

集団ではなく、nTreg、末梢誘導性 Treg、さらには活性化したエフェクターT細胞など、様々な亜集団を含む分画であることが明らかとなっており、その役割は病態毎に異なる可能性がある。そこで、本年度は CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の多様性に着目し、SLE 患者における CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞分画の異常とその病態における役割を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

アメリカリウマチ学会の分類基準を満たす SLE 患者 47 例、健常人 19 例を対象とした。SLE 患者の末梢血採取時点での臨床情報（抗 dsDNA 抗体価、白血球数、リンパ球数、ヘモグロビン、血小板数、ESR、ヘマトクリット、血清アルブミン、CRP、総補体価、血清クレアチニン、蛋白尿、SLEDAI、SLAM）は履歴的に調査した。また、SLE 患者 6 例を対象として疾患活動期と寛解期の経時的変化を検討した。

### 2. 細胞の調製

採取した末梢血は比重遠心法により末梢血単核球（PBMC）を分離し、以下の検討に用いた。一部の実験では、PBMC から磁気細胞分離により CD4<sup>+</sup>細胞を分離した。CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞は PBMC からフローサイトメトリー（FACS MoFlo XDP; Beckman Coulter）を用いて分離した。分離した細胞の純度はともに 90%以上であった。

### 3. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞比率の解析

CD4<sup>+</sup>細胞中における Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率は、PBMC を抗 CD4 抗体（clone 13B8.2; Beckman Coulter）で蛍光標識後、抗 Foxp3 抗体（clone 236A/E7; eBioscience）によって細胞内染色をおこない、フローサイトメトリー（FACS Calibur; BD Biosciences）を用いて解析した。

### 4. Treg 特異的脱メチル化領域（TSDR）の解析

分離した CD4<sup>+</sup>細胞または CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞からゲノム DNA を回収し、bisulfite 処理後にメチル化特異的定量的 PCR 法を施行した。各検体中における、TSDR がメチル化された DNA のコピー数と TSDR が脱メチル化された DNA のコピー数をもとに、TSDR が脱メチル化された細胞の比率を算

出した。

### 5. 統計学的解析

2 群間の比較と臨床情報との相関解析はそれぞれ Mann-Whitney U-test と Pearson's correlation coefficient を用いて解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は学内の倫理委員会での承認後に行った。検体採取の際には、事前に文書によるインフォームドコンセントを得た。

## C. 研究結果

### 1. 健常人と SLE 患者における CD4<sup>+</sup>細胞中の Foxp3<sup>+</sup>細胞比率の比較

CD4<sup>+</sup>細胞中における Foxp3<sup>+</sup>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）。同一患者の検体を用いた経時的な解析では、治療による疾患活動性低下に伴って CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率が減少した（r = 0.57、P < 0.01）。

### 2. SLE 患者における CD4<sup>+</sup>細胞中の Foxp3<sup>+</sup>細胞比率と臨床情報との相関関係

CD4<sup>+</sup>細胞中における Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率は抗二本鎖 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。なお、他の臨床情報との間に関連は認めなかった。

### 3. 健常人と SLE 患者における CD4<sup>+</sup>細胞中の TSDR 脱メチル化細胞比率の比較

CD4<sup>+</sup>細胞中における TSDR 脱メチル化細胞の比率は SLE 患者で健常人に比べて有意に増加していた（11.5 ± 6.7% vs 3.6 ± 1.3%、P < 0.01）。また、TSDR 脱メチル化細胞の比率は CD4<sup>+</sup>細胞中 Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率と有意に相関していた（r = 0.52、P < 0.01）。

### 4. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞における TSDR の解析

CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞と CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>細胞を分離し、TSDR 脱メチル化細胞の比率を測定したところ、健常人と同様に SLE 患者においても CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の TSDR は完全に脱メチル化されていた。一方、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>細胞の TSDR は両群ともに完全にメチル化されていた。

#### D. 考察

SLE 患者において CD4<sup>+</sup>細胞中の Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率は増加しており、疾患活動性と正の相関がみられた。この理由として、①Treg の免疫制御機能が低下し、それを代償するための増加、あるいは②CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞が Treg としてではなく、エフェクター細胞として病原性を発揮する可能性が考えられた。

また、Foxp3 遺伝子のプロモーター領域や第 1 イントロンに存在する TSDR はナイーブ T 細胞、活性化 T 細胞、末梢誘導性 Treg ではメチル化されているが、胸腺由来 nTreg では脱メチル化されている。今回の検討から、SLE 患者で増加している Foxp3<sup>+</sup>細胞は TSDR のメチル化状態から判断すると胸腺由来 nTreg に分類されることが示された。

来年度の検討課題として、SLE 患者末梢血中で増加している nTreg が正常な免疫制御能を有しているかを検討する予定である。そのためには、細胞内蛋白である Foxp3 を用いずに表面抗原のみによって nTreg 分画を分離する必要がある。しかし、SLE 患者の Foxp3<sup>+</sup>Treg は CD25 や CD45RA などの細胞表面マーカーで発現異常が報告されている。そのため、SLE 患者における CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞を特定できる細胞表面マーカーの組み合わせを探索する必要がある。

#### E. 結論

SLE 患者末梢血中で疾患活動性に一致して増加する CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞は、TSDR のメチル化状態から胸腺由来 nTreg に一致する分画であった。また、末梢血 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>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。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nishimoto T, Satoh T, Takeuchi T, Ikeda Y, and Kuwana M. Critical role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in preventing murine autoantibody-mediated thrombocytopenia. *Exp. Hematol.* 40(4): 279-289. 2012.
2. Hanaoka H, Okazaki Y, Satoh T, Kaneko Y, Yasuoka H, Seta N, and Kuwana M. Circulating anti-double-stranded DNA antibody-secreting cells in patients with systemic lupus erythematosus: a novel biomarker for disease activity. *Lupus.* 21(12): 1284-1293. 2012.

##### 2. 学会発表

1. Kuwana M: Roles of T lymphocytes in pathogenesis of Behçet's disease. 15<sup>th</sup> International Conference on Behçet's Disease (Yokohama). 2012. 7.
2. Kuwana M: CD4<sup>+</sup> T regulatory cells in ITP. 4<sup>th</sup> ICIS Expert Meeting Changes in ITP of Children and Adults (Montreux). 2012. 9.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

## 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

研究分担者 田村直人 順天堂大学医学部膠原病内科 准教授

### 研究要旨

T細胞サブセットの異常は、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) をはじめとする多くの自己免疫疾患の病態に関与している。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が明らかになりつつある。本研究では、ヒト自己免疫性疾患での解析の前段階として、アジュバント関節炎 (adjuvant-induced arthritis: AIA) ラットにPI3K阻害薬を投与し、リンパ節T細胞についての検討を行った。AIAラットにおける関節炎の発症に伴う所属リンパ節でのT細胞増加は、PI3K阻害薬投与により抑制された。また、リンパ節T細胞を *in vitro* にて刺激するとIFN $\gamma$ 、IL-17の発現が認められたが、これらはPI3K阻害薬により濃度依存的に抑制された。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。

### A. 研究目的

RAをはじめとする多くの自己免疫疾患ではTh細胞のサブセットの異常が認められ、病態形成に関与している。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、そのアイソフォームであるPI3K $\delta$ やPI3K $\gamma$ は主に免疫系細胞に発現し、炎症や自己免疫異常状態で活性化しており、治療標的分子のひとつとして考えられている。さらにPI3Kは、Th細胞の増殖や分化にも重要であることが明らかになっている。本研究は、関節リウマチなどの炎症性自己免疫性疾患のヒトT細胞サブセット異常におけるPI3Kの関与を明らかにし、PI3K阻害薬によるその是正について検討することを目的としている。今回は、その前段階として関節炎モデルラットT細胞におけるPI3Kの関連についての検討を行った。

### B. 研究方法

Lewisラットに完全フロイドアジュバントを皮下注射して関節炎を誘導した。アイソフォーム非特異的PI3K阻害薬を10日目より1日1回経口投与し、後肢の体積測定により関節炎の重症度を評価した。また、単径リンパ節におけるリンパ球数の経時的変化をフローサイトメトリーにて

解析した。また、単径リンパ節のリンパ細胞をPI3K阻害薬存在下および非存在下で *in vitro* にてマイトジェン刺激し、細胞増殖能やIL-17産生に対する影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本学に物実験計画を申請し、承認を得たうえで研究を行った。

### C. 研究結果

PI3K阻害薬はラットにおけるAIAの発症頻度および重症度を濃度依存性に抑制した。AIAラットでは、関節炎の発症に伴って単径リンパ節におけるCD4陽性T細胞の一過性の増加が認められたが、PI3K阻害薬投与群では増加が抑制されていた(図1)。また、*in vitro*における正常ラット脾細胞から採取したリンパ球をConA刺激したときの細胞増殖はPI3K阻害薬にて強く抑制され、IFN $\gamma$ 産生も濃度依存性に抑制された。さらに、AIAラット単径リンパ節から採取したリンパ球をConA刺激したときの細胞増殖およびIL-17産生は、PI3K阻害薬の添加によって抑制された(図2)。この抑制はPI3K $\delta$ 選択的阻害薬の存在下でも認められ、PI3K $\delta$ がアイソフォームとして重要であると考えられた。

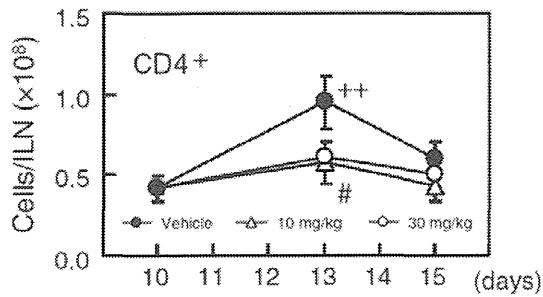


図 1. AIA ラット単径リンパ節における CD4 陽性 T 細胞数の変化

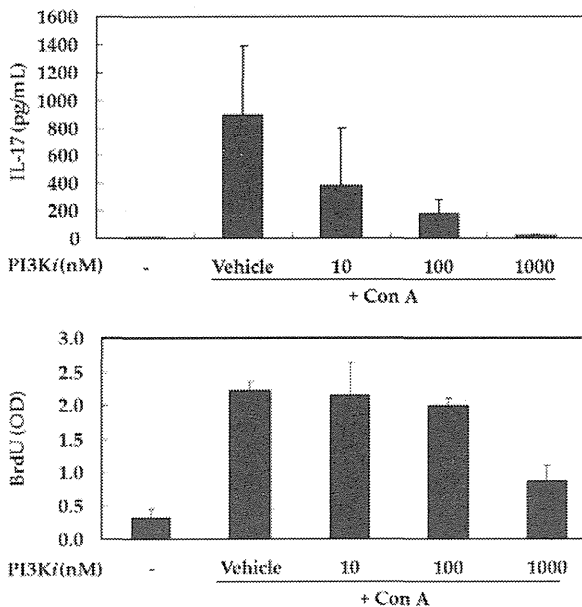


図 2. AIA ラット単径リンパ節由来リンパ球のマイトジェン刺激による増殖と IL-17 産生への PI3K 阻害薬の影響

#### D. 考察

PI3K を介した細胞内シグナル伝達は AIA のエフェクターフェーズにおける CD4 陽性 T 細胞の増殖や IL-17 などのサイトカイン産生に関与しており、この抑制が PI3K 阻害薬による抗リウマチ作用の発現に寄与している可能性が示唆された。現在、関節リウマチ患者末梢血 CD4 陽性 T 細胞における PI3K の発現、*in vitro* におけるアイソフォーム選択性および非選択制 PI3K 阻害薬の CD4 陽性 T 細胞の分化やサイトカイン産生に対する影響について検討中である。

#### E. 結論

関節炎モデルにおける PI3K 阻害による抗リウマチ作用は T 細胞調節を介している可能性があり、今後は関節リウマチ患者においてもさらなる

検討が必要である。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Ogasawara M, Tamura N, Kageyama M, Onuma S, Kusaoi M, Toyama S, Sekiya F, Matsudaira R, Nawata M, Tada K, Matsushita M, Kempe K, Amano H, Morimoto S, Yamaji K, Takasaki Y. Single-center, retrospective analysis of efficacy and safety of tacrolimus as a second-line DMARD in combination therapy and the risk factors contributing to adverse events in 115 patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 31:251-257, 2012.
- Sakai R, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Atsumi T, Koike T, Nakajima A, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Tohma S, Sugihara T, Ueki Y, Hashiramoto A, Kawakami A, Hagino N, Miyasaka N, Harigai M. Drug retention rates and relevant risk factors for drug discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving anticytokine therapy with different target molecules. *Ann Rheum Dis* 11:1820-1826, 2012.
- Sakai R, Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Nakajima A, Atsumi T, Koike T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Tohma S, Tamura N, Fujii T, Sugihara T, Kawakami A, Hagino N, Ueki Y, Hashiramoto A, Nagasaka K, Miyasaka N, Harigai M. Time-dependent increased risk for serious infection from continuous use of TNF antagonists during three years in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 8:1125-1134, 2012.
- Ogasawara M, Murayama G, Yamada Y, Nemoto T, Kageyama M, Toyama S, Kusaoi M, Onuma S, Kon T, Sekiya F, Sugimoto K, Matsudaira R, Matsushita M, Tada K, Kempe K, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Autofeedback from ultrasound images provides rapid improvement in palpation skills for

identifying joint swelling in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 6:1207-1214, 2012.

- 5) Haruta K, Mori S, Tamura N, Sasaki A, Nagamine M, Yaguchi S, Kamachi F, Enami J, Kobayashi S, Yamori T, Takasaki Y. Inhibitory effects of ZSTK474, a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, on adjuvant-induced arthritis in rats. *Inflamm Res* 61:551-562, 2012.
  - 6) 田村直人. リウマチ性疾患におけるPI3キナーゼに関する最近の知見. *日本臨床免疫学会誌* 35:8-13, 2012.
  - 7) 田村直人. 全身性エリテマトーデス. *日本医師会雑誌* 140: 2300-2304, 2012.
  - 8) 田村直人. 早期診断・早期治療, Window of opportunity. *治療* 94:207-212, 2012.
  - 9) 高崎芳成, 田村直人. PI3K 阻害薬 炎症性疾患における PI3K の関与. 炎症疾患におけるキナーゼ阻害薬の進歩. *医学のあゆみ* 240:577-582, 2012.
  - 10) 田村直人, 多田久里守. 脊椎関節炎の分子病態. *リウマチ科* 47: 130-135, 2012.
  - 11) 林絵利, 田村直人. 重複 (オーバーラップ) 症候群. *日本臨牀* 18: 540-544, 2012.
  - 12) 田村直人. リウマチ性疾患における低用量グルココルチコイド治療. *リウマチ科* 48: 64-68, 2012.
  - 13) 田村直人. 関節リウマチ (RA) : 診断と治療の進歩. 非生物学的製剤. *日内科会誌* 101:2873-2879, 2012.
  - 14) 小笠原倫大, 田村直人. 関節リウマチ治療におけるカルシニューリン阻害薬. *炎症と免疫* 6:49-54, 2012.
2. 学会発表
- 1) Matsudaira R, Tamura N, Watanabe T, Matsushita M, Ogasawara M, Yamaji K, Takasaki Y. Factors associated with normalized physical function and clinical remission defined with simplified disease activity index by 1-year infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. The European League Against Rheumatism Annual Congress 2012, Berlin, Germany, Jun 2012.
  - 2) Matsushita M, Ogasawara M, Kenpe K, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Non-invasive evaluation of pulmonary arterial hypertension in patient with connective tissue disease. The European League Against Rheumatism Annual Congress 2012, Berlin, Germany, Jun 2012.
  - 3) Kawamoto T, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Clinical study of determination of myositis-associated autoantibodies in Japanese patients with connective tissue diseases except auto-immune myositis. American College of Rheumatology 76<sup>th</sup> Annual Meeting. Washington DC, USA, Nov 2012.
  - 4) Matsushita M, Kawamoto T, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Clinical evaluation of anti-aminoacyl tRNA synthetase antibodies in Japanese patients with connective tissue diseases. American College of Rheumatology 76<sup>th</sup> Annual Meeting. Washington DC, USA, Nov 2012.
  - 5) Chiba A, Tamura N, Matsudaira R, Yamamura T, Takasaki Y, Miyake S. Mucosal-associated invariant T cells are inactivated by IFN± and reduced in systemic lupus erythematosus. American College of Rheumatology 76<sup>th</sup> Annual Meeting. Washington DC, USA, Nov 2012.
  - 6) 小笠原倫大, 村山豪, 山田祐介, 根本卓也, 景山倫彰, 頭山尚子, 草生真規雄, 今高之, 関谷文男, 杉本郁, 松平蘭, 松下雅和, 多田久里守, 建部一夫, 山路健, 田村直人, 高崎芳成. 関節超音波検査結果の自己フィードバックにより関節診察技術が向上する. 第56回日本リウマチ学会学術集会, 東京, 2012年4月26-28日.
  - 7) 土江健太郎, 小沼心, 河野晋也, 名切裕, 野澤和久, 田村直人, 高崎芳成. ステロイド治療抵抗性ループス腎炎に対するタクロリムス、ミゾリビン併用療法の治療効果. 第56回日本リウマチ学会学術集会, 東京, 2012年4月26-28日.
  - 8) 石山健太郎, 西山千春, 頭山尚子, 田村直人, 高崎芳成. 破骨細胞分化における TGF- $\beta$  シグナルと転写調節因子 PU.1. 第56回日本リウマチ学会学術集会, 東京, 2012年4月26-28日.
  - 9) 小笠原倫大, 渡邊朋子, 安藤誠一郎, 松平蘭, 山路 健, 田村直人, 高崎芳成, 梁広石, 津田 裕士, 池田圭吾, 森本真司, 関川巖, 木

- 田一成, 小林茂人, 片桐彰, 山田雅人, 小沼心, 名切裕. TCZ 観察研究-トシリズマブ治療は MTX 併用、生物学的製剤前治療歴に関わらず著明改善が期待できる. 順天堂大学附属病院関連 6 施設 80 例のレトロ解析. 第 56 回日本リウマチ学会学術集会, 東京, 2012 年 4 月 26-28 日.
- 10) 松下雅和, 山路健, 田村直人, 高 芳成. 当院における抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体の臨床的検討. 第 56 回日本リウマチ学会学術集会, 東京, 2012 年 4 月 26-28 日.
- 11) 松平蘭, 田村直人, 渡邊朋子, 渡邊崇, 関谷文男, 山路健, 高崎芳成. 関節リウマチ患者における生物学的製剤治療と <sup>2</sup>-D グルカン値についての検討. 第 56 回日本リウマチ学会学術集会. 東京, 2012 年 4 月 26-28 日.
- 12) 渡邊朋子, 松平蘭, 渡邊崇, 関谷文男, 山路健, 田村直人, 高崎芳成. 当院におけるインフリキシマブ投与期間中にみられた感染症の検討. 第 56 回日本リウマチ学会学術集会, 東京, 2012 年 4 月 26-28 日.
- 13) 小笠原倫大, 村山豪, 山田祐介, 根本卓也, 景山倫彰, 頭山尚子, 草生真規雄, 今高之, 関谷文男, 杉本郁, 松平蘭, 松下雅和, 多田久里守, 建部一夫, 山路健, 田村直人, 高崎芳成. 関節リウマチの手指・手関節のパワープラシグナルは臨床的評価項目から予測可能か? 第 56 回日本リウマチ学会学術集会, 東京, 2012 年 4 月 26-28 日.
- 14) 田村直人. 早期 RA の鑑別診断. 全身性結合組織病. 第 56 回日本リウマチ学会学術集会. 東京, 2012 年 4 月 26-28 日
- 15) 松下雅和, 河本敏雄, 山路健, 田村直人, 高崎芳成. 当院における筋炎関連自己抗体の臨床的検討. 第 23 回日本リウマチ学会関東支部学術集会, 東京, 2012 年 12 月 1 日.
- 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

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

研究分担者 森尾友宏 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 准教授  
研究協力者 今井耕輔 東京医科歯科大学・大学院・小児・周産期地域医療学講座

研究要旨

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。

A. 研究目的

ヒトT細胞亜群を表面抗原分析で高感度にまた少量の検体を用いて解析できるシステムを構築することを第一の目的とした。さらに、免疫疾患の中でも特に免疫担当細胞亜群の偏りやその機能異常が明らかとなる可能性が高い、先天性免疫不全症候群患者におけるT細胞亜群について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

Flow cytometerによるヒト免疫担当細胞サブセット解析

健常人及び当科に紹介のあった免疫不全症患者（複合型免疫不全症、分類不能型免疫不全症、高IgM症候群、高IgE症候群、慢性皮膚粘膜カンジダ症など）からEDTA-2Naあるいはヘパリン加にて採血し、EDTA採血の際はそのまま、ヘパリン加採血の場合はFicoll-Hypaque法にて単核球を分離し、下記の抗体を用いて染色し、BD Fortessa®を用いて10 color, 12 parameter解析を行った。

	488				640				405	
	FITC	PE	ECF	PC5/Cy5.5	PE-Cy7	APC	AF-700	APC-Vio770	B/PB/BV/V4	VioG/Amcyan
PBMC	CD16	CD56	CD45RA	HLA-DR	CD8	CD19	CD14	CD45RO	CD4	CD3
T subset-1	va24	vp11	CD45RA	CD62L	CD8	CD31	CCR7	CD45RO	CD4	CD3
T subset-2	TCR $\alpha\beta$	TCR $\alpha\beta$	HLA-DR	CD25	CCR4	IL-7R	CD8	CD45RO	CD4	CD3
T subset-3	CD38	CCR6	HLA-DR	CXCR5	CD8	CXCR3	-	CD45RO	CD4	CD3
B subset-1'	CD38	CD24	-	IgM	CD10	CD21	CD5	-	CD19	CD20
B subset-2'	IgD	CD27	-	IgM	-	-	-	-	CD19	-
B subset-3'	IgD	IgA	-	IgM	CD27	IgG	-	-	CD19	-
DC	Lin	CD123	HLA-DR	CD11c	CD83	CD303	-	-	-	-

(倫理面への配慮)

本研究では健常人および免疫不全症患者からの末梢血を用いて検討を行った。解析においては、最小限のサンプル量で行えるように留意し、倫理審査委

員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

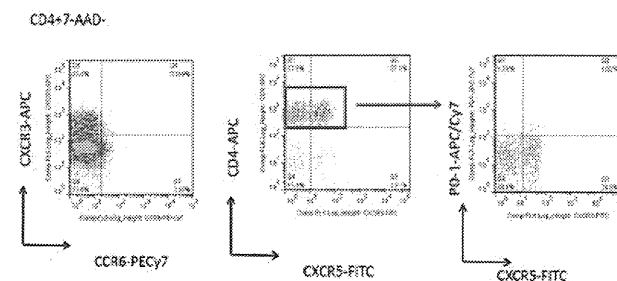
FACS解析 (T細胞亜群)

各サブセットでは以下のT細胞亜群を検出すべく蛍光色素、抗体のクローン、抗体の組み合わせを変えて検討を行った。

T subset-1: naïve(いやゆるnaïve, recent thymic emigrant: RTE CD45RA+CD31+), memory (central memory, effector memory)、NKT、及び CD4-CD8-double negative T  
T subset 2:  $\alpha\beta T, \gamma\delta T$ 、活性化T、Treg  
T subset 3: Th1, Th2, Th17, follicular helper T, CD8 regulatory T (CD8+CXCR3+)

Helper T細胞サブセットの検出に工夫を要したが、それ以外の組み合わせでは比較的容易に各サブセットを描出することができた。

下記に示すものではTh1: CXCR3+CCR6-, Th2: CXCR3-CCR6-, Th17: CXCR3-CCR6+, Tfh: CXCR5+PD-1+であるが、Th2に関してはさらにCCR4+の基準が必要である。一方TfhについてはCXCR5+に加えてPD-1などのマーカーが必要になる。



FACS解析 (それ以外)

上記に示すように、T細胞亜群以外にもB細胞亜群 (transitional, naïve, IgM memory, switched memory,

extrafollicular IgM/IgA B, plasmablast, plasma cell) 、DC細胞サブセット (pDC, mDC, activated mDC) 、NK細胞などの検出も行った。

#### D. 考察

今回の解析からT細胞の様々なサブセットが解析可能なことが明らかになった。今後はさらにCD8 regulatory Tなどの情報も収集し、Th subsetがそれぞれ特徴的なサイトカイン産生パターンを示すかの検証が必要である。特に免疫不全症患者の場合には表面抗原による亜群分類のみならず、機能的側面からの検証が必要になると思われる。

免疫不全症においては実際の診断的に有用であり、特にmemory Tの減少、ICOS欠損症、NKT細胞の消失、X連鎖リンパ増殖症候群などある程度疾患を疑わせる判断にもなる可能性がある。一方様々な自己免疫疾患や感染症の合併とT subsetの関係はこれからの検討課題である。

今回の検討ではTCR Vbeta repertoireについての解析を入れていないが、今後そのskewの解析やspectratypingによるその検証も必要となってくると思われる。

#### E. 結論

蛍光色素と抗体の組み合わせを工夫し、10 color FACS解析を行うことにより、少量の血液からT細胞亜群+B, DC, NK細胞亜群を同定することが可能になった。今後健常人や患者においてさらに解析を進め、また機能的側面との関連性を検討することにより、病態解明の一助になることが期待される。

#### F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

#### G. 研究発表

1. 学術雑誌での発表 (英文論文)
  1. Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, **Morio T**, Yachie A. Rapid Detection of Intracellular p47phox and p67phox by Flow Cytometry; Useful Screening Tests for Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol.* (in press) 2013.
  2. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm M.C., **Morio T**, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor and Ig kappa-deleting recombination excision circles. *J. Allerg. Clin. Immunol.* (in press), 2013.
  3. Shimizu M, Kanegane H, Wada T, Motoyoshi Y, **Morio T**, Candotti F, Yachie A. Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol.* **131**:587-590, 2013.
  4. Nakamura K, Du L, Tunuguntla R, Fike F, Cavalieri S, **Morio T**, Mizutani S, Brusco A, Gatti RA. Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat.* **33**:198-208, 2012.
  5. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, **Morio T**. Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nature Immunol.* **13**: 369-378, 2012.

(著書・総説)

1. 森尾友宏：先天性免疫不全症の病態と思春期以降のマネジメント  
血液内科 65 (4) 599-607,2012.
2. 森尾友宏：【サイトカインのすべて(完全改訂版)】 サイトカイン投与およびサイトカイン抑制による治療 免疫不全症  
臨床免疫・アレルギー科 57 : Suppl.21 838-844,



2012.

3. 森尾友宏：原発性免疫不全症における臨床遺伝学 T細胞系免疫異常症における遺伝子診療 日本遺伝カウンセリング 33:49-53, 2012.
4. 森尾友宏：分類不能型免疫不全症 日本臨牀 70:2011-2021, 2012.
5. 森尾友宏：分類不能型免疫不全症 Update 日本臨床免疫学会雑誌 35:14-22, 2012.

2. 学会発表

1. **Morio T.** Primary Immunodeficiencies due the Defect in Signaling Molecules.  
**2012 KSMCB Annual Meeting, Seoul, Korea.**  
October 2012.
  2. Mitsuiki N, Oshim K, Imai K, Ohara O, Morio T, Mizutani A. Genetic Analysis For 207 Cases With Primary Immunodeficiency (PID) Consulted to A Single Center Through PID Network in JAPAN (PIDJ) in 5 Years (2007-2011).  
**15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012).** Florence, Italy. October 2012.
  3. 森尾友宏：細胞内寄生菌にたいする感染防御機構、第44回日本小児感染症学会総会・学術集会、北九州、2012年11月23日
  4. 森尾友宏：先天性免疫不全症および血液系腫瘍において診断の手がかりとなる皮膚病変と、診断への道筋、第36回日本小児皮膚科学会学術大会、前橋市2012年7月15日
  5. 森尾友宏：Btk is a critical gatekeeper of neutrophil responses、**Mini-Symposium on Immune System and Primary Immunodeficiency (PID)**、東京2012年5月22日
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当無し

## 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

研究分担者 上阪 等 東京医科歯科大学医学部医学科 准教授  
研究協力者 長谷川 久紀 東京医科歯科大学医学部医学科 大学院生

研究要旨：細胞傷害性 CD8T 細胞が筋傷害の主病態である多発性筋炎 (PM) は、既存の治療に対する副作用や抵抗性のために、主病態に基づいた新規治療薬のニーズを要する難病疾患である。CTLA-4 Ig(アバタセプト)は強力に T 細胞応答を阻害することで、臨床では関節リウマチに対して治療効果を示している薬剤であり、PM/皮膚筋炎 (DM) に対しても有効とする症例報告を認めている。我々は CTLA-4 Ig の PM に対する適応拡大を目的に、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 (PM) マウスモデルに対し、CTLA-4 Ig(アバタセプト)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。これら筋炎モデルに対する CTLA-4 Ig(アバタセプト)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。

### A. 研究目的

多発性筋炎 (PM) は、高容量副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤により一定の治療成績を得られているが、ステロイドの副作用を呈する症例や治療抵抗例を依然認める難病疾患であり、病態に基づいた新規治療薬のニーズがある。複数の研究結果により、現在、PM の筋傷害の主病態は細胞傷害性 CD8T 細胞によると推定されている。CTLA-4 Ig(アバタセプト)は強力に T 細胞応答を阻害し、臨床では関節リウマチを始めとする自己免疫疾患に対して治療効果を示している。一般的に、CTLA-4 Ig は CD4T 細胞応答を抑制するが、CD8T 細胞応答は抑制しないとされている。しかしこの考えは、CTLA-4 Ig がアロ抗原反応性の CD8T 細胞の細胞傷害能を抑制できなかった結果に基づいたものである。我々の研究室では、PM のマウスモデルとして、細胞傷害性 CD8T 細胞が筋障害の主病態である C 蛋白誘導性筋炎 (CIM) と C 蛋白由来 CD8T 細胞エピソードペプチド誘導性筋炎 (pCIM) の開発に成功している。そこで我々は、CIM と pCIM に対し CTLA-4 Ig の非臨床試験を試み、その有効性の評価を通じ、CTLA-4 Ig による CD28-CD80/86 補助刺激阻害が抗原特異的な CD8T 細胞応答を抑制するか否かの検証を行うと共に、CTLA-4 Ig の PM 治療への適応拡大の可能性の検証を目的とした。

### B. 研究方法

CIM マウスに対し、i) C 蛋白免疫時から CTLA-4 Ig(アバタセプト)を投与(予防的投与)、ii) 過去に組織学的に筋炎の発症が確認されている免疫 7 日目から CTLA-4 Ig を投与(治療的投与)、iii) 免疫 7 日目から抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体を併用投与、をそれぞれ行い、免疫後 21 日目にマウスの大腿四頭筋、大腿屈筋を回収し、筋炎の程度を組織学的に点数化し評価した。対照には BSA とラット IgG を用いた。次に、C 蛋白由来 CD8T 細胞エピソードペプチドをパルスした樹状細胞 (DC) を移入して誘導性した筋炎モデル (pCIM) に対し、DC 移入時から CTLA-4 Ig を投与し、1 週間後に筋炎の程度を組織学的に点数化し評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、現段階ではヒト検体等はいないが、動物(マウス)実験を含む研究であるため、研究計画等を本学動物実験委員会に提出しており承認を得ている。

### C. 研究結果

CIM、pCIM の両実験系において、CTLA-4Ig 投与を受けたマウスの筋炎の組織学的スコアは、対照群と比べ有意に低下していた。CIM の予防的投与

群では、筋炎組織学的スコア(平均±SD)は  $0.38 \pm 0.58$  vs  $1.31 \pm 0.55$  (CTLA-4-Ig vs 対照群、 $p < 0.05$ 、マンホイットニー-U検定)であった。CIMの治療的投与群の筋炎スコアは  $0.21 \pm 0.39$  vs  $1.63 \pm 1.68$  ( $p < 0.05$ )であり、pCIMの筋炎スコアは  $0.53 \pm 0.32$  vs  $1.92 \pm 0.68$  ( $p < 0.05$ )であった。CIMに対する抗CD80/86抗体投与においても同様の結果となり、筋炎スコアは  $0.69 \pm 0.87$  vs  $2.50 \pm 1.55$  (抗CD80/86抗体 vs 対照、 $p < 0.05$ )であった。

#### D. 考察

CIMに対するCTLA-4 Ig(アバタセプト)または抗CD80/86抗体の治療的投与において筋炎の改善効果を認めたこと、更にCD8T細胞の直接的な活性化にて生じるpCIMにおいても筋炎の治療効果を認めたことは、CTLA-4 IgによるCD28-CD80/86補助刺激阻害がCD4T細胞応答抑制とは無関係に細胞傷害性CD8T細胞を直接抑制することを示した。また、これらの筋炎モデルに対するCTLA-4 Igの有効性と、実臨床においてもCTLA-4 Igが治療抵抗性のPM/皮膚筋炎(DM)患者に対して有効であったとする症例報告より、CTLA-4 Igは、自己攻撃性のCD8T細胞発症後のPMに対しても有効な治療であることが示唆される。故に、PM/DMに対するCTLA-4 Igの臨床試験を行う意義があると考えられ、現在検討中である。

#### E. 結論

CTLA-4 Igは抗原提示細胞上のCD80/86からCD4T細胞上のCD28への補助刺激シグナルだけでなく、CD8T細胞上のCD28へのシグナルも直接阻害し、PMの治療に有効と考えられる。

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Matsubara T, Yamana S, Tohma S, Takeuchi T, Kondo H, Kohsaka H, Ozaki S, Hashimoto H, Miyasaka N, Yamamoto A, Hiraoka M, Abe T. Phase I study in Japanese rheumatoid arthritis patients evaluating the safety, tolerability and efficacy of abatacept. *Mod Rheumatol* (Epub ahead of print, 2012)

##### 2. 学会発表

長谷川久紀、溝口史高、東みゆき、宮坂信之、上阪等：第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012年

長谷川久紀、溝口史高、東みゆき、宮坂信之、上阪等：第41回日本免疫学会学術集会 2012年

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

## 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

研究分担者 藤尾 圭志 東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科 特任講師  
研究協力者 住友 秀次 東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科 助教  
庄田 宏文 東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科 助教

**研究要旨** 免疫応答を抑制する制御性T細胞サブセットとしてCD4陽性CD25陽性Foxp3陽性制御性T細胞(CD25陽性Treg)が知られているが、このCD25陽性Tregは主にT細胞の免疫応答を抑制し、CD25陽性Tregを欠損すると1型糖尿病などの内分泌疾患や、腸炎、皮膚炎を呈するが、関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)とは異なる表現型となる。分担研究者らは最近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。よってLAG3TregはB細胞の免疫応答と局所の炎症を抑制する、CD25Tregと相補的な免疫寛容機構であると考えられる。本研究では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。そしてヒトCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞は、免疫不全NOGマウスにヒト末梢血単核球を移入することにより生ずるGVHDを抑制した。RA, SLE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。以上の結果からヒトCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞はマウスLAG3Tregと類似した性質を持っており、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

### A. 研究目的

免疫応答を抑制する制御性T細胞サブセットとしてCD4陽性CD25陽性Foxp3陽性制御性T細胞(CD25陽性Treg)が知られているが、このCD25陽性Tregは主にT細胞の免疫応答を抑制し、CD25陽性Tregを欠損すると1型糖尿病などの内分泌疾患や、腸炎、皮膚炎を呈するが、関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)とは異なる表現型となる。このことはCD25陽性Treg以外の免疫寛容システムの異常がRAやSLEに関与している可能性を示唆している。分担研究者らは、最近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FasとPD-L1依存性にB細胞の抗体産生を抑制し、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。よってLAG3TregはB細胞の免疫応答と局所の炎症を抑制する、CD25Tregと相補的な免疫寛容機構であると考えられる。本研究では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、その機能を解析することを目的とする。

### B. 研究方法

健常人の末梢血および扁桃腺、RA、SLE患者の末梢血において、CD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞を回収し、割合、遺伝子発現をFACSや定量PCR、マイクロアレイで解析する。またマウスCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞でみられる抗体産生抑制能・炎症抑制能について試験管内および生体内で解析する。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた研究計画については、東京大学医学部倫理審査委員会の承認を受けた。すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実施された。

### C. 研究結果

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。そしてヒトCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞は、免疫不全NOGマウスにヒト末梢血単核球を移入することにより生ずるGVHDを抑制した。RA, SLE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。

#### D. 考察

ヒトCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞はマウスLAG3Tregと類似した遺伝子発現を示し、試験管内での抗体産生抑制能および生体内での炎症抑制能を示した。RA, SLEでのヒトCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞の減少は、自己抗体の産生および疾患の発症に関与している可能性が考えられる。マウスLAG3Tregはその抑制能にPD-L1とFasを用いており、ヒトCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞が同様の抑制機構を用いているか、や病勢との関連なども今後検討していく。マウスではIL-27はCD4陽性細胞にEgr2とLAG3の発現を誘導することが判明しており、ヒトでもIL-27で同様の細胞が誘導できるかどうか検討していく。

#### E. 結論

ヒトCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞はマウスLAG3Tregと類似した制御性T細胞サブセットである。今後自己免疫疾患発症との関連の検討が重要である。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.* 71 Suppl 2:i96-100, 2012.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory T cell-mediated control of autoantibody-induced inflammation. *Front Immunol.* 3:28, 2012.

Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Kidney-infiltrating CD4+ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. *Kidney Int.* 82:969-79, 2012.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory cell subsets in the control of autoantibody production related to systemic autoimmunity. *Ann Rheum Dis.* 2012 Dec 19.

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 Jan 25.

##### 2. 学会発表

岡本明子、藤尾圭志、松本巧、岡村僚久、住友秀次、岩崎由希子、澁谷美穂子、庄田宏文、山本一彦

Tofacitinibは生体内でCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞を誘導し、試験管内でCD4陽性T細胞のEgr2発現の誘導する 第56回日本リウマチ学会学術総会 ワークショップ 平成24年4月26日

藤尾圭志、岡村僚久、住友秀次、岩崎由希子、岡本明子、松本巧、山本一彦 制御性T細胞と自己免疫 第40回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム 平成24年9月27日

岡本明子、藤尾圭志、松本巧、住友秀次、岡村僚久、山本一彦 Jak阻害薬は生体内でCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞を誘導し、試験管内でCD4陽性T細胞のEgr2発現の誘導する 第40回日本臨床免疫学会総会 ポスター発表 平成24年9月28日

Okamoto Akiko, Fujio Keishi, Ishigaki Kazuyoshi, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko. Tofacitinib induces CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells in vivo and the expression of Egr2 in CD4+ T cells in

vitro. 第 41 回日本免疫学会学術総会 平成 24  
年 12 月 6 日

**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

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

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

研究分担者 田中 良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

研究協力者 中山田 真吾 産業医科大学医学部第一内科学講座 学内講師

研究要旨 自己免疫疾患の病態形成過程では、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(T<sub>fh</sub>)細胞の活性化が重要な役割を担う。しかし、関節リウマチ(RA)などの病態形成におけるT<sub>fh</sub>細胞の分化と機能の異常は不詳である。今回、健常人、RA患者、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、DCの表現型、及び患者背景との関連性を検討した。その結果、疾患活動性の高いRA、特に無治療およびACPA陽性症例では、各サブセットの比率に変化を認めないが、全てのマーカーを中等度発現する細胞集団(CXCR3<sup>int</sup> CCR6<sup>int</sup> CXCR5<sup>int</sup>)の割合が増加していた。また、その細胞集団では、CD69などの活性化マーカーが特徴的に高発現していた。以上より、疾患活動性の高いRA患者末梢血CD4<sup>+</sup>T細胞では、可塑性を有するT<sub>fh</sub>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、及び、と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が考えられた。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)や関節リウマチ(RA)などの自己免疫疾患の病態形成過程では、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(T<sub>fh</sub>)細胞の活性化が重要な役割を担う。しかし、病態形成におけるT<sub>fh</sub>細胞の分化と機能の異常は不明である。本研究では、自己免疫疾患の病態において、樹状細胞(DC)-T<sub>fh</sub>細胞-B細胞軸を中心に、DCのシグナルがT細胞サブセットのバランス異常を介して、T<sub>fh</sub>への偏向を誘導する過程を解明すると共に、T<sub>fh</sub>の機能異常とB細胞の過剰活性化のシグナル制御による新規治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

健常人、RA患者、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(FACSVerse)を用いて、T細胞、B細胞、DCの表現型、及び患者背景との関連性を検討した。その際、特にCD4<sup>+</sup>T細胞におけるT<sub>fh</sub>細胞と他のサブセットとの表現型の重複と相違に着目した。8からの組合せは、MaeckerらのHIPC提案を参考に(Nat Rev Immunol, 2012)、さらに当科独

自の組合せを加えた。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRBで承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

C. 研究結果

(1) 健常人末梢血では、Th1細胞(CXCR3<sup>hi</sup> CXCR5<sup>neg</sup>)、Th17細胞(CCR6<sup>hi</sup> CXCR5<sup>neg</sup>)、T<sub>fh</sub>細胞(CXCR3<sup>neg</sup> CCR6<sup>neg</sup> CXCR5<sup>hi</sup>)で構成されるCD4<sup>+</sup>T細胞サブセットが検出された。(2) 疾患活動性の高いRA、特に無治療およびACPA陽性症例では、各サブセットの比率に変化を認めないが、全てのマーカーを中等度発現する細胞集団(CXCR3<sup>int</sup> CCR6<sup>int</sup> CXCR5<sup>int</sup>)の割合が増加していた。(3) その細胞集団

では、CD69 などの活性化マーカーが特徴的に高発現していた。(4) MTX 等への治療抵抗症例では、Th1 細胞 (CXCR3<sup>hi</sup> CXCR5<sup>neg</sup>)、Th17 細胞 (CCR6<sup>hi</sup> CXCR5<sup>neg</sup>)の相対的な増加を認めた。

#### D. 考察

健常人では CD4<sup>+</sup> T 細胞分画のバランスが維持されるのに対して、活動期の RA では可塑性を有する Tfh 様の活性化したエフェクター亜集団が出現し、病態形成に寄与する可能性が示唆された。現在、この細胞集団における治療前後での変化、SLE 症例での検討、DC および B 細胞でのサブセット異常との関連性を検討中である。さらに、CD4<sup>+</sup> T 細胞と DC 或いは B 細胞との共培養系にて、Tfh 細胞への可塑性を誘導するシグナルの同定と B 細胞機能への影響を検討予定である。

#### E. 結論

RA 患者末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞では、可塑性を有する Tfh 様メモリー細胞の活性化と増加による病態形成への関与、及び、と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が考えられた。今後、このようなヘルパー T 細胞サブセットのバランス破綻と機能異常を齎す細胞内外のシグナル伝達異常が特定されることで、そのシグナル制御による T 細胞サブセットのバランス異常の修復を介した新規治療法の開発が期待される。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Nakano K, Wang S-P, Akashi K, Tanaka Y. Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129, 1594-1601
2. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. B-cell or T-cell-dominant recurrence after rituximab therapy in patients with SLE. *Ann Rheum Dis*

(2012) 71, 1749-1750

3. Tanaka Y, Maeshima Y, Yamaoka K. In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, i70-i74
4. Iwata S, Saito K, Hirata S, Tanaka Y. Phenotypic changes of lymphocyte in a patients with IgG4-related disease after corticosteroid therapy. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 2058-2059
5. Tak PP, Mease PJ, Genovese MC, Kremer J, Haraoui B, Tanaka Y, Bingham III CO, Ashrafzadeh A, Travers H, Safa-Leathers S, Kumar S, Dummer W. Efficacy and safety of ocrelizumab in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to at least one TNF inhibitor: results from the phase III SCRIPT trial. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 360-370
6. Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, Tanaka Y. IL-1  $\beta$  induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt5a/Ror2 pathway. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 3355-3363
7. Maeshima K, Yamaoka K Kubo s, Nakano K, Iwata S, Saito K, Ohishi M, Miyahara H, Tanaka S, Ishi K, Yoshimatsu H, Tanaka Y. A JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of IFN- $\gamma$  and IL-17 production by human CD4<sup>+</sup> T cells. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 1790-1798
8. Tanaka Y. Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal? *Ann Rheum Dis* (in press)
9. Kameda H, Kanbe K, Sato e, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, Takeuchi T. A merged presentation of clinical and radiographic data using probability plots in a clinical trial, the JESMR study. *Ann Rheum Dis* (in press)



10. Takeuchi T, Harigai M, Tanaka Y, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Yoshinari T, Baker D, and the GO-MONO study group. Golimumab monotherapy in Japanese patients with active rheumatoid arthritis despite prior treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs: results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-MONO study through 24 weeks. *Ann Rheum Dis* (in press)
  11. van der Heijde D, Tanaka Y, Fleischmann R, Keystone E, Kremer J, Zerbini C, Cardiel MH, Cohen S, Nash P, Song YW, Tegzová D, Wyman BT, Gruben D, Benda B, Wallenstein G, Krishnaswami S, Zwillich SH, Bradley JD, Connell CA and the ORAL Scan investigators. Tofacitinib (CP-690,550) in patients with rheumatoid arthritis on methotrexate: 12 month data from a 24 month Phase 3 randomized radiographic study. *Arthritis Rheum* (in press)
  12. Tanaka Y, Harigai M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Mitasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Baker D & the GO-FORTH study group. Golimumab, a human anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody, injected subcutaneously every 4 weeks in Japanese patients with active rheumatoid arthritis in combination with methotrexate: results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-FORTH study through 24 weeks. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 817-824
  13. Sawamukai N, Satake A, Schmidt AM, Lamborn IT, Tanaka Y, Kambayashi T. Cell autonomous role of TGF $\beta$  and IL-2 receptor in CD4+ and CD8+ inducible regulatory T cell generation during graft-versus-host disease. *Blood* (2012) 119: 5575-83
  14. Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida s, Akama H, Kupper H, Aprora V, Tanaka Y. Adalimumab a human anti-TNF monoclonal antibody, outcome study for the prevention of joint damage in Japanese patients with early rheumatoid arthritis: the HOPEFUL 1 study. *Ann Rheum Dis* (in press)
2. 学会発表
    1. Y. Tanaka. The Maximization of Efficacy of Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. The 8th International Congress on Autoimmunity, Granada, Spain. May/2012
    2. Tanaka Y, Harigai M, T. Takeuchi, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Kanazawa M, Yoshinari T, Baker D, Miyasaka N, Koike T. 52-week results of clinical, radiographic and pharmacokinetic assessments: golimumab, a human anti-TNF monoclonal antibody, administered subcutaneously every four weeks in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. The Annual European Congress of Rheumatology 2012, Berlin, German, Jun/2012
    3. Y. Tanaka. Treatment of SLE with biologics. The 15th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, APLAR 2012, Dead Sea, Jordan, Sep/2012
    4. Y Tanaka, S Hirata, S Fukuyo, M Nawata, S Kubo, K Yamaoka, K Saito. Discontinuation of Adalimumab without Functional and Radiographic Damage Progression After Achieving Sustained Remission in Patients with Rheumatoid Arthritis (the HONOR study): 1-Year Results. The 78th Annual Congress of American College of Rheumatology, 2012, Washington DC, USA, Nov/2012
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
    1. 特許取得 特になし
    2. 実用新案登録 特になし
    3. その他 特になし

## 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

研究分担者 川上 純 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  
(第一内科) 教授

研究協力者 一瀬邦弘 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  
(第一内科) 助教

### 研究要旨

〈背景〉全身性エリテマトーデス(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が想定される。SLEにおける制御性T細胞は病態の制御に関与していることは報告されているが、どのように誘導、制御されているのかについては明らかにされていない。今回、我々は制御性T細胞を中心にCaMKIVの役割について検討を行った。〈方法〉ヒトの正常およびSLE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。またIL-2発現変化を介した制御性T細胞の機能についてSLEモデルマウスMRL/lpr(wild type:WT)とMRL/lpr. *camkiv*<sup>-/-</sup>を用いて検討した。〈結果〉ヒトの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。MRL/lpr. *camkiv*<sup>-/-</sup>ではT細胞におけるIL-2発現およびCD4+CD25+FoxP3+細胞populationがWTに比べて有意に増加していた。また、MRL/lpr. *camkiv*<sup>-/-</sup>のCD4+CD25+T細胞はWTに比べて有意にCD4+CD25-細胞の増殖抑制効果を認めた。〈結論〉SLEにおいてCaMKIV発現は増加しており、病態に関与していると考えられた。また、CaMKIV発現抑制により、制御性T細胞の機能が回復しSLEの進展抑制効果をもたらす可能性があることが示唆された。

### A. 研究目的

SLEにおける制御性T細胞がどのように誘導、制御されているのかについての詳細は不明な点が多い。今回、Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase Type IV(CaMKIV)を解析の中心に据え、これらを検討した。

### B. 研究方法

ヒトの正常およびSLE患者のT細胞をCD3/CD28で刺激し、si-RNAにて*CAMK4*をsilencingさせて、FoxP3 mRNAおよびタンパク発現変化を検討した。またSLEのモデルマウスMRL/lpr(wild type:WT)の*CAMK4*をgenetic deletionしたMRL/lpr. *camkiv*<sup>-/-</sup>を用いて、T細胞におけるIL-2発現やCD4+CD25+FoxP3発現、CD4+CD25+細胞のeffector T細胞の制御についてウェスタンブロットやフローサイトメトリー法で検討を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究は長崎大学臨床研究倫理委員会、ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会における「全身性エリテマトーデスの病態を多角的に解析する臨床研究」およびBeth Israel Deaconess Medical Center(BIDMC), Bostonの動物実験・倫理委員会による承認を得て、プロトコールを遵守して行った。

### C. 研究結果

ヒトのSLE患者のT細胞では*CAMK4* specific si-RNAにより、FoxP3の発現回復効果を認めた(図1)。MRL/lpr. *camkiv*<sup>-/-</sup>ではT細胞におけるIL-2発現およびCD4+CD25+FoxP3+細胞populationがWTに比べて有意に増加していた。またCD4+CD25+FoxP3発現細胞はWTでもCD4+CD25-T細胞にIL-2を添加することにより、MRL/lpr. *camkiv*<sup>-/-</sup>と同程度にまで発現が回復していた。またMRL/lpr. *camkiv*<sup>-/-</sup>のCD4+CD25+T細胞はWTに比べて有意に

CD4+CD25<sup>-</sup>細胞の増殖抑制効果を認めた (図 2)。

#### D. 考察

ヒト SLE 患者 T 細胞および MRL/*Ipr* マウスを用いた検討では、*CAMK4* deletion により制御性 T 細胞 (Treg) の発現が増加し、免疫担当細胞の活性化を制御し、SLE の進展抑制効果に關与する可能性が示唆された。その機序として *CAMK4* deletion により IL-2 発現が回復し、制御性 T 細胞を増加、活性化させていることが考えられた。

#### E. 結論

SLE において CaMKIV 発現は増加しており、病態に關与していると考えられた。また、CaMKIV 発現抑制による制御性 T 細胞を介した SLE の進展抑制効果が期待された。

#### F. 健康危険情報

特記事項無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ohyama K, Kawakami A, Tamai M, Baba M, Kishikawa N, Kuroda N. Serum immune complex containing thrombospondin-1: a novel biomarker for early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 71 (11): 1916-1917, 2012.
- 2) Koga T, Fujikawa K, Horai Y, Okada A, Kawashiri SY, Iwamoto N, Suzuki T, Nakashima Y, Tamai M, Arima K, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Ishimatsu Y, Mukae H, Kuwana M, Kohno S, Eguchi K, Aoyagi K, Kawakami A. The diagnostic utility of anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody testing for predicting the prognosis of Japanese patients with DM. *Rheumatology (Oxford).* 51 (7): 1278-1284, 2012.

##### 2. 学会発表

- 1) Ichinose K, Kawakami A, and George C. Tsokos. Inhibition of

Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV Suppresses the Autoimmunity in Lupus-Prone Mice. *American College of Rheumatology (ACR/ARHP2012).* 2012/11/10-11/14.

- 2) Ichinose K, Kawakami A, and Tsokos George. Inhibition of Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV suppresses the autoimmunity lupus-prone mice. 99<sup>th</sup> IMMUNOLOGY2012. 2012/5/4-5/8.
- 3) Iwamoto N, Vettori S, Maurer B, Brock M, Jungel A, Galgagni M, Gay R, Distler J, Gay S, Kawakami A, Distler. Downregulation of miR-193b in systemic sclerosis regulates the proliferative vasculopathy by urokinase-type plasminogen activator expression. The 15th Congress of Asia Pacific League of Associations for Rheumatology. 2012/9/10-14.
- 4) 一瀬邦弘, 川上 純. ループス腎炎のメサンギウム細胞における Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV の役割. 第 40 回日本臨床免疫学会. 2012/9/27-9/29.

#### 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

