

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:91-93.

平成25 年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題Vogt-  
小柳- 原田病で増加するCD4 陽性T 細胞クロー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

木ノ内 玲子

依頼稿 (報告)

# 平成 25 年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 Vogt-小柳-原田病で増加する CD4 陽性 T 細胞クローンの検 索とその抗原ペプチド同定による診断法・治療法の研究

木ノ内 玲 子\*

## はじめに

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、診断法の確立がのぞまれる。

原田病の患者のほとんどが HLA-DR4 (HLA-DRB1\*0405) を有し<sup>1)</sup>、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可能性が考えられ、特定の病因抗原ペプチドを結合した HLA-DR 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 (図 1)。

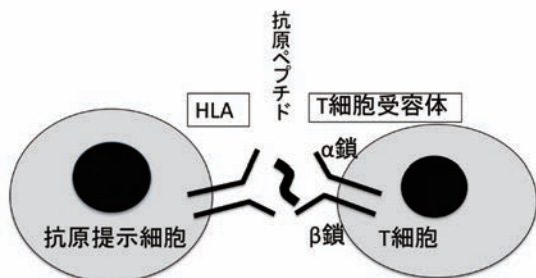


図 1 T 細胞受容体による自己の HLA と抗原ペプチドの認識

T 細胞受容体が自己の HLA とそれに接着する抗原ペプチドを同時に認識する。T 細胞受容体は抗体と同様に多様性がある。

## 研究目的

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 T 細胞受容体  $\beta$  鎖の相補性決定領域 3 (CDR3: 最も多様性に富む領域) のシークエンスから明らかにし (図 2)、典型的でない所見を呈する原田病の診断法として確立可能か検討する。この CD4 陽性 T 細胞クローンの認識する抗原ペプチドの同定をはかる。

## 対 象

当院ぶどう膜炎外来を受診し、インフォームドコンセントを得た原田病患者 17 例と対照とし原田病以外のぶどう膜炎患者 12 例を対象とした。原田病患者 17 例のうち 10 例は治療後の検討も行った。

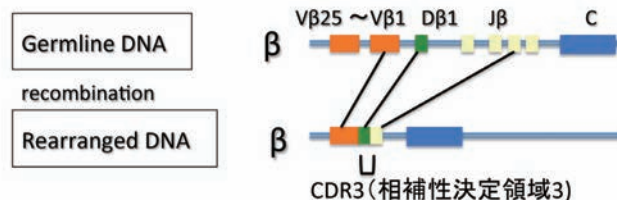


図 2 T 細胞受容体の遺伝子

T 細胞受容体は遺伝子再構成により多様性を生み出している。もっとも多様性のある部分が相補性決定領域 3 (CDR3) であり、V  $\beta$  と C 領域の配列でプライマーを作成し、この部分の配列を検討した。

\*旭川医科大学 医工連携総研講座

## 方法

### cDNA の作成

末梢血 10cc を採取し（当院倫理委員会承認済み）、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）。

CD4 陽性単核球の T 細胞受容体の V  $\beta$  1 から V  $\beta$  25 のプライマーで PCR したものを GeneScan で分析

T 細胞受容体 V  $\beta$  1 から V  $\beta$  25 でサブタイプを合わせて、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。上記方法で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 PCR を実施し、各々の PCR 産物を GeneScan にかけた。

原田病の患者末梢血で増加している CD4 陽性 T 細胞のクローンの検討

GeneScan の結果、共通クローンの疑わせるパターンがあった V  $\beta$  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 V  $\beta$  と C 領域の PCR プライマーで増幅した。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。

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

CDR3 領域の塩基配列を決定したところ、原田病で共通で見られた配列があり、これを参考に定量 PCR 用にプライマーを作成した。定量 PCR は 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

## 結果

### genescan

原田病患者 3 例の末梢血中の CD4 陽性細胞の mRNA から RT-PCR を行い、TCR の V  $\beta$  1 から V  $\beta$  25 のプライマーを用いて増幅したそれぞれのサンプルを geneScan にかけたところ、V  $\beta$  11 と V  $\beta$  21 で共通して増えているようにみられるピークがみられた。

CD4 陽性単核球の T 細胞受容体  $\beta$  鎖の CDR 3 のアミノ酸配列解析

V  $\beta$  のプライマーで増幅した CD4 陽性単核球の T 細胞受容体  $\beta$  鎖の塩基配列から CDR 3 のアミノ酸配列を決定した。原田病患者 17 例中 13 例の CDR 3 の配列で、共通なものが認められた。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。

### 定量 PCR

原田病 13 例で共通で認められた CDR3 の配列からプライマーを作成した。原田病患者 17 例のうち 14 例の CD4 陽性単核球からの cDNA を用いて、定量 PCR で確認したところ、14 例中 8 例でこの配列が確認できた。原田病治療後 10 例と原田病以外のぶどう膜炎 5 例での定量 PCR ではこの配列は増幅されなかった。

## 考察

自己抗体の検出は自己免疫疾患の診断に有用であるが、疾患特異的に増加する T 細胞クローンの同定による診断法はまだ確立されていない。近年、T 細胞受容体や B 細胞受容体の CDR3 の配列の検討は進められてきているが<sup>2)</sup>、疾患特異的と周知されるに至るものはない。今回、原田病患者の末梢血の CD4 陽性単核球を用いて、T 細胞受容体の CDR3 の配列から、患者で多く見られるクローンが見つかった。このクローンの CDR3 の配列で定量 PCR をおこなったところ、原田病患者で多く確認できた。現在、CDR3 の配列からの定量 PCR が診断に有用か、新規原田病患者で検討中である。今回、CDR3 の配列を解析したのは、GeneScan で原田病患者間での共通クローンの存在を疑われた V  $\beta$  のプライマーで増幅したのみである。これ以外の V  $\beta$  を持ち、原田病患者の多くに見

られる共通のクローンが他にある可能性は残っており、今後、次世代シーケンス分析など新しい技術を使用して、解析を続ける必要があると考えられる。また、今回認められたクローンが原田病に特異なものであるか、あるいは、新規発症の原田病の診断に利用できるかは今後まだ検討していかなければならない。

このクローンからの抗原ペプチド解析については、他の増加クローンがないか、新規発症患者でもクロー

ンの存在を確認してから、できるだけ新しい技術を応用して行う必要があると考えている。

## 文 献

- 1) 大野重昭, 他: 日眼雑誌 96:1558-1579, 1992.
- 2) Krell PF, Reuther S, Fischer U, et al. *Haematologica*. 2013;98(9):1388-1396.