

はじめに

サルコイドーシスの病因として今日 *propionibacterium* 属が注目されている。

歴史的には、肉芽腫形成疾患としての類似性から抗酸菌感染が古くから国際的に研究されてきたが、近年、抗酸菌 DNA 検出などから再び論争の的として close up された¹⁾。また Almenoff PL 等は sarcoidosis 患者 20 例の末梢血から 19 例に L-form 抗酸菌の培養陽性を認めたとし議論を呼んだ²⁾。

サルコイドーシスの病因として生きた抗酸菌そのものは今日概ね否定されているが、ツベルクリン反応局所に生きた抗酸菌を証明できないと同様に、sarcoid reaction の要因として抗酸菌の genetic な産物の関与を考慮すべきという見解もだされている³⁾。本研究は、抗酸菌症例を多く抱える全国の国立療養所へのアンケート調査から、サルコイドーシスと抗酸菌感染症の併存例の頻度、両疾患の相互の影響を臨床的に検討する。

対象と方法

抗酸菌症を多く抱える全国の国立療養所を対象に、本研究に賛同した 15 施設へアンケート調査を行い、1989 年から 1998 年までの菌陽性結核症例数、サルコイドーシス例数、同一個体での両者合併例数を調査し、両者合併症例について臨床的検討を行った。

結 果

国立療養所 15 施設での 1989 年から 1998 年までの 10 年間の菌陽性結核症例数は、11171 例であり、サルコイドーシスは 218 例であった。

このうち、サルコイドーシス結核症合併例数は、4 例であり、母集団は異なるがサルコイドーシス非定型抗酸菌症合併例数は 3 例であった。

抗酸菌症合併サルコイドーシス例は女性 5 例、男性 2 例で、平均年齢は 58.9 歳であった。両疾患の関係は、サルコイドーシス先行が 2 例、結核症先行が 2 例であった。

考案・結論

サルコイドーシス有病率は人口 10 万対 7.5 ~ 9.3 と推定されており、今回の国立療養所 15 施設調査でのサルコイドーシス結核症合併例は菌陽性結核症 11171 例中 4 例であり、人口 10 万対比に換算すると 35.807 であり、

国立療養所東京病院
びまん性肺疾患研究班 研究協力者

菌陽性結核患者には高い頻度でサルコイドーシスが認められた。15 施設が呼吸器診療施設である事によるバイアスがあるかどうか検討したが、菌陽性結核罹患率を人口 10 万対 16 として算出した 15 施設母集団のサルコイドーシス発症期待値 1361.3 例より、実際の診療例数 213 例数は有意に低く、プラスのバイアスは認められなかった。両疾患併存 4 例のうち 1 例はサルコイドーシス治療目的のステロイド投与中粟粒結核を発症したもので、他の 3 例はステロイド投与はなく、明らかな結核発症誘因は見いだせなかった。

Propionibacteriu 属には種々の抗菌薬が有効であり⁴⁾、抗結核薬である RFP も有効であるとの報告も見られるが¹²⁾、今回調査中で、4 例中 3 例はサルコイドーシス治療より結核症治療が先行していた。

しかし、結核化学療法はサルコイドーシス経過に明らかな増悪ないし軽快などの影響は与えていなかった。

諸外国の報告では、Kostina 等が肺 sarcoidosis 6473 例中 41 例 (6.3%) に活動性肺結核が見られたとし、肺結核および肺結核治療は sarcoidosis 臨床経過に影響を与えなかったとしている¹³⁾。

国立療養所 15 施設において 1989 年から 1998 年までの 10 年間を対象に菌陽性結核症例数、サルコイドーシス例数、両疾患合併例数の調査を行い、菌陽性結核症例とサルコイドーシス合併は一般人口中の有病率より高い頻度で認められた。

この理由の一部は明らかにサルコイドーシス治療目的のステロイド投与に起因するが、他は不明であった。結核症化学療法はサルコイドーシス臨床経過に明らかな影響を与えなかった。

この研究は以下 15 施設の協力により行われた。国立療養所大牟田病院、国立療養所神奈川病院、国立療養所近畿中央病院、国立療養所山陽荘病院、国立療養所青嵐荘病院、国立療養所中部病院、国立療養所天竜荘病院、国立療養所刀根山病院、国立療養所西札幌病院、国立療養所西新潟中央病院、国立療養所広島病院、国立療養所南岡山病院、国立療養所南九州病院、国立療養所南福岡病院、国立療養所東京病院。

参考文献

- 1) Ang SC, Moscovic EA : Cross-reactive and species specific *Mycobacterium tuberculosis* antigens in the immunoprofile of Schaumann bodies: a major clue to the etiology of sarcoidosis. *Histol Histopathol* 11: 125-134, 1996
- 2) Almenoff PL, Johnson A, Lesser M, Mattman LH : Growth of acid fast L forms from the blood of patients with sarcoidosis. *Thorax* 51: 530-533, 1996

- 3) Vokurka M, Lecassier D; du Bois RM, Wallaert B; Kambouchner M, Tazi A, Hance AJ : mycobacteria of the M tuberculosis complex in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 156: 3 Pt 1, 1000-3, 1997
- 4) Litvinov VI, Chernousova LN, Safonova SG, Kalinina OA, Kulikovskaia NV, Kapina MA, Demianenko NV: Interaction of Mycobacteria isolated from sarcoidosis patients with antituberculosis antibodies. *Probl Tuberk*, 1997, : 5, 36-8
- 5) Popper HH, Klemen H, Hoefler G, Winter E: Presence of mycobacterial DNA in sarcoidosis. *Hum Pathol*, 28: 7796-800, 1997
- 6) Cannone M, Vago L, Porini G, Bonetto S, Cassi C, Bramerio M, Rizzato G, Barberis MC : Detection of mycobacterium tuberculosis DNA using nested polymerase chain reaction in lymph nodes with sarcoidosis, fixed in formalin and embedded in paraffin. *Pathologica*, 89: 512-6, 1997
- 7) Wong CF, Yew WW, Wong PC: A case of concomitant tuberculosis and sarcoidosis with mycobacterial DNA present in the sarcoid lesion. *Chest*, 114: 2, 626-9, 1998
- 8) Wilsher ML, Menzies RE, Croxson MC: Mycobacterium tuberculosis DNA in tissues affected by sarcoidosis. *Thorax* 53: 871-874, 1998
- 9) Baughman RP: Can tuberculosis cause sarcoidosis? New techniques try use this search to answer an old question. *Chest* 114: 363-364, 1998
- 10) Kurokawa I, Nishijima S, Kawabata S: Antimicrobial susceptibility of Propionibacterium acnes isolated from acne vulgaris. *Eur J Dermatol* 9: 25-28, 1999
- 11) Zaluga E, Giedrys-Kalemba S, Halasa J : Bacterial flora of acne lesions in diagnostic material of the Microbiology and Immunology Department, Pomeranian Medical Academy (PAM) in Szczecin. *Med Dosw Mikrobiol* 48: 55-59, 1996
- 12) Kostina ZI, Brazhenko NA, Gerasimova EV, Kolnikova OV: Specific features of diagnosis and treatment of patients with pulmonary sarcoidosis and tuberculosis *Probl Tuberk*, 1998, : 2, 10-3

サルコイドーシス症例気管支肺胞洗浄液中 リンパ球表面 CD26 発現の検討

石井 芳樹 知花 和行 福田 健

サルコイドーシスは、Th1 タイプのサイトカイン有意な炎症反応を示す慢性肉芽腫性疾患である。CD26 は細胞表面に存在し dipeptidyl peptidase としての活性をもつ regulatory enzyme であり、その発現は IL-2 や interferon- γ などのサイトカインを産生する Th1 タイプの T 細胞に認められることより Th1 のマーカーと考えられている。また、CD26 は、その酵素活性により RANTES などのケモカインの作用を変化させ、サ症におけるリンパ球集積にも関与している可能性がある。そこで、サ症における気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中リンパ球表面の CD26 発現と疾患活動性との相関を検討した。サルコイドーシス症例および対照として気管支喘息症例、健常者の気管支肺胞洗浄液中リンパ球の表面マーカーをフローサイトメトリーにて解析した。サルコイドーシス症例における BALF リンパ球 CD26 陽性率は健常者や喘息症例に比し優位に高値であった。また、サルコイドーシス症例において CD26 陽性率はリンパ球数と有意な相関を認めた。これらの結果から CD26 は、サルコイドーシスの病態に関与し活動性の指標として有用である可能性が示唆された。

DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV (CD26) EXPRESSION ON LYMPHOCYTES IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID FROM PATIENTS WITH SARCOIDOSIS

Yoshiki Ishii, Kazuyuki Chibana, Takeshi Fukuda

Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine, Mibu, Tochigi, Japan

Sarcoidosis is a chronic granulomatous disease of unknown origin, showing Th1-dominant profile of inflammatory response. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) is a cell surface regulatory enzyme. Since CD26 expression on lymphocytes is upregulated by IL-12 and IL-2, it has been proposed as a maker of Th1 response. In the present study, we investigated the CD26 expression on BALF lymphocytes in patients with sarcoidosis using flow cytometry. CD26 positive rate in sarcoidosis was significantly higher than that in healthy control, eosinophilic pneumonia, and atopic bronchial asthma. There was significant correlation between percentages of CD26 positive cells and percentages of lymphocytes in BALF from patients with sarcoidosis ($r=0.778$, $p<0.001$). However, the correlation between percentages of CD26 positive cells and CD4/8 ratio in BALF was weak ($r=0.405$, $p=0.076$). These findings suggest that CD26 may play an important role in the mechanism of lymphocyte accumulation into lung mediated by RANTES and that CD26 expression on lymphocytes in BALF may be a useful marker reflecting disease activity in patients with sarcoidosis.

はじめに

CD26 は、活性化 T 細胞の表面抗原であるが、腎や肝、腸管などの上皮細胞にも発現が見られる。その発現は、IL-2 や IL-12 によって増強され、Th1 のマーカーと考えられている¹⁾。CD26 の構造は膜通過部分を除きほとんどの部分が細胞外に存在する 110kDa の糖蛋白質であり、細胞外ドメインの C 末端には dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) という exoenzyme をもつ (Figure 1)²⁾。CD26 は costimulatory molecule として T 細胞の活性化や増殖に働く。CD26 の DPPIV 活性は、T 細胞活性化においても重要な役割を演じているが、それ以外に種々の生物活性ペプチドを切断することによって細胞機能を調節していることが知られており、RANTES や SDF-1 α などのケモカインが基質となり、その作用が調節を受けている。RANTES は、T 細胞、単球、好酸球に対しそれぞれ、CCR5、CCR1、CCR3 という受容体を介して遊走因子として働くが、CD26 によって N 末端のペプチド 2 個が切断されると T 細胞遊走活性が増強されるが、単球、好酸球への遊走活性は低下する。すなわち、CD26 の存在下で、RANTES は、T 細胞選択的な遊走因子として働くことになる³⁾。

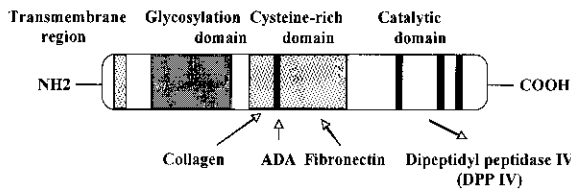


Figure 1. Structure and Characteristics of CD26

サルコイドーシスは、IL-2、IFN- γ などのサイトカインの産生が亢進しており、Th1 優位な疾患と考えられる。また、サルコイドーシス症例の BAL 細胞で RANTES の発現が増加しており、リンパ球集積において RANTES の関与が重要であると考えられる⁴⁾。

そこでサルコイドーシスの病態に CD26 が関与しているか否かまた、BALF リンパ球表面の CD26 の発現がサルコイドーシス活動性の指標となるか否か知るため、サルコイドーシス BALF リンパ球における CD26 陽性率を測定し、健常人および Th2 優位と考えられるアレルギー疾患と比較検討した。

対象と方法

サルコイドーシス 21 例、好酸球性肺炎 6 例、気管支喘息 (非アトピー型) 10 例、気管支喘息 (アトピー型) 12 例、健常人 6 例を対象として BAL を施行し、リンパ球表面の CD26 の発現をフローサイトメトリーにて測定した。

結 果

BALF 所見を Table 1 に示した。サルコイドーシス症例では、健常人に比べて総細胞数とリンパ球比率の有意な増加が見られた。また、Table 2 に示したようにサルコイドーシス症例では CD4/8 比が 5.5 と健常人に比して有意に高値を示した。CD26 の陽性率は、健常人、好酸球性肺炎、アトピー型喘息の各群と比較してサルコイドーシス群において有意に高値を示した (Figure 2)。サルコイドーシス群においても CD26 陽性率がばらついているのは、活動性の低い症例と高い症例が混在しているためと考えられるため、サルコイドーシスの活動性を反映する指標として BALF 中リンパ球比率を用いて CD26 陽性率との相関を検討した。Figure 3 に示したようにサルコイドーシス症例における CD26 陽性率とリンパ球比率は有意な正の相関を示した ($r=0.728$, $p<0.0005$)。しかし、Figure 4 に示したように CD4/8 比と CD26 陽性率の間には有意な相関を認めなかった。

Table1. BAL Findings(I)

	n	TCC ($\times 10^5/ml$)	Macropage (%)	Lymph (%)	PMN (%)	Eos (%)
Sarcoidosis	21	4.2 \pm 2.5	71 \pm 21	28 \pm 21	0.8 \pm 0.8	0.3 \pm 0.3
Eosinophilic Pneumonia	6	6.2 \pm 4.3	48 \pm 26	18 \pm 19	3.0 \pm 3.3	31 \pm 25
Bronchial Asthma (Atopic)	12	1.8 \pm 0.9	83 \pm 19	13 \pm 19	0.7 \pm 0.7	3.0 \pm 4.6
Bronchial Asthma (Non-Atopic)	10	1.6 \pm 0.9	86 \pm 8.4	11 \pm 7.0	1.1 \pm 1.8	2.1 \pm 2.7
Healthy control	6	1.9 \pm 0.7	89 \pm 8.8	9.5 \pm 8.7	1.0 \pm 0.8	0.6 \pm 0.6

Table2. BAL Findings(II)

	n	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/8	CD26 (%)
Sarcoidosis	21	69 \pm 17	22 \pm 14	5.5 \pm 5.0	65 \pm 16
Eosinophilic Pneumonia	6	37 \pm 14	40 \pm 18	1.1 \pm 0.6	45 \pm 15
Bronchial Asthma (Atopic)	12	43 \pm 18	39 \pm 14	1.6 \pm 1.6	53 \pm 13
Bronchial Asthma (Non-Atopic)	10	50 \pm 15	33 \pm 11	2.1 \pm 2.2	62 \pm 14
Healthy control	6	48 \pm 26	37 \pm 24	2.1 \pm 1.7	51 \pm 22

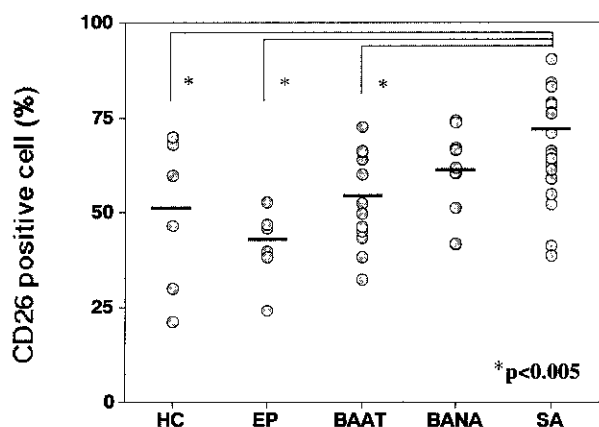


Figure 2. Percentage of CD26 Positive Lymphocytes in BALF from Patients with Sarcoidosis and Allergic Diseases. Sarcoidosis HC: Healty Control, EP: Eosinophilic Pneumonia, BA-AT : Bronchial Asthma (Atopic type), BA-NA: Bronchial Athma (Non-atopic), SA: sarcoidosis.

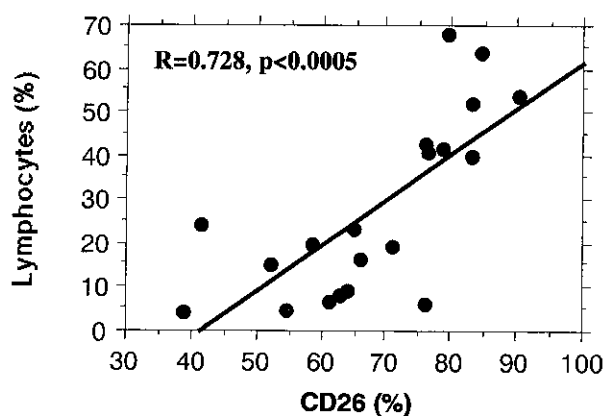


Figure 3. Correlation between CD26 Positive Rate and Percentage of Lymphocytes.

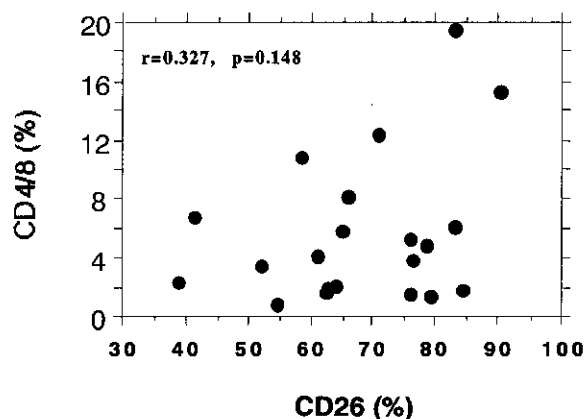


Figure 4. Correlation between CD26 Positive Rate and CD4/8 Ratio.

考 察

サルコイドーシス症例においてBALFリンパ球表面のCD26陽性率は健常者や好酸球性肺炎、アトピー型喘息などTh2優位と考えられる疾患と比較して有意に高値を示した。従来よりサルコイドーシスは、Th1優位の疾患と考えられており、またBALFリンパ球よりIL-2やIFN- γ などTh1サイトカインの産生が増加していることが報告されており、今回の結果からCD26がTh1を反映するマーカーとして有用である可能性が示唆された。また、BALF中リンパ球比率とCD26陽性率に有意な正の相関を示したことより、サルコイドーシスにおける肺へのリンパ球集積にCD26が関与している可能性が示唆された。CD26は、そのDPPIV活性によりRANTESを分解して、リンパ球特異的なケモカインと変換させることが報告されている³⁾。また、サルコイドーシス症例のBAL細胞でRANTESの発現が増加しており、RANTESがCD26によってmodulateされてリンパ球集積に関与している可能性が推察された⁴⁾。

BALF中リンパ球比率はサルコイドーシス活動性の指標であるが、今回、リンパ球比率とCD26陽性率が良好な相関を示したことからCD26陽性率も活動性のマーカーとなりうる可能性が示唆された。今回、対象として検討したTh2優位疾患のうち好酸球肺炎症例では健常者と比較してCD26陽性率が低値を示したが、健常者の症例数も少なく有意差は認められなかった。また、喘息症例については安定期症例であったためかCD26発現の低下を認めなかった。Th1リンパ球のマーカーとしては、CCR5やCXCR3なども知られており、今後これらのマーカーとの相関についても検討したい。

参考文献

- 1) Willheim M, Ebner C, Baier K, Kern W, Schrottbauer K, Thien R, Kraft D, Breiteneder H, Reinisch W, Scheiner O. Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T (H1) subsets. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100:348-55.
- 2) Dong RP, Tachibana K, Hegen M, Munakata Y, Cho D, Schlossman SF, Morimoto C. Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation. *J Immunol.* 1997, 159:6070-6.
- 3) Iwata S, Yamaguchi N, Munakata Y, Ikushima H, Lee JF, Hosono O, Schlossman SF, Morimoto C. CD26/dipeptidyl peptidase IV differentially regulates the chemotaxis of T cells and monocytes toward RANTES:

possible mechanism for the switch from innate to acquired immune response. *Int Immunol.* 1999;11:417-26.

- 4) Petrek M, Pantelidis P, Southcott AM, Lympny P, Safranek P, Black CM, Kolek V, Weigl E, du Bois RM. The source and role of RANTES in interstitial lung disease. *Eur Respir J.* 1997;10:1207-16.

ヒト肺胞マクロファージにおける PPAR γ の発現と機能に関する研究

千田 金吾* 朝田 和博 須田 隆文

核内レセプター Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) はリガンド依存性の転写因子であり、脂肪細胞の分化やインスリン抵抗性に関与している。最近、PPAR γ のリガンドがマクロファージの活性化や単球からの炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されたが、PPAR γ の肺胞マクロファージ (AM) における発現および役割は明らかでない。今回われわれは RT-PCR 法を用い、ヒト AM における PPAR の発現を検討した。ヒト末梢血単球と mRNA の発現を半定量的に比較したところ、ヒト AM において PPAR γ が 10-20 倍多く発現していた。PPAR α 、 β には差はなかった。次に LPS 刺激によるヒト AM からの TNF α 産生に対する PPAR γ のリガンドの影響を検討した。LPS およびリガンドの存在下でヒト AM を 24 時間培養し、上清中の TNF α を測定した。PPAR γ のリガンドである 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J $_2$, troglitazone, pioglitazone のいずれも TNF α 産生を抑制した。以上より PPAR γ のヒト AM の機能への関与が示唆された。さらに、そのリガンドが炎症性疾患に対する治療薬となる可能性が考えられた。

EXPRESSION AND FUNCTION OF PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR GAMMA IN HUMAN ALVEOLAR MACROPHAGES

Kingo Chida, Kazuhiro Asada, Takafumi Suda

Second Division, Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is a member of the nuclear receptor family of ligand-dependent transcription factors and regulates adipocyte differentiation. Recently, it has been reported that PPAR γ ligands, such as 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J $_2$ (15d-PGJ $_2$) and the thiazolidinediones, inhibit the production of inflammatory cytokines from monocytes and the activation of macrophages. Using reverse transcriptase polymerase chain reaction, we investigated the expression of PPAR γ in human alveolar macrophages (AMs) obtained by bronchoalveolar lavage and compared its expression with that of human peripheral blood monocytes. We found that the expression of PPAR γ mRNA in AMs was significantly higher than that in monocytes. However there was no significant difference in the expression of PPAR α or β . To explore the functional role of PPAR γ in AMs, we examined the effect of PPAR γ ligands on tumor necrosis factor alpha (TNF- α) production by AMs stimulated with lipopolysaccharide (LPS). AMs were incubated in culture medium containing LPS in the presence of either vehicle only or PPAR γ ligands, 15d-PGJ $_2$, troglitazone, and pioglitazone for 24 h. The concentrations of TNF- α in the medium were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. We found that all three ligands inhibited LPS-induced TNF- α production by AMs in a dose-dependent manner. These data suggest that PPAR γ in AMs may play an inhibitory role in inflammatory responses and that PPAR γ ligands may be potential agents for the treatment of inflammation in the lung.

はじめに

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) は核内レセプタースーパーファミリーに属するリガンド依存性の転写因子であり, α , β , γ の3つのアイソフォームが存在する. PPAR γ は主に脂肪組織に存在し, 脂質代謝やインスリン抵抗性に関与している. PPAR γ のリガンドとして 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) や糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体の troglitazone (ノスカル®) や pioglitazone (アクトス®) が知られている¹⁻³⁾. 一方, マクロファージや単球にも PPAR γ の発現がみられ, そのリガンドがマクロファージの活性化や単球からの炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告された^{4,5)}. しかし, PPAR γ の肺胞マクロファージ (AM) における発現および役割は明らかにされていない.

今回われわれは, ヒト AM において PPAR α , β , γ の発現と TNF α 産生に及ぼす PPAR γ のリガンドの影響を検討した.

対象と方法

1) 肺胞マクロファージの分離

健康人 (非喫煙者) に生理食塩水 150ml で BAL をおこなった. 回収した細胞を 5%FCS 添加 RPMI 培地で 1×10^6 /ml とし, 血清コート培養皿に注ぎ 5%CO₂, 37°C の培養器で 2 時間培養した. 非付着細胞を取り除き, ラバーポリスマンで付着細胞をはがし回収した.

2) 末梢血単球の分離

健康人 (非喫煙者) からヘパリン添加ヒト血液を 50ml 採取した. 比重遠心法にて単核球を分離し, さらに肺胞マクロファージと同様に付着法にて単球 (Mon) を分離した.

3) RT-PCR

AM と Mon から AGPC 法にて RNA 抽出した. MoMLV RTase にて cDNA を合成し, それぞれのプライマー⁶⁾ を使い Taq polymerase にて PCR をおこなった (表 1). denaturation は 95°C を 1 分, annealing は 58°C を 1 分, extension は 72°C を 2 分とした. PCR 産物を 6% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色したのちデンストグラフで測定した.

4) 肺胞マクロファージの培養

健康人 (非喫煙者) に生理食塩水 200ml で BAL をおこ

表 1 プライマーの配列

Primer	Sequence	Product Size	Cycles	
PPAR α	Sense	5'-TCATCAAGAAGACGGAGTCG-3'	213-bp	28
	Antisense	5'-CGGTTACCTACAGCTCAGAC-3'		
PPAR β	Sense	5'-TCCCTCTTCTCAGTTCCTC-3'	289-bp	28
	Antisense	5'-CAGGAGACAGAAGTGAGGAC-3'		
PPAR γ	Sense	5'-CAGCATTCTACTCCACATT-3'	222-bp	26
	Antisense	5'-ATCTCCACAGACACGACATT-3'		
β -actin	Sense	5'-GGGCATGGGTCAGAAGGATT-3'	302-bp	26-28
	Antisense	5'-GAGGCGTACAGGATAGCAC-3'		

なった. 回収した細胞を 5%FCS 添加 RPMI 培地で 3×10^5 /ml とし, 24well 培養皿に 0.5ml ずつ分注した. 5%CO₂, 37°C の培養器で 1 時間培養し, 非付着細胞を取り除き 5%FCS 添加 RPMI 培地を 0.5ml 加えた. DMSO (vehicle), リガンド (15d-PGJ₂, Troglitazone, Pioglitazone) を加え 1 時間後に LPS 0.1ng/ml を加えた. リガンドを加えてから 24 時間培養した後, 培養上清を回収した.

5) TNF- α の測定

R&D 社の ELISA kit を使い, 培養上清中の TNF- α を測定した.

6) 統計

数値は平均土標準偏差で表し, 統計学的解析には student's t-test または Fisher's PLSD を用いた.

結 果

1) ヒト AM における PPAR α , β , γ の発現

ヒト AM では PPAR α , β , γ のいずれも mRNA の発現が認められた (図 1). デンストメトリーの結果を β -actin 値で補正をし, 半定量的に比較したところヒト AM はヒト Mon に比べ PPAR γ の mRNA の発現が有意に亢進していた ($P < 0.01$). PPAR α , β では差はみられなかった (図 2).

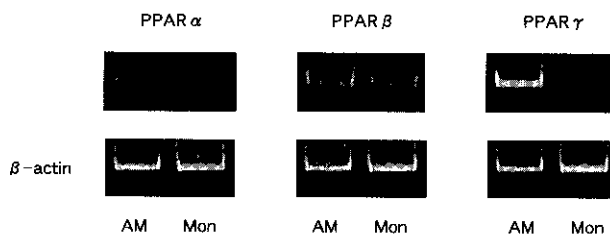


図 1 RT-PCR による PPAR の mRNA の発現

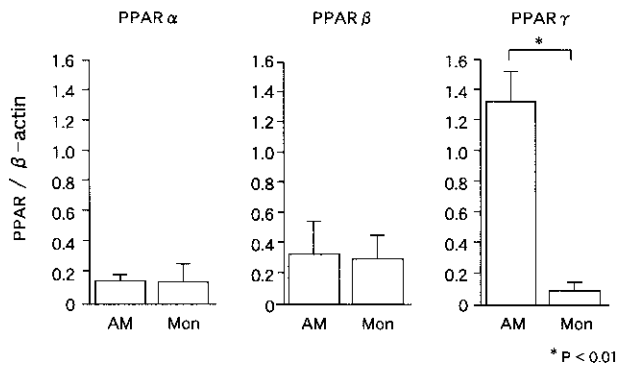


図2 PPAR の mRNA の発現量の比較

2) ヒト AM における TNF α 産生に及ぼす PPAR γ のリガンドの影響

vehicle を加えたときの TNF α 値を 1 としてそれぞれのリガンドの影響を比較検討した。15d-PGJ₂ は LPS 刺激による肺胞マクロファージからの TNF α 産生を濃度依存的に抑制し、0.3 μ M と 10 μ M, 0.3 μ M と 30 μ M さらに 1 μ M と 30 μ M の間で有意差が認められた (図 3A)。

Troglitazone, Pioglitazone は濃度依存的に TNF- α 産生を抑制する傾向がみられた (図 3B, C)。

考案・結論

肺胞マクロファージは種々の刺激により TNF α などのサイトカインを放出し、肺における炎症反応や免疫調節に重要な役割を果たしている。TNF- α は慢性関節リウマチなどの膠原病、感染症、動脈硬化やインスリン抵抗性などの代謝性疾患など多くの病態に関与している。

最近、PPAR γ のリガンドによるラット腹腔マクロファージの活性化の抑制⁴⁾ やヒト末梢血単球からの炎症性サイトカインの産生の抑制⁵⁾ が報告され、炎症に対する抑制作用が注目されている。さらに、これらのリガンドはラットの心筋細胞や Kupffer 細胞からの TNF α 産生を低下させ^{7,8)}、ラットの大腸炎や関節炎を抑制する^{9,10)}。

そこで、われわれはヒト AM においても PPAR γ が炎症反応に関与していると仮定し、PPAR γ の発現および TNF- α 産生に対するリガンドの影響を検討した。ヒト AM における PPAR γ の mRNA の発現量はヒト Mon に比べ有意に亢進しており、AM においてより重要な役割を担っていると考えられた。実際に、Mon からマクロファージに分化していくに従い PPAR γ の発現が亢進することが知られている¹¹⁾。さらにリガンドが LPS 刺激によるヒト AM からの TNF- α 産生を抑制することから、PPAR γ は肺における炎症反応および免疫調節に関与している可能性が示唆された。また、AM が関与する炎症性疾患において PPAR γ のリガンドが治療薬となる可能性が考え

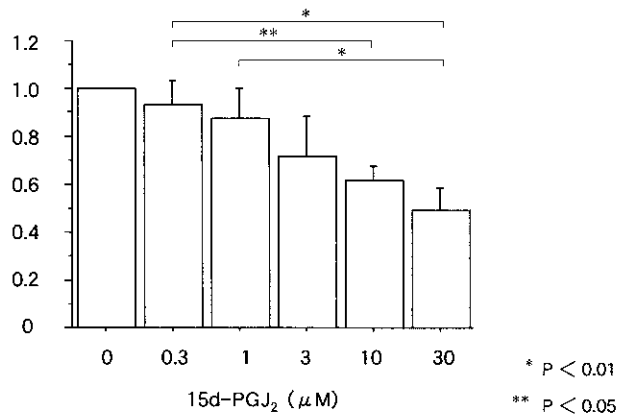


図3A TNF- α 産生に対する 15d-PGJ₂ の影響

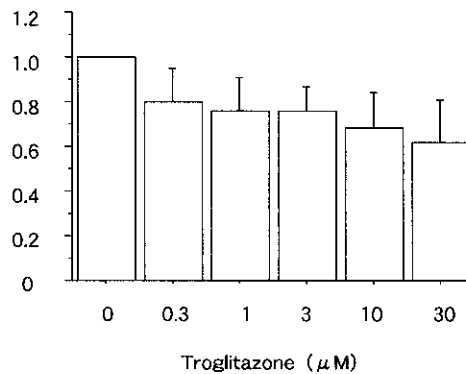


図3B TNF- α 産生に対する Troglitazone の影響

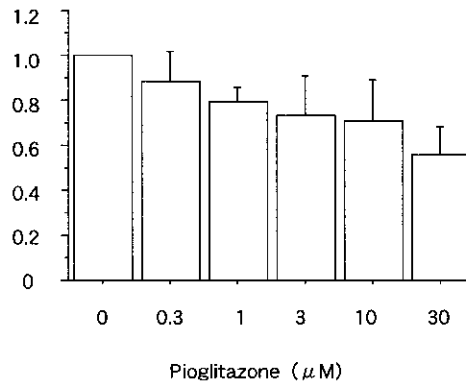


図3C TNF- α 産生に対する Pioglitazone の影響

られた。

LPS 刺激によるマクロファージからの TNF- α 産生には NF- κ B が関与しており¹²⁾、TNF- α 産生抑制のメカニズムとして PPAR γ を介した NF- κ B の抑制が考えられている^{7,8)}。しかし、15d-PGJ₂ が I- κ B kinase を抑制するといった報告^{13,14)} やリガンドによるサイトカインの抑制については PPAR γ を介していないとの報告¹⁵⁻¹⁷⁾ もあり、PPAR γ の生理的意義を含め今後さらなる検討が必要である。

参考文献

- 1) Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . Cell. 1995; 83: 803-12.
- 2) Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. Cell. 1995; 83: 813-9.
- 3) Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR gamma). J Biol Chem. 1995; 270: 12953-6.
- 4) Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. Nature. 1998; 391: 79-82.
- 5) Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. Nature. 1998; 391: 82-6.
- 6) Rivier M, Safonova I, Lebrun P, Griffiths CE, Ailhaud G, Michel S. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes. J Invest Dermatol. 1998; 111: 1116-21.
- 7) Takano H, Nagai T, Asakawa M, Toyozaki T, Oka T, Komuro I, Saito T, Masuda Y. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes. Circ Res. 2000; 87: 596-602.
- 8) Uchimura K, Nakamuta M, Enjoji M, Irie T, Sugimoto R, Muta T, Iwamoto H, Nawata H. Activation of retinoic X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in rat Kupffer cells. Hepatology. 2001; 33: 91-9.
- 9) Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR- γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. J Clin Invest. 1999; 104: 383-9.
- 10) Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H. 15-deoxy- Δ ^{12,14}-PGJ₂ induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. J Clin Invest. 2000; 106: 189-97.
- 11) Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. J Biol Chem. 1998; 273: 25573-80.
- 12) Swantek JL, Christerson L, Cobb MH. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha promoter activity is inhibitor of nuclear factor- κ B kinase-dependent. J Biol Chem. 1999 ; 274: 11667-71.
- 13) Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK. 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J₂ inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97: 4844-9.
- 14) Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. Nature. 2000; 403: 103-8.
- 15) Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Le Grand CB, Shelton BA, Detmers PA, Somers EP, Carbin L, Moller DE, Wright SD, Berger J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF- α responses of macrophages to lipopolysaccharide *in vitro* or *in vivo*. J Immunol. 2000; 164: 1046-54.
- 16) Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR- γ dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. Nat Med. 2001; 7: 48-52.
- 17) Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, Milstone DS, Mortensen RM, Spiegelman BM, Freeman MW. The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. Nat Med. 2001; 7: 41-7.

サルコイドーシス患者における肺胞マクロファージの 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase (1 α 水酸化酵素) 遺伝子の 発現と疾患活動性に関する研究

千田 金吾* 乾 直輝 須田 隆文

1 α 水酸化酵素は、腎臓に発現し 25-hydroxyvitamin D3 から活性型の 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 を生成する。サルコイドーシスでは活性型肺胞マクロファージが同酵素活性を示し、高カルシウム血症の原因と考えられてきた。今回、サルコイドーシス患者の肺胞マクロファージにおける 1 α 水酸化酵素遺伝子の発現を初めて同定するとともに、疾患活動性、カルシウム代謝との関連を検討した。サルコイドーシス患者 7 名を対象とし、非サルコイドーシス患者をコントロールとし RT-PCR を行い 1 α 水酸化酵素の発現量を調べた。1 α 水酸化酵素の発現量はサルコイドーシス群が 10.8 \pm 3.6 で、コントロール群の 2.2 \pm 1.4 と比べ有意に ($p < 0.02$) 亢進していた。また、発現量は BAL 中リンパ球比率と相関し、画像、肺機能の悪化を認める症例で高値を示した。カルシウム代謝については 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3/25-hydroxyvitamin D3 比と有意な相関を示し、サルコイドーシスにおける高カルシウム血症の原因と考えられた。

A Significant Correlation between the 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -Hydroxylase Gene Expression in Alveolar Macrophages and Activity of Sarcoidosis

Kingo Chida, Naoki Inui, Takafumi Suda

Second Division, Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 3600 Handacho, Hamamatsu, Japan

Hypercalcemia occurs in granulomatous diseases such as sarcoidosis. The activity of the enzyme 1 α -hydroxylase converting 25-hydroxyvitamin D3 to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 has been detected in alveolar macrophages obtained from patients with sarcoidosis, but there has been no study on the relation between the 1 α -hydroxylase gene expression and the activity of sarcoidosis. To demonstrate the 1 α -hydroxylase gene in human alveolar macrophages and clarify the correlation between the 1 α -hydroxylase-mRNA level and the activity of sarcoidosis, we selected 7 patients with sarcoidosis and 6 control patients with other pulmonary disorders who consecutively underwent bronchoalveolar lavage. The level of human 1 α -hydroxylase mRNA was measured by semiquantitative polymerase chain reaction amplification.

The expression of 1 α -hydroxylase was demonstrated in purified human alveolar macrophages. The 1 α -hydroxylase-mRNA level in BAL cells was five-fold higher in sarcoidosis than control patients. There was a good correlation between the 1 α -hydroxylase-mRNA level in BAL samples and the relative population of alveolar lymphocytes and the 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 to 25-hydroxyvitamin D3 ratio. There is a good correlation of 1 α -hydroxylase gene expression in alveolar macrophages with the activity of sarcoidosis and calcium metabolism.

はじめに

近年遺伝子レベルにおいて構造が解明された 1 α 水酸化酵素は、主に腎臓に発現し、25-hydroxyvitamin D3 から活性型の 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 を生成し、カルシウム代謝の中心的役割を果たす。一方、原因不明の肉芽腫性疾患であるサルコイドーシスは、本邦ではその頻度は稀であるが、欧米では数%から数十%の割合で高カルシウム血症や高カルシウム尿症をきたすことが知られている^{1,4)}。以前より活性型肺胞マクロファージが同酵素活性を示すことが報告されており^{2,5,6)}、高カルシウム血症の原因と考えられてきた。今回、サルコイドーシス患者の肺胞マクロファージにおける 1 α 水酸化酵素遺伝子の発現を初めて同定するとともに、疾患活動性、カルシウム代謝との関連を検討した。

対象と方法

対象は当院で病理組織学的に診断のついたサルコイドーシス患者7名とした。コントロール群としてサルコイドーシス以外の COPD, IIP などの呼吸器疾患の患者とした。方法としては BAL を施行し、回収細胞から付着法にてマクロファージを分離し⁷⁾、AGPC 法にて RNA を抽出した⁸⁾。MMLV 逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、この cDNA を template として PCR を行い 1 α 水酸化酵素の発現量を調べた。発現量は GAPDH で補正し、semiquantitative な評価を行った。また、PCR 産物はサザンブロットにて確認した。

結果

1: 対象としたサルコイドーシス患者の臨床的特徴

1998年12月から1999年5月までに当院で BAL を施行した症例を consecutive に対象とした (表 1)。性別、レントゲンステージ、罹患臓器、呼吸器症状、肺機能、ACE など様々であった。7 症例中で特に症例 A, D はレントゲン所見の悪化、咳嗽、呼吸苦の出現、肺機能の悪化を認め活動性が高いと考えられた。

2: 対象症例の BAL 所見 (表 2)

両群で比較すると、リンパ球比率と CD4/8 比がサルコイドーシス群において有意に高値を示した。

3: 対象症例のカルシウム代謝に関する測定値 (表 3)

両群間で差は認めないが、一部サルコイドーシス患者でカルシウム、1 α , 25-dihydroxyvitamin D3, 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3/25-hydroxyvitamin D3 比が上昇していた。

4: サザンブロットの結果 (Fig.1)

右 3 レーンがサルコイドーシス症例、左 2 レーンがコントロール群を示す。サルコイドーシス症例で 1 α 水酸化酵素のバンドが強く認められた。

5: 1 α 水酸化酵素の発現量 (Fig.2)

GAPDH の発現量と ratio をとり、両群間で 1 α 水酸化酵素の発現量を比較した。コントロール群と比べ、サル

Table1 Clinical Characteristics of Patients with Sarcoidosis

Patient	Age/Sex	Chest radiograph Stage	Outcome	ACE (IU/l)	Symptoms	$\Delta\%$ FVC (%)
A	63 / F	II	worsen	29.9	dyspnea, cough	- 14.6
B	31 / F	I		20.2	none	
C	65 / F	III	persist	14.0	fatigue	+ 3.0
D	46 / F	II	worsen	19.8	dyspnea	- 16.1
E	30 / F	II	persist	12.6	none	+10.0
F	39 / F	II	persist	18.2	none	- 3.5
G	59 / M	I		17.0	none	

Chest radiograph Outcome
worsen: infiltrates deteriorate compared with initial finding
persist: infiltrates are unchanged compared with initial finding
 $\Delta\%$ FVC: changes in %FVC during the period between the initial examination and the present study

Table2 The findings of Bronchoalveolar lavage Analysis

Patient	Recovery Rate %	Total Cell $\times 10^6/ml$	Percentage of Macrophages	Percentage of Lymphocytes	Ratio of CD4/CD8
Sarcoidosis					
A	70	2.00	56.2	39.8	11.90
B	75	2.39	78.8	19.4	6.20
C	57	0.91	93.4	5.2	4.22
D	33	1.16	62.7	32.3	8.58
E	78	1.50	81.6	18.2	not done
F	73	3.35	95.1	4.5	not done
G	64	1.41	91.0	7.8	11.29
mean \pm SD	64.3 \pm 15.5	1.82 \pm 0.84	79.8 \pm 15.3	18.2 \pm 13.7*	8.44 \pm 3.28*
Non-sarcoidosis					
1	43	2.03	93.4	5.2	0.94
2	50	5.76	95.2	4.0	0.49
3	60	2.17	96.4	2.2	0.91
4	53	0.69	90.6	7.2	2.27
5	43	2.00	98.2	1.0	2.52
6	62	4.96	96.2	2.2	1.03
mean \pm SD	51.5 \pm 8.1	2.94 \pm 1.97	95.0 \pm 2.7	3.6 \pm 2.3	1.36 \pm 0.83

*: p<0.02 compared with non-sarcoidosis

Table3 Serum and Urinary Indices Related to Calcium Metabolism

Patient	Serum Calcium	Ionized Calcium	Urinary Calcium	Urinary Calcium / Creatinine	PTH	1,25 D3	25 D3	Ratio of 1,25D3 / 25D3
	mg/dl	mEq/l	mEq/l		pg/ml	pg / ml	ng / ml	
Sarcoidosis								
mean \pm SD	10.1 \pm 0.8	2.58 \pm 0.23	6.4 \pm 5.0	0.10 \pm 0.04	33.4 \pm 23.1	53.6 \pm 12.7	18.0 \pm 11.4	4.57 \pm 3.68
Non-sarcoidosis								
mean \pm SD	10.0 \pm 0.5	2.39 \pm 0.08	4.5 \pm 2.1	0.08 \pm 0.04	23.0 \pm 12.3	42.4 \pm 13.1	17.5 \pm 4.6	2.68 \pm 1.35

25D3: 25-hydroxyvitamin D3
1,25D3: 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3

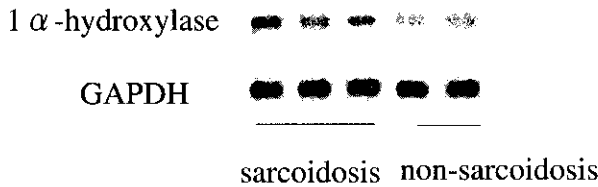


Fig.1 Southern blot analysis of 1α -hydroxylase gene in patients with sarcoidosis and control patients

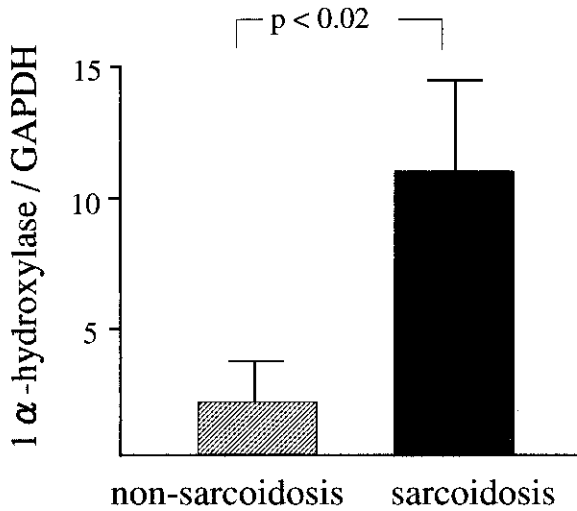


Fig.2 Expression of 1α -hydroxylase-mRNA in alveolar macrophages

コイドーシス群において発現量が有意に亢進していた。
6: 1α 水酸化酵素の発現量と疾患活動性との関係 (Fig.3)
 サルコイドーシスの疾患活動性は自覚症状やガリウムシンチの取り込み、画像、肺機能などの変化とともにBAL中リンパ球比率、CD4/8比、血清ACEなどが表すと言われている。この中で、BAL中リンパ球比率が 1α 水酸化酵素の発現量と正の相関を示した。発現量は画像、肺機能の悪化を認めた症例で高値を示した。

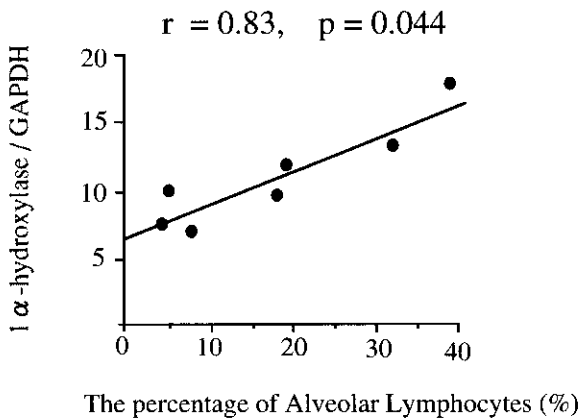


Fig.3 Correlation of 1α -hydroxylase-mRNA and the percentage of alveolar lymphocyte

7: 1α 水酸化酵素の発現量とカルシウム代謝に関わるindexとの関係 (Fig.4)

1α 水酸化酵素の発現量は 1α , 25-dihydroxyvitamin D3/25-hydroxyvitamin D3と正の相関を示した。

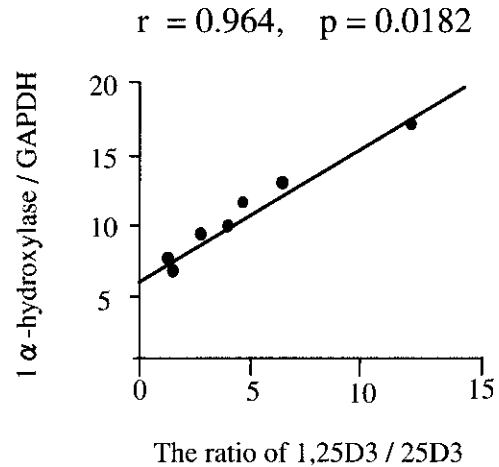


Fig.4 Correlation of 1α -hydroxylase-mRNA in alveolar macrophages and the calcium metabolism

結論および考察

サルコイドーシスにおける高カルシウム血症は1939年, Harrellにより報告され¹⁾, 1α , 25-dihydroxyvitamin D3の上昇がこの病態に関係があることが示された^{3,9)}.更に肺胞マクロファージが 1α , 25-dihydroxyvitamin D3産生を起こしていることも示された^{2,6)}.以後様々な報告がなされてきたが, 1α 水酸化酵素の酵素活性を示すのみで肺胞マクロファージにおける遺伝子の発現を示したものはなかった²⁾.今回、我々はサルコイドーシス患者の肺胞マクロファージにおいて 1α 水酸化酵素遺伝子の発現を同定した。サルコイドーシスの活動性として、WASOGは自覚症状の悪化や肺機能、画像所見の悪化をあげている²²⁾.検査項目としては、BALの細胞分画、CD4/8比、血清ACEなどが用いられている。今回、この3検査項目について 1α 水酸化酵素の遺伝子発現量と比較したところ、同酵素の発現量はサルコイドーシスの活動性の指標であるBAL中リンパ球比率および 1α , 25-dihydroxyvitamin D3/25-hydroxyvitamin D3比と有意な相関を示し、サルコイドーシスにおける高カルシウム血症の原因と考えられた。

参考文献

- 1) Harrell GT, Fisher S. Blood chemical changes in Boeck's sarcoid with particular reference to protein, calcium and phosphatase values. J Clin Invest. 18:687-693.

- 1939
- 2) Adams JS, Sharma OP, Gacad MA, Singer FR. Metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *J Clin Invest.* 72: 1856-1860. 1983
 - 3) Papapoulos SE, Clemens TL, Fraher LJ, *et al.* 1, 25-dihydroxycholecalciferol in the pathogenesis of the hypercalcaemia of sarcoidosis. *Lancet.* 1979; 1: 627-630.
 - 4) Adams JS. Vitamin D metabolite-mediated hypercalcemia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 18: 765-778. 1989
 - 5) Adams JS, Singer FR, Gacad MA, *et al.* Isolation and structural identification of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 produced by cultured alveolar macrophages in sarcoidosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 60: 960-966. 1985
 - 6) Adams JS, Gacad MA. Characterization of 1 α -hydroxylation of vitamin D3 sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J Exp Med.* 161: 755-765. 1985
 - 7) Sone S, Moriguchi S, Shimizu E, *et al.* *In vitro* generation of tumoricidal properties in human alveolar macrophages following interaction with endotoxin. *Cancer Res.* 42: 2227-2231. 1982
 - 8) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159. 1987
 - 9) Bell NH, Stern PH, Pantzer E, *et al.* Evidence that increased circulating 1 α , 25-dihydroxyvitamin D is the probable cause for abnormal calcium metabolism in sarcoidosis. *J Clin Invest.* 64: 218-225. 1979
 - 10) Consensus conference: activity of sarcoidosis. Third WASOG meeting, Los Angeles, USA, September 8-11, 1993. *Eur Respir J.* 7: 624-627. 1994

樹状細胞遊走阻止によるアクネス菌誘導性急性肺炎症の増悪

松島 網治

Propionibacterium acnes (*P.acnes*) 菌の気管内投与により惹起される急性肺炎症モデルにおけるケモカイン動態を解析し、ケモカインを分子標的とした肺炎症の制御を試みた。*P.acnes* 投与後2日をピークとして好中球を中心とした炎症性細胞浸潤が認められ、MIP-2の著明な発現亢進を認めた。この急性炎症は抗MIP-2抗体および抗CXCR2抗体投与により著明に改善された。一方ナイーブT細胞や成熟樹状細胞の遊走に重要な役割を果たしているCCケモカインSLCに対する抗体を作成し投与したところ好中球およびマクロファージを主体とする炎症性細胞浸潤はかえって増悪した。肺炎症部位では成熟樹状細胞が鬱滞し、メモリーT細胞のリクルートメントが減少しているのに対して局所リンパ節においてはCD4T細胞の分裂像と樹状細胞数の減少が認められた。さらに抗原特異的なT細胞増殖反応も著明に減弱していた。これらの結果から急性肺炎症においてケモカインが治療目的の分子標的となりうる事が明らかとされたと同時に、肺急性炎症においても樹状細胞が非特異的免疫応答から抗原特異的な獲得免疫への移行に重要な役割を果たしており、樹状細胞に対する遊走制御は炎症反応を増悪することもありうる事が示唆された。

Blockade of secondary lymphoid tissue chemokine exacerbated *Propionibacterium acnes*-induced acute lung inflammation

Kouji Matsushima

Department of Molecular Preventive Medicine, School of Medicine, The University of Tokyo

Chemokine-chemokine receptor interaction plays an important role in leukocyte/dendritic cell (DC) trafficking in inflammation and immune responses. We investigated the pathophysiological roles of secondary lymphoid tissue chemokine (SLC; CCL21) and macrophage inflammatory protein-2 (MCP-2) in the development of acute pulmonary inflammation induced by an intratracheal injection of *Propionibacterium acnes* in mice. Immunohistochemical studies revealed that SLC was constitutively expressed in the peribronchial area and perivascular lymphatics in normal mice. MIP-2-positive cells were observed in alveolar spaces in mice challenged with *P.acnes*. Both neutralizing Abs against MIP-2 and CXC chemokine receptor 2 alleviated the *P.acnes*-induced pulmonary inflammation when injected before *P.acnes* Ag challenge. On the other hand, polyclonal anti-SLC Abs exacerbated the pulmonary inflammation. The number of mature DCs as well as macrophages and neutrophils in the *P.acnes* Ag-challenged lungs were increased, whereas the number of CD4⁺ T cells, including memory T cells was decreased. The number of mature and proliferative CD4⁺ T cells in the regional lymph nodes were decreased in mice injected with anti-SLC pAbs compared with those in mice treated with control Abs. An *in vitro* proliferation assay confirmed the impairment of the Ag specific T cell response in regional lymph nodes of mice treated with anti-SLC pAbs. These results indicate for the first time a regulatory role for SLC-recruited mature DCs in bridging an acute inflammatory response (innate immunity) and acquired immunity in the lung.

はじめに

肺は広大な毛細血管床と肺胞表面積を有し、常に外界からの侵襲にさらされている臓器で恒常的に免疫反応が起きている臓器である。炎症性刺激が加わると未熟樹状細胞は抗原を貪食処理する過程で炎症性サイトカインの存在下で成熟樹状細胞に分化する。この時成熟樹状細胞は MHC Class II 抗原や CD86 や CD40 などの補助刺激因子を高発現すると同時にケモカインレセプターのスイッチングを行い、CCR7 を発現するようになる。成熟樹状細胞は CCR7 のリガンドである SLC (Secondary lymphoid tissue chemokine) を発現するリンパ管内皮細胞に向かって遊走し、やがて所属リンパ節に到達する。ここではじめて樹状細胞はナイーブ T 細胞に抗原提示し、特異的免疫応答が開始されることになる^{1,2)}。肺組織における炎症においても速やかな樹状細胞の移動局在が McWilliam らにより報告されている³⁾。SLC (CCL21, 別名; Exodus-2, 6Ckine, TCA-4) は 6 つのシステインをもつユニークな CC ケモカインで 1997 年にクローニングされた^{4,7)}。98 年にはその受容体が EBI ligand chemokine (MIP-3B) と同じく CCR7 であることも明らかにされた⁸⁾。SLC 遺伝子の欠損マウスである *plt* マウスでは二次リンパ組織におけるナイーブ T 細胞や樹状細胞の局在異常が認められる⁹⁾。さらに SLC/CCR7 相互作用は成熟樹状細胞の所属リンパ節への移動に不可欠であることが明らかにされている^{10,12)}。

一方、*Propionibacterium acnes* (*P.Acnes*) はグラム陽性の嫌気性桿菌でサルコイドーシスとの関連が指摘されている¹³⁾。今回我々は *P.Acnes* 誘導性肺急性炎症モデルにおけるケモカイン動態を解析し、特定されたケモカイン中和抗体の治療効果を検討すると同時に、樹状細胞の遊走に關与する SLC に対する中和抗体の獲得免疫成立に対する影響を調べた。

対象と方法

動物

6-8 週齢の雌 C57BL/6 を実験に供した。また SLC, MIP-2, CXCR2 に対するポリクローナル抗体を作成する目的で雌 NZW 家兔を使用した。

レコンビナント SLC 精製と抗 SLC1 抗体の作成

緒方らの方法によりレコンビナント SLC を発現、精製した¹⁴⁾。精製蛋白 100 μ g を GERBU エマルジョンにて週 1 回、計 5 回サギに免疫し特異的抗血清を得、さらにプロテイン G カラムで精製した抗体を使用した。抗 SLC 抗体は MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-3, LARC, RANTES

東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室
びまん性肺疾患研究班 分担研究者

などに交差反応性を示さなかった。同様にして抗 MIP-2, 抗 CXCR2 抗体を作成した。

P.Acnes 誘発性急性肺炎

P.Acnes 死菌 300 μ g を C57BL/6 マウス気管内に麻酔下投与し、気管支肺胞洗浄液 BAL 中の細胞構成を調べた。また SLC, MIP-2, CCR7, CXCR2 などのケモカイン・ケモカイン受容体発現の解析を RT-PCR 法にて行った。さらに抗 SLC, MIP-2, CXCR2, CD86 抗体などを用いて肺凍結切片の免疫組織化学的検索を行った。肺炎細胞の FACS 解析には抗 CD4, CD11b, CD11c, CD44, CD62L, MHC Class II 抗体などを用いた。*P.acnes* 誘導性急性肺炎における SLC, MIP-2, CXCR2 の役割を検討するため、*P.acnes* 投与 1 時間前、それぞれ 600 μ g の抗体を C57BL/6 マウスに腹腔内投与した。

細胞走化試験

ポアサイズ 3 μ m のトランスウェルを用いて 100 μ l に懸濁した試験細胞を上層チャンバーに入れ 4 時間培養し、下層チャンバーの SLC に対するケモタクシス試験を行った。遊走細胞数はフローサイトメーターを用いてカウントした。

T 細胞分裂増殖試験

肺局所リンパ節細胞を *P.acnes* 抗原存在下で 72 時間培養し WST-1 細胞分裂試験キットを用いて T 細胞の増殖反応を調べた。

結 果

BAL 中の炎症性細胞

P.acnes 投与後の BAL 中の好中球およびマクロファージは 2 日をピークとして多数出現し、それにひきつづいてリンパ球の浸潤が認められた (Fig.1)。

2 日目の好中球数は $20.9 \pm 5.28 \times 10^4$ であった。

RT-PCR 法によるケモカイン・ケモカイン受容体発現

P.acnes 投与後 2 日目の肺組織のケモカイン・ケモカイン受容体発現を RT-PCR により調べたところ、MIP-2 の発現上昇を認めたのに対して SLC の発現には変化がなく、CCR7 発現はむしろ低下していた (Fig.1B)。

肺浸潤細胞の免疫組織化学的検索

SLC 発現は高内皮細胞小静脈 HEV に強く発現されているほか、気管支周囲および血管周囲リンパ管にも認められた (Fig.2A-a and c) MIP-2 は *P.acnes* 投与後 2 日目の肺胞マクロファージおよび好中球に発現が認められた (Fig.2g)。

肺浸潤細胞に対する遊走試験

P.acnes 投与後 2 日目の肺浸潤細胞の SLC に対する遊走試験を行ったところ、MHCclassII⁺ CD11c⁺ ないし MHC ClassII⁺ CD86⁺ の樹状細胞や B 細胞が有意に多く遊走した (Fig.3A and C)。それに対して CD4T 細胞は抗原刺激

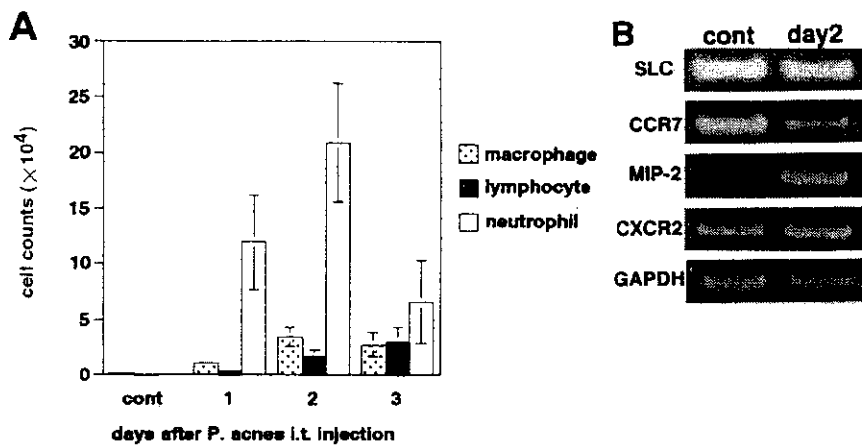


Fig.1 Kinetic cell analysis of BAL cells and RT-PCR analysis of lungs in acute pulmonary inflammation induced by *P.acnes* Ag injection. A, Mice in each group ($n=5$) were i.t. injected with *P.acnes* Ag ($300\mu\text{g}$) and then analyzed. The numbers of macrophages/monocytes, lymphocytes, and neutrophils in BAL were counted as described in *Materials and Methods*. Results are presented as the mean \pm SD. B, Total RNA was isolated from lung tissues of untreated or *P.acnes* Ag-injected mice and reverse transcribed as described in *Materials and Methods*. cDNA products were amplified using oligonucleotide primers specific for each chemokine, chemokine receptor, or the housekeeping gene GAPDH.

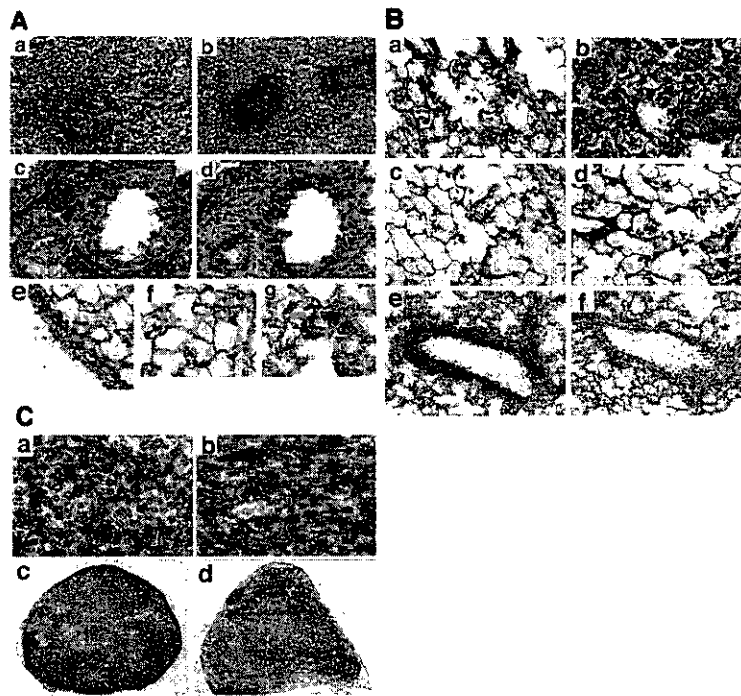


Fig.2 Immunohistochemical examination of lungs and pulmonary regional LNs. A, Pulmonary regional LNs obtained from untreated mice were stained for SLC (a, red) and MECA-79 (b, brown). Lung sections from untreated mice were stained with rabbit anti-SLC pAbs (c and e, red), control rabbit IgG (d), and anti-MIP-2 pAbs (f, red). Lung sections from *P.acnes* Ag-injected mice were stained with anti-MIP-2 (day 2; g). SLC was expressed in HEV (MECA-79 positive) in the regional LNs (a and b). In the lung, SLC (red) was expressed in peribronchial regions (c) and perivascular lymphatic vessels (e). MIP-2 was induced in alveolar macrophages and infiltrated neutrophils in alveoli after *P.acnes* Ag injection (g). Magnification, $\times 200$. B, *P.acnes* Ag-injected lung sections obtained from mice administered control rabbit IgG (a), anti-SLC pAbs (b), anti-CXCR2 pAbs (c), and anti-MIP-2p Abs (d) were stained with hematoxylin-eosin. Magnification, $\times 200$. Mice were injected with Abs 1h before *P.acnes* Ag ($300\mu\text{g}$) injection and analysed 2 days later. Lung sections from mice administered anti-SLC pAbs (e) or control rabbit IgG (f) were stained with anti-CD86 mAb (red). Magnification, $\times 100$. Anti-SLC pAbs exacerbated *P.acnes* Ag induced pulmonary inflammation (b), whereas anti-CXCR2 or anti-MCP-2 pAbs inhibited cellular infiltration induced by *P.acnes* Ag (c and d). CD86⁺ cells were accumulated in perivascular areas in the lung in *P.acnes* Ag-treated mice injected with anti-SLC pAbs (day 2; e). Only a few CD86⁺ cells were detected around vascular areas in *P.acnes* Ag-treated mice injected with control rabbit IgG (day 2; f). C, Cryosections of the pulmonary regional LNs obtained from mice injected with *P.acnes* Ag were stained with anti-CD4 (red) and anti-BrdU mAbs (brown in the nucleus, arrows). Anti-SLC pAbs (a) or control rabbit IgG (b) was administered 1 h before *P.acnes* Ag injection. Two days later, each mouse received an i.v. injection of BrdU ($500\mu\text{g}$) 1 h before death. Pulmonary regional LNs from mice injected with anti-SLC mAb (c) or control IgG (d) were also stained with anti-CD86 mAb (red).

の前後で有意な差は認められなかった (Fig.3B).

抗 MIP-2, SLC 抗体投与の影響

投与1時間前に抗 MIP-2 抗体 600 μ g 投与したマウスでは2日後の炎症性細胞浸潤が著明に改善されたのに対して、抗 SLC 抗体を投与したマウスでは逆に炎症の増悪が認められた (Fig.4A, Fig.2B-d). またこの抗 SLC 抗体による増悪効果は4日目にも認められるが、抗 MIP-2 抗体による改善効果は4日後には認められなかった (Fig.5B). 肺浸潤細胞の FACS 解析では MHC ClassII⁺ CD11c⁺ および MHC ClassII⁺ CD86⁺ 細胞が有意に多く (Fig.5A and B), メモリーフェノタイプである CD4⁺ CD44⁺ T 細胞はむしろ減少していた (Fig.5C). Gr-1 陽性細胞は炎症悪化に一致して上昇していた (Fig.5E). さらに肺局所リンパ節で

は BrdU 陽性の細胞分裂像の減少と MHC ClassII⁺ CD86⁺ 細胞の減少が認められた (Fig.6A-C). *P.acnes* 特異的な T 細胞分裂増殖反応もまた有意に減少していた (Fig.6D).

考案・結論

MIP-2 は IL-8 に相同性をもち顆粒球に対して強い走化性を示すケモカインである¹⁵⁾. MIP-2 に対する特異的中和抗体が *P. acnes* による急性肺炎を著明に改善したことにより、この病態の成立に MIP-2/CXCR2 相互作用による細胞移動が重要な役割を果たしていることが明らかとなった.

SLC は SCYA21a および SCYA21b の2つの遺伝子によりコードされており、前者はセリン残基をもち2次リンパ組織に発現されているのに対して後者はロイシン残基を有し非リンパ組織に発現されている¹⁶⁾. 我々の作成した抗 SLC 抗体はリンパ組織の HEV と気管支および血管周囲の間質細胞に反応することから2つの遺伝子産物両方を検出する抗体であることがわかる. また多くの成績により SLC/CCR7 相互作用は成熟樹状細胞の所属リンパ節への移動に不可欠であることが明らかにされていることから、抗 SLC 抗体投与による急性炎症反応の増悪は樹状細胞の移動障害によると考えられる. 事実、炎症部位における MHCclassII⁺ CD11c⁺ 細胞の増加と血管周囲における CD86 陽性細胞の鬱帯はこの考えを強く示唆している. そして成熟樹状細胞の所属リンパ節への移動障害はリンパ節におけるナイーブ T 細胞への抗原提示の頻度を低下させ、特異的免疫応答の開始を障害するものと考えられる. 実際所属リンパ節における分裂像は減少し、抗原特異的な CD4T 細胞の増殖反応も著明に低下していることが明らかとなった. その結果炎症局所にリクルートするメモリー T 細胞の数が減少し、炎症反応の終息に障害がでてくるものと考えられる. さらに成熟樹状細胞は MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, RANTES など多くの炎症性ケモカインを産生することが知られており¹⁰⁾, 抗 SLC 抗体により炎症部位からの速やかな移動が傷害されることによってさらに炎症性細胞浸潤を促進するに至ったと考えられる (Fig.7).

以上の結果から、ケモカインを分子標的とした治療が急性肺炎においても有効であることを明瞭に示すと同時に、肺における自然免疫から獲得免疫への成立過程において SLC/CCR7 を介した成熟樹状細胞の移動が重要な役割を果たしていることを明らかにした. さらにケモカインないし樹状細胞を分子標的とした治療を考えるうえで樹状細胞の遊走阻止による増悪効果も考慮する必要性も示唆された.

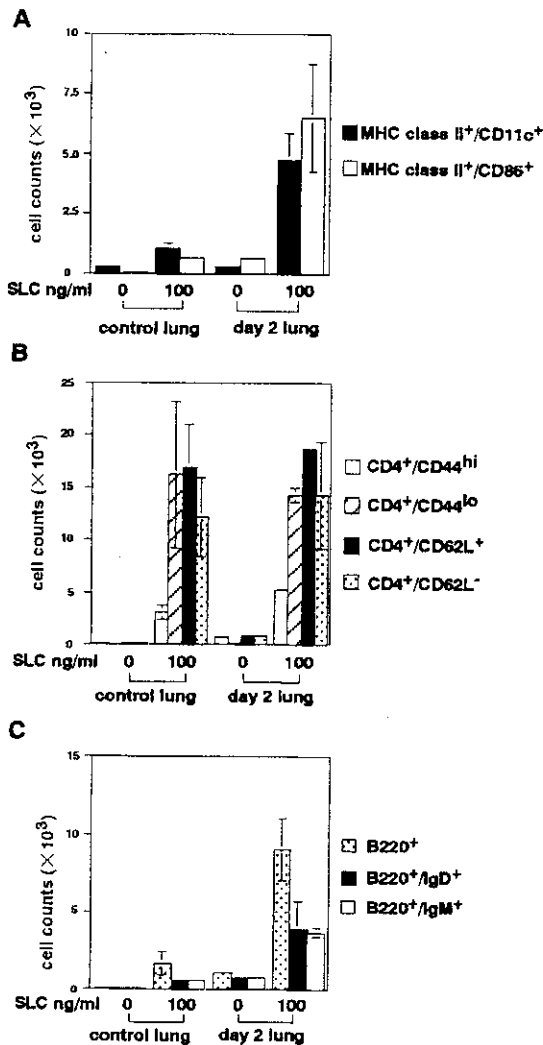


Fig.3 Chemotaxis assay for SLC on lung cells.Lung cells obtained from mice injected with *P.acnes* Ag were cultured in Transwells in the presence(100ng/ml)or the absence of recombinant SLC as described in *Materials and Methods*.Migrated cells were stained for MHC class II/CD 11c or MHC class II/CD86(A),for CD4/CD44 or CD4/CD62L(B), and for B220,B220/IgD,or B220/IgM(C) and were analyzed with an EPICS Elite instrument.Results are presented as the mean \pm SD. Similar results were obtained in two other independent experiments.

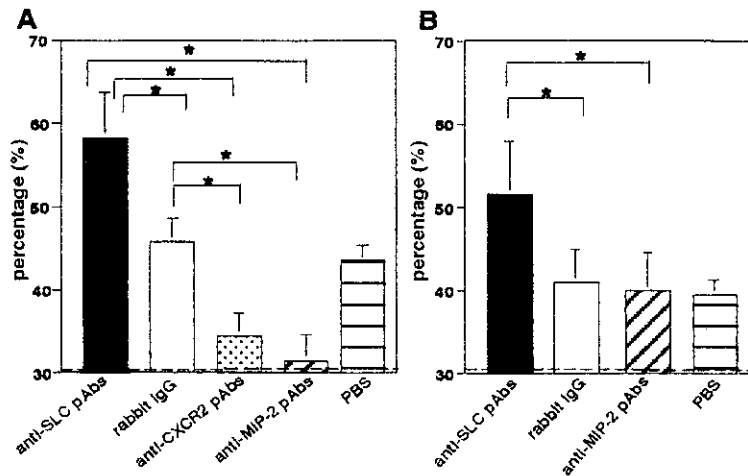


Fig.4 Quantitative evaluation of inflammatory area by image analysis. Hematoxylin-eosin-stained lung section from mice injected with anti-SLC pAbs, control IgG, anti-CXCR2 pAbs, anti-MIP-2 pAbs, or only PBS 1 h before *Pacnes* Ag challenge were prepared for image analysis as described in *Materials and Methods*. Interstitial and infiltrated areas were converted into black, airway density areas were subtracted as white, and then black pixels were measured using National Institutes of Health Image software. Results are expressed as the percentage of black pixel areas per total pixels at $\times 100$ magnification. Ten fields were examined for each mouse in each group ($n=6$). Results were expressed as the mean \pm SD. The data for each group at 2 days (A) and 4 days (B) after i.t. *Pacnes* Ag administration are shown. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test. $*p<0.05$. The average percentages for each column on day 2 were $58.2 \pm 5.58\%$ (■), $45.8 \pm 2.28\%$ (□), $34.4 \pm 2.83\%$ (▨), $31.4 \pm 3.14\%$ (▩), and $43.5 \pm 1.94\%$ (□), respectively (A). The background percentage (30.2%) of the pulmonary interstitial area of nontreated control mouse is indicated by dotted lines in A and B.

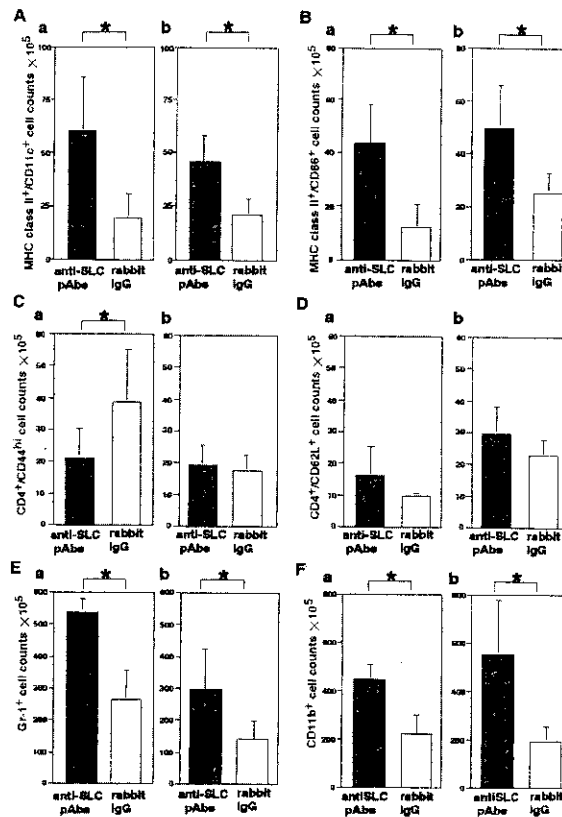


Fig.5 Characterization of lung cell subpopulations in exacerbated inflammation. Lung cells obtained from mice administered anti-SLC pAbs (■) or control rabbit IgG (□) 1 h before *Pacnes* Ag injection were analyzed on an EPICS Elite instrument. A-a, MHC class II⁺/CD11c⁺ (2 days after *Pacnes* Ag injection); A-b, 4 days; B-a and B-b, MHC class II⁺/CD86⁺ (B-a, day 2; B-b, day 4); C-a and C-b, CD4⁺/CD44^{high} (C-a, day 2; C-b, day 4); D-a and D-b, CD4⁺/CD62L⁺ cells (D-a, day 2; D-b, day 4); E-a and E-b, Gr-1⁺ (E-a, day 2; E-b, day 4); F-a and F-b, CD11b⁺ (F-a, day 2; F-b, day 4). Results are expressed as the mean \pm SD ($n=6$). $*p<0.05$.

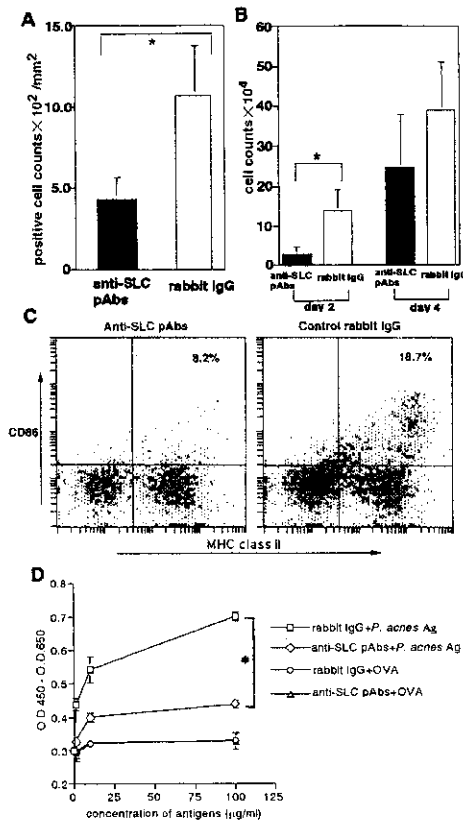


Fig6 Effects of anti-SLC pAbs on proliferative response and DC migration in regional LNs. **A**, Mice administered anti-SLC pAbs (■) or control IgG (□) 1 h before *Pacnes* Ag injection received 500 μg of BrdU 2 days after the challenge. Cryosections of pulmonary regional LNs were stained with anti-BrdU mAb as described in *Materials and Methods*. BrdU-positive cells in the T cell areas were counted. The numbers of BrdU-positive cells in anti-SLC and control rabbit IgG-treated mice were $4.74 \pm 0.93 \times 10^2$ and $10.8 \pm 3.78 \times 10^2$ counts/mm², respectively. The number in mice treated with PBS alone was $1.89 \pm 0.48 \times 10^2$ counts/mm². Results are expressed as the mean \pm SD ($n=7$). *, $p<0.05$. **B**, Mice were injected i.v. with control rabbit IgG (□) or anti-mSLC pAbs (■) and were challenged with *Pacnes* Ag on day 0. Cells from the pulmonary regional lymph nodes were prepared on days 2 and 4 and were stained with PE-conjugated anti-CD86 mAb and biotinylated anti-MHC class II(I-A^b) followed by streptavidin-FITC. The number of MHC class II⁺/CD86⁺ cells from lymph nodes was analyzed and counted on an EPICS Elite instrument. Results are expressed as the mean \pm SD ($n=6$). *, $p<0.05$. **C**, The percentages of DCs(MHC class II⁺/CD86⁺ cells) from the regional LNs on day 2 were indicated by gating on monocytes according to forward and side scatter. **D**, An *in vitro* cell proliferation assay was performed using pulmonary regional LN cells obtained from mice injected with anti-SLC pAbs or control rabbit IgG before *Pacnes* Ag challenge as described in *Materials and Methods*. Results are expressed as the mean \pm SD. *, $p<0.05$.

参考文献

1) Inaba, K., M.Inaba, N.Romani, H.Aya, M.Deguchi, S.Ikehara, S.Muramatsu, and R.M.Steinman. Generation

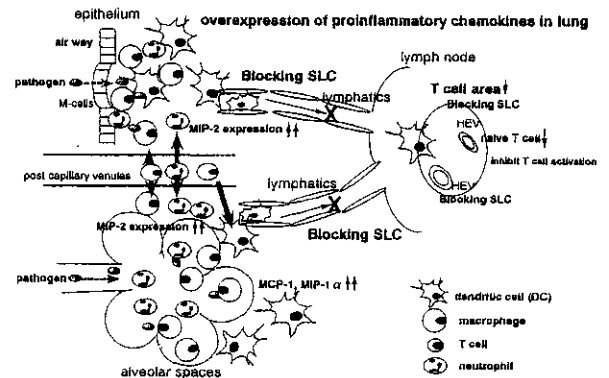


Fig.7 Diagram depicting the role of SLC in an acute pulmonary inflammation. Proinflammatory chemokines including MIP-2 are produced in inflamed lesions in response to the pathogen invading through lymphoepithelial cells (M-cells) in bronchial epithelium or alveoli. These chemokines induce migration of inflammatory cells (macrophages, neutrophils, lymphocytes, immature DCs) into inflamed lesions. Immature DCs differentiate to mature DCs during phagocytosis and the processing of pathogens, and leave the inflamed tissue. Mature DCs migrate into regional lymph nodes(LNs) via lymphatics where SLC is constitutively expressed. They are localized in the T cell area in LNs and activate naive T cells. Activated or memory T cells then get into the circulation and are recruited toward an inflamed tissue. In this way, acute inflammation and primary immune response are linked tightly to develop acquired immunity and eliminate the pathogens. Blockade of SLC by neutralizing anti-SLC pAbs inhibits migration of mature DCs into regional LNs. Retention of mature DCs in primary lesions results in the overproduction of proinflammatory chemokines and exacerbation of inflammation in the lung.

of large number of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176: 1693.

2) Banchereau, J., and R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245, 1998.
 3) McWilliam, A. S., D. Nelson, J. A. Thomas, and P. G. Holt. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surface. *J. Exp. Med.* 179: 1331, 1994.
 4) Nagira, M., T.Imai, K.Hieshima, J.Kusuda, M.Ridanpaa, S.Takagi, M.Nishimura, M.Kakizaki, H.Nomiyama, and O.Yoshie. Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13. *J. Biol. Chem.* 272: 19518, 1997.
 5) Hromas, R., C.H.Kim, M.Klemsz, M.Krathwhol, K.Fife, S.Cooper, C.Schnizlein-Bick, and H.E.Broxmeyer. Isolation and characterization of Exodus-2, a novel C-C chemokine with a unique 37-amino acid carboxyl-terminal extension. *J. Immunol.* 159: 2554, 1997.