

学位論文

「Regulation of Tumor Necrosis Factor- α by Peptide Lv in Bone Marrow Macrophages and Synovium」 (骨髓マクロファージ及び滑膜における TNF- α 発現に対する Peptide Lv の作用)

DM18028 迎 学

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 整形外科学
指導教授 高相 晶士

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

【背景】

本邦における変形性関節症(OA)患者は年々増加しており、疼痛を有する OA 患者数は 800 万人にのぼる。OA 患者の疼痛コントロールは健康寿命の延長に極めて重要であるが、その疼痛機序は十分に明らかになっていない。滑膜の炎症が OA 発症と進行に関与している可能性が示唆されている。また、骨髄由来の単球/マクロファージは滑膜組織に動員され、炎症性サイトカインの産生を通じて変形性関節症の滑膜の炎症に寄与することが報告されている。従って、単球/マクロファージが分泌する炎症性サイトカインの調整は、滑膜の炎症を治療するための重要な治療戦略となる可能性がある。また、最近の研究では、V-Set and Transmembrane Domain-containing 4 (VSTM4) とそのフラグメントである Peptide Lv が、それぞれ T 細胞活性と vascular endothelial growth factor (VEGF) に似た免疫抑制活性を示すことが示唆されている。VEGF は M1 マクロファージの M2 マクロファージへの極性化を促進し、TNF- α を介したアポトーシスを阻害することで炎症抑制の役割を果たすことが報告されている。そこで、Peptide Lv がマクロファージ活性を調節し、滑膜の炎症に影響を与えるという仮説を立てた。本研究では、マクロファージと滑膜における炎症性サイトカインの発現に対する Peptide Lv の役割を調査した。

【方法】

Peptide Lv の効果を検討するために、monocyte colony-stimulating factor (M-CSF)存在下で培養した C57BL/6J マウス 由来の bone marrow-derived macrophages (BMM)を Vehicle、lipopolysaccharide (LPS)、LPS + Peptide Lv で刺激した。定量 PCR (qPCR) を使用して *Tnfa*、*Il1b*、*Il6*、および *Ifng* の発現を評価した。TNF- α および IFN- γ の産生は、ELISA を使用して測定した。次にマクロファージおよび滑膜の炎症に対する Peptide Lv 欠失の影響を調べるために、ゲノム編集を使用して *peptide Lv* 欠失マウスを作製した。LPS によって誘発される *Tnfa* と *Ifng* の発現、および TNF- α と IFN- γ の産生を、野生型および *peptide Lv* 欠失マ

ウスから分離された BMM で評価した。さらに、*Tnfa* と *Ifng* の発現を、膝の損傷の前後で野生型マウスと *peptide Lv* 欠失マウスの間で比較した。

【結果】

Peptide Lv は LPS を介した *Tnfa* および *Ifng* の発現上昇、TNF- α および IFN- γ の産生上昇を抑制した。野生型マウスと比較して、*peptide Lv* 欠失マウスでは LPS 刺激で *Tnfa* および *Ifng* の発現、TNF- α および IFN- γ の産生が有意に増加した。損傷した膝の滑膜において *Tnfa* 発現は、野生型マウスと比較して *peptide Lv* 欠失マウスで有意に上昇した。

【考察】

過去に VSTM ファミリーは T 細胞の機能を抑制し、VSTM4 は T 細胞による IFN- γ 、IL-2、IL-17 などの炎症性サイトカインの産生を減少させることが報告されている。今回の結果から、Peptide Lv がマクロファージに対して抗炎症作用を与える可能性が示唆された。

Peptide Lv は VEGF 受容体と相互作用する可能性が示唆されており、炎症性刺激に対する VEGF の保護作用の報告も散見される。本研究で Peptide Lv が TNF- α を調整するメカニズムは不明なままだが、VEGF 様の作用が関与しているかもしれない。TNF- α は NGF、CGRP、COX-2 などの疼痛関連因子の産生も調節していることが示唆されている。実際に TNF- α 阻害薬は OA の滑膜炎と痛みを抑制することが報告されている。さらに、近年抗 TNF- α 抗体の関節内注射が OA の症状と進行を改善させたとの報告もある。Peptide Lv が TNF- α の発現を抑制した今回の結果から、Peptide Lv が OA の有用な治療標的となる可能性がある。

【今後の課題】

Peptide Lv の濃度を変えた研究を行っていない。TNF- α に対する Peptide Lv の効果を BMM で調べており、滑膜マクロファージに対する効果は不明である。Peptide Lv がマクロファージの TNF- α に影響を与えるメカニズムは不明である。滑膜の TNF- α 発現は *peptide Lv* 欠失マウスで上昇したが、この結果がマクロファージの影響によるものかどうかは不明である。

【結語】

Peptide Lv はマクロファージの $\text{TNF-}\alpha$ を抑制し、滑膜の炎症に関与した。Peptide Lv は滑膜炎の有用な治療標的となる可能性がある。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM) の調製	2
2-2. LPS を介した炎症性サイトカインの発現に対する Peptide Lv の影響	2
2-3. Peptide Lv 欠失マウスの作製	2
2-4. 遺伝子型の判定およびマウスの系統化	3
2-5. LPS を介した TNF- α および IFN- γ 産生に対する Peptide Lv 欠失の影響	3
2-6. 滑膜炎の誘発	4
2-7. 統計分析	4
3. 結果	
3-1. BMM における LPS 誘発炎症性サイトカイン発現に対する Peptide Lv の効果	4
3-2. TNF- α 発現に対する Peptide Lv 欠失の影響	5
3-3. 滑膜炎での <i>Tnfa</i> および <i>Ifng</i> 発現に対する Peptide Lv 欠失の影響	6
4. 考察	6
5. 総括	7
6. 今後の課題	7
7. 謝辞	8
8. 引用文献	8
9. 業績目録	11
10. 図表	13

1. 序論

変形性膝関節症 (OA) の特徴は、関節軟骨の変性、骨のリモデリング、骨棘形成、線維化、および滑膜の過形成などである¹。過去の報告から、滑膜の炎症が OA の進行と構造変化に関与している可能性が示唆されている²。

マクロファージおよび単球などの骨髄細胞は、滑膜炎における tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6)などの炎症性サイトカインの産生に寄与している³⁻⁵。これらの炎症性サイトカインは、変形性関節症の軟骨破壊および痛みを促進することが知られている^{4,5}。また、骨髄由来の単球/マクロファージは滑膜組織に動員され、炎症性サイトカインの産生を通じて変形性関節症の滑膜の炎症に寄与することが報告されている^{2,6,7}。さらに、我々は過去に、骨髄由来の骨髄球系細胞が KOA マウスモデルの滑膜に動員されることを報告した⁸。従って、単球/マクロファージが分泌する炎症性サイトカインの調節は、滑膜の炎症を治療するための効果的な治療戦略になる可能性がある。

V-Set and transmembrane domain-containing (VSTM) family は、T 細胞活性、腫瘍成長、及び脂肪細胞分化制御など、体内での多様な役割を果たしていることが知られている⁹⁻¹²。V-Set and transmembrane domain-containing 4 (VSTM4)は 320 アミノ酸 (aa) で構成される膜貫通タンパク質である。VSTM4 のフラグメントである Peptide Lv (ヒト、aa 55-94、マウス、aa 55-103) は、L 型電位依存性カルシウムチャネルを増強し、vascular endothelial growth factor (VEGF) 様の生物学的作用を有することが報告されている^{13,14}。VEGF は、M1 マクロファージの M2 マクロファージへの極性化を促進や、TNF- α を介したアポトーシスを阻害することにより、炎症プロセスを調節すると考えられている¹⁵⁻¹⁷。そこで Peptide Lv が VEGF と同様にマクロファージ活性を調節し、滑膜の炎症に役割を果たすと仮定した。本研究では、マクロファージと滑膜の炎症における炎症性サイトカインの発現に対する Peptide Lv の役割を検討した。

2. 方法

2-1. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM) の調製

Monocyte colony-stimulating factor (M-CSF)で増殖した BMM は、以前に報告されたプロトコルに基づいて採取した¹⁸。C57BL/6J マウス的大腿骨から分離した骨髓細胞を、100 ng/ml M-CSF を含む α -MEM で培養した。培養 4 日目に、非接着細胞を除去し、新鮮な M-CSF を含む α -MEM でさらに 3 日間培養した。

2-2. LPS を介した炎症性サイトカインの発現に対する Peptide Lv の影響

BMM は、上記のように C57BL/6J マウスから分離した。合成 Peptide Lv (DSLLAVRWFFAPDGSQEALMVKMTKLRIHQYYGNFSRTANQQRLRLLEE) は、Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA, USA) から購入した。パイロット研究では、1 μ g/ml の Peptide Lv が *Tnfa* の発現を抑制したのに対し、0.1 μ g/ml の Peptide Lv は抑制しなかったため、本研究では 1 μ g/ml の Peptide Lv を使用した。

BMM は、vehicle (α -MEM)、1 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS)、1 μ g/ml LPS + 1 μ g/ml Peptide Lv で 6 および 24 時間刺激した。その後、RNA を BMM から抽出し、以前に報告されたプロトコルに基づく cDNA 合成に使用した。qRT-PCR に使用したプライマーの配列を表 1 に示す。*Tnfa*、*Il1b*、*Il6*、および *Ifng* の発現を qRT-PCR を使用して測定した。また、処理の 24 時間後の上清中の TNF- α および IFN- γ 濃度を、ELISA にて測定した。

2-3. Peptide Lv 欠失マウスの作製

Peptide Lv をコードする領域を欠失するために、*Vstm4* 遺伝子のエクソン 2 の塩基配列における 2 箇所を標的とした 2 種類のガイド RNA (gRNAa: 5'-CTGTGGTGCTCTCAATGTCA-3'、および gRNAb: 5'-ACCTCTCATTTCGTCGCCG-3') を設計し (図 3)、Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA) で合成されたものを入手した。この 2 種類の gRNA とともに、Cas9

タンパク質 (Integrated DNA Technologies、Coralville、IA、USA) を、既に報告されている方法¹⁹に従って、C57BL/6J マウスの受精卵にエレクトロポレーション法により導入した。2細胞期まで培養し、生存していた胚を偽妊娠雌の ICR マウスの卵管に移植し、産仔を得た。

2-4. 遺伝子型の判定およびマウスの系統化

Peptide Lv 領域の欠失の有無は、尻尾の組織サンプルからゲノム DNA を抽出し、PCR 法により検出した。特異的プライマーセット (F1 : 5'-CTTCAGAATTCCAGGTGTTTCC-3', R1 : 5'-AGTGTCCAAGAGCTGTCCTCAT-3')、および Ex-Taq DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ、滋賀、日本) を用いて、94°C で 20 秒間、60°C で 20 秒間、72°C で 20 秒間を 35 サイクルで増幅した PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により確認した (図 3)。欠失をもつマウスのうち、PCR 産物の塩基配列からアミノ酸配列を推定し、*peptide Lv* 領域を含むアミノ酸配列がインフレームで欠失したマウス (Δ Lv マウス) をスクリーニングし系統化した (図 3)。 Δ Lv 遺伝子座は 413bp にバンドが、野生型は 777bp にバンドが検出された。*Peptide Lv* 転写産物は、BMM からの cDNA サンプルと、野生型および *peptide Lv* ホモ欠失マウスから採取した滑膜組織を使用して PCR を実行することによって得られた (図 3)。以下のプライマーを使用して、*peptide Lv* (299 bp) 転写物を検出した : F2、5'-CTATGGGAAGTTCAGCCGGAC-3' および R2、5'-AGCACACAAGGACAGCGTA-3'。

2-5. LPS を介した TNF- α および IFN- γ 産生に対する *Peptide Lv* 欠失の影響

BMM は、上記のように C57BL/6J マウスと *peptide Lv* 欠失マウスから分離した。BMM を vehicle (α -MEM) または 1 μ g/ml LPS で 6 時間および 24 時間刺激後、qRT-PCR を用いて *Tnfa* および *Ifng* の発現を評価した。LPS 処理の 24 時間後の上清中の TNF- α および IFN- γ 濃度を ELISA にて評価した。

2-6. 滑膜炎の誘発

10 週齢の野生型 (C57BL/6J) および *peptide Lv* 欠失マウスは、12 時間の明暗サイクルの下、 $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ および $55\pm 10\%$ の湿度のセミバリアシステムで飼育された。麻酔下に野生型および *peptide Lv* 欠失マウスの片方の膝に medial parapatellar approach で侵入し、膝蓋骨を外側に脱臼させ恒久性膝蓋骨脱臼を作製することで滑膜の炎症モデルを作製した²⁰。損傷の 1 週間後、滑膜標本を採取し、RNA 抽出液中でホモジナイズした ($n=5$)。 *Tnfa* および *Ifng* の RNA 抽出、cDNA 合成、および qPCR は、上記のように実行した。

2-7. 統計分析

一元配置分散分析を使用した Bonferroni 多重比較検定を使用して、vehicle、LPS、および LPS+Peptide Lv 群間の差を決定した。Kolmogorov-Smirnov 検定に続いて、t 検定または Mann-Whitney *U* 検定を使用して、野生型マウスと *peptide Lv* 欠失マウスの平均値 (SD) の差を比較した。すべての統計分析は、SPSS バージョン 19.0 (IBM Corp. Chicago, IL, USA) を使用して実行した。 $P<0.05$ は統計的に有意であるとした。

3. 結果

3-1. BMM における LPS 誘発炎症性サイトカイン発現に対する Peptide Lv の効果

BMM に対する Peptide Lv の効果を調査した。 LPS 曝露 6 時間で *Tnfa*、*Il1b*、*Il6*、および *Ifng* は有意に上昇をした (*Tnfa*, $p=0.004$; *Il1b*, $p<0.001$; *Il6*, $p<0.001$; *Ifng*, $p=0.010$; 図 1A-D)。 24 時間でも同様に *Tnfa*、*Il1b*、*Il6*、および *Ifng* は有意に上昇をした (*Tnfa*, $p=0.009$; *Il1b*, $p=0.001$; *Il6*, $p<0.001$; *Ifng*, $p=0.0109$)。 Peptide Lv は、6 時間 (*Tnfa*, $p=0.015$; *Ifng*, $p=0.011$) および 24 時間 (*Tnfa*, $p=0.002$; *Ifng*, $p=0.049$) で LPS を介した *Tnfa* および *Ifng* 発現の上昇を抑制した。 対照的に、Peptide Lv の存在下で *Il1b* 及び *Il6* の発現に変化は認めなかった。 LPS は、上清中の TNF- α および IFN- γ 濃度を有意に増加させた (TNF- α , p

<0.001;IFN- γ , $p = 0.012$;図 2A,B)。これらの上昇した TNF- α および IFN- γ は、Peptide Lv の存在下で有意に減少した (TNF- α , $p = 0.029$;IFN- γ , $p = 0.044$;図 2A,B)。

3-2. TNF- α 発現に対する *Peptide Lv* 欠失の影響

Peptide Lv が BMM における LPS を介した TNF- α および IFN- γ の産生を減少させるという今回の発見を踏まえて、*peptide Lv* 欠失がマクロファージおよび滑膜炎に及ぼす影響を検討した。*Peptide Lv* 遺伝子のエクソン 2 上に gRNA を設計後、CRISPR/Cas9 システムを用いて *peptide Lv* 欠失マウスを作製した (図 3A)。得られ遺伝子改変個体を C57BL / 6J マウスと交配して、F1 マウスを得た (図 3B)。Genotyping により、すべての F1 マウスに *peptide Lv* 遺伝子のエクソン 2 が欠落していることを確認した (図 3C)。*Peptide Lv* 欠失後に予測されるアミノ酸配列を図 3D に示す。また、RT-PCR により、*peptide Lv* 欠失マウスの BMM、滑膜組織において *peptide Lv* mRNA が発現していないことを確認した (図 3E)。

6 時間および 24 時間 Vehicle 刺激を行った野生型マウス由来の BMM と *peptide Lv* 欠失マウス由来の BMM で *Tnfa* と *Ifng* の発現に有意差は認めなかった。(6 時間 (*Tnfa*, $p = 0.917$; *Ifng*, $p = 0.602$;図 4A,B)、24 時間 (*Tnfa*, $p = 0.917$; *Ifng*, $p = 0.175$;図 4A,B))。対照的に、LPS による BMM の刺激は、野生型マウスと比較して、*peptide Lv* 欠失マウスに由来する BMM の *Tnfa* 発現を有意に増加させた (6 時間、 $p = 0.009$; 24 時間、 $p = 0.009$;図 4A)。qRT-PCR の結果と一致して、TNF- α 濃度は、野生型マウスと比較して、*peptide Lv* 欠失マウスに由来する BMM で有意に増加した ($p = 0.001$;図 4C)。LPS 刺激は、6 時間で *peptide Lv* 欠失マウスと比較して野生型マウス由来の BMM で *Ifng* 発現を有意に増加させ ($p = 0.009$;図 4B)、24 時間で野生型マウスと比較して *peptide Lv* 欠失マウス由来の BMM で *Ifng* 発現を有意に増加させた ($p = 0.047$;図 4B)。IFN- γ 濃度は、野生型マウスと比較して、*peptide Lv* 欠失マウス由来の BMM で有意に増加した ($p = 0.028$;図 4D)。

3-3. 滑膜炎での *Tnfa* および *Ifng* 発現に対する *Peptide Lv* 欠失の影響

損傷していない野生型マウスの滑膜における *Tnfa* 発現は、損傷していない *peptide Lv* 欠失マウスの *Tnfa* 発現に有意差はなかった ($p = 0.713$; 図 5A)。滑膜における *Tnfa* 発現は、損傷していない滑膜と比較して、野生型マウスと *peptide Lv* 欠失マウスの両方で損傷後に有意に増加した (それぞれ $p = 0.009$ 、 $p = 0.009$)。ただし、損傷後の滑膜における *Tnfa* 発現は、野生型マウスよりも *peptide Lv* 欠失マウスで有意に増加していた ($p = 0.011$; 図 5A)。損傷の前後で野生型マウスと *peptide Lv* 欠失マウスの間で *Ifng* 発現に有意差は認めなかった (0 日目、 $p = 0.347$; 7 日目、 $p = 1.000$)。

4. 考察

過去に、VSTM family のタンパク質が T 細胞を抑制し、組換え VSTM タンパク質が *in vitro* で T 細胞の機能を阻害することが報告されている。組換え VSTM4 は、T 細胞による IFN- γ 、IL-2、IL-17 などの炎症性サイトカインの産生を減少させることが報告されている¹²。今回、*Peptide Lv* は LPS を介した TNF- α および IFN- γ の産生を阻害し、*Peptide Lv* の欠失によって、LPS で刺激された BMM の TNF- α および IFN- γ の産生が増加した。この結果から、*Peptide Lv* がマクロファージに抗炎症作用を与える可能性がある。

Peptide Lv は VEGF 受容体と相互作用し、心筋細胞の下流シグナル伝達を引き起こすことが報告されている¹³。また、炎症性刺激に対する VEGF の保護効果が報告されている^{15,21}。VEGF は内皮細胞で LPS を介したアポトーシスを抑制し¹⁵、ヒト単球細胞株で LPS を介した M1 polarization を抑制することが報告されている²¹。本研究において *Peptide Lv* が TNF- α を調節するメカニズムは不明なままだが、*Peptide Lv* の VEGF 様作用が関与している可能性がある。

TNF- α は nerve growth factor、calcitonin gene-related peptide、cyclooxygenase-2 などの疼痛関連分子の産生を調節している⁵。今回、*Tnfa* 発現レベルは *peptide Lv* 欠失マウスの滑膜で増加していた。TNF- α は OA の主要な分子成分であり、創薬ターゲットである²²⁻²⁵。TNF- α 阻害

剤は、OA 患者の滑膜炎と痛みを改善することが知られている²³。さらに、最近のパイロット研究において、抗 TNF- α 抗体の関節内注射は、OA の症状と進行を有意に改善していた^{22, 24}。Peptide Lv が TNF- α の発現を抑制することから、Peptide Lv は OA の有用な治療標的となる可能性がある。

IFN- γ は主に T 細胞と NK 細胞によって産生され、マクロファージの活性化に寄与する²⁶。一方、マクロファージも IFN- γ を産生し、LPS によって刺激されることが知られている^{27, 28}。また、Fc に融合した VSTM4 の細胞外ドメインを含む融合タンパク質 (VSTM4-Fc) がヒト T 細胞での IFN- γ 産生を阻害することが報告されている¹²。本研究では、マクロファージでの IFN- γ 発現に対する VSTM4 フラグメントの効果を検討した。Peptide Lv は IFN- γ 産生を抑制し、Peptide Lv の欠失がマクロファージの IFN- γ 産生を増加させることを発見した。細菌感染に関する研究で、マクロファージ由来の IFN- γ がオートクリン/パラクリン経路を介してマクロファージを活性化することが報告されている²⁹。今回の結果から、Peptide Lv が IFN- γ 産生を介したマクロファージの活性化を抑制する可能性がある。しかし、本研究では、滑膜の *Ifng* 発現は、野生型、*peptide Lv* 欠失マウスのいずれにおいても損傷後に増加しなかった。従って、滑膜炎時の IFN- γ 発現における Peptide Lv の役割は不明なままであり、さらなる研究が必要である。

5. 総括

マクロファージは、VSTM4 のフラグメントである *peptide Lv* を発現する。*Peptide Lv* は、マクロファージにおける TNF- α および IFN- γ の産生を抑制し、*peptide Lv* の欠失は、滑膜炎における *Tnfa* の発現を増加させた。従って、*peptide Lv* は滑膜炎の治療標的となる可能性がある。

6. 今後の課題

第一に、in vitro 研究で Peptide Lv の単回投与の効果しか検討していない。第二に、TNF- α に対する Peptide Lv の効果を BMM のみ調べており、滑膜マクロファージでの効果は不明である。第三に、*peptide Lv* がマクロファージの TNF- α に影響を与えるメカニズムは不明なままである。最後に、滑膜の *Tnfa* 発現は *peptide Lv* 欠失マウスで上昇したが、この結果がマクロファージの影響によるものかどうかは不明なままである。

7. 謝辞

本研究を終えるにあたり、御指導いただきました北里大学医学部整形外科学 高相晶士教授、井上玄教授、内田健太郎講師、技術員の大貫裕子さんに深謝いたします。また、動物実験をする際には、動物実験センターの皆様方に大変お世話になりました。最後に、この調査の一部は、科学研究費助成事業（研究活動スタート支援、課題番号 19K24037）、北里大学学術奨励研究資金からの助成を受けたものです。

8. 引用文献

1. Lietman C, Wu B, Lechner S, Shinar A, Sehgal M, Rossomacha E, et al. Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling ameliorates osteoarthritis in a murine model of experimental osteoarthritis. JCI Insight. 2018;3:e96308.
2. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. Arthritis Res Ther. 2006;8:R187.
3. Takano S, Uchida K, Inoue G, Miyagi M, Aikawa J, Iwase D, et al. Nerve growth factor regulation and production by macrophages in osteoarthritic synovium. Clin Exp Immunol. 2017;190:235-43.
4. Uchida K, Satoh M, Inoue G, Onuma K, Miyagi M, Iwabuchi K, et al. CD11c(+) macrophages

and levels of TNF- α and MMP-3 are increased in synovial and adipose tissues of osteoarthritic mice with hyperlipidaemia. *Clin Exp Immunol*. 2015;180:551-9.

5. Uchida K, Takano S, Matsumoto T, Nagura N, Inoue G, Itakura M, et al. Transforming growth factor activating kinase 1 regulates extracellular matrix degrading enzymes and pain-related molecule expression following tumor necrosis factor- α stimulation of synovial cells: an in vitro study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017;18:283.

6. Sergijenko A, Roelofs AJ, Riemen AH, De Bari C. Bone marrow contribution to synovial hyperplasia following joint surface injury. *Arthritis Res Ther*. 2016;18:166.

7. Sun W, Zhang H, Wang H, Chiu YG, Wang M, Ritchlin CT, et al. Targeting notch-activated M1 macrophages attenuates joint tissue damage in a mouse model of inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res*. 2017;32:1469- 80.

8. Uchida K, Naruse K, Satoh M, Onuma K, Ueno M, Takano S, et al. Increase of circulating CD11b(+)Gr1(+) cells and recruitment into the synovium in osteoarthritic mice with hyperlipidemia. *Exp Anim*. 2013;62:255-65.

9. Dong Y, Zhang Y, Kang W, Wang G, Chen H, Higashimori A, et al. VSTM2A suppresses colorectal cancer and antagonizes Wnt signaling receptor LRP6. *Theranostics*. 2019;9:6517-31.

10. Levin SD, Taft DW, Brandt CS, Bucher C, Howard ED, Chadwick EM, et al. Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur J Immunol*. 2011;41:902-15.

11. Secco B, Camire E, Briere MA, Caron A, Billong A, Gelinas Y, et al. Amplification of adipogenic commitment by VSTM2A. *Cell Rep*. 2017;18:93-106.

12. Wang J, Manick B, Renelt M, Hansen L, Person A, Kalabokis V, et al. VSTM4 is a novel negative regulator of T cell activation. *J Immunol*. 2019;202(1 supplement):124.4.

13. Shi L, Ko ML, Abbott LC, Ko GY. Identification of Peptide lv, a novel putative neuropeptide

that regulates the expression of L-type voltage-gated calcium channels in photoreceptors. PLoS ONE. 2012;7:e43091.

14. Shi L, Zhao M, Abbey CA, Tsai SH, Xie W, Pham D, et al. Newly identified Peptide, Peptide Lv, promotes pathological angiogenesis. J Am Heart Assoc. 2019;8:e013673.

15. Koh H, Tasaka S, Hasegawa N, Yamada W, Shimizu M, Nakamura M, et al. Protective role of vascular endothelial growth factor in endotoxin-induced acute lung injury in mice. Respir Res. 2007;8:60.

16. Lai YS, Wahyuningtyas R, Aui SP, Chang KT. Autocrine VEGF signalling on M2 macrophages regulates PD-L1 expression for immunomodulation of T cells. J Cell Mol Med. 2019;23:1257-67.

17. Li N, Qin J, Lan L, Zhang H, Liu F, Wu Z, et al. PTEN inhibits macrophage polarization from M1 to M2 through CCL2 and VEGF-A reduction and NHERF-1 synergism. Cancer Biol Ther. 2015;16:297-306.

18. Kawakubo A, Uchida K, Miyagi M, Nakawaki M, Satoh M, Sekiguchi H, et al. Investigation of resident and recruited macrophages following disc injury in mice. J Orthop Res. 2020;38:1703-9.

19. Okubo T, Hara K, Azuma S, Takada S. Effect of retinoic acid signaling on Ripply3 expression and pharyngeal arch morphogenesis in mouse embryos. Dev Dyn. 2021;250:1036-50.

20. Takano S, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Aikawa J, Iwabuchi K, et al. Adrenomedullin regulates IL-1beta gene expression in F4/80+ macrophages during synovial inflammation. J Immunol Res. 2017;2017:9832430.

21. Wheeler KC, Jena MK, Pradhan BS, Nayak N, Das S, Hsu CD, et al. VEGF may contribute to macrophage recruitment and M2 polarization in the decidua. PLoS ONE. 2018;13:e0191040.

22. Fioravanti A, Fabbroni M, Cerase A, Galeazzi M. Treatment of erosive osteoarthritis of the hands by intra-articular infliximab injections: a pilot study. Rheumatol Int. 2009;29:961-5.

23. Grunke M, Schulze-Koops H. Successful treatment of inflammatory knee osteoarthritis with

tumour necrosis factor blockade. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:555-6.

24. Guler-Yuksel M, Allaart CF, Watt I, Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, van Schaardenburg D, et al. Treatment with TNF-alpha inhibitor infliximab might reduce hand osteoarthritis in patients with rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18:1256-62.

25. Magnano MD, Chakravarty EF, Broudy C, Chung L, Kelman A, Hillygus J, et al. A pilot study of tumor necrosis factor inhibition in erosive/inflammatory osteoarthritis of the hands. *J Rheumatol*. 2007;34:1323-7.

26. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:133-46.

27. Di Marzio P, Puddu P, Conti L, Belardelli F, Gessani S. Interferon gamma upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med*. 1994;179:1731-6.

28. Fultz MJ, Barber SA, Dieffenbach CW, Vogel SN. Induction of IFN-gamma in macrophages by lipopolysaccharide. *Int Immunol*. 1993;5:1383-92.

29. Rothfuchs AG, Gigliotti D, Palmblad K, Andersson U, Wigzell H, Rottenberg ME. IFN-alpha beta-dependent, IFN-gamma secretion by bone marrow-derived macrophages controls an intracellular bacterial infection. *J Immunol*. 2001;167:6453-61.

9. 業績目録

1. Mukai M, Uchida K, Okubo T, Takano S, Matsumoto T, Satoh M, Inoue G, Takaso M : Regulation of Tumor Necrosis Factor- α by Peptide Lv in Bone Marrow Macrophages and Synovium. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:702126.

2. Takata K, Uchida K, Takano S, Mukai M, Inoue G, Sekiguchi H, Aikawa J, Miyagi M, Iwase D, Takaso M : Possible Regulation of bFGF Expression by Mast Cells in Osteoarthritis Patients with Obesity: A Cross-Sectional Study. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;14:3291-3297.

3. Mukai M, Uchida K, Sugo K, Nakasu M, Nakajima T, Takata K, Takaso M, Urabe K : Long-term antibacterial activity of vancomycin from calcium phosphate cement in vivo. Biomed Mater Eng. In press. (DOI: 10.3233/BME-211243)
4. Uchida K, Takano S, Takata K, Mukai M, Koyama T, Ohashi Y, Saito H, Takaso M, Miyagi M, Inoue G : Differential Synovial CGRP/RAMP1 Expression in Men and Women With Knee Osteoarthritis. Cureus. 2021;13(6):e15483.
5. Uchida K, Mukai M, Miyagi M, Fukushima K, Uchiyama K, Nakayama A, Matsumoto M, Takahira N, Urabe K, Takaso M, Inoue G : Management of regional bone bank during declaration of a state of emergency concerning the COVID-19 in Japan. Cell Tissue Bank. 2021;1-7.
6. Tsukada A, Uchida K, Aikawa J, Takano S, Iwase D, Mukai M, Miyagi M, Nanri Y, Inoue G, Takaso M : Unilateral-dominant reduction in muscle volume in female knee osteoarthritis patients: computed tomography-based analysis of bilateral sides. J Orthop Surg Res. 2020;15(1):543.
7. Takata K, Uchida K, Mukai M, Takano S, Aikawa J, Iwase D, Sekiguchi H, Miyagi M, Inoue G, Takaso M : Increase in Tryptase and Its Role in the Synovial Membrane of Overweight and Obese Patients with Osteoarthritis of the Knee. Diabetes Metab Syndr Obes. 2020;13:1491-1497.
8. Takano S, Uchida K, Shoji S, Itakura M, Iwase D, Aikawa J, Mukai M, Sekiguchi H, Inoue G, Takaso M : Vascular Endothelial Growth Factor Is Regulated by the Canonical and Noncanonical Transforming Growth Factor- β Pathway in Synovial Fibroblasts Derived from Osteoarthritis Patients. Biomed Res Int. 2019;2019:6959056.
9. Takano S, Uchida K, Itakura M, Iwase D, Aikawa J, Inoue G, Mukai M, Miyagi M, Murata K, Sekiguchi H, Takaso M : Transforming growth factor- β stimulates nerve growth factor production in osteoarthritic synovium. BMC Musculoskelet Disord. 2019;20(1):204.
10. Aikawa J, Uchida K, Takano S, Inoue G, Iwase D, Miyagi M, Mukai M, Shoji S, Sekiguchi H, Takaso M : Regulation of calcitonin gene-related peptide expression through the

COX-2/mPGES-1/PGE2 pathway in the infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):215.

11. Takano S, Uchida K, Inoue G, Matsumoto T, Aikawa J, Iwase D, Mukai M, Miyagi M, Takaso M : Vascular endothelial growth factor expression and their action in the synovial membranes of patients with painful knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2018;19(1):204.

12. Mukai M, Uchida K, Takano S, Iwase D, Aikawa J, Inoue G, Miyagi M, Takaso M : Down-regulation of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 in the infrapatellar fat pad of osteoarthritis patients with hypercholesterolemia. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):137.

13. Mukai M, Miyagi M, Koyama T, Imura T, Nakahara K, Nakazawa T, Inoue G, Saito W, Shirasawa E, Uchida K, Takaso M : Spontaneous Spinal Epidural Hematoma in an Infant with Developmental Disabilities. *Spine Surg Relat Res.* 2018;2(4):335-339.

10. 図表

primer	Sequence (5' -3')	Product size (bp)
Tnfa-F	CTGAACTTCGGGGTGATCGG	122
Tnfa-R	GGCTTGTCACCTCGAATTTTGAGA	
Il1b-F	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	89
Il1b-R	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT	
Il6-F	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	131
Il6-R	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG	
Ifng-F	AGACAATCAGGCCATCAGCAA	134
Ifng-R	GGACCCCTGTGGGTGTTGAC	
Gapdh-F	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	223
Gapdh-R	ACACATTGGGGGTAGGAACA	

表 1 | qRT-PCR に使用したプライマーの配列

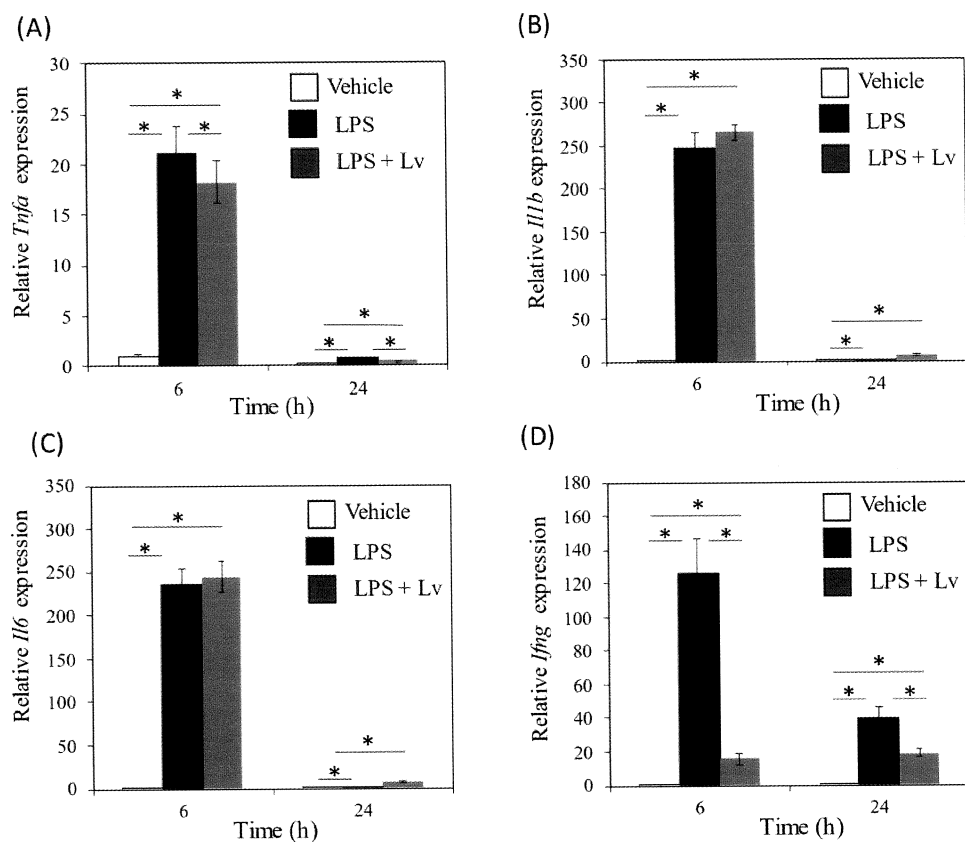


図 1 | BMM における LPS 誘発炎症性サイトカイン発現に対する Peptide Lv の効果

(A) *Tnfα*, (B) *Il1b*, (C) *Il6*, (D) *Ifng* 発現。相対的発現は 6 時間での Vehicle 処理における発現に基づいて決定した。すべてのデータは平均値 ± 標準誤差で示した (n = 8)。*は有意差を示す (p < 0.05)。

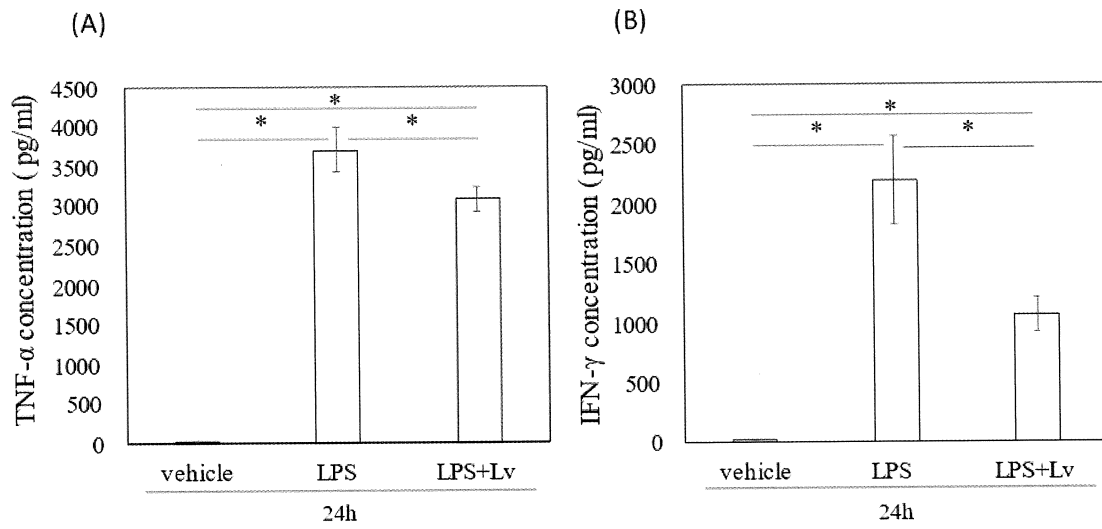


図 2 | BMM における LPS を介した TNF- α および IFN- γ 産生に対する Peptide Lv の効果
培養上清中の(A) TNF- α (B) IFN- γ 濃度。すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差で示した (n = 8)。
*は有意差を示す ($p < 0.05$)。

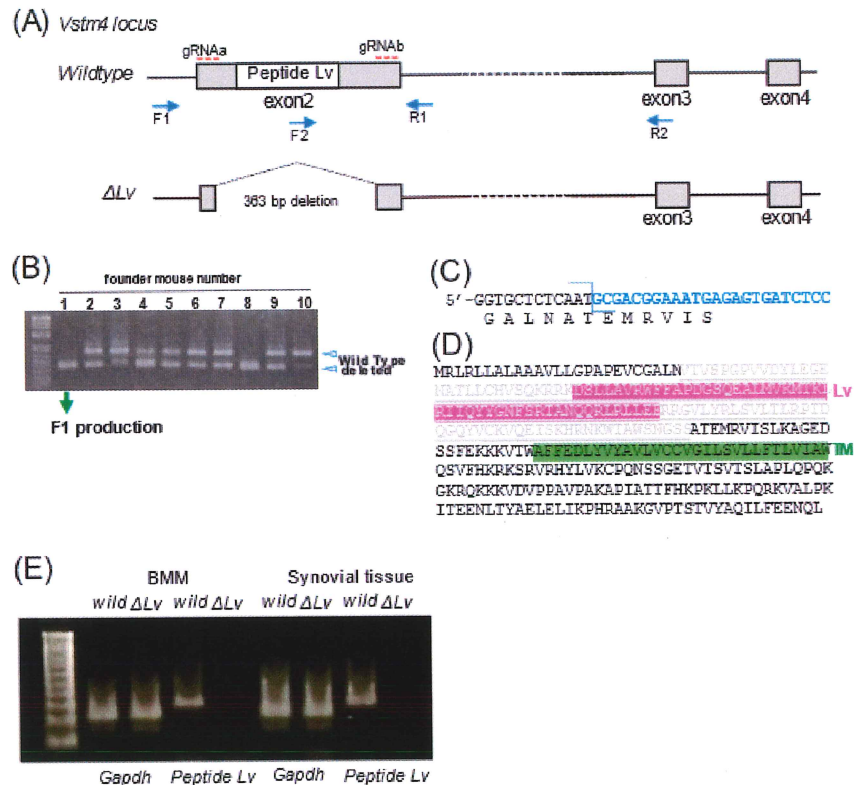


図 3 | *Peptide Lv* 欠失マウスの作製

(A) 野生型の *Vstm4* 遺伝子座とゲノム編集で用いた gRNA および PCR に使用されるプライマーの位置。(B) PCR 法による *peptide Lv* 欠失マウスのスクリーニングと No.1 マウスの系統化。(C)ゲノム編集により欠失が起きた領域の塩基配列の接合部とそれから予想されるアミノ酸配列。(D) *Vstm4* タンパク質の全アミノ酸配列と各領域: Peptide Lv (ピンク)、膜貫通ドメイン(TM; グリーン)、灰色の文字は欠失が起きたと予想されるアミノ酸配列を示す。(E) Peptide Lv の欠失を確認するための RT-PCR の結果。

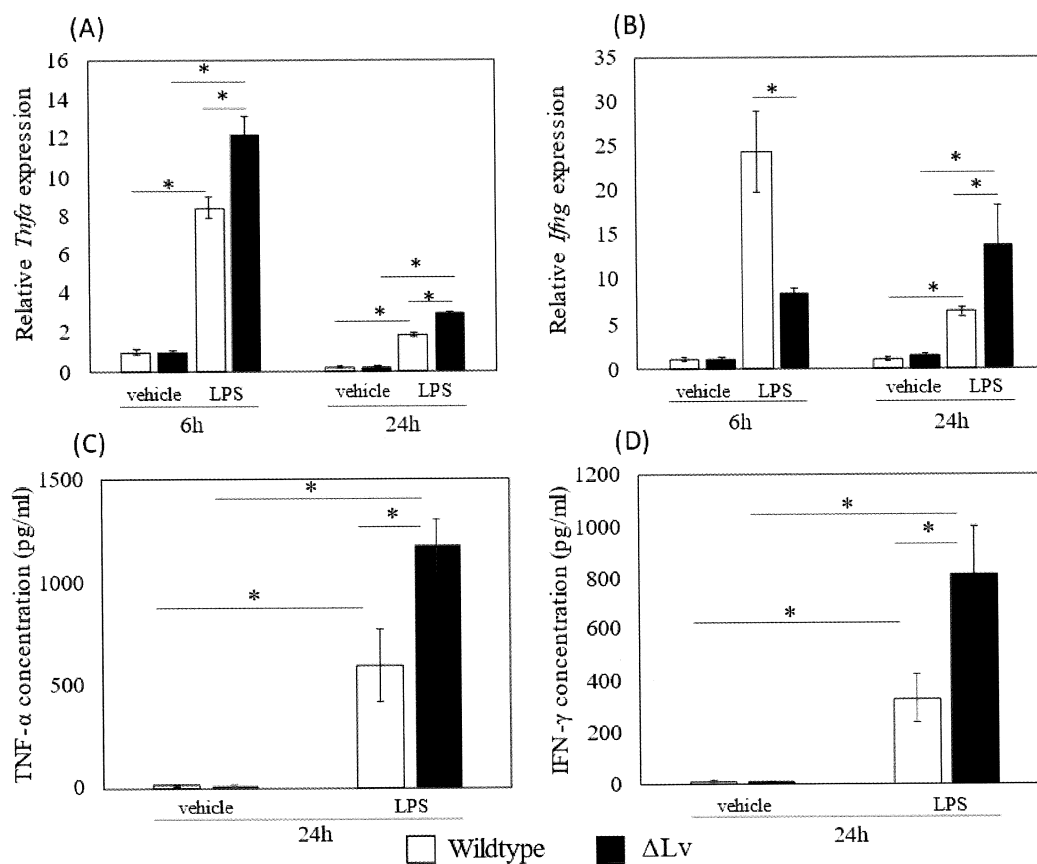


図 4 | TNF- α および IFN- γ の発現、産生に対する *peptide Lv* 欠失の影響

野生型マウス由来の BMM と *peptide Lv* 欠失マウス由来の BMM における (A) *Tnfa* (B) *Ifng* 発現と培養上清中の (C) TNF- α (D) IFN- γ 濃度。すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 8$)。*は有意差を示す ($p < 0.05$)。

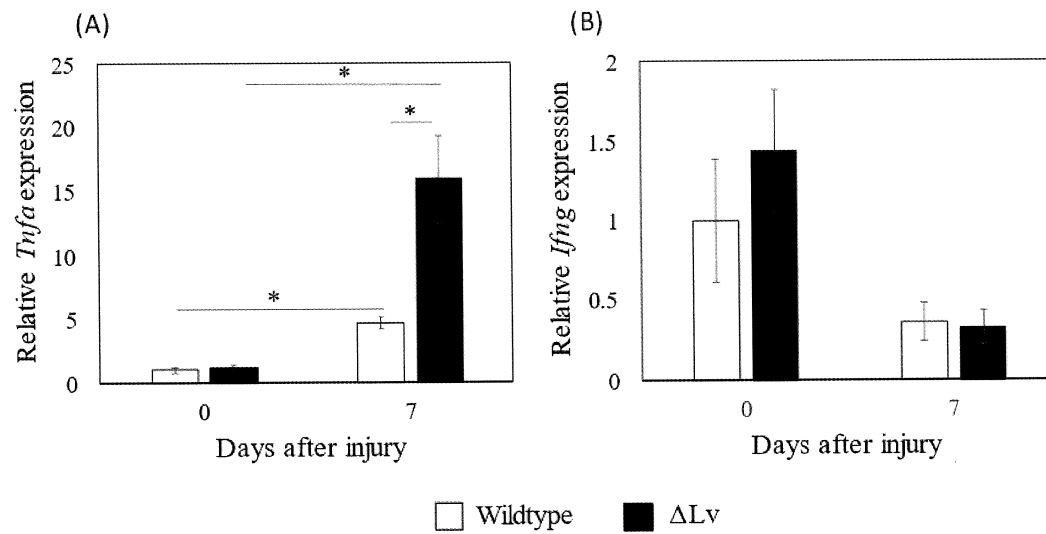


図 5 | 滑膜炎での *Tnfa* および *Ifng* 発現に対する *peptide Lv* 欠失の影響

野生型マウス由来の滑膜と *peptide Lv* 欠失マウス由来の滑膜における(A) *Tnfa* (B) *Ifng* 発現。

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した (n = 5)。*は有意差を示す (p < 0.05)。