

全身性エリテマトーデス (SLE) における CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の異常に関する研究

研究分担者 桑名正隆 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⁺Foxp3⁺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⁺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⁺Foxp3⁺T 細胞の役割を検討するため、末梢血を用いて CD4⁺細胞中の Foxp3⁺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⁺Foxp3⁺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⁺Foxp3⁺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⁺Foxp3⁺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⁺CD25⁺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⁺IL-17⁺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テムが存在しており、その破綻が種々の自己免疫疾患の発症要因のひとつと想定されている。免疫制御機構のひとつに、制御性 T 細胞 (Treg) による末梢性トレランスの維持が知られている。代表的なサブセットとして胸腺由来の CD4⁺CD25^{high} 胸腺由来 Treg (nTreg) が知られており、nTreg への分化を規定するマスター遺伝子として Foxp3 が同定されている。

近年、Foxp3 を発現する CD4⁺細胞は単一の細胞集団ではなく、nTreg、末梢誘導性 Treg、さらには活性化したエフェクター T 細胞など、様々な亜集団を含む分画であることが明らかにされた。当然ながら、これら CD4⁺Foxp3⁺分画の機能は同一でなく、それぞれが異なる病態と関連する可能性がある。

多くの自己免疫疾患で Foxp3⁺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⁺Foxp3⁺細胞の多様性に着目し、SLE 患

者における CD4⁺Foxp3⁺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变化を検討した。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⁺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⁺Foxp3⁺細胞のフェノタイプ解析

CD4⁺Foxp3⁺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⁺細胞からゲノム DNA を回収し、bisulfite 処理後にメチル化特異的定量的 PCR 法を施行した。各検体中における、TSDR がメチル化された DNA のコピー数と TSDR が脱メチル化された DNA のコピー数をもとに、TSDR が脱メチル化された細胞の比率を算出した。CD4⁺細胞中における TSDR 脱メチル化細胞の比率を nTreg 比率とした。

5. 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⁺CD25⁺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⁺CD25⁺細胞と CD4⁺CD25⁻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⁺CD25⁻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⁺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 μg/mL) を

用いた。蛍光輝度の低下した分裂細胞の全 CD4⁺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⁺CD25⁺細胞の共培養時に CD4⁺CD25⁺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⁺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⁺IL-17⁺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. 健康人と SLE 患者における CD4⁺細胞中の Foxp3⁺細胞比率の比較

CD4⁺細胞中における Foxp3⁺細胞の比率は SLE 患者で健康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⁺Foxp3⁺細胞の比率が減少した ($r = 0.57, P < 0.01$)。一方、CD4⁺細胞中における Foxp3⁺細胞の比率は MS と原発性 ITP では健康人と同等で、CD4⁺Foxp3⁺細胞比率の増加は SLE に特徴的であった。

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

CD4⁺細胞中における Foxp3⁺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⁺細胞中の TSDR 脱メチル化細胞比率の比較

CD4⁺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⁺細胞中 Foxp3⁺細胞の比率と有意に相関していた ($r = 0.52$ 、 $P < 0.01$)。CD4⁺Foxp3⁺細胞と CD4⁺Foxp3⁻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⁺Foxp3⁺細胞の TSDR は完全に脱メチル化されていた。一方、CD4⁺Foxp3⁻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 フェノタイプの解析

SLE では健常人に比べて CD4⁺Foxp3⁺細胞表面における CD25 の発現が低下 ($P < 0.01$)、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⁺Foxp3⁺CD25⁺CD45RA⁺) が SLE で増加していたが ($P = 0.03$) authentic Treg (CD4⁺Foxp3⁺CD25^{high})、effector Treg (CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺CD49d⁻)、高純度 Treg (CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺CD127^{low}) および CD4⁺Foxp3⁺CD25^{high}CD127^{low})、高純度 effector Treg (CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺CD49d⁻CD127^{low}) に差はなかった。

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⁺Foxp3⁺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⁺Foxp3⁺Helios⁺細胞と CD4⁺Foxp3⁺CD49d⁺細胞は明確に異なるサブセットであった。

そこで、次に CD4⁺Foxp3⁺CD49d⁺細胞における各種分子の発現を SLE 16 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⁺Foxp3⁺CD49d⁺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⁺Foxp3⁺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⁺CD25⁺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 SLE 2 例と健常人 3 例由来の CD4⁺CD25⁺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⁺Foxp3⁺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⁺Foxp3⁺IL-17⁺細胞の検出

SLE 末梢血で増えている CD4⁺Foxp3⁺CD49d⁺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⁺IL-17⁺T 細胞の浸潤がみられた。そこで、CD4⁺IL-17⁺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⁺細胞中の Foxp3⁺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⁺Foxp3⁺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にない。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⁺Foxp3⁺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^{low}、CD45RA⁺である点は SLE 末梢血中で増えていた CD4⁺Foxp3⁺細胞と同様だが、免疫制御能を欠く点が大きく異なる。CD4⁺Foxp3⁺IL-17⁺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⁺Foxp3⁺IL-17⁺細胞もルーブ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⁺Foxp3⁺細胞比率は疾患活動性 (SLEDAI)、抗二本鎖 DNA 抗体価と相関することとあわせて、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⁺CD25⁺ 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. 15th International Conference on Behçet's Disease (Yokohama). 2012. 7.
2. Kuwana M: CD4⁺ T regulatory cells in ITP. 4th 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