



The biased V γ gene usage in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 影山, 康德 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1482

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 205号	学位授与年月日	平成 7年 3月 8日
氏 名	影 山 康 徳		
論文題目	<p>The biased Vγ gene usage in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (慢性関節リウマチ患者関節液中の Vγ 遺伝子発現の偏り)</p>		

博士(医学) 影山 康徳

論文題目

The biased V γ gene usage in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis
(慢性関節リウマチ患者関節液中のV γ 遺伝子発現の偏り)

論文の内容の要旨

〔目的〕

慢性関節リウマチ (RA) における $\gamma\delta$ T 細胞は結核菌、もしくは heat shock protein (HSP) へ高い反応性を示すことが報告されており、結核菌もしくは HSP の RA の病因に果たす役割が推察される。また V γ 9/V δ 2 レセプターをもつ $\gamma\delta$ T 細胞が結核菌もしくは HSP に反応性を示すことが知られている。 $\gamma\delta$ T 細胞の RA の病因における役割を究明するためにどのレパトアの $\gamma\delta$ T 細胞が RA 関節液中に増加しているか γ 鎖について解析した。また RA の病因における結核菌反応性 $\gamma\delta$ T 細胞の関与についても検討した。

〔方法〕

対照は RA 患者24例、男性4例、女性20例、年齢は17才から70才、平均57.8才、罹病期間は5年から37年、平均20年、さらに正常者8例、痛風患者2例を用いた。RA 関節液、痛風関節液はヒアルロニダーゼ処理後、RA もしくは正常者末梢血はそのまま Ficoll-paque 比重遠心法により、単核球層を分離し、acid-phenol 法にて全 RNA を抽出した。random primer と逆転写酵素を用いて一本鎖 cDNA を作製し、各 V γ の特異的 primer と 32 P 標識した共通 primer である C γ を用いて定量条件での polymerase chain reaction (PCR) を行った。得られた PCR 産物を電気泳動し、目的のバンドを切り出し、液体シンチレーションカウンターにてその放射活性を測定した。また各 V γ の primer ごとに PCR 曲線を作製し、PCR の一回の増幅率である amplification efficiency を求め、もとの RNA 量を推定した。また PCR 産物を TA cloning kit を用い、一部は Klenow 酵素にて平滑末端化したあと、PGEM-3 Z プラスミドに挿入し、大腸菌に移入後、dideoxy 法にて塩基配列を決定した。また、RA 関節液、RA 末梢血、正常者末梢血を結核死菌 MTH37RA にて6日間刺激後、 3 H-thymidine の取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定し、刺激後の V γ のレパトアの変動を同様の PCR を用いて解析した。

〔結果〕

正常者末梢血、痛風関節液に有意に発現している V γ 遺伝子は V γ 9 であり、RA 関節液においては V γ 3 であった。RA 末梢血においてはおよそ半数の症例が V γ 9 を最も多く発現していた。また RA 関節液、正常者末梢血において V γ 3 / 5 primer により増幅された PCR 産物より得られた cDNA clone は RA 関節液、正常者末梢血ともに J1 / 2 に rearrange する clone が多く認められ、V γ 3 に rearrange する CDR3 領域において RA 関節液、正常者末梢血ともに特異的塩基配列、アミノ酸配列は認められなかった。また RA 関節液、RA 末梢血、正常者末梢血ともに結核死菌に反応する $\gamma\delta$ T 細胞は V γ 9 のレパトアであった。

〔考察〕

正常者末梢血において優位に発現している V γ 遺伝子は V γ 9 であり、RA 関節液において優位に発現している V γ 遺伝子は V γ 3 であった。また結核菌もしくは HSP に反応する clone は V γ 9 をもつ $\gamma\delta$ T 細胞であることが報告されており、今回正常者末梢血、RA 関節液、RA 末梢血において結核死

菌に反応する $\gamma\delta$ T 細胞は $V\gamma 9$ であったことから、少なくとも RA 関節液中に増加していた $\gamma\delta$ T 細胞は結核菌もしくはその主要な抗原である HSP65 に反応して増加しているのではなく、別の抗原に反応して増加している可能性が考えられた。さらに CDR3 領域の塩基配列とそのアミノ酸配列に特異性が認められなかったことから、RA 関節液中の $\gamma\delta$ T 細胞における抗原認識は CDR3 領域よりも V 領域が主役を演じるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) の惹起抗原の詳細はまだ明らかではない。RA の多くの症例で mycobacterium tuberculosis (MT) もしくは 65-kDa mycobacterial heat-shock protein (HSP) に高反応性を示す T 細胞 (特に $\gamma\delta$ T 細胞) が関節液や滑膜に増加することが報告されており、MT 反応性 $\gamma\delta$ T 細胞の関与が注目を集めている。そこで申請者は RA 患者の関節液中にどのようなレパトアの TCR γ -鎖を使用する $\gamma\delta$ T 細胞が増加しているかを解析するとともに、RA の病因と考えられている MT 反応性 $\gamma\delta$ T 細胞の関与を明らかにしようとしていた。

審査の結果、評価された点は次のとおりである。

- (1) 用いた材料、および方法は本研究の目的を検討する上で適切であると判断された。まず、ヒト $\gamma\delta$ T 細胞の $V\gamma$ 遺伝子頻度の解析法として、正常者、RA 患者の末梢血および関節液中より分離した単核球より、酸一フェノール法で全 RNA を抽出後、cDNA を合成し、各 $V\gamma$ の特異的 5' primer と 32 P 標識 C γ antisense primer を用いて、各 $V\gamma$ ごとに reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法をおこない、その PCR 産物を電気泳動した。ゲルの放射活性を測定し、各 $V\gamma$ 遺伝子の放射活性比率から $V\gamma$ の使用頻度を求めており、 $V\gamma$ 遺伝子の解析を行う上で、その精度と再現性に問題はない。また、塩基配列は PCR 産物を TA cloning kit を用い、PGE-M3 Z プラスミドに挿入し、大腸菌に移入後、dideoxy 法で決定している。一方、結核死菌 MTH37RA で刺激した単核球の刺激後の $V\gamma$ のレパトアの変動を検索して MT 反応性の解析をしている。いずれの方法も問題はないと判断された。
- (2) RA 関節液中 $\gamma\delta$ T 細胞では $V\gamma 3$ を多く発現していたが、末梢血においてはその半数の症例が $V\gamma 9$ を最も多く発現していた。一方、正常者末梢血や痛風患者の関節液中の $\gamma\delta$ T 細胞では $V\gamma 9$ を優位に発現していた。また、IL-2 存在下で MT-反応性 T 細胞の $V\gamma$ を解析したところ、 $V\gamma 9$ 発現の増強が認められた。これらの所見から申請者は RA 関節液中に増加していた $\gamma\delta$ T 細胞は MT や HSP に対する反応性クローンである $V\gamma 9$ $\gamma\delta$ T 細胞とは異なり、別の未知の抗原に対して反応増殖した T 細胞クローンであると主張した。この見解は RA 発症に関与すると考えられている MT や HSP 以外の未知の抗原を解明する上で示唆に富むものであると高い評価が与えられた。
- (3) さらに、RA 関節液と正常者末梢血の $V\gamma 3$ に rearrange する CDR3 領域においてその塩基配列とアミノ酸配列に特異性が認められないことから、申請者は RA 関節液中の $\gamma\delta$ T 細胞の抗原認識は CDR3 領域よりも、V 領域が主役を演じていると主張している。この見解は RA 発症に関連する $\gamma\delta$ T 細胞の抗原認識機構を解明する上で示唆に富むものと評価された。

なお審査の過程において、申請者に対して次のような質疑がなされた。

- 1) RT-PCR において extra band は出現しないか
- 2) 末梢血および関節液中の単核球の細胞組成や鑑別を行ったか。また、抗原提示細胞は存在するか

- 3) $V\gamma 3$ 発現を刺激する抗原として、どのようなものがあるか
 - 4) $V\gamma 3$ を使用している γ/δ T 細胞が関節液中や滑膜内で増殖している証拠はあるか
 - 5) どのようなウイルスが RA の惹起抗原として考えられているか
 - 6) RA の滑膜細胞の病理学的変化について
 - 7) RA の病期によって γ/δ T 細胞と α/β T 細胞の関与の違いがみられるか
 - 8) RA 患者のうち、ツベルクリン反応陽性者と陰性者で T 細胞の $V\gamma$ 解析を行ったか
 - 9) 熱ショック時に滑膜上皮にどのような抗原が発現されるか
 - 10) 滑膜にどのような惹起抗原が存在しているか
 - 11) MTH37RA と IL-2 による刺激実験において、含まれる抗原提示細胞の種類と量について
- 以上の質問に対する申請者の解答はおおむね適切であり、問題点も充分把握しており、本論文は博士(医学)の学位授与に相応しい内容を備えていることを審査委員全員が一致して判定した。

論文審査担当者 主査 教授 山下 昭

副査 教授 菅野 剛史 副査 教授 喜納 勇

副査 助教授 串田 一博 副査 講師 戸倉 新樹