

学位申請論文

Tumor necrosis factor 阻害療法は関節リウマチ患者の 末梢 T 細胞分化異常 (terminal differentiated effector memory T 細胞の増大) を是正する

獨協医科大学 内科学 (呼吸器・アレルギー)

大原 徹也

要 旨 関節リウマチ (Rheumatoid arthritis, RA) 発症において Tumor Necrosis Factor (TNF) など炎症性サイトカインは重要な役割を果たしている。また、T 細胞も重要な役割を果たしているが、その異常は不明な点がある。近年導入された TNF 阻害療法は RA の炎症、関節破壊を劇的に抑制し、一部の症例には治癒状態を誘導する。しかし、TNF 阻害療法の T 細胞異常に与える効果は不明である。本研究は末梢 T 細胞分化に着目し、RA 患者に T 細胞分化異常が存在するか、TNF 阻害療法がそれを是正するか明らかにすることを目標とする。そのために TNF 阻害療法および疾患修飾性抗リウマチ剤 (Disease modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs) 投与患者の末梢 T 細胞分化表面マーカーを経時的に解析した。RA 患者においては T 細胞分化異常があり、terminally differentiated effector memory T 細胞 (CD4 陽性 CD28^{null} T 細胞および CD8 陽性 CD45RA memory effector 細胞) が増大していた。T 細胞分化異常は、TNF 阻害療法により、疾患活動性のコントロールともに是正されるが、DMARDs では是正されなかった。したがって、TNF 阻害療法には T 細胞への作用という新たな効果が存在することおよびその作用が RA 治癒誘導において働く可能性が示唆された。

Key Words : Tumor necrosis factor 阻害療法, 関節リウマチ, T 細胞分化異常, DMARDs

緒 言

関節リウマチ (RA) は、破壊性の多関節炎を特徴とする全身性炎症疾患である。その発症・病態形成機序として免疫異常、サイトカインネットワークの亢進に伴う炎症が重要な役割を果たしている^{1,2)}。Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)、インターロイキン 6 (Interleukin-6, IL-6)、IL-1 などの炎症性サイトカインは重要である。実際、これらを標的とした治療が実用化されている。

特に TNF- α は RA の炎症維持および軟骨破壊・骨破壊に働く重要なサイトカインである。TNF- α は RA 滑膜細胞より分泌され、分泌細胞自体に働き、滑膜細胞を増殖させ、同時に TNF- α を含む炎症性サイトカイン・ケモカインを分泌させるオートクライムループを形成す

ることにより慢性炎症の自律的維持に働く。また、TNF- α 刺激により分泌されたサイトカイン・ケモカインは関節内への炎症細胞の動員を促進し、炎症を維持、増幅する。さらに、TNF- α は滑膜細胞を活性化させ、プロテアーゼなどを分泌させ軟骨を障害するとともに、直接軟骨細胞のアポトーシスを誘導し、軟骨を破壊する。骨に対しては、TNF- α は直接あるいは間接的に破骨細胞の分化を誘導し、骨破壊を誘導する¹⁻³⁾。

このような働きのある TNF- α の阻害療法として、TNF- α に対する中和抗体であるインフリキシマブ、可溶性 TNF- α レセプター製剤であるエタネルセプトはわが国でも使用され、臨床現場において著明な有効性を示し、RA の治療体系を変えつつある。TNF 阻害療法は、メソトレキサート (methotrexate, MTX) などの抗リウマチ薬 (DMARDs) の無効・効果不十分例にも炎症・症状の改善をもたらし、さらに従来の DMARD 療法では困難であった関節破壊の進行を阻止し、一部の症例においては修復をもたらし革命的な治療法である⁴⁻⁷⁾。また、TNF 阻害療法の早期、十分な投与により、drug free の

平成 19 年 11 月 26 日受付, 平成 19 年 12 月 14 日受理
別刷請求先: 大原徹也

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880
獨協医科大学 内科学 (呼吸器・アレルギー)

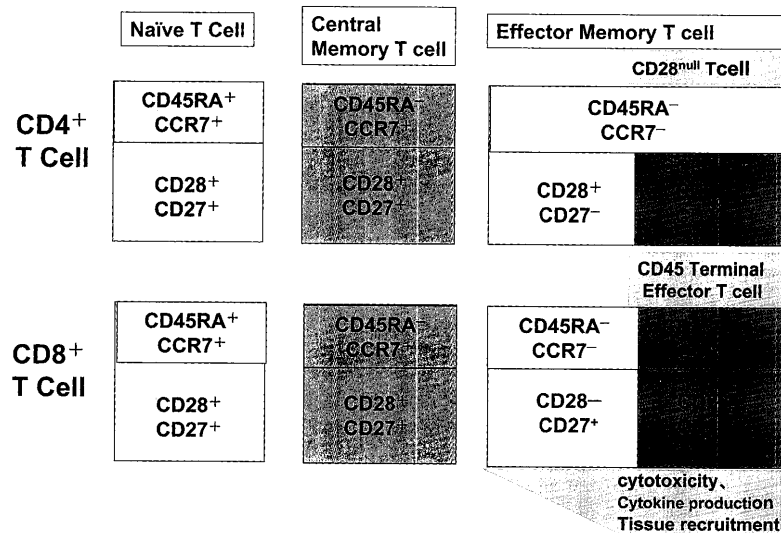


図1 末梢T細胞分化とその表面マーカー

末梢でのCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞分化とその表面上のCD45RA, CCR7, CD27, CD28の発現パターンを示す。CD4陽性細胞はnaïve T細胞と2つのmemory T細胞 (central memoryとeffector memory T細胞)に分類される。加齢, 自己免疫に伴いCD4陽性CD28^{null} T細胞が出現し, 性質上terminally differentiated T細胞に分類される。CD8陽性T細胞はnaïve T細胞と3つのmemory T細胞 (central memory, effector memory T細胞, およびCD45RA陽性terminally differentiated T細胞)に分類される。

状態, 治癒状態の誘導も最近報告されている⁸⁾。

RA病態形成に対しては, T細胞も重要な役割を果たしている。RA滑膜組織中にはT細胞の浸潤が認められている。RAは, 自己抗体, T細胞による自己免疫性炎症より始まり, その後サイトカインネットワークによる自律的慢性炎症過程に移行すると考えられ, 病初期におけるT細胞の重要性が指摘されている^{1~3)}。また, 慢性炎症維持・関節破壊においてもT細胞によるマクロファージ・線維芽細胞・血管内皮細胞の活性化およびT細胞より分泌されるインターフェロン- γ (Interferon- γ , IFN- γ), IL-17, 顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor, GM-CSF), receptor activator NF kappa B ligand (RANKL)などのサイトカインの重要性が報告されている^{1~3)}。実際, T細胞を標的とした治療が実際におこなわれ, 効果をあげている。T細胞活性化に必要な副刺激であるCD28シグナルを阻害するアバタセプト (CTLA4-Ig)は実用化され, TNF阻害療法と同様な効果が報告されている⁹⁾。このようにT細胞はRAの発症・病態形成において重要な役割を果たしている。

しかし, RAにおけるT細胞異常がいかなるものかは十分に明らかにされておらず, さらにRAに治癒状態をもたらす可能性のあるTNF阻害療法がT細胞異常に与える効果も不明である。

T細胞は胸腺で分化を果たし, 末梢T細胞として胸腺外に出て, 各種機能をもったT細胞に分化する^{10,11)}。胸腺より末梢にでたばかりの細胞はnaïve T細胞と呼ばれ, ホーミングレセプターであるCCR7とL-セレクチン (CD62L)を発現し, 血中とリンパ器官を移動している。また, これらの細胞はCD45RAを発現している。リンパ組織内で樹状細胞に抗原を提示され活性化された細胞はmemory T細胞に分化する。これらの細胞は, 抗原刺激に再暴露されることで急速に反応・増殖し, プロファイルが特殊化したサイトカインを多量に産生する。その際, memory T細胞ではその表面CD45はRAからROにアイソフォームが変わる。Memory T細胞はさらにcentral memory T細胞とeffector memory T細胞と呼ばれる2つの細胞群に大別される。Central memory T細胞はCCR7を持ち, リンパ器官間を移動し, 抗原の暴露を監視している。一方, effector memory T細胞はCCR7を失い, 組織内に浸潤し, effector細胞としてサイトカインを分泌・細胞傷害性などを示し, 抗原の除去に努める。CD8陽性T細胞では, effector memory T細胞の一部はさらに強力なeffector活性を持ち, 再びCD45RAを発現し, 副刺激分子であるCD28を欠如したCD45RA effector memory T細胞となる。この細胞群は強力なeffector機能をもち, 通常の抗原刺激では増殖しがたいことよりterminally differentiated effector memory T細胞とも呼

ばれる。Memory T細胞は細胞表面上のCD45RA/RO, CCR7, CD27, CD28などの発現により, central memory, effector memory T細胞とCD8陽性T細胞ではさらにCD45RA effector memory T細胞に分類される。図1にその概略をまとめた。これらmemory T細胞の分化が, naïve T細胞より別々に分化するのか, memory T細胞間で分化するのか, その順序はいかなるものかは決着がつかない。

これらのほか, 加齢, 炎症などによりこの系列から外れる細胞集団が分化しうる。CD4陽性CD28陰性のCD4陽性CD28^{null} T細胞はその代表である。CD4陽性CD28^{null} T細胞は抗体産生を促すhelper T細胞としての機能はないが, 強力なIFN- γ などサイトカイン産生能を持ち, perforin, granzymeなどの細胞傷害物質を持ち, 強い細胞傷害能を示すeffector細胞である。本細胞は, CD8陽性CD45RA T細胞と同様にterminally differentiated effector memory T細胞の性状を持ち, その生体での役割が注目されている^{12,17)}。

本研究は末梢T細胞分化に着目し, RA患者においてT細胞分化異常が存在するか, 存在するならばその異常がいかなるものか明らかにするとともに, TNF阻害療法がT細胞分化異常を是正するか明らかにすることを目標とした。そのために, 患者末梢血のT細胞分画を解析した。

方 法

患者:

獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科, 2005-2006年に抗体療法外来開催日の膠原病外来を受診したRA患者(n=67)を対象とした。RAの診断はアメリカリウマチ学会分類基準(1987)¹²⁾によりおこなった。疾患活動性はDisease Activity Score 28 (DAS28)¹⁴⁾により評価した。治療反応性は欧州リウマチ学会(European League Against Rheumatism, EULAR)判定基準¹⁴⁾により判定した。TNF阻害療法はインフリキシマブ3mg/kg投与, エタネルセプトは25mg・週2回投与によりおこなった。

コントロール群として健常人コントロール(n=13)および疾患コントロールとして, 獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科に2006年に入院した活動期全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus, SLE)患者(n=7)をおいた。SLEの診断はアメリカリウマチ学会分類基準¹⁶⁾によった。

Flowcytometryによるリンパ球表面マーカーの解析:

同意の得られた患者よりヘパリン化静脈血を5ml採取した。血液はFicoll Paque (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)に重層, 遠心し, 単核球を分離した。

単核球はPBSで2回洗浄後, 1×10^7 /mlの濃度で1%FCS含有PBSに再浮遊させ, 50mlをチューブに入れ, 以下の抗体を用いon iceで30分染色し, PBSで2回洗浄後, 500mlの1%FCS含有PBSに再浮遊させ, Flowcytometryによる4-colour解析をおこなった。Flowcytometry解析はCELL Quest softwareを用い, FACScalibar (Becton Dickinson, San Jose, CA)にておこなった。T細胞, B細胞, NK細胞の同定には抗CD3-FITC, 抗CD20-PE (eBioScience, San Diego, CA), 抗CD16-PerCP, 抗CD56-APC抗体 (Becton Dickinson) を, CD4, CD8細胞の同定には抗CD4-PerCP (eBioScience), 抗CD8-APC抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) を, naïve/memory T subpopulationの解析には, 抗CD4-PerCP, 抗CD8-APC抗体と, 抗CD45RA-PE (Becton Dickinson), 抗CCR7-FITC抗体 (R & D Sysyem Inc Minneapolis, MN) あるいは抗CD28-FITC, 抗CD27-PE抗体 (Becton Dickinson) を用いた。CD4陽性CD28^{null}細胞の表面マーカーの解析には, 抗CD4-APC (Becton Dickinson), 抗CD28-biotin (Becton Dickinson), 抗CD45RA-PE, 抗CCR7-FITC抗体および, streptavidin-tricolour (Caltag, Sandiego, CA, USA) を用いた。ネガティブコントロール抗体として各蛍光色素結合アイソタイプコントロールIg (Becton Dickinson) を用いた。

T細胞はCD3陽性, B細胞はCD20陽性, NK細胞はCD3陰性でCD16あるいはCD56陽性細胞とした。

統計解析

データはmean \pm standard deviation (sd)で表示した。統計解析はThe Statistical Package for BioScience (COM WORKS CO, Tokyo, Japan)を用いstudent-t test, welch test, parametric correlation-regression analysisにて解析した。P<0.05を統計的に有意と判定した。

結 果

患者プロフィール

本研究は患者をTNF阻害療法以外の通常の抗リウマチ薬(DMARDs)による治療を受けた患者群, およびTNF阻害療法を22週以上受けた患者に分類した。後者はさらにEULAR治療反応基準¹⁴⁾でmoderate以上の反応を示した群をTNF阻害療法反応群と反応を示さなかったTNF阻害療法抵抗群の3群に分類し解析をおこなった。表1に本研究の患者プロフィールを示す。TNF阻害療法反応群ではDMARD使用群に比し, RAの疾患活動性の指標であるDAS28, CRPが有意に低下していた。

表1 RA患者のプロフィール

	年齢 (平均)	性 男/女	罹病期間 (年)	CRP (mg/dl)	DAS28	PSL (mg)	DMARD
RA TNF Inhibitors (-) (n = 36)	52.0 ± 13.0	9/27	11.2 ± 7.4	2.4 ± 2.8	5.6 ± 1.2	6.2 ± 4.2 (n = 26)	MTX : 20 SASP : 7 CsA : 3 BUC : 2
RA TNF Inhibitors (+) 治療反応群 (n = 24)	50.1 ± 13.8	5/19	10.0 ± 4.5	0.7 ± 1.02*	3.1 ± 1.2**	5.6 ± 2.8 (n = 21)	MTX : 14 SASP : 5 CsA : 1 BUC : 2
INF : ETN = 13 : 11							
治療抵抗群 (n = 7)	58.2 ± 7.9	3/4	11.9 ± 4.8	3.3 ± 3.0	5.6 ± 1.3	9.8 ± 3.6 (n = 7)	MTX : 4 SASP : 2 FK506 : 1
INF : ETN = 5 : 2							

Tumor necrosis factor 阻害療法 (TNF inhibitor treatment, TNF Inh),
 インフリキシマブ (Infliximab, INF), エタネルセプト (Etenercept, ETN)
 メソトレキサート (Methotrexate, MTX), サラゾスルファピリジン (Sulfasalazine, SASP)
 シクロスポリン (Cyclosporin, CsA), ブシラミン (Bucillamine, Buc),
 タクロリムス (Tacrolims, FK506), プレドニゾロン (Prednisolone, PSL),
 (DMARDs療法とTNF阻害療法の間に有意差あり, $p < 0.01$ * and $p < 0.001$ **)

表2 RA患者のリンパ球分画

	リンパ球数 (/mm ³)	T細胞% (CD3+)	B細胞% (CD20+)	NK細胞% (CD3-CD16+/CD56+)	CD4/CD8%
健常人 (n = 13)	1950 ± 341	64.3 ± 11.5	9.1 ± 3.9	18.4 ± 9.5	3.75 ± 3.41
RA TNF Inhibitors (-) (n = 36)	1497 ± 662	63.8 ± 13.5	8.0 ± 4.1	15.9 ± 11.2	3.73 ± 2.13
RA TNF Inhibitors (+) 治療反応群 (n = 24)	1413 ± 439	65.9 ± 10.4	7.2 ± 4.6	13.6 ± 9.2	3.59 ± 2.53
治療抵抗群 (n = 7)	1391 ± 811	57.6 ± 19.0	6.7 ± 3.8	12.6 ± 16.4	3.81 ± 3.24

Tumor necrosis factor 阻害療法 (TNF inhibitor treatment)

表2に末梢血リンパ球分画を示すが, RA患者では健常人に比し, リンパ球数が減少していたが, T細胞, B細胞, NK細胞 (CD3陰性CD16/CD56陽性細胞), CD4/CD8比はRA 3群間で差は認められなかった。

RA患者ではCD4⁺CD28^{null} T cells, terminally differentiated effector memory cells T細胞が増加している

RA患者における末梢T細胞分化異常の有無を明らか

にするために, TNF阻害療法を受けていない患者の末梢単核球CD4陽性T細胞中のnaïve T細胞, memory T細胞分画をそれぞれ解析した。

CD4陽性T細胞はCD45RAと2次リンパ組織へのhomingを決めるケモカインであるCCR7の発現によりnaïve T細胞 (CD45RA⁺ CCR7⁻) と2つのmemory T細胞; central memory細胞 (CD45RA⁻ CCR7⁺) とeffector memory T細胞 (CD45RA⁻ CCR7⁻) に分類される。まず, TNF阻害剤を使用せず通常のDMARD療法を

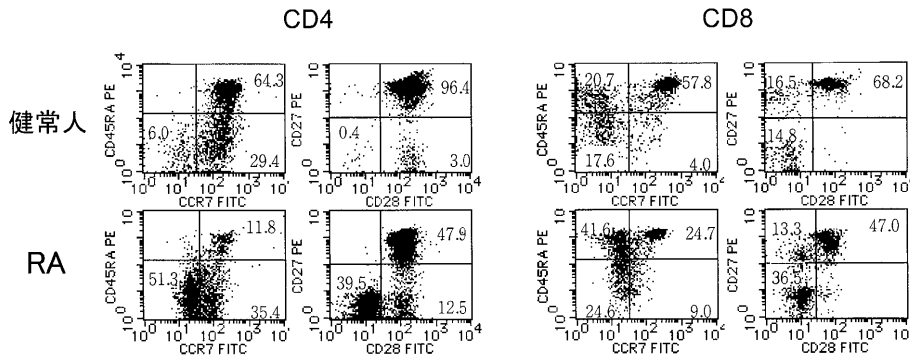


図2 健常人, RA患者における末梢 naïve, memory T細胞
健常人およびRA患者末梢T細胞上のCD45RAとCCR7, CD28とCD27の発現をFlowcytometryに解析した典型例を示す. 各数字は頻度を示す.

表3 健常人, RA患者, SLE患者のT細胞分画

	健常人% n = 13	RA % n = 36	SLE % n = 7	
CD4 ⁺ cells				
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	40.8 ± 20.6	33.0 ± 7.9	24.9 ± 16.0	
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	48.1 ± 19.0	34.1 ± 14.0	22.6 ± 8.6	
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	24.9 ± 16.0	15.4 ± 11.1	15.8 ± 4.3	
CD27 ⁺ CD28 ⁺				
CD27 ⁻ CD28 ⁺	86.1 ± 9.5	87.7 ± 9.7	88.9 ± 14.8	
CD27 ⁻ CD28 ⁻	9.5 ± 5.4	4.8 ± 3.2	3.8 ± 1.7	
	3.8 ± 4.1	7.3 ± 7.3	2.0 ± 2.2	p < 0.05*
CD8 ⁺ cells				
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	41.6 ± 13.1	24.5 ± 17.8	44.7 ± 18.6	p < 0.01*
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	7.0 ± 2.5	8.8 ± 6.5	3.4 ± 1.8	
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	24.6 ± 8.7	21.6 ± 11.6	19.1 ± 11.7	
CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	26.5 ± 11.4	44.5 ± 17.9	31.0 ± 20.6	p < 0.001*
CD27 ⁺ CD28 ⁺	65.9 ± 11.7	46.7 ± 22.6	57.2 ± 18.0	p < 0.001*
CD27 ⁺ CD28 ⁻	10.7 ± 3.5	9.1 ± 4.6	18.5 ± 8.2	
CD27 ⁻ CD28 ⁻	20.7 ± 11.7	41.3 ± 20.2	22.9 ± 19.3	p < 0.001*

健常人とRAで有意差あり*

うけているRA患者末梢T細胞中の3分画の頻度を検討した(図2). 表3に示すようにRA患者では健常人に比し, effector memory T細胞が減少している傾向があったが, 有意差ではなかった(p = 0.06). また, SLE患者のnaïve T細胞と2つのmemory T細胞分画はRAのものと同様であった.

次にDMARD使用RA患者におけるCD4陽性CD28^{null} T細胞の末梢血中の頻度について, CD28とCD27を染色し解析した(図2). 健常人ではCD4陽性T細胞は主にCD28⁺ CD27⁺ T細胞とCD28⁺ CD27⁻ T細胞からなり, 先に報告のあるようにCD27⁻細胞はCCR7陰性であり, effector-memory T細胞に相当した¹⁷⁾. このほかに, CD4陽性CD28^{null} T細胞に相当する少数のCD27⁻ CD

28⁻ T細胞が存在し, RA患者では増大していた. この細胞分画はCD45RA⁻ CCR7⁻ CD27⁻ CD28⁻であった. なお, このCD4陽性CD28^{null} T細胞は機能的には強力なeffector機能を持つことが報告され, terminally differentiated effector memory T細胞とみなされている¹⁸⁾.

CD4陽性CD28^{null} T細胞はRA患者で健常者に比し, 有意に増加していた(p = 0.04)(表3). CD4陽性CD28^{null} T細胞は, 加齢とともに増加するとの報告があり¹²⁾, 私の検討においても健常人では増加していたが(p < 0.01), RA患者では加齢との関連は認められなかった(p = 0.17)(図3). また, 自己免疫疾患であるSLE患者ではCD4陽性CD28^{null} T細胞は増加していなかった. これらよりRA患者においては, terminally differentiated effec-

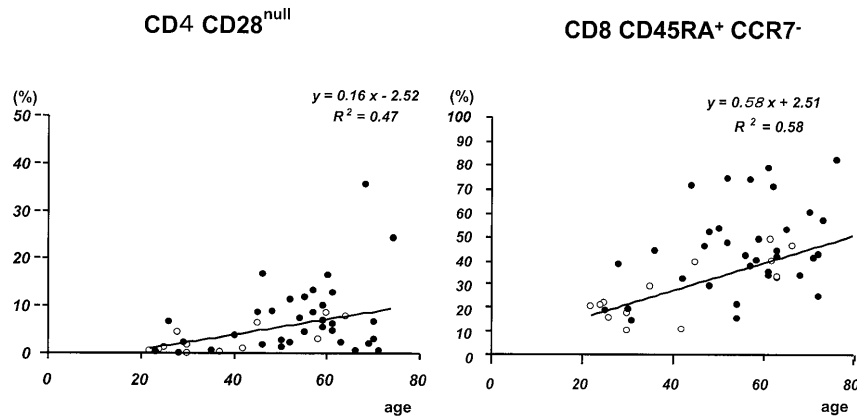


図3 RA患者における末梢血 terminally differentiated memory T cells 頻度と加齢の関連。健康人およびRA患者の末梢血の terminally differentiated memory T cells であるCD4陽性CD28^{null} T細胞、CD8陽性CD45RA陽性 terminally differentiated T細胞の頻度と年齢の関連を検討した。○は健康人、●はRA患者を示す。線は健康人より得られた回帰直線である。Rはその相関係数をしめしている。

tor memory T細胞であるCD4陽性CD28^{null} T細胞が増加していることが明らかになった。

RA患者ではCD8陽性 CD45RA 陽性 terminally differentiated effector memory T細胞が増加している

RA患者における末梢T細胞分化異常の有無を明らかにするために、患者末梢単核球CD8陽性T細胞中のnaïve T細胞、memory T細胞分画を解析した。

CD8陽性T細胞はCD45RAとCCR7の発現によりnaïve T細胞 (CD45RA⁺ CCR7⁺) と3つのmemory T細胞；central memory細胞 (CD45RA⁻ CCR7⁺)、effector memory T細胞 (CD45RA⁻ CCR7⁻)、およびCD45RA陽性effector memory T細胞 (CD45RA⁺ CCR7⁻) に分類される。CD45RA陽性effector memory T細胞はterminally differentiated effector memory T細胞に相当する。

まず、TNF阻害剤を使用せず通常のDMARD療法をうけているRA患者末梢CD8陽性T細胞をCD45RAおよびCCR7に対する抗体で染色し、naïve T細胞および各memory T細胞分画の頻度を検討した (図2)。表3に示すようにRA患者では健康人に比し、naïve T細胞が減少し ($p = 0.001$)、CD45陽性effector memory T細胞 (CD45RA⁺ CCR7⁻) が有意に増大していた ($p = 0.0002$)。CD45陽性effector memory T細胞は健康人においては加齢に従い増加していたが ($p = 0.003$)、RA患者においては加齢により増加する傾向はあったが有意ではなかった ($p = 0.06$)。なお、健康者における年齢とCD45陽性effector memory T細胞の回帰直線による細胞頻度予想値 (細胞% = $0.58 \times \text{年齢} + 2.5$, $R^2 = 0.58$) と実測値の

差は、RA患者で 7.6 ± 11.4 と健康者の 1.2 ± 9.0 より有意に大きく正の値であり、加齢では説明のつかないCD45陽性effector memory T細胞がRA患者では存在することが示された (図3)。

さらにCD8陽性細胞中のCD28^{null} CD27^{null}細胞頻度についてもCD28とCD27を染色し、解析した (図1)。CD8陽性T細胞は、CD45RA⁺ CD28⁺ CD27⁺細胞、CD45RA⁻ CD28⁺ CD27⁻、CD45RA⁻ CD28⁻ CD27⁺、CD45RA⁺ CD28⁻ CD27⁻ の4細胞群に分かれ、それぞれがnaïve, central memory, effector memory, terminally differentiated effector memory T細胞に相当する¹⁹⁾。

CD8陽性CD28^{null} CD27^{null}細胞はRA患者末梢血中では、健康人に比し有意に増加していた ($p < 0.0001$) (表3)。CD8陽性CD28^{null} CD27^{null}細胞はCCR7⁻ CD45RA⁺であり、CD45陽性effector memory T細胞に相当し、terminally differentiated effector memory T細胞と考えられた。

なお、SLE患者においては、CD45RA陽性effector memory CD8陽性T細胞およびCD28^{null} CD27^{null} CD8陽性細胞の増加は認められなかった。

以上より、RA患者においては、terminally differentiated effector memory T細胞であるCD8陽性CD45RA陽性CD28^{null} CD27^{null} T細胞が増加していることが明らかになった。

CD4陽性およびCD8陽性 terminally differentiated effector memory T細胞の増加と臨床像の関連

RA患者ではCD4陽性およびCD8陽性 terminally dif-

表4 TNF 阻害療法を施行したRA患者のメモリー T細胞分化

	Control	RA-DMARDs療法	RA-TNF 阻害療法	
	n = 13	n = 36	治療反応群 n = 24	治療抵抗群 n = 7
CD4 ⁺ cells				
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	40.8 ± 20.6	33.0 ± 7.9	55.1 ± 16.1	45.1 ± 24.6
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	48.1 ± 19.0	34.1 ± 14.0	30.1 ± 14.5	22.1 ± 5.4
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	24.9 ± 16.0	15.4 ± 11.1	12.8 ± 8.3	27.0 ± 23.6
CD27 ⁺ CD28 ⁺				
CD27 ⁺ CD28 ⁺	86.1 ± 9.5	87.7 ± 9.7	91.4 ± 6.5	82.7 ± 12.2
CD27 ⁻ CD28 ⁺	9.5 ± 5.4	4.8 ± 3.2	4.0 ± 1.4	4.5 ± 1.7
CD27 ⁻ CD28 ⁻	3.8 ± 4.1	7.3 ± 7.3	4.4 ± 6.0	12.7 ± 11.3
p < 0.05 [*]				
CD8 ⁺ cells				
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	41.6 ± 13.1	24.5 ± 17.8	44.4 ± 19.7	18.4 ± 18.3
p < 0.01 ^{1,3-5)}				
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	7.0 ± 2.5	8.8 ± 6.5	6.9 ± 2.9	4.9 ± 2.3
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	24.6 ± 8.7	21.6 ± 11.6	14.9 ± 9.4	13.6 ± 8.6
P < 0.05 ^{3,4)} , p < 0.001 ²⁾				
CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	26.5 ± 11.4	44.5 ± 17.9	33.6 ± 16.2	63.3 ± 15.7
P < 0.05 ⁴⁾ , p < 0.001 ^{1,3,5)}				
CD27 ⁺ CD28 ⁺				
CD27 ⁺ CD28 ⁺	65.9 ± 11.7	46.7 ± 22.6	57.6 ± 22.3	36.1 ± 19.3
P < 0.05 ^{4,5)} , p < 0.001 ^{1,3)}				
CD27 ⁺ CD28 ⁻	10.7 ± 3.5	9.1 ± 4.6	8.6 ± 3.4	11.5 ± 6.0
CD27 ⁻ CD28 ⁻	20.7 ± 11.7	41.3 ± 20.2	31.7 ± 20.1	48.4 ± 14.0
P < 0.05 ⁵⁾ , p < 0.001 ^{1,3)}				

- 1) : 健常人とRAのDMARD投与群の間で有意差あり.
- 2) : 健常人とTNF阻害療法治療反応群において有意差あり.
- 3) : 健常人とTNF阻害療法治療抵抗群で有意差あり.
- 4) : DMARDs治療群とTNF阻害療法治療反応群の間で有意差あり.
- 5) : TNF阻害療法治療反応群とTNF阻害療法治療抵抗群の間で有意差あり.

ferentiated effector memory T細胞が増加していることが明らかになった。その機序、臨床的意味を明らかにするために、terminally differentiated effector memory T細胞頻度と臨床症状、検査所見との関連を検討した。

TNF阻害療法をしていないRA患者末梢血中terminally differentiated effector memory T細胞頻度とRAの活動性(DAS28)、罹病期間、治療法との関連は認めなかった。

terminally differentiated effector memory T細胞分化は炎症性サイトカインにより制御されている^{20,21)}。そのため、IL-6により誘導される炎症マーカーであるCRPとの関連を検討した。CRPとCD4陽性およびCD8陽性terminally differentiated effector memory T細胞の頻度は相関が認められなかった(図2)。

TNF阻害療法反応患者ではterminally differentiated effector memory T細胞の増加が認められない

RAの炎症、臨床像を劇的に改善するTNF阻害療法が、RA患者のT細胞分化異常に及ぼす効果をDMARD治療群、TNF阻害療法反応群および抵抗群で検討した。なお、治療反応群、抵抗群のデータは治療後22週以降のものである。

表4に示すように、健常人に比しDMARD治療患者群では有意にCD4陽性CD28^{null}T細胞は増加していた。しかし、TNF阻害療法反応群はCD4陽性CD28^{null}T細胞に健常人と同様の頻度で有意差はなく、DMARD治療群と比較すると有意差はないが減少傾向であった(p = 0.06)。これに対し、TNF阻害療法抵抗群ではCD4陽性CD28^{null}T細胞はDMARD治療群と同様に健常人より有意に増大しており、その程度は有意ではないがDMARD群より大きかった。

CD8陽性T細胞についても、TNF阻害療法反応群では

表5 RA患者でのインフリキシマブとエタネルセプト投与による terminally differentiated T細胞頻度への影響

	DMARDs療法		TNF 阻害療法			
	n = 36	治療反応群		治療抵抗群		
		INF n = 13	ETN n = 11	INF n = 5	ETN n = 2	
CD4 ⁺ CD28 ⁻ CD27 ⁻	7.3 + 7.3	2.1 + 1.4*	5.8 + 8.1	8.3 + 9.9	16.0 + 13.7	
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	44.5 + 17.9	32.6 + 18.4*	33.9 + 13.4**	61.1 + 16.7	69.2 + 20.1	
CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD27 ⁻	41.3 + 20.3	29.1 + 16.7*	32.8 + 22.6	45.1 + 11.3	46.4 + 27.7	

インフリキシマブ (infliximab, INF), エタネルセプト (etanercept, ETN)

DMARDsとインフリキシマブ間で有意差あり (p<0.05*).

DMARDsとエタネルセプト間で有意差あり (p<0.05**)

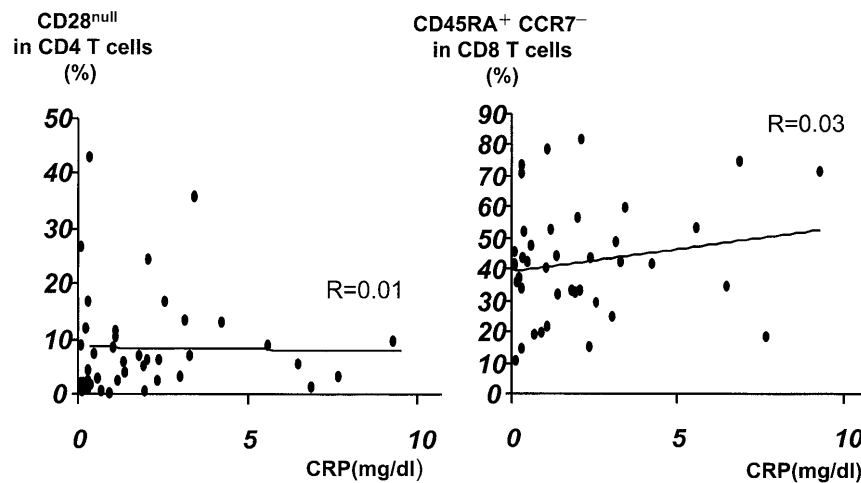


図4 末梢血 terminally differentiated memory T cells 頻度と血清CRPの関連
末梢血の terminally differentiated memory T cells である CD4 陽性 CD28^{null} T 細胞, CD8 陽性 CD45RA 陽性 terminally differentiated T 細胞の頻度と血清 CRP の関連を検討した。R は相関係数である。

CD45RA 陽性 effector memory T 細胞 (CD45RA⁺ CCR7⁻) が DMARD 治療群に比し減少していた。しかし、TNF 阻害療法抵抗群ではむしろ増大傾向であった。CD8 陽性 CD28^{null} CD27^{null} 細胞についても同様に TNF 阻害療法反応群では DMARD 治療群に比し減少していた。

以上より TNF 阻害療法反応群では CD8 陽性 T 細胞での terminally differentiated effector memory T 細胞が TNF 阻害療法を受けていない患者に比べ、減少していた。しかし、治療に反応していない患者ではむしろこれらの細胞群は増大していた。また、有意ではないが CD4 陽性 terminally differentiated effector memory T 細胞作用を持つ CD4 陽性 CD28^{null} T 細胞も同様の傾向を示した。

CD4 陽性 CD28^{null} T 細胞は、インフリキシマブ投与患者群で有意に減少していたが、CD8 陽性 CD45RA effec-

tor memory T 細胞減少はインフリキシマブおよびエタネルセプト投与群で同様に認められた (表5)。

TNF 阻害療法は RA 患者の terminally differentiated effector memory T 細胞の増加を是正する

TNF 阻害療法反応患者では terminally differentiated effector memory T 細胞の増大が抑制されていた。TNF 阻害療法が terminally differentiated effector memory T 細胞の増大を是正するか、TNF 阻害療法前および治療後 22 週で末梢血中 CD4 陽性および CD8 陽性 terminally differentiated effector memory T 細胞の頻度を治療前後で検討した。

TNF 阻害療法は、TNF 阻害療法反応群においては、有意に CD4 陽性および CD8 陽性 terminally differentiated effector memory T 細胞 (CD4 陽性 CD28^{null}, CD8 陽性 CD45RA⁺ CCR7⁻, CD8⁺ CD28^{null} CD27^{null} T 細胞) の

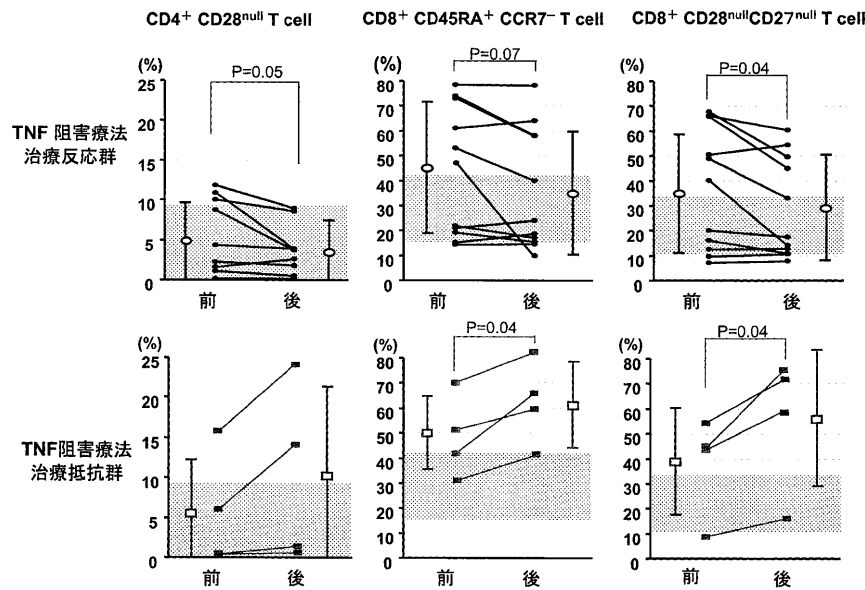


図5 TNF 阻害療法の末梢血 terminally differentiated memory T cells 頻度に及ぼす効果
TNF 阻害療法前および治療後22週の末梢血の terminally differentiated memory T cells である CD4 陽性 CD28^{null} T 細胞, CD8 陽性 CD45RA 陽性 terminally differentiated T 細胞 (CD8⁺ CD45RA⁺ CCR7⁻ T cell および CD8⁺ CD28^{null} CD27^{null} T cell) の頻度を検討した。
上段は TNF 阻害療法反応群 (n = 11), 下段は TNF 阻害療法無効群 (n = 4) を示す。●■は個人の値, ○□は平均, 縦線は標準偏差を示す。影付の部分は健常人の ± 平均 ± 標準偏差の範囲を示す。

頻度を低下させた (図5)。その低下は terminally differentiated effector memory T 細胞の増加があるもので著明であった。一方, TNF 阻害療法抵抗群では, 逆に terminally differentiated effector memory T 細胞はむしろ増加していた。

なお, 図5の治療前の値で示されるように, TNF 阻害療法前の naïve-memory T 細胞分画解析は TNF 治療反応性を予想できなかった。

以上より, TNF 阻害療法は治療反応群において T 細胞分化に影響を与え, terminally differentiated effector memory T 細胞の増加を是正することが明らかにされた。

DMARD 療法は RA 活動性を抑制するが terminally differentiated effector memory T 細胞増加を抑制しない

TNF 阻害療法が terminally differentiated effector memory T 細胞の増加を是正したが, この効果が TNF 阻害療法に特有のものかあるいは RA の活動性がコントロールされたためによるものかを明らかにするため, DMARD 治療反応患者の末梢血中 CD4 陽性および CD8 陽性 terminally differentiated effector memory T 細胞

の頻度の変化を検討した。

DMARD 療法は治療反応群において, CD4 陽性および CD8 陽性 terminally differentiated effector memory T 細胞の頻度に有意な変化をもたらさなかった (図6)。

考 案

本研究は RA 患者においては T 細胞分化異常があり, terminally differentiated effector memory T 細胞が CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞分画で増大していることを明らかにし, その異常は, TNF 阻害療法により, 疾患活動性のコントロールとともに是正されることを明らかにした。また, DMARDs による疾患活動性のコントロールは T 細胞分化異常を十分に是正できないことを明らかにした。

私は RA 患者においては, 末梢 T 細胞の分化異常があり, terminally differentiated effector memory T 細胞にあたる CD4 陽性 CD28^{null} T 細胞, CD8 陽性 CD45RA 陽性 memory effector T 細胞が増大していることを日本人において見出した。

RA の末梢 T 細胞の分化異常は以前から報告されている。CD4 陽性細胞に関すると, Weyand らのグループは, 健常人ではほとんど存在せず加齢で増大するユニークな

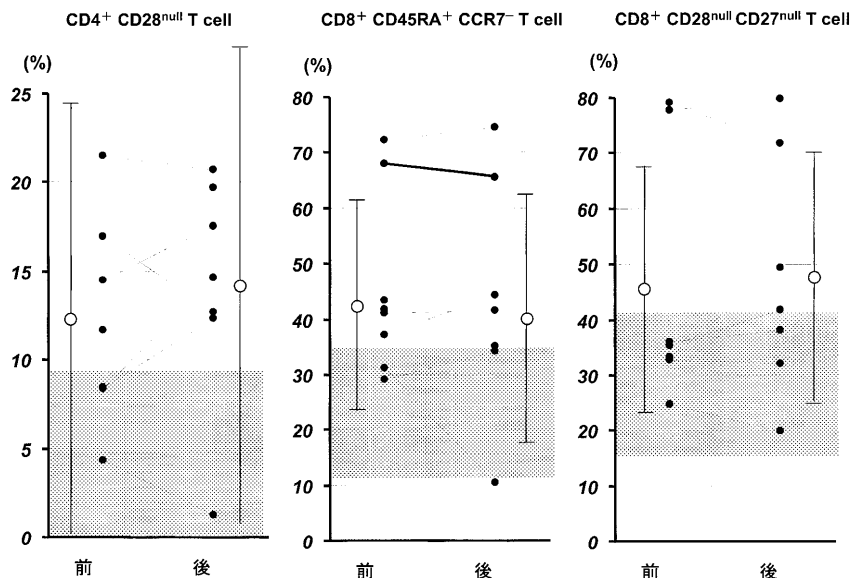


図6 DMARDs療法の末梢血terminally differentiated memory T cells頻度に及ぼす効果
DMARDs治療患者 (n = 7) の末梢血のterminally differentiated memory T cellsであるCD4陽性CD28^{null} T細胞, CD8陽性CD45RA陽性terminally differentiated T細胞 (CD8⁺ CD45RA⁺ CCR7⁻ T cell およびCD8⁺ CD28^{null} CD27^{null} T cell) の頻度の経時的変化を検討した。DMARDs治療患者は治療にEULAR改善基準のmoderate response以上を示した。T細胞の解析は治療変更開始時で疾患活動性のある時期とその22週で臨床症状の改善が認められた時期におこなった。●は個人の値, ○は平均, 縦線は標準偏差を示す。影付の部分は健常人の±平均±標準偏差の範囲を示す。

細胞集団であるCD4陽性CD28^{null}細胞がRA患者末梢血中に増加していることを見出し, これら細胞は自己反応性であることを示した²²⁾。CD4陽性CD28^{null} T細胞は強力なIFN- γ 産生能を持ち, perforin, granzymeなどの細胞傷害物質を持ち, 強い細胞傷害能を示し, 強力なeffector細胞であることを明らかにした¹⁸⁾。その細胞はNK細胞に発現されるclass I MHCを認識するレセプター killer cell Ig-like receptors (KIR) を持ち, CD57, CCR5を発現するが, CD28, CD27, CCR7, CCR4は発現していないことを報告した^{23~25)}。さらにRA患者の関節組織にCD4陽性CD28^{null} T細胞が浸潤していることを示し, RA発症に関与することを示した²⁶⁾。彼女らは, また, RA患者において, CD4陽性CD28^{null} T細胞の増大は安定し存在し, 関節外症状の存在と関連するが, 罹病期間, 疾患活動性, 治療と関連しないことを報告した²⁷⁾。私の結果も彼女らの結果と一致し, CD4陽性CD28^{null}細胞がRA患者で増大しているが, 罹病期間, CRP, 通常のDMARD療法とはその増大は関連していなかった。

CD8陽性細胞の分化異常に関しては, RA患者ではCD8陽性CD57陽性T細胞がRA患者末梢血および関節液中で増加していることが報告されている^{28,29)}。また, CD8陽性CD57陽性T細胞の増大はRA疾患活動性, 炎症, 罹病期間などと関連しないことも報告されている。

私はRA患者でCD8陽性CD45RA陽性effector memory T細胞が増大し, その増大はRA疾患活動性, 炎症, 罹病期間と関連しないことを見出した。CD8陽性CD45RA effector memory T細胞は特異的にCD57を発現しており³⁰⁾, 報告されているCD8陽性CD57陽性T細胞の増加は我々が観察したCD8陽性CD45RA陽性effector memory T細胞の増大であったと考えられる。

私のCD8陽性CD45RA陽性effector memory T細胞がRA患者で増大しているとの所見に対し, Maldonadoらは, CD45RA⁻とCD62L⁻の発現により, CD8陽性細胞を分類し, RA患者では, CD45RA⁺ CD62L⁺のnaïve T細胞とCD45RA⁻ CD62L⁻のcentral memory T細胞が増大し, CD45RA⁺ CD62L⁻のCD45RA陽性effector memory T細胞が減少していると報告している³⁴⁾。この差は患者背景などによるものかも知れない。また, 最近, IL-15非存在下の抗原刺激がCD62L⁻ T細胞にCD62Lを再発現させることもあり³⁵⁾, CD45RA陽性memory effector T細胞が刺激によりCD62Lを発現させ, 彼らの分類でいうCD45RA⁺ CD62L⁺にシフトしたかもしれない。

T細胞分化異常, CD4陽性およびCD8陽性terminally differentiated effector memory T細胞の増大がRAの発症にいかなる役割をはたしているかは十分に解明されて

いない。しかし、CD4陽性およびCD8陽性 terminally differentiated effector memory T細胞は組織浸潤性があり、強力なIFN- γ などのサイトカイン産生能を持つことが報告されており^{18,31~33}、滑膜組織中のマクロファージなどを活性化し、炎症の維持・関節破壊に関与することが推測される。また、terminally differentiated effector memory T細胞はperforin, granzymeなどの細胞傷害因子を持ち、直接的に関節破壊に関与している可能性もある。これら細胞は副刺激分子であるCD28を発現していないが、killer cell Ig-like receptors (KIR)を持ち、滑膜細胞に発現しているMICAなどのclass I MHC分子により活性化されることも報告され²³、terminally differentiated effector memory T細胞は滑膜で活性化し、そのeffector機能を発揮すると考えられる。

また、いかなる機序でRAにおいてT細胞分化異常、CD4陽性およびCD8陽性 terminally differentiated effector memory T細胞の増大が起こるかは不明である。CD4陽性CD28^{null} T細胞の誘導には、持続的な抗原刺激³⁶、TNF- α の持続暴露、あるいはIL-15存在下でのKIR刺激などが報告あるいは推定されている²³。CD8陽性CD45RA陽性 effector memory T細胞の分化にはIL-15などのサイトカイン刺激が重要であり^{10,20,21,37}、また、これらサイトカイン存在下の抗原刺激では通常刺激では増えないCD8陽性 terminally differentiated effector memory T細胞とされるこれら細胞をも増殖することが報告されている^{9,38}。したがってCD4陽性およびCD8陽性 terminal differentiated effector T細胞の増大にはRA病態に関与するサイトカインおよびその結果活性化した細胞からの刺激が重要と考えられるが、詳細は不明である。なお、IL-15はRA患者で上昇し、TNF阻害療法により低下することが報告されている^{43~45}。実際、IL-15を標的としたRAの治療も試みられている。

私はTNF阻害療法がRAにおけるT細胞の分化異常、CD4陽性およびCD8陽性 terminally differentiated effector memory T細胞の増大を是正することを明らかにした。PawlikらはインフリキシマブがRAのCD4陽性CD28^{null} T細胞の増大を是正すると報告している³⁹。しかし、TNF阻害療法がCD8陽性CD45RA memory effector T細胞の増大を是正することは新知見である。

Pawlikらは、TNF阻害療法のCD4陽性CD28^{null}細胞是正の機序として、TNFにより引き起こされるCD28遺伝子転写抑制機序をTNF阻害療法が阻害することを論じている^{39,40}。しかし、本研究は、1) CD28^{null} CD4陽性T細胞ではCD27も発現がないこと、2) TNF阻害療法がCD4陽性のみならず、CD8陽性分画におけるterminal differentiated effector memory T細胞であるCD8陽性

CD45RA memory effector T細胞の増大をも是正すること、3) T細胞の是正は治療反応症例のみに認められること、および4) TNF阻害療法治療抵抗例ではTNFは十分に中和されていると考えられるが、CD28^{null} T細胞が減少せず、むしろ増加することなどを考えあわせると、TNF阻害療法は単にCD28の発現抑制を解除する機序のみではなく、RAそのものあるいはそれに伴う炎症によるT細胞分化異常を是正すると考えたい。

本研究はさらにTNF阻害療法はまたterminally differentiated effector memory T細胞の増大を是正するが、DMARD療法では是正されないことを明らかにした。この違いはTNF阻害療法と通常のDMARD療法によりもたらされるRAのコントロールには量的および質的な違いを反映しているかもしれない。

DMARDsは一見臨床症状を改善 (clinical remission) するが、炎症のコントロールは不十分で関節内の炎症は持続する。一方、TNF阻害剤はより強力に炎症をコントロールし radiological remission をもたらし、これらの2つの治療の効果には差がある。実際、DMARD療法で臨床的に症状が消失した患者でも関節破壊は進行することはよく経験する。BrownらはDMARDにて臨床的寛解になっている患者関節をMRIにて調べると96%の患者が滑膜炎を、46%の患者が骨髄浮腫を示し、DMARDsによるコントロールは臨床上一十分に見えても、炎症は続いていることを明らかにした⁴¹。DMARDsがT細胞分化異常を是正しなかったのは、炎症の量的コントロールが不十分なことを反映している可能性がある。

また、TNF阻害療法はTNFとそれに関連した炎症を特異的に抑制するが、DMARDsの作用機序は異なる。炎症抑制機序の差 (質的) がT細胞分化異常の是正効果を反映している可能性がある。TNF阻害療法反応患者で臨床的寛解に達しない患者でもT細胞分化異常の是正が見られたが、DMARDs治療患者では認められなかった。これらのTNF阻害療法反応患者では、炎症の一部は残存しているが、TNF刺激の遮断により炎症のある部分は阻害されていると考えられる。このTNF刺激の遮断により抑制され、かつ、DMARDsでは抑制されない炎症がterminally differentiated effector memory T細胞の増大に重要な役割を果たしていると考えられる。今後、この2つの治療法により抑制される炎症の差の検討が、terminally differentiated effector memory T細胞の増大の原因、RAにおけるこれら細胞の役割の解析につながりうると考えられ、今後の研究課題である。

本研究はT細胞分化異常の是正はTNF阻害療法を受けている患者でもRAの活動性・炎症がコントロールされていない患者では認められないことを明らかにした。

このことは、TNF- α 刺激遮断のみではterminally differentiated effector memory T細胞の増大を是正できないことを示している。TNF- α により引き起こされるサイトカインネットワークの活性化・炎症がterminally differentiated effector memory T細胞の増大に重要な役割を果たしていることを示唆する。

なお、本研究ではCD4陽性CD28^{null} T細胞はインフリキシマブ治療によりその増大が是正されていたが、エタネルセプトではその効果は有意差で示されなかった。一方、CD8陽性CD45RA T細胞は、インフリキシマブ・エタネルセプトの両者により増大が抑制されていた。インフリキシマブはTNF- α のみを抑制するのに対し、エタネルセプトは他にリンホトキシンも中和する。また、インフリキシマブはTNF- α 産生細胞自体を除去するが、エタネルセプトには細胞除去効果はない。これらの差が、抑制される炎症の質の違いをもたらす、CD4陽性およびCD8陽性terminally differentiated effector memory T細胞の増大是正効果の差をもたらすと考えられる。

以上、TNF阻害療法はTNF刺激経路を遮断することで、それに引き続くサイトカインネットワーク、炎症・免疫ネットワークを変化させ、effector memory T細胞の分化・維持を制御している刺激を修飾することによりT細胞の分化異常を是正していると考えられる。

なお、RA患者でもterminally differentiated effector memory T細胞の増大のない患者が存在することおよびTNF阻害療法でterminally differentiated effector memory T細胞が減少するが、臨床的に活動性が持続する患者が存在することはterminally differentiated effector memory T細胞が病態形成に関与していない可能性も示唆する。しかし、RAの病態形成には多彩な経路が存在する¹⁻³⁾。実際、TNF阻害療法、CTLA4-Ig療法なども実際すべての患者に有効ではない。また、terminally differentiated effector memory T細胞の組織浸潤能、強力なeffector機能を考えると、本細胞群はRA病態形成の一つの経路として働いている可能性が高いと考える。

今回明らかにしたTNF阻害療法がT細胞分化異常を是正するとの知見は、TNF阻害療法がサイトカイン・炎症カスケードを抑制しRAをコントロールするのみではなく、T細胞にも直接あるいは間接的に作用することによりT細胞異常を是正し、RAをコントロールする可能性を示唆する。最近、TNF阻害療法を十分、特に初期に、おこなったRA患者においてdrug freeの状態、RAの治療状態が誘導されたとの報告がある⁸⁾。この治療状態誘導にはRA病態に関与するT細胞を含めた複数の経路の抑制が必要と考えられる。TNF阻害療法のT細胞異常是正効果は治療状態誘導において必須である可能性がある

る。もし、そうであれば、TNF阻害療法患者におけるT細胞モニターが、治療状態誘導判定に役立つ可能性があるであろう。

結 論

私はRA患者においてT細胞分化異常（CD4陽性およびCD8陽性terminally differentiated effector memory T細胞の増大）が存在することを示し、この異常がRAの病態形成に関与する可能性を示した。さらに、T細胞分化異常はTNF阻害療法で是正されることを示し、TNF阻害療法のT細胞への作用という新たな効果を見出し、その作用がRA治療誘導において働く可能性を述べた。

参考文献

- 1) D. Lee, M. Weinblatt : Rheumatoid arthritis. *Lancet*, **358** : 903-911, 2001.
- 2) Choy EH, Panayi GS. : Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, **344** : 907-916, 2001.
- 3) McInnes IB, Schett G. : Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, **7** : 429-442, 2007.
- 4) Lipsky PE, Van der Heijde D, St Clair EW et al. : Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-TNF Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med*, **343** : 1594-1602, 2000.
- 5) Maini R, St Clair EW, Breedveld F, et al. : Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate : a randomised phase III trial. *Lancet*, **354** : 1932-1939, 1999.
- 6) Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, et al. : Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med*, **337** : 141-147, 1997.
- 7) Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, et al. : Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis : double-blind randomised controlled trial. *Lancet*, **363** : 675-681, 2004.
- 8) Van der Bijl AE, Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, et al. : Infliximab and methotrexate as induction therapy in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **56** : 2129-2134, 2007.

- 9) Genovese M, Becker J, Schiff M, et al. : Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor a inhibition. *N Engl J Med*, **353** : 1114-1123, 2005.
- 10) Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. : Central memory and effector memory T cell subsets : Function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, **22** : 745-763, 2004.
- 11) Reiner SL, Sallusto F, Lanzavecchia A, et al. : Division of labor with a workforce of one : Challenges in specifying effector and memory T cell fate. *Science*, **317** : 622-625, 2007.
- 12) Goronzy JJ, Weyand CM. : Aging, autoimmunity and arthritis T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity-catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, **5** : 225-234, 2003.
- 13) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. : The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **31** : 315-324, 1988.
- 14) Van der Heijde DM, van 't Hof MA, van Riel PL, et al. : Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis : first step in the development of a disease activity score. *Ann Rheum Dis*, **49** : 916-920, 1990.
- 15) Van Gestel AM, Haagmsma CJ, van Riel P L C M, et al. : Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum*, **41** : 1845-1850, 1998.
- 16) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. : The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, **25** : 1271-1277, 1982.
- 17) Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ. : CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol*, **166** : 877-84, 2001.
- 18) Park W, Weyand CM, Schmidt D, et al. : Co-stimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human CD4⁺CD28⁻ T cells. *Eur J Immunol*, **27** : 1082-1090, 1997.
- 19) Tomiyama H, Matsuda T, Takiguchi M. : Differentiation of human CD8 (+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol*, **168** : 5538-5550, 2002.
- 20) Surh CD, Boyman O, Purton J. et al. : Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev*, **211** : 154-163, 2006.
- 21) Chiu WK, Fann M, Weng NP, et al. : Generation and growth of CD28^{null} CD8⁺ memory T cells mediated by IL-15 and its induced cytokines. *J Immunol*, **177** : 7802-7810, 2006.
- 22) Schmidt D, Goronzy JJ, Weyand CM. : CD4⁺ CD7⁻ CD28⁻ T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest*, **97** : 2027-3207, 1996.
- 23) Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, et al. : Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NK-G2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100** : 9452-9457, 2000.
- 24) Warrington, K. J., S. Takemura, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand, et al. : CD4⁺, CD28⁻ T cells in RA patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis Rheum*, **44** : 13-20, 2001.
- 25) Bergen J, Thompson A, Slik A, et al. : Phenotypic and Functional Characterization of CD4 T Cells Expressing Killer Ig-Like Receptors. *J Immunol*, **173** : 6719-6726, 2004.
- 26) Namekawa, T., U. G. Wagner, J. J. Goronzy, et al. : Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum*, **41** : 2108-2116, 1998.
- 27) Martens PB, Goronzy JJ, Schaid D, et al. : Expansion of unusual CD4⁺T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **40** : 1106-1114, 1997.
- 28) Burns CM, Tsai V, Zvaifler NJ, et al. : High percentage of CD8⁺, Leu⁻7⁺ cells in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheum*, **35** : 865-873, 1992.
- 29) Wang EC, Lawson TM, Vedhara K et al. : CD8high⁺ (CD57⁺) T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **40** : 237-248, 1997.
- 30) Höflich C, Döcke WD, Busch A, et al. : CD45RA (bright)/CD11a (bright) CD8⁺ T cells : effector T cells. *Int Immunol*, **10** : 1837-1845, 1998.
- 31) Hamann D, Baars PA, Rep MH, et al. : Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8C T cells. *J. Exp. Med*, **186** : 1407-1418, 1997.
- 32) Sallusto F, Lenig D, Forster R, et al. : Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, **401** : 708-712, 1999.
- 33) Appay V, Dunbar PR, Callan M, et al. : Memory CD8C T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*, **8** : 379-385, 2002.
- 34) Maldonado A, Mueller YM, Thomas P, et al. : De-

- creased effector memory CD45RA⁺ CD62L⁻ CD8⁺ T cells and increased central memory CD45RA⁻ CD62L⁺ CD8⁺ T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*, **5** : R91–96, 2003.
- 35) Van Leeuwen EM, van Buul JD, Remmerswaal EB, et al. : Functional re-expression of CCR7 on CMV-specific CD8⁺ T cells upon antigenic stimulation. *Int Immunol*, **17** : 713–719, 2005.
- 36) Schmidt D, Martens PB, Weyand CM, et al. : The repertoire of CD4⁺ CD28⁻ T cells in rheumatoid arthritis. *Mol Med*, **2** : 608–618, 1996.
- 37) Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. : Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, **101** : 4260–4266, 2003.
- 38) van Leeuwen EM, Gamadia LE, Baars PA, et al. : Proliferation requirements of cytomegalovirus-specific, effector-type human CD8⁺ T cells. *J Immunol*, **169** : 5838–5843, 2002.
- 39) Pawlik A, Ostanek L, Brzosko I et al. : Therapy with infliximab decreases the CD4⁺CD28⁻ T cell compartment in peripheral blood in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, **24** : 351–354, 2004.
- 40) Bryl E, Vallejo AN, Weyand CM, et al. : Downregulation of CD 28 expression by TNF- α . *J Immunol*, **167** : 3213–3238, 2001.
- 41) Brown AK, Quinn MA, Karim Z, et al. : Presence of significant synovitis in rheumatoid arthritis patients with disease-modifying antirheumatic drug-induced clinical remission : evidence from an imaging study may explain structural progression. *Arthritis Rheum*, **54** : 3761–3773, 2006.
- 42) Williams MA, Bevan MJ. : Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol*, **25** : 171–192, 2007.
- 43) McInnes IB, al-Mughales J, Field M, et al. : The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med*, **2** : 175–182, 1996.
- 44) Petrovic-Rackov L, Pejnovic N. : Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, **25** : 448–452, 2006.
- 45) Kageyama Y, Takahashi M, Torikai E, et al. : Treatment with anti-TNF-alpha antibody infliximab reduces serum IL-15 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, **26** : 505–509, 2007.