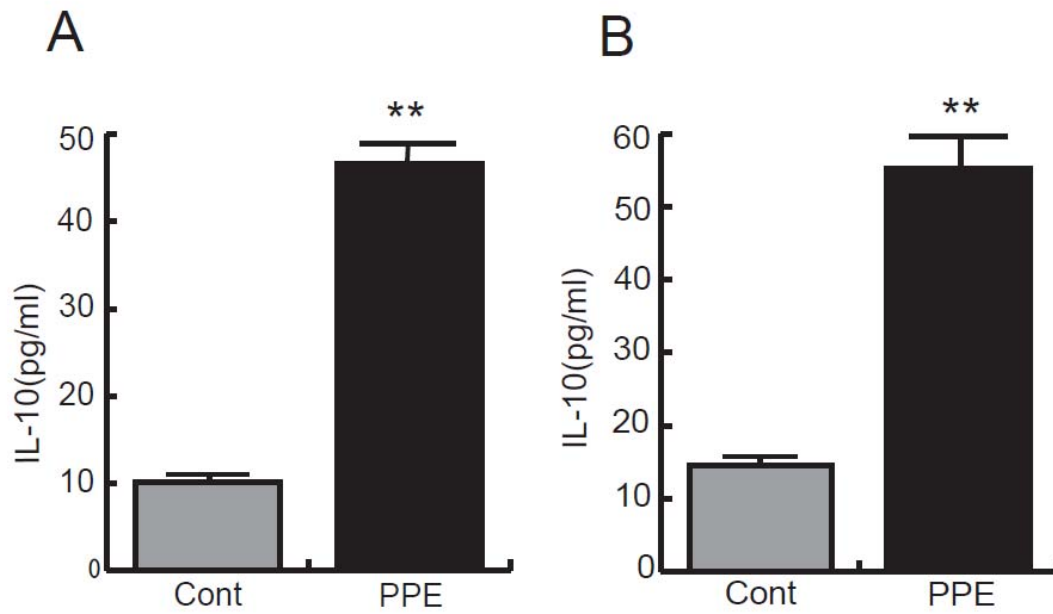


図4 肺 DC のサイトカイン産生

DC を対照群または PPE 投与群の day 2 の肺から分離し、LPS (A) または poly (I:C) (B) の投与下で 2 日間培養し、産生された IL-10 の濃度を測定した。 ** $p < 0.01$ (対照群との比較)

エラストラーゼ誘導肺気腫における T 細胞のサイトカイン産生

次に、肺気腫形成過程の T 細胞の機能の評価のために、まずサイトカインの産生を評価した。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も 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- γ 、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- γ の産生亢進を認めたが、IL-4、IL-10 は検出感度以下が多く有意差は認めなかった。また IL-17、TNF- α は PMA とイオノマイシンによる刺激では差がなかったが、抗 CD3e 抗体による刺激で有意に産生が亢進していた (図 6)。

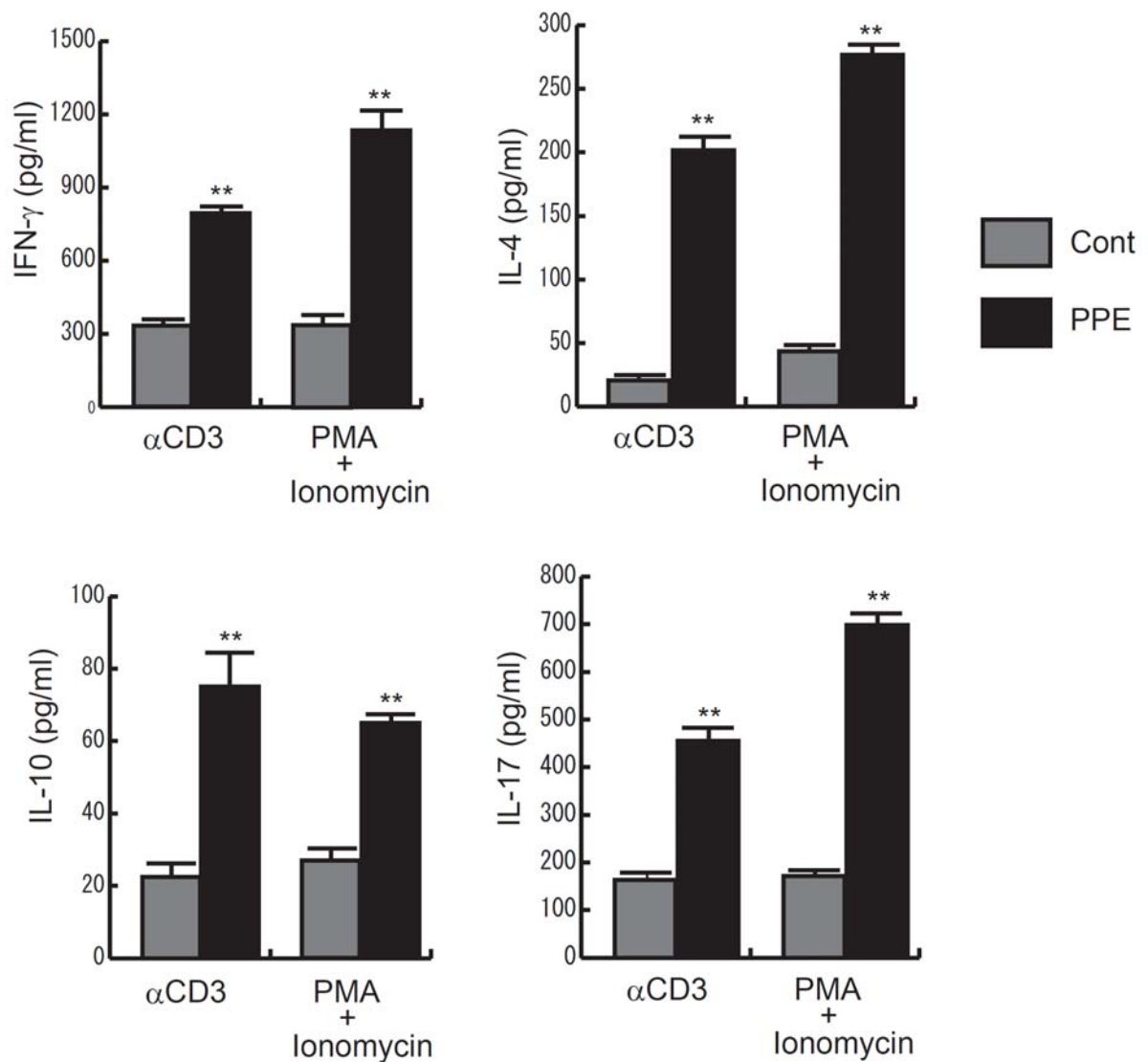


図5 CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生

肺 CD4 陽性 T 細胞を対照群または PPE 投与群の day 5 の肺から分離し、プレート固着の抗 CD3e 抗体による刺激で 2 日間培養、もしくは PMA 1 ng/ml とイオノマイシン (Ionomycin) 1 μg/ml を添加した培地で 24 時間培養し、培養上清のサイトカインを ELISA にて測定した。** p < 0.01 (対照群との比較)

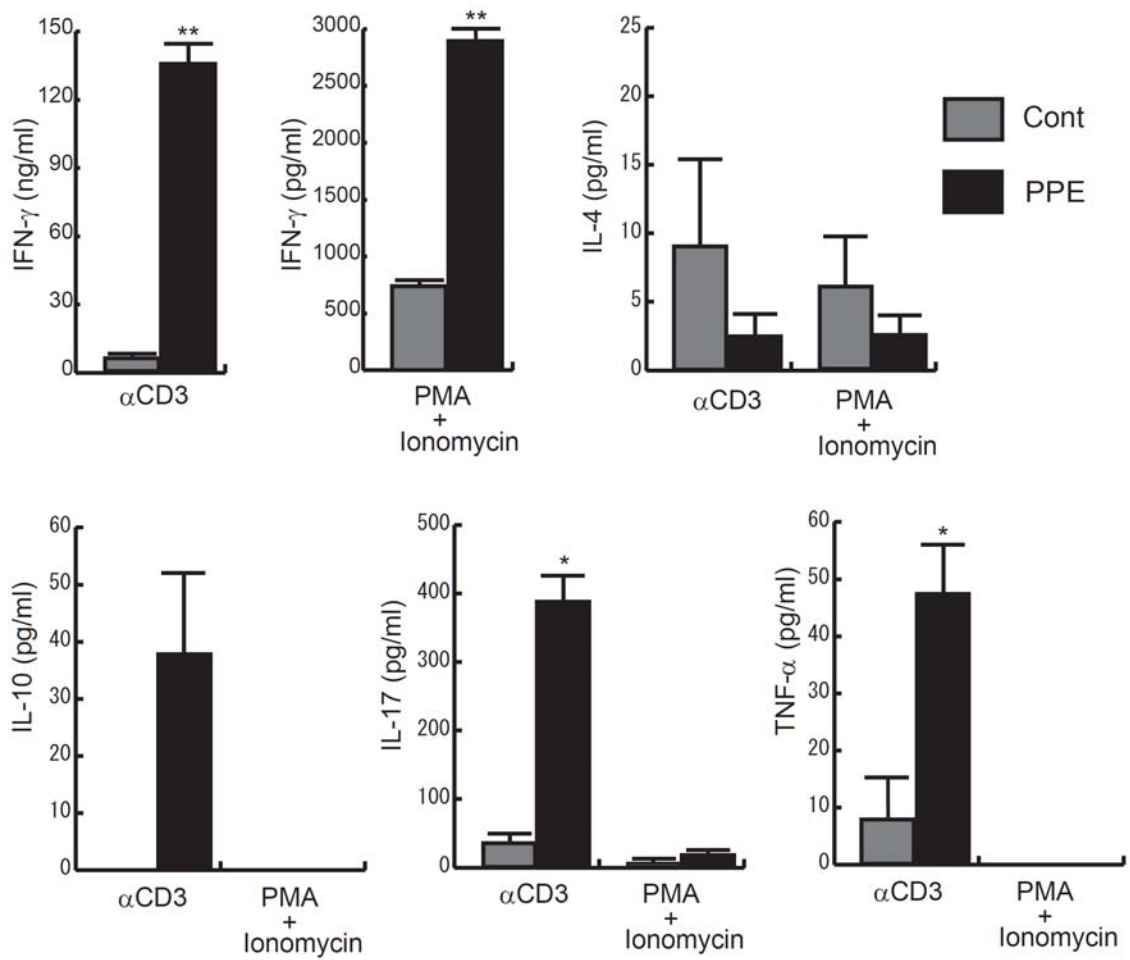


図6 CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産生

肺 CD8 陽性 T 細胞を対照群または PPE 投与群の day 5 の肺から分離し、プレート固着の抗 CD3e 抗体による刺激で 2 日間培養、もしくは PMA とイオノマイシンを添加した培地で 24 時間培養し、培養上清のサイトカインを ELISA にて測定した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (対照群との比較)

エラスターゼ誘導肺気腫における細胞傷害性

最後にエラスターゼの投与後に肺の構成細胞のアポトーシスが誘導されることを確認するために、肺の組織切片内のアポトーシス細胞の存在を TUNEL 法で評価した (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 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。day 7 の肺においても同様の所見を得た。

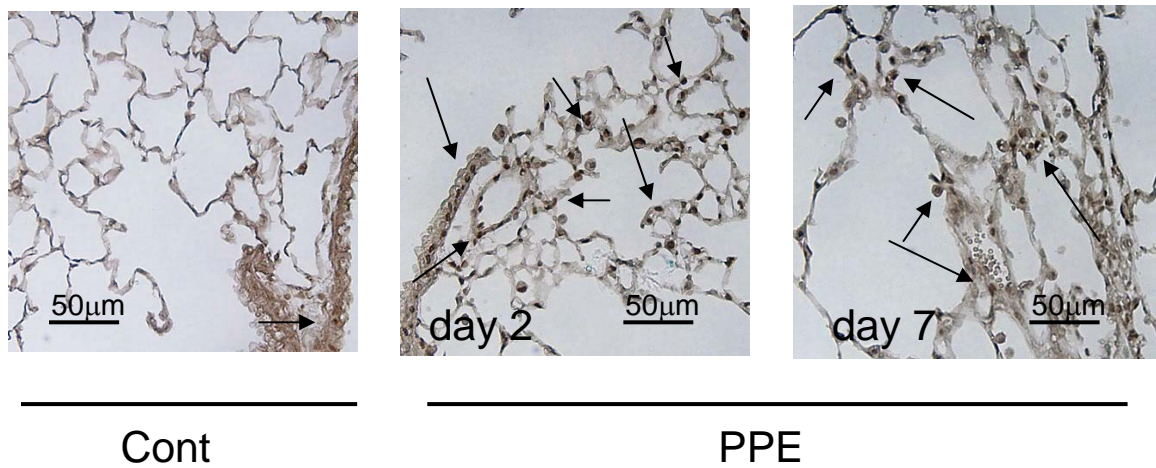


図7 PPE誘導肺気腫におけるアポトーシスの検出

パラフィン包埋した対照群 (PPE 未投与) と PPE 投与群 (day2、7) の肺から 4µm で切り出した切片をフルオロセイン-dUTP で標識し、HRP 結合抗フルオロセイン抗体により検出し、3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) を基質として発色させ、アポトーシス細胞を検出した。対照群の検体では陽性細胞は所々に認めるのみであるが、PPE 投与群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る。

考察

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- γ 、IL-17、TNF- α 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。

本研究では、過去の報告と同様、PPE の投与により肺に好中球主体の炎症が誘発され、2 週間以内に肺気腫が形成されることが示された。これは COPD が喫煙などの有害因子に慢性的に暴露されることによって非常に緩徐に進行する病態であることとは対照的であり、本研究のように急性炎症に伴い急速に肺気腫が進行する現象は一般的に COPD の経過中には認められない。従って、エラスターゼ誘導肺気腫モデルの病態が一般的な COPD の病態を十分に反映していない可能性は否定できない。しかしながら、エラスターゼによる肺気腫の誘導に、酵素活性による直接の肺傷害だけでなく、炎症機転が介在していることは過去の報告で示されている[40]。また、結果的に肺気腫を誘導するという点で、本モデルと COPD の炎症は同様であり、その機序に何らかの共通点があることが推測される。例えば、本モデルで使用した PPE はタンパク分解酵素の一つであるが、COPD の病態においても多種のタンパク分解酵素が好中球・マクロファージなどから分泌される。さらに、エラスターゼによるエラスチンの分解産物にはマクロファージを誘導する作用があるとの報告がある[44]。即ち、エラスターゼは COPD の病態において中心的な

細胞の一つとされるマクロファージを制御している可能性が示唆されており、エラスターゼ誘導肺気腫モデルにおいても、このエラスターゼとマクロファージの関係は反映されると考えられる。本モデルと COPD との間には以上のような共通点が考えられ、本モデルの炎症機転を解析することは COPD の病態の解明にも寄与する面があると考えられる。

本研究では、肺 DC による T 細胞の増殖反応の亢進を認めた。これまで肺気腫の病態における DC の役割を検討した研究は極めて少ない。Robbins らは喫煙マウスの縦隔リンパ節で、DC の共刺激分子の発現と T 細胞の増殖刺激が抑制されていることを報告しているが[39]、本研究と比較して何点か違いを指摘することができる。第一に、Robbins らは 1 ヶ月の喫煙暴露で DC の解析を行っているが、これは肺気腫が形成される前の肺傷害の時期に相当する。一方、本研究のモデルでは PPE 投与 2 日後には肺気腫が形成されつつあるので、肺気腫を誘導する病態機序がまさに進行している肺気腫の形成過程において DC の機能の解析を行ったことになる。第二に、本研究では肺実質の DC を解析対象としたのに対し、Robbins らは縦隔リンパ節の DC を解析対象とした。縦隔リンパ節は肺実質で刺激されて成熟した DC が移入する器官であるうえ[30]、肺ではなく血流から移行して分化した DC も縦隔リンパ節には存在する[45]。こうした DC の成熟度や由来の違いが DC 解析の結果に影響した可能性がある。第三に、肺気腫を誘導するモデルが Robbins (喫煙) と本研究 (PPE) で異なっており、この違いが結果に影響した可能性も考えられる。

本研究は気腫肺の DC のサイトカイン産生を初めて検討した。以前の研究で早期の抗原特異的免疫応答における DC の機能の亢進に伴い IL-10 の産生が亢進したことが認められており[46]、本研究で認められた IL-10 の産生亢進も同様に、DC の

活性化を示唆している可能性がある。

DC の活性化の機構として、今までに幾つかの機序が想定されている。一つは病原菌由来のあるパターンを持った分子が、toll 様受容体 (toll like receptor; TLR) に代表されるような細胞表面の受容体に結合することで DC の活性化を促すシグナルである[30、32]。もう一つは内因性の因子に由来する刺激で、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が DC を活性化しうる[32、47]。本研究では後者の機序が想定されるが、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[48、49]、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。エラスターゼの DC に対する直接作用については、マウスの骨髄から分化誘導した DC にヒト好中球エラスターゼを作用させることで共刺激分子の発現を低下させ LPS による DC の成熟を抑制したとの報告があるが[50]、肺 DC に対する作用や、生体内でエラスターゼが DC に与え得る影響については未だ検討されていない。エラスターゼを初めとするプロテアーゼは COPD の病態において主要な位置を占める分子であるので[1、50、51]、プロテアーゼが 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。

本研究ではエラスターゼにより気腫が形成されている肺の CD4 陽性 T 細胞において、IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-17 の産生亢進が認められた。IFN- γ は Th1 細胞、IL-4は Th2 細胞、IL-17は Th17細胞が産生する代表的なサイトカインであり[13、14]、IL-10 については Th2 サイトカインとされる一方、制御性 T 細胞との関連も近年注目されている[52、53]。従って気腫形成に伴い肺内の CD4 陽性 T 細胞は活

性化されているが、それは Th1/2/17 のいずれか特定の集団に偏った分化ではないと考えられる。一方、肺の CD8 陽性 T 細胞においては IFN- γ 、IL-17、TNF- α の産生亢進を認めた。細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞も CD4 陽性 T 細胞と同じく産生されるサイトカインの種類によって分類されており、産生されるサイトカインのパターンも CD4 陽性 T 細胞の場合と類似している。すなわち、IFN- γ を産生し IL-4、IL-5 を産生しない細胞を Tc1 細胞、逆に IL-4、IL-5 を産生し IFN- γ を産生しない細胞を Tc2 細胞と呼ぶ[15]。従って本研究で認められた IFN- γ の産生亢進、IL-4 の無産生は Tc1 細胞の産生パターンに一致する。また、TNF- α は Tc1 細胞で産生されるものの Tc2 細胞では産生されないとの報告があり[19]、本研究でみられた TNF- α の産生も Tc1 型に矛盾しない。一方 IL-17 を産生する CD8 陽性 T 細胞の存在については、IL-17 の発見後間もない頃から認識されてはいたものの[54]、その機能は最近ようやく報告されつつある段階であり[16、55]、Tc1/2 との関係や CD8 陽性 T 細胞内での位置づけについてはまだ十分に確立していない。以上より、気腫肺に存在する CD8 陽性 T 細胞は、ほぼ Tc1 型に一致するが、IL-17 を産生する別の細胞集団も一部含んでいる可能性があるかと推測される。

COPD 患者の肺において T 細胞の産生するサイトカインを検討した過去の報告をみると、Tc1 型が増加していたというもの[17、18、21]、Th1 型と Tc2 型が増加していたというもの[19]と、Th1 型、Th2 型、Tc2 型が増加していたというものがある[20]。TNF- α 産生細胞については、CD4 陽性/CD8 陽性 T 細胞ともに増加はしていなかったとするもの[19]と CD8 陽性 T 細胞は増加していたとするもの[21]がある。本研究の結果との違いは、動物とヒトの違いによるところが大きいのかも知れないが、COPD の重症度と病態の不均一性が関係している可能性もある。すな

わち、Tc2 型が増加していたとする報告は中等症以下の重症度の COPD 患者の BAL の検体を使用したものであり[19、20]、この症例では肺気腫の形成がさほど進行していない可能性がある。さらに、一般的に気腫化した肺は BAL の回収が困難となるので[56]、回収された細胞のうち気腫が進行した領域に由来する細胞の比率は少なくなり、気道領域と構造の保たれた肺泡領域とに由来する細胞の比率が増加することが予測される。その結果肺気腫以外のもう一つの COPD の基本的特徴である慢性気管支炎としての病態が、BAL の所見に反映されやすいという可能性が考えられる。一方、Tc1 型が亢進ないし増加しているとした報告の多くは、手術で摘出された肺組織から分離された T 細胞を使用している[17、18]。一つは重症の患者を対象にした研究であり[17]、もう一つは、IFN- γ の発現の程度が COPD の重症度に相関していることを示している[18]。以上のことから、Tc1 細胞は COPD の中でも肺気腫の病態により密接に関係した細胞なのではないかと推測される。この仮説についてはさらなる検証が必要であるものの、本研究では肺気腫を確実に誘導するモデルで CD8 陽性 T 細胞が Tc1 型であったことを示しており、上記仮説に矛盾しない結果であった。

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る。CD8 陽性 T 細胞は細胞表面に発現した MHC class I-抗原ペプチド複合体の認識を経て、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。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。肺の炎症細胞が細胞傷害性を発揮する可能性を示した過去の報告には、急性肺傷害モデルにおけるリンパ球のパーフォリ

ン、グランザイムの発現増加を示したもの[57]、COPD 患者の喀痰由来のリンパ球において血液由来細胞に対する細胞傷害性の亢進とパーフォリンの発現増加を示したもの[28]が挙げられる。また、抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞が、同抗原を発現させた肺胞上皮細胞に対してアポトーシスを誘導したという報告もある[58]。しかし肺気腫に由来する 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。

本研究では、CD4 および CD8 陽性 T 細胞の両方で IFN- γ の産生亢進を認めた。肺気腫において IFN- γ が担う役割の重要性については過去に動物モデルで検証されてきた。マウスの肺に IFN- γ を強制発現させると、好中球とマクロファージが主体の炎症が惹起され、肺気腫が形成されたとの報告がある[59]。また喫煙誘発肺気腫モデルにおいて、IFN- γ を産生する CD8 陽性 T 細胞が IP-10 (IFN- γ -inducible protein-10) を産生し、マクロファージに MMP-12 の産生を促すことで肺気腫の形成に寄与することを示した報告がある[60]。さらに IFN- γ は LPS や TNF- α の存在下で好中球のスーパーオキシドの産生を促進するとされており[61]、IFN- γ は肺内の酸化ストレスの増加を介して肺気腫の形成に寄与している可能性もある。よって肺の T 細胞の産生する IFN- γ 産生に関しては、肺気腫の形成に重要な役割を担っている可能性があると考えられる。

本研究では肺 T 細胞の IL-17 の産生を認めた。これまでに気腫肺の T 細胞による IL-17 の産生の検討は、COPD 患者を対象とした研究ではなされておらず、喫煙暴露マウスの BAL で IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞を認めたとする報告があるのみである[62]。IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞は Th17 と呼ばれ、様々な自己免疫性炎症性疾患において中心的な役割を担うとして近年注目されている[14]。IL-17 は

Th17の中心的なエフェクターサイトカインであり、上皮・内皮・線維芽細胞に作用してIL-8等のケモカイン、GM-CSF等の成長因子、および接着因子の発現を促すことにより、好中球の産生増加と炎症局所への集積を誘導する[63]。気道においても同様の機序でBALF中の好中球数を増加させる効果があり、これは肺感染症においては主要な防御機構を担っていると考えられているが、一方で喘息では増悪因子として、気道過敏性の上昇や重症例での好中球の増加に関連があると考えられている[64]。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い[65]。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。IL-17は気道に好中球を集積させることでBALFのタンパク分解活性を上昇させるという報告があり[66]、COPDにおいても同様の機序でIL-17が肺構造の破壊に役割を果たしている可能性が考えられる。さらにIL-17はマクロファージに対しても、局所への集積と生存を促しMMP-9の発現を促すとの報告があり[67]、マクロファージを介して肺気腫形成に寄与している可能性も考えられる。

本研究において認められたT細胞の機能の亢進は、炎症による抗原非特異的な活性化であるかもしれないが、DCの機能の亢進と合わせて考えると、抗原特異的に活性化を受けた結果であるという可能性も考えられる[32]。例えば、肺気腫形成過程における炎症機転、およびPPEの酵素活性自体による肺構造の破壊は、新たな抗原の生成や隠されていた抗原の表出を促すと考えられ[12、68]、炎症局所においてリンパ球がこの新たな自己抗原を認識することで、免疫寛容ではなく炎症性免疫応答が誘導される可能性がある。過去にサルコイドーシスで獲得免疫応答が亢進

していたとの報告があり、同様の機序が推定されている[69]。肺に豊富に存在するエラスチン（弾性線維の構成タンパク）はエラスターゼの基質でもあり、エラスターゼによるエラスチンの分解産物（elastin peptides; EPs）は生体内で生成されて新たな自己抗原となる可能性を有するが、実際に COPD 患者の末梢血で EPs に反応するリンパ球、および EPs を認識する抗体の存在が確認されている[70]。抗原特異的な免疫応答が肺気腫の形成に関与する可能性についても過去に検討されており、ヒト臍帯静脈内皮細胞をラットに免疫することで肺の内皮細胞に対する免疫応答が惹起され、肺気腫が誘導されたとの報告がある[71]。しかし EPs や血管内皮に反応するリンパ球が、喫煙/エラスターゼ誘導肺気腫や COPD 患者の肺に存在するかについてはまだ検証されていない。

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肺 DC の機能を検討し、T 細胞に対する増殖反応の促進と、IL-10 の産生亢進を初めて示した。肺 DC の活性化は、肺気腫の病態で想定されている自己免疫応答に対して、これを促進する役割を担う可能性が考えられる。肺気腫の病態に自己免疫応答の関与が考えられることから[10、12、70、71]、DC の機能を修飾することは COPD の治療となる可能性がある。また本研究では CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞が共に活性化していることを示し、気腫肺において IL-17 産生 CD8 陽性細胞の存在を初めて示した。さらに T 細胞の産生する IFN- γ 、IL-17 は、好中球・マクロファージの肺局所への集積と活性化を介して、肺構造の破壊を促している可能性も考えられる。よって T 細胞の機能を修飾することも、COPD の病態の改善につながるものが期待される。しかし DC および T 細胞は、感染防御にも重要な役割を担っているので、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。例えば COPD に関する獲得免疫応答の検討が進み、中心的な自己抗原の存在と病態への寄与が明らかになったならば、抗原特異的な治療を創出することで、病原体など他の異物に対する正常な免疫応答を損なうことなく COPD の病態を改善することが可能になるかもしれない。今日はまだ COPD の病態について不明な点が多く、なお一層の研究の進展が望まれる。

結語

本研究により、エラスターゼ誘導肺気腫モデルにおいて、1) 肺気腫の形成過程において肺 DC による T 細胞の増殖反応の亢進と IL-10 の産生が亢進していること、2) 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ていることが示され、DC および T 細胞が肺気腫の病態に関与している可能性が示唆された。

参考文献

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. *GOLD Workshop Updated 2007. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Available from URL:<http://www.goldcopd.com>. Updated 2007.
2. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349:1498-1504
3. Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, Adachi M, Nagai A, Kuriyama T, Takahashi K, Nishimura K, Ishioka S, Aizawa H, Zaher C: COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology* 2004; 9:458-464
4. Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, Decramer M; UPLIFT Study Investigators: A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008; 359:1543-1554
5. Pride NB: Smoking cessation: effects on symptoms, spirometry and future trends in COPD. *Thorax* 2001; 56:Suppl 2, 7-10.
6. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M: Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1277-1285
7. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD: The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;

350:2645-2653

8. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK: Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:852-857.
9. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ: Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26:602-609
10. van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, Hylkema MN, van den Berg A, Timens W, Kerstjens HA: Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:751-758.
11. MacNee W: Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:258-266
12. Agustí A, MacNee W, Donaldson K, Cosío M: Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58:832-834
13. Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17:338-346
14. Lawrence Steinman: A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007; 13:139-145

15. Mosmann TR, Li L, Sad S: Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol* 1997; 9:87-92
16. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H: CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 2006; 177:6852-6858
17. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis DE, Kheradmand F: An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004; 1:e8
18. Freeman CM, Curtis JL, Chensue SW: CC chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 6 expression by lung CD8+ cells correlates with chronic obstructive pulmonary disease severity. *Am J Pathol* 2007; 171:767-776
19. Barczyk A, Pierzchala W, Kon OM, Cosio B, Adcock IM, Barnes PJ: Cytokine production by bronchoalveolar lavage T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1484-1492
20. Barceló B, Pons J, Fuster A, Sauleda J, Noguera A, Ferrer JM, Agustí AG: Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol* 2006; 145:474-479
21. Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S: Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clin Exp Immunol* 2007; 150:22-29

22. Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A; Respiratory Failure Research Group in Japan: Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 2004; 125:626-32
23. Calabrese F, Giacometti C, Beghe B, Rea F, Loy M, Zuin R, Marulli G, Baraldo S, Saetta M, Valente M: Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respir Res* 2005; 6:14.
24. Sawada M, Ohno Y, La BL, Funaguchi N, Asai T, Yuhgetsu H, Takemura G, Minatoguchi S, Fujiwara H, Fujiwara T: The Fas/Fas-ligand pathway does not mediate the apoptosis in elastase-induced emphysema in mice. *Exp Lung Res* 2007; 33:277-88
25. Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A: Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28:555-562
26. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG: Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001; 17:946-53
27. Yasuda N, Gotoh K, Minatoguchi S, Asano K, Nishigaki K, Nomura M, Ohno A, Watanabe M, Sano H, Kumada H, Sawa T, Fujiwara H: An increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD. *Respir Med* 1998; 92:993-999
28. Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, Tsoumakidou M, Tsiligianni I, Klimathianaki M, Siafakas NM: Perforin expression and cytotoxic activity of

- sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* 2004; 125:71-76
29. Vernooy JH, Möller GM, van Suylen RJ, van Spijk MP, Cloots RH, Hoet PH, Pennings HJ, Wouters EF: Increased granzyme A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:464-472
30. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
31. Steinman RM, Witmer MD: Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:5132-5136
32. Kapsenberg ML: Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:984-993.
33. Julia V, Hessel EM, Malherbe L, Glaichenhaus N, O'Garra A, Coffman RL: A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity* 2002; 16:271-283.
34. van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, Vos N, Willart M, Duez C, Hoogsteden HC, Lambrecht BN: In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 2005; 201:981-91.
35. Tsoumakidou M, Demedts IK, Brusselle GG, Jeffery PK: Dendritic cells in chronic obstructive pulmonary disease: new players in an old game. *Am J*

Respir Crit Care Med 2008; 177:1180-1186.

36. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG: Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:998-1005.

37. Verhoeven GT, Hegmans JP, Mulder PG, Bogaard JM, Hoogsteden HC, Prins JB: Effects of fluticasone propionate in COPD patients with bronchial hyperresponsiveness. *Thorax* 2002; 57:694-700.

38. D'hulst AI, Vermaelen KY, Brusselle GG, Joos GF, Pauwels RA: Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J* 2005; 26:204-213.

39. Robbins CS, Franco F, Mouded M, Cernadas M, Shapiro SD: Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice. *J Immunol* 2008; 180:6623-6628.

40. Lucey EC, Keane J, Kuang PP, Snider GL, Goldstein RH: Severity of elastase-induced emphysema is decreased in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta receptor-deficient mice. *Lab Invest* 2002; 82:79-85

41. To Y, Dohi M, Tanaka R, Sato A, Nakagome K, Yamamoto K: Early interleukin 4-dependent response can induce airway hyperreactivity before development of airway inflammation in a mouse model of asthma. *Lab Invest* 2001; 81: 1385-1396.

42. Dunnill MS: Quantitative methods in the study of pulmonary pathology.

Thorax 1962; 17: 320-328.

43. Imamura M, Okunishi K, Ohtsu H, Nakagome K, Harada H, Tanaka R, Yamamoto K, Dohi M: Pravastatin attenuates allergic airway inflammation by suppressing antigen-sensitization, IL-17 production, and antigen-presentation in the lung. Thorax 2009; 64(1): 44-49

44. Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA, Mecham RP, Senior RM, Shapiro SD: Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. J Clin Invest 2006; 116:753-759

45. Reis e Sousa C: Dendritic cells in a mature age. Nat Rev Immunol 2006; 6: 476-483.

46. Okunishi K, Dohi M, Nakagome K, Tanaka R, Yamamoto K: A novel role of cysteinyl leukotrienes to promote dendritic cell activation in the antigen-induced immune responses in the lung. J Immunol 2004; 173: 6393-6402

47. Vermaelen K, Pauwels R: Pulmonary dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med 2005; 172: 530-51.

48. Fields RC, Schoenecker JG, Hart JP, Hoffman MR, Pizzo SV, Lawson JH: Protease-activated receptor-2 signaling triggers dendritic cell development. Am J Pathol 2003; 162:1817-1822.

49. Yanagita M, Kobayashi R, Kashiwagi Y, Shimabukuro Y, Murakami S: Thrombin regulates the function of human blood dendritic cells. Biochem

Biophys Res Commun 2007; 364:318-324.

50. Roghanian A, Drost EM, MacNee W, Howie SE, Sallenave JM: Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:1189-1198

51. Churg A, Wright JL: Proteases and emphysema. *Curr Opin Pulm Med* 2005 ; 11:153-159

52. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765

53. Veldman C, Nagel A, Hertl M: Type I regulatory T cells in autoimmunity and inflammatory diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140:174-183

54. Shin HC, Benbernou N, Fekkar H, Esnault S, Guenounou M: Regulation of IL-17, IFN-gamma and IL-10 in human CD8(+) T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. *Cytokine* 1998; 10:841-850

55. Liu SJ, Tsai JP, Shen CR, Sher YP, Hsieh CL, Yeh YC, Chou AH, Chang SR, Hsiao KN, Yu FW, Chen HW: Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J Leukoc Biol* 2007; 82:354-360

56. Lofdahl JM, Cederlund K, Nathell L, Eklund A, Sköld CM: Bronchoalveolar lavage in COPD: fluid recovery correlates with the degree of emphysema. *Eur Respir J* 2005; 25:275-281

57. Hashimoto S, Kobayashi A, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, Nakajima H: Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in

septic acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:237-243

58. Liu AN, Mohammed AZ, Rice WR, Fiedeldey DT, Liebermann JS, Whitsett JA, Braciale TJ, Enelow RI: Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor-alpha: relative insensitivity to Fas ligand. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:849-858

59. Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman HA Jr, Shapiro SD, Elias JA: Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med* 2000; 192:1587-1600

60. Maeno T, Houghton AM, Quintero PA, Grumelli S, Owen CA, Shapiro SD: CD8+ T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Immunol* 2007; 178:8090-8096

61. Young HA, Hardy KJ: Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 1995; 58:373-381

62. Harrison OJ, Foley J, Bolognese BJ, Long E 3rd, Podolin PL, Walsh PT: Airway infiltration of CD4+ CCR6+ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement. *Immunol Lett* 2008; 16:13-21.

63. Kolls JK, Linden A: Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004; 21:467-476

64. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK: IL-17 cytokine family. *Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1265-1273

65. Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC: The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:512-21.
66. Hoshino H, Laan M, Sjostrand M, Lotvall J, Skoogh BE, Linden A: Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:143-149
67. Sergejeva S, Ivanov S, Lotvall J, Linden A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33:248-253
68. Lanzavecchia A: How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *J Exp Med* 1995; 181:1945-1948
69. Dohi M, Yamamoto K, Masuko K, Ikeda Y, Matsuzaki G, Sugiyama H, Suko M, Okudaira H, Mizushima Y, Nishioka K: Accumulation of multiple T cell clonotypes in lungs of healthy individuals and patients with pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1994; 152:1983-1988.
70. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F, Coxson HO, Cogswell S, Storness-Bliss C, Corry DB, Kheradmand F: Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 2007 May;13(5):567-569
71. Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, Moore M, Sullivan A, Nicolls MR, Fontenot AP, Tudor RM, Voelkel NF: An animal model of

autoimmune emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:734-742

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導下さいました指導教員、山本一彦教授に深甚なる謝意を表します。また、終始、懇切なるご指導、ご鞭撻を頂きました講師の土肥眞先生に厚く御礼申し上げます。共同研究者である田中良一先生、中込一之先生、奥西勝秀先生、今村充先生からも数多くのご指導いただきました。ここに深謝いたします。最後に、本研究の遂行にあたり終始支えていただいた実験助手の黒崎香榮さんに深謝いたします。