
原 著

傍腫瘍性神経症候群の宿主要因としての 制御性 T 細胞機能遺伝子発現の解析

谷 卓

新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞医学専攻

分子情報医学講座神経内科学分野専攻

(主任：西澤正豊教授)

Functional Gene Expressions of Regulatory T cell in Paraneoplastic Neurological Syndromes

Takashi TANI

Neurology, Molecular Neuroscience and Brain Diseases,

Course for Molecular and Cellular Medicine,

Niigata University Graduate School of Medicine

(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

要 旨

【背景と目的】傍腫瘍性神経症候群（PNS）は、担癌患者に自己免疫学的機序により生じる特徴的な神経症候群であり、腫瘍抗原により活性化された免疫系が腫瘍との交差抗原を持つ神経組織を傷害する機序が考えられている。同一組織型を持つ担癌患者のなかで PNS を発症する頻度は 1% 前後とされ、発症症例には何らかの宿主要因が存在する可能性が推測される。一方、自己免疫疾患では免疫自己寛容の破綻が生じていると考えられており、近年、末梢性免疫寛容に重要な働きを担う CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞（Treg）との関連が注目を集めている。本研究では、PNS における免疫制御系の動態を Treg 分画の機能遺伝子の発現を定量的に評価することで、免疫制御系の機能異常が PNS の宿主要因である可能性を検討することを目的とした。

【方法】肺小細胞癌（SCLC）を伴う Lambert-Eaton 筋無力症症候群（LEMS）（LEMS 群）、抗 Hu 抗体症候群（Hu 群）、抗 Yo 抗体症候群（Yo 群）について、神経症候のない SCLC（SCLC 群）および健常者（HC 群）を対照として、末梢血のリンパ球亜分画分布パターンをフローサイトメーターを用いて比較し、さらにセルソーターで分取した Treg 分画の機能遺伝子

Reprint requests to: Takashi TANI
Neurology Brain Research Institute of
Niigata University
1-757 Asahimahi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学脳研究所神経内科学分野

谷 卓

mRNA (FOXP3, TGF- β 1, CTLA-4, GITR) 発現をリアルタイム RT-PCR 法で定量的に解析した。

【結果】リンパ球亜分画分布パターンでは各群間に明らかな差はみられなかった。LEMS 群では神経症状を呈さない SCLC に比べ、FOXP3, CTLA-4 の発現が低下していた。また、Hu 群、Yo 群では神経症状のない SCLC に比べ FOXP3, TGF- β 1 発現が低下していた。

【結論】PNS 患者末梢血では、免疫制御に関わる Treg の複数の機能遺伝子に発現低下がみられ、PNS における Treg の機能低下を示唆する所見と考えられた。Treg の機能低下は、免疫寛容の破綻を引き起こし、自己免疫機序による組織傷害を生じうるため、PNS の宿主要因になりうると思われた。

キーワード：傍腫瘍性神経症候群, 制御性 T 細胞, リンパ球サブセット解析, FOXP3, TGF- β 1, CTLA-4

はじめに

傍腫瘍性神経症候群 (paraneoplastic neurological syndrome; PNS) は、腫瘍の直接浸潤や圧迫、治療の副作用、感染、梗塞、代謝障害などによらず、免疫反応による遠隔作用により神経徴候を来す特異な自己免疫疾患である¹⁾。その病態は、腫瘍が提示する抗原に対して誘導された免疫応答が、交差抗原を持つ神経組織をも攻撃する機序が考えられている。PNS の多くは、腫瘍原発組織と神経症状との間に一定の関連を持って病型毎に特徴的な自己抗体が産生され、神経症状の出現と自己抗体の検出は腫瘍の発見に先立つことが多いことから、背景腫瘍発見の有用なマーカーとなることがある。Lambert-Eaton 筋無力症症候群 (LEMS) は肺小細胞癌を背景とし、神経筋接合部シナプス前部でのアセチルコリン放出に必要な電位依存性カルシウムチャンネルに対する自己抗体が産生されることにより、チャンネルが機能不全をおこし、アセチルコリン放出が障害され筋無力症状を来すのがその病態であり²⁾、LEMS 患者血清 IgG を神経筋接合部標本に添加することで LEMS と同様の病態を再現できることから、本症では抗体そのものが直接病態に関わると考えられる。一方、抗 Hu 抗体陽性 PNS および抗 Yo 抗体陽性 PNS では、罹患神経組織に対応する特異的抗神経抗体が存在することから、当初はその抗体による組織傷害が考えられていたが、動物への抗体移入実験でモデルが作れないこと、傷害組織に、

限られた T 細胞受容体を有する CD8 陽性 T 細胞が oligoclonal に浸潤していることや、罹患神経組織の神経細胞が MHC class I 分子を発現していることなどから、細胞傷害性 T 細胞による病態機序が考えられている³⁾⁴⁾。

PNS の病初期には、腫瘍の発育が遅かったり転移が抑制されていることが知られている。このことは PNS では腫瘍に対する免疫反応も亢進し、腫瘍の発育、転移を抑制している可能性を示唆している¹⁾。また、担癌患者の中でも PNS 発症例は 1% 前後と少なく、同じ組織型の癌患者においても PNS を発症する例は限られていることから、PNS 発症例に特殊な宿主要因が存在していることが推測される。以上のことから、我々は PNS 患者の宿主要因の一つの可能性として免疫制御系の異常を想定した。

免疫寛容は、中枢性免疫寛容と末梢性免疫寛容に分けられ、中枢免疫寛容は胸腺や骨髄における自己反応性リンパ球の淘汰であり、末梢性免疫寛容は不完全な中枢免疫寛容の結果生じた自己反応性免疫細胞の末梢における不活化である⁵⁾。近年、Sakaguchi らにより末梢性免疫寛容に重要な役割を担う CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞 (Treg) が、自己反応性 T 細胞の活性化を制御する細胞としてその存在が証明された⁶⁾。その後、Treg の master gene が *forkhead/winged-helix family transcription factor, Foxp3* であることが発見され^{7)–9)}、ヒトに関しても並行して immune dysregulation polyendocrinopathy, enteropathy,

X-linked syndrome (IPEX) や X-linked autoimmunity - allergic dysregulation syndrome (XLAAD) で *FOXP3* 変異が原因であることが判明した¹⁰⁾⁻¹²⁾. また, Treg 機能分子として, Foxp3 の制御下に発現する Cytotoxic T lymphocyte - associated antigen 4 (CTLA-4) は, Treg の表面マーカーで, 抗原提示細胞 (APC) などに出発されている B7 ファミリー分子と結合し, 免疫抑制に関与する. CTLA-4 によって誘導される transforming growth factor- β (TGF- β) は, 局所の免疫系を抑制し, Glucocorticoid - induced tumor - necrosis factor receptor family related molecule (GITR) も, APC 表面の GITR リガンドと結合し免疫抑制に関与する.

マウスにおいては CD4 陽性 CD25 陽性分画がほぼ Treg であるが, ヒトにおいてはその分画には多量の活性化 T 細胞が混在するため, Treg の検討においては通常純度の高い CD4 陽性 CD25 強陽性分画が用いられる. 近年, ヒトにおけるさまざまな自己免疫疾患, 腫瘍性疾患でも Treg 分画の分布頻度, 機能異常の報告がなされているが¹³⁾⁻¹⁵⁾, 自己免疫疾患の一つである PNS においては, Treg に関する報告はこれまでなされていない. PNS において Treg の機能低下があるという我々の作業仮説を検証するために, 今回我々は PNS 患者末梢血におけるリンパ球亜分画の解析と Treg の機能分子の定量的発現解析を施行した.

対象と方法

1. 対象

肺小細胞癌 (SCLC) を伴う LEMS 患者 (LEMS 群) 5 名, SCLC を背景に持つ抗 Hu 抗体陽性 PNS (Hu 群) 2 名, 乳癌を背景に持つ抗 Yo 抗体陽性 PNS (Yo 群) 3 名, 疾患対照群として神経症状のない SCLC 患者 (SCLC 群) 4 名, および健常者 (HC 群) 22 名について, 書面によるインフォームドコンセントを得て, ヘパリン加で 10ml 採血し解析に用いた. 対象の SCLC は, 細胞診, もしくは組織診により診断された. また,

LEMS は臨床症状, 経過と電気生理学的診断法および血清中の電位依存性 Ca チャンネルに対する抗体 (抗 VGCC 抗体) の検出により診断された. また, 抗 Hu/Yo 抗体陽性 PNS は, 特徴的な臨床症状, 経過と Hu/Yo リコンビナント蛋白を用いたウエスタンブロット法による抗 Hu/Yo 抗体の確認によって診断された.

2. モノクローナル蛍光抗体

細胞の分画マーカーとして, Fluorescein isothiocyanate (FITC) 結合 CD4 抗体 (Sigma - Aldrich), Allophycocyanin (APC) 結合 CD25 抗体, Phycoerythrin (PE) 結合 CD62L 抗体, APC - Cy7 結合 CD8 抗体, APC 結合 CD56 結合抗体, APC 結合抗 CXCR3 抗体, PE 結合抗 CCR4 抗体, PerCP - Cy5.5 結合 CD3 抗体, PerCP - Cy5.5 結合 CD4 抗体 (BD Biosciences Pharmingen) を用いた. 細胞ラベルに用いた抗体の濃度は, その推奨濃度に従った.

3. フローサイトメトリー

対象より得た末梢血を塩化アンモニウム溶液溶血法により溶血させて白血球浮遊液を作成し, モノクローナル蛍光抗体の組み合わせ (CD4 \times CD8 \times CXCR3, CD4 \times CCR4, CD4 \times CD25 \times CD62L, CD4 \times CD45RA) を 4°C で 45 分反応させた後にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 1 回洗ったものをフローサイトメーター (FACSAria, BD 社) で解析した. 検定にはウィルコクソンの順位和検定を用いた.

4. Treg 機能遺伝子発現解析

1) 細胞ソーティングおよび cDNA テンプレートの作成

対象より得た末梢血から Ficoll 比重遠心法で単核球を採取し, CD4 (FITC), CD25 (APC), CD62L (PE) 抗体を 4°C で 45 分反応させ, FACSAria セルソーターを用いて CD4 陽性リンパ球分画から CD4 陽性 CD25 強陽性 CD62L 強陽性分画を, CD25 分画の上位 3% となるように 10000 個程度を分取した (図 1). ソーティングし

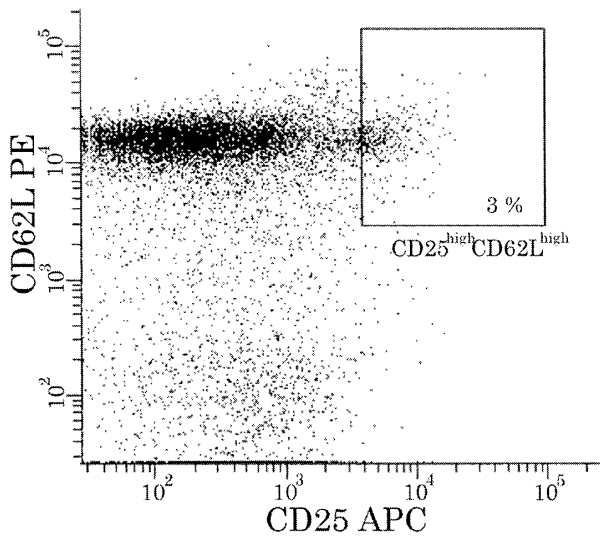


図1 Tregが集簇するCD4⁺CD25^{high}CD62L^{high}分画対象のPBMCをCD4, CD25, CD62Lのモノクローナル蛍光抗体でラベルし、フローサイトメーターで解析した。リンパ球とCD4⁺でゲートをかけ、Tregが多く含まれるCD25^{high}CD62L^{high}分画をソーティングして分取し、機能遺伝子発現解析に用いた。

た細胞からRNeasy Mini Kit (QIAGEN社)でRNAを抽出し、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN社)で逆転写してcDNAテンプレートを作成した。

2) 定量的RT-PCR

FOXP3, TGF- β 1は、検証されたプライマー・プローブセット (QIAGEN社)とQuantiTect Probe Kit (QIAGEN社)を用い、ABI PRISM 7900によりRT-PCRを行った。CTLA-4, GITRは、検証されたプライマーセット (QIAGEN社)とQuantiTect SYBR Green Kit (QIAGEN社)を用い、同様にRT-PCRを行った。いずれも対照遺伝子をGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)とし、定量的解析には検量線法を用いて濃度を測定し、PBMC (7×10^6 個)から同様に得たコントロールcDNAテンプレートとの発現比を検定した。検定にはウィルコクソンの順位和検定を用いた。

結 果

1. リンパ球亜分画分布パターン

リンパ球亜分画分布パターン (図2)では、CD4, CD8の他に、Th1, Tc1のマーカーとしてCXCR3を、Th2のマーカーとしてCCR4を用い、末梢血における陽性細胞の頻度を比較した。その結果、CD4/CD8比ならびにTreg分画 (CD4陽性CD25強陽性CD62L強陽性)、ナイーブT分画 (CD4陽性CD45RA強陽性)、Th1分画 (CD4陽性CXCR3強陽性)、Th2分画 (CD4陽性CCR4強陽性)、Tc1分画 (CD8陽性CXCR3強陽性)の頻度に群間の有意差は認めなかった。

2. Treg 遺伝子発現の定量的解析

末梢血単核球におけるTregの機能評価のために、Tregが集簇するCD4陽性CD25強陽性CD62L強陽性分画を分取し、Treg機能遺伝子であるFOXP3, TGF- β 1, CTLA-4, GITRのmRNA発現を測定し、発現比を示した (図3)。FOXP3発現においては、LEMS群の発現がSCLC群より低く (平均 \pm SD 52.5 ± 42.1 対 193.7 ± 102 ; $P = 0.034$)、Hu/Yo群も同様にSCLC群より低かった (44.0 ± 28.5 対 193.7 ± 102.0 ; $P = 0.02$)。また、TGF- β 1においてもHu/Yo群がSCLC群より低値であった (0.45 ± 0.09 対 0.99 ± 0.32 ; $P = 0.02$)。CTLA-4ではLEMS群がSCLC群より発現レベルが低かった (1.83 ± 1.70 対 5.55 ± 1.61 ; $P = 0.037$)。GITRでは群間に有意差がみられなかった。

考 察

PNSの病態は、腫瘍が通常神経組織のみに発現されている自己抗原を表出することにより、腫瘍免疫が生じ、交差抗原を持つ神経組織傷害することであるが、同じ組織型を持つ症例でも発症する例は限られる。神経症状の有無に関わらず腫瘍そのものの抗原分子の発現には差がないとされることから、PNS発症例には何らかの宿主要因があることが推測されるが、我々はその要因として末梢

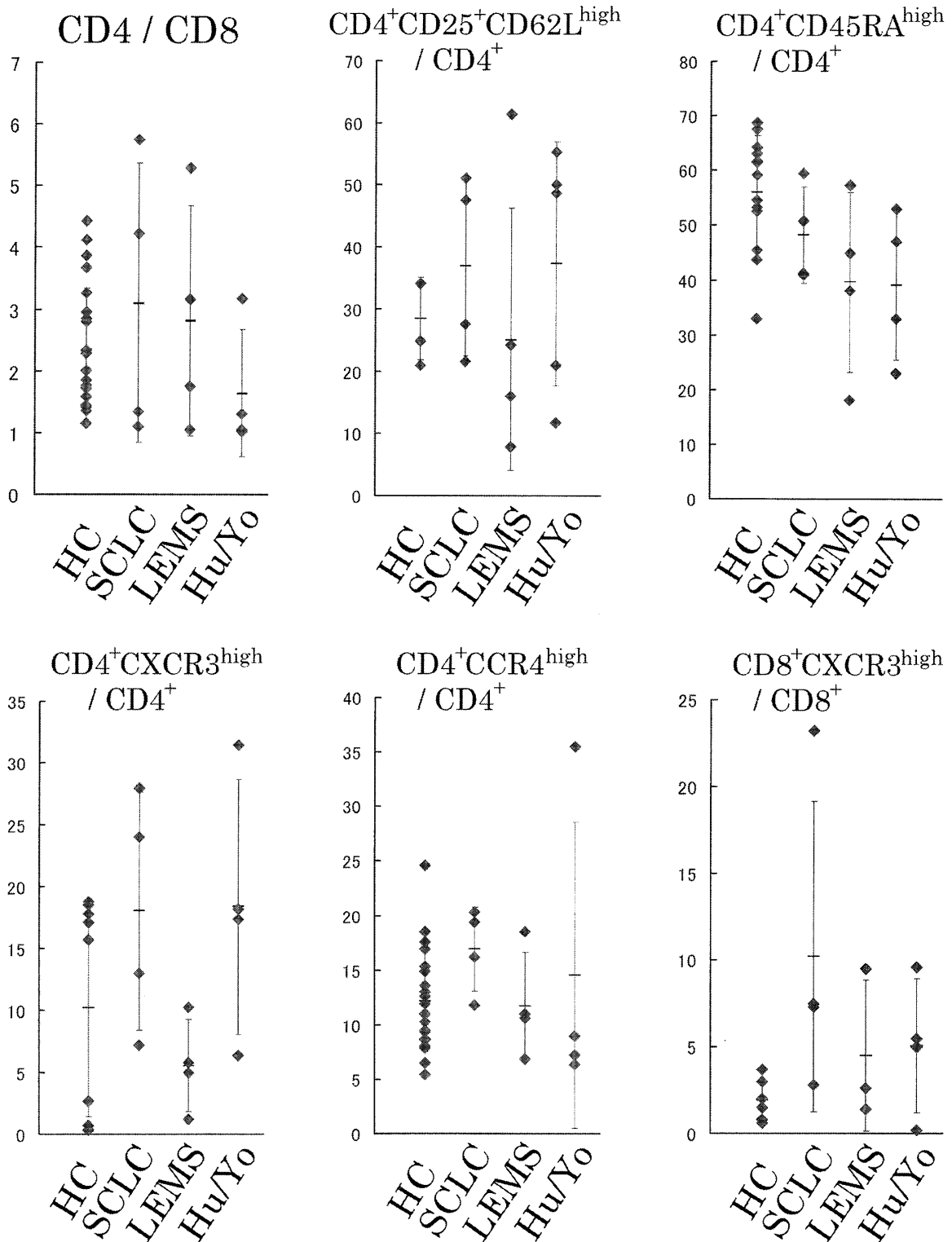


図2 リンパ球サブセット解析

対象末梢白血球を、表示した表面抗原対応蛍光モノクローナル抗体でラベルして頻度を解析した。CD4/CD8比, Tregを多く含む分画 (CD4⁺CD25⁺CD62L^{high}), ナイーブT細胞分画 (CD4⁺CD45RA^{high}), Tヘルパー1分画 (CD4⁺CXCR3^{high}), Tヘルパー2分画 (CD4⁺CCR4^{high}), 細胞障害T1分画 (CD8⁺CXCR3^{high})の頻度には、明らかな群間の差は認められなかった。

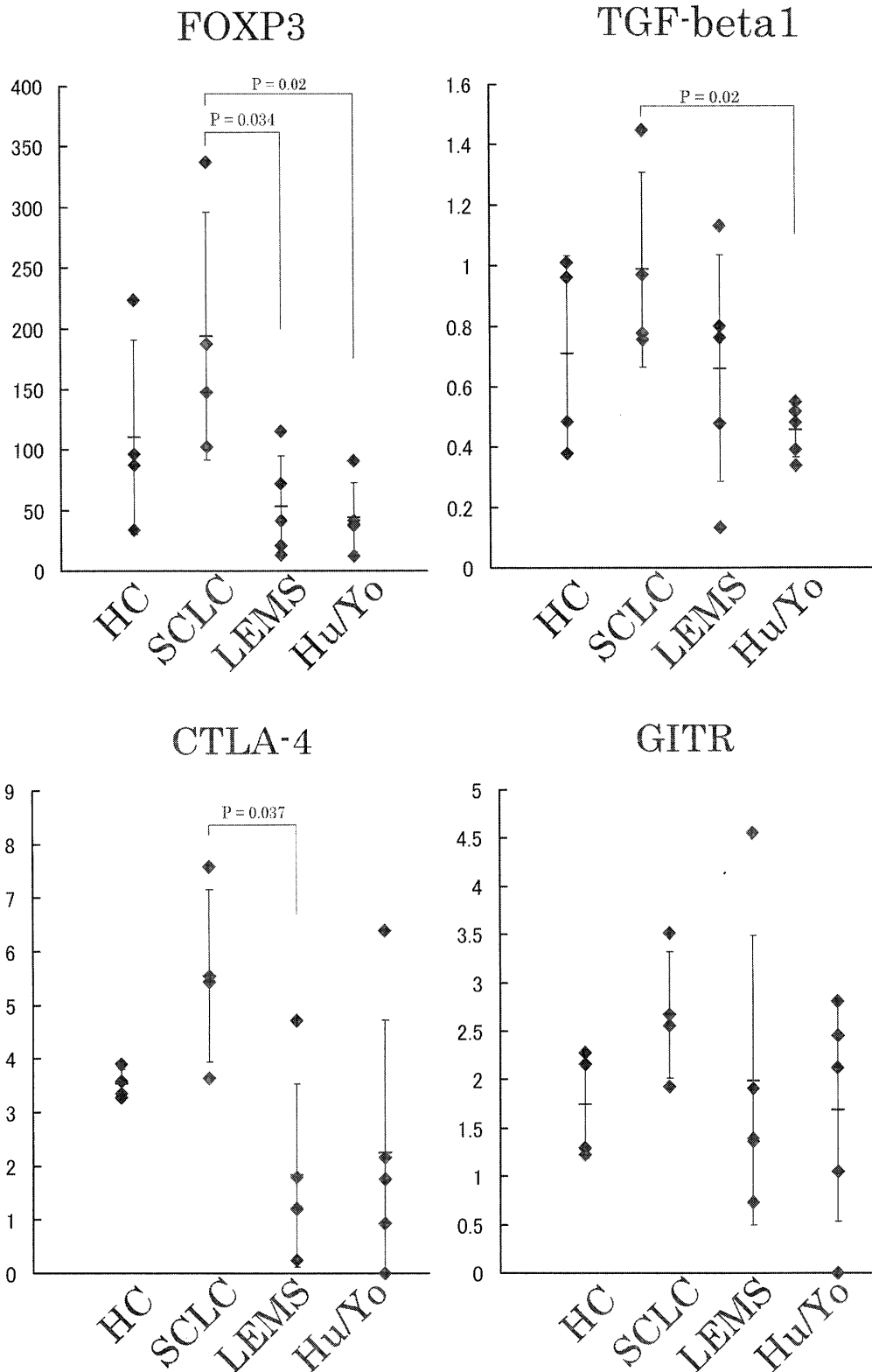


図3 Treg 機能遺伝子発現解析

ソーティングした Treg リッチ CD25^{high} CD62L^{high} 分画から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法で機能遺伝子発現レベルを定量し、対象 cDNA との発現比で示した。FOXP3 は SCLC 群に比べ LEMS 群、Hu/Yo 群で発現が低下していた。TGF- β 1 は SCLC 群に比べ Hu/Yo 群で発現が低下していた。CTLA-4 は SCLC 群に比べ LEMS 群で発現が低下していた。

免疫寛容の低下が背景にある可能性を考え、それを検証するために、リンパ球亜分画分布パターン解析ならびに Treg を多く含む CD4 陽性 CD25 強陽性 CD62L 強陽性分画において機能遺伝子発現を定量的に解析した。その結果、リンパ球亜分画分布パターンでは群間に差異を認めなかったが、遺伝子発現解析では神経症状のない SCLC 症例に比べ PNS 症例で複数の Treg 機能遺伝子で mRNA の発現低下を認めた。これらは PNS における免疫制御系の低下を示唆する結果と考えられる。

対象遺伝子との比較発現比は、*FOXP3* で数十～数百倍と大きかったが、他の *TGF-β1*, *CTLA-4*, *GITR* といった遺伝子では数倍以下の値しか示さなかった。この差は各遺伝子の転写・誘導機構の差であると考えられる。Treg のマスター遺伝子である *FOXP3* を強制発現させたナイーブ T 細胞は *CTLA-4*, *GITR*, *CD103* といった Treg 表面マーカーを表出し、活性化リンパ球抑制機能を示すことから、*FOXP3* が *CTLA-4*, *GITR* といった遺伝子の誘導に関与していると考えられるが、直接の転写因子であるかどうかはまだ明らかではない。*TGF-β*, *CTLA-4*, *GITR* といった分子は非制御性 T 細胞にも表出されている機能分子であることから、並列的に他の転写因子の影響を受けている可能性も考えられる。

Treg の頻度、機能の変動は、他の自己免疫疾患や腫瘍疾患においても報告されている。Hafler らは多発性硬化症患者の末梢血で Treg の機能低下があることを報告した¹³⁾。潰瘍性大腸炎の末梢血でも CD4 陽性 CD25 陽性 CD45RO 陽性分画の頻度低下と、疾患活動性とその分画の頻度が逆相関していることが報告されている¹⁶⁾。全身性エリテマトーデスでも Treg の頻度の低下が報告されており¹⁷⁾¹⁸⁾、自己免疫疾患では Treg の頻度、機能とも低下していることが推測される。また、一般に担癌患者では、腫瘍に対する免疫応答が抑制されることで腫瘍が進展するとされ、実際、担癌患者の末梢血や胸水、腹水などの浸出液、腫瘍および周囲の組織で Treg の頻度が上昇していることが報告されており、この増加した Treg が免

疫系を抑制し、腫瘍の発生、進展に関与していることが推測されている¹⁹⁾。このように自己免疫疾患や腫瘍性疾患において Treg に関する多くの報告があるが、PNS についてはこれまで報告されていなかった。この報告は、PNS における免疫制御系の低下に関する最初の論文である。

この報告では、PNS を LEMS 群と Hu/Yo 群 2 つのグループに分けた。LEMS では抗 VGCC 抗体が神経筋接合部の興奮収縮連関を阻害することが原因と考えられており、主に液性免疫を主体とする群である。Hu/Yo 群では細胞傷害性 T 細胞が主役を担うと考えられていることから、病態の違いのために 2 群に分けて解析したが、両群とも SCLC 群と比較し Treg 機能遺伝子の表出が低下していた。病態は異なるものの両者とも腫瘍を背景として神経組織に対する免疫応答が亢進する自己免疫疾患であり、免疫制御系機能遺伝子の発現低下がその背景にあることが確認された。

Treg の機能評価のため *FOXP3* の発現を解析する方法として、主に 2 種類の手法が使われている。すなわち PCR を用いた mRNA 定量と Foxp3 の細胞内染色である。mRNA 定量においては、全 PBMC や CD4 陽性 CD25 陽性リンパ球を分母とした検討では *FOXP3* の発現量は少なく、また活性化 T 細胞などの Treg 以外の細胞の混入により mRNA の相対量に変動が生じやすいという欠点を有する。他の手法である Foxp3 細胞内染色においては、Treg を CD25 表出の強弱にかかわらず他の細胞から区別して評価でき、Treg の頻度や細胞 1 つ 1 つにおける Foxp3 の発現なども評価可能であるが、細胞内染色ではパラホルムアルデヒドによる固定操作が必要であり、定量的解析が困難であるという欠点を持つ。

Treg の表面マーカーとして CD25 が用いられるが、Foxp3 細胞内染色による検討では CD25 弱陽性～陰性の亜分画にも低頻度ながら Foxp3 陽性の Treg が存在し、逆に強陽性分画でも Treg にわずかながら活性化 T 細胞の混入があることから、CD25 は十分に特異的なマーカーとは言い難い。より特異的な Treg の表面マーカーの発見が待たれるところである。CD103, *GITR* など比較的

Treg 特異的とされている他の表面マーカーとの multi color ソーティングでは感度, 特異度ともさらに高くなる可能性がある. ヒトの場合, Treg の検討に CD25 を表面抗原として用いた場合, CD25 強陽性分画は通常上位 4~10% であるが²⁰⁾, 本研究では CD4, CD25 に CD62L のマーカーを加え, さらに CD25 上位 3% を分取することで, より特異的な Treg 分画を分取し解析に用いた.

結 論

PNS における末梢血単核球 Treg リッチ分画 (CD4 陽性 CD25 強陽性 CD62L 強陽性) の機能遺伝子発現を評価し, その結果, 神経症状のない肺小細胞癌と比べ, PNS では同分画の Treg 機能遺伝子発現に低下を認め, PNS 症例では宿主要因として免疫制御系に機能異常が存在する可能性が示唆された.

謝 辞

本研究を直接ご指導いただきました脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野の田中恵子助教授およびご校閲いただきました西澤正豊教授に深く感謝申し上げます.

文 献

- 1) Bataller L and Dalmau J: Paraneoplastic neurologic syndromes. *Neurologic Clinics N Am* 21: 221 - 247, 2003.
- 2) Takamori M, Maruta T and Komai K: Lambert-Eaton myasthenic syndrome as an autoimmune calcium-channelopathy. *Neurosci Res* 36: 183 - 191, 2000.
- 3) 田中恵子: 神経疾患と自己抗体. *脳神経* 58: 189 - 198, 2006.
- 4) 田中恵子: 傍腫瘍性神経症候群の病態機序. *臨床神経* 41: 1150 - 1152, 2001.
- 5) Wing K, Fehérvári Z and Sakaguchi S: Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol* 18: 991 - 1000, 2006.
- 6) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and Toda M: Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor α -Chains (CD25). *J Immunol* 155: 1151 - 1164, 1995.
- 7) Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF and Ramsdell F: Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27: 68 - 73, 2001.
- 8) Khattri R, Kasprowicz D, Cox T, Mortrud M, Appleby MW, Brunkow ME, Ziegler SF and Ramsdell F: The Amount of Scurf Protein Determines Peripheral T Cell Number and Responsiveness. *J Immunol* 167: 6312 - 6320, 2001.
- 9) Fontenot JD, Gavin MA and Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330 - 336, 2003.
- 10) Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF and Ochs HD: The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27: 20 - 21, 2001.
- 11) Chatila TA, Blaeser F, Nga Ho, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C and Bowcock AM: JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 106: R75 - 81, 2000.
- 12) Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Prohl S, Appleby M and Brunkow ME: X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27: 18 - 20, 2001.
- 13) Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL and Hafler DA: Loss of Functional Suppression by CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in Patients with

- Multiple Sclerosis. *J Exp Med* 199: 971 - 979, 2004.
- 14) Jyh - Hong L, Li - Chieh W, Yu - Tsan L, Yao - Hsu Y, Dong - Tsamn L and Bor - Luen C: Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 117: 280 - 286, 2006.
- 15) Xiu HY, Yamagiwa S, Ichida T, Matsuda Y, Sugahara S, Watanabe H, Sato Y, Abo T, Horwitz DA and Aoyagi Y: Increase of CD4+CD25+ regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 45: 254 - 262, 2006.
- 16) Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiwa Y, Harada N and Nawata H: An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 51: 677 - 686, 2006.
- 17) Crispin JC, Martinez A and Alcocer - Varela J: Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 21: 273 - 276, 2003.
- 18) Liu MF, Wang CR, Fung LL and Wu CR: Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 59: 198 - 202, 2004.
- 19) Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S and Mills KHG: Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF- β - Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4+ and CD8+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 177: 896 - 904, 2006.
- 20) Meignin V, Régis Peffault de Latour, Zuber J, Régnaultc A, Mounier N, Lemaître F, Dastot H, Itzykson R, Devergie A, Cumano A, Gluckman E, Janin A, Bandeira A and Socié G: Numbers of *Foxp3*-expressing CD4+CD25^{high} T cells do not correlate with the establishment of long-term tolerance after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 33: 894 - 900, 2005.

(平成19年1月5日受付)