

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)

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

総括・分担 研究報告書 (平成 26 年度)

研究代表者 山 本 一 彦

平成 27(2015) 年 3 月発行

目 次

・ 総合研究報告 -----	1
「 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に関する研究 」 東京大学大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ学 研究代表者 山本 一彦	
・ 分担研究報告	
「 関節リウマチ患者における包括的臨床免疫解析の試み 」-----	5
東京大学大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ学 山本 一彦	
「 全身性エリテマトーデス患者T細胞における RasGRP1 および関連分子に関する研究 」-----	7
北海道大学大学院医学研究科 免疫・代謝内科学 保田 晋助	
「 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 」 -----	13
筑波大学 医学医療系内科 膠原病・リウマチ・アレルギー 松本 功	
「 発症早期関節炎の末梢血における T 細胞の解析 第3報 」-----	15
東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 内科 小竹 茂	
「 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 」-----	17
日本医科大学アレルギー膠原病内科 桑名 正隆	
「 強直性脊椎炎患者の末梢血単核球に関する研究 」 -----	21
順天堂大学医学部膠原病内科 田村 直人	
「 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に関する研究」-----	24
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学 森尾 友宏	

「 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 」	27
東京医科歯科大学医学部医学科 上阪 等	
「 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 」	29
東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科 藤尾 圭志	
「 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 」	31
産業医科大学医学部第1内科学講座 田中 良哉	
「 全身性エリテマトーデスにおけるCD4+CD52+細胞の免疫調節に関する研究 」	33
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座 川上 純	
. 刊行に関する一覧	36

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

(研究代表者)

山本 一彦 東京大学大学院医学系研究内科学専攻アレルギー・リウマチ学 教授

(研究分担者)

保田 晋助 北海道大学大学院医学研究科 免疫・代謝内科学 講師

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

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

桑名 正隆 日本医科大学アレルギー膠原病内科 教授

田村 直人 順天堂大学膠原病科 准教授

森尾 友宏 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学 准教授

上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 教授

藤尾 圭志 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ学 講師

田中 良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

川上 純 長崎大学第一内科 教授

研究要旨

ヒトの免疫系は多くの点でマウスの免疫系と似ているが、細部については差異があることから、マウスを中心とした動物モデルでの知見はヒトの免疫学に直接的に応用できない。しかし、分析の困難さから、マウスの免疫システムの理解と比べヒトの免疫系の理解は十分でない。これらのことから欧米を中心にヒト免疫学の充実が提唱されているが、我が国では本格的な取り組みは始まっていない。本研究では、獲得免疫の中心である T 細胞に焦点をあて、ヘルパー型 T 細胞、制御性 T 細胞などの機能的サブセットおよびその亜集団をヒトでどのように把握するか、各疾患でどのような異常が起こっているか、それを修復するにはどのような方向の治療が考えられるかなどについて、内科、小児科の研究者が疾患横断的に研究を進めることを目的としている。平成 24 年度は、ヒトの各 T 細胞サブセットの検出、各疾患における遺伝子発現の検出、機能異常の検出、各種治療薬の影響の検出などの多くの方法論や情報を共有し、平成 25 年および 26 年度には、実際の健常人および患者サンプルでの解析を進めた。

A. 研究目的

本研究の目的は、獲得免疫の中心であり免疫応答をコントロールする T 細胞に焦点を当て、その機能的サブセットを末梢血リンパ球を中心としたヒトサンプルでどのように把握するか、健常人集団と比較して各疾患でどのような異常が起こり病態形成に繋がるのか、それを修復するにはどうしたら良いか、などに関して各分担研究者間で情報交換を行いながら横断的に検討することである。

現在の免疫学研究はモデル動物であるマウスを中心に目覚ましい進展を遂げており、次々に新しい分子、細胞などが明らかになっている。しかし、マウスとヒトの免疫システムは似ているが完全に同じではない。実際に、マウスで明らかになった知見をそのままヒトの疾患研究に応用することは容易ではない。例えば、制御性 T 細胞の表面マーカーもマウスと同じではない。従って、ヒトとマウスの新しい情報を的確に把握しつつ、解析を進

める必要がある。しかし、分析の困難さから、マウスの免疫システムと比べ、ヒトの免疫系の解析と理解は十分でない。これらのことからヒト免疫学の充実が提唱されており、諸外国では積極的な研究が開始されているが、我が国での具体的な取組はほとんどない。

このような状況を踏まえ、本研究では、今までヒトの免疫疾患領域で研究を進めてきた内科、小児科の研究者が、疾患横断的にヒトのT細胞に関して研究を進めることを目的とした。ヒトの各T細胞サブセットを如何に的確に検出するか、その機能を如何に解析するか、現在使用中や開発中の治療薬が試験管内や生体内でT細胞サブセットや遺伝子発現に如何に影響を及ぼすかなど多くの解決しなければならない問題がある。これらに関して、本領域に関する我が国の第一線研究者を分担研究者として集結し、多くの方法論や情報を共有し、議論を進めていくことで、我が国におけるヒト免疫学の端緒を開くことが目的である。

B. 研究方法

平成24年度には複数の研究会を開催し、共通の方法論の採用などの議論を行った。これをもとに平成25・26年度にはこれらを継続させながら、研究成果に関する議論を進めた。研究代表者の山本は、各研究者が使うヘルパー型T細胞、キラー型T細胞、制御性T細胞などのT細胞サブセットおよびそのナイーブ、メモリーなどの亜集団の分離・解析法に関して、Human Immunology Project Consortium(HIPC)の標準化法(Nat Rev Immunol.12:191, 2012)を参照しながら、健常人サンプルでの標準的な方法を試行し、スタンダードな方法として提示すること、各種治療薬の供給に関しての交渉などを通して、共通に使える試薬の整備などを継続的に行った。さらに関節リウマチ(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、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。

森尾分担研究者は、単一遺伝子異常による原発性免疫不全症における自己免疫疾患の発症機構とヘルパーT細胞(Th)サブセットの関与に関して

の研究を進める為、10カラーFACSを用いた解析を行った。さらにB細胞受容体、T細胞受容体について、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。

保田分担研究者は、T細胞の分化に重要であるが一部の膠原病患者T細胞で発現が低下しているRasGRP1 蛋白およびのスプライシング因子のASF/SF2 に注目して、全身性エリテマトーデス(SLE)患者と健常人末梢血を比較した。具体的には末梢血よりT細胞を単離し、RNAを抽出、ASF/SF2、RasGRP1 およびその下流のDNMT1 の発現を検討した。松本分担研究者は、動物モデルの関節炎発症早期の脾臓とRA患者CD4陽性T細胞に共通して高発現が認められるHCgp-39(human cartilage glycoprotein 39)とFPR2 (forml peptide receptor 2)に着目し、これらによるT細胞サブセットと自己免疫病態への関連を検討した。健常人及びRA患者から単離した末梢血単核球及びCD4⁺T細胞のサブセット(Th1, Th2, Th2)における発現を検討した。

小竹分担研究者は、病態形成の主役であるヘルパー型T細胞に関して、発症早期関節炎で未治療の患者におけるヘルパーT細胞、特にTh17細胞分画を解析した。桑名分担研究者は病態形成を抑制する制御性T細胞(Treg)に関して、CD4⁺Foxp3⁺細胞の多様性に着目し、SLE患者末梢血CD4⁺Foxp3⁺T細胞およびCD4⁺Foxp3⁺CD49d⁺細胞の細胞比率、各種遺伝子発現を検討した。さらに免疫抑制機能を調べる為、磁気ビーズおよびフローサイトメトリーによるソーティングで分離し、同種混合性リンパ球反応における抑制能を評価した。

田村分担研究者は、これまで我が国で発症頻度が低いために検討がされてこなかった強直性脊椎炎(ankylosing spondylitis: AS)の末梢血単核球の検討を行った。さらにこの単核球を刺激し、サイトカイン産生細胞の頻度を細胞内染色で解析した。上阪分担研究者は、多発性筋炎・皮膚筋炎について、末梢血リンパ球分画異常の存在を明らかにすることを主目的とし、Flow cytometerによる解析を行った。

藤尾分担研究者は、独自に見出した新規LAG3

陽性制御性 T 細胞について、ヒト疾患の末梢血の LAG3 陽性制御性 T 細胞を FACS で解析、ソーティングで回収し遺伝子発現や機能を評価した。具体的には、健康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、マウスでみられる抗体産生抑制能で重要な分子である TGF- β 3 について解析した。

田中分担研究者は、SLE における活性化 Tfh 細胞、B 細胞サブセットの質的異常を明らかにすることを目的とし、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、DC、T 細胞、B 細胞のサブセットの細分類を試み、各サブセット間および患者背景との相関を検討した。さらに、ヒト末梢血ナイーブ T 細胞を TCR 架橋と各種サイトカイン (IL-6, IL-12, IL-21, IFN- γ / β など) で分化誘導させ、ケモカイン受容体、転写因子 Bcl-6、T-bet などの発現を検討した。川上分担研究者は、健康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ていることから (Nat Immunol. 2013;741-8.)、SLE における CD4⁺CD52^{low} 細胞と CD4⁺CD52^{high} 細胞の役割を検討した

C. 研究結果

山本研究代表者は、RA 患者の免疫担当細胞と HLA-DRB1 の疾患感受性遺伝子型 (SE)、ケモカイン受容体 CXCR4 との関連を検討した。SE 陽性 RA 患者では CD4⁺メモリー T 細胞比率が増加しており、この比率と T 細胞の DR 陽性率、抗 CCP 抗体値に正の相関がみられることを見出した。また CXCR4 は RA 患者 T 細胞では健康人に比して発現が亢進しており、CD4⁺メモリー T 細胞における陽性率は、B 細胞の DR 発現量、活動性指標の DAS28、RA に特異性の高い自己抗体である抗 CCP 抗体と正の相関があることを見出した。森尾分担研究者は原発性免疫不全症に関する解析を続けた。原因不明の患者が含まれている Common variable immunodeficiency (CVID) 患者の中には T 細胞、B 細胞の分化障害から自己免疫疾患を発症する例が存在する。そこで次世代シーケンサーにより

T 細胞受容体 (TCR)、B 細胞受容体 (BCR) の解析を行い、CDR3 領域長、D・J 領域の利用率、J 領域における新しい配列の追加などを検討した。この結果、一部の患者に幾つかの領域における頻度の偏りなどがあることを見出した。

保田研究分担者は、SLE 患者 T 細胞におけるスプライシング因子 ASF/SF2 の mRNA 発現レベルが健康人と比較して有意に低下していること、この低下が疾患活動性と関連があることを見出した。また SLE 患者における ASF/SF2 の発現レベルは正常 RasGRP1、DNMT1 の発現レベルと強い正の相関を有することを見出した。

松本分担研究者は、昨年度にマウスにおける抗原誘発関節炎発症早期の T 細胞に高発現している HCgp-39 と FDR2 が、ヒトでもコントロールと比較し RA の CD4 陽性 T 細胞に高発現していることを見出した。今年度はさらにこれを進め、HCgp-39 は CD25⁺Foxp3⁺Treg にのみ高発現していること、リコンビナント HCgp-39 は抗原特異的 T 細胞増殖や Th1, Th17 からのサイトカイン産生を著明に抑制することを見出した。小竹分担研究者は、発症早期関節炎において、活性化 NK レセプターマーカーの CD161 が陽性で CXCR3 陰性のメモリーヘルパー T 細胞が IL-17 産生細胞の 80% であることを見出した。

桑名分担研究者は、昨年度までの検討から SLE 末梢血において Foxp3⁺胸腺由来 Treg (nTreg) が増加し、その比率は疾患活動性と相関すること報告した。しかし、最近 CD4⁺Foxp3⁺ T 細胞の可塑性と多様性が示されていることから、SLE 患者末梢血 CD4⁺Foxp3⁺ T 細胞の病態における役割を検討した。その結果、CD4⁺Foxp3⁺ CD49d⁺細胞では nTreg に由来する免疫抑制能は有するが、IL-17 を介して炎症病態を促進する可能性を見出した。

田村分担研究者は、日本人で頻度が低く検討がほとんどされていない強直性脊椎炎の末梢血では、単球の比率が高く、NK 細胞が低いことを見出した。また CD4 陽性 T 細胞の中では、Th17 の頻度が高く、Th1 は低い傾向があり、CD8 陽性 T 細胞でも IL-17 の発現が亢進していることを明らかにした。

上阪研究分担者は、初発・無治療の筋炎患者の

末梢血の解析を行い、健常人と比較して、CD4 優位の傾向があり、特に central memory CD4 陽性細胞が多く、naïve CD8 陽性細胞が少ない傾向を認めた。制御性 T 細胞は、健常人に比べて多い傾向を見出した。

藤尾研究分担者はヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性の新規制御性 T 細胞に関して、試験管内での濾胞性ヘルパー 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を見出した。さらにこの細胞は培養により TGF- β 3 を発現し、ヒトリコンビナント TGF- β 3 は、ヒト B 細胞の分裂および抗体産生を抑制することを明らかにした。さらにアバタセプト投与前後で検討したところ、アバタセプト投与後にヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞の LAG3 発現が増強することを見出した。

田中分担研究者は SLE 患者では CD4⁺ICOS⁺CXCR5⁺Tfh 細胞の比率、CD19⁺B 細胞中の CD19⁺IgD⁻CD27⁺ effector memory B 細胞の比率が増加し、両者に正の相関を認めることを見出した。また、CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁺の Tfh/Th1 細胞の可塑性を有する細胞が増加し、この亜集団が IFN- γ 産生を介して CXCR5⁺CXCR3⁺memory B 細胞を誘導することを明らかにした。川上分担研究者は、SLE では健常人や非 SLE 患者に比べて CD4⁺CD52^{low} 細胞の出現がみられ、活動性と相関することから、病態形成に関与している可能性を見出した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノムの収集ならびに情報の提供およびヒト末梢血の解析については、各施設の倫理委員会の承諾を得、臨床検体はインフォームドコンセントのもとに収集され、個人情報漏洩のないよう管理された。個人情報を伝達しないレトロスペクティブ観察研究やアンケート調査は、連結不能・完全匿名法とした。治験計画においては GCP 準拠とし、被験者への不利益を最小限にとどめ、被験者の得る利益を最大限にするよう配慮した。動物実験に際しては、各施設の倫理委員会により承認された実験計画書に基づいて実験を行った。

D. 考察

欧米では、ヒト免疫学の重要性は以前から指摘され、巨額の研究費による免疫担当細胞の網羅的遺伝子発現のデータベース構築などが行われている。一方、我が国ではこのような動きはなく、マウスを用いた基礎免疫学での国際的なリードと比較し、ヒト免疫学の研究は個々の研究者のレベルでは優れたものがあるものの、全体として満足すべきレベルではない。

本研究組織は、このような現状を改善し今後の突破口を切り開くべく、我が国の臨床免疫学領域の第一線で研究を行い、将来を担うことが期待されている研究者を中心に構成されている。Human Immunology Project Consortium (HIPC) の提案するヒト末梢血細胞解析の標準化法 (Nat Rev Immunol.12:191, 2012) も、実際に自らの研究室で動くことが判明し、マニュアルも作成したことから、本研究を進めることが、我が国の疾患免疫学の礎となり、新たな治療薬創出の為の直接的な研究成果とともに、将来的な免疫治療推進施策の拠点形成にも繋がると期待される。

E. 結論

本研究は、我が国におけるヒト免疫研究と疾患解析の研究体制の一つのモデルとなることが期待される。

F. 健康危機情報

特記事項無し

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、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⁺CXCR5⁺CCR6⁻ CXCR3⁻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た。

B. 研究方法

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⁺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)それに従って研究を進めた。

C. 研究結果

DAS28 と CD45RA⁺CXCR5⁺CCR6⁻CXCR3⁻細胞比率に正

の相関を認め、DAS28 と CD19⁺B 細胞比率に負の相関を認めた。また RF と CD27^{high}CD38^{high} plasmablast 比率、plasmablast 比率と CD45RA⁺CXCR5⁺CCR6⁺CXCR3⁻(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、健康人、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⁺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が、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 分画において遊走に関わるケモカインレセプター CXCR4 発現が亢進していた。CD4⁺CD45RA⁺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⁺CXCR5⁺CCR6⁻CXCR3⁻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

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

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

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

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

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患者 T 細胞における RasGRP1 および関連分子に関する研究

研究分担者 保田晋助 北海道大学大学院医学研究科 免疫・代謝内科学 講師

研究要旨 全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 T 細胞における MAP キナーゼ経路を通じた DNA の低メチル化は病態形成に深く関わっていると考えられる。CD3 鎖のスプライシングを制御している代表的な SR 蛋白である SRSF1 (SF2) の発現量を検討したところ、健常人と比較して SLE 患者 T 細胞では有意に低値であった。SLE 患者 T 細胞において MAP キナーゼ経路の上流に位置する RasGRP1 の発現低下やスプライスバリエーションの増加が認められるが、SF2 の発現量は正常にスプライスされた RasGRP1 の発現量、さらには DNA メチル化酵素である DNMT1 の発現量と相関していた。SF2 は RasGRP1 exon 11 mRNA と直接結合し、RasGRP1 の蛋白レベルを正に調整することが分かった。SLE 患者 T 細胞において、SF2 の低発現が RasGRP1 スプライス異常および蛋白レベルの低下を来とし、病態に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE)患者 T 細胞において CD3 鎖が低発現であり、代表的な SR 蛋白である SF2 が CD3 鎖のスプライシングを制御していることが報告された (Moulton V and Tsokos G, *J Biol Chem* 2010)。また、米国人 SLE 患者由来 T 細胞において SF2 の発現が健常人と比較して低値であり、また疾患活動性が高い患者においてより SF2 の発現量が低いことが報告された (Moulton et al. *PNAS* 2013)。

RasGRP1 は T 細胞内で Ras を活性化する細胞内シグナル蛋白であり、我々は SLE 患者末梢血 T 細胞において RasGRP1 スプライス異常の頻度が健常人と比較して高く、これに関連して蛋白レベルが低下することを報告した (Yasuda S et al, *J Immunol* 2007)。SLE 患者 T 細胞では RasGRP1 の下流である MAP キナーゼ経路の活性低下が DNA メチル化の低下に繋がると考えられている。一方 RasGRP1 は転写因子である Gfi-1 による正の制御を受けるが、Gfi-1 の発現低下は Th17 細胞の分化に重要である。本研究では、SLE 患者 T 細胞において Gfi-1, RasGRP1, MAP キナーゼ, DNMT1 経路がどの段階で異常を来しているかを明らかにし、新たな治療ターゲットを探索することを目的とする。また、健常人・SLE 患者間で SF2 の発現に相違があるかどうか、また SF2 の発現が正常にスプ

ライシングされた RasGRP1 の発現と相関するかどうかについても検討する。

B. 研究方法

SLE 患者 45 名, 関節リウマチ (RA) 患者 11 名および健常人 27 名由来の末梢血より RosetteSep human T cell enrichment cocktail (StemCell Technologies) を用いて T 細胞を単離し、RNA を抽出、RasGRP1 の上流である Gfi-1, また下流と考えられる DNMT1 の発現を検討した。また、RasGRP1 のスプライス異常にかかわる可能性のある SF2 についてもその発現を検討した。RasGRP1 スプライス異常の多くは exon 11 を欠損するため、正常スプライシングによる RasGRP1 の定量には exon 10-11 接合部を認識するプローブを、スプライスバリエーションも含んだトータルの RasGRP1 の定量には exon 2-3 接合部を認識するプローブを用いた。

SF2 と RasGRP1 exon 11 との相互作用を検討する目的で、FLAG タグ付加リコンビナント SF2, FLAG タグ付加リコンビナント疑似リン酸化 SF2 を作製した。RasGRP1 exon11 上の SF2 の結合が予測される部位に相当する RNA を合成し、biotin タグを付加した。ランダム配列 RNA をコントロールとした。SF2-FLAG, RasGRP1 exon 11 RNA-biotin, streptavidin ビーズを混和して免疫沈

降法により両者の結合を検出した。

T細胞におけるSF2の発現がRasGRP1の蛋白レベルを調節しているかどうかを直接確認する目的で、Jurkat T細胞株に2種のSF2特異的siRNAまたはコントロールsiRNAを、Neon Transfection System (Life Technologies)を用いて遺伝子導入した。48時間後にセルライゼートを調整して抗SF2抗体、抗RasGRP1抗体および抗アクチン抗体を用いて免疫プロットを行い、それぞれの蛋白レベルを解析した。

本研究はヘルシンキ宣言および臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日改訂)を遵守して実施した。試料は被験者の個人情報とは無関係の番号を付して管理し、被験者を特定できる情報を含まないよう配慮した。

C. 研究結果

SF2発現の検討; SLE患者末梢血T細胞におけるSF2の発現レベルは、健常人と比較して有意に低下していた($p < 0.001$, t検定)(Fig.1)。

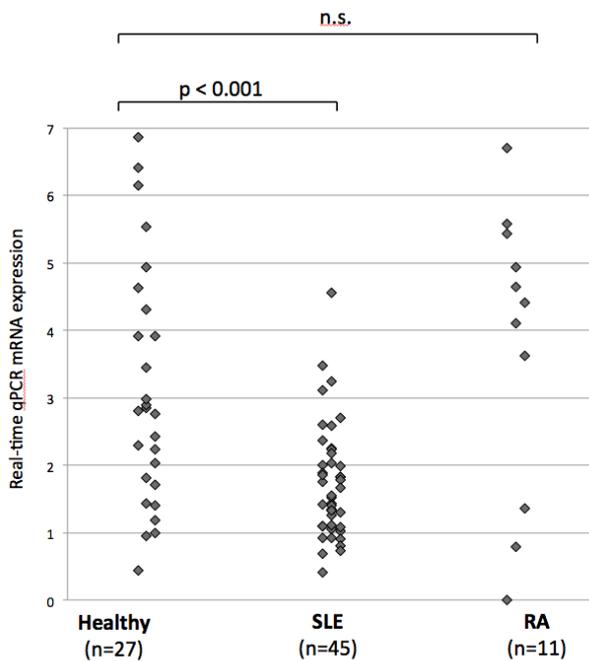


Fig.1; Expression levels of SF2 mRNA in peripheral blood T cells

RA患者では健常人とSF2発現レベルの差は認められなかった。SLE患者におけるSF2の発現レベルはRasGRP1(normal form)、DNMT1の発現と強い正の相関を示した(Fig.2)。

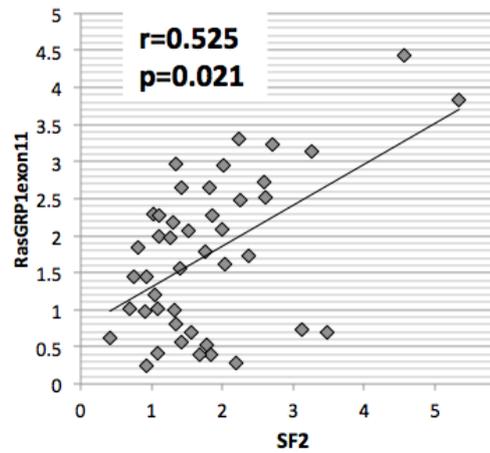


Fig.2 (A) Correlation between expression levels of SF2 and RasGRP1 (normal form) in lupus T cells

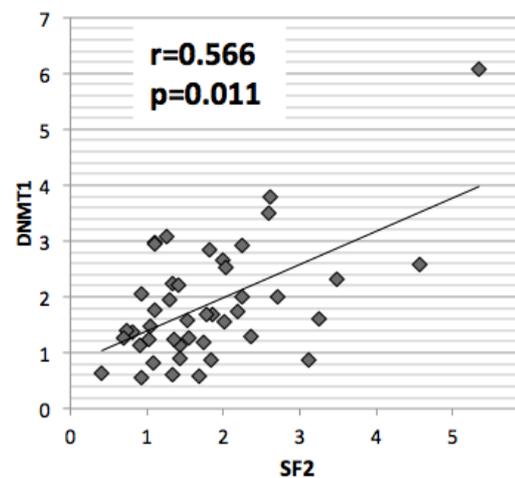


Fig.2 (B) Correlation between expression levels of SF2 and DNMT1 in lupus T cells

SLE患者におけるSF2の発現量は、疾患活動性の高い患者では疾患活動性の無い患者と比較して有意に低値であった(Fig.3)。

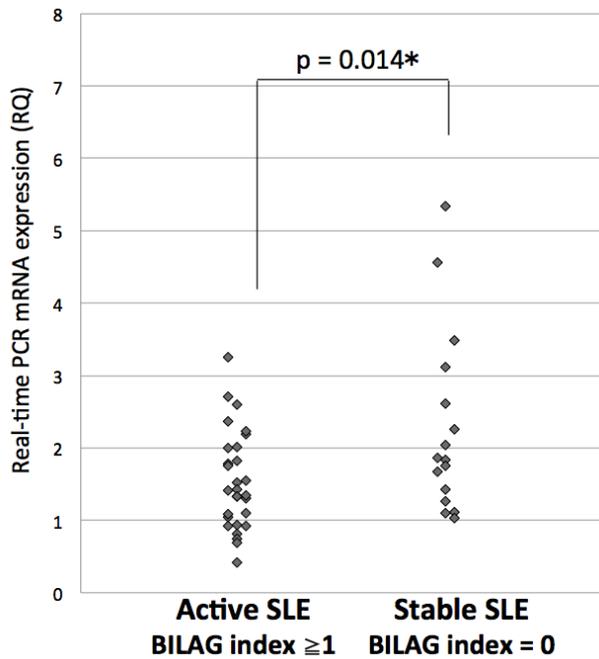


Fig.3; Comparison of SF2 expression in T cells from SLE patients according to their disease activity

リコンビナント SF2 の作製 ;

HEC293 細胞を用いて発現した疑似リン酸化 SF2 を FLAG 精製し、ウェスタンブロット法にて確認した (Fig.4)。

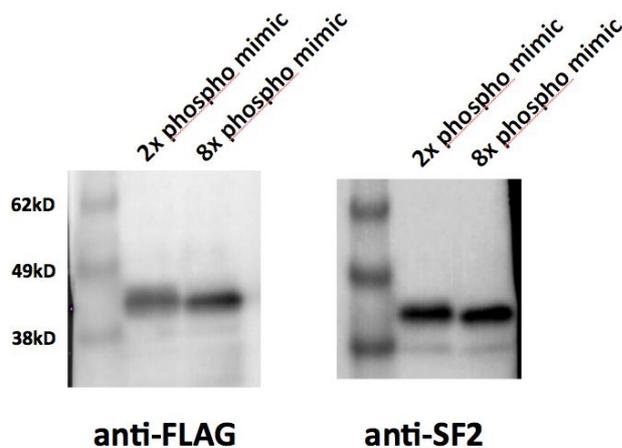


Fig.4; Expression and purification of recombinant phospho-mimic SF2

疑似リン酸化 SF2 と RasGRP1 exon 11 RNA との結合を、免疫沈降法にて確認した (Fig.5)。コントロール RNA に比較して、RasGRP1 exon 11 RNA はより多量の SF2 と結合することが示された。

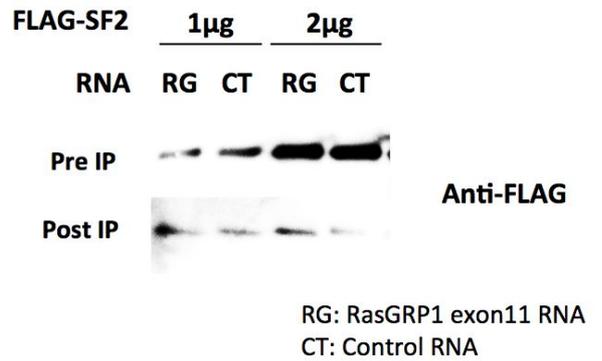


Fig.5; Binding between RasGRP1 exon 11RNA and phosphor-mimic SF2

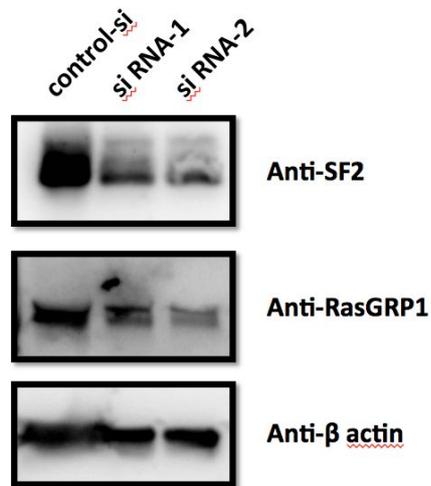


Fig.6; Knockdown of SF2 in Jurkat cells using siRNA

Jurkat T 細胞株を用いた SF2 ノックダウンの影響 ; SF2 特異的 siRNA を Jurkat 細胞に遺伝子導入した結果、コントロール siRNA を導入した場合と比較して SF2 蛋白レベルは低下していた (Fig.6)。SF2 のノックダウンにより、RasGRP1 の蛋白レベルは低下しており、SF2 が RasGRP1 の蛋白発現を調整していることが示された。

Gfi-1 発現の検討 ; SLE 患者における Gfi-1 の発現レベルは、健常人と比較して有意に亢進していた (Fig.7)。

健常人では Gfi-1 発現レベルと RasGRP1 (normal form) の発現レベルに正の相関が認められたが、SLE 患者でその傾向は認められなかった (Fig. 8)。

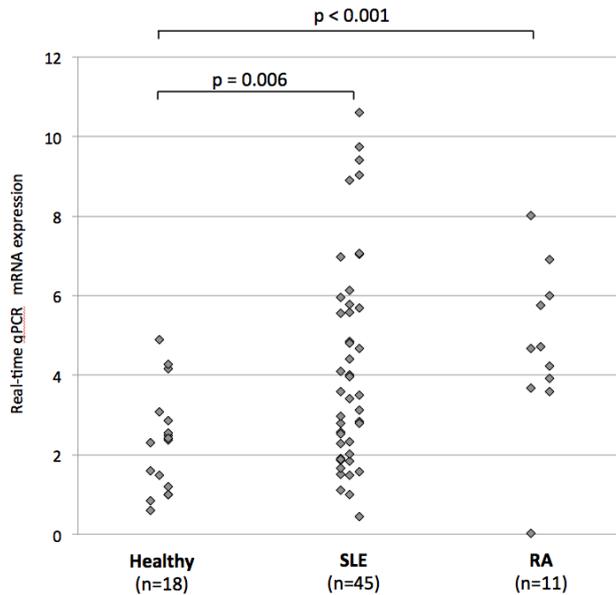


Fig. 7; Expression levels of Gfi-1 mRNA in peripheral blood T cells

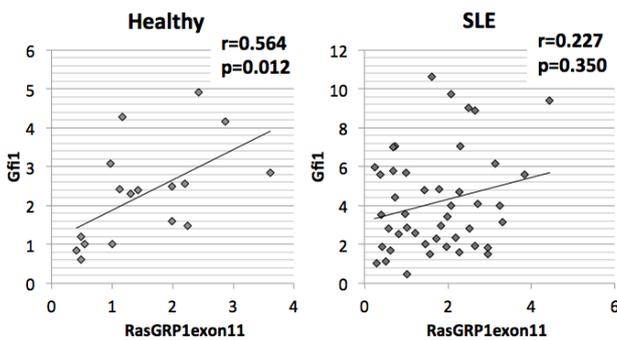


Fig. 8; Correlation between expression levels of Gfi-1 and RasGRP1 in peripheral blood T cells

D. 考察

SLE患者T細胞ではGfi1の発現亢進が認められるにも関わらずその下流であるRasGRP1の発現は亢進しておらず、既報のRasGRP1スプライスバリエーションの増加が、Gfi1、MAPキナーゼ経路を通じたT細胞の機能制御に支障をきたす原因となっている可能性が考えられる。Gfi1がmiR-21を負にコントロールし、miR-21がRasGRP1の発現を負にコントロールするが、SLE患者由来CD4+ T細胞ではmiR-21が高発現すると報告されており、結果としてGfi1-RasGRP1経路によるRasGRP1発現量の調節機構がSLE患者においては破綻していることが示唆された。

健常人においてSF2は、RasGRP1 exon 11に結合することでその正常なスプライシングを促し、

exon 11を含む正常なRasGRP1の発現を亢進、その下流シグナルであるDNMT1の発現を増強することが示唆された (Fig.9A)。SLE患者、なかでも疾患活動性の高い状態でのT細胞では特にSF2の発現量が低く、RasGRP1 exon 11のスプライシングに障害を来した結果としてDNAの低メチル化を来す可能性が示唆された (Fig.9B)。SF2とRasGRP1 exon 11との直接結合が示され、またT細胞株においてSF2をロックダウンすることによってRasGRP1の蛋白レベルが低下したことから、SF2はCD3鎖のみならずRasGRP1の発現を調節することが明らかになった。

活動性の高いSLE患者ではSF2の発現レベルが低下することでSLE患者由来T細胞のフェノタイプであるCD3鎖およびRasGRP1の低発現が誘導されると考えられた。SF2発現の制御ができればRasGRP1およびCD3鎖のスプライシングを正常化が可能となり、その下流シグナルも正常化される事が期待される。

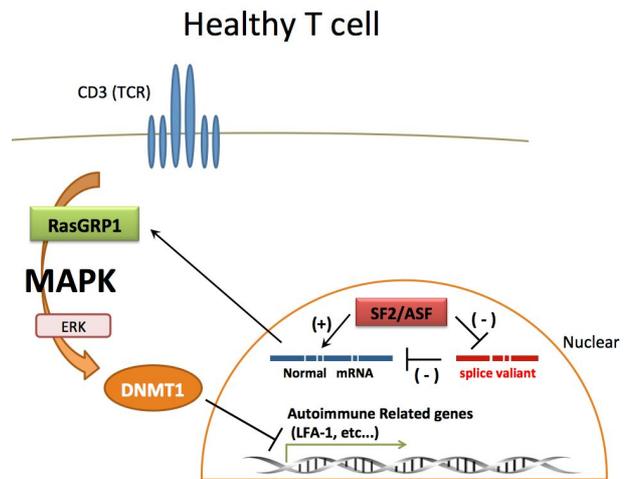


Fig.9 (A); SF2 regulates RasGRP1 splicing in healthy T cells

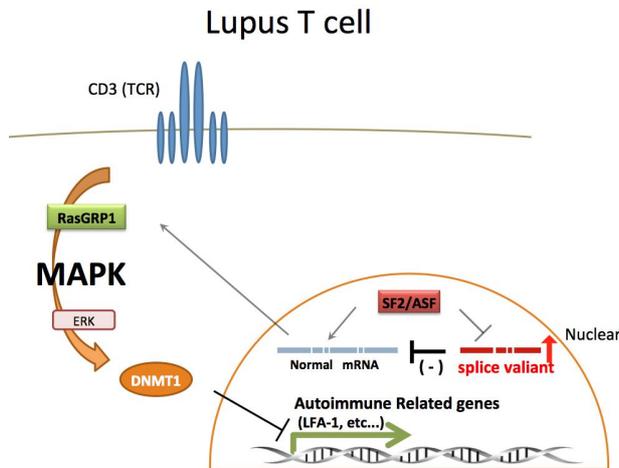


Fig.9 (B); Impaired SF2 expression results in abnormal splicing of RasGRP1 mRNA and lower protein levels

E. 結論

SLE 患者における SF2 の低下が RasGRP1 スプライス異常を通じて SLE の病態形成に関与す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. Tanaka M, Koike R, Sakai R, Saito K, Hirata S, Nagasawa H, Kameda H, Hara M, Kawaguchi Y, Tohma S, Takasaki Y, Dohi M, Nishioka Y, Yasuda S, Miyazaki Y, Kaneko Y, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Miyasaka N, Harigai M. Pulmonary infections following immunosuppressive treatment during hospitalization worsen the short-term vital prognosis for patients with connective tissue disease-associated interstitial pneumonia. *Mod Rheumatol. in press*
2. Oku K, Amengual O, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. An independent validation of the global anti-phospholipid syndrome score in Japanese cohort of patients with autoimmune diseases. *Lupus in press*
3. Yamazaki H, Sakai R, Koike R, Miyazaki Y, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yasuda S, Kurita T, Kaneko Y, Tanaka Y, Nishioka Y, Takasaki Y, Nagasaka K, Nagasawa H, Tohma S, Dohi M, Sugihara T, Sugiyama H, Kawaguchi Y, Inase N, Ochi S, Hagiyaama H, Kohsaka H, Miyasaka N and Harigai M. Assessment of risks for pulmonary infection during 12 months after commencing or intensifying immunosuppressive treatment for active connective tissue diseases: A report from a large-scale prospective cohort study. *J Rheumatol in press*
4. Watanabe K, Yasuda S, Noguchi A, Horita T, Atsumi T. Coronary and mesenteric involvement in polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheumatol. in press*
5. Kono M, Yasuda S, Stevens RL, Koide H, Kurita T, Shimizu Y, Kanetsuka Y, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Shimizu T, Majima T, Koike T, Atsumi T. RasGRP4 is aberrantly expressed in the fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and controls their proliferation. *Arthritis Rheumatol. in press*
6. Kurita T, Yasuda S, Amengual O, Atsumi T. The efficacy of calcineurin inhibitors for the treatment of interstitial lung disease associated with polymyositis/dermatomyositis. *Lupus*. 2015;24:3-9
7. Kurita T, Yasuda S, Oba K, Odani T, Kono M, Otomo K, Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Amenguak O, Horita T, Atsumi T. The effect of tacrolimus in patients with interstitial lung diseases complicated with polymyositis or dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015; 54:39-44
8. Kataoka H, Yasuda S, Fukaya S, Oku K, Horita T, Atsumi T, Koike T. Decreased expression of Runx1 and lowered production of Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells in systemic sclerosis. *Mod Rheumatol*. 2015;25:90-95

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
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
- 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+ T 細胞において高発現が認められた Human cartilage glycoprotein-39 (HC gp39), Formyl peptide receptor 2 (FPR2), に着目し、これらによる T 細胞サブセット tuning 機構と自己免疫病態への関連を検討する。

A. 研究目的

我々は GPI 誘導関節炎(GIA)発症早期の脾臓 CD4+ 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。昨年までの報告で、GIA において、HC gp-39 分子が抗原特異的 T 細胞に高発現していること、FPR2+ T 細胞は FPR2-T 細胞と比較し IFN γ , T-bet を高発現し、Th1 phenotype を呈しており、RA 患者 CD4+ T 細胞でも健常人(HS)と比較し FPRL-1(ヒト FPR2 homolog) 発現が増加していることを報告した。GIA 及び RA 患者サンプルを用いて HC gp-39, FPR2 と CD4+ T 細胞サブセットとの関連をさらに検討した。

B. 研究方法

- 1) 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。
- 2) recombinant HC gp-39 (rHC gp-39) を用いて GIA 脾臓 T 細胞の増殖および IFN γ (Th1) および IL-17 (Th17) 産生を検討した。
- 3) GIA よりリンパ節を採取し、GPI 及びコントロールで刺激し、FPR2 陰性及び陽性細胞における抗原特異的 IFN γ の発現を比較検討した。
- 4) RA 患者(n=20)及び HS(n=18)より CD4+ T 細胞を

単離し、HC gp-39, FPRL-1 の mRNA 発現を比較解析した。

5) RA 患者 FPRL-1 の発現を FACS 解析にて CD4+ 及び CD14+ 細胞で検討し、また CD4 陽性細胞を CXCR3+CCR6- (Th1) 、 CXCR3-CCR6+ (Th17), CXCR3-CCR6- (Th2) 細胞に選り分け、分離し、FPR2 の mRNA 発現を検討した。

(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。

C. 研究結果

- 1) HC gp-39 は CD25+Foxp3+ 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。
- 2) 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 ($p < 0.05$)。
- 3) GPI 刺激により FPR2 陽性細胞が上昇し (12.2%)、26% の FPR2 陽性細胞が IFN γ を発現していた。一方 FPR2 陰性細胞では IFN γ 発現が認められなかった。
- 4) HC gp-39, FPRL-1 mRNA とともに RA 患者 CD4+ T 細胞に有意に高発現していた ($p < 0.05$)。
- 5) 一部の RA 患者で FPRL-1 の CD4+ 細胞での発現を認めた。CD14+ 細胞には RA, HS とも強い発現が認められた。

D. 考察

関節炎マウスにおいて HC gp-39 は CD25+Foxp3+

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⁺T 細胞に高発現を認めた。

2. 実用新案登録
なし
3. その他

E. 結論

関節炎において、HC gp-39 は CD4⁺Treg 細胞に発現し制御的に、FPR2 は CD4⁺Th1 細胞に発現し、両分子ともに RA 患者 CD4⁺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

特記すべきことなし

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⁺CD25⁺Foxp3⁺ 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. 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
 4. 松本功 関節リウマチの分子標的 細胞 46:475-478, 2014
2. 学会発表
 1. 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⁺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

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

発症早期関節炎の末梢血における T 細胞の解析 第 3 報

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 の可塑性(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。早期 RA においては IFN γ 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(plasticity)が最近注目されている。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する。

B. 研究方法

当科受診の早期 RA5 例(罹病期間 6 ヶ月以下)、罹病期間 24 ヶ月の未治療 RA 1 例 (図では*) および変形性関節症(OA)8 例の末梢血におけるヘルパー T 細胞を MACS 法により CD4+CD45RO+に分離したのちフローサイトメトリー法により CCR6, CXCR3, CD161, IL-17, IFN γ の発現を解析した。

(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 3178)。

C. 研究結果

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 1)。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。

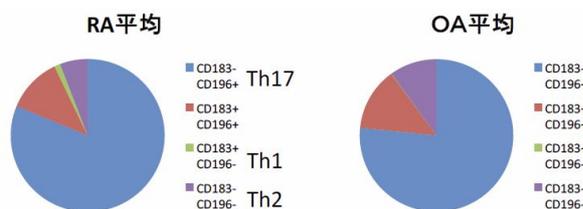


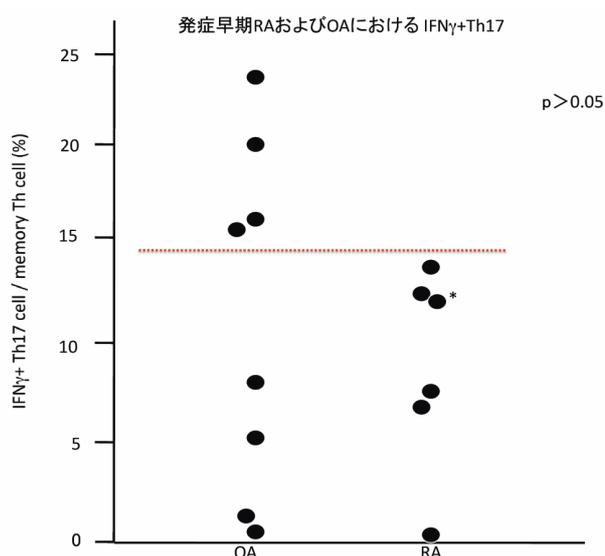
図 1 CCR6, CXCR3 で分割した場合、IL-17 産生細胞の含まれる比率

2)Th17 細胞(CCR6+CXCR3-)の memory Th 細胞に対する比率および IL-17+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。

意差は認められなかった。

3)IFN γ +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 (図 2)。

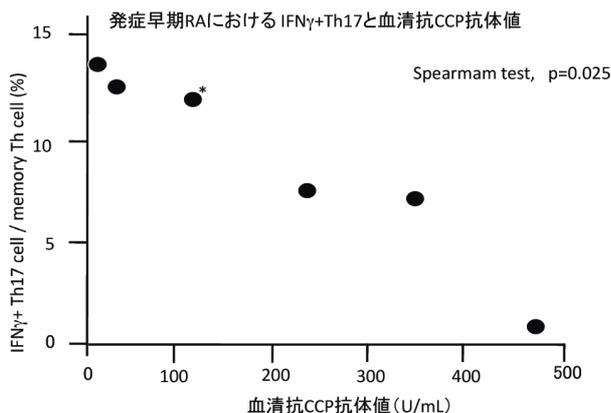
図 2



4) RA において Th17 細胞の memory Th 細胞に対する比率は、罹病期間でプロットすると罹病期間 3M でピークを示す傾向が認められた。IFN γ +Th17 細胞の memory Th 細胞に対する比率は、罹病期間と正の相関を示す傾向が認められた。

5) RA の IFN γ +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)(図 3)

図 3



D. 考察

Th17 細胞に関して当研究班の分類法の妥当性が示された。今回の我々の検討での、未治療早期 RA における、IFN γ +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 γ +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 γ 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

国内

- 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 Interface, 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.

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, 39: 468-470, 2014.

- 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.

2. 学会発表

国内

- 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 年 7 月 25 日(金) 大阪

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⁺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。昨年度までの検討から SLE 末梢血中に Foxp3⁺胸腺由来 Treg（nTreg）が増加し、その比率は疾患活動性と相関すること報告した。そこで、本年度は SLE 末梢血中で増えている nTreg サブセットのフェノタイプ、免疫制御能、病変局所へのリクルートを調べることで、SLE 病態における役割を追究した。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 末梢血中で増加している 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⁺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。

昨年度までの検討から、活動期 SLE 患者末梢血中で CD4⁺Foxp3⁺nTreg が健常人と比較して増加しており、その比率は疾患活動性と相関することを明らかにした。また、CD4⁺Foxp3⁺nTreg の増加は自己免疫疾患の中で SLE に特異的で、増加している CD4⁺Foxp3⁺細胞分画は CD127 や CD49d を発現し、IL-17 産生能を有する健常人でほとんど検出さ

れないサブセットであることを示した。そこで、本年度は SLE 末梢血中の nTreg サブセットのフェノタイプ、免疫制御能、病変局所へのリクルートをさらに詳細に調べることで、SLE 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（1980年）の分類基準を満たす SLE16例、健常人16例を対象とした。SLEはすべて SLEDAI が5以上の活動性を有する例とした。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、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. 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。

5. 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 群間の比較には Mann-Whitney U-test を用いた。

(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. SLE 末梢血中で増加している nTreg フェノタイプの解析

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 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⁺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。

2. 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 SLE2 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。

3. 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

昨年度までの解析結果と合わせて、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⁺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. Kuwana M. Dysregulated negative immune regulators in immune thrombocytopenia. *ISBT Sci. Ser.* 2014; 9: 217-222.
2. 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. 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.
2. 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.
3. 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

強直性脊椎炎患者の末梢血単核球に関する研究

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
林 絵利 順天堂大学医学部膠原病内科

研究要旨 強直性脊椎炎患者末梢血単核球における各免疫細胞の頻度について、健常人と比較検討を行った。細胞表面マーカーを用いた多重染色により解析したところ、Th17細胞や単球の増加を認め、NK細胞は減少していた。サイトカイン産生細胞ではCD8T細胞におけるIL-17産生細胞の増加が認められた。強直性脊椎炎ではIL-23/IL-17経路の病態への関与が考えられているが、Th17細胞の頻度については様々な報告があり一定していない。また、国内では強直性脊椎炎はまれで末梢血単核球のサブセットに関する検討はほとんどされていないため、今後、さらなる検討が必要である。

A. 研究目的

強直性脊椎炎（ankylosing spondylitis: AS）は、体軸関節炎および末梢関節炎を主病態とする原因不明の慢性炎症性疾患である。これまでにAS患者末梢血においていくつかのリンパ球サブセット異常が示されているが、欧米に比べて有病率が極端に低い日本人における報告はほとんどない。今回、日本人AS患者の末梢血の免疫細胞の頻度について検討を行った。

B. 研究方法

健常人10名および改定ニューヨーク分類基準を満たしたAS患者10名の末梢血より単核球（PBMC）を分離し、本研究班の標準化プロトコルに準じて、細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体で多重染色後、フローサイトメトリーにて免疫細胞の頻度を解析して、比較検討を行った。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いていない。また、個人情報の管理に注意を払い、個人の特定が行われないように配慮した。

C. 研究結果

AS患者10名中9名が男性で、年齢30.5（中央値） \pm 8.7歳（19-44歳）、平均罹病期間11.3 \pm 6.5年であり、疾患活動性の指標であるBASDAI（Bath Ankylosing spondylitis disease activity score）は3.54 \pm 2.54、CRP2.51 \pm 4.64mg/dlであった。9名でNSAIDが投与され、3名でサラゾスルファピリジン、2名でTNF阻害薬が投与されていた。HLA-B27は検査された7名全例で陽性、残り3名は未検であった。

AS患者では、健常人に比してTh17細胞の頻度が高い傾向にあった（図1）が、疾患活動性との明らかな相関はみられなかった。Th1、Th2細胞、Treg細胞の頻度にASと健常人で差は認めなかった。自然免疫系では、NK細胞の頻度がASでは有意に低かった。B細胞およびそのサブセットに有意な差はみられなかったが、ASでは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。

CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞中のPMA+ionomycin刺激後のIL-17、IFN γ およびTNF α 産生細胞の頻度について検討したところ、CD8陽性T細胞でのIL-17産生細胞の頻度がASで高い傾向にあった（図2）。

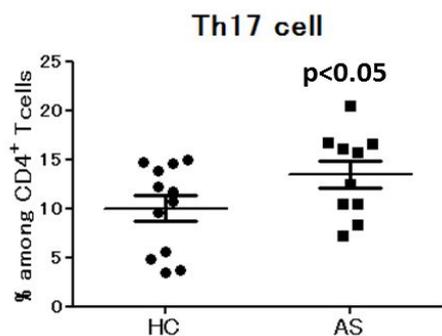


図1. AS患者PBMCにおけるTh17細胞の頻度

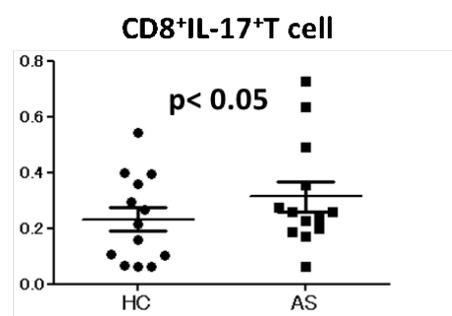


図2. AS患者CD8陽性T細胞におけるIL-17産生細胞の頻度

D. 考察

ASの病態にはTNFのほか、IL-17/IL-23が関与すると考えられており、TNF阻害薬は約60%のASに有効であり、またIL-23やIL-17阻害薬も試験が行われ有効性が報告されている。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、差がないとの報告や逆に低下しているとの報告もある。今回、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。

他のThサブセットやTreg細胞、B細胞サブセットの頻度はASと健常人で有意な差は認めなかった。特異的自己抗体が陽性で関節外症状が多彩な関節リウマチと比べて、ASの炎症はより局所的であり、免疫細胞の変化はより少ない可能性がある。また、ASの発症早期は炎症が強く、症状の増悪と消失の繰り返しが顕著であり、その後は徐々に骨新生による変化が主体となる。従って、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は異なると考えられる。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っていく必

要がある。日本人はASと強く関連するHLA-B27保有率が低く、ASの有病率も欧米に比べ極端に低いため、これまでの解析はほとんどなく、今後のさらなる検討が必要である。

E. 結論

AS患者末梢血単核球ではTh17細胞の頻度が高く、IL-17産生CD8陽性T細胞の増加が認められたが、症例数が少ないため病態との関連を含めて今後のさらなる検討が必要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 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) 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.

2) 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.

3) 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

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

本研究では次世代シーケンサーを用いた手法により、従来の解析を越える 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 4 例および原因遺伝子の同定された PID 患者 6 例について解析を行った。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。遺伝子変異が同定された患者のうち、自己免疫性疾患を合併した LRBA 欠損症患者では TCR、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。他の原因遺伝子の同定された PID 患者では、おおむね既報の通りの異常を認めた。今後は、原因不明の患者を含む HIGM や CVID 患者に対してもこうした解析を進めていきたい。

A . 研究目的

原発性免疫不全症 (PID) のなかでも、AID 異常による Hyper IgM syndrome (HIGM) では自己免疫疾患の合併が多く、体細胞突然変異の障害がその原因の一つとして考えられている。また、Common variable immunodeficiency (CVID) のなかには T 細胞、B 細胞の分化障害から自己免疫を発症する例が存在する。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。

これまで我々は FACS による T 細胞受容体遺伝子再構成解析やキャピラリーシーケンスによる体細胞突然変異解析を実施してきたが、一度に解析可能なリード数に限りがあるなどの問題があった。本研究では次世代シーケンサー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

健常者 (4 例、3 歳 ~ 35 歳) および原因遺伝子の同定された PID 患者 (6 例、0 歳 6 ヶ月 ~ 46 歳) 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、TCR 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) を用いてシーケンスを行った (図 1)。

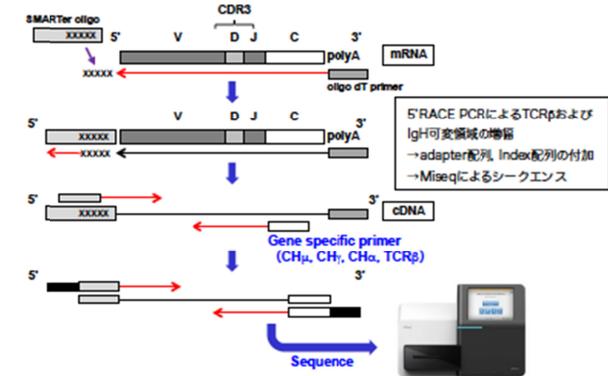


図 1. 次世代シーケンサーを用いた TCR・BCR 解析法

(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

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。中でも、LRBA 欠損症患者は自己免疫疾患（1 型 DM、ITP など）を合併しており、本研究の趣旨に最も適合していると考えた。

LRBA 欠損症患者の B 細胞分画はリンパ球の 0.4% であったが、BCR 配列についても十分解析可能であった。TCR、IgM、IgA で CDR3 領域長に偏りを認め（図 2）、IgM、IgA の D 領域、J 領域の利用率に偏りを認めた（図 3）。また、体細胞突然変異の頻度が低下しており（図 4）、IgM で A>G、C>T 変異が、IgA で A>T、C>A 変異が増加していた（図 5）。

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。

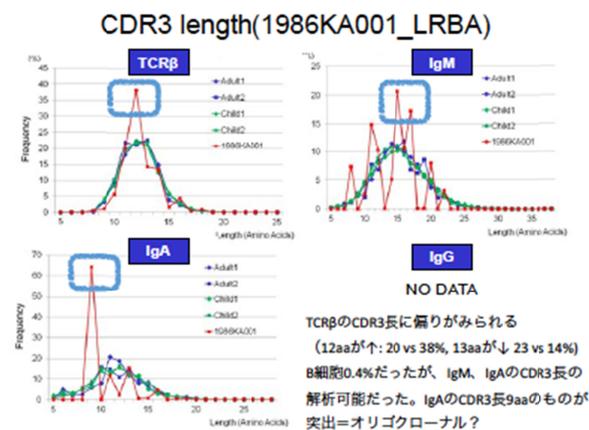


図2. CDR3領域長の解析

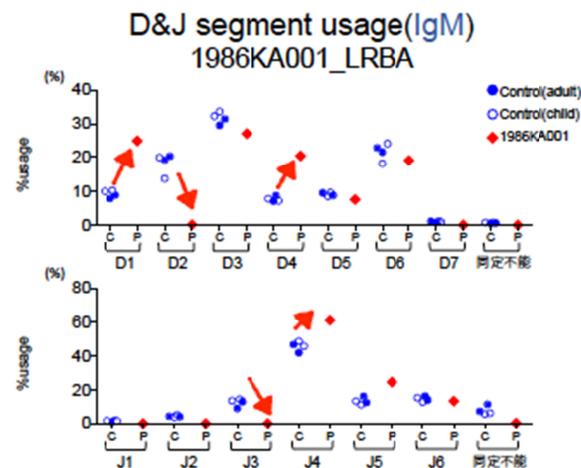


図 3. D 領域、J 領域の利用率

VH-SHM Analysis of FR3 region 1986KA001_LRBA

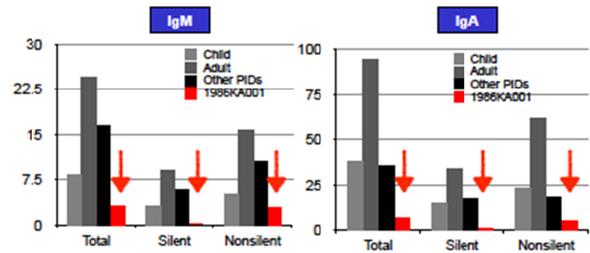


図 4. 体細胞突然変異の頻度

IgM (% of total mutations)						IgA (% of total mutations)					
To	From					To	From				
Pt	A	C	G	T		Pt	A	C	G	T	
A	-	1.0	58.8	1.1	60.9	A	-	0.8	0.7	17.5	19.0
C	1.4	-	0.6	18.2	20.2	C	21.7	-	0.5	3.3	25.5
G	6.0	8.6	-	0.9	15.5	G	34.1	17.4	-	0.3	51.9
T	0.8	2.0	0.5	-	3.3	T	0.1	2.7	0.8	-	3.7

Child	A	C	G	T	
A	-	4.1	13.2	6.4	23.7
C	3.0	-	7.7	21.8	32.5
G	19.9	11.4	-	4.7	36.0
T	1.2	5.2	1.3	-	7.8

Adult	A	C	G	T	
A	-	5.1	13.1	5.9	24.1
C	4.7	-	6.1	20.0	30.9
G	17.4	11.6	-	6.4	35.5
T	1.6	5.9	2.1	-	9.6

図 5. 体細胞突然変異のパターン

D. 考察

原因遺伝子の同定されたPID患者では、おおむね既報の通りの異常を認めた。今後は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

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解析および体細胞突然変異解析の方法を構築した。また、実際にPID患者検体を用いて解析し、その有用性を検証した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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.
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. **16th 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. **16th 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 Ig Responses. **16th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2014)**. Prague, Czech Republic. October 2014.
 4. 岡野 翼、今井耕輔、宮脇零士、奥津美夏、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
 5. 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
 6. 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- 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
- 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。今年度は新たに PM3 例、DM5 例、ADM2 例の解析を行い解析対象は計 17 症例となった。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、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。

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にし、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（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

昨年度に引き続き、新規症例に関する解析を行った。今年度は新たに PM3 例、DM5 例、ADM2 例の解析を行うことができ、解析対象患者は PM4 例、DM10 例、ADM3 例の計 17 症例となった。また、健常者 4 名についても新たに解析を行った。これら症例の詳細について図 1 に示す。

	年齢	性別	診断	筋傷害	肺傷害	皮疹	合併症	
1-6	20-40	健常者コントロール						
7	83	女	PM	+				
8	63	男	PM	+				
9	81	女	PM	+				
10	46	女	PM	+				
11	59	女	DM	+		+		
12	53	女	DM	+		+		
13	58	女	DM	+		+		
14	45	女	DM	+		+		
15	43	女	DM	+	+	+		
16	50	男	DM	+	+	+		
17	60	男	DM	+	+	+		
18	67	女	DM	+	+	+		
19	62	男	ADM		+	+		
20	65	男	ADM		+	+		
21	63	女	ADM		+	+	悪性腫瘍	
22	62	男	DM	+		+	悪性腫瘍	
23	65	男	DM	+		+	悪性腫瘍	

図 1) 解析対象症例

PM/DM/ADM 症例は健常者に比べて CD4 優位の傾向を認め、特に Central memory CD4+細胞が多く、naïve CD8+細胞が少ない傾向であった。また、制御性 T 細胞 (Treg) は健常者に比して多い傾向であった。筋傷害を有する症例 (PM・DM) では有さない症例 (ADM) に比して effector memory CD8+細胞が多い傾向を認めた。間質性肺炎合併例では非合併例と比して濾胞型ヘルパー T 細胞 (Tfh) が少ない傾向を認めた (図 2、3)。

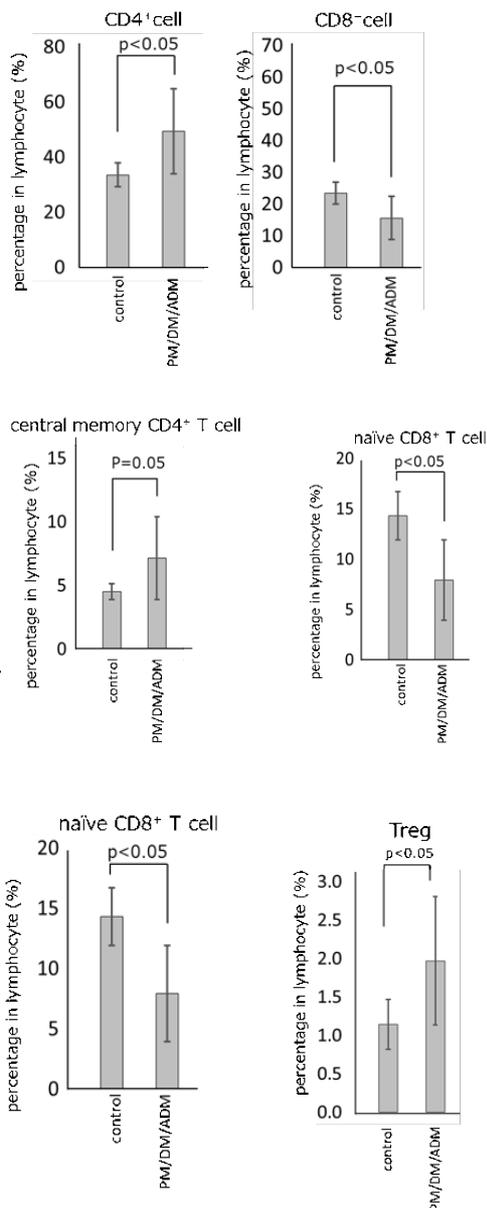


図 2) 健常者と PM/DM/ADM による比較

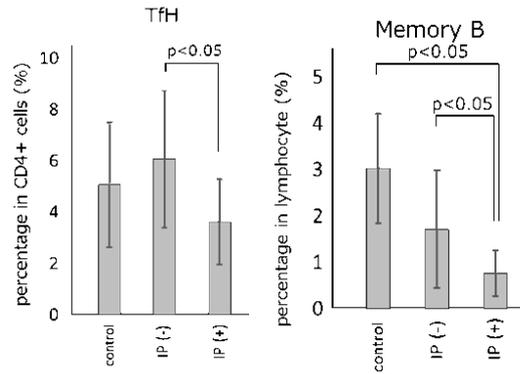


図 3) 間質性肺炎合併の有無による比較

D. 考察

炎症性筋疾患の病態において CD4 陽性 T 細胞が根幹的役割を担っていることが考えられる。また、筋傷害の有無、間質性肺炎の有無によって部分的に異なる傾向を認めたことから、PM・DM・ADM における筋傷害と肺傷害が異なる免疫学的異常を伴っていることが推察される。

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。これまでの本研究で(1)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(2)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(3)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、一方、SLEDAI、DAS28など疾患活動性との明らかな相関を認めない、ことを確認した。今年度は末梢血のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞の機能を検討し、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の抑制を確認できた。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に参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、今年度は末梢血のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞の機能を検討した。

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。

C. 研究結果

これまで扁桃腺の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞については、試験管内の抗体産生抑制能が確認できていたが、今回初めて末梢血の 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。また末梢血の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞を培養すると TGF-β3 の mRNA を発現することが判明した。ヒト TGF-β3 のリコンビナントタンパクはヒト B 細胞の分裂および抗体産生を抑制した。アバタセプトは CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞の試験管内での培養に添加すると LAG3 発現を増強した。

D. 考察

ヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞がマウス LAG3Treg と類似した遺伝子発現機能を持つことが明らかとなった。またヒト B 細胞が TGF-β3 感受性であることから、ヒトにおいても TGF-β3 による B 細胞制御機構が存在する可能性が示唆された。ヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞の機能が、アバタセプトの治療効果と関連している可能性が示唆された。

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-β3-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.

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

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)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。今年度は、SLE患者では末梢血免疫担当細胞において、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。以上から、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)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(DC) - Tfh細胞 - B細胞軸を中心に、DC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。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。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、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。

(2) 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。

(3) 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。

(4) DC サブセットでは、CD11c⁺CD123⁻の新たな DC 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

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。

E. 結論

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。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。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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]

2. Iwata S, Yamaoka K, Niino 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)
3. 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
4. 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
5. 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

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 CD4+CD52+細胞の免疫調節に関する研究

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。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.)。そこで今回、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。さらに CD52 分子は CD4+CD52highT 細胞から切断され、CD4+CD52lowT 細胞表面の siglec-10 を介して、抑制性のシグナルを伝達していると考えられている。我々は SLE 患者における可溶性 CD52 分子が有意に健常人や他のリウマチ性疾患に比べて低下していることを見出し、SLE の病態に寄与している可能性が考えられた。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

全身性エリテマトーデス(SLE)における制御性 T 細胞(Treg)の役割について議論が分かれており、一定の見解が得られていない。CD52 は T 細胞や B 細胞を始めとする様々なリンパ球に発現している。最近、CD4+ CD52high 細胞から切断された可溶性 CD52 が Siglec-10 を介して CD4+ CD52low 細胞の活性化を抑制することが報告され、自己免疫性疾患などの病態に関与することが示唆された (Nat Immunol. 2013 Jul;14(7):741-8.)。この CD4+CD52+細胞は従来の制御性 T 細胞とは異なる機能を有していると思われ、SLE におけるその機能的意義について検討したいと考えた。

B. 研究方法

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」による承認を得て、プロトコルを遵守して行った。

C. 研究結果

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

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。また可溶性 CD52 分子の低下が siglec-10 を発現している他の T 細胞や B 細胞への抑制性シグナル伝達を阻害し、SLE の病態に寄与している可能性がある。

E. 結論

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-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) 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.
- 5) 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.

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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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 2 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.

- 5) 一瀬邦弘, 牛草 健, 有馬和彦, 高谷亜由子, 西野文子, 中島好一, 鈴木貴久, 寶來吉朗, 川尻真也, 岩本直樹, 玉井慎美, 中村英樹, 折口智樹, **川上 純**. 当院における中枢神経ループスの治療反応因子の検討. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014/4/24~4/26.

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

2014年度 (関連論文)						
	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻	頁	年
山本彦	Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Nakachi S, Komai T, Shoda H, Miyazaki J, Fujio K, <u>Yamamoto K</u> .	TGF-β3-expressing CD4+CD25-LAG3+regulatory T cells control humoral immuneresponses.	Nat Commun		in press	2015
	<u>Yamamoto K</u> , Okada Y, Suzuki A and Kochi Y	Genetics of rheumatoid arthritis in Asia—present and future.	Nat. Rev. Rheumatol		in press	2015
	Kochi Y, Suzuki A, <u>Yamamoto K</u> .	Genetic basis of rheumatoid arthritis: acurrent review.	Biochem Biophys Res Commun	452	254-62	2014
	Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, SuDF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga T W, Dieudé P, Mariette X, Bridges SL Jr, Zernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; RACI consortium; GARNET consortium, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, <u>Yamamoto K</u> and Plenge RM.	Genetics of rheumatoid arthritis contributesto biology and drug discovery	Nature	506	376-381	2014
	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻	頁	年
保田晋助	Kono M, <u>Yasuda S</u> , Stevens RL, Koide H, Kurita T, Shimizu Y, Kanetsuka Y, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Shimizu T, Majima T, Koike T, Atsumi T	RasGRP4 is aberrantly expressed in the fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and controls their proliferation.	Arthritis Rheumatol		in press	2015
	Kurita T, <u>Yasuda S</u> , Oba K, Odani T, Kono M, Otomo K, Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Atsumi T	The effect of tacrolimus in patients with interstitial lung diseases complicated with polymyositis or dermatomyositis	Rheumatology	54	39-44	2015
	Kataoka H, <u>Yasuda S</u> , Fukaya S, Oku K, Horita T, Atsumi T, Koike T	Decreased expression of Runx1 and lowered production of Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells in systemic sclerosis.	Mod Rheumatol	25	90-95	2015
	Kono M, <u>Yasuda S</u> , 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	23	1124-1132	2014
	Jin H, Arase N, Hirayasu K, Suenaga T, Saito F, Tanimura K, Matsuoka S, Ebina K, Shi K, Toyama-Sorimachi N, <u>Yasuda S</u> , Horita T, Hiwa R, Takasugi K, Ohmura K, Yoshikawa H, Saito T, Atsumi T, Sasazuki T, Katayama I, Lanier L, Arase H	Autotantibodies to IgG/HLA-DR complex are associated with rheumatoid arthritis susceptibility	PNAS	111	3787-3792	2014

	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻	頁	出版年
小竹茂	Nanke Y, Kobashigawa T, Yago T, Kawamoto M, Yamanaka H, <u>Kotake S</u>	A novel peptide from TCTA protein inhibits proliferation of fibroblast-like synoviocyte (FLS) from rheumatoid arthritis patients.	Centr Eur J Immunol	39	468-470	2014
	Kobashigawa T, Nanke Y, Takazoe M, Iihara K, Yamanaka H, <u>Kotake S</u>	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	13-19	2014
	南家由紀, <u>小竹茂</u>	M-CSF/GM-CSF	最新医学	69	66-72	2014
	<u>小竹茂</u>	関節リウマチ治療における滑膜切除術の適応 Ortho Interface	Salvus	31	in press	2015
	南家由紀, <u>小竹茂</u>	ステロイドの上手な減らし方	臨床と研究	91	11-13	2014
	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻	頁	年
桑名正隆	<u>Kuwana M</u>	Dysregulated negative immune regulators in immune thrombocytopenia.	ISBT Sci. Ser	9	217-222	2014
	Nishimoto T, Numajiri M, Nakazaki H, Okazaki Y, and * <u>Kuwana M</u>	Induction of immune tolerance to platelet antigen by short-term thrombopoietin treatment in a mouse model of immune thrombocytopenia.	Int. J. Hematol	100	341-344	2014
	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻	頁	年
田村直人	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, <u>Tamura N</u> , 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	24	915-9	2014
	<u>Nemoto T</u> , Ogasawara M, Matsuki Y, Murayama G, Yamada Y, Sugisaki N, Ando S, Minowa K, Kon T, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, <u>Tamura N</u> , Takasaki Y.	Can routine clinical measures predict ultrasound-determined synovitis and remission in rheumatoid arthritis patients?	Clin Exp Rheumatol	32	51-60	2014
	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, <u>Tamura N</u> , Makino S, Takasaki Y.	Predictive value of bone destruction and duration of clinical remission for subclinical synovitis in rheumatoid arthritis patients.	Mod Rheumatol	15	11-16	2014
	<u>田村直人</u> , 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。	日脊椎関節炎会誌	4	19-24	2014

	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻	頁	出版年
森尾友宏	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(4)	545-8	2014
	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(9)	1155-61	2014
	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻	頁	年
藤尾圭志	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		in press	2015
	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.		in press	2015
	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻	頁	出版年
田中良哉	Iwata S, Nakayama 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	
	Iwata S, Yamaoka 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	73	1395-1397	2014
	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	73	2192-2198	2014
	Wang S-P, Iwata S, Nakayama S, Sakata K, Yamaoka K, Tanaka Y.	Tofacitinib, a Jak inhibitor, inhibits human B cell activation in vitro.	Ann Rheum Dis	73	2213-2215	2014
	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻	頁	年
川上純	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		in press	2015
	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.	25	Sep-85	2015
	Migita K, Izumi Y, Juichi 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	175	208-14	2014
	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	103	1564-69	2014
	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— 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	72	Aug-53	2014

2014年度（関連書籍）					
著者氏名	タイトル	書籍名	編集者名	出版社名・地	頁
松本功	関節リウマチの滑膜炎ではどういった病態が起きていますか？	関節リウマチクリニカルクエスト10	住田孝之	診断と治療社	
田村直人、多田久里守	付着部炎と骨新生	リウマチ病セミナーXX	七川敬次、編集 前田晃、吉川秀樹、塩沢俊一、佐伯行彦、熊ノ郷淳、福田真輔、志水正敏、村田紀和、西林保郎	永井書店	1-7