

鉄分を基礎とする化合物 MRN-100 は樹状細胞および樹状細胞によりプライミングされた CD4 陽性 T 細胞で抗炎症性サイトカイン IL-10 を選択的にアップレギュレートして糖尿病を改善

Aya Ghoneum、Dr. James Gimzewski

UCLA 分子・細胞・発達生物学科（カリフォルニア州ロサンゼルス）

緒言

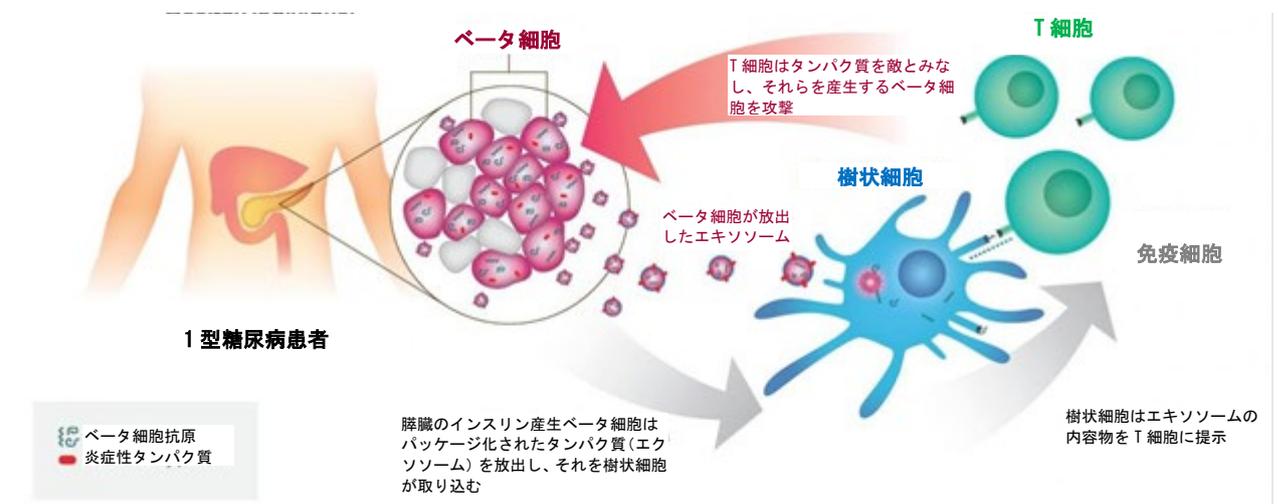
- ◇ 1 型糖尿病 (T1D) は、膵臓でインスリンを産生するベータ (β) 細胞を免疫細胞が攻撃して破壊する自己免疫疾患である。
- ◇ β 細胞と、マクロファージや樹状細胞 (DCs) 等のアクセサリー細胞が産生する活性酸素種 (ROS) と炎症性サイトカインは、糖尿病 (DM) の増悪で主要な役割を担っている。
- ◇ 鉄分を基礎とする化合物 MRN-100 は強力な抗酸化剤で、おそらく抗酸化剤として作用して免疫反応を抑える生物学的反応調節物質として機能することができる。
- ◇ 樹状細胞と T 細胞は、炎症性のインターロイキン 6 (IL6) や腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、および抗炎症性のインターロイキン 10 (IL-10) 等のサイトカインを通じて情報を交換している。

論点：

BRMs は、免疫細胞が媒介する損傷の増悪作用を止めることで糖尿病を治療するのに使用できるか。

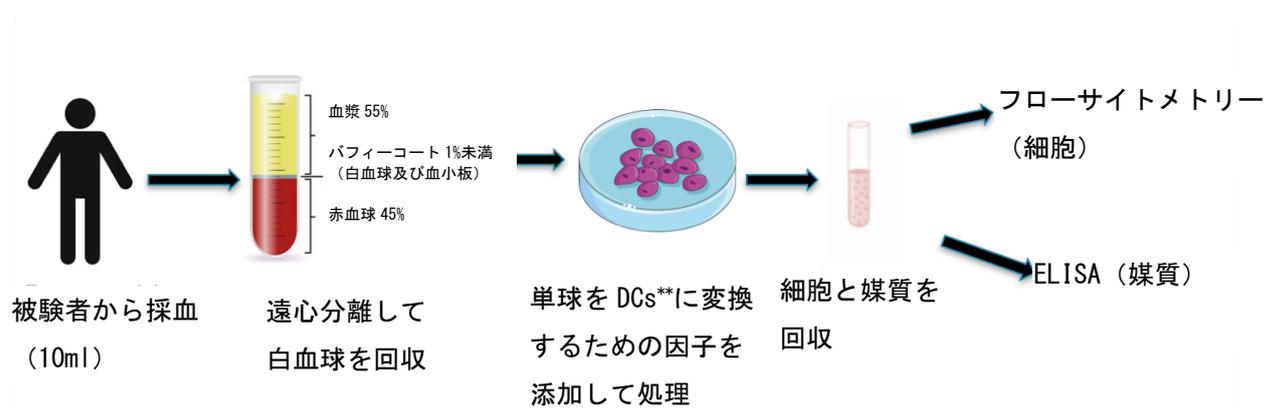
仮説：

MRN-100 は DCs および T 細胞における炎症と関連したサイトカイン発現に影響を及ぼすことで抗炎症環境を促進する。



図：樹状細胞（青色）と T 細胞（緑色）がベータ細胞（ピンク色）を外來性として検出して攻撃し、インスリン産生の低下をもたらす様子の図解

材料と方法

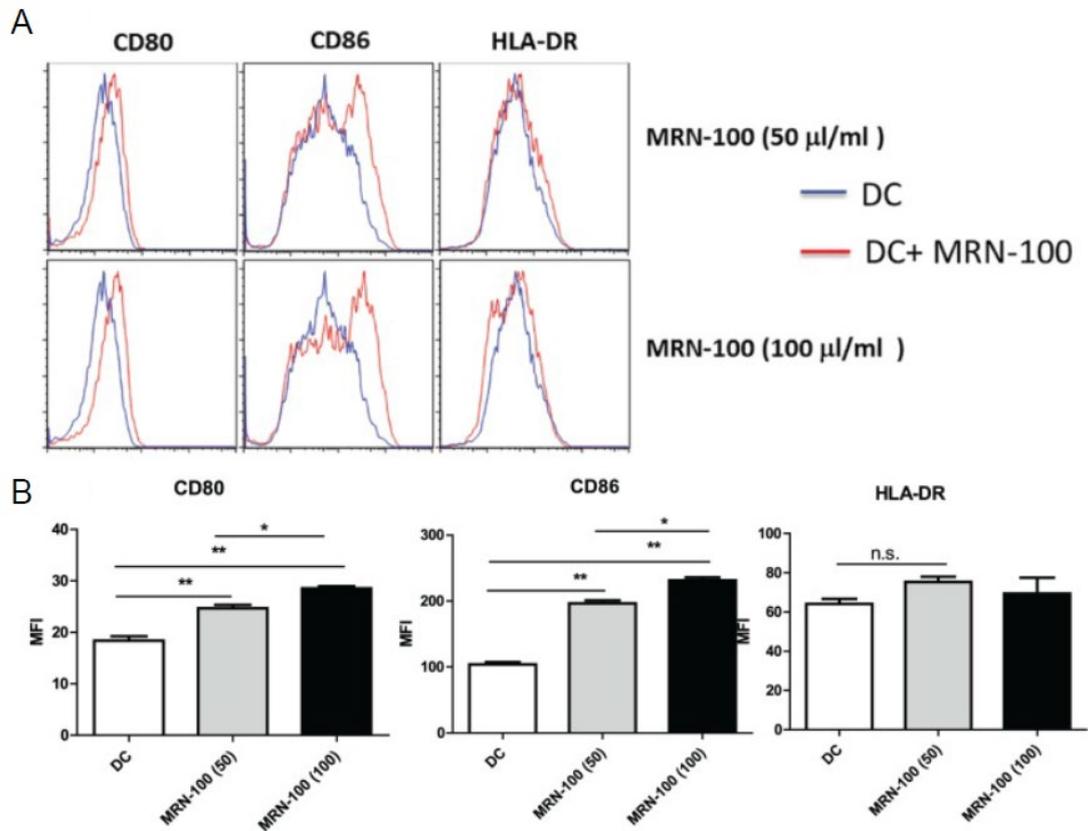


- ◇ DCs を MRN-100 にて 24 時間にわたり処理
- ◇ MRN-100 は 2 つの異なる濃度 (50 μ l/ml および 100 μ l/ml) にて使用
- ◇ LPS を添加して DC を活性化し炎症状態を模倣
- ◇ DC を MRN-100 または LPS、もしくはその両方で 24 時間にわたる前処理を実施後、5 日にわたり T 細胞と共培養
- ◇ 表面マーカーをフローサイトメトリーにより測定、分泌サイトカインを ELISA により測定

実験群

樹状細胞 (DCs)	CD4 陽性 T 細胞
DCs+MRN-100	DCs および T 細胞
DCs+LPS	MRN-100+DCs および T 細胞
DCs+LPS+MRN-100	LPS+DCs および T 細胞
	MRN-100+LPS+DCs および T 細胞

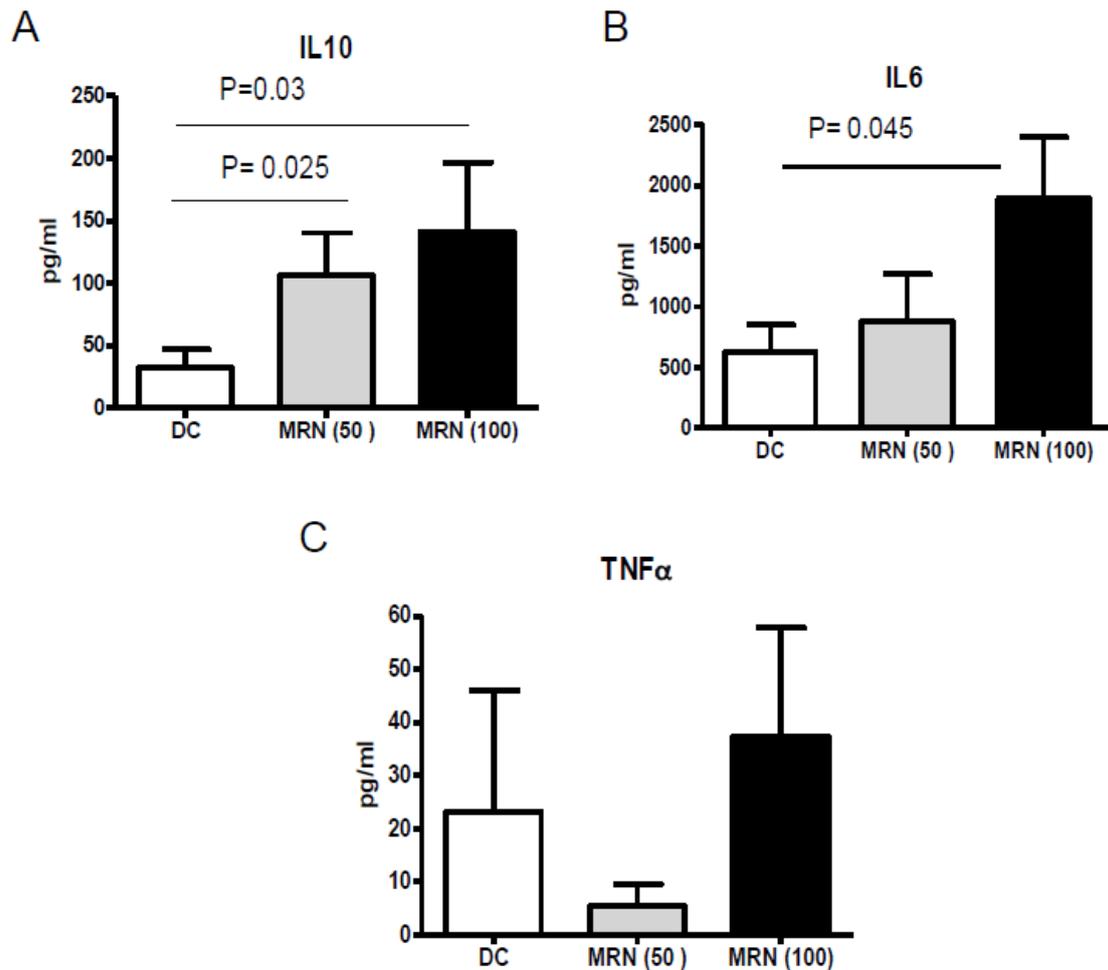
1. 休止樹状細胞表面マーカー発現に対する MRN-100 の影響



A:フローサイトメトリーのデータは、対照（青線）と比較して50および100 μ l/mlの両濃度のMRN-100（赤線）による処理後のDCsにおけるCD80およびCD86細胞表面マーカーの発現量が増加することを示している。これはDCsの活性化状態が高まっていることを示す。この変化はHLA-DRでは観察されなかった。

B:フローサイトメトリーのデータを数値化するとMRN-100の両濃度でCD80およびCD86の有意な増加が示される（* p <0.05、** p <0.01）。

2. MRN-100 は休止 DCs で一部の炎症性および抗炎症性サイトカインの産生を増大

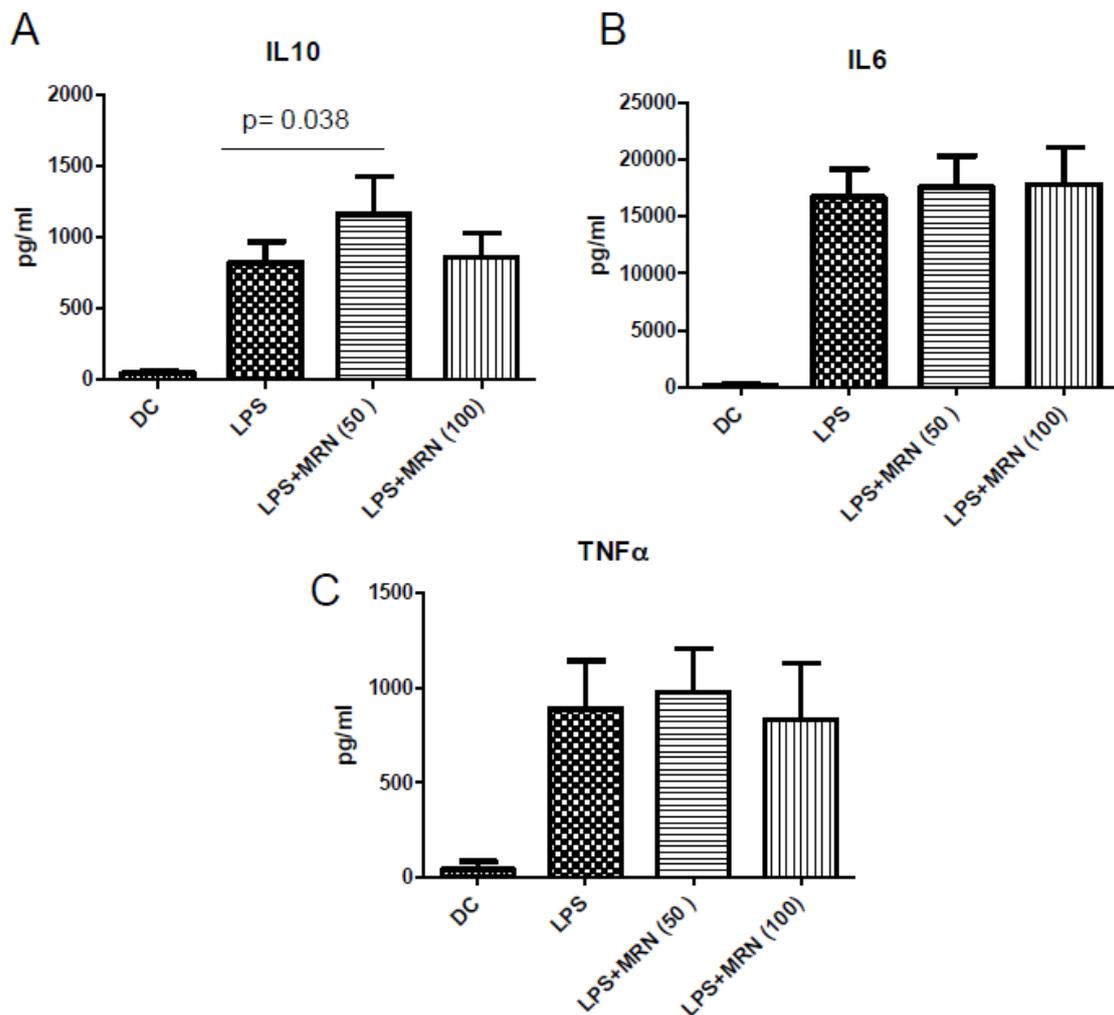


A:MRN-100 による処理を受けた細胞の媒質から得た ELISA データは、未処理の対照 (DC) と比較して抗炎症性 IL10 の分泌が増加していることを示す。

B:MRN-100 による処理は、濃度 100 μ l/ml の場合のみ IL6 分泌を増大させ、50 μ l/ml では増大させなかった。

C:MRN-100 は炎症性 TNF- α の産生に変化をもたらさなかった。

3. LPS により活性化された DCs で MRN-100 は抗炎症性サイトカインの産生を増大

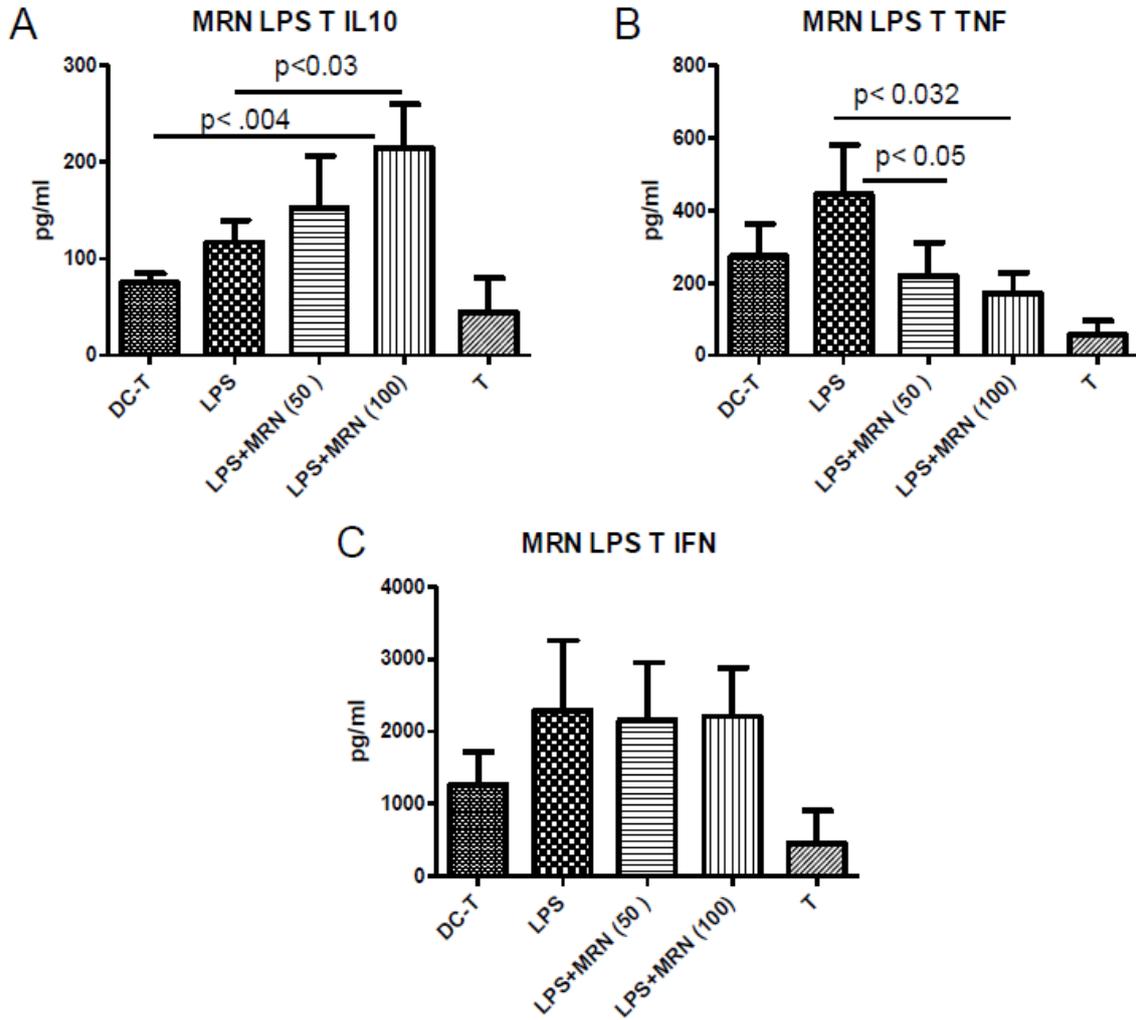


A: LPS により活性化された DCs の媒質から得た ELISA データは、活性化対照 (LPS) と比較して MRN-100 による処理が 50 μ l/ml の濃度にて抗炎症性 IL10 の分泌を増大させた。活性化された DCs はいずれも非活性化休止 DC 対照 (DC) と比較して IL10 分泌を有意に増大させた。

B: LPS による活性化は IL6 の発現を増大させたが MRN-100 による処理は IL6 産生に変化をもたらさなかった。

C: LPS による活性化は TNF- α の発現を増大させたが、MRN-100 の添加は TNF- α 産生に変化をもたらさなかった。

4. MRN-100 による処理は DC によりプライミングされた休止期 T 細胞におけるサイトカイン発現に変化をもたらさない

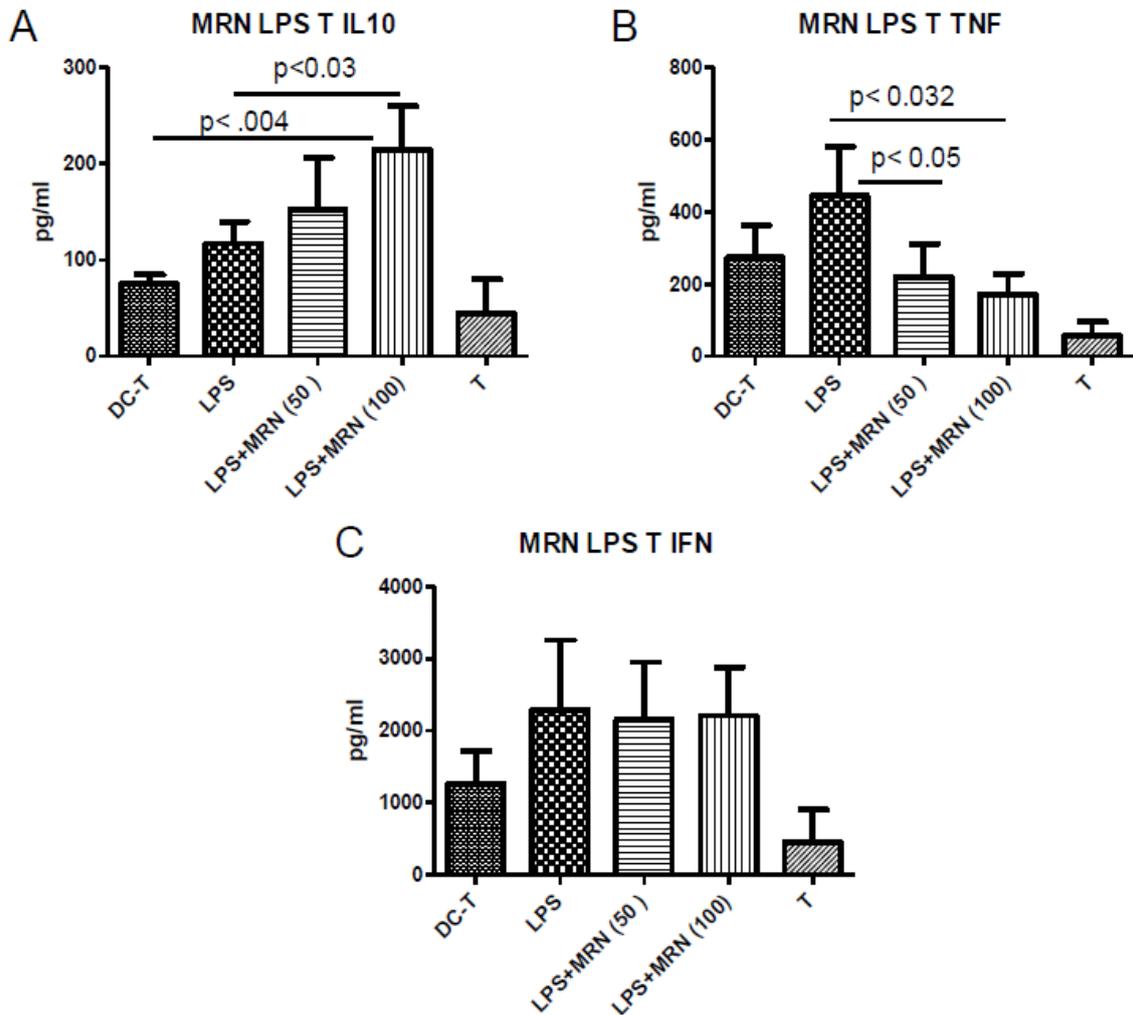


A: CD4 陽性 T 細胞の単独 (CD4T) または DCs と共培養 (MRN-100 による処理済みまたは対照) における媒質から得られた ELISA データは、炎症性 IFN の濃度がいずれの条件でも差がなかったことを示している。

B: DC との共培養後に炎症性 IL5 の濃度は上昇したが、MRN-100 による前処理は DC 共培養の対照と比較して IL5 発現に変化をもたらさなかった。

C-D: 抗炎症性 IL10 (C) および炎症性 TNF- α (D) の濃度に変化は見られなかった。

5. MRN-100 による処理は DC によりプライミングされ LPS により活性化された T 細胞におけるサイトカイン発現に変化をもたらす



A: CD4 陽性 T 細胞の単独 (T)、未処理の休止期 DCs との共培養 (DC-T)、LPS により活性化された DCs (MRN-100 による処理済みまたは対照) との共培養における媒質から得た ELISA データは、いずれの濃度の MRN-100 による処理でも抗炎症性 IL10 の濃度が上昇することを示した。

B: 低濃度および高濃度のいずれの MRN-100 による処理でも炎症性 TNF- α の濃度は低下した。

C: 炎症性 IFN の濃度に変化は見られなかった。

結論

1. MRN-100 は**休止期** DCs の活性化状態を高める。
2. MRN-100 は**休止期** DCs で抗炎症性および炎症性サイトカインを増加させる。
3. MRN-100 は低濃度にて**活性化** DCs の抗炎症性サイトカインを増加させるが炎症性サイトカインには影響を及ぼさない。
4. MRN による処理を受けた**活性化** DCs は共培養 **T 細胞**における抗炎症性サイトカインを増加させ炎症性サイトカインを減少させる。

MRN-100 は糖尿病における DC 媒介性 T 細胞活性化を抑制するのに役立つ可能性がある

謝辞

研究への協力

Dr. James Gimzewski (UCLA カリフォルニア・ナノシステム研究所)、Dr. Sastry Gollapudi (カリフォルニア大学アーバイン校医学部)、Dr. Anshu Agrawal (カリフォルニア大学アーバイン校医学部)、Sudhanshu Agrawal (MS) (カリフォルニア大学アーバイン校医学部) に感謝の意を表します。

資金源

本研究は株式会社エイ・シー・エム (東京) の助成金による支援を受けています。