

全身性エリテマトーデス患者の末梢血リンパ球における テロメラーゼ活性およびテロメア長の解析

安 田 淳

東京慈恵会医科大学内科学講座リウマチ・膠原病内科

(受付 平成 18 年 11 月 28 日)

ANALYSIS OF TELOMERASE ACTIVITY AND TELOMERE LENGTH IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Jun YASUDA

Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine

We investigated the clinical significance of telomerase activity and telomere length in peripheral blood T cells (CD3+) and B cells (CD19+) of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Telomerase activity was measured with the telomeric repeat amplification protocol assay, and telomere length was measured with flow-fluorescence in situ hybridization. Patients with SLE were classified into those with active SLE and inactive SLE according to the SLE disease activity index (SLEDAI). The T cell telomerase activity was significantly higher in patients with active or inactive SLE than in healthy subjects. However, the degree of telomerase activity was not correlated with the SLEDAI. In contrast, B cell telomerase activity was significantly higher in patients with active SLE than in healthy subjects and was strongly correlated with the SLEDAI. The T cell telomere length was significantly shorter in patients with SLE than in healthy subjects, whereas B cell telomere length did not differ between these two groups. These results suggest that in patients with SLE T cells are undergoing cell division continuously and that T cell telomerase activity is higher than normal but not high enough to prevent telomere shortening. However, we speculate that in B cells, cell division does not occur at an abnormally high rate in the inactive phase but occurs frequently in the active phase and that increased telomerase activity prevents telomere shortening.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2007; 122: 41-51)

Key words: telomere length, telomerase activity, peripheral lymphocytes, systemic lupus erythematosus

I. 緒 言

テロメアは真核生物の染色体末端に存在する DNA 蛋白質複合体であり、染色体の安定化には必須の構造であると考えられている¹⁾。ヒトのテロメア DNA は TTAGGG の繰り返し構造で、染色体末端に位置している。この末端部分のテロメ

ア DNA は通常の DNA 合成酵素では複製されない。このため、細胞分裂が起きるたびにテロメア DNA は短縮してゆく²⁾³⁾。このことは末端複製問題として知られている⁴⁾。テロメラーゼは、テロメア DNA 配列を染色体末端に付加する逆転写酵素を含む RNA 蛋白質複合体であり、細胞分裂に伴うテロメア長短縮に拮抗していると考えられてい

る⁵⁾。

テロメア・テロメラーゼに関する研究は、これまでに悪性腫瘍の分野において盛んに行われてきた⁶⁾。悪性腫瘍細胞は、その高いテロメラーゼ活性によって細胞分裂に伴うテロメア DNA 短縮が拮抗され、無限分裂が可能となっていると推察されている⁵⁾⁶⁾。一方近年、正常リンパ球を含む多くの非不死化細胞においてもテロメラーゼ活性が発現していることが発見され⁷⁾、テロメア・テロメラーゼは多くの研究者から注目され始めた。正常リンパ球では、平常時にはテロメラーゼ活性は発現していないが、リンパ球の活性化が起こるとテロメラーゼ活性が誘導されることが報告されている⁷⁾⁸⁾。このメカニズムはいまだに不明な点も多いが、細胞周期とテロメラーゼ発現の関連が報告されている⁹⁾¹⁰⁾。正常 T リンパ球における *in vitro* の刺激実験では、G0 期にはテロメラーゼ活性は検出されないが、PHA 刺激により細胞周期が G1 期から S 期に入るとテロメラーゼ活性が強く誘導され、再び細胞周期から出て静止期となるとテロメラーゼ活性は消失していた¹⁰⁾。この他にも、細胞周期とテロメラーゼ活性誘導の関連性について多くの報告がなされている¹¹⁾。リンパ球は抗原から刺激を受けると爆発的に細胞分裂を行い増殖する。したがって、テロメラーゼの生物学的意義が細胞分裂に伴うテロメア短縮に対する拮抗反応とすれば、リンパ球が S 期となったときにテロメラーゼ活性の誘導が起こることは非常に合目的であると考えられる。

正常リンパ球におけるテロメラーゼ活性が注目を集めるようになってから、これまでに多くの自己免疫性疾患やアレルギー性疾患におけるリンパ球のテロメラーゼ活性について、報告がなされた^{12)–17)}。著者らも以前、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) 患者の末梢血単核球細胞 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) におけるテロメラーゼ活性は疾患活動性と強く相関することを報告した¹⁷⁾。この報告において著者らはこのテロメラーゼ活性の異常はリンパ球由来の可能性が高いことを指摘した。そこで今回この研究をさらに発展させるために、SLE 患者の末梢血を T リンパ球、B リンパ球に分け、それぞれのテロメラーゼ活性とテロメア長

を測定し、それらを臨床所見と比較した。

II. 対象と方法

1. 対象

東京慈恵会医科大学附属病院のリウマチ・膠原病内科外来通院中もしくは入院中の SLE 患者 34 名を対象とした。その内訳は、男性 3 名、女性 31 名で、年齢分布は 18 歳から 64 歳 (平均 39.15 ± 12.47 SD) であった。患者は SLE 疾患活動性指数 (SLE disease activity index: SLEDAI) を用いて、活動期 (SLEDAI ≥ 6, $n=18$) と非活動期 (SLEDAI < 6, $n=16$) に分けた。このうち 17 名では、そのテロメア長も測定した。17 名はすべて女性で、年齢分布は 26 歳から 57 歳 (平均 39.74 ± 10.57 SD) であった。対照群として、健常成人 17 名の T 細胞および B 細胞におけるテロメラーゼ活性およびテロメア長を測定した。その内訳は、男性 1 名、女性 16 名で、年齢分布は 18 歳から 57 歳 (平均 37.77 ± 12.56 SD) であった。すべての患者で、アメリカリウマチ協会の SLE 分類基準を満たしていた。また、対照群においては、特記すべき既往症や治療中の疾患はみられなかった。

参加したすべての SLE 患者および健常者に対して今回の研究に関する説明を行い、文書による同意を得た上で、上腕肘皮静脈からヘパリン (アベンティスファーマ、東京) コートしたシリンジ (テルモ、東京) で末梢静脈血を約 20 ml 採取した。なお、本研究は東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を得て実施した。

2. T 細胞および B 細胞の分離精製

採取した末梢血からフィコール比重遠心法を用いて PBMC を分離した。すなわち、採取した末梢血全量を Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) により、その使用説明書に従って PBMC に分離精製した。この PBMC の細胞数を血球計算板 (サンリード硝子有限会社、東京) を用いて算出し、細胞数が 1×10^7 cells となるように調整した。さらに、この PBMC を MACS 磁気細胞分離システム (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) により、その使用説明書に従って、T 細胞と B 細胞に分離精製した。すなわち、得られた PBMC 1×10^7 cells に対して CD3 マイクロビーズ (MicroBeads conjugated anti-human

CD3 mouse IgG2a, Miltenyi Biotec) の原液 20 μL を付加し, 6°C で 15 分間インキュベーション後, MiniMACS Separator (Miltenyi Biotec) を用いて CD3 陽性細胞 (T 細胞) を分離した. 同様に CD19 マイクロビーズ (MicroBeads conjugated anti-human CD19 mouse IgG2a, Miltenyi Biotec) を用いて CD19 陽性細胞 (B 細胞) を分離した. このシステムにより分離された各 T 細胞および B 細胞の精製率を, フローサイトメーターを用いて確認した. すなわち, 分離したそれぞれの T 細胞および B 細胞に Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-human CD3 mouse IgG2a (eBioscience, San Diego, CA) および Phycoerythrin (PE) anti-human CD20 mouse IgG2b (eBioscience) のそれぞれ 25 倍希釈したものを 20 μL 付加し, 氷上で 1 時間インキュベーションした. これを FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いて測定した. この際, FITC の測定には FL1 を, PE の測定には FL2 を用いた. 両者ともに, それらの精製率は 95% 以上であった.

3. テロメラーゼ活性の測定 (Telomeric Repeat Amplification Protocol Assay: TRAP assay)

各リンパ球細胞のテロメラーゼ活性を, TRAP アッセイ法により測定した. 今回の実験では, TRAPeze テロメラーゼ活性検出キット (INTERGEN Co., Purchase, NY) を用い, その実験プロトコルを若干改変した上で測定した. すなわち, 各サンプル細胞 1.0×10^5 個を $1 \times \text{CHAP lysis buffer}$ (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 0.1 mM Benzamidine, 5 mM β -Mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% Glycerol) 100 μl に懸濁して融解ホモジナイズし, 氷上で 30 分間インキュベートした. これを 15,000 rpm, 4°C で 20 分間遠心し, 上清を新しい 1.5 ml 遠心管に移し取った. この細胞融解液 20 μl を PCR 反应用 200 μl チューブに移し, さらに同キットに含まれる各反应用試薬 (10 \times TRAP 反応液 (200 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl_2 , 630 mM KCl, 0.5% Tween 20, 10 mM EGTA) 5 μl , 50 \times dNTP 混合物 (各 2.5 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 1 μl , TS プライマー 1 μl , プライマー混

合物 (RP プライマー, K1 プライマー, TSK1 テンプレート) 1 μl , PCR 用水 21.6 μl , Taq ポリメラーゼ 0.4 μl) をそれぞれ規定量づつ加え, 30°C で 10 分間インキュベートした (テロメア伸長反応). 続けて polymerase chain reaction (PCR) 法を用いてテロメラーゼ活性を検出した. サーマルサイクラー GeneAmp 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA) の設定は 94°C 30 秒, 60°C 30 秒の 2 ステップ PCR で, この行程を合計 30 サイクル行った. 得られた PCR 産生物 10 μl に 10 \times Blue Juice (Invitrogen, Carlsbad, CA) 2 μl を加えて計 12 μl とし, これを全量 12% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った. このゲルを SYBR Gold (Molecular Probes, Eugene, OR) にて 15 分間染色した後, CCD カメラ付き UV トランスイルミネーター (TOYOBO, 東京) でゲルを撮影した. 検体細胞のテロメラーゼにより合成される PCR 産生物は, 50 bp 以上に見られる 6 bp 間隔のラダーとして認められるバンドである. 内部コントロール用テンプレート (TSK1 テンプレート) を増幅した PCR 産物は 36 bp に認められるバンドである. このバンドを NIH image 画像解析ソフト (National Institute of Health, Bethesda, MD) により解析し, 50 bp 以上に認められるバンドの総量を 36 bp に見られるバンドの総量で割ったものをテロメラーゼ活性値とした.

4. 定量化曲線

今回用いた TRAP アッセイ法の定量性を確認するために, RAMOS 細胞 (B リンパ腫由来 cell line) のテロメラーゼ活性を測定した (Fig. 1). RAMOS 細胞の希釈列を作成し, 上記の方法で TRAP アッセイを行ったところ, テロメラーゼ活性値は 0.026 から 27.55 の範囲で定量性があることが確認された (Fig. 1).

5. テロメア長の測定 (Flow-fluorescence in situ hybridization: Flow-FISH)

今回の研究では, 各リンパ球分画のテロメア長測定原理として Flow-FISH 法を採用した. すなわち, テロメア長測定用市販キット Telomere PNA Kit (DAKO) を用いて, 細胞内 DNA を抽出することなしに, 直接細胞内のテロメア配列を in situ hybridization により特異的に染色し, フローサイトメーターを用いて定量化し測定した.

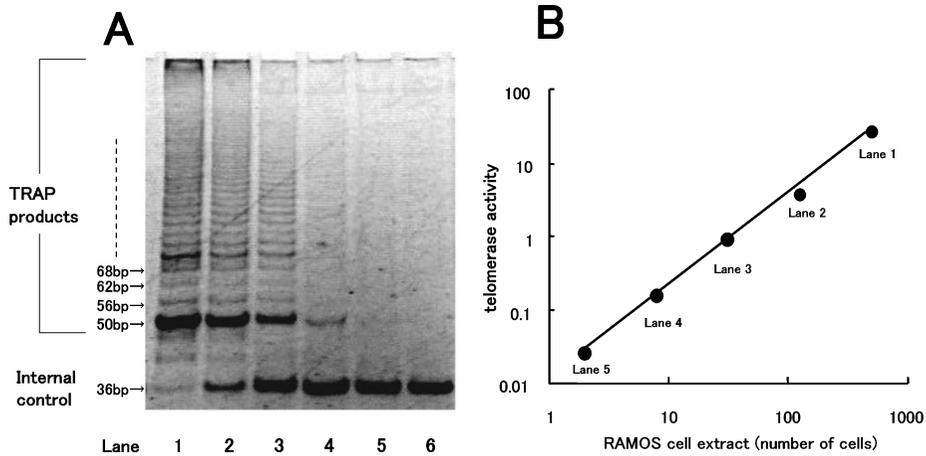


Fig. 1. Calibration line for the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay. To validate the quantitiveness of the TRAP assay, serial dilutions of RAMOS cells (B lymphoma-derived cell line) were prepared, and their respective telomerase activities were measured.

A: Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of TRAP assay products. A 6-bp ladder of bands of 50 bp or larger indicates the TRAP assay products formed by RAMOS cell telomerase. The band observed at 36 bp indicates the internal control product. The telomerase activity was defined as the total amount of bands of 50 bp or larger divided by that of the 36-bp band. Lane 1: TRAP assay product from 1000 RAMOS cells; Lane 2: TRAP assay product from 250 RAMOS cells; lane 3: TRAP assay product from 63 RAMOS cells; Lane 4: TRAP assay product from 16 RAMOS cells; Lane 5: TRAP assay product from 4 RAMOS cells; and Lane 6: TRAP assay product from the negative control.

B: Calibration line for telomerase activity. The telomerase activities in 4 and 1000 RAMOS cells were 0.026 and 27.55, respectively. The longitudinal and horizontal axes indicate the logarithm of the telomerase activity level and that of the number of RAMOS cells, respectively. Thus, it was confirmed that the telomerase activities in this assay ranged from 0.026 to 27.55. The calibration line demonstrates a linear relationship between RAMOS cell number and telomerase activity from 0.026 to 27.55.

以下に実験方法の詳細を示す。前述の磁気細胞分離法により CD3 陽性もしくは CD19 陽性細胞に精製した各リンパ球 1×10^6 cells を、新しい 1.5 ml 遠心管にそれぞれ取り分けた。これに FITC conjugated telomere peptide nucleic acid (PNA) probe (DAKO) $300 \mu\text{l}$ を加え良く混和し、 82°C で 10 分間インキュベート (Denaturation) した後、暗所室温で 1 晩静置 (in situ hybridization) した。翌朝、余分な probe を除くために、Wash buffer (DAKO) にて 2 回洗浄した。その後、死細胞や分裂中の細胞を検出するために、DNA staining solution (containing Propidium Iodide, DAKO) $500 \mu\text{l}$ を加え 4°C で 3 時間染色し、新しい FACS 用試験管 (Becton Dickinson) に移した。これを FACS Calibur (Becton Dickinson) にて、1 サンプルあたり少なくとも 10,000 個の細胞を測定した。測定に使用したチャンネルは

FL1 と FL3 で、それぞれのチャンネルで FITC と DNA 染色の蛍光強度を測定した。DNA 染色により分裂期にある細胞群や死細胞をゲーティングにて除いた後、サンプル細胞における FITC 蛍光強度の平均値をサンプル細胞の平均テロメア長とした。この際、FACS Calibur の蛍光感度の設定によっては、サンプルの平均蛍光強度値が容易に変化してしまう。これを常時一定にするために、テロメア長が長鎖かつ一定で、FACS 設定時の基準点となるようなスタンダード用の細胞を用意した。このスタンダード細胞も常にサンプル細胞と同時に in situ hybridization を行い、さらに FACS Calibur による蛍光強度の測定もサンプル細胞と同時に行った。サンプル細胞のテロメア長はこのスタンダード細胞における平均蛍光強度の比 (relative telomere length: RTL (%)) で表した。スタンダード細胞は Telomere PNA Kit

(DAKO) で推奨されている 1301 cell line (Human T-cell leukemia cell line, European collection of cell cultures, Wiltshire, UK) を用いた。

6. 統計学的解析

正常者群, 活動性 SLE 群および非活動性 SLE 群の 3 群間におけるテロメラーゼ活性は, Kruskal-Wallis 検定により多群間比較を行い, 追検定として Mann-Whitney U 検定を行って求めた。群間差の判定は Bonferroni 法に従って, 有意水準 p 値が $0.017 (=0.05/3)$ 以下の場合を, 各 2 群間に有意差があると判断した。正常者群および SLE 群のテロメア長の 2 群間比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。また, SLEDAI や臨床検査データとテロメラーゼ活性の相関関係の検討は, Spearman 順位相関を用いて解析した。

III. 結 果

末梢血 T 細胞のテロメラーゼ活性値を活動期 SLE 群, 非活動期 SLE 群, 正常者群 3 群間で比較した (Fig. 2A)。まず Kruskal-Wallis 検定により多群間の比較を行ったところ, 3 群間で統計学的に有意差を認めず, 2 群間の比較には Mann-Whitney の U 検定を用いたが, 活動期 SLE 群と正常群間の p 値は 0.004 以下, 非活動期 SLE 群と

正常群間の p 値は 0.162 であった。一方, 活動期 SLE 群と非活動期 SLE 群間の p 値は 0.162 で, 両群間に有意差を認めなかった。すなわち, T 細胞のテロメラーゼ活性値は活動期および, 非活動期どちらにおいても正常群と比べて上昇していた。しかし, 活動期と非活動期間では有意差がなかった。

次に末梢血 B 細胞のテロメラーゼ活性値を同様に比較した (Fig. 2B)。Kruskal-Wallis 検定により, 3 群間で有意差を認めたことを確認したのち, Mann-Whitney の U 検定を行った。活動期 SLE 群と正常群間の p 値は 0.001 以下, 非活動期 SLE 群と正常群間の p 値は 0.505 であった。また活動期 SLE 群と非活動期 SLE 群間の p 値は 0.001 以下であった。すなわち, B 細胞のテロメラーゼ活性値は活動期においてのみ上昇していた。

末梢血 T 細胞テロメラーゼ活性値と SLEDAI の関係は Spearman の順位相関を用いて解析した (Fig. 3A)。T 細胞テロメラーゼ活性値と SLEDAI 間の p 値は 0.312 で, 両者間に相関関係を認めなかった。同様の解析法を用い, B 細胞テロメラーゼ活性値と SLEDAI の関係を調べた (Fig. 3B)。B 細胞テロメラーゼ活性値と SLEDAI 間の p 値は 0.01 以下で両者に強い正の

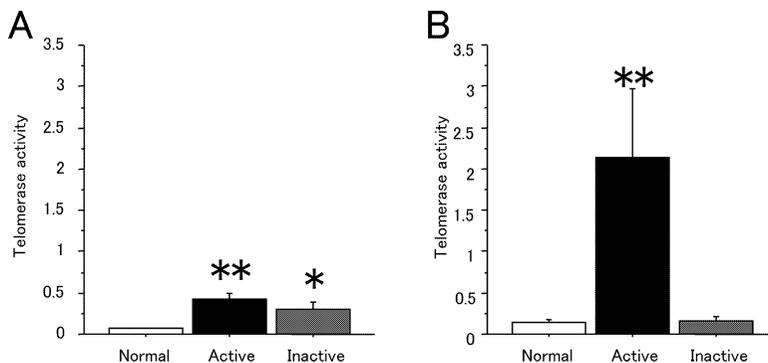


Fig. 2. Comparison of lymphocyte telomerase activity between SLE patients and healthy subjects.

A: Comparison of T cell telomerase activity. The T cell telomerase activity of patients with active or inactive SLE was higher than that of the healthy subjects. However, there was no difference in telomerase activity between the patients with active SLE and those with inactive SLE.

B: Comparison of B cell telomerase activity. The B cell telomerase activity of the SLE patients was markedly elevated in the active phase, but did not significantly differ in the inactive phase from the healthy subjects. Normal, healthy adults; "Active" indicates patients with active SLE; "Inactive", patients with inactive SLE; **, $p < 0.01$; and *, $p < 0.05$. Data are expressed as the mean SEM.

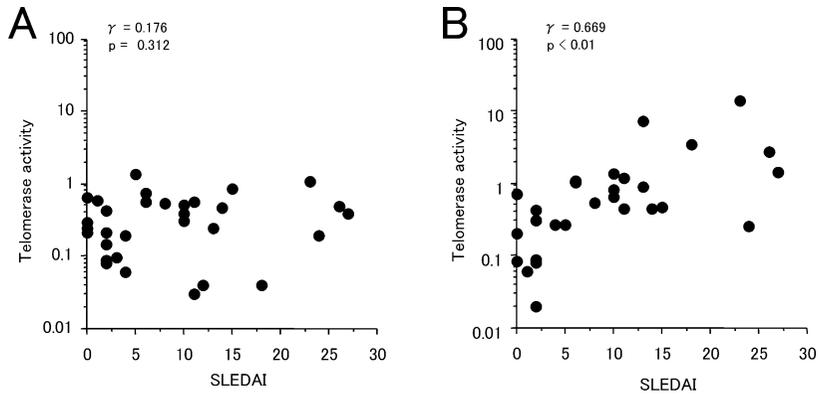


Fig. 3. Correlation between SLE disease activity index (SLEDAI) and lymphocyte telomerase activity.

A: Correlation between SLEDAI and T cell telomerase activity.

B: Correlation between SLEDAI and B cell telomerase activity. A correlation was found between B cell telomerase activity and SLEDAI, but not between T cell telomerase activity and SLEDAI.

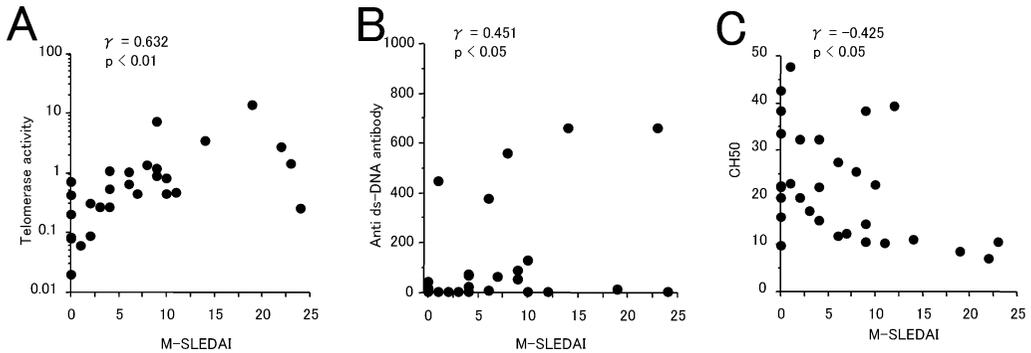


Fig. 4. Comparison of the correlations of modified SLEDAI (M-SLEDAI) with B cell telomerase activity, anti-double-stranded DNA antibody titer, and serum complement titer.

A: Correlation between M-SLEDAI and B cell telomerase activity.

B: Correlation between M-SLEDAI and anti-double-stranded DNA antibody titer.

C: Correlation between M-SLEDAI and serum complement titer.

相関関係を認めた。

B細胞のテロメラーゼ活性値と疾患活動性の関係を検討した(Fig. 4A)。さらにこの程度を判断するために、抗二本鎖DNA抗体価と疾患活動性の関係(Fig. 4B)および補体価と疾患活動性の関係(Fig. 4C)と比較した。疾患活動性の判定にはSLEDAIを用いたが、SLEDAIの項目中には抗二本鎖DNA抗体価および補体価が含まれているため、今回の比較ではSLEDAIから抗二本鎖DNA抗体価および、血清補体価の項目を除いたmodified SLEDAI (M-SLEDAI)を用いた¹⁸⁾。M-SLEDAIとB細胞テロメラーゼ活性値、M-

SLEDAIと抗二本鎖DNA抗体価、M-SLEDAIと補体価(CH50)の関係をSpearmanの順位相関を用いて比較検討した(Fig. 4)。M-SLEDAIとB細胞テロメラーゼ活性値および抗二本鎖DNA抗体価は正の相関を、M-SLEDAIとCH50は負の相関を示した。相関係数はM-SLEDAIとB細胞テロメラーゼ活性値間は0.632、M-SLEDAIと抗二本鎖DNA抗体価間は0.451、M-SLEDAIとCH50間は-0.425であった。すなわちB細胞のテロメラーゼ活性値は3者間においてはM-SLEDAIと最も強く相関した。

末梢血B細胞テロメラーゼ活性値と各種臨床

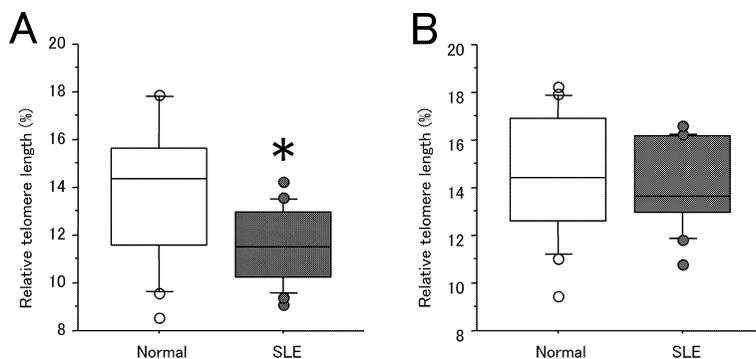


Fig. 5. Comparison of lymphocyte telomere lengths between SLE patients and healthy subjects.
 A: Comparison of T cell telomere lengths. T cell telomere length was shorter in the SLE patients than in healthy adults.
 B: Comparison of B cell telomerase lengths. There was no significant difference in B cell telomerase length between the SLE patients and normal subjects.
 *, $p < 0.05$. Top bar: 90 percentile, Top of box: 75 percentile, Center line of box: 50 percentile, Bottom of box: 25 percentile, Bottom bar: 10 percentile.

Table 1. Correlations of B lymphocytes telomerase activity with various clinical data.

	γ	p	result
WBC	-0.135	0.439	NS
lymph	-0.298	0.115	NS
Hb	-0.073	0.674	NS
Plt	0.038	0.827	NS
CRP	0.332	0.056	NS
C3	-0.410	0.030	S
C4	-0.285	0.154	NS
CH50	-0.547	0.003	S
IgG	0.654	0.001	S
IgA	0.255	0.194	NS
IgM	0.349	0.075	NS
dsDNA	0.553	0.002	S
proteinuria	0.171	0.341	NS
prednisolone	-0.218	0.248	NS

WBC: white blood cell counts ($/\mu\text{L}$), lymph: lymphocyte cell counts ($/\mu\text{L}$), Hb: hemoglobin (g/dL), Plt: thrombocyte cell counts ($/\mu\text{L}$), CRP: C reactive protein (mg/dL), C3: complement 3 (mg/dL), C4: complement 4 (mg/dL), CH50: complement activity (U/mL), IgG: immunoglobulin G (mg/dL), IgA: immunoglobulin A (mg/dL), IgM: immunoglobulin M (mg/dL), dsDNA: anti-double-stranded DNA antibody (U/mL), prednisolone: daily dose of prednisolone (mg/day).

γ : coefficient of correlation, p : p -value of Spearman's correlation coefficient by rank. NS: not significant, S: significant.

検査項目の関係を Spearman の順位相関を用いて解析した (Table 1). B 細胞のテロメラーゼ活性値と正の相関関係を認めたものは IgG 値 ($p = 0.001$) および抗二本鎖 DNA 抗体価 ($p = 0.002$) であった. B 細胞のテロメラーゼ活性値と負の相関関係を認めたものは C3 値 ($p = 0.03$) および CH50 ($p = 0.003$) であった. 末梢血 T 細胞テロメラーゼ活性と各種臨床検査項目の関係も同様に解析したが, 有意な相関関係を認めなかった.

末梢血 T 細胞および B 細胞のテロメア長を SLE 群と正常群で Mann-Whitney の U 検定を用いて解析した (Fig. 5). 末梢血の T 細胞のテロメア長においては, 正常群と SLE 群間の p 値は 0.0127, B 細胞のテロメア長においては, 両群間の p 値は 0.3062 であった. すなわち T 細胞のテロメア長は, 正常者群と比べて SLE 群では短かった. しかし, B 細胞のテロメア長には有意差を認めなかった.

IV. 考 察

これまでに著者らは, SLE 患者における PBMC のテロメラーゼ活性について, その疾患活動性, 臨床データ, 治療内容との関連について詳細に検討してきた¹⁶⁾¹⁷⁾. SLE 患者 PBMC においては, 疾患活動性とともテロメラーゼ活性は上昇し, 治療による疾患活動性の低下に伴ってテロメラーゼも低下した. しかし疾患活動性の低い寛

解期においても PBMC のテロメラーゼ活性は、正常者と比べて軽度上昇していた¹⁷⁾。この SLE 患者 PBMC に認められるテロメラーゼ活性の異常は PBMC のどの分画由来によるものか興味を持たれた。そして今回の研究によって、活動期 SLE 患者における疾患活動性と相関する PBMC の強いテロメラーゼ活性は主に B 細胞に由来していたことがはじめて分かった。この B 細胞のテロメラーゼ活性は、SLE の疾患活動性の判定に臨床上用いられている抗二本鎖 DNA 抗体価、血清補体価、C3 値、IgG 値と相関した。さらに M-SLEDAI との相関関係は抗二本鎖 DNA 抗体価や血清補体価より強かった。このことから B 細胞のテロメラーゼ活性は、疾患活動性の判定に臨床的にも有用となると考えられた。一方、寛解期 SLE 患者における PBMC の軽度のテロメラーゼ活性はおもに T 細胞に由来していることが判明した。

本研究では、T 細胞、B 細胞分画のテロメア長についても検討した。リンパ球のテロメア長は年齢によっても変化するため、今回コントロール症例を選択する上で患者層と年齢を一致させることにとくに注意した。また、活動期患者と非活動期患者でテロメア長が異なる傾向を示す可能性があったので、活動期患者と非活動期患者に分け検討したが、一定の関係は認めなかった。また、テロメラーゼ活性とテロメア長についての関係も検討したが、PBMC で解析した結果¹⁷⁾と同様に一定の関係は示さなかった。そのため、テロメア長の比較は活動期患者と非活動期患者に分けずに行った。結果は、SLE 患者の T 細胞テロメア長は正常者と比べて短かった。一方、B 細胞テロメア長は SLE 患者と正常者では有意差は認めなかった。

テロメラーゼ活性の結果と以上の結果を併せて以下のように考察した。SLE 患者においては T 細胞は持続的に多くの細胞分裂をしている。そのテロメラーゼ活性は正常者と比べては高いがテロメア長の短縮を防ぐ程でない。実際今回の測定においても T 細胞のテロメラーゼ活性は B 細胞のテロメラーゼ活性に比べて低かった。一方、B 細胞の場合は正常者と比べて細胞分裂が多く起こっていない、あるいは細胞分裂が起こっていたとしても、テロメラーゼ活性が上がることによりテロ

メアの短縮が阻止されている。さらに、B 細胞においては活動期のみテロメラーゼ活性が上がり、非活動期にはテロメラーゼ活性が上がっていないことを併せ、以下のように考察した。B 細胞においては非活動期には正常者と比べて異常な細胞分裂は起きていない。しかし、活動期に入ると B 細胞の細胞分裂が盛んに起こるが、テロメラーゼ活性が上がることによりテロメアの短縮は防がれている。

SLE 患者においては B 細胞のポリクローナルな活性化が報告され¹⁹⁾、その後、患者由来 B 細胞は無刺激条件下でも増殖能、免疫グロブリン産生能が亢進していると報告され²⁰⁾、B 細胞全般の活性化が自己抗体産生や血清中免疫グロブリン産生亢進を引き起こしていると考えられている。一方、SLE 患者における T 細胞の研究も近年進歩し、SLE 患者に認められる多彩な症状に強く関与していることが明らかとなった。SLE 患者 T 細胞では、T 細胞表面の MHC クラス II の異常発現²¹⁾、mutated T 細胞の出現頻度の増加²²⁾、IL-2mRNA の上昇、血清中 IL-2 および可溶性 IL-2 受容体の上昇²³⁾²⁴⁾、CD40ligand の発現上昇²⁵⁾²⁶⁾、sCD8- α 分子の上昇²⁷⁾などの報告がされている。これらは SLE 患者において T 細胞の活性化が起こっているためと考えられている。また、SLE モデルマウスでは CD4 陽性 T 細胞を除くことで SLE 発症を防ぐことができること²⁸⁾、胸腺欠損マウスでは SLE を発症しないこと²⁹⁾³⁰⁾、ヒト SLE においてもヒト免疫不全ウイルスの感染により SLE 活動性が改善すること³¹⁾なども報告されている。これらの報告は SLE の病態形成に T 細胞が深く関与していることを示すものであるが、おもにそれぞれ別個に T 細胞や B 細胞を分析し、それらの異常を指摘する報告が多い。一方、今回の研究では T 細胞、B 細胞とも同じ測定法を用い、その異常を評価した。この点が、従来の報告と比べてユニークな点といえる。

以上から、SLE 患者の T 細胞は常時活性化しているが、疾患の顕性化にはそれだけでは不十分であることが推測される。症状の顕性化には B 細胞の活性化が必須であるが、一方、SLE の臨床症状を抑止するだけであれば、B 細胞の抑制だけで十分かもしれない。実際、SLE に対する抗 CD20

モノクローナル抗体によるB細胞にターゲットを絞った治療が臨床使用され始めている³²⁾。しかしながら、本質的な治療を行うためにはT細胞をもターゲットに入れた治療が必要である。さらに、このB細胞活性化がT細胞により惹起されるとすれば、T細胞-B細胞の細胞間相互作用をターゲットとした治療も有用である。実際近年、T細胞-B細胞間相互作用に関与している細胞表面分子であるCD40ligandをターゲットにしたモノクローナル抗体によるヒトSLEに対する臨床成績が報告されている³³⁾³⁴⁾。今後、このような生物製剤を用いた場合の各リンパ球におけるテロメラゼ活性の動向は興味深い。また、SLEに対する生物製剤を用いた治療戦略を組み立てる際に、各リンパ球におけるテロメラゼ活性の測定は、適切なターゲットの設定および治療薬選択の際に有用となるであろう。

V. 結 語

SLEの病態形成にはB細胞の活性化が必須であり、さらにT細胞もその病因に深く関わっていることが考えられた。この病態把握には、リンパ球のテロメラゼ活性の測定が有用であると考えられた。

稿を終えるに臨み、ご校閲を賜った東京慈恵会医科大学内科学講座糖尿病・代謝・内分泌内科 田嶋尚子教授に深く感謝いたします。また、ご教授を賜りました同内科学講座リウマチ・膠原病内科 山田昭夫教授、DNA医学研究所分子免疫学研究部 斎藤三郎助教授に深く感謝いたします。さらに、本研究において、ご指導ご協力を頂きました下記の諸先生方に感謝致します。DNA医学研究所分子免疫学研究部 大野裕治講師、池島宏子助手、総合医科学研究センター臨床研究開発室 松島雅人助教授、内科学講座リウマチ・膠原病内科 吉田健助手、金月勇助手、横山徹助手、国立相模原病院リウマチ科 小澤義典先生。最後に終始ご指導を下さった内科学講座リウマチ・膠原病内科 黒坂大太郎講師に感謝します。

文 献

- 1) Day JP, Marder BA, Morgan WF. Telomeres and their possible role in chromosome stabilization. *Environ Mol Mutagen* 1993; 22: 245-

- 9.
- 2) Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-60.
- 3) Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Azham M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, et al. Telomere shortening is associated with cell division *in vitro* and *in vivo*. *Exp Cell Res* 1995; 220: 194-200.
- 4) Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992; 225: 951-60.
- 5) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5.
- 6) Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11: 1921-9.
- 7) Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995; 155: 3711-5.
- 8) Igarashi H, Sakaguchi N. Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood* 1997; 89: 1299-307.
- 9) Buchkovich KJ. Telomeres, telomerase, and the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 1996; 2: 187-95.
- 10) Buchkovich KJ, Greider CW. Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 1443-54.
- 11) Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MA. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 1997; 90: 182-93.
- 12) Wu K, Higashi N, Hansen ER, Lund M, Bang K, Thestrup-Pedersen K. Telomerase activity is increased and telomere length shortened in T cells from blood of patients with atopic dermatitis and psoriasis. *J Immunol* 2000;

- 165 : 4742-7.
- 13) Yamanishi Y, Hiyama K, Maeda H, Ishioka S, Murakami T, Hiyama E, et al. Telomerase activity in rheumatoid synovium correlates with the mononuclear cell infiltration level and disease aggressiveness of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998 ; 25 : 214-20.
 - 14) Katayama Y, Kohriyama K. Telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells of systemic connective tissue diseases. *J Rheumatol* 2001 ; 28 : 288-91.
 - 15) Honda M, Mengesha E, Albano S, Nichols WS, Wallace DJ, Metzger A, et al. Telomere shortening and decreased replicative potential, contrasted by continued proliferation of telomerase-positive CD8+CD28(lo) T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2001 ; 99 : 211-21.
 - 16) Kurosaka D, Ozawa Y, Yasuda J, Yamada A, Akiyama M, Saito S, et al. Telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with SLE. *Ann Rheum Dis* 2001 ; 60 : 1158-9.
 - 17) Kurosaka D, Yasuda J, Yoshida K, Yokoyama T, Ozawa Y, Obayashi Y, et al. Telomerase activity and telomere length of peripheral blood mononuclear cells in SLE patients. *Lupus* 2003 ; 12 : 591-9.
 - 18) Barr SG, Zonana-Nacach A, Magder LS, Petri M. Patterns of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999 ; 42 : 2682-8.
 - 19) Klinman DM, Steinberg AD. Systemic autoimmune disease arises from polyclonal B cell activation. *J Exp Med* 1987 ; 165 : 1755-60.
 - 20) Klinman DM, Shirai A, Ishigatsubo Y, Conover J, Steinberg AD. Quantitation of IgM- and IgG-secreting B cells in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1991 ; 34 : 1404-10.
 - 21) Eisenberg RA, Cohen PL. Class II major histocompatibility antigens and the etiology of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1983 ; 29 : 1-6.
 - 22) Gmelig-Meyling F, Dawisha S, Steinberg AD. Assessment of in vivo frequency of mutated T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1992 ; 175 : 297-300.
 - 23) ter Borg EJ, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG. Changes in plasma levels of interleukin-2 receptor in relation to disease exacerbations and levels of anti-dsDNA and complement in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1990 ; 82 : 21-6.
 - 24) Spronk PE, ter Borg EJ, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CG. Changes in levels of soluble T-cell activation markers, sIL-2R, sCD4 and sCD8, in relation to disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus: a prospective study. *Ann Rheum Dis* 1994 ; 53 : 235-9.
 - 25) Koshy M, Berger D, Crow MK. Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J Clin Invest* 1996 ; 98 : 826-37.
 - 26) Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest* 1996 ; 97 : 2063-73.
 - 27) Linker-Israeli M, Hyun S, Ozeri-Chen T, Wallace DJ, Banks K, Klinenberg JR. Elevated in vivo and in vitro secretion of CD8-alpha molecules in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1994 ; 152 : 3158-67.
 - 28) Wofsy D, Seaman WE. Reversal of advanced murine lupus in NZB/NZW F1 mice by treatment with monoclonal antibody to L3T4. *J Immunol* 1987 ; 138 : 3247-53.
 - 29) Mihara M, Ohsugi Y, Saito K, Miyai T, Togashi M, Ono S, et al. Immunologic abnormality in NZB/NZW F1 mice. Thymus-independent occurrence of B cell abnormality and requirement for T cells in the development of autoimmune disease, as evidenced by an analysis of the athymic nude individuals. *J Immunol* 1988 ; 141 : 85-90.
 - 30) Shoenfeld Y, Mozes E. Pathogenic idiotypes of autoantibodies in autoimmunity: lessons from new experimental models of SLE. *FASEB J* 1990 ; 4 : 2646-51.
 - 31) Molina JF, Citera G, Rosler D, Cuellar ML, Molina J, Felipe O, et al. Coexistence of human immunodeficiency virus infection and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1995 ; 22 : 347-50.
 - 32) Looney RJ, Anolik J, Sanz I. B lymphocytes in systemic lupus erythematosus: lessons from

- therapy targeting B cells. *Lupus* 2004; 13: 381-90.
- 33) Grammer AC, Slota R, Fischer R, Gur H, Girschick H, Yarboro C, et al. Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. *J Clin Invest* 2003; 112: 1506-20.
- 34) Boumpas DT, Furie R, Manzi S, Illei GG, Wallace DJ, Balow JE, et al. A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 719-27.