慢性関節リウマチ患者末梢血および滑液リンパ球の IL-2 産生・ IL-2 に対する反応性の異常

岡田 純・柏崎禎夫*

Abnormal production of and response to interleukin-2 in peripheral blood and synovial fluid lymphocytes in rheumatoid arthritis The cell surface phenotypes and interleukin-2 related function were studied employing lymphocytes from peripheral blood(PB)and synovial fluid(SF)of patients with rheumatoid arthritis(RA). The numbers of IL-2R positive and Ia positive lymphocytes from peripheral blood of patients with RA were increased when compared to normal blood. Con A activated lymphocytes both from PB and SF in patients with RA produced decreased IL-2. In contrast, unstimulated PB lymphocytes from RA patients, who had active disease and whose disease duration was less than 3 years, showed increased proliferation response to IL-2($P<0.01$). RA SF lymphocytes showed increased response to IL-2 than PB lymphocytes with RA($P<0.01$). In synovial fluid, numbers of $2H4^+CD4$ cell were decreased. Those abnormalities in T lymphocytes from RA patients appeared to play an important role in pathogenesis of RA.

Jun Okada・Sadao Kashiwazaki*

* Department of Internal Medicine, School of Medicine Kitasato University

key words: interleukin 2, rheumatoid arthritis, synovial fluid

慢性関節リウマチ(RA)の病態形成の一因として、免疫異常の関与が推測されている。RAにおける細胞性免疫の異常として、末梢血 suppressor T リンパ球の機能低下¹⁾や、関節液中での Ia 陽性・活性化T細胞数の増加が報告されている²⁻⁵⁾。RA 病変の主座である滑膜でも、活性化した CD4 陽性 helper T 細胞が増加し、Ia 陽性単球との細胞相互作用が注目されている²⁾。これら活性化したT細胞のRA病態形成における役割の重要性が推測されるが、T細胞機能の解明はいまだ十分ではない。

一方、interleukin 2(IL-2)は、T細胞の活性化・増殖には欠かせない lymphokine である。すなわち、抗原や interleukin-1(IL-1)により刺激されたT細胞は、その表面に IL-2 receptor(IL-2R)を表現する。この IL-2R 陽性T細胞は、IL-2 により増殖することが明らかにされている。さて、RA におけるT細胞の IL-2 の産生能および IL-2 に対する反応性については、いまだ一定の成績は得られていない⁶⁻⁸⁾。

そこで、本研究では、RA 末梢血および滑液T細胞について、T細胞表面 marker および IL-2 の産生能、IL-2 反応性を検討し、早期 RA では、IL-2 に対する反応性が亢進していることを見いだしたので報告する。

対象と方法

(1) 対象

classical または definite RA 患者の末梢血リンパ球ま

たは関節液リンパ球を用いた。対照として健常人の末梢血リンパ球を用いた。

(2) リンパ球の分離・分画

末梢血および滑液リンパ球は、比重遠心法にて型のごとく単核球細胞に分離した⁴⁾。ついで、単核球細胞は10% fetal calf serum(FCS)加 RPMI 1640培養液中に浮遊し、Petri dish 中にて 37°C 5% CO₂ 加湿恒温槽にて16時間培養後、非付着細胞を回収した。これを nylon wool カラムに加え 37°C 30分間培養した。カラムに5% RPMI 1640培養液を加えて得られた nylon wool カラム非付着細胞をT細胞とし以後の実験に用いた⁴⁾。

(3) リンパ球の IL-2 に対する反応性

10% FCS 加 RPMI1640 培養液に 1×10^5 /well として浮遊した単核球細胞に 0.1 unit の human recombinant IL-2(rIL-2: TGP-3, 武田薬品)を添加し、96 well 丸底 plate(Nunc 社)にて 37°C で24時間培養した。細胞収穫の4時間前に各 well に ³H-thymidine を 0.5 μ Ci 添加した。細胞を glass filter に収穫後、液体シンチレーターにて放射活性を測定した。

(4) リンパ球の IL-2 産生能

培養液に 2×10^6 /ml となるように単核球を浮遊し、10 μ g/ml の濃度の concanavalin A(Con A)を添加して試験管内で48時間培養後、上清を回収し、以後の実験に用いた。

(5) IL-2 活性の測定

IL-2 依存性T細胞 line である CTLL-2 を用いて IL-2 活性を測定した。すなわち、培養液に 1×10^3 /well

* 北里大学医学部内科学教室

表1 surface markers of T cells in peripheral blood and synovial fluid T cells

monoclonal antibodies	T cells		
	normal PB (17)*	RA PB (25)	RA SF (7)
CD4/CD8 Ratio	2.5 ±1.1**	2.1 ±0.9	0.56 ±0.4
Ia(DR)	5.1% ±6.1	2.35% ±13.3 ^{a)}	38.5% ±18.5 ^{b)}
IL-2R	7.0 ±4.6	11.4 ±10.1 ^{a)}	n.d.

* () number of cases

** mean ± SD

a) significant difference ($P < 0.05$) between RA PB and normal PB.b) significant difference ($P < 0.01$) between RA SF and normal PB.

n.d.: not done

表2 T cell markers in RA synovial fluids

monoclonal antibodies	percent
CD4	36.6 ± 6.6*
CD4 ⁺ 4B4(helper)	28.6 ± 8.7
CD4 ⁺ 2H4(suppressor/inducer)	1.4 ± 0.1
CD8(suppressor/killer)	54.5 ± 12.1

Four cases of RA were examined.

* mean ± SD

として浮遊した CTLL-2 に倍々稀釈した培養上清を添加し、37°C 24時間培養した。細胞収穫の4時間前に各wellに³H-thymidineを0.5 μci添加し、DNA合成能を測定した。IL-2活性はGillsなどのprobit法¹⁰⁾により算出した。

(6) T細胞の細胞表面 marker

間接 rosette 法にて測定した⁴⁾。すなわち、T細胞 1×10^5 と monoclonal 抗体(L243, IL-2R, Beckton Dikens 社, T4, T8, 2H4, 4B4, Colter Clon 社)とを4°C 30分間反応後、Hanks 液にて洗浄後、抗マウス IgG 標識 immunobead(BIO-RAD 社)を加えた。ついで、Fisher 遠心器で1,000 G 15秒間遠心し、30分間静置後、pelleteをほぐし検鏡し、5個以上の beads を保有していたものを rosette 陽性と判定した。CD4, CD8 細胞の 2H4, 4B4 陽性細胞の算定には Epics C(Colter 社)による two color analysis を用いた¹¹⁾。

結 果

① 末梢血の T 細胞表面 marker (表1) での CD4/CD8 比は、健常人と RA 患者とに差はなかったが、RA 患者滑液 T 細胞でのそれは0.56と著明な低下が認められ

表3 IL-2 production by Con A stimulated lymphocytes

disease	No. of cases	IL-2 production (unit)
normal PBL	10	8.98 ± 5.06*
RA PBL	25	5.85 ± 6.15
RA SFL	5	3.00 ± 1.39 ^{a)}

* mean ± SD

a) significant difference ($P < 0.01$) between RA synovial fluid lymphocyte (SFL) and normal peripheral blood lymphocyte (PBL).

た。Ia 陽性 T 細胞数は RA 末梢血、滑液ではそれぞれ、23.5%、38.5%と有意の増加がみられた。IL-2R 陽性細胞数も、健常人の7%に対して RA 11%と健常人のそれとくらべて有意の増加($P < 0.05$)がみられた。すなわち、RA の末梢血および滑液中では活性化 T 細胞が増加していることが推測された。

滑液中の CD4/CD8 比の異常をさらに検討するため、CD4 細胞を helper 細胞と suppressor inducer 細胞にわけることが可能な 4B4, 2H4 抗体を用いて解析した。suppressor inducer(2H4)の CD4 陽性細胞は1.4%ときわめて低値で、CD4 細胞のほとんどが helper T 細胞であった(表2)。すなわち、RA 滑液では CD8 細胞は存在していても、suppressor inducer 細胞が不足している状態にあると考えられた。

② Con A 刺激による健常人の末梢血リンパ球の IL-2 産生能は平均 8.98 ± 5.06 UNIT であったのに対して、RA 末梢血リンパ球では 5.85 ± 6.15 と低下し、RA 滑液リンパ球ではさらに 3.00 ± 1.39 と有意な低下($P < 0.01$)が認められた(表3)。

③ リンパ球の IL-2 反応性と RA の活動性との関係を検討した(図1)。健常人末梢血での IL-2 反応性は 36 CMP であったが、発症3年未満の活動性 RA は、IL-2 反応性は 205 CPM と有意に著明な亢進を示した($P < 0.01$)。しかし、非活動期には 62 CPM と低下していた。発症3年以上の活動性 RA も、IL-2 反応性は 111 CPM と健常人にくらべて増加していたが、その程度は軽度で、非活動期との間に有意差は得られなかった。

④ RA の末梢血と滑液中のリンパ球の IL-2 反応性を同時に採取した検体を用いて検討した(図2)。IL-2 添加せずにみた DNA 合成能では、末梢血と滑液との間には有意差は認められなかったが、IL-2 添加時には滑液 T 細胞の DNA 合成能は有意に増加($P < 0.01$)していた。

考 察

IL-2 は T 細胞の増殖・分化に欠かせない lymphokine

図 1 Proliferation responses to IL-2 were examined under unstimulated condition

Patients with active disease had increased response to IL-2 compared to patients with inactive disease ($P < 0.05$). Especially, patients with active disease and with short disease duration (< 3 years) had significantly increased response to IL-2 ($P < 0.01$). () indicate number of cases.

である。慢性関節リウマチでは、末梢血リンパ球の IL-2 の産生能や反応性に関する報告はあるが、いまだ一致した成績が得られていない。

そこで、本研究では、RA 患者の末梢血および滑液のリンパ球を用いて IL-2 の産生能および反応性を検討した。RA 患者末梢血では IL-2 産生能は低下していたが、反応性は特に発症早期の活動性 RA 患者で亢進していた。滑液でも IL-2 の産生能は低下していたが、その反応性は末梢血よりはさらに亢進していた。すなわち、RA では、IL-2 の産生は低下しているにもかかわらず、その反応性は逆に亢進していることが示唆された。

RA では、滑膜の活性化した macrophage が IL-1 を産生し、末梢血の単球も RA の発症時または増悪時には IL-1 の産生が増強することが報告されている¹²⁾。さらに、SPA 刺激の RA 末梢血リンパ球は早期または再燃時に IL-2 に対する反応性が亢進していると報告されている⁸⁾。すなわち、RA では単球による IL-1 の産生が亢進し、それにより T 細胞は活性化され、ついで IL-2 に対する反応性が増強するものと推測される。したがって、滑液中の T 細胞が IL-2 に対する反応性が著明に亢進していたことを明らかにした本研究の成績は注目され

図 2 Proliferation response to IL-2 were compared between peripheral blood (PB) and synovial fluid (SF) lymphocytes in patients with RA. ^3H -TdR incorporations of SF were significantly increased with addition of IL-2 ($P < 0.05$). SF lymphocytes showed significantly higher proliferation response to IL-2 than PB lymphocytes ($P < 0.01$).

る。また、RA 患者末梢血では、活性化 T 細胞である Ia および IL-2R 陽性細胞が増加しており、滑液でも Ia 陽性 T 細胞が著明に増加していたことは、上述の結果を支持するものと考えられる。末梢血・滑液の T 細胞の IL-2 に対する反応性の亢進が、特に RA の早期で著明であったことは RA の病態形成を考えるうえで重要な所見と考えられる。

一方、滑液中では、リンパ球の IL-2 反応性は亢進していたが、その IL-2 産生能は低下していた。しかも、CD8 細胞は増加していたが、suppressor inducer である 2H4 陽性 CD 4 細胞¹⁴⁾が、滑液中で著明に低下していたことは、滑液で活性化した T 細胞の増加が suppressor T 細胞の機能障害と関連しているものと考えられる。

滑液中の IL-2 活性に関しては、IL-2 活性が存在するとの報告があるが、いまだ結論は得られていない^{7,13,15)}。これは、滑液中に IL-2 inhibitor が存在するために、滑液をゲル濾過などにて分画せずに測定すると IL-2 活性が陰性となる可能性も考えられる。本研究でも、滑液 T 細胞は末梢血 T 細胞よりはさらに活性化した状態にあったが、この T 細胞からの IL-2 の産生は低下していた。筆者らも滑液中の IL-2 活性の検出を試みたが、その存在を確認できなかった。すなわち、滑液では、IL-2 は不足状態にあると考えられる。これが RA の病態の原因であるのか結果であるのかは、今後明らかにする重要な課題と考えられる。

結 語

① RA 末梢血では、IL-2R 陽性および Ia 陽性 T 細胞が増加していた。

② IL-2 産生能は、RA 末梢血リンパ球でも RA 滑液リンパ球でも低下していた。

③ 発症早期の活動性 RA では IL-2 に対する反応性が高まり、これは RA 早期の関節病変形成にかかわるものとして注目された。

④ RA 患者滑液中でも Ia 陽性 T 細胞は増加しているが、T4 suppressor inducer T 細胞は減少していた。一方、IL-2 に対する反応性は亢進していたが、その産生能は低下しており、滑液では IL-2 の不足状態にあると考えられた。

文 献

- 1) Janossay G., Duke, O., Poulter, L.W., Panayi, G., Bofill, M., Goldstein, G.: Rheumatoid arthritis: a disease of T lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* 2: 839, 1981.
- 2) Tosato, G., Steinberg, A.D., Blaese, R.M.: Defective EBV-specific suppressor T cell function in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 305: 1238-1243, 1984.
- 3) Galili, U., Roesenthal, L., Klein, E.: Activated T cells in the synovial fluid of arthritic patients. *J. Immunol.* 127: 430-432, 1981.
- 4) Yu, D.T.Y., Winchester, R.J., Fu, S.M. et al.: Peripheral Blood Ia-positive T cells; increase in certain diseases and after immunization. *J. Exp. Med.* 151: 91-100, 1980.
- 5) Kato, K., Okada, J., Kashiwazaki, S.: The role of Ia positive T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 6: 1-5, 1986.
- 6) Silver, R.M., Redelman, D., Zvaifler, N.J.: Studies of rheumatoid synovial fluid lymphocytes. A comparison of their behavior with blood mononuclear cells in the autologous mixed lymphocyte reaction and response to TCGF. *Clin. Immunol. Immunopath.* 27: 15-27, 1983.
- 7) Nouri, A.M.E., Panayi, G.S., Goodman, S.M.: Cytokines and the chronic inflammation of rheumatic disease. II. The presence of interleukin-2 in synovial fluid. *Clin. Exp. Immunol.* 59: 402-409, 1984.
- 8) Tan, P., Shore, A., Leary, P., Keystone, E.C.: Interleukin abnormalities in recently active rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 11: 593-596, 1985.
- 9) Combe, B., Pope, R.M., Fischbach, Darnell, B., Baron, S., Talal, N.: Interleukin-2 in rheumatoid arthritis: production of and response to interleukin-2 in rheumatoid synovial fluid, synovial tissue and peripheral blood. *Clin. Exp. Immunol.* 59: 520-528, 1985.
- 10) Gills, S., Ferm, M.M., Ou, W., Smith, K.A.: T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* 120: 2027, 1979.
- 11) 田沢裕光, 水越正信, 鈴木英夫: フローサイトメトリーを用いた表面免疫グロブリン陽性細胞の検出. *臨床病理* 33: 389-292, 1985.
- 12) Shore, A., Jaglal, S., Keystone, E.C.: Enhanced interleukin 1 generation by monocytes *in vitro* is temporally linked to an early event in the onset or exacerbation of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 65: 293-302, 1986.
- 13) Wilkins, J.A., Warrington, R.J., Sugurdson, S., Rutherford, W.J.: The demonstration of an interleukin-2 like activity in the synovial fluids of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 10: 109-113, 1983.
- 14) Morimoto, C., Letvin, N.L., Rudd, C.E., Hagan, M., Takeuchi, T., Schlossman, S.F.: The role of the 2H4 molecule in the generation of suppressor function in Con A-activated T cells. *J. Immunol.* 137: 3247-3253, 1987.
- 15) Miossec, P., Kashiwado, T., Ziff, M.: Inhibitor of Interleukin 2 in rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 30: 121-129, 1987.