

はじめに

肺は外界の病原性、非病原性の微生物や抗原に恒常的に暴露される環境にあり、皮膚、腸管と共に最も免疫学的に活性化された臓器の一つである。肺では侵入した病原体や抗原に対して有効な免疫応答を誘導・開始する生体防御機構、ならびに抗原暴露により惹起される生体に不利な過剰な免疫応答を制御する免疫調節機構が発達しており、このような肺の局所免疫監視機構は、生体のホメオスタシスの維持に重要な役割を演じている。樹状細胞(DC)はナイーブなT細胞を活性化し得る強力な抗原提示細胞(APC)であり、様々なサイトカインを産生し免疫応答の誘導と調節を行い免疫応答の主役を担う^{1,2)}。肺においてDCは、気道、気管支血管鞘間質、胸膜、および肺胞隔壁に局在するが、そのDCの動態や機能についてはいまだ不明の点が多い³⁾。近年、免疫応答におけるプロフェッショナルなAPCとしてのDCの重要性が注目されてきたが、一方、肺には肺胞マクロファージをはじめとする食機能に富んだAPC、すなわちマクロファージも豊富に存在する。我々は、肺の初期免疫応答におけるDCの重要性とその動態を明らかにするため、「肺局所での初期免疫応答を有効に開始・誘導し得るAPCはマクロファージではなくDCである」という仮説をたて、マウス肉芽腫モデルを作成し実験的に検証した⁴⁾。肺の局所免疫監視機構の制御は、抗酸菌感染症や日和見感染症などにおける感染免疫の増強、癌免疫の増強、さらにサルコイドーシス、過敏性肺炎、アレルギー性肺疾患などにおける過剰な病的免疫応答の抑制など、新しい観点からの呼吸器疾患の治療戦略を描くことを可能としよう。

対象と方法

1) 免疫と肉芽腫の作成

PPD (*Mycobacterium bovis* strain AN-5) /complete Freund's adjuvant を C57BL/6 マウス (6-8 週齢, 雌) の尾基部に皮下注 (0.2 mg PPD/mouse) し免疫した。

熊本大学医学部第一内科

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

14 日後, PPD で被覆したセファロースビーズ (CNBr-activated Sepharose 4B beads) を尾静脈より静注した。肺には末梢肺静脈に塞栓したビーズを中心に Th1 偏向性の肉芽腫が形成された⁵⁾。対照として非免疫の正常マウスを用いた。静注後 6, 12 時間, 3, 7, 14 日に肺を単離し凍結保存, あるいは 1 および 3 日目の肺とその所属リンパ節から DC の単離を行った。

2) 免疫組織学的検討

OCT 包埋凍結肺組織をクリオスタットで 3 μ m に薄切, アセトン固定し, avidin-biotin immunoperoxidase 法で肉芽腫形成参画細胞のパネリングを行った。M5/114 (rat anti-mouse MHC class II mAb), MOMA2 (rat anti-mouse monocyte/macrophage mAb), rat anti-mouse CD3, CD4, CD8 α mAb, hamster anti-mouse CD11c mAb, polyclonal rabbit anti-PPD Ab を一次抗体として使用した⁴⁾。また継時的に肉芽腫径を測定し切片上の肉芽腫の面積を求めた。

3) 肺および所属リンパ節からの DC の単離

PPD 免疫あるいは非免疫マウスに PPD 被覆あるいは非被覆ビーズ静注, 1, 3, 7 日後の肉芽腫肺およびその所属肺門・縦隔リンパ節から, また対照として正常マウス肺および肺門・縦隔リンパ節から DC を単離した。簡略に, 肺からの DC 単離は, 肺循環系を 0.6 mM EDTA/PBS で還流洗浄後, 同溶液にて気管支肺胞洗浄を行い末梢血や肺胞マクロファージを除去した後, 肺を細切しコラゲナーゼ処理し, BSA density gradient にて低比重細胞を採取した。洗浄後プラスチックプレートへの 2 時間の細胞付着にて非付着細胞を除去し, 付着細胞は GM-CSF (250 U/ml) 添加培養液でさらに 16 時間培養した。新たな浮遊細胞のみを回収し, Ficoll で死細胞を除去し, M5/114 mAb による immunomagnetic positive selection を行い DC 肉芽形成参画 DC を単離した。リンパ節からの DC の単離は, リンパ節のコラゲナーゼ処理後, PE-CD11c mAb と FITC-B220 mAb (rat anti-mouse CD45R mAb) を用いて FACS にて CD11c⁺ CD45R⁻ 細胞を回収した。DC の純度は各々約 90%, 92% であった⁴⁾。

4) Antigen Presentation Assay

正常 C57BL/6 マウス (6-8 週齢, 雌) の尾基部皮下に, PPD (150 μ g/mouse) あるいは HEL (hen egg lysozyme, 150 μ g/mouse) を CFA とともに免疫し,

14 日後、鼠径リンパ節を採取しリンパ球を IL-2 (10 U/ml) 添加培養液で培養し、4 週ごとにそれぞれ PPD あるいは HEL を添加し restimulation を繰り返すことにより、PPD あるいは HEL 特異的な T 細胞を樹立した⁴⁾。これらの抗原特異的な T 細胞クローンをを用いて肺あるいは肺門・縦隔リンパ節から単離した DC の抗原提示能を検討した⁴⁾。DC は radiation (1000 rad) 後、96 穴平底プレートに 10^4 , 10^3 , 10^2 cells/well でプレートし、これに PPD 特異的な T 細胞を 5×10^4 cells/well で共培養した。培養開始 72 時間後に $1 \mu\text{Ci/well}$ の [³H]-thymidine を添加しさらに 18 時間培養した。DC の抗原提示能を β -scintillation spectrometer にて [³H]-thymidine の取り込みで示される T 細胞の増殖能として計測した。陽性コントロールとして PPD 抗原 (30 $\mu\text{g/well}$) を添加した系をおき、一方、陰性コントロールとして PPD 特異的な T 細胞のかわりに HEL 特異的な T 細胞を用いた系をおいた。また、APA の陽性コントロールとして、放射線照射した脾細胞と抗原特異的な T 細胞、これにそれぞれの特異抗原 (30 $\mu\text{g/well}$) を添加して共培養した系を同時に評価した。抗原特異的な T 細胞の増殖能を T cell proliferative response として以下の式により求めた。DC + PPD-T (cpm) / PPD-T (cpm)。

5) In situ hybridization

Murine IL-12 p40 cDNA をテンプレートとして、252 bp の IL-12 fragment を PCR を用いて作成した⁴⁾。簡略に、制限酵素処理後再びプラスミドに組み込み、DIG RNA labeling kit (Roche Molecular Biochemicals) を用いて Digoxigenine ラベルの sense および antisense RNA プロブ (252nt, 175-426) を合成した。2% paraformaldehyde, 30% sucrose にて前固定し OCT 埋理した凍結肺組織を Cryostat で 10 μm に薄切し、manufacture protocol (Roche Molecular Biochemicals) に従い型通り hybridization と発色を行い、肺肉芽腫上の IL-12 p40 発現細胞を同定した⁴⁾。

6) RNase Protection Assay (RPA)

MCK-2b multi-probe template set (BD Pharmingen) から Maxiscript Kit (Ambion) を用いて instruction に従い [α -³³P]UTP-labeled antisense probe を作成した⁴⁾。凍結保存した肺組織から total RNA を抽出し、probe と hybridization し、RPA III kit を用いて RNase 処理をした。非切断 fragment を 5% polyacrylamide sequencing gel に展開した。乾燥 gel を Model GS-363

Molecular Imager System を用いて解析し、densitometry system にて発現量を定量化した。各々のサイトカインのバンドは GDPDH のバンドにて標準化し発現量を比較検討した⁴⁾。

結 果

1) 肉芽腫形成と肉芽腫構成細胞の変化

PPD 被覆ビーズ静注 3 日目 (day3) に最大径を示す類上皮細胞肉芽腫が形成され、day7 には自然消退傾向を示した。PPD 免疫マウスでは非免疫マウスに比べ day1 から肉芽腫はより大きく、その両群間の肉芽腫径の差は day7 には小さくなった (図 1)。次に肉芽腫の単位面積当たりの MHC class II⁺ 細胞、MOMA2⁺ マクロファージ、CD11c⁺ DC、CD4⁺ T 細胞、および CD8⁺ T 細胞を検討した (図 2)。免疫・非免疫の両群とも肉芽腫形成初期の day1 からすでに MHC class II⁺, CD11c⁺ の DC が肉芽腫内に観察された。day1 では免疫群が非免疫群に比べ有意に細胞密度が高かったが、day3 ではこの差異は縮小した。day3 までにこれらの DC やマクロファージと共に T 細胞が、CD4⁺ T 細胞 > CD8⁺ T 細胞の傾向で肉芽腫周囲に散在性に観察された。CD11c⁺ DC は day1 から抗原被覆ビーズ周囲に接して観察され、day3 では DC はビーズ周囲と共に肉芽腫周囲にも散在しており、周囲に CD4⁺ T 細胞 > CD8⁺ T 細胞の集簇も認

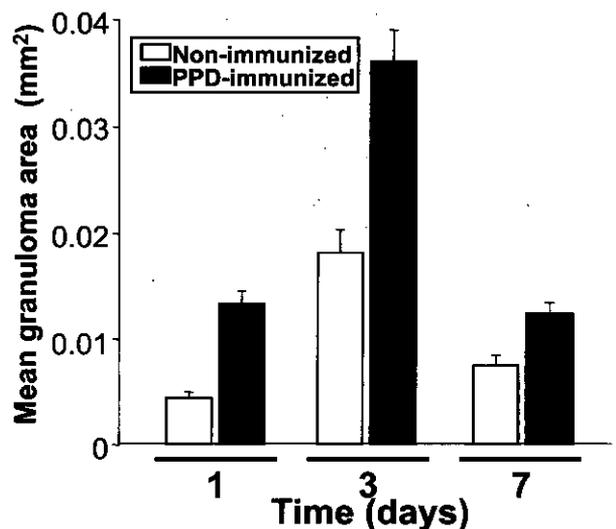


図 1 肉芽腫の形成と消退。

PPD 被覆ビーズの静注後、day3 をピークとした類上皮細胞肉芽腫が形成され、day7 には自然消退傾向を示した。PPD 免疫群は非免疫群に比べ有意に大きく細胞成分に富んだ肉芽腫を形成した。

められた。マクロファージは肉芽腫内に散在していた (図 3)。これらの結果から、非免疫群では侵入抗原に対する初期免疫応答の結果としての肉芽腫形成が遅延し、かつその規模も小さく終焉することが確認された。一方免疫群では、既感作 APC や抗原特異的 T 細胞がすでに存在し、抗原の肺局所への侵入に対し速やかに有効な免疫応答を開始することが可能であり、抗原特異的 T 細胞のクローナ

ルな増殖が迅速に誘導されることを示唆する結果であった。また、MHC class II⁺細胞数は常に CD11c⁺DC の数より多く、その形態像も加味すると、CD11c⁺DC はより成熟した DC であるのに対し、MHC class II⁺細胞は未熟 DC と一部は活性化したマクロファージの両者をとらえていると考えられた。

2) APC としての DC の機能

肺および縦隔・肺門リンパ節より各々 DC を単離し、あらかじめ樹立した PPD 抗原特異的な感作 T 細胞を用いた Antigen Presentation Assay を行った。day 1 の肉芽腫肺より単離した DC は、新たな PPD 抗原の添加なしに有意なリンパ球増殖反応を誘導し得た。免疫群では非免疫群より約 2 倍の抗原特異的 T 細胞増殖誘導を惹起しえた。day 3 の肉芽腫肺単離 DC は、新たな PPD 抗原の添加なしには抗原特異的な T 細胞の増殖を誘導することができなかった。一方、所属リンパ節より単離した DC は day 1 で肉芽腫肺 DC の約 2 倍の、および day 3 ともに新たな PPD 抗原の添加なしに有意な抗原特異的な T 細胞増殖能を示した (図 4)。

3) DC による免疫応答の誘導と調節

IL-12 p40 mRNA の発現を In situ 法にて検討すると、day 1 および day 3 の肺肉芽腫内に明らかな陽性細胞を検出可能であった (図 5)。これらの細胞は比較的大きな核を有し細胞質に富みビーズを取り囲む細胞間に突起を伸ばした形態をしめしており、免疫染色でみた MHC class II⁺、CD11c⁺細胞の分布・局在とよく一致していることから DC であると考えられた。また、肉芽腫肺から抽出した RNA を用いてサイトカインの発現を RNase protection assay (RPA) 法で検討した。IL-1 β 、IL-1Ra、IL-6、IFN- γ は正常コントロールマウスの肺と比較してそれらの発現が増加して観察された (図 6)。

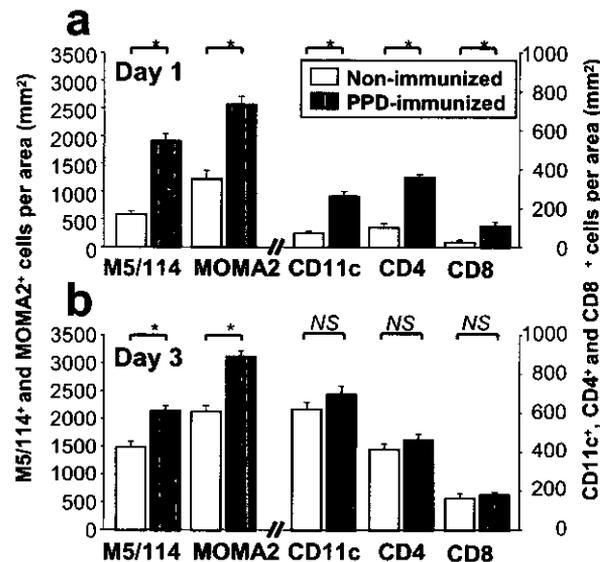


図 2 肉芽腫を構成する免疫担当細胞。
免疫・非免疫の両群とも肉芽腫形成初期の day 1 からすでに MHC class II⁺、CD11c⁺の DC が肉芽腫内に観察された。day 1 では免疫群が非免疫群に比べ有意に細胞密度が高かったが、day 3 ではこの差異は縮小した。day 3 までにこれらの DC やマクロファージと共に T 細胞が、CD4⁺T 細胞 > CD8⁺T 細胞の傾向で肉芽腫周囲に散在性に観察された。

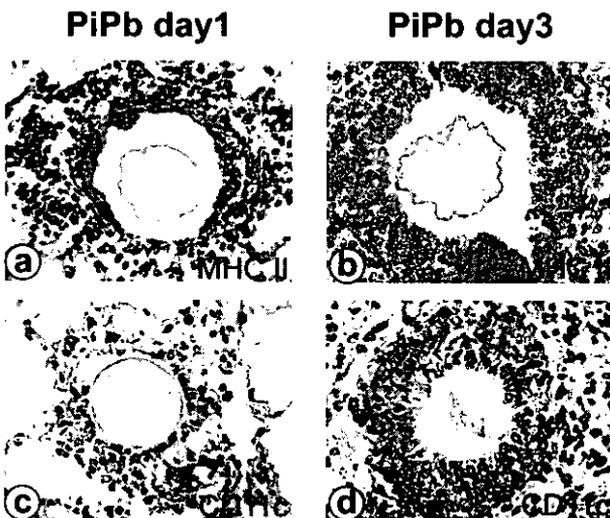


図 3 肉芽腫構成細胞の免疫組織学的検討。
肉芽腫形成初期の day 1 からすでに未熟な DC が肉芽腫内に観察され、day 3 にはビーズ周囲に樹状の突起を伸ばした MHC class II⁺、CD11c⁺の DC が存在した。

考 察

今回の PPD 被覆ビーズ静注によるマウス肺肉芽腫モデルによる検討により、肺の肉芽腫性免疫応答の初期段階で、DC は肺局所に存在し、APC としての機能を担い、Th1 サイトカイン産生細胞としての免疫応答の誘導と調節に寄与していることが明らかとなった。DC は肺局所で抗原を補足し初期免疫応答を開始するとともに、抗原を処理した DC の一

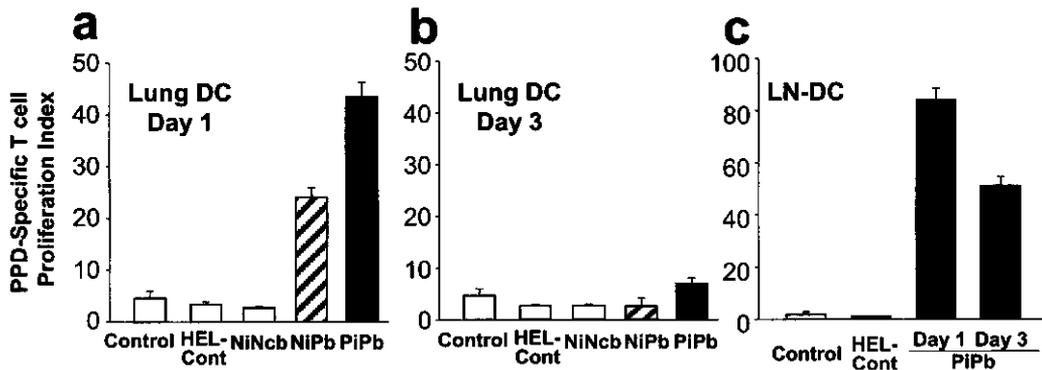


図4 肉芽腫肺および所属リンパ節から単離した DC の抗原提示能。
 day 1 の肉芽腫肺より単離した DC, および day1, 3 の所属リンパ節より単離した DC は新たな PPD 抗原の添加なしに抗原特異的なリンパ球増殖反応を誘導し得た。 day3 の肉芽腫肺単離 DC には有意な抗原特異的 T 細胞増殖の誘導能が認められなかった。

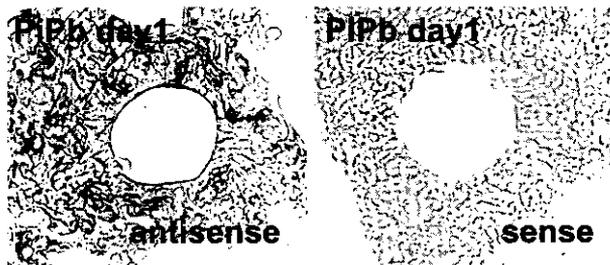


図5 In situ hybridization でみた肺肉芽腫内 IL-12 p40 mRNA の発現細胞。
 day1 および day3 の肺肉芽腫内の、ビーズを取り囲む細胞間に突起を伸ばした DC に、IL-12 p40 mRNA 発現を認めた。

部は成熟しつつ所属リンパ節に迅速に移動し、抗原特異的な T 細胞の迅速なクローン増殖を行っていると考えられた。 PPD 免疫群では非免疫群に比べ day1 より肉芽腫は大きく細胞成分に富み、 day3 では成熟した類上皮細胞肉芽腫が形成されたが免疫 / 非免疫群間の差は減少していた。 非免疫群における初期免疫応答の遅延は、免疫による抗原感作リンパ球の存在の有無によると推察された。 これらの結果から、 DC は肺の肉芽腫性免疫応答を誘導する重要な APC であると考えられた。

PPD 被覆ビーズ静注後、 DC の一部は肉芽腫形成局所に留まり、他は所属リンパ節へ成熟しつつ移動し、それぞれ APC として有意な抗原提示を行っていた。 本研究で得られた興味深い知見の 1 つは、 day1 の肉芽腫肺 DC と所属リンパ節 DC の抗原提示能の差異である。 所属リンパ節 DC は肉芽腫肺 DC の約 2 倍の抗原提示能を示した。 この理由として、 day1 の所属リンパ節 DC は肉芽腫肺 DC に比べより成熟している可能性、あるいは DC と共存するマクロファージが DC の免疫応答に抑制的に機能している可能性が考えられた⁶⁾。 次に、所属リンパ節よ

り抽出した DC は day1 および day3 とともに APC として機能していたが、 day3 の肉芽腫肺から得た DC は、その総数は増加しているにもかかわらず、有意な抗原提示能を示さなかったことも、また示唆深い結果であると考えられた。 本モデルは day3 に肉芽腫形成のピークを迎え day7 には自然消退傾向のあるモデルであることを考え合わせると、肺肉芽腫局所に留まる day3 の DC が過剰な遷延する免疫応答を押さえるべく免疫学的無視様の抑制的な働きをしている可能性も示唆された⁷⁾。 他の可能性として共存するマクロファージの抑制的な役割の関与や肉芽腫内の炎症細胞や増加したマトリックスにより DC とビーズ表面の抗原との物理的な距離が抗原獲得・処理の障害となっていることなども考えられた。

肉芽腫肺からは IFN- γ を含めた炎症性サイトカインの発現の増加を認めた。 In situ 法により肉芽腫のビーズ近傍の DC に IL-12 p40 mRNA の強い発現を認めた。 RPA では IL-12 p40 の発現量の増加を確認できなかったが、 In situ での結果と合わせると、 IL-12 の発現は他の炎症性サイトカインとは異なり肉芽腫全体としては豊富ではなく、 DC 等の極めて限局した細胞でバラクリン的に制御されて局所でのみ発現し、この結果として DC のみならずマクロファージやリンパ球も含めて多くの肉芽腫構成細胞から炎症性サイトカインや IFN- γ 等の Th1 サイトカインの発現が誘導されていることが示唆された。

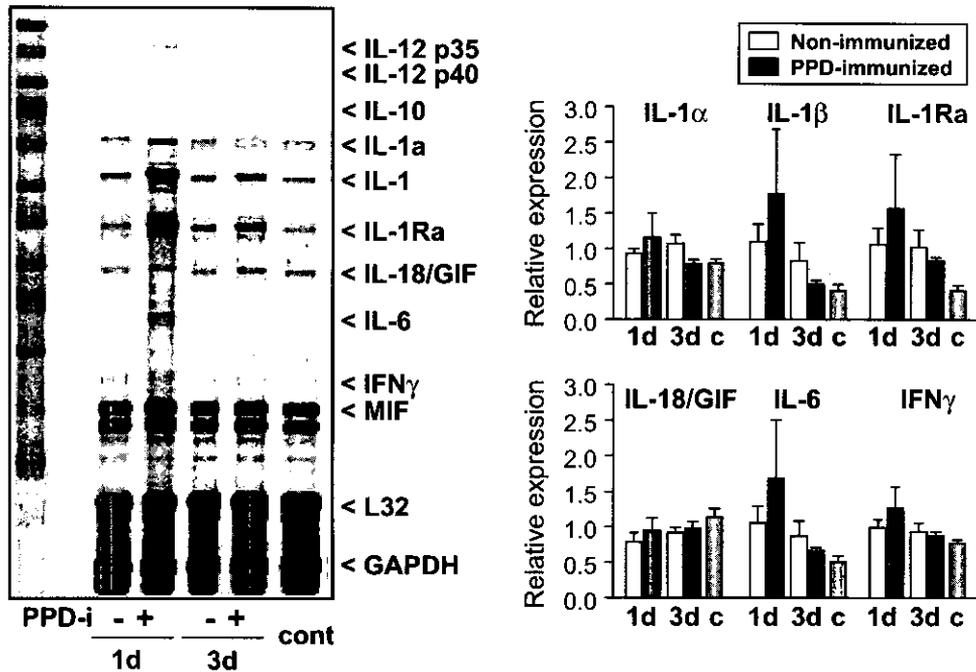


図6 RNase protection assay でみた肉芽腫肺のサイトカイン発現。
肉芽腫肺から抽出したRNAを用いてサイトカインの発現をRNase protection assay (RPA)法で検討した。IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IFN- γ は正常コントロールマウスの肺と比較してそれらの発現が増加して観察された。

参考文献

- 1) Banchereau J and Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.
- 2) Banchereau J, Briere F, Caux C, *et al*: Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
- 3) Suda T, McCarthy KM, Vu Q, *et al*: Dendritic cell precursors are enriched in the vascular compartment of the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 728-737.
- 4) Iyonaga K, McCarthy KM, Schneeberger EE, *et al*: Dendritic cells and the regulation of a granulomatous immune response in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 671-679.
- 5) Chensue SW, Warmington K, Ruth J, *et al*: Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Production of Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of tumor necrosis factor. *Am J Pathol* 1994; 145: 1105-1113.
- 6) Holt PG, Oliver J, Bilyk N, *et al*: Downregulation of the antigen presenting cells function (s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 1993; 177: 397-407.
- 7) Reis e Sousa C, Yap G, Schulz O, *et al*: Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. *Immunity* 1999; 11: 637-647.

抗原繫留によらないマウス肺肉芽腫症モデルの解析

西脇 徹¹ 米山 博之¹ 江石 義信^{2*} 松島 綱治^{1*}

肺肉芽腫症は、その遷延により線維化が容易に誘導され、ガス交換が障害される。しかし、肺臨床における多くの肉芽腫性疾患は、病態形成機序に不明な点が多く、肺線維症の治療も視野に入れた解析が強く望まれている。

今回我々は、*P. acnes* の反復免疫により誘導される Th1 型マウス肺肉芽腫症モデルの発症機構を解明するべく、1) 正常マウス肺での *P. acnes* の存在、2) 正常肺所属リンパ節で成立している *P. acnes* に対する免疫応答、3) 肺外増殖した *P. acnes* 感作リンパ球が循環血流由来を経て肺肉芽腫を誘導し得ることを、免疫学的手法を用いて示した。

このマウス肺肉芽腫モデルは、肺内に抗原繫留せずに病変を誘導する点で従来の動物モデルとは大きく異なり、原因不明間質性肺疾患の病態解明に向けた新たな糸口となることが期待される。

Investigation of a murine pulmonary granuloma model without anchoring antigens

Tetsu Nishiwaki¹, Hiroyuki Yoneyama¹, Yoshinobu Eishi², Kouji Matsushima¹

¹ Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

² Department of Human Pathology, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Although granulomatous lung disease can induce fibrosis and gas exchange disturbance, the etiological factors remain still obscure. Therefore, a vigorous investigation aiming at therapy of lung fibrosis is strongly desired.

We have studied the mechanisms of Th1 type pulmonary granuloma formation in a murine model of repeated *P. acnes* immunization. We demonstrated that: 1) *P. acnes* exists in normal murine lung, 2) Immunoresponses against *P. acnes* is already established in pulmonary regional lymph nodes even in steady state, 3) Circulating *P. acnes*-sensitized lymphocytes expanding at extrapulmonary site can induce pulmonary granulomas.

This newly animal model differs from previously reported ones at the point of forming pulmonary lesions without anchoring antigens in the lung, and is expected to be a clue for resolving interstitial lung disease of unknown origin.

はじめに

肉芽腫性病変が単なる炎症の「なれの果て」ではなく、局所炎症の行く末を左右する「司令塔」の役割を担っているという概念は、近年、当教室米山らのマウス肝肉芽腫モデルの仕事^{1,2)}をはじめとする諸報告によって市民権を得つつある。一方、肺肉芽腫症はその遷延により容易に線維化を惹起しガス交換を障害するので、発症機序の解析とそれに基づく治療戦略の検討は、肺臨床における重要な課題である。

従来の肺肉芽腫症の基礎研究では、抗原をコーティングしたビーズや寄生虫卵を経静脈的に投与し、肺血管に塞栓・繫留させることで局所免疫応答を誘導するといった動物モデルを使用して病態解析を行っている^{3,4)}。しかし、実地臨床で遭遇する多くの原因不明の肺肉芽腫性疾患は、病変分布や病像が従来の動物モデルと様相を異にしており、発症機序の更なる探究には、より臨床に即した動物モデルが必要である。

このような新規の動物モデルを作製するため、我々は、肉芽腫を誘導しやすくサルコイドーシス原因抗原の候補と考えられている *Propionibacterium acnes* (以下 *P. acnes*) を抗原として用い、様々な投与方法と投与量の組み合わせの中から、*P. acnes* の反復免疫が臨床像に近い肺病変を誘導することを見出した。そして、この病変マウスの発症機構について、1) 従来無菌であると言われていた下気道肺には *P. acnes* が常在している、2) 肺所属リンパ節では定常状態より *P. acnes* に対する免疫応答が成立している、3) 従って、肺外で刺激を受けて増殖した *P. acnes* 感作リンパ球であっても、循環血流を介して肺内に流入することで肺肉芽腫を誘導することができる、という仮説をたてた (図 1)。

本稿では、この仮説の傍証となるべき実験結果を、若干の考察を加えて報告する。

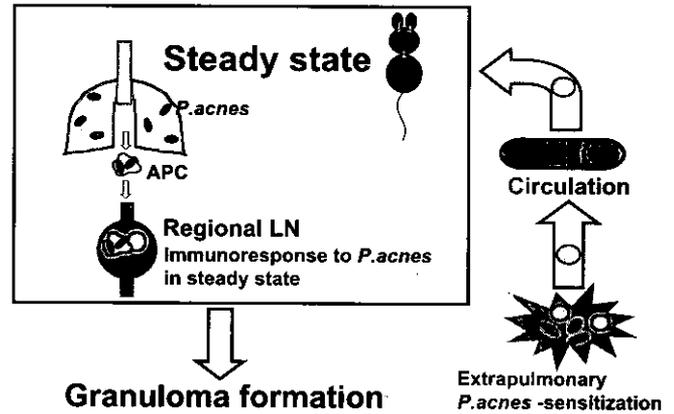


図 1 仮説

対象と方法

マウスは SPF で管理された C57BL/6J (雌, 6 ~ 8 週) を使用。抗原として用いた *P. acnes* (ATCC11828) は嫌気条件下で培養し、表 1 に示す実験以外は全て 60 度で 30 分間過熱し、死菌化した。

免疫染色は間接的免疫アルカリフォスファターゼ (以下 ALP) ・ペルオキシダーゼ (以下 HRP) 法で行った⁵⁾。免疫染色に一次抗体として用いた抗マウスモノクローナル抗体は CD4 (クローン RM4-5), CD8 α (53-6.7), IL-4 (BVD6-24G2), IFN- γ (XMG1.2) :BD PharMingen 製, F4/80 (Cl: A3-1), CD11c (N418) :Serotec 製, DEC205 (NLDC-145) :BMA Biomedicals 製で、*P. acnes* のリポテイコ酸を認識する抗体⁶⁾ は研究協力者である江石氏より御提供頂いた。また二次抗体は、HRP 標識抗ラット免疫グロブリン抗体 :Biosource International 製, HRP 標識抗マウス免疫グロブリン抗体 :DAKO 製, ALP 標識抗ハムスター免疫グロブリン抗体 :Cedarlane 製, ビオチン化 ALP: ニチレイ製, Alexa Fluor 488 抗ラット免疫グロブリン, ストレプトアビジン Alexa Fluor 594: Molecular Probes 製を使用した。

リンパ球増殖アッセイは、無刺激の正常マウスから諸臓器の所属リンパ節を摘出し、1 ウェル 1 \times 10⁵ 個の調整細胞に、抗原および対照抗原 (*P. acnes*・OVA: 10 μ g/100 μ l, PBS) のみを加えたプレートを 3 日間培養した後、WST-1 細胞増殖アッセイシステム (Takara Biomedicals 製) により解析した。

細胞移入実験に使用した *P. acnes* 感作 CD4 陽性細胞の単離は、磁気ビーズ吸着法 (MACSsystem: Miltenyi Biotech 製) により行った。実験では、マウス一匹に対し 2 \times 10⁵ 個の細胞を経尾静注した。

1 東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室

2 東京医科歯科大学病理部

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

結 果

最初に *P. acnes* の反復免疫により誘導したマウス肺の肉芽腫形成像を示す。400 μ g の *P. acnes* を完全フロイントアジュバント：DIFCO 製と共に2週間間隔で下肢足底に皮下注射すると、2回以上の免疫から2週後のマウス肺では、胸膜直下を中心に類上皮細胞・多核巨細胞の集簇を核とした単核球の集積が認められた(図2)。また、これらの病変内細胞構成は、抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞の代表的表面マーカーとして知られる F4/80・CD11c と CD4 との二重免疫染色により、従来の典型的肺肉芽腫⁷⁾と同様の細胞構成であることが分かった(図3)。更に、インターフェロンガンマ (IFN γ)・インターロイキン4 (IL4) と CD4 との二重免疫染色を行うと、これらは IFN γ 産生性、すなわち Th1 型肉芽腫であった(図4)。

このモデルにおける発症メカニズムの仮説の前提として、正常下気道肺における *P. acnes* の常在を明らかにするために、抗 *P. acnes* 抗体を使用して免疫染色を行った。図5に定常状態のマウス肺における *P. acnes* 染色像を示す。弱拡大像では肺胞腔内に表出した細胞内に陽性像がみられ、強拡大像では比較的辺縁明瞭な複数の顆粒の集合として *P. acnes* が染色された。そこで、この *P. acnes* 貪食細胞を同定し、*P. acnes* の常在を裏付けるために F4/80, CD11c, DEC205 の抗体を用いて *P. acnes* との二重免疫染色を行った。*P. acnes* は F4/80 発現細胞に貪食されており、CD11c・DEC205 発現細胞には貪食されていなかった(図5)。

次に、定常状態のマウス肺における *P. acnes* に対する免疫応答の存在を確認するために、未感作マウスより肺所属リンパ節と、比較のために他の器官における所属リンパ節も摘出し、リンパ節細胞増殖アッセイを行った(図6)。鼠径、腸間膜、肺、肝臓の各リンパ節では、いずれにおいても *P. acnes* に対する免疫応答が認められたが、脾臓では反応が弱かった。これらにより、

正常マウス肺における *P. acnes* の常在と免疫応答の成立が示唆された。

そこで、肺外で増殖した *P. acnes* 感作リンパ球が循環血流を経て、未感作肺に肉芽腫を誘導し得ることを確認するために、*P. acnes* 感作 CD4 陽性細胞の移入実験を行った。2 \times 10⁵個の *P. acnes* 感作 CD4

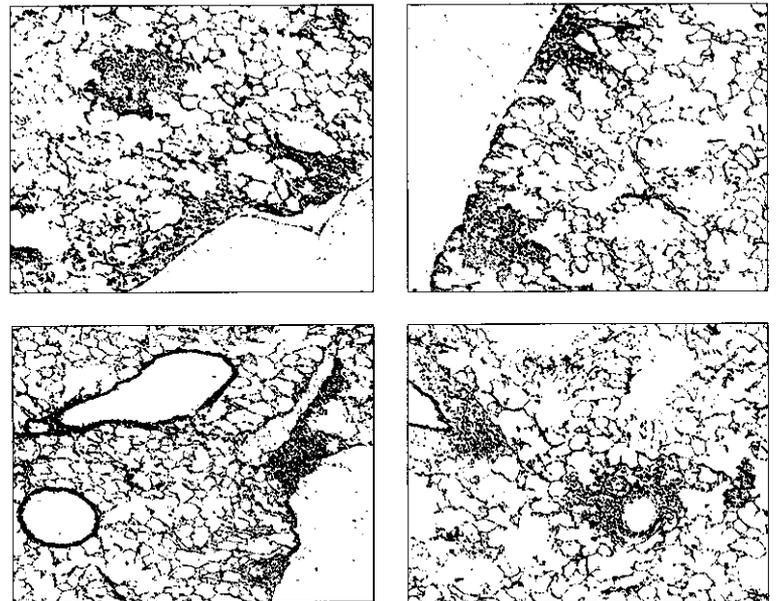
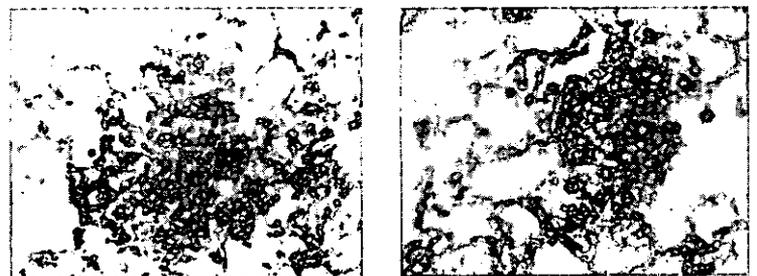
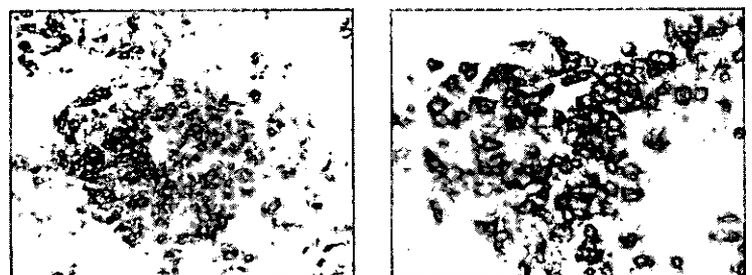


図2 *P. acnes* 反復免疫後のマウス肺



F4/80 + CD4



CD11c + CD4

図3 肉芽腫内細胞構成

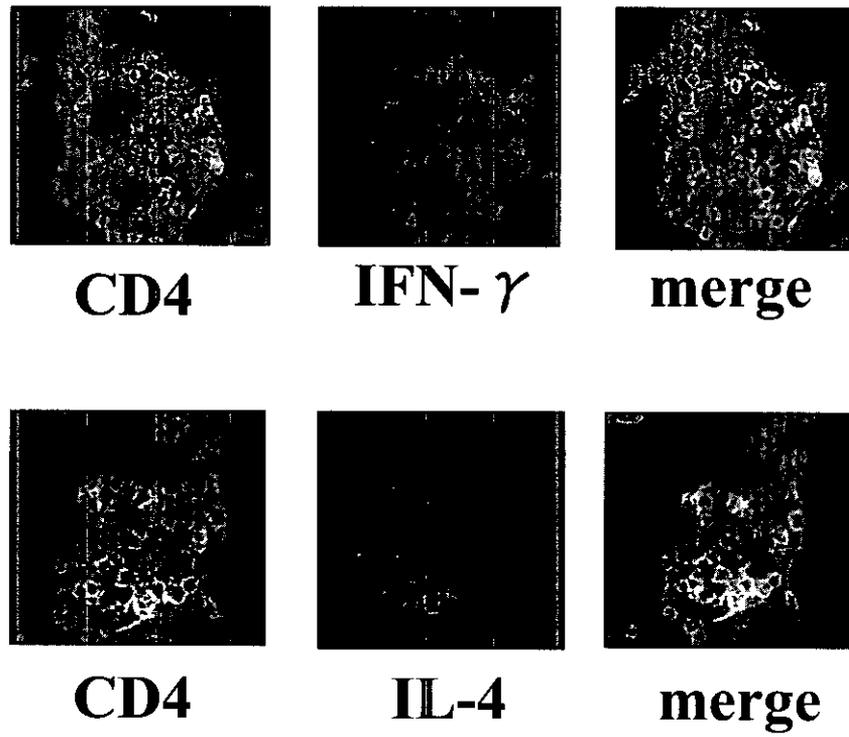


図4 肉芽腫内ヘルパーT細胞の再生サイトカイン

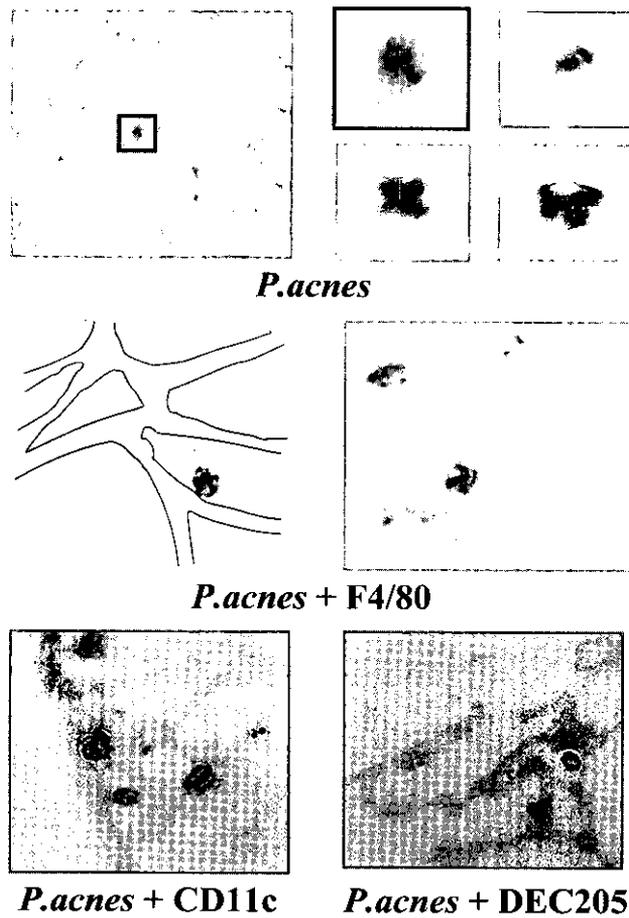


図5 正常マウス肺における *Pacnes* 貪食細胞

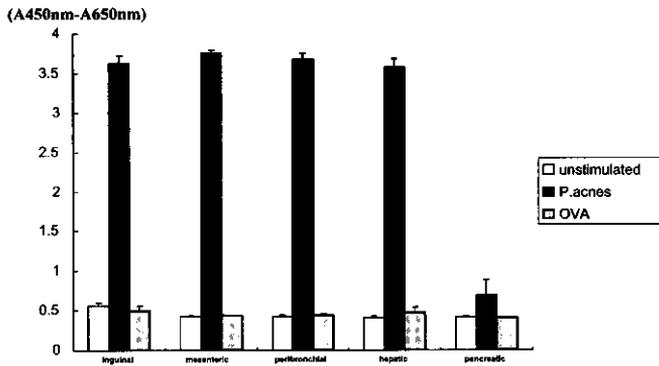


図6 リンパ節細胞増殖アッセイ

陽性細胞を経尾静注された正常マウスでは、2週間後から肺肉芽腫の形成が観察された。一方、未感作マウスから単離したCD4陽性細胞の移入では肉芽腫は誘導されなかった(図7)。

最後に、定常肺における*P. acnes*の存在が、*P. acnes*の反復免疫で肺肉芽腫を誘導し得る要因であることを確認するため、生菌*P. acnes*気管内投与後の反復免疫が病変形成に与える影響を、図8の実験により観察した。すると、極微量な*P. acnes*の前投与によっても、量依存的に病変が強くなる傾向がみられた(図9)。

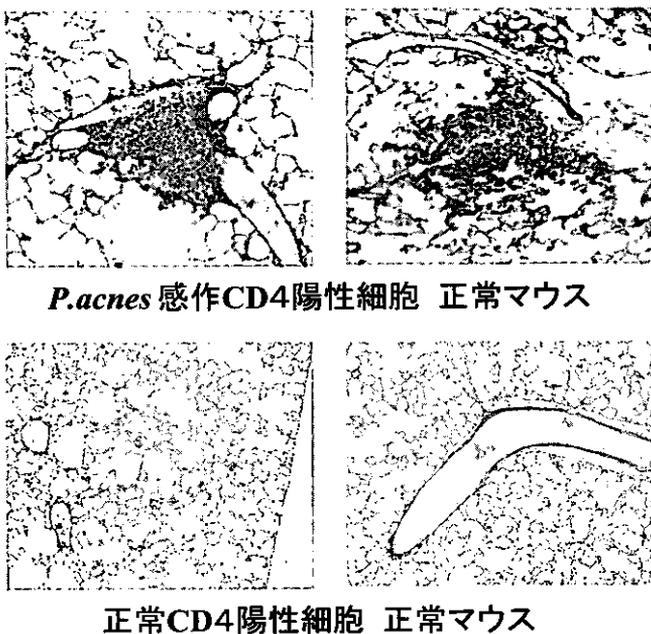


図7 ヘルパーT細胞移入実験

考案・結論

肺肉芽腫の病態形成機序に対する従来の考え方は、肺結核・粟粒結核症や過敏性肺臓炎に代表されるような、外来性抗原の経気道・経血管的肺内侵入後の長期停滞に対する免疫応答を基本とするものが主流であった⁷⁾。従って、サルコイドーシスをはじめとする原因不明の肺肉芽腫性疾患も、各種抗酸菌・真菌・ウイルス肺感染の続発症という観点から研究されることが多く⁸⁾、肉芽腫形成の免疫機構を解析するために用いられる動物モデルのほとんどは、抗原を静注・肺血管塞栓させて肺内に繋留させることによるものであった^{3,4)}。

我々が見出した*P. acnes*の反復免疫による肺肉芽腫モデルは、肺内に抗原を留めずに病変を誘導する点で、従来の肺肉芽腫モデルとは大きく異なり、無菌とされている下気道肺には定常時より抗原である*P. acnes*が存在する可能性を示唆している。抗*P. acnes*抗体を用いた免疫組織化学的な検討では、正常マウス肺において*P. acnes*が存在し、さらに、樹状細胞の代表的表面マーカーであるCD11c・DEC205陽性の細胞よりも、貪食能に長けたマクロファージのマーカーであるF4/80陽性の細胞に多く取り込まれており、肺常在免疫担当細胞の機能分担にも合致する結果であった⁹⁾。

また、一般に肺内抗原は抗原提示細胞により速やかに所属リンパ節に運ばれT細胞に情報が伝播される⁹⁾。従って、正常肺所属リンパ節においても*P. acnes*に対する免疫応答が成立しているはずである。未感作マウスから摘出した各所属リンパ節では、脾臓を除いた、すべてにおいて*P. acnes*に対する明らかな免疫反応が認められた。この結果は、従来*P. acnes*の常在が示唆されている器官と各リンパ節の解剖学的な関係とも矛盾せず、*P. acnes*の正常肺内の存在を裏付けるものとなった。

正常マウス肺の解析結果と、*P. acnes*に感作されたCD4陽性細胞の移入が未感作マウスに肺肉芽腫を誘導する事実は、*P. acnes*反復免疫モデルの病変形成機序におけるアウトラインを構成していると考えられる。しかし、これらの結果のみでは、感作ヘルパーT細胞が肺間質に影響を与えて、最終的な間質内病変形成に至る詳細なメカニズムは分からない。

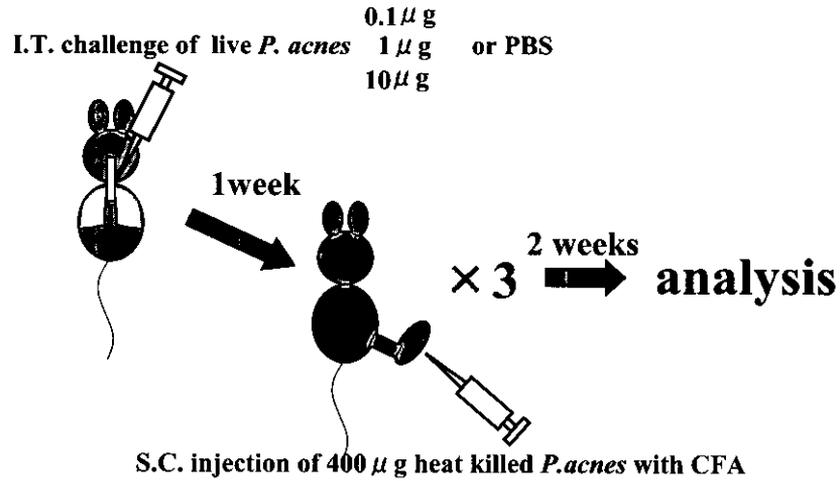


図8 実験スケジュール

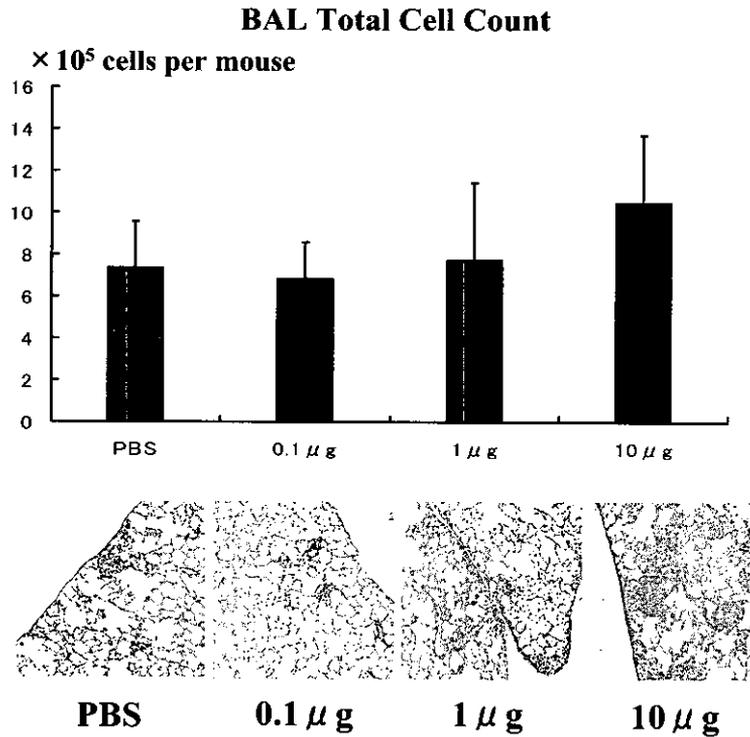


図9 生菌 *P. acnes* の気管内前投与が肉芽腫形成に与える影響

臨床的には、肺外感染が肺間質性病変を誘発・悪化させることは良く知られており、そのメカニズムや責任分子を解明していくことは、今後の間質性肺疾患研究課題の一つになり得ることと考え、ここに報告した。

参考文献

- 1) Yoneyama H, Matsuno K, *et al.* : Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J. Exp. Med.* 193 (1) : 35-49, 2001.
- 2) Yoneyama H, Narumi S, *et al.* : Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes.

- J. Exp. Med. 195 (10) : 1257-1266, 2002.
- 3) Wangoo A, Sparer T, *et al.* : Contribution of Th1 and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous lung disease. J. Immunol 166 : 3432-3439.
- 4) Chensue SW, Lukacs NW, Kunkel SL, *et al.* : Aberrant in vivo T helper type 2 cell response and impaired eosinophil recruitment in CC chemokine receptor 8 knockout mice. J. Exp. Med. 193 (5) : 573-584, 2001.
- 5) Matsuno K, Ezaki T, *et al.* : A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. J. Exp. Med. 183 : 1865-1878, 1996.
- 6) Eishi Y, *et al.* : *Propionibacterium acnes* as a causative antigen of sarcoidosis. Sarcoidosis 11 (2) : 148, 1994.
- 7) Robinson DS, *et al.* : Granulomatous Processes. In : Crystal RG, Weibel ER, *et al.* The lung : scientific foundations. 2nd ed, Lippincott-Raven publishers, Philadelphia. : 2395-2409, 1997.
- 8) Conron M, Du Bois RM: Immunological mechanisms in sarcoidosis. Clin Exp Allergy. 31 : 543-554, 2001.
- 9) 西脇 徹, 米山 博之, 松島 綱治 : 実験的 *P. acnes* 誘導肺炎症モデルにおける樹状細胞の役割. 呼吸器, 3 (1) : 49-55, 2003.

サルコイドーシス患者血清における IL-12, IL-18 濃度と疾患活動性について

杉崎 勝教* 津田 富康

40名のサルコイドーシス患者血清中のIL-12p40及びIL-18濃度を測定したところいずれも正常対照に比べ著明な増加を示した。これらの値を血清ACE値と比較したところ正の相関関係が認められた。またIL-12はIL-18と互いに正の相関を認めた。サルコイドーシス患者では末梢血レベルでTh1型免疫反応が起こっており、全身的な疾患活動性を見る上でこうしたTh1系サイトカインの測定が有用と考えられた。

Serum IL-12 and IL-18 Level in Sarcoidosis Patients and Their Relationship to Disease Activity

Katsunori Sugisaki, Tomiyasu Tsuda

Division of Pulmonary Disease, Department of Immunology and Allergy, Oita Medical University

We examined the serum concentration of IL-12p40 and IL-18 in 40 sarcoidosis patients and 20 normal subjects. The results showed that those Th1 cytokines increased significantly in sarcoidosis patients, and serum concentration of IL-12p40 and IL-18 were related each other positively, and to serum ACE level. Those results suggest that sarcoidosis patients have Th1 hyper-reactivity not only in local lesions, also in systemic peripheral blood. Serum Th1 cytokine level is useful indicator for systemic disease activity.

研究目的

IL-12は主にBリンパ球、マクロファージ、樹状細胞から産生されTリンパ球やNK細胞の機能の調節に働いている¹⁾。またヘルパーT細胞においてはTh1/Th2サブタイプのうちTh1細胞への分化を促してTh1型反応を増強させる主要なサイトカインであることが分かっている²⁾。活性型IL-12はp40とp35の2つのサブユニットからなるp70のダイマーでありこの他にp40同士のホモダイマーも存在して相互に活性の調節をおこなっている。今回我々はサルコイドーシス(以下サ症)患者血清中のIL-12p40の濃度を測定し、サ症における疾患活動性とIL-12p40濃度との関係について検討した。

対象と方法

ステロイド剤が投与されていないサ症患者40名と正常対照20名の血清中のIL-12p40とIL-18の濃度をELISA法で測定した。これらの値を従来からの疾患活動性の指標として知られている血清ACE値やBALF中CD4/CD8比と比較した。

結 果

- 1) サ症患者血清中のIL-12p40, IL-18濃度は正常対照に比べ有意に高値を示した。(図1)
- 2) サ症患者血清中のIL-12p40, IL-18濃度は血清ACEと弱い正の相関関係を示した。(図2, 3)
- 3) サ症患者血清中のIL-12p40, IL-18濃度は相互に弱い正の相関関係を示した。(図4)
- 4) サ症患者血清中のIL-12p40濃度はBALF中CD4/CD8比と有意な相関関係を示さなかった。

考案と結論

サ症患者血清中ではIL-12p40やIL-18等のTh1サイトカインが著明に増加しており末梢血のレベルでTh1型の免疫反応が起こっていることが推測された。BALF等の検討によりサ症では肺局所にお

いても同様のTh1型の免疫反応が起こっていることが知られていることから³⁾、サ症では全身的にTh1型免疫反応の活性化により疾患が活動化していることが予想される。こうした事実はサ症が単に局所的な疾患に止まらず、全身的な病変形成をきたす疾患であることを改めて示していると言える。

今後IL-12p40やIL-18などの新しい疾患活動性の指標が従来からの指標と比べ新たな臨床的な意義を持っているかについてさらに十分な検等が必要と思われる。

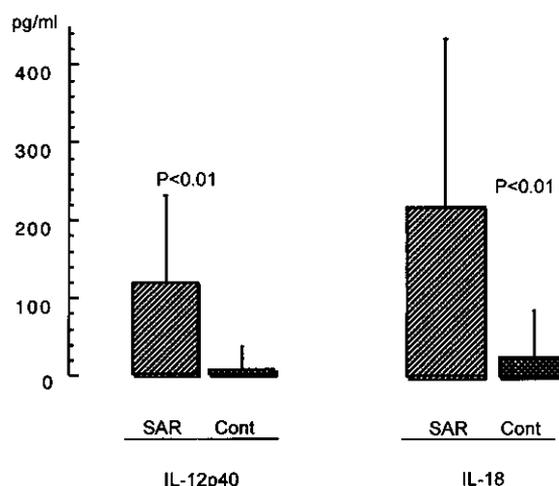


Figure1 Serum IL-12p40 and IL-18 concentration in sarcoidosis patients

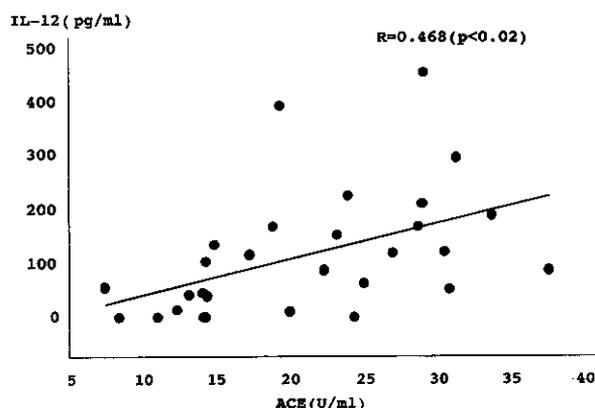


Figure2 The correlation between Serum ACE and IL-12p40

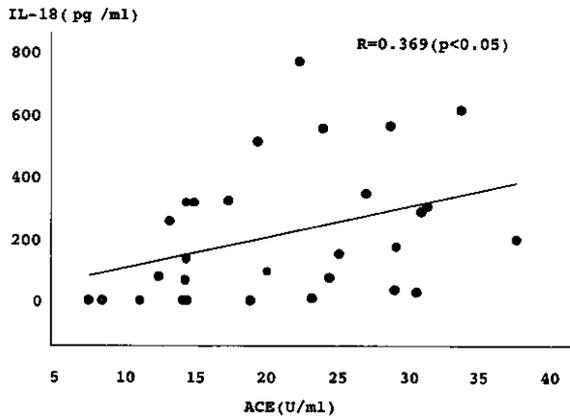


Figure3 The correlation between Serum ACE and IL-18

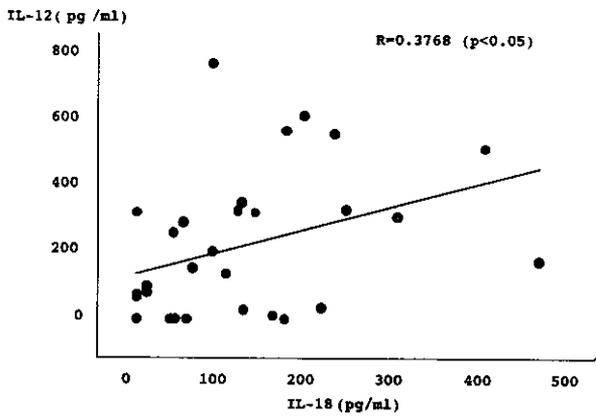


Figure4 The correlatino between Serum IL-12p40 and IL-18

参考文献

- 1) Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, *et al*: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170: 827-845.
- 2) Scott P : IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 1993; 260: 496-497.
- 3) Moller D, Forman JD, Liu MC, *et al*: Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profile in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1996; 156: 4952-4960.

Th1 系免疫に関わる遺伝子の変異と サルコイドーシス発症の関連についての解析

田中 剛^{1,2} 松下 育美¹ 大橋 順³ 中田 光^{1*}
折津 愈⁴ 徳永 勝士³ 慶長 直人^{1**}

本研究は、多型性に富むマイクロサテライト (MS) をマーカーとして利用し、サルコイドーシス発症と関連する変異を同定することを目的に解析を行った。昨年度、Th1 系免疫に関わる 6 遺伝子近傍の MS 多型をマーカーとして設定し、スクリーニングを行い、STAT4 の MS マーカーで疾患との関連を認めた。STAT4 領域に疾患感受性変異が存在する場合、STAT4 の機能や発現量などに変化を与え Th1 系免疫の賦活化や持続に影響を与える、あるいは細胞内殺菌能に影響を及ぼしサルコイドーシスの発症に関わるなどの可能性が考えられる。そこで、本年度、STAT4 領域で感受性変異の有無を確認するため SNP 解析を行った。その結果、STAT4 の MS マーカーと連鎖不平衡にあり、疾患との関連を認める SNP が STAT4 遺伝子のイントロン領域で見出された (A19664G; *P* 値 0.016)。得られた結果を確定的なものとするため、別の症例・対照群で再現性を確認し、その後、機能解析で病態に関わる意義について検討する予定である。

Polymorphisms of genes related to the Th1 immune response in sarcoidosis

Goh Tanaka^{1,2}, Ikumi Matsushita¹, Jun Ohashi³, Koh Nakata¹
Masaru Oritsu⁴, Katsushi Tokunaga³, Naoto Keicho¹

¹ Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan

² Department of Respiratory Medicine, University of Tokyo

³ Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

⁴ Department of Respiratory Diseases, Japanese Red Cross Medical Center

Association studies using linkage disequilibrium (LD) between disease loci and nearby genetic markers are proposed to identify susceptibility genes for complex diseases. To identify genetic predisposition to sarcoidosis, we analyzed polymorphisms of microsatellites (MS) as markers for candidate loci and conducted a case control study on sarcoidosis. Six genes related to the Th1 immune response were chosen as candidates. We carried out screening using the MS markers for these genes and showed that one of the MS marker alleles near the STAT4 gene was significantly associated with the disease. Further search for variations within the STAT4 gene was made and at least one SNP in the STAT4 gene was found to be in LD with the MS marker and associated with the disease. These results should be reproduced and then functional studies are needed to determine the susceptibility variants.

未知の SNP を探索した。コーディング領域については、cDNA を利用した。まず、RNA を末梢血リンパ球から TRIZOL Reagent (GIBCO BRL) を使用して抽出し、reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により、cDNA 合成した。これを用い、LA-PCR で増幅した後にシーケンスし、コーディング領域の SNP を探索した。

5. 統計解析

(1) ハプロタイプ推定と連鎖不平衡解析

タイピングを行った対照群 88 検体の結果を使用し、MS, SNP とも頻度が 5%以上の対立遺伝子について、連鎖不平衡を解析した。また、対立遺伝子頻度が一致し完全な連鎖不平衡 ($r^2=1$) にある複数の SNP については、そのうちの一つのみを代表として解析した。

対立遺伝子が、2重ヘテロ接合体の場合、相を特定できないため、expectation-maximization algorithm (EM algorithm) を用いた ARLEQUIN program (<http://lgb.unige.ch/arlequin>) で推定した。

ハプロタイプ推定の結果をもとに、連鎖不平衡の尺度として、 D' , r^2 を計算した。組換えの頻度について評価する場合には D' を、関連解析のマーカーとしての検出力を評価する場合には r^2 を用いた。

連鎖不平衡の検定には尤度比検定を行った。

(2) Hardy-Weinberg 平衡の検定

対照群の遺伝子型データの正当性の評価には、Hardy-Weinberg 平衡の検定を行った。検定には、ARLEQUIN program を利用した。

(3) 関連解析

タイピング後の疾患との関連解析には、 χ^2 検定を行った。期待値 5 以下となる対立遺伝子については、Fisher's exact 検定を行った。P 値 0.05 以下を有意差ありとした。

結 果

1. MS マーカーと SNP 間の連鎖不平衡の解析

MS マーカーと SNP 間の連鎖不平衡の指標として対立遺伝子毎に計算した D' および r^2 を、IFN- γ RI を参考として示す (図 1)。STAT 領域以外では D' 値は 0.6-1.0 程度であり、また r^2 もいずれかの対立遺伝子で少なくとも 0.1-0.3 を示し、MS マーカーの対立遺伝子と SNP 間で強い連鎖不平衡を認めた。クラスターを形成する STAT1 および STAT4 遺伝子の領域では、連鎖不平衡の程度は他の候補遺伝子領域と比較し強いものではなかったが、候補領域内の SNP の多くは、尤度比検定でマーカーの対立遺伝子と連鎖不平衡にあることが明らかになった。

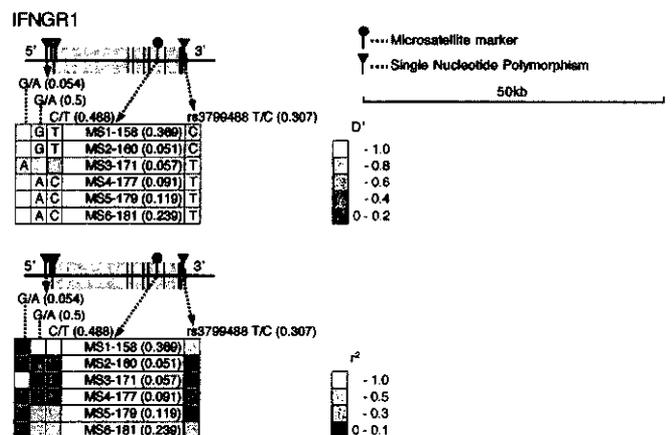


図 1 IFN γ -RI におけるマイクロサテライトの対立遺伝子と SNP 間の連鎖不平衡- D' , r^2

マイクロサテライトの各対立遺伝子と候補遺伝子の 5', もしくは 3', 付近の SNP との連鎖不平衡を D' と r^2 で計算した。連鎖不平衡の検定で有意であった SNP については、ハプロタイプを組む対立遺伝子を記載した。rs- は dbSNP 登録 ID。 () 内は対立遺伝子頻度。

2. STAT4 領域におけるサルコイドーシス感受性変異の探索

STAT4 遺伝子のコーディング領域には SNP を認めなかった。また、NCBI のデータベース dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) 上に登録されている日本人以外のパネルでみられた 2カ所の非同義置換 (rs3024839, rs3024933) について、症例群 83 検体でタイピングを行ったが、こちらでも SNP を認めなかった。プロモーター領域 (転写開始領域から 5' 側上流約 3,000bp) では、3 個 (A-1277G, T-977C, A-954G), 新規 SNP を同定した。

これらの新規 SNP 及び JSNP データベース上か

ら選択した STAT4 領域の SNP を中心に、対照 88 検体についてタイピングし、連鎖不平衡の解析を行った。その結果、イントロン 3 を境に、D' が比較的高い値を示す 2 つのブロックの存在がみられた (図 2)。

以上の STAT4 領域に存在する SNP のうち、STAT4 マーカーと連鎖不平衡にある SNP を中心に関連解析を行った結果、A19664G (rs1551442) で、マーカーと同様に保有者の頻度で有意差を認めた (表 3)。また、A19664G と rs1020658, rs1551441, rs1551440 (全てイントロン 3 に存在) は、ほぼ完全な連鎖不平衡 ($r^2 \approx 1$) を認めた。

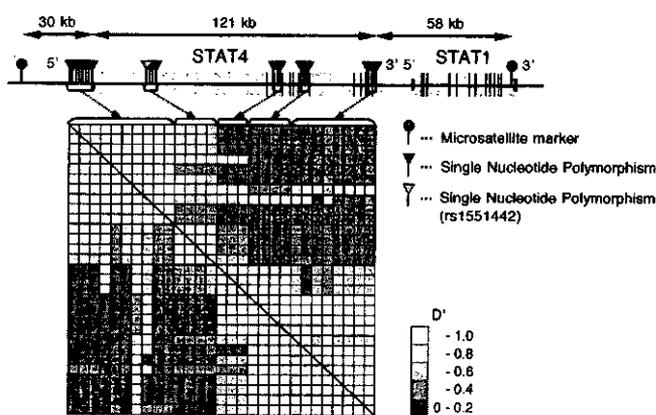


図 2 STAT4 領域の連鎖不平衡マッピング STAT4 領域内でタイピングした SNP 間の D' を計算した。INT3 を境として大きく 2 つの連鎖不平衡の強い領域に区別されている。

表 3 STAT4 遺伝子の SNPs とサルコイドーシスの関連解析

SNP 位置	対立遺伝子	症例 (n= 83)	対照 (n= 96)	χ^2 値	P 値
+19664	A/A, A/G	83 (1.000)	89 (0.927)	—	0.016*
	G/G	0 (0)	7 (0.073)		

()内は対立遺伝子頻度, * Fisher's exact検定で解析

考 察

本年度は、まず、昨年度に設定した MS マーカーの連鎖不平衡の及ぶ範囲が候補遺伝子領域内をカバーしているかを確認するため、候補遺伝子の 5' もしくは 3' 末端付近の SNP のタイピングを行った。その結果、MS マーカーのそれぞれの対立遺伝子と SNP 間の連鎖不平衡のパラメーター D' は高値を示

し、MS と SNP の間で相互に強い連鎖不平衡にあると考えられた。 r^2 も MS のいずれかの対立遺伝子がマーカーとして有用とされる 0.1 以上の値^{2,3)}を示し、十分にマーカーとして使用できると考えられた。STAT4 遺伝子に関しては、D', r^2 も他の領域と比較しやや低値を示し、STAT4 領域のマーカーとしては、やや感度が低いものと考えられた。

昨年度に行った解析で、STAT4 マーカーの一つの対立遺伝子で有意差を認め、この対立遺伝子が疾患感受性変異と連鎖不平衡にある可能性が示唆されていた。STAT4 は、IL-12 レセプターからのシグナルを受けた janus kinase (JAK) により活性化され、src homology2 (SH2) ドメインを介して 2 量体を形成した後に、細胞質から核内に移行し、直接、IFN γ の転写を誘導する転写因子である。よって、STAT4 領域に疾患感受性変異が存在する場合、STAT4 の機能や発現量などに変化を与え Th1 系免疫の賦活化や持続に影響を与える、あるいは細胞内殺菌能に影響を及ぼしサルコイドーシスの発症に関わるなどの可能性が考えられる。そこで、STAT4 領域の SNP 解析を行った。まず、直接、タンパク構造に変化を与え、機能に影響する可能性のあるコード領域について検討を行ったが、この領域には SNP を認めなかった。次にプロモータ領域の SNP 探索で同定された新規の SNP 3 個とデータベース (dbSNP, JSNP) 上から選択した SNP について、連鎖不平衡を解析したところ、STAT4 マーカーと比較的強い連鎖不平衡を認める SNP は、イントロン 3 領域より 5' 側であり、3' 側は、主に STAT4 とクラスターをなす STAT1 遺伝子のマーカーと連鎖不平衡にあることが明らかとなった。

STAT4 のマーカーと連鎖不平衡にある SNP を中心に関連解析を行った結果、イントロン領域にある SNP (A19664G) で疾患との関連を認めた。また、これらとほぼ完全な連鎖不平衡 ($r^2 \approx 1$) にある同じイントロン領域の SNP でも関連が示唆された。これらは、マーカーとの連鎖不平衡が比較的弱い SNP であり、また、疾患との関連も有意差は認めるものの、それほど強いものではなかった。そのため、これらの SNP を真の感受性変異と考えるほかに、マーカーと同様に STAT4 遺伝子内もしくは近傍の別の遺伝子内の未知の感受性変異と連鎖不均衡にあるために有意差がでている可能性も考えられた。

いずれにせよ、この領域で、マーカーの対立遺伝子、SNPの頻度とも症例と対照で有意な差を認めており、スクリーニングで得られた結果を確定的なものとするため、今後、別の症例・対照群を集積し解析結果の再現性を確認する必要があると考えられる。そして、さらにマーカーと連鎖不平衡にある領域の詳細なマッピングを行い、その後に、機能解析で病態に関わる意義について検討する予定である。

参考文献

- 1) Risch N, and Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517, 1996.
- 2) Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nature Genetics* 22: 139-44, 1999.
- 3) Pritchard JK, and Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *American Journal of Human Genetics* 69: 1-14, 2001.