

平成 23年 6月 20日現在

機関番号：82710
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2010
課題番号：20592217
研究課題名（和文）網羅的 T 細胞レセプター解析に基づく口腔扁平苔癬病態形成に関する研究
研究課題名（英文） T cell receptor analysis in oral lichen planus
研究代表者 鈴木 隆二（SUZUKI RYUJI）
独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）
診断・治療研究室・室長
研究者番号：70373470

研究成果の概要（和文）：

口腔扁平苔癬病変部に浸潤する T リンパ球に関する解析として、TCR レパトア解析、病変部のサイトカイン発現量解析、および Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) family と各リガンドを介したシグナル伝達機構の遺伝子発現解析を行った。TCR レパトア解析の結果から口腔扁平苔癬病変部に浸潤する T リンパ球はスーパー抗原の関与が示唆された。また、口腔扁平苔癬病変部の免疫状態をサイトカイン発現プロファイルおよび臨床症状を包括的に検討した結果、CD4 陽性 T 細胞の優位な浸潤と IL-5, TNF の発現増加が確認された。さらに、EGFR-family と各リガンドを介したシグナル伝達機構の遺伝子発現結果から、受容体では EGFR、リガンドでは AREG, EREG, HB-EGF の高発現が確認された。EGFR-リガンドが罹患部浸潤 T 細胞に濃染されていたことより、T 細胞機能解析と EGFR シグナル伝達の関与を検討することにより、口腔扁平苔癬の総合的病態形成メカニズムの解明および悪性度や癌化率などの新規診断法の開発につながることを期待される結果となった。

研究成果の概要（英文）：

Oral lichen planus (OLP) is a refractory disorder of the oral mucosa, and develops via a T cell-mediated immune process. Here, we examined the characteristics of the infiltrating T cells in terms of the T cell receptor (TCR) repertoires, T cell clonality, T cell phenotypes and cytokine production profiles. TCR repertoire analyses and CDR3 size spectratyping were performed using PBMCs and tissue specimens of OLP biopsies from 12 patients. The cytokine expression profiles and T cell phenotypes were measured by real-time quantitative polymerase chain reaction. The expressions of 4 EGFR-like receptors and 6 EGF-like ligands were measured in OLP tissues from 10 patients and compared with the levels in normal oral mucosa (NOM) from 10 healthy donors.

We observed that there were skewed TCR repertoires in the tissue samples (TCRVA8-1, VA22-1, VB2-1, VB3-1 and VB5-1) and PBMCs (TCRVA8-1, VB2-1, VB3-1 and VB5-1) from OLP patients. Furthermore, the CDR3 distributions in the skewed TCR subfamilies exhibited polyclonal patterns. We observed increases in CD4+ T lymphocytes, IL-5, TNF- α and human leucocyte antigen D-related in the OLP tissue specimens. Of the receptors, only EGFR mRNA and protein were more highly expressed in OLP compared with NOM tissues. Regarding the ligands, the mRNAs of amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG), and heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) were more highly expressed in OLP compared with NOM tissues. These ligands were strongly expressed by infiltrating lamina propria lymphocytes as well as epithelial keratinocytes in OLP lesions, as shown by immunohistochemistry.

Taken together, the present results suggest that T cells bearing these TCRs are involved in the pathogenesis of OLP, and that IL-5 and TNF- α may participate in its inflammatory process. The enhanced EGFR expression on the keratinocytes in OLP lesions and the up-regulation of EGF-like ligands in keratinocytes and infiltrating mononuclear cells

could contribute to the carcinogenesis and pathogenesis of OLP.
交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：臨床免疫学

科研費の分科・細目：口腔粘膜疾患

キーワード：口腔扁平苔癬，T細胞受容体

1. 研究開始当初の背景

本疾患の発病メカニズムには内分泌異常、歯科金属または薬剤アレルギー、C型肝炎ウイルス、GVHD、自己免疫疾患などの関与が示唆されているが未だ明らかにされていない。上皮下粘膜固有層に帯状のリンパ球浸潤の大多数がT細胞であることから、本症の発病に細胞性免疫機構の関与が考えられており、T細胞抗原認識受容体(T cell receptor; TCR)のレパトア解析やサイトカインの解析などの免疫組織学的研究が少数例の患者を対象にして行われ、スーパー抗原や自己免疫疾患の関与が盛んに報告されているが本疾患の病因および病態形成を説明することには至っておらず、今なお不明な点が多い。口腔扁平苔癬の病理像としては、上皮の肥厚と帯状のTリンパ球浸潤が認められるとされているが、浸潤しているTリンパ球の認識する抗原やその病態形成に対する関与については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平苔癬の発症および病態形成にT細胞を介した免疫応答とEGFRシグナル伝達が関与しているという仮説のもとに口腔扁平苔癬組織におけるEGFRの発現を検討し、さらに、病変部浸潤Tリンパ球の解析結果と併せて口腔粘膜上皮の肥厚病態形成にT細胞が如何なる生物学的関与を有するか検討を行った。

3. 研究の方法

1) 患者背景調査

術前に対象患者の年齢、性別、既往歴、現病歴、現症(全身、局所)についての詳細な調査を行うと同時に患者に本研究の意義を説

明し、以後の検索の同意を得る。

2) 検体採取および病理学的検討

口腔扁平苔癬生検時に切除材料を採取し、RNA安定化試薬に浸漬して組織内RNAの安定化をはかると共に、一部を病理学的評価に用いてリンパ球浸潤度、モノクローナル抗体を用いての免疫組織学的検討を行った。

3a) TCRレパトア解析

RNA安定化試薬に保存した組織または末梢血単核球からRNAを抽出しTCRレパトア解析(Matsutani T, et al.)に用いる。要約するとRNAからcDNAを合成した後、Adaptorを付加する。酵素処理によりAdaptor付加cDNAを適当な形にし、AdaptorおよびTCR定常領域にそれぞれ相補的なオリゴDNAプライマーセットとして用いてnestedPCRを行い、全てのTCRをコードする遺伝子を同一条件下で特異的に増幅する。得られたPCR産物を全てのTCRVファミリーにそれぞれ相補的なオリゴDNAを固着化したマイクロプレートに播種してハイブリダイゼーションを行った後、酵素反応を用いて発色させ吸光度を測定する。得られた吸光度から各TCRVファミリーの相対存在率を算出(TCRレパトア解析)し、健康人のそれと比較した。

3b) CDR3 size spectratypingによるクローナリティ解析

研究計画3a)におけるTCRレパトア解析において、患者検体で偏りの見られた場合には、CDR3 size spectratyping(Matsutani T, et al.)を実施し、偏りの見られたファミリーがモノクローナルな偏りか否かを確認する。すなわち、偏りの見られたファミリーをコードするTCR遺伝子をPCRにより選択的に増幅し、TCR可変領域(V領域)のうち最も変化に富むCDR3領域の遺伝子サイズをフラグメント解析によりパターン解析し、単一

の TCR を有する T 細胞の増殖（モノクローナル増殖）であるか否かを検討した。

4) 定量的 PCR によるサイトカイン mRNA 発現量の定量

RNA 安定化試薬に保存した組織または末梢血単核球から RNA を抽出し cDNA を合成した後、適切なプライマーを用いて TNF-、INF-、IL-2、IL-4、IL-5 などのサイトカインおよび EGFR シグナル伝達に關する EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 及びそのリガンドである EGF、AREG、TGF、REG、HB-EGF、BTC、NRG1 の mRNA 発現量の定量を real-time PCR により実施した。

5 a) TCR アミノ酸配列の決定

研究計画 3 a) における TCR レパトア解析において、T 細胞のモノクローナルな偏りが確認された場合、その CDR3 領域をコードする遺伝子配列をシーケンサーにより同定し、アミノ酸配列を決定した。

7) 病態形成に關わる病因解明

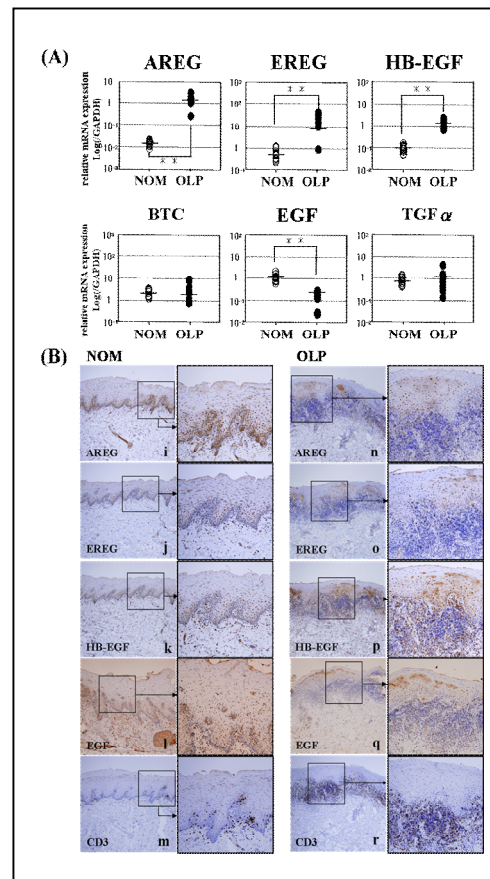
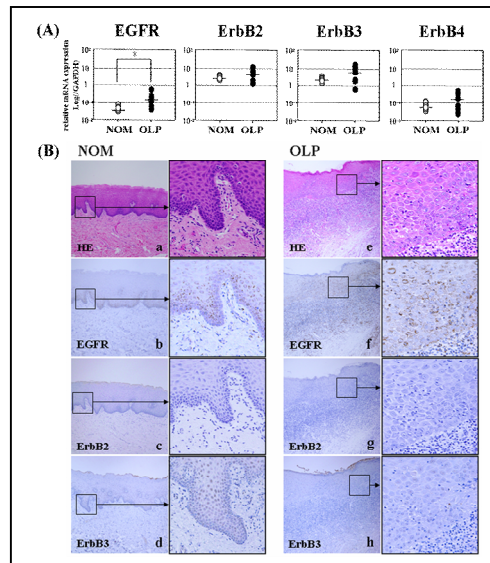
研究計画 3 a) および 3 b) においてスーパー抗原の關与が示唆される結果が得られた場合（TCR の顕著な偏りが確認されたものの、モノクローナルな偏りではなかった場合、すなわちポリクローナルな偏りがあった場合）は、患者血清中の抗スーパー抗原抗体価の測定、組織検体中スーパー抗原遺伝子の発現解析および HLA タイピングを実施し、スーパー抗原の關与の有無を検討する。また、組織検体中のスーパー抗原タンパク質の検出を免疫組織染色により実施した。

4. 研究成果

TCR レパトア解析の結果から口腔扁平苔癬病変部に浸潤する T リンパ球は TCRVA8-1, VA22-1, VB2-1, VB3-1, VB5-1 を有するポリクローナル増殖しており、スーパー抗原の關与が示唆された。

患者の末梢血中では TCRVA8-1, VB2-1, VB3-1, VB5-1 を有する T 細胞が存在しており、組織中の T 細胞の TCR サブファミリーと近似していることから、自己免疫疾患様の免疫応答が起こっていることが考えられた。

リアルタイム PCR 法と免疫組織化学染色により、EGFR-family と各リガンドを介したシグナル伝達機構の遺伝子発現結果から、受容体では EGFR、リガンドでは AREG、REG、HB-EGF の高発現が確認された。



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)

Akito Gotoh, Yoshiki Hamada, Noriyuki Shiobara, Kenichi Kumagai, Kanichi Seto,

Tatsuya Horikawa, Ryuji Suzuki.
Polyclonal expansion of T cells bearing
restricted T cell receptor repertoires in
lesions of oral lichen planus without
hepatitis C virus infection.
Clin Exp Immunol 154(2):192-201 2008 査
読あり

Kenichi Kumagai, Tatsuya Horikawa,
Akito Gotoh, Shoji Yamane, Hiroyuki
Yamada, Hiroshi Kobayashi, Yoshiki Hamada,
Ryuji Suzuki
Up-regulation of EGF receptor in
keratinocytes and its ligands in
infiltrating lymphocytes in the lesions of
oral lichen planus
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol
Endod, 110(6):748-54. 2010 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

Kenichi Kumagai, Horikawa T, Gotoh A,
Yamane S, Yamada H, Kobayashi H, Eguchi
T, Hamada Y, Suzuki R
The pathogenesis of oral lichen planus via
epidermal growth factor receptor
signaling
The 14th International Congress of
Immunology
August 22-27, 2010 (PP-066) Kobe

小林浩, 熊谷賢一, 江口貴紀, 重松宏昭,
濱田良樹, 鈴木さつき, 鈴木隆二
口腔扁平苔癬及び白板症における EGFR
familyの網羅的解析
第9回比較歯科医学研究会学術大会
2011.3.6 (1) 東京

熊谷賢一, 堀川達弥, 後藤哲人, 山田浩
之, 小林浩, 江口貴紀, 濱田良樹, 鈴木隆
二
口腔扁平苔癬における EGFR シグナル伝達機
構の解明
第64回日本口腔科学会学術集会
2010.5.20-21(1-P-7) 札幌

後藤哲人, 濱田良樹, 熊谷賢一, 小早川
元博, 亀井和利, 齋藤知之, 瀬戸皖一, 鈴
木隆二
口腔扁平苔癬における特異的な TCR レパトア
を有するT細胞のポリクローナル様増殖
第53日本口腔外科学会総会 2008.10.20-21
(1-P-019) 徳島

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://ccs.tsurumi-u.ac.jp/dental/kouza/koku1.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 隆二 (SUZUKI RYUJI)
独立行政法人国立病院機構
(相模原病院臨床研究センター)
診断・治療研究室・室長
研究者番号: 70373470

(2) 研究分担者

福井 尚志 (FUKUI NAOSHI)
独立行政法人国立病院機構
(相模原病院臨床研究センター)
病態総合研究部・研究部長
研究者番号: 10251258

(3) 連携研究者

なし