

201229037A

厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

免疫疾患におけるT細胞サブセットの機能異常と
その修復法の開発

平成24年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 山本一彦

平成25(2013)年3月

目 次

I. 総括研究報告書	1
「免疫疾患におけるT細胞サブセットの機能異常とその修復法の開発に関する研究」	
研究代表者 山本 一彦	
II. 研究分担報告	
「健常人T細胞サブセット分離法の確立と各種治療薬の整備に関する研究」	5
東京大学 大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ学 山本 一彦	
「全身性エリテマトーデス患者T細胞におけるRasGRP1および関連分子に関する研究」	7
北海道大学 大学院医学研究科 免疫・代謝内科学 保田 晋助	
「T細胞高発現分子Annexin-A1及びHC gp-39によるTサブセット調節機構と関節炎増悪メカニズムに関する研究」	10
筑波大学 医学医療系内科 膠原病・リウマチ・アレルギー 松本 功	
「発症早期関節リウマチの末梢血におけるTh1細胞, Th17細胞の定量」	13
東京女子医科大学 膠原病リウマチ痛風センター、膠原病リウマチ内科 小竹 茂	
「全身性エリテマトーデス(SLE)におけるCD4 ⁺ Foxp3 ⁺ T細胞の異常に関する研究」	15
慶應義塾大学 医学部リウマチ内科 桑名 正隆	
「関節炎のT細胞サブセット異常におけるPI3キナーゼの関与と阻害薬によるその修復に関する研究」	18
順天堂大学 医学部 膠原病内科 田村 直人	
「multicolor FACSによるT細胞サブセットの解析方法の確立：免疫不全症における免疫細胞亜群の解析」	22
東京医科歯科大学 大学院 発生発達病態学分野 森尾 友宏	

「 CTLA-4 Ig(アバタセプト)の CD8T 細胞依存性多発性筋炎モデルへの 非臨床試験に関する研究 」	25
東京医科歯科大学 医学部医学科 上阪 等	
「 ヒト免疫疾患における LAG3 陽性制御性 T 細胞に対する研究に関する研究 」	27
東京大学 医学部付属病院 アレルギー・リウマチ内科 藤尾 圭志	
「 免疫疾患における樹状細胞-濾胞性ヘルパーT細胞-B細胞軸の異常の解明と治療法の開発に 関する研究 」	30
産業医科大学 医学部第1内科学講座 内科学・膠原病学・臨床免疫学 田中 良哉	
「 全身性エリテマトーデスにおける制御性 T 細胞に与える Calcium/calmodulin dependent kinase type IV の役割に関する研究 」	33
長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻 展開医療科学講座 川上 純	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37

I. 総括研究報告

免疫疾患におけるT細胞サブセットの機能異常とその修復法の開発に関する研究

(研究代表者)

山本 一彦 東京大学大学院医学系研究内科学専攻アレルギー・リウマチ学 教授

(研究分担者)

保田 晋助 北海道大学大学院医学研究科 免疫・代謝内科学 講師

松本 功 筑波大学医学医療系内科膠原病・リウマチ・アレルギー 准教授

小竹 茂 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター内科 准教授

桑名 正隆 慶應義塾大学リウマチ内科 准教授

田村 直人 順天堂大学膠原病科 准教授

森尾 友宏 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学 准教授

上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 准教授

藤尾 圭志 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ学 特任講師

田中 良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

川上 純 長崎大学第一内科 教授

研究要旨

マウスを中心とした動物モデルでの知見はヒトの免疫学に直接的に応用できない。ヒトの免疫系は多くの点でマウスの免疫系と似ているが、細部については差異がある。しかし、分析の困難さから、マウスの免疫システムの理解と比べヒトの免疫系の理解は十分でない。これらのことからヒト免疫学の充実が提唱されている。そこで、本研究では、獲得免疫の中心であるT細胞に焦点をあて、ヘルパー型T細胞、制御性T細胞などの機能的サブセットおよびその亜集団をヒトでどのように把握するか、各疾患でどのような異常が起こっているか、それを修復するにはどのような方向の治療が考えられるかなどについて、内科、小児科の研究者が疾患横断的に研究を進めることを目的とした。平成24年度は、ヒトの各T細胞サブセットの検出、自然免疫系の影響や各疾患における遺伝子発現の検出、機能異常の検出、各種治療薬の影響の検出などの多くの方法論や情報を共有し研究成果について議論を進めた。

A. 研究目的

現在の免疫学の研究はモデル動物のマウスを中心に目覚ましい進展を遂げており、それにより次々に新しい分子、細胞などが明らかになっている。これらの情報をもとに、免疫が関与する疾患では、サイトカイン阻害を中心とした生物学的製剤の開発が進展している。これらは実際に有効であり重要な治療法であるが、サイトカインなどの抑制だけで疾患の根本的な制御は難しい。多くの動物モデルの研究から、免疫疾患の病態には自然免疫の影響を受けながら最終的には獲得免疫系のT細胞を中心としたリンパ球が大きく関与していることが示されている。しかし、実際のヒトの疾患

ではリンパ球がどのような役割を果たしているのか明確に把握できていないのが現状である。

これに関しては、マウスを中心とした動物モデルでの知見がヒトの免疫学に直接的に応用できないことが最大の問題点となっている。ヒトの免疫系は多くの点でマウスの免疫系と似ているが、細部については差異がみられる。例えば、制御性T細胞の表面マーカーもマウスと同じではない。従って、これらの新しい情報を的確に把握しつつ、それらを用いて解析を進める必要がある。しかし、分析の困難さから、マウスの免疫システムの理解と比べヒトの免疫系の理解は十分でない。これらのことからヒト免疫学の充実が提唱されており、

諸外国では積極的な研究が開始されているが、我が国での具体的な取組はほとんどない。

すなわち、多くのヒト免疫システムの知見を集積して、各疾患の病態をより正確に把握し、それらを如何に修復するかの研究の推進が必要である。また、マウスの免疫システムの知見に立脚して開発された従来の治療薬や現在開発中の治療薬が、ヒトの免疫担当細胞に本当に期待されているような作用を発揮しているのか、予想外の作用はないのか、などに関する検討はほとんどされていない。疾患制御を目的として使われている免疫抑制薬が、実はヒト制御性 T 細胞を選択的に阻害しているというデータも指摘され始めている。

本研究の目的は、獲得免疫の中心であり免疫応答を増強したり制御する T 細胞に焦点を当て、その機能的サブセットを末梢血リンパ球を中心としたヒトサンプルでどのように把握するか、健康人集団と比較して各疾患でどのような異常が起こり病態形成に繋がるのか、それを修復するにはどうしたら良いか、などを各分担研究者間で情報交換を行いながら横断的に検討することである。

B. 研究方法

平成 24 年度には複数の研究会を開催し、共通の方法論の採用などの議論を行い、平成 25、26 年度にはこれらを継続させながら、成果に関する議論を進めていくことを予定している。研究代表者の山本は、各研究者が使うヘルパー型 T 細胞、キラー型 T 細胞、制御性 T 細胞などの T 細胞サブセットおよびそのナイーブ、メモリーなどの亜集団の分離・解析法に関して、Human Immunology Project Consortium (HIPC) の標準化法 (Nat Rev Immunol. 12:191, 2012) を参照しながら、健康人サンプルでの標準的な方法を試行し、スタンダードな方法として提示すること、各種治療薬の供給に関しての交渉などを通して、共通に使える試薬の整備などを行った。

森尾分担研究者は、単一遺伝子異常による原発性免疫不全症における自己免疫疾患の発症機構とヘルパー T 細胞 (Th) サブセットの関与に関する研究を進める為、10 カラー FACS を用いた解析を行った。病態形成の主役であるヘルパー型 T 細胞に関しては、小竹分担研究者は、発症早期関

節炎で未治療の患者の末梢血、関節液、滑膜組織におけるヘルパー T 細胞 (Th1, Th17) を解析した。保田分担研究者は、T 細胞の分化に重要であるが一部の膠原病患者 T 細胞で発現が低下している RasGRP1 蛋白に注目して研究を進めた。特に自己免疫疾患の T 細胞における RasGRP1 の発現を検討し、RasGRP1 のスプライス異常にかかわる可能性のある SF2, SRSF2 (SC35) を含め、その制御による疾患のコントロールを目指した。松本分担研究者は、動物モデルの関節炎発症早期の脾臓と関節リウマチ (RA) 患者 CD4 陽性 T 細胞に共通して高発現が認められる Annexin-A1, Hcgp39 に着目し、これらによる T 細胞サブセット調節機構と自己免疫病態への関連を検討した。田村分担研究者は、RA の T 細胞サブセット機能異常における PI3 キナーゼ経路の関与および阻害薬によるその是正について検討した。田中分担研究者は、全身性エリテマトーデス (SLE) など膠原病患者の B 細胞の抗体産生を誘導する濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh) の分化と機能の異常を解明した。

病態形成を抑制する制御性 T 細胞に関しては、桑名分担研究者は、SLE を含む各種自己免疫疾患における FoxP3 陽性 CD4 陽性 T 細胞の病態との関わりを追究した。川上分担研究者は、SLE における Calcium/Calmodulin dependent Kinase type IV (CaMKIV) の制御性 T 細胞および Th17 細胞の制御機能について研究した。藤尾分担研究者は、独自に見出した新規 LAG3 陽性制御性 T 細胞について、各種のヒト疾患の末梢血の LAG3 陽性制御性 T 細胞を FACS で解析、ソーティングで回収し遺伝子発現や機能を評価した。上阪分担研究者は、CD4 陽性のヘルパー型 T 細胞と対照的に、世界的に研究が遅れている CD8 陽性キラー T 細胞サブセットに焦点を当て、分化・活性化と機能発現の機序を解明した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノムの収集ならびに情報の提供およびヒト末梢血の解析については、各施設の倫理委員会の承諾を得、臨床検体はインフォームドコンセントのもとに収集され、個人情報漏洩のないよう管理された。個人情報を伝達しないレトロスペクティブ観察研究やアンケート調査は、連結不能・

完全匿名法とした。治験計画においてはGCP準拠とし、被験者への不利益を最小限にとどめ、被験者の得る利益を最大限にするよう配慮した。動物実験に際しては、各施設の倫理委員会により承認された実験計画書に基づいて実験を行った。

C. 研究結果

山本らは、班全体の方法論に関して、T細胞サブセットの分離方法については、統一的な見解はいまだなされていないことから、現在 Human Immunology Project Consortium (HIPC)において進められている統一的T細胞サブセット分離法を検討し、T細胞サブセット分離法を確立することを目指した。また森尾らは、10種類の抗体を組み合わせて multicolor FACS を行うことにより、約 1-2mL の血液検体を用いて naïve, memory, Th subsets, Treg, NKT, $\alpha\beta T/\gamma\delta T$, activated T などの亜群を簡便に検討可能なシステムを構築した。そのシステムを用いて、実際の免疫不全症検体を解析し、その有用性を検証した。

各分担研究者の研究に関しては、保田らは、SLE患者 T 細胞における MAP キナーゼ経路を通じた DNA の低メチル化が病態形成に深く関わっていると考えた。CD3と鎖のスプライシングを制御している代表的な SR 蛋白である SRSF1 (SF2) の低発現が RasGRP1 スプライス異常に関与し、結果的に DNA の低メチル化を来している可能性を示した。松本らは、自己反応性 T 細胞に特異的に高発現している分子の同定をめざし、GPI 誘導関節炎発症早期の脾臓及び RA 患者 CD4⁺T 細胞において高発現が認められた Annexin-A1, HC gp39 に着目し、これらによる T細胞サブセット tuning 機構と自己免疫病態への関連を検討した。

小竹らは、発症早期の RA で未治療の患者の末梢血中のヘルパーT細胞における Th1 細胞, Th17 細胞の比率をメトトレキサートの治療前後に定量した。対照疾患として変形性関節症(OA)患者末梢血を用いたところ、RA における Th17 細胞は治療前では OA と比べ有意に多く、治療により減少した。これらのことから、Th17 細胞が RA の発症早期の病態に関与している可能性が示唆された。桑名らは、CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の多様性に着目して SLE 患者末梢血 CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の病態における役割を検討した。CD4⁺細胞中の Foxp3⁺T 細胞の

比率は SLE 患者で健常人に比べて有意に増加していた。Foxp3⁺T 細胞比率は抗二本鎖 DNA 抗体価、活動性指数 SLEDAI と正の相関を、血清総補体価と負の相関を示した。同一患者の経時的な解析では、Foxp3⁺T 細胞比率は治療による疾患活動性低下に伴って減少した。また、TSDR が脱メチル化した nTreg の頻度は SLE 患者で健常人より増加し、末梢血 Foxp3⁺細胞比率と相関していた。また、健常人、SLE 患者から分離した CD4⁺Foxp3⁺T 細胞のほぼ全てが nTreg であった。

田村らは、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) は、細胞の活性化・増殖や生存をはじめ様々な基本的な細胞機能を誘導する分子であるが、ヘルパーT細胞における増殖や分化にも重要であることに注目した。動物モデルで PI3K 阻害薬によりサイトカインの産生が濃度依存的に抑制されたことから、PI3K は関節炎における T細胞増殖や病態関連サイトカインの誘導に関与していることが考えられ、現在ヒトにおいて検討中である。

藤尾らは、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 Egr2 陽性の新規制御性 T 細胞 (LAG3Treg) をマウスにおいて発見し、この LAG3Treg が IL-10 を産生するとともに B 細胞抗体産生を抑制し、その機能欠損により全身性自己免疫疾患を呈することを見出した。そこで今回、マウスで得られた知見をもとに、ヒトにおいても類似の表現型の細胞を同定し解析した。ヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞は、マウス LAG3Treg と同様に IL-10, Egr2, PD-L1 を発現していた。また試験管内で B 細胞による抗体産生を抑制する活性を示した。さらに実際の RA、SLE 患者の末梢血での CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞の割合は、健常人と比較して有意に減少していたことから、自己免疫疾患の発症に関与している可能性があると考えられた。

田中らは、B 細胞による過剰な自己抗体産生とそれを誘導する濾胞性ヘルパーT (Tfh) 細胞の活性化に着目し、健常人、RA、SLE 患者より末梢血を採取し、8カラーフローサイトメトリーを用いて、T細胞、B細胞、樹状細胞の表現型、及び患者背景との関連性を検討した。疾患活動性の高い RA 患者末梢血 CD4⁺T 細胞では、可塑性を有する Tfh 様メモリー細胞のエフェクター亜集団が存在し、その亜集団の活性化と増加による病態形成への関与やエフェクター細胞バラ

ンスの異常による治療抵抗性への関与の可能性が示唆された。

川上らは、SLEのT細胞では Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase Type IV (CaMKIV) の発現が増加し、T細胞の活性化を制御する機能があることに注目した。ヒトの正常および患者のT細胞を用い、*CAMK4* を si-RNA にて gene silencing し、FoxP3 mRNA および蛋白発現変化を観察したところ、SLE患者のT細胞では *CAMK4* の gene silencing により、FoxP3 の発現回復効果を認めたことから、SLEにおいてCaMKIVの発現増加が病態に関与している可能性が示された。

上阪らは、RAの治療として使われている CTLA-4 Ig (アバタセプト) が強力にT細胞応答を阻害し、多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM) に対しても有効とする症例報告に着目した。そこで、細胞傷害性 CD8T 細胞が筋障害の主病態である2つの多発性筋炎マウスモデルに対し、CTLA-4 Ig の非臨床試験を行い、CTLA-4 Ig が CD28-CD80/86 補助刺激阻害により筋炎モデルの筋炎を有意に改善する結果を得た。すなわち、これら筋炎モデルに対する CTLA-4 Ig の有効性は、同薬剤が CD8T 細胞応答を直接抑制することを示し、PM/DM の新規治療薬となり得る可能性を示唆すると考えられた。

D. 考察

進展しているマウスを中心とした基礎免疫学とは対照に、ヒトの免疫システムの解析は容易でなく、それが疾患の免疫学的理解の妨げになっている。欧米では、ヒト免疫学充実の重要性は以前から指摘され、巨額の研究費による免疫担当細胞の網羅的遺伝子発現のデータベース構築などが行われている。一方、我が国ではこのような動きはなく、マウスを用いた基礎免疫学での国際的なリードと比較し、ヒト免疫学の研究は個々の研究者のレベルでは優れたものがあるものの、全体として満足すべきレベルではない。

本研究組織は、このような現状を改善し今後の突破口を切り開くべく、我が国の臨床免疫学領域の第一線で研究を行い、将来を担うことが期待されている研究者を中心に構成されている。このよ

うな研究組織は我が国のヒト免疫学の1つの拠点形成への第一歩になると期待される。本研究を進めることが、我が国の疾患免疫学のさらなる進展の礎となり、新たな治療薬創出の為の直接的な情報提供、実際の治療法の開発とともに、将来的な免疫治療推進施策の拠点形成にも繋がると期待される。

E. 結論

本研究は、我が国におけるヒト免疫研究と疾患解析の研究体制の一つのモデルとなることが期待される。

F. 健康危機情報

特記事項無し

II. 研究分担報告

健常人T細胞サブセット分離法の確立と各種治療薬の整備に関する研究

研究分担者 山本一彦 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ学教授
研究協力者 住友秀次 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ学助教

研究要旨 ヒト末梢血リンパ球の解析にはフローサイトメーターを用いたT細胞サブセットの同定・分離が必須であるが、この手法については、統一的方法・基準が未だに明確になっていない。そこで我々は、現在 Human Immunology Project Consortium (HIPC) において進められている統一的T細胞サブセット分離法を検討し、その再現性などを含めてT細胞サブセットの分離・同定法を確立することを目指した。

A. 研究目的

ヒトの免疫担当細胞サブセットの分離・同定は細胞表面マーカーの発現の有無とその組み合わせを基本に行われ、解析や分離の為にフローサイトメーターが主に用いられている。しかし、現時点では各細胞サブセットの定義が国際的に標準化されていない。Human Immunology Project Consortium (HIPC) は、ヒト細胞サブセット分類の標準化を目標として検討が進められているプロジェクトである。本研究では、このプロジェクトに則り、健常人および患者T細胞サブセットを分離するための細胞表面マーカーの選択・蛍光色素の組み合わせなどについて、実際に検討して適切な方法として確立し、それを班員で共有することを目的とした。

B. 研究方法

フローサイトメーター（ベックマン・コールター社：MoFlo XPD）を用いて、HIPC の報告 [Nat Rev Immunol. (2012)12:191-200] で標準化が検討されている抗原・色素の組み合わせで細胞染色して分取・機能解析を行った。また実際の実験における問題点や改良すべき点を、ヒトT細胞染色に関する既報と併せて考察した。

(倫理面への配慮)

ヒト末梢血を解析するにあたり、匿名化操作な

ど倫理面に配慮した実験計画を作成し、東京大学医学部附属病院の院内倫理審査委員会にて承認されている[審査番号 1999-(3)]。

C. 研究結果

制御性T細胞 (Treg) 用染色にはマーカーCD25, CD4, CD127, CD45R, Live [Calcein]/Dead[EthD-1] などを用い、Tヘルパーサブセット (TH1/T_H2/T_H17) 用染色にはCXCR3, CD4, CCR6, Live[Calcein]/ Dead[EthD-1] などを用いフローサイトメーターで解析を行った。MoFlo XDP においては、Live/Dead Kit のFL1→FL2 の漏れこみ、FL3→FL4 の漏れこみや、PerCP-Cy5.5 と PE-Cy7 の分離不良など課題は残るが、組み合わせを工夫してナイーブ/制御性T細胞 (Naïve/Treg) 等細胞集団の解析を行い、細胞集団の特性が保持されていることを確認した。

D. 考察

細胞集団の特性が維持されていることから、今回の染色パターンで得た各細胞集団を分離できたと考え、サブセット分画として使用できると考えられるが、分離不良など一部解決すべき問題もある。今回得られた結果とHIPCからの情報を統合して最適な条件を確立することが必要であろう。

E. 結論

HIPC で提示された染色パターンを用いて、細胞集団を得ることができているが、分子・色素の振り分けなどで問題があることも明らかになった。今後はHIPCからの情報を統合して最適な条件を確立する必要がある。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed O W, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese. PLoS Genet. 2012;8:e1002455.
2. Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tanii H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L, Worthington J, Siminovitch KA, Lathrop M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K; Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. Nat Genet. 2012;44:511-6.
3. Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K; Kidney-infiltrating CD4+ T-cell

clones promote nephritis in lupus-prone mice. Kidney Int. 2012;82:969-79.

4. Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, Ikari K, Tsunoda T, Takahashi A, Kubo M, Taniguchi A, Matsuda F, Ohmura K, Momohara S, Mimori T, Yamanaka H, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K; Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF- κ B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. PLoS Genet. 2012;8:e1002949.
5. Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1-mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4+ T cells. Eur J Immunol. 2013;43:1063-1073.
- 6.住友秀次「最新医学」68巻3号615頁2013年

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

全身性エリテマトーデス患者 T 細胞における RasGRP1 および関連分子に関する研究

研究分担者 保田晋助 北海道大学大学院医学研究科 免疫・代謝内科学 講師
研究協力者 栗田崇史 北海道大学大学院医学研究科 免疫・代謝内科学 医員
橋本陶子 北海道大学大学院医学研究科 免疫・代謝内科学 医員

研究要旨 全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 T 細胞における MAP キナーゼ経路を通じた DNA の低メチル化は病態形成に深く関わっていると考えられる。CD3 ζ 鎖のスプライシングを制御している代表的な SR 蛋白である SRSF1 (SF2) の発現量を検討したところ、健常人と比較して SLE 患者 T 細胞では有意に低値であった。SLE 患者 T 細胞において MAP キナーゼ経路の上流に位置する RasGRP1 の発現低下やスプライスバリエントの増加が認められるが、SF2 の発現量は正常にスプライスされた RasGRP1 の発現量、さらには DNA メチル化酵素である DNMT1 の発現量と相関していた。SLE 患者 T 細胞において、SF2 の低発現が RasGRP1 スプライス異常に関与し、結果的に DNA の低メチル化を来している可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE)患者 T 細胞において CD3 ζ 鎖が低発現であり、代表的な SR 蛋白である SF2 が CD3 ζ 鎖のスプライシングを制御していることが報告された (Moulton V and Tsokos G, *J Biol Chem* 2010)。RasGRP1 は T 細胞内で Ras を活性化する細胞内シグナル蛋白であり、我々は SLE 患者末梢血 T 細胞において RasGRP1 スプライス異常の頻度が健常人と比較して高く、これに関連して蛋白レベルが低下することを報告した (Yasuda S et al, *J Immunol* 2007)。SLE 患者 T 細胞では RasGRP1 の下流である MAP キナーゼ経路の活性低下が DNA メチル化の低下に繋がると考えられている。一方 RasGRP1 は転写因子である Gfi-1 による正の制御を受けるが、Gfi-1 の発現低下は Th17 細胞の分化に重要である。本研究では、SLE 患者 T 細胞において Gfi-1, RasGRP1, MAP キナーゼ, DNMT1 経路がどの段階で異常を来しているかを明らかにし、新たな治療ターゲットを探索することを目的とする。また、健常人・SLE 患者間で SF2 の発現に相違があるかどうか、また SF2 の発現が正常にスプライシングされた RasGRP1 の発現と相関するかどうかについても検討する。

B. 研究方法

SLE 患者 45 名、関節リウマチ (RA) 患者 11 名および健常人 18 名由来の末梢血より RosetteSep human T cell enrichment cocktail (StemCell Technologies) を用いて T 細胞を単離し、RNA を抽出、RasGRP1 の上流である Gfi-1、また下流と考えられる DNMT1 の発現を検討した。また、RasGRP1 のスプライス異常にかかわる可能性のある SF2, SRSF2 (SC35)についてもその発現を検討した。RasGRP1 スプライス異常の多くは exon 11 を欠損するため、正常スプライシングによる RasGRP1 の定量には exon 10-11 接合部を認識するプローブを、スプライスバリエントも含んだトータルの RasGRP1 の定量には exon 2-3 接合部を認識するプローブを用いた。

本研究はヘルシンキ宣言および臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年 7 月 31 日改訂) を遵守して実施した。試料は被験者の個人情報とは無関係の番号を付して管理し、被験者を特定できる情報を含まないよう配慮した。

C. 研究結果

SLE 患者末梢血 T 細胞における SF2 の発現レベルは、健常人と比較して有意に低下していた ($p=0.035$, t 検定) (Fig.1)。

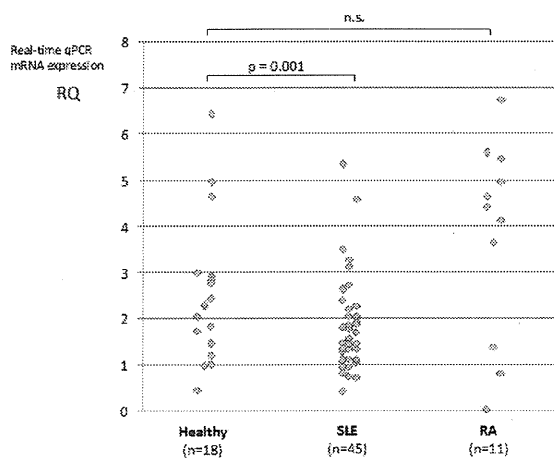


Fig.1: SF2 expression in T cells

RA患者では健康人とSF2発現レベルの差は認められなかった。SLE患者におけるSF2の発現レベルはRasGRP1 (normal form)、DNMT1の発現と強い正の相関を示し ($r=0.517, p=0.023$ [RasGRP1]; $r=0.557, p=0.013$ [DNMT1]、Pearsonの積率相関分析)、さらにRasGRP1 (normal form)とDNMT1の発現レベルにも正の相関が認められた ($r=0.564, p=0.012$) (Fig.2)。

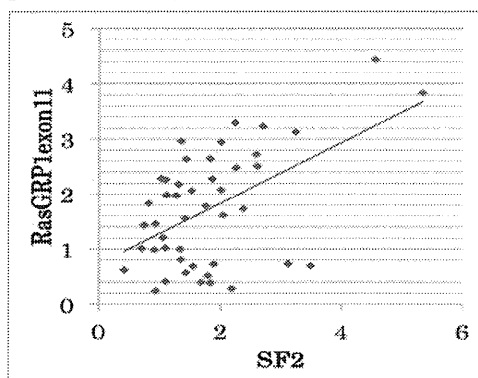


Fig.2 (A) Correlation between expression levels of SF2 and RasGRP1 (normal form) in lupus T cells

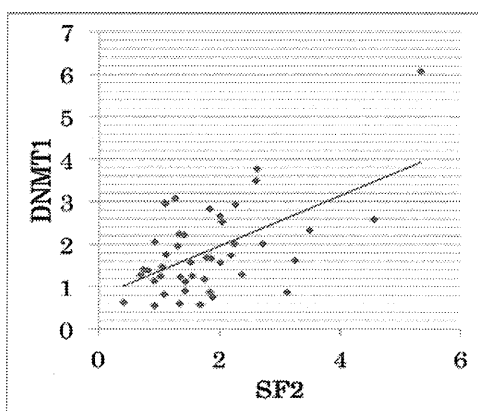


Fig.2 (B) Correlation between expression levels of SF2 and DNMT1 in lupus T cells

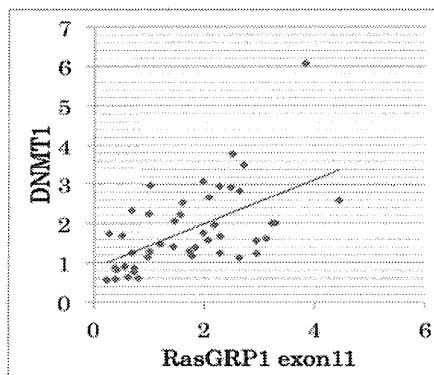


Fig.2(C) Correlation between expression levels of RasGRP1 (normal form) and DNMT1 in lupus T cells

RasGRP1 (total)、RasGRP1 (normal form)、SC35、DNMT1の発現はSLEの患者と健康人の間に差は認められなかった。

SLE患者におけるGfi-1の発現レベルは、健康人と比較して有意に亢進していた ($p=0.006$) (Fig.3)。健康人ではGfi発現レベルとRasGRP1 (normal form)の発現レベルに正の相関が認められたが ($r=0.566, p=0.012$)、SLE患者でその傾向は認められなかった (Fig. 4)。

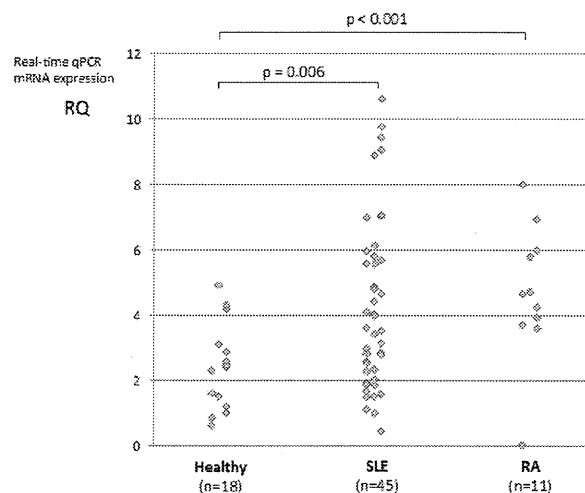


Fig.3: Gfi1 expression in T cells

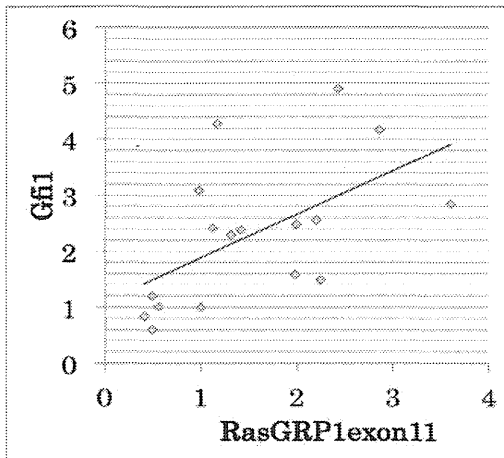


Fig.4 (A) Correlation between expression levels of Gfi1 and RasGRP1 (normal form) in T cells from healthy individuals

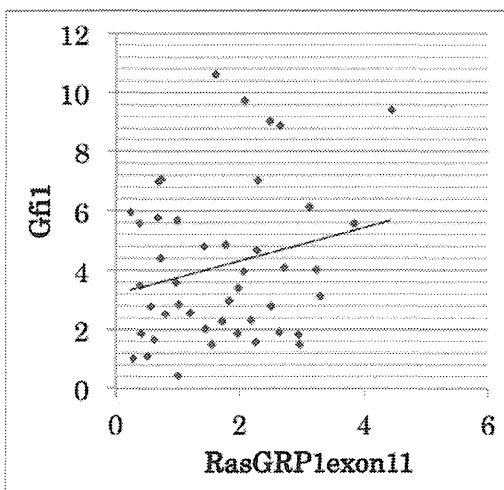


Fig.4 (B) Correlation between expression levels of Gfi1 and RasGRP1 (normal form) in T cells from SLE patients

SLE 患者における DNMT1、RasGRP1 (normal form)、Gfi の発現レベルは、いずれも疾患活動性 (抗 DNA 抗体価、SLEDAI スコア) との相関は認められなかった。

D. 考察

SLE 患者 T 細胞では Gfi1 の発現亢進が認められるにも関わらずその下流である RasGRP1 の発現は亢進しておらず、既報の RasGRP1 スプライスバリエーションの増加が、Gfi1、MAP キナーゼ経路を通じた T 細胞の機能制御に支障をきたす原因となっている可能性が考えられる。Gfi1 が miR-21 を負

にコントロールし、miR-21 が RasGRP1 の発現を負にコントロールすることがそれぞれ報告されていることから、Gfi1 による RasGRP1 の発現調整は miR-21 を介するものである可能性が考えられる。SLE 患者由来 CD4+ T 細胞では miR-21 が高発現すると報告されており、結果として Gfi1-RasGRP1 発現量の相関が消失していると考えられた。

また CD3 と鎖のスプライシングを制御する SF2 は、RasGRP1 normal form, すなわち exon 11 を含む正常な RasGRP1 の発現にも関与し、その下流シグナルである DNMT1 の発現に影響を与えることで SLE 患者 T 細胞における DNA の低メチル化を来す可能性が示唆された。今後は SF2 と RasGRP1 exon 11 の直接結合について検討する必要があるが、SF2 発現の制御が可能になれば RasGRP1、CD3 と鎖のスプライシングを正常化させることに繋がると期待される。

E. 結論

SLE 患者における SF2 の低下が RasGRP1 スプライス異常を通じて SLE の病態形成に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
未発表

2. 学会発表

2012 年日本免疫学会総会・学術集会 (神戸市)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
特記事項無

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 分担報告書

T細胞高発現分子 Annexin-A1 及び HC gp-39 による Tサブセット調節機構と
関節炎増悪メカニズムに関する研究

研究分担者 松本 功 筑波大学医学医療系内科膠原病・リウマチ・アレルギー 准教授
共同研究者 住田孝之 筑波大学医学医療系内科膠原病・リウマチ・アレルギー 教授
共同研究者 田中勇希 筑波大学医学医療系内科膠原病・リウマチ・アレルギー 大学院生

研究要旨 免疫疾患において、自己反応性 T 細胞に特異的に高発現している分子は同定されていない。GPI 誘導関節炎発症早期の脾臓及び RA 患者 CD4⁺T 細胞において高発現が認められた Annexin-A1, HC gp39 に着目し、これらによる T細胞サブセット tuning 機構と自己免疫病態への関連を検討する。HC gp39 は抗原特異的な条件での蛋白増加及び T細胞増殖抑制、また CD4⁺CD25⁺細胞分画での産生細胞増多傾向が認められたことより、GPI 誘導関節炎の慢性化制御を司っている可能性が考えられた。

A. 研究目的

HC gp-39 は関節リウマチ(RA)患者の自己抗原として知られており、RA を含む自己免疫疾患患者で血清中 HC gp-39 の上昇が報告されている。しかしながら、関節炎病態におけるこの分子の T細胞への関与や、変動、局在及び機能に関しては不明な点が多い。Glucose-6-phosphate isomerase(GPI)誘導関節炎モデルを用いて、我々はこれらの検討を行った。

B. 研究方法

- 1) GPI 誘導関節炎 (day0, 7, 14, 21, 28) 血清 HC gp-39 量を ELISA で検定した。
- 2) 脾臓及びリンパ節での HC gp-39 mRNA 発現変動を realtime PCR で測定した。
- 3) 各細胞分画(CD4, CD19, CD11b etc)に分け、脾臓での HC gp-39 発現挙動を比較検討した。
- 4) GPI 抗原特異的な HC gp-39 蛋白産生を d7 の脾臓を用いて検定した。また、各 T細胞サブセットでの HC gp-39 発現を FACS で検討した。
- 5) 2種の CD4⁺T細胞増殖応答 (CD3/28 及び抗原特異的)に対する合成ヒト HC gp-39 蛋白の影響を探索した。
- 6) 関節局所での HC gp-39 蛋白発現を免疫組織化学法及び FACS で検討した。

(倫理面への配慮)

筑波大学の医の倫理特別委員会はすでに承認済みである。

C. 研究結果

- 1) 血清 HC gp-39 は day7, 14 に有意に上昇し、day7 がピークであった。
- 2) 脾臓及びリンパ節での HC gp-39 mRNA 発現は day 7 で有意に上昇した。
- 3) CD4⁺T細胞で抗原特異的な HCgp-39 の発現上昇が認められた。CD11b⁺細胞でも発現上昇は認められたものの、コントロール蛋白免疫でも同様な発現上昇が認められた。
- 4) GPI 培養上清中の HC gp-39 蛋白産生は有意に上昇した。FACS 解析では CD4⁺細胞中の HC gp-39 陽性細胞数は Th1/2/17 での上昇はなく、CD25⁺細胞で増加する傾向が認められた。
- 5) GPI 特異的 T細胞増殖は合成 HC gp-39 を加えることにより抑制されたが、CD3/28 刺激条件下での影響は認められなかった。
- 6) 関節での HC gp-39 発現上昇は day 14 で認められた。免疫組織学的検討では分葉球にて発現上昇が強く、関節浸潤細胞の FACS 解析では CD4 以外の分画に発現上昇が強く認められた。

D. 考察

HC gp-39 は脾臓 CD4⁺T cells に GPI 誘導関節炎発症早期に発現上昇が認められ、抗原特異的な条件での蛋白増加及び T細胞増殖抑制、また CD4⁺CD25⁺細胞分画での産生細胞増多傾向が認められたことより、GPI 誘導関節炎の慢性化制御を司っている可能性が考えられた。

E. 結論

HC gp-39 は関節炎マウス脾臓 CD4⁺T 細胞に強発現し、抗原特異的免疫応答の制御に関わっている可能性が考えられた。今後は AnnexinA1 と合わせヒト疾患での検討も進めていく。

F. 健康危機情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y, *Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Minami R, Umeda N, Kanamori A, Ochiai N, Miyazawa K, Sugihara M, Hayashi T, Goto D, Ito S and Sumida T : Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4(STEAP4) is TNFalpha-induced protein that regulates IL-6, IL-8, and cell proliferation in synovium from patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol* 22:128-36,2012
2. Kondo Y, Iizuka M, Wakamatsu E, Yao Z, Tahara M, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Yoh K, Takahiashi S, Matsumoto I, and Sumida T.:Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 64:162-72, 2012
3. Tsuboi H, Nakamura Y, Iizuka M, Matsuo N, Matsumoto I, Sumida T.: Generation and functional analysis of monoclonal antibodies against the second extracellular loop of human M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Mod. Rheumatol.* 22, 264-271, 2012.
4. Tanaka Y, *Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Umeda N, Tanaka Y, Sugihara M, Hayashi T, Ito S, Sumida T: Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4(STEAP4) is expressed on monocytes/neutrophils, and is regulated by TNF antagonist in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 30:99-102, 2012
5. Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N.: Association of *PHRF1-IRF7* region polymorphism with clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Lupus* 21:890-5,2012
6. Hashizume M, Yoshida H, Tanaka K, Suzuki M, Matsumoto I, Sumida T, Mihara M. Interleukine-6 regulates anti-arthritic effect of methotrexate via the reduction of SLC19A1 expression in mouse arthritis model *Arthritis Res. Ther.* 14: R96, 2012
7. Tsuboi H, Matsuo N, Iizuka M, Tsuzuki S, Kondo Y, Tanaka A, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T. Analysis of IgG4 class switch-related molecules in IgG4-related disease. *Arthritis Res. Ther.* 14: R171, 2012
8. Inoue A, *Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Tanaka Y, Mihara M, Takahashi S, Sumida T. TIARP (TNFAIP9) deficiency leads to arthritis via IL-6 overproduction with enhanced NF-kB, STAT3 signaling and dysregulated apoptosis of macrophages. *Arthritis Rheum* 64:3877-85, 2012
9. Horikoshi M, Goto D, Seiji Segawa, Yohei Yoshiga, Keiichi Iwanami, Asuka Inoue, Yuki Tanaka, Matsumoto I, Sumida T. Activation of invariant NKT cells with glycolipid ligand \pm -galactosylceramide ameliorates glucose-6-phosphate isomerase peptide-induced arthritis. *PLoS One.* 2012;7(12):e51215
10. Suzuki T, Horikoshi M, Sugihara M, Hirota T, Ogishima H, Umeda N, Kondo Y, Tsuboi H, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Sumida T. Therapeutic efficacy of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor inhibitors: One year follow-up by low-field extremity MRI. *Mod. Rheumatol.*(in press)
11. Iizuka M, Tsuboi H, Matsuo N, Kondo Y, Asashima H, Matsui M, Matsumoto I, Sumida T. The crucial roles of IFN-g in the development of M3 muscarinic acetylcholine receptor induced Sjogren's syndrome-like sialadenitis. *Mod. Rheumatol* (in press)
12. Umeda N, *Matsumoto I, Ito I, Kawasaki A,

- Tanaka Y, Inoue A, Tanaka Y, Tsuboi H, Suzuki T, Hayashi T, Ito S, Tsuchiya N, Sumida T. Anti-citrullinated glucose-6-phosphate isomerase peptide antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with HLA-DRB1 shared epitope alleles and disease activity. Clin. Exp. Immunol. (in press)
13. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T. Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjogren's syndrome in Japanese patients. Mod. Rheumatol (in press)
14. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Shimada K, Masui T, Ikenaka T, Hashimoto A, Okazaki Y, Takaoka H, Futami H, Komiyama A, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Takasaki Y, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Suda A, Nagaoka S, Kono H, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Fukui N, Hashimoto H, Sumida T, Ono M, Tsuchiya N, Tohma S: Association of a Single Nucleotide Polymorphism in the SH2D1A Intronic Region with Systemic Lupus Erythematosus. Lupus (in press)
15. Ogishima H, Tsuboi H, Naoto Umeda, Horikoshi M, Kondo Y, Sugihara M, Suzuki T, Matsumoto I, Sumida T. Analysis of subclinical synovitis detected by ultrasonography and low-field magnetic resonance imaging in patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol(in press)
16. Grunewald TG, Bach H, Cossarizza A, Matsumoto I. The STEAP Protein Family: Versatile Oxidoreductases and Targets for Cancer Immunotherapy with Overlapping and Distinct Cellular Functions. Biol Cell. 104:641-657, 2012
2. 学会発表
1. Matsumoto I, Sumida T. Immunological mechanisms in autoimmune arthritis via ubiquitous autoantigens. International Rheumatology symposium 第56回日本リウマチ学会総会 (東京) 国際シンポジウム、4月、2012
2. 松本功、井上明日香、住田孝之 TIARP欠損による炎症性サイトカイン異常と関節炎発症機構 第56回日本リウマチ学会総会 (東京) シンポジウム、4月、2012
3. 松本功、梅田直人、土屋尚之、住田孝之 関節リウマチにおける抗シトルリン化GPI抗体 第56回日本リウマチ学会総会 (東京) シンポジウム、4月、2012
4. Matsumoto I Pathophysiology of autoimmune arthritis - From clinic to bench and vice versa-. China-Japan Rheumatology symposium、第56回日本リウマチ学会総会 (東京) 国際シンポジウム、4月、2012
5. Matsumoto I.: Autoimmune arthritis mediated by glycolytic enzyme- focusing on regulatory TNF α -induced protein- International Congress on Autoimmunology (in Granada), May 10th, 2012
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

発症早期関節リウマチの末梢血における Th1 細胞, Th17 細胞の定量

研究分担者 小竹 茂 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター内科 准教授

研究要旨： ヘルパーT細胞における Th1 細胞および Th2 細胞は、1986年の Mosmann らによる発見以来、多くの疾患の病態における関与が明らかとなっている。実際、現在 Th1 細胞、Th2 細胞は通常の検査受託会社のルーチン測定項目にもなっている。2005年には新たなヘルパーT細胞の分画として Th17 細胞が発見され、関節リウマチ (RA) の病態において Th17 細胞の関与はすでに明らかである。発症早期の RA における Th17 の関与に関する報告もある。今回、発症早期の RA で未治療の患者の末梢血中のヘルパーT細胞における Th1 細胞, Th17 細胞の比率をメトトレキサートの治療前後に定量した。対照疾患として軟骨変性疾患である変形性関節症(OA)患者末梢血における比率を定量した。RA における Th17 細胞は治療前では OA と比べ有意に多く、治療により減少した。Th17 細胞が RA の発症早期の病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) の病態においてインターロイキン 17 (IL-17) および IL-17 を産生している Th17 細胞の関与はすでに明らかである。発症早期の RA におけるこれらの関与に関する報告もある (Raza et al. 2005, Arthritis Res Ther)。今回、比較的発症早期の RA で未治療の患者の治療前後の末梢血および変形性関節症患者の末梢血におけるヘルパーT細胞における Th1 細胞, Th17 細胞の比率を定量し、RA の発症早期の病態におけるヘルパーT細胞の役割を明らかにする。

B. 研究方法

当科受診の早期 RA 患者 5 例および OA 患者 3 例の末梢血のヘルパーT細胞における Th1 細胞, Th17 の比率をプロスペクティブに、フローサイトメトリー法により定量した。RA においては治療開始前および開始後の少なくとも 2 点で測定した。Th1 細胞および Th17 細胞は細胞内の IFN γ および IL-17 の染色により同定した。治療は全例メトトレキサート (MTX) の内服であった。

抗体は以下を使用した：CD4/PC5 (Beckman Coulter), IFN γ /FITC, IL-17/AlexaFluor647 (BD Bioscience)。細胞内サイトカイン刺激は PMA+Ionomycin により行い、分泌阻害には

brefeldin A を用いた。測定機器は BD Bioscience FACS Calibur を用いた。統計解析は Wilcoxon 検定および Student's t 検定を用いた。

C. 研究結果

RA 患者 5 例および OA 患者 3 名からの末梢血のヘルパーT細胞を解析した。全例未治療であり、1 例以外は発症 1 年以内の早期 RA であった。ヘルパーT細胞における Th17 細胞の比率は OA 患者に比べ RA 患者において有意に高く ($p=0.03$)、ヘルパーT細胞における Th17 細胞の比率は治療により全例で低下した ($p=0.03$)。

一方、Th1 細胞あるいは IL-17・IFN γ の両者を産生している Th17/Th1 細胞の比率には一定の傾向は認められなかった。

D. 考察

RA の発症早期の病態においては、Th1 細胞よりも Th17 細胞の関与が重要である可能性が示唆された。今回の結果は、2005年の Raza らの報告を支持する結果であった。今後、発症のより早期例、および RA 以外の脊椎関節炎などの解析を行う予定である。

さらに、Th1 細胞および Th17 細胞の同定方法も

他の方法を試みる予定である。つまり Human Immunology Project の細胞表面抗原による同定法(Maecker et al. Nat Immunol 2012)あるいはサイトカイン分泌細胞を測定する方法 (Militenyi Biotec, Analysis of cytokine-secreting cells [MACS®]) などである。

E. 結論

発症早期 RA では、1) OA に比べ、病態において Th17 細胞の関与が示唆された。2) MTX 治療により Th17 細胞の比率が減少した。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

全身性エリテマトーデス (SLE) における CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の異常に関する研究

研究分担者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部内科 准教授

研究要旨

A. 研究目的

Foxp3 は制御性 T 細胞 (Treg) に特異的な転写因子として発見され、その分化と機能を司るマスター転写因子として知られている。近年、Foxp3⁺T 細胞の可塑性と多様性が示されている。これまで SLE 患者を対象とした Foxp3⁺Treg の検討が行われたが、再現性に乏しく一定の結論は得られていない。そこで、本年度は CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の多様性に着目して SLE 患者末梢血 CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の病態における役割を検討した。

B. 研究方法

対象はアメリカリウマチ学会の分類予備基準を満たす SLE 患者 47 例と健常人 19 例。フローサイトメトリーを用いて CD4⁺細胞中における Foxp3⁺細胞の比率 (%) を測定した。また、胸腺由来 Treg (nTreg) で選択的に脱メチル化された遺伝子領域 (TSDR) を T 細胞由来ゲノム DNA を用いたメチル化特異的 PCR により定量的に解析した。

C. 研究結果

CD4⁺細胞中の Foxp3⁺T 細胞の比率は SLE 患者で健常人に比べて有意に増加していた (平均±標準偏差: 15.4±7.3% vs 8.9±2.3%、P<0.01)。Foxp3⁺T 細胞比率は抗二本鎖 DNA 抗体価 (r=0.52、P<0.01)、SLEDAI (r=0.57、P<0.01) と正の相関を、血清総補体価 (r=0.52、P<0.01) と負の相関を示した。同一患者の経時的な解析では、Foxp3⁺T 細胞比率は治療による疾患活動性低下に伴って減少した。また、TSDR が脱メチル化した nTreg の頻度は SLE 患者で健常人より増加し (11.5±6.7% vs 4.5±3.5%、P<0.01)、末梢血 Foxp3⁺細胞比率と相関していた (r=0.52、P<0.01)。また、健常人、SLE 患者から分離した CD4⁺Foxp3⁺T 細胞のほぼ全てが nTreg であった。

D. 考察

SLE 末梢血中で Foxp3⁺T 細胞比率は増加しており、疾患活動性と正の相関がみられた。TSDR のメチル化状態を調べたところ、SLE で増加している CD4⁺Foxp3⁺細胞は一過性に Foxp3 を発現したエフェクター T 細胞や末梢で分化した誘導型 Treg でなく、胸腺由来 nTreg であった。これら nTreg は自己免疫病態を有効に抑制できないか、あるいは病態を促進している可能性が想定される。今後、SLE 活動期に増加する CD4⁺Foxp3⁺nTreg の機能解析を通じて病態における役割を追究する必要がある。

E. 結論

末梢血 CD4⁺Foxp3⁺T 細胞比率が SLE の診断、疾患活動性評価に有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

免疫システムには、過剰な応答を抑制するためのブレーキシステムが存在しており、その破綻が種々の自己免疫疾患の発症要因のひとつと想定されている。免疫制御機構のひとつに、制御性 T 細胞 (Treg) による末梢性トレランスの維持が知られている。代表的なサブセットとして胸腺由来の

CD4⁺CD25⁺内在性 Treg (nTreg) が知られており、nTreg への分化を規定するマスター遺伝子として Foxp3 が同定されている。

多くの自己免疫疾患で Foxp3⁺Treg の減少・機能低下が報告されているが、SLE 患者におけるこれまでの検討では一定の結果が得られていない。

近年、Foxp3 を発現する CD4⁺細胞は単一の細胞