

201322018A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業  
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野)

## 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 25 年度 総括・分担 研究報告書

研究代表者 山 本 一 彦

平成 26(2014) 年 3 月発行



## 目 次

I. 総括研究報告	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に関する研究」	
東京大学大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ学 研究代表者 山本 一彦	
II. 分担研究報告	
「関節リウマチ患者における包括的臨床免疫解析の試み」	6
東京大学大学院医学系研究科アレルギー・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」	8
北海道大学大学院医学研究科 免疫・代謝内科学 保田 晋助	
「関節炎におけるFormyl peptide receptor 2 (FPR2)発現T細胞サブセットの解析」	12
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	
「発症早期関節炎の末梢血におけるT細胞の解析 第2報」	15
東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 内科 小竹 茂	
「全身性エリテマトーデス (SLE) におけるCD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> T細胞の異常に関する研究」	16
慶應義塾大学医学部内科 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」	19
順天堂大学医学部膠原病内科 田村 直人	
「原発性免疫不全症における10カラーFACSを用いたリンパ球分画解析に関する研究」	21
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 森尾 友宏	

「 多発性筋炎/皮膚筋炎症例の末梢血リンパ球サブセット解析 」	24
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細胞に関する研究 」	26
東京大学医学部アレルギー・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 」	28
産業医科大学医学部第1内科学講座 田中 良哉	
「 全身性エリテマトーデスにおけるCD4+CD52+細胞の免疫調節に関する研究 」	32
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座 川上 純	
III. ヒトPBMC解析マニュアル	34
IV. 刊行に関する一覧	51

# 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 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 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

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ことから、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。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。これらのことから欧米を中心にヒト免疫学の充実が提唱されているが、我が国では本格的な取り組みは始まっていない。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ている。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、平成 25 年度には、実際の健常人および患者サンプルでの解析を進めた。

### A. 研究目的

本研究の目的は、獲得免疫の中心であり免疫応答をコントロールする 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、健常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、などに関して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。

現在の免疫学研究はモデル動物であるマウスを

中心に目覚ましい進展を遂げており、次々に新しい分子、細胞などが明らかになっている。しかし、マウスとヒトの免疫システムは似ているが完全に同じではない。実際に、マウスで明らかになった知見をそのままヒトの疾患研究に応用することは容易ではない。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、ヒトとマウスの新しい情報を的確に把握しつつ、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と比べ、ヒトの免疫系の解析

と理解は十分でない。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。

このような状況を踏まえ、本研究では、今までヒトの免疫疾患領域で研究を進めてきた内科、小児科の研究者が、疾患横断的にヒトの T 細胞に関して研究を進めることを目的とした。ヒトの各 T 細胞サブセットを如何に的確に検出するか、その機能を如何に解析するか、現在使用中や開発中の治療薬が試験管内や生体内で T 細胞サブセットや遺伝子発現に如何に影響を及ぼすかなど多くの解決しなければならない問題がある。これらに関して、本領域に関する我が国の第一線研究者を分担研究者として集結し、多くの方法論や情報を共有し、議論を進めていくことで、我が国におけるヒト免疫学の端緒を開くことが目的である。

## 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った。これをもとに平成 25 年にはこれらを継続させながら、研究成果に関する議論を進めた。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、健常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継続的に行った。さらに関節リウマチ(RA)の免疫学的異常と臨床像との関連を明らかにするために、またリスク遺伝子である HLA-DRB1 と免疫細胞との関連を明らかにするために、臨床所見・免疫細胞動態・HLA-DRB1 遺伝子型との関連について、包括的な検討を試みた。

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して

の研究を進める為、10カラーFACSを用いた解析を行った。具体的にはリンパ球分画を大きく見るための PBMC パネル

(CD3/4/8/19/16/56/14/HLADR)、T 細胞を詳しくみる T1, T2, T3 パネル、B 細胞分画を見る B1, B3 パネル、樹状細胞を見る DC パネル、を設定し検討した。

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 蛋白およびの下流のシグナル分子に注目して、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者と健常人末梢血を比較した。具体的には末梢血より 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 についてもその発現を検討した。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 RA 患者 CD4 陽性 T 細胞に共通して高発現が認められる Formyl peptide receptor2 (FDR2) に着目し、これらによる T 細胞サブセットと自己免疫病態への関連を検討した。健常人、シェーグレン症候群患者及び RA 患者から単離した末梢血単核球及び CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD11b<sup>+</sup>細胞における FPR2 発現を比較検討し、さらに FPR2 発現と ESR, CRP との関連を検討した。

小竹分担研究者は、病態形成の主役であるヘルパー型 T 細胞に関して、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。桑名分担研究者は病態形成を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) に関して、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の多様性に着目し、SLE 患者末梢血 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞の亜分画および病態における役割を検討した。具体的には、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞比率、Treg 特異的脱メチル化領域 (TSDR)、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の表面抗原とサイトカインを組み合わせ解析を行った。

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するため、健常人および RA 患者の末梢血から単核球を分離しアイソフォーム選択的もしくは非選択的 PI3K 阻害薬の

存在下・非存在下にて、抗CD3抗体+抗CD28抗体、あるいはPMA+ionomycinで刺激した。刺激5時間後のCD4陽性T細胞の刺激前後におけるサイトカインの発現をフローサイトメトリーにて解析した。さらに、24時間後の培養上清中サイトカイン濃度をビーズアッセイ法にて測定した。上阪分担研究者は、多発性筋炎・皮膚筋炎について、末梢血リンパ球分画異常の存在を明らかにすることを主目的とし、Flow cytometerによる解析を行った。

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。具体的には、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、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した。また臨床所見・パラメータとCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞の関連を解析した。

田中分担研究者は、SLEにおける活性化Tfh細胞、B細胞サブセットの質的異常を明らかにすることを目的とし、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、DC、T細胞、B細胞のサブセットの細分類を試み、各サブセット間および患者背景との相関を検討した。さらに、ヒト末梢血ナイーブT細胞をTCR架橋と各種サイトカイン(IL-6, IL-12, IL-21, IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ など)で分化誘導させ、ケモカイン受容体、転写因子Bcl-6、T-betなどの発現を検討した。川上分担研究者は、健常人の末梢血におけるCD52<sup>high</sup>T細胞がCD52<sup>low</sup>T細胞活性を抑制する機能を有する可能性が示唆されていることから(Nat Immunol. 2013;741-8.)、SLEにおけるCD4+CD52+細胞の免疫調節に関する役割を検討した

### C. 研究結果

山本研究代表者はPlasmablast, Tfh-Th17細胞が自己抗体産生に関係していること、CD45RA<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup>細胞が疾患活動性と相関があること、早期未治療RA患者では免疫学的異

常が顕著であることを示した。森尾分担研究者は原発性免疫不全症に関する解析を続け、原因遺伝子の同定された患者では、おおむね既報の通りであったため、疑い患者が紹介されてきたときのスクリーニング方法として、有効であることと考えた。一方、原因不明の患者が含まれているCommon variable immunodeficiency (CVID)患者でも、特徴的な分化異常を呈する患者が含まれていたため、今後、こうした患者に対して機能解析を行い、また、全exome解析の結果も組み合わせ、原因遺伝子の同定につなげていく方向性が見出された。

保田研究分担者は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られるのでCD3 $\zeta$ 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。その結果、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ーション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。

松本分担研究者は、マウスにおける抗原誘発関節炎発症早期のT細胞に高発現しているFDR2が、ヒトでもコントロールと比較しRAのCD4陽性T細胞に高発現していることを見出し、またこの細胞はTh1型の表現型であることを示した。FDR2は健常人やシェーグレン患者と比較しRA患者末梢血、特にCD4<sup>+</sup>T細胞のみで高発現を認め、さらにCD4<sup>+</sup>細胞FDR2発現は、ESRと強い正の相関を示した。小竹分担研究者は、発症早期関節炎(RA)において、活性化NKレセプターマーカーのCD161+ヘルパーT細胞におけるTh1のTh17に対する比がRAはOAで有意に高かったことから、末梢血におけるCD161+ヘルパーT細胞のTh17からTh1への可塑性が病態に関与している可能性が示唆されるこ



とを見出した。

桑名分担研究者は、昨年度までの検討から SLE 末梢血において Foxp3<sup>+</sup>胸腺由来 Treg (nTreg) が増加し、その比率は疾患活動性と相関すること報告した。しかし、最近 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞の可塑性と多様性が示されていることから、SLE 患者末梢血 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞の病態における役割を検討した。CD4<sup>+</sup>細胞中における Foxp3<sup>+</sup>T 細胞と nTreg の比率の増加は多発性硬化症や原発性免疫性血小板減少症患者でみられず SLE に特徴的であった。

CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>細胞分画の検討では、Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> や Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD49d<sup>-</sup>などの免疫抑制能を有する Treg 分画は健常人と SLE で差はなく、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>細胞、CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD49d<sup>+</sup> 細胞分画は SLE で増加していた。さらに、SLE 末梢血中の CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞は健常人に比べて IL-2 産生が低下し、IL-17 産生が増加していた。以上より、SLE 末梢血中で増加している CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞は、健常人でほとんど検出されない

CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup>細胞で IL-17 産生能を有していることを明らかにした。活動期 SLE 末梢血で増加している nTreg は特有の表面マーカーとサイトカイン産生能を有する新たなサブセットであり、免疫炎症病態に関わる可能性が想定された。

田村分担研究者は、RA 患者末梢血単核球を刺激し、CD4 陽性 T 細胞における IL-17 および IFN $\gamma$  の発現を解析したところ、PI3K 阻害薬添加により抑制され、さらに培養上清中のサイトカイン IL-17、IFN $\gamma$ 、IL-17、IL-6、TNF $\alpha$  産生も PI3K 阻害薬により抑制されることを見出した。これらの作用は、アイソフォーム選択的阻害薬のうち PI3Kd 選択的阻害薬で最も強かった。これらのことから、PI3K、特に PI3Kd は RA 患者における Th1、Th17 サイトカインの発現に関与しており、RA における治療標的となり得ることが示唆された。上阪分担研究者は、多発性筋炎・皮膚筋炎について、特に 3 徴候である皮膚傷害・筋傷害・肺傷害それぞれの有無に着目して解析したところ、間質性肺炎合併例において非合併例と比較して CD4 優位であり、特に naïve CD4 T 細胞が多い傾向、TH2 細胞優位の傾向を認めた。この結果により、筋傷害と肺傷害が異なる免

疫異常に基づく可能性が考えられた。

藤尾研究分担者はヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性の新規制御性 T 細胞が Fas-FasL および PD-1-PD-L1 依存性に B 細胞のアポトーシスを誘導することを確認した。また臨床データとの関連を検討したところ、SLE、RA の末梢血で CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞の割合の減少を認めたが、SLEDAI、DAS28 など疾患活動性との明らかな相関を認めなかった。アバタセプト投与前後で検討したところ、アバタセプト投与後にヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞増加する傾向を認めた。

田中分担研究者は SLE 患者も末梢血では活性化 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> Tfh 細胞と CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> effector memory B 細胞の割合が増加し、免疫担当細胞の分化異常の存在が示された。また、CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>の新たな DC サブセットが増加し、CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup>の Tfh/Th1 細胞可塑性を有する細胞、effector memory B 細胞の相互作用による病因的関与が考えられた。川上分担研究者は、SLE では健常人や他のリウマチ性疾患に比べて CD4<sup>+</sup>CD52<sup>high</sup> T 細胞および CD8<sup>+</sup>CD52<sup>high</sup> T 細胞の集団が少ないことを見出した。また、この CD52<sup>high</sup> T 細胞は従来の制御性 T 細胞 (Treg) とは異なる抑制性 T 細胞の集団であることが示唆された。これらのことは SLE の病態や治療標的因子を議論する上で重要である。

また、山本研究代表者と住友秀次研究協力者、森尾分担研究者と今井耕輔研究協力者らが共同で、ヒト末梢血解析マニュアルを作成した。

(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。

#### D. 考察

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。Human Immunology Project Consortium (HIPC) の提案するヒト末梢血細胞解析の標準化法 (Nat Rev Immunol. 12:191, 2012) も、実際に自らの研究室で動くことが判明し、マニュアルも作成したことから、本研究を進めることが、我が国の疾患免疫学の礎となり、新たな治療薬創出の為の直接的な研究成果とともに、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. 分担研究報告

## 関節リウマチ患者における包括的臨床免疫解析の試み

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\*、永渕 泰雄\*、庄田 宏文\*、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 所属

**研究要旨** 関節リウマチにおける、免疫学的異常と臨床所見・免疫細胞動態・HLA-DRB1 遺伝子型との関連について、ヒト PBMC のフローサイトメトリー解析を用いて包括的な解析を行った。Plasmablast, Tfh-Th17 細胞が自己抗体産生に関係していること、CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup>細胞が疾患活動性と相関があること、早期未治療関節リウマチ患者では免疫学的異常が顕著であることが示された。

### A. 研究目的

ヒトにおける、関節リウマチ(RA)の免疫学的異常と臨床像との関連を明らかにするために、またリスク遺伝子である HLA-DRB1 と免疫細胞との関連を明らかにするために、臨床所見・免疫細胞動態・HLA-DRB1 遺伝子型との関連について、包括的な検討を試みた。

### B. 研究方法

早期未治療 RA 患者 8 名を含む RA 患者 50 名、健常人 25 名を対象とした。ヒト末梢血単核球(PBMC)をマルチカラー染色によるフローサイトメトリー解析を行うことで、CD4<sup>+</sup>T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球、樹状細胞それぞれのサブセット分類と、細胞表面の HLA-DR 発現量の定量を行った。そして、RA 患者の臨床情報と HLA-DRB1 タイピングによる shared epitope(SE)の有無との関連を検討した。

(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

DAS28 と CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup>細胞比率に正の相関を認め、DAS28 と CD19<sup>+</sup>B 細胞比率に負の相関を認めた。また RF と CD27<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>

plasmablast 比率、plasmablast 比率と

CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>(Tfh-Th17)細胞比率に正の相関を認めた。早期未治療 RA 患者では、健常人、治療後慢性 RA 患者と比較して、plasmablast 比率および Tfh-Th17 細胞比率が増加していた。また早期未治療 RA 患者では、CD4<sup>+</sup>T 細胞、NK 細胞上の HLA-DR 発現量が増加しており活性化を示した。SE の有無による各サブセット比率の有意な変化を認めなかった。SE 陽性者では B 細胞、単球上の HLA-DR 発現量増加を認めた。

### D. 考察

Plasmablast, Tfh-Th17 細胞が自己抗体産生に関係していること、また CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup>細胞が疾患活動性と相関があることが示唆された。早期未治療 RA 患者では多様な免疫学的異常が生じており、抗リウマチ治療によりそれらが是正されることが示唆された。

### E. 結論

ヒト PBMC について、マルチカラー染色のフローサイトメトリーを用いた解析を行うことで、関節リウマチにおける多様な免疫学的異常の検討を行うことが可能となった。得られた相関関係を基礎に作業仮説を立て、各細胞集団の具体的な機能解析を行うには更なる検討が必要であるが、今後解析を重ね、関節リウマチの病因解明につなげていく方針である。



F. 健康危機情報 → 総括にて報告

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto K, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Tanaka Y, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Shoji T, Sakamaki Y, van der Heijde D, Miyasaka N, Koike T. Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in Japanese rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate : the J-RAPID randomized, placebo-controlled trial. Mod Rheumatol. 2013 Dec 9. [Epub ahead of print]
2. Okada Y, et al(+94人), Yamamoto K. and Plenge RM. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature. 2014;506(7488):376-381.
3. Nagafuchi Y, Sumitomo S, Soroida Y, Kanzaki T, Iwasaki Y, Michishita K, Iwai T, Ikeda H, Fujio K, Yamamoto K. The power Doppler twinkling artefact associated with periarticular calcification induced by intra-articular corticosteroid injection in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2013;72(7):1267-9.
4. Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Ishii T, Horita T, Saito K, Okamoto A, Nishimoto N, Myouzen K, Kubo M, Hirakata M, Sumida T, Takasaki Y, Yamada R, Nakamura Y, Kamatani N, Yamamoto K. An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of \*09:01 allele on disease phenotypes. Rheumatology(Oxford). 2013;52(7):1172-82
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(4):1063-73.
- 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

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 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ーション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 と鎖が低発現であり、代表的な SR 蛋白である SF2 が CD3 と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 27 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 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、スプライスバリエーション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。

SF2 と RasGRP1 exon 11 との相互作用を検討する目的で、FLAG タグ付加リコンビナント SF2, FLAG タグ付加リコンビナント疑似リン酸化 SF2 を作製した。RasGRP1 exon11 上の SF2 の結合が予測される部位に相当する RNA を合成し、biotin タグを付加した。ランダム配列 RNA をコントロールとした。SF2-FLAG, RasGRP1 exon 11 RNA-biotin, streptavidin ビーズを混和して免疫沈降法により両者の結合を検出した。

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

SF2 発現の検討；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 ( $p < 0.001$ , t 検定) (Fig.1)。

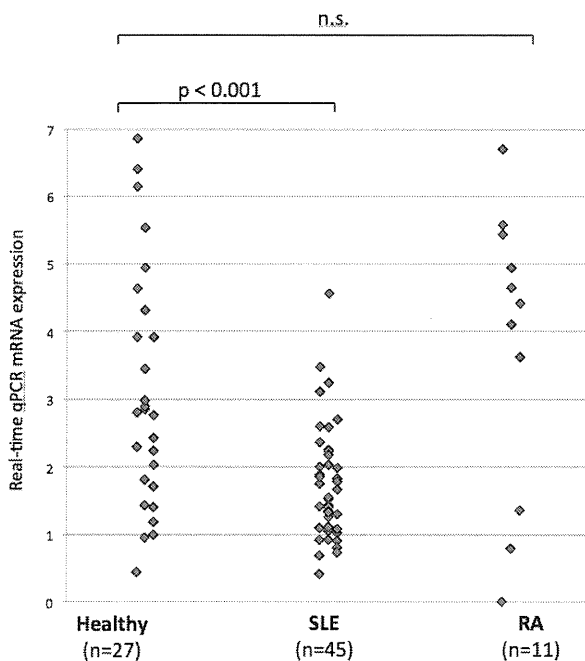


Fig.1; Expression levels of SF2 mRNA in peripheral blood T cells

RA 患者では健常人と 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た (Fig.2)。

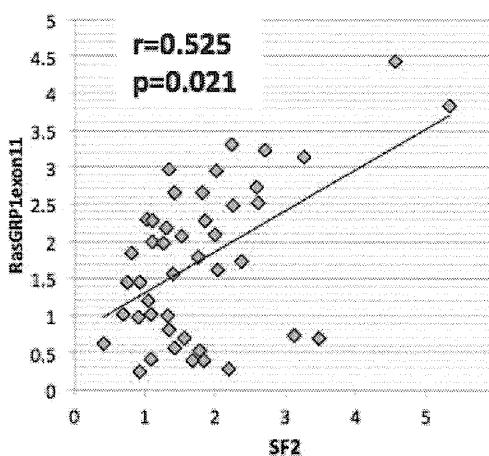


Fig.2 (A) Correlation between expression levels of SF2 and RasGRP1 (normal form) in lupus T cells

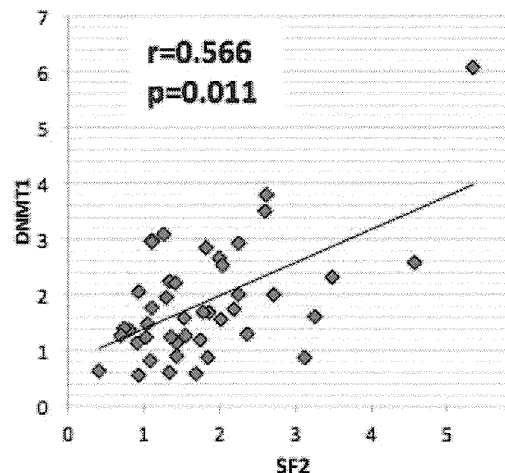


Fig.2 (B) Correlation between expression levels of SF2 and DNMT1 in lupus T cells

SLE 患者における SF2 の発現量は、疾患活動性の高い患者では疾患活動性の無い患者と比較して有意に低値であった (Fig.3)。

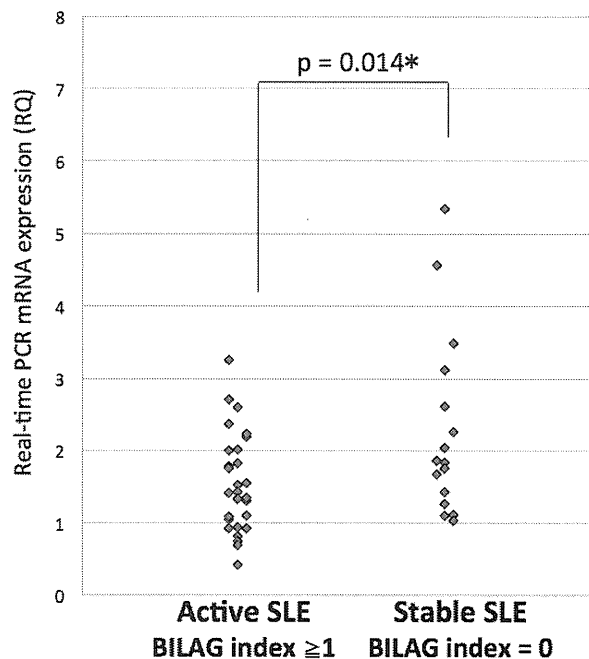


Fig.3; Comparison of SF2 expression in T cells from SLE patients according to their disease activity

リコンビナント SF2 の作製；

HEC293 細胞を用いて発現した疑似リン酸化 SF2 を FLAG 精製し、ウェスタンブロット法にて確認した (Fig.4)。



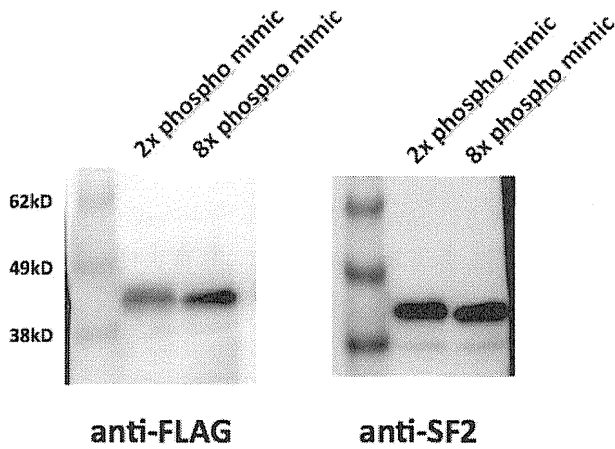


Fig.4; Expression and purification of recombinant phospho-mimic SF2

疑似リン酸化SF2とRasGRP1 exon 11 RNAとの結合を、免疫沈降法にて確認した (Fig.5)。コントロールRNAに比較して、RasGRP1 exon 11 RNAはより多量のSF2と結合することが示された。

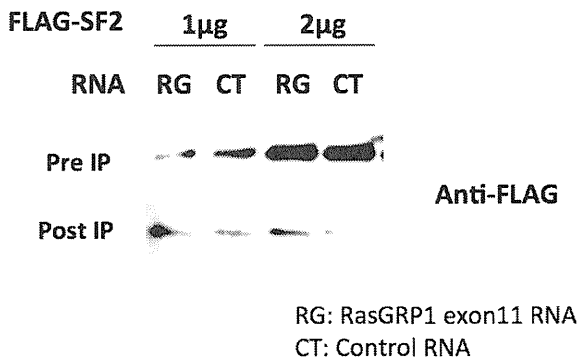


Fig.5; Binding between RasGRP1 exon 11 RNA and phospho-mimic SF2

Gfi-1 発現の検討; 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 (Fig.6)。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、SLE患者でその傾向は認められなかった (Fig. 7)。

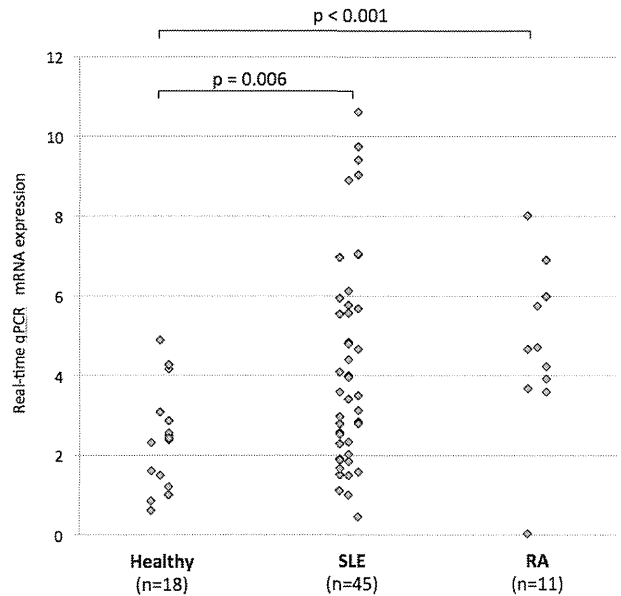


Fig.6; Expression levels of Gfi-1 mRNA in peripheral blood T cells

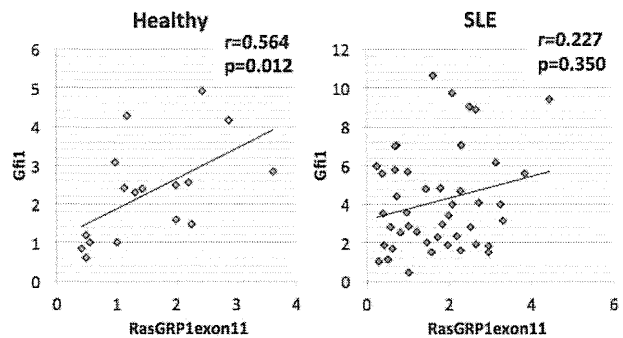


Fig.7; Correlation between expression levels of Gfi-1 and RasGRP1 in peripheral blood T cells

#### 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が、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経路によるRasGRP1発現量の調節機構がSLE患者においては破綻していることが示唆された。

健康人においてSF2は、RasGRP1 exon 11に結

合することでその正常なスプライシングを促し、exon 11 を含む正常な RasGRP1 の発現を亢進、その下流シグナルである DNMT1 の発現を増強することが示唆された (Fig.8A)。SLE 患者、なかでも疾患活動性の高い状態での T 細胞では特に SF2 の発現量が低く、RasGRP1 exon 11 のスプライシングに障害を来した結果として DNA の低メチル化を来す可能性が示唆された (Fig.8B)。SF2 発現の制御ができれば RasGRP1, および CD3 と鎖のスプライシングを正常化が可能となり、その下流シグナルも正常化される事が期待される。

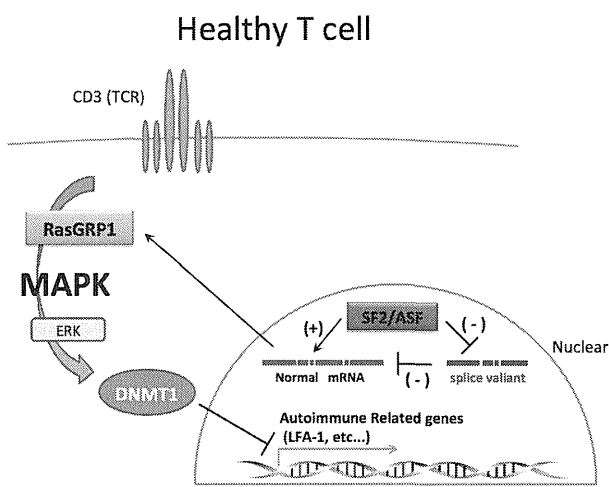


Fig.8 (A); SF2 regulates RasGRP1 splicing in healthy T cells

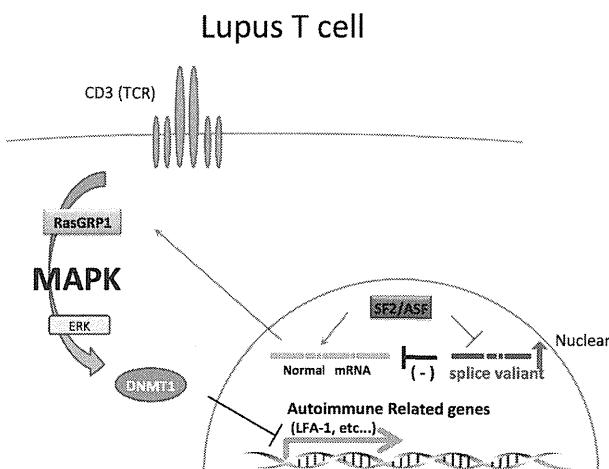


Fig.8 (B); Impaired SF2 expression results in abnormal splicing of RasGRP1 mRNA and lower protein levels

E. 結論

SLE 患者における SF2 の低下が RasGRP1 スプライシング異常を通じて 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→総括にて報告

G. 研究発表

1. 論文発表  
未発表

2. 学会発表

2013 年日本リウマチ学会総会・学術集会 (京都市)

2013 年アメリカリウマチ学会 (サンディエゴ)

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

特記事項無し

## 関節炎における Formyl peptide receptor 2 (FPR2) 発現 T 細胞サブセットの解析 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<sup>+</sup>T 細胞において高発現が認められた Annexin-A1 とそのリガンドである Formyl peptide receptor 2 (FPR2), 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。

### A. 研究目的

Formyl peptide receptor 2 (FPR2) は細胞表面に存在する 7 回膜貫通型 G 蛋白共役受容体であり、炎症を正にも負にも制御する機能を保持する。そのリガンドは annexin-A1 (ANX1)、lipoxin A4, serum amyloid A などが挙げられている。FPR2 は単球や T 細胞にも発現することが知られているが、我々は GPI 誘導関節炎発症早期の脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞において FPR2 が高発現していることを genechip で同定した。しかしながら、関節炎、特に T 細胞における役割は未だ不明点が多い。我々は T 細胞が病態に強く関与する GPI 誘導関節炎モデル及び RA 患者サンプルを用いて FPR2 と CD4<sup>+</sup>T 細胞との関与を検討した。

### B. 研究方法

- 1) GPI 免疫後 CD4<sup>+</sup>T 細胞における FPR2 mRNA 発現を経時的に検討した。
- 2) GPI 免疫後 day7 リンパ節から FPR2<sup>+</sup>または FPR2<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞を sorting し、各 Th サブセットに特徴的なサイトカイン及び転写因子の発現を定量 PCR で検討した。
- 3) FPR2 下流 シグナルを解析するため、ナイーブ T 細胞を抗 CD3/28 抗体 + IL-6 に ANX1 添加/非添加で培養し、STAT1, STAT3 のリン酸化を計時的に FACS で確認した。
- 4) ナーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を Th1 および Th17 分化条件で培養し、FPR2 発現を FACS で検討した。
- 5) 健常人 (HS, n=18)、シェーグレン症候群患者 (SS, n=17) 及び関節リウマチ患者 (RA, n=26)

から単離した末梢血単核球 (PBMC) 及び CD4<sup>+</sup>T 細胞, CD11b<sup>+</sup>細胞における FPR2 発現を比較検討した。

- 6) CD4<sup>+</sup>細胞、CD11b<sup>+</sup>細胞の FPR2 発現と ESR, CRP との相関を検討した。

(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) GPI 免疫後関節炎発症早期 day7 で FPR2 発現が亢進していた。
- 2) FPR2<sup>+</sup> T 細胞は FPR2<sup>-</sup> T 細胞と比較し IFN $\gamma$ , T-bet を高発現していた。
- 3) STAT1 のリン酸化は、ANX1 刺激後 30 分で遷延傾向を認めた。STAT3 のリン酸化には差は認めなかった。
- 4) Th1 分化条件で FPR2<sup>+</sup> T 細胞は IFN $\gamma$ 陽性細胞に高発現していた。
- 5) FPR2 は HS, SS と比較し RA 患者末梢血、特に CD4<sup>+</sup>T 細胞のみで高発現を認めた (p<0.05)。
- 6) CD4<sup>+</sup>細胞 FPR2 発現は、ESR と強い正の相関を示した (R=0.964, p<0.001)

### D. 考察

マウスにおいて FPR2 は脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞に GPI 誘導関節炎発症早期に発現上昇が認められ、FPR2<sup>+</sup> T 細胞は Th1 phenotype を有していた。また RA 患者においても CD4<sup>+</sup>T 細胞に高発現を認め、炎症反応とのリンクが認められた。



## E. 結論

FPR2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞はRAにおいて重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

## F. 健康危機情報→総括にて報告

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.* 172: 44-53, 2013
2. 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* 23: 219-225, 2013
3. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Shimada K, Masui T, Ikenaka T, Hashimoto A, Okazaki Y, Takaoka H, Futami H, Komiya 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* 22:497-503, 2013
4. 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* 23:614-616, 2013
5. 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.* 23:782-7,2013
6. 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* 24:60-68,2014
7. Ito S, Ogishima H, Kondo Y, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Sumida T: Early diagnosis and treatment of steroid-induced diabetes mellitus in patients with rheumatoid arthritis and other connective tissue diseases. *Mod Rheumatol* 21:52-59,2014
8. Hagiya C, Tsuboi H, Yokosawa M, Hagiwara S, Takai C, Hirota T, Asashima H, Miki H, Umeda N, Horikoshi M, Kondo Y, Sugihara M, Ogishima H, Suzuki T, Hiraoka T, Kaji Y, Matsumoto I, Ohshika T, Sumida T. Clinicopathological features of IgG4-related disease complicated with orbital involvement. *Mod Rheumatol* (in press)
9. Yokosawa M, Tsuboi H, Nasu K, Hagiya C, Hagiwara S, Ogishima H, Hirota T, Horikoshi M, Kondo Y, Sugihara M, Suzuki T, Minami M, Bukawa H, Matsumoto I, Sumida T. Usefulness of MR imaging of the parotid glands in patients with Sjogren's syndrome. *Rheumatology*(in press)
10. Tsuboi H, Asashima H, Takai C, Hagiwara S, Hagiya C, Yokosawa M, Hirota T, 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, Yoshifuji H, Ohta A, Matsumoto I, Sumida T. Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjogren's syndrome in Japan. *Mod Rheumatol* (in press)

11. Iizuka M, Tsuboi H, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Matsui M, Matsumoto I, Sumida T. M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive IL-17- producing T cells promotes development of Sjogren's syndrome like sialadenitis. Mod Rheumatol (in press)
12. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Ito I, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Amano H, Nagai T, Hirohara S, Setoguchi K, Kono H, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Katayama M, Migita K, Suda A, Ohno S, Hashimoto H, Takasaki Y, Sumida T, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. Human Leukocyte Antigens and Systemic Lupus Erythematosus: A Protective Role for the HLA-DR6 alleles DRB1\*13:02 and \*14:03. PLoS One(in press)

2. 学会発表

1. Matsumoto I: Role of IL-6 and TNF $\alpha$ -induced proteins in autoimmune arthritis JSICR and MMCB (Tokyo), 5月20日,2013
2. Matsumoto I: The regulatory role of TNF $\alpha$ -induced protein9(TNFAIP9) in arthritis with mice and humans. Autoimmunity Congress Asia 2013 Satellite Symposium (Hong Kong) 11月21日、2013

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

## 発症早期関節炎の末梢血における T 細胞の解析 第 2 報

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

研究要旨 Th17 の可塑性が最近報告されている。しかし、関節リウマチの発症早期の病態において不明である。今回、CD161+T 細胞における Th1 の Th17 に対する比が上昇していることから、発症早期に Th17 が Th1 に変化している可能性を示唆する結果を得た。

### A. 研究目的

Th17 の可塑性(plasticity)が最近報告されている。さらに、Th17 が IFN $\gamma$  を産生する Th1 に変化した場合でもヒト Th17 のマーカーである CD161 は発現された状態にあることが報告されている(Annunziato et al. 2013 Seminars Immunol)。今回、発症早期関節炎(関節リウマチ RA、反応性関節炎 ReA)で未治療の患者の末梢血におけるヘルパー T 細胞(CD161+細胞, Th17)を解析した。

### B. 研究方法

当科受診の早期(罹病期間 5M 以下)RA 5 例、ReA 1 例および変形性関節症(OA)6 例の末梢血におけるヘルパー T 細胞(CD161+細胞, Th17)をフローサイトメトリー法により解析した。

(倫理面への配慮)

東京女子医科大学倫理委員会にて臨床研究として承認されている(承認番号 2849)。

### C. 研究結果

1)Th17 細胞の比率は RA 患者および OA 患者において差は認められなかった。

2)OA の CD161+ヘルパー T 細胞は全例 10%以下であった。RA および ReA では CD161+ヘルパー T 細胞は 3 例が 10%以上、3 例が 10%以下であった。

3)CD161+ヘルパー T 細胞における Th1 の Th17 に対する比において、RA は OA と比べ有意に高かった(p=0.040)。

### D. 考察

RA の発症 5M 以内において Th17 細胞の末梢血

における比率は OA 患者と差は認められなかった。一方、CD161+ヘルパー T 細胞は OA 患者の値を基準とすると、RA および ReA 患者では高い群と低い群に分けられる可能性が示唆された。さらに CD161+ヘルパー T 細胞における Th1 の Th17 に対する比は、RA は OA よりも統計学的有意に高かった。以上より、発症早期に Th17 が Th1 に変化することが RA の病態に認められる可能性が示唆された。今後は今回の症例の経過を追跡し、さらに発症のより早期例、および症例数を増やし解析を行う予定である。

### E. 結論

発症早期関節炎(RA)において、末梢血における CD161+ヘルパー T 細胞の Th17 から Th1 への可塑性が病態に関与している可能性が示唆された。

### F. 健康危機情報→総括にて報告

### 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