

## 全身性エリテマトーデスにおけるリンパ球減少と リンパ球活性酸素の関係

石井 俊徳

### Relationship between lymphocytopenia and reactive oxygen species of lymphocytes in systemic lupus erythematosus

Toshinori Ishii

#### Abstract:

Lymphocytopenia is an important laboratory finding in diagnosis and disease activity estimation of systemic lupus erythematosus. Here, I demonstrated that the amount of reactive oxygen species (ROS) produced by lymphocytes was negatively correlated with the number of lymphocytes in peripheral blood, and that the former was also positively correlated with both Fas positive rates and apoptosis rates of lymphocytes. These results suggest that ROS is necessary for the process of apoptosis which triggers lymphocytopenia in systemic lupus erythematosus.

**Key word** : SLE, ROS, Lymphocytopenia

#### はじめに

全身性エリテマトーデス (SLE) は自己免疫疾患のプロトタイプといわれる代表的な疾患であり、自己免疫機序による全身臓器の障害により多彩な症状を呈する<sup>1)</sup>。その臓器障害の機序としては、自己抗原と抗体から構成される免疫複合体により刺激された好中球や単球から遊離される活性酸素・水解酵素・サイトカインが、同じく免疫複合体により活性化された補体とともに血管内皮細胞を障害するいわゆるIII型アレルギーが主役を演じていると考えられている。またリンパ球減少や血小板減少には自己抗体によるII型アレルギーの関与も考えられる。このように臓器障害の主役をなす自己抗体の産生は、SLEにおいては自己反応B細胞のポリクローナルな活性化とT細胞の機能異常

によってもたらされる。

健常人であればこのような自己反応性リンパ球は成熟の過程で大部分が排除される (クローン除去) が、一部は生き残る。しかし残存した自己反応性リンパ球も自己抗原の長期間にわたる刺激の結果クローン除去される<sup>2)</sup>。これら自己反応性クローン除去の機構はFas抗原が関与するアポトーシスと考えられている<sup>2)</sup>。しかしSLEでは自己反応性リンパ球のFas抗原の発現低下により、自己反応性リンパ球のクローン除去が生じない可能性が指摘されている<sup>3),4)</sup>。他方Fas抗原の過剰発現<sup>5)</sup>や、抗アポトーシス作用をもつ proto-oncogeneとして知られる *bcl-2* の異常<sup>6)</sup>により自己反応性でないリンパ球はアポトーシスに陥り、これがリンパ球減少の一因である可能性も考えられる。

血球における活性酸素種 (ROS) の役割としては、好中球や単球などによる貪食した異物の殺菌が広く知られているが、種々の細胞内代謝へ関与している<sup>7),8),9)</sup>ことも指摘されており、アポトーシス<sup>10)</sup>もその一つである。本稿ではSLEのリンパ球減少へのROSの関与、さらにアポトーシスとROSとの関係について検討した。

## 検 体

SLE患者8名(すべて女性、年齢 $39.2 \pm 12.1$ 才)と健常人7名(すべて女性、年齢 $23.4 \pm 7.5$ 才)より静脈血をヘパリン加真空採血管に10ml、EDTA加真空採血管に2ml採血した。SLE症例は全て非活動性で、副腎皮質ステロイド剤の投与量は維持量(プレドニソロンで15mg/日未満)である。

## 方 法

### 1. 単核球分離

ヘパリン加採血した静脈血をリン酸緩衝食塩液(PBS, pH7.4, CosmoBio社)で2倍に希釈後、同量のLymphocyte Separation Medium (LSM, 比重1.077, Organon社)に重層し、室温で2,000rpm30分遠沈した。そして血漿とLSMの中間層の単核球分画を採取し、PBSで3回洗浄後PBSに再浮遊させ単核球分画とした。次にtrypan blueによるdye exclusion法で生細胞を計数し、 $2 \times 10^6$ /mlに濃度調整した。

### 2. 活性酸素測定

Bass等の方法<sup>11)</sup>を修正したFCM法で行った。すなわち単核球 $100 \mu\text{l}$ に5 (and 6)-carboxy $2'$ ,  $7'$ -dichlorofluorescein diacetate (cDCFH-DA,  $100 \mu\text{M}$ : Molecular Probe Inc., OR., USA)  $10 \mu\text{l}$ を加え $37^\circ\text{C}$ 30分反応させた。この間にcDCFH-DAは細胞内でエステラーゼの作用で脱アセチル化されcDCFHとなり、さらに産生されたスーパーオキシド由来の過酸化水素によりcDCFとなる。このcDCFの緑色蛍光の平均蛍光強度 (MFI) をF

CM (Cytoron: Ortho, Raritan, NJ, USA)で測定した。非特異的蛍光を除外するためにネガティブコントロールとして5 (and 6)-carboxychlorofluorescein diacetate (CFH-DA,  $100 \mu\text{M}$ : Molecular Probe Inc., OR., USA)もcDCFH-DAと同様の処理を行ってMFIを測定し、cDCFとの差を活性酸素(過酸化水素)の相対的な量とした。

### 3. Fas抗原測定

Phycoerythrin (PE) 標識抗ヒトFas (CD95) 抗体 (Pharminogen社)  $10 \mu\text{l}$ を単核球 $100 \mu\text{l}$ に加え、on iceで30分反応させた後、PBSで洗浄しPBS 1mlに再浮遊させた。次にFCMのサイトグラム上でリンパ球と単球を選別し、リンパ球のFas陽性率を測定した。

### 4. リンパ球細胞膜のジギトニン処理

細胞内抗原を抗体により検出するためには、抗体が細胞膜を通過する必要があるため、ジギトニン(和光純薬社)による細胞膜処理を行った。ジギトニンは細胞形態を変化させフローサイトメーター(FCM)によるリンパ球選別に支障をきたすので、まず0.25%paraformaldehyde (PFA, 和光純薬社) PBS溶液をリンパ球浮遊液に対して10倍量加え、on iceで2分固定処理した。PBSで3回洗浄後PBS 1mlに再浮遊させ、ジギトニン溶液( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  PBS)を等量加えon iceで20分間置き膜処理をした。

### 5. Bcl-2測定

濾胞性Bリンパ腫の染色体転座切断点の解析より同定されたproto-oncogeneである*bcl-2*遺伝子<sup>12)</sup>は、抗アポトーシス遺伝子としての働きを持っている。Bcl-2蛋白は殆どすべての正常リンパ球のミトコンドリア、小胞体や核膜に発現している<sup>13),14)</sup>。そこで蛍光標識抗Bcl-2抗体をBcl-2蛋白に結合させその蛍光の強さをBcl-2蛋白量とした。すなわち単核球のPFA固定、ジギトニン処理を行い、次にFITC標識抗Bcl-2抗体(DAKO社)をon iceで30分反応させ、FCMでBcl-2のMFIを測定した。リンパ球のBcl-2陽性率はSLE  $96.8 \pm 4.4$ 、健常人 $98.3 \pm 0.6$ であった。

6. アポトーシス測定 (Apo2.7抗原測定)

Apo2.7抗原はアポトーシスを起こした細胞のミトコンドリア膜に初期段階から発現する38kDの蛋白 (7A6抗原) である<sup>15)</sup>。したがってApo2.7抗原に対する抗体を用いた蛍光抗体法では、初期の段階から感度よく簡便にアポトーシスに陥った細胞を測定できる。そこでPFA固定とジギトニン処理した単核球とPE標識抗Apo2.7抗体 (Immunotech社) をon iceで30分反応させた後、FCMでApo2.7抗原の陽性率を測定した。

7. 静脈血リンパ球数の測定

静脈血のリンパ球数は、EDTA加採血した静脈血を用いて自動血球計数機 (Coulter Counter S-PLUSSTKR, コールター社) で測定した。

8. 統計処理

健常人とSLEとの間のデータの有意差検定はStudent t-testで行った。2つのデータの相関性はピアソンの相関係数を求め検定した。

結果

1. 静脈血リンパ球数とリンパ球活性酸素の関係 (図1)

静脈血リンパ球数 (平均値±SD/ $\mu$ l) を健常人とSLE患者で比較してみると、健常人は2,280±496であるのに対しSLEでは1,059±547となり、SLEが有意 ( $p<0.01$ ) に減少していた。他方ROSは健常人が140±14なのに対しSLEは165±21となり、SLEの方が有意 ( $p<0.05$ ) に高くなっていた。次に静脈血リンパ球数とROSの相関性を調べてみた。測定数が少ないため健常人とSLEを一緒にして相関係数を計算してみると、 $r=-0.66$  ( $p<0.01$ ) となり、ROSが高いほどリンパ球が減少しているという負の相関関係がみられた。

2. リンパ球のアポトーシス発現率と活性酸素の関係 (図2)

アポトーシスを起こしているリンパ球の比率は、健常人が2.1±0.4%、SLEが3.1±1.5%となり、SLEの方が高かったが有意差はなかった。しかしア

ポトーシスとROSの相関性を調べてみると、相関計数  $r=0.71$  ( $p<0.01$ ) の有意の正の相関を示した。

3. リンパ球のFas陽性率とROSの関係 (図3)

リンパ球のFas陽性率は、健常人31.0±7.0%、SLE 53.8±11.6%となり、SLEのFas陽性率の方が健常人よりも有意 ( $p<0.01$ ) に高かった。またFas陽性率とROSの相関性も相関計数  $r=0.52$  ( $p<0.05$ ) の有意の正の相関がみられた。

4. リンパ球のBcl-2蛋白量とROSの関係

リンパ球のBcl-2蛋白量は健常人では108.3±3.5、SLEでは114.4±5.6となりSLEの方が有意 ( $p<0.05$ ) に多かった。しかしBcl-2蛋白量とROSとの間には有意の相関はみられなかった。

考察

SLEの末梢血リンパ球数とリンパ球ROSとの関係を調べてみると、両者間には有意の負の相関関係がみられた。この結果はROSがリンパ球減少と相関関係にあることを間接的に示している。以前SLEのリンパ球減少とアポトーシスとの関係

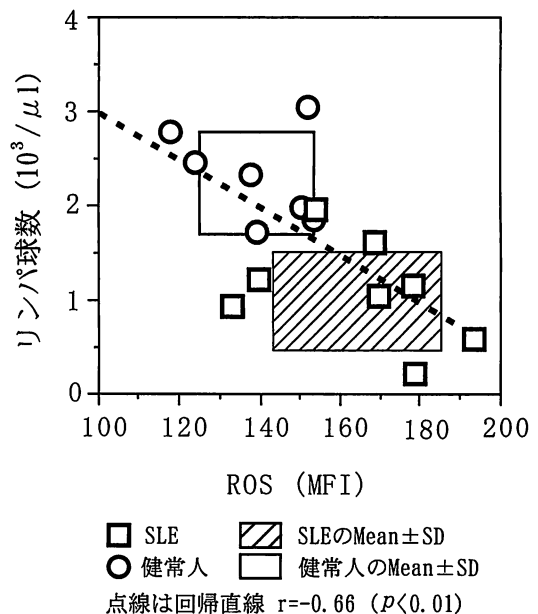


図1 静脈血リンパ球数とリンパ球ROSの関係

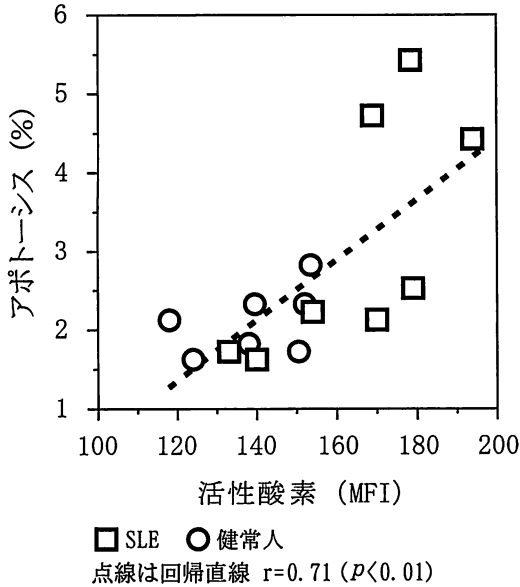


図2 リンパ球のアポトーシスと活性酸素の関係

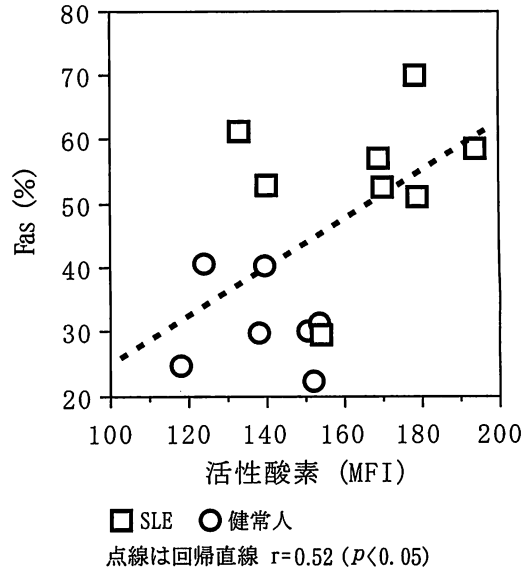


図3 リンパ球Fas陽性率と活性酸素の関係

を研究した結果<sup>16)</sup>では、リンパ球の減少にはFasやBcl-2などアポトーシスの発現に関係する物質との関連がみられた。そこでROSとFas陽性率、Bcl-2蛋白量、アポトーシス発現率との関係も検討してみると、ROSとFas陽性率およびアポトーシス発現率間に相関があるという結果をえた。しかしBcl-2蛋白量との間に相関はみられなかった。このことはROSがアポトーシスの誘導から実行に至る経路のどこかに関与しているが、アポトーシスの抑制機構には関与していないことを示唆している。

次にROSがアポトーシスの誘導にどのように関わっているのかを考えてみた。細胞外のROSに暴露されてアポトーシスを生じる代表例として、白血球の産生するROSによる血管内皮細胞の障害が上げられる。この場合ROSは癌関連遺伝子p53の発現を誘発し、細胞内Ca<sup>2+</sup>を上昇させ、カスパーゼを活性化しアポトーシスを引き起こす<sup>17)</sup>とされている。本研究では細胞内のROSを測定しているが、測定しているROSが細胞内で発生したものではなく、細胞外から細胞内にもたらされた可能性について考えてみた。ここで実際に測定しているROSは過酸化水素であるが、過酸化

水素の前駆物質であるスーパーオキシドは細胞膜を殆ど透過できない<sup>18)</sup>ことからスーパーオキシドの形で細胞内に入る可能性はない。しかし過酸化水素は水溶液中の寿命が非常に長く<sup>19)</sup>、細胞膜を容易に透過できることから、細胞外由来の過酸化水素を測定している可能性がある。もしそうであるとすれば、本研究では単核球を使っているので単核球由来の過酸化水素がリンパ球内に侵入してきたのを測定していることになる。しかし単核球分画中のリンパ球と単核球を除去したリンパ球のみの分画のROSを測定し比較した結果、両者に差がみられなかった(未発表データ)ことから、単核球の産生したROSがリンパ球内のROS測定に影響を及ぼしたとは考えにくく、ここではやはりリンパ球の細胞内で発生したROSを測定していると考えられる。

次にROSのリンパ球内での産生機構とアポトーシス経路への関与について考察する。リンパ球のROSの産生機構についてはB細胞のように膜NADPH oxidase系をもつサブセットもあるが、リンパ球全体に共通しているのはミトコンドリア・マイクロゾーム電子伝達系である。岡田等のグループ<sup>19)</sup>はミトコンドリア仲介性アポトーシスにおけ

るROSの役割について次のように述べている。アポトーシス誘導刺激を受けた細胞ではミトコンドリアでROSの産生が高まり、ROSは容積感受性外向き整流性(VSOR)アニオンチャンネルを活性化しKClの細胞外への流出を生じさせる。その結果アポトーシスの初期に観察される細胞縮小化が生じる。次にミトコンドリアを介したカスパーゼ9の活性が生じ、カスパーゼ3の活性化と細胞内KClの減少によりDNAが断片化する。岡田等はHeLa細胞を用いているが、リンパ球においてもROSはアポトーシスに同様の役割を演じているものと推測される。

SLEではFas依存性アポトーシスによりリンパ球減少が生じると考えられている<sup>20)</sup>が、本研究でROSとFas陽性率に相関性があるという結果は、Fas依存性アポトーシスの経路にミトコンドリア仲介性アポトーシスが組み込まれていることを示唆している。さらにROSとアポトーシスに相関があるのでミトコンドリア仲介性アポトーシスが主要な経路であると考えられる。しかしミトコンドリア依存性カスパーゼ活性を抑制するBcl-2とROSに相関性がみられないことは、IAPファミリー蛋白によるカスパーゼ3活性の抑制がリンパ球の生存に重要である可能性を示唆している。

SLE発症の一因となる自己反応性リンパ球はFas抗原の発現異常によりアポトーシスに陥りにくい<sup>3),4)</sup>といわれているが、本研究で測定したSLEリンパ球のFas陽性率は健常人よりも高くなっていた。その原因としては次の二つが考えられる。第一には自己反応性リンパ球の割合が非常に低いことである。SLE単核球中に存在する自発的免疫グロブリン分泌細胞数を調べた研究<sup>21),22)</sup>によると、活動性SLEでは10個の単核球当たり $3,984 \pm 960$ と健常人( $382 \pm 89$ )の10倍存在していると報告されている。この自発的免疫グロブリン分泌細胞には活性化された自己反応性B細胞が多数含まれていると推測される。単核球の90%がリンパ球で自己反応性Tリンパ球が自己反応性Bリンパ球の9倍存在していると推定(静脈血リンパ球サブセツ

トの比率を基に)して計算すると、最大限に見積もってリンパ球の約5.5%が自己反応性リンパ球ということになる。残りの非自己反応性リンパ球は炎症性サイトカインの作用でFas抗原発現が亢進しているために、リンパ球全体としてFas抗原陽性率が高くなるという考えである。第二の原因は、Fas抗原の発現が機能的には低下しているが、抗体が認識する抗原としては発現が低下していないというものである。しかしSLEの動物モデルであるMRL/lprマウス<sup>23)</sup>と異なり、ヒトSLEでは本研究と同様にFas抗原の発現が亢進しているという報告が多い<sup>20),24)</sup>。またFas抗原の機能も健常人リンパ球<sup>3)</sup>と同様に異常なしという報告<sup>20)</sup>があるが、非常に数が少ない自己反応性リンパ球を正確に測定できているかという疑問がある。しかしヒトSLEでは、自己反応性リンパ球のアポトーシス耐性がBcl-2等のアポトーシス抑制機構側の問題である可能性は否定できない。

リンパ球の減少は診断分類基準<sup>25)</sup>にもあるようにSLEの重要な検査所見の一つであり、減少の程度は活動期ほどではないが非活動期でも高頻度に見られる。リンパ球減少は抗リンパ球自己抗体(ALA)による<sup>26)</sup>と考えられており、その具体的な機序についてはALAによる直接的な障害やALAのオプソニン効果による網内系貪食などが推測されている。治療薬特に副腎皮質ステロイド剤によるリンパ球減少については、副腎皮質ステロイド剤の大量投与SLEと少量投与SLEでリンパ球数に差がない<sup>27)</sup>という報告があり、その可能性は少ないと思われる。ALAがアポトーシスを誘導することを裏付ける報告はないが、再生不良性貧血患者に抗胸腺グロブリンを投与し、T細胞にFasおよびTNF- $\alpha$ が関与したアポトーシスが誘導されたという報告<sup>28)</sup>や、膵臓移植患者に胸腺グロブリンを投与したところ、移植臓器リンパ球のBcl-2、iNOs、CD95Lの発現減少とアポトーシスの誘導がみられたという報告<sup>29)</sup>は、ALAがリンパ球にアポトーシスを誘導する可能性を強く示唆している。

アポトーシスを誘導するその他の因子として炎症性サイトカインがある。なかでもTNF- $\alpha$ はSLEの血漿中で増加しており<sup>30)</sup>、リンパ球ROSを高め<sup>31)</sup>、アポトーシスを誘導する<sup>32)</sup>。したがってAL AのみならずTNF- $\alpha$ などのサイトカインの高値もリンパ球減少の要因と考えることが出来る。リンパ球のアポトーシスの誘因が何であれ、ROSはアポトーシス経路の重要なメッセンジャーであると考えられ、リンパ球減少とROSが密接な関係にあるという本研究はそれを裏付けている。

## おわりに

SLEにおけるリンパ球減少は、全てのサブセットが同じ割合で減少しているのではなく、CD4<sup>+</sup>T細胞なかでもCD4<sup>+</sup>2H4<sup>+</sup>T細胞の減少が著しい<sup>36)</sup>とされている。今回の測定はリンパ球全体を対象としたが、今後リンパ球サブセットレベルでリンパ球減少とROSとの関係を検討する必要がある。

## 要 旨

SLEにおいてリンパ球減少は診断および活動性評価の重要な所見である。リンパ球ROSとリンパ球減少との関係を調べてみた結果、有意の負の相関がみられた。またROSはFas陽性率やアポトーシス発現率と正の相関がみられた。この結果はROSがリンパ球減少を引き起こすアポトーシス経路に密接に関わっていることを示唆している。

## 文 献

- 1) Lahita, R.G. : Systemic lupus erythematosus, p369-387. Churchill Livingstone, New york, 1992.
- 2) 米原伸 : アポトーシスとFas抗原, 炎症と免疫 3 : 6-13, 1994.
- 3) Miyawaki, T., et al.: Differential expression of apoptosis related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. J.Immunol. 149 : 3753-3758, 1992.
- 4) Russell, J. H. et al. : Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 4409-4413, 1993.
- 5) Amasaki, Y., et al. : Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) : a possible mechanism for lymphopenia. Clin. exp. Immunol. 99 : 245-250, 1995.
- 6) Itoh, N., et al. : Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. J.Immunol. 151 : 621-627, 1993.
- 7) Schreck, R., et al.: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. EMBO J. 10 : 2247-2258, 1991.
- 8) Goldstone, S.D., et al.: Redox regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway during lymphocyte activation. Biochim. Biophys. Acta 1355 : 353-360, 1997.
- 9) Nakamura, K., et al.: Redox regulation of a src family protein tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> in T cells. Oncogene 8 : 3133-3139, 1993.
- 10) Shimizu, T., et al.: A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel. PNAS 101 : 6770-6773, 2004.
- 11) Bass, D.A., et al. : Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils. J.Immunol. 130 : 1910-1917, 1983.
- 12) Tsujimoto, Y., et al. : Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science 228:1440-1443, 1985.
- 13) Hockenberry, D., et al. : Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 348 : 334-336, 1990.
- 14) Monaghan, P., et al.: Ultrastructural localization of bcl-2 protein. J.Histochem. Cytochem. 40 : 1819-1825, 1992.
- 15) Zhang, C., et al.: A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. J.Immunol. 157 : 3980-3987, 1996.
- 16) 石井俊徳 : SLEにおけるリンパ球減少とアポトーシス. 熊本大学医療技術短期大学部紀要第11号 : 73-81, 2001.
- 17) Niwa, K., et al.: Redox regulation of PI3K/Akt and p53 in bovine aortic endothelial cells exposed to hydrogen peroxide. Antioxidants & redox signaling 5,713-722, 2003.
- 18) 浅田浩二、中野稔、柿沼カツ子 : 活性酸素測定マニュアル. P 6, 1992. 講談社サイエンティフィック (東京)
- 19) Shimizu, T., et al. : A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume - sensitive Cl<sup>-</sup> channel. PNAS 101 : 6770-6773, 2004.
- 20) Mysler, E. et al.: The apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. J.Clin.Invest. 93 : 1029-1034, 1994.
- 21) Blaese, R., et al. : Increased immunoglobulin-secreting cells in the blood of patients with active systemic lupus erythematosus. Am. J. Med. 68 : 345-350, 1980.
- 22) Fauci, A.S., et al.: Polyclonally triggered B cells in the peripheral blood and bone marrow of normal individuals and in patients with systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum. 24 : 577-583, 1981.
- 23) Watanabe-Fukunaga, R., et al. : Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen

- that mediates apoptosis. *Nature* 356 : 314-317, 1992.
- 24) 小林清一 他：自己免疫疾患におけるFas抗原の発現異常。  
炎症と免疫 3 : 16-23, 1994.
- 25) Tan, E.M. et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25 : 1271-1277, 1982.
- 26) Lahita, R.G.: Systemic lupus erythematosus, p784-786. Churchill Livingstone, New York, 1992.
- 27) Bakke, A.C. et al.: T lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus. Correlation with corticosteroid therapy and disease activity. *Arthritis Rheum.* 26 : 745-750, 1983.
- 28) Dubey, S. et al.: Involvement of Fas and TNF pathways in the induction of apoptosis of T cells by antithymocyte globulin. *Ann. Hematol.* 82 : 496-499, 2003.
- 29) Fiorina, P. et al.: Selective intra-graft apoptosis and down-regulation of lymphocyte bcl-2, iNOs and CD95L expression in kidney-pancreas transplanted patients after anti-Thymoglobulin induction. *Transpl. Int.* 17 : 603-608, 2004.
- 30) Aringer, M. et al.: SLE-Complex cytokine effects in a complex autoimmune disease: tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Therapy* 5 : 172-177, 2003.
- 31) 石井俊徳：全身性エリテマトーデスにおけるリンパ球活性酸素の異常について。熊本大学医療技術短期大学部紀要 第9号 : 33-42, 1999.
- 32) Rubin, B.Y., et al.: Correlation between the anticellular and DNA fragmenting activity of tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 48 : 6006-6010, 1988.