



Title	炎症性疾患の予防、治療に関する研究
Author(s)	村上, 薫
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15918号
Issue Date	2024-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k15918
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/92196">http://hdl.handle.net/2115/92196</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	MURAKAMI_Kaoru.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

炎症性疾患の予防、治療に関する研究

(Research on prevention and treatment of inflammatory diseases)

2024年3月

北海道大学

村上 薫

Kaoru Murakami



学位論文

炎症性疾患の予防、治療に関する研究

(Research on prevention and treatment of inflammatory diseases)

2024年3月

北海道大学

村上 薫

Kaoru Murakami

## 目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁

### 第一章

#### *Rhodobacter azotoformans* 由来 LPS (RAP99LPS) の

#### ウイルスに対する免疫増強作用

緒言	9 頁
実験方法	11 頁
結果	15 頁
考察	33 頁
総括および結論	36 頁
謝辞	37 頁
利益相反	38 頁
引用文献	39 頁

## 第二章

### AI ナノポアを用いた新型コロナウイルス変異型の識別

緒言	42 頁
実験方法	43 頁
結果	48 頁
考察	61 頁
総括および結論	63 頁
謝辞	64 頁
利益相反	65 頁
引用文献	66 頁

## 第三章

### 関節リウマチの遠隔炎症の片側への波及メカニズム

緒言	70 頁
実験方法	72 頁
結果	79 頁
考察	105 頁

総括および結論	106 頁
謝辞	107 頁
利益相反	108 頁
引用文献	109 頁

## 発表論文目録及び学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

Kaoru Murakami, Daisuke Kamimura, Rie Hasebe, Mona Uchida, Nobuya Abe, Reiji Yamamoto, Jing-Jing Jiang, Yasuhiro Hidaka, Yuko Nakanishi, Shuzo Fujita, Yuki Toda, Nobuhiro Toda, Hiroki Tanaka, Shizuo Akira, Yuki Tanaka, and Masaaki Murakami  
*Rhodobacter azotoformans* LPS (RAP99-LPS) is a TLR4 agonist that inhibits lung metastasis and enhances TLR3-mediated chemokine expression  
Frontiers in Immunology, accept 後

Kaoru Murakami, Shimpei I Kubota, Kumiko Tanaka, Keiichiroh Akabane, Rigel Suzuki, Yuta Shinohara, Hiroyasu Takei, Shigeru Hashimoto, Yuki Tanaka, Shintaro Hojyo, Osamu Sakamoto, Norihiko Naono, Takayui Takaai, Kazuki Sato, Yuichi Kojima, Toshiyuki Harada, Takeshi Hattori, Satoshi Fuke, Isao Yokota, Satoshi Konno, Takashi Washio, Takasuke Fukuhara, Takanori Teshima, Masateru Taniguchi\*, and Masaaki Murakami\*  
High-Precision Rapid Testing of Omicron SARS-CoV-2 Variants in Clinical Samples Using AI-Nanopore  
Lab on a Chip, accept 後

Rie Hasebe, Kaoru Murakami, Masaya Harada, Nada Halaka, Hiroshi Nakagawa, Fuminori Kawano, Yoshinobu Ohira, Tadafumi Kawamoto, Fiona E Yull, Timothy S Blackwell, Junko Nio-Kobayashi, Toshihiko Iwanaga, Masahiko Watanabe, Harumi Hotta, Toshihide Yamashita, Daisuke Kamimura, Yuki Tanaka, and Masaaki Murakami  
ATP spreads inflammation to other limbs through crosstalk between sensory neurons and interneurons  
Journal of experimental medicine, accept 後

本研究は以下の学会に発表した。

村上薫、他 3 名 AI ナノポアを用いた病原体の網羅的高精度迅速検査法の開発,第 9 回北海道大学部局横断シンポジウム.札幌.2023 年 10 月 (ポスター発表、銀賞)



Kaoru Murakami, An Artificial Intelligence Nanopore Platform Detects Mutant SARS-CoV-2 including Omicron Variant by Recognizing Spike Proteins, The 5th International Forum on Quantum Metrology and Sensing (Ifqms) . 2022, November(口頭発表)

村上薫、他 7 名 紅色非硫黄細菌 LPS による免疫活性化作用、抗がん、抗ウイルス作用について, 第 54 回北海道病理談話会. 札幌. 2021 年 9 月 (口頭発表)

村上薫、他 7 名 紅色非硫黄細菌 LPS による免疫活性化作用, 日本インターフェロン・サイトカイン学会第 85 回学術集会. 東京. 2021 年 5 月 (ポスター発表)

村上薫、量子と医療の融合～ゲートウェイ反射を通じた事象～,量子生命科学会第 2 回大会. 千葉. 2020 年 12 月 (口頭発表)

村上薫、他 6 名 紅色非硫黄細菌 LPS による免疫活性化作用、抗がん、抗ウイルス作用の解析,量子生命科学会第 2 回大会. 千葉. 2020 年 12 月 (ポスター発表、優秀発表賞)

村上薫、他 12 名 紅色非硫黄細菌 LPS による免疫活性化作用、抗がん、抗ウイルス作用の解析,第 6 回北大・部局横断シンポジウム. 札幌. 2020 年 10 月 (ポスター発表)

## 要旨

【背景と目的①】細菌やウイルスに感染することで感染症は生じる。その中で発表者は複数の研究を通じて、*Rhodobacter azotoformans* の菌体成分の炎症における役割、新型コロナウイルス感染症の新しい検査法の確立、さらに感染を含む片側の関節内炎症が対側に波及する際の神経回路とその炎症誘導メカニズムについて、研究し、解明した。一つ目の研究は、*Rhodobacter azotoformans* 由来 LPS (RAP99LPS) のウイルスに対する免疫増強作用である。紅色非硫黄細菌は、硫黄粒を持たない光合成能を持つ細菌群で自然界に存在する。わが国では特に *Rhodobacter azotoformans* の菌体成分が健康食品としてヒト、家畜に利用されてきた。いくつかの紅色非硫黄細菌の LPS は、TLR4 を競合することで O157 など大腸菌依存性の食中毒を予防、治療できることがわかっているが、RAP99LPS 単体では免疫増強作用はないとされている。発表者は、この物質のウイルスに対する免疫増強作用を検討した。

【対象と方法①】(1)まず、RAP99LPS のマウス腹腔内投与は TLR4 受容体を介して免疫系を活性化し、脾腫を誘導した。(2) 2019 年から SARS-CoV2 感染は猛威を振るい、私たちの生活を制限している。発表者は RAP99LPS が SARS-CoV2 を含む RNA ウイルス感染にどのような効果が見られるかを人工 RNA である poly(I:C)を用いて検討した。

【結果①、考察】(1)具体的には樹状細胞、マクロファージ、好中球、B 細胞、gdT 細胞、NK 細胞、CD8+T 細胞、Treg 細胞については数が増加し、血清中の STAT3 を活性化する IL-6、NFkB を活性化する TNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、IL-17A、STAT 活性化サイトカインである IFN $\gamma$ ,IL-2,IL-3,IL-4,IL-12、GMCSF、ケモカインである MIP1a,MIP1b,MCP1,KC、RANTES の濃度を上昇させた。また、脾臓では、血管内皮細胞、線維芽細胞にて STAT3 と NFkB の同時活性化が認められ IL-6 アンプの活性化が示された。これは RAP99LPS そのものが免疫増強作用があることを示している。

(2)RAP99LPS 事前投与マウスでは、poly(I:C)投与後、COVID19 重症化の主因であるサイトカインストームを引き起こす STAT3 を活性化する IL-6、NFkB を活性化する TNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、IL-17A、STAT 活性化サイトカインである IFN $\gamma$ ,IL-2,IL-3,IL-4,IL-12、GMCSF の産生を減少させた。一方、免疫細胞を感染局所に集積する MIP1a,MIP1b,MCP1 ケモカイン発現は上昇した。

【結論】RAP99-LPS は TLR4 アゴニストであり、in vivo および in vitro において免疫細胞を活性化し、ケモカインおよびサイトカインを分泌する。

【背景と目的②】二つ目の研究として、発表者は阪大産研と共同で AI ナノポアを用いた新型コロナウイルス変異型の識別について研究を行った。

具体的な研究内容として、SARS-CoV-2 を含む病原性ウイルス変異体を迅速かつ正確に診断できるデジタルプラットフォームの開発は、パンデミックが過ぎ去り、with コロナの時代である現在、喫緊の課題として挙げられている。

発表者の共同研究者である大阪大学産研所属の谷口教授は、以前に武漢SARS-CoV-2 を5分以内に高い感度と特異性で検査できる人工知能 (AI) -nanoporeプラットフォームを報告したが、このプラットフォームがウイルスのどの部分を認識して、識別を行っているかは不明であった。同様に、このプラットフォームがSARS-CoV-2の変異型や臨床検体中のウイルスの存在を検出できるかどうかについても、さらなる研究が必要であった。

【対象と方法②】発表者はこれまでに発見された6種のSARS-CoV-2ウイルスについて人工知能 (AI) -ナノポアプラットフォームを用いて測定をした。その後、COVID-19患者の唾液検体からo変異体を同定する実験を行った。

【結果②、考察】発表者の研究グループは、前述した人工知能 (AI) -nanoporeプラットフォームの改良版を用いてSARS-CoV-2の変異型を識別できることを実証した。さらに、δ型とo型のSタンパクを発現する武漢SARS-CoV-2ウイルスを開発し、これを同定し、ウイルスの表面構造を識別できることを示した。最後に、このプラットフォームを使用して、COVID-19患者の唾液検体からomicron変異体を、それぞれ100%と94%の感度と特異度で同定することに成功した。

【結論】上記の結果から、改良型AI-nanoporeプラットフォームは、SARS-CoV-2変異型の効果的な診断ツールであることが示され、今後はサル痘やインフルエンザウイルス、さらには豚コレラなどの診断ができるようにデータを取得中である。

【背景と目的③】最後に、発表者は感染症によって起こりうる炎症性疾患の代表である関節リウマチの遠隔炎症についての研究を行った。リウマチは片側に炎症が生じると、もう片側にも炎症が生じる疾患であることが知られている。

【対象と方法③】この研究で発表者が所属するグループはリウマチモデルマウスを用いて、左足底関節にサイトカインを注射で投与し、炎症を起こさせた後に関節包や関連神経などを解析した。

【結果③、考察】上記の実験を行った結果、リウマチモデルマウスの左足関節の炎症シグナルがATPを中核とする感覚ニューロン-介在ニューロン間のクロストークを介して右側の足関節に広がることが示された。この神経経路を外科的に切除したり、薬物を使って阻害したりすると、反対側での炎症発生が抑制されたことから、ATPは

神経伝達物質であると同時に炎症促進物質でもあり、局所炎症と反対側の炎症を誘発する神経経路の仲介役として機能しているというメカニズムがわかった。

【結論】 この結果は、遠隔炎症ゲートウェイ反射と名付けられ、この神経経路を遮断することで、炎症性疾患、特に関節リウマチのように炎症が離れた位置まで広がる疾患に対する治療効果が期待できることを示している。

## 略語表

本文中、および図中で使用した略語は以下の通りである。

AI	artificial intelligence
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	adenosine triphosphate
AUC	Area Under the Curve
BCG-CWS	bacillus Calmette-Guerin-cell wall skeleton
BSL3	biosafety level 3
CCL2	CC-chemokine Ligand 2
CFA	Freund's Complete Adjuvant
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
CD19	Cluster of Differentiation 19
CNS	Central Nervous System
Cre	cyclization recombination
Ct	Cycle Threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNase	Deoxyribonuclease
DRG	dorsal root ganglion
DC	Dendritic cell
EFBS	Exosome-Depleted FBS
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EV	Extracellular Vesicle
FBS	fetal bovine serum
FG	Fluoro-Gold
GMCSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
gdT	Ganma-delta Tcell
HEK	Human Embryonic Kidney cells
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPRT	Hypoxanthine guanine phospho-ribosyl- transferase
HSV2	herpes simplex virus type 2
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL-6	Interleukin-6

IL-6R	Interleukin-6 receptor
IgG	Immunoglobulin G
IV	Intravenous injection
L5	lumbar spinal cord
Light GBM	Light Gradient Boosting Machine
LPS	Lipopolysaccharide
LOS	lipo-oligosaccharide
LSM	laser confocal microscope
MACS	Magnetic cell sorting
MCP	monocyte Chemotactic protein
MHC	major histocompatibility complex
MIP1a	macrophage inflammatory protein 1-alpha
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger ribonucleic acid
Myd88	myeloid differentiation factor 88
Nav1.8	voltage-dependent Na <sup>+</sup>
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NK	natural killer
OCT	Optimal Cutting Temperature
Oligo(dT)	oligo-deoxythymidylate
Poly(I:C)	polyinosinic-polycytidylic acid
pSTAT3	Phospho-Signal transducer and activator of transcription 3
P 值	Probability 值
RA	rheumatoid arthritis
R azotoformans	<i>Rhodobacter azotoformans</i>
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RNA	ribonucleic acid
ROC 曲線	Receiver Operatorating Characteristic 曲線
RPMI1640	(Roswell Park Memorial Institute 1640
RT-PCR	Real time Polymerase Chain Reaction
SA	staphylococcus aureus
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SEM	standard error of the mean
SLE	systemic lupus erythematosus
SiN 膜	silicon nitride thin 膜

SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
S タンパク	Spike タンパク
T10	10th thoracic spinal cord
TLR3	Toll-like receptor 3
TNF $\alpha$	Tumor necrosing factor $\alpha$
TRIF	TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
TCID50	Median Tissue Culture Infectious Dose
VOI	variant of interest
VOC	Variant of Concern

## 第一章

### *Rhodobacter azotoformans* 由来 LPS (RAP99LPS) の

### ウイルスに対する免疫増強作用

#### 緒言

リポ多糖 (LPS) はグラム陰性菌の細胞壁の構成成分である。大腸菌由来の LPS (*E. coli*-LPS) は、Toll 様受容体 (TLR) 4 分子を介して、免疫細胞、特に樹状細胞 (DC) やマクロファージなどの自然免疫細胞を刺激することが知られている (K. Hoshino, et al., 1999)。TLR ファミリーのメンバーは、保存された微生物構造を認識し、自然免疫応答だけでなく、DC を介した T 細胞の活性化を通じて適応免疫応答も活性化する (R. Medzhitov, et al., 1997)。TLR4 が LPS と結合すると、少なくとも 2 つのシグナル伝達経路が活性化される。一つはミエロイド分化因子 88 (Myd88) に依存するもので、もう一つは TIR ドメイン含有アダプター誘導 IFN $\beta$  (TRIF) に依存するものである (B. Beutler., 2004)。TLR 結合タンパク質である Myd88 は、NF- $\kappa$ B の活性化に寄与し、IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインを誘導する。一方、TRIF 依存性のシグナル伝達は、IRF3 の活性化を介して IFN $\gamma$  の発現につながる (K. Hoebe et al., 2003)。TLR3 は、コロナウイルスのような一本鎖ウイルスも含め、感染ウイルスの二本鎖 RNA を認識する役割を担っている (M. Matsumoto et al., 2008; G.C. Sen et al., 2005)。TLR4 シグナルはマクロファージにおいて TLR3 のアップレギュレーションを誘導し (X. Ding et al., 2017)、我々は内皮細胞においても同様の効果を見出した (未発表)。さらに、TLR4 は LPS に結合することで内在化され、LPS に結合した TLR4 と TLR3 はともにエンドソームに局在する。この 2 つの TLR はまた、TRIF が関与する共通のシグナル伝達経路を共有している (T. Kawai et al., 2010)。TLR3 および TLR4 の結合パートナーである TRIF は、TBK1 および TRAF3 に結合し、IRF3 および IRF7 を活性化して I 型インターフェロン産生を誘導し、TRAF6 と相互作用して NF- $\kappa$ B を活性化することにより自然免疫に寄与している (N.J. Gay et al., 2014)。*Rhodobacter* 属細菌もグラム陰性菌であり、内毒素活性を持たない LPS を産生し、大腸菌 LPS を含む他の LPS の拮抗薬として働くことが報告されている (W.J. Christ et al., 1995; U. Seydel et al., 2000; M. Mullarkey et al., 2003)。さらに、IL-6 などの炎症性サイトカインを低レベルで誘導する。*Rhodobacter azotoformans* LPS である RAP99-LPS の構造は、グルクロン酸を含む短い糖鎖構造からなる新規なリポオリゴ糖を含んでいる



(Y. Kanie et al., 2019)。しかしながら、RAP99-LPS の機能解析は行われていない。本研究では、RAP99-LPS の TLR4 アンタゴニスト機能を検討した。その結果、RAP99-LPS は TLR4 を介して DC や T 細胞を含む様々な免疫細胞を活性化し、その前処理によりマウスの生体内で大腸菌-LPS 誘発体重減少が抑制されることが示された。さらに、RAP99-LPS は B16F1 癌細胞の肺転移を抑制した。RAP99-LPS 前処理は、IL-1b、TNF $\alpha$ 、IL-17A、IL-6 などの NF $\kappa$ B および STAT3 刺激因子の TLR3 介在性発現を抑制したが、MCP1、MIP1a、MIP1b などのケモカインの発現を増強した。これらの知見は、RAP99-LPS が実際には TLR4 刺激剤であり、拮抗剤ではないことを示しており、TLR4 が介在するエンドトキシンショックや TLR3 が誘発するサイトカインストームを弱め、肺腫瘍の転移を抑制するなど、in vivo で有益な作用を持つことを示している。

# 実験方法

## 1 マウス系統

C57BL/6 マウス、C3H/HeN および C3H/HeJ 雄性マウス (6-9 週) を日本 SLC (静岡、日本) から購入した。本研究で行われたすべての動物実験は、北海道大学遺伝子医学研究所の承認を得ており、すべてのマウスは同研究所の動物飼育ガイドラインに従い、特定の病原体を含まない条件下で飼育・管理された。動物実験は北海道大学動物実験委員会のガイドラインに従って行われ、動物実験のプロトコールは北海道大学動物実験委員会の承認を得た。

## 2 試薬

本研究で使用した *R.azotoformans* BP0899 株は Nite Biological Resource Center に寄託されていた (アクセッション番号: NITE BP-644)。RNase A、DNase および Proteinase K は Merck (ドイツ、ダルムシュタット) から購入した。Bacto Yeast Extract は BD Difco (New Jersey, USA) から購入した。SA 培地は、コハク酸ナトリウム (1.0 g)、酢酸ナトリウム (1.0 g)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.5 g)、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.6 g)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1.0 g)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.2 g)、NaCl (0.2 g)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.05 g) Bacto Yeast Extract (0.1 g)、微量元素溶液 (1 mL)、ビタミン溶液 (1 mL) を 1000 mL の蒸留水に溶解した。微量元素溶液は、EDTA-2Na (1000 mg)、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2000 mg)、 $\text{ZnCl}_2$  (100 mg)、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (100 mg)、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  (100 mg)、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (100 mg)、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (20 mg)、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (10 mg)、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10 mg)、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (5 mg) を蒸留水 1000 mL に溶解したものである。ビタミン溶液は、蒸留水 100 mL 中のチアミン-HCl (50 mg)、ナイアシン (50 mg)、p-アミノ安息香酸 (30 mg)、ピリドキシン-HCl (10 mg)、ビオチン (5 mg) およびビタミン B12 (5 mg) から構成された。ビタミン溶液は 5°C で暗所にストックした。SA 培地 (pH6.7) を 121°C で 15 分間オートクレーブした。質量分析に使用した溶媒は HPLC グレードまたは LC/MS グレードであった。その他の溶媒および試薬は特殊グレードを使用した。TLC プレート (シリカゲル、60 F254) は Merck Millipore (ドイツ、ダルムシュタット) から購入した。

*R.azotoformans* は 30°C の SA 培地で好氣的に増殖させた。培養液は遠心分離により回収し、凍結乾燥した。凍結乾燥した細菌細胞 (20.0 g) を褐色が消えるまでアセトンで洗浄した。その後、細胞を真空中で乾燥させ、熱フェノール-水法にかけた。抽出液を 27200xg、4°C で 40 分間、3 回遠心分離した。上清を分離し、蒸留水を用いてフェノールが検出されなくなるまで透析した (MWCO 7 kDa)。得られた抽出液を限

外ろ過 (MWCO 100 kDa) で 75 mL に濃縮した。抽出液に RNaseA (0.5 mg/mL) と DNase (5 µg/mL) を加え、得られた溶液を 37°C で 6 時間インキュベートした。次に proteinase K 200 µg/mL を加え、溶液を 50°C で 4 時間インキュベートした。残った沈殿物に蒸留水 30mL を加え、攪拌して溶解させた。この水溶液を限外ろ過にかいた (MWCO 100 kDa) 。その後、沈殿画分を溶解した水溶液を熱フェノール-水法に 3 回供した後、透析 (MWCO 7 kDa) 、限外濾過 (MWCO 100 kDa) を行った。得られたものを凍結乾燥し、165mg の精製 LOS を得た。

大腸菌-LPS (055: B5) (タンパク質 2%、核酸 2.5%混入)は、Merck(ドイツ、ダルムシュタット)から購入した。

### 3 TLR2 と TLR4 シグナルアッセイとそれに伴う細胞株

1 型コラーゲン陽性内皮細胞 BC1 細胞株は、宮坂昌之教授 (大阪大学、吹田市、日本) より頂いた。

BC1 細胞は以下のようにして樹立された。BALB/c マウス (日本チャールス・リバー株式会社、神奈川県) の大腿骨を分離し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後に平滑筋と骨膜を除去し骨髓細胞を採取した。残った骨は断片になるように切断し、カルシウムとマグネシウムを除いたハンクス平衡食塩水溶液(0.5% コラゲナーゼ添加) 中に入れ、37 度で 15 分間穏やかに振盪した後に細胞 (BC1 細胞) を回収し、10% FBS 高グルコース DMEM で培養した。

HEK-Blue<sup>TM</sup> mTLR2 および HEK-Blue<sup>TM</sup> mTLR4 細胞は Invivogen 社 (アメリカ、サンディエゴ) から購入した。当該細胞は 1X HEK-Blue selection を添加した増殖培地で維持培養し、増殖培地は 1 週間に 1 回更新した。

実験時には 70-80% のコンフルエントに達した後、増殖培地を捨て、あらかじめ温めた PBS で細胞を洗浄した。HEK-Blue 検出培地で 280,000 細胞/mL の細胞懸濁液を調製し、細胞懸濁液 180µL と 96 ウェルプレートの各ウェルにサンプルまたは陰性対照または陽性対照 20µl を直ちに添加してプレートを 37°C、5%CO<sub>2</sub> 中で 9 時間インキュベートした後に、iMark Microplate reader spectrophotometer (Bio-Rad, Tokyo, Japan) を用いて、各ウェルを 630 nm で分析した。

### 4 LPS 介在エンドトキシンモデルマウス

C57BL/6 マウス、C3H/HeN マウスおよび C3H/HeJ マウスに 200µg の RAP99-LPS または大腸菌-LPS を腹腔内投与した後、体重を測定した。

### 5 B16F1 細胞を用いた肺がんモデルマウス

これは B16F1 細胞を用いて行った。B16F1 細胞を培養して 70-80% のコンフルエントに達した後に回収し、無血清 RPMI1640 で 3 回洗浄して生理食塩水に  $1 \times 10^7$  cells/mL で再懸濁した。

調整した B16F1 細胞 ( $1 \times 10^6/100\mu\text{L}$ ) は C57BL/6 マウスに i.v. 投与された。その後、RAP99-LPS ( $0.3\text{mg}/300\mu\text{L}$ ) または生理食塩水 ( $300\mu\text{L}$ ) を 24 時間ごとに腹腔内注射し、RAP99-LPS 投与群では、飲料水を RAP99-LPS を溶解した水 ( $10 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$ ) に置換した。14 日目に解剖して、マウスの肺の中の B16F1 細胞コロニー数を解剖顕微鏡 (オリンパス、東京、日本) でカウントした。

## 6 フローサイトメトリーおよび細胞調製

大腸菌 LPS、RAP99-LPS、または生理食塩水を投与したマウスから脾臓を採取した。得られた脾臓は DMEM 培地を入れた 50mL チューブ中のセルストレーナー上で破碎し、遠心分離して上清を捨て、沈殿物に 1 mL の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を氷上で 1 分間加えた。Ter-119 の分析では、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  処理は省略した。その後、49mL の DMEM を加え、混合物を遠心した。細胞ペレットを MACS Buffer で再懸濁し、単細胞懸濁液を得た。液中の細胞数を血球計数装置で測定した後、フローサイトメトリー分析を行った。

フローサイトメトリーにおいては脾臓細胞集団の細胞表面抗原を以下の抗マウス抗体を用いて、2.4G2 抗体存在下で染色した： FITC 標識抗 CD19 (クローン MB19-1、eBioscience 社、東京、日本)、Pacific Blue 標識抗 CD3 (クローン 145-2C11、BioLegend 社、東京、日本)、PE-Cy7 標識抗 CD4 (クローン RM4-5 ; eBioscience)、FITC 標識抗 CD44 (クローン IM7 ; eBioscience)、APC 標識抗 CD11c (クローン N418 ; BioLegend)、APC 標識抗 MHC クラス II (クローン M5/114. 15. 2 ; BioLegend)、FITC 標識抗 CD11b (クローン M1/70、BioLegend)、Pacific Blue 標識抗 MHC クラス II (クローン AF6-120. 1 ; BioLegend)、PE 標識抗 CD45R/B220 (クローン RA3-6B2 ; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)、Pacific Blue 標識抗 Gr-1 (クローン RB6-8C5、BioLegend)、ビオチン標識抗 CD11b (クローン M1/70、BioLegend)、抗 CD19 (クローン 6D5、eBioscience)、抗 NK1.1 (クローン PK136、eBioscience)。

細胞内 Foxp3 染色に関しては、 $1-5 \times 10^5$  cells/mL の単細胞懸濁液を調製し、96V ウェルボトムプレートで CD4、CD25、陰性マーカーとしての MHC クラス II を含む表面マーカーで染色した。MACS Buffer (5% FBS-PBS with 1.86g/l EDTA) で洗浄後、細胞ペレットを 200 $\mu\text{L}$  の Foxp3 Fixation/Permeabilization working solution とともに各ウェルに加えた。細胞懸濁液を暗所 2-8°C で 30 分間インキュベートした。その後得られたサンプルを 400-600xg で 5 分間遠心し、上清を捨て、沈殿をボルテックスしてから細胞を 200 $\mu\text{L}$  の 1X Permeabilization Buffer で 2 回洗浄した。その後約 100 $\mu\text{L}$  の 1X

Permeabilization Buffer に 0.5 $\mu$ L の蛍光標識抗 Foxp3 抗体（クローン MF23、Becton, Dickinson and Company, New Jersey, America）を加え、室温で 60 分間インキュベートした。その後、細胞を 200 $\mu$ L の 1X Permeabilization Buffer で 2 回洗浄した後に細胞は MACS Buffer に再懸濁されて、フローサイトメトリー分析を行った。

## 7 サイトカインの Bioplex 分析

Bioplex アッセイは以下の方法で行った。

抗体結合ビーズを 96 ウェルプレートのウェルに入れ、50 $\mu$ L の血清検体および標準物質と混合した。その後、プレートを 850 rpm で 30 分間、室温で振とうした後にプレートを 3 回洗浄し、25 $\mu$ L の検出抗体を加え、プレートを 850rpm、室温で 30 分間振とうした。その後再度 3 回洗浄し、50 $\mu$ L のストレプトアビジン-PE を各ウェルに添加し、プレートを再び 850rpm、室温で 10 分間振とうした。次に 125 $\mu$ L のアッセイバッファーを加え、プレートを 850rpm、室温で 30 分間振とうした。最後に、bio-plex analyzer (Bio-Rad, 東京)を用いてプレートを読み取った。

## 8 免疫組織染色

IL-6 アンプ活性化の検証のため、刺激後の脾臓のパラフィン切片を用いて pSTAT3 (#9138, Cell Signaling Technology, マサチューセッツ, アメリカ) と pNF $\kappa$ B(pp65) (SAB4504488, Merck) の免疫組織染色を行った。画像定量は、各マウスで 4 箇所/切片で行った。pSTAT3 または pp65 を有する核 (DAB+領域) の面積比は、10000 $\mu$ m<sup>2</sup> (ヘマトキシリン+領域) あたりの比で示した。

## 9 統計処理

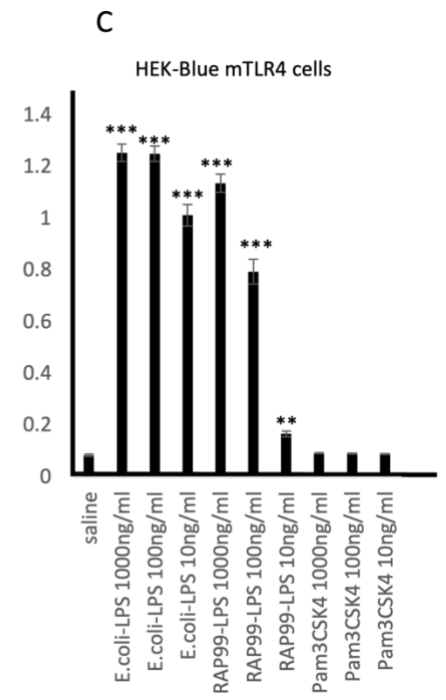
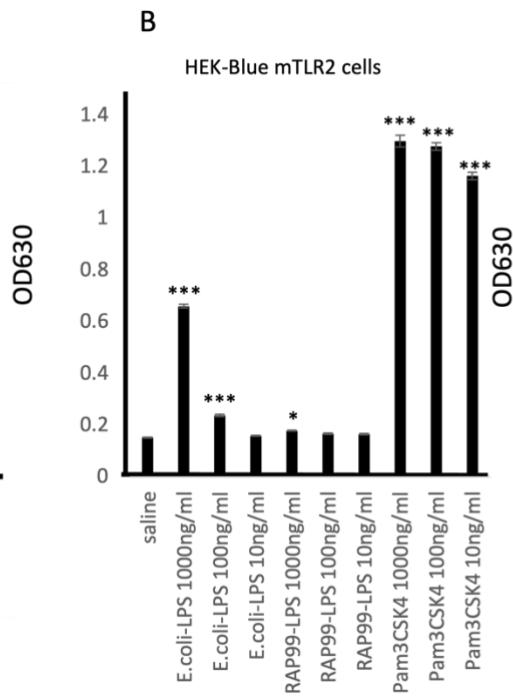
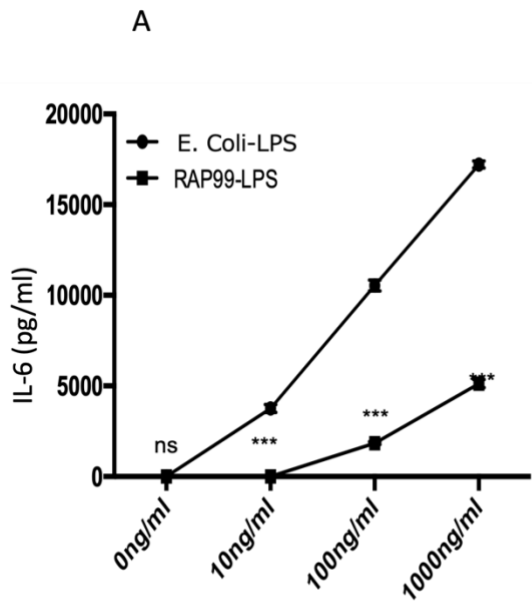
実験データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (Mean $\pm$ SEM)で示した。本研究では、2 群間の有意差検定に Student's *t* 検定を用いた。3 群間以上の有意差検定には analysis of variance (ANOVA) 検定を用いた。p 値は 0.05 未満のものを有意とし、\**p* < 0.05、\*\**p* < 0.01、および\*\*\**p* < 0.001 で示した。

## 結果

**1.RAP99-LPS は、大腸菌-LPS に対して拮抗活性を有する TLR4 リガンドである。**我々は標準的な大腸菌-LPS 精製方法と同じ用法で RAP99-LPS を精製した(Y. Kanie et al., 2019)。結果、精製物のタンパク質と核酸の濃度は Sigma E.coli-LPS と同程度（それぞれ 2.1%と 2.5%）であり、純度が高いことが示された。

次に、2つの LPS の *in vitro* での反応を調べた。その結果、RAP99-LPS は培養液中の IL-6 の濃度を用量依存的に上昇させたが、大腸菌-LPS ほど強くは上昇しなかった（図 1A）。さらに、精製 LPS に最も多く含まれる汚染 TLR 活性化因子は TLR2 リガンドであるため(L.A. Haile et al., 2017)、TLR2 を発現する細胞株において、RAP99-LPS が IL-6 濃度を上昇させるかどうかを検討した。具体的には mTLR2 または mTLR4 を発現する 2つの HEK 細胞株を用いて、RAP99-LPS 活性が TLR2 リガンドに感受性があるかどうかを調べた。TLR2 シグナル伝達は、大腸菌-LPS に対しては低濃度ではあるものの有意な増加を示したが、RAP99-LPS に対しては優位な増加を示さなかった（図 1B）。対照的に、どちらの LPS も TLR4 シグナル伝達経路を活性化したが、大腸菌-LPS の刺激の方が強かった（図 1C）。これらの結果から、RAP99-LPS は TLR4 リガンドであることが示された。

次に、RAP99-LPS が大腸菌-LPS に対して拮抗作用を有するかどうかを調べた。大腸菌-LPS を注射する前に RAP99-LPS を 1日1回5日間注射し（累計6日目に大腸菌-LPS を注射した、図では DAY1 と表記）、その後マウスを 5日間観察した。RAP99-LPS の前処置により、大腸菌-LPS による体重減少が有意に抑制され（図 2）たため、RAP99-LPS の大腸菌-LPS に対する拮抗活性が示された。



### 図 1. RAP99-LPS の invitro での TLR4 抑制効果

(A) ELISA による培養上清中の IL-6 濃度を示す。BC1 細胞は分析前に大腸菌-LPS または RAP99-LPS で 24 時間処理した。

(B) HEK-Blue™ mTLR2 細胞および (C) HEK-Blue™ mTLR4 細胞を大腸菌-LPS または RAP99-LPS で処理した 6 時間後に OD630 を分析した。

データは 3 回分の実験結果の平均値と標準誤差を示す。

\*および\*\*は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05、0.01 未満のものを示す。 \*\*

および\*\*\* は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.01、および 0.001 未満のものを示す。



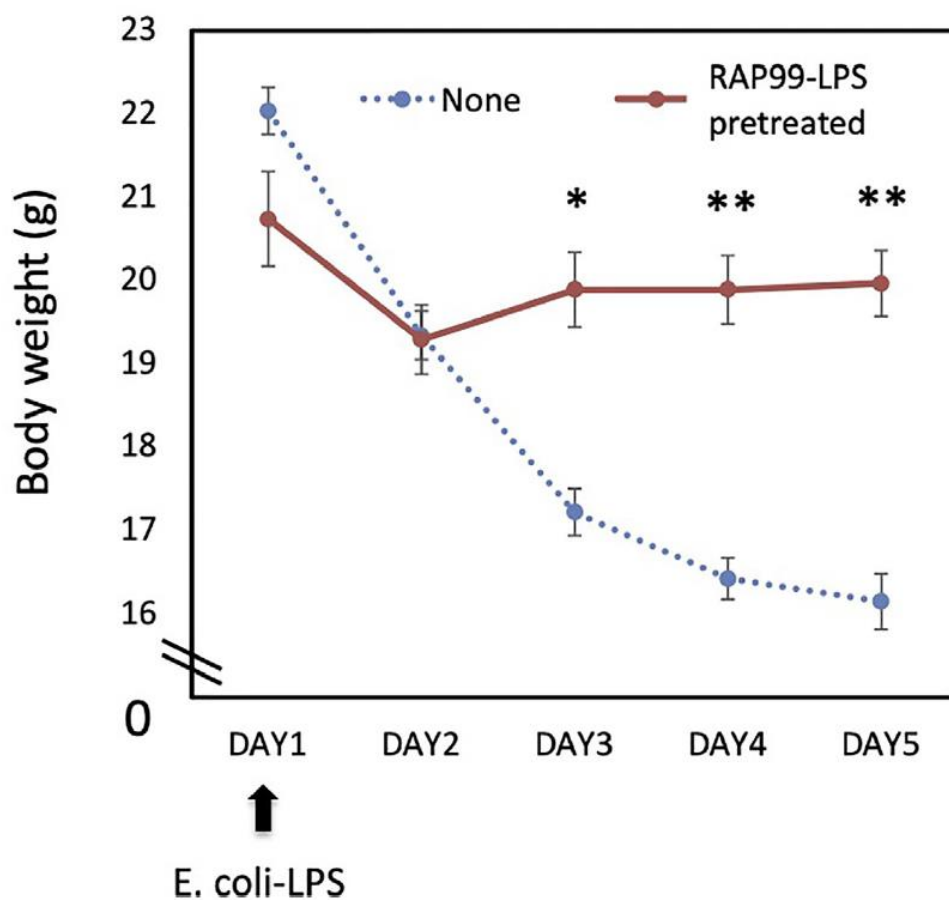


図 2. RAP99-LPS による前処置は大腸菌-LPS による体重減少を抑制する。  
 RAP99-LPS (200 $\mu$ g/日) または生理食塩水を C57BL/6 マウスに 5 日間毎日腹腔内注射した後、6 日目に大腸菌-LPS (200 $\mu$ g) を注射して体重を調査した。  
 データは 5 匹分の実験結果の平均値と標準誤差を示す。  
 \*および\*\*は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05、0.01 未満のものを示す。\*\*  
 および\*\*\* は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.01、および 0.001 未満のものを示す。

## 2. RAP99-LPS は免疫細胞の活性化を誘導する TLR4 アゴニストである。

in vitro での結果に続き、我々は RAP99-LPS が TLR4 アゴニストとして in vivo で免疫刺激活性を持つかどうかを調べた。マウスに RAP99-LPS と大腸菌-LPS を腹腔内投与し、体重と脾臓の免疫細胞の活性化状態を調べた。それぞれの LPS の投与量は先行研究(G. Srinivasan et al., 2012)に従い、200 $\mu$ g とした。

その結果、RAP99-LPS 注射は一過性の体重減少を誘発したが、その後は元に戻った (図 3A)。大腸菌-LPS 注射による体重減少はより大きかったが (図 3A)、脾臓の脾臓細胞総数は、大腸菌-LPS 注射よりも RAP99-LPS 注射後の方が多かった (図 3B)。

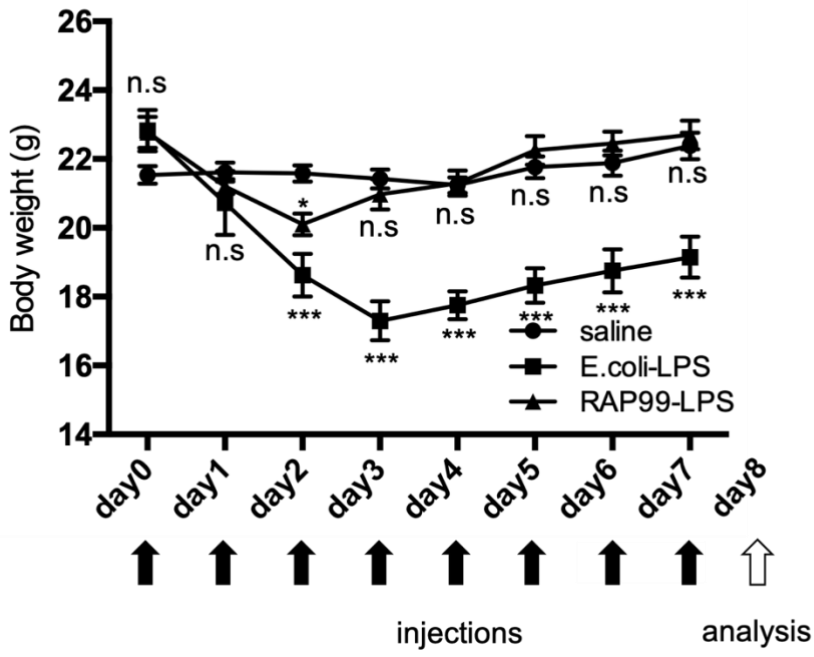
RAP99-LPS 注射は、大腸菌-LPS 注射よりも、DC (CD11c+)、単球/マクロファージ (Ly6G/C-CD11b+)、好中球 (Ly6G/C+CD11b+)、B 細胞 (CD19+)、および NK 細胞 (NK1.1+) を増加させた。CD4+T 細胞 (CD44<sup>lo</sup>CD4+および CD44<sup>hi</sup>CD4+)、CD8+T 細胞 (CD44<sup>lo</sup>CD8+および CD44<sup>hi</sup>CD8+)、Treg 細胞 (Foxp3+CD4+) および Ter-119+細胞の数も、RAP99-LPS を注射した脾臓でより増加した。

また、我々は RAP99-LPS および大腸菌 LPS 投与後のサイトカインおよびケモカインの発現についても調べた。その結果、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-17A などの NF $\kappa$ B 刺激因子、IFN $\gamma$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、GM-CSF などの STAT 刺激因子、MIP1a、MIP1b、MCP1、KC、RANTES などのケモカインはいずれも処理後に増加したが、RAP99-LPS 処理後の IL-6、IL-17A、MIP1a、MIP1b のレベルは大腸菌-LPS 処理後よりも低かった (図 4)。

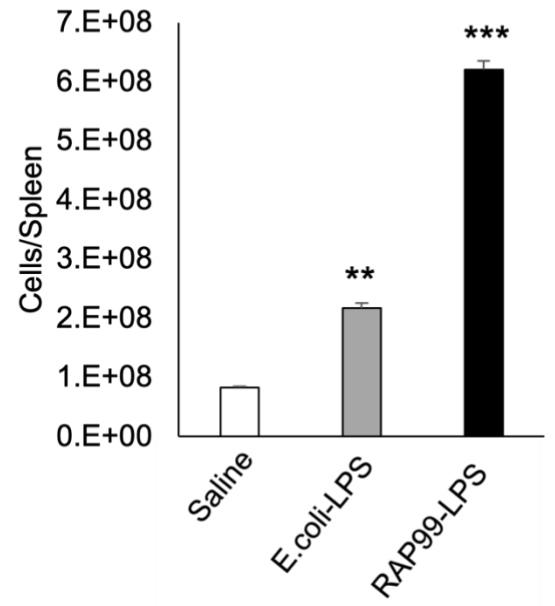
さらに、LPS は TLR4 を介して効く物質であるため、次に RAP99-LPS による体重減少および脾腫が 実際に TLR4 に依存しているかどうかを調べた。

これらの実験には C3H/HeJ マウスを用いた。C3H/HeJ マウスはドミナントネガティブ変異により TLR4 のシグナル伝達を持たないからである。C3H/HeJ マウスへの RAP99-LPS 投与は、対照の C3H/HeN マウスとは異なり、ごくわずかな一過性の脾腫を誘発しただけであった (図 5A および 5B)。また、RAP99-LPS を 6 回投与しても、C3H/HeJ マウスでは IL-6 がほとんど増加しなかった (図 5C)。このように、TLR4 刺激物質である RAP99-LPS による処置は、TLR4 を介して免疫活性化を誘導することがわかった。

A



B



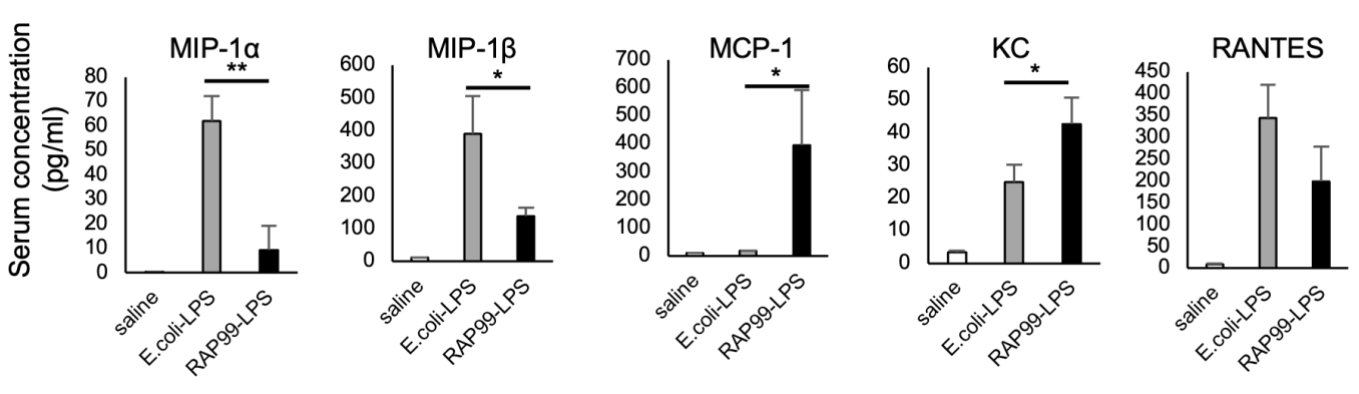
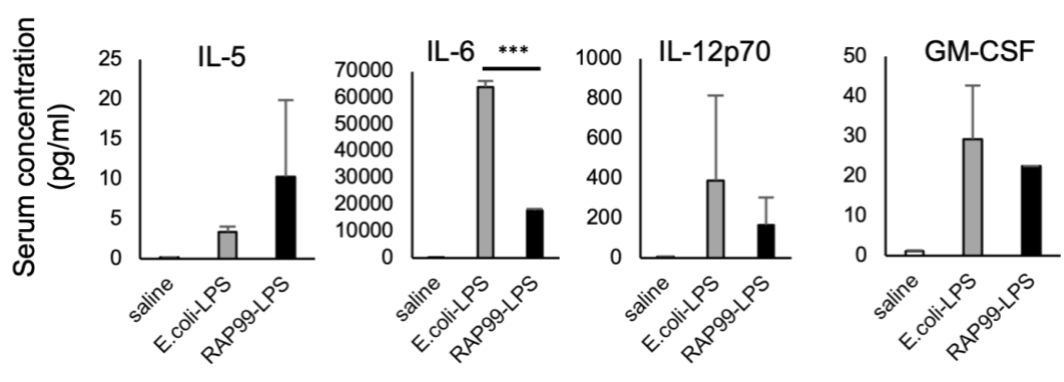
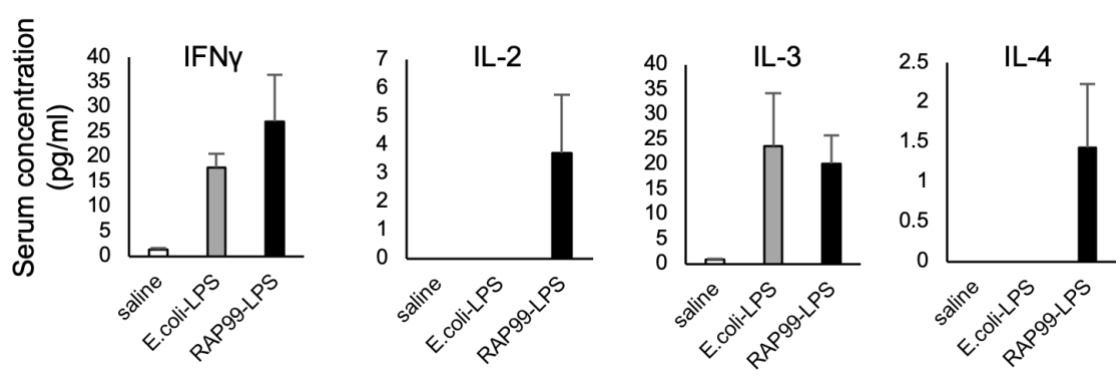
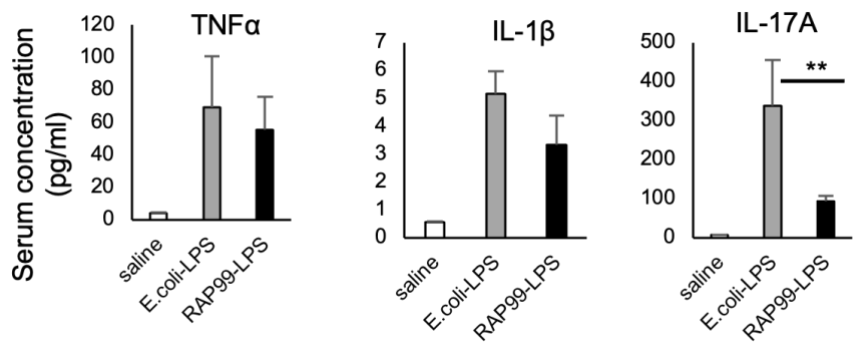
### 図 3. RAP99-LPS 処理による免疫活性化の誘導

大腸菌-LPS (200 $\mu$ g/日)、RAP99-LPS (200 $\mu$ g/日)、または生理食塩水を C57BL/6 マウスに 8 日間腹腔内投与し、(A) 体重および (B) 脾臓細胞数を観察した。

データは生理食塩水は 4 匹、LPS は 5 匹分の実験結果の平均値と標準誤差を示す。

\*および\*\*は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05、0.01 未満のものを示す。 \*\*

および\*\*\* は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.01、および 0.001 未満のものを示す。



#### 図 4. RAP99-LPS による血清中サイトカイン、ケモカインの上昇

大腸菌-LPS (200 $\mu$ g/日)、RAP99-LPS (200 $\mu$ g/日)、または生理食塩水を C57BL/6 マウスに 8 日間腹腔内投与し、血清中の IL-6、サイトカインおよびケモカイン (pg/ml) の量を分析した。データは生理食塩水は 4 匹、LPS は 5 匹分の実験結果の平均値と標準誤差を示す。

\*および\*\*は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05、0.01 未満のものを示す。\*\*および\*\*\* は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.01、および 0.001 未満のものを示す。

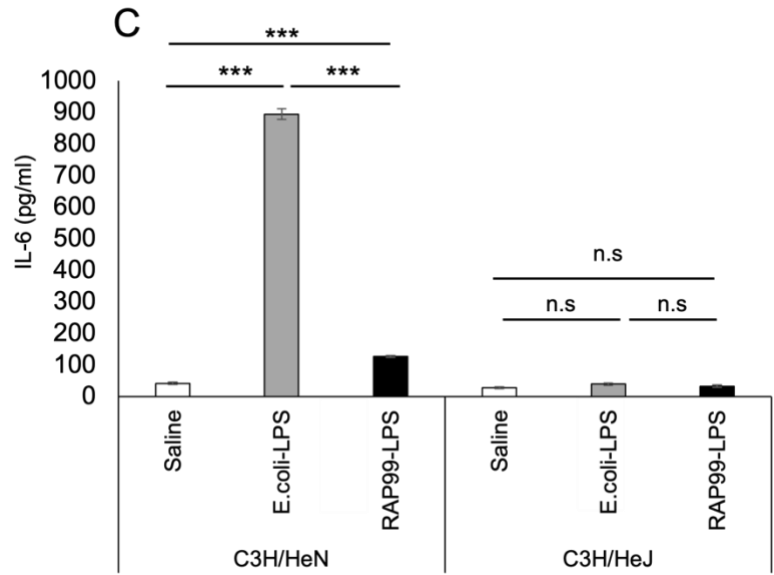
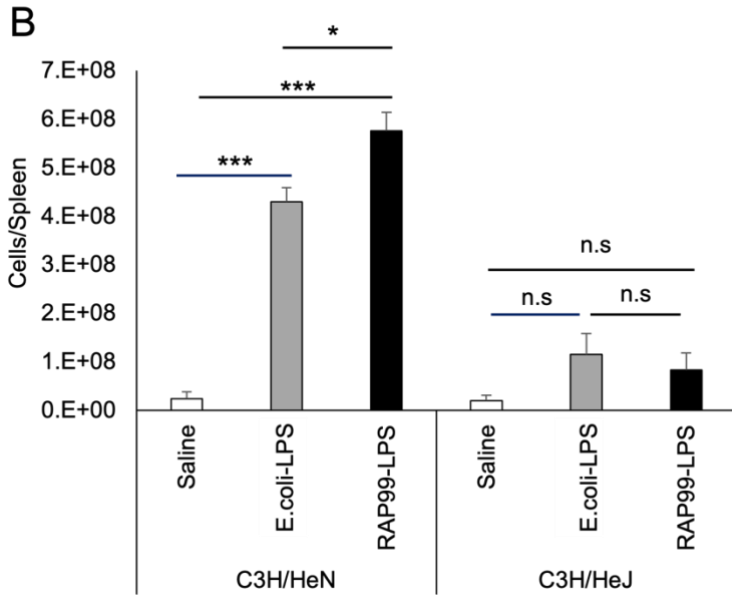
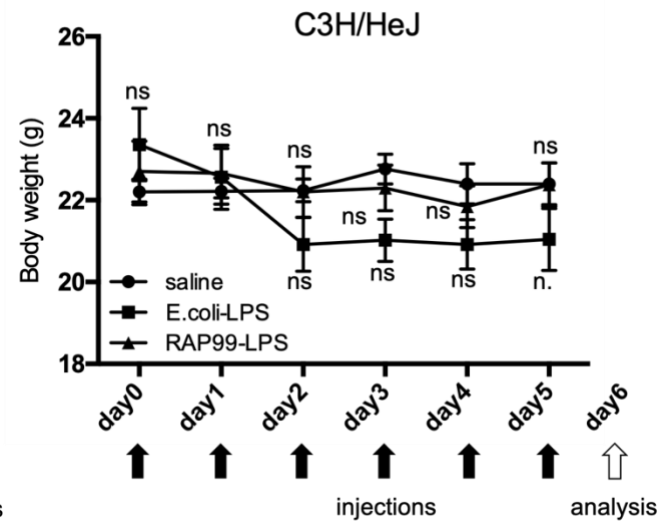
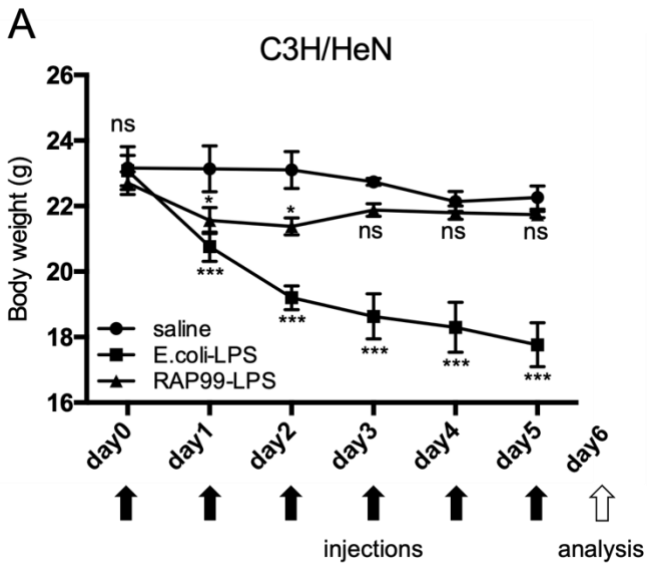


図5. TLR4 は *in vivo* での RAP99-LPS を介した免疫活性化に参与している。  
大腸菌-LPS (50mg/日)、RAP99-LPS (50mg/日)、または生理食塩水を C3HHe/N マウスおよび C3HHe/J マウスに 9 日間腹腔内注射し、(A) 体重、(B) 脾臓細胞数、および (C) IL-6 血清レベルを調べた。図 (A) において、大腸菌 LPS および RAP99-LPS を注射したマウスは生理食塩水を注射したマウスと比較して p 値を算出した。

データは生理食塩水は 4 匹、LPS は 5 匹分の実験結果の平均値と標準誤差を示す。

\*および\*\*は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05、0.01 未満のものを示す。 \*\*

および\*\*\* は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.01、および 0.001 未満のものを示す。



### 3.マウスへの RAP99-LPS 投与は B16F1 細胞の肺転移を抑制した

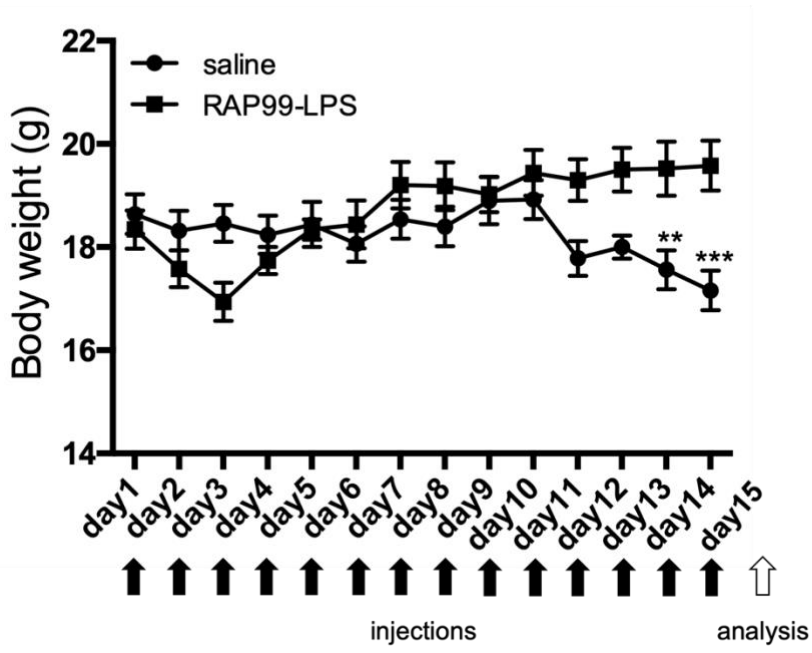
次に、我々は *in vivo* における RAP99-LPS の有益な効果を調べることにした。

サイトカイン、マクロファージ、NK 細胞、および gdT 細胞は B16F1 細胞における免疫応答に関与していることから (Y. Carmi et al., 2011; M. Cheng et al., 2014; I.J. Fidler., 1974; S. Kim et al., 2000)、上記で示された RAP99-LPS による免疫活性化が B16F1 細胞の肺転移を抑制するかどうかを調べた。

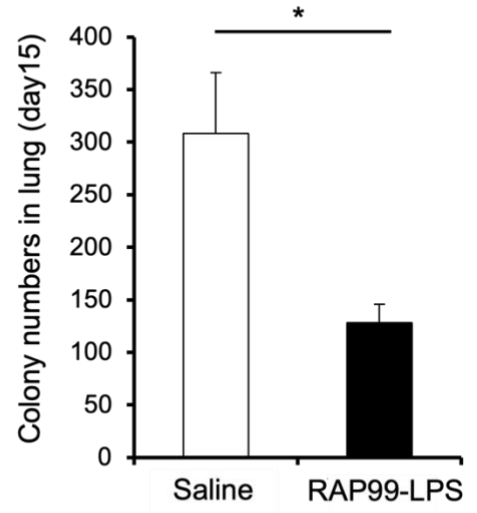
まず、B16F1 細胞をマウスに静脈注射で投与し、その後 RAP99-LPS もしくは生理食塩水を 14 日間静脈注射で投与した。

その結果、RAP99-LPS 投与は、B16F1 細胞の体重減少と肺転移を有意に抑制した (図 6)。さらに、RAP99-LPS 処置は B16F1 細胞を有するマウスにおいても脾臓重量を有意に増加させた (未発表)。したがって、RAP99-LPS は TLR4 を介して *in vivo* での抗腫瘍反応を増強することが示された。

A



B



**図 6. RAP99-LPS の投与は B16F1 細胞の体重減少および肺転移を抑制した。**

1×10<sup>6</sup>個の B16F1 細胞を C57BL/6 マウスに静脈内注射で投与後、RAP99-LPS (200mg/日) もしくは生理食塩水を 14 日間静脈内投与し、(A) 体重の経過、および (B) 15 日目に sacrifice させた後の肺の B16F1 細胞コロニー数を示す。

データは各群 4 匹分の実験結果の平均値と標準誤差を示す。

\*および\*\*は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05、0.01 未満のものを示す。\*\*および\*\*\* は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.01、および 0.001 未満のものを示す。

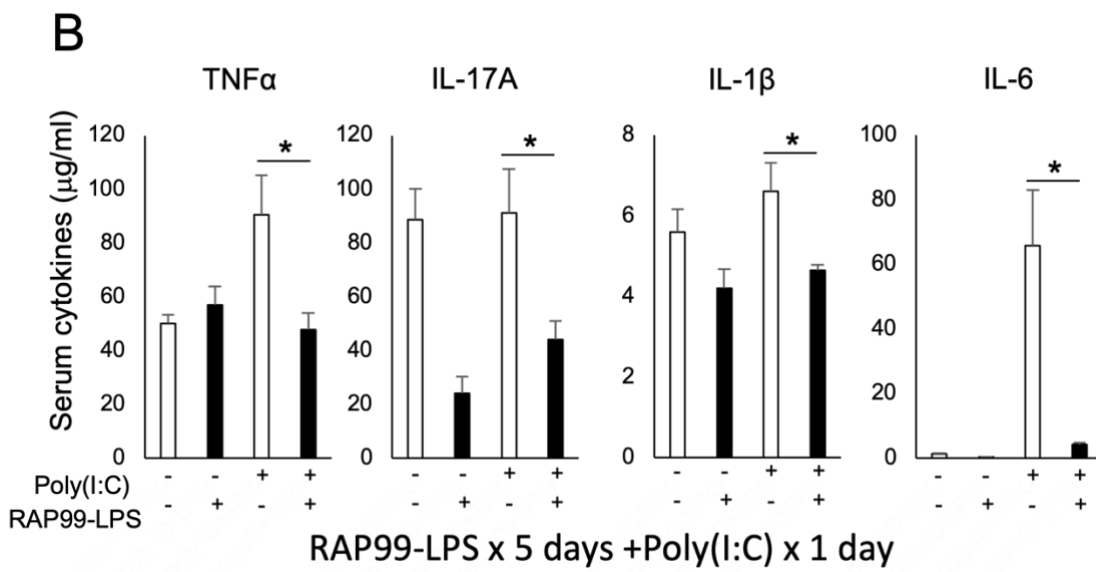
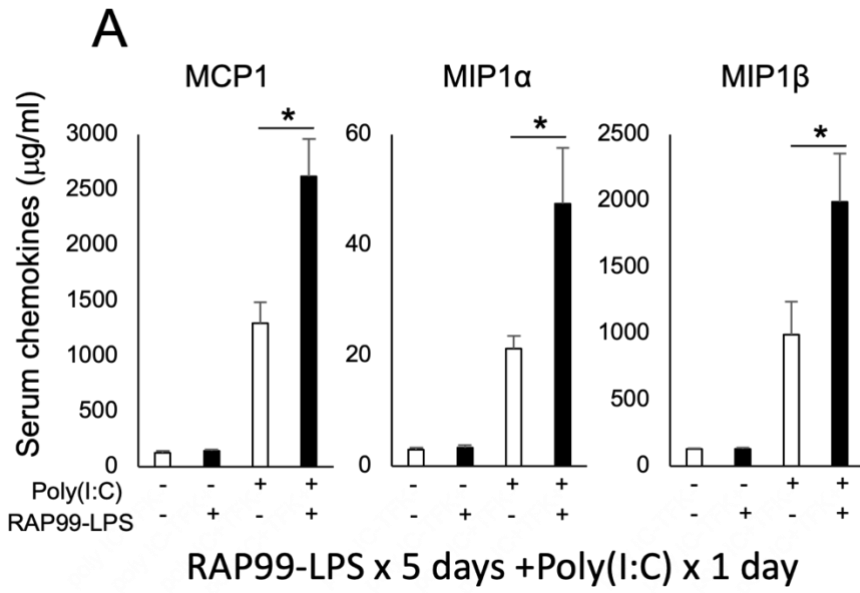
**4. ウイルス感染前の RAP99-LPS の投与は TLR3 を介するケモカインの発現を増強したが、NF- $\kappa$ B および STAT3 の刺激因子の発現は抑制した。**

我々はこれまでの RAP99-LPS による免疫系の増強は SARS-CoV2 のような RNA ウイルスに対する抗ウイルス応答も増強するのではないかという仮説を立て、実際に RAP99-LPS による前処理が人工ウイルスとして知られる Poly(I:C) に対する免疫応答を増強するかどうかを調べた。

RAP99-LPS をマウスに投与すると、MCP1、MIP1a、MIP1b を含むいくつかのケモカインの発現を有意に増強し、一方、TNF $\alpha$ 、IL-1b、IL-17A、IL-6 のような NF- $\kappa$ B 刺激因子と STAT3 刺激因子の発現を抑制した (図 7A、B)。NF- $\kappa$ B と STAT3 は当教室でこれまで研究している IL-6 アンプと深く関連しているということが知られている (M. Murakami et al., 2013)。IL-6 アンプとは、STAT3 と NF- $\kappa$ B 経路の同時活性化により、非免疫細胞において NF- $\kappa$ B の活性化を増強する免疫反応である。しかしながら、この反応が増強しすぎるとサイトカインストームが体内で起こってしまい、重篤な症状を引き起こすことが知られている。

RAP99-LPS を投与した脾臓の免疫組織化学的解析から、RAP99-LPS および/またはポリ(I:C)で刺激した後の STAT3 と NF- $\kappa$ B のリン酸化は、NF- $\kappa$ B 刺激因子および STAT3 刺激因子の発現と相関していることが分かった(図 7C-E)。

これらの結果から、RAP99-LPS を投与するによって TLR3 介在ケモカインを増強することにより effector 細胞の局所蓄積を増強し、さらに NF- $\kappa$ B 刺激因子および STAT3 刺激因子のレベルを低下させることにより、その後の RNA ウイルス感染後のサイトカインストーム誘導を抑制する可能性を示唆している。



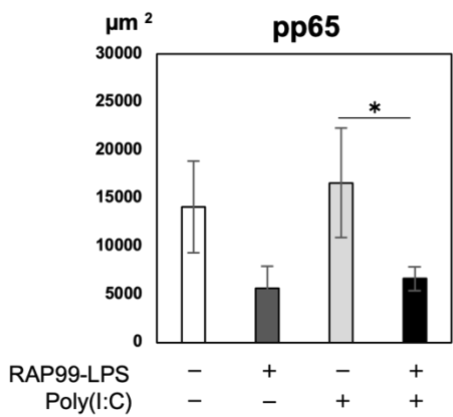
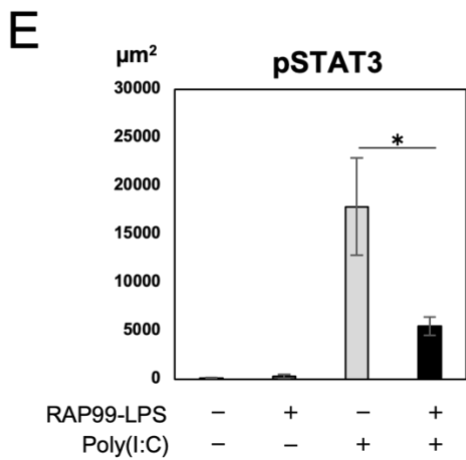
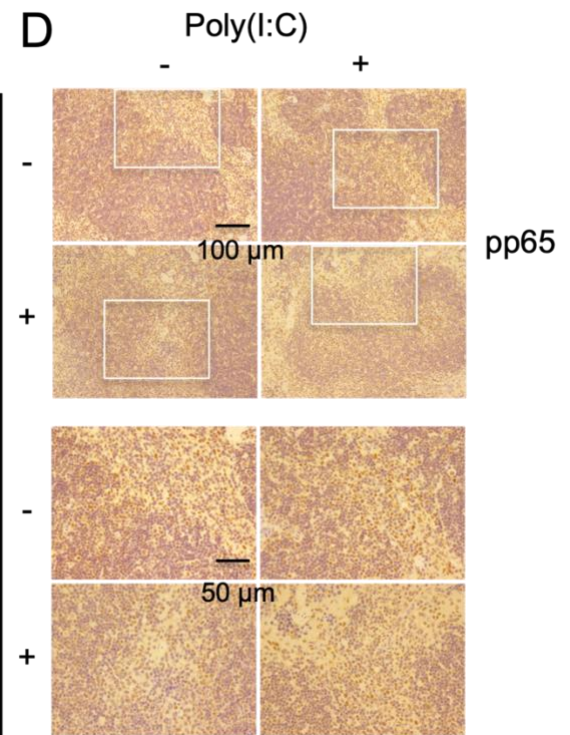
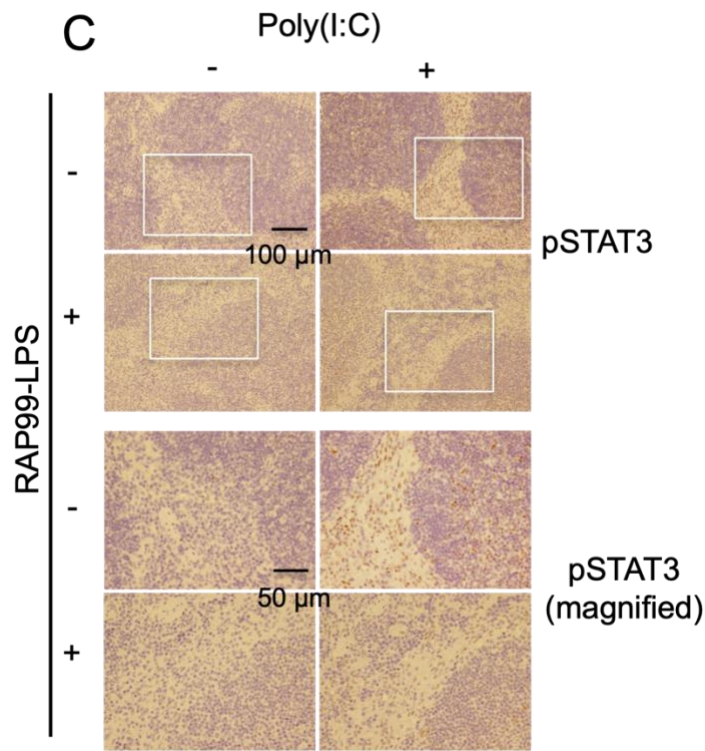


図 7. RAP99-LPS に投与による人工ウイルス投与前の処置はケモカインの発現を増強し、TLR3 リガンド注射後の NF- $\kappa$ B および STAT3 刺激サイトカインの発現を抑制した。

RAP99-LPS (200 $\mu$ g/日) または生理食塩水を C57BL/6 マウスに 5 日間毎日腹腔内投与し、その後 6 日目に poly(I:C) (200 $\mu$ g) を投与した後、血清ケモカイン(A)およびサイトカイン(B)を poly(I:C)投与 6 時間後に分析した。

脾臓の免疫組織化学は抗リン酸化-STAT3 抗体 (C) および抗リン酸化 NF- $\kappa$ B 抗体 (D) を用いて行った。

(E) (C) および (D) の定量データ。pStat3 または pp65 を有する核の面積比 (DAB +面積) を 10,000mm<sup>2</sup> あたり (ヘマトキシリン+面積) で示した。

データは全て各群 4 匹分の実験結果の平均値と標準誤差を示す。

\*および\*\*は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05、0.01 未満のものを示す。 \*\*

および\*\*\* は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.01、および 0.001 未満のものを示す。

## 考察

我々は、他の *Rhodobacter* LPS とは異なり、*Rhodobacter azotoformans* BP0899 の LPS である RAP99-LPS が TLR4 アゴニストであり、in vivo および in vitro において免疫細胞を活性化し、ケモカインおよびサイトカインを分泌することを明らかにした。

RAP99-LPS は、(i) 大腸菌-LPS による細胞内毒素ショックで誘発される体重減少の抑制、(ii) B16F1 細胞の肺転移の抑制、(iii) TLR3 を介したケモカインの誘導、サイトカインストームに関与する NF- $\kappa$ B 刺激因子および STAT3 刺激因子の抑制など、in vivo で有益な効果を示した。*Rhodobacter azotoformans* の抽出物は、免疫応答を調節して疾病を抑制するために、日本ではヒトや動物の健康補助食品として使用されていることから、今回の結果はこのサプリメントの in vivo での効果を証明するものであると考えられる。

しかし、この研究で使用された用量は、ヒトや動物が使用する市販のサプリメントの用量よりもはるかに高いことに注意すべきである。

上記の結果に加え、in vitro において我々は RAP99-LPS が TLR4 シグナル伝達経路を刺激するが、TLR2 シグナル伝達経路は刺激しないことを示した。

また、RAP99-LPS は TLR4 を介したシグナル伝達を持たない C3H/HeJ マウスでは、RAP99-LPS を介した体重減少と脾腫が有意に抑制されたが、コントロールの C3H/HeN マウスでは抑制されなかったことから、大腸菌 LPS と同様に TLR4 を介して免疫細胞を活性化しているということもわかった。

実際、RAP99-LPS を in vivo で処理すると、DC、マクロファージ、好中球、NK 細胞、gdT 細胞、B 細胞、T 細胞など、自然免疫系および適応免疫系のさまざまな免疫細胞が活性化された。理研免疫細胞リファレンスデータベース

(<http://refdic.rcai.riken.jp/welcome.cgi>) によると、TLR4 は主に上皮細胞、線維芽細胞、間質細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、肥満細胞で発現しているが、T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞では発現が低い。したがって、我々は RAP99-LPS は CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、Treg 細胞、gdT 細胞、NK 細胞などの免疫細胞に直接的およびサイトカインを介する間接的な影響を及ぼしているのではないかという仮説を立てた。

この仮説に関連して、大腸菌 LPS 処理と比較して RAP99-LPS 処理後は MCP1 や KC などのケモカイン濃度が高いこともわかったことから、大腸菌-LPS と RAP99-LPS はどちらも TLR4 リガンドであるにもかかわらず、RAP99-LPS と大腸菌-LPS 処理によって免疫細胞の活性化が異なることを強く示唆している。さらに、*E. coli*-LPS は



RAP99-LPS と比較して、*in vitro* でより多くの TLR4 シグナルを伝達したことから (図 1C)、TLR4 アゴニストとしての活性の違いが示唆された。

先述のように *Rhodobacter azotoformans* の抽出物は、健康補助食品として使用されることがあり、本研究では、マウスモデルにおいて RAP99-LPS の 3 つの健康効果を示した。マウスに大腸菌-LPS を注射するとエンドトキシンショックを引き起こし、サイトカインストームや体重減少を引き起こし、死に至ることもある(A. Haziot et al., 1996)。しかし、*Rhodobacter* から分離された他の LPS(W.J. Christ et al., 1995; U. Seydel et al., 2000; M. Mullarkey et al., 2003)と同様に、RAP99-LPS でを事前に投与したマウスは、大腸菌-LPS を投与しても体重減少を示さなかった。

この発見は、RAP99-LPS の補充が、大腸菌 O157 を含む TLR4 を活性化する細菌によって誘発される食中毒を予防できることを示唆している。RAP99-LPS と大腸菌-LPS はともに TLR4 に結合することから、RAP99-LPS を介した体重減少抑制の分子メカニズムには TLR4-受容体の競合が関与していることが示された(P. Rallabhandi, et al., 2012)。大腸菌-LPS は RAP99-LPS と比較してより多くの TLR4 シグナルを伝達したことから(F. Nomura et al., 2000)、TLR3 リガンドと同様に、大腸菌-LPS に対する RAP99-LPS の予防効果には、TLR4-受容体の競合だけでなく、LPS 耐性やその他の要因も関与していると考えられる。

腫瘍細胞の転移に対する抵抗性はサイトカイン、マクロファージ、NK 細胞、および gdT 細胞に依存するため(Y. Carmi et al., 2011; M. Cheng et al., 2014; I.J. Fidler et al., 1974; S. Kim et al., 2000)、B16F1 肺転移モデルを用いて RAP99-LPS の抗腫瘍活性を調べたところ、RAP99-LPS 処置が転移を有意に抑制することが分かったが、この抑制効果が TLR4 によって媒介されるかどうかは示さなかった。

さらに、RAP99-LPS を投与すると、MCP1、MIP1a、MIP1b などのケモカインの発現が増加したが、TLR3 リガンドである Poly(I:C)を注射すると、IL-1b、TNF $\alpha$ 、IL-17A、IL-6 などの NF- $\kappa$ B および STAT3 刺激因子の発現が抑制された。Poly(I:C)注射は *in vivo* での RNA ウイルス感染を模倣することから、これらの結果は、RAP99-LPS を含む *Rhodobacter azotoformans* 抽出物を摂取している人が、RNA ウイルスに対する免疫系を活性化している可能性を示唆した。

結論として、我々は、*Rhodobacter azotoformans* の抽出物に含まれる成分である RAP99-LPS が、TLR4 アゴニストとして免疫細胞を活性化することを証明した。これは、ロドバクターの LPS が TLR4 アゴニストであるという初めての報告である。

この研究により RAP99-LPS を事前に投与すると、肺の B16F1 腫瘍細胞の転移が抑制され、Poly(I:C)を介するケモカインの発現が増強されて RNA ウイルスに対する抵抗性を得られることが示唆された。これらの結果は、日本で健康補助食品として使用さ

れている *Rhodobacter azotoformans* の抽出物が、腫瘍の肺転移や SARS-CoV2 を含むウイルス感染に対して有益な効果を示す可能性を示唆している。

## 総括および結論

- RAP99-LPS は TLR4 のアゴニストである。
- RAP99-LPS は大腸菌-LPS による細胞内毒素ショックで誘発される体重減少を抑制する。
- RAP99-LPS は B16F1 細胞の肺転移を抑制する。
- RAP99-LPS は TLR3 を介したケモカインを誘導し、サイトカインストームに関する NF- $\kappa$ B 刺激因子および STAT3 刺激因子を抑制する。

本研究では、健康食品として用いられているがその詳細な機能が明らかとなっていないなかった、*Rhodobacter azotoformans* BP0899 の LPS である RAP99-LPS の効能を明らかにした。今回の結果はこのサプリメントの *in vivo* での効果を証明するものである。

具体的には RAP99-LPS を投与するとその後の大腸菌-LPS 投与による体重減少を抑制したことから、RAP99-LPS は *Rhodobacter* から分離された他の LPS と同様に大腸菌-LPS に対するアンタゴニストであることが示された。

しかし、RAP99-LPS を投与すると、C57BL/6 マウスでは脾腫と免疫細胞数の増加が見られたが、C3H/HeJ マウスでは見られなかったことから、RAP99-LPS は TLR4 を介して免疫細胞を刺激することが証明された。

同様に、RAP99-LPS は B16F1 腫瘍細胞の肺転移を抑制し、TLR3 を介するケモカインの発現を増強した。

これらの結果は、RAP99-LPS が TLR4 アゴニストであり、免疫系の活性化状態を高め、*in vivo* での抗ウイルスおよび抗腫瘍活性を促進することを示している。

我々が RAP99-LPS の研究を行ったことにより、今後、RAP99-LPS が健康食品として出なく、その効能を活かして医薬品などに発展していくことが考えられる。

この研究の課題点としては、他の *Rhodobacter* 属の菌から分離された LPS がどのような効能を持つのかについて実際に実験して評価できていないことがある。これらについては今後他の *Rhodobacter* 属の菌の LPS を入手、または作成し、実際に *in vivo*, *in vitro* で実験を行っていきたい。

## 謝辞

第一章を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学 村上正晃教授に深く感謝いたします。また、直接のご指導を頂きました QST 量子免疫グループ主任研究員・田中勇希先生、北海道大学遺伝子病制御研究所 分子神経免疫学特任講師・田中宏樹先生、特任講師・蔣菁菁先生、生理学研究所・分子神経免疫研究部門特任准教授・長谷部理絵先生に心から感謝いたします。さらに、各種研究材料を提供していただきましたティーエフケイ株式会社医療情報技術室長・日高康博様に深く感謝いたします。

最後に本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました、ティーエフケイ株式会社および北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野のすべてのみなさまに、心より御礼申し上げます。

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

K. Hoshino, O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda., et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162 (1999) 3749-52.

R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388 (1997) 394-7.

B. Beutler, Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430 (2004) 257-63.

K. Hoebe, X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S.O. Kim., et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424 (2003) 743-8.

M. Matsumoto, and T. Seya, TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev* 60 (2008) 805-12.

G.C. Sen, and S.N. Sarkar, Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev* 16 (2005) 1-14.

X. Ding, S. Jin, Y. Tong, X. Jiang, Z. Chen, S. Mei., et al. TLR4 signaling induces TLR3 up-regulation in alveolar macrophages during acute lung injury. *Sci Rep* 7 (2017) 34278.

T. Kawai, and S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11 (2010) 373-84.

N.J. Gay, M.F. Symmons, M. Gangloff, and C.E. Bryant, Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 14 (2014) 546-58.

W.J. Christ, O. Asano, A.L. Robidoux, M. Perez, Y. Wang, G.R. Dubuc., et al. E5531, a pure endotoxin antagonist of high potency. *Science* 268 (1995) 80-3.

U. Seydel, M. Oikawa, K. Fukase, S. Kusumoto, and K. Brandenburg, Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur J Biochem* 267 (2000) 3032-9.

M. Mullarkey, J.R. Rose, J. Bristol, T. Kawata, A. Kimura, S. Kobayashi., et al. Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 304 (2003) 1093-102.

Y. Kanie, Y. Yamaguchi, A. Hayashi, J. Uzawa, M. Hatakeyama, Y. Hidaka., et al. Structural analysis of a novel lipooligosaccharide (LOS) from *Rhodobacter azotoformans*. *Carbohydr Res* 473 (2019) 104-114.

L.A. Haile, S.K. Polumuri, R. Rao, L. Kelley-Baker, D. Kryndushkin, R. Rajaiiah., et al. Cell based assay identifies TLR2 and TLR4 stimulating impurities in Interferon beta. *Sci Rep* 7 (2017) 10490.

G. Srinivasan, J.D. Aitken, B. Zhang, F.A. Carvalho, B. Chassaing, R. Shashidharamurthy., et al. Lipocalin 2 deficiency dysregulates iron homeostasis and exacerbates endotoxin-induced sepsis. *J Immunol* 189 (2012) 1911-9.

Y. Carmi, G. Rinott, S. Dotan, M. Elkabets, P. Rider, E. Voronov., et al. Microenvironment-derived IL-1 and IL-17 interact in the control of lung metastasis. *J Immunol* 186 (2011) 3462-71.

M. Cheng, L. Qian, G. Shen, G. Bian, T. Xu, W. Xu., et al. Microbiota modulate tumoral immune surveillance in lung through a  $\gamma\delta$ T17 immune cell-dependent mechanism. *Cancer Res* 74 (2014) 4030-41.

I.J. Fidler, Inhibition of pulmonary metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages. *Cancer Res* 34 (1974) 1074-8.

S. Kim, K. Iizuka, H.L. Aguila, I.L. Weissman, and W.M. Yokoyama, In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 2731-6.

M. Murakami, M. Harada, D. Kamimura, H. Ogura, Y. Okuyama, N. Kumai., et al. Disease-Association Analysis of an Inflammation-Related Feedback Loop. *Cell Reports* 3 (2013) 946-959.

A. Haziot, E. Ferrero, F. Kontgen, N. Hijiya, S. Yamamoto, J. Silver., et al. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4 (1996) 407-14.

P. Rallabhandi, R.L. Phillips, M.S. Boukhvalova, L.M. Pletneva, K.A. Shirey, T.L. Gioannini., et al. Respiratory syncytial virus fusion protein-induced toll-like receptor 4 (TLR4) signaling is inhibited by the TLR4 antagonists *Rhodobacter sphaeroides* lipopolysaccharide and eritoran (E5564) and requires direct interaction with MD-2. *mBio* 3 (2012).

F. Nomura, S. Akashi, Y. Sakao, S. Sato, T. Kawai, M. Matsumoto., et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 164 (2000) 3476-9.



## 第二章

### AI ナノポアを用いた新型コロナウイルス変異型の識別

#### 緒言

2019年12月、感染性呼吸器疾患患者からヒトからヒトへの感染能力を持つ新規コロナウイルスが発見された。その結果、現在 COVID-19と呼ばれる病気が世界中に急速に拡大し、パンデミックを引き起こしている。COVID-19は病原性SARS-コロナウイルス2 (SARS-CoV-2) によって誘導される。COVID-19の主な表現型は急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) であり、重症例ではSARS-CoVやMERS-CoV (de Wit et al., 2016; Cevik, M et al., 2021; Huang, C et al., 2020; Wu, D. et al., 2020; Hu, B et al., 2021; Cevik, M et al., 2020)を含む最近出現した他のコロナウイルスによる疾患と同様にサイトカインストームを示す。

SARS-CoV-2を含む多くのウイルスは常に変異している(Harvey, W. et al., 2021; van Dorp, L et al., 2020)。ほとんどの変異はウイルスの性質に影響を与えないが、中には高い感染率や重篤な症状を引き起こし、治療や診断の効率を低下させるものもある

(Zhang, L. et al 2020)。SARS-CoV-2の変異型は、その出現が世界の公衆衛生に対する潜在的脅威となることから、Variants of Interest (VOI) と Variants of Concern

(VOC) に分類されている(Khateeb, J. et al., 2021; Tao, K et al., 2021)。VOCには少なくとも、 $\alpha$ 型、 $\beta$ 型、 $\gamma$ 型、 $\delta$ 型、 $\omicron$ 型の5種類があり(Duong, D.,2021; He, X et al.,2021)、したがって、感染患者の特定とともに変異型のタイプも特定する必要がある。

現在、SARS-CoV-2亜型の検出には、次世代シーケンシングとRT-PCRが標準となっている(Chiara, M et al., 2020; Bhojar, R et al., 2021)が、残念ながら、これらの方法は特に高い処理能力を持つわけでも、費用対効果が高いわけでもない。そこで我々はこれらの問題を克服したより良い方法を開発すべく、ナノポアに着目して研究を実施した。

まず、ナノポアとは、直径数ナノメートルから数百ナノメートルの穴を持つシリコンウェハー基板のことである (Taniguchi, M., 2015; Branton, D et al., 2008; Shi, W et al., 2017; Howorka, S et al., 2009; Rozevsky, Y et al., 2020)。厚みと直径の比が1未満の低アスペクトの固体ナノポアは、DNA、ウイルス、細菌、エクソソームを含む細胞外小胞 (EV) に関する様々な種類の情報 (体積、構造、表面電荷など) を収集するために使用されてきた(Derrington, I et al., 2010; Varongchayakul, N et al., 2018; McMullen, A et

al., 2014; Arima, A et al., 2018; Darvish, A. et al., 2019; Tsutsui, M et al., 2017; Ryuzaki, S et al., 2021)。最近、我々は、HCoV-229E、SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2の4種類のサイズが似ているコロナウイルスを正確に同定するためのAI-nanoporeプラットフォームを開発した(Taniguchi, M. et al., 2021)。このプラットフォームは、唾液検体中の武漢型SARS-CoV-2の検出において、5分以内の測定時間で感度90%、特異度96%を示すことが示された(Taniguchi, M. et al., 2021)。しかし、(i)本システムがSARS-CoV-2のどの表面タンパク質を区別できるか、(ii)本システムがSARS-CoV-2の変異体を区別できるか、(iii)本システムが臨床検体中のSARS-CoV-2の変異体を認識できるか、といった疑問が残されたままである。

そこで、この研究は我々が開発を行ったAI-nanoporeプラットフォームが、臨床サンプル中のオミクロンを含むSARS-CoV-2変異体のスパイク(S)-タンパク質の差異を主に認識し、高精度、迅速な診断結果の提示、そして高い費用対効果を達成している優れた検出デバイスであることを示す。

# 実験方法

## 1. 倫理声明

本研究におけるウイルス分離手順は、ヘルシンキ宣言2013に従い、北海道大学施設審査委員会の承認を得た。北海道大学および関連病院で募集したヒト被験者の検体を含むすべてのプロトコルは、北海道大学および各病院の施設審査委員会の審査および承認を受けた。すべてのヒト参加者は、書面によるインフォームド・コンセントを提供した。

## 2. 培養ウイルスの調製

TMPRSS2をトランスフェクトしたアフリカミドリザル腎臓VeroE6細胞 (VeroE6/TMPRSS2細胞) を、5%FBSまたは5%エクソソームフリーFBS (EFBS) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を含むDMEM (Sigma-Aldrich, Japan) 中で維持・増殖させた。Wuhan (hCoV-19/Japan/TKYE610670/2020株、GISAID:EPI\_ISL\_479681) および $\alpha$ - (hCoV-19/Japan/QK002/2020株、GISAID:EPI\_ISL\_768526) 、 $\beta$ - (hCoV-19/Japan/TY8-612/2021株、GISAID:EPI\_ISL\_1122890) 、 $\gamma$ - (hCoV-19/Japan/TY7-501/2021株、GISAID:EPI\_ISL\_8333) : EPI\_ISL\_833366) 、 $\delta$ -型 (hCoV-19/Japan/TKYTK1734/2021, GISAID: EPI\_ISL\_2378732) および $\omicron$ 型 (hCoV-19/Japan/TY38-873P0/2021, GISAID: EPI\_ISL\_7418017) のコロナウイルスをVeroE6/TMPRSS2細胞を用いて増殖させた。これらのコロナウイルスのウイルスストックをMillex-HV Syringe Filter Unit 0.45  $\mu$ m (Merck, Darmstadt, Germany)を用いてろ過した。濾液は、ナノポアおよび機械学習と組み合わせて診断に使用した。ウイルス力価は、50%組織培養感染量 (TCID<sub>50</sub>) アッセイとプラークアッセイを用いて算出した。 $\delta$ 型および $\omicron$ 型Sタンパクを発現するWuhan変異株は、reverse geneticシステム33を用いて樹立した。

## 3. 臨床検体中のSARS-CoV2亜種のPCRと塩基配列決定

Ampdirect™ 2019-nCoV検出キット (島津製作所、京都、日本) またはTrexGene™ SARS-CoV-2検出キット (東洋紡績、福井、日本) を用いてSARS-CoV-2 RNAを検出した。

具体的な方法として、Ampdirect™ 2019-nCoV検出キットを用いて、サンプル5 $\mu$ Lとサンプル処理試薬5 $\mu$ Lを混合し、90°Cで5分間加熱した後、氷上で冷却した。処理し

た混合物を、ポリメラーゼ、dNTP、プライマー、プローブを含む反応混合物15 $\mu$ Lと混合した。LightCycler® 96システム (Roche, Basel, Switzerland) を用いてワンステップRT-PCRを行った。2019-nCoV-N1-F (5'-GACCCCAAATCAGCGAAAT-3')、2019-nCoV-N1-R (5'-TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG-3')、2019-nCoV-N2-F (5'-TTACAAACATTGGCCGCAA-3') のプライマー、および2019-nCoV-N2-R (5'-GCGCGACATTCCGAAGAA-3')、ならびに2019-nCoV-N1-P (5'-ROX-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ2-3') および2019-nCoV-N2-P (5'-FAM-N2-P) のプローブを含む。P (5'-FAM-ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1-3') は、“2019-Novel Coronavirus Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes”に記載されています。室温まで冷却後、ポリメラーゼ、dNTP、プライマー、プローブを含む反応試薬40 $\mu$ Lを加えた。LightCycler® 96 systemまたはQuantStudio 5 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いてワンステップRT-PCRを行った。2019-nCoV-N1-F、2019-nCoV-N1-R、NIID-2019-nCoV-N-F2 (5'-AAATTTTGGGGACCAGGAAC-3') のプライマー、および2019-nCoV-N2-R、ならびに2019-nCoV-N1-P (5'-Cy5-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ2-3') および2019-nCoV\_N2-P (5'-ROX-ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG-BHQ2-3') のプローブは“Novel Coronavirus Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes”および“Pathogen Detection Manual 2019-nCoV ver.2.9.1”に記載されている。

#### 4. 培養ウイルスのパルス採取、測定方法

ナノポアモジュール (M-AS-300-A028-001-Pm)、イオン電流測定システム (nanoSCOUTERTM WEL1100)、波形抽出ソフトウェア (Aipore PC Software) は Aipore Corporation (日本、東京) から購入した。これらの製品はBSL3実験室のクリーンベンチに設置した。窒化シリコン上に作製したナノポアは、直径300 nm、厚さ50 nmである。これに通すための培養上清はアミコンフィルターで100倍に濃縮した。さらに得られた濃縮液をDMEMで10倍に希釈し、0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターでろ過した。具体的な測定方法としては、まず15 $\mu$ LのDMEMをナノポアモジュールのシスチャンバーとトランスチャンバーに入れた。ナノポアモジュールは、装置付属の測定専用ソケットに取り付け、測定装置に設置した。電圧-0.1 Vの印加下で、-35~-45 nAのベース電流が得られたとき、導通テストは合格とみなし、シスチャンバーからDMEMを取り除いて15 $\mu$ Lの培養ウイルス溶液をシスチャンバーに入れた。イオン電流測定は、測定装置に組み込まれた100kHzのローパスフィルターを用いて、-0.1Vで250kHzのサンプリングレートで行った。汚染を防ぐために使い捨てのナノポアモジュールを使用し、ナノポアモジュール1個の測定時間は10分であった。

イオン電流-時間波形は、Aipore PCソフトウェアとカルマンフィルターを用いて、データから自動的に抽出された。電流の上昇と下降（増加と減少）は、それぞれ連続するデータ点数が電流閾値を下回るか上回るかによって決定された。電流の下降時間は波形の開始時間、上昇時間は終了時間、差は継続時間と定義した。波形の開始時間、各波形の持続時間、最大電流（Ip）、電流の持続時間（td）は、Aipore-One™を用いて示した。

## 5. 臨床検体のパルス測定方法

電氣的測定は、導通試験と緩衝液を1xPBSとした以外は上記の培養ウイルスを用いた場合と同様に行った。RT-PCR陽性およびRT-PCR陰性唾液検体は、0.45μmメンブレンフィルター付き遠心チューブを用いて、室温で2分間、12000×gで遠心ろ過し、その後唾液濾液を1xPBSで2倍希釈した。上記の導通テスト合格後、シスチャンバーを15μLの希釈唾液濾液を含む別のシスチャンバーに交換した。

## 6. 培養ウイルスから得られたパルスの機械学習

抽出されたイオン電流-時間波形は、Aipore-One™ サーバーを用いて解析された。機械学習に用いた特徴は、波形の高さと波形の時間ベクトルの組み合わせである。波形の高さと時間ベクトルの分割数は様々であった。汚染イオン電流-時間波形はPUCによって除去された。機械学習に使用した分類器は、ランダムフォレストとサポートベクターマシンを実装したフリーウェアの機械学習プラットフォームであるscikit-learnである。

学習する波形を選択した後、機械学習を行った。機械学習ではアンダーサンプリング法を採用し、全バリエーションの波形数を比較のバリエーションの中で最も少ない波形数に調整した。精度の指標としてF値を採用し、10重クロスバリデーション法で計算した。機械学習が完了すると、使用した特徴量（分類子、感度、特異度、精度、再現率、真陽性率、真陰性率）がF値の高いものから順に表示され、F値をもたらず混同行列が自動的に生成された。

## 7. 臨床検体から得られたパルスの機械学習

Aipore PCソフトウェアを用いて、臨床検体から得られたイオン電流-時間波形を自動抽出した。その後オープンライブラリtsfreshを用いて、学習過程で約800の特徴量を抽出し、学習過程で高い精度を示した上位20の特徴量をテストに使用した。

次に、LightGBMを分類器として波形学習データを学習した。分類器のデフォルト設定は、ハイパーパラメータを変更せずに適用した。検体のFメジャーを最大にする陽性波形の比率を機械学習した。

本研究で使用した特徴量は、オープンソースソフトウェア "tsfresh" を用いて生成した<sup>37</sup>。使用した分類器は、オープンソースソフトウェア "scikit-learn" に実装されているものである<sup>38</sup>。

## **8. データの利用方法**

本研究で得られたウイルスおよび臨床検体の電流-時間プロファイルの測定データは、Zenodo (<https://doi.org/10.5281/zenodo.7244052>) で公開されている。

## 結果

### 1. ナノポア装置による精製SARS-CoV-2亜種の検出

AI-nanoporeプラットフォームは、ナノポアモジュール、計測システム、AIソフトウェア、AIクライアントサーバーから構成される（図1a）。直径300nmのナノポアは、シリコン基板上に蒸着された厚さ50nmのSiN膜上に作製された。

ナノポアモジュールでは、ナノポアデバイスの両面がPDMSチャンネルに接着されている。実験で得られたイオン電流-時間波形は、市販の電気測定システム

(nanoSCOUTERTM WEL1100) を用いて測定し、測定システムに接続されたPCに実装された市販のソフトウェアを用いて抽出した。抽出された波形は、サーバー上に実装された市販のAIソフトウェア (Aipore-ONETM) により機械学習され、分類された。

分析対象物がナノポアを通過すると、イオンの流れが遮断されるためイオン電流が減少する。イオン電流-時間波形には、ナノポアを通過する際の分析物の体積、構造、表面電荷に関する情報が含まれている。機械学習は、これら3つの情報を含む特徴を抽出し、波形の分類に基づいて分析物の同定を可能にする。

このナノポアモジュールを用いた計測システムを用いて、精製した武漢型、 $\alpha$ 型、 $\beta$ 型、 $\gamma$ 型、 $\delta$ 型、 $\sigma$ 型のSARS-CoV-2ウイルスのパルス波形を-0.1 Vで測定した。測定時は精製ウイルスとコントロールサンプル（培養上清）をシスチャンバーに、緩衝液DMEMをトランスチャンバーに入れた。

ほとんどの場合、イオン電流-時間波形の振幅は時間とともに減少した（図1bとc）。0.1Vを加えた場合には波形は得られなかったことから、精製ウイルスが負に帯電していることが確認された。

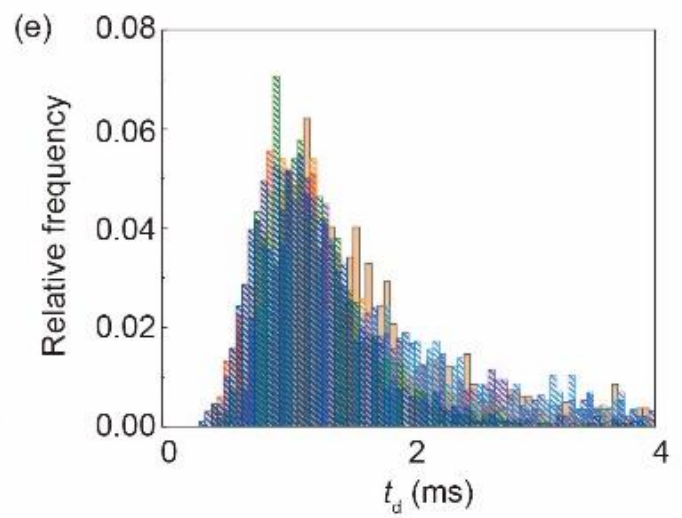
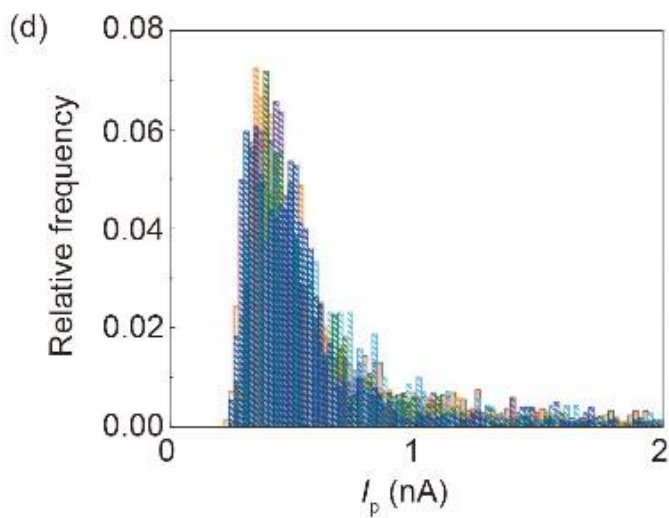
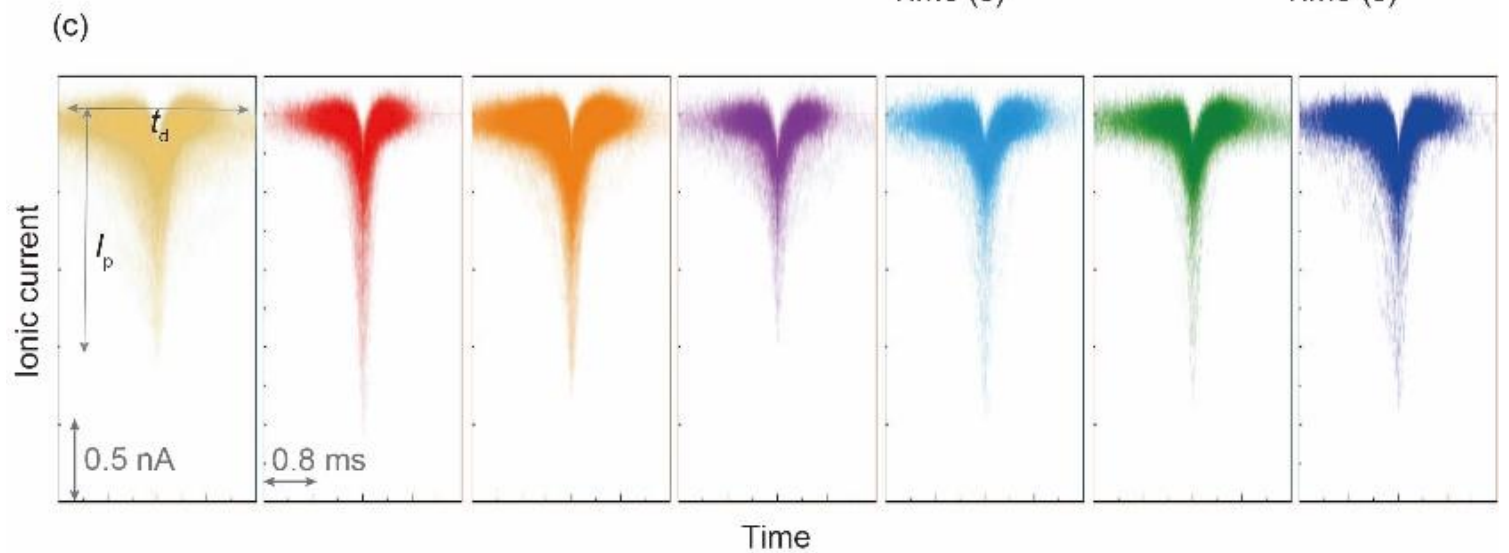
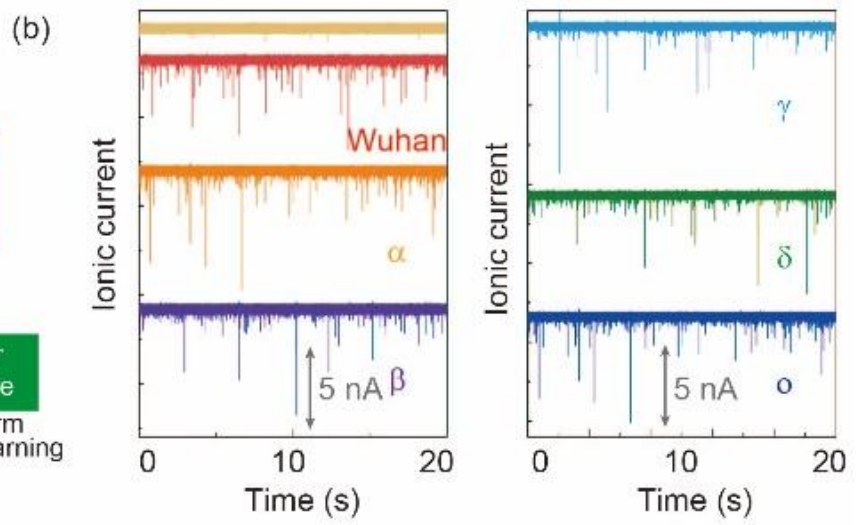
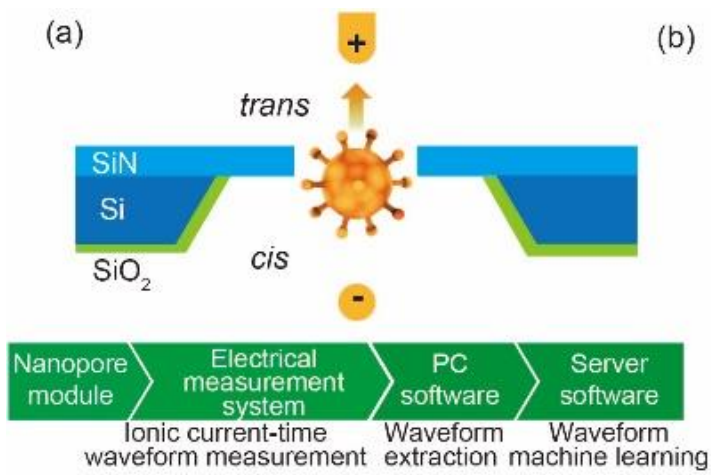
各波形の最大電流 ( $I_p$ ) と電流持続時間 ( $t_d$ ) のヒストグラムは、ほぼ重なっていた（図1dとe）。最大電流と電流持続時間の大きなばらつきは、ウイルスがナノ細孔の中心を通過しなかったことによるOff-axis効果(Smythe, W., 2003; Qin, Z et al., 2011; Berge, L et al., 1999; Ying, C et al., 2022)によるもので、これは中心軸からのずれが大きいと、イオン電流の変化も大きくなる現象である。Off-axis効果は、ウイルスがナノ細孔の中心軸から外れた方向からナノ細孔に接近した場合にも発生し、ウイルスの直径が小さいほど中心軸からのずれが大きくなり、Off-axis効果が大きくなる。

さらに分析を進めると、コントロールサンプルの最大電流はウイルスサンプルの最大電流よりも小さいことがわかった（図1b）。我々はこれの原因は、ウイルス調製のために細胞培養液に添加したFBS中のエクソソームではないかと推測した。そこで、FBS中とエクソソームを含まないFBS (EFBS) 中のナノ粒子のサイズを干渉顕微鏡

で別々に測定したところ、FBS中のナノ粒子の平均サイズは200nm（直径）以下であった。しかしウイルス感染なしの細胞培養上清中により大きなナノ粒子が検出されたことから、細胞培養由来のナノ粒子にはFBS由来のエクソソームと細胞培養液中の細胞由来のエクソソームの2種類が存在すると結論し、AI-nanoporeプラットフォームを用いてこれらのエクソソームとウイルス粒子を区別した。

この実験の結果、将来的に臨床サンプルを測定する場合には、サンプル中に体内の様々な細胞からのエクソソームが存在するためナノポア解析の高感度化、高分解能化の必要性が示唆された。





**図1. AIナノポアプラットフォームを用いたウイルス測定。**

a. イオン電流-時間波形測定システムの概略図を示す。

プラットフォームは、ナノポアモジュール、電気計測システム、PCソフトウェア、サーバーソフトウェアの4つのコンポーネントで構成されている。測定には直径300nm、厚さ50nmの孔径のナノポアが使用された。

b. 培養上清と6種類の培養ウイルスのイオン電流-時間プロファイル。

c. 培養上清のイオン電流-時間波形の重ね合わせ。

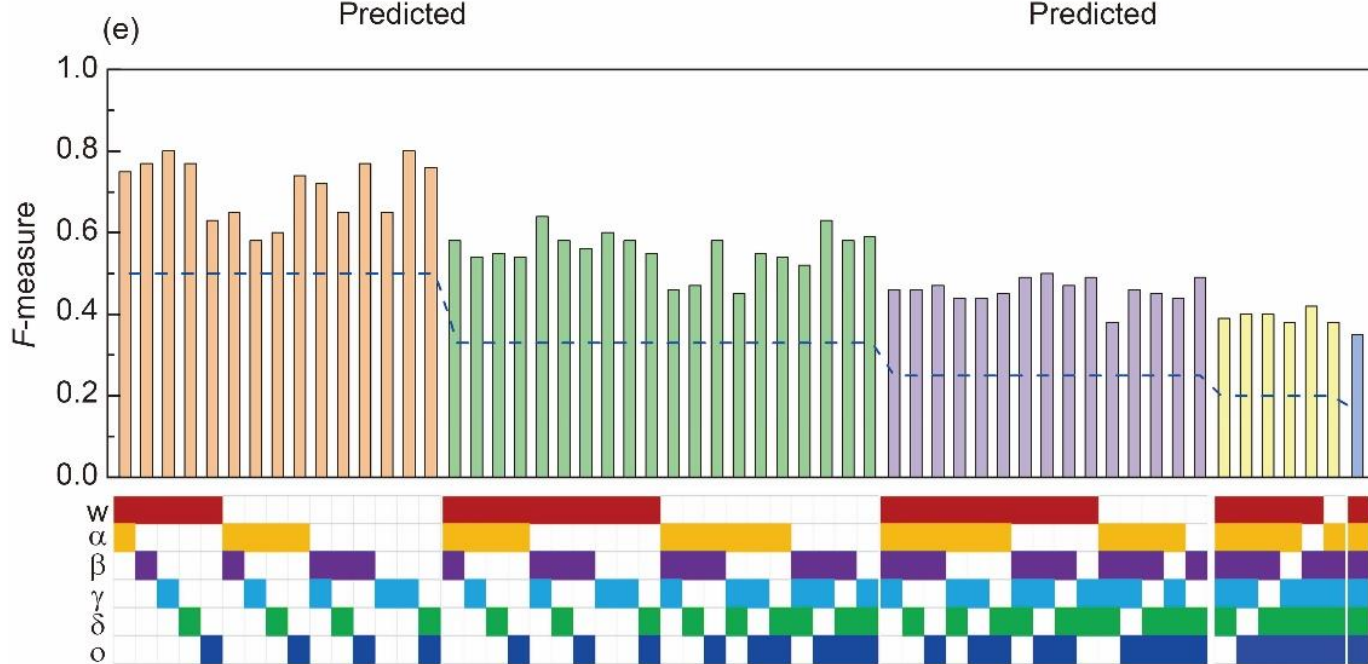
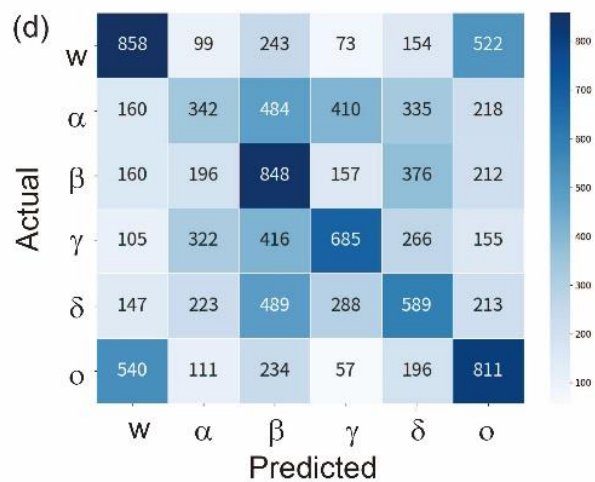
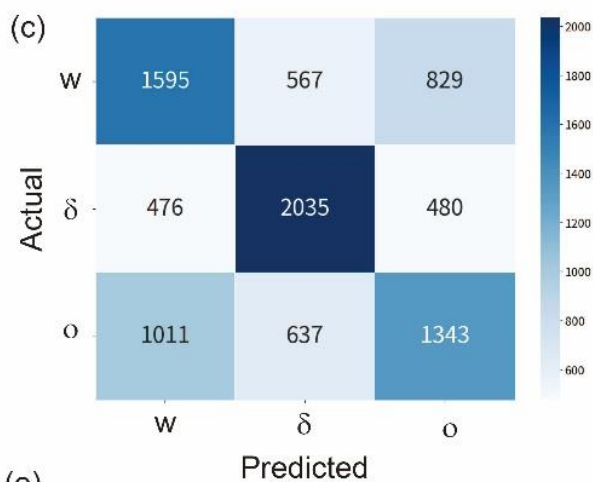
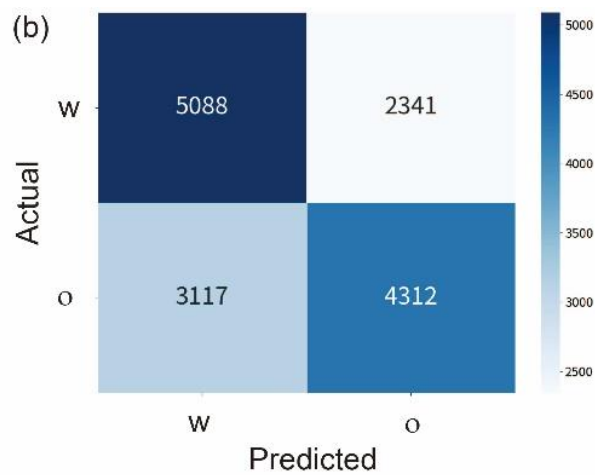
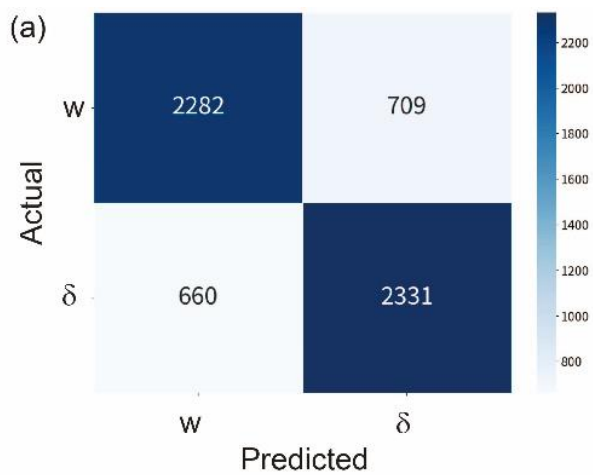
d,e. 最大電流値 ( $I_p$ ) と電流持続時間 ( $t_d$ ) のヒストグラム。赤、橙、紫、水色、緑、青はそれぞれ武漢型、 $\alpha$ 型、 $\beta$ 型、 $\gamma$ 型、 $\delta$ 型、 $\theta$ 型を示す。黄色はネガティブコントロールを示す。

## 2. AI-nanoporeプラットフォームは6つのSARS-CoV-2変異型を同定することができた。

まず、我々は前述のAI-nanoporeプラットフォームと方法を用いて武漢型と $\delta$ 型、武漢型と $\alpha$ 型を比較した。F値は $2 \times \text{Recall} \times \text{Precision} / (\text{Recall} + \text{Precision})$ として計算され、 $\text{Recall} = 2282 / (2282 + 709)$ 、 $\text{Precision} = 2282 / (2282 + 660)$ となり、武漢型と $\delta$ 型のF値は0.77、武漢型と $\alpha$ 型のF値は0.63となった（図2a、2b）。すべてのF値が0.5以上であったことから、これらの結果は、我々のAI-nanoporeプラットフォームが2つの変異体間の違いを識別できることを示している。

次に、6つのバリエーションの中から2つの変異型の組み合わせをすべて計算したところ、F値は0.58（ $\alpha$ 型と $\gamma$ 型）から0.8（武漢型と $\gamma$ 型、 $\gamma$ 型と $\alpha$ 型）の範囲であり、当社のAI-nanoporeプラットフォームが任意の2つの変異型の違いを識別できることが確認された。次に、比較を3つの変異体に拡張し（図2c）、0.45から0.64のF測定範囲を得た（図2e）。このF値が0.33以上であったことから、我々のAIナノポアプラットフォームが3つの変異体間の違いを識別できることが確認された。

同様に、4種類、5種類、6種類の変異型間の比較では、F値の範囲はそれぞれ0.38-0.50、0.38-0.42、0.35となり（図2d、2e）、多くの種類を比較する際でも我々のプラットフォームが有効であることが確認された。このように、AI-nanoporeプラットフォームは6つのSARS-CoV-2変異型を同定した。

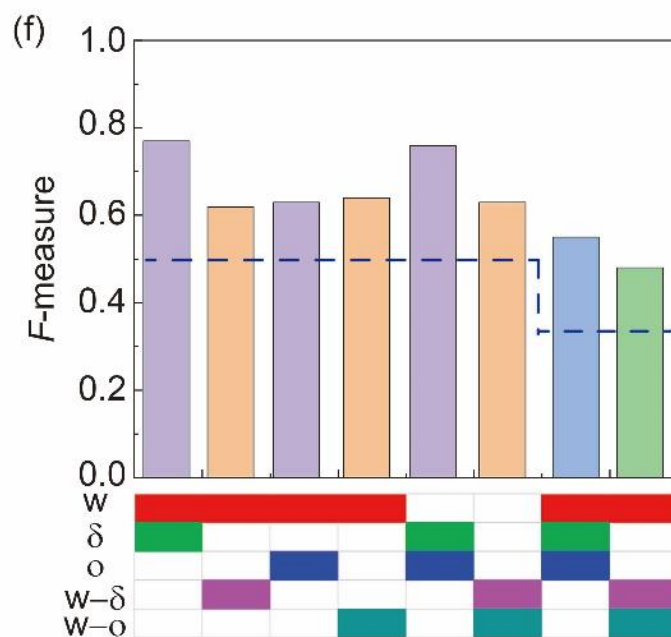
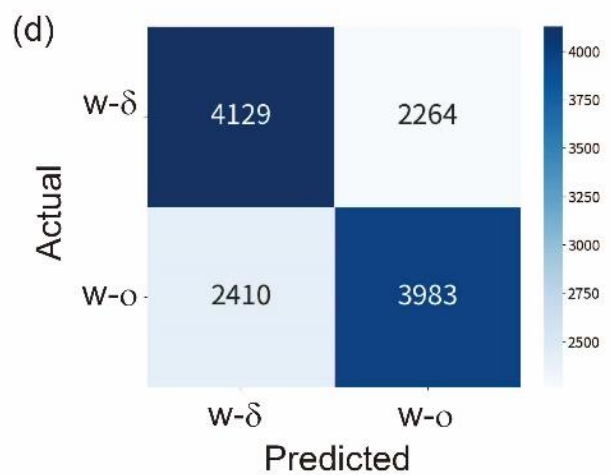
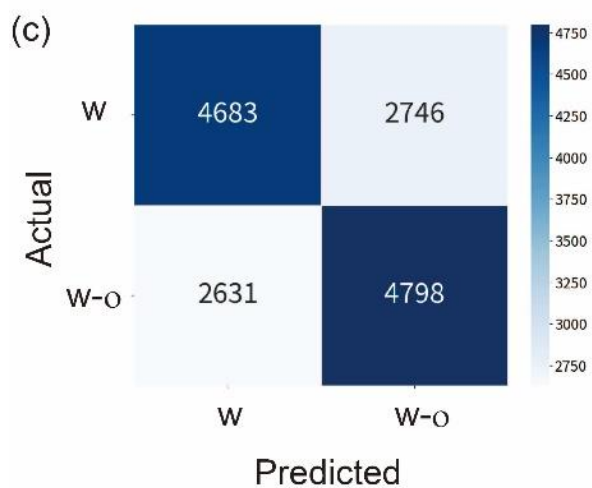
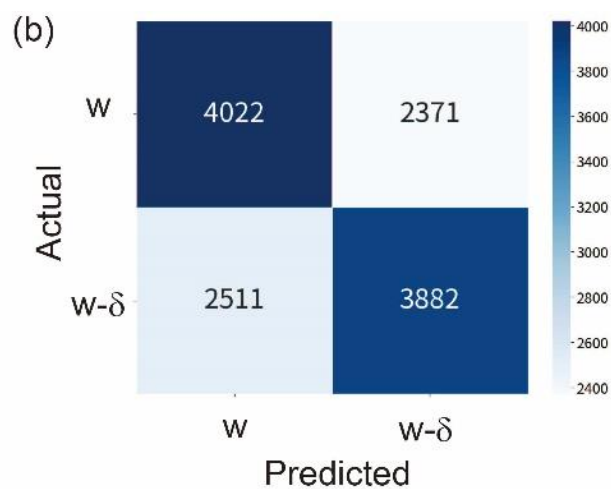
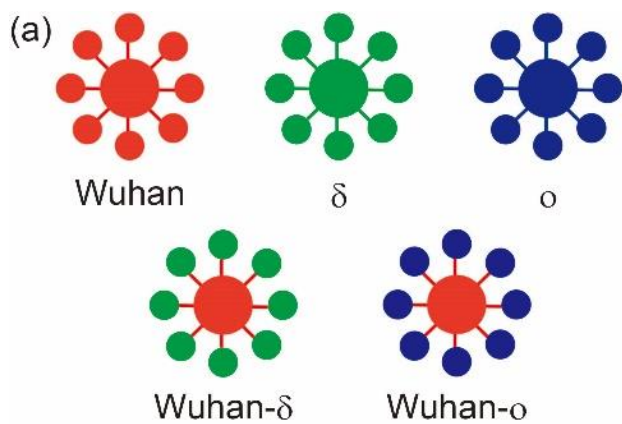


## 図2. 培養されたSARS-CoV-2変異体ウイルスの同定

- a.武漢型および $\delta$ 型、
- b.武漢型および $\omicron$ 型、
- c.武漢型、 $\delta$ 型および $\omicron$ 型、
- d.武漢型、 $\alpha$ 型、 $\beta$ 型、 $\gamma$ 型、 $\delta$ 型および $\omicron$ 型のイオン電流時間波形の機械学習によって得られたConfusion matricesを示す。Confusion matricesの数字は、機械学習プロセスで使用したイオン電流-時間波形の数を示す。
- e.チャートは、F-measuresの計算に使われた6種類の変異体の組み合わせを示す。赤、オレンジ、紫、水色、緑、青は、それぞれ武漢、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -、 $\omicron$ -型に対応する。F測定値が青い点線より大きい場合にウイルスが同定されたことを示している。

### 3. AIナノポアプラットフォームはウイルス表面のSタンパク質を検出する。

変異体の変異は主にウイルス表面のSタンパク質に影響を及ぼしていることから、我々はAI-nanoporeプラットフォームがSタンパク質を検出するという仮説を立てた。この仮説を検証するため、PCA法により $\delta$ 型Sタンパク質と $\alpha$ 型Sタンパク質を持つ武漢型SARS-CoV-2ウイルスを樹立し（図3a）（Torii, S. et al., 2021）、上述の6つの変異型と同じ条件で、そのイオン電流-時間波形を測定した（図2d）。2変量比較のF値は0.62から0.64の範囲であり（図3b-3dと3f）、3変量比較のF値は0.47であった（図3eと3f）ため、AI-nanoporeプラットフォームはSタンパクの変異によりそれぞれのウイルスの変異型を識別することが示唆された。しかし、F値が上記に示した武漢型と $\delta$ 型、武漢型と $\alpha$ 型のそれらよりも少し低かったので、他の構造の違いも影響していることが考えられる。



### 図3. $\delta$ またはo型のSタンパク質を持つ武漢型SARS-CoV-2変異体の同定

- a. 武漢- $\delta$ 型および武漢-o型は、それぞれ $\delta$ -およびo-型Sタンパクを発現する武漢型のウイルスを示す。
- b. 武漢型と武漢- $\delta$ 型
- c. 武漢と武漢-o型、
- d. 武漢-oと武漢- $\delta$ 型、
- e. 武漢、武漢- $\delta$ 、武漢-o型におけるそれぞれのイオン電流時間波形の機械学習によって得られた混同行列を示す。混同行列の数字は、機械学習プロセスで使用されたイオン電流-時間波形の数を示す。
- f. F値計算に使用した組み合わせを示す。赤、緑、青、紫、エメラルドグリーンは、それぞれ武漢型、 $\delta$ 型、o型、武漢- $\delta$ 型、武漢-o型に対応する。F値が青い点線を越えたときにウイルスが同定されたと規定できる。



#### 4. AI-nanoporeプラットフォームは患者唾液検体中のo型SARS-CoV-2ウイルスを検出した。

我々はAI-nanoporeプラットフォームが実際の臨床でも応用できるかどうかを検討すべく、AI-nanoporeプラットフォームが患者の唾液検体中のSARS-CoV-2変異型ウイルスを検出できるかどうかを調べた。

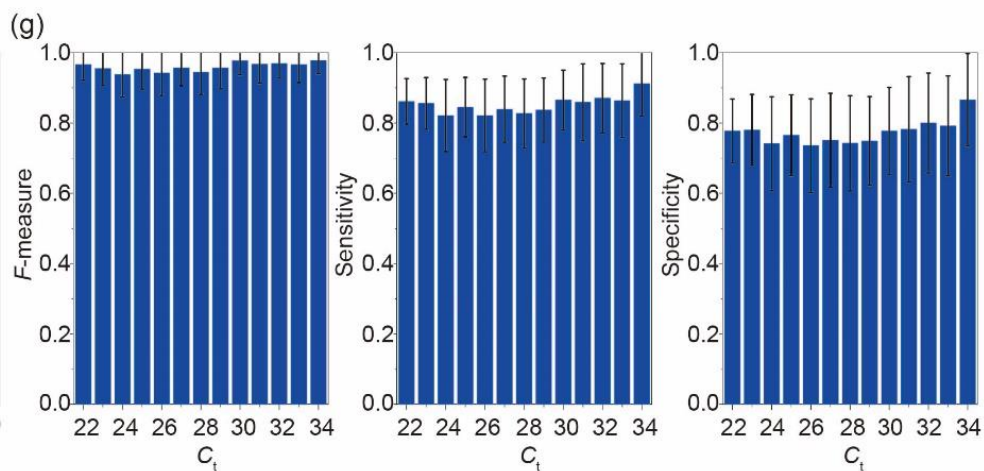
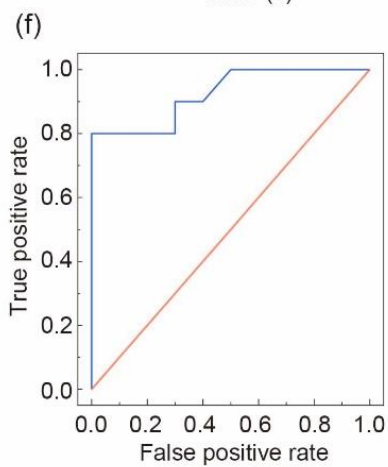
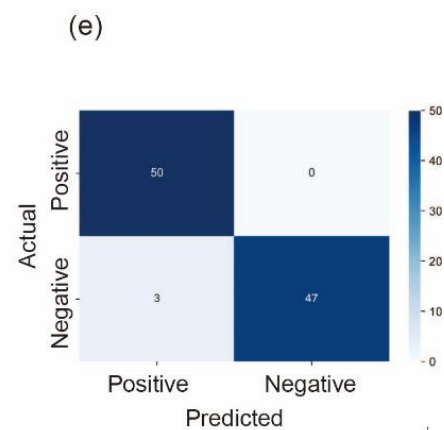
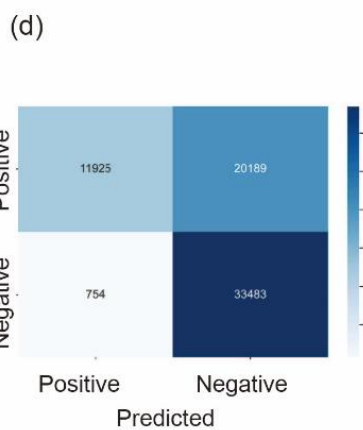
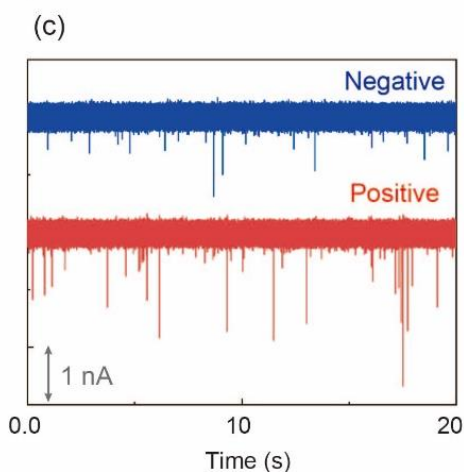
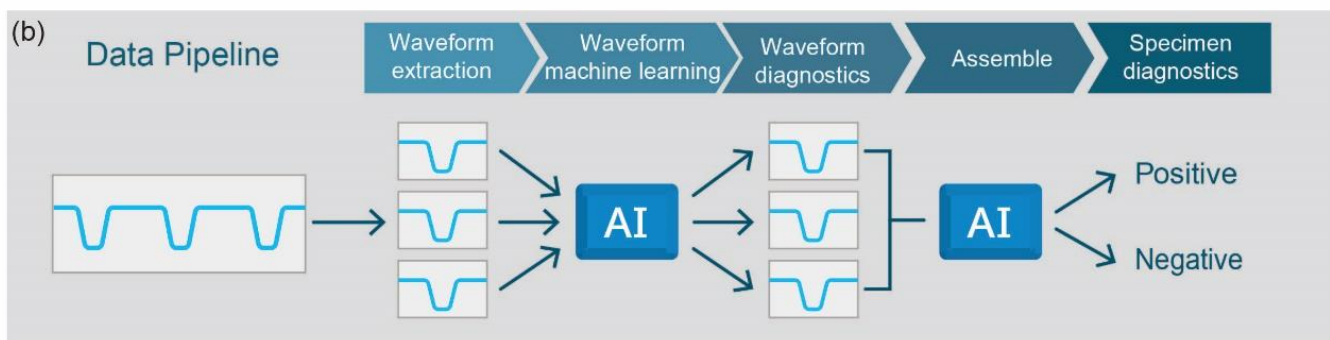
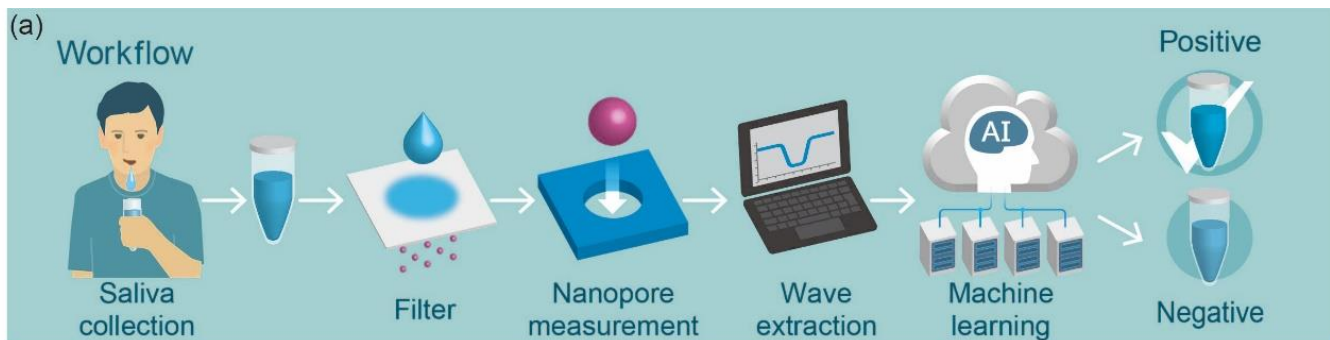
具体的には、2021年10月から2022年5月にかけて、北海道大学病院、JCHO北海道病院、KKR札幌医療センター、国立病院機構北海道医療センターにおいて、RT-PCRの結果に基づいてSARS-CoV-2感染者132名または非感染者109名から採取した241検体の唾液を用い、図4aおよび4bに示したワークフローとプロトコールに基づいて、100個のo型SARS-CoV-2ウイルスを分析した。

まず0.45 $\mu$ mのフィルターで唾液検体をろ過して異物を除去した後、ナノポアデバイスを用いて唾液中のo型SARS-CoV-2ウイルスのイオン電流-時間波形を記録した。しかし、0.45 $\mu$ mフィルターでは唾液中に含まれるエクソソームを検体から除去することはできなかった。

次に、得られたイオン電流-時間波形を機械学習に使用し、サンプル中のo型SARS-CoV-2変異体を検出した(図4c)。機械学習では、RT-PCRの結果に基づいて、o型を含む感染検体100検体と非感染検体100検体のデータを無作為に選択し、学習を行った。

陽性50検体、陰性50検体で機械学習を行った場合、F値は0.65、感度と特異度はそれぞれ100%と94%であった。したがって、AI-nanoporeプラットフォームは、臨床検体中のo型SARS-CoV-2変異体を非常に正確に同定することができることが示された。

この結果は、RT-PCRの結果と同等かそれ以上であるが、AI-nanoporeプラットフォームは測定時間5分という短い時間でこの結果を得ることができるため、より優れた診断プラットフォームであると言える(Smithgall, M. et al., 2020)。



#### 図 4. 患者唾液検体を用いた実験の概略図とその結果

- a. 患者から唾液検体を採取した後、遠心分離し、濾過した。濾過した検体を 1xPBS で 10 倍に希釈し、各サンプルを 10 分間測定した。その後イオン電流-時間波形を抽出し、機械学習により解析した。この時最も高い特徴量と分類子は、サンプルが陽性か陰性かを判定するための基準として適応された。結果、50 の RT-PCR 陽性サンプルと 50 の RT-PCR 陰性サンプルを学習と学習ができていないかのテストデータとして使用した。
- b. データパイプラインの概略図を示す。測定により抽出されたイオン電流-時間波形は機械学習された。RT-PCR 陰性検体から得られた波形は、夾雑物が通過したことによる波形を含むこと、さらに RT-PCR 陽性検体から得られた波形には、夾雑物が通過したことによる波形とウイルスによる波形の両方が含まれていたが、夾雑物が通過したことによる波形は PUC により可能な限り除去された。1 回目の機械学習では、1 つの波形が高い精度で陽性と判定された。
- c. RT-PCR 陽性検体と RT-PCR 陰性検体のイオン電流-時間プロファイルを示す。
- d. テスト工程で得られた波形の混同行列。数字は分類された波形の数を示す。
- e. 検査工程で得られたサンプルの混同行列。
- f. The receiver operating characteristic (ROC) 曲線 (AUC = 0.925) を示す。
- g. F 値、感度、特異度の Ct 依存性を示す。

## 考察

我々の共同研究者は以前、ナノ粒子のイオン電流時間波形に基づいた SARS-CoV-2 武漢型および SARS や MARS を含む他のコロナウイルスを認識する AI-nanopore プラットフォームを報告した。

我々はそれをさらに発展させ、AI-nanopore プラットフォームは上記に加えて全ての SARS-CoV-2 変異型を識別することができるようになった。

前述の論文において、培養液はウイルスに匹敵するサイズの粒子を含まないため、完全にネガティブコントロールとして認識されていたが、実際にはエクソソームが含まれていたことが判明した。そこで我々はエクソソームを夾雑物として認識して排除できるように、PUC 法を応用した機械学習を用いて、精製された 6 種類の SARS-CoV-2 変異型コロナウイルス（武漢、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\omicron$ 型）を高い精度で識別することに成功した。

また、この AI-nanopore プラットフォームは、 $\delta$ -または  $\omicron$ -型 S タンパクを発現する SARS-CoV-2 武漢型を認識できることも示した。加えて、この AI-nanopore プラットフォームが COVID-19 患者から分離した唾液サンプル中の  $\omicron$ -型 SARS-CoV-2 ウイルスを同定できることも示した。

したがって、我々の AI-nanopore プラットフォームは、5 分という非常に短い時間であるにもかかわらず、非常に高い精度で陰性や陽性を識別するだけでなく、SARS-CoV-2 変異型の識別も可能である非常に有益で利便性のある検査法である。

AI-nanopore プラットフォームから得られる波形から、ナノ粒子の体積、構造、表面電荷に関する情報が得られることはすでに知られている(Tsutsui, M et al., 2017)。しかし、これら 3 つのパラメーターのうち、どれが同定に最も影響を与えるかを実験的に実証するのは困難であった。SARS-CoV-2 の変異型は主にウイルス表面の S タンパクに影響し、前述の実験でこの AI-nanopore プラットフォームは現在までに確認されている 6 種の変異型を識別することができたことから、我々はこの AI-nanopore プラットフォームは表面電荷に着目して識別を行なっているのではないかという仮説を立てた。

武漢型と比較すると、 $\alpha$  型はその S タンパク質に N501Y、A570D、D614G、S983A、D1118H を含む 10 の変異があり、 $\beta$  型も D80A、D215G、K417N、E484K、D614G を含む 10 の変異があり、 $\gamma$  型は L18F、K417T、E484K、N501Y、D614G、T10 を含む 13 の変異がある、D614G、および T1027I、 $\delta$  型には T19R、G142D、E156G、L452R、T478K、D614G、P681R、および D950N を含む 10 の変異があり、 $\omicron$  型には T95I、G142D、G339D、S371L、K417N、N440K、T478K、E484A、Q493R、Q498R、

T547K、D614G、N679K、N764K、D796Y、N856K、N969K を含む 37 の変異がある。

これらの変異の多くには、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、リジン (K)、アルギニン (R) などの荷電アミノ酸が含まれており、これらすべてが表面電荷、ひいてはイオン電流時間波形に影響を及ぼす可能性がある。δ と o の S タンパクを発現している武漢型の計測データをすでに我々は得ていたため、表面電荷の違いを定量的に推定するために、我々は APBS-PDB2PQR

(<https://server.poissonboltzmann.org/>) を用いて、武漢、δ、o 型の S タンパクの表面電荷の和 (等電点) を計算した結果、等電点は武漢型が最も低く、δ 型と o 型は同じであることがわかった。

上記の実験にもあった通り、AI-nanopore プラットフォームは δ または o 型 S タンパクを発現する武漢型と通常の武漢型を識別することができた。しかし、δ または o 型の S タンパク質を発現している武漢型と通常の武漢型と比較した場合、F 値は δ 型と武漢型、o 型と武漢型を測定した場合の F 値とは異なることが分かった。

これらの結果は、我々の AI-nanopore プラットフォームが表面電荷だけではなく、他の要因も用いて変異型を識別していることを示している。

SARS-CoV-2 やインフルエンザウイルスを含む RNA ウイルスは変異率が高く 35、これらの変異の多くは、SARS-CoV-2 では S タンパク、インフルエンザではヘマグルチニンやノイラミニダーゼなどの表面分子に影響を及ぼす (Lyons, D et al., 2018) ことが知られている。前述の通り、我々の AI-nanopore プラットフォームは表面電荷を主に用いて識別を行うため、これらのウイルスの変異体にも柔軟に対応できる。RT-PCR と次世代シーケンサーは、臨床検体中の SARS-CoV-2 とその変異型を同定するための標準的な手法であるが、これらの方法は効率的ではない上に、費用対効果も高くはない。我々が確立した AI-nanopore プラットフォームは、これらの欠点をすべて克服することができ、臨床症状を示す COVID-19 患者における病原性 SARS-CoV-2 変異型を検出するためのより良い方法であると言えるだろう。

## 総括および結論

- AI-nanopore プラットフォームは武漢型をはじめとする 6 種類の変異型 SARS-CoV-2 を識別することができる。
- AI-nanopore プラットフォームは武漢型の S タンパクを  $\delta$  のものに変えた武漢- $\delta$  型や S タンパクを  $\circ$  のものに変えた武漢- $\circ$  型をそれぞれ識別することができた。
- AI-nanopore プラットフォームは主に S タンパクの違いで各変異型を識別しているが、他の要因も用いている。
- AI-nanopore プラットフォームは  $\circ$  型の臨床検体中の SARS-CoV-2 ウイルスを検出し、陽性と陰性を非常に高い精度で判定することができる。
- AI-nanopore プラットフォームは従来の検査法である RT-PCR と次世代シーケンサーと比較して非常に効率が高い、迅速で信頼性のある検査法である。

我々の AI-nanopore プラットフォームは、培養中および COVID-19 患者から分離された唾液検体中の SARS-CoV-2 変異型を感度 100%、特異度 94% で認識する。さらに、このプラットフォームは S タンパクの違いにも敏感である。したがって、このプラットフォームは SARS-CoV-2 のような新興感染病原体の診断ツールとして有用であろう。

我々の研究により AI-nanopore プラットフォームの診断ツールとしての可能性を提示することができたが、今後の研究としては、サル痘やインフルエンザ、ムンプスウイルスや HPV、結核菌などの我々に身近なウイルスを計測して解析を行うことによって、AI-nanopore プラットフォームを用いた感染症診断ライブラリを作成することができると思われる。実際、我々はこの研究の後にサル痘とインフルエンザ 5 種の計測を完了しており、臨床検体についても多数のインフルエンザ患者唾液の測定と解析を行っている。今後は高病原性鳥インフルエンザを含む残り 139 種のインフルエンザを測定し、上述の感染症診断ライブラリを作成していく方針である。

この研究の不足点としては、AI-nanopore プラットフォーム自体が S タンパクを主な識別の基準にしていることが分かっているものの、残りの基準が分からずじまいになっているところがある。これについてはさまざまな部分を変化させたウイルスを作成して計測し、今後解明していく方針である。

## 謝辞

第二章を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた北海道大学遺伝子病制御研究所 分子神経免疫学 村上正晃教授に深く感謝いたします。また、直接のご指導を頂きました大阪大学産業科学研究所 バイオナノテクノロジー分野 谷口正輝教授、北海道大学遺伝子病制御研究所 分子神経免疫学 特任講師・久保田晋平先生、博士研究員・田中くみ子先生、北海道大学医学院 産婦人科学 博士課程2年・赤羽慧一郎先生に心から感謝いたします。さらに、各種研究材料や検体、ウイルスを提供していただきました Aipore 株式会社・武居弘泰様、JCHO 北海道病院・原田敏之先生、北海道医療センター・服部健史先生、KKR 札幌病院・福家聡先生、北海道大学医学院 微生物学免疫分野 福原崇介教授、助教・鈴木理滋先生、北海道大学医学院 血液内科学 豊嶋崇徳教授に深く感謝いたします。

最後に本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました、Aipore 株式会社、大阪大学産業科学研究所および北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野のすべてのみなさまに、心より御礼申し上げます。

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。



## 引用文献

de Wit, E.; van Doremalen, N.; Falzarano, D.; Munster, V. J. *Nat Rev Microbiol* 2016, 14, (8), 523-34.

Cevik, M.; Tate, M.; Lloyd, O.; Maraolo, A. E.; Schafers, J.; Ho, A. *Lancet Microbe* 2021, 2, (1), e13-e22.

Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; Cheng, Z.; Yu, T.; Xia, J.; Wei, Y.; Wu, W.; Xie, X.; Yin, W.; Li, H.; Liu, M.; Xiao, Y.; Gao, H.; Guo, L.; Xie, J.; Wang, G.; Jiang, R.; Gao, Z.; Jin, Q.; Wang, J.; Cao, B. *Lancet* 2020, 395, (10223), 497-506.

Wu, D.; Wu, T.; Liu, Q.; Yang, Z. *International Journal of Infectious Diseases* 2020, 94, 44-48.

Hu, B.; Guo, H.; Zhou, P.; Shi, Z. L. *Nat Rev Microbiol* 2021, 19, (3), 141-154.

Cevik, M.; Kuppalli, K.; Kindrachuk, J.; Peiris, M. *Bmj* 2020, 371, m3862.

Harvey, W. T.; Carabelli, A. M.; Jackson, B.; Gupta, R. K.; Thomson, E. C.; Harrison, E. M.; Ludden, C.; Reeve, R.; Rambaut, A.; Peacock, S. J.; Robertson, D. L. *Nat Rev Microbiol* 2021, 19, (7), 409-424.

van Dorp, L.; Acman, M.; Richard, D.; Shaw, L. P.; Ford, C. E.; Ormond, L.; Owen, C. J.; Pang, J.; Tan, C. C. S.; Boshier, F. A. T.; Ortiz, A. T.; Balloux, F. *Infection, Genetics and Evolution* 2020, 83, 104351.

Zhang, L.; Jackson, C. B.; Mou, H.; Ojha, A.; Rangarajan, E. S.; Izard, T.; Farzan, M.; Choe, H. *bioRxiv* 2020.

Khateeb, J.; Li, Y.; Zhang, H. *Crit Care* 2021, 25, (1), 244.

Tao, K.; Tzou, P. L.; Nouhin, J.; Gupta, R. K.; de Oliveira, T.; Kosakovsky Pond, S. L.; Fera, D.; Shafer, R. W. *Nature Reviews Genetics* 2021, 22, (12), 757-773.

Duong, D. *Cmaj* 2021, 193, (27), E1059-e1060.

He, X.; Hong, W.; Pan, X.; Lu, G.; Wei, X. *MedComm (2020)* 2021, 2, (4), 838-845.

Chiara, M.; D'Erchia, A. M.; Gissi, C.; Manzari, C.; Parisi, A.; Resta, N.; Zambelli, F.; Picardi, E.; Pavesi, G.; Horner, D. S.; Pesole, G. *Briefings in Bioinformatics* 2020, 22, (2), 616-630.

Bhojar, R. C.; Jain, A.; Sehgal, P.; Divakar, M. K.; Sharma, D.; Imran, M.; Jolly, B.; Ranjan, G.; Rophina, M.; Sharma, S.; Siwach, S.; Pandhare, K.; Sahoo, S.; Sahoo, M.; Nayak, A.; Mohanty, J. N.; Das, J.; Bhandari, S.; Mathur, S. K.; Kumar, A.; Sahlot, R.; Rojarani, P.; Lakshmi, J. V.; Surekha, A.; Sekhar, P. C.; Mahajan, S.; Masih, S.; Singh, P.; Kumar, V.; Jose, B.; Mahajan, V.; Gupta, V.; Gupta, R.; Arumugam, P.; Singh, A.; Nandy, A.; P. V, R.; Jha, R. M.; Kumari, A.; Gandotra, S.; Rao, V.; Faruq, M.; Kumar, S.; Reshma G, B.; Varma G, N.; Roy, S. S.; Sengupta, A.; Chattopadhyay, S.; Singhal, K.; Pradhan, S.; Jha, D.; Naushin, S.; Wadhwa, S.; Tyagi, N.; Poojary, M.; Scaria, V.; Sivasubbu, S. *PLOS ONE* 2021, 16, (2), e0247115.

Taniguchi, M. *Anal Chem* 2015, 87, (1), 188-99.

Branton, D.; Deamer, D. W.; Marziali, A.; Bayley, H.; Benner, S. A.; Butler, T.; Di Ventra, M.; Garaj, S.; Hibbs, A.; Huang, X.; Jovanovich, S. B.; Krstic, P. S.; Lindsay, S.; Ling, X. S.; Mastrangelo, C. H.; Meller, A.; Oliver, J. S.; Pershin, Y. V.; Ramsey, J. M.; Riehn, R.; Soni, G. V.; Tabard-Cossa, V.; Wanunu, M.; Wiggin, M.; Schloss, J. A. *Nat Biotechnol* 2008, 26, (10), 1146-53.

Shi, W.; Friedman, A. K.; Baker, L. A. *Analytical Chemistry* 2017, 89, (1), 157-188.

Howorka, S.; Siwy, Z. *Chem Soc Rev* 2009, 38, (8), 2360-84.

Rozevsky, Y.; Gilboa, T.; van Kooten, X. F.; Kobelt, D.; Huttner, D.; Stein, U.; Meller, A. *ACS Nano* 2020, 14, (10), 13964-13974.

Derrington, I. M.; Butler, T. Z.; Collins, M. D.; Manrao, E.; Pavlenok, M.; Niederweis, M.; Gundlach, J. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, 107, (37), 16060-16065.

Varongchayakul, N.; Song, J.; Meller, A.; Grinstaff, M. W. *Chem Soc Rev* 2018, 47, (23), 8512-8524.

McMullen, A.; de Haan, H. W.; Tang, J. X.; Stein, D. *Nat Commun* 2014, 5, 4171.

Arima, A.; Tsutsui, M.; Harlisa, I. H.; Yoshida, T.; Tanaka, M.; Yokota, K.; Tonomura, W.; Taniguchi, M.; Okochi, M.; Washio, T.; Kawai, T. *Sci Rep* 2018, 8, (1), 16305.

Darvish, A.; Lee, J. S.; Peng, B.; Saharia, J.; VenkatKalyana Sundaram, R.; Goyal, G.; Bandara, N.; Ahn, C. W.; Kim, J.; Dutta, P.; Chaiken, I.; Kim, M. J. *Electrophoresis* 2019, 40, (5), 776-783.

Tsutsui, M.; Yoshida, T.; Yokota, K.; Yasaki, H.; Yasui, T.; Arima, A.; Tonomura, W.; Nagashima, K.; Yanagida, T.; Kaji, N.; Taniguchi, M.; Washio, T.; Baba, Y.; Kawai, T. *Sci Rep* 2017, 7, (1), 17371.

Ryuzaki, S.; Yasui, T.; Tsutsui, M.; Yokota, K.; Komoto, Y.; Paisrisarn, P.; Kaji, N.; Ito, D.; Tamada, K.; Ochiya, T.; Taniguchi, M.; Baba, Y.; Kawai, T. *Anal Chem* 2021, 93, (18), 7037-7044.

Taniguchi, M.; Minami, S.; Ono, C.; Hamajima, R.; Morimura, A.; Hamaguchi, S.; Akeda, Y.; Kanai, Y.; Kobayashi, T.; Kamitani, W.; Terada, Y.; Suzuki, K.; Hatori, N.; Yamagishi, Y.; Washizu, N.; Takei, H.; Sakamoto, O.; Naono, N.; Tatematsu, K.; Washio, T.; Matsuura, Y.; Tomono, K. *Nat Commun* 2021, 12, (1), 3726.

Smythe, W. R. *Review of Scientific Instruments* 2003, 43, (5), 817-818.

Qin, Z.; Zhe, J.; Wang, G.-X. *Measurement Science and Technology* 2011, 22, (4), 045804.

Berge, L. I.; Jøssang, T.; Feder, J. *Measurement Science and Technology* 1999, 1, 471.

Ying, C.; Houghtaling, J.; Mayer, M. *Nanotechnology* 2022, 33, (27), 275501.

Torii, S.; Ono, C.; Suzuki, R.; Morioka, Y.; Anzai, I.; Fauzyah, Y.; Maeda, Y.; Kamitani, W.; Fukuhara, T.; Matsuura, Y. *Cell Rep* 2021, 35, (3), 109014.

Smithgall, M. C.; Scherberkova, I.; Whittier, S.; Green, D. A. *J Clin Virol* 2020, 128, 104428.

Lyons, D. M.; Luring, A. S. *Viruses* 2018, 10, (8).

## 第三章

### 関節リウマチの遠隔炎症の片側への波及メカニズム

#### 緒言

関節リウマチ(RA)の基本的な特徴の1つの基準は遠隔部の炎症であり、両側の関節に激しい変形と不動性が生じる(Arnett et al., 1988; Clarke et al., 1994)ことがあるとされる。同様の症状は乾癬や肺線維症など他の疾患でも観察され、神経機構が関与していると報告されている (Kelly et al., 2007; Kidd et al., 1989) が、そのメカニズムの詳細は明らかにされていない。

IL-6 アンブは、滑膜線維芽細胞や内皮細胞などの非免疫細胞において、組織特異的な炎症と NF- $\kappa$ B 活性化を亢進させるメカニズムである。IL-6 アンブの誘導は、動物モデルや RA 患者において、ケモカインや増殖因子を含む炎症を惹起させる因子の発現を引き起こす(Murakami et al., 2011; Ogura et al., 2008)。 IL-6 アンブでは NF- $\kappa$ B と STAT3 の同時刺激によって NF- $\kappa$ B シグナルの亢進が誘導され、続いて局所炎症が起こる(Atsumi et al., 2014; Harada et al., 2015; Lee et al., 2013; Murakami et al., 2013; Murakami et al., 2011; Ogura et al., 2008; Okuyama et al., 2018)ことが知られている。NF- $\kappa$ B 標的の1つである IL-6 は炎症時の主要な STAT3 刺激因子であるため、副次的に炎症性疾患において IL-6 アンブを介して炎症性メディエーターを発現させるために STAT3 の活性化を維持する (Murakami et al., 2019) 。実際、IL-6 アンブは、皮膚、腎臓、中枢神経系 (CNS) 、肺を含む多くの臓器の炎症性疾患において関与している (Arima et al., 2012; Fujita et al., 2019; Higuchi et al., 2020; Hirano and Murakami., 2020; Lee et al., 2013; Stofkova et al., 2019; Takada et al., 2020) 。

我々は上記の数々の研究から、炎症とは、IL-6 を介した免疫細胞の蓄積および/または局所の非免疫細胞の増殖、それに続く局所の恒常性の調節障害であると定義した (Murakami et al., 2019)。

血管内皮細胞において、我々は IL-6 アンブは交感神経の活性化によって増強され、次いで自己反応性 CD4+ T 細胞が血液関門を通過するためのゲートウェイを確立する、所謂ゲートウェイ反射と言われる現象を発見した (Kamimura et al., 2020 ; Matsuyama et al., 2021) 。この時、交感神経の活性化に伴って分泌されるノルアドレナリンは IL-6 アンブを介して局所内皮細胞の NF- $\kappa$ B 活性化を誘導する。

ゲートウェイ反射では、痛み、ストレス、電気などの環境刺激による感覚神経の活性化によって交感神経の活性化が引き起こされ、特定部位の血管に自己反応性 T 細胞のゲートウェイを誘導し、組織特異的な自己免疫疾患を引き起こす(Arima et al., 2012; Arima et al., 2015; Arima et al., 2017; Stofkova et al., 2019)。

そこで我々は、2つの部位間の炎症をつなぐ神経の反射が、前述のリウマチのように片側からもう片側へ広がる炎症に関与しているのではないかという仮説を立てた。さらに、いくつかの神経伝達物質が NF- $\kappa$ B および/または STAT3 経路を活性化または抑制すること (Murase and McKay, 2014; Nicolas et al., 2012)、さらには脳の微小炎症によって誘導された ATP が新たな神経経路を活性化し、次いで突然死を伴う遠隔臓器の炎症が起こる現象を実際に発見したことから (Arima et al., 2017)、神経伝達物質の分泌が炎症の拡大を引き起こすかどうかをについて分析した。

ゲートウェイ反射は、神経系と免疫系のクロストークを制御するメカニズムのひとつにすぎない。例えば、化学的交感神経切除術後に実験的自己免疫性脳脊髄炎の重症度が悪化することから(Chelmicka-Schorr et al., 1992)、交感神経系が免疫反応に調節作用を及ぼしていることが示唆される。さらに、Molleston らは、視神経切断が脳上丘のミクログリアを活性化し、炎症病変が視神経切断側に局在することを示した (Molleston ら、1993)。Pavlov と Tracey は、敗血症マウスモデルや RA 患者、さらには炎症性腸疾患の患者において、迷走神経刺激が炎症反射として全身の炎症を抑制することを示した (Pavlov and Tracey, 2017)。

F759 マウスは、関節の IL-6 アンプに起因する RA を加齢とともに自然発症する RA モデルマウスである(Atsumi et al., 2002; Murakami et al., 2011; Ogura et al., 2008)。これらのマウスは、IL-6 受容体の複合体中にある IL-6 シグナル伝達物質である gp130 に Y759F というアミノ酸置換を有している (Murakami et al., 2019)。リン酸化された Y759 は、IL-6 シグナル伝達を負に制御する SOCS3 の結合部位であるため、IL-6 を介した STAT3 の活性化が亢進し、その後加齢に伴って両側の足関節に RA 様疾患が発症する。加えて I 型コラーゲン陽性非免疫細胞における IL-6 シグナルの亢進が、F759 関節炎の発症に関与している。

この研究では、F759 マウスを用いて炎症拡大の分子メカニズムを検討した。その結果、両足関節間の局所的な神経相互作用が、両脚での ATP の発現を介した炎症の拡大誘導に重要な役割を果たしており、この ATP が神経経路を活性化し、IL-6 アンプを介して炎症の進展を促進することを示した。この知見は、この神経経路の遮断が、関節炎を含む様々な炎症拡大に対する治療戦略の可能性を示唆している。

## 実験方法

### 1. マウス系統

すべての実験に成体（8-10 週齢）の雄マウスを用いた。

C57BL/6 マウスは日本 SLC（静岡県）から購入した。

F759 マウスは C57BL/6 マウスと 10 世代以上交配してから使用した。

I 型コラーゲン-Cre マウスは、Dr. G. Karsenty（Baylor College of Medicine, Houston, TX）より提供され、STAT3<sup>flox/flox</sup> マウス（大阪大学審良教授より提供）（Takeda et al., 1998）および IKK<sup>γ</sup><sup>flox/flox</sup> マウス（Schmidt-Supprian et al., 2000）と交配した。

C57BL/6 バックグラウンドの NFκB レポータートランスジェニックマウスも上記の F759 マウスと交配してから使用した（Sadikot and Blackwell, 2008）。

B6.129(Cg)-Fostm1.1(cre/ERT2)Luo/マウスおよび B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J(Ai14)マウスは Jackson Laboratory から購入され、c-fos CreERT2-Ai14 マウスを得るために交配された。

マウスは大阪大学医学部の規定に従って特定の病原体不検出条件下で飼育された。

すべての動物実験は、大阪大学大学院生命機能研究科および医学系研究科、北海道大学遺伝子医学研究所の施設動物実験委員会のガイドラインに従って行われた。

本研究での全ての動物実験のプロトコールは、大阪大学大学院生命機能研究科・医学系研究科および北海道大学大学院遺伝子病制御研究所の施設動物実験委員会の承認を得た上に行われた。

### 2. 抗体と試薬

染色には以下の抗体を使用した：

抗 c-Fos ウサギポリクローナル抗体（Abcam、製品番号 ab190289）、抗 Nav1.8 ウサギポリクローナル抗体（渡辺雅彦教授からの寄贈）、抗リン酸化 c-Fos（Ser32）ウサギモノクローナル抗体（D82C12）（Cell Signaling Technologies、番号 5368S）。

Watanabe）、抗リン酸化 c-Fos（Ser32）ウサギモノクローナル抗体（D82C12）（Cell Signaling Technologies、製品番号 5368S）、抗 HSV2 ウサギ全抗血清（Novus Biologicals、製品番号 NB120-9534）、抗プロエンケファリンモルモットポリクローナル抗体（渡辺雅彦教授からの寄贈）、抗 TRPV1 モルモットポリクローナル抗体（渡辺雅彦教授からの寄贈）、抗カレチニンニワトリポリクローナル抗体（Encor Biotechnology, no. CPCA-Calret）、抗リン酸化 STAT3（Tyr705）ウサギモノクローナル抗体（D3A7）（Cell Signaling Technologies、番号 9145）、抗ビメンチン（Abcam、番号 ab92547）、抗リン酸化 NF-κB p65（pSer276）ウサギポリクローナル抗体

(Sigma-Aldrich、番号 SAB4504488)。SAB4504488)、抗 P2RX7 ヤギポリクローナル抗体 (Abcam、No.ab93354)、抗マウス CD31 ラットモノクローナル抗体 (BD Pharmingen、No.550274)、Alexa Fluor 647 標識抗リン酸化 CREB (Ser133) ウサギモノクローナル抗体 (クローン 87G3、Cell Signaling Technologies、No. 14001S)、Alexa Fluor 546 ロバ抗ウサギ IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific、No.A10040)、Alexa Fluor 488 ロバ抗ウサギ IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific、No. A21206)、Alexa Fluor 555 ロバ抗ウサギ IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific、番号 A31572)、Alexa Fluor 488 ロバ抗ヤギ IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific、番号 A11055)、Alexa Fluor 647 ヤギ抗ニワトリ IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific、番号 A21449)、Alexa Fluor 488 ロバ抗モルモット IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch、番号 756-545-148)、および Alexa Fluor 555 ロバ抗ラット IgG (H+L) (Abcam、番号 ab150154)。

VECTASTAIN Elite ABC Kit Peroxidase (Rabbit IgG)と ImmPACT DAB Substrate Kit Peroxidase は Vector Laboratories から購入した。

抗マウス IL-17 Ab (R &D Systems 社、MAB421) および抗 IL-6R Ab (中外製薬社) を *in vivo* 中和に使用した。

マウス IL-17A は Peprotech 社から購入した。

ヒト可溶性 IL-6R $\alpha$  は R&D systems から購入した。

ヒト IL-6 は東レより入手した。

A438079 hydrochloride (No.2972)、A803467 (No.2976) および IKK 16 (No.2539) は Tocris Bioscience から購入した。

Fluoro Gold (FG)は Fluorochrome (No.52-9400)から、ATP は Sigma-Aldrich (No.A6559)から購入した。ATP 測定試薬キットは Toyo Ink から購入した (No.LL100-1)。

ブラジキニン EIA キット (ヒト、ラット、マウス) (No.EK-009-01) および CGRP EIA キット (ラット、マウス) (No.EK-015-09) は Phoenix Pharmaceuticals から購入した。

ELISA キットについてはヒト IL-6 ELISA セット (No. 555220, BD Biosciences 社製)、IL-17 マウス ELISA (No.BMS6001, Thermo Fisher Scientific 社製)、LEGEND MAX ヒト IL-6 ELISA キット (No.430507, BioLegend 社製) を使用した。

ルシフェラーゼレポーターアッセイシステムについては No.E1500 の Promega 社製の物を使用し、ノルエピネフリン EIA キットは No.VA-10-0200 の LDN 社製の物を使用した。

Alexa Fluor-488 (番号 C22841) および Alexa Fluor-555 (番号 C22843) 結合コレラトキシン B サブユニット、および Zenon Rabbit IgG 標識キット、Alexa Fluor 488 (番号



Z25302) および Alexa fluor 555 (番号 Z25305) は、Thermo Fisher Scientific から購入した。

### 3. マウスの関節への注射

IL-6、IL-17A、ATP、A803467、A438079、FG、HSV2 (ATCC、番号 VR-540TM)、Alexa Fluor 標識 CTB、抗マウス IL-17 抗体、および抗 IL-6R 抗体をマウスの足関節および膝関節に注射した。

### 4. サイトカイン誘発関節炎の評価

IL-6 および IL-17A を注射した F759 マウスについて、関節炎の重症度は、両側から評価された 2 つのパラメータ、(1)足関節の腫脹と(2)足関節の可動制限に基づいていた。各パラメータの重症度は 0~3 の尺度で評価され、0 は変化なし、1 は軽度の変化、2 は中程度の変化、3 は重度の変化を示す。各マウスの片脚足関節 1 点の平均値を用いた。

### 5. マウスの足神経の切断方法

胸椎から仙椎の間の椎骨に沿って皮膚切開を行い、L4-5 分節レベルまたは L4-6 分節レベルの脊髄の左後根を露出させ、脊髄と L5 または L4-L6 の DRG 間の求心性線維を切断した。偽手術対照群のマウスは、左の DRG と根が露出されたが、神経には傷をつけずそのまま縫合した。対側はすべてのマウスで無傷のままであった。

### 6. 坐骨神経の部分結紮

坐骨神経の部分結紮 (Seltzer モデル) は、臀部の皮膚を切開し、坐骨神経を露出させ、神経の直径の約 1/3 から 1/2 のあたりを 6-0 PGA 縫合糸 (秋山、東京) で結紮することで行った。偽手術マウスでは、神経は露出させたが結紮はしなかった。

### 7. リアルタイム PCR

sepsol-RNA I (ナカライテスク社製)、クロロホルム (Sigma-Aldrich 製)、イソプロパノール (Sigma-Aldrich 製) を用いて L5 DRG から全 RNA を調製するか、GenElute Mammalian Total RNA Kit (Sigma-Aldrich 製) を用いて足関節組織から調製した。この RNA を DNase I (Sigma-Aldrich 製) で処理し、Oligo(dT)18 プライマーを用いて M-MLV 逆転写酵素 (Promega 製) で逆転写を行った。cDNA 産物を各リアルタイム PCR 反応に用いた。ゲノム DNA は、アルコール沈殿担体 Ethachinmate (ニッポンジーン) とイソプロパノールを用いて、HSV2 を注射した L5 DRG とマウスの足関節から調製した。

7300 高速リアルタイム PCR システムと PROBE qPCR マスターミックス (KAPA Biosystems) を用いて、c-fos および HPRT mRNA と HSV2 DNA のレベルを定量した。

TaqMan PCR プライマーペアは以下の通りである：

マウス HPRT プライマー、5'-AGCCCCAAAATGTTAAGGTTG-3'および 5'-CAAGGGCATCCAACAACAAAC-3'；

マウス c-fos プライマー、5'-CCTTCTCCAGCATGGGCTC-3'および 5'-CGTGGGATAAAGTTGGCACTA-3'；

および HSV2 プライマー、5'-CGCATCAAGACCACCTCCTC-3'および 5'-GCTCGCACCACGCGA-3'。

TaqMan プローブは以下の通りであった：マウス HPRT プローブ、5'-GATCCAACAAAGTCTGGCCTGTATCCAACAC-3' [TAMRA]；マウス c-fos プローブ、5'-GTGTCAACAGGACTTGCGCAGAT [TAMRA]；および HSV2 プローブ、5'-GCGGCGATGCGCCAG [TAMRA]。

TaqMan リアルタイム PCR の条件は、95°Cで 40 サイクル、3 秒間、続いて 60°Cで 40 サイクル、30 秒間であった。相対的な HSV2 DNA 複製レベルは、ゲノム DNA 量のレベルで正規化した。

7300 高速リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) および SYBR green qPCR マスターミックス (KAPA Biosystems) を用いて、IL-6、CCL2、CCL3、CCL21、CXCL2、および HPRT mRNA のレベルを定量した。

PCR プライマーペアは以下の通りである：マウス HPRT プライマー、5'-GATTAGCGATGATGAACCAGGTT-3'および 5'-CCTCCCATCTCCTTCATGACA-3'；

マウス IL-6 プライマー、5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'および 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'；

およびマウス CCL2 プライマー、5'-CCGGCTGGAGCATCCACGTGT-3'および 5'-TGGGGTCAGCACAGACCTCTCT-3'。

リアルタイム PCR の条件は、94°Cで 40 サイクル、15 秒後、60°Cで 40 サイクル、60 秒であった。

## 8. 凍結パラフィン包埋切片の作製と免疫組織化学

脊髄と足関節を摘出し、脊髄節を分離した。個々の脊髄セグメントと足関節を OCT コンパウンド (SECTION-LAB、広島) に包埋した。切断面を粘着フィルム

(Cryofilm type IIIC (16UF)、SECTION-LAB) で覆い、凍結切片 (10~20μm) をクライオスタット (CM3050S) またはマクロトーム (CM3600XP、Leica Microsystems、ドイツ) を用いて作製した。

パラフィン包埋切片のために、足関節を採取し、10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。得られた切片を上述の抗体で染色し、Hoechst 33342 (Invitrogen、東京) でカウンター染色した後、BZ-9000 顕微鏡 (KEYENCE、大阪) または LSM980 (Carl Zeiss、ドイツ) で解析した。

## 9. 免疫染色の定量化

リン酸化 c-fos<sup>+</sup>、c-fos<sup>+</sup>、MHC クラス II<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、pp65<sup>+</sup>、および pSTAT3<sup>+</sup>領域を Image J (Wayne Rasband、NIH) を用いて測定した。共焦点化は、Imaris ソフトウェア (Bitplane) の Coloc モジュールを用いて測定した。

## 10. 脛骨神経の電気刺激と電気生理学的信号の記録

C57BL/6 マウスをウレタン麻酔した。体温はサーモスタット式加温パッドとランプ (ATC-101B-RS、ユニークメディカル、東京、日本) を用いて 37.0~37.5°C に維持した。右側または左側の足首周囲の脛骨神経を、刺激装置とアイソレータ (SEN-7203 および SS-202J、日本光電) を用いて、3 秒ごとに 0.5ms の矩形波パルスで刺激した。DRG 近傍に分離した L5 後根 (n=5) および/または大腿部または足首周囲に分離した坐骨神経 (n=5) を、バイポーラ白金-イリジウムワイヤー電極上に置き、プリアンプ (MEG-6100、日本光電)、AD コンバータ (Micro 1401、ケンブリッジ・エレクトロニック・デザイン)、ソフトウェア (Spike 2、ケンブリッジ・エレクトロニック・デザイン) を用いて電気生理学的信号を検出した。神経は温めた流動パラフィンで覆った。電気刺激によって誘発された反応は、ソフトウェアを用いて平均化した (>10 試行)。

## 11. マウス脊髄の切断

胸椎から腰椎にかけての椎骨に沿って皮膚切開を行い、筋肉と椎弓を切除した。脊髄を露出させ、鋭利な刃物で深さ 0.5-0.6mm で T9-13 レベルの中央部で縦に切断した後縫合した。マウスは麻痺させなかった。偽手術対照群のマウスは、筋肉と椎弓を切除したが、脊髄はそのまま縫合した。このマウスを使った実験は、手術の 10~14 日後に行われた。

## 12. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

NF-κB レポーター Tg/F759 マウスの足関節を採取し、滑膜組織を passive lysis buffer (Promega、東京) でホモジナイズした。遠心後、上清を回収し、Bradford assay を用いて総タンパク質量を調整した。組織溶解液のルシフェラーゼ活性は、Luciferase reporter assay system (Promega、東京) を用いて測定した。

### 13. ATP アッセイ

個々のマウスから足関節を採取し、10mM HEPES-NaOH および 250mM スクロースを含む蒸留水 10mL に 30 分間浸した。4°C で 3000rpm の遠心分離を 10 分間行った後、上清を回収した。ATP 測定試薬キット (TOYO Ink、東京) を用い、ホモジナイズステップを省略した以外は、製造者の指示に従ってルシフェリン-ルシフェラーゼアッセイで ATP レベルを測定した。

### 14. ELISA 法

細胞培養上清およびマウス血清中の IL-6 濃度は ELISA キット (BD Biosciences, 東京) を用いて測定した。マウスの足関節におけるノルエピネフリン、CGRP、ブラジキニンおよびサブスタンス P のレベルは、ELISA キット (LDN、Nordhorn、ドイツ; Phoenix Pharmaceuticals、Burlingame、カリフォルニア; または R&D systems、東京) を用いて測定した。マウス足関節におけるニューロペプチド Y のレベルは、ELISA キット (EMD Millipore Corporation, U.S.A.) を使用して測定した。血清中のヒト IL-6 およびマウス IL-17 レベルは、ELISA キット (それぞれ Biologend および eBioscience) を用いて測定した。

### 15. 細胞培養と刺激条件

I 型コラーゲン陽性血管内皮細胞 BC1 は、宮坂教授 (大阪大学) より入手した。W26 滑膜線維芽細胞の刺激には、細胞を 96 ウェルプレート (1×10<sup>4</sup> 細胞/ウェル) にプレートティングし、ヒト IL-6 (50 ng/mL; 東レ) + ヒト可溶性 IL-6R $\alpha$  (50 ng/mL; R&D システムズ)、およびマウス IL-17A (50 ng/mL; R&D システムズ) で 24 時間刺激した。細胞培養上清は ELISA 用に回収し、細胞増殖は MTT アッセイ (下記参照) で評価した。

### 16. MTT アッセイ

チアゾリルブルーテトラゾリウムブロマイドを用いて、製造元の指示に従い測定した (Sigma-Aldrich 製、東京)。

### 17. コラーゲン誘発関節炎

CIA は、C57BL/6 マウスに 200 $\mu$ g のニワトリ II 型コラーゲン (Sigma-Aldrich 製) と 250 $\mu$ g の Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin 細胞壁骨格 (BCG-CWS) を CFA で乳化したものをマウスの背中に皮内注射した。

初回注射の3週間後、200 $\mu$ g のニワトリ II 型コラーゲンと 250 $\mu$ g の CFA に乳化した BCG-CWS を含むブースター注射を尾の付け根に皮内投与した。2 回目の免疫から 21 日間、2~3 日ごとに臨床的関節炎活性を評価した。中手指節関節、中足指節関節、足関節の関節炎の重症度を以下の尺度を用いてスコア化した：0=関節炎なし、1=関節炎の程度は小さい、2=軽度の腫脹、3=中等度の腫脹、4=重度の腫脹。関節炎スコアは、後肢の関係する関節のスコアの合計であった。

## 18. 統計分析

2 群間の差の統計解析には Student の t 検定（両側検定）または Welch の t 検定を用いた。多重比較には Dunnett の検定を用いた。関節炎モデルの臨床スコアの統計解析には Wilcoxon 順位和検定を用いた。統計解析は正規分布を仮定して行った。P 値は 0.05 未満を統計的に有意とみなした。

## 結果

### 1. 感覚ニューロンは関節間の炎症の拡大において極めて重要である。

我々は以前、IL-17A と IL-6 の足関節注射によって、F759 マウスにサイトカイン誘発性関節炎と非免疫細胞誘発性関節炎を確立した (Atsumi et al., 2017; Murakami et al., 2011; Ota et al., 2020)。組織学的解析によると、滑膜腔は肥大化した滑膜線維芽細胞によって狭くなっており、MHC クラス II+細胞や CD4+細胞などの免疫細胞が罹患関節に集積していることが示された (Murakami et al, 2011)。

このモデルでは、炎症は片側、両側の 2 通り誘導することができるため、足関節からもう一方の関節へと炎症が拡大される様子を観察することができ、どちらの足関節にサイトカインを注射しても、それぞれの関節に炎症が誘導される。

我々は炎症が拡大される経路は神経経路に依存している可能性があると考え、第 5 腰椎 (L5) 横の後根神経節 (DRG) の片側の感覚ニューロンの脱離を行い、足関節の関節炎の発症に感覚経路が関与しているかどうかを調べた。

まず F759 マウスの両足関節に IL-17A と IL-6 を注射した。その後 L5DRG の片側の感覚ニューロンを脱離すると、両足関節の関節炎の発症が抑制された (図 1、A および B)。

次に、片側の炎症がもう片側の炎症の引き金になるかどうかを調べた。まず F759 マウスの左足首にサイトカインを注射し、右足首関節の局所細胞の状態を調べた。その結果、サイトカイン注入 3 日後には、CD11b+MHC クラス II+細胞が増加していたが、T 細胞は増加していなかった (図 1C)。さらに対側の関節におけるサイトカイン誘発性関節炎を調べるために両群とも左足首にサイトカインを注射し、右足首には少量のサイトカインを注射した。その結果、右関節の臨床スコアは、左関節への IL-17A と IL-6 の注射によって増強された (図 1D)。このように、両側の関節炎症の発症には感覚経路が関与しているということが判明した。

次に、炎症誘発後の神経活性化を調べた。IL-17A と IL-6 の注射により、同側の L5 DRG で c-fos の発現が誘導されたが、同側の L3、L4、L6 DRG では誘導されなかった (図 1E)。

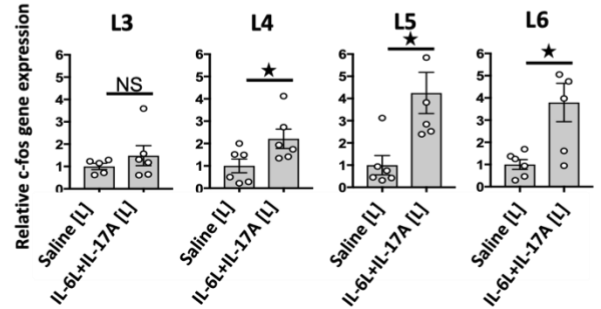
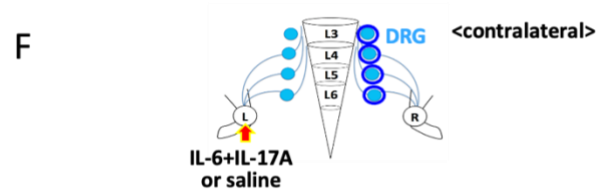
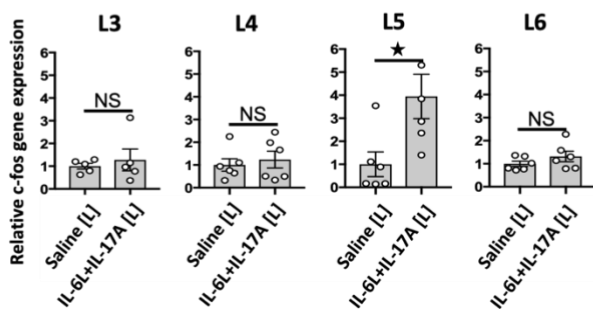
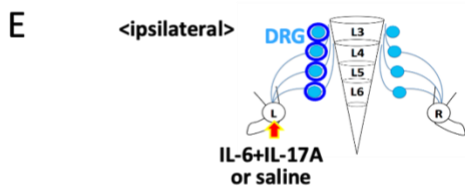
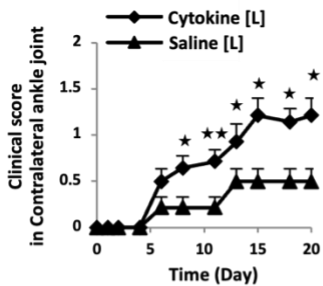
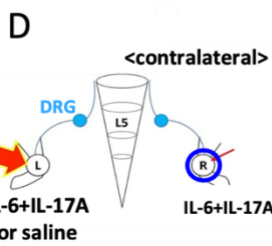
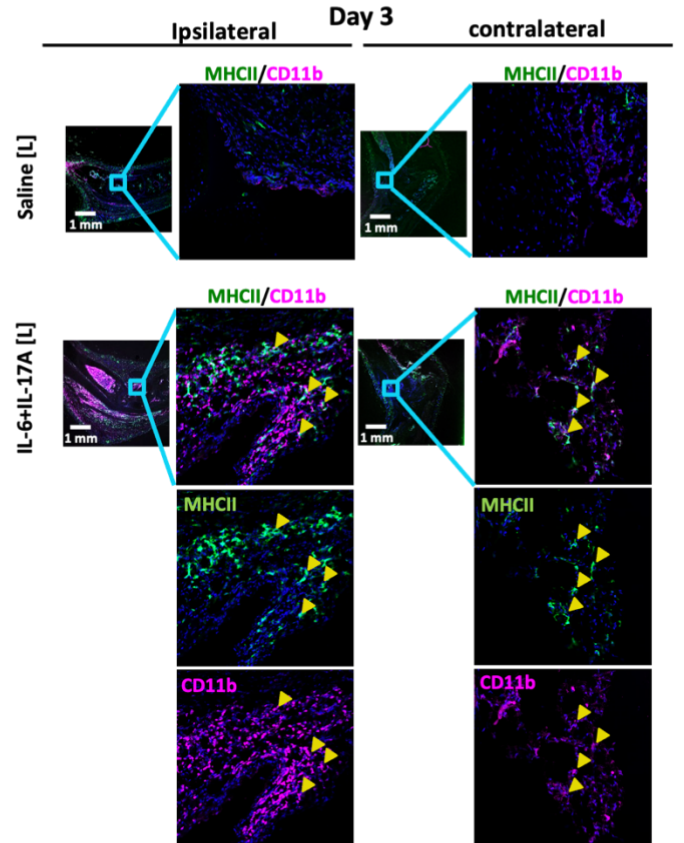
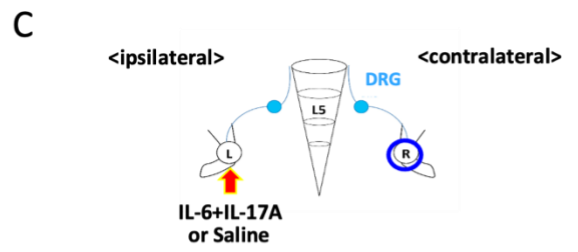
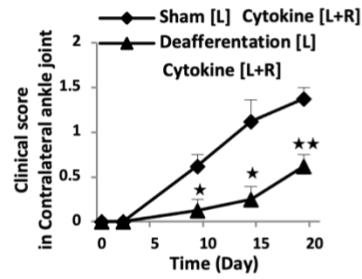
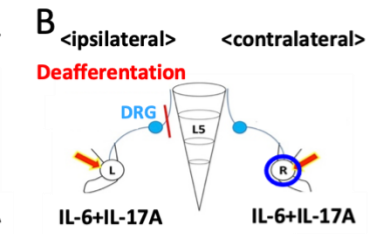
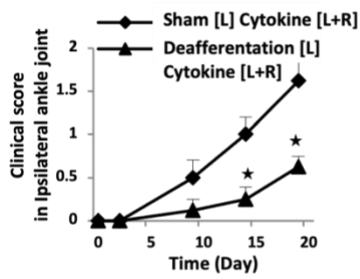
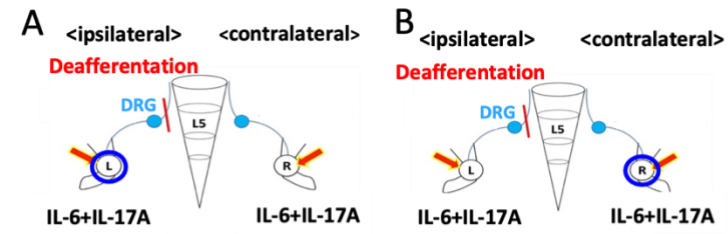
足関節と DRG の直接的な神経接続は、逆行性神経トレーサーである FLUORO-GOLD (FG) を右関節に注入して検出することで確認した。

その結果、FG+細胞の 90.9%が Nav1.8 陽性、TRPV1 陰性の神経細胞であった。

Nav1.8 と TRPV1 の二重陽性細胞は、L5 DRG の FG+細胞の 9.1%であった。

同様に、サイトカイン注入後の対側の L5 DRG では、活性化した c-fos+感覚ニューロンは Nav1.8+TRPV1-または Nav1.8+TRPV1+であった (図 1、G および H)。このよ

うに、片側の足関節の炎症は同側の L5 DRG で Nav1.8+TRPV1-の感覚活性化を誘導し、その神経シグナルはその後、対側の L4-L6 DRG の Nav1.8+TRPV1+/感覚神経ニューロンに伝わり、両側の足関節の炎症に感覚神経の回路が関与していることが示された。





**図 1. 両側の足関節の炎症には活性化した神経回路が関与している。**

(A および B) 左側の L5 DRG で脱神経または偽手術を行った F759 マウスの左 (A) および右 (B) 足首の平均臨床スコア $\pm$ SEM を示す。IL-17A と IL-6 (各 0.1 $\mu$ g) を 0、1、2 日目に両足首に注射した (各群 n=4)。

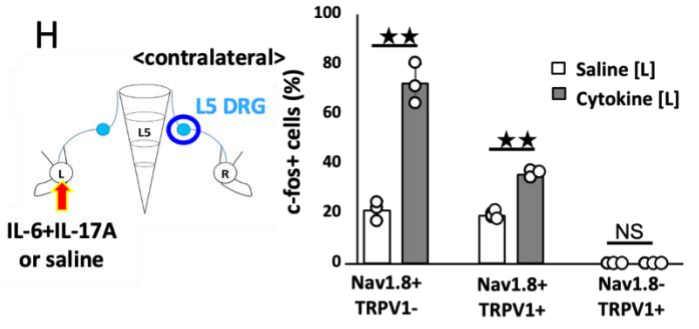
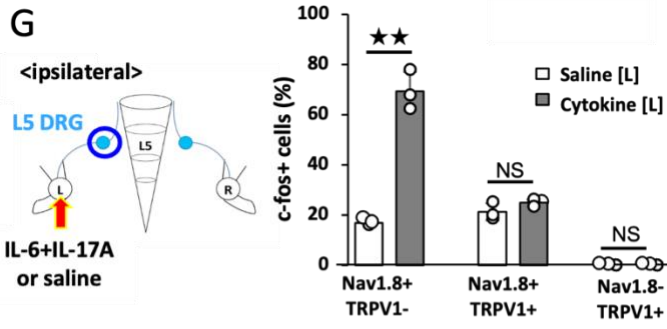
(C) IL-17A と IL-6 または生理食塩水を注射して 3 日目の F759 マウスの足関節の CD11b+MHCII+細胞染色図を示す。

IL-17A と IL-6 または生理食塩水 (各 1 $\mu$ g) を 0、1、2 日目に左足関節に注射した。色については緑 : MHC II。マゼンタ:CD11b。青色:核となっている。

矢印は CD11b+MHCII+細胞を示す。

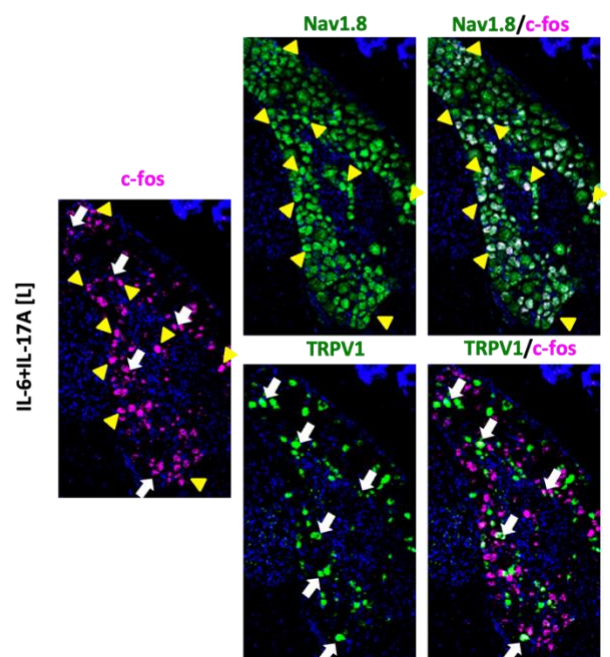
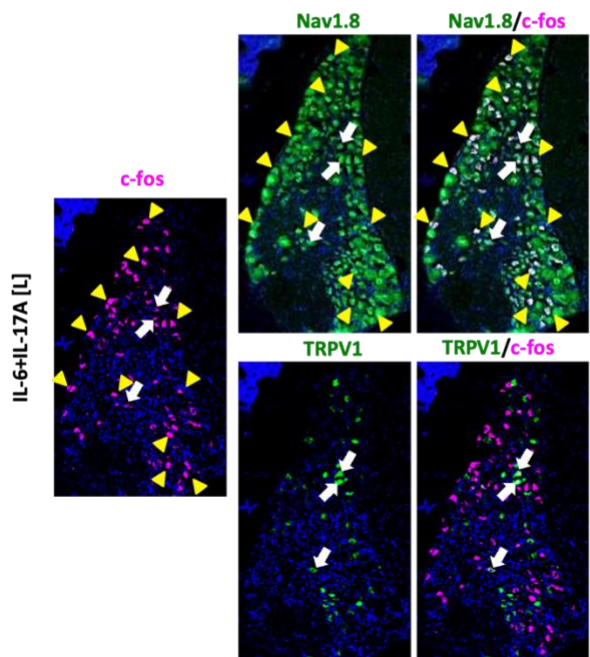
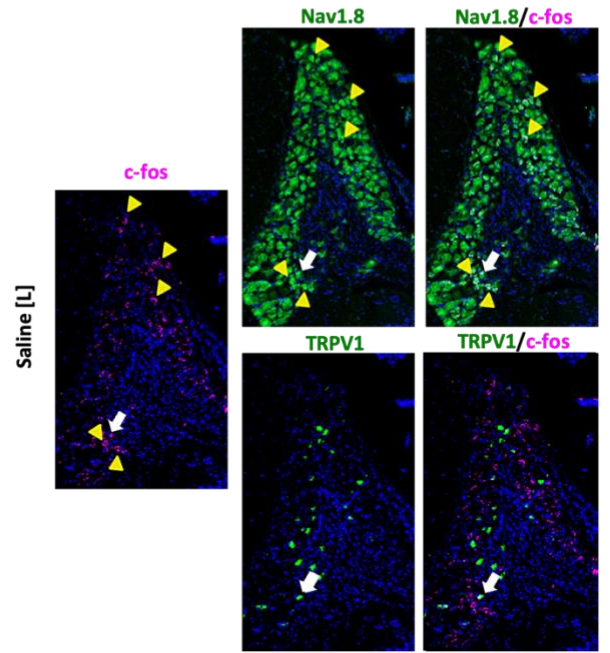
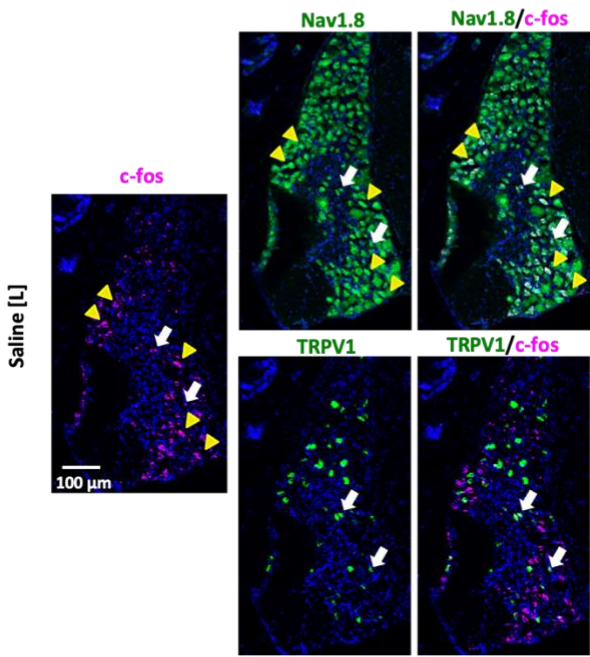
(D) 0-2 日目に右足関節に IL-17A および IL-6 を低用量 (各 0.01 $\mu$ g)、左足関節に高用量 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を注射した後の F759 マウスの右足関節の臨床スコア (各群 n=14) の平均スコア $\pm$ SEM を示す。P 値は、Wilcoxon 順位和検定を用いて算出した (★、P<0.05)。

(E と F) 0、1、2 日目に IL-17A と IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を左足関節に注射した。3 日目に real-time PCR を用いて同側 (E) または対側 (F) の L3、L4、L5、L6 DRG における c-fos 発現を調べた (各群 n=5-6)。棒グラフは平均スコア $\pm$ SEM を示す。P 値は、Wilcoxon 順位和検定を用いて算出した (★、P<0.05)。



ipsilateral L5 DRG

contralateral L5 DRG



**図 1. 両側の足関節の炎症には活性化した神経回路が関与している。**

(G と H) 0、1、2 日目に IL-17A と IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を左足関節に注射し、3 日目に同側 (G) または対側 (H) の L5 DRG で c-fos、Nav1.8、TRPV1 を染色した。

図下方に示している染色図について、マゼンタ:c-fos。緑:Nav1.8 または TRPV1。青色:核、黄色の矢頭は c-fos+Nav1.8+TRPV1-ニューロンを、白矢印は c-fos+Nav1.8+TRPV1+ニューロンを示す。

上の棒グラフは、Nav1.8+TRPV1-、Nav1.8+TRPV1+、または Nav1.8-TRPV1+ニューロンの総数に占める c-fos+細胞の割合を示す。実験は独立して 3 回行い、データは平均値 $\pm$ SEM で示した。P 値は Student's t-tests を用いて算出した (★, P < 0.05; ★★, P < 0.01; NS, not significant)。

グラフの上または左に描かれた図は、実験設定を示している。L は左足首、L5 は第 5 腰椎レベル、DRG は後根神経節、R は右足首。矢印はサイトカインまたは生理食塩水の注射を示し、青丸は関節炎を評価した足関節 (A-D) または検査した DRG (E-H) を示す。

## 2. プロエンケファリン陽性の介在ニューロンネットワークは関節間の感覚神経ニューロンとつながって炎症を拡大させる。

我々は足関節間の感覚路をつなぐ脊髄の神経回路の詳細を調べるため、単純ヘルペスウイルス 2 (HSV2) を用いて、神経の追跡をおこなった (Turner and Jenkins, 1997)。

具体的な方法として、まず片側の関節に HSV2 を注射した後、観察を行った。

その結果、HSV2 は 4 日目には注射した側の L5 DRG に存在し (図 2A)、5 日目には L5 後角に達し (図 2B)、7 日目には同じ側の胸髄 (T13) でも検出された (図 2C)。その後、10 日目には T10-T13 の対側右側で検出され (図 2D)、14 日目には対側の DRG (L4-6) で検出された (図 2E およびデータは示さず)。

これらの結果は定量的 PCR によって確認された (図 2F)。

また、電気信号が脛骨神経の神経回路の活性化を片側 (左側) から他側へ誘導するかどうかを調べた。対側 (右側) の L5 後根では興奮性電位が検出されたが (図 2G)、対側の脛骨神経では検出されなかった (図 2H)。

これらの観察から、少なくとも両方の DRG を介した両足関節間の神経接続が確認された。次に、上記により HSV2 は T10-T13 の胸髄の両側に存在したことが分かったので、関節間の感覚経路に接続する介在ニューロンの存在を調べた。方法としては胸髄下部 (T9-13) の脊髄を縦に切断し、回復期を経た後にサイトカインを注射すると、偽手術マウスでは対側の L5 DRG で c-fos の発現が誘導されたが、脊髄切断マウスではほとんど発現が認められなかった (図 2I)。このことは、T9-13 介在ニューロンが関節間の炎症を拡大させるための重要な要因であることを示唆している。

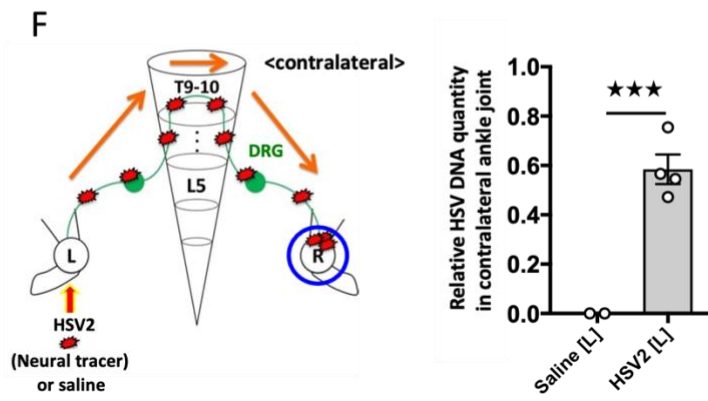
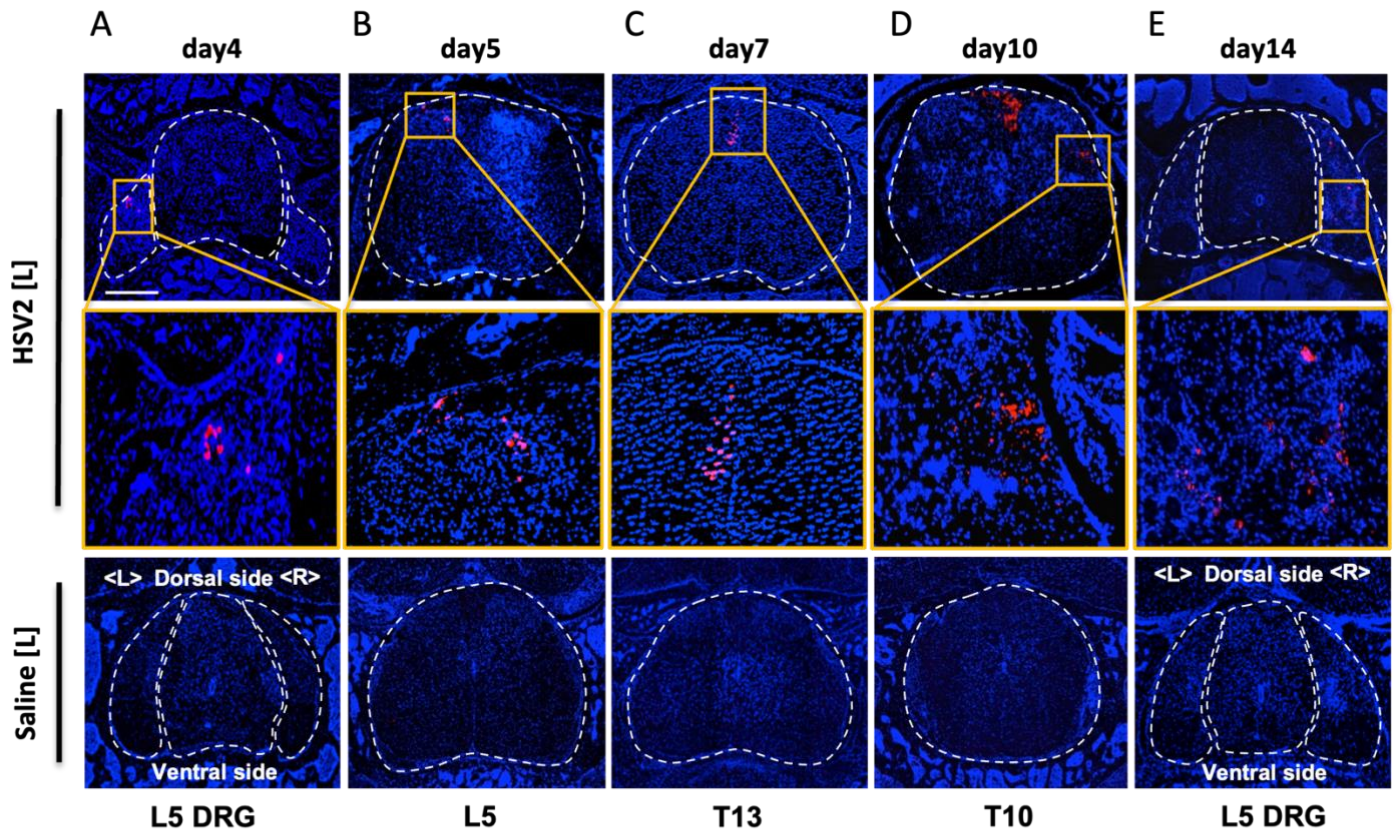
次に、我々は片側の関節にサイトカインを注射した後の脊髄の活性化を調べた。リン酸化 c-fos+ニューロンは、注射した 15 分後には主に L5 後角の注入側に存在し、30 分後には両側で活性化ニューロンが増加することが分かった (図 2J)。また、L5 脊髄の中心管周辺のいくつかのニューロンも、サイトカイン注入後に活性化した (図 2J)。

興味深いことに、活性化したニューロンは主に T13 後角の注入側に見られたが、T11-T12、L1-L4、L6 には見られなかった (図 2K)。さらに、T10 脊髄の中心管周辺のニューロンは、刺激 30 分後に活性化した (図 2L)。

これらの結果から、炎症を拡大させる神経回路は、関節間の感覚ニューロン-介在ニューロンネットワークとの結合であることが示唆された。

炎症の拡大に関与する介在ニューロンマーカーを調べるために、我々は次にプロエンケファリンやカレチニンを含むいくつかの介在ニューロンマーカーに対する抗体を用いた (Peirs et al.)。その結果、サイトカイン注入後、L5 と T13 のほとんどの c-fos+ニューロンがプロエンケファリンを発現したが、カレチニンは発現しなかった (図

2、M と N) 。したがって、プロエンケファリン陽性介在ニューロンネットワークは、関節間の感覚神経ニューロンにつながって炎症を拡大させていることが判明した。



**図 2. 足関節へのサイトカイン注射は、両側関節間の脊髄におけるプロエンケファリン陽性介在ニューロンを含む神経経路を活性化する**

(A-E) HSV2 ( $4.5 \times 10^5$  pfu) または生理食塩水を F759 マウスの左足関節に注射し、その後観察した結果を示す。

- (A) .4 日目に脊髄と L5 DRG で HSV2 を染色した結果
- (B) .5 日目に L5 で染色した結果
- (C) .7 日目に T13 で染色した結果
- (D) .10 日目に T10 で染色した結果
- (E) .14 日目に L5 DRG で染色した結果

Hoechst 33342 による核染色を青で示す。破線は脊髄と DRG の輪郭を示す。

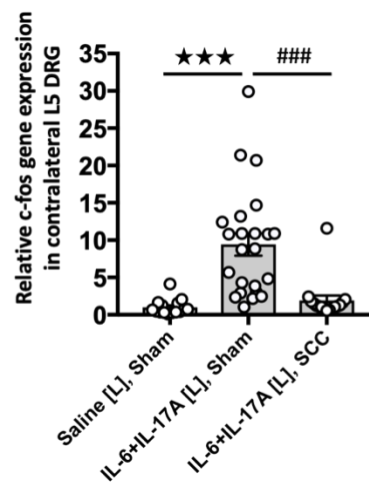
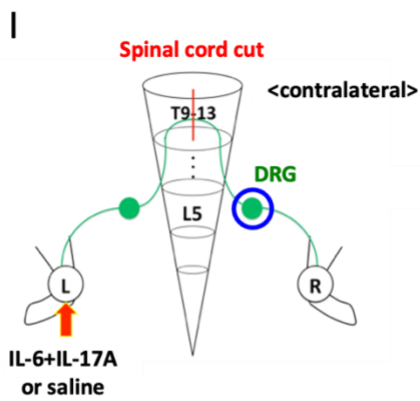
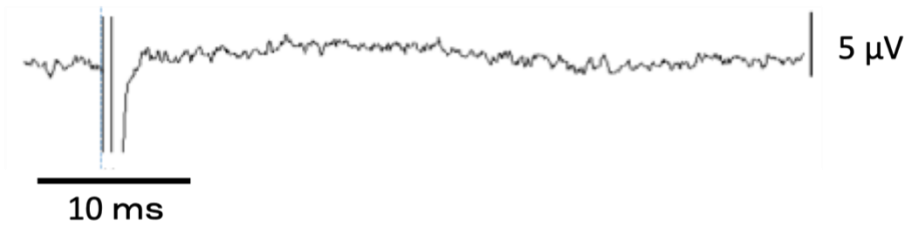
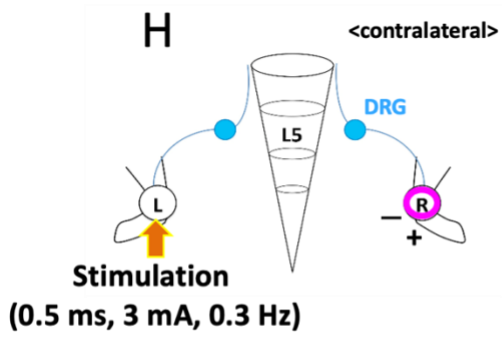
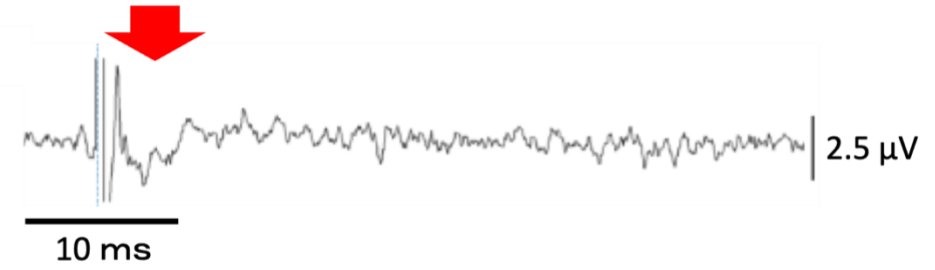
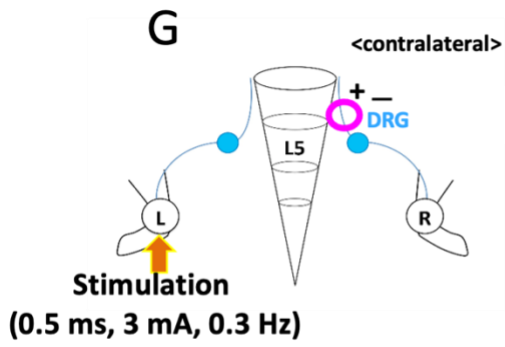
オレンジ色の枠内の拡大画像を中段に示している。

さらに生理食塩水を注射したコントロール F759 マウスの切片を下段に示している。

(F) 0 日目に HSV2 ( $4.5 \times 10^5$  pfu) または生理食塩水を F759 マウスの左足関節に注射し、その後 20 日目に real-time PCR 法で対側 (右) の足関節の HSV2 DNA を検出した (各群  $n = 2-4$ ) データを示す。棒グラフは平均値  $\pm$  SEM で示した。

P 値は Student の t 検定 (A-C) および Wilcoxon 順位和検定 (D) を用いて算出した (★および#,  $P < 0.05$ ; ★★および##,  $P < 0.01$ ; ★★★,  $P < 0.001$ ; NS, not significant)。

L は左足首、L5 は第 5 腰椎レベル、T9~T13 は第 9~13 胸髄、DRG は後根神経節、R は右足首。矢印は HSV2、サイトカインまたは生理食塩水の注射を示す。青丸は検査した足関節または DRG を示す。





**図 2. 足関節へのサイトカイン注射は、両側関節間の脊髄におけるプロエンケファリン陽性介在ニューロンを含む神経経路を活性化する**

(G および H) 左脛骨神経に電気刺激 (0.5ms、3mA、0.3Hz) を加えた結果を示す。刺激を加えた結果、電気信号は対側 (右側) の後根 (G) または脛骨神経レベル (H) で検出された (各群 n=5)。

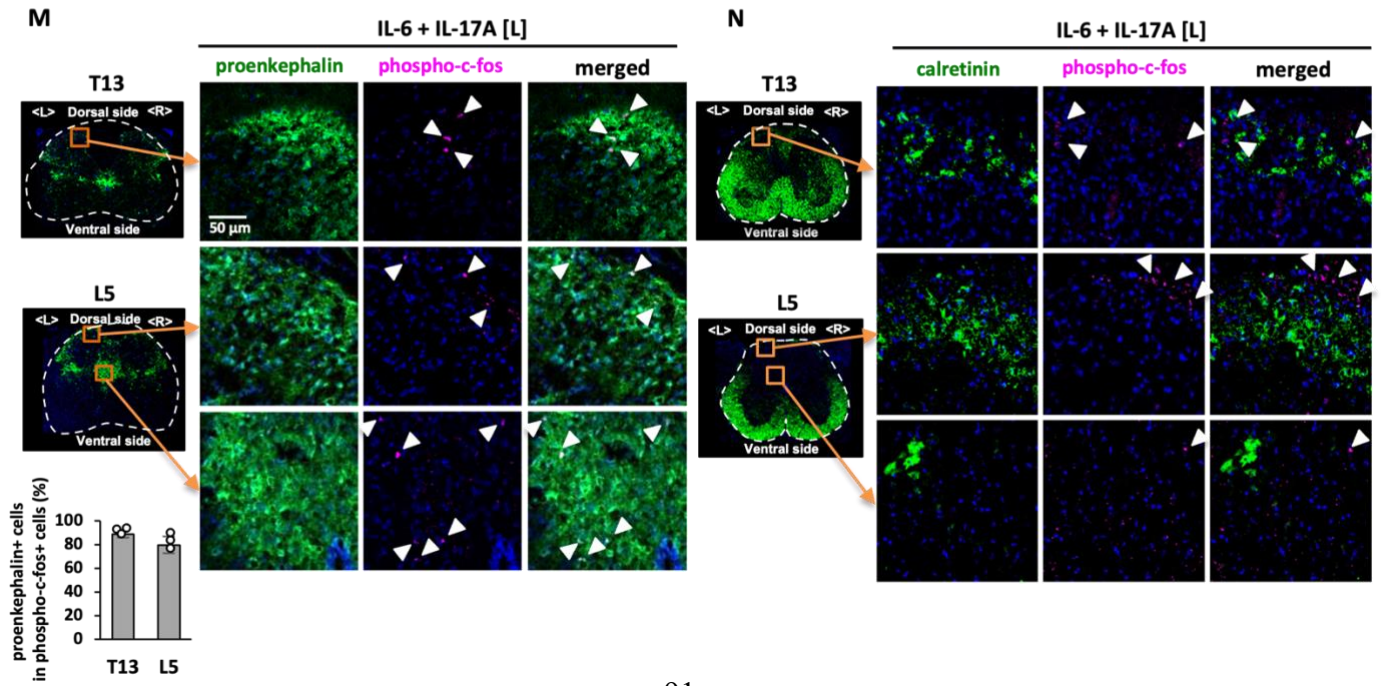
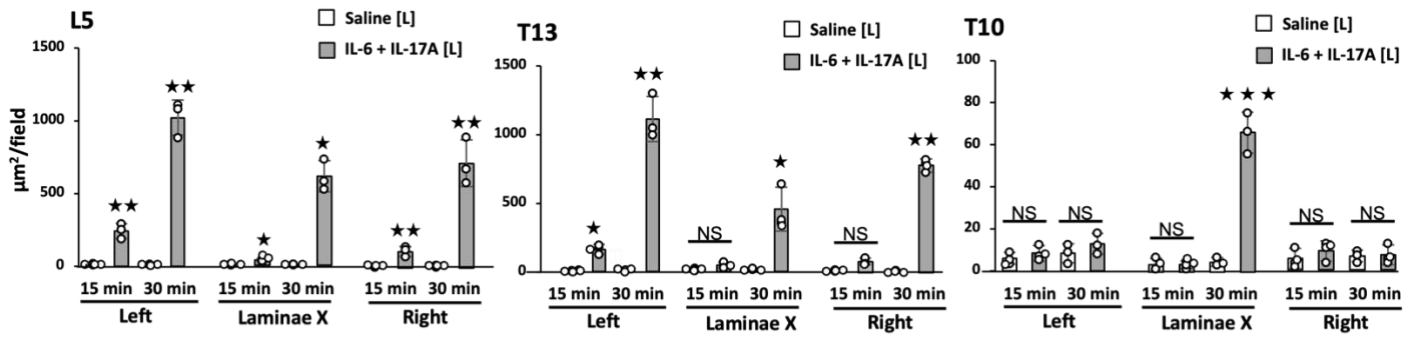
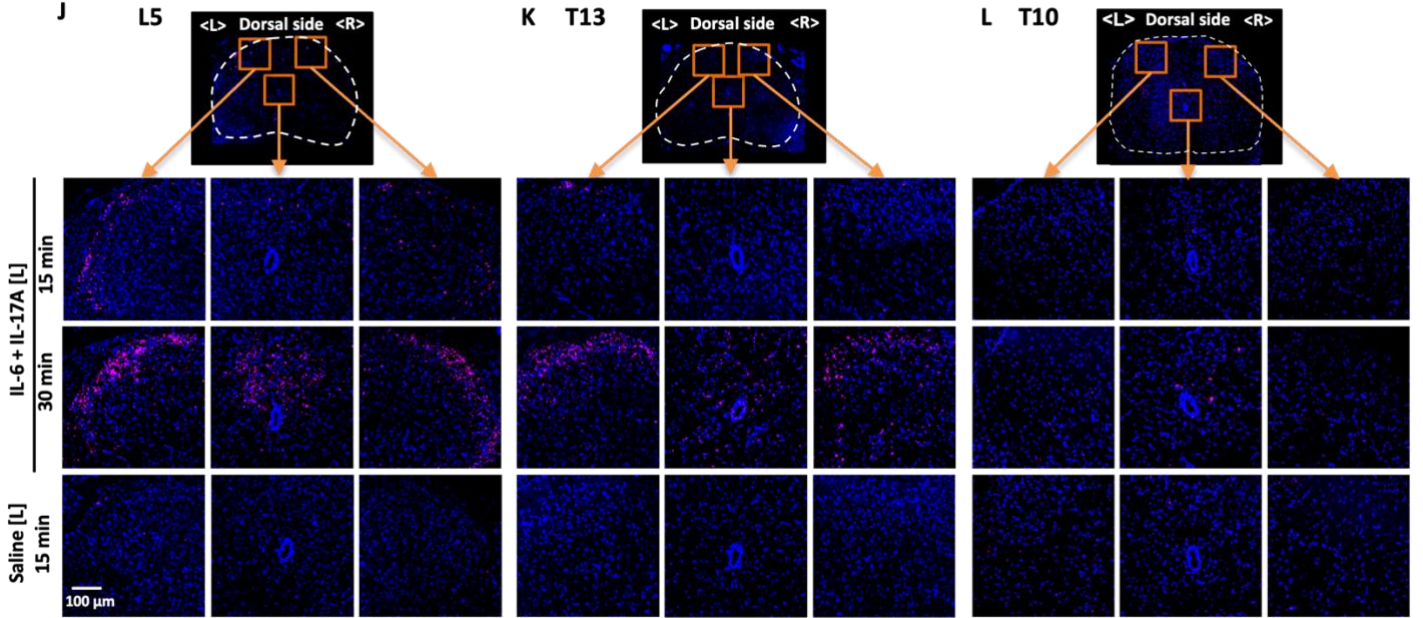
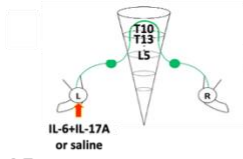
赤矢印は検出された電気生理学的信号を示す。

陽性対照として、記録側 (右) の神経に刺激を加えたところ、後根および坐骨神経レベルで複合活動電位が検出された (図示せず)。

(I) 脊髄切断 (SCC、T9-T13) または偽手術を受けた F759 マウスにおける右 L5 DRG の c-fos 発現を棒グラフで示す。IL-17A と IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を 0、1、2 日目に左足首に注射し、3 日目にリアルタイム PCR 法で c-fos 発現を調べて、その平均値 $\pm$ SEM を棒グラフとして示した (各群 n=15-23)。

L は左足首、L5 は第 5 腰椎レベル、T9~T13 は第 9~13 胸髄、DRG は後根神経節、R は右足首。矢印は HSV2、サイトカインまたは生理食塩水の注射を示す。青丸は検査した足関節または DRG を示す。

P 値は Student の t 検定 (A-C) および Wilcoxon 順位和検定 (D) を用いて算出した (★および#, P < 0.05; ★★および##, P < 0.01; ★★★, P < 0.001; NS, not significant)。



**図 2. 足関節へのサイトカイン注射は、両側関節間の脊髄におけるプロエンケファリン陽性介在ニューロンを含む神経経路を活性化する**

(J-L)IL-17A と IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を 0 日目に F759 マウスの左足関節に注射し、最後に注射した 15 分後または 30 分後に(J)L5 脊髄、(K)T13 脊髄、(L)T10 脊髄におけるリン酸化 c-fos 発現を解析した。

染色した図について、マゼンタはリン酸化 c-fos、青は核を示す。さらに、1 フィールド (225,625 $\mu$ m<sup>2</sup>) あたりのリン酸化 c-fos 陽性領域を定量して、平均値 $\pm$ SEM を棒グラフに示した (各群 n=3)。

(M-N) IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を 0 日目に F759 マウスの左足関節に注射し、その後、最後の注射から 15 分後に L5 および T13 脊髄におけるリン酸化 c-fos および (M) プロエンケファリンまたは (N) カレチニンの発現を解析した。

染色した図については緑はプロエンケファリン (M) またはカレチニン (N) である。マゼンタはリン酸化 c-fos。青は核を示。矢印はリン酸化 c-fos シグナルを示す。L は左足首、L5 は第 5 腰椎レベル、T9~T13 は第 9~13 胸髄、DRG は後根神経節、R は右足首。矢印は HSV2、サイトカインまたは生理食塩水の注射を示す。青丸は検査した足関節または DRG を示す。

P 値は Student の t 検定 (A-C) および Wilcoxon 順位和検定 (D) を用いて算出した (★および#, P < 0.05; ★★および##, P < 0.01; ★★★, P < 0.001; NS, not significant)。

### 3. 同側の足関節の炎症は反対側の足関節の ATP を増加させ、炎症が発症するトリガーとなる

上記の結果から、我々は反対側の足関節における神経伝達物質を調べた。

関節炎の発症には ATP、サブスタンス P、CGRP、ブラジキニンなどの多くの神経伝達物質が関係していると考えられている (Grassel, 2014; Larsson et al., 1991; Miller et al., 2002; O'Connor et al., 2004; Xie et al., 2014)。

実際、戦術の実験で同側の関節で炎症が誘発された後、ATP が反対側の関節で増加していることが分かった (図 3A)。同様に、ATP 合成酵素の発現は、刺激後に反対側関節の Nav1.8+ニューロンで増加した (図 3B)。

さらに、A438079 (選択的 P2RX7 アンタゴニスト) の注射により、対側関節における NF- $\kappa$ B の活性化、IL-6 および CCL2 の発現が抑制され (図 3C)、A438079 を対側の足関節に注射すると、関節炎の発症が抑制された (図 3D)。

これらの結果は、同側の足関節における炎症が ATP を増加させ、対側の関節に関節炎を誘発することを示唆している。

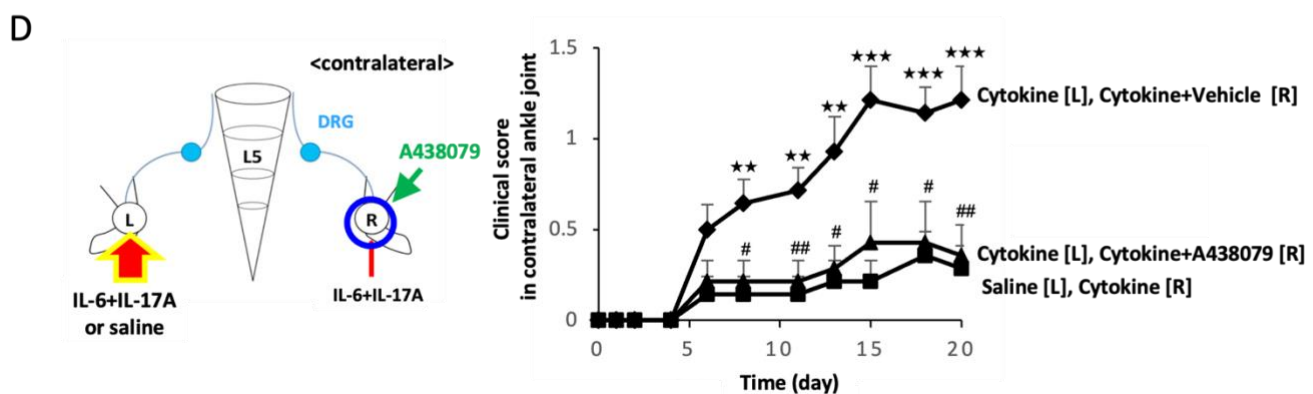
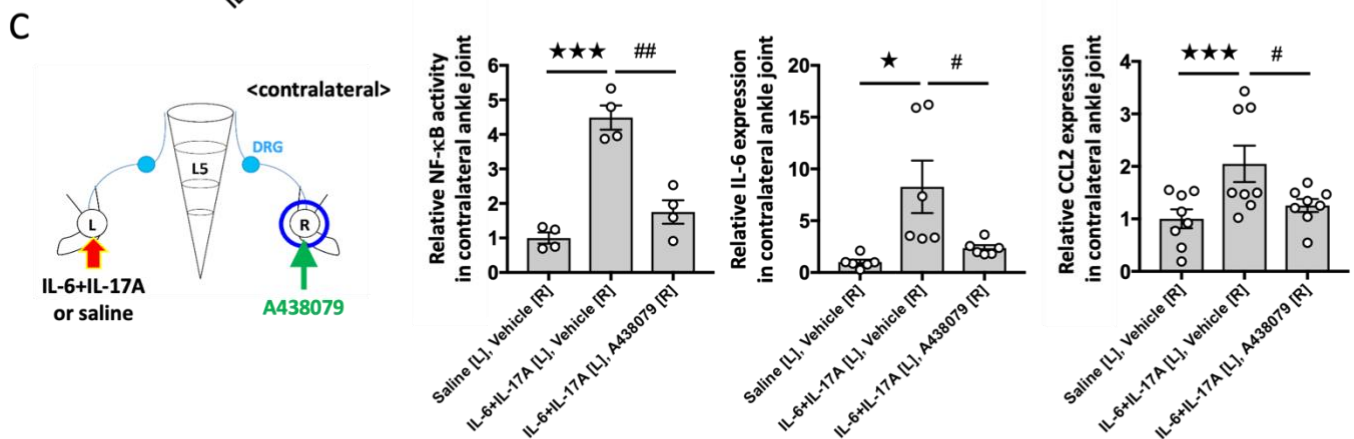
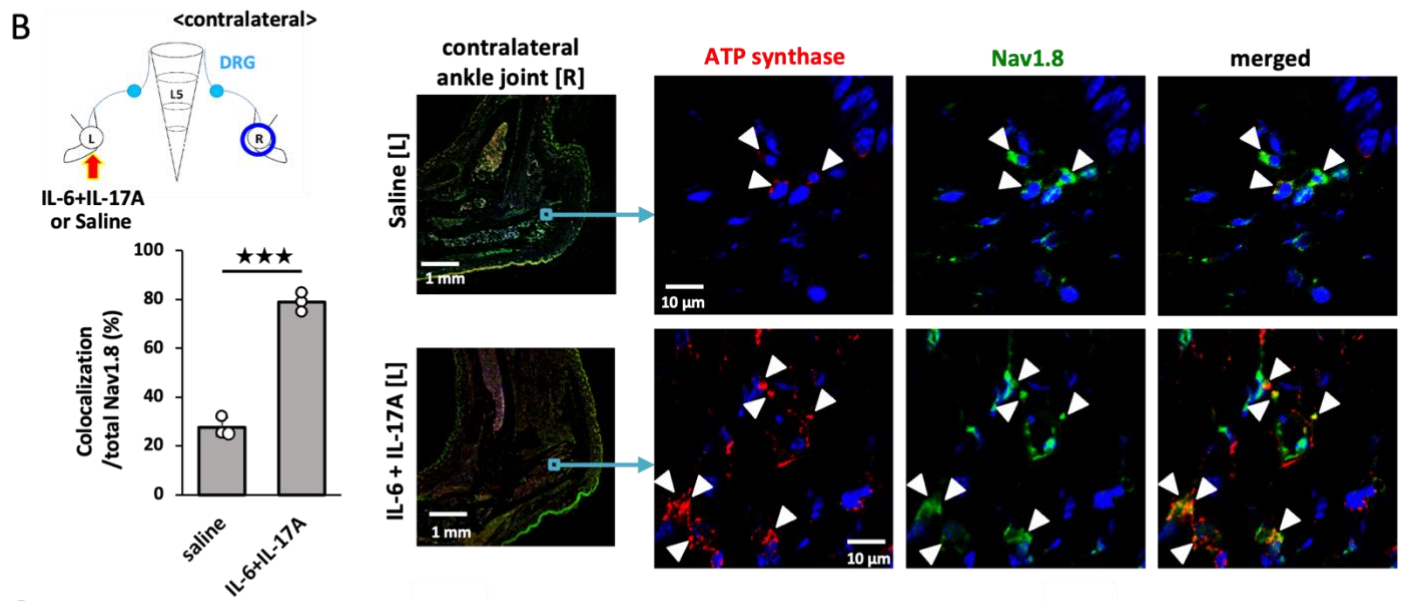
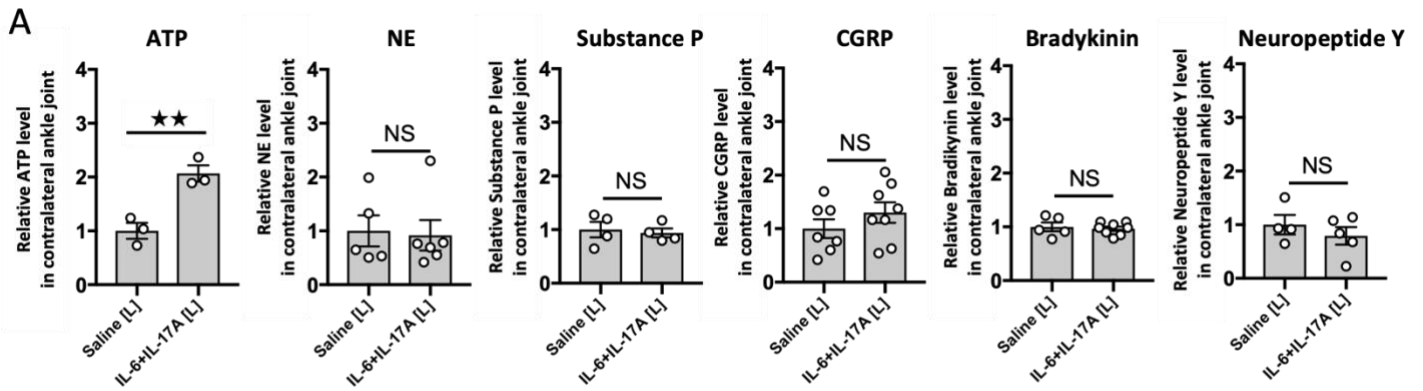


図 3.非免疫系細胞由来の ATP は、IL-17A および IL-6 サイトカインシグナルをを介して神経を活性化させ、遠隔炎症を誘導する。

(A)IL-17A と IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を 0、1、2 日目に F759 マウスの左足関節に注射し、その後、ATP (各群 n=3)、ノルエピネフリン (NE) (各群 n=5-6) を分析した、サブスタンス P (各群 n=4)、CGRP (各群 n=7-8)、ブラジキニン (各群 n=5-8)、および神経ペプチド Y (各群 n=4-5) の発現を 3 日目に対側 (右) の足関節で分析した。グラフは、生理食塩水注射群に対する相対発現量を示し、平均値 $\pm$ SEM を棒グラフとして示した。

(B) IL-17A と IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を F759 マウスの左足関節に 0、1、2 日目に注射し、3 日目に対側 (右) の足関節で ATP 合成酵素と Nav1.8 の免疫染色を行った。ATP 合成酵素と Nav1.8 の共局在は Z-stack 画像を用いて定量した (各群 n=3)。棒グラフは Nav1.8 の全シグナル量に占める共局在化シグナル量の割合を示す。染色については赤:ATP 合成酵素、緑:Nav1.8。青:核を示す。

((C) IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を、0、1、2 日目に F759 マウスの左足関節に注射し、対側 (右) 足関節に A438079 もしくは A438079 溶媒を注射した。

その後 3 日目に対側足関節における NF- $\kappa$ B 活性化、IL-6 および CCL2 レベルを解析して平均値 $\pm$ SEM を棒グラフとして示した (各群 n=4-6)。

(D) IL-17A と IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を左足関節に注射し、低用量の IL-17A と IL-6 (各 0.01 $\mu$ g) と A438079 溶媒、もしくは IL-17A と IL-6 (各 0.01 $\mu$ g) と A438079 (10 $\mu$ g)、もしくは IL-17A と IL-6 (各 0.01 $\mu$ g) を F759 マウスの右足関節に 0、1、2 日目に注射した後、右足関節の臨床的関節炎スコアを評価し、平均スコア $\pm$ SEM を示した。(各群 n=4-5)。

P 値は Student の t 検定 (A-C) および Wilcoxon 順位和検定 (D) を用いて算出した (★および#, P < 0.05; ★★および##, P < 0.01; ★★★, P < 0.001; NS, not significant)。

#### 4. 反対側の脚関節における ATP 誘導には、関節間の感覚ニューロン-介在ニューロンの相互作用が重要である。

次に、我々は脚関節間の機能的な神経接続について調べるための実験を行った。具体的にはサイトカインを注射した側の脚の L5 DRG の感覚ニューロンの脱離 (図 3E)、T9-13 脊髄の切断 (図 3F)、対側の L4-L6 DRG の感覚神経の脱離 (図 3G) である。

これらから得られた結果は、脚関節間に機能的な感覚ニューロン-介在ニューロン結合が存在し、反対側の脚関節における ATP を誘導することを示唆している。

#### 5. 局所における ATP は同側の関節炎症によって誘導され、反対側の関節での炎症を発症させる神経伝達物質として機能する。

上述の結果を受けて、我々は同側の関節炎症がどのように感覚ニューロンを活性化するかを調べた。以前、我々はサイトカイン刺激により局所血管から誘導される細胞外 ATP が脳内の神経経路の活性化を促進することを見出していた (Arima et al., 2017) ことから、ATP に注目した。

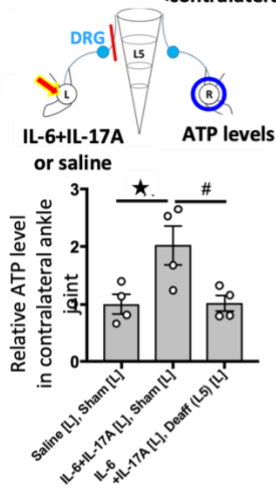
その結果、滑膜細胞における IL-17A および IL-6 刺激後の ATP 濃度は、in vitro での NF- $\kappa$ B 活性化に依存した形で増加していることが分かった (図 3H)。さらに、ATP 濃度は I 型コラーゲン陽性非免疫細胞に依存した形でサイトカイン注射後に足関節で有意に増加した (図 3I)。一方の足関節に IL-6 と IL-17A に加え A438079 を注射すると、L5 DRG ニューロンの神経活性化が抑制され (図 3J)、他方の関節では ATP 濃度の上昇が抑制された (図 3K)。さらに、一方の足関節に ATP を注射すると、対側の関節の ATP 濃度が上昇した (図 3L)。

次に我々は ATP シグナルを遮断することで、サイトカインを注射した関節で炎症の拡大が抑制されるかどうかを調べた。

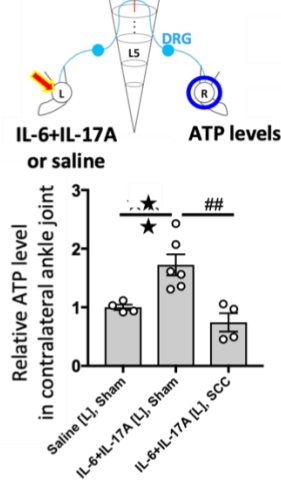
F759 マウスにサイトカインを注射したのと同じ関節に A438079 を注射すると、関節炎の発症が抑制された (図 3M)。ここで重要なことは、A438079 の同側注射により、同側、反対側両方の関節炎の発症が抑制されたことである (図 3、N および O)。

このように、I 型コラーゲン陽性非免疫細胞におけるサイトカイン刺激は、脚関節の感覚経路を活性化する ATP 発現を増加させ、炎症を拡大させるということが分かった。

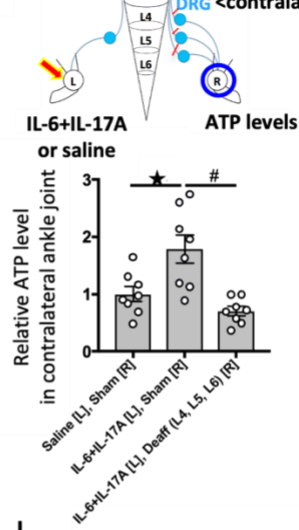
**E** Deafferentation <contralateral>



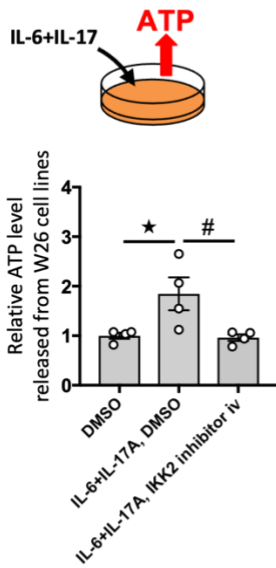
**F** Spinal cord cut <contralateral>



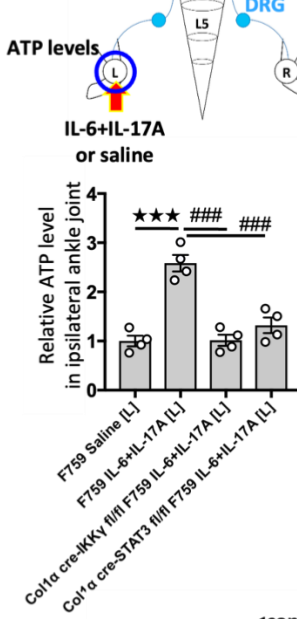
**G** Deafferentation <contralateral>



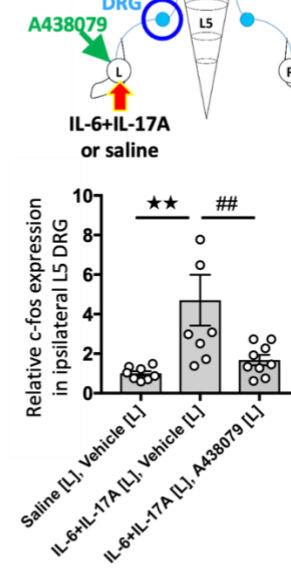
**H** W26 (Synovial fibroblasts)



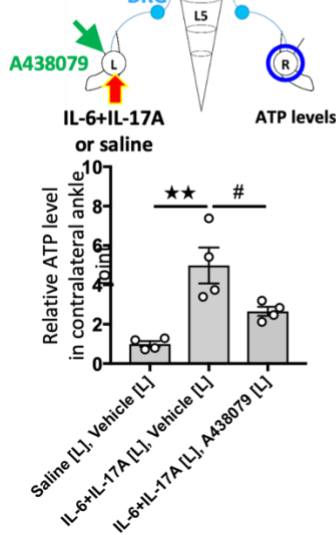
**I** <ipsilateral>



**J** <ipsilateral>



**K** <contralateral>



**L** <contralateral>

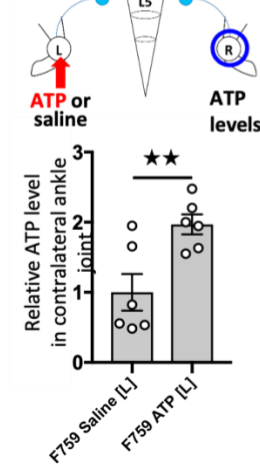




図 3.非免疫系細胞由来の ATP は、IL-17A および IL-6 サイトカインシグナルを介して神経を活性化させ、遠隔炎症を誘導する。

(E) 左側の L5 DRG を脱離 (Deaff) または偽手術 (Sham) した F759 マウスの左足関節に、IL-17A と IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を術後 0 から 2 日目に注射し、その後 ATP アッセイキットを用いて 3 日目に対側 (右側) の足関節の ATP レベルを解析した平均値 $\pm$ SEM を棒グラフとして示した。(各群 n=4)。

(F) T9-13 脊髄を切断 (SCC) または偽手術 (Sham) を施した F759 マウスの左足関節に IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を術後 0 から 2 日目に注射し、3 日目に対側 (右) 足関節の ATP レベルを解析し、平均値 $\pm$ SEM を棒グラフとして示した (各群 n=4~6)。

(G) 右側の L4-L6 DRG を脱離 (Deaff) または偽手術 (Sham) した F759 マウスの左足関節に IL-17A と IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を、術後 0 から 2 日目に注射し、3 日目に対側 (右側) の足関節の ATP レベルを解析し、平均値 $\pm$ SEM を棒グラフとして示した (各群 n=8)。

(H) W26 滑膜線維芽細胞を 3 群に分けて培養実験を行った。具体的には

1. 培養液に溶媒 (DMSO) のみ添加した群、
2. ヒト IL-6 (50ng/mL) + 可溶性 IL-6R $\alpha$  (50ng/mL) およびマウス IL-17A (50ng/mL) で刺激し、IKK2 阻害剤 IV (5 $\mu$ M) を加えた群、
3. ヒト IL-6 (50ng/mL) + 可溶性 IL-6R $\alpha$  (50ng/mL) およびマウス IL-17A (50ng/mL) で刺激し、溶媒 (DMSO) を加えた群に分類した。

その後培養上清を回収し、ATP アッセイキットを用いて評価した結果を示す (各群 n=4)。

(I) IF759 マウス、F759/Coll $\alpha$ -cre IKK $\gamma$ flox/flox マウス、および F759/Coll $\alpha$ -cre STAT3flox/flox マウスの左足関節に IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を 0 から 2 日目に注射し、次いで 3 日目に同側 (左側) 足関節の ATP 濃度を分析し、平均値 $\pm$ SEM を棒グラフとして示した。(各群 n=4)。

(J) F759 マウスを手術後 3 群に分けて実験を行った結果を示す。

1. 0 から 2 日目に左足関節に生理食塩水と P2RX7 阻害剤 A438079 の溶媒を注射した群
2. 0 から 2 日目に左足関節に IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) と P2RX7 阻害剤 A438079 の溶媒を注射した群
3. 0 から 2 日目に左足関節に IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) と P2RX7 阻害剤 A438079(10 $\mu$ g)を注射した群に分け、3 日目に同側 (左側) L5 DRG における c-fos 発現を解析し平均値 $\pm$ SEM を棒グラフとして示した (各群 n=8~9)。

(K) F759 マウスを手術後 3 群に分けて実験を行った結果を示す。

1. 0 から 2 日目に左足関節に生理食塩水と P2RX7 阻害剤 A438079 の溶媒を注射した群

2. 0 から 2 日目に左足関節に IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) と P2RX7 阻害剤 A438079 の溶媒を注射した群

3. 0 から 2 日目に左足関節に IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) と P2RX7 阻害剤 A438079(10 $\mu$ g)を注射した群に分け、

3 日目に対側 (右) 足関節の ATP 濃度を解析し平均値 $\pm$ SEM を棒グラフとして示した (各群 n=4)。

(L) 0 から 2 日目に F759 マウスの左足関節に ATP (2 $\mu$ g) または生理食塩水を注射し、3 日目に対側 (右) 足関節の ATP 濃度を解析した結果を平均値 $\pm$ SEM を棒グラフとして示した (各群 n=6)。

P 値は Student の t 検定 (A-C) および Wilcoxon 順位和検定 (D) を用いて算出した (★および#, P < 0.05; ★★および##, P < 0.01; ★★★, P < 0.001; NS, not significant)。

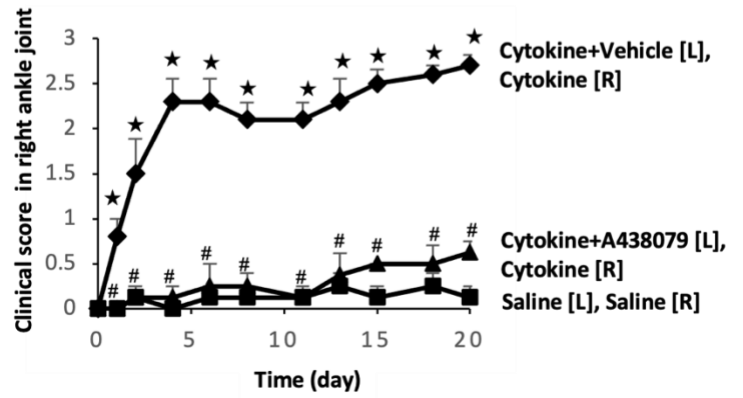
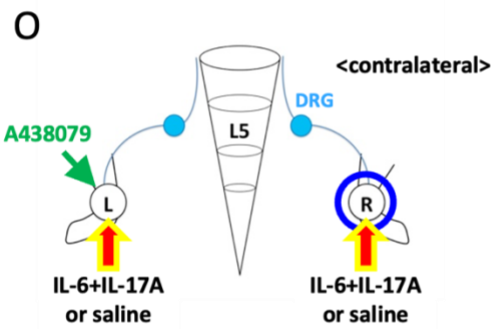
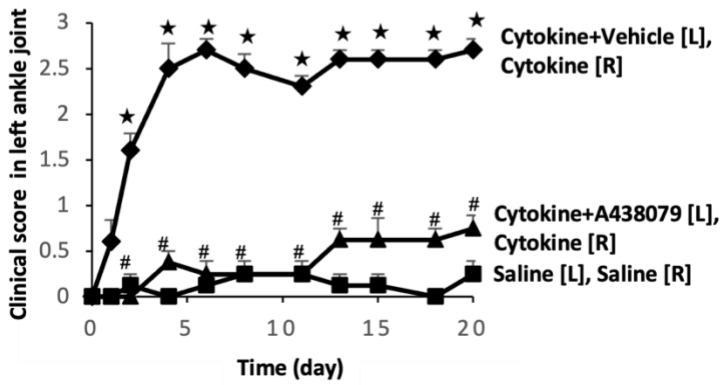
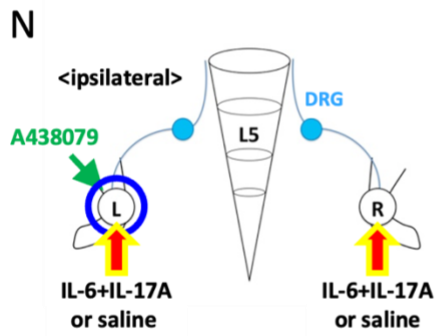
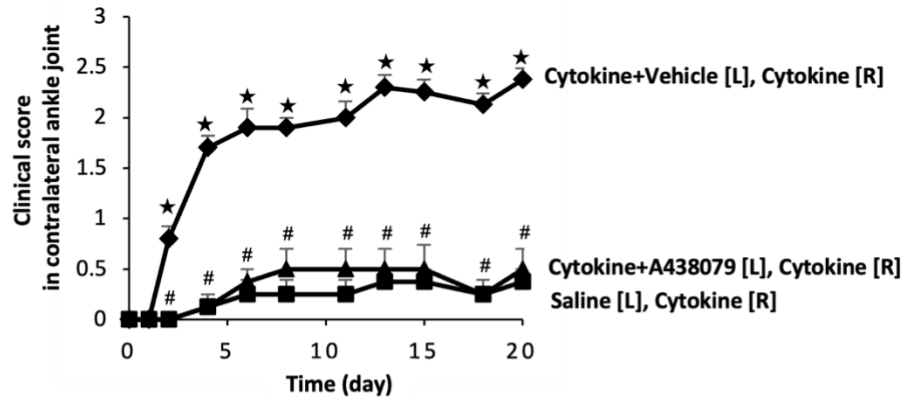
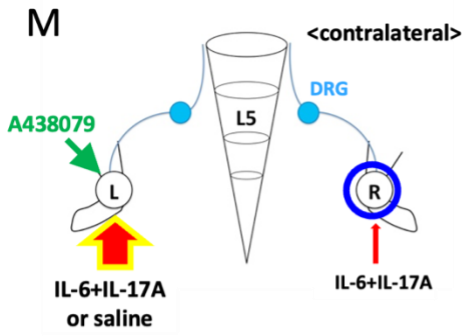


図 3.非免疫系細胞由来の ATP は、IL-17A および IL-6 サイトカインシグナルを介して神経を活性化させ、遠隔炎症を誘導する。

(M) F759 マウスを手術後 3 群に分けて実験を行った結果を示す。

1. 0 から 2 日目に左足関節に生理食塩水、右足関節に IL-17A および IL-6 (各 0.01 $\mu$ g) を注射した群
2. 0 から 2 日目に左足関節に IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) と P2RX7 阻害剤 A438079 の溶媒、右足関節に IL-17A および IL-6 (各 0.01 $\mu$ g) を注射した群
3. 0 から 2 日目に左足関節に IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) と P2RX7 阻害剤 A438079(10 $\mu$ g)、右足関節に IL-17A および IL-6 (各 0.01 $\mu$ g) を注射した群に分け、F759 マウスの右足関節の臨床的関節炎スコアを評価し、平均スコア $\pm$ SEM を示した (各群 n = 14) 。

(N および O) F759 マウスを手術後 3 群に分けて実験を行った結果を示す。

1. 0 から 2 日目に両足関節に生理食塩水を注射した群
2. 0 から 2 日目に両足関節に IL-17A および IL-6 (各 0.1 $\mu$ g) を、左足に P2RX7 阻害剤 A438079 の溶媒を注射した群
3. から 2 日目に両足関節に IL-17A および IL-6 (各 0.1 $\mu$ g) を、左足に P2RX7 阻害剤 A438079(10 $\mu$ g)を注射した群に分け、F759 マウスの右足関節の臨床的関節炎スコアを評価し、平均スコア $\pm$ SEM を示した (各群 n = 14) 。

P 値は Student の t 検定 (A-C) および Wilcoxon 順位和検定 (D) を用いて算出した (★および#, P < 0.05; ★★および##, P < 0.01; ★★★, P < 0.001; NS, not significant) 。

## 6. ATP は NF- $\kappa$ B の活性化によって分泌され、反対側の関節では重要な NF- $\kappa$ B 刺激因子となる

免疫細胞の機能に対する ATP と P2RX7 の関係の重要性はすでに報告されており (Labasi et al., 2002)、我々はここで、感覚ニューロン、内皮細胞、線維芽細胞などの非免疫細胞に対する ATP-P2RX7 の影響を調べた。

その結果、I 型コラーゲン陽性非免疫系細胞の NF- $\kappa$ B または STAT3 シグナルを欠損させた F759 マウスでは、片側の関節に ATP を注入しても、対側の関節の ATP は増加しなかった (図 3P)。このことは、IL-6 アンブが反対側の関節の ATP の増加に重要であることを示唆している。

また、同側関節をサイトカインで刺激後に対側関節の滑膜線維芽細胞や内皮細胞を含むビメンチン陽性細胞において NF- $\kappa$ B と STAT3 分子がリン酸化されていた (図 3Q)。

加えて、A438079 による P2RX7 シグナルの遮断は、対側の ATP 増加を抑制し (図 3R)、P2RX7 はサイトカイン刺激の有無に関わらず、Nav1.8+ニューロンと同様にビメンチン陽性細胞および CD31+細胞で発現した (図 3S)。

これらの結果は、反対側関節の滑膜線維芽細胞と内皮細胞は同側でサイトカイン刺激をした際に生じる ATP に反応する細胞であることを示唆している。

したがってこれらの非免疫細胞は、反対側関節の IL-6 アンブに依存した形で、IL-6 と CCL2 を分泌し、さらに ATP を分泌して、炎症がより増強していくことが考えられる。

さらに我々は前述の F759 モデルで得られた知見を従来の RA モデルに適用できるかどうかを検討した結果、コラーゲン誘発関節炎 (CIA) でも類似したメカニズムが見られることを発見した。従って、サイトカイン誘発関節炎モデルで同定された感覚ニューロン-介在ニューロン経路は野生型マウスにも存在し、CIA モデルにおける両足関節炎症の病態形成に寄与している。

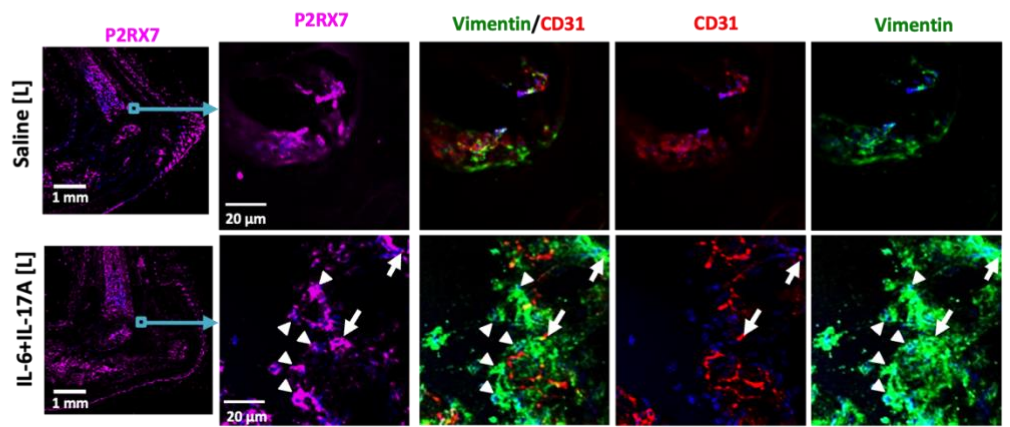
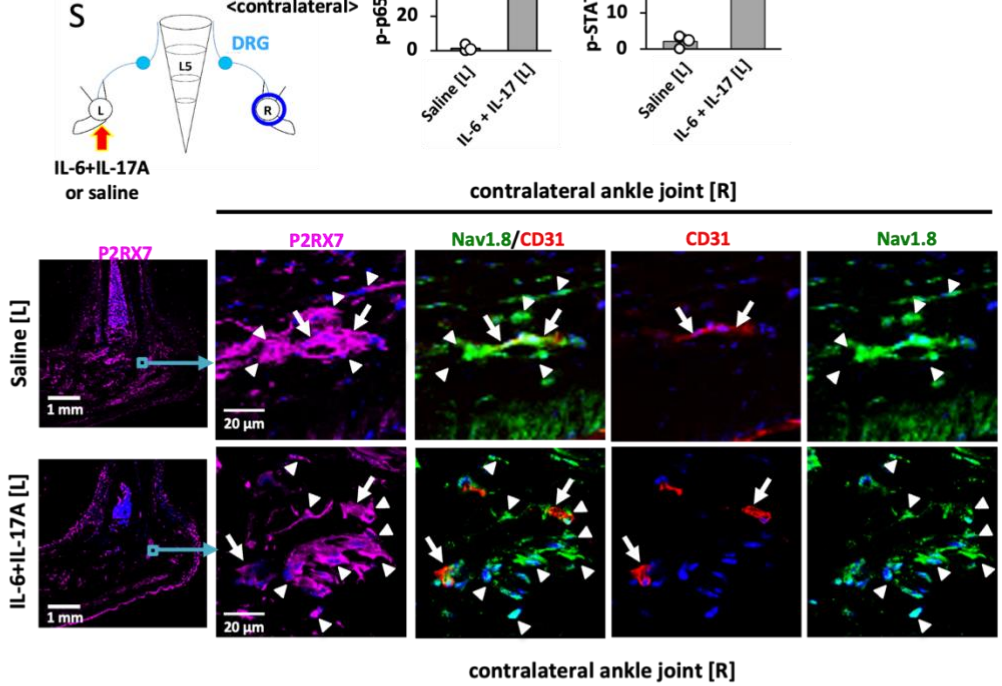
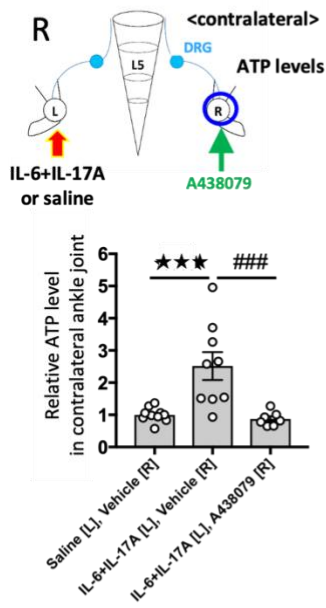
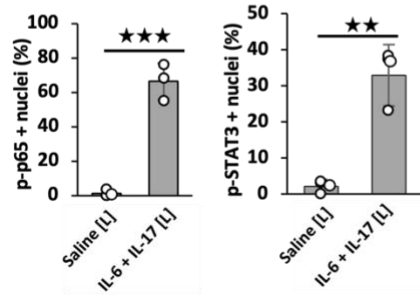
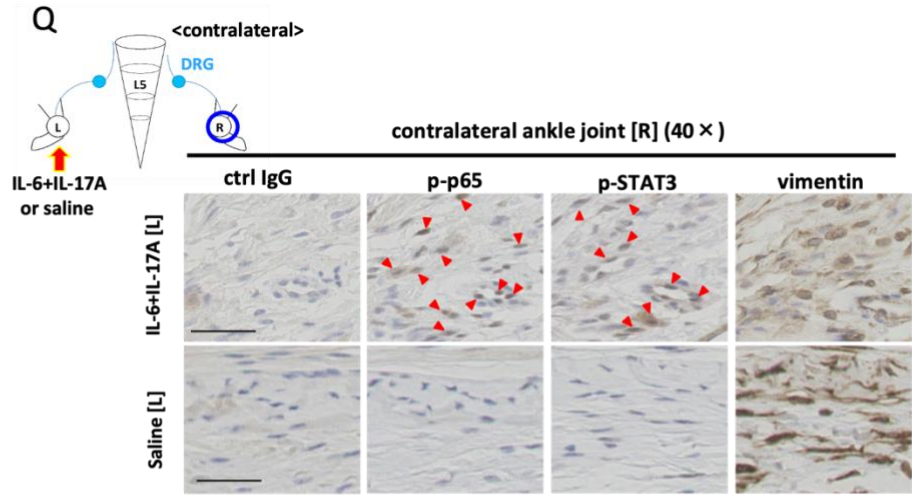
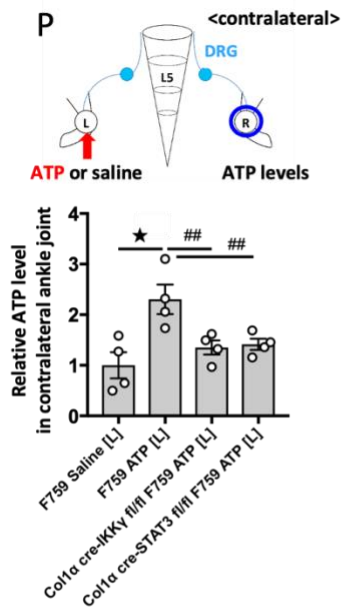


図 3.非免疫系細胞由来の ATP は、IL-17A および IL-6 サイトカインシグナルを介して神経を活性化させ、遠隔炎症を誘導する。

(P) 0 から 2 日目に F759 マウス、F759/Coll $\alpha$ -cre IKK $\gamma$ flox/flox マウス、F759/Coll $\alpha$ -cre STAT3flox/flox マウスの左足関節に ATP (2 $\mu$ g) または生理食塩水を注射し、3 日目に対側 (右) 足関節の ATP 濃度を解析して示した (各群 n=4)。

(Q)IL-17A と IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を F759 マウスの左足関節に 0 から 2 日目に注射し、免疫組織化学的に対側 (右) 足関節のリン酸化 NF- $\kappa$ B p65 (p-p65) と STAT3 (p-STAT3)、およびビメンチン (非免疫系細胞マーカー) を検出した。矢印は p-p65+または p-STAT3+の核を示す。棒グラフは、全核に占める p-p65+または p-STAT3+核の割合を示した (各群 n=3)。

(R) F759 マウスを手術後 3 群に分けて実験を行った結果を示す。

1. 0 日目に左足関節に生理食塩水を注射し、0 から 2 日目に右足関節に P2RX7 阻害剤 A438079 の溶媒を注射した群

2.0 日目に左足関節に IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) を注射し、0 から 2 日目に P2RX7 阻害剤 A438079 の溶媒を注射した群

3.0 日目に左足関節に IL-17A および IL-6 (各 1 $\mu$ g) を注射し、0 から 2 日目に P2RX7 阻害剤 A438079(10 $\mu$ g)を注射した群に分け、

3 日目に対側 (右) 足関節の ATP 濃度を解析した (各群 n=7~10)。

(S) IL-17A と IL-6 (各 1 $\mu$ g) または生理食塩水を、0 から 2 日目に F759 マウスの左足関節に注射し、3 日目に反対側 (右) 足関節の P2RX7、Nav1.8、ビメンチン、CD31 を免疫染色した。染色図の色としてマゼンタ:P2RX7、緑:Nav1.8 またはビメンチン、赤:CD31、青色:核を示す。

矢印は Nav1.8+CD31+またはビメンチン+CD31+シグナルと融合した P2RX7 シグナルを示す。鋏は P2RX7 シグナルと Nav1.8 またはビメンチンシグナルを併合したもの。

実験は独立して少なくとも 3 回行い、代表的なデータを示した。

平均スコア $\pm$ SEM を示す。P 値は、Dunnett の検定 (P、R、S) または Student の t 検定 (Q) を用いて計算した (★、P<0.05 ; ★★および###、P<0.01 ; ★★★★★および###、P<0.001) 。図は実験設定を示している。L は左足首、L5 は第 5 腰椎レベル、DRG は後根神経節、R は右足首。矢印はサイトカイン、ATP、生理食塩水、または A438079 の注射を示す。青丸は検査した足関節を示す。

## 考察

この研究を通じて、我々はサイトカイン誘発モデルおよび CIA モデルにおいて、足関節間に炎症が拡大するメカニズムを示した。

足関節周辺に分布する感覚ニューロンは、主に L5 DRG に接続しているが、L4 および L6 DRG にも接続している (Kawano et al., 2004) ことが知られている。F759 マウスの片方の足関節にサイトカインを注射すると、L5 DRG の両側で c-fos の発現が誘導されることから、片側からの炎症シグナルが両側の感覚ニューロンを活性化することが示唆された。この結果は、非免疫系細胞からの ATP が、対側の関節に向かう感覚経路を活性化するための重要な神経伝達物質であることを示している。

また ATP は ATP 合成酵素とともに、反対側関節の感覚ニューロンから放出されることもわかった。興味深いことに、内皮細胞 (Arima et al., 2017) や滑膜細胞 (図 3H) もサイトカイン刺激後に ATP を産生し、ATP は IL-6 アンブの活性化を刺激した。よって、我々は ATP は両関節において重要な神経伝達物質であると同時に炎症伝達物質でもあるという仮説を立てた。

炎症が片側から片側へ波及する症状は RA では一般的である。Lefèvre らは、RA の滑膜線維芽細胞 (RASf) が遊走し、疾患の拡大に寄与することを示した (Lefèvre et al., 2009) が、RASf がどのようにして他の関節に到達するかについては、まだ解明されていない。

我々はここで示された両側の炎症に対する局所的な神経制御が、ケモカインの発現を誘発し、その後の RASf の動員を促進するという仮説を立てた。Donaldson らは、完全フロイントアジュバント (CFA) 誘発関節炎を用いて、カプサイシン受容体 TRPV1 陽性神経線維が炎症の対側への広がりに関与していることを報告した (Donaldson et al., 1995) が、我々のデータもまた、F759 関節炎における Nav1.8+TRPV1+/- 感覚ニューロンの関与を示唆している。しかしながら CFA 誘発関節炎では、前帯状皮質が炎症を対側へ広げる部位である可能性があり (Arima et al., 2017) 炎症が拡大する際の各神経回路の詳細な関係を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。



## 総括および結論

- F759 マウスは加齢と共に関節リウマチを発症するマウスであり、我々は左足の足裏に IL-6 と IL-17 を 3 日間に渡り注射することによってサイトカイン関節炎モデルマウスを作った。
- 感覚神経が遠隔炎症を悪化させる可能性を探るため、右足の神経の求心路を遮断したマウスとそうでないマウスの足底にサイトカインを打って観察した結果、感覚神経が炎症を悪化させる可能性があることが分かった。
- 炎症が片側から片側へ波及する神経回路は下部胸髄を經由していることが分かった。
- 炎症が片側から片側へ波及するために必要な神経伝達物質は ATP であった。
- RA モデルマウスはこの実験で主に使ったサイトカイン関節炎モデルマウスの他に CFA 誘発関節炎モデルマウスがいるが、このモデルマウスでも同様の結果が得られ、この発見は炎症が拡大する病気全般に当てはまることを示唆することができた。

結論として、我々は 2 つの関節炎モデルにおいて炎症を広げるメカニズムを報告した。

我々は胸髄を介した関節間の局所的な感覚ニューロン-介在ニューロンの接続が、神経経路を活性化し IL-6 アンプを増強する ATP を介して炎症を広げるのに重要であることを示した。

RA 患者や他のモデルにおける炎症の広がりと同じメカニズムが当てはまるかどうかについては今後の研究が必要であるが、我々は遠隔炎症ゲートウェイ反射と名付けたこの現象で証明した数々の結果から、神経経路の遮断は炎症の拡大を伴う様々な疾患に対する治療標的となる可能性があることを示した。

今後の研究としてはこの治験がシェーグレン症候群、SLE、強皮症、乾癬などの他の炎症性疾患に共通するかどうかを実際のマウスモデルも用いて検討していく方針である。

また、この研究の不足している点としては、今回発見したメカニズムは中枢から抹消へと向かう逆行性となっており、こちらの分子機構がまだ判明していない点である。これについては逆行性の神経について詳しく解析していく方針である。また、もう一つあるとすればヒト検体を用いた実験を一切やっておらず、実際のヒトでの証明ができていない点である。この点は、現在リウマチのみならず、さまざまな炎症性疾患の末梢血、組織などを入手しているため、これらの詳細な解析を今後進めていきたい。

## 謝辞

第三章を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた北海道大学遺伝子病制御研究所 分子神経免疫学 村上正晃教授に深く感謝いたします。また、直接のご指導を頂きました生理学研究所・分子神経免疫研究部門特任准教授・長谷部理絵先生、QST 量子免疫グループ主任研究員・田中勇希先生に心から感謝いたします。さらに、各種研究材料や抗体を提供していただきました北海道大学医学研究院 解剖発生学 渡辺雅彦教授に深く感謝いたします。

最後に本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました、北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野のすべてのみなさまに、心より御礼申し上げます。

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

Arima, Y., M. Harada, D. Kamimura, J.H. Park, F. Kawano, F.E. Yull, T. Kawamoto, Y. Iwakura, U.A. Betz, G. Marquez, T.S. Blackwell, Y. Ohira, T. Hirano, and M. Murakami. 2012. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell* 148:447-457.

Arima, Y., D. Kamimura, T. Atsumi, M. Harada, T. Kawamoto, N. Nishikawa, A. Stofkova, T. Ohki, K. Higuchi, Y. Morimoto, P. Wieghofer, Y. Okada, Y. Mori, S. Sakoda, S. Saika, Y. Yoshioka, I. Komuro, T. Yamashita, T. Hirano, M. Prinz, and M. Murakami. 2015. A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model. *eLife* 4:e08733.

Arima, Y., T. Ohki, N. Nishikawa, K. Higuchi, M. Ota, Y. Tanaka, J. Nio-Kobayashi, M. Elfeky, R. Sakai, Y. Mori, T. Kawamoto, A. Stofkova, Y. Sakashita, Y. Morimoto, M. Kuwatani, T. Iwanaga, Y. Yoshioka, N. Sakamoto, A. Yoshimura, M. Takiguchi, S. Sakoda, M. Prinz, D. Kamimura, and M. Murakami. 2017. Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *eLife* 6:e25517.

Arnett, F.C., S.M. Edworthy, D.A. Bloch, D.J. McShane, J.F. Fries, N.S. Cooper, L.A. Healey, S.R. Kaplan, M.H. Liang, and H.S. Luthra. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315-324.

Atsumi, T., K. Ishihara, D. Kamimura, H. Ikushima, T. Ohtani, S. Hirota, H. Kobayashi, S.J. Park, Y. Saeki, Y. Kitamura, and T. Hirano. 2002. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med* 196:979-990.

Atsumi, T., R. Singh, L. Sabharwal, H. Bando, M. Jie, Y. Arima, M. Yamada, M. Harada, J.J. Jiang, T. Hirano, D. Kamimura, H. Ogura, and M. Murakami. 2014. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Research* 74:8-14.

Atsumi, T., H. Suzuki, J.J. Jiang, Y. Okuyama, I. Nakagawa, M. Ota, Y. Tanaka, T. Ohki, K. Katsunuma, K. Nakajima, Y. Hasegawa, O. Ohara, H. Ogura, Y. Arima, D. Kamimura, and M.

- Murakami. 2017. Rbm10 regulates inflammation development via alternative splicing of Dnmt3b. *International immunology* 29:581-591.
- Burnstock, G. 2006. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in pharmacological sciences* 27:166-176.
- Chavan, S.S., V.A. Pavlov, and K.J. Tracey. 2017. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity* 46:927-942.
- Chelmicka-Schorr, E., M.N. Kwasniewski, and R.L. Wollmann. 1992. Sympathectomy augments adoptively transferred experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 37:99-103.
- Clarke, G.S., J.C. Buckland-Wright, and R. Grahame. 1994 Symmetry of radiological features in the wrist and hands of patients with early to moderate rheumatoid arthritis: a quantitative microfocal radiographic study. *Br J Rheumatol.* 33:249-254.
- Donaldson, L.F., D.S. McQueen, and J.R. Seckl. 1995. Neuropeptide gene expression and capsaicin-sensitive primary afferents: maintenance and spread of adjuvant arthritis in the rat. *J Physiol* 486 ( Pt 2):473-482.
- Fujita, M., Y. Yamamoto, J.J. Jiang, T. Atsumi, Y. Tanaka, T. Ohki, N. Murao, E. Funayama, T. Hayashi, M. Osawa, T. Maeda, D. Kamimura, and M. Murakami. 2019. NEDD4 Is Involved in Inflammation Development during Keloid Formation. *J Invest Dermatol* 139:333-341.
- Grassel, S.G. 2014. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Arthritis Res Ther* 16:485.
- Harada, M., D. Kamimura, Y. Arima, H. Kohsaka, Y. Nakatsuji, M. Nishida, T. Atsumi, J. Meng, H. Bando, R. Singh, L. Sabharwal, J.J. Jiang, N. Kumai, N. Miyasaka, S. Sakoda, K. Yamauchi-Takahara, H. Ogura, T. Hirano, and M. Murakami. 2015. Temporal expression of growth factors triggered by epiregulin regulates inflammation development. *Journal of immunology* 194:1039-1046.

Higuchi, H., D. Kamimura, J.J. Jiang, T. Atsumi, D. Iwami, K. Hotta, H. Harada, Y. Takada, H. Kanno-Okada, K.C. Hatanaka, Y. Tanaka, N. Shinohara, and M. Murakami. 2020.

Orosomucoid 1 is involved in the development of chronic allograft rejection after kidney transplantation. *International immunology* 32:335-346.

Hirano, T., and M. Murakami. 2020. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. *Immunity* 52:731-733.

Holton, P. 1959. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145:494-504.

Igarashi, H., J. Hashimoto, T. Tomita, H. Yoshikawa, and K. Ishihara. 2010. TP53 mutations coincide with the ectopic expression of activation-induced cytidine deaminase in the fibroblast-like synoviocytes derived from a fraction of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 161:71-80.

Kamimura, D., Y. Tanaka, R. Hasebe, and M. Murakami. 2020. Bidirectional communication between neural and immune systems. *International immunology* 32:693-701.

Kawamoto, T., and K. Kawamoto. 2014. Preparation of thin frozen sections from nonfixed and undecalcified hard tissues using Kawamoto's film method (2012). *Methods Mol Biol* 1130:149-164.

Kawano, F., A. Ishihara, J.L. Stevens, X.D. Wang, S. Ohshima, M. Horisaka, Y. Maeda, I. Nonaka, and Y. Ohira. 2004. Tension- and afferent input-associated responses of neuromuscular system of rats to hindlimb unloading and/or tenotomy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R76-86.

Kawano, F., Y. Matsuoka, Y. Oke, Y. Higo, M. Terada, X.D. Wang, N. Nakai, H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi, and Y. Ohira. 2007. Role(s) of nucleoli and phosphorylation of ribosomal protein S6 and/or HSP27 in the regulation of muscle mass. *American journal of physiology. Cell physiology* 293:C35-44.

Kelly, S., J.P. Dunham, and L.F. Donaldson. 2007. Sensory nerves have altered function contralateral to a monoarthritis and may contribute to the symmetrical spread of inflammation. *Eur J Neurosci* 26:935-942.

Kidd, B.L., P.I. Mapp, S.J. Gibson, J.M. Polak, F. O'Higgins, J.C. Buckland-Wright, and D.R. Blake. 1989. A neurogenic mechanism for symmetrical arthritis. *Lancet* 2:1128-1130.

Kitabayashi, C., T. Fukada, M. Kanamoto, W. Ohashi, S. Hojyo, T. Atsumi, N. Ueda, I. Azuma, H. Hirota, M. Murakami, and T. Hirano. 2010. Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation. *Int. Immunol.* 22:375-386.

Labasi, J.M., N. Petrushova, C. Donovan, S. McCurdy, P. Lira, M.M. Payette, W. Brissette, J.R. Wicks, L. Audoly, and C.A. Gabel. 2002. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *Journal of immunology* 168:6436-6445.

Larsson, J., A. Ekblom, K. Henriksson, T. Lundeberg, and E. Theodorsson. 1991. Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 20:326-335.

Lee, J., T. Nakagiri, D. Kamimura, M. Harada, T. Oto, Y. Susaki, Y. Shintani, M. Inoue, S. Miyoshi, E. Morii, T. Hirano, M. Murakami, and M. Okumura. 2013. IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *International immunology* 25:319-332.

Lefevre, S., A. Knedla, C. Tennie, A. Kampmann, C. Wunrau, R. Dinser, A. Korb, E.M. Schnaker, I.H. Tarner, P.D. Robbins, C.H. Evans, H. Sturz, J. Steinmeyer, S. Gay, J. Scholmerich, T. Pap, U. Muller-Ladner, and E. Neumann. 2009. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med* 15:1414-1420.

Malmberg, A.B., and A.I. Basbaum. 1998. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76:215-222.

Matsuyama, S., Y. Tanaka, R. Hasebe, S. Hojyo, and M. Murakami. 2021. Gateway Reflex and Mechanotransduction. *Front Immunol* 12:780451.

- Meng, J., J.J. Jiang, T. Atsumi, H. Bando, Y. Okuyama, L. Sabharwal, I. Nakagawa, H. Higuchi, M. Ota, M. Okawara, R. Ishitani, O. Nureki, D. Higo, Y. Arima, H. Ogura, D. Kamimura, and M. Murakami. 2016. Breakpoint Cluster Region-Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II. *Journal of immunology* 197:3111-3119.
- Miller, L.E., J. Grifka, J. Scholmerich, and R.H. Straub. 2002. Norepinephrine from synovial tyrosine hydroxylase positive cells is a strong indicator of synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 29:427-435.
- Molleston, M.C., M.L. Thomas, and W.F. Hickey. 1993. Novel major histocompatibility complex expression by microglia and site-specific experimental allergic encephalomyelitis lesions in the rat central nervous system after optic nerve transection. *Adv Neurol* 59:337-348.
- Murakami, M., M. Harada, D. Kamimura, H. Ogura, Y. Okuyama, N. Kumai, A. Okuyama, R. Singh, J.J. Jiang, T. Atsumi, S. Shiraya, Y. Nakatsuji, M. Kinoshita, H. Kohsaka, M. Nishida, S. Sakoda, N. Miyasaka, K. Yamauchi-Takahara, and T. Hirano. 2013. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell reports* 3:946-959.
- Murakami, M., D. Kamimura, and T. Hirano. 2019. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity* 50:812-831.
- Murakami, M., Y. Okuyama, H. Ogura, S. Asano, Y. Arima, M. Tsuruoka, M. Harada, M. Kanamoto, Y. Sawa, Y. Iwakura, K. Takatsu, D. Kamimura, and T. Hirano. 2011. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J Exp Med* 208:103-114.
- Murase, S., and R.D. McKay. 2014. Neuronal activity-dependent STAT3 localization to nucleus is dependent on Tyr-705 and Ser-727 phosphorylation in rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 39:557-565.
- Nicolas, C.S., S. Peineau, M. Amici, Z. Csaba, A. Fafouri, C. Javalet, V.J. Collett, L. Hildebrandt, G. Seaton, S.L. Choi, S.E. Sim, C. Bradley, K. Lee, M. Zhuo, B.K. Kaang, P. Gressens, P. Dournaud, S.M. Fitzjohn, Z.A. Bortolotto, K. Cho, and G.L. Collingridge. 2012. The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity. *Neuron* 73:374-390.



O'Connor, T.M., J. O'Connell, D.I. O'Brien, T. Goode, C.P. Bredin, and F. Shanahan. 2004. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 201:167-180.

Ogura, H., M. Murakami, Y. Okuyama, M. Tsuruoka, C. Kitabayashi, M. Kanamoto, M. Nishihara, Y. Iwakura, and T. Hirano. 2008. Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity*. 29:628-636.

Okuyama, Y., Y. Tanaka, J.J. Jiang, D. Kamimura, A. Nakamura, M. Ota, T. Ohki, D. Higo, H. Ogura, N. Ishii, T. Atsumi, and M. Murakami. 2018. Bmi1 Regulates I $\kappa$ B $\alpha$  Degradation via Association with the SCF Complex. *Journal of immunology* 201:2264-2272.

Ota, M., Y. Tanaka, I. Nakagawa, J.J. Jiang, Y. Arima, D. Kamimura, T. Onodera, N. Iwasaki, and M. Murakami. 2020. Role of Chondrocytes in the Development of Rheumatoid Arthritis Via Transmembrane Protein 147-Mediated NF- $\kappa$ B Activation. *Arthritis Rheumatol* 72:931-942.

Pavlov, V.A., and K.J. Tracey. 2017. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. *Nat Neurosci* 20:156-166.

Peirs, C., S.P. Williams, X. Zhao, C.E. Walsh, J.Y. Gedeon, N.E. Cagle, A.C. Goldring, H. Hioki, Z. Liu, P.S. Marell, and R.P. Seal. 2015. Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* 87:797-812.

Sadikot, R.T., and T.S. Blackwell. 2008. Bioluminescence: imaging modality for in vitro and in vivo gene expression. *Methods Mol Biol*. 477:383-394.

Sasai, M., Y. Saeki, S. Ohshima, K. Nishioka, T. Mima, T. Tanaka, Y. Katada, K. Yoshizaki, M. Suemura, and T. Kishimoto. 1999. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum*. 42:1635-1643.

Sawa, S., D. Kamimura, G.H. Jin, H. Morikawa, H. Kamon, M. Nishihara, K. Ishihara, M. Murakami, and T. Hirano. 2006. Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med*. 12:1459-1470.

Schmidt-Supprian, M., W. Bloch, G. Courtois, K. Addicks, A. Israël, K. Rajewsky, and M. Pasparakis. 2000. NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol . Cell* 5:981-992.

Seltzer, Z., R. Dubner, and Y. Shir. 1990. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218.

Sorkin, L.S., K.A. Eddinger, S.A. Woller, and T.L. Yaksh. 2018. Origins of antidromic activity in sensory afferent fibers and neurogenic inflammation. *Semin Immunopathol* 40:237-247.

Stofkova, A., D. Kamimura, T. Ohki, M. Ota, Y. Arima, and M. Murakami. 2019. Photopic light-mediated down-regulation of local alpha1A-adrenergic signaling protects blood-retina barrier in experimental autoimmune uveoretinitis. *Sci Rep* 9:2353.

Takada, Y., D. Kamimura, J.J. Jiang, H. Higuchi, D. Iwami, K. Hotta, Y. Tanaka, M. Ota, M. Higuchi, S. Nishio, T. Atsumi, N. Shinohara, Y. Matsuno, T. Tsuji, T. Tanabe, H. Sasaki, N. Iwahara, and M. Murakami. 2020. Increased urinary exosomal SYT17 levels in chronic active antibody-mediated rejection after kidney transplantation via the IL-6 amplifier. *International immunology*

Takeda, K., T. Kaisho, N. Yoshida, J. Takeda, T. Kishimoto, and S. Akira. 1998. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *Journal of immunology* 161:4652-4660.

Turner, S.L., and F.J. Jenkins. 1997. The roles of herpes simplex virus in neuroscience. *J Neurovirol.* 3:110-125.

Xie, Z., J. Dai, A. Yang, and Y. Wu. 2014. A role for bradykinin in the development of anti-collagen antibody-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 53:1301-1306.