

## 論文の要旨

### 論文題目 Elucidation of the Role of T-bet Overexpression in T cells in the Development of Acquired Pulmonary Alveolar Proteinosis

(後天性肺胞蛋白症発症における T 細胞内 T-bet 過剰発現の役割解明)

氏名 入口 翔一

#### 背景：

肺胞蛋白症は呼吸器領域の希少疾患である (1)。本疾患罹患患者は肺胞マクロファージの肺サーファクタント処理機能異常による、肺胞腔内でのサーファクタント過剰蓄積を呈する。先行研究より、GM-CSF シグナル異常が本疾患の発症に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方で、二次性肺胞蛋白症は GM-CSF シグナル異常に依存しない機構で発症することも報告されているが、その発症機序は未解明のままである。

二次性肺胞蛋白症は血液疾患、免疫疾患、感染症、及び種々の有害物質吸引にて発症することが知られている。このことから血液細胞の異常が肺胞蛋白症発症に関与していることが示唆される。実際、肺胞蛋白症罹患患者より採集した肺胞洗浄液中で T 細胞の数が増えていることが報告されている。加えて、本疾患罹患患者の血清中ではヘルパー T 細胞 (Th) サイトカインが異常に増加していることも報告された。これらの知見は、T 細胞の異常活性化が肺胞蛋白症発症に関与していることを示唆している。

以上の背景より、T 細胞活性化タンパクを検討した結果、私は T-bet が二次性肺胞蛋白症の発症関連因子ではないかと仮説を立てた。T-bet は 1 型ヘルパー T 細胞分化を制御する T 細胞転写因子として知られている (2)。T-bet の過剰発現や欠損などの制御異常は、様々な免疫疾患や自己免疫疾患発症に関与していることが示されてきた。先行研究より、T 細胞において T-bet を過剰発現するトランスジェニックマウス (ヒト CD2 (hCD2)-T-bet トランスジェニックマウス) は、皮膚炎を自然発症することが示された。しかしながら、T 細胞内における T-bet 過剰発現のその

他臓器への影響は検討されていない。本研究では、高齢 hCD2-T-bet トランスジェニックマウスがヒト肺胞蛋白症に類似する疾患を発症することを見出した。また私は、本疾患モデルマウスにおける肺胞蛋白症発症機序解明を試みた。

### 高齢 hCD2-T-bet<sup>tg/tg</sup> マウスは肺胞蛋白症様病態を発症する

hCD2-T-bet トランスジェニックマウスにおける導入遺伝子 T-bet の発現は、ヒト CD2 プロモーターにて制御されているため、T 細胞に限定される (3)。私は、本導入遺伝子ヘテロ接合体マウス (T-bet<sup>tg/wt</sup>) 同士を交配させることによって得られた子孫が、肺疾患を発症するかの検討を行った。その結果、高齢のホモ接合体マウス (T-bet<sup>tg/tg</sup>) のみ、肺での病変を伴い死亡する事が明らかとなった。さらに詳細な病理学的解析を行った結果、T-bet<sup>tg/tg</sup> の肺胞腔にて、サーファクタントが異常蓄積していることが判明した。これより、高齢 T-bet<sup>tg/tg</sup> はヒト肺胞蛋白症に酷似した病態を発症することが示唆された。次に、T-bet<sup>tg/tg</sup> の表現形が導入遺伝子挿入箇所による遺伝子欠損によって引き起こされたかの検討を行うため、導入遺伝子挿入部位の決定を試みた。結果、導入遺伝子は 1 1 番染色体の遺伝子間に挿入されていることが確認された。また、肺胞蛋白症様病態は別ラインの T-bet<sup>tg/tg</sup> においても発症することが明らかとなった。以上より、T-bet<sup>tg/tg</sup> における肺胞蛋白症の発症は、タンパク質翻訳遺伝子及び非翻訳 RNA の欠損によるものではなく、T 細胞での T-bet 過剰発現によって引き起こされることが示唆された。

### T 細胞内 T-bet 過剰発現による肺胞蛋白症発症は GM-CSF シグナル減弱を伴わない

T-bet を過剰発現する T 細胞が T-bet<sup>tg/tg</sup> における肺胞蛋白症の病因であるかを検討する為、Rag2 欠損マウスへのリンパ球移植実験を行った。レシピエントマウスの解析結果より、T-bet<sup>tg/tg</sup> リンパ球のみで肺胞蛋白症が引き起こされることが明らかとなった。引き続き、本表現形の発症に二次的な GM-CSF シグナル遺伝子の発現減弱が関与するかを検討するため、肺と肺胞マクロファージにおける遺伝子発現解析を行った。その結果、GM-CSF シグナル伝達に関与しない GM-CSFR  $\alpha$  鎖以外の遺伝子に発現減弱は確認されなかった。以上より、T-bet<sup>tg/tg</sup> は、二次的な GM-CSF シグナル遺伝子発現減弱に依存しない機構で、肺胞蛋白症を発症する可能性が示唆された。

### T-bet<sup>tg/tg</sup> における肺胞蛋白症発症は肺炎症と肺胞腔内白血球細胞構成の変化を伴う

T 細胞での T-bet 過剰発現によって惹起される肺胞蛋白症発症機序を解明するため、本モデルマウスの病態解析を行った。T-bet が Th1 細胞のマスターレギュレーターであり、その発現が本マウスでは過剰発現されていることから、私は Th1 細胞の過剰活性化が本病態の進行に関与しているのではないかと仮説を立てた。この仮説を検討するため、cytometric bead array にて、本マウス肺における炎症性サイトカインの定量解析を行った。その結果、T-bet<sup>tg/tg</sup> 肺において、

IL-6、TNF や、Th1 特異的サイトカインである、IFN- $\gamma$  などの炎症性サイトカインと共に炎症細胞遊走因子の monocyte chemotactic protein-1 の顕著な上昇が確認された。次に、これらのサイトカインを産生する細胞を同定するため、フローサイトメーターにて肺胞洗浄液中に含まれる白血球の表面抗原発現解析を行ったところ、T-bet<sup>tg/tg</sup> では肺胞マクロファージ分画 (Autofluorescence (AF)<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, Siglec-F<sup>+</sup>, F4/80<sup>High</sup>, CD11b<sup>Mid</sup>) が顕著に減少していることが明らかとなった。さらに、その他の肺胞洗浄内マクロファージ分画 (AF<sup>+</sup>) の一部は、骨髄由来マクロファージに特徴的な表面抗原発現パターン (BM macrophages; AF<sup>+</sup>, F4/80<sup>Low</sup>, CD11b<sup>High</sup>) を示す事が判明した。それ以外のマクロファージ分画細胞は F4/80<sup>Low</sup>、CD11b<sup>Mid</sup>、CD11c<sup>-</sup>であった。CD3e陽性 T 細胞の増加は T-bet<sup>tg/tg</sup> と T-bet<sup>tg/wt</sup> 両方の肺胞洗浄液中で確認されたものの、骨髄由来マクロファージは T-bet<sup>tg/tg</sup> 肺胞洗浄液中のみで検出された。以上の結果は、T-bet<sup>tg/tg</sup> における肺胞蛋白症発症には、肺炎症と肺胞腔内の細胞構成変化が関与していることを示唆する。

#### 炎症性単球の経時的な増加が肺胞蛋白症発症に関与する

T-bet<sup>tg/tg</sup> が肺胞蛋白症を発症する週齢は個体間で差があることから、加齢に伴う疾患の進行を解析することが困難であった。この問題を解決するため、末梢血における本疾患発症予測因子の探索を試みた。同週齢マウス末梢血液の全血球計算値とフローサイトメーターによる白血球分画の解析を行った結果、骨髄由来マクロファージの前駆細胞とされる炎症性単球の上昇が確認されるとともに、疾患の発症と相関することが判明した。また、T-bet<sup>tg/tg</sup> リンパ球を移植された Rag2 欠損マウスでの経時的な末梢血液解析より、炎症性単球が徐々に増加することが分かった。これらの結果より、末梢血液での炎症性単球増加が T-bet<sup>tg/tg</sup> における肺胞蛋白症発症の予測因子となりうる事が示唆された。

#### T-bet<sup>tg/tg</sup> は骨髄造血異常を呈する

マウス単球の半減期は約一日であるにもかかわらず、T-bet<sup>tg/tg</sup> 末梢血液では炎症性単球の経時的な増加が確認された。従って、私は T-bet<sup>tg/tg</sup> は骨髄前駆細胞からの造血異常を呈するとの仮説を立てた。この可能性を検証するため、*in vitro* 及び *in vivo* での骨髄細胞の解析を行った。コロニーアッセイの結果、T-bet<sup>tg/tg</sup> 骨髄細胞はコロニー形成数の増加を示す一方で、単球・マクロファージ系統への分化異常を呈することが明らかとなった。また、骨髄移植実験の結果、肺胞蛋白症を発症した T-bet<sup>tg/tg</sup> 骨髄細胞は、T 細胞系列の再構築能の低下と共に、競合的骨髄移植下において、顕著なキメリズムの低下を示した。これらの実験結果より、T-bet<sup>tg/tg</sup> の骨髄造血能は疾患発症に伴って異常をきたす事が示唆された。

## 結語

本研究にて私は、T細胞内での T-bet 過剰発現が肺胞蛋白症様病態の発症に寄与する事を明らかにした。二次性肺胞蛋白症の発症機序は GM-CSF シグナル異常を伴わないことが示唆されてきたが、その機序は解明されていなかった。本研究にて私は、T細胞内 T-bet 過剰発現が、GM-CSF シグナル異常を伴わない機序で肺胞蛋白症を発症しうる事を示した。また、本モデルマウスの解析より、本表現形に特徴的な病態の解明にも成功した。現在、臨床検体を用いて、本知見のヒトでの有用性の検討を行っている。今後、本研究が肺胞蛋白症発症機序に関する新しい知見を付与することが期待される。

## 参考文献:

1. Trapnell BC, Whitsett JA, Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med*. 2003;349(26):2527–2539.
2. Lazarevic V, Glimcher LH, Lord GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(11):777–789.
3. Ishizaki K et al. Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *J Immunol*. 2007;178(1):605–612.