

循環血中血管内皮前駆細胞（EPC）定量法の標準化

研究分担者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部内科 准教授
協力者 岡崎有佳 慶應義塾大学医学部大学院 大学院生
協力者 佐藤隆司 慶應義塾大学医学部特別研究 助教
協力者 安岡秀剛 慶應義塾大学医学部内科 助教

研究要旨

強皮症（SSc）患者にみられる特徴的な末梢循環障害の病態に血管内皮前駆細胞（EPC）の異常による脈管形成不全の関与が示されている。しかし、SScにおける循環血中 EPC の増減に関してこれまで一定した結果が得られていない。その原因のひとつとして EPC 測定法の違いが考えられ、その点を解消するためにヨーロッパ強皮症研究グループ（EUSTAR）が EPC 測定法の推奨を提唱した。そこで、本推奨に合致する2つの測定法を用いて SSc、健常人検体を同時に解析し、測定法の違いによる影響を検討した。その結果、異なる方法で EPC 分画を濃縮しても、フローサイトメトリーにより得られた EPC 数は相関することが示された。ただし、EPC 数をフローサイトメトリーのイベントではなく、末梢血の容積あたりで表すことが必要であることが示された。

A. 研究目的

強皮症（systemic sclerosis; SSc）は、皮膚および内臓諸臓器の線維化に加え、末梢循環障害を特徴とする¹⁾。組織学的には爪床毛細血管の無血管領域や四肢の末梢動脈の側副血行路形成不全がみられ、虚血に対する血管の形成障害がみられる。成人における血管の修復・形成には、血管新生（angiogenesis）と脈管形成（vasculogenesis）の2つの過程が存在する。血管新生では、既存の成熟血管内皮細胞が増殖、遊走することで近傍の血管形成や損傷血管の修復を誘導する。一方、脈管形成では、骨髄から動員された血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell; EPC）が末梢血中に動員され、損傷血管などの局所で成熟血管内皮細胞へと分化することで血管形

成や損傷血管の修復を誘導する²⁾。我々は、SSc 患者において EPC の主要なサブセットである CD34+ CD133+ VEGFR2+ 細胞が末梢血中で減少し、その分化能も障害されていることを報告した³⁾。その後、他の研究グループから SSc 患者における EPC 数に関する報告がされているが、その増減に関しては一定の結果が得られていないのが現状である。その理由の一つとして、各々の報告で EPC 測定法が異なることが挙げられる。その点を解消するため、ヨーロッパ強皮症研究グループ（EUSTAR）により EPC 測定に関する推奨が提唱された⁴⁾。フローサイトメトリーによる測定では、① CD34、CD133、VEGFR2 の3つのマーカーに加えて、7-AAD など細胞生存マーカーを組み合わせること、②できる限り多くのイ

イベントを取り込むこと、③非特異的反応の原因となる Fc 受容体をブロックすること、④フローサイトメトリーに熟練した研究者が解析すること、の4点が挙げられている。また、末梢血中の EPC 数がきわめて少ないことから、末梢血を直接解析するより、フローサイトメトリーで解析する前に何らかの手法を用いて EPC を濃縮することが勧められている。従来の我々の方法では、①で明記されている細胞生存マーカーを用いていなかったが、他の項目は満たしていた³⁾。また、EPC 濃縮法として、我々は磁気ビーズを用いた CD34+ 細胞の分離を用いているが³⁾、Avouac らはロゼット法を用いて Lin- 細胞を分離している⁵⁾。そこで、これら EPC 測定法の違いによる影響を検討するため、SSc および健常人の同一サンプルを用いた side-by-side の検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象

アメリカリウマチ学会の分類基準を満たす SSc 患者 10 例 (diffuse 型、limited 型各 5 例) を対象とした。いずれの症例も喫煙、高血圧、脂質異常症など虚血性心疾患のリスク因子を有していなかった。また、対照として健常人 10 例を用いた。

2. EPC の定量

EPC の定量は以下の 2 つの方法で行った。

1) 磁気細胞分離システム (MACS) 法³⁾

末梢血から末梢血単核球を比重遠心法で分離し、Fc 受容体 blocking reagent (Miltenyi Biotech) 処理後に磁気ビーズを用いた MACS システムを用いて CD34+ 細胞を濃縮した。FITC 標識抗 CD34 抗体 (AC136, Miltenyi Biotech)、PE 標識抗 CD133 抗体 (AC133/2, Miltenyi Biotech)、APC 標識抗 VEGFR2 抗体 (AC133/2, R&D systems) を用いて染色し

た後に FACSCalibur (Becton Dicknson) を用いて CD34+CD133+VEGFR2+ 細胞を検出した。スクイッター解析でリンパ球領域にゲートをかけることで死細胞を除去し、Flow-count ビーズ (Beckman Coulter) を用いて末梢血 1 mL あたりの数として定量化した。また、EUSTAR による推奨を満たすため、7-AAD (Beckman Coulter) 染色による死細胞除去を加えた解析も行った。

2) ロゼット法⁵⁾

各種細胞表面マーカーに対する抗体カクテル RosetteSep (StemCell Technologies) を末梢血と混和し、比重遠心法を用いて Lin- 細胞を分離した。Fc 受容体 blocking reagent で処理後に、上記と同様にフローサイトメトリーにより CD34+CD133+VEGFR2+7-AAD- 細胞を検出した。EPC 数は Lin- 細胞を取り込んだ 10^6 イベントあたりの絶対数として表した。また、同時に MACS 法と同様に Flow-count ビーズを用いて末梢血 1 mL あたりの数として定量化する解析も行った。なお、本法は EUSTAR による推奨に合致している。

3. Lin- 細胞分画中の細胞成分の検討

RosetteSep を用いて分離した Lin- 細胞分画を APC 標識抗 CD3 抗体 (UCHT-1)、PE 標識抗 CD14 抗体 (RMO2)、PE 標識抗 CD41 抗体 (P2)、FITC 標識抗 glycoprotein A 抗体 (11E4B7.6, Beckman Coulter)、FITC 標識抗 CD19 抗体 (SJ25-C1, Becton Dicknson) を用いて染色し、フローサイトメトリーにより表面マーカーの発現を調べた。死細胞は 7-AAD 染色により除外した。

4. 統計学的検討

2 群間の比較には Mann-Whitney U-test、相関解析には直線回帰分析を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は学内の倫理委員会で承認され、検体採取に当たっては全ての患者に対して研究内容を説明し、文書による同意を得た。

C. 研究結果

SSc 患者 10 例と健常人 10 例を対象に、MACS 法、ロゼット法の 2 つの方法を用いて同時に末梢血中の EPC 数を測定した。MACS 法では 7-AAD-細胞にゲートをかけることで、ロゼット法と共に EUSTAR のより推奨された 4 項目全てを満たした。図 1 に細胞分離後のフローサイトメトリーでの解析結果の例を示す。いずれの方法でも、スキャッター分析と 7-AAD 染色により死細胞を除去し、CD34、CD133、VEGFR2 全てが陽性となる細胞群を EPC として検出することができた。

2 つの方法で得られた EPC 数の相関を検討すると (図 2)、MACS 法により得られた結果とロゼット法で Lin-細胞 10^6 個あたりの絶対数として得られた結果は全く相関しなかった ($r=0.08$)。一方、ロゼット法の結果を Flow-count ビーズを用いて 1mL あたりの絶対数として表すと、MACS 法による 1mL あたりの絶対数とよく相関した ($r=0.65$, $p=0.002$)。実際に、ロゼット法での解析結果を Lin-細胞 10^6 個あたりの絶対数、1mL あたりの絶対数で表すと、両者に有意な相関は得られなかった ($r=0.41$)。その原因を検討するため、ロゼット法を用いて分離した Lin-細胞分画に含まれる末梢血細胞をフローサイトメトリーにより調べた。その結果、Lin-細胞分画に含まれる細胞の 90% 以上が CD41+ 血小板または glycophorin A+ 赤血球で、2% 未満の CD3+ T 細胞、CD14+ 単球、CD19+B 細胞も含んでおり、これらマーカーがすべて陰性の Lin-細胞はわずか

5% 未満であった。

MACS 法において 7-AAD 処理の有無で検討を行ったところ、7-AAD 処理を加えると EPC 数は処理なしの場合に比べて 60% 程度に減少したが、両者は強く相関した (図 2, $r=0.96$, $P < 0.001$)。したがって、7-AAD 処理により非特異的反応が抑制されたが、従来法³⁾との乖離はわずかであった。

最後に MACS 法 (7-AAD 処理あり、7-AAD 処理なし)、ロゼット法 (Lin-細胞 10^6 個あたりの数として解析、1mL あたりの数として解析) で測定した EPC 数を SSc と健常人で比較した (図 3)。MACS 法では、7-AAD 処理の有無にかかわらず SSc で健常人より有意に少なかった ($p=0.01$, 0.0007)。一方、ロゼット法では、Lin-細胞 10^6 個あたりの数として表すと SSc と健常人で EPC 数に差がなかったが ($p=0.5$)、Flow-count ビーズを用いて 1 mL あたりの数として定量化すると SSc で有意に減少していた ($p=0.001$)。

D. 考案

末梢血中の EPC 数はきわめて少なく (末梢血単核球 10^5 あたり 1 個程度)、また EPC に特異的な細胞表面マーカーがまだ同定されていない。そのため、EPC 定量の標準化には解決すべき課題が残されている。これまでの SSc 患者を対象とした EPC 数の測定結果が一致しない理由は測定法の違いによることは明白である。その点で、EUSTAR により EPC 測定の推奨が提唱された意義は大きい。末梢中に含まれる EPC はごく少数のため、フローサイトメトリーによる全血の直接解析は困難である。そのため、フローサイトメトリー解析の前に EPC を含む分画を濃縮する必要がある。その手法として、我々が報告した MACS 法と Avouac らによるロゼット法があ

る。いずれの方法を用いても分離過程で目的とする EPC のロスが生じ、また回収率には個体差があるため定量性に影響を及ぼす。しかし、今回の検討では、いずれの方法を用いても Flow-count ビーズを用いて 1mL あたりの数として EPC を定量化するとほぼ同様の EPC 数が得られた。ただし、Avouac らの原著にしたがって EPC を Lin⁻ 細胞 10⁶ 個あたりの数として表すと、正確性を欠いた。その原因として、EPC 数の基になっている Lin⁻細胞分画に赤血球や血小板が多数混入していることが明らかとなった。したがって、EPC 数の定量化をフローサイトメトリーのイベントではなく、末梢血の容積あたりで表す方が検体間のばらつきの影響が少ないと考えられる。

今回の検討では、EUSTAR の推奨に合致した MACS 法、ロゼット法いずれを用いても SSc で健常人に比べて EPC 数が少なかった。今後は、測定法を標準化した上で、複数の施設で様々な背景因子を有する SSc 患者を対象とした検討を行い、EPC 数の増減について結論を得ることが必要である。

E. 結 論

EUSTAR の推奨に合致した 2 つの方法により測定した EPC 数はよく相関したことから、EPC 測定の標準化が可能と考えられる。ただし、再現性の高い結果を得るためには、EPC 数を末梢血の容積あたりで表すことが望ましいことが示された。

F. 文 献

1. LeRoy EC. Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am.* 1996; 22: 675-94.
2. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells

responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999; 85: 221-8.

3. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, et al. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet.* 2004; 364: 603-610.
4. Distler JH, Allanore Y, Avouac J, et al.; EULAR Scleroderma Trials and Research group. EULAR Scleroderma Trials and Research group statement and recommendations on endothelial precursor cells. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 163-8.
5. Avouac J, Juin F, Wipff J, et al. Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: association with disease severity. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67: 1455-60.

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J. Long-term beneficial effects of statins on vascular manifestations in patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol.* 2009; 19: 530-5.
2. 学会発表
 1. 岡崎有佳、佐藤隆司、安岡秀剛、桑名正隆：循環血管内皮前駆細胞（CEP）を定量化する測定法の検証。第 53 回日本リウマチ学会総会（東京）。2009. 4.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

MACS法(7-AAD-/ビーズを用いた解析)

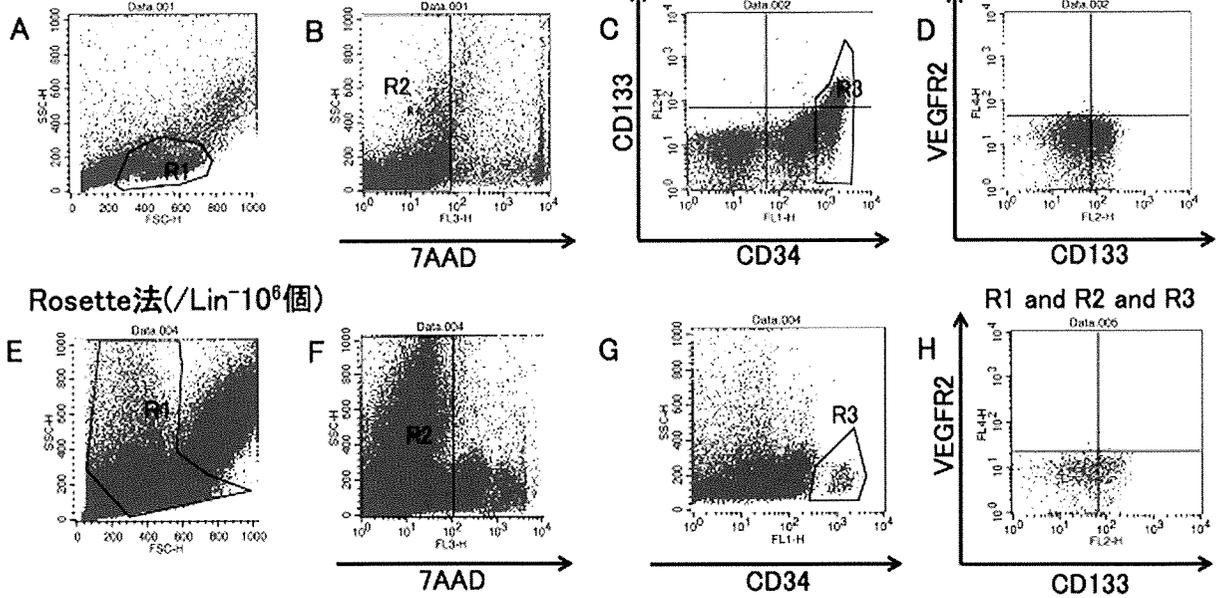


図1: FACSによるEPCの検出。MACS法、ロゼット法を用いて分離した細胞集団をフローサイトメトリーにより解析した。CD34+細胞集団にゲートを掛けた後、CD133、VEGFR2で展開した。EPCはCD34+CD133+VEGFR2+細胞として検出された。

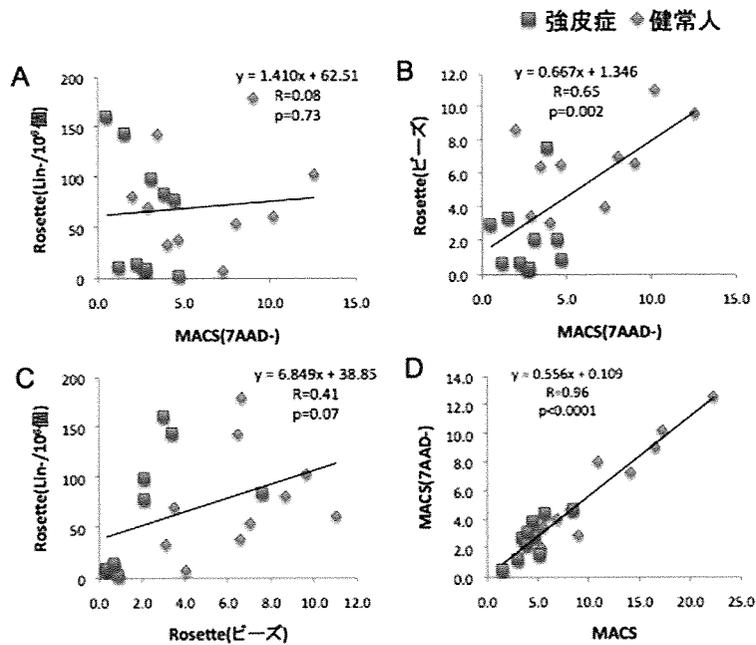


図2: MACS法とロゼット法で測定した末梢血EPC数の相関関係。MACS法では7-AAD処理ありと7-AAD処理なしで解析し、末梢血1mlあたりの数として表した。ロゼット法ではLin-細胞 10^6 個あたりの数、1mLあたりの数として表した。

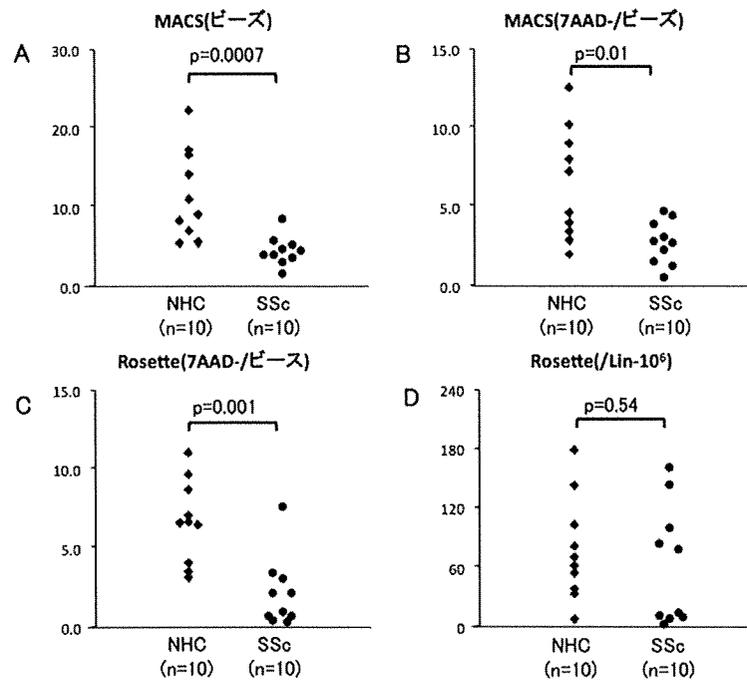


図3：MACS法とロゼット法で測定したEPC数の健常人（NHC）とSScにおける絶対数の比較。

強皮症肺線維症における NAMPT/PBEF/Visfatin の検討

研究分担者 遠藤平仁 東邦大学医療センター大森病院膠原病科 准教授

研究要旨

Nicotinamide phosphoribosyl Transferase (NAMPT) は NAD^+ 依存性脱アセチル化酵素であり DNA 結合蛋白のアセチル化抑制に作用する。近年炎症免疫病態にも関与し PBEF とも呼ばれまた脂肪細胞からも分泌されインシュリン抵抗性にも関与しアディポカインとしての作用も有し Visfatin とも呼ばれる。この NAMPT は強皮症 (SSc) 患者血清に高濃度で存在し健常人よりも高値であった。また間質性肺炎患者の BALF 中にも高濃度で存在し血中 KL-6 濃度と正の相関を示した。末梢単核球にも NAMPT mRNA が健常人より高値で検出された。生検肺組織において免疫組織学的に CD68 陽性単核球に NAMPT が強く染色された。またブレオマイシン投与マウス間質性肺炎モデルにおいて間質性肺炎誘導後マウス NAMPT は高い値で血中に誘導され BALF 中にも高値で出現する。肺組織に間質性肺炎誘導後誘導され気管上皮細胞や浸潤単核球に出現していた。マウス肺線維芽細胞に rNAMPT を添加すると COL1 α mRNA や MCP-1mRNA の誘導が認められた。以上より NAMPT/Visfatin は SSc 患者の肺線維症の形成に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

Nicotinamide phosphoribosyl Transferase (NAMPT) は NAD^+ 依存性脱アセチル化酵素であり DNA 結合蛋白のアセチル化抑制に作用する。近年炎症免疫病態にも関与し PreBcell enhancing factor (PBEF) とも呼ばれる。また脂肪細胞からも分泌されインシュリン抵抗性にも関与しアディポカインとしての作用も有し Visfatin とも証されていた。近年他の炎症免疫疾患において NAMPT が関与し病態形成に重要な役割をはたしていることが報告された。特に関節リウマチや急性肺障害の際血液中や病変局所に産生され炎症性サイトカインとしての役割も示すことが明らかになった。我々は今回、強皮症患者特に呼吸器障害と NAMPT の役割が注目さ

れていることから間質性肺炎、肺線維症との関連性について検討した。

B. 研究方法

臨床サンプルにおける NAMPT の測定

全身性強皮症 10 例及び他の膠原病合併間質性肺炎 10 例の血清、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 及び生検標本 (経気管支肺生検) 標本の NAMPT の発現を ELISA 法及び免疫染色にて確認、ELISA (Nampt/Visfatin (human) ELISAKit (Enzo Life Science, Switzerland) を用い測定した。なお検査の際文書にて承諾書を得て標本は匿名にて個人情報に留意し使用した。

ブレオマイシン投与間質性肺炎マウスモデルにお

ける NAMPT の意義を検討した。ヒト NAMPT/Visfatin 及び SIRT-1 は Real-TimePCR にて mRNA の発現を定量化した。NAMPT/Visfatin: Sense Primer 5'-aagcttttagggcccttg-3'(1786-1805 bp)、Antisense Primer 5'-aggccatgtttatttctga-3'(2104-2084 bp)、SIRT-1 Sense Primer 3'-ccacggataggtatggctcaga-5'(4005-4026bp)、AntiSense Primer 3'-tggagttgggtatgtaagac-5'(5595-5615 bp) を用いた。

C57NBL/6 オスマウス 5 週例に塩酸プレオマイシン (科研薬品より提供) 5 mg/kg 50 μ を用い経気管支的に肺内散布をおこなった。21 日後麻酔下にて屠殺し、経気管支的に PBS 1ml にて洗浄した。洗浄液を回収し総 RNA を分離し cDNA を作成後 RT-PCR、Real Time PCR にて NAMPT mRNA の発現を測定した。また採血血清中の NAMPT/Visfatin 濃度を ELISA 法にて測定した。

MouseNAMPT/Visfatin Sense 5'-cttgcttcagctcctgggtatcc-3'(454-473 bp)、Antisense 5'-gagagatcctctctgta-3'(599-583 bp)

Mouse GAPDH Sense Primer5'-tgtgatgggtgtgaaccacgagaa-3'(430-453 bp)、

Antisense Primer 5'-gagccttccacaatgccaagt-3'(559-536 bp) を用いた。

ELISA Kit (Mouse Visfatin ELISA Kit (AdipoGen, Seoul, Korea) を用いた。

C. 研究結果

SSc30 例、健常人 20 例の血清 NAMPT 濃度は SSc 5.38 \pm 5.36 ng/ml、健常人 0.544 \pm 1.35 ng/ml (P = 0.031) と有意に SSc 血清に NAMPT が高値であった。また末梢血単核球から mRNA における NAMPTmRNA 発現は健常人平均 1 として SSc は

4.16 倍発現を強く認めた。しかしびまん皮膚硬化型と限局皮膚硬化型を比較したが 2 群間に差は認めなかった。BALF 中の NAMPT は平均 0.69 \pm 0.81ng/ml (SSc 0.38 \pm 0.21ng/ml、その他 0.92 \pm 1.0ng/ml) 有意差はないがやや SSc IP では低い傾向があった。また血中 KL-6 や CCL18、BALF 中の好中球、リンパ球数、呼吸機能 % VC、% DLco との関連性は確認できなかった。TBLB による IP 肺組織の NAMPT の発現を免疫組織化学的に測定した。肺組織中の CD68 陽性単球に陽性所見を認めた。線維芽細胞に陽性所見は認めなかった。

2) プレオマイシン投与実験間質性肺炎における NAMPT/Visfatin の発現

プレオマイシン投与間質性肺炎において NAMPT/Visfatin の発現は上昇した。プレオマイシン投与 7 日、21 日後肺内 NAMPT/Visfatin mRNA は上昇し Bleomycin 5.28 \pm 0.24 AU、Control 1.81 \pm 0.68 AU と NAMPT mRNA は 2.93 倍に上昇した。培養マウス肺線維芽細胞にマウスリコンビナント NAMPT/Visfatin を添加し線維芽細胞増殖およびコラーゲンタイプ I α や MCP-1、IL-6 などの産生誘導に及ぼす効果について検討した。NAMPT は 100 ng/ml という高濃度において細胞増殖、COL-1 α の発現が確認できた。

また MCP-1、IL-6 mRNA の発現亢進を確認した。しかし VEGF mRNA の発現は誘導しなかった。

D. 考案

NAMPT/Visfatin は NAD 依存性脱アセチル化酵素であり細胞の機能維持に必須な酵素である。しかしこの酵素は細胞外に放出されるとそれ自身が炎症免疫機能、代謝機能などに多彩な作用を有する。つまりサイトカイン、B 前駆細胞分化促進因子、そし

てインシュリン作用を有しインシュリン抵抗性を有するアデポカインとしての作用を有する。近年急性肺障害や関節リウマチ滑膜病変など炎症性疾患において NAMPT/Visfatin が検出され病態形成に関与していることが報告されている。

強皮症における間質性肺炎 (SScIP) は生命予後に関係する臓器合併症である。病態形成に様々な因子が作用している。SScIP の病態形成における NAMPT/Visfatin について検討した。

SSc-IP 患者の血清や気管支肺胞洗浄液に NAMPT は検出され免疫組織化学的に CD68 陽性肺内マクロファージに強く発現していた。またブレオマイシン投与マウス間質性肺炎モデルでは浸潤したマクロファージや炎症細胞以外に気管支粘膜上皮細胞にも NAMPT が存在していた。NAMPT は滑膜上皮細胞や気管支粘膜上皮細胞に発現していることが報告されている。

NAMPT/Visfatin は Proinflammatory cytokine の機能を有し様々な炎症性サイトカインにより合成が誘導される。In vitro 実験でリンパ球やマクロファージや内皮細胞は TNF や IL-1、IL-6 など炎症性サイトカインにより誘導される。NAMPT は細胞のアポトーシス抑制や NAD⁺ 合成を介し Histone deacetylase III SIRT-1 (Stimulator inducing regulator) を誘導する。SIRT-1 は細胞寿命亢進に関与し病変の維持に関与する。慢性炎症病変において NAMPT が高濃度に維持されることは関節リウマチや炎症性腸疾患、乾癬病変に高濃度で存在することが報告されている。

また急性肺障害において II 型肺胞上皮細胞、血管内皮細胞、好中球に誘導されていることが報告されている。IP 病変においてもヒト CD68 陽性マクロファージに強く発現し、実験関節炎においても気管支

上皮細胞や内皮細胞に発現していた。間質性肺炎、肺線維症に NAMPT が役割を果たしているか未だ研究の余地がある。

E. 結 論

NAMPT/PBEF/Visfatin は SSc IP の肺病変にて産生亢進が報告され病態形成に関与している可能性が示唆され、今後新たな治療標的としての可能性があると考えられる。

F. 文 献

1. Luk, T., Malam, Z., Marshall, JC: Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF) /visfatin; a novel mediator of innate immunity, J Leukocyte Biol, 2008, 83, 804-816.
2. Skokowa, J., Lan D., Thakur, BK. et. al: NAMPT is essential for the G-CSF-induced myeloid differentiation via a NAD-sirtuin-1-dependent pathway, Nature Med, 2009, 15, 151-158.
3. Ye, SQ., Simon, BA, Molony, JP et. al: PBEF as a potential novel biomarker in acute lung injury, Am J. Respir. Crit. CareMed, 2005, 171, 361-370.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

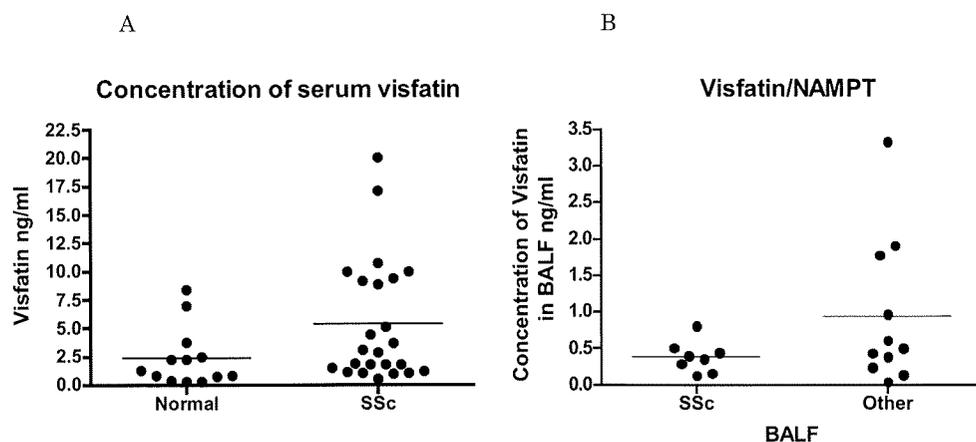


図 1A : SSc 患者血液中の NAMPT/Visfatin 濃度
 健常人 20、SSc 32 例 P<0.05

図 1B : SSc IP 患者の気管支肺胞洗浄液における NAMPT/Visfatin 濃度の検討
 SSc IP 9 例、他の疾患にともなう IP 18 例

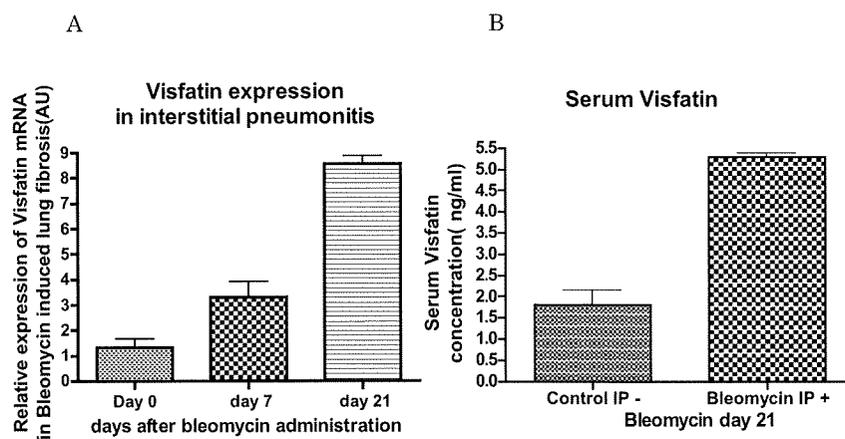


図 2A : ブレオマイシン投与マウス IP モデルにおける NAMPT/Visfatin の発現
 肺内 mRNA の発現を Real Time PCR にて測定した。P<0.05

図 2B : ブレオマイシン投与マウス IP モデルにおける NAMPT/Visfatin の発現
 血中 NAMPT/Visfatin 濃度上昇 IP (+) ブレオマイシン投与 21 日、IP (-) 溶媒のみ投与 21 日。
 P<0.05

IL-2/18 誘導間質性肺炎における NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の役割

研究分担者	後藤大輔	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 臨床免疫学 講師
協力者	瀬川誠司	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 臨床免疫学 大学院生
協力者	吉賀洋平	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 臨床免疫学 大学院生
協力者	杉原誠人	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 臨床免疫学 講師
協力者	林 太智	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 臨床免疫学 講師
協力者	千野裕介	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 臨床免疫学 講師
協力者	松本 功	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 臨床免疫学 准教授
協力者	伊藤 聡	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 臨床免疫学 准教授
協力者	住田孝之	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 臨床免疫学 教授

研究要旨

全身性強皮症において、間質性肺炎による死亡の割合が増加していることから、現在、解決すべき最も重要な病態の一つとなっている。今回我々は、IL-2 と IL-18 によって誘導されるヒト間質性肺炎の初期像に類似した細胞浸潤性の間質性肺炎マウスモデルを用いて、間質性肺炎の病態解明を試みた。その結果、このモデルで増殖することが知られている NK 細胞と同様に、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞も増加していることが明らかとなった。間質性肺炎の病態解明の鍵を握る細胞として、我々はこの NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞に着目し、更に解析を行うこととした。その結果、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が 1) 多様な T 細胞受容体 (TCR) γ 鎖、 δ 鎖を持つ、ポリクローナルな集団であること、2) 細胞表面には、IL-2 受容体 β と IL-18 受容体 β のいずれも多く発現していること、3) IL-2/IL-18 刺激により有意に増殖すること、4) IFN- γ や TNF- α のサイトカイン産生能を有する細胞であること、が明らかとなった。以上の結果より、IL-2 と IL-18 誘導間質性肺炎マウスモデルにおいて、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞は炎症を惹起する細胞集団である可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は、いまだに難治性の疾患であることに変わりがなく、他の膠原病疾患の多くがステロイドを初めとした免疫抑制療法が有効であるのとは対照的に、決定的な有効治療がないのが問題となっている。皮膚の硬化病変もさることながら、予後を左右する内臓病変が問題となるが、特に最近、強皮症患者の死因の中で間質性肺炎が占める割合が顕著に増えてきている¹⁾。従って、強皮症患者の予後を改善する為には、間質性肺炎の病態を明らかとし、その治療法を検討することが最も重要なことであると考えられる。

これまでの報告では、ブレオマイシン等の薬剤誘導性の間質性肺炎モデルを用いた研究が多く行われているが、これは誘導後、肺組織に直ぐに線維化を認めるモデルである。しかし、通常ヒトの間質性肺炎では、活動期では細胞浸潤が盛んであり、線維化はどちらかと言えば終末像となる。そこで、ヒトの活動期の間質性肺炎像に近い IL-2 と IL-18 にて誘導される肺の間質に細胞浸潤が誘導されるモデル²⁾を用いて、間質性肺炎の病態を明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

1) IL-2 と IL-18 による間質性肺炎の誘導

C57BL/6 マウス、4 週令の雌 (日本チャールス・リバー株式会社、横浜) を用いて、既に論文にて報告されている方法²⁾にて、リコンビナントヒト IL-2 を 50,000 U/日 とリコンビナントマウス IL-18 を 1 μ g/日 投与し、間質性肺炎の誘導を行った。コントロールとして、PBS 200 μ l/日 を投与した群を用いた。

2) NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞と NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞の選別

NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞と NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞を選択的に回収する為に、組織から回収したリンパ球を TCR γ/δ + isolation kit (Miltenyi Biotec KK, Auburn, CA) を用いて濃縮した細胞群を作り、抗 NK1.1 抗体と抗 TCR δ 抗体でそれらを染色し FACS vantage にて選別を行った。純度は NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞は >93 %、NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞は >92% であった。

3) TCR V γ 鎖と V δ 鎖の解析

NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞と NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞から mRNA を抽出し、cDNA を作成した。TCR V γ 鎖と V δ 鎖を増幅させる為、V γ 1、2、4、5、6、7 と V δ 1-7 を検出する為のプライマーを用いた PCR 法にて検出を行った。

4) NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞と NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化

それぞれ IL-2 受容体と IL-18 受容体を発現していることから、間質性肺炎誘導に用いた IL-2 (100 U/ml) と IL-18 (10 ng/ml) にて活性化反応を解析した。これ以外に、TCR を強く活性化した状態での反応をみるために、PHORBOL 12-MRISTATE 13-ACETATE (PMA) (50ng/ml) と Ionomycin (1 μ g/ml) での活性化反応下での解析も行った。

なお、本研究を行うにあたり、「動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「筑波大学動物実験取扱規定」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議)」に従って動物実験計画書を提出し、筑波大学の動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の TCR レパトア解析

間質性肺炎悪化とともに増加してくる NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞群に関して解析を行ったところ、TCR は V γ 1、2、4 鎖、V δ 1、2、3、4、5、6、7 鎖の発現細胞を認め (図 1)、この細胞集団がポリクローナルな集団であることが明らかとなった。

2) NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞のサイトカイン産生能

NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞のサイトカイン産生能を確認する為に、PMA/ionomycin で刺激し、産生されるサイトカイン濃度を測定したところ、IFN- γ 、TNF- α の産生能が NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞と比較して有意に高いことが分かった (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$) (図 2)。

3) IL-2+IL-18 投与下での NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の反応

まず初めに、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が IL-2 や IL-18 に反応しうる細胞集団であるか否かを確認する為に、細胞表面の IL-2R β と IL-18R β の発現の確認を行った。その結果、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞と NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞のいずれも IL-2R β と IL-18R β を発現しているが、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の方がより多くの受容体を発現していることが分かった (図 3)。

さらに IL-2 と IL-18 を投与することで増殖反応の違いをみたところ、サイトカイン受容体を多く発現している NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の方が 96 時間後に有意に増殖反応が高いことが判明した ($p < 0.05$) (図 4)。

そして、IL-2 と IL-18 を投与することで NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞がどのようなサイトカイン産生をするのかを確認したところ、NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞と比較して IFN- γ 産生量が有意に多いことが明らかとなった ($p < 0.05$)。TNF- α 産生も多い傾向は認められ

たが、有意差は無かった (図 5)。

D. 考案

IL-2/IL-18 誘導間質性肺炎では、肺への NK 細胞の浸潤と IFN- γ の増加が病態形成に関与していると言われている²⁾。しかし、我々は NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞も病態悪化とともに増加してくるを見出した。従って、間質性肺炎初期に、NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞も病態形成に関与している可能性が考えられた。

本研究に用いた IL-2/IL-18 誘導間質性肺炎はヒトの間質性肺炎の初期像に似たモデルであり、活動性間質性肺炎像と捉えることが出来る。NK 細胞に加えて NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞も肺組織で増えている理由は、単に IL-2、IL-18 それぞれの受容体を高発現しているということも考えられるが、肝臓では NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が PBS 投与群でも多く存在するが、IL-2 と IL-18 を投与しても肝臓の NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞は増えない (データ未提示)。そのことから、肺にのみ集積する NK 細胞が産生する IFN- γ 等により NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が増殖し、増殖した NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が産生する TNF- α が NK 細胞を増殖させ、さらに IFN- γ を産生するようになると言った相乗効果が働いている可能性が考えられる。

NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞は IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-13、TNF- α の産生能を有する細胞群であることが報告されている^{3,4)}。本研究でも PMA/ionomycin の刺激により NK1.1 陰性 $\gamma\delta$ T 細胞より多くの TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 を産生することを示した。そして、これらのサイトカイン産生により、肺での炎症が惹起されている可能性が示唆される。今後、TCR γ 鎖のノックアウトマウスを用いた研究により、それを証明する必要が有るだろう。

ヒトにおいて NK1.1 は CD161 に相当するが、こ

れまでに CD161 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が HIV 感染患者⁵⁾ や多発性硬化症患者⁶⁾ の末梢血で増えているという報告がある。しかしながら、間質性肺炎患者での報告は未だ無い。従って、今後、間質性肺炎患者における CD161 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の研究が間質性肺炎を理解する上で重要と考える。

E. 結 論

ヒト間質性肺炎に似た IL-2/IL-18 誘導間質性肺炎モデルにおいて、IFN- γ 、TNF- α を産生する NK1.1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞も肺に集積しており、間質性肺炎の病態に関与していることが示唆される。

F. 文 献

1. Steen VD, Medsger TA.: Change in cause of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 940-944
2. Okamoto M, Kato S, Oizumi K, Kinoshita M, Inoue Y, Hoshino K, et al.: Interleukin 18 (IL-18) in synergy with IL-2 induces lethal lung injury in mice: a potential role for cytokines, chemokines, and natural killer cells in the pathogenesis of interstitial pneumonia. *Blood* 2002; 99: 1289-1298
3. Felices M, Yin C C, Kosaka Y, Kang J, Berg L J.: Tec kinase Itk in $\gamma\delta$ T cells is pivotal for controlling IgE production in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 8308-8313
4. Haas JD, Gonzalez FH, Schmitz S, Chennupati V, Fohse L, Kremmer E, Forster R, Prinz I.: CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma-producing gammadelta effector T cells. *Eur J Immunol* 2009; 39: 3488-3497

5. Fenoglio D, Poggi A, Catellani S, Battaglia F, Ferrera A, Setti M, Murdaca G, Zocchi MR.: Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood* 2009; 113: 6611-6618
6. Poggi A, Zancolli M, Catellani S, Borsellino G, Battistini L, Zocchi MR.: Migratory pathways of gammadelta T cells and response to CXCR3 and CXCR4 ligands: adhesion molecules involved and implications for multiple sclerosis pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1107: 68-78

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Low levels of soluble CD1d protein alters NKT cell function in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med* 2009; 24: 481-486
2. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Inhibition of transforming growth factor- β signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease in mice. *Clin Exp Immunol*, 2010 (in press)

2. 学会発表

1. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Using NKT1.1 + TCR γ/δ + T cells, function in the generation of interstitial lung disease induced by IL-2 and IL-18. The 5th International Symposium on

- CD1d/NKT Cells, Mar. 23-27, 2009, Kamakura
2. Goto D, Segawa S, Yoshiga Y, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Low levels of soluble CD1d protein alters NKT cell function in patients with rheumatoid arthritis. The 5th International Symposium on CD1d/NKT Cells, Mar. 23-27, 2009, Kamakura
 3. 瀬川誠司、後藤大輔、吉賀洋平、林 太智、松本 功、伊藤 聡、住田孝之、サイトカイン誘導性肺障害モデルを用いた間質性肺炎発症メカニズムの解析、第53回日本リウマチ学会総会・学術集会、東京、2009
 4. 後藤大輔、瀬川誠司、吉賀洋平、林 太智、松本 功、伊藤 聡、住田孝之、関節リウマチ患者における可溶性CD1d分子によるNKT細胞の制御機構、第53回日本リウマチ学会総会・学術集会、東京、2009
 5. 瀬川誠司、後藤大輔、吉賀洋平、杉原誠人、林太智、千野裕介、松本 功、伊藤 聡、住田孝之、IL-2+IL-18誘導性間質性肺炎モデルマウスにおけるNK1.1+ $\gamma\delta$ T細胞による病態制御機構の解析、第37回日本臨床免疫学会総会、東京、2009
 6. 後藤大輔、瀬川誠司、吉賀洋平、杉原誠人、林太智、千野裕介、松本 功、伊藤 聡、住田孝之、transforming growth factor- β シグナル制御によるIL-2+IL-18誘導性間質性肺炎の制御機構、第37回日本臨床免疫学会総会、東京、2009
 7. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. The analysis of NK1.1+ $\gamma\delta$ T cell-mediated mechanism of IL-2 plus IL-18 induced interstitial lung disease. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

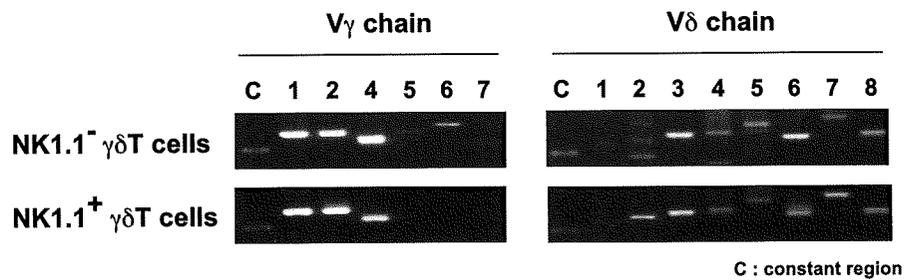


図1：肺組織リンパ球中のNK1.1陽性／陰性 $\gamma\delta$ T細胞のTCR-V γ と-V δ 遺伝子発現の解析。IL-2/IL-18誘導間質性肺炎の肺組織のリンパ球からNK1.1陽性／陰性 $\gamma\delta$ T細胞を抽出し、RT-PCR法にて解析した。Cは定常領域のRT-PCR

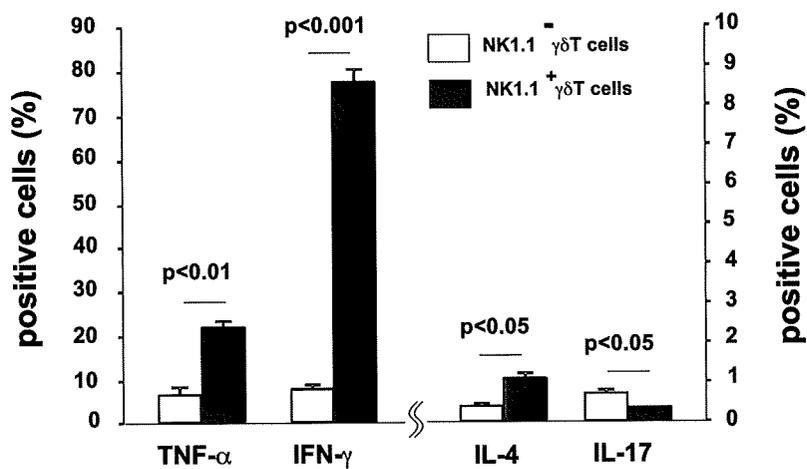


図2：NK1.1陽性／陰性 $\gamma\delta$ T細胞のサイトカイン産生能。PMA/ionomycin刺激によるTNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-17の産生の違いを解析

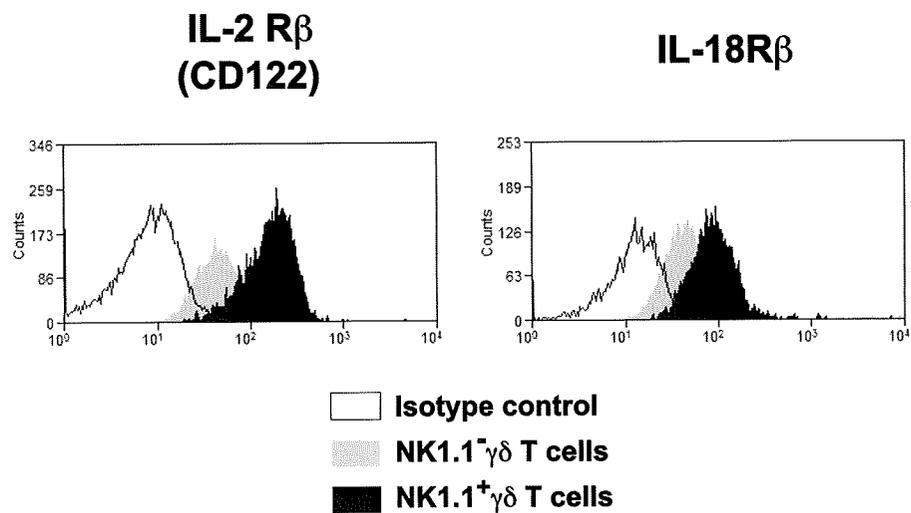


図3：NK1.1陽性／陰性 $\gamma\delta$ T細胞上のIL-2受容体 β とIL-18受容体 β の発現を解析

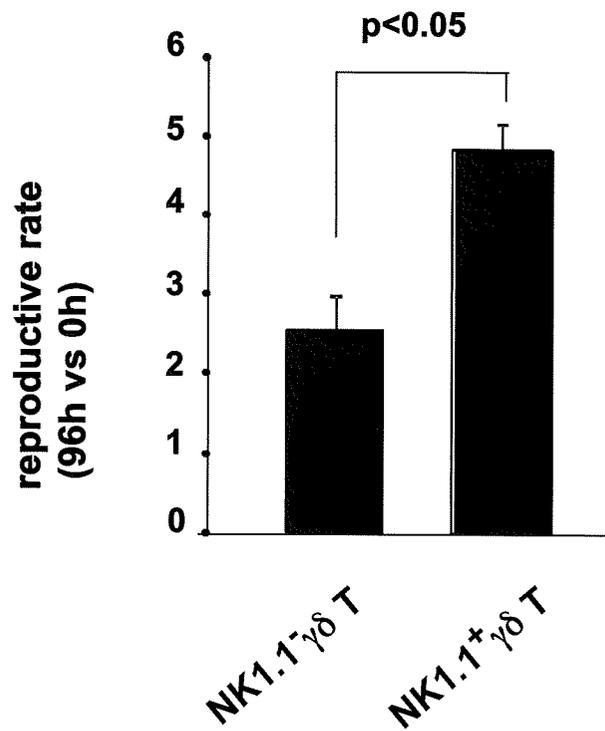


図4：全脾細胞を IL-2/IL-18 添加後、96 時間培養した時の NK1.1 陽性／陰性 $\gamma\delta$ T 細胞の増殖能の解析。それぞれ、刺激前の細胞数を 1 とした時の割合を示す

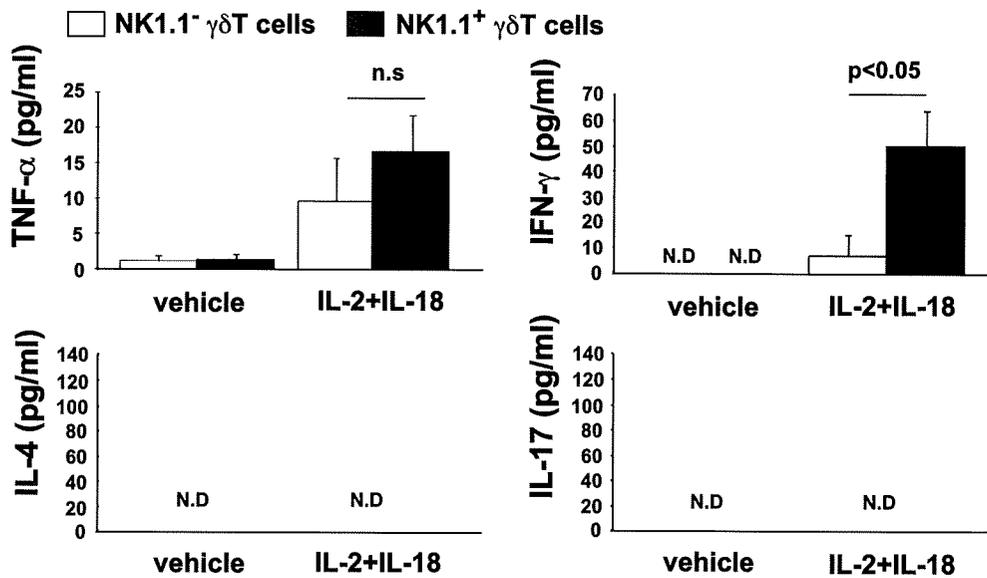


図5：IL-2/IL-18 刺激による NK1.1 陽性／陰性 $\gamma\delta$ T 細胞のサイトカイン産生能。N.D. は検出感度以下であったことを示す

マトリックスの合成と分解からみた臓器線維症の治療戦略

研究協力者 稲垣 豊 東海大学医学部基盤診療学系 教授
協力者 東山 礼一 東海大学医学部基盤診療学系 奨励研究員
協力者 三上健一郎 東海大学医学部基盤診療学系 奨励研究員
研究代表者 佐藤 伸一 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授

研究要旨

組織におけるコラーゲンの含量は合成と分解のバランスの上に規定され、両者の不均衡はコラーゲンの過剰沈着を通じて諸臓器の線維症を引き起こす。臓器線維症の進展と改善過程におけるコラーゲン合成系と分解系を包括的に解析することを目的として、I型コラーゲン遺伝子プロモーターと緑色蛍光、MMP-13 遺伝子プロモーターと赤色蛍光を連結した融合遺伝子を組み込んだ Dual reporter mouse を作製した。この Dual reporter mouse を用いて実験的肝線維症の進展過程における両プロモーターの活性化動態を解析し、同マウスが強皮症の難治線維化病態の解明や新規治療法の開発においても有用なツールとなりうることを明らかにした。

A. 研究目的

強皮症は、皮膚をはじめとする全身諸臓器にコラーゲンやその他の細胞外マトリックス成分の異常沈着をきたす、原因不明の進行性疾患である。コラーゲンは、細胞外マトリックスの主要成分として、組織や臓器形態の保持のみならず組織修復や創傷治療においても重要なはたらきを演じているが、その産生調節機構が破綻をきたすと組織に過剰なコラーゲンが沈着し、皮膚・肺・腎・肝・脾など諸臓器の線維化を引き起こす。

強皮症に対する治療戦略として、これまでは線維化の進行をいかに抑えるか、すなわちコラーゲンをはじめとするマトリックスの合成抑制が重要視されてきた。しかしながら、組織のコラーゲン含量は合成と分解のバランスの上に規定されており、臓器線維症治療とはこの合成系と分解系の不均衡の是正に

ほかならない¹⁾。

そこで今回、臓器線維症の進展と改善過程におけるコラーゲン合成系と分解系を包括的に解析することを目的として、I型コラーゲン遺伝子プロモーターと緑色蛍光、MMP-13 遺伝子プロモーターと赤色蛍光を連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (Dual reporter mouse) を作製した。

B. 研究方法

1) Dual reporter mouse の作製

線維化組織において増加するマトリックスの主要成分である I 型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖をコードする COL1A2 遺伝子プロモーターと Enhanced green fluorescence (EGFP、緑色蛍光)、ならびに齧歯類における主要な間質性コラーゲナーゼである MMP-13 遺伝子のプロモーターと DsRed2 (赤色蛍光) を

連結した融合遺伝子をマウス受精卵に顕微注入して、Dual reporter mouse を樹立した (図 1)。

2) 四塩化炭素肝障害・線維症の作製と共焦点レーザー顕微鏡観察

上記の Dual reporter mouse に四塩化炭素を単回もしくは反復投与して、COL1A2 ならびに MMP-13 プロモーターの活性化を、それぞれ EGFP と DsRed2 の共焦点レーザー顕微鏡観察により検討した。

3) 星細胞の分離・培養と FACS 解析

Dual reporter mouse の門脈内にカニューレションし、肝における I 型コラーゲンと MMP-13 双方の主要産生細胞である星細胞を、コラゲナーゼ・プロナーゼ液の還流と Nycodenz 比重遠心法により分離した。同細胞における COL1A2 ならびに MMP-13 プロモーターの活性化を、EGFP あるいは DsRed2 蛍光の FACS により解析するとともに、分離した星細胞を初代培養に供して、COL1A2 あるいは MMP-13 プロモーターの活性化を経時的に観察した。

4) 倫理面への配慮

組換え DNA 実験、および組換え DNA 実験に準ずる実験 (動物個体を用いる実験) の計画と実施には常に留意し、所属施設の遺伝子組換え実験安全管理規定ならびに動物実験指針に則って行った。

C. 研究結果

1) 肝線維化の進展過程における COL1A2 もしくは MMP-13 プロモーターの活性化

Dual reporter mouse に四塩化炭素を単回投与して 72 時間後に採取した肝組織を観察すると、中心静脈周囲の壊死部に COL1A2 プロモーターが活性化した EGFP 発現細胞を多数認めた (図 2)。一方、MMP-13 プロモーターが活性化した DsRed2 陽性細

胞は見られず、コラーゲンの代謝バランスが合成系優位に傾いていることが示された。また、四塩化炭素を投与したマウスから星細胞分画を採取して FACS 解析を行うと、全星細胞の約 30% が EGFP 陽性を示したが、DsRed2 発現細胞は認められず、上記の共焦点顕微鏡観察結果と合致した所見が得られた (図 3)。

一方、四塩化炭素を反復投与して作製した線維肝組織の共焦点レーザー顕微鏡観察では、線維束に沿って COL1A2 プロモーターが活性化した多数の EGFP 発現細胞を、また門脈域には MMP-13 プロモーターが活性化した少数の DsRed2 陽性細胞を認めた。しかしながら、EGFP と DsRed2 両者陽性の細胞は認められなかった。

2) 星細胞の初代培養過程における COL1A2 もしくは MMP-13 プロモーターの活性化

Dual reporter mouse の正常肝から分離した星細胞を初代培養に供すると、培養 2 日目の静止期には DsRed2 の発現が見られ、MMP-13 プロモーターの活性化が示された (図 4 A)。一方、培養後 1 週間を経過した活性化星細胞では DsRed2 蛍光は消失し、替わって EGFP の発現が増強した (図 4 B)。また、両者陽性の星細胞は、全培養過程を通じてほとんど認められなかった。このことから、星細胞の培養に伴う活性化過程において、MMP-13 プロモーターから COL1A2 プロモーターへのシグナル転換が示された。

D. 考案

コラーゲン分解系の調節機構の研究は、コラーゲン合成系の調節研究に比して著しく立ち遅れている。しかも、合成系と分解系とを同時に解析した研究はほとんど見られない^{2,3)}。本研究により in vivo の肝

線維化進展過程ならびに *in vitro* の星細胞の活性化過程において、I型コラーゲンプロモーターとMMP-13プロモーターの活性化細胞とは一致せず、両者の発現には相反的な調節機構がはたっていることが示唆された。

本 Dual reporter mouse を用いることで、実験的皮膚線維症の進展ならびに改善過程におけるコラーゲンの合成と分解とを、単一細胞レベルで、しかも経時的に解析することが可能となった。たとえば、強皮症のモデルとされるブレオマイシン投与による皮膚線維症では、同薬剤の投与中止後にいかなる病態の変化を示すのか。その際にみられるマトリックスの合成系と分解系の挙動は、強皮症の難治線維化病態を考える上で大きな示唆を与え、新規治療法の開発に繋がることが期待される。

E. 結 論

I型コラーゲン遺伝子プロモーターと緑色蛍光、MMP-13 遺伝子プロモーターと赤色蛍光を連結した融合遺伝子を組み込んだ Dual reporter mouse を作製し、実験的肝線維症の進展過程における両プロモーターの活性化動態を解析した。本マウスは、強皮症の難治線維化病態の解明や新規治療法の開発においても、有用なツールとなりうると考えられた。

F. 文 献

1. Inagaki Y, Higashi K, Nemoto T, et al: Treatment strategies for organ fibrosis based on regulation of collagen metabolism. *Connective Tissue* 35: 193-200, 2003
2. Magness ST, Bataller R, Yang L, et al. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell popula-

tions. *Hepatology* 40: 1151-1159, 2004

3. Schaefer B, Rivas-Estilla AM, Meraz- Cruz N, et al. Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 162: 1771-1780, 2003

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Higashiyama R, Moro T, Nakao S, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, Ikeda K, Adachi E, Bou-Gharios G, Okazaki I, Inagaki Y: Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology* 137: 1459-1466, 2009
 2. Endo H, Watanabe T, Sugioka Y, Niioka M, Inagaki Y, Okazaki I: Activation of two distinct MAPK pathways governs constitutive expression of matrix metalloproteinase-1 in human pancreatic cell lines. *Int J Oncology* 35: 1237-1245, 2009
 3. 稲垣豊、東山礼一、茂呂忠、三上健一郎：骨髄細胞による肝線維化の病態形成. *細胞* 42: 33-36, 2010
2. 学会発表
 1. 東山礼一、中尾祥絵、茂呂忠、渋谷弥生、石川治、稲垣豊：皮膚創傷治癒ならびに線維化過程における骨髄由来細胞のコラーゲン合成への関与. 第108回日本皮膚科学会総会、2009年4月25日、福岡
 2. 稲垣豊、東山礼一、池田一雄：胆汁うっ滞性肝線維症の発生・進展に上皮間葉移行は関与するか. 第45回日本肝臓学会総会、2009年6月5日、