

# Prediction of clinical course in pediatric minimal change nephrotic syndrome by t-cell receptor diversity analysis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/17278">http://hdl.handle.net/2297/17278</a>

## 微小変化型ネフローゼ症候群における TCR構造多様性の分析による予後の推測

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管発生発達病態学  
(旧講座名：小児科学)  
(主任：小泉晶一教授)

中 井 明 子

微小変化型ネフローゼ症候群 (minimal change nephrotic syndrome, MCNS) 患者において、T細胞機能異常と疾患の関連性が報告されている。我々は、36名の小児MCNS患者 (18名の非頻回再発例と18名の頻回再発例およびステロイド依存例) におけるT細胞受容体 (T cell receptor, TCR)  $V\beta$  レパートリー分布解析、TCR  $V\beta$  の相補性決定領域 (complementarity determining region, CDR) 3のサイズ分布解析を行うことにより、TCR構造の多様性を評価し、その臨床経過との関連性について比較検討した。その結果、非頻回再発例ではTCR  $V\beta$  レパートリーの分布の異常は、 $CD4^+$ T細胞、 $CD8^+$ T細胞ともに少なかった。一方、頻回再発例およびステロイド剤依存例では、特に $CD8^+$ T細胞において、特定のTCR  $V\beta$  レパートリーの異常増殖が認められる例が多く存在しており、さらにCDR3サイズ分布の偏りがみられ、TCRの多様性が明らかに減少していた。また、頻回再発例、ステロイド依存例では、臨床経過の改善とともに、TCRの多様性にも改善がみられる例が存在した。以上より、小児MCNSにおいて病初期にTCR多様性の解析を行うことにより、その後の臨床経過を推測し、多様性の減少を認めた例においては、早期の免疫抑制剤の使用が可能になることが示唆された。

**Key words** CDR3, MCNS, TCR diversity,  $V\beta$  repertoire

微小変化型ネフローゼ症候群 (minimal change nephrotic syndrome, MCNS) は、高度蛋白尿と全身の浮腫を主症状とする疾患である。小児期MCNSでは多くの臨床スタディにより経口ステロイド剤による治療が確立されている<sup>1)2)</sup>。しかし、一部は頻回再発やステロイド依存の経過をとり、ステロイド剤に加えて、サイクロフォスファミドやシクロスポリンなどの免疫抑制剤の投与が必要となる。これらの免疫抑制剤を投与する頃には、既に大量のステロイド剤が投与されており、そのステロイド剤による副作用が問題となっている。そこで、初発時に頻回再発例かあるいはステロイド依存例かが推測できれば、病初期からの免疫抑制剤の使用が可能となり、ステロイド剤の総投与量を減少させ、その結果ステロイド剤の副作用を減少させることが可能となるのではないかと考えた。

これまでの報告により、MCNSの病態にはT細胞の関与が示唆されている<sup>3)~5)</sup>。いくつかの報告では、根本的なT細胞の機能異常が糸球体のポドサイトの機能異常を惹起することも示唆している<sup>6)7)</sup>。それゆえ、長期間のステロイド剤投与や免疫抑制剤の投与を必要とする難治例においてはT細胞の機能異常が関連していることが推測されてきた。本研究では、MCNS症例についてT細胞受容体 (T cell receptor, TCR)  $V\beta$  レパートリー分布解析、TCR  $V\beta$  相補性決定領域 (complementarity

determining region, CDR) 3サイズ分布解析を用いてTCR構造の多様性の評価を行い、臨床経過との関連性について検討した。さらに、今回の結果がMCNS症例のステロイド反応性の推測に応用できるかについても考察した。

### 対象および方法

#### I. 対象

2000年から2006年の期間中に金沢大学医学部附属病院小児科および関連病院小児科に通院する小児期MCNSの患者36名を対象とした。男女別では、男21例、女15例。年齢は、1歳~21歳、平均9.4歳であった。このうち、非頻回再発例 (non frequent relapser, NFR) 18例、頻回再発例 (frequent relapser, FR) 13例、ステロイド剤依存例 (steroid dependent patient, SD) 5例であった。

健康成人20例のTCR  $V\beta$  レパートリー分布解析結果を正常コントロールとして用いた。また、CDR3サイズ解析には6名 (0歳~11歳) の健康小児を正常コントロールとして使用した。

NFR, FR, SDの分類基準は、以下のような一般的な方法に準じた。頻回再発例とは初回治療を国際法<sup>7)</sup>(ステロイド剤短期投与法) による治療にて行った場合、寛解導入後6ヶ月間に2回以上の再発をきたしたものの、またステロイド剤の長期漸減投与

平成19年10月3日受付、平成19年10月24日受理

Abbreviations: CDR, complementarity determining region; CS, complexity score; FR, frequent relapser; MCNS, minimal change nephrotic syndrome; MPHs, major peak heights; NFR, non frequent relapser; SD, steroid dependent patient; TCR, T cell receptor; TPHs, total peak heights

を行った場合は、ステロイド治療中止後、2ヶ月以内の再発を2回以上繰り返したものとした。また、ステロイド剤依存例とはステロイド剤の投与中ないし投与中止後2週間以内の再発を2回以上繰り返したもの、あるいは4回の再発のうち2回以上が投与中ないし中止後2週間以内であったものとした<sup>7)</sup>。

## II. 方法

### 1. 検体

初発時、再発時、ステロイド剤内服中の寛解時、ステロイド剤非内服中の寛解時において、外来での採血にてヘパリン加静脈血を採取し用いた。なお、本解析のプロトコルは、金沢大学大学院医学系研究科におけるヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の許可を得ている(許可年月:2006年8月29日、審査番号:第119号、課題名:小児遺伝性疾患に対する包括的遺伝診断システムの確立)。また用いた検体は、ヘルシンキ宣言に準じて保護者および本人にインフォームドコンセントを行い、承諾を得た対象においてのみ解析を施行した。

ヘパリン加静脈血からフィコール・ハイパーク (Ficoll-Hypaque) 比重遠心法にて単核球を分離した。その単核球を2-アミノエチルイソチオウロニウムブロマイド (2-aminoethylisothiuronium bromide, Sigma, St. Louis, USA) 処理ヒツジ赤血球を用いたロゼット法とフィコール・ハイパーク比重遠心法を用い分離したEロゼット形成細胞をT細胞として用いた。さらに、Dynabeads M-450 CD4, CD8 (DynaL Biotech ASA, Oslo, Norway) を用いて、それぞれCD4<sup>+</sup>T細胞(CD8<sup>+</sup>T細胞)とCD8<sup>+</sup>T細胞(CD4<sup>+</sup>T細胞)に分離しT細胞亜分画検体として用いた<sup>8)9)</sup>。

### 2. 総RNA抽出とcDNAの作製

上記より得られたT細胞亜分画から、Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) を加えRNAを抽出した。RNA濃度は、GeneQuant Pro RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を用いて測定した<sup>10)</sup>。抽出されたRNAは、RandomHex Primer (タカラ, 大津) とRAV-2 (タカラ) を加え、Gene Amp PCR System 9600 (Parkin-Elmer Applied Biosystems Division, Norwalk, USA) を用いて反応させcDNAに逆転写した。

### 3. TCR V $\beta$ レパートリー分布解析 (量的解析)

TCR V $\beta$  レパートリー分布解析は3カラーフローサイトメトリー法により行った。1.で得られたT細胞分画をリン酸緩衝生

理食塩水(PBS, pH7.2)で3回洗浄し、各V $\beta$ レパートリー(V $\beta$  1, 2, 3, 5.1, 5.2, 5.3, 7, 8, 9, 11, 12, 13.1, 13.8, 14, 16, 17, 18, 20, 21.3, 22, 23)に対するPE標識抗TCR V $\beta$ 抗体(Coulter Immunotech, Marseille, France)と混和させ30分間冷却反応し、さらにFITC標識抗CD8抗体(Becton Dickinson, San Diego, USA)とRPE-Cy5標識抗CD4抗体(DAKO, Glostrup, Denmark)とで15分間反応させた後、PBSで2回洗浄後、細胞をPBSに再浮遊したうえでフローサイトメーターCytoron Absolute (Ortho Diagnostic System, 東京)を用いて解析した(図1A)。

### 4. TCR V $\beta$ CDR3 サイズ分布解析 (質的解析)

TCR V $\beta$  CDR3 サイズ分布解析は、Konnoら<sup>8)</sup>やMizunoら<sup>9)</sup>の方法をもとに行ったが以下に要約する。24種類の5'TCR V $\beta$  特異的プライマー(5'TCDBV)(V $\beta$  1~20<sup>11)</sup>, V $\beta$  21~24<sup>12)</sup>)と6Fam標識3'TCR C $\beta$ 特異的プライマー(3'TCRBC)を用いた。cDNAはGeneAmp PCR System 9700 (Parkin-Elmer Applied Biosystems)を用いて、94℃×1分、55℃×1分、74℃×1分で35サイクル増幅させた。各PCR産物2 $\mu$ l、フォルムアミド12 $\mu$ l、Gene Scan 500 ROX (Parkin-Elmer Applied Biosystems) 0.2 $\mu$ lを混和して、95℃×2分で熱変性後、急速冷却した。その産物をABI 310 GeneScan (Parkin-Elmer Applied Biosystems)で自動解析した(図1B)。CDR3解析による各々のピーク位置のずれはアミノ酸をコードする3bpの数の差を反映している。正常パターンでは、TCR $\beta$ 鎖の再編成により多様性が獲得されるため9~10種のピーク(異なるアミノ酸数)が同定されガウス分布を呈する。

### 5. CS (Complexity score) の算出

CSは、すでに報告されているBonbergerら<sup>13)</sup>の方法を参照して算出した。TCR V $\beta$  CDR3サイズ分布は、各TCR V $\beta$ に異なった数と大きさのピークが検出された。それらのピークから、計算式によりCSを算出した<sup>9)13)</sup>。計算式は以下の通りである。

CS = TPHsの総和×MPHsの数/MPHsの総和。ここでmajor peak heights (MPHs)とは、total peak heights (TPHs)の総和の10%以上を占めるピークのことである。前述の様に、正常パターンでは多様性が獲得されるため9~10種のピークが同定されガウス分布を呈する。そして、CSも平均5~6と高値を示す。しかし、異常パターンでは多様性が獲得されずシングルまたはオリゴクローナルなピークを呈しCSも1~4と低値を示す(図2)。

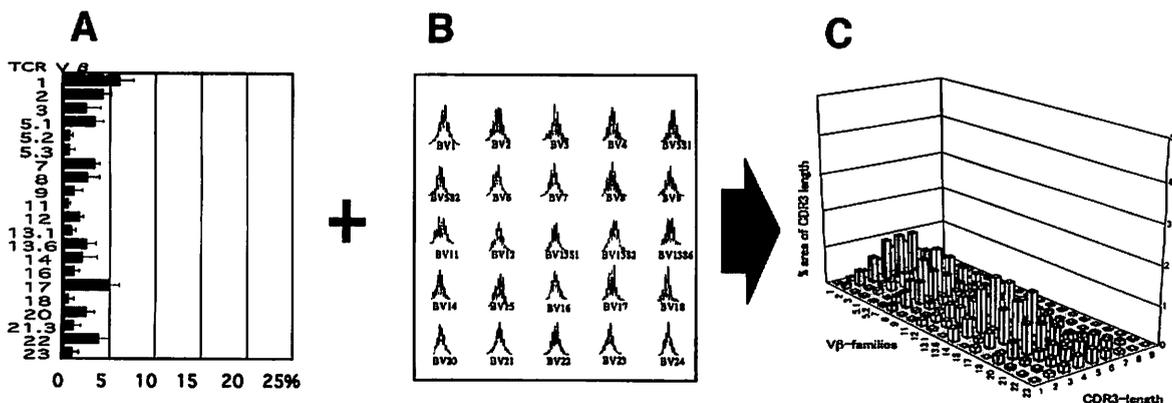


Fig. 1. V $\beta$  repertoires (A), CDR3 sizes (B), and 3-D analysis of TCR diversity (C) in normal controls: These figures show normal patterns of quantitative analysis (V $\beta$  repertoires), qualitative analysis (CDR3 sizes), and a combination of the two (3-D analysis).

6. TCRレパートリーの量的・質的解析

TCR Vβ レパートリー分布解析結果による量的解析とTCR Vβ CDR3サイズ分布解析結果による質的解析を掛け合わせて3次元グラフに表した<sup>14)~16)</sup>。総CDR3を100%として各々のピークの%を算出し、レパートリー分布による各Vβレパートリーの%と掛け合わせた(図1C)。

7. 統計学的処理

測定値は、平均値±標準偏差 ( $\bar{X} \pm SD$ ) で表記した。有意差検定は、Mann-WhitneyのU検定およびt検定により検討した。p<0.05を統計学的有意差ありと評価した。

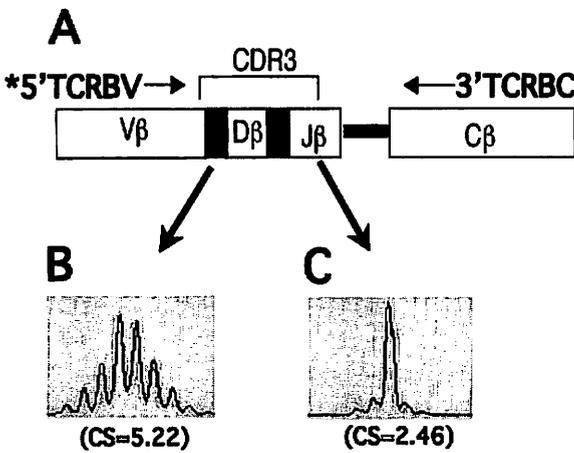


Fig. 2. Spectratyping of CDR3 size: Primer for 24 different Vβ subfamilies and a fluorescent BC primer (A). Variety in a Vβ repertoire results in multiple peaks; Gaussian distribution (B). A repertoire lacking variety shows few peaks; Skewed distribution (C).

成 績

I. 正常コントロールにおける末梢血TCR Vβレパートリー分布解析, CDR3サイズ分析および3D解析

20例の正常コントロールにおけるVβレパートリー分布解析の結果を示す(図1A)。また、それぞれの正常コントロールにおけるCDR3サイズ分布(図1B)と3D解析(図1C)の結果を示す。正常コントロールでは、TCR Vβ CDR3サイズ分析は多くのピークを認めガウス分布を示し、CSは高値を示した(図2)。

II. MCNS各臨床型のTCR Vβレパートリー分布

MCNS各臨床型でのVβレパートリー分布の結果を正常コントロールとともに図3に示す。非頻回再発例ではCD4<sup>+</sup>T細胞, CD8<sup>+</sup>T細胞ともにVβレパートリーの分布異常はわずかであった。これに比して、頻回再発例, ステロイド依存例ではCD8<sup>+</sup>T細胞においていくつかのVβに正常+2SD以上の増加を示すレパートリー分布が認められた(\*で示す)。しかし、この傾向はCD4<sup>+</sup>T細胞では顕著ではなかった。

III. MCNS各病型におけるCDR3サイズ分析(図4)

正常コントロールでは、すべてのCD8<sup>+</sup>T細胞のVβにおいてガウス分布を呈し、CS平均値は5.27であった。非頻回再発例でも、ほとんどのVβが正常ガウス分布を呈してCS平均値は5.32で正常コントロールとほぼ同等であった。これに対し、頻回再発例およびステロイド剤依存例ではオリゴクローナルもしくはモノクローナルな分布を呈するVβが多数存在し、頻回再発例ではCS平均値4.92、ステロイド剤依存例ではCS平均値4.38と低値であった。このような傾向は、CD8<sup>+</sup>T細胞で強く認められたがCD4<sup>+</sup>T細胞では認められなかった(図4)。

IV. CSの各群における比較

CD4<sup>+</sup>T細胞とCD8<sup>+</sup>T細胞のCSを比較するために、正常コントロール、非頻回再発例、頻回再発例、ステロイド剤依存例、各群の代表例をそれぞれ列挙し比較検討した(図5)。正常コントロールでは、ほとんどのVβがガウス分布を呈しているため

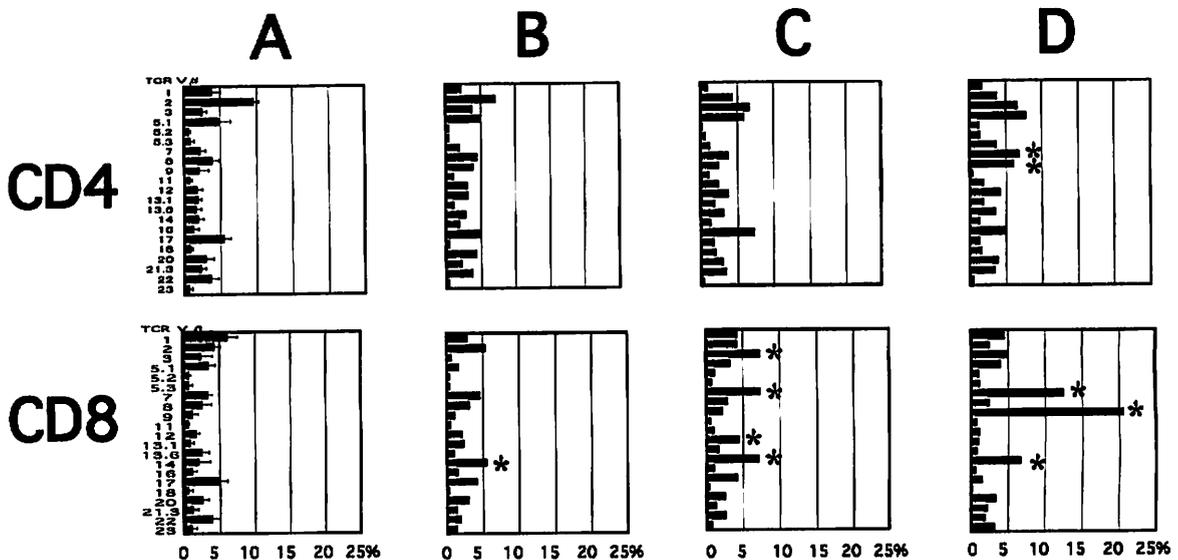


Fig. 3. Vβ repertoire distribution of a typical case in different groups of MCNS patients: (A), normal control; (B), NFR; (C), FR; (D), SD. \* indicates obviously increased Vβ repertoires. Same as normal control, abnormalities in Vβ repertoire distribution in NFR patient were infrequent in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. In some FR/SD patients, selected Vβ repertoires were significantly increased in CD8<sup>+</sup> T cells.

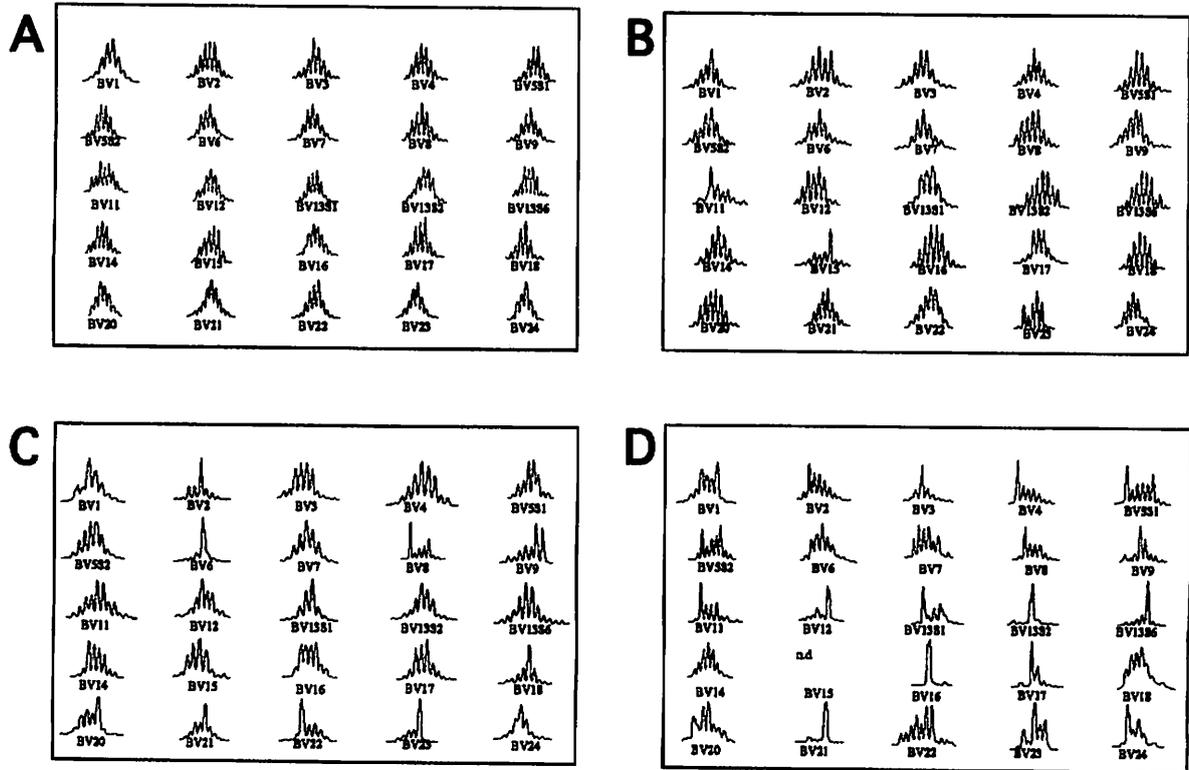


Fig. 4. CDR3 size distributions on CD8<sup>+</sup> T cells of a typical case in different groups of MCNS patients: (A), normal control; (B), NFR; (C), FR; (D), SD. In FR/SD patients CDR3 size distributions showed an oligoclonal or monoclonal pattern in many V $\beta$  subfamilies of CD8<sup>+</sup> T cells. Mean CS values of FR (4.92) and SD (4.38) patients were low in comparison with normal control (5.27) and NFR (5.32) patients. Numerical value in a parenthesis is mean CS value of each group.

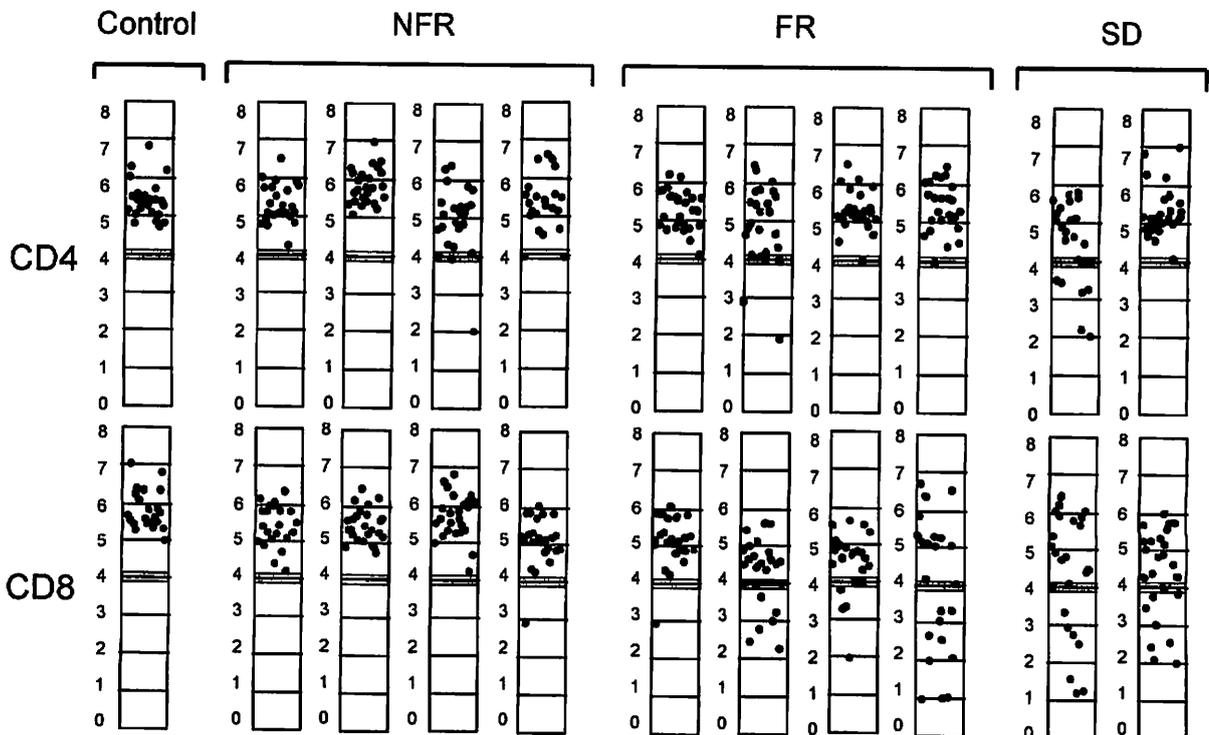


Fig. 5. Distributions of mean CS values of some typical cases in patients from each group: Mean CS was < 4.0 in many FR/SD V $\beta$  repertoires.

CSが5~6の間に分布していた。非頻回再発例では、正常群とほぼ同様なパターンを呈していたが、頻回再発例、ステロイド剤依存例では、スコア分布において幅広いばらつきが認められるようになり、特にCSが4以下に著しく低下したV $\beta$ レパートリーがより目立つようになった。このような傾向は、CD4<sup>+</sup>T細胞よりもCD8<sup>+</sup>T細胞に顕著であった(図5)。

また、すべての症例でのCD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞におけるCSをグラフ化した(図6)。CD4<sup>+</sup>T細胞について、各群のCSの平均値を比較すると正常コントロールでは5.14 $\pm$ 0.01、非頻回再発では5.26 $\pm$ 0.21、頻回再発例/ステロイド剤依存例では5.13 $\pm$ 0.31であり有意差は認められなかった。一方、CD8<sup>+</sup>T細胞における各群のCSの平均値は正常コントロールで5.25 $\pm$ 0.15、非頻回再発例では5.42 $\pm$ 0.33、頻回再発例/ステロイド剤依存例では4.90 $\pm$ 0.44であり、正常対象/非頻回再発例と頻回再発例/ステロイド剤依存例において統計的有意差が認められた。

頻回再発例とステロイド依存例でのCD8<sup>+</sup>T細胞の平均CSは半数の例で-2SD (CS=4.95) 以下であった。そして、MCNS症例で、CD8<sup>+</sup>T細胞の平均CSが4.95以下の場合、鋭敏度56%、特異度77%で頻回再発またはステロイド依存型の経過をとることが予測された。なお、症例が少ないので断定は出来ないが、ステロイド剤依存例に限って言えば、CD8<sup>+</sup>T細胞の平均CSが4.95以下の場合に鋭敏度、特異度ともに100%近い確率で予測できる可能性も示唆された。

#### V. 短期間のステロイド治療による TCR 多様性的変化

我々は、短期間のステロイド治療そのものが、TCRの多様性に影響を及ぼすかどうかに関して検討を行った(図7)。CD8<sup>+</sup>T細胞におけるTCR V $\beta$ レパートリー分布およびCDR3サイズ分析では、初発時、2週間のステロイド治療後、3か月後の寛解

時ともに同様のパターンを示し、短期間のステロイド治療による影響は認めなかった。

#### VI. 臨床経過と TCR 多様性的変化

頻回再発例において、初発時から3年間、本解析を施行し得た一例を呈示する(図8)。この症例は臨床的には当初頻回再発例であったが、経過とともに非頻回再発と軽快していった。TCR構造の多様性的解析結果では、初発時ではCD8<sup>+</sup>T細胞のCS平均値が4.02であったが、3年後には臨床症状の軽快に伴いCS平均値4.92まで改善していった。このように、TCR V $\beta$ レパートリーは臨床症状の改善度と非常によく相関していた。

#### VII. TCR レパートリーの量的・質的解析

TCR V $\beta$ レパートリー分布解析(量的解析)結果とTCR V $\beta$

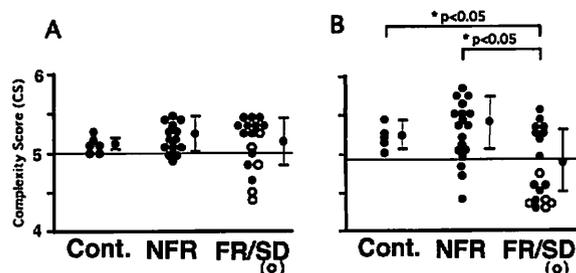


Fig. 6. Mean CS values for all patients: There was a significant difference of mean CS values between normal controls or NFR patients and FR/SD patients. A value of -2SD was shown in a line. Control; n=6 (CD4<sup>+</sup>T cell; n=6, CD8<sup>+</sup>T cell; n=5), NFR; n=18 (CD4<sup>+</sup>T cell; n=14, CD8<sup>+</sup>T cell; n=18), FR; n=13 (CD4<sup>+</sup>T cell; n=12, CD8<sup>+</sup>T cell; n=13), SD; n=5 (CD4<sup>+</sup>T cell; n=5, CD8<sup>+</sup>T cell; n=5).

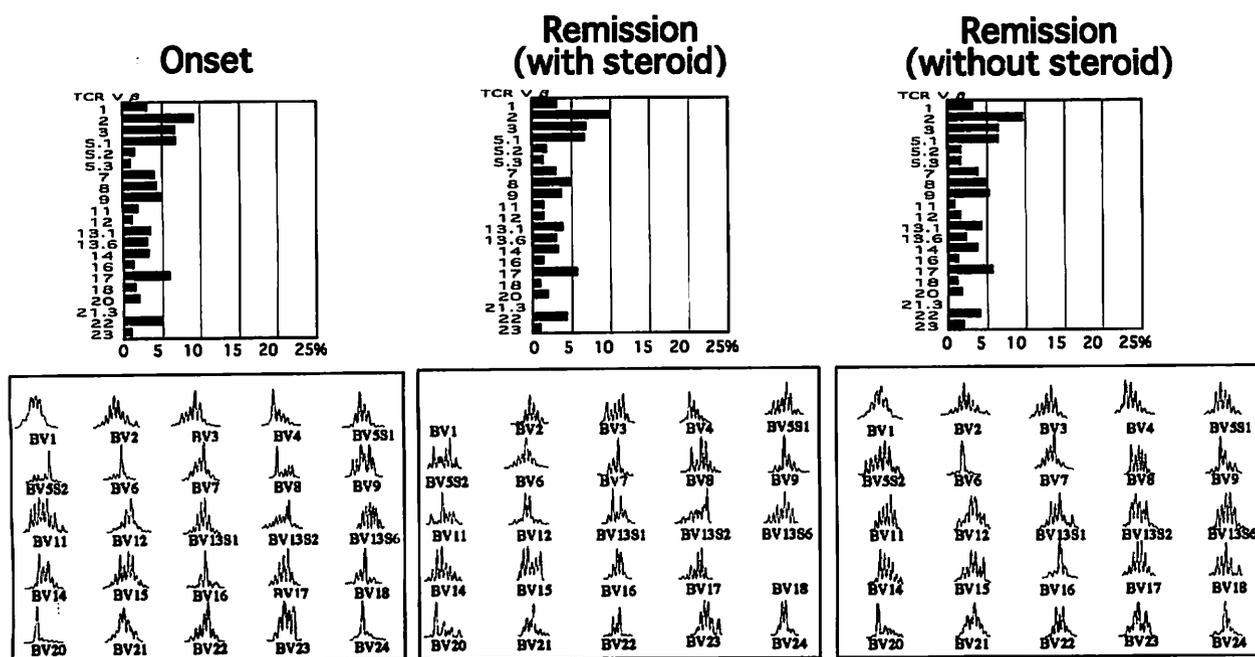


Fig. 7. Effect of short-term steroid therapy on CD8<sup>+</sup> TCR diversity: Short-term steroid therapy did not result in significant distortion of the TCR repertoire or CDR3 size distribution. Each CS value was 4.69 at the onset, 4.57 at remission with steroid and 4.92 at remission without steroid.

CDR3サイズ分布解析 (質的解析)の 結果を掛け合わせて3次元による量的・質的解析評価を行った (図9).

正常対象および非頻回再発例では, TCR V $\beta$  レパートリー分布解析で異常に増加しているV $\beta$ は認めず, TCR V $\beta$  CDR3サイズ分布解析でもほとんどのV $\beta$ ではガウス分布を示すため, 3次元解析にても異常に増加しているV $\beta$ は認められなかった.

これに対して, 頻回再発例やステロイド剤依存例の一部では, TCR V $\beta$  レパートリー分布解析で異常に増加しているV $\beta$ の存在と, そのV $\beta$ レパートリーにおけるモノクローナル/オリゴクローナルなTCR V $\beta$  CDR3サイズ分布を認め, TCR V $\beta$ レパー

トリーの量的, 質的変化は3次元解析によってより顕著に示された.

考 察

MCNSは最も頻発する小児期糸球体疾患で, 高度の蛋白尿, 低アルブミン血症, 高脂血症, 浮腫を特徴とする. 病理組織的には, 電子顕微鏡における糸球体上皮細胞の足突起の癒合が唯一の所見である. 本疾患は, 一般的にステロイド剤によって改善される. 国際小児腎臓研究班 (International Study of Kidney Disease of Children, ISKDC) の調査では, ステロイド剤反応例は約90%, そのうち再発しない例は約40%で比較的予後良好な疾患である. しかし, ステロイド剤依存例が20%, 頻回再発例が約30%であり, ステロイド剤を長期投与せざるを得ない症例が半数近く存在する. このような症例では, 低身長, 身体的変貌, 白内障といった副作用を始めとし, なかには致死的経過にいたる重篤な副作用を呈する症例も存在し, 本疾患の治療のうえで大きな問題となっている<sup>12)</sup>. 近年では頻回再発例, ステロイド依存例に対して, シクロスポリンを代表とする免疫抑制剤を使用し良好な結果が得られている<sup>7)</sup>. しかし, これらの免疫抑制剤は頻回再発例やステロイド剤依存例および抵抗例に投与されるため, 投与し始めた頃にはすでにステロイド剤による副作用がかなり出現してしまっているのが現状である. したがって, 病初期からステロイド剤に対する反応性が予測できれば, より早期に免疫抑制剤を含めた適切な初期治療が施行で

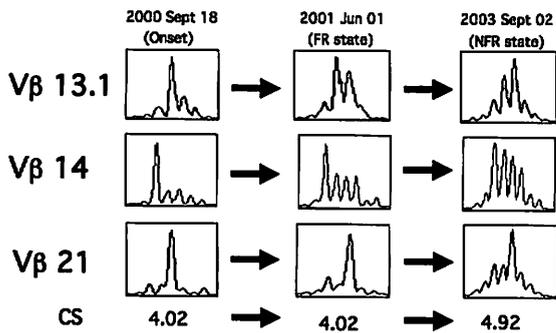


Fig. 8. Relationship between clinical course and change in CD8<sup>+</sup> TCR diversity: The increase in CS correlated well with improvement in the clinical course.

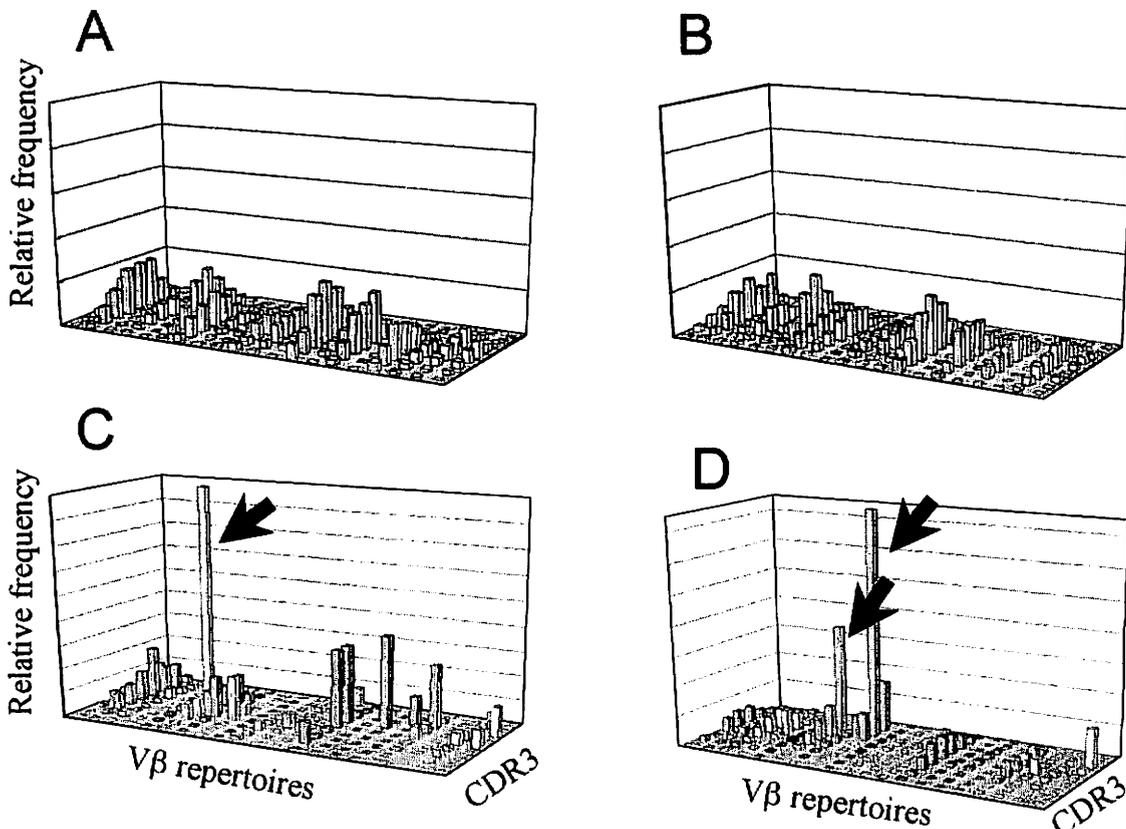


Fig. 9. 3-D analysis of CD8<sup>+</sup> TCR repertoires in each group of MCNS patients: (A), normal control; (B), NFR; (C), FR; (D), SD. In FR/SD patients, selected V $\beta$  repertoires in CD8<sup>+</sup> T cells were markedly increased and CDR3 size analysis showed oligoclonal and/or monoclonal patterns.

き、ステロイド剤の副作用も軽減できるものと思われる。よって、病初期からステロイド剤に対する反応性を予測できるような指標の確立が期待される。

一方、MCNSの病因に関しては1974年にShalhoub.R.Jが全身的なT細胞の機能異常と細胞介在性障害であり、T細胞が産生する液性因子(リンホカイン)の糸球体基底膜透過性亢進作用によるという仮説を提唱<sup>3)</sup>して以来、その発生に免疫学的機序が関与しているということが示唆されている。活性化したCD8陽性T細胞が疾患の活動性の高い時期に増加し、それがIL-2を誘導するという報告もある。さらに疾患活動期にCD4とCD8比の逆転がみられ、それが細胞障害性T細胞の増加を促すという報告もある。これらの報告から、T細胞がMCNSの病因に大きな役割を果たしていることが示唆される<sup>9)</sup>。

T細胞機能に関しては、最近ではTCR構造の多様性解析が注目されている。TCR構造の多様性解析は、膠原病、免疫不全疾患、悪性リンパ腫など様々な疾患で解析されている<sup>17)~22)</sup>。そのうちの一つでは、特発性ネフローゼ症候群の難治例でCD8<sup>+</sup>T細胞が直接関与していることを示している<sup>21)</sup>。その一方で、移植後のネフローゼ症候群の再発例ではTCRの活性化または特定のクローンの増殖も認められなかったとする報告もある<sup>22)</sup>。その他ネフローゼ症候群の病因にT細胞が関与しているという論文は、今回提示した以外にも多くの報告がある。

本研究では、MCNS患者を非頻回再発例と頻回再発例およびステロイド剤依存例の3群に分けてT細胞構造の機能解析を行った。非頻回再発例では、TCR V $\beta$ レパートリー分布およびTCR V $\beta$  CDR3サイズ分布ともに異常を示すものはまれであった。これに対し、頻回再発例およびステロイド剤依存例ではTCR V $\beta$ レパートリー分布、TCR V $\beta$  CDR3サイズ分布の両者ともに、CD8<sup>+</sup>T細胞における異常分布が認められた。これらの結果から、少なくともCD8<sup>+</sup>T細胞におけるTCR構造の多様性を検討する事で、非頻回再発例か否かを病初期から約60%の感度で鑑別できる可能性が示唆された。なお、ステロイド剤依存例に限れば約100%の感度で鑑別できる可能性も示唆された。そして、本解析を用いて頻回再発例、ステロイド剤依存例と予測できた症例に対して、病初期からステロイド剤以外の免疫抑制剤を早期併用する事で、ステロイド剤の副作用をいっそう軽減でき本疾患の治療法の向上に大いに貢献するものと考えられた。

また、長期間経過を追って検討した結果からは、臨床経過の改善とともにCD8<sup>+</sup>T細胞においてTCRの多様性の改善が認められた。しかし、短期間のステロイド治療ではTCR構造の多様性には変化は認められなかった。つまり、測定する時期はステロイド剤による初期治療が始まってからでも十分評価しうる事が判明した。また、長期間の観察においては、適宜本解析を施行する事で再発回数やステロイド剤の反応性を予測してゆく事も可能であると思われた。

さらに、今回のTCR V $\beta$ レパートリー分布解析による量的解析とTCR V $\beta$  CDR3サイズ分布解析による質的解析を組み合わせた量的・質的3次元解析の結果から、頻回再発例やステロイド剤依存例において異常に増殖しているクローンをより顕著に検出できた。これらのクローンは、本疾患の病態やステロイド剤の反応性に深く関与するクローンであると考えられた。しかし、これらのクローンは症例ごとで全く違っており共通のクローンは存在しなかった。そこで、これらのクローンを抽出し共通に認識し反応する抗原を検索すれば、いまだかつて明らかに

されていない本疾患の病態にさらに近づく事が出来る可能性が示唆された。

以上、TCR構造の多様性の解析結果から、小児MCNSではリンパ球なかでもCD8<sup>+</sup>T細胞において、その病態に深く関与する亜群が存在していることが示唆された。また、今回の解析方法を用いる事で病初期から再発の程度やステロイド剤の依存度が予測でき、その結果を治療に応用できる可能性も考えられた。さらに、今回の結果を更に深く検討を進める事で、本疾患の病因にも大きく迫る事が可能であると考えられた。しかし、これらの仮説の検証にはさらに症例を重ねる必要がある。また、今回は小児の症例のみ解析を行ったが、成人でも同様の結果が得られるかどうかは未知である。また、この解析が本疾患の転帰を予測するうえで本当に有用か否かを検討するため、ステロイド剤への反応性、転帰とTCR多様性分析を組み合わせた大規模な前方視的臨床研究を計画中である。

## 結 論

小児MCNSにおけるTCR構造の多様性の解析を行い以下の結果を得た。

1. 予後良好な非頻回再発型では、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞ともにTCR構造の多様性は保たれており正常コントロールと同じようなパターンであった。
2. 一方、予後不良な頻回再発型やステロイド剤依存例では、TCR V $\beta$ レパートリー分布の解析においては、CD8<sup>+</sup>T細胞でのいくつかのV $\beta$ レパートリーに著明な増加を示すものが認められた。しかし、この傾向はCD4<sup>+</sup>T細胞ではそれほど顕著ではなかった。また、CDR3サイズ解析ではオリゴクローナルもしくはモノクローナルな分布を呈するV $\beta$ が多数存在し、TCR構造の多様性が失われていた。このような傾向は、V $\beta$ レパートリー分布解析の結果と同様にCD8<sup>+</sup>T細胞で強く認められたがCD4<sup>+</sup>T細胞では認められなかった。さらに、これらの傾向はステロイド剤内服の有無などの影響は受けず、短期間の観察ではその変化はわずかなものであった。一方、長期間の観察では再発の頻度やステロイド剤の感受性に相関して臨床経過の改善とともにTCR構造の多様性も改善していった。
3. TCR構造の多様性をスコア化した結果から、予後不良な頻回再発型もしくはステロイド剤依存型のある程度の確率で予測することが可能であると思われた。この予測を用いて、病初期からステロイド剤以外の免疫抑制剤も加えるような新たな治療法が確立できれば、本疾患の治療法の改善に大きく寄与できるものと思われた。
4. TCR V $\beta$ レパートリー分布の解析およびTCR CDR3サイズ解析を合わせて解析した結果では、予後不良と思われる頻回再発型やステロイド剤依存例において特定のクローンが異常に増加していた。この増加しているクローンには一定の傾向が得られなかったが、本疾患の難治度やステロイド剤感受性に深く関与している可能性が示唆された。そして、今後これらのクローンが共通に認識している抗原を検索してゆく事で、いまだ原因不明である本疾患の病態解明に大きく寄与する可能性も示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導と御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管発生発達病態学分野 小泉晶一教授

をはじめ、金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻病態検査学講座 谷内江昭宏教授、金沢大学医学部附属病院小児科 太田和秀講師（現在、国立病院機構金沢医療センター小児科医長）に深甚なる謝意を表します。さらに、本研究の遂行に御協力を賜りました金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管発生発達病態学 教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。また、貴重な患者検体を御提供くださいました公立砺波総合病院、公立能登総合病院、金沢赤十字病院、厚生進高岡病院、公立松任石川中央病院、国立病院機構金沢医療センター、珠洲市立総合病院、福井県済生会病院、小松市民病院の小児科の先生方に心より深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) International Study of Kidney Disease of Children . Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int* 13: 159-165, 1978
- 2) Niaudet P. Steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome in children. *In* ED Avner, WE Harmon, P Niaudet (eds), *Pediatric Nephrology*, 5th ed, p543-556, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2004
- 3) Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet* 2: 556-560, 1974
- 4) Cunard R, Kelly CJ. T cells and minimal change disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 1409-1411, 2002
- 5) Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C, Salsano ME. T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 39: 958-965, 2002
- 6) Patrakka J, Lahdenkari AT, Koskimies O, Holmberg C, Wartiovaara J, Jalanko H. The number of podocyte slit diaphragms is decreased in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Res* 52: 349-355, 2002
- 7) Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* 362: 629-639, 2003
- 8) Konno A, Okada K, Mizuno K, Nishida M, Nagaoki S, Toma T, Uehara T, Ohta K, Kasahara Y, Seki H, Yachie A, Koizumi S. CD8alpha alpha memory effector T cells descend directly from clonally expanded CD8alpha +beta high TCRalpha beta T cells in vivo. *Blood* 100: 4090-4097, 2002
- 9) Mizuno K, Yachie A, Nagaoki S, Wada H, Okada K, Kawachi M, Toma T, Konno A, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. Oligoclonal expansion of circulating and tissue-infiltrating CD8+ T cells with killer/effector phenotypes in juvenile dermatomyositis syndrome. *Clin Exp Immunol* 137: 187-194, 2004
- 10) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 11) Choi YW, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8941-8945, 1989
- 12) Labrecque N, McGrath H, Subramanyam M, Huber BT, Sekaly RP. Human T cells respond to mouse mammary tumor virus-encoded superantigen: V beta restriction and conserved evolutionary features. *J Exp Med* 177: 1735-1743, 1993
- 13) Bomberger C, Singh-Jairam M, Rodey G, Guerriero A, Yeager AM, Fleming WH, Holland HK, Waller EK. Lymphoid reconstitution after autologous PBSC transplantation with FACS-sorted CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* 91: 2588-2600, 1998
- 14) Zeng W, Nakao S, Takamatsu H, Yachie A, Takami A, Kondo Y, Sugimori N, Yamazaki H, Miura Y, Shiobara S, Matsuda T. Characterization of T-cell repertoire of the bone marrow in immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia. *Blood* 93: 3008-3016, 1999
- 15) Pilch H, Hohn H, Freitag K, Neukirch C, Necker A, Haddad P, Tanner B, Knapstein PG, Maeurer MJ. Improved assessment of T-cell receptor (TCR) VB repertoire in clinical specimens: combination of TCR-CDR3 spectratyping with flow cytometry-based TCR VB frequency analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 257-266, 2002
- 16) Yawalkar N, Ferenczi K, Jones DA, Yamanaka K, Suh KY, Sadat S, Kupper TS. Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 102: 4059-4066, 2003
- 17) Namekawa T, Wagner UG, Goronzy JJ, Weyand CM. Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 41: 2108-2116, 1998
- 18) Cherin P, Herson S, Crevon MC, Hauw JJ, Cervera P, Galanaud P, Emilie D. Mechanisms of lysis by activated cytotoxic cells expressing perforin and granzyme-B genes and the protein TIA-1 in muscle biopsies of myositis. *J Rheumatol* 23: 1135-1142, 1996
- 19) Rieux-Laucat F, Bahadoran P, Brousse N, Selz F, Fischer A, Le Deist F, De Villartay JP. Highly restricted human T cell repertoire in peripheral blood and tissue-infiltrating lymphocytes in Omenn's syndrome. *J Clin Invest* 102: 312-321, 1998
- 20) O'Shea UD, Hollowood KM, Boylston AW. Demonstration of the oligoclonality of an enteropathy associated T-cell lymphoma by monoclonal antibodies and PCR analysis of the T-cell receptor V-beta repertoire on fixed tissue. *Hum Pathol* 27: 509-513, 1996
- 21) Frank C, Herrmann M, Fernandez S, Dirnecker D, Boswald M, Kolowos W, Ruder H, Haas JP. Dominant T cells in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int* 57: 510-517, 2000
- 22) Herve C, Le Berre L, Miqueu P, Degauque N, Ruiz C, Brouard S, Guillet M, Soulillou JP, Dantal J. Blood T-cell repertoire in idiopathic nephrotic syndrome recurrence following kidney transplantation. *Am J Transplant* 6: 2144-2151, 2006

**Prediction of Clinical Course in Pediatric Minimal Change Nephrotic Syndrome by T-cell Receptor Diversity Analysis** Akiko Nakai, Department of Angiogenesis and Vascular Development, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 Juzen Med. Soc., 116, 128 – 136 (2007)

**Key words** MCNS, TCR diversity, CDR3, V $\beta$  repertoire

#### **Abstract**

To further elucidate the clinical relevance of T-cell abnormality in minimal change nephrotic syndrome (MCNS), and to predict the consequences of MCNS, we studied T-cell receptor (TCR) diversity by analyzing CDR3 size distribution and the frequency of V $\beta$  repertoire usage. Thirty-six pediatric patients with MCNS were enrolled. Eighteen were frequent relapsers and/or steroid-dependent (FR/SD) and 18 were non-frequent relapsers (NFR). The study was performed to analyze serial changes of TCR V $\beta$  repertoires in the two groups of patients. Frequencies of V $\beta$  repertoire usage were determined by flow cytometry, and TCR CDR3 length distribution was analyzed by GeneScan. In NFR patients, abnormalities in the distribution of 21 V $\beta$  repertoires were few in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. In FR/SD patients, the patterns were normal in CD4<sup>+</sup> T cells, while selected V $\beta$  repertoires were significantly increased in CD8<sup>+</sup> T cells in some patients. Furthermore, TCR diversity was significantly reduced in CD8<sup>+</sup> T cells in FR/SD patients as shown by marked skewing of CDR3 size distributions. It is noteworthy that in some FR/SD patients the initially abnormal TCR diversity improved as the clinical symptoms improved such that they became NFR over the years. Analysis of TCR diversity may delineate the subgroup of patients with FR/SD and provide a rationale for early intervention with immunosuppressive therapy for these patients.