

機関番号：34417

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791102

研究課題名 (和文) サルコイドーシスにおける $\gamma\delta$ T細胞の異常と病因病態への関与研究課題名 (英文) Association between $\gamma\delta$ T cells abnormalities and pathogenesis in sarcoidosis.

研究代表者

植田 郁子 (UEDA IKUKO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：80452100

研究成果の概要 (和文)：

$\gamma\delta$ T細胞の絶対数や頻度、 $\gamma\delta$ T細胞上のCD62L、CD69の発現は正常人と患者の間に差はなかった。末梢血中V δ 2+細胞の頻度が減少し、V γ 9+細胞の頻度が増加しており、患者で $\gamma\delta$ T細胞レパートアの異常が認められた。PMAとionomycinによる刺激を加えた後、 $\gamma\delta$ T細胞のサイトカイン産生の異常の有無を検討し、IFN- γ 産生が亢進している患者がみられた。IFN- γ を加え単球を培養したところ、単球の細胞数が増加することが確認された。したがって $\gamma\delta$ T細胞はIFN- γ を異常に産生し、サルコイドーシスの病態に関与している可能性が推測された。

研究成果の概要 (英文)：

No significant differences in the absolute number of $\gamma\delta$ T cells and the proportion of $\gamma\delta$ T cells, and cell surface expression of CD62L and CD69 were observed in sarcoidosis patients. Abnormality of $\gamma\delta$ T cells repertoire were observed; the frequency of V δ 2+ cells was decreased and the frequency of V γ 9+ cells were increased in sarcoidosis patients compared to control. After the stimulation PMA plus ionomycin, $\gamma\delta$ T cells from some patients have increased production of IFN- γ . It was confirmed that IFN- γ induced the proliferation of monocyte. $\gamma\delta$ T cells may related to the pathogenesis of sarcoidosis by abnormal production of IFN- γ .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚生理学・サルコイドーシス・ $\gamma\delta$ T細胞

1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシスは、肺、リンパ節、皮膚、眼、心臓、筋肉など全身諸臓器に乾酪壊死のない類上皮細胞肉芽腫が形成される疾患で、現在でもその原因は不明であるが、疾患感受性のある宿主が環境中の何らかの抗原物質

(起因体)に曝露されて Th1 タイプの過敏性免疫反応が誘導されることが示されている。これまでこの感染因子に関して数々の検討がなされてきたが本症の起因体が一体どのようなものであるかはいまだ確定されていない。形成される病変が乾酪壊死の有無を除

けば結核性肉芽腫に類似しており、病変部には好酸性の封入体を認めること、ツベルクリン反応が発症とともに陰性化することなどから、結核との関連性がうたがわれてきたが、本症は元来伝染性はなく病変部から結核菌は培養されていない。他方、アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) が本症病変部から高率、多量に検出されることが報告され、アクネ菌に対して Th1 タイプの過敏性免疫反応を有する人では、何らかの環境要因を契機に局所で異常増殖する菌を標的として、肉芽腫形成が引き起こされる可能性が考えられている。

ヒトT細胞は、 $\alpha\beta$ 型および $\gamma\delta$ 型のT細胞受容体(TCR)を持つ細胞からなる。末梢におけるほとんどのT細胞が $\alpha\beta$ T細胞であるのに対し、 $\gamma\delta$ T細胞は1-5%とされている。これまでに $\gamma\delta$ T細胞は細胞内寄生性細菌の感染初期の防御機構に加え、感染局所の肉芽腫の形成に関与している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

これまでの報告よりサルコイドーシス患者において、T細胞がその発症に必須であることが知られているが、主要なT細胞である $\alpha\beta$ T細胞については多数の研究報告がみられるが、 $\gamma\delta$ T細胞に関する検討は未だ少ない。また本教室でのこれまでの研究により、単球は組織に浸潤し、マクロファージへと分化するが、これらがサルコイドーシスの病態に重要な役割を果たすことがわかっている。

したがって、本研究では $\gamma\delta$ T細胞の異常の有無についての検討、とくにそのサイトカイン産生の異常の有無と単球との関連の検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) サルコイドーシス患者における $\gamma\delta$ T細胞の絶対数と頻度の検討

蛍光色素で標識された抗 $\gamma\delta$ T細胞レセプター抗体と抗CD3抗体で末梢血細胞を染色し、 $\gamma\delta$ T細胞をフローサイトメトリーで検出した。 $\gamma\delta$ T細胞数と単球の細胞数との関連について検討するため、単球のマーカである蛍光色素標識抗CD14抗体、抗CD16抗体による染色も同時に行った。

(2) サルコイドーシス患者における $\gamma\delta$ T細胞のフェノタイプの解析

サルコイドーシス患者における $\gamma\delta$ T細胞が活性化しているかどうかを、表面分子の発現を蛍光色素で標識した特異抗体によりフローサイトメトリーにより測定した。CD69やCD62Lを活性化マーカーとして、その陽性細胞の頻度や、その発現量の違いを比較した。

(3) サルコイドーシス患者における $\gamma\delta$ T細胞レパトアの異常の有無

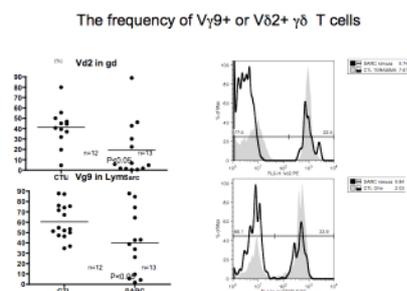
サルコイドーシス患者末梢血中の $\gamma\delta$ T細胞レパトアの異常について、蛍光色素標識抗TCRV δ 2抗体と抗V γ 9抗体を用いてフローサイトメトリーにより検討した。

(4) サルコイドーシス患者の $\gamma\delta$ T細胞のサイトカイン産生能の解析

サルコイドーシス患者より末梢血単核細胞を単離し、PMA+ionomycinの刺激を加え、4時間後に末梢血単核細胞を回収した。抗 $\gamma\delta$ T細胞レセプター抗体で細胞外染色し、その後、蛍光色素でラベルしたIFN- γ やTNF- α 、IL-17を特異的に認識する抗体を用いて細胞内染色することにより、サルコイドーシス患者由来 $\gamma\delta$ T細胞におけるサイトカイン産生の異常の有無をフローサイトメトリーで測定した。

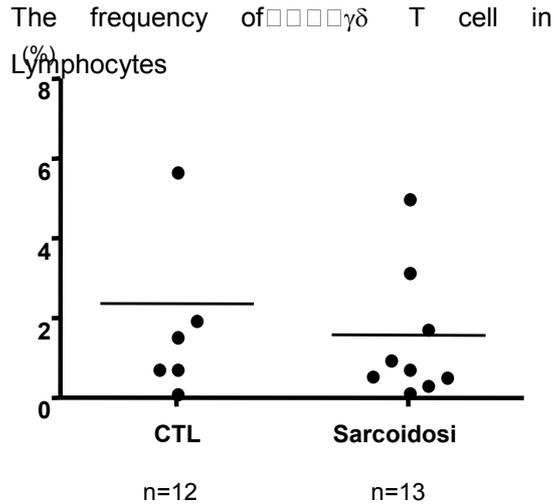
(5) IFN- γ が単球に及ぼす影響についての検討

IFN- γ が単球に及ぼす影響について、IFN- γ がヒトの単球の増殖を促進させるかどうかを細胞数の変化を検討する。

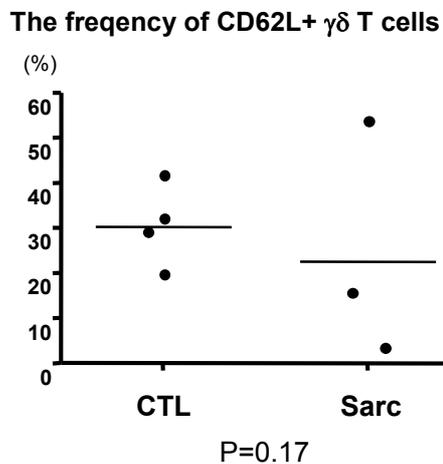


4. 研究成果

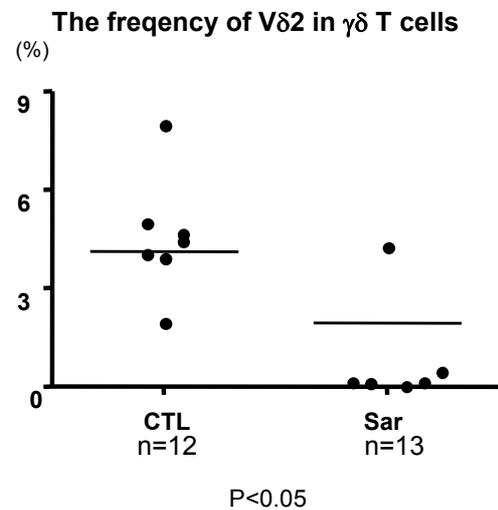
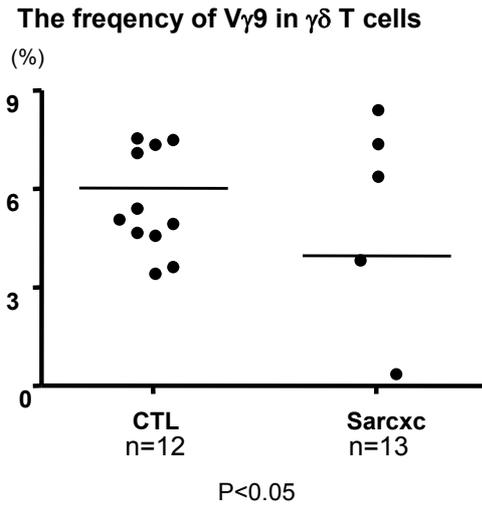
(1) サルコイドーシスにおける $\gamma\delta$ T細胞の絶対数やリンパ球における頻度についてフローサイトメトリーにより検討したが、正常人と比較し差はなかった。 $\gamma\delta$ T細胞数と単球の細胞数との相関について検討するため、抗CD14抗体、抗CD16抗体による染色も同時に行い検討したが、明らかな相関はみとめられなかった。



(2) サルコイドーシス患者における $\gamma\delta$ T細胞の表面分子の発現の異常を、フローサイトメトリーにより測定した。CD69の陽性の頻度およびその発現については正常人と比較し差はなかった。CD62Lの陽性の頻度について、サルコイドーシス患者で正常人と比較して低下している傾向がみられたが有意差はみとめられなかった。またCD62Lの発現に差はみとめられなかった。



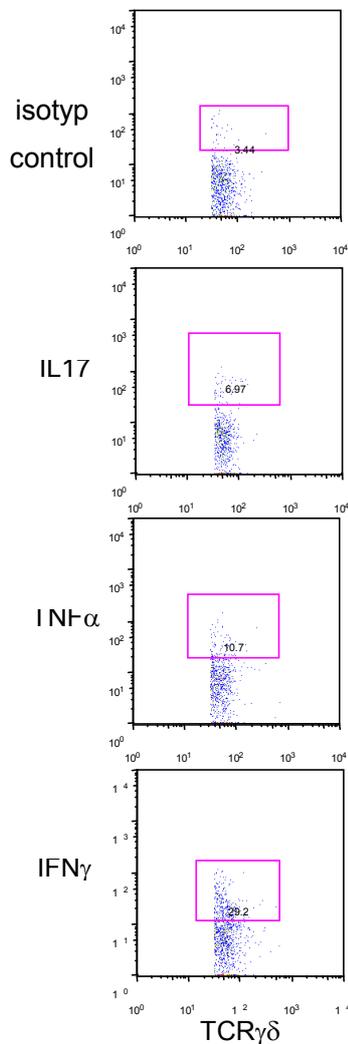
(3) 末梢血中の $\gamma\delta$ T細胞レパトアの異常の有無について抗TCRV δ 2抗体と抗V γ 9抗体を用いて検討した。V δ 2+ $\gamma\delta$ T細胞細胞の頻度が正常人に比較してサルコイドーシス患者で減少していることがわかった。またV γ 9+ $\gamma\delta$ T細胞細胞の頻度も同じくサルコイドーシス患者で低下していることがわかった。



(4) サルコイドーシス患者末梢血中の $\gamma\delta$ T細胞の機能異常について検討するため、正常人および患者の末梢血を採取し、単核球を単離したのち、PMAとionomycinによる刺激を加え、4時間後に末梢血単核細胞を回収し、抗 $\gamma\delta$ T細胞レセプター抗体で細胞表面を染色し、その後、刺激により $\gamma\delta$ T細胞が産生すると知られているIL-17、TNF α 、IFN- γ による細胞内

染色を行い $\gamma\delta$ T細胞によるこれらのサイトカイン産生を検討した。IL-17については正常人および患者の $\gamma\delta$ T細胞いずれにおいても、わずかに産生が認められたのみでほとんど産生していなかった。TNF α については、正常人および患者の $\gamma\delta$ T細胞いずれにおいても産生されていたが、正常人および患者で明らかな差は認められなかった。IFN- γ では正常人および患者の $\gamma\delta$ T細胞いずれにおいても産生されており、さらに産生が亢進している患者がみられた。今後正常人、患者ともにサンプル数を増やしさらに詳細に解析し検討する予定である。

The representative figure of intracellular staining of $\gamma\delta$ T cells



(5) これらのサイトカインが、サルコイドーシスの病態に重要であると知られている単球に

及ぼす影響につき、単球にこれらのサイトカインを加え培養し検討した。先の検討によりサルコイドーシスで産生が亢進している可能性が疑われたIFN- γ を加え単球を培養したところ、単球の細胞数が増加することが確認された。今後、これらの作用がIFN- γ によるものかどうか、IFN- γ を阻害する抗体などを用いてさらに詳細に検討したい。

(6)サルコイドーシスの病巣局所における $\gamma\delta$ T細胞の浸潤

抗 $\gamma\delta$ T細胞レセプター抗体を用いてサルコイドーシス患者より採取した皮膚組織を用いて組織染色を試みた。酵素抗体法による染色と、蛍光標識した抗 $\gamma\delta$ T細胞レセプター抗体を用いて蛍光顕微鏡で観察する方法を試みたが、 $\gamma\delta$ T細胞の頻度は低く、特異的な染色かどうかを十分判断することが困難であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Ikuko Ueda-Hayakawa, Minoru Hasegawa, Sayoko Kumada (他5名1番目), Usefulness of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and Rheumatoid factor to detect rheumatoid arthritis in patients with systemic sclerosis. Rheumatology. 49(11), 2135-9, 2010

② Mugii Naoki, Minoru Hasegawa, Yasuhito Hamaguchi, Ikuko Ueda-Hayakawa (他10名、7番目), Reduced red blood cell velocity in nailfold capillaries as a sensitive and specific indicator of microcirculation injury in systemic sclerosis. Rheumatology. 48(6), 696-703, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 郁子 (UEDA IKUKO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：80452100

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし