

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- 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