

## SLE 患者における末梢血 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> リンパ球の減少

延藤 俊子

膠原病の病態としてT細胞の異常が示唆され、SLE においては末梢血 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 細胞の低下が報告されている。私共は、この細胞の低下が、リンパ球そのものの異常によるのか、あるいは、他の外的因子が関与して起こるのかを検討した。まず、血清因子を除外するために、リンパ球を分離、培養し、培養の前後で CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 細胞を測定した。更に、SLE 患者血清がリンパ球に及ぼす影響をリンパ球のカルシウムイオン取込みの変化によって検討した。SLE 患者では、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> リンパ球は、末梢血より分離直後健常人より低下していたが、分離1週間後には健常人と同程度まで回復した。また、患者血清を正常リンパ球に反応させると、リンパ球のカルシウムイオン取込みは、健常人血清を反応させた場合より増加した。これらの結果から、SLE では患者の血液中で、リンパ球が何らかの持続的刺激を受けている可能性が強く示唆された。(平成5年4月27日採用)

### Decreased CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Lymphocytes in Peripheral Blood of SLE Patients

Toshiko Nobutoh

Decreased CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> lymphocytes have been reported in peripheral blood of SLE patients. Using flow cytometer, the CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> lymphocytes were found to be decreased at the first day just after separation of lymphocytes, but recovered to normal range after one week culture without patient's sera. The moderate systemic application of corticosteroids to SLE patients had no effects on the lymphocytes of the present study.

To investigate whether these decreased cells could be initiated by their own intracellular natures or by some extrinsic factors, healthy lymphocytes were incubated with the positive and the negative sera and Ca<sup>++</sup> level were counted. One minute after incubation with the positive sera, Ca<sup>++</sup> uptakes of the normal lymphocytes increased, but not with the healthy negative sera.

These results suggest that the CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> cells were persistently activated in the peripheral blood of SLE patients and that their sera contained some extrinsic unknown factors to be able to activate the lymphocytes. (Accepted on April 27, 1993)

*Kawasaki Igakkaishi* 19 (2) : 83-89, 1993

**Key Words** ① CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> lymphocytes ② SLE ③ Ca<sup>++</sup> uptake

## はじめに

全身性エリテマトーデスは代表的な全身性自己免疫疾患であり、数多くのT細胞、B細胞の機能異常が指摘されている。近年、リンパ球の表面マーカーであり、細胞内シグナル伝達に関与していると思われるCD45分子が注目され、患者末梢血中のCD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>リンパ球減少が報告されている。

CD45分子はリンパ球表面に存在する糖蛋白で、細胞外ドメイン、膜通過ドメイン、細胞質内ドメインからなる。細胞質内ドメインにはProtein Tyrosine Phosphatase活性が存在し、このことから細胞内シグナル伝達に関与していると考えられている。また、細胞質外ドメインの差異により、分子量の異なるアイソフォームがあり、ヒトのリンパ球では現在5種類が明らかにされている。その中のひとつであるCD45RAは、リンパ球が刺激を受けた場合、他のアイソフォームであるCD45ROに一過性に变化し、その後再び回復することが言われている。

今回私共は、SLE患者の末梢血で見られるCD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>リンパ球の減少が、リンパ球そのものの異常によるのか、あるいは何らかの外的因子が関与して起こるものかを検討した。

## 材料と方法

CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>リンパ球の測定；患者の血液の中からリンパ球を分離し、約1週間培養液中に置くことで、血漿とリンパ球の接触を絶ち、リンパ球に対する患者血漿の影響を取り除き、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>リンパ球がどのように変化するかを測定した。

SLE患者13人(年齢16歳~78歳、平均41.7歳、男2人、女11人)と、コントロールとして健康人24人(年齢25歳~55歳、平均36.1歳、男9人、女15人)より、本人の同意を得て採血を行った。患者は外来通院者が8人、入院患者が5人である。未治療者は3人で、他はプレドニ

ゾロンを内服しており、その内1人はシクロスポリンを併用していた。

ヘパリンを加えた末梢血10mlをリンパ球分離液(Separate L、武藤化学薬品株式会社)に重層し、比重遠心法で単核球を分離した。得られた単核球の半数を10%FCSを加えたRPMI-1640に浮遊させ、残りの半数を分離直後にPE標識抗CD4抗体(Leu3a抗体、Becton Dickinson)、およびFITC標識抗CD45RA抗体(Serotec)と反応させ、flow cytometer(FACStar、Becton Dickinson)で蛍光を測定した。また、培養液に浮遊させた細胞は、末梢血より分離した1週間後に同様の方法で蛍光を測定した。

リンパ球のカルシウムイオン濃度の測定；リンパ球膜表面のCD45RA分子は、リンパ球が刺激を受けることで変動するが、患者の血清がリンパ球を活性化するか否かを検討するため、健康人リンパ球に患者血清を加え、カルシウムイオン濃度の変化を測定し、リンパ球活性化の有無を見た。

健康人ボランティア2人から前述の方法によりリンパ球を採取し、SLE患者6人(年齢18歳~45歳、平均35.5歳、男1人、女5人)、健康人5人(年齢26~66歳、平均46.4歳、男1人、女4人)から、本人の同意を得て、血清を採取した。

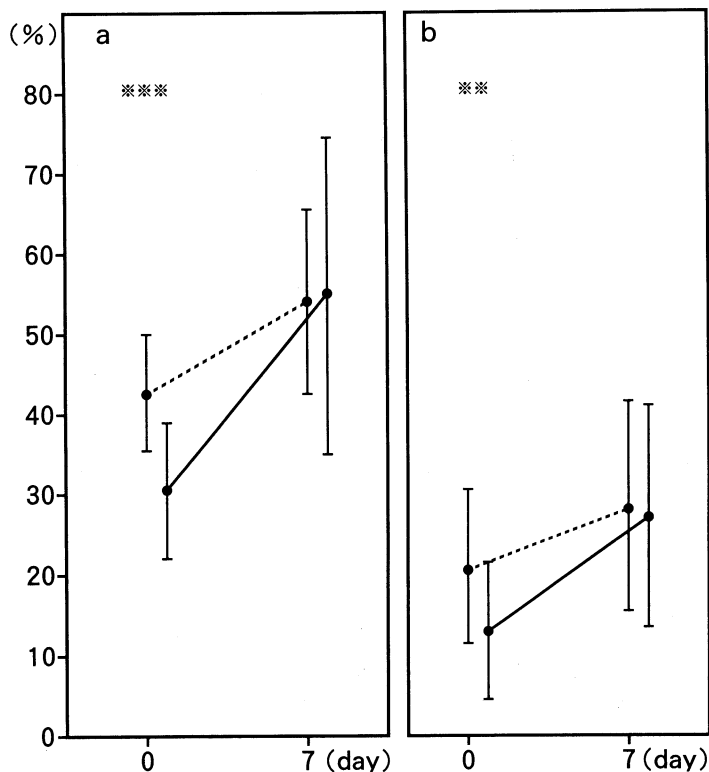
末梢血より分離したリンパ球を、カルシウムイオンのキレート剤である蛍光色素、Fluo 3-AM(和光純薬工業株式会社)と反応させ、更に、これに2倍に希釈した血清、および対照としてHanks溶液を加えた、血清を加えた後、1、3、5、10、20分後に、リンパ球の蛍光をFACStar model flow cytometerで測定し、カルシウムイオン取込みを判定した。

## 結 果

CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>リンパ球；末梢血より分離当日、健康人リンパ球のCD4<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>およびCD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>細胞の割合はそれぞれ42.9%、63.7%、20.8%であり、SLE患者リンパ球のそ

**Table 1.** Population of blood lymphocyte subsets in healthy controls and SLE patients

	0 day		1 week		1 week / 0 day	
	Normal	SLE	Normal	SLE	Normal	SLE
CD4 <sup>+</sup>	42.9%	30.4%	54.0%	55.1%	1.29	1.81
CD45RA <sup>+</sup>	63.7%	66.4%	57.4%	62.9%	0.92	0.95
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	20.8%	13.1%	28.4%	27.1%	1.67	2.32



**Fig. 1.** T lymphocyte subsets/all lymphocytes

----- control    ——— SLE  
 \*\*\* p<0.001    \*\* p<0.01

a : CD4<sup>+</sup> lymphocytes/all lymphocytes

b : CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> lymphocytes/all lymphocytes

れは30.4%, 66.4%, 13.1%であった(**Table 1**). すなわち, SLE では健康人に比べ, 分離当日のCD4<sup>+</sup> および CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 細胞の割合が有意に低下していた (p=0.0002, p=0.0087). また, 1週間培養した後は, 健康人リンパ球のCD4<sup>+</sup> および CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 細胞の割合は54.0%, 28.4%, SLE 患者リンパ球のそれは55.1%, 27.1%になり, ここではSLE と健康人の間には有意差は認められなかった(p=0.98, p=0.86,

**Fig. 1a, b**). 従って, リンパ球分離後1週間と分離当日の細胞の割合の比をみると, CD4<sup>+</sup> 細胞では健康人で1.29, SLE で1.81, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 細胞では健康人で1.67, SLE で2.32となり, どちらも有意差を持って (p=0.0008, p=0.0065), SLE の方が高値となった (**Fig. 2a, b**).

対象とした患者の多くは副腎ステロイド剤を使用していたが, リンパ球CD4, CD45RA 分子

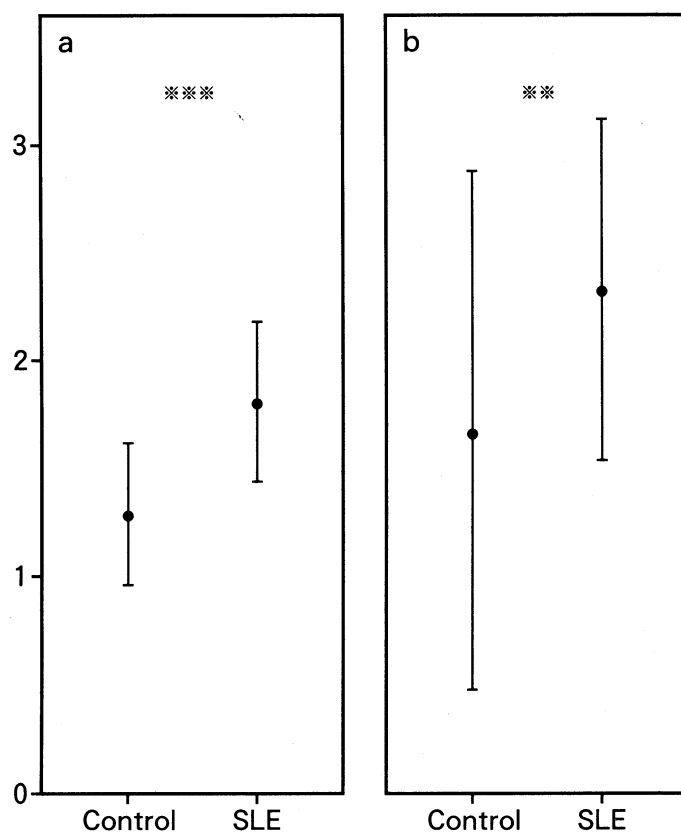


Fig. 2. 1 week/0 day : percentage of T lymphocyte subsets

\*\*\* p<0.001

\*\* p<0.001

a : 1 week/0 day : percentage of CD4<sup>+</sup> lymphocytes

b : 1 week/0 day : percentage of CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> lymphocytes

Table 2. Before and after application of corticosteroid

		0 day		1 week		1 week/0 day	
		before	after	before	after	before	after
CD4 <sup>+</sup>	case 1	41.1%	37.3%	71.6%	64.2%	1.74	1.72
	case 2	39.0%	39.6%	80.9%	60.6%	2.07	1.53
	case 3	28.1%	26.3%	54.6%	47.3%	1.94	1.80
	means	36.1%	34.4%	69.0%	57.4%	1.92	1.68
CD45RA <sup>+</sup>	case 1	41.3%	42.1%	42.9%	51.0%	1.03	1.21
	case 2	85.8%	74.0%	70.6%	80.4%	0.82	1.09
	case 3	61.1%	61.0%	71.6%	71.3%	1.17	1.17
	means	62.9%	59.0%	61.7%	67.5%	1.01	1.16
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	case 1	8.0%	5.6%	17.2%	20.5%	2.15	3.65
	case 2	31.6%	25.1%	58.9%	43.6%	1.83	1.73
	case 3	10.9%	9.2%	33.8%	27.5%	3.10	2.98
	means	16.8%	13.3%	36.6%	30.5%	2.37	2.79

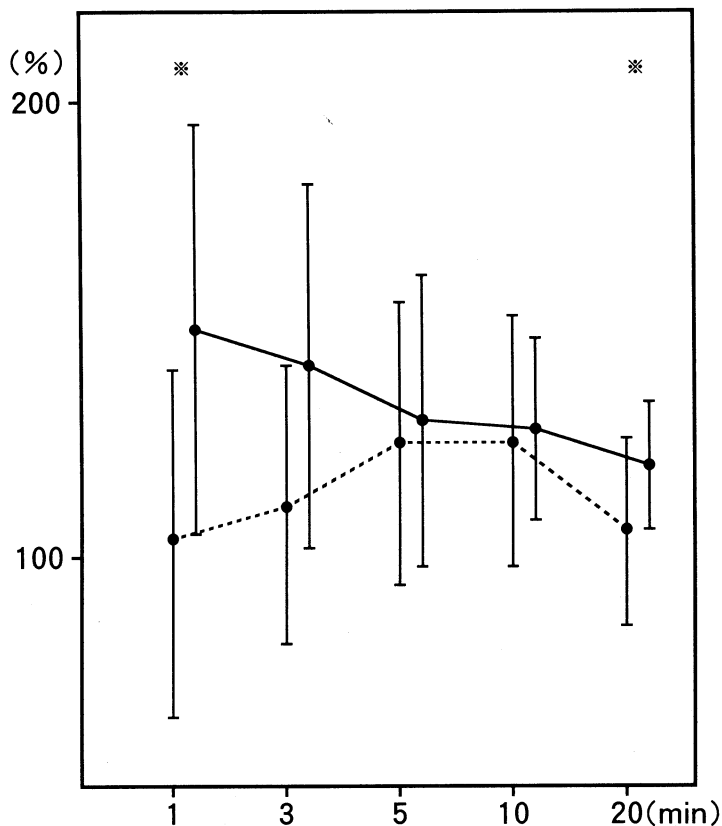


Fig. 3. Percentage of lymphocytes which showed increased Ca<sup>++</sup> level  
 ----- control      ——— SLE  
 ※ p<0.05

に対するステロイドの影響を検討するために、未治療患者3人において副腎ステロイド剤使用前後にリンパ球のCD4、CD45RA分子の出現を測定した (Table 2)。その結果、どちらの分子も末梢血より分離当日、1週間後とも副腎ステロイド剤使用前後に明らかな差異は認められず、他の副腎ステロイド剤使用中の患者の測定値とも明らかな差異はなかった。

リンパ球のカルシウムイオン濃度；リンパ球に血清を加えると、蛍光を強く示す一群の細胞が現れ、同部の細胞数を、Hanks液を加えた場合の細胞数に対する割合で表した (Fig. 3)。SLE患者血清を加えた場合、細胞数は1分後に150.3%となり、健常人血清を加えた場合(104.1%)より、有意に増加していた (p=0.05)。

### 考 察

SLE患者では、末梢血のCD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>リンパ球が減少していることが既に報告されている<sup>1)~3)</sup>が、今回私共は、末梢血よりリンパ球を分離し、1週間培養すると、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>リンパ球は増加し、健常人と同程度の割合になることを明らかにした。これまでの報告で、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>リンパ球は、可溶性抗原やPHAなどで刺激を受けると、その細胞数が減少し<sup>4), 5)</sup>、その後再び増加する<sup>6)</sup>ことが報告されているので、SLEで見られたこの現象は、患者の血清中にリンパ球を持続的に活性化させる因子が含まれていることを強く示唆している。

血清中には、各種のサイトカインや抗リンパ球抗体など、リンパ球を活性化する物質が、数多く含まれていると考えられ、これらの物質は、健康人の血清中にも存在していると思われる。これは、健康人血清をリンパ球に反応させた場合に、リンパ球のカルシウムイオン濃度が、僅かながら増加したことや、健康人リンパ球を *in vitro* で培養した場合に、 $CD4^+CD45RA^+$  リンパ球の細胞数が増加したことで明らかである。しかし、これらの変化は、SLE 患者においてより明確に現れ、SLE 患者血清中には、健康人とは異なるリンパ球刺激物質が存在すると考えられた。

SLE では以前より、IgG および IgM 抗リンパ球抗体が報告されている<sup>7,9)</sup> が、その後、抗  $CD4^+CD45RA^+$  リンパ球抗体が報告されている<sup>9,10)</sup>。Tanaka らの報告<sup>9)</sup> によると、正常な  $CD4^+$  リンパ球に SLE 患者血清とウサギ補体を反応させると、 $CD4^+CD45RA^+$  リンパ球の細胞数が減少し、suppressor/inducer 機能も消失したと言う。この反応は、補体依存性であり、細胞の破壊を引き起こしている可能性が大きく、私

共が今回示した変化と、必ずしも関係ないかも知れないが、自己抗体とリンパ球の関係を考える上で、たいへん興味深い。

また、SLE では、血清中の IL-2R や IL-10 が、活動性を反映して増加する<sup>11)~13)</sup> ことが知られており、リンパ球の機能異常を示すと同時に、これらのサイトカインの異常が、更にリンパ球の異常を引き起こしている可能性を示している。

血清中に存在すると思われる、リンパ球刺激物質を特定することは、現在のところ困難であるが、SLE 患者血清中に、健康人とは異なったリンパ球刺激物質が、存在することは明らかである。今後は、これらの物質の解明とともに、病態への関与を検討することが必要と思われる。

稿を終えるにあたり、ご校閲、ご指導を賜りました、植木宏明教授に深甚なる感謝の意を表します。この研究の遂行に当たって、ご協力をいただいた楊治氏(川崎医科大学衛生学教室)に感謝致します。本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費(No.3-513)の援助によって行われたものである。

## 文 献

- 1) Smolen JS, Morimoto C, Steinberg AD, Wolf A, Schlossman SF, Steinberg RT, Penner E, Reinherz E, Reichlin M, Chused TM: Systemic Lupus Erythematosus: Delineation of Subpopulations by Clinical, Serologic, and T Cell Subset Analysis. *Am. J. Med. Sciences.* 289: 139-147, 1985
- 2) Morimoto C, Steinberg AD, Letvin NL, Hagan M, Takeuchi T, Daley J, Levine H, Schlossman SF: A Defect of Immunoregulatory T Cell Subsets in Systemic Lupus Erythematosus Patients Demonstrated with Anti-2H4 Antibody. *J. Clin. Invest.* 79: 762-768, 1987
- 3) Sato K, Miyasaki N, Yamaoka K, Okuda M, Yata J, Nishioka K: Quantitative Defect of  $CD4^+H4^+$  Cells in Systemic Lupus Erythematosus and sjogren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 30: 1407-1411, 1987
- 4) Morimoto C, Letven NL, Rudd CE, Hagan M, Takeuchi T, Schlossmann SF: The Role of the 2H4 Molecule in the Generation of Suppressor Function in Con A-Activated T Cells. *J. Immunol.* 137: 3247-3253, 1986
- 5) Warren HS, Skipsey LJ: Loss of Activation-Induced CD45RO with maintenance of CD45RA Expression during Prolonged Culture of T Cells and NK Cells. *Immunology* 74: 78-85, 1991
- 6) Rothstein DM, Yamada A, Schlossmann SF, Morimoto C: Cyclic Regulation of CD45 Isoform Expression in a Long Term Human  $CD4^+CD45RA^+$  T Cell Line. *J. Immunol.* 146: 1175-1183, 1991
- 7) Minota S, Winfield JB: IgG Anti-Lymphocyte Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus React

- with Surface Molecules Share by Peripheral T Cells and a Primitive T Cell Line. *J. Immunol.* 138 : 1750—1756, 1987
- 8) Minota S, Winfield JB : Identification of Three Major Target Molecules of IgM Antilymphocyte Autoantibodies in Systemic Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 139 : 3644—3651, 1987
  - 9) Tanaka S, Matsuyama T, Steinberg AD, Schlossman SF, Morimoto C : Antilymphocyte Antibodies Against CD4<sup>+</sup>2H4<sup>+</sup> Cell Populations in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 32 : 398—405, 1989
  - 10) Mimura T, Fernsten P, Jarjour W, Winfield JB : Autoantibodies Specific for Different Isoforms of CDde in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Exp. Med.* 172 : 653—656, 1990
  - 11) Wolf RE, Brelsford WG : Soluble Interleukin-2 Receptors in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 31 : 729—735, 1988
  - 12) Raziuddin S, Al-Janade MA, Al-Wabel A : Soluble Interleukin 2 Receptor Levels in Serum and its Relationship to T Cell Abnormality and Clinical Manifestations of the Disease in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Rheumatol.* 18 : 831—836, 1991
  - 13) 石田 博 : SLEの発症とIL-10. *臨床免疫* 25 : 43—51, 1993