

博士論文

論文題目 全身性エリテマトーデス患者の末梢血単核球
の解析と CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ T 細胞の検討

氏 名 加藤 里佳

目次

目次	1
要旨	2
序文	3
方法	10
臨床データの収集	10
末梢血からの免疫担当細胞分離とフローメーター解析	11
FACS による細胞サブセット分類	14
RNA 抽出、cDNA 合成および qPCR	14
培地と刺激条件	15
細胞内染色	15
磁気細胞分離 (MACS)	16
共培養による機能解析	17
統計	18
結果	19
臨床情報	19
末梢血免疫細胞サブセット分類の結果	19
SLEDAI およびその他の臨床学的指標と各サブセット間の 順位相関係数	20
SLE 高疾患喝道性群・低疾患活動性群での細胞サブセットの比較	21
SLE 治療前後での細胞サブセットの比較	21
CD25 陽性 LAG3 陽性 T 細胞は RORc と Foxp3 の mRNA 発現が 高い	22
CD25 陽性 LAG3 陽性 T 細胞は IL-17A と Foxp3 の蛋白レベルで 発現が高い	23
CD25 陽性 LAG3 陽性 T 細胞は制御性活性を示さない	24
考察	25
謝辞	29
引用文献	30
図表	46

全身性エリテマトーデス患者の末梢血単核球の解析と CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ T 細胞の検討

所属： 大学院医学系研究科内科学専攻（博士課程）

生体防御腫瘍内科学講座（アレルギー・リウマチ学）

指導教員名： 山本 一彦

申請者名： 加藤 里佳

要旨

全身性エリテマトーデス（SLE）は、免疫寛容の破綻により臓器障害を呈する自己免疫疾患であるが、疾患活動性と関連する免疫担当細胞は明らかになっていない。私は SLE 患者の末梢血中の免疫担当細胞分画を解析し、臨床指標との関連、治療前後の変化を検討した。その結果、SLE の疾患活動性と関連があり、加療により減少する細胞集団、CD4⁺CD25⁺LAG3⁺T 細胞を認めた。本細胞群は Foxp3 を発現する一方、細胞増殖抑制能は示さず、Th17 細胞の性質も併せてもっていた。本細胞群は炎症性疾患で病原性があるとされる Foxp3⁺Th17 と関連する可能性があり、SLE の免疫学的病態の理解につながる一助になると考える。

1. 序文

1.1 全身性エリテマトーデス (SLE)

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus、以下 SLE) は免疫寛容の破綻により T 細胞・B 細胞をはじめとする免疫担当細胞が活性化し、自己抗体を産生することで全身の臓器に臓器障害を呈する自己免疫疾患である^[1, 2]。免疫学的恒常性を保つためにはヘルパーT 細胞と制御性 T 細胞のバランスが重要であり、SLE 発症においてそのバランスに不均衡が生じていると指摘されている^[3]。ヘルパーT 細胞は主に Th1、Th2 と Th17 に分類され、それぞれインターフェロンガンマ (IFN γ)、インターロイキン 4 (IL-4)、インターロイキン 17A (IL-17A) を産生する。また、自己抗体を産生する B 細胞も SLE の病態には深くかかわっていると考えられる。ただ、以下に述べるように、SLE の病態に重要な免疫担当細胞分画が何であるかについては、様々な報告が出されてはいるが明確な結論にはいまだ至っていない。

1.2 Th1/2 と SLE

SLEでは、血漿中のIL-4, IL-6やIL-10などTh2由来のサイトカインが増加しており、またIL-2やIFN γ などTh1由来のサイトカインが減少していることから、Th1/2バランスではTh2に偏位しているという報告がある^[4, 5]。一方で、ループ

ス腎炎や増殖性糸球体腎炎を伴うSLE患者ではIFN γ /IL-4比率が高いことよりTh1への著しい偏位がSLEと関係しているという報告もある^[6, 7, 8]。Th1/Th2バランスが崩れることでSLEが誘発される、というコンセンサスは一致しているが、どちらに偏るかという点ではいまだ議論が多い^[9]。

1.3 Th17とSLE

Th17はIL-17Aを分泌することから命名されたが、IL-21、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）やIL-22を含む様々なサイトカインを分泌し^[10]、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 γ t（ROR γ t。ヒトではRORc）を特異的に発現する^[11]。Th17は通常、恒常性の保たれた環境（特に小腸の基底膜）によく見られるが、感染や炎症が起きている状況下では他の組織内でも誘導される^[12, 13, 14]。Th17が産生するIL-17Aは、上皮細胞や線維芽細胞などのケモカインやサイトカイン産生を促進し、好中球、マクロファージやリンパ球の分化や成熟を促すことが知られており、SLEの病態に大きく関わっているという報告もある^[15]。

1.4 制御性T細胞（Treg）について

制御性T細胞とは、自己抗原に対する免疫反応を抑制する細胞群の総称で、

自己免疫疾患で重要な役割を担う。最も主要なTregサブセットは坂口らによって報告されたCD4⁺CD25⁺T細胞であり^[16]、転写因子であるFoxp3により規定されていることも知られている。Tregとしては他にも多くの分画が報告されており、IL-10を高産生するTr1^[17, 18]、TGF-β1を高産生するTr3^[19]、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3) を発現し、IL-10を高産生するLAG3⁺Tregなどがある^[20, 21]。

1.5 CD25⁺Treg と SLE

末梢において自己反応性T細胞を制御し、免疫寛容を維持するために、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞 (CD25⁺Treg) は重要な役割を担っている。CD25⁺Tregは、転写因子Foxp3を特異的に発現しており、CD25⁺Tregの分化・機能発現・分化状態の維持において必須の役割を担う^[16, 22, 23]。また、CD127 (IL-7R) の発現は、Foxp3の発現と逆の相関関係にあることが示された^[24, 25]。そのため、細胞表面マーカーとしてはCD127、CD3とCD4の組み合わせによりFoxp3⁺T細胞が分離可能と考えられている。ヒトにおいては、CD25⁺Tregは末梢血CD4⁺T細胞の5-10%を占めており^[26, 27]、CD127 low/-で同定でき、マウスと同じくFoxp3を特異的に発現している^[24]。

CD25⁺TregとSLEの関連に関する報告も数多い。SLE患者の末梢血におけるCD4⁺Foxp3⁺T細胞の割合について、健常人に比べて増加しているとする文献^[28, 29]と、不変もしくは減少しているとする文献^[30, 31, 32]と分かれているが、これ

はCD25⁺Tregの定義が著者らにより違うためと思われる。また、SLEの病勢指標として広く用いられているSLE disease activity index (SLEDAI) とCD25⁺Tregの相関関係があるという報告^[28, 29]や、抗ds-DNA抗体 (IgG) との相関関係を示すもの^[30, 32]、さらには病勢との関連がないとするものまで意見は様々である^[33]。

1.6 CD25⁺Treg と Th17 の可塑性について

CD25⁺Treg と Th17 は互いに相反する働きを持っているが、これらの間に可塑性があることも明らかになっている^[34]。マウスの実験において、IL-6・IL-1βなどのサイトカイン刺激により Foxp3⁺CD25⁺Treg から Th17 が誘導されることが報告されている^[35]。同様の現象はヒトでも報告されており、ヒト Foxp3⁺CD25⁺Treg から Th17 様細胞への *in vitro* での転化は IL-1β の存在とエピジェネティックな修飾に依存しているとされる^[36, 37, 38]。近年、ヒトの卵巣腫瘍に浸潤している CD25⁺Treg が、生体内で Th17 様細胞に転化していることが報告された^[39]。興味深いことに IL-17 を分泌する CD25⁺Treg は *in vitro* ではいくらかの抑制機能を保持しているが、IL-1β と IL-6 による強い活性化によりその抑制能は減弱する^[38]。

1.7 リンパ球活性化遺伝子 3 (LAG3)

リンパ球活性化遺伝子 3 (Lymphocyte activation gene 3; LAG3)は CD4 と類似し

た構造をもつ分子であり、MHC class II と強い結合能力をもつ^[40]。LAG3 欠損マウスでは膵島炎を引き起こすことにより 1 型糖尿病を発症しやすいことも報告されている^[41]。また、LAG3 と PD-1 を同時に欠損すると致死的な心筋炎が誘発される^[42]。このように、LAG3 が自己免疫疾患を制御するうえで重要であることが推測されている。LAG3 欠損マウスの CD4⁺CD25⁺Treg は抑制能活性が減少する一方で、エフェクター細胞の存在により活性化された CD4⁺CD25⁺Treg は、同活性化刺激のないものよりも LAG3 を高く発現することも知られている^[40]。

1.8 LAG3⁺Treg と SLE

CD4⁺CD25⁻LAG3⁺で定義される LAG3⁺Treg は IL-10 依存性に免疫活性化を抑制する働きをもっており、マウスの実験において、IL-10 が欠如したマウスでは腸炎が抑制されないことが分かっている^[21]。また、ループスモデルマウスに LAG3⁺Treg を移入すると、CD25⁺Treg よりも蛋白尿の増悪を抑制し、ds-DNA 抗体の上昇や腎糸球体の病理スコアの上昇を抑える^[43]。CD4⁺CD25⁻CD45RA⁻LAG3⁺T 細胞(LAG3⁺Treg)は健常人でも観察されており、マウスの LAG3⁺Treg と同様に初期増殖応答タンパク質 2 (EGR2) を発現し、IL-10 と IFN γ を出し、さらに TCR 刺激により明らかに多くの IL-10 を産生する^[43]。ただ、今回 SLE で認められた CD25⁺LAG3⁺T 細胞は、健常人ではほとんど認め

ない細胞分画とされている^[43]。

1.9 その他の細胞（CD4⁺ ナイーブ T 細胞、B 細胞、単球、NK 細胞）と SLE

CD4⁺CD45RA⁺ナイーブ T 細胞は SLE 患者では減少しており、特にループス腎炎や CNS ループスを伴うような病勢の高い SLE では特にナイーブ T 細胞が減少していることが知られている^[44]。

SLE ではポリクローナルな B 細胞の異常がおこり、びまん性に B 細胞活動過多な状態となり、抗体産生が過剰になる。SLE 患者の末梢血ではリンパ球中の B 細胞が減少し、B 細胞サブセットの割合が変化する。SLE ではナイーブ B 細胞は減少する一方で、メモリー B 細胞、形質芽細胞や形質細胞は増加することが報告されている^[45, 46, 47]。また、臨床的に落ち着いている SLE 患者では自己反応性の成熟したナイーブ B 細胞が増えるが、病勢の高い患者ではその数が減少するという報告もある^[48]。

SLE における単球に関しても様々な報告がある。単球は一般的に CD14⁺CD16⁻ (classical monocyte)、CD14⁺CD16⁺ (intermediate monocyte)、CD14^{low}CD16⁺ (non-classical monocyte) の 3 つのサブセットに分けられる。Intermediate monocyte は関節リウマチ患者の末梢血では増えており、かつ血沈や CRP と相関関係にあることが報告されている^[49]。SLE 患者と健常人の末梢血中

の単球数を比較したところ単球各サブセット間では大きな偏りを認めず、病勢との相関関係も確認されなかったが、単球の総数は SLE で減少していた^[50, 51]。一方で intermediate monocyte の割合は患者と健常人で差がなかったという報告もある^[52]。

NK 細胞は健常人と比べて SLE 患者で減少している^[53]が病勢との関わりに関する報告はない。

上記のように、これまで SLE 患者の末梢血中の T 細胞、B 細胞、単球、NK 細胞それぞれのサブセットの割合やそれらと病勢との関連、さらには病態への関わり方など多くの実験がなされてきたが、いまだ核心的な結果が得られていない。今回、私は健常人、SLE 患者、RA 患者の末梢血中のサブセットの割合を比較し、SLE 患者に特有なサブセット割合の変化を観察、さらにそのサブセットが SLE の病態にどのように関わっているのかを検討した。

2. 方法

2.1 臨床データの収集

2013年6月から2014年12月までに東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科に通院中であったSLE患者27名を対象に臨床情報の収集と末梢血解析を行った。対象はACR 1982年SLE分類基準またはSLICC 2012年SLE分類基準を満たす20歳以上のSLE患者とし、感染症もしくは悪性腫瘍の合併を認める症例は除外した。臨床情報として年齢、性別、病勢指標として幅広く用いられているSLEDAI score (Table 1) を収集した^[54]。検査所見として解析日当日の白血球数、リンパ球数、血小板数、CRP、1週間以内の補体、1ヶ月以内の抗ds-DNA抗体力価、抗核抗体力価を用いた。抗ds-DNA抗体は蛍光酵素免疫測定法、抗核抗体は間接蛍光抗体法によって測定した。健常対照群として30名の健常人 (healthy donor、以下HD) の免疫細胞サブセット分類を行った。また疾患対象群として30名のRA患者の免疫細胞サブセット分類を行った。RA患者は1987年ACR関節リウマチ診断基準もしくは2010年ACR/EULAR関節リウマチ分類基準を満たす20歳以上のものとした。本研究はすべてのドナーから文書を用いてインフォームドコンセントを取得しており、倫理審査委員会で承認を受けたものである (倫理審査承認番号10154)。

2.2 末梢血からの免疫担当細胞分離とフローサイトメーター解析 (FACS)

対象患者および健常人のヘパリン化した新鮮末梢血から Ficoll-Paque Plus (GE healthcare) による密度勾配遠心分離により細胞分離を行った。Ammonium chloride potassium (ACK) により溶血を行い、Fc-gamma レセプター (FcR) を介した抗体の非特異的結合を阻害するために FcR ブロッキング試薬を加えた後、一定の細胞濃度 (1×10^6 cell /100 μ l) 及び一定の抗体量(Table 2)で染色を行った。以下に詳細な方法を述べる。

- ① LeucoSepTM Centrifuge Tube 2 本にそれぞれ Ficoll-Paque Plus を 17 ml ずつ入れ、1500 rpm で 1 分間遠心した。
- ② ヘパリン化した新鮮末梢血 20 ml と Phosphate Buffered Saline (PBS) 20 ml を 50 ml Falcon[®]チューブ (池田理化) に入れピペッティングした。
- ③ ①で遠心した 2 本の LeucoSepTM Centrifuge Tube に②を 20 ml ずつ入れ、20°C、1000 rpm で 30 分間遠心 (加速/減速ともに soft) した。
- ④ ③で遠心後の 2 本の LeucoSepTM Centrifuge Tube の上清をパスツールピペットで吸引、廃棄し、7 ml 程度の buffy coat を 2 本の 50 ml Falcon[®]チューブにそれぞれ入れ、各々に PBS 30ml を追加後、4°C、1300 rpm で 8 分間遠心した。
- ⑤ ④の 2 本の 50 ml Falcon[®]チューブの上清をパスツールピペットで吸引、廃棄し、2 本のうちの 1 本に ACK 1.5 ml を追加して数秒間ピペッティ

ングする。ピペッティング後、全量をもう一方の 50 ml Falcon[®] チューブにうつし、30 秒ほど勢いよくピペッティングして溶血処理し、再度全量を吸引して 15ml Corning[®] 遠沈管（池田理化）1 本に入れ、PBS 10 ml をさらに追加、細胞数を数えた上で 4°C、1300 rpm で 8 分間遠心した。

⑥ ⑤で遠心した 15ml Corning[®] 遠沈管の上清をパスツールピペットで吸引、廃棄し、細胞濃度が 1×10^5 cells / μ l になるように PBS を適宜追加した。

⑦ ⑥の細胞を以下のように 1.5 ml エッペンドルフチューブに分け、各エッペンが全量 100 μ l となるように適宜 PBS を追加した。

- 1×10^6 cells (10 μ l) → エフェクター T 細胞解析用
- 1×10^6 cells (10 μ l) → B 細胞解析用
- 1×10^6 cells (10 μ l) → 単球/NK 細胞解析用
- 1×10^6 cells (10 μ l) → 制御性 T 細胞解析用
- 4×10^6 cells (40 μ l) → 9 本の compensation 解析用

⑧ FcR ブロッキング試薬をエフェクター T 細胞/ B 細胞/単球・NK 細胞/制御性 T 細胞解析用エッペンにそれぞれ 10 μ l ずつ、9 本の compensation 解析用に 5 μ l ずつ入れ、氷上で 30 分経過した後、Table 2 のように抗体を入れ、氷上に 20 分間置いて染色を行った。

⑨ 20分経過後、PBS 1000 μ l 加えて 1300 rpm、4°Cで5分間遠心して wash し、1mM EDTA 入り PBS 500 μ l に再懸濁して 5 ml Round-bottom tube with cell strainer cap (Falcon) にメッシュを通して入れ、解析した。

抗体は Human Fc Receptor Binding Inhibitor Purified (eBioscience)、CD3-PerCPCy5.5 (clone: UCHT1、BioLegend)、CD3-PE/Cy7 (clone:UCHT1、BioLegend)、CD27-FITC (clone:O323、BioLegend)、CD24-PE (clone:ML5、BD)、CD38-PE/Cy7 (clone:HIT2、BioLegend)、CD19-APC/Cy7 (clone:HIB19、BioLegend)、IgD-BV421 (clone:IA6-2、BD)、CXCR5-AF488 (clone:RF8B2、BD)、CCR6-PE (clone:11A9、BD)、CD25-PECy7 (clone:BC96、eBioscience)、CD45RA-APC/Cy7 (clone:HI100、BioLegend)、CXCR3-BV421 (clone:1C6/CXCR3、BD)、CD4-V500 (clone:RPA-T4、BD)、CD14-FITC (clone:M5E2、BioLegend)、HLADR-PE (clone:L243、eBioscience)、CD16-PerCPCy5.5 (clone:3G8、BioLegend)、CD56-APC/Cy7 (clone:HCD56、BioLegend)、CD19-V500 (clone:HIB19、BD)、LAG3-PE (clone: 874501、R&D)、CCR7- PerCPCy5.5 (clone:G043H7、BioLegend)、CD127-PE/Cy7 (clone:eBioRDR5、eBioscience)、CD25-BV421 (clone:BC96、BioLegend)、CD4-FITC (clone:RPA-T4、BioLegend)、CD4-PE (clone:OKT4、BioLegend)、CD4-PerCPCy5.5 (clone:OKT4、BioLegend)、CD4-PE/Cy7 (clone:RPA-T4、BioLegend)、CD4-APC (clone:RPA-T4、BioLegend)、CD4-APC/Cy7 (clone:RPA-T4、BioLegend)、CD4-BV421 (clone:OKT4、BioLegend)

を使用した。解析は 8 カラーを用いたフローサイトメーター MoFlo XDP (Beckman Coulter)により行った。

2.3 FACS による細胞サブセット分類

FACS を用いた末梢血中の免疫担当細胞の細胞サブセット分類は、米国 NIH における Human immunology Project^[55]に準じて行い、CD4 陽性 T 細胞、B 細胞、単球、NK 細胞の比率を測定した。分画の定義を Table 3 にまとめる。

Gating strategy を Figure 1 に示す。SLE と関連が深いと想定した LAG3 関連 T 細胞サブセットを分類し、さらに LAG3 陰性集団を CD4 陽性 T 細胞、B 細胞、単球、NK 細胞を分類することで全参加被験者の分画を解析した。FACS データの解析は Flowjo (Tomy Digital Biology) により行った。

2.4 RNA 抽出、cDNA 合成および qPCR

健常人と SLE 患者からソートした単核球から RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて全 RNA を抽出し、さらに random primers (Invitrogen) と SuperScript III によって cDNA に逆転写した。合成された cDNA を用いて各細胞内の遺伝子発現レベルを確認するために定量的 PCR を iCycler (Bio-Rad) にて行った。反応液の組成は、10 ml SYBR Green Master Mix (Qiagen)、15p mol forward/reverse primers および cDNA サンプルで、総量が 20 ml になるように調整した。相対的

mRNA 量はヒトのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を元に決定した (Table 4)。

2.5 培地と刺激条件

健常人から採取した単核球を 5 mg/ml CD3、10 mg/ml CD28、100 IU/ml IL-2 の条件下で 72 時間刺激培養し、7-AAD 染色をしたうえで 7-AAD 陰性細胞を採取することで死細胞除去を行った。培地には 10% FCS、100 mg/ml L-グルタミン酸、100 U/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシンおよび 50 mM 2-メルカプトエタノールを加えた RPMI 1640 を用いた。

2.6 細胞内染色解析

健常人の末梢血から採取した単核球を 5 mg/ml CD3、10 mg/ml CD28、100 IU/ml IL-2 の条件下で 72 時間培養した。解析の 12 時間前に 25 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、1 mg/ml ionomycin による刺激を行い、さらにモノネンシンを含む蛋白輸送阻害薬である GolgiStop で細胞内の蛋白輸送過程を阻害した。細胞表面を 7-AAD で染色した後、Cytotfix/Cytoperm (BD) で固定し IFN- γ -FITC、IL-4-APC、IL-17A-APC、IL-10-eFluor660 で染色、プロトコールに準じて 10 \times Perm/Wash (BD) を蒸留水で 10 倍希釈した Perm/Wash で wash をしてフローサイトメーターで解析を行った。

Foxp3 の細胞内染色は、分取した末梢血中単核球の細胞表面を 7-AAD で染色、プロトコールに準じて準備をした Fix/Perm (Fixation/permeabilization concentrate と Fixation/permeabilization diluents を 1:3 の割合で混合した) 溶液で固定、Foxp3-FITC による染色を行い、10×Permeabilization Buffer (eBioscience) を蒸留水で 10 倍希釈して準備した 1×Permeabilization Buffer で wash をした後フローサイトメーターで解析を行った。

2.7 磁気細胞分離 (MACS)

ナイーブ CD4⁺T 細胞アイソレーション Kit II (Miltenyi Biotec) を用いて健康人の CD4⁺ナイーブ T 細胞を採取した。まず、pH 7.2, 0.5% 牛胎児血清 (FCS) と 2mM エチレンジアミンエチレンジアミン四酢酸酢酸 (EDTA) および PBS を用いて 2% FPBS を準備した。健康人末梢血からの単核細胞分離は 2.2 の①～⑤と同様に行った。その後は以下の手順による。

- (1). 細胞数を確認して 4°C、1300 rpm で 10 分間遠心した後、上清を完全に除去し、 1×10^7 cells /40 μ l になるように 2% FPBS で調整した。
- (2). 1×10^7 cells あたりナイーブ CD4⁺T 細胞 Biotin-Antibody Cocktail II を 10 μ l 加え、よく混合してから冷蔵庫内 (2-8°C) で 5 分間反応させた。
- (3). 1×10^7 cells あたり 30 μ l の 2% FPBS を加え、さらに 1×10^7 cells あたりナイーブ CD4⁺T 細胞 MicroBead Cocktail II を 20 μ l 加え加えてよく混合し、

冷蔵庫内 (2-8°C) で 10 分間反応させた。

- (4). 10 分経過したら、総量が 500 μ l になるように 2% FPBS で調整した。
- (5). LS カラム (Miltenyi Biotec) を MACS separator に装着して 2% FPBS 3ml で洗浄、廃液を廃液入れに受けた。
- (6). 次に(4)で準備したサンプルを LS カラムに通し、15ml Corning[®] 遠沈管に受け、さらに 2% FPBS 3ml で追加洗浄してカラムを通過してきた液体サンプルを全て回収した。
- (7). 最後に細胞数を数えて終了した。

2.8 共培養による機能解析

健常人の末梢血からフローサイトメーターにより抗原提示細胞 (APC; 抗原提示能のみを残した細胞。ここでは CD3 陰性と定義した)、CD25⁺Treg、CD25⁺LAG3⁺T 細胞を採取した。また CD4⁺ナイーブ T 細胞を磁気細胞分離 (MACS) により採取した。ナイーブ T 細胞は一部にカルボキシフルオセイン二酢酸サクシニミジルエステル (CFSE) で染色を行った。10 mg/ml CD3, 5 mg/ml CD28 でプレコートされた 96well プレートの各 well に APC 10 万 cells、ナイーブ T 細胞 5 万 cells と CD25⁺Treg もしくは CD25 陽性 LAG3 陽性 T 細胞を 5 万 cells ずつまき、37°C 5%CO₂ で 72 時間培養した後にフローサイトメーターで解

析をおこなった。APC は 3000rad の γ 線照射を行った。

2.9 統計

量的変数の対応のない 2 群の検定は Mann-Whitney U test、3 群以上の検定は Kruskal-Wallis test を行った。治療前後での対応のある 2 群の検定は paired t-test を行った。統計学的有意差を $p < 0.05$ とした。

3. 結果

3.1 臨床情報

健常人 (Healthy control : HC) 30名、RA患者30名、SLE患者27名を対象とした。RA患者の年齢平均は他の2群に比べ有意に高かったが、健常人とSLE患者の年齢平均には有意差はなかった。SLE患者のSLEDAIスコア平均値は10.1であり、18.5%の患者がループス腎炎、33.3%の患者が神経精神 SLE (NPSLE) を合併していた。また、SLE患者のリンパ球数は健常人に比べて有意に減少していた。血小板数は3群間で差を認めなかった。SLE患者における補体価の平均値はC3 67.1(mg/dl)、C4 11.4(mg/dl)であり正常値に比べて低下を認めた。抗 ds-DNA 抗体と抗核抗体力価の平均値はそれぞれ 89U/mL、1031 倍であった。臨床情報のまとめを Table 5 に示す。

SLE患者の治療内容については、倫理的観点より治療を優先され、解析時点で既に治療介入が開始されている症例も複数含まれている。

3.2 末梢血免疫細胞サブセット分類の結果

健常人、30名、RA患者30名、SLE患者27名の末梢血中T細胞、B細胞、単球 (Mono)、NK細胞の、それぞれCD4陽性T細胞 (CD4⁺T)、B細胞 (B)、単球 (Monocyte)、リンパ球 (Lymph) 中の比率 (%) を求めた (Figure 2-1)。

CD4⁺T 細胞については、CD25⁺LAG3⁺細胞は、SLE 患者において有意に増加していた。CD25 と LAG3 で展開した健常人、RA 患者、SLE 患者での代表的な解析図を Figure 2-2 に示す。CD25⁺Treg と Th17 細胞も SLE 患者における有意に増加しており、CD4⁺ナイーブ T 細胞は SLE 患者で有意に減少していた。Th2 細胞は健常人に比べて RA、SLE の双方で増加していた。

B 細胞については、ナイーブ B 細胞と Transitional B 細胞は SLE 患者で有意な減少を認め、クラススイッチ後メモリーB 細胞と形質芽細胞は SLE 患者で有意な増加を認めた。

単球については、CD14^{low}CD16⁺単球(Non-classical monocyte)は SLE 患者において有意に減少していた。NK 細胞では有意な変化を認めなかった。

3.3 SLEDAI およびその他の臨床学的指標と各サブセット間の順位相関係数

SLE の臨床学的指標と相関のある細胞サブセットを同定するために、SLE 患者の各リンパ球サブセットの割合と SLEDAI およびその他の臨床学的指標（白血球数、リンパ球数、補体、抗 ds-DNA 抗体および抗核抗体力価）との順位相関係数を解析した (Figure 3-1)。SLEDAI との間で最も高い相関関係を示したのは CD14⁺CD16⁻単球(Classical monocyte)、クラススイッチ後メモリーB 細胞、次いで CD25⁺LAG3⁺T 細胞であった。

その他の臨床学的指標との関係性については、白血球数と CD14⁺CD16⁺単球、リンパ球数とクラススイッチ後メモリーB 細胞、補体(CH50)と Th1 細胞および Tfh が強い逆相関の関係を示した。抗 ds-DNA 抗体との相関関係を示したサブセットは認めなかったが、抗核抗体力価と形質芽細胞には比較的高い相関関係を認めた。

SLEDAI と相関が強かった 3 分画と SLEDAI との順位相関係数と p 値を示した図を Figure 3-2 に示す。

3.4 SLE 高疾患活動性群・低疾患活動性群での細胞サブセットの比較

SLE 患者内でも、疾患活動性によって細胞サブセット比率が異なるかどうかを検討した。27 名の SLE 患者を、SLEDAI が 5 以下を非活動性 SLE、6 以上を活動性 SLE として 2 群に分け、各細胞サブセット比率を比較した (Figure 4)。高活動性 SLE において有意に増加していたのは、CD25⁺LAG3⁺T 細胞、Th2 細胞、CD14⁺CD16⁺単球(Classical monocyte)であった。

3.5 SLE 治療前後での細胞サブセットの比較

SLE に対する治療がどのように免疫担当細胞サブセットの比率に影響を与えるかを検討するため、治療前後での各細胞サブセット比率の変化を確認した。

SLE 患者の中で特に疾患活動性が高かった 3 名を選び、治療前後での各免

疫担当細胞サブセットの割合の変化を解析したところ、ほとんどのサブセットにおいて一貫した傾向を示さなかった中で、 $CD25^+LAG3^+T$ 細胞では一貫して治療後に減少する傾向を認めた (Figure 5-1)。Figure 5-1 で治療前後比較による増減変化率の平均値をとったものを Figure 5-2 に示す。この3名中1名は治療介入後10か月時点で SLEDAI が再度上昇したが、それと同時に治療後に減少していた $CD25^+LAG3^+T$ 細胞が治療介入後の再増悪時に再び増加していた (Figure 5-3)。

ここまでの結果をまとめると、SLE において健常人・RA 患者との比較で有意差があり、また SLE 高疾患活動性でも有意に増加している細胞サブセットは $CD25^+LAG3^+T$ 細胞と Th2 であった。そのうち、 $CD25^+LAG3^+T$ 細胞は SLEDAI との相関は弱いながらあり、SLE の加療で有意に減少していた。私は SLE の病態と関連する可能性のある細胞群として $CD25^+LAG3^+T$ 細胞に注目し、解析を進めることとした。

3.6 $CD25^+LAG3^+T$ 細胞は RORc と Foxp3 の mRNA 発現が高い

代表1名の健常人の末梢血から $CD4^+$ ナイーブ T 細胞、 $CD25^+LAG3^+T$ 細胞 ($LAG3^+T$ 細胞)、 $CD25^+LAG3^+T$ 細胞、 $CD25^+Treg$ を分取し、抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体で 72 時間刺激し定量的 PCR を行った。 $LAG3^+T$ 細胞では LAG3、EGR2 の発現が高く、 $CD25^+Treg$ では Foxp3 の発現が高値であった。 $CD25^+LAG3^+T$

細胞では少ないながら Foxp3 の発現を認めたが、意外なことに RORc の発現が有意に高値であった(Figure 6)。

3.7 CD25⁺LAG3⁺T 細胞は IL-17A と Foxp3 の蛋白レベルで発現が高い

蛋白レベルでの各細胞群のサイトカイン産生・Foxp3 産生を解析するために、健常人の末梢血から CD4⁺ナイーブ T 細胞、CD4⁺メモリーT 細胞、CD25⁻LAG3⁺T 細胞 (LAG3⁺T 細胞)、CD25⁺LAG3⁺T 細胞、CD25⁺Treg を分取し、抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体で 72 時間刺激し細胞内染色を行った。エフェクター T 細胞と関連のあるサイトカイン (IFN- γ 、IL-4、IL-17A)、LAG3 陽性 T 細胞と関連のあるサイトカイン (IL-10) と Foxp3 の蛋白レベルでの発現量を確認した。

代表的な結果を Figure 7-1 に示す。LAG3⁺T 細胞は IFN- γ と IL-10 の発現が高く、これは既報と一致する^[21]。CD25⁺LAG3⁺T 細胞は IL-17A と Foxp3 の発現が高かった。

健常人 3 名の結果をまとめたものを Figure 7-2 に示す。LAG3⁺T 細胞とメモリーT 細胞では IFN- γ の発現が他のサブセットと比較して有意に高かった。また、CD25⁺LAG3⁺T 細胞では IL-17A の発現レベルが比較的高く、LAG3⁺T 細胞では IL-10 の発現が比較的高かった。さらに、Foxp3 は CD25⁺Treg で最も発現が高かったが、CD25⁺LAG3⁺T 細胞においても高い発現を認めた。IL-4 の発現

レベルには有意差を認めなかった。

3.8 CD25⁺LAG3⁺T 細胞は制御性活性を示さない

健常人の末梢血単核球から分取した CD25⁺Treg と CD25⁺LAG3⁺T 細胞を用いて共培養を行い、細胞増殖抑制能を検討した。CD25⁺Treg では細胞増殖抑制能を認めたが、CD25⁺LAG3⁺T 細胞では明らかな細胞増殖抑制能を認めなかった(Figure 8)。

4. 考察

今回私は、健常人、SLE 患者、疾患コントロール群としての RA 患者の末梢血中細胞サブセット比率を検討した。まず既知の知見との整合性を確認した。

CD4⁺ナイーブ T 細胞が SLE 患者で有意に減少する一方、SLE 病勢との相関関係がないことは既報と一致する^[44, 56, 57]。CD25⁺Treg についての報告は、CD25⁺Treg の定義によっても異なる。私は CD4⁺CD25⁺CD127^{low}CD45RA⁻細胞群を CD25⁺Treg と定義し、SLE 患者において CD25⁺Treg が有意に増加していることを確認した。私と同じ定義を使用した Yan らの結果は私の結果と一致している^[28, 29]。B 細胞については、SLE 患者でナイーブ B 細胞が減少し、メモリー B 細胞、形質芽細胞は増加すると報告されており^[58]、私の実験でも同様の結果を得た。

以上より、私の実験結果は既報と一致しており、今回の細胞サブセット比率同定方法の正当性を裏付けると考える。以下に、今回私が特に注目した CD4⁺CD25⁺LAG3⁺T 細胞について論じる。

健常人や疾患コントロール群としての RA 患者との比較において、SLE 患者では CD25⁺LAG3⁺T 細胞が明らかに多かった。また SLE の疾患活動性指標である SLEDAI が高い SLE 患者では、低疾患活動性の SLE 患者に比べて CD25⁺LAG3⁺T 細胞が有意に多かった。SLEDAI と CD25⁺LAG3⁺T 細胞の割合との間には正の相関関係は弱いながら存在すること、さらに、は治療により

CD25⁺LAG3⁺T 細胞が減少することから CD25⁺LAG3⁺T 細胞は SLE の病態に何らかの形で関与している可能性が高いと考えられ、その免疫学的特徴について検討した。

CD25⁺LAG3⁺T 細胞の性質として、2つの可能性を考えた。1つは、SLE の病勢を増悪させるエフェクタータイプの細胞で、SLE 加療によって少なくなる可能性。2つは、制御性 T 細胞に類する細胞で、病勢増悪の際に SLE を抑制する目的で増加し、SLE 治療により病勢がコントロールされると少なくなる可能性である。これらを検証するため、転写因子やサイトカイン分泌プロフィールを検討した。CD25⁺LAG3⁺T 細胞では、Foxp3 が CD25⁺Treg よりは低値ながら発現していることが定量的 PCR および細胞内染色で確認された。ただ、CD25⁺LAG3⁺T 細胞は明らかな制御性活性を認めなかった。また、CD25⁺LAG3⁺T 細胞は RORc^[39]も高発現することが定量的 PCR で確認され、また細胞内染色により IL-17 産生が比較的高かった。これらの結果から、CD25⁺LAG3⁺T 細胞は、Th17 と Foxp3⁺CD25⁺Treg の双方の性質を持つ細胞 (IL-17⁺Foxp3⁺T 細胞) ^[59] である可能性が示唆された。

Foxp3 は CD25⁺Treg のマーカーではあるが、ヒトでは活性化した細胞でも一過性の Foxp3 発現を認める。ただ、ヒト FOXP3 遺伝子座のいくつかの領域における DNA の脱メチル化は CD25⁺Treg でのみ観察されており、活性化した一般的な CD4⁺T 細胞では観察されず、鑑別点となる^[60, 61]。

Foxp3⁺CD25⁺Treg の中には、刺激下で IL-17 を分泌する、IL-17⁺Foxp3⁺T 細胞がいくつか報告されている。CD161⁺Foxp3⁺Treg は、CD161 を発現し、抑制能、TSDR の脱メチル化が Treg 同様である一方、炎症下で炎症性サイトカイン (IL-17, IFN-g) を分泌しており、若年性特発性関節炎などの炎症性の環境下では増えている^[62]。小松らは CD25^{low}Foxp3⁺CD4⁺T 細胞は関節炎を発症した状況下では Foxp3 を発現しなくなり Th17 細胞へと分化することを報告し、この細胞を exFoxp3 と名付けた。さらに IL-17 を発現する exFoxp3Th17 細胞が関節炎部位に蓄積していることも分かっている^[63]。

SLE患者の末梢血においてIL-17の濃度は高く^[64, 65, 66, 67]、IL-17はB細胞活性化因子 (B-cell-activating factor, BAFF) と共働してB細胞の分化や自己抗体の産生を促進させる^[68, 69]。Th17は、血管壁の炎症に関与しており、SLE患者の皮膚、肺、腎臓へ浸潤しており、SLEの発症・再燃に関与している^[70, 71]。

本研究の制限は、CD25⁺LAG3⁺T 細胞の抑制能はみているが、Foxp3 発現の意義の検討、つまり FOXP3 遺伝子座における DNA の脱メチル化をみていない点であり、今後解析が望まれる。また、CD25⁺T 細胞において、LAG3 が発現することがなぜ IL-17 産生と関連するかについても明らかにすることができていない。さらに、SLE 患者の末梢血中リンパ球数が減少しており、かつリンパ球中の CD25⁺LAG3⁺T 細胞は希少であることが障壁となり、患者検体を用いた同細胞群の性質検証は困難であり結論を導くには至らなかった。

LAG3⁺Treg が発現する転写因子 Egr2 は、転写因子 Batf を阻害することによって IL-17 の発現を抑制し、Th17 分化を抑制する^[72]。Egr2 を欠損した T 細胞では Th17 への分化が亢進するが、Th1 や Th2 への分化には影響しない^[72]。多発性硬化症の患者から得られた CD4⁺T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激すると EGR2 の発現が減少する一方で IL-17 の発現が増加した^[72]。CD25⁺LAG3⁺T 細胞は、LAG3⁺Treg より EGR2 の発現は低いために LAG3⁺Treg より IL-17 産生が亢進している可能性が推測される。ただ、LAG3 によって、CD25⁺Treg と IL-17⁺Foxp3⁺T 細胞の選別がなぜ可能かはまだ明らかではない。

私は 27 名の SLE 患者と 30 名の RA 患者、および健常人を対象に免疫細胞サブセット分類を行い、CD4⁺CD25⁺LAG3⁺T 細胞が SLE 患者で著しく増加し、かつ病勢とも相関関係にあり、加療に伴って減少することを新たに見出した。さらに、この細胞群は IL-17 と Foxp3 を同時に発現しており、炎症性疾患との関連が指摘されている IL-17⁺Foxp3⁺T 細胞と一致するところが多い。CD4⁺CD25⁺LAG3⁺T 細胞は SLE 患者の病勢と密接に関連していると考えられ、本細胞群の解析は今後 SLE の病態解明につながると考える。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始温かいご指導とご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ内科学 山本一彦教授に心より感謝を申し上げます。アレルギー・リウマチ内科第 18 研究室の藤尾圭志講師には研究の方向性に関してご指導とご鞭撻を賜り感謝申し上げます。また、本研究の機会を与えてくださり、日々の実験内容や手技・研究の方向性など終始親身なご指導、ご鞭撻を賜りました住友秀次助教に厚く御礼申し上げます。庄田宏文助教には臨床情報収集において貴重なご助言と支持を頂き感謝申し上げます。

同研究室の永渕泰雄特任臨床医、大学院生の仲地真一郎先生、土田優美先生、櫻井恵一先生、土屋遥香先生、花田徳大先生には共同で末梢血の実験に取り組み、臨床情報の収集やフローサイトメトリーによる解析、および免疫担当細胞の分画解析において分担していただき誠に感謝を申し上げます。井上堯実験助手にはフローサイトメトリー解析を行う上で技術補佐をしていただき、心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1 Mills, J. A. Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* **330**, 1871-1879,(1994).
- 2 Kotzin, B. L. Systemic lupus erythematosus. *Cell* **85**, 303-306,(1996).
- 3 Viallard, J. F., Pellegrin, J. L., Ranchin, V., Schaefferbeke, T., Dehais, J., Longy-Boursier, M., Ragnaud, J. M., Leng, B. & Moreau, J. F. Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN-gamma)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical and experimental immunology* **115**, 189-195,(1999).
- 4 Mohan, C., Adams, S., Stanik, V. & Datta, S. K. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *The Journal of experimental medicine* **177**, 1367-1381,(1993).
- 5 Houssiau, F. A., Lefebvre, C., Vanden Berghe, M., Lambert, M., Devogelaer, J. P. & Renaud, J. C. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* **4**, 393-395,(1995).
- 6 Tokano, Y., Morimoto, S., Kaneko, H., Amano, H., Nozawa, K., Takasaki, Y. & Hashimoto, H. Levels of IL-12 in the sera of patients

- with systemic lupus erythematosus (SLE)--relation to Th1- and Th2-derived cytokines. *Clinical and experimental immunology* **116**, 169-173,(1999).
- 7 Davas, E. M., Tsirogianni, A., Kappou, I., Karamitsos, D., Economidou, I. & Dantis, P. C. Serum IL-6, TNFalpha, p55srTNFalpha, p75srTNFalpha, srIL-2alpha levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clinical rheumatology* **18**, 17-22,(1999).
- 8 al-Janadi, M., al-Balla, S., al-Dalaan, A. & Raziuddin, S. Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases. *Journal of clinical immunology* **13**, 58-67,(1993).
- 9 Lit, L. C., Wong, C. K., Li, E. K., Tam, L. S., Lam, C. W. & Lo, Y. M. Elevated gene expression of Th1/Th2 associated transcription factors is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology* **34**, 89-96,(2007).
- 10 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* **27**, 485-517,(2009).
- 11 Ivanov, II, McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A.,

- Lafaille, J. J., Cua, D. J. & Littman, D. R. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133,(2006).
- 12 Ivanov, II, Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K. & Littman, D. R. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485-498,(2009).
- 13 Pappu, R., Rutz, S. & Ouyang, W. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends in immunology* **33**, 343-349,(2012).
- 14 Ouyang, W., Kolls, J. K. & Zheng, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* **28**, 454-467,(2008).
- 15 Dolff, S., Bijl, M., Huitema, M. G., Limburg, P. C., Kallenberg, C. G. & Abdulahad, W. H. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical immunology* **141**, 197-204,(2011).
- 16 Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells

- expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* **155**, 1151-1164,(1995).
- 17 Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S. & Levings, M. K. Type 1 T regulatory cells. *Immunological reviews* **182**, 68-79,(2001).
- 18 Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E. & Roncarolo, M. G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742,(1997).
- 19 Weiner, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological reviews* **182**, 207-214,(2001).
- 20 Mills, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature reviews. Immunology* **4**, 841-855,(2004).
- 21 Okamura, T., Fujio, K., Shibuya, M., Sumitomo, S., Shoda, H., Sakaguchi, S. & Yamamoto, K. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**,

- 13974-13979,(2009).
- 22 Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061,(2003).
- 23 Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* **4**, 330-336,(2003).
- 24 Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F. & Bluestone, J. A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1701-1711,(2006).
- 25 Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R., Kelleher, A. & Fazekas de St Groth, B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1693-1700,(2006).

- 26 Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology* **6**, 345-352,(2005).
- 27 Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. & Hafler, D. A. CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *The Journal of Immunology* **167**, 1245-1253,(2001).
- 28 Lin, S. C., Chen, K. H., Lin, C. H., Kuo, C. C., Ling, Q. D. & Chan, C. H. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *European journal of clinical investigation* **37**, 987-996,(2007).
- 29 Yan, B., Ye, S., Chen, G., Kuang, M., Shen, N. & Chen, S. Dysfunctional CD4+,CD25+ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells. *Arthritis and rheumatism* **58**, 801-812,(2008).
- 30 Zhang, B., Zhang, X., Tang, F. L., Zhu, L. P., Liu, Y. & Lipsky, P. E. Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Annals of the*

- rheumatic diseases* **67**, 1037-1040,(2008).
- 31 Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochoy, G. & Sakaguchi, S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **30**, 899-911,(2009).
- 32 Suen, J. L., Li, H. T., Jong, Y. J., Chiang, B. L. & Yen, J. H. Altered homeostasis of CD4(+) FoxP3(+) regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology* **127**, 196-205,(2009).
- 33 Suen, J. L. & Chiang, B. L. CD4(+)FoxP3(+) regulatory T-cells in human systemic lupus erythematosus. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* **111**, 465-470,(2012).
- 34 Kleinewietfeld, M. & Hafler, D. A. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Seminars in immunology* **25**, 305-312,(2013).
- 35 Xu, L., Kitani, A., Fuss, I. & Strober, W. Cutting Edge: Regulatory T Cells Induce CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T Cells or Are Self-Induced to Become Th17 Cells in the Absence of Exogenous TGF β . *The Journal of*

- Immunology* **178**, 6725-6729,(2007).
- 36 Kleinewietfeld, M., Starke, M., Di Mitri, D., Borsellino, G., Battistini, L., Rotzschke, O. & Falk, K. CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood* **113**, 827-836,(2009).
- 37 Koenen, H. J., Smeets, R. L., Vink, P. M., van Rijssen, E., Boots, A. M. & Joosten, I. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* **112**, 2340-2352,(2008).
- 38 Beriou, G., Costantino, C. M., Ashley, C. W., Yang, L., Kuchroo, V. K., Baecher-Allan, C. & Hafler, D. A. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* **113**, 4240-4249,(2009).
- 39 Leveque, L., Deknuydt, F., Bioley, G., Old, L. J., Matsuzaki, J., Odunsi, K., Ayyoub, M. & Valmori, D. Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4⁺ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells. *Journal of immunotherapy* **32**, 101-108,(2009).
- 40 Huang, C. T., Workman, C. J., Flies, D., Pan, X., Marson, A. L., Zhou, G., Hipkiss, E. L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H. I., Powell, J. D.,

- Pardoll, D. M., Drake, C. G. & Vignali, D. A. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* **21**, 503-513,(2004).
- 41 Okazaki, T., Okazaki, I. M., Wang, J., Sugiura, D., Nakaki, F., Yoshida, T., Kato, Y., Fagarasan, S., Muramatsu, M., Eto, T., Hioki, K. & Honjo, T. PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. *The Journal of experimental medicine* **208**, 395-407,(2011).
- 42 Wang, J., Okazaki, I. M., Yoshida, T., Chikuma, S., Kato, Y., Nakaki, F., Hiai, H., Honjo, T. & Okazaki, T. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *International immunology* **22**, 443-452,(2010).
- 43 Okamura, T., Sumitomo, S., Morita, K., Iwasaki, Y., Inoue, M., Nakachi, S., Komai, T., Shoda, H., Miyazaki, J., Fujio, K. & Yamamoto, K. TGF-beta3-expressing CD4+CD25(-)LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. *Nature communications* **6**, 6329,(2015).
- 44 Gordon, C., Matthews, N., Schlesinger, B. C., Akbar, A. N., Bacon, P. A., Emery, P. & Salmon, M. Active systemic lupus erythematosus is associated with the recruitment of naive/resting T cells. *British*

journal of rheumatology **35**, 226-230,(1996).

- 45 Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G. R., Lipsky, P. E., Radbruch, A. & Dorner, T. Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* **165**, 5970-5979,(2000).
- 46 Arce, E., Jackson, D. G., Gill, M. A., Bennett, L. B., Banchereau, J. & Pascual, V. Increased Frequency of Pre-germinal Center B Cells and Plasma Cell Precursors in the Blood of Children with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* **167**, 2361-2369,(2001).
- 47 Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E. H., Milner, E. C. B. & Sanz, I. A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* **178**, 6624-6633,(2007).
- 48 Mietzner, B., Tsuiji, M., Scheid, J., Velinzon, K., Tiller, T., Abraham, K., Gonzalez, J. B., Pascual, V., Stichweh, D., Wardemann, H. & Nussenzweig, M. C. Autoreactive IgG memory antibodies in patients with systemic lupus erythematosus arise from nonreactive and polyreactive precursors. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* **105**, 9727-9732,(2008).
- 49 Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C. & Wagner, U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis and rheumatism* **64**, 671-677,(2012).
- 50 Li, X., Ptacek, T. S., Brown, E. E. & Edberg, J. C. Fcγ receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes and immunity* **10**, 380-389,(2009).
- 51 Li, Y., Lee, P. Y., Sobel, E. S., Narain, S., Satoh, M., Segal, M. S., Reeves, W. H. & Richards, H. B. Increased expression of FcγRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus. *Arthritis research & therapy* **11**, R6,(2009).
- 52 Li, Y., Lee, P. Y. & Reeves, W. H. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **58**, 355-364,(2010).
- 53 Gabriel, L., Morley, B. J. & Rogers, N. J. The role of iNKT cells in the immunopathology of systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1173**, 435-441,(2009).

- 54 Bombardier, C., Gladman, D. D., Urowitz, M. B., Caron, D. & Chang, C. H. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis and rheumatism* **35**, 630-640,(1992).
- 55 Maecker, H. T., McCoy, J. P. & Nussenblatt, R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature reviews. Immunology* **12**, 191-200,(2012).
- 56 Neidhart, M., Pataki, F., Michel, B. A. & Fehr, K. CD45 isoforms expression on CD4+ and CD8+ peripheral blood T-lymphocytes is related to auto-immune processes and hematological manifestations in systemic lupus erythematosus. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* **126**, 1922-1925,(1996).
- 57 Watanabe, T., Suzuki, J., Mitsuo, A., Nakano, S., Tamayama, Y., Katagiri, A., Amano, H., Morimoto, S., Tokano, Y. & Takasaki, Y. Striking alteration of some populations of T/B cells in systemic lupus erythematosus: relationship to expression of CD62L or some chemokine receptors. *Lupus* **17**, 26-33,(2008).
- 58 Joo, H., Coquery, C., Xue, Y., Gayet, I., Dillon, S. R., Punaro, M., Zurawski, G., Banchereau, J., Pascual, V. & Oh, S. Serum from

- patients with SLE instructs monocytes to promote IgG and IgA plasmablast differentiation. *The Journal of experimental medicine* **209**, 1335-1348,(2012).
- 59 Ayyoub, M., Deknuydt, F., Raimbaud, I., Dousset, C., Leveque, L., Bioley, G. & Valmori, D. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 8635-8640,(2009).
- 60 Kwan, B. C., Tam, L. S., Lai, K. B., Lai, F. M., Li, E. K., Wang, G., Chow, K. M., Li, P. K. & Szeto, C. C. The gene expression of type 17 T-helper cell-related cytokines in the urinary sediment of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* **48**, 1491-1497,(2009).
- 61 Baron, U., Floess, S., Wieczorek, G., Baumann, K., Grutzkau, A., Dong, J., Thiel, A., Boeld, T. J., Hoffmann, P., Edinger, M., Turbachova, I., Hamann, A., Olek, S. & Huehn, J. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *European journal*

- of immunology* **37**, 2378-2389,(2007).
- 62 Pesenacker, A. M., Bending, D., Ursu, S., Wu, Q., Nistala, K. & Wedderburn, L. R. CD161 defines the subset of FoxP3+ T cells capable of producing proinflammatory cytokines. *Blood* **121**, 2647-2658,(2013).
- 63 Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-hora, M., Kodama, T., Tanaka, S., Bluestone, J. A. & Takayanagi, H. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nature medicine* **20**, 62-68,(2014).
- 64 Tsun, A., Chen, Z. & Li, B. Romance of the three kingdoms: RORgammat allies with HIF1alpha against FoxP3 in regulating T cell metabolism and differentiation. *Protein & cell* **2**, 778-781,(2011).
- 65 Yang, J., Chu, Y., Yang, X., Gao, D., Zhu, L., Yang, X., Wan, L. & Li, M. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **60**, 1472-1483,(2009).
- 66 Wong, C. K., Ho, C. Y., Li, E. K. & Lam, C. W. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **9**, 589-593,(2000).

- 67 Wong, C. K., Lit, L. C., Tam, L. S., Li, E. K., Wong, P. T. & Lam, C. W. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clinical immunology* **127**, 385-393,(2008).
- 68 Nalbandian, A., Crispin, J. C. & Tsokos, G. C. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clinical and experimental immunology* **157**, 209-215,(2009).
- 69 Doreau, A., Belot, A., Bastid, J., Riche, B., Trescol-Biemont, M. C., Ranchin, B., Fabien, N., Cochat, P., Pouteil-Noble, C., Trolliet, P., Durieu, I., Tebib, J., Kassai, B., Ansieau, S., Puisieux, A., Eliaou, J. F. & Bonnefoy-Berard, N. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nature immunology* **10**, 778-785,(2009).
- 70 Crispin, J. C. & Tsokos, G. C. IL-17 in systemic lupus erythematosus. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, 943254,(2010).
- 71 Wang, Y., Ito, S., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Murata, H., Tsutsumi, A., Hayashi, T., Uchida, K., Usui, J., Yamagata, K. & Sumida, T. Laser microdissection-based analysis of cytokine balance

in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Clinical and experimental immunology* **159**, 1-10,(2010).

- 72 Miao, T., Raymond, M., Bhullar, P., Ghaffari, E., Symonds, A. L., Meier, U. C., Giovannoni, G., Li, S. & Wang, P. Early growth response gene-2 controls IL-17 expression and Th17 differentiation by negatively regulating Batf. *Journal of immunology* **190**, 58-65,(2013).

Table 1. SLE Disease Activity Index (SLEDAI)

	点数	症状	定義
中枢神経系	8	痙攣	最近発症したもの。代謝性、感染性、薬剤性ものは除外。
	8	精神症状	現実世界の認識がひどく障害され、通常行動に異常をきたしている状態。幻覚、支離滅裂、連合弛緩、認知機能障害、非論理的思考、奇怪な行動、まとまりのない行動、緊張病性行動を含む。尿毒症や薬剤性は除外。
	8	器質的脳障害	見当識障害、記憶や他の知的機能などの精神機能に、急速な臨床的特徴変化を伴った異常をきたしている状態。集中力の低下や遂行機能障害と、以下の中から少なくとも2つ以上を伴った意識混濁を含む。認知障害、思考散乱性言語、不眠症または日中の眠気、精神運動活動の増加。代謝性、感染性、薬剤性ものは除外。
	8	視力障害	SLEに伴う網膜病変。軟性白斑、網膜出血、脈絡膜からの滲出液漏出や出血、眼神経炎を含む。高血圧性、感染性、薬剤性は除外。
	8	脳神経障害	脳神経も含めた、新規の感覚神経および運動神経障害。
	8	ループス頭痛	執拗に続くひどい頭痛。偏頭痛様であっていいが、麻薬性鎮痛薬には治療反応性なし。
	8	脳血管障害	新規脳血管系のイベント。動脈硬化症は除外。
血管	8	血管炎	潰瘍、壊疽、手指皮下結節、爪周囲の梗塞、線状出血、もしくは生検や血管造影での血管炎証明。
筋・骨格系	4	関節炎	2関節以上の疼痛と炎症所見（圧痛、腫脹、関節液貯留など）
	4	筋炎	CKやアルドラーゼの上昇を伴う近位筋痛や筋力低下または筋電図変化または生検による証明、のいずれか。
腎臓	4	尿円柱	顆粒円柱もしくは赤血球円柱
	4	血尿	>5 red blood cells/hpf。尿管結石、感染、その他の原因は除外。
	4	蛋白尿	>0.5g/日。初発もしくは最近0.5g/日以上増えた。
	4	膿尿	>5 white blood cells/hpf。感染は除外。
皮膚	2	新たな皮疹	新たな、もしくは繰り返す炎症型紅斑。
	2	脱毛	新たな、もしくは繰り返す異常な、散在する、び漫性の毛髪減少。
	2	粘膜潰瘍	新たな、もしくは繰り返す口腔内もしくは鼻腔内潰瘍。
漿膜	2	胸膜炎	摩擦音、胸水、胸膜肥厚のいずれかを伴う胸膜炎性胸痛。
	2	心膜炎	摩擦音、心嚢水、心電図以上のうちいずれか1つを伴う心膜炎性疼痛。
免疫検査	2	低補体血症	CH50, C3, C4が正常下限よりも低値。
	2	抗DNA抗体上昇	正常値より上昇している。
全身	1	発熱	> 38℃。感染症は除外。
血液	1	血小板減少	< 血小板 100,000/mm ³
	1	白血球減少	<白血球 3,000/mm ³ 、薬剤性は除外。

上記表の該当する項目の点数を全て加算し、その合計点数を SLEDAI score とする^[54]。

Table 2. 抗体表

エフェクターT細胞/B細胞/単球・NK細胞/制御性T細胞解析用

エフェクターT細胞		B細胞		単球・NK細胞		制御性T細胞	
CXCR5-AF488	2 µl	CD27-FITC	2 µl	CD14-FITC	5 µl		
CCR6-PE	20 µl	CD24-PE	20 µl	HLA-DR-PE	10 µl	LAG3-PE	10 µl
CD3-PerCP Cy5.5	5 µl	CD3-PerCP Cy5.5	2 µl	CD16-PerCP Cy5.5	3 µl	CCR7-PerCP Cy5.5	3 µl
CD25-PE Cy7	5 µl	CD38 PE Cy7	2 µl	CD3-PE Cy7	3 µl	CD127-PE Cy7	1 µl
				CD123-APC	10 µl		
CD45RA-APC Cy7	3 µl	CD19 APC Cy7	2 µl	CD56-APC Cy7	5 µl	CD45RA-APC Cy7	3 µl
CXCR3-BV421	5 µl	IgD BV421	3 µl	CD11c-BV421	5 µl	CD25-BV421	3 µl
CD4-V500	2 µl			CD19-V500	3 µl	CD4-V500	2 µl
計	42 µl		31 µl		44 µl		22 µl

Compensation 用 (それぞれの単染色)

染色なし	—	—
FITC	CD4-FITC	2 µl
PE	CD4-PE	5 µl
PerCP Cy5.5	CD4-PerCP Cy5.5	4 µl
PE Cy7	CD4-PE Cy7	1 µl
APC	CD4-APC	5 µl
APC Cy7	CD4-APC Cy7	2 µl
BV421	CD4-BV421	2 µl
V500	CD4-V500	2 µl

Table 3. 各細胞サブセットの定義

サブセット名 (略語)	定義
CD4 ⁺ T cells	CD4+
LAG3 ⁺ T cells	CD4+CD25-LAG3+
CD25 ⁺ LAG3 ⁺ T cells	CD4+CD25+LAG3+
LAG3 ^{hi} T cells	CD4+CD25-LAG3hi
Naïve CD4 ⁺ T cells	CD4+CD25-LAG3-CCR7+CD45RA+
CD25 ⁺ regulatory T cells (CD25 ⁺ Treg)	CD4+CD25+LAG3-CD127lowCD45RA-
Follicular helper T cells (Tfh)	CD4+CD45RA-CXCR5+
T helper type-1 cells (Th1)	CD4+CD45RA-CXCR5-CXCR3+CCR6-
T helper type-2 cells (Th2)	CD4+CD45RA-CXCR5-CXCR3-CCR6-
T helper type-17 cells (Th17)	CD4+CD45RA-CXCR5-CXCR3-CCR6+
B cells	CD3-CD19+
Naïve B cells	CD3-CD19+IgD+CD27-
Unswitched memory B cells (unsw MB)	CD3-CD19+IgD+CD27+
Switched memory B cells (sw MB)	CD3-CD19+IgD-CD27+
Plasmablast (PB)	CD3-CD19+IgD-CD27highCD38high
transitional B cells (Trans B)	CD3-CD19+CD24highCD38high
Monocytes	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14+
classical monocyte (Class Mono)	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14highCD16-
intermediate monocyte (Int Mono)	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14highCD16+
non-classical monocyte (Non-class Mono)	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14dimCD16+
natural killer cells (NK)	CD3-CD19-CD14-CD56+

Table 4. qPCR に用いたプライマー

Primer	Sequence
huLAG3-Fw	CCTCCGACTGGGTCATTTT
huLAG3-Rv	CGTTGAAGCCATCTCTGTAGG
huEGR2-Fw	GAGTTGGGTCTCCAGGTTGT
huEGR2-Rv	CACCGGGTAGATGTTGTCAG
huFoxp3-Fw	GAAACAGCACATTCCCAGAGTTC
huFoxp3-Rv	ATGGCCCAGCGGATGAG
huRORc-Fw	CAGTCATGAGAACACAAATTGAAGTG
huRORc-Rv	CAGGTGATAACCCCGTAGTGGAT
huGAPDH-Fw	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
huGAPDH-Rv	GAAGATGGTGATGGGATTTC

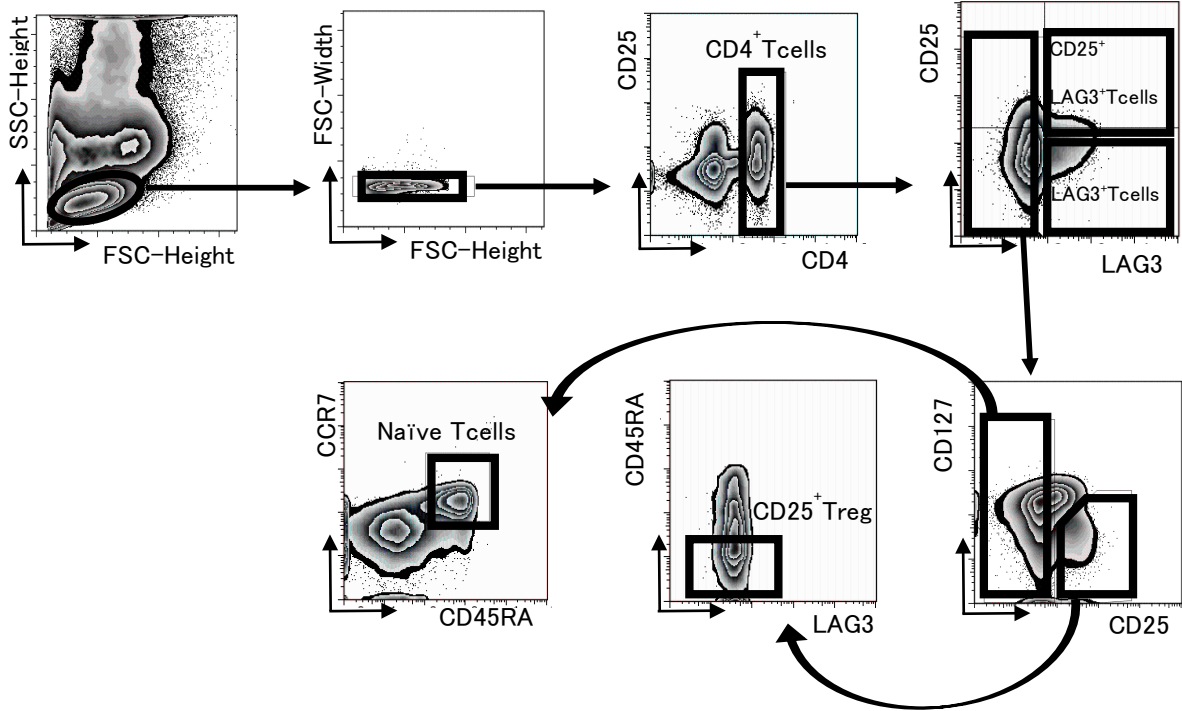
Table 5. 解析対象患者の臨床情報

Mean (SD)	HC (n=30)	RA (n=30)	SLE (n=27)
Age	34.6 (8.0)	54.5 (13.8) ***	44.1 (17.4)
Male/Female - n	7/23	8/22	3/24
SLEDAI	-	-	10.1 (8.1)
Lupus nephritis - n, (%)	-	-	5 (18.5)
NPSLE - n, (%)	-	-	9 (33.3)
WBC (/ml)	5,266 (1,332)	7,143 (2,171) **	6,192 (2,847)
Lymph (/ml)	1,859 (644)	1,523 (576)	1,400 (867) *
Plt (10 ⁴ /ml)	23.3 (5.5)	27.3 (7.5)	21.4 (10.5)
CH50 (mg/dl)	-	-	35.6 (16.1)
C3 (mg/dl)	-	-	67.1 (23.8)
C4 (mg/dl)	-	-	11.4 (8.3)
Anti dsDNA ab (U/mL)	-	-	89.0 (126)
ANA (times) - (median)	-	107 (464)	1,031 (1,173) ***
CRP (mg/dl)	-	1.1 (2.35)	0.29 (0.59)

HC; Healthy Control, RA; Rheumatoid Arthritis, SLE; Systemic Lupus Erythematosus, SLEDAI: SLE Disease Activity Index, NPSLE; Neuropsychiatric SLE, WBC; White Blood Count, Lymph; Lymphocyte, Plt; Platelet, CH50; 50% hemolytic unit of complement, C3; complement 3, C4; complement 4, Anti dsDNA ab; Anti-double stranded DNA antibody, ANA; Antinuclear Antibody, CRP; C-reactive Protein

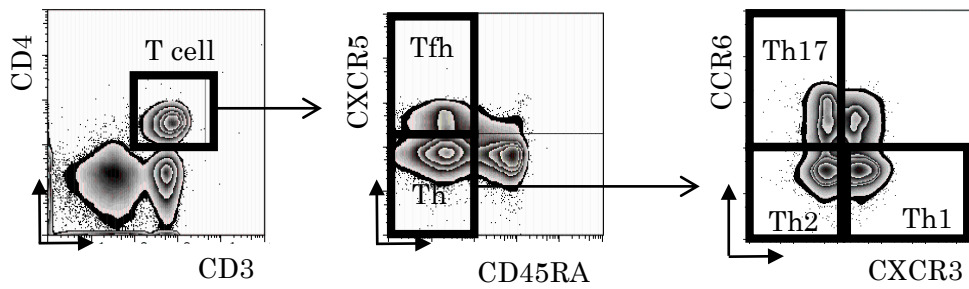
*p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005

A.



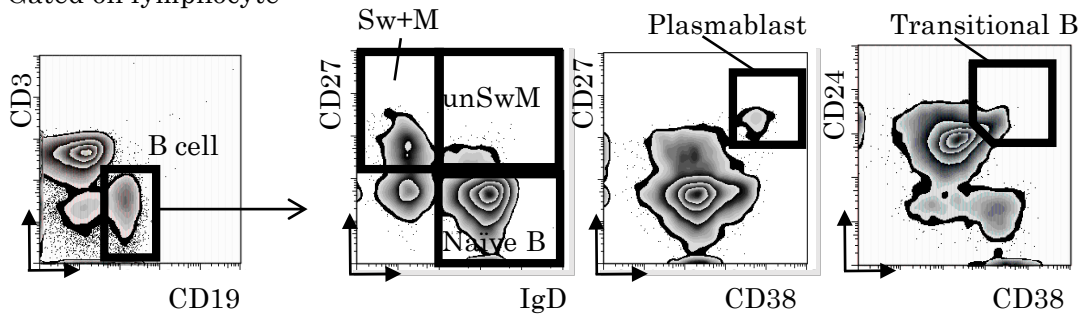
B.

Gated on lymphocyte



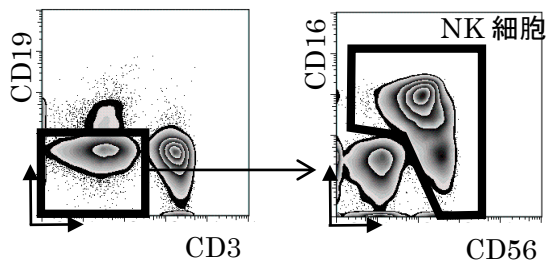
C.

Gated on lymphocyte



D.

Gated on Lymphocyte



E.

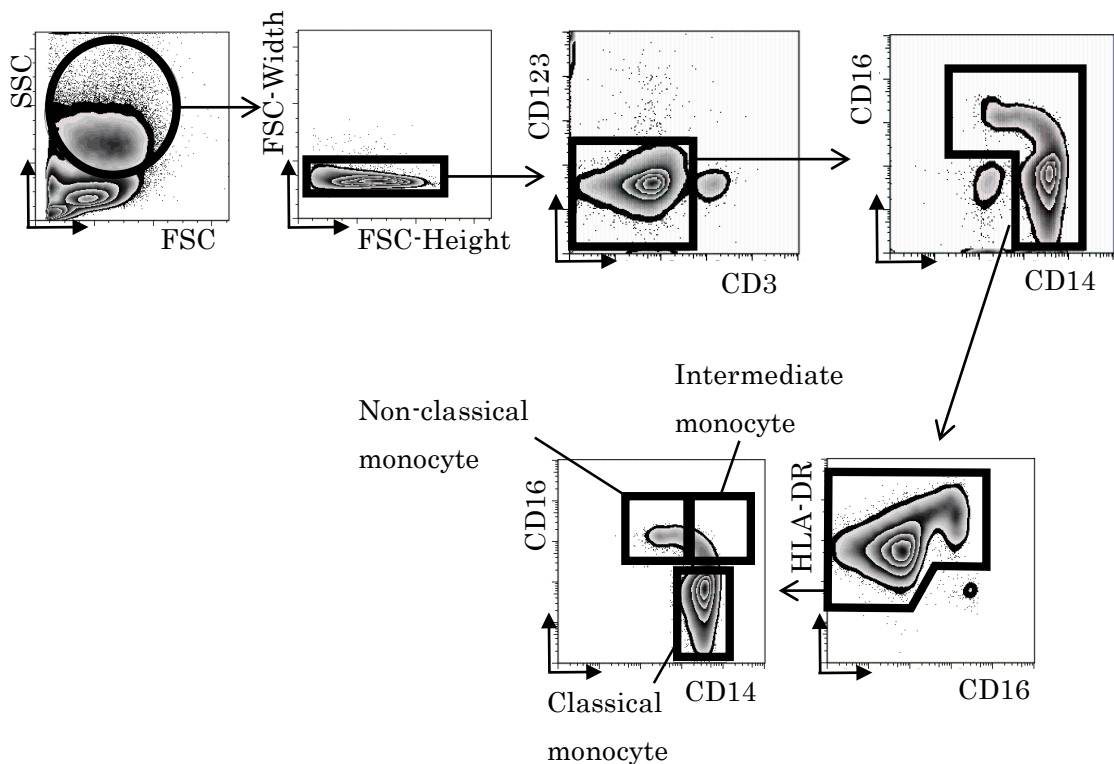


Figure 1 フローサイトメトリーによる分画解析

免疫担当細胞の分画解析方法の一例を示す。リンパ球ゲートを決定した後、CD4 陽性集団を CD4⁺ T 細胞とし、さらにそれらを LAG3 陽性と LAG3 陰性に分けた。LAG3 陽性の集団をさらに CD25 陰性と陽性に分け、それぞれ LAG3⁺T 細胞、CD25⁺LAG3⁺T 細胞とした。LAG3 陰性の集団のうち CD25 陽性 CD127 陰性~弱陽性 CD45RA 陰性のものを CD25⁺Treg とし、CD25 陰性 CCR7 陽性 CD45RA 陽性のものを Naïve T とした (A)。エフェクターT 細胞 (B)、B 細胞 (C)、NK 細胞 (D)、単球 (E) の分画解析方法について示した。定義の詳細については Table 4 にまとめた。

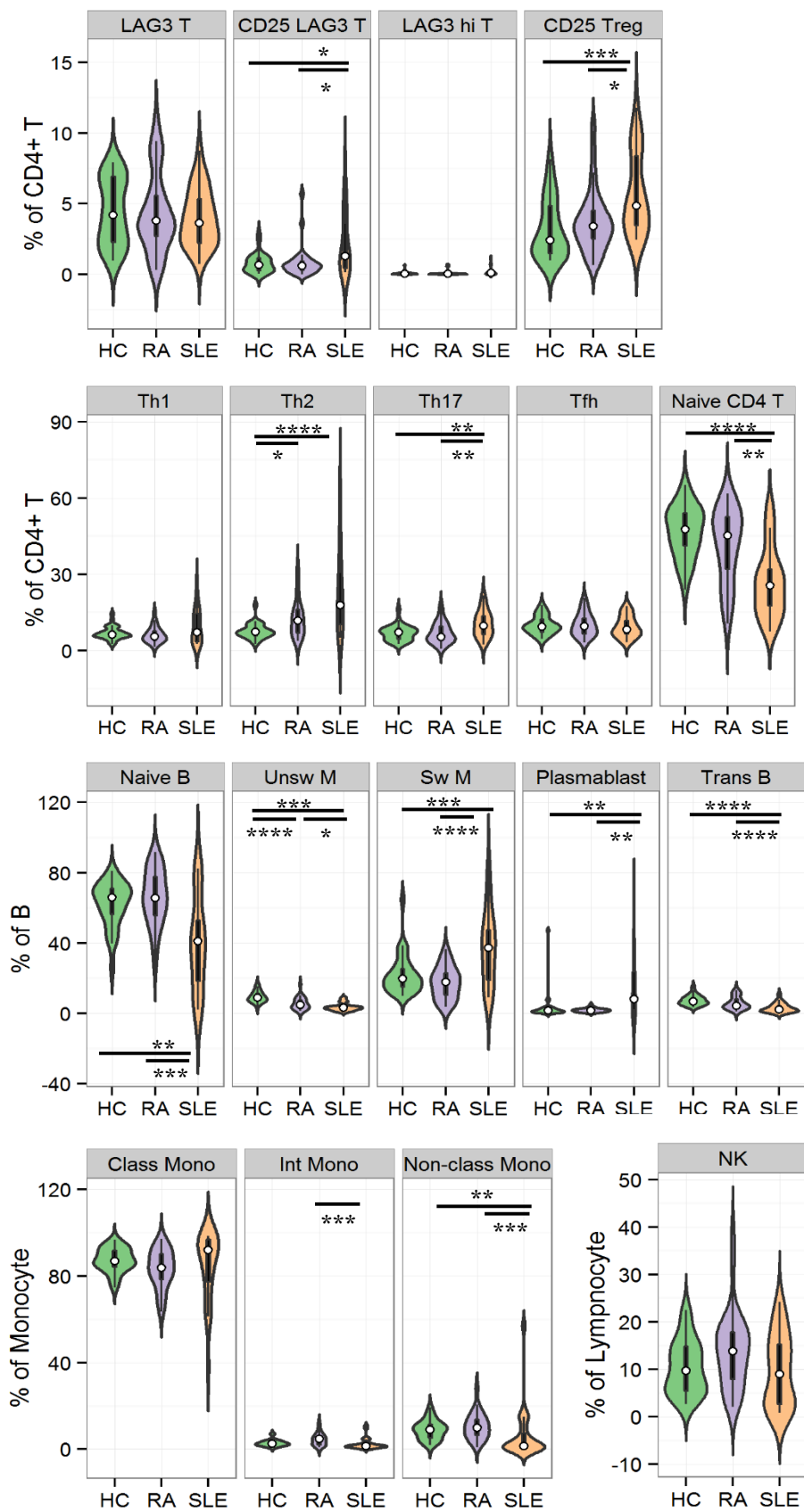


Figure 2-1. 健常人、RA 患者および SLE 患者における各サブセット割合の比較

30名の健常人、30名のRA患者、27名のSLE患者の末梢血中免疫担当細胞をフローサイトメトリーにて分画解析した。それぞれのサブセットのCD4陽性T細胞(CD4⁺T)、B細胞(B)、単球(Monocyte)、リンパ球(Lymph)中の比率(%)を示した。3群の比較はKruskal-Wallis testによるDunn's multiple comparisonで検定した。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001。

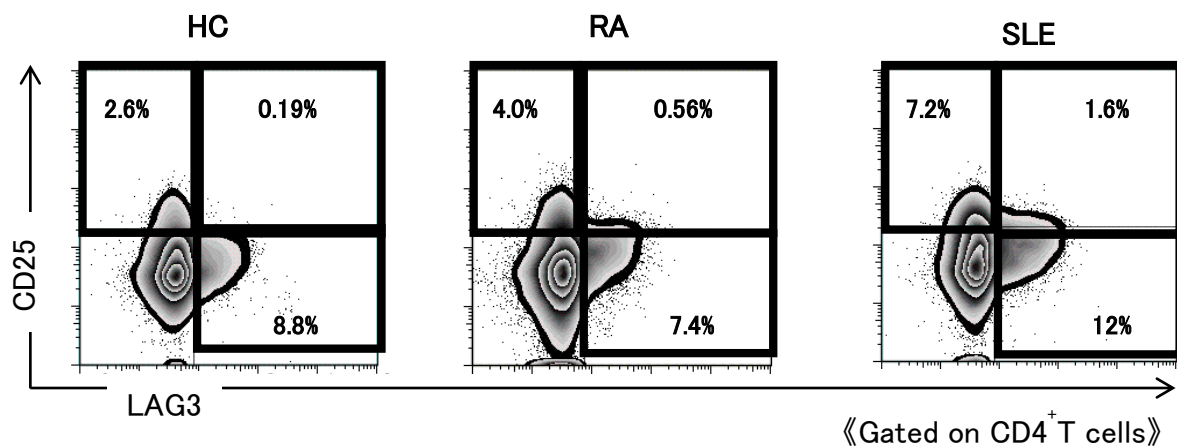


Figure 2-2. 健常人(HC)、関節リウマチ患者 (RA)、SLE 患者における、代表的な展開図

免疫担当細胞の分画解析を健常人、RA 患者、SLE 患者の検体で行った。CD4⁺T 細胞を CD25 と LAG3 で分類した典型例を示す。

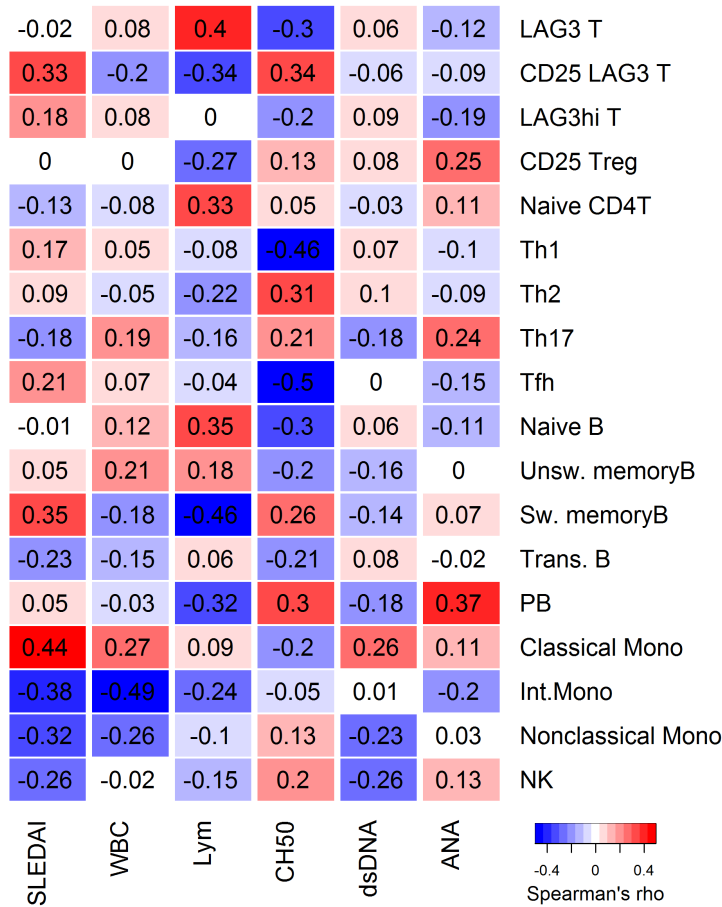


Figure 3-1. 各サブセットと臨床データとの相関

SLEDAI、白血球数、リンパ球数、補体価 (CH50)、ds-DNA 抗体値、抗核抗体力価と 27 名の SLE 患者の各サブセットの割合との関係を Spearman の順位相関係数にて評価した。

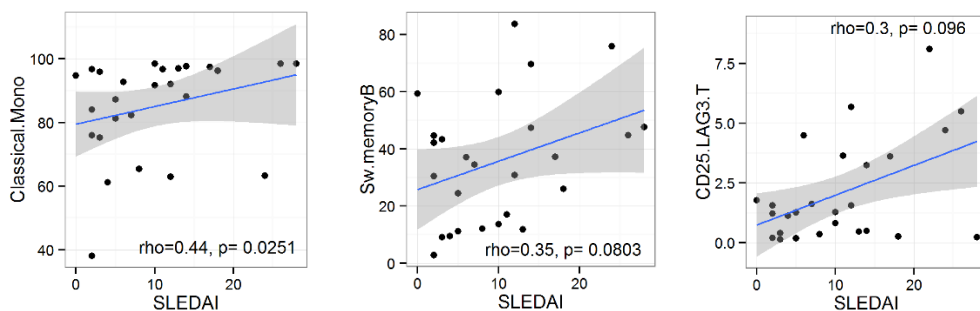


Figure 3-2. SLEDAI との相関関係が強かった 3 サブセットの Spearman の順位相関係数と p 値

Figure 3-1 で示した Spearman の順位相関係数のうち、SLEDAI との順位相関係数が特に高かった CD25⁺LAG3⁺T、Classical monocyte、Switched Memory B について Spearman の順位相関係数と p 値を図にしたものを示す。各サブセットの定義は Table 2 による。

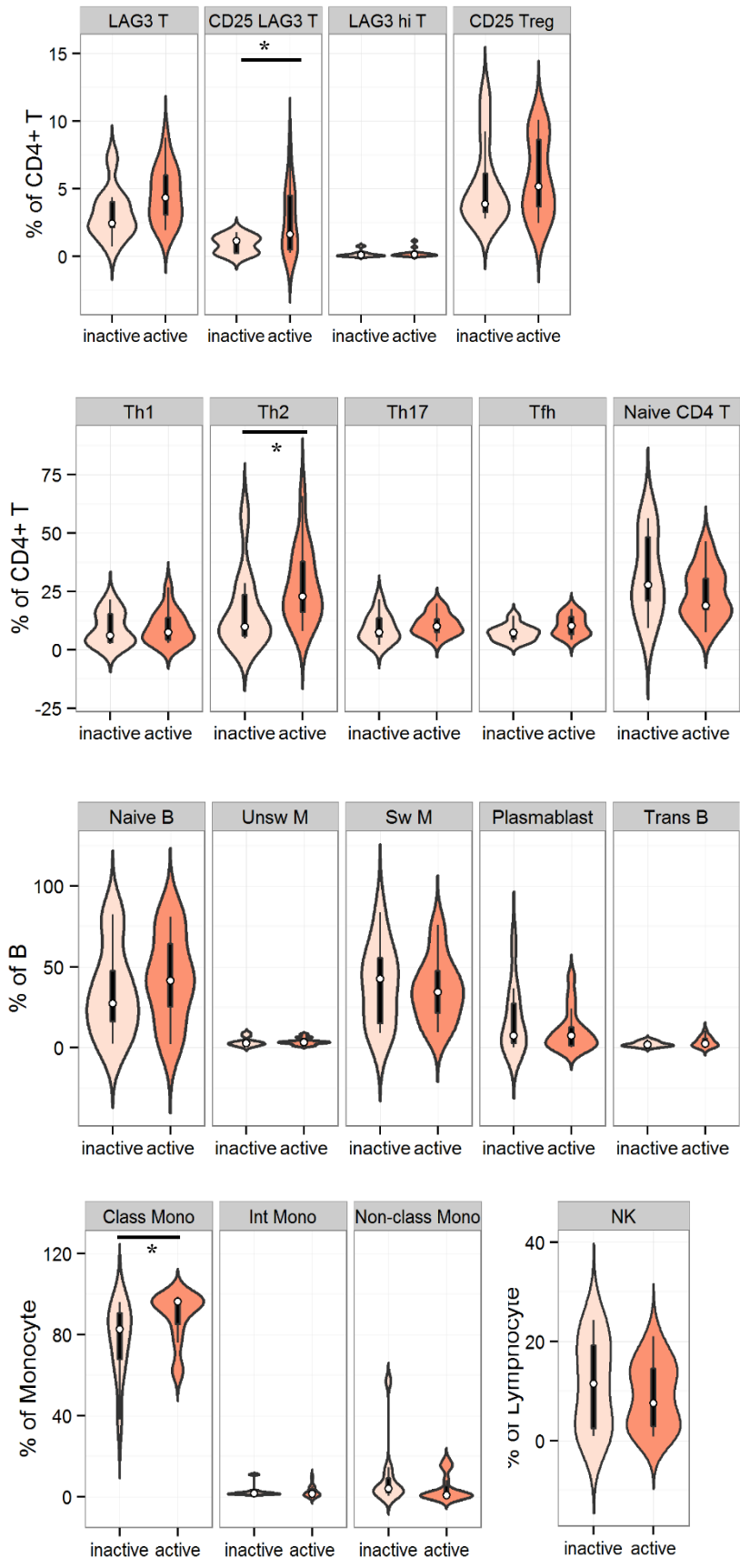


Figure 4. SLE 患者での各サブセットの割合の病勢での比較

27名のSLE患者の末梢血中免疫担当細胞をフローサイトメトリーにて分画解析した結果をSLEDAIスコアにより病勢の低いものと高いものの2群に分け、病勢の強弱による差の有無を検討した。SLEDAIスコアが5以下の症例をinactive、SLEDAIスコアが6以上の症例をactiveと定義した。両群の比較はMann-Whitney U testにより行った。* $p < 0.05$ 。

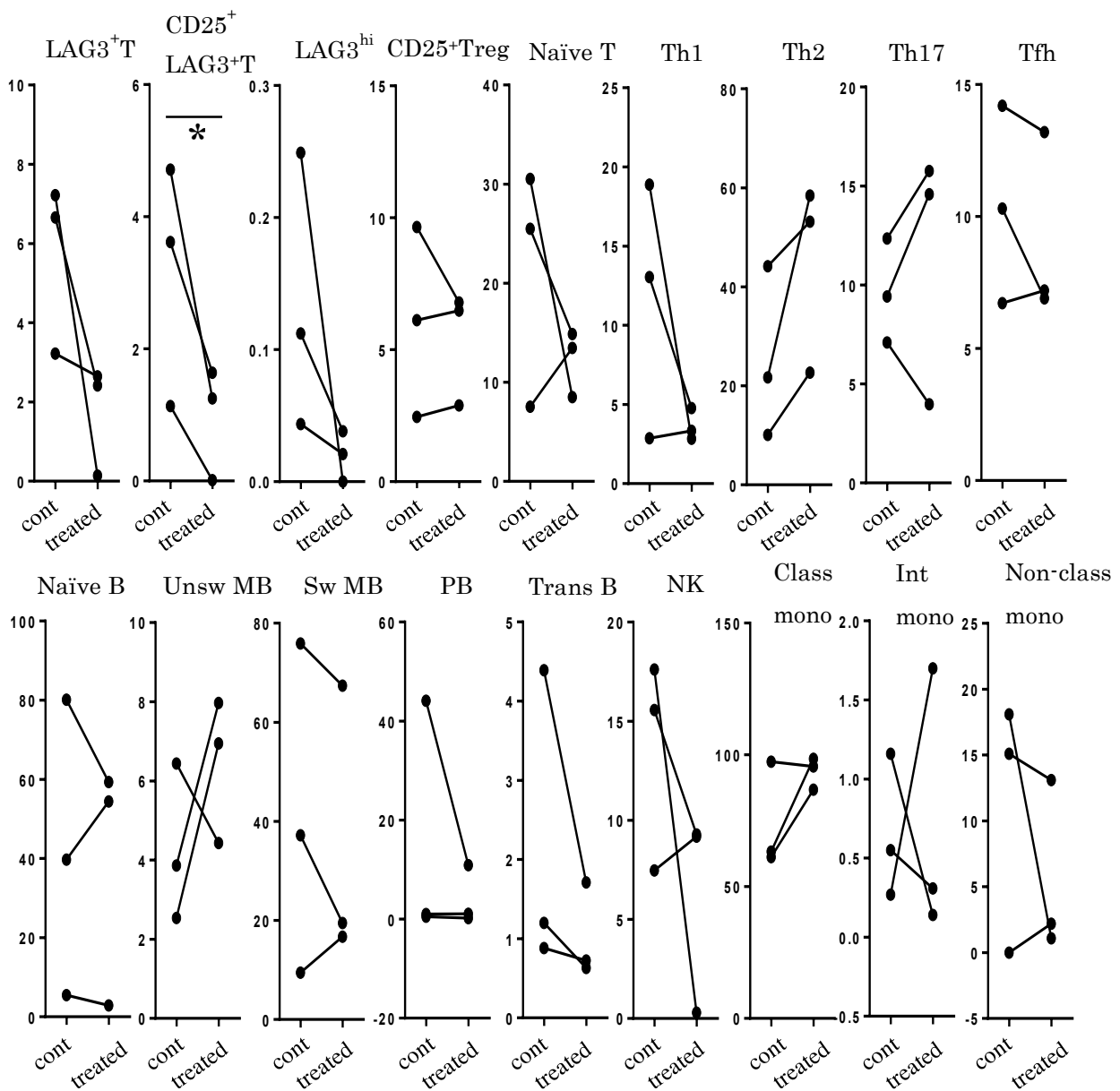


Figure 5-1. 各サブセットの治療前後の変化

27名のSLE患者のうち、特に病勢の高い3名で治療前後での末梢血中免疫担当細胞の分画解析を行った。Figure2, 4に準じて、それぞれのサブセットのCD4⁺T細胞 (CD4⁺T)、B細胞 (B)、単球 (Monocyte)、リンパ球 (Lymph) 中の割合 (%) を示し、治療前後での変化を示した。2群間の比較は paired-t test により行った。*p=0.08。

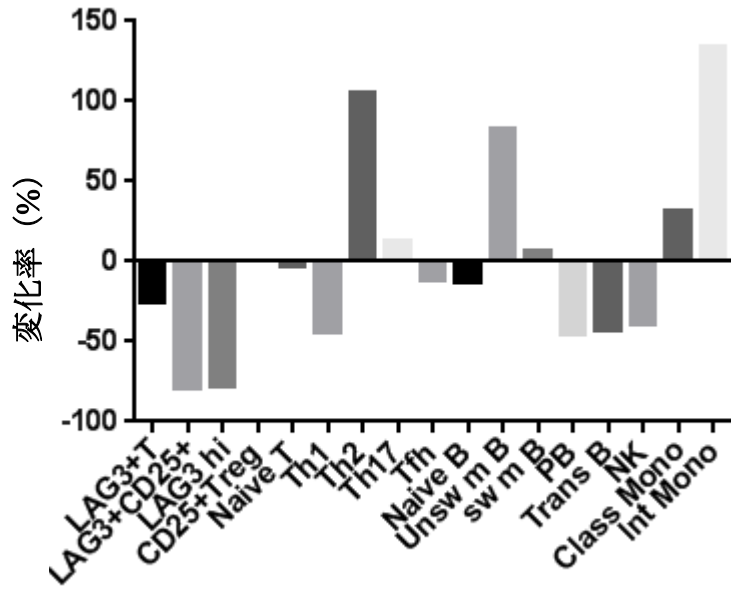


Figure 5-2. 各サブセットの治療前後の変化

Figure 5-1 で示した免疫担当細胞比率の平均変化率(%)を示した。治療前を基準とし、治療前後で変化した比率が治療前の何%になるかを計算したものである。

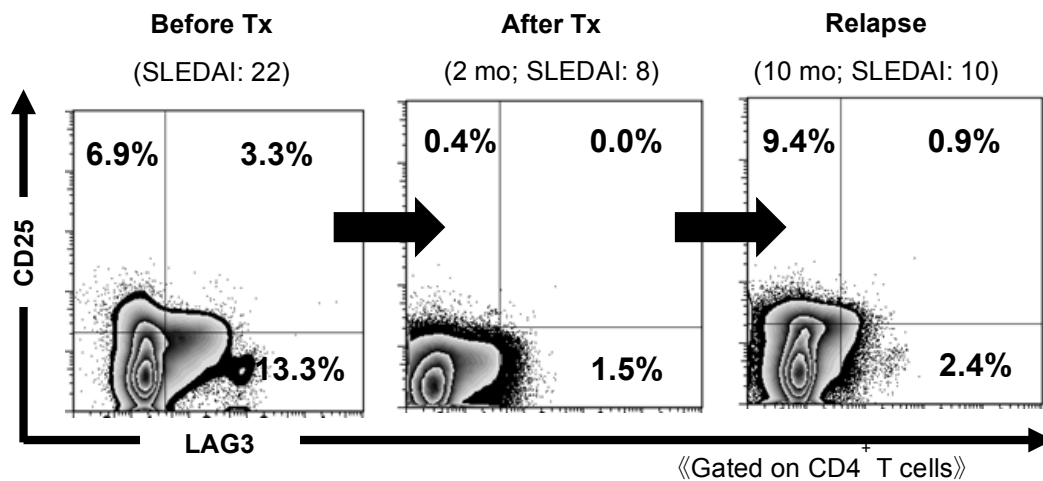


Figure 5-3. 治療前後での CD4⁺CD25⁺LAG3⁺T 細胞の変化

病勢の高いSLE患者の末梢単核球中CD4⁺T細胞をCD25とLAG3で分類したパネルを経時的に示した。この症例は、中枢神経ループスの再燃のため治療を要した。2か月後にはSLEDAIスコアが22から8まで改善を認めた。初期治療から10か月後には新規皮疹の出現でSLEDAIスコアが8から10に微増している。

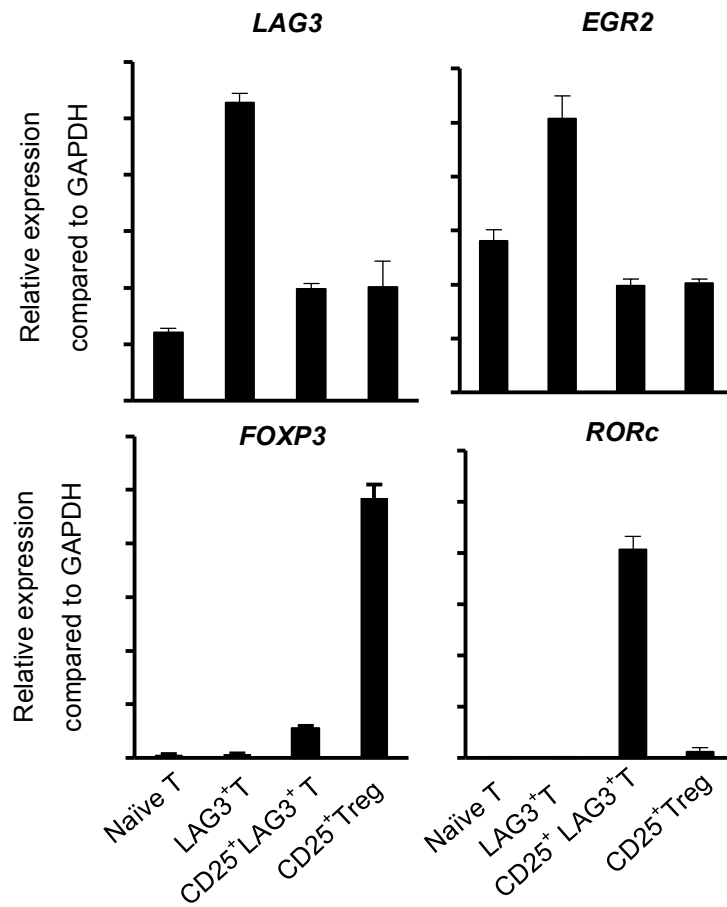


Figure 6. 健常人検体での qPCR 結果

健常人の末梢単核球から取得した Naive T 細胞、LAG3⁺T 細胞、CD25⁺LAG3⁺T 細胞、CD25⁺Treg を抗ヒト CD3 抗体 (10 mg/ml)、可溶性抗ヒト CD28 抗体 (5 mg/ml) と IL-2 (100 IU/ml) の存在下で 72 時間刺激培養を行ったのち、cDNA を合成した。Table 3 に示したプライマーを用いて qPCR を行い、各サブセットにおける LAG3、EGR2、Foxp3、RORc の DNA の発現量を検討した。

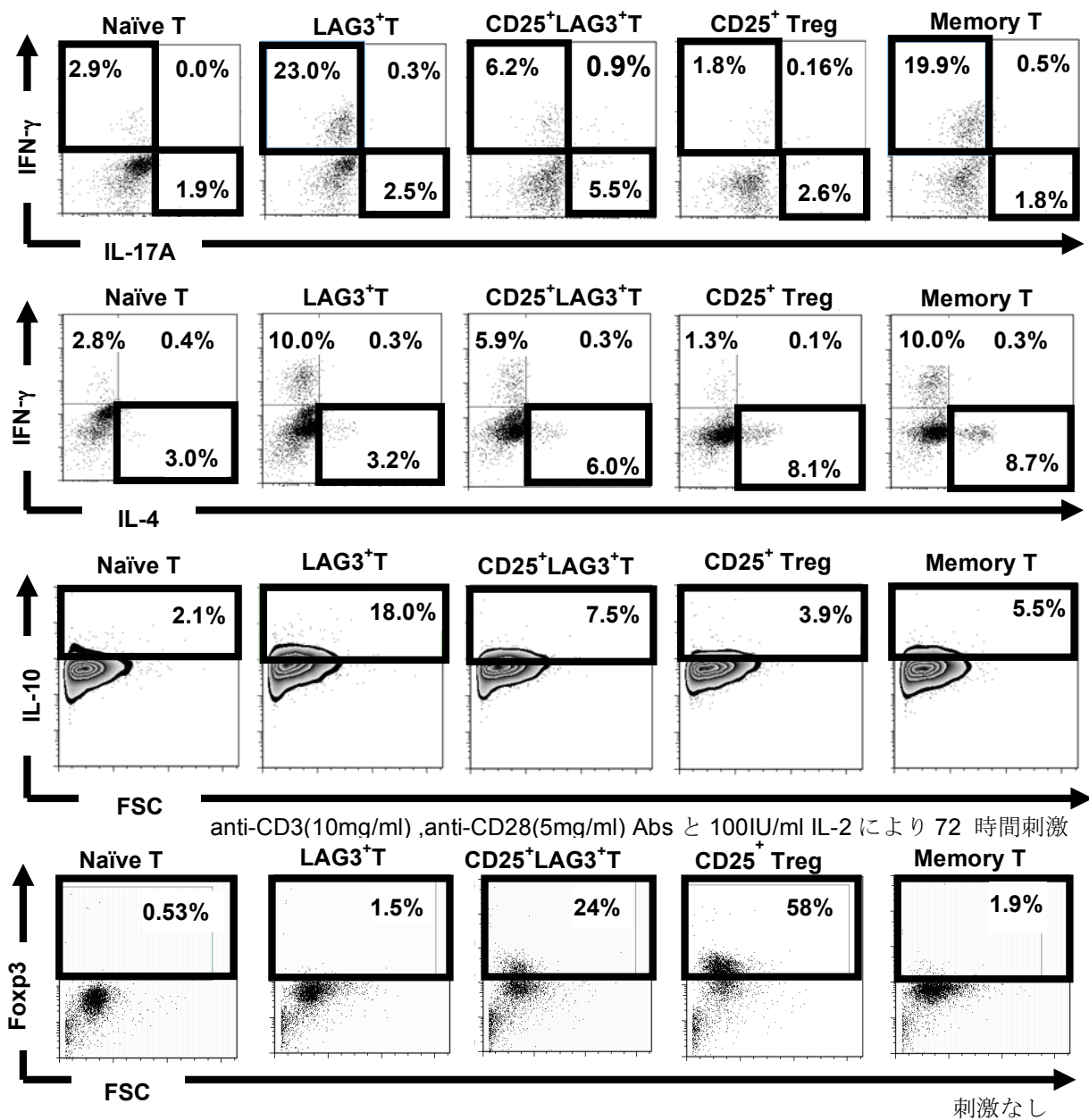


Figure 7-1. 細胞内染色による各サブセットによるサイトカイン発現の検討

健康人の末梢単核球から取得した Naïve T 細胞、LAG3⁺ T 細胞、CD25⁺LAG3⁺ T 細胞、CD25⁺ Treg、Memory T 細胞を抗ヒト CD3 抗体 (10 mg/ml)、可溶性抗ヒト CD28 抗体 (5 mg/ml) と IL-2 (100 IU/ml) の存在下で 72 時間刺激培養を行ったのち、細胞表面は 7-AAD により染色、細胞内を IFN- γ 、IL-4、IL-17、IL-10 でそれぞれ染色した。死細胞除去を行ったうえで、生細胞内の各サイトカインの発現をフローサイトメトリーにより検討した。さらに、健康人から取得した各サブセットを刺激せずに、細胞表面は 7-AAD により染色、細胞内を Foxp3 で染色し、同様に生細胞内の転写因子の発現をフローサイトメトリーにより検討した。

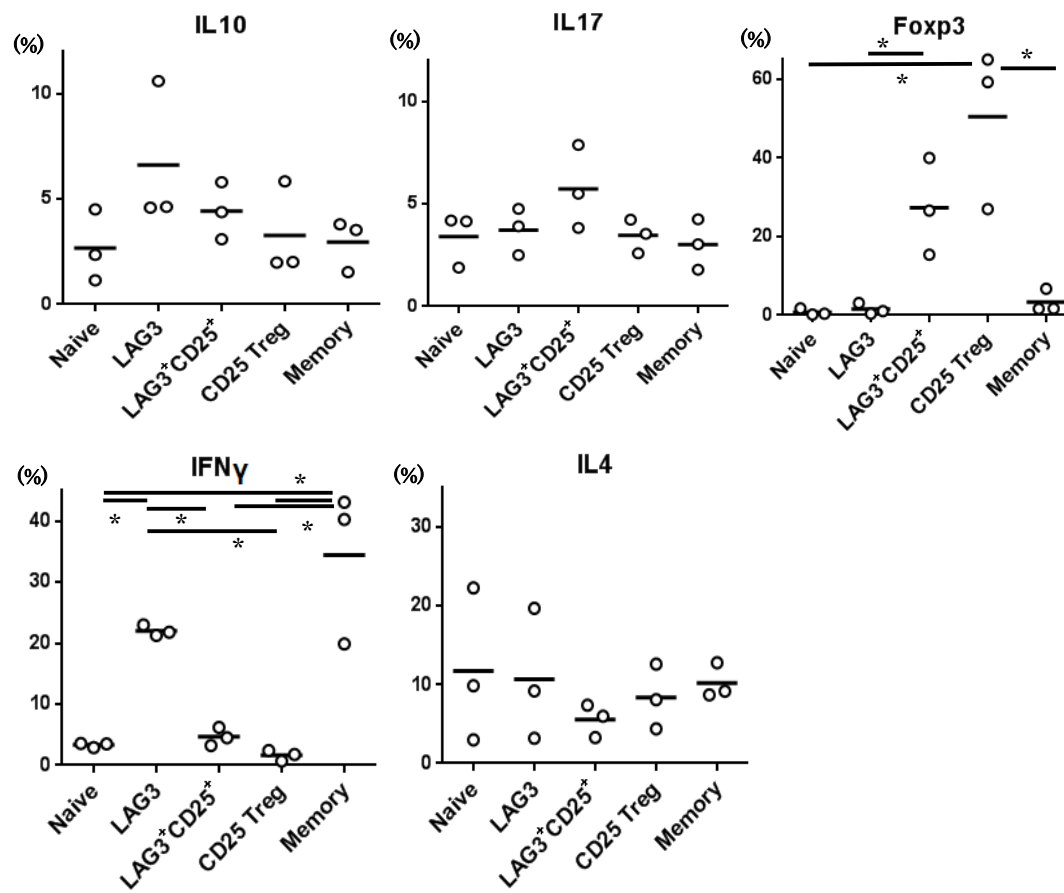


Figure 7-2. 健常人(n=3)での各サブセットによるサイトカイン発現の検討

3名の健常人の末梢単核球より Naive T 細胞、LAG3⁺ T 細胞、CD25⁺LAG3⁺ T 細胞、CD25⁺ Treg、Memory T 細胞を取得し、抗ヒト CD3 抗体 (10 mg/ml)、可溶性抗ヒト CD28 抗体 (5 mg/ml) と IL-2 (100 IU/ml) の存在下で 72 時間刺激培養を行ったのち、細胞表面は 7-AAD により染色、細胞内を IFN- γ 、IL-4、IL-17、IL-10 でそれぞれ染色。死細胞除去を行ったうえで、生細胞内の各サイトカインの発現をフローサイトメトリーにより検討した結果を示した。Foxp3 解析に関しては、健常人から各サブセットを取得したのち、刺激をせずに、細胞表面は 7-AAD により染色、細胞内を Foxp3 で染色し、生細胞内の転写因子の発現をフローサイトメトリーにより検討した。* $p < 0.05$ 、One Way ANOVA による Tukey's multiple comparison test による。

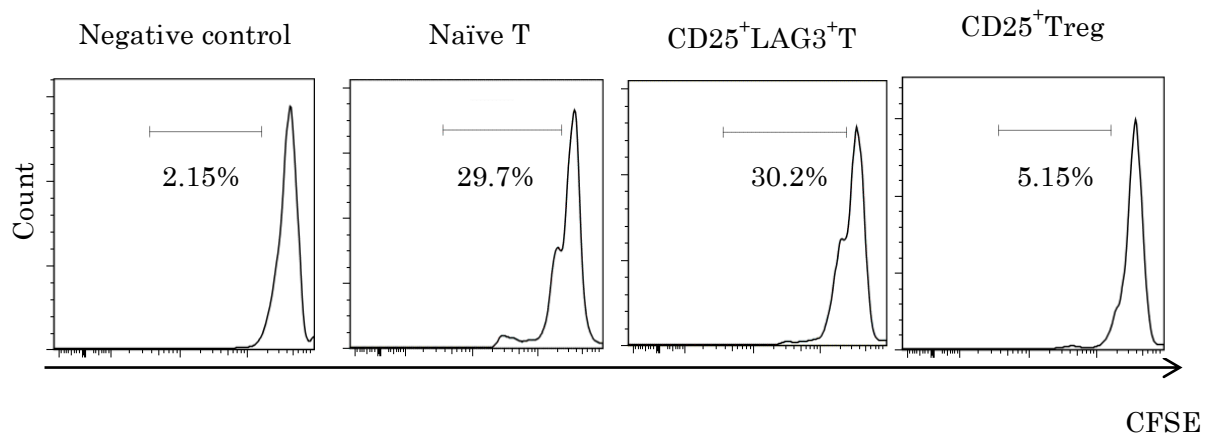


Figure 8. 共培養による機能解析

健常人より採取し 3000 rad γ 線照射した抗原提示細胞 (APC) 10 万個と、MACS により採取しかつ CFSE 染色をしたナイーブ T 細胞 5 万個を、それぞれフローサイトメーターにより採取した 5 万個ずつのナイーブ T 細胞、CD25⁺Treg、CD25⁺LAG3⁺T 細胞と共培養を行った。10 mg/ μ l CD3, 5 μ g/ml CD28 で刺激をし、37°C 5%CO₂ で 72 時間培養後に解析を行った。