

## 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  
永淵 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 ) 、それによって研究を進めた。

### 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、健常人、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, Tanii 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-κB 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+CD25-LAG3+ 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