

201414006B

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 難治性疾患等実用化研究事業  
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)

## 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

総合 研究報告書 (平成 24～26 年度)

研究代表者 山 本 一 彦

平成 27(2015) 年 3 月発行

## 構成員名簿

研究代表者：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・代謝内科学分野 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 附属膠原病リウマチ痛風センター膠原病リウマチ内科 准教授

桑名 正隆

日本医科大学 アレルギー膠原病内科 教授

田村 直人

順天堂大学 医学部膠原病内科 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 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 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1内科学講座内科 教授

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

## 目 次

I. 総合研究報告	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」	7
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」	10
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HC gp-39 及びFPR2 発現T細胞サブセットの解析に関する研究」	17
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」	19
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」	22
日本医科大学アレルギー膠原病内科 桑名 正隆	
「関節炎患者末梢単核球異常とその修復に関する研究」	27
順天堂大学医学部膠原病内科 田村 直人	
「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」	32
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 」	36
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 」	39
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 」	43
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制御性T細胞に関する研究 」	47
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	51
IV. 刊行に関する一覧	69

# 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 日本医科大学アレルギー膠原病内科 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 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、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 年および 26 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

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・26年度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、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,特に感受性アレルのShared epitope(SE)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細胞を詳しく見る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。さらにB細胞受容体、T細胞受容体について、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。

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スプライシング因子のASF/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(FPR2)とHCgp-39(human cartilage glycoprotein 39)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とHCgp-39の発現を比較検討し、さらにFPR2発現とESR,CRPとの相関を検討した。

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

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て解析を行った。さらに末梢血 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞および CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>細胞の細胞比率、各種遺伝子発現を検討し、免疫抑制機能を調べる為、磁気ビーズおよびフローサイトメトリーによるソーティングで分離し、同種混合性リンパ球反応における抑制能を評価した。

田村分担研究者は、RA の T 細胞サブセット機能異常における PI3 キナーゼ経路の関与および阻害薬によるその是正について検討するため、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。また、これまで我が国で発症頻度が低いために検討がされてこなかった、強直性脊椎炎(ankylosing spondylitis: AS) の末梢血単核球の検討を行った。さらにこの単核球を刺激し、サイトカイン産生細胞の頻度を細胞内染色で解析した。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。さらに、マウスでみられる抗体産生抑制能で重要な分子である TGF- $\beta$ 3 について解析した。

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<sup>+</sup>CD52<sup>+</sup>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。また、RA 患者の免疫担当細胞と HLA-DRB1 の疾患感受性遺伝子型 (SE)、ケモカイン受容体 CXCR4 との関連を検討した。SE 陽性 RA 患者では CD4+メモリー T 細胞比率が増加しており、この比率と T 細胞の DR 陽性率、抗 CCP 抗体値に正の相関がみられることを見出した。また CXCR4 は RA 患者 T 細胞では健常人に比して発現が亢進しており、CD4+メモリー T 細胞における陽性率は、B 細胞の DR 発現量、活動性指標の DAS28、RA に特異性の高い自己抗体である抗 CCP 抗体と正の相関があることを見出した。

森尾分担研究者は原発性免疫不全症に関しての解析を続け、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。すなわち CVID 患者の中には T 細胞、B 細胞の分化障害から



自己免疫疾患を発症する例が存在した。そこで次世代シーケンサーにより T 細胞受容体 (TCR)、B 細胞受容体 (BCR) の解析を行い、CDR3 領域長、D・J 領域の利用率、J 領域における新しい配列の追加などを検討した。この結果、一部の患者に幾つかの領域における頻度の偏りなどを見出した。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 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。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、この低下が疾患活動性と関連があること、ASF/SF2 の発現レベルは正常 RasGRP1、DNMT1 の発現レベルと強い正の相関があることから、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 RA の CD4 陽性 T 細胞にコントロールと比較し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。さらに FDR2 と同様な高発現している HCgp-39 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た。そして、HCgp-39 は CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg にのみ高発現していること、リコンビナント HCgp-39 は抗原特異的 T 細胞増殖や Th1, Th17 からのサイトカイン産生を著

明に抑制することを見出した。

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 が陽性のヘルパー 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 陽性ヘルパー 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。さらに、CD161 が陽性で CXCR3 陰性のメモリーヘルパー T 細胞が IL-17 産生細胞の 80% であることを見出した。

桑名分担研究者は、従来の検討から 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ている。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>/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。これらから CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD49d<sup>+</sup>細胞では nTreg に由来する免疫抑制能は有するが、IL-17 を介して炎症病態を促進する可能性があることが示された。すなわち、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。さらに、日本人で頻度が低く検討がほとんどされていない強直性脊椎炎の末梢血では、単球の比率が高く、NK細胞が低いことを見出した。またCD4陽性T細胞の中では、Th17の頻度が高く、Th1は低い傾向があり、CD8陽性T細胞でもIL-17の発現が亢進していることを明らかにした。

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。また、筋炎患者全体では、特にcentral memory CD4陽性細胞が多く、naïve CD8陽性細胞が少ない傾向を認めた。制御性T細胞は、健常人に比べて多い傾向を見出した。

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。一方、この新規制御性T細胞は、ヒトでも試験管内での濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)とB細胞の共培養による抗体産生を抑制することを見出した。さらにこの細胞は培養によりTGF- $\beta$ 3を発現し、ヒトリコンビナントTGF- $\beta$ 3は、ヒトB細胞の分裂および抗体産生を抑制することを明らかにした。田中分担研究者はSLE患者の末梢血では活性化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細胞の割合が増加することから、免疫担当細胞の分化異常の存在を示した。また、CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>のTfh/Th1細胞の可塑性を

有する細胞が増加し、この亜集団がIFN $\gamma$ 産生を介してCXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>memory B細胞を誘導することを明らかにした。

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。一方、SLEでは健常人や非SLE患者に比べてCD4<sup>+</sup>CD52<sup>low</sup>細胞の出現がみられ、活動性と相関することから、病態形成に関与している可能性を見出した。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知見である。

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

分担研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授  
研究協力者 住友 秀次 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 助教  
永渕 泰雄 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 大学院生  
藤尾 圭志 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 講師

研究要旨 ヒトにおける、末梢血単核球 (PBMC) の解析手法を標準化するために、フローサイトメーターを用いた検討によって、各細胞サブセットの解析に最適と思われる抗体のクローン、色素の組み合わせを検討し、「ヒト PBMC 解析マニュアル」を作成した。それを用いて、関節リウマチ (RA) の免疫学的異常と臨床像、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、RA 患者末梢血の免疫学的解析を行った。その結果、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、Memory T 細胞の CXCR4 陽性率が、疾患活動性、B 細胞の HLA-DR 発現量と正の相関を示すことが明らかとなった。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。

### A. 研究目的

ヒト細胞サブセットの解析において、細胞表面マーカーの定義が国際的に標準化するために、Human Immunology Project Consortium (HIPC) は、ヒト細胞サブセット分類の標準化を目標とする報告を行った [Nat Rev Immunol. (2012) 12:191-200]。本研究では、初年度において T 細胞サブセットを分離するための細胞表面マーカーの選択・蛍光色素の組み合わせなど、実際に検討して適切な方法を確立することを試みた。

次年度以降は、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ることにした。

### B. 研究方法

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

これによって定められた解析パネルを用いて、早期未治療 RA 患者 8 名を含む RA 患者 50 名、健康人 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)

ヒト検体を用いた実験であることから、検体採取方法・個人情報保護方法・同意取得方法などに関して東京大学医学部研究倫理審査申請を行い、平成 25 年 6 月 12 日に承認され (審査番号 10154)、それに従って研究を進めた。

### C. 研究結果

フローサイトメーターを用いた検討によって、他チャンネルへの漏れこみを少なく、また分離が良好で、各細胞サブセットの解析に最適と思われる抗体のクローン、色素の組み合わせを検討し、「ヒト PBMC 解析マニュアル」を作成した。

RA 患者の PBMC 解析においては、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、健康人、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。

興味深いことに、RA 患者ではすべての CD4 分画で CXCR4 発現が亢進していた。CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>Memory T 細胞の CXCR4 陽性率は、DAS28、抗 CCP 抗体値と正の相関を示し、また B 細胞の HLA-DR 発現量とも正の相関を示した。

#### 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。

また、RA 患者 CD4 陽性 T 細胞における CXCR4 発現亢進は、遊走能と関係があると考えられるが、B 細胞上 HLA-DR 発現によって CXCR4 発現が誘導される可能性が示唆され、更なる検討を行っている。

#### 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

特になし

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed O W, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002455.
2. Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tani H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L, Worthington J, Siminovitch KA, Lathrop M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K; Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012;44:511-6.
3. Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K; Kidney-infiltrating CD4<sup>+</sup> T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. *Kidney Int.* 2012;82:969-79.
4. Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, Ikari K, Tsunoda T, Takahashi A, Kubo M, Taniguchi A, Matsuda F, Ohmura K, Momohara S, Mimori T, Yamanaka H, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K; Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF- $\kappa$ B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002949.
5. Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1-mediated IL-10 production in

- IL-27-stimulated CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2013;43:1063-1073.
6. 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]
7. 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.
8. 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.
9. 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
10. Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Nakachi S, Komai T, Shoda H, Miyazaki J, Fujio K, Yamamoto K. TGF- $\beta$  3-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup> regulatory T cells control humoral immune responses *Nat Commun*. 2015 in press
13. Yamamoto K, Okada Y, Suzuki A and Kochi Y. Genetics of rheumatoid arthritis in Asia—present and future. *Nat.Rev.Rheumatol*. in press 2015
14. Kochi Y, Suzuki A, Yamamoto K. Genetic basis of rheumatoid arthritis: a current review. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 ;452(2):254-62.
15. 住友秀次 「最新医学」 68 巻 3 号 615 頁 2013 年 3 月
16. 住友秀次 「医学のあゆみ」 250 巻 1 号 41-46 頁 2015 年 1 月
2. 学会発表
1. 第 58 回日本リウマチ学会 (平成 26 年 4 月 25 日)「関節リウマチ患者における包括的臨床免疫解析の試み」永淵泰雄、住友秀次、藤尾圭志、山本一彦ほか
2. 第 35 回日本炎症・再生医学会 (平成 27 年 7 月 2 日)「関節リウマチ患者における包括的臨床免疫解析の試み」永淵泰雄、住友秀次、藤尾圭志、山本一彦ほか
3. 第 42 回日本臨床免疫学会 (平成 26 年 9 月 25 日)「関節リウマチ患者における包括的臨床免疫解析の試み」永淵泰雄、住友秀次、藤尾圭志、山本一彦ほか
3. その他
- 住友秀次、今井耕輔  
「ヒト PBMC 解析マニュアル」
- 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

**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 $\zeta$  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。SF2 は RasGRP1 exon 11 mRNA と直接結合し、RasGRP1 の蛋白レベルを正に調整することが分かった。SLE 患者 T 細胞において、SF2 の低発現が RasGRP1 スプライス異常および蛋白レベルの低下を来し、病態に関与す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 $\zeta$  鎖が低発現であり、代表的な SR 蛋白である SF2 が CD3 $\zeta$  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)。また、米国人 SLE 患者由来 T 細胞において SF2 の発現が健常人と比較して低値であり、また疾患活動性が高い患者においてより SF2 の発現量が低いことが報告された (Moulton et al. *PNAS* 2013)。

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。

T細胞におけるSF2の発現がRasGRP1の蛋白レベルを調節しているかどうかを直接確認する目的で、Jurkat T細胞株に2種のSF2特異的siRNAまたはコントロールsiRNAを、Neon Transfection System (Life Technologies) を用いて遺伝子導入した。48時間後にセルライゼートを調整して抗SF2抗体、抗RasGRP1抗体および抗 $\beta$ アクチン抗体を用いて免疫ブロットを行い、それぞれの蛋白レベルを解析した。

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)。

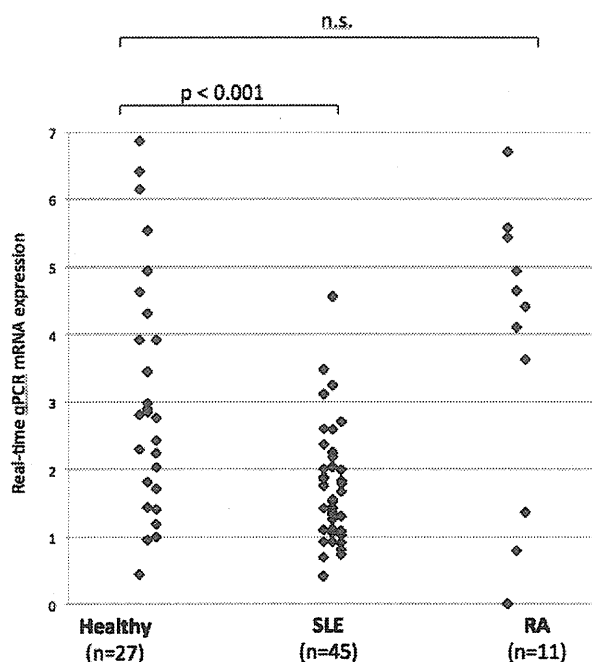


Fig.1; Expression levels of SF2 mRNA in peripheral blood T cells

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)。

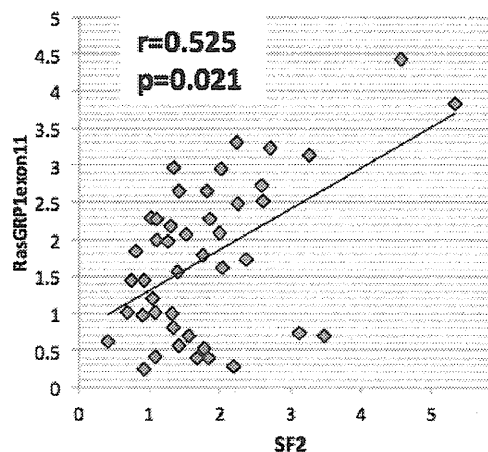


Fig.2 (A) Correlation between expression levels of SF2 and RasGRP1 (normal form) in lupus T cells

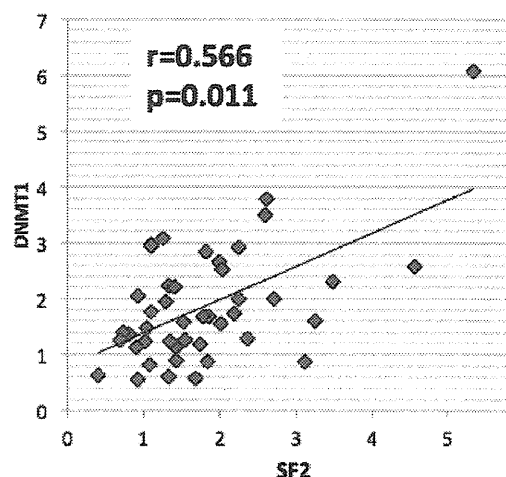


Fig.2 (B) Correlation between expression levels of SF2 and DNMT1 in lupus T cells

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)。

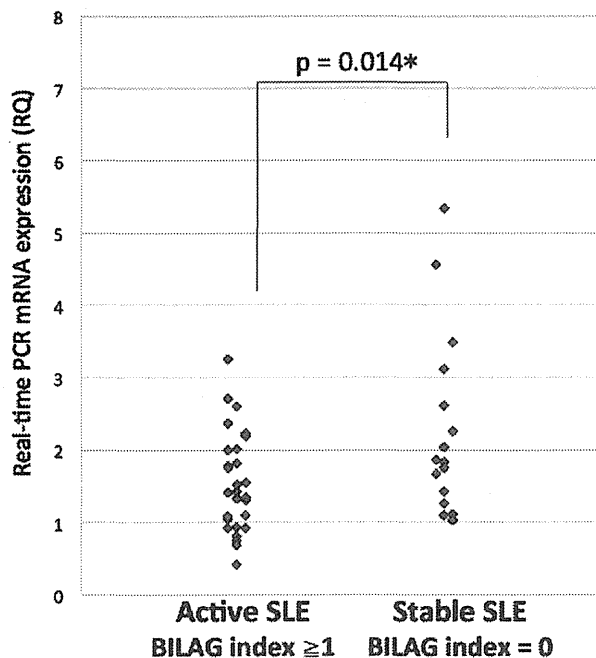


Fig.3; Comparison of SF2 expression in T cells from SLE patients according to their disease activity

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)。

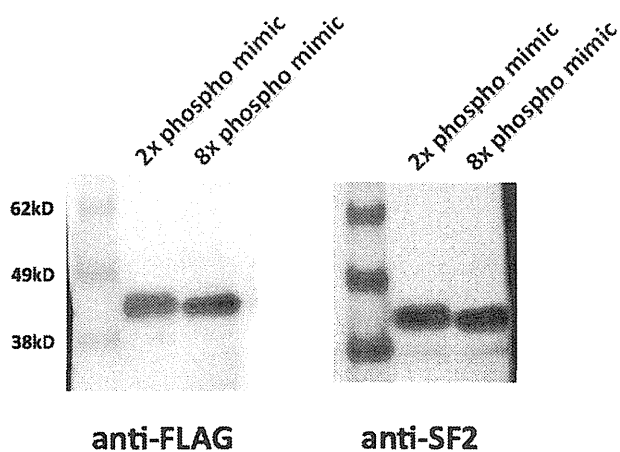


Fig.4; Expression and purification of recombinant phospho-mimic SF2

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。

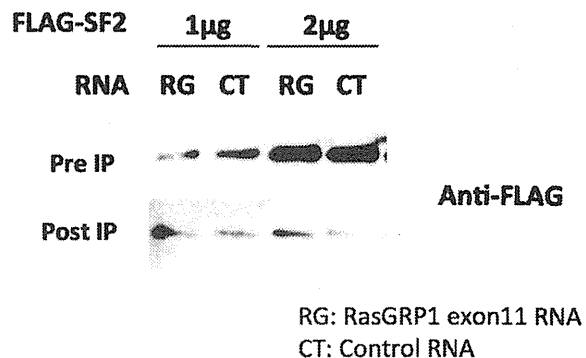


Fig.5; Binding between RasGRP1 exon 11RNA and phosphor-mimic SF2

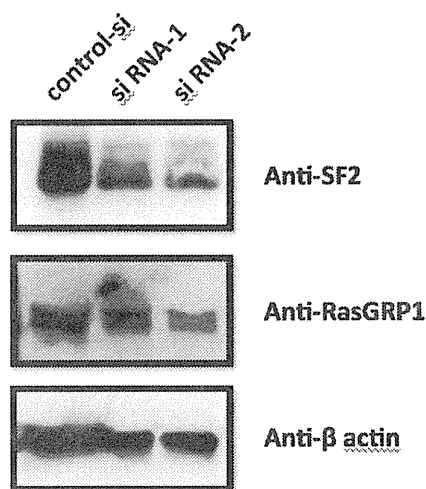


Fig.6: Knockdown of SF2 in Jurkat cells using siRNA

Jurkat T 細胞株を用いた SF2 ノックダウンの影響 ; SF2 特異的 siRNA を Jurkat 細胞に遺伝子導入した結果、コントロール siRNA を導入した場合と比較して SF2 蛋白レベルは低下していた (Fig.6)。SF2 のノックダウンにより、RasGRP1 の蛋白レベルは低下しており、SF2 が RasGRP1 の蛋白発現を調整していることが示された。

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.7)。健康人では Gfi-1 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. 8)



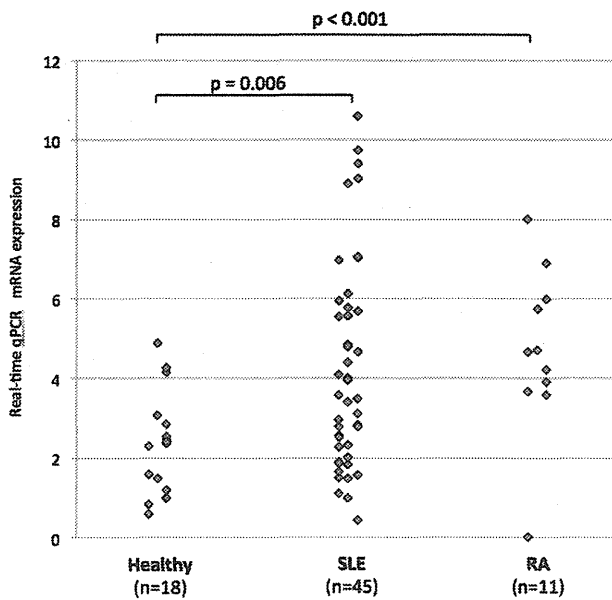


Fig.7; Expression levels of Gfi-1 mRNA in peripheral blood T cells

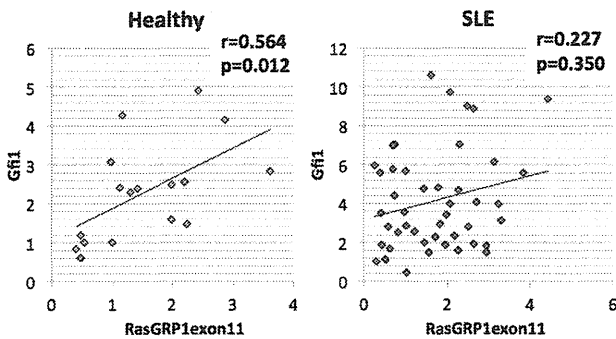


Fig.8; Correlation between expression levels of Gfi-1 and RasGRP1 in peripheral blood T cells

#### 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。

健常人において 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.9A)。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.9B)。SF2 と RasGRP1 exon 11 との直接結合が示され、また T 細胞株において SF2 をノックダウンすることによって RasGRP1 の蛋白レベルが低下したことから、SF2 は CD3 と鎖のみならず RasGRP1 の発現を調節することが明らかになった。

活動性の高い SLE 患者では SF2 の発現レベルが低下することで SLE 患者由来 T 細胞のフェノタイプである CD3 と鎖および RasGRP1 の低発現が誘導されると考えられた。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。

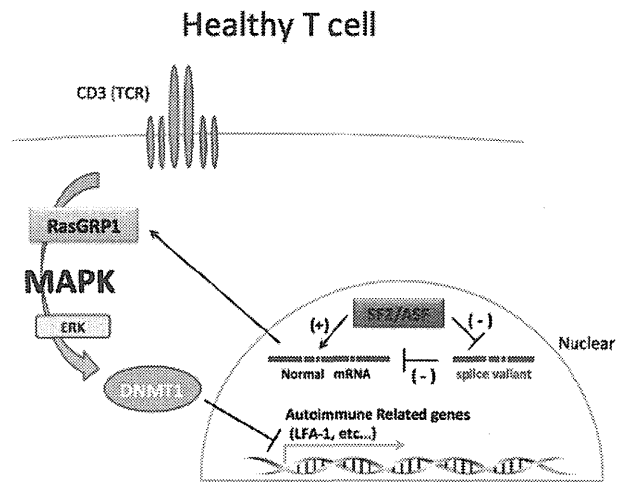


Fig.9 (A); SF2 regulates RasGRP1 splicing in healthy T cells

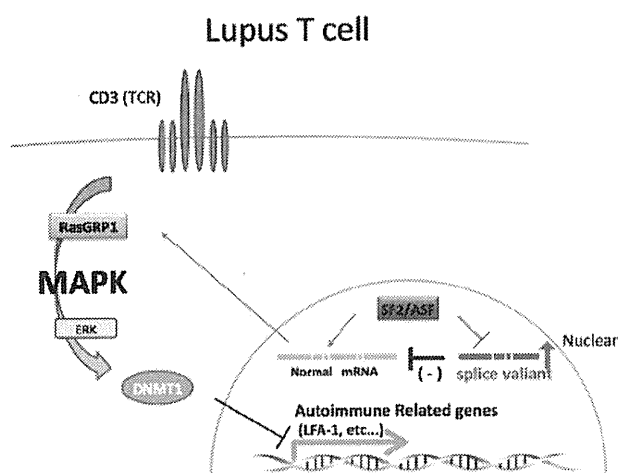


Fig.9 (B); Impaired SF2 expression results in abnormal splicing of RasGRP1 mRNA and lower protein levels

#### E. 結論

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

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tanaka M, Koike R, Sakai R, Saito K, Hirata S, Nagasawa H, Kameda H, Hara M, Kawaguchi Y, Tohma S, Takasaki Y, Dohi M, Nishioka Y, Yasuda S, Miyazaki Y, Kaneko Y, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Miyasaka N, Harigai M. Pulmonary infections following immunosuppressive treatment during hospitalization worsen the short-term vital prognosis for patients with connective tissue disease-associated interstitial pneumonia. *Mod Rheumatol. in press*
2. Oku K, Amengual O, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. An independent validation of the global anti-phospholipid syndrome score in Japanese cohort of patients with autoimmune diseases. *Lupus in press*
3. Yamazaki H, Sakai R, Koike R, Miyazaki Y, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yasuda S, Kurita T, Kaneko Y, Tanaka Y, Nishioka Y, Takasaki Y, Nagasaka K, Nagasawa H, Tohma S, Dohi M, Sugihara T, Sugiyama H, Kawaguchi Y, Inase N, Ochi S, Hagiyaama H, Kohsaka H, Miyasaka N and Harigai M. Assessment of risks for pulmonary infection during 12 months after commencing or intensifying immunosuppressive treatment for active connective tissue diseases: A report from a large-scale prospective cohort study. *J Rheumatol in press*
4. Watanabe K, Yasuda S, Noguchi A, Horita T, Atsumi T. Coronary and mesenteric involvement in polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheumatol. in press*
5. Kono M, Yasuda S, Stevens RL, Koide H, Kurita T, Shimizu Y, Kanetsuka Y, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Shimizu T, Majima T, Koike T, Atsumi T. RasGRP4 is aberrantly expressed in the fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and controls their proliferation. *Arthritis Rheumatol. in press*
6. Kurita T, Yasuda S, Amengual O, Atsumi T. The efficacy of calcineurin inhibitors for the treatment of interstitial lung disease associated with polymyositis/dermatomyositis. *Lupus. 2015;24:3-9*
7. Kurita T, Yasuda S, Oba K, Odani T, Kono M, Otomo K, Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Amenguak O, Horita T, Atsumi T. The effect of tacrolimus in patients with interstitial lung diseases complicated with polymyositis or dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford). 2015; 54:39-44*
8. Kataoka H, Yasuda S, Fukaya S, Oku K, Horita T, Atsumi T, Koike T. Decreased expression of Runx1 and lowered production of Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells in systemic sclerosis. *Mod Rheumatol. 2015;25:90-95*