

題目

単球遺伝子発現プロファイルを用いた
急性 GVHD 治療標的分子の探索

こばやしあやこ
小 林 彩 香

(血液病学専攻)

防衛医科大学校

平成 25 年度

目 次

第1章	研究の背景	1-5 頁
第2章	サイトカイン誘導マクロファージモデルと造血幹細胞移植患者単球の遺伝子発現プロファイル	
第1節	研究材料と方法	
1-1	倫理審査	6 頁
1-2	患者背景	6 頁
1-3	末梢血単球の分離	6 頁
1-4	サイトカイン誘導マクロファージモデルの作成	6-7 頁
1-5	マイクロアレイ解析	7-8 頁
第2節	結果 1: サイトカイン誘導マクロファージモデルの遺伝子発現プロファイル	
2-1	サイトカイン誘導マクロファージモデルの遺伝子発現変化	8 頁
2-2	階層的クラスタリング解析	8-9 頁
2-3	遺伝子オントロジー解析	9 頁
2-4	Gene Set Enrichment Analysis	9-11 頁
第3節	結果 2: 造血幹細胞移植患者単球の遺伝子発現プロファイル	
3-1	造血幹細胞移植患者単球の遺伝子発現変化	11 頁
3-2	Toll like receptor (TLR) signaling pathway および NOD like receptor (NLR) signaling pathway における階層的クラスタリング解析	11 頁
3-3	急性 GVHD 発症患者における TAK1 遺伝子の発現増加	11-12 頁

第4節 小括	12-13 頁
第3章 単球系細胞における TAK1 の機能解析	
第1節 研究材料と方法	
1-1 5Z-7-Oxozeaenol	14 頁
1-2 サイトカインアレイ	14 頁
1-3 リアルタイム RT-PCR	14-15 頁
1-4 同種リンパ球混合試験	15-16 頁
1-5 同種樹状細胞による T 細胞の活性化	16-17 頁
第2節 結果	
2-1 5Z-7-Oxozeaenol による TAK1 阻害が LPS 刺激下单球の炎症性サイト カインに及ぼす効果	17 頁
2-2 5Z-7-Oxozeaenol による TAK1 阻害が LPS 刺激下单球の TNF α の転写 に及ぼす効果	17-18 頁
2-3 5Z-7-Oxozeaenol による TAK1 阻害が同種リンパ球混合試験における リンパ球の活性化に及ぼす効果	18 頁
2-4 5Z-7-Oxozeaenol による TAK1 阻害が同種樹状細胞による T 細胞の活 性化に及ぼす効果	18 頁
第3節 小括	18-19 頁
第4章 考察	20-22 頁
第5章 総括および結論	23 頁

謝辞

引用文献

図表

第1章 研究の背景

同種造血幹細胞移植 (allogenic hematopoietic stem cell transplantaion: allo-HSCT) は、予後不良の造血器腫瘍に治癒をもたらし得る有効な治療として確立されてきた。ドナー選択や幹細胞供給源の多様化、レシピエントの前処置法の開発により allo-HSCT の適応が広がる一方で、急性移植片対宿主病 (Graft versus host disease: GVHD) は allo-HSCT 後の非再発死亡や Quality of life 低下の主要因であり、改善の必要がある。

急性 GVHD は、ドナー由来の T 細胞が、ヒト白血球抗原 (Human leukocyte antigens: HLAs) 分子やマイナー組織適合性抗原 (minor histocompatibility antigens: mHAs) 分子を標的として、宿主の皮膚、消化管、肝臓等の組織を傷害する免疫反応である。典型的には、斑状の皮疹、嘔気、嘔吐、水様下痢等の消化器症状、胆汁うっ滞性肝炎等の臨床症状を呈する。従来は移植後 100 日までに発症するものを急性 GVHD としていたが、現在は発症時期を問わず、典型的な症状をもって診断する(1)。

急性 GVHD の発症のリスクとして、ドナーと患者間における HLA の不一致があげられる(2)。しかし、HLA 一致血縁ドナーからの移植においても約 40%で急性 GVHD が発症すると報告されており、HLA の不一致以外の急性 GVHD のリスクについて広く検討されてきた(3)。これによると、ドナーの選択においては、非血縁間移植、女性ドナーから男性患者への移植、ABO 型血液型のマイナーミスマッチ等は急性 GVHD の発症を増加させることが報告されている(4, 5)。また、移植幹細胞中の制御性 T 細胞 (Regulatory T-cell: Treg) の割合と急性 GVHD の発症との関連が報告され、臨床応用が試みられている(6)。患者側の要素としては、骨髄破壊的前処置、特に全身放射線照射 (Total body irradiation: TBI) は急性 GVHD の発症を増加させることや、移植後早期の消化管傷害が急性 GVHD の発症を増加させることなどが報告され

ている(3)。

急性 GVHD の免疫病態生理として、3-step model が提唱されている(7)。はじめに、TBI や抗がん剤等の移植前処置によって傷害された宿主の組織から、腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor- α : TNF α) や Interleukin-1 (IL-1), IL-6 などの炎症性サイトカインが放出される。また腸管粘膜傷害によって、lipopolysaccharide (LPS) などの細菌菌体成分の血中への流入がおこる。これらの内因性、外因性刺激により宿主の樹状細胞 (Dendritic cell: DC) をはじめとする抗原提示細胞 (Antigen presenting cell: APC) が活性化される (Step 1)。次のステップでは、宿主 APC によるドナー T 細胞の活性化がおこる。アロ抗原提示を受けて活性化されたドナー T 細胞は、Th1 細胞となり、Interferon (IFN)- γ や IL-2 などのサイトカインを産生し、細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) を誘導する (Step 2)。最終ステップでは、これらの CTL がエフェクター細胞として働き、炎症性サイトカインとともに組織傷害を引き起こす (Step 3)。さらに Th1 細胞が産生する IFN- γ により活性化されたマクロファージから炎症性サイトカインが産生され、GVHD が増幅される (図 1)。

自然免疫を司る DC やマクロファージは、病原体固有の構造 (Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) を認識するパターン認識受容体 (Pattern-recognition receptors: PRRs) を細胞膜表面あるいは細胞質内に発現しており、これにより外部由来の病原体を認識し、インターフェロンや炎症性サイトカイン、ケモカイン等を産生することにより感染初期の生体防御に重要な役割を果たしている(8)。PRRs のうち、Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) や、NOD 様受容体 (Nod-like receptor: NLR) については、急性 GVHD との関連が多く検討されている。TLR はヒトでは TLR1 から TLR10 までの 10 種類が確認されている。このうち TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 は細菌由来の PAMPs を認識し、TLR1, 2, 4, 5, 6 の下流では炎症性サイトカイン

を、TLR7, 9 の下流では I 型インターフェロンを産生する。TLR4 は細胞表面に存在し、グラム陰性桿菌由来の LPS を認識する。Allo-HSCT における後方視的解析では、ドナーあるいは患者の TLR4 における遺伝子変異は急性 GVHD の発症を減少させたが、グラム陰性桿菌による感染は増加したとの報告がある一方で(9)、急性 GVHD の発症を増加させたとの報告もある(10)。TLR9 は細胞内に存在し、細菌の DNA を認識する。急性骨髄性白血病患者に対する allo-HSCT の後方視的解析において、患者の TLR9 における遺伝子変異は急性 GVHD の発症には明らかな関連を認めなかったが、5 年生存率を有意に延長させたと報告されている(11)。また、GVHD モデルマウスを用いた研究では、TLR9 遺伝子ノックアウトにより腸管 GVHD による死亡が減少したと報告されている(12)。TLR5 は細胞表面に存在し細菌の鞭毛を認識するが、GVHD モデルマウスを用いた研究では、TLR5 のアゴニストである flagellin を予防投与することにより、TBI による腸管傷害の緩和、炎症性サイトカインの産生の低下、ドナー由来の制御性 T 細胞の増加等を通じて急性 GVHD が軽減することが報告され、臨床への応用が期待される(13)。NLR はヒトでは 23 種類確認されているが、主に NOD2 と急性 GVHD との関連が検討されている。NOD2 は細胞質内に存在し、細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンを認識し、下流で炎症性サイトカインの転写を亢進させる(8)。Allo-HSCT における後方視的解析では、患者の NOD2 における遺伝子変異は急性 GVHD を増加させることが報告されている(11)。

マクロファージは、骨髄系共通幹細胞から Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) および、Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) により分化した単球に由来し、循環血中からそれぞれの組織に移行して分布する。生体内の微小環境の影響により、様々な活性化状態にあることが知られている。ヒトにおけるマクロファージの研究の多くは、末梢血単球から *in vitro* でサイトカインにより誘導したマクロファージを用

いており、誘導に用いたサイトカインがマクロファージの性質に影響している可能性がある。実際、ヒト末梢血単球にサイトカインを加えて培養することにより、異なる性質のマクロファージや DC が誘導されることが報告されている(14)。GM-CSF により誘導されたマクロファージは炎症惹起性で、LPS 刺激に対して IL-23, IL-12 などの炎症性サイトカインを産生し、Th1 に対し促進的に作用する(15)。活性化 T 細胞や natural killer 細胞等で産生されるサイトカイン IL-32 により誘導されたマクロファージは、IL-1 β や IL-6 などの炎症性サイトカインを産生する(16)。一方 M-CSF により誘導されたマクロファージは抗炎症性サイトカイン IL-10 を産生し、Th1 に抑制的に作用する。M-CSF 同様に c-fms のリガンドである IL-34 によっても、IL-10 を産生する抗炎症性マクロファージが誘導される(17)。M-CSF はヒト血中に安定して存在していることから、生体内マクロファージの定常状態は M-CSF 誘導マクロファージに近いと考えられている(18)。同様に GM-CSF と IL-4 により DC が誘導される(19)。

GVHD モデルマウスによる研究では、M-CSF の移植前投与により GVHD の発症及び関連死亡率が減少することが報告されている(20)。同じくマウスにおいて、IL-32 を抑制することで、急性 GVHD の発症および関連死亡率が減少することが報告されている(21)。これらのサイトカインが、マクロファージの活性化状態に影響し、急性 GVHD の発症や重症度に関与している可能性が示唆される。しかしながら、実際の移植環境下におけるマクロファージの活性化状態と急性 GVHD の発症、程度との関連は未解明である。

本研究の目的は、ヒト単球からサイトカインにより誘導したマクロファージの遺伝子発現プロファイルをもとに、生体内の炎症や自然免疫におけるそれぞれのマクロファージの機能について解析し、さらに、ヒト同種造血幹細胞移植環境下における末梢血単球の遺伝子発現プロファイルを用いて、単球の活性化状態と急性 GVHD の発症および病態との関連を明らかにす

るものである。

第2章 サイトカイン誘導マクロファージモデルと造血幹細胞移植患者単球の遺伝子 発現プロファイル

第1節 研究材料と方法

1-1 倫理審査

研究プロトコールは防衛医科大学校倫理委員会によって承認され（第 812 号）、全ての症例および健常被験者からインフォームドコンセントを得た。

1-2 患者背景

2010 年 11 月から 2012 年 9 月の間に当科において allo-HSCT を受けた造血器腫瘍患者 9 名を対象とし、移植幹細胞の生着後に末梢血から単球を採取した（表 1）。移植時の患者の年齢は 39 歳から 65 歳（中央値 45 歳）、男性が 4 名、幹細胞ソースの内訳は非血縁骨髄が 5 名、血縁骨髄が 2 名、臍帯血が 2 名であった。HLA 一致度は、1 抗原不一致が 1 名、2 抗原不一致が 1 名、3 抗原不一致が 2 名であった。5 名が骨髄破壊的、2 名が非破壊的前処置を受けた。GVHD 予防にはカルシニューリン阻害剤（タクロリムスあるいはシクロスポリン）が投与され、1 名を除いて短期メソトレキセートが併用された。日本造血細胞移植学会のガイドラインに従って、急性 GVHD の診断および重症度を判定した(22)。

1-3 末梢血単球の分離

4 名の健常被験者（男性 2 名、女性 2 名）および 9 名の allo-HSCT を受けた患者から末梢血 20mL を採取し、RosetteSep human monocyte enrichment cocktail (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) を使用し、単球を分離した。サイトスピン標本のライトギムザ（WG）染色による形態観察では単球分画は 85% 以上含まれていた。

1-4 サイトカイン誘導マクロファージモデルの作成

健常被験者から採取した単球にサイトカイン刺激を加え、サイトカ

イン誘導マクロファージを作成した。末梢血から分離した単球を 1×10^6 個/ml の濃度とし、24well プレートに 1 ml/well の細胞浮遊液に調整した。培地には 10% の非働化したウシ胎児血清 (Thermo, Melbourne, Australia) を加えた RPMI-1640 (Sigma, St Louis, USA) を用いた。炎症性マクロファージモデルは IL-32 γ (IL-32-M Φ) あるいは GM-CSF (GM-M Φ) 添加によって作成した。Recombinant Human IL-32 γ (R&D systems, Minneapolis, USA) 600ng/ml、あるいは Recombinant Human GM-CSF (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 250ng/ml を加え、37°C 5%CO₂ で 7 日間培養した。培地およびサイトカインは 72 時間に一回交換した (14, 23)。炎症性マクロファージモデルは M-CSF (M-M Φ) あるいは IL-34 (IL-34-M Φ) 添加によって作成した。Recombinant Human M-CSF (Milteny Biotec) 100ng/ml、あるいは Recombinant Human IL-34 (R&D systems) 100ng/ml を加え、上記の培養条件により培養した。培養後 total RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。

1-5 マイクロアレイ解析

分離後の単球あるいは培養後のマクロファージから RNeasy ミニキット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を分離、精製した。5 μ g の total RNA をテンプレートとし、Ovation RNA Amplification System V2 (NuGen, San Carlos, USA) を用いてランダムプライマーおよび polyT プライマーにより二重鎖 cDNA プローブを合成した。cDNA を Cy3 で標識し、マイクロアレイにハイブリダイズさせた。オリゴヌクレオチドマイクロアレイは、24,000 遺伝子のプローブが配置された NimbleGen Gene Expression Array (Roche NimbleGen Inc., Madison, Wisconsin, USA) を用いた。42°C で 16 時間のインキュベーションを実施した後、NimbleGen MS 200 Microarray Scanner (Roche NimbleGen Inc.) でスキャンを実施し、NimbleGen DEVA software (Roche NimbleGen Inc.) を用いて Robust

Multi-chip Analysis アルゴリズムによるデータの標準化を行った。標準化したデータは GeneSpringGX11 (Agilent Technologies, CA, USA) により解析した。分子間ネットワーク解析およびパスウェイ解析には Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) ソフトウェア (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) を用いた。

第2節 結果 1: サイトカイン誘導マクロファージモデルの遺伝子発現プロフィール

2-1 サイトカイン誘導マクロファージモデルの遺伝子発現変化

IL-32-MΦ、GM-MΦ、M-MΦ、IL-34-MΦ の遺伝子発現データを標準化の後に GeneSpring にとりこみ、Filter on expression により発現量 20% 以下のデータを除外した。24,000 個中 19,198 個の遺伝子発現データが抽出され、これを解析対象とした。

M-MΦを基準とし、IL-32-MΦ、GM-MΦ、IL-34-MΦにおける遺伝子発現を比較した(表2)。TNF α induced protein3 interacting protein3 (TNIP3)はIL-32-MΦにおいて171.0倍と最も発現が増加し、GM-MΦでも46.3倍と増加していた。IL-34-MΦでは2.1倍と軽度増加していた。発現の変化が上位であった遺伝子のうち、サイトカインやケモカインでは、IL-32-MΦではIL-1 α , CCL23, CCL18が増加し、GM-MΦではIL-1 α , CCL23, IL-1 family member 8 (IL1F8)が増加し、IL-34-MΦではCCL13が増加した。また、GM-MΦではIL-10が減少し、IL-34-MΦではCXCL10, IL-15が減少した。受容体では、IL-32-MΦではCCR7が増加し、GM-MΦではIL-7 receptor (IL-7R), IL3-R α が増加し、IL-34-MΦではCCR2が増加した。IL-32-MΦではIL-1R2が減少し、GM-MΦではIL-1R1, IL-1R2が減少した。

2-2 階層的クラスタリング解析

M-MΦと比較して 2 倍以上発現が増加した遺伝子は、IL-32-MΦで 1,764 個、GM-MΦで 776 個、IL-34-MΦで 22 個であった。M-MΦと比較して 2 倍以上発現が減少した遺伝子は、IL-32-MΦで 1,514 個、GM-MΦで 878 個、IL-34-MΦで 9 個であった。M-MΦと比較して、2 倍以上の発現の増減があった遺伝子の総数は 4,189 個であった(図 2)。この遺伝子発現データについて、GeneSpring を用いて階層的クラスタリング解析を行った(図 3)。M-MΦと IL-34-MΦでは遺伝子発現プロファイルが類似し、個人間の差異がサイトカイン間の差異を上回った。IL-32-MΦは最も独立したプロファイルを示し、GM-MΦは、M-MΦおよび IL-34-MΦと類似しつつ、独立したプロファイルを示した。

2-3 遺伝子オントロジー解析

M-MΦとの比較で 2 倍以上発現が増加した遺伝子発現データについて、GeneSpring を用いて遺伝子オントロジー(Gene Ontology:GO)解析を行った(表 3)。IL-32-MΦでは、52 の GO カテゴリーで corrected p-value 0.05 を満たした。GM-MΦでは、18 つの GO カテゴリーで corrected p-value 0.05 を満たした。一方、IL-34-MΦではいずれの GO カテゴリーも corrected p-value 0.05 を満たさなかった。GO カテゴリーのうち、immune system process と、immune response において IL-32-MΦでは 65 個の遺伝子で発現が増加し GM-MΦでは 52 個の発現が増加し、いずれの MΦにおいても corrected p-value 0.05 を満たした(表 4)。これらのカテゴリーには複数のケモカインやインターロイキンが含まれ、炎症性マクロファージモデルと抗炎症性マクロファージモデル間で、炎症に関わる遺伝子の発現の変化が有意であることを示した。

2-4 Gene Set Enrichment Analysis

Filter on expression により抽出された 19,198 個の遺伝子発現データについて、GSEA ソフトウェアを用いてパスウェイ解析を行った。

Molecular signature database (MSigDB) より、186 種類の既知のパスウェイのデータセットである、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) gene set を選択した。

(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)。

IL-32-MΦ と M-MΦ 間では、IL-32-MΦ において 83 種類の gene set が enrich され、GM-MΦ と M-MΦ 間では、GM-MΦ において 97 種類の gene set が enrich された(表 5)。

IL-32-MΦ において enrich された gene set には、急性 GVHD との関連の可能性が指摘されている TLR signaling pathway および NLR signaling pathway が含まれた。

TLR は最初に発見された PRRs で、ヒトでは 10 種類同定されている。LPS や核酸、flagellin などの細菌菌体成分がリガンドとして同定されている。TLR によるリガンドの認識は、MyD88 依存性に NF-kappa-B や MAP キナーゼの活性化をもたらし、TNF α や IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインが産生される。TLR3 および 4 の下流には MyD88 非依存性経路も存在し、活性化により IFN が産生される(24)。代表的な NLR である NOD1, NOD2 は細胞質に存在し、リガンドとしてペプチドグリカン等が同定されている。下流では TLR signaling pathway と同じく、NF-kappa-B や MAP キナーゼを活性化し炎症性サイトカインが産生される(25)。

IL-32-MΦ で発現が増加した遺伝子は、KEGG TLR signaling pathway gene set を構成する 102 個の遺伝子のうち、発現比 1.2 倍をカットオフとすると 39 個であった(表 6-1)。KEGG NLR signaling pathway gene set を構成する 62 個の遺伝子のうち、発現比 1.2 倍をカットオフとすると 18 個であった(表 6-2)。いずれの signaling pathway においても、転写因子 NF-kappa-B、MAPK1 (ERK), MAPK11/12 (p38) キナーゼの発現が増加した。TLR signaling pathway の下流では炎症性サイトカイン IL-8, IL-6, IL-12

β , IL-1 β 等の発現が増加していた。NLR signaling pathway の下流では炎症性サイトカイン IL-8、ケモカイン CCL2 の発現が増加した(図 4A, B)。

第3節 結果 2: 造血幹細胞移植患者単球の遺伝子発現プロファイル

3-1 造血幹細胞移植患者単球の遺伝子発現変化

対象患者 9 名のうち、臨床所見や病理組織診断により、7 名が急性 GVHD と診断された。急性 GVHD の重症度は、2 名が grade III、3 名が grade II、2 名が grade I であった(表 1)。

Filter on expressionにより発現量 20%以下のデータを除外した。24,000 個中 17,511 個の遺伝子発現データが抽出された。この遺伝子発現データを対象に、GeneSpring を用いて急性 GVHD の有無や grade によるクラスタリング解析を施行したが、明らかなプロファイルの傾向は見出されなかった。

3-2 Toll like receptor (TLR) signaling pathway および NOD like receptor (NLR) signaling pathway における階層的クラスタリング解析

造血幹細胞移植患者単球の遺伝子発現データに対し、KEGG TLR signaling pathway gene set あるいは KEGG NLR signaling pathway gene set に含まれる遺伝子による階層的クラスタリング解析を行った。いずれの解析においても、急性 GVHD の有無でクラスタリングされる傾向を認めた(図 5)。これらの signaling pathway に含まれる遺伝子について、急性 GVHD 発症患者単球と非発症患者単球のそれぞれ平均値をとり比較した(表 7)。急性 GVHD 発症患者単球において、TNF, IL-1 β , IL-6, IL-18 等の炎症性サイトカインの発現が増加しており、TLR signaling pathway や NLR signaling pathway を活性化する方向に遺伝子発現が変化していると考えられた。

3-3 急性 GVHD 発症患者における TAK1 遺伝子の発現増加

急性 GVHD 発症患者単球では非発症患者単球と比較して、MAP3K7 (TGF- β Activated Kinase 1: TAK1) の発現が 9.8 倍と著明に増加していた。TAK1 は MAPK kinase family に属し、NF- κ B signaling pathway および MAPK signaling pathway の活性化に必須のキナーゼである。このことから、急性 GVHD 発症患者単球では、TAK1 の発現増加を介して TLR signaling pathway および NLR signaling pathway の下流の NF- κ B signaling pathway および MAPK signaling pathway が活性化し、炎症性サイトカインの産生亢進を通じて急性 GVHD の発症、増悪に関与している可能性を見出した。

第4節 小括

急性 GVHD の免疫病態モデル(7)より、宿主の DC やマクロファージ等の単球系細胞は、急性 GVHD の発症、維持増悪に関与していると考えられている。一方で、モデルマウスを用いた研究では、M-CSF の投与や IL-32 の抑制は急性 GVHD を軽減することが報告されている(20, 21)。これらのサイトカインはマクロファージの活性化状態に影響すると考えられていることから、マクロファージの活性化状態が急性 GVHD の発症や病態と関連する可能性が高いと考え、遺伝子発現プロファイルからの解明を試みた。

まず、健常被験者の単球をサイトカイン処理することにより、炎症性マクロファージと抗炎症性マクロファージモデルを作成し、マイクロアレイで両者の遺伝子発現プロファイルを比較した。GeneSpring を用いた階層的クラスタリング解析では、炎症性マクロファージモデル, IL-32-M Φ は、抗炎症性マクロファージモデル, M-M Φ とは非類似の遺伝子発現プロファイルを示し、他の炎症性マクロファージモデル, GM-M Φ はこれらの中間の遺伝子発現プロファイルを示した。一方、抗炎症性マ

クロファージモデル, IL-34-MΦは、M-MΦと類似の遺伝子発現プロファイルを示した。遺伝子オントロジー解析では、IL-32-MΦ、GM-MΦはともに immune system process ならびに immune response に関連する遺伝子において、M-MΦと比較して発現が増加することが示された。GSEA ソフトウェアを用いたパスウェイ解析では、IL-32-MΦでは M-MΦとの比較で、急性 GVHD との関連が指摘されている PRRs である TLR 及び NLR の signaling pathway が enrich された。これらの signaling pathway は、下流で NF-kappa-B signaling pathway や MAPK signaling pathway を活性化して炎症性サイトカインを産生する点が共通している。実際に IL-32-MΦでは NF-kappa-B、MAPK1 (ERK)、MAPK11/12 (p38) の発現増加がみられ、その下流での炎症性サイトカインの発現の増加を認めた。

造血幹細胞移植患者単球の遺伝子発現プロファイルをこれらの signaling pathway に含まれる遺伝子でクラスタリングすると、急性 GVHD の発症の有無でクラスタリングされる傾向を認めた。急性 GVHD 発症患者では、TAK1 の発現が著明に増加しており、TAK1 の発現増加を通じて TLR signaling pathway や NLR signaling pathway が活性化しているものと考えられる。そして、その下流で NF-kappa-B signaling pathway や MAPK signaling pathway が活性化し、炎症性サイトカインの産生亢進を通じて急性 GVHD の発症や増悪に関与している可能性を見出した。

第3章 単球系細胞における TAK1 の機能解析

第1節 研究材料と方法

1-1 5Z-7-Oxozeaenol

TAK1 機能解析には、5Z-7-Oxozeaenol を Sigma aldrich 社より購入して使用した。これは TAK1 kinase 阻害剤としてスクリーニングされた化合物である。MAP3K ファミリーのなかで TAK1 を選択的に阻害することが確認されている (26)。

1-2 サイトカインアレイ

健常被験者の単球からの炎症性サイトカイン産生に TAK1 阻害が与える影響をサイトカインアレイにより確認した。健常被験者から採取した末梢血から単球を分離し、 2×10^6 個/ml の濃度とし、24well プレートに 1 ml/well の細胞浮遊液とした。5Z-7-Oxozeaenol を 50nM および 100nM の濃度で添加し、37°C, 5%CO₂ 条件下で 1 時間前処理後に、*Salmonella enteritidis* 由来 LPS (Sigma) を 100ng/ml 添加し、計 16 時間培養した。5Z-7-Oxozeaenol は DMSO で溶解し、1μl/well となるよう調整した。培養後の単球から、上清を 600 μl/well 回収し、Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A (ARY005; R&D systems)を用いて、36 種類のサイトカインについて評価した。メンブレンからの化学発光の検出および数値化には LAS3000 イメージアナライザーおよび Multi Gauge ソフトウェア(富士フイルム、東京、日本)を用いた。

1-3 リアルタイム RT-PCR

LPS 刺激下での健常被験者単球の TNFα の遺伝子発現量に TAK1 阻害が与える影響を、リアルタイム RT-PCR 法により比較した。健常被験者 3 名から採取した末梢血から単球を分離し、 2×10^6 個/ml の濃度とし、24well プレートに 1 ml/well の細胞浮遊液とした。5Z-7-Oxozeaenol を 100nM の濃度で添加し、37°C の 5%CO₂ インキュベーターで 1 時間前処理後

に LPS を 100ng/ml 添加し、計 16 時間培養した。5Z-7-Oxozeaenol は DMSO で溶解し、1 μ l/well となるよう調整した。培養後の単球を回収し、RNeasy ミニキットにより total RNA を抽出した。Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) および T7-oligo[dT] プライマーを用いて、55°C で 30 分間、total RNA 800ng を逆転写させることにより、一本鎖 cDNA を作成した。DNA の標識には Universal Probe Library probes (Roche) を用いた。PCR 反応には、Light Cycler 480 (Roche) を使用した。内部標準として、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) を用いた。PCR 反応は、各サンプルにつき triplicate で実施した。

1-4 同種リンパ球混合試験

同種リンパ球混合試験は、同種単核球を混合培養することによるリンパ球活性化の観察であり、移植時の免疫反応の *in vitro* モデルとして施行される。同種リンパ球混合試験における TAK1 阻害の効果を確認した。健常被験者 a (ドナー)、および b (レシピエント) から末梢血を採取し、Ficoll-Conray 比重遠心法により単核球を単離した。レシピエント単核球の一部は組織培養ディッシュに 16 時間静置し付着細胞を除いて回収することにより、レシピエント単球除去単核球とした。レシピエント単核球およびレシピエント単球除去単核球をマイトマイシン C (MitomycinC: MMC) (協和発酵工業, 日本) 40 μ l/ml で 37°C、40 分間処理した。ドナー単核球、MMC 処理レシピエント単核球、MMC 処理レシピエント単球除去単核球を、それぞれ 20% ヒト AB 型血清を加えた RPMI-1640 で 5×10^5 個/ml の浮遊液とした。96well プレートにドナー単核球と、MMC 処理レシピエント単核球もしくは MMC 処理レシピエント単球除去単核球を 100 μ l/well の量で等量混合した。ドナー単核球を、MMC 処理自己単核球もしくは MMC 処理自己単球除去単核球と混合培養したものを陰性コントロールとし、放射線の取り込みを陰性コントロールとの比率で計算したものを

Stimulation index としてドナーリンパ球の活性化を評価した。

1-5 同種樹状細胞による T 細胞の活性化

急性 GVHD の免疫病態生理モデルでは、移植前処置により傷害された組織から放出された炎症性サイトカインや、血中に流入した LPS などの内因性、外因性刺激により活性化されたレシピエント DC は、ドナー T 細胞の活性化を通じて急性 GVHD の発症、増悪に関与するとされる。同種 DC と T 細胞の混合培養により、同種 DC による T 細胞の活性化における TAK1 阻害の効果を確認した。DC は以下の要領で単球から作成した。健常被験者 2 名から RosetteSep で単球を単離し、1%の非働化したウシ胎児血清を加えた RPMI-1640 培地で 1×10^6 個/mL の細胞浮遊液に調整した。Recombinant human GM-CSF 100ng/ml および、Recombinant Human IL-4 (R&D systems) 40ng/ml を加えて 6 日間培養し、単球由来 DC に分化させ、LPS 10ng/ml を加えてさらに 2 日間培養し、成熟 DC とした (27)。培地およびサイトカインは 48 時間に一回交換した。培養には組織培養ディッシュを使用し、付着細胞のみを回収した。T 細胞は以下の要領で単離した。健常被験者 2 名の末梢血から、Lymphoprep (Axis-shield, Norway) により単核球を単離し、組織培養ディッシュに静置し付着細胞を除去した後、Nylon wool カラムを通して T 細胞に精製した (28)。異なる被験者から得られた DC 3×10^3 個/100 μ L と T 細胞 1×10^5 個/100 μ L (DC:T 細胞=1:30) を 96well プレートで混合した。5Z-7-Oxozeaenol を 100nM 加え、37°C, 5% CO₂ 条件下で 5 日間培養後に、BrdU を 100 μ M 添加し 24 時間培養した。培地および 5Z-7-Oxozeaenol は培養開始 72 時間で一度交換した。培養後細胞を固定し、ペルオキシダーゼ標識抗 BrdU 抗体と反応させた後に基質を加え、LAS3000 イメージアナライザーおよび Multi Gause ソフトウェアを用いて化学発光の検出、数値化をおこなった。DC と T 細胞の提供者を入れ替えた組み合わせでも同様の実験を行った。各培養は triplicate で実

施した。

第2節 結果

2-1 5Z-7-Oxozeaenol による TAK1 阻害が LPS 刺激下单球の炎症性サイトカインに及ぼす効果

健常被験者の単球に対して LPS 刺激を加えることにより、上清中の IL-8 は著明に増加し、IL-6, IL-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1ra), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), TNF α も増加傾向がみられた。Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1 (Serpin E1) については LPS 刺激の有無に関わらず同程度検出された (図 6)。サイトカインアレイで評価したその他のサイトカイン (C5/C5a, CD40 Ligand, G-CSF, GM-CSF, GR α (CXCL1), I-309 (CCL1), Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), IFN- γ , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-16, IL-17, IL-17E, IL-23, IL-27, IL-32 α , IP-10 (CXCL10), I-TAC (CXCL11), MCP-1 (CCL2), MIP-1 β (CCL4), SDF-1 (CXCL12), Triggering receptor expressed on monocytes 1 (TREM-1)) については、LPS 刺激の有無に関わらず検出されなかった。

次に、TAK1 阻害の有無による LPS 刺激後の炎症性サイトカイン産生の変化を観察した。5Z-7-Oxozeaenol 50nM により、IL-6 と TNF α はサイトカインアレイの検出感度下限まで低下した。その他のサイトカインも 5Z-7-Oxozeaenol の濃度に依存して低下した。

2-2 5Z-7-Oxozeaenol による TAK1 阻害が LPS 刺激下单球の TNF α の転写に及ぼす効果

5Z-7-Oxozeaenol による TAK1 阻害が LPS 刺激下の TAK1 および TNF α の転写に与える影響を、健常被験者 3 名の単球を用いてリアルタイム RT-PCR 法で確認した。5Z-7-Oxozeaenol により、健常被験者のいずれの

単球においても $\text{TNF}\alpha$ の発現は低下した(図 7A)。また、5Z-7-0xozeaenol により TAK1 自体の発現も低下した(図 7B)。

2-3 5Z-7-0xozeaenol による TAK1 阻害が同種リンパ球混合試験におけるリンパ球の活性化に及ぼす効果

同種リンパ球混合試験において、レシピエント単核球との混合培養によるドナーリンパ球の活性化は 5Z-7-0xozeaenol により抑制された。また、レシピエント単核球から単球を除去することによりドナーリンパ球の活性化は抑制されたが、5Z-7-0xozeaenol により抑制は軽減された(図 8)。これより、同種リンパ球混合試験におけるリンパ球活性化はレシピエント単球に依存することが示された。また、5Z-7-0xozeaenol によるリンパ球活性化の抑制は、レシピエント単球の TAK1 の阻害による効果と推測された。

2-4 5Z-7-0xozeaenol による TAK1 阻害が同種樹状細胞による T 細胞の活性化に及ぼす効果

同種 DC と混合培養した場合の T 細胞の活性化は、自己 DC と混合培養した場合と比較して亢進した。同種 DC と混合培養した場合の T 細胞の活性化は 5Z-7-0xozeaenol により抑制された。自己 DC と混合培養した場合の T 細胞の活性化も 5Z-7-0xozeaenol により抑制されたが、同種 DC と混合培養した場合と比較して抑制は軽度であった(図 9)。これより、T 細胞は同種 DC により活性化され、これは 5Z-7-0xozeaenol により抑制されることが示された。また、5Z-7-0xozeaenol による T 細胞活性化の抑制は、同種 DC の TAK1 の阻害による効果と推測された。

第3節 小括

TAK1 キナーゼ阻害剤 5Z-7-0xozeaenol を用いて、単球系細胞における TAK1 の果たす機能についての解析を行った。LPS 刺激下单球の上清では、5Z-7-0xozeaenol により IL-6, $\text{TNF}\alpha$ 等複数の炎症性サイトカイン濃度

が低下した。リアルタイム RT-PCR 法により、5Z-7-0xozeaenol は LPS 刺激下单球における TNF α の発現を抑制することを確認した。また、5Z-7-0xozeaenol により TAK1 自体の発現も抑制された。同種リンパ球混合試験では、ドナーリンパ球の活性化は 5Z-7-0xozeaenol により抑制された。レシピエント単核球から単球を除去することによりドナーリンパ球の活性化は抑制されたが、5Z-7-0xozeaenol により抑制は軽減された。ドナーリンパ球活性化はレシピエント単球に依存することが示された。また、レシピエント単球の TAK1 を阻害することによりドナーリンパ球の活性化は抑制されると推測された。同種 DC と T 細胞の混合培養では、T 細胞の活性化は同種 DC により亢進し、5Z-7-0xozeaenol により抑制されることが示された。同種 DC との混合培養における、5Z-7-0xozeaenol による T 細胞活性化の抑制は、DC の TAK1 阻害による効果と推測された。

第4章 考察

造血幹細胞移植治療後の患者単球の遺伝子発現プロファイリングの解析により、急性 GVHD を発症した患者の単球では、炎症性シグナル伝達因子 TAK1 の活性化及び、TNF α を含む炎症性サイトカインの産生亢進が確認された。組織へ移入した単球は、局所性サイトカイン等の影響を受け、炎症性マクロファージへと分化し GVHD を誘導する。サイトカイン分化誘導マクロファージの遺伝子発現プロファイル解析では、M-CSF 誘導マクロファージは、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生が亢進しているのに対し、IL-32 誘導マクロファージでは NF-kappa-B 及び MAPK signaling pathway の活性化を通じて、炎症性サイトカインを産生していることが明らかとなった。したがって、炎症局所でのサイトカインバランスの違いにより、単球もそれぞれ独自のシグナル伝達経路の活性化を受け、環境に応じた組織マクロファージへと分化すると考えられる。

急性 GVHD 患者単球で発現が増加していた TAK1 は、MAPK kinase family に属する TLR シグナル伝達に必須のキナーゼであり、NF- κ B、p38MAPK や ERK 等、複数のシグナル伝達経路を活性化することが、強制発現系や炎症性自己免疫疾患モデルマウスでの遺伝子ノックダウン等で示されている(29-31)。このことは、急性 GVHD 患者単球では複数の炎症性経路が活性化状態にあることを示唆するものであり、TAK1 が GVHD のコントロールを目的とした分子治療標的として有用である可能性を示す。LPS-TLR4 刺激ヒト単球での TAK1 抑制試験では、複数の炎症性サイトカインの産生が抑制され、TAK1 の炎症性シグナル伝達分子としての重要性を裏付ける結果となった。

これまで自然免疫を標的とした急性 GVHD の抑制や治療法としては、抗サイトカイン療法が多く用いられ、マウスでの LPS アンタゴニストによる急性 GVHD 抑制の報告や(32)、ヒトでの急性 GVHD に対する IL-1 β アンタゴニスト(33)、抗 TNF 抗体、抗 IL-2R 抗体や抗 IL-6R 抗体等の有用性が報告さ

れてきた(34, 35)。しかしながら、その治療成績は十分ではなく、わが国では保険適応外の治療である。その他に、腸内細菌等の内因性 TLR リガンドによる腸管 APC の活性化に対して、プロバイオティクスによる GVHD 予防効果が報告されている(36)。また、分子標的療法では、MyD88 阻害剤による GVHD での炎症反応活性化の抑制等がマウスモデルで報告されているが(37)、ヒト GVHD に臨床応用されているものは現時点ではまだない。

急性GVHDの発症には、活性化組織マクロファージから産生される TNF α 等による直接的な組織障害の他、APCからの抗原提示により活性化されたCTLによる組織障害が重要である(38)。このCTLの活性化を担うAPCは主としてDCによるものと考えられている。DCは、移植前処置によって発生する生体の炎症環境によってその抗原提示能を亢進させ、所属リンパ節のT細胞を活性化することにより間接的にGVHDを増悪させる(39)。本研究で確認された TAK1が活性化した単球由来のDCが、GVHDにどのような影響を与えるのか、また、TAK1の抑制によってCTL誘導やGVHDを抑制することが可能であるのか、今後、さらなる臨床的検証が必要である。

GVHD 発症例で白血病の再発率が低下することが報告されて以来、臨床的に Graft-versus-leukemia (GVL) 効果は GVHD の発症と密接に関係することが明らかとなった。モデルマウスを用いた研究によって、GVL も GVHD と同様に、アロ抗原 (HLAs、mHAs) を発現した宿主由来の APC によって誘導されることが示され、白血病細胞のみではドナーCTL が十分に活性化されないことがわかっている(40)。一方、MHC 適合骨髄移植マウスに対して、宿主白血病細胞の移植と donor lymphocyte infusions を行った GVL 効果の検証では、TLR リガンドによる APC の活性化が、GVL の増強に重要であるとされた(41)。したがって、TLR シグナルの過剰な抑制は GVL 効果の減弱をもたらす可能性もあり、臨床の現場においては、GVHD 予防効果とのバランスが重要と考えられる。

現在、急性 GVHD の予防は、カルシニューリン阻害剤による T 細胞の抑制が標準予防法として確立されており、発症時の標準的初期治療薬は副腎皮質ステロイドである。ステロイド抵抗性の場合は、抗ヒト T 細胞グロブリンやミコフェノール酸モフェチルによる免疫抑制の強化や、抗サイトカイン療法等、さまざまな二次療法が報告されている。しかしながら、比較試験によってその有用性が示されているものではなく、標準治療がないのが現状である。LPS 刺激によって TLR4 シグナルが活性化した炎症性マクロファージでは、TAK1 の活性はデキサメタゾン投与によっても抑制されず、ステロイド耐性であることが報告されている (42)。また、ステロイド抵抗性の皮膚や腸管 GVHD において、マクロファージの組織浸潤が多く認められ、皮膚 GVHD においては、マクロファージの浸潤の程度が予後に相関することが示されている (43)。これらのことから、ステロイド抵抗性 GVHD においては、活性化マクロファージに対する TAK1 の抑制が治療に効果的である可能性がある。また、TAK1 は、GVHD のエフェクター細胞である T 細胞の機能獲得にも重要な因子である。T 細胞の活性化と増殖には TAK1 による MAPK シグナルの活性化が必須であり、TAK1-JNK 経路を抑制すると活性化 T 細胞がアポトーシスを起こし排除されることが報告されている (44)。実際の移植における GVHD の発症の機序および病態には、APC による自然免疫の活性化と T 細胞を中心とした獲得免疫が複雑に関連していると考えられる。TAK1 は自然免疫と獲得免疫の双方に関連しており、急性 GVHD の制御の標的分子として有用である可能性がある。

第5章 総括および結論

炎症性マクロファージモデル IL-32-MΦ では TLR signaling pathway および NLR signaling pathway に共通する NF- κ -B、MAPK1 (ERK)、MAPK11/12 (p38) の発現が増加し、その下流での炎症性サイトカインの発現が増加した。

造血幹細胞移植患者単球の遺伝子発現は、TLR signaling pathway および NLR signaling pathway に含まれる遺伝子によって急性 GVHD の有無によりクラスタリングされた。急性 GVHD を発症した患者単球では TAK1 および TNF, IL-1 β , IL-6, IL-18 等の炎症性サイトカインの発現が増加した。TAK1 の発現増加は、TLR signaling pathway や NLR signaling pathway に共通する NF- κ -B signaling pathway や MAPK signaling pathway を活性化し、炎症性サイトカインの産生亢進を通じて急性 GVHD の発症や増悪に関与している可能性を見出した。

健常人単球系細胞における TAK1 の機能解析では、LPS 刺激下单球の上清中の炎症性サイトカインの濃度は 5Z-7-Oxozeaenol により低下した。リアルタイム RT-PCR 法による発現解析では、5Z-7-Oxozeaenol は LPS 刺激下单球における TNF α の発現を抑制した。また TAK1 自体の発現も抑制した。

同種リンパ球混合試験におけるドナーリンパ球の活性化は 5Z-7-Oxozeaenol により抑制された。ドナーリンパ球の活性化はレシピエントの単球に依存することが示され、ドナーリンパ球の活性化は、レシピエント単球の TAK1 阻害により抑制されることが推測された。

同種 DC と T 細胞の混合培養により、T 細胞の活性化は同種 DC により亢進し、5Z-7-Oxozeaenol により抑制された。T 細胞の活性化は、同種 DC の TAK1 阻害により抑制されることが推測された。

TAK1 は急性 GVHD の制御の標的分子となりうる可能性を見出した。

謝辞

本論文を作成するにあたり、御指導、御高閲を賜りました、防衛医科大学校内科学講座教授 木村文彦先生に心より感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり御指導頂きました防衛医科大学校内科学講座講師 佐藤謙先生、同助教 小林真一先生、同 大澤有紀子先生に深謝申し上げます。

本研究に際し、貴重な御助言、御協力を賜りました諸先生はじめ、すべての方々に深く御礼申し上げます。

最後に、ここまで支えてくれた夫 真一、娘 杏美、双方の両親に心から感謝します。

引用文献

1. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 Dec;11(12):945-56.
2. Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Aug;13(8):965-74.
3. Jagasia M, Arora M, Flowers ME, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):296-307.
4. Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):3214-9.
5. Ludajic K, Balavarca Y, Bickeboller H, Rosenmayr A, Fischer GF, Fae I, et al. Minor ABO-mismatches are risk factors for acute graft-versus-host disease in hematopoietic stem cell transplant patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Nov;15(11):1400-6.
6. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011 Jan 20;117(3):1061-70.
7. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease.

Lancet. 2009 May 2;373(9674):1550-61.

8. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011 Feb;30(1):16-34.

9. Lorenz E, Schwartz DA, Martin PJ, Gooley T, Lin MT, Chien JW, et al. Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(7):384-7.

10. Elmaagacli AH, Koldehoff M, Hindahl H, Steckel NK, Trenscher R, Peceny R, et al. Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation*. 2006 Jan 27;81(2):247-54.

11. Elmaagacli AH, Steckel N, Ditschkowski M, Hegerfeldt Y, Ottinger H, Trenscher R, et al. Toll-like receptor 9, NOD2 and IL23R gene polymorphisms influenced outcome in AML patients transplanted from HLA-identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant*. 2011 May;46(5):702-8.

12. Heimesaat MM, Nogai A, Bereswill S, Plickert R, Fischer A, Loddenkemper C, et al. MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease. *Gut*. 2010 Aug;59(8):1079-87.

13. Hossain MS, Jaye DL, Pollack BP, Farris AB, Tselanyane ML, David E, et al. Flagellin, a TLR5 agonist, reduces graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients while enhancing antiviral immunity. *J Immunol*. 2011 Nov 15;187(10):5130-40.

14. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and

anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol.* 2006 Feb;79(2):285-93.

15. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 30;101(13):4560-5.

16. Netea MG, Lewis EC, Azam T, Joosten LA, Jaekal J, Bae SY, et al. Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Mar 4;105(9):3515-20.

17. Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, Garo E, Ifrah N, Guardiola P, et al. IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFNgamma. *PLoS One.* 2013;8(2):e56045.

18. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006 Nov 15;177(10):7303-11.

19. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 19;93(6):2588-92.

20. Hashimoto D, Chow A, Greter M, Saenger Y, Kwan WH, Leboeuf M, et al. Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Exp Med.* 2011 May 9;208(5):1069-82.

21. Marcondes AM, Li X, Tabellini L, Bartenstein M, Kabacka J, Sale GE, et

- al. Inhibition of IL-32 activation by alpha-1 antitrypsin suppresses alloreactivity and increases survival in an allogeneic murine marrow transplantation model. *Blood*. 2011 Nov 3;118(18):5031-9.
22. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974 Oct;18(4):295-304.
23. Chihara T, Suzu S, Hassan R, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Motoyoshi K, et al. IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ*. 2010 Dec;17(12):1917-27.
24. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*. 2010 Mar 26;32(3):305-15.
25. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):549-59.
26. Ninomiya-Tsuji J, Kajino T, Ono K, Ohtomo T, Matsumoto M, Shiina M, et al. A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *J Biol Chem*. 2003 May 16;278(20):18485-90.
27. Betts BC, St Angelo ET, Kennedy M, Young JW. Anti-IL6-receptor-alpha (tocilizumab) does not inhibit human monocyte-derived dendritic cell maturation or alloreactive T-cell responses. *Blood*. 2011 Nov 10;118(19):5340-3.
28. Ratzinger G, Reagan JL, Heller G, Busam KJ, Young JW. Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the level of antigen presentation in allogeneic graft-host interactions in transplantation. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1422-9.

29. Ninomiya-Tsuji J, Kajino T, Ono K, Ohtomo T, Matsumoto M, Shiina M, et al. A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *The Journal of biological chemistry*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 May 16;278(20):18485-90.
30. Holtmann H, Enninga J, Kalble S, Thiefes A, Dorrie A, Broemer M, et al. The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *J Biol Chem*. 2001 Feb 2;276(5):3508-16.
31. Courties G, Seiffart V, Presumey J, Escriou V, Scherman D, Zwerina J, et al. In vivo RNAi-mediated silencing of TAK1 decreases inflammatory Th1 and Th17 cells through targeting of myeloid cells. *Blood*. 2010 Nov 4;116(18):3505-16.
32. Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, Teshima T, Hill GR, Tesolin A, et al. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 2001 Jun;107(12):1581-9.
33. Antin JH, Weisdorf D, Neuberg D, Nicklow R, Clouthier S, Lee SJ, et al. Interleukin-1 blockade does not prevent acute graft-versus-host disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interleukin-1 receptor antagonist in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2002 Nov 15;100(10):3479-82.
34. Tsimberidou AM, Thomas D, O'Brien S, Andreeff M, Kurzrock R, Keating M, et al. Recombinant human soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor (p75) fusion protein Enbrel in patients with refractory hematologic malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002 Sep;50(3):237-42.
35. Drobyski WR, Pasquini M, Kovatovic K, Palmer J, Douglas Rizzo J, Saad

- A, et al. Tocilizumab for the treatment of steroid refractory graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Dec;17(12):1862-8.
36. Gerbitz A, Schultz M, Wilke A, Linde HJ, Scholmerich J, Andreessen R, et al. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4365-7.
37. Loiarro M, Capolunghi F, Fanto N, Gallo G, Campo S, Arseni B, et al. Pivotal Advance: Inhibition of MyD88 dimerization and recruitment of IRAK1 and IRAK4 by a novel peptidomimetic compound. *J Leukoc Biol*. 2007 Oct;82(4):801-10.
38. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jun;12(6):443-58.
39. Koyama M, Hashimoto D, Aoyama K, Matsuoka K, Karube K, Niino H, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):2088-95.
40. Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JL. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med*. 2005 Nov;11(11):1244-9.
41. Durakovic N, Radojicic V, Skarica M, Bezak KB, Powell JD, Fuchs EJ, et al. Factors governing the activation of adoptively transferred donor T cells infused after allogeneic bone marrow transplantation in the mouse. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4564-74.
42. Bhattacharyya S, Ratajczak CK, Vogt SK, Kelley C, Colonna M, Schreiber RD, et al. TAK1 targeting by glucocorticoids determines JNK and I κ B regulation in Toll-like receptor-stimulated macrophages. *Blood*. 2010 Mar 11;115(10):1921-31.

43. Nishiwaki S, Terakura S, Ito M, Goto T, Seto A, Watanabe K, et al. Impact of macrophage infiltration of skin lesions on survival after allogeneic stem cell transplantation: a clue to refractory graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Oct 1;114(14):3113-6.
44. Hirata Y, Sugie A, Matsuda A, Matsuda S, Koyasu S. TAK1-JNK Axis Mediates Survival Signal through Mcl1 Stabilization in Activated T Cells. *J Immunol*. 2013 May 1;190(9):4621-6.

図表

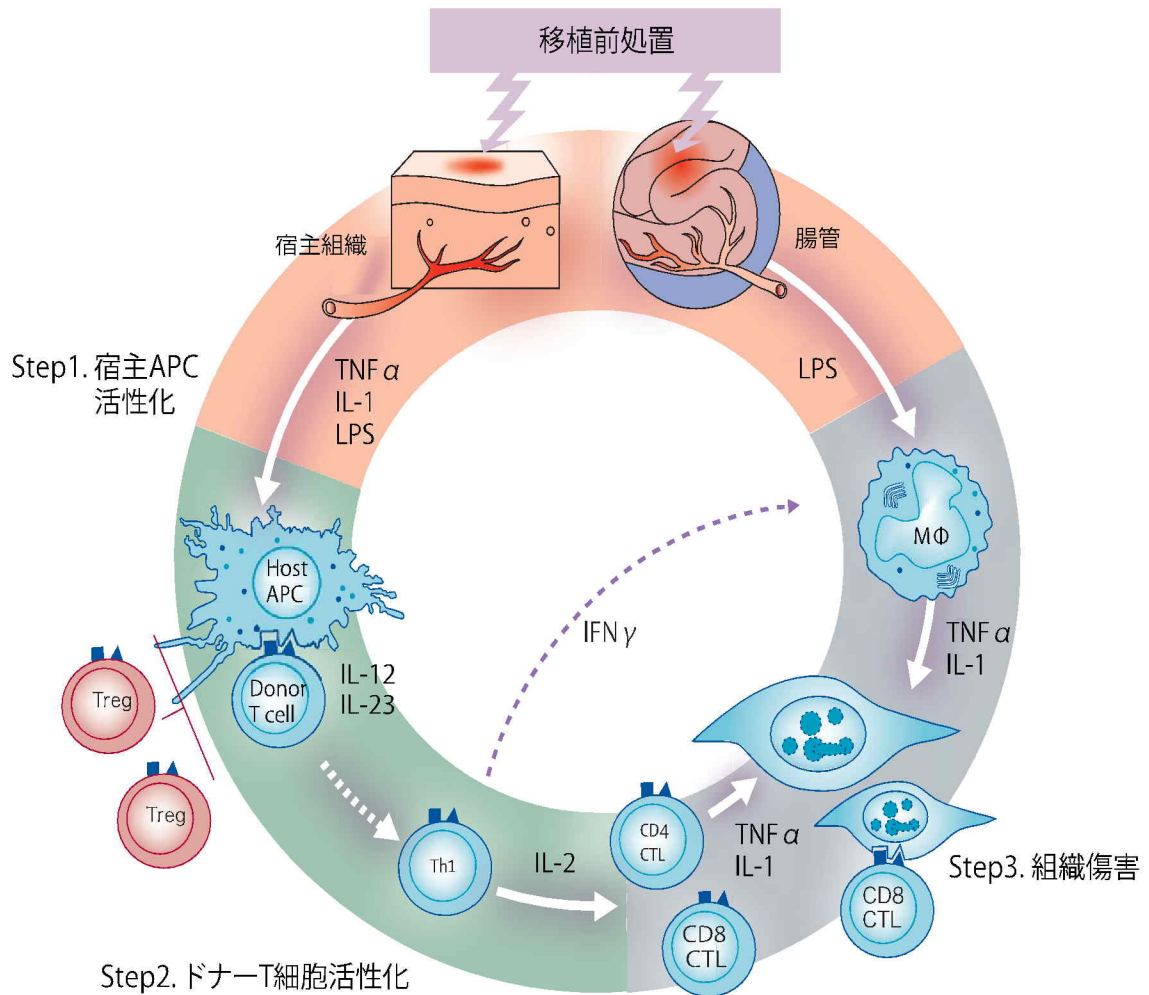


図1. 急性GVHDの免疫病態生理

放射線や抗がん剤等の移植前処置等によって傷害された宿主の組織から、TNF α やIL-1等の炎症性サイトカインが放出される。また、傷害された組織からLPS等の微生物由来物質の血中への流入がおこる。これらの内因性、外因性刺激により、宿主の抗原提示細胞(antigen-presenting cells: APC)が活性化される(Step1).

活性化された宿主APCはIL-12やIL-23を産生し、ドナーT細胞を活性化し、Th1細胞の産生を促進する(Step2).

ドナーTh1細胞はIL-2を産生し、細胞傷害性T細胞 (Cytotoxic T lymphocyte: CTL) を誘導し、CTLやサイトカインによる組織傷害が発生し、GVHDと診断される(Step3). ドナーTh1から産生されたIFN- γ や、腸管から流入したLPS等によりマクロファージが活性化され、炎症性サイトカイン産生がおこり、GVHDはさらに増幅される。

(文献7より改変)

表1. 患者背景

症例	性別	年齢	疾患	幹細胞ソース	HLA適合度	前処置	GVHD予防	aGVHD					
								stage			grade	治療	転帰
								皮膚	肝臓	腸管			
1	F	65	急性骨髄性白血病	非血縁骨髄	1抗原不一致	Flu/L-PAM	FK506+short term MTX	2	3	1	Ⅲ	mPSL	軽快
2	F	39	急性リンパ性白血病	非血縁骨髄	2抗原不一致	TBI12Gy/CY	FK506+short term MTX	2	1	2	Ⅲ	mPSL	軽快
3	M	41	急性骨髄性白血病	血縁骨髄	3抗原不一致	TBI12Gy/CY	CyA+short term MTX	3	0	1	Ⅱ	mPSL	軽快
4	M	45	原発性骨髄線維症	非血縁骨髄	一致	Bu/CY	FK506+short term MTX	3	0	0	Ⅱ	なし	軽快
5	M	49	骨髄異形成症候群	血縁骨髄	一致	TBI12Gy/CY	CyA+short term MTX	2	0	1	Ⅱ	なし	軽快
6	M	40	急性骨髄性白血病	臍帯血	3抗原不一致	Bu/CY	FK506+short term MTX	2	0	0	I	なし	軽快
7	F	53	急性骨髄性白血病	非血縁骨髄	一致	TBI12Gy/CY	FK506+short term MTX	1	0	0	I	なし	軽快
8	F	42	急性骨髄性白血病	非血縁骨髄	一致	TBI12Gy/CY	FK506+short term MTX	0	0	0	0	なし	-
9	F	59	急性骨髄性白血病	臍帯血	一致	Flu/L-PAM	FK506	0	0	0	0	なし	-

表2-1A. IL-32-MΦで発現が増加した遺伝子(上位50)

Gene Name	Gene Symbol	Fold change (IL-32:M)
TNFAIP3 interacting protein 3	TNIP3	171.0
prostaglandin E synthase	PTGES	69.2
mast cell-expressed membrane protein 1	MCEMP1	56.2
complement component 1, s subcomponent	C1S	53.7
indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	INDO	41.7
lysosomal-associated membrane protein 3	LAMP3	36.9
carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	CES1	29.3
solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3	SLC24A3	26.8
carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	CES1	26.6
met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	MET	25.5
chemokine (C-C motif) receptor 7	CCR7	20.4
natural killer cell group 7 sequence	NKG7	19.0
integrin, beta 8	ITGB8	17.5
complement component 1, r subcomponent-like	C1RL	17.3
sialic acid binding Ig-like lectin 10	SIGLEC10	15.6
galactose-3-O-sulfotransferase 4	GAL3ST4	13.6
interleukin 1, alpha	IL1A	12.9
chemokine (C-C motif) ligand 23	CCL23	12.8
similar to Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 precursor	LOC651928	12.6
T-box 3 (ulnar mammary syndrome)	TBX3	12.6
transmembrane protease, serine 11E	TMPRSS11E	12.1
olfactory receptor, family 10, subfamily K, member 1	OR10K1	11.1
protein C receptor, endothelial (EPCR)	PROCR	10.9
complement component 3	C3	10.9
glutamate receptor, metabotropic 3	GRM3	10.8
gap junction protein, beta 2, 26kDa (connexin 26)	GJB2	10.0
hypothetical gene supported by AK126863	LOC441426	9.8
similar to anaphase promoting complex subunit 1	LOC653532	9.5
FKSG73 protein	LOC440888	9.4
chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	CCL18	9.4
Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 2 (mouse)	MEIS2	9.1
fibroblast growth factor 12	FGF12	9.0
carbonic anhydrase XII	CA12	8.9
hypothetical gene supported by AK127888	FLJ45994	8.9
Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 2 (mouse)	MEIS2	8.9
hypothetical LOC255411	LOC255411	8.7
BTB (POZ) domain containing 11	BTBD11	8.7
neuregulin 1	NRG1	8.6
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 13	ABCC13	8.6
chemokine (C-C motif) ligand 23	CCL23	8.6
mucolin 2	MCOLN2	8.5
PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)	PPFIBP1	8.5
fms-related tyrosine kinase 3	FLT3	8.5
hypothetical LOC400968	LOC400968	8.5
similar to F-box only protein 2	LOC342897	8.4
hypothetical LOC375010	LOC375010	8.3
olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 3	OR2J3	8.3
olfactory receptor, family 4, subfamily Q, member 3	OR4Q3	8.3
olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 2	OR2J2	8.3
purine-rich element binding protein G	PURG	8.3

表2-1B. IL-32-MΦで発現が減少した遺伝子(上位50)

Gene Name	Gene Symbol	Fold change (IL-32:M)
coagulation factor XIII, A1 polypeptide	F13A1	-169.8
KIAA0101	KIAA0101	-83.8
hypothetical protein FLJ36748	FLJ36748	-81.9
galanin	GAL	-77.5
chitinase 1 (chitotriosidase)	CHIT1	-76.2
topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	TOP2A	-61.3
lipoprotein lipase	LPL	-59.2
kinesin family member 20A	KIF20A	-56.3
KIAA0101	KIAA0101	-56.1
fibronectin 1	FN1	-55.7
folate receptor 2 (fetal)	FOLR2	-54.6
cellular retinoic acid binding protein 2	CRABP2	-45.9
selenoprotein P, plasma, 1	SEPP1	-41.2
ubiquitin-conjugating enzyme E2C	UBE2C	-38.0
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	MYBL2	-35.1
leucine-rich repeat LGI family, member 2	LGI2	-34.7
ubiquitin-conjugating enzyme E2C	UBE2C	-32.5
solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 3	SLC28A3	-31.4
hypothetical protein DKFZp762E1312	DKFZp762E1312	-31.4
glypican 4	GPC4	-31.1
TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)	TPX2	-30.9
discs, large homolog 7 (Drosophila)	DLG7	-30.8
similar to Antigen Ki-67	LOC442448	-30.4
interleukin 1 receptor, type II	IL1R2	-30.4
cyclin B2	CCNB2	-27.8
interferon-induced protein 44-like	IFI44L	-27.3
hypothetical LOC441107	LOC441107	-26.9
bactericidal/permeability-increasing protein	BPI	-25.7
gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	GREM1	-25.1
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	MKI67	-24.4
collectin sub-family member 12	COLEC12	-23.8
sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	SIGLEC1	-22.7
hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	HMMR	-21.8
deoxyribonuclease II beta	DNASE2B	-21.8
insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1	-21.6
PDZ binding kinase	PBK	-21.1
maternal embryonic leucine zipper kinase	MELK	-21.0
apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	APOBEC3B	-20.5
ubiquitin specific peptidase 2	USP2	-20.5
cyclin A2	CCNA2	-20.2
SHC SH2-domain binding protein 1	SHCBP1	-19.7
cyclin D1	CCND1	-19.4
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	-19.3
establishment of cohesion 1 homolog 2 (S. cerevisiae)	ESCO2	-19.2
chromosome 18 open reading frame 24	C18orf24	-18.7
aurora kinase B	AURKB	-18.7
ubiquitin specific peptidase 2	USP2	-18.6
histone 1, H3c	HIST1H3C	-18.6
kalirin, RhoGEF kinase	KALRN	-18.6
cell division cycle associated 1	CDCA1	-18.4

表2-2A. GM-MΦで発現が増加した遺伝子(上位50)

Gene Name	Gene Symbol	Fold change (GM:M)
SH3 and cysteine rich domain	STAC	463.7
mast cell-expressed membrane protein 1	MCEMP1	124.5
aquaporin 3 (Gill blood group)	AQP3	111.7
chemokine (C-C motif) ligand 23	CCL23	106.1
inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	INHBA	104.9
chemokine (C-C motif) ligand 24	CCL24	56.6
chemokine (C-C motif) ligand 23	CCL23	53.0
zinc finger protein 365	ZNF365	46.3
TNFAIP3 interacting protein 3	TNIP3	46.3
matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	MMP10	43.2
aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	ALDH1A2	42.8
S100 calcium binding protein P	S100P	41.6
amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1)	AOC3	41.1
cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine)	CDH17	37.9
interleukin 1, alpha	IL1A	36.7
suppressor of cytokine signaling 2	SOCS2	34.7
hypothetical protein FLJ10159	FLJ10159	34.6
haptoglobin	HP	33.6
hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	HSD11B1	32.3
cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	CDH1	31.2
carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	CES1	29.5
hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	HSD11B1	29.3
haptoglobin-related protein	HPR	28.9
interleukin 1 family, member 8 (eta)	IL1F8	28.5
macrophage receptor with collagenous structure	MARCO	27.7
carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	CES1	26.9
retinol binding protein 4, plasma	RBP4	24.6
Norrie disease (pseudoglioma)	NDP	23.2
interleukin 7 receptor	IL7R	23.0
fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	FLT1	22.6
small breast epithelial mucin	SBEM	22.4
TCR gamma alternate reading frame protein	TARP	21.9
agouti related protein homolog (mouse)	AGRP	20.8
similar to similar to protein of unknown function	LOC653567	18.8
olfactory receptor, family 8, subfamily G, member 5	OR8G5	18.4
A kinase (PRKA) anchor protein 5	AKAP5	18.4
hemoglobin, gamma G	HBG2	17.8
similar to protein of unknown function	RP11-162I21.1	16.9
inducible T-cell co-stimulator	ICOS	16.6
resistin	RETN	16.5
interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	IL3RA	15.8
pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	PPBP	15.5
nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kDa	NFE2	14.8
solute carrier organic anion transporter family, member 4C1	SLCO4C1	14.4
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	14.2
protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	PKIA	14.1
cholesterol 25-hydroxylase	CH25H	14.1
C-type lectin domain family 6, member A	CLEC6A	14.1
lysosomal-associated membrane protein 3	LAMP3	13.6
carbonic anhydrase XII	CA12	13.5

表2-2B. GM-M中で発現が減少した遺伝子(上位50)

Gene Name	Gene Symbol	Fold change (GM:M)
coagulation factor XIII, A1 polypeptide	F13A1	-92.7
stabilin 1	STAB1	-85.2
selenoprotein P, plasma, 1	SEPP1	-74.2
interleukin 1 receptor, type II	IL1R2	-62.3
leucine-rich repeat LGI family, member 2	LGI2	-47.9
calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta 3 subunit	CACNA2D3	-39.7
HtrA serine peptidase 1	HTRA1	-36.9
interleukin 1 receptor, type II	IL1R2	-34.1
collagen, type XXIII, alpha 1	COL23A1	-29.2
serine dehydratase	SDS	-26.6
interleukin 10	IL10	-25.7
CD163 molecule-like 1	CD163L1	-25.5
insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1	-22.8
solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9	SLC9A9	-21.0
taxilin beta	TXLNB	-16.3
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	MERTK	-16.1
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	TNFRSF9	-16.0
folate receptor 2 (fetal)	FOLR2	-15.4
potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	KCNMB4	-15.2
interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	-15.2
Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	SPIC	-14.4
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	HTR2B	-14.4
adenosine A3 receptor	ADORA3	-14.1
ADP-ribosylation factor-like 4C	ARL4C	-13.9
prolactin-induced protein	PIP	-13.6
adenosine A3 receptor	ADORA3	-13.6
lymphocyte antigen 9	LY9	-12.9
insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	-12.4
dipeptidyl-peptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	DPP4	-12.2
delta-like 1 (Drosophila)	DLL1	-12.2
metastasis suppressor 1	MTSS1	-11.9
kalirin, RhoGEF kinase	KALRN	-11.7
heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	HS3ST1	-11.7
ADAM-like, decysin 1	ADAMDEC1	-11.6
hypothetical protein FLJ20701	FLJ20701	-11.4
tweety homolog 2 (Drosophila)	TTYH2	-11.2
immunoglobulin superfamily, member 4	IGSF4	-10.8
armadillo repeat containing 9	ARMC9	-10.5
CD93 molecule	CD93	-10.5
urotensin 2	UTS2	-10.1
synaptotagmin I	SYT1	-10.1
gasdermin 1	GSDM1	-9.9
heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2	HS3ST2	-9.9
transmembrane protein 37	TMEM37	-9.8
fibulin 5	FBLN5	-9.7
corticotropin releasing hormone binding protein	CRHBP	-9.7
chromosome 20 open reading frame 26	C20orf26	-9.6
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	KCNJ5	-9.5
latent transforming growth factor beta binding protein 2	LTBP2	-9.5
endothelin receptor type B	EDNRB	-9.5

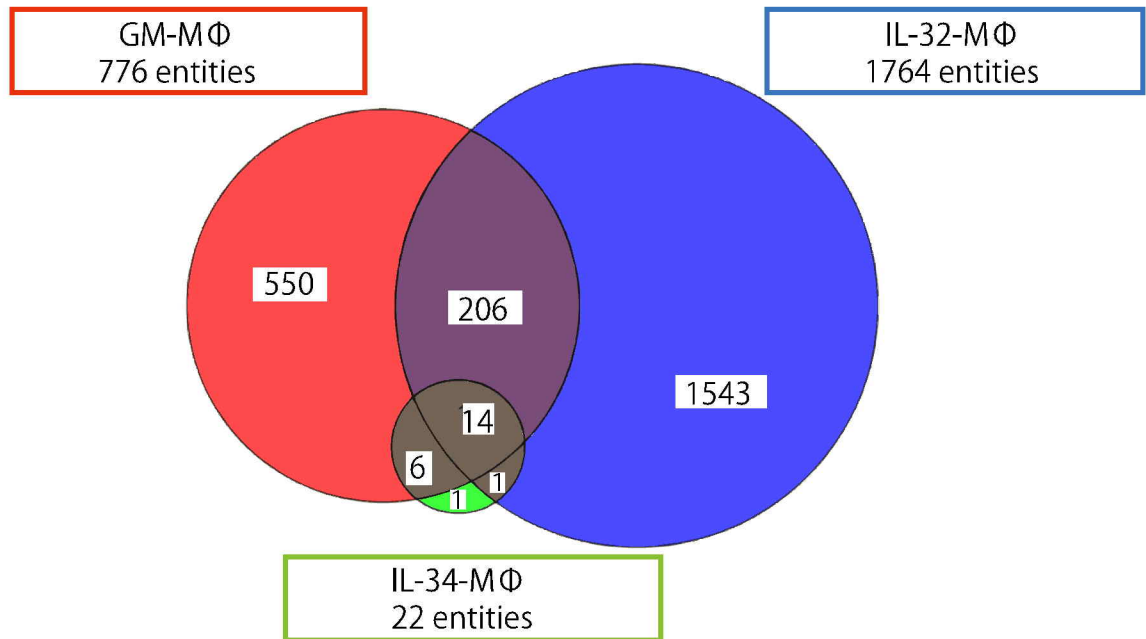
表2-3A. IL-34-Mで発現が増加した遺伝子(上位50)

Gene Name	Gene Symbol	Fold change (IL-34:M)
peroxiredoxin 2	PRDX2	3.9
chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)	CCT7	3.8
Rho GTPase activating protein 30	ARHGAP30	3.7
Kruppel-like factor 4 (gut)	KLF4	3.4
death-associated protein	DAP	3.2
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit	ATP5D	3.1
transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein	TRPC4AP	3.1
TatD DNase domain containing 2	TATDN2	3.0
FtsJ homolog 2 (E. coli)	FTSJ2	2.9
KIAA0971	KIAA0971	2.9
chromosome 9 open reading frame 32	C9orf32	2.8
hematological and neurological expressed 1	HN1	2.7
chemokine (C-C motif) ligand 13	CCL13	2.7
KIAA0406 gene product	KIAA0406	2.4
cut-like 1, CCAAT displacement protein (Drosophila)	CUTL1	2.3
coiled-coil domain containing 97	CCDC97	2.3
lysosomal-associated membrane protein 3	LAMP3	2.2
olfactomedin 1	OLFM1	2.2
chromosome 21 open reading frame 86	C21orf86	2.1
TNFAIP3 interacting protein 3	TNIP3	2.1
secretogranin V (7B2 protein)	SCG5	2.1
pyruvate kinase, muscle	PKM2	2.0
chemokine (C-C motif) receptor 2	CCR2	2.0
similar to MUF1 protein	LOC440970	2.0
mitochondrial ribosomal protein L54	MRPL54	1.9
glucosidase, alpha acid (Pompe disease, glycogen storage disease type II)	GAA	1.8
germ cell associated 1	GSG1	1.8
A kinase (PRKA) anchor protein 8-like	AKAP8L	1.8
similar to G1 to S phase transition protein 1 homolog (GTP-binding protein GST1-HS)	LOC643855	1.8
glutamate receptor, metabotropic 3	GRM3	1.8
suppressor of cytokine signaling 2	SOCS2	1.8
hypothetical protein LOC642815	FLJ36868	1.8
MAP3K12 binding inhibitory protein 1	MBIP	1.8
similar to spermine synthase	LOC391799	1.8
ankyrin repeat and MYND domain containing 2	ANKMY2	1.7
HDCMA18P protein	HDCMA18P	1.7
hypothetical protein LOC649598	FLJ46309	1.7
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 17	DNAJC17	1.7
similar to bovine IgA regulatory protein	LOC492311	1.7
neuromedin B	NMB	1.7
golgi phosphoprotein 4	GOLPH4	1.7
similar to similar to protein of unknown function	LOC653567	1.7
intelectin 1 (galactofuranose binding)	ITLN1	1.7
RGM domain family, member B	RGMB	1.7
breast carcinoma amplified sequence 1	BCAS1	1.7
family with sequence similarity 81, member A	FAM81A	1.7
similar to ribosomal protein S11	LOC645138	1.7
HESB like domain containing 1	HBLD1	1.7
mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme B	MGAT4B	1.7
olfactory receptor, family 8, subfamily I, member 2	OR8I2	1.6

表2-3B. IL-34-MΦで発現が減少した遺伝子(上位50)

Gene Name	Gene Symbol	Fold change (IL-34:M)
carboxypeptidase A4	CPA4	-3.3
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	-3.3
TGFB-induced factor (TALE family homeobox)	TGIF	-2.4
zinc finger protein 462	ZNF462	-2.3
six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	STEAP1	-2.2
epiregulin	EREG	-2.0
ribonuclease, RNase A family, 7	RNASE7	-2.0
similar to peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 4	LOC653505	-2.0
matrix-remodelling associated 7	MXRA7	-2.0
upstream transcription factor 1	USF1	-2.0
signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	STAT3	-2.0
matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	MMP12	-2.0
gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	GREM1	-2.0
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1E	HTR1E	-1.9
delta-like 1 (Drosophila)	DLL1	-1.9
family with sequence similarity 102, member B	FAM102B	-1.9
stathmin 1/oncoprotein 18	STMN1	-1.8
transmembrane protein 14A	TMEM14A	-1.8
otoancorin	OTOA	-1.8
transmembrane protein 46	TMEM46	-1.8
fibronectin 1	FN1	-1.8
collagen, type XXII, alpha 1	COL22A1	-1.8
WNT1 inducible signaling pathway protein 1	WISP1	-1.8
oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	OLR1	-1.8
histone 1, H4c	HIST1H4C	-1.7
hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	HEY1	-1.7
cancer/testis antigen 1A	CTAG1A	-1.7
pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	PPBP	-1.7
poly(A) binding protein, nuclear 1	PABPN1	-1.7
hypothetical protein LOC340529	RP11-493K23.2	-1.7
cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1	CYP8B1	-1.7
scaffold attachment factor B2	SAFB2	-1.7
MORC family CW-type zinc finger 4	MORC4	-1.7
interleukin 15	IL15	-1.7
olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 10	OR4D10	-1.7
bone morphogenetic protein 4	BMP4	-1.7
5-nucleotidase, ecto (CD73)	NT5E	-1.7
elastase 2A	ELA2A	-1.7
similar to osteoclast-associated receptor isoform 5	LOC441864	-1.6
junctional adhesion molecule 2	JAM2	-1.6
cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	CDC2	-1.6
nucleoporin like 1	NUPL1	-1.6
myosin binding protein C, slow type	MYBPC1	-1.6
zonadhesin	ZAN	-1.6
mucin 15, cell surface associated	MUC15	-1.6
otoferlin	OTOF	-1.6
KIAA2018	KIAA2018	-1.6
hypothetical protein DKFZp566J091	LBH	-1.6
SH2 domain protein 1A, Duncans disease (lymphoproliferative syndrome)	SH2D1A	-1.6
glycine/arginine rich protein 1	GRRP1	-1.6

A M-MΦとの比較で発現量が2倍以上増加した遺伝子数



B M-MΦとの比較で発現量が2倍以上減少した遺伝子数

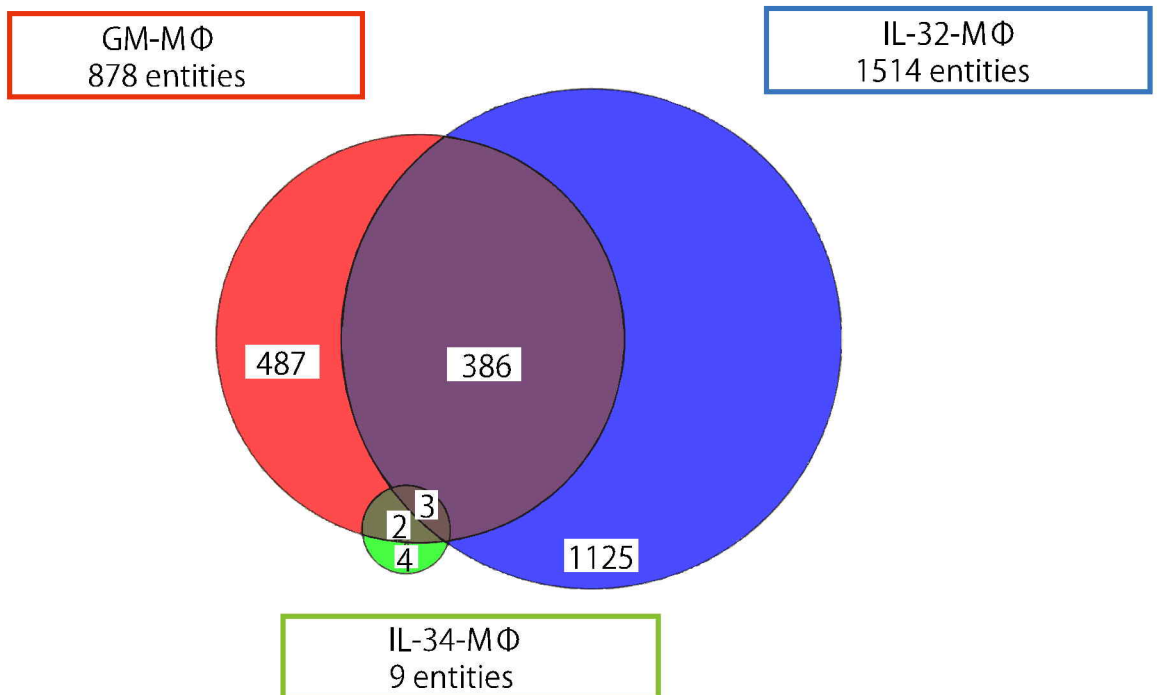


図2. サイトカイン誘導マクロファージモデル間の遺伝子発現変化

M-MΦとの比較で、発現量が2倍以上増加した遺伝子は、IL-32-MΦで1,764個、GM-MΦで776個、IL-34-MΦで22個であった(A)。

発現量が2倍以上減少した遺伝子は、IL-32-MΦで1,514個、GM-MΦで878個、IL-34-MΦで9個であった(B)。

M-MΦとの比較で発現量が2倍以上増減した遺伝子の総数は4,189個であった。

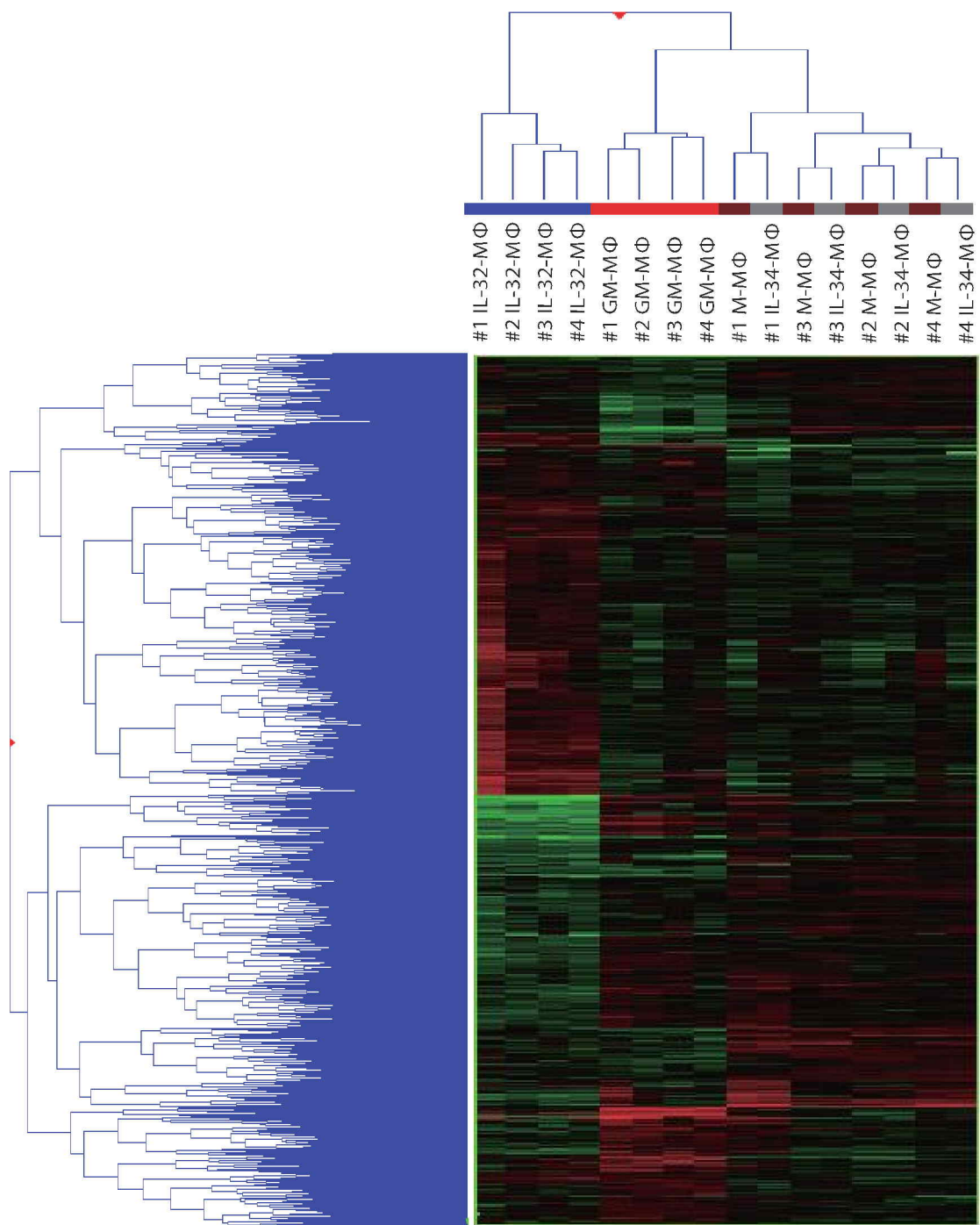


図 3. 階層的クラスタリング解析

M-MΦとの比較で発現量が2倍以上増減した4,189個の遺伝子について階層的クラスタリング解析を行った。

IL-34-MΦはM-MΦと類似のプロファイルを示した。IL-32-MΦは、M-MΦと最も離れたプロファイルを示し、GM-MΦは中間のプロファイルを示した。

表3-1. M-MΦと比較してIL-32-MΦで発現が2倍以上増加した遺伝子によるGene Ontology解析

GO Term	GO ACCESSION	corrected p-value
CELLULAR COMPONENT		
plasma membrane	GO:0005886 GO:0005904	1.7E-11
cell periphery	GO:0071944	2.8E-11
membrane part	GO:0044425	4.4E-11
intrinsic to membrane	GO:0031224	7.6E-10
integral to membrane	GO:0016021	1.7E-09
membrane	GO:0016020	2.0E-07
plasma membrane part	GO:0044459	5.6E-06
extracellular region	GO:0005576	1.3E-05
extracellular region part	GO:0044421	1.8E-04
integral to plasma membrane	GO:0005887	9.6E-04
intrinsic to plasma membrane	GO:0031226	1.1E-03
extracellular space	GO:0005615	1.2E-03
cellular_component	GO:0005575 GO:0008372	4.6E-02
BIOLOGICAL PROCESS		
cell surface receptor linked signaling pathway	GO:0007166	9.9E-12
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	GO:0007186	4.1E-11
signal transmission	GO:0023060	9.9E-11
signaling process	GO:0023046	9.9E-11
signal transduction	GO:0007165	1.9E-10
response to stimulus	GO:0050896 GO:0051869	6.3E-10
signaling	GO:0023052	2.0E-09
sensory perception of smell	GO:0007608	4.5E-09
sensory perception of chemical stimulus	GO:0007606	1.0E-08
multicellular organismal process	GO:0032501 GO:0050874	1.2E-07
defense response	GO:0006952 GO:0002217 GO:0042829	1.2E-07
sensory perception	GO:0007600	1.4E-07
inflammatory response	GO:0006954	3.6E-06
response to wounding	GO:0009611 GO:0002245	3.9E-06
immune system process	GO:0002376	1.3E-05
system process	GO:0003008	1.6E-05
signaling pathway	GO:0023033	1.6E-05
neurological system process	GO:0050877	2.6E-05
immune response	GO:0006955	5.5E-05
biological regulation	GO:0065007	7.5E-03
regulation of cellular process	GO:0050794 GO:0051244	8.0E-03
taxis	GO:0042330	8.1E-03
chemotaxis	GO:0006935	8.1E-03
regulation of biological process	GO:0050789 GO:0050791	1.8E-02
cell adhesion	GO:0007155	2.6E-02
biological adhesion	GO:0022610	2.6E-02
locomotion	GO:0040011	2.9E-02
response to chemical stimulus	GO:0042221	3.6E-02
lung development	GO:0030324	4.2E-02
MOLECULAR FUNCTION		
signal transducer activity	GO:0004871 GO:0005062 GO:0009369 GO:0009370	6.0E-12
molecular transducer activity	GO:0060089	6.0E-12
receptor activity	GO:0004872 GO:0019041	1.2E-11
transmembrane receptor activity	GO:0004888 GO:0004926	3.4E-11
olfactory receptor activity	GO:0004984	4.9E-10
G-protein coupled receptor activity	GO:0004930 GO:0001622 GO:0001623 GO:0001624 GO:0001625 GO:0016526	6.3E-09
G-protein-coupled receptor binding	GO:0001664	4.8E-04
chemokine receptor binding	GO:0042379	1.6E-02
cytokine activity	GO:0005125	4.6E-02
chemokine activity	GO:0008009	4.9E-02

表3-2. M-MΦと比較してGM-MΦで発現が2倍以上増加した遺伝子によるGene Ontology解析

GO Term	GO ACCESSION	corrected p-value
CELLULAR COMPONENT		
membrane part	GO:0044425	1.0E-02
membrane	GO:0016020	1.1E-02
extracellular region	GO:0005576	2.0E-02
plasma membrane part	GO:0044459	2.2E-02
intrinsic to membrane	GO:0031224	2.2E-02
integral to membrane	GO:0016021	4.0E-02
plasma membrane	GO:0005886 GO:0005904	4.4E-02
extracellular space	GO:0005615	4.6E-02
BIOLOGICAL PROCESS		
immune system process	GO:0002376	1.9E-06
immune response	GO:0006955	4.2E-04
cytokine-mediated signaling pathway	GO:0019221	6.8E-03
DNA-dependent DNA replication initiation	GO:0006270 GO:0042024	1.4E-02
lipid biosynthetic process	GO:0008610	2.2E-02
sterol metabolic process	GO:0016125	4.0E-02
MOLECULAR FUNCTION		
cytokine binding	GO:0019955 GO:0019965	9.2E-03
cytokine receptor activity	GO:0004896 GO:0004907	2.2E-02
cytokine receptor binding	GO:0005126	2.2E-02
growth factor binding	GO:0019838	2.4E-02

表4-1. GO immune system process, immune response(に含まれ、IL-32-MΦで発現が2倍以上増加した遺伝子(アルファベット順))

Gene Name	RefSeq	Description
ADA	NM_000022	adenosine deaminase
AQP9	NM_020980	aquaporin 9
BCL11A	NM_022893	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)
BCL3	NM_005178	B-cell CLL/lymphoma 3
C3	NM_000064	complement component 3
C6	NM_000065	complement component 6
CCL18	NM_002988	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)
CCL19	NM_006274	chemokine (C-C motif) ligand 19
CCL2	NM_002982	chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL20	NM_004591	chemokine (C-C motif) ligand 20
CCL23	NM_005064	chemokine (C-C motif) ligand 23
CCL24	NM_002991	chemokine (C-C motif) ligand 24
CCL7	NM_006273	chemokine (C-C motif) ligand 7
CCL8	NM_005623	chemokine (C-C motif) ligand 8
CCR2	NM_000647	chemokine (C-C motif) receptor 2
CCR5	NM_000579	chemokine (C-C motif) receptor 5
CD2	NM_001767	CD2 molecule
CD22	NM_001771	CD22 molecule
CD300LF	NM_139018	CD300 molecule-like family member f
CD79A	NM_001783	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha
CFP	NM_002621	complement factor properdin
CLCF1	NM_013246	cardiotrophin-like cytokine factor 1
CLEC4E	NM_014358	C-type lectin domain family 4, member E
CNR2	NM_001841	cannabinoid receptor 2 (macrophage)
CTSG	NM_001911	cathepsin G
DEFB4	NM_004942	defensin, beta 4
DLL1	NM_005618	delta-like 1 (Drosophila)
EDN1	NM_001955	endothelin 1
FCRL4	NM_031282	Fc receptor-like 4
FLT3	NM_004119	fms-related tyrosine kinase 3
HAMP	NM_021175	hepcidin antimicrobial peptide
IBRDC3	NM_153341	IBR domain containing 3
ICOSLG	NM_015259	inducible T-cell co-stimulator ligand
IL22	NM_020525	interleukin 22
IL2RA	NM_000417	interleukin 2 receptor, alpha
IL32	NM_001012631	interleukin 32
IL7	NM_000880	interleukin 7
IL7R	NM_002185	interleukin 7 receptor
IL8	NM_000584	interleukin 8
IRAK2	NM_001570	interleukin-1 receptor-associated kinase 2
IRF4	NM_002460	interferon regulatory factor 4
KIAA1914	NM_001001936	KIAA1914
LILRA4	NM_012276	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 4
LYN	NM_002350	v-src-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
MARCO	NM_006770	macrophage receptor with collagenous structure
MEIS1	NM_002398	Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog (mouse)
NCF1	NM_000265	neutrophil cytosolic factor 1, (chronic granulomatous disease, autosomal 1)
NFIL3	NM_005384	nuclear factor, interleukin 3 regulated
OLR1	NM_002543	oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
ONECUT1	NM_004498	one cut domain, family member 1
OSM	NM_020530	oncostatin M

表4-1. 続き

Gene Name	RefSeq	Description
PF4	NM_002619	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
POU2AF1	NM_006235	POU domain, class 2, associating factor 1
POU2F2	NM_002698	POU domain, class 2, transcription factor 2
S100A7	NM_002963	S100 calcium binding protein A7 (psoriasin 1)
SLAMF7	NM_021181	SLAM family member 7
SP100	NM_003113	SP100 nuclear antigen
SPN	NM_001030288	sialophorin (gpL115, leukosialin, CD43)
TAL1	NM_003189	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
TIMP1	NM_003254	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
TRAT1	NM_016388	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1
TRPC4AP	NM_015638	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein
ULBP1	NM_025218	UL16 binding protein 1
VTN	NM_000638	vitronectin
XBP1	NM_005080	X-box binding protein 1

表4-2. GO immune system process, immune responseに含まれ、GM-M中で発現が2倍以上増加した遺伝子(アルファベット順)

Gene Name	RefSeq	Description
ACE	NM_000789	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1
AIM2	NM_004833	absent in melanoma 2
APLN	NM_017413	apelin, AGTRL1 ligand
AQP9	NM_020980	aquaporin 9
BCAR1	NM_014567	breast cancer anti-estrogen resistance 1
BTLA	NM_181780	B and T lymphocyte associated
CCL17	NM_002987	chemokine (C-C motif) ligand 17
CCL18	NM_002988	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)
CCL20	NM_004591	chemokine (C-C motif) ligand 20
CCL23	NM_005064	chemokine (C-C motif) ligand 23
CCL24	NM_002991	chemokine (C-C motif) ligand 24
CCR2	NM_000647	chemokine (C-C motif) receptor 2
CD1A	NM_001763	CD1a molecule
CD1B	NM_001764	CD1b molecule
CD1C	NM_001765	CD1c molecule
CD2	NM_001767	CD2 molecule
CD274	NM_014143	CD274 molecule
CD300LF	NM_139018	CD300 molecule-like family member f
CEACAM8	NM_001816	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8
CSF1	NM_172210	colony stimulating factor 1 (macrophage)
CTSW	NM_001335	cathepsin W (lymphopain)
EDG6	NM_003775	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 6
EDN1	NM_001955	endothelin 1
FLT3	NM_004119	fms-related tyrosine kinase 3
G6PD	NM_000402	glucose-6-phosphate dehydrogenase
ICOS	NM_012092	inducible T-cell co-stimulator
IL1RAP	NM_002182	interleukin 1 receptor accessory protein
IL1RAP	NM_134470	interleukin 1 receptor accessory protein
IL27RA	NM_004843	interleukin 27 receptor, alpha
IL2RA	NM_000417	interleukin 2 receptor, alpha
IL7	NM_000880	interleukin 7
IL7R	NM_002185	interleukin 7 receptor
IRF4	NM_002460	interferon regulatory factor 4
KIT	NM_000222	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
LOC340061	NM_198282	hypothetical protein LOC340061
LTA	NM_000595	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
MARCO	NM_006770	macrophage receptor with collagenous structure
MEIS1	NM_002398	Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog (mouse)
MYD88	NM_002468	myeloid differentiation primary response gene (88)
OASL	NM_003733	2-5-oligoadenylate synthetase-like
OLR1	NM_002543	oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
PF4	NM_002619	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
PPBP	NM_002704	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)
SLAMF1	NM_003037	signaling lymphocytic activation molecule family member 1
SMAD6	NM_005585	SMAD, mothers against DPP homolog 6 (Drosophila)
TAL1	NM_003189	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
TM7SF4	NM_030788	transmembrane 7 superfamily member 4
TNFSF14	NM_003807	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
TREM1	NM_018643	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
TRPC4AP	NM_015638	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein
ULBP2	NM_025217	UL16 binding protein 2
VTN	NM_000638	vitronectin

表5-1.M-MΦと比較して IL-32-MΦでenrichされたKEGG gene set

Gene Set Name	Normalized enrichment score	Normalized p-value
KEGG_CYTOSOLIC_DNA_SENSING_PATHWAY	1.40	0.00
KEGG_RIG_I_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1.47	0.02
KEGG_N_GLYCAN_BIOSYNTHESIS	1.43	0.04
KEGG_LYSOSOME	1.44	0.05
KEGG_RETINOL_METABOLISM	1.45	0.06
KEGG_EPITHELIAL_CELL_SIGNALING_IN_Helicobacter_Pylori_Infection	1.38	0.07
KEGG_OLFACTORY_TRANSDUCTION	1.45	0.07
KEGG_PROTEASOME	1.49	0.08
KEGG_BASAL_CELL_CARCINOMA	1.26	0.12
KEGG_GLYCEROLIPID_METABOLISM	1.39	0.12
KEGG_STEROID_HORMONE_BIOSYNTHESIS	1.33	0.13
KEGG_REGULATION_OF_AUTOPHAGY	1.43	0.15
KEGG_DRUG_METABOLISM_CYTOCHROME_P450	1.26	0.15
KEGG_METABOLISM_OF_XENOBIOTICS_BY_CYTOCHROME_P450	1.33	0.15
KEGG_FATTY_ACID_METABOLISM	1.25	0.16
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	1.30	0.16
KEGG_APOPTOSIS	1.21	0.17
KEGG_NOTCH_SIGNALING_PATHWAY	1.16	0.17
KEGG_PORPHYRIN_AND_CHLOROPHYLL_METABOLISM	1.21	0.23
KEGG_STARCH_AND_SUCROSE_METABOLISM	1.21	0.23
KEGG_PPAR_SIGNALING_PATHWAY	1.13	0.24
KEGG_DORSO_VENTRAL_AXIS_FORMATION	1.16	0.26
KEGG_AMINO_SUGAR_AND_NUCLEOTIDE_SUGAR_METABOLISM	1.14	0.26
KEGG_TIGHT_JUNCTION	1.13	0.27
KEGG_RNA_POLYMERASE	1.23	0.28
KEGG_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION	1.23	0.28
KEGG_SPHINGOLIPID_METABOLISM	1.19	0.28
KEGG_FRUCTOSE_AND_MANNOSE_METABOLISM	1.09	0.30
KEGG_TYROSINE_METABOLISM	1.11	0.30
KEGG_TRYPTOPHAN_METABOLISM	1.06	0.31
KEGG_ETHER_LIPID_METABOLISM	1.02	0.33
KEGG_PRIMARY_IMMUNODEFICIENCY	1.09	0.35
KEGG_TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	1.03	0.36
KEGG_ARACHIDONIC_ACID_METABOLISM	1.06	0.36
KEGG_AMYOTROPHIC_LATERAL_SCLEROSIS_ALS	1.07	0.36
KEGG_DRUG_METABOLISM_OTHER_ENZYMES	1.06	0.37
KEGG_B_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1.02	0.38
KEGG_ARRHYTHMOGENIC_RIGHT_VENTRICULAR_CARDIOMYOPATHY_ARVC	0.99	0.41
KEGG_ADIPOCYTOKINE_SIGNALING_PATHWAY	1.04	0.43
KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1.02	0.43
KEGG_PROTEIN_EXPORT	0.99	0.45
KEGG_LEISHMANIA_INFECTION	1.00	0.48
KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.99	0.49
KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	0.95	0.49
KEGG_ADHERENS_JUNCTION	0.94	0.52
KEGG_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	0.96	0.53
KEGG_AMINOACYL_TRNA_BIOSYNTHESIS	0.85	0.55
KEGG_AUTOIMMUNE_THYROID_DISEASE	1.04	0.56
KEGG_SPLICEOSOME	0.98	0.56
KEGG_GALACTOSE_METABOLISM	0.90	0.56

表5-1. 続き

Gene Set Name	Normalized enrichment score	Normalized p-value
KEGG_TASTE_TRANSDUCTION	0.91	0.57
KEGG_NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY	0.84	0.57
KEGG_MELANOGENESIS	0.93	0.57
KEGG_RIBOSOME	0.89	0.59
KEGG_FC_GAMMA_R_MEDIATED_PHAGOCYTOSIS	0.97	0.59
KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	0.82	0.61
KEGG_VIRAL_MYOCARDITIS	0.84	0.63
KEGG_ACUTE_MYELOID_LEUKEMIA	0.87	0.65
KEGG_LINOLEIC_ACID_METABOLISM	0.79	0.66
KEGG_LEUKOCYTE_TRANSENDOTHELIAL_MIGRATION	0.91	0.66
KEGG_INTESTINAL_IMMUNE_NETWORK_FOR_IGA_PRODUCTION	0.83	0.66
KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_BIOSYNTHESIS_HEPARAN_SULFATE	0.83	0.67
KEGG_VIBRIO_CHOLERAE_INFECTION	0.79	0.68
KEGG_TYPE_II_DIABETES_MELLITUS	0.87	0.69
KEGG_NEUROTROPHIN_SIGNALING_PATHWAY	0.88	0.70
KEGG_HUNTINGTONS_DISEASE	0.81	0.72
KEGG_NEUROACTIVE_LIGAND_RECEPTOR_INTERACTION	0.82	0.74
KEGG_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE	0.80	0.74
KEGG_HEDGEHOG_SIGNALING_PATHWAY	0.78	0.75
KEGG_NITROGEN_METABOLISM	0.73	0.79
KEGG_HISTIDINE_METABOLISM	0.66	0.79
KEGG_ASTHMA	0.66	0.80
KEGG_SELENOAMINO_ACID_METABOLISM	0.76	0.81
KEGG_PROXIMAL_TUBULE_BICARBONATE_RECLAMATION	0.70	0.83
KEGG_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.80	0.83
KEGG_RENAL_CELL_CARCINOMA	0.78	0.84
KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_DEGRADATION	0.67	0.86
KEGG_CYSSTEINE_AND_METHIONINE_METABOLISM	0.74	0.87
KEGG_ARGININE_AND_PROLINE_METABOLISM	0.76	0.89
KEGG_PARKINSONS_DISEASE	0.53	0.91
KEGG_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	0.46	0.93
KEGG_PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLI_INFECTION	0.57	0.96
KEGG_ALLOGRAFT_REJECTION	0.53	0.97

表5-2. M-MΦと比較してGM-MΦでenrichされたKEGG gene set

Gene Set Name	Normalized enrichment score	Normalized p-value
KEGG_SELENOAMINO_ACID_METABOLISM	1.70	0.00
KEGG_HEMATOPOIETIC_CELL_LINEAGE	1.56	0.00
KEGG_PRION_DISEASES	1.56	0.00
KEGG_ADHERENS_JUNCTION	1.55	0.00
KEGG_N_GLYCAN_BIOSYNTHESIS	1.55	0.00
KEGG_PROTEASOME	1.52	0.00
KEGG_AMINOACYL_TRNA_BIOSYNTHESIS	1.46	0.00
KEGG_ONE_CARBON_POOL_BY_FOLATE	1.46	0.00
KEGG_PRIMARY_IMMUNODEFICIENCY	1.51	0.02
KEGG_VIRAL_MYOCARDITIS	1.48	0.02
KEGG_GLUTATHIONE_METABOLISM	1.46	0.02
KEGG_DRUG_METABOLISM_OTHER_ENZYMES	1.57	0.03
KEGG_PURINE_METABOLISM	1.33	0.03
KEGG_PPAR_SIGNALING_PATHWAY	1.51	0.03
KEGG_BETA_ALANINE_METABOLISM	1.44	0.03
KEGG_DNA_REPLICATION	1.64	0.03
KEGG_PYRIMIDINE_METABOLISM	1.48	0.03
KEGG_RNA_DEGRADATION	1.41	0.03
KEGG_ACUTE_MYELOID_LEUKEMIA	1.36	0.05
KEGG_PROPANOATE_METABOLISM	1.45	0.06
KEGG_VALINE_LEUCINE_AND_Isoleucine_DEGRADATION	1.31	0.06
KEGG_PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLI_INFECTION	1.36	0.06
KEGG_NITROGEN_METABOLISM	1.41	0.08
KEGG_TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	1.23	0.09
KEGG_ARRHYTHMOGENIC_RIGHT_VENTRICULAR_CARDIOMYOPATHY_ARVC	1.36	0.09
KEGG_THYROID_CANCER	1.36	0.11
KEGG_MISMATCH_REPAIR	1.44	0.11
KEGG_PEROXISOME	1.39	0.12
KEGG_TIGHT_JUNCTION	1.24	0.12
KEGG_NUCLEOTIDE_EXCISION_REPAIR	1.41	0.13
KEGG_TYPE_II_DIABETES_MELLITUS	1.21	0.14
KEGG_FATTY_ACID_METABOLISM	1.26	0.14
KEGG_SPLICEOSOME	1.30	0.14
KEGG_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON	1.13	0.14
KEGG_RNA_POLYMERASE	1.39	0.15
KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	1.24	0.15
KEGG_ENDOMETRIAL_CANCER	1.22	0.17
KEGG_STEROID_HORMONE_BIOSYNTHESIS	1.27	0.17
KEGG_APOPTOSIS	1.15	0.18
KEGG_PARKINSONS_DISEASE	1.39	0.18
KEGG_GLYCOLYSIS_GLUONEOGENESIS	1.26	0.19
KEGG_FRUCTOSE_AND_MANNOSSE_METABOLISM	1.36	0.20
KEGG_PENTOSE_PHOSPHATE_PATHWAY	1.30	0.20
KEGG_AMINO_SUGAR_AND_NUCLEOTIDE_SUGAR_METABOLISM	1.21	0.21
KEGG_BASE_EXCISION_REPAIR	1.23	0.21
KEGG_COLORECTAL_CANCER	1.27	0.22
KEGG_CITRATE_CYCLE_TCA_CYCLE	1.29	0.22
KEGG_HUNTINGTONS_DISEASE	1.21	0.26
KEGG_CELL_CYCLE	1.20	0.27
KEGG_TRYPTOPHAN_METABOLISM	1.11	0.30

表5-2. 続き

Gene Set Name	Normalized enrichment score	Normalized p-value
KEGG_STARCH_AND_SUCROSE_METABOLISM	1.14	0.30
KEGG_ALZHEIMERS_DISEASE	1.13	0.30
KEGG_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	1.19	0.31
KEGG_HISTIDINE_METABOLISM	1.09	0.32
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	1.10	0.32
KEGG_PYRUVATE_METABOLISM	1.13	0.32
KEGG_GALACTOSE_METABOLISM	1.15	0.33
KEGG_SYSTEMIC_LUPUS_ERYTHEMATOSUS	1.17	0.34
KEGG_LEUKOCYTE_TRANSENDOTHELIAL_MIGRATION	1.05	0.34
KEGG_HOMOLOGOUS_RECOMBINATION	1.19	0.37
KEGG_TYPE_1_DIABETES_MELLITUS	1.08	0.37
KEGG_LEISHMANIA_INFECTION	1.08	0.40
KEGG_BUTANOATE_METABOLISM	1.05	0.41
KEGG_ALANINE_ASPARTATE_AND_GLUTAMATE_METABOLISM	1.02	0.42
KEGG_PORPHYRIN_AND_CHLOROPHYLL_METABOLISM	1.01	0.42
KEGG_INTESTINAL_IMMUNE_NETWORK_FOR_IgA_PRODUCTION	1.06	0.42
KEGG_GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL_GPI_ANCHOR_BIOSYNTHESIS	1.09	0.44
KEGG_COMPLEMENT_AND_COAGULATION_CASCADES	1.04	0.46
KEGG_TYROSINE_METABOLISM	1.04	0.48
KEGG_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE	0.93	0.49
KEGG_GLYCEROPHOSPHOLIPID_METABOLISM	0.93	0.50
KEGG_PANCREATIC_CANCER	0.96	0.50
KEGG_GLYCOSPHINGOLIPID_BIOSYNTHESIS_LACTO_AND_NEOLACTO_SERIES	0.89	0.52
KEGG_PROSTATE_CANCER	0.93	0.53
KEGG_AMYOTROPHIC_LATERAL_SCLEROSIS_ALS	0.98	0.54
KEGG_GLYCEROLIPID_METABOLISM	0.88	0.54
KEGG_PROXIMAL_TUBULE_BICARBONATE_RECLAMATION	0.89	0.55
KEGG_METABOLISM_OF_XENOBIOTICS_BY_CYTOCHROME_P450	0.98	0.56
KEGG_RETINOL_METABOLISM	0.92	0.56
KEGG_ARACHIDONIC_ACID_METABOLISM	0.89	0.56
KEGG_INSULIN_SIGNALING_PATHWAY	0.97	0.57
KEGG_BLADDER_CANCER	0.97	0.58
KEGG_BASAL_TRANSCRIPTION_FACTORS	0.92	0.59
KEGG_STEROID_BIOSYNTHESIS	0.83	0.59
KEGG_CARDIAC_MUSCLE_CONTRACTION	0.89	0.59
KEGG_LYSINE_DEGRADATION	0.86	0.62
KEGG_ASTHMA	0.85	0.63
KEGG_CYTOSOLIC_DNA_SENSING_PATHWAY	0.88	0.64
KEGG_RIBOSOME	0.81	0.66
KEGG_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	0.88	0.68
KEGG_ALLOGRAFT_REJECTION	0.79	0.69
KEGG_NON_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	0.85	0.70
KEGG_AUTOIMMUNE_THYROID_DISEASE	0.69	0.73
KEGG_OLFACTORY_TRANSDUCTION	0.55	0.83
KEGG_BASAL_CELL_CARCINOMA	0.77	0.83
KEGG_VEGF_SIGNALING_PATHWAY	0.82	0.84
KEGG_LINOLEIC_ACID_METABOLISM	0.56	0.94

表6-1. KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY gene setにおけるIL-32-MΦの発現比(対M-MΦ)

Gene Name	Description	Fold change
IFNA10	interferon, alpha 10	5.67
IFNA17	interferon, alpha 17	5.06
IL8	interleukin 8	5.01
IFNA4	interferon, alpha 4	4.48
IKBKE	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	3.69
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	3.48
IFNA14	interferon, alpha 14	3.00
MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	2.89
IFNA16	interferon, alpha 16	2.68
IFNA7	interferon, alpha 7	2.61
IFNA6	interferon, alpha 6	2.58
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	2.17
CD80	CD80 molecule	2.12
IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)	2.02
IL1B	interleukin 1, beta	1.97
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	1.93
IFNAR1	interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	1.86
CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	1.67
MYD88	myeloid differentiation primary response gene (88)	1.65
PIK3R5	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101	1.65
IRF5	interferon regulatory factor 5	1.43
RIPK1	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	1.39
IFNA5	interferon, alpha 5	1.34
CD86	CD86 molecule	1.33
IFNA13	interferon, alpha 13	1.32
IFNA21	interferon, alpha 21	1.32
IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	1.31
MAPK11	mitogen-activated protein kinase 11	1.29
TBK1	TANK-binding kinase 1	1.28
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1.27
CD14	CD14 molecule	1.27
MAPK12	mitogen-activated protein kinase 12	1.26
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	1.26
TLR8	toll-like receptor 8	1.25
CD14	CD14 molecule	1.24
AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	1.23
IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	1.22
IRF7	interferon regulatory factor 7	1.20
PIK3CD	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide	1.20

表6-2. KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY gene setにおけるIL-32-MΦの発現比(対M-MΦ)

Gene Name	Description	Fold change
IL8	interleukin 8	5.01
BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	3.06
NFKBIB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	2.26
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	2.22
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	2.17
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	2.17
CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8	2.09
IL1B	interleukin 1, beta	1.97
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	1.93
PYDC1	PYD (pyrin domain) containing 1	1.69
CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	1.67
CASP5	caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase	1.37
MAPK11	mitogen-activated protein kinase 11	1.29
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1.27
MAPK12	mitogen-activated protein kinase 12	1.26
PYCARD	PYD and CARD domain containing	1.26
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	1.26
HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	1.23

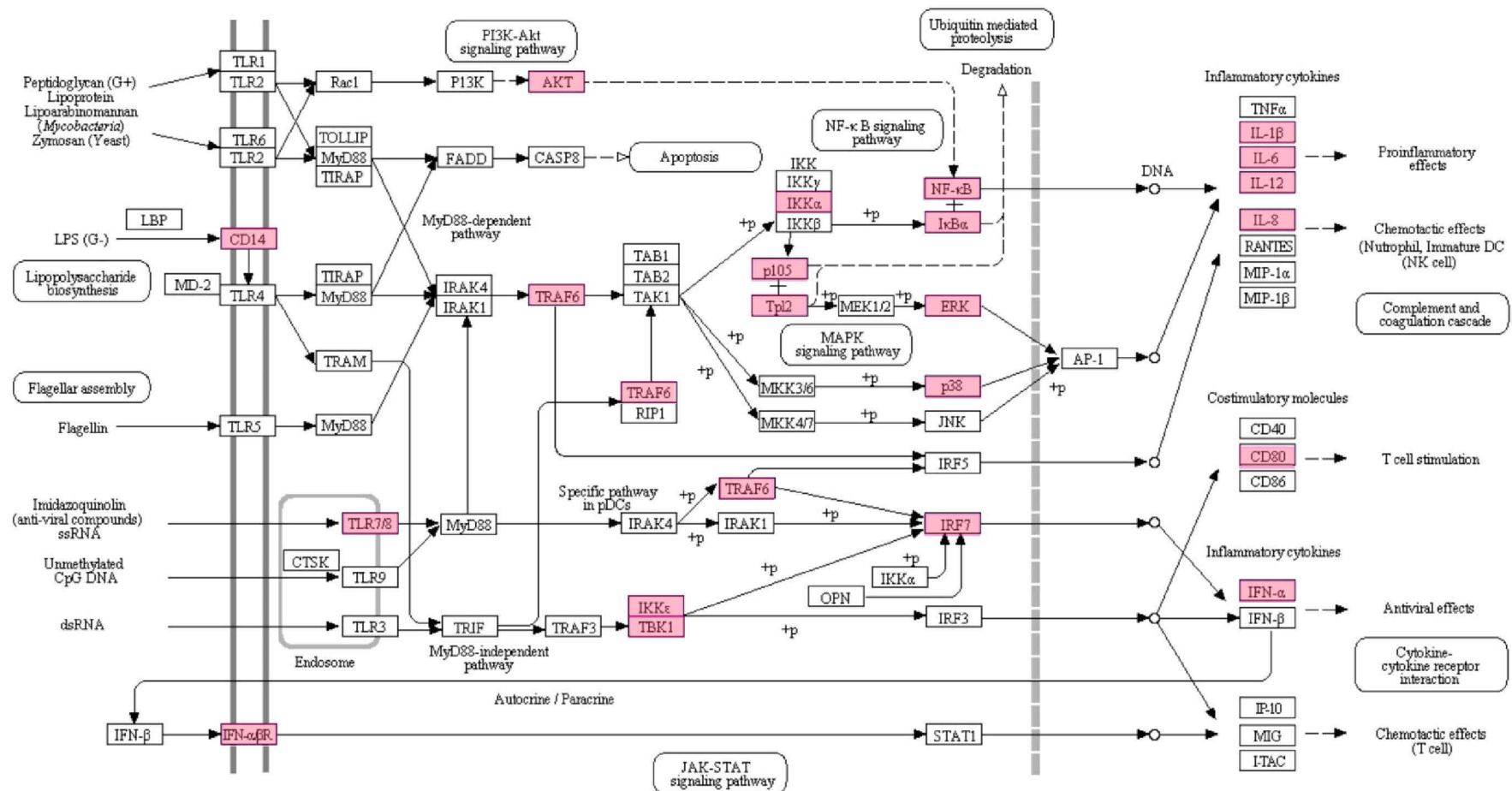


図4A. KEGG Toll like receptor signaling pathway

TLR signaling pathwayはMyD88 dependent pathwayとMyD88 independent pathwayに大別され、MyD88 dependent pathwayの下流ではNF-kappa-B signaling pathwayやMAPK signaling pathwayを活性化し炎症性サイトカインを産生する。MyD88 independent pathwayの下流ではIFNを産生する。

IL-32-MΦでM-MΦと比較して発現が1.2倍以上増加した遺伝子を赤で示す。NF-kappa-B、MAPK1(ERK),MAPK11/12(p38)と、その下流のIL-8, IL-6,IL-12β,IL-1βの発現が増加した。

(KEGG pathway databaseより引用)

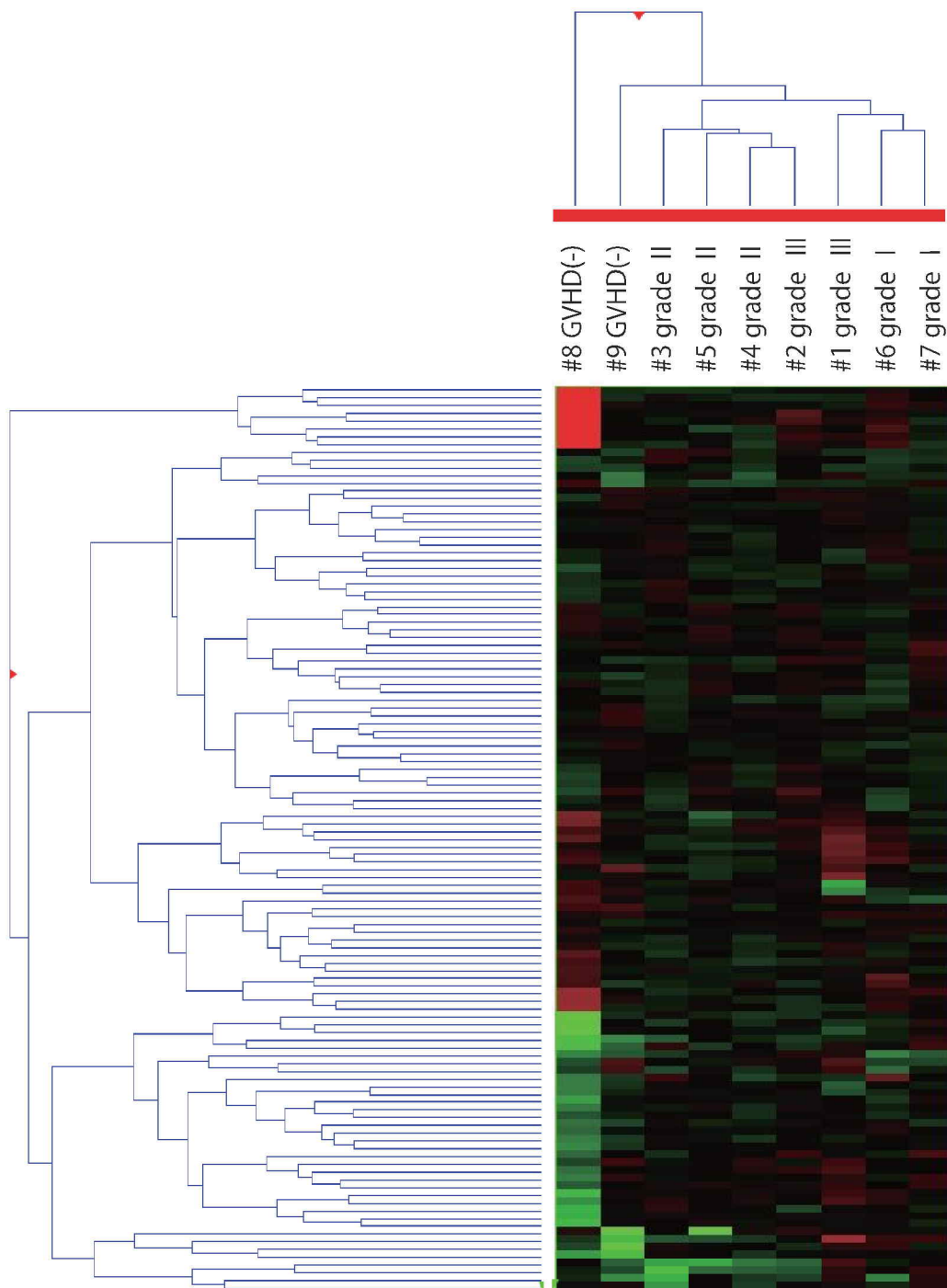


図 5A. KEGG Toll like receptor signaling pathway における造血幹細胞移植患者
単球の遺伝子発現クラスタリング解析
KEGG TLR signaling pathway に含まれる遺伝子の造血幹細胞移植患者 9 名 (#1-#9)
の単球における発現について階層的クラスタリング解析を行った。
何らかの急性 GVHD を発症した症例と急性 GVHD を発症しなかった症例でクラス
タリングされる傾向を認めた。

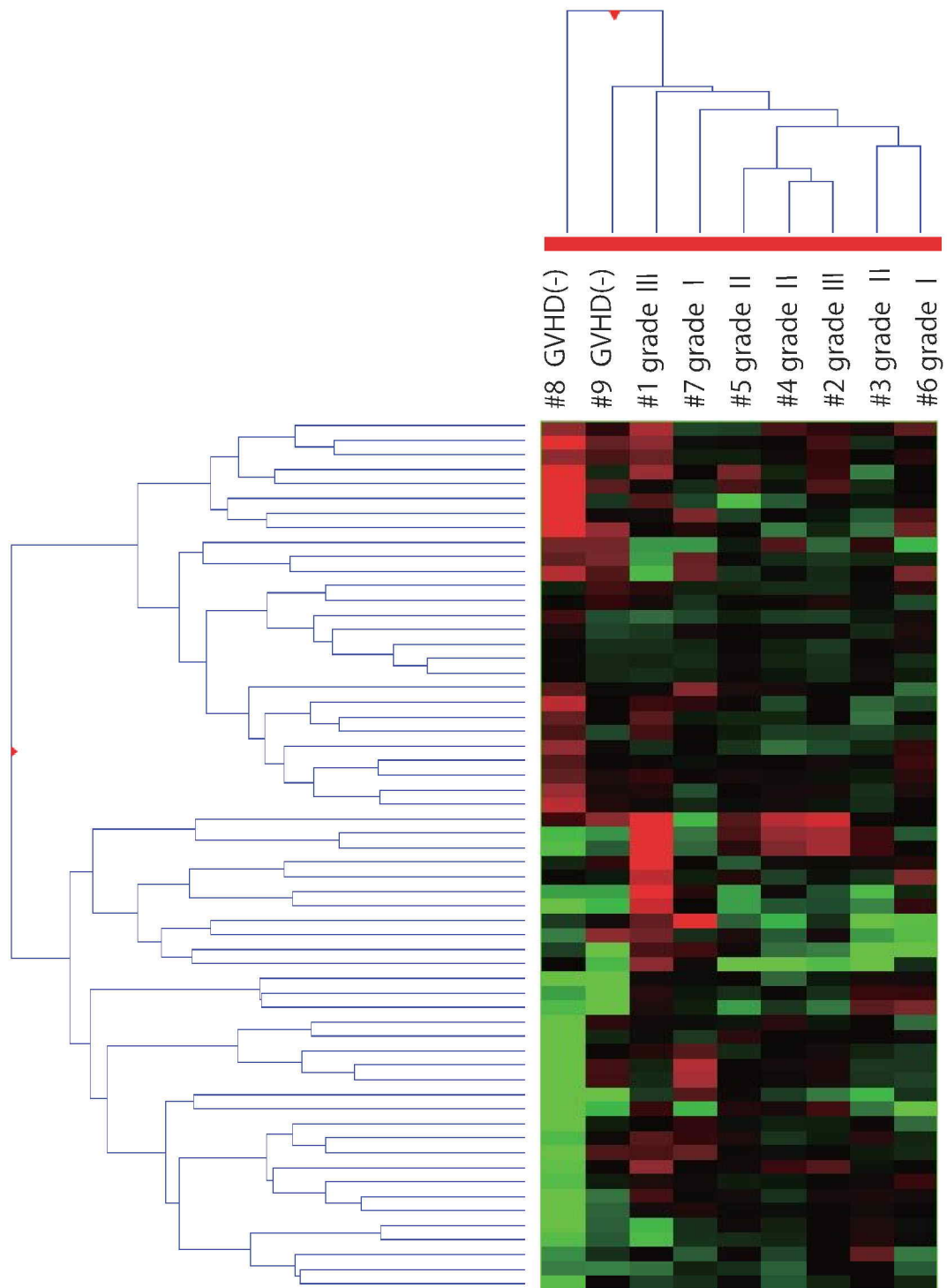


図 5B. KEGG Nod like receptor signaling pathway における造血幹細胞移植患者単球の遺伝子発現クラスタリング解析

KEGG NLR signaling pathway に含まれる遺伝子の造血幹細胞移植患者 9 名 (#1-#9) の単球における発現について階層的クラスタリング解析を行った。

TLR signaling pathway と同様に、何らかの急性 GVHD を発症した症例と急性 GVHD を発症しなかった症例でクラスタリングされる傾向を認めた。

表7-1. KEGG_TOLL LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY gene setにおける急性GVHD発症患者単球の発現比(対 非発症患者単球)

Gene Name	Description	Fold change
IFNAR1	interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	11.73
MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	9.80
MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	7.97
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	6.91
PIK3R5	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101	6.13
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	6.10
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	5.76
LBR	lamin B receptor	4.23
IRF5	interferon regulatory factor 5	3.98
CD14	CD14 molecule	3.91
LY96	lymphocyte antigen 96	3.67
MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	3.28
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)	3.26
MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	3.24
TLR5	toll-like receptor 5	3.00
TBK1	TANK-binding kinase 1	2.96
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	2.87
CTSK	cathepsin K (pseudosclerosis)	2.72
RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 (avian)	2.69
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	2.65
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9	2.42
MAP2K7	mitogen-activated protein kinase kinase 7	2.34
TICAM2	toll-like receptor adaptor molecule 2	2.25
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	2.19
IKBKG	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	1.88

表7-1. 続き

Gene Name	Description	Fold change
IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	1.76
AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	1.75
PIK3CB	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	1.73
IL1B	interleukin 1, beta	1.57
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	1.57
CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	1.52
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	1.50
IRAK4	interleukin-1 receptor-associated kinase 4	1.47
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	1.44
IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	1.43
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	1.39
TLR8	toll-like receptor 8	1.36
PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (p55, gamma)	1.35
IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	1.31
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	1.29
IRF7	interferon regulatory factor 7	1.28
TLR6	toll-like receptor 6	1.23
MAP2K2	mitogen-activated protein kinase kinase 2	1.21

表7-2. KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY gene setにおける急性GVHD発症患者単球の発現比(対 非発症患者単球)

Gene Name	Description	Fold change
IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	10.86
MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	9.80
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	6.91
ERBB2IP	erb2 interacting protein	6.91
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	6.01
PYCARD	PYD and CARD domain containing	5.55
MEFV	Mediterranean fever	5.30
PSTPIP1	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1	4.68
TAB3	TAK1-binding protein 3	4.59
PYCARD	PYD and CARD domain containing	4.22
BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2	3.39
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	3.27
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	2.87
RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 (avian)	2.69
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9	2.42
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	2.40
MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3	2.05
IKBKG	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	1.88
HSP90AB1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	1.57
IL1B	interleukin 1, beta	1.57
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	1.57
CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	1.52
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	1.32

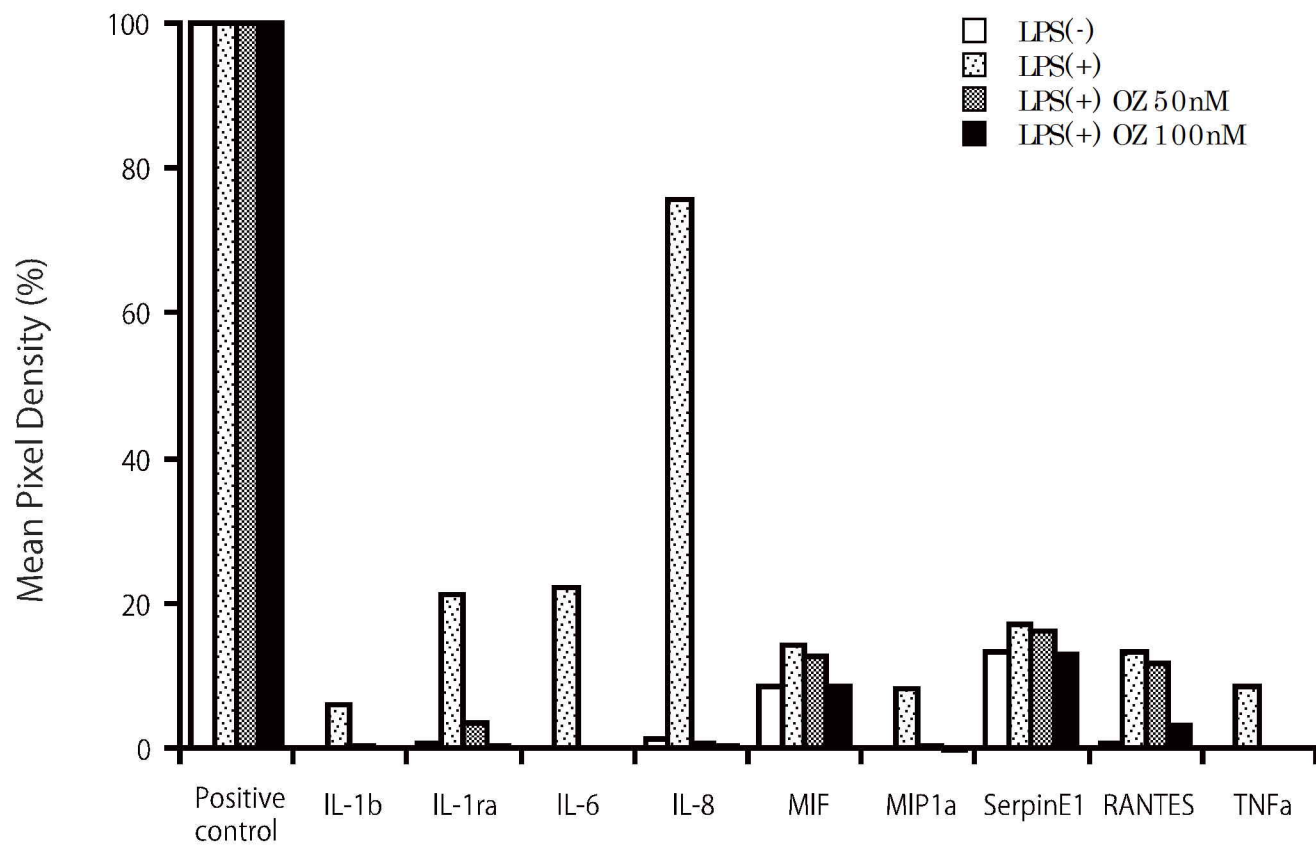


図 6. サイトカインアレイによる健常人単球の上清中サイトカイン濃度の評価

サイトカインアレイで評価した 36 種類のサイトカインのうち、LPS 刺激下の健常人単球の上清からは 9 種類のサイトカインが検出された。LPS 刺激による増加は IL-8 で最も著明であった。TNFa と IL-6 は OZ 50nM により検出感度以下に抑制された。その他のサイトカインは OZ の濃度に依存して抑制された。

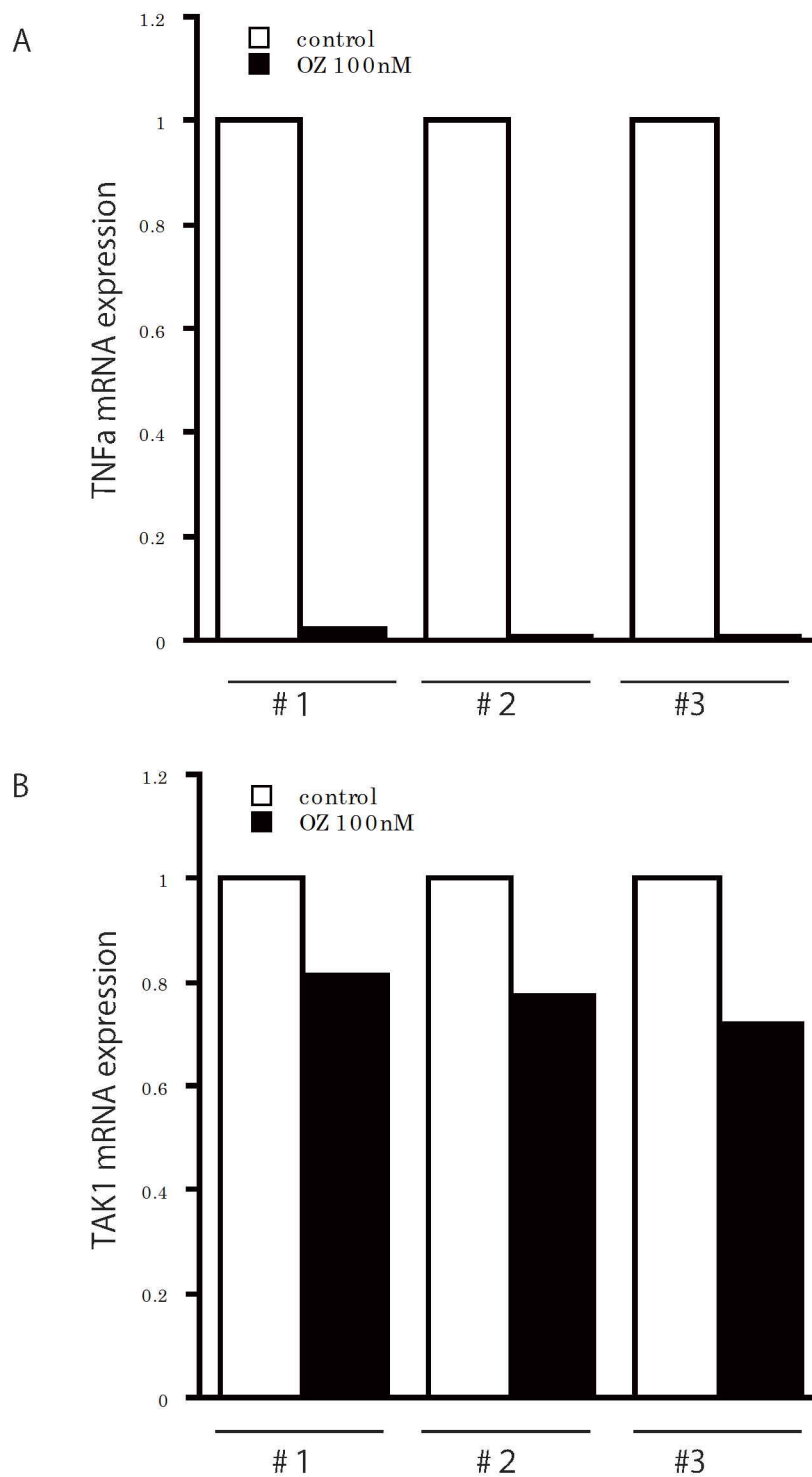


図 7. LPS 刺激下の健常被験者単球における TNFα および TAK1 の発現解析
健常被験者 3 名 (#1-3) の単球を 5Z-Oxozeaenol(OZ)100nM で 1 時間前処理の後、LPS100ng/ml を加えて計 16 時間培養した。いずれの単球においても、TNFα の発現は OZ により低下した (A)。
同じく健常被験者 3 名の単球において、TAK1 の発現は OZ により低下した低下した (B)。

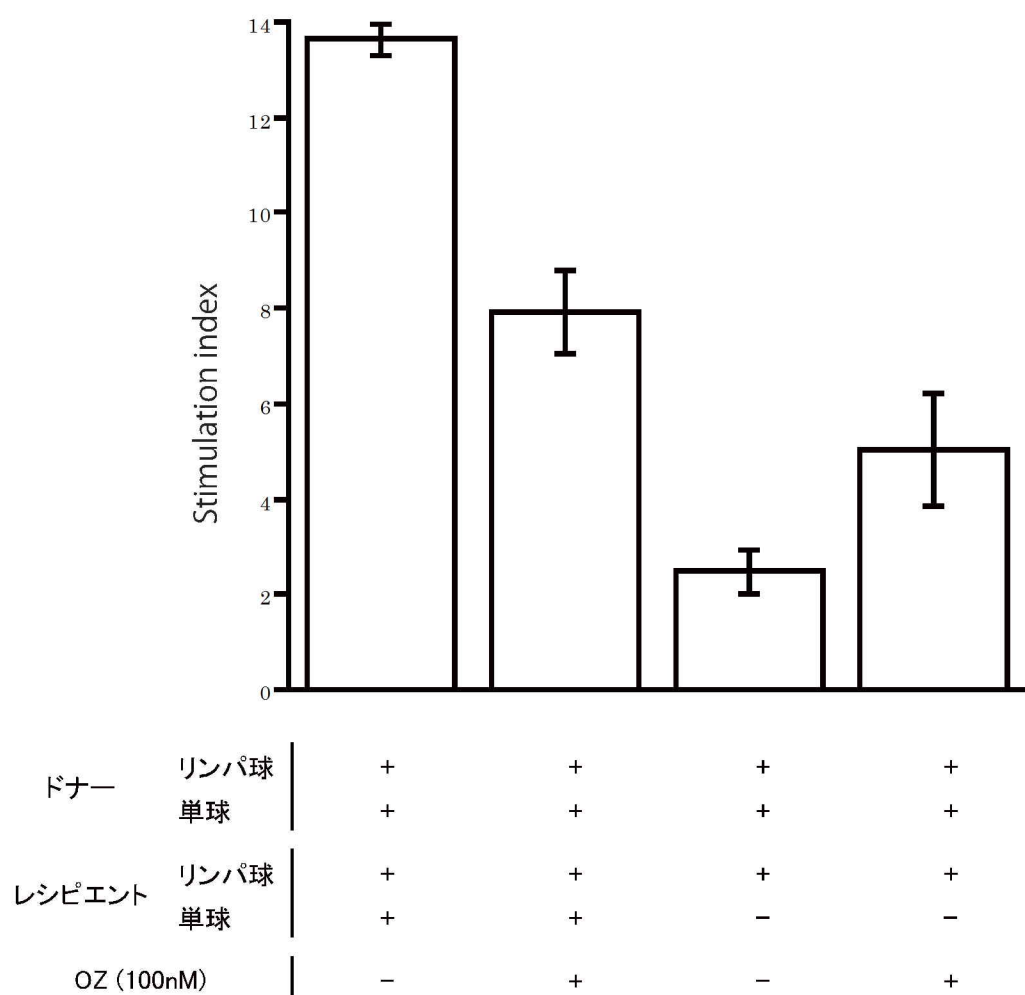


図 8. 同種リンパ球混合試験における 5Z-7-Oxozeaenol(OZ) の影響

健常被験者ドナー単核球を MMC 処理した健常被験者レシピエント単核球と混合し、5 日間培養後、 ^3H チミジンを加え 24 時間培養した。

ドナー自己単核球との混合培養を基準とした ^3H チミジンの取り込みの比率から計算した Stimulation index によりドナーリンパ球の活性化を評価した。レシピエント単核球との混合培養によるドナーリンパ球の活性化は OZ により抑制された。また、レシピエント単核球から単球を除去することにより、ドナーリンパ球の活性化は抑制された。この抑制は OZ により軽減された。

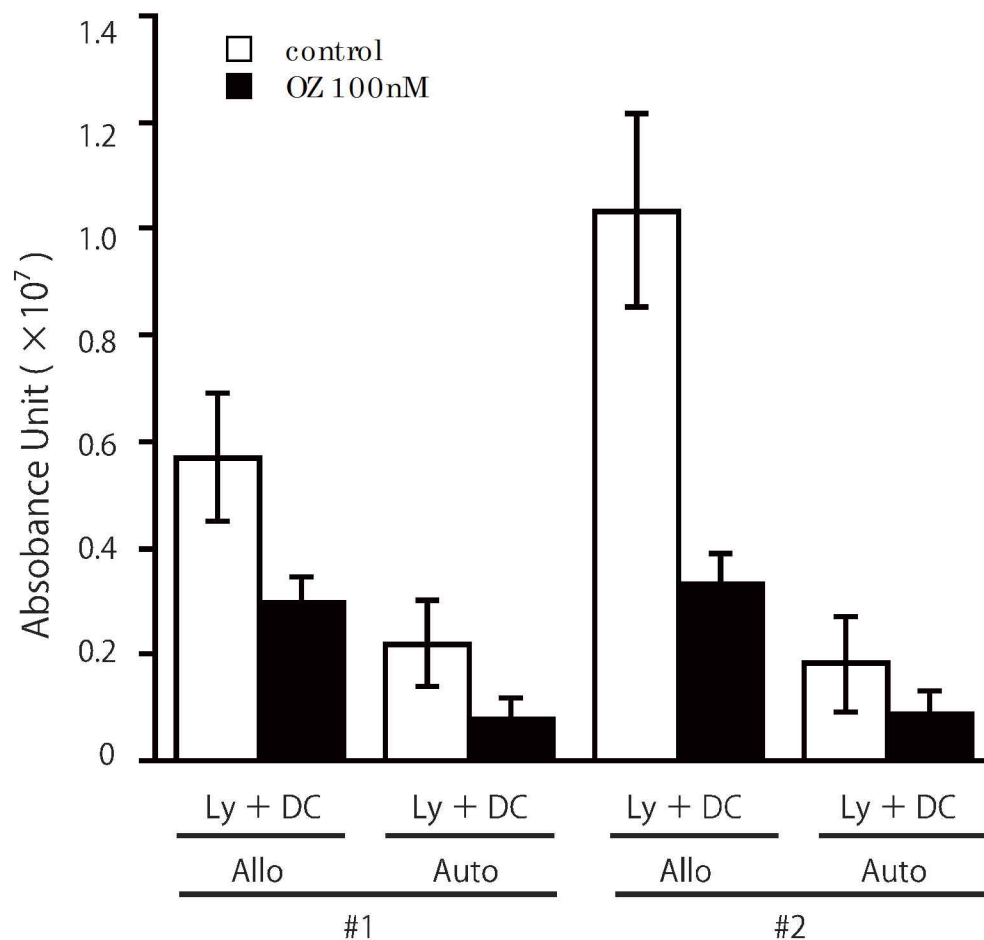


図 9. 同種樹状細胞による T リンパ球増殖刺激における 5Z-Oxozeaenol(OZ) の影響
 健常被験者の T リンパ球 (Ly) と樹状細胞 (DC) を 30 対 1 の割合で混合し 5 日間培養
 後、BrdU を添加して 24 時間培養した。培養後細胞を固定し、ペルオキシダーゼ標
 識抗 BrdU 抗体と反応後に基質を加え、化学発光により細胞増殖を評価した。
 同種樹状細胞との混合培養 (Allo) により、自己樹状細胞との混合培養 (Auto) と比較
 して T リンパ球の増殖は亢進した。OZ100nM により Allo 反応での T リンパ球の増
 殖亢進は抑制された。T リンパ球と樹状細胞の提供者を逆にした場合も (#1,#2) 同様
 の傾向であった。