

3 1. 動物実験モデルにおける *Acinetobacter radioresistens* の新規病原性についての検討

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として知られているが、現在に至るまでその病因は特定されていない。我々はこのまでの研究で、川崎病小児の上部消化管粘膜から分離した細菌の代謝産物が同患者の末梢血単核球 (PBMC) の増殖を促進すること、グラム陰性菌が分泌する分子量 60~70kDa のタンパク質 (HSP60) が川崎病の発症に関与しているという可能性を考えた¹⁾。収集した細菌サンプルのうち、我々は *Acinetobacter radioresistens* に注目した。*Acinetobacter* 属は土壌や泥、池、水回りなど湿った環境に存在する細菌であり²⁾、*A. baumannii* を主体とした *Acinetobacter* 属の細菌については、近年院内感染が問題となっているが³⁾、*A. radioresistens* の病原性についてはほとんど報告がない。本研究は、重症川崎病患者から分離された *A. radioresistens* について、その培養上清を用いて動物実験を行うことで、生体内での働きを検証することを目的とした。

〔方法〕 *A. radioresistens* の臨床株 2 株、標準株 1 株の培養上清を作成し、マウス (C57BL6/J 日本クレア 6 週齢) の腹腔内に投与した。培養上清を 5 日間投与し、1 日投与し翌日に解剖を行う短期群と 6 週間後に解剖する長期観察群とを設け、以下の検討を行った。血清学的に、血液生化学検査、各種サイトカインの測定を行った。各種臓器の免疫・組織学的・細菌学的検索として、薄切組織標本を作成し、hematoxylin-eosin (H-E) 染色と各種免疫組織化学染色を行った。

〔結果〕 *A. radioresistens* を腹腔内投与した群は、コントロール群 (PBS 投与群) と比較し、マウスに有意な体重減少、電解質バランス異常、低アルドステロン血症を認めた。長期観察群では *A. radioresistens* 投与群で、肝臓の血管周囲を中心に炎症細胞の集簇を認めた。今回の実験ではマウスに明らかな冠動脈病変は確認できなかった。

〔考察〕 *A. radioresistens* の培養上清に含まれるタンパク質が、マウスにおいては、肝臓の慢性炎症、一過的な体重減少、電解質バランス異常、低アルドステロン血症を誘引し、生体への病原性を有することがわかった。*A. radioresistens* が川崎病の原因となる病原体であると結論づける事はできなかった。本研究は、*A. radioresistens* を用いた初めての *in vivo* 実験であり、今回の結果の詳細なメカニズムについては、さらなる検討が必要である。

〔結論〕 *A. radioresistens* が分泌するタンパク質が、生体において生理学および組織学的に有害な影響を引き起こす可能性が指摘された。

〔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

[発表論文]

- 1) Novel pathogenicity of secretory proteins from *Acinetobacter radioresistens* in experimental models

Yuki Suzuki, Toshifumi Osaka, Hidehiro Ueshiba, Naoko Yanagisawa, and Satoru Nagata

Tokyo Women's Medical University Journal (Accept 済 発行未)

3 2. DPP4 阻害薬によるラット IFALD モデルに対する肝線維化抑制効果

末吉亮¹、山田進¹、川上萬留実²、石井惇也¹、田邊賢司²、世川修¹

(¹小児外科学、²総合医科学研究所)

〔目的〕 短腸症候群(Short Bowel Syndrome; SBS)患者の予後改善には、腸管関連性肝障害(Intestinal failure associated liver disease; IFALD)を克服することが喫緊の課題といえる。我々は経口糖尿病薬である DPP4 阻害薬(DPP4-I)を用いて、血中 GLP-1 及び GLP-2 上昇の効能により、ラット SBS モデルにおいて肝酵素を低下させる肝保護作用を報告してきた¹⁾。今回、中心静脈栄養+SBS モデルを施行したラット IFALD モデルを用いて、DPP4-I による肝線維化に対するの効能を検討したため、こちらに報告する。

〔方法〕 生後 8 週 of SD ラットを以下の 2 群、DPP4-I 群:IFALD モデル[SBS+中心静脈栄養]+DPP4 阻害薬投与(n=7)、Control 群:IFALD モデル+生理食塩水投与(n=7)に分類し、比較検討した。手術 21 日後にラットを犠死せしめ、組織(肝臓、血清)を採取した。肝線維化を評価するため、Sirius-red 染色、 α -SMA 抗体による蛍光組織染色による検討を行った。 α -SMA 抗体での検討については画像解析ソフト ImageJ による定量化を施行した。また、メカニズムの評価として血清 GLP-1, GLP-2, TGF- β を ELISA 法にて測定した。

〔結果〕 Sirius-red 染色において、Control 群では 7 匹中 2 匹に門脈周囲の肝線維化像を認めたのに対して、DPP4-I 群では肝線維化所見は認めなかった(図 1)。 α -SMA 抗体染色では、 α -SMA 抗体陽性領域が DPP4-I 群で有意に減少していた [DPP4-I 群: $0.180 \pm 0.053\%$, Control 群: $0.281 \pm 0.031\%$, $P < 0.01$]。血清 GLP-1 は DPP4-I 群で有意に上昇していた [DPP4-I 群: 102.0 ± 83.7 pM/mL, Control 群: 48.4 ± 18.0 pM/mL, $P < 0.05$]。血清 GLP-2 は有意差は認めなかった [DPP4-I 群: 3.73 ± 3.66 , Control 群 3.69 ± 1.66]。血清 TGF- β は DPP4-I 群で有意に減少していた [DPP4-I 群: 21.8 ± 20.6 , Control 群 42.7 ± 37.8 , $P < 0.05$]。

〔考察〕 DPP4 阻害薬はラット IFALD モデルにおいて、有意に肝線維化を抑制していた。そのメカニズムとして、DPP4 阻害薬による GLP-1 上昇により、TGF- β 活性の抑制が関与していることが示唆された。

〔結論〕 本研究により DPP4 阻害薬の肝線維化抑制効果が明らかとなり、経口薬による短腸症候群の新たな治療戦略に繋がることが期待される。

〔文献〕

1) Sueyoshi R., Furuhashi N., Ishii J., et al. (2022) *Pediatr Surg Int.* 39(1):21

[学会発表]

- 1) Sueyoshi R., Ishii J., Yamada S., et al. Decrease in liver fatty accumulation and fibrosis in rat intestinal failure associated liver disease models through dipeptidyl peptidase IV inhibition. The 56th Annual Meeting Pacific Association of Pediatric Surgeons, Bali, Indonesia 2023/9.
- 2) 末吉亮、古橋七海、川上万留実、他. DPP4 阻害薬によるラット IFALD モデルに対する肝保護作用、第 60 回日本小児外科学会学術集会、大阪、2023/6

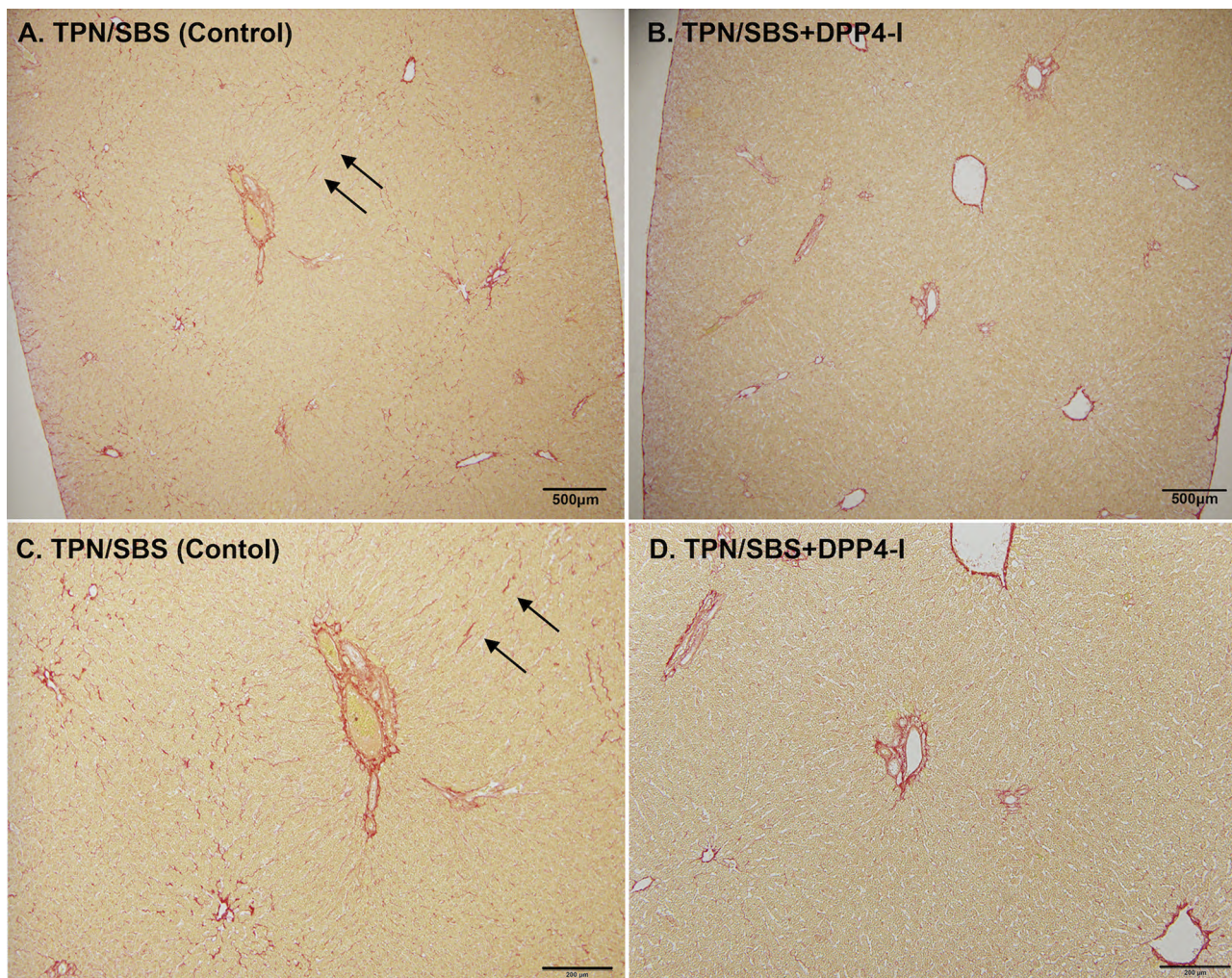


図 1. Sirius red 染色

- A. TPN/SBS(Control) 群: 低倍率 門脈領域に肝線維化所見を呈している。
- B. TPN/SBS+DPP4-I 群: 低倍率 肝線維化所見を認めない。
- C. TPN/SBS(Control) 群: 高倍率 門脈領域に肝線維化所見を呈している。
- D. TPN/SBS+DPP4-I 群: 高倍率 肝線維化所見を認めない。

※巻末にカラー図掲載

3.3. 血管炎における皮膚と血清の微生物叢の変化

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)。特に、ウイルスについては、従来の病原体同定法では全体の0.07%以下のウイルスしか検出できないとされており、未知のウイルスを含む病原体が血管炎発症に関与している可能性は否定できない。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、細菌、真菌以外にウイルスの検出も可能となる。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、ウイルスを含めた血管炎病原微生物の探索を行った。

〔方法〕 2020年から2022年にかけて、血管炎患者由来皮膚13サンプル、血管炎患者由来血清15サンプル、健常人コントロール由来皮膚組織11サンプル、健常人コントロール由来血清14サンプルの採取を行った。血管炎患者は、皮膚動脈炎4例、IgA血管炎12例、顕微鏡的多発血管炎1例、クリオグロブリン血症性血管炎1例と診断した。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3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。さらに、血管炎患者由来検体と、健常人コントロール由来検体の間で微生物叢に変化があるか比較した。本研究は、本学倫理委員会の承認(承認番号:5700)を受け、ヘルシンキ宣言の原則に従い、文書によるインフォームド・コンセントを行った。

〔結果〕 Kraken2ソフトウェアを用いて血清と皮膚組織中のウイルス組成を解析した。通常、無菌とされる血清から、多種多様なウイルスが検出された。そのうち、SENウイルスは、血管炎患者由来の血清および血管炎患者由来の皮膚組織において、健常人よりも高頻度に検出された。また、各血清サンプルのSENウイルス陽性率を比較するために、定量PCRを実施したところ、血管炎患者17名中13名(76.5%)、健常人患者5名中2名(40%)でSENウイルスが検出された。次に、患者の臨床的特徴によってSENウイルスのリード数が異なるかどうかを検討した。皮膚動脈炎患者では、健常人と比較してSENウイルスのリード数の割合が有意に高いことが分かった。ユークリッド距離に基づく主成分分析を用いて血清サンプルのβ多様性を調べたところ、血管炎患者と健常人の間に差のある傾向が見られた(PERMANOVA: $R^2=0.06465$, $p=0.0486$)。また、血管炎患者と健常人との間の差異を検出するために、線形判別分析効果量を用いて血清細菌分類群を分析した。血管炎患者の血清で顕著に増加した細菌は *Corynebacteriales* であった。

〔考察〕 本研究では、包括的なメタゲノム・ショットガンシーケンシングを利用して、血管炎患者では血清と皮膚組織中のウイルスと細菌の組成が変化することを証明した。特に、皮膚組織で検出される SEN ウイルスのリード数は、血管炎患者群で上昇していた。さらに、SEN ウイルスは IgA 血管炎患者よりも皮膚動脈炎患者の血清中に存在しやすい。SEN ウイルスは 1999 年に発見された血液媒介性の一本鎖環状 DNA ウイルスである。日本における SEN ウイルスの有病率は 10%と報告されており、一般人口に比べて肝疾患患者での発生率が高い(2)。HCV 関連混合型クリオグロブリン血症患者の約 5%が、小血管への免疫複合体 (IC) の沈着の結果として、クリオグロブリン血症性血管炎を発症する。本研究では、皮膚血管における SEN ウイルスの存在を組織学的に確認はできなかったが、他のウイルスと同様に、血管壁の直接傷害または血管壁への IC 沈着が血管炎を誘発する可能性がある。血清中に同定された細菌のうち、*Corynebacteriales* が血管炎患者の血清で有意に検出された。*Corynebacteriales* は通常、臨床的には重要でない汚染物質とみなされているが、腸内の *Corynebacteriales* 1 が白斑患者の罹病期間や血清 IL-18 値と関連している報告もある(3)。

〔結論〕 我々は皮膚血管炎における微生物叢の変化を発見し、メタゲノムショットガン解析を用いて病原微生物の新たな候補を同定した。このような微生物組成の変化は、血管炎の環境的誘因あるいは潜在的な悪化因子として作用する可能性がある。血管炎の発症と進行におけるこれらの病原体の重要性を検証するためには、さらなる研究が必要である。

〔文献〕

- 1) Jennette, J. C. et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 65, 1-11, doi:10.1002/art.37715 (2013).
- 2) Shibata, M. et al. The presence of a newly identified infectious agent (SEN virus) in patients with liver diseases and in blood donors in Japan. *J Infect Dis* 184, 400-404, doi:10.1086/322050 (2001).
- 3) Ni, Q. et al. Gut Microbial Dysbiosis and Plasma Metabolic Profile in Individuals With Vitiligo. *Front Microbiol* 11, 592248, doi:10.3389/fmicb.2020.592248 (2020).

〔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.
- 2) Miyata R, Miyabe C, Oki H, Motooka D, Nakamura S, Miyabe Y, Takenaka Y, Fukuya Y, Yudo K, Ishiguro N. Alteration of microbial composition in the skin and blood in vasculitis. *Sci Rep.* 2023 Sep 15;13(1):15317.

3 4 . Elotuzumab enhances CD16-independent NK cell-mediated cytotoxicity in both SLAMF7-positive and -negative myeloma cells

Yan-Hua Wang, Shotaro Hagiwara, Mayuko Ishii, Mari Miyazaki, Akihito Shinohara,
Kentaro Yoshinaga and Masayuki Shiseki
(Department of Hematology)

[Purpose] Multiple myeloma (MM) is an intractable hematological malignancy caused by abnormalities in plasma cells. Combination therapy using antibodies and natural killer (NK) effectors, which are innate immune cells with safe and potent antitumor activity, is a promising approach for cancer immunotherapy and can enhance antitumor effects. Elotuzumab (Elo) is an immune-stimulatory antibody that targets the signaling lymphocytic activation molecule family 7 (SLAMF7) expressed on the surface of MM and NK cells. In this study, we examined whether Elo can promote the NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) effect of a CD16-positive NK cell line as well as that of activated expanded NK cells derived from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) against target cells. Furthermore, we evaluated the antitumor effects of CD16-negative NK cells with and without Elo pretreatment on both SLAMF7-negative and -positive myeloma cells.

[Methods] The human leukemia cell line K562, myeloma cell lines U266, MM.1S, and RPMI 8226 were used as target (T) cells. As effectors (E), NK-92MI/CD16a and NK-92MI cell lines, and expanded primary NK cells (eNKs) from PBMCs of three healthy donors and three patients with MM after obtaining informed consent (Ethics Committee approval no. 4479) were used for assays. The PBMCs were cultured in medium containing cytokines and regents, and split into half every 3–4 day at 37 °C in 5% CO₂ for 3 weeks as previously described by our group ¹⁾. To evaluate the effects of Elo upon coculture of effectors with target cells, FCM assay, LDH assay, ELISA, and quantitative RT-PCR were performed at different $E : T$ ratios and time courses.

[Results] Both the two NK cell lines were found to express very high levels of CD56 and SLAMF7. NK-92MI/CD16a showed high CD16 expression, and no expression was detected in NK-92MI. High-purity NK (CD56⁺CD3⁻) were obtained from the PBMCs of donors and patients with MM (83.8% and 64.7%, day 21, respectively) after expansion; while CD56⁻CD3⁺ were clearly decreased both in these PBMCs. MM.1S expressed high levels of SLAMF7, while other target cells showed no expression. Efficacy of NK cell-mediated cytotoxicity against target cells increases as the $E : T$ ratio increases both in NK cell lines and expanded NK cells. Elo increases NK-92MI/CD16a- and expanded NK effector cell-mediated ADCC activity only against SLAMF7-positive MM.1S. On the other hand, the addition of Elo directly activated NK-92MI and resulted in significantly increased cytotoxicity not only against SLAMF7-positive MM.1S cells but also against SLAMF7-negative K562, U266, and RPMI 8226 cells, compared to cells pretreated without Elo. After pretreatment of NK-92MI with Elo

and subsequent culture with the target cells, CD107a degranulation and IFN- γ levels were significantly increased compared to cells pretreated without Elo. Also, the increased mRNA expression of granzyme B (GZMB) and tumor necrosis factor (TNF)- α seemed to be highly involved in the NK-92MI cell-mediated cytotoxicity against target cells after Elo stimulation compared cells pretreated without Elo. In the presence of Elo, the expression of IL-1 α was continuously elevated up to 4 hr, and showed a highly drastic increase at 24 hr.

[Discussion] Our findings are consistent with those of previous studies²⁾ demonstrating the effect of Elo on NK cells *via* CD16-mediated ADCC in killing SLAMF7-positive myeloma cells. This indirect effect depends on the efficient interaction between Fc-CD16a and NK cells. NK-92MI activity could be directly promoted by pretreatment with Elo, which resulted in an enhanced cytotoxic effect. These findings are supported by the observations that Elo-pretreated NK cells eliminate tumor cells through the release of granzymes and perforin, thereby producing IFN- γ and TNF- α which modulate the immune response and induce apoptosis in target cells. The results of IL-1 α expression may indicate that IL-1 α is on the pathway that activates and releases TNF- α in response to cell injury, thus inducing apoptosis. Notably, the effects of Elo on NK-92MI should also be considered in terms of the adequacy of Elo concentration, $E : T$ ratio, and prestimulation time. However, this study is limited only to SLAMF7-positive NK cell lines *in vitro*, further verifications using primary cells are needed in future studies.

[Conclusions] The present study demonstrated that Elo directly enhances the antitumor effects of CD16-independent NK cells. The genes GZMB, TNF- α , and IL-1 α are associated with the upregulation of NK-92MI cell-mediated cytotoxicity against both SLAMF7-positive and -negative myeloma cells upon Elo prestimulation.

[References]

- 1) Tanaka J., Tanaka N., Wang Y.H., et al. (2020) *Haematologica*. 105(4): e190-193
- 2) Collins S.M., Bakan C.E., Swartzel G.D., et al. (2013) *Cancer Immunol Immunother*. 62(12): 1841-1849

[Article]

- 1) Wang Y.H., Hagiwara S., Kazama H., et al. (2024) Elotuzumab enhances CD16-independent NK cell-mediated cytotoxicity against myeloma cells by upregulating several NK cell-enhancing genes. *J Immunol Res*. 2024:1429879

[Conference Presentation]

- 1) Hagiwara S., Wang Y.H., Kobayashi H., et al. Ex-vivo expanded NK cell therapy combined with elotuzumab for MRD after autologous stem cell transplantation: A phase I/II clinical trial in progress. 61st ASH Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, USA, 2019/12

35. 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、PRDX2 の遺伝子発現は増加した。ダサチニブのみにより ROS レベルに関係なく PRDX2no 細胞質タンパク質発現を増加させた。PRDX1 遺伝子発現は減少したが、細胞質蛋白レベルはダサチニブによって増加した。SUMO 化は PRDX1 のホウン訳後制御に関与することが示された。

〔考察〕 ダサチニブは NK 細胞増殖に関連しており、さらに抗酸化作用を有する PRDX1 と PRDX2 は NK 細胞増強因子としても知られている。また酸化ストレス下における PRDX1 は CAR-NK 細胞の生存に十四縋区割りを果たしている。TKI は PRDX1 と PRDX2 の遺伝子発現に同等に影響を及ぼすが、細胞質タンパクの増加はダサチニブのみにみられた。SUMO 化は遺伝子発現の制御を含む多くの細胞内プロセスを制御する。われわれの結果は、ダサチニブと SUMO 化が PRDX1 の細胞質発現を協調的に調節し、ダサチニブが PRDX1 の発現に独立して効果を有することを示した。

〔結論〕 PRDX1 と PRDX2 は白血病治療における潜在的な治療標的である可能性を示唆される。

〔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) 投稿中

3 6 . Upregulation of PD-1 and its ligands and expansion of T peripheral helper cells in the nephritic kidneys of lupus-prone BXSB- *Yaa* mice

Rina Moriyama, Yasuhiro Katsumata, Yuko Okamoto, Hanae Kikuchi and Masayoshi Harigai

(Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine)

[Purpose] This study aimed to investigate the role of the programmed cell death protein 1 (PD-1) pathway and T peripheral helper (Tph) cells in the pathogenesis of lupus nephritis using lupus-prone BXSB- *Yaa* mice.

[Methods] Male BXSB- *Yaa* mice and age-matched male C57BL/6 mice were used. The expression of PD-1 and its ligands (programmed death ligand-1, PD-L1 and programmed death ligand-2, PD-L2) and the phenotypes of kidney-derived cells and splenocytes expressing these molecules were analyzed by immunofluorescence and flow cytometry.

[Results] Nephritis spontaneously developed in 16-wk-old but not in 8-wk-old BXSB- *Yaa* or C57BL/6 mice. PD-1 was expressed on CD4⁺ mononuclear cells (MNCs) that infiltrated the glomeruli of 16-wk-old BXSB- *Yaa* mice. The frequency of CD4⁺PD-1⁺CXCR5⁺ICOS⁺ kidney-derived Tph cells was higher in 16-wk-old than in 8-wk-old BXSB- *Yaa* and C57BL/6 mice, whereas the frequency of CD4⁺PD-1⁺CXCR5⁺ICOS⁺ kidney-derived T follicular helper (Tfh) cells was not significantly different between the mice. PD-L1 was constitutively expressed in the renal tubules. PD-L2 was expressed in the glomeruli of 16-wk-old BXSB- *Yaa* mice. The frequency of PD-L1^{high}CD11c⁺CD3⁺CD19⁻ and PD-L2⁺CD11c⁺CD3⁺CD19⁻ kidney-derived MNCs in 16-wk-old BXSB- *Yaa* mice was significantly higher than that of the control mice. The percentage of kidney-derived Tph cells but not Tfh cells was correlated with the urinary protein levels and serum anti-dsDNA antibody titers in the nephritic mice.

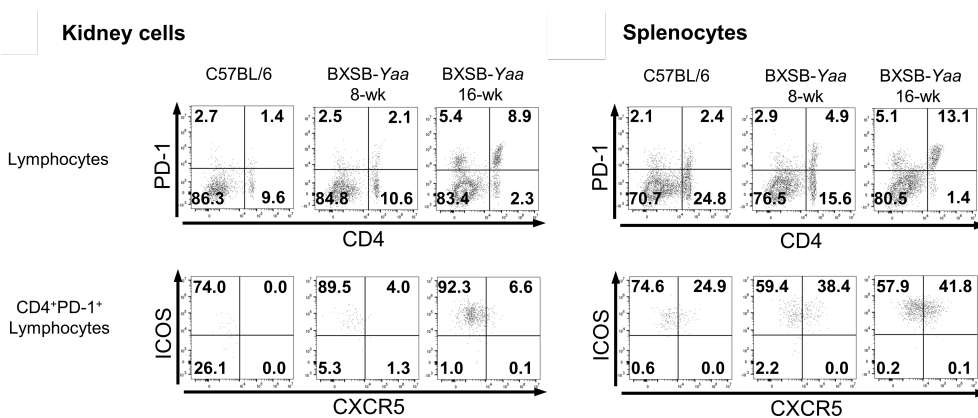


Figure 1. Representative dot plots from the flow cytometric analysis of CD4⁺PD-1⁺CXCR5⁺ICOS⁺ cells (considered as T peripheral helper [Tph] cells) and CD4⁺PD-1⁺CXCR5⁺ICOS⁺ cells (considered as T follicular helper [Tfh] cells), gated from the total kidney-derived and spleen-derived lymphocytes in C57BL/6 mice, 8-wk-old BXSB- *Yaa* mice, and 16-wk-old BXSB- *Yaa* mice.

[Discussion] The expression of PD-1 increased in the nephritic kidneys of the BXSB-*Yaa* mice in the present study. The upregulation of PD-1 mainly resulted from the expansion of the CD4⁺PD-1⁺CXCR5⁺ICOS⁺ lymphocytes (Tph cells) in the kidneys. In contrast, the frequency of CD4⁺PD-1⁺CXCR5⁺ICOS⁺ lymphocytes (Tfh cells) was not significantly different between the prenephritic and nephritic BXSB-*Yaa* mice in either the kidney or spleen, although they were higher than those of the C57BL/6 mice. This suggests that PD-1 has different roles in the kidneys and spleen in LN and that Tph cells may contribute locally to the development of nephritis compared to Tfh cells. The pathomechanisms by which the expression of PD-L1 and PD-L2 increased in the nephritic kidneys of the BXSB-*Yaa* mice seem complex. Through immunofluorescence microscopy, PD-L1 but not PD-L2 was constitutively expressed on the renal tubules, whereas PD-L2 was upregulated in the glomeruli (presumptively the mesangium) of 16-wk-old BXSB-*Yaa* nephritic mice in the present study. On the other hand, flow cytometric analysis revealed that the majority of the PD-L1^{high} or PD-L2⁺ MNCs among the kidney-derived cells were CD11c⁺CD3⁻CD19⁻ MNCs that coexpressed CD11b and F4/80 in the 16-wk-old BXSB-*Yaa* mice and that the frequency of these CD11c⁺ MNCs was higher than that in 8-wk-old BXSB-*Yaa* and C57BL/6 mice. It is speculated that the frequency of the kidney-resident mononuclear phagocytes and the PD-L1 and PD-L2 expression on these cells increased in nephritic kidneys and that the infiltrating PD-1⁺ Tph cells interact with these cells, PD-L1⁺ renal tubules, and PD-L2⁺ mesangium. The percentage of CD4⁺PD-1⁺CXCR5⁺ICOS⁺ kidney-derived lymphocytes (Tph cells) in 16-wk-old BXSB-*Yaa* mice was significantly correlated with clinical lupus activity, namely the urinary protein levels and serum anti-dsDNA antibody titers. Regulation of the PD-1:PD-L pathway is an attractive treatment target for systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases.

[Conclusions] The results of this study suggest that kidney-infiltrating PD-1⁺ Tph cells expanded concomitantly with the upregulation of PD-L1 and PD-L2 in the kidneys and the progression of lupus nephritis.

3.7. 全身性強皮症患者における血清 CA19-9 値と間質性肺疾患に関する横断的研究

廣瀬光¹、樋口智昭^{1,2}、市村裕輝¹、高木香恵³、栃本明子¹、勝又康弘¹、針谷正祥¹、川口鎮司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、³足立医療センター・内科)

〔目的〕 全身性強皮症 (SSc) 患者における間質性肺疾患 (ILD) は代表的な合併症の一つ¹⁾で、SSc 関連死の原因として最多²⁾である。SSc-ILD の正確な予後予測は困難であるが、バイオマーカーの活用により、その精度向上が期待されている。CA19-9 は他の膠原病関連 ILD や特発性肺線維症³⁾において疾患活動性や予後予測での有用性が示されているが、SSc-ILD においては明らかではない。本研究では、全身性強皮症関連間質性肺疾患 (SSc-ILD) のバイオマーカーとして CA19-9 を評価した。

〔方法〕 2010 年から 2021 年までに東京女子医科大学病院に入院し、胸部 CT 検査を受けた SSc 患者を対象とした。患者は胸部 CT 所見に基づいて間質性肺疾患 (ILD) と診断され、肺機能検査所見と合わせて limited または extensive ILD 群に分類された。健常人 32 人と SSc 患者 56 人の血清 CA19-9 値を測定し、血清 CA19-9 値の群間差及び肺機能との相関を評価した。本臨床研究は本学の倫理委員会の承認を受けて行った (No.: 3733-R2, 2021-0091)。

〔結果〕 SSc 患者 56 人の罹病期間は中央値 1.1 年 [四分位範囲 : 0.3~4.3]、37 人がびまん皮膚硬化型、modified Rodnan total skin thickness score の中央値は 17 点 [四分位範囲 : 10~23] であった。40 人が ILD を有し、17 人が extensive ILD 群に分類された。血清 CA19-9 値は、健常人より SSc 患者で高かった。limited ILD 群と比較して、extensive ILD 群で有意に上昇し (中央値 [四分位範囲] : 25.7 U/mL [10.1~50.8] 対 8.8 U/mL [4.5~17.6], $p=0.02$)、ILD 面積と相関した ($r=0.30$, $p=0.02$) (図 1、2)。肺機能との相関は、%FVC、%DLco のいずれも認めなかった (%FVC $r=-0.04$, $p=0.77$, %DLco $r=0.10$, $p=0.50$)。

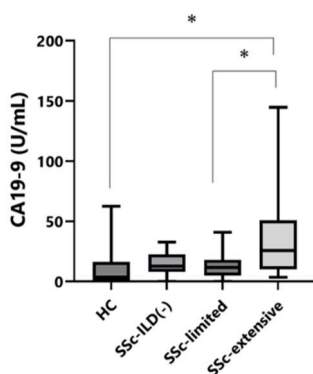


図 1. CA19-9 の群間差

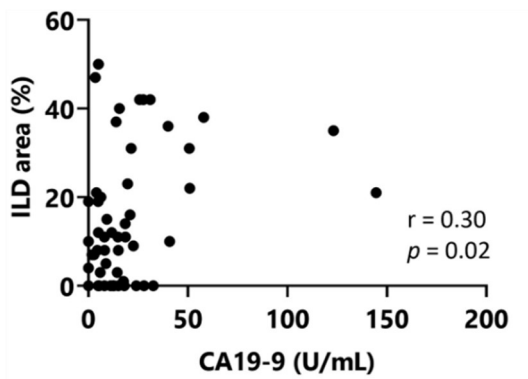


図 2. ILD と CA19-9 の相関

〔考察〕 本研究では、extensive ILD 群で血清 CA19-9 値が上昇することと、血清 CA19-9 値と ILD 面積とが正の相関を示すことが明らかとなった。バイオマーカーとはその目的に応じて、診断、予後予測などのために使用されるが、本研究では、CA19-9 値は extensive ILD 群で有意に上昇しており、広範囲に広がる ILD の診断マーカーとなる可能性が示唆された。また、extensive ILD 群では死亡率がより高いことが示されているので、血清 CA19-9 値の上昇は予後予測のマーカーとなる可能性がある。本研究は横断的研究であるため、バイオマーカーとしての血清 CA19-9 値の有用性を評価するためには、予後との関連や治療中の血清 CA19-9 値の定量的変化など、縦断的評価を含むさらなる研究が必要と考える。

〔結論〕 本研究の結果から、血清 CA19-9 値は SSc 患者において ILD の面積と関連した。SSc 患者において extensive ILD 群を同定するためのマーカーとなる可能性が示唆された。

〔文献〕

- 1) Christopher P D., Dinesh K., et al. (2017) Lancet. 390(10103): 1685-1699
- 2) Muriel E., Christophe M., et al. (2017) Ann Rheum Dis. 76: 1897
- 3) Toby M M., Eunice O., et al. (2017) Lancet Respir Med. 5(12): 946-955

〔発表論文〕

- 1) Hirose H., Higuchi T. et. al. Int J Rheum Dis. 2024 Jan;27(1):e14978

3 8 . Prognostic impact of immune-related adverse events in metastatic renal cell carcinoma treated with nivolumab plus ipilimumab

Takashi Ikeda^{1,2}, Hiroki Ishihara¹, Yuki Nemoto², Hidekazu Tachibana³, Hironori Fukuda¹, Kazuhiko Yoshida¹, Toshio Takagi¹, Junpei Iizuka¹, Yasunobu Hashimoto², Hideki Ishida¹, Tsunenori Kondo³ and Kazunari Tanabe¹

(¹ Department of Urology, Kidney Center, ² Department of Urology, Saiseikai Kawaguchi General Hospital, Saitama, Japan, ³ Department of Urology, Tokyo Women's Medical University Adachi Medical Center)

[Purpose] Evidence regarding the prognostic impact of immune-related adverse events (irAEs) remains limited in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC) treated with nivolumab plus ipilimumab as a first-line systemic therapy. Thus, we investigated the association between irAE development and oncological outcomes during nivolumab plus ipilimumab therapy.

[Methods] We retrospectively evaluated 46 patients with mRCC who were treated with nivolumab plus ipilimumab at our hospital and its affiliated institutions. The associations between irAE development and progression-free survival (PFS), overall survival (OS), and objective response rates (ORRs) were assessed after treatment initiation.

[Results] A total of 60 irAEs occurred in 33 patients (72%), with 24 grade ≥ 3 irAEs developed in 20 patients (43%). PFS was significantly longer in patients with irAEs than that in patients without irAEs ($P < 0.0001$); however, OS was not different ($P = 0.571$) (Fig.1). Multivariable analysis further revealed that the development of irAEs was an independent predictor of a longer PFS (hazard ratio: 0.18, $P = 0.0005$). A landmark analysis for the initial four cycles of nivolumab plus ipilimumab administration also showed that PFS was significantly longer in patients with irAEs than that in patients without irAEs ($P = 0.0386$). The ORRs were also higher in patients with irAEs ($P = 0.0064$). Furthermore, in 22 patients (48%) who discontinued nivolumab plus ipilimumab treatment, the 6-month PFS rate was 87%.

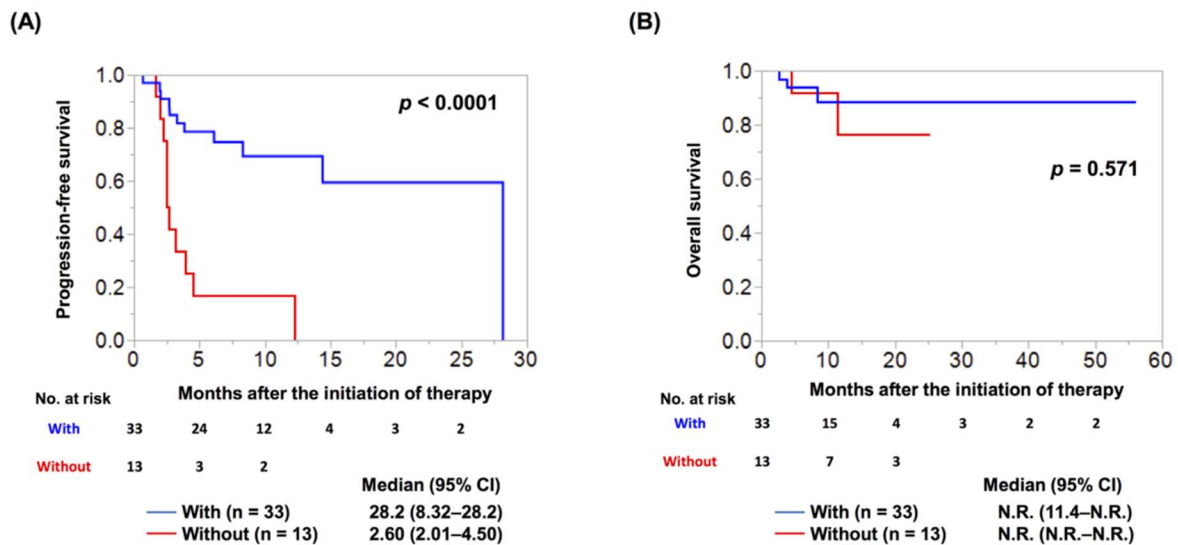


Fig. 1. Survival of patients after the initiation of nivolumab plus ipilimumab therapy based on the development of irAEs. (A) Progression-free survival and (B) overall survival. irAEs, immune-related adverse events; CI, confidence interval; N.R., not reached

[Discussion] The treatment strategies for mRCC have dramatically changed because of the appearance of novel combinations of immune checkpoint inhibitors and molecular-targeted therapy. Similar to nivolumab plus ipilimumab, other immune checkpoint inhibitor regimens can also frequently induce irAEs and require predictive or prognostic factors of survival. Taken together, future studies are needed to investigate the association between irAE development and the outcome for more effective treatment of mRCC.

[Conclusions] This multi-institutional study showed that irAE development was significantly associated with PFS but not with OS in patients treated with nivolumab plus ipilimumab as a first-line therapy. The development of irAEs may be used as a surrogate prognostic marker for PFS in this treatment regimen.

[Article]

1) Ikeda T, Ishihara H., Nemoto Y., et al. (2021) Urol Oncol. 39(10) : 735.e9-735.e16

39. ACO 合併慢性鼻副鼻腔炎の病態形成機序の解明

向井昌功、松居可奈子、野中学
(耳鼻咽喉科学)

〔目的〕 喘息 (BA) を合併する慢性副鼻腔炎 (CRS) は再発しやすく難治性であることが多い。one airway, one disease の観点から喘息と慢性副鼻腔炎は同じ炎症病態と考えられ始めている。近年、独立した疾患と考えられてきた喘息と COPD がオーバーラップする ACO (Asthma COPD Overlap) が定義された¹⁾。よって喘息合併慢性副鼻腔炎には、ACO 合併群と非合併群が存在する。肺領域では COPD は好中球系の炎症性疾患、喘息は好酸球系の炎症性疾患とされている。鼻副鼻腔炎でも同様の炎症性変化が確認されるのか、この両群における副鼻腔粘膜の細胞浸潤やサイトカインプロファイル、臨床的特徴を明らかにすることを目的とする。

〔方法〕 BA 合併 CRS 患者 16 名の鼻茸 (BAnp) と ACO 合併 CRS 患者 15 名の鼻茸 (ACOnp) を採取し、両者の炎症細胞浸潤の特徴を免疫染色にて検討した。

〔結果〕 ACOnp は BAnp と比較して CD8+リンパ球と CD163+細胞 (マクロファージ) の数がそれぞれ p 値 0.02 未満、p 値 0.01 未満と有意に多く、エラスターゼ陽性細胞 (好中球) は多い傾向を認めた。

〔考察〕 ACOnp には BAnp よりも COPD の特徴がみられた^{2),3)}。ACO 患者はその特徴が上気道の鼻茸にも見られ、BA 患者よりもステロイド抵抗性を示す可能性がある。

〔結論〕 ACO 合併 CRS と BA 合併 CRS は異なる炎症病態と考えられた。

〔文献〕

- 1) 喘息と COPD のオーバーラップ (ACO) 診断と治療の手引き 2018
- 2) Barnes PJ. (2017) Clin Sci (Lond). 131(13):1541-1558
- 3) Jing Wang, Huajie Lv, Zhuang Luo, et. al. (2018) Respir Res. 19(1):47

〔学会発表〕

- 1) 向井昌功. Asthma and COPD Overlap 合併慢性鼻副鼻腔炎患者の鼻茸における炎症性浸潤細胞の特徴. 第 123 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会、兵庫、2022/5

40. 癌性腹水中の腫瘍浸潤 $\gamma\delta$ 型 T 細胞培養能回復の検討

阿部結貴¹、小林博人²、田畑務¹

(¹産婦人科学、²足立医療センター・輸血・細胞治療部)

〔目的〕 卵巣癌は癌性腹水を有する進行癌で見つかることが多く、予後不良である。癌性腹水の症状緩和に腹水濾過濃縮再静注法が有効であるが、頻回の施行が必要であり、難治性腹水に対する新しい治療方法が求められている。 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は、癌免疫細胞療法のエフェクター細胞として、国内外で様々なアプローチで臨床試験が行われている^{1,2)}。In vitro においては、末梢血単核球に活性化剤としてゾレドロン酸 (Zol)、増殖因子として IL (Interleukin) -2 を加える事で大量培養が可能である。さらに私たちは IL-18 を添加する事で、CD56 陽性 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖を促し、細胞傷害活性が増強する事を報告した³⁾。また、腹水濾過濃縮時に使用される濾過カラムから回収した腹水浸潤リンパ球 (Ascites Infiltrating Lymphocytes: AILs) からも、Zol と IL-2 をもちいて $\gamma\delta$ 型 T 細胞を培養できることを報告している⁴⁾。課題としては末梢血 $\gamma\delta$ 型 T 細胞に比べて培養効率が約 1/50 と低い⁵⁾ ため、臨床応用するためには効率的に増殖させる方法の開発が必要である。

Zol の代わりに、新たに合成されたビスホスホネートプロドラッグである tetrakis-pivaloyloxymethyl 2-(thiazole-2-ylamino) ethylidene-1,1-bisphosphonate (PTA)^{6,7)} を用いても、AILs 中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞を培養が可能である。今回の研究では、活性化剤として Zol と PTA を用いて培養し、抗 PD-1 (Programmed cell death 1) 抗体としてニボルマブを添加することで、AILs 中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖回復が得られるか検討した。

〔方法〕 東京女子医科大学病院産婦人科に入院中で、癌性腹水貯留に対して腹水濾過濃縮再静注法を行った患者から同意を得て、濾過カラムより AILs を採取した。抗原として Zol または PTA を用い、IL-2 と IL-18 を添加し 14 日間培養した。培養時にニボルマブを添加する群、しない群に分け、培養前後にフローサイトメトリーを用いて細胞表面抗原を解析した。この研究は「癌性腹水微小環境が及ぼす $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖抑制解除を目指した新規免疫細胞療法開発」(承認番号 5376) として本学倫理委員会で承認を受けて行っている。

〔結果〕 患者 5 例の AILs を用いて上記の通り培養した。中央値 (最小値 - 最大値) で示すと培養前の CD3 陽性細胞中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の割合は 0.90 (0.25 - 2.22) %であった(図 1)。

$\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖率、培養後 CD3 陽性細胞中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の割合はそれぞれ、ニボルマブ添加なく PTA で培養した群 : 70.6 (15.1 - 463) 倍、78.2 (1.4 - 91.9) %、ニボルマブ添加なく Zol で培養した群 : 212 (99.4 - 2142) 倍、87.5 (5.3 - 95.3) %、ニボルマブ添加あり PTA で培養した群 : 192 (58.3 - 765)

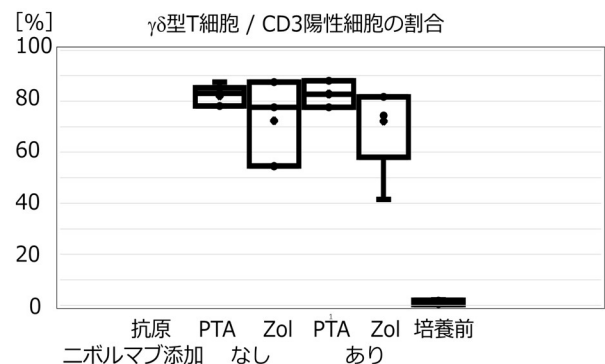


図 1. CD3 陽性細胞中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞の割合

倍、77.6 (8.6 - 88.4) %、ニボルマブ添加あり Zol で培養した群 : 828.6 (45.0 - 3300) 倍、81.6 (53.3 - 95.8) %であった (図 1、2)。培養前後の CD3 陽性細胞中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞割合は有意に増加 ($p < 0.05$) していたが、活性化剤やニボルマブ追加有無には関係しなかった。 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖率はニボルマブを添加した方が高い傾向にあった (有意差なし)。また、活性化剤としては Zol よりも PTA を使用した方が増殖率は高い傾向にあった (有意差なし)。

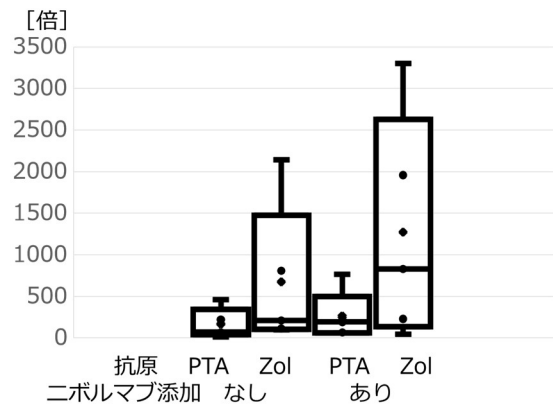


図 2. $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖率

〔考察〕 有意差は認められなかったが、疲弊 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は PD-1 を発現することから、培養時に PD-1 を阻害することで、一部の $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖能が回復し、増殖率が改善された可能性が考えられた。PTA は Zol よりも強力に $\gamma\delta$ T 細胞を刺激し増殖させる活性化剤として開発されたが、末梢血中と腹水中の $\gamma\delta$ T 細胞では効果が異なる可能性も考えられる。今回は 5 例のみと少数例での検討であったため、今後症例数を増やして観察していきたい。

〔結論〕 腹水濾過濃縮時に使用される濾過カラムから得られた AILs 中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞培養時に抗 PD-1 抗体としてニボルマブを添加し、増殖回復が得られる可能性がある。

〔文献〕

- 1) Kobayashi H., Tanaka Y. (2015) Pharmaceuticals (Basel). 8(1): 40-61.
- 2) Tanaka Y., Kobayashi H., Terasaki T., et al. (2007) Medicinal Chemistry. 3(1): 85-99.
- 3) Abe Y., Kobayashi H., Akizawa Y., et al. (2018) Annals of Cancer Research and Therapy. 26(2): 71-6.
- 4) Abe Y., Kobayashi H., Akizawa Y., et al. (2018) Anticancer Res. 38(7): 4327-31.
- 5) Abe Y., Kobayashi H., Kanno T., et al. (2019) Annals of Cancer Research and Therapy. 27(2): 73-9.
- 6) Matsumoto K., Hayashi K., Murata-Hirai K., et al. (2016) Chemmedchem. 11(24): 2656-63.
- 7) Tanaka Y., Iwasaki M., Murata-Hirai K., et al. (2017) Scientific Reports. 7.