

9. Sakai R, Cho SK, Nanki T, Koike R, Watanabe K, Yamazaki H, Nagasawa H, Amano K, Tanaka Y, Sumida T, Ihata A, Yasuda S, Nakajima A, Sugihara T, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Miura Y, Miyasaka N, Harigai M. The risk of serious infection in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitors decreased over time; a report from the registry of Japanese rheumatoid arthritis patients for long-term safety (REAL) database. *Rheumatol Int*. 2014;34(12):1729-36.
10. Kono M, Yasuda S, Kato M, Kanetsuka Y, Kurita T, Fujieda Y, Otomo K, Horita T, Oba K, Kondo M, Mukai M, Yanai M, Fukasawa Y, Atsumi T. Long-term outcome in Japanese patients with lupus nephritis. *Lupus*. 2014; 23, 1124–1132
11. Amengual O, Horita T, Binder W, Norman GL, Shums Z, Kato M, Otomo K, Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Yasuda S, Atsumi T. Comparative analysis of different enzyme immunoassays for assessment of phosphatidylserine-dependent antiphospholipid antibodies. *Rheumatol Int*. 2014; 34(9):1225-30.
12. Cho SK, Sakai R, Nanki T, Koike R, Watanabe K, Yamazaki H, Nagasawa H, Tanaka Y, Nakajima A, Yasuda S, Ihata A, Ezawa K, Won S, Choi CB, Sung YK, Kim TH, Jun JB, Yoo DH, Miyasaka N, Bae SC, Harigai M; for the RESEARCH investigators; the REAL Study Group. A comparison of incidence and risk factors for serious adverse events in rheumatoid arthritis patients with etanercept or adalimumab in Korea and Japan. *Mod Rheumatol*. 2014; 24(4):572-9.
13. Jin H, Arase N, Hirayasu K, Kohyama M, Suenaga T, Saito F, Tanimura K, Matsuoka S, Ebina K, Shi K, Toyama-Sorimachi N, Yasuda S, Horita T, Hiwa R, Takasugi K, Ohmura K, Yoshikawa H, Saito T, Atsumi T, Sasazuki T, Katayama I, Lanier LL, Arase H. Autoantibodies to IgG/HLA class II complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(10):3787-92
14. Oku K, Amengual O, Zigon P, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue factor gene expression mediated by the phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody. *Rheumatology (Oxford)*. 2013; 52(10):1775-84
15. Kato M, Atsumi T, Oku K, Amengual O, Nakagawa H, Fujieda Y, Otomo K, Horita T, Yasuda S, Koike T. The involvement of CD36 in monocyte activation by antiphospholipid antibodies. *Lupus*. 2013;22(8):761-71
16. Yasuda S. Disseminated intravascular coagulation in the presence of antiphospholipid antibodies: differential diagnosis from catastrophic or microangiopathic antiphospholipid syndrome. *Intern Med*. 2013;52(2):169-70
17. Amengual O, Atsumi T, Oku K, Suzuki E, Horita T, Yasuda S, Koike T. Phospholipid scramblase 1 expression is enhanced in patients with antiphospholipid syndrome. *Mod Rheumatol*. 2013; 23(1):81-8.
18. Fujieda Y, Atsumi T, Amengual O, Odani T, Otomo K, Kato M, Oku K, Kon Y, Horita T, Yasuda S, Koike T. Predominant prevalence of arterial thrombosis in Japanese patients with the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012;21(14):1506-14
19. Odani T, Yasuda S, Ota Y, Fujieda Y, Kon Y, Horita T, Kawaguchi Y, Atsumi T, Yamanaka H, Koike T. Up-regulated expression of HLA-DRB5 transcripts and high frequency of the HLA-DRB5\*01:05 allele in scleroderma patients

with interstitial lung disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(10):1765-74

2. 学会発表

1. Kurita T, Yasuda S, Moulton VR, Shimizu Y, Kono M, Koide H, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Tsokos GC, Atsumi T. Decreased Levels of Splicing Factor 2 / Alternative Splicing Factor (SF2/ASF) induced Lower Levels of RasGRP1 in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. ACR meeting, Boston, USA Nov 15-18, 2014
2. Kurita T, Yasuda S, Moulton VR, Kono M, Koide H, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Tsokos GC, Atsumi T. Decreased Levels of Splicing Factor 2 / Alternative splicing factor (SF2/ASF) Correlate with Lower Transcript Levels of the RasGRP1 Normal Isoform in Lupus T Cells. ACR meeting, San Diego, USA Oct 26-29, 2013
3. Yasuda S. Diagnosis and treatment of RA in Japan, Experience and recommendations of using Tocilizumab in general. The 6th Rheumatology Meeting in Aubrac. Best Western Lagiore, Aubrac, France, Jun 11-12, 2013
4. Yasuda S, Kubota A, Nakagawa H, Kuroki K, Fujieda Y, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Maenaka K, Atsumi T, Role of  $\beta_2$ -glycoprotein

I Domain V in Angiogenesis. CORA meeting, Budapest, Hungary, Apr 4-6, 2013

5. Yasuda S. IL-6 rationale in RA – from bench side. AURORA meeting. London, UK, Oct 19-20,2012
6. Yasuda S, Odani T, Ota Y, Fujieda Y, Kon Y, Horita T, Kawaguchi Y, Atsumi T, Yamanaka H, Koike T. Haematopoietic stem cell transplantation for interstitial lung diseases in patients with systemic sclerosis; Therapeutic effect and evaluation of up-regulated genes. The 8<sup>th</sup> international congress on autoimmunity. Granada, Spain, May 9-13, 2012

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 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

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 Human cartilage glycoprotein-39 (HC gp39) は制御性 T 細胞サブセットに、Formyl peptide receptor 2 (FPR2) は Th1 細胞サブセットに特異的に発現し、ヒト CD4<sup>+</sup>陽性 T 細胞でも RA 患者で発現上昇していることが明らかにされた。これらによる T 細胞サブセット tuning 機構が自己免疫病態に関連していることが考えられる。

### A. 研究目的

我々は GPI 誘導関節炎 (GIA) 発症早期の脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞において HC gp-39 及び FPR2 が高発現していることを genechip で同定した。HC gp-39 は、主に好中球、マクロファージなどに発現する分子であり、関節リウマチ (RA) において自己抗原として同定されている。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、単球及び T 細胞にも発現することが知られている。GIA 及び RA 患者サンプルを用いて HC gp-39, FPR2 (ヒト FPRL-1) と CD4<sup>+</sup>T 細胞サブセットとの関連を検討した。

### B. 研究方法

1) GIA 脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞における HC gp-39, FPR2 mRNA 発現を経時的に検討した。  
2) GIA 脾臓より T 細胞を採取し、GPI 及びコントロール (GST) で刺激し、Th1, Th17 および Treg における HC gp-39 発現を比較解析した。  
3) recombinant HC gp-39 (rHC gp-39) を用いて GIA 脾臓 T 細胞の増殖および IFN $\gamma$  (Th1) および IL-17 (Th17) 産生を検討した。  
4) 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。

5) RA 患者 (n=20) 及び HS (n=18) より CD4<sup>+</sup>T 細胞を単

離し、HC gp-39, FPRL-1 の mRNA 発現を比較解析した。

6) RA 患者 FPRL-1 の発現を FACS 解析にて CD4<sup>+</sup> 及び CD14<sup>+</sup> 細胞で検討し、CD4<sup>+</sup> 細胞、CD11b<sup>+</sup> 細胞の FPRL-1 発現と ESR, CRP との関連を検討した。

### C. 研究結果

1) GIA 早期 day7 の CD4<sup>+</sup> 細胞で HC gp-39, FPR2 両者とも発現が亢進していた。  
2) HC gp-39 は CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg にのみ高発現を認め、特に抗原特異的 Treg で発現が上昇していた。  
3) rHC gp-39 は抗原特異的 T 細胞増殖および Th1 および Th17 からのサイトカイン産生を顕著に抑制した (p<0.05)。  
4) 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、Th1 特異的と考えられた。  
5) HC gp-39, FPRL-1 mRNA とともに RA 患者 CD4<sup>+</sup>T 細胞に有意に高発現していた (p<0.05)。  
6) 一部の RA 患者で FPRL-1 の CD4<sup>+</sup> 細胞での発現を認めた。CD4<sup>+</sup> 細胞 FPRL-1 発現は、ESR と強い正の相関を示した (R=0.964, p<0.001)

(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。

### D. 考察

関節炎マウスにおいて HC gp-39 は CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg に、FPR2 は Th1 (特に抗原特異的) に局在していた。また RA 患者においても HC gp-39, FPRL-1

ともに mRNA レベルで CD4<sup>+</sup>T 細胞に高発現し、蛋白レベルで発現上昇している RA 患者も存在した。

#### E. 結論

関節炎において、HC gp-39 は CD4<sup>+</sup>Treg 細胞に発現し制御的に、FPR2 は CD4<sup>+</sup>Th1 細胞に発現し、両分子ともに RA 患者 CD4<sup>+</sup>T 細胞に高発現していることから、病態への関与が考えられた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tanaka Y, Matsumoto I, Inoue A, Umeda N, Takai C, Sumida T. Antigen-specific overexpression of human cartilage glycoprotein 39 on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells in the generation of glucose-6-phosphate isomerase induced arthritis. *Clin Exp Immunol* 177:419-27, 2014
2. Matsumoto I, Inoue A, Takai C, Umeda N, Tanaka Y, Kurashima Y, Sumida T. Regulatory roles of tumor necrosis factor alpha-induced proteins (TNFAIP) 3 and 9 in arthritis. *Clin Immunol* 153:73-78, 2014
3. Grunewald TG, Bach H, Cossarizza A, Matsumoto I. The STEAP Protein Family: Versatile Oxidoreductases and Targets for Cancer Immunotherapy with Overlapping and Distinct Cellular Functions. *Biol Cell*. 104:641-657, 2012
4. Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Tanaka Y, Mihara M, Takahashi S, Sumida T. Murine tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced adipose-related protein (tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced protein 9) deficiency leads to arthritis via interleukin-6 overproduction with enhanced NF- $\kappa$ B, STAT-3 signaling, and dysregulated apoptosis of macrophages. *Arthritis Rheum* 64:3877-3885, 2012
5. Kondo Y, Iizuka M, Wakamatsu E, Yao Z, Tahara M, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Yoh K, Takahashi S, Matsumoto I, and Sumida T. Overexpression of Tbet gene regulates murine autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*. 64:162-172, 2012
6. 松本功 T 細胞分化制御による関節炎治療 リウマチ科 51:559-563, 2014
7. 松本功 関節リウマチの分子標的 細胞 46:475-478, 2014
8. 松本功 特集:関節リウマチ 関節リウマチの動物モデルとその臨床的意義 *Medical Practice* 36: 564-567, 2013
9. 松本功 関節リウマチにおける Th17 細胞と抗 IL-17, 23 抗体療法 *最新医学* 67: 275-280, 2012
10. 松本功 関節リウマチ診療 update IL-17 阻害は有効か? *内科 南江堂* 109:659-663, 2012

##### 2. 学会発表

1. Tanaka Y, Matsumoto I, Inoue A, Umeda N, Takai C, Kurashima Y, Kawaguchi H, Sumida T. Specific overexpression of FPR2 (FPRL-1) on Th1 cells in GPI-induced arthritis and patients with rheumatoid arthritis. American college of rheumatology annual meeting, Boston, 2014
2. Matsumoto I. Autoimmune arthritis mediated by glycolytic enzyme- focusing on regulatory TNF $\alpha$ -induced protein- International Congress on Autoimmunology, Granada, 2012
3. 田中 勇希, 松本 功, 井上 明日香, 梅田 直人, 高井 千夏, 倉島 悠子, 川口 星美, 住田 孝之 HC gp-39 は関節炎において Foxp3<sup>+</sup>Treg に発現し抗原特異的 Th1 および Th17 を抑制する。第 42 回日本臨床免疫学会、2014
4. 松本功: 関節リウマチの病因論 update 第 16 回リウマチフォーラム (品川)、2012

#### 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

総合研究報告書 (H24~26)

発症早期関節炎の末梢血における T 細胞の解析

分担研究者 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

研究協力者 南家由紀 同 講師、川本 学 同 研究室

研究要旨 Th17はある条件のもと Th1 へ変化するという可塑性(plasticity)が最近注目されている。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、発症早期かつ未治療の関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) の患者の末梢血におけるヘルパーT細胞を Th17 細胞分画およびこの分画細胞のサイトカインの発現を解析した。はじめにサイトカインによる分類、次に CD161 発現とサイトカインによる分類、最後に当研究班採用の CD 発現による分類とサイトカインを組み合わせて解析した。最終的には、早期 RA においては IFN $\gamma$  産生 Th17 細胞比が抗 CCP 抗体値と関連している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Th17 の可塑性が最近注目されている。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、発症早期かつ未治療の関節リウマチの患者の末梢血におけるヘルパーT細胞を Th17 細胞分画およびこの分画細胞のサイトカインの発現を解析した。

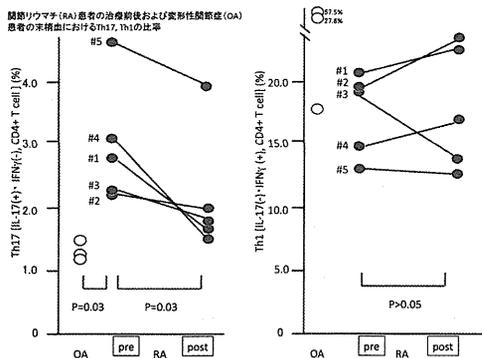
B. 研究方法

外来を受診した発症1年以内未治療の RA 患者を対象とし、対照疾患として変形性関節症患者 (OA) を検討した。3回の解析での患者群は異なる。末梢血をフローサイトメトリー法により解析した。はじめに細胞内サイトカイン産生パターン(IL-17, IFN $\gamma$ )による分類、次ぎに CD161 発現とサイトカイン産生パターンによる分類、最後に当研究班採用の CD 発現による分類とサイトカイン産生パターンを組み合わせて解析した。(倫理面への配慮)

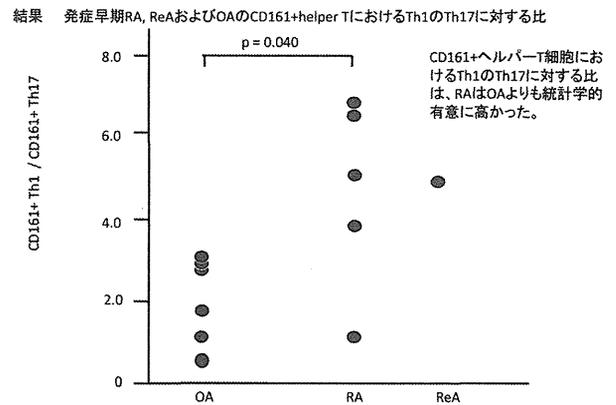
東京女子医科大学倫理委員会にて臨床研究として承認されている(承認番号 2849 および 3178)。

C. 研究結果

はじめの検討では、早期 RA では 1) OA に比べ Th17 の関与が示唆され、2) MTX 治療により Th17 の比率が減少した。



次ぎの解析では CD161+ヘルパーT細胞における Th1 の Th17 に対する比は RA において OA よりも高かった。



最後の解析では、1)CCR6 および CXCR3 の発現で 4 分割した場合、CCR6+CXCR3-分画に IL-17 産生細胞の約 80% が認められた [Kruskal-Wallis, p=0.0014(RA), p=0.00017(OA)] (図)。さらにこの分画の IL-17 産生細胞の約 80% は CD161+細胞であった。

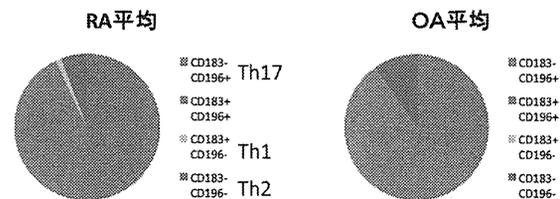
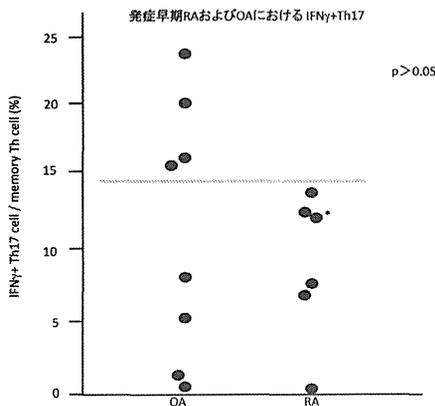
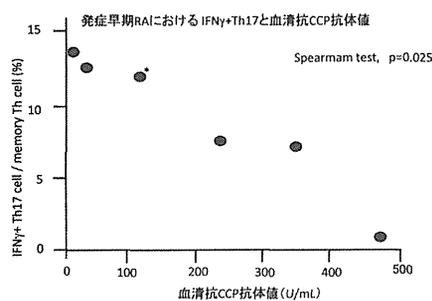


図 CCR6, CXCR3 で分割した場合、IL - 17 産生細胞の含まれる比率。

IFN $\gamma$ +Th17 細胞の memory Th 細胞に対する比率は RA と OA の間に統計学的有意差は認められなかった。しかし、RA において OA よりも少ない傾向が認められた。



RA の IFN $\gamma$ +Th17 細胞の memory Th 細胞に対する比率は血清抗 CCP 抗体値と負の相関を示した (Spearman test,  $p=0.025$ )。



#### D. 考察

最後の解析より、Th17 細胞に関して当研究班の分類法の妥当性が示された。我々の検討での、未治療早期 RA における、IFN $\gamma$ +Th17 細胞の CD4+ 細胞に対する比率の低値傾向および、抗 CCP 抗体値と有意な負の相関から、IFN $\gamma$ +Th17 細胞が滑膜に集積して滑膜炎に関与している可能性が示唆されるかもしれない。今後さらに症例数を増やし検討する。

#### E. 結論

Th17 細胞に関して当研究班の分類法の妥当性が示された。早期 RA においては IFN $\gamma$  産生 Th17 細胞比が抗 CCP 抗体値と関連している可能性が示唆された。今後さらに症例数を増やし検討する。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 南家由紀、小竹 茂 最新医学 M-CSF/GM-CSF 66-72, 2014.
- 2) 小竹 茂 関節リウマチ治療における滑膜切除術の適応 Ortho Interfac, Salvus 31 2014, in press.

- 3) 南家由紀 小竹 茂 ステロイドの上手な減らし方 臨床と研究 91(4), 11-13, 2014.
- 4) 小竹 茂、山中寿 関節リウマチ medichina 50 (3),420-423, 2013.
- 5) 小竹 茂、南家由紀 腸炎性関節炎. 臨床消化器内科 28 (5), 585-591, 2013.
- 6) 小竹 茂 関節リウマチ 病態 Evidence Based Medicine を活かす膠原病・リウマチ診療 改訂第 3 版 山中寿監修 Medical View 社 18-22, 2013.
- 7) 小竹 茂 脊椎関節炎 Evidence Based Medicine を活かす膠原病・リウマチ診療 改訂第 3 版 山中寿監修 Medical View 社 438-462, 2013.
- 8) 八子 徹、南家由紀、川本 学、小竹 茂 転写因子 RBP-J による骨びらんの抑制. リウマチ科 48 (5)581-6, 2012.
- 9) 小竹 茂、南家由紀 腸炎性関節炎 enteropathic arthritis 日本脊椎関節炎学会誌 Vol. 4(1) 19-25, 2012.2.

#### 海外

- 1) Nanke Y, Kobashigawa T, Yago T, Kawamoto M, Yamanaka H, Kotake S. A novel peptide from TCTA protein inhibits proliferation of fibroblast-like synoviocyte (FLS) from rheumatoid arthritis patients. Centr Eur J Immunol, 2015. in press.
- 2) Kobashigawa T, Nanke Y, Takazoe M, Iihara K, Yamanaka H, Kotake S. A Case of Human Leukocyte Antigen (HLA) B27-Positive Intestinal Behçet's Disease with Crohn's Disease-Like Anal Fistulas. Clin Med Insights Case Rep 7:13-9. 2014.
- 3) Kotake S, Nanke Y. Effect of TNF  $\alpha$  on osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells. Biochim Biophys Acta. 1840(3):1209-13, 2014.
- 4) Kotake S, Yago T, Kawamoto M, Nanke Y. Human receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) induces osteoclastogenesis of primates in vitro. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 48(9):593-8, 2012.
- 5) Yago T, Nanke Y, Kawamoto M, Yamanaka H, Kotake S. Tacrolimus potently inhibits human osteoclastogenesis induced by IL-17 from human monocytes alone and suppresses human Th17 differentiation. Cytokine. 59(2):252-7, 2012.

6) Nanke N, Ishiguro N, Yago T, Kobashigawa T, Hashida T, Kotake S. The role of regulatory T cells in mice with experimental autoimmune uveitis – a preliminary study. *Centr Eur J Immunol*, 37 (2): 102-105, 2012.

7) Nanke Y, Kobashigawa T, Yago T, Kawamoto M, Yamanaka H, Kotake S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and matrix metalloproteinase-3 production in rheumatoid arthritis synovial tissue is inhibited by blocking gap junction communication. *Centr Eur J Immunol*, 37 (3): 237-242, 2012.

#### 学会発表

1) 小竹 茂、南家由紀、八子 徹、川本 学、山中 寿 ヒト破骨細胞の細胞膜には voltage-dependent anion channel (VDAC) が発現しており分化を制御している 第2報: Time lapse 装置による観察 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会 P2-016 2014. 4. 25

2) 小竹 茂, 八子 徹, 川本 学, 南家由紀 T cell leukemia translocation-associated gene (TCTA) 遺伝子導入マウスにおける骨解析 0-050 第32回日本骨代謝学会 2014. 7. 25. 大阪

3) 小竹 茂 シンポジウム S11 リウマチ性疾患とヒト免疫 S11-4 関節リウマチとヘルパーT細胞の役割 第57回日本リウマチ学会学術集会(京都) 2013年

4) 小竹 茂 日本リウマチ学会学術集会(東京) シンポジウム関節破壊を制御する治療法の新展開 - from bench to bed - 4. 関節リウマチにおける免疫異常と骨破壊 ~ヒト破骨細胞分化の制御機構の解明~ 第56回日本リウマチ学会学術集会(東京) 2012年

5) 小竹 茂 教育研修講演『Osteoclastogenesis ヒト破骨細胞分化の機序の解明 1990-2012』第56回日本リウマチ学会総会・学術集会(東京) 2012年

6) 小竹 茂 リウマチ性疾患に関連した骨粗鬆症の薬物治療 第1回世田谷区骨形成セミナー 2012年

7) 小竹 茂、南家由紀 教育講演『反応性関節炎』脊椎関節炎学会(岡山) 2012年

8) 小竹 茂 特別講演『関節リウマチをはじめとする膠原病におけるT細胞の役割』第1回福

島 臨床プライマリー連携セミナー 2012年 海外

1) Nanke Y, Kobashigawa T, Yago T, Kawamoto M, Yamanaka H, Kotake S. Detection of IFN- $\gamma$ +IL-17+ cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome and Miklicz's disease, P1-23, 12th International Symposium of Sjogren's syndrome (2013.10 Kyoto), 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

## 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

研究分担者 桑名正隆 日本医科大学アレルギー膠原病内科 教授

### 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<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞の可塑性と多様性が示されている。SLE 患者における Foxp3<sup>+</sup>Treg の検討がこれまで行われてきたが、結果の再現性に乏しく一定の結論は得られていない。そこで、SLE の病態形成における CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞の役割を検討するため、末梢血を用いて CD4<sup>+</sup>細胞中の Foxp3<sup>+</sup>T 細胞の比率を調べた。その結果、予想に反して SLE 患者では健常人に比べて CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞が有意に増加し、その比率は疾患活動性と相関していた。また、*foxp3* 遺伝子プロモーター領域の解析では、SLE 末梢血中に増えている CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞はプロモーター領域が脱メチル化された胸腺由来 Treg (nTreg) であることが確認された。活動期 SLE 末梢血中で増加している CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞は、健常人で通常は発現を欠くまたは低い CD49d、CD127 を高発現し、免疫抑制活性と関連する Helios、CD152 を発現し、同時に Th17 に特徴的な CD161、IL-17 を発現していた。同種リンパ球混合試験による免疫制御能の検討では SLE、健常人由来 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>細胞は同程度の免疫制御能を有していた。ループス腎炎腎組織では CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>細胞の多くが Foxp3 を発現しており、その割合は対照として用いた IgA 腎症に比べて有意に高かった。以上より、活動期 SLE 末梢血で増加している nTreg は Treg と Th17 両者の特徴を兼ね備えたユニークな ex-Treg サブセットで、SLE の病態形成に関わる可能性が示された。

### 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<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>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。

近年、Foxp3 を発現する CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>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。

多くの自己免疫疾患で Foxp3<sup>+</sup>Treg の減少・機能低下が報告されているが、SLE 患者におけるこれまでの検討では一定の結果が得られていない。そこで、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の多様性に着目し、SLE 患者における CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞分画の異常とその病

態における役割を追究した。

### B. 研究方法

#### 1. 対象

アメリカリウマチ学会の 1980 年分類基準を満たす SLE47 例、健常人 16 例を対象とした。SLE 患者の検体採取時の臨床情報(抗 dsDNA 抗体価、白血球数、リンパ球数、ヘモグロビン、血小板数、ESR、ヘマトクリット、血清アルブミン、CRP、総補体価、血清クレアチニン、蛋白尿、SLEDAI、SLAM) は履歴的に調査した。SLEDAI が 5 以上を活動性ありとした。SLE 患者 6 例を対象として疾患活動期と寛解期の経時的変化を検討した。また、自己免疫性疾患の対照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。腎組織を用いた検討では、保存腎組織の中からループス腎炎 (ISN/RPC 分類 IV 型) 6 例、IgA 腎症を合併した関節リウマチ 5 例を無作為に抽出した。

#### 2. 細胞の調製

採取した末梢血は比重遠心法により末梢血単核球 (PBMC) を分離し、以下の検討に用いた。一部の実験では、PBMC から磁気細胞分離により CD4<sup>+</sup>細胞を分離した。分離した細胞の純度は 95% 以上であった。

### 3. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞のフェノタイプ解析

CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の表面抗原は、PBMC を抗 CD4 抗体 (Beckman Coulter)、抗 CD25 抗体 (BD)、抗 CD45RA 抗体 (BD)、抗 CD49d 抗体 (BD)、抗 CD127 抗体 (BD)、抗 CD152 抗体 (Biolegend)、抗 CD161 抗体 (Biolegend) を組み合わせて蛍光標識後、抗 Foxp3 抗体 (eBioscience) によって細胞内染色を行い、フローサイトメトリー (FACS Calibur; BD Biosciences) 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 Helios 抗体 (Biolegend)、抗 IL-17 抗体 (Biolegend) も同時に染色した。

### 4. *foxp3* 遺伝子プロモーター領域の Treg 特異的脱メチル化領域 (TSDR) の解析

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

既報にしたがって、同種リンパ球混合試験 (MLR) の原理を利用した手法で CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞の免疫制御能を評価した。PBMC から磁気細胞分離により CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞を分離した。分離した細胞の純度は、前者で 90%以上、後者で 95%以上であった。抗 CD3 抗体存在下で放射線照射 PBMC (60 Gy) と CFSE 標識した同種 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞を 5 日間共培養し、フローサイトメトリーを用いて CD4<sup>+</sup>細胞の細胞輝度を解析した。陽性コントロールとして PHA (1  $\mu$ g/mL) を用いた。蛍光輝度の低下した分裂細胞の全 CD4<sup>+</sup>細胞における割合を求めた。Treg の免疫制御能は、PBMC と同種 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞の共培養時に

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を添加することで観察される細胞分裂の抑制効果で評価した。

### 6. 腎組織における IL-17<sup>+</sup>Treg の検討

パラフィン腎組織切片を用いてマウス抗 CD4 抗体 (Abcam)、マウス抗 FoxP3 抗体 (Abcam)、ラビット抗 IL-17 抗体 (Abcam) と反応させた。2 次抗体は Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体、Alexa568 標識抗マウス IgG 抗体、Alexa660 標識抗ラビット IgG 抗体 (すべて Life Technologies) を用いた。蛍光顕微鏡 (Olympus, x400) で観察し、CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>細胞における FoxP3 発現細胞の割合を評価した。

### 6. 統計学的解析

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

### (倫理面への配慮)

本研究は慶應義塾大学医学部の倫理委員会での承認後に行った。検体採取の際には、事前に文書によるインフォームドコンセントを得た。

## C. 研究結果

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

CD4<sup>+</sup>細胞中における Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率は SLE 患者で健常人に比べて有意に増加していた ( $P < 0.01$ )。同一患者の検体を用いた経時的な解析では、治療による疾患活動性低下に伴って CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率が減少した ( $r = 0.57, P < 0.01$ )。一方、CD4<sup>+</sup>細胞中における Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率は MS と原発性 ITP では健常人と同等で、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞比率の増加は SLE に特徴的であった。

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

CD4<sup>+</sup>細胞中における Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率は抗二本鎖 DNA 抗体価 ( $r = 0.52, P < 0.01$ )、SLEDAI ( $r = 0.57, P < 0.01$ ) と正の相関を、血清総補体価 ( $r = 0.52, P < 0.01$ ) と負の相関を示した。なお、他の臨床情報との間に関連は認めなかった。

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

CD4<sup>+</sup>細胞中における TSDR 脱メチル化細胞の比率は SLE 患者で健常人に比べて有意に増加していた ( $P < 0.01$ )。また、TSDR 脱メチル化細胞の比率は CD4<sup>+</sup>細胞中 Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率と有意に相関していた ( $r = 0.52$ ,  $P < 0.01$ )。CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞と CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>細胞を分離し、TSDR 脱メチル化細胞の比率を測定したところ、健常人と同様に SLE 患者においても CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の TSDR は完全に脱メチル化されていた。一方、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>細胞の TSDR は両群ともに完全にメチル化されていた。

### 4. SLE 末梢血中で増加している nTreg フェノタイプ解析

SLE では健常人に比べて CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞表面における CD25 の発現が低下 ( $P < 0.01$ )、CD49d と CD127 ( $P < 0.01$ ) の発現が増加していた (両者共に  $P < 0.01$ )。また、Treg 分画では naïve Treg

(CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) が SLE で増加していたが ( $P = 0.03$ )、authentic Treg

(CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>)、effector Treg

(CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD49d<sup>-</sup>)、高純度 Treg

(CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>)および

CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>)、高純度 effector Treg (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD49d<sup>-</sup>CD127<sup>low</sup>) に差はなかった。

最近、SLE 末梢血中で免疫制御活性を促進する転写因子 Helios を発現する Treg の増加が報告されている。そこで、SLE、健常人それぞれ 16 例ずつを対象に、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞における Treg 機能に関わる Helios と CD152、Th17 に特徴的な CD161 と IL-17 に加えて CD127、CD49d の発現をフローサイトメトリーで検討した。SLE では健常人に比べて CD49d、CD127 陽性細胞の比率が高く (両者とも  $P < 0.01$ )、昨年度の結果と同様であった。Helios、CD152 の発現細胞の比率に差はなかったが、SLE では健常人に比べて CD161、IL-17 発現の割合が統計学的に有意に高かった (両者とも  $P < 0.01$ )。多重染色での解析では、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>細胞と CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>細胞は明確に異なるサブセットであった。

そこで、次に CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>細胞における各種分子の発現を SLE16 例、健常人 16 例で比較

した。両群間で CD127 発現頻度に差はなかったが、SLE で健常人に比べて Helios、CD152 の発現割合が高く (両者とも  $P < 0.01$ )、CD161、IL-17 の発現割合も高かった ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。したがって、SLE 末梢血で増えている CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>細胞は nTreg と Th17 の特徴を兼ね備えている可能性が示された。

### 5. 末梢血 Treg の免疫制御能の検討

Foxp3 は細胞内蛋白であるため CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞を分離することができないため、末梢血より Treg に相当する CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を分離して、同種 MLR で評価される免疫制御活性を SLE、健常人で比較した。検討した SLE2 例と健常人 3 例由来の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞はすべて免疫制御能を有しており、増殖阻害活性も同等であった。ちなみに、SLE 末梢血中で増加している CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞はほぼ全てが CD25 を発現していた。

### 6. ループス腎炎組織における CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>細胞の検出

SLE 末梢血で増えている CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>細胞が病変部組織にリクルートされ病変形成に関与する可能性を検討するため、ループス腎炎 6 例および IgA 腎症 5 例由来の腎組織を用いた免疫組織染色を行った。ループス腎炎、IgA 腎症両者で主に間質に CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>T 細胞の浸潤がみられた。そこで、CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>T 細胞における Foxp3 陽性細胞の割合を比較すると、IgA 腎症に比べてループス腎炎で有意に高かった ( $P = 0.006$ )。

## D. 考察

SLE 患者において CD4<sup>+</sup>細胞中の Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率は増加しており、疾患活動性と正の相関がみられた。活動期 SLE 末梢血中で増加している CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞は、(1) Foxp3 遺伝子プロモーター領域は脱メチル化された胸腺由来 nTreg、(2) 健常人で通常は発現を欠くまたは低い CD49d、CD127 を高発現し、(3) 免疫抑制活性に関連する Helios、CD152 を発現するとともに免疫制御能を有し、(4) Th17 に特徴的な CD161、IL-17 を発現することが明らかとなった。これら細胞は Treg 本来の免疫制御能と Th17 エフェクター活性の両者を兼ね備えた、きわめて特異な T 細胞サブセットと

考えられた。マウスにおいて同様の T 細胞サブセットが報告されており、ex-Treg と呼ばれているが、ヒトでの報告はこれまでない。ex-Treg は免疫制御能を有することから活性化 T 細胞が Foxp3 を発現したとは考えづらく、何らかの病的環境下で Treg 亜集団の一つが増殖したか、あるいは nTreg から分化したサブセットのいずれかと考えられる。近年、Treg の可塑性 (plasticity) が議論されているが、生体内では Treg と Th17 を明確に分けることが困難なことが示された。

IL-17 産生能を有する CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞が強皮症や関節リウマチ患者末梢血中に検出されることが報告されている。これらは Foxp3<sup>low</sup>、CD45RA<sup>-</sup>である点は SLE 末梢血中で増えていた CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞と同様だが、免疫制御能を欠く点が大きく異なる。CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>細胞は関節リウマチの末梢血のみならず病変部滑膜でも検出され、病態を促進するエフェクターとして作用すると考えられている。

SLE 末梢血中で増加していた CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>細胞もループス腎炎腎組織にリクルートされていることが確認された。SLE 患者末梢血中の CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>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とあわせて、SLE 活動期の免疫炎症病態との関連が示唆された。これら T 細胞サブセットは病変局所で IL-17 産生を介して炎症を惹起すると考えられるが、CD152 を発現して免疫制御能を有することから T 細胞の活性化を抑制する可能性もある。これらサブセットの病態への関わりの解明には、今後のさらに詳細な検討を要する。

本研究成果により、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 Treg と Th17 両者の特徴を兼ね備えたユニークなサブセットで、SLE の病態形成に関わることが明らかにされた。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nishimoto T, Satoh T, Takeuchi T, Ikeda Y, Kuwana M. Critical role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in preventing murine autoantibody-mediated thrombocytopenia. *Exp. Hematol.* 40(4): 279-289. 2012.
2. Hanaoka H, Okazaki Y, Satoh T, Kaneko Y, Yasuoka H, Seta N, Kuwana M. Circulating anti-double-stranded DNA antibody-secreting cells in patients with systemic lupus erythematosus: a novel biomarker for disease activity. *Lupus.* 21(12): 1284-1293. 2012.
3. Kuwana M. Dysregulated negative immune regulators in immune thrombocytopenia. *ISBT Sci. Ser.* 2014; 9: 217-222.
4. Nishimoto T, Numajiri M, Nakazaki H, Okazaki Y, Kuwana M. Induction of immune tolerance to platelet antigen by short-term thrombopoietin treatment in a mouse model of immune thrombocytopenia. *Int. J. Hematol.* 2014;100(4): 341-344.

### 2. 学会発表

1. Kuwana M: Roles of T lymphocytes in pathogenesis of Behçet's disease. 15<sup>th</sup> International Conference on Behçet's Disease (Yokohama). 2012. 7.
2. Kuwana M: CD4<sup>+</sup> T regulatory cells in ITP. 4<sup>th</sup> ICIS Expert Meeting Changes in ITP of Children and Adults (Montreux). 2012. 9.
3. 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.
4. 桑名正隆、西本哲也: リウマチ性疾患における制御性 T 細胞. 第 58 回日本リウマチ学会総会 (東京). 2014. 4.
5. 桑名正隆: 自己免疫と T 細胞. 第 42 回日本臨床免疫学会総会 (東京). 2014. 9.
6. 桑名正隆: Immune thrombocytopenia: roles of immune regulatory mechanisms in autoimmune pathogenesis. 第 43 回日本免疫学会学術集会

(京都). 2014.12.

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

## 関節炎患者末梢単核球異常とその修復に関する研究

分担研究者 田村直人 順天堂大学医学部膠原病内科 准教授  
研究協力者 多田久里守 順天堂大学医学部膠原病内科  
杉崎良親 順天堂大学医学部膠原病内科  
林 絵利 順天堂大学医学部膠原病内科

研究要旨 関節炎患者の末梢血単核球について、そのサブセット異常と修復の可能性について検討した。平成 24 年度は、ラットのアジュバント関節炎 (AIA) について検討した。AIA ラットでは関節炎の発症に伴い所属リンパ節で T 細胞増加がみられたが、PI3K 阻害薬経口投与により抑制された。また、リンパ節 T 細胞を *in vitro* にて刺激すると IFN $\gamma$ 、IL-17 の発現が認められたが、これらも PI3K 阻害薬により濃度依存性に抑制された。平成 25 年度は、関節リウマチ (RA) 患者の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 $\gamma$  を解析したところ、発現は健常人より高く、PI3K 阻害薬添加により抑制された。さらに、培養上清中の IL-17、IFN $\gamma$ 、IL-17、IL-6、TNF $\alpha$  産生も PI3K 阻害薬により抑制された。以上から、PI3K は RA の Th1, Th17 サイトカイン発現異常に関与しており、その阻害により関節炎は抑制されることが示唆された。平成 26 年度は脊椎関節炎である強直性脊椎炎患者の末梢血単核球における免疫細胞の頻度を本研究班にて標準化された細胞表面染色にて解析した。強直性脊椎炎患者では Th17 細胞および IL-17 産生 CD8 陽性 T 細胞の増加が認められ、病態への関与が考えられた。

### A. 研究目的

T 細胞サブセットなど免疫細胞の異常は、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) をはじめとするリウマチ性疾患の病態に深く関与していると考えられている。本研究では RA モデルとしてアジュバント関節炎 (adjuvant-induced arthritis: AIA) ラットにおける T 細胞異常と phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 阻害薬によるその是正の可能性について検討した。次に、関節リウマチ患者末梢血単核球を用いて、Th1、Th17 や他の炎症性サイトカイン産生と PI3K 阻害による抑制効果について検討した。また、平成 26 年度には脊椎関節炎である強直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis: AS) 患者末梢血単核球のサブセット異常について検討を行った。

### B. 研究方法

(平成 24、25 年度) AIA ラットにアイソフォーム非特異的 PI3K 阻害薬を 10 日目より 1 日 1 回経口投与し、後肢の体積測定により関節炎の重症度を評価、また単径リンパ節におけるリンパ球数の

経時的変化を解析した。単径リンパ節由来 T 細胞を PI3K 阻害薬存在下および非存在下で *in vitro* にてマイトジェン刺激し、細胞増殖能や IL-17 産生に対する影響を検討した。また、RA 患者末梢血より単核球を分離、アイソフォーム選択的もしくは非選択的 PI3K 阻害薬の存在下にて、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激し、CD4 陽性 T 細胞における細胞内サイトカインの発現をフローサイトメトリーにて解析、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。

(平成 26 年度) 健常人 10 名および AS 患者 10 名の末梢血単核球 (PBMC) を分離し、本研究班で作製された標準化プロトコールに準じて多重染色後、フローサイトメトリーにて各免疫細胞の頻度を解析した。また、PBMC を PMA 50 ng/ml および ionomycin 500 ng/ml で 3 時間培養し、サイトカイン産生細胞の頻度を細胞内染色にて解析した。

(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

用していない。また、個人情報の管理に注意を払い、個人の特特定が行われないように配慮した。また、動物実験では本学に物実験計画を申請し、承認を得たうえで研究を行った。

### C. 研究結果

(平成 24、25 年度) AIA ラットでは、関節炎の発症に伴って単径リンパ節における CD4 陽性 T 細胞の一過性の増加が認められたが、PI3K 阻害薬投与群では増加が抑制されていた(図 1)。さらに、AIA ラット単径リンパ節由来リンパ球を *in vitro* で刺激したときの細胞増殖および IL-17 産生は、PI3K 阻害薬によって抑制された(図 2)。RA 患者では、抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体刺激後の IFN $\gamma$  および IL-17 陽性細胞数は、RA 患者で健常人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 3)。培養上清中の IFN $\gamma$ 、IL-17、IL-6、TNF $\alpha$  濃度も RA 患者で健常人より上昇しており、PI3K 阻害薬により抑制された(図 4)。AIA ラット、RA 患者いずれにおいても、アイソフォーム選択的阻害薬のなかでは PI3K  $\delta$  選択的阻害薬の抑制効果が強かった。

(平成 26 年度) AS 患者は、年齢 30.5 (中央値)  $\pm$  8.7 歳、平均罹病期間 11.3  $\pm$  6.5 年、BASDAI (Bath ankylosing spondylitis disease activity score) は 3.54  $\pm$  2.54、CRP 2.51  $\pm$  4.64 mg/dl であった。AS 患者 PBMC では、健常人に比して Th17 細胞の頻度が高い傾向にあった(図 5) が、疾患活動性との明らかな相関はみられなかった。

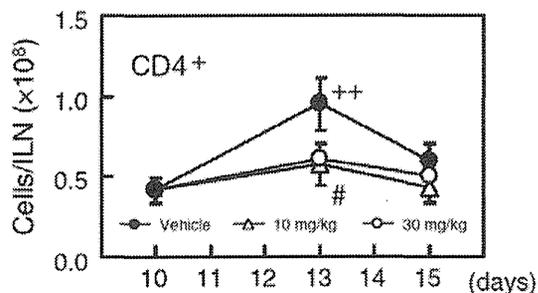


図 1. AIA ラット単径リンパ節における CD4 陽性 T 細胞数の変化

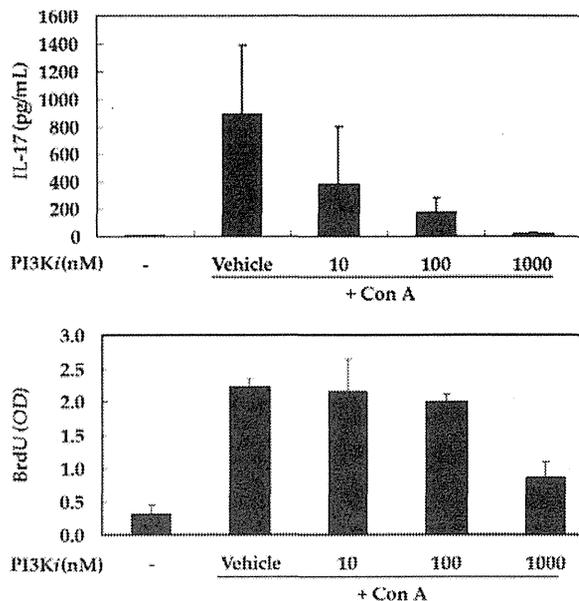


図 2. AIA ラット単径リンパ節由来リンパ球のマイトジェン刺激による増殖と IL-17 産生への PI3K 阻害薬の影響

また、NK 細胞の頻度が AS では有意に低かったほか、単球の頻度が増加しており、classical monocyte の頻度が増加し、non-classical monocyte は減少していた。Th1、Th2 細胞、Treg 細胞、B 細胞サブセットに有意な差はみられなかった。また、CD8 陽性 T 細胞中の IL-17 産生細胞の頻度が AS で高い傾向にあった(図 6)。

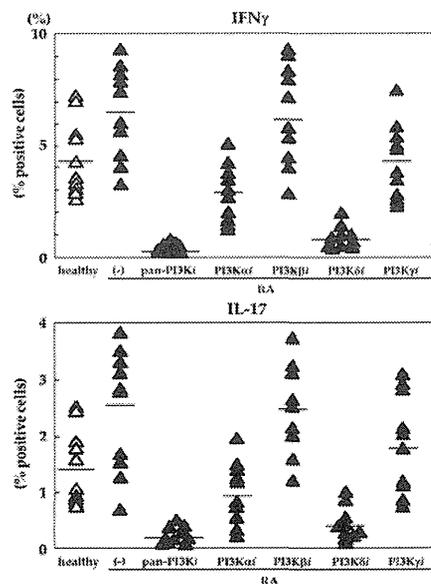


図 3. RA 患者の IFN $\gamma$  および IL-17 産生 CD4+ T 細胞の PI3K 阻害による変化

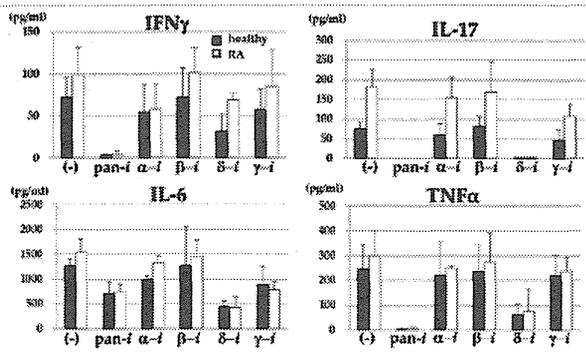


図 4. RA 患者 PBMC 培養上清中サイトカイン濃度

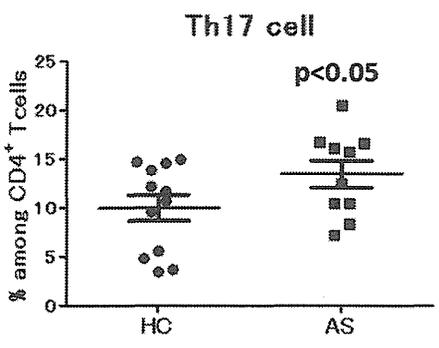


図 5. AS 患者 PBMC における Th17 細胞の頻度

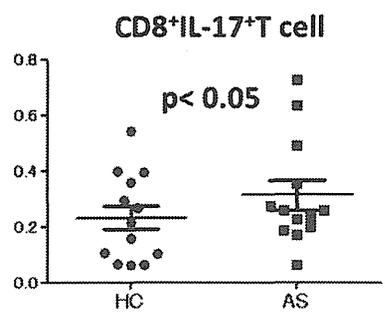


図 6. AS 患者 CD8 陽性 T 細胞における IL-17 産生細胞の頻度

D. 考察

(平成 24、25 年度) 関節炎ラットリンパ節や RA 患者 PBMC では、CD4 陽性 T 細胞の増殖や、Th1、Th17 サイトカインの産生亢進がみられ、これらには PI3K を介した細胞内シグナル伝達に関与しており、その阻害薬により抗リウマチ作用が得られる可能性が示唆された。

(平成 26 年度) AS の病態には TNF $\alpha$  のほか、IL-17/IL-23 が関与すると考えられている。これまでに AS 患者末梢血リンパ球における Th17 細胞、あるいは IL-17 産生細胞の増加が示されている

が、逆に低下しているとの報告もある。日本人 AS 患者では健常人より Th17 細胞が増加していたが、活動性との関連性はみられなかった。AS は発症早期は炎症が強く、その後は徐々に骨新生による変化が主体となることから、検体採取時期や骨病変の進行度によっても免疫細胞の頻度やサイトカイン産生量が異なる可能性があると考えられた。今後はより早期の症例で解析を進めるとともに、病期による違いについて検討を行う必要がある。

E. 結論

関節炎モデルラットおよび RA 患者における Th1、Th17 サブセット異常は PI3K 阻害薬により是正できる可能性が示唆された。また、AS 患者でも末梢血 Th17 細胞の増加がみられ、病態との関連についてさらなる検討が必要と考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ogasawara M, Tamura N, Kageyama M, Onuma S, Kusaoi M, Toyama S, Sekiya F, Matsudaira R, Nawata M, Tada K, Matsushita M, Kempe K, Amano H, Morimoto S, Yamaji K, Takasaki Y. Single-center, retrospective analysis of efficacy and safety of tacrolimus as a second-line DMARD in combination therapy and the risk factors contributing to adverse events in 115 patients with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol 31:251-257, 2012.

2) Sakai R, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Ihata A, Ishigatsumo Y, Atsumi T, Koike T, Nakajima A, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Tohma S, Sugihara T, Ueki Y, Hashiramoto A, Kawakami A, Hagino N, Miyasaka N, Harigai M. Drug retention rates and relevant risk factors for drug discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving

- anticytokine therapy with different target molecules. *Ann Rheum Dis* 11:1820-1826, 2012.
- 3) Sakai R, Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Nakajima A, Atsumi T, Koike T, Ihata A, Ishigatubo Y, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Tohma S, Tamura N, Fujii T, Sugihara T, Kawakami A, Hagino N, Ueki Y, Hashiramoto A, Nagasaka K, Miyasaka N, Harigai M. Time-dependent increased risk for serious infection from continuous use of TNF antagonists during three years in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 8:1125-1134, 2012.
- 4) Ogasawara M, Murayama G, Yamada Y, Nemoto T, Kageyama M, Toyama S, Kusaoi M, Onuma S, Kon T, Sekiya F, Sugimoto K, Matsudaira R, Matsushita M, Tada K, Kempe K, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Autofeedback from ultrasound images provides rapid improvement in palpation skills for identifying joint swelling in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 6:1207-1214, 2012.
- 5) Haruta K, Mori S, Tamura N, Sasaki A, Nagamine M, Yaguchi S, Kamachi F, Enami J, Kobayashi S, Yamori T, Takasaki Y. Inhibitory effects of ZSTK474, a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, on adjuvant-induced arthritis in rats. *Inflamm Res* 61:551-562, 2012.
- 6) 田村直人. リウマチ性疾患における PI3 キナーゼに関する最近の知見. *日本臨床免疫学会誌* 35:8-13, 2012.
- 7) 田村直人, 多田久里守. 脊椎関節炎の分子病態. *リウマチ科* 47: 130-135, 2012.
- 8) 田村直人. 関節リウマチ (RA) : 診断と治療の進歩. *非生物学的製剤. 日内科会誌* 101:2873-2879, 2012.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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*. 2014;32:54-60.
- 12) Gorai M, Ogasawara M, Matsuki Y, Yamada Y, Murayama G, Sugisaki N, Nemoto T, Ando S, Minowa K, Kon T, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Weighting with the Lansbury articular index improves the correlation of ultrasound score with serum matrix metalloproteinase-3 level in rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol* 2014;. 24:915-9.
- 13) Doe K, Nozawa K, Okada T, Tada K, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Usefulness of minor salivary gland biopsy in the diagnosis of IgG4-related disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;15:2673-7.
- 14) Sakai R, Cho SK, Nanki T, Koike R, Watanabe K, Yamazaki H, Nagasawa H, Amano K, Tanaka Y, Sumida T, Ihata A, Yasuda S, Nakajima A, Sugihara T, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Miura Y, Miyasaka N, Harigai M; REAL study group. The risk of serious infection in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitors decreased over time: a report from the registry of Japanese rheumatoid arthritis patients on biologics for long-term safety (REAL) database. *Rheumatol Int*. 2014;34:1729-36.
- 15) Tokai N, Ogasawara M, Gorai M, Matsuki Y, Yamada Y, Murayama G, Sugisaki N, Nemoto T, Ando S, Minowa K, Kon T, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Makino S, Takasaki Y. Predictive value of bone destruction and

duration of clinical remission for subclinical synovitis in rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol*. 2014; 15:1-6.

16) 田村直人, 多田久里守, 小林茂人, 井上 久, 高崎芳成. 強直性脊椎炎の病態: 炎症と骨新生について. *日本脊椎関節炎学会誌*. 4:19-24, 2014.

## 2. 学会発表

1) Matsudaira R, Tamura N, Watanabe T, Matsushita M, Ogasawara M, Yamaji K, Takasaki Y. Factors associated with normalized physical function and clinical remission defined with simplified disease activity index by 1-year infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. The European League Against Rheumatism Annual Congress 2012, Berlin, Germany, Jun 2012.

2) Matsushita M, Ogasawara M, Kenpe K, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y Non-invasive evaluation of pulmonary arterial hypertension in patient with connective tissue disease. The European League Against Rheumatism Annual Congress 2012, Berlin, Germany, Jun 2012.

3) Kawamoto T, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Clinical study of determination of myositis-associated autoantibodies in Japanese patients with connective tissue diseases except auto-immune myositis. American College of Rheumatology 76th Annual Meeting. Washington DC, USA, Nov 2012.

4) Matsushita M, Kawamoto T, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Clinical evaluation of anti-aminoacyl tRNA synthetase antibodies in Japanese patients with connective tissue diseases. American College of Rheumatology 76th Annual Meeting. Washington DC, USA, Nov 2012.

5) Chiba A, Tamura N, Matsudaira R, Yamamura T, Takasaki Y, Miyake S. Mucosal-associated invariant T cells are inactivated by IFN $\alpha$  and reduced in systemic lupus erythematosus. American College of Rheumatology 76th Annual

Meeting. Washington DC, USA, Nov 2012

6) 石山健太郎, 西山千春, 頭山尚子, 田村直人, 高崎芳成. 破骨細胞分化における TGF- $\beta$  シグナルと転写調節因子 PU.1. 第 56 回日本リウマチ学会学術集会, 東京, 2012 年 426-28 日.

7) 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.

8) 林 絵利, 千葉麻子, 多田久里守, 山路 健, 田村直人, 高崎芳成, 三宅幸子. 強直性脊椎炎患者における免疫細胞の解析. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会, グランドプリンスホテル新高輪, 東京, 2014 年 4 月 24-26 日.

9) 多田久里守, 田村直人, 小林茂人, 井上 久, 高崎芳成. 本邦における Adalimumab あるいは Infliximab 投与した強直性脊椎炎患者の疾患活動性予測因子の解析. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会, グランドプリンスホテル新高輪, 東京, 2014 年 4 月 24-26 日.

10) Eri Hayashi, Asako Chiba, Mie Kitagaichi, Kurisu Tada, Ken Yamaji, Naoto Tamura, Yoshinari Takasaki and Sachiko Miyake. Involvement of IL-17-Producing MAIT Cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66 (Suppl): s766.

## 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 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

研究分担者 森尾友宏 東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学分野 教授  
研究協力者 今井耕輔 東京医科歯科大学大学院 小児・周産期地域医療学寄附講座 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を開発する目的で以下の研究を行った。

- 1) 原発性免疫不全症における 10 カラーFACS を用いた免疫担当細胞亜群解析の確立  
10 カラーFACS により、少量の末梢血で従来の解析を越える免疫担当細胞亜群の解析を可能とすることを目的として研究を行った。約 1-2mL の血液検体を用いて naïve , memory, Th subsets, Treg, NKT, ab T/gd T, activated T などの亜群を簡便に検討可能なシステムを構築した。そのシステムを用いて、実際の免疫不全症検体を解析し、その有用性を検証した。
- 2) 次世代シーケンサーを用いたヒト T 細胞・B 細胞受容体遺伝子再構成および体細胞突然変異解析法の確立

次世代シーケンサーを用いた手法により、多検体同時に十分なリード数の TCR・BCR 配列の解析を可能とすることを目的として研究を行った。健常者および原因遺伝子の同定された PID 患者 (PIK3CD, LRBA, IL2RG, ATM, ICOS) の検体を用いて解析を行い、その実用性を検証した。また、自己免疫疾患のモデルとして、1 型 DM や ITP などの様々な自己免疫疾患合併した LRBA 欠損症患者の解析を行い、レパトアの偏りや体細胞突然変異の減少といった特徴的な異常を同定した。

### 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、その免疫担当細胞亜群解析は非常に重要である。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。

一方で、CVID 患者では自己免疫疾患を合併するものが多いことが知られており、免疫担当細胞亜群の偏りや分化障害がその原因の一つとして考えられている。そのため、自己免疫疾患のモデルとして PID における TCR、BCR を解析することは有用であると考えられる。

一度に解析可能なリード数に制約があるなど、従来のキャピラリーシーケンシングや FACS を用いた手法が抱える問題点を克服するため、本研究では次世代シーケンサー (NGS) を用いることにより、多検体同時に十分なリード数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

- 1) 10 カラーFACS を用いた免疫担当細胞亜群解析

健常者および 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、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。

- 2) NGS を用いたヒト T 細胞・B 細胞受容体遺伝子再構成および体細胞突然変異解析

健常者および原因遺伝子の同定された PID 患者からインフォームド・コンセントをとり、EDTA 加末梢血を採取した。単核球分離後に RNA を抽出し、5'RACE 反応により cDNA を合成した後、IgH、TCRb の定常領域に特異的なプライマーを用いた PCR 反応により IgM、IgG、IgA、TCRβ の可変領域全長の cDNA を増幅した。これらの PCR 産物にアダプター配列を付加し、Miseq (illumina 社) を用いてシーケンシングを行った。

(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

1) 10 カラーFACS を用いた免疫担当細胞亜群解析

リンパ球分画を概観するための PBMC パネル (CD3/4/8/19/16/56/14/HLADR)、T 細胞を詳細に解析する T1、T2、T3 パネル、B 細胞を詳細に解析する B1、B3 パネル、樹状細胞を見る DC パネルの 7 パネルを設定し、健常者、PID 患者で検討した。

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 患者は TRECs、KRECs の数値で 4 群に分ける方法 (Kamae *et al*, *J. Allerg. Clin. Immunol.* 2013) により、A 群 (TRECs、KRECs 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) に亜群分類した。

遺伝子変異が同定された患者の解析では、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、TRECs 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。

2) NGS を用いたヒト T 細胞・B 細胞受容体遺伝子再構成および体細胞突然変異解析

シーケンス結果から CDR3 領域長、D・J 領域の利用率、JUNCTION 領域における N-addition、Palindrome 配列、ならびに FR3 領域における体細胞突然変異の頻度およびパターンを検討した。

原因遺伝子の同定された PID 患者の内訳は、PIK3CD 2 例、LRBA 1 例、IL2RG 1 例、ATM 1 例、ICOS 1 例であった。

原因遺伝子の同定された PID 患者のうち、自己免疫疾患 (1 型 DM、ITP など) を合併した LRBA 欠損症患者では、B 細胞分画がリンパ球の 0.4% と少数であったが、BCR 配列についても十分解析可能であり、以下の特徴を認めた。TCRb、IgM、IgA で CDR3 領域長に偏りを認め、IgM、IgA の D 領域、J 領域の利用率に偏りを認めた。また、体細胞突然変異の頻度が低下しており、IgM で A>G、C>T 変

異が、IgA で A>T、C>A 変異が増加していた。その他の PID 患者では IL2RG 患者で体細胞突然変異の頻度が低下していた、ATM 患者では JUNCTION 領域における N-addition の減少を認めた。

### D. 考察

10 カラーFACS を用いた免疫担当細胞亜群解析では、抗体や蛍光の組み合わせ、コンペンセーションの取り方など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、exome 解析の結果も組み合わせる原因遺伝子の同定につなげていきたい。

また、NGS を用いたヒト T 細胞・B 細胞受容体遺伝子再構成および体細胞突然変異解析では、複数の患者検体を同時に、TCR および BCR (IgM、IgG、IgA) についてシーケンスを行ったが、各 10 万リードのデータが得られ、従来法の問題点を克服することができた。その反面、データ量が膨大であるため、今後は効率的に解析を行うパイプラインの構築が必要であると考えられた。今後さらに他の遺伝子変異既知の患者で解析を重ね、有用性を検証した上で、HIGM、CVID を含む遺伝子変異未知の患者について検討し、病態解析の一助としていきたい。

### E. 結論

10 カラーFACS により、少量の末梢血で詳細な免疫担当細胞亜群解析が可能なパネルを構築した。また、NGS を用いたヒト T 細胞・B 細胞受容体遺伝子再構成解析、体細胞突然変異解析の方法を構築した。実際に健常者や PID 患者の検体を用いてこれらの解析を行い、その実用性を検証した。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Endo A, Watanabe K, Ohye T, Matsubara T, Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, **Morio T**, Mizutani S. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. *Clin. Infect. Dis.* **59**:545-8, 2014.

2. Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsuiki N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwara M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Homma K, Nonoyama S, Mizutani S, **Morio T**. Cord blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **49**:1155-61, 2014.
  3. Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, **Morio T**, Yachie A. Rapid Detection of Intracellular p47phox and p67phox by Flow Cytometry; Useful Screening Tests for Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol.* **33**:857-64, 2013.
  4. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm M.C., **Morio T**, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin  $\kappa$ -deleting recombination excision circles. *J. Allerg. Clin. Immunol.* **131**:1437-40, 2013.
  5. Shimizu M, Kanegane H, Wada T, Motoyoshi Y, **Morio T**, Candotti F, Yachie A. Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol.* **131**:587-90, 2013.
  6. Nakamura K, Du L, Tunuguntla R, Fike F, Cavalieri S, **Morio T**, Mizutani S, Brusco A, Gatti RA. Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat.* **33**:198-208, 2012.
  7. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, **Morio T**. Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nature Immunol.* **13**: 369-78, 2012.
- (著書・総説)
1. 森尾友宏：先天性免疫不全症の病態と思春期以降のマネジメント 血液内科 **65**:599-607, 2012.
  2. 森尾友宏：【サイトカインのすべて(完全改訂版)】 サイトカイン投与およびサイトカイン抑制による治療 免疫不全症 臨床免疫・アレルギー科 **57**:838-44, 2012.
  3. 森尾友宏：原発性免疫不全症における臨床遺伝学 T細胞系免疫異常症における遺伝子診療 日本遺伝カウンセリング **33**: 49-53, 2012.
  4. 森尾友宏：分類不能型免疫不全症 日本臨牀 **70**:2011-21, 2012.
  5. 森尾友宏：分類不能型免疫不全症 Update 日本臨床免疫学会雑誌 **35**:14-22, 2012.
  2. 学会発表
    1. Imai K, Tsujiita Y, Mitsui-Sekinaka K, Mitsuiki N, Takashima T, Okano T, Aoki Y, Kimoto F, Inoue M, Iwasaki F, Kaneko T, Waragai T, Sano H, Kikuta A, **Morio T**, Nonoyama S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for the Patients with Activated P13K-Delta Syndrome. **16<sup>th</sup> Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2014)**. Prague, Czech Republic. October 2014.
    2. Takashima T, Tsujita Y, Yeh T.W, Mitsuiki N, Kanegane H, Kracker S, Durandy A, Nonoyama S, **Morio T**, Imai K. Clinical and Immunological Features of Patients with Gain-of-Function PIK3CD Mutations in Japan. **16<sup>th</sup> Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2014)**. Prague, Czech Republic. October 2014.
    3. Mitsuiki N, Yang X, Bartol S, Kosaka Y, Takada H, Imai K, Kanegane H, Mizutani S, Van der Burg M, Van Zelm M, Ohara O, **Morio T**. Mutations in Bruton's Tyrosine Kinase Impair Responses. **16<sup>th</sup> Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2014)**. Prague, Czech Republic. October 2014.
    4. **Morio T**. Primary Immunodeficiencies due the Defect in Signaling Molecules. **2012 KSMCB Annual Meeting**. Seoul, Korea. October 2012.
    5. Mitsuiki N, Oshim K, Imai K, Ohara O, **Morio T**, Mizutani A. Genetic Analysis For 207 Cases With Primary Immunodeficiency (PID) Consulted to A Single Center Through PID Network in JAPAN (PIDJ) in 5 Years (2007-2011). **15<sup>th</sup> Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012)**. Florence, Italy. October 2012.
    6. **Morio T**. Btk is a critical gatekeeper of neutrophil responses. **Medical Immunology World Initiative (MIWI) projects**. Yokohama, Japan. May 2012.
    7. 岡野 翼、今井耕輔、宮脇零士、奥津美