

3 1 . IgE -mediated egg allergy in children: molecular biological analysis of peripheral blood mononuclear cells stimulated in vitro by ovalbumin

Yoichiro Kaburaki¹, Yuki Suzuki^{1,2} and Satoru Nagata ¹

(¹ Department of Pediatrics, ² Department of Microbiology and Immunology)

[Purpose] Molecular biological analysis of the in vitro response of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from children allergic to ovalbumin could help to elucidate the mechanism of IgE-mediated egg allergy in humans.

[Methods] PBMCs were obtained from children with egg allergy who visited our clinic (December 2019 to September 2020) and were subjected to in vitro stimulation by ovalbumin for 24 hours. The cytokine profile was examined using ELISA.

[Results]

Now in progress.

3 2. *Acinetobacter radioresistens* の病原性探索

鈴木悠貴¹、大坂利文²、上芝秀博²、柳澤直子²、永田智¹

(¹小児科学、²微生物学免疫学)

〔目的〕 川崎病は、中・小型血管の血管炎であり、乳幼児に好発する急性の発熱性疾患である。現在までに川崎病の発症機構は特定されておらず、川崎病の原因については様々な視点から研究が行われてきた。このような中、我々は人体で最も多くの外来抗原に曝露されている消化管粘膜に定着する常在細菌の中から、川崎病の発症と関連する病原体の探索を試みてきた。これまでの研究から、川崎病の免疫グロブリン治療後の血清から *Acinetobacter radioresistens* 由来の heat-shock protein タンパク質（分子量 60-70 kDa）と交差する抗体が検出されており、免疫グロブリン中の中和抗体によりこの病原因子が失活されたと考えられた。また、*A. radioresistens* 由来の代謝産物が末梢血単核球を活性化することも併せて報告された¹⁾。*Acinetobacter* 属の細菌は土壌や泥、池、水回りなど湿った環境に存在する細菌であり²⁾、医療施設においては多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* の院内感染がしばしば発生している³⁾。しかしながら、*A. radioresistens* に関するヒトに対する病原性についての情報は無いのが現状である。そこで本研究は、重症川崎病患児の小腸から分離された *A. radioresistens* の病原性を評価することを目的とした。本年度は、*A. radioresistens* の培養上清に含まれるタンパク質の生体影響を調べた。

〔方法〕 *A. radioresistens*（臨床株 2 株；標準株 1 株）の培養上清を、C57BL6/J マウス（日本クレア、6 週齢）の腹腔内に投与した。単回投与したマウスを翌日に解剖を行う短期的な評価（短期観察群）と、培養上清を 5 日間投与したマウスを 6 週間後に解剖を行う長期的な評価（長期観察群）を用意した。血清に関しては生化学バイオマーカーおよび各種サイトカインの測定を行い、各種臓器については、薄切組織標本を作成し、hematoxylin-eosin (H-E) 染色と CD3 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

〔結果〕 短期観察群において、コントロール群（PBS 投与群）と比較して、*A. radioresistens* の培養上清を投与したマウスでは著しい体重減少が観察された。一方、長期観察群においては、*A. radioresistens* の培養上清を投与したマウスでは、IgG1 抗体価の上昇および肝臓の血管周囲を中心に炎症細胞の浸潤、CD3 陽性細胞の集簇を認めた。

〔考察〕 短期観察群において確認された急激な体重減少は、各種臓器に顕著な炎症像は確認されなかったことから、電解質の恒常性破綻などの病態生理学的視点からの解析が必要であると考えられた。一方、長期観察群で観察された肝臓への持続的なリンパ球浸潤については、*A. radioresistens* の培養上清中のタンパク質による自己免疫応答の活性化に起因している可能性を検証していく必要がある。

〔結論〕 *A. radioresistens* は生体の恒常性を破綻させる病原性タンパク質を産生している。

〔文献〕

- 1) Nagata S., Yamashiro Y., Ohtsuka Y., et al. (2009) *Immunology*. 128: 511-520
- 2) Wong D., Nielsen TB., Bonomo RA., et al. (2017) *Clin Microbiol Rev*. 30: 409-447
- 3) Bergogne-Berezin E., Towner KJ. (1996) *Clin. Microbiol Rev*. 9: 148-165

3 3 . Laminin-221-derived recombinant fragment facilitates isolation of cultured skeletal myoblasts

Yuki Kihara^{1,2}, Jun Homma², Ryo Takagi², Keiko Ishigaki¹, Satoru Nagata¹ and Masayuki Yamato²

(¹Department of Pediatrics, ²Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science)

[Purpose] Laminin is a major component of the basement membrane, containing multiple domains that bind integrin, collagen, nidogen, dystroglycan, and heparan sulfate. Laminin-221, expressed in skeletal and cardiac muscles, has strong affinity for the cell-surface receptor, integrin $\alpha 7\text{X}2\beta 1$. The E8 domain of laminin-221, which is essential for cell integrin binding, is commercially available as a purified recombinant protein fragment. In this study, recombinant E8 fragment was used to purify primary rodent myoblasts. We established a facile and inexpensive method for primary myoblast culture exploiting the high affinity binding of integrin $\alpha 7\text{X}2\beta 1$ to laminin-221.

[Methods] Total cell populations from dissociated muscle tissue were enzymatically digested and seeded onto laminin-221 E8 fragment-coated dishes. The culture medium containing non-adherent floating cells was removed after 2-hour culture at 37°C. The adherent cells were subjected to immunofluorescence staining of desmin, differentiation experiments, and gene expression analysis.

[Results] The cells obtained were $70.3 \pm 5.49\%$ (n = 5) desmin positive in mouse (Fig. 1) and $67.7 \pm 1.65\%$ (n = 3) in rat (Fig. 2). Immunofluorescent staining and gene expression analyses of cultured cells showed phenotypic traits of myoblasts.

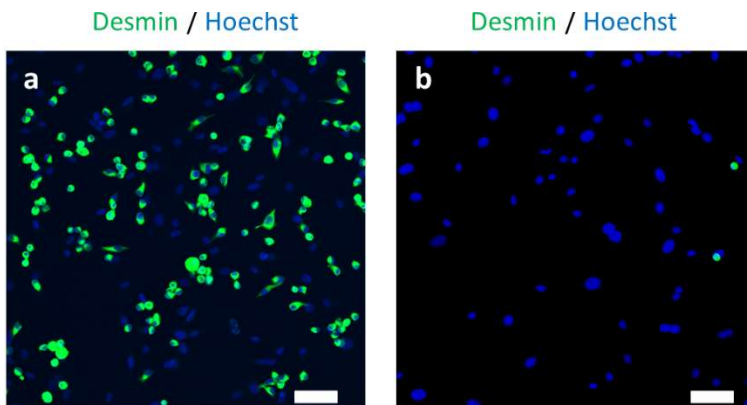


Figure1. Immunofluorescent staining of obtained myoblasts (mouse)

※For a color print of the Figure 1, see page 132.

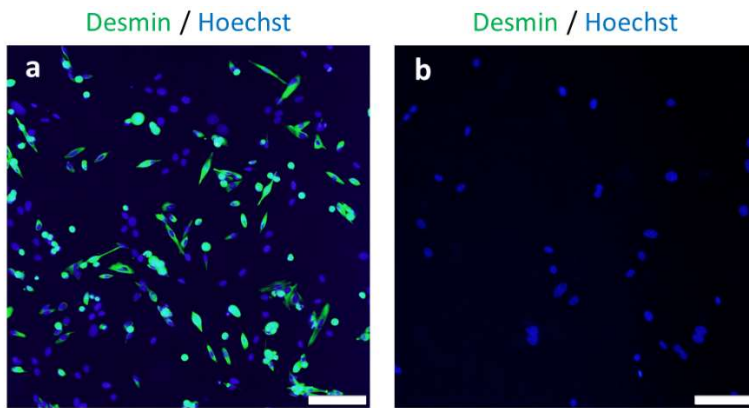


Figure2. Immunofluorescent staining of obtained myoblasts (rat)

※For a color print of the Figure 2, see page 132.

[Discussion] In present study, we were not able to obtain 100% myoblasts with this laminin-221 E8 fragment-coated dishes. This study revealed for the first time that integrins $\alpha 7$ are also expressed in fibroblasts of fascia, and this was thought to be the reason for the difficulty in obtaining 100% purity myoblasts because they adhere to laminin-221 in the same mechanism as myoblasts.

[Conclusions] This study reports a novel facile method for primary culture of myoblasts obtained from mouse and rat skeletal muscle by exploiting the high affinity of integrin $\alpha 7$ to laminin-221.

[Article]

- 1) Kihara Y., Homma J., Yamato M. (2021) Laminin-221-derived recombinant fragment facilitates isolation of cultured skeletal myoblasts. Regen Ther. 20 : 147-156

[Conference Presentation]

- 1) 木原祐希. ラミニン-221 フラグメントコートディッシュを用いた筋芽細胞の単離法確立. 第 21 回日本再生医療学会総会、オンライン、2022/3

3 4. Decreased in liver damage in short bowel syndrome rat models through DPP4 inhibition

Ryo Sueyoshi¹, Nanami Furuhashi¹, Junya Ishii¹, Marumi Kawakami²

Kenji Tanabe² and Osamu Segawa¹

(¹Department of Pediatric Surgery, ²Institute for Comprehensive Medical Sciences)

[Purpose] Total parenteral nutrition causes liver damage in patients with short bowel syndrome (SBS). Intestinal failure-associated liver disease (IFALD) is the strongest mortality risk factor in patients with SBS. We previously demonstrated the efficacy of dipeptidyl peptidase 4 inhibitor (DPP4-I) use for nutritional absorption and intestinal barrier function enhancement in mice SBS models. Herein, we aimed to investigate the efficacy of DPP4-I use in liver damage prevention in an SBS rat model.

[Methods] Rats were divided into four groups: normal saline (NS)+sham (n=6), DPP4-I+sham (n=5), NS+SBS (n=7), and DPP4-I+SBS (n=7). The sham operation involved small intestine dissection and re-anastomosis without intestinal resection, whereas SBS was induced via a resection of 80% of the proximal small intestine and re-anastomosis. DPP4-I or NS was administered orally once daily from postoperative days 1-21. Rats were euthanized on postoperative day 21, and then tissues were harvested. Serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin, and total bile acid levels were used for liver function assessment. Moreover, we evaluated the liver damage using the steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score, which was also used for nonalcoholic steatohepatitis assessment. Body weight, food intake, and blood glucose levels were recorded.

[Results] Study results are summarized in the table. On postoperative day 21, there was no significant difference in body weight among the groups. ALT level was significantly lower in the DPP4-I+SBS group than in the NS+SBS group (32.5±4.5 vs. 47.2±10.1 IU/L, $p<0.05$). Jejunal and ileal villus heights were significantly higher in the DPP4-I+SBS group than in the NS+SBS group. Blood glucose level was lower in the DPP4-I+SBS group than in the NS+SBS group, although the difference was not statistically significant ($p=0.15$). The SAF score was significantly lower in the DPP4-I+SBS group than in the NS+SBS group (4.83±0.75 vs. 2.40±0.89, $p<0.05$).

	%body weight on day 21 [%]	Villus height in jejunum [μm]	Crypt depth in jejunum [μm]	Villus height in ileum [μm]	Crypt depth in ileum [μm]	AST [IU/L]	ALT [IU/L]	TBA [μmol/L]	SAF scoring	Blood glucose level [mg/dL]	Food intake in 2-3 weeks [g]
NS+SBS group (n=7)	158.0±13.0	779.7±53.7 [□]	262.2±16.2 [□]	740.8±20.4 [□]	276.0±26.0 [□]	205.5±128.3	47.2±10.1	12.0±5.2	4.83±0.75	201.6±47.8	163.7±10.3
DPP4-I+SBS group (n=7)	144.5±11.0	874.8±34.8 ^{*□}	262.6±21.1 [□]	803.2±59.4 ^{*□}	280.4±25.3 [□]	172.8±21.6	32.5±4.5 [#]	7.7±6.1	2.40±0.89 [#]	151.1±48.6	156.8±5.4
NS+Sham group (n=6)	163.4±4.4	721.1±21.1	217.2±15.6	554.9±15.3	202.1±15.9	125±1.0	41.0±2.6	11.0±3.6	3.00±0.89	156.2±42.6	146.9±29.8
DPP4-I+Sham group (n=5)	156.2±10.3	758.9±27.6 [□]	243.0±14.4 [□]	561.1±14.8	204.3±11.8	123.7±5.8	38.7±11.2	23.7±4.0	2.17±1.17	181.2±31.7	119.7±43.1
* : $P < 0.01$ vs. NS+SBS group											
# : $P < 0.05$ vs. NS+SBS group											
□ : $P < 0.01$ vs. NS+Sham group											

Figure1. Data analyze

[Discussion] The most common causes of mortality in intestinal failure patient population are liver failure and sepsis. IFALD is the most insoluble issue when the SBS patients face on intestinal transplantation with or without combined liver transplantation. Although the pathogenesis of IFALD is not fully understood, molecular pathways responsible for liver injury have been elucidated and are depend on three primary factors, which is intestinal microbiome, intestinal permeability in IF and the correlation of parenterally administered lipid emulsions¹). We have remarked that DPP4-I which is the drug for type 2 diabetes mellitus was efficacious to SBS mice model. We showed that the administration of DPP4-I resulted in improvement in mucosal capacity, intestinal epithelial cells proliferation, glucose transport and intestinal barrier function²⁻⁴). The GLP-2 analog had been approved as only one drug for SBS patients. However, endogenous GLP-2 is rapidly (within 7 min) inactivated, predominantly by the endogenous serine protease DPP4. Therefore, the GLP-2 analog, Teduglutide is composed of a DPP4 resistant GLP-2. The DPP4-I up-regulated serum GLP-2 level in this study in a rat SBS model as well as the previous study in a mouse SBS model⁴). In addition to, the DPP4-I had not only the effects of GLP-2 and but also GLP-1. It had been previously demonstrated that GLP-1 receptor agonists and DPP4 inhibitor reduced transaminase activity and liver steatosis in the NAFLD animal studies and NAFLD clinical trials⁵). Concomitant with those studies, rat ALT level was significantly reduced in DPP4-I+SBS group than in NS+SBS group in our study.

[Conclusions] The downregulation of ALT level and SAF score triggered by DPP4-I use may be correlated with DPP4-I-induced adiposis inhibition in rat SBS and nonalcoholic steatohepatitis models. Therefore, DPP4-Is may be used to reduce IFALD occurrence in patients with SBS.

[Reference]

- 1) Lee WS, Chew KS, Ng RT et al. (2020) *Hepatology international*. 14 (3): 305-316.
- 2) Sueyoshi R, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N et al. (2020) *Pediatr Surg int*. 36 (1): 49-55.
- 3) Sueyoshi R, Woods Ignatoski KM, Okawada M et al. (2014) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 307 (4): 410-419.
- 4) Okawada M, Holst JJ, Teitelbaum DH (2011) *Surgery* 150 (2): 217-223.
- 5) Nakouti T, Karagiannis AK, Tziomalos K et al. (2015). *Cur Vasc Pharmacol*. 13 (5): 649-657.

[Conference Presentation]

- 1) Sueyoshi R, Furuhashi N, Kawakami M et al. The efficacy of DPP4 inhibitor for the rat short bowel syndrome model. 59th Japanese Pediatric Surgery conference, Tokyo, 2022/5

3.5. 血管炎における病原微生物の探索（第2報）

宮部千恵、宮田龍臣、大貫真依、石黒直子
(皮膚科学)

〔目的〕 血管炎の病因としては、感染症や他の自己免疫性疾患、薬剤性などが知られているが、50%が原因不明とされている。感染に対する生体の防御反応が、血管に対する免疫反応としての血管炎を起こす可能性が示唆されているが、そのメカニズムは十分解明されていない¹⁾。次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析技術の発達により、遺伝子特異的なプライマー等を必要とせず、サンプル中に存在している全ての核酸の塩基配列を網羅的に解読することが可能となった。サンプル中の核酸全てを断片化して解読するメタゲノムショットガン解析により、未知の細菌、真菌、ウイルス等の検出が可能となる。本研究では、血管炎組織・血液中に含まれる微生物由来の核酸を網羅的に解析することで、血管炎病原微生物の探索を行うことを目的とする。

〔方法〕 血管組織と血清から核酸を抽出し、ホスト細胞の除去処理後、抽出した DNA および RNA の両端にアダプター配列を付加したライブラリの調整を行った。大阪大学微生物病研究所との共同研究により、得られた DNA, RNA ライブラリを、第三世代シーケンサーを用いて解析した。得られた配列の生物種アノテーションをマッピングおよび相同性検索により行った。本研究は、本学倫理委員会の承認（承認番号：5700）を受けて施行した。

〔結果〕 2022年9月現在の時点で、血管炎患者由来皮膚 21 サンプル、血管炎患者由来血清 25 サンプル、健常人コントロール由来皮膚組織 14 サンプル、健常人コントロール由来血清 15 サンプルの採取を行った。

まず、細菌叢についての解析を行なった。サンプル中の各細菌の割合を元に、血管炎とコントロール間の菌組成をユークリッド距離もしくは Bray-Curtis で比較し、 β 多様性解析を行なった（図1）。ユークリッド距離では、PERMANOVA: $R^2 = 0.06465$, $p = 0.0486$, Bray-Curtis では、PERMANOVA: $R^2 = 0.05241$, $p = 0.05719$ という結果であり、統計的に明らかな差異は認めなかった。

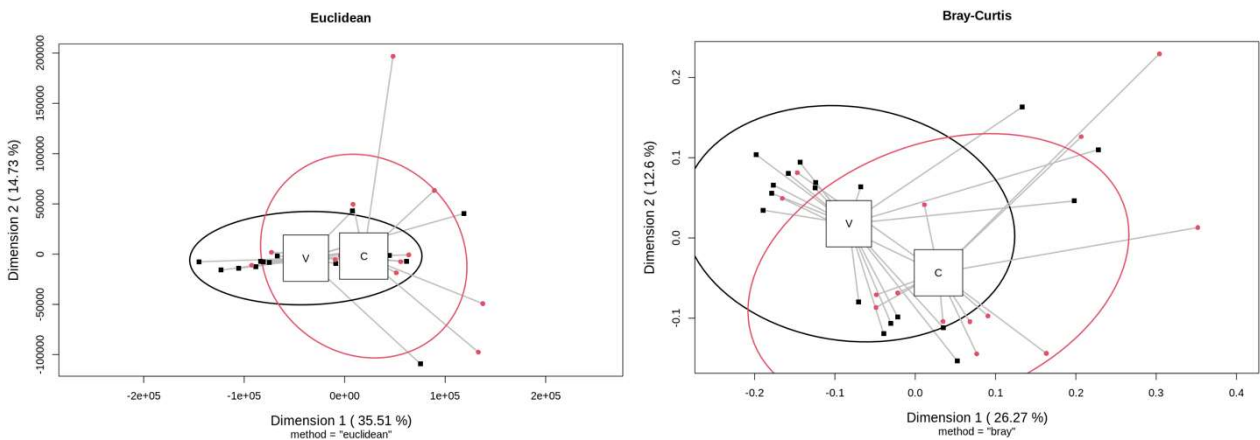


図1. 血管炎群(V: Vasculitis)とコントロール群(C: Control)における β 多様性

LEfSe (Linear discriminant analysis effect size) での群間比較解析では、血管炎とコントロールを比較すると、血管炎患者由来の血清で *Corynebacteriales* や *Rhodobacteriales* などの増加を認めた(図2)。現在、ウイルスに関するデータについても解析中である。

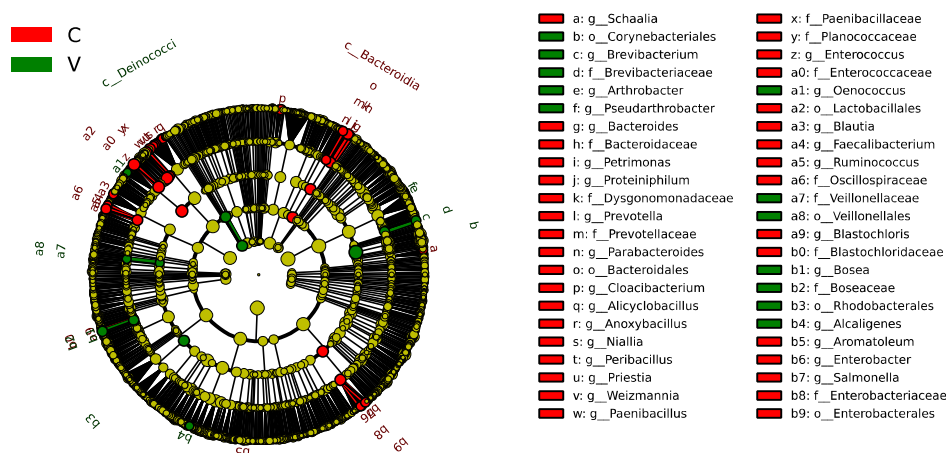


図2. 血管炎群(V: Vasculitis)とコントロール群(C: Control)における LEfSe による群間比較解析の Cladogram

[考察] 今回、血管炎患者由来血清と健常人由来血清の菌叢比較を行なったところ、細菌については、単一の病原菌を同定することはできなかったが、*Corynebacteriales* などの一部の細菌が血管炎で増加していることがわかった。*Corynebacteriales* は粘膜や皮膚の常在菌であるため、血管炎発症との因果関係についてはさらなる検討を要する。今回、IgA 血管炎や皮膚動脈炎といった異なる血管炎の病型が混在していたことが、細菌叢の多様性に有意な差を認めなかった要因の一つとも考えられ、今後それぞれの病型や重症度、治療内容などのファクターを加味した解析を行う予定である。

[結論] 本研究のように、第三世代シーケンサーを用いた高感度なメタゲノム法を用いて、血管炎における病原微生物由来の核酸の解析を行った例は過去に無く、血管炎発症メカニズムの解明に繋がる事が期待される。引き続きウイルスを含めたデータの解析を進める予定である。

[発表論文]

1) Miyabe C, Miyabe Y, Miyata R, Ishiguro N. Pathogens in Vasculitis: Is It Really Idiopathic? Jma j. 2021;4(3):216-24

3 6 . Increased PSMD10 expression in bone marrow of patients with acute myeloid leukemia

Yuki Iizuka, Masayuki Shiseki and Junji Tanaka
(Department of Hematology)

[Purpose] The *PSMD10* gene, which is located on chromosome X, encodes a PSMD10 protein characterized by seven ankyrin repeats¹⁾. PSMD10 physically interacts with multiple proteins through ankyrin repeats, and modulates function of target proteins, including oncoproteins and/or tumor suppressor proteins. For example, PSMD10 interacts with MDM2, resulting in increased p53 degradation by proteasome. PSMD10 also functions as a negative regulator in RB tumor suppressor protein-mediated cellular pathways^{1),2)}. These indicate that PSMD10 functions as an oncoprotein. PSMD10 overexpression was observed in several different types of human cancers, including hepatocellular carcinoma, breast cancer, and prostate cancer. Roles of PSMD10 in normal and/or malignant hematopoiesis have not been clarified. Therefore, we analyzed PSMD10 expression level in patients with acute myeloid leukemia (AML) to investigate its clinical and biological significance.

[Methods] Bone marrow mononuclear cells at diagnosis of AML was used for the analysis. Written informed consent was obtained from all patients in the present study. To analyze PSMD10 expression, quantitative real-time RT-PCR was carried out by the TaqMan probe method (Applied Biosystems) with co-amplification of the endogenous control gene, human GAPDH. Expression levels were obtained using the standard curve method in each experiment, after normalization with the GAPDH gene for each sample.

[Results] A total of 76 patients with AML were included into this study. Bone marrow samples from control subjects (n=10) were also analyzed for PSMD10 expression. Relative PSMD10 expression level was significantly higher in patients with AML compared with control subjects (P=0.0088). There was no correlation between PSMD10 expression level and bone marrow blast percentage, hemoglobin concentration, peripheral leukocyte count, or platelet count in AML patients. We investigate impact of PSMD10 expression level on survival in AML patients. The Kaplan-Meier plot indicated that estimated median overall survival (OS) time was 5.0 years in whole AML cohort in the present study. According to PSMD10 expression level, patients were divided into four groups, highest (Q1), intermediate (Q2 and Q3), and lowest (Q4) quartiles. Patients in Q1 group showed trend towards better OS than patients in other (Q2-Q4) groups (P=0.117); estimated 1-year and 2-year OS times were 81.9% and 73.4% in Q1 group, 57.1% and 50.1% in Q2-4 groups, respectively.

[Discussion] Our present results demonstrated higher PSMD10 expression level in AML patients suggesting that role of PSMD10 as an oncogene in leukemogenesis. We hypothesized that high PSMD10 expression was associated poorer survival of AML patients. However, high PSMD10 expression showed trend toward association with better survival. We do not have a clear explanation

to this phenomenon. Further investigation, including analysis of status *TP53* gene in the patients, is required.

[Conclusions] PSMD10 expression was significantly higher in bone marrow cells of patients with acute leukemia than those of control subjects, suggesting role of PSMD10 in development of acute leukemia. Clinical and biological significance of PSMD10 expression in acute leukemia are under investigation.

[Reference]

- 1) Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med.* 2000; 6: 96-9
- 2) Lozano G and Zambetti GP. Gankyrin: An intriguing name for a novel regulator of p53 and RB. *Cancer Cell* 2005 ;8 :3-4

[Conference Presentation]

- 1) Increased PSMD10 expression in bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. 25th Congress of the European Hematology Association, Frankfurt, Germany (2020/6) (Web only)

37. ダサチニブは CML 細胞においてペルオキシレドキシシン 1 および 2 の発現を調節する

風間啓至^{1,2}、王艶華²、田中淳司²

(1 足立医療センター・内科、²血液内科学)

〔目的〕 CML 細胞におけるチロシンキナーゼ阻害薬の ROS および抗酸化作用を有するペルオキシレドキシシン 1・2 (PRDX1・2) に対する影響を調べる。

〔方法〕 イマチニブ・ニロチニブ・ダサチニブを作用させた CML 細胞を、フローサイトメトリーで ROS のレベルを、遺伝子・蛋白の発現をリアルタイム PCR およびウエスタンブロットティング、免疫染色法で検討する。蛋白の SUMO 化を免疫沈降法で検討する。

〔結果〕 K562 細胞において、イマチニブ・ニロチニブ・ダサチニブにより、PRDX1 の遺伝子発現は減少し、PRDX2 の遺伝子発現は増加した。PRDX1・2 の細胞質タンパクはダサチニブにより増加したが、イマチニブ・ニロチニブでは増加しなかった。PRDX1 遺伝子転写と乖離した蛋白の増加のメカニズムとして、SUMO 化が関与することが示された。

〔考察〕 チロシンキナーゼ阻害薬の中でもペルオキシレドキシシン 1・2 に対する差異が認められた。ペルオキシレドキシシン 1・2 は白血病治療の標的分子と考えられており、チロシンキナーゼ阻害薬の抗白血病効果に差異が見られる可能性を示唆するものと考えられた。ペルオキシレドキシシン 1・2 は NK 細胞の enhancing factor¹⁾としても知られ、ダサチニブの抗白血病治療におけるこれまで示されてきた分子標的効果のほかに、SUMO 化の関与・免疫学的作用も示唆された。

〔結論〕 ダサチニブの CML 細胞に対する作用を広く臨床検体で検討することが望まれる。

〔文献〕

1) Ishii T, Warabi E, Yanagawa T. T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *J Clin Biochem Nutr.* 2012;50(2):91-105

〔発表論文〕

1) 投稿準備中

38. 強皮症線維化病態における FOXM1 の病態への関与の解明

樋口智昭^{1,2}、野呂瀬貴也¹、川口鎮司¹、針谷正祥¹

(¹膠原病リウマチ内科学、²リウマチ性疾患先進的集学医療寄附研究部門)

〔目的〕 強皮症 (SSc) は、皮膚や内臓を侵す進行性の線維化疾患である。強皮症の線維化病態では、さまざまな刺激により活性化した線維芽細胞による過剰な細胞外マトリックス産生が持続して生じる。したがって、線維芽細胞の活性化制御を主眼とした研究が活発に進められてきたが、いまだに有効な治療法の開発にはつながっていない。Forkhead box protein M1 (FOXM1) は細胞周期のマスターレギュレーターとして知られている転写因子の1つで、S期およびM期への移行を促進することにより、細胞周期の進行を刺激する。FOXM1は通常不活性形で存在するが、活性化FOXM1にはさまざまな生理学的作用があり、例えば損傷後の組織修復を促進する。病的状態におけるFOXM1の役割も徐々に解明が進んでおり、特発性肺線維症で肺常在線維芽細胞の活性化を促進することが報告された¹⁾。これらの知見から、線維化病態における線維芽細胞の活性化制御にFOXM1が重要な役割を有しており、SScにおいても治療ターゲットとなることが示唆され、本研究では、SSc由来皮膚線維芽細胞を用いて、FOXM1が線維芽細胞活性化と関連するかどうか解析を行った。

〔方法〕 SSc由来皮膚線維芽細胞は、びまん性皮膚硬化型SSc患者の前腕から採取した。成人の健康な皮膚線維芽細胞 (倉敷紡績、Lonza) は購入した。FOXM1の阻害剤として siomycin (倉敷紡績、Lonza) を使用した。皮膚線維芽細胞は、ウシ胎児血清添加ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で培養し subconfluent にした後、無血清下で24時間培養し、TGF-β1の存在下または非存在下で、0~1μMの siomycin (Millipore) を添加した。24~48時間培養後 total RNA、cell lysate を回収し、それぞれリアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロッティングを用いて各種マーカーを定量した。線維芽細胞の収縮活性は、ゲル収縮アッセイ (Cell Biolabs) を用いて解析した。

〔結果〕 FOXM1の発現は、健常成人由来皮膚線維芽細胞において TGF-β1 依存的に上昇した。SSc由来皮膚線維芽細胞および TGF-β 刺激健常成人由来皮膚線維芽細胞における線維化マーカーの発現は、siomycinの投与によりダウンレギュレートされた。この変化は、mRNA レベルでもタンパクレベルでも確認された。ゲル収縮アッセイでは、TGF-β1で刺激された健常成人由来皮膚線維芽細胞は TGF-β1 刺激のない健常成人由来皮膚線維芽細胞に比べ強いゲル収縮能の増強が認められたが、siomycinを TGF-β1 と同時投与すると、ゲル収縮活性は低下した。

〔考察〕 上記の結果から、TGF-β1 添加で FOXM1 発現が上昇し、さらに、活性化皮膚線維芽細胞線維化能は FOXM1 阻害薬である siomycin の作用で抑制された。したがって、siomycin は TGF-β1 を介した皮膚線維芽細胞活性化やコラーゲン産生を制御している可能性が示唆された。

〔結論〕 本研究の結果から、FOXM1 が SSc 皮膚線維芽細胞の線維化活性を制御していることが示唆され、FOXM1 が強皮症線維化病態の治療ターゲットとなり得ることが示された。

[文献]

1) Penke LR, Speth JM, Dommeti VL, et al. (2018) J Clin Invest. 128(6): 2389-2405

39. モデルマウスを用いた、全身性エリテマトーデスの病態における Programmed cell death protein 1(PD-1)の意義の解明

森山倫奈、勝又康弘、岡本祐子、菊池華恵、高田秀人、中村昌平、針谷正祥
(膠原病リウマチ内科学)

〔目的〕 近年、全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus, SLE) の病態においては、濾胞性ヘルパーT (T follicular helper, Tfh) 細胞・末梢性ヘルパー T (T peripheral helper, Tph) 細胞とその細胞表面マーカーである programmed cell death protein 1 (PD-1)が注目され、当研究室からもヒト SLE 患者において可溶性 PD-1 の濃度が疾患活動期に高いことが報告されている¹⁾。しかし、PD-1 をノックアウトしたマウスが SLE 様の腎炎を生じることも報告されており、PD-1 とそのリガンド (PD-1 ligand 1, PD-L1、PD-1 ligand 2, PD-L2) からなる共刺激経路の役割は、単純に促進的・抑制的とはいえ、詳細は不明である。本研究は、SLE の自然発症モデル (BXSB/MpJ-Yaa マウス) を用いて、その病態における PD-1 の意義を明らかにすることを目的とした。

〔方法〕 動物は、SLE の自然発症モデル動物である、BXSB/MpJ-Yaa (オス) のマウスを用いた。C57BL/6 系統のマウスを非発症コントロール群とした。各マウスを、生後 8 週、16 週の時点で、採尿して尿蛋白を半定量してから二酸化炭素ガス吸入により安楽殺し、心臓採血で得た血清中の可溶性 PD-1、抗 dsDNA 抗体を、市販 ELISA キットとマイクロプレートリーダー (Synergy LX) を用いて測定した。採取した脾臓や腎臓の一部から細胞浮遊液を作り、フローサイトメーター (CytoFLEX) を用いて細胞膜表面に発現する CD4、PD-1、CXCR5、ICOS の発現を解析した。残りの組織は凍結保存し、光学顕微鏡による観察、および免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡で CD4、PD-1、PD-L1、CXCR5、ICOS の発現を解析した。

〔結果〕 BXSB/MpJ-Yaa マウスは、C57BL/6 マウスに比べて、体重が少なく、蛋白尿が多かった。BXSB/MpJ-Yaa マウス腎組織では、HE 染色や PAS 染色標本で、糸球体腎炎の像が認められた。共焦点レーザー顕微鏡では、腎炎組織に CD4+PD-1+細胞の浸潤と PD-L1 の発現を認めた。フローサイトメトリーでは、脾臓では PD-1+CXCR5+CD4+細胞と PD-1+CXCR5-CD4+ICOS+細胞が増加し、腎臓では PD-1+CXCR5-CD4+ICOS+細胞が増加していた (図 1)。一方、8 週時点では、PD-1+CXCR5+CD4+細胞と PD-1+CXCR5-CD4+ICOS+細胞は、脾臓には認められたが、腎臓には認められなかった。また、血清の可溶性 PD-1 濃度が経時的に上昇し、抗 dsDNA 抗体価と相関した ($r = 0.50$)。

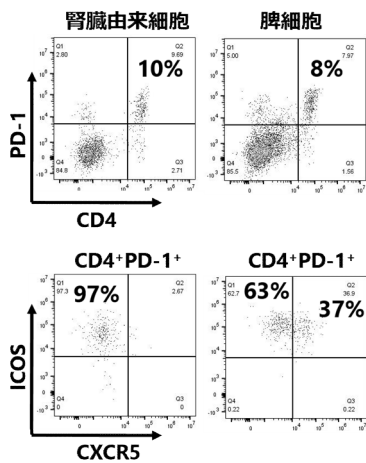


図 1. 16 週齢の BXSJ/MpJ-Yaa マウスの腎臓および脾臓由来細胞のフローサイトメトリー

〔考察〕 マウスにおいて、Tph 細胞の免疫学的フェノタイプや役割は、ヒトに比べると報告が乏しく、確立していないが、今回の検討で脾臓や腎臓で観察された PD-1+CXCR5-CD4+ICOS+細胞は Tph 細胞に相当すると考えられ、一方、脾臓でのみ観察された PD-1+CXCR5+CD4+細胞は Tfh 細胞に相当すると考えられた。また、PD-1 のスプライズバリエーションである可溶性 PD-1 は、ヒトにおいては、PD-L1 や PD-L2 と相互作用することにより、PD-1/PD-L シグナル伝達経路を阻害し、T 細胞の活性化を促進する、すなわち、細胞表面の膜型 PD-1 とは反対の調節効果を有することが示唆されているが、可溶性 PD-1 は、ヒト SLE で報告されていると同様に、BXSJ/MpJ-Yaa マウスでも疾患活動期に高いことが認められた。

〔結論〕 SLE・ループス腎炎の病態において、PD-1 には、発現する組織や細胞によって異なる意義があることが示唆された。

〔文献〕

1) Hirahara S., Katsumata Y., Kawasumi H., et al. (2020) Lupus. 29(7): 686-696

4 0 . A novel method for ex vivo stimulation of mesenchymal stem cells via invariant natural killer T cell activation with α -galactosylceramide

Rumi Ishii¹, Emi Kawaguchi¹, Takafumi Yamakawa¹, Taichi Kanzawa¹, Hidetoshi Ishigooka¹, Takashi Ikeda¹, Ryo Ishiyama¹, Masako Ikemiyagi¹, Kan Saiga¹, Yasuyuki Ishii², Kazunari Tanabe¹ and Toshio Takagi¹

(¹Department of Urology, ²Department of Immunological Diagnosis, Juntendo University Graduate School of Medicine)

[Purpose] Mesenchymal stem cells (MSCs) typically exhibit unique regenerative and immunomodulatory properties when exposed to proinflammatory cytokines. Invariant natural killer T (iNKT) cells are known to modulate the acquired immune system by producing Th1, Th2, and Th17 cytokines. We previously reported that iNKT cell stimulation by α -galactosylceramide (α GalCer) led to the induction of *de novo* generation of Tregs in murine thymocyte culture system¹). Here, we tested the hypothesis that MSCs exhibit more effective immunomodulatory activity in coexistence with activated iNKT cells.

[Methods] MSCs from mouse adipose tissues and murine splenocytes were co-cultured in the presence or absence of α GalCer on culture plates. It has been reported that only NKT cells were activated by α GalCer in mouse spleen cells. To investigate further, MSCs and splenocytes were also plated in the lower and upper chambers, respectively, of a trans-well dish, and cultured in the presence or absence of α GalCer. The mRNA expression levels of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) in MSCs were measured by real-time polymerase chain reaction. The proportion of Tregs were analyzed by flow cytometry. The concentration of interferon (IFN)- γ in the culture supernatants was measured using the Cytometric Bead Array.

[Results] When co-cultured with splenocytes in the presence of α GalCer, the mRNA expression of IDO and PD-L1 was increased in MSCs (Fig.1) in both the culture plates and trans-well plates. These results suggest that the immunomodulatory activity of MSCs was induced by soluble factors secreted from activated iNKT cells. The concentration of IFN- γ in culture supernatants was increased and Tregs were significantly expanded in the co-culture in the presence of α GalCer, but not in its absence (Fig.2).

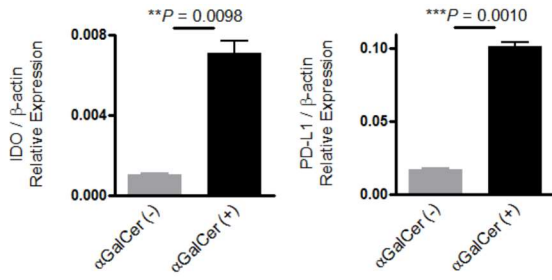


Fig.1 The co-culture of splenocytes and MSCs in the presence of αGalCer, the mRNA expression of PD-L1 and IDO was increased in the MSCs

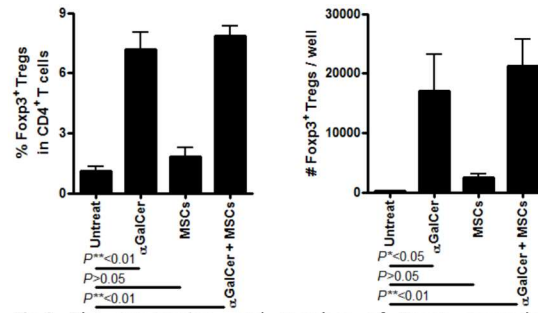


Fig.2 The proportion and number of Tregs expanded following co-culture of splenocytes and MSCs in the presence of αGalCer, but not in its absence.

[Discussion] The mRNA expression of IDO and PD-L1 was increased in MSCs when co-cultured with splenocytes in the presence of αGalCer in both the culture plates and trans-well plates. The MFI levels of PD-L1 were increased in MSCs when co-cultured with αGalCer-supernatant. These results suggest that the immunomodulatory activity of MSCs was induced by soluble factors secreted from activated iNKT cells. Tregs were significantly expanded in the co-culture in the presence of αGalCer, but not in its absence.

[Conclusions] By co-culture with iNKT cells stimulated with α-galactosylceramide, MSCs exhibit more effective immunomodulatory activity, including induction of expression of various immunoregulatory molecules and expansion of regulatory T cells.

[Article]

- 1) Katsumata H, Ikemiyagi M, Hirai T, Kanzawa T et al. (2019) Immunol Lett. ; 206 : 41-48

[Conference Presentation]

- 1) Rumi Ishii et al. A novel method for ex vivo stimulation of mesenchymal stem cells via invariant natural killer T cell activation with α-galactosylceramide. American Transplant Congress 2022, Boston, USA, 2022/6