

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07942

研究課題名(和文)硝子体疾患における眼内Tリンパ球6-color flow cytometry解析

研究課題名(英文)6-color flow cytometry of intraocular T-lymphocytes in vitreous disease

研究代表者

稲葉 亨 (INABA, Tohru)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60203204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞性眼内リンパ腫(B-IOL)は硝子体混濁の主要な原因疾患であるが、病理組織検査が実施困難な場合も多く、しばしば診断に難渋する。一方、B-IOLは中枢神経系病変を合併しやすく致命的となり得るため、迅速かつ適切な診断が必要である。我々は6-color flow cytometryによりB-IOLでは他の硝子体混濁性疾患と比較して硝子体内の制御性Tリンパ球比率が低く、PD-1陽性細胞傷害性Tリンパ球が高値であることを示した。この所見は硝子体内IL10/IL6比と同様に、腫瘍細胞が硝子体内で明らかに増加する以前の段階から認めており、B-IOLの存在を病初期に示唆する有用な指標となることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B-IOLの診断は病理組織学的検索が困難なことが多く、現状では硝子体細胞診や免疫関連遺伝子検査が主な検査手段として用いられる。ただし、これらの検査は硝子体IL10/IL6比より感度が低く、結果判明まで時間を要する。今回、我々が用いた硝子体リンパ球FCMは迅速かつ定量的に結果を得ることが可能であり、硝子体内IL10/IL6比と同様にB-IOLの存在を病初期に示唆することで、B-IOL患者の予後改善につながると考えられる。また、B-IOLにおけるPD-1陽性Tc比率高値という結果はリンパ腫細胞の免疫学的逃避の主体と考えられ、B-IOLに対する免疫チェックポイント阻害剤の有用性を評価する意義がある。

研究成果の概要(英文)：Intraocular B-cell lymphoma (B-IOL) is one of the major causative diseases for vitreous opacity. But, the diagnosis of B-IOL seems often difficult because histopathological specimen is not easily obtained. On the other hand, B-IOL is frequently complicated by lethal central nervous system invasion. Therefore, prompt and accurate diagnosis is necessary for B-IOL. We analyzed the subset of intraocular T-lymphocytes obtained from the various patients with vitreous opacity including B-IOL using 6-color flow cytometry (FCM). As the result, lower ratio of CD4 positive regulatory T-lymphocytes and higher ratio of PD-1 positive cytotoxic T lymphocytes was found in B-IOL compared with other diseases. Such characteristic profile was detected even in the patients with suspicious B-IOL who had not diagnosed yet by morphological or genetic examinations. Therefore, FCM for intraocular T-lymphocytes seems useful for screening for B-IOL in early phase like as intraocular IL10/IL6 ratio.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：硝子体疾患 硝子体混濁 眼内Tリンパ球 フローサイトメトリー 悪性リンパ腫 制御性Tリンパ球 PD-1陽性細胞傷害性Tリンパ球 硝子体IL-10/IL-6比

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

硝子体混濁の原因には感染症、悪性腫瘍、サルコイドーシス等が挙げられるが、解剖学的位置関係や視機能温存の面から病理組織学的検査が困難で、原因疾患の特定に難渋することが多い。一方、病勢が進行すればADLが著しく障害されて失明に至る可能性もあり、さらに悪性リンパ腫では中枢神経系病変を発症しやすく致命的となるため、迅速かつ適切な診断が必要である。

我々は2008年から400例以上の硝子体混濁患者の硝子体内リンパ球の表面抗原を3 color flow cytometry (FCM)で解析し、Tリンパ球/Bリンパ球比率やCD4陽性Tリンパ球/CD8陽性Tリンパ球比率(CD4/CD8比)が硝子体混濁の原因疾患推定に有用であることを報告した(Kojima K, et al. Ophthalmol 119: 2012. Inaba T, et al. Int J Lab Hematol 2015. Nagata K, et al. Case Rep Ophthalmol 2015, Maruyama K, et al. Medicine 2016. )

その後、従来よりも多種類の抗原を同時解析可能な次世代FCMが臨床実装されるようになり、研究代表者の施設でも2 laser 6 color FCM機器が導入された。このため、従来から実施していた3 color FCMでのスクリーニングを6 color FCMにバージョンアップすることで、これまで検討出来ていなかった硝子体内Tリンパ球の細分画を詳細に解析することが可能となった。

### 2. 研究の目的

従来の研究から、サルコイドーシスでは眼内Tリンパ球CD4/CD8比3.5がスクリーニングに有用なこと、ヒトヘルペスウイルス性内眼炎(human herpes viral uveitis: HHVU)や原発性B細胞性硝子体網膜リンパ腫(B-PVRL)でしばしばCD4/CD8比<1.0となることが明らかとなったが、CD4/CD8比のみでは不十分でより、詳細な機能的細分画に関する検討が必要と思われる。

そこで2 laser FCM機器を用いて眼内Tリンパ球の表面抗原を同時に6種類解析することで、Tリンパ球の細分画のうち特にCD4陽性制御性Tリンパ球(regulatory T cell: Treg)およびPD-1陽性細胞障害性Tリンパ球(PD-1+ cytotoxic T cell: PD-1+ Tc)を中心に解析することで、硝子体混濁の原因推定や病態把握、更には適切な治療法選択に有用であるかを検討した。

また、硝子体内インターロイキン(interleukin: IL)-6やIL-10等のサイトカイン濃度測定が硝子体混濁の原因推定に有用であることも報告されているため、6-color FCMと併せて検討した。

### 3. 研究の方法

#### 対象症例)

2019年12月から2024年3月までの研究期間中に硝子体混濁に対して硝子体切除術を受けた患者のうち、6-color FCMに必要な硝子体内リンパ球(100個/本以上)を回収し得た51例(性別:男性15例、女性36例、年齢:51-86歳、中央値72歳)を対象とした。

#### 方法)

##### 1) 硝子体内リンパ球 FCM

硝子体切除術時に採取した灌流液10mLをフィルター濾過・遠心洗浄後0.7mLに再浮遊させて0.1mLずつ分注し、表2に示す蛍光標識抗体を添加し、Navios EXフローサイトメーター(Beckman Coulter)を用いて1本あたり5分間データ収集を行ない、Kaluza(Beckman Coulter)を用いて解析した。また、残り0.1mLからサイトスピン塗標本を作成し、May-Giemsa染色を実施した。

表1: 硝子体リンパ球 FCM に用いた蛍光標識 monoclonal 抗体の組み合わせ

No.	Fluorochrome-conjugated antibody						Subset
	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	
1	IgG1	IgG1	CD45	CD4	CD8	CD3	negative control
2	CD45RA	CD197	CD45	CD4	CD8	CD3	naive/memory
3	CD28	CD27	CD45	CD4	CD8	CD3	early/intermediate/late
4	CD57	CD279	CD45	CD4	CD8	CD3	exhausted T
5	CD127	CD25	CD45	CD4	CD8	CD3	regulatory T(T reg.)
6	kappa	lambda	CD45	CD19	CD20	CD3	T/B ratio, κ/λ ratio

##### 2) 硝子体内サイトカイン濃度

Bio-Plex マルチプレックスシステム(バイオ・ラッド・ラボラトリーズ、東京)を用いてIL-6, IL-10を含めた27種類の硝子体内サイトカイン濃度を網羅的に測定した。

##### 3) 硝子体内リンパ球遺伝子解析

硝子体内リンパ球よりDNAを抽出し、PCR法により免疫グロブリン重鎖(IgH)遺伝子あるいは

T細胞受容体(TCR)遺伝子を増幅後、キャピラリー電気泳動法(capillary electrophoresis: CE)で明瞭なピークを認めた場合を再構成ありと判断した。検査用試薬キットはABI Fluorescence Detection, PCRおよびCE用機器はVeriti96-well Thermal CyclerとABI PRISM 3130xl Genetic AnalyzerあるいはVeritti Dx Thermal Cyclerと3500xl DX Genetic Analyzerを用いた。

#### 4) 統計方法

統計解析ソフトウェア Just Make Plots (JMP)を用いて主要疾患別の中央値をSteel-Dwass法で比較し、 $p < 0.05$ を有意と判断した。

### 4. 研究成果

#### 1) 対象患者の内訳

解析可能症例51例の臨床診断はB-PVRL 16例(男性4例、女性12例、年齢中央値72歳)、サルコイドーシス8例(男性1例、女性7例、年齢中央値75歳)、HHVU 7例(男性4例、女性3例、年齢中央値64歳)、HTLV-1関連ぶどう膜炎(HTLV-1 associated uveitis: HAU) 3例(女性3例、年齢中央値73歳)、診断未確定17例(男性6例、女性11例、年齢中央値74歳、(B-PVRL疑い3例を含む)であり、これら5群間の患者年齢中央値には有意差は認めなかった。

各々の臨床診断はB-PVRLは細胞診 class 4または細胞診 class 3, IL-10/IL-6  $> 1$ , /  $> 3$  or 0.5, IgH再構成の2つ以上(Nakano S, et al. Ophthalmol 2021)、HHVUはmultiplex PCR陽性、サルコイドーシスは国際ワークショップ基準 probable(Mochizuki M, et al. Br J Ophthalmol 2019)、HAUは血清抗HTLV-1抗体陽性かつmonoclonalなT細胞増加(-)とした。

#### 2) 硝子体内Tリンパ球細分画比率

硝子体内CD3陽性/CD45強陽性(CD3+/CD45++)細胞数を分母として各々のTリンパ球細分画比率の中央値を疾患群毎に求めた結果を表2に示す。なお、下線で示した3項目は統計学的有意差を認めたため個別にデータを示す。

表2: 疾患群別眼内Tリンパ球細分画比率

Clinical diagnosis	CD4/8 ratio	CD4				CD8									
		RA- 197-	RA- 197+	RA+ 197+	25++ 127-	RA- 197-	RA- 197+	RA+ 197-	RA+ 197+	27- 28-	27+ 28-	27+ 28+	57+ 279-	279+	
B-PVRL (n=16)	1.5	23.3	47.1	13.5	<u>2.2</u>	26.8	33.2	6.4	16.0	4.0	16.0	67.3	0.2	<u>95.6</u>	
HAU (n=3)	1.1	29.1	58.7	5.0	48.9	14.4	36.3	8.6	15.0	21.3	25.5	47.9	1.6	62.4	
HHVU (n=7)	0.8	11.4	65.4	13.2	16.4	27.0	31.9	6.6	24.8	24.8	19.4	32.6	2.9	67.1	
Sarcoidosis (n=8)	<u>15.4</u>	28.1	59.1	4.0	8.5	15.1	27.6	11.6	27.7	20.6	19.3	45.5	2.1	61.1	
Unclassifiable (n=17)	3.1	28.6	50.4	13.6	10.1	30.2	25.0	12.6	30.4	14.8	14.7	53.0	2.9	64.8	

#### CD4/CD8 比

サルコイドーシスでは硝子体内Tリンパ球CD4/CD8比の中央値が15.4であったのに対し、他の4群では $< 3.5$ であった。但し、統計学的有意差はB-PVRL群に対してのみ認めた。

#### CD4陽性制御性Tリンパ球(Treg)比率(図1)

CD4陽性Tリンパ球においてTreg相当の表現型(CD25陽性/CD127陰性~弱陽性)を示す細胞集団の比率はB-PVRLでは中央値2.2%であり、HHVU、サルコイドーシス、診断未確定例に対して有意に低値であった。HHVUでは全例10%以上でありサルコイドーシスと比較して有意に高値であったが、HHVUの原因ウイルス別にTreg比率を検討するには症例数が不十分であった。

HAUは症例数が少なく統計学的有意差は認めていないが全例40%以上であり、HTLV-1がCD4陽性Tリンパ球分画中でTregやメモリー細胞に感染する結果と考えられる。なお3例とも細胞診はclass 2-3、TCR遺伝子再構成も認めておらず、腫瘍性T細胞の存在は否定的であった。

#### PD-1陽性細胞傷害性Tリンパ球比率(図2)

B-PVRLはHHVU、サルコイドーシス、診断未確定例と比較してCD8陽性細胞傷害性Tリンパ球におけるCD279(PD-1)陽性細胞集団(PD-1+ Tc)の比率が明らかに高値であった。また、診断未確定例にはB-PVRL疑い例が3例含まれており、いずれも85.0%以上であった。

図 1：疾患群別の硝子体内 CD4 陽性リンパ球における Treg 比率の比較

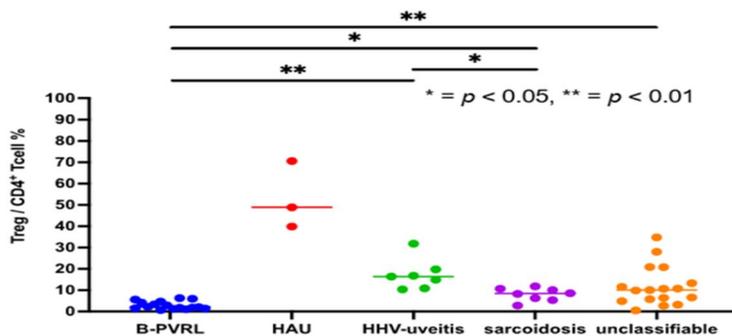
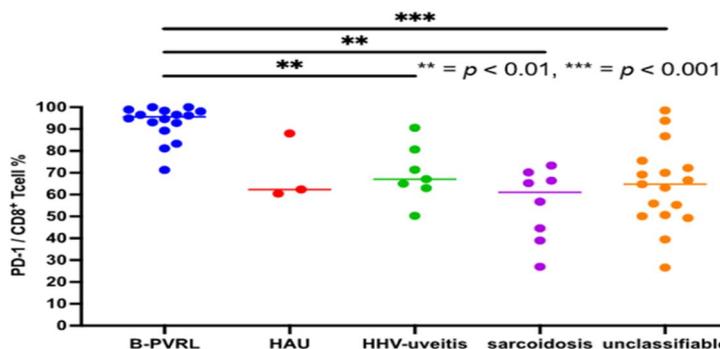


図 2：疾患群別の硝子体内 CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球における PD-1 陽性細胞比率の比較

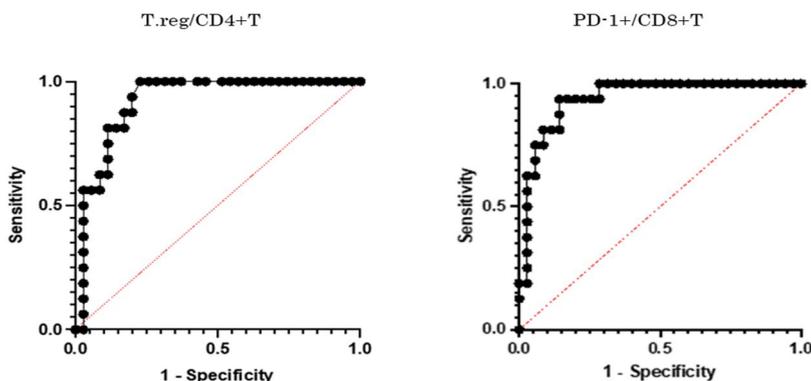


B-PVRL 診断における硝子体内 T リンパ球分画比率の診断特性 (図 3)

B-PVRL 診断における硝子体内 T リンパ球比率の診断特性を ROC 曲線から求めたところ、Treg はカットオフ値 6.3% の場合に AUC 0.921, 感度 100%, 特異度 77.1% となった。一方、PD-1+ Tc に関してはカットオフ値 81.2% の場合に AUC 0.939, 感度 93.8%, 特異度 85.7% となった。

B-PVRL 確定例 16 例および疑い例 3 例については Treg は全例カットオフ値以下であったが、PD-1+ Tc に関しては疑い例全例がカットオフ値以上であったのに対し、確定例では 2 例がカットオフ値以下であった。

図 3：B-PVRL 診断における Treg および PD-1 陽性細胞比率に関する ROC 解析



B-PVRL 疑い例での経時変化 (図 4)

Case 1 (B-PVRL 疑い例) は硝子体手術を 2 回受けたが、いずれも細胞診は class 2、硝子体内 B リンパ球 / の偏重発現の有無は検索出来ず、IgH 再構成も検出されなかったが、再手術時の IL-10/IL-6 比は著しく高値となった。一方、Treg 0.5%、PD-1+ Tc 98.5% であり、従来の B-PVRL 診断根拠で最も高感度とされる IL-10/IL-6 比の補助的検査としての有用性が示唆された。

B-PVRL では腫瘍細胞が網膜から硝子体内に遊離しなければ細胞診や / 偏重発現 IgH 再構成による確定診断は不可能であるが、硝子体内 Treg や PD-1+ Tc 比率は IL-10/IL-6 比と同様に、反応性 T リンパ球が硝子体内に遊離しておれば B-PVRL の存在を示唆するものと考えられる。

B-PVRL、HHVU、サルコイドーシスの代表例での FCM 検査結果を図 5 に示す。B-PVRL では CD8 陽性 T リンパ球での CD279 の発現率が高いだけでなく、発現強度も強いことが明らかである。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 稲葉 亨	4. 巻 50
2. 論文標題 血液検査室のためのフローサイトメトリー入門	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Technology	6. 最初と最後の頁 379-387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 稲葉 亨、松本和道	4. 巻 81
2. 論文標題 悪性リンパ腫の細胞表面抗原解析 診断の基本と応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 143-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 稲葉 亨、松本和道、抱 章子、西村博志	4. 巻 24
2. 論文標題 FCM検査の標準化 検査所見の付け方、留意点	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本検査血液学会誌	6. 最初と最後の頁 166-174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 稲葉 亨、松本和道	4. 巻 49
2. 論文標題 造血器腫瘍におけるFCM検査結果解釈時の注意点 非典型例への対応	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 検査と技術	6. 最初と最後の頁 1182-1186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 稲葉 亨、松本和道、塚本 拓	4. 巻 68
2. 論文標題 フローサイトメトリー検査実践講座 B細胞性腫瘍	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床病理	6. 最初と最後の頁 207-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 稲葉 亨、松本和道、抱 章子、西村博志
2. 発表標題 FCM検査の標準化 検査所見の付け方、留意点
3. 学会等名 第23回日本検査血液学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永田健児
2. 発表標題 感染病態からみたブドウ膜炎
3. 学会等名 第126, 127回京都眼科学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉 亨、永田 健児
2. 発表標題 硝子体混濁患者における眼内リンパ球6-color FCM
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永田 健児
2. 発表標題 ぶどう膜炎に対する硝子体手術の温故知新
3. 学会等名 第44回日本眼科手術学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲葉 亨、塚本 拓
2. 発表標題 フローサイトメトリー検査実践講座～B細胞性腫瘍
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲葉 亨、出口英人、永田健児、山野哲弘、貫井陽子
2. 発表標題 硝子体混濁の原因疾患スクリーニングとしての眼内リンパ球FCMの有用性
3. 学会等名 第70回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 出口英人、永田健児、稲葉亨、北野ひかる、外園千恵
2. 発表標題 ぶどう膜炎における硝子体中の制御性T細胞
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Deguchi H, Nagata K, Inaba T, Kitano H, Sotozono C
2. 発表標題 Intravitreal regulatory T cells detected in the vitreous of uveitis patients
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Deguchi H, Nagata K, Inaba T, Kitano H, Sotozono C
2. 発表標題 T-cell subset analysis of vitreous fluid in intraocular lymphoma and uveitis
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永田 健児 (Nagata Keinji)  (00457988)	京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医  (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------