

Biased T cell receptor $V\beta$ gene expression in bronchoalveolar lavage fluid from patients with sarcoidosis

メタデータ	言語: en 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: 吉富, 淳 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1038

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	医博第 185号	学位授与年月日	平成 7年 3月27日
氏名	吉 富 淳		
論文題目	Biased T cell receptor V β gene expression in bronchoalveolar lavage fluid from patients with sarcoidosis (サルコイドーシス患者の気管支肺胞洗浄液における T 細胞レセプター β 鎖可変領域(V β)遺伝子発現の偏り)		

博士(医学) 吉 富 淳

論文題目

Biased T cell receptor V β gene expression in bronchoalveolar lavage fluid from patients with sarcoidosis

(サルコイドーシス患者の気管支肺胞洗浄液における T 細胞レセプター β 鎖可変領域 (V β) 遺伝子発現の偏り)

論文の内容の要旨

(目的) サルコイドーシス (サ症) は原因不明の全身性肉芽腫性疾患であり、肺局所へ CD4⁺T 細胞の著明な集積を伴うことなどから、何らかの未知抗原の経気道的侵入と患者の特殊な免疫反応性により発症すると推定されている。このサ症患者の特殊な免疫反応性を検討する一環として、胞膈炎とそれに引き続く肉芽腫に中心的な役割を果たしていると考えられる $\alpha\beta$ T 細胞の性格を明らかにすることは重要である。我々は T 細胞レセプター β 鎖可変領域 (β chain variable region, V β) に着目し、サ症患者の末梢血と気管支肺胞洗浄液 (BALF) における V β レパートリーを半定量的 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて検討した。

(対象) 未治療サ症患者 17 例 (平均年齢 44.2 歳、男性 10 例、女性 7 例)、健常者 9 例 (平均年齢 52.3 歳、男性 3 例、女性 6 例)、突発性肺線維症患者 4 例 (平均年齢 61.5 歳、男性 10 例) の末梢血、BALF 中のリンパ球を材料とした。

(方法) 末梢血、BALF より 1 段階 RNA 単離法にて総 RNA を抽出後、cDNA を合成し、22 種類の V β に特異的な 5' primer と ³²P にて標識した 3' C β (β chain constant region) primer を用いて、各 V β ごとに RT-PCR を行った。PCR 産物を電気泳動したゲルを乾燥させ、X 線フィルムに感光させた後、目的とする V β 遺伝子を切り出し、放射性活性を測定した。そして、各 V β 遺伝子の放射性活性の全体に対する比率 (%) を計算し、その V β の使用頻度とし、健常者における末梢血、BALF の各 V β の mean + 2 SD を越える場合を有意な増加とみなした。また、BALF に V β 6 の強い発現が認められたサ症 3 例について、その V β 6-C β 遺伝子を pGEM vector にてクローニングし、dye primer cycle sequence を行い、レーザー蛍光 DNA シークエンサーを用いて complementarity determining region 3 (CDR3) の塩基配列を解析し、アミノ酸配列を決定した。

(結果) 1) BALF において、サ症では健常者に比べ V β 2 と V β 6 が強く発現していた。サ症 17 例中、V β 2 が 11 例 (64.7%) に、V β 6 が 10 例 (58.8%) に強く発現していた。2) サ症の BALF と末梢血との比較では、BALF において V β 2、V β 6、V β 13 が強く発現していた。V β 13 は健常者においても末梢血より BALF に強く発現していた。3) サ症の BALF に強い発現の認められた V β 6 を含む CDR3 のアミノ酸配列の検討では、各症例によって異なるもののアミノ酸の使用に選択性が認められた。特に症例 16 では 5 クローン中、4 クローンが同一の塩基配列を示した。4) BALF に V β 2 あるいは V β 6 の強い発現が認められたサ症患者の HLA-DR を始めとする臨床検査所見や背景因子を検討したが一定の傾向は指摘できなかった。5) 末梢血における V β の検討では、サ症と健常者との間に差を認めなかった。6) 突発性肺線維症では、末梢血、BALF において特定の V β の発現は指摘できなかった。

(考案ならびに結語) サ症の BALF に V β 2、V β 6 の強い発現が認められたことは、健常者や突発性肺線維症との比較から、サ症に特異的であると結論できる。サ症の未知抗原の侵入の場と推定される

肺局所において、V β 2あるいはV β 6を発現したT細胞が増加しており、V β 6⁺CDR3のアミノ酸配列の一部に相同性が認められたことは、サ症の病変形成に限られたT細胞が関与していることを示す。これらのT細胞はサ症の未知抗原を認識し、オリゴクローナルに増殖していることが示唆され、特にサ症のV β 6⁺T細胞に関しては、症例のMHCにより異なるCDR3を用いて抗原を認識している可能性が推定された。

論文審査の結果の要旨

サルコイドーシス（サ症）は肺を中心として起こる原因不明の全身性肉芽腫性疾患である。申請者は肉芽腫形成に関与すると考えられている $\alpha\beta$ T細胞の未知の抗原に対する反応性に注目し、T細胞レセプター β 鎖可変領域（ β chain variable region、V β ）のサ症特異性の有無を明らかにするため、サ症患者の末梢血と気管支肺胞洗浄液（BALF）中のT細胞を用い半定量的 reverse transcriptase-polymerase chain reaction（RT-PCR）法でV β レパートリーを検討した。

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、本研究目的を解析する上において適切であると判断された。とくに、リンパ球のV β 遺伝子の解析法として、RNAを抽出後cDNA合成をおこない、22種類のV β 特異的5'primerと³²P標識3'C β （ β chain constant region）primerを用い、各V β ごとにRT-PCRをおこない、その産物を電気泳動した後、各V β 遺伝子の放射活性の比率からV β の使用頻度を求めており、V β 遺伝子の解析を行う上で、その精度、再現性に問題はない。また、V β 6のアミノ酸配列の解析法として、V β 6-C β 遺伝子をpGEM vectorにてクローニングし、dye primer cycle sequenceと、レーザー蛍光DNAシーケンサーを用いて complementarity determining region 3（CDR3）の塩基配列から求めているが、この方法も確立された方法として適切であると判断された。

(2)健常者、およびサ症患者の末梢血とBALF中リンパ球の各V β 使用頻度の解析から、サ症のBALFでは健常者に比べ、17例中15例にV β の強い発現が認められ、とくにV β 2とV β 6の発現が顕著であり、同症の末梢血と比較してもほぼ同様の傾向が認められることを明らかにしている。これらの所見から、申請者はサ症の肺局所において、V β 2あるいはV β 6を発現したT細胞が増加することがサ症の特徴であると主張している。これに対し、審査委員会では、これまでに報告がみられないとして独創性が認められるとともに、サ症発症に関与する未知の抗原を解明する上で示唆に富むものと判断された。

(3)サ症のBALFリンパ球でV β 6を強く発現している3例につき、CDR3のアミノ酸配列を解析した結果、症例により異なるものの一部に相同性が認められることを見だし、サ症V β 6⁺T細胞はCDR3を用いて抗原認識を行い、オリゴクローナルに増殖する可能性を主張している。この見解は未知の抗原の認識機序を解明する上で新しい考え方を提唱するものであると評価された。

なお、審査の過程において、本研究対し次のような質疑がなされた。

- 1) サ症末梢血中のリンパ球亜群の比率と $\gamma\delta$ T細胞の出現率について
- 2) サ症の病理組織像や症状に病期による違いが認められるか
- 3) BALを行った部位が肺上葉の変化を反映している根拠
- 4) 肺内リンパ節のT細胞に関してV β 解析を行ったか
- 5) BALFリンパ球のCD4/8比が高値を示す理由と、病態との相関について

- 6) サ症の BALF リンパ球で V β 2 と V β 6 の発現増加を示さない例をどのように解釈するか
- 7) V β 2 発現例で CDR3 のアミノ酸配列を検討したか
- 8) Propionibacterium acnes やスーパー抗原で刺激した際の BALF リンパ球について V β 2 と V β 6 の発現を検討したか
- 9) Moller らの V β 発現に関する研究成績と本研究結果の不一致をどのように説明するか
- 10) サ症発症抗原の侵入部位として、肝や小腸の可能性はないか

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)の学位論文に相応しい内容をもつことを審査委員全員の一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 山下 昭
副査 教授 池田 和之 副査 教授 吉見 輝也
副査 助教授 古川 福実 副査 講師 鈴木 一也