



移植前Mitomycin-C処置による膵島移植グラフト生着延長のメカニズムの解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-01-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 直哉 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000154

移植前 **MMC** 処置による膵島移植グラフト生着延長のメカニズム
-複数の免疫細胞遊走因子の分泌抑制による局所免疫不応答の誘導-

佐藤直哉

福島県立医科大学大学院 医学研究科医学専攻 病態制御外科学

【要約】

【背景】膵島移植は重症低血糖発作を伴うインスリン依存糖尿病患者に血糖応答性インスリン分泌能の回復をもたらすが、移植グラフトの生着率改善が最大の課題である。その要因は膵島分離過程で強い細胞ストレスを受けたグラフトへの宿主免疫応答により、移植後に移植片の大半が喪失されることにある。成績改善には、膵島毒性を有する免疫抑制剤を用いることなく、移植細胞・組織への宿主免疫応答を抑制しうるアプローチが望まれる。これまで、移植前 Mitomycin-C (MMC) 処置により免疫抑制剤を投与せずに移植膵島の長期生着が得られることが示されている。本研究では、MMC 処置がもたらす膵島の遺伝子発現変化を網羅的に解析し、免疫抑制剤の非使用下での膵島グラフト生着延長メカニズムの解明を試みた。

【方法】実験①；分離したラット膵島を MMC 処置群 (10 μ g/ml、30 分) と単純培養群に分け、Streptozotocin 誘導糖尿病マウスの腎被膜下に移植した。また、移植部位に浸潤した免疫細胞を免疫組織学的染色にて評価した。実験②；両群において新鮮膵島と 3 日間培養膵島を採取 (各 n=3) し、マイクロアレイにて網羅的遺伝子解析を行った。バイオインフォマティクス解析ソフトを用いて、データマイニング解析、および生物学的機能解析を行った。実験③；遺伝子解析の妥当性を in vitro 実験系において検証した。膵島培養液中のタンパク発現を ELISA 法により評価し、さらに膵島培養液へのマウス単球の遊走能を評価した。

【結果】結果①；ラット膵島のマウスへの免疫抑制剤非使用移植実験の結果、MMC 処置膵島の平均生着期間は非処置膵島と比較して有意に延長した。移植部位の免疫細胞数は MMC 処置膵島で有意に減少し局所免疫不応答の誘導が示唆された。結果②；両群の膵島において発現遺伝子の生物学的機能変化を比較した結果、非処置群では多くの遺伝子群 (cellular movement, immune cell trafficking, inflammatory response など) で発現増強を認めたが、MMC 処置膵島ではいずれも発現が抑制されていた。これらの遺伝子群より膵島より分泌される免疫細胞遊走因子 (サイトカイン・ペプチダーゼ) が MMC 処置により複数で同時に抑制されていることが注目され、発現差の大きい IL-6、MCP-3、MMP2 を検証実験の候補として選定した。結果③；膵島培養液中の IL-6、MCP-3 および MMP-2 値はいずれも、MMC 処置膵島において有意に抑制され、遺伝子解析の妥当性が確認された。また、膵島培養液に対するマウス単球の遊走能は、MMC 処置群において有意に抑制された。さらに非処置膵島培養液に抗 MCP-3 モノクローナル抗体もしくは MMP 阻害剤を用いると単球の遊走能は有意に抑制された。

【結語】膵島分離過程を経た膵島グラフトは、免疫細胞遊走因子を分泌し、宿主免疫応答を惹起するが、移植前培養期間に MMC 処置を付加することにより、免疫細胞遊走因子の分泌が抑制され、局所免疫反応の不応答が誘導されることで、免疫抑制剤非使用下においてもグラフトの生着延長がもたらされるものと考えられた。

【研究の背景および目的】

膵島移植は、 β 細胞機能が廃絶した 1 型糖尿病患者において、無自覚性低血糖発作を伴う血糖コントロールが困難な重症症例に対し、血糖応答性インスリン分泌の回復をもたらす β 細胞置換療法である。近年の欧米を中心とした臨床試験の結果、膵島移植により重症インスリン依存糖尿病患者は内因性インスリン分泌能を長期間獲得し、重症低血糖発作から解放されることが明らかになっている(1, 2)。しかし、膵島移植には通常複数回の移植を必要とする上、移植後のインスリン離脱率は 1 年目では 80%、移植後 5 年で 10%以下と低下するため(2)、生着率の改善が最大の課題である。その要因は移植後にグラフトの大半が喪失されることにあり、それに寄与する現象として、1) 膵島分離過程における細胞ストレスによる細胞活性低下(3, 4)、2) 細胞ストレスを受けたグラフトが惹起する自然免疫系反応(5, 6)、3) グラフト拒絶反応(7)、4) 自己免疫の再活性化(8)、および 5) 免疫抑制剤による細胞毒性(9)などが知られている。したがって、免疫抑制剤を用いることなく、細胞ストレスを受けたグラフトが惹起する宿主免疫応答を抑制できれば、膵島移植の成績を向上させる極めて有効なアプローチとなりうる。膵島移植は細胞・組織移植であり、生着促進を目指した移植前処置の付加は、臓器移植に比して容易である。我々はこれまでに、Mitomycin-C (MMC) による移植前処置が、免疫抑制剤の投与を要せずに、膵島グラフトの長期生着を誘導することを明らかにしてきた(10-12)。この方法は、簡便なグラフトの処置のみでレシピエントへの侵襲も伴わない有望な方法であるが、これまでに MMC 処置による膵島グラフトの生着延長のメカニズムは明らかではなかった。この生着延長のメカニズムの解明は、膵島移植における移植前グラフトにどのような変化を与えるべきかについて、新たな知見を加えることになると思われる。よって本研究では、膵島の遺伝子発現を網羅的に解析し、MMC 処置とその後の培養期間における膵島の生物学的機能変化を包括的に捉え、その機能変化から膵島生着延長のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

実験動物

本研究で実施した動物実験では、生後 8~10 週の雄 Wister rat(CLEA Japan, Inc, Tokyo, Japan)を膵島ドナーとして使用した。糖尿病マウスは、生後 8~9 週の雄マウス C57BL/6(H-2b)(B6 mice; Nihon Clea, Inc. Shizuoka, Japan)の腹腔内に Streptozotocin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を 250mg/Kg body weight 投与して作成した。随時空腹時血糖が連日 2 回の測定で 400mg/dl 以上の個体を糖尿病マウスと認定し、レシピエントとした。実験で使用するラットとマウスは、調整された温度と適切な明暗サイクル下で飼育された。骨髓細胞からの単球分離には、生後 8~10 週の雄 B6 マウスを使用した。すべての動物実験において、麻酔法はイソフルランの吸入麻酔法を使用した。動物実験プロトコールは福島県立医科大学の動物実験倫理委員会の承認を得ている。

膵島分離・MMC 処置と培養、膵島移植

膵島の分離は過去に我々が報告した方法(13)に則り実施した。簡潔に述べると、摘出したラット膵の主膵管よりコラゲナーゼ(Liberase;0.23mg/ml)を注入し膨化させ、消化した後に膵外分泌組織と膵島組織が混在した溶液から Ficol 液を用いた比重遠心法で膵島のみを純化する。分離膵島は MMC 処置膵島と非処置膵島の 2 群に分け、MMC 処置群では MMC を 10mg/ml 濃度に調整した培地 (RPMI-1640 with HEPES[10mM], L-glutamine[2mM], penicillin[100U/mL], streptomycin sulfate[100µg/mL], amphotericin B[0.5/mL], and 10% fetal bovine serum)にて 30 分間培養し(11)、非処置膵島は培地のみで同時間培養した。その後 3 回洗浄し、培地 RPMI で培養した (37°C、5%CO₂/95% air)。膵島移植実験では、300 個の膵島を顕微鏡下に採取し、糖尿病 B6 マウスの左腎皮膜下に移植した。拒絶は、血糖値が連続 2 日間の測定で 300mg/dl を超えた場合と定義した。

移植部位の免疫細胞浸潤の評価

移植グラフトに対する局所免疫応答を評価するために、移植部位に浸潤した免疫細胞を免疫組織学的染色後、免疫細胞数を測定した。膵島移植により血糖正常化した糖尿病マウスを、移植後 4 日目および 8 日目に安楽死させた。移植側腎を摘出し、速やかに 10%ホルマリンで固定し、移植グラフトの断面が最大となるように割を入れパラフィン包埋後、4 µm の連続切片を作成した(14)。連続切片は、まず H.E. 染色で免疫細胞浸潤を評価し、さらに免疫組織学的染色法にて単球、T 細胞、そして B 細胞を染色した。マウス単球染色には抗 F4/80 モノクローナル抗体(dilution 1:200; Abcam, UK)を使用し、T 細胞染色には抗 CD3 モノクローナル抗体 (dilution 1:100, Abcam, UK)、B 細胞染色に抗マウス CD45R モノクローナル抗体(dilution 1:50; Caltag)を使用した。

分離膵島の RNA 精製と増幅, Microarray 解析

MMC 処置によるグラフト生着延長のメカニズムを解明するために、膵島遺伝子の網羅的発現解析を行った。MMC 処置および非処置膵島の両群において、新鮮膵島 (d0-islets)、培養 1 日後(d1-islets)、培養 3 日後(d3-islets)の膵島を採取し、総 RNA 抽出を行った。200 個の分離膵島を顕微鏡下に採取し、ただちに-80°Cで冷凍保存した。膵島の総 RNA の抽出はメーカーの手順に従い Rneasy[®] Mini Kit を用いて行った。抽出された RNA の定量と純度は NanoDrop 1000 Spectrophotometer と Agilent RNA 6000 Nano Kit で測定し、RNA integrity number 値 > 7.0 かつ、濃度 >33ng/µl であるサンプルを増幅の基準とした。それぞれの総 RNA サンプルより逆転写酵素で cDNA を合成し (Ambion R WT Expression Kit を使用)、さらに RNA ポリメラーゼで増幅しながら、cRNA を合成した。合成された cRNA は GeneChip R WT Terminal Labeling Kit で蛍光ラベルし、GeneChip R Rat gene 1.0 ST Array にてハイブリダイゼーションした。つぎに、このアレイを Gene

ChipR Scanner 3000 7G でスキャンし、蛍光強度イメージを作成後、GeneChip® Command Console® Software を用いて解析した。

マイクロアレイデータ解析および発現遺伝子 Bio-function 解析

マイクロアレイデータの Normalization と filtering は Gene Spring GX software Version 12.5. を用いて行った。発現差解析では、d0-islet に対する d1-および d3-islet の遺伝子発現強度を比較し、発現強度に 2 倍以上のカット・オフ基準を満たす transcripts を特定した。発現強度 2 倍以上のデータについて Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Qiagen, Redwood City, CA, USA; www.qiagen.com/ingenuity) を用いた Bio-function 解析をおこなった。この解析は、マイクロアレイデータを Ingenuity knowledge data base に基づく生物学的プロセスに分類し、各クラスターの発現傾向を統計学的に解析する方法である。この解析法により、全遺伝子の発現プロファイルを包括的に解釈することが可能となるのみならず、統計学的に有意な生物学的機能のランク付けが可能となる。

ELISA を用いた臍島培養上清中の蛋白測定

Bio-function 解析の結果に基づき、我々は immune cell trafficking (ICT) 遺伝子群が MMC 処置により最も抑制された生物学的プロセスのひとつであり、さらにそれら遺伝子群において、臍島グラフトが分泌する複数の免疫細胞遊走因子（サイトカインおよびペプチダーゼ）が同時に抑制される変化に注目した。そこでアレイデータの検証を目的として、臍島培養上清中の蛋白発現を ELISA kit にて測定した。リストアップされた免疫細胞遊走因子のなかで、MMC 処置により遺伝子発現が最も抑制された分子を検証の候補として選定した。サイトカイン遺伝子では IL-6、IL-33、Monocyte chemotactic protein-3(MCP-3)を、ペプチダーゼ遺伝子では Matrix metalloproteinase 2(MMP2)と Matrix metalloproteinase 9 (MMP9)を選出した。

分離臍島 240 個を顕微鏡下に採取し、3.5cm の培養皿(Sumiron)を用い 3ml の RPMI-1640 培地で培養した（臍島；80 個/ml）。臍島培養上清は培養 1 日目、2 日目、3 日目に採取し、速やかに -80°C にて保存した。培養上清中の各因子の蛋白濃度は ELISA kit を用いて測定した（IL-6, IL-33, および MMP9 の定量；Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、MCP-3 定量；ELISA Kit for MCP3 (Cloud-Clone Corp. Houston, TX, USA)、MMP-2 定量；Mmp2 ELISA kit (Abnova)、すべてのアッセイは重複測定）。それぞれの ELISA kit の測定下限値は、IL-6; 21pg/ml, IL-33; 6.85pg/ml, MCP-3; 5.7pg/ml, MMP2; 10pg/ml, and MMP9; 0.013ng/ml であった。各アッセイにおける発光濃度測定は吸光マイクロプレートリーダー(450nm)を用いて行った。

自動細胞分離装置によるマウス単球分離

生後 8~10 週の雄 B6 マウスを吸入麻酔で安楽死させ、腓骨および脛骨を摘出し、骨髓

細胞を採取した(15)。骨髓細胞由来の単球分離は、非単球細胞(T細胞, 顆粒球, NK細胞, B細胞, 樹状細胞, および好酸球)を除去して行った。採取した骨髓細胞に抗 CD3, 抗 CD7, 抗 CD19, 抗 CD45RA, 抗 CD56, および抗 IgE 抗体を含むカクテル抗体(monocyte isolation kit; Miltenyi Biotec Bergisch-Gladbach, Germany)を加え、磁気細胞分離装置(auto MACS® Pro Separator; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany)を用いて分離を行った。

マウス単球遊走能解析

ラット臍島培養上清へのマウス単球の遊走能は、Transwell migration assay 法を用いて評価した。Migration assay の chamber は、単球に適した Transwell permeable pore size 5µm (corning, USA)を使用した。ラット臍島培養上清は蛋白定量に使用したサンプルと同様のものを使用した。分離した単球を 1.0×10^6 個/ml となるよう無血清培地で希釈し (A 液)、上段槽に A 液 100µl 注入し、下段槽には 600µl 臍島培養上清を注入した。5～7 時間の培養後に、5µm の小孔を介して下段槽に移動した単球数の平均 (高倍率 10 視野における単球数の平均値) を測定し、単球の遊走能とした。Negative control には RPMI に対する単球遊走能を用いた。また、MCP-3 阻害による単球遊走能への影響を評価するために、培養上清に 2µg/ml の抗 MCP-3 モノクローナル抗体(Abcam, UK)に加え、単球の遊走能を測定した。さらに、MMP ファミリー (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP8, MMP9, MMP-12, MT-MMP1, MMP-26) の阻害剤 GM6001 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA)を 10µmol/L の濃度で培養上清に加え、単球の遊走能を測定した。

統計解析

本研究のデータは平均±SEM で表記した。IL-6, MCP-3, および MMP-2 蛋白量は、Student t-test を用いて比較し、単球の遊走能は Student-t test もしくは One-way Anova を用いて比較した。グラフト生着日数は Kaplan-Meier 法で算出し、MMC 処置群と非処置群での生着期間の比較は log-rank test を用いた。全ての解析において、p 値 0.05 以下を統計学的有意と定義した。全ての統計解析は Graph-Pad PRISM 5.0 software (GraphPad, La Jolla, CA)を用いて行った。

【結果】

移植前 MMC 処置により誘導される移植グラフト生着延長効果

MMC 処置を加えた WS(RT1k)ラット臍島を、Streptozotocin 糖尿病化マウス C57BL/6(B6:H2-b)に移植する concordant な異種臍島移植モデルにおいて、MMC 処置グラフトの著名な生着延長を確認した(MST; 98 days versus 17days, $p < 0.01$)(Figure1)。特に、約 40%の MMC 処置臍島では、免疫抑制剤を用いずに 100 日を超える長期生着

を認めた。これらの結果は我々がこれまでに報告と一致した成績であり(10)、MMC 処置による移植グラフトの生着延長が本研究においても再現されたことを示している。

移植前 MMC 処置による局所免疫不応答の誘導

ラット膵島をマウス腎被膜下に移植する **concordant** な異種移植実験において、移植部位に遊走された免疫細胞数とその構成を免疫組織染色にて評価した。その結果、移植後 8 日目のグラフトに集簇する免疫細胞は MMC 処置膵島で有意に減少することが明らかになった (Figure A and B)。また、浸潤した免疫細胞の構成を明らかにするために、移植部位の連続切片を免疫染色した。移植後 8 日目に移植部位へ集簇した免疫細胞は、単球 (F4/80 陽性) および T 細胞 (CD3 陽性) が優位であり、B 細胞 (CD45R 陽性) の比率は低いことが明らかになった (Figure 2 C,D,E, F, G, H)。また、MMC 処置および非処置膵島グラフトへ浸潤した免疫細胞を比較すると、移植後 4 日目で有意な差は認めなかったが、移植後 8 日目では、MMC 処置グラフトで単球、T 細胞および B 細胞のすべての免疫細胞数が減少しており (Figure 3)、MMC 処置による局所の免疫不応答が誘導されたことが明らかになった。これらの結果についても、我々の既報と一致していた(14)。

MMC 処置による膵島遺伝子プロファイルの変化

MMC 処置および非処置膵島より抽出された総 RNA を、マイクロアレイにて網羅的に解析した。分離後培養期間に膵島で生じる遺伝子プロファイル変化を明らかにするために、両群において 3 日培養膵島(d3-islets)の遺伝子発現を新鮮膵島(d0-islets)と比較した。非処置膵島ではカット・オフ基準(発現強度 2 倍以上)を満たす遺伝子を 735 個認め、そのうち 526 個で遺伝子発現が増強され、209 個で遺伝子発現が抑制された。一方、MMC 処置膵島では上記基準を満たす 871 個の遺伝子のうち、289 個で発現が増強され、582 個で発現が抑制された (table 1)。この発現差解析で選出された遺伝子 (非処置; 735 個、MMC 処置 ; 871 個) について、IPA ソフトウェアを用いて生物学的機能別にクラスター解析を行った。膵島での遺伝子発現を視覚化した **heat map** が示すように、MMC 処置膵島と非処置膵島では培養期間で生じる遺伝子変化に顕著な違いを認めることが明らかとなった (Figure 4)。すなわち、非処置膵島では培養期間に **cellular movement**, **immune cell trafficking**, および **inflammatory response** といった細胞活性化に関連する多くの遺伝子群で発現が増強されるが、MMC 処置はこれらの遺伝子群を含む多くの遺伝子が抑制されることが明らかとなった。また、MMC 処置膵島では、**cell death and survival** に関与する遺伝子群の発現が増強され、MMC 処置による DNA 複製障害作用による結果と考えられた (Figure 4)。Bio-function 解析の結果、非処置膵島において統計学的に最も有意に変化した生物学的機能クラスターは、**cellular movement** (IPA 上の **Molecular and Cellular Functions category** において)と **immune cell trafficking**(IPA 上の **Physiological System Development and Function category** において)であった(Figure 5)。

これらの遺伝子群のうち膵島が分泌すると知られる免疫細胞遊走因子に注目すると、非処置膵島では多くのサイトカインおよびペプチダーゼ遺伝子の発現上昇を認めるが、その一方で、MMC 処置膵島では、これらの免疫細胞遊走因子は複数で同時に抑制されることが示された(Figure6)。さらに、MMC 処置により抑制される免疫細胞遊走因子は 3 日間の培養期間に増加されることが明らかとなり、グラフト生着延長に関与しうる因子として注目された。(table2)。

MMC 処置による免疫細胞遊走因子の分泌抑制効果

網羅的遺伝子解析の結果より、MMC 処置により誘導されるグラフト生着延長因子として、膵島が分泌する複数の免疫細胞遊走因子（サイトカイン・ペプチダーゼ）の抑制に注目した。それらの免疫細胞遊走因子のより、最も発現が抑制された遺伝子について、膵島培養上清中のタンパク発現を検証した (table2; IL-6(FC;-7.659)、IL-33(FC;-5.372)、MCP3(FC;-3.819)、MMP2(FC;-4.721)および MMP9(FC;-2.406))。その結果、IL-6、MCP-3、および MMP-2 において膵島培養上清中のタンパク発現は、MMC 処置群で有意に抑制されることが明らかになった(IL-6 level (n=7); 879.1 ± 95.2 pg/ml vs 577.1 ± 56.5 pg/ml, $p < 0.05$, MCP3 level(n=8); 56.5 ± 4.3 pg/ml vs 38.0 ± 2.6 pg/ml, $p < 0.01$, and MMP2 level (n=4); 3.15 ± 0.38 ng/ml vs 1.78 ± 0.37 ng/ml, $p < 0.05$, respectively)。しかし、IL-33 および MMP9 については、今回使用した ELISA kit では検出下限値以下となるデータであった。以上より、複数の因子について膵島培養上清中のタンパク発現が検証され、アレイデータの妥当性が確認された。

移植前 MMC 処置による単球細胞の遊走能抑制効果

これまでの実験では、MMC 処置が膵島グラフトより分泌される免疫細胞遊走因子を抑制することを明らかにした。そこで次なる重要な検証として、ラット膵島培養上清へのマウス単球の遊走能に及ぼす MMC 処置の影響を評価した。タンパク発現が検証された MCP3 および MMP-2 の阻害が、単球の遊走能抑制に寄与するかどうかについても評価した。その結果、MMC 処置膵島では培養上清へのマウス単球の遊走能が、非処置膵島と比較して有意に抑制されることが明らかになった(non-treated versus MMC-treated d1-islet; 185.2 ± 8.3 vs 264 ± 13.0 /one high power field, $p < 0.001$, d3-islets; 463.8 ± 10.4 versus 624.7 ± 24.2 /one high power field, $p < 0.001$)(Figure8)。また、非処置膵島の培養上清中に抗 MCP-3 モノクローナル抗体(anti MCP-3 mAb)もしくは、MMPs 阻害剤を付加した際のマウス単球の遊走能は有意に抑制されることが示され(anti MCP-3 mAb; 657.9 ± 41.8 /one high power field ($p < 0.05$), GM6001; 611.3 ± 24 /one high power field ($p < 0.05$), and no agent; 908.0 ± 49.5 /one high power field, respectively)(Figure9)、これらの因子が移植グラフトへの単球遊走に重要な役割を担う可能性が示唆された。

【考察】

近年、マイクロアレイ技術の革新により、膨大な生物情報の計測と解析が可能となり、その膨大な情報を効率よく整理・解析し、その生物学的意義を明らかにするバイオインフォマティクスの重要性が高まっている (16)。従来までわれわれは個々の分子やパスウェイに注目し、その発現や機能を解析するアプローチを試みてきたが(14, 17)、それらの方法はMMC処置による膵島の生体機能変化の一部分のみを捉えているに過ぎない可能性があった。今回、マイクロアレイデータをバイオインフォマティクスツールにて解析することにより、膵島遺伝子の生物学的機能変化を包括的に捉え、かつ統計学的に有意な生物学的機能変化を際立たせることで、膵島内で生じる変化をより正確に解釈することが可能となったと思われる。MMC 処置および非処置グラフトの遺伝子発現を解析し、その生物学的機能変化を比較した結果、移植前 MMC 処置により **cellular movement, immune cell trafficking**, および **inflammatory response** といった細胞活性化に関連する多くの遺伝群が抑制されることが示唆された。中でも、グラフト生着延長因子として最も注目すべき生物学的プロセスは、MMC 処置は移植膵島グラフトが分泌する免疫遊走性サイトカインおよびペプチダーゼの遺伝子発現を複数で同時に抑制することであると思われた。

本研究の遺伝子解析結果は、膵島グラフトが分離過程で被る細胞ストレスにより培養期間に多くの炎症誘導性サイトカインを分泌するという過去の知見(18)と一致している。Cowley らはヒト膵島の遺伝子発現を解析し、分離膵島では **NF-KB** パスウェイの活性化により複数の炎症誘導性サイトカインの遺伝子発現が増強されることを報告し(19)、さらに Solomon らは移植後グラフトにおいても同様であることを報告している(20)。膵島より分泌される炎症誘導性サイトカイン (**TNF α** (21)や **MCP-1**(22)など) や **alarmin** (**HMGB1**(23)) は宿主免疫応答を惹起し移植成績に関与することが知られており、治療のターゲットになりうると考えられている。実際に、膵島分泌ケモカイン-ケモカインレセプターの阻害が免疫細胞動員を抑制し、膵島グラフトの生着に寄与することがいくつかの動物実験モデルで示され(24-26)、さらに抗 **TNF α** 抗体を用いた抗炎症プロトコールの有効性も臨床研究で検証されている(27)。しかし、それらの炎症誘導因子を単一に抑制するプロトコールが、免疫抑制剤を用いずに膵島グラフトの生着延長を達成するという報告は存在せず、その効果には限界があると考えられる。Citorn らは、単一の炎症誘導性サイトカインを標的とした細胞外あるいは細胞表面での炎症制御は、サイトカイン作用の冗長性や重複性により障害されたため、複数のターゲットを抑制することの必要性を主張している(28)。その点において、MMC 処置は膵島グラフトより分泌される複数の免疫遊走因子を同時に抑制する **multi-target effector** として抗炎症作用を有していると考えられ、より効果的なアプローチになりうるものであるといえる。

遺伝子解析の結果注目された **IL-6**、**MCP-3**、**MMP-2** については、膵島培養上清中の蛋白発現はいずれも MMC 処置膵島において有意に抑制されることが明らかとなり、遺

伝子解析結果の妥当性が示された。さらに、ラット膵島培養上清へのマウス単球の遊走能は、MMC 処置膵島群で有意に抑制されることが示され、膵島グラフトより分泌される免疫細胞遊走因子が宿主免疫を惹起するという一連の反応を MMC 処置が抑制すると考えられた。また、MCP-3 と MMP-2 については、抗 MCP-3 モノクローナル抗体もしくは MMPs 阻害剤を膵島培養上清に加え、それぞれを阻害することでマウス単球の遊走能が有意に抑制されることが示された。したがって、MCP-3 および MMP-2 は移植部位の初期自然免疫応答に重要な役割を担っている可能性があり、治療のターゲットともなりうると思われる。

MCP-3 および MMPs は移植グラフトの生着ならびに機能に関連があることが報告されている。MCP-3 は CC ケモカインのサブファミリーのひとつに分類され、主な白血球をすべて活性化する多面的性を有するケモカインとして知られている(29)。Ali らは精製された MCP-3 アンタゴニストが、マウス皮膚移植モデルにおいてグラフトへの CD3 陽性細胞浸潤を抑制し、グラフト生着延長をもたらすことを示している(30)。そして、MMP-2 は亜鉛依存性エンドペプチダーゼの 1 つであり、細胞外マトリックスの分解機序に関わり、細胞浸潤・転移に密接に関係していることが知られている(31)。Barro らは、ラット膵島の内に MMP-2 を含む多くの MMPs 遺伝子の発現を報告し(32)、さらに Lingwal らは、MMP-2/-9 の阻害薬を投与するモデルにおいて膵島グラフトが糖尿病マウスの血糖を早期に低下させることを示している(33)。また、IL-6 については、Itoh らは抗 IL-6 受容体抗体が膵島移植早期における移植グラフト喪失を軽減することを報告している(34)。しかし、Choi らは IL-6 を培養上清に付加することが細胞死とインスリン分泌低下を回避すると報告しており(35)、IL-6 が治療のターゲットになりうるかどうかについて、定まった見解は認めていない。本研究では一部の molecules に注目して蛋白発現を実証したが、これら以外にも複数の免疫細胞遊走因子が MMC 処置により遺伝子発現が抑制されており、膵島グラフト生着に関連する可能性があると考えられる。

これまでに、単一の薬剤処置により複数の免疫遊走性因子を同時に抑制するモデルは報告されていない。我々の既報では、MMC 処置による移植グラフトの生着延長効果は、処置後 3 日間の培養期間を設けることで増強されることを示した(11)が、どのような生物学的プロセスが MMC 処置膵島グラフト内で生じ、生着延長効果に関与したのかという疑問に対する明確な答えは得られていなかった。本研究の結果は、MMC 処置により抑制される免疫細胞遊走因子が 3 日間の培養期間に増加される (table2) ことを示しており、MMC 処置後の培養により増強されるグラフト生着延長効果の要因と考えられた。また、MMC 処置誘導されるグラフト移植部での局所免疫不応答は(10, 11, 14)、複数の免疫遊走性因子を同時に抑制することの相加または相乗効果より達成された可能性が推察され、複数の因子を同時に抑制することの重要性を示唆しているものと考えられた。

移植グラフトへの初期免疫応答は、単球や好中球を代表とする自然免疫担当細胞の集簇に始まることを考慮すれば、それらの遊走因子の抑制を達成しうる移植前グラフト処

置は理にかなった方法といえる。今回我々は、MMC 処置グラフトへ集簇する免疫細胞数が、移植後 4 日目では非処置グラフトと比較して有意差を認めないが、移植後 8 日目で著大な減少を認めることを示した。この現象は、グラフトへの自然免疫反応の抑制は、浸潤細胞による直接的なグラフト障害の軽減のみならず、獲得免疫応答の誘導シグナルを減衰させる可能性があることを示唆している。したがって、移植後初期免疫応答を十分に抑制することがグラフト長期生着においても重要であることが推察される。

本研究の結果を解釈する際に考慮すべき項目は以下のとおりである。今回の研究では免疫細胞遊走因子について注目し解析を行ったが、これら以外にも MMC 処置による生着延長に寄与する生物学的プロセスが存在する可能性があることである。MMC 処置による膵島グラフト生着延長の機序について、その全貌を明らかにするには免疫細胞遊走因子以外についても研究を進める必要があると考えられる。

本研究により、膵島移植前のグラフトへの MMC 処置は、複数の免疫細胞遊走因子を同時に抑制することを可能とし、局所免疫反応の不応答を誘導することで、免疫抑制剤非使用下においてもグラフトの生着延長をもたらすことが示された。移植前に宿主免疫応答の惹起を抑制しうる処置を付加することが極めて効果的であるということを示しており、この概念は、膵島移植のみならず、細胞移植全般においてもグラフト生着率向上を達成しうる新たなアプローチとなると考えられる。臨床応用可能な移植前処置の確立を目指し、大動物を用いた実験での検証が望まれる。

結語

膵島分離過程を経た膵島グラフトは、免疫細胞遊走因子を分泌し、宿主免疫応答を惹起するが、移植前培養期間に MMC 処置を付加することにより、免疫細胞遊走因子の分泌が抑制され、局所免疫反応の不応答が誘導される。免疫抑制剤非使用下においてもグラフトの生着延長をもたらしうる有用なアプローチであると考えられた。

Reference

1. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *The New England journal of medicine*. 2006 Sep 28;355(13):1318-30. PubMed PMID: 17005949.
2. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005 Jul;54(7):2060-9. PubMed PMID: 15983207.
3. Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, Thirunavukkarasu C, Ge X, Profozich J, et al. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes*. 2004 Oct;53(10):2559-68. PubMed PMID: 15448084.
4. Noguchi H, Naziruddin B, Jackson A, Shimoda M, Ikemoto T, Fujita Y, et al. Fresh islets are more effective for islet transplantation than cultured islets. *Cell transplantation*. 2012;21(2-3):517-23. PubMed PMID: 22793060.
5. Bennet W, Groth CG, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O. Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Upsala journal of medical sciences*. 2000;105(2):125-33. PubMed PMID: 11095109.
6. Moberg L, Johansson H, Lukinius A, Berne C, Foss A, Kallen R, et al. Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. *Lancet*. 2002 Dec 21;360(9350):2039-45. PubMed PMID: 12504401.
7. Sleater M, Diamond AS, Gill RG. Islet allograft rejection by contact-dependent CD8+ T cells: perforin and FasL play alternate but obligatory roles. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2007 Aug;7(8):1927-33. PubMed PMID: 17617855.
8. Bosi E, Braghi S, Maffi P, Scirpoli M, Bertuzzi F, Pozza G, et al. Autoantibody response to islet transplantation in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2001 Nov;50(11):2464-71. PubMed PMID: 11679423.
9. Berney T, Buhler LH, Majno P, Mentha G, Morel P. Immunosuppression for pancreatic islet transplantation. *Transplantation proceedings*. 2004 Mar;36(2 Suppl):362S-6S. PubMed PMID: 15041369.
10. Matsuyama S, Gunji T, Ise K, Sato Y, Saito T, Gotoh M. Permanent acceptance of mitomycin C-treated islet allograft. *Transplantation*. 2003 Jul 15;76(1):65-71. PubMed PMID: 12865788.
11. Gunji T, Saito T, Sato Y, Matsuyama S, Ise K, Kimura T, et al. Mitomycin-C

treatment followed by culture produces long-term survival of islet xenografts in a rat-to mouse model. *Cell transplantation*. 2008;17(6):619-29. PubMed PMID: 18819250.

12. Grtochowiecki T, Gotoh M, Dono K, Takeda Y, Nishihara M, Ohta Y, et al. Pretreatment of crude pancreatic islets with mitomycin C prolongs graft survival time in xenogeneic rat-to-mouse model. *Transplantation*. 1999 Jun 15;67(11):1474-7. PubMed PMID: 10385088.

13. Saito T, Ohashi K, Utoh R, Shimizu H, Ise K, Suzuki H, et al. Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. *Transplantation*. 2011 Dec 15;92(11):1231-6. PubMed PMID: 22124282.

14. Ise K, Kanazawa Y, Sato Y, Matsuyama S, Gunji T, Endo Y, et al. Survival of mitomycin C-treated pancreatic islet xenografts is mediated by increased expression of transforming growth factor-beta. *Transplantation*. 2004 Mar 27;77(6):907-14. PubMed PMID: 15077036.

15. Yona S, Hayhoe R, Avraham-Davidi I. Monocyte and neutrophil isolation and migration assays. *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan [et al]. 2010 Feb;Chapter 14:Unit 14 5. PubMed PMID: 20143313.

16. Gusev Y. Computational methods for analysis of cellular functions and pathways collectively targeted by differentially expressed microRNA. *Methods*. 2008 Jan;44(1):61-72. PubMed PMID: 18158134.

17. Saito T, Saito T, Sato Y, Ise K, Anazawa T, Oshibe I, et al. Mitomycin C treatment significantly reduces central damage of islets in culture. *Pancreas*. 2012 Mar;41(2):245-52. PubMed PMID: 22076566.

18. Negi S, Jetha A, Aikin R, Hasilo C, Sladek R, Paraskevas S. Analysis of beta-cell gene expression reveals inflammatory signaling and evidence of dedifferentiation following human islet isolation and culture. *PloS one*. 2012;7(1):e30415. PubMed PMID: 22299040. Pubmed Central PMCID: 3267725.

19. Cowley MJ, Weinberg A, Zammit NW, Walters SN, Hawthorne WJ, Loudovaris T, et al. Human islets express a marked proinflammatory molecular signature prior to transplantation. *Cell transplantation*. 2012;21(9):2063-78. PubMed PMID: 22404979.

20. Solomon MF, Kuziel WA, Simeonovic CJ. The contribution of chemokines and chemokine receptors to the rejection of fetal proislet allografts. *Cell transplantation*. 2004;13(5):503-14. PubMed PMID: 15565863.

21. Angaswamy N, Fukami N, Tiriveedhi V, Cianciolo GJ, Mohanakumar T. LMP-420, a small molecular inhibitor of TNF-alpha, prolongs islet allograft survival by induction of suppressor of cytokine signaling-1: synergistic effect with cyclosporin-A. *Cell transplantation*. 2012;21(6):1285-96. PubMed PMID: 22469483.

22. Piemonti L, Leone BE, Nano R, Sacconi A, Monti P, Maffi P, et al. Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. *Diabetes*. 2002 Jan;51(1):55-65. PubMed PMID: 11756323.
23. Matsuoka N, Itoh T, Watarai H, Sekine-Kondo E, Nagata N, Okamoto K, et al. High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Mar;120(3):735-43. PubMed PMID: 20124731. Pubmed Central PMCID: 2827961.
24. Abdi R, Smith RN, Makhoul L, Najafian N, Luster AD, Auchincloss H, Jr., et al. The role of CC chemokine receptor 5 (CCR5) in islet allograft rejection. *Diabetes*. 2002 Aug;51(8):2489-95. PubMed PMID: 12145162.
25. Abdi R, Means TK, Ito T, Smith RN, Najafian N, Jurewicz M, et al. Differential role of CCR2 in islet and heart allograft rejection: tissue specificity of chemokine/chemokine receptor function in vivo. *Journal of immunology*. 2004 Jan 15;172(2):767-75. PubMed PMID: 14707046.
26. Citro A, Cantarelli E, Maffi P, Nano R, Melzi R, Mercalli A, et al. CXCR1/2 inhibition enhances pancreatic islet survival after transplantation. *The Journal of clinical investigation*. 2012 Oct 1;122(10):3647-51. PubMed PMID: 22996693. Pubmed Central PMCID: 3461913.
27. Takita M, Matsumoto S, Shimoda M, Chujo D, Itoh T, Sorelle JA, et al. Safety and tolerability of the T-cell depletion protocol coupled with anakinra and etanercept for clinical islet cell transplantation. *Clinical transplantation*. 2012 Sep-Oct;26(5):E471-84. PubMed PMID: 23061757. Pubmed Central PMCID: 4082563.
28. Citro A, Cantarelli E, Piemonti L. Anti-inflammatory strategies to enhance islet engraftment and survival. *Current diabetes reports*. 2013 Oct;13(5):733-44. PubMed PMID: 23912763.
29. Xu LL, McVicar DW, Ben-Baruch A, Kuhns DB, Johnston J, Oppenheim JJ, et al. Monocyte chemoattractant protein-3 (MCP3) interacts with multiple leukocyte receptors: binding and signaling of MCP3 through shared as well as unique receptors on monocytes and neutrophils. *European journal of immunology*. 1995 Sep;25(9):2612-7. PubMed PMID: 7589134.
30. Ali S, O'Boyle G, Hepplewhite P, Tyler JR, Robertson H, Kirby JA. Therapy with nonglycosaminoglycan-binding mutant CCL7: a novel strategy to limit allograft inflammation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010 Jan;10(1):47-58. PubMed PMID: 19951286.
31. Song J, Wu C, Zhang X, Sorokin LM. In vivo processing of CXCL5 (LIX) by matrix

metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 promotes early neutrophil recruitment in IL-1 β -induced peritonitis. *Journal of immunology*. 2013 Jan 1;190(1):401-10. PubMed PMID: 23225890.

32. Barro C, Zaoui P, Morel F, Benhamou PY. Matrix metalloproteinase expression in rat pancreatic islets. *Pancreas*. 1998 Nov;17(4):378-82. PubMed PMID: 9821179.

33. Lingwal N, Padmasekar M, Samikannu B, Bretzel RG, Preissner KT, Linn T. Inhibition of gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) activity reduces cellular inflammation and restores function of transplanted pancreatic islets. *Diabetes*. 2012 Aug;61(8):2045-53. PubMed PMID: 22586582. Pubmed Central PMCID: 3402316.

34. Itoh T, Nitta T, Nishinakamura H, Kojima D, Mera T, Ono J, et al. HMGB1-Mediated Early Loss of Transplanted Islets Is Prevented by Anti-IL-6R Antibody in Mice. *Pancreas*. 2015 Jan;44(1):166-71. PubMed PMID: 25058889.

35. Choi SE, Choi KM, Yoon IH, Shin JY, Kim JS, Park WY, et al. IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. *Transplant immunology*. 2004 Jun-Jul;13(1):43-53. PubMed PMID: 15203128.

Figure Legends

Figure 1

MMC 処置および非処置異種移植グラフトの生着期間。MMC 処置グラフトでは、非処置グラフトと比較して著大な生着期間の延長を認めた(MST; 98 days versus 17days, $p<0.01$)。

Figure 2

移植後 8 日目の異種移植グラフト周囲の組織学的所見。

図 A,C,E、および G は MMC 処置グラフトの、図 B、D,F,および H は非処置グラフトの組織学的所見を示す。パラフィン包埋標本の連続切片を免疫組織染色し、T 細胞 (CD3 染色陽性)、マクロファージ (F480 染色陽性)、および B 細胞 (CD45R 染色陽性) について評価した。

Figure 3

MMC 処置により誘導される局所免疫応答抑制

MMC 処置 (circles) および非処置グラフト (square) に浸潤した免疫細胞数をカウントし、比較した。浸潤した免疫細胞において優位な構成細胞は、CD3 陽性 T 細胞なら

びに F480 陽性マクロファージであった。移植後 8 日目のグラフトへ浸潤した免疫細胞は数は、T 細胞、マクロファージ、および B 細胞すべてにおいて有意に減少していた ($p < 0.05$)。

Figure 4

3 日間の培養期間での MMC 処置および非処置脾臓における遺伝子発現 heatmap
アレイデータは生物学的機能別クラスターに図示された。各クラスターは統計学的に有意なクラスターの順 ($-\log(p\text{-value})$) にサイズ化され、発現の $z\text{-score}$ 値によって色分けされる。非処置脾臓では培養期間に **cellular movement**, **immune cell trafficking**, および **inflammatory response** といった細胞活性化に関連する多くの遺伝群で発現が増強されるが、MMC 処置はこれらの遺伝子群を含む多くの遺伝子が抑制されることが明らかとなった。

Figure 5

MMC 処置ならびに非処置脾臓の Bio-function 解析結果

非処置脾臓において統計学的に最も有意に変化した生物学的機能クラスターは、**cellular movement** と **immune cell trafficking** であったが、MMC 処置によりいずれも抑制された。

Figure 6

Immune cell trafficking 遺伝子の亜カテゴリーの詳細

非処置脾臓では多くのサイトカインおよびペプチダーゼ遺伝子の発現上昇(サイトカイン遺伝子の比率 (10.1%; 17/168), ペプチダーゼ遺伝子の比率(8.3%; 14/168)) を認めた。その一方で、MMC 処置脾臓では、これらの免疫細胞遊走因子は複数で同時に抑制されることが示された (MMC 処置脾臓により抑制された因子数(80%; 16/20 genes))。

Figure 7

脾臓培養上清中の IL-6、MCP-3、および MMP-2 のタンパク発現量

IL-6、MCP-3、および MMP-2 の脾臓培養上清中のタンパク発現は、MMC 処置脾臓と比較して非処置脾臓において著明に高値であった(IL-6 level (n=7); $879.1 \pm 95.2 \text{ pg/ml}$ vs $577.1 \pm 56.5 \text{ pg/ml}$, $p < 0.05$, MCP3 level (n=8); $56.5 \pm 4.3 \text{ pg/ml}$ vs $38.0 \pm 2.6 \text{ pg/ml}$, $p < 0.001$, and MMP2 level (n=4) $3.15 \pm 0.38 \text{ ng/ml}$ vs $1.78 \pm 0.37 \text{ ng/ml}$, $p < 0.04$, respectively)。

Figure 8

ラット脾臓培養上清へのマウス単球の遊走能

MMC 脾臓および非処置脾臓において、培養 1 日目もしくは 3 日目の培養上清へのマウ

ス単球の遊走能を比較した。マウス単球遊走能は、強拡大にて撮影した遊走単球数の平均値で算出した。

- A) 遊走した単球数は、非処置臍島と比較して MMC 処置臍島では有意に少なかった。
(d1-islet; 185.2 ± 8.3 vs 264 ± 13.0 /one high power field, $p < 0.01$, d3-islets; 463.8 ± 10.4 versus 624.7 ± 24.2 /one high power field, $p < 0.01$)
- B) マウス単球の遊走能は、臍島培養上清中に抗 MCP-3 モノクローナル抗体もしくは MMPs 阻害剤を付加することで抑制される(anti-MCP3 mAb; 657.9 ± 41.8 /one high power field ($p < 0.05$), GM6001; 611.3 ± 24 /one high power field ($p < 0.05$), and no agent; 908.0 ± 49.5 /high power field, respectively)。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた卒業論文指導教員の後藤満一教授に感謝致します。また、遺伝子解析に関して格別なご指導を頂きました和田郁夫教授、森努先生に厚く感謝申し上げます。さらに日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた穴澤貴行先生、見城明先生、木村隆先生、芳賀淳一郎先生、佐藤哲先生に感謝申し上げます。最後に、本研究の実験において多大な支援を頂きました菊田有紀子氏、大友栄子氏、渡邊結子氏、佐々木日出美氏、湯田ゆかり氏に感謝いたします。

Figure1

MMC-induced prolongation of Islet graft survival in xeno-transplantation
(Wister rat islet → C57BL/6 mice)

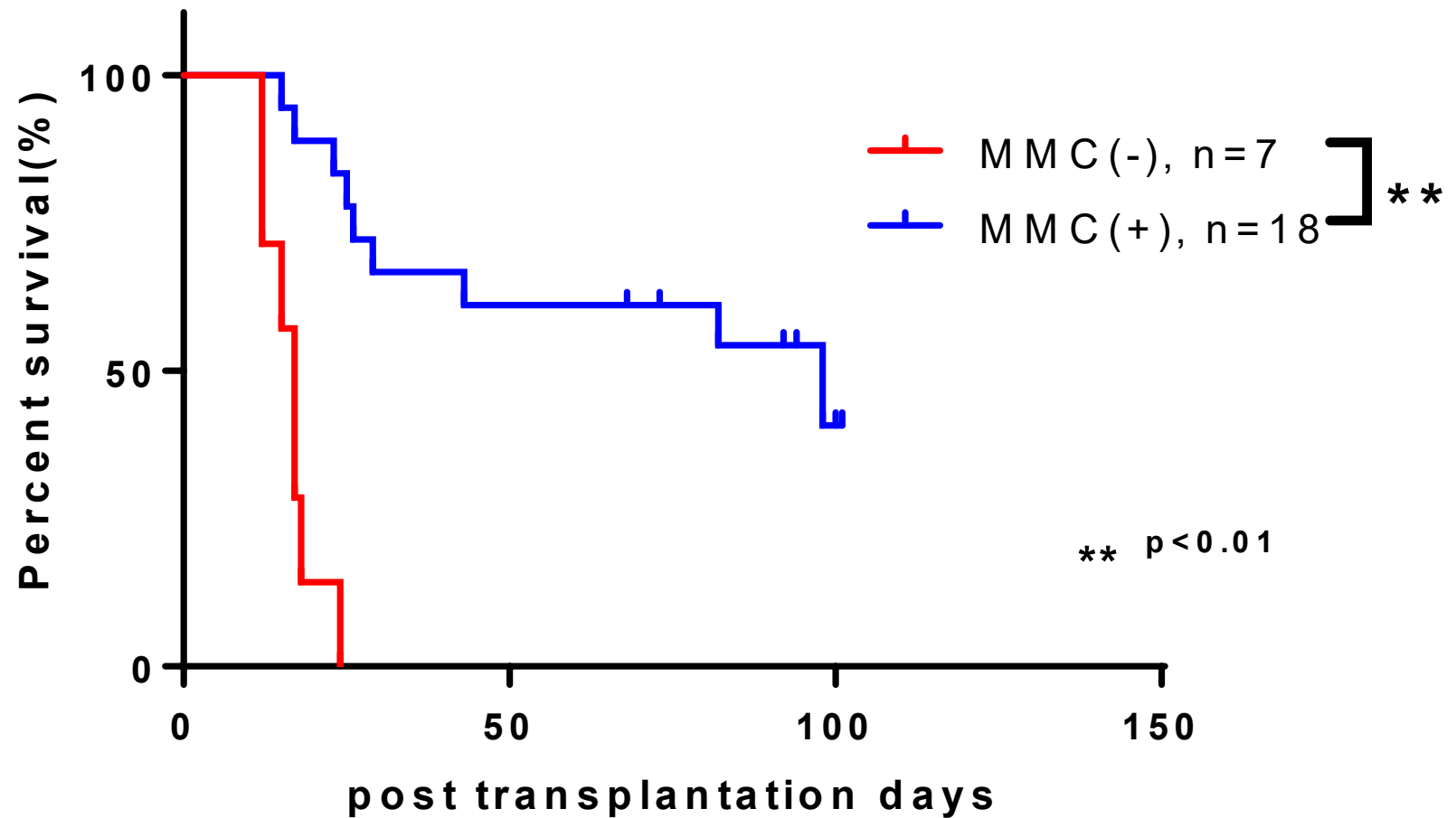


Figure2 **MMC-induced suppression of local immune response**

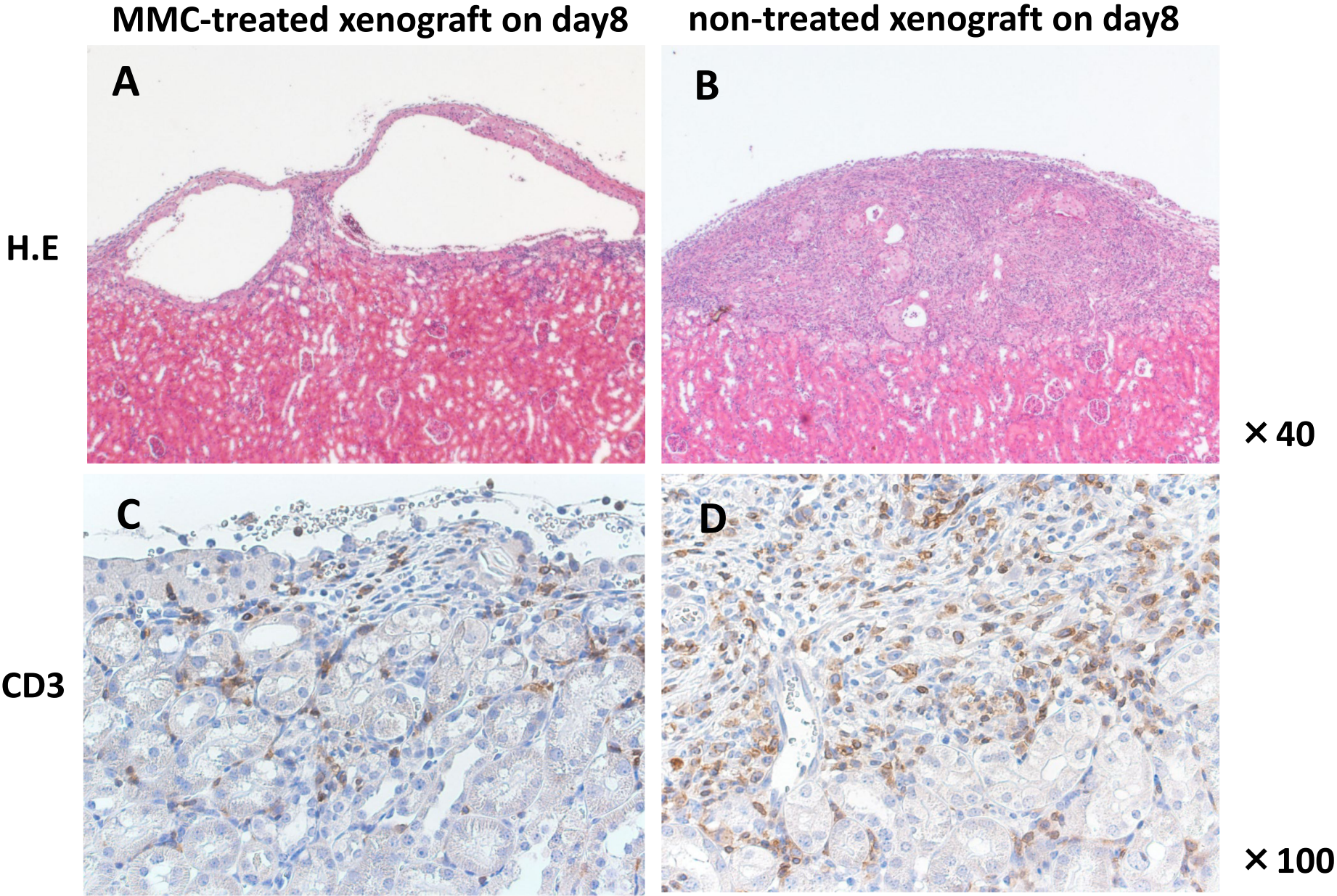
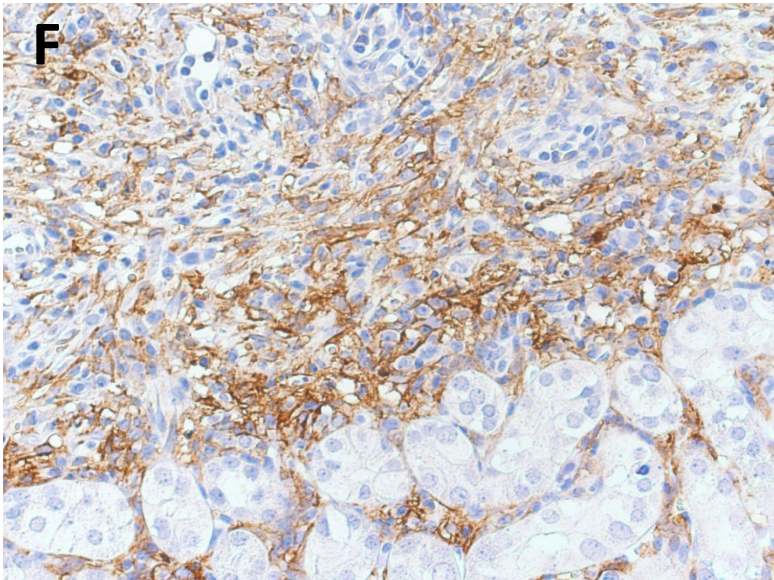
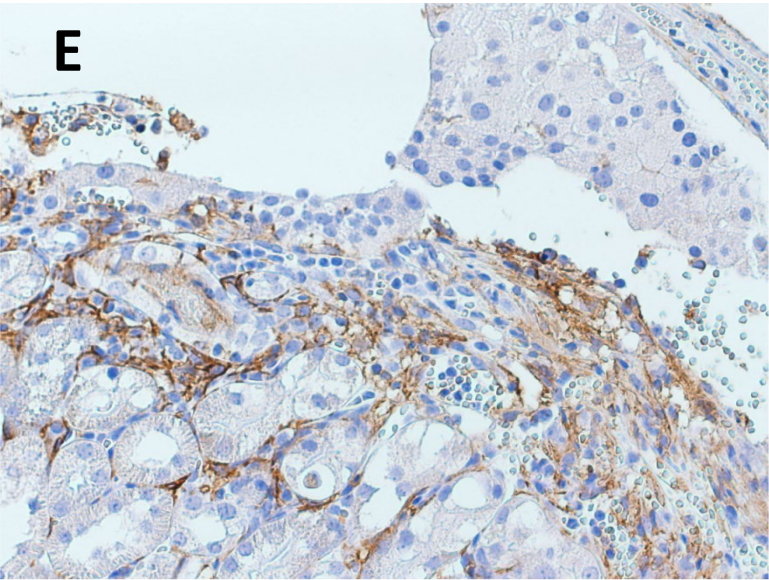


Figure2

MMC-treated xenograft on day8

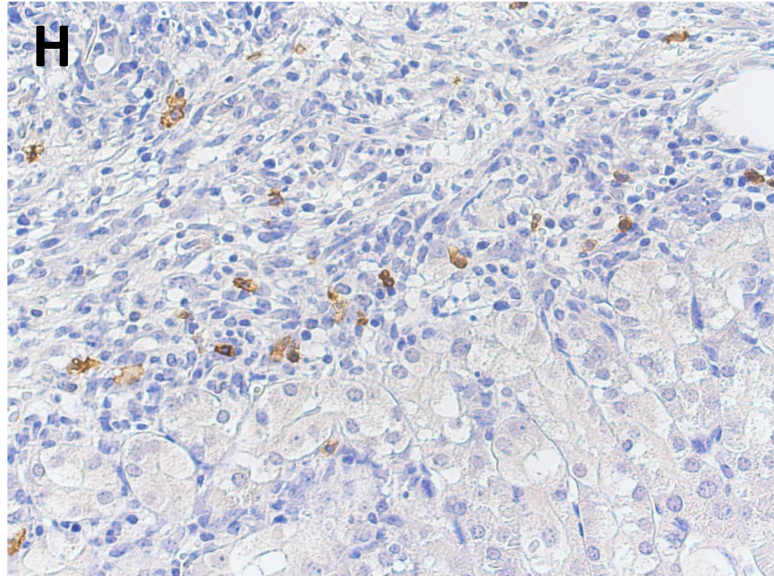
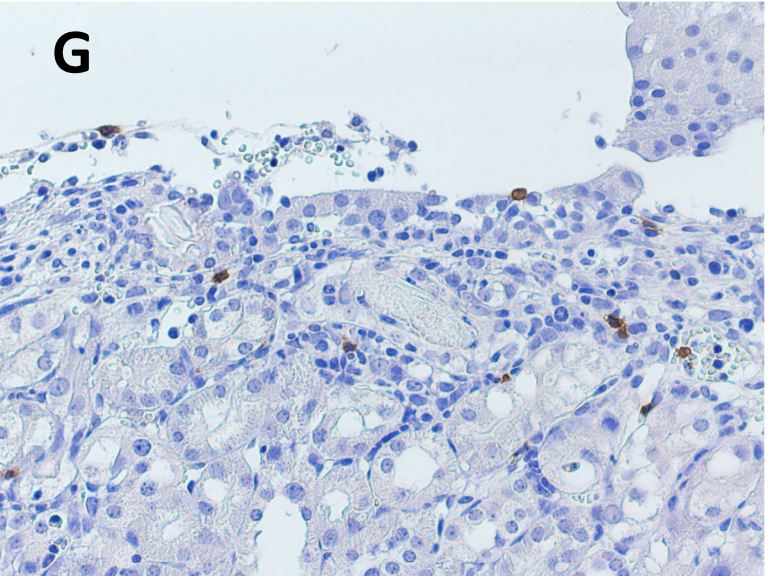
non-treated xenograft on day8

F480



× 100

CD45R



× 100

Figure3 **MMC-induced local immune suppression in xenografts**

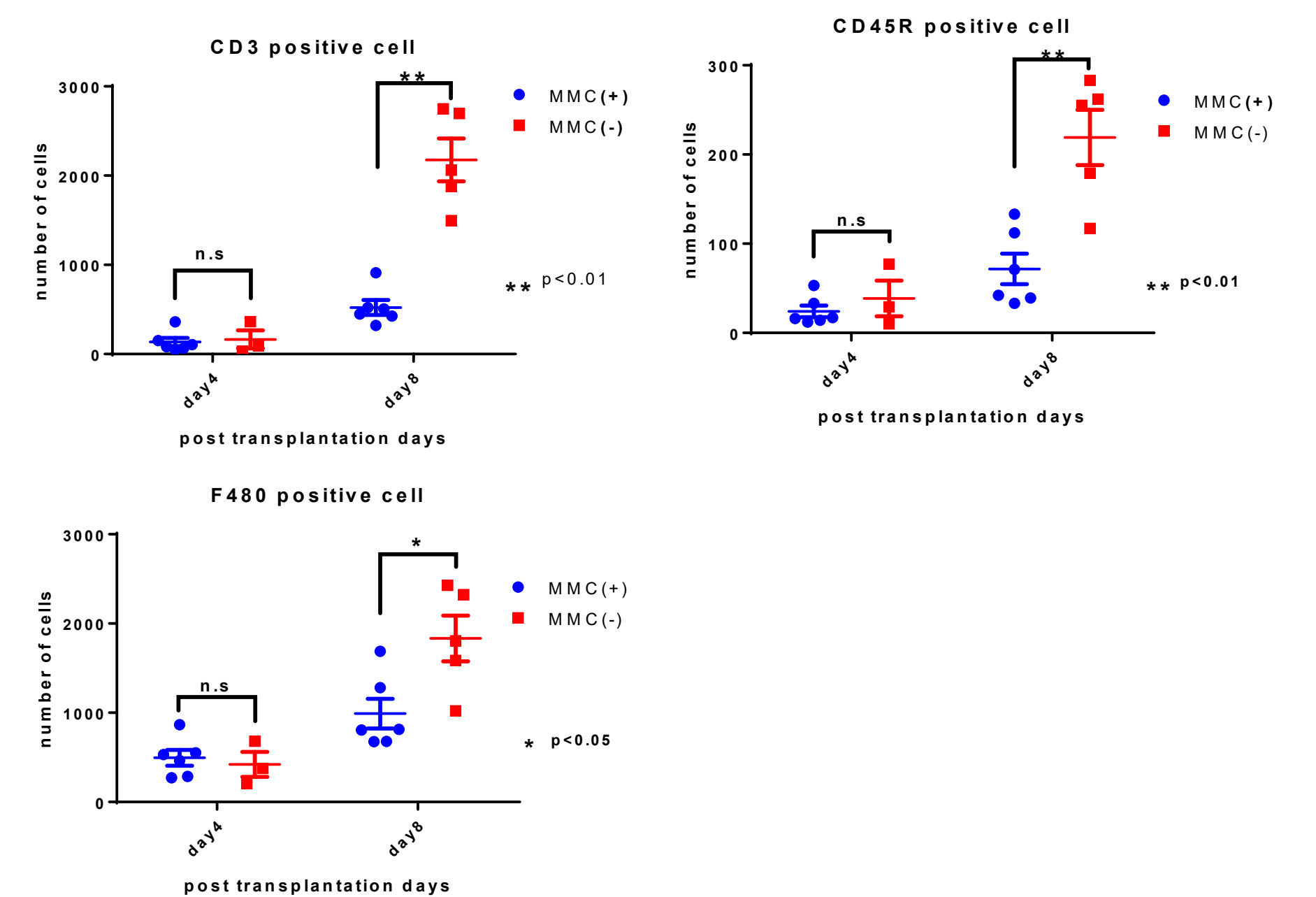
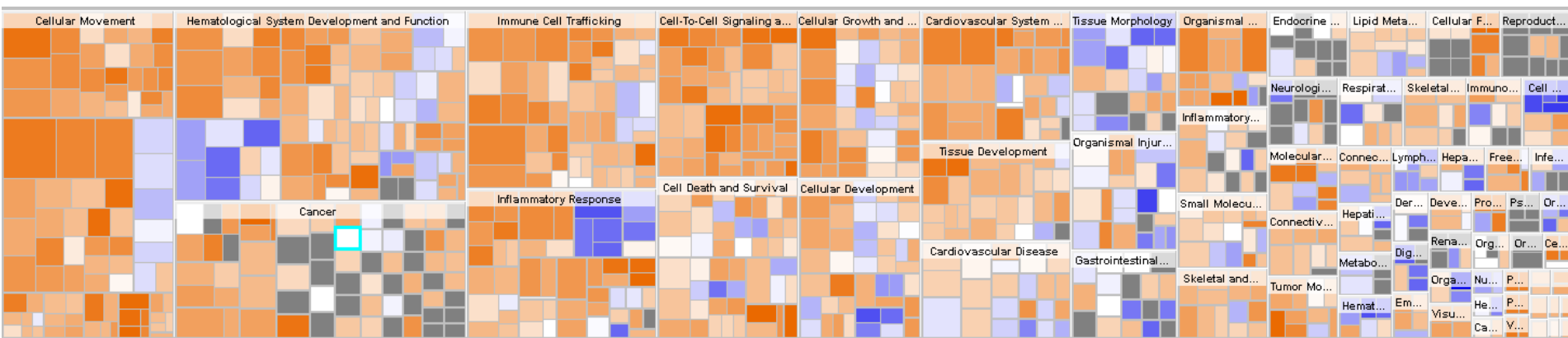


Figure4 Bio-function analysis of gene alteration in non-treated and MMC-treated islets

Non-treated islets; d0-islets v.s d3-islets

Sized by $-\log(p\text{-value})$
colored by z-score

Up-regulation
Down-regulation



MMC-treated islets; d0-islets to d3-islets

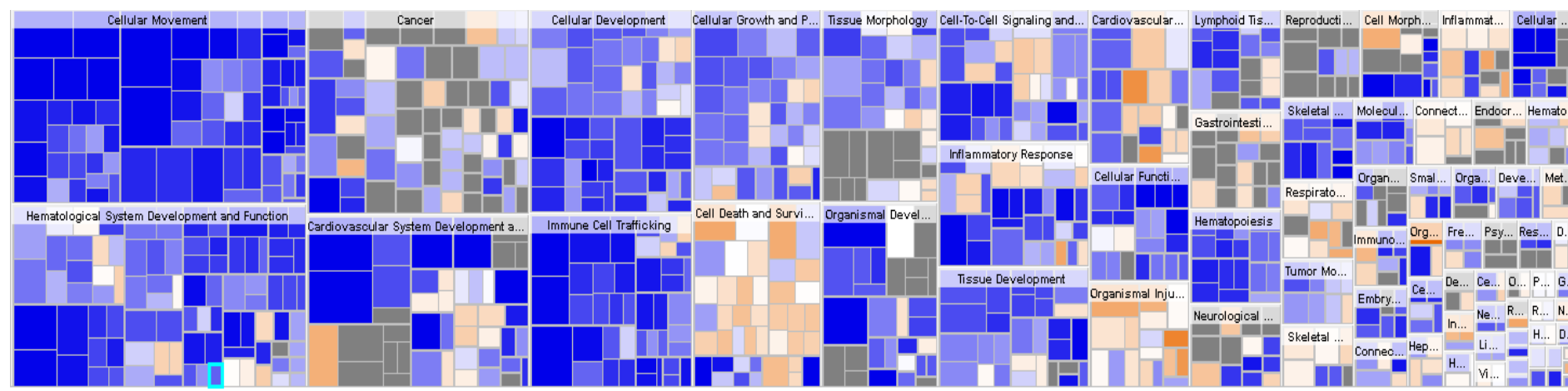
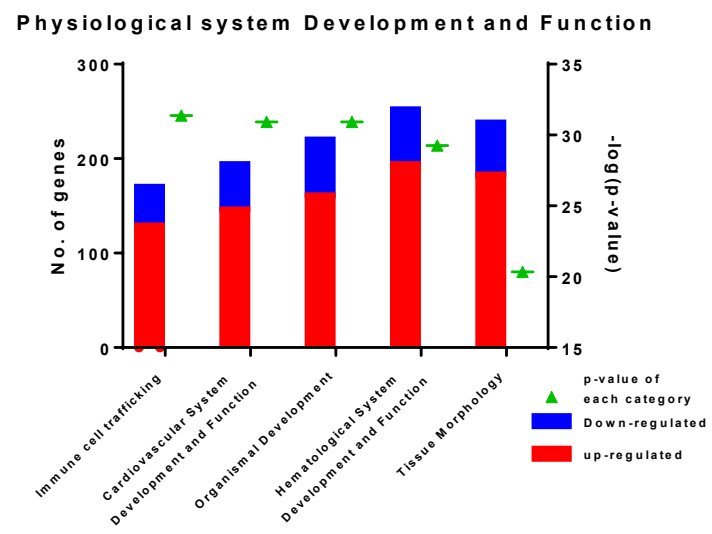
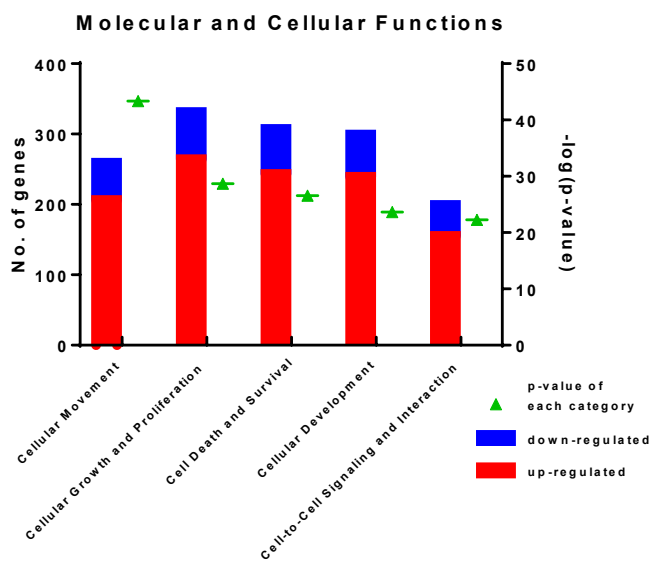


Figure5 Top bio-function categories; ranked by p-value

Non-treated islets (d0 to d3-cultured)



MMC-treated islets (d0 to d3-cultured)

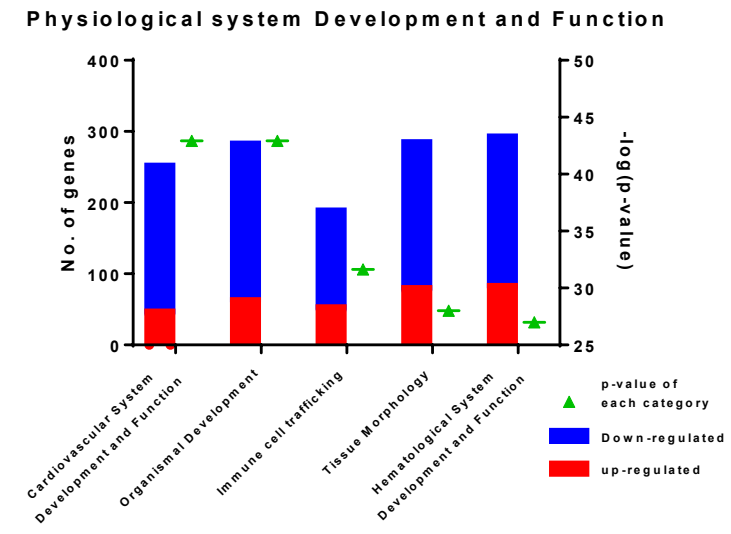
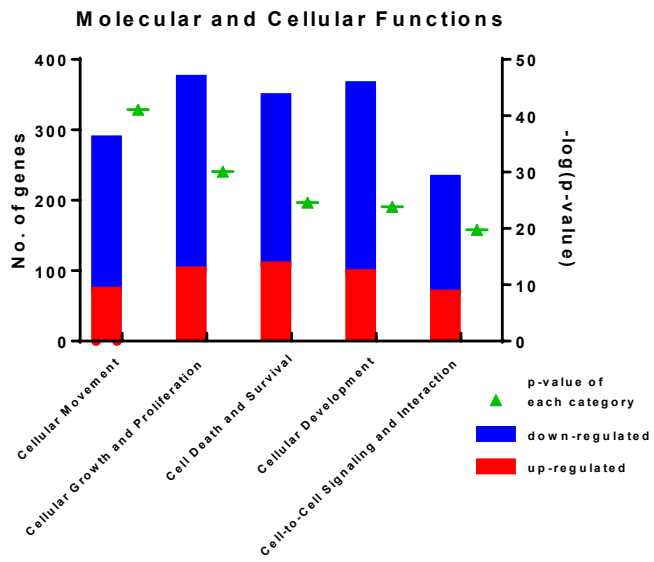
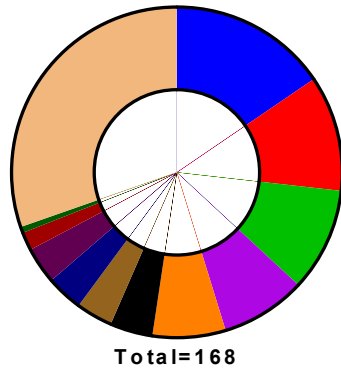
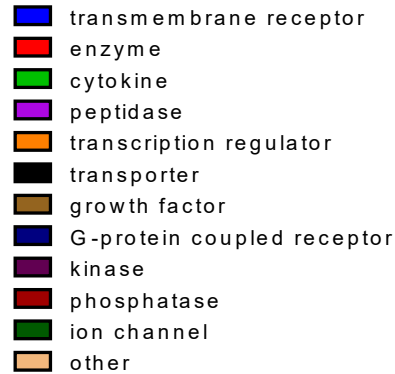


Figure6 Subcategories of immune cell trafficking genes in MMC- or non-treated islets

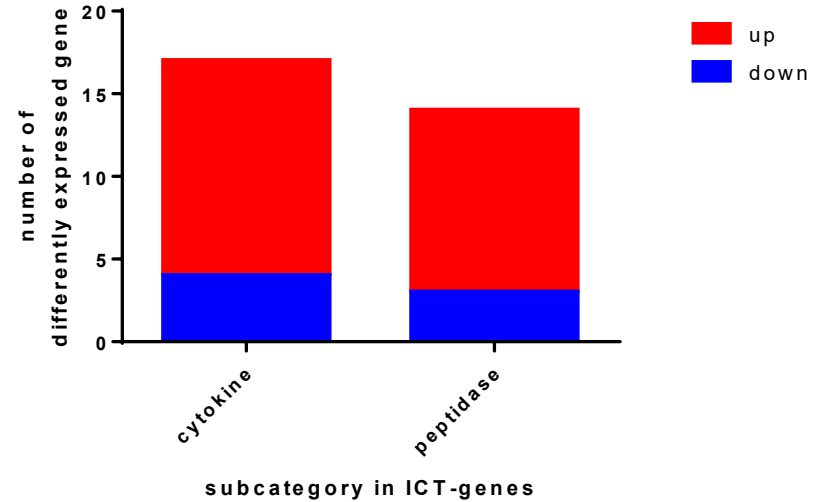
Non-treated islets



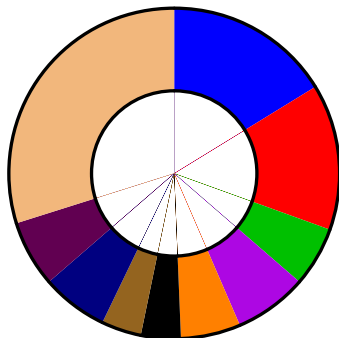
Total=168



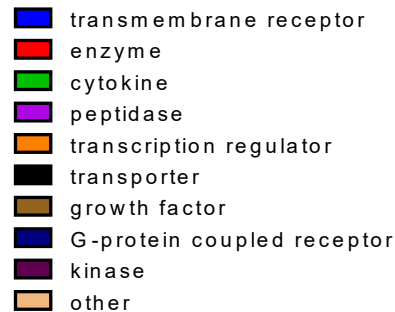
cytokine & peptidase gene expression in non-treated d3-islets



MMC-treated islets



Total=154



cytokine&peptidase gene expressin in MMC-treated d3-islets

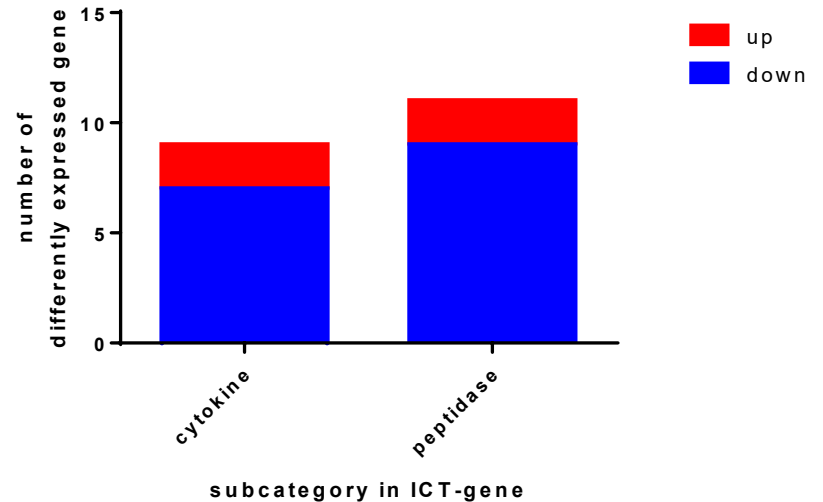


Figure7

MMC-induced suppression of islets secretion of chemoattractant

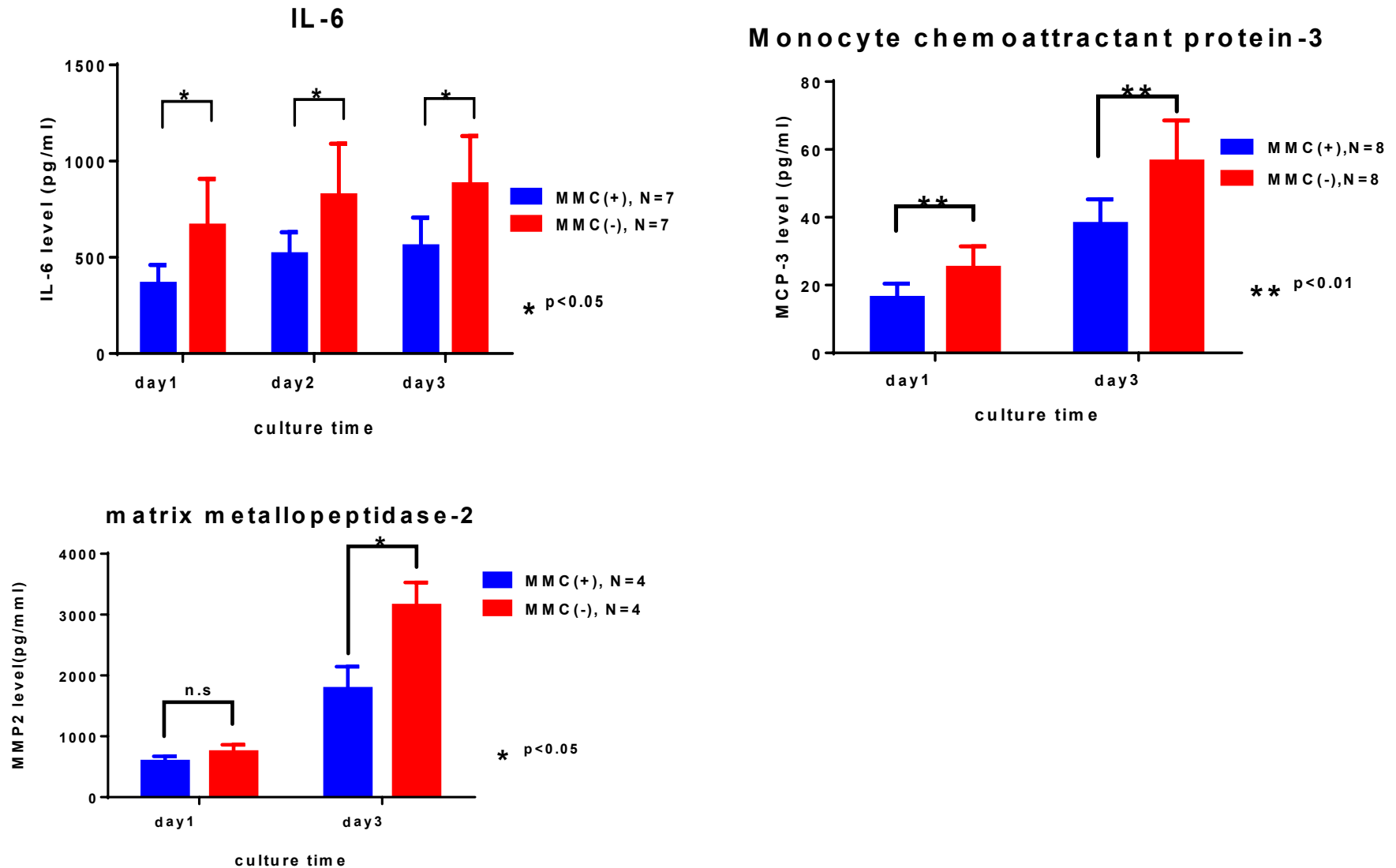
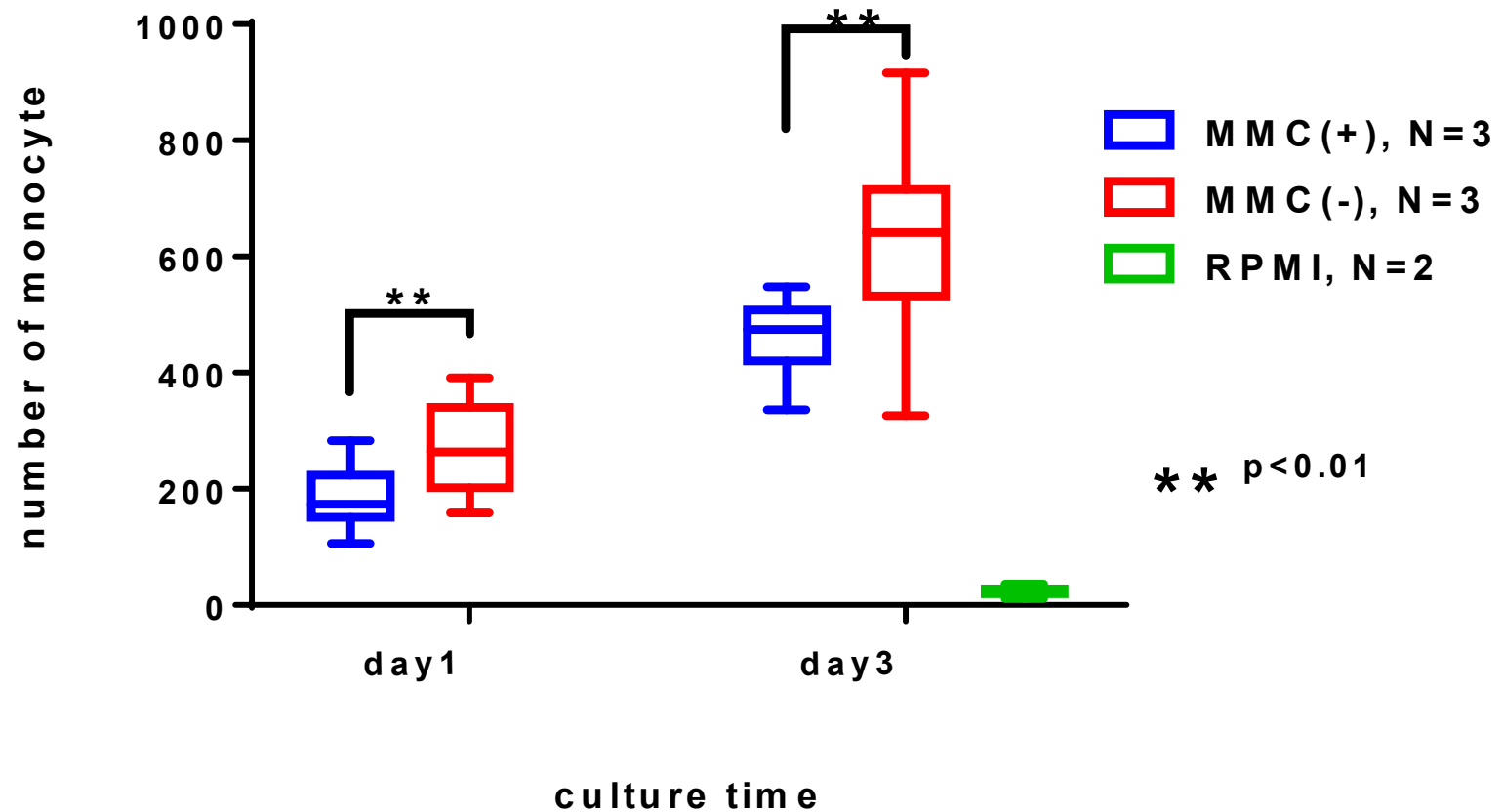


Figure8A

Inhibition of mouse monocyte chemotaxis by ex-vivo MMC treatment

A



t-test

Figure 8B

Inhibition of monocyte chemotaxis by anti MCP-3 mAb and MMPs inhibitor(GM6001)

B

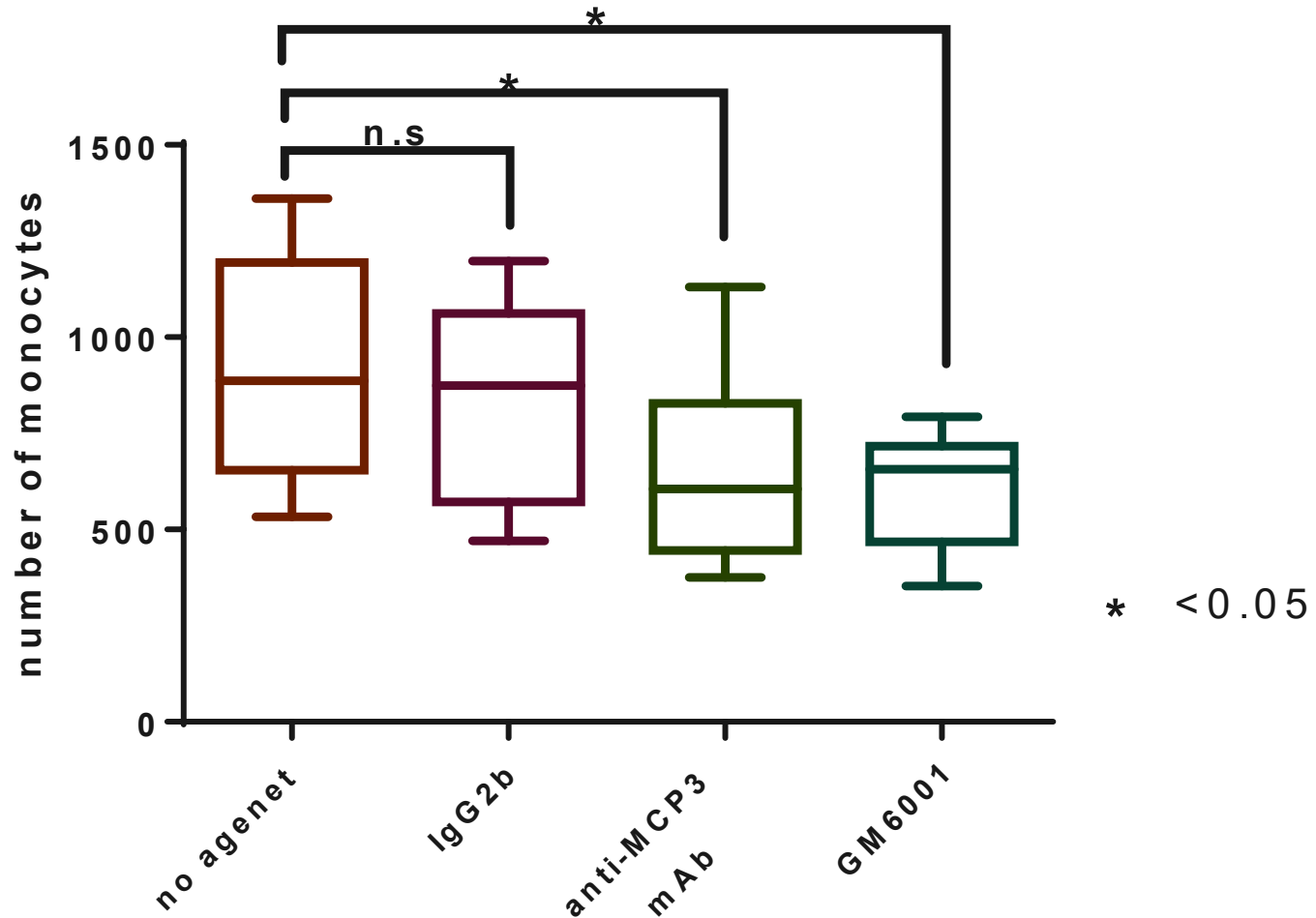


Table1

**Number of differentially expressed genes (Fold change $\geq |2|$)
in non-treated and MMC-treated islets**

Non-treated	d1-cultured islets	d3-cultured islets
Up-regulated genes	398	526
Down-regulated genes	325	209
total	723	735

MMC-treated	d1-cultured islets	d3-cultured islets
Up-regulated genes	203	289
Down-regulated genes	560	582
total	763	871

Table2

Synchronous suppression of cytokine and peptidase genes by ex-vivo MMC treatment

	30min. cultured islets			1-Day cultured islets			3-Day culture islets		
	Symbol	Gene Name	FC	Symbol	Gene Name	FC	Symbol	Gene Name	FC
cytokines	IL6	interleukin 6	9.041	CXCL10	chemokine ligand 10	4.530	CXCL10	chemokine ligand 10	8.839
	CCL13	chemokine ligand 13	7.102	WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	-2.085	IL15	interleukin 15	2.374
	CXCL10	chemokine ligand 10	5.657	IL11	interleukin 11	-3.936	CXCL13	chemokine ligand 13	-2.258
	CXCL2	chemokine ligand 2	4.629				CXCL14	chemokine ligand 14	-2.311
	CXCL3	chemokine ligand 3	4.350				IL10	interleukin 10	-2.969
							WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	-3.050
							CCL7	chemokine ligand 7	-3.819
							IL33	interleukin 33	-5.372
peptidase							IL6	interleukin 6	-7.659
				ADAM8	ADAM metalloproteinase domain 8	3.812	ADAM8	ADAM metalloproteinase domain 8	11.024
				C3	complement component 3	-3.454	LOC286960	LOC286960	3.782
							CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase	-2.360
							MMP9	matrix metalloproteinase 9	-2.406
							PLAU	plasminogen activator, urokinase	-2.507
							MMP7	matrix metalloproteinase 7	-3.203
							MMP14	matrix metalloproteinase 14	-3.872
							C3	complement component 3	-4.536
							MMP2	matrix metalloproteinase 2	-4.721
							CTSC	cathepsin C	-4.843
							GZMB	GZMB	-4.997