

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659803

研究課題名(和文)特異的T細胞同定によるフォークト・小柳・原田病の診断法の確立

研究課題名(英文)Diagnostic method by identifying specific T cell clone in Vogt-Koyanagi-Harada disease

研究代表者

木ノ内 玲子(KINOUCHI, Reiko)

旭川医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：70344562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：原田病患者で疾患特異的に増加するT細胞クローンがあるか、T細胞受容体相補性決定領域3のアミノ酸配列から検討を行った。治療前原田病17例中13例の末梢血CD4陽性T細胞で共通のクローン認められた。原田病以外のぶどう膜炎、治療後ではこれは認められなかった。このクローンを検出する定量PCRを実施したところ、原田病14例中8例(2010までには発症症例)で検出されたが、2011年以降に発症した症例では検出されなかった。今後は他のCDR3クローノタイプの検討を進める必要がある。この結果は2015年日本眼科学会総会で報告した。

研究成果の概要(英文)： We tried to identify specific T cell clone for Vogt-Koyanagi-Harada disease to establish diagnostic method. We found a clone which was seen in peripheral blood of 13 out of 17 VKH cases, while the clone was not seen in uveitis other than VKH and VKH after treatment. Though we performed qPCR detecting this clone to establish diagnostic methods, we could not detect the clone in VKH which developed after 2011. (We reported this results in the 119th annual meeting of the Japanese Ophthalmological Society, 2015.)

研究分野：眼科

キーワード：フォークト・小柳・原田病 T細胞受容体

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患では液性免疫が主体となり発症する疾患と細胞性免疫が主体となり発症する疾患がある。前者は自己抗体の検索が臨床応用されているが、後者での自己反応性 T 細胞の検索は臨床応用できていない。

フォークト・小柳・原田病(原田病)はメラノサイトに対する自己免疫と考えられている全身疾患であり、眼・皮膚・内耳・髄膜などに炎症を起こす。特徴的な漿液性網膜剥離を伴うぶどう膜炎と、身体の随伴症状を示した場合は容易に診断できるが、典型的でない所見を呈したり、他のメラノサイトを有する臓器の症状を呈していなかったりした場合は診断が難しくなる。急性後部多発性斑状色素上皮症や後部強膜炎など、原田病との異同が問題とされている疾患もある。また、眼所見を伴わず、原因不明の内耳炎や髄膜炎とされている症例のなかに原田病が混ざっている可能性があり、診断法の確立が必須である。

原田病の患者のほとんどが HLA-DR4 (HLA-DRB1*0405) を有し、これに結合した特定の自己抗原ペプチドが疾患発症に関わっていると考えられる。つまり、HLA-DR4 を有する原田病患者では、特定の病因抗原ペプチドを結合した HLA-DR4 を認識する抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンが増えていると推測される。

本研究は原田病を、増加している CD4 陽性 T 細胞クローンから診断できるようにするための研究である。この方法が確立されれば、他の自己免疫疾患の診断法として応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

原田病患者の末梢血で増えている CD4 陽性 T 細胞クローンを明らかにし、典型的でない所見を呈する原田病の診断法として確立をはかる。

3. 研究の方法

(1) cDNA の作成

原田病治療前後(治療前 17 例、そのうち 10 例の治療後)と原田病でないぶどう膜炎患者(12 例:急性前部ぶどう膜炎 4 例;サルコイドーシス 2 例;ベーチェット病 1 例;分類不能 5 例)の末梢血 10cc を採取し、フィコール・コンレイ比重遠心法で単核球を分離した。一部を CD4 Microbeads® (MACS) で CD4 を発現する単核球として選別した。単核球全体と CD4 陽性単核球それぞれから RNA を抽出し、cDNA を作成した (NucleoSpin®RNAII:

Macherey-Nagel、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit®: Roche を使用)。

(2) CD4 陽性単核球の T 細胞受容体の VB サブタイプを網羅する 31 種のプライマーで PCR したものを各々 GeneScan で分析

T 細胞受容体 VB サブタイプを網羅する 31 種の PCR 用プライマーを作成した。Reverse プライマーはひとつ C 領域の配列から作成した。原田病患者 3 例の CD4 陽性単核球からの cDNA を試料として、VB サブタイプ各々のプライマーで PCR を実施し、産物を GeneScan にかけて。

(3) TRBV25-1 (IMGT 表記) と TRBV11-1, 3 (IMGT 表記) サブタイプで原田病の患者末梢血で増加している CD4 陽性 T 細胞のクローンを検討

GeneScan の結果、症例間で共通クローンの疑わせるパターンがあった TRBV25-1 と TRBV11-1, 3 で CDR3 領域のシーケンスを検討した。FastStart High Fidelity PCR System® (Roche) を用いて、cDNA サンプルから TRBV25-1 と TRBV11-1, 3 のプライマーと C 領域の Reverse プライマーで PCR を行った。PCR 産物を 1.6% アガロースゲルに流し精製した後、TOPO TA

Cloning® Kits (Invitrogen) を用いベクターに組み込み、Jet Competent Cell (BioDynaics Laboratory Inc.) に Transform した。LB プレート培地にまき培養後 48 個のコロニーを拾い、クローニングされたベクターから FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack® (Roche) を用いてベクターに組み込んだ部分を PCR で増幅した。サンプルをファスマックシーケンスサービスに送付し、塩基配列を決定した (図 1)。

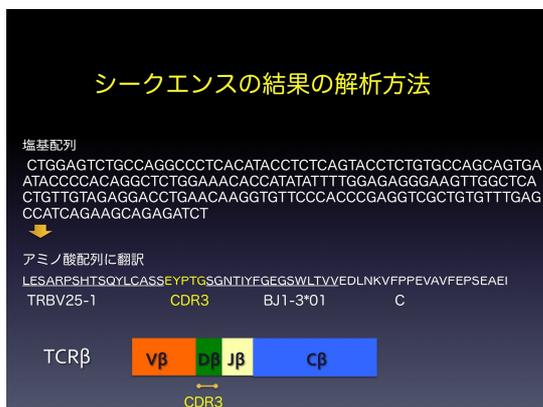


図 1. CDR3 のアミノ酸配列の決定

(4) 原田病で共通に見られた CDR3 領域の配列からプライマーを作成し、定量 PCR

TRBV25-1 プライマーで増幅し CDR3 領域の塩基配列を決定したところ、治療前原田病 13 例で共通で認められたクロナタイプが見つかった。このクロナタイプを特異的に増やすプライマーを作成し、定量 PCR 行った (原田病治療前 14 例)。LightCycler 480 Probes Master (Roche, 4707494) を用いて LightCycler® 480 リアルタイム PCR システム (Roche) にて測定を行った。

(5) V サブタイプを網羅的に増幅した検討

原田病 5 例の治療前後の CD4 陽性 T 細胞からの cDNA を使用し、V 領域の配列から作成した degenerated primer で、V サブタイプを網羅的に PCR で増幅後、次

世代シーケンサーで解析した。

4. 研究成果

(1) genescan

Vβ サブタイプ 31 種のプライマーと C 領域のプライマーで PCR を行い、増幅したそれぞれの Vβ サブタイプのサンプルを geneScan にかけての結果、TRBV25-1 と TRBV11-1, 3 で症例間に重複して増えているようにみられるピークがみられた (図 2)。

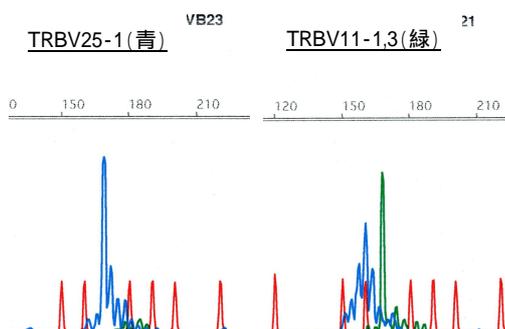


図 2. geneScan (TRBV25-1 と TRBV11-1, 3 のプライマーで PCR を行ったもの)

(2) CD4 陽性単核球の T 細胞受容体 鎖の CDR3 のアミノ酸配列解析

TRBV25-1 と TRBV11-1, 3 のプライマーで増幅した CD4 陽性単核球の T 細胞受容体 鎖の塩基配列から CDR3 のアミノ酸配列を決定した。原田病患者 17 例中 13 例で TRBV25-1 プライマーを使い増幅した CDR3 の配列で、共通なものが認められた (図 3、4、5)。この配列は治療後 10 例と原田病以外のぶどう膜炎患者 12 例では認められなかった。

る。今後、疾患に関連する T 細胞クロノタイプ検討は、疾患の診断治療に繋げられる可能性が高いので、加速されると思われる。

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 5 件)

間瀬 智子, 木ノ内 玲子, 小村 景司, 福井 勝彦, 吉田 晃敏 網膜出血と軟性白斑を認めた silent 巨細胞性動脈炎 臨床眼科(査読あり)69 巻 3 号 Page379-383(2015.03)

<http://www.igaku-shoin.co.jp/journal/Detail.do?journal=36173>

伊藤 はる奈, 木ノ内 玲子, 吉田 晃敏 EDI-OCT で脈絡膜肥厚を認めた高血圧脈絡膜症 眼科(査読あり)56 巻 13 号 Page1565-1570(2014.12)

http://www.molcom.jp/item_detail/195188/

Song YS, Kinouchi R, Ishiko S, Fukui K, Yoshida A. Hypertensive choroidopathy with eclampsia viewed on spectral-domain optical coherence tomography. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2013;251(11):2647-2650(査読あり)

DOI: 10.1007/s00417-013-2462-9

Ishibazawa A, Kinouchi R, Minami Y, Katada A, Yoshida A. Recurrent Vogt-Koyanagi-Harada disease with sensorineural hearing loss and choroidal thickening. Int Ophthalmol. 2014 Jun;34(3):679-84. (査読あり)

DOI: 10.1007/s10792-013-9849-9

鴫澤 亮, 木ノ内 玲子, 籠川 浩幸, 吉田 晃敏 他の網膜疾患の合併が診断・治療に影響した Vogt-小柳-原田病 眼科 54(5):667-673, 2012(査読あり)

<http://www.kanehara-shuppan.co.jp/magazines/detail.html?code=024532012050>

[学会発表](計 3 件)

木ノ内玲子, Vogt-小柳-原田病で増加する CD4 陽性 T 細胞クロノンの検索、119 回日本眼科学会総会、2015 年 4 月 16 日、札幌

Ishii N, Kinouchi R, Yokota H, Takahashi A, Yoshida A. "Cystoid changes in retinal ganglion cell layer by OCT in Linezolid-induced optic neuropathy." World Ophthalmology Congress, Tokyo, 2014.6.9

Kinouchi R, Minami Y, Ishiko S,

Mikami D, Hanada K, Moriya K, Yoshida A. Educational use and costs of a telemedicine microsurgery support system for medical students 18th ISfTeH International Conference, Takamatu, Japan 2013/10/19

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

木ノ内玲子, Vogt-. 小柳- 原田病で増加する CD4 陽性 T 細胞クロノンの検索とその抗原ペプチド同定による診断法・治療法の研究. 旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:91-93.

http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/modules/xoonips/download.php/f1501091.pdf?file_id=7723

6. 研究組織

(1)研究代表者

木ノ内玲子 (KINOUCHI, Reiko)

旭川医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：70344562