

全身性エリテマトーデスにおける末梢血 CD4 陽性細胞 および CD8 陽性細胞のテロメラーゼ活性の上昇

小 澤 義 典

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 21 年 12 月 15 日)

ELEVATED TELOMERASE ACTIVITY IN PERIPHERAL BLOOD CD4- AND CD8-POSITIVE CELLS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Yoshinori OZAWA

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

Various abnormalities of peripheral blood T-cells have been reported in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). We have also previously reported abnormal telomerase activity in CD3-positive cells in patients with SLE and have become interested in the T-cell fraction in which this abnormality occurs. In this study, we separated CD4- and CD8-positive fractions from the T-cell fraction and measured telomerase activity in each fraction involving 14 patients with SLE and 14 age- and sex-matched healthy control subjects. The CD4- and CD8-positive cells were separated with a magnetic beads cell-sorting system, and the telomerase activity level was measured with the telomeric repeat amplification protocol assay. Telomerase activity level was significantly higher in peripheral blood CD4- and CD8-positive cells from patients with SLE than in those from control subjects. Telomerase activity in these cells was correlated with the SLE disease activity index (SLEDAI), a finding that suggests that the telomerase activity level in peripheral blood CD4- and CD8-positive cells in patients with SLE serves as an index of the disease activity.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2010;125:115-20)

Key words: telomelase, systemic lupus erythematosus, CD4, CD8

I. 緒 言

テロメアは、染色体の安定化に必須な DNA 蛋白質構造体である¹⁾。テロメア DNA は染色体末端にあり、通常の DNA 合成酵素では複製されず、そのままでは細胞分裂ごとに短縮する¹⁾²⁾。テロメラーゼはテロメア配列を染色体末端に付加する逆転写酵素で、テロメアの短縮に拮抗してテロメア構造の維持に機能している²⁾。癌細胞においてはテロメラーゼの活性化が起きている。このため、細胞分裂が起きてもテロメア長が保たれ、無限分裂が可能になっている³⁾。

一方、癌細胞以外の細胞においてもテロメラーゼの活性化が起きている。リンパ球においては、

何らかの刺激により活性化が起き細胞分裂が盛んとなった時テロメラーゼ活性が上昇する⁴⁾⁻¹²⁾。このようなことから自己免疫疾患におけるリンパ球のテロメラーゼ活性を検討した報告がいくつかなされている¹³⁾⁻¹⁵⁾。

我々は、以前 Systemic lupus erythematosus (SLE) 患者を SLEDAI により活動期と非活動期に分け、それぞれの末梢血 CD3 陽性細胞および CD19 陽性細胞のテロメラーゼ活性を報告した¹⁶⁾。結果は、CD19 陽性細胞のテロメラーゼ活性は活動期においてのみ正常者と比べて上昇していた。また、それは SLEDAI と強く相関していた。一方、CD3 陽性細胞のテロメラーゼ活性は、活動期、非活動期どちらも正常者と比べて上昇していた。しかし、

その活性の程度は活動期のCD19陽性細胞のテロメラーゼ活性と比べて低く、またSLEDAIとは関連していなかった。このことから、B細胞の場合、非活動期には異常な細胞分裂は起きていないが、活動期に入ると細胞分裂が盛んに起きると考えられた。一方、T細胞の場合は、活動期、非活動期に関わらず、持続的に細胞分裂が盛んに起きていると考えられた。そして次に、このT細胞のテロメラーゼ活性の異常がT細胞のどの分画に起きているのか興味が持たれた。そこで、今回我々は、T細胞をCD4陽性分画とCD8陽性分画に分け、それぞれのテロメラーゼ活性を測定した。

II. 対象と方法

1. 対象

本研究内容は症例研究に先だち、東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を得た。インフォームドコンセントを得て、SLE患者および健常コントロール者から末梢血を20ml採血した。SLE患者は、すべてアメリカリウマチ協会のSLE分類基準を満たしていた。今回、末梢血CD4陽性細胞、CD8陽性細胞のテロメラーゼ活性の検討はSLE患者14例で行った。テロメラーゼ活性を測定したSLE患者14例の内訳は、すべて女性で、その年齢の分布は25歳から50歳 (mean age 35.50 ± 8.97 yrs) であった。健常コントロール者14例の内訳は、すべて女性例で、その年齢の分布は23歳から56歳 (mean age 34.8 ± 9.75 yrs) であった。

2. CD4陽性細胞およびCD8陽性細胞の分離精製

ヘパリン採血より得た末梢血よりフィコール比重遠心法により単核球分画を分離した。つぎにMACS磁気細胞分離システム (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) によりCD4陽性細胞とCD8陽性細胞に分離精製した。最後に分離されたCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞の精製率をフローサイトメーターFACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) により確認した。両者ともに精製率は95%以上であった。さらに分離したCD4陽性、CD8陽性細胞分画中のB細胞 (CD19陽性細胞) のcontaminationを検討するため、分離精製した細胞を抗CD19抗体を用いてFACSにより解析した。CD19陽性細胞は0.5%以下であった。

3. テロメラーゼ活性の測定

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て測定を行った。各サンプル細胞 1.0×10^5 個を1xCHAP lysis buffer $100 \mu\text{l}$ に懸濁して融解ホモジナイズし、氷上にて30分間インキュベートした。これを遠心機により15,000rpm, 4°C で20分間遠心し、その上清 $10 \mu\text{l}$ に10xTRAP反応液 $0.5 \mu\text{l}$, 50x dNTP混合物 $0.5 \mu\text{l}$, TSプライマー $0.5 \mu\text{l}$, プライマー混合物 $0.5 \mu\text{l}$, distilled water $10.8 \mu\text{l}$, Taqポリメラーゼ $0.2 \mu\text{l}$ を加

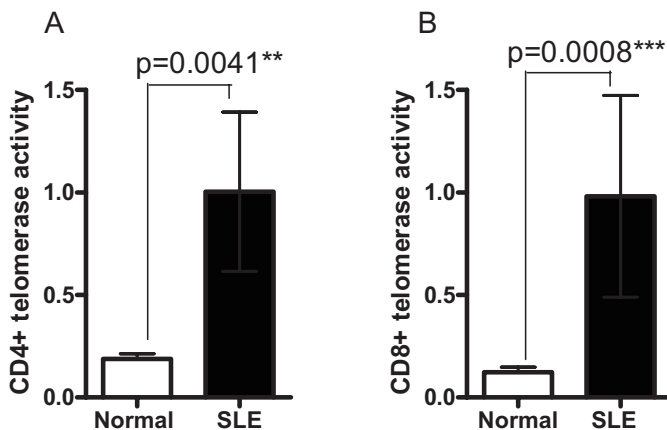


Fig. 1. Comparison of peripheral T-cell telomerase activity levels between SLE patients and normal subjects. 1A, Comparison of telomerase activity levels in CD4+ cells. 1B, Comparison of telomerase activity levels in CD8+ cells.

え、30℃で10分間インキュベートした後、PCR反応を行った。サーマルサイクラー GeneAmp9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA) の設定は94℃ 30秒, 60℃ 30秒の2ステップで、30サイクル行った。得られたPCR産生物を、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, 日本) でゲルを撮影した。得られた画像はNIH image画像解析ソフト (National Institute of Health, Bethesda, MD) にて解析した。今回の解析では、50bp以上のラダーをすべてTRAP産生物とし、このTRAP産生物ラダーの総和を内部コントロール用バンドで割ったものをテロメラーゼ活性値とした。各々の検体の測定

においてはトリプルケートで行ないその平均値をデータとして扱った。

4. 結果の解析

SLE群および正常者群間におけるテロメラーゼ活性は、Mann-Whitney U検定を行った。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

今回解析した症例の末梢血CD4陽性およびCD8陽性細胞のテロメラーゼ活性値および臨床検査値をTable 1に示した。まず、末梢血CD4陽性細胞のテロメラーゼ活性値をSLE群、正常者群2群

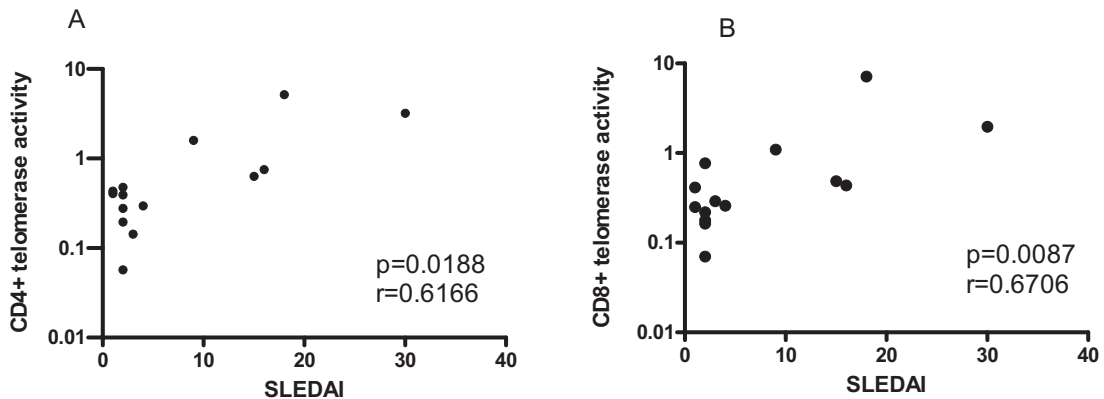


Fig. 2. Correlation between the level of telomerase activity in peripheral T cells and the SLEDAI. The vertical axis is plotted on a logarithmic scale. 2A, Correlation between the level of telomerase activity in CD4+ cells and the SLEDAI. 2B, Correlation between the level of telomerase activity in CD8+ cells and the SLEDAI.

Table 1. Lymphocyte CD4 and CD8 telomerase activity and clinical data in SLE patients.

Case	Sex	Age	Telomerase activity		WBC / μ L	Lymph / μ L	Hb g/dL	Plt $\times 10^3 / \mu$ L	CRP mg/dL	C3 mg/dL	C4 mg/dL	CH50 U/mL	IgG mg/dL	IgA mg/dL	IgM mg/dL	ANA	dsDNA U/mL	u-prot mg/dL	SLEDAI
			CD4+cell	CD8+cell															
P1	F	49	0.433	0.250	4,300	1,200	13.7	4.6	0.04	71	10	39.5	927	216	51	19	5	0	1
P2	F	30	0.278	0.178	6,000	1,400	12.3	23.4	0.04	87	19	43.9	2,578	336	38	ND	21	0	2
P3	F	28	0.143	0.291	3,200	500	13.0	12.7	0.05	63	12	52.3	1,999	453	70	79	31	ND	3
P4	F	29	0.296	0.259	4,600	600	13.5	19.1	0.08	54	6	23.4	2,079	342	243	+	25	ND	4
P5	F	37	0.750	0.436	4,100	700	11.0	11.7	1.57	49	4	19.8	ND	ND	73	89	9	3,748	16
P6	F	43	0.477	0.164	5,200	1,300	10.7	27.2	0.08	57	7	23.9	1,357	359	73	160×	38	0	2
P7	F	30	0.196	0.219	7,100	1,100	14.5	19.8	0.02	77	14	35.4	1,610	290	75	0	15	0	2
P8	F	44	0.392	0.769	7,000	900	11.5	24.0	0.63	81	6	27.0	2,196	355	55	+	40	0	2
P9	F	27	0.631	0.486	2,700	800	10.3	8.4	1.32	35	2	6.6	2,329	241	86	1280×	900	352	15
P10	F	25	5.174	7.138	3,200	1,300	11.6	7.6	0.45	24	2	7.4	2,544	367	108	92	103	1,140	18
P11	F	50	1.598	1.093	3,800	900	8.2	10.8	6.3	34	7	11.4	1,601	459	47	82	228	394	9
P12	F	26	0.057	0.070	8,200	800	13.1	20.3	0.22	63	18	35.0	ND	ND	ND	ND	45	126	2
P13	F	34	0.406	0.413	10,900	2,000	13.8	8.1	0.8	72	9	30.4	1,688	104	77	80	17	195	1
P14	F	45	3.214	1.972	1,300	600	10.4	6.5	0.04	33	1	4.5	2,071	235	116	96	1,320	289	30

WBC:white blood cell counts, Lymph:lymphocyte cell counts, Hb:hemoglobin, Plt:thrombocyte cell counts, CRP:C-reactive protein, C3:complement 3, C4:complement 4, CH50:complement titer, IgG:immunoglobulin G, IgA:immunoglobulin A, IgM:immunoglobulin M, dsDNA:anti-double-strand DNA antibody, u-prot:proteinuria, SLEDAI:SLE disease activity index, ND:Not done.

間で比較した (Fig. 1A). 2群間の比較を, Mann-WhitneyのU検定を用いて行った. SLE群と正常者群間において統計学的に有意差が認められた ($P=0.0041$). 次に末梢血CD8陽性細胞のテロメラーゼ活性値を同様に比較した (Fig. 1B). その結果, 2群間において統計学的に有意差が認められた ($P=0.0008$).

末梢血CD4陽性細胞およびCD8陽性細胞のテロメラーゼ活性値とSLEDAIおよび各種臨床検査項目の関係をSpearmanの順位相関を用いて解析した (Fig. 2, Table 2). 末梢血CD4陽性細胞のテロメラーゼ活性値とSLEDAIには正の相関関係が認められた ($p=0.0188$, $r=0.6166$) (Fig. 2A). 各検査項目のうち, CD4陽性細胞のテロメラーゼ活性値と正の相関が認められたものは尿蛋白であった. 負の相関が認められたものは白血球数, Hb値, 血小板数, C3値, C4値, CH50値であった (Table 2). 末梢血CD8陽性細胞のテロメラーゼ活性値とSLEDAIも正の相関関係が認められた ($p=0.0087$, $r=0.6706$) (Fig. 2B). CD8陽性細胞のテロメラーゼ活性値と正の相関関係が認められたものは尿蛋白であった. CD8陽性細胞のテロ

メラーゼ活性値と負の相関関係にあったものは白血球数, 血小板数, C3値, C4値, CH50値であった (Table 2).

最後に, CD4陽性細胞のテロメラーゼ活性値とCD8陽性細胞のテロメラーゼ活性値の関係をSpearmanの順位相関を用いて解析した. 両者間には統計学的に相関関係が認められた ($P=0.0022$, $r=0.7451$) (Fig. 3).

IV. 考 察

Klapperらは, SLE患者の末梢血CD4陽性細胞, CD8陽性細胞のテロメラーゼ活性を, 我々と同様に検討し報告している¹⁷⁾. 彼らは, SLE患者末梢血CD4陽性細胞, CD8陽性細胞とも正常者と比べて上昇している傾向が認められたが統計学的には有意差が認められなかったと報告している. 一方, 今回我々が示したデータにおいては, CD4陽性細胞, CD8陽性細胞両者とも統計学的な有意差が認められた. 彼らの解析した症例は, 9例と我々より少なかった. また, テロメラーゼ活性値の出し方も我々の方法と異なっている. 彼らは, Hela細胞由来のテロメラーゼ活性値と比較した

Table 2. Correlations of peripheral CD4+ or CD8+ cell telomerase activity with various clinical data

	CD4 p-value	Spearman r	CD8 p-value	Spearman r
WBC	0.0164*	-0.6271	0.0169*	-0.6249
Lymph	0.7583	0.0905	0.5156	-0.1898
Hb	0.0121*	-0.6484	0.0612	-0.5121
plt	0.0320*	-0.5736	0.0336*	-0.5692
CRP	0.1419	0.4133	0.1	0.5215
C3	0.0019**	-0.7525	0.0219*	-0.6051
C4	0.0005***	-0.8049	0.0009***	0.7850
CH50	0.0003***	-0.8198	0.0056**	-0.6967
IgG	0.9656	0.0140	0.3079	0.3217
IgA	0.9828	0.0070	0.6331	0.1538
IgM	0.3541	0.2937	0.2756	0.3427
dsDNA	0.164	0.3934	0.0666	0.5033
u-pro	0.0076**	0.7251	0.0303*	0.6236
SLEDAI	0.0188*	0.6166	0.0087**	0.6706

WBC:white blood cell counts, Lymph:lymphocyte cell counts, Hb:hemoglobin, Plt:thrombocyte cell counts, CRP:C-reactive protein, C3:complement 3, C4:complement 4, CH50:complement titer, IgG:immunoglobulin G, IgA:immunoglobulin A, IgM:immunoglobulin M, dsDNA:anti-double-strand DNA antibody, u-pro:proteinuria, SLEDAI:SLE disease activity index, Coefficient of correlation(p-value):Spearman's correlation Coefficient by rank: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

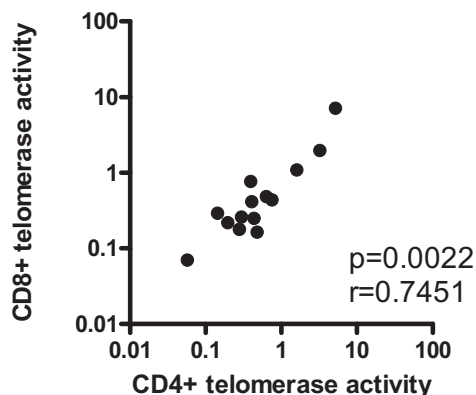


Fig. 3. Correlation between telomerase activity levels in peripheral CD4+ and CD8+ cells. The vertical axis is plotted on a logarithmic scale. The horizontal axis is plotted on a logarithmic scale.

相対値をテロメラーゼ活性値としていた。今回我々が統計学的に有意差を得ることができた理由として症例数の増加や測定方法の違いが考えられた。

我々は、以前、SLE患者において、末梢血CD3陽性細胞のテロメラーゼ活性値は正常者に比べて上昇しているが、活動期と非活動期間には統計学的には有意差が無く、SLEDAIとも相関しないと報告した¹⁶⁾。一方今回、T細胞をCD4、CD8分画に分けテロメラーゼ活性値を測定したところ、疾患の活動性に伴いテロメラーゼ活性が上昇していた。個々の症例について観察をしてみると、テロメラーゼ活性値が高い例としてTable 1のP10、P14が注目された。この両者はSLEDAIも高く疾患活動性が高い例であった。一方、症例P5、P9においては、SLEDAIは高かったがテロメラーゼ活性値はそれほど高くはなかった。このように個々の症例間において、ばらつきもあったが、全体でみると統計学的に有意差が認められた。そこでもう一度以前の報告¹⁶⁾を見直してみると、統計学的には有意差は得られなかったが、CD3陽性細胞のテロメラーゼ活性値は、活動期において非活動期と比べて高い傾向であった。しかし、SLE患者におけるT細胞のテロメラーゼ活性値は、どの時期においても、同様の測定方法で以前に報告した活動期のB細胞のテロメラーゼ活性値と比べて低いことは前回の報告¹⁶⁾と変わりなかった。

SLE患者の病態におけるT細胞については、CD4陽性細胞におけるFoxp3発現¹⁸⁾、perforinとgranzyme B発現CD8陽性細胞増加¹⁹⁾、CD8陽性細胞における膜TNF- α の増加²⁰⁾などが報告されている。今回のデータもこれらの報告を裏付けているものと考えられた。また、今回T細胞をCD4陽性細胞とCD8陽性細胞に分け解析したので、両者が異なる動向をするかは興味が持たれた。しかし両者のテロメラーゼ活性値は相関しており、今のところ両者が異なる動向を示しているとは考えにくかった。一方、非活動期におけるCD4陽性細胞とCD8陽性細胞の動向については今後さらなる検討を要すると考えられた。以前我々は、CD3陽性細胞は非活動期においても上昇していると報告した¹⁶⁾。今回の解析においても、正常者

と比べてCD4およびCD8陽性細胞は非活動期においても上昇している傾向が認められた。しかし、非常に活性の低いレベルでのテロメラーゼ活性値の比較であるので、最終的な結論は今後さらに症例数を増やして検討すべきであると考えられた。

今回我々はCD4、CD8分画について検討をしたが、更に他の免疫学的マーカーについても検討を行うとSLEの病態をより詳しく解析できるかもしれない。しかし、今回用いたテロメラーゼ活性測定法は、少なくとも 1×10^5 のリンパ球が必要であった。今後、他の免疫学的マーカーのリンパ球のテロメラーゼ活性を検討するには、少ないリンパ球数でテロメラーゼ活性が測定可能となる測定法の開発が必要と考えられた。また、テロメラーゼ上昇そのものが直接病態に関与しているかどうかの検討も今後の課題である。リンパ球のテロメラーゼ活性は、clonal expansion時に上昇することが知られている。リンパ球のテロメラーゼの活性の上昇は、リンパ球の分裂がさかんに起きている、つまりリンパ球の活性化の指標となる。しかし今までに、リンパ球においてテロメラーゼ活性の上昇が直接リンパ球機能に関与しているという明確な報告はない。今後この点についても検討する必要がある。

V. 結 語

SLE患者末梢血のCD4陽性細胞、CD8陽性細胞のテロメラーゼ活性値はSLE患者の疾患活動性の指標となると考えられた。

稿を終えるに臨みご教授を賜りました東京慈恵会医科大学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 齋藤三郎准教授に深く感謝いたします。さらに、本研究において、ご指導ご協力頂きました下記の諸先生方に感謝いたします。内科学講座リウマチ・膠原病内科、金月勇講師、吉田健講師、柳町麻衣美医師。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 黒坂大太郎准教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Zakian VA. Telomeres: beginning to understand the end. Science 1995;270:1601-7.
- 2) Counter CM. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. Mutat Res 1996;366:45-63.

- 3) Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-91.
- 4) 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.
- 5) Igarashi H, Sakaguchi N. Telomerase activity is induced by the stimulation to antigen receptor in human peripheral lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:649-55.
- 6) Weng N, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Regulation of telomerase RNA template expression in human T lymphocyte development and activation. *J Immunol* 1997;158:3215-20.
- 7) Buchkovich KJ, Greider CW. Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells. *Mol Biol Cell* 1996;7:1443-54.
- 8) Bodnar AG, Kim NW, Effros RB, Chiu CP. Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp Cell Res* 1996;228:58-64.
- 9) Yamada O, Motoji T, Mizoguchi H. Up-regulation of telomerase activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1996;1314:260-6.
- 10) Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *J Exp Med* 1996;183:2471-9.
- 11) Igarashi H, Sakaguchi N. Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood* 1997;89:1299-307.
- 12) Hu BT, Lee SC, Marin E, Ryan DH, Insel RA. Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells *in vivo* and can be re-expressed in memory B cells activated *in vitro*. *J Immunol* 1997;159:1068-71.
- 13) Katayama Y, Kohriyama K. Telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells of systemic connective tissue diseases. *J Rheumatol* 2001;28:288-91.
- 14) Yudoh K, Matsuno H, Nezuka T, Kimura T. Different mechanisms of synovial hyperplasia in rheumatoid arthritis and pigmented villonodular synovitis: the role of telomerase activity in synovial proliferation. *Arthritis Rheum* 1999;42:669-77.
- 15) Honda M, Mengesha E, Albano S, Nicols 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, Yasuda J, Yoshida K, Yoneda A, Yasuda C, Kingetsu I et al. Abnormal telomerase activity and telomere length in T and B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2006;33:1102-7.
- 17) Klapper W, Moosig F, Sotnikova A, Qian W, Schröder JO, Parwaresch R. Telomerase activity in B and T lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1681-3.
- 18) Bonelli M, von Dalwigk K, Savitskaya A, Smolen JS, Scheinecker C. Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:664-71.
- 19) Blanco P, Pitard V, Viallard JF, Taupin JL, Pellegrin JL, Moreau JF. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005;52:201-11.
- 20) Horiuchi T, Morita C, Tsukamoto H, Mitoma H, Sawabe T, Harashima S, et al. Increased expression of membrane TNF-alpha on activated peripheral CD8+ T cells in systemic lupus erythematosus. *Int J Mol Med* 2006;17:875-9.