

博士論文

論文題目 免疫細胞タイピングによる関節リウマチの臨床免疫研究

氏名 永渕 泰雄

目次

目次	1
要旨	2
序文	3
方法	8
患者及び対照群	8
フローサイトメトリーによる解析	9
免疫細胞タイピング	10
HLA-DRB1 タイピングと細胞表面 HLA-DR 発現定量	11
RNA-seq	12
統計	13
結果	15
患者背景	15
関節リウマチ患者における広範な免疫細胞サブセットの変化	15
免疫細胞サブセットの変化は自己抗体産生と関連する	16
Shared Epitope 陽性者では memoryT 細胞比率が上昇している	17
RA T 細胞上の HLA-DR 発現増加は抗 CCP 抗体値と関わる	18
ABT による治療では T 細胞活性が低下し、更に Treg と CD14 ^{bri} CD16 ⁺ 単球比率が減少する	19
関節滑液 CD4 陽性 T 細胞での CXCR4 発現上昇	20
末梢血 CD4 陽性 T 細胞の CXCR4 発現上昇は臨床的活動性と関わる	21
RNA-seq による CD4 陽性 T 細胞サブセットの発現パターンの比較	22
RA において重要遺伝子の発現は表面マーカーによるサブセット特異的ではない	23
考察	25
参考文献	30
謝辞	43
図表	44

免疫細胞タイピングによる関節リウマチの臨床免疫研究

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： 永渕 泰雄

要旨

関節リウマチの遺伝因子、免疫学的異常と臨床像の関連についての知見は限られている。私は 82 名の RA 患者の shared epitope の有無と末梢血単核球免疫細胞タイピング結果を検討することで、shared epitope 陽性患者では CD4 陽性 T 細胞を介した獲得免疫反応の活性化が起こっており、これが抗 CCP 抗体産生に関わることを示した。更に末梢血中の CD4 陽性 CD45RA 陰性細胞における CXCR4 発現上昇が疾患活動性や抗 CCP 抗体と関連することを示した。これらの知見は関節リウマチの病態理解を深めるのみならず、将来的には新規治療に役立つ可能性があると考えられる。

(279 文字)

序文

関節リウマチ (rheumatoid arthritis、以下 RA) は持続的な自己免疫反応と全身の関節の炎症性関節炎を生じ、進行性の関節破壊に至る炎症性疾患である。病因は明確ではないが複数の遺伝因子と環境因子の相互作用を背景として発症する自己免疫疾患と考えられている。近年の 10 万人以上を対象とした大規模なゲノムワイド関連解析では 101 個の RA 感受性遺伝子座が同定されている(1)。その中で最初に RA の感受性遺伝子として同定され、すべての感受性遺伝子の中で最大の影響を及ぼすのが Human Leukocyte Antigen-DRB1 (以下 HLA-DRB1) 多型である(2-3)。RA と関係がある多型として HLA-DRB1*04:01、04:05、01:01 等が同定されており、これらの HLA-DRB1 の 70-74 番目の共通アミノ酸配列は shared epitope (以下 SE) と呼ばれ、抗環状シトルリン化ペプチド抗体 Anti-cyclic citrullinated peptide antibody、以下抗 CCP 抗体) 陽性 RA と強い関連が報告されている(4-5)。喫煙に代表される環境因子も RA の重要な発症因子であり、SE と相互作用して抗 CCP 抗体陽性 RA の発症に関わることが疫学調査によって示されている(6-7)。

抗 CCP 抗体陽性 RA 患者の解析では、HLA-DRB1 多型と RA との関連はほぼすべて 11、13、71、74 番目のアミノ酸配列によって説明され、これらはすべて主要組織適合遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex、以下 MHC) のペプチド収容溝

にあたる部位にあたる(8)。HLA-DRB1の多型は、抗原提示細胞上のMHCクラスIIを介したCD4陽性T細胞への抗原提示によって関節リウマチの発症に関わるものが強く示唆される。SE陽性のHLA-DRB1を発現した抗原提示細胞からはシトルリン化ペプチドなどの自己抗原が効率的に提示され(9)、これが自己抗原特異的CD4陽性T細胞の活性化や自己反応性B細胞の形質芽細胞(Plasmablast、以下PB)や形質細胞への分化、更にシトルリン化ペプチドに対する抗CCP抗体を含む自己抗体産生を引き起こす可能性がある。抗CCP抗体はRAに特異的な自己抗体であり、骨破壊進行と関連した予後不良因子である(10-11)。抗CCP抗体はRAの発症に先駆けて血清中に存在し、破骨細胞分化を促進し、またマウスモデルでは実際に関節炎を増悪させる(12-14)。もう一つの代表的自己抗体であるリウマトイド因子(Rheumatoid Factor、以下RF)は免疫グロブリンIgG Fc部分に対する自己抗体であり、抗CCP抗体同様RAの発症に先駆けて血清に存在する(15)。多くの症例では抗CCP抗体と併存して存在し、抗CCP抗体とは独立した骨破壊の予測因子であることが報告されている(16)。

RAの炎症滑膜局所ではリンパ濾胞様反応が生じ、T細胞のクローン増殖、またシトルリン化自己抗原に対する自己抗体産生B細胞の集積と体細胞変異が認められる(17-18)。RA関節滑膜には持続的な獲得免疫反応が起こって炎症を促進していることが示唆される。更に関節滑膜でのマクロファージの活性化とTNF- α やIL-6に代表される炎症性サイトカインの産生、繊維芽細胞や破骨細胞の活性化が相互に結びつき、

持続性の炎症性滑膜炎を生じていると考えられる(19)。

古典的にはRAはIFN- γ 産生に特徴づけられるTh1型の免疫反応によって起こるとされてきた(20)。IL-17を産生し慢性炎症や破骨細胞分化に関わるTh17細胞の発見以降RAにおけるTh17型の免疫反応の重要性が注目されているが、実際に中心的な役割を果たすかは明確ではない(21-24)。B細胞分化や抗体産生を促し獲得免疫反応に重要である濾胞性ヘルパーT細胞 (follicular helper T cell、以下Tfh) に異常が生じRAでの自己抗体産生とも関連している可能性も指摘されている(25-27)。制御性T細胞 (regulatory T cell、以下Treg) はエフェクターT細胞の活性化や増殖を抑制するため、その量的質的な異常とRAの関係が論じられている(28-30)。炎症関節局所ではTregが増加しているが制御能が低下している、もしくはTh17細胞に変化して炎症を悪化させてしまうと報告されている(31-32)。これらのTh1、Th17、Tfh、Tregのサブセットのうち、いずれがRAの病態において中心的な役割を果たすのかについては明らかになっておらず、複合的な病態への影響が考えられている。

RAの炎症病変の中心は全身の関節滑膜であることから、病原性CD4陽性T細胞サブセットは全身の末梢循環を介して全身の関節に遊走、局在するものと考えられる。関節滑膜局所のCD4陽性T細胞で特に高発現するケモカインレセプターとしてCXCR4が報告されている(33-34)。繊維芽細胞によってCXCR4のリガンドであるstromal cell-derived factor-1 (SDF-1、別名CXCL12) が産生され関節滑液中に高濃度に

存在する(35)。実際に炎症性サイトカインによって活性化した CD4 陽性 T 細胞は CXCR4 発現上昇によって遊走能を増す(36)。また少数例ではあるが RA 末梢血 CD4 陽性細胞での CXCR4 の発現上昇が報告されている(37)。マウスモデルにおいても T 細胞特異的 CXCR4 欠損によってコラーゲン誘導関節炎の発症率が大幅に減少し、CXCR4 は関節への遊走に重要であることが示されている(38)。これらの知見から CD4 陽性 T 細胞サブセットの RA 関節への遊走に CXCR4 が重要であることが示唆される。

RA における T 細胞の重要性は T 細胞を標的とした生物学的製剤である abatacept (以下 ABT) の高い臨床的有効性からも裏付けられる。ABT はヒト CTLA4 の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc ドメインからなる CTLA4-Ig 融合タンパクである。CTLA4 は活性化 T 細胞上に発現し、T 細胞上の CD28 よりも抗原提示細胞上の CD80/CD86 との親和性が高いため、CD80/CD86 と CD28 との結合による共刺激を遮断する作用を持つ(39)。ABT は TNF- α や IL-6 を阻害する生物学的製剤と同等の約 60%前後の有効率を示すことが報告されており、日米欧の RA 治療ガイドラインにおいてもこれらと同等に推奨されている(40-43)。しかしながら、非ステロイド性抗炎症薬やステロイド製剤、メトトレキサートに代表される疾患修飾性抗リウマチ薬に生物学的製剤を組み合わせる既存の RA 治療では効果不十分な症例や、感染症などの副作用を生じる症例も多い。症例間の差に基づく個別化治療や、より有効性安全性の高い新規治療の開発が期待される。

個々の RA 症例はその遺伝子因子及び環境因子、自己抗体の有無、疾患活動性や治療歴において不均一である。RA 症例間の個別の差異にまで対応したより深い病態理解を目指すためには、モデル動物を用いた免疫学的研究のみでは不十分であり、ヒト免疫学的なアプローチが必要である。免疫細胞タイピングはフローサイトメトリーを利用して 1 細胞レベルで多様な免疫細胞の特徴を調べることで有力な手法となりうる (44)。RA 患者の単核球において広範に免疫細胞タイピングを検討した報告はなく、その全体像や臨床像との関連は未だ不明である。

私は RA 患者の末梢血単核球を免疫細胞タイピングによって評価し、HLA-DRB1 の遺伝子型との関連や ABT による治療前後の比較を検討することで、臨床像と関連し治療標的となりうるサブセットの同定を試みた。特に Th1、Th17、Tfh のいずれかが RA で増加しており、疾患活動性と正に相関し、治療によって減少するという仮説及び、Treg が RA で減少しており、疾患活動性と負に相関し、治療によって増加するという仮説の検証を行った。また関節滑液中 CD4 陽性 T 細胞に高発現する CXCR4 分子に着目し、末梢血 CD4 陽性 T 細胞における CXCR4 の発現と疾患活動性との関連を示した。更に RNA-sequencing (以下 RNA-seq) による発現解析によって CD4 陽性 T 細胞サブセットの妥当性についての検討を行った。

方法

患者及び対照群

2013年4月から2014年8月に東大病院アレルギー・リウマチ内科に通院中であったRA患者82名を対象とし臨床情報の収集と免疫細胞タイピング、HLA-DRB1タイピングを行った。対象は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18歳以上のRA患者とし、活動性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、罹病期間、参加時点での治療内容としてメトトレキサート及び生物学的製剤の使用の有無、関節所見を含めた総合活動性指標であるDisease Activity Score 28 joints-ESR (以下DAS28) と身体機能評価指標であるHealth Assessment Questionnaire Disability Index (以下HAQ) を収集した(45-46)。検査所見として参加当日のESR1h値、2週間以内のRF力価、1年以内の抗CCP抗体力価を用いた。患者背景についてはTable1に示す。RFはラテックス免疫比濁法(15 IU/ml以上が陽性)、抗CCP抗体は化学発光酵素免疫測定法(MBL、4.5 U/ml以上が陽性)によって測定した。RA発症1年以内でステロイド製剤、疾患修飾性抗リウマチ薬、生物学的製剤全ての未使用者を早期未治療患者とした。ABTによる治療開始直前に参加した17名のうち6か月間治療継続した15名においては、治療開始6か月時点で免疫細胞タイピングの再解析を行い治療開始

前と比較した。17名のうち1名は二次無効、1名は肺炎のためABT治療を中止した。

関節滑液は協力施設である下北沢病院通院中の6名の関節リウマチ患者において治療目的にて採取された滑液のうち臨床検査に用いた残りを利用して解析を行った。健常対照群として71名の健常人 (healthy donor、以下 HD) の免疫細胞タイピングを行った。HDについては質問紙による自己申告に基づき治療中の疾患がないことを確認した。本実験におけるRA患者の末梢血及び関節滑液、HD末梢血の使用は東京大学大学院医学系研究科・医学部の倫理委員会にて承認を受けている (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、及び承認番号：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)。

フローサイトメトリーによる解析

事前の検討において標準的な凍結保存により細胞表面抗原に変化を認めたことから(47)、全ての解析は新鮮末梢血及び関節滑液を用いて行った。末梢血及び関節滑液中の単核球の分離はFicoll-Paque Plus (GE healthcare) による密度勾配遠心分離にて実施した。ammonium chloride potassium (ACK) 溶血緩衝液による溶血を行い、Fc-gammaレセプターによる非特異的結合を阻害した後に一定の細胞濃度 (1×10^6 cell/100 microL) 及び一定の抗体量で染色を行った。使用抗体は以下の通り：Human Fc Receptor Binding Inhibitor Purified (eBioscience)、CD3-PE-Cy7 (clone: UCHT1、

BioLegend) 、 CD3-PerCP-Cy5.5 (clone: UCHT1、 BioLegend) 、 CD4-PerCP-Cy5.5 (clone:OKT4、 BioLegend) 、 CD4-V500 (clone: RPA-T4、 BD) 、 CD11c-Brilliant Violet 421 (clone: B-ly6、 BD) 、 CD14-FITC (clone: M5E2、 BioLegend) 、 CD16-PerCP-Cy5.5 (clone: 3G8、 BioLegend) 、 CD19-APC-Cy7 (clone: HIB19、 BioLegend) 、 CD19-V500 (clone: HIB19、 BD) 、 CD24-PE (clone: ML5、 BD) 、 CD25-Brilliant Violet 421 (clone: BC96、 BioLegend) 、 CD25-PE-Cy7 (clone: BC96、 eBioscience) 、 CD27-FITC (clone: O323、 eBioscience) 、 CD38-PE-Cy7 (clone: HIT2、 BioLegend) 、 CD45RA-APC-Cy7 (clone: HI100、 BioLegend) 、 CD56 -APC-Cy7 (clone: HCD56、 BioLegend) 、 CD123-APC (clone: AC145、 Miltenyi) 、 CD127-PE-Cy7 (clone: eBioRDR5、 eBioscience) 、 CXCR3-Brilliant Violet 421 (clone: 1C6、 BD) 、 CXCR4-APC (clone: 12G5、 BD) 、 CXCR5-Alexa Fluor 488 (clone: RF8B2、 BD) 、 CCR6-PE (clone: 11A9、 BD) 、 HLA-DR-PE (clone: L243、 eBioscience) 、 IgD-Brilliant Violet 421 (clone: IA6-2、 BD)。解析は8カラーフローサイトメーターである MoFlo XDP (Beckman Coulter)により行った。

免疫細胞タイピング

免疫細胞タイピングの対象とした細胞サブセットの定義を Table2 にまとめた。細胞サブセットの定義は米国 NIH を中心とした Human Immunology Project の標準化法を基礎として CD4 陽性 T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー細胞(Natural killer cells、以下

NK 細胞)、単球、樹状細胞(dendritic cells、以下 DC)を分類し(44)、更に RA において重要性が指摘されている細胞サブセットの追加を行った。まず CD4 陽性 T 細胞サブセットに末梢血中の Tfh 対応サブセットをさらに Th1 細胞の性質を併せ持つ Tfh1 細胞、Th2 細胞の性質を併せ持つ Tfh2 細胞、Th17 細胞の性質を併せ持つ Tfh17 細胞に細分類を行った(48)。代表図を Figure1 に示した。単球についても、CD14dim、HLA-DR 陰性である顆粒球の混入を厳密に防ぐため HLA-DR をサブセット定義に含めるとともに(49)、CD14 と CD16 に基づく細分類において CD14brightCD16+単球サブセット比率が RA 患者で上昇しており高い炎症性サイトカイン産生能を示すという既報に基づき 3 サブセット分類を行った(50)。参加した全例で CD4 陽性 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球の免疫細胞タイピングを行った。DC の免疫細胞タイピングは RA 43 例、HD65 例のみで行った。T 細胞サブセットの CXCR4 発現は RA 24 例、HD26 例で検討した。CXCR4 陽性率は isotype control (APC Mouse IgG2a、 κ Isotype Ctrl、clone: MOPC-173、Biolegend) を用いて決定した。

HLA-DRB1 タイピングと細胞表面 HLA-DR 発現定量

RA 例のみ PCR-SBT 法による HLA-DRB1 のタイピングを株式会社エスアールエルに依頼し行った。以下の遺伝子型を Shared epitope 陽性とした: 01:01、01:02、04:01、04:04、04:05、04:08、04:10、10:01、14:02、14:06(51)。HLA-DR 定量には QuantiBRITE

PE (BD) を用いた。取扱説明書に従いフローサイトメトリー解析上の HLA-DR-PE の MFI (mean fluorescence intensity) 値と 4 つの蛍光ビーズ当たりの PE 数の線型回帰から計算することで 1 細胞あたりの細胞表面数 HLA-DR 発現量を求めた (HLA-DR 分子/PE 分子比率=1)。HLA-DR-PE 抗体と染色細胞の比率は事前に細胞表面の HLA-DR の飽和量であることを確認した濃度 (10 microL/ 1 x 10⁶ cell) に統一した。

RNA-seq

3 名の RA 患者 (識別番号 : RA3、RA4、RA5)、1 名の HD (識別番号 : HD2) において CD4 陽性 T 細胞サブセットの RNA-seq によってトランスクリプトームの検討を行った。細胞数の制限のため以下の 7 サブセットを対象とした (Naive:CD3+CD4+CD45RA+CD25-CXCR5-/Th1:CD3+CD4+CD45RA-CD25-CXCR5-CXCR3+CCR6-/Th2:CD3+CD4+CD45RA-CD25-CXCR5-CXCR3-CCR6-/Th17:CD3+CD4+CD45RA-CD25-CXCR5-CXCR3-CCR6+/Th17.1:CD3+CD4+CD45RA-CD25-CXCR5-CXCR3+CCR6+/Tfh:CD3+CD4+CD45RA-CD25-CXCR5+/CD25+:CD3+CD4+CD45RA-CD25+)。MoFlo XDP による 4way-sort によって RNAprotect Cell Reagent (Qiagen) に 0.5-5.0 x 10⁴ cell 細胞を回収した。回収細胞は-80°Cで保存し、ドライアイス中で共同研究機関である理化学研究所へ輸送した。TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina) によって library 調整し、HiSeq 2500 (Illumina) によるシーケンスを行った (rapid run mode)。

Quality control (QC) として各リードからアダプター配列と phred クオリティスコア 20 未満の塩基をトリミング後、phred クオリティスコア 20 未満の塩基を 20% 以上含むリードを除いた。QC 後のリード長は平均 3.5×10^7 リード ($2.2 - 4.8 \times 10^7$ リード) であった。UCSC human genome 19 をレファランス配列とし Tophat2 によってマッピングした(52)。マップ率は平均 79 % (50 - 83 %) であった。cufflinks によって UCSC human genome 19 の gene model を参照し、発現量の指標である fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped (FPKM) を求めた(53)。library 調整、シーケンス及び、FPKM の算出は理化学研究所統合生命医科学研究センター自己免疫疾患研究チームに依頼した。更にサンプル間の比較を行うため limma による quantile normalization を行い、サンプル間の条件の違いによる変動の影響(batch effect)を除くため Surrogate variable analysis を行い解析データとした(54, 55)。サンプルの比較を主成分分析及び、ユークリッド距離によるクラスター解析によって行った。サンプル数の制限のため HD と RA 間の比較は行わなかった。

統計

カテゴリカルデータの検定はカイ 2 乗検定で行った。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 群の検定は正規性の検定を満たし paired t-test にて行った。年齢のサ

ブセット比率への影響は線形回帰によって補正可能で、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞比率は年齢によって減少するが、年齢の Treg 等の比率への影響は少ないという既報に基づき、RA 患者と HD の免疫細胞サブセット比率は、年齢による線型回帰によって補正を行った(56)。2 変数間の相関はスピアマンの順位相関係数によって評価した。相関の検討において検査値が基準下限以下もしくは上限以上の場合、下限値もしくは上限値を参考値として用いた。欠損値は解析ペアごとに除外した。統計解析には SPSS version 19 (IBM) および R version 3.0.1 (R Foundation for Statistical Computing) を利用した。

結果

患者背景

71名のHDと82名のRAを対象とし、背景はTable1に示した。年齢の中央値がHD群33歳、RA群62歳と有意に異なっていた ($p<0.001$)。RA群には18%の早期未治療の患者群を含み、50%はメトトレキサート、24%は生物学的製剤で治療中であった。RA罹病期間中央値は4年であり、DAS28による疾患活動性分類では、寛解群/低疾患活動性/中疾患活動性/高疾患活動性群が各々11/6/35/30例と活動性が高い症例が中心であった。89%がRFもしくは抗CCP抗体陽性の血清反応陽性RAであった。またRA患者の61% (50例) が shared epitope 陽性だった。

関節リウマチ患者における広範な免疫細胞サブセットの変化

系の妥当性を評価するため、4名のHDにて免疫細胞タイピングを14日間隔で2度行い評価した。Table2の24サブセットの変化をスピアマンの順位相関係数で検討したところ、 $Rho=.892$ 、 $p=<.001$ と非常に強い正の相関を認めた。同一人の複数回の免疫細胞タイピングによって安定したサブセット比率が認められることが分かった。

Figure2およびTable3、Table4に年齢差を線形回帰で補正した後のHDとRAにおける免疫細胞タイピングの比較を示した。CD4陽性T細胞サブセットにおける比較では、

RA では naive T 細胞比率が増加しており、memoryT サブセットの亜分画のうち Th1、Th17、Th1/17、Tfh サブセットの亜分画のうち Tfh17 サブセット更に Treg 比率も有意に減少していた ($p<0.01$ もしくは $p<0.001$)。B 細胞における比較では、RA では naive B 細胞比率及び DN 細胞比率が増加しており、unswMB、swMB、PB、TransB 細胞比率が減少していた ($p<0.01$ もしくは $p<0.001$)。また RA では CD14briCD16+ 単球比率の増加及び、mDC 比率の減少を認めた ($p<0.001$)。NK 細胞サブセットには有意な差を認めなかった。HD と RA の CD4 陽性 T 細胞、B 細胞、単球、DC の末梢血免疫サブセットには広範な変化が存在することが示された。

免疫細胞サブセットの変化は自己抗体産生と関連する

個別の RA 症例間における臨床像と免疫サブセットの変動との関係を検討するため、DAS28、抗 CCP 抗体値、RF 力価、HAQ、罹病期間と各サブセット比率との関係をピアマンの順位相関係数にて評価し Table5 に示した。個々のサブセット比率のうち、いずれも単独で DAS28 もしくは HAQ と有意な相関を示すものは認めなかった。抗 CCP 抗体値とは naiveT 細胞比率が負の相関を示し ($Rho=-.374$ 、 $p=.001$)、memoryT 細胞比率及び Tfh 比率が正の相関を示した (memoryT: $Rho=.325$ 、 $p=.004$ 、Tfh: $Rho=.285$ 、 $p=.001$)。RF 力価とは PB 比率が正の相関を示した ($Rho=.405$ 、 $p=.00023$)。Treg 比率は罹病期間と負の相関を示した ($Rho=-.361$ 、 $p=.003$)。疾患活動性と相関を示すサ

ブセットは存在せず、自己抗体のうち抗 CCP 抗体については memoryT 細胞および Tfh、また RF については PB とそれぞれ異なるサブセットとの関連が示唆された。

Shared Epitope 陽性者では memoryT 細胞比率が上昇している

続いて SE 陽性が免疫細胞タイピングに与える影響を検討するため、RA 患者を SE 陽性群 (n=50) と SE 陰性群 (n=32) に 2 群し比較を行った。SE 陽性群と陰性群の背景因子として年齢や性別、DAS28 には有意差を認めなかった (それぞれ p=.489、p=.177、p=.751)。抗 CCP 抗体値は SE 陽性群で有意に高く (SE 陽性群 91.7 U/ml、SE 陰性群 40.0 U/ml、中央値、p=0.003)、SE と抗 CCP 抗体の関連を示す既報と合致した(4)。RF においても同様の傾向を認めたが有意差はなかった (SE 陽性群 77 IU/ml、SE 陰性群 32.5 IU/ml、中央値、p=0.054)。

SE 陽性群及び陰性群の各免疫細胞サブセットの比較を行い、各サブセット比率の差を Figure3A、Table4 に示した。SE 陽性群では memory T 細胞比率、細分画では特に Th1、Tfh17、Treg 比率が有意に増加していた (memoryT: +27.33%、p=.036、Th1: +34.05%、p=.020、Tfh17: +40.46% p=.014、Treg: +55.97%、p=.046)。HD と比較して RA 全体では memoryT 細胞比率が減少しているが、SE 陽性群に限れば健常人に近い比率だった (Table3、Table4)。抗 CCP 抗体値と memoryT 細胞比率には正の相関が認められ (Table5)、SE 陽性群での抗 CCP 抗体値及び memoryT 細胞比率の増加はこれと合致す

る結果であった。

RA T 細胞上の HLA-DR 発現増加は抗 CCP 抗体値と関わる

SE の有無と実際の末梢血単核球表面の HLA-DR 発現との関連を調べるため、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球、DC 上の HLA-DR 発現をフローサイトメトリーにて評価した。T 細胞及びNK 細胞においては、HLA-DR 発現は一部の細胞のみに認められる活性化マーカーであるため、HLA-DR 陽性率を用いて評価した(44)(57)。B 細胞の 98.6% (82 例の中央値) が HLA-DR 陽性であり、単球や DC はその定義上 100%が HLA-DR 陽性であるため陽性率によってこれらの細胞の HLA-DR 発現を評価することはできない。そのため、蛍光ビーズを対照として計算した 1 細胞あたりの HLA-DR 定量値を用いて評価を行った。HD、SE 陰性 RA 群、SE 陽性 RA 群の 3 群での HLA-DR 発現の比較し Figure3B に示した。RA では T 細胞及び NK 細胞の HLA-DR 陽性率が上昇していた (T 細胞: HD 8.13%、SE 陰性 RA 9.90%、SE 陽性 RA 13.7%、 $p<.001$ 、NK 細胞: HD 7.74%、SE 陰性 RA 9.39%、SE 陽性 RA 15.9%、中央値、 $p<.001$)。更に T 細胞の HLA-DR 陽性率は抗 CCP 抗体値との正の相関を示すことから (Table6)、T 細胞の活性化が RA の抗 CCP 抗体産生において役割を果たすことが示唆された。また、SE 陽性 RA 群においてのみ、B 細胞及び単球上の HLA-DR 発現量上昇を認めていた (B 細胞: HD 3.31×10^4 /cell、SE 陰性 RA 4.03×10^4 /cell、SE 陽性 RA 3.78×10^4 /cell、中央

値、 $p=0.023$ 、単球: HD 0.85×10^4 /cell、SE 陰性 RA 0.74×10^4 /cell、SE 陽性 RA 1.02×10^4 /cell、中央値、 $p=0.020$ 、DC: HD 3.90×10^4 /cell、SE 陰性 RA 3.55×10^4 /cell、SE 陽性 RA 3.45×10^4 /cell、中央値、 $p=0.747$)。B 細胞、単球の HLA-DR 発現量と臨床指標の明確な相関は認めなかった (Table6)。

以上より RA では T 細胞の活性化が生じておりそれが抗 CCP 抗体産生と正の相関を示すこと、SE 陽性は抗原提示細胞である B 細胞、単球上の HLA-DR 発現量と関連することが示された。

ABT による治療では T 細胞活性が低下し、更に Treg と CD14^{bri}CD16⁺単球比率が減少する

ABT は T 細胞を標的とした治療とされるが、実際の患者での免疫学的な変化に関する知見は限られている。ABT による治療が免疫細胞サブセットに与える影響を検討するため、15 名の RA 患者で治療前と治療後に免疫細胞タイピングを行い比較した。15 名の平均年齢は 59 歳、14 名が女性、13 名が RF および抗 CCP 抗体陽性、9 名が SE 陽性だった。平均罹病期間は 12 年、3 名は他の生物学的製剤からの切り替えで、12 名は 1 剤目の生物学的製剤使用であった。

ABT による治療後には DAS28 の有意な減少を認めた (Figure4A、治療前 DAS28 4.93、治療後 DAS28 3.69、平均、 $p=0.004$)。RF には変化を認めなかった (治療前:RF 115.8

IU/ml、治療後 RF 101.80 IU/ml、平均、 $p=.304$)。治療前後で免疫細胞タイピング結果を比較すると Treg と CD14briCD16+単球比率の減少を認めた (Figure4B、Treg: -35.4% $p=.031$ 、CD14briCD16+ -25.2%、 $p=.021$)。mDC についても 41.9%の増加を認めたが、治療前後解析例が 5 例と限られていたため有意ではなかった ($p=.193$)。さらに各細胞の HLA-DR 発現を治療前後で比較すると T 細胞のみで有意な HLA-DR 発現の減少を認め T 細胞の活性低下が示された (Figure4C、治療前: 14.9%、治療後: 10.4%、 $p<.001$)。

ABT 治療によって T 細胞の活性化が低下するのみならず Treg 比率が減少すること、また CD14briCD16+単球サブセットの減少を認め、これらと ABT の治療効果との関連を示唆した。

関節滑液 CD4 陽性 T 細胞での CXCR4 発現上昇

RA の炎症病変の中心は関節滑膜局所である。関節穿刺の際に得られる関節滑液を利用することで実際に炎症局所において生じている免疫異常に関する検討を行うことが可能である。私は関節遊走に関連しうる細胞表面マーカーとして報告されている CXCR4 発現に着目し、関節滑液及び末梢血の CD4 陽性 T 細胞の各サブセットでの発現を検討した。

まず、6 名の RA 患者の関節滑液を検討した。平均年齢は 59 歳、全員が女性だった。

平均罹病期間は 20 年で、5 名がメトトレキサートを含む抗リウマチ薬による治療中、1 名が生物学的製剤であるゴリムマブによる治療中だった。Figure5 に関節滑液の CD4 陽性 T 細胞の細胞表面マーカーの分析結果を示した。関節滑液 CD4 陽性 T 細胞の 96.7%が CD45RA 陰性であり、92.6%が CXCR4 陽性であった (6 例での平均値)。一方末梢血 CD4 陽性 T 細胞の免疫細胞タイピングにおける表面マーカーである CXCR5 (陽性率 3.76%、6 例での平均値)、CXCR3 (17.6%)、CCR6 (33.5%)、CD25 (11.8%) の発現は一部の細胞のみに認められた。したがって CD45RA 陰性及び CXCR4 陽性は関節滑液 CD4 陽性 T 細胞の特徴と考えられた。

末梢血 CD4 陽性 T 細胞の CXCR4 発現上昇は臨床的活動性に関わる

末梢血 CD4 陽性 T 細胞サブセットにおける CXCR4 発現について検討するため、24 例の RA 患者と 26 例の HD で比較を行い Figure6A に示した。RA の CD4 陽性 T 細胞のすべてのサブセットで CXCR4 の発現上昇を認めた (** $p < .01$ 、*** $p < .001$)。CXCR4 は naiveT 細胞及び Tfh 細胞で陽性率が高く、memoryT 細胞サブセットの細分画サブセット間 (Th1、Th2、Th17、Th1/17) や Tfh サブセットの細分画サブセット間 (Tfh1、Tfh2、Tfh17) ではほぼ一定していた。各サブセットの CXCR4 発現と臨床指標の相関検討を Table7 に示した。memoryT 細胞の CXCR4 発現が DAS28 と最も強い正の相関を示し (Rho=.469、 $p = .021$)、更に抗 CCP 抗体値 (Rho=.449、 $p = .032$)、HAQ (Rho=.639、

p=.004) とも正の相関を示した (Figure6B) 。したがって末梢血 CD4 陽性 T 細胞の中でも特に memoryT 細胞の CXCR4 発現上昇が疾患活動性や抗 CCP 抗体と関わることを示され、RA の関節炎病態に関与している細胞集団である可能性が考えられた。また、memoryT 細胞の CXCR4 発現と特に B 細胞の HLA-DR 発現量とに正の相関の傾向が認められ、B 細胞上の HLA-DR を介した T 細胞刺激と CXCR4 発現の関係が示唆された (Figure6C、B 細胞: Rho=.389、p=.060、単球: Rho=.056、p=.796、DC: Rho=.150、p=.494、スピアマンの順位相関係数) 。

RNA-seq による CD4 陽性 T 細胞サブセットの発現パターンの比較

免疫細胞タイピングにおいて、CD4 陽性 T 細胞の細胞表面のケモカインレセプターである CXCR3/CCR6/CXCR5 による分類を利用した。この分類の妥当性は健常人サンプルを用いてすでに評価されているが(48)(58)、RA 患者における妥当性は十分に確立していない。mRNA レベルにおけるサブセットの特徴を網羅的に調べるため、私は CD4 陽性 T 細胞サブセットにおいて RNA-seq による発現解析を行いその評価を行った。RNA-seq は RNA 由来の cDNA を次世代シーケンサーによってシーケンスする手法である。DNA マイクロアレイに代表される既存の手法よりも網羅的に、高い定量性のトランスクリプトーム解析を行うことができる(59)。

1 名の HD と 3 名の RA 患者において、Naive、Th1、Th2、Th17、Th17.1、Tfh、CD25+

の 7 サブセットをフローサイトメトリーによってソートし計 28 サンプルについて RNA-seq を行った。多次元の発現データを集約し可視化するため主成分分析による比較を行った (Figure7A) (60)。各サブセットはそれぞれ発現パターンが似通っているが、HD と RA の差は明確ではなかった。第一主成分によって Naïve サブセットはそれ以外の 6 サブセットと区別され、第二主成分によって CD25+サブセットはエフェクターサブセットに相当する Th1、Th2、Th17、Th17.1、Tfh と区別された (Figure7A 左)。更に第三主成分と第四主成分のプロットによってエフェクターサブセット群は区別され、Th1 と Th2、及び Th17 と Th17.1 は相互に発現パターンが似通っていた (Figure7A 右)。ユークリッド距離によるクラスタリング解析においても同様のサブセット間の関係が裏付けられた (Figure7B)。各サブセットにはそれぞれ特有の mRNA 発現パターンが存在し「サブセット」として妥当であること、特に Naïve サブセットと CD25+サブセットは発現パターンにおいて特徴的なサブセットであることが示された。

RA において重要遺伝子の発現は表面マーカーによるサブセット特異的ではない

Th1 細胞は転写因子 t-bet (遺伝子名 TBX21) の発現と、サイトカイン IFN- γ (遺伝子名 IFNG) の産生に特徴づけられる細胞であり、Th2 細胞は同様に GATA3 を発現し IL-4 を産生する。比較的新しく定義されたサブセットである Th17、Tfh、Treg についても同様に、ROR γ t (遺伝子名 RORC) 及び IL-17A が Th17、Bcl6 及び IL-21 が Tfh、foxp3

が Treg の特徴とされている(61-62)。Figure8 にこれらの重要遺伝子と分類に利用した細胞表面マーカーである CXCR3/CCR6/CXCR5/CD25 (遺伝子名 IL2RA) の発現の比較を示した。

まず CXCR3/CCR6/CXCR5/CD25 についてはそれぞれ陽性サブセットとして定義されるサブセットに高発現していることが確認された。Th1 は CXCR3、TBX21、IFNG、Th17 は CCR6、RORC を高発現しサブセット定義の妥当性を示した。Th1 には Tfh の特徴の BCL6、IL-21 の発現も併存していた。IL17A の発現は Th17、Th17.1 サブセットと合致せず、発現は非常に限られていた。Th2 は GATA3、IL4 を高発現したが、一方で RA 例では Th1 の特徴である TBX21、IFNG の発現も認めた。Tfh サブセットについては、BCL6 の発現は明確ではなかった。末梢血中の Tfh 対応サブセットとリンパ濾胞の Tfh サブセットは完全には同一ではなく、末梢血 Tfh 対応サブセットは Bcl6 の発現も限られているという報告に合致するものと考えられた(63)。CD25+サブセットについては特徴に合致する CD25、FOXP3 また抑制性サイトカインの IL10 の高発現を認めると同時に、エフェクターサブセットの Th2、Th17、Tfh の特徴も併せ持ち不均一性が示された。重要遺伝子の発現から各サブセットを評価すると、表面マーカーは妥当であっても転写因子、無刺激条件下でのサイトカイン産生は不均一性であり、各サブセットが必ずしも均一ではないことが示された。

考察

私は71名のHDと82名のRA患者を対象とした免疫細胞タイピングを行い、これまでの既報において最も広範な免疫細胞サブセットの比較を行った。また遺伝的なSEとRA患者の免疫細胞サブセットの関係を初めて検討した。CD4陽性T細胞においては、RA末梢血で病原性サブセットの候補と考えられているTh1、Th17、Tfhはその比率を減少しており、疾患活動性との相関を認めず、ABTによる治療でも変化を認めなかった (Figure2、Table3、Figure4B、Table5)。RA末梢血でのTregの増減については一定の結論が得られていないが(64-65)、本研究ではRA末梢血での減少を認めた。TregはABTによる治療によって既報に合致した減少を示し(66)、疾患活動性制御におけるTregの意義も明確ではなかった。

RNA-seqによる発現解析による発現パターンの類似性からサブセット分類の妥当性が示される一方、これらのサブセットが不均一であるという限界も示された。特にRA末梢血においてTh2サブセットはHDと比較して比率が減少しておらず、そこにTh1を特徴づける遺伝子発現が含まれる点は重要と考えられた (Figure2、Table3、Figure8)。Th1細胞は活性化によって細胞表面のCXCR3発現を低下させる(67)。RA患者末梢血にはCXCR3が陰性化した活性化Th1細胞が存在し、Th2サブセットとして分類されている可能性を示唆するものと考えられる。またCD25+サブセットに制御

性サブセットとエフェクターサブセット細胞である Th2、Th17、Tfh が混在している可能性があった。これらが免疫細胞タイピング自体の限界であるのか、RA の疾患特異的な変化であるかについて更なる検討が必要と考えられる。

RA 末梢血における B 細胞サブセットの変化については、本研究と合致する unswMB の減少や DNB の増加が報告されている (Figure2、Table3) (68-69)。naiveB 細胞の増加及び swMB の減少は既報とは相反する結果であった(70)。TransB は T 細胞の活性化を抑制する制御性 B 細胞サブセットの一つであり、活動性 RA で減少していると報告されているものの本研究では有意な差を認めなかった(71)。患者集団や対照群の違い、実験手法の違いにより異なる結果が得られた可能性がある。

高い炎症性サイトカイン産生能が報告されている CD14briCD16+単球は HD と比較して RA で上昇しており(50)、更に ABT による治療によって減少を認めた点で病態と関連したサブセットと考えられた。ABT は T 細胞を標的とした治療薬であるが、抗原提示細胞上の CD80/CD86 と結合することで抗原提示細胞の活性化や機能を抑制する逆方向のシグナルも報告されている(72)。CD14briCD16+単球の減少は T 細胞を介した影響だけではなく、単球への ABT の直接作用の可能性もある。mDC は HD と比較して RA 末梢血で減少しており、ABT 治療によって増加する傾向を認めた。mDC は RA 患者末梢血では減少しており TNF- α 阻害薬であるインフリキシマブによって増加すること、関節滑液では増加していることが報告されており、炎症関節局所で抗原

提示細胞として働く可能性がある(73-74)。

SE は CD4 陽性 T 細胞への抗原提示によって、抗 CCP 抗体陽性 RA と強く関連すると考えられてきた。しかし、SE 陽性が RA 患者の CD4 陽性 T 細胞サブセットへ与える影響についての知見は限られている。私は、SE 陽性 RA では CD4 T 細胞中の memoryT 細胞比率が増加しており (Figure3) 、memoryT 細胞比率及び T 細胞 HLA-DR 陽性率と抗 CCP 抗体値との正の相関が存在することを示した (Table5 及び Table6)。

これらの結果は CD4 陽性 T 細胞を介した獲得免疫反応が実際に SE 陽性 RA で活性化し、抗 CCP 抗体産生に関わることを示唆する。SE 陽性 RA での B 細胞及び単球の HLA-DR 発現上昇は、CD4 陽性 T 細胞への抗原提示を効率化している可能性がある (Figure3B) (75)。既報において、SE 陽性 RA 患者の末梢血中にごく少数存在するシトルリン化ペプチド特異的 CD4 陽性 T 細胞を MHC-ペプチドテトラマーを用いて特定すると、CD45RO+CXCR3+の Th1 型であることが報告されている(76)。本研究においても SE 陽性群では Th1、Tfh17、Treg が有意な上昇を認めており、これらのサブセットが抗 CCP 抗体産生機序に関わる候補となりうると考えられる。一方、RF については検討したサブセットの中で PB が最も強い相関を認めた (Table5) 。RF の産生機序が抗 CCP 抗体とは異なるメカニズムである可能性を示唆する結果と考えられる。

私は CD4 陽性細胞のサブセットにおける CXCR4 の発現を詳細に検討し、CD4 陽性細胞 memoryT サブセットでの CXCR4 の発現上昇と疾患活動性や抗 CCP 抗体値が強

く関連することを示した (Figure6B、Table7)。更に B 細胞の HLA-DR 発現は memory T 細胞の CXCR4 発現上昇と相関する傾向があった (Figure6C)。T 細胞受容体を介した刺激によって、CD4 陽性 T 細胞上の CXCR4 発現は一時的に低下した後、数日かけて上昇していくことが報告されている(34)。したがって、B 細胞上の HLA-DR を介した T 細胞受容体刺激によって CD45RA 陰性 T 細胞に CXCR4 の発現上昇が起こると考えられる。CXCR4 の発現上昇は関節への遊走能を高め、関節局所で抗 CCP 抗体産生を促している可能性がある (Figure9)。今後末梢血と関節滑液の CXCR4 陽性 T 細胞につき、サイトカイン産生能など *in vitro* での機能解析や TCR レパートリー解析による類縁性の解析など多面的な解析が必要と考えられる。

本研究には複数の限界がある。RA 患者群は活動性の高い症例を中心としており、一般的な患者群を必ずしも反映しない可能性がある。対照群である HD と RA 患者群には年齢差があり、両群の比較における潜在的交絡因子の存在を否定できない。免疫細胞タイピングにおいて各サブセット比率に基づく検討を行っているが、細胞数の絶対数についての検討も必要である。HD の HLA-DRB1 のタイピングを行っていないため、RA で観察された SE の影響が疾患特異的な変化であるか不明である。CD4 サブセットの RNA-seq はサンプルが限られており、より多くのサンプルによる HD と RA サブセットの質的な違いも含めた検討が必要である。また、本研究の結果について今後独立した患者群での再現性の確認が期待される。

私は 82 名の RA 患者を対象とした免疫細胞タイピングを行い、SE 陽性 RA 患者では memoryT 細胞サブセットの増加に示される CD4 陽性 T 細胞を介した獲得免疫反応が活性化しており、これが抗 CCP 抗体値と相関することを示した。末梢血中の Th1、Th17、Tfh、Treg サブセットには明確な疾患活動性との関連は認めず、CD4 陽性 CD45RA 陰性細胞での CXCR4 発現上昇が疾患活動性や抗 CCP 抗体値と関連することを示した。本研究によって、個々の RA 症例の免疫学的な不均一性への理解が深まるのみならず、今後 T 細胞を中心とした RA の免疫学的異常を標的とした新規治療の開発にも結び付く可能性があるものと考えられる。

参考文献

1. 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.
2. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1987 Nov;30(11):1205-13.
3. Diogo D, Okada Y, Plenge RM. Genome-wide association studies to advance our understanding of critical cell types and pathways in rheumatoid arthritis: Recent findings and challenges. *Curr Opin Rheumatol*. 2014 Jan;26(1):85-92.
4. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum*. 2005 Nov;52(11):3433-8.
5. Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Ishii T, Horita T, et al. An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: Effects of *09:01 allele on disease phenotypes. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Jul;52(7):1172-82.

6. Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG, et al. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: Results from a primary care-based incident case-control study in norfolk, england. *Arthritis Rheum.* 1997 Nov;40(11):1955-61.
7. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* 2006 Jan;54(1):38-46.
8. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2012 Jan 29;44(3):291-6.
9. Scally SW, Petersen J, Law SC, Dudek NL, Nel HJ, Loh KL, et al. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 2013 Nov 18;210(12):2569-82.
10. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2000 Jan;43(1):155-63.
11. Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A, et al.

Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis.* 2003 Feb;62(2):120-6.

12. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004 Feb;50(2):380-6.

13. Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, et al. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):961-73.

14. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest.* 2012 May 1;122(5):1791-802.

15. Dorner T, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin Rheumatol.* 2004 May;16(3):246-53.

16. Hecht C, Englbrecht M, Rech J, Schmidt S, Araujo E, Engelke K, et al. Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann Rheum Dis.* 2014 Aug 12.

17. Klarenbeek PL, de Hair MJ, Doorenspleet ME, van Schaik BD, Esveldt RE, van de Sande

MG, et al. Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease. *Ann Rheum Dis.* 2012 Jun;71(6):1088-93.

18. Amara K, Steen J, Murray F, Morbach H, Fernandez-Rodriguez BM, Joshua V, et al. Monoclonal IgG antibodies generated from joint-derived B cells of RA patients have a strong bias toward citrullinated autoantigen recognition. *J Exp Med.* 2013 Mar 11;210(3):445-55.

19. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011 Dec 8;365(23):2205-19.

20. Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996 Dec;39(12):1961-9.

21. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1133-41.

22. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1123-32.

23. 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.

24. Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushi JI, Kaibara N, et al. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Sep;67(9):1299-304.

25. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63.

26. Ma J, Zhu C, Ma B, Tian J, Baidoo SE, Mao C, et al. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:827480.

27. Liu R, Wu Q, Su D, Che N, Chen H, Geng L, et al. A regulatory effect of IL-21 on T follicular helper-like cell and B cell in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012 Nov 23;14(6):R255.

28. 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.

29. 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.

30. Wehrens EJ, Prakken BJ, van Wijk F. T cells out of control--impaired immune regulation

in the inflamed joint. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Jan;9(1):34-42.

31. van Amelsfort JM, van Roon JA, Noordegraaf M, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, et al. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4⁺,CD25⁺ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Mar;56(3):732-42.

32. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, et al. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med*. 2014 Jan;20(1):62-8.

33. Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, et al. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4⁺ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165(11):6590-8.

34. Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, et al. Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. *J Immunol*. 2000 Sep 15;165(6):3423-9.

35. Kanbe K, Takagishi K, Chen Q. Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4. *Arthritis Rheum*. 2002 Jan;46(1):130-7.

36. Bryant J, Ahern DJ, Brennan FM. CXCR4 and vascular cell adhesion molecule 1 are key

chemokine/adhesion receptors in the migration of cytokine-activated T cells. *Arthritis Rheum.*

2012 Jul;64(7):2137-46.

37. Wang A, Guilpain P, Chong BF, Chouzenoux S, Guillevin L, Du Y, et al. Dysregulated expression of CXCR4/CXCL12 in subsets of patients with systemic lupus erythematosus.

Arthritis Rheum. 2010 Nov;62(11):3436-46.

38. Chung SH, Seki K, Choi BI, Kimura KB, Ito A, Fujikado N, et al. CXC chemokine receptor 4 expressed in T cells plays an important role in the development of collagen-induced

arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(5):R188.

39. Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev.* 2003

Apr;192:161-80.

40. Weinblatt ME, Schiff M, Valente R, van der Heijde D, Citera G, Zhao C, et al.

Head-to-head comparison of subcutaneous abatacept versus adalimumab for rheumatoid arthritis: Findings of a phase IIIb, multinational, prospective, randomized study. *Arthritis*

Rheum. 2013 Jan;65(1):28-38.

41. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of

rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2007 Dec 1;370(9602):1861-74.

42. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, et al.

EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and

biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis.* 2014 Mar;73(3):492-509.

43. Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, et al. 2012 update of the 2008 american college of rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012 May;64(5):625-39.

44. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat Rev Immunol.* 2012 Feb 17;12(3):191-200.

45. 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.

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

47. Yokoyama WM, Thompson ML, Ehrhardt RO. Cryopreservation and thawing of cells. *Curr Protoc Immunol.* 2012 Nov;Appendix 3:3G.

48. 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.

49. Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A*. 2010 May;77(5):410-9.

50. 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 Rheum*. 2012 Mar;64(3):671-7.

51. Fisher BA, Bang SY, Chowdhury M, Lee HS, Kim JH, Charles P, et al. Smoking, the HLA-DRB1 shared epitope and ACPA fine-specificity in Koreans with rheumatoid arthritis: Evidence for more than one pathogenic pathway linking smoking to disease. *Ann Rheum Dis*. 2014 Apr;73(4):741-7.

52. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*. 2013 Apr 25;14(4):R36,2013-14-4-r36.

53. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Corrigendum: Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and cufflinks. *Nat Protoc*. 2014 Oct;9(10):2513,2513a. Epub 2014 Sep 25.

54. Leek JT, Scharpf RB, Bravo HC, Simcha D, Langmead B, Johnson WE, et al. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nat Rev Genet.* 2010 Oct;11(10):733-9.
55. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics.* 2012 Mar 15;28(6):882-3.
56. Ponchel F, Goeb V, Parmar R, El-Sherbiny Y, Boissinot M, El Jawhari J, et al. An immunological biomarker to predict MTX response in early RA. *Ann Rheum Dis.* 2014 Nov;73(11):2047-53.
57. Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, Queiros ML, Justica B, Orfao A. The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states. *Blood Cells Mol Dis.* 2002 Mar-Apr;28(2):181-90.
58. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature.* 2012 Apr 26;484(7395):514-8.
59. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009 Jan;10(1):57-63.

60. Ringner M. What is principal component analysis? *Nat Biotechnol.* 2008 Mar;26(3):303-4.
61. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89.
62. Nakayamada S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol.* 2012 Jun;24(3):297-302.
63. He J, Tsai LM, Leong YA, Hu X, Ma CS, Chevalier N, et al. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity.* 2013 Oct 17;39(4):770-81.
64. Moradi B, Schnatzer P, Hagmann S, Rosshirt N, Gotterbarm T, Kretzer JP, et al. CD4(+)CD25(+)/highCD127low/(-) regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints--analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood. *Arthritis Res Ther.* 2014 Apr 17;16(2):R97.
65. 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.
66. 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 Aug 5;14:34,2172-14-34.

67. Chen J, Vistica BP, Takase H, Ham DI, Fariss RN, Wawrousek EF, et al. A unique pattern of up- and down-regulation of chemokine receptor CXCR3 on inflammation-inducing Th1 cells. *Eur J Immunol.* 2004 Oct;34(10):2885-94.

68. Moura RA, Weinmann P, Pereira PA, Caetano-Lopes J, Canhao H, Sousa E, et al. Alterations on peripheral blood B-cell subpopulations in very early arthritis patients. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jun;49(6):1082-92.

69. de la Torre I, Moura RA, Leandro MJ, Edwards J, Cambridge G. B-cell-activating factor receptor expression on naive and memory B cells: Relationship with relapse in patients with rheumatoid arthritis following B-cell depletion therapy. *Ann Rheum Dis.* 2010 Dec;69(12):2181-8.

70. Fekete A, Soos L, Szekanecz Z, Szabo Z, Szodoray P, Barath S, et al. Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: Suggested relationships with antigen-driven immune responses. *J Autoimmun.* 2007 Sep-Nov;29(2-3):154-63.

71. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med.* 2013 Feb 20;5(173):173ra23.

72. Bonelli M, Ferner E, Goschl L, Bluml S, Hladik A, Karonitsch T, et al. Abatacept

(CTLA-4IG) treatment reduces the migratory capacity of monocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2013 Mar;65(3):599-607.

73. Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR, Gracie JA, Sturrock RD, Tak PP, et al. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(1):R15.

74. Richez C, Schaefferbeke T, Dumoulin C, Dehais J, Moreau JF, Blanco P. Myeloid dendritic cells correlate with clinical response whereas plasmacytoid dendritic cells impact autoantibody development in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):R100.

75. Kerlan-Candon S, Louis-Pence P, Wiedemann A, Combe B, Clot J, Eliaou JF, et al. Specific overexpression of rheumatoid arthritis-associated HLA-DR alleles and presentation of low-affinity peptides. *Arthritis Rheum.* 2001 Jun;44(6):1281-92.

76. James EA, Rieck M, Pieper J, Gebe JA, Yue BB, Tatum M, et al. Citrulline-specific Th1 cells are increased in rheumatoid arthritis and their frequency is influenced by disease duration and therapy. *Arthritis Rheumatol.* 2014 Jul;66(7):1712-22.

謝辞

本研究を進めるにあたり多くのご支援とご指導を賜りました指導教員の山本一彦教授に深く感謝いたします。また第18研究室の藤尾圭志講師、庄田宏文助教、住友秀次助教には本研究のテーマ選択と実施において多くのお力添えと示唆を頂き深く感謝いたします。また同研究室の仲地真一郎大学院生、加藤里佳大学院生、土田優美大学院生、櫻井恵一大学院生、土屋遙香大学院生、花田徳大大大学院生には共同で末梢血および関節滑液の実験に取り組み、臨床情報の収集やフローサイトメトリー解析において分担いただき深く感謝いたします。井上堯実験助手にはフローサイトメトリー解析において技術補佐をいただき深く感謝いたします。生物学的製剤治療中のRA患者の臨床情報の収集においてご協力いただいた免疫療法管理学講座の神田浩子特任准教授、立石晶子特任助教に深く感謝いたします。共同研究機関である理化学研究所統合生命医科学研究センター自己免疫疾患研究チームの高地雄太上級研究員、鈴木亜香里上級研究員、石垣和慶研究員、山口健介研究員にはCD4陽性T細胞サブセットのRNA-seq解析の実施、データ解析につき多大なご協力をいただき深く感謝いたします。

Table1. 研究母集団の特徴

	HD	RA	p value
number, n	71	82	
female/male	52/19	67/15	0.209
age, years, median (IQR)	33 (28-41)	62 (48-67)	<0.001
RA duration, years, median (IQR)		4 (1-17)	
DAS28, median (IQR)		4.4 (3.45-5.47)	
remission/LDA/MDA/HDA, n		11/6/35/30	
HAQ, median (IQR)		0.8125 (0.25-1.75)	
Shared Epitope positivity, %		61	
RF positivity, %		88	
Anti-CCP antibody positivity, %		80	
treatment naïve, %		18	
treatment with methotrexate, %		50	
treatment with biologics, %		24	

性別はカイ 2 乗検定、年齢は Mann-Whitney U test にて比較した。HD: Healthy Donor、RA: Rheumatoid Arthritis、IQR: Interquartile range、DAS28: Disease Activity Score 28 joints-ESR、LDA: low disease activity、MDA: moderate disease activity、HDA: high disease activity、HAQ: Health Assessment Questionnaire Disability Index、RF: Rheumatoid Factor、Anti-CCP antibody: Anti-cyclic citrullinated peptide antibody

Table2. 免疫細胞タイピングにおけるサブセット定義

subset name (abbreviations)	cell definition
CD4+ T cells	CD3+CD4+
naive CD4+ T cells	CD3+CD4+CD45RA+CXCR5-
memory CD4+ T cells	CD3+CD4+CD45RA-CXCR5-
follicular helper T cells (Tfh)	CD3+CD4+CD45RA-CXCR5+
T helper type-1 cells (Th1)	CD3+CD4+CD45RA-CXCR5-CXCR3+CCR6-
T helper type-2 cells (Th2)	CD3+CD4+CD45RA-CXCR5-CXCR3-CCR6-
T helper type-17 cells (Th17)	CD3+CD4+CD45RA-CXCR5-CXCR3-CCR6+
T helper type1/17 cells (Th1/17)	CD3+CD4+CD45RA-CXCR5-CXCR3+CCR6+
follicular helper T cells/Th1 cells (Tfh1)	CD3+CD4+CD45RA-CXCR5+CXCR3+CCR6-
follicular helper T cells/Th2 cells (Tfh2)	CD3+CD4+CD45RA-CXCR5+CXCR3-CCR6-
follicular helper T cells/Th17 cells (Tfh17)	CD3+CD4+CD45RA-CXCR5+CXCR3-CCR6+
regulatory T cells (Treg)	CD3+CD4+CD45RA-CD25+CD127low
B cells	CD3-CD19+
naive B cells	CD3-CD19+IgD+CD27-
unswitched memory B cells (swB)	CD3-CD19+IgD+CD27+
switched memory B cells (swB)	CD3-CD19+IgD-CD27+
double negative B cells (DNB)	CD3-CD19+IgD-CD27-
plasmablast (PB)	CD3-CD19+IgD-CD27highCD38high
transitional B cells (TransB)	CD3-CD19+CD24highCD38high
natural killer cells (NK)	CD3-CD19-CD14-CD56+
CD16+ NK cell	CD3-CD19-CD14-CD56lowCD16+
CD16- NK cell	CD3-CD19-CD14-CD56highCD16-
Monocytes	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14+
CD14brightCD16- monocyte	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14brightCD16-
CD14brightCD16+ monocyte	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14brightCD16+
CD14dimCD16+ monocyte	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14dimCD16+
dendritic cells (DC)	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14-
myeloid dendritic cells (mDC)	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14-CD11c+CD123-
plasmacytoid dendritic cells (pDCs)	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14-CD11c-CD123+

Table3. HD と RA の免疫細胞タイピングの比較

subset name (abbreviations)	HD (n=71)	RA (n=82)	p values
CD4+ T cells			
naive CD4+ T cells	51.1 (41.9-58.5)	59.4 (48.4-68.7)	0.001
memory CD4+ T cells	34.0 (28.7-40.4)	28.2 (20.0-36.1)	<0.001
follicular helper T cells (Tfh)	11.0 (9.47-15.2)	8.98 (6.34-12.3)	0.002
T helper type-1 cells (Th1)	7.52 (6.05-10.1)	5.46 (3.74-8.06)	<0.001
T helper type-2 cells (Th2)	8.55 (7.02-9.92)	10.5 (5.62-15.1)	0.439
T helper type-17 cells (Th17)	8.15 (6.25-9.97)	6.82 (4.02-9.19)	0.004
T helper type1/17 cells (Th1/17)	8.45 (6.55-11.5)	4.57 (2.66-6.51)	<0.001
follicular helper T cells/Th1 cells (Tfh1)	2.42 (1.73-3.19)	2.06 (1.51-2.93)	0.102
follicular helper T cells/Th2 cells (Tfh2)	2.67 (2.08-3.59)	2.67 (2.15-3.86)	0.547
follicular helper T cells/Th17 cells (Tfh17)	4.46 (3.56-5.87)	2.85 (1.87-4.57)	<0.001
regulatory T cells (Treg)	3.19 (2.18-4.58)	2.39 (1.13-0.58)	0.002
B cells			
naive B cells	61.0 (49.6-70.2)	68.7 (54.7-80.2)	0.001
unswitched memory B cells (unswMB)	8.32 (6.43-11.8)	4.91 (3.68-7.30)	<0.001
switched memory B cells (swMB)	24.9 (17.4-32.6)	15.5 (9.91-22.1)	<0.001
double negative B cells (DNB)	5.89 (4.23-8.25)	7.59 (5.48-10.8)	0.004
plasmablast (PB)	2.13 (1.39-3.75)	1.07 (0.54-2.20)	<0.001
transitional B cells (TransB)	6.19 (3.89-8.26)	5.96 (3.52-8.68)	0.849
natural killer cells (NK)			
CD16+ NK cell	94.8 (91.6-96.1)	93.8 (85.2-96.3)	0.501
CD16- NK cell	5.18 (3.89-8.38)	6.25 (3.66-14.8)	0.225
Monocytes			
CD14brightCD16- monocyte	90.4 (85.7-92.6)	86.2 (79.5-92.2)	0.017
CD14brightCD16+ monocyte	2.16 (1.60-2.87)	3.59 (1.96-5.66)	<0.001
CD14dimCD16+ monocyte	7.71 (5.23-10.4)	8.40 (4.55-13.5)	0.384
dendritic cells (DC)			
myeloid dendritic cells (mDC)	47.2 (38.8-52.2)	33.6 (25.0-39.5)	<0.001
plasmacytoid dendritic cells (pDCs)	16.7 (11.6-24.3)	15.4 (10.5-26.5)	0.711

82名の関節リウマチ患者および71名の健常人の末梢血単核球をフローサイトメトリーにて免疫細胞タイピングした。それぞれのサブセットのCD4陽性T細胞(A), B細胞(B), NK細胞(C), 単球(D), 樹状細胞(E)中比率(%)を示し、年齢による線形回帰で補正後健常人と関節リウマチ間で比較を行った(Figure2に対応)。各サブセット比率(%)の中央値(四分位数範囲)を示す。p値はMann-Whitney U testによる。

Table4. HD と SE-RA と SE+RA の免疫細胞タイピングの比較

subset name (abbreviations)	HD (n=71)	SE-RA (n= 32)	SE+RA (n=50)	p values
CD4+ T cells				
naive CD4+ T cells	51.1 (41.9-58.5)	63.8 (54.2-74.7)	56.0 (46.0-65.6)	0.001
memory CD4+ T cells	34.0 (28.7-40.4)	23.2 (15.2-30.7)	30.3 (21.1-38.8)	<0.001
follicular helper T cells (Tfh)	11.0 (9.47-15.2)	8.20 (6.15-10.5)	9.98 (7.90-14.0)	0.002
T helper type-1 cells (Th1)	7.52 (6.05-10.1)	4.63 (3.32-5.89)	6.60 (3.98-9.13)	<0.001
T helper type-2 cells (Th2)	8.55 (7.02-9.92)	6.78 (4.72-13.0)	11.4 (6.11-15.6)	0.075
T helper type-17 cells (Th17)	8.15 (6.25-9.97)	5.15 (3.84-8.15)	7.08 (4.34-9.72)	0.007
T helper type1/17 cells (Th1/17)	8.45 (6.55-11.5)	3.62 (2.54-5.98)	5.00 (3.57-7.71)	<0.001
follicular helper T cells/Th1 cells (Tfh1)	2.42 (1.73-3.19)	1.81 (1.12-2.95)	2.24 (1.57-2.83)	0.147
follicular helper T cells/Th2 cells (Tfh2)	2.67 (2.08-3.59)	2.29 (1.70-3.22)	2.82 (2.39-4.21)	0.107
follicular helper T cells/Th17 cells (Tfh17)	4.46 (3.56-5.87)	2.39 (1.48-2.99)	3.68 (2.07-4.88)	<0.001
regulatory T cells (Treg)	3.19 (2.18-4.58)	1.61 (0.87-2.74)	2.61 (1.45-4.08)	0.001
B cells				
naive B cells	61.0 (49.6-70.2)	65.0 (52.5-73.5)	72.8 (62.2-81.8)	0.001
unswitched memory B cells (unswMB)	8.32 (6.43-11.8)	5.59 (3.90-8.28)	4.70 (3.67-6.98)	<0.001
switched memory B cells (swMB)	24.9 (17.4-32.6)	16.9 (10.9-24.5)	14.9 (9.87-21.0)	<0.001
double negative B cells (DNB)	5.89 (4.23-8.25)	9.18 (5.39-12.9)	7.16 (5.53-9.76)	0.01
plasmablast (PB)	2.13 (1.39-3.75)	1.03 (0.51-1.92)	1.19 (0.62-2.38)	<0.001
transitional B cells (TransB)	6.19 (3.89-8.26)	4.58 (3.47-7.99)	6.47 (3.77-9.22)	0.424
natural killer cells (NK)				
CD16+ NK cell	94.8 (91.6-96.1)	93.8 (85.5-96.4)	93.6 (83.2-96.2)	0.199
CD16- NK cell	5.18 (3.89-8.38)	6.25 (3.56-14.5)	6.44 (3.75-16.8)	0.199
Monocytes				
CD14brightCD16- monocyte	90.4 (85.7-92.6)	85.1 (78.6-94.6)	86.2 (79.5-91.8)	0.03
CD14brightCD16+ monocyte	2.16 (1.60-2.87)	4.10 (1.92-7.32)	3.32 (1.99-4.89)	<0.001
CD14dimCD16+ monocyte	7.71 (5.23-10.4)	8.29 (3.57-15.3)	9.00 (5.82-13.5)	0.393
dendritic cells (DC)				
myeloid dendritic cells (mDC)	47.2 (38.8-52.2)	36.0 (30.6-39.5)	31.8 (22.7-39.2)	<0.001
plasmacytoid dendritic cells (pDCs)	16.7 (11.6-24.3)	12.2 (10.4-17.1)	21.3 (10.7-31.6)	0.256

82名の関節リウマチ患者および71名の健常人の末梢血単核球をフローサイトメトリーにて免疫細胞タイピングした。それぞれのサブセットのCD4陽性T細胞(A), B細胞(B), NK細胞(C), 単球(D), 樹状細胞(E)中比率(%)を示し、年齢による線形回帰で補正後健常人とshared epitope陰性(SE-)、shared epitope陽性(SE+)関節リウマチ間で比較を行った。各サブセット比率(%)の中央値(四分位数範囲)を示す。p値はKruskal-Wallis testによる。

Table5. 免疫細胞サブセット比率と臨床指標の相関

(表は次頁に示す)

DAS28、抗 CCP 抗体値、RF 力価、HAQ、罹病期間と 82 名の RA 患者の免疫細胞タイピングサブセット比率との関係をスピアマンの順位相関係数にて評価した。各サブセットの定義は Table2 による。

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $P < 0.001$ 、スピアマンの順位相関係数および p 値を示す。

		DAS28	Anti-CCP Antibody	RF	HAQ	disease duration
naiveT	Spearman's Rho	-.042	-.374***	-.158	-.170	-.046
	p value	.714	.001	.167	.167	.686
memoryT	Spearman's Rho	.057	.325***	.198	.182	.041
	p value	.620	.004	.082	.137	.717
Tfh	Spearman's Rho	.007	0.285*	-.036	.007	.024
	p value	.951	.011	.755	.952	.833
Th1	Spearman's Rho	.004	.253*	-.014	-.070	-.260*
	p value	.971	.026	.902	.574	.021
Th2	Spearman's Rho	.107	.283*	.194	.172	.169
	p value	.359	.013	.094	.168	.141
Th17	Spearman's Rho	-.039	.178	.036	.002	.063
	p value	.736	.121	.758	.990	.583
Th1/17	Spearman's Rho	-.113	.054	-.181	-.153	-.249*
	p value	.327	.642	.116	.217	.028
Tfh1	Spearman's Rho	-.022	.265*	-.121	-.077	-.192
	p value	.849	.020	.296	.535	.092
Tfh2	Spearman's Rho	-.117	.221	-.008	-.071	.002
	p value	.309	.054	.942	.567	.989
Tfh17	Spearman's Rho	-.060	.165	-.036	.011	.104
	p value	.603	.151	.757	.932	.363
Treg	Spearman's Rho	.040	.188	.145	-.137	-.361**
	p value	.754	.137	.252	.312	.003
naiveB	Spearman's Rho	.092	-.123	-.004	-.110	-.200
	p value	.421	.281	.974	.374	.076
unswMB	Spearman's Rho	-.173	-.018	-.157	-.141	-.014
	p value	.128	.878	.166	.253	.901
swMB	Spearman's Rho	-.111	.063	-.021	.086	.184
	p value	.329	.583	.850	.483	.102
DNB	Spearman's Rho	.039	.213	.110	.270*	.221*
	p value	.734	.060	.330	.026	.049
PB	Spearman's Rho	.019	.125	.405***	-.031	.014
	p value	.869	.279	.000	.802	.905
TransB	Spearman's Rho	.089	.053	.115	-.029	.006
	p value	.446	.656	.328	.816	.960
CD16+NK	Spearman's Rho	-.003	.126	.040	.088	-.055
	p value	.982	.288	.738	.485	.644
CD16-NK	Spearman's Rho	.003	-.126	-.040	-.088	.055
	p value	.982	.288	.738	.485	.644
CD14briCD16- Monocyte	Spearman's Rho	-.005	-.131	.001	-.151	.016
	p value	.964	.253	.996	.211	.888
CD14briCD16+ Monocyte	Spearman's Rho	.101	.105	.044	.203	-.028
	p value	.377	.361	.702	.092	.809
CD14briCD16+ Monocyte	Spearman's Rho	-.030	.132	-.022	.108	-.027
	p value	.795	.249	.845	.371	.810
mDC	Spearman's Rho	-.122	-.069	-.216	-.267	-.225
	p value	.429	.662	.164	.111	.142
pDC	Spearman's Rho	-.020	.141	-.178	.017	.121
	p value	.896	.366	.253	.919	.434

Table6. 免疫細胞 HLA-DR 発現と臨床指標の相関

		DAS28	Anti-CCP Antibody	RF	HAQ	disease duration
T cell HLA-DR positive(%)	Spearman's	.169	.304*	.151	.289*	.009
	p value	.165	.012	.215	.024	.941
NK HLA-DR positive(%)	Spearman's	.130	.198	.099	.033	.088
	p value	.288	.105	.419	.799	.473
B cell HLA-DR/ cell	Spearman's	.114	.042	-.023	-.019	-.129
	p value	.350	.733	.848	.882	.290
Monocyte HLA-DR /cell	Spearman's	-.132	.008	-.077	-.052	-.046
	p value	.280	.947	.531	.691	.708
DC HLA-DR /cell	Spearman's	-.023	-.246	-.290	-.070	-.067
	p value	.878	.107	.053	.672	.663

DAS28、抗 CCP 抗体値、RF 力価、HAQ、罹病期間と 82 名の RA 患者の T 細胞及び NK 細胞の HLA-DR 陽性率、B 細胞・単球・DC の HLA-DR 発現量との関係をスピアマンの順位相関係数にて評価した。各サブセットの定義は Table2 による。* $p < 0.05$ 、スピアマンの順位相関係数および p 値を示す。DAS28: Disease Activity Score 28 joints-ESR、Anti-CCP antibody: Anti-cyclic citrullinated peptide antibody、RF: Rheumatoid Factor、HAQ: Health Assessment Questionnaire Disability Index

Table7. CD4 陽性 T 細胞サブセットの CXCR4 発現と臨床指標の相関

		DAS28	Anti-CCP Antibody	RF	HAQ	disease duration
naive T	Spearman's Rho	.422*	.260	-.035	.284	-.293
CXCR4+(%)	p value	.040	.231	.872	.253	.165
memory T	Spearman's Rho	.469*	.449*	-.173	.639**	-.145
CXCR4+(%)	p value	.021	.032	.420	.004	.498
Tfh	Spearman's Rho	.383	.384	-.058	.754***	-.057
CXCR4+(%)	p value	.065	.070	.788	.000	.793
CD25+	Spearman's Rho	.397	.337	-.096	.710**	-.048
CXCR4+(%)	p value	.054	.116	.655	.001	.824

DAS28、抗 CCP 抗体値、RF 力価、HAQ、罹病期間と 24 名の RA 患者の CD4 陽性 T 細胞サブセット CXCR4 陽性率との関係をスピアマンの順位相関係数にて評価した。各サブセットの定義は Table2 による。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $P < 0.001$ 、スピアマンの順位相関係数および p 値を示す。DAS28: Disease Activity Score 28 joints-ESR、Anti-CCP antibody: Anti-cyclic citrullinated peptide antibody、RF: Rheumatoid Factor、HAQ: Health Assessment Questionnaire Disability Index

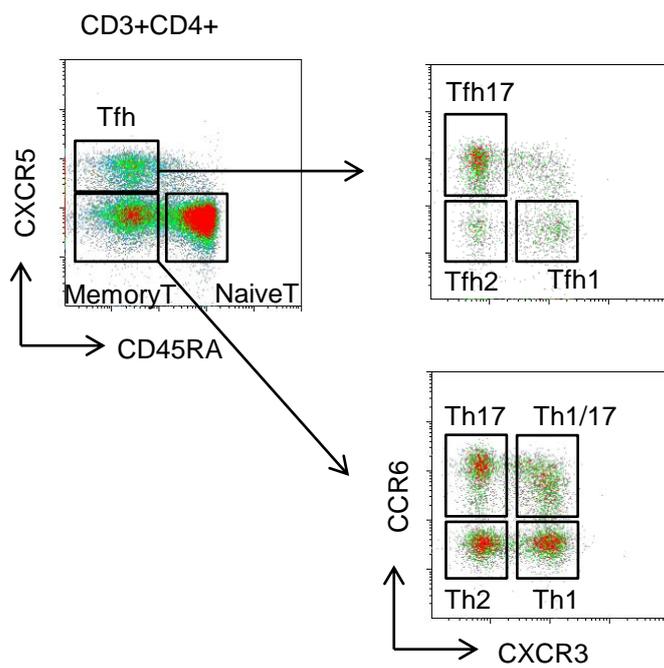


Figure1. フローサイトメトリーによる免疫細胞タイピング

関節リウマチ患者末梢血中の単核球をフローサイトメトリーにて分類した。CD3+CD4+T 細胞を CD45RA, CXCR5, CXCR3, CCR6 によって分類した。

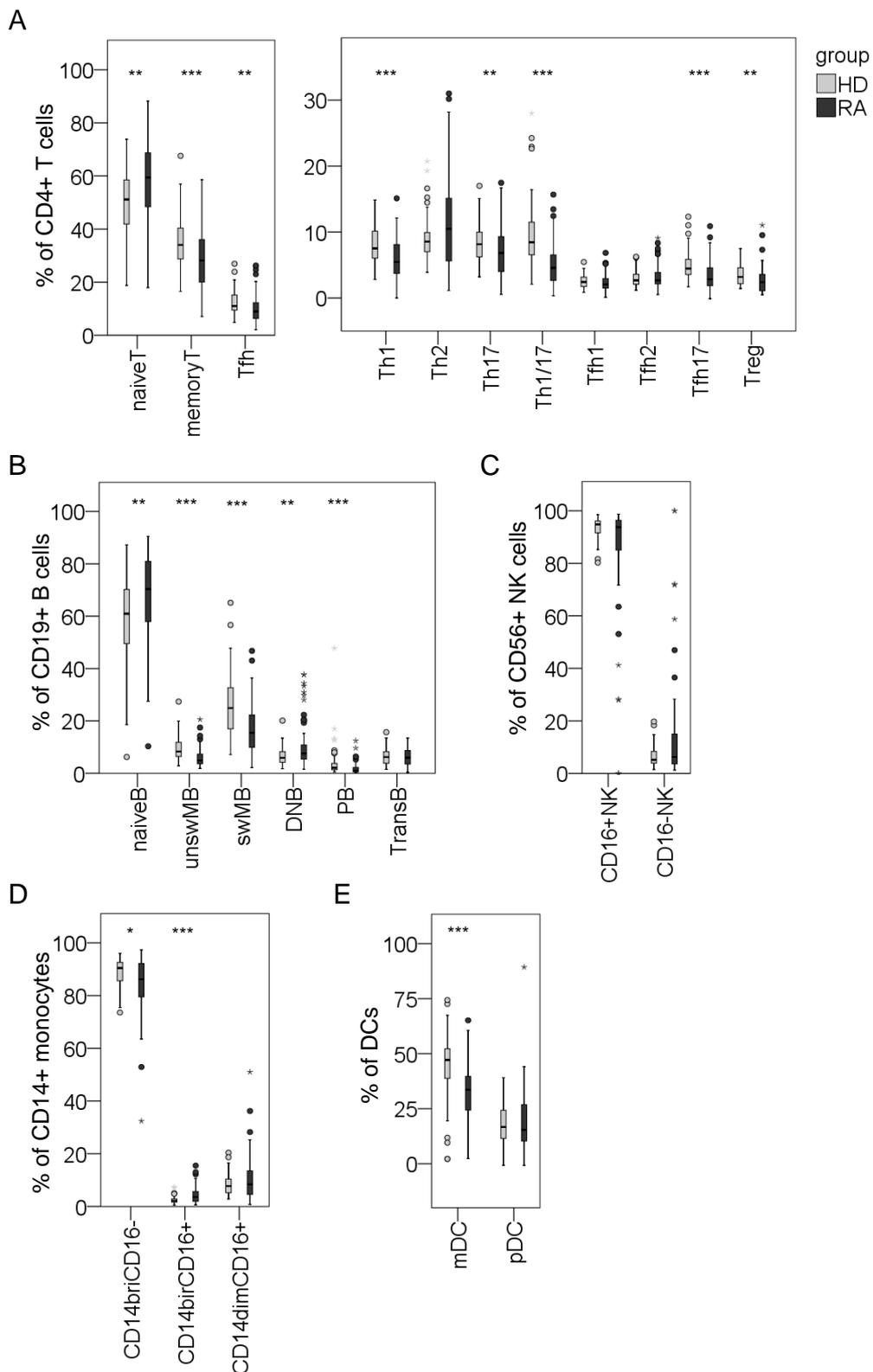


Figure2. 関節リウマチにおける広範な末梢血免疫細胞サブセットの変化

82名の関節リウマチ患者および71名の健常人の末梢血単核球をフローサイトメトリーにて免疫細胞タイピングした。それぞれのサブセットのCD4陽性T細胞(A), B細胞(B), NK細胞(C), 単球(D), DC(E)

中比率(%)を示し、年齢による線形回帰で補正後健常人と関節リウマチ間で比較を行った。各サブセットの定義は Table2 に示した。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $P < 0.001$ 、Mann-Whitney U test による。

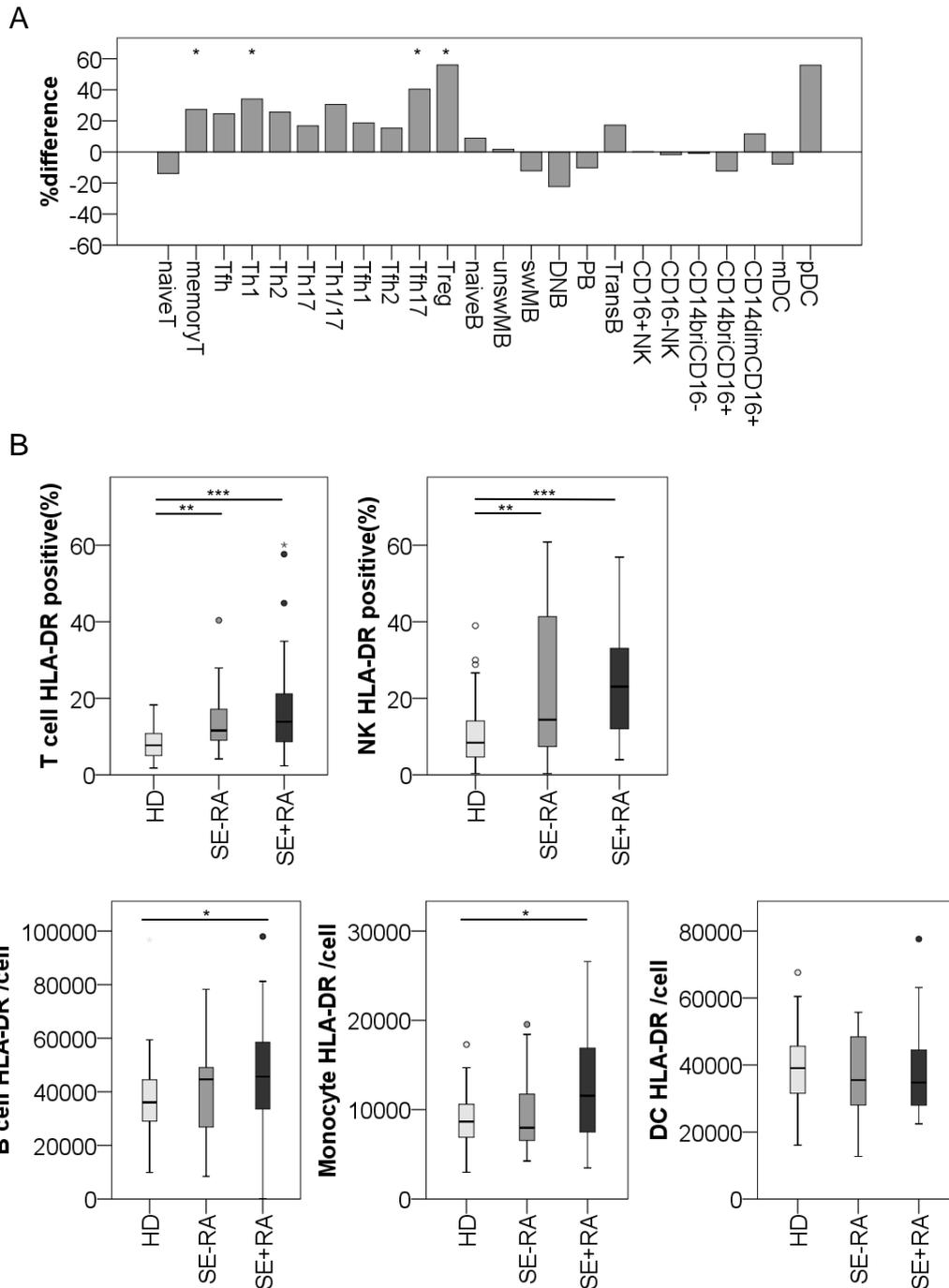


Figure3. 関節リウマチ患者 Shared Epitope(SE)は T 細胞サブセットおよび HLA-DR 発現へ影響する (A)SE 陽性 RA 患者群(n=50)のフローサイトメトリーによる各免疫細胞サブセット平均比率の SE 陰性 RA 患者群平均(n=32)からの差(%). 両群の比較は Mann-Whitney U test によって行った. (B)健全人、SE 陰性 RA 患者群、SE 陽性 RA 患者群間でのフローサイトメトリーによる T 細胞、NK 細胞での HLA-DR 陽性率および、B 細胞、単球、樹状細胞あたりの HLA-DR 発現量の比較. T 細胞、NK 細胞では HLA-DR 陽性率によって評価し、B 細胞、単球、DC では定量値を用いて比較した. 3 群の比較は Kruskal-Wallis test によって行った. *p<0.05 **p<0.01 ***P<0.001

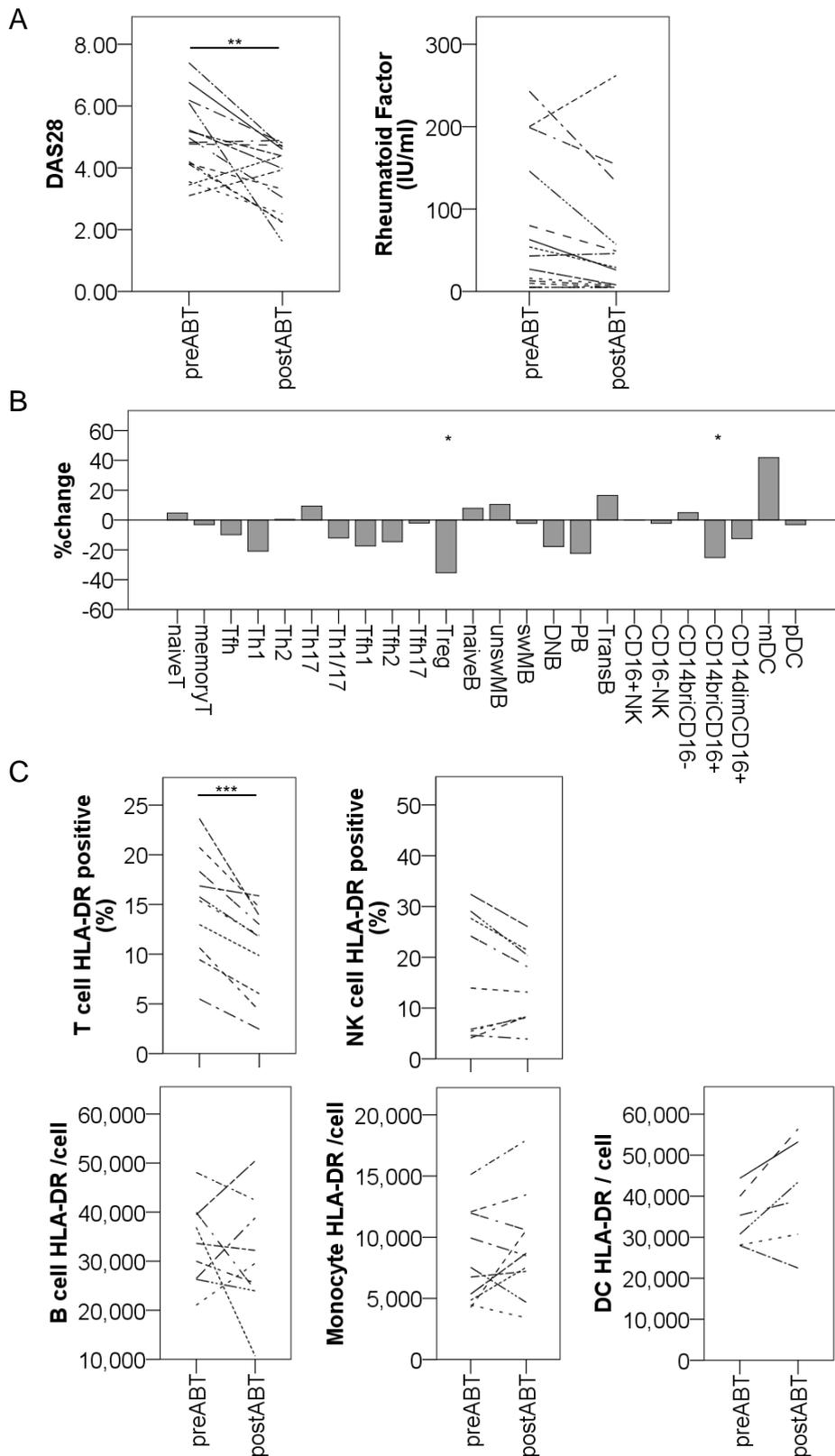


Figure4. Abatacept(ABT)治療による Treg と CD14brCD16+単球の減少

15名の関節リウマチ患者で ABT による治療開始前(preABT)と治療継続後6ヶ月(postABT)に末梢血免疫細胞タイピングを行った。DAS28 およびリウマトイド因子の治療前後での変化(A)及び各免疫細胞サ

ブセット平均比率の治療前後での変化率(B)と HLA-DR 発現の変化(C)を示した。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ 、
paired-t test による。

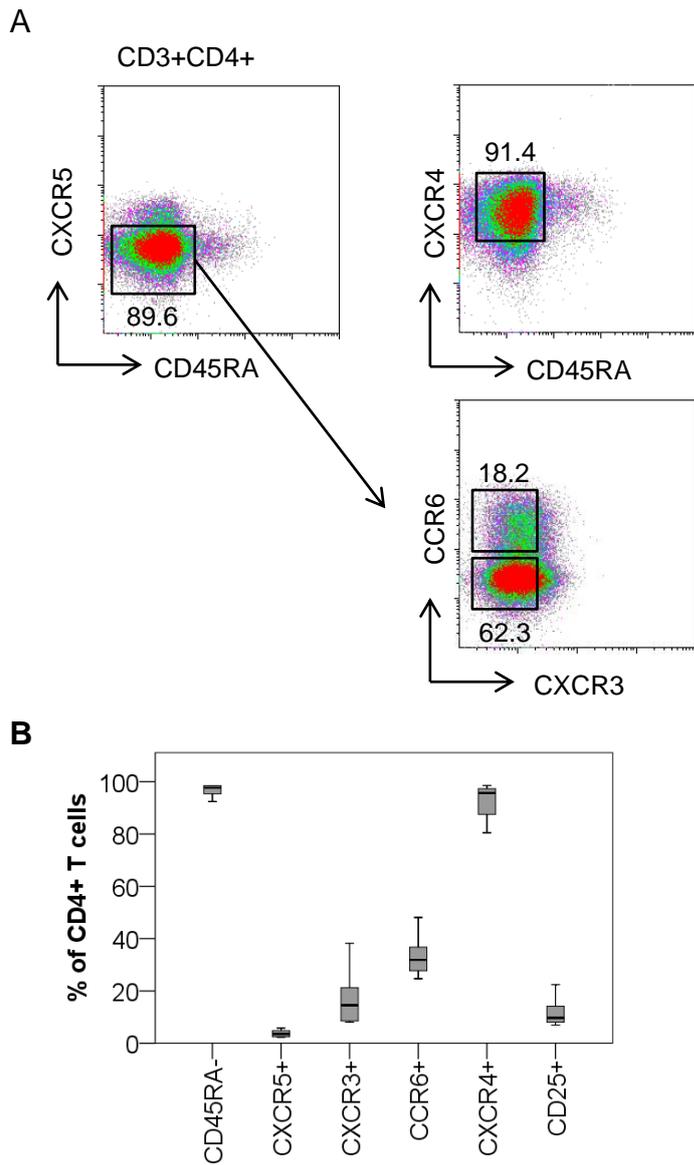


Figure5. 関節リウマチ滑液 CD4 陽性 T 細胞は CD45RA 陰性 CXCR4 陽性である

関節リウマチ患者関節滑液中 CD4 陽性 T 細胞の CD45RA, CXCR5, CXCR3, CCR6, CXCR4, CD25 の発現をフローサイトメトリーにて評価した(n=6)。フローサイトメトリー分析の代表例(A)、および CD45RA, CXCR5, CXCR3, CCR6, CXCR4, CD25 平均陽性率を示した(B)。(A)図中に各プロット中の比率(%)を示した。

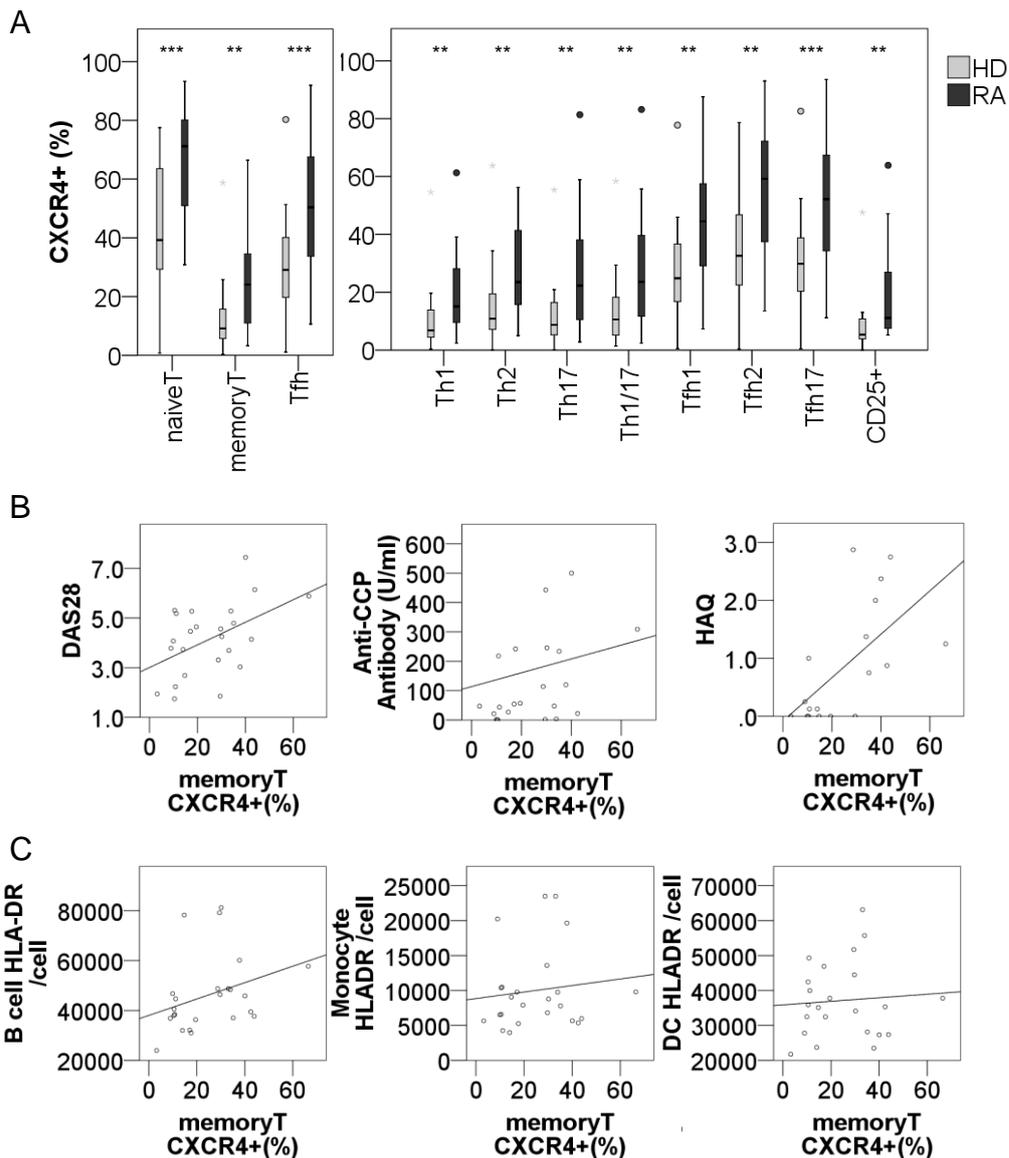
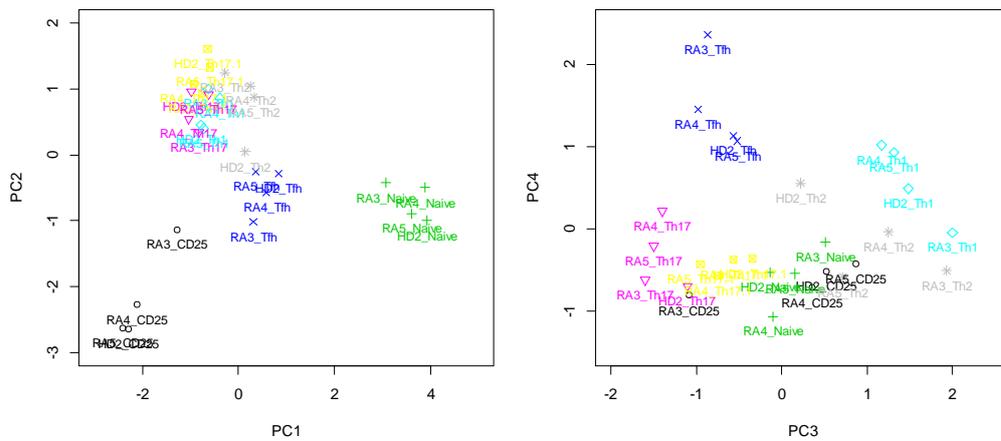


Figure6. 関節リウマチにおける末梢血 CD4 陽性 T 細胞の CXCR4 発現上昇と疾患活動性との関連 (A)24 名の RA 患者および 26 名の HD の末梢血免疫細胞をフローサイトメトリーにてタイピングし、それぞれのサブセットの CXCR4 の陽性率を比較した。(B)関節リウマチ患者の memoryT サブセットの CXCR4 陽性率と DAS28,抗 CCP 抗体値、HAQ に正の相関を認めた (Table6)。(C) 関節リウマチ患者の memoryT サブセットの CXCR4 陽性率と B 細胞の HLA-DR 発現量に正の相関の傾向を認めた。各細胞サブセットの定義は、CD25+細胞(CD3+CD4+CD45RA-CD25+)を除き Table2 の通り。**p<0.01 ***P<0.001、Mann-Whitney U test による。

A



B

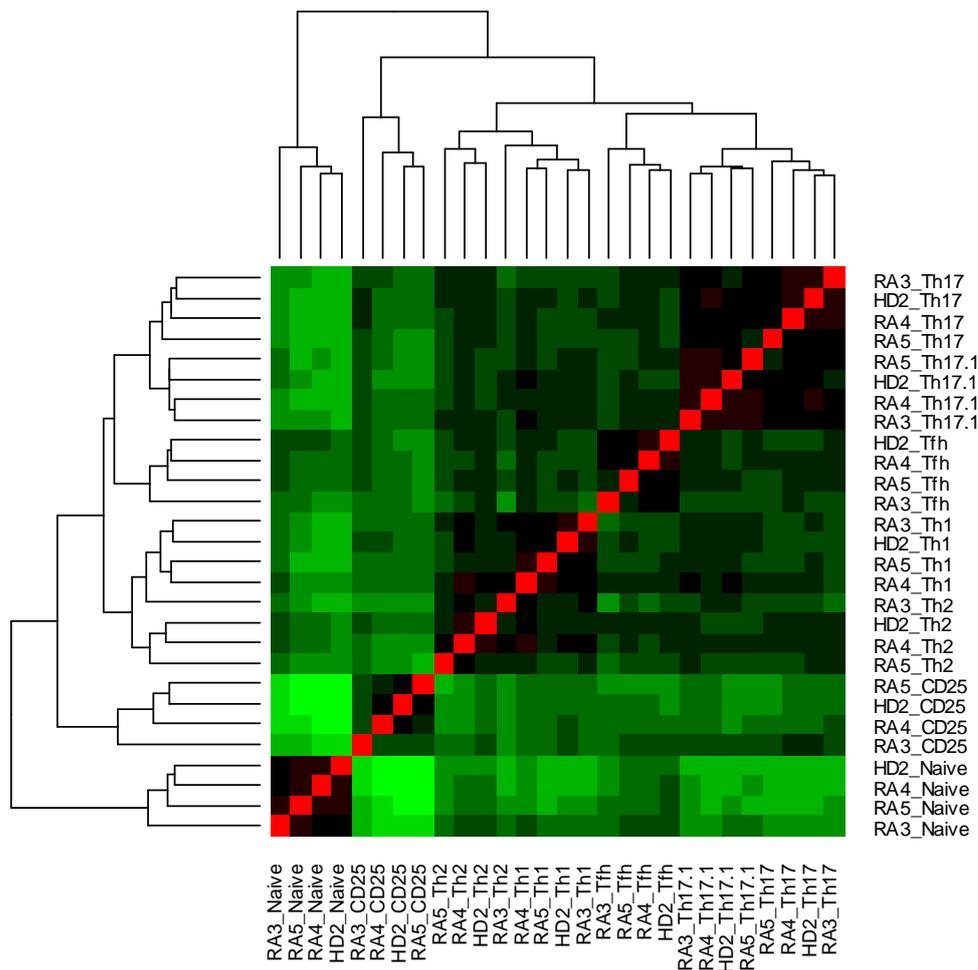


Figure7. RNA-seq による CD4 陽性 T 細胞サブセットの比較

1名のHD(HD2)および3名のRA(RA3,4,5)において、Naive, Th1, Th2, Th17, Th17.1, Tfh, CD25+の7サブセットのRNA-seqによる発現解析を行った。(A)主成分分析により7サブセットの比較し、第一主成分と第二主成分によるプロット(左)及び、第三主成分と第四主成分のプロット(右)を示した。(B)ユークリッド距離によるクラスタリングをヒートマップによって示した。

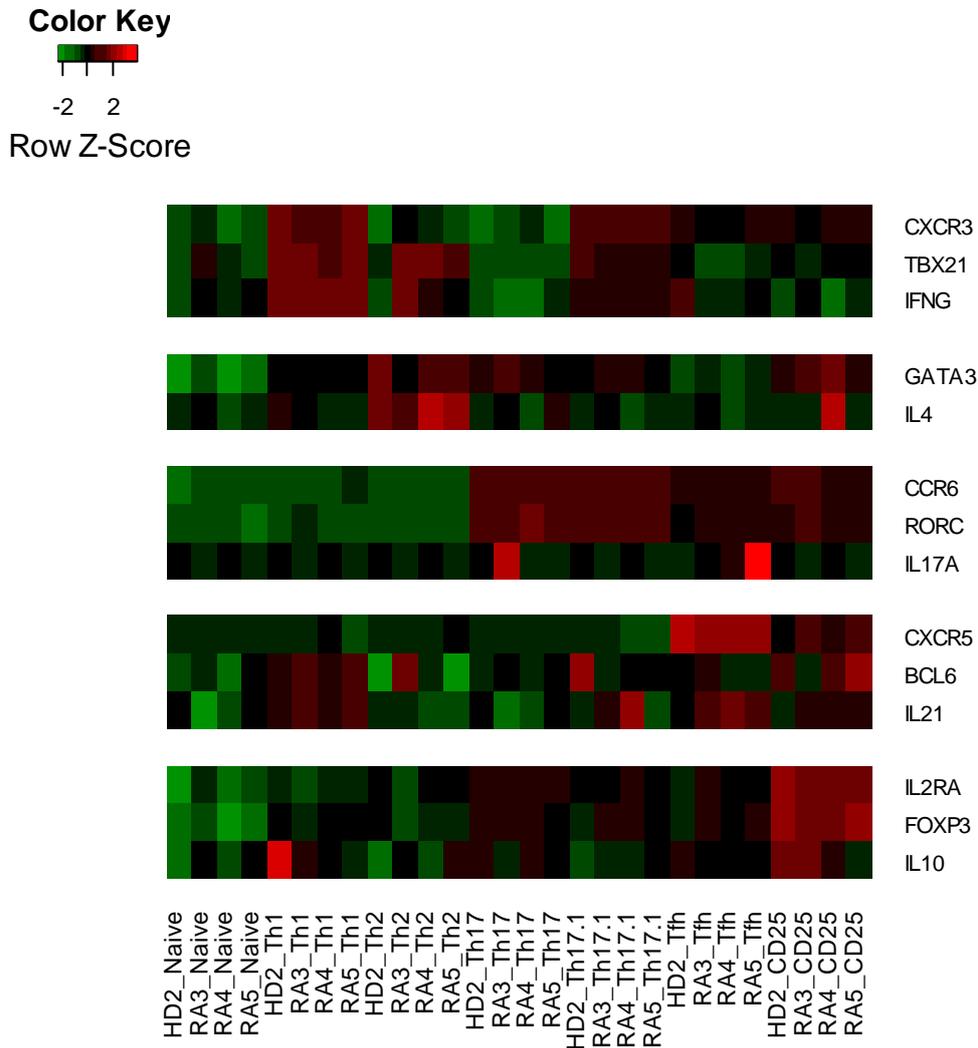


Figure8. CD4 陽性 T 細胞サブセットの RNA-seq による重要遺伝子の発現比較

1名のHD(HD2)および3名のRA(RA3,4,5)において、Naive, Th1, Th2, Th17, Th17.1, Tfh, CD25+の7サブセットのRNA-seqによる発現解析を行い、各サブセットの重要遺伝子の発現をヒートマップに示した。Th1に関連したCXCR3, TBX21, IFNG, Th2に関連したGATA3, IL4, Th17と関連したCCR6, RORC, IL17A, Tfhに関連したCXCR5, BCL6, IL21, Tregと関連したIL2RA, FOXP3, IL10の発現を示した。

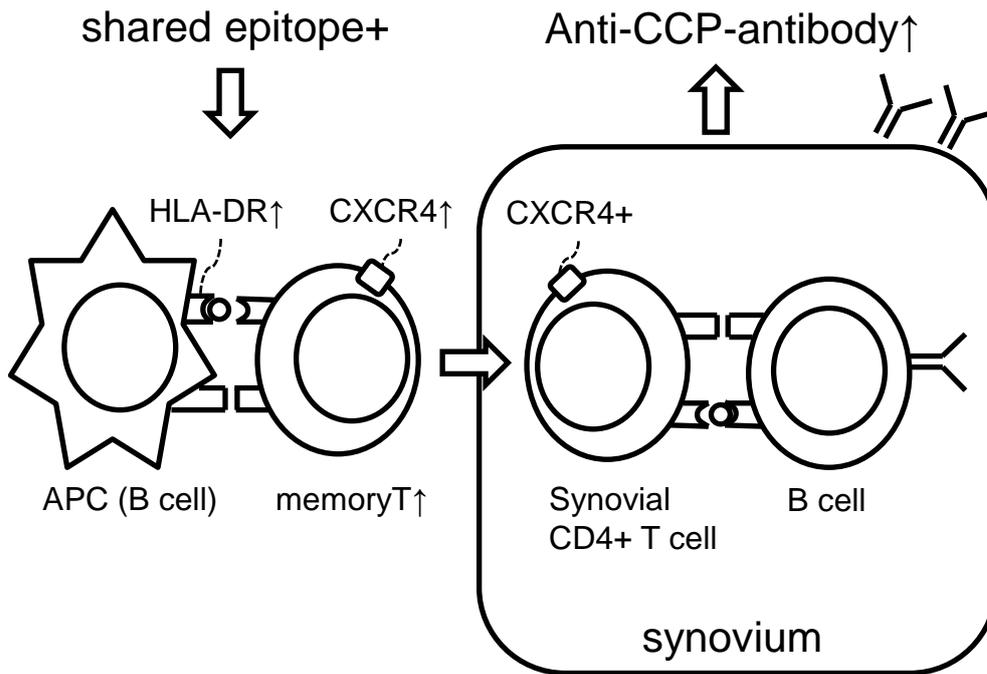


Figure9. shared epitope と抗 CCP 抗体の関係の模式図

本研究から示唆される shared epitope と抗 CCP 抗体の関係を模式的に示した。Shared epitope 陽性者では APC である B 細胞や単球上の HLA-DR 発現上昇が起こり、memoryT 細胞比率が上昇している。また B 細胞 HLA-DR 発現が memoryT 細胞の CXCR4 発現上昇と関連し、T 細胞の関節への移行が促進される可能性がある。これによって関節局所でシトルリン化抗原に対する獲得免疫反応が生じ、抗 CCP 抗体が産生される可能性が考えられる。APC: Antigen presenting cells