

- 夏、高島健浩、青木由貴、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、水谷修紀、森尾友宏：炎症性腸疾患と *Mycobacterium avium* 感染症を合併した NEMO 異常症に対する非血縁者間骨髄移植、第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会、岡山、2014 年 11 月 29 日
8. 谷ヶ崎博、平井麻衣子、下澤克宜、金澤剛二、陳基明、高島健浩、今井耕輔、森尾友宏、高橋昌里：全腸性の粘膜下リンパ増殖性疾患と軽度の免疫異常を示す女兒に同定された PIK3CD 遺伝子の胚細胞性変異、第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会、岡山、2014 年 11 月 28 日
 9. 高島健浩、辻田由喜、今井耕輔、関中佳奈子、YehTsu-Wen、満生紀子、奥野友介、村松秀城、白石友一、千葉健一、田中洋子、宮野悟、吉田健一、小川誠司、金兼弘和、小島勢二、小原収、森尾友宏、野々山恵章：Activated PI3K- δ syndrome 患者の臨床的・免疫学的特徴、第 42 回日本臨床免疫学会総会、東京、2014 年 9 月 25 日
 10. 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
 11. 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 γ 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
 12. 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
 13. 森尾友宏：細胞内寄生菌にたいする感染防御機構、第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会、北九州、2012 年 11 月 23 日
 14. 森尾友宏：先天性免疫不全症および血液系腫瘍において診断の手がかりとなる皮膚病変と、診断への道筋、第 36 回日本小児皮膚科学会学術大会、前橋市、2012 年 7 月 15 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
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

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 初発・無治療の多発性筋炎・皮膚筋炎について、Flow cytometer による末梢血リンパ球分画解析を行った。計 17 症例と健常者の比較により、多発性筋炎・皮膚筋炎症例の末梢血では CD4 陽性 T 細胞、特に central memory CD4 陽性 T 細胞が多く naïve memory B 細胞が少ないことが明らかとなった。また、各臓器傷害の有無による比較では、間質性肺炎合併例において非合併例と比して濾胞性 T 細胞およびメモリー B 細胞が少ないことが明らかとなった。これらの末梢血リンパ球分画の異常が病態に関与している可能性が考えられ、疾患予後予測因子や治療標的となることが期待される。

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)。

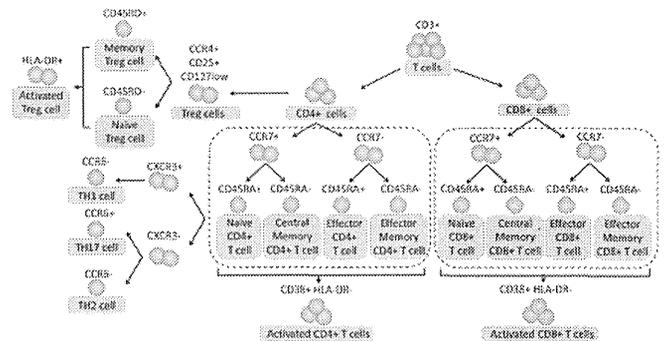


図 1) HIPC による T 細胞分類フローチャート

(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 月から平成 26 年 12 月に当科に入院した初発・無治療の PM4 例、DM10 例、ADM3 例の計 17 症例について解析を行った。間質性肺炎合併例は 7 例 (いずれも DM ・ADM)、悪性腫瘍合併例は 3 例 (DM2 例 ・ADM1 例) であった。

Flow cytometry による解析の結果、PM/DM/ADM 症例は健常者に比べて CD4 優位であった (図 2)。

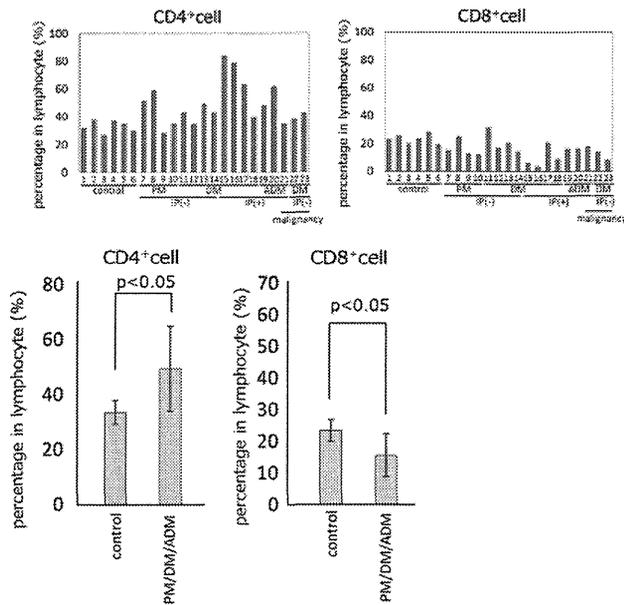


図 2) CD4+T 細胞、CD8+T 細胞

特に Central memory CD4+細胞が多く、naïve CD8+細胞が少なかった。(図 3、図 4)。

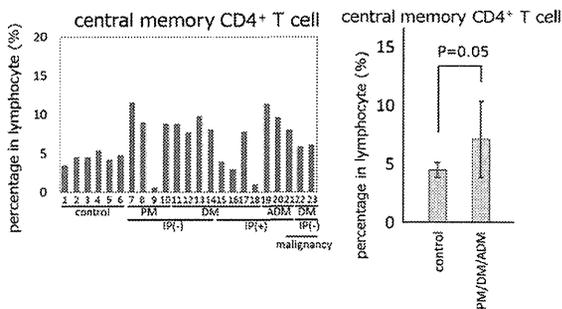


図 3) Central memory CD4+T 細胞

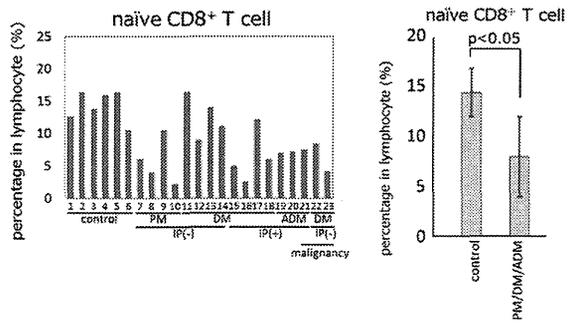
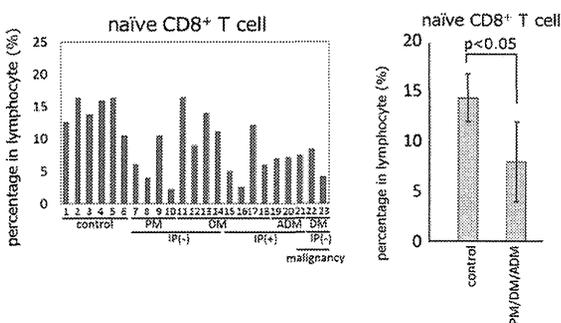


図 4) naïve CD8+T 細胞

また、健常者に比して制御性 T 細胞が多い傾向を認めた (図 5)。

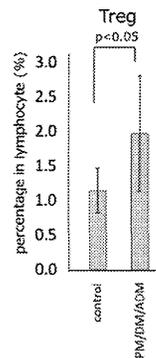


図 5) 制御性 T 細胞

間質性肺炎合併例と非合併例の比較では、間質性肺炎合併例において濾胞性 T 細胞、memory B 細胞が少ないことが明らかとなった (図 6)。

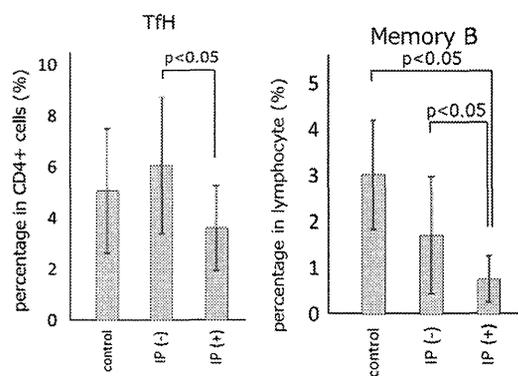


図 6) 濾胞性 T 細胞、memory B 細胞

D. 考察

PM/DM/ADM 症例では健常者と比べて CD4 陽性細胞優位であり、特に central memory CD4+T 細胞が多いことが明らかとなった。このことから、これらの免疫異常が炎症性筋疾患の病態形成に重

要な役割を担っていることが示唆された。

また、傷害臓器別の解析により、間質性肺炎合併例において非合併例に比して末梢血中の濾胞性 T 細胞・memory B 細胞が少ないことが明らかとなった。これらの細胞が肺傷害の病態に関与している可能性が考えられ、難治性で重篤な病態である間質性肺炎の予後予測因子や新たな治療標的となることが期待される。

E. 結論

細胞表面マーカーの解析により、炎症性筋疾患における末梢血リンパ球分画異常を明らかにした。

F. 健康危機情報

なし

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

分担研究者 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た。1年目にヒト扁桃腺の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た。2年目にはヒト扁桃腺の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。また末梢血のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞の臨床データとの関連を検討し、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一方、SLEDAI、DAS28など疾患活動性との明らかな相関を認めなかった。3年目は末梢血のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞が、末梢血の濾胞性ヘルパー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が確認できた。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。

(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

1年目にヒト扁桃腺の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た。2年目にはヒト扁桃腺の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。また末梢血のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞の臨床データとの関連を検討し、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だ一方、SLEDAI、DAS28など疾患活動性との明らかな相関を認めなかった。3年目は末梢血のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞が、末梢血の濾胞性ヘルパー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が確認できた。

D. 考察

ヒト扁桃腺および末梢血のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞とマウスCD4陽性CD25陰性LAG3陽性Egr2陽性制御性T細胞の間に一定の類似性を認めた。ヒト末梢血のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞は自己抗体産生の制御に寄与していると考えられ、この細胞集団が自己免疫疾患患者で減少していることは、病態との関連を示唆していると考えられる。

E. 結論

ヒトCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞が自己免疫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

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Nakachi S, Komai T, Shoda H, Miyazaki JI, Fujio K, Yamamoto K. TGF- β 3-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. *Nat Communications*. 2015 in press.

Shoda H, Fujio K, Sakurai K, Ishigaki K, Nagafuchi Y, Shibuya M, Okamura T, Yamamoto K. Autoantigen BiP-derived HLA-DR4 epitopes differentially recognized by effector and regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2015 in press.

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;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;43:1063-73.

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.

Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis*. 71 Suppl 2:i96-100, 2012.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory T cell-mediated control of autoantibody-induced inflammation. *Front Immunol*. 3:28, 2012.

Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Kidney-infiltrating CD4+ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. *Kidney Int.* 82:969-79, 2012.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory cell subsets in the control of autoantibody production related to systemic autoimmunity. *Ann Rheum Dis.* 2012 Dec 19.

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 Jan 25.

2. 学会発表

Keishi Fujio, TGF-beta3-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. 第43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12日

藤尾圭志 TGF-beta3 産生による CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の B 細胞機能抑制 第79回日本インターフェロンサイトカイン学会 (札幌) シンポジウム 2014年6月19日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Shuji Sumitomo, Shinichiro Nakachi, Kazuhiko Yamamoto. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells and systemic autoimmunity. 第58回日本リウマチ学会 (東京) 国際リウマチシンポジウム 2014年4月25日

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
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

岡本明子、藤尾圭志、松本巧、岡村僚久、住友秀次、岩崎由希子、澁谷美穂子、庄田宏文、山本一彦

Tofacitinib は生体内で CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を誘導し、試験管内で CD4 陽性 T 細胞の Egr2 発現の誘導する 第56回日本リウマチ学会学術総会 ワークショップ 平成24年4月26日

藤尾圭志、岡村僚久、住友秀次、岩崎由希子、岡本明子、松本巧、山本一彦 制御性 T 細胞と自己免疫 第40回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム 平成24年9月27日

岡本明子、藤尾圭志、松本巧、住友秀次、岡村僚久、山本一彦 Jak 阻害薬は生体内で CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を誘導し、試験管内で

CD4 陽性 T 細胞の Egr2 発現の誘導する 第 40 回日本臨床免疫学会総会 ポスター発表 平成 24 年 9 月 28 日

Okamoto Akiko, Fujio Keishi, Ishigaki Kazuyoshi, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko. Tofacitinib induces CD4+CD25⁻LAG3⁺ regulatory T cells in vivo and the expression of Egr2 in CD4⁺ T cells in vitro. 第 41 回日本免疫学会学術総会 平成 24 年 12 月 6 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一内科学講座 教授
研究協力者 中山田真吾 産業医科大学医学部第一内科学講座 講師
研究協力者 久保智史 産業医科大学医学部第一内科学講座 助教

研究要旨 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(Tfh)細胞の活性化が重要な役割を担う。しかし、これらの自己免疫疾患の病態形成におけるTfh細胞の分化と機能の異常は不詳である。本研究では、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を用いて、T細胞、B細胞、樹状細胞の表現型、及び患者背景との関連性を検討した。疾患活動性の高いRA、特に無治療およびACPA陽性症例では、Th1/Th17/Tfhに関連する全てのマーカーを中等度発現する細胞集団(CXCR3^{int}CCR6^{int}CXCR5^{int})の割合が増加し、その細胞集団ではCD69などの活性化マーカーが特徴的に高発現していた。一方、SLE患者末梢血において、可塑性を有するTfh/Th1細胞とCXCR5⁻CXCR3⁺memory B細胞が相関して検出され、両者はIFN- γ /T-betシグナルを介して、その分化と機能を共有する事が示唆された。また、CD11c⁻CD123⁻の新たな樹状細胞様の亜集団が存在し、B細胞分化と疾患活動性に関与していた。以上、疾患活動性の高いRA患者末梢血CD4⁺T細胞では、可塑性を有するTfh様メモリー細胞のエフェクター亜集団が存在し、その亜集団の活性化と増加による病態形成への関与が考えられた。また、SLEでは、新規樹状細胞サブセット、可塑性を有するTfh/Th1細胞、ケモカイン受容体発現異常を伴うeffector memory B細胞の相互作用による病因的関与が考えられた。

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(Tfh)細胞の活性化が重要な役割を担う。本研究では、自己免疫疾患の病態形成において、樹状細胞-Tfh細胞-B細胞軸を中心に、樹状細胞のシグナルがT細胞サブセットのバランス異常を介して、Tfh細胞への分化の偏向を誘導する過程を解明する。その際、患者末梢血リンパ球の細胞表現型をNIH/FOCISがHuman Immunology Projectとして提唱した抗体セット、及び、ケモカイン受容体抗体を含む独自の抗体セットを用いて8カラーフローサイトメトリーで解析する。さらに、疾患活動性や治療抵抗性に関わる細胞群が明らかにし、多様な免疫病態に応じたオーダーメイド治療の開発を目指す。

B. 研究方法

健常人、関節リウマチ(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、T細胞、B細胞、DCの表現型、及び患者背景との関連性を検討し、疾患活動性や治療抵抗性に関わる細胞群を検討した。その際、患者末梢血リンパ球の細胞表現型をNIH/FOCISがHuman Immunology Projectとして提唱した抗体セット、及び、ケモカイン受容体抗体を含む独自の抗体セットを用いて解析した。さらに、ヒト末梢血T細胞およびB細胞におけるケモカイン受容体、転写因子Bcl-6、T-betなどの誘導機構を解析した。(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

個人情報が所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) 健常人末梢血では、Th1細胞(CXCR3^{hi}CXCR5^{neg})、Th17細胞(CCR6^{hi}CXCR5^{neg})、Tfh細胞(CXCR3^{neg}CCR6^{neg}CXCR5^{hi})で構成されるCD4⁺T細胞サブセットが検出された。

(2) 疾患活動性の高いRA、特に無治療およびACPA陽性症例では、各サブセットの比率に変化を認めないが、全てのマーカーを中等度発現する細胞集団(CXCR3^{int}CCR6^{int}CXCR5^{int})の割合が増加し、その細胞集団では、CD69などの活性化マーカーが特徴的に高発現していた。MTX等への治療抵抗症例では、Th1細胞(CXCR3^{hi}CXCR5^{neg})、Th17細胞(CCR6^{hi}CXCR5^{neg})の相対的な増加を認めた。

(3) 健常人、RA患者に比してSLE患者では、CD4⁺T細胞におけるCD4⁺ICOS⁺CXCR5⁺Tfh細胞の割合、及び、CD19⁺B細胞中のCXCR5発現を欠くCD19⁺IgD⁻CD27⁻memory B細胞の割合が増加し、両者に正の相関を認めた。

(4) 活性化Tfh細胞とCXCR5⁻CXCR3⁻memory B細胞の割合は、SLEの疾患活動性と相関せず、抗Sm抗体価と相関した。免疫抑制療法により疾患活動性が改善された後も、CXCR5⁻memory B細胞は残存した。

(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。

(6) SLE患者では可塑性をもつTfh/Th1(CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁺)様細胞が増加し、この亜集団はIFN- γ の産生を介してT-betを発現するCXCR5⁻CXCR3⁺memory B細胞を誘導した。

(7) 樹状細胞サブセットでは、CD11c⁻CD123⁻の新たな樹状細胞様の亜集団が疾患活動性と相関して増加し、

クラスター解析ではmemory B細胞やplasmablastと正の相関を示した。

D. 考察

健常人ではCD4⁺T細胞分画のバランスが維持されるのに対して、活動期のRAでは可塑性を有するTfh様の活性化したエフェクター亜集団が出現し、病態形成に寄与する可能性が示唆された。今後、このようなヘルパーT細胞サブセットのバランス破綻と機能異常を齎す細胞内外のシグナル伝達異常が特定されることで、そのシグナル制御によるT細胞サブセットのバランス異常の修復を介した新規治療法の開発が期待される。

一方、SLE患者の末梢血では、CD11c⁻CD123⁻の新たなDC様の亜集団が存在し、B細胞分化と疾患活動性に関与していた。さらに、SLE患者では可塑性を有するTfh/Th1細胞とCXCR5⁻CXCR3⁺memory B細胞が相関して検出され、両者はIFN- γ /T-betシグナルを介して、その分化と機能を共有する事が示唆された。さらに、これらの可塑性をもつメモリーサブセットは、既存治療では根治困難なSLEの病因に関与する可能性が示唆された。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。

E. 結論

RA患者末梢血CD4⁺T細胞では、可塑性を有するTfh様メモリー細胞の活性化と増加による病態形成への関与、及び、とエフェクター細胞バランスの異常による治療抵抗性への関与が考えられた。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、ケモカイン受容体発現異常を伴うeffector memory B細胞の相互作用による病因的関与が考えられた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Iwata S, Nakayamada S, Fukuyo S, Kubo S, Yunoue N, Wang S-P, Yoshikawa M, Saito K, Tanaka Y. Activation of Syk in peripheral blood B cells in patients with rheumatoid arthritis: A potential target for abatacept therapy. *Arthritis Rheum* [Epub ahead of print]
- Kondo M, Yamaoka K, Sakata K, Sonomoto K, Lin L, Nakano K, Tanaka Y. IL-6/STAT3 signaling pathway contributes to chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* [Epub ahead of print]
- 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* [Epub ahead of print]
- Ishizaki J, Saito K, Nawata M, Mizuno Y, Tokunaga M, Sawamukai N, Tamura M, Hirata S, Yamaoaka K, Hasegawa H, Tanaka Y. Low complements and high titer of anti-Sm antibody as predictors of histopathologically proven silent lupus nephritis without abnormal urinalysis in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* (in press)
- Iwata S, Yamaoaka K, Niuro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Wang S-P, Kondo M, Yoshikawa M, Akashi K, Tanaka Y. Increased Syk phosphorylation leads to overexpression of TRAF6 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* (in press)
- Tanaka Y, Martin Mola E. Can IL-6-targeting catch up TNF-targeting in rheumatoid arthritis: from studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab. *Ann Rheum Dis* (2014) 73, 1395-1397
- 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* (2014) 73, 2192-2198
- Wang S-P, Iwata S, Nakayamada S, Sakata K, Yamaoka K, Tanaka Y. Tofacitinib, a Jak inhibitor, inhibits human B cell activation in vitro. *Ann Rheum Dis* (2014) 73, 2213-2215
- 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* (2014) 53:1282-90
- Tanaka Y. Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal? *Ann Rheum Dis* (2013) 72, ii124-ii127
- 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
- van der Heijde D, Tanaka Y, Fleischmann R, et al. 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
- 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

14. Oiwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. B-cell or T-cell-dominant recurrence after rituximab therapy in patients with SLE. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 1749-55
15. Tanaka Y., Maeshima Y, Yamaoaka K. In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, i70-i74
16. Maeshima K, Yamaoaka K Kubo s, Nakano K, Iwata S, Saito K, Ohishi M, Miyahara H, Tanaka S, Ishi K, Yoshimatsu H, Tanaka Y. A JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of IFN- γ and IL17 production by human CD4+ T cells. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 1790-98
17. Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, Tanaka Y. IL-1 β induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt5a/Ror2 pathway. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 3353-63
18. Tanaka Y. Intensive treatment and treatment holiday of TNF-inhibitors in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* (2012) 24, 319-326
19. Tanaka Y., Harigai M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Mitasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Yoshinari T, Baker D and the GO-FORTH study group. Golimumab, a human anti-TNF- α monoclonal antibody, injected subcutaneously every 4 weeks in Japanese patients with active rheumatoid arthritis in combination with methotrexate. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 817-824
20. Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Nakano K, Wang S-P, Akashi K, Tanaka Y. Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129, 1594-1601

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における制御性 T 細胞に関する研究

分担研究者 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 (第一内科) 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 (第一内科) 助教
古賀智裕 長崎大学病院医療教育開発センター 助教
梅田雅孝 長崎大学病院第一内科 医員(大学院生)
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)における制御性 T 細胞(Treg)の役割については一定の見解が得られていない。SLE の T 細胞では Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase Type IV(CaMKIV)の発現が増加し、T 細胞の活性化を制御する機能があることが想定される。我々はヒトの SLE 患者の T 細胞で *CAMK4* の gene silencing により、FoxP3 が発現回復することを報告した。CaMKIV 発現抑制により、制御性 T 細胞の機能が回復し SLE の進展抑制効果をもたらす可能性があると考えられた。

一方、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.)。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)と相関関係を認めず、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

SLE における制御性 T 細胞がどのように誘導、制御されているのかについて明らかにする。

B. 研究方法

<研究 1>

ヒトの正常および SLE 患者の T 細胞を CD3/CD28 で刺激し、si-RNA にて *CAMK4* を silencing させて、FoxP3 mRNA およびタンパク発現変化を検討した。また SLE のモデルマウス MRL/lpr(wild type:WT) の *CAMK4* を genetic deletion した MRL/lpr.camkiv-/-を用いて、T 細胞における IL-2 発現や CD4+CD25+FoxP3 発現、CD4+CD25+細胞の effector T 細胞の制御についてウェスタンブロットやフローサイトメトリー法で検討を行った。

<研究 2>

SLE 患者(N=33), 健常人(N=11), 非 SLE 患者

(N=8, 混合性結合組織病:2, 関節リウマチ:6) のヒト末梢血単核細胞(PBMC) を分離し、フローサイトメーターにて CD4+CD25+CD127+ 細胞(制御性 T 細胞) および CD52high と CD52low T 細胞の発現を検討した。同時に SLEDAI, 抗 ds-DNA 抗体価、補体価などの臨床的パラメータとの相関について解析を行った。

(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」および Beth Israel Deaconess Medical Center(BIDMC), Boston の動物実験・倫理委員会による承認を得て、プロトコールを遵守して行った。

C. 研究結果

<研究 1>

ヒトの SLE 患者の T 細胞では CAMK4 specific si-RNA により、FoxP3 の発現回復効果を認めた。MRL/lpr.camkiv^{-/-}では T 細胞における IL-2 発現および CD4+CD25+FoxP3+細胞 population が WT に比べて有意に増加していた。また CD4+CD25+FoxP3 発現細胞は WT でも CD4+CD25-T 細胞に IL-2 を添加することにより、MRL/lpr.camkiv^{-/-}と同程度にまで発現が回復していた。また MRL/lpr.camkiv^{-/-}の CD4+CD25+T 細胞は WT に比べて有意に CD4+CD25-細胞の増殖抑制効果を認めた。

<研究 2>

SLE 患者は平均年齢 43.0±17.9 歳，男女比：男性 27.2%，平均 SLEDAI：7.5±5.9 (0-21)であった。SLE 患者，健常人，非 SLE 患者の 3 群間において CD4+CD25+CD127+細胞の population に有意差を認めなかった。SLE 患者の CD4+CD25+CD127+細胞と CD52lowT 細胞の間にも相関は認めなかった。SLE 患者の CD52lowT 細胞は SLEDAI と有意に相関を示したが(p=0.0485,r=0.346096)，抗 ds-DNA 抗体価や補体価との相関は示さなかった。高 SLEDAI(6 >) の SLE 患者は，健常人，非 SLE 患者と比較し，有意に CD52lowT 細胞を多く認めた(高 SLEDAI vs. 健常人:p=0.0011,高 SLEDAI vs. 非 SLE 患者:p=0.0034)。また，可溶性 CD52 分子を ELISA 法で測定したところ，SLE で他群 (vs. RA: p=0.0142, vs. 健常人: p=0.0011) と比較し有意な低下を認めた。

D. 考察

ヒト SLE 患者 T 細胞および MRL/lpr マウスを用いた検討では，CAMK4 deletion により制御性 T 細胞(Treg)の発現が増加し，免疫担当細胞の活性化を制御し，病気の進展抑制効果に関与する可能性が示唆された。

また SLE などの自己免疫性疾患では 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，疾患活動性に関与している可能性があると考えられる。

E. 結論

SLE において CaMKIV 発現は増加しており，病態に関与していると考えられる。CaMKIV 発現抑制による制御性 T 細胞を介した SLE の進展抑制効果が期待される。また 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

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura H, Takahashi Y, Yamamoto-Fukuda T, Horai Y, Nakashima Y, Arima K, Nakamura T, Koji T, and **Kawakami A**. Direct infection of primary salivary gland epithelial cells by HTLV- I that induces the niche of the salivary glands of sjogren's syndrome patients. Arthritis Rheumatol. 2015, in press.
- 2) Horai Y, Koga T, Fujikawa K, Takatani A, Nishino A, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Ida H, Kakugawa T, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Mukae H, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Kuwana M, Origuchi T, Kohno S, **Kawakami A**. Serum interferon- α is a useful biomarker in patients with anti-melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) antibody-positive dermatomyositis. Mod Rheumatol. 2015 Jan;25(1):85-9.
- 3) Migita K, Izumi Y, Jiuchi Y, Kozuru H, Kawahara C, Izumi M, Sakai T, Nakamura M, Motokawa S, Nakamura T, **Kawakami A**. Effects of Janus kinase inhibitor tofacitinib on circulating serum amyloid A and interleukin-6 during treatment for rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol. 2014 Feb;175(2):208-14.
- 4) 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. 2014 Feb;34(2):221-5.
- 5) 岩本 直樹, **川上 純**. 【自己免疫性血液疾患:診断と治療の進歩】病態の基礎 自己抗体の産生機序. 日本内科学会雑誌. 2014.103(7):1564-1569.
- 6) 一瀬邦弘, **川上 純**. 最新関節リウマチ

学 一寛解・治癒を目指した研究と最新治療— III.関節リウマチの発症要因と発症メカニズム Th17 細胞. 日本臨牀. 2014.72(3):53-58.

- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Ohyama K, **Kawakami A**, Tamai M, Baba M, Kishikawa N, Kuroda N. Serum immune complex containing thrombospondin-1: a novel biomarker for early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 71 (11): 1916-1917, 2012.
- 10) Koga T, Fujikawa K, Horai Y, Okada A, Kawashiri SY, Iwamoto N, Suzuki T, Nakashima Y, Tamai M, Arima K, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Ishimatsu Y, Mukae H, Kuwana M, Kohno S, Eguchi K, Aoyagi K, **Kawakami A**. The diagnostic utility of anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody testing for predicting the prognosis of Japanese patients with DM. *Rheumatology (Oxford)*. 51 (7): 1278-1284, 2012.

2. 学会発表

- 1) Ichinose K, Ushigusa T, Nakashima Y, Suzuki T, Horai Y, Kawashiri SY, Iwamoto N, Tamai M, Arima K, Nakamura H, Origuchi T, **Kawakami A**. Predictors of Therapeutic Outcomes in Patients with Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus. 2014 ACR/ARHP Annual Meeting.

2014/11/14~11/19.

- 2) 一瀬邦弘、古賀智裕、**川上純**. 全身性エリテマトーデスにおける Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase type IV の役割. 第 42 回 日本臨床免疫学会.2014/9/25~9/27.
- 3) Ichinose K, Ushigusa T, Koga T, Tsokos GC, **Kawakami A**. Role of calcium/calmodulin -dependent kinase type IV in podocyte function in lupus nephritis. *EULAR 2014*. 2014/6/11~6/14.
- 4) 古賀智裕, **川上 純**, Tsokos, G.C. CaMK 4 阻害による Akt/mTOR 経路および CREM- α を介した TA17 関連自己免疫疾患の制御. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014/4/24~4/26.
- 5) 一瀬邦弘, 牛草 健, 古賀智裕, Tsokos, G.C, **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 2 報). 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014/4/24~4/26.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.

- 9) 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.

- 10) 一瀬邦弘, 川上純, George C. Tsokos; 第 40 回日本臨床免疫学会総会 (東京) 2012 年 9 月 27 日-29 日.
- 11) 一瀬邦弘, 川上純, George C. Tsokos; 第 55 回日本腎臓学会学術集会 (横浜) 2012 年 6 月 1 日-3 日.
- 12) 一瀬邦弘, 川上純, George C. Tsokos; 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (東京) 2012 年 4 月 26 日-28 日.
- 13) Ichinose K, Tsokos GC, Kawakami A et. al; ACR/ARHP 2012 Annual Meeting; November 9th - 14th, 2012 Washington, DC.
- 14) Ichinose K, Tsokos GC, Kawakami A et. al; 99th AAI Annual Meeting, IMMUNOLOGY 2012[™], May 4-8, 2012 Boston, Massachusetts.

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
名称: 中枢神経ループス (NPSLE) 診断用バイオマーカー
番号: 特願 2013-55543
出願日: 平成 25 年 3 月 18 日

Ⅲ. ヒト PBMC 解析 マニュアル

ヒト PBMC 解析 マニュアル

author

今井 耕輔 東京医科歯科大学 大学院小児・周産期地域医療講座

住友 秀次 東京大学 医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科



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。

本件は、平成25年度において、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野）を受け、実施した研究成果である。

□ 一般的な解析パネル

- ・ 使用機器：ベックマン・コールター社 MoFlo XDP (8 color)
- ・ Human Immunology Project の提言[Nature Reviews Immunology, 2012 (12):191-200]を基礎とした
- ・ カッコ内はクローン名
- ・ BV421= Brilliant violet 421, V500= Violet 500

色素	Th cell パネル	Treg cell パネル	B cell パネル	DC, Monocyte, NK cell パネル
FITC	CXCR5 (RF8B2)	CD25 (BC96)	CD27 (O323)	CD14 (M5E2)
PE	CCR6 (11A9)	-	CD24 (ML5)	HLA-DR (L243)
PerCP-Cy5.5	CD3 (UCHT1)	CD4 (OKT4)	CD3 (UCHT1)	CD16 (3G8)
PE-Cy7	CD25 (BC96)	CD127 (eBioRDR5)	CD38 (HIT2)	CD3 (UCHT1)
APC	-	CCR7 (G043H7)	-	CD123 (AC145)
APC-Cy7	CD45RA (HI100)	CD45RA (HI100)	CD19 (HIB19)	CD56 (HCD56)
BV421	CXCR3 (1C6/CXCR3)	-	IgD (IA6-2)	CD11c (B-ly6)
V500	CD4 (RPA-T4)	-	-	CD19 (HIB19)