難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と

新規治療法の開発

(プロジェクト番号：S1511014)

平成 27 年度～令和元年度

文部科学省

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

研究成果報告書

令和 2 年 5 月

学校法人名：日本大学
大　学　名：日本大学
研究組織名：医学部総合医学研究所・
免疫アレルギー学グループ
研究代表者：照井　正　（日本大学医学部・教授）

<目　　次>

1. はしがき

本報告書は、平成 27 年度から文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(研究拠点を形成する研究)に採択された研究プロジェクト「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」の 5 年間の研究成果をまとめたものです。本事業では、皮膚科学、呼吸器内科学、血液膠原病内科学、整形外科学、産婦人科学および歯科学の臨床免疫専門医および基礎免疫・アレルギー学者が連係し、横断的な研究拠点を形成し、臨床から得られたデータを基に個々の疾病に対する多面的、集学的な取り組みを行い、難治性の免疫・アレルギー疾患の克服を目指しました。具体的には、慢性特発性蕁麻疹の病態の一部を解明し、治療選択の新たなバイオマーカーを発見しました。関節リウマチの病態におけるマスト細胞の役割の解明と EB ウイルスの関与について新たな知見を得ました。免疫系ヒト化 HLA-DR4 transgenic マウスにおいて、慢性移植片対宿主病様の臓器病変が起きること、慢性移植片対宿主病に関連する自己抗体の出現を発見しました。血管内Ｂ細胞性リンパ腫の予後に MYC の発現が寄与している可能性を初めて示しました。マウス喘息モデルによる網羅的遺伝子解析およびヒト化マウスによる喘息モデル構築で難治性喘息の病態解明、新規標的同定を行いました。また、IgE 依存性に活性化したヒトマスト細胞から遊離した細胞外小胞中の miR103a-3p は、ヒト 2 型自然リンパ球からの IL-5 産生を有意に増強させることを明らかにしました。また本事業に参画する各科の大学院生を対象に、自立した論理的な思考力と問題の解決能力を鍛え、優れた研究者とリサーチマインドを持った良き臨床医の育成に貢献しました。

最後に本研究プロジェクトを支えてくださった文部科学省、日本私立大学振興店共済事業団、共同研究者の皆様、研究スタッフの方々、日本大学本部研究推進部、医学部研究事務課、研究支援部の皆様、関連研究機関の方々に深く御礼を申し上げます。また本プロジェクトの外部評価委員として評価を賜りました奥山隆平先生(信州大学医学部皮膚科学教授)、松田　彰先生(順天堂大学医学部眼科学准教授)、吉原重美先生(獨協医科大学小児科学教授)、松本健治先生(独立行政法人国立成育医療センター部長)に深く感謝申し上げます。

研究代表者　照井　正

2. 研究成果報告書概要

（様式 2）

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

平成 27 年度～令和元年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」研究成果報告書概要

１　学校法人名　日本大学　　　２　大学名　日本大学

３　研究組織名　医学部総合医学研究所（免疫アレルギー学グループ）

４　プロジェクト所在地　東京都板橋区大谷口上町 30-1

５　研究プロジェクト名　難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発

６　研究観点　研究拠点を形成する研究

７　研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
照井　正	医学部	教授

８　プロジェクト参加研究者数　17　名

９　該当審査区分　理工・情報　　生物・医歯　　人文・社会

１０　研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
照井　正	医学部・教授	アトピー性皮膚炎および慢性蕁麻疹の病態解明	アトピー性皮膚炎および慢性蕁麻疹の解析
山本樹生	医学部・客員教授	産婦人科領域免疫疾患の病態の解明	習慣性流産、不育症および妊娠高血圧腎症の自己抗体の病態への関与
武井正美	医学部・教授	関節リウマチの病態解析	SAP 遺伝子の発現と関節リウマチ病態の関係解析
木澤靖夫	薬剤部・教授	難治性（ステロイド抵抗性）気道炎症疾患モデル動物の作成	難治性（ステロイド抵抗性）気道炎症疾患の病態解析
藤田英樹	医学部・准教授	尋常性乾癬の病態解析	尋常性乾癬の病態解析
斎藤　修	医学部・兼任講師	関節リウマチの病態解析	関節リウマチ関節滑膜細胞解析
權　寧博	医学部・教授	気管支喘息から COPD への移行病態の解明	COPD･喘息患者の血清や気道分泌液のオミックス解析
北村　登	医学部・准教授	関節リウマチの病態解析	SAP 遺伝子の発現と関節リウマチ病態の関係解析
千島史尚	医学部・准教授	産婦人科領域免疫疾患の病態の解明	習慣性流産、不育症および妊娠高血圧腎症の自己抗体の病態への関与

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

丸岡秀一郎	医学部・准教授	気管支喘息の病態の解明	気管支喘息マウスモデルの実験
岡山吉道	医学部・准教授	難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解	マスト細胞実験
浅野正岳	歯学部・教授	歯周病と関節リウマチの関係の解明	歯周病患者のシトルリン化抗体の検索
高橋恭子	生物資源学部・教授	難治性免疫・アレルギー性疾患の病態の解明	細胞実験・動物実験
葉山惟大	医学部・助教	慢性蕁麻疹の病態解析	慢性蕁麻疹の病態解析
（共同研究機関等）			
松本健治	独立行政法人国立成育医療センター部長	マスト細胞に発現する疾患特異的遺伝子の解析	DNA chip 実験と解析
村上　誠	東京大学大学院医学系研究科・教授	マスト細胞に発現する疾患特異的遺伝子の in vivo での検討	遺伝子改変動物作成と動物実験
布村　聡	佐賀大学医学部・准教授	難治性免疫・アレルギー性疾患の病態の解明	細胞実験・動物実験

＜研究者の変更状況（研究代表者を含む）＞

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
関節リウマチの病態解析	医学部・准教授	斎藤　修	関節リウマチ関節滑膜細胞解析

（変更の時期：令和元年 10 月 1 日）

新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
医学部・准教授	医学部・兼任講師	斎藤　修	関節リウマチ関節滑膜細胞解析

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
気管支喘息から COPD への移行病態の解明	医学部・准教授	権　寧博	COPD･喘息患者の血清や気道分泌液のオミックス解析

（変更の時期：平成 30 年 4 月 1 日）

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
医学部・准教授	医学部・教授	權　寧博	COPD・喘息患者の血清や気道分泌液のオミックス解析

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
難治性免疫・アレルギー性疾患の病態の解明	生物資源科学部・准教授	高橋　恭子	細胞実験・動物実験

（変更の時期：平成 30 年 4 月 1 日）

新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
生物資源科学部・准教授	生物資源科学部・教授	高橋　恭子	細胞実験・動物実験

旧 1

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
難治性免疫・アレルギー性疾患の病態の解明	医学部・助教	布村　聡	細胞実験・動物実験

（変更の時期：平成 27 年 12 月 1 日）

旧 2

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
医学部・助教	佐賀大学医学部・助教	布村　聡	細胞実験・動物実験

（変更の時期：平成 29 年 7 月 1 日）

新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
佐賀大学医学部・助教	佐賀大学医学部・准教授	布村　聡	細胞実験・動物実験

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
マスト細胞に発現する疾患特異的遺伝子の in vivo での検討	公益財団法人東京都医学総合研究所・参事研究員	村上　誠	遺伝子改変動物作成と動物実験

（変更の時期：平成 29 年 4 月 1 日）

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
公益財団法人東京都医学総合研究所・参事研究員	東京大学大学院医学系研究科・教授	村上　誠	遺伝子改変動物作成と動物実験

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
産婦人科領域免疫疾患の病態の解明	医学部・教授	山本　樹生	習慣性流産の病態解析

（変更の時期：平成 28 年 4 月 1 日）

新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
医学部・教授	医学部・客員教授	山本　樹生	習慣性流産の病態解析

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
気管支喘息の病態の解明	医学部・助教	丸岡　秀一郎	気管支喘息マウスモデルの実験

（変更の時期：平成 27 年 12 月 1 日）

新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
医学部・助教	医学部・准教授	丸岡　秀一郎	気管支喘息マウスモデルの実験

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
歯周病と関節リウマチの関係の解明	歯学部・准教授	浅野　正岳	歯周病患者のシトルリン化抗体の検索

（変更の時期：平成 27 年 4 月 1 日）

新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
歯学部・准教授	歯学部・教授	浅野　正岳	歯周病患者のシトルリン化抗体の検索

１１　研究の概要（※　項目全体を１０枚以内で作成）

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

（１）研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

近年、先進国においてその罹患率が増加し、社会問題にもなっている免疫・アレルギー疾患の病因、病態を環境因子、特に感染症どの炎症によって出現する免疫異常の分子機構を明らかにし、免疫・アレルギー疾患を扱う臨床各科の横断的な共同研究を通して、予防、治療に貢献することを目的とする。難治性免疫・アレルギー疾患について、遺伝子のみでは解決されないことは明らかで、またトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどの網羅的な解析の限界も次々に知られ、今や個々の疾病に対する多面的、集学的な取り組みの必要性が再認識されて来ている。本事業は、臨床から得られたデータを基に皮膚科学、呼吸器内科学、血液膠原病内科学、整形外科学、産婦人科学および歯科学の臨床免疫専門医および基礎免疫・アレルギー学者が連係し、研究拠点を形成し、大学院生と若手医師の研究指導を行い、難治性の免疫・アレルギー疾患の克服を目指す。また本事業に参画する各科の大学院生を対象に、自立した論理的な思考力と問題の解決能力を鍛え、優れた研究者とリサーチマインドを持った良き臨床医の育成に貢献することもひとつの目的になる。学術的な特色としては、難治性免疫・アレルギー疾患を扱う臨床各科の横断的な共同研究である点である。現在これら臨床各科が一同に会してセミナーおよび研究討論を行う場を設け会合を定期的に実施している。また疾患の炎症部位に局在しているヒトマスト細胞を解析対象として取り扱う点も特色である。ヒトマスト細胞は多様性を示し、組織から分離した場合、組織が肺などの粘膜組織や、皮膚や滑膜などの結合組織であるかによって、刺激に対する反応性や、遺伝子発現のプロファイルなどの性質が異なる。このようなマスト細胞が保持する性質は、免疫疾患の種別によっても異なっている。呼吸器内科は上皮細胞を専門とし、関節リウマチ研究班では滑膜細胞やリンパ球研究を中心としてきたが、免疫・アレルギー疾患患者の病変部に局在しているマスト細胞と上皮細胞/線維芽細胞との相互作用の解析を行なうことも大きな特徴である。現在、培養の難しさなどの点から、日本国内でヒトマスト細胞を用いた研究を行なっている研究施設はほとんど無く、免疫・アレルギー疾患とヒトマスト細胞に関する研究分野で主導的な役割を果たすという意味で本研究プロジェクトの意義は大きい。

（２）研究組織

アレルギー学、免疫学に携わる臨床医および研究者の有機的な連携により学問融合的な共同研究を可能とし、診療部門の枠を超えた臨床の共同研究チームに基礎研究者も加わることによって、基礎と臨床の緊密な連携による横断的な総合医学研究拠点を形成している。皮膚科学、呼吸器内科学、整形外科学、血液膠原病内科学、産婦人科学および歯科学分野の臨床免疫専門医および基礎免疫・アレルギー学者が連係し、大学院生と若手医師の研究指導を行っている。大学院生は各科より計 18 名を受け入れて、PD と RA は計 6 名雇用した。

（３）研究施設・設備等

＜施設＞
日本大学医学部のリサーチセンター１階{研究室(1F-1, 1F-2)、培養室(1F-1, 1F-2), セミナー室}, リサーチセンター2 階化学分析室(2F-1)の１部を使用した。
＜主な装置、設備＞ 本プロジェクトにおいて、主に使用された装置、設備のうち、私学助成を受けたもので共同利用機器と して多くの研究者が使用した装置と利用時間(平成 27～令和元年度）は以下である。

1. フローサイトメーター(Cytomics FC500): (平成 27 年度に導入, 1320 時間)
2. マグネティックセルソーサー: (平成 14 年度に導入, 190 時間)
3. バイオフリーザー: (平成 19 年度に導入, 43440 時間)
4. 自動炭酸ガス細胞培養装置: (平成 20 年度に導入, 43440 時間)
5. UV サンプル撮影装置: (平成 20 度に導入, 156 時間)
6. 超低温槽: (平成 24 度に導入, 156 時間)
7. 超純水製造システム: (平成 23 度に導入, 5290 時間)
8. 次世代シークエンサー(イルミナ MiSeq, Thermofisher ION PGM): (平成 25 年度に導入, 78 時間)

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

（４）研究成果の概要　※下記、１３及び１４に対応する成果には下線及び＊を付すこと。

1）血液膠原病内科学分野

＜優れた成果が上がった点＞

*1. 血管内Ｂ細胞性リンパ腫の予後に MYC の発現が寄与している可能性を初めて示した。

*2. 免疫系ヒト化 HLA-DR4 transgenic マウスにおいて、慢性移植片対宿主病様の臓器病変が起きること、慢性移植片対宿主病に関連する自己抗体の出現を発見した。

＜課題となった点＞

1. 血管内Ｂ細胞性リンパ腫の MYC 発現機構が不明である。
2. ヒト化マウスモデルにおいて慢性移植片対宿主病の特徴である線維化を認めていない。臓器病変を生じる病態の解明、血清学的所見の観察などが十分でない。

＜自己評価の実施結果と対応状況＞

1. 血管内Ｂ細胞性リンパ腫の EBER、MYC、BCL2 などの発現を初めて示し病態の解明に貢献している。
2. ヒト化マウスにおける慢性 GVHD モデルの検討は概ね順調である。

＜外部（第三者）評価の実施結果と対応状況＞

平成 28 年度報告会において「概ねしっかりと質の高い担保された研究が展開されている。強いて改善点をあげるのであれば強皮症において、多数の強皮症患者の心臓病変の解析を行っているが、解析の質をより高めるために、前向き研究をより大規模に実施するべく、他施設との連携を積極的に検討すると良いと思われた。」との外部評価者のコメントをもらった。板橋中央総合病院とは以前より共同研究で症例を共有しているので、本研究でも倫理委員会に共同研究で書類を提出し、多施設との連携で症例を収集している。

平成 29 年度報告会において「マウスモデルの説明に分子作用の図解があると理解しやすかった。」との外部評価者のコメントをもらい、下記の通り図表を作成した。

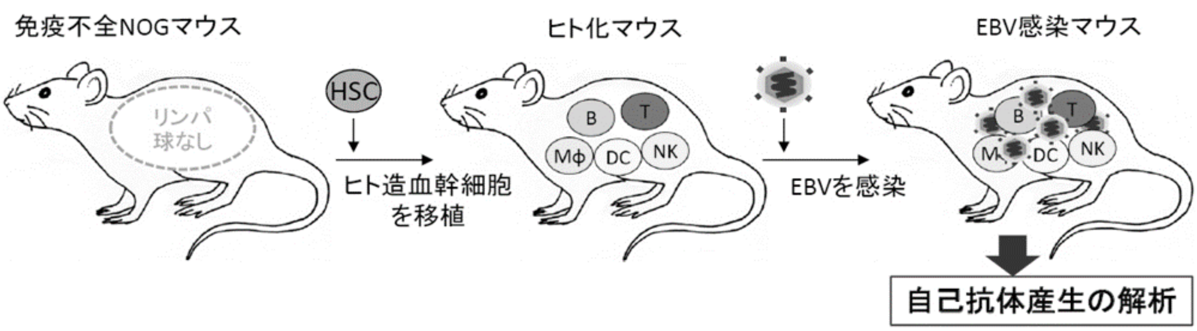


図1. EBV感染ヒト化マウスの作製と自己抗体産生の解析

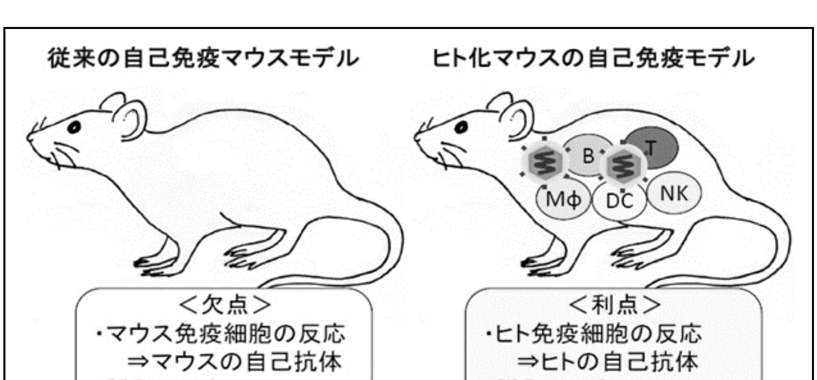


図2. 従来の自己免疫マウスモデルとヒト化マウスモデルの比較

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

平成 30 年度報告会において
1. 「ヒト免疫化 MHC マウスの皮膚以外の所見や自己抗体の有無についての検討が必要である。」との外部評価者のコメントをもらい、皮膚以外に肝臓、肺については組織学的検討を行い、炎症性細胞浸潤や線維化の所見を確認している。また自己抗体に関しては慢性 GVHD 時に検出されるといわれるヒト抗 PDGFRα抗体を Western blot 法で証明した。
2. 「本新規の染色対転座を伴った白血病に対する発症機序の詳細な解明が必要である。」との外部評価者のコメントをもらった。イルミナ社シーケンサーHiSeq にて、その断片の両側 100 塩基程度に対し網羅的シーケンスを行った。得られたペアのシーケンス結果を参照配列にマッピングし、ペアのそれぞれが参照配列のどの位置にマッピングされるかを集計することで転座点を検出し新規融合遺伝子 ZNF362/MAML3 を同定した。また PCR 法で ZNF362/MAML3 RNA の転写を確認した。ホルマリン固定標本で蛋白の発現を検討する。さらに ZNF362/MAML3 RNA を BaF3 細胞に遺伝子導入して機能解析する予定である。

令和元年度報告会において
１.「本事業にかけるエフォートが少ないように感じました。また、IVL に関しては是非ともリンパ腫細胞を直接解析する（例えば single cell RNAseg 等）手法を試みるべきだと思います。１００個程度の細胞を用いれば非常に詳細な解析が行えます。特に DLBCL や成熟 B 細胞と比較することで、病態や予後に関連する機序が明らかになるかもしれない。」との外部評価者のコメントをもらった。われわれは蛋白発現から解析を考えていたので貴重なご意見をであった。IVL では多くの場合、生検検体中のリンパ腫細胞は少なく、他の細胞の混入も多いので解析手法を検討したい。

＜研究期間終了後の展望＞
1. myc 遺伝子再構成など MYC の発現機構や、その他の腫瘍関連蛋白の発現を検討し、予後との関連、新たな分子標的治療に結びつけたい。
2. 慢性 GVHD モデルが確立できた場合は、治療実験に移り新規治療戦略の開発を行う。

＜研究成果の副次的効果＞
1. 血管内Ｂ細胞性リンパ腫に EBER は発現していなかった。
2. 自己抗体産生機序の研究にこのマウスモデルを使用できる可能性を示した。

2）整形外科学分野・医学教育センター

＜優れた成果が上がった点＞
*1. ヒト関節滑膜マスト細胞は、MrgX2 を発現し、滑液中の substance P によって活性化されるのみならず、マスト細胞が substance P を産生・分泌し神経性炎症にヒト関節滑膜マスト細胞は関与していることが明らかとなった。また、ヒト関節滑膜マスト細胞は、IL-17A を産生しないことを示した。
*2. 関節リウマチと変形性膝関節症のヒト関節滑膜マスト細胞の差異は、FcRγの架橋によって産生される PGD_2 の量が関節リウマチでは有意に多いことがわかりこれは COX の発現の差であった。
*3. 関節リウマチと変形性膝関節症患者の関節滑膜液中の脂質メディエーターをリピドミクスの手法を用いて網羅的に比較したところ炎症性脂質メディエーターのみならず抗炎症性脂質メディエーターも有意に関節リウマチ患者で高いことが明らかとなった。

＜課題となった点＞
1. 関節リウマチにおける神経性炎症に関しては、げっ歯類では示唆されていつが、ヒトに関しては不明であった。
2. 関節リウマチと変形性膝関節症のヒト関節滑膜マスト細胞の差異については不明であった。
3. 関節リウマチにおいて、個々の脂質メディエーターの役割や定量をした研究は存在するが、脂質メディエーター全体の量的・質的変化を網羅的に解析することは困難であった。

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

＜自己評価の実施結果と対応状況＞
1. 関節リウマチの炎症にマスト細胞と神経ペプチドが関与している可能性が示唆された。
2. 関節リウマチ患者の関節滑膜マスト細胞は変形性膝関節症患者のマスト細胞とはフェノタイプが異なることが明らかとなった。

＜外部（第三者）評価の実施結果と対応状況＞
平成 28 年度報告会において「今回の研究では、 マスト細胞に焦点を集中させ解析を進めている。 深い解析がなされ、 魅力的な成果が得られている。 一方、 展開をさらに広げることも大切である。 そのために異なるアプローチに積極的にトライしていくことを、これまで同様に継続していくことが重要と思われた。」との外部評価者のコメントをもらい、ヒト関節滑膜マスト細胞と神経ペプチドの関係に注目し解析した。また、関節リウマチと変形性膝関節症のヒト関節滑膜マスト細胞に発現している遺伝子の網羅的発現解析を行った。研究費の配分を遺伝子の網羅的発現解析に使用した。
平成 29 年度報告会において「患者由来サンプルにおける臨床情報（例えば NSAIDs 使用の状況、息者背景）も検討に加えるのが良い。」との外部評価者のコメントをもらい、患者臨床情報との関連を検討した。
平成 30 年度報告会において「(関節リウマチと変形性膝関節症患者の関節滑膜液中の脂質メディエーターをリピドミクスの手法を用いて網羅的解析に関して)症例数を増加しての検討が必要である。」との外部評価者のコメントをもらい、症例数を増加してのデータをまとめ、現在論文を投稿中である。
令和元年度報告会において「各患者のリピドミクス解析結果はクラスタリング解析を
行って、患者の病型分類や、脂質メディエーターの中で類似した挙動を示す分子群を抽出することで、それらの産生細胞や産生機序に関する情報が得られると思います。」との外部評価者のコメントをもらい、各患者のリピドミクス解析結果はクラスタリング解析を行って、患者の病型分類や、脂質メディエーターの中で類似した挙動を示す分子群を抽出することによって、それらの産生細胞や産生機序に関する情報を得るため解析を進めている。

＜研究期間終了後の展望＞
1. 関節リウマチ患者の関節滑膜マスト細胞における COX の高発現はエピジェネティックな制御と考え microRNA array を施行し、関節リウマチ患者の関節滑膜マスト細胞におけるいくつかの候補 microRNA の発現の増強や減弱が確認された。それら microRNAs の発現のノックダウンや強制発現を行い COX 発現への影響を検索しているが、決定的な microRNA が見つかっていない。
2. 関節リウマチ患者の関節滑膜マスト細胞からの PGD_2 の多量産生が関節リウマチの病態にどのように関与しているのかが未解決である。PGD_2 合成酵素欠損マウスの骨髄から培養したマスト細胞をマウス細胞コンディショナルノックアウトマウスに移植し、関節炎モデルマウスを作製しその役割を調べる。
3. 関節リウマチ患者の関節滑膜マスト細胞に高発現している COX を始めとした遺伝子群が治療標的となりうるのか検討を行う。

＜研究成果の副次的効果＞
関節リウマチ患者の関節滑膜マスト細胞は大量の TNF-α を産生しており、その産生制御が治療に結び付くことが示唆された。

3）皮膚科学分野・医学教育センター
＜優れた成果が上がった点＞
*1. 慢性特発性蕁麻疹患者は、血中抗 IgE 自己抗体濃度が健常人より統計学的有意に高く、その自己抗体による高親和性 IgE 受容体の架橋能も統計学的有意に高いことを示した。
*2. 慢性特発性蕁麻疹患者において自己血清皮内テスト陽性および血清 IgE 値低値は、シクロ

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

スポリンの治療効果を予測するバイオマーカーとなることを示した。
*3. IgE 依存性刺激に対し活性化能の欠如した好塩基球を有する慢性特発性蕁麻疹患者は、omalizumab 治療に対する反応速度が速い傾向が見られた。
*4. 慢性特発性蕁麻疹患者の血漿中の 5-HETE や 5-HEPE は健常人よりも有意に高値であり、蕁麻疹の病勢と関連がある可能性を示した。また、アトピー性皮膚炎患者の血漿中の脂質メディエーターのほとんどは、健常人より有意に低値であったため、脂質代謝の低下がアトピー性皮膚炎の病勢に関与する可能性を示した。

＜課題となった点＞
1. 慢性特発性蕁麻疹における自己抗体による高親和性 IgE 受容体の架橋能の評価が十分でなかった。
2. 慢性特発性蕁麻疹患者において omalizumab 治療効果を予測するバイオマーカーとして様々な因子が候補として挙げらているが、シクロスポリンに関してはそのバイオマーカーは検討されていなかった。
3. IgE 依存性刺激に対し活性化能の欠如した好塩基球を有する慢性特発性蕁麻疹患者と IgE 依存性刺激に対し活性化能のある好塩基球を有する慢性特発性蕁麻疹患者との臨床的な差異は不明であった。
4. 慢性特発性蕁麻疹とアトピー性皮膚において、個々の脂質メディエーターの役割や定量をした研究は存在するがが、脂質メディエーター全体の量的・質的変化を網羅的に解析することは困難であった。

＜自己評価の実施結果と対応状況＞
1. 慢性特発性蕁麻疹の病態の一部が解明できたが、本態は未だ不明な点が多い。シクロスポリン治療効果を予測するバイオマーカーの探索は臨床的に有意義な結果が得られた。今後、症例数を増やして検討したい。
2. リピドミクス解析によって、慢性特発性蕁麻疹およびアトピー性皮膚炎における脂質メディエーターの量的・質的変化を明らかにでき、バイオマーカーとなりうる脂質メディエーターを見いだすことができた。今後は、バイオマーカーに関しては、症例数を増やして検証し、疾患の発症との関係を検討する。

＜外部（第三者）評価の実施結果と対応状況＞
平成 28 年度報告会において「全体として、 しっかりと高い質の担保された研究が展開されている。多数の臨床検体をベースにして、抗 IgE 抗体や抗 FcεRIα 抗体の有無と関連付けて’慢性奪麻疹の病態解析が進められている。 強いて改善点をあげるのであれば、 さらに病態の本質に迫る独自性の高い成果をあげるために、異なるアプローチに積極的にトライしていくことを期待したい。」との外部評価者のコメントをもらい、RBL 細胞にヒト高親和性 IgE 受容体を強制発現させ、その架橋でルシフェラーゼ活性が増加する人工的な細胞を作製し慢性特発性蕁麻疹患者の血清 IgG を添加して慢性特発性蕁麻疹における自己抗体による高親和性 IgE 受容体の架橋能を評価した。また、慢性特発性蕁麻疹患者においてシクロスポリンの治療効果を予測するバイオマーカーを検索した。
平成 29 年度報告会において「いくつもの興味深いデータが出ているので、今後アトピー性皮膚炎との比較など臨床的な方向からデータの意義を追求するとともに場合によってはマウスモデルでの分子メカニズムの検討など多面的な取り組みが期待される。」との外部評価者のコメントをもらい、アトピー性皮膚炎との比較を行った。また、ヒト化 hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg NOG mice (文献 74)を用いて分子メカニズムの検討予定である。
平成 30 年度報告会において
1. 「8-HETE や 7,17diHDoHE と炎症性細胞（好酸球、好中球）の関連性の検討が必要である。」との外部評価者のコメントをもらい、8-HETE や 7,17diHDoHE と炎症性細胞（好酸球、好中球）との関連性の検討を現在している。
2. 「CSU 患者の症例数を増やし、さらなるシクロスポリンやオマリズマブの治療効果に対す

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

る上記バイオマーカーを用いた予測検討が必要である。」との外部評価者のコメントをもらい、CSU 患者の症例数を増やし、さらなるシクロスポリンやオマリズマブの治療効果に対する上記バイオマーカーを用いた予測検討を行い論文 27 に一部その成果を発表した。

令和元年度報告会において「EXILE 法などによる解析結果に留まらず、その機序の検討も試みる、あるいは自己血清のどの成分が膨疹形成に寄与するか、といったもう一段踏み込んだ解析が望まれます。各患者のリピドミクス解析結果はクラスタリング解析を行って、患者の病型分類や、脂質メディエーターの中で類似した挙動を示す分子群を抽出することで、それらの産生細胞や産生機序に関する情報が得られると思う。」との外部評価者のコメントをもらい、自己血清のどの成分が膨疹形成に寄与するかを調べるために CHO 細胞に皮膚マスト細胞に発現している GPCR を強制発現させ、簡単にその活性化が測定できる人工的な細胞の系を作り、患者血清を添加して検討する。各患者のリピドミクス解析結果はクラスタリング解析を行って、患者の病型分類や､脂質メディエーターの中で類似した挙動を示す分子群を抽出することによって、それらの産生細胞や産生機序に関する情報を得るため解析を進めている。

＜研究期間終了後の展望＞

1. 慢性特発性蕁麻疹患者において治療効果を予測するバイオマーカーとして様々な因子が候補として挙げられているが、統計学的に有効性を示すのに十分な症例数が得られていない。症例数を増やして検討したい。
2. 引き続き慢性特発性蕁麻疹の病態の解明を行っていく。炎症に関与する好塩基球、好酸球および好中球の活性化は、脂質代謝産物に影響を受けるため、その研究も行っていく。
3. 慢性特発性蕁麻疹患者において好塩基球が炎症の増悪に働いているのか、収束に働いているのかを調べるため炎症局所の好塩基球の遺伝子発現プロファイルを調べる。
4. 自己血清皮内テスト(ASST)陽性を惹起する因子の探索のため MrgX2 を強制発現させた人工的な細胞を作製し ASST 陽性および陰性患者の血清をその細胞に添加し活性化を検討する。

＜研究成果の副次的効果＞

脂質代謝産物の研究を含めた上記の研究により新たな治療薬の開発や食事など生活指導の方法を提案することができる。発明の名称: 慢性特発性蕁麻疹の重症度マーカー, 及びその使用 特願 2019-101289 号 ①発明者 岡山吉道, 照井　正, 伊東真奈, 豊島翔太, 村上　誠, 武富芳隆, 三木寿美　②出願日 令和 1 年 05 月 30 日 ③出願人 日本大学　として慢性特発性蕁麻疹の重症度バイオマーカーの特許を取得した。企業との共同研究により簡易な測定系の確立を目指し臨床の場で役立てたい。

4）産婦人科学分野・医学教育センター

＜優れた成果が上がった点＞

*1. ヒト妊娠脱落膜にマスト細胞が存在し、妊娠初期では、tryptase^{high} chymase^{low} のマスト細胞が、妊娠末期では tryptase^{high} chymase^{high} の細胞が有意であった。また、この細胞は FcεRI を発現し、IgE 依存性の刺激によりヒスタミン遊離することが判明した。またこの細胞の長期培養系を樹立できた。

＜課題となった点＞

妊娠脱落膜には多数のマスト細胞が存在することは報告されていたが、ヒト妊娠脱落膜マスト細胞の役割は、不明であった。

＜自己評価の実施結果と対応状況＞

ヒト妊娠脱落膜マスト細胞は妊娠時期によってそのフェノタイプを変えることが分かった。長期培養系の確立はヒト妊娠脱落膜マスト細胞の役割を調べるための重要なツールと成り得る。

＜外部（第三者）評価の実施結果と対応状況＞

平成 28 年度報告会において「概ねしっかりと高い質の担保された研究が展開されている。今後

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

のさらなる展開が期待される。一方、ヒトの生殖臓器でのマスト細胞の機能を明らかにしようというプロジェクトであり、検体の確保や解析手技の点で様々な制約が生じることが懸念される。マウス等のげっ歯類での解析とヒトでの解析を総合的に検討するなど、他臓器のプロジェクト以上に広いアプローチを期待したい。」との外部評価者のコメントをもらい、肺、皮膚、滑膜、ヒト末梢血および臍帯血由来培養マスト細胞に発現している遺伝子との比較を DNA chip を用いて行った。

＜研究期間終了後の展望＞
ヒト妊娠脱落膜マスト細胞の長期培養系において肺、皮膚、滑膜、臍帯血および末梢血由来の培養マスト細胞と同じ培養系では、同程度の成熟マスト細胞が得られず、何等かの factor が必要であることが示唆された。ヒト妊娠脱落膜マスト細胞の長期培養系において stem cell factor に加えて必要な因子の探索として、他のマスト細胞との比較のため網羅的発現遺伝子解析を行っている。

＜研究成果の副次的効果＞
ヒト妊娠脱落膜マスト細胞の長期培養系の改良により、多数の成熟マスト細胞を利用してヒト妊娠脱落膜マスト細胞の役割を調べることができる。

5）呼吸器内科学分野
＜優れた成果が上がった点＞
*マウス喘息モデルによる網羅的遺伝子解析およびヒト化マウスによる喘息モデル構築で難治性喘息の病態解明、新規標的同定を行い、成果を論文、学会発表した。

＜課題となった点＞
　臨床検体から難治性アレルギー疾患（喘息）の病態解明、治療標的を同定することは困難であり、ヒトの免疫反応を忠実に再現できる動物モデルが必要であった。

＜自己評価の実施結果と対応状況＞
　マウス喘息モデルによる治療薬候補を同定し、治療効果をヒト化マウスで検証するという一連の実験系を構築できたことは臨床的意義があり、臨床応用を検討する。

＜外部（第三者）評価の実施結果と対応状況＞
平成 28 年度報告会において「全体として、しっかりと質の高い担保された研究が展開されている。さらなる展開が期待される。強いて改善点をあげるのであれば、細かい点にも留意して解析結果の完璧性を高め、その成果をより早く広く発信する事に留意して貰いたい。」との外部評価者のコメントをもらい、特発性肺線維症の新規自己抗体の研究では、さらに臨床検体数を増やし、精度の高いデータとした。できるだけ早くその成果を発信すべく現在論文作成中である。エクソソームのモデルについても現在、論文投稿準備中である。
平成 29 年度報告会において「上皮バリア研究は先行研究があるので、それらの内容を踏まえて、細かい条件にも注意を払って進めてゆくのが良いと思います。」との外部評価者のコメントをもらい、先行研究結果を踏まえて、検証実験を行い、成果を得た。現在論文作成中である。
平成 30 年度報告会において

1. 「喘息治療薬創薬へ応用する上で、ヒト化マウスの特性について詳細な検討が必要である」との外部評価者のコメントをもらい、ヒト化マウスから肺ヒト ILC2、マスト細胞を抽出し、その機能解析をおこなうことができ、ヒト化マウスのより詳細な特性を検証中である。さらにヒト難治性喘息モデルを作成し、これらの細胞が難治化にどのように関与するのかを検証中である。
2. 「アンジオテンシン変換酵素 2(ACE2)活性化薬である dimizazene aceturate(DIZE) の気道炎症抑制効果の作用機序の検討が必要である」との外部評価者のコメントをもらい、初代培養ヒト気道上皮細胞を用いた実験により ACE2 が気道上皮細胞に発現し、2 型アレルギー

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

性炎症および粘液産生細胞への分化を制御していること、DIZE はこれらを抑制することを明らかにした。

令和元年度報告会において「開発されたモデルマウスを用いた研究を推進して頂きたい。また、トランスクリピトーム解析結果は是非とも Gene Ontology 解析(Gene Function)、Pathway 解析などの Post-transcriptome 解析を進めて頂きたい。」との外部評価者のコメントをもらい、ヒト化マウスを用いた難治性喘息モデルについては肺ヒトマスト細胞による網羅的遺伝子発現解析を開始している。

＜研究期間終了後の展望＞

ヒト難治性喘息モデルの構築および新規治療薬探索の基礎となる成果をあげることができたため、これらを用いて難治性喘息の分子病態および創薬に応用していく。

＜研究成果の副次的効果＞

ヒト化マウスを用いて難治性喘息の新規バイオマーカー、治療標的を同定し、臨床応用と特許申請を目指す。

6) 医学教育センター

＜優れた成果が上がった点＞

*1. IgE 依存性に活性化したヒトマスト細胞から遊離した細胞外小胞中の miR103a-3p は、ヒト 2 型自然リンパ球からの IL-5 産生を有意に増強させることを明らかにした。

*2. 生まれて初めて喘鳴が出現した乳幼児が今後反復喘鳴を起こすバイオマーカーとして鼻汁中の MIP-1αを同定した。

＜課題となった点＞

1. 活性化したヒトマスト細胞細胞から遊離される外小胞中の miRNA のヒト 2 型自然リンパ球に対する役割は不明であった。
2. 生まれて初めて喘鳴が出現した乳幼児が今後反復喘鳴を起こす予測バイオマーカーは、検索されていなかった。

＜自己評価の実施結果と対応状況＞

1. ヒト２型自然リンパ球の単離・培養の実験系を構築し、2 型自然リンパ球からのサイトカイン産生を制御する miRNA を同定することができた。今回は、IgE 依存性に活性化したヒトマスト細胞から遊離した細胞外小胞中の miRNA を解析したが、今後は、IL-33 や MRGPRX2 の ligands で刺激したヒトマスト細胞から遊離した細胞外小胞中の miRNA を解析する。
2. 世界で初めて、生まれて初めて喘鳴が出現した乳幼児が今後反復喘鳴を起こすバイオマーカーを同定できた。早期介入治療の臨床治験を始める準備を開始している。

＜外部（第三者）評価の実施結果と対応状況＞

平成 29 年度報告会において「マスト細胞からのエクソソームの内容が IL- 33 あるいは IgE 刺激によって異なる制御を受けるとの発表は 2 型炎症のメカニズムの中で重要なシグナル経路において新規性のある概念であり、今後の展開が期待されます。」との外部評価者のコメントをもらい、研究内容をそのメカニズムへ移行させた。

平成 30 年度報告会において「(IgE 依存性に活性化したヒトマスト細胞から遊離した細胞外小胞中の miR103a-3p は、ヒト 2 型自然リンパ球からの IL-5 産生を有意に増強させることを明らかにした研究に関して)アトピー性皮膚炎など臓器別の好酸球性炎症性疾患との関連性について検討が必要である。」との外部評価者のコメントをもらい、アトピー性皮膚炎など臓器別の好酸球性炎症性疾患との関連性について検討したところアトピー性皮膚炎患者血中の miR103a-3p の発現量は健常人よりも有意に高いことが判明し、現在論文の投稿準備中である。

令和元年度報告会において「臨床検体における EV は是非とも CSU 患者の血清も検討するべきと感じる。」との外部評価者のコメントをもらい、CSU 患者の血清から EV を抽出して研究を進める予定である。

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

<研究期間終了後の展望>
1. マウス病態モデルを用いて、in vivo において、IgE 依存性に活性化したマスト細胞から遊離された細胞外小胞の役割を明らかにすること、IL-33 依存性に活性化したマスト細胞から遊離された細胞外小胞の役割も検討する。
2. 生まれて初めて喘鳴が出現した乳幼児が今後反復喘鳴を起こす予測バイオマーカーとして MIP-1αの濃度から早期治療介入する群としない群に 2 分し将来の喘息発症にどのような影響を示すかを検討する。

<研究成果の副次的効果>
アレルギー疾患において、細胞外小胞の miRNA を標的とした治療法の開発に資する研究となった。

7) <外部（第三者）評価委員からの総合評価の実施結果と対応状況>
平成 28 年度報告会において「今後より研究の質を高めるために研究グループを横断した共同研究の展開を検討するのも良いのではないかと考えた。また、研究成果を外部に広く発信する事で、外部との共同研究を進めることも従来以上に検討されると良いと思われた。」との外部評価者のコメントをもらい、皮膚科、整形外科、婦人科、呼吸器内科および医学教育センター間で共同研究を進めた。東大、筑波大、国立成育医療センター研究所、順天堂大学との共同研究を行った。
平成 29 年度報告会において「アレルギーという観点から考えると、鼻アレルギー、食物アレルギー、眼アレルギーなどへの取り組みがあるとさらにプロジェクトの幅が広がるように感じました。」との外部評価者のコメントをもらい、眼アレルギーに関しては順天堂大学医学部眼科との共同研究を行った。今後食物アレルギーモデルマウスでの検討を行う。
平成 30 年度報告会において「症例を用いた研究の場合、症例数を増加しての検討が必要である」との外部評価者のコメントをもらい、症例数を増加して解析を行った。
令和元年度報告会において
1. 「その現象が起こる機序の解明: タンパクや脂質などの量や質が患者群と対照群で異なる場合には、その産生細胞、産生刺激、転写因子、epigenetic control,genetic control など、どのレベルでの異常に起因しているかを解析すると共に、それらの阻害が治療の標的となる可能性について検討する。」との外部評価者のコメントをもらい、臨床データからその現象が起こる機序の解明を進めている。脂質の量や質が患者群と対照群で異なることから、その産生細胞、産生刺激、転写因子、epigenetic control,genetic control など、どのレベルでの異常に起因しているかを解析すると共に、それらの阻害が治療の標的となる可能性についての検討を始めた。
2. 「その現象が臨床的にどの様な意義を持つのかを検討する: バイオマーカーとしての意義は、診断・治療反応性/抵抗性、予後等に関連する場合に論じるべきである。その際には ROC 曲線を描いて、Cut off point や感度、特異度などを示す事が必要。症状に相関する項目は、疾患の病態にリンクしている可能性があり、是非ともその分子の誘導機序等を検討する。その他、昨今の研究手法の進歩は目覚ましいものがあり、特にオミックス解析は、抽出された候補分子群の上流解析、相関解析や、分子機能解析(Gene Ontology)など、in silico 解析手法が次々と確率されております。また、１細胞次世代シーケンスや CyTOF などの技術も臨床検体を深く解析するのに極めて Powerful であることが知られてきました。海外の研究室は、そうした技術を持つ研究室とうまく共同研究することで臨床検体の解析を効率よく推進しております。そうした最新技術を有する共同研究の相手を見つけることも、本研究費が目指す戦略的研究基盤整備に該当しますので、是非ともそちらの方向へ進むことも検討されることを望みます。」との外部評価者のコメントをもらい、バイオマーカーとしての意義の検討を行っている。診断・治療反応性/抵抗性、予後等に関連するか否かを調べている。ROC 曲線を描いて、Cut off point や感度、特異度などを示した。症状に相関する項目は、疾患の病態にリンクしている可能性があり、その分子の誘導機序等を検討してい

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

きたい。最新技術を有する共同研究の相手を今後みつけオミックス解析を行いたい。

１２　キーワード（当該研究内容をよく表していると思われるものを８項目以内で記載してください。）

（１） アレルギー　（２） マスト細胞　（３） 気管支喘息
（４） 関節リウマチ　（５） 慢性蕁麻疹　（６） FcεRI
（７） EB ウイルス　（８） オマリズマブ

１３　研究発表の状況（研究論文等公表状況。印刷中も含む。）
上記、１１(４)に記載した研究成果に対応するものには＊を付すこと。

＜雑誌論文＞

1) 血液膠原病内科学分野

1 *2 Usui M, Fujikawa T, Osawa M, Hakii C, Ikumi N, Nozaki T, Kitamura N, Hatta Y, Fujiwara S, Takei M: Self-assembly formed by a short DNA probe pair: Application for highly sensitive mRNA species detection without reverse transcription. Biochem Biophys Res Commun. 2015; 467: 1012. 査読有

2 *2 Fujiwara S, Imadome K, Takei M: Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. Exp Mol Med. 2015; 47: e135. 査読有

3 *1 Iriyama N, Hino H, Moriya S, Hiramoto M, Hatta Y, Takei M, Miyazawa K: The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, abemaciclib, exerts dose-dependent cytostatic and cytocidal effects and induces autophagy in multiple myeloma cells. Leukemia and Lymphoma. 2018 59(6): 1439-1450. 査読有

4 Uno S, Tanaka T, Ashiba H, Fujimaki M, Tanaka M, Hatta Y, Takei M, Awazu K, Makishima M: Sensitive typing of reverse ABO blood groups with a waveguide-mode sensor.Journal of Bioscience and Bioengeneering. 2018; 126(1): 131-137. 査読有

5 Nakagawa M, Uno S, Iriyama N, Matsunawa M, Makishima M, Takeuchi J, Tsuboi I, Hatta Y, Takei M: Combined treatment with benzo[a]pyrene and 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 induces expression of plasminogen activator inhibitor 1 in monocyte/macrophage-derived cells. Toxicology and Applied Pharmacology 2018; 15: 345: 48-56. 査読有

6 *2 Siarot L, Chutiwitoonchai N, Sato H, Chang H, Sato H, Fujino M, Murakami T,Aono T, Kodama E, Kuroda K, Takei M, Aida Y: Identification of human immunodeficiency virus type-1 Gag-TSG101 interaction inhibitors by high-throughput screening. Biochem Biophys Res Commun. 2018; 503(4): 2970-2976. 査読有

7 *2 Kitamura N, Shiraiwa H, Inomata H, Nozaki T, Ikumi N, Sugiyama K, Nagasawa Y, Karasawa H, Iwata M, Matsukawa Y, Takei M: Efficacy and safety of minodronic acid hydrate in patients with steroid-induced osteoporosis. Int J Rheum Dis. 2018; 21(4): 813-820. 査読有

8 Ohtake S, Takahashi H, Nakagawa M, Uchino Y, Miura K, Iriyama N, Nakayama T, Hatta Y, Takei M: One percent chlorhexidine-alcohol for preventing central venous catheter-related infection during intensive chemotherapy for patients with haematologic malignancies. Journal of Infection and Chemotherapy. 2018; 24(7): 544-548. 査読有

9 Hamada T, Iriyama N, Takahashi H, Miura K, Uchino Y, Nakagawa M, Hatta Y, Takei M: Thrombopoietin Levels During Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy for Chronic Myeloid Leukemia. Clincal Drug Investigation. 2018; 38(9): 813-818. 査読有

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

10 *2 Kobayashi H, Kobayashi Y, Yokoe I, Kitamura N, Nishiwaki A, Takei M, Giles JT: Heart Rate-corrected QT Interval Duration in Rheumatoid Arthritis and Its Reduction with Treatment with the Interleukin-6 Inhibitor Tocilizumab. Journal of Rheumatology. 2018; 45(12): 1620-1627. 査読有

11 Iriyama N, Takahashi H, Miura K, Uchino Y, Nakagawa M, Hatta Y, Takei M: Enhanced perforin expression associated with dasatinib therapy in natural killer cells. Leukemia Ressearch. 2018; 68: 1-8. 査読有

12 *2 Yokoe I, Kobayashi H, Kobayashi Y, Giles JT, Yoneyama K, Kitamura N, Takei M: Impact of Tocilizumab on N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels in patients with active rheumatoid arthritis without cardiac symptoms. Scand J Rheumatol. 2018; 47: 364-370. 査読有

13 Iriyama N, Hino H, Moriya S, Hiramoto M, Hatta Y, Takei M, Miyazawa K: The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, abemaciclib, exerts dose-dependent cytostatic and cytocidal effects and induces autophagy in multiple myeloma cells. Leukemia and Lymphoma. 2018; 59(6): 1439-1450. 査読有

14 Iriyama N, Takahashi H, Naruse H, Miura K, Uchino Y, Nakagawa M, Iizuka K, 4.Hamada T, Hatta Y,Nakayama T, Takei M: A novel fusion gene involving PDGFRB and GCC2 in a chronic eosinophilic leukemia patient harboring t(2;5)(q37; q31). Mol Genet Genomic Med. 2019; 7(4): e00591. 査読有

15 *2 Sugiyama K, Kobayashi H, Kobayashi Y, Yokoe I, Takei M, Kitamura N: Association of cardiac magnetic resonance-detected myocardial abnormalities with disease characteristics and brain natriuretic peptide levels in systemic sclerosis without cardiac symptoms. Int J Rheum Dis. 2019; 22(6): 1016-1022. 査読有

16 Kurihara K, Iriyama N, Miura K, Uchino Y, Takahashi H, Nakagawa M, Iizuka K, Hamada T, Koike T, Hatta Y, Nakayama T, Takei M: MPC-1 expression in myeloma cells is associated with the efficacy of bortezomib therapy. Medical Oncology. 2019; 36(9): 75. 査読有

17 *2 Watanabe N, Nodomi K, Koike R, Kato A, Takeichi O, Kotani AI, Kaneko T, Sakagami H, Takei M, Ogata Y, Sato S, Imai K: EBV LMP1 in gingival epithelium potentially contributes to human chronic periodontitis via inducible IL8 production. in vivo. 2019; 33(6): 1793-1800. 査読有

18 Ikumi N, Fujita H, Terui T, Takahashi H, Miura K, Hatta Y, Takei M: Aggressive CD4-CD8-CD45RA+CCR10- primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: A case report. Acta Derm Venereol. 2019; 99(12): 1176-1177. 査読有

19 Saito S, Kitamura-Muramatsu Y, Komine F, Polat M, Takeshima SN, Takei M, Aida Y: Absence of bovine leukemia virus proviral DNA in Japanese human blood cell lines and human cancer cell lines. Arch Virol. 2020; 165(1): 207-214. 査読有

20 Nakayama T, Chuma M, Tochikura N, Iwabuchi S, Suzuki S, Matsumoto C, Imai T, Hamada T, Nakagawa M, Takahashi H, Uchino Y, Miura K, Iriyama N, Hatta Y, Takei M, Kimura T: Increased arbekacin clearance in patients with febrile neutropenia. Therapeutic Drug Monitoring. 2020; 42(1): 133-138. 査読有

21 Nakayama T, Chuma M, Tochikura N, Iwabuchi S, Suzuki S, Matsumoto C, Imai T, Hamada T, Nakagawa M, Takahashi H, Uchino Y, Miura K, Iriyama N, Hatta Y, Takei M, Kimura T: Increased arbekacin clearance in patients with febrile neutropenia. Ther Drug Monit. 2020; 42(1): 133-138. 査読有

22 *2 Murakami H, Suzuki T, Tsuchiya K, Gatanaga H, Taura M, Kudo E, Okada S, Takei M, Kuroda K, Yamamoto T, Hagiwara K, Dohmae N, Aida Y: Protein arginine N-methyltransferases 5 and 7 promote HIV-1 production. Viruses. 2020; 23: 12(3): pii: E355. 査読有

23 *2 Koike R, Nodomi K, Watanabe N, Ogata Y, Takeichi O, Takei M, Kaneko T, Tonogi M, Kotani AI, Imai K: Butyric acid in saliva of chronic periodontitis patientsInduces transcription of the EBV lytic switch activator BZLF1: A pilot study. in vivo. 2020; 34(2): 587-594. 査読有

24 *2 藤原成悦，中村浩幸，武井正美: EB ウイルス関連疾患の発症メカニズムーなぜ一部の人が発症するのか? 臨床免疫・アレルギー科. 2019; 72(4): 425-434.

2) 整形外科学分野・医学教育センター

25 *1 Kan J-I, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Seki M, Saito S, Ra C, Tokuhashi Y, Okayama Y: Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Allergol Int. 2016; 65(Suppl): S11-16. 査読有

26 *1 Okamura Y, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Toyoshima S, Kuroda K, Saito S, Tokuhashi Y, Okayama Y: The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. Allergol Int. 2017; 66S: S9-20. 査読有

3) 皮膚科学分野・医学教育センター

27 *2 Endo T, Toyoshima S, Kanegae K, Izaki S, Nishimori N, Ito M, Sugai K, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Identification of biomarkers for predicting the response to cyclosporine A therapy in patients with chronic spontaneous urticaria. Allergology international 2019; 68(2): 270-273. 査読有

28 *1 Izaki S, Toyoshima S, Endo T, Kanegae K, Nunomura S, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Nakamura R, Akiyama H, Ra C, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Differentiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies(AAbs) to induce FcεRI crosslinking, as compared to anti-FcεRIα Aabs. Allergology international. 2019; 68(3): 342-351. 査読有

29 Niwa Y, Hayama K, Tagui T, Ito-Watanabe M, Endo T, Fujita H, Terui T: Case of Anaphylaxis Due to Carmellose Sodium. J Dermatol. 2020; 47: e15. 査読有

30 *3 Endo T, Toyoshima S, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Correspondence: The patients, who have anti-FcεRI nonreactive basophils, do not represent patients with severe chronic spontaneous urticaria. J Allergy Clin Immunol Pract. 2020; 8(2): 824-825. 査読有

31 葉山惟大, 照井　正: 蕁麻疹. 医学と薬学 72. 2015; 1667-1673.

32 葉山惟大, 照井　正: 慢性蕁麻疹と自己抗体. 臨床免疫・アレルギー科 64. 2015; 255-260.

33 岡山吉道, 藤澤大輔, 葉山惟大, 照井　正: 小児科診療 79. 2016; 1355-1359.

34 葉山惟大: 慢性蕁麻疹における自己抗体. アレルギーの臨床 37. 2017; 53-57.

35 葉山惟大: 慢性蕁麻疹における病態生理への関与と治療の分子標的としての IgE. 臨床免疫・アレルギー科 68. 2017; 11-18.

36 葉山惟大: 【慢性蕁麻疹の Up to Date】病態・治療 Q&A 病態・治療 Q&A 蕁麻疹に対する最新の治療戦略についてお教えください. 医学のあゆみ. 2018; 105: 15-16.

37 葉山惟大: 【血管性浮腫の基礎と臨床 アップデート】特発性の血管性浮腫. アレルギー・免疫 25. 2018; 1136.

38 葉山惟大: 【これで困らない! 蕁麻疹患者の対応法】オマリズマブをどう使うか. Monthly

Book Derma. 2018; 276: 43.

39 遠藤嵩大, 葉山惟大, 岡山吉道, 照井　正: 重症慢性特発性蕁麻疹のシクロスポリン治療, オマリズマブ治療の効果を予測するバイオマーカーについて. 臨床免疫・アレルギー科 72. 2019; 547.

40 葉山惟大: 慢性特発性蕁麻疹治療における生物製剤. アレルギーの臨床 2019; 39: 181.

41 葉山惟大: 【蕁麻疹の病態と治療】抗 IgE 抗体による治療. アレルギーの臨床. 2019; 39: 365.

42 葉山惟大: 【境界領域の診療】皮膚科的疾患 蕁麻疹. 小児内科. 2019; 51: 1452.

4) 産婦人科学分野

43 *1 Matsuno T, Toyoshima S, Sasaki-Sakamoto T, Kashiwakura J-I, Matsuda A, Watanabe Y, Azuma H, Kawana K, Yamamoto T, Okayama Y: Characterization of human decidual mast cells and establishment of a culture system. Allergol Int. 2018; 67: S18-S24. 査読有

5) 呼吸器内科学分野

44 Kozu Y, Gon Y, Maruoka S, Kazumichi K, Sekiyama A, Kishi H, Nomura Y, Ikeda M, Hashimoto S: Protocadherin-1 is a glucocorticoid-responsive critical regulator of irway epithelial baηier function. BMC Pulmonary Medicine. 2015; 15: 80. 査読有

45 Shintani Y, Maruoka S, Gon Y, Koyama D, Yoshida A, Kozu Y, Kuroda K, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2) regulates airway epithelial barrier integrity. Allergology International. 2015; 64 Suppl: S54-S63. 査読有

46 Koyama D, Maruoka S, Gon Y, Shintani Y, Sekiyama T, Hiranuma H, Shikano S, Kuroda K, Takeshita I, Tsuboi E , Soda K , Hashimoto S: Myeloid differentiation-2 is a potential biomarker for the amplification process of allergic airway sensitization in mice. Allergology International. 2015; 64 Suppl: S37-S45. 査読有

47 * Gon Y, Maruoka S, Kishi H, Kozu Y, Kuroda K, Mizumura K, Nomura Y, Oshima T, Hashimoto S: DsRNA disrupts airway epithelial barrier integrity through down-regulation of claudin members. Allergol Int. 2016; 65 Suppl: S56-S58. 査読有

48 * Gon Y, Maruoka S, Inoue T, Mizumura K, Kuroda K, Fukano Y, Yamagishi K, Tsuboi E, Hashimoto S: Gene expression analysis in airway-secreting extracellular vesicles upon house dust mite exposure. Allergol Int. 2016; 65 Suppl: S53-S55. 査読有

49 * Gon Y, Maruoka S, Kishi H, Kozu Y, Kazumichi K, Nomura Y, Takeshita I, Oshima T, Hashimoto S: NDRG1 is important to maintain the integrity of airway epithelial barrier through claudin-9 expression. Cell Biol Int. 2017; 41(7): 716-725. 査読有

50 * Gon Y, Maruoka S, Inoue T, Kuroda K, Yamagishi K, Kozu Y, Shikano S, Soda K, Lotvall J, Hashimoto S: Selective release of miRNAs via extracellular vesicles is associated with house dust mite allergen-induced airway inflammation. Clinical & Experimental Allergy. 2017; 47: 1586-1598. 査読有

51 * Maruoka S, Gon Y, Mizumura K, Okamoto S, Tsuya K, Shikano S, Soda K, Naguro I, Ichijo H, Hashimoto S: Involvement of apoptosis signal-regulating kinase-1 in house dust mite-induced allergic asthma in mice. Allergol International. 2017; 66 Suppl: S50-S52. 査読有

52 * Gon Y, Shikano S, Maruoka S, Mizumura K, Kozu Y, Kuroda K, Tsuboi E, Takeshita I, Kishi H, Nomura Y, Oshima T, Hashimoto S: CpG oligodeoxynucleotides enhance airway epithelial barrier integrity. Allergol Int. 2017; 66 Suppl: S47-S49. 査読有

53 * Ito R, Maruoka S, Soda K, Katano I, Kawai K, Yagoto M, Hanazawa A, Takahashi T, Ogura T, Goto M, Takahashi R, Toyoshima S, Okayama Y, Izuhara K, Gon Y, Hashimoto S, Ito M, Nunomura S: A humanized mouse model to study asthmatic airway inflammation via the human IL-33/IL-13 axis. JCI Insight. 2018; 3(21): pii: 121580. 査読有

54 Gon Y, Shimizu T, Mizumura K, Maruoka S, Hikichi M: Molecular techniques for respiratory diseases: MicroRNA and extracellular vesicles. Respirology. 2020; 25(2): 149-160. 査読有

55 * Shikano S, Gon Y, Maruoka S, Shimizu T, Kozu Y, Iida Y, Hikichi M, Takahashi M, Okamoto S, Tsuya K, Fukuda A, Mizumura K, Hashimoto S: Increased extracellular vesicle miRNA-466 family in the bronchoalveolar lavage fluid as a precipitating factor of ARDS. BMC Pulm Med. 2019; 19(1): 110. 査読有

56 權　寧博, 丸岡秀一郎, 黒田和道, 深野義人, 山岸賢司, 橋本　修: 気道分泌型エクソソーム. 臨床免疫・アレルギー科. 2015; 64(5): 495-500.

57 權　寧博, 丸岡秀一郎, 橋本　修: 臨床検体 exosome 解析. アレルギーの臨床. 2016; 36(13): 1259-1262.

58 權　寧博, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 橋本　修: 気道バリアとアレルギー. アレルギー・免疫. 2017, 6; 24(6): 760-767.

59 丸岡秀一郎, 岡本真一, 釋　文雄, 江花昭一, 村上正人, 橋本　修: 呼吸器心身症の分子病態におけるストレスレジリエンス. 心身医学. 2018; 58(1): 30-36.

60 權　寧博, 福田麻佐美, 山田志保, 丸岡秀一郎: 喘息抗体医薬からみえてきた病態; 気管支喘息の新たな知見. 臨床免疫・アレルギー科. 2019; 72(4): 394-398.

61 權　寧博, 福田麻佐美, 山田志保, 黒澤雄介, 丸岡秀一郎: 好酸球性炎症の免疫学的多様性-喘息抗体医薬からみえてきた病態-. 日本気管食道科学会会報(日気食会報). 2019; 70(5): 315-319.

62 丸岡秀一郎, 福田麻佐美, 山田志保, 黒澤雄介, 權　寧博: エピゲノム修飾の意義. アレルギーの臨床; アレルギー疾患の遺伝的背景. 科学 2019; 39(10). No.532, 17-19.

6) 医学教育センター

63 Ohshima S, Mori S, Shigenari A, Miyamoto A, Takasu M, Imaeda N, Nunomura S, Okayama Y, Tanaka M, Kitagawa H, Kulski JK, Inoko H, Ando A, Kametani Y: Differentiation ability of multipotent hematopoietic stem/progenitor cells detected by a porcine specific anti-CD117 monoclonal antibody. Biosci Trends. 2014; 8(6): 308-315. 査読有

64 Nunomura S, Ohtsubo-Yoshioka M, Okayama Y, Terui T, Ra C: FcRγ promotes contact hypersensitivity to oxazolone without affecting the contact sensitisation process in B6 mice. Exp Dermatol. 2015; 24(3): 204-208. 査読有

65 Nunomura S, Okayama Y, Terui T, Ra C: Treatment of murine mast cells with IgEκ and protein L enhances apoptotic cell death induced by IL-3 withdrawal. Biochem Bioph Res Co. 2015; 456(2): 700-705. 査読有

66 Ueshima C, Kataoka TR, Hirata M, Furuhata A, Suzuki E, Toi M, Tsuruyama T, Okayama Y, Haga H: The killer cell Ig-like receptor 2DL4 expression in human mast cells and its potential role in breast cancer invasion. Cancer Immunol Res. 2015; 3(8): 871-880. 査読有

67 Ueshima C, Kataoka TR, Hirata M, Koyanagi I, Honda T, Tsuruyama T, Okayama Y, Seiyama A, Haga H: NKp46 regulates the production of serine proteases and IL-22 in human mast cells in urticaria pigmentosa. Exp Dermatol. 2015; 24(9): 675-679. 査読有

68 Nunomura S, Okayama Y, Mastumoto K, Hashimoto N, Endo-Umeda K, Terui T, Makishima M, Ra C: Activation of LXRs using the synthetic agonist GW3965 represses the production of pro-inflammatory cytokines by murine mast cells. Allergol Int. 2015; 64(Supple): S11-S17. 査読有

69 *2 Sugai K, Kimura H, Miyaji Y, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Sasaki-Sakamoto T, Matsunaga S,

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

Yamada Y, Kashiwakura J-I, Noda M, Ikeda M, Kozawa K, Ryo A, Yoshihara S, Ogata H, Okayama Y: MIP-1α level in nasopharyngeal aspirates at the first wheezing episode predicts recurrent wheezing. J Allergy Clin Immunol. 2016; 137(3): 774-781. 査読有

70 Metcalfe DD, Pawankar R, Ackerman SJ, Akin C, Clayton F, Falcone FH, Gleich GJ, Irani AM, Johansson MW, Klion AD, Leiferman KM, Levi-Schaffer F, Nilsson G, Okayama Y, Prussin C, Schroeder JT, Schwartz LB, Simon HU, Walls AF, Triggiani M: Biomarkers of the involvement of mast cells, basophils and eosinophils in asthma and allergic diseases. World Allergy Organ J. 2016; 11; 9: 7. 査読有

71 Ueshima C, Kataoka TR, Takei Y, Hirata M, Sugimoto A, Hirokawa M, Okayama Y, Blumberg RS, Haga H: CEACAM1 long isoform has opposite effects on the growth of human mastocytosis and medullary thyroid carcinoma cells. Cancer Med. 2017; 6(4): 845-856. 査読有

72 Nunomura S, Ra C, Terui T, Okayama Y: Disulfide-linked dimerization of the FcRγ chain is required for positive and negative regulation of mast cell activation via FcεRI. Allergol Int. 2017; 66S: S41-S43. 査読有

73 Shimanaka Y, Kono N, Taketomi Y, Arita M, Okayama Y, Tanaka Y, Nishito Y, Mochizuki T, Kusuhara H, Adibekian A, Cravatt BF, Murakami M, Arai H: Omega 3 fatty acid epoxides are autocrine mediators that ensure full activation of mast cells. Nat Med. 2017; 23: 1287-1297. 査読有

74 Ito R, Maruoka S, Soda K, Katano I, Kawai K, Yagoto M, Hanazawa A, Takahashi T, Ogura T, Goto M, Takahashi R, Toyoshima S, Okayama Y, Izuhara K, Gon Y, Hashimoto S, Ito M, Nunomura S: A humanized mouse model to study asthmatic airway inflammation via the human IL-33/IL-13 axis. JCI Insight. 2018; 2: 3(21): pii: 121580. 査読有

75 Wang Y, Nakahashi-Oda C, Okayama Y, Shibuya A: Autonomous regulation of immunoglobulin E-mediated mast cell degranulation and immediate hypersensitivity reaction by an inhibitory receptor CD300a. J Allergy Clin Immunol. 2019; 144(1): 323-327. 査読有

76 Nishida K, Hasegawa A, Yamasaki S, Uchida R, Ohashi W, Kurashima Y, Kunisawa J, Kimura S, Iwanaga T, Watarai H, Hase K, Ogura H, Nakayama M, Kashiwakura J. Okayama Y, Kubo M, Ohara O, Kiyono H, Koseki H, Murakami M, Hirano T: Mast cells play role in wound healing through the ZnT2 / GPR39 / IL-6 axis. Sci Rep. 2019; 9(1): 10842. 査読有

77 Okayama Y: Preface to the proceedings of the 32nd Workshop on Eosinophils in Allergy and Related Diseases 2018. Allergol Int. 2019; 68S: S1-S2.

78 Okayama Y, Matsumoto H, Odajima H, Takahagi S, HideM, Okubo K: Roles of omalizumab in various allergic diseases. Allergol Int. 2020; 69(2): 167-177. 査読有

79 岡山吉道: 重症慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞における Mas-related gene X2 の高発現. 臨床免疫・アレルギー科. 2015; 63(2): 146-150.

80 岡山吉道，布村　聡，羅　智靖: ヒトマスト細胞における高親和性 IgE 受容体□鎖の役割. 化学と生物. 2015; 53(4): 222-227.

81 岡山吉道: アレルギー疾患の分子標的. アレルギー. 2015; 64(1): 9-13.

82 岡山吉道: ヒトの皮膚アレルギー疾患におけるマスト細胞の役割. 獣医臨床皮膚科. 2015; 21(3): 137-141.

83 岡山吉道: 好酸球. 診断と治療. 2015; 103(5): 558-565.

84 岡山吉道，藤澤大輔，葉山惟大，照井　正: 重症慢性蕁麻疹患者においては Mas-related gene X2 を発現している皮膚マスト細胞数が増加している. 小児科診療. 2016; 79(10):

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

1355-1359.
85 岡山吉道: IgE と疾患(アレルギー疾患と自己免疫疾患)について. アレルギー・免疫. 2016; 23(12): 1670-1675.
86 岡山吉道, 布村　聡, 下川敏文, 高橋恭子, 斎藤修, 山本樹生, 照井　正: 疾患特異的ヒトマスト細胞のフェノタイプの解析とフェノタイプの変化の機序の解明. 日本大学医学部総合医学研究所紀要. 2016; 4: 8-12.
87 岡山吉道: IgE 非依存性マスト細胞活性化による自然免疫と炎症の制御. アレルギーの臨床. 2017; 37(3): 22-26.
88 岡山吉道: マスト細胞症 mastocytosis. アレルギー. 2017; 66(6): 817-818.
89 岡山吉道: アレルギー学研究とマスト細胞研究の将来. アレルギー・免疫. 2017; 24(8): 1009-1010.
90 岡山吉道: 薬物アレルギーとマスト細胞. 小児科臨床. 2017; 70(12): 2073-2077.
91 岡山吉道: ヒトマスト細胞と MAS-related gene X2(MrgX2). 臨床免疫・アレルギー科. 2018; 69(3): 277-280.
92 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹におけるマスト細胞の活性化機構. アレルギー. 2018; 67(3): 192-196.
93 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹におけるマスト細胞と好塩基球の活性化の機序に関して. 臨床免疫・アレルギー科. 2018; 69(5): 463-467.
94 岡山吉道: マスト細胞. 鼻アレルギーフロンティア. 2018; 18(2): 76-79.
95 岡山吉道: IgE 受容体「アレルギー用語解説」シリーズ. アレルギー. 2018; 67(9): 1279-1280.

＜図書＞

1 丸岡秀一郎, 橋本　修: 呼吸器疾患診断治療アプローチ 1　気管支喘息. pp58-64. 中山書店, 2017.
2 Okayama Y, Fujisawa D, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Terui T, Ra C. Heterogeneity of human mast cells in allergic diseases. In: Marcus M and Behrendt H(eds). Allergies: current challenges and solusions. pp121-123. Pacini editore, Pisa, Italy, 2016.
3 岡山吉道: IgE およびその他の免疫グロブリン 日本医師会雑誌 第 145 巻・特別号 アレルギー疾患のすべて. ppS42-S43. 日本医師会, 東京, 2016.
4 岡山吉道: マスト細胞, 好塩基球 日本医師会雑誌 第 145 巻・特別号 アレルギー疾患のすべて. pp S63-S64. 日本医師会, 東京, 2016.
5 岡山吉道: マスト細胞とアレルギー 赤ちゃんとお母さんのためのアレルギー読本 周産期医学第 48 巻 増刊号. pp438-441. 東京医学社, 東京, 2018.
6 岡山吉道: アレルギー疾患に対する生物学的製剤治療の展望 特集「アレルギー疾患 update -最新の治療同行と展望-」. pp148-152. 日本臨床, 東京, 2019.

＜学会発表＞

1) 血液膠原病内科学分野

1 *2 北村　登, 長澤洋介, 岩田光浩, 武井正美: EBV とリウマチ性疾患. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜, 2016.4.
2 *2 Iwata M, Nagasawa Y, Kitamura N, Nozaki T, Ishizuka E, Imadome K, Fujiwara S, Takei M: Epstein-Barr Virus-Induced Expression of Receptor Activator Nuclear Factor-κB Ligand on B

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

cells is Possibly Responsible for Erosive Arthritis in Epstein-Barr Virus-Infected Humanized Nonobese Diabetic/Shi-scid/γcnull Mice. American College of Rheumatology Annual Meeting, Washington DC, 2016.11.

3 *1 Iriyama N, Hino H, Moriya S, Hiramoto M, Hatta Y, Takei M: Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor Abemaciclib Exerts Dose-Dependent Cytostatic and Cytocidal Effects on Multiple Myeloma Cells Via Autophagy. American Society of Hematology 58th annual meeting, San Diego, 2016.12.

4 *1 高橋宏通, 三浦勝浩, 西巻はるな, 濱田高志, 中川　優, 飯塚和秀, 入山規良, 八田善弘, 増田しのぶ, 武井正美: 当院で治療を行った血管内 B 細胞性リンパ腫 17 例における臨床的、病理学的特徴.　第 34 回悪性リンパ腫治療研究会, 横浜, 2019.4.13.

5 *2 北村　登, 野崎高正, 井汲菜摘, 西脇農真, 杉山海太, 長澤洋介, 芳沢昌栄, 都築　広, 濱口麻里奈, 大島正嗣, 谷川　悠, 浅谷真也, 秋谷久美子, 岩田光浩, 原岡ひとみ, 武井正美: 既存治療で再燃した好酸球性多発血管炎性肉芽腫症に対し mepolizumab 投与により神経症状の改善を認めた 3 例の検討. 第 63 回日本リウマチ学会総会, 京都, 2019.4.

6 *2 北村　登, 杉原徳彦, 杉原壽彦, 佐野彰彦: 気管支喘息患者における benralizumab の有効性の検討～臨床効果と喀痰好酸球の推移. 第 68 回日本アレルギー学会学術集会, 東京, 2019.4.

7 *2 都築　広, 長澤洋介, 長塚靖子, 岩田光浩, 北村　登, 武井正美, 伊藤亮治, 高橋武司, 伊藤　守: 免疫系ヒト化 HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid, IL-2Rγ null マウスを用いた新たな graft versus host disease モデルの検討 第 47 回日本臨床免疫学会総会, 札幌, 2019.10.

8 *1 高橋宏通, 三浦勝浩, 西巻はるな, 八田善弘, 武井正美: 当院で治療を行った血管内 B 細胞性リンパ腫 17 例における臨床的, 病理学的特徴. 第 19 回血液疾患フォーラム, 東京, 2019.11.9.

9 *2 西原正浩, 濱口麻里奈, 浅谷真也, 大島正嗣, 谷川　悠, 都築　広, 長澤洋介, 杉山海太, 西脇農真, 井汲菜摘, 岩田光浩, 原岡ひとみ, 北村　登, 武井正美: 早期よりメポリズマブを導入し, 神経伝達速度で運動感覚障害の改善が認められた好酸球性多発血管炎性肉芽腫症の一例. 第 30 回日本リウマチ学会関東支部学術集会, 東京, 2019.12.

2) 整形外科学分野・医学教育センター

10 *1 三嶋信太郎, 岡村祐己, 坂本朋美, 柏倉淳一, 布村　聡, 徳橋泰明, 羅　智靖, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)におけるサブスタンス P(SP)-Mas-related gene X2(MrgX2)を介した滑膜マスト細胞による炎症の増悪(ミニシンポジウム 34 好酸球/ 肥満細胞・好塩基球). 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2015.5.28.

11 *1 菅順一郎, 三嶋信太郎, 柏倉淳一, 藤澤大輔, 坂本朋美, 関　雅之, 斎藤　修, 羅　智靖, 徳橋泰明, 岡山吉道: 滑膜マスト細胞における IL-17A の発現の機序の検討. アレルギー・好酸球研究会 2015, 東京, 2015.10.24.

12 *2 三嶋信太郎, 菅順一郎, 岡村祐己, 李　賢鎬, 柳澤正彦, 関　雅之, 斎藤　修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)と変形性関節症(OA)患者滑膜組織マスト細胞の相違に関する検討. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜, 2016.4.21.

13 *1 菅順一郎, 三嶋信太郎, 岡村祐己, 李　賢鎬, 柳澤正彦, 関　雅之, 斎藤　修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)と変形性関節症(OA)患者滑膜組織マスト細胞における IL-17A の発現. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜, 2016.4.21.

14 *2 三嶋信太郎, 菅順一郎, 坂本朋美, 関　雅之, 斎藤　修, 羅　智靖, 徳橋泰明, 岡山

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

吉道: 関節リウマチ患者滑膜組織マスト細胞における COX の高発現(ミニシンポジウム 20 好酸球, マスト細胞, 好塩基球). 第 65 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2016.6.17.

15 *1 菅順一郎, 三嶋信太郎, 坂本朋美, 羅　智靖, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)と変形性関節症(OA)患者滑膜組織マスト細胞における IL-17A の発現と産生機構(ポスター発表 14 好酸球・マスト細胞, 好塩基球 1/ 組織構成細胞 1). 第 65 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2016.6.17.

16 *1 岡村祐己, 三嶋信太郎, 菅順一郎, 柏倉淳一, 坂本朋美, 豊島翔太, 山田賢鎬, 関　雅之, 斎藤　修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)における滑膜マスト細胞からのサブスタンス P (SP)産生. アレルギー・好酸球研究会 2016. 東京, 2016.10.22.

17 *2 三嶋信太郎, 柏倉淳一, 松本健治, 豊島翔太, 坂本朋美, 斎藤　修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ患者滑膜組織マスト細胞における miR-199a-3p と PTGS2 は, 有意な負の相関を示す(ミニシンポジウム 20). 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.16.

3) 皮膚科学分野・医学教育センター

18 *1 伊崎聡志, 布村　聡, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅　智靖, 照井　正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹(CSU)患者における抗 FcεRIα 鎖(α 鎖)自己抗体の臨床的意義. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2016.6.

19 *1 伊崎聡志, 豊島翔太, 西盛信幸, 柏倉淳一, 布村　聡, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅　智靖, 照井　正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹(CSU)患者における抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRlα 鎖(α 鎖)自己抗体の臨床的意義(第 1 報). 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.

20 *1 伊崎聡志, 豊島翔太, 西盛信幸, 柏倉淳一, 布村　聡, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅　智靖, 照井　正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹(CSU)患者における抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRlα 鎖(α 鎖)自己抗体の臨床的意義(第 2 報). 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.

21 *1 遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅　智靖, 照井　正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹患者と健常人の好塩基球における抗 FcεRIα 鎖抗体(CRA1)と抗 IgE 抗体刺激による反応性の比較. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.

22 岡山吉道, 豊島翔太, 伊崎聡志, 藤澤大輔, 鐘ヶ江加寿子, 坂本朋美, 小野芳啓, 中村亮介, 西盛信幸, 遠藤嵩大, 照井　正, 羅　智靖: 慢性特発性蕁麻疹(CSU)におけるマスト細胞の活性化機構. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.

23 *1 遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅　智靖, 照井 正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹患者と健常人の好塩基球における抗 FcεRIα 鎖抗体(CRA1)と抗 IgE 抗体刺激による反応性の比較. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.

24 *1 伊崎聡志, 豊島翔太, 西盛信幸, 柏倉淳一, 布村　聡, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅　智靖, 照井　正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹(CSU)患者における抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRlα 鎖(α 鎖)自己抗体の臨床的意義(第 1 報). 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.

25 *1 伊崎聡志, 豊島翔太, 西盛信幸, 柏倉淳一, 布村　聡, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大,

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

藤田英樹，羅　智靖，照井　正，岡山吉道：慢性蕁麻疹(CSU)患者における抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRIα 鎖(α 鎖)自己抗体の臨床的意義(第 2 報)．第 66 回日本アレルギー学会学術大会，東京，2017.6.

26 葉山惟大：ゾレア®による治療が明らかにした慢性蕁麻疹の病態メカニズム．第 47 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会，鹿児島，2017.12.

27 西村真帆，葉山惟大，佐藤奈由，中村政志，矢上晶子，松永佳世子，照井 正：ニンジンアレルギーの 1 例．　第 47 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会，鹿児島，2017.12.

28 *3 Endo T, Toyoshima S, Izaki S, Nishmori N, Kanegae K, Hayama K, Ra C, Okayama Y, Terui T: Analysis of the serum factor responsible for suppressing basophil FcεRI-mediated activation in patients with chronic spontaneous urticaria. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 高知, 2017.12.

29 葉山惟大：慢性蕁麻疹と好酸球．第 117 回日本皮膚科学会総会，広島，2018.5.

30 葉山惟大：慢性蕁麻疹に対する抗体療法　抗 IgE 抗体(オマリズマブ)による治療の実際．第 117 回日本皮膚科学会総会，広島，2018.5.

31 *1 Izaki S, Toyoshima S, Nunomura S, Kanegae K, Kashiwakura J, Nakamura R, Sasaki-Sakamoto T, Nishimori N, Endo T, Akiyama H, Hayama K, Ra C, Terui T, Okayama Y: Statistically higher ability of aggregation of FcεRI by autoantibody against FcεRI α-chain and IgE in patients with chronic spontaneous urticaria compared with normal subjects. International Investigative Dermatology 2018, オーランド，アメリカ, 2018.5.

32 葉山惟大：蕁麻疹診療における抗体療法の現状．第 67 回日本アレルギー学会学術大会，千葉，2018. 6.

33 葉山惟大：オマリズマブによる慢性特発性蕁麻疹治療の実際．第 67 回日本アレルギー学会学術大会，千葉，2018. 6.

34 *3 遠藤嵩大，豊島翔太，葉山惟大，西盛信幸，伊﨑聡志，鐘ヶ江加寿子，坂本朋美，照井正，　岡山吉道：慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の好塩基球における IgE 依存性の反応性とオマリズマブの治療効果．第 67 回日本アレルギー学会学術大会，千葉，2018. 6.

35 *3 遠藤嵩大，豊島翔太，葉山惟大，西盛信幸，伊﨑聡志，鐘ヶ江加寿子，坂本朋美，照井正，岡山吉道：慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の抗 FcεRIα 鎖自己抗体による FcεRI 架橋能とオマリズマブの治療効果．第 67 回日本アレルギー学会学術大会，千葉，2018.6.

36 葉山惟大：小児の蕁麻疹の治療～抗体製剤治療の実際～．第 42 回日本小児皮膚科学会学術大会，埼玉，2018.7.

37 *3 遠藤嵩大，豊島翔太，葉山惟大，伊東真奈，西盛信幸，伊﨑聡志，鐘ヶ江加寿子，坂本朋美，照井　正，岡山吉道：慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の好塩基球における FcεRI を介する刺激に反応する(R)群と反応しない(NR)群のオマリズマブの治療効果．第 32 回アレルギー・好酸球研究会，東京，2018.9.

38 伊東真奈，葉山惟大，伊﨑聡志，西盛信幸，遠藤嵩大，藤田英樹，照井　正：日本大学皮膚科で治療した慢性蕁麻疹患者に対するオマリズマブの使用例の臨床的検討．第 70 回西部支部学術大会，島根，2018.11.

39 丹羽悠介，葉山惟大，田杭具視，伊東真奈，遠藤嵩大，藤田英樹，照井　正：カルメロースナトリウム(カルボキシメチルセルロース)によるアナフィラキシーの 1 例．第 48 回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会，奈良，2018.11.

40 葉山惟大：慢性特発性蕁麻疹における抗体療法の実際とその効果予測因子．第 48 回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会，奈良，2018.11.

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

41 葉山惟大: 慢性蕁麻疹の新しい治療. 第 82 回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 東京, 2018.12.

42 *1 Izaki S, Toyoshima S, Endo T, Kanegae K, Nunomura S, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Nakamura R, Akiyama H, Ra C, Hayama K, Okayama Y, Terui T: Differntiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies(AAbs) to induce FcεRI crosslinking, as compared to anti-FcεRIα AAbs. KOREA DERMA 2019, ソウル, 韓国, 2019.3.

43 伊東真奈, 葉山惟大, 伊﨑聡志, 西盛信幸, 遠藤嵩大, 藤田英樹, 照井　正: 日本大学皮膚科で経験したオマリズマブ使用例の臨床的検討. 第 35 回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会, 愛媛, 2019.4.

44 葉山惟大: 皮膚アレルギー疾患における分子標的薬. 第 68 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2019.6.

45 *2 遠藤嵩大, 豊島翔太, 鐘ヶ江加寿子, 伊﨑聡志, 西盛信幸, 伊東真奈, 菅井和子, 葉山惟大, 照井　正, 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹患者に対するシクロスポリンの治療の効果を予測するバイオマーカーの同定. 第 68 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2019.6.

46 *4 伊東真奈, 遠藤嵩大, 豊島翔太, 三木寿美, 武富芳隆, 葉山惟大, 坂本朋美, 村上　誠, 照井　正, 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹,アトピー性皮膚炎患者血漿を用いた脂質分子の網羅的解析. 第 68 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2019.6.

47 葉山惟大: 慢性蕁麻疹における自己免疫性機序の関与 第 118 回日本皮膚科学会総会, 愛知, 2019.6.

48 丹羽悠介, 葉山惟大, 伊東真奈, 遠藤嵩大, 藤田英樹, 照井　正: 思春期慢性蕁麻疹患者に対する抗 IgE 抗体療法. 第 43 回日本小児皮膚科学会学術大会, 埼玉, 2019.7.

49 *1 Izaki S, Toyoshima S, Endo T, Kanegae K, Nunomura S, Kashiwakura J,Sasaki-Sakamoto T, Nakamura R, Akiyama H, Ra C, Hayama K, Okayama Y, Terui T: Differntiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies to induce FcεRI crosslinking, as compared to anti- FcεRIα autoantibodies. European Society for Dermatological Research 2019, フランス, ボルドー, 2019.9.

50 *2 Endo T, Toyoshima S, Kanegae K, Izaki S, Nishimori N, Ito M, Sugai K, Hayama K, Okayama Y, Terui T: Identification of biomarkers for predicting the response to cyclosporine A therapy in patients with chronic spontaneous urticaria. The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 青森, 2019.11.

51 田杭真帆, 葉山惟大, 遠藤嵩大, 伊﨑聡志, 西盛信幸, 伊東真奈, 丹羽悠介, 藤田英樹, 照井　正: 日本大学皮膚科で経験した慢性蕁麻疹患者に対するオマリズマブ使用例の臨床的検討. 第 49 回皮膚免疫アレルギー学会, 神奈川, 2019.12.

4) 産婦人科学分野・医学教育センター

52 高橋英幹, 松野孝幸, 村瀬隆之, 千島史尚, 久野宗一郎, 山本樹生: 妊娠高血圧腎症における脱落膜 natural cytotoxicity receptors の変化. 第 37 回日本妊娠高血圧学会, 埼玉, 2016.10.

53 *1 松野孝幸, 岡山吉道, 山崎元美, 柏倉 淳一, 坂本朋美, 豊島翔太, 東　裕福, 村瀬隆之, 千島史尚, 山本樹生: ヒト脱落膜マスト細胞の分布と培養マストの樹立. 第 31 回日本生殖免疫学会, 兵庫, 2016.12.

54 *1 松野孝幸, 岡山吉道, 東　裕福, 村瀬隆之, 千島史尚, 川名　敬, 山本樹生: ヒト脱落

膜マスト細胞の解析と脱落膜培養マスト細胞の樹立．第 69 回日本産科婦人科学会学術集会，広島, 2017.4.

55 *1 山崎元美，山本樹生，豊島翔太，坂本朋美，柏倉淳一，岡山吉道：ヒト妊娠初期脱落膜マスト細胞は高親和性 IgE 受容体 FcεRI を発現している．第 66 回日本アレルギー学会，東京, 2017.6.

56 *1 松野孝幸，豊島翔太，柏倉淳一，坂本朋美，東　裕福，松田　彰，川名　敬，山本樹生，岡山吉道：ヒト妊娠初期脱落膜マスト細胞の特徴についての検討．第 31 回アレルギー・好酸球研究会，東京, 2017.10.

5) 呼吸器内科学分野

57 Maruoka S, Gon Y, Shikano S, Shintani Y, Koyama D, Sekiyama A, Hiranuma H, Inoue T, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S: ExosomalMicroRNAs In The Serum Are Potential Real-Time Biomarkers For Allergic Inflammation In The Airway Of Mice. European Respiratory Society Annual Congress, Amsterdam, Netherland, 2015. 9. 27.

58 Shikano S, Inoue T, Maruoka S, Gon Y, Kuroda K, Yamagishi K, Soda K, Tsuboi E, Takeshita I, and Hashimoto S: Exosomal messenger RNAs in the airway are potential biomarkers for acute lung injury in mice. European Respiratory Society Annual Congress, Amsterdam, Netherland, 2015. 9. 27.

59 * 權　寧博, 丸岡秀一郎, 橋本　修: エクソソームの疾患バイオマーカーとしての可能性. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会，東京, 2015.4.

60 * 權　寧博, 丸岡秀一郎, 井上寿男, 曽田香織, 神津　悠， 鹿野壮太郎, 橋本　修: アレルギー　性気道炎症における気道分泌型 exosome の役割. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2015. 4.

61 * 井上寿男, 權　寧博，丸岡秀一郎, 鹿野壮太郎, 黒田和道，山岸賢司，曽田香織, 橋本　修: マウスLPS 誘導性肺障害におけるBALF 中エクソソームの RNA 発現解析．第 55 回日本呼吸器学会学術講演会，東京, 2015.4.

62 * 權　寧博, 丸岡秀一郎, 黒田和道 ,山岸賢司, 鹿野壮太郎, 曽田香織, 坪井絵新子, 竹下郁子, 橋本　修: マウス端息モデルを用いた気道分泌型 exosome の解析 . 第 64 回日本アレルギー学会学術大会，東京, 2015.5.

63 神津　悠，岸　博介，權　寧博，竹下郁子，野村泰之，水村賢司，丸岡秀一郎，大島猛史，橋本　修：ウイルス感染による気道上皮バリア障害における mir-155 の役割．アレルギー，好酸球研究会 2015，東京, 2015.10.20.

64 權　寧博，井上寿男，深野義人，山岸賢司，黒田和道，鹿野壮太郎，曽田香織，水村賢司，丸岡秀一郎，橋本　修：マウス喘息モデルにおける気道分泌型細胞外小胞 RNA の網羅的発現解析．アレルギー，好酸球研究会 2015，東京, 2015.10.20.

65 權　寧博：特発性肺線維症の病態を反映する疾患特異的自己抗体の同定．第 9 回日本大学先端バイオフォーラム，東京, 2016. 1. 27.

66 井上寿男，權　寧博，丸岡秀一郎，鹿野壮太郎，黒田和道，山岸賢司，津谷恒太，曽田香織，橋本　修: LPS 誘導性肺障害におけるエクソソームの RNA 発現解析．私立大学戦略的研究基盤形成支援技業平成 27 年度報告会，東京, 2016.2.27.

67 * 鹿野壮太郎，井上寿男，權　寧博，丸岡秀一郎，黒田和道，山岸賢司，曽田香織，橋本　修：急性肺障害モデルにおける exosome 由来 miRNA 発現解析．第 56 回日本呼吸器学会学術講演会，京都, 2016.4.8.

68 權　寧博：平成 28 年度熊谷賞受賞講演：気道上皮機能の破綻と気道炎症の病態機序の解明．第 56 回日本呼吸器学会学術講演，京都, 2016. 4. 8.

69 * 井上寿男，權　寧博，丸岡秀一郎，鹿野壮太郎，黒田和道，山岸賢司，曽田香織，橋本　修：マウス LPS 誘導性肺障害におけるエクソソームの RNA 発現解析．第 56 回日本呼吸器

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

学会学術講演会，京都, 2016.4.8.
70 引地麻梨，權　寧博，丸岡秀一郎，水村賢司，高橋麻衣，森澤朋子，大木隆史，坪井絵莉子，橋本　修: 特発性肺線維症における新規血中自己抗体同定の試み．第 56 回日本呼吸器学会学術講演会，京都, 2016. 4. 9.
71 岡本真一，丸岡秀一郎，權　寧博，水村賢司，神津　悠，新谷榮崇，鹿野壮太郎，津谷恒太，竹下郁子，橋本　修: ストレス関連遺伝子の上皮バリア機能形成に及ぼす影響．第 56 回日本呼吸器学会学術講演会，京都, 2016.4.9.
72 新谷榮崇，權　寧博，丸岡秀一郎，水村賢司，熊澤文雄，神津　悠，竹下郁子，曽田香織，橋本　修: 気道上皮細胞におけるバリア機能及びサイトカイン産生制御における NDRG1 の役割．第 56 回日本呼吸器学会学術講演会，京都, 2016.4.9.
73 津谷恒太，丸岡秀一郎，權　寧博，水村賢司，神津　悠，新谷榮崇，鹿野壮太郎，岡本真一，坪井絵莉子，曽田香織，竹下郁子，橋本　修: ダニアレルゲンによる気道上皮分化過程の上皮バリア形成に及ぼす影響．第 56 回日本呼吸器学会学術講演会，京都, 2016.4.9.
74 神津　悠，丸岡秀一郎，權　寧博，橋本　修: ウイルス感染による気道上皮バリア障害における mir-155 の役割．第 56 回日本呼吸器学会学術講演会，京都, 2016.4.9.
75 Hikichi M, Gon Y, Maruoka S, Morisawa T, Ooki T, Mizumura K, Ito R, Hiranuma H, Kumasawa F, Kozu Y, Tsuboi E and Hashimoto S: Identification of a New Specific Autoantibody of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. American Thoracic International Conference, San Francisco USA, 2016.5.16.
76 神津　悠，權　寧博，水村賢司，丸岡秀一郎，橋本　修: ウイルス感染による気道上皮バリア障害における mir-155 の役割．第 65 回日本アレルギー学会学術大会，東京, 2016. 6.17.
77 新谷榮崇，權　寧博，丸岡秀一郎，水村賢司，熊澤文雄，神津　悠，竹下郁子，曽田香織，橋本　修: 気道上皮細胞におけるバリア機能及びサイトカイン産生制御における NDRG1 の役割．第 65 回日本アレルギー学会学術大会，東京, 2016.6.18.
78 岡本真一，丸岡秀一郎，權　寧博，水村賢司，神津　悠，新谷榮崇，鹿野壮太郎，津谷恒太，竹下郁子，橋本　修: ストレス関連遺伝子の上皮バリア機能形成に及ぼす影響．第 65 回日本アレルギー学会学術大会，東京, 2016.6.18.
79 津谷恒太，丸岡秀一郎: ダニアレルゲンによる気道上皮分化過程の上皮バリア形成に及ぼす影響．第 65 回日本アレルギー学会学術大会，東京, 2016.6.18.
80 鹿野壮太郎，權　寧博，丸岡秀一郎，水村賢司，神津　悠，井上寿男，黒田和道，津谷恒太，岡本真一，橋本　修: 気道上皮バリア機能に及ぼす Toll-like receptor 9 の役割．アレルギー・好酸球研究会， 東京, 2016.10.22.
81 丸岡秀一郎，權　寧博，岡本真一，津谷恒太，水村賢司，曽田香織，名黒　功，一條秀憲，橋本　修: ダニアレルゲン誘導性気道炎症における ASK1 の役割．アレルギー・好酸球研究会，東京, 2016.10.22.
82 引地麻梨，權　寧博，丸岡秀一郎，水村賢司，高橋麻衣，森澤朋子，大木隆史，坪井絵莉子，橋本　修: 特発性肺線維症に特異的な新規血中自己抗体の同定．第 20 回東京呼吸病態研究会，東京, 2016.11.8.
83 岡本真一，丸岡秀一郎，釋　文雄，權　寧博，水村賢司，竹下郁子，橋本　修: ストレス関連遺伝子は気道上皮バリア機能を調節する．第 21 回日本心療内科学会総会･学術大会，奈良, 2016.12.3.
84 * 岡本真一，丸岡秀一郎，權　寧博，津谷恒太，水村賢司，曽田香織，名黒　功，一条秀憲，橋本　修: ダニアレルゲン誘導性気道炎症における ASK1 の役割．第 57 回日本呼吸器学会学術講演会，東京, 2017. 4. 22.
85 岡本真一，丸岡秀一郎，權　寧博，津谷恒太，水村賢司，神津　悠，坪井絵莉子，曽田香織，竹下郁子，橋本　修: dsRNA による気道上皮前駆細胞のバリア機能形成に及ぼす影響．第 66 回日本アレルギー学会学術大会，東京, 2017.6.18.
86 * Okamoto S, Maruoka S, Gon Y, Tsuya K, Mizumura K, Soda K, Naguro I, Ichijo H, Hashimoto S: Involvement of apoptosis signal-regulating kinase-1 in house dust mite-induced allergic asthma in mice. European Respiratory Society International Congress 2017, Milan, Italy, 2017.9.10.

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

87 丸岡秀一郎: 呼吸器心身症のストレス応答メカニズム. 日本自律神経学会総会, 埼玉, 2018.10.

88 髙橋麻衣, 水村賢司, 丸岡秀一郎, 曽田香織, 權　寧博: ミトコンドリアを介した鉄代謝による肺線維化の病態制御. 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2019.4.

89 津谷恒太, 丸岡秀一郎, 岡本真一, 神津　悠, 水村賢司, 曽田香織, 竹下郁子, 權　寧博: ATP 誘導性気道上皮バリア増強に関与するプリン作動性受容体の同定. 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2019.4.

90 岡本真一, 丸岡秀一郎, 津谷恒太, 神津　悠, 坪井絵莉子, 曽田香織, 竹下郁子, 權　寧博: polyI: C による気道上皮前駆細胞のバリア機能形成に及ぼす影響. 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2019.4.

91 * 福田麻佐美, 丸岡秀一郎, 山田志保, 黒澤雄介, 神津　悠, 權　寧博: ダニアレルゲン(HDM)によるマウス喘息モデルにおけるアンジオテンシン変換酵素 2(angiotensin converting enzyme 2; ACE2)の役割. 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2019.4.

92 * 丸岡秀一郎, 伊藤亮治, 布村　聡, 豊島翔太, 岡山吉道, 出原賢治, 橋本　修, 伊藤守, 權　寧博: NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg マウスを用いた IL-33, ダニアレルゲン誘導型ヒト喘息モデルの開発. 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2019.4.

93 * 山田志保, 丸岡秀一郎, 伊藤亮治, 布村　聡, 豊島翔太, 岡山吉道, 出原賢治, 橋本修, 伊藤　守, 權　寧博: ミニシンポジウム 17 動物モデル 2: アレルギー性気道炎症の治療; NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg マウスを用いた IL-33, ダニ誘導型ヒト喘息モデルの開発. 第 68 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2019.6.

94 * 福田麻佐美, 丸岡秀一郎, 山田志保, 黒澤雄介, 神津　悠, 權　寧博: ミニシンポジウム 17 動物モデル 2: アレルギー性気道炎症の治療; ダニアレルゲン(HDM)によるマウス喘息モデルにおけるアンジオテンシン変換酵素 2 の役割. 第 68 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2019.6.

95 丸岡秀一郎, 權　寧博: シンポジウム 15 喘息を取り巻く様々な環境; 喘息病態におけるストレス応答メカニズム. 第 68 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2019.6.

6) 医学教育センター

96 *2 岡山吉道, 菅井和子, 宮地裕美子, 木村博一: 反復喘鳴を予測するためのウイルス性下気道感染症による初回喘鳴児の喀痰中の biomarker の同定. 第 112 回日本内科学会総会・講演会, 京都, 2015.4.10.

97 *2 岡山吉道, 菅井和子, 宮地裕美子, 塚越博之, 池田政憲, 木村博一: 反復喘鳴を予測のためのウイルス性下気道感染症による初回喘鳴児における biomarker の同定. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2015.4.18.

98 *2 菅井和子, 宮地裕美子, 山田裕美, 吉原重美, 池田政憲, 岡山吉道: ウイルス感染に伴う初回喘鳴児における鼻汁中メディエーターと反復喘鳴の検討(ミニシンポジウム 11 喘息関連疾患・病態). 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2015.5.26.

99 宮地裕美子, 菅井和子, 吉住正和, 吉原重美, 岡山吉道, 野田雅博, 木村博一: 乳幼児の RS ウイルス感染後の反復喘鳴における TSLP の関与(ミニシンポジウム 11 喘息関連疾患・病態). 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2015.5.26.

100 下川敏文, 布村　聡, 藤澤大輔, 岡山吉道, 羅　智靖: 骨髄細胞分化における C/EBPa の C-末端領域の解析. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2015.5.26.

101 岡山吉道: レビュートーク : マスト細胞研究の新展開(シンポジウム 9 免疫･アレルギー疾

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

患の治療のためのマスト細胞・好塩基球における新規分子標的). 第 64 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2015.5.28.

102 布村　聡, 岡山吉道, 松本健治, 梅田香織, 照井　正, 填島　誠, 羅　智靖: LXR を介したマスト細胞における炎症性サイトカイン産生の抑制. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2015.5.28.

103 藤澤大輔, 布村　聡, 柏倉淳一, 紀太博仁, 菊川裕介, 藤谷靖志, 葉山惟大, 畠田優子, 坂本朋美, 照井　正, 羅　智靖, 岡山吉道: 皮膚マスト細胞における Mas-related gene X2 について(シンポジウム 9 免疫･アレルギー疾患の治療のためのマスト細胞･好塩基球における新規分子標的). 第 64 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2015.5.28.

104 岡山吉道: 喘息の重症化とマスト細胞(シンポジウム 1 抗 IgE 抗体療法-その効果発現機序と臨床的意義-). 第 25 回国際喘息学会日本・北アジア部会, 横浜, 2015.9.3.

105 Okayama Y: Heterogeneity of human mast cells in allergic inflammatory diseases(Symposium 17 Mast cells in allergic inflammation). XXIV World Allergy Congress, Seoul, Korea, 2015.10.15.

106 岡山吉道, 下条直樹: シンポジウム 2 宿主と共生細菌叢の相互作用による免疫学的恒常性の維持. 司会のことば, 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.16.

107 岡山吉道, 豊島翔太, 伊崎聡志, 藤澤大輔, 鐘ヶ江佳寿子, 坂本朋美, 小野芳啓, 中村亮介, 西盛信幸, 遠藤嵩大, 照井　正, 羅　智靖: 慢性特発性蕁麻疹(CSU)におけるマスト細胞の活性化機構. 教育講演 4, 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.16.

108 *2 菅井和子, 木村博一, 宮地裕美子, 池田政憲, 吉原重美, 岡山吉道: ウイルス感染と小児気管支喘息の発症・予防(シンポジウム 3 ウイルス感染と気管支喘息), 第 65 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2016.6.17.

109 岡山吉道, 清野　宏: レビュートーク(シンポジウム 4 IgE 非依存性のシグナルによるマスト細胞の活性化制御とアレルギー・免疫疾患), 第 65 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2016.6.17.

110 岡山吉道: アレルギー疾患に対する生物学的製剤による革新的な治療法(シンポジウム 21 各科に広がる生物学的製剤の現状と問題点—高価な薬剤の有効性と本当に効く患者とは—). 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.18.

111 宮地裕美子, 菅井和子, 吉住正和, 吉原重美, 野田雅博, 木村博一, 岡山吉道: 乳幼児の RS ウイルス感染後の反復喘鳴における TSLP の関与. アレルギー･好酸球研究会 2017, 東京,2017.10.21.

112 Okayama Y, Toyoshima S, Izaki S, Nunomura S, Kashiwakura J, Terui T, Ra C: Autoantibodies(AAbs) against the FcεRI α-chain and IgE in patients with chronic spontaneous urticarial(CSU) induced statistically higher abilities of FcεRI aggregation compared with non-atopic control(NC) subjects. Workshop 39 Aystemic autoimmune disease(3). 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会, 仙台, 2017.12.14.

113 *1 Toyoshima S, Inoue T, Sakamoto-Sasaki T, Kanegae K, Ra C, Matsumoto K, Gon Y, Okayama Y: Comparison of microRNA in human mast cell-derived exosomes in innate and acquired immunity. Workshop 40 Granulocyte & Mast cells. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会, 仙台, 2017.12.14.

114 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹(CSU)に対する有用性から考えられるオマリズマブの作用機序. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2018.6.22.

115 *1 豊島翔太, 坂本朋美, 鐘ヶ江佳寿子, 井上寿男, 權　寧博, 羅　智靖, 松本健治, 岡山吉道: 自然免疫及び獲得免疫応答におけるヒトマスト細胞由来エクソソーム microRNA

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

の網羅的比較解析．第 67 回日本アレルギー学会学術大会，東京, 2018.6.23.

116 Okayama Y, Fujisawa D, Endo T, Kashiwakura J, Kanegae K, Sakamoto T, Toyoshima S, Hayama K, Ra C, Terui T: Expression of Mas-related gene X2 on mast cells in skin of patients with severe chronic spontaneous urticarial. World Histamine Symposium 2018，神戸, 2018.7.9.

117 坂本朋美，豊島翔太，榎本幸典，菅井和子，高増哲也，吉原重美，岡山吉道: RS ウイルスによるヒトマスト細胞の活性化機構の検討．アレルギー・好酸球研究会 2018，東京, 2018.9.22.

118 菅井和子，坂本朋美，柏倉淳一，宮地裕美子，吉住正和，木村博一，吉原重美，岡山吉道: RS ウイルス感染による初回喘鳴児における鼻汁中抗 RSV IgE 値, TSLP と反復喘鳴の関係. アレルギー・好酸球研究会 2018，東京, 2018.9.22.

119 岡山吉道: 最新データから考える慢性特発性蕁麻疹の病因・病態とオマリズマブ．第 87 回日本皮膚科学会東京支部学術学会，東京, 2018.12.2.

120 岡山吉道，菅井和子，木村博一，梁　明秀，吉原重美: RS ウィルス感染による初回喘息児の鼻汁中 TSLP, Th2 サイトカイン濃度と抗 RS ウィルス特異的 IgE 値と反復喘息の関連について．第 59 回日本呼吸器学会学術講演会，東京, 2019.4.12.

121 *2 岡山吉道，菅井和子，坂本朋美，吉原重美: 初回喘息児における鼻汁中 MIP-1α レベルは反復喘息を予測する．第 116 回日本内科学会総会・講演会，名古屋, 2019.4.26.

122 坂本朋美，豊島翔太，岡山吉道: RS ウイルスによるヒトマスト細胞の活性化．第 68 回日本アレルギー学会学術大会，東京, 2019.6.14.

123 *1 Toyoshima S, Sasaki-Sakamoto T, Gon Y, Ra C, Matsumoto K, Okayama Y: Exosomal miRNA derived from anti-IgE activated human mast cells enhances IL-5 production in ILC2 in the presence of IL-33．第 68 回日本アレルギー学会学術大会，東京, 2019.6.15.

124 *1 Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Kurosawa Y, Gon Y, Ra C, Matsumoto K, Okayama Y: miR103a-3p in extracellular vesicles derived from anti-IgE Ab activated human mast cells enhances IL-5 production from ILC2 in the presence of IL-33．第 48 回日本免疫学会総会・学術集会，浜松, 2019.12.13.

125 *1 Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Okayama Y: miR103a-3p in extracellular vesicles derived from human mast cells following aggregation of FcεRI enhances IL-5 production from IL-33-stimulated type2 innate lymphoid cells(ILC2) via silencing protein arginine methyltransferase. In Mechanisms of Allergy, WAC(World Allergy Congress) 2019, Lyon, France, 2019.12.14.

126 *1 Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Kurosawa Y, Gon Y, Ra C, Matsumoto K, Okayama Y: miR103a-3p in extracellular vesicles derived from IgE plus anti-IgE Ab activated human mast cells enhances IL-5 production from ILC2 in the presence of IL-33. 2020 AAAAI Annual Meeting, American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, Philadelphia, Pensilvenia, 2020.3.14.

＜研究成果の公開状況＞（上記以外）

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等
＜既に実施しているもの＞
1　本プロジェクトの中間報告会を兼ねた公開成果発表会を行った。
平成 29 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立. 東京, 2017.11.

＜これから実施する予定のもの＞
第 60 回日本呼吸器学会学術講演会、第 69 回日本アレルギー学会学術大会、アレルギー・好酸球研究会 2020、第 22 会アジア太平洋リウマチ学会にて成果発表予定である。

１４　その他の研究成果等

「１２　研究発表の状況」で記述した論文、学会発表等以外の研究成果及び企業との連携実績があれば具体的に記入してください。　また、上記１１(４)に記載した研究成果に対応するものには＊を付してください。

関連した特許

発明の名称: 慢性特発性蕁麻疹の重症度マーカー, 及びその使用 特願 2019-101289 号 ①発明者 岡山吉道, 照井　正, 伊東真奈, 豊島翔太, 村上　誠, 武富芳隆, 三木寿美　②出願日 令和 1 年 05 月 30 日 ③出願人 日本大学

学会発表等以外の研究発表

1) 血液膠原病内科学分野

1　*2 杉山海太, 北村　登, 小林ひとみ, 小林泰之, 大島正嗣, 濱口麻里奈, 芳沢昌栄, 長澤洋介, 西脇農真, 井汲菜摘, 野崎高正, 猪股弘武, 白岩秀隆, 唐澤博美, 岩田光浩, 松川吉博, 武井正美: シェーグレン症候群と疾患関連遺伝子の関係性, および無症候性シェーグレン症候群の心臓病変の解析研究. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 27 年度報告会, 東京, 2016.2.27.

2　*2 長澤洋介, 井汲菜摘, 野崎高正, 猪股弘武 吉田広人, 今留謙一, 北村　登, 岩田光浩, 藤原成悦, 武井正美: Epstein-Barr virus 感染による NOD/Shi-scid IL-2rgnull びらん性関節炎マウスモデルにおけるヒト破骨細胞の検討. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 27 年度報告会, 東京, 2016.2.27.

3　*2 杉山海太, 北村　登, 小林ひとみ, 小林泰之, 大島正嗣, 濱口麻里奈, 芳沢昌栄, 都築広, 長澤洋介, 西脇農真, 井汲菜摘, 野崎高正, 岩田光浩, 武井正美: 強皮症における心病変の解析研究：心臓 MRI と心血管疾患の炎症性バイオマーカーによるアプローチ私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 28 年度報告会, 東京, 2017.2.25.

4　*2 岩田光浩, 長澤洋介, 北村　登, 野崎高正, 石塚瑛子, 今留謙一, 中村浩幸, 藤原成悦,

清水則夫, 武井正美: Epstein-Barr ウイルス(EBV)感染によりヒト化 NOD/Shi-scid IL-2rgnul (hu-NOG)マウスに起こる関節リウマチ(RA)類似びらん性関節炎の発症機序の解明: 関節骨びらんを引き起こすヒト破骨細胞の分化・活性化に必須な receptor activator nuclear factor-κB (RANK) ligand (RANKL)発現への EBV の関与. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 28 年度報告会, 東京, 2017.2.25.

5 *2 都築 広, 長澤洋介, 岩田光浩, 北村 登, 武井正美: ヒト免疫化 HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid, IL-2Rγnull マウスを用いた Epstein-Barr virus 感染とびらん性関節炎の検討. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 29 年度報告会, 東京, 2018.2.24.

6 *1 入山規良, 高橋宏通, 三浦勝浩, 内野慶人, 中川 優, 濱田高志, 八田善弘, 武井正美: ダサチニブは NK 細胞において JAK-STAT 経路を活性化しパーフォリン発現を増強させる. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 29 年度報告会, 東京, 2018.2.24.

7 *2 岩田光浩, 長塚靖子, 長澤洋介, 都築 広, 渡邉美遥, 北村 登, 藤原成悦, 武井正美: 関節骨びらんを引き起こす破骨細胞の異常分化・活性化への Epstein-Barr ウイルス. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)令和元年度報告会, 2020.2.29.

8 *2 高橋宏通, 三浦勝浩, 西巻はるな, 濱田高志, 中川 優, 飯塚和秀, 内野慶人, 入山規良, 八田善弘, 中山智祥, 増田しのぶ, 武井正美: 当院で治療を行った血管内 B 細胞性リンパ腫 17 例における臨床的, 病理学的特徴. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)令和元年度報告会, 2020.2.29.

2) 整形外科学分野・医学教育センター

9 *1 菅順一郎, 三嶋信太郎, 柏倉淳一, 藤澤大輔, 坂本朋美, 関 雅之, 斎藤 修, 羅 智靖, 徳橋泰明, 岡山吉道: 滑膜マスト細胞における IL-17A の発現の機序の検討. アレルギー・好酸球研究会 2015, 東京, 2015.10.24.

10 *2 三嶋信太郎, 菅順一郎, 井上寿男, 柏倉淳一, 坂本朋美, 岡村祐己, 李 賢鎬, 柳澤正彦, 関 雅之, 斎藤 修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)と変形性関節症(OA)患者滑膜組織マスト細胞の相違に関する検討. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成 27 年度報告会, 東京, 2016.2.27.

11 *1 菅順一郎, 三嶋信太郎, 坂本朋美, 藤澤大輔, 柏倉淳一, 岡村祐己, 李 賢鎬, 柳澤正彦, 関 雅之, 斎藤 修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)と変形性関節症(OA)患者の滑膜組織マスト細胞における IL-17A の発現. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成 27 年度報告会, 東京, 2016.2.27.

12 *1 岡村祐己, 三嶋信太郎, 菅順一郎, 柏倉淳一, 坂本朋美, 豊島翔太, 山田賢鎬, 関 雅之, 斎藤 修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)における滑膜マスト細胞からのサブスタンス P(SP)産生. アレルギー・好酸球研究会 2016, 東京, 2016.10.22.

13 *2 李 賢鎬, 三嶋信太郎, 柏倉淳一, 豊島翔太, 菅順一郎, 関 雅之, 斎藤 修, 徳橋泰明, 松本健治, 岡山吉道: 関節リウマチ患者マスト細胞は変形性関節症患者マスト細胞に比較して有意に prostaglandin D_2 を産生する. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成 28 年度報告会, 東京, 2017.2.25.

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

14 *1 菅順一郎, 三嶋信太郎, 坂本朋美, 柏倉淳一, 李　賢鎬, 藤澤大輔, 関　雅之, 斎藤　修, 羅　智靖, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)と変形性関節症(OA)患者滑膜組織マスト細胞における IL-17A の発現と産生機構. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成 28 年度報告会, 東京, 2017.2.25.

15 柳澤正彦, 柏倉淳一, 李　賢鎬, 坂本朋美, 岡村祐己, 齋藤　修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 免疫複合体刺激による培養ヒト滑膜マスト細胞からの TNF-α と IL-8 の産生に対する IL-33 の影響に関する検討. 平成 29 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.11.25.

16 李　賢鎬, 柏倉淳一, 齋藤　修, 徳橋泰明, 羅　智靖, 岡山吉道: FcεRI および FcεRII を介した凝集 IgG による関節リウマチ患者由来ヒト滑膜マスト細胞の活性化. 平成 29 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.11.25.

17 *1 菅順一郎, 三嶋信太郎, 坂本朋美, 關　雅之, 斎藤　修, 羅　智靖, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチと変形性関節症のヒト滑膜マスト細胞における IL-17A の発現. 平成 29 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.11.25.

18 *2 三嶋信太郎, 柏倉淳一, 豊島翔太, 菅順一郎, 關　雅之, 斎藤　修, 徳橋泰明, 松本健治, 岡山吉道: 関節リウマチ患者マスト細胞は変形性関節症患者マスト細胞に比較して有意に prostaglandin D_2 を産生する. 平成 29 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.11.25.

19 *1 岡村祐己, 三嶋信太郎 , 菅順一郎, 柏倉淳一, 坂本朋美, 豊島翔太, 李　賢鎬, 齋藤　修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)における滑膜マスト細胞によるサブスタンス P(SP)を介する炎症の制御機構 平成 29 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.11.25.

20 *2 三嶋信太郎, 柏倉淳一, 豊島翔太, 菅順一郎, 関　雅之, 斎藤　修, 徳橋泰明, 松本健治, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)患者マスト細胞は変形性関節症(OA)患者マスト細胞に比較して FcεR を介して有意に prostaglandin D_2 を産生する. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 29 年度報告会, 東京, 2018.2.24.

21 *3 佐野有隆, 豊島翔太, 三木寿美, 武富芳隆, 坂本朋美, 李　賢鎬, 齋藤　修, 徳橋泰明, 村上 誠, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)と変形性膝関節症(OA)患者の膝関節滑液中の脂質メディエーターの網羅的比較解析. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)令和元年度報告会, 2020.2.29.

3) 皮膚科学分野・医学教育センター

22 *1 伊崎聡志, 布村　聡, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅　智靖, 照井　正, 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹患者における抗 FcεRIα 鎖自己抗体の臨床的意義. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 27 年度報告会, 東京, 2016.2.27.

23 藤澤大輔, 柏倉淳一, 布村　聡, 紀太博仁, 菊川裕介, 藤谷靖志, 葉山惟大, 畠田優子, 坂本朋美, 羅　智靖, 岡山吉道, 照井　正: 重症慢性特発性蕁麻疹患者の膨疹部における

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

Mas-related gene X2 を発現する皮膚マスト細胞数の上昇．私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 27 年度報告会，東京, 2016.2.27.

24 *1 伊崎聡志，豊島翔太，西盛信幸，柏倉淳一，布村　聡，鐘ヶ江加寿子，藤澤大輔，畠田優子，葉山惟大，藤田英樹，羅　智靖，照井　正，岡山吉道：慢性蕁麻疹(CSU)患者における抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRIα 鎖(α 鎖)自己抗体の臨床的意義．私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 28 年度報告会，東京, 2017.2.25.

25 *3 遠藤嵩大，豊島翔太，伊崎聡志，西盛信幸，藤澤大輔，畠田優子，葉山惟大，藤田英樹，羅　智靖，照井　正，岡山吉道：慢性蕁麻疹(CSU)患者と健常人(NC)の好塩基球における IgE 依存性刺激による反応性の比較．私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 28 年度報告会，東京, 2017.2.25.

26 *1 西盛信幸，豊島翔太，鐘ヶ江佳寿子，坂本朋美，柏倉淳一，布村　聡，遠藤嵩大，藤澤大輔，葉山惟大，藤田英樹，照井　正，羅　智靖，岡山吉道：慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者において，hemokinin-1 はヒトマスト細胞の脱顆粒を惹起する．私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 28 年度報告会，東京, 2017.2.25.

27 *1 伊崎聡志，豊島翔太，遠藤嵩大，柏倉淳一，布村　聡，中村亮介，秋山晴代，鐘ヶ江加寿子，藤澤大輔，畠田優子，葉山惟大，藤田英樹，羅　智靖，照井　正，岡山吉道：慢性蕁麻疹(CSU)患者の抗 FcεRIa 鎖(α 鎖)自己抗体による FcεRI 架橋能とオマリズマブの治療効果，私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 29 年度報告会，東京, 2018.2.24.

28 *3 遠藤嵩大，豊島翔太，伊崎聡志，西盛信幸，葉山惟大，坂本朋美，鐘ヶ江和子，照井　正，岡山吉道：慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の好塩基球における FcεRI を介する反応性の差異とオマリズマブに対する治療効果について．私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 29 年度報告会，東京, 2018.2.24.

29 *3 遠藤嵩大，豊島翔太，葉山惟大，伊東真奈，西盛信幸，伊崎聡志，鐘ヶ江加寿子，坂本朋美，照井　正，岡山吉道：慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の好塩基球における FcεRI を介する刺激に反応する(R)群と反応しない(NR)群のオマリズマブの治療効果．第 32 回アレルギー・好酸球研究会，東京, 2018.9.

30 *1 伊崎聡志，豊島翔太，遠藤嵩大，柏倉淳一，布村　聡，中村亮介，秋山晴代，鐘ヶ江加寿子，藤澤大輔，畠田優子，葉山惟大，藤田英樹，羅　智靖，照井　正，岡山吉道：慢性蕁麻疹(CSU)患者は抗 IgE 自己抗体による高親和性 IgE 受容体(FcεRI)架橋能 が健常人に比べ高い．私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)令和元年度報告会, 2020.2.29.

31 *2 遠藤嵩大，豊島翔太，葉山惟大，伊東真奈，西盛信幸，伊崎聡志，鐘ヶ江加寿子，菅井和子，照井　正，岡山吉道：演題慢性特発性蕁麻疹患者に対するシクロスポリンの治療効果を予測するバイオマーカーの同定．私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)令和元年度報告会, 2020.2.29.

32 *4 田杭真帆，豊島翔太，三木寿美，伊東真奈，遠藤嵩大，丹羽悠介，武富芳隆，葉山惟大，坂本朋美， 照井　正，岡山吉道：リピドミクスを用いた慢性特発性蕁麻疹(CSU)およびア

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

トピー性皮膚炎(AD)の脂質メディエーターのプロファイル. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)令和元年度報告会, 2020.2.29.

4) 産婦人科学分野・医学教育センター

33 高橋英幹, 小林祐介, 久野宗一郎, 松野孝幸, 村瀬隆之, 山崎元美, 千島史尚, 山本樹生: 妊娠高血圧腎症における末梢血および脱落膜 NK 細胞の natural cytotoxicity receptor の変化. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 27 年度報告会, 東京, 2016.2.27.

34 *1 松野孝幸, 岡山吉道, 坂本朋美, 鈴木真美, 千島史尚, 山本樹生: ヒト脱落膜マスト細胞の分離と特徴. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 27 年度報告会, 東京, 2016.2.27.

35 *1 松野孝幸, 山崎元美, 坂本朋美, 豊島翔太, 村瀬隆之, 東　裕福, 川名　敬, 柏倉淳一, 山本樹生, 岡山吉道: ヒト脱落膜マスト細胞は高親和性 IgE 受容体 FcεRI を発現している. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 28 年度報告会, 東京, 2017.2.25.

36 *1 松野孝幸, 豊島翔太, 柏倉淳一, 坂本朋美, 東　裕福, 松田　彰, 川名　敬, 山本樹生, 岡山吉道: ヒト妊娠初期脱落膜マスト細胞の特徴についての検討. 第 31 回アレルギー・好酸球研究会, 東京, 2017.10.

5) 呼吸器内科学分野

37 神津　　悠, 岸　　博介 , 權　寧博, 竹下郁子 , 野村泰之 , 水村賢司, 丸岡秀一郎, 大島猛史, 橋本　　修: ウイルス感染による気道上皮バリア障害における mir-155 の役割. アレルギー, 好酸球研究会2015, 東京, 2015.10.

38 * 權　寧博, 井上寿男, 深野義人, 山岸賢司 , 黒田和道 , 鹿野壮太郎, 曽田香織 , 水村賢司, 丸岡秀一郎, 橋本　修: マウス喘息モデルにおける気道分泌型細胞外小胞 RNA の網羅的発現解析. アレルギー, 好酸球研究会 2015, 東京, 2015.10.

39 * 丸岡秀一郎, 權　寧博, 水村賢司, 井上寿男, 神津　悠, 新谷榮崇, 鹿野壮太郎, 津谷恒太, 岡本真一, 坪井絵莉子, 曽田香織, 竹下郁子, 橋本　修: 喘息の病態形成に関与する気道上皮バリア脆弱化メカニズムの検討. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 27 年度報告会, 東京, 2016.2.27.

40 * 井上寿男, 權　寧博, 丸岡秀一郎, 鹿野壮太郎, 黒田和道, 山岸賢司, 曽田香織, 橋本　修: LPS 誘導性肺障害におけるエクソソームの RNA 発現解析. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 27 年度報告会, 東京, 2016.2.27.

41 * 權　寧博: 特発性肺線維症の病態を反映する疾患特異的自己抗体の同定. 第 9 回日本大学先端バイオフォーラム, 東京, 2016.1.

42 鹿野壮太郎, 權　寧博, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 神津　悠, 井上寿男, 黒田和道, 津谷恒太, 岡本真一, 橋本　修: 気道上皮バリア機能に及ぼすToll-like receptor 9の役割. アレルギー・好酸球研究会, 東京, 2016.10.

43 * 丸岡秀一郎, 權　寧博, 岡本真一, 津谷恒太, 水村賢司, 曽田香織, 名黒　功, 一條秀憲, 橋本　修: ダニアレルゲン誘導性気道炎症におけるASK1の役割. アレルギー・好酸球研究会, 東京, 2016.10.

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

44 * 引地麻梨, 権　寧博, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 髙橋麻衣, 森澤朋子, 大木隆史, 坪井絵莉子, 橋本　修: 特発性肺線維症に特異的な新規血中自己抗体の同定. 第20回東京呼吸病態研究会, 東京, 2016.11.

45 * 引地麻梨, 権　寧博, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 高橋麻衣, 森澤朋子, 大木隆史, 坪井絵莉子, 橋本　修: 特発性肺線維症に特異的な新規血中自己抗体の同定. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成28年度報告会, 東京, 2017.2.25.

46 * 井上寿男, 権　寧博, 丸岡秀一郎, 鹿野壮太郎, 黒田和道, 山岸賢司, 曽田香織, 橋本修: マウス LPS 誘導性肺障害におけるエクソソームの RNA 発現解析. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 28 年度報告会, 東京, 2017.2.25.

47 * 岡本真一, 丸岡秀一郎, 権　寧博, 津谷恒太, 水村賢司, 神津　悠, 坪井絵莉子, 曽田香織, 竹下郁子, 橋本　修: ウイルス感染による気道上皮バリアの脆弱化機構の検討. 平成 29 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム, 東京, 2017.11.25.

48 高橋麻衣, 権　寧博, 引地麻梨, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 森澤朋子, 大木隆史, 坪井絵莉子, 橋本　修: 特発性肺線維症に特異的な新規自己抗体の同定. 平成 29 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム, 東京, 2017.11.25.

49 * 岡本真一, 丸岡秀一郎, 権　寧博, 津谷恒太, 水村賢司, 神津　悠, 坪井絵莉子, 曽田香織, 竹下郁子, 橋本　修: ウイルス感染による気道上皮バリアの脆弱化機構の検討. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 29 年度報告会, 東京, 2018.2.24.

50 * 引地麻梨, 権　寧博, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 高橋麻衣, 森澤朋子, 大木隆史, 坪井絵莉子, 橋本　修: 特発性肺線維症に特異的な新規血中自己抗体の同定. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 29 年度報告会, 東京, 2018.2.24.

51 引地麻梨: 肺線維症のバイオマーカー. 第 3 回 IPF Academy in 板橋, 東京, 2018.2.

52 権　寧博: マスト細胞の重要性と抗原測定の意義. これからの喘息治療を考える会 in 東京, 東京, 2018.4.

53 権　寧博: 喘息の気道炎症を考える. 城北地区 呼吸器 Expert Meeting, 東京, 2018.4.

54 権　寧博: 好酸球をターゲットにした重症喘息の今後の展開. Severe Asthma Symposium in Osaka, 大阪, 2018.5.

55 権　寧博: 好酸球をターゲットにした重症喘息の今後の展開. Severe Asthma Symposium, 東京, 2018.6.

56 権　寧博: 好酸球をターゲットにした重症喘息の今後の展開. Severe Asthma Symposium in Matsumoto～ファセンラ新発売記念講演会～, 長野, 2018.6.

57 権　寧博: 好酸球をターゲットにした重症喘息治療の今後の展開. Severe Asthma Expert Meeting in 久留米ーファセンラ皮下注 30mg シリンジ新発売記念ー, 福岡. 2018.10.

58 * 山田志保, 丸岡秀一郎, 伊藤亮治, 布村　聡, 豊島翔太, 岡山吉道, 出原賢治 , 橋本　修, 伊藤　守, 権　寧博: NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg マウスを用いた IL-33, ダニ誘導型ヒト喘息モデルの開発. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 30 年度報告会, 東京, 2019.2.23.

59 * 福田麻佐美, 丸岡秀一郎, 山田志保, 黒澤雄介, 神津　悠, 権　寧博: 呼吸器ダニアレルゲン(HDM)によるマウス喘息モデルにおけるアンジオテンシン変換酵素 2(angiotensin converting enzyme 2; ACE2)の役割. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・ア

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

レルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 30 年度報告会, 東京, 2019.2.23.

60 * 福田麻佐美, 丸岡秀一郎, 山田志保, 黒澤雄介, 神津　悠, 權　寧博: ダニアレルゲン(HDM)によるマウス喘息モデルでの angiotensin converting enzyme 2(ACE2)の役割. 第 1 回日本アレルギー学東京会関東地方会, 2019.3.

61 * 山田志保: ヒト化マウスを用いた難治性喘息モデルの開発. 第 23 回東京呼吸病態研究会, 東京, 2019.11.

62 * 山田志保, 丸岡秀一郎, 福田麻佐美, 黒澤雄介, 豊島翔太, 岡山吉道, 伊藤亮治, 布村聡, 伊藤　守, 權　寧博: ヒト化マウスを用いた難治性喘息モデルの開発. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)令和元年度報告会, 2020.2.29.

63 * 福田麻佐美, 丸岡秀一郎, 山田志保, 黒澤雄介, 神津　悠, 權　寧博: ダニアレルゲン(HDM)によるマウス喘息モデルでの angiotensin-converting enzyme 2(ACE2)の役割. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)令和元年度報告会, 2020.2.29.

6) 医学教育センター

64 岡山吉道: 慢性蕁麻疹の病態とバイオマーカーについて. 第 13 回順天堂眼アレルギー研究会, 東京, 2016.9.7.

65 岡山吉道: アレルギー炎症とマスト細胞. アストラゼネカ株式会社メデイカル本部呼吸器領域担当者向け社員教育企画, 東京, 2016.9.27.

66 布村　聡, 羅　智靖, 照井　正, 岡山吉道: FcεRI を介したマスト細胞活性化における FcRγ 鎖 S-S 結合の役割. アレルギー・好酸球研究会 2016, 東京, 2016.10.22.

67 *1 豊島翔太, 岡村祐己, 管順一郎, 三嶋信太郎, 坂本朋美, 柏倉淳一, 李　賢鎬, 関　雅之, 斎藤　修, 羅　智靖, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)における滑膜マスト細胞によるサブスタンス P(SP)介在性炎症の増強と制御. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成 28 年度報告会, 東京, 2017.2.25.

68 *1 豊島翔太, 坂本朋美, 鐘ヶ江加寿子, 井上寿男, 權　寧博, 羅　智靖, 松本健治, 岡山吉道: 自然免疫および獲得免疫応答におけるヒトマスト細胞由来エクソソーム内 microRNA の網羅的比較解析. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)平成 29 年度報告会, 東京, 2018.2.24.

69 岡山吉道: PAF とアレルギー炎症. 第 23 回那須ティーチイン学術集会, 東京, 2018.7.28.

70 坂本朋美, 豊島翔太, 榎本幸典, 菅井和子, 高増哲也, 吉原重美, 岡山吉道: RS ウイルスによるヒトマスト細胞の活性化機構の検討. アレルギー・好酸球研究会 2018, 東京, 2018.9.22.

71 菅井和子, 坂本朋美, 柏倉淳一, 宮地裕美子, 吉住正和, 木村博一, 吉原重美, 岡山吉道: RS ウイルス感染による初回喘鳴児における鼻汁中抗 RSV IgE 値, TSLP と反復喘鳴の関係. アレルギー・好酸球研究会 2018, 東京, 2018.9.22.

72 岡山吉道: ウイルス感染と反復喘鳴. 第 36 回呼吸器・免疫シンポジウム, 東京, 2018.10.27.

73 岡山吉道: アレルギー炎症と PAF(血小板活性化因子), 愛知県耳鼻咽喉科医会 尾張地区研修会, 名古屋, 2019.7.20.

74 岡山吉道: マスト細胞と好塩基球の役割. 第 39 回六甲カンファレンス, 大阪, 2019.8.10.

75

76 岡山吉道: アレルギー炎症と PAF(血小板活性化因子). 町田市耳鼻咽喉科医会学術講演会,

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

東京, 2019.11.19.

77 岡山吉道: アレルギー炎症と PAF(血小板活性化因子). 城東アレルギーセミナー, 東京, 2019.11.28.

78 岡山吉道: オマリズマの作用機序から考える重症アレルギー性疾患の病態. IgE forum 2020 in Tokyo, 東京, 2020.2.1.

79 岡山吉道: アレルギー炎症と PAF(血小板活性化因子). 練馬区耳鼻咽喉科医会講演会, 東京, 2020.2.18.

80 *1 豊島翔太, 坂本朋美, 黒澤雄介, 松田　彰, 渡部保男, 権　寧博, 羅　智靖, 松本健治, 岡山吉道: IgE 依存性に活性化したヒトマスト細胞が遊離する細胞外小胞中の miR103a-3p は, PRMT5 の発現を抑制することで, IL-33 刺激による 2 型自然リンパ球からの IL-5 産生 を増強させる. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」(S1511014)令和元年度報告会, 2020.2.29.

１５　「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

＜「選定時」に付された留意事項＞
外部評価を行うこと。

＜「選定時」に付された留意事項への対応＞
外部評価者による評価を行った。
2017 年 2 月 25 日に同平成 28 年度報告会をを行い、信州大学医学部皮膚科学教授 奥山隆平先生を外部評価者として招き、外部評価を行った。
2018 年 2 月 24 日に同平成 29 年度報告会を行い、順天堂大学医学部眼科学准教授 松田　彰先生を外部評価者として招き、外部評価を行った。
2019 年 2 月 23 日に同平成 30 年度報告会を行い、獨協医科大学小児科学教授 吉原重美先生を外部評価者として招き、外部評価を行った。
2020 年 2 月 29 日に同平成 31 年(令和元)度報告会を行い、独立行政法人国立成育医療センター部長 松本健治先生を外部評価者として招き、外部評価を行った。

＜「中間評価時」に付された留意事項＞
なし

＜「中間評価時」に付された留意事項への対応＞
なし

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1511014

16　施設・装置・設備・研究費の支出状況（実績概要）　　（千円）

年度・区分		支出額	内訳 法人負担	私学助成	共同研究機関負担	受託研究等	寄付金	その他（　　）	備考
平成27年度	施設	0							
	装置	0							
	設備	9,979	3,327	6,652					
	研究費	33,202	15,435	17,767					
平成28年度	施設	0							
	装置	0							
	設備	0							
	研究費	44,455	27,582	16,873					
平成29年度	施設	0							
	装置	0							
	設備	0							
	研究費	42,382	24,183	18,199					
平成30年度	施設	0							
	装置	0							
	設備	0							
	研究費	48,988	35,761	13,227					
令和元年度	施設	0							
	装置	0							
	設備	0							
	研究費	45,672	26,095	19,577					
総額	施設	0	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	0	
	設備	9,979	3,327	6,652	0	0	0	0	
	研究費	214,699	129,056	85,643	0	0	0	0	
総計		224,678	132,383	92,295	0	0	0	0	

（様式2）

法人番号	131075

17　施設・装置・設備の整備状況 （私学助成を受けたものはすべて記載してください。）

《施　　設》（私学助成を受けていないものも含め、使用している施設をすべて記載してください。）　（千円）

施 設 の 名 称	整備年度	研究施設面積	研究室等数	使用者数	事業経費	補助金額	補助主体
医学部創設70周年記念館（リサーチセンター）	H12年度	5,722㎡	8	20	----	----	日本大学

※　私学助成による補助事業として行った新増築により、整備前と比較して増加した面積　0　㎡

《装置・設備》（私学助成を受けていないものは、主なもののみを記載してください。）　（千円）

装置・設備の名称	整備年度	型　番	台　数	稼働時間数	事業経費	補助金額	補助主体
（研究装置）							
				h			
				h			
				h			
				h			
				h			
（研究設備）							
ハイドロエンドフローサイトメーター Gallios	H27	2レザー6カラーモデル	1	850 h	9,979	6,652	私学助成
				h			
				h			
				h			
				h			
（情報処理関係設備）							
				h			
				h			
				h			
				h			
				h			

法人番号	131075

18 研究費の支出状況 （千円）

年　　度	平成　　27　年度			
小 科 目	支 出 額	積　算　内　訳		
		主 な 使 途	金　額	主　な　内　容
教　育　研　究　経　費　支　出				
消 耗 品 費	16,033	研究用消耗品	16,033	試薬, 実験用マウス　等
光 熱 水 費	0		0	
通信運搬費	6	実験動物輸送	6	実験用マウス輸送
印刷製本費	0		0	
旅費交通費	654	学会旅費	654	日本研究皮膚科学会, 日本生殖免疫学会, 国際粘膜免疫学会　等
報酬・委託料	51	英文校正	51	英文校正
（ 修繕費 ）	2,917	機器修繕	2,917	バイオシェーカー修理, キャピラリーシーケンサー修理　等
（ 雑費 ）	365	学会参加	365	国内外学会参加費
計	20,026		20,026	
ア　ル　バ　イ　ト　関　係　支　出				
人件費支出	768	研究補助	768	時給1,400円, 年間時間数451時間, 実人数1人
（兼務職員）	32	研究補助	32	時給950円, 年間時間数34時間, 実人数1人
				※所定福利費等を含む
教育研究経費支出	0		0	
計	800		800	
設 備 関 係 支 出（1個又は1組の価格が500万円未満のもの）				
教育研究用機器備品	10,400	研究用機器	10,400	蛍光セルイメージャー, 卓上遠心エバポレーター　等
図　書	0		0	
計	10,400		10,400	
研　究　ス　タ　ッ　フ　関　係　支　出				
リサーチ・アシスタント	0		0	
ポスト・ドクター	1,976	ポスト・ドクター	1,976	学内1名
研究支援推進経費	0		0	
計	1,976		1,976	学内1名

年　　度	平成　　28　年度			
小 科 目	支 出 額	積　算　内　訳		
		主 な 使 途	金　額	主　な　内　容
教　育　研　究　経　費　支　出				
消 耗 品 費	18,813	研究用消耗品	18,813	試薬, 実験用マウス　等
光 熱 水 費	0		0	
通信運搬費	34	研究試料輸送	34	実験用マウス輸送, 研究材料輸送
印刷製本費	0		0	
旅費交通費	51	学会旅費	51	学会旅費(日本研究皮膚科学会), 近距離出張
報酬・委託料	1,429	業務委託	1,429	免疫染色標本政策委託　等
（ 修繕費 ）	276	研究機器修繕	276	微量高速冷却遠心機修繕　等
（ 雑費 ）	182	学会参加	182	学会参加費, 論文掲載料　等
計	20,785		20,785	
ア　ル　バ　イ　ト　関　係　支　出				
人件費支出	977	研究補助	977	時給950円, 年間時間数1008.5時間, 実人数1人
（兼務職員）	2,021	研究補助	2,021	時給1,100円, 年間時間数139905時間, 実人数1人
				※所定福利費を含む
教育研究経費支出	0		0	
計	2,998		2,998	
設 備 関 係 支 出（1個又は1組の価格が500万円未満のもの）				
教育研究用機器備品	8,180	研究用機器	8,180	炭酸ガス培養装置, オートサンプラー　等
図　書	0		0	
計	8,180		8,180	
研　究　ス　タ　ッ　フ　関　係　支　出				
リサーチ・アシスタント	0		0	
ポスト・ドクター	12,492	ポスト・ドクター	12,492	学内3人
研究支援推進経費	0		0	
計	12,492		12,492	学内3人

（様式2）

法人番号	131075

年度	平成 29 年度			
小科目	支出額	積算内訳		
		主な使途	金額	主な内容
教育研究経費支出				
消耗品費	16,155	研究消耗品	16,155	試薬, 実験器具, 実験用マウス 等
光熱水費	0		0	
通信運搬費	36	研究試料輸送	36	実験用マウス輸送, 研究材料輸送
印刷製本費	0		0	
旅費交通費	7	近距離交通費	7	近距離交通費（検体サンプル受取）
報酬・委託料	1,793	英文校正、研究機器保守点検委託	1,793	英文校正, 高速冷却遠心機保守点検
（修繕費）	1,421	研究機器修繕	1,421	凍結乾燥機修繕, フローサイトメーター修繕 等
計	19,412		19,412	
アルバイト関係支出				
人件費支出	1,040	研究補助	1,040	時給950円, 年間時間数1050時間, 実人数1人
（兼務職員）	2,189	研究補助	2,189	時給1,100円, 年間時間数1537時間, 実人数1人
				※所定福利費等を含む
教育研究経費支出				
計	3,229		3,229	
設備関係支出（1個又は1組の価格が500万円未満のもの）				
教育研究用機器備品	11,348	研究用機器	11,348	遺伝子導入装置, 正立蛍光顕微鏡 等
図書	0		0	
計	11,348		11,348	
研究スタッフ関係支出				
リサーチ・アシスタント	0		0	
ポスト・ドクター	8,393	ポスト・ドクター	8,393	学内2人
研究支援推進経費	0		0	
計	8,393		8,393	学内2人

年度	平成 30 年度			
小科目	支出額	積算内訳		
		主な使途	金額	主な内容
教育研究経費支出				
消耗品費	32,164	研究消耗品	32,164	試薬, 実験用マウス 等
光熱水費	0		0	
通信運搬費	50	研究試料輸送	50	研究材料輸送
印刷製本費	0		0	
旅費交通費	450	近距離交通費	450	近距離出張(検体サンプル受取り)
報酬・委託料	2,848	業務委託	2,848	英文校正, 高速冷却遠心機保守点検 等
（修繕費）	100	研究機器修繕	100	高圧蒸気滅菌器修繕, リアルタイムPCRシステム修繕 等
（雑費）	50	学会参加	50	学会参加費
計	35,662		35,662	
アルバイト関係支出				
人件費支出	1,142	研究補助	1,142	時給950円, 年間時間数1,240時間, 実人数1人
（兼務職員）	1,932	研究補助	1,932	時給1,100円, 年間時間数1,677時間, 実人数1人
				※所定福利費等を含む
教育研究経費支出	0		0	
計	3,074		3,074	
設備関係支出（1個又は1組の価格が500万円未満のもの）				
教育研究用機器備品	5,714	研究用機器	5,714	証明装置付実体顕微鏡, ALSメディカル冷蔵庫 等
図書	0		0	
計	5,714		5,714	
研究スタッフ関係支出				
リサーチ・アシスタント	0		0	
ポスト・ドクター	4,538	ポスト・ドクター	4,538	学内1人
研究支援推進経費	0		0	
計	4,538		4,538	学内1人

（様式2）

法人番号	131075

年　　度	令和　　元　年度			
小 科 目	支 出 額	積　算　内　訳		
		主 な 使 途	金　額	主　な　内　容
教　育　研　究　経　費　支　出				
消 耗 品 費	27,975	研究消耗品	27,975	試薬, 実験用マウス　等
光 熱 水 費	0		0	
通信運搬費	2	研究試料輸送	2	研究材料輸送
印刷製本費	11	ポスター印刷	11	学会発表ポスター印刷
旅費交通費	416	学会旅費	416	学会旅費(WAC2019, 日本アレルギー学会), 近距離出張
報酬・委託料	3,548	業務委託	3,548	研究用標本作成, 英文校正　等
（ 修繕費 ）	255	研究機器修繕	255	CO2インキュベーターUVランプ交換, メディカルフリーザー修繕　等
（ 雑費 ）	89	学会参加	89	学会参加費
計	32,296		32,296	
ア　ル　バ　イ　ト　関　係　支　出				
人件費支出	1,122	研究補助	1,122	時給1,000円, 年間時間数1,177時間, 実人数1人
（兼務職員）	1,899	研究補助	1,899	時給1,100円, 年間時間数1,651時間, 実人数1人
				※所定福利費等を含む
教育研究経費支出				
計	3,021		3,021	
設 備 関 係 支 出（1個又は1組の価格が500万円未満のもの）				
教育研究用機器備品	5,800	研究用機器	5,800	オートクレーブ, 超低温フリーザー, 少量試料遠心濃縮システム　等
図　　書	0		0	
計	5,800		5,800	
研　究　ス　タ　ッ　フ　関　係　支　出				
リサーチ・アシスタント	0		0	
ポスト・ドクター	4,555	ポスト・ドクター	4,555	学内1人
研究支援推進経費	0		0	
計	4,555		4,555	学内1人

3．研究成果の概要

シェーグレン症候群と疾患関連遺伝子の関係性, および無症候性シェーグレン症候群の心臓病変の解析研究

The relation between Sjögren syndrome and disease related genes and the analysis at cardiac involvement of asymptomatic Sjögren syndrome

杉山海太 [1)]、北村　登 [1)]、小林ひとみ [1)]、 小林泰之 [1)],、大島正嗣 [1)]、濱口麻里奈 [1)]、芳沢昌栄 [1)]、長澤洋介 [1)]、西脇農真 [1)]、井汲菜摘 [1)]、野崎高正 [1)]、 猪股弘武 [1)]、 白岩秀隆 [1)]、 唐澤博美 [1)]、 岩田光浩 [1)]、 松川吉博 [1)]、 武井正美 [1)]

Kaita SUGIYAMA[1)], Noboru KITAMURA[1)], Hitomi KOBAYASHI[1)], Yasuyuki KOBAYASHI[1)], Masashi OSHIMA[1)], Marina HAMAGUCHI[1)], Shoei YOSHIZAWA[1)], Yosuke NAGASAWA, [1)] Natsumi IKUMI[1)], Takamasa NOZAKI[1)], Hirotake INOMATA[1)], Hidetaka SHIRAIWA[1)], Hiromi KARASAWA[1)], Mitsuhiro IWATA[1)], Yoshihiro MATSUKAWA[1)], Masami TAKEI[1)]

[1)]日本大学医学部 内科学系血液膠原病内科学分野

[要旨]

シェーグレン症候群(SS)の疾患関連遺伝子のひとつとして考えられ、モデルマウスで発現している Parotid secretory protein (PSP)の遺伝子がヒトで発現されているか否かを検討するため、シェーグレン症候群患者の小唾液腺組織での PSP 遺伝子発現をリアルタイム PCR で検討し、PSP 蛋白発現を免疫染色で検討した。PSP 遺伝子発現は認めたが、免疫染色では PSP 蛋白は染色されなかった。PSP 遺伝子が二次的な反応として発現していることが示唆された。また、SS による心臓合併症が知られているが無症候性に発症していることがある。心臓 MRI(cardiac magnetic resonance imaging: CMR)は心筋の障害を描出するのに有用な検査であり、今回 SS 患者の CMR と自己抗体、バイオマーカーを評価する事で SS の潜在性心筋病変を評価した。QT c の延長と IL-6 が CMR の病変と有意な相関を認め、SS の深在性心臓病変の診断、評価に有用であることが示唆された。

〈研究 1〉

[背景・目的]

当研究室では DNA マイクロアレイ法を用いて、SS のモデルマウス唾液腺上で高発現している遺伝子をいくつか発見し、 疾患関連遺伝子として報告した。 それら遺伝子のうち PSP 遺伝子の発現をリアルタイム PCR で検討し、ヒト唾液腺組織を使用してこれら蛋白の発現について免疫組織染色法で検討し疾患特異的な遺伝子か否かについて解析することとした。

[方法]

5 人の SS 患者検体を使用し、対照群として 4 人の唾液腺嚢胞患者検体を使用した。

全ての患者にインフォームドコンセントを行って同意を得た検体を使用した。小唾液腺は患者下口唇より生検された検体を使用した。SS 患者年齢は 45 歳から 69 歳、唾液腺嚢胞患者は 22 歳から 62 歳であった。*PSP* 遺伝子のヒトペプチドを合成し(PSP: SAWQLAKQKAQEAEC)、ウサギに免疫しこれらペプチドに対する抗ヒトペプチド抗体を作製し血清よりアフィニティカラムで精製(蛋白精製工業、高崎市)したものを使用した。

[結果]

PSP のペプチドに対する抗マウスペプチド抗体を一次抗体に用いて免疫組織染色を施行した。PSP 遺伝子はヒト一次性、二次性 SS 患者の唾液腺導管細胞において発現を認めた。ヒト唾液腺嚢胞患者の唾液腺導管細胞では発現を認めなかった。

[考察]

自然界の口腔環境は細菌あるいは virus 感染にさらされている。SS では慢性炎症と唾液分泌低下で感染に対する防御機構が低下しているものと考えられる。PSP 分子は慢性炎症と細菌感染に対して抗炎症的に働くペプチドであり、ヒトで亢進する理由として、PSP 分子は病因に関連する何らかの感染に対する炎症とそれに対する抗炎症効果で発現亢進した可能性が考えられた。

[結論]

シェーグレン症候群(SS)患者 PSP の発現を、ヒト唾液腺組織で検討し PSP 遺伝子の発現は認めたが、ヒト唾液腺嚢胞患者の唾液腺導管細胞では発現を認めなかった。
PSP 遺伝子が二次的な反応として発現していることが示唆された。

[参考文献]

[1]Madsen HO, Hjorth JP: Molecular cloning of mouse PSP mRNA. Nucleic Acids Res. 1985; 13: 1-13.

[2]Mirels L, Ball WD: Neonatal rat submandibular gland protein SMG-A and parotid secretory protein are alternatively regulated members of a salivary protein multigene family. J Biol Chem. 1992; 267, 2679-2687.

[3]Khovidhunkit M, Hachem JP, Medzihradszky KF, Duchateau PN, Shigenaga JK, Moser AH, et al: Parotid secretory protein is an HDL-associated protein with anticandidal activity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005; 288: 1306-1315.

〈研究 2〉

[背景・目的]

SS の疾患特異的自己抗体である抗 SS-A/Ro 抗体や抗 SS-B/La 抗体が陽性の母親の胎児に完全房室ブロックが 2〜5%に診断され、成人 SS 患者の心電図では PR 時間の延長がみられる。このように SS には心臓病変の合併が知られているが、心臓病変があっても臨床的に心症状を現しにくく、突然死で発見される例も報告されている。過去に我々は心臓 MRI を用い、他の膠原病疾患において無症候性の心臓病変が存在する事を発見し、さらに SS では Raynaud 症状が強い患者における無症候性の心臓病変を心臓 MRI(cardiac magnetic resonance imaging; CMR)で確認した事を報告した。今回我々は, SS 患者に CMR を行い、同時に心血管疾患の炎症性バイオマーカーを測定し、心症状を有さない段階での SS 患者の心臓病変の頻度と程度、炎症性バイオマーカーとの関連性を検討する。

[方法]

心症状のない一次性 SS(pSS)の患者(54 名)を対象に CMR を行った。心筋の線維化の評価可能な遅延ガドリニウム造影(late gadolinium enhancement; LGE)、心筋の浮腫が判定できる T2 強調画像(T2-weighted image; T2WI)を用いて無症候性の心病変の検討を行った。また、 LGE 及び T2WI と SSc の疾患背景因子,心血管の炎症性バイオマーカー(TNF-α, IL-6, PTX3, MMP-9, leptin, adiponectin)に関連性があるかどうか評価した。

[結果]

LGE 陽性の患者は 10 例(18.5%)でうち 2 例(3.7%)は T2WI も陽性であった。T2WI 陽性の患者は 3 例(5.6%)だった。LGE は QTc 間隔と関連を示した(p=0.047)。54 例中 36 例の pSS 患者で炎症性バイオマーカーを追加測定した。pSS の患者において IL-6 は LGE 陽性を示した患者で有意に高値であったが(p=0.026)ほぼ全例が正常値であった。

Patient characteristics according to myocardial late gadolinium enhancement

	Total (n=54)	No LGE (n=44)	LGE Present (n=10)	p-value
Cardiovascular factors				
Systolic blood pressure, mmHg*	121±14	121±14	122±12	0.91
Diastolic blood pressure, mmHg*	71±10	71±10	70±8	0.69
Total cholesterol, mg/dL*	188±33	184±33	206±28	0.17
LDL-C, mg/dL*	107±21	106±21	109±20	0.68
HDL-C, mg/dL**	56(45-67)	57(45-67)	55(44-84)	0.77
Triglycerides, mg/dL**	101(77-130)	101(77-130)	99(76-150)	0.90
Hemoglobin A1c, %*	5.6±0.3	5.6±0.3	5.4±0.2	0.11
Framingham score, units**	11(6-13)	11(6-13)	11(9-13)	0.75
N-terminal proBNP, pg/mL**	52(21-134)	47(21-119)	116(37-535)	0.09
QTc, per ms*	433±25	430±25	447±15	0.047
Cardiac MRI measures				
Ejection fraction, %*	64±6	63±8	64±6	0.80
T2WI BB, units, n(%) ***	3(5.6)	1(2.3)	2(20)	0.085

Means ± standard deviation or median (interquartile range) depicted unless otherwise indicatated.

* t-test
** Wilcoxon rank sum test
*** Fisher's exact test

Patient characteristics according to myocardial late gadolinium enhancement
- inflammatory biomarkers -

	Total (n=36)	No LGE (n=28)	LGE Present (n=8)	p-value
Pentraxin 3, ng/mL	1.6(1.1-2.1)	1.6 (1.2-2.1)	1.5 (1.0-2.2)	0.70
IL-6, pg/mL	1.7(1.2-2.6)	1.6 (1.0-2.1)	2.6 (1.8-3.4)	0.026
TNF-α, pg/mL	1.1(0.9-1.5)	1.1(0.9-1.5)	1.0 (0.8-1.3)	0.63
Leptin, μg/mL	13.6(8.3-18.3)	13.6 (8.3-18.3)	14.1 (7.9-21.8)	0.91
Adiponectin, ng/mL	5.1(3.0-7.1)	5.1 (3.0-6.9)	5.5 (3.2-9.3)	0.63
MMP9, ng/ml	27(21-32)	27(23-35)	23(17-27.8)	0.27

Median (interquartile range) depicted.

Wilcoxon rank sum test

[考察]

CMR を用いて pSS 患者の心病変を指摘することができた。無症候性の pSS 患者において高頻度に LGE 陽性を認めた。第二に QTc 間隔は LGE と有意に関連を示した。検索した限りでは pSS 患者の心筋異常と QTc 間隔が関連していることを示した研究はこれまでにない。無症候性の pSS 患者でも CMR で評価することで心血管病変の頻度が高いことが示された。今後も pSS 症例の蓄積と疾患に関連する臨床的あるいは免疫学的なマーカーの検討が必要である。

[結論]

SS 患者の CMR と自己抗体、バイオマーカーを評価する事で SS の潜在性心筋病変を評価し、QT c の延長と IL-6 が CMR の病変と有意な相関を認め、SS の深在性心臓病変の診断、評価に有用であることが示唆された。

［参考文献］

[1]Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG: Overall and cause-specific mortality in systemic lupus erythematosus: an updated meta-analysis. Lupus. 2016; 25: 727-734.

[2]Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, et al: Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. Circulation. 2003; 107: 1303-1307.

[3]Geraldino-Pardilla L, Gartshteyn Y, Piña P, Cerrone M, Giles JT, et al: ECG non-specific ST-T and QTc abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus compared with rheumatoid arthritis. Lupus Sci Med. 2016; 3: e000168.

Epstein-Barr virus 感染による NOD/Shi-scid IL-2rgnull びらん性関節炎マウスモデルにおけるヒト破骨細胞の検討

Human osteoclastogenesis in Epstein–Barr virus-induced erosive arthritis of humanised NOD/Shi-*scid*/IL-2Rγ^{null} mice

長澤洋介 [1)]、井汲菜摘 [1)]、野崎高正 [1)]、猪股弘武 [1)], 吉田広人 [1)], 今留謙一 [1)], 北村　登 [1)]、岩田光浩 [1)]、藤原成悦 [1)]、武井正美 [1)]

Yosuke NAGASAWA[1)], Natsumi IKUMI[1)], Takamasa NOZAKI[1)], Hirotake INOMATA[1)], Hiroto YOSHIDA[1)], Kenichi IMADOME[1)], Noboru KITAMURA[1)], Mitsuhiro IWATA[1)], Shigeyori FUJIWARA[1)], Masami TAKEI[1)]

[1)]日本大学医学部 内科学系血液膠原病内科学分野

[要旨]

Epstein-Barr virus (EBV)は、関節リウマチ(RA)の発症に関与する環境因子である可能性が示唆されている。今回ヒト(h)免疫化 NOD/Shi-scid IL-2γ^{null} マウス(以下 hNOG マウス)に EBV を感染させ、びらん性関節炎モデルを発症させ、骨びらん局所に存在する破骨細胞の同定と由来を検討した。びらん性関節炎発症 hNOG マウスは EBV 感染後の末梢血中の CD4/8 の比を解析することにより、より高率にびらん性関節炎を発症することが確認され、骨びらんをマイクロ 3D-CT を用いて 3 次元的に証明した。さらに骨びらんを来す破骨細胞を同定するため骨びらんを来した病理組織標本をヒト cathepsin K に対するモノクローナル抗体と tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)で染色し、組織中に存在する破骨細胞がヒト由来であることを証明した。さらに hNOG マウスの骨髄中有核細胞を macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)および receptor activator of nuclear factor κB ligand(RANKL)添加で培養し、多核の破骨細胞を分化誘導し、培養細胞を TRAP 染色、抗ヒト cathepsin K 抗体および抗ヒトミトコンドリア抗体を用いた免疫染色を行い、陽性でこの細胞がヒト由来であることを証明した。このモデルマウスはヒトの破骨細胞でのびらん性関節炎を起こした初めてのモデルで、今後の病態解明、治療薬の開発につながるものと思われた。

[背景および目的]

Epstein-Barr virus (EBV)は、関節リウマチ(RA)の発症に関与する環境因子である可能性が示唆されている。EBV はヒト以外新世界サルにしか感染しないため、動物実験が困難だが、ヒト免疫化マウスの開発によってマウスを用いた EBV 感染実験が可能となった。桑名らは、hNOG マウスに EBV を感染させると膝関節にびらん性関節炎を発症することを報告した。[1)] しかし、発症機序を含めて解明すべき点が多数残されている。

(1) 高率にびらん性関節炎を発症させるための条件

桑名らの報告によると、EBV 感染 hNOG マウスの関節炎発症率は約 65%であった。関節炎発症には何が必要であるのか条件検討が必要と考えられた。

(2) 膝関節の三次元構造

桑名らの報告では, 関節炎の評価は関節組織切片による組織学的評価のみである。関節の三次元構造を画像検査的手法で評価できないか方法の検討が必要と考えられた。

(3) 骨びらん部局所に存在する破骨細胞の同定と由来

本研究はヒト免疫化マウスを使用しており、免疫細胞においてはヒト細胞とマウス細胞が混在していると考えられる。EBV は前述のようにヒト細胞にしか感染しないため、びらん性関節炎の発症にはヒト免疫細胞が関わっていると予想される。このことを確認するため、骨びらん部局所において骨破壊を行っている破骨細胞がヒト細胞由来であるのか、あるいはマウス細胞由来であるのか検討が必要と考えられた。

(4) 抗 IL-6 受容体抗体投与によるびらん性関節炎抑制効果

桑名らの報告では、EBV 感染 hNOG マウスに発症するびらん性関節炎は RA に類似した特徴を持っている。そこで、実際に RA 治療薬として臨床使用されている抗ヒト IL-6 受容体抗体製剤の投与を EBV 感染 hNOG マウスに行い、関節炎抑制効果があるか確認することを計画した。

[方法]

(1) 高率にびらん性関節炎を発症させるための条件

EBV 感染後末梢血リンパ球中のヒト CD4 陽性細胞およびヒト CD8 陽性細胞の比率に着目し、EBV 感染によって上昇する CD8 陽性細胞の比率が CD4 陽性細胞の比率を上回る EBV 感染後 8 から 10 週間経過した後に解剖を行い、関節炎の発症率を検討する。

(2) 膝関節の三次元構造

EBV 感染 hNOG マウスの膝関節をマイクロ 3D-CT 撮影し、画像検査においても RA と類似した特徴を有しているか評価する。

(3) 骨びらん部局所に存在する破骨細胞の同定と由来

EBV 感染 hNOG マウスの膝関節組織切片に対して破骨細胞のマーカーである tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) の染色を行い、破骨細胞の存在を確認する。加えて、ヒト cathepsin K に対するヒト特異抗体を用いて免疫染色を行い、骨びらん部局所においてヒト破骨細胞の存在を確認する。また、破骨細胞の前駆細胞は骨髄に存在し[2]、破骨細胞前駆細胞は M-CSF および RANKL の刺激を受けて破骨細胞に分化する[3]ことが知られている。そのため、ヒト M-CSF およびヒト RANKL 存在下で EBV 感染 hNOG マウスの骨髄細胞を培養し、培養細胞に対して TRAP 染色を行

い、破骨細胞の存在を確認する。加えて、cathepsin K およびミトコンドリアに対するヒト特異抗体用いた免疫染色を行い、ヒト破骨細胞の存在を確認し、EBV 感染 hNOG マウスの骨髄にヒト破骨細胞の前駆細胞が存在するかどうか検討を行う。

(4) 抗 IL-6 受容体抗体投与によるびらん性関節炎抑制効果
EBV 感染 hNOG マウスにおいて、対照群にはラット抗ヒトおよびラット抗マウス IL-6 受容体抗体製剤をコントロール群にはラット IgG を投与する。

[結果]

(1) EBV 感染後 8 から 10 週間の時点で解剖を行い、膝関節切片を組織学的に評価した結果、15 頭の EBV 感染 hNOG マウス全例において大腿骨遠位部後面関節辺縁の滑膜起始部にびらん性関節炎が確認された。一方で、10 頭の EBV 非感染 hNOG マウスにおいてはいずれにおいても関節炎は確認されなかった。
(2) マイクロ 3D-CT 検査の結果、EBV 感染 hNOG マウスの膝関節では、関節包骨付着部付近に骨びらんが確認されたが、EBV 非感染マウスでは認められなかった。
(3) EBV 感染 hNOG マウスの膝関節組織骨びらん部には多核細胞が複数存在し、それらの多核細胞は TRAP 染色で陽性を示し、抗ヒト cathepsin K 抗体を用いた免疫染色に陽性を示した。また、EBV 感染 hNOG マウスの骨髄細胞をヒト M-CSF およびヒト RANKL 存在下で培養して得た培養細胞中には大型の多核細胞が認められ、それらの細胞は TRAP 染色陽性、抗ヒト cathepsin K 抗体および抗ヒトミトコンドリア抗体を用いた免疫染色に陽性を示した。
(4) 5 頭の対照群マウスも 5 頭のコントロール群マウスも。全例で骨びらんが観察され、抗ヒト IL-6 受容体抗体製剤投与によって骨びらんは抑制されなかった。

[考察]

(1) EBV 感染 hNOG マウス における末梢血中の CD8 陽性細胞の上昇は EBV 感染 B 細胞を除去し、感染細胞の増殖を阻止するために反応性に上昇してきたと考えられる。この結果から、びらん性関節炎が EBV 感染細胞の増殖反応に関連して起こるのか、あるいはそれに反応した CD8 陽性 T 細胞が関与するのかなど、今後の検討課題となった。
(2) 膝関節をマイクロ 3D-CT で観察した結果、組織所見と同様に RA に認められる関節包骨付着部付近に骨びらんが形成されることが確認できた。この結果は今までの組織学的解析のみならず、マイクロ 3D-CT 撮影による画像検査的手法によっても骨びらんの観察および評価が可能であることを示している。
(3) 膝関節組織の組織化学染色結果から、膝関節骨びらん部局所に存在する多核細胞は破骨細胞と考えられる。さらには、組織切片で観察されるほとんどの多核細胞において発現する cathepsinK がヒト特異的 cathepsinK 抗体に反応したことから、EBV 感

染 hNOG マウスにおいて骨びらん形成に関与する破骨細胞は、ヒト破骨細胞が主体であると考えられる。続いて、EBV 感染 hNOG マウスの骨髄細胞培養の結果、マウス骨髄培養細胞から TRAP 陽性、ヒト cathepsin K 陽性、そしてヒトミトコンドリア陽性を示す大型の多核細胞が得られた。このことは、ヒト破骨細胞が EBV 感染 hNOG マウスの骨髄細胞から分化誘導されたことを示す。膝関節骨びらん部局所に存在するヒト破骨細胞は、EBV 感染に関連する何らかの要因により骨髄に存在するヒト破骨細胞前駆細胞から分化し、膝関節局所に動員され、骨びらんを形成した可能性が考えられる。

(4) RA 治療薬として使用されている生物学的製剤の中でも、今回は抗 IL-6 受容体抗体に着目し、EBV 感染 hNOG マウスに発症するびらん性関節炎への効果を検討したが、抗 IL-6 受容体抗体投与によって関節炎の抑制は認められなかった。IL-6 は骨芽細胞の RANKL 発現を高めることによって破骨細胞分化を促進するという報告がある[4)]。今回 EBV 感染 hNOG マウスに対して、ヒト IL-6 受容体およびマウス IL-6 受容体それぞれに対する抗体投与を行ったにも関わらず骨びらんが観察されたことから、IL-6 が骨芽細胞の RANKL 発現を高めることによって、ヒト破骨細胞分化に大きく関与した可能性は低いと考えられる。

[結論]

今回我々は EBV 感染 hNOG マウスによるびらん性関節炎の証明とびらん性関節炎を骨破骨細胞がヒト由来出あることを証明した。このモデルマウスはヒトの破骨細胞でのびらん性関節炎を起こした初めてのモデルで、今後の病態解明、治療薬の開発につながるものと思われた。

[参考文献]

[1)]Kuwana Y, Takei M, Yajima M, et al: Epstein-Barr virus induces erosive arthritis in humanized mice. PLoS One. 2011; 6: e26630.

[2)]Ibbotson KJ, Roodman GD, McManus LM, et al: Identification and characterization of osteoclast-like cells and their progenitors in cultures of feline marrow mononuclear cells. J Cell Biol. 1984; 99: 471-480.

[3)]Takeshita S, Kaji K, Kudo A: Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. J Bone Miner Res 2000; 15: 1477-1488.

[4)]Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. Ann N Y Acad Sci. 2008; 1143: 123-150.

強皮症における心病変の解析研究：心臓 MRI と心血管疾患の炎症性バイオマーカーによるアプローチ

The analysis of cardiac imvolvement at systemic sclerosis; the approach using cardicamagnetic resonance imaging and inflammatory biomarker of cardiovascular disease

杉山海太 [1)]、北村　登 [1)]、小林ひとみ [1)]、小林泰之 [1)]、大島正嗣 [1)]、濱口麻里奈 [1)]、芳沢昌栄 [1)]、都築　広 [1)]、長澤洋介 [1)]、西脇農真 [1)]、井汲菜摘 [1)]、野崎高正 [1)]、岩田光浩 [1)]、武井正美 [1]

Kaita SUGIYAMA[1)], Noboru KITAMURA[1)], Hitomi KOBAYASHI[1)], Yasuyuki KOBAYASHI[1)], Masashi OSHIMA[1)], Marina HAMAGUCHI[1)], Shoei YOSHIZAWA[1)], Hiroshi TSUZUKI[1)], Yosuke NAGASAWA[1)], Atsuma NISHIWAKI[1)], Natsumi IKUMI[1)], Takamasa NOZAKI[1)], Mitsuhiro IWATA[1)], Masami TAKEI[1)]

[1)]日本大学医学部 内科学系血液膠原病内科学分野

[要旨]

強皮症(SSc)の心合併症は予後に大きく左右されることが知らされている。近年心臓 MRI(cardiac magnetic resonance imaging; CMR)により低侵襲に心病変を検出出来る事が報告されている。今回我々は SSc 患者の CMR による心病変の評価と geometry 等の関連を明らかにする事を目的とした。心症状のない SSc 患者を対象に CMR を撮影し、さらにその患者の各種バイオマーカーを測定し、心病変との関連を検討した。CMR の所見と geometry とで相関がみられ、さらに BNP、NT-proBNP とも相関がみられた。

[背景・目的]

SSc の死因の約 3 割は心病変によるとの報告があり、SSc の心病変は予後に大きく関わる。また心病変があっても臨床的に心症状を現しにくいとされている。近年、CMR の進歩は極めて急速であり、低侵襲に心病変を検出してその程度を定量化できるようになった。CMR は様々な病態の心病変を高い検出能で診断可能で、その症状や程度の診断が低侵襲かつ的確に評価可能である。SSc の予後を大きく規定する心病変を心症状が発現する前に早期に捉えることは重要である。CMR を用いて SSc における無症候性の心病変の真の頻度を明らかとすることより、心病変の予後の推定においても重要な役割を有すると考えられる。CMR を用いて、SSc における無症候性の心病変の評価と、心病変と geometry などの関連を明らかにすることを目的に研究を行った。無症候性の心病変を評価する事で SSc の心合併症の早期診断、治療に結びつく事が示唆され

た。

[方法]

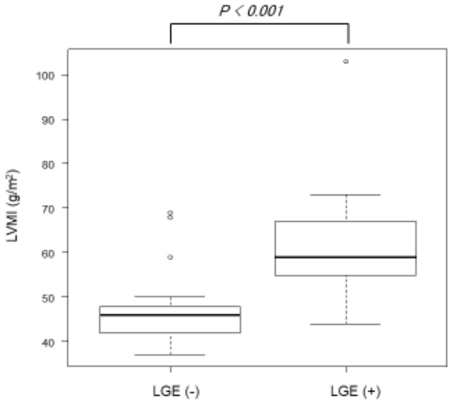
　心症状のない SSc の患者を対象に、CMR を行った。心筋の線維化の評価可能な遅延ガドリニウム造影(late gadolinium enhancement; LGE)、心筋の浮腫が判定できる T2 強調画像(T2-weighted image; T2WI)を用いて無症候性の心病変の検討を行い、更に無症候性の心病変が左室の geometry と関連しているかどうかを評価した。また、LGE 及び T2WI と SSc の疾患背景因子、脳性ナトリウム利尿ペプチド(brain natriuretic peptide; BNP)、ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体 N 端フラグメント(N-terminal pro-BNP; NT-proBNP)、および心血管の炎症性バイオマーカー(TNF-α, IL-6, PTX3, MMP-9, leptin, adiponectin)に関連性があるかどうか評価した。
今回、後ろ向き研究(49 名の SSc 患者を対象; Study 1)と前向き研究(13 名の SSc 患者を対象; Study 2)の二つを行った。

[結果]

Study 1 では 55 %、Study 2 では 85 %の患者で LGE が陽性であった。T2WI は、Study 1 で 22 %, Study 2 で 38 %の患者に陽性であった。Study 1 では 30 %の患者に geometry の変化が見られ、LGE 陽性患者の内の 45 %で geometry の変化が見られた。LGE 陽性群と陰性群を比較したところ、BNP 及び NT-proBNP において有意差を認めた。BNP は 16.7 pg/mL 以上で線維化が生じている可能性を示した。Study 1 において LGE 及び T2WI 陽性群と陰性群を比較したところ、抗 Scl-70 抗体において有意差を認めた。
Study 2 で心血管の炎症性バイオマーカーは、症例数が少ないためか一定の見解は得られなかった。

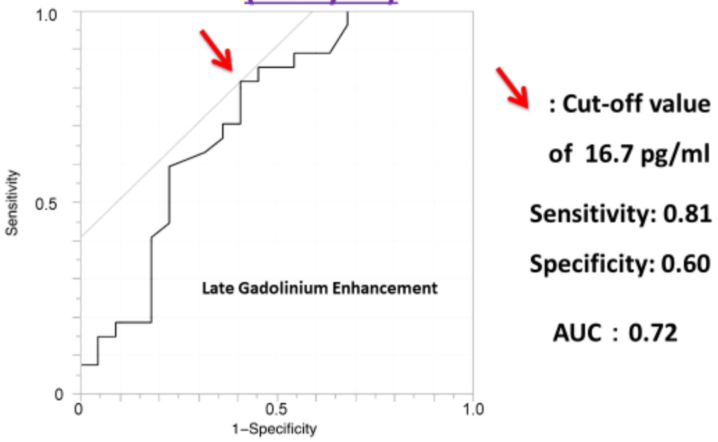
る。

LVMI of LGE (+) and LGE (-) groups (study 1¶)



Group comparisons were made using the Wilcoxon rank-sum test.
¶:Study 1 was evaluated by MRI at 1.5 or 3.0 Tesla.
LGE: late gadolinium enhancement; LVMI: left ventricular mass index

Receiver operating characteristics analysis showed BNP reliably detected LGE (Study 1¶)



LGE: Late gadolinium enhancement; BNP: Brain natriuretic peptide
¶:Study 1 was evaluated by MRI at 1.5 or 3.0 T.

[考察]

SSc の心病変は無症候性に進行することが多く認められ、線維化や浮腫性変化だけでなく心臓の形態学的な変化も起きていることを示した。放射線被曝もなく安全な侵襲の少ない CMR を行い心病変の合併を診断することは発症予防や治療戦略に有用である。

[結論]

今回、SSc の無症候性心病変を CMR とバイオマーカーを用いて評価し、geometry と BNP、NT-proBNP と相関がみられ、無症候性の心病変を評価する事で SSc の心合併症の早期診断、治療に結びつく事が示唆された。

[参考文献]

[1)]Kobayashi Y, Kobayashi H, T Giles J, Yokoe I, Hirano M, Nakajima Y, et al: Detection of Left Ventricular Regional Dysfunction and Myocardial Abnormalities Using Complementary Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Patients with Systemic Sclerosis without Cardiac Symptoms: A Pilot Study. Intern Med. 2016; 55: 237-243.

[2)]Kobayashi H, Yokoe I, Hirano M, Nakamura T, Nakajima Y, Fontaine KR, et al: Cardiac magnetic resonance imaging with pharmacological stress perfusion and delayed enhancement in asymptomatic patients with systemic sclerosis. J Rheumatol. 2009; 36: 106-112.

[3)]Kobayashi Y, Kobayashi H, T Giles J, Yokoe I, Hirano M, Nakajima Y, et al: Detection of Left Ventricular Regional Dysfunction and Myocardial Abnormalities Using Complementary Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Patients with Systemic Sclerosis without Cardiac Symptoms: A Pilot Study. Intern Med. 2016; 55: 237-243.

ヒト免疫化 HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid, IL-2Rγnull マウスを用いた Epstein-Barr virus 感染とびらん性関節炎の検討

The analysis of erosive arthritis infected Epstein-Barr virus using humanized HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid, IL-2Rγnull mouse

都築　広[1)]、長澤洋介[1)]、岩田光浩[1)]、北村　登[1)]、武井正美[1)]
Hiroshi TSUZUKI[1)], Yosuke NAGASAWA[1)], Noboru KITAURA[1)], Masami TAKEI[1)]

[1)]日本大学医学部 内科学系血液・膠原病内科学分野

[要旨]

ヒト免疫化 NOD/Shi-scid IL-2Rγnull マウス(以下 hNOG マウス)に Epstein-Barr virus(EBV)を感染させると膝関節にびらん性関節炎を発症することを報告し、関節リウマチの発症に EBV 関与の可能性を証明した。しかし、関節リウマチ(以下 RA)の病態により近づけるため、RA の遺伝子系に関与している HLA-DR4 に着目し、HLA-DR4 トランスジェニック NOG マウスに HLA-DR4 陽性ヒト造血幹細胞を移植(以下 hHLA-DR4 Tg マウス)し、そこに EBV を感染させ、hNOG マウスと同様のびらん性関節炎発症について検討した。hHLA-DR4 Tg マウスは hNOG マウスと比較しヒト造血幹細胞移植の生着が不良だったが、膝関節や肺組織にリンパ球浸潤を主とする炎症性変化を認めた。しかし EBV 未感染のマウスでもリンパ球浸潤を認める所見が得られた事から非特異的な反応である可能性が考えられた。

[背景]

我々は以前に、hNOG マウスに EBV を感染させると膝関節にびらん性関節炎を発症することを報告し、関節リウマチの発症に EBV 関与の可能性を証明した。[1)] hNOG マウスの特徴として、外来抗原に対して IgG 抗体の産生がほとんどみられず、液性免疫系の機能が不十分であることが指摘されている。[2)] 上記の EBV 感染 hNOG マウスの血清中に関節リウマチに関連する自己抗体を認めなかった。RA の病態には液性免疫が深く関わっており、hNOG マウスを利用した検討には限界がある。HLA-DR4 をトランスジェニックした NOG マウスに HLA-DR4 陽性ヒト造血幹細胞を移植して作製したヒト免疫化マウス(以下 hHLA-DR4 Tg マウス)は外来抗原に対して IgG 抗体を産生することが報告されており、[3)] 従来の hNOG マウスの欠点を補う新たなマウスとして期待されている。

[目的]

今回，関節リウマチの疾患感受性遺伝子である HLA-DR4 を有する hHLA-DR4 Tg マウスに EBV を感染させ、関節リウマチ様のびらん性関節炎を誘導できるか、関節リウマチに関連する自己抗体が出現するかどうかを検討する.

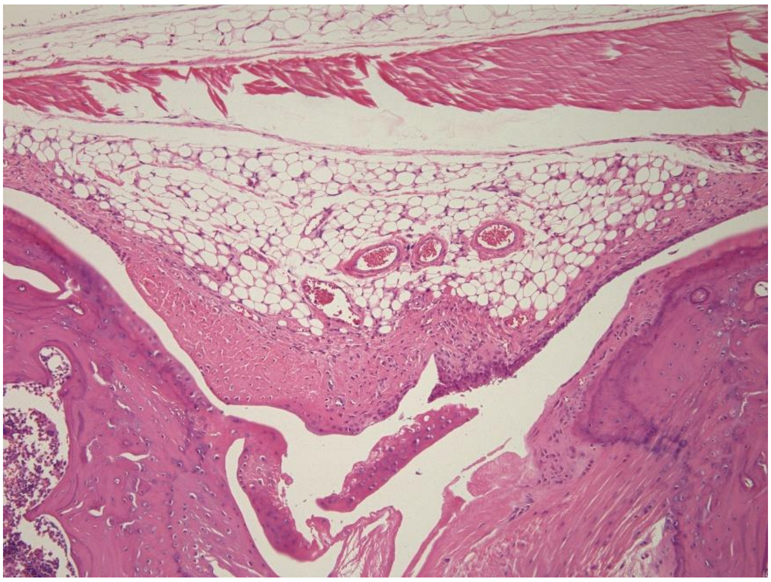
[方法]

生後 6～10 週のマウスに HLA-DR4 陽性のヒト臍帯血から採取した CD34 陽性細胞を経静脈的に投与して移植を行った。移植 12 週後に生着の状況を確認し、20 あるいは 200 Td の EBV を感染させ、感染後 16～20 週後に解剖して各臓器の組織学的所見を評価した。

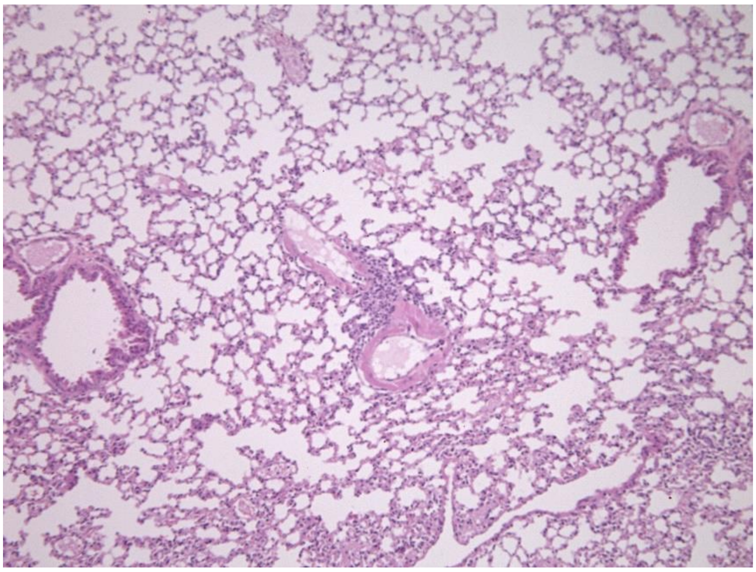
[結果]

現状の報告にとどまるが、hHLA-DR4 Tg マウスでは hNOG マウスと比較してヒト造血幹細胞移植の生着が不良で、また、EBV 感染の有無に関わらず膝関節や肺組織にリンパ球浸潤を主とする炎症性変化を認めた。

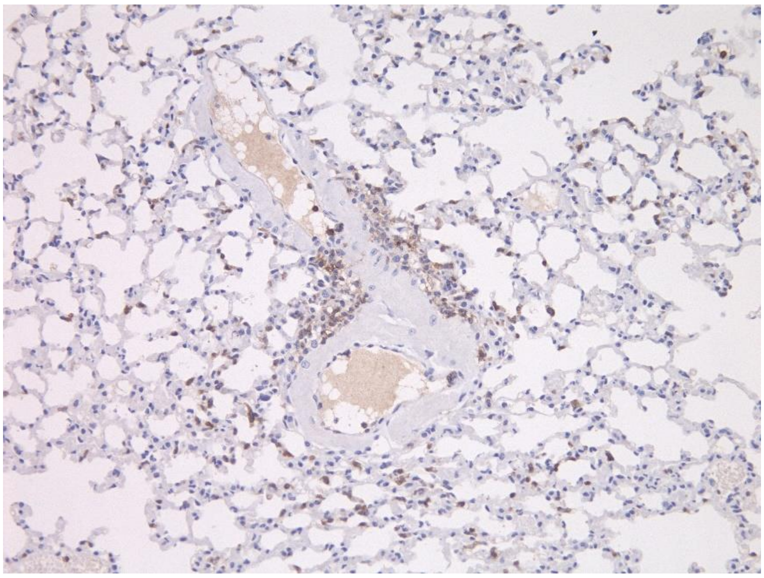
膝関節 HE 染色（×200 倍）



肺組織 HE 染色（×200 倍）



肺組織ヒト CD3 染色（×400 倍）



[考察]

hHLA-DR4 Tg マウスで hNOG マウスと同様の EBV 感染によるびらん性関節炎発症を検討したが、以前の hNOG マウスと比較し骨髄生着率が低かった。これについては HLA-DR4 臍帯血の細胞濃度が一定でなく、CD34 細胞濃度が不均一な事が考えられた。さらに移植後、EBV 感染、未感染関わりなく、関節以外にも肺に炎症性細胞浸潤を認める事から GVHD 様の反応を示していることが考えられた。今後、HLA-DR4 臍帯血の CD34 細胞の量の検討、ならびに GVHD 様の反応がもたらす影響につき解析をする必要が認められた。

[結論]

hHLA-DR4 Tg マウスで hNOG マウスと同様の EBV 感染によるびらん性関節炎発症を検討し、関節、肺に炎症性細胞浸潤を認めたが、非特異的な反応の可能性が高かった。今後移植の生着率の改善、関節以外の組織への炎症細胞浸潤の発生機序を検討する。

[参考文献]

[1)]Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, et al: Epstein-Barr virus induces erosive arthritis in humanized mice. PLoS One. 2011; 6: e26630.

[2)]Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, et al: The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac(null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). Int Immunol. 2009; 21: 843-858.

[3)]Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, et al: Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/γcnull mouse. Int Immunol 2012; 24: 243-252.

ヒト免疫化 HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid, IL-2Rγnull マウスを用いた graft versus host disease モデルの検討

The analysis of graft versus host disease model using humanized HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid, IL-2Rγnull mouse

都築　広[1)]、長澤洋介[1)]、長塚靖子[1)]、岩田光浩[1)]、北村　登[1)]、武井正美[1)]
Hiroshi TSUZUKI[1)], Yosuke NAGASAWA[1)], Yasuko NAGATSUKA[1)], Mitsuhiro IWATA[1)], Noboru KITAMURA[1)], Masami TAKEI[1)]

[1)]日本大学医学部 内科学系血液・膠原病内科学分野

[要旨]

重症免疫不全マウス(HLA-DR4 transgenic NOD/SCID/IL-2Rγnull マウス(以下 HLA-DR4 Tg マウス)に HLA-DR4 陽性のヒト造血幹細胞を移植してヒト免疫化したマウスモデルでは液性免疫系が機能していることが報告された。このマウスを用いて特に移植片対宿主病 graft versus host disease(以下 GVHD)生じる生体反応を検討した。ヒト免疫化 HLA-DR4 Tg マウスでは体重減少や脱毛、円背などの全身状態不良の所見を認めなかったが、病理組織学的に皮膚真皮の肥厚が目立つ傾向にあった。臨床では皮膚硬化性病変が慢性 GVHD の診断的特徴とされており、今回の所見は慢性 GVHD の一症状を捕らえている可能性がある。今後皮膚以外の組織の検討や自己抗体測定の解析が必要と思われた。

[背景]

近年、ヒト免疫系の研究ツールとしてヒト免疫化マウスの重要性が高まっている。特に実験動物中央研究所で 2002 年に作製された重症免疫不全マウスモデル NOD/ SCID/ IL-2Rγ null マウス(以下 NOG マウス)は、従来の免疫不全マウスと比較してヒト造血幹細胞移植時の生着が良好であり、ウイルス感染やアレルギー・自己免疫疾患の研究に役立ってきた、[1)] しかし、ヒト免疫化 NOG マウスには液性免疫系の機能が不十分であるという欠点がある。[2)] 重症免疫不全マウス(HLA-DR4 Tg マウス)に HLA-DR4 陽性のヒト造血幹細胞を移植してヒト免疫化したマウスモデルでは液性免疫系が機能していることが報告され、ヒト免疫化 NOG マウスの欠点を補う新たなヒト免疫化マウスとして期待されている。[3)]

[目的]

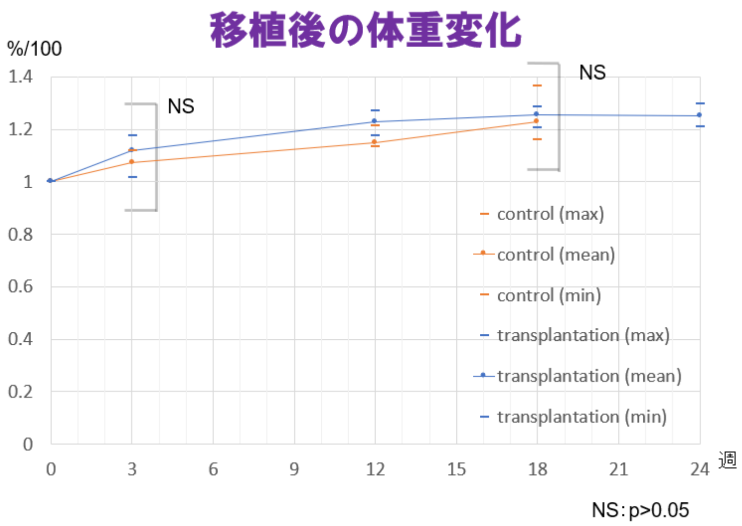
ヒト免疫化 HLA-DR4 Tg マウスについて、造血幹細胞移植に関連する有害事象、特に移植片対宿主病 graft versus host disease(以下 GVHD)についてはまだ解明されておらず、今回の研究ではヒト免疫化 HLA-DR4 Tg マウスに生じる生体反応を検討した。

[方法]

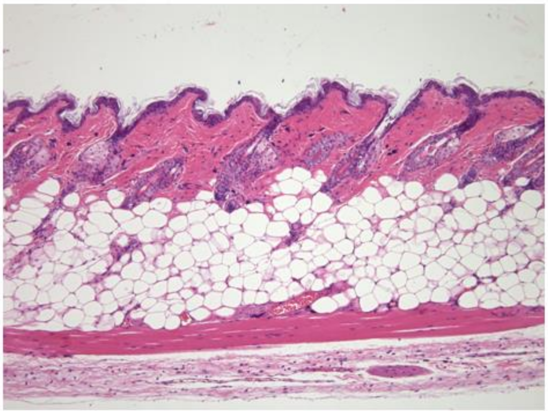
HLA-DR4 陽性凍結臍帯血を融解し、磁気細胞分離により CD34 陽性細胞を抽出した。生後 8 週の HLA-DR4 Tg マウスに尾静脈から投与した(1 頭あたり $2\sim3\times10^5$ cells)。移植後、マウスの体重や全身状態を観察し、移植 26 週後に解剖した。各臓器(皮膚、脾臓、肺など)の組織標本を作製し、移植 MHC マウス 8 匹、非移植 MHC マウス 7 匹で比較・検討した。

[結果]

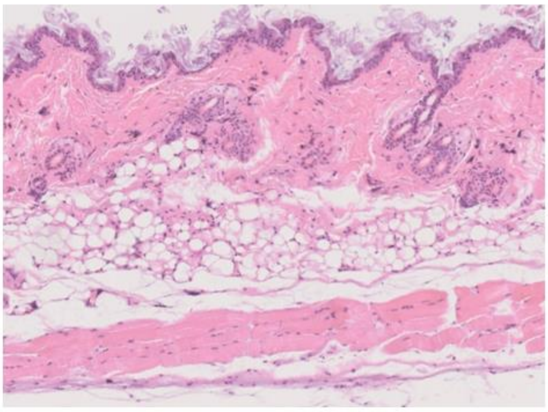
現状の報告ではあるが、ヒト免疫化 HLA-DR4 Tg マウスでは体重減少や脱毛、円背などの全身状態不良の所見を認めなかった。



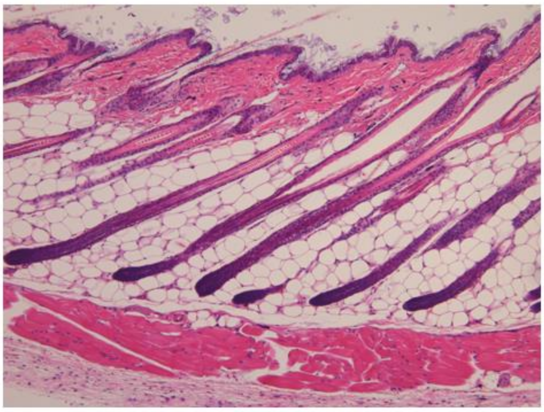
組織所見ではヒト免疫化 HLA-DR4 Tg マウスで皮膚真皮の肥厚が目立つ傾向にあった。



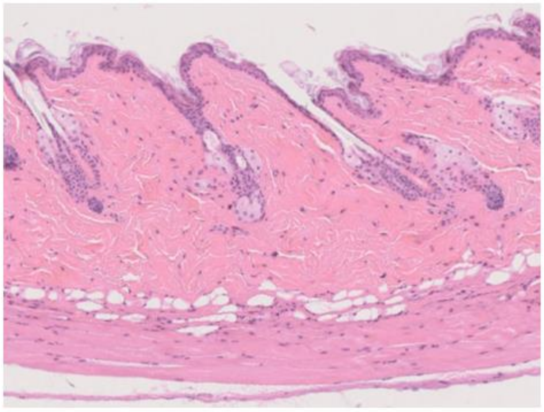
非移植マウス
（HE染色、×100倍）



移植マウス
（HE染色、×130倍）



非移植マウス
（HE染色、×100倍）



移植マウス
（HE染色、×130倍）

[考察]

ヒト免疫化 HLA-DR4 Tg マウスでは体重減少や全身状態不良などの有害事象は見られなかったが、病理組織学的には皮膚真皮の肥厚が見られた。臨床では皮膚硬化性病変が慢性 GVHD の診断的特徴とされており、ヒト免疫化 MHC マウスに見られた皮膚病変は慢性 GVHD 所見を示していることが示唆される。ヒトの慢性 GVHD を証明したモデルマウスはまだ存在しないが、ヒト免疫化 HLA-DR4 Tg マウスがヒトの GVHD 反応を引き起こしていることが証明されれば慢性 GVHD の病態の解明につながる可能性がある。また、慢性 GVHD の線維化に関与すると言われているヒト抗 derived growth factor receptor(PDGFRα)抗体が証明されれば、このマウスの系がヒトの慢性 GVHD を表現していることが証明されると思われる。今後はこのモデルマウスについて皮膚以

外の臓器の組織所見や抗 PDGFRα 抗体を含めた自己抗体を解析する必要があると思われた。

[結論]

HLA-DR4 Tg マウスでの GVHD 反応を検討し、病理組織学的に皮膚真皮の肥厚がみられた。皮膚硬化性病変が慢性 GVHD の診断的特徴とされており、今後皮膚以外の組織の検討や GVHD に関与するといわれる抗 derived growth factor receptor(PDGFRα)抗体の解析が必要と思われた。

[参考文献]

[1]Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, et al: NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood. 2002; 10o: 3175-3182.

[2]Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, et al: The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac(null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). Int Immunol. 2009; 21: 843-858.

[3]Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, et al: Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/γcnull mouse. Int Immunol 2012; 24: 243-252.

骨びらんを引き起こす破骨細胞の異常分化・活性化への Epstein-Barr ウイルスの関与; EBV による破骨細胞の分化・活性化に必須となる receptor activator nuclear factor-κB ligand(RANKL)発現誘導

The Effect of Epstein-Barr Virus on Aberrant Osteoclastogenesis Causing Bone Erosion: induction of Receptor Activator Nuclear Factor-κB Ligand (RANKL) Essential for Osteoclastogenesis by Epstein-Barr Virus

岩田光浩 [1), 2)]、長澤洋介 [1)]、北村 登 [1)]、野崎高正 [1)]、都築 広 [1)]、長塚靖子 [1)]、水野瑛子 [1)]、渡邉美遥 [1)]、今留謙一 [3)]、藤原成悦 [1), 4)]、武井正美 [1)]

Mitsuhiro IWATA[1), 2)], Yosuke NAGASAWA[1)], Noboru KITAMURA[1)], Takamasa NOZAKI[1)], Hiroshi TSUZUKI[1)], Yasuko NAGATSUKA[1)], Eiko ISHIZUKA-MIZUNO[1)], Miharu WATANABE[1)], Ken-ichi IMADOME[3)], Shigeyoshi FUJIWARA[1), 4)], Masami TAKEI[1)]

[1)]日本大学医学部 内科学系血液膠原病内科学分野、[2)]日本大学医学部 免疫アレルギー学プロジェクトチーム、[3)]国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部

[要旨]

ヒト化 nonobese diabetic/Shi-scid/γc^{null} (NOG)マウスで Epstein-Barr ウイルス(EBV)感染により関節リウマチ(RA)類似びらん性関節炎が発症する。本マウスで骨びらん形成の主役と考えられるヒト破骨細胞の異常分化・活性化の機序を解明するため、破骨細胞の分化・活性化に必須となるヒト receptor activator nuclear factor-κB ligand(RANKL)発現誘導への EBV の関与について検討した。過去の報告に準じてヒト化マウスを作製し、EBV(B95-8 産生、Akata 株産生)を感染させた。感染後 8–10 週でマウス末梢血を採取し、RANKL 発現と発現細胞の解析を flow cytometry により行った。また、EBV 未感染の臍帯血ならびに B-cell line Ramos 細胞を EBV 含有培養液で培養し、マウス末梢血と同様手法により RANKL 発現を解析した。EBV 感染の有無は real-time PCR 法により EBV DNA 定量で行った。結果は、EBV 感染ヒト化 NOG マウスの末梢血にヒト RANKL 発現を認め、発現細胞は EBV の第一標的である B 細胞であった。EBV 未感染マウス末梢血には RANKL 陽性細胞は認められなかった。EBV は臍帯血 B 細胞および Ramos 細胞に in vitro で感染し、RANKL 発現を誘導した。両細胞からは高レベルの EBV DNA が検出され、EBV 感染が確認された。以上の結果から、EBV は、感染により B 細胞に破骨細胞の分化・活性化に必須な RANKL の発現を誘導し、関節に骨びらんを伴う関節炎を引き起こすことが示唆された。

[背景]

Epstein-Barr ウイルス(EBV)の関節リウマチ(RA)への関与は、1970 年後半から始まった多くの研究報告から強く示唆されている。我々の研究グループでも、これまでに EBV と RA に関し多くの研究報告を行ってきた。[1] EBV はヒト以外では新世界ザルにしか感染しないため、長らく動物を使用した実験で検討を行うことが困難であった。近年、重度免疫不全(SCID)マウスを用い免疫系をヒト化したマウスが開発され、[2] EBV 感染実験が本マウスで可能となった [3), 4)]。我々は nonobese diabetic/Shi-scid/γc^{null} (NOG)マウスにヒト臍帯血由来 CD34^{+}の造血幹細胞を移植し、免疫系をヒト化したヒト化 NOG マウスに EBV を感染させ、RA 類似の骨びらんを伴う関節炎を発症する実験動物モデルを作製し、2011 年に報告した [5)]。さらに、本マウスで観察される骨びらんの形成は、ヒト破骨細胞が主役である可能性が高いこと、そして、マウス骨髄に生着したヒト造血幹細胞から分化したヒト破骨細胞前駆細胞が、骨吸収能を持つ成熟ヒト破骨細胞へと分化することを明らかにした [6)]。正常個体では、骨を作る骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞とが相互作用しながら骨代謝のバランスをとっている。しかし、何らかの原因で破骨細胞の分化・活性化が異常に亢進しバランスが崩れると、過剰な骨吸収により骨びらんや骨損失を生じるようになるとされる [7)]。これまでの我々の研究結果と考え合わせると、EBV 感染が破骨細胞の異常分化・活性化を引き起こし、骨びらんを形成する可能性が示唆された。

[目的]

骨びらんを引き起こす破骨細胞異常分化・活性化への EBV の関与について検討する目的で、本研究では破骨細胞の分化・活性化に必須となる receptor activator nuclear factor-κB (RANK) signal を誘導する RANK ligand (RANKL, CD254)[7)] 発現への EBV の関与について検討する。

[方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会に研究倫理および臨床研究審査研究申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(日本大学医学部倫理委員会承認番号: 211-3、日本大学医学部付属板橋病院臨床研究審査委員会承認番号: RK-140613-11)。

(2) NOG マウスの免疫系ヒト化と EBV 感染

既報 [6)] に準じて行った。簡潔に以下に記す。７週齢 NOG マウスにヒト CD34^{+}造血幹細胞を移植し約３か月経過後、ヒト免疫系細胞の構築が十分であることを、flow cytometry(FCM)でマウス末梢血単核球のヒト CD45、CD3 および CD19 各マーカー

陽性細胞率を調べ評価した。EBV は、B-95-8 EBV 産生株(JCRB9123, Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka)あるいは Akata 産生株から産生された EBV を精製し、1.0–2.0 × 10^1 TD_{50}/100 μL でマウス尾静脈から投与した。
(日本大学動物実験委員会承認番号：AP18MED010、AP18ME009-3)
(日本大学医学部遺伝子組換え実験安全委員会承認番号：2016 医、2018 医 7)

(3) 臍帯血単核球と B-cell line の EBV 感染
臍帯血提供者の両親から同意を得、日大医学部産婦人科学教室の協力のもとに取得した臍帯血から単核球を分離した。臍帯血単核球および Ramos (EBV-negative B-cell lymphoma cell line, ATCC) 細胞を EBV (Akata 株産生あるいは B95-8 細胞産生: 5.0×10^1–2.0×10^3 TD_{50}) 含有培養液(10–20% FBS 加 RPMI1640)で 5% CO_2 下 37℃で感染培養した。

(4) RANKL 発現ならびに RANKL 発現細胞の解析
EBV 感染後 8-10 週(この時期に解剖し関節組織を検討するとほとんどの感染マウスでびらん性関節炎が確認されることを過去に報告)のマウス末梢血を採取し、溶血操作後に得られた白血球を抗ヒト RANKL モノクローナル抗体ほか各種リンパ球マーカーに対するモノクローナル抗体で染色し、multicolor FCM で解析した。同時に、同週齢未感染ヒト化 NOG マウスの末梢血も採取し同様解析を行った。EBV 含有培養液で培養開始した臍帯血単核球および Ramos 細胞は、経時的に RANKL 発現の推移を FCM で解析した。

(5) EBV DNA 定量
EBV 感染培養臍帯血単核球および Ramos 細胞から DNA を抽出し、EBV ウイルス DNA を real-time PCR で測定した。

[結果]

B95-8 EBV、Akata EBV で各 4 頭ずつ感染させたヒト化 NOG マウスの末梢血を FCM で解析した結果、どちらの EBV 感染でもすべての感染マウスでヒト RANKL 陽性細胞が認められ、RANKL 発現細胞は、B-cell marker である CD19、CD20 陽性細胞がほとんどであった。EBV 未感染マウス末梢血では、ヒト RANKL 陽性細胞は認められなかった。次に、B 細胞は EBV の第一標的であり、EBV による感染で B 細胞に RANKL 発現が誘導される可能性を考え、EBV 未感染新鮮臍帯血から単核球を分離し B95-8 EBV 含有培養液で培養し、FCM で RANKL 発現を経時的に調べた。その結果、EBV 感染後 2 週前後で RANKL 陽性細胞が出現しはじめ、４週目では大半の細胞が RANKL 陽性 B 細胞となった。培養を続け感染後８週目でも RANKL 陽性 B 細胞は認

められた。異なる donor から得られた臍帯血単核球を、B95-8 EBV あるいは Akata EBV で感染させ同様に調べてみたが、結果は類似していた。感染 8 週後の両 donor の感染細胞からは、高レベルの EBV DNA が real time PCR で検出された。続いて、pure な B 細胞培養系で EBV 感染 RANKL 発現誘導を確認するため、EBV-negative B-cell lymphoma cell line Ramos を用いて検討した。EBV 未感染 Ramos 細胞では RANKL 発現はほとんど認められなかったが、B95-8 EBV 感染後 2 週前後で臍帯血同様に RANKL 陽性細胞が出現し始め、3-4 週で RANKL 陽性 Ramos 細胞が 30%を超えた。同細胞からは、高レベルの EBV DNA が real time-PCR で検出された。

[考察]

本研究で、骨びらんの主役である破骨細胞の分化・活性化に必須となる RANKL 発現への EBV の関与について検討した結果、RA 類似骨びらんを伴う関節炎が発症する EBV 感染ヒト化 NOG マウスの末梢血にヒト RANKL 発現が認められ、発現細胞のほとんどが EBV の第一標的である B 細胞であること、骨びらんを発症しない EBV 未感染マウス末梢血ではヒト RANKL 発現は認められないこと、さらに、in vitro で EBV に感染させた臍帯血 B 細胞ならびに B-cell line Ramos 細胞に RANKL 発現が誘導されることを明らかにした。その後の実験で、破骨細胞分化・活性化に必要な RANKL 以外の因子の発現も EBV が誘導すること、EBV 感染臍帯血 B 細胞が実際に破骨細胞を分化誘導するポテンシャルを有することを示唆する結果を得ており、現在検討を進めている。以上から、EBV は、破骨細胞の異常分化・活性化を引き起こし関節に骨びらんを形成することが強く示唆された。

[結論]

EBV は、感染により B 細胞に破骨細胞の分化・活性化に必須な signal 誘導分子の発現を誘導し、関節に骨びらんを伴う関節炎を引き起こすことが示唆された。

[参考文献]

[1)] Takei M, Mitamura K, Fujiwara S, et al: Detection of Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1 and latent membrane protein 1 in synovial lining cells from rheumatoid arthritis patients. Int Immunol. 1997; 9: 739-743.

[2)] Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood. 2002; 100: 3175-3182.

[3)] Fujiwara S, Matsuda G, Imadome K. Humanized mouse models of Epstein-Barr virus infection and associated diseases. Pathogens. 2013; 2: 153-176.

[4]Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, et al. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. J infect Dis. 2008; 198: 673-682.
[5]Kuwana Y, Takei M, Yajima M, et al: Epstain-Barr virus induces erosive arthritis in humanized mice. PLos One. 2011; 6: e26630.
[6]Nagasawa Y, Ikumi N, Nozaki T, et al: Human osteoclasts are mobilized in erosive arthritis of Epstain-Barr virus-infected humanizes NOD/Shi-Scid/IL-2Rγ^{null} mice. American College of Rheumatology. 2014; 66 (Suppl 1020).
[7]Leibbrandt A, Penninger J.M. RANK/RANKL: Regulator of immune responses and bone physiology. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008; 1143: 123-150.

ダサチニブは NK 細胞において JAK-STAT 経路を活性化し パーフォリン発現を増強させる

Enhanced perforin expression associated with dasatinib therapy in natural killer cells

入山規良[1)]、高橋宏通[1), 2)]、三浦勝浩[1)]、内野慶人[1)]、中川　優[1)]、濱田高志[1)]、八田善弘[1)]、武井正美[1)]

Noriyoshi IRIYAMA[1)], Hiromichi TAKAHASHI[1), 2)], Katsuhiro MIURA[1)], Masaru NAKAGAWA[1)], Takashi HAMADA[1)], Yoshihiro HATTA[1)], Masami TAKEI[1)]

[1)]日本大学医学部 内科学系血液・膠原病内科学分野、[2)]日本大学医学部 病態病理学系臨床検査医学分野

[要旨]

チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)のひとつであるダサチニブは NK 細胞を活性化することが知られている。本研究では TKI 治療中の慢性骨髄性白血病患者の末梢血検体を解析し、ダサチニブが NK 細胞の JAK-STAT 系を活性化し、パーフォリン発現を増強させることを明らかにした。

[背景]

慢性骨髄性白血病(chronic myeloid leukemia; CML)はチロシンキナーゼ阻害薬(tyrosine kinase inhibitor; TKI)であるイマチニブの臨床応用により予後が劇的に改善した疾患である。[1)] さらに現在では治療抵抗性および不耐容患者に対して、第二世代 TKI であるダサチニブ、ニロチニブ、ボスチニブおよび第三世代 TKI であるポナチニブが利用可能となっている。[2)]

これらの TKI のうち、ダサチニブは natural killer(NK)細胞を増加させ、かつ抗腫瘍活性を増強することが知られている。[3)] 増加した NK 細胞は大顆粒リンパ球の形態を呈し、*in vitro* での CML 細胞に対する抗腫瘍活性が高いことも知られている。[3, 4)] さらに、NK 細胞の増加を認めた症例は治療反応性が良好であることや、TKI 中断後の無治療寛解率が高いことも示されている。[3)-6)] しかしながら、ダサチニブが腫瘍免疫を増加させるメカニズムはいまだ不明のままである。

[目的]

TKI 治療中の CML 患者において、NK 細胞の細胞障害性分子であるパーフォリンの発現、関連する細胞内シグナル活性、およびサイトカイン分析をおこなうことにより、ダサチニブが NK 細胞を活性化する機序を明らかにする。

[対象および方法]

(1) 倫理的考慮

本臨床研究実施にあたっては、日本大学医学部附属板橋病院の臨床研究審査委員会に申請をおこない、当委員会の承認を得ている(RK-150609-15)。登録患者にはインフォームドコンセントを実施し、文書による同意を得た。

(2) 対象

40 例の TKI 治療中 CML 患者が登録された。23 例はダサチニブ、11 例はイマチニブ、6 例はニロチニブ治療中の患者であった。活動性のある悪性腫瘍、感染症もしくは重大な臓器障害を有する患者は登録不可であった。原疾患による免疫系への影響を除外するため、細胞遺伝学的寛解以上の治療反応を得ている患者を選択し、また 3 か月以上の TKI 治療を受けていることを登録の適格条件とした。末梢血検体は TKI 内服直前に採取された。

(3) 細胞内シグナルおよびパーフォリン解析

NK 細胞内のリン酸化シグナル解析は phospho-flow 法を用いておこなった。採取した末梢血検体から、Lymphoprep^{TM} を用いた遠心分離により単核球を精製した。末梢血単核球を 1.5%パラホルムアルデヒドで固定し、90%メタノールで透過処理をおこない、分析まで-20℃で保存した。細胞表面を CD3 および CD56 で染色し、CD3-CD56+分画を NK 細胞と定義した。同時に細胞内染色をおこない、pJAK1、pJAK2、pSTAT1、pSTAT3、pERK、pJNK、pAKT、pp38 およびパーフォリンの発現強度を測定した。これらの発現強度は median fluorescence intensity (MFI)で評価した。解析例を図 1 に示す。

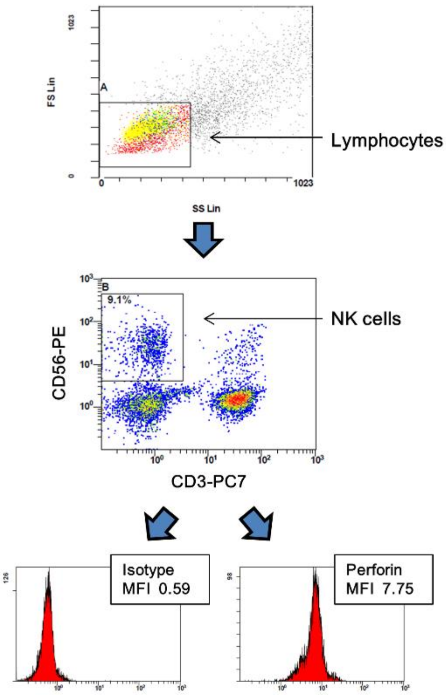


図 1

(4) 血漿サイトカイン分析

血漿成分は上記同様に TKI 内服直前に実施した採血検体を遠心分離し、分析まで-80℃で凍結保存した。血漿 IFN-γ および IL-2 濃度を ELISA 法で測定した。

(5) 統計解析

統計学的解析は、群間比較は Mann-Whitney U test を用い、連続変数の相関については Pearson’s correlation coefficient を用いた。$P < 0.05$ を統計学的有意とみなした。統計解析ソフトは JMP v.11.0.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いた。

[結果]

(1) 患者背景

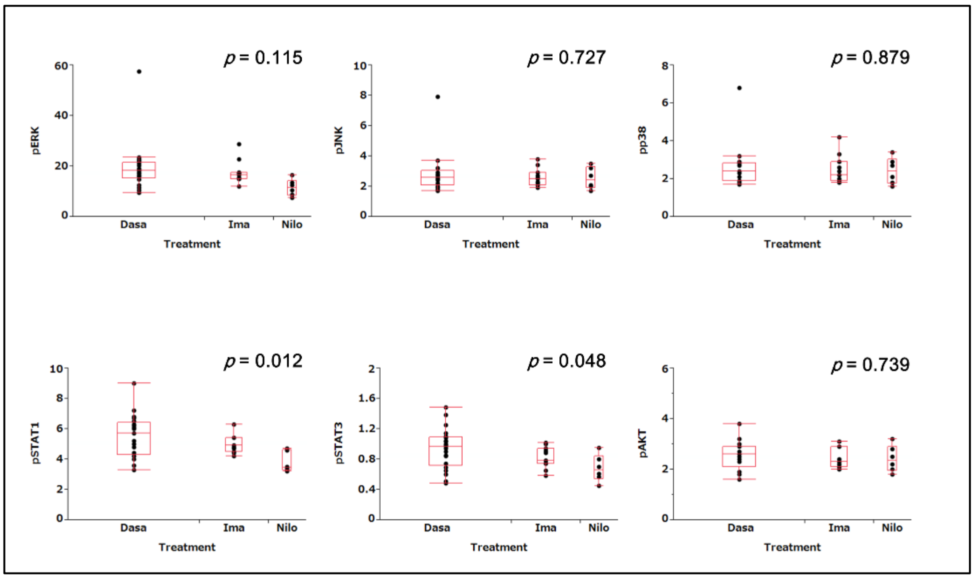
40 例の登録の患者のうち、ダサチニブ投与群の 23 例は年齢中央値 47 歳(範囲 25-85 歳)、他の TKI 投与群は年齢中央値 54 歳(範囲 38-84 歳)であった($P = 0.538$)。性別は男性がそれぞれの群で 13 例、10 例であった($P = 1.000$)。深い寛解を得られている患者はそれぞれの群で 10 例、11 例であり、分子学的大寛解未到達例はそれぞれ 3 例、1 例であった($P = 0.466$)。

(2) NK 細胞のリン酸化シグナル強度

TKI 内服前の NK 細胞のリン酸化シグナル強度を図２に示す。ダサチニブ投与群の

NK 細胞は、他の TKI 投与群と比較して pSTAT1 および pSTAT3 の強度が高い結果であった。他の pERK、pJNK、pp38 および pAKT の強度は差を認めなかった。

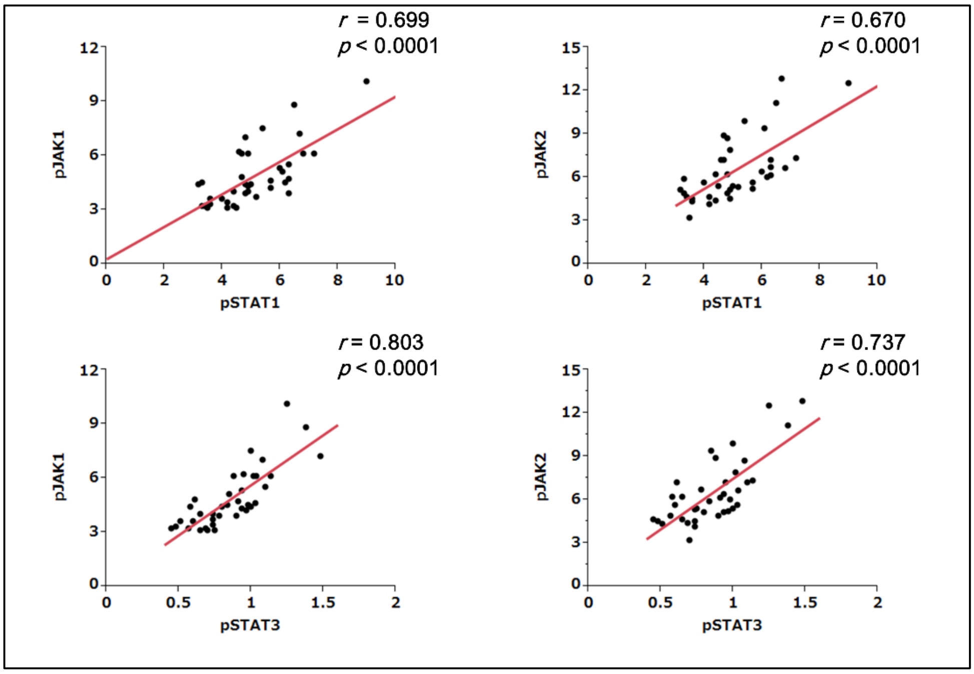
図 2



(3) NK 細胞の JAK-STAT 経路の活性化

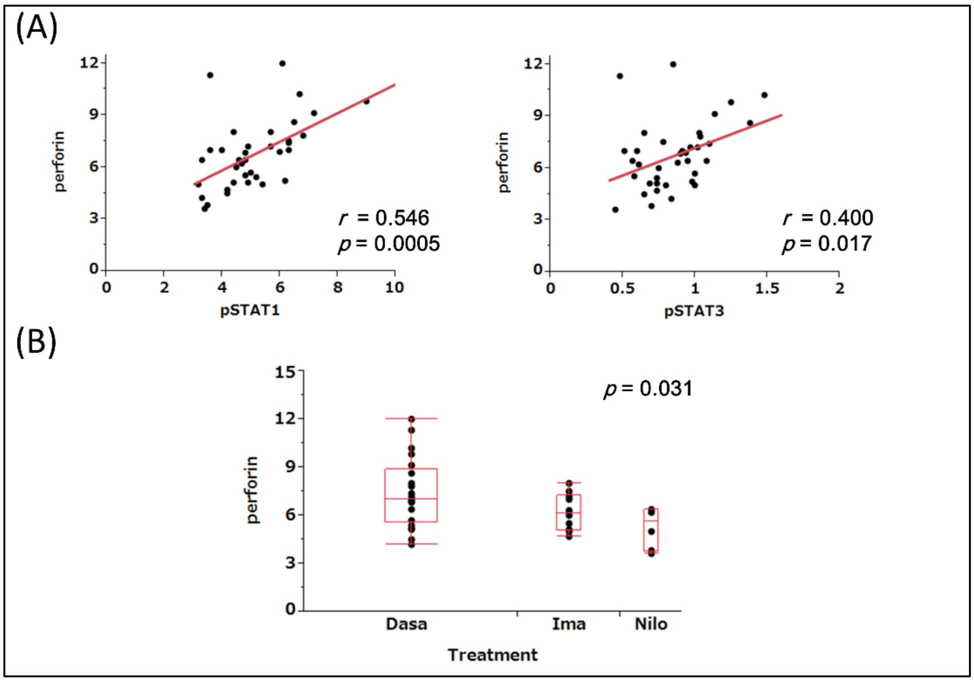
次に、NK 細胞における STAT と JAK の強度の関連について調査した。図 3 に示すように、pSTAT1 および pSTAT3 は pJAK1 および pJAK2 と有意に正の相関を示した。

図 3



また、図 4 に示すように、TKI 治療中の NK 細胞におけるパーフォリン発現強度は pSTAT1 および pSTAT3 と有意に相関していた(A)。さらに、パーフォリン発現強度はダサチニブ投与群が他の TKI 投与群よりも有意に高い結果であった(B)。

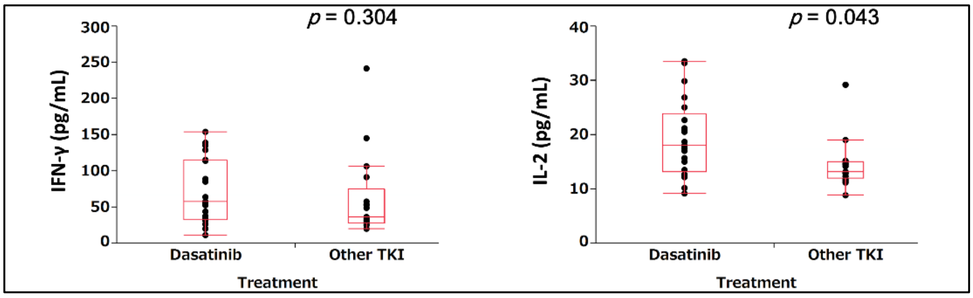
図 4



(4) 血漿サイトカイン濃度

さらに我々はこれらの TKI 治療中の患者血漿中のサイトカイン濃度を測定した。結果を図５に示す。ダサチニブ投与群と他の TKI 投与群の血漿 IFN-γ 濃度は差を認めなかったが、IL-2 濃度はダサチニブ投与群で他の TKI 投与群よりも有意に高値を示す結果であった。

図 5



[考察]

我々は本研究において、TKI 治療中の CML 患者検体を分析することによって、ダサチニブが抗腫瘍活性を増強させる機序を明らかにしようと試みた。ダサチニブ治療中の NK 細胞数の増加や大顆粒リンパ球の出現は、CML の治療アウトカムを改善することはすでに知られているが、[3)-6)] 本研究ではダサチニブ治療中の患者における NK 細胞は JAK-STAT 系、特に Th1 経路である JAK1、JAK2、STAT1 および STAT3 が活性化しており、パーフォリン発現強度が他の TKI で治療されている患者に比較して有意に高かった。我々は結論として、NK 細胞におけるパーフォリンの発現増強が、ダサチニブが抗腫瘍活性を増強する機序であると結論付けた。過去にはダサチニブ治療中の患者は免疫動態が Th1 優位に傾くことが報告されているが、[7)] ダサチニブは Th1 サイトカインに対して IFN-γ の抑制を伴わずの IL-2 発現増強をきたし、結果として他の TKI に比べて NK 細胞の JAK-STAT 経路を活性化しているものと考えられた。

また、実臨床の上で重要なことは、これらの JAK-STAT 系の活性化やパーフォリンの発現増強が治療効果に直接的な影響を与えるかどうかである。今回は検討された症例数が少なく、検体採取の時期も一定していないため、治療効果との関連を明らかにすることはできなかった。今後、症例を蓄積していくことにより、それらの関連を明確にすることができる可能性があると考える。

さらに、新規に承認された CML 治療薬であるボスチニブやポナチニブといった TKI においては、免疫動態への影響が明らかにはされておらず、これらの TKI についても免疫系への影響を検討する余地はあるものと考えられる。

[結論]

本研究はダサチニブが免疫系に与える影響を示し、 抗腫瘍活性を誘導するメカニズムを明らかにした。

［参考文献］

[1)]Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, Baccarani M, Deininger MW, Cervantes F, Fujihara S, Ortmann CE, Menssen HD, Kantarjian H, O'Brien SG, Druker BJ: Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2017; 376(10): 917-927.

[2)]Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Deininger MW, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Janssen JJWM, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Mayer J, Nicolini F, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rea D, Richter J, Rosti G, Rousselot P, Saglio G, Saußele S, Soverini S, Steegmann JL, Turkina A, Zaritskey A, Hehlmann R: European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2020; 34(4): 966-984.

[3)]Mustjoki S, Ekblom M, Arstila TP, Dybedal I, Epling-Burnette PK, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Höglund M, Kovanen P, Laurinolli T, Liesveld J, Paquette R, Pinilla-Ibarz J, Rauhala A, Shah N, Simonsson B, Sinisalo M, Steegmann JL, Stenke L, Porkka K: Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. Leukemia. 2009; 23(8): 1398-1405.
[4)]Kim DH, Kamel-Reid S, Chang H, Sutherland R, Jung CW, Kim HJ, Lee JJ, Lipton JH: Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia. Haematologica. 2009; 94(1): 135-139.
[5)]Rea D, Henry G, Khaznadar Z, Etienne G, Guilhot F, Nicolini F, Guilhot J, Rousselot P, Huguet F, Legros L, Gardembas M, Dubruille V, Guerci-Bresler A, Charbonnier A, Maloisel F, Ianotto JC, Villemagne B, Mahon FX, Moins-Teisserenc H, Dulphy N, Toubert A: Natural killer-cell counts are associated with molecular relapse-free survival after imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia: the IMMUNOSTIM study. Haematologica. 2017; 102(8): 1368-1377.
[6)]Imagawa J, Tanaka H, Okada M, Nakamae H, Hino M, Murai K, Ishida Y, Kumagai T, Sato S, Ohashi K, Sakamaki H, Wakita H, Uoshima N, Nakagawa Y, Minami Y, Ogasawara M, Takeoka T, Akasaka H, Utsumi T, Uike N, Sato T, Ando S, Usuki K, Morita S, Sakamoto J, Kimura S: Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial. Lancet Haematol. 2015; 2(12): e528-e535.
[7)]Kreutzman A, Ilander M, Porkka K, Vakkila J, Mustjoki S: Dasatinib promotes Th1-type responses in granzyme B expressing T-cells. Oncoimmunology. 2014; 3: e28925.

当院で治療を行った血管内B細胞性リンパ腫17例における臨床的、病理学的特徴

Relationship between MYC protein expression and disease progression with intravascular B cell lymphomas

高橋宏通[1),2)]、三浦勝浩[1)]、西巻はるな[3)]、濱田高志[1)]、中川　優[1)]、飯塚和秀[1),2)]、内野慶人[1)]、入山規良[1)]、八田善弘[1)]、中山智祥[2)]、増田しのぶ[3)]、武井正美[1)]

Hiromichi TAKAHASHI[1),2)], Katsuhiro MIURA[1)], Haruna NISHIMAKI[3)], Takashi HAMADA[1)], Masaru NAKAGAWA[1)], Kazuhiro IIZUKA[1),2)], Yoshihito UCHINO[1)], Noriyoshi IRIYAMA[1)], Yoshihiro HATTA[1)], Tomohiro NAKAYAMA[2)], Shinobu MASUDA[3)], Masami TAKEI[1)]

[1)]日本大学医学部附属板橋病院　血液膠原病内科、[2)]日本大学医学部　病態病理学系臨床検査医学分野、[3)]日本大学医学部　病態病理学系腫瘍病理学分野

[要旨]

当院で治療を行った17例の血管内B細胞リンパ腫(IVL)患者を対象として、患者背景、予後、病理学的特徴を評価した。予後は3年の無病生存率(PFS)51%、3年の全生存率(OS)74%であり平均的なDLBCLと比較し予後不良の傾向があった。特徴的であったのが、増殖因子であるMYCタンパク陽性率は82%の症例で陽性となり、BCL2陽性も71%であり、予後不良なDouble-Expressor Lymphomaも53%に該当するものも53%を占めていた。結果としてIVL症例の多くで腫瘍細胞中のMYCタンパクが高発現していることを証明した。IVLは予後不良といわれているが、その原因としてMYCタンパクの増加が寄与している可能性がある。

[背景と目的]

血管内B細胞リンパ腫(intravascular B cell lymphoma: IVL)はリンパ節腫大を伴わず、主に血管内、その周囲に腫瘍性病変が限局するびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)の亜種である。[1)] また日本人においては高率に血球貪食症候群を合併し、非常に強い全身症状を伴うと言われているが、病理学的特徴の詳細はわかっていない。近年DLBCLにおいて、myc遺伝子の再構成やMYCタンパクの発現亢進が予後不良因子となる報告があり、[2)] 臨床的にも応用されてきているがIVLにおけるmyc遺伝子再構成やMYCタンパクの発現に対する報告はほとんどない。そのため当院における

IVL 患者の臨床的特徴と予後を評価し、その病理検体を用い、MYC タンパクの発現率と myc 遺伝子の再構成の有無を評価する。

表1　患者背景

		n = 17	(%)
年齢 (median)		66 (43-81)	
性別 (M/F)		7/10	
浸潤臓器			
	骨髄	13	(76)
	脾臓	8	(47)
	皮膚	5	(29)
	CNS	2	(12)
	肝臓	2	(12)
	肺	1	(6)
血球貪食像			
	あり	6	(55)
フェリチン			
	≧500	10	(67)
HLH2004			
	あり	10	(63)
治療			
	R-CHOP	10	(59)
	R-intensified-Chemo	7	(41)

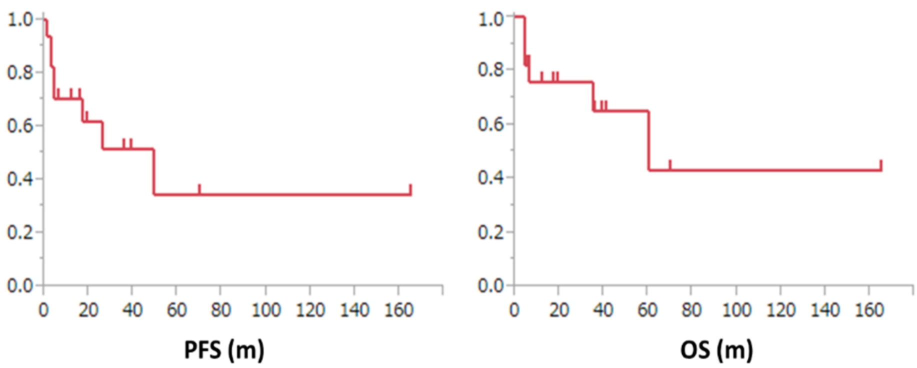
[方法]

IVL の定義として、①明らかなリンパ節の腫大を伴わず、節外性に明らかな腫瘤形成を認めない。②腫瘍細胞は実質臓器や皮下組織の血管内とその周囲に限局する、もしくは骨髄内に限局する。③腫瘍細胞は病理学的に成熟 B 細胞である、上記①～③をすべて満たすものとする。症例はすべてリツキシマブを含めた多剤併用化学療法を施行していた。臨床経過は生存の有無、再発の有無、中枢神経浸潤の有無を評価した。病理学的には CD10、BCL6、MUM1 から Cell of Origin (COO)を評価し、MYC、BCL2 から Double-Expressor Lymphoma (DEL)を評価した。また、一部の症例で c-myc の bleak apart を FISH 法で解析し、myc 再構成の有無を評価した。

[結果]

当院 IVL 患者 17 例を解析したところ、年齢中央値は 66 歳であり、骨髄浸潤が 76%で最多であり、続いて脾臓、皮膚浸潤が多かった。血球貪食症候群に関しては、骨髄で血球貪食像が認められたのが 55%であり、HLH2004 クライテリアを満たすものを含めると 63%であった(表 1)。予後は 3 年の無病生存率(PFS)51%、3 年の全生存率

図1 IVL17例の治療予後



左が無病生存率（PFS）、右が生存率を(OS)をそれぞれ月ごとに、カプランマイヤー法を用いて算出した。中央観察期間は16ヶ月であり3年PFSおよびOSはそれぞれ51%, 74%であった。

(OS)74%であり平均的なDLBCLと比較し予後不良の傾向があり、中枢神経浸潤を29%と高度に認めた(図1)。病理学的特徴としてCOOではすべてがnon GCB typeであり、CD5は27%に陽性で、EBERはすべて陰性であった。MYC陽性率は82%の症例で≧40%の陽性率であり、BCL2陽性も71%であり、DEL に該当するものが53%を占めていた(表2)。FISH法によるc-mycのbreak apartはいくつかの症例で認められていた(図2)。

表2 17例の病理学的特徴

No.	sex	age	COO	CD10	BCL6	MUM1	BCL2	CD5	EBER	MYC-IHC(%)	MYC ≧40	DEL	CNS invasion	Outcome
1	M	70	non GCB	-	-	-	+	-	-	10	-	-	-	A
2	M	50	non GCB	-	-	+	+	-	-	30	-	-	-	A
3	M	74	non GCB	-	-	+	+	+	-	30	-	-	-	A
4	M	66	non GCB	-	-	+	+	-	-	40	+	+	+	D
5	F	69	non GCB	-	-	+	-	+	-	50	+	-	+	D
6	F	79	non GCB	-	-	+	+	-	-	50	+	+	+	D
7	M	56	non GCB	-	-	+	+	+	-	50	+	+	-	A
8	F	43	GCB	-	+	-	-	+	-	60	+	-	-	A
9	F	57	non GCB	-	-	+	+	-	-	60	+	+	-	A
10	F	72	non GCB	-	+	+	-	-	-	60	+	-	-	A
11	F	64	non GCB	-	-	-	-	-	-	70	+	-	-	A
12	M	78	non GCB	-	-	+	+	-	-	70	+	+	-	A
13	M	58	non GCB	-	+	+	+	-	-	70	+	+	-	A
14	F	81	non GCB	-	-	+	+	-	-	70	+	+	-	D
15	F	56	non GCB	-	+	+	+	+	-	70	+	+	+	A
16	F	64	non GCB	-	-	+	-	+	-	80	+	-	-	D
17	F	70	non GCB	-	-	+	+	-	-	80	+	+	+	D
(%)				0	24	82	71	27	0		82	53	29	

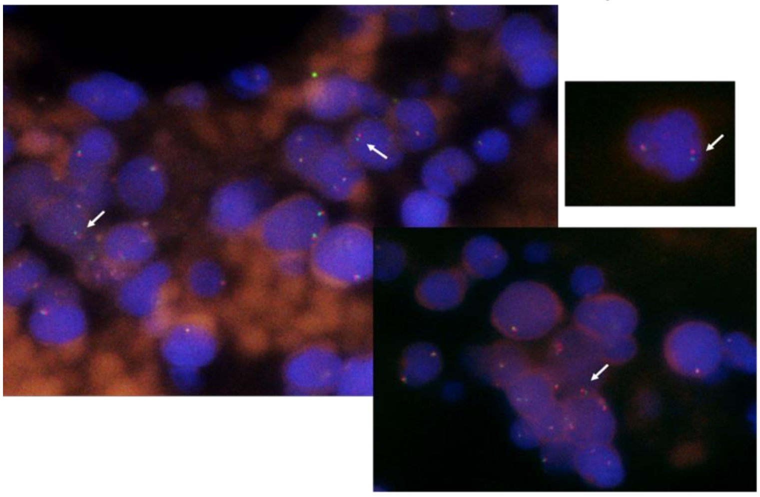
[考察]

IVLは予後不良といわれているが、その原因としてMYCタンパクの増加が寄与している可能性がある。本研究結果からIVLは予後不良であり、その大部分がMYCタンパク高発現であったことが確認された。またいくつかの症例でmyc遺伝子の再構成を示唆する結果が見られた。

最近の報告で、IVLにおけるMYCタンパク発現の増強、MYD88の発現について報告しているがmyc再構成は認めていない。[3)]

本研究のIVL症例においてMYCタンパクの発現と予後、中枢神経浸潤が互いに影響している可能性が示唆され、MYCタンパクの高発現が組織浸潤性や中枢神経浸潤率に影響を与えており、IVLの中枢神経浸潤率の高さにもMYCが関与しているかもし

図2 No.17におけるMYC-FISH break-apart



c-myc遺伝子領域前後に赤と緑の蛍光プローブをつけ、再構成があった際に分裂するようセッティングしてある。いくつかの症例で再構成を認めているものを図で示した。

れない。ただ、本研究結果からは直接的な因果関係は証明されていない。
IVL 症例のいくつかで myc 遺伝子の再構成を示唆する所見が得られた。しかし、完全な再構成を証明することは困難であった。そのため IVL における myc 再構成の詳細は不明であり、遺伝子レベルでどのように MYC タンパクの発現に関与しているかは今後の検討課題である。

[結語]

IVL 症例の多くで腫瘍細胞中の MYC タンパクが高発現していることを証明した。
IVL は予後不良といわれているが、その原因として MYC タンパクの増加が寄与している可能性がある。

[参考文献]

[1)]Shimada K, Kinoshita T, Naoe T, Nakamura S: Presentation and management of intravascular large B-cell lymphoma. Lancet Oncol. 2009; 10(9): 895-902.
[2)]Rosenthal A, Younes A: High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. Blood Rev. 2017; 31(2): 37-42.
[3)]Schrader AMR, Jansen PM, Willemze R, Vermeer MH, Cleton-Jansen AM, Somers SF, Veelken H, van Eijk R, Kraan W, Kersten MJ, van den Brand M, Stevens WBC, de Jong D, Abdul Hamid M, Tanis BC, Posthuma EFM, Nijland M, Diepstra A, Pals ST, Cleven AHG, Vermaat JSP: High prevalence of MYD88 and CD79B mutations in intravascular large B-cell lymphoma. Blood. 2018; 131(18): 2086-2089.

特徴的な染色体転座を有する ALL 細胞の変異遺伝子の解析
Analysis of acute lymphoblastic leukemia with a t(1; 4) translocation

内野慶人 [1)]、濱田高志 [1)]、髙橋宏通 [1), 2)]、入山規良 [1)]、八田善弘 [1)]、中山智祥 [2)]、武井正美 [1)]

Yoshihito UCHINO[1)], Takashi HAMADA[1)], Hiromichi TAKAHASHI[1), 2)], Noriyoshi IRIYAMA[1)], Yoshihiro HATTA[1)], Tomohiro NAKAYAMA[2)], Masami TAKEI[1)]

[1)]日本大学医学部 内科学系血液膠原病内科学分野、[2)]日本大学医学部 病態病理学系臨床検査医学分野

［要旨］

報告の無い染色体転座 t(1;4) (p34;q31)を伴った急性リンパ性白血病の細胞について解析を行い、発症に関与した可能性のあるキメラ遺伝子 ZNF362/MAML3 を同定した。このキメラ遺伝子が Notch シグナル系や Wnt シグナル系の活性化を来すことにより腫瘍につながった可能性が示唆された。

［背景］

急性リンパ性白血病は成人において予後不良な造血器悪性腫瘍の一つであり、化学療法単独での長期生存率は満足のいくものではない。[1)] 一方、急性前骨髄球性白血病や慢性骨髄性白血病など一部の白血病においては、腫瘍増殖に関わるシグナルをブロックする分子標的治療薬の登場により予後の大幅な改善が認められており、急性リンパ性白血病においても腫瘍化のメカニズムのより詳細な解明が待たれる。
今回我々は、これまで報告の無い染色体転座を伴った急性リンパ性白血病を経験し、発症機序の解明を行った。

［症例］

50 代男性。20XX 年 8 月、発熱で近医を受診した際に汎血球減少を認め、血液内科にて骨髄穿刺し、ペルオキシターゼ陰性の芽球が骨髄有核細胞の 20%以上を占めていたことから急性白血病の診断で加療目的に当院紹介受診となった。当院にて再度施行した骨髄穿刺により得られた芽球細胞の表面マーカー解析結果より B 細胞性急性リンパ性白血病の診断となった。この際同時に提出した骨髄染色体分析の結果で 46, XY, t(1;4) (p34;q31)の染色体異常を 20 細胞中 15 細胞で認めた（図 1）。診断後速やかに JALSG ALL 202-O レジメンによる寛解導入化学療法を行った。血球回復後の骨髄穿刺

で完全寛解の達成を確認した。この際同時に提出した骨髄染色体分析の結果は正常核型となっていた（図 1）。

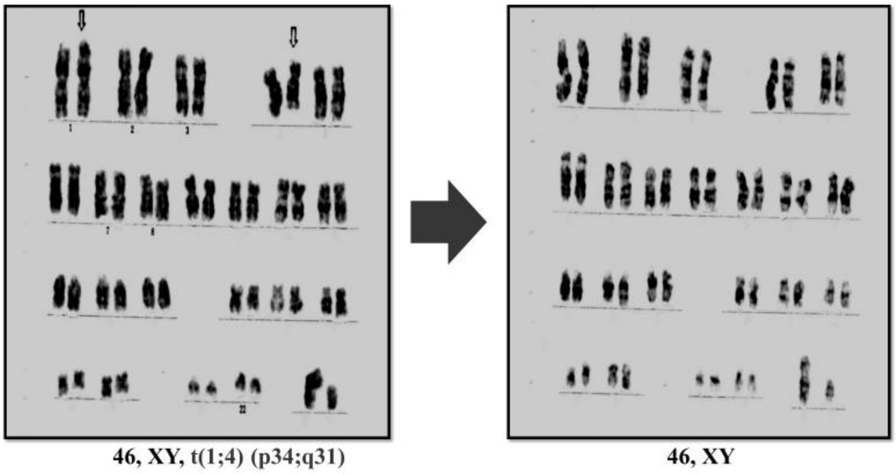


図 1　診断時ならびに寛解時の骨髄染色体検査結果
診断時に認めた t(1;4)(p34;q31) （図左）は寛解達成後消失した（図右）。

［方法及び結果］

診断時の患者骨髄液を検体として用いた。Burrows-Wheeler Aligner: 0.7.10 を用いてリファレンス配列へのマッピングを行った。リファレンス配列は UCSC Genome Browser hg19 を用いた。マッピング出来たリードから構造変異の検出に使用するリードを選択し、BreakDancer: 1.4.5 を用いて Structual Variation を検出した。Integrative Genomics Viewer: 2.4.10 を用いて目視にて最終的な Beak point の検出を行った。
相補的な染色体転座(図 2)について各々分析したところ、1 番染色体の 3'側と 4 番染色体の 3'側の融合染色体では転座部位の近傍にストップコドンがあることから、キメラ遺伝子は転写されていない可能性が高いことが判明した。一方で 1 番染色体の 5'側と 4 番染色体の 5'側の融合染色体ではストップコドンを挟まず Zinc finger(ZNF) 362/ Masterminde-like(MAML) 3 という融合遺伝子を形成し得ることが判明した。

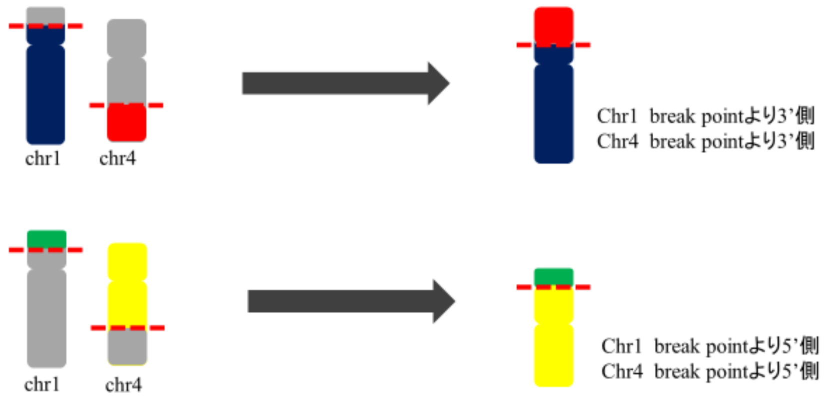


図 2　相補的な転座染色体
転座により上下 2 つの異常染色体が生じる。5'側同士(図下)の染色体は転座近傍にストップコドンを認めなかった。

引き続き、同様の診断時検体に対して PCR direct sequense 法を用いて ZNF362/MAML3 融合遺伝子が転写されている事を確認した(図 3)。

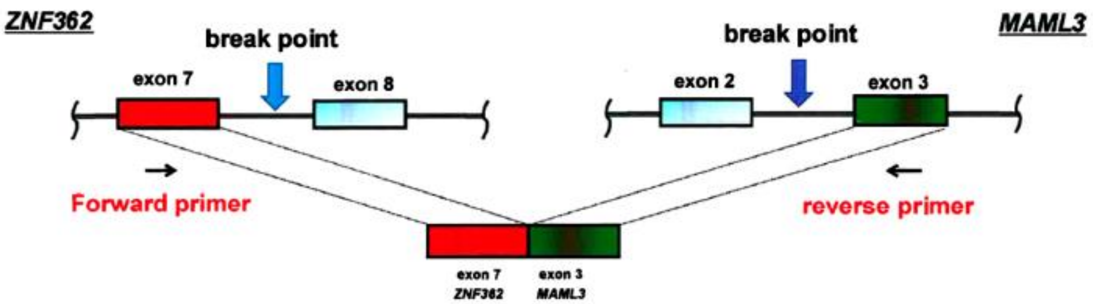


図 3　PCR direct sequense 法での転写の確認
実際に白血病細胞において ZNF362/MAML3 が転写されている事を確認した。

[考察]

白血病の寛解達成に伴い、発症時に認めていた染色体異常が消失していることから、この染色体異常は白血病細胞に由来するものと考えられた。次世代シークエンサーを用いた白血病細胞の解析により、この染色体異常により産生されるキメラ遺伝子の候補として ZNF362/MAML3 が挙げられた。MAML3 は Notch シグナル系における転写の co-activator としての働きの他、[2] Wnt シグナル系における転写の co-activator としての働き [3] を有している。Wnt シグナル系の下流には cyclin D1 や c-myc がある。これら遺伝子は既知の B 細胞性リンパ腫や白血病の発症に関わるものであり、[4), 5)] 診断時検体

においてこれらタンパク発現が正常細胞に比較して亢進していることを証明したいと考えている。今回診断時に認めた染色体異常は既報のないものであるが、変異遺伝子の下流で活性化されているシグナルは既知の白血病と同様である可能性がある。白血病発症に関与するより下流の共通したシグナルを同定することで新たな治療のターゲットの同定に結び付く可能性があると考えられる。

［結論］

46, XY, t(1;4) (p34;q31)の染色体異常を有する急性リンパ性白血病細胞において、ZNF362/MAML3 キメラ遺伝子がその発症に関与した可能性が示唆された。

［参考文献］

[1] Yoshihiro Hatta: Acute Lymphoblastic Leukemia. Rinsho Ketsueki. 2014; 55: 185-190.

[2] Motoo Kitagawa: Notch Signalling in the Nucleus: Roles of Mastermind-like (MAML) Transcriptional Coactivators. J Biochem. 2016; 159: 287-294.

[3]Marie-Clotilde Alves-Guerra,Chiara Ronchini,Anthony J. Capobianco: Mastermind-like 1 is a specific coactivator of β-catenin transcription activation and is essential for colon carcinoma cell survival. Cancer Res. 2007; 67: 8690-8698.

[4]Salah Aref, M Mabed, M El-Sherbiny, T Selim, A Metwaly: Cyclin D1 Expression in Acute Leukemia. Hematology. 2006; 11: 31-34.

[5]Katsuhiro Miura, Hiromichi Takahashi, Masaru Nakagawa, Asami Izu, Masahiko Sugitani, Daisuke Kurita, Masashi Sakagami, Shimon Ohtake, Yoshihito Uchino, Atsuko Hojo, Hitomi Kodaira, Mai Yagi, Yujin Kobayashi, Noriyoshi Iriyama, Sumiko Kobayashi, Satomi Kiso, Yukio Hirabayashi, Yoshihiro Hatta, Masami Takei: Clinical significance of co-expression of MYC and BCL2 protein in aggressive B-cell lymphomas treated with a second line immunochemotherapy. Leuk Lymphoma. 2016; 57: 1335-1341.

関節リウマチ(RA)における滑膜マスト細胞による substance P を介する炎症の二重制御機構

The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis

岡村佑紀 [1), 2)]、三嶋信太郎 [1), 2)]、柏倉淳一 [1), 3)]、坂本朋美 [1), 4), 5)]、豊島翔太 [1), 3), 4)]、齋藤修 [2)]、岡山吉道 [1), 4), 5)]

Yuki OKAMURA[1), 2)], Shintaro MISHIMA[1), 2)], Jun-ichi KASHIWAKURA[1), 3)], Tomomi SAKAMOTO-SASAKI[1), 4), 5)], Shota TOYOSHIMA[1), 4), 5)], Shu SAITO[2)], Yoshimichi OKAYAMA[1), 3), 4)]

[1)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、[2)]日本大学医学部 整形外科、[5)] 北海道大学大学院 薬学研究院衛生化学研究室、[4)]日本大学医学部 医学教育センター、[5)] 日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター

[要旨]

substance P は RA 罹患関節の関節液中に多量に存在し滑膜細胞の増殖、活性化による IL-1 や IL-6 産生などを惹起し、炎症に関与していることが報告されている。そこで RA と変形性関節症(OA)患者の滑膜組織マスト細胞に対する substance P の影響を検討したところ、両患者の滑膜組織マスト細胞は MrgX2 を介してヒスタミンを遊離し、PGD_2 を産生したが測定可能な量のサイトカインは産生されなかった。また MrgX2 陽性細胞数に関して両者に差はなかった。substance P の発現細胞を調べるため RA と OA 患者滑膜組織の免疫組織化学染色を行ったところマスト細胞は substance P を発現しておりその陽性数や発現頻度には有意差はなかったが、substance P の染色パターンが異なり、RA では 41%の、一方 OA では 7%のマスト細胞において substance P は細胞膜周辺に局在していた。FcεRI の架橋および凝集 IgG 刺激で刺激 2 時間以降に Tac1 mRNA が上昇したが、細胞上清中の substance P は測定感度以下であった。マスト細胞内には 700 pg/10^6 個が存在し、刺激 30 分後にその substance P 量は有意に減少した。substance P はマスト細胞プロテアーゼである chymase によって分解されることがわかった。活性化された滑膜マスト細胞は即座に substance P を分解し、これは RA において substance P を介する滑膜細胞の活性化を抑制していることが示唆された。このことは RA においてマスト細胞による substance P を介する 2 重の炎症の制御があることが示唆された。

[背景]

Mrg 受容体は、脊髄後根神経節や感覚神経に発現し、痛覚に関与する G タンパク質共役型受容体に属する受容体ファミリーである。げっ歯類では 50 以上の遺伝子からなる 4 つの Mrg 受容体 subfamily が存在し、ヒトでは、MrgX1-X7 の 7 つの受容体が同定されている。[1)-3)] MrgX1 と MrgX2 は、感覚神経細胞のみならず、臍帯血由来培養マスト細胞とマスト細胞腫のセルライン LAD2 にも発現している。[4), 5)] substance P、compound 48/80、cortistatin、somatostatin、pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide、dynorphin、vasoactive intestinal peptide (VIP)、抗菌ペプチド LL-37 が MrgX2 のリガンドである。[4), 5)] MrgX1 のリガンドは、bovine adrenal medulla peptide である。[3)]

関節リウマチ (RA) は、進行性の関節破壊により日常生活の活動制限を引き起こす全身性の慢性炎症性疾患であり、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1 や IL-6 が重要な役割を果たしている。[6)] 実験的関節炎ラットモデルの滑膜では substance P 濃度の有意な増加を認め、[7)] substance P の関節投与で炎症が増悪する。[8)] NK-1R 拮抗薬を用いると、炎症と痛みが減弱する。[9), 10)] また、RA 患者の関節滑液中の substance P 濃度は変形性関節症 (OA) 患者と比較して有意に高い。[11)] substance P の分泌細胞としては、神経細胞、[12)] 線維芽細胞 [13)] および単球・マクロファージ [14)] が報告されているが、マスト細胞に関しての報告はない。RA における substance P による神経性炎症の役割についてはよく分かっていない。

[目的]

RA の炎症の場におけるマスト細胞のフェノタイプの解析を行い、疾患特異的な分子の発現を解析する目的にて RA の病態に関連する分子を同定し、その分子の発現や活性化を制御する機序の解明を行った。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-160112)。

(2) 細胞

ヒト滑膜マスト細胞は、RA および変形性関節症(OA)の滑膜組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑膜組織を採取後ただちに 2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1% fungizone を含んだ IMDM に入れ、はさみを用いてできるだけ細切した。collagenase と hyaluronidase を用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後 recombinant human (rh) SCF (200 ng/mL, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)と rhIL-6 (50 ng/mL, PeproTech)を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM)で培養した。42 日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、rhSCF (100 ng/mL)と rhIL-6 (50 ng/mL)を含んだ IMDM で培養した。 また、滑膜組織を酵素で細胞を分散後培養し、プレートに接着した線維芽細胞を採取した。

(3) 免疫化学組織染色と共焦点顕微鏡による解析

共焦点顕微鏡による解析はすでに報告した方法を用いて行った。滑膜組織を固定して、膜の穴あけをした後、Alexa Fluor® 488 標識マウス抗 tryptase モノクローナル抗体(clone AA1; DakoCytomation Inc. , Carpinteria, CA, USA)、Alexa Fluor® 555 標識マウス抗 substance P モノクローナル抗体 (clone 266815; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、ウサギ 抗ヒト MrgX2 ポリモノクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, UK)アイソタイプコントロール Alexa Fluor® 488 標識マウス IgG1 および Alexa Fluor® 555 標識マウス IgG1 およびウサギ IgG とインキュベートした。MrgX2 の染色のためには、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体、 Cy3 標識 streptavidin (Biolegend, San Diego, CA, USA) を用いた。核染色には DAPI を用いた。FV1000 型共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いた。

(4) Flow cytometry

滑膜組織から酵素的に分散してマスト細胞の精製は以下の抗体を用いて細胞を染色した後 FACS Aria IIu (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)を用いて行った。マウス抗ヒト MrgX2 モノクローナル抗体(clone 477533; R&D Systems)、マウス抗ヒト FcεRI α 鎖モノクローナル抗体(クローン CRA1, eBioscience, San Diego, CA, USA)、マウス抗ヒト tryptase モノクローナル抗体 (clone AA1; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA)、PE 標識抗マウス IgG1 抗体および FITC 標識抗マウス IgG2 抗体を用いた。

(5) RT-PCR

マスト細胞の総 RNA は RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)を用いて抽出し精製した。500 μg/mL oligo (dT12-18) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、10 mM dNTP mix (Invitrogen)、5 x first strand buffer (Invitrogen)、0.1 M DTT (Invitrogen)、SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) および RNase OUT (Invitrogen)を用いて cDNA に逆転写を行った。TAC1、TAC3、TAC4、MrgX2、IL-6、IL-8、osteopontin,および GAPDH の primer と probe は Assays-on-Demand™ service (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)のものを使用した。

(6) マスト細胞の活性化

IgE (0.5 μg/mL, Calbiochem, San Diego, CA, USA) で 30 分感作した OA および RA 患

者の滑膜マスト細胞を 0.1、1.0、10 μg/mL の抗 IgE ポリクローナル抗体(DakoCytomation Inc.)で刺激した。FcγRI および FcγRIIA の架橋は、マスト細胞を 1, 10 μg/mL の凝集ヒト IgG で刺激した。コントロールとして単量体ヒト IgG で 30 分間刺激した。また、substance P (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)あるいは calcium ionophore A23187 (Sigma-Aldrich)で刺激した。ヒスタミン遊離と PGD_2 産生と substance P 分泌量を測定するためその細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。

(7) 遺伝子発現抑制

レンチウイルスベクターを用いた shRNA 技術にてヒト滑膜組織由来培養マスト細胞の MrgX2 の発現抑制をおこなった。MrgX2 のコンストラクションに対する sense と antisense オリゴヌクレオタイド配列のレンチウイルス発現プラスミド は Sigma-Aldrich から購入した。

(8) 脱顆粒、PGD_2 産生と substance P 分泌量の測定

ヒスタミン遊離と PGD_2 産生と substance P 分泌量の測定は酵素免疫法を用いた。

(9) IL-6, IL-8, osteopontin 産生量の測定

IL-6, IL-8, osteopontin 産生量の測定には ELISA (R&D Systems)を用いた。

(10)統計解析

OA と RA の 2 群間の検定においては正規分布に従ってない分布の中心分布の差を検定するため、Mann-Whitney の *U* 検定を用いた。解析には、GraphPad Prism 6 (MDF, Tokyo, Japan)を用いた。$p < 0.05$ を統計学的に有意差があるとした。

[結果]

RA と OA 患者滑膜組織の免疫組織化学染色を行ったところ両患者の滑膜組織マスト細胞は substance P を発現しておりその陽性数や発現頻度には有意差はなかったが、substance P の染色パターンが異なり、OA では細胞質全体にびまん性に存在し(図 1A 参照)、RA では 41%の(図 1B 参照)、OA では 7%のマスト細胞において substance P は細胞膜周辺に局在していた。FcεRI の架橋および凝集 IgG 刺激で刺激 2 時間以降に Tac1 mRNA が上昇したが、細胞上清中の substance P は測定感度以下であった。substance P はマスト細胞から分泌される chymase によって分解された。マスト細胞内には substance P が 700 pg/10^6 個が存在し、刺激 30 分後にその substance P 量は有意に減少した。活性化された滑膜マスト細胞は即座に substance P を分解し、これは RA において substance P を介する滑膜細胞の活性化を抑制していることが示唆された。両患者の滑膜組織マスト細胞は MrgX2 を介してヒスタミンを遊離し、PGD_2 を産生したが測

定可能な量のサイトカインは産生されなかった。また MrgX2 陽性細胞数に関して両者に差はなかった。

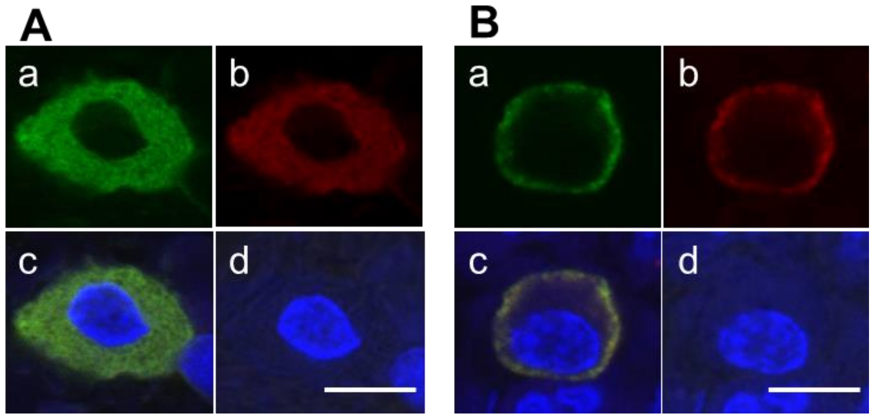


図 1　RA (A) および OA 患者 (B) の滑膜組織 におけるマスト細胞の substance P (赤, b)と tryptase (緑, a)の細胞内局在
共焦点顕微鏡による解析を行った。青は DAPI による核染色である。c は a と b の merge 像、d は DAPI のみの像である。Bar = 5 μm.

[考察]

substance P は滑膜マスト細胞上の MrgX2 を介しマスト細胞を活性化し炎症メディエーターを遊離させ炎症を惹起させた。RA の関節滑液中にも substance P は存在し SP-MrgX2 枢軸が両疾患の炎症の病態に関与していることが示唆された。substance P の発現細胞を調べるため RA と OA 患者滑膜組織の免疫組織化学染色を行ったところマスト細胞は substance P を発現しておりその陽性数や発現頻度には有意差はなかったが、substance P の染色パターンが異なり、RA では 41%の、一方 OA では 7%のマスト細胞において substance P は細胞膜周辺に局在していた。この局在はマスト細胞の活性化で惹起されたため RA ではマスト細胞の活性化が起こっていることが示唆された。活性化された滑膜マスト細胞は即座に substance P を遊離するが同時に遊離する chymase によって substance P を分解し、これは RA において substance P を介する滑膜細胞の活性化を抑制していることが示唆された。このことは RA においてマスト細胞による substance P を介する 2 重の炎症の制御があることが示唆された。

[結論]

関節リウマチ(RA)の神経性炎症にマスト細胞は、substance P の分泌と分解また、substance P による活性化機構が存在し、炎症の促進と抑制の二重の炎症制御機構を持っていることが示唆された。[9)]

[参考文献]

[1] Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y: Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcγRI and FcγRII. Arthritis Rheum. 2013; 65 (1): 109-119.

[2] Yanagisawa M, Kashiwakura J, Lee H, Okamura Y, Sasaki-Sakamoto T, Saito S, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y: IL-33 synergistically enhances immune complex-induced tumor necrosis factor-α and IL-8 production in cultured human synovium-derived mast cells. Int Arch Allergy Immunol. 2013; 161(supple2): 32-36.

[3] Okamura Y, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Toyoshima S, Kuroda K, Saito S, Tokuhashi Y, Okayama Y: The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. Allergol Int. 2017; 66S: S9-S20.

[4] Kan J-I, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Seki M, Saito S, Ra C, Tokuhashi Y, Okayama Y: Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Allergol Int. 2016; 65(Suppl): S11-S16.

[5] Hammad H, de Heer HJ, Soullie T, Hoogsteden HC, Trottein F, Lambrecht BN: Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. J Immunol. 2003; 17: 3936-3940.

[6] Rajakariar R, Hilliard M, Lawrence T, et al: Hematopoietic prostaglandin D2 γsynthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD_2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104: 20979-20984.

[7] Arimura A, Yaslli K, Kishino J, Trivedi S, Colville-Nash P, Bellingan G, Fitzgerald D, Yaqoob MM, Gilroy DW: Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751. J Pharmacol Exp Ther. 2001; 298: 411-419.

[8] Tsubosaka Y, Nakamura T, Hirai H, Hori M, Nakamura M, Ozaki H, Murata T: A deficiency in the prostaglandin D_2 receptor CRTH2 exacerbates adjuvant-induced joint inflammation. J Immunol. 2014; 193: 5853-5840.

[9] Okamura Y, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Toyoshima S, Kuroda K, Saito S, Tokuhashi Y, Okayama Y: The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. Allergol Int. 2017; 66S: S9-S20.

関節リウマチ(RA)と変形性関節症(OA)患者滑膜組織マスト細胞における IL-17A の発現

Comparison of features of synovial mast cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis

管順一郎[1), 2)]、三嶋信太郎[1), 2)]、坂本朋美[1), 3), 4)]、柏倉淳一[1), 5)]、李　賢鎬[2)]、齋藤　修[2)]、岡山吉道[1), 3), 4)]

Jun-ichiro KAN[1), 2)], Shintaro MISHIMA[1), 2)], Tomomi SAKAMOTO-SASAKI[1), 3), 4)], Jun-ichi KASHIWAKURA[1), 5)], Hyunho LEE[2)], Shu SAITO[2)], Yoshimichi OKAYAMA[1), 3), 4)]

[1)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、[2)]日本大学医学部 整形外科、[3)]日本大学医学部 医学教育センター、[4)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、[5)] 北海道大学大学院薬学研究院衛生化学研究室

[要旨]

IL-17A は関節リウマチ(RA)の病態に重要な役割を果たしている。IL-17A の主たる産生細胞は Th17 細胞であるが、近年ヒトマスト細胞からの IL-17A の産生の報告が数件あり、RA 患者の滑膜マスト細胞が IL-17A を産生しているかどうかを変形性関節症（OA）患者の滑膜組織マスト細胞との比較を免疫組織化学染色および in vitro の実験系を用いて行った。OA と RA 患者の滑膜マスト細胞における IL-17A 発現頻度は様々であり、IL-17A 陽性マスト細胞数とその頻度に両患者間において有意な差を認めなかった。RA および OA 患者由来培養滑膜マスト細胞 10^5 個から 40 － 50 pg 程度の少量の IL-17A が刺激なしで 24 時間培養後の細胞上清中に分泌されたが、IgE および IgG 依存性の刺激、TNF-α、C5a、LPS、IL-23+IL-1β の刺激によって IL-17A 産生の増加はみられなかった。従って、RA の病態において滑膜マスト細胞は, IL-17A の主たる産生細胞ではないと考えられた。

[背景]

IL-17A は Th17 細胞が産生するサイトカインで、マクロファージや線維芽細胞に作用して IL-1β や IL-6、TNF-α の産生を促進させる。[1), 2)] IL-17A は間葉系細胞に作用してマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の発現を亢進させ骨融解を促進する。[3)] また、骨芽細胞に作用して RANK の発現を亢進させ、RANKL を介して破骨細胞への分化を促進する。[4)] 関節リウマチ患者では、滑膜組織中のマスト細胞数の増加、関節液中のヒスタミン量およびトリプターゼ量の増加を認める。我々は、滑膜マスト細胞が FcγRI、FcγRII を発現しており、凝集 IgG は FcγRI、FcγRIIA を介して滑膜マ

スト細胞を活性化し TNF-α を産生することを報告した。[5] 臍帯血マスト細胞が凝集 IgG, TNF-α, アナフィラトキシン C5a, LPS の刺激で IL-17A (400-800 pg/mL)を産生するいう報告がある。[6] また、皮膚マスト細胞は IL-23 と IL-1β の刺激により extracellular trap formation が惹起され IL-17A を分泌するという報告があるが [7] 詳細は不明である。

[目的]

RA と OA 滑膜マスト細胞における IL-17A の発現頻度と各種刺激による滑膜マスト細胞からの IL-17A の産生について詳細に検討することを目的とした。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-160112)。

(2) 細胞

ヒト滑膜マスト細胞は、RA および変形性関節症(OA)の滑膜組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑膜組織を採取後ただちに 2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1% fungizone を含んだ IMDM に入れ、はさみを用いてできるだけ細切した。collagenase と hyaluronidase を用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後 recombinant human (rh) SCF (200 ng/mL, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)と rhIL-6 (50 ng/mL, PeproTech)を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM)で培養した。42 日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、rhSCF (100 ng/mL)と rhIL-6 (50 ng/mL)を含んだ IMDM で培養した。 また、滑膜組織を酵素で細胞を分散後培養し、プレートに接着した線維芽細胞を採取した。

(3) 免疫化学組織染色と共焦点顕微鏡による解析：

共焦点顕微鏡による解析はすでに報告した方法を用いて行った。滑膜組織を固定して、膜の穴あけをした後、Alexa Fluor® 488 標識マウス抗 tryptase モノクローナル抗体(clone AA1; DakoCytomation Inc. , Carpinteria, CA, USA)、Alexa Fluor® 555 標識ウサギ抗 IL-17A ポリクローナル抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、アイソタイプコントロール Alexa Fluor® 488 標識マウス IgG1 および Alexa Fluor® 555 標識ウサギ IgG とインキュベートした。FV1000 型共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いた。

(4) 滑膜マスト細胞の活性化

IgE (0.5 μg/mL, Calbiochem, San Diego, CA, USA) で 30 分感作した OA および RA 患者の滑膜マスト細胞を 0.1, 1.0, 10 μg/mL の抗 IgE ポリクローナル抗体 (DakoCytomation Inc.)で 24 時間刺激した。FcγRI の架橋は、マスト細胞を 0.1, 1, 10 μg/mL の抗ヒト FcγRI 抗体の $F(ab')_2$ fragments ($F(ab')_2\alpha$FcγRI, clone 10.1; ID Labs Inc. , London, ON, Canada)で 30 分間刺激した。コントロールとしてマウス IgG1 の $F(ab')_2$ fragments ($F(ab')_2$mIgG1, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA) で 30 分間刺激した。細胞を 1 度洗浄後 FcγRI の架橋のため抗マウス IgG $F(ab')_2$ fragments のヤギ $F(ab')_2$ fragments ($gF(ab')_2\alpha mF(ab')_2$, Jackson Immune Laboratory)を添加しさらに 24 時間刺激した。滑膜マスト細胞を 3, 10, 30 ng/mL の rhIL-33 (R&D Systems Inc.)で 24 時間刺激した。抗 FcεRI 抗体(0.3μg/mL, clone CRA1, eBioscience, San Diego, CA, USA)と単量体 IgG(1μg/mL)あるいは凝集 IgG (1μg/mL)と同時に IL-33 (30 ng/mL)を添加し 24 時間刺激した。滑膜マスト細胞を rhTNF-α (10 ng/mL, R&D Systems Inc.), アナフィラトキシン C5a (5 μg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), LPS (10 ng/mL, Sigma-Aldrich)で 24 時間刺激した。また、rhIL-23(10 ng/mL, R&D Systems Inc.)と rhIL-1β (2.5 ng/mL, R&D Systems Inc.)の同時刺激を 24 時間行った。IL-17A または IL-8 産生を測定するためその細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。

(5) IL-17A と IL-8 産生量の測定

IL-17A と IL-8 産生量の測定は ELISA (R&D Systems Inc.)を用いた。

(6) 統計解析

OA と RA の 2 群間の検定においては正規分布に従ってない分布の中心分布の差を検定するため、Mann-Whitney の U 検定を用いた。解析には、GraphPad Prism 6 (MDF, Tokyo, Japan)を用いた。$p < 0.05$ を統計学的に有意差があるとした。

[結果]

OA と RA 患者の滑膜マスト細胞における IL-17A 発現頻度は様々であり、IL-17A 陽性マスト細胞数とその頻度に両患者間において有意な差を認めなかった。RA および OA 患者由来培養滑膜マスト細胞 10^5 個から 40 – 50 pg 程度の少量の IL-17A が刺激なしで 24 時間培養後の細胞上清中に分泌されたが、IgE および IgG 依存性の刺激、TNF-α、C5a、LPS、IL-23+IL-1β の刺激によって IL-17A 産生の増加はみられなかった。

[考察]

OA と RA 患者の滑膜マスト細胞における IL-17A 発現頻度は様々であり、IL-17A 発現陽性滑膜組織マスト細胞数およびその頻度は両患者間で有意差はなかった。また、IL-

17A が各種刺激によってヒトマスト細胞から産生されるという報告[6), 7)]があるが、我々の実験系では確認できなかった。マスト細胞の培養条件の違いがあるが、その理由は不明である。滑膜マスト細胞は、構成的に少量の IL-17A を分泌しているが、IL-17A 産生を増加させる機序は現時点では不明である。

[結論]

RA の病態において滑膜マスト細胞は、IL-17A の主たる産生細胞ではないと考えられた。

[参考文献]

[1)]Toh ML, Kawashima M, Hot A, Miossec P, Miossec P: Role of IL-17 in the Th1 systemic defects in rheumatoid arthritis through selective IL-12Rbeta2 inhibition. Ann Rheum Dis. 2010; 69: 1562-1567.

[2)]Shahrara S, Pickens SR, Mandelin AM, 2nd, Karpus WJ, Huang Q, Kolls JK, et al: IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction. J Immunol. 2010; 184: 4479-4487.

[3)]Moran EM, Mullan R, McCormick J, Connolly M, Sullivan O, Fitzgerald O, et al: Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, Oncostatin M and response to biologic therapies. Arthritis Res Ther. 2009; 11: R113.

[4)]Kotake S, Yago T, Kawamoto M, Nanke Y: Role of osteoclasts and interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: crucial 'human osteoclastology'. J Bone Miner Metab. 2012; 30: 125-135.

[5)]Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y: Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcγRI and FcγRII. Arthritis Rheum. 2013; 65 (1): 109-119.

[6)]Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, et al: Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. J Immunol. 2010; 184: 3336-3340.

[7)]Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, et al: Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. J Immunol. 2011; 187: 490-500.

[8)]Kan J-I, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Seki M, Saito S, Ra C, Tokuhashi Y, Okayama Y: Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Allergol Int. 2016; 65(Suppl): S11-16.

関節リウマチと変形性関節症の滑膜マスト細胞の比較

Comparison of features of synovial mast cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis

三嶋信太郎[1), 2)]、豊島翔太[1), 3), 4)]、坂本朋美[1), 3), 4)]、李　賢鎬[2)]、齋藤　修[2)]、松本健治[5)]、岡山吉道[1), 3), 4)]

Shintaro MISHIMA[1), 2)], Shota TOYOSHIMA[1), 3), 4)], Tomomi SAKAMOTO-SASAKI[1), 3), 4)], Hyunho LEE[2)], Shu SAITO[2)], Kenji MATSUMOTO[5)], Yoshimichi OKAYAMA[1), 3), 4)]

[1)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、[2)]日本大学医学部 整形外科、[3)]日本大学医学部 医学教育センター、[4)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、[5)]国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究室

[要旨]

関節リウマチ(RA)のマスト細胞は、変形性関節症(OA)のマスト細胞と比較するとが免疫複合体の刺激によってヒスタミン遊離量およびサイトカイン産生量には差がなかったが、過剰な PGD_2 を産生することが分かった。その原因として prostaglandin synthase 1 (PTGS1)、prostaglandin synthase 2 (PTGS2) mRNA の発現量は OA マスト細胞と比較して RA マスト細胞の方が有意に高かった。miRNA chip の結果、OA マスト細胞の方が、RA マスト細胞より 3 倍以上発現量が高い miRNA を 20 個見出した。これら 20 個の miRNA のうち PTGS2 の発現制御に寄与する miRNA は miR199a-3p であった。miR-199a-3p と PTGS2 の発現量の相関を調べたところ OA マスト細胞では相関がなかったが、RA マスト細胞では負の相関がみられたため miR199a-3p が PTGS2 の発現の制御に関与していることが示唆された。

[背景]

凝集 IgG が FcεRI と FcγRII を介してヒト滑膜マスト細胞を活性化し TNF-α を産生すること、[1)] さらに凝集 IgG 刺激による滑膜マスト細胞からの TNF-α の産生は IL-33 によって相乗的に増加すること、[2)] 凝集 IgG 刺激によって滑膜マスト細胞から産生される substance P は同時に分泌される chymase によって分解され炎症の抑制にもマスト細胞は働いていること、[3)] 滑膜マスト細胞は関節リウマチ(RA)の滑膜組織で IL-17A の主要な産生細胞ではないこと [4)] を報告してきた。しかしながら、RA における滑膜マスト細胞の特徴は未だに明らかにされていない。

[目的]

RA の炎症の場におけるマスト細胞のフェノタイプの解析を行い、疾患特異的な分子の発現を解析する目的にて RA の病態に関連する分子を同定し、その分子の発現や活性化を制御する機序の解明を行った。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-160112)。

(2) 細胞

ヒト滑膜マスト細胞は、RA および変形性関節症(OA)の滑膜組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑膜組織を採取後ただちに 2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1% fungizone を含んだ IMDM に入れ、はさみを用いてできるだけ細切した。collagenase と hyaluronidase を用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後 SCF (200 ng/mL)と IL-6 (50 ng/mL)を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM)で培養した。42 日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/mL)と IL-6 (50 ng/mL)を含んだ IMDM で培養した。また、滑膜組織を酵素で細胞を分散後培養し、プレートに接着した線維芽細胞を採取した。

(3) マスト細胞の精製

滑膜組織から酵素的に分散してマスト細胞の精製は以下の抗体を用いて細胞を染色した後 FACS Aria IIu (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)を用いて行った。 Alexa 647 標識抗 FcεRIα モノクローナル抗体(クローン CRA1, eBioscience, San Diego, CA, USA)および PE 標識抗 Kit モノクローナル抗体(クローン YB5, B8, BD Biosciences)である。

(4) RT-PCR

マスト細胞の総 RNA は RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)を用いて抽出し精製した。500 μg/mL oligo (dT12-18) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、10 mM dNTP mix (Invitrogen)、5 x first strand buffer (Invitrogen)、0.1 M DTT (Invitrogen)、SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen)および RNase OUT (Invitrogen)を用いて cDNA に逆転写を行った。PTGS1、PTGS2、LTC4S、TBXAS1、HPGDS、miR-199a-3p、RNU48 および GAPDH の primer と probe は Assays-on-Demand™ service (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)のものを使用した。

(5) DNA chip 解析

OA マスト細胞と RA マスト細胞の発現遺伝子を DNA chip を用いて網羅的解析を行った。OA マスト細胞と RA マスト細胞から RNeasy Mini kit (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出し、前述の方法で cDNA に逆転写した。逆転写した cDNA と biotin 標識されたヌクレオチド 3 リン酸を用いて、ビオチン化相補的 RNA (Biotin-cRNA)を合成した。Biotin-cRNA と Human Genome U133 (Affymetrix)を 45ºC で 16 時間反応させ、ハイブリダイゼーションした。その後、streptavidin-phycoerythrin (PE)と反応させ、Hewlett-Packard Gene Array Scanner (Palo Alto, CA, USA)を用いて蛍光強度を読み取った。各プローブの蛍光強度は、GeneChip Analysis Suite 5.0 (Affymetrix)で数値化した。数値化したデータを Genespring software (Agilent Techologies, Santa Clara, CA, USA)を用いて解析し、RA マスト細胞における発現量が OA マスト細胞と比較して高かった遺伝子群を抽出した。

(6) miRNA の網羅的発現解析

OA および RA マスト細胞(それぞれ 3 ドーナー)から miRNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて miRNA を抽出した。抽出した miRNA (100 ng)に、miRNA Spile-In solution (Agient Technoligies)、CIP Master Mix を添加し、37°C で 30 分間反応させ脱リン酸化させた。その後、DMSO を添加し、100°C で 10 分間反応させ氷上で冷却し反応を停止させた。脱リン酸化処理した miRNA 溶液に Cy3 を含んだ Ligation Master Mix (Agilent Technologies)を添加し 16°C で 2 時間反応させた。Cy3 でラベルした miRNA を精製し miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies)と 55°C で 20 時間反応させハイブリダイゼーションさせた。その後 miRNA を抽出した。miRNA の網羅的発現解析はヒト miRNA Micro assay kit Release16.0 (Agient Technoligies)を用いて行った。

(7) マスト細胞の活性化

IgE 感作したマスト細胞を 0.1、1.0、10 μg/mL の抗 FcεRIαモノクローナル抗体 (クローン CRA1、eBioscience)あるいはカルシウムイオノフォア A23187 (10^{-6}M) で 30 分間刺激した。FcγRI の架橋は、マスト細胞を 1, 10 μg/mL の抗ヒト FcεRI 抗体の $F(ab')_2$ fragments ($F(ab')_2$αFcγRI, clone 10.1)で 30 分間刺激した。コントロールとしてマウス IgG1 の $F(ab')_2$ fragments ($F(ab')_2$mIgG1、Jackson Immune Laboratory、West Grove、PA) で 30 分間刺激した。細胞を１度洗浄後 FcγRI の架橋のため抗マウス IgG $F(ab')_2$ fragments のヤギ $F(ab')_2$ fragments (g$F(ab')_2$αm$F(ab')_2$, Jackson Immune Laboratory)を添加しさらに 30 分間刺激した。ヒスタミン遊離と PGD_2 産生を測定するためその細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。

(8) OA マスト細胞と RA 線維芽細胞との共培養

OA マスト細胞と RA 線維芽細胞を collagen coting の 24 穴プレートを用いてマスト細胞培地で 96 時間共培養した。まず RA 線維芽細胞をプレートに線維芽細胞培地とともに加え、48 時間インキュベートしコンフルエントにした。その後培地をマスト細胞培地に置き換え、一穴につき 3×10^5 個ずつ OA マスト細胞を加えた。96 時間後マスト細胞のみ単離した。RA 線維芽細胞は底面に張り付くため弱くピペッティングすると OA マスト細胞のみ単離可能であった。

(9) 脱顆粒、PGD_2 産生

ヒスタミン遊離と PGD_2 産生は酵素免疫法を用いた。

(10)統計解析

OA と RA の 2 群間の検定においては正規分布に従ってない分布の中心分布の差を検定するため、Mann-Whitney の *U* 検定を用いた。miR-199a-3p と PTGS2 の発現量の相関は Spearman の順位相関係数を用いて相関の強さを検定した。解析には、GraphPad Prism 6 (MDF, Tokyo, Japan)を用いた。$p < 0.05$ を統計学的に有意差があるとした。

[結果]

DNA chip の結果、prostaglandin synthase 1 (PTGS1)、prostaglandin synthase 2 (PTGS2)、thromboxane synthase 1 (TBXAS1)、leukotriene C_4 synthase (LTC4S) mRNA の発現量は OA マスト細胞と比較して RA マスト細胞の方が有意に高かった。また、IgE 依存性刺激において PGD_2 産生量は RA マスト細胞の方が有意に高かった。一方 LTB_4 産生量は OA マスト細胞で有意に高かった。IgG 依存性刺激において PGD_2 産生量は RA マスト細胞のほうが有意に高かった。したがって、OA および RA マスト細胞は、異なった性質を有していることが明らかになった。RA 線維芽細胞において PTGS1、PTGS2、TBXAS1、LTC4S mRNA の発現量は OA 線維芽細胞と同程度であった。OA マスト細胞を RA 線維芽細胞と共培養しても PTGS1、PTGS2、TBXAS1、LTC4S mRNA の発現量に変化は見られなかったことから、両マスト細胞の性質の違いは、線維芽細胞に起因しないことが示唆された。次に miRNA chip の結果、OA マスト細胞の方が、RA マスト細胞より 3 倍以上発現量が高い miRNA を 20 個見出した。これら 20 個の miRNA のうち PTGS2 の発現制御に寄与する miRNA は miR199a-3p であった。miR-199a-3p と PTGS2 の発現量の相関を調べたところ OA マスト細胞では相関がなかったが、RA マスト細胞では負の相関がみられた(図 1)。関節液中の PGD_2 量は、RA の方が有意に高かったのに対し、PGE_2 量は両群間に有意な差は見られなかった。

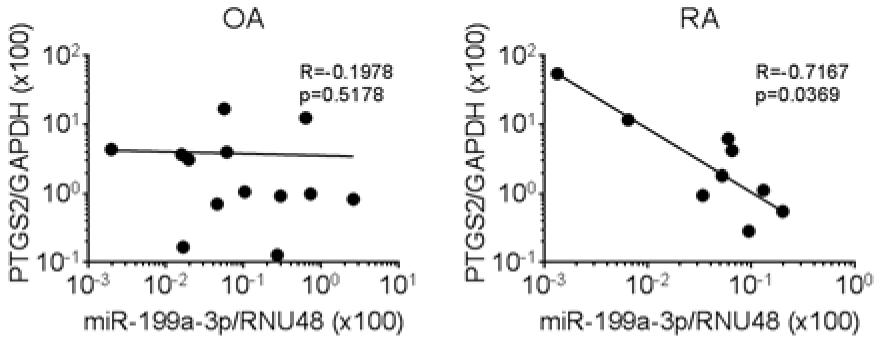


図 1　OA と RA 患者の滑膜マスト細胞における miR-199a-3p と PTGS2 発現量の相関

[考察]

RA 患者の滑膜組織での PGD$_2$ 産生細胞はマスト細胞のみでなく滑膜線維芽細胞やマクロファージも産生細胞である。実際に関節滑液中の PGD$_2$ 量を測定すると、RA 患者で有意に高いことが分かった。PGD$_2$ 受容体および PGD$_2$ 合成酵素の欠損マウスを用いた研究から PGD$_2$、特に HPGDS 由来の PGD$_2$ は炎症の抑制効果を持つことが示されている。その機序としては①PGD$_2$ が樹状細胞表面の DP1 を介して樹状細胞の遊走と機能を抑制し、結果として T 細胞機能を抑制すること、[5] ②PGD$_2$ の分解産物である 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J$_2$ (15d-PGJ$_2$)が peroxisomeproliferator-activated receptor (PPAR)-γ依存性および非依存性の系を介して好中球の遊走を抑制することによって炎症を抑制すること、[6] ③炎症の際に T 細胞と B 細胞から産生される IL-10 を増加させ、マクロファージから産生される炎症性サイトカイン TNF-α を低下させること [6] が示唆される。実際、関節炎マウスモデルにおいて、PGD$_2$ 受容体の阻害薬、[7] PGD$_2$ 受容体欠損マウスを用いた報告 [8] からも PGD$_2$ は炎症抑制効果をもつことが示唆される。[8] これらの報告と本研究の結果から、RA 患者マスト細胞が免疫複合体の刺激によって過剰な PGD$_2$ を産生することにより、RA の炎症を抑制している可能性が示唆された。

[結論]

関節リウマチ(RA)のマスト細胞は、変形性関節症(OA)のマスト細胞と比較するとが免疫複合体の刺激によって過剰な PGD$_2$ を産生することが分かった。その原因として prostaglandin synthase 1 (PTGS1)、prostaglandin synthase 2 (PTGS2) mRNA の発現量は OA マスト細胞と比較して RA マスト細胞の方が有意に高かった。

[参考文献]

[1] Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y: Activation of

human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcγRI and FcγRII. Arthritis Rheum. 2013; 65 (1): 109-119.
[2] Yanagisawa M, Kashiwakura J, Lee H, Okamura Y, Sasaki-Sakamoto T, Saito S, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y: IL-33 synergistically enhances immune complex-induced tumor necrosis factor-α and IL-8 production in cultured human synovium-derived mast cells. Int Arch Allergy Immunol. 2013; 161(supple2): 32-36.
[3] Okamura Y, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Toyoshima S, Kuroda K, Saito S, Tokuhashi Y, Okayama Y: The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. Allergol Int. 2017; 66S: S9-S20.
[4] Kan J-I, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Seki M, Saito S, Ra C, Tokuhashi Y, Okayama Y: Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Allergol Int. 2016; 65(Suppl): S11-S16.
[5] Hammad H, de Heer HJ, Soullie T, Hoogsteden HC, Trottein F, Lambrecht BN: Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. J Immunol. 2003; 17: 3936-3940.
[6] Rajakariar R, Hilliard MLawrence T, et al. Hematopoietic prostaglandin D2 γsynthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD_2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104: 20979-20984.
[7] Arimura A, Yaslli K, Kishino J, Trivedi S, Colville-Nash P, Bellingan G, Fitzgerald D, Yaqoob MM, Gilroy DW: Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751. J Pharmacol Exp Ther. 2001; 298: 411-419.
[8] Tsubosaka Y, Nakamura T, Hirai H, Hori M, Nakamura M, Ozaki H, Murata T: A deficiency in the prostaglandin D_2 receptor CRTH2 exacerbates adjuvant-induced joint inflammation. J Immunol. 2014; 193: 5853-5840.

重症関節リウマチ(RA)患者の膝関節滑液中の炎症性および抗炎症性脂質メディエーターは、重症変形性関節症(OA)患者に比較して活性化が亢進している

Activation of inflammation and resolution pathways of lipid mediators in synovial fluid from patients with severe rheumatoid arthritis compared with severe osteoarthritis

佐野有隆[1), 2)]、豊島翔太[1), 3) , 4)]、三木寿美[5)]、武富芳隆[5)]、坂本朋美[1), 3), 4)]、李　賢鎬[2)]、齋藤　修[2)]、村上　誠[5)]、岡山吉道[1), 3), 4)]

Yutaka SANO[1), 2)], Shota TOYOSHIMA[1), 3), 4)], Yoshimi MIKI[5)], Yoshitaka TAKETOMI[5)], Tomomi SAKAMOTO-SASAKI[1), 3), 4)], Hyunho LEE[2)], Shu SAITO[2)], Makoto MURAKAMI[5)], Yoshimichi OKAYAMA[1), 3), 4)]

[1)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、[2)]日本大学医学部 整形外科、[3)]日本大学医学部 医学教育センター、[4)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、[5)]東京大学大学院 医学系研究科附属疾患生命工学センター健康環境医工学教室

[要旨]

変形性関節症(OA)患者と比較すると、関節リウマチ(RA)患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。炎症の増悪が抗炎症性脂質メディエーターも増加させている可能性が示唆された。これら脂質メディエーターの中で 5-HETE、12-HETE、8,9-EET、LXA4、PD1、12-HEPE、4-HDoHE および 17-HdoHE は、RA と OA を区別するバイオマーカーとなることが示唆された。

[背景]

関節リウマチ(RA)は、複数の遺伝的要因に環境因子が加わり自己免疫応答が惹起され、結果として慢性の炎症が複数の滑膜組織に生じ、進行性の破壊性関節炎に至る疾患と考えられている。エイコサノイド経路は、RA の病態において重要な役割を果たしている。RA 患者の滑液中の PGD_2、PGE_2 および LTB_4 は変形性関節症(OA)患者と比較して有意に高いこと、[1)] PGE_2 と LTB_4 は炎症の増悪に関与していること [1) 2)] が報告されている。RA の病態においては、cyclooxygenase (COX) と 5-lipooxygenase (5-LO)の経路の過剰な発現認められ、これらの過剰発現は、methotrexate などの DMARDs、抗 TNF-α 抗体治療や B 細胞除去療法では、抑制できないことが報告されており、[3) 4)] 亜臨床的な炎症や再発に関与していると示唆されている。また、抗炎症

性脂質メディエーターの関節炎への関与が示唆されるが、DHA や EPA 代謝物に関しては解析がほとんどされてなく、OA 患者と比較した脂質メディエーターの網羅的比較解析はなされていない。

[目的]

RA において、関節液中の脂質メディエーターの量的、質的な変化をリピドミクスの手法を用いて解析し、プロファイルを明らかにすることを目的とした。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-160112)。

(2) 対象

人工膝関節置換術時に 18 例の RA 患者の関節滑液と 26 例の OA 患者の関節滑液を採取し、滑液をヒアルロニダーゼで処理した。

(3) リピドミクス

関節液は 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)にて 10 倍に希釈した。固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出した。4000Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer (AB Sciex)と液体クロマトグラフィー (liquid chromatography [LC]; NexeraX2 system; Shimazu)を用いて網羅的に酸化脂肪酸を比較解析した。脂質メディエーター量は、multiple reaction monitoring (MRM) transition のピークの下の面積から算出した。標準量が手に入るものは絶対量を算出した。

(4) 統計解析

臨床データの 2 群間の統計学的解析は、Kruskal-wallis test を用いた。相関の評価には、Spearman の順位相関係数を用いた。*p* 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF、Tokyo、Japan)を使用した。

[結果]

アラキドン酸由来の脂質メディエーターでは、$PGF_{2\alpha}$、5-HETE、LTB_4、12-HETE および 8,9-EET が、 OA 患者よりも RA 患者において有意に高値であった。抗炎症性の脂質メディエーターである AA 由来の脂質メディエーターでは、LXA_4 および LXB_4、DHA 由来の脂質メディエーターでは、PD1、RvD2 および 10-HDoHE 等が、EPA 由来

の脂質メディエーターでは、5-、8-、および 12-HEPEs および LTB_5 が OA 患者よりも RA 患者において有意に高値であった。

[考察]

ROC 曲線から特異度、感度を検定したところ 17 の脂質メディエーターが OA 患者よりも RA 患者において有意に高値であった。陽性尤度比が 10 以上を示す脂質メディエーターは、5-HETE、12-HETE、8、9-EET、LXA_4、PD1、12-HEPE、4-HDoHE および 17-HdoHE であった。これらの脂質メディエーターが重症 RA の病態に関与していることが示唆された。OA 患者と比較すると、RA 患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。炎症の増悪が抗炎症性脂質メディエーターも増加させている可能性が示唆された。

[結論]

OA 患者と比較すると、RA 患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。これら脂質メディエーターの中で 5-HETE、12-HETE、8、9-EET、LXA4、PD1、12-HEPE、4-HDoHE および 17-HdoHE は、RA と OA を区別するバイオマーカーとなることが示唆された。[5)]

［参考文献］

1) Korotkova M, Jakobsson PJ: Persisting eicosanoid pathways in rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol. 2014; 10: 229-241.

2) Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, et al: Neutrophil-derived leukotriene B_4 is required for inflammatory arthritis. J Exp Med. 2006; 203: 837–842.

3) Korotkova M, Westman M, Gheorghe KR, af Klint E, Trollmo C, Ulfgren AK, Klareskog L, Jakobsson PJ: Effects of antirheumatic treatments on the prostaglandin E2 biosynthetic pathway. Arthritis Rheum. 2005; 52: 3439-347.

4) Gheorghe KR, Thurlings RM, Westman M, Boumans MJ, Malmström V, Trollmo C, Korotkova M, Jakobsson PJ, Tak PP: Prostaglandin E_2 synthesizing enzymes in rheumatoid arthritis B cells and the effects of B cell depleting therapy on enzyme expression. PLoS One. 2011; 6: e16378.

5) Sano Y, Toyoshima S, Miki Y, Taketomi Y, Ito M, Lee H, Saito S, Murakami M, Okayama Y: Activation of inflammation and resolution pathways of lipid mediators in synovial fluid from patients with severe rheumatoid arthritis compared with severe osteoarthritis. Asia Pacific Allergy. 2020; In press.

慢性特発性蕁麻疹 (CSU) 患者と健常人における抗 IgE 自己抗体濃度と抗 IgE 自己抗体による高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) 架橋能の差異

Differentiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies (AAbs) to induce FceRI crosslinking, as compared to anti-FcεRIα AAbs

伊﨑聡志[1), 2), 3)]、豊島翔太[1), 2), 4)]、遠藤嵩大[1), 2), 3)]、柏倉淳一[5)]、布村　聡[6)]、中村亮介[7)]、秋山晴代[8)]、葉山惟大[1), 2), 3)]、鐘ヶ江加寿子[1), 2), 4)]、藤澤大輔[1), 2), 3)]、畠田優子[1), 2), 3)]、藤田英樹[1), 2), 3)]、照井　正[1), 2), 3)]、岡山吉道[1), 2), 4)]

Satoshi IZAKI[1), 2), 3)], Shota TOYOSHIMA[1), 2), 4)], Takahiro ENDO[1), 2), 3)], Jun-ichi KASHIWAKURA[5)], Satoshi NUNOMURA[6)], Ryousuke NAKAMURA[7)], Haruyo AKIYAMA[8)], Koremasa HAYAMA[1), 2), 3)], Kazuko KANEGAE[1), 2), 4)], Daisuke FUJISAWA[1), 2), 3)], Yuko HATADA[1), 2), 3)], Hideki FUJITA[1), 2), 3)], Tadashi TERUI[1), 2), 3)], Yoshimichi OKAYAMA[1), 3), 4)]

[1)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、[2)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、[3)]日本大学医学部 皮膚科学系皮膚科学分野、[4)]日本大学医学部 医学教育センター、[5)] 北海道大学大学院 薬学研究院衛生化学研究室、[6)]佐賀大学医学部 分子医化学分野、[7)] 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部、[8)] 帝京平成大学薬学部 薬学科

[要旨]

慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者血清中の抗 IgE 抗体濃度は健常人に比較して統計学的に有意に高かった (p 値 < 0.0001) 。抗 IgE 抗体による FcεRI の架橋能も CSU 患者群の方が NC 群よりも架橋能が統計学的に有意に高かった (p 値 $= 0.0106$)。従って日本人の CSU の病態には抗 IgE 抗体が関与していると考えられる。

[背景]

慢性特発性蕁麻疹(chronic spontaneous urticarial, CSU)は、原因が不明な 6 週間以上持続する蕁麻疹であり、マスト細胞の活性化が病態の本態であるが、マスト細胞の活性化機構は解明されていない。私達は、CSU に関しては、substance P の新規受容体 MrgX2 が重症 CSU 患者のマスト細胞に高発現していることおよび substance P のみならず好酸球顆粒タンパクが皮膚マスト細胞上の MrgX2 を介して活性化することを報告した。[1)] 一方、CSU 患者血清の 5〜10%に IgE に対する自己抗体(抗 IgE 抗体)、30〜45%に高親和性 IgE 受容体(FcεRI)α 鎖に対する自己抗体（抗 α 鎖抗体)が存在することが報告されているが、[2)] これら自己抗体によるマスト細胞活性化能は明らかにされてい

ない。さらにこれら自己抗体のマスト細胞活性化能と臨床症状との関連性は不明である。

[目的]

CSU 患者の抗 IgE 抗体、抗 α 鎖抗体のマスト細胞活性化能と臨床的特徴の関連性およびその役割を調べることを第一の目的とした。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-15908-12およびRK-160112-2)。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

(2) 対象

CSU 患者 108 人、健常者コントロール(NC) 56 人の血清から IgG 分画を精製した。

(3) 抗 IgE 自己抗体濃度の測定

Ab-Rapid SPiN EX を用いて、患者の血清から IgG 分画を精製した。maxisorp plate に 1 μg/mL のヒト IgE、myeloma を 100 μL 添加し、4℃で一晩静置して固相化した。洗浄液 (Tween 20 を 0.1% になるように加えた TBS)でプレートを 4 回洗浄した。非特異的な結合を防ぐため、100 μL のブロッキング液 (FBS を PBS に溶解し 10% FBS とした)を加え、室温で 1 時間ブロッキングした。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した。 PBS で 10 倍に希釈した精製 IgG 分画を 100 μL 加え、室温で 2 時間静置した。 洗浄液でプレートを 4 回洗浄し、PBS で 1 万倍に希釈した horseradish peroxidase (HRP)標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を 100 mL 加え、室温で 1 時間反応させた。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した後、3、3'、5、5'-tetramethylbenzidine (TMB) microwell peroxidase substrate system を用い発色させた。2N H_2SO_4 で反応を停止させ、Multiskan Go microplate spectorometer を用いて 450 nm の吸光度を測定した。また定量的に行うためにヒト IgG を倍々希釈し、HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体で検出された吸光度をもとに検量曲線作成し、基準となる精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を ELISA で測定した。プレート間の補正のためこの基準となる精製 IgG の抗 IgE 抗体で毎回検量線を作成し、検体の精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を算出した。

(4) 抗 α 鎖自己抗体濃度の測定

過去の報告の方法に従い精製 IgG に含まれる抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度を測定した。Maxisorp plates に 1 μg/mL のリコンビナント可溶性 α 鎖を 100 μL 加え、 4℃で一晩静置し固相化した。固相化以降は、抗 IgE 自己抗体濃度測定と同様の方法を用いた。検量曲線はヒト化抗 FcεRIα 抗体 (clone CRA2)を用いて作成した。

(5) 抗 α 鎖抗体および抗 IgE 抗体による FcεRI の架橋能の測定

IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)法を用い、CSU 患者群と NC 群の抗 α 鎖抗体および抗 IgE 抗体による FcεRI の架橋能(マスト細胞活性化能)を測定し、それぞれを比較した。図 1 は、改良型 EXiLE 法の原理である。ラット好塩基球白血病細胞にヒト高親和性 IgE 受容体 FcεRI と NF-AT-responsive ルシフェラーゼ reporter 遺伝子を強制発現させた細胞を用いると抗 FcεRI α 鎖自己抗体による FcεRI の架橋能を簡便かつ高感度に測定できる。抗 IgE 自己抗体の場合、IgE で感作した後、患者の精製 IgG を添加する。

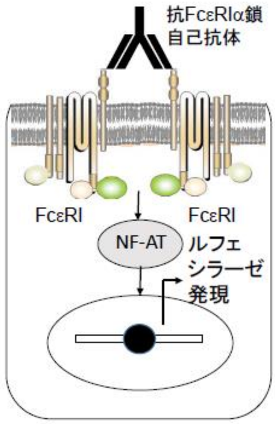


図 1

(6) 統計解析

統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan)を使用した。2 群間の連続変数は Mann-Whitney *U* test、非連続変数は 2-sided Fisher's exact test を行った。*p* 値は、0.05 未満の場合、統計学的に有意な差があると判断した。

[結果]

抗 IgE 抗体濃度は、CSU 患者群の方が NC 群よりも統計学的に有意に高値だった($p < 0.0001$, cutoff value: 0.558 μg/mL)。抗 IgE 抗体濃度の cutoff 値以上と未満の CSU 患者の臨床的特徴を比較すると、cutoff 値以上の患者で罹病期間が有意に長かった。抗□鎖抗体濃度は両者間に統計学的な有意差はなかった。EXiLE 法によるマスト細胞活性化能は CSU 患者群の抗 IgE 抗体の方が NC 群よりも統計学的に有意に高値であった($p = 0.0106$、図 2)。

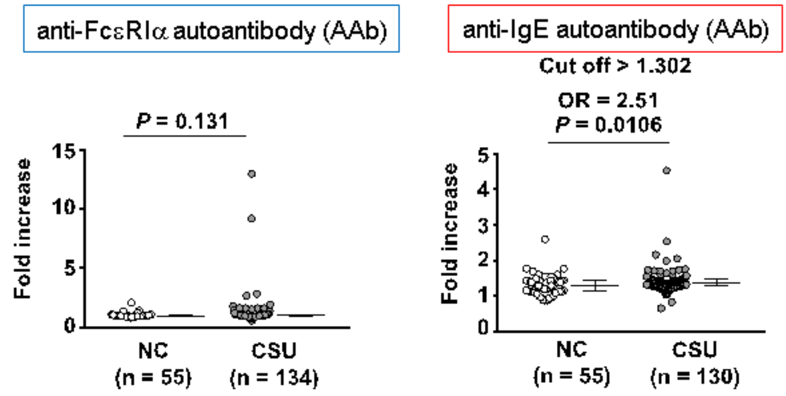


図 2 抗 α 鎖抗体と抗 IgE 抗体によるマスト細胞活性化能
CSU 患者の抗 IgE 自己抗体による FcεRI の架橋能が NC 群に比較して有意に高いことが判明した (B)。非刺激の fold increase を 1 とした。

[考察]

CSU 患者群の抗 IgE 抗体の濃度およびマスト細胞活性化能は、NC 群と比較して有意に高値であったことから、CSU 患者群の抗 IgE 抗体は、NC 群と何か質的な違いがあることが示唆された。CSU 患者において抗 IgE 抗体濃度と抗 IgE 鎖抗体によるマスト細胞活性化能には相関がなかったことから抗 IgE 抗体の一部がマスト細胞活性化能を有していることが示唆された。マスト細胞活性化能の機序としては、抗 IgE 抗体のエピトープの違い、avidity の違いやアイソタイプの違いなど様々な要因の結果である。

[結論]

CSU 患者群の抗 IgE 抗体の濃度およびマスト細胞活性化能は、NC 群と比較して有意に高値であり、CSU の病態に関与していることが示唆された。

[参考文献]

1) Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, Kuroda K, Nunomura S, Hayama K, Terui T, Ra C, Okayama Y: Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticarial. J Allergy Clin Immunol. 2014; 134: 622-633.

2) Kolkhir P, Church MK, Weller K, Metz M, Schmetzer O, Maurer M: Autoimmune chronic spontaneous urticaria: What we know and what we do not know. J Allergy Clin Immunol. 2016; 139: 1772-1781.

3) Nakamura R, Uchida Y, Higuchi M, Nakamura R, Tsuge I, Urisu A, Teshima R: A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. Allergy. 2010; 65: 1266-1273.

[4] Izaki S, Toyoshima S, Endo T, Kanegae K, Nunomura S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Nakamura R, Akiyama H, Ra C, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Differentiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies (AAbs) to induce FcεRI crosslinking, as compared to anti-FcεRIα AAbs. Allergol Int. 2019; 68(3): 342-351.

慢性特発性蕁麻疹患者に対するシクロスポリンの治療効果を評価するバイオマーカーの同定

Identification of biomarkers for predicting the response to cyclosporine A therapy in patients with chronic spontaneous urticaria

遠藤嵩大[1), 2), 3)]、 豊島翔太[1), 2), 4)]、 葉山惟大[1), 2), 3)]、 伊東真奈[1), 2), 3)]、 西盛信幸[1), 2), 3)]、 伊﨑聡志[1), 2), 3)]、 鐘ヶ江加寿子[1), 2), 4)]、 菅井和子[5)]、 照井　正[1), 2), 3)]、 岡山吉道[1), 2), 4)]

Takahiro ENDO[1), 2), 3)], Shota TOYOSHIMA[1), 2), 4)], Koremasa HAYAMA[1), 2), 3)], Mana ITO[1), 2), 3)], Nobuyuki NISHIMORI[1), 2), 3)], Satoshi IZAKI[1), 2), 3)], Kazuko KANEGAE[1), 2), 4)], Kazuko SUGAI[5)], Tadashi TERUI[1), 2), 3)], Yoshimichi OKAYAMA[1), 3), 4)]

[1)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、 [2)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、 [3)]日本大学医学部 皮膚科学系皮膚科学分野、 [4)]日本大学医学部 医学教育センター、 [5)]すがいこどもクリニック

[要旨]

慢性特発性蕁麻疹におけるシクロスポリンの治療反応性のバイオマーカーとして自己血清皮内テスト(autologous serum skin test, ASST)が陽性であること、血清 IgE 値が低値であることが示唆された。

[背景]

慢性特発性蕁麻疹(chronic spontaneous urticarial, CSU)とは、「特定の誘発因子がなく、6 週間以上の掻痒と膨疹の消褪を繰り返す皮膚疾患である。」とされている。自己血清を皮内に注射する ASST は患者の一部で陽性となることから、血清中に誘発因子が存在すると考えられている。この原因として高親和性 IgE 受容体(FcεRI)の α 鎖および IgE に対する自己抗体(抗 FcεRIα 鎖自己抗体、抗 IgE 自己抗体)の関与が推測されているが、ASST とこれら自己抗体の関係は不明である。抗ヒスタミン薬の治療に抵抗性である重症な CSU 患者においてオマリズマブやシクロスポリンが投与される。オマリズマブの治療反応性のバイオマーカーとして血清 IgE が高値であること[1)]や ASST が陰性であること[2)]が報告されている。しかし、シクロスポリンの治療反応性のバイオマーカーは報告されていない。

[目的]

本研究では、CSU のシクロスポリンの治療効果を予測するためのバイオマーカーを調べることを目的とした。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-15908-12およびRK-160112-2)。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

(2) プロトコール

抗ヒスタミン薬の 2 倍量の加療にて効果不十分の CSU 患者 34 名(女性 20 人、男性 14 人)を対象とした。シクロスポリンは 3 mg/kg/day で 4 週間の投与を行った。治療前後の蕁麻疹の重症度は UAS7 を用いて評価した。治療後の UAS7 が 6 以下を効果ありとした。ASST の陽性群と陰性群の間の罹病期間、血清 IgE 値、末梢血好塩基球数、抗核抗体陽性率、抗サイログロブリン抗体陽性率、抗マイクロゾーム抗体陽性率、抗 FcεRIα 鎖自己抗体および抗 IgE 抗体自己濃度を比較した。

(3) 重症度 (Urticaria Activity Score 7; UAS7)

UAS7 とは患者の痒みの程度と(0 = none, 1 = mild, 2 = moderate ,3 = severe)膨疹の数(0 = none, 1 = 1~20, 2 = 21~50, 3 = 50 以上)によるスコアを 1 日ごとに合計し(スコア: 0 ~ 6)、さらにそのスコアを 1 週間分合計したものである(スコア: 0 ~ 42)。

(4) 自己血清皮内テスト(ASST)

静脈血を採取し 15 分静置した後、3000 rpm で 15 分遠心分離し血清を回収した。1mL シリンジと 27G 針を用い、血清 50 μL を前腕屈側に皮内注射した。陰性コントロールとして血清注射部位から 3〜5 cm 離した部位に生理食塩水を 50 mL 皮内注射した。30 分後に判定し、膨疹の直径が陰性コントロールより 1.5 mm 以上あるものを陽性とした。

(5) 抗 IgE 自己抗体濃度の測定

Ab-Rapid SPiN EX を用いて、患者の血清から IgG 分画を精製した。maxisorp plate に 1 μg/mL のヒト IgE、 myeloma を 100 μL 添加し、4℃で一晩静置して固相化した。洗浄液 (Tween 20 を 0.1% になるように加えた TBS)でプレートを 4 回洗浄した。非特異的な結合を防ぐため、100μL のブロッキング液 (FBS を PBS に溶解し 10%

FBS とした)を加え、室温で 1 時間ブロッキングした。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した。PBS で 10 倍に希釈した精製 IgG 分画を 100 μL 加え、室温で 2 時間静置した。洗浄液でプレートを 4 回洗浄し、PBS で 1 万倍に希釈した horseradish peroxidase (HRP)標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を 100 μL 加え、室温で 1 時間反応させた。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した後、3、3'、5、5'-tetramethylbenzidine (TMB) microwell peroxidase substrate system を用い発色させた。2N H_2SO_4 で反応を停止させ、Multiskan Go microplate spectorometer を用いて、450 nm の吸光度を測定した。また定量的に行うために、ヒト IgG を倍々希釈し、HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体で検出された吸光度をもとに検量曲線作成し、基準となる精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を ELISA で測定した。プレート間の補正のため、この基準となる精製 IgG の抗 IgE 抗体で毎回検量線を作成し、検体の精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を算出した。

(6) 抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度測定

過去の報告の方法に従い精製 IgG に含まれる抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度を測定した。Maxisorp plates に 1 μg/mL のリコンビナント可溶性 α 鎖を 100 μL 加え、4℃で一晩静置し固相化した。固相化以降は、抗 IgE 自己抗体濃度測定と同様の方法を用いた。検量曲線はヒト化抗 FcεRIα 抗体 (clone CRA2)を用いて作成した。

(7) 統計解析

統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan)を使用した。2 群間の連続変数は Mann-Whitney U test、 非連続変数は 2-sided Fisher's exact test を行った。p 値は、0.05 未満の場合、統計学的に有意な差があると判断した。

[結果]

シクロスポリン投与によって ASST 陽性群の UAS7≦6 になった割合は、ASST 陰性群よりも有意に高値であった ($p = 0.0048$)。シクロスポリンの治療後 UAS7≦6 群では治療後 UAS7 > 6 群と比較し、血清 IgE が有意に低値であった ($p = 0.0003$)。ROC 曲線から得られた最適なカットオフ値は 88.5 IU/mL であった。血清 IgE 値≦88.5 群と血清 IgE 値>88.5 群の ASST 陽性率を比較したが、両群において有意な差はみられなかった ($p = 0.727$)。

[考察]

ASST 陰性群よりも ASST 陽性群ではシクロスポリンは有効であることから、ASST は治療を選択するバイオマーカーになると考えられる。また血清 IgE 値が 88。5 IU/mL 以下であることはシクロスポリンに反応性がありといえる ASST と血清 IgE 値の間に

有意な関係はなかったことから独立したパラメーターであることが考えられた。今後この作用機序について検討を行う。CSU の治療において ASST 陽性・血清 IgE 低値群はシクロスポリン、ASST 陰性・血清 IgE 高値群はオマリズマブが勧められる [3]。

[結論]

CSU 患者において ASST 陽性と血清 IgE 値がカットオフ値以下であることがシクロスポリンの治療効果の予測のバイオマーカーになることが新たに判明した。

[参考文献]

[1] Ertas R, Ozyurt K, Atasoy M, Hawro T, Maurer M: The clinical response to omalizumab in chronic spontaneous urticaria patients is linked to and predicted by IgE levels and their change. Allergy. 2018; 73: 705-712.

[2] Gericke J, Metz M, Ohanyan T, Weller K, Altrichter S, Skov PS, et al: Serum autoreactivity predicts time to response to omalizumab therapy in chronic spontaneous urticaria. J Allergy Clin Immunol. 2017; 139: 1059-1061 e1.

[3] Endo T, Toyoshima S, Kanegae K, Izaki S, Nishimori N, Ito M, Sugai K, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Identification of biomarkers for predicting the response to cyclosporine A therapy in patients with chronic spontaneous urticaria. Allergol Int. 2019; 68(2): 270-273.

慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の好塩基球における FcεRI を介する反応性の差異とオマリズマブに対する治療効果について

Relationship between changes in the 7-day urticaria activity score after treatment with omalizumab and the responsiveness of basophils to FcεRI stimulation in patients with chronic spontaneous urticaria

遠藤嵩大 [1), 2), 3)]、豊島翔太 [1), 2) ,4)]、葉山惟大 [1), 2), 3)]、田杭真帆 [1), 2), 3)]、丹羽悠介 [1), 2), 3)]、伊東真奈 [1), 2), 3)]、照井　正 [1),2), 3)]、岡山吉道 [1), 2) ,4)]

Takahiro ENDO [1), 2), 3)], Shota TOYOSHIMA [1), 2), 4)], Koremasa HAYAMA [1), 2), 3)], Maho TAGUI [1), 2), 3)], Yusuke NIWA [1), 2), 3)], Mana ITO [1), 2), 3)], Tadashi TERUI [1), 2), 3)], Yoshimichi OKAYAMA[1), 2), 4)]

[1)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、[2)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、[3)]日本大学医学部 皮膚科学系皮膚科学分野、[4)]日本大学医学部 医学教育センター

[要旨]

CSU 患者の好塩基球は FcεRI を介した刺激に対して反応性が低下している群と反応性が低下していない群に分けられる。反応性が低下していない群では反応性が低下している群と比較し、Urticaria Control Test のスコアが統計学的に有意に高値であり、オマリズマブの治療が効きにくい傾向が見られた。

[背景]

CSU の患者の約半分の好塩基球は FcεRI を介した刺激に対して反応が低い。[1)]しかし、FcεRI を介した刺激に対して好塩基球の反応性が正常の患者の群と低下している群の臨床的な特徴は明らかになっていない。また好塩基球の FcεRI を介する刺激に対する反応性の低下を引き起こす要因についても明らかになっていない。

[目的]

FcεRI 刺激に対する好塩基球の正常な反応性を示す患者と低下した反応性を示す患者の臨床的な特徴を調査すること。

[対象および方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-15908-12)。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

(2) 対象

2017 年 4 月から 2018 年 8 月の間に、日本大学付属板橋病院でオマリズマブによる治療を受けていた CSU 患者 22 人(女性 15 人、男性 7 人、年齢範囲 24〜87 歳)を対象とした。また、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、喘息、アレルギー性疾患、または自己免疫疾患の病歴のない人を 20 人(女性 8 人、男性 12 人、年齢範囲 23〜64 歳)をコントロール群(NC)とした。

(3) 重症度

7-days Urticaria Activity Score(UAS7)とは患者の痒みの程度と(0 = none、1 = mild、2 = moderate、3 = severe)膨疹の数(0 = none、1 = 1~20、2 = 21~50、3 = 50 以上)によるスコアを 1 日ごとに合計し(スコア: 0 ~ 6)、さらにそのスコアを 1 週間分合計したものである(スコア: 0 ~ 42)。[2)] Urticaria Control Test(UCT)は、過去 4 週間の蕁麻疹の状態について、4 つの質問を 0〜4 点、計 16 点満点で評価する質問票である。[3)]

(4) 好塩基球活性化試験(BAT)

好塩基球での CD203c の発現を定量化するために、Allergenicity Kit(Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA)を使用した。ヘパリン添加全血を抗 FcεRI 抗体(clone; CRA1、3μg/ mL)、抗 IgE 抗体(clone; E124-2-8D、10μg/ mL)、N ホルミル-L-メチオニル-L-ロイシル-L-フェニルアラニン(fMLP)(1μg/ mL)または陰性コントロール(リン酸緩衝生理食塩水)で 15 分間 37℃で刺激した。CD3-PC7、CRTH2-FITC、CD203c-FITC は反応中に添加した。サンプルは、Gallios フローサイトメーターおよび FlowJo(TreeStar, Woodburn, OR, USA)を使用して分析した。活性化した好塩基球は、刺激されていない好塩基球と CD203c の発現を比較して、活性化を評価した。各サンプルで少なくとも 500 個の好塩基球を分析した。

(5) 抗 IgE 自己抗体濃度の測定 [4)]

Ab-Rapid SPiN EX を用いて、患者の血清から IgG 分画を精製した。maxisorp plate に 1 μg/mL のヒト IgE, myeloma を 100 mL 添加し、4℃で一晩静置して固相化した。洗浄液(Tween 20 を 0.1% になるように加えた TBS)でプレートを 4 回洗浄し

た。非特異的な結合を防ぐため、100 mL のブロッキング液(FBS を PBS に溶解し 10% FBS とした)を加え、室温で 1 時間ブロッキングした。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した。PBS で 10 倍に希釈した精製 IgG 分画を 100 mL 加え、室温で 2 時間静置した。洗浄液でプレートを 4 回洗浄し、PBS で 1 万倍に希釈した horseradish peroxidase(HRP)標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を 100 mL 加え、室温で 1 時間反応させた。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した後、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) microwell peroxidase substrate system を用い発色させた。2N H_2SO_4 で反応を停止させ、Multiskan Go microplate spectorometer を用いて、450 nm の吸光度を測定した。また定量的に行うために、ヒト IgG を倍々希釈し、HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体で検出された吸光度をもとに検量曲線作成し、基準となる精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を ELISA で測定した。プレート間の補正のため、この基準となる精製 IgG の抗 IgE 抗体で毎回検量線を作成し、検体の精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を算出した。

(6) 抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度測定 [4)]

過去の報告の方法に従い精製 IgG に含まれる抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度を測定した。Maxisorp plates に 1 μg/mL のリコンビナント可溶性 FcεRIα 鎖を 100 μL 加え、4℃で一晩静置し固相化した。固相化以降は、抗 IgE 自己抗体濃度測定と同様の方法を用いた。検量曲線はヒト化抗 FcεRIα 抗体 (clone CRA2)を用いて作成した。

(7) FcεRIα 鎖抗体および抗 IgE 抗体による FcεRI の架橋能の測定 [4)]

IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)法を用い、CSU 患者群と NC 群の抗 FcεRIα 鎖抗体および抗 IgE 抗体による FcεRI の架橋能(マスト細胞活性化能)を測定し、それぞれを比較した。ラット好塩基球白血病細胞にヒト高親和性 IgE 受容体 FcεRI と NF-AT-responsive ルシフェラーゼ reporter 遺伝子を強制発現させた細胞を用いると抗 FcεRIα 鎖自己抗体による FcεRI の架橋能を簡便かつ高感度に測定できる。抗 IgE 自己抗体の場合、IgE で感作した後、患者の精製 IgG を添加した。

(8) 統計解析

統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan)を使用した。2 群間の連続変数は Mann-Whitney *U* test, Wilcoxon matched-pairs signed-rank test, 非連続変数は 2-sided Fisher's exact test を行った。*p* 値は、0.05 未満の場合、統計学的に有意な差があると判断した。

[結果]

CSU 患者は BAT の結果で抗 FcεRIα モノクローナル抗体による刺激後の好塩基球活性化率に従って 2 つのグループに分けられた。好塩基球の CD203c の発現の割合が ≤10%である患者を陽性群(BAT-positive)(n = 9)とし、> 10%である患者を BAT 陰性群(BAT-negative)と定義した。BAT 陰性群と BAT 陽性群の間で UAS7 に有意差はなかったが、UCT スコアは BAT 陽性患者よりも BAT 陰性患者で有意に高かった（p = 0.010）。年齢、性別、疾患期間、自己血清皮内テストの陽性率、末梢血好酸球数、末梢血好酸球数、血清総 IgE 値、抗核抗体の陽性率、抗 IgE 自己抗体の濃度と FcεRI 架橋能力、抗 FcεRIα 鎖自己抗体の濃度と FcεRI 架橋能力に両群において有意差はみられなかった。[5)]

これら患者全員にオマリズマブ 4 週間隔で 3 回の皮下注射を行った。UAS7 が 6 以下になった場合を治療に反応した日とした。84 日間の治療終了時に、UAS7 は 16 人の患者で 6 以下(73%)であった(図 1)。 UAS7 は、BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の両方で、0 日目と比較して 7 日目、35 日目、および 84 日目に大幅に減少した(図 2、3)。35 日間のオマリズマブ治療後、すべての BAT 陰性患者で UAS スコアが 15 未満に減少したのに対し(図 2)、BAT 陽性患者 13 名中 6 名ではスコアが 16 以上であった(図 3)。オマリズマブによる治療後の末梢血好塩基球数の有意な増加は、BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の両群でみられた。 オマリズマブ治療後に、両群好塩基球において FcεRI 刺激に対する CD203c の割合は有意に増加した。[6)]

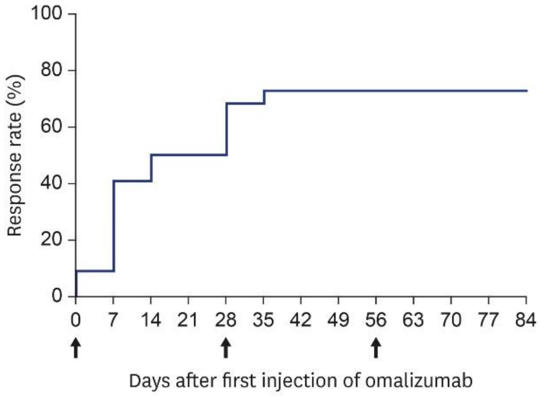


図 1　BAT 陰性患者(n = 9)および BAT 陽性患者(n = 13)におけるオマリズマブの有効性
全患者（n = 22）においてオマリズマブ治療により UAS7≤6 が達成された患者の割合を、反応した日毎にプロットした。矢印はオマリズマブ注射を示す。

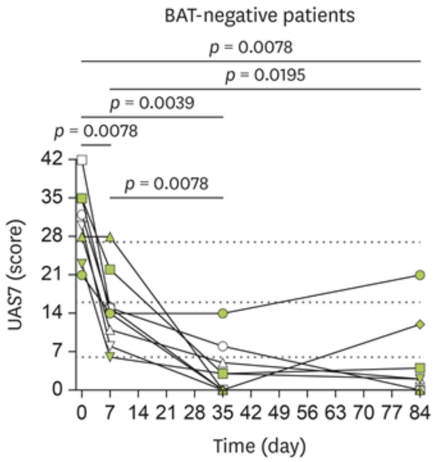


図 2　BAT 陰性群のオマリズマブ治療による UA7S の経時的変化

オマリズマブによる治療前(0 日目)と治療後(7、35、84 日目、n = 9)の BAT 陰性患者の UAS7 の変化を示す。点線は UAS7 の重症度毎の境界を示す。統計は Mann-Whitney U test を使用した。

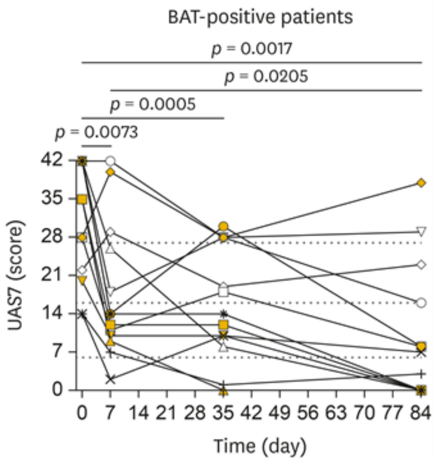


図 3　BAT 陽性群のオマリズマブ治療による UA7S の経時的変化

オマリズマブによる治療前(0 日目)と治療後(7 日目、35 日目、84 日目、n = 13)の BAT 陽性患者の UAS7 の変化を示す。点線は UAS7 の重症度毎の境界を示す。統計は Mann-Whitney *U* test を使用した。

[考察]

BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の間で ASST の陽性率や抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRIα 鎖自己抗体の血清濃度、およびこれらの自己抗体による FcεRI 架橋能力は、両群の間で有意差はなかった。したがって、抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRIα 鎖自己抗体は、FcεRI 刺激に対する好塩基球の弱い反応性を誘発するのには十分ではない可能性

がある。別の血清学的因子が FcεRI 刺激に対する好塩基球の弱い反応性を誘発する可能性が考えられる。

オマリズマブ治療後の CD203c の割合の有意な増加は両群でみられた。さらに、多くの BAT 陰性患者はオマリズマブによる治療後に BAT 陽性患者となった。オマリズマブ治療後に FcεRIα 鎖の好塩基球表面発現レベルは減少することが報告されている。[7] これら２つを合わせて考えると、オマリズマブは、細胞内シグナル伝達を変化させることにより、FcεRI 刺激に対する好塩基球の反応性を高めることが推測される。

[結論]

CSU 患者において BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の間でオマリズマブへの反応性が、両群で異なる可能性があることを示唆された。FcεRI を介した弱い好塩基球の活性化を誘発する因子は抗 IgE 自己抗体や抗 FcεRIα 鎖自己抗体ではなかった。さらなる研究が必要だと考えられる。[6]

[参考文献]

[1] Vonakis BM, Vasagar K, Gibbons SP Jr, Gober L, Sterba PM, Chang H, Saini SS: Basophil FcepsilonRI histamine release parallels expression of Src-homology 2-containing inositol phosphatases in chronic idiopathic urticaria. J Allergy Clin Immunol. 2007; 119: 441-448.

[2] Mathias SD, Crosby RD, Rosén KE, Zazzali JL: The minimal important difference for measures of urticaria disease activity: updated findings. Allergy Asthma Proc. 2015; 36: 394-398.

[3] Weller K, Groffik A, Church MK, Hawro T, Krause K, Metz M, Martus P, Casale TB, Staubach P, Maurer M: Development and validation of the Urticaria Control Test: a patient-reported outcome instrument for assessing urticaria control. J Allergy Clin Immunol. 2014; 133: 1365-1372. 1372.e1–1376.

[4] Izaki S, Toyoshima S, Endo T, Kanegae K, Nunomura S, Kashiwakura JI, Sasaki-Sakamoto T, Nakamura R, Akiyama H, Ra C, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Differentiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies (AAbs) to induce FcεRI crosslinking, as compared to anti-FcεRIα AAbs. Allergol Int. 2019; 68: 342–351.

[5] Endo T, Toyoshima S, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Patients who have anti-FcεRI nonreactive basophils do not represent patients with severe chronic spontaneous urticaria. J Allergy Clin Immunol Pract. 2020; 8(2): 824-825.e2.

[6] Endo T, Toyoshima S, Hayama K, Tagui M, Niwa Y, Ito M, Terui T, Okayama Y: Relationship between changes in the 7-day urticaria activity score after treatment with

omalizumab and the responsiveness of basophils to FcεRI stimulation in patients with chronic spontaneous urticaria. Asia Pac Allergy. 2020; 10(2). e12.
[7)] Metz M, Staubach P, Bauer A, Brehler R, Gericke J, Kangas M, Ashton-Chess J, Jarvis P, Georgiou P, Canvin J, Hillenbrand R, Erpenbeck VJ, Maurer M: Clinical efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria is associated with a reduction of FcεRI-positive cells in the skin. Theranostics. 2017; 7: 1266-1276.

慢性特発性蕁麻疹 (CSU)患者において、 hemokinin-1 は ヒトマスト細胞の脱顆粒を惹起する

Hemokinin-1 induces degranulation of human mast cells in patients with chronic spontaneous urticaria (CSU)

西盛信幸[1), 2), 3)]、 豊島翔太[1), 2), 4)]、 鐘ヶ江佳寿子[1), 2), 4)]、 坂本朋美[1), 2), 4)]、 柏倉淳一[5)]、 布村　聡[6)]、 遠藤嵩大[1), 2), 3)]、 藤澤大輔[1), 2), 3)]、 葉山惟大[1), 2), 3)]、 藤田英樹[1), 2), 3)]、羅　智靖[7)]、照井　正[1), 2), 3)]、岡山吉道[1), 2), 4)]

Nobuyuki NISHIMORI[1), 2), 3)], Shota TOYOSHIMA[1), 2), 4)], Kazuko KANEGAE[1), 2), 4)], Tomomi SAKAMOTO[1), 2), 4)], Jun-ichi KASHIWAKURA[5)], Satoshi NUNOMURA[6)], Takahiro ENDO[1), 2), 3)], Daisuke FUISAWA[1), 2), 3)], Koremasa HAYAMA[1), 2), 3)], Hideki FUJITA[1), 2) 3)], Chisei RA[7)], Tadashi TERUI[1), 2), 3)], Yoshimichi OKAYAMA[1), 2), 4)]

[1)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、[2)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、[3)]日本大学医学部 皮膚科学系皮膚科学分野、[4)]日本大学医学部 IR・医学教育センター、[5)]北海道大学大学院 薬学研究院衛生化学講座、[6)]佐賀大学医学部 分子医化学分野、[7)]日本大学医学部 微生物学教室

[要旨]

CSU 患者の一群で、HK-１が膨疹を惹起していることが示唆された。この群は、自己抗体が原因となる蕁麻疹群とは別の群の可能性がある。

[背景]

最近、神経伝達を担うタキキニン類神経ペプチドの一つであるサブスタンス P (Substance P: SP)が、CSU 患者の血清中で有意に増加し、SP 濃度と重症度との間に正の相関関係があることが報告され、[1), 2)] SP が CSU の病因の一つであることが示唆された。 また、我々は、Mas-related gene X2 (MrgX2)が SP の受容体であり、UAS7 が 30 以上の重症 CSU 患者において、皮膚マスト細胞における MrgX2 の発現が有意に増強していることを報告した。[3)] SP とヘモキニン-1(Hemokinin-1: HK-1)は、11 個のアミノ酸からなり、N 末端側に 6 個の共通のアミノ酸を有している。とりわけ、HK-1 は、その他のタキキニン類神経ペプチドとは異なり、血球系の細胞が産生源であるという特徴を有し、がん細胞の浸潤や動脈圧降下などに寄与することも知られているが、[4)] CSU への関与は不明である。

[目的]

CSU 患者における HK-1 の役割を明らかにすること。

[対象および方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-15908-12およびRK-160112-2)。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

(2) プロトコール

日本大学医学部附属板橋病院皮膚科を受診したCSU患者68名と対照群(健常コントロール、normal control: NC)44名から採血し血清を分離した。さらに、血清からC-18カラムを用いてペプチドを抽出した。血清中のペプチド濃度を5倍に濃縮し、このペプチド溶液をHK-1およびSPの測定に用いた。HK-1濃度と抗FcεRIα鎖自己抗体濃度および抗IgE自己抗体濃度を比較した。またヒトマスト細胞を培養し、HK-1刺激によるヒトマスト細胞からのヒスタミン濃度を測定した。

(3) ヘモキニン、SP、ヒスタミンの測定

HK-1、SPおよびヒスタミンの測定は、酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)を用いた。

(4) 抗IgE自己抗体濃度の測定

Ab-Rapid SPiN EXを用いて、患者の血清からIgG分画を精製した。maxisorp plateに1 μg/mLのヒトIgE、myelomaを100 μL添加し、4℃で一晩静置して固相化した。洗浄液(Tween 20を0.1% になるように加えたTBS)でプレートを4回洗浄した。非特異的な結合を防ぐため、100μLのブロッキング液(FBSをPBSに溶解し10% FBSとした)を加え、室温で1時間ブロッキングした。洗浄液でプレートを４回洗浄した。PBSで10倍に希釈した精製IgG分画を100 μL加え、室温で2時間静置した。洗浄液でプレートを4回洗浄し、PBSで1万倍に希釈したhorseradish peroxidase(HRP)標識マウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体を100 μL加え、室温で1時間反応させた。洗浄液でプレートを4回洗浄した後、3、3’、5、5’-tetramethylbenzidine(TMB) microwell peroxidase substrate systemを用い発色させた。2N H_2SO_4で反応を停止させ、Multiskan Go microplate spectorometerを用いて、450 nmの吸光度を測定した。また定量的に行うために、ヒトIgGを倍々希釈し、HRP標識マウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体で検出された吸光度をもとに検量曲線作成し、基準となる精製IgGに含まれる抗IgE抗体濃度

をELISAで測定した。プレート間の補正のため、この基準となる精製IgGの抗IgE抗体で毎回検量線を作成し、検体の精製IgGに含まれる抗IgE抗体濃度を算出した。

(5) 抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度測定

過去の報告の方法に従い精製 IgG に含まれる抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度を測定した。Maxisorp plates に 1 μg/mL のリコンビナント可溶性 α 鎖を 100 μL 加え、4℃で一晩静置し固相化した。固相化以降は、抗 IgE 自己抗体濃度測定と同様の方法を用いた。検量曲線はヒト化抗 FcεRIα 抗体(clone CRA2)を用いて作成した。

(6) ヒトマスト細胞の培養

ヒトマスト細胞は皮膚および関節滑膜から精製し、stem cell factor(SCF)とinterleukin(IL)-6を用いて培養した。

(7) マスト細胞脱顆粒実験

Plateにマスト細胞を播種し、1 μg/mLのヒトIgEを加え感作した。刺激した細胞を回収し、qRT-PCR用 plateへ分注し、試薬(HK-1、SP、抗ヒトIgE抗体、A23187)を加え反応させた後、ヒスタミン濃度をenzyme immunoassay(EIA)法で測定した。

(8) 統計解析

統計学的解析は、GraphPad Prism 7(MDF, Tokyo, Japan)を使用した。2群間の連続変数はMann-Whitney *U* test、 非連続変数は2-sided Fisher's exact testを行った。相関関係はSpearman's rank correlation testおよび3群間の解析はone way ANOVAもしくはtwo way ANOVAを行った。*p*値は、0.05未満の場合、統計学的に有意な差があると判断した。

[結果]

CSU 患者 68 名中 12 名(17.6%)において、HK-1 が検出され、一方 NC では HK-1 は感度以下 (5 pg/mL)であった。 HK-1 は、NC よりも CSU の方が統計学的に有意に高かった ($p = 0.0089$)。 CSU 患者において血清 HK-1 濃度と抗 FcεRIα 自己抗体濃度に負の相関関係がみられた。血清 HK-1 濃度と抗 IgE 自己抗体濃度との相関は認められなかった。また、HK-1 は濃度依存性にヒトマスト細胞からヒスタミンの脱顆粒を惹起した。

[考察]

CSU 患者群の血清中 HK-1 濃度は NC と比較し有意に高く CSU 患者群の HK-1 濃度は抗 α 鎖自己抗体と負の相関を持ち、抗 IgE 自己抗体濃度と相関しない。ヒト皮膚マスト細胞は MrgX2 受容体を介し HK-1 濃度依存性にヒスタミン遊離する、ということが

明らかになった。これらの結果から HK-1 は自己抗体とは独立した機序で CSU の病態に関与する可能性が示された。また HK-1 は SP 同様に MrgX2 を介してヒスタミン遊離を惹起しえるので、ヒト皮膚マスト細胞上の MrgX2 は、CSU の予防や新規治療のターゲットとなる可能性が示された。

[結論]

CSU 患者の一群で、HK-１が MrgX2 を介し濃度依存性にヒトマスト細胞からのヒスタミンを遊離させた。CSU 患者において血清中 HK-1 濃度は NC 群と比較し有意に高値であった。また HK-1 濃度と抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度との間に負の相関がみられ、自己抗体が原因となる蕁麻疹群とは別の群の可能性があることが示唆された。

[参考文献]

[1] Metz M, Krull C, Hawro T, Saluja R, Groffik A, Stanger C, Staubach P, Maurer M: Substance P is upregulated in the serum of patients with chronic spontaneous urticaria. J Invest Dermatol. 2014; 134: 2833-2836.

[2] Zheng W, Wang J, Zhu W, Xu C, He S: Upregulated expression of substance P in basophils of the patients with chronic spontaneous urticaria: induction of histamine release and basophil accumulation by substance P. Cell Biol Toxicol. 2016; 32: 217-228.

[3] Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, Kuroda K, <u>Nunomura S, Hayama K, Terui T</u>, Ra C, <u>Okayama Y</u>: Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria. J Allergy Clin Immunol. 2014; 134: 622-633.

[4] Borbély É, Helyes Z: Role of hemokinin-1 in health and disease. Neuropeptides. 2017; 64: 9-17.

リピドミクスを用いた慢性特発性蕁麻疹 (CSU)患者血漿中の脂質メディエーターのプロファイル

Profile of lipid mediators in sera obtained from patients with chronic spontaneous urticaria using lipidomics

田杭真帆[1), 2), 3)]、豊島翔太[1), 3), 4)]、三木寿美[5)]、伊東真奈[1), 2), 3)]、遠藤嵩大[1), 2), 3)]、丹羽悠介[1), 2), 3)]、武富芳隆[5), 6)]、葉山惟大[1), 2), 3)]、坂本朋美[1), 3), 4)]、村上　誠[5), 6)]、照井　正[1), 2), 3)]、岡山吉道[1), 3), 4)]

Maho TAGUI[1), 2),3)], Shota TOYOSHIMA[1), 3), 4)], Yoshimi MIKI[5)], Mana ITO[1),2), 3)], Takahiro ENDO[1), 2), 3)], Yusuke NIWA[1), 2), 3)], Yoshitaka TAKETOMI[5), 6)], Koremasa HAYAMA, [1), 2), 3)], Tomomi SAKAMOTO-SASAKI [1), 3), 4)], Makoto MURAKAMI[5),6)], Tadashi TERUI[1), 2), 3)], Yoshimichi OKAYAMA[1), 3), 4)]

[1)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、[2)]日本大学医学部 皮膚科学系皮膚科学分野、[3)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、[4)]日本大学医学部 医学教育センター、[5)]東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター 健康環境医工学教室、[6)]東京大学大学院 医学系研究科分子細胞生物学専攻生化学・分子生物学講座細胞情報学

[要旨]

慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者では、血漿中の炎症性脂質メディエーターである 5-HETE および LTE_4 が健常人(NC)と比較し有意に高値である一方で、抗炎症性脂質メディエーターである LXA_4、PD1 および RVD2 が有意に低値であった。炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常が CSU の病態に関与している可能性が示唆された。また, 12-HETE と LXA_4 においては、CSU の重症度と有意な相関関係を認め、重症度を決定する有用なバイオマーカーになる可能性が示唆された。

[背景]

近年、リピドミクスを用いた解析によって、脂質メディエーターの量的・質的な変化が生体の恒常性やアレルギー疾患の発症に関与していることが明らかになってきている。

蕁麻疹とは、そう痒を伴う一過性の紅斑と膨疹が出没を繰り返す皮膚疾患であり、特定の誘因がなく 6 週間以上症状が続くものを慢性特発性蕁麻疹(chronic spontaneous urticarial, 以下 CSU)という。その重症度は、患者自身が膨疹の数と痒みの程度をスコ

ア化することで決定されており、重症度を示す客観的なバイオマーカーは存在しない。

[目的]

リピドミクスを用いて、CSUにおける脂質メディエーターのプロフィルを明らかにし、病態や重症度に関連する脂質メディエーターを探索することを目的とした。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-15908-12およびRK-160112-2)。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

(2) 対象

CSU患者67例、健常人(NC)27例の血漿から固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出し、LC-MSを用いて脂質メディエーターの解析を行った。

(3) リピドミクス

血漿は20 mM Tris-HCl (pH 7.4)にて10倍に希釈した。固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出した。4000Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer (AB Sciex) と液体クロマトグラフィー (liquid chromatography [LC]; NexeraX2 system; Shimazu)を用いて網羅的に酸化脂肪酸を比較解析した。脂質メディエーター量は、multiple reaction monitoring (MRM) transitionのピークの下の面積から算出した。標準量が手に入るものは絶対量を算出した[1)]。

(4) 統計解析

臨床データの2群間の統計学的解析は、Mann-Whitney *U* test を用いた。相関の評価には、Spearmanの順位相関係数を用いた。*p*値が0.05未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan)を使用した。

[結果]

CSUにおいては、アラキドン酸(AA)代謝産物の5-HETE, LTE_4がNCと比較して有意に高値であった。また、$PGF_{2\alpha}$, LXA_4はNCと比較して有意に低値であった。エイコサ

ペンタエン酸(EPA)とドコサヘキサエン酸(DHA)の代謝物では 5-HEPE, PD1, R_VD2 が NC と比較して有意に高値であった。

12-HETE と LXA_4 では CSU の重症度(UAS7 と UCT 両者)と有意な相関関係が認められたが、　12-HETE が高値ほど軽症であり、LXA_4 が高値ほど重症であった。5-HETE および 12-HETE と末梢血好塩基球数との間には正の相関が認められた。

[考察]

CSU で高値であった LTE_4 は、CysLT3 受容体を介して気管支収縮作用や血管透過性作用を及ぼす炎症性脂質メディエーターである。また Th2 細胞の活性化を増強し、好中球の機能を亢進させる。[2)]5-HETE は、IgE 依存性の刺激で好塩基球およびマスト細胞が産生することが報告されている。[3)] リポキシン(LX)は、好中球、好酸球の遊走抑制、樹状細胞における炎症性サイトカインの産生抑制等の抗炎症作用を持つ。[4)] これらのことから、CSU では、炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常が病態に関与している可能性が示唆された。

CSU の重症度と有意な相関があった 12-HETE は、好塩基球数とも有意な正の相関関係があり、好塩基球数の減少(basopenia)は重症であるとの報告[5)] があり、今回の私達の報告とも合致している。今後好塩基球数と 12-HETE の関連について検討していく。

[結論]

CSU 患者の血漿においては、炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常が CSU の病態に関与している可能性が示唆された。また、12-HETE と LXA_4 においては、CSU の重症度と有意な相関関係を認め、重症度を決定する有用なバイオマーカーになる可能性が示唆された。

[参考文献]

[1)]Sano Y, Toyoshima S, Miki Y, Taketomi Y, Ito M, Lee H, Saito S, Murakami M, Okayama Y: Activation of inflammation and resolution pathways of lipid mediators in synovial fluid from patients with severe rheumatoid arthritis compared with severe osteoarthritis. Asia Pacific Allergy. 2020; In press.

[2)]Taketomi Y, Murakami M: Immunological Regulation by Bioactive Lipids. Yakugaku Zasshi. 2017; 137: 503-515.

[3)]Warner JA, Peters SP, Lichtenstein LM, Hubbard W, Yancey KB, Stevenson HC, Miller PJ, MacGlashan Jr DW: 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? J Leukoc Biol. 1989; 45(6): 558-71.

[4]Seran C, Maddox J, Petasis N, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady H, Colgan S, Madara J: Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. Biochemistry. 1995; 34: 14609-14615.
[5]Magen E, Mishal J, Zeldin Y, Schlesinger M: Clinical and laboratory features of antihistamine-resistant chronic idiopathic urticaria. Allergy Asthma Proc. 2011; 32: 460-466.

ヒト子宮脱落膜マスト細胞の表現系解析および培養系の確立

Characterization of human decidual mast cells and establishment of a culture system

松野孝幸[1), 2)], 豊島翔太[1), 3), 4)], 坂本朋美[1), 3), 4)], 柏倉淳一[5)], 松田彰[6)], 渡部保男[6)], 東裕福[2)], 川名　敬[2)], 山本樹生[2)], 岡山吉道[1), 3), 4)]

Takayuki MATSUNO[1), 2)], Shota TOYOSHIMA[1), 3), 4)], Tomomi SAKAMOTO-SASAKI[5)], Jun-ichi KASHIWAKURA[5)], Akira MATSUDA[2)], Yasuo WATANABE[2)], Hiromitsu AZUMA [5)], Kei KAWANA[2)], Tatsuo YAMAMOTO[2)], Yoshimichi OKAYAMA[1), 3), 4)]

[1)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、[2)]日本大学医学部 外科系産婦人科、[3)]日本大学医学部 医学教育センター、[4)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、[5)]北海道大学大学院 薬学研究院衛生化学研究室、[6)]順天堂大学 眼科

[要旨]

子宮脱落膜において、マスト細胞は母体側に局在していた。子宮脱落膜から単離直後の脱落膜マスト細胞および培養脱落膜マスト細胞は、マスト細胞の表面分子マーカーである FcεRI と Kit を発現していた。また、その細胞内には、Tryptase および Chymase を発現していた。さらに、IgE 依存性の刺激で単離直後および培養脱落膜マスト細胞からの脱顆粒も観察された。したがって、培養脱落膜マスト細胞は、子宮脱落膜に局在するマスト細胞の機能および性質を検証するための有益なツールとなることが示唆された。

[背景]

母体にとって胎児は、父親由来の抗原も有しており semi-allograft であるが免疫寛容が成立している。[1, 2] 妊娠成立の過程で形成される脱落膜には、ナチュラルキラー細胞や T 細胞が局在し、妊娠過程において、胎児への免疫寛容成立に重要な役割を果たしていると考えられている。[1, 2] IgE 依存性アレルギー疾患の責任細胞であるマスト細胞も子宮脱落膜で観察されている [3)]。マウスを用いた研究では、子宮マスト細胞は着床・妊娠維持および分娩に関与していることが示唆されているが、ヒトの子宮マスト細胞の妊娠過程における役割については不明な点が多い。

[目的]

子宮脱落膜におけるマスト細胞の表現系を明らかにし、機能を解析するための培養系の確立を行うことを目的とした。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては, 日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し, 当委員会の承認を得ている(RK-150609-16)。

(2) 対象

子宮脱落膜は、人工妊娠中絶(妊娠 6～10 週)で子宮内容除去術を受けた患者より得た。

(3) 細胞単離

採取した脱落膜を細切し、1.5 mg/mL の Collagenase Type 1、0.75 mg/mL の Hyaluronidase で、37℃で 30 分間酵素処理後、Percoll を用いて比重遠心を行い、マスト細胞を分離した。分離したヒト脱落膜マスト細胞を SCF と IL-6 を含むメチルセルロース培地で培養した。

(4) フローサイトメーター解析

単離した脱落膜マスト細胞をマスト細胞のマーカーである FcεRIα、Kit、tryptase、chymase に対する抗体で染色し、発現を解析した。

(5) 蛍光免疫染色

ヒト妊娠初期脱落膜組織を tryptase で蛍光免疫染色を行った。

(6) ヒスタミン遊離試験

分離直後および培養脱落膜マスト細胞のヒスタミン遊離能を EIA 法で検討した。

(7) 統計解析

in vitro の実験データの 2 群間の統計学的解析は、Mann-Whitney U test を用いた。3 群以上の統計解析は、One-way ANOVA と Dunnett’s test を用いた。*p* 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は, GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan)を使用した。

[結果]

ヒト妊娠脱落膜組織において tryptase 陽性細胞は、主に母体面側に局在していた。フローサイトメトリー解析の結果、妊娠脱落膜マスト細胞は $FcεRI^{+}$ Kit^{+} $tryptase^{high}$ $chymase^{low}$ であった。分離した脱落膜マスト細胞を SCF と IL-6 を含むメチルセルロ

ース培地で培養すると約 12 週間後には、ほぼ 100%の純度となった。分離直後および培養脱落膜マスト細胞は FcεRI の架橋刺激でヒスタミンを遊離した (図 1)。

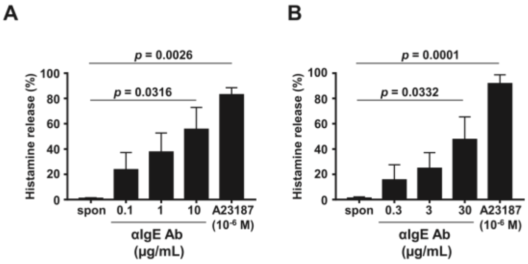


図1. IgE依存性刺激による脱落膜マスト細胞のヒスタミン遊離
(A) 分離直後 (B)培養脱落膜マスト細胞

[考察]

ヒト妊娠脱落膜の母体側にマスト細胞は存在しており、妊娠初期において妊娠の維持や胎児に対する寛容に役割を有していることが考えられた。その妊娠脱落膜マスト細胞は、tryptase および chymase を発現していたことから、粘膜結合織型マスト細胞 (MC_{TC})であると考えられる。さらに、細胞表面に機能を持った FcεRI を発現しており、IgE 依存性の刺激により活性化されることが示唆された。妊娠と IgE との関連は不明であるが、結合組織型のマスト細胞は IgE 非依存的に活性化できることから、脱落膜マスト細胞は、妊娠初期において IgE 非依存的な刺激によって活性化し、妊娠維持や寛容に寄与していることが示唆された。

[結論]

ヒト妊娠脱落膜にマスト細胞は存在していた。その脱落膜から細胞を単離し、培養することが可能である。培養によっても、マスト細胞の性質と機能を維持していた。[4)]

[参考文献]

[1)] Le bouteiller P, Bensussan A: Up-and-down immunity of pregnancy in humans. F1000Res. 2017; 6: 1216.

[2)] Ghaebi M, Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Jadidi-Niaragh F, Ahmadi M, Yousefi M: Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. Biomed Pharmacother. 2017; 88: 61-73.

[3)] Needham K, Fadia M, Dahlstrom JE, Harrington K, Shadbolt B, Robson SJ: Sig- nificance of mast cell distribution in placental tissue and membranes in spontaneous preterm birth. J Inflamm Res. 2016; 9: 141-145.

[4] Matsuno T, Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Kashiwakura JI, Matsuda A, Watanabe Y, Azuma H, Kawana K, Yamamoto T, Okayama Y: Characterization of Human Decidual Mast Cells and Establishment of a Culture System. Allergol Int. 2018; 67S: S18-S24.

喘息の病態形成に関与する気道上皮バリア脆弱化機序の検討

The investigation of the mechanism of vulnerability of airway epithelial barrier integrity in the pathogenesis of asthma

岡本真一[1),2)]、丸岡秀一郎[1),2)]、 津谷恒太[1),2)]、水村賢司[1)]、 井上寿男[1)]、神津　悠[1),2)]、 新谷榮崇[3)]、 鹿野壯太郎[1),2)]、坪井絵莉子[1)]、 曽田香織[1)]、 竹下郁子[1)]、 橋本　修[1),3)]、 權　寧博[1),2)]
Shinichi OKAMOTO[1),2)], Shuichiro MARUOKA[1),2)], Kota TSUYA[1),2)], Kenji MIZUMURA[1)], Toshio INOUE[1)], Yutaka KOZU[1),2)], Yoshitaka SHINTANI[3)], Sotaro SHIKANO[1),2)], Eriko TSUBOI[1)], Kaori SODA[1)], Ikuko TAKESHITA[1)], Shu HASHIMOTO[1),4)], Yasuhiro GON[1),2)]

[1)]日本大学医学部 内科学系呼吸器内科学分野、[2)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター
[3)]赤羽中央病院、 [4)]湘南医療大学

［要旨］

初代ヒト気管支上皮細胞(NHBE)および気道基底細胞(VA10)への dsRNA(polyI:C)刺激は、有意に上皮バリア機能形成を減弱した。TLR3、TRIF 特異的 siRNA を導入した VA10 は、polyI:C による上皮バリア機能減弱を有意に抑制したことから、polyI:C による気道上皮バリア形成の減弱化は、気道上皮分化誘導前の基底細胞内の TLR3-TRIF 経路を介しておこることがわかった。気道基底細胞へのウイルス感染が、喘息患者の上皮バリア機能の脆弱化を誘導する可能性が示唆された。

[背景]

気道上皮バリア機構は、ウイルスやアレルゲンなどの環境因子の侵入を防ぐ重要な生体防御機構である。気管支喘息(以下、喘息)患者の上皮バリア機能は、健常者と比較して脆弱であり、喘息の病態形成に上皮バリア機能が重要な役割を担っていることがわかった。[1)]我々はこれまで気道上皮細胞を用いてウイルス感染を模倣する dsRNA(PolyI:C)刺激による上皮バリア形成に及ぼす影響について報告してきた。[2)] また、幼少期のウイルス感染が、その後の喘息発症を誘導する可能性を示唆する報告もあり、[3)] 上皮バリア機能が形成される初期段階に脆弱化を決定する何らかの機序が存在することが推測される。気道には気道上皮細胞への分化能を有する基底細胞が存在している [4)] が、基底細胞へのウイルス感染が上皮バリア形成の初期段階におよぼす影響を検討した報告はない。

［目的］

本研究の目的は、気道上皮の前駆細胞である基底細胞に着目し、ウイルス感染による上皮バリアの脆弱化機序を解明し、喘息病態形成につながる分子病態を明らかにすることである。そのために初代ヒト気管支上皮細胞(NHBE)および気道基底細胞株 VA10 を用いて、ウイルス感染を模倣する dsRNA(polyI:C)刺激による上皮バリア形成に及ぼす影響について検討した。

[対象及び方法]

(1)　細胞培養

NHBE、VA10 はトランスウェルに 3 日間培養液中で培養した(Liquid Covered Culture, LCC)。その後、気道上皮細胞への分化を誘導する培養系 Air Liquid Interface(ALI)を用いて培養した。

(2)　上皮バリア機能測定

上皮バリア機能はトランスウェル上層と下層に置いた電極に電流を流し、細胞層間の電気抵抗を計測する経上皮電気抵(Trans Electric Resistance, TER)および FITC-デキストラン溶剤の拡散から、細胞間の透過性を評価する傍細胞透過率を用いた。ALI 前 3 日間のみに dsRNA で刺激し、その後、polyI:C 非存在下の ALI で培養し、上皮バリア機能を測定した。（図１）

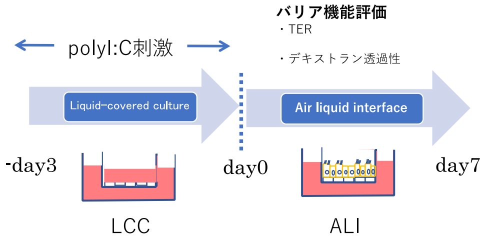


図 1　細胞培養方法および気道上皮バリア機能測定のタイムライン

NHBE、VA10 はトランスウェル上で 3 日間培養液中で培養した後(LCC)、気道上皮細胞への分化を誘導する培養系 ALI として培養した。ALI 前 3 日間のみに polyI:C で刺激し、その後は polyI:C 非存在下の ALI とし、TER、デキストラン透過性を測定した。

(3)　遺伝子発現解析

分化誘導前の NHBE に基底細胞が存在することを確認するために、基底細胞マーカーである CK5、CK14 のリアルタイム PCR を行なった。

(4)　TLR3、TRIF 特異的 small interfering RNA(siRNA)トランスフェクション

基底細胞への polyI:C 刺激が TLR3、TRIF の経路を介してバリアの減弱に関与しているかを検討するため、特異 siRNA を用いて実験を行った。VA10 に TLR3、TRIF 特異的 siRNA を Lipofectamine™ RNAiMAX を用いてトランスフェクションし、24 時間後にトランスウェル上に移し、polyI:C による刺激および ALI 培養を前述と同様に行った。経時的な TER 測定とデキストラン透過性の測定によりバリア機能への影響を検討した。

(5)　統計解析

データは Graphpad Prism7 Software(La Jolla, CA, USA)を使用し解析した。2 群間の比較は Student's *t* 検定あるいは Mann-Whitney *U* test、多群間の比較は ANOVA 検定を行った。*p* 値は 0.05 未満の場合、統計学的に有意な差があると判断した。

[結果]

ALI 前 3 日間のみに poly-I:C 刺激群はコントロール群と比較して、polyI:C 非存在下 ALI 培養後の上皮バリア機能形成が減弱した。VA10 においても同様の結果が得られた（図 1）。

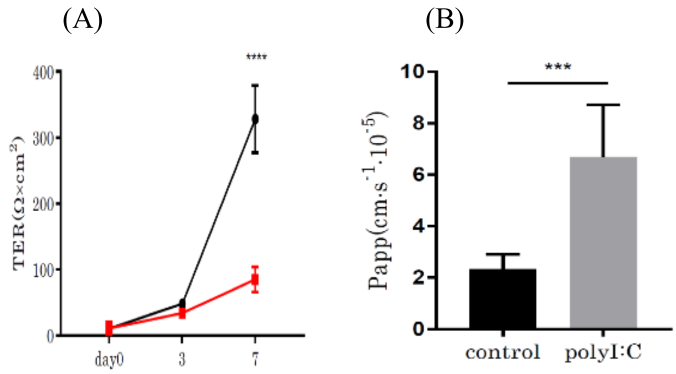


図 1　気道基底細胞株 VA10 への polyI:C 刺激が上皮バリア形成に与える影響
(A)コントロール群（黒線）と polyI:C 刺激群（赤線）で、ALI 培養開始時を第 0 日とし、第 3 日、第 7 日で TER を測定し経時的変化を検証した。成績は平均値±SDs、n＝9; ****p＜0.0001 で示した。(B) ALI 培養開始時を第 0 日とし、第 7 日にデキストランをトランスウェル上層に添加し、蛍光吸光度でデキストラン透過性を測定した。成績は実験の平均値± SDs, n = 3; ***p < 0.001 。

ALI により分化を誘導する前の NHBE は、基底細胞のマーカーである *KRT5*、*KRT14* を発現しており、その遺伝子発現は ALI 培養により減弱した。以上より分化誘導前の NHBE は主に基底細胞であることが証明できた。

TLR3、TRIF 特異的 siRNA を導入した VA10 は、コントロール siRNA を導入した VA10 と比較して、polyI:C による上皮バリア機能減弱を有意に抑制した。

[考察]

dsRNA は、気道上皮分化誘導前の基底細胞内の TLR3-TRIF 経路を介して、気道上皮バリア形成を減弱させると考えられた。

[結論]

気道基底細胞へのウイルス感染が、その後の上皮バリア形成を減弱させ、喘息病態形成に関与する可能性が示唆された。上皮バリア機能が形成される初期段階に脆弱化を決定する何らかの機序が存在することが推測され、さらなる検証が必要である。

[参考文献]

[1)]Holgate ST: Epithelium dysfunction in asthma. J Allergy Clin Immunol. 2007; 120: 1233-1244.
[2)]Gon Y, Maruoka S, Kishi H, Kozu Y, Kuroda K, Mizumura K, Nomura Y, Oshima T, Hashimoto S: DsRNA disrupts airway epithelial barrier integrity through down-regulation of claudin members. Allergol Int. 2016; 65

Suppl: S56-S58.
[3]Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, Printz MC, Lee WM, Shult PA, Reisdorf E, Carlson-Dakes KT, Salazar LP, DaSilva DF, Tisler CJ, Gern JE, Lemanske RF Jr: Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. Am J Respir Crit Care Med. 2008; 178: 667-672.
[4]Halldorsson S, Asgrimsson V, Axelsson I, Gudmundsson GH, Steinarsdottir M, Baldursson O, Gudjonsson T: Differentiation potential of a basal epithelial cell line established from human bronchial explant. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2007; 43: 283-289.

気道由来細胞外小胞 RNA はマウス LPS 誘導性肺傷害の新規バイオマーカーとなりうる
Airway extracellular vesicle RNA is a potential biomarker for endotoxin-induced lung injury

井上寿男[1)]、丸岡秀一郎[1),2)]、鹿野壮太郎[1),2)]、黒田和道[3)]、山岸賢司[4)]、曽田香織[1)]、橋本　修[1),5)]、権　寧博[1),2)]

Toshio INOUE[1)], Shuichiro MARUOKA[1), 2)], Sotaro SHIKANO[1), 2)], Kazumichi KURODA[3)], Kenji YAMAGISHI[4)], Kaori SODA[1)], Shu HASHIMOTO[1), 5)], Yasuhiro GON[1), 2)]

[1)]日本大学医学部 内科学系呼吸器内科学分野、[2)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター [3)]日本大学医学部 病態病理学系微生物学分野、[4)]日本大学工学部 生命応用化学科バイオインフォマティクス研究室、[5)]湘南医療大学

[要旨]

LPS 誘導性肺傷害の BALF の EV 内には、IL-1β、CCL3、CXCL10、Lcn2 などの炎症性および抗炎症性の RNA 情報が含まれることを示した。これらの情報は、LPS に反応した肺組織の病態生理的変化と相関しており、さらに末梢血中の細胞外小胞内においても、少なくても一部においては反映されることを明らかにした。気道および末梢血への細胞外小胞の RNA の選択的な分泌は、LPS への生体応答を反映しており、急性肺傷害におけるバイオマーカーとなる可能性を示唆した 。

[背景]

敗血症などを原因とする急性呼吸促迫症候群(ARDS)は、急性肺傷害から著名な呼吸不全を引き起こし、高い死亡率を有する予後不良な病態である。[1)] 実臨床において、早期に病態を反映したバイオマーカーは存在せず、早急に克服すべき病態の 1 つである。近年、細胞外小胞(Extracellular Vesicle, EV)は、様々な細胞から放出され、体液中に含まれており、内胞されている mRNA や miRNA を介した細胞間遺伝情報伝達への関与が示唆されている。[2)] 我々はマウス喘息モデルを用いて、肺胞洗浄液中の EV 内の遺伝子発現が喘息病態を反映するバイオマーカーとなる可能性を報告してきた。[2), 3)] しかし、気道に分泌される EV が急性肺傷害の病態を反映するかどうかは詳細な検証はなされていない。

[目的]

本研究の目的は、マウス急性肺傷害モデルである LPS(Lipopolysaccharide)経気道曝露により気道および血清中に分泌される EV 内の RNA のプロフィールの解析を行い、肺局所の病態への関与を検討することである。

[対象及び方法]

1) LPS 誘導性肺傷害モデル

マウス(C57BL/6J)に LPS (50μg/マウス)を経気道曝露し、24 時間後に気管支肺胞洗浄液(BALF)、

血清および肺組織を採取した。

2) EV 抽出、形態観察および数の定量化

ExoQiuck(SBI)を用いて EV を単離した。EV の形態は電子顕微鏡を用いて観察した。EV 数はqNano(IZON)を用いて測定した。

3) 網羅的遺伝子発現解析

単離した EV から RNA を抽出した後、次世代シーケンサー(Ion PGM Sequencer)を用いて RNA 発現解析を行った。また、肺組織の RNA との発現プロファイルと比較した。データ解析は Partek Genomics Suite、CLC Genomics Workbench、Ingenuity Pathways Analysis (IPA)などを用いて行なった。

4) 統計学的解析

データは Graphpad Prism Software(La Jolla, CA, USA)を使用し解析した。実験群間における比較には、正規分布を示すデータはスチューデント *t* 検定を用い、非正規分布を示すデータはMann-Whitney U 検定を用いて評価した。多群間の比較は one-way ANOVA 検定を行った。有意水準は $p<0.05$ とした。明記している場合を除いて、数値は平均値±標準誤差値で記載した。

[結果]

BALF から 100 nm の膜小胞が得られた。この膜小胞に EV のマーカーである Alix、teg101 が発現していた。LPS 曝露後 EV の数に変化は認められなかった。コントロール群、LPS 曝露群ともに EV 内の RNA の大部分は小さいサイズ(<200 nucleotides)であった。LPS 曝露後の EV 内の RNA 量は増加していた。BALF 中 EV と肺組織で mRNA 発現の相関は認められなかったが、LPS 刺激により有意に変動した遺伝子群については BALF 中 EV と肺組織で mRNA 発現に正の相関がみられた。その遺伝子群には炎症物質である IL-1β、MIP-1β などが認められた(表 1)。また、血清中エクソソーム内の IL-1β、CCL3、CXCL10、Lcn2、Nfkbia mRNA においては、LPS 曝露マウス群で増加する傾向があった。

Gene Symbol	Exosome RNA-Seq FoldChange	Exosome RNA-Seq (read count (average)) PBS	LPS	Lung Tissue DNA microarray FoldChange
Ccl3	1440.4	0.3	269.4	112.3
Ccl4	150.4	1.8	141.1	6.3
Irg1	145.8	1.0	126.5	87.6
CXCl10	143.3	1.1	189.4	14.9
Il1b	80.1	3.3	153.4	26.9
Nfkbia	66.8	3.3	133.7	2.3
Il1rn	50.4	4.6	187.6	14.8
CXCl2	31.7	6.2	137.5	23.9
Lcn2	28.6	6.6	174.0	7.2
Mefv	14.4	21.9	501.3	10.1
Cd274	11.5	7.6	125.6	6.2
Fth1	6.0	457.5	1971.5	1.5

表 1 BALF 中 EV で LPS 刺激により発現が変動し、肺組織でも遺伝子が同様の変動を示す遺伝子群

赤字：炎症促進の報告がある遺伝子群、

青地：炎症抑制の報告がある遺伝子群

[考察]

LPS 誘導性肺傷害の BALF の EV 内には、IL-1β、CCL3、CXCL10、Lcn2 などの炎症性および抗炎症性の RNA 情報が含まれることを示した。これらの情報は、LPS に反応した肺組織の病態生理的変化と相関しており、また、このような変化は、末梢血中の細胞外小胞内においても、少なくても一部においては、反映されることを明らかにした。

[結論]

気道および末梢血への細胞外小胞の RNA の選択的な分泌は、LPS への生体応答を反映しており、急性肺障害において診断のために役に立つバイオマーカーの可能性を示唆した。

[参考文献]

[1)]Confalonieri M, Salton, F, Fabiano F :Acute respiratory distress syndrome. Eur Respir Rev. 2017; 26: 160116.

[2)]Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007; 9: 654-659.

[3)]Gon Y, Maruoka S, Inoue T, Mizumura K, Kuroda K, Fukano Y, Yamagishi K, Tsuboi E, Hashimoto S: Gene expression analysis in airway-secreting extracellular vesicles upon house dust mite exposure. Allergol Int. 2016; 65 Suppl: S53-S55.

[4)]Gon Y, Maruoka S, Inoue T, Kuroda K, Yamagishi K, Kozu Y, Shikano S, Soda K, Lötvall J, Hashimoto S: Selective release of miRNAs via extracellular vesicles is associated with house dust mite allergen-induced airway inflammation. Clin Exp Allergy. 2017; 47(12): 1586-1598.

特発性肺線維症に特異的な新規血中自己抗体の同定
The identification of new self-antibody in the serum of patients with idiopathic pulmonary fibrosis

引地麻梨[1)]、權　寧博[1)]、丸岡秀一郎[1)]、水村賢司[1)]、高橋麻衣[1)]、森澤朋子[1),2)]、大木隆史[3)]、坪井絵莉子[1)]、橋本　修[1),4)]

Mari HIKICHI[1)], Yasuhiro GON[1)], Shuichiro MARUOKA[1)], Kenji MIZUMURA[1)], Mai TAKAHASHI[1)], Tomoko MORISAWA[1),2)], Takashi OKI[3)], Eriko TSUBOI[1)], Shu HASHIMOTO[1),4)]

[1)]日本大学医学部 内科学系呼吸器内科学分野、[2)]独立行政法人地域医療機能推進機構 山梨病院、[3)]独立行政法人地域医療機能推進機構 横浜中央病院、[4)]湘南医療大学

[要旨]

IPF 患者、健常者の血清を採取し、ヒトタンパク質マイクロアレイを用いて血清中自己抗体スクリーニングを行なった。その結果、健常者群と比較して IPF 患者群で有意に上昇する血中抗 UBE2T 抗体を同定した。構築した ELISA によっても同様の結果をえた。IPF の診断に有用なバイオマーカーとなる可能性がある。抗 UBE2T 抗体の IPF における臨床的意義、UBE2T とその自己抗体の線維化過程における役割を、今後さらに検討する必要があると考えられる。

[背景]

特発性肺線維症(Idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)は肺に原因不明の線維化を生じる疾患で、類似する画像・病理所見を有する肺疾患が多いことから、IPF の診断は極めて困難であり、5 年生存率が 30～50%の予後不良な疾患である。[1),2)] 年 IPF における新規の血中自己抗体が複数報告されるようになり、[3),4),5)] 既存の確立した血中自己抗体の検査が、IPF の自己免疫病態や病型ごとの固有の特徴を正確に反映しているかどうかについて、疑問がもたれるようになった。このように病変部における過剰免疫が IPF の基礎病態に何らかの影響を及ぼしている可能性は高く、IPF の自己免疫病態を反映する新たな指標を同定することは重要である。

[目的]

本研究の目的は、IPF に特異的な新規血中自己抗体の探索を行い、新規疾患バイオマーカーとしての臨床的意義を検証することである。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている。

(2) 対象

2011 年 10 月から 2018 年 3 月に日本大学医学部附属板橋病院　呼吸器内科を受診した IPF 患者、または健常ボランティアより血清を採取した。検体の提供者には本研究への参加に際し、血液の利用と診療記録の閲覧に関して文書による説明と同意を得た。

(3) 血清中自己抗体スクリーニング

ヒトタンパク質マイクロアレイ(ProtoArray v5.0 Human Protein Microarray® (Invitrogen. Carlsbad, CA))を用いて IPF 9 例(女性)および健常者 9 例(女性)の血清中に存在する 9000 種類のタンパクに対する自己抗体を探索した。

(4) 標的自己抗体の測定

標的自己抗体に対する Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA)法による測定系を確立し、健常者(control) n=61、慢性過敏性肺炎(CHP) n=6、サルコイドーシス(sarcoidosis) n=14、 interstitial pneumonia with autoimmune features (IPAF) n=10、特発性肺線維症(IPF) n=43、膠原病に伴う間質性肺炎(CTD-ILD) n=12 の各群の血清抗 UBE2T 抗体濃度を ELISA 法で測定した。

(5) 統計学的解析

データは Graphpad Prism version 5.04 を使用し解析した。3 群間以上における自己抗体の蛍光強度または濃度の比較には Kruskal-Wallis 検定、事後比較として Dunn 検定を用いた。2 群間における自己抗体濃度や患者背景の比較には Mann-Whitney U 検定、フィッシャーの正確確率検定、Spearman 順位相関分析を用いて検討した。有意水準は $p<0.05$ とした。明記している場合を除いて、数値は平均値±標準誤差で記載した。

[結果]

ヒトタンパク質マイクロアレイにより健常群と比較して、IPF 患者群で有意に高値を示した抗 ubiquitin enzyme 2T(UBE2T)抗体を同定した。構築した ELISA により血中抗 UBE2T 抗体値を測定した(図１)。IPF と CTD-ILD は健常群と比較し有意に抗 UBE2T 抗体濃度が高かった。

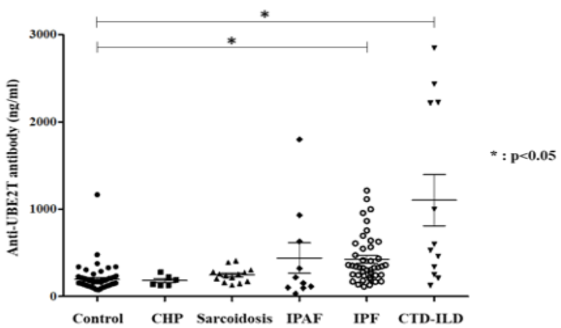


図 1　ELISA 法による各群の血清抗 UBE2T 抗体濃度測定

健常者(control) n=61、慢性過敏性肺炎(CHP) n=6、サルコイドーシス(sarcoidosis) n=14、 interstitial pneumonia with autoimmune features (IPAF) n=10、特発性肺線維症(IPF) n=43、膠原病に伴う間質性肺炎(CTD-ILD) n=12 の各群の血清抗 UBE2T 抗体濃度を ELISA 法で測定した。

[考察]

IPF 患者の血清中自己抗体スクリーニングで、血中抗 UBE2T 抗体を同定した。構築した ELISA により、IPF の診断に有用なバイオマーカーとなる可能性がある。

[結論]

抗 UBE2T 抗体の IPF における臨床的意義、UBE2T とその自己抗体の線維化過程における役割を、今後さらに検討する必要があると考えられる。

[参考文献]

1) Lynch DA, Sverzellati N, Travis WD, Brown KK, Colby TV, Galvin JR, Goldin JG, Hansell DM, Inoue Y, Johkoh T, Nicholson AG, Knight SL, Raoof S, Richeldi L, Ryerson CJ, Ryu JH, Wells AU: Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper. Lancet Respir Med. 2018; 6(2): 138-153.

2) Fernandez Perez ER, Daniels CE, Schroeder DR, St Sauver J, Hartman TE, Bartholmai BJ, Yi ES, Ryu JH: Incidence, prevalence, and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based study. Chest. 2010; 137(1): 129-137.

3) Kahloon RA, Xue J, Bhargava A, Csizmadia E, Otterbein L, Kass DJ, Bon J, Soejima M, Levesque MC, Lindell KO, Gibson KF, Kaminski N, Banga G, Oddis CV, Pilewski JM, Sciurba FC, Donahoe M, Zhang Y, Duncan SR: Patients with idiopathic pulmonary fibrosis with antibodies to heat shock protein 70 have poor prognoses. Am J Respir Crit Care Med. 2013; 187(7): 768-775.

4) Li FJ, Surolia R, Li H, Wang Z, Kulkarni T, Liu G, de Andrade JA, Kass DJ, Thannickal VJ, Duncan SR, Antony VB: Autoimmunity to Vimentin Is Associated with Outcomes of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. J Immunol. 2017; 199(5): 1596-1605.

5) Taille C, Grootenboer-Mignot S, Boursier C, Michel L, Debray MP, Fagart J, Barrientos L, Mailleux A, Cigna N, Tubach F, Marchal-Sommé J, Soler P, Chollet-Martin S, Crestani B: Identification of periplakin as a new target for autoreactivity in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2011; 183(6): 759-766.

ダニアレルゲン(HDM)によるマウス喘息モデルにおける アンジオテンシン変換酵素 2(angiotensin converting enzyme 2; ACE2)の役割

The role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in the house dust mite-induced allergic airway inflammation

福田麻佐美 [1), 2)]、丸岡秀一郎 [1), 2)]、山田志保 [1), 2)]、黒澤雄介 [1), 2)]、神津　悠 [1), 2)]、 權　寧博 [1), 2)]
Asami FUKUDA[1), 2)], Shuichiro MARUOKA[1), 2)], Shiho YAMADA[1), 2)], Yusuke KUROSAWA[1), 2)], Yutaka KOZU[1), 2)], Yasuhiro GON[1), 2)]

[1)]日本大学医学部 内科学系呼吸器内科学分野、[2)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター

[要旨]

ハウスダストダニアレルゲン(house dust mite, HDM)誘導性喘息モデルの炎症増幅過程における肺組織を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、有意に発現が減少するアンジオテンシン変換酵素 2(angiotensin converting enzyme 2; ACE2)を同定した。ACE2 の活性化物質である diminazene aceturate(DIZE)の腹腔内投与群は、コントロール群と比較して HDM による BALF 中の好酸球浸潤、肺組織への炎症性細胞浸潤および粘液産生細胞の過形成、気道過敏性の亢進のいずれも抑制した。HDM による BALF 中 IL-5、 IL-13 の上昇、IL-10 の減少、肺組織の IL-33、CCL20 の上昇をいずれも抑制した。ACE2 は HDM 誘導性アレルギー性気道炎症を抑制的に制御している可能性が示唆された。また、ACE2 は喘息新規治療薬の標的分子となる可能性が示唆された。

[背景]

気管支喘息(以下、喘息)の病態は、HDM に代表される環境因子により誘導されるアレルギー性気道炎症といわれているが、いまだに不明な点が多く、現行の治療に抵抗性を示す重症患者も少なくない。新たな治療につながる病態解明は急務である。これまで HDM 誘導性マウス喘息モデルを用いて、HDM 感作によるアレルギー性気道炎症の増幅機序を解明してきた [1)] が、治療標的となりうる分子の同定には至っていない。

[目的]

本研究の目的は、HDM によるアレルギー性気道炎症の増幅過程で発現が変動する分子群から、新たな治療標的となりうる分子を同定し、新規喘息治療薬を見出すことである。

[対象及び方法]

(1) HDM を用いたマウス喘息モデル

本実験は「日本大学動物実験運営内規」を遵守し、動物実験計画書の通り行った。C57BL/6J マウスに HDM を 3 回(第 0、7、14 日)経気道的に投与した。第 17 日に気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid; BALF)中の好酸球数、BALF および肺組織中のサイトカイン産生を

ELISA 法で測定した。また、肺組織への炎症細胞の浸潤および粘液細胞の過形成、気道過敏性亢進の有無を評価し、喘息病態形成を確認した。

(2) 網羅的遺伝子発現解析

第 0、3、7、10、14、17 日にマウス肺組織から全 RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、発現が変動する標的分子を同定した。

(3) 標的分子に作用する薬剤による HDM 誘導性アレルギー性気道炎症抑制効果

Control あるいは HDM を第 0、7、14 日に経気道的に投与し、第 10〜16 日に Control あるは新規薬剤の腹腔内投与を行い、第 17 日に BALF 中の肺組織中の IL-5 の好酸球数の測定およびサイトカイン産生を ELISA 法で測定した。また、肺組織への炎症細胞の浸潤および粘液細胞の過形成、気道過敏性亢進の抑制効果も検証した。

(4) 統計学的解析

データは Graphpad Prism Software(La Jolla, CA, USA)を使用し解析した。実験群間における比較には、正規分布を示すデータはスチューデント t 検定を用い、非正規分布を示すデータは Mann-Whitney U 検定を用いて評価した。有意水準は $p<0.05$ とした。明記している場合を除いて、数値は平均値±標準誤差値で記載した。

[結果]

マイクロアレイのチップに実装されている 28944 遺伝子から、網羅的遺伝子発現解析を行い、第 17 日のコントロール群と HDM 群を比較し、有意に変動している遺伝子を 9293 同定した。さらに 5 倍以上発現が減少していた 17 遺伝子の 1 つとして、ACE2 を同定した。ACE2 はアンジオテンシンIIをアンジオテンシン(1-7)へ変換する酵素であり、アンジオテンシン(1-7)/Mas receptor 経路を介して抗炎症作用や抗線維化作用を示す[2)]。ACE2 の活性化物質である diminazene aceturate(DIZE)の腹腔内投与群は、コントロール群と比較して HDM による BALF 中の好酸球浸潤、肺組織への炎症性細胞浸潤および粘液産生細胞の過形成、気道過敏性の亢進のいずれも抑制した。HDM による BALF 中 IL-5、 IL-13 の上昇、IL-10 の減少、肺組織の IL-33、CCL20 の上昇をいずれも抑制した。

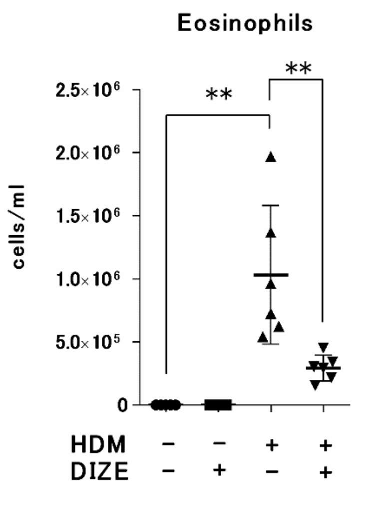


図 1　DIZE 投与による HDM 誘導性アレルギー性気道炎症抑制効果

HDM 100μg/マウスまたはコントロールを第 0、7、14 日に経気道投与し、DIZE またはコントロールを第 10〜16 日に腹腔内投与し、第 17 日に BALF を採取した（n=6、 **：p＜0.01）

[考察]

HDM 誘導性マウス喘息モデルを用いて、網羅的遺伝子発現解析から ACE2 を同定した。ACE2 は HDM 誘導性のアレルギー性気道炎症を抑制的に制御している可能性が示唆された。ACE2 活性化物質の投与により HDM 誘導性アレルギー性気道炎症が抑制されたことから ACE2 は喘息新規治療薬の標的分子となる可能性が示唆された。

[結論]

ACE2 活性化物質である DIZE は、喘息の新規治療薬となる可能性がある。

[参考文献]

[1)] Koyama D, Maruoka S, Gon Y, Shintani Y, Sekiyama T, Hiranuma H, Shikano S, Kuroda K, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S: Myeloid differentiation-2 is a potential biomarker for the amplification process of allergic airway sensitization in mice. Allergol Int. 2015; 64 Suppl: S37-S45.

[2)] Tan WSD, Liao W, Zhou S, Mei D, Wong WF: Targeting the renin-angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases. Curr Opin Pharmacol. 2018; 40: 9-17.

ヒト化マウスを用いた難治性喘息モデルの開発

The development of human refractory asthma model using humanized mice

山田志保[1), 2)]、丸岡秀一郎[1), 2)]、福田麻佐美[1), 2)]、黒澤雄介[1), 2)]、豊島翔太[1), 2), 3), 4)]、岡山吉道[2), 3), 4)]、伊藤亮治[3)]、伊藤　守[3)]、權　寧博[1),2)]

Shiho YAMADA[1), 2)], Shuichiro MARUOKA[1), 2)], Asami Fukuda[1), 2)], Yusuke KUROSAWA[1), 2)], Shota TOYOSHIMA[1), 2), 3), 4)], Yoshimichi OKAYAMA[2), 3), 4)], Ryoji ITO[3)], Mamoru ITO[3)], Yasuhiro GON[1), 2)]

[1)]日本大学医学部 内科学系呼吸器内科学分野、[2)]日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、[3)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、[4)]日本大学医学部 医学教育センター、[5)]実験動物中央研究所

[要旨]

ヒト造血幹細胞を移入してヒト免疫系細胞を有したヒト免疫系細胞(好酸球、好塩基球、マスト細胞など)を有する IL3/G-CSF/IL5 トリプルトランスジェニックマウス(トリプル Tg マウス)への hIL-33 単独投与により BALF 中のヒト好酸球浸潤、IL-5、IL-13 産生、杯細胞過形成、気道過敏性亢進を認め、喘息病態を再現することができた。この hIL-33 単独投与による BALF 中のヒト好酸球浸潤、杯細胞過形成はステロイド投与によって抑制されるが、hIL-33＋hTSLP 投与による BALF のヒト好酸球浸潤は、ステロイド投与後も抑制されず、ステロイド抵抗性を示した。以上よりこのヒト化マウスを用いることでヒト難治性喘息病態を再現でき、新たな分子病態の解明や新規薬剤開発できる可能性が示唆された。

[背景]

気管支喘息(以下、 喘息)は慢性の気道炎症が主な病態であり、吸入ステロイドは治療管理において有効な薬剤であるが、その一方でステロイド抵抗性を有する難治性喘息患者が約 10%存在している。そのため難治性喘息の分子病態を解明し、新規治療薬を開発することは本疾患の克服において重要な課題である。近年、気道上皮由来のサイトカインである IL-33 及び Thymic stromal lymphopoietin(TSLP)が喘息の難治化(ステロイド抵抗性)に関与していることが報告され、[1)] 自然免疫を介した難治性喘息の分子病態が注目されている。しかし、ヒトにおいて難治性喘息の病態を再現し、難治性気道炎症を経時的に解析することは非常に困難である。

[目的]

本研究の目的は、ヒト造血幹細胞を移入してヒト免疫系細胞を有したヒト免疫系細胞(好酸球、好塩基球、マスト細胞など)を有する IL3/G-CSF/IL5 トリプルトランスジェニックマウス(トリプル Tg マウス)を用いて喘息モデルを構築し、[2)] ヒト免疫細胞の難治化病態を解明することである。これにより、 ヒト難治性喘息の新たな分子病態の解明や新規薬剤開発に応用できる可能性が示唆された。

[対象及び方法]

(1) マウス喘息モデル

本実験は「日本大学動物実験運営内規」を遵守し、動物実験計画書の通り行った。トリプル Tg マウスに humanIL-33(hIL-33)を気管内投与し、第 7 日に気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid; BALF)中のヒト好酸球数、ヒトサイトカインを測定した。また、肺組織への炎症細胞の浸潤および粘液細胞の過形成、気道過敏性亢進の有無を評価し、喘息病態形成を確認した。

(2) ヒト化マウスによるステロイド抵抗性喘息モデルの構築

トリプル Tg マウスに、第 1-3 日に humanIL-33(hIL-33)および humanTSLP(hTSLP)を気管内投与、ステロイドを第 0-3 日に腹腔内投与し、第 7 日に肺胞洗浄液中のヒト好酸球浸潤、ヒト IL-5 を検証し、ステロイド抵抗性の有無を評価した。

(3) 統計学的解析

データは Graphpad Prism Software(La Jolla, CA, USA)を使用し解析した。実験群間における比較には、正規分布を示すデータはスチューデント t 検定を用い、非正規分布を示すデータは Mann-Whitney U 検定を用いて評価した。有意水準は $p<0.05$ とした。明記している場合を除いて、数値は平均値±標準誤差値で記載した。

[結果]

hIL-33 単独投与により BALF 中のヒト好酸球浸潤、IL-5、IL-13 産生、杯細胞過形成、気道過敏性亢進を認め、喘息病態をを再現することができた。[2] hIL-33 単独投与による BALF 中のヒト好酸球浸潤、杯細胞過形成はステロイド投与によって抑制された。一方で hIL-33＋hTSLP 投与による BALF のヒト好酸球浸潤は、ステロイド投与後も抑制されず、ステロイド抵抗性を示した(図 1)。

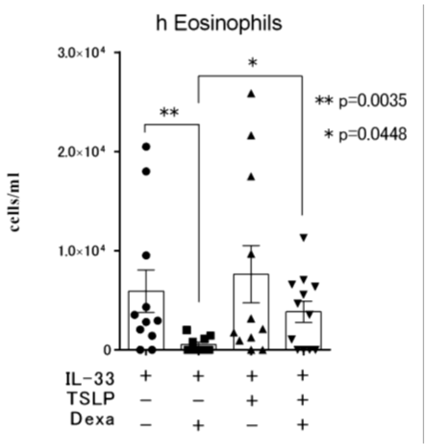


図 1　ヒト化マウスを用いた難治性喘息モデル作成
トリプル Tg マウスに、第 1-3 日に hIL-33(IL-33)＋hTSLP(TSLP)を気管内投与、ステロイド(DEX)を第 0-3 日に腹腔内投与し、第 7 日に BALF 中のヒト好酸球(h Eosinophils)数を測定し、ステロイド抵抗性の有無を評価した。

[考察]

トリプル Tg マウスへの hIL-33＋hTSLP 投与により、BALF のヒト好酸球浸潤は、ステロイド投与後も抑制されず、ステロイド抵抗性を示した。以上よりヒト化マウスを用いてヒト難治性喘息病態を再現することができた。

[結論]

ヒト化マウスによるヒト難治性喘息モデルを活用することで新たな分子病態の解明や新規薬剤開発できる可能性が示唆された。

[参考文献]

[1)]Kabata H, Moro K, Fukunaga K, Suzuki Y, Miyata J, Masaki K, Betsuyaku T, Koyasu S, Asano K: Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. Nat Commun. 2013; 4: 2675.

[2)]Ito R, Maruoka S, Soda K, Katano I, Kawai K, Yagoto M, Hanazawa A, Takahashi T, Ogura T, Goto M, Takahashi R, Toyoshima S, Okayama Y, Izuhara K, Gon Y, Hashimoto S, Ito M, Nunomura S: A humanized mouse model to study asthmatic airway inflammation via the human IL-33/IL-13 axis. JCI Insight. 2018; 3(21): e12158

FcεRI の凝集により活性化したヒトマスト細胞が遊離する細胞外小胞中の miR103a-3p は, 2 型自然リンパ球からの IL-5 産生を増強させる

miR103a-3p in extracellular vesicles from FcεRI aggregated human mast cells enhances IL-5 production from type2 innate lymphoid cells

豊島翔太 1), 2), 3), 坂本朋美 1), 2), 3), 黒澤雄介 3), 4), 葉山惟大 3), 5), 松田　彰 6), 渡部保男 6), 照井　正 3), 5), 權　寧博 3), 4), 松本健治 7), 岡山吉道 1), 3), 4)

Shota TOYOSHIMA1), 2), 3), Tomomi SAKAMOTO-SASAKI1), 2), 3), Yusuke KUROSAWA3), 4), Koremasa HAYAMA3),5), Akira MATSUDA6), Yasuo WATANABE6), Tadashi TERUI 3), 5), Yasuhiro GON3), 4), Kenji MATSUMOTO7), Yoshimichi OKAYAMA1), 2), 3)

1)日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、2)日本大学医学部 医学教育センター、3)日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、4) 日本大学医学部 内科学系呼吸器内科、5)日本大学医学部 皮膚科学系皮膚科学分野、6) 順天堂大学 眼科、7)国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部

[要旨]

マスト細胞 (Mast Cells: MCs)と 2 型自然リンパ球 (Group 2 innate lymphoid cells: ILC2)の相互作用が、アレルギー疾患の増悪化に重要な役割を果たす。近年、細胞が遊離する細胞外小胞(Extracellular Vesicles: EVs)は、miRNA やタンパク質を内包し、受け手側の細胞の表現系や機能を制御することが明らかにされ、細胞間相互作用の新たな様式として注目されている。しかし、MCs と ILC2 において、EVs を介する相互作用はまだ言及されていなかった。IgE 依存性に活性化したマスト細胞から遊離された EVs は、ILC2 からの 2 型サイトカインの一つである IL-5 の産生を有意に増強させた。この EVs には、miRNA の一つである miR103a-3p の発現が特異的に増加していた。この miR103-3p は、ILC2 内で、protein arginine methyltransferase protein 5 (PRMT5)の発現を抑制し、転写因子の GATA3 の脱メチル化を促進することで、IL-5 産生を増強していた。さらに、アトピー性皮膚炎患者の血清 EVs 中では、miR103a-3p の発現が有意に高知であった。したがって、IgE 依存性に活性化したマスト細胞から遊離される EVs は、IL-5 産生を増強させ、好酸球性炎症を増悪化させていることが示唆された。 (図 1)

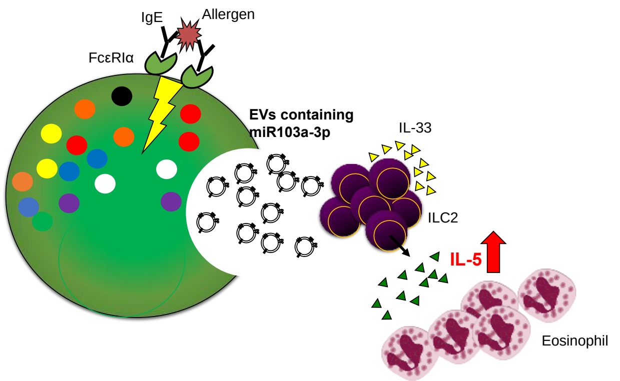


図1. IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されるEVsは、IL-5産生を増強させ、好酸球性炎症を増悪化させている

[背景]

IgE 依存性に活性化した MCs は、ヒスタミン、IL-5 や IL-13 などの 2 型サイトカインおよび脂質メディエーターなどを産生し、アトピー性皮膚炎や気管支喘息などの IgE 依存性の

アレルギー疾患の発症・増悪に寄与することが知られている。[1), 2)] ILC2 も 2 型サイトカインを産生し、アレルギー疾患や寄生虫感染防御に寄与している。[3), 4)] アレルギー疾患や寄生虫感染において、MCs が産生するサイトカインや脂質メディエーターが、ILC2 の機能を制御することが報告されている。[5)] つまり、MCs と ILC2 の相互作用は、アレルギー疾患の発症や増悪化に重要である。細胞は microRNA (miRNA)を内包した EVs を遊離し、受け手側の細胞の表現系や機能発現に影響を及ぼすことが明らかになった。[6), 7)] しかしながら、アレルギー疾患における IgE 依存性に活性化した MCs が遊離する EVs の役割はまだ言及されていない。

[目的]

本研究では IgE 依存性に活性化したヒト MCs が遊離する EVs が、ILC2 の機能に及ぼす影響を検証することを目的とした。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては, 日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-150908-12 および RK-160112-2)。

(2) ヒトマスト細胞の培養

ヒト滑膜マスト細胞は、変形性関節症の滑膜組織から分離培養した。滑膜組織を採取後ただちに 2% FBS、100 IU/mL の streptomycin/penicillin および 1% fungizone を含んだ IMDM に入れ細切した。 1.5 mg/mL の collagenase type I と 0.75 mg/mL の hyaluronidase を用いて 37℃で 1 時間反応させた。比重遠心によってマスト細胞の前駆細胞を単離し 100 ng/mL の recombinant human (rh) SCF および 50 ng/mL の rhIL-6 を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM)で培養した。

(3) 細胞外小胞の単離

ヒト培養滑膜 MCs を刺激なし、100 ng/mL の IL-33、 IgE もしくは IgE+抗 IgE 抗体で 24 時間刺激し細胞上清を回収した。回収した細胞上清に ExoQuick-TC を添加し、一晩反応させ、6,000 x g、30 分遠心を行い、EVs を単離した。

(4) ヒト ILC2 の単離・培養

末梢血から LSM を用いて末梢血単核球から単離し、CD3、CD4、 CD8、CD11b、CD14、CD16 そして CD19 Microbeads を用いて lineage 陰性細胞を単離した。この細胞から $Lin^-CD45^+CRTh2^+CD161^+$細胞 (ILC2)を FACS Aria IIu で単離した。単離した ILC2 をマイトマイシン処理した末梢血単核球と 100 IU/mL の IL-2 存在下で培養した。

(5) サイトカイン測定

ILC2 の培養上清中の IL-5 および IL-13 は ELISA で測定した。

(6) 統計解析

3 群以上の統計解析は two-way analysis of variance (ANOVA)および Turkey's multiple comparison test もしくは one-way ANOVA および Turkey's multiple comparison test で行った。臨床データの 2 群間比較は、Mann-Whitney *U* test。*p* 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は, GraphPad Prism 8 (MDF, Tokyo, Japan)を使用した。

[結果]

抗 IgE 抗体刺激したヒト MCs 由来の EVs (anti-IgE-EVs)は, IL-33 刺激による ILC2 からの IL-5 産生を有意に増強させたが、IL-13 産生には影響を及ぼさなかった(図 2)。miRNA の網羅的解析を行ったところ、anti-IgE-EVs 中では、miR103a-3p や miR23b-3p を含んだ 7 個の miRNA の発現が特異的に上昇していた (図 3)。 リアルタイム PCR で実際の発現を解析したところ、miR103a-3p および miR23b-3p が anti-IgE-EVs で特異的に発現が上昇していた。この二つの miRNA のうち Anti-IgE-EVs と共培養した ILC2 においては、miR103a-3p の発現が有意に増強していた。miR103a-3p の過剰発現によって, ILC2 からの IL-33 刺激による IL-5 産生が増強された。miR103a-3p の標的となる遺伝子を *in silico* で探索したところ、protein arginine methyltransferase protein 5 (PRMT5)が標的となることが明らかになった。Anti-IgE-EV と共培養および miR103a-3p を過剰発現した ILC2 においては、PRMT5 の発現低下が認められた。さらに、miR103a-3p の過剰発現は、GATA3 の脱メチル化も増強した。また、アトピー患者血清中 EVs の miR103a-3p の発現レベルは、健常コントロール血清中の EVs の miR103a-3p の発現レベルよりも有意に高値であった (図 4)。

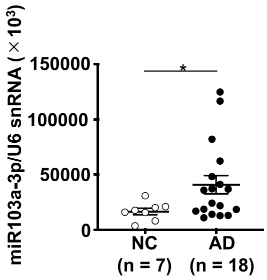


図4. アトピー性皮膚炎患者におけるmiR103a-3pの発現

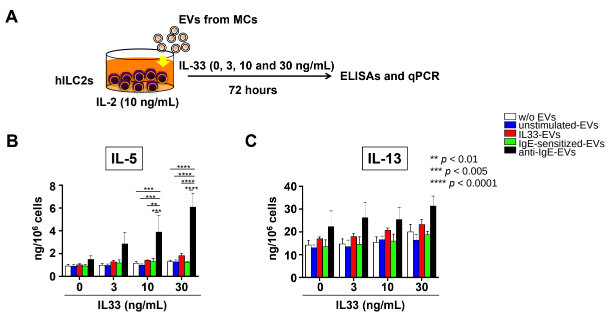


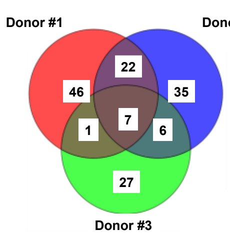
図2. IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されるEVsは、ILC2からのIL-33依存性IL-5産生を増強させる。
(A) マスト細胞由来のEVsとの共培養実験プロトコール (B, C) 共培養上清中サイトカイン濃度 (B) IL-5 (C) IL-13

[考察]

IgE 依存性の刺激によって活性化したマスト細胞は、miR103a-3p を含んだ EVs を遊離し、ILC2 がその EVs を取り込むと PRMT5 の発現が低下し、メチル化された GATA3 から脱メチル化された GATA3 へとなり、ILC2 からの IL-5 の産生を増強させることが示唆された。さらに、EVs 中の miR103a-3p は、アトピー性皮膚炎の発症・増悪化に関与している可能性が考えられた。

[結論]

IgE 依存性に活性化されたマスト細胞由来の EVs は、miR103a-3p を含有し、ILC2 などの IL-5 産生細胞からの IL-5 産生を増強させることで、好酸球性炎症の増悪化に寄与している可能性が考えられた。



	Donor #1	Donor #2	Donor #3
miR134-5p	107.1	99.7	3.0
miR1290	3.9	14.1	3.9
miR23b-3p	38.0	2.3	2.4
miR103a-3p	6.4	3.2	2.8
miR3940-5p	4.6	3.5	3.7
miR4734	36.3	58.0	72.8
miR6728-5p	2.6	3.5	2.2

図3. IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されるEVs特異的なmiRNA
IgE感作したマスト細胞から遊離されたEVs中のmiRNAの発現を"1"とした時、IgE + anti-IgE Absで刺激したマスト細胞から遊離されたEVs中のmiRNAの発現

[参考文献]

[1] Galli SJ, Tsai M: IgE and mast cells in allergic disease. Nat Med. 2012; 18: 693-704.

[2]Liu FT, Goodarzi H, Chen HY: IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. Clin Rev Allergy Immunol. 2011; 41: 298-310.

[3]Artis D, Spits H: The biology of innate lymphoid cells. Nature. 2015; 517: 293-301.

[4] Mjösberg J, Spits H: Human innate lymphoid cells. J Allergy Clin Immunol. 2016; 138: 12651276.

[5]Xue L, Salimi M, Panse I, Mjösberg JM, McKenzie AN, Spits H, Klenerman P, Ogg G: Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. J Allergy Clin Immunol. 2014; 133: 1184-1194.

[6]Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007; 9: 654-659.

[7]Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Thery C: Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. Nat Cell Biol. 2019; 21: 9-17.

乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーの同定

Identification of biomarkers for predicting the recurrent wheezing from patients with viral lower respiratory infection on the first episode of wheeze

菅井和子 [1),2)]、木村博一 [3)]、坂本朋美 [4),5),6)]、塚越博之 [7)]、岡山吉道 [4),5),6)]

Kazuko SUGAI [1), 2)], Hirokazu KIMURA [3)], Tomomi SAKAMOTO-SASAKI [4), 5), 6)], Hiroyuki TSUKAGOSHI [7)], Yoshimichi OKAYAMA[4), 5), 6)]

[1)] 国立病院機構福山医療センター小児科、[2)] すがいこどもクリニック、[3)] 群馬パース大学、[4)]日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、[5)] 日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、[6)] 日本大学医学部 医学教育センター、[5)]すがいこどもクリニック、[7)] 群馬県衛生環境研究所

[要旨]

MIP-1α が乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーとして同定された。

[背景と目的]

乳幼児期の気道ウイルス感染、特に、Respiratory Syncytial Virus(RSV)と Human Rhinovirus (HRV)は、欧米のハイリスク児のコホート研究から、反復性喘鳴や喘息発症、学童期以降の肺機能低下への関与が報告されてきた。[1)] しかし、乳幼児期早期の呼吸器感染における起因病原体、ウイルスの種類とその後の喘息発症との関係性は低いことが最近報告され、[2)] 病原体同定のみで喘息発症予測は困難であることが示唆された。そのため乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーの同定を試みた。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部および国立病院機構横浜医療センターの倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-151013-6)。

(2) 対象とプロトコール

反復喘鳴発症を予測する指標の同定を目的に、下気道ウイルス感染に伴う初回喘鳴で国立病院機構横浜医療センター小児科に入院した乳幼児を対象に、2 年半後の反

復喘鳴有無とその予測因子に関し検討した。喘鳴を初めて呈し下気道感染症にて入院した乳幼児(82 例、中央値 5.0 ヶ月 0-50 ヶ月) を対象とした。明らかな細菌感染による下気道感染症の児、ステロイド薬投与を行っている児、早産児は除外した。入院第 1 日目に、研究説明同意を行い、採血、鼻汁吸引物採取を行い、同時に、鼻汁スメアも作成した。採取鼻汁は-80℃で保存後、RT-PCR 法により RSV(A,B 型)、HRV(A-C 型)ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス(1-4 型)、インフルエンザウイルス(A-C 型)、アデノウイルス、ヒトボカウイルスを検索、また鼻汁中の各種サイトカイン、ケモカインを一度に 27 種類のサイトカイン等が測定可能な Bio-Plex ®マルチプレックス分析システムもしくは Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(酵素結合免疫吸着法)にて測定した。さらに、鼻汁中の総 IgE、抗 RSV-IgE 抗体、抗 RSV-IgG 抗体、トリプターゼの測定を行った。初回喘鳴入院 2 年半経過後、外来にて診察もしくは保護者に電話し、その後の喘鳴症状(医師にて診察上確認されたもの)の確認をした。反復喘鳴の定義は、2 回以上の喘鳴とした。

(3) 統計解析

臨床データの 2 群間の統計学的解析および in vitro の実験の 3 群間の統計学的解析は Mann-Whitney U test を用いて $p < 0.05$ を有意とした。in vitro の実験の 2 群間の統計学的解析は unpaired Student t-test を用いて $p < 0.05$ を有意とした。鼻汁中のバイオマーカーに関しては、変数減少法を用いた二項ロジスティック解析を行った。

[結果]

初回喘鳴後、対象児 82 例中 49 例に反復喘鳴がみられた。両親の喘息家族歴や患者本人の食物アレルギー、アトピー性皮膚炎有無によるその後の反復喘鳴の差はなかったが、食物アレルギーを有する児で反復喘鳴をきたす割合が高い傾向がみられた(p = 0.184)。初回喘鳴児の入院時鼻汁スメアの細胞分画では、好中球、好酸球、リンパ球、単球・マクロファージ全ての細胞の割合において、入院後の反復喘鳴有無で有意差は認めなかった。初回喘鳴時の患者の鼻汁中から RT-PCR 法を実施した 60 名における検出ウイルスにおいては、93%の患者より何らかの呼吸器ウイルスが検出され、RSV、HRV、RSV と HRV の混合感染がその半数以上を占めていた。RSV、HRV 各ウイルス陽性者、陰性者間でその後の反復喘鳴発症率には差はなかった。初回喘鳴時の鼻汁中の主要なバイオマーカーの反復喘鳴発症有無で比較をしたところ、ウイルス感染それ自体で誘導されるインターフェロン(IFN)、Th1 サイトカインに関しては、IFN-α、IL-2 で有意に、初回喘鳴後反復喘鳴を呈した群で高値であったが、強い抗ウイルス活性を持つ IFN-α では有意差は認めなかった。気管支喘息において、気道リモデリング、気道炎症への関与が大きいとされ、近年注目されている気道上皮由来のサイトカインである Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) 、IL-33、IL-25 は、いずれも有意差はなかっ

た。また、IL-4、IL-5、IL-13 といったアレルギーに大きく関与する Th2 サイトカイン、マスト細胞からの化学伝達物質であるトリプターゼでも有意差はみられなかった。IL-9 においても反復喘鳴児で有意に高値であったが、MIP-1α、MIP-1β において特に有意差が強く認められた。これら様々なバイオマーカーに関し、変数減少法を用いた二項ロジスティック解析を行ったところ MIP-1α において、初回喘鳴後の反復喘鳴因子として有意(p = 0.015)なオッズ比(7.72)が得られた。

[考察]

MIP-1α は、マクロファージ、樹状細胞、リンパ球など多くの細胞から産生されるケモカインの一種であり、好酸球、単球やリンパ球遊走に関与する。この MIP-1□が高値であることは、呼吸器ウイルス感染が、気道炎症、気道過敏性亢進、気道リモデリングに影響を及ぼしていることが考えられる。乳幼児がウイルス感染による喘鳴をきたした場合、現在までその後の反復喘鳴、喘息発症における明確な予測因子はなかったが、今回の研究結果で MIP-1α が予測因子として有用である可能性が示唆された。しかし、本研究は入院患者を対象としており、さらに、明らかな閾値が得られたわけではない。喘息家族歴有無、患者本人のアレルギー歴の有無など十分考慮し、乳幼児においては、反復喘鳴、喘息発症に注意し、喘息発症時には早期介入、思春期までの寛解導入のため注意深く経過観察することが必要と考える。

[結論]

MIP-1α が乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。[3)]

[参考文献]

1) Caliskan M, Bochkov YA, Kreiner-Moller E, Bonnelykke K, Stein MM, Du G, Bisgaard H, Jackson DJ, Gern JE, Lemanske RF, Jr., Nicolae DL, Ober C: Rhinovirus wheezing illness and genetic risk of childhood-onset asthma. N Engl J Med. 2013; 368: 1398-1407.

2) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, Kimura H: A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. BMC Infect Dis. 2011; 11: 168.

3) Sugai K, Kimura H, Miyaji Y, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Sasaki-Sakamoto T, Matsunaga S, Yamada Y, Kashiwakura J-I, Noda M, Ikeda M, Kozawa K, Ryo A, Yoshihara S, Ogata H, Okayama Y: MIP-1α level in nasopharyngeal aspirates at the first wheezing episode predicts recurrent wheezing. J Allergy Clin Immunol. 2016; 137(3): 774-781.