

令和元年6月8日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10834

研究課題名(和文) 原発性および続発性眼内リンパ腫におけるリンパ腫細胞の眼内浸潤機構の解析

研究課題名(英文) Pathological and molecular analysis for intraocular cell invasion of primary or secondary intraocular lymphoma

研究代表者

高橋 洋如 (TAKAHASHI, Hiroyuki)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80750786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、眼内リンパ腫細胞の眼内への遊走・集積メカニズムを明らかにすることを目的とし、眼内リンパ腫疑い患者の眼の前房水、硝子体液を検体として採取し、病理学的診断、フローサイトメトリー、PCRによる免疫グロブリン遺伝子鎖解析、液内サイトカインの測定による診断と、検体の収集を進めた。細胞成分を用いて腫瘍細胞株の樹立を試みたが、手法の確立には至らなかった。また本研究の過程で、慢性活動性EBウイルス感染症の患者において、眼内リンパ腫類似の眼内炎症像を呈することがわかり、浸潤機構の解析により、眼内EBウイルスDNAの上昇および治療への反応性など新しい知見を得ることができ、国際誌に報告することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で取り組んだ眼内リンパ腫は眼科疾患において比較的稀な疾患であるが、中枢神経リンパ腫の発症と強く関係していることから、その早期診断は患者の生命予後に影響を与える重要な課題である。本研究では浸潤機構を解明するにあたって必要な検体の収集を十分に行えた。腫瘍細胞株の樹立に至らなかったが、研究の継続によって今後の進展が期待できるものである。また、同時に慢性活動性EBウイルス感染症の眼内細胞浸潤の病像を論文に報告することができた。本疾患も生命予後に関わる疾患であり、初期症状としての眼初見を明らかできたことは社会的に意義があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of current study was to investigate ocular specimen pathologically and molecular biologically, and to reveal the mechanism of ocular cell invasion in patients with primary and secondary intraocular lymphoma. Aqueous humour and vitreous fluid of patients with intraocular lymphoma were collected and analysed using pathological diagnosis, flow cytometric analysis, genomic analysis of immunoglobulin, and measurement of cytokine. We also tried to culture cell line of intraocular lymphoma using collected cell component, but finally the procedure was not validated during the study period. On the other hand, intraocular cell invasion in patients with chronic active Epstein-Barr virus infection (CAEBV) was also investigated using the same methods. As a result, the elevation of EBV-DNA was detected and response to chemoradiotherapy was revealed. We reported the uveitis associated with CAEBV for international academic journal.

研究分野：眼科学

キーワード：眼内リンパ腫 ぶどう膜炎 PCR法 前房水 硝子体液

1. 研究開始当初の背景

眼内リンパ腫は、網膜色素上皮下や硝子体に病変の主座を有するリンパ腫の一病型であり、その発症頻度は全リンパ腫病型の約1%と非常に稀な疾患である。眼内リンパ腫は、感染性または自己免疫性の眼内炎症性疾患であるぶどう膜炎に類似の臨床像をしばしば呈し、我が国のぶどう膜炎疫学調査では、その約1%を占めることが報告されている。しかし、眼内リンパ腫はぶどう膜炎と異なり、視覚障害の原因になる事のみならず、高率に中枢神経系に進展し生命予後が極めて不良な疾患であるため、迅速かつ正確な診断が不可欠である。

リンパ腫の診断には病理学的診断が必要かつ不可欠であるが、眼内よりリンパ腫細胞による混濁を除去する目的で行われる硝子体切除術などで得られる眼内リンパ腫細胞の量はごく僅かであり、また眼球内から得られる細胞成分はしばしば変性を来しているため、病理学的診断は困難な事が多い。これに対して、近年では眼内から得られた微量検体を用いての分子遺伝学的手法が、眼内リンパ腫診断に有用であるとの報告が多数なされている。すなわち、PCR法によるB細胞受容体重鎖遺伝子再構成の検出が有効であるとの報告や、硝子体液中のインターロイキン(IL)-10とIL-6の比が、ぶどう膜炎では1以下が多いことに対して眼内リンパ腫ではしばしば1以上となり、診断に有用であるとの報告などである。病理学的診断にこれらの検査結果を加味する事で、眼内リンパ腫の診断率は向上しつつあり、それらの手法を用いて我々はこれまでに30例を越す眼内リンパ腫症例に対し診断、治療を行ってきた。しかしこれらの検査を行うためには、熟練した眼科医による手術操作と、十分な研究設備が必要となる。しかしこのような環境を全ての眼科臨床施設で揃えることは難しく、より簡便かつ特異性の高い眼内リンパ腫の診断標的分子の同定が望まれていた。また、腫瘍細胞が眼内および中枢神経に局限して進展することが特徴だが、なぜリンパ腫細胞がこれらの組織を標的として集積するかについては明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、眼内リンパ腫患者における眼内浸潤腫瘍B細胞が眼内に遊走、集積するメカニズムを明らかにする事を目的として、眼内リンパ腫患者眼局所より得られた腫瘍B細胞株および硝子体液に対して、ケモカイン、接着分子などの各種免疫関連分子およびその受容体の発現解析を行う。本研究から得られる情報により、眼内への腫瘍B細胞の浸潤に関わる重要な分子が同定される事が予想され、また眼内リンパ腫の新たな診断マーカー、治療標的分子が同定される事が期待される。

3. 研究の方法

眼内リンパ腫患者、また対照として眼内リンパ腫に病態が類似するサルコイドーシスなどの炎症眼、さらには網膜前膜などの非炎症眼から、眼内リンパ腫検査または消炎、混濁除去治療目的で硝子体切除術を行い、約1.0mlの硝子体液を採取する。採取した硝子体液は主に次項に述べる病理学的検査、分子免疫学的検査に用い、残存した硝子体液をそれぞれの患者より文書による同意を得た上で本研究に使用する。採取した硝子体液は直ちに遠心分離を行い、液性成分は後日の解析に備えて凍結保存し、細胞成分は培養に用いる。眼内リンパ腫が疑われる患者の硝子体液のうち、約0.3mlを当院病理部に提出し、病理細胞診断を行う。腫瘍細胞は眼内に浸潤した時点で膨化、変性を来し、病理細胞診断で偽陰性の結果となることを避けるため、免疫グロブリン重鎖遺伝子のV領域とJ領域それぞれにプライマーを設計し、患者硝子体液約0.1mlからDNAを分離したのちにPCRを施行し、硝子体液における腫瘍B細胞群の存在を、遺伝子レベルで検出する。同様に、免疫グロブリン軽鎖のモノクローナリティーを検出するため、免疫グロブリン鎖と鎖それぞれに特異的な蛍光標識抗体で患者硝子体液0.3mlに対して二重染色を行い、フローサイトメトリーにてその偏りを検索する。鎖、鎖いずれかへの優位な偏りの有無をもって、腫瘍B細胞群の存在を蛋白レベルで検出できる。患者硝子体液約0.1mlを用いて、IL-10とIL-6をELISAにて測定し、補助診断として用いる。以上、病理細胞診断、PCRとフローサイトメトリーによる免疫グロブリンのモノクローナリティー検索、眼内リンパ腫に特徴的なIL-10/IL-6発現パターンを調べる事で、眼科的臨床所見を加味して総合的に眼内リンパ腫の診断を行い、確定診断された硝子体液約0.3mlおよび浸潤細胞を用いて、以後の研究を行う。

眼内リンパ腫患者から採取した硝子体液の細胞成分を用いて、既報に準じて腫瘍B細胞株を樹立、培養する。樹立したB細胞株は、前述のPCR法およびフローサイトメトリーを行い、クローナリティーの確認を行うとともに、検体採取時に行った分子学的諸検査と同一の結果が得られるかについて、PCR増幅産物の分子量および鎖の偏移パターンをもって確認する。これにより、得られたB細胞株のキャラクターが患者眼内に浸潤していたB細胞と同一のものであるかを確認し、以後の解析に

用いる。細胞株化した腫瘍 B 細胞は、十分な細胞数が得られたのちに、以後の実験に備え細胞保存液を用いて液体窒素下で凍結保存する。

眼内リンパ腫患者眼局所より樹立した腫瘍 B 細胞株の細胞表面における、各種ケモカイン受容体、接着分子の発現についてフローサイトメトリーを用いて検索する。対照として健常人末梢血に細胞分離カラムを用いて B 細胞を分離し、同様の実験に用いる。検索対象の候補分子としては、Chan ら (Chan CC, et al. Ophthalmology. 2003;110:421-6) が 3 例の剖検眼で検出した CXCR4, CXCR5 を含め、ケモカイン受容体および接着分子を合わせ約 30 種を予定した。また、検出されたケモカイン受容体については、B 細胞株からメッセンジャー RNA を抽出し、Real-time PCR を用いて遺伝子発現を確認する。眼内リンパ腫、およびぶどう膜炎、網膜前膜患者から採取した硝子体液の上清成分に対して、抗体アレイを用いて各種サイトカイン、ケモカイン、接着分子の発現を検索する。抗体アレイ (RayBio 社製サイトカインアレイキット) は数十マイクロリットルの微量検体から多項目のサイトカイン、ケモカイン、接着分子を同時測定できるものである。

4. 研究成果

(1) 眼内リンパ腫細胞の眼内浸潤機構の解析

本研究は、眼内リンパ腫細胞の眼内への遊走・集積メカニズムを明らかにすることを目的とし、眼内リンパ腫患者眼局所検体から得られる腫瘍細胞および硝子体液を解析、検討するものであり、今年度は眼内リンパ腫疑い患者の眼検体を収集して解析し、病理細胞診断、セルブロック法による病理組織診断、フローサイトメトリー、PCR による免疫グロブリン重鎖遺伝子再構成の検出、サイトカイン解析によるインターロイキン (IL)-10 の検出および IL-10/IL-6 比の上昇の検索を行い、病理学的・分子生物学的に眼内リンパ腫の診断に至った検体の収集を引き続き行った。眼内リンパ腫患者眼局所より樹立した腫瘍 B 細胞株の細胞表面における、各種ケモカイン受容体、接着分子の発現についてフローサイトメトリーを用いて検索する予定であったが、腫瘍細胞株の樹立には困難が多いことがわかり、今後の検討項目となった。

(2) 慢性活動性 Epstein-Barr ウイルス感染症の眼内細胞浸潤

本研究の過程で、慢性活動性 EB ウイルス感染症による眼内リンパ腫類似の眼内炎症像を明らかにする事ができた。これについては、更なる眼内検体に対する分子学的解析を行ったところ、全身症状に先行して、眼内浸潤病変が出ることや、局所治療には抵抗するが、全身放射線化学療法が眼病変を軽快させることなど、新しい知見を得ることができた。慢性活動性 EB ウイルス感染症の眼内病変とその分子生物学的検査の特徴について、症例報告として国際専門誌に報告することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

Takahashi H, Takase H, Arai A, Mochizuki M, Ohno-Matsui K. Bilateral granulomatous panuveitis in two patients with T-cell type of chronic active Epstein-Barr virus infection. BMC Ophthalmology 査読あり 2019 19(1):83.

〔学会発表〕計 2 件

高橋洋如、高瀬博、新井文子、寺田裕紀子、鴨居功樹、望月學、大野京子 両眼性肉芽種性汎ぶどう膜炎像を呈した EB ウイルス陽性 T リンパ増殖症の 2 例 第 119 回日本眼科学会総会 平成 27 年

高橋洋如、高瀬博、新井文子、寺田裕紀子、鴨居功樹、望月學、大野京子 両眼性肉芽種性汎ぶどう膜炎像を呈した EB ウイルス陽性 T リンパ増殖症の 2 例 (日本眼科学会学術展示優秀賞受賞口演) 第 69 回日本臨床眼科学会 平成 27 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高瀬 博

ローマ字氏名：(TAKASE, hiroshi)

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：眼科

職名：講師
研究者番号（8桁）：20451940

研究分担者氏名：鴨居 功樹
ローマ字氏名：(KAMOI, kojū)
所属研究機関名：東京医科歯科大学
部局名：眼科
職名：講師
研究者番号（8桁）：40451942

研究分担者氏名：島田 典明
ローマ字氏名：(SHIMADA, noriaki)
所属研究機関名：東京医科歯科大学
部局名：眼科
職名：助教
研究者番号（8桁）：40547460