

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591177
 研究課題名（和文）SLE 制御性 T 細胞 FOXP3 アイソフォーム発現とその免疫抑制機構における役割
 研究課題名（英文）FOXP3 isoform expression in the regulatory T cells in systemic lupus erythematosus patients and its role in the mechanism of the immune suppression
 研究代表者
 鈴木 勝也（SUZUKI KATSUYA）
 埼玉医科大学 ・ 医学部 ・ 助教
 研究者番号：70306695

研究成果の概要（和文）：全身性エリテマトーデスにおいて、免疫寛容に重要な役割を果たす制御性 T 細胞（Treg）に発現する FOXP3 およびそのアイソフォームの遺伝子発現低下が認められたことから、両者が免疫寛容機能低下の原因として重要な役割を担っていると考えられた。次に、免疫抑制下における FOXP3 発現への影響を調べたところ、発現低下した細胞は自然型ではなく誘導型 Treg 細胞であった。本疾患の有効な治療標的を考える上で重要な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：In patient with systemic lupus erythematosus (SLE), gene expression of both FOXP3 and its isoform, which express in regulatory T cell (Treg) that play an important role in immune tolerance, were decreased. These results indicated that both are important as a cause in immune tolerance in SLE. Next we investigated FOXP3 expression in immune suppressive state and found that decreased Treg subpopulation was not natural but induced Treg. From our study, we obtained important clues on the effective therapeutic target for SLE.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内科学（リウマチ膠原病学）

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：全身性エリテマトーデス、T細胞、制御性T細胞、FOXP3、アイソフォーム
 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)は妊娠可能な年代の女性に好発する全身性自己免疫疾患で、厚生労働省特定疾患にも指定されている難病である。本邦における罹患数は 5-10 万人と推定されている。本疾患は多くの疾患と同様に遺伝的素因に環境要因が加わることで発症すると考えられている。遺伝的素因としては、補体早期成分に加え、ゲノムの連鎖解析の結果から白血球表面抗原(HLA)の DR2, 3 領域、Fc 受容体、CD3 鎖をはじめ多くの疾患感受性遺伝子が報告されている。環境要因としては紫外線、薬剤、外傷、手術、精神的ストレス、食事等に加え、強く性差による支配を受けている。

病態としては免疫異常と多彩な自己抗体産生により特徴づけられ、T および B 細胞の異常活性化とその不適切な持続が細胞レベルでの主たる要因と考えられている。不明とされてきた病因・病態については、ここ数年で急速に、分子レベル・遺伝子レベルでの多くの知見が集積されてきている。

胸腺、末梢あるいは組織において T 細胞活性化は免疫系により厳密な制御を受けている。制御性 T 細胞(Regulatory T cell, Treg)は、胸腺、末梢 T 細胞、末梢リンパ組織で 5-10% を占めていて CD25 分子を高発現する CD4 陽性 T 細胞群に含まれている。同マーカーは活性化 T 細胞の表現系でもありその識別が困難であったが、ごく最近になり FOXP3 遺伝子の発現の有無により Treg が否かの識別が可能であることが判明した。FOXP3 分子は Forkhead/winged-helix family に属する制御性転写因子で、その発現は CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞にほぼ限局している。Treg は CD25+CD4- T 細胞の増殖を細胞間接触により抑制し、TNF やインターフェロン などのサイトカイン産生を抑制する。CD8+ T 細胞、B 細胞、NKT 細胞への抑制機能も有すると報告されている。

生後 3 日目のマウスから胸腺摘出をすると末梢に CD25+CD4+ T 細胞数が著減し、自己免疫疾患を発症する。この系で CD25+CD4+ T 細胞を発症前に移入すると発症を抑制されることから、Treg は末梢トレランスの維持に重要で、その数の低下が自己免疫性疾患の病因として注目されることとなった。

実際に本疾患をはじめとする種々の自己

免疫性疾患でも Treg の数の低下が報告されており、末梢トレランス低下の機序として興味深い結果が得られている。

しかしながら、本疾患において Treg そのものに異常があるのかそれとも二次的な結果であるのかに関する点などに関する有用な報告はなく未知である。さらに Treg の数や質的な異常を是正して T 細胞の活性化を抑制することにより本疾患の治療あるいは予防が可能であるのかどうか、臨床免疫学的にもきわめて重要な課題と考えられる。

2. 研究の目的

本疾患の病因、病態の解明および新規治療法の開発が最終的な目標であるが、本研究課題では、本疾患における末梢血 Treg およびそのアイソフォームの役割および免疫抑制下における Treg への影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SLE 末梢血における制御性 T 細胞(Treg)割合の測定

末梢血より Ficoll 法を用いてリンパ球分画を抽出し、リンパ球分画を CD4-FITC、CD25-APC (Beckman Coulter, eBioscience) で細胞外染色、FOXP3-PE (eBioscience) の細胞内染色し、フローサイトメーター (FACScan/Calibur, BD Bioscience) により、CD4+ T 細胞中の FOXP3+CD25+CD4+ T 細胞の割合を測定。

(2) SLE 末梢血における FOXP3 および Exon2 欠損アイソフォームの制御性 T 細胞における発現

FOXP3 mRNA は 1869 塩基からなり、189 から 1484 番目までが FOXP3 タンパクのコーディング配列 (open reading frame) で、11 の Exon から構成されている。Exon2 (396 から 500 番目) 欠損がこれまで報告されているバリエーションアイソフォームである。

末梢血単核球からの mRNA の抽出および cDNA への変換後、FOXP3 および Exon2 欠損バリエーションを識別できる特異的プライマーおよび TaqMan プローブを設定し、定量的 RT-PCR 用 サーマルサイクラー (Applied

Biosystems) を用いて FOXP3mRNA 発現量を定量。内部コントロールとしては G3PDH を使用。

(3) T細胞抑制効果を有する免疫抑制薬による FOXP3 発現への影響

末梢血から、末梢血単核球分画 (PBMC) を採取。抗 CD3 抗体磁気 beads を用い T細胞を MACS により分離採取。 5×10^4 個/ml (10%FCS/RPMI に懸濁)の割合で細胞を調整。抗 CD3 抗体(10ug/ml)と抗 CD28 抗体(1ug/ml)のプレートコーティングおよび刺激なしの 2 群にて、各 3well ずつ、処理なし、Tacrolimus (0.1、0.3、1、3、10 ng/ml) を添加し、37 度 CO2 7.5%で 24 時間培養。細胞を回収し。抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体、抗 FOXP3 抗体で三重染色し、Treg 割合を測定。

(4) T細胞抑制効果を有する免疫抑制薬の Treg の遺伝子発現への影響

末梢血より CD4+CD25+CD127lowTreg 細胞をセルソーターで分離。Tacrolimus (10 ng/ml) 添加あり、なし条件で in vitro 培養 (2.5×10^4 /200ul/ 96well plate, 18 時間) Total RNA を抽出、両群の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析(Agilent technology 社 44k DNA チップ)を施行。

4. 研究成果

(1)SLE 末梢血における制御性 T細胞(Treg) 割合の測定

SLE 患者 9 例、関節リウマチ患者 36 例、健康人 7 例の末梢血における CD4+T 細胞中 FOXP3+CD25+CD4+T 細胞の割合を測定したところ。SLE 末梢血 Treg の CD4 陽性細胞中の割合は幅広い分布をとり、健康人および関節リウマチ患者との有意差は認めなかった。

限られた症例数であるが、現在可能な最も精密な測定法である FOXP3 を指標としたフローサイトメトリー法で量的な差異は認めなかったことから、本疾患における末梢血 T細胞における Treg の量的な差異は必ずしも明らかではないと結論した。

(2) SLE 末梢血における FOXP3 および Exon2 欠損アイソフォームの制御性 T細胞における発現

SLE25 例、RA (疾患コントロール) 23 例、健康人 8 例、合計 56 例において解析を行ったところ、SLE、RA とも健康人に比し、統計学的有意に両アイソフォームの発現低下を認めた。両アイソフォーム発現比はほぼ同等

で、正の相関が認められ、同じ機構で転写制御を受けている可能性が示唆された。

この発現低下は末梢白血球数およびリンパ球数と相関なく、これらの影響のみでは説明出来なかった。本疾患における Treg 機能低下の原因として、FOXP3mRNA 発現低下が重要な役割を担っていると考えた。

ヒト Exon2 欠損アイソフォームの役割としては、in vitro における過去の報告では、機能的に阻害として働くという説と相加的であるが異なる役割をもつという説が提唱されている。in vivo における本研究結果は、後者の方を支持するものであった。

以上の結果から、SLE末梢血Tregにおける FOXP3およびアイソフォームの発現低下は、本疾患におけるTregの質的異常の可能性を示唆するものと考えられた。

(3) T細胞抑制効果を有する免疫抑制薬による FOXP3 発現への影響

次に免疫抑制薬が FOXP3 発現に与える影響を明らかにするために、T細胞抑制効果を有するカルシニューリン阻害薬(tacrolimus)の in vitro における FOXP3 発現への影響を健康人 8 例において調べた。全例で抗 CD3 および抗 CD28 抗体刺激により FOXP3 陽性細胞の割合は増加を認め、これに tacrolimus を加えると有意に発現が低下した。発現低下した細胞は CD62L 低発現細胞であった。すなわち、発現低下した細胞は自然型ではなく誘導型 Treg 細胞であった。

FOXP3 遺伝子は抗 CD3 および抗 CD28 抗体刺激により誘導されるが、カルシニューリン阻害薬(tacrolimus)阻害するのはこちらのみで、胸腺由来の Treg への影響は認めなかった。以上から本疾患の治療薬として用いられているカルシニューリン阻害薬(tacrolimus)の FOXP3 遺伝子発現への影響が明らかとなった。

(4) T細胞抑制効果を有する免疫抑制薬制御性 T細胞の遺伝子発現への影響

カルシニューリン阻害薬による Treg への影響をさらに詳しく調べるため、健康人由来 Treg の DNA マイクロアレイ解析した。優位に発現が変化していた遺伝子 1021 (高発現 661/低発現/360) を同定した。

Gene ontology 解析を行ったところ、10 遺伝子グループ(multicellular organismal process in biological process (P=0.009) and extra cellular region in cellular component (P=0.001) など)において優位に発現低下が認められた。これらは他の薬剤

や CD3/CD28 刺激群、さらに全 T 細胞とも全く異なっていた。

以上から本疾患の治療薬として用いられているカルシニューリン阻害薬 (tacrolimus) の Treg 遺伝子発現への影響が明らかとなった。

以上の結果から SLETreg では FOXP3 およびそのアイソフォーム発現低下が明らかとなり、末梢における免疫寛容の質的異常の一因が明らかとなった。さらに、本疾患の治療薬であるカルシニューリン阻害薬 (tacrolimus) の Treg における FOXP3 発現およびその他の遺伝子発現に対する独特の抑制機構が明らかとなった。

末梢免疫寛容の修復を目指した治療を考慮する際は、Treg の量的ではなく質的な回復を視野に入れたアプローチが必要と考えられた。今後の課題として、効率的な探索法、末梢免疫寛容機能の評価法、さらに介入による副作用などが依然として残っているが、FOXP3 をはじめとした遺伝子発現調節による Treg の質的回復という方向性を見いだすことができた。

本研究は、本疾患の有効な治療標的を考えた上で重要な知見が得られたと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Suzuki K, Tamaru J, Okuyama A, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Nish E, Yoshimoto K, Setoyama Y, Kaneko K, Osada H, Honda N, Sasaki Y, Itoyama S, Tsuzaka K, Takeuchi T: IgG4-related systemic disease manifesting as Mikulicz disease with subsequent secondary portal hypertension and remarkable IgG4-linked IL-4 elevation, *Rheumatology* 2010, in press (査読有)

鈴木勝也、竹内勤: 新薬展望 2010 抗リウマチ薬、*医薬ジャーナル増刊号*、*医薬ジャーナル社*、大阪、Vol.46 S-1、217-21、2010 (査読無)

Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Takei H, Nishi E, Okuyama A, Tsuzaka K, Takeuchi T: Single Center Prospective Study of Tacrolimus Efficacy and Safety in Treatment of Various Manifestations

in Systemic Lupus Erythematosus, *Rheumatology int.* 2010 Feb 19 ePub ahead of print (査読有)

Suzuki K, Nagasawa H, Kameda H, Amano K, Kondo T, Itoyama S, Tanaka Y, Takeuchi T: Severe acute thrombotic exacerbation in two cases with anti-phospholipid syndrome after retreatment with rituximab in phase I/II clinical trial for refractory systemic lupus erythematosus, *Rheumatology*,48(2): 198-9, 2009 (査読有)

Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Takei H, Sekiguchi N, Nishi E, Ogawa H, Tsuzaka K, Takeuchi T: Single Center Prospective Study of Tacrolimus Efficacy and Safety in Treatment of Rheumatoid Arthritis, *Rheum. Int.*, 29(4): 431-6, 2009 (査読有)

鈴木勝也、竹内勤: 特集 臨床でわかったエビデンス Type 1 インターフェロンはループスだけの特徴か? ,分子リウマチ治療, vol.2、No.3、119-22, 2009 (査読無)

Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T: Effect of Interleukin 2 on synthesis of B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) in human peripheral blood mononuclear cells, *Cytokine*, 44(1):44-8, 2008 (査読有)

鈴木勝也、竹内勤: 特集 リウマチ性疾患における腎障害 ループス腎炎に対するタクロリムスの有用性、*リウマチ科* 40(6)、604-7、2008 (査読無)

鈴木勝也、瀬戸山由美子、竹内勤: 話題 クラスタ分類の最新の情報: *臨床検査* 51(9), 983-5、*医学書院*、東京、2007 (査読無)

[学会発表](計 13 件)

Suzuki K: Immunological intervention for systemic lupus erythematosus, Seminar, NIH Science Event, June 12, 2009, Bethesda, MD, USA, (Invited)

鈴木勝也: T 細胞に対するイムノロジカルインターベンション、第 5 回リウマチヤングアカデミー、平成 21 年 7 月 18 日、北広島

鈴木勝也: ループス腎炎に対するタクロリムスの有用性、第 3 回埼玉リウマチ・膠原病フォーラム、平成 21 年 7 月 4 日、さいたま

Suzuki K: Tacrolimus has Pleiotropic Molecular Effects on Human Regulatory T Cells, American College of Rheumatology 72st annual scientific meeting Oct 28, 2008 San Francisco, USA

Suzuki K: Molecular Effects to Human Regulatory T cells by Treatment with T Cell Activation Inhibitor and TNF Blockade: The American Association of Immunologist 95th annual meeting: Apr. 8, 2008, San Diego, USA

鈴木勝也: Regulation of B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) Synthesis by Interleukin-2 in human peripheral blood mononuclear cells、第 38 回日本免疫学会学術集会、平成 20 年 12 月 3 日、京都

鈴木勝也: 全身性エリテマトーデスおよび関節リウマチにおける末梢制御性T細胞の役割、第 36 回日本臨床免疫学会総会、平成 20 年 10 月 18 日、東京

鈴木勝也: 膠原病におけるタクロリムスの有用性、第 2 回埼玉リウマチ・膠原病フォーラム、平成 20 年 6 月 21 日、浦和

鈴木勝也: 関節リウマチ患者末梢制御性 T 細胞の量的質的異常と治療薬の与える影響、第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 20 年 4 月 23 日、札幌

Suzuki K: Efficacy and safety of tacrolimus in patients with rheumatic disease: appropriate clinical application for various rheumatic conditions: American College of Rheumatology 71st annual scientific meeting, Nov.2007, Boston, USA

鈴木勝也: Regulatory T cells and FOXP3 isoform expression in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: 第 37 回日本免疫学会学術集会、平成 19 年 11 月 21 日、東京

鈴木勝也: T 細胞活性化阻害薬および TNF 阻害薬の末梢制御性 T 細胞に対する影響、第 35 回日本臨床免疫学会総会、平成 19 年 10 月 19 日、大阪

鈴木勝也: リウマチ性疾患に対するタクロリムス治療の安全性と有効性、第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 19 年 4 月 27 日、横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 勝也 (SUZUKI KATSUYA)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 70306695

(2)研究分担者

竹内 勤 (TAKEUCHI TSUTOMU)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 50179610

(3)連携研究者 なし