



# CD45RA-Foxp3[high] activated/effector regulatory T cells in the CCR7+CD45RA-CD27+CD28+ central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with...

Matsuki, Fumichika

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第5953号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005953>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

CD45RA-Foxp3<sup>high</sup> activated/effector regulatory T cells in the  
CCR7+CD45RA-CD27+CD28+ central memory subset are decreased in  
peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis

関節リウマチ患者末梢血では、CD27+CD28+セントラルメモリー分画の  
CD45RA-Foxp3<sup>high</sup> 制御性 T 細胞が減少している

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
免疫内科学分野  
(指導教員：森信 暁雄准教授)

松木 郁規

【背景】関節リウマチ患者では関節での炎症と骨破壊が認められる。滑膜組織の CD4+T 細胞は活性化状態にあり、単球、マクロファージ、滑膜線維芽細胞の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1) の産生を誘導する。また、骨破壊に関与している破骨細胞の分化・活性化にも CD4+T 細胞が関与している。そして、関節リウマチ患者の滑膜組織に浸潤している T 細胞は、オリゴクローナルな CD4+T 細胞集団であるという報告がある。これらのことから、CD4+T 細胞が関節リウマチの病態形成の中核をなしていると考えられる。しかし、関節リウマチ患者に T 細胞のシグナル分子であるカルシニューリンの阻害剤を投与しても効果は限定的であり、マウス関節炎モデルで T 細胞を除去しても、関節炎の抑制効果は限定的であることが知られている。これらは、制御性の T 細胞も除去してしまうことが一因と考えられている。従って、T 細胞のなかでも病原性の T 細胞を標的とした治療が求められている。

CD4+T 細胞は CCR7 と CD45RA によって 3 つのサブセットに分類できる。CD45RA+CCR7+ はナイーブサブセット (Naive)、CCR7+CD45RA- はセントラルメモリーサブセット (T<sub>CM</sub>)、CCR7-CD45RA- はエフェクターメモリーサブセット (T<sub>EM</sub>) である。ナイーブサブセットは抗原未感作の細胞で CD45RA- であるのに対し、メモリーサブセットは CD45RA+ である。さらにメモリー細胞はセントラルメモリーサブセットとエフェクターメモリーサブセットに分類でき、セントラルメモリーサブセットはリンパ節に遊走する細胞であり、エフェクターメモリーサブセットは炎症局所に遊走する細胞である。また、CD45RA、CCR7 に CD27 や CD28 を加えた 4 つの表面抗原により、CD4+T 細胞を分類すると各分画がサイトカイン産生の違いやテロメア長の違いを示すなど機能分類に有用な事が報告されている。CD27、CD28 は共刺激分子であり、ナイーブ細胞からメモリー細胞になるにつれて徐々に発現低下する。また、CD27、CD28 が発現低下した細胞ほど IFN- $\gamma$  の産生が高く、テロメア長が短くなる特徴がある。一方、最近では制御性 T 細胞 (Treg 細胞) が CD45RA と Foxp3 により 3 つの集団に機能分類できる事が報告されている。3 つの集団は CD45RA+Foxp3<sup>low</sup> の naïve Treg 細胞、CD45RA-Foxp3<sup>high</sup> の activated/effector Treg 細胞、CD45RA-Foxp3<sup>low</sup> の non-Treg 細胞である。前者 2 つは抑制能があり、naïve Treg 細胞より activated/effector Treg 細胞の方が抑制能は高い。non-Treg 細胞は抑制能が無く、炎症性サイトカインを産生する細胞集団である。

【目的】関節リウマチ (RA) の病態の中心となる CD4+T 細胞サブセットを同定することを目的として、RA 患者の末梢血の CD4+T 細胞を 4 つの表面抗原マーカー (CCR7, CD45RA, CD27, CD28) により細かく分類し、そのサブセットの割合、サイトカイン産生 (IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$ )、Foxp3 発現について解析した。

【方法】RA 患者及び健康人の末梢血を Ficoll により末梢血単核球 (PBMC) に分離した後、CCR7、CD45RA、CD27、CD28、CD4 の 5 つの表面抗原を染色し、各サブセットの割合を解析した。サイトカイン産生細胞、Foxp3 発現細胞の解析では表面抗原と細胞内染色の 2 段階染色法を用いた。CCR7、CD45RA、CD27、CD28、CD4 の表面抗原を染色した後に、サイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$ ) もしくは、Foxp3 を染色した。解析では多重染色解析ができる MoFlo を用いた。患者検体は神戸大学免疫内科で治療中の患者からインフォームドコンセントを得た検体

を用いた。

【結果】CCR7、CD45RA、CD27、CD28により末梢血 CD4+T 細胞を分類すると6つのサブセットに分類できる(CD27+CD28+CD4+Naïve, CD27+CD28+CD4+T<sub>CM</sub>, CD27-CD28+CD4+T<sub>CM</sub>, CD27+CD28+CD4+T<sub>EM</sub>, CD27-CD28+CD4+T<sub>EM</sub>, CD27-CD28-CD4+T<sub>EM</sub>)。RA患者末梢血では、CD27+CD28+CD4+T<sub>CM</sub> サブセットが健常人に比して有意に減少していた。また、この減少している CD27+CD28+CD4+T<sub>CM</sub> サブセットについて機能解析を行うと Foxp3 を発現する Treg 細胞が有意に減少していた。さらに CD45RA と Foxp3 による Treg 細胞の機能分類を行うと、抑制能の高い CD45RA-Foxp3<sup>high</sup> 細胞が CD27+CD28+CD4+T<sub>CM</sub> サブセットで減少していた。関節リウマチ患者の疾患活動性を示す Das28-CRP と相関関係を調べたところ、CD45RA-Foxp3<sup>high</sup> とは相関は見られなかったが、CD45RA-Foxp3<sup>low</sup> 細胞と負の相関があった。一方、RA 患者末梢血の炎症性サイトカインについて解析したところ、TNF- $\alpha$  産生細胞が CD27+CD28+CD4+T<sub>EM</sub> サブセットで健常人より有意に増加していた。

【結論】RA 患者末梢血では CD27+CD28+CD4+T<sub>CM</sub> サブセットの抑制能の高い CD45RA-Foxp3<sup>high</sup> Treg 細胞が減少し、炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$  細胞が CD27+CD28+CD4+T<sub>EM</sub> サブセットで有意に増加していた。この制御性 T 細胞の減少と TNF- $\alpha$  細胞の増加が病態の中心的役割を果たしているかもしれない。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2370 号	氏 名	松木 郁親
論文題目 Title of Dissertation	<p>CD45RA-Foxp3<sup>high</sup> activated/effector regulatory T cells in the CCR7+CD45RA-CD27+CD28+ central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis</p> <p>関節リウマチ患者末梢血では、CD27+CD28+セントラルメモリー分画のCD45RA-Foxp3<sup>high</sup> 制御性 T 細胞が減少している</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 南 康博 Chief Examiner</p> <p>副 査 金部 誠 千代子 Vice-examiner</p> <p>副 査 吉田 俊 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

関節リウマチ(RA)患者の滑膜組織のCD4+T細胞は活性化状態にあり、炎症性サイトカインの産生を誘導する。また、骨破壊に関与する破骨細胞の分化・活性化にもCD4+T細胞が関与している。さらに、RA患者の滑膜組織に浸潤しているT細胞は、オリゴクローナルなCD4+T細胞集団であるという報告があり、CD4+T細胞がRAの病態形成の中核と考えられる。しかし、RA患者へのカルシニューリン阻害剤投与の効果は限定的であり、マウス関節炎モデルでT細胞を除去しても、関節炎の抑制効果は限定的であり、制御性T細胞(Treg細胞)も除去してしまうことが一因と考えられる。

CD4+T細胞はCCR7、CD45RAにより、CD45RA+CCR7+のナイーブサブセット(Naive)、CCR7+CD45RA-のセントラルメモリーサブセット(T<sub>CM</sub>)、CCR7-CD45RA-のエフェクターメモリーサブセット(T<sub>EM</sub>)の3つに分類できる。ナイーブサブセットは抗原未感作細胞でCD45RA+であり、メモリーサブセットはCD45RA-である。さらにメモリー細胞は、リンパ節に遊走するセントラルメモリーサブセットと炎症局所に遊走するエフェクターメモリーサブセットに分類できる。また、CD45RA、CCR7に加え、CD27、CD28によりCD4+T細胞を分類すると、サイトカイン産生やテロメア長の違い等により機能的に分画できることが報告されている。CD27、CD28はナイーブ細胞からメモリー細胞になるにつれ徐々に発現低下する。また、CD27、CD28が発現低下した細胞ではIFN-γの産生が高く、テロメア長が短くなる特徴がある。一方、最近Treg細胞がCD45RA、Foxp3によりCD45RA+Foxp3<sup>low</sup>のnaive Treg細胞、CD45RA-Foxp3<sup>high</sup>のactivated/effector Treg細胞、CD45RA-Foxp3<sup>low</sup>のnon-Treg細胞の3集団に分類でき、naive Treg細胞よりactivated/effector Treg細胞の方が抑制能は高く、またnon-Treg細胞は抑制能がなく、炎症性サイトカインを産生する細胞集団であることが知られている。

本研究では、RAの病態の中心となるCD4+T細胞サブセットを同定することを目的として、RA患者末梢血のCD4+T細胞を表面抗原マーカー(CCR7、CD45RA、CD27、CD28)により詳細に分類し、各サブセットの割合、サイトカイン産生(IFN-γ、IL-17、TNF-α)、Foxp3発現について解析した。RA患者及び健康人の末梢血をFicollにより末梢血単核球に分離後、CCR7、CD45RA、CD27、CD28、CD4を免疫蛍光染色し、各サブセットの割合を解析した。サイトカイン産生細胞、Foxp3発現細胞の解析では、表面抗原と細胞内染色の2段階染色法を用いた。CCR7、CD45RA、CD27、CD28、CD4を染色後、サイトカイン(IFN-γ、IL-17、TNF-α)またはFoxp3を染色した。解析では多重染色解析が可能なMofloを用いた。患者検体は神戸大学免疫内科で治療中の患者からインフォームドコンセントを得た検体を用いた。

本研究では、CCR7、CD45RA、CD27、CD28により末梢血CD4+T細胞を以下の6つのサブセット(CD27+CD28+CD4+Naive, CD27+CD28+CD4+T<sub>CM</sub>, CD27-CD28+CD4+T<sub>CM</sub>, CD27+CD28+CD4+T<sub>EM</sub>, CD27-CD28+CD4+T<sub>EM</sub>,

CD27-CD28- CD4+T<sub>EM</sub>)に分類した。RA 患者末梢血では、CD27+CD28+CD4+T<sub>CM</sub> サブセットが健常人に比して有意に減少しており、このサブセットについて解析したところ Foxp3 を発現する Treg 細胞が有意に減少していた。さらに CD45RA と Foxp3 による Treg 細胞の機能分類を行ったところ、抑制能の高い CD45RA-Foxp3<sup>high</sup> 細胞が CD27+CD28+CD4+T<sub>CM</sub> サブセットで減少していた。RA 患者の疾患活動性を示す Das28-CRP との相関関係を調べたところ、CD45RA+Foxp3<sup>low</sup> 細胞と負の相関があった。また、RA 患者末梢血では TNF-α産生細胞が CD27+CD28+CD4+T<sub>EM</sub> サブセットで健常人より有意に増加していた。

本研究は、RA 患者末梢血 CD4+細胞を表面抗原マーカーにより詳細に分画し、各分画の機能を研究したものであるが、従来知られていなかった RA における CD27+CD28+CD4+T<sub>CM</sub> サブセットの抑制能の高い CD45RA-Foxp3<sup>high</sup>Treg の減少と CD27+CD28+CD4+T<sub>EM</sub> サブセットでの TNF-α産生細胞の増加を見出したものであり、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。