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

メタデータ	言語: jpn 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, 康徳 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	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)		

博士(医学)　影 山 康 徳

論文題目

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)

論 文 の 内 容 の 要 旨

〔目的〕

慢性関節リウマチ (RA) におけるγδT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Vγ9/Vδ2レセプターをもつγδT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。γδT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γδT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γδT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Vγの特異的primerと^{32}P標識した共通primerであるCγ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Vγ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-3Z 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Vγ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Vγ遺伝子はVγ9であり、RA関節液においてはVγ3であった。RA末梢血においてはおよそ半数の症例がVγ9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Vγ3/5primer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、Vγ3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γδT細胞はVγ9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Vγ遺伝子はVγ9であり、RA関節液において優位に発現しているVγ遺伝はVγ3であった。また結核菌もしくはHSPに反応するcloneはVγ9をもつγδT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γδT細胞はVγ9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γδT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γδT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γ/δT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γ/δT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TCRγ-鎖を使用するγ/δT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γ/δT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γ/δT細胞のVγ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Vγの特異的5'primerと^{32}p標識Cγ antisense primerを用いて、各Vγ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Vγ遺伝子の放射活性比率からVγの使用頻度を求めており、Vγ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-M3Z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Vγ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γ/δT細胞ではVγ3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Vγ9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γ/δT細胞ではVγ9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Vγを解析したところ、Vγ9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γ/δT細胞はMTやHSPに対する反応性クローンであるVγ9 γ/δT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Vγ3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γ/δT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γ/δT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）Vγ3発現を刺激する抗原として、どのようなものがあるか

4）Vγ3を使用しているγ/δT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/δT細胞とα/βT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Vγ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