



Title	全身性エリテマトーデスの皮膚病変と細胞老化の関連性
Author(s)	山本, 瀬菜
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第16826号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16826
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99671
Type	doctoral thesis
File Information	Sena_Yamamoto.pdf, 全文



学 位 論 文

全身性エリテマトーデスの皮膚病変と細胞老化の関連性

山 本 瀬 菜

北海道大学大学院保健科学院
保健科学専攻保健科学コース

2 0 2 5 年 度

目次

要約	1
略語リスト	3
第1章 緒言	
1-1. 全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus [SLE]) と皮膚エリテマトーデス (Cutaneous lupus erythematosus[CLE])	6
1-2. CLE の分子病態	7
1-3. CLE と細胞老化	8
1-4. 本論文の目的	9
第2章 CLE 皮膚組織における老化細胞の検証	
2-1. 諸言	9
2-2. 対象と方法	
2-2-1. 遺伝子発現データおよび解析方法	10
2-2-2. scRNA-seq 解析	10
2-2-3. 統計処理	11
2-3. 結果	
2-3-1. 細胞老化関連遺伝子セットでの GSEA	11
2-3-2. Hallmark 遺伝子セットでの GSEA	13
2-3-3. SLE 皮膚由来表皮細胞のクラスター化	15
2-3-4. 老化細胞による I 型 IFN 産生	16
2-3-5. 表皮基底細胞の細胞間コミュニケーション解析	20
2-3-6. CLE 患者皮膚における HLA-I 発現の検証	21
2-3-7. SLE 患者皮膚由来老化表皮基底細胞での HLA-I 発現の検証	23
2-3-8. SLE 患者皮膚由来老化表皮基底細胞での I 型 IFN 関連遺伝子および EGFR シグナル関連遺伝子発現の検証	24
2-3-9. SLE 患者皮膚由来非老化表皮基底細胞における HLA-I 発現の検証	25
2-3-10. 老化表皮基底細胞と CD8+T 細胞の細胞間コミュニケーション解析	26
2-4. 考察	27
2-5. 結論	28
第3章 SASP 因子が与える HLA-I 発現および免疫回避への影響の検証	

3-1. 諸言	28
3-2. 対象と方法	
3-2-1. 細胞培養および細胞老化誘導	29
3-2-2. 初代ヒト表皮 KC (Normal human epidermal keratinocytes [NHEK]) の培養および細胞老化誘導	29
3-2-3. SPiDER- β Galactosidase (SPiDER- β Gal) 染色	29
3-2-4. SASP conditioned media (CM) 回収	30
3-2-5. HLA-I 発現の免疫細胞化学染色	30
3-2-6. Total RNA 抽出および定量的リアルタイム PCR	30
3-2-7. HBEGF 中和抗体と HaCaT 細胞培養	32
3-2-8. In-cell Western アッセイ	32
3-2-9. CM および I 型 IFN 中和抗体存在下での細胞培養	32
3-2-10. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) からの CD8+T 細胞の分離	33
3-2-11. HaCaT 細胞と CD8+T 細胞の共培養および Caspase 3/7 の蛍光強度	33
3-2-12. 統計処理	33
3-3. 結果	
3-3-1. 老化細胞の HLA 発現に関する <i>in vitro</i> 検証	33
3-3-2. HBEGF 阻害が HLA 発現を回復させるメカニズムの検証	39
3-3-3. CD8+ T 細胞と老化 HaCaT 細胞の相互作用の検証	40
3-4. 考察	42
3-5. 結論	42

第 4 章 SLE モデルマウスにおける細胞老化の病態関与の検証

4-1. 諸言	43
4-2. 対象と方法	
4-2-1. 動物実験	43
4-2-2. 皮膚病変スコアリング	44
4-2-3. SLE モデルマウス皮膚の組織学的解析	44
4-2-4. SLE モデルマウス皮膚の免疫蛍光染色	44
4-2-5. <i>In vitro</i> fisetin 添加実験	45
4-2-6. SPiDER- β Gal 染色	45
4-2-7. 統計処理	46
4-3. 結果	
4-3-1. SLE モデルマウスにおける皮膚病変の検証	46
4-3-2. SLE モデルマウスにおける細胞老化の検証	47

4-3-3. SLE モデルマウスにおける MHC と EGFR の検証	48
4-3-4. SLE モデルマウスにおける免疫細胞の検証	49
4-3-5. SLE モデルマウスの老化細胞除去による検証	49
4-3-6. SLE モデルマウスへの fisetin 投与による老化細胞の検証	51
4-3-7. SLE モデルマウスへの fisetin 投与による免疫細胞と EGFR と IFN の 検証	53
4-4. 考察	53
4-5. 結論	54
第 5 章 総合考察	54
第 6 章 結論	55
謝辞	58
参考文献	59
業績リスト	66

要約

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus[SLE]) は全身の臓器に慢性炎症を引き起こす自己免疫疾患である。皮膚エリテマトーデス (Cutaneous lupus erythematosus[CLE]) は、単独の皮膚疾患として、また SLE 症状の一つとして現れる。CLE の臨床症状は SLE の診断基準にも組み込まれ、SLE の早期発見と評価において極めて重要な役割を果たしている。すなわち、CLE 病態メカニズムの理解は、SLE に対する次世代の治療戦略を確立するための鍵となる可能性がある。CLE では主要な病態タイプで共通して認められる Interface dermatitis (境界部皮膚炎) において、ケラチノサイト (Keratinocytes [KC]) に対し、Type I Interferon (I 型 IFN) シグナルによって細胞傷害性 T 細胞の攻撃性が高まることで、慢性炎症を誘導していると考えられている。しかし、未だ I 型 IFN を産生する原因細胞とその特徴は、明らかになっていない。

細胞老化は、不可逆的な細胞周期の停止状態を指し、senescence-associated secretory phenotype (SASP) となることで、サイトカインやケモカインなどの炎症性因子を分泌し、加齢関連疾患や慢性炎症を引き起こす。老化細胞は I 型 IFN シグナルを活性化することが知られており、CLE 病態への関与が推測されるものの、CLE に老化細胞が存在しているのか、またもし老化細胞が I 型 IFN の産生に関与するのであれば、どのように免疫細胞と相互作用し CLE 病態を誘導するのか明らかになっていない。

そこで、本研究では、CLE および SLE 患者の皮膚組織の遺伝子アレイデータおよび single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) データ、SLE モデルマウスを用いた解析によって、CLE 病態における細胞老化の役割の解明を行った。

はじめに、CLE 患者皮膚の遺伝子アレイデータを用いて、細胞老化関連遺伝子群の発現を検証したところ、健常対照皮膚と比較し、CLE 皮膚では細胞老化関連遺伝子群が亢進していることが明らかになった。次に、SLE 皮膚の scRNA-seq 解析を行い、細胞老化因子 *CDKN1A* の発現を高めた表皮基底細胞が存在し、I 型 IFN の発現を上昇させることがわかった。表皮基底細胞は KC の一つであり、表皮の最下層に存在する細胞である。さらに、老化表皮基底細胞は I 型 IFN をリガンドとして発現し、非老化表皮基底細胞が I 型 IFN 応答関連遺伝子を高めていることが明らかになったことから、老化表皮基底細胞が産生する I 型 IFN が、正常表皮基底細胞の形質を変化させていることが推測された。そこで、さらに scRNA-seq 解析を行い、CD8+細胞傷害性 T 細胞へ抗原提示する役割を持つ HLA (Human leukocyte antigen) クラス I 分子 (HLA-I) の発現を検証した。結果、HLA-I の発現は非老化表皮基底細胞で上昇していた。一方、老化表皮基底細胞は HLA-I の発現を非老化表皮基底細胞よりも低下させていた。さらに、老化表皮基底細胞はオートクライン作用により、HLA-I の発現を抑制する EGFR シグナルを高めていたことから、老化表皮基底細胞が産生す

る I 型 IFN が、正常表皮基底細胞に対する CD8+T 細胞からの細胞傷害性を高める一方、老化表皮基底細胞は、EGFR シグナルを高めることで HLA-I の発現を抑制し、CD8+T 細胞からの攻撃から逃れている可能性が示唆された。

そこで、ヒト不死化 KC である HaCaT 細胞を用いた *in vitro* 実験を実施し、老化表皮細胞と正常表皮細胞、CD8+T 細胞との相互作用を検証した。Ultraviolet B 照射によって老化誘導した HaCaT 細胞では HLA-I の発現が低下し、老化 HaCaT 細胞の SASP 因子は、I 型 IFN シグナルを介して非老化 HaCaT 細胞の HLA-I 発現を上昇した。さらに、CD8+T 細胞、老化 HaCaT 細胞、非老化 HaCaT 細胞の共培養実験により、老化 HaCaT 細胞は CD8+T 細胞による非老化 HaCaT 細胞に対するアポトーシスを誘導した。最後に、SLE モデルマウスである MRL/lpr に対して老化細胞除去薬である fisetin を経口投与し、老化表皮基底細胞の CLE 病態形成への関与を検証した。結果、vehicle 群と比較して fisetin 投与群では、p21^{WAF1/CIP1} 陽性の老化細胞が減少し、皮膚病変の改善を認めた。

これらの結果から、CLE では老化表皮基底細胞が産生する I 型 IFN が、細胞傷害性 T 細胞の正常表皮基底細胞に対する攻撃性を高め、CLE 皮膚病態を形成している可能性が示唆された。さらに、老化表皮基底細胞は細胞傷害性 T 細胞の攻撃を回避する特性があることがわかった。今後は、老化表皮基底細胞を標的とした CLE 新規治療法の開発が期待される。

略語リスト

Ab: Antibody
ACLE: Acute CLE
AMP®: Accelerating Medicines Partnership®
ANGPTL: Angiopoietin-like protein
APM: Antigen-processing and presentation machinery
AREG: Amphiregulin
B2M: β 2 microglobulin
BSA: Bovine serum albumin
CCLE: Chronic CLE
CDH: Cadherin
CDK: Cyclin-dependent kinases
cGAS: Cyclic GMP-AMP synthase
CLDN: Claudin
CLE: Cutaneous lupus erythematosus
CM: Conditioned media
CypA: Cyclophilin A
DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO: Dimethyl sulfoxide
dNTP: Deoxyribonucleotides
D+Q: Dasatinib + Quercetin
EGF : Epidermal growth factor
EGFR: Epidermal growth factor receptor
EPH: Ephrin
FBS: Fetal bovine serum
FDR: False discovery rate
GAP: Growth-associated protein
GEO: Gene Expression Omnibus
GO: Gene ontology
GSEA: Gene set enrichment analysis
HBEGF: Heparin-binding EGF-like growth factor
H&E: Hematoxylin • eosin
HLA: Human leukocyte antigen
HMGB1: High mobility group box 1
ICLE: Intermittent CLE

IGFBP: Insulin-like growth factor binding protein
JAM: Junctional adhesion molecule
JCRB: Japanese Collection of Research Bioresources
KC: Keratinocytes
LINE1: Long interspersed nuclear element-1
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MHC: Major histocompatibility complex
MIF: Macrophage migration inhibitory factor
mRNA: Messenger RNA
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NES: Normalized enrichment scores
NF- κ B: Nuclear factor- κ b
NHEK: Normal human epidermal keratinocytes
NK: Natural killer
One-way ANOVA: One-way analysis of variance
PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells
PBS-T: Phosphate buffered saline with tween 20
PCA: Principal component analysis
pDC: Plasmacytoid dendritic cells
p-EGFR: Phospho-EGFR
PFA: Paraformaldehyde
PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
PS: Penicillin streptomycin
SASP: Senescence-associated secretory phenotype
SCAPs: Senescent cell anti-apoptotic pathways
SCLE: Subacute CLE
SLE: Systemic lupus erythematosus
SPiDER- β Gal: SPiDER- β Galactosidase
scRNA-seq: Single-cell RNA-sequencing
STAT1: Signal transducer and activator of transcription 1
STING: Stimulator of interferon genes
TBS-T: Tris buffered saline with tween 20
TCR: T cell receptor
THBS: Thrombospondin
TNFa: Tumor necrosis factor alpha
UMAP: Uniform manifold approximation and projection

UV: Ultraviolet

UVB: Ultraviolet B

第1章 諸言

1-1. 全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus [SLE]) と皮膚エリテマトーデス (Cutaneous lupus erythematosus[CLE])

SLE は、皮膚、血管、脳、肺、腎臓、関節など全身の臓器に臨床症状を呈する自己免疫疾患である¹。有病率は人口 10 万人あたり 20-150 例と報告され、妊娠可能年齢の女性に多く、男女比はおよそ 1:10 である^{2,3}。SLE の発症要因は未だ明らかでなく、遺伝的要因、エピジェネティックな変化、ホルモンおよび環境因子（紫外線曝露、薬剤など）が複合的に関与していると考えられている。

CLE は、単独の皮膚疾患として、また SLE 症状の一つとして約 70-80% の SLE 患者に現れる炎症性疾患である。臨床像は、瘢痕を残さない急性の発疹から、慢性的な病変まで多岐にわたり、患者の生活の質に深刻な影響を及ぼす。CLE は、急性皮膚エリテマトーデス (Acute CLE [ACLE])、亜急性皮膚エリテマトーデス (Subacute CLE [SCLE])、慢性皮膚エリテマトーデス (Chronic CLE [CCLE])、間欠性皮膚エリテマトーデス (Intermittent CLE [ICLE]) の 4 つの主要カテゴリーに大別される。表 1 に、代表的なサブタイプの特徴と主な鑑別診断をまとめる⁴。また、CLE で認められる「頬部紅斑」「円板状皮疹」「光線過敏症」「口腔内潰瘍」などの症状は、2019 年ヨーロッパリウマチ学会/アメリカリウマチ学会における SLE の診断基準に組み込まれており、CLE の診断は SLE の早期発見と評価において極めて重要な役割を果たしており⁴、CLE の複雑な病態メカニズムの理解は SLE 診断法の開発と、次世代の治療戦略を確立するための鍵となると考えられる。

表 1. CLE の分類と臨床的・組織学的特徴

サブタイプ	臨床的特徴	組織学的特徴	主な鑑別診断
ACLE	頬骨部に見られる対称性の紅斑（蝶形紅斑）が典型的。鼻唇溝を避ける特徴がある。全身性では薬疹に似た紅斑が広範囲に出現する。	顕著な Interface dermatitis、基底細胞の液状変性、真皮上層の浮腫。表皮剥離を伴うこともある。	酒さ、接触皮膚炎、薬疹、薬剤性光線過敏症
SCLE	日光曝露部に好発する、環状または乾癬様の鱗屑を伴う紅斑性丘疹・局面。瘢痕	ACLE より軽度の Interface dermatitis。真皮のムチン沈着は少ない。	乾癬、環状肉芽腫、体部白癬、薬剤性光線過敏症

	を残さずに治癒するが、色素脱失を伴うことが多い。		
円板状 CLE (CCLE の代表)	境界明瞭な、鱗屑と毛孔一致性の角栓を伴う紅斑性局面。慢性化すると中心部の萎縮、瘢痕、色素沈着・脱失を来す。顔面、耳、頭部に好発。	著明な Interface dermatitis に加え、毛包周囲および血管周囲の密なリンパ球浸潤、毛孔角栓、真皮のムチン沈着。	乾癬、皮膚 T 細胞性リンパ腫、サルコイドーシス、多形日光疹
腫脹性 CLE (ICLE の代表)	境界不明瞭で浮腫性の、蕁麻疹様の紅斑性局面。表皮の変化（鱗屑や萎縮）を伴わない。日光曝露部に好発し、瘢痕を残さない。	Interface dermatitis を欠く。真皮の著明なムチン沈着と血管周囲のリンパ球浸潤が特徴。	偽リンパ腫、多形日光疹、環状肉芽腫

1-2. CLE の分子病態

CLE では表 1 のように臨床的・組織学的な多様性があるが、腫脹性 CLE を除く主要サブタイプに共通して「Interface dermatitis（境界部皮膚炎）」が認められる。Interface dermatitis では、Type I Interferon（I 型 IFN）シグナルによって誘導されるケラチノサイト（Keratinocytes [KC]）への免疫細胞による細胞傷害性が認められ、CLE 病変の慢性化や瘢痕化は、I 型 IFN シグナルの強度や持続性に関連していると考えられている⁴。また近年では、CLE において一見正常に見える非病変部の皮膚でも、IFN シグナル関連遺伝子群の発現が持続的に上昇していることが報告され、慢性的な IFN の活性化状態が、CLE の病態形成の基盤をなしていると考えられている⁴。CLE における I 型 IFN の産生は、自然免疫系の核酸センサーが自己由来の核酸を誤って認識することによって引き起こされ、細胞質内に漏れ出た自己 DNA を cyclic GMP-AMP synthase（cGAS）- stimulator of interferon genes（STING）経路を介することで、I 型 IFN 産生を強力に活性化することが報告され⁴、Z 型コンフォメーションをとる特殊な自己 DNA を認識するセンサーである ZBP1 が cGAS-STING 経路を増強する報告がある⁴。

紫外線 (Ultraviolet [UV]) は、CLE 患者の多くが報告する光線過敏症の誘導因子として知られる。UV 照射は KC にミトコンドリアの酸化ストレスを引き起こし、酸化されたミトコンドリア DNA が細胞質へ放出される。この DNA は Z 型コンフォメーションをとりやすくなり、ZBP1 がこの Z-DNA を安定化させ、cGAS による認識を促進し、その結果、STING 経路が強力に活性化され、大量の I 型 IFN が産生され KC のアポトーシスが亢進することが報告されている⁵。また、CLE の病変部では、複数の免疫細胞と皮膚構成細胞が相互に作用し、自己増幅的な炎症回路が形成されている⁶。活性化した KC は、CXCL9、CXCL10、CXCL11 などのケモカインを大量に産生する⁶。これらのケモカインは、その受容体である CXCR3 を発現する CD8+細胞傷害性 T 細胞や Th1 細胞を強力に病変部へ誘引する⁶。浸潤した T 細胞は IFN- γ などを放出し、KC をさらに刺激してケモカイン産生を増幅させる⁷。

SLE における I 型 IFN を過剰産生する原因細胞については、以前から形質細胞様樹状細胞 (Plasmacytoid dendritic cells [pDC]) の関与が推測されていた⁸。pDC は核酸を含む免疫複合体に反応することで IFN を産生し、その他の免疫系を活性化させる⁸。しかし、近年の前臨床試験では、pDC はエフェクター細胞として機能せず、疾患活動性や循環 IFN 濃度に関わらず、Toll 様受容体を介したサイトカインの産生や T 細胞の活性化を誘導しないことが明らかになった^{9,10}。すなわち、pDC 以外の細胞が IFN を産生し、CLE 発症を誘引していることが考えられるが、KC なのか、それとも他の細胞なのか同定されておらず、IFN を産生する原因細胞とその特徴については、明らかになっていない。

1-3. CLE と細胞老化

細胞老化は不可逆的な細胞周期停止を特徴とし、テロメア短縮^{11,12}、がん遺伝子活性化¹³、放射線¹⁴、高レベルの活性酸素種¹⁵、ミトコンドリア機能不全¹⁶、炎症性サイトカインおよびケモカイン¹⁷、メカニカルストレス¹⁸、タンパク質凝集¹⁹、オートファジーの低下²⁰、リボソームストレス^{21,22}、成長因子²³などさまざまなストレス因子によって引き起こされ、senescence-associated secretory phenotype (SASP) として知られるサイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼなど炎症誘導性因子の分泌を促進する形質となる²⁴。本来、細胞老化は、細胞周期を停止することで腫瘍形成を抑制する防御機構として機能するが、SASP を介して、加齢関連疾患や慢性炎症を引き起こすことが知られている²⁵。

細胞老化の誘導には、p21^{WAF1/CIP1} および p16^{INK4a} が関与しており、細胞周期停止の中心的な役割を果たす。これらは cyclin-dependent kinases (CDK) の活性を阻害し、低リン酸化状態の retinoblastoma、p107 および p130 を介して、E2F 転写活性およびその標的遺伝子 (Cyclin E や Cyclin D など) の転写が抑制され、細胞

周期は G1 期で停止する²⁶。SLE 患者の皮膚病変の免疫組織化学解析においても、p21^{WAF1/CIP1} および p16^{INK4A} 陽性の表皮基底細胞が同定されている²⁷。しかし、老化細胞が CLE 病態に関与しているのか、CLE 病態で中心的な役割を果たす IFN との関係性は未だ不明である。

また、老化細胞は、long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) retrotransposable elements の脱抑制を示し、その結果、LINE-1 相補的 DNA の細胞質蓄積と強力な I 型 IFN 応答の活性化が起こることがわかっている²²。この活性化は inflammaging として知られる加齢関連の慢性炎症を駆動する要因であることがわかっており、LINE-1 逆転写産物である相補的 DNA が cGAS-STING 経路を刺激することによって媒介される²²。このように、CLE の病態に細胞老化が関与している可能性が示唆されているものの、IFN 産生における老化細胞の関与や炎症の増幅サイクルにおけるその機能については十分に解明されていない。

1-4. 本論文の目的

本研究では、CLE 皮膚組織で老化細胞の存在と、それらが I 型 IFN 産生や免疫細胞との相互作用を通じて病態を誘導するメカニズムを検証した。具体的には、CLE および SLE 患者皮膚組織の遺伝子アレイおよび single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) 解析と、ヒト不死化 KC を用いた *in vitro* 実験によって検証した。さらに SLE モデルマウスの皮膚病変に対する老化細胞除去薬の効果を検証することで、老化細胞の CLE 皮膚病態への関与を *in vivo* で明らかにした。

第 2 章 CLE 皮膚組織における老化細胞の検証

2-1. 緒言

前述のように、これまで CLE において老化細胞の病態への関与が推測され、細胞老化関連遺伝子である p21^{WAF1/CIP1} および p16^{INK4a} 陽性の表皮細胞の存在が報告されてきた²⁷。しかしながら、遺伝子発現解析による老化細胞の同定については p21^{WAF1/CIP1} および p16^{INK4a} の発現上昇に加え、SASP 因子を同定することで、同じく細胞周期抑制因子を上昇させる休止細胞や終末分化細胞と区別し、老化細胞を同定できる²⁸。そこで、本研究においては CLE 患者皮膚の網羅的遺伝子発現解析によって、細胞老化関連遺伝子の発現を検証する。さらに、単一細胞による scRNA-seq 解析によって、皮膚病変に存在する老化細胞の細胞種を同定し、老化細胞と IFN 産生細胞、さらには他の細胞との細胞間コミュニケーションについて、バイオインフォマティクス解析によって明らかにした。

2-2. 対象と方法

2-2-1. 遺伝子発現データおよび解析方法

CLE 患者皮膚の遺伝子発現データは、米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) が運営・管理している公共のデータベースである Gene Expression Omnibus (GEO) から取得した (GSE184989)²⁹。本データセットには、ACLE (n = 20)、SCLE (n = 22)、慢性円板状皮膚エリテマトーデス (chronic discoid lupus erythematosus[DLE] : n = 26) および健常対照者 (control : n = 4) のパラフィン包埋皮膚生検サンプルを用いたマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現データで構成された。データ解析は R (<https://www.r-project.org/>) および Transcriptome Analysis Console ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) を用いて実施した。Gene set enrichment analysis (GSEA) は Broad Institute が提供する GSEA ソフトウェア³⁰ を用いて行い、遺伝子セットは細胞老化関連遺伝子セット (SenMayo)²⁸ および Hallmark 遺伝子セット³¹ を使用した。GSEA における統計的有意性の判定には、Signal2Noise 法を用い、false discovery rate (FDR) 法によって q-value を算出した。

2-2-2. scRNA-seq 解析

scRNA-seq データは Accelerating Medicines Partnership® (AMP®) により公開された AMP® Phase1-Metro³² データセットであり、Single Cell Portal

(https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell) から quality-controlled 発現マトリックスデータとして取得した。GSE186476³³ は NCBI の GEO から取得した。

データの前処理は、R プログラミング言語を用い、Seurat (ver. 4.3.0)³⁴ パッケージで行った。AMP® Phase1-Metro データセットには、SLE 患者 14 例の皮膚サンプルが含まれている。また、GSE186476 データセットには、CLE 患者 7 例および健常対照 14 例の皮膚サンプルが含まれている。GSE186476 データセットについては、CLE および健常皮膚由来のシングルセルデータを用い、遺伝子が 3 細胞以上で検出されていること、各細胞あたり検出遺伝子数が 100~5,000 の範囲であること、ミトコンドリア遺伝子発現率が 10%未満であることの条件でフィルタリングを行った。データは “NormalizeData” 関数を用いて正規化し、“FindVariableFeatures” 関数により 2,000 個の高変動遺伝子を同定した。

“FindIntegrationAnchors” および “IntegrateData” 関数を用いてバッチ効果を補正した後、データをスケーリングし、principal component analysis (PCA) により次元を削減した。可視化には uniform manifold approximation and projection (UMAP) を使用した。クラスタリングは、“FindNeighbors” および “FindClusters” 関数を用い、resolution 0.2 で実施した。既知のマーカー遺伝子に基づき、以下のように

細胞群をアノテーションした。表皮基底細胞 (*KRT5*、*KRT14*)、有棘細胞 (*KRT1*、*KRT10*、*DSGI*)、顆粒細胞 (*KRT2*、*DSCI*)、メラノサイト (*MLANA*)、汗腺細胞 (*DCD*)。Single-sample GSEA (ssGSEA)³⁵ は、escape (ver. 1.6.0) および dittoSeq (ver. 1.8.1) パッケージを用いて実施した。細胞老化関連遺伝子セットとして、Casella³⁶、Fridman³⁷、SenMayo²⁸、Global Senescence Literature Curated 2020³⁸、SASP Literature Curated³⁹、Purcell⁴⁰、Hernandez⁴¹ を使用した。また、Type I IFN 関連遺伝子セットとして、type I IFN production (GO:0032606)、response to type I IFN (GO:0034340)、および interferon-alpha response (GO:0035455) を用いた。さらに、EGFR signaling (R-HSA-177929)、MHC-I-mediated antigen processing and presentation (R-HSA-983169)、MHC-II antigen presentation (R-HSA-2132295)、immune system process (GO:0002376)、および immune response (GO:0006955) に関連する遺伝子セットを使用した。また、CellChat (ver. 1.6.1) を用いて、リガンド-レセプター相互作用に基づく細胞間コミュニケーション解析を行った⁴²。Communication probability の統計的有意性は permutation test により評価し、 $P < 0.05$ を有意水準とした。

2-2-3. 統計処理

定量データは R プログラミング言語を用いて可視化し、箱ヒゲ図およびバイオリンプロットで示した。また、各サンプルの定量値をドットプロットで示した。2 群間の比較に t 検定を用い、3 群以上の差の評価には one-way analysis of variance (ANOVA) を実施した。One-way ANOVA で統計的有意性が示された場合のみ、多重比較が行われた。多重比較の P 値は tukey 法または bonferroni で補正した。統計解析は R のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR を用いて行った⁴³。

2-3. 結果

2-3-1. 細胞老化関連遺伝子セットでの GSEA

CLE 患者の皮膚組織における細胞老化を検証するため、GEO データベース (GSE184989)²⁹ から取得した CLE 患者の遺伝子発現データにて、細胞老化関連遺伝子セット (SenMayo)²⁸ を用いて、GSEA³⁰ を実施した。GSEA により、CLE 患者の皮膚組織では正常皮膚組織 (Ctrl) と比較して SenMayo 遺伝子セットがエンリッチしていることが明らかになった (図 1a)。さらに、CLE pathomorphology²⁹ に基づいて分類された ACLE、SCLE、DLE のサブタイプを解析したところ、すべてのサブタイプで SenMayo 遺伝子セットがエンリッチしていることが示された (図 1a)。さらに、細胞老化関連遺伝子として代表され

る *CDKN1A* と *CDKN2A* の発現が、CLE 患者のすべてのサブタイプで正常皮膚と比較して、上昇していた (図 1b)。また、表皮基底細胞の解析では、真皮乳頭周囲の表皮基底細胞に豊富に含まれる表皮幹細胞因子 *COL17A1*、*ASS1*、*POSTN* の発現が有意に低下していた (図 1c)。一方、*KRT14*、*PTTG1*、*CDC20*、*RRM2*、*GJB2*、*HELLS*、*UHRF1*、*PCLAF*、*KRT16*、*KRT6A* などの他の基底細胞マーカーの発現には有意な差は認められなかった (図 1c)。

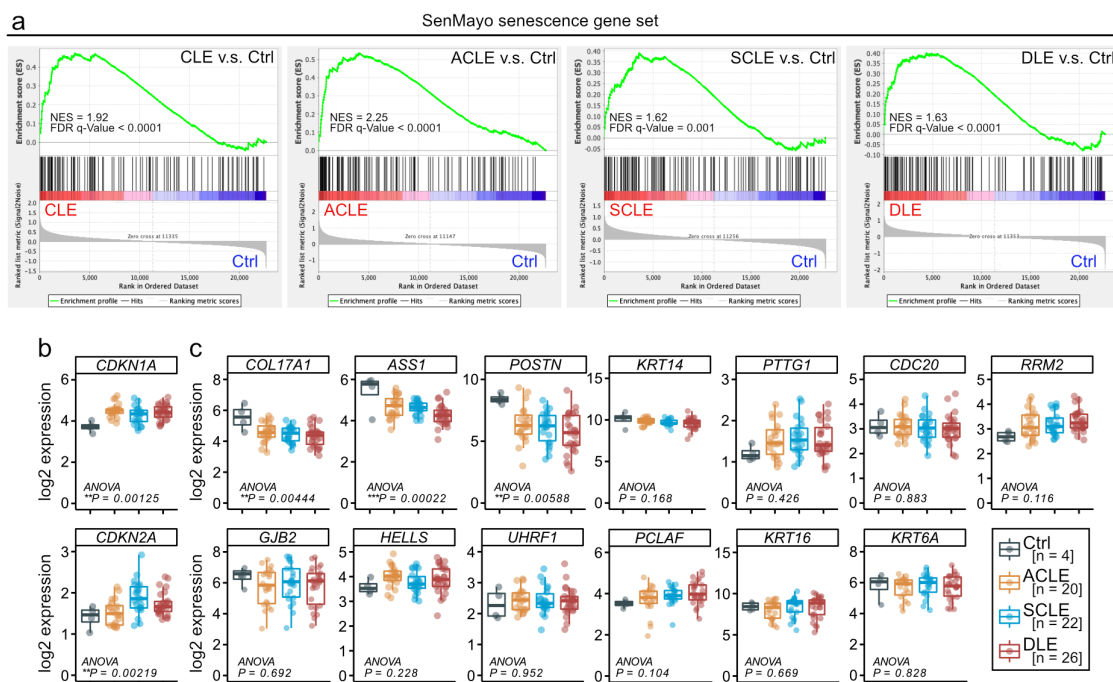


図 1. CLE における細胞老化関連遺伝子の発現

(a) 正常皮膚 (Ctrl: n=4) と比較した CLE (n=68)、ACLE (n=20)、SCLE (n=22) および DLE (n=26) の遺伝子アレイデータと SenMayo の GSEA。Normalized enrichment scores : NES。 (b) 細胞老化関連遺伝子 (*CDKN1A*、*CDKN2A*) および、 (c) 表皮基底細胞因子 (*KRT14*、*PTTG1*、*CDC20*、*RRM2*、*COL17A1*、*ASS1*、*POSTN*、*GJB2*、*HELLS*、*UHRF1*、*PCLAF*、*KRT16*、*KRT6A*) の log₂ 変換された遺伝子発現量。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。GSEA の統計解析には t 統計量に基づくランキング法である Signal2Noise 法を用いて P 値を算出し、FDR 法によって q 値を算出した。各遺伝子発現の 4 群間の比較には one-way ANOVA を用いた。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした。

2-3-2. Hallmark 遺伝子セットでの GSEA

2-3-1 と同様に遺伝子発現データを用いて、Hallmark 遺伝子セット³¹を用いた GSEA³⁰を実施した。GSEA により、CLE 患者の皮膚組織では正常皮膚組織と比較して、炎症反応に関連する遺伝子と補体系の成分をコードする遺伝子が有意にエンリッチされることが示された（図 2）。

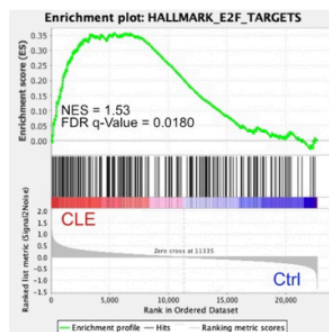
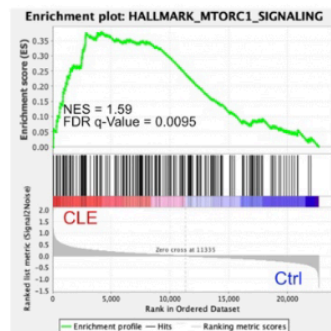
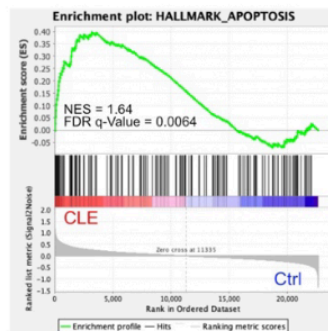
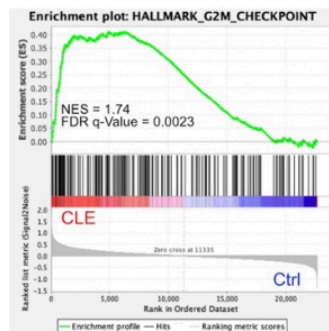
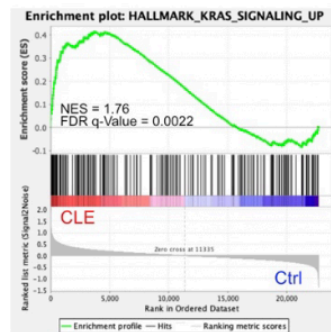
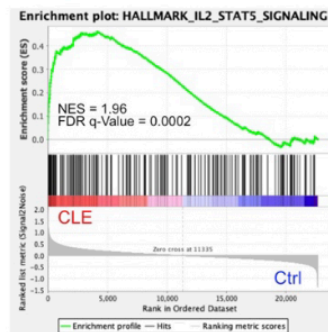
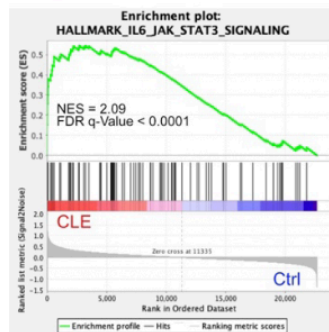
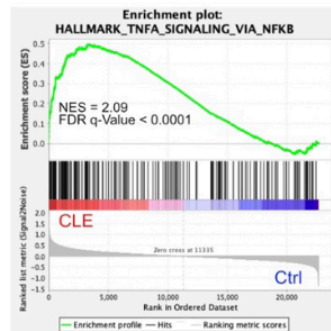
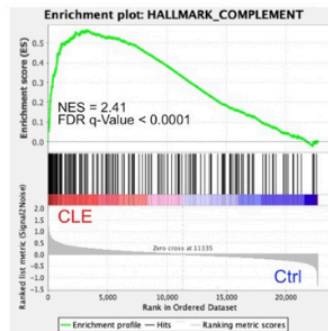
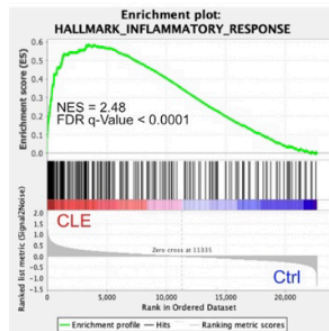
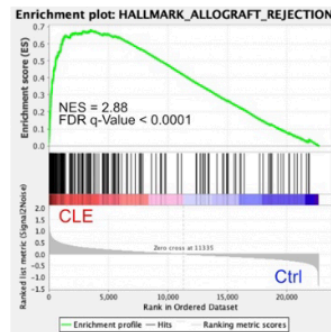
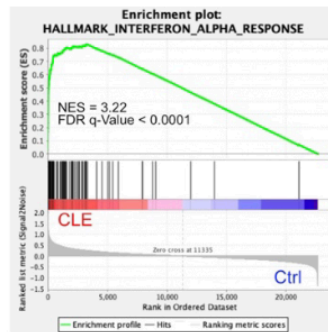
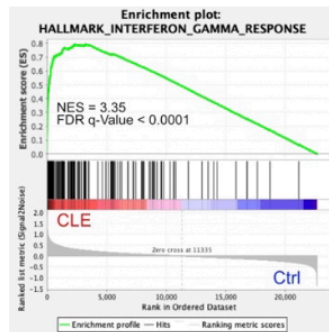


図 2. CLE における炎症反応および補体関連因子の発現

正常皮膚 (Ctrl : n=4) と CLE (n = 68) で、GSEA を実施し、有意にエンリッチされた Hallmark 遺伝子セット。Normalized enrichment scores : NES。GSEA の統計解析には t 統計量に基づくランキング法である Signal2Noise 法を用いて P 値を算出し、FDR 法によって q 値を算出した。

2-3-3. SLE 皮膚由来表皮細胞のクラスター化

SLE 皮膚病変における細胞老化に関与する細胞タイプを同定するため、SLE 患者の皮膚から採取した scRNA-seq データセット (AMP® Phase1-Metro)³² を解析し、ssGSEA³⁵ を実施した。はじめに、皮膚由来 KC を抽出し、基底細胞マーカー *KRT5* および *KRT14* を発現する表皮基底細胞を同定した (図 3)。結果、5 つの表皮基底細胞クラスターが同定された。

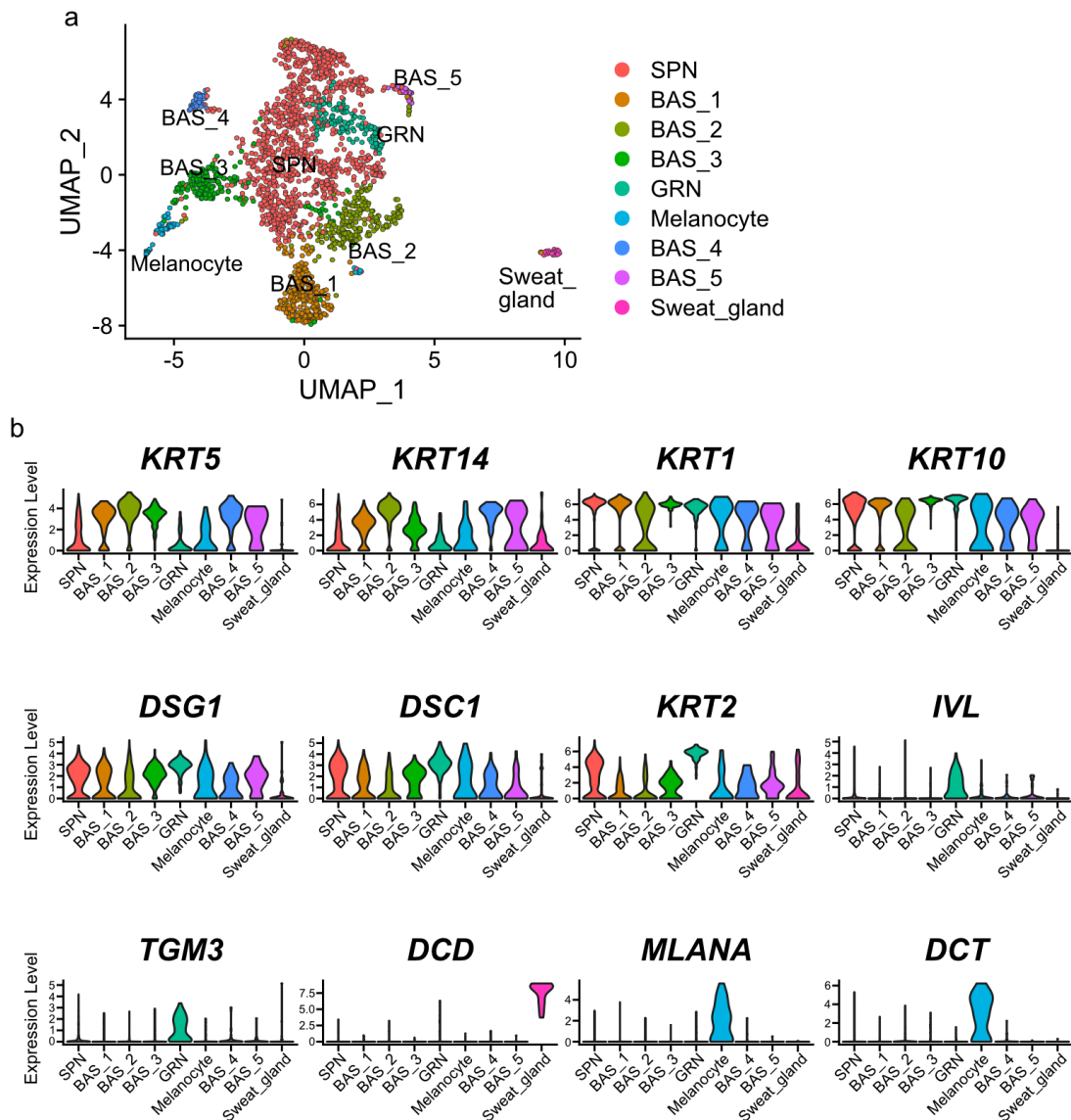


図 3. SLE 患者由来の各細胞クラスターにおける UMAP およびバイオリンプロット

(a) SLE 患者の皮膚由来細胞を抽出し、UMAP により可視化したプロット。(b) 各細胞クラスターにおけるマーカー遺伝子のバイオリンプロット。クラスターはそれぞれ、有棘細胞クラスター (SPN)、基底細胞クラスター (BAS_1~5)、顆粒細胞クラスター (GRN)、メラノサイトクラスター (Melanocyte)、および汗腺クラスター (Sweat_gland) を指す。

2-3-4. 老化細胞による I 型 IFN 産生

次に、2-3-3 で同定した表皮基底細胞の 5 つのクラスターについて、遺伝子発現に基づき、*COL17A1*-high (*COL17*)、*CDKN1A*-high (*CDKN1A*)、BAS1、BAS2、

BAS3 クラスタ (図 4a および b) として同定した。ssGSEA により、細胞老化関連遺伝子セットを最もエンリッチするクラスターは、CDKN1A クラスタであることがわかり、これを老化細胞クラスター (SEN) と同定した (図 4c)。また、DecoupleR 解析により、SEN クラスタで p53、nuclear factor- κ B (NF- κ B)、mitogen-activated protein kinase (MAPK)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、epidermal growth factor receptor (EGFR)、transforming growth factor β (TGF β)、hypoxia、androgen activity の増加が示された (図 4d)。Gene ontology (GO) エンリッチメント解析により、COL17 クラスタでは「Epidermis development」が有意にエンリッチメントされ、SEN クラスタでは「Viral Process」と「Negative regulation of cell cycle」が有意にエンリッチメントされていることが明らかになった (図 5)。さらに、SEN クラスタで、細胞老化に寄与する DNA 損傷応答に関連する GO タームが有意に増加していることが示された (図 6)²⁴。最後に、I 型 IFN 関連遺伝子セットを検証したところ、SEN クラスタで有意にエンリッチメントされていることが明らかになった (図 7)。

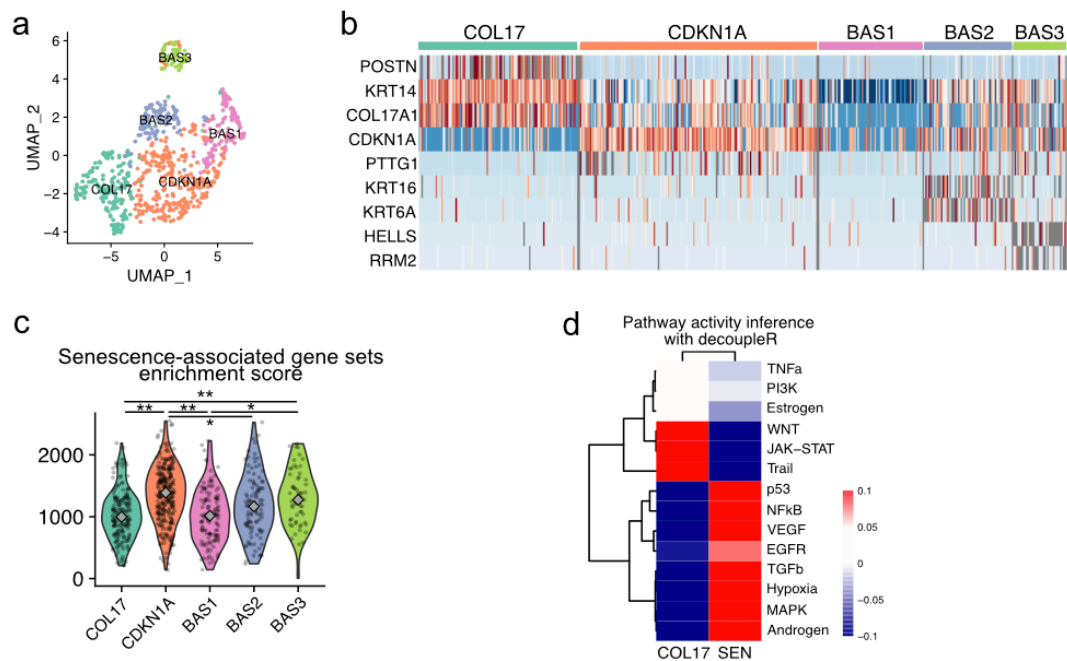


図 4. SLE 患者の皮膚における老化表皮基底細胞クラスターの同定

(a) SLE 患者の皮膚からの表皮基底細胞の UMAP。(b) 表皮基底細胞の 5 つの細胞クラスターにわたる差次的発現遺伝子のヒートマップ。(c) 7 つの老化関連遺伝子セットのエンリッチメントスコアの中央値のバイオリンプロット。細胞老化関連遺伝子セットには、Casella UP、Fridman UP、SenMayo、Global Senescence Literature Curated 2020、SASP Literature Curated gene set、Purcell、およ

び Hernandez を使用した。(d) *COL17A1* -high および *CDKN1A* -high 老化クラスター間の差次的パスウェイ活性を示すヒートマップ。定量データはバイオリンプロットで示した。5 群間の比較には one-way ANOVA を使用し、多重比較の P 値は tukey 法で補正した。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$)。PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; TNFa, tumor necrosis factor alpha.

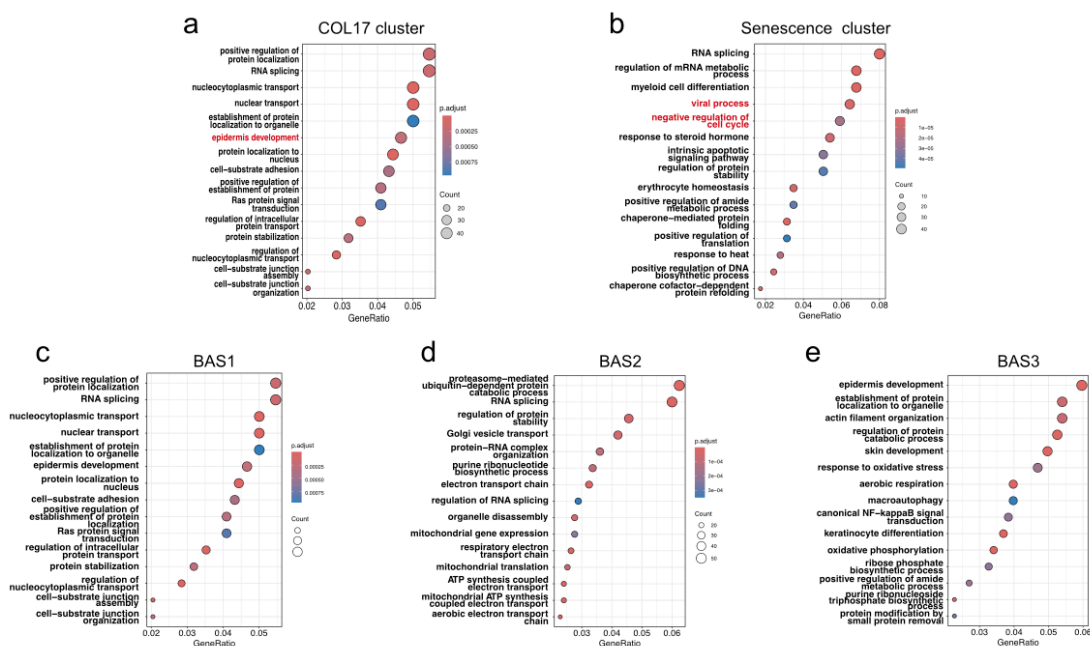


図 5. 表皮基底細胞における生物学的プロセスの上位 10 項目の GO タームのバブルプロット

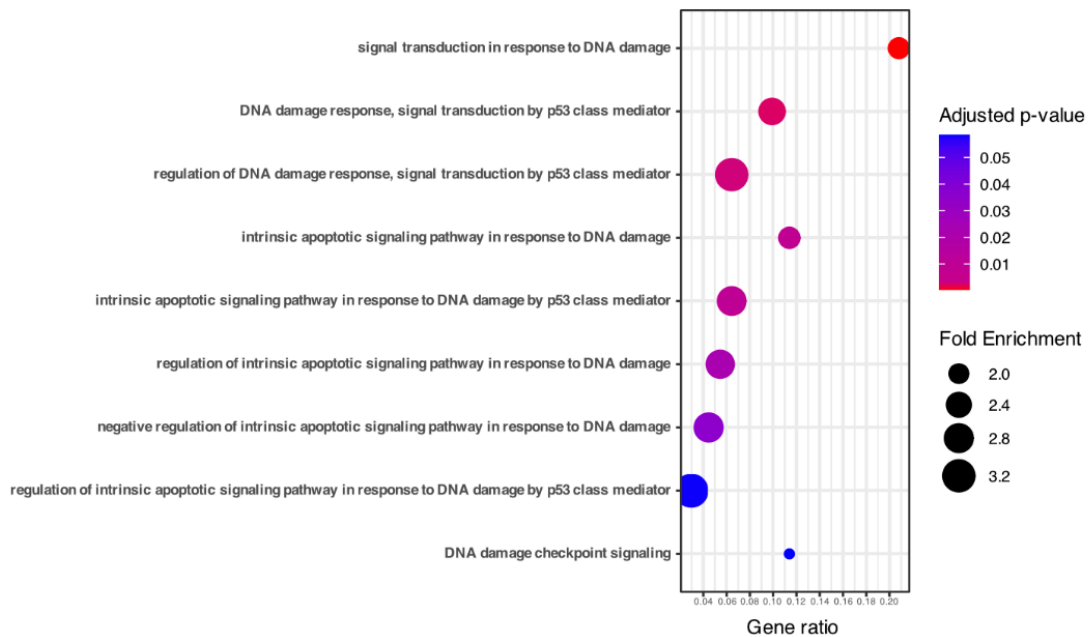


図 6. SEN クラスターにおいて同定された DNA 損傷関連の生物学的プロセスに関する GO タームのバブルプロット

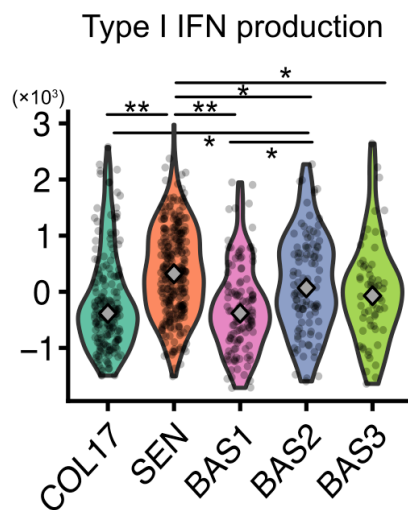


図 7. I 型 IFN 産生の ssGSEA スコアのバイオリンプロット

定量データはバイオリンプロットで示した。5 群間の比較には one-way ANOVA を使用し、多重比較の P 値は tukey 法で補正した。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$)。

2-3-5. 表皮基底細胞の細胞間コミュニケーション解析

老化細胞は、SASP を介して、慢性炎症性病態における微小環境を形成することが知られている²⁴。scRNA-seq データを用いて、細胞間コミュニケーションネットワークを解析可能な CellChat⁴² を用いて、コミュニケーション強度が高い上位 20 シグナルを可視化した。解析の結果、SEN クラスタはその他の非老化クラスタよりも細胞間コミュニケーションが活発で、epidermal growth factor (EGF) シグナル伝達が強いことが分かった (図 8a)。SEN クラスタは EGF シグナル伝達のリガンド発現がエンリッチしており、SEN、BAS2、BAS3、COL17 クラスタではその受容体発現が高かった (図 8b および c)。次に、EGF pathway の詳細なリガンドとレセプターを解析した。結果、EGF pathway の中では、heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF) -EGFR および amphiregulin (AREG) -EGFR の相互作用が SEN クラスタで有意に増加しており、HBEGF-EGFR の相互作用がより強いことが明らかになった (図 8d および e)。

以上の結果から、SEN クラスタは BAS2 および BAS3 の間で EGF シグナル伝達ネットワークは相互作用の増加を示し (図 8d)、さらにオートクラインシグナルを通して、非常に強い EGF シグナル伝達を示した (図 8d)。

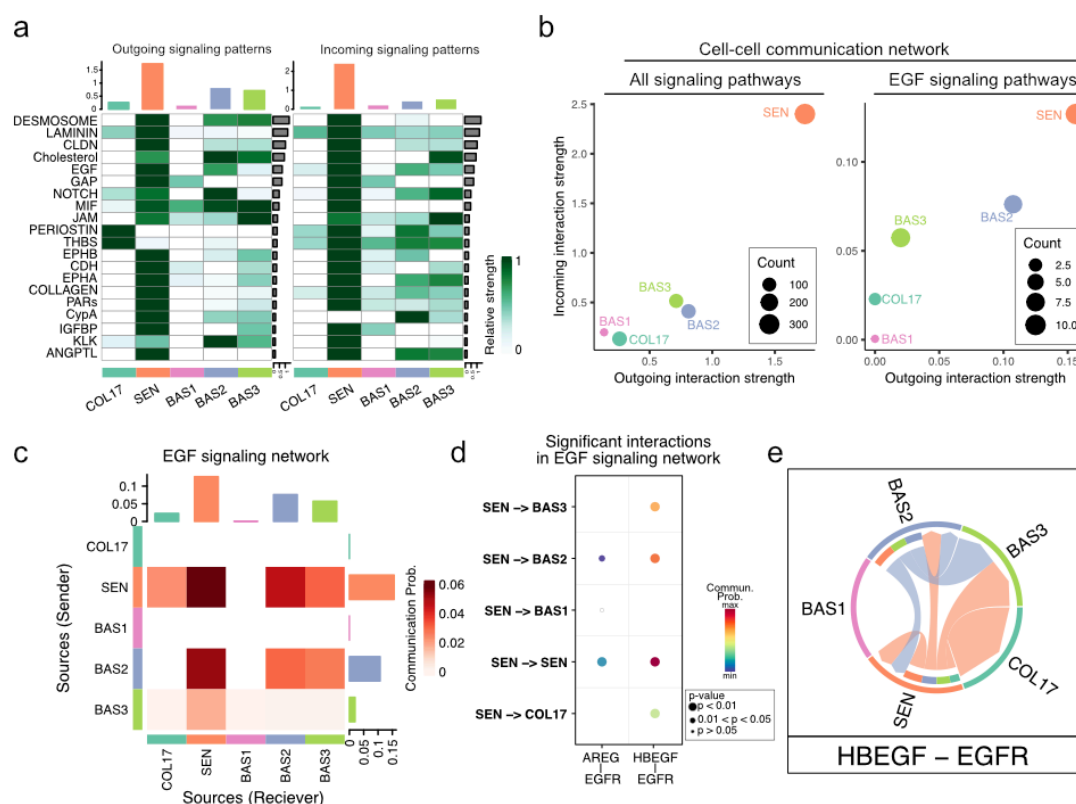


図 8. SLE 患者の皮膚由来表皮基底細胞の細胞間コミュニケーション解析

(a) Outgoing シグナル伝達 (左) と Incoming シグナル伝達 (右) を示す上位 20 のシグナル伝達分子の相対的強度のヒートマップ。(b) 細胞間コミュニケーションネットワークの散布図。x 軸と y 軸はそれぞれ outgoing または incoming communication probability の合計を示す。ドットのサイズは inferred links の数に比例する。(c) EGF シグナル伝達の相対的強度のヒートマップ。(d) HBEGF-EGFR および AREG-EGFR シグナル伝達のパブルプロット。色は communication probability を表し、青と赤はそれぞれ最小値と最大値を示す。(e) HBEGF-EGFR ネットワークのコード図。ANGPTL, angiopoietin-like protein; CDH, cadherin; CLDN, claudin; CypA, cyclophilin A; EPH, ephrin; GAP, growth-associated protein; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; JAM, junctional adhesion molecule; MIF, macrophage migration inhibitory factor; THBS, thrombospondin.

2-3-6. CLE 患者皮膚における HLA-I 発現の検証

I 型 IFN は SLE の発症と進行に重要な長期的な HLA (Human leukocyte antigen) (I および II) 発現を誘導することが知られている⁴⁴。HLA は HLA クラス I (HLA-I) と HLA クラス II (HLA-II) に分類される。HLA-I は古典的 HLA-I (HLA-A、HLA-B、HLA-C) と非古典的 HLA-I (HLA-E、HLA-F、HLA-G) が含まれる。古典的 HLA-I と非古典的 HLA-E は有核細胞に発現し、細胞質および核由来のタンパクを CD8+T 細胞へ提示するほか、natural killer (NK) 細胞とも相互作用する⁴⁵。HLA-I の発現は tumor necrosis factor alpha や IFN などの炎症性サイトカイン刺激に応答して誘導されることが知られている。一方で、EGFR シグナルは、下流の MAPK 経路などを通して、major histocompatibility complex (MHC) の発現を負に制御する可能性が報告されている⁴⁶。したがって、MHC の発現レベルは、これらシグナルのバランスにより調節されていると考えられる。これらの関係を検証するため、CLE 患者と健常対照者の皮膚 scRNA-seq データセット (GSE186476)³³ を解析した。CLE 患者の病変部組織と非病変部組織ともに UMAP 解析し、13 の細胞クラスターを同定した。I 型 IFN の産生に関して、健常対照者と比較して、病変部と非病変部の皮膚の両方で I 型 IFN 産生が高い表皮細胞の割合が有意に増加していることが示された。なお、CLE 患者の病変部と非病変部では有意差は認められなかった。以降、解析は CLE 患者の病変部皮膚と対照者の皮膚を用いて行った (図 9)。はじめに、UMAP を用いて皮膚由来の細胞をクラスター化し、*KRT5*、*KRT14*、*COL17A1* を発現する表皮基底細胞を同定した (図 10a)。CLE 皮膚病変由来の表皮基底細胞は、健常対照と比較して、細胞老化関連遺伝子セットと I 型 IFN 関連遺伝子セットが上昇した (図 10b および c)。また、*HLA-I* (*HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*、*HLA-E*) (図 10d) および *HLA-II* (*HLA-DRA*、*HLA-DRB1*、*HLA-DQB1*) の発現が上昇していた (図 11)。

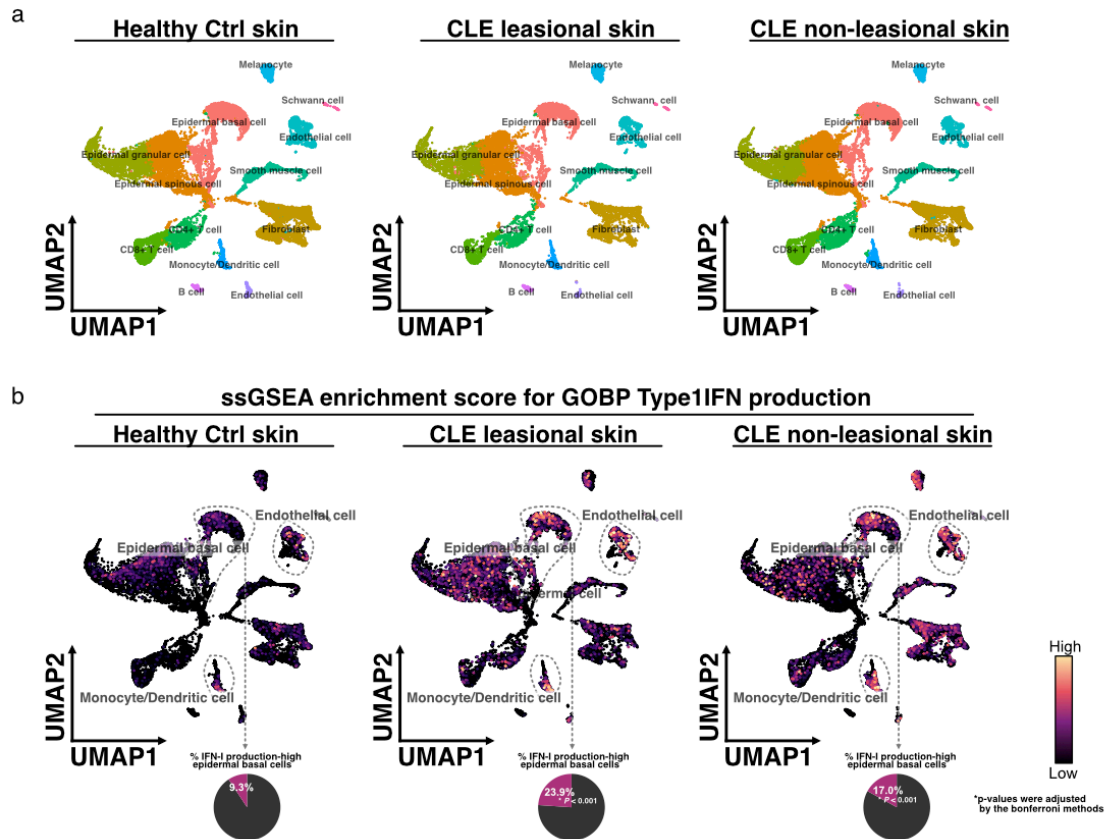


図 9. 健常対照および CLE 患者皮膚サンプルの scRNA-seq 解析

(a) 健常対照 (Ctrl、左)、CLE 病変部 (中央)、および CLE 非病変部 (右) の皮膚サンプルにおいて同定された細胞クラスターの UMAP プロット。各ドットは 1 個の細胞を表し、クラスターに応じて色分けされている。細胞タイプはラベルで示した。(b) 健常対照、CLE 病変部、CLE 非病変部皮膚サンプルにおける GO 生物学的プロセス「Type I IFN Production」に関する ssGSEA エンリッチメントスコアの UMAP プロット。カラースケールは相対的なエンリッチメントスコアを示す。P 値は bonferroni 法で補正した。

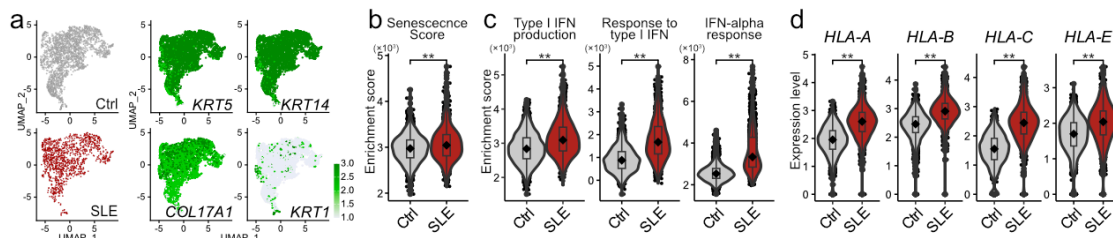


図 10. SLE 患者皮膚の表皮基底細胞における I 型 IFN シグナル関連遺伝子セットおよび古典的 HLA-I の発現

(a) 健常対照 (Ctrl) および SLE 患者由来の表皮基底細胞 (SLE) の UMAP プロットと、*KRT5*、*KRT14*、*COL17A1*、*KRT1* の feature プロット。(b) 老化関連遺伝子セット、(c) I 型 IFN シグナル関連遺伝子セット、(d) *HLA-A*、*-B*、*-C*、*-E* の発現を示すバイオリンプロット。定量データはバイオリンプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした ($*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ および $***P < 0.001$)。

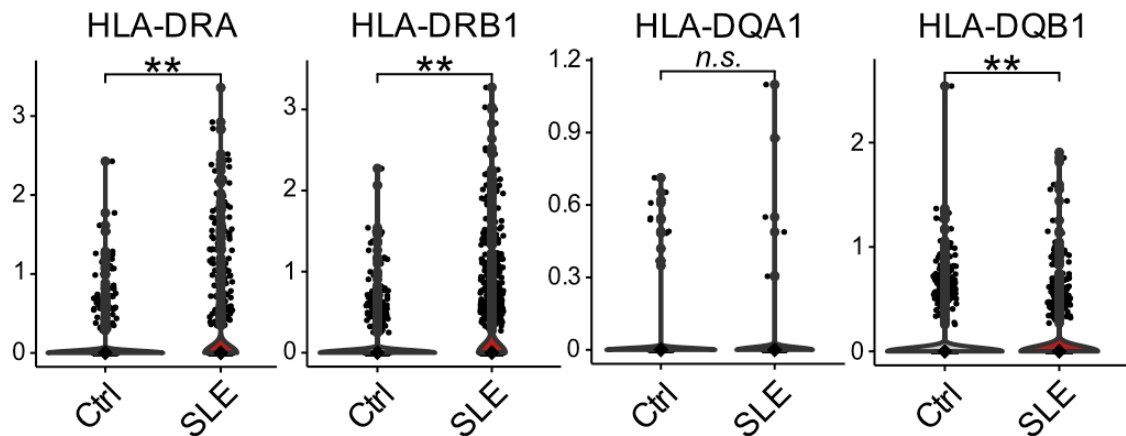


図 11. SLE 患者皮膚の表皮基底細胞における古典的 HLA-II の発現

健常対照 (Ctrl) および SLE 患者由来の表皮基底細胞 (SLE) における *HLA-DRA*、*-DRB1*、*-DQA1*、*-DQB1* の発現を示すバイオリンプロット。定量データはバイオリンプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした ($*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ および $***P < 0.001$)。

2-3-7. SLE 患者皮膚由来老化表皮基底細胞での HLA-I 発現の検証

次に、SLE 患者由来の表皮基底細胞を UMAP によって、クラスター化し、*CDKN1A*-low *COL17A1*-high 非老化表皮基底細胞 (NSEN) および *CDKN1A*-high *COL17A1*-low 老化表皮基底細胞 (SEN) の 2 つのクラスターを同定した (図 12a および b)。SEN クラスターは NSEN クラスターと比較して、細胞老化関連遺伝子のエンリッチメントスコアが高く (図 12c)、古典的 HLA-I 分子 (*HLA-B* および *HLA-C*) および MHC class I (MHC-I) antigen-processing and presentation machinery (APM) 分子 ($\beta 2$ microglobulin [B2M]) の発現が低下していた (図 12d)。対照的に、非古典的 HLA-I 分子である *HLA-E* は SEN クラスターでより高かった (図 12d)。HLA-II 分子である *HLA-DRA* および *HLA-DQA1* の発現は NSEN クラスターと比較して SEN クラスターで上昇していた (図 13)。

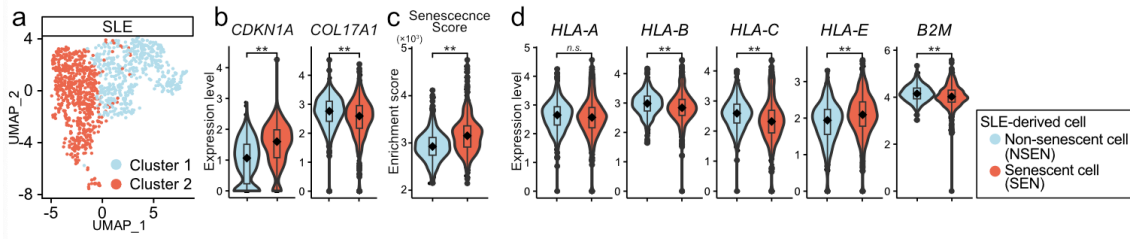


図 12. SLE 患者由来の老化表皮基底細胞における古典的 HLA-I の発現

(a) SLE 患者皮膚由来の表皮基底細胞の UMAP プロット。(b) *CDKN1A* および *COL17A1* の発現、(c) 老化関連遺伝子セット (d) *HLA-A*、*-B*、*-C*、*-E*、*B2M* の発現を非老化クラスター (NSEN) および老化クラスター (SEN) で示したバイオリンプロット。定量データはバイオリンプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$)。

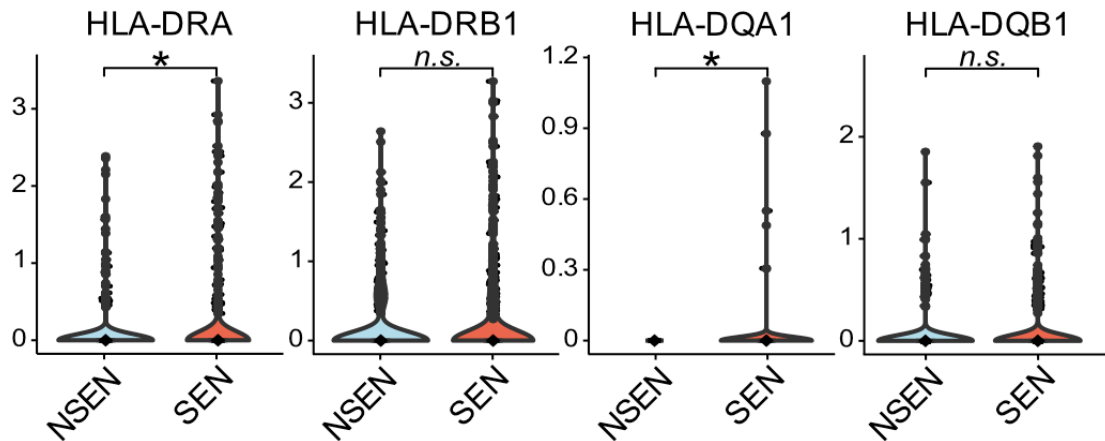


図 13. SLE 患者由来の老化表皮基底細胞における古典的 HLA-II の発現

SLE 患者由来の非老化クラスター (NSEN) と老化クラスター (SEN) における *HLA-DRA*、*-DRB1*、*-DQA1*、*-DQB1* の発現を示すバイオリンプロット。定量データはバイオリンプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$)。

2-3-8. SLE 患者皮膚由来老化表皮基底細胞での I 型 IFN 関連遺伝子および EGFR シグナル関連遺伝子発現の検証

次に、EGF シグナル伝達は IFN によって増加する HLA-I 発現を抑制することが知られているため⁴⁶、I 型 IFN 産生、I 型 IFN 応答および EGFR シグナル伝達について ssGSEA³⁵を実施した。結果、SEN クラスターは、NSEN クラスターと比較して、I 型 IFN 産生のエンリッチメントスコアが高いが、I 型 IFN 応答は低

く、EGFR シグナル伝達が高くなった（図 14a および b）。EGFR は SEN クラスターで優勢で、IFN α/β 受容体（IFNAR）と I 型 IFN 応答は NSEN クラスターで優勢だった（図 14c および d）。

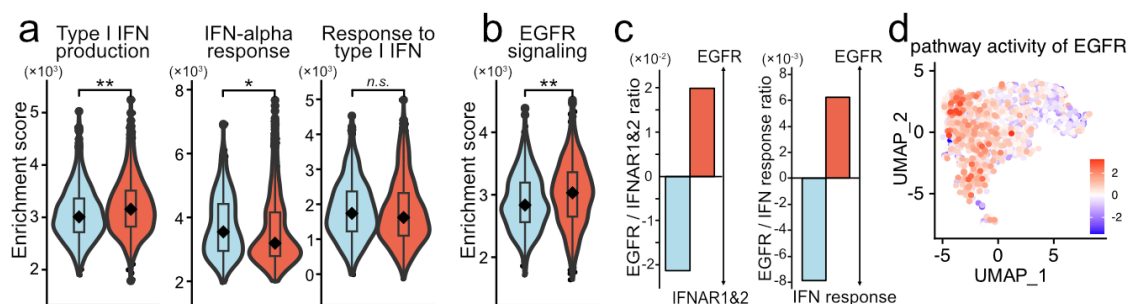


図 14. SLE 患者由来の老化表皮基底細胞における I 型 IFN シグナル関連遺伝子および EGFR シグナル関連遺伝子の発現

(a) I 型 IFN シグナル関連遺伝子セット、(b) EGFR シグナル関連遺伝子セットのバイオリンプロットおよび (c) EGFR と IFN 応答の比。(d) EGFR 経路活性の feature プロット。定量データはバイオリンプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした ($*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ および $***P < 0.001$)。

2-3-9. SLE 患者皮膚由来非老化表皮基底細胞における HLA-I 発現の検証

NSEN クラスターを IFN 応答レベルに基づいてさらに分類すると、IFN 応答-high クラスターでは *HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*、*HLA-E* および *B2M* の発現が上昇していることが明らかになった（図 15a および b）。さらに、IFN 応答-high クラスターは、MHC-I を介した抗原処理および提示、免疫システムプロセスのエンリッチメントスコアが高かったが、MHC-II を介した抗原提示には違いがなかった（図 15c-e）。

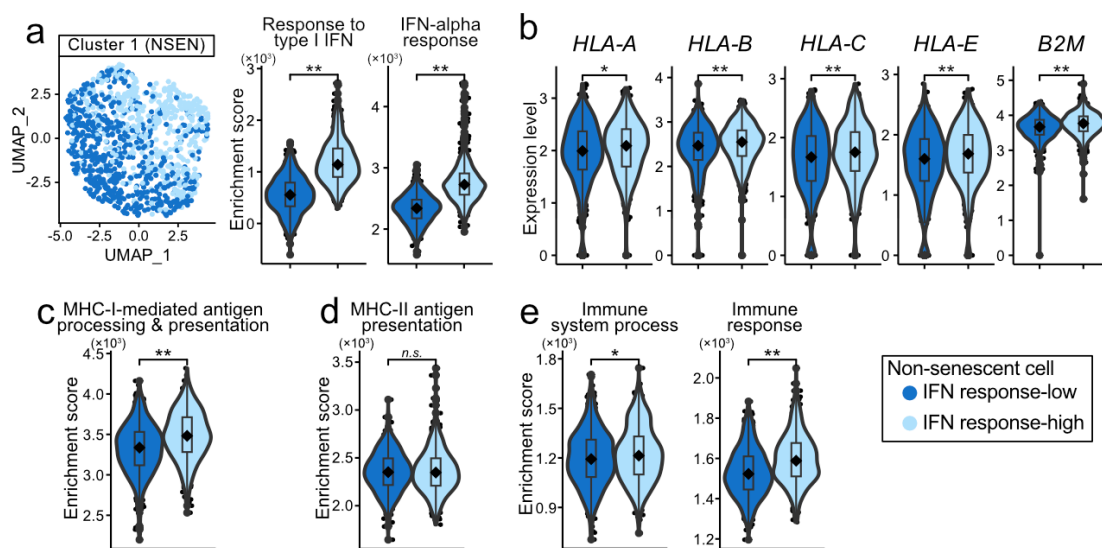


図 15. SLE 患者由来の非老化表皮基底細胞 (IFN 応答-high および IFN 応答-low) における I 型 IFN シグナル関連遺伝子および EGFR シグナル関連遺伝子の発現

(a) SLE 患者皮膚由来の非老化表皮基底細胞 (NSEN) の UMAP プロットと I 型 IFN 応答関連遺伝子セットおよび (b) *HLA-A*、*-B*、*-C*、*-E*、*B2M* の発現を示すバイオリンプロット、(c) MHC-I を介した抗原提示、(d) MHC-II を介した抗原提示、(e) 免疫系プロセス/応答のバイオリンプロット。定量データはバイオリンプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした ($*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ および $***P < 0.001$)。

2-3-10. 老化表皮基底細胞と CD8+T 細胞の細胞間コミュニケーション解析

CD8+T 細胞と SEN および NSEN クラスターとの細胞間コミュニケーションを検証するため、NicheNet⁴⁷ 解析を行った。図 16 は、CD8+T 細胞と NSEN クラスターまたは SEN クラスターとの間で同定されたリガンド受容体ペアを示すが、NSEN クラスターと CD8+ T 細胞の間に同定されたリガンド受容体ペアの数は、双方向で同数であった。一方、SEN クラスターと CD8+ T 細胞との相互作用は、SEN クラスターのリガンドと CD8+T 細胞の受容体のペアが多かった。これは、老化細胞が CD8+T 細胞に及ぼす影響が強いことを示唆している (図 16)。これらの結果は、CLE 患者の皮膚において、HLA-I および APM が上昇した非老化表皮基底細胞が CD8+T 細胞の標的となる可能性がある一方、老化表皮基底細胞は腫瘍細胞で報告されているのと同様に免疫回避する性質を持っている可能性を示唆している⁴⁸。

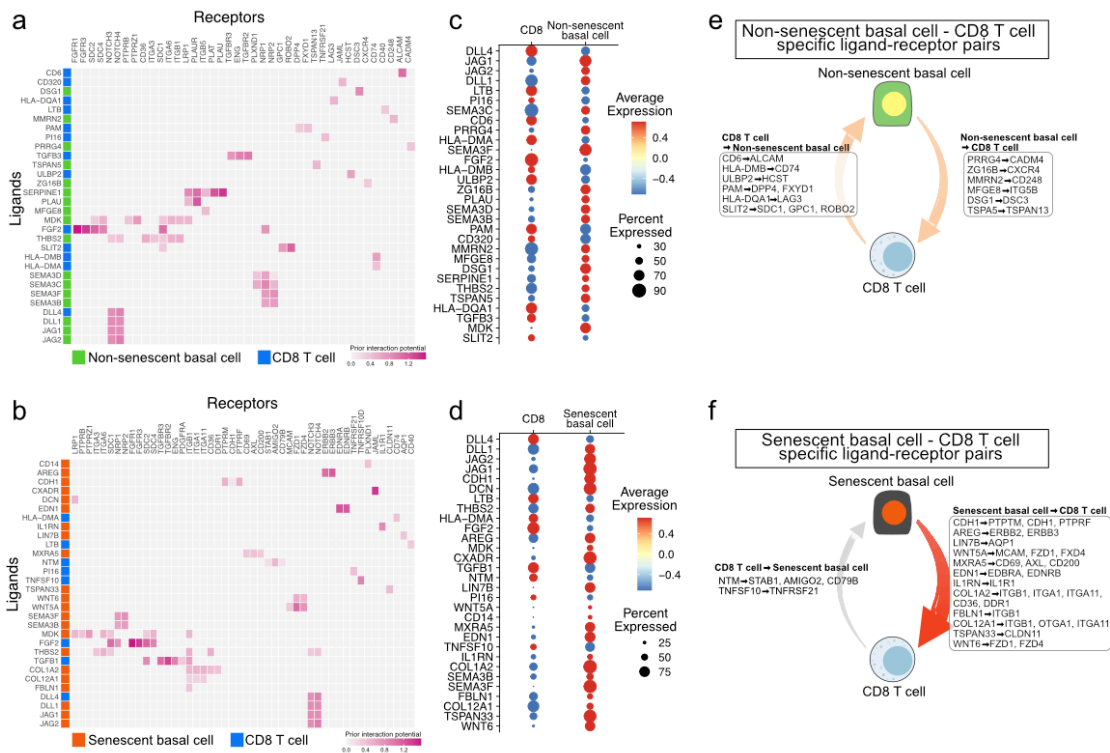


図 16. CD8+T 細胞と非老化または老化表皮基底細胞間のリガンド-レセプター相互作用に関する NicheNet 解析

(a-b) 非老化または老化表皮基底細胞と CD8+T 細胞との相互作用を媒介するリガンドおよびレセプターの上位を示すヒートマップ。(c-d) リガンド-レセプター相互作用を示すドットプロット。ドットの色はリガンド発現細胞におけるリガンドの平均発現量を、ドットの大きさはそのリガンドを発現する細胞の割合を示す。(e-f) 非老化または老化表皮基底細胞と CD8+T 細胞間のシグナル伝達に参与するリガンド-レセプターペアの模式図。矢印はシグナル伝達の推定方向を示す。

2-4. 考察

老化表皮基底細胞は非老化表皮基底細胞と比較して、HLA-I の発現が低下していた。老化表皮基底細胞で、HLA-I の発現が低下した要因として、細胞間コミュニケーション解析の結果から、EGF のオートクライン効果によるものであると推測した。先行研究では、がん細胞において、IFN- γ および EGFR 阻害剤または MEK 阻害剤を添加すると、HLA 分子の発現が上昇することが実証されている⁴⁸。これらより、EGF 経路は IFN 刺激による HLA-I の発現を抑制すると推測できる。scRNA-seq データは、老化表皮基底細胞が I 型 IFN の産生を増加させたものの、I 型 IFN 応答は低く、EGFR シグナルとの比を検証すると、老化表皮基底細胞では、EGFR シグナルが優位であった。一方、非老化表皮基底細胞は、I 型 IFN 応

答が優位で、I 型 IFN 応答のレベルで、高低の 2 群に分けたところ、I 型 IFN 応答が高い非老化表皮基底細胞は、より免疫応答や MHC-I を介した抗原処理および提示の遺伝子セットが高かった。

本章ではいくつかの研究限界がある。HLA-E の発現は SEN クラスターでよりエンリッチしていた。老化真皮線維芽細胞は非古典的 MHC 分子 HLA-E を発現することが知られている。これは NK 細胞および late-differentiated CD8+ T 細胞上の抑制様レセプター natural killer cell receptor group 2A と相互作用し、老化細胞に対する免疫応答を抑制する⁴⁹。HLA-E のレベルは SEN クラスターで上昇していた。そのため、HLA-E の発現増加により CD8+ T 細胞または NK 細胞の細胞傷害性が抑制される可能性がある。NKT 細胞は conserved MHC class I-like molecule CD1d 依存性で、従来の T 細胞とは異なり、細胞表面に CD1d 分子を認識するインバリエント T cell receptor α chain (TCR- α)が存在するため、インバリエント NKT 細胞または I 型 NKT 細胞と呼ばれている⁵⁰。NKT 細胞には CD1d 非依存性 NKT 細胞のサブタイプがあるが、SLE 患者の病態には CD1d 依存性インバリエント NKT 細胞の関与が示唆されている⁵⁰。本研究の scRNA-seq 解析では、SEN クラスターでも NSEN クラスターでも CD1d 遺伝子発現は確認されなかったが、NKT 細胞と老化細胞の関係は検証されていない。

2-5. 結論

本章では、SLE 患者由来の老化表皮基底細胞で HLA-I の発現が低下していることが明らかになった。老化表皮基底細胞は EGFR シグナルの発現が優位なのに対して、非老化表皮基底細胞は IFN 応答が優位であることが示された。さらに、CD8+T 細胞との相互作用解析で非老化表皮基底細胞は CD8+T 細胞の標的になる可能性がある一方で、老化表皮基底細胞は免疫回避している可能性が示された。

第 3 章 SASP 因子が与える HLA-I 発現および免疫回避への影響の検証

3-1. 緒言

老化細胞が分泌する SASP 因子は、オートクライン効果およびパラクライン効果を通じて、自身や周囲の細胞の機能に多様な影響を与える²⁴。オートクライン効果では、SASP 因子が自らの老化状態を強化する一方で、パラクライン効果では、周囲の正常細胞に老化関連形質を誘導し、炎症性サイトカインの発現を亢進する⁵¹。このように、SASP は組織の微小環境を大きく変化させ、慢性炎症などの病態形成に寄与する。また、前章で非老化表皮細胞にて発現上昇を認めた古典的 HLA-I 分子には抗原ペプチドが提示され、CD8+T 細胞は TCR を通して認識・

結合する。活性化された CD8+T 細胞は、細胞傷害性を示し、パーフォリンやグランザイム B などの細胞傷害性顆粒を放出することで、標的細胞にカスパーゼ依存性アポトーシスを誘導する⁵²。そのため、本章では *in vitro* において表皮細胞に細胞老化を誘導し、老化表皮細胞の特徴を明らかにすると同時に、非老化細胞との老化細胞、さらに CD8+T 細胞とのインタラクションを検証した。

3-2. 対象と方法

3-2-1. 細胞培養および細胞老化誘導

ヒト不死化 KC である HaCaT 細胞は、札幌医科大学細胞バンク（札幌医科大学、札幌、日本）から入手した。HaCaT 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) および 1% penicillin streptomycin (PS) 含有 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)-high glucose 培地で継代培養した。細胞老化は ultraviolet B (UVB) を照射して誘導した。6well 透明プレートにそれぞれ 1well あたり 450,000 細胞播種し、3 日後のコンフルエント HaCaT 細胞に UV 照射器 (UVP Crosslinker CL-3000M; Analyticjena, Jena, Germany) を用いて 50mJ の UVB 照射を行い、2 日後に回収したものを解析に使用した。コントロール細胞は播種後 3 日後コンフルエントになった時点で回収したものを使用した。

3-2-2. 初代ヒト表皮 KC (Normal human epidermal keratinocytes [NHEK]) の培養および細胞老化誘導

NHEK (HT-5224-K) は、健常な 1 歳男性ドナー由来の細胞を Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) 細胞バンクより入手した。細胞は、KGM-Gold BulletKit (LONZA, Basel, Switzerland) を用いて継代培養した。細胞老化は UVB を照射して誘導した。96well 黒色プレートにそれぞれ 1well あたり、26,250 細胞播種し、1 日後のコンフルエント NHEK に UV 照射器 (UVP Crosslinker CL-3000M; Analytikjena) を用いて 50 mJ の UVB 照射を行い、2 日後に回収したものを解析に使用した。コントロール細胞は播種後 1 日後コンフルエントになった時点で回収したものを使用した。

3-2-3. SPiDER-β Galactosidase (SPiDER-β Gal) 染色

HaCaT 細胞を 4% paraformaldehyde (PFA) により室温で 5 分間固定し、phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後、SPiDER-β Gal 染色液 (1:50 in McIlvaine Buffer Solution, pH 6.0, Dojindo, 熊本、日本) を用いて 37℃で 30 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で洗浄し、再び室温で 4% PFA により 10 分間固定し、phosphate buffered saline with tween 20 (PBS-T) で洗浄した。細胞核は DAPI

(1:1000; Dojindo) で染色した。画像は蛍光顕微鏡 (Axio Observer 7; ZEISS, Jena, Germany) を用いて撮影した。蛍光画像の定量解析は ZEN Zeiss 解析ソフトウェアを用いて行い、SPiDER- β Gal 陽性細胞の割合は、SPiDER- β Gal 陽性細胞数を DAPI 陽性細胞数で割ることで算出した。蛍光強度はランダムに選択した細胞にて測定した。

3-2-4. SASP conditioned media (CM) 回収

HaCaT 細胞を前述の方法に従い UVB 照射した後、洗浄し、0.2% FBS および 1% PS 含有 DMEM 培地で 48 時間培養した。さらに、PBS で 2 回洗浄した後、1% PS 含有 phenol red-free DMEM で 24 時間培養した培養上清を回収し、これを SASP CM とした。コントロールの培地 (Ctrl CM) は、同様の手順で UVB 照射を行わずに培養した HaCaT 細胞から採取した。

3-2-5. HLA-I 発現の免疫細胞化学染色

HaCaT 細胞 (25,000~50,000 細胞/well) を 8well チャンバースライド (μ -Slide 8 Well; ibidi, Gräfelting, Germany) に播種し、前述の方法に従って UVB 照射および CM 処理を行った。細胞は 4°C のメタノールで 5 分間固定し、22.52 mg/mL グリシンおよび 1% bovine serum albumin (BSA) を含む PBS-T で室温、30 分間ブロッキングした。PBS で洗浄後、rabbit anti-HLA class 1 ABC Abs (1:250; EPR22172, ab225636, Abcam, Cambridge, UK) を室温で 1 時間反応させた。続いて、PBS で 3 回 (各 5 分) 洗浄し、二次抗体として、goat anti-rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 647 (8 μ g/mL; #A32733, Thermo Fisher Scientific) を暗所・室温で 1 時間反応させた。Cellstain DAPI 溶液 (1:1000; Dojindo) で核染色を行った。画像は蛍光顕微鏡 (Axio Observer 7; ZEISS) を用いて撮影した。蛍光画像の定量解析は、ZEN Zeiss 解析ソフトウェアを用いて行い、蛍光強度はランダムに選択した細胞にて測定した。

3-2-6. Total RNA 抽出および定量的リアルタイム PCR

Total RNA の抽出は、TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) または SuperPrep® Cell Lysis for qPCR (TOYOBO, 大阪, 日本) を用いて行った。RNA は、iScript Advanced cDNA Synthesis Kit (#1725038, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) または 5 $\times$ RT Master Mix (TOYOBO) を使用して逆転写し、cDNA を合成した。定量的リアルタイム PCR は、SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) または THUNDERBIRD Next® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を用い、CFX Connect™ Real-Time PCR 解析システム (Bio-Rad Laboratories) で実施した。サイクリング条件は 95°C、30 秒、40

サイクルの増幅（95℃、15 秒または 5 秒、60℃、30 秒）で設定した。各遺伝子の発現量は、HaCaT 細胞では ACTB、HPRT1、TBP、NHEK では ACTB、HPRT1、TBP、GAPDH で補正し、データの比較には $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた。

使用したプライマー配列は以下表 2 に記載した。

表 2. 第 3 章で使用したプライマー配列

Gene	Forward 5' to 3'	Reverse 5' to 3'
<i>AREG</i>	GCACCTGGAAGCAGTAACAT GC	GGCAGCTATGGCTGCTAATG CA
<i>B2M</i>	CCACTGAAAAAGATGAGTAT GCCT	CCAATCCAAATGCGGCATCT TCA
<i>CASP3</i>	GGAAGCGAATCAATGGACT CTGG	GCATCGACATCTGTACCAGA CC
<i>CASP8</i>	AGAAGAGGGTCATCCTGGG AGA	TCAGGACTTCCTTCAAGGCT GC
<i>CASP9</i>	GTTTGAGGACCTTCGACCAG CT	CAACGTACCAGGAGCCACTC TT
<i>CDKN1A</i>	AGGTGGACCTGGAGACTCTC AG	TCCTCTTGGAGAAGATCAGC CG
<i>COL17A1</i>	GCTCTTGGCATTCTTAGTG TC	GATGTACTGCTGAATCTCCT GGC
<i>HBEGF</i>	TGTATCCACGGACCAGCTGC TA	TGCTCCTCCTTGTTTGGTGTG G
<i>HLA-A</i>	AGATACACCTGCCATGTGCA GC	GATCACAGCTCCAAGGAGA ACC
<i>HLA-B</i>	CTGCTGTGATGTGTAGGAGG AAG	GCTGTGAGAGACACATCAG AGC
<i>HLA-C</i>	GGAGACACAGAAGTACAAG CGC	ACATCCTCTGGAGGGTGTGA GA
<i>HLA-E</i>	CGGCTACTACAATCAGAGCG AG	AATCCTTGCCGTCGTAGGCG AA
<i>IFNA</i>	CAGTTCCAGAAGGCTCCAGC	TCCTCATCCCAAGCAGCAG
<i>IFNA10</i>	GTTCCAGAAGGCTCAAGCCA TC	TAGGAGGCTCTGTTCCCAAG CA
<i>IRF5</i>	TTCTCTCCTGGGCTGTCTCTG	CTATACAGCTAGGCCCCAGG G

<i>IRF7</i>	GCAGCGTGAGGGTGTGTCTT	GCTCCATAAGGAAGCACTCG AT
<i>ACTB</i>	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATA G
<i>GAPDH</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC
<i>HPRT1</i>	CATTATGCTGAGGATTTGGA AAGG	CTTGAGCACACAGAGGGCTA CA
<i>TBP</i>	TGTATCCACAGTGAATCTTG GTTG	GGTTCGTGGCTCTCTTATCCT C

3-2-7. HBEGF 中和抗体と HaCaT 細胞培養

HaCaT 細胞および UVB 照射により老化を誘導した UVB HaCaT 細胞を、2% FBS 含有 DMEM-high glucose 培地に HBEGF 中和抗体 (Anti-Human HB-EGF Affinity Purified Polyclonal Antibody; AF-259-SP, R&D Systems, MN, USA) を 0.05、0.1、0.2 µg/mL の濃度で添加し、48 時間培養した。

3-2-8. In-cell Western アッセイ

HaCaT 細胞 (8,750~17,500 細胞/well) を 96well 黒色プレートに播種し、前述の方法に従って UVB 照射および HBEGF 中和抗体 (Anti-Human HB-EGF Affinity Purified Polyclonal Antibody; R&D Systems) 0.2µg/mL による処理を行った。

細胞を 4%PFA で、室温、15 分間固定し、メタノールで、-20℃、10 分間処理した。その後、5% BSA 含有 tris buffered saline with tween 20 (TBS-T) 溶液で 1 時間ブロッキングを行った。次に、rabbit anti-STAT1 (1:1000; D1K9Y, #14994, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) または rabbit anti-pSTAT1 (Tyr701) Abs (1:1000; 58D6, #9167, Cell Signaling Technology) を用い、4℃で一晩反応させた。その後、TBS-T で洗浄し、IRDye® 800CW goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:600; LI-COR, Lincoln, NE, USA) および hFAB rhodamine anti-tubulin primary antibody (1:1000; Bio-Rad Laboratories) を用いて室温で 1 時間反応させた。蛍光画像は ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories) で取得し、Image Labsoft ware (Bio-Rad Laboratories) を用いて定量解析を行った。各タンパク質の発現量は、tubulin の発現量で補正した。

3-2-9. CM および I 型 IFN 中和抗体存在下での細胞培養

HaCaT 細胞を 24well 透明プレートに 100,000 細胞/well の密度で播種し、3 日培養した。その後、2% FBS 含有 Ctrl CM または SASP CM (0µg/mL) および 2% FBS 含有 Ctrl CM または SASP CM に、IFN-α 中和抗体 (Human IFN-alpha Antibody;

MMHA-2、21100-1、R&D Systems) または IFN- β 中和抗体 (Human IFN-beta Antibody; # 76703、MAB814-100、R&D Systems) を添加し、48 時間 (IFN- α : 5 or 10 μ g/mL; IFN- β : 7.5 or 15 μ g/mL) 培養した。

3-2-10. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) からの CD8+T 細胞の分離

PBMCs (CC-2704、22TL227189; LONZA) を CTS™ AIM V™ SFM (Thermo Fisher Scientific) に 5% CTS™ Immune Cell SR (Thermo Fisher Scientific) を添加した培地中で、1,000,000 細胞/mL の濃度で播種した。PBMC は、Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific) を PBMC と等量添加し、さらに 30 U/mL のリコンビナントヒト IL-2 (Peprotech、NJ、USA) を加えて T 細胞を増殖させた。5 日間、T 細胞増殖させた後、MojoSort Human CD8 T-Cell Isolation Kit (BioLegend、CA、USA) を用い、プロトコルに従って CD8+T 細胞を分離した。

3-2-11. HaCaT 細胞と CD8+T 細胞の共培養および Caspase 3/7 の蛍光強度

PKH26 (Sigma-Aldrich、MO、USA) で染色した HaCaT 細胞を、老化 HaCaT 細胞と共に、2% FBS 含有 phenol red-free DMEM または 2% FBS 含有 SASP CM で培養した。HaCaT 細胞を 2 日培養後、CellEvent™ Caspase-3/7 Detection Reagent および 100,000 個の CD8+T 細胞を添加した。共培養 5 時間後に、蛍光プレートリーダー (Infinite® 200 PRO; TECAN) を用いて Caspase 3/7 の蛍光強度を測定した。その後、PBS で洗浄し、4%PFA で、室温、15 分間固定し、DAPI 溶液 (1:1000; Dojindo) で細胞核を染色した。蛍光画像は、蛍光顕微鏡 (Axio Observer 7; ZEISS) を用いて取得した。蛍光強度は、CD8+T 細胞非共培養群にて、正規化した。

3-2-12. 統計処理

定量データは R プログラミング言語を用いて可視化し、箱ヒゲ図で示した。また、各サンプルの定量値をドットプロットで示した。2 群間の比較に t 検定を用い、3 群以上の差の評価には one-way ANOVA を実施した。One-way ANOVA で統計的有意性が示された場合のみ、多重比較が行われた。多重比較の P 値は tukey 法で補正した。統計解析は R のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR を用いて行った⁴³。

3-3. 結果

3-3-1. 老化細胞の HLA 発現に関する *in vitro* 検証

SASP の微小環境への影響はオートクラインおよびパラクライン機構によって媒介されるため、SASP 因子が老化細胞と非老化細胞における HLA-I 発現の差

に寄与しているのではないかと推測した。そこで、ヒト不死化 KC である HaCaT に UVB を照射し、細胞老化を表皮細胞に誘導した。CLE および SLE の発症と進行のリスク因子である UVB 曝露は⁶、DNA 損傷を介して細胞老化を誘発することが知られている²⁴。UVB HaCaT 細胞では、老化細胞のマーカーである SPiDER-β Gal 陽性細胞の増加を認めた (図 17a および b)²⁴。UVB HaCaT 細胞では、scRNA-seq 解析によって同定した老化表皮基底細胞と同様に、*CDKN1A* の発現上昇と *COL17A1* の発現低下を示した (図 17c)。また、UVB HaCaT 細胞は EGF シグナルリガンドである *HBEGF* および *AREG* の発現増加 (図 17d) と自然免疫応答および SLE 病態に関与する interferon regulatory transcription factor ファミリーのメンバーである *IRF5*、*IRF7* および *IFNA*、*IFNA10* の発現が増加した (図 17e および f)⁵³。

さらに、表皮細胞および UVB 照射老化表皮細胞に対する SASP CM の培養実験 (図 18a) から、UVB HaCaT 細胞では HLA-I 発現レベルが有意に低下したのに対し、SASP CM で処理した非老化 HaCaT 細胞では有意に高い発現レベル (図 18b および c) を示した。遺伝子発現解析により、UVB HaCaT 細胞では HLA-I (*HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*、*HLA-E* : 図 19) および *B2M* (図 20) の発現低下が確認された。

同様に、NHEK への UVB 照射は *CDKN1A* および *HBEGF* の発現を増加させたが、HaCaT 細胞および SLE 患者の scRNA-seq データとは異なり、HLA-I 発現 (*HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*、*HLA-E*) は有意に増加した (図 21)。次に、表皮細胞の HLA 発現と免疫原性の SASP を介したメカニズムを探るため、本研究で老化表皮細胞由来の SASP 因子として特定された *HBEGF* と I 型 IFN に対する中和抗体の効果を試験した。*HBEGF* 中和抗体は UVB 照射によって低下した HLA-I 発現を回復させ (図 19)、I 型 IFN 中和抗体は SASP によって増加した HLA-I 発現を抑制した (図 22)。このことから、*HBEGF* は老化表皮細胞でオートクライン的に HLA-I レベルを低下させるのに対し、I 型 IFN は非老化表皮細胞でパラクリン的に HLA-I 発現を増強することが実証された (図 19 および 22)。この結果は scRNA-seq 解析によって裏付けられ、老化表皮基底細胞クラスターでは EGFR が優勢なシグナル伝達経路であることが明らかになった。対照的に、非老化表皮基底細胞クラスターでは IFNAR と I 型 IFN 応答シグナル伝達経路が優勢であった (図 14c)。

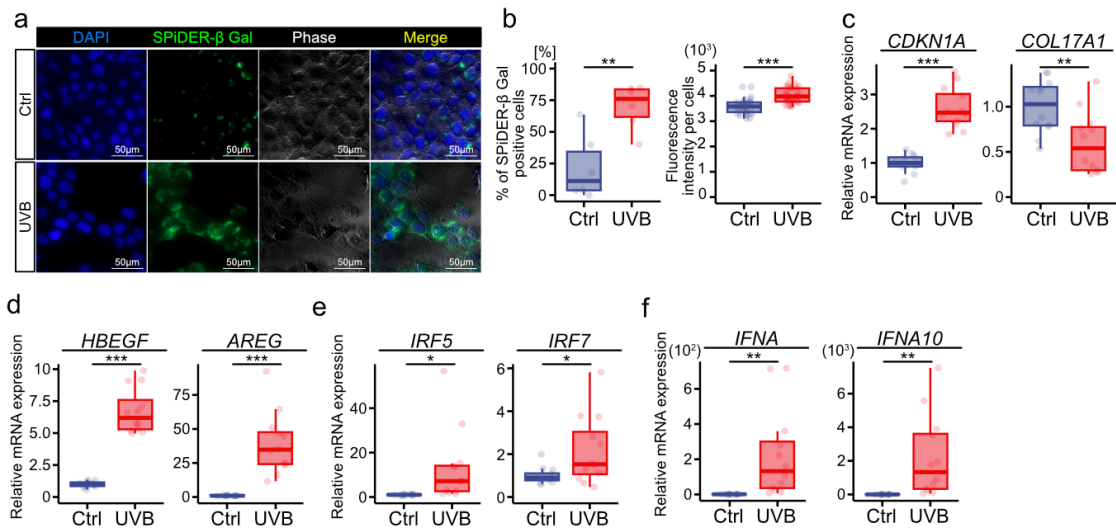


図 17. UVB 照射による HaCaT 細胞の細胞老化誘導

(a) HaCaT 細胞 (Ctrl) および UVB 照射により老化を誘導した HaCaT 細胞 (UVB) における SPiDER-β Gal 染色の代表画像。(b) SPiDER-β Gal 陽性細胞の割合 (各 $n = 6$) および SPiDER-β Gal 蛍光強度 (各 $n = 6$ 細胞 $\times$ 5 視野) の定量解析。

(c) Ctrl および UVB HaCaT 細胞における *CDKN1A* および *COL17A1* の遺伝子発現量 (各 $n = 12$)。 (d) Ctrl および UVB HaCaT 細胞における *HBEGF* および *AREG* の遺伝子発現量 (各 $n = 12$)。 (e) Ctrl および UVB HaCaT 細胞における *IRF5* および *IRF7* の遺伝子発現量 (各 $n = 12$)。 (f) Ctrl および UVB HaCaT 細胞における *IFNA* および *IFNA10* の遺伝子発現量 (各 $n = 12$)。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用いた。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および *** $P < 0.001$)。

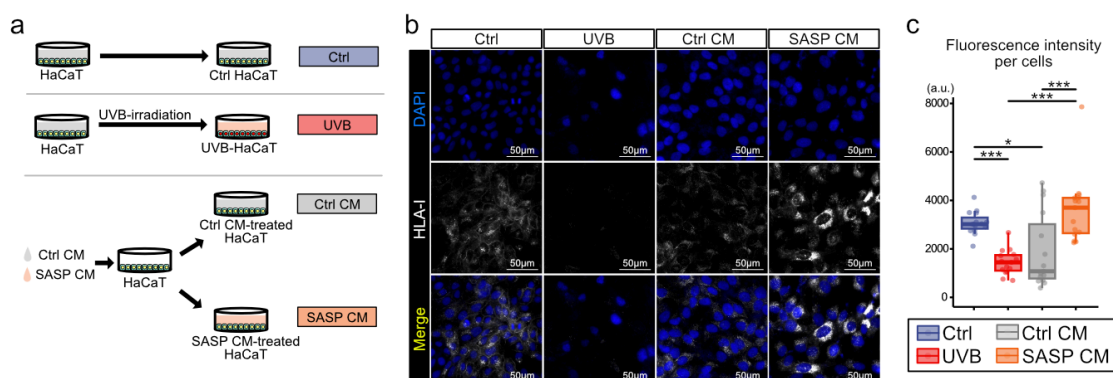


図 18. 老化 HaCaT 細胞および CM 添加 HaCaT 細胞における HLA-I 発現

(a) 老化誘導および CM 処理の手順を示す模式図。(b) HLA-I の免疫細胞化学染色の代表画像および (c) 蛍光強度 (各 $n = 3$ 細胞 $\times$ 5 視野)。

定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。4 群間の比較には one-way ANOVA を使用し、多重比較の P 値は tukey 法で補正した。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および *** $P < 0.001$)。

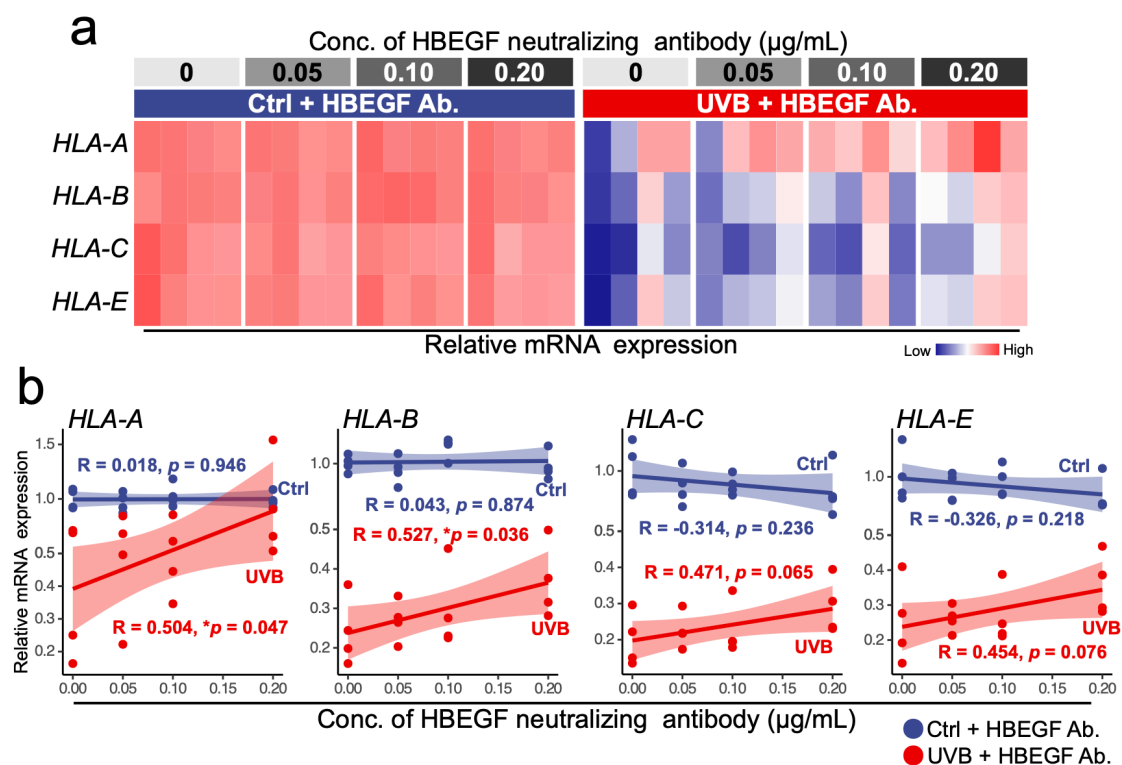


図 19. 老化 HaCaT 細胞における HLA-I 発現

(a) HBEGF 中和抗体を添加した HaCaT 細胞および UVB HaCaT 細胞における HLA-A、-B、-C、-E の遺伝子発現ヒートマップおよび (b) 抗体濃度との相関 (各 $n = 4$)。Ab, antibody; mRNA, messenger RNA.

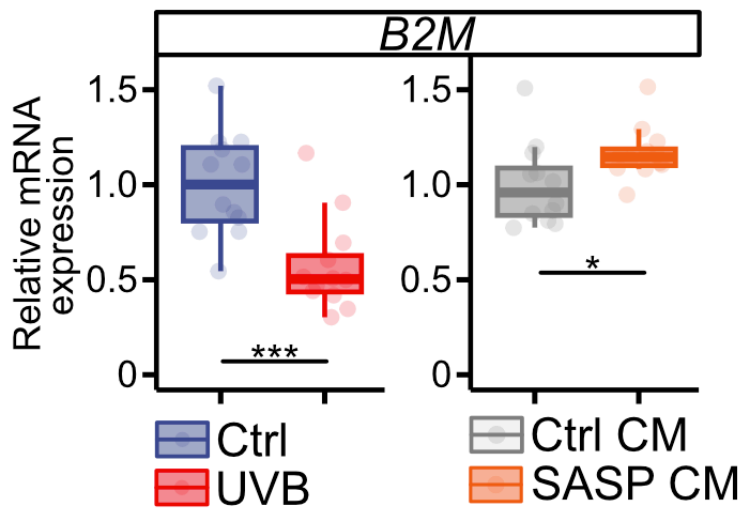


図 20. HaCaT 細胞 (Ctrl)、UVB HaCaT 細胞 (UVB)、および Ctrl CM または SASP CM を添加した HaCaT 細胞における B2M 遺伝子の発現量 (各 $n = 12$)

定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用いた。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした ($*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ および $***P < 0.001$)。

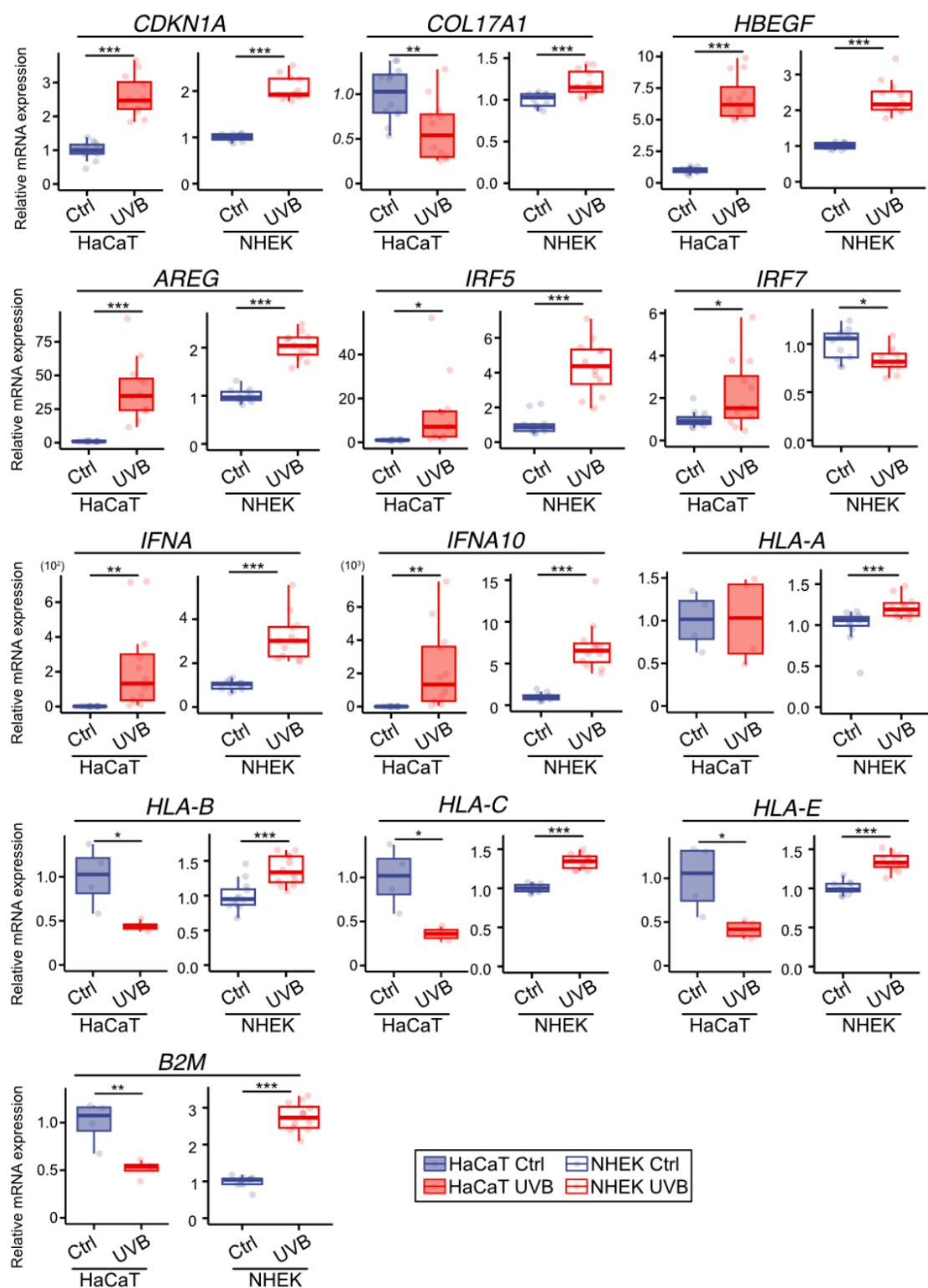


図 21. UVB を照射した HaCaT 細胞および NHEK の遺伝子発現レベル

定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用いた。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$)。

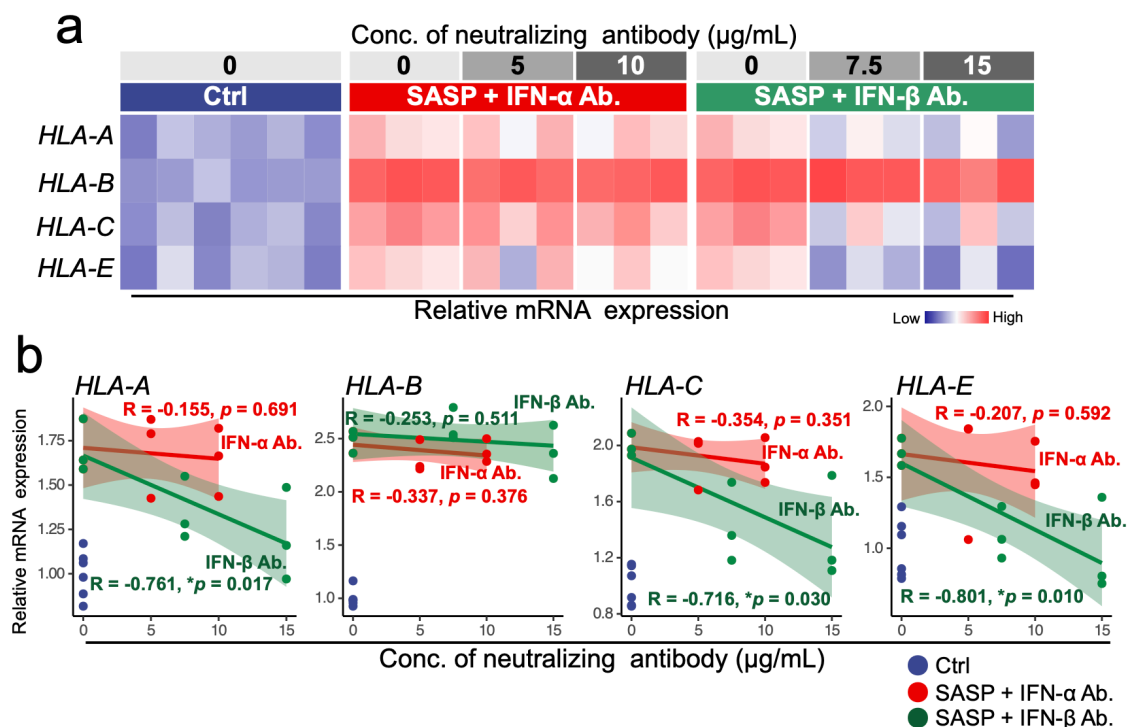


図 22. SASP CM 処理 HaCaT 細胞における HLA-I 発現

(a) IFN-α および IFN-β 中和抗体を添加した Ctrl CM および SASP CM 処理細胞における HLA-A、-B、-C、-E の遺伝子発現ヒートマップおよび (b) 抗体濃度との相関 (Ctrl CM: $n = 6$ 、SASP CM: $n = 3$)。Ab, antibody; mRNA, messenger RNA.

3-3-2. HBEGF 阻害が HLA 発現を回復させるメカニズムの検証

HBEGF 阻害が HLA 発現を回復させるメカニズムがオートクライン I 型 IFN シグナル伝達に作用することで起こるのか、IFN シグナルとは独立したメカニズムによるものかを検討するため、I 型 IFN 経路の下流シグナルである signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) シグナル伝達について、検証した⁵⁴。In cell western アッセイでは、HBEGF 中和抗体はコントロールおよび UVB HaCaT 細胞のいずれにおいても STAT1 および pSTAT1 の発現を阻害しないことが示された。これらの結果は、HBEGF の阻害がオートクライン I 型 IFN の効果とは独立して HLA 発現を回復させることを示唆している (図 23)。

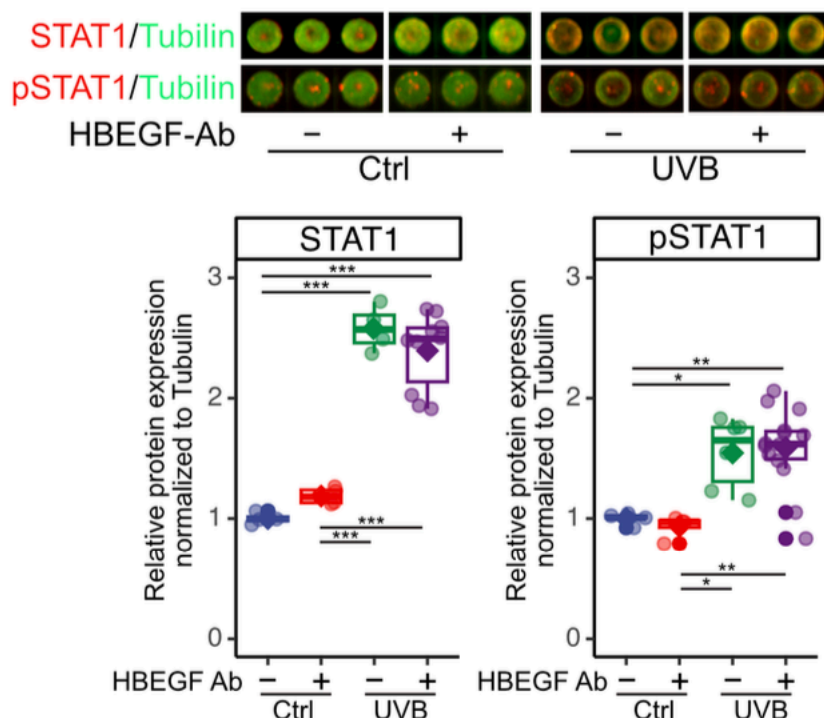


図 23. HBEGF 抗体の有無による老化 HaCaT 細胞の In-cell Western アッセイ
 HaCaT 細胞 (Ctrl) および UVB 照射により老化を誘導した HaCaT 細胞 (UVB) に対して、HBEGF 中和抗体の有無で実施した In-cell Western アッセイの代表画像。細胞は STAT1、pSTAT1、tubulin で染色し、tubulin 発現量で正規化した相対的タンパク質発現量を定量した。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。4 群間の比較には one-way ANOVA を使用し、多重比較の P 値は tukey 法で補正した。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$)。

3-3-3. CD8+ T 細胞と老化 HaCaT 細胞の相互作用の検証

次に、老化細胞が CD8+ T 細胞を介した正常細胞の細胞死誘導に関与するかを明らかにするために CD8+T 細胞との共培養実験を行った。共培養実験では、UVB HaCaT 細胞または CD8+T 細胞どちらかのみと共培養した場合、HaCaT 細胞の生存率に影響を与えないことが分かった。つまり、SASP が直接的に正常 HaCaT 細胞の細胞死誘導をしないこと、また SASP の影響を受けていない CD8+ T 細胞は HaCaT 細胞の細胞死誘導をしないことがわかった。しかし、老化 HaCaT 細胞を CD8+T 細胞と共培養したり、SASP 因子に曝露させたりした場合、活性化カスパーゼ 3/7 の発現が増加した (図 24)。つまり、SASP または老化細胞との接触は CD8+ T 細胞による正常 HaCaT 細胞の細胞死誘導を促進することが明らかになった。また、CD8+T 細胞のアポトーシス関連遺伝子 *CASP3*、*CASP8*、

CASP9 の発現レベルに変化がなかったことから、UVB HaCaT 細胞との共培養も SASP 因子への曝露も CD8+ T 細胞の生存に影響を与えないことが確認できた (図 25)。

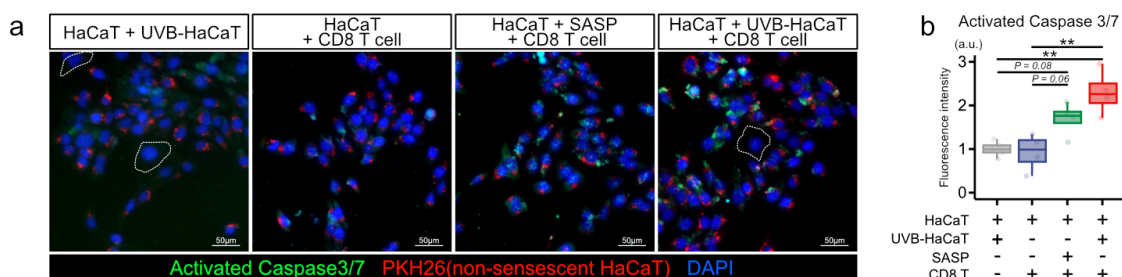


図 24. CD8+T 細胞との共培養実験

(a) 活性化カスパーゼ 3/7 および PKH26 染色の代表画像。点線は UVB HaCaT 細胞を示す。(b) CD8+T 細胞の有無における UVB HaCaT 細胞または SASP 処理 HaCaT 細胞の活性化カスパーゼ 3/7 蛍光強度 ($n = 4-5$)。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。4 群間の比較には one-way ANOVA を使用し、多重比較の P 値は tukey 法で補正した。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした ($*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ および $***P < 0.001$)。

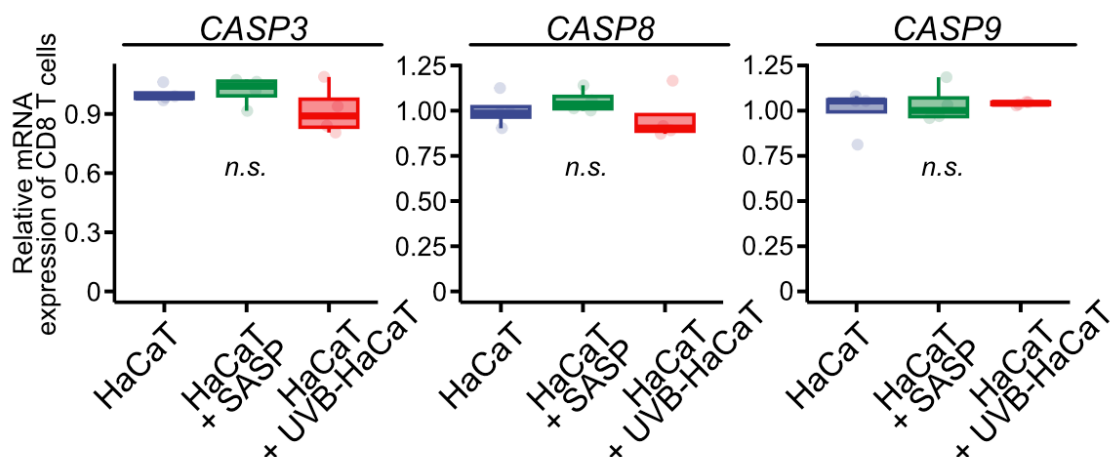


図 25. HaCaT 細胞、SASP + HaCaT 細胞、UVB HaCaT + HaCaT 細胞と共培養した CD8+T 細胞における CASP3、CASP8、CASP9 の発現量 (各 $n = 4$)。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。3 群間の比較には one-way ANOVA を使用し、多重比較の P 値は tukey 法で補正した。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした ($*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ および $***P < 0.001$)。

3-4. 考察

前章での、scRNA-seq 解析では老化表皮基底細胞は HLA-I の発現を低下させた。さらに、この老化表皮基底細胞の HLA-I の発現低下は、細胞間コミュニケーション解析の結果から、EGF のオートクライン効果によるものと推測された。これは、HBEGF 抗体を添加した際に老化表皮細胞における古典的 HLA-I の発現が増加するという本章の *in vitro* 実験によって裏付けられた。さらに、CD8+T 細胞との共培養実験で、老化表皮細胞と共存する非老化表皮細胞や SASP に暴露された非老化表皮細胞は活性化カスパーゼ 3/7 の発現を高めた。これらの結果は、老化表皮細胞が免疫を回避できる一方で、正常表皮細胞による抗原提示を促進することを示唆している。CLE の病変では、CD8+細胞傷害性 T 細胞の浸潤とグランザイム B およびパーフォリンの発現が観察されており⁵⁵、これらの細胞が真皮表皮境界部の KC のアポトーシスに関与することが示唆される。このことから、HLA-I を介した抗原提示を受けた表皮細胞が CD8+T 細胞により標的化され、アポトーシスを誘導されるという機構が、CLE 病態形成の一端を担っていると考えられる。

また、本章では、HaCaT 細胞と NHEK の UVB 照射に対する反応が異なることが分かった。老化 HaCaT 細胞では、UVB 照射によって、HBEGF、AREG および I 型 IFN 関連遺伝子の発現が上昇し、老化 NHEK でも同様であった。しかし、HLA-I の発現は老化 NHEK で有意に増加したのに対し、HaCaT 細胞では増加しなかった。HaCaT 細胞はヒト KC の代替モデルとして用いられてきたが、HaCaT 細胞と NHEK の間には生物学的な違いが報告されている⁵⁶。UVB 照射 8 時間後、NHEK では p21 および p16 タンパク質の発現が認められたのに対し、HaCaT 細胞では p16 タンパク質の発現は検出されなかった⁵⁷。HaCaT 細胞における細胞老化マーカーの増加は比較的緩やかで、UVB 照射後 1~5 日で p16、p21、senescence-associated β -galactosidase の発現が増加する^{58,59}。HaCaT 細胞と NHEK との間で UVB の反応にこのような違いが生じる理由は不明であるが、細胞老化マーカーが異なる時点で現れ、SASP 状態を変化させることが分かっている²²。刺激に対する老化反応の違いは、SLE 病態の理解に役立つ可能性がある。

3-5. 結論

本章では、*in vitro* 老化表皮細胞において、HLA-I の発現が低下することが明らかになった。同時に、老化表皮細胞の SASP は非老化表皮細胞の HLA-I の発現を上昇させることがわかった。また、HBEGF と I 型 IFN に対する中和抗体の添加実験により、HBEGF は老化表皮細胞でオートクライン的に HLA-I レベルを低下させるのに対し、I 型 IFN は非老化表皮細胞でパラクリン的に HLA-I 発現を

増強することが実証された。さらに、CD8+T 細胞は老化表皮細胞や SASP と共存した場合、非老化表皮細胞に対して、攻撃を高める可能性を示した。

第 4 章 SLE モデルマウスにおける細胞老化の病態関与の検証

4-1. 緒言

MRL/lpr マウスは、Fas 遺伝子に欠損変異を有し、Fas 依存性アポトーシスが障害されることによりリンパ球の異常増殖を起こす。ヒト SLE 様の自己免疫疾患を自然発症し、抗 double stranded 抗体をはじめとする多様な自己抗体を産生する⁶⁰。これにより、免疫複合体の沈着による糸球体腎炎を発症するほか、中枢神経ループスと呼ばれる脳障害、リンパ節腫脹、血管炎、関節炎、皮膚炎などの症状を呈する。また、これまで MRL/lpr マウスにて腎臓および脳組織で、老化細胞の存在が報告されている^{25,61}。そこで本章では、SLE モデルマウスとして MRL/lpr を用いて、SLE 様皮膚病変における老化細胞を検証し、老化細胞除去薬（セノリティクス）の効果を検証した。セノリティクスは、Dasatinib+Quercetin (D+Q)、Fisetin、ABT-263 (Navitoclax) などが知られており、phosphatidylinositol 3-kinase /AKT 経路や B-cell lymphoma 2 ファミリーなどの Senescent Cell Anti-apoptotic Pathways (SCAPs) を阻害することで、老化細胞を選択的に除去するとされている⁶²。本研究では、抗炎症・抗酸化作用を有するフラボノイドであり、MRL/lpr マウスにて腎臓および中枢神経ループスに対する老化細胞除去作用が報告されている fisetin を用いて皮膚病変に対する効果を検証した⁶³。

4-2. 対象と方法

4-2-1. 動物実験

メスの MRL/lpr マウス (n=33) を SLE モデルマウスとして用い、同ハプロタイプの MRL/MpJ マウス (n=21) を対照群として使用した (Sankyo Lab Service、東京、日本)。マウスは 1 ケージあたり 3~5 匹で飼育し、温度 20~26℃、湿度 30~70%、12 時間の明暗サイクル下で、無菌 (Specific Pathogen Free) 条件下にて飼育した。人道的エンドポイントは、全身状態の憎悪により明らかな衰弱状態 (実験開始時体重の 70%以下への減少、あるいは刺激による体動の著しい減少や飲水・捕食困難) を目安として設定したが、本研究においてこれらの基準に該当する個体は認められず、すべてのマウスを実験に使用した。全ての動物実験は、札幌医科大学動物実験委員会の承認を得たプロトコルに従って実施した。病態解析には、18 週齢の MRL/MpJ マウス (n=9) および MRL/lpr マウス (n=9) を使用した。Fisetin 投与解析には、18 週齢の MRL/MpJ マウス (n=12) および

MRL/lpr マウス (n = 24) を使用した。Fisetin は、100 mg/kg の濃度で経口投与し、20% PEG-400 を vehicle として、18 週齢から 4 週間にわたり、週 5 回投与した。

R ソフトウェアを用いて、fisetin 投与群および vehicle 群を無作為化した。サンプルサイズは予備実験結果に基づいて決定した。処理順序、測定順序、ケージ位置などの潜在的交絡因子は本研究ではコントロールしていない。マウスは 22 週齢で、メデトミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの 3 種混合麻酔による深麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、組織を採取した。

4-2-2. 皮膚病変スコアリング

皮膚病変の重症度を 0-3 段階で以下のように評価した。鼻の皮膚：0 = 病変なし、0.5 = 部分的な病変 (<50%)、1 = 広範な病変 (>50%)。背部皮膚：0 = 病変なし、0.5 = 小さな病変 (<10 mm 径)、1.5 = 大きな病変 (>10 mm 径) または痂皮を伴う病変。眼の皮膚：0 = 病変なし、0.5 = 病変あり。スコアリングは、治療群を盲検化した状態で実施した。

4-2-3. SLE モデルマウス皮膚の組織学的解析

背部皮膚を採取し、4%PFA で一晩固定した後、パラフィン包埋後、5 μ m の切片を作製し、hematoxylin・eosin (H&E) 染色を行った。画像は倒立顕微鏡 (Axio Observer 7; ZEISS) で取得した。表皮厚は ImageJ ソフトウェアを用いて 5 か所、ランダムで測定し、平均値を算出した。

4-2-4. SLE モデルマウス皮膚の免疫蛍光染色

免疫染色は既報の方法に準じて実施した⁶⁴。切片は脱パラフィンし、再水和後、クエン酸緩衝液 (10 mM sodium citrate、pH 6.0) または ethylenediaminetetraacetic acid 緩衝液 (1 mM、pH 8.0) 中で電子レンジ (95-98°C、10 分) による抗原賦活化を行った。冷却後、スライドを脱イオン水で 2 回、TBS-T で 1 回 (各 5 分) 洗浄した。次に、1% BSA 含有 TBS-T で室温 (20-26°C) 15 分間ブロッキングを行い、一次抗体と 4°C で一晩反応させた。TBS-T で 3 回洗浄 (各 5 分) 後、ImmPRESS HRP horse anti-rabbit IgG polymer reagent (MP-7401; Vector Laboratories、Newark、CA、USA) を室温・暗所で 30 分間反応させた。再度 TBS-T で 3 回洗浄後、TSA Plus Working Solution (Fluorescein、Cyanine 3、Cyanine 5; AKOYA BIOSCIENCES、Marlborough、MA、USA) で室温・暗所で 10 分間反応させた。マルチプレックス染色では、クエン酸緩衝液中で再度電子レンジ処理 (95-98°C、10 分) によるストリッピングを行い、その後同様にチラミド蛍光標識による染色を行った。細胞核染色には、Cellstain DAPI 溶液 (1:1000; Dojindo) を用い、VECTASHIELD

(Vector Laboratories) で封入した。一次抗体は rabbit anti-p21 (1:1000; 5G7、ZRB1141、Sigma-Aldrich)、rabbit anti-collagen XVII (1:100; EPR18614, ab184996、Abcam)、rabbit anti-HMGB1 (1:400; D3E5、#6893、Cell Signaling Technology)、rabbit anti-CD4 (1:200; D7D2Z、#25229、Cell Signaling Technology)、rabbit anti-CD8 α (1:800; D4W2Z、#98941、Cell Signaling Technology)、rabbit anti-F4/80 (1:500; D2S9R、#70076、Cell Signaling Technology)、rabbit anti-interferon alpha 2 (1:100; ab193055、Abcam)、rabbit anti-MHC Class I (1:500; E8E7N、#76828、Cell Signaling Technology)、rabbit anti-phospho-EGFR (Tyr1068) (1:200; D7A5、#3777、Cell Signaling Technology) を用いた。これらの一次抗体は SignalStain Antibody Diluent (Cell Signaling Technology) で希釈した。蛍光画像は蛍光顕微鏡 (Axio Observer 7; ZEISS) で取得した。免疫染色画像の定量解析は、ZEN Zeiss 解析ソフトウェアおよび ImageJ ソフトウェアを用いて行った。p21^{WAF1/CIP1} 陽性細胞の陽性率は表皮における p21^{WAF1/CIP1} 陽性細胞数を DAPI 陽性細胞数で割った数を算出した。細胞ごとの発現強度は表皮基底層全体の発現強度をプロットし、無作為的に p21^{WAF1/CIP1} と Col17 の発現強度を選択した。High mobility group box 1 (HMGB1) の評価では表皮において HMGB1 が核外に放出されている細胞数を DAPI 陽性細胞数で割った数を算出した。CD4、CD8 α および F4/80 陽性細胞の定量解析では真皮において 6500.076 μm^2 四方内の CD4、CD8 α および F4/80 陽性細胞数をカウントした。MHC-I 発現量はランダムに選択した p21^{WAF1/CIP1} 陽性細胞および陰性細胞で比較した。IFN- α および pEGFR 発現量は表皮内の DAPI 陽性細胞数で正規化した。

4-2-5. *In vitro* fisetin 添加実験

HaCaT 細胞 (17,500 細胞/well) は 96well 黒色プレートに播種し、前述の条件で UVB 照射を行った。Fisetin (S2298; Selleck, TX, USA) は使用前に dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、照射 2 日後に 0 μM (DMSO コントロール)、5 μM 、10 μM 、または 20 μM となるように添加した。その後、細胞をさらに 2 日インキュベートした。コントロール HaCaT 細胞には、播種 3 日後に細胞がコンフルエントに達した時点で、同じ濃度の fisetin を添加し、さらに 2 日インキュベートした。細胞数および細胞老化は、それぞれ DAPI 染色および SPiDER- β Gal 染色を用いて評価した。

4-2-6. SPiDER- β Gal 染色

HaCaT 細胞を室温で 4% PFA により 5 分間固定し、PBS で洗浄後、SPiDER- β Gal 染色液 (1:50 in McIlvaine Buffer Solution、pH 6.0、Dojindo) を用いて 37°C で 30 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で洗浄し、再び室温で 4% PFA

により 10 分間固定し、PBS-T で洗浄した。細胞核は DAPI (1:1000; Dojindo) で染色した。画像は蛍光顕微鏡 (Axio Observer 7; ZEISS) を用いて撮影した。相対蛍光強度は、プレートリーダー (Infinite® 200 PRO; TECAN) を用いて、SPiDER- β Gal の蛍光強度を DAPI の蛍光強度で割り、0 μ M fisetin の値で正規化して算出した。

4-2-7. 統計処理

定量データは R プログラミング言語を用いて可視化し、箱ヒゲ図で示した。また、各サンプルの定量値をドットプロットで示した。2 群間の比較に t 検定を用い、3 群以上の差の評価には one-way ANOVA を実施した。One-way ANOVA で統計的有意性が示された場合のみ、多重比較が行われた。多重比較の P 値は tukey 法または dunnett 法で補正した。統計解析は R のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR を用いて行った⁴³。

4-3. 結果

4-3-1. SLE モデルマウスにおける皮膚病変の検証

SLE 皮膚病態に与える老化細胞の影響を検証するため、SLE モデルマウスである MRL/lpr マウスを用いた *in vivo* の検証を行なった。組織学的解析では、MRL/lpr マウスはコントロールマウスの MRL/MpJ マウスと比較して表皮厚が有意に厚く、皮膚病変スコアが悪化することが示された (図 26)。

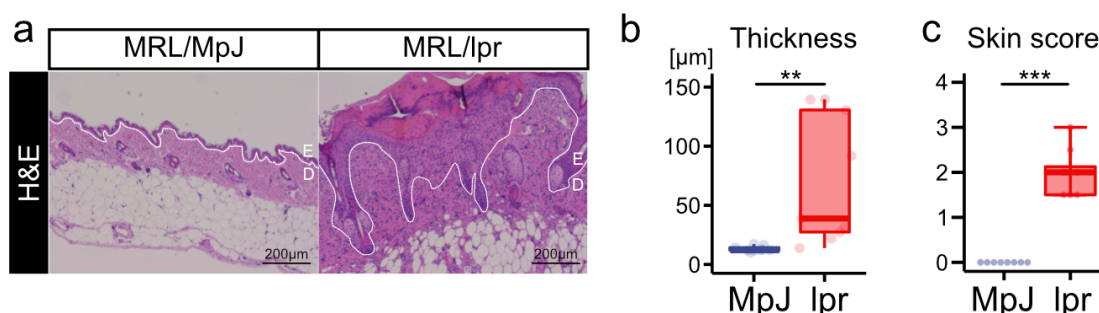


図 26. MRL/MpJ および MRL/lpr マウスにおける皮膚病変

(a) MRL/MpJ および MRL/lpr マウス背部皮膚の H&E 染色像。点線は真皮表皮接合部を示す。E : 表皮、D : 真皮。(b) MRL/MpJ および MRL/lpr マウスにおける表皮厚の定量解析 (各 n=9)。(c) 背部、眼、鼻部の皮膚病変スコア (各 n=8)。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用いた。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$)。

4-3-2. SLE モデルマウスにおける細胞老化の検証

Immunohistochemistry を用いて、p21^{WAF1/CIP1} およびコラーゲン 17 α 1 (Col17) の発現を検証した。p21^{WAF1/CIP1} 陽性表皮細胞の割合は、MRL/lpr マウスの方が MRL/MpJ マウスよりも高く (図 27a および b)、p21^{WAF1/CIP1} の蛍光強度が増加し、Col17 の蛍光強度が減少した (図 27a および c)。表皮基底層の 2.5 次元図と蛍光強度のヒストグラムは、MRL/lpr マウスの p21^{WAF1/CIP1} 陽性細胞における Col17 の発現が低いことを示した (図 27d および e)。さらに、Lamin B1 が欠失している表皮細胞は p21^{WAF1/CIP1} および 53BP1 の発現を示した (図 27f)。これらは DNA 損傷を伴う老化細胞の特徴である²⁴。さらに、MRL/lpr マウスでは、STING を介した細胞老化を制御することが知られている HMGB1 の核外放出が増加した (図 27g および h)⁶⁵。

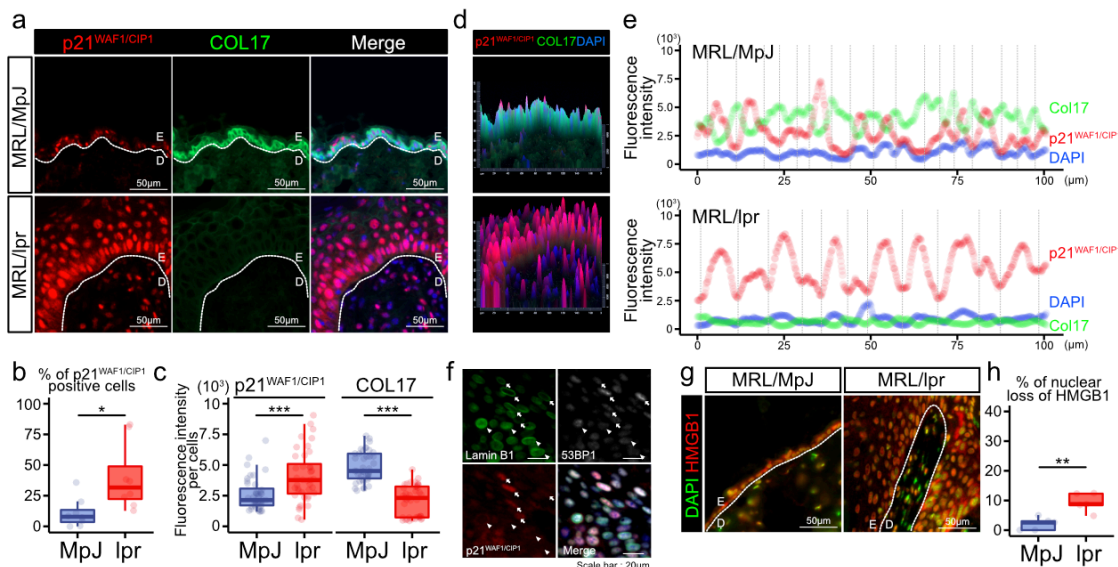


図 27. 免疫蛍光染色による MRL/MpJ および MRL/lpr マウス皮膚における p21^{WAF1/CIP1} および COL17 の発現

(a) MRL/MpJ および MRL/lpr マウス皮膚における p21^{WAF1/CIP1} (赤)、COL17 (緑)、DAPI (青) の免疫蛍光染色代表画像。点線は真皮表皮接合部を示す。E:表皮、D:真皮。(b-c) MRL/MpJ および MRL/lpr マウス皮膚における p21^{WAF1/CIP1} 陽性表皮細胞の割合 (各 n=8) および表皮基底細胞における p21^{WAF1/CIP1} および COL17 の蛍光強度 (各 n=8 細胞×5 視野)。(d-e) 表皮基底層における p21^{WAF1/CIP1}、COL17、および DAPI の蛍光強度を示す 2.5 次元図 (d) および (e) 蛍光強度のプロファイル。x 軸は測定距離を示す。(f) MRL/lpr マウス皮膚における lamin B1 (緑)、p21^{WAF1/CIP1} (赤)、53BP1 (灰色)、DAPI (青) の免疫蛍光染色代表画像。矢印は lamin B1 低発現細胞、矢頭は lamin B1 高発現細胞を示す。(g) MRL/MpJ および MRL/lpr マウス皮膚における HMGB1 (赤)、DAPI (緑) の免

疫蛍光染色代表画像。点線は真皮表皮接合部を示す。E：表皮、D：真皮。(h) MRL/MpJ および MRL/lpr マウス皮膚における HMGB1 の核外放出率(各 $n=5$)。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用いた。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした ($*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ および $***P < 0.001$)。

4-3-3. SLE モデルマウスにおける MHC と EGFR の検証

MRL/lpr マウス皮膚の $p21^{WAF1/CIP1}$ 陽性細胞における MHC-I 発現は、 $p21^{WAF1/CIP1}$ 陰性細胞と比較して有意に減少していた(図 28a および b)。MRL/lpr マウスでは phospho-EGFR (pEGFR) 発現が増加しており(図 28c および d)、pEGFR 発現レベルは $p21^{WAF1/CIP1}$ 陽性細胞の存在と有意に相関していた(図 28e)。

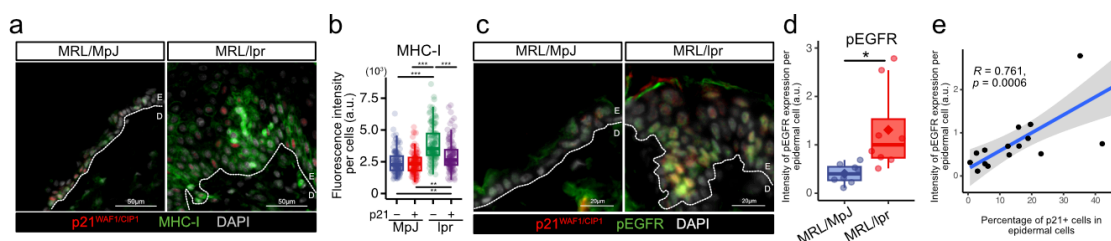


図 28. 免疫蛍光染色による MRL/MpJ および MRL/lpr マウス皮膚における MHC-I および EGFR の発現解析

(a) MRL/MpJ および MRL/lpr マウス皮膚における $p21^{WAF1/CIP1}$ (赤)、MHC-I (緑)、DAPI (灰色) の免疫蛍光染色代表画像。点線は真皮表皮接合部を示す。E：表皮、D：真皮。(b) MRL/MpJ および MRL/lpr マウス皮膚における $p21^{WAF1/CIP1}$ 陽性および陰性細胞における MHC-I 蛍光強度の定量解析 (各 $n = 8$ 匹 $\times 5$ 細胞 $\times 3$ 視野)。(c) MRL/MpJ および MRL/lpr マウス皮膚における $p21^{WAF1/CIP1}$ (赤)、pEGFR (緑)、DAPI (灰色) の免疫蛍光染色代表画像。点線は真皮表皮接合部を示す。E：表皮、D：真皮。(d) MRL/MpJ および MRL/lpr マウスにおける pEGFR 蛍光強度の定量解析 (各 $n = 8$)。(e) $p21^{WAF1/CIP1}$ 陽性細胞割合と pEGFR 蛍光強度との相関 (各群 $n = 8$)。相関はピアソンの相関係数を用いて評価し、95% 信頼区間を表示した。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用いた。4 群間の比較には one-way ANOVA を使用し、多重比較の P 値は tukey 法で補正した。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした ($*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ および $***P < 0.001$)。

4-3-4. SLE モデルマウスにおける免疫細胞の検証

MRL/lpr マウスでは真皮層において CD4+T 細胞、CD8 α +T 細胞、F4/80+マクロファージの割合が高かった (図 29)。

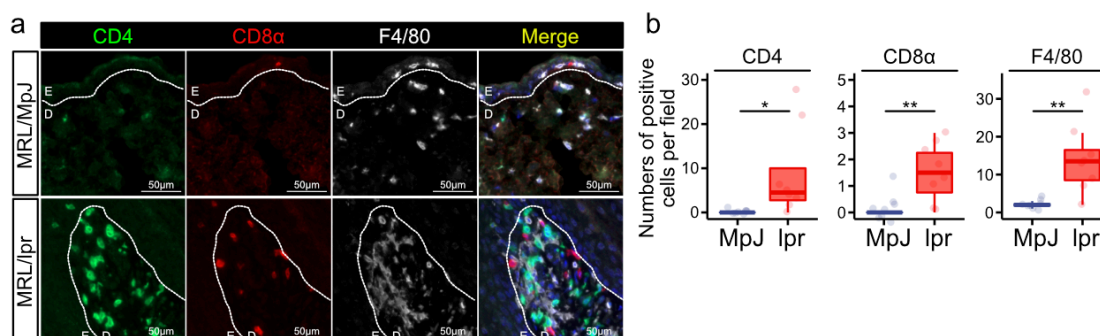


図 29. 免疫蛍光染色による MRL/MpJ および MRL/lpr マウス皮膚における CD4、CD8 α 、F4/80 の解析

(a) MRL/MpJ および MRL/lpr マウス皮膚における CD4 (緑)、CD8 α (赤)、F4/80 (白)、および DAPI (青) の免疫蛍光染色代表画像。点線は真皮表皮接合部を示す。E : 表皮、D : 真皮。(b) MRL/MpJ および MRL/lpr マウス真皮における CD4+細胞、CD8 α +細胞、F4/80+細胞の数 (各 n=8)。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。2 群間の比較には student の t 検定を用いた。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および *** $P < 0.001$)。

4-3-5. SLE モデルマウスの老化細胞除去による検証

SLE 患者の皮膚病変に細胞老化が与える影響を解明するために、老化細胞除去薬 fisetin を用いた検証を試みた⁶²。まず、UVB 照射した老化 HaCaT 細胞を用いて、fisetin の効果を *in vitro* で検証したところ、fisetin は SPiDER- β Gal の蛍光強度を有意に低下させた (図 30)。次に、MRL/lpr マウスおよび MRL/MpJ マウスに、fisetin または 20% polyethylene glycol-400 (Vehicle) を週 5 日間、4 週間経口投与した (図 31a)。Vehicle の MRL/lpr マウスは皮膚スコアが徐々に悪化したのに対し、fisetin 投与した MRL/lpr マウスは皮膚スコアの悪化が抑制された (図 31b および c)。組織学的解析により、fisetin 投与が表皮肥厚を改善することが明らかになった (図 31d および e)。

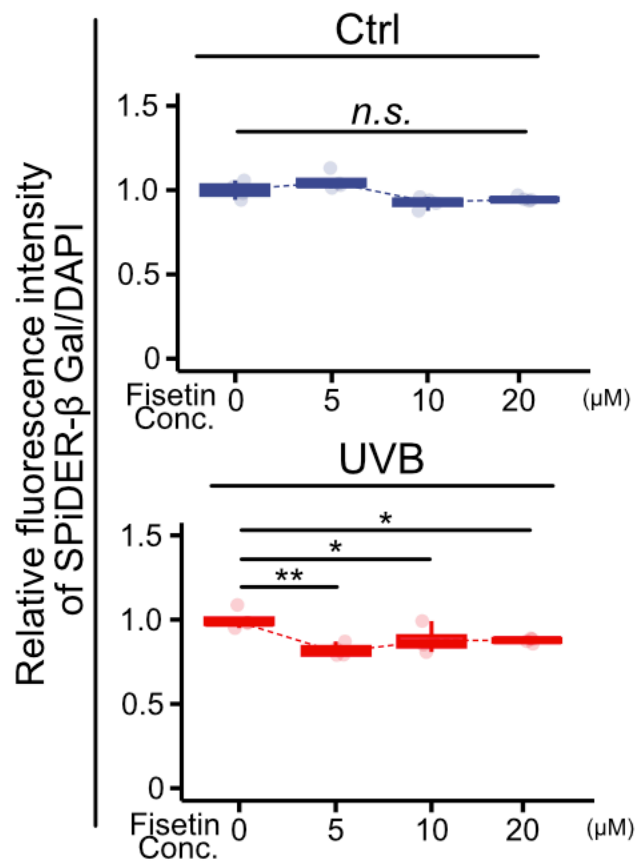


図 30. 老化細胞除去薬 **fisetin** が老化 HaCaT 細胞に及ぼす影響

HaCaT 細胞 (Ctrl) および UVB 照射によって老化を誘導した HaCaT 細胞 (UVB) に対し、fisetin (0-20μM) 処理した際の SPiDER-β Gal の相対蛍光強度 (n=4) 。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。4 群間の比較には one-way ANOVA を使用し、多重比較の P 値は dunnett 法で補正した。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$) 。

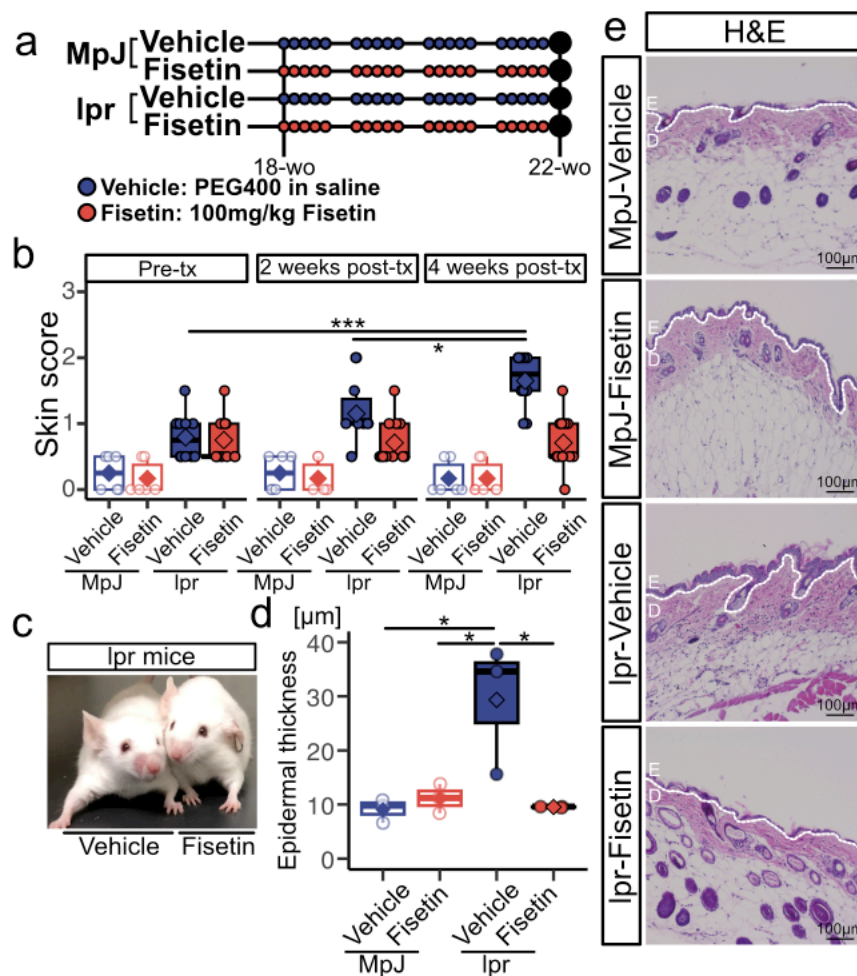


図 31. Fisetin 投与による MRL/lpr マウスにおける皮膚病変

(a) MRL/MpJ および MRL/lpr マウスに対する fisetin 経口投与の概要図。(b-c) MRL/MpJ (vehicle および fisetin, 各 $n = 6$) および MRL/lpr (vehicle および fisetin, 各 $n = 10-12$) マウスの皮膚病変スコア (b) および皮膚の肉眼像 (c)。

(d) MRL/MpJ および MRL/lpr (vehicle および fisetin, 各 $n = 3$) マウスにおける表皮厚。(e) MRL/MpJ および MRL/lpr マウスにおける H&E 染色代表画像。点線は真皮表皮接合部を示す。E: 表皮、D: 真皮。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。4 群間の比較には one-way ANOVA を使用し、多重比較の P 値は tukey 法で補正した。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$)。PEG, polyethylene glycol.

4-3-6. SLE モデルマウスへの fisetin 投与による老化細胞の検証

Fisetin 投与による皮膚炎の改善が、老化細胞除去によって起こったかを検証するため、介入後の MRL/lpr マウスの皮膚組織を用いた immunohistochemistry 解析

を実施した。Fisetin を投与した MRL/lpr では、vehicle の MRL/lpr マウスと比較して、表皮細胞における $p21^{WAF1/CIP1}$ 陽性細胞の割合の減少、および $p21^{WAF1/CIP1}$ の発現強度の減少、COL17 の発現強度の増加、HMGB1 の核外放出が有意に減少した（図 32）。

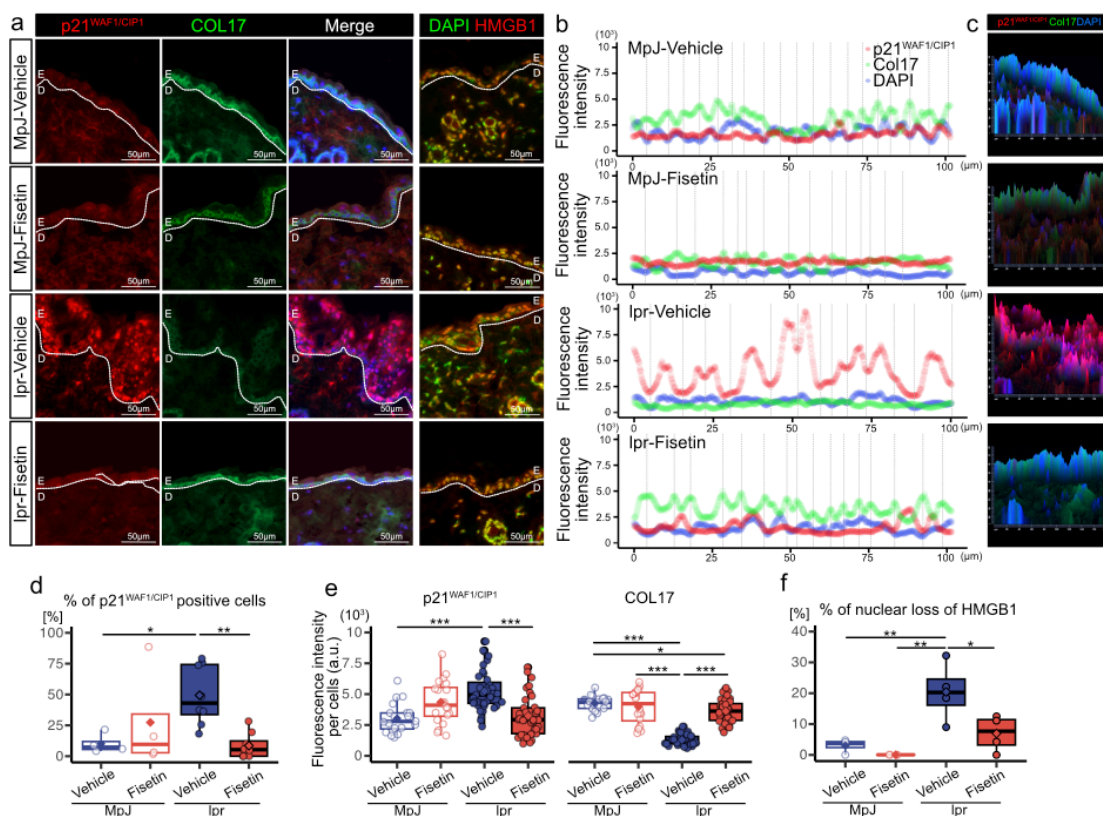


図 32. Fisetin 投与による MRL/lpr マウスにおける $p21^{WAF1/CIP1}$ 陽性細胞

(a) MRL/MpJ および MRL/lpr マウスにおける $p21^{WAF1/CIP1}$ 、COL17、HMGB1 の免疫蛍光染色代表画像。点線は真皮表皮接合部を示す。E : 表皮、D : 真皮。(b-c) 表皮基底層における蛍光強度のプロットおよび $p21^{WAF1/CIP1}$ 、COL17、DAPI の蛍光強度を示す 2.5 次元図。x 軸は測定距離を示す。(d) 表皮における $p21^{WAF1/CIP1}$ 陽性細胞の割合および (e) 表皮基底細胞における $p21^{WAF1/CIP1}$ および COL17 の蛍光強度（マウス 1 匹あたり 5 視野；MRL/MpJ: n = 4、MRL/lpr: n = 8）。

(f) MRL/MpJ および MRL/lpr (vehicle および fisetin、各 n = 4) における HMGB1 核外放出率の定量。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。4 群間の比較には one-way ANOVA を使用し、多重比較の P 値は tukey 法で補正した。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$)。

4-3-7. SLE モデルマウスへの fisetin 投与による免疫細胞と EGFR と IFN の検証

Fisetin 投与により、vehicle の MRL/lpr マウスで増加していた pEGFR および IFN- α の発現、CD4+T 細胞、CD8 α +T 細胞、および F4/80+マクロファージの数も減少した（図 33）。これらの結果は、p21^{WAF1/CIP1} 陽性老化表皮基底細胞が SLE 患者の皮膚病変の発症に関与していることを示している。

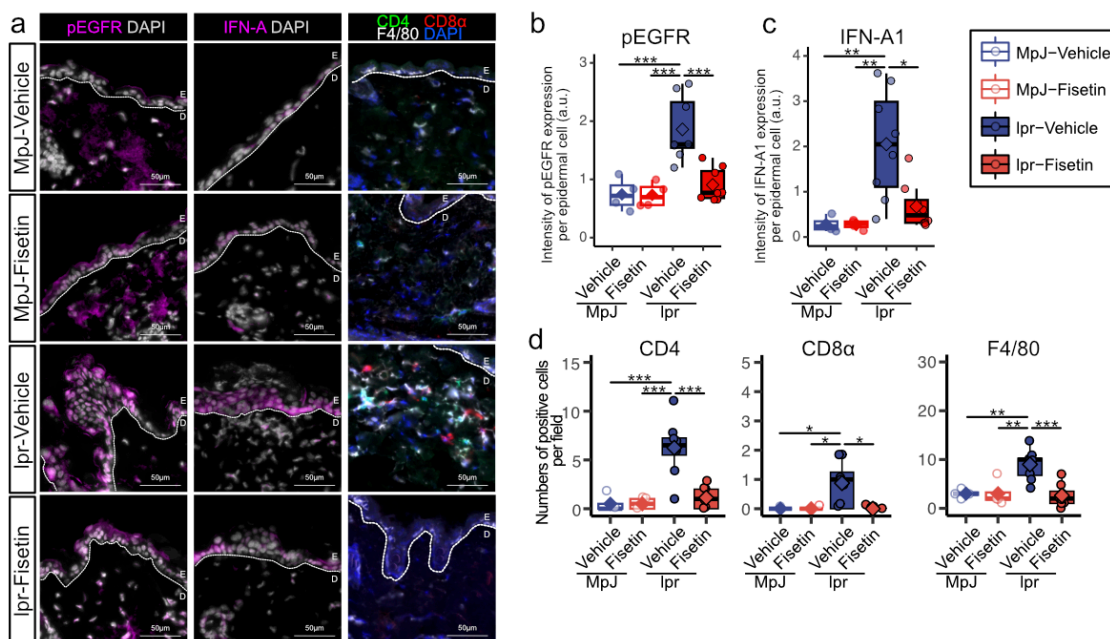


図 33. Fisetin 投与による MRL/lpr マウスにおける免疫細胞、EGFR、IFN の発現

(a-d) pEGFR、IFN- α 、CD4、CD8 α 、F4/80 の染色像および定量解析（MRL/MpJ: 各 n=4, MRL/lpr: 各 n=8）。定量データは箱ヒゲ図と各サンプルの定量値をドットプロットで示した。4 群間の比較には one-way ANOVA を使用し、多重比較の P 値は tukey 法で補正した。P 値が 0.05 未満は統計的に有意であるとみなした（* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$ ）。

4-4. 考察

本章では、SLE マウスモデルにおいて、CDKN1A (p21^{WAF1/CIP1}) 陽性老化表皮細胞が存在し、COL17 発現の低下を示した。また、老化細胞除去薬である fisetin を MRL/lpr マウスに投与すると p21^{WAF1/CIP1} 陽性の老化表皮細胞が減少し、COL17 の発現も回復した。さらに、fisetin 投与は、炎症細胞浸潤や皮膚病変を改善することがわかった。老化細胞は、生存を SCAP に依存しており⁶²、老化細胞除去薬は、SCAP を阻害することで非老化細胞に影響を与えず、老化細胞に選択的なアポトーシスを誘導すると言われている⁶²。本章では、老化細胞を除去する

ことで皮膚病変が改善した。Fisetin の老化細胞に対する特異的効果については、本章では明らかにしていないが、老化細胞が除去されたことにより、皮膚病変が改善されたことは、老化細胞が SLE 様皮膚病変を形成していた可能性があり、将来的に老化表皮細胞を標的とした CLE 治療が有効である可能性が示唆された。しかしながら、本研究においては fisetin がどのシグナル経路を介して老化細胞除去効果を発揮したのか検討していない。さらに、fisetin 以外の薬剤についてもより効果が認められる可能性は否定できない。今後は、fisetin 以外の老化細胞除去薬も含めて、検証する必要がある。

4-5. 結論

本章では、SLE モデルマウスを用いた *in vivo* 実験において、p21^{WAF1/CIP1} 陽性の老化表皮基底細胞は MHC-I の低下、EGFR の発現上昇を示すことを明らかにした。さらに、老化細胞除去薬である fisetin は老化表皮基底細胞を除去し、免疫細胞浸潤や IFN の発現上昇を改善し、皮膚病変が改善された。これにより、老化細胞が皮膚病変の形成に関与する可能性を示した。

第 5 章 総合考察

本研究では、CLE 患者および SLE 患者の皮膚組織および SLE マウスモデルを用いて、全身性エリテマトーデスの皮膚病変と細胞老化の関連性について検証を行なった。本研究では、SLE 患者皮膚で *CDKN1A* (p21^{WAF1/CIP1}) -high *COL17A1* (COL17) -low 老化表皮基底細胞を同定した。p21^{WAF1/CIP1} 陽性細胞は E2F 転写活性を阻害し、retinoblastoma ファミリーを持続的に活性化し、cyclin-dependent kinase 2 を阻害することで細胞増殖を制御する²⁴。細胞老化は多くの場合、p16^{Ink4a} または p21^{WAF1/CIP1} によって引き起こされる²⁴。近年の研究では、機能不全のテロメアを持つ老化細胞、特に p21^{WAF1/CIP1} を発現しているが p16^{Ink4a} を発現していない老化細胞を除去すると、放射線によって誘発された SASP に関連するいくつかの炎症誘発性因子を減らすことができることが示されている⁶⁶。表皮幹細胞マーカーでタイプ II 膜貫通タンパク質である COL17 は、表皮を真皮界面に接着させ、細胞接着分子を基底膜に局在させる機能を持つ⁶⁷。幹細胞の DNA 損傷応答は、COL17 (COL17A1/BP180) タンパク質分解を引き起こすことが知られており⁶⁸、CLE 患者における DNA 損傷が、COL17 発現の減少の原因である可能性がある⁶。また、scRNA-seq データでは、表皮基底細胞クラスターである BAS2 と BAS3 も *CDKN1A*-high クラスターほどではないものの、老化関連遺伝子セットのスコアが高いことが示された。BAS2 クラスターは KRT16 と KRT6A を高発現しており、これら I 型および II 型ケラチンは皮膚の初期の炎症と自然免疫を制御する⁶⁹。基底細胞での KRT16 の過剰発現は過剰増殖、ケラチ

ンフィラメントネットワークが変化、細胞間接着の減少につながるため、ケラチノサイトの活性化における役割が示唆されている⁷⁰。Krt16 トランスジェニックマウスの皮膚は、EGFR を介したシグナル伝達が活性化した皮膚と類似した特徴を持つ可能性が示唆された⁷⁰。円板状エリテマトーデス患者の皮膚でも KRT16 の発現増加が示されている⁷¹。BAS3 は RRM2 と HELLS を高発現していた。RRM2 の蓄積は ATR-Chk1 経路および E2F1 の安定化により促進され、DNA 合成の構成要素である deoxyribonucleotides (dNTP) を供給して DNA 損傷と細胞死を防ぐ⁷²。RRM2 はケラチノサイトの分化中に dNTP プールを維持する。BAS3 はケラチノサイトと表皮の分化に関連した GO タームと関連していた。EGFR シグナル伝達は retinoblastoma tumor suppressor を活性化することにより、E2F1 誘導性アポトーシスを阻害する⁷³。このことから、BAS3 は表皮基底細胞で分化し、抗アポトーシスの特性を示す可能性がある。BAS2 と BAS3 も CDKN1A の発現が増加したが、「negative regulation of cell cycle」は CDKN1A -high クラスタでエンリッチされていたため、本研究では CDKN1A -high クラスタのみに焦点を当てた。しかし、BAS2 および BAS3 における EGF シグナル伝達も SLE 病態に影響を及ぼす可能性があり、今後の研究でさらなる検証が必要である。

また、本研究では、細胞老化が SLE 皮膚病態を形成するメカニズムを一つ提唱したが、SLE 皮膚において、なぜ細胞老化が誘導されるか、特定の要因については検証しなかった。しかし、UVB 照射は老化誘導および EGFR シグナル伝達と IFN 活性化を引き起こすことから、CLE 患者の皮膚病変において細胞老化の引き金となる可能性がある。UVB 曝露は DNA 損傷を誘導し、cGAS-STING 経路の活性化につながる可能性がある。これは様々な細胞タイプで観察される反応であり^{24,65,74}、SLE の病態生理に限られるものではない。細胞外空間に放出された断片化された核 DNA によっても細胞老化が引き起こされ、cGAS-STING 経路への別の刺激となる可能性があり⁷⁵、SLE における細胞老化の誘導因子を明らかにするには、今後さらなる調査が必要である。

第 6 章 結論

本研究論文では第 1 に scRNA-seq データを用いたバイオインフォマティクス解析によって、CLE および SLE 皮膚における老化表皮基底細胞と正常表皮基底細胞との細胞間コミュニケーションを検証した。第 2 に *in vitro* モデルを用いて、老化表皮細胞と正常表皮細胞の細胞間コミュニケーションに関与するシグナル伝達経路を検証した。第 3 に SLE マウスモデルを用いて、老化細胞除去薬である fisetin を投与し、老化表皮細胞の皮膚病態への関与と効果を検証した。以上の検証を踏まえ、以下の結論を得た（図 34）。

1. CLE および SLE 皮膚において、老化した表皮基底細胞は、*CDKN1A* 発現の上昇および *COL17A1* 発現の低下を特徴とし、正常皮膚と比較して、CLE および SLE 皮膚で多く存在していた。
2. 老化表皮基底細胞は、I 型 IFN や EGFR リガンドを含む SASP 因子を分泌し、老化表皮基底細胞内での EGFR リガンドはオートクライン作用により、HLA-I 発現を低下させた。一方、非老化表皮基底細胞では老化細胞が分泌する SASP によって、I 型 IFN 応答を高め、HLA-I 発現および抗原処理・提示機能が亢進し、結果として CD8+T 細胞依存性のアポトーシスが誘導された。
3. SLE マウスモデルにおいて、老化細胞除去により皮膚病変が改善した。結果、老化細胞は皮膚病変や病態の形成に関与することが明らかになった。

本研究の結果は、老化表皮基底細胞が CLE 及び SLE 皮膚病態形成に重要な役割を果たすことを示唆した。これは、老化細胞が CLE の新規治療標的になる可能性がある。

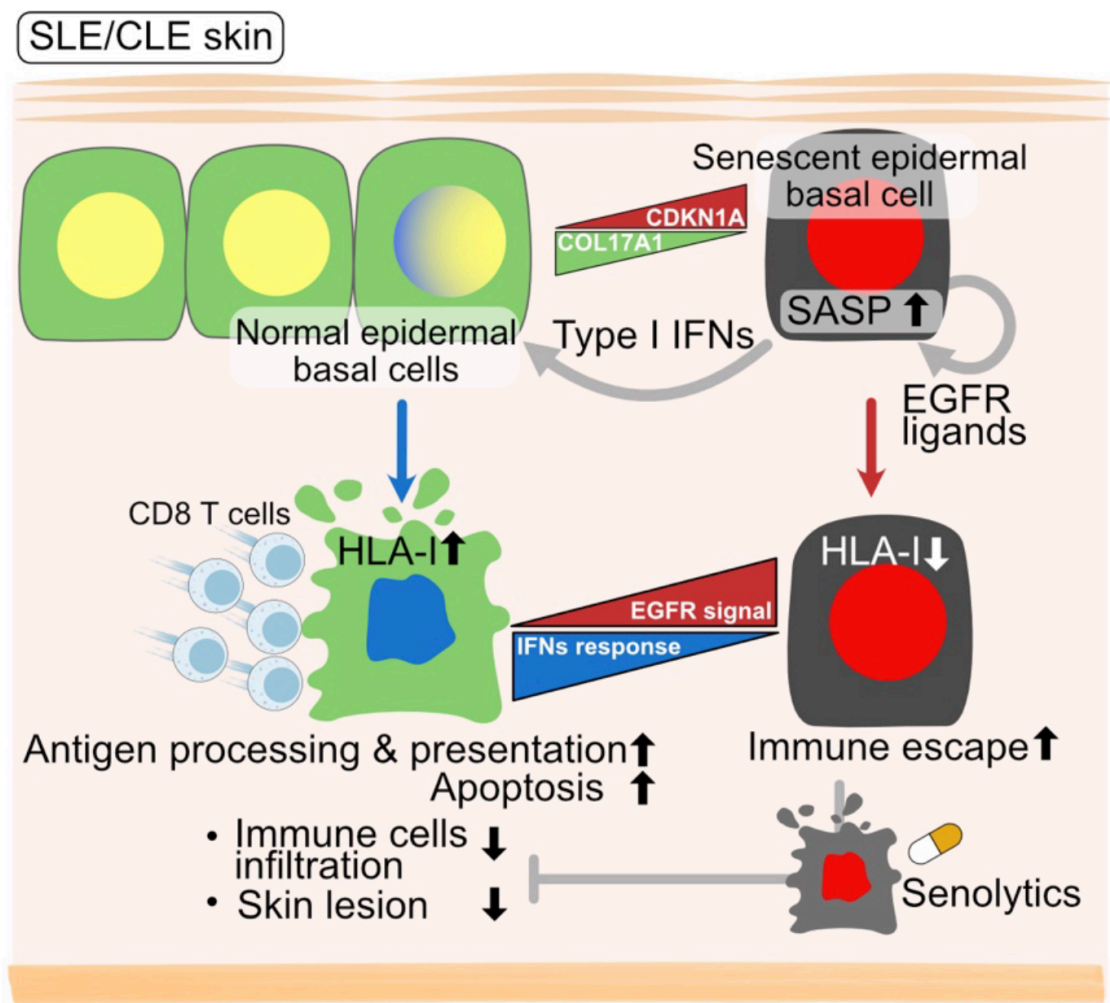


図 34. 老化表皮基底細胞が SLE/CLE 皮膚病態に寄与するメカニズムの模式図

謝辞

本研究の遂行にあたり多くの方にご指導ご鞭撻を賜りました。主任指導教員である北海道大学大学院保健科学研究所リハビリテーション科学分野の千見寺貴子教授に心より感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり多くのご指導、ご助言をいただきました札幌医科大学大学院保健医療学研究科の齋藤悠城教授に謹んで感謝の意を申し上げます。そして、副指導教員として助言をいただきました北海道大学大学院保健科学研究所リハビリテーション科学分野の宮島真貴講師に深く感謝申し上げます。さらに、論文をご精読いただきました北海道大学大学院保健科学研究所病態解析学分野の石津明洋教授、北海道大学大学院保健科学研究所リハビリテーション科学分野の前島洋教授に深く感謝いたします。最後にさまざまな面でご協力いただきました研究室の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

1. Dai X, Fan Y, Zhao X. Systemic lupus erythematosus: updated insights on the pathogenesis, diagnosis, prevention and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10(1):102. doi:10.1038/s41392-025-02168-0
2. Scherlinger M, Kolios AGA, Kyttaris VC, Tsokos GC. Advances in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Drug Discov.* 2025;24(12):926-944. doi:10.1038/s41573-025-01242-0
3. Fanouriakis A, Tziolos N, Bertsias G, Boumpas DT. Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2021;80(1):14-25. doi:10.1136/annrheumdis-2020-218272
4. Klein B, Billi AC, Abernathy-Close L, Kahlenberg JM. Cutaneous lupus erythematosus - from pathogenesis to targeted therapy. *Nat Rev Rheumatol.* 2025;21(12):703-718. doi:10.1038/s41584-025-01318-6
5. Klein B, Reynolds MB, Xu B, et al. Epidermal ZBP1 stabilizes mitochondrial Z-DNA to drive UV-induced IFN signaling in autoimmune photosensitivity. *Sci Immunol.* 2025;10(105):eado1710. doi:10.1126/sciimmunol.ado1710
6. Wenzel J. Cutaneous lupus erythematosus: new insights into pathogenesis and therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(9):519-532. doi:10.1038/s41584-019-0272-0
7. Klicznik MM, Szenes-Nagy AB, Campbell DJ, Gratz IK. Taking the lead – how keratinocytes orchestrate skin T cell immunity. *Immunol Lett.* 2018;200:43-51. doi:10.1016/j.imlet.2018.06.009
8. Rönnblom L, Pascual V. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus.* 2008;17(5):394-399. doi:10.1177/0961203308090020
9. Psarras A, Alase A, Antanaviciute A, et al. Functionally impaired plasmacytoid dendritic cells and non-haematopoietic sources of type I interferon characterize human autoimmunity. *Nat Commun.* 2020;11(1):6149. doi:10.1038/s41467-020-19918-z
10. Vazquez T, Patel J, Kodali N, et al. Plasmacytoid Dendritic Cells Are Not Major Producers of Type 1 IFN in Cutaneous Lupus: An In-Depth Immunoprofile of Subacute and Discoid Lupus. *J Invest Dermatol.* 2024;144(6):1262-1272.e7. doi:10.1016/j.jid.2023.10.039
11. Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with

- unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 2004;6(2):168-170. doi:10.1038/ncb1095
12. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):729-740. doi:10.1038/nrm2233
 13. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 2006;444(7119):638-642. doi:10.1038/nature05327
 14. Le ONL, Rodier F, Fontaine F, et al. Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell.* 2010;9(3):398-409. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00567.x
 15. Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(7):339-344. doi:10.1016/S0968-0004(02)02110-2
 16. Chapman J, Fielder E, Passos JF. Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Lett.* 2019;593(13):1566-1579. doi:10.1002/1873-3468.13498
 17. Faust HJ, Zhang H, Han J, et al. IL-17 and immunologically induced senescence regulate response to injury in osteoarthritis. *J Clin Invest.* 2020;130(10):5493-5507. doi:10.1172/JCI134091
 18. Xing QJ, Liang QQ, Bian Q, et al. Leg amputation accelerates senescence of rat lumbar intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976).* 2010;35(23):E1253-61. doi:10.1097/BRS.0b013e3181e7d087
 19. Johmura Y, Yamanaka T, Omori S, et al. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science.* 2021;371(6526):265-270. doi:10.1126/science.abb5916
 20. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature.* 2016;529(7584):37-42. doi:10.1038/nature16187
 21. Lessard F, Igelmann S, Trahan C, et al. Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):789-799. doi:10.1038/s41556-018-0127-y
 22. De Cecco M, Ito T, Petrashen AP, et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature.* 2019;566(7742):73-78. doi:10.1038/s41586-018-0784-9
 23. Hubackova S, Krejcikova K, Bartek J, Hodny Z. IL1- and TGFβ-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative,

- oncogene-induced, and drug-induced paracrine “bystander senescence”. *Aging*. 2012;4(12):932-951. doi:10.18632/aging.100520
24. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 2019;179(4):813-827. doi:10.1016/j.cell.2019.10.005
 25. Saito Y, Miyajima M, Yamamoto S, et al. Accumulation of Senescent Neural Cells in Murine Lupus With Depression-Like Behavior. *Front Immunol*. 2021;12:692321. doi:10.3389/fimmu.2021.692321
 26. Schmitt CA, Wang B, Demaria M. Senescence and cancer - role and therapeutic opportunities. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(10):619-636. doi:10.1038/s41571-022-00668-4
 27. Wang X, Diercks G, Lambers WM, et al. Senescent Progenitor Cells in the Skin of Patients with Cutaneous Lupus Erythematosus. *J Invest Dermatol*. 2022;142(3 Pt B):976-980.e2. doi:10.1016/j.jid.2021.06.022
 28. Saul D, Kosinsky RL, Atkinson EJ, et al. A new gene set identifies senescent cells and predicts senescence-associated pathways across tissues. *Nat Commun*. 2022;13(1):4827. doi:10.1038/s41467-022-32552-1
 29. Abernathy-Close L, Lazar S, Stannard J, et al. B Cell Signatures Distinguish Cutaneous Lupus Erythematosus Subtypes and the Presence of Systemic Disease Activity. *Front Immunol*. 2021;12:775353. doi:10.3389/fimmu.2021.775353
 30. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-15550. doi:10.1073/pnas.0506580102
 31. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst*. 2015;1(6):417-425. doi:10.1016/j.cels.2015.12.004
 32. Der E, Suryawanshi H, Morozov P, et al. Tubular cell and keratinocyte single-cell transcriptomics applied to lupus nephritis reveal type I IFN and fibrosis relevant pathways. *Nat Immunol*. 2019;20(7):915-927. doi:10.1038/s41590-019-0386-1
 33. Dunlap GS, Billi AC, Xing X, et al. Single-cell transcriptomics reveals distinct effector profiles of infiltrating T cells in lupus skin and kidney. *JCI Insight*. 2022;7(8). doi:10.1172/jci.insight.156341
 34. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*. 2021;184(13):3573-3587.e29. doi:10.1016/j.cell.2021.04.048

35. Yi M, Nissley DV, McCormick F, Stephens RM. ssGSEA score-based Ras dependency indexes derived from gene expression data reveal potential Ras addiction mechanisms with possible clinical implications. *Sci Rep*. 2020;10(1):10258. doi:10.1038/s41598-020-66986-8
36. Casella G, Munk R, Kim KM, et al. Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(14):7294-7305. doi:10.1093/nar/gkz555
37. Fridman AL, Tainsky MA. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. *Oncogene*. 2008;27(46):5975-5987. doi:10.1038/onc.2008.213
38. Avelar RA, Ortega JG, Tacutu R, et al. A multidimensional systems biology analysis of cellular senescence in aging and disease. *Genome Biol*. 2020;21(1):91. doi:10.1186/s13059-020-01990-9
39. Zhang B, Fu D, Xu Q, et al. The senescence-associated secretory phenotype is potentiated by feedforward regulatory mechanisms involving Zscan4 and TAK1. *Nat Commun*. 2018;9(1):1723. doi:10.1038/s41467-018-04010-4
40. Purcell M, Kruger A, Tainsky MA. Gene expression profiling of replicative and induced senescence. *Cell Cycle*. 2014;13(24):3927-3937. doi:10.4161/15384101.2014.973327
41. Hernandez-Segura A, de Jong TV, Melov S, Guryev V, Campisi J, Demaria M. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol*. 2017;27(17):2652-2660.e4. doi:10.1016/j.cub.2017.07.033
42. Jin S, Guerrero-Juarez CF, Zhang L, et al. Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. *Nat Commun*. 2021;12(1):1088. doi:10.1038/s41467-021-21246-9
43. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(3):452-458. doi:10.1038/bmt.2012.244
44. Molineros JE, Looger LL, Kim K, et al. Amino acid signatures of HLA Class-I and II molecules are strongly associated with SLE susceptibility and autoantibody production in Eastern Asians. *PLoS Genet*. 2019;15(4):e1008092. doi:10.1371/journal.pgen.1008092
45. van den Elsen PJ, Holling TM, Kuipers HF, van der Stoep N. Transcriptional regulation of antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(1):67-75. doi:10.1016/j.coi.2003.11.015
46. Kersh AE, Sasaki M, Cooper LA, Kissick HT, Pollack BP. Understanding the Impact of ErbB Activating Events and Signal Transduction on Antigen

- Processing and Presentation: MHC Expression as a Model. *Front Pharmacol.* 2016;7(SEP):327. doi:10.3389/fphar.2016.00327
47. Browaeys R, Saelens W, Saeys Y. NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. *Nat Methods.* 2020;17(2):159-162. doi:10.1038/s41592-019-0667-5
 48. Brea EJ, Oh CY, Manchado E, et al. Kinase Regulation of Human MHC Class I Molecule Expression on Cancer Cells. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(11):936-947. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0177
 49. Pereira BI, Devine OP, Vukmanovic-Stejić M, et al. Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8⁺ T cell inhibition. *Nat Commun.* 2019;10(1):2387. doi:10.1038/s41467-019-10335-5
 50. Chen J, Wu M, Wang J, Li X. Immunoregulation of NKT Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol Res.* 2015;2015(1):1-8. doi:10.1155/2015/206731
 51. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013;15(8):978-990. doi:10.1038/ncb2784
 52. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8⁺ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer.* 2021;124(2):359-367. doi:10.1038/s41416-020-01048-4
 53. Fu Q, Zhao J, Qian X, et al. Association of a functional IRF7 variant with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2011;63(3):749-754. doi:10.1002/art.30193
 54. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(2):87-103. doi:10.1038/nri3787
 55. Maz MP, Martens JWS, Hannoudi A, Reddy AL, Hile GA, Kahlenberg JM. Recent advances in cutaneous lupus. *J Autoimmun.* 2022;132:102865. doi:10.1016/j.jaut.2022.102865
 56. Lewis DA, Hengeltraub SF, Gao FC, Leivant MA, Spandau DF. Aberrant NF-kappaB activity in HaCaT cells alters their response to UVB signaling. *J Invest Dermatol.* 2006;126(8):1885-1892. doi:10.1038/sj.jid.5700333
 57. Chaturvedi V, Qin JZ, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, Nickoloff BJ. Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. *J Biol Chem.* 1999;274(33):23358-23367. doi:10.1074/jbc.274.33.23358

58. Li M, Ge Y, Bai S, et al. Atorvastatin calcium alleviates UVB-induced HaCat cell senescence and skin photoaging. *Sci Rep.* 2024;14(1):30010. doi:10.1038/s41598-024-81573-x
59. Shu P, Mo J, Li Z, Li M, Zhu W, Du Z. Ferulic acid in synergy with retinol alleviates oxidative injury of HaCaT cells during UVB-induced photoaging. *Aging.* 2024;16(8):7153-7173. doi:10.18632/aging.205749
60. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. In: *Advances in Immunology.* Vol 37. Academic Press; 1985:269-390. doi:10.1016/S0065-2776(08)60342-9
61. Ijima S, Saito Y, Nagaoka K, et al. Fisetin reduces the senescent tubular epithelial cell burden and also inhibits proliferative fibroblasts in murine lupus nephritis. *Front Immunol.* 2022;13:960601. doi:10.3389/fimmu.2022.960601
62. Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine.* 2017;21:21-28. doi:10.1016/j.ebiom.2017.04.013
63. Yousefzadeh MJ, Zhu Y, McGowan SJ, et al. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine.* 2018;36:18-28. doi:10.1016/j.ebiom.2018.09.015
64. Kita A, Saito Y, Miura N, et al. Altered regulation of mesenchymal cell senescence in adipose tissue promotes pathological changes associated with diabetic wound healing. *Commun Biol.* 2022;5(1):310. doi:10.1038/s42003-022-03266-3
65. Lee JJ, Park IH, Kwak MS, Rhee WJ, Kim SH, Shin JS. HMGB1 orchestrates STING-mediated senescence via TRIM30 α modulation in cancer cells. *Cell Death Discov.* 2021;7(1):28. doi:10.1038/s41420-021-00409-z
66. Chandra A, Lagnado AB, Farr JN, et al. Targeted clearance of p21- but not p16-positive senescent cells prevents radiation-induced osteoporosis and increased marrow adiposity. *Aging Cell.* 2022;21(5):e13602. doi:10.1111/accel.13602
67. McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci.* 2003;31(3):169-177. doi:10.1016/S0923-1811(03)00045-8
68. Matsumura H, Mohri Y, Binh NT, et al. Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. *Science.* 2016;351(6273):aad4395. doi:10.1126/science.aad4395
69. Lessard JC, Piña-Paz S, Rotty JD, et al. Keratin 16 regulates innate immunity in response to epidermal barrier breach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(48):19537-19542. doi:10.1073/pnas.1309576110

70. Paladini RD, Coulombe PA. Directed Expression of Keratin 16 to the Progenitor Basal Cells of Transgenic Mouse Skin Delays Skin Maturation. *J Cell Biol.* 1998;142(4):1035-1051. doi:10.1083/jcb.142.4.1035
71. de Berker D, Dean D, Leigh IM, Burge S. Keratin expression in discoid lupus erythematosus. *Exp Dermatol.* 1995;4(6):350-356. doi:10.1111/j.1600-0625.1995.tb00059.x
72. Anacker DC, Aloor HL, Shepard CN, et al. HPV31 utilizes the ATR-Chk1 pathway to maintain elevated RRM2 levels and a replication-competent environment in differentiating Keratinocytes. *Virology.* 2016;499:383-396. doi:10.1016/j.virol.2016.09.028
73. Ginsberg D. EGFR signaling inhibits E2F1-induced apoptosis in vivo: implications for cancer therapy. *Sci STKE.* 2007;2007(371):pe4. doi:10.1126/stke.3712007pe4
74. Gehrke N, Mertens C, Zillinger T, et al. Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing. *Immunity.* 2013;39(3):482-495. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.004
75. Kato Y, Park J, Takamatsu H, et al. Apoptosis-derived membrane vesicles drive the cGAS–STING pathway and enhance type I IFN production in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(10):1507-1515. doi:10.1136/annrheumdis-2018-212988

業績リスト

本論文の一部は以下の論文に発表した。

1. **Yamamoto S**, Saito Y, Sato T, Nakano S, Kasseki D, Nagao A, Miura N, Nagaoka K, Kita A, Miyajima M, Ijima S, Taniguchi K, Niida A, Chikenji TS. Orchestration of Skin Pathology in Cutaneous Lupus Erythematosus by HLA Class I Down-Regulated Senescent Epidermal Basal Cells, *Arthritis & Rheumatology*, 2025, DOI: 10.1002/art.43244.

本論文の一部は以下の学会に発表した。

[口述発表]

1. **山本瀬菜**, 齋藤悠城, 中野世那, 佐藤吏紗, 三浦倫寛, 長岡賢太郎, 北愛里紗, 宮島真貴, 井嶋翔吾, 谷口浩二, 新井田厚司, 千見寺貴子, 老化細胞の免疫回避機構が関わる皮膚エリテマトーデス病態, 日本薬学会第 145 年会, 福岡, 2025 年 3 月.
2. **山本瀬菜**, 齋藤悠城, 中野世那, 佐藤吏紗, 三浦倫寛, 長岡賢太郎, 北愛里紗, 宮島真貴, 井嶋翔吾, 谷口浩二, 新井田厚司, 千見寺貴子, 老化細胞の免疫回避機構に着眼したエリテマトーデスの皮膚病態の解明, 第 97 回日本生化学会大会, 横浜, 2024 年 11 月.
3. **Yamamoto S**, Saito Y, Nakano S, Sato T, Miura N, Nagaoka K, Kita A, Miyajima M, Ijima S, Taniguchi K, Niida A, Chikenji TS, HLA Class I-Downregulated Senescent Epidermal Basal Cells Orchestrate Skin Pathology in Systemic Lupus Erythematosus, 12th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society Joint with Korean Association of Immunologists International Meeting 2024, Seoul, Korea, October 2024.
4. **山本瀬菜**, 齋藤悠城, 井嶋翔吾, 北愛里紗, 三浦倫寛, 佐藤吏紗, 宮島真貴, 千見寺貴子, 全身性エリテマトーデスの皮膚病態と再生に関わる老化表皮幹細胞, 第 22 回日本再生医療学会総会, 国立京都国際会館, 2023 年 3 月.

[ポスター発表]

1. **Yamamoto S**, Saito Y, Sato T, Nakano S, Kasseki D, Nagao A, Miura N, Nagaoka K, Kita A, Miyajima M, Ijima S, Taniguchi K, Niida A, Chikenji T, Orchestration of skin pathology in systemic lupus erythematosus by HLA-I down-regulated senescent epidermal basal cells, Regen Rehab '25, Chicago, US, November 2025.
2. **山本瀬菜**, 齋藤悠城, 中野世那, 佐藤吏紗, 三浦倫寛, 長岡賢太郎, 北愛里紗, 宮島真貴, 井嶋翔吾, 谷口浩二, 新井田厚司, 千見寺貴子, 細胞老化随伴

分泌現象は全身性エリテマトーデスにおける表皮細胞の免疫原性を高める, 第 45 回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2024 年 7 月.

3. **Yamamoto S**, Saito Y, Sato T, Miura N, Nagaoka K, Iwamoto T, Miyajima M, Kita A, Chikenji TS, Cellular Senescence in Epidermal Stem Cells as a Potential Driver of Lupus Erythematosus Skin Lesions, Cell Bio 2023, the joint meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB) and European Molecular Biology Organization (EMBO), Boston, US, December 2023.
4. **山本瀬菜**, 齋藤悠城, 井嶋翔吾, 北愛里紗, 三浦倫寛, 佐藤吏紗, 宮島真貴, 千見寺貴子, 全身性エリテマトーデス皮膚炎における老化細胞の役割とシングルセル解析による病態解明, 第 44 回日本炎症・再生医学会, 大阪, 2023 年 7 月.
5. **山本瀬菜**, 齋藤悠城, 井嶋翔吾, 北愛里紗, 三浦倫寛, 佐藤吏紗, 宮島真貴, 藤宮峯子, 千見寺貴子, フィセチンによる老化細胞除去は MRL/lpr マウスのエリテマトーデス様皮膚病変を改善する, 第 43 回日本炎症・再生医学会, 淡路, 2022 年 7 月.
6. **Yamamoto S**, Saito Y, Ijima S, Kita A, Miura N, Sato T, Miyajima M, Fujimiya M, Chikenji TS, Senolysis by fisetin ameliorates lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice, The 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference, Osaka, Japan, December 2021.

その他の業績一覧

[学術論文]

1. Saito Y, **Yamamoto S**, Chikenji TS. Role of cellular senescence in inflammation and regeneration. *Inflammation and Regeneration*, 2024, DOI: 10.1186/s41232-024-00342-5.
2. Kita A, **Yamamoto S**, Saito Y, Chikenji TS. Cellular senescence and wound healing in aged and diabetic skin, *Frontiers in Physiology*, 2024, DOI: 10.3389/fphys.2024.1344116.
3. Ijima S, Saito Y, **Yamamoto S**, Nagaoka K, Iwamoto T, Kita A, Miyajima M, Sato T, Miyazaki A, Chikenji TS. Senescence-associated secretory phenotypes in mesenchymal cells contribute to cytotoxic immune response in oral lichen planus. *Immunity & Ageing*, 2023, DOI: 10.1186/s12979-023-00400-5.
4. Ijima S, Saito Y, Nagaoka K, **Yamamoto S**, Sato T, Miura N, Iwamoto T, Miyajima M, Chikenji T. Fisetin reduces the senescent tubular epithelial cell burden and also inhibits proliferative fibroblasts in murine lupus nephritis, *Frontiers in Immunology*, 2022, DOI: 10.3389/fimmu.2022.960601.

5. Saito Y, Miyajima M, **Yamamoto S**, Miura N, Sato T, Kita A, Ijima S, Fujimiya M, Chikenji T. Intrathecal injection of mesenchymal stromal cells cultured on 3D fiber ameliorates multiple organ damage in murine lupus, *Stem Cells Translational Medicine*, 2022, DOI: 10.1093/stcltm/szac021.
6. Kita A, Saito Y, Miura N, Miyajima M, **Yamamoto S**, Sato T, Yotsuyanagi T, Fujimiya M, Chikenji T. Altered regulation of mesenchymal cell senescence in adipose tissue promotes pathological changes associated with diabetic wound healing, *Communications Biology*, 2022, DOI: 10.1038/s42003-022-03266-3.
7. Saito Y, Miyajima M, **Yamamoto S**, Sato T, Miura N, Fujimiya M, Chikenji T. Accumulation of Senescent Neural Cells in Murine Lupus With Depression-Like Behavior, *Frontiers in Immunology*, 2021, DOI: 10.3389/fimmu.2021.692321.

[学会発表（口述発表）]

1. Nagao A, Saito Y, Sato T, Ueda N, **Yamamoto S**, Kasseki D, Yokouchi M, Ota K, Miyajima M, Chikenji T, Depression leads to the downregulation of cellular senescence-associated genes and alteration of cell-to-cell signaling, Regen Rehab '25, Chicago, US, November 2025.
2. 佐藤吏紗, 宮島真貴, **山本瀬菜**, 横内美結, 葛石大入, 長尾彩花, 太田克法, 齋藤悠城, 千見寺貴子, 母体免疫活性による仔マウスの細胞老化がシナプス形成異常とミクログリアの食食機能不全に関与する, 第 98 回日本生化学会大会, 京都, 2025 年 11 月.
3. 長尾彩花, 上田直弘, 佐藤吏紗, **山本瀬菜**, 葛石大入, 横内美結, 太田克法, 宮島真貴, 齋藤悠城, 千見寺貴子, うつ病病態における細胞老化関連遺伝子の低下と細胞間コミュニケーションの変化, 第 98 回日本生化学会大会, 京都, 2025 年 11 月.
4. **Yamamoto S**, Evans CH, Ambrosio F, Iijima H. Defining Hormonally Regulated Cell-cell Interactions In Osteoarthritic Cartilage At The Resolution Of Single Cells, 18th International Cartilage Repair Society (ICRS), Boston, US, October 2025.
5. Saito Y, Miura N, **Yamamoto S**, Sato T, Nagaoka K, Iwamoto T, Miyajima M, Kita A, Chikenji TS, Exercise-induced senescence-like gene signature in fibro/adipogenic progenitors is impaired in diabetes muscle, Cell Bio 2023, the joint meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB) and European Molecular Biology Organization (EMBO), Boston, US, December 2023.
6. 佐藤吏紗, 齋藤悠城, 宮島真貴, **山本瀬菜**, 三浦倫寛, 藤宮峯子, 千見寺貴子, 海馬における細胞老化は神経新生を促進して慢性ストレス誘発性うつ様症状に抵抗する, 第 22 回日本再生医療学会総会, 国立京都国際会館, 2023 年 3 月.

7. Saito Y, Miyajima M, **Yamamoto S**, Sato T, Miura N, Fujimiya M, Chikenji TS, Fisetin improved depressive behavior in murine lupus by decreasing senescent neural cell, The 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference, Osaka, Japan, December 2021.

[学会発表（ポスター発表）]

1. Kasseki D, Saito Y, Ota K, Ueda N, Sato T, **Yamamoto S**, Yokouchi M, Nagao A, Miyajima M, Chikenji T, Exercise-Induced Senescence-Associated Gene Signature Attenuate in Fibro/Adipogenic Progenitors of Diabetic Skeletal Muscle, Regen Rehab '25, Chicago, US, November 2025.
2. Ota K, Saito Y, Kasseki D, **Yamamoto S**, Sato T, Ueda N, Yokouchi M, Nagao A, Miyajima M, Chikenji T, Senescent fibroblasts contribute to arthritis flares in rheumatoid arthritis, Regen Rehab '25, Chicago, US, November 2025.
3. 葛石大入, 齋藤悠城, 宮島真貴, 佐藤吏紗, **山本瀬菜**, 横内美結, 太田克法, 長尾彩花, 上田直弘, 千見寺貴子, 糖尿病における骨格筋間葉系前駆細胞の運動応答特性の変化, 第 98 回日本生化学会大会, 京都, 2025 年 11 月.
4. 横内美結, 齋藤悠城, **山本瀬菜**, 葛石大入, 太田克法, 佐藤吏紗, 長尾彩花, 千見寺貴子, RNA-seq 解析を用いた老化細胞におけるメカノトランスダクション関連遺伝子の同定, 第 98 回日本生化学会大会, 京都, 2025 年 11 月.
5. 太田克法, 葛石大入, **山本瀬菜**, 佐藤吏紗, 上田直弘, 横内美結, 長尾彩花, 宮島真貴, 齋藤悠城, 千見寺貴子, 関節リウマチにおける関節炎の再燃に老化細胞が関与する, 第 98 回日本生化学会大会, 京都, 2025 年 11 月.
6. Kasseki D, Saito Y, Miyajima M, Sato T, **Yamamoto S**, Yokouchi M, Ota K, Nagao A, Ueda N, Chikenji T, Characterization of Exercise-Induced Responses in Fibro/Adipogenic Progenitors of Diabetic Skeletal Muscle, 7th FHS International Conference, Sapporo, Japan, October 2025.
7. Yokouchi M, Saito Y, **Yamamoto S**, Kasseki D, Ota K, Sato T, Nagao A, Chikenji T, Identification of mechanotransduction-related genes in senescent cells using RNA-seq analysis, 7th FHS International Conference, Sapporo, Japan, October 2025.
8. Ota K, Kasseki D, **Yamamoto S**, Sato T, Ueda N, Yokouchi M, Nagao A, Miyajima M, Saito Y, Chikenji T, Senescent cells contribute to arthritis flares in rheumatoid arthritis, 7th FHS International Conference, Sapporo, Japan, October 2025.
9. Nagao A, Ueda N, Sato T, **Yamamoto S**, Kasseki D, Yokouchi M, Ota K, Miyajima M, Saito Y, Chikenji T, Depression involves downregulation of cellular

senescence-associated genes and alteration of intercellular communication, 7th FHS International Conference, Sapporo, Japan, October 2025.

10. 葛石大入, 齋藤悠城, 宮島真貴, 佐藤吏紗, 山本瀬菜, 太田克法, 長尾彩花, 千見寺貴子, 糖尿病骨格筋における間葉系前駆細胞の運動応答, 第 11 回日本筋学会学術集会, 宮城, 2024 年 8 月.
11. 葛石大入, 松本陽太, 宮島真貴, 佐藤吏紗, 山本瀬菜, 齋藤悠城, 千見寺貴子, 関節リウマチにおける老化細胞の同定と老化細胞除去による滑膜炎の抑制, 第 46 回日本炎症・再生医学会, 京都, 2024 年 7 月.
12. 葛石大入, 齋藤悠城, 宮島真貴, 佐藤吏紗, 山本瀬菜, 千見寺貴子, 運動による間葉系前駆細胞の老化関連遺伝子シグネチャーは糖尿病骨格筋で減弱する, 第 46 回日本炎症・再生医学会, 京都, 2024 年 7 月.
13. 長尾彩花, 齋藤悠城, 佐藤吏紗, 山本瀬菜, 葛石大入, 横内美結, 宮島真貴, 千見寺貴子, うつ病およびモデルマウスにおける細胞老化関連遺伝子発現の変化, 第 46 回日本炎症・再生医学会, 京都, 2024 年 7 月.
14. Kasseki D, Saito Y, Yamamoto S, Chikenji TS, Effects of Mechanical Stress and Hyperglycemia on Senescence in Skeletal Muscle, 12th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society Joint with Korean Association of Immunologists International Meeting 2024, Seoul, Korea, October 2024.
15. Miyajima M, Saito Y, Sato T, Yamamoto S, Yokouchi M, Tomaru U, Ishizu A, Chikenji TS, Senescent Neural Progenitor Cells Increased Neurite Outgrowth in Mouse Model of Autism Spectrum Disorders, 12th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society Joint with Korean Association of Immunologists International Meeting 2024, Seoul, Korea, October 2024.
16. Sato T, Saito Y, Yamamoto S, Miura N, Miyajima M, Chikenji TS, Cellular Senescence in the Hippocampus Regulates Resilience to Chronic Stress by Secreting Neurogenic/Protective Factors, 12th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society Joint with Korean Association of Immunologists International Meeting 2024, Seoul, Korea, October 2024.
17. Yamamoto K, Yamamoto S, Kita A, Ueda N, Yotsuyanagi T, Saito Y, Chikenji TS, Identification of TGFB1-upregulated senescent fibroblasts in keloids, 12th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society Joint with Korean Association of Immunologists International Meeting 2024, Seoul, Korea, October 2024.
18. Ueda N, Saito Y, Yamamoto S, Kita A, Yotsuyanagi T, Chikenji TS, Characterization of healer-specific senescent fibroblasts in diabetic foot ulcer by single-cell RNA-seq analysis, 12th Annual Meeting of the International Cytokine &

Interferon Society Joint with Korean Association of Immunologists International Meeting 2024, Seoul, Korea, October 2024.

19. 山本花練, 山本瀬菜, 北愛里紗, 齋藤悠城, 千見寺貴子, ケロイドで増加する TGFB1 を高発現する老化線維芽細胞のシングルセル RNA-seq 解析による同定, 第 45 回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2024 年 7 月.
20. Iwamoto T, Saito Y, Yamamoto S, Nagaoka K, Murahashi Y, Teramoto A, Iba K, Yamashita T, Chikenji TS, Cellular senescence of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis model mice, Cell Bio 2023, the joint meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB) and European Molecular Biology Organization (EMBO), Boston, US, December 2023.
21. Nagaoka K, Saito Y, Ijima S, Yamamoto S, Sato T, Miura N, Iwamoto T, Miyajima M, Chikenji TS, Involvement of cellular senescence in the pathogenesis of lupus nephritis in mice, Cell Bio 2023, the joint meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB) and European Molecular Biology Organization (EMBO), Boston, US, December 2023.
22. Yamamoto K, Yamamoto S, Kita A, Saito Y, Chikenji T, Identification of TGFB1-upregulated senescent fibroblasts in keloids, 6th FHS International Conference, Sapporo, Japan, October 2023.
23. 齋藤悠城, 岩本大輝, 山本瀬菜, 宮島真貴, 村橋靖崇, 寺本篤史, 射場浩介, 山下敏彦, 千見寺貴子, 滑膜線維芽細胞の細胞老化は関節リウマチにおける炎症性組織プライミング誘導に関与する, 第 44 回日本炎症・再生医学会, 大阪, 2023 年 7 月.
24. 宮島真貴, 齋藤悠城, 佐藤吏紗, 山本瀬菜, 三浦倫寛, 千見寺貴子, 自閉スペクトラム症モデルマウスにおける神経前駆細胞の細胞老化, 第 44 回日本炎症・再生医学会, 大阪, 2023 年 7 月.
25. 長岡賢太郎, 齋藤悠城, 井嶋翔吾, 山本瀬菜, 佐藤吏紗, 三浦倫寛, 岩本大輝, 宮島真貴, 千見寺貴子, 老化細胞除去薬フィセチンが尿細管細胞の細胞老化と腎再生に与える影響, 第 22 回日本再生医療学会総会, 国立京都国際会館, 2023 年 3 月.
26. 齋藤悠城, 宮島真貴, 山本瀬菜, 三浦倫寛, 佐藤吏紗, 北愛里紗, 井嶋翔吾, 藤宮峯子, 千見寺貴子, 全身性エリテマトーデスモデルマウスにおける骨髄神経障害は多臓器障害を悪化させる, 第 43 回日本炎症・再生医学会, 淡路, 2022 年 7 月.
27. Sato T, Saito Y, Miyajima M, Yamamoto S, Miura N, Fujimiya M, Chikenji TS, Altered regulation of senescence-associated secretory phenotype in hippocampus

- modulates resilience to chronic mild psychiatric stress, The 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference, Osaka, Japan, December 2021.
28. Miura N, Saito Y, Kita A, Miyajima M, Sato T, **Yamamoto S**, Fujimiya M, Chikenji TS, Lower-expression of Cdkn2a is associated with dysregulation of fibro-adipogenic progenitors results in skeletal muscle atrophy and degeneration in diabetic mice, The 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference, Osaka, Japan, December 2021.
 29. Miyajima M, Saito Y, Sato T, Miura N, **Yamamoto S**, Fujimiya M, Chikenji TS, Accumulation of senescent neurons in mice model of autism spectrum disorder with abnormal synaptic pruning, The 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference, Osaka, Japan, December 2021.
 30. Kita A, Saito Y, Miura N, **Yamamoto S**, Sato T, Yotsuyanagi T, Fujimiya M, Chikenji TS, Diabetic wound impaired injury-induced transient senescence in adipose tissue that promotes the normal wound healing process, The 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference, Osaka, Japan, December 2021.

受賞

1. 北海道大学大学院保健科学院修士課程研究発表賞 (Best Presentation Award), 北海道大学大学院保健科学院, 2023/3.
2. ICIS Travel Award, 12th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society Joint with Korean Association of Immunologists International Meeting 2024, 2024/7.
3. 若手優秀発表賞, 第 97 回日本生化学会大会, 2024/11.

その他

1. 国立研究開発法人 科学技術振興機構 次世代研究者挑戦的研究プログラム, (2023/4 – 2024/3) .
2. 日本学術振興会 特別研究員 DC2 (2024/4 - 2026/3).
3. 海外学会等出席研究交流助成, 伊藤医薬学術交流財団, (2024/5 受賞通知) .