

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 CD52^{high} T 細胞が CD52^{low} 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+CD52^{high} T 細胞の集団が少ないことがわかった。また、この CD52^{high} 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 CD52^{high} と CD52^{low} 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關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、疾患活動性に關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、

病態に關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關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-1 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 寛解・治癒を目指した研究と最新治療 .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- 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 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 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 2 0 1 3 - 5 5 5 4 3
出願日: 平成 2 5 年 3 月 1 8 日