

博士論文

ヒト末梢血中の CD4 陽性 CD25 陰性
LAG3 陽性制御性 T 細胞の機能解析と
関節リウマチ患者における検討

仲 地 真 一 郎

目 次

目 次	• • • • • 1
要 旨	• • • • • 2
序 文	• • • • • 3
方 法	• • • • • 8
結 果	• • • • • 19
考 察	• • • • • 24
参考文献	• • • • • 30
図 表	• • • • • 44
謝 辞	• • • • • 56

ヒト末梢血中の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の 機能解析と関節リウマチ患者における検討

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： 仲地 真一郎

要 旨

制御性 T 細胞は、自己免疫疾患の病態と密接な関連がある。私は、近年マウスで同定された CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ 制御性 T 細胞 (LAG3⁺ Treg) をヒト末梢血において同定し、それが IL-10 を高産生し抗体産生抑制能をもつことを示した。次に 101 名の健常人と 85 名の関節リウマチ患者の末梢血の解析し、LAG3⁺ Treg は関節リウマチ患者で少なく、アバタセプト治療で増加することを明らかにした。さらに、アバタセプト存在下の培養では、Naïve CD4⁺ T 細胞から LAG3⁺ Treg 様細胞への分化が促進された。これらの知見は自己免疫疾患の病態解明に大きく寄与することが期待される。

序 文

関節リウマチ

関節リウマチは慢性の破壊性の多発性関節炎であり、ときに肺や皮膚、眼などの関節外も冒す炎症性自己免疫疾患である。2014年に報告された日本国内の大規模コホート研究 (IORRA cohort) によると、日本での罹患者数は124万人で、有病率は1.0%である。発症年齢のピークは40-50歳代である(1)。関節リウマチは単一の要因ではなく、遺伝的要因と環境的要因の両者が複合的に作用し発症すると考えられている(2)。遺伝的要因についての報告は多くあるが、そのなかでも特筆すべきは、GWAS (genome-wide association studies) の解析結果において101個の疾患感受性遺伝子が同定されたが、human leukocyte antigen (HLA)-DRB1の関与が群を抜いて大きかったことである(3)。関節リウマチの感受性遺伝子の多くがT細胞やB細胞、サイトカインシグナル経路に関連していることがわかっているが、その中でもCD4⁺T細胞に抗原を提示するHLA-DRの関与が大きいという事実は、CD4陽性T細胞が関節リウマチの病態に大きな役割を果たしていると言える。このような遺伝的背景を持ったうえで、関節リウマチの発症は自己寛容の破綻から開始される。未だ特定できていない何らかの要因によって自己反応性のT細胞が活性化し、それを受けてB細胞からの自己抗体産生が始まる。リウマトイド因子や抗cyclic citrullinated peptide (CCP) 抗体、Interleukin (IL)-6やtumor necrosis factor (TNF)- α などの炎症性サイトカイン、破骨細胞などが関わ

り、関節リウマチの病態を形成する(4)。これらを制御するものとして制御性 T 細胞 (regulatory T cells、以下 Treg) の関与が示唆されている。

制御性 T 細胞は自己免疫疾患の発症と維持に関わる

Treg は免疫寛容の維持や自己免疫疾患の発症を防ぐために重要な細胞である。Treg にはさまざまな亜分類が報告されているが、そのなかでも $CD25^+Foxp3^+$ Treg と、タイプ 1 制御性 T 細胞 (Type 1 regulatory T cells、以下 Tr1 細胞) が特に重要である。坂口らが同定した $CD25^+Foxp3^+$ Treg は、最も重要な制御性 T 細胞であり、当初 $CD4^+CD25^+$ T 細胞として定義されたが(5)、その後転写因子 Forkhead Box P3 (Foxp3) がこの細胞のマスター遺伝子として報告された(6, 7)。 $CD25^+$ Treg は、IL-2 と結合する IL-2 受容体 ($CD25$) を高発現している(8)。IL-2 は炎症性細胞や B 細胞などを活性化するが、 $CD25^+$ Treg は他の細胞に結合する IL-2 を奪うことでそれらの細胞の活性化を妨げる(9, 10)。また、 $CD25^+$ Treg は Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) を高発現しており、この CTLA-4 が抗原提示細胞上の CD80/86 と結合して、抗原提示細胞の T 細胞への結合を阻害し免疫応答を抑制する(11)。Foxp3 遺伝子の変異は全身の炎症や自己免疫疾患を生じ、マウスとヒトでそれぞれ scurfy マウス、Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) 症候群として知られている(8)。しかし、これらにおいては関節炎を呈さず、また自己抗体を生じないため、 $CD25^+$

Treg のみでは自己免疫疾患すべてを説明することはできず、他の Treg の関与を考慮する必要がある。

IL-10 産生制御性 T 細胞と LAG3

Groux らは、Foxp3 を発現せず、高 IL-10 下で誘導され、IL-10 を高産生する制御性 T 細胞集団を発見し、Tr1 細胞と名付けた(12)。Tr1 細胞はビタミン D3(13)、抗 CD46 抗体(14)、ラパマイシン(15)、IL-27(16, 17)によっても誘導される。Tr1 細胞は実験的 自己免疫脳脊髄炎(18)や腸炎モデルマウス(12)の症状を改善させる。また、Tr1 細胞は IL-4 や IL-17 は低産生であり、抗原提示細胞のアポトーシスを誘導する(19-21)。Tr1 細胞を特徴づけるマーカーが見つかっていなかったために、長らく生体内での存在が 確認されていなかったが、2013 年に Gagliani らは Lymphocyte activation gene 3 (LAG3) と CD49b が Tr1 細胞のマーカーであると報告した(22)。この LAG3 分子は、CD4 の 100 倍以上の親和性を持って MHC クラス II へ結合する表面分子であり(23)、その半分 が細胞内に存在しており、細胞表面にはダイマーを形成して発現している(23, 24)。 MHC と結合することで抗原特異的 T 細胞に対して負の制御を行う(25)。マウスでの LAG3 単独欠損はリンパ組織の増殖のみとフェノタイプは弱い(26)、LAG3 と programmed cell death (PD)-1 を同時に欠損すると致死的な心筋炎を発症する(27)。

自己免疫反応を制御するためには複数の機構が備わっている

自己免疫反応を制御する、免疫寛容の機構は生体に複数備わっており、胸腺においては負の選択が(28, 29)、末梢においてはアナジーや制御性 T 細胞などが知られている(30)。免疫寛容に関する遺伝子としてはアポトーシスを誘導する遺伝子である Fas が知られており、Fas の変異はヒトにおいて自己免疫疾患を生じる(31, 32)。また、アナジー関連の遺伝子としては EGR2 が報告されており、これは T 細胞からの IFN- γ や IL-2 分泌を阻害し、Treg の免疫寛容やアナジーに重要な E3 リガーゼである Cbl-b の発現を上昇させる(33)。マウスでの Egr2 の変異は脱髄性ニューロパチーを生じ(34)、ヒトでの EGR2 の変異は Charcot-Marie-Tooth 病などに関連がある(35)。T 細胞・B 細胞特異的に Egr2 をノックアウトしたマウスではループス様の自己免疫疾患を生じる(36)。また EGR2 は、ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association studies、GWAS) でクローン病への関与や(37, 38)、全身性エリテマトーデスの疾患感受性に影響するなど(39)、自己免疫疾患と関連していることも明らかになっている。アナジーの誘導には CD28 共刺激の阻害が必要であるが、共刺激を阻害する薬剤として CTLA4-Ig (アバタセプト) があり、関節リウマチにおいて広く用いられている。この特徴的な作用機序を有するアバタセプトは、分子機構の解明に貢献しており(40)、注目を集めている薬剤のうちの 1 つである。

LAG3⁺ Treg

岡村らは、マウスにおいて、CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ T 細胞 (以下 LAG3⁺ Treg) が IL-10 を高産生する制御性 T 細胞であり、また Egr2 を特異的に発現しており、Naive CD4⁺ T 細胞に Egr2 を強制発現させることで LAG3⁺ Treg が誘導されることを示した(41)。また、LAG3⁺ Treg は IL-10 依存性にモデルマウスの腸炎を抑制した(41)。さらに、LAG3⁺ Treg は B 細胞による抗体産生を抑制することで全身性エリテマトーデスモデルマウスの腎炎を改善させ、またその抗体産生抑制能には Fas と Egr2 の双方が必要であることが報告された(42)。この結果を踏まえて、私は LAG3⁺ Treg がヒト末梢血にも存在し、自己免疫疾患において抑制的に作用し、関節リウマチではその頻度が低く治療で改善するという仮説を立てた。

実験目的

本研究では、ヒト末梢血中に LAG3⁺ Treg が存在するかどうかを確認した。そして、ヒト LAG3⁺ Treg がマウス LAG3⁺ Treg と同様に IL-10 を高産生し、B 細胞の抗体産生を抑制するかどうかを調べた。また、健常人と関節リウマチ患者での LAG3⁺ Treg の差をみるために、末梢血検体を解析した。さらに、アバタセプト治療前と治療 6 か月後の関節リウマチ患者の末梢血を解析し、アバタセプトが LAG3⁺ Treg に与える影響を観察した。

方 法

患者及び対照群の末梢血サンプルと臨床情報

全ての研究がヘルシンキ宣言に遵守して行われた。2013年4月から2015年7月に東京大学医学部附属病院に入院もしくは通院していた85名の関節リウマチ患者を対象とした。これらの対象は、1987年アメリカリウマチ学会関節リウマチ診断基準もしくは2010年アメリカリウマチ学会/ヨーロッパリウマチ学会関節リウマチ分類基準を満たす20歳以上の男女とした。活動性感染症や悪性腫瘍を合併している症例を除外した。臨床情報として、性別、年齢、罹患期間、これらの対象の活動性指標として Disease Activity Score 28 joints-C-reactive protein (CRP) (以下 DAS28-CRP) と Clinical Disease Activity Index (CDAI) を収集した。検査所見として、検体収集当日の CRP、Erythrocyte sedimentation rate (ESR) 1h、2週間以内の rheumatoid factor (RF) 値、1年以内の抗 cyclic citrullinated peptide (CCP) 抗体価を用いた(43, 44)。また、関節リウマチ発症1年以内で、ステロイドホルモン製剤、疾患修飾性抗リウマチ薬、生物学的製剤のいずれも使用していない患者を早期未治療患者 (Naïve RA) と定義した。CDAI を疾患活動性の指標として用いた解析では、治療の前後ともに解析を行った患者については治療前のデータを用いた。また、CTLA-4 Ig 製剤であるアバタセプトで治療を行った患者では、導入開始直前と投与6か月後に末梢血検体を採取し、リンパ球のフロ

ーサイトメトリー解析を行った。対照群として、101名の質問紙によりスクリーニングされた20歳以上の健常人男女より末梢血検体を採取し、関節リウマチ患者同様にリンパ球のフローサイトメトリー解析を行った。過去および現在において自己免疫疾患に罹患しておらず、ステロイドホルモン剤を内服していない健常人が選ばれた。関節リウマチ患者および健常人の背景をTable 1 および Table 2 に示す。また、2013年度不活化インフルエンザワクチンを接種した4名の健常人（男性3名、女性1名）より、接種直前、接種7日後、接種14日後に末梢血を採取してリンパ球解析を行った。これらの末梢血検体採取と解析は、東京大学大学院医学系研究科・医学部の倫理委員会より承認を受けている（承認番号：10154、関節リウマチ患者におけるオレンシア投与前後のT細胞サブセットの比較研究、および承認番号：G3582、ヒト免疫細胞における遺伝子多型と遺伝子発現の関連解析）。全ての被験者より書面によるインフォームド・コンセントを得た。

リンパ球分離とフローサイトメトリー解析

多くの文献では末梢血検体を冷凍凍結し後日まとめて解析を行っているが、予備実験での冷凍凍結保存検体と新鮮検体との比較では、細胞表面抗原の頻度に差が見られた。そのため、より正確な結果を得るために、全検体において採血同日にリンパ球を分離しフローサイトメトリー解析を行った。Ficoll-Paque Plus (GE healthcare) を用いた

密度勾配遠心分離法により末梢血単核球の分離を行った。単核球分離後、ammonium chloride potassium (ACK) 溶血緩衝液を用いて溶血し、Fc- γ 受容体ブロッキング試薬を用いて染色抗体の細胞表面抗原への非特異的結合を阻害した。その後、一定の細胞濃度 (1×10^6 細胞/100 μ L) に調整し、一定の染色抗体量を定めて細胞表面を染色した。使用した抗体は以下の通りである：Human Fc Receptor Binding Inhibitor Purified (eBioscience)、Alexa Fluor 488 anti-CXCR5 (clone : RF8B2、BD Biosciences)、PE anti-CCR6 (clone : 11A9、BD Biosciences)、Brilliant Violet 412 anti-CXCR3 (clone : 1C6、BD Biosciences)、V500 anti-CD4 (clone : RPA-T4、BD Biosciences)、Alexa Fluor 488 anti-CD49b (clone : AK7、BioLegend)、PerCP-Cy5.5 anti-CD3 (clone : UCHT1、BioLegend)、PerCP-Cy5.5 anti-CCR7 (clone : G043H7、BioLegend)、APC anti-CD19 (clone : HIB19、BioLegend)、APC-Cy7 anti-CD45RA (clone : HI100、BioLegend)、Brilliant Violet 421 anti-CD25 (clone : BC96、BioLegend)、PE-Cy7 anti-CD127 (clone : eBioRDR5、eBioscience)、PE anti-LAG3 (FAB2319P、R&D Systems)。表面抗原の解析および細胞の分取は8カラーフローサイトメーターである MoFlo XDP (Beckman Coulter) を用いた。米国 National Institute of Health が中心となって作成された Human Immunology Project の標準化法に則して、各種細胞サブセットの表面抗原に基づく定義を下記の通りに行った(45)。Naïve CD4⁺ T 細胞 : CD4⁺CD45RA⁺CD25⁻LAG3⁻CCR7⁺ cells、T helper (Th) 1 細胞 : CD4⁺CD45RA⁻CXCR3⁺CCR6⁻ cells、Th2 細胞 : CD4⁺CD45RA⁻CXCR3⁻CCR6⁻

cells、Th17 細胞 : $CD4^+CD45RA^-CXCR3^-CCR6^+$ cells、濾胞性 T 細胞 (Follicular helper T cells、以下 Tfh 細胞) : $CD4^+CD45RA^-CXCR5^+$ cells (Figure 2、6) または $CD4^+CD45RA^-CXCR5^+CD25^-LAG3^-$ cells (Figure 3、4、5)、 $CD25^+$ Treg : $CD4^+CD45RA^-CD25^+LAG3^-CD127^{dim}$ cells、 $LAG3^+$ Treg : $CD4^+CD45RA^-CD25^-LAG3^+$ cells、B 細胞 : $CD3^-CD19^+$ cells。 $LAG3^+$ Treg の分画採取における代表図を Figure 1A に示した。フローサイトメトリー解析は FlowJo ソフトウェア (Tree Star) を用いた。

細胞内染色

健康人の末梢血よりリンパ球を分離し、細胞表面染色の手順と同様に Fc- γ 受容体ブロッキング試薬を用いて染色抗体の細胞表面抗原への非特異的結合を阻害した。その後、一定の細胞濃度 (1×10^6 細胞/100 μ L) に調整し、一定の染色抗体量を定めて細胞表面を染色し、死細胞除去目的で 7-AAD を加えた。遠心後、1 倍濃度の FOXP3 Fix/Permeabilizaion Buffer を加えて固定後、洗浄し、FOXP3 Permeabilization Buffer を用いて細胞膜透過処理を行い、その後抗 FOXP3 抗体を加えて細胞内染色を行った。上記過程は FOXP3 細胞内染色キット (eBioscience) を用いた。このようにして作成したサンプルをフローサイトメトリーで解析を行った。

ELISA によるサイトカイン産生の検討

抗 CD3 抗体 (5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、clone : MAB100、monoclonal mouse IgG1、R&D Systems) と抗 CD28 抗体 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、clone : 37407、monoclonal mouse IgG1、R&D Systems) でプレートされた平底細胞培養用 96 穴プレート (3599、Corning) に各 T 細胞分画 (2×10^4 細胞/well) を加えて二酸化炭素濃度 5.0%、37°C のインキュベーター内で 3 日間培養したのちに上清を回収し、キットの説明書に従い Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) で行われた。IL-10、IL-17A、IFN- γ 、TGF- β 1 の検出に用いた ELISA キットは以下の通りである : OptEIA Human IL-10 ELISA Kit II (BD Biosciences) 、 Human IL-17A ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience) 、 Human IFN- γ ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience) 、 Quantiline ELISA Human TGF- β 1 (R&D Systems) 。 10% ウシ胎児血清 (Equitech-Bio) 、 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン、50 mM 2-メルカプトエタノール (Life Technologies) を加えた RPMI 1640 (Gibco) を培養液として、IL-10、IL-17A、IFN- γ の検出のための培養を行った。この培養液は T 細胞 B 細胞共培養実験およびアバタセプト添加培養の実験にも用いた。また、X-VIVO 20 (Lonza) を培養液として用いて TGF- β 1 検出のための培養を行った。

T 細胞抑制実験

健常人末梢血より得られた Naïve CD4⁺ T 細胞 (3×10^4 細胞/well) を 2 μM へ調整した Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE、Dojindo) で標識し、3000 rad で

照射した抗原提示細胞 (CD3⁻ 細胞、 1×10^5 細胞/well) や CD25⁺ Treg (3×10^4 細胞/well) と共に抗 CD3 抗体 (5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) でプレコートされた U 底細胞培養用プレートへ加えて、RPMI 1640 中で 3 日間培養後に細胞分裂した T 細胞の頻度をフローサイトメトリーで解析した。

T 細胞 B 細胞共培養実験

各 CD4⁺ T 細胞サブセット (1×10^5 細胞/well) を Tfh 細胞 (5×10^4 細胞/well) と B 細胞 (1×10^5 細胞/well) と共に U 底 96 穴細胞培養用プレートに加えた。特異的抗原刺激を模倣するため、Recombinant staphylococcal enterotoxin B (以下 SEB、Toxin Technology) を 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で各ウェルに加えた(46)。二酸化炭素濃度 5.0%、37°C のインキュベーター内で 12 日間培養後に上清を回収し、免疫グロブリン (Immunoglobulin、以下 Ig) の濃度を ELISA 法で測定した(46)。用いたキットは以下の通り： Human IgG ELISA Quantitation Set、Human IgA ELISA Quantitation Set、Human IgM ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories)。また、ブロッキング抗体 (anti-human IL-10 mAb、anti-human Fas-Ligand mAb: R&D Systems) を用いて、mouse IgG1 κ isotype control (eBioscience) をコントロールとして各 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で上記の系に投与し、それぞれの阻害による影響を調べた。制御性 T 細胞の抗体産生抑制能に細胞間接触が必要か否かを調べるために、Transwell (HTS Transwell-96 Well Plate 3381、Corning) を使い、B 細胞 (3×10^5 細

胞/well) 、Tfh 細胞 (2×10^5 細胞/well) 、LAG3⁺ Treg (1×10^5 細胞/well) を加えて上記の系を同様に行った。

96穴細胞培養用プレート

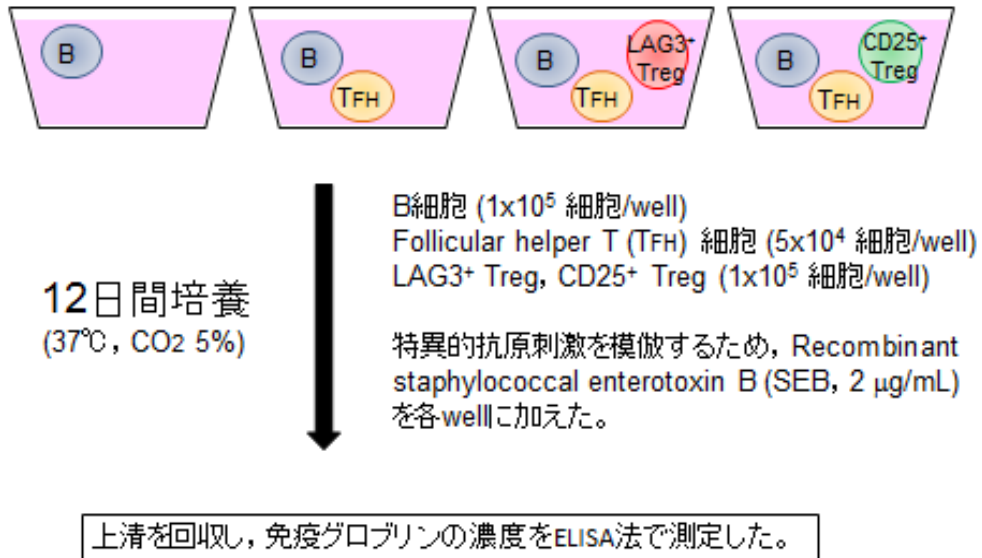


Figure S1 共培養実験系

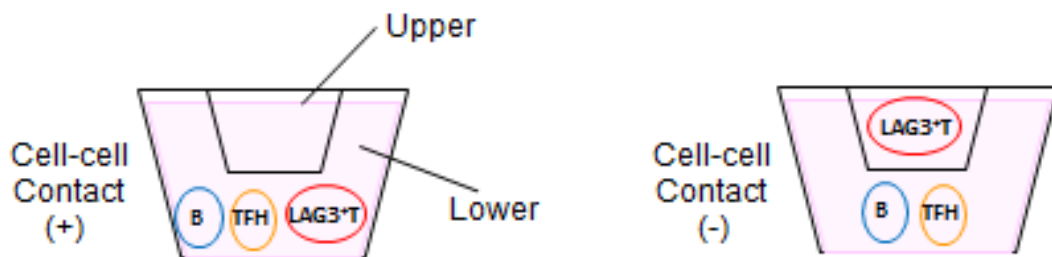


Figure S2 Transwell を用いた共培養実験系

アバタセプト存在下での培養実験

アバタセプトの T 細胞分化への影響を調べるために、健康人末梢血より得られた Naïve CD4⁺ T 細胞 (2x10⁵ 細胞/well) あるいは CD4⁺ T 細胞 (2x10⁵ 細胞/well) を放射線照射 (3000 rad) した抗原提示細胞 (CD3⁻ 細胞、3x10⁵ 細胞/well) と共に、抗 CD3 抗体 (1.0 µg/mL) でプレコートされた平底 96 穴細胞培養用プレートへ加え、二酸化炭素濃度 5.0%、37°C のインキュベーター内で 4 日間培養した。このようにして得られた細胞を 7-AAD で染色し、フローサイトメトリーで解析した。また、このように得られた培養細胞 (1x10⁵ 細胞/well) を、前述の共培養の系と同様に、Tfh 細胞 (5x10⁴ 細胞/well) と B 細胞 (1x10⁵ 細胞/well) と共に U 底 96 穴細胞培養用プレートに加えた。特異的抗原刺激を模倣するため、Recombinant staphylococcal enterotoxin B (以下 SEB、Toxin Technology) を 2 µg/mL の濃度で各ウェルに加えた。二酸化炭素濃度 5.0%、37°C のインキュベーター内で 12 日間培養後に上清を回収し、免疫グロブリン (Immunoglobulin、以下 Ig) の濃度を ELISA 法で測定した。

培養液はその他の実験同様に調整された RPMI 1640 を用いた。アバタセプトは臨床でも用いられているものと同じ製品 (オレンシア®) を Bristol-Myers より購入し、10 µg/mL の濃度で各ウェルへ加えた(47)。コントロールとして Human IgG1 Fc (R&D Systems) を使用した。

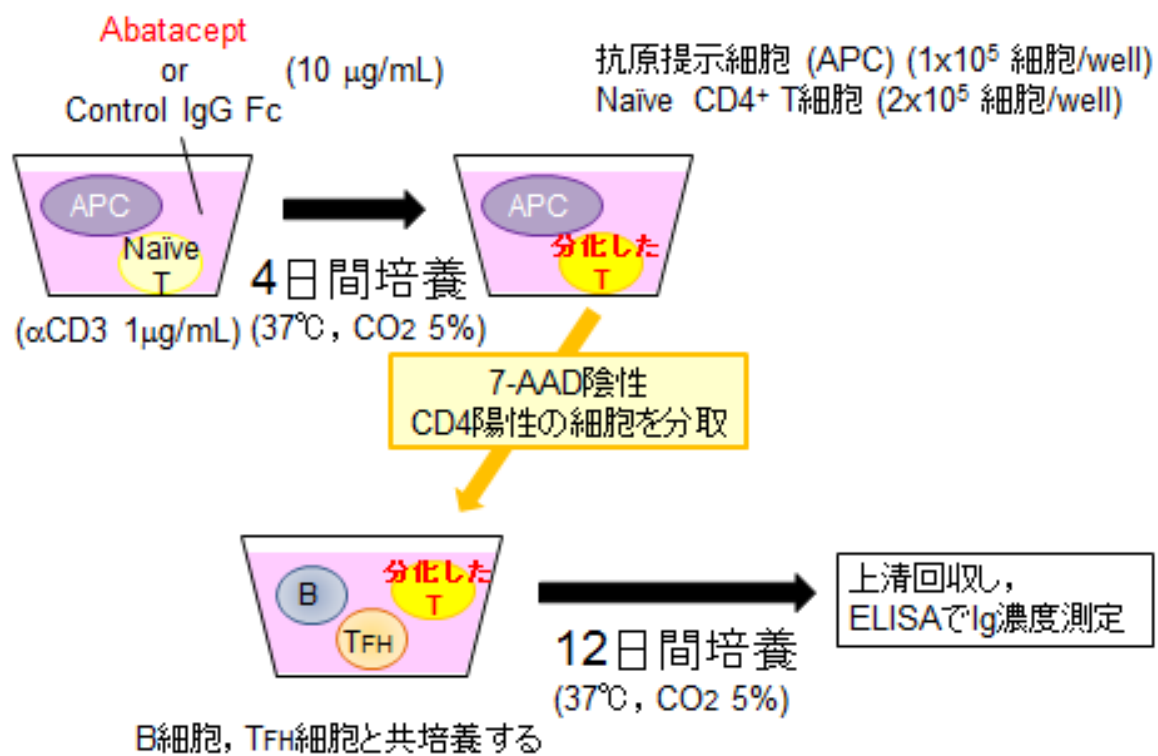


Figure S3 アバタセプト存在下の培養実験

定量的リアルタイム PCR

上記アバタセプト存在下で4日間培養して得られた培養細胞から、RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて説明書に従って RNA を抽出した。その後、random primers (Invitrogen) と Superscript III (Invitrogen) を用いて RNA を逆転写し、cDNA を合成した。SYBR Green Master Mix (Qiagen) と EGR2 遺伝子のプライマー (forward 5'-(TGGAGAGAAGAGGTCGTTGG)-3'、reverse 5'-(CTGGATGAGGCGGTGGTTG)-3') を用いて cDNA サンプルとあわせ、iCycler (Bio-Rad) を用いて定量的 PCR 行った。また、ハウスキーピング遺伝子として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (forward 5'-(GAAGGTGAAGGTCGGAGTC)-3'、reverse 5'-(GAAGATGGTGATGGGATTTC)-3') を使用した。

統計学的分析

平均値±標準偏差でデータを表記した。統計学的有意差の判定には、2群間の比較においては unpaired two-tailed Student's *t*-test、Mann-Whitney U test を用い、3群間の比較においては Wilcoxon signed-rank test、Tukey's multiple comparison test を用いた。有意水準は 5%として検定し、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ のように記載した。統計解析には GraphPad Prism version 5.03 (GraphPad Software Inc.) および R version 3.1.2 (R Foundation for Statistical Computing) を利用した。

結 果

ヒト末梢血中の LAG3⁺ Treg は IL-10 を高産生し、抗体産生を抑制する

ヒト末梢血より単核球を分離し、LAG3⁺ Treg の集団の存在を確認した (Figure 1A)。
CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞 (以下、CD25⁺ Treg) を比較対照のために分取し、
以後の実験を行った。比較対照集団のゲーティングの妥当性を検証するために、これ
らの T 細胞抑制能の確認と FOXP3 の細胞内染色を行った。その結果、CD25⁺ Treg は
T 細胞の分裂を抑制し (Figure 1B) 、また FOXP3 を発現しており (Figure 1C) 、今ま
での報告で示されている CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg 集団と同じであることを確認した。

培養上清で ELISA を行ったところ、LAG3⁺ Treg は IL-10 を高産生し、IFN- γ も Th1
細胞と同程度分泌し、IL-17A は産生しておらず (Figure 2A、2B) 、これらはマウスと
同様の結果であった。次に、マウス LAG3⁺ Treg の特徴である B 細胞の抗体産生抑制
能を調べるために、B 細胞と Tfh 細胞との共培養を行った。抗原特異的な作用を模倣
するために SEB を用いた。その結果、LAG3⁺ Treg は有意に IgG 産生を抑制していた
(Figure 3A) 。また、CD4⁺CD25⁻LAG3⁻ T 細胞では抑制されなかったことから、抗体産
生抑制能を有するには LAG3 が陽性であることが必要だといえる。また、LAG3⁺ Treg
は IgM と IgA の産生も抑制しており (Figure 3B) 、クラススイッチに関わる過程を阻
害しているのではなく免疫グロブリン産生そのものを抑制していることを示唆して

いる。Gagliani らは、IL-10 産生 Tr1 細胞のなかでも LAG3⁺CD49b⁺ 細胞が T 細胞増殖抑制能をもつと報告していることから(22)、CD49b を発現していることが抗体産生抑制に必要か否かを調べた。その結果、CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ T 細胞においては CD49b が陰性でも抗体産生を有意に抑制していた (Figure 3C)。

LAG3⁺ Treg の抗体産生抑制には細胞間接触が必要である

LAG3⁺ Treg が抗体産生抑制能を発揮するためには、細胞間接触が必要かを調べるために、細胞集団を分離して培養することのできる Transwell を用いて B 細胞・Tfh 細胞との共培養実験を行った。その結果、LAG3⁺ Treg と他の細胞との接触を断つと抑制能が有意に解除された (Figure 4)。マウスでは Fas 関連アポトーシスが LAG3⁺ Treg の抗体産生抑制能に関わっている(41)。これをもとに、私はブロッキング抗体を用いた共培養実験を行った。その結果、LAG3⁺ Treg は抗 IL-10 抗体を加えてもその抗体産生抑制能が解除されなかったが、抗 Fas リガンド抗体を加えると抗体産生抑制能が解除された (Figure 5)。これは、LAG3⁺ Treg の抗体産生抑制能には IL-10 が依存しない可能性や Fas の関与の可能性が示唆される結果となった。これらのことから、LAG3⁺ Treg が抗体産生抑制能を示すには細胞間接触が必要だといえる。

ワクチン接種により LAG3⁺ Treg に変化が生じる

ワクチン接種を行うと、次の抗原侵入時に即時に対応できるように抗原に対する免疫応答が惹起される。LAG3⁺ Treg が免疫応答に関与しているかどうかを調べるために、私は 2013 年季節性インフルエンザワクチン接種を 4 名の健常人へ行い、接種直前、day7、day14 でそれぞれ末梢血を採取し、その中での LAG3⁺ Treg の変化をみた (Figure 6)。その結果、4 名の被験者ともに day7 には LAG3⁺ Treg の割合は減少し、day14 には接種直前と同程度へ戻っていた。この結果より、LAG3⁺ Treg はヒトにおける能動免疫応答にも関与するサブセットであることが示唆された。

LAG3⁺ Treg は関節リウマチ患者で少なく、特に疾患活動性が高い患者で減少する

101 名の健常人ボランティアと 85 名の関節リウマチ患者の末梢血中の LAG3⁺ Treg を調べた (Table 1)。健常人群が 39.3±10.7 歳、関節リウマチ患者群が 58.9±13.1 歳と年齢には有意差を認めた (p<0.001)。解析結果として、LAG3⁺ Treg の CD4⁺ T 細胞中における頻度は健常人では 5.07±2.78%、関節リウマチ患者では 3.76±2.72%と、関節リウマチ患者で有意に少なかった (P<0.001、Figure 7A)。さらに未治療の関節リウマチ患者では LAG3⁺ Treg は 3.51±2.18%であり、こちらも健常人と比して有意に少なかった (P<0.05、Figure 7B)。また、CD25⁺ Treg の頻度は関節リウマチ患者全体では健常人のそれと比べて少なかったが (P<0.05、Figure 7A)、未治療患者では有意差は見られなかった (Figure 7B)。CDAI を疾患活動性の指標として用いて検討したところ (カ

ットオフ値：10)、疾患活動性の高い群では低い群よりも LAG3⁺ Treg が有意に少なかった (P<0.05)。一方で、CD25⁺ Treg の頻度に有意差を認めなかった (Figure 7C)。

アバタセプト治療後の関節リウマチ患者では LAG3⁺ Treg が増加する

関節リウマチ患者 18 名を対象に、アバタセプト投与前後で末梢血中の LAG3⁺ Treg を解析した (Table 2)。LAG3⁺ Treg の頻度がアバタセプト治療 6 か月後では治療前と比べて有意に増加した (P<0.01、Figure 8A)。対照的に、CD25⁺ Treg はアバタセプト治療 6 か月後には治療前と比べて有意に減少しており (P<0.05、Figure 8A)、この結果は他の報告と同様であった(47-49)。さらに、アバタセプト投与患者において DAS28-CRP の変化を指標として治療反応性をみたところ (カットオフ値：1.4)、治療反応良好群では LAG3⁺ Treg の増加の程度が有意に大きかった (P<0.05、Figure 8B)。

アバタセプトは LAG3⁺ Treg 様細胞への分化を促進する

前述の結果を踏まえて、私はアバタセプトによって LAG3⁺ Treg 様細胞への分化が促進されるという仮説を立て、*in vitro* で実験を行った。Naïve CD4⁺ T 細胞を健常人末梢血から分取し、アバタセプトを加えて 4 日後に再度フローサイトメトリーを用いて解析を行った。すると、アバタセプトを加えて培養した群ではコントロール群に比して有意に LAG3⁺ Treg が増加していた (P<0.0001、Figure 9A)。このように培養した細

胞を分取して EGR2 の発現を調べたところ、アバタセプト投与群では EGR2 の mRNA が有意に上昇していた ($P < 0.01$, Figure 9B)。また、これらの培養細胞を B 細胞、Tfh 細胞と共に培養したところ、アバタセプト存在下で培養した T 細胞はコントロール群に比して有意に抗体産生を抑制していた ($P < 0.0001$, Figure 9C)。以上の結果から、アバタセプト存在下では、培養細胞の EGR2 の発現が高く、LAG3⁺ Treg 様の表現型と抑制能を付与することが示された。

考 察

本研究では、マウスで同定された LAG3⁺ Treg と同等の細胞が、ヒト末梢血中に存在することを示した。ヒト LAG3⁺ Treg は、マウス LAG3⁺ Treg と同様に IL-10 を高産生し、B 細胞の抗体産生抑制能を示した。なお、私は以前にマウス同様にヒト末梢血 LAG3⁺ Treg でも EGR2 発現が他の細胞集団と比較して有意に亢進していることを確認している(42)。代表的な制御性 T 細胞である CD25⁺ Treg は、CTLA-4 を介して抗原提示細胞の機能を抑制することも知られているが(50)、本研究において、LAG3⁺ Treg は CD25⁺ Treg よりも明らかに強力な抗体産生抑制能を認めた。また、Gagliani らによると、ヒト IL-10 産生制御性 T 細胞を LAG3 と CD49b の共発現により同定しているが(22)、本研究では、抗体産生抑制能には CD49b の発現は必要なく、LAG3 単独でヒト IL-10 産生制御性 T 細胞を定義できた。私の検討では、CD49b 陽性率は Gagliani らの検討に比してはるかに低く、細胞集団を同定すること自体が困難であった。また、LAG3⁺ Treg が抗体産生抑制能を有するには次に述べる細胞間接触が必要であることを考えると、極めて少ない細胞集団では細胞同士の接触の機会が減るため、抗体産生抑制能を有する LAG3⁺ Treg を LAG3 単独で定義することは妥当であると考えている。

自己免疫疾患を引き起こす要因は多く知られているが、Fas 遺伝子変異もそのひとつである。Fas は TNF 受容体ファミリーの一種で(51, 52)、Fas リガンドは TNF と類似

している膜貫通タンパクであり(53, 54)、これらが結合することでアポトーシスが誘導される(55)。Fas・Fas リガンドの突然変異である *lpr*・*gld* は劣性遺伝子であり、これらのホモ個体は生後よりダブルネガティブ ($CD4^+CD8^-$) T 細胞がリンパ組織へ異常に集積し、自己反応性 T リンパ球のアポトーシスが阻害され、抗 DNA 抗体を産生されることで免疫複合体沈着による糸球体腎炎、脾腫、リンパ節腫脹、唾液腺炎といったループス様症状を呈する(56-58)。マウス $LAG3^+$ Treg に関する検討において、B6/*lpr* マウス由来の $LAG3^+$ Treg では抗体産生抑制能が消失するが、B6/*gld* マウスでは抗体産生抑制能が保たれることから、 $LAG3^+$ Treg 上に発現している Fas が B 細胞の抗体産生抑制に重要であることが明らかになっている(42)。本研究において、ヒト $LAG3^+$ Treg の抗体産生抑制能の発揮には細胞同士の接触が必要であり、Fas リガンドを阻害することでその抑制能が解除されることを示した。これにより、ヒト $LAG3^+$ Treg による抗体産生抑制には、Fas-Fas リガンドの相互作用が関与することが推察された。

一般に生体内ではワクチン接種によって接種抗原に対する抗体産生が促される。

$CD25^+FOXP3^+$ Treg に関しては、インフルエンザワクチンを投与するとマウスでもヒトでも接種後に一過性に上昇するという報告があるが(59-61)、ヒト IL-10 産生制御性 T 細胞については報告がない。健常人にインフルエンザワクチン接種を行ったところ、 $CD25^+$ Treg は他の報告同様に有意差は認めないが上昇傾向があり、 $LAG3^+$ Treg が一過性に減少していたことが確認された。このことは、末梢血中の $LAG3^+$ Treg が能動

免疫に関与するサブセットであることを示唆し、抗体産生細胞の増加を考えればこのような変化は妥当であると考えられる。

自己免疫疾患におけるヒト LAG3⁺ Treg の動態を把握するために、私は関節リウマチ患者末梢血中の LAG3⁺ Treg について検討した。関節リウマチ患者では健常人よりも LAG3⁺ Treg が有意に少なく、特に活動性が高い関節リウマチ患者で LAG3⁺ Treg が減少していた。Alvarado らは CD25⁺ Treg や Tr1 細胞について健常人、関節リウマチ患者、全身性エリテマトーデス患者において比較を行っているが、それぞれに有意差は無かったと報告している(62)。さらに、関節リウマチ患者では CD25⁺ Treg が低下する(63)、不変である(64)、上昇する(65)、といった様々な報告がありその細胞比率については一定の見解が得られておらず、疾患活動性との関連も定まっていない。LAG3⁺ Treg の抗体産生抑制能を持つが、関節リウマチは抗 CCP 抗体やリウマトイド因子などの自己抗体が病態に関わっており、これらを抑制していると考えられる。また、LAG3⁺ Treg はそれが産生する IL-10 によって、関節リウマチの関節炎を抑えている可能性がある。自己免疫疾患の関節炎では Th17 細胞が病態に深く関わっており(66)、Th17 細胞は早期関節リウマチでは matrix metalloproteinases (MMP) を誘導したり(67)、破骨細胞を増加させたりする(68)。一方、IL-10 が関節炎症状に抑制的に働くことが示されており、IL-10 受容体欠損マウスでは、免疫後の Tfh 細胞からの IL-21、IL-17 産生が亢進し、Tfh 細胞の過剰な分化および抗体産生の亢進を認める(69)。また、コラ

ーゲン誘導関節炎モデルマウスにおいて IL-10 が Th17 細胞を抑制することで症状を減弱させたり(70)、Tr1 細胞が IL-10 産生を介して Th17 細胞を抑制したりすることが報告されており(71)、LAG3⁺ Treg が IL-10 を分泌して Th17 細胞を抑制して関節リウマチの炎症を抑えらる。関節リウマチの病勢に従って LAG3⁺ Treg の頻度が減少するのは、LAG3⁺ Treg の IL-10 による炎症抑制と抗体産生抑制が得られない結果と考えられる。

本研究では、共刺激分子阻害薬であるアバタセプトによる加療によって、関節リウマチ患者の LAG3⁺ Treg が有意に増加していた。また、Naive CD4⁺ T 細胞と抗原提示細胞との共培養において、アバタセプトを投与した群ではコントロール群と比較して CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ T 細胞が増加し、EGR2 の発現が有意に上昇していた。そして、アバタセプト存在下で培養した細胞は抗体産生抑制能を付与していたため、LAG3⁺ Treg 様の細胞へと分化したといえる。Egr2 は LAG3⁺ Treg を制御しているアナジー関連遺伝子である(33)。アナジーは T 細胞受容体刺激を受けた T 細胞が CD28 を介した共刺激が阻害されることにより惹起される(72, 73)。アバタセプトは CTLA4-Ig 製剤であり、抗原提示細胞の B7 と結合することで T 細胞の共刺激を阻害する(74)。本研究結果を考えると、アバタセプトは Naive CD4⁺ T 細胞の CD28 共刺激を阻害し、EGR2 の発現を上昇させ、LAG3⁺ Treg 様細胞を誘導することで関節リウマチの治療に関与している可能性が推測された。

アバタセプトと LAG3⁺ Treg の関連について、その他の可能性も考えられる。転写因子 FOXO3 は EGR2 と結合して T 細胞の免疫寛容を維持するが(75)、CD28 共刺激が入ると FOXO3 が AKT によりリン酸化され、トランスクリプターの破綻が生じる(75)。アバタセプトは CD28 共刺激を阻害することで EGR2 の転写を保ち、EGR2 に制御されている LAG3⁺ Treg が増加する可能性がある。また、樹状細胞が産生する IL-27 が Naive CD4⁺ T 細胞を IL-10 産生制御性 T 細胞へと分化させるという報告や(16)、治療に反応する関節リウマチ患者ではプラズマ細胞様樹状細胞によって IL-10 産生制御性 T 細胞が誘導されるという報告から(76)、LAG3⁺ Treg も樹状細胞からの何らかの刺激が加わることで誘導され、アバタセプトがそれを補助している可能性も考えられる。アバタセプトは関節リウマチにおいて、Tfh 細胞の割合を減少させ、B 細胞受容体シグナルに重要な役割を果たす Syk のリン酸化値を減少させるため、この薬剤が B 細胞と Tfh 細胞の相互作用を標的とすることが明らかになっている(77)。関節リウマチに対してアバタセプトを投与すると抗 CCP 抗体やリウマトイド因子などの自己抗体が減少し(78, 79)、IgG も減少する(78)。また、アバタセプトでの治療により、関節リウマチとシェーグレン症候群との合併症例で IgG やリウマトイド因子が減少し(80)、全身性エリテマトーデスの合併症例でも IgG や抗 DNA 抗体が減少する(81)。さらには 1 次性シェーグレン症候群への投与でも IgG やリウマトイド因子が減少することから(82)、関節リウマチにおいてもそれ以外の自己免疫疾患においても、アバタセプトが LAG3⁺

Treg の誘導を介して自己抗体を抑制している可能性がある。

本研究には制限がある。LAG3⁺ Treg の抗体産生抑制能を示す実験において、ブロッキング抗体を用いたが、これのみでは IL-10 や Fas リガンドの寄与が絶対的なものとは断定することはできない。本研究では LAG3⁺ Treg の抗体産生抑制能は抗 IL-10 抗体によっては解除されなかったが、IL-10 が Tfh 細胞を抑制するという報告もあり (69)、IL-10 による抑制性の働きを示している可能性は否定できない。健常人と患者間の比較では、関節リウマチ未治療患者の検体数が 16 名と少ないため、健常人との LAG3⁺ Treg の差をより正確に示すためにはさらなる症例の集積が必要である。また、関節液・滑膜の解析を行っていないため、LAG3⁺ Treg が炎症局所ではどのような動態を示すかが明らかとなっておらず、同細胞の病態への直接的な関与が明確になっていない。また、他の薬剤でもアバタセプトと同様に LAG3⁺ Treg が治療後に増加するのかは解析症例不足のため不明である。

免疫寛容を司る制御性 T 細胞は、自己免疫疾患の発症・治癒に深く関与しており、その機能解析や疾患における動態、分化誘導機構の解明は自己免疫疾患の病態解明に重要である。本研究で明らかとなった、ヒト末梢血中の LAG3⁺ Treg の抗体産生抑制能や、関節リウマチ患者における LAG3⁺ Treg の減少、アバタセプトによる LAG3⁺ Treg の増加は、関節リウマチに対してアバタセプトでの治療を行う根拠となり、さらに自己免疫疾患の治療法の開発へとつながることが期待される。

参考文献

1. Yamanaka H, Sugiyama N, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S. Estimates of the prevalence of and current treatment practices for rheumatoid arthritis in Japan using reimbursement data from health insurance societies and the IORRA cohort (I). *Mod Rheumatol*. 2014 Jan;24(1):33-40.
2. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011 Dec 8;365(23):2205-19.
3. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014 Feb 20;506(7488):376-81.
4. Smolen JS, Aletaha D, Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Apr;8(4):235-43.
5. 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. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
6. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.

7. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6.
8. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):20-1.
9. Schorle H, Holtschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature.* 1991 Aug 15;352(6336):621-4.
10. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁽⁺⁾ CD25⁽⁺⁾ CD4⁽⁺⁾ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med.* 2005 Mar 7;201(5):723-35.
11. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science.* 2008 Oct 10;322(5899):271-5.
12. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997 Oct 16;389(6652):737-42.
13. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, et al. In vitro

generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002 Mar 4;195(5):603-16.

14. Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature.* 2003 Jan 23;421(6921):388-92.

15. Battaglia M, Stabilini A, Draghici E, Gregori S, Mocchetti C, Bonifacio E, et al. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes.* 2006 Jan;55(1):40-9.

16. Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1380-9.

17. Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol.* 2010 Sep;11(9):854-61.

18. Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1372-9.

19. Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Front Immunol.* 2012;3:30.
20. Pot C, Apetoh L, Kuchroo VK. Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Semin Immunol.* 2011 Jun;23(3):202-8.
21. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010 Mar;10(3):170-81.
22. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.* 2013 Jun;19(6):739-46.
23. Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, Bruniquel D, Donini S, El-Tayar N, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27;94(11):5744-9.
24. Woo SR, Li N, Bruno TC, Forbes K, Brown S, Workman C, et al. Differential subcellular localization of the regulatory T-cell protein LAG-3 and the coreceptor CD4. *Eur J Immunol.* 2010 Jun;40(6):1768-77.
25. Huard B, Prigent P, Pages F, Bruniquel D, Triebel F. T cell major histocompatibility complex class II molecules down-regulate CD4+ T cell clone responses following LAG-3 binding. *Eur J Immunol.* 1996 May;26(5):1180-6.

26. Miyazaki T, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Independent modes of natural killing distinguished in mice lacking Lag3. *Science*. 1996 Apr 19;272(5260):405-8.
27. Okazaki T, Okazaki IM, Wang J, Sugiura D, Nakaki F, Yoshida T, et al. PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. *J Exp Med*. 2011 Feb 14;208(2):395-407.
28. Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*. 2003 May;3(5):383-91.
29. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 2005 Oct;5(10):772-82.
30. Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jan;2(1):11-9.
31. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*. 1995 Jun 16;81(6):935-46.
32. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. 1995 Jun 2;268(5215):1347-9.
33. Safford M, Collins S, Lutz MA, Allen A, Huang CT, Kowalski J, et al. Egr-2 and

Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol.* 2005 May;6(5):472-80.

34. Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, et al. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature.* 1994 Oct 27;371(6500):796-9.

35. Shy ME, Garbern JY, Kamholz J. Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective. *Lancet Neurol.* 2002 Jun;1(2):110-8.

36. Zhu B, Symonds AL, Martin JE, Kioussis D, Wraith DC, Li S, et al. Early growth response gene 2 (Egr-2) controls the self-tolerance of T cells and prevents the development of lupuslike autoimmune disease. *J Exp Med.* 2008 Sep 29;205(10):2295-307.

37. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet.* 2007 May;39(5):596-604.

38. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007 Jun 7;447(7145):661-78.

39. Myouzen K, Kochi Y, Shimane K, Fujio K, Okamura T, Okada Y, et al. Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet.* 2010 Jun 1;19(11):2313-20.

40. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, et al. AUTOIMMUNE

DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science*. 2015 Jul 24;349(6246):436-40.

41. Okamura T, Fujio K, Shibuya M, Sumitomo S, Shoda H, Sakaguchi S, et al. CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):13974-9.

42. Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Nakachi S, et al. TGF-beta3-expressing CD4⁺CD25⁽⁻⁾LAG3⁺ regulatory T cells control humoral immune responses. *Nat Commun*. 2015;6:6329.

43. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995 Jan;38(1):44-8.

44. Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR. Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis Rheum*. 1980 Feb;23(2):137-45.

45. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012 Mar;12(3):191-200.

46. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ T cells are counterparts of T follicular cells and contain

specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011 Jan 28;34(1):108-21.

47. Pieper J, Herrath J, Raghavan S, Muhammad K, Vollenhoven R, Malmstrom V. CTLA4-Ig (abatacept) therapy modulates T cell effector functions in autoantibody-positive rheumatoid arthritis patients. *BMC Immunol*. 2013;14:34.

48. Alvarez-Quiroga C, Abud-Mendoza C, Doniz-Padilla L, Juarez-Reyes A, Monsivais-Urenda A, Baranda L, et al. CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol*. 2011 Aug;31(4):588-95.

49. Scarsi M, Zanotti C, Chiarini M, Imberti L, Piantoni S, Frassi M, et al. Reduction of peripheral blood T cells producing IFN-gamma and IL-17 after therapy with abatacept for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2014 Mar-Apr;32(2):204-10.

50. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):303-10.

51. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*. 1989 Jul

21;245(4915):301-5.

52. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1989 May 1;169(5):1747-56.

53. Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med.* 1994 Mar 1;179(3):873-9.

54. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell.* 1993 Dec 17;75(6):1169-78.

55. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 1991 Jul 26;66(2):233-43.

56. Seaman WE, Wofsy D, Greenspan JS, Ledbetter JA. Treatment of autoimmune MRL/lpr mice with monoclonal antibody to Thy-1.2: a single injection has sustained effects on lymphoproliferation and renal disease. *J Immunol.* 1983 Apr;130(4):1713-8.

57. Nose M, Nishihara M, Kamogawa J, Terada M, Nakatsuru S. Genetic basis of autoimmune disease in MRL/lpr mice: dissection of the complex pathological manifestations and their susceptibility loci. *Rev Immunogenet.* 2000;2(1):154-64.

58. Nishihara M, Terada M, Kamogawa J, Ohashi Y, Mori S, Nakatsuru S, et al. Genetic basis of autoimmune sialadenitis in MRL/lpr lupus-prone mice: additive and hierarchical properties of polygenic inheritance. *Arthritis Rheum.* 1999 Dec;42(12):2616-23.
59. Brincks EL, Roberts AD, Cookenham T, Sell S, Kohlmeier JE, Blackman MA, et al. Antigen-specific memory regulatory CD4+Foxp3+ T cells control memory responses to influenza virus infection. *J Immunol.* 2013 Apr 1;190(7):3438-46.
60. Wang SM, Tsai MH, Lei HY, Wang JR, Liu CC. The regulatory T cells in anti-influenza antibody response post influenza vaccination. *Hum Vaccin Immunother.* 2012 Sep;8(9):1243-9.
61. Bedoya F, Cheng GS, Leibow A, Zakhary N, Weissler K, Garcia V, et al. Viral antigen induces differentiation of Foxp3+ natural regulatory T cells in influenza virus-infected mice. *J Immunol.* 2013 Jun 15;190(12):6115-25.
62. Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, Baranda L, Layseca-Espinosa E, Abud-Mendoza C, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2006 Sep;27(2):110-8.
63. Kawashiri SY, Kawakami A, Okada A, Koga T, Tamai M, Yamasaki S, et al. CD4+CD25(high)CD127(low/-) Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2011 Dec;38(12):2517-21.

64. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med*. 2004 Aug 2;200(3):277-85.
65. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 2004 Sep;50(9):2775-85.
66. Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H, et al. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Oct;62(10):2876-85.
67. van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, Mus AM, Colin EM, Hazes JM, et al. Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis Rheum*. 2011 Jan;63(1):73-83.
68. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2673-82.
69. Cai G, Nie X, Zhang W, Wu B, Lin J, Wang H, et al. A regulatory role for IL-10

receptor signaling in development and B cell help of T follicular helper cells in mice. *J Immunol.* 2012 Aug 1;189(3):1294-302.

70. Ye L, Wen Z, Li Y, Chen B, Yu T, Liu L, et al. Interleukin-10 attenuation of collagen-induced arthritis is associated with suppression of interleukin-17 and retinoid-related orphan receptor gamma production in macrophages and repression of classically activated macrophages. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(2):R96.

71. Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'Connor W, Jr., Huber FJ, Chaudhry A, et al. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity.* 2011 Apr 22;34(4):554-65.

72. Borde M, Barrington RA, Heissmeyer V, Carroll MC, Rao A. Transcriptional basis of lymphocyte tolerance. *Immunol Rev.* 2006 Apr;210:105-19.

73. Fathman CG, Lineberry NB. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol.* 2007 Aug;7(8):599-609.

74. Fiocco U, Sfriso P, Oliviero F, Pagnin E, Scagliori E, Campana C, et al. Co-stimulatory modulation in rheumatoid arthritis: the role of (CTLA4-Ig) abatacept. *Autoimmun Rev.* 2008 Oct;8(1):76-82.

75. Gao B, Kong Q, Kemp K, Zhao YS, Fang D. Analysis of sirtuin 1 expression reveals

a molecular explanation of IL-2-mediated reversal of T-cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 17;109(3):899-904.

76. Kavousanaki M, Makrigiannakis A, Boumpas D, Verginis P. Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: induction of interleukin-10-producing Treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy. *Arthritis Rheum*. 2010 Jan;62(1):53-63.

77. Iwata S, Nakayamada S, Fukuyo S, Kubo S, Yunoue N, Wang SP, et al. Activation of Syk in peripheral blood B cells in patients with rheumatoid arthritis: a potential target for abatacept therapy. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Jan;67(1):63-73.

78. Scarsi M, Paolini L, Ricotta D, Pedrini A, Piantoni S, Caimi L, et al. Abatacept reduces levels of switched memory B cells, autoantibodies, and immunoglobulins in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2014 Apr;41(4):666-72.

79. Emery P, Durez P, Dougados M, Legerton CW, Becker JC, Vratsanos G, et al. Impact of T-cell costimulation modulation in patients with undifferentiated inflammatory arthritis or very early rheumatoid arthritis: a clinical and imaging study of abatacept (the ADJUST trial). *Ann Rheum Dis*. 2010 Mar;69(3):510-6.

80. Tsuboi H, Matsumoto I, Hagiwara S, Hirota T, Takahashi H, Ebe H, et al. Efficacy and safety of abatacept for patients with Sjogren's syndrome associated with rheumatoid

arthritis: rheumatoid arthritis with orencia trial toward Sjogren's syndrome Endocrinopathy (ROSE) trial-an open-label, one-year, prospective study-Interim analysis of 32 patients for 24 weeks. *Mod Rheumatol.* 2015 Mar;25(2):187-93.

81. Ikeda K, Sanayama Y, Makita S, Hosokawa J, Yamagata M, Nakagomi D, et al. Efficacy of abatacept for arthritis in patients with an overlap syndrome between rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:697525.

82. Meiners PM, Vissink A, Kroese FG, Spijkervet FK, Smitt-Kamminga NS, Abdulahad WH, et al. Abatacept treatment reduces disease activity in early primary Sjogren's syndrome (open-label proof of concept ASAP study). *Ann Rheum Dis.* 2014 Jul;73(7):1393-6.

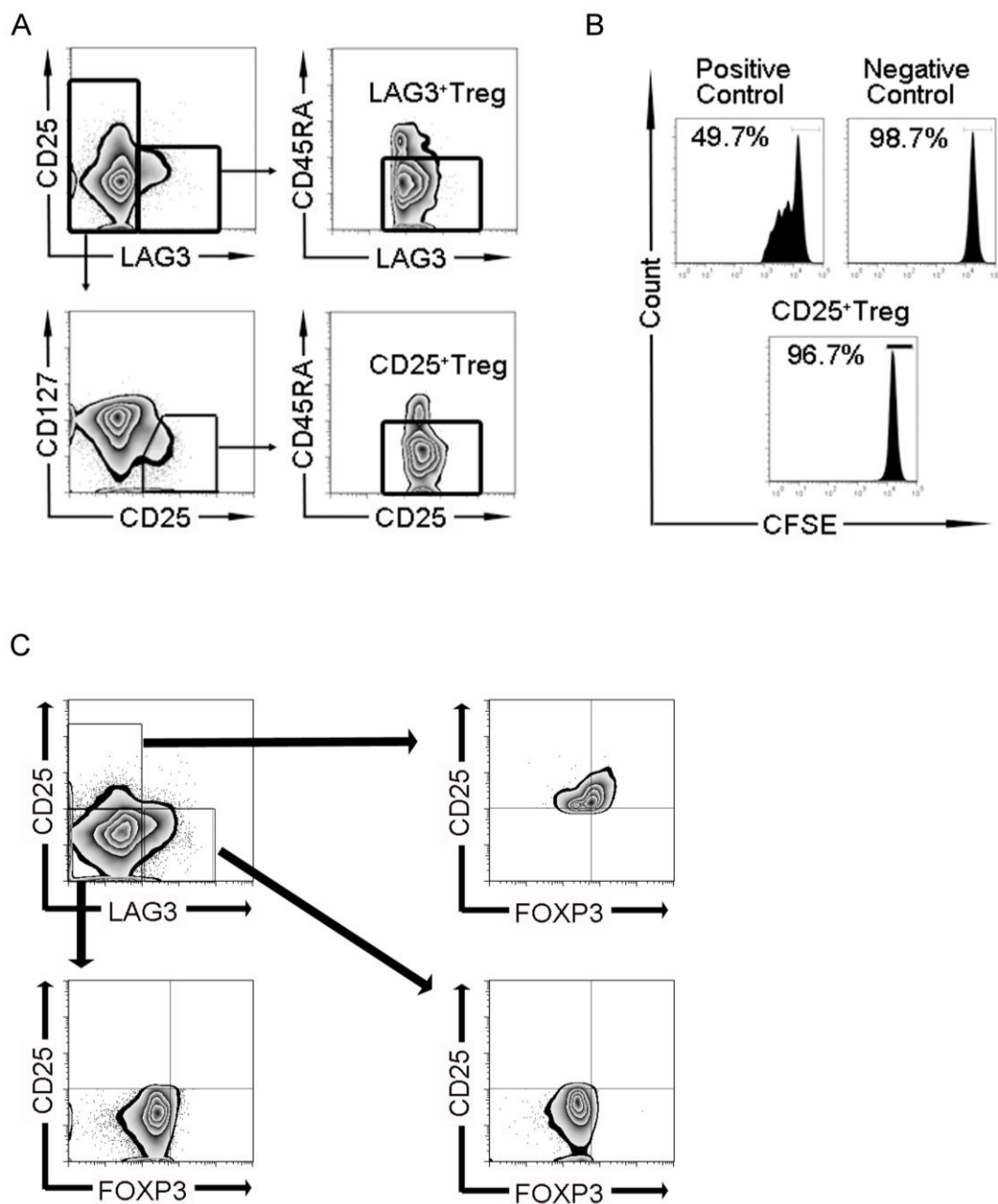


Figure 1. LAG3⁺ Treg と CD25⁺ Treg の定義

図のとおり LAG3⁺ Treg (CD4⁺CD45RA⁻CD25⁺LAG3⁺ cells)、CD25⁺ Treg (CD4⁺CD45RA⁻CD25⁺LAG3⁻CD127^{dim} cells) を定義して以後の実験では分取した (A)。また、この定義の妥当性を調べるために CD25⁺ Treg を Naïve CD4⁺ T 細胞 (CD4⁺CD45RA⁺CD25⁻LAG3⁻CCR7⁺ cells) と抗原提示細胞 (CD3⁻ cells) と共培養し、CD25⁺ Treg が T 細胞の増殖抑制能を持つことを確認した (B)。CD25⁺ Treg のマスター遺伝子である FOXP3 の発現を細胞内染色により観察した (C)。

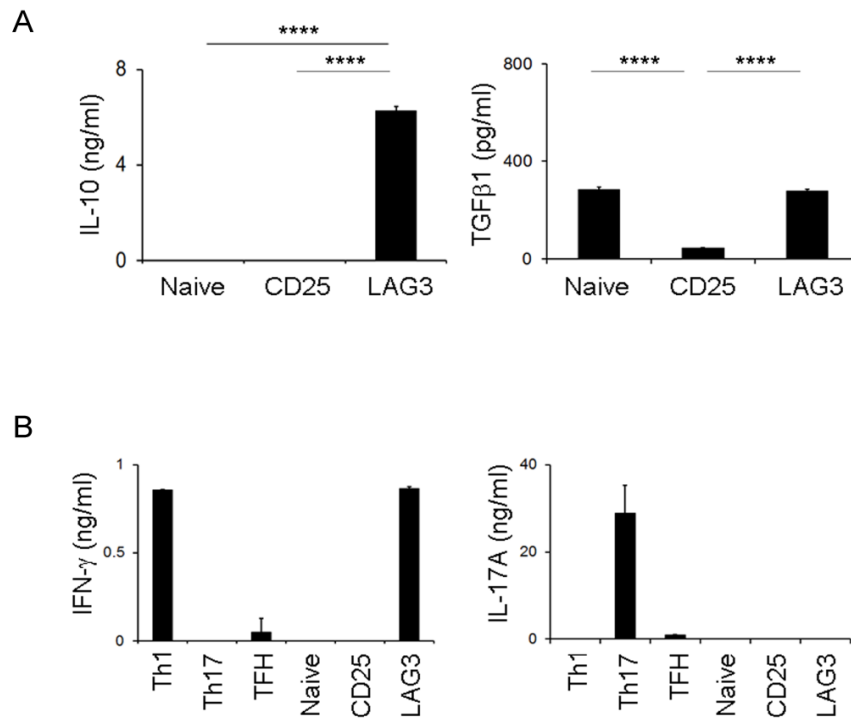


Figure 2. LAG3⁺ Treg は IL-10 を高産生する

健常人末梢血中の LAG3⁺ Treg を抗 CD3/CD28 抗体刺激下で 3 日間培養し、上清を回収して ELISA を行い IL-10 と TGF-β1 (A)、IFN-γ と IL-17A (B) についてそのほかの T 細胞サブセットと比較した。T 細胞の各サブセットの定義はそれぞれ、Naïve T 細胞 (CD4⁺CD45RA⁺CD25⁻LAG3⁻CCR7⁺ cells)、CD25⁺ Treg (CD4⁺CD45RA⁻CD25⁺LAG3⁻CD127^{dim} cells)、LAG3⁺ Treg (CD4⁺CD45RA⁻CD25⁻LAG3⁺ cells)、Th1 細胞 (CD4⁺CD45RA⁻CXCR3⁺CCR6⁻ cells)、Th17 細胞 (CD4⁺CD45RA⁻CXCR3⁻CCR6⁺ cells)、Tfh 細胞 (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺ cells) とした。実験は 3 回行われた。***P<0.001、****P<0.0001、Tukey's multiple comparison test による。

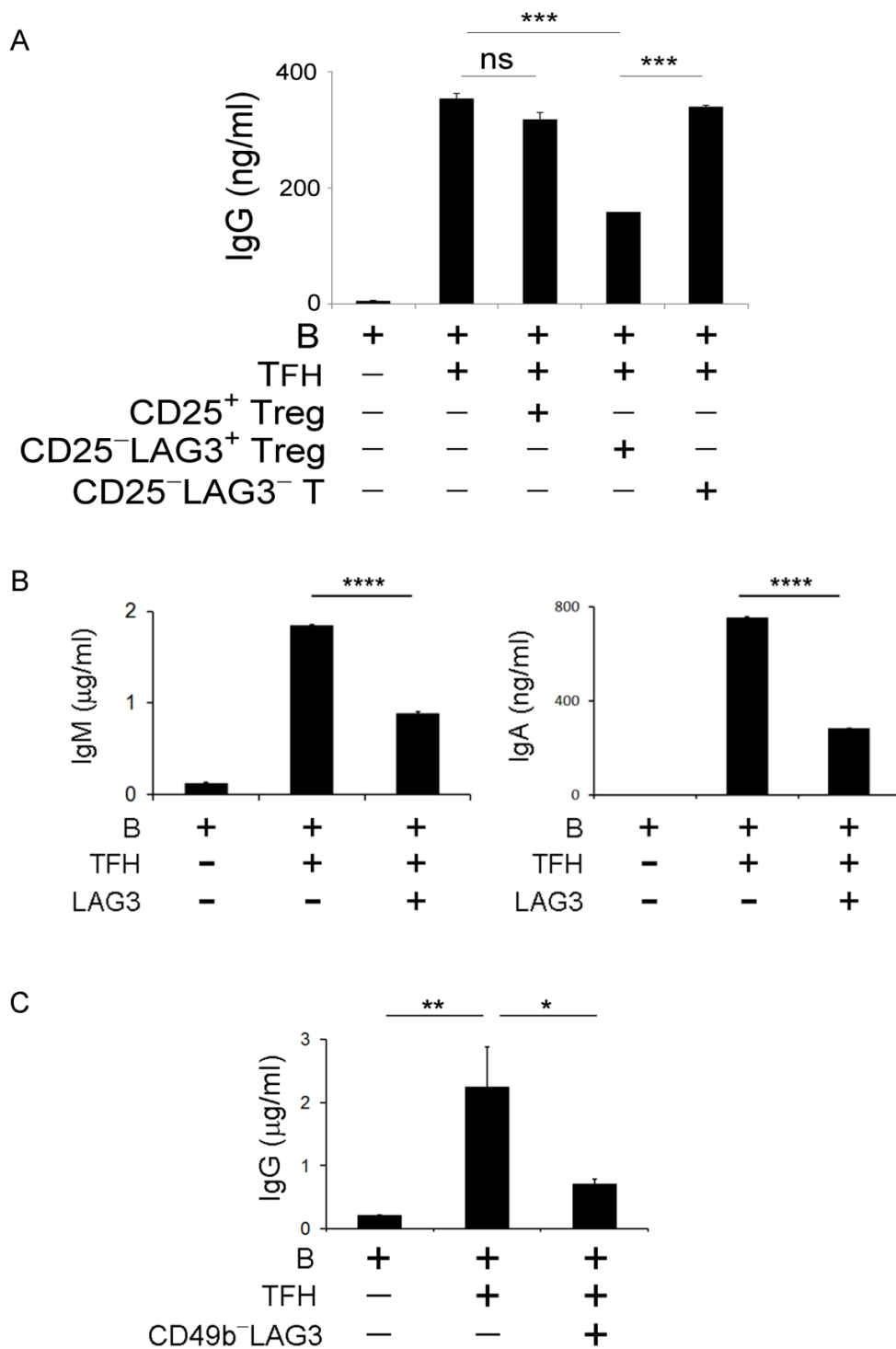


Figure 3. LAG3⁺ Treg は抗体産生を抑制する

健常人末梢血中のLAG3⁺ TregをSEB存在下でB細胞とTfh細胞と12日間培養し、上清を回収してELISAによりIgG(A、C)、IgMとIgA(B)を測定した。各サブセットの定義はそれぞれ、B細胞(CD3⁻CD19⁺ cells)、Tfh細胞

(CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺CD25⁻LAG3⁻ cells) 、 CD25⁺ Treg (CD4⁺CD45RA⁻CD25⁺LAG3⁻CD127^{dim} cells) 、 LAG3⁺ Treg (CD4⁺CD45RA⁻CD25⁻LAG3⁺ cells) 、 CD25⁻LAG3⁻ T 細胞 (CD4⁺CD45RA⁻CD25⁻LAG3⁻ cells) 、 CD49b⁻LAG3⁺ Treg 細胞 (CD4⁺CD45RA⁻CD25⁻LAG3⁺CD49b⁻ cells) とした。それぞれの実験は 3 回ずつ行われた。ns ; not significant、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001、Tukey's multiple comparison test による。

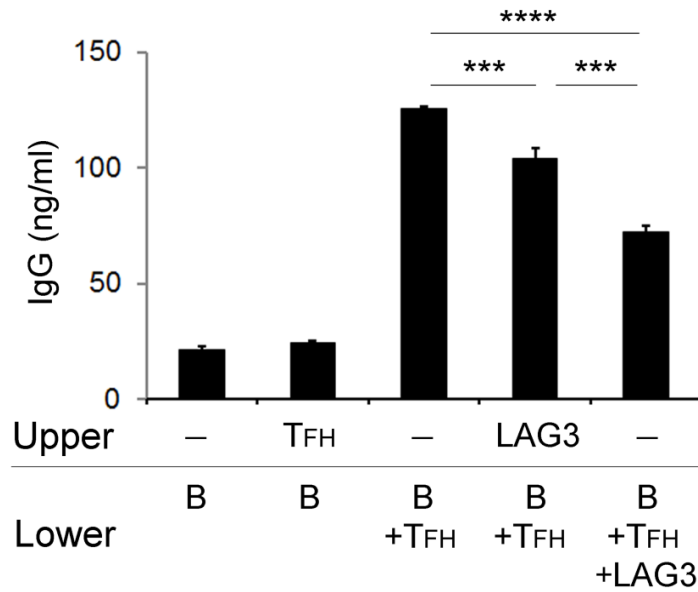


Figure 4. LAG3⁺ Treg が抗体産生を抑制するには細胞間の接触が必要である

健康人末梢血中の LAG3⁺ Treg を SEB 存在下で Transwell を用いて B 細胞と Tfh 細胞と共培養し、12 日目に上清を回収した。各サブセットは upper chamber と lower chamber に図のとおりに加えた。回収した上清中の IgG は ELISA にて検出した。実験は 3 回行われた。***P<0.001、****P<0.0001、Tukey's multiple comparison test による。

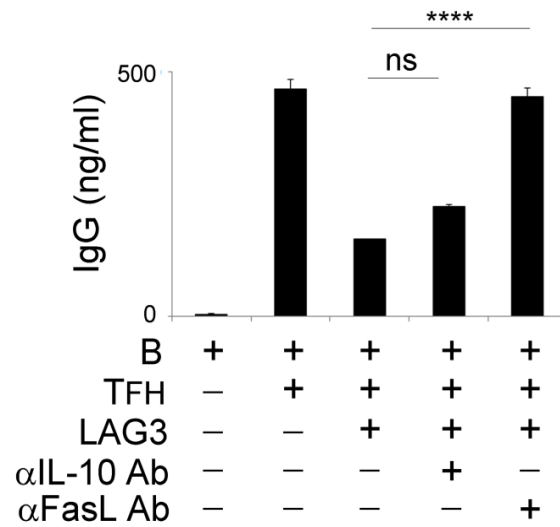


Figure 5. LAG3⁺ Treg の抗体産生抑制能は Fas が作用する細胞間接触に依拠している可能性がある

健常人末梢血中の LAG3⁺ Treg を SEB 存在下で B 細胞と Tfh 細胞と共培養し、12 日目に上清を回収した。LAG3⁺ Treg を含む培養群に、抗 IL-10 抗体、抗 Fas リガンド抗体を加えた群を作成した。回収した上清中の IgG は ELISA にて検出した。実験は 3 回行われた。****P<0.0001、ns ; not significant、Tukey's multiple comparison test による。

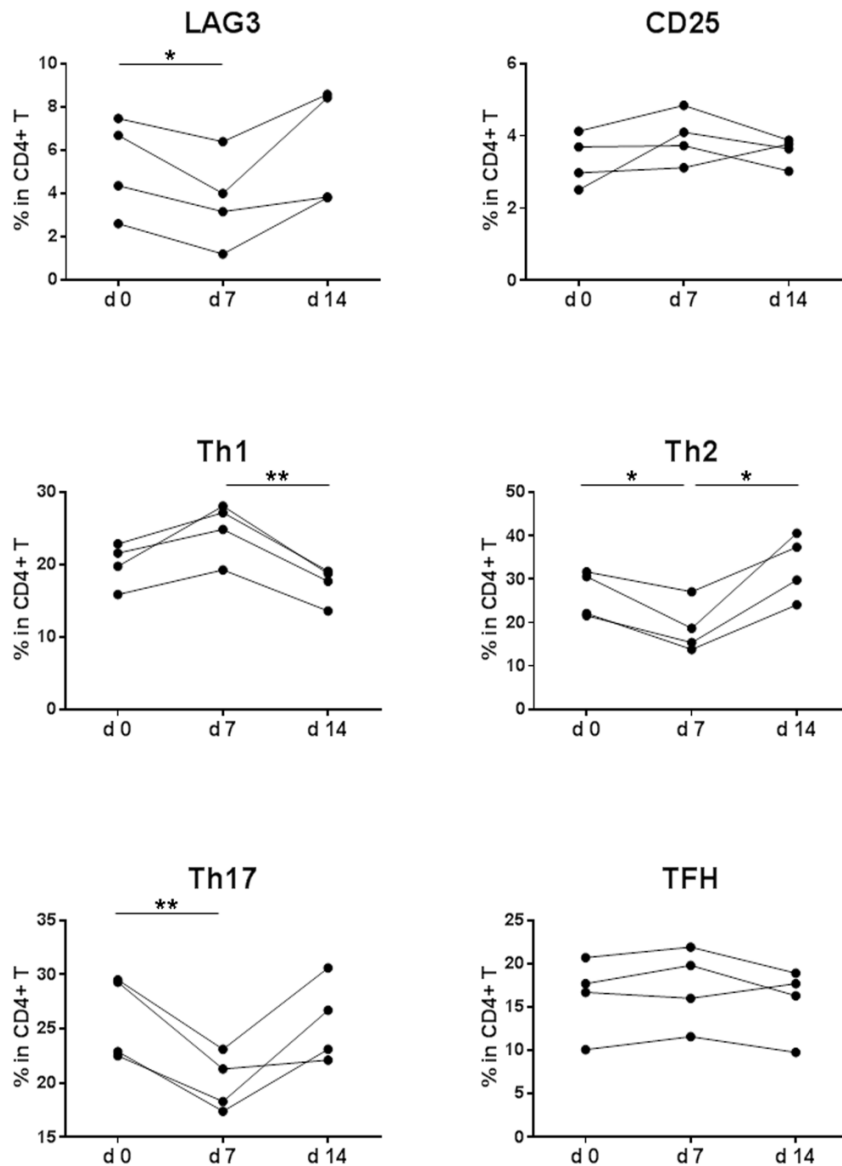


Figure 6. インフルエンザワクチン接種で一過性に LAG3⁺ Treg が減少する

インフルエンザワクチンを接種した4名の健常人より末梢血を採取し、各 T 細胞サブセットの変化を調べた。末梢血の採取と解析はワクチン接種直前の同日 (d0)、7 日後 (d7)、14 日後 (d14) に行った。T 細胞の各サブセットの定義はそれぞれ、CD25⁺ Treg (CD4⁺CD45RA⁻CD25⁺LAG3⁻CD127^{dim} cells)、LAG3⁺ Treg (CD4⁺CD45RA⁻CD25⁻LAG3⁺ cells)、Th1 細胞 (CD4⁺CD45RA⁻CXCR3⁺CCR6⁻ cells)、Th2 細胞 (CD4⁺CD45RA⁻CXCR3⁻CCR6⁻ cells) Th17 細胞 (CD4⁺CD45RA⁻CXCR3⁻CCR6⁺ cells)、Tfh 細胞 (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺ cells) とした。*P<0.05、**P<0.01、Tukey's multiple comparison test による。

Table 1 健常人と関節リウマチ患者の特徴

	HD (n = 101)	RA (n = 85)	naïve RA (n = 16)
Gender, female, n (%)	80 (79)	67(79)	10 (63)
Age (years)	39.3 ± 10.7	58.9 ± 13.1	55.9 ± 12.2
Disease duration (month)		139.4 ± 153.9	6.7 ± 8.3
DAS28-CRP		3.7 ± 1.5	4.1 ± 1.6
DAS28-ESR		4.4 ± 1.6	4.9 ± 1.6
CDAI		16.6 ± 12.1	21.6 ± 14.5
Rheumatoid factor (% positive)		74 (87)	15 (94)
Anti-CCP antibody (% positive)		72 (85)	13 (81)
Levels of CRP (mg/dl)		1.81 ± 3.24	3.40 ± 5.30
Treatment naïve, n (%)		16 (19)	16 (100)
Treatment with MTX, n (%)		41 (48)	
Treatment with biologics, n (%)		20 (24)	
TNF- α inhibitor		8 (9)	
Tocilizumab		5 (6)	
Abatacept		7 (8)	

平均値±標準偏差でデータを表記した。HD, healthy donor; RA, rheumatoid arthritis; DAS28, Disease Activity Score 28 joints; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CDAI, Clinical Disease Activity Index; CCP, cyclic citrullinated peptide; MTX, methotrexate; TNF, tumor necrosis factor.

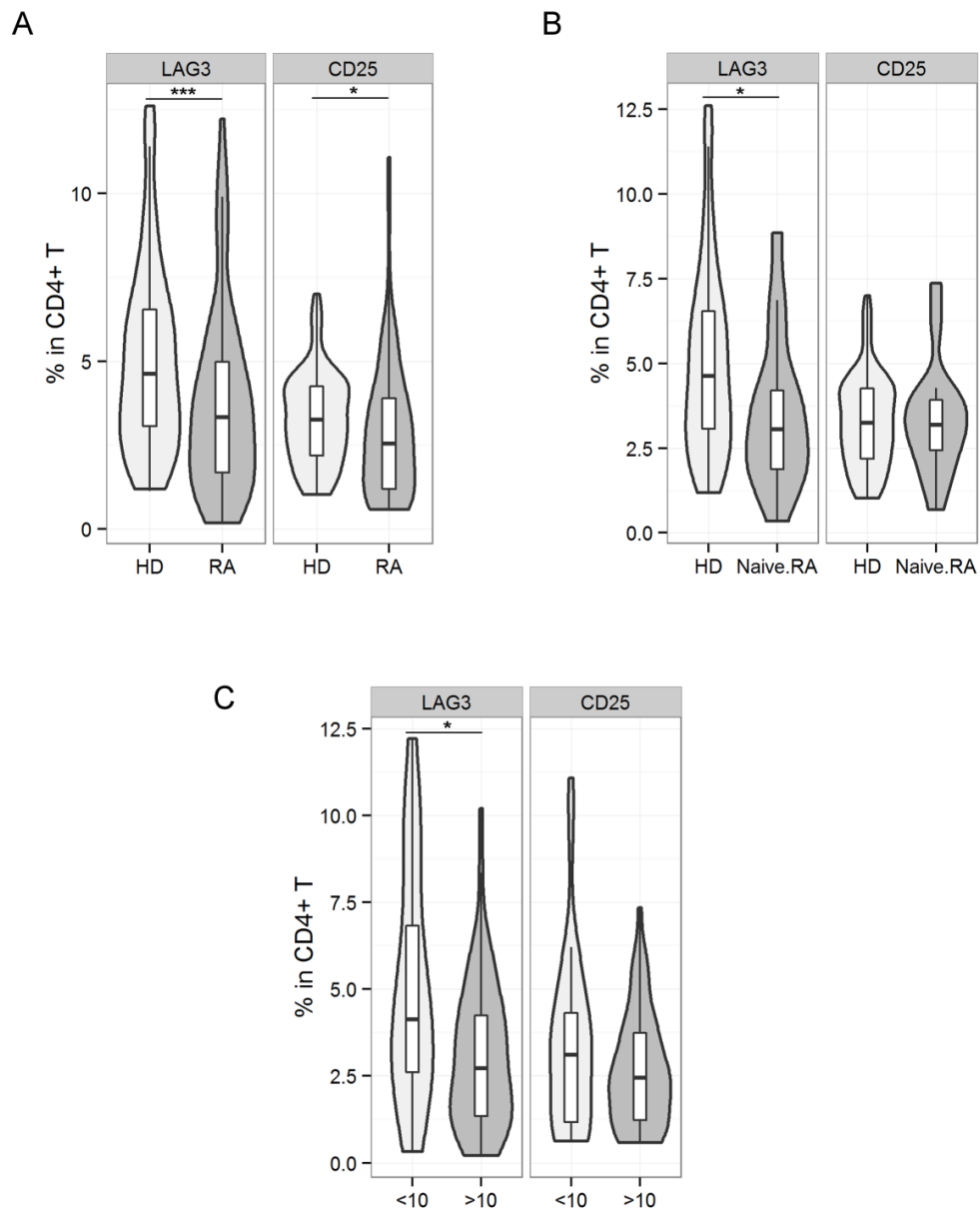


Figure 7. 関節リウマチ患者では健常人と比べて LAG3⁺ Treg が少ない

健常人 (n=101) と関節リウマチ患者 (n=85) より採取した末梢血からリンパ球を分離し、LAG3⁺ Treg と CD25⁺ Treg の頻度を比較した (A)。健常人 (n=101) と未治療関節リウマチ患者 (Naïve RA、n=16) との Treg を比較した (B)。また、関節リウマチを Clinical Disease Activity Index (CDAI) を用いて寛解・低疾患活動性群 (CDAI <10, n=30) と中・高疾患活動性群 (CDAI >10, n=55) での Treg を比較した (C)。*P<0.05、***P<0.001、unpaired two-tailed Student's *t*-test による。

Table 2 アバタセプト投与前の関節リウマチの特徴

	RA patients with abatacept (n = 18)
Gender, female, n (%)	15 (83)
Age (years)	62.7 ± 13.2
Disease duration (month)	187.5 ± 144.2
DAS28-CRP	4.2 ± 1.3
DAS28-ESR	4.9 ± 1.2
CDAI	21.4 ± 11.7
Rheumatoid factor (% positive)	15 (83)
Anti-CCP antibody (% positive)	18 (100)
Levels of CRP (mg/dl)	1.54 ± 2.85
Biologics naïve, n (%)	13 (72)

平均値±標準偏差でデータを表記した。RA, rheumatoid arthritis; DAS28, Disease Activity Score 28 joints; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CDAI, Clinical Disease Activity Index; CCP, cyclic citrullinated peptide.

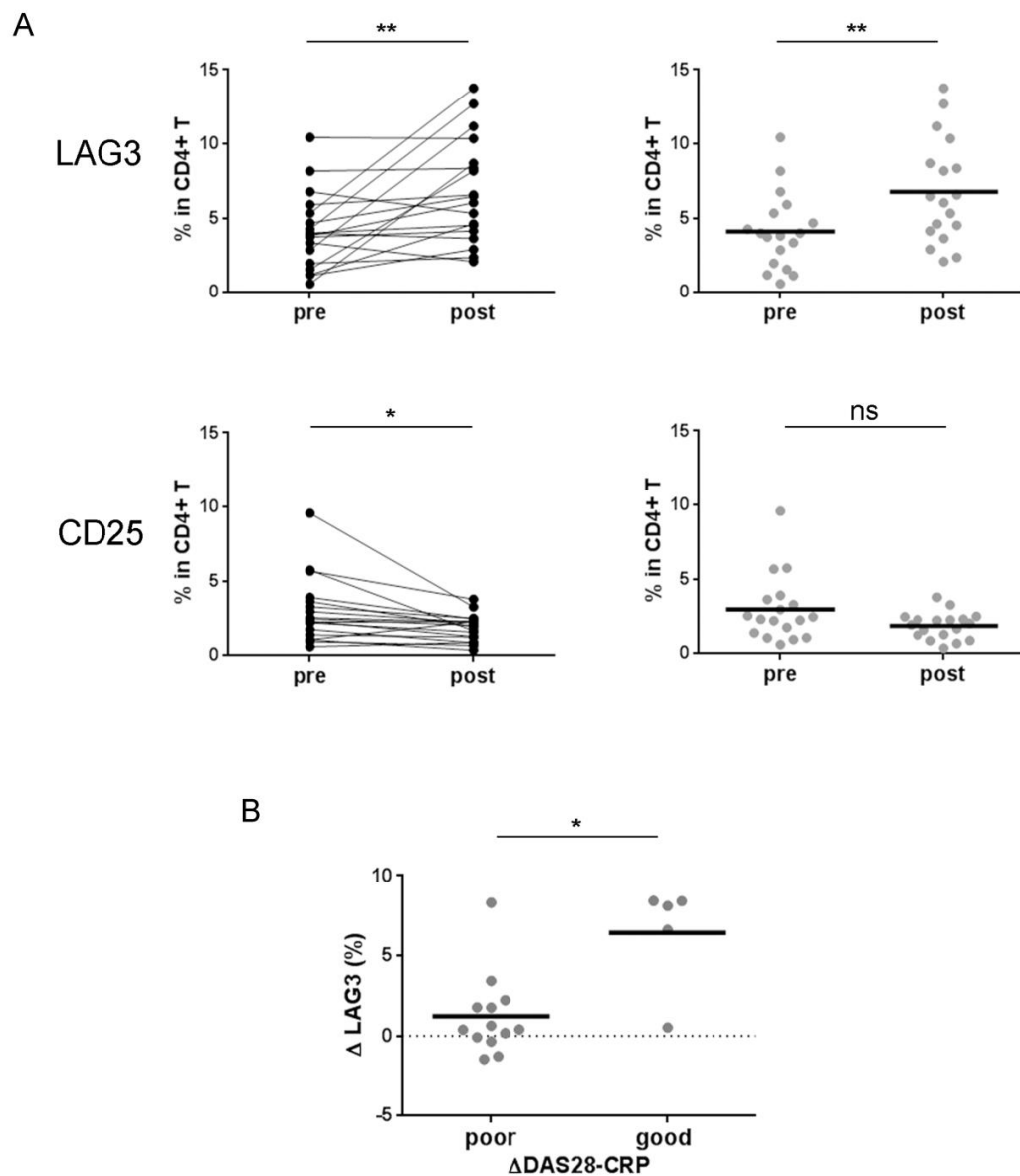


Figure 8. アバタセプト投与により LAG3⁺ Treg は増加する

アバタセプト治療を受けた関節リウマチ患者 (n=18) において、同薬剤投与直前 (pre) と投与6か月後 (post) の末梢血を採取し、LAG3⁺ Treg と CD25⁺ Treg を比較した (A)。また、関節リウマチの疾患活動性指標である DAS28-CRP の変化量をもとに、治療反応良好群と不良群に分けて LAG3⁺ Treg の変化の程度を比較した (Δ DAS28-CRP カットオフ値 1.4)。ns ; not significant、*P<0.05、**P<0.01、Wilcoxon signed-rank test (A 左図)、Mann-Whitney U test (A 右図、B) による。

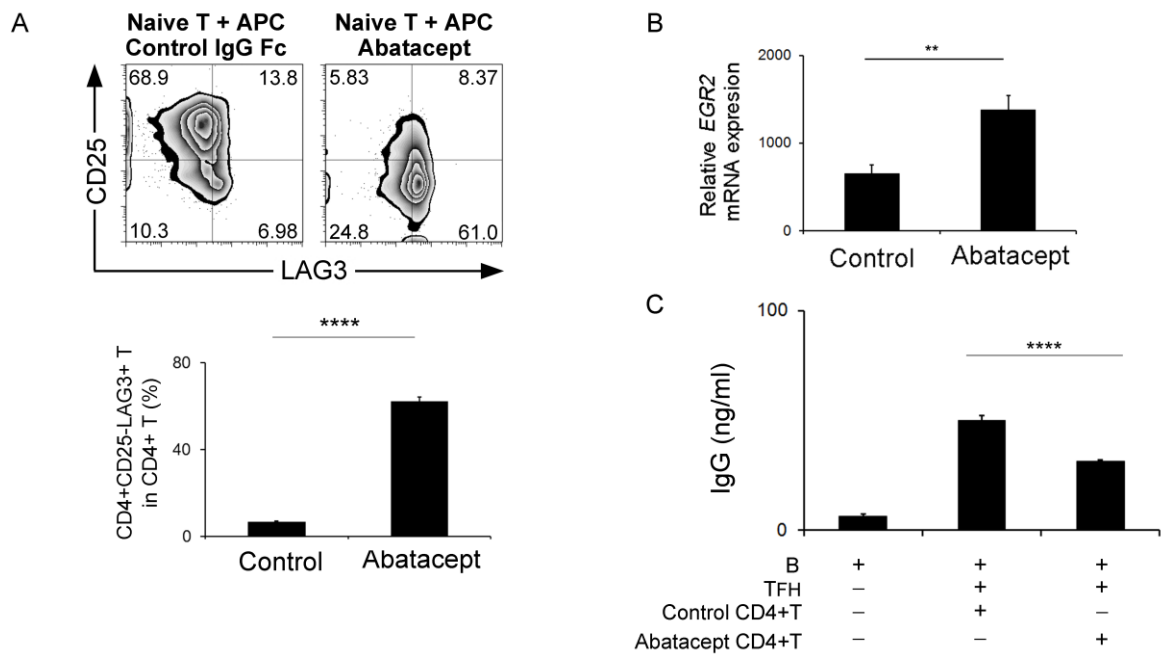


Figure 9. アバタセプトは LAG3⁺ Treg 様細胞への分化を促進させる

健康人末梢血中の Naïve CD4⁺ T 細胞を抗 CD3 抗体刺激下で抗原提示細胞 (antigen presenting cells, APC) とともにアバタセプト存在下で 4 日間培養し、フローサイトメトリーを用いて表面マーカーを解析した (A)。また、7-AAD 陰性細胞を採取し、リアルタイム PCR により EGR2 の発現をみた (B)。A のとおりに培養した細胞を B 細胞と Tfh 細胞と共に培養し、12 日後に上清を回収して IgG を ELISA にて検出した。実験はそれぞれ 3 回行われた。**P<0.01、****P<0.0001、Tukey's multiple comparison test による。

謝 辞

本研究において多くの御助言と御支援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・リウマチ学 山本 一彦 教授に心から感謝を申し上げます。

第 18 研究室の藤尾 圭志 講師、岡村 僚久 特任助教、庄田 宏文 助教、森田 薫 大学院生、井上 眞璃子 大学院生、駒井 俊彦 大学院生には、研究方針決定に非常に有益な着想を賜り、深く感謝を申し上げます。

第 18 研究室の土田 優美 大学院生、加藤 里佳 大学院生、櫻井 恵一 大学院生、土屋 遙香 大学院生、花田 徳大 大学院生、永渕 泰雄 医師には、健常人および関節リウマチ患者の末梢血検体と臨床情報収集およびフローサイトメトリー解析の実験をご分担頂きました。免疫療法管理学講座 神田 浩子 特任准教授、立石 晶子 特任助教には、生物学的製剤治療中の関節リウマチ患者の臨床情報収集に御助力賜りました。また、井上 堯 実験助手には技術補佐を頂きました。彼らの多大な御尽力により、多くの貴重なデータを集めることができました。深く感謝を申し上げます。

最後に、住友 秀次 助教には実験手技の御指導を初めとして、学会発表の準備や研究論文の作成を大変親身にサポートしていただき、平素より研究生活を大いに支えてくださいました。ここに感謝の意を表します。