

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

研究協力者 西本哲也 慶應義塾大学医学部内科 研究員

研究要旨

Foxp3 は制御性 T 細胞 (Treg) 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が、近年 CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の可塑性と多様性が示されている。昨年度までの検討から SLE 末梢血において Foxp3⁺ 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。そこで、フローサイトメトリーを用いて 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⁺細胞中における Foxp3⁺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でみられず SLE に特徴的であった。CD4⁺Foxp3⁺細胞分画の検討では、Foxp3⁺CD25⁺CD127^{low} や Foxp3⁺CD25⁺CD49d⁺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⁺Foxp3⁺CD127⁺細胞、CD4⁺Foxp3⁺CD49d⁺細胞分画は SLE で増加していた。さらに、SLE 末梢血中の CD4⁺Foxp3⁺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⁺Foxp3⁺細胞は、健常人でほとんど検出されない CD4⁺Foxp3⁺CD127⁺/CD49d⁺細胞で IL-17 産生能を有していることが明らかとなった。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。

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^{high} 胸腺由来 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 CD4⁺Foxp3⁺Treg の減少・機能低下が報告されているが、SLE 患者を対象としたこれまでの検討では疾患活動性や臓器障害の多様性、解析に用いた表面マーカーの違いから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にされた。当然ながら、これら CD4⁺Foxp3⁺分画の機能は同一でなく、それぞれが異なる病態と関連する可能性がある。

昨年度までの検討から、SLE 患者で CD4⁺Foxp3⁺ の nTreg が健常人と比較して増加しており、その比率は疾患活動性と相関することを明らかにした。そこで、本年度は CD4⁺Foxp3⁺細胞の多様性に着目し、SLE 患者末梢血 CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の亜分画および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 SLE47 例、健常人 19 例を対象とした。また、自己免疫性疾患のコントロールとして多発性硬化症 (MS) 15 例、原発性免疫性血小板減少症 (ITP) 16 例を用いた。

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⁺細胞を分離した。分離した細胞の純度は 90% 以上であった。

3. CD4⁺Foxp3⁺細胞比率の解析

CD4⁺細胞中における Foxp3⁺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⁺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。CD4⁺細胞中における TSDR 脱メチル化細胞の比率を nTreg 比率とした。

5. CD4⁺Foxp3⁺細胞の表面抗原とサイトカインの解析

CD4⁺Foxp3⁺細胞の表面抗原は、PBMC を抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体 (clone M-A251; BD)、抗 CD45RA 抗体 (clone 5H9; BD)、抗 CD49d 抗体 (clone 9F10; BD)、抗 CD127 抗体 (clone HIL-7R-M21; BD) で蛍光標識後、抗 Foxp3 抗体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 MoFlo XDP; Beckman Coulter, FACS Calibur) を用いて解析した。また一部の実験では、細胞内染色時に抗 IFN- γ 抗体 (clone B27; Biologend)、抗 IL-2 抗体 (clone MQ1-17H12; Biologend)、抗 IL-17 抗体 (clone N49-653; Biologend) を同時に染色することで産生サイトカインを解析した。

6. 統計学的解析

2 群間の比較には Mann-Whitney U-test を用いた。

(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. 各種自己免疫疾患における CD4⁺Foxp3⁺細胞比率の比較

CD4⁺細胞中における Foxp3⁺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 \pm 標準偏差 : $15.4 \pm 7.3\%$ vs $8.9 \pm 2.3\%$, $P < 0.01$)。また、MS と原発性 ITP では健常人と同等で、CD4⁺Foxp3⁺細胞比率の増加は SLE に特徴的であった。

2. 各種自己免疫疾患における nTreg 比率の比較

nTreg の比率は SLE で健常人に比べて有意に増加していた ($11.5 \pm 6.7\%$ vs $3.6 \pm 1.3\%$, $P < 0.01$)。さらに、CD4⁺Foxp3⁺細胞比率と同様に、MS や原発性 ITP の nTreg 比率は健常人と差がなく、nTreg 増加は SLE にのみ認められた。また、健常人、各疾患群で TSDR 脱メチル化細胞比率は CD4⁺Foxp3⁺細胞比率と相関していた (健常人; $r = 0.56$, $P < 0.05$; SLE; $r = 0.39$, $P < 0.05$; MS; $r = 0.63$, $P < 0.05$; 原発性 ITP; $r = 0.51$, $P = 0.05$)。

3. CD4⁺Foxp3⁺細胞の表面抗原

SLE では健常人に比べて CD4⁺Foxp3⁺細胞表面における CD25 の発現が低下 ($38.5 \pm 10.4\%$ vs $56.9 \pm 14.1\%$, $P < 0.01$)、CD49d ($79.7 \pm 9.0\%$ vs $52.9 \pm 11.0\%$, $P < 0.01$) と CD127 ($34.3 \pm 21.6\%$ vs $10.4 \pm 7.8\%$, $P < 0.01$) の発現が増加していた。また、Treg 分画では naïve Treg (CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺CD45RA⁺) が SLE で増加していたが ($1.2 \pm 0.9\%$ vs $0.6 \pm 0.3\%$, $P = 0.03$)、authentic Treg (CD4⁺Foxp3⁺CD25^{high})、effector Treg (CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺CD49d)、高純度 Treg (CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺CD127^{low} および CD4⁺Foxp3⁺CD25^{high}CD127^{low})、高純度 effector Treg (CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺CD49d CD127^{low}) に差はなかった。一方、SLE の CD4⁺Foxp3⁺細胞中では、健常人ではほとんどみられない CD4⁺Foxp3⁺CD127⁺細胞 ($6.6 \pm 5.4\%$ vs $1.5 \pm 1.2\%$, $P < 0.01$) と CD4⁺Foxp3⁺CD49d⁺細胞 ($6.8 \pm 5.6\%$ vs $1.6 \pm 0.9\%$, $P < 0.05$) が増加していた。

4. CD4⁺Foxp3⁺細胞のサイトカイン産生能

SLE における CD4⁺Foxp3⁺細胞では健常人と比較して IL-2 産生が低下 ($10.5 \pm 5.1\%$ vs $14.9 \pm 4.0\%$,

P<0.05)、IL-17 産生が増加していた (7.7±5.9% vs 1.5±0.9%、P<0.05)。IFN- γ 産生に差はなかった。

D. 考察

これまで報告されている SLE 末梢血中の Treg 解析では、CD4⁺Foxp3⁺細胞は増加、CD4⁺CD25^{high}細胞または CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺細胞は減少もしくは不変とするものが多い。このような結果の不一致は CD4⁺Foxp3⁺細胞の多様性である程度説明可能である。CD4⁺Foxp3⁺細胞の中でも免疫調節活性を有する高純度 Treg、effector Treg 分画は SLE 末梢血で不変で、naïve Treg 分画で軽度の増加を認めた。この分画が最近 SLE 末梢血中で CD4⁺細胞中での比率増加 (実数は不変) が報告されている CD4⁺Foxp3⁺Helios⁺細胞を含む。

一方、我々の Foxp3 遺伝子メチル化解析を用いた検討では SLE 末梢血中での nTreg 比率の増加が示され、その現象は他の自己免疫疾患ではみられず SLE に特徴的であった。興味深いことに、SLE 末梢血で増加している nTreg は健常人ではほとんど検出されない CD4⁺Foxp3⁺CD127⁺細胞または CD4⁺Foxp3⁺CD49d⁺細胞であることが明らかとなった。免疫制御活性を有する CD4⁺Foxp3⁺細胞は CD127、CD49d 発現が低い、または欠くことが知られており、Foxp3 遺伝子メチル化状態は nTreg であるにもかかわらず免疫制御活性を欠く新たな T 細胞分画である可能性が考えられる。

実際に SLE 末梢血中の CD4⁺Foxp3⁺細胞は IL-17 を高率に発現していた。残念ながら今回 IL-17 産生細胞が CD4⁺Foxp3⁺CD127⁺/CD49d⁺細胞であるかの確認はできていないが、これらが新規概念の ex-Treg に属する細胞集団であるかもしれない。実際に、SLE 患者末梢血中の CD4⁺Foxp3⁺細胞比率は疾患活動性 (SLEDAI)、抗二本鎖 DNA 抗体価と相関することから、SLE の免疫炎症病態との関連が示唆された。

本研究により、本来は免疫抑制に働く nTreg が免疫応答や炎症を惹起することで SLE 病態に関わる新たな病態概念が示された。今後 ex-Treg 分画の詳細な機能解析や分化を制御する因子の同定が SLE の病態解明、新規治療法の開発につながるかもしれない。

E. 結論

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 T 細胞サブセットであることが明らかにされた。

F. 健康危機情報→総括にて報告

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuwana M. Dysregulated negative immune regulators in immune thrombocytopenia. *ISBT Sci. Ser.* In press.

2. 桑名正隆: 自己免疫疾患・アレルギー疾患 (後篇) それぞれの疾患の理解; 免疫性血小板減少症. 最新医学 68(6, suppl): 1362-1370, 2013.

2. 学会発表

1. 桑名正隆: 自己免疫疾患における FoxP3 陽性制御性 T 細胞. 第 57 回日本リウマチ学会総会 (京都). 2013. 4. (シンポジウム 11: リウマチ性疾患とヒト免疫)

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・増殖や生存など多くの基本的な細胞機能に関与する分子であるが、CD4 陽性 T 細胞の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。アジュバント関節炎ラットにおいて PI3K 阻害薬が T 細胞を介した抗リウマチ作用を示したことから、本研究ではヒト T 細胞における PI3 阻害薬の作用について検討した。関節リウマチ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 γ の発現を解析したところ、PI3K 阻害薬添加により抑制された。さらに、培養上清中のサイトカイン IL-17、IFN γ 、IL-17、IL-6、TNF α 産生も PI3K 阻害薬により抑制された。これらの作用は、アイソフォーム選択的阻害薬のうち PI3K δ 選択的阻害薬で最も強かった。PI3K、特に PI3K δ 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。

A. 研究目的

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。昨年度の研究で、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) ラットにおける PI3K 阻害効果について検討した。PI3K 阻害薬は AIA ラットにおいて明らかな抗リウマチ作用を示したが、AIA ラットのリンパ節 T 細胞について解析したところ、関節炎の発症に伴う所属リンパ節での T 細胞増加は、PI3 阻害薬投与により抑制されていた。また、リンパ節 T 細胞を *in vitro* にてマイトジェン刺激すると IFN δ 、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。以上により、PI3K は RA の病態にも T 細胞を介して関与している可能性が考えられたため、RA 患者末梢血を用いて検討を行った。

B. 研究方法

健常人および RA 患者各 10 名の末梢血を採取した。RA 患者の年齢の中央値は 50.3 歳、罹病期間

は 4.83 ± 3.12 年、DAS28-CRP は平均 4.32 ± 0.72 であった。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。

(倫理面への配慮)

患者検体を用いるにあたっては当施設の倫理委員会の承認を受け、十分なインフォームドコンセントを行った。患者検体は本研究以外の目的では用いていない。また、個人情報の管理に注意を払い、個人の特長が行われないように配慮した。

C. 研究結果

PMA+ionomycin 刺激後の CD4 陽性 T 細胞において PI3K 阻害薬により TNF α 発現は抑制されたが、IL-17、IL-6、IFN γ などサイトカイン発現の抑制は認められなかった。抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体刺激では、刺激後の RA 患者 CD4 陽性細胞における IFN γ および IL-17 陽性細胞数は、それぞれ健常人に比べてより増加していたが、PI3K 阻害薬により濃度依存的に抑制された(図 1)。アイソフ

フォーム非選択的阻害薬および p110δ 選択的阻害薬では低濃度での抑制が認められた。また、培養上清においては、IFN γ 、IL-17、IL-6、TNF α 濃度は刺激後に RA 患者でより上昇しており、PI3K 阻害薬により抑制された (図2)。細胞内発現、培養上清中濃度のいずれにおいても、アイソフォーム選択的阻害薬のなかでは p110 δ (PI3K δ) 選択的阻害薬の抑制効果が最も強かった。

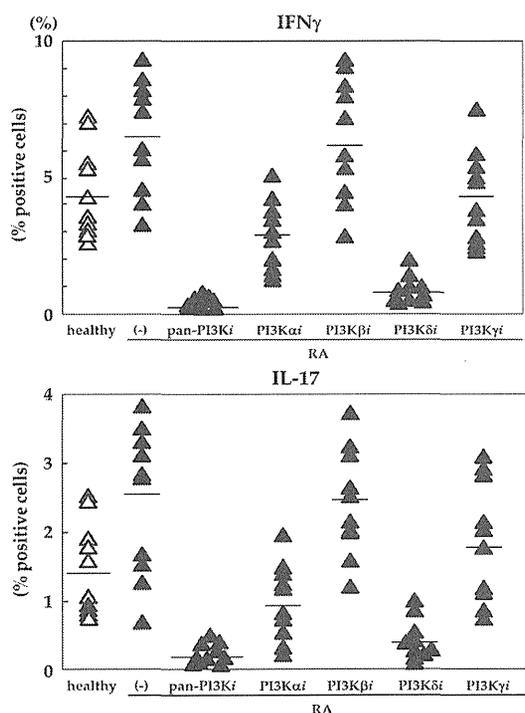


図1. CD4⁺T細胞内サイトカインの変化

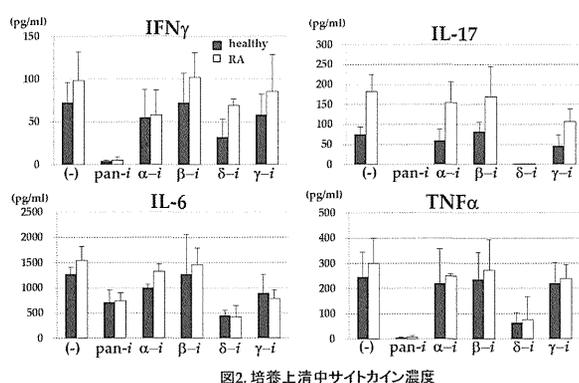


図2. 培養上清中サイトカイン濃度

D. 考察

PI3KはRA患者CD4陽性リンパ球におけるTh1, Th17サイトカイン産生に関与しており、特にPI3K δ 阻害によりこれらの産生が抑制されることが示唆された。RAにおいてPI3Kは滑膜線維芽細胞増殖や炎症細胞浸潤、破骨細胞形成など複数の

ステップでその病態に関連している可能性が考えられるが、CD4陽性T細胞においてはその阻害によりサイトカイン産生が抑制され、サブセット異常が是正される可能性が示唆された。

E. 結論

PI3KはTh1, Th17サイトカイン産生に関与するRAの治療標的であり、PI3K阻害薬、特にPI3K δ 選択的阻害薬によるRA治療の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

- 1) Murayama G, Ogasawara M, Nemoto T, Yamada Y, Ando S, Minowa K, Kon T, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Clinical miscount of involved joints denotes the need for ultrasound complementation in usual practice for patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 31:506-14, 2013.
- 2) Nemoto T, Ogasawara M, Matsuki Y, Murayama G, Yamada Y, Sugisaki N, Ando S, Minowa K, Kon T, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Can routine clinical measures predict ultrasound-determined synovitis and remission in rheumatoid arthritis patients?. Clin Exp Rheumatol. 2013 Oct 17. [Epub ahead of print]
- 3) 田村直人. 抗炎症療法における unmet needs. PI3 キナーゼ阻害薬. 炎症と免疫. 21;234-238, 2013.

2. 学会発表

- Ishiyama K, Tamura N, Yashiro T, Okumura K, Takasaki Y. Role of a transcription factor PU.1 in TGF-beta signaling-mediated osteoclast differentiation. Ann Rheum Dis;72 (Suppl3):380, 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 なし

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

研究分担者 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)
研究協力者 今井耕輔 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学
寄附講座 准教授)
高島健浩 (愛媛大学大学院医学系研究科 小児医学講座 大学院生)

研究要旨：

本研究では 10 カラーFACS により、少量の末梢血で従来の解析を越えるリンパ球分画の解析を可能とすることを目的として研究を行った。健常者 20 例および PID 患者 (遺伝子変異同定例 23 例、CVID 患者 38 例) からインフォームド・コンセントをとり、FACS 解析を行った。また、その結果を抽出した DNA を用いた TRECs(T cell receptor recombination excision circles), KRECs(Ig kappa chain recombination excision circles)の定量と比較して検討した。PBMC パネル、T1,T2,T3 パネル、B1,B3 パネル、DC パネル、を設定し、健常者、PID 患者で検討した。遺伝子変異が同定された患者の中では、毛細血管拡張性運動失調症(ATM)患者で T 細胞数、recent thymic emigrants(RTE)の減少、ナイーブ B 細胞の減少が見られた。また、STAT3 患者と STAT1 患者で Th17 の減少が見られた。STAT1 患者で DNT の上昇が見られた。CVID 患者では、TREC が低下している C 群、D 群で RTE の減少が見られ、B 群、D 群では B 細胞数減少も見られ、pDC の減少と相対的な mDC の増加が見られた。A 群ではスイッチメモリー B 細胞の減少が顕著であった。当初は compensation の取り方、抗体の選び方等に工夫が必要であったが、欧州での標準化プロトコール等も参考にしつつ、条件設定を行い、実際の免疫不全症患者で検討を行った。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、有効であると考えられた。一方、原因不明の患者が含まれている 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きたい。

A. 研究目的

原発性免疫不全症 (PID) とくに Common variable immunodeficiency(CVID)などの低ガンマグロブリン血症は、T 細胞の分化、機能障害を伴う複合免疫不全症(CID)や免疫制御異常症が含まれる場合があり、そのリンパ球分画の解析は原因遺伝子検索を行う上でも非常に重要である。これまで我々はヘパリン加末梢血からの単核球分離後 4 カラーFACS を用い、13 パネルで T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞の解析を行い、多検体を処理してきたが、多くの例は、郵送で数日かかること、年少例で採血困難な例もあり、少量サンプルで多カラーにより、パネル数を減らすことが求められていた。本研究では 10 カラーFACS により、少量の末梢血で従来の解析を越えるリンパ球分画の解析を可能とすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

健常者 (20 例、0 歳 2 ヶ月～50 歳)、および PID 患者 (遺伝子変異同定例 23 例、0 歳 7 ヶ月～46 歳、CVID 患者 38 例、1 歳～54 歳) からインフォームド・コンセントをとり、EDTA 加末梢血を溶血後、モノクローナル抗体により染色を行い、LSR Fortessa (BD 社) を用いて FACS 解析を行った。また、その結果を抽出した DNA を用いた TRECs(T cell receptor recombination excision

circles), KRECs(Ig kappa chain recombination excision circles)の定量と比較して検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、本学医学部倫理委員会にて承認された研究計画に従い、説明書を被験者に説明の上同意を得た検体について、解析を行った。

C. 研究結果

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、健常者、PID 患者で検討した (表 1)。

原因遺伝子の同定された PID 患者としては、STAT1 6 例、Wiskott-Aldrich 症候群 4 例、STAT3 3 例、ATM 5 例、CD40L 2 例、ICOS 2 例、LRBA 1 例だった。また、CVID を TREC,KREC で 4 群に分ける方法 (Kamae *et al*, *J. Allerg. Clin. Immunol.*, 2013) により、A 群(TREC, KREC 正常例)19 例、B 群 1 例 (TRECs 正常, KRECs 低下例)、C 群 10 例 (TRECs 低下, KRECs 正常例)、D 群 8 例 (TRECs, KRECs 低下例) に亜群分類された (図 1)。遺伝子変異が同定された患者の中では、毛細血管拡張性運動失調症(ATM)患者で T 細胞数、recent thymic emigrants (RTE)の減少、ナイーブ B 細胞の減少が見られた。また、STAT3 患者と STAT1 患者で Th17 の減少が見られた。STAT1

患者で DNT の上昇が見られた。
 CVID 患者では、TREC_s が低下している C 群、D 群で RTE の減少が見られ、D 群ではさらに B 細胞数減少も見られ、pDC の減少と相対的な mDC の増加が見られた。A 群ではスイッチメモリー B 細胞の減少が顕著であった。

D. 考察

10 カラーのため、当初はコンペンセーションの取り方、抗体の選び方、蛍光色素の組み合わせ等に工夫が必要であったが、欧州での標準化プロトコル等を参考にしつつ、条件設定を行い、実際の免疫不全症患者で検討を行った。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、有効であると考えられる。一方、原因不明の患者が含まれている 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、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きたい。

E. 結論

健康者検体を用いて少量検体で詳細な免疫担当細胞亜群解析を実施可能な抗体・蛍光色素の組み合わせを模索し、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞亜群を解析可能なパネルを構築した。また、実際に PID 患者検体を用いて解析し、その実用性を検証した。

表 1. FACS パネル

Fraction	FITC	PE	ECD	PC5 PE/PEy5	PC7/Cy7	APC	AF-700	APC- Vio770	Vio Blue	Vio Green
PBMC: T, B, NK, Mono	CD16	CD27	CD45RA	CD56	CD8	CD19	CD14	CD45RO	CD4	CD3
Bc: mDC, pDC	Lin	CD123	HLA-DR	CD11c	CD83	CD303	-	-	CD45	-
T4: NKT, Memory, Naive	vα24	vβ11	CD45RA	CD62L	CD8	CD31	CCR7	CD45RO	CD4	CD3
T2: vα7, Treg, adT	TCRαβ	TCRαβ	CD8	CD25	CCR4	IL-7R	-	-	CD4	CD3
T3: Th Th1, Th2, Th17	CD38	CCR8	CD8	CXCR5	CD161	CXCR3	HLA-DR	CD45RO	CD4	CD3
B1: Immature, Transitional	CD38	CD24	-	IgM	CD10	CD21	CD5	-	CD19	CD20
B2: Memory IgG, IgA, IgM	IgD	IgA	-	IgM	CD27	IgG	-	-	CD19	-

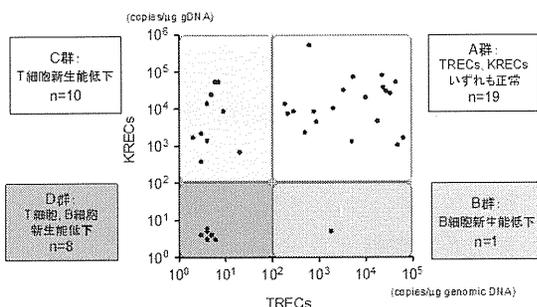


図 2. CVID 症例の TREC_s, KREC_s による亜群分類

		STAT1 n=6	WAS n=4	STAT3 n=3	ATM n=6	CD40L n=4	ICOS n=2	LRBA n=1
T 細胞	T細胞数				↓			
	RTE				↓			
	DNT	↑						
	Th17	↓		↓				
B 細胞	B細胞数							
	Memory B				↑			

図 3. 遺伝子変異同定患者のまとめ

		A群 n=16	B群 n=1	C群 n=10	D群 n=8
T 細胞	T細胞数				
	RTE			↓	↓
B 細胞	B細胞数				↓
	Switched memory B	↓			
DC	mDC/pDC				↑

図 4. CVID 患者のまとめ

F. 健康危機情報→総括にて報告

G. 研究発表

1. 論文発表

- Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowij S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, **Morio T**, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Leukoc. Biol.* 2014. (in press)
- Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, **Morio T**, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T. B-cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol.* 98: 355-60, 2013.
- Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, **Morio T**, Mizutani S, Takagi M. Successful Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Patient With Ataxia Telangiectasia Using Rituximab. *J Pediatr Hematol Oncol.* 35: 482-5, 2013.

4. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, **Morio T**, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer*. 60: 836-41, 2013.
5. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm MC, **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*. 131: 1437-40, 2013.
6. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, **Morio T**, Imai K, Mitsui N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 290: 164-8, 2013.
7. 森尾友宏: 分類不能型免疫不全症 (CVID) の多彩な病像と分子基盤 *臨床血液* 54: 1983-91, 2013.
8. 森尾友宏: 先天性免疫異常症: 内科領域で遭遇する多彩な疾患 *臨床血液* 54: 726-35, 2013.
9. 高木正稔, 今井耕輔, 森尾友宏, 水谷修紀: The Research Front Line of Immune Thrombocytopenia 原発性免疫不全症候群関連の免疫性血小板減少症 *臨床血液* 54: 357-64, 2013.
10. 森尾友宏:【検査値を読む 2013】細胞性免疫検査 リンパ球サブセット検査 *内科* 111: 1404, 2013.
11. 森尾友宏:【検査値を読む 2013】細胞性免疫検査 Bリンパ球表面免疫グロブリン *内科* 111: 1403, 2013.
12. 森尾友宏:【検査値を読む 2013】細胞性免疫検査 T細胞 B細胞比率 *内科* 111: 1400, 2013.
13. 森尾友宏:【血液症候群(第2版)-その他の血液疾患を含めて-】リンパ球の異常 リンパ球機能異常と類縁疾患 原発性免疫不全症候群 分類不能型免疫不全症 *日本臨床 別冊血液症候群* 2: 232-6, 2013.
14. 森尾友宏:【知っておきたい最新の免疫不全症分類-診断から治療まで】症候と診断 免疫不全症を疑うとき *小児科診療* 76: 376-82, 2013.
15. 森尾友宏:【免疫反応と疾患】免疫不全における免疫異常 先天性免疫不全症候群 *Medicina* 50: 484-9, 2013.
- 学会発表
- 高島健浩、今井耕輔、森尾友宏、水谷修紀、石井栄一: 1型高IgE症候群患者9例の臨床的・免疫学的検討、第41回日本臨床免疫学会総会、下関、2013年11月27日
 - 星加将吾、加藤文代、角田達彦、久保充明、満生紀子、今井耕輔、森尾友宏、杉原茂孝: 1型糖尿病に低 α_2 グロブリン血症、血小板減少、多発性硬化症様病変を併発したLRBA欠損症の1例、第4回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2013年9月22日
 - 高島健浩、満生紀子、今井耕輔、水谷修紀、森尾友宏: STAT1変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症12例の検討、第4回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2013年9月22日
 - 森尾友宏: Overview2 ヒトリンパ球解析の現状と展望、日本リウマチ学会総会(シンポジウム(ヒト免疫とリウマチ性疾患))、東京、2014年4月26日
 - 森尾友宏: 日常診療における免疫不全症、第63回小児科トピックス Meet the Experts 特別講演、東邦大学(東京)、2014年3月13日
 - 森尾友宏: 抗体産生不全症とは: 検査からみえるものとみえないもの 第3回(金沢)小児免疫不全症研究会(招待講演)、金沢、2014年2月8日
 - 森尾友宏: 免疫不全症候群から学ぶ human immunology、第41回日本臨床免疫学会総会(シンポジウム)、山口、2013年11月27日-29日
 - 森尾友宏: 分類不能型免疫不全症 (CVID) の多彩な病像と分子基盤、第75回日本血液学会学術集会、北海道、2013年10月11日-13日
 - 森尾友宏: 抗体産生不全症の分子病態探索、第3回関西免疫不全症研究会、2013年7月27日
 - 森尾友宏: 原発性免疫不全症からみる血液腫瘍疾患の分子基盤、第5回九州免疫不全症研究会、福岡、2013年7月13日
- H. 知的所有権の出願・取得状況
- 特許取得 特になし。
 - 実用新案登録 特になし。
 - その他 特になし。

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

研究分担者 上阪等 東京医科歯科大学医学部医学科 教授
 研究協力者 高村聡人 東京医科歯科大学医学部医学科 助教

研究要旨 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。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示唆された。

A. 研究目的

多発性筋炎 (PM) ・皮膚筋炎 (DM) はいずれも骨格筋を傷害する炎症性筋疾患である。古くよりその病理学的知見に基づき、PM はCD8 陽性T細胞、DM はCD4 陽性T細胞によってもたらされると考えられている。しかしながら、PM・DM は骨格筋傷害に加えて皮膚傷害 (皮疹) ・肺傷害 (間質性肺炎) を三徴候とする疾病であり、骨格筋の病理組織像のみから病態を理解することは困難であると言える。そこで本研究では、患者末梢血中におけるリンパ球分画を解析することで、その病態を全身的に評価・解析する。さらに、肺傷害・筋傷害・皮膚傷害の有無とリンパ球分画の比較を行うことで、各々の傷害に関わる免疫異常の存在を明らかとし、将来的には重症度や治療抵抗性の予測因子となりうるかを検証する。

B. 研究方法

初発のPM・DM・Amyopathic DM (ADM) 患者を対象とし、同意取得の後に末梢血を採取した。対象とする症例は、それぞれ1992年厚生省自己免疫疾患調査研究班の提唱する診断基準およびSontheimerらの提唱するADM診断基準 (Dermatol, 1993) に則って診断された症例とし、対象群には健常者を用いた。細胞表面マーカーはHuman Immunology Project Consortium (HIPC) の提唱するフローチャートに則って選定し、10カラーFlow cytometerを用いて解析を行った (図1)。

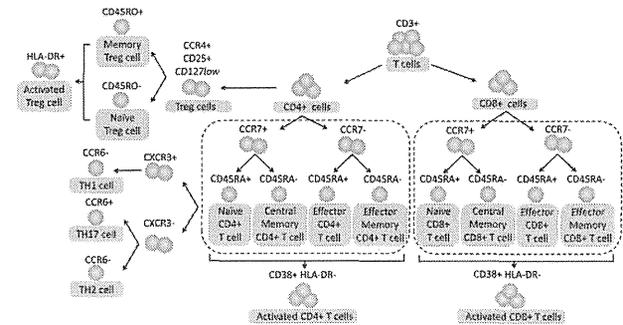


図1) HIPCによるT細胞分類フローチャート

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いる解析として、本学医学部倫理審査委員会の承認を得て行った。また、検体採取に際しては同意書を用いた患者同意取得を厳守した。

C. 研究結果

平成25年1月から11月に当院に入院した初発・無治療のPM1例、DM5例、ADM1例の計7症例について解析を行った。PM1例・DM1例は間質性肺炎非合併、DM4例とADM1例は間質性肺炎合併例であった。

間質性肺炎合併症例では、非合併例に比べてCD4 優位であり (図2)、特にnaïve CD4 T細胞が多い傾向を認めた (図3)。また、Memory T細胞の分画では、間質性肺炎合併例でcentral memory CD4 T細胞優位であった (図4)。

Helper T細胞の解析では、間質性肺炎合併例に

において TH2 細胞優位の傾向を認めた (図 5)。

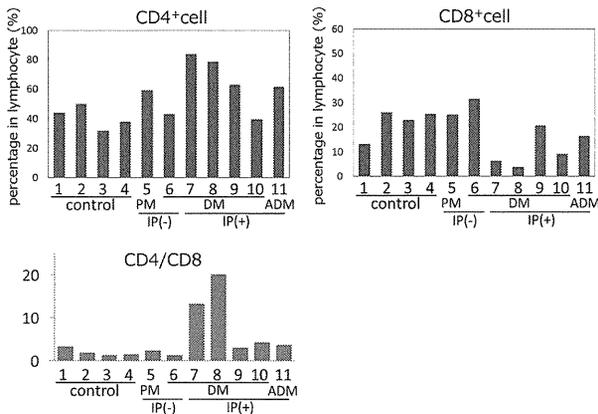


図 2) CD4/CD8 陽性 T 細胞

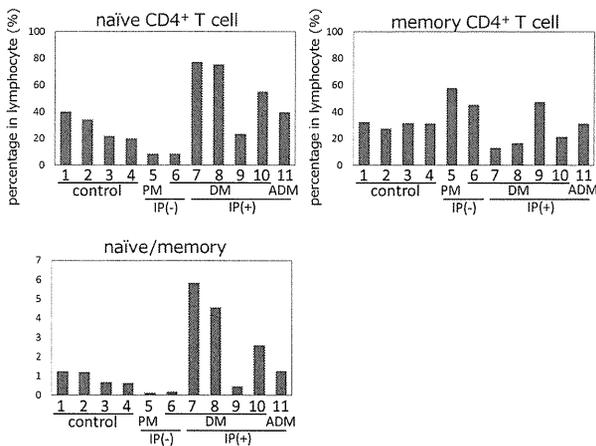


図 3) naïve/memory CD4 陽性 T 細胞

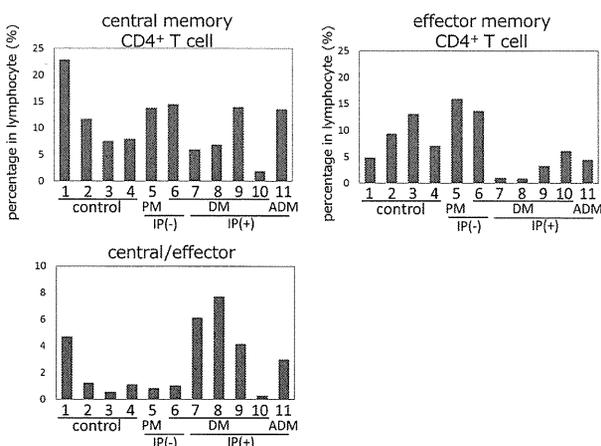


図 4) central/effector memory CD4 陽性 T 細胞

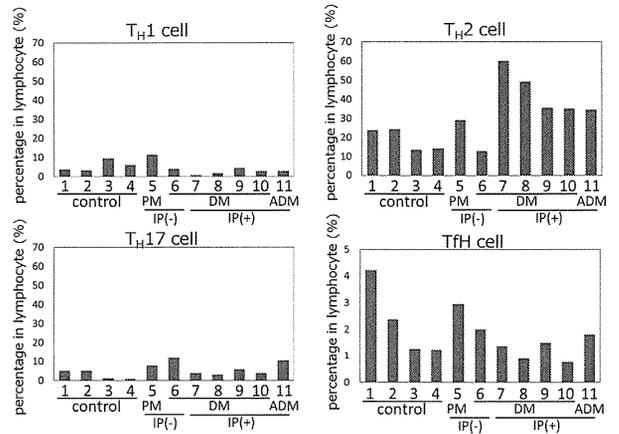


図 5) Helper T 細胞

D. 考察

間質性肺炎合併の有無によって末梢血リンパ球分画に異なる傾向を認めることから、PM・DMにおける筋傷害と肺傷害が異なる免疫学的異常に基づくことが考えられる。

これまでの解析では重症の間質性肺炎合併例は含まれていないことから、肺傷害の予後予測因子の同定には至っていない。また PM・ADM も各々 1 例にとどまることから皮疹の有無・筋傷害の有無に関する検討は行えていない。

E. 結論

PM・DM・ADM における筋障害と肺傷害が異なる免疫異常に基づく可能性が示唆された。今後、より豊かつ多彩な症例について検討を行う必要がある。

F. 健康危機情報 → 総括にて報告

G. 研究発表

1. 論文発表 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

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

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 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
仲地 真一郎 東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科 大学院生

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⁺Treg) が知られているが、CD25⁺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 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 Egr2 陽性の新規制御性 T 細胞 (LAG3⁺Treg) をマウスにおいて同定し、この LAG3⁺Treg が IL-10 を産生しつつ B 細胞の抗体産生を抑制すること、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。このことから、LAG3⁺Treg は B 細胞の免疫応答と局所の炎症を抑制する、CD25⁺Treg 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、ヒトの CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞を同定し解析している。これまでにヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞の IL-10, Egr2, PD-L1 の発現と、試験管内での B 細胞による抗体産生の抑制活性、生体内での移植片対宿主病の抑制を確認していた。今年度はヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞が 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。以上の結果からヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞がマウス LAG3⁺Treg と類似していること、その減少が自己免疫疾患の発症の素因となっている可能性が考えられた。

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⁺Treg) が知られているが、この CD25⁺Treg は主に T 細胞の免疫応答を抑制し、CD25⁺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、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 Egr2 陽性の新規制御性 T 細胞 (LAG3⁺Treg) をマウスにおいて発見し、この LAG3⁺Treg 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 LAG3⁺Treg は B 細胞の免疫応答と局所の炎症を抑制する、CD25⁺Treg 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の機能を解析することを目的とし、今年度は臨床パラメータとの関連を中心に解析した。

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、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。

(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。

D. 考察

ヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞と臨床データの関連を解析したところ、SLE, RA では末梢血のヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞の割合が有意に減少しているが、疾患活動性や炎症反応とは相関を示さなかった。以上の結果からヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞がマウス LAG3⁺Treg と類似していること、その減少が自己免疫疾患の発症の素因となっている可能性が考えられた。

E. 結論

ヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞が自己臓器疾患の病態に関与している可能性が考えられ、今後自己免疫疾患症例におけるさらなる解析が必要である。

F. 健康危機情報→総括にて報告

G. 研究発表

1. 論文発表

Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Morita K, Ishigaki K, Suzukawa K, Kanaya K, Kondo K, Yamasoba T, Furukawa A, Kitahara N, Shoda H, Shibuya M, Okamoto A, Yamamoto K. Transcription factor early growth response 3 is associated with the TGF- β 1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo. *J Immunol*. 2013;191:2351-9.

Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Egr2 and Egr3 are the unique regulators for systemic autoimmunity. *JAKSTAT*. 2013 Apr 1;2(2):e23952.

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 Apr;43(4):1063-73.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory cell subsets in the control of autoantibody production related to systemic autoimmunity. *Ann Rheum Dis*. 2013 Apr;72 Suppl 2:ii85-9.

2. 学会発表

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Nakachi Shinichiro, Hirofumi Shoda, Kazuyoshi Ishigaki, Kazuhiko Yamamoto. The role of CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells in autoimmune diseases. 第42回日本免疫学会学術総会 国際シンポジウム 平成25年12月11日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Kazuhiko Yamamoto. The B cell control by Egr2-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells. 2013 アジア国際自己免疫学会 平成25年11月21日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Yukiko Iwasaki, Kazuyoshi Ishigaki, Akiko Okamoto, Kazuhiko Yamamoto. Egr2-mediated control of autoimmunity. JSCIR-MMCB 2013 symposium 平成25年5月21日

Yukiko Iwasaki, Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Atsushi Yanai, Shuji Sumitomo, Hirofumi Shoda, Kazuhiko Yamamoto. Novel IL-10 induction pathway mediated by Egr2 in IL-27-stimulated T cells. 第57回日本リウマチ学会学術集会 ワークショップ 平成25年4月20日

藤尾圭志、岡村僚久、住友秀次、岩崎由紀子、岡本明子、山本一彦「全身性エリテマトーデスと免疫制御細胞」 第57回日本リウマチ学会学術集会 シンポジウム 平成25年4月19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

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1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1内科学講座 学内講師

研究協力者 久保智史 産業医科大学医学部第1内科学講座 助教

研究要旨 全身性エリテマトーデス(SLE)の発症過程では、濾胞性ヘルパーT (T_{fh})細胞および B 細胞の活性化による過剰な自己抗体産生を介した多臓器障害が生ずる。しかし、病態を形成するこれらのリンパ球サブセットの分化と機能の詳細は不明である。本年度は、SLE における活性化 T_{fh} 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た。その結果、SLE 患者も末梢血では活性化 CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺ T_{fh} 細胞と CD19⁺IgD⁻CD27⁺ 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⁺CD123⁺の新たな DC サブセットが増加し、CD4⁺CXCR5⁺ CXCR3⁺の T_{fh}/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。今後、DC/T_{fh} 細胞/B 細胞の分化異常を齎す細胞内外のシグナル伝達異常の同定とそのシグナル制御による新規治療法の開発が期待される。

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_{fh}) 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_{fh} 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形成において、樹状細胞 (DC) -T_{fh} 細胞-B 細胞軸を中心に、DC のシグナルがヘルパーT 細胞サブセットのバランス異常を介して、T_{fh} への偏向を誘導する過程を解明すると共に、シグナル伝達の JAK-STAT 系に焦点をあて、T_{fh} の機能異常と B 細胞の過剰活性化の制御を介する新規治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

本年度は、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、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- α / β / γ 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。

(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、RA 患者に比して SLE 患者では活性化 CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺ T_{fh} 細胞と CD19⁺IgD⁻CD27⁺ effector memory B 細胞の割合が増加し、両者には有意な正の相関を認めた。(2) 活性化 T_{fh} 細胞と effector memory B 細胞の割合は、SLE の疾患活動性と相関せず、抗 Sm 抗体価と有意に相関した。(3) DC サブセットでは、plasmacytoid DC の割合に変化を認めず、myeloid DC が減少し、CD11c⁺CD123⁺の新たな DC サブセットが増加し、plasmablast の割合と自己抗体価に相関した。(4) SLE 患者では、T_{fh} 細胞と Th1 細胞の形質を重複する T_{fh}/Th1 (CD4⁺CXCR5⁺ CXCR3⁺)細胞が増加した。(5)

末梢血由来のナイーブ T 細胞を IFN- γ または IL-12 で刺激すると、Bcl-6⁺ T-bet⁺ の Tfh/Th1 様の細胞が誘導され、IFN- γ と IL-12 の共刺激が STAT1/STAT4 のリン酸化を亢進させ、IL-21 の産生による Tfh 細胞の機能を誘導した。

D. 考察

SLE 患者の末梢血では、新規の CD11c⁻CD123⁻DC サブセットが検出され、活性化した IL-21 産生性 Tfh 細胞の増加、effector memory B 細胞の増加を介して自己抗体産生による病態形成へ寄与する可能性が示唆された。さらに、SLE 患者では可塑性を有する Tfh/Th1 細胞が存在しており、IFN- γ -STAT1 経路と IL-12-STAT4 経路を介して分化誘導される事が示唆された。

E. 結論

SLE 患者では末梢血免疫担当細胞の分化異常が存在し、新規 DC サブセット、可塑性を有する Tfh/Th1 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。今後、DC/Tfh 細胞/B 細胞の分化異常を齎す細胞内外のシグナル伝達異常の同定とそのシグナル制御による新規治療法の開発が期待される。

F. 健康危機情報→総括にて報告

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y, Hirata S. Is it possible to withdraw biologics from therapy in rheumatoid arthritis? *Clinical Therapeutics* (in press)
2. Tanaka Y, Hirata S, Kubo S, Fukuyo S, Hanami K, Sawamukai N, Nakano K, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamura F, Saito K. Discontinuation of adalimumab after achieving remission in patients with established rheumatoid arthritis: 1-year outcome of the HONOR study. *Ann Rheum Dis* (in press)
3. Kubo S, Yamaoka K, Kondo M, Yamagata K, Zhao J, Iwata S, Tanaka Y. The JAK inhibitor tofacitinib reduces the T cell stimulatory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. *Ann Rheum Dis* (in press)
4. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Takei S, Tanaka Y, Sano Y, Yaguramaki H, Yamanaka H. Characteristics related with good effectiveness and safety with tocilizumab: Postmarketing surveillance of 7901 rheumatoid arthritis patients in Japan. *J Rheumatol* (in press)
5. Hirata S, Saito K, Kubo S, Fukuyo S, Mizuno Y, Iwata S, Nawata M, Sawamukai N, Nakano K, Yamaoka K, Tanaka Y. Discontinuation of adalimumab after attaining DAS28 (ESR) remission in patients with rheumatoid arthritis (HONOR study): and observational study. *Arthritis Res Ther* (in press)
6. Kondo M, Yamaoka K, Sonomoto K, Fukuyo S, Oshita K, Okada Y, Tanaka Y. IL-17 inhibits chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Plos ONE* (in press)
7. Yamanaka H, Ishiguro N, Takeuchi T, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S, Akama H, Kupper H, Arora V, Tanaka Y. Recovery of clinical but not radiographic outcomes by the delayed addition of adalimumab to methotrexate-treated Japanese patients with early rheumatoid arthritis: 52 week results of the HOPEFIL-1 trial. *Rheumatology* (in press)
8. Fukuyo S, Yamaoka K, Sonomoto K, Oshita K, Okada Y, Saito K, Yoshida Y, Kanazawa T, Minami Y, Tanaka Y. IL-6-accelerated calcification by induction of ROR2 in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells is STAT3-dependent. *Rheumatology* (in press)
9. Yukawa S, Yamaoka K, Sawamukai N, Shimajiri S, Kubo S, Miyagawa I, Sonomoto K, Saito K, Tanaka Y. Dermal mast cell density in fingers reflects severity of skin sclerosis in systemic sclerosis. *Mod Rheumatol* (in press)
10. Sonomoto K, Yamaoka K, Kubo S, Hirata S, Fukuyo S, Maeshima K, Suzuki K, Saito K, Tanaka Y. Effects of tofacitinib on lymphocytes in rheumatoid arthritis: Relation to efficacy and infectious adverse events. *Rheumatology* (in press)
11. Tanaka Y. Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal? *Ann Rheum Dis* (2013) 72, ii124-ii127
12. Smolen JS, Schoels MM, Nishimoto N,

- Breedveld FC, Burmester G, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Gabay C, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Jones G, Kvien TK, Murakami M, Betteridge N, Bingham III C, Bykerk V, Choy E, Combe B, Cutolo M, Graninger W, Lanan A, Martin-Mola E, Montecucco C, Ostergaard M, Pavelka K, Rubbert-Roth A, Sattar N, Scholte-Voshaar M, Tanaka Y, Trauner M, Valentini G, Winthrop K, de Wit M, van der Heijde D. Consensus statement on blocking the effects of interleukin-6 and in particular by interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann Rheum Dis* (2013) 72, 482-492
13. Tanaka Y, Yamaoka K A Jak inhibitor tofacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis from basic to clinic. *Mod Rheumatol* (2013) 23, 415-424
 14. O'Shea JJ, Kontzias A, Yamaoka K, Tanaka Y, Laurence A. Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* (2013) 72, ii111-
 15. Tanaka Y, Hirata S, Saleem B, Emery P. Discontinuation of biologics in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* (2013) 31 (Suppl. 78): S22-S27
 16. 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* (2013) 72, 310-312
 17. Aoki T, Yamashita Y, Saito K, Tanaka Y, Korogi Y. Diagnosis of early-stage rheumatoid arthritis: usefulness of unenhanced and gadolinium-enhanced MR images at 3T. *Clin Imaging* (2013) 37, 348-353
 18. 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* (2013) 65: 559-570
 19. Toyota T, Akamatsu N, Tanaka A, Shouzaki T, Tsuji S, Saito K, Tanaka Y. Mesial temporal lobe epilepsy as a neuropsychiatric syndrome of systemic lupus erythematosus. *Epilepsia* (2013) 54, e33-e36
 20. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. Persistent memory B cell down-regulation after 6-year remission induced by rituximab therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* (2013) 22, 538-540
 21. Aoki T, Yamashita Y, Oki H, Takahashi H, Hayashida Y, Saito K, Tanaka Y, Korogi Y. Iterative decomposition of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation (IDEAL) of the wrist and finger at 3T: Comparison with chemical shift selective fat suppression images. *J Magn Reson Imaging* (2013) 37, 733-738
 22. Li X, Yamagata K, Nishita M, Endo M, Arfian N, Rikitake Y, Emoto N, Hirata K, Tanaka Y, Minami Y. Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of tubular epithelial cells during renal fibrosis. *Genes Cells* (2013) 18, 608-619
 23. 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* (2013) 72, 1488-1495
 24. Mori T, Kabashima K, Fukamachi S, Kuroda E, Sakabe JI, Kobayashi M, Nakajima S, Nakano K, Tanaka Y, Matsushita S, Nakamura M, Tokura Y. D1-like dopamine receptors antagonist inhibits cutaneous immune reactions mediated by Th2 and mast cells. *J Dermatol Sci* (2013) 18, 608-619
 25. Hanami K, Nakano K, Saito K, Okada Y, Yamaoka K, Kubo S, Kondo M, Tanaka Y. Dopamine D2-like receptor signaling suppresses human osteoclastogenesis. *Bone* (2013) 56, 1-8

26. Ikenouchi-Sugita A, Yoshimura R, Hori H, Umene-Nakano W, Katsuki A, Saito K, Tanaka Y, Nakamura J. Plasma catecholamine metabolite levels and the activities of psychiatric symptoms in systemic lupus erythematosus. Hum Psychopharm Clin (2013) 28, 198-202
27. Hirata S, Driven L, Shen Y, Centola M, Cavet G, Lems WF, Tanaka Y, Huizinga TWJ, Allaart CF. A multi-biomarker score measures rheumatoid arthritis disease activity in the BeSt study. Rheumatology (2013) 52, 1202-1207
28. 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 (2013) 72, 1488-1495

Autoimmunity. Granada, Spain. 平成 24 年 5 月 9 日 - 12 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

2. 学会発表

1. Y. Tanaka. Treatment of SLE with biologics. The 15th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, APLAR 2012, Dead Sea, Jordan. 平成 24 年 9 月 10 日 - 14 日
2. Y Tanaka, S Hirata, S Fukuyo, M Nawata, S Kubo, K Yamaoka and 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. 第 78 回米国リウマチ学会 ACR 2012 (concurrent Workshop), Washington DC, USA, 平成 24 年 11 月 9 日から 11 月 14 日
3. Y. Tanaka. Next stage of RA treatment: Biologics-free remission will be a possible treatment goal?. Advances in Targeted Therapies 2012, Baveno, Italy. 平成 24 年 3 月 28 日 - 4 月 1 日
4. Y. Tanaka. Next stage of RA treatment: Biologics-free remission will be a possible treatment goal? T3 Medical Symposium, Seoul, "Achievement of ultimate treatment goal in RA". Seoul. 平成 24 年 5 月 3 日 - 4 日
5. Y. Tanaka. The Maximization of Efficacy of Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. The 8th International Congress on

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

研究分担者 川上 純 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座 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展開医療科学講座 助教)
柳原克紀 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科臨床検査医学 教授)

研究要旨 全身性エリテマトーデス(SLE)は多彩な免疫学的異常を伴い、多臓器が障害される全身性自己免疫疾患である。SLE における抑制系シグナルに関してはこれまで様々な議論がなされており、一定の見解が得られていない。CD52 分子は B 細胞、T 細胞、単球/マクロファージなどの免疫系細胞に発現しており、慢性リンパ球性白血病(CLL)治療のターゲットとなっている。最近、健常人の末梢血における CD52high T 細胞が CD52low T 細胞活性を抑制する機能を有する可能性が示唆された(Nat Immunol. 2013 Jul;14(7):741-8.)。そこで今回、我々は 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。その結果、SLE では健常人や他のリウマチ性疾患に比べて CD4+CD52high T 細胞および CD8+CD52high T 細胞の集団が少ないことがわかった。また、この CD52high 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、重要な役割を果たすと考えられ、機能的意義を解明することが今後のテーマとなるであろう。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)における制御性 T 細胞(Treg)の役割について議論が分かれており、一定の見解が得られていない。CD52 は T 細胞や B 細胞を始めとする様々なリンパ球に発現している。最近、CD4+ CD52high 細胞から切断された可溶性 CD52 が Siglec-10 を介して CD4+ CD52low 細胞の活性化を抑制することが報告され、自己免疫性疾患などの病態に関与することが示唆された。この CD4+CD52+細胞は従来の制御性 T 細胞とは異なる機能を有していると思われる、SLE におけるその機能的意義について検討したいと考えた。

B. 研究方法

健常人(N=7)、SLE 患者(N=13)、非 SLE 患者(N=5)のヒト末梢血単核細胞を分離し、フローサイトメーターにて CD4+CD25high 細胞、CD4+CD25+CD127- 細胞 (Treg) および CD4+CD52+T 細胞発現を検討した。さらに CD4+CD52+細胞は CD52high と CD52low の集団に分けて解析を行った。同時に SLE の疾患活動性を示す、Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)、抗 ds-DNA 抗体価、補体価など

との相関を検討した。

(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」による承認を得て、プロトコルを遵守して行った。

C. 研究結果

今回の研究の SLE 患者は疾患活動性示す、SLEDAI 9.75 ± 4.35 、C3 83.0 ± 18.8 mg/dl、C4 18.9 ± 5.11 mg/dl、抗 ds-DNA 抗体 18.4 ± 50.8 IU/ml で中等度の疾患活動性を有する患者群であった。CD4+CD25high 細胞および CD4+CD25+CD127-細胞(Treg)の集団は各群間に有意差を認めなかった。CD4+CD52+細胞のうち CD52high 細胞は健常人、SLE 患者、非 SLE 患者群で各々 84.9 ± 9.93 (%)、 62.3 ± 17.2 (%)、 56.2 ± 22.5 (%)と健常人群で有意に多く認められた(健常人群 vs. SLE 群; $p=0.0492$, 健常人群 vs. 非 SLE 群; $p=0.0377$)。一方、CD52low 細胞は健常人、SLE 患者および非 SLE 患者で各々 9.76 ± 9.46 (%)、 27.2 ± 13.0 (%)、 26.9 ± 17.8 (%)と SLE 群で高い傾向にあった(健常人群 vs. SLE

群;p=0.0518)。

D. 考察

SLEなどの自己免疫性疾患ではCD4+CD52high細胞発現が低下し、CD4+CD52low細胞の出現がみられていることから、この細胞集団が活性化され、自己抗体などの産生に寄与している可能性があると考えられる。

E. 結論

CD4+CD52+細胞はこれまでのTregと異なる機序で、T細胞を制御し、CD52highとCD52lowの発現量の違いが自己免疫性疾患発症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

- 1) Kuriya G, Uchida T, Akazawa S, Kobayashi M, Nakamura K, Satoh T, Horie I, Kawasaki E, Yamasaki H, Yu L, Iwakura Y, Sasaki H, Nagayama Y, Kawakami A, Abiru N. Double deficiency in IL-17 and IFN- γ signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*. 56 (8): 1773-1780, 2013.
- 2) Kobayashi M, Kaneko-Koike C, Abiru N, Uchida T, Akazawa S, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Ida H, Kawasaki E, Yamasaki H, Nagayama Y, Sasaki H, Kawakami A. Genetic deletion of granzyme B does not confer resistance to the development of spontaneous diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol*. 173 (3): 411-418, 2013.
- 3) Kawashiri SY, Ueki Y, Terada K, Yamasaki S, Aoyagi K, Kawakami A. Improvement of plasma endothelin-1 and nitric oxide in patients with systemic sclerosis by bosentan therapy. *Rheumatol Int*. 2013 Sep 27.

2. 学会発表

- 1) 川尻真也, 中島好一, 寶來吉朗, 鈴木貴久,

岡田覚丈, 中島宗敏, 溝上明成, 松岡直樹, 右田清志, 中村英樹, 折口智樹, 青柳 潔, 川上 純 全身性強皮症合併症と血管内皮機能検査およびバイオマーカーの関連の検討. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013/4/18-4/20.

- 2) 一瀬邦弘, 牛草 健, 梅田雅孝, 中島好一, 鈴木貴久, 寶來吉朗, 岡田覚丈, 川尻真也, 岩本直樹, 玉井慎美, 中村英樹, 折口智樹, 川上 純. ループス腎炎における Calcium/calmodulin dependent kinase protein type IV のポドサイト機能に対する影響. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013/4/18-4/20.
- 3) 一瀬邦弘, 梅田雅孝, 中島好一, 鈴木貴久, 寶來吉朗, 岡田覚丈, 川尻真也, 岩本直樹, 玉井慎美, 有馬和彦, 中村英樹, 折口智樹, 川上 純. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus における脳脊髄液中サイトカインプロファイルの検討. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013/4/18-4/20.
- 4) Ichinose K, Ushigusa T, Koga T, George C. Tsokos, Kawakami A. Role of Calcium/Calmodulin Kinase IV On Podocyte Function in Lupus Nephritis. 2013 ACR/ARHP Annual Meeting 13. 2013/10/25/10/30.

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。

Ⅲ. ヒトPBMC解析マニュアル

ヒト PBMC 解析マニュアル

- ・遠心機を 20°C に温める
 - ・採血（ヘパリンコートしたシリンジを用いて 20ml）
 - ・PBMC の分離：細胞、抗体は原則 on ice で作業する。
1. Leucosep tube 2 本に Ficoll-Paque を 17ml ずつ入れて、1500 rpm, 1 min 遠心。
 2. 末梢血 20 ml と PBS 20 ml を Falcon に入れピペッティング。
 3. 遠心後の Leucosep に 2. を 20 ml ずつ入れる。
 4. 20°C, 1000 rpm, 30 min (加速減速 soft) で遠心。
 5. パスツールピペットで上清を捨てて、7ml 程度の buffy coat をとり、50mL tube に入れる。PBS 30 ml 追加後、4°C, 1300 rpm, 8 min 遠心。
 6. 上清を捨てて、ACK 1.5 ml で溶血処理し、15 ml tube へうつし、PBS 10 ml で rescue。
 7. 細胞カウントし、4°C, 1300 rpm, 8 min 遠心。
 8. 上清を捨てて、細胞を 1×10^6 ずつエッペンに分け、PBS を足して全量 100 μ l とする。
 9. Fc block を 10 μ l ずつ入れ、30 min on ice。
 10. 抗体を入れ、20 min on ice。
 11. PBS 1000 μ l で wash (1300 rpm, 4°C, 5 min)
 12. 1mM EDTA 入り PBS 500 μ l に resuspend 後、mesh を通して解析する。