

# びまん性汎細気管支炎

# エリスロマイシンの抗炎症作用： 包括的遺伝子発現解析から（第一報）

滝沢 始<sup>1\*</sup> 中島 敏治<sup>2</sup> 斉藤 博久<sup>2</sup> 梅田 啓<sup>3</sup>

びまん性汎細気管支炎に対する特効的效果から、その抗炎症作用が注目された14員環マクロライド系抗生物質（以下マクロライド）は、現在では慢性副鼻腔炎、副鼻腔気管支症候群をはじめさまざまな疾患領域での治療応用が行われている。私達はこれまでに、気道炎症に重要な役割を演じるサイトカイン、ケモカイン、接着分子の発現への抑制効果に注目し、これらに共通して重要な転写調節因子（NFκB, AP-1）への抑制性作用を報告してきた。しかし、マクロライドの薬効の機構をすべて説明することはできない。そこで、ヒト気道上皮細胞を標的細胞として、エリスロマイシンの遺伝子発現への作用を、ジーンチップを用いて包括的に評価することを試みた。ヒト気管支上皮細胞株 BET-1A において種々の条件下でエリスロマイシン  $10^{-6}$ M を作用させて包括的遺伝子発現への影響を検討した。エリスロマイシンの処理により発現が増強する遺伝子と減弱する遺伝子が存在した。TNF-α 1ng/ml により発現が明らかに増強した遺伝子群においてエリスロマイシンにより有意に抑制されたものは認められなかった。今後、マクロライドの処理時間などを変えてさらに検討する予定である。

## Studies on the microarray analysis of transcripts in human bronchial epithelial cells: An approach to the anti-inflammatory actions of macrolide antibiotics

Hajime Takizawa<sup>1</sup>, Toshiharu Nakajima<sup>2</sup>, Hirohisa Saito<sup>2</sup>, Akira Umeda<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Respiratory Medicine, University of Tokyo, Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan.

<sup>2</sup> Department of Allergy and Immunology, National Children's Medical Research Center, Tokyo, Japan.

<sup>3</sup> Department of Interdisciplinary Medicine, National Children's Medical Center

Macrolide antibiotics have an anti-inflammatory activity, which is believed to be one of the important mechanisms of therapeutic efficacy for the treatment of diffuse panbronchiolitis. To investigate the molecular mechanisms of their actions, we explored to utilize the array analysis of mRNA transcripts in human bronchial epithelial cells. The cells were treated with therapeutic dosages of erythromycin (EM) with and without the stimulus of TNF-alpha. Total cellular RNA were extracted and subjected to gene transcription analysis by GeneChip. EM showed increasing and suppressing effects on transcription of several genes. This approach seemed to help elucidating the important genes involved in the therapeutic effectiveness of the macrolides.

## はじめに

エリスロマイシン (EM) をはじめとする 14 員環マクロライド抗生物質の慢性気道炎症性疾患における有効性の機序について、これまでに気道上皮細胞のサイトカイン/ケモカイン、接着分子の発現ないし産生、遊離を抑制することを報告してきた<sup>1,3)</sup>。これらの多くに共通して重要な転写調節因子 (NFκB, AP-1) の活性化についてもゲルシフトアッセイにより検討し、薬剤と刺激の同時処置では明らかな抑制作用はないが<sup>4)</sup>、治療域濃度のエリスロマイシン (EM, 10<sup>-6</sup>M) およびクラリスロマイシン (CAM) を種々の条件で前添加した系においては 24 時間の前処置により、明らかな NFκB, AP-1 の活性化抑制作用を見出した<sup>5)</sup>。さらに、マクロライドの抗菌作用を有しない各種誘導体が転写調節因子 (NFκB, AP-1) の活性化を抑制しうること、IkB のリン酸化には直接作用しないこと、を示した<sup>6)</sup>。前年度は、マクロライドの作用点のひとつに核内結合過程が存在することを示唆する結果が得られた<sup>7)</sup>。

しかし、これらの研究によって解明された効果のみで、マクロライドの多面的な薬効の機構をすべて説明することはできない。そこで、ヒト気道上皮細胞を標的細胞として、エリスロマイシンの遺伝子発現への作用を、ジーンチップを用いて包括的に評価することを試みた。今年度はその第一報を報告する。

## 対象と方法

## 細胞培養

既報のごとく<sup>5)</sup>、ヒト気管支上皮細胞株 BET-1A を用い、ホルモン・成長因子を添加した Ham's F12 液で培養した。EM の効果は BET-1A 細胞に EM (1μg/ml)、TNF-α (1ng/ml) 及びその両者を添加し 37℃ で 3 時間培養した。反応後、total RNA を精製

した。遺伝子発現解析は Affymetrix 社のプロトコールに従って total RNA から cDNA を経てビオチン化 cRNA を調製した。ジーンチップ (Human Genome U133A, Affymetrix 社) と 16 時間ハイブリダイズさせた後、ファコエリスリン標識ストレプトアビジンを反応させレザースキャナーで蛍光を測定し、解析ソフト Suite 4.0 で解析した (図 1)。

発現強度の値が 100 を超え、かつコントロールの値より 2 倍以上の遺伝子を有意な変化とした。

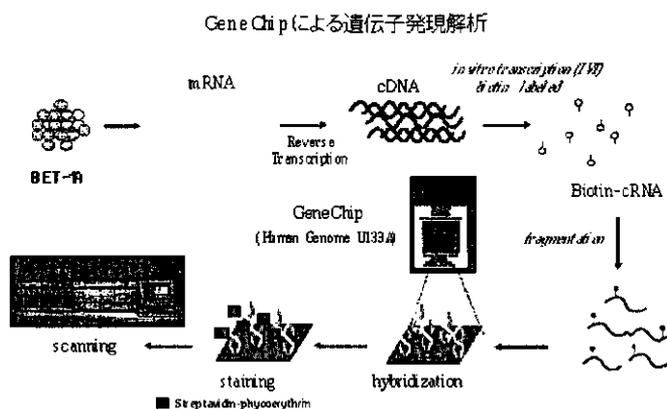


図1 ジーンチップを用いた包括的遺伝子発現の解析方法。

## 結 果

- (1) EM の処理により、3 時間後の IL-8 遺伝子発現レベルは減弱傾向を示した。また、この条件下 24 時間インキュベートしたあとの細胞上清中の IL-8 濃度を測定したところ、明らかな抑制作用を示した (図 2)。この結果は、既報の我々を含む緒家の報告に矛盾しないものであった<sup>2,8)</sup>。
- (2) 培養液のみ、EM (1μg/ml)、TNF-α (1 ng/ml) 及びその両者の 4 群とも、約 1 万の遺伝子発現が検出され、その数に明らかな差はなかった。
- (3) EM の処理により、発現が増強する遺伝子が約 150 みられ、一方減弱する遺伝子が約 280 ほど存在した。
- (4) TNF-α 1ng/ml により発現が強く増強した遺伝子群においてエリスロマイシンにより著明に抑制されたものは認められなかった。
- (5) TNF-α 1ng/ml により発現が 1.5 倍以上増強した遺伝子群においてエリスロマイシンにより有意に抑制されたものが認められた。

1 東京大学医学部呼吸器内科

2 国立成育医療センター 研究所免疫アレルギー研究部

3 総合診療部

\* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

## 考 案

これまでの研究により、14員環マクロライド抗生物質が、炎症性サイトカインなどの発現に重要な転写調節因子（NFκB, AP-1）の活性化を抑制することが明らかになり、びまん性汎細気管支炎の気道炎症を改善する1機序として推定されるに到っている。この作用は、気道上皮細胞のみならずマクロファージ、リンパ球、線維芽細胞においても認められ<sup>8,11)</sup>、生体に対するかなり普遍的な作用である可能性がある。一方、マクロライドには、気道分泌抑制作用、細胞のアポトーシスへの作用、リンパ球の増殖抑制作用など、きわめて多面的な作用も示されており、以上述べた機構だけで薬効を説明しきることはできない。従来は、気道炎症病態から候補となる分子を選んで研究を進めてきたわけであるが、今回は、Affymetrix社のジーンチップを用いて、約2万以上の遺伝子についてその発現への影響を検討できた。このうち、ヒト気道上皮細胞において今回検出可能であったのは、約半分の1万個であった。

まず、EMの処理により、3時間後のIL-8遺伝子発現レベルは減弱傾向を示した。また、24時間後の細胞上清中のIL-8濃度も、明らかな抑制作用を示した（図2）。この結果は、既報の我々を含む諸

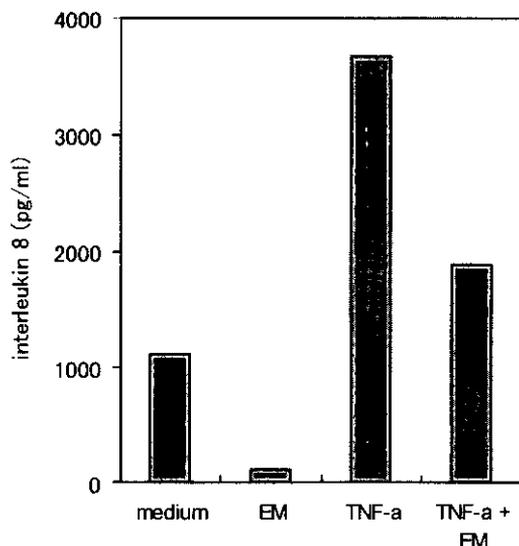


図2 ヒト気管支上皮細胞株 BET-1A の IL-8 遺伝子発現とタンパク産生に及ぼすエリスロマイシンの影響。

EM 処置により明らかな遺伝子発現とタンパク産生の抑制が認められた。

家の報告に矛盾ないものであった<sup>2,8)</sup>。また、内部標準である beta-actin, GAPDH の発現レベルは4群間ではほぼ一定であり、実験系の妥当性が示唆された。EM の処理により、発現が増強する遺伝子が約150 みられ、一方減弱する遺伝子が約280 存在した。TNF-α 1ng/ml により炎症性分子を含む多数の遺伝子の発現が強く増強したが、すでに報告されている ICAM-1 などを含め、エリスロマイシンにより明らかに抑制されたものは認められなかった。しかし、TNF-α 1ng/ml により発現が1.5 倍以上増強した遺伝子群においてエリスロマイシンにより有意に抑制されたものが認められた。

マクロライドの作用機構を解明する上で、今回のアプローチは、同時にヒトの全遺伝子の2/3 の発現への影響を網羅的に検出できる点が最大の利点と思われる。しかし、一方で、細胞内でリン酸化されるシグナル分子の動きなどはとらえられないことなどの限界もまた存在する。さらに、マクロライドの効果発現には少量で長期の投与が必要であることを考慮するとマクロライドの試験管内での作用時間にも工夫が必要である。我々は、以上の点にも留意しながら、マクロライドの作用に関与する遺伝子群の検索を推進する予定である。

## 結 論

マクロライドの抗炎症作用解明のために、ヒト気道上皮細胞を用いてジーンチップによる包括的遺伝子発現の検討を行い、その変化を検出することができた。

## 謝 辞

共同研究者として本研究の遂行にご協力いただいた北里研究所 大村 智先生、砂塚敏明先生に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) H. Takizawa, M. Desaki, T. Ohtoshi, *et al.* : Erythromycin suppresses interleukin 6 expression by human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210: 781-786, 1995

- 2) H. Takizawa, M. Desaki, T. Ohtoshi *et al.* : Erythromycin modulates IL-8 expression in human bronchial epithelial cells: Studies with normal and inflamed airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 266-271, 1997.
- 3) Kawasaki S, Takizawa H, Ohtoshi T, *et al.* : Roxithromycin inhibits cytokine production and neutrophil attachment with human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1499-1502, 1998
- 4) 滝沢 始, 出崎真志, 河崎 伸, 他: エリスロマイシン療法の機序解明: ヒト気道上皮細胞の転写調節に対するマクロライド抗生物質の作用. 厚生省特定疾患呼吸器系疾患調査研究班びまん性肺疾患分科会平成10年度研究報告書, 124-127.
- 5) Desaki M, Takizawa H, Ohtoshi T, *et al.* Erythromycin suppresses nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 124-128, 2000.
- 6) 滝沢 始, 出崎真志, 岡崎 仁: マクロライド抗生物質のサイトカイン発現抑制作用: その細胞内機構へのアプローチ. 平成12年度厚生省特定疾患呼吸器系研究班研究報告(01年1月27日) 同報告書 pp. 28-31.
- 7) 滝沢 始, 出崎真志, 岡崎 仁: マクロライド抗生物質が示す抗炎症作用の細胞内分子機構に関する検討. 平成13年度厚生省特定疾患呼吸器系研究班研究報告(同報告書 pp. 47-50.)
- 8) Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, *et al.* Clarithromycin inhibits NF- $\kappa$ B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 44-47, 2001.
- 9) Miyanohara T, Ushikai M, Matsune S, *et al.* Effects of clarithromycin on cultured human nasal epithelial cells and fibroblasts. *Laryngoscope* 110: 126-131, 2000.
- 10) Aoki Y, Kao PN: Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF-kappaB, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2678-2684, 1999.
- 11) Kikuchi T, Hagiwara K, Honda Y. *et al.* Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF-kappa B transcription factors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 49 (5) : 745-55, 2002

# びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子研究

## ーヒトゲノム上の連鎖不平衡構造との関連ー

慶長 直人<sup>1\*</sup> 土方美奈子<sup>1</sup> 松下 育美<sup>1</sup> 中田 光<sup>1\*\*</sup>  
徳永 勝士<sup>2</sup> 中田紘一郎<sup>3</sup> 田口 善夫<sup>4\*\*</sup> 吾妻安良太<sup>5\*</sup>  
工藤 翔二<sup>5</sup>

びまん性汎細気管支炎の疾患感受性候補遺伝領域として、HLA-A, B 遺伝子間の 200 kb の領域が推定されている。その領域を遺伝子予測プログラムによって解析し、予測されるエクソン部を中心に、一塩基多型 (SNPs) を探索した結果、100 個以上の SNPs が同定された。連鎖不平衡の指標として D' を用いた場合、200 kb の候補領域の中には、特に連鎖不平衡の強い領域が 80 kb に渡って存在していた。連鎖不平衡のブロック構造の中にある複数の SNP は疾患と有意な関連を示したが、その中でとりわけ強い関連を示すものは見いだされていない。一方、その候補領域の中に新たな遺伝子がクローニングされ、構造上、膜型ムチンと推測されたが、疾患との関連する遺伝子変異は現時点では見いだされていない。

## Linkage disequilibrium mapping of an HLA-related susceptibility gene for diffuse panbronchiolitis

Naoto Keicho<sup>1</sup>, Minako Hijikata<sup>1</sup>, Ikumi Matsushita<sup>1</sup>, Koh Nakata<sup>1</sup>,  
Katsushi Tokunaga<sup>2</sup>, Koichiro Nakata<sup>3</sup>, Yoshio Taguchi<sup>4</sup>, Arata Azuma<sup>5</sup>  
Shoji Kudoh<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan

<sup>2</sup> Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

<sup>3</sup> Division of Respiratory Diseases, Toranomon Hospital

<sup>4</sup> Department of Respiratory Medicine, Tenri Hospital

<sup>5</sup> Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

One of the major susceptibility genes for diffuse panbronchiolitis may be located within 200 kb in the HLA class I region. We extensively searched for new genetic markers in the critical region and identified more than 100 single nucleotide polymorphisms (SNPs). The extent of strong linkage disequilibrium was 80 kb of the candidate region. Although many SNPs in the 80 kb showed association with the disease, all the levels of association were not prominently high. A novel gene has also been cloned in the critical region. It appears to be a membrane-associated mucin in structure. However, no disease-associated mutations have been found so far.

## はじめに

びまん性汎細気管支炎の病因を考える上で、日本人患者集団では、血清学的に、東アジア人に特徴的な HLA class I 抗原である Bw54 (現在の B54 抗原) を高頻度に保有していることが明らかになり、環境要因、外的要因のほかに、少なくともアジア人特有の遺伝的要因が本疾患の発症に関与している可能性が強く示唆されている。本疾患が国際的に認知されるにつれ、中国や韓国から複数の症例が報告され、欧米より、アジア系移民の発症についても散発的な報告が見られるようになった。さらに日本呼吸器学会のシンポジウムなどを通じて、積極的にアジア周辺諸国との交流が深められた結果、韓国、中国に多くの患者が存在すること、古く中国南部を起源とする、タイ、ベトナムにも正確な統計はないものの、まれならず患者が見られることが明らかになり、ここ数年で、アジア系集団の遺伝的要因が本疾患の発症に関与していることが、より明確になってきている<sup>1)</sup>。

日本においては、HLA-B54 (B\*5401) と本疾患の関連性は再確認されたが<sup>2)</sup>、韓国においては、HLA-B54 とは明らかな関連を示さず、代わって HLA-A11 が本疾患と強い関連性 (補正 p 値 < 0.0005, オッズ比 = 5.4) を示した<sup>3)</sup>。すなわち、びまん性汎細気管支炎は HLA class I 関連疾患であるが、密接に関連する HLA class I 対立遺伝子型は韓国人と日本人の患者でそれぞれ異なるという結果であった。このことは、疾患感受性遺伝子のひとつが HLA-A、HLA-B 遺伝子座の間 (6p21.3) に存在し、その遺伝子の変異が日韓共通の HLA-A11、B54 を担う祖先染色体上に生じ、歴史的組み換えと遺伝子浮動などの結果として、日本では HLA-B54 と韓国では HLA-A11 と連鎖不平衡を生じるようになったと考えれば、合理的に説明できる。

びまん性汎細気管支炎では、前述の結果から、特定の HLA 分子そのものではなく、HLA-A、B 遺伝子座間に真の疾患感受性遺伝子が存在するものと推定された。我々は、本疾患の主要感受性遺伝子の変異はおそらくアジア人の祖先がアジア人以外の集団と分かれた後に生じたものと考えている。昨年までの検討により、本疾患の主要感受性遺伝子は HLA-B 座より 300 kb ほどテロメアより (HLA-A 座側) の約 200 kb の領域と推定されている<sup>4)</sup>。韓国人患者の対立遺伝子型もその結果を支持し、これを契機に、びまん性汎細気管支炎は、国際的なヒト遺伝子および遺伝的要因を有する疾患のデータベース Mendelian Inheritance in Man に、MIM 604809 として登録されることとなった。本年度は、さらにこの候補領域をマイクロサテライトより高密度に分布する一塩基置換 (SNP) を用いて、詳細に検討した。

## 対象と方法

1995 年厚生省班診断基準に基づき DPB と確認された DPB 患者 92 例、対照者 100 例を対象として解析を行った。DPB 主要感受性遺伝子候補領域である 200 kb の塩基配列について、GenScan コンピュータプログラムを用いて推定される予測遺伝子のエクソン部を中心に PCR プライマーをデザインし、それぞれ約 500 bp ずつ増幅し、ABI PRISM 3100 DNA シーケンサー (Applied Biosystems) を用いた直接シーケンス法により、塩基配列を決定し、SNP を同定した。それらの結果を基に、症例、対照集団について、同様な直接シーケンス法に基づくタイピングを実施した。

新規遺伝子のクローニングに関しては、ヒト気管支上皮細胞株 NCI-H292 細胞から total RNA を抽出し、初めに 5' RACE および 3' RACE を行い、得られた遺伝子の 5' 末端側の断片と 3' 末端側の断片をつなぐ目的で、total RNA から Oligo-dT プライマーにより合成された cDNA をテンプレートにして、long PCR による全長クローニングを行った。

(倫理面への配慮) 本研究における遺伝子解析に関しては、三省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した当センターの遺伝子解析に係わる倫理委員会の承認を受けている。

1 国立国際医療センター 研究所・呼吸器疾患研究部  
 2 東京大学人類遺伝学教室  
 3 虎の門病院呼吸器科  
 4 天理よろづ相談所病院呼吸器内科  
 5 日本医科大学第四内科  
 \* びまん性肺疾患研究班 分担研究者  
 \*\* 〃 研究協力者

## 結 果

1. 候補領域における連鎖不平衡のブロック様構造  
 遺伝子予測プログラムである GenScan により予測されたエクソン部位を中心に PCR 増幅し, 200 kb の領域内の, のべ 20 kb 以上の塩基配列を決定し, 比較検討し, SNP を同定した. その後, 症例, 対照のタイピングを行い, 連鎖不平衡の指標として  $D'$  を用いて解析したところ, 200 kb の候補領域の中には, 特に連鎖不平衡の強い 80 kb の領域が存在していた (図 1). 80 kb の連鎖不平衡のブロック構造の中にある複数 SNP は疾患と有意な関連を示したが, その中で, 突出して強い関連を示すものは見いだされていない (図 2).

## 2. 新規遺伝子のクローニング

得られた遺伝子は 4 つのエクソンから成り, 1,773 アミノ酸の蛋白をコードしていた. エクソン 2 から 4 は GENESCAN の予測と一致していたが, エクソン 1 は異なっていた. 蛋白の N 末端側には 27 アミノ酸から成るシグナルペプチドが予測され, C 端側には 23 アミノ酸長の膜貫通部位が予測された. 2 番目のエクソンにコードされる領域はセリン・スレオニンを多く含む縦列繰り返し配列が存在していた. 以上の特徴からこの遺伝子がコードする蛋白は細胞膜貫通型のムチンと予測された (図 3).

## 考案・結論

DPB 感受性遺伝子となる HLA クラス I の候補領域は, もともと既知の遺伝子が知られていない空白の領域であったこともあり, 遺伝子座 (予測も含む) を対象として SNP を検索していく JSNP プロジェクト (東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターと科学技術振興事業団による共同プロジェクト) では, 取り残された領域であった<sup>5)</sup>.

日本と韓国の DPB と HLA class I 遺伝子型との関連分析の結果から推測される仮説である, HLA-A, B 間に DPB 発症に関連する遺伝子が存在し, HLA-B\*54, A\*11 を保有する東アジア人の祖先染色体上にその遺伝子の変異が生じた可能性について, 検討した結果, HLA-B 座より 300 kb ほどテロメアより

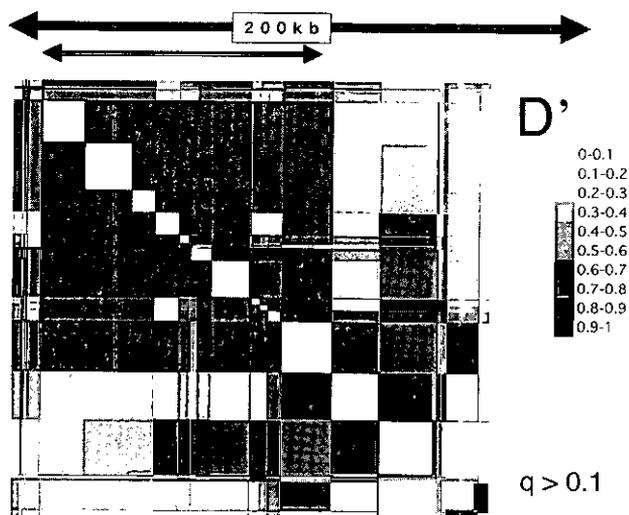


図 1 候補領域内に存在する SNP 間の連鎖不平衡値  $D'$  から推定されるゲノム構造  
 200 kb の候補領域のうち,  $D'$  0.9 以上の強い連鎖不平衡を示す領域, 約 80 kb が黒い四角で示されている.

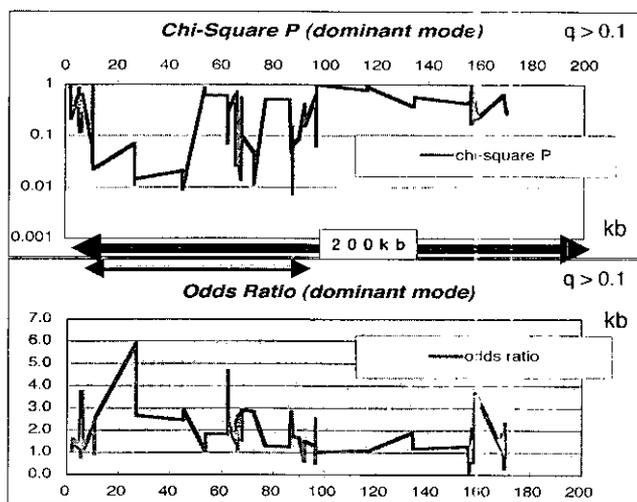


図 2 候補領域内に存在する SNP 頻度の症例対照連関解析におけるカイ 2 乗 p 値 (上段) とオッズ比 (下段)  
 カイ 2 乗 p 値は, 左側の 80 kb の領域で低く, 有意差を示す SNP が多く, 右側では, 有意差を示す SNP がみられない. オッズ比は, 頻度の低い SNP では正確な値が得られていない.

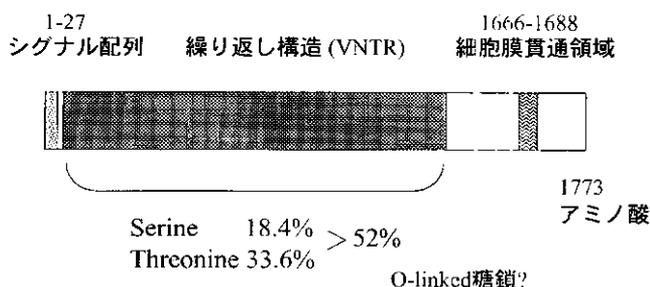


図 3 候補領域内に同定された新規遺伝子  
 アミノ酸配列上, 膜型ムチン様構造を取っており, シグナル配列および膜貫通領域も推測される.

の約 200 kb の領域に DPB 感受性遺伝子が存在する確率が高いことが明らかになり、領域内新規遺伝子の同定と、遺伝マーカー、特に SNPs によるさらなる候補領域の絞り込みにより、疾患感受性遺伝子を分子遺伝学的に同定することが求められ、今回の検討に至った。予測される遺伝子座を中心とした遺伝子変異の検討の結果、200 kb の領域の中には予想以上に多くの SNPs が高密度かつ高頻度に存在することが明らかになった。これらの SNPs はコンピュータ上、エクソンと予測される領域を中心にスクリーニングしたため、単純に位置的マーカーとして候補領域の絞り込みに用いられるのみならず、それ自体がコーディング領域に存在し、機能的意味合いを持っている可能性があると考えられた。症例対照のタイピング結果から、強い連鎖不平衡にある 80 kb の領域が見いだされたが、その中で特に疾患と関連の強い特定の SNP を見いだすまでには至っていない。真の感受性遺伝子変異が、この連鎖不平衡のブロック構造の中にある未同定の変異である可能性が考えられる。一方、その候補領域の中に新たな遺伝子がクローニングされたが、現時点では疾患との関連する遺伝子変異は見いだされていない。

びまん性汎細気管支炎の HLA 関連疾患感受性遺伝子候補領域 200 kb 内に、100 個以上の SNP が同定され、その連鎖不平衡に関わるブロック構造が明らかにされた。またその候補領域の中に新たな遺伝子がクローニングされた。

## 参考文献

- 1) Keicho, N., Kudoh, S. : Diffuse panbronchiolitis: role of macrolides in therapy. *Am J Respir Med*, 1 (2) : 119-131, 2002.
- 2) Keicho N, Tokunaga K, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Bannai M, Emi M, Ohishi N, Yazaki Y, Kudoh S. Contribution of HLA genes to genetic predisposition in diffuse panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 846-850, 1998
- 3) Park MH, Kim YW, Yoon HI, Yoo C-G, Han SK, Shim Y-S, Kim WD. Association of HLA class I antigens with diffuse panbronchiolitis in Korean patients. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 526-529, 1999
- 4) Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Ohishi N, Emi M, Park MH, Inoko H, Tokunaga K, Kudoh S. Fine localization of a major disease susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet* 66: 501-507, 2000
- 5) Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tanaka T. Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 193, 037 genetic variations in the human genome. *J Hum Genet* 47: 605-610, 2002

# びまん性汎細気管支炎におけるムチン遺伝子群の プロモーター多型の検討

神尾孝一郎<sup>1,2</sup> 松下 育美<sup>1</sup> 田中 剛<sup>1,3</sup> 中田 光<sup>1\*</sup>  
吾妻安良太<sup>2\*\*</sup> 工藤 翔二<sup>2</sup> 慶長 直人<sup>1\*\*</sup>

びまん性汎細気管支炎 (Diffuse panbronchiolitis: DPB) を始めとした慢性気道炎症性疾患においては気道粘液分泌の亢進がみられ、その主要な成分であるムチン遺伝子の転写活性が亢進していることが推測される。また特に DPB では MHC class I の約 200kb の領域に疾患感受性遺伝子の存在が推定されており、この領域では現在ムチン様の遺伝子のクローニングが進行している。これらのことから、この病態におけるムチンの役割を検討するため、転写調節領域の変異が転写活性におよぼす影響の検討を開始した。対象は気道における発現が確認されているムチン遺伝子群であるが、このうち *MUC5B* の複数の変異で疾患との関連が予想された。連鎖不平衡構造の解析から、これらの変異が強い連鎖不平衡にあることが確認され、ハプロタイプ解析を行った。統計学的なハプロタイプ頻度の推定とともに SSCP 法を応用したハプロタイプ頻度の確定を行った。DPB 群と対象群で認められるハプロタイプ頻度には差がみられ、解析終了後に関連が見られた場合には機能解析も行っていく予定である。

## Variations in the promoter region of *MUC5B* gene may affect susceptibility to diffuse panbronchiolitis

K. Kamio<sup>1,2</sup>, I. Matsushita<sup>1</sup>, G. Tanaka<sup>1,3</sup>, K. Nakata<sup>1</sup>  
A. Azuma<sup>2</sup>, S. Kudoh<sup>2</sup>, N. Keicho<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan

<sup>2</sup> Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

<sup>3</sup> Dept. of Respiratory Diseases, Univ. of Tokyo

Diffuse panbronchiolitis (DPB) is a chronic inflammatory airway disease predominantly affecting Asian population. Although its etiology is unknown, one of the major susceptibility genes has been reported to locate within the HLA class I region. Because DPB is considered to be a complex genetic disease, contribution of other genetic factors is also suspected. Among symptoms of DPB, hypersecretory state is very characteristic. From this point of view, we focused on mucin genes mainly expressed in the airways and hypothesized that their promoter variations could affect transcriptional activity of the genes and modulate mucus secretion in the airway. After the screening of polymorphisms, we identified several variations in the promoter region of *MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B* and *MUC7* genes. Analysis of these variations in 92 Japanese DPB patients and 129 healthy controls showed associations with the promoter variations in *MUC5B*. Estimation via the EM algorithm reconstructed three major haplotypes, one of which appeared to be associated with the disease. To determine the reconstructed haplotypes directly, we modified the method of PCR-SSCP and sequenced the PCR product of single stranded DNA which was extracted from the fragment excised from an acrylamide gel. These variations themselves or variations in coding region in linkage disequilibrium with a promoter haplotype of *MUC5B* gene may affect susceptibility or resistance to DPB.



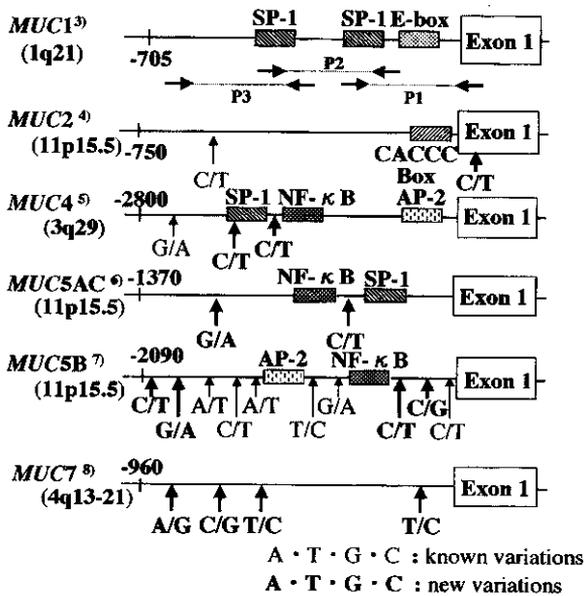


図1 各ムチン遺伝子について、今回解析したプロモーター領域の範囲ならびに変異の位置を図示してある。転写開始点を+1とし、それより上流側の位置を-で示してある。例えばMUC1ではP1, P2, P3のようにプロモーター領域をカバーできるように3つのプライマーセットを作成し解析した。↑は変異の位置を示しており、細字はデータベースで確認できるもの、太字は今回見出された新規のものを示してある。SP-1, NF-κBなどは文献に記載のあった転写因子が結合するコンセンサス配列の位置を示している。各遺伝子の右肩に、参照文献を示している。

### 統計学的処理

疾患とマーカーの関連解析では $\chi^2$ 検定を行い、 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した。対照群のHardy-Weinberg平衡の検定にはArlequin programを用いた。

### 結果

#### 1. ムチン遺伝子群プロモーター領域のスクリーニング

PCR-SSCP法とdirect sequence法によるスクリーニングの結果、MUC1を除くムチン遺伝子で、解析した領域に複数の変異を認めた。この中には、SNPのデータベースであるdbSNPやJSNPに報告されているもの以外に、今回の解析で新規に認めたものも含まれている(図1)。

#### 2. 各SNPにおける疾患群と対照群の関連解析

それぞれのムチン遺伝子にみられた各SNPについて疾患群と対照群の間で関連解析を行った。この結果、MUC5Bの複数のSNPsで疾患との関連が予

想されたが、他のムチン遺伝子との関連は認められなかった。

#### 3. MUC5Bプロモーター領域のSNPs間の連鎖不平衡構造の解析およびハプロタイプ頻度の推定

SNPs間の連鎖不平衡の程度の指標として、対照群129例についてpairwiseの $D'$ を計算したところ、転写開始点に近い5個のSNPの間では一つの組み合わせ以外全て $D'$ が0.8~1.0の強い連鎖不平衡にあった。これらの強い連鎖不平衡にある5個のSNPsに関して、Arlequin programを用いて疾患群と対照群のそれぞれでハプロタイプ頻度を推定した(表1)。この結果、H1は疾患群で多い傾向が見られ、H2は逆に低下しており、頻度差が存在することが予想された。しかしこの統計的な推定量を用いて関連解析を行うことは問題があるため、以下のSSCPによるハプロタイプの確定を試みた。

表1 EM algorithmによるハプロタイプ頻度の推定

MUC5Bの転写調節領域に見られた10個のSNPsのうち、連鎖不平衡の程度が強い転写開始点に近い5個のSNPsから成るハプロタイプ頻度をEM algorithmで推定した。対象はDPB患者92例(184アリル)、対照群129例(258アリル)である。H1は疾患群で多い傾向が見られ、H2は逆に低下しており、頻度差が存在することが予想された。

Haplotypes	Estimated haplotype frequencies (%)	
	DPB (184 alleles)	Control (258 alleles)
H1 GGAGC	43.4	36.4
H2 GAGCT	10.9	23.9
H3 AGGCT	20.6	19.2
H4 GAGCC	9.3	8.4
H5 GGGCT	6.6	4.5
H6 GGGCC	5.1	4.1
H7 AGGCC	0.7	0.9

#### 4. MUC5Bプロモーター領域のSNPsから成るハプロタイプのSSCPによる解析ならびに確定したハプロタイプを用いた関連解析

ハプロタイプを実験的に確定するため、5個のSNPsを含む約1.1kbのDNAを泳動した結果を図2に示す。図2にはハプロタイプ頻度の推定で5%以上の頻度があったハプロタイプH1からH4までを代表的なパターンとして示してある。各ハプロタイプごとに移動度に差が見られ、それぞれのバンドを切り出すことにより、ハプロタイプが確定できる。

疾患群50例、対照群50例、それぞれ100アリ

ルずつで、SSCPにより決定したハプロタイプ頻度を表2に示す。統計的な推定値と同様の傾向が見られるが、疾患群および対照群でそれぞれのハプロタイプについて関連解析を行ったところ、H2は  $p=0.027$  で疾患群で有意に低下していた。

考案・結論

今回のムチン遺伝子群の解析では、MUC5Bの転写調節領域の複数のSNPsで疾患との関連が予想された。MUC5Bのプロモーター領域に認められた10個のSNPsのうち、転写開始点に近い5個のSNPは強い連鎖不平衡にあった。この5個のSNPに関してEM algorithmを用いて最大尤度法で推定したハプロタイプ頻度では、疾患群と対照群で頻度差が存在する事が予想された。そこでこれらの推定量を実験的に確認するために、今回われわれはSSCPを応用した方法を開発した。これにより

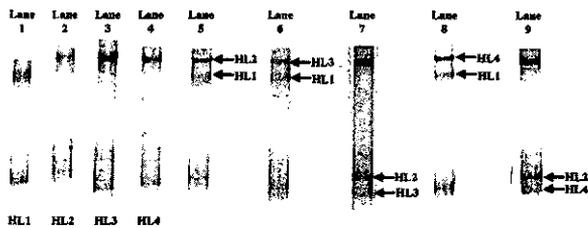


図2 MUC5Bのプロモーター領域の転写開始点に近い5個のSNPsを含むPCR productでのSSCP。

頻度の高いHL1からHL4のSSCPのパターンを示している。Lane 1～4の検体はそれぞれ、HL1、HL2、HL3、HL4のホモである。Lane 5～9は図に示してあるようにヘテロの検体である。これらのバンドは切り出した後DNAを抽出し、再度PCRを施行し、そのシーケンスを行うことにより塩基配列を確認している。

表2 SSCPによるハプロタイプ頻度の確定

MUC5Bの転写調節領域に見られた10個のSNPsのうち、連鎖不平衡の程度が強い転写開始点に近い5個のSNPsから成るハプロタイプ頻度をSSCPで確定した。対象はDPB患者50例(100アリル)、対照群50例(100アリル)である。統計的な推定値と同様の関連解析の結果、H2は  $p=0.027$  で疾患群で有意に低下していた。

Haplotypes	Determined haplotype frequencies (%)	
	DPB (100 alleles)	Control (100 alleles)
H1 GGAGC	47	37
H2 GAGCT	12	24
H3 AGGCT	24	22
H4 GAGCC	10	10
H5 GGGCT	4	4
H6 GGGCC	3	1
H7 AGGCC	0	2

統計的な推定量と同様に、実際のハプロタイプ頻度にも両者の間で差が見られ、このうちH2は疾患群で有意に低下していた。

今回の解析では、個々のSNPのみでなく、ハプロタイプと疾患との関連を検討したが、このようなハプロタイプ単位での解析は近年重要視されつつある。例えばDrysedaleらは、 $\beta_2$ アドレナリン受容体のプロモーター領域にある複数のSNPに関して、これらのSNPからなるハプロタイプを用いて検討したところ、喘息患者での解析で特定のハプロタイプをもつ者で $\beta_2$ 刺激薬に対する反応が良好であったが、個々のSNPでの検討では関連は認められなかったと報告している<sup>12)</sup>。その他にも、ハプロタイプ単位での解析が報告されている<sup>13,14)</sup>。

通常のsequence法では対立遺伝子の存在する遺伝子座が2つ以上存在する場合には、ハプロタイプを決定する事は不可能である。これを解決する一つの方法としてEM algorithmを用いて統計学的にハプロタイプ頻度を推定する事が行われている。

しかしながら、推定量自体がもともと幅のある統計量であり、これを用いてさらに $\chi^2$ 検定等の統計処理を行うことは問題があると考えられる。さらに疾患群では、EM algorithmによる推定を行う際に前提となるHardy-Weinberg平衡が成立しているとは限らない。また家系情報が得られる場合にはハプロタイプが決定されるが、多くの多因子疾患では入手が困難である。これらとは別に、実験的にハプロタイプを決定する方法も考案されており、allele specific primerを用いる方法やTAクローニング、またsomatic cell hybridを利用した方法などが行われているが、いずれも長所、短所があり一般化しているとは言い難い。今回われわれは通常のSSCPをmodifyした方法を考案し、ハプロタイプの決定に応用したが、得られたバンドは1本のchromosome由来のフラグメントに相当することになり、このsequenceを行うことにより確実にハプロタイプを決定できることになる。

個々のSNPより、このようにして決定されたハプロタイプの方が疾患と強い負の関連が予想されたが、このハプロタイプ自体が例えば疾患抵抗性に関与している可能性が考えられる。あるいはこれと連鎖不平衡にある別の変異が疾患と関係していて、このハプロタイプはみかけ上、関連がみら

れただけである可能性も考えられる。とくにムチン遺伝子群ではコード領域の VNTR 多型が特徴的であり、これとの関連も考慮が必要である。これらを明らかにしていくために、今後は変異と機能に関わる解析を予定している。

今回 DPB との関連が予想された *MUC5B* は、粘膜下腺より分泌されるムチンであるが、杯細胞より分泌される *MUC5AC* で行われている検討に比べて、解析の報告はまだ乏しい。また DPB の病変の主座である呼吸細気管支領域は一般に気管支腺に乏しいとされており、*MUC5B* で見られる variation が DPB の病態にどの様に関与しているのかは今後詳細な検討を加えなければならない。しかし *MUC5B* の発現のパターンは病的な状態では変化すると報告もあり、Chen らは肺気腫や特発性間質性肺炎では *MUC5B* の発現が杯細胞でも認められるようになる報告している<sup>7)</sup>。この中で、通常杯細胞から分泌される *MUC5AC* の発現パターンに関しては病的状態でも変化はなかったと報告されている。

DPB との関連が報告されてきた MHC class I の約 200kb の領域で、新規のムチン様の遺伝子のクローニングが進行していることから、関連解析で関連の予想されたムチン遺伝子の詳細な解析は重要と考えられる。

## 参考文献

- 1) Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Ohishi N, Emi M, Park MH, Inoko H, Tokunaga K, Kudoh S. Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet.* 66: 501-507, 2000.
- 2) Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Marquette CH, Wurtz A, Aubert JP, Gosselin B, Porchet N. From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. *Int. J. Cancer.* 86: 162-168, 2000.
- 3) Kovarik A, Lu PJ, Peat N, Morris J, Taylor-Papadimitriou J. Two GC boxes (Spl sites) are involved in regulation of the activity of the epithelium-specific MUC1 promoter. *J Biol Chem.* 271: 18140-18147, 1996.
- 4) Gum JR, Hicks JW, Kim YS. Identification and characterization of the MUC2 (human intestinal mucin) gene 5'-flanking region: promoter activity in cultured cells. *Biochem. J.* 325: 259-267, 1997.
- 5) Perrais M, Pigny P, Ducourouble MP, Petitprez D, Porchet N, Aubert JP, Van Seuning I. Characterization of human mucin gene MUC4 promoter: importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* 276: 30923-30933, 2001.
- 6) Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J. Biol. Chem.* 273: 6812-6820, 1998.
- 7) Chen Y, Zhao YH, Di YP, Wu R. Characterization of human mucin 5B gene expression in airway epithelial and genomic clone of the amino-terminal and 5'-flanking region. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 25: 542-553, 2001.
- 8) Bobek LA, Liu J, Sait SN, Shows TB, Bobek YA, Levine MJ. Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene, MUC7. *Genomics* 31: 277-82, 1996.
- 9) Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 12: 921-927, 1995.
- 10) Lewontin RC. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 120: 849-852, 1964.
- 11) Schneider S, Roessli D, Excoffier. Arlequin, version 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva, 2000.
- 12) Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, Stephens JC, Judson RS, Nandabalan K, Arnold K, Ruano G, Liggett SB. Complex promoter and coding region  $\beta_2$ -adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10483-10488, 2000.
- 13) Paul H. L. J. Joosten, Mascha Toepoel, Edwin

- C. M. Mariman, Everardus J. J. Van Zoelen.  
Promoter haolotype clombinations of the platelet-  
derived growth factor d -receptor gene predispose to  
human neural tube defects. *Nature genetics* 27: 215-  
217, 2001.
- 14) McLaughlin DP, Sharma A, McGinley A, Samra  
GS. The advantages of haplotype analysis of the  
promoter region of the human apolipoprotein E gene.  
*Analytical Biochemistry* 299: 183-187, 2001.

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Nakamura A, Mori Y, Hagiwara K, Suzuki T, Sakakibara T, Kikuchi T, Igarashi T, Ebina M, Abe T, Miyazaki J, Takai T, and Nukiwa T	Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice	J. Exp. Med	197	669-674	2003
Inoue A, Saijo Y, Maemondo M, Gomi K, Tokue Y, Kimura Y, Ebina M, Moriya T, Nukiwa T	Severe acute interstitial pneumonia possibly related to Gefitinib	Lancet	361 (9352)	137-9	2003 Jan 11
Shimizukawa M, Ebina M, Narumi K, Kikuchi T, Munakata H, Nukiwa T	Intratracheal gene transfer of decorin reduces subpleural fibroproliferation induced by bleomycin	Am J Physiol	284	L526-L532	2003
Inoue A, Saijo Y, Maemondo M, Gomi K, Tokue Y, Kimura Y, Ebina M, Kikuchi T, Moriya T, Nukiwa T	Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib	Lancet	361 (9352)	137-9	2003 11
Kimura Y, Suzuki T, Kaneko C, Darnel AD, Moriya T, Suzuki S, Handa M, Ebina M, Nukiwa T, Sasano H	Retinoid receptors in the developing human lung	Clin Sci (Lond)	103	613-21	2002
Kikuchi T, Maemondo M, Narumi K, Matsumoto K, Nakamura T, Nukiwa T	Tumor suppression induced by intratumor administration of adenovirus vector expressing NK4, a 4-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, and naive dendritic cells	Blood	100	3950-9	2002
Kikuchi T, Hagiwara K, Honda Y, Gomi K, Kobayashi T, Takahashi H, Tokue Y, Watanabe A, Nukiwa T	Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF-kappa B transcription factors	J Antimicrob Chemother	49	745-55	2002
Ebina M, Shimizukawa M, Narumi K, Miki M, Koinuma D, Watanabe M, Munakata H, Nukiwa T	Towards an effective gene therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: anti-inflammation, antifibrosis, and regeneration	Chest	121	32S-33S	2002
Koinuma D, Miki M, Ebina M, Tahara M, Hagiwara K, Kondo T, Taguchi Y, Nukiwa T	Successful treatment of a case with rapidly progressive bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) using cyclosporin A and corticosteroid	Intern Med	41	26-9	2002
Maemondo M, Narumi K, Saijo Y, Usui K, Tahara M, Tazawa R, Hagiwara K, Matsumoto K, Nakamura T, Nukiwa T	Targeting angiogenesis and HGF function using an adenoviral vector expressing the HGF antagonist NK4 for cancer therapy	Mol Ther	5	177-85	2002
Takami K, Takuwa N, Okazaki H, Kobayashi M, Ohtoshi T, Kawasaki S, Dohi M, Yamamoto K, Nakamura T, Tanaka M, Nakahara K, Takuwa Y, Takizawa H	Interferon-gamma inhibits hepatocyte growth factor-stimulated cell proliferation of human bronchial epithelial cells: upregulation of p27 (kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor	Am. J. Respir. Cell Mol. Biol	26	231-238	2002
Kohyama T, Liu X, Wen FQ, Kim HJ, Takizawa H, Rennard SI	Potentiation of human lung fibroblast chemotaxis by the thromboxane A2 analog U-46619	J Lab Clin Med	139	43-9	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Kohyama T, Liu X, Kim HJ, Kobayashi T, Ertl RF, Wen FQ, Takizawa H, Rennard SI	Prostacyclin analogs inhibit fibroblast migration	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	283	L428-32	2002
Kohyama T, Liu X, Wen FQ, Zhu YK, Wang H, Kim HJ, Takizawa H, Cieslinski LB, Barnette MS, Rennard SI	PDE4 inhibitors attenuate fibroblast chemotaxis and contraction of native collagen gels	Am J Respir Cell Mol Biol	26	694-701	2002
Kohyama T, Liu XD, Wen FQ, Kim HJ, Takizawa H, Rennard SI	Prostaglandin D2 inhibits fibroblast migration	Eur Respir J	19	684-9	2002
Saito Y, Azuma A, Kudo S, Takizawa H, Sugawara I	Effects of diesel exhaust on murine alveolar macrophages and a macrophage cell line	Exp Lung Res	28	201-17	2002
Saito Y, Azuma A, Kudo S, Takizawa H, Sugawara I	Long-term inhalation of diesel exhaust affects cytokine expression in murine lung tissues: comparison between low- and high-dose diesel exhaust exposure	Exp Lung Res	28	493-506	2002
Desaki M, Sugawara I, Iwakura Y, Yamamoto K, Takizawa H	Role of Interferon-gamma in the Development of Murine Bronchus-Associated Lymphoid Tissues Induced by Silica in Vivo	Toxicol Appl Pharmacol	185	1-7	2002
Takizawa H	Editorial: Acute eosinophilic pneumonia: Possible role of hyperreactivity of airway epithelial cells	Intern. Med	41	917	2002
Kudoh S, Azuma A, Tamaoki J, Takizawa H, Nakata K, Goto H	Novel actions of erythromycin and its derivatives, Macrolide Antibiotics	Chemistry, Biology, and Practice (second edition), Edited by Omura S, Academic Press, SanDiego, U. S. A.		pp. 534-569	2002
Hoshino Y, Nakata K, Hoshino S, Honda Y, Tse D, Shioda T, Rom W, and Michael Weiden	Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines	J. Exp. Med.	195	495-505	2002
Schoch OD, Schanz U, Koller M, Nakata K, Seymour JF, Russi EW, Boehler A	Bronchoalveolar lavage findings in pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with GM-CSF	Thorax			2002 in press
Kurosu K, Yumoto N, Rom WN, Takiguchi Y, Jaishree J, Nakata K, Tatsumi K, Mikata A, Kuriyama T, Weiden MD	Oligoclonal T cell expansions in pulmonary lymphoproliferative disorders: demonstration of the frequent occurrence of oligoclonal T cells in human immunodeficiency virus-related lymphoid interstitial pneumonia	Am J Respir Crit Care Med	165 (2)	254-9	2002
Keicho N, Kudoh S.	Diffuse panbronchiolitis: role of macrolides in therapy	Am J Respir Med	1 (2)	119-131	2002
Fujii T, Hogg J, Keicho N, Vincent R, Van Eeden S, Hayashi S	Adenoviral E1A modulates inflammatory mediator expression by lung epithelial cells exposed to PM10 -R1	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol			2002 in press
Matsushita I, Hasegawa K, Nakata K, Yasuda K, Tokunaga K, Keicho N	Genetic Variants of Human beta Defensin-1 and Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Biochem Biophys Res Commun	291 (1)	17-22	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Matsuzaka Y, Tounai K, Denda A, Tomizawa M, Makino S, Okamoto K, Keicho N, Oka A, Kulski J, Tamiya G, Inoko H	Identification of novel candidate genes in the diffuse panbronchiolitis critical region of the class I human MHC	Immunogenetics	54 (5)	301-309	2002
Tetsuo Yamada, Yoshinobu Eishi, Satoshi Ikeda, Ikuo Ishige, Takashige Suzuki, Tamiko Takemura, Touichiro Takizawa, and Morio Koike	In situ localization of Propionibacterium acnes DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition	J Pathol	198	541-547	2002
Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takizawa T, Koike M, Takemura T, Kudoh S, Costabel U, Guzman J, Rizzato G, Gambacorta M, du Bois R, Nicholson AG, Sharma Om P, Ando M	Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes from Japanese and European patients with sarcoidosis	J Clin Microbiol	40 (1)	198-204	2002
Kobayashi D, Eishi Y, Ohkusa T, Ishige I, Suzuki T, Minami J, Yamada T, Takizawa T, Koike M	Gastric mucosal density of Helicobacter pylori estimated by real-time PCR compared with results of urea breath test and histological grading	J Med Microbiol	51	1-7	2002
Fujita H, Eishi Y, Ishige I, Saitoh K, Takizawa T, Arima T, Koike M	Quantitative analysis of bacterial DNA from Mycobacteria spp., Bacteroides vulgatus, and Escherichia coli in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases	J Gastroenterol	37	509-516	2002
Murakami S, Iwaki D, Mitsuzawa H, Sano H, Takahashi H, Voelker DR, Akino T, Kuroki Y	Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor- $\alpha$ secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with toll-like receptor 2	J Biol Chem	277 (9)	6830-6837	2002
Miyamoto H, Sugawara I, Azuma A, Saito Y, Kohno N, Kudoh S	Differential secretion of cytokines and adhesion molecules by HUVEC stimulated with low concentrations of bleomycin	Cell Immunol			2002
Tanji C, Yamamoto H, Yorioka N, Kohno N, Kikuchi K, Kikuchi A	kinase anchoring protein AKAP220 binds to glycogen synthase kinase-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ ) and mediates protein kinase a-dependent inhibition of GSK-3 $\beta$ , P	J Biol Chem	277 (40)	36955-36961	2002
Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, Abe M, Nishimura K, Hiwada K, Kohno N	Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases	Am J Resp Crit Care Med	165	378-381	2002
Katayama H, Yokoyama A, Kohno N, Sakai K, Hiwada K, Yamada H, Hirai K	Production of eosinophilic chemokines by normal pleural mesothelial cells	Am J Respir Cell Mol Biol	26 (4)	398-403	2002
Hirakata Y, Kato T, Ishii Y, Kitamura S, Sugiyama Y	Trichosporon asahii-induced asthma in a family with Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis	Ann. Allergy Asthma. Immunol.	88 (3)	335-338	2002
Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, Sugiyama Y	Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation	Clin. Exp. Allergy	32 (10)	1520-1526	2002

## 2002年度びまん性肺疾患調査研究

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, Sugiyama Y	FST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation	Biochem. Biophys. Res. Commun.	299	18-24	2002
Tajima S, Sando Y, Maeno T, Sagawa N, Nara M, Maeno Y, Nakagawa J, Ito Y, Hoshino Y, Suga T, Arai M, Kurabayashi M	Increased serum thymidine kinase activity in acute sarcoidosis	Internal Medicine	41 (2)	129-132	2002
Tsuchiya T, Chida K, Suda T, Schneeberger EE, Nakamura H	Dendritic cell involvement in pulmonary granuloma formation elicited by bacillus calmette-guerin in rats	Am J Respir Crit Care Med	165 (12)	1640-6	2002
Matsuda H, Suda T, Hashizume H, Yokomura K, Asada K, Suzuki K, Chida K, Nakamura H	Alteration of Balance between Myeloid Dendritic Cells and Plasmacytoid Dendritic Cells in Peripheral Blood of Patients with Asthma	Am J Respir Crit Care Med	166 (8)	1050-4	2002
Suda T, Chida K, Todate A, Ide K, Asada K, Nakamura Y, Suzuki K, Kuwata H, Nakamura H	Oncostatin M production by human dendritic cells in response to bacterial products	Cytokine	17 (6)	335-40	2002
Matsumoto K, Hayakawa H, Ide K, Suda T, Chida K, Hashimoto H, Sato A, Nakamura H	Effects of suplatast tosilate on cytokine profile of bronchoalveolar cells in allergic inflammation of the lung	Respirology	7 (3)	201-7	2002
Hayakawa H, Shirai M, Sato A, Yoshizawa Y, Todate A, Imokawa S, Suda T, Chida K, Tamura R, Ishihara K, Saiki S, Ando M	Clinicopathological features of chronic hypersensitivity pneumonitis	Respirology	7 (4)	359-64	2002
Uchiyama H, Nagata T, Yamada T, Uchijima M, Aoshi T, Suda T, Chida K, Nakamura H, Koide Y	Endosomal/lysosomal targeting of a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium by DNA immunisation induces a specific T-cell subset and partial protective immunity in vivo	FEMS Microbiol Lett	216 (1)	91-7	2002
Hamanaka T, Takei A, Takemura T, Oritsu M	Pathological study of cases with secondary open angle glaucoma due to sarcoidosis	Am J Ophthalmology	134	17-26	2002
Lei Q, Takemura T, Ikushima S, Ando T, Yanagawa T, Akiyama O, Oritsu M, Tanaka N, Kuroki T	Hyperplastic epithelial foci in honeycomb lesions in idiopathic pulmonary fibrosis	Virchows Archiv 441	No.3	271-278	2002
Huang L, Tani K, Ogushi F, Ogawa H, Shimizu T, Motoki Y, Moriguchi H, Sone S	Role of CD13/Aminopeptidase N in Rat Lymphocytic Alveolitis Caused by Thoracic Irradiation	Radiat Res	157	191-198	2002
Hasegawa Y, Imaizumi K, Sekido Y, Iinuma Y, Kawabe T, Hashimoto N, Shimokata K	Perfusion and ventilation isotope lung scans in constrictive bronchiolitis obliterans	Respiration	69	550-555	2002
Iinuma Y, Senda K, Takakura S, Ichiyama S, Tano M, Abe T, Yamamoto T, Nakashima K, Baba H, Hasegawa Y, Shimokata K	Evaluation of a commercially available serologic assay for antibodies against tuberculosis-associated glycolipid antigen	Clinical chemistry and Laboratory Medicine	40	832-836	2002