

はじめに

びまん性肺疾患の診断において高分解能 CT (HRCT) 検査は極めて有用である^{1,2)}。本研究では長期経過観察を行ったサルコイドーシスの HRCT 所見と肺機能の変化を比較し、初期の HRCT 所見が肺機能の変化を予測し予後推定に有用であるかどうか検討した。

対象および方法

対象は、国立病院機構近畿中央胸部疾患センター (旧国立療養所近畿中央病院) で診療し長期観察可能であった肺サルコイドーシス患者 40 例 (男 20 例, 女性 20 例, 年齢 22-67 歳) である。平均 7.4 年間 (3~18 年) 経過観察を行い、初期 (initial) と最終 (last) の HRCT 所見と肺機能 (% FVC, FEV_{1.0}/FVC) の変化を retrospective に検討した。画像の読影は二人の放射線科医が独立して行った。これまでの我々の報告に従い所見および病変の拡がりやを決定解析した^{3,4,5,6)}。

結 果

(1) 40 例の初期 HRCT では small nodules (n=32), large nodules (n=10), septal lines (n=19), consolidation (n=7), conglomeration (n=7) の所見が多く認められた。初期 HRCT と最終 HRCT で有意差を認めた所見は bronchial distortion, traction bronchiectasis, honeycombing, emphysema, parenchymal bands であった (表 1)。

(2) 40 例中, 18 例 (15%) の初期 HRCT に nodular opacity を優位に認められた。このうち 8 例の最終 CT で陰影は消失, 7 例で減少, 2 例で増加, 1 例は不変。増加した 2 例では conglomeration パターンが出現 (表 2)。

(3) 40 例中, 8 例 (20%) の初期 HRCT で multiple large nodule を優位に認めた。このうち最終 CT で 7

例が消失, 1 例で diffuse fine nodules が出現した (表 2)。

(4) 40 例中, 5 例 (12.5%) の初期 HRCT で conglomeration が優位であった。全員 conglomeration は縮小, あるいは消失したが, bronchial distortion を求めた (表 2)。

(5) 40 例中 5 例 (12.5%) の初期 HRCT で ground glass opacity を優位に認めた。この内 3 例で traction bronchiectasis も認められた。最終 HRCT では全ての患

表 1 初期および最終 HRCT 所見

HRCT 所見	初期 CT (n=40)	最終 CT (異常所見あり) (n=25)	P
Small nodules	32	20	NS
Large nodules	19	7	NS
Ground-glass opacity	18	12	NS
Consolidation	7	1	NS
Conglomeration	7	6	NS
Septal lines	19	14	NS
Intralobular lines	5	8	NS
Bronchial distortion	0	6	0.0064
Traction bronchiectasis	4	9	0.0228
Honeycombing	0	6	0.0064
Small cyste	2	2	NS
Bullee	1	4	NS
Emphysema	1	6	0.0279
Parenchymal bands	0	4	0.0187

(NS: not significant)

表 2 HRCT 優位所見の経時的変化

Predomint CT patterns	全患者 (n=40)	治療例 (n=13)	非治療例 (n=27)
Nodular			
→ Clearing	8	3	5
→ Decreased	7	2	5
→ Increased	2	1	1
→ No change	1	0	1
Multiple large nodular			
→ Clearing	7	0	7
→ Nodular	1	0	1
Conglomeration			
→ Bronchial distortion	5	3	2
Ground-glass opacity			
→ Honeycombing	4	2	2
→ Bullous	1	0	1
Consolidation			
→ Honeycombing	2	1	1
→ Linear	1	0	1
Mixed (nodular linear)			
→ Decreased	1	1	0

¹ 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 呼吸不全・難治性肺疾患研究部

² 放射線科

³ 内科

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

者で ground glass opacity の広がり, 軽快したが, 4 例で honeycombing が出現し, 残り 1 例 (非喫煙者) は無数の bullae と少数の honeycomb が認められた (表 2).

(6) 40 例中, 3 例 (7.5%) の初期 HRCT で consolidation が認められ, うち 2 例の最終 HRCT で honeycomb となり 1 例で diffuse linear opacity となった (表 2).

(7) 40 例中, 1 例の初期 HRCT で nodular と linear opacity を認めたが最終 HRCT で減少した.

(8) 治療の有無でそれぞれの変化に有意差はなし.

(9) 初期 HRCT で ground glass opacity, conglomeration, mixed パターンを認める例では %FVC は低値であった. FEV_{1.0}/FVC は conglomeration の患者で低かった.

(10) 初期検査時 20 例の患者で %FVC は 80% 未満であった. この中には conglomeration 優位の 5 例, ground-glass パターン優位の 4 例, consolidation 優位の 2 例, mixed パターンの 1 例が含まれる. %FVC が低く ground-glass パターン優位の 4 例中 3 例で traction bronchiectasis を伴っていた.

(11) Conglomeration を認めた 4 例では, conglomeration パターンが bronchial distortion に変化し %FVC は 10% 以上軽快した. しかし conglomeration を認めた 1 例では %FVC はステロイド治療にもかかわらず悪化した. この患者は無数の bullae と low-attenuation area, bronchial distortion が出現した (図 1).

(12) 初期 HRCT で ground-glass パターンを認めた 5 例のうち 3 例で ground-glass が honeycomb あるいは bullous となり %FVC の低下を認めた. これら 3 例の患者のうち 2 例はステロイド治療例であり 1 例

は無治療例であった. 初期 HRCT で ground-glass を優位に認め, 最終 HRCT で honeycomb をみとめた 1 例では %FVC は低下なし. 間質性陰影の拡がりは減少 (図 2).

(13) 初期 HRCT で consolidation を優位に認めた中の 1 例で %FVC が低下し, 1 例では consolidation から linear パターンになったが %FVC は低下しなかった (図 3).

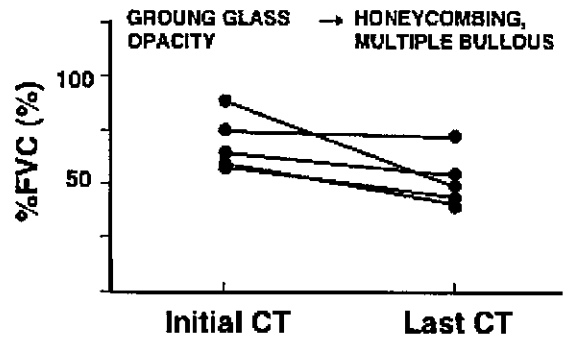


図 2 HRCT で ground glass opacity から honeycomb あるいは bullous パターンへ変化した患者の %FVC の変化.

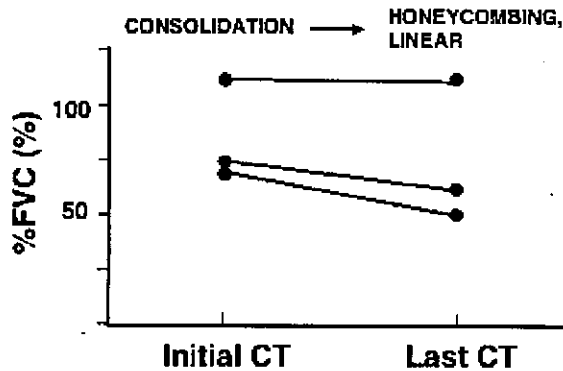


図 3 HRCT で conglomeration から honeycomb あるいは linear パターンへ変化した患者の %FVC の変化.

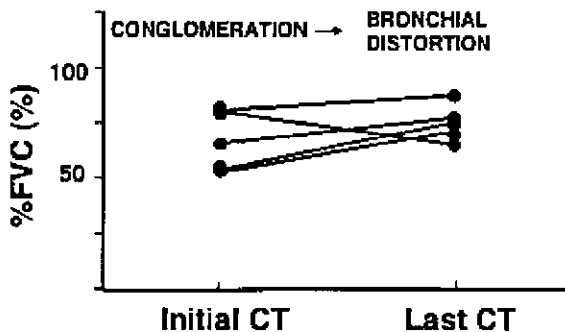


図 1 HRCT で conglomeration から bronchial distortion パターンへ変化した患者の %FVC の変化.

表 3 各 HRCT 所見での肺機能の変化 (n=40)

CT Pattern		Initial test	Last test
Ground-glass	%FVC (%)	67.5 ± 15.6	53.1 ± 12.4
	FEV ₁ /FVC (%)	87.5 ± 6.6	91.4 ± 6.0
Consolidation	%FVC (%)	83.5 ± 24.2	73.5 ± 32.9
	FEV ₁ /FVC (%)	86.3 ± 8.1	91.6 ± 7.9
Conglomeration	%FVC (%)	64.2 ± 13.3	74.5 ± 8.5
	FEV ₁ /FVC (%)	64.3 ± 5.0	65.8 ± 7.1
Mixed	%FVC (%)	45.3	63.6
	FEV ₁ /FVC (%)	100.0	98.8
Nodular	%FVC (%)	93.5 ± 20.2	96.3 ± 16.0
	FEV ₁ /FVC (%)	88.8 ± 5.9	87.0 ± 6.5
Multiple large-nodular	%FVC (%)	93.5 ± 4.4	92.4 ± 6.5
	FEV ₁ /FVC (%)	83.8 ± 8.5	84.9 ± 3.6
Total	%FVC (%)	84.8 ± 20.7	84.8 ± 21.5
	FEV ₁ /FVC (%)	84.0 ± 9.8	84.8 ± 10.0

(14) FEV_{1.0}/FVC のデータを表3に示す。Conglomeration 症例では%FVCは改善したもののFEV_{1.0}/FVCは低下した。

(15) 観察期間で ground-glass opacity 優位であった2例, consolodation 優位であった1例, conglomeration 優位であった1例が死亡した。

考 察

肺サルコイドーシスのHRCT所見に関するこれまでの報告では、治療の有無にかかわらず、nodular opacitiesは可逆性を秘めており、のう疱性変化や構造改築の所見は可逆性がないと報告されている³⁾。我々の成績では traction bronchiectasis, bronchial distortion, honeycombing, emphysema, parenchymal bandsは経過を追って多く認められるようになった。また ground-glass と linear opacity パターンは可逆性との報告とそうでないとの報告がある³⁾。Ground-glassに構造改築所見を伴っている場合は線維化所見と考えられるが、今回の2例の患者では ground-glass opacitiesに tractio bronchiectasisを伴っていなかったが、治療の有無に関わらず honeycombing となった。この間 ground-glass 所見は軽快していた。この2例では初期CTで線維化は検出できなかった。Ground-glassの所見部位では活動性の胞隔炎、あるいは小さな肉芽腫が多く存在していると考えられるが、病理像との対比の報告では ground-glass opacitiesの部位では小さなサイズの肉芽腫、線維化、空気が混在する場合があるとの報告もある³⁾。

Nodular opacitiesの所見は経過を追うと軽快する事が多いと考えられるが、多数の multiple large nodular pattern 所見も予後は良好であった。

結 論

HRCTで nodularあるいは multiple large nodular パターンを認める場合は予後は良好であり、ground-glass opacityや consolidationを優位に認める場合は呼吸機能障害に至る可能性があり、予後は不良と考えられた。Conglomeration パターンの縮小は bronchial distortionをきたす場合があり、呼吸機能障害にいたる場合とそうでない場合がある。初期HRCTで優位なパターンを評価する事は肺サルコイドーシス患者の予後を推測する意味で有用である。

文 献

- 1) 井上義一. 特発性肺線維症. 泉孝英編; 新しい診断と治療のABC3/呼吸器3 サルコイドーシス. 最新医学社, p. 125-p. 135. 2002.
- 2) 井上義一. びまん性肺疾患の診断, 臨床検査. in びまん性肺疾患の臨床. 泉孝英監修, 坂谷光則, 長井苑子, 北市正則, 井上義一編 p. 29-35 第3版. 金芳堂 2003年.
- 3) Akira M, Kozuka T, Inoue Y, Sakatani M. Long-term follow-up CT evaluation in patients with pulmonary sarcoidosis. Chest. 127: 185-91, 2005.
- 4) Akira M, Yamamoto S, Inoue Y, et al. High resolution computed tomography findings in asbestosis and idiopathic pulmonary fibrosis: a comparative study. AJR. 181: 163-169, 2003.
- 5) Akira M, Inoue Y, Yamamoto S, et al. Non-specific interstitial pneumonia: findings on sequential CT scans of nine patients. Thorax. 55: 854, 2000.
- 6) Akira M, Sakatani M, Ueda E. Idiopathic pulmonary fibrosis: progression of honeycombing at thin-section CT. Radiology. 189: 687, 1993.

肺常在プロピオニバクテリウム・アクネスにより誘導される サルコイド様マウス肺肉芽腫の解析

西脇 徹¹ 米山 博之¹ 松尾 直樹¹
松島 綱治^{1*} 江石 義信^{2*}

今日に至るまで、多くの研究者がサルコイドーシスの病因を微生物感染に求めてきたが、各々の候補病原体がどのようなメカニズムで発症を誘発するかについては、依然明らかにされていない。感染と疾患発症の因果関係を説明しうる適切な動物モデルが欠落していたことは、その原因のひとつであると思われる。

今回我々は、現在サルコイドーシスの有力な病因候補と考えられているプロピオニバクテリウム・アクネス (*P. acnes*) の肺外反復感作が、サルコイド肺に類似した Th-1 型肺肉芽腫を胸膜直下や気管支血管周囲に誘導することを示した。これらの病変は、無菌領域と考えられてきた下気道肺に *P. acnes* が存在し、そのため、肺外で *P. acnes* に感作された CD4 陽性 T 細胞であっても、経循環的に肺内に流入した後に肉芽腫を形成することから誘導されると考えられた。また、肺常在 *P. acnes* を感受性のある抗生剤で除菌すると常在 *P. acnes* 量の減少とともに肺病変は軽減したため、*P. acnes* の肉芽腫形成に対する寄与が確かめられた。

本報告において我々は、肺常在菌である *P. acnes* が肺サルコイド様病変を誘導することを多角的に検証・確認した。これに基づき、肺常在菌を標的にした抗菌治療がサルコイドーシスのような肺肉芽腫性疾患に適用されうる可能性を提唱する。

Analysis of Murine Sarcoid-like Pulmonary Granulomatosis Induced by Indigenous Pulmonary *Propionibacterium acnes*

Tetsu Nishiwaki¹, Hiroyuki Yoneyama¹, Naoki Matsuo¹,
Kouji Matsushima¹, and Yoshinobu Eishi²

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

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

Although many researchers have considered infection as the triggering factor for sarcoidosis, the mechanisms by which the candidate causative organisms induce this disorder remain unclear. This appears to be due to the lack of the suitable animal model to assess the causal relationship between the disease and infection.

We report here that extrapulmonary sensitization to *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), which is the most likely candidate to date, induced pulmonary Th-1 granulomas mainly in the subpleural and peribronchovascular regions, mimicking sarcoidosis. These granulomas appear to be caused by indigenous *P. acnes* pre-existing in the lower respiratory tract of the normal lung, which is believed to be germ-free, and by an influx of *P. acnes*-sensitized CD4⁺ T cells from the circulation. Importantly, the eradication of indigenous *P. acnes* with antibiotics alleviated the granulomatous lung disease, convincing the contribution of *P. acnes* to the formation of the lesions.

This is the first report to present clear evidence of the contribution of an indigenous pulmonary bacterium to the formation of sarcoid-like lesions in the lung. We propose that treatment targeting indigenous *P. acnes* in the lung will be a possible remedy for pulmonary sarcoidosis.

はじめに

疾患の発見から100年以上経った今も、サルコイドーシスの病因は不明とされている。多くの原因不明の疾患がそうであるように、サルコイドーシスの病因論を取り巻く諸説も、人種・遺伝背景や細菌・ウイルス感染、生活環境といったカテゴリーに分けられて議論が展開されている¹⁾。高度な分子生物学的手法と的確な統計処理を用いて蓄積される臨床研究報告は、各々の学説の妥当性を相応に支持してきた。しかしながら、それらは「学説に基づく実験動物への疾患誘発」などといった、基礎医学における再現性を立証する明確な証左を欠いており、議論はいまだ混沌としているのも事実である。

当教室では、本班会議において「プロピオニバクテリウム・アクネス (以下 *P. acnes*) によるサルコイドーシス発症論」²⁾³⁾⁴⁾ を支持する立場として、マウス肺肉芽腫病態における *P. acnes* の存在意義を検証してきた。このなかで、1) 無菌領域であると考えられていた脊椎動物 (マウス) の正常下気道肺にも *P. acnes* が存在し、正常所属リンパ節において *P. acnes* に対する免疫応答が成立していること、2) そのため、肺外での感作であっても、循環血流から十分量の *P. acnes* 感作リンパ球が肺に流入することで肉芽腫病変を形成しうることを示してきた。

本報告では、上記メカニズム (仮説) を基に樹立したサルコイド様マウス肺肉芽腫モデルにおいて、肺常在 *P. acnes* が病変形成に寄与する現象を、より多角的に検証・確認し、「肺常在菌による間質性肺疾患発症」という新規かつ重要な学説を確かめることを目的とした。

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* のリポペプチド酸を認識する抗体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。

RT-PCRはSPFマウスの下気道肺、及び肺・肝臓・皮膚・脾臓の各所属リンパ節より抽出したRNA1 μ gを逆転写して作成した相補的DNAを用いて施行した。プライマーは先行文献³⁾において *P. acnes* の16sリボゾームRNAの菌特異的な配列を基に、設計・使用されているものを用いている。(forward, 5'-GCGTGAGTGACGGTAATGGGTA-3'; reverse, 5'-TTCCGACGCGATCAACCA-3')

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陽性細胞は足床に *P. acnes* を感作されたマウスの腫大した鼠径リンパ節から採取したリンパ節細胞から、磁気ビーズ吸着法 (MACS system: Miltenyi Biotech 製) を用いて単離した。実験では、マウス一匹に対し2 \times 10⁶個の細胞を経尾静注した。

生菌 *P. acnes* の気道内前投与の実験では、*P. acnes* の足床反復感作一週間前に *P. acnes* の生菌を1グループ5匹ずつ、それぞれ0.1 μ g, 1 μ g, 10 μ g (1 μ g中の *P. acnes* は2.5 \times 10⁵個) で投与し、PBS投与群と比較した。なお、*P. acnes* の気道内投与のみでは、感作開始時、および終了時に肺肉芽腫形成の無いことは確認している。また、対照実験は *P. acnes* の代わりにラクトバチルス・ガセリ (*L. gasseri*; ATCC 33323)

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

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

を同様に用いて行った。

抗生剤投与実験では、1グループ5匹のマウスに、それぞれPBS、塩酸ミノサイクリン133 μg/dose (MINO: Wyeth Lederle製)、クリンダマイシン1.6 mg/dose (CLDM: Pharmacia製)、硫酸ゲンタマイシン53 μg/dose (GM) (Schering-Plough製)を、長期投与群では*P. acnes*の足床反復感作一週間前から終了時まで、また、短期投与群(図中「short」と表記)では3回目の感作から解析までの2週間の期間で、腹腔内および経口投与した。(投与初日のみ経気道投与も実施。)

結 果

*P. acnes*による肺肉芽腫症発症メカニズムの前提として、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1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。また、この*P. acnes*貪食細胞を同定するために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ところ、*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。さらに、*P. acnes*の常在を多角的に証明するために行ったSPF正常マウス肺の遺伝子

学的な解析でも各個体に様々な程度の*P. acnes*遺伝子が検出された。また、無菌マウスを用いた対照実験においては*P. acnes*遺伝子は検出されなかった(図1)。

正常肺所属リンパ節における*P. acnes*特異的免疫応答を確認するために、肺所属リンパ節における*P. acnes*の存在を遺伝子学的に解析した。本来*P. acnes*の常在が示唆されている臓器と同様、肺の正常所属リンパ節にも、遺伝子学的に*P. acnes*が証明された。

さらに、未感作マウスから肺所属リンパ節と、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ところ、肺、鼠径、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(図2)。これらにより、正常マウス肺における*P. acnes*の常在と、定常時よりすでに*P. acnes*に対する免疫応答の成立していることが示唆された。

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か否かを確認するために、*P. acnes*感作CD4陽性細胞の移入実験を行った。2×10⁶個の*P. acnes*感作CD4陽性細胞を経尾静注された正常マウスでは、2週間後から肺および肝肉芽腫の形成が観察された。一方、アジュバントのみで感作した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3)。

以上より、肺に直接*P. acnes*が感作されなくても*P. acnes*感作ヘルパーT細胞が経循環的に肺に流入する

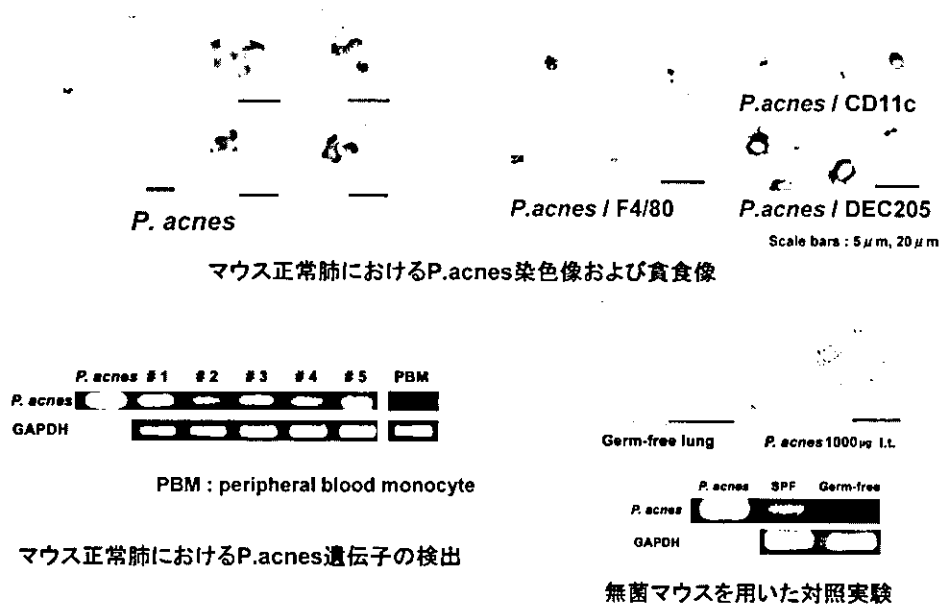


図1 正常マウス下気道肺における*P. acnes*の同定

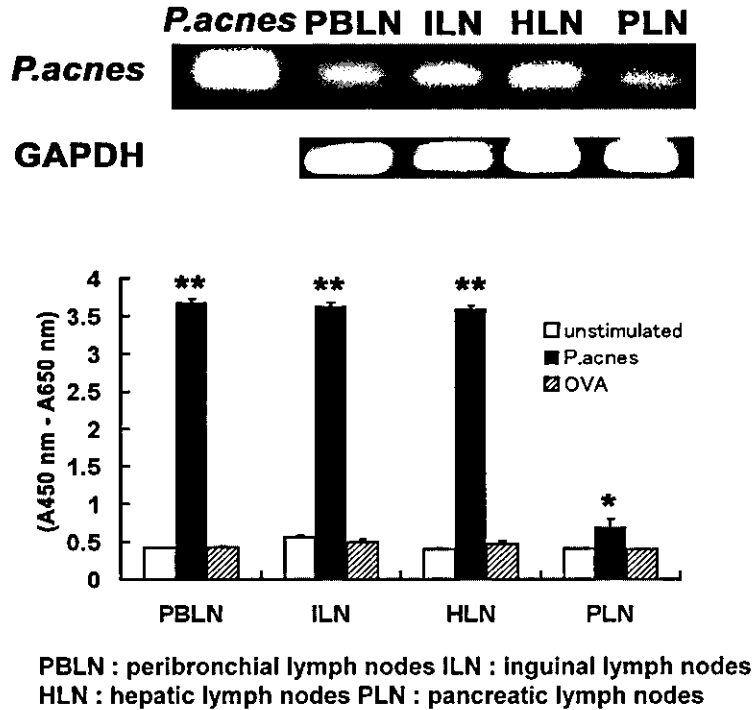


図2 正常マウス肺所属リンパ節における *P. acnes* 遺伝子および特異的免疫応答

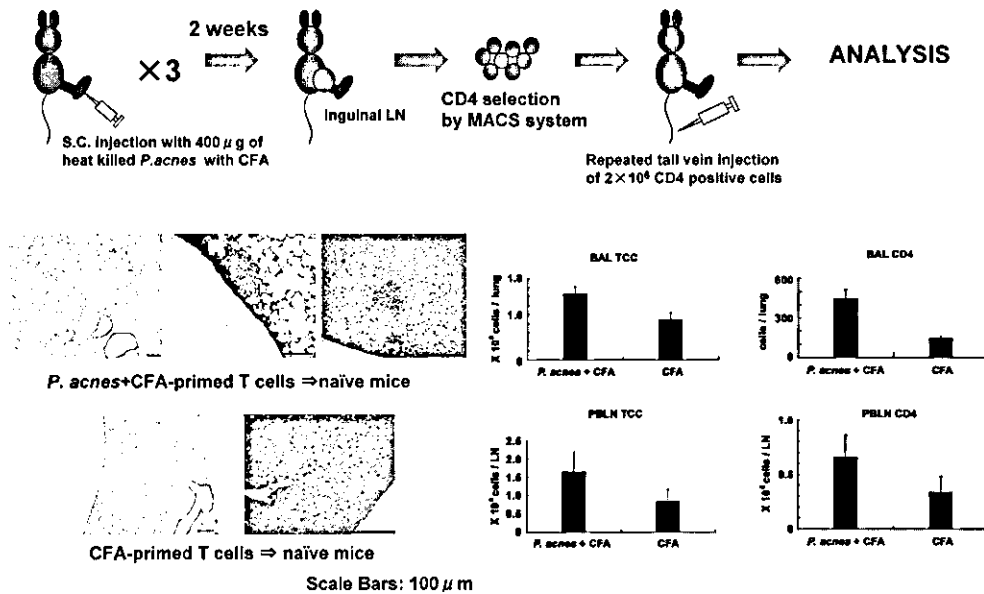


図3 *P. acnes* 感作 T 細胞の正常マウスへの経静脈的移入による肺・肝肉芽腫の誘導

ことで肉芽腫病変を誘導しうるということが示唆されたため、恒常的に循環血流中の *P. acnes* 感作ヘルパー T 細胞数を増加させ、より慢性肺肉芽腫症に近い病像を誘導する目的で、定期的にあジュバントを用いた *P. acnes* の肺外 (足床) 感作を行った。400 μg 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・肺

血管・リンパ管周囲有意に、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。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った。さらに、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

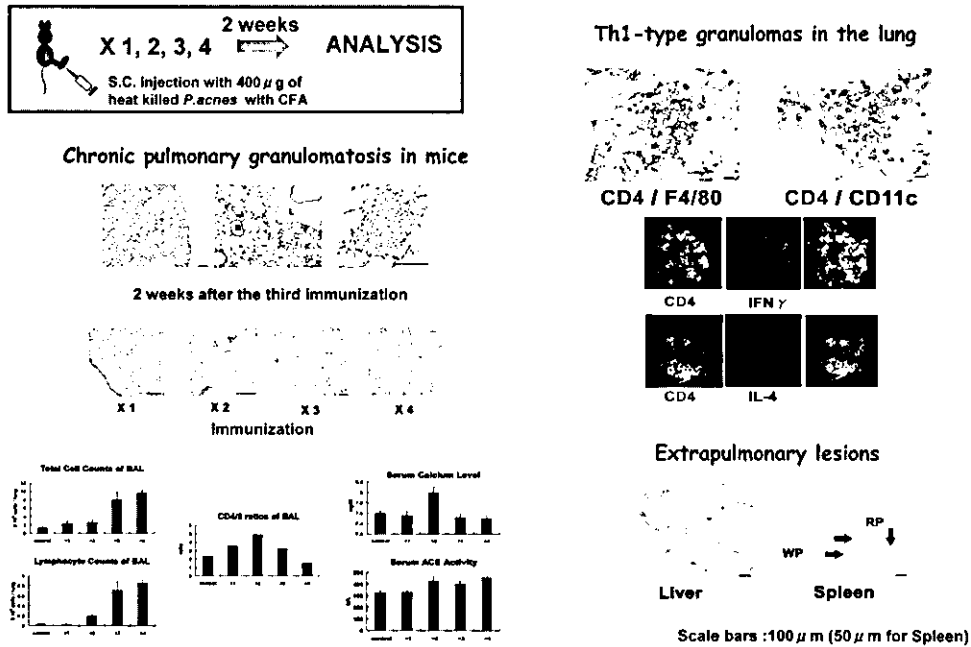


図4 *P. acnes* の反復肺外感作により誘導されるマウスサルコイド様肺肉芽腫病変

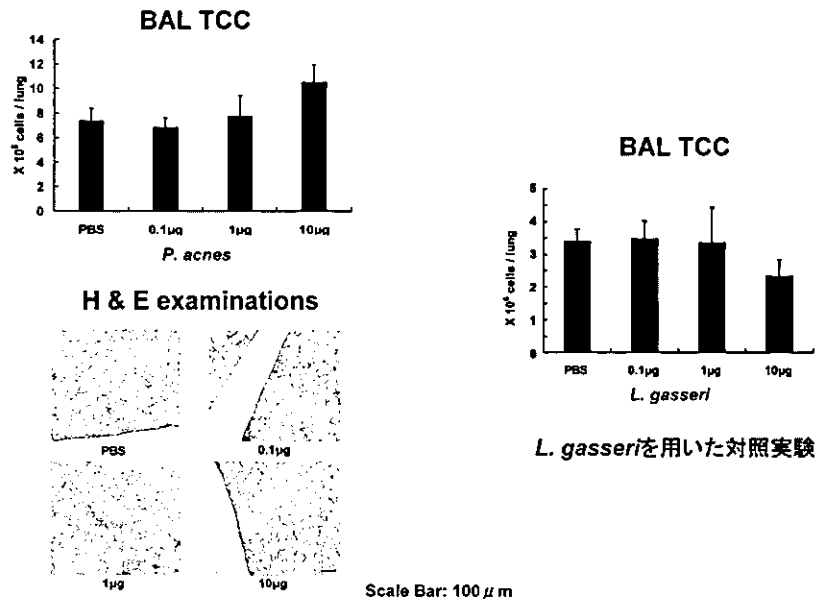


図5 *P. acnes* の反復感作前投与により増強する肺肉芽腫病変

行くと、これらは $IFN\gamma$ 産生性、すなわち Th1 型肉芽腫であった。さらに、このモデルにおいては感作回数依存的に肺胞洗浄液 (BAL) 中のリンパ球優位の増加が認められ、血清の ACE 活性も上昇したが、BAL 中リンパ球の CD4/CD8 比と血清カルシウム値は、肉芽腫形成が認められ始める感作 2 回のグループで最も高値を示した。また、サルコイドーシスにおいて特徴とされる肺外病変の有無を確認するべく肝臓・脾臓に

おいても組織学的な解析をしたところ、肝臓には肺と同様な肉芽腫が多数認められ、脾臓には、赤脾髄に CD4 陽性細胞の異常集積が認められた (図 4)。

つぎに、この *P. acnes* の肺外反復免疫モデルにおける肺肉芽腫病変が、健常時より肺に常在する *P. acnes* に依存して誘導されていることを確認する為に、*P. acnes* の免疫開始前に人工的に肺内 *P. acnes* を増加・及び減少させることで、肉芽腫病変の程度が呼応する

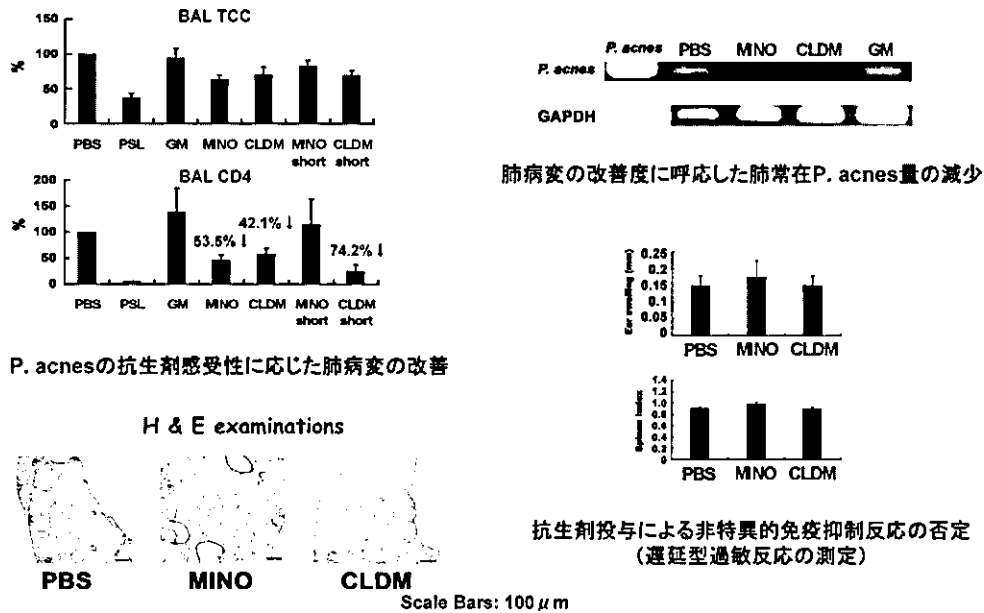


図6 抗生剤による肺常在 *P. acnes* の除菌により改善する肺肉芽腫病変

か否かを検討した。

肺常在 *P. acnes* が増加している状態を想定するために行った図5の実験では、免疫開始前に気道内投与された *P. acnes* の量依存的に BAL 総細胞数は増加し、組織学的にも肉芽腫形成の増加をみた。一方、*P. acnes* の代わりに *L. gasseri* を用いた対照実験ではこのような肺病変の変化は認められなかった (図5)。

また、肺常在 *P. acnes* を減ずる目的で行った抗生剤投与と実験では、すでに皮膚科診療の領域において、*P. acnes* による尋常性痤瘡に効果があり、繁用されている塩酸ミノサイクリン (MINO)、クリンダマイシン (CLDM) と、対照として *P. acnes* に感受性が低いとされているアミノグリコシド系抗生剤である硫酸ゲンタマイシン (GM) を用いた。MINO・CLDM 長期投与群においては、*P. acnes* 反復免疫による BAL 総細胞数・CD4 陽性細胞数の増加は抑えられ、また、組織学的にも肉芽腫形成の減少を認めた。一方、GM 投与群においてはこのような変化は認めなかった。さらに、短期投与群においても、CLDM 投与群において肺病変の軽減を認めた。これらの病勢の変化は各群の肺常在 *P. acnes* の量の変化に比例していた (図6)。

考案・結論

「細菌・ウイルス感染が疾患を誘発する」という可能性は、原因不明疾患の病態を論ずる際に検証すべき事

項のひとつである。これまでも、サルコイドーシスをはじめ、クローン病やギラン・バレー症候群などといった、従来病因が未知であるとされる疾患において、特定の細菌感染が発症を誘発する可能性が示唆されてきた。

感染と発症を結びつけるうえで、病因と推察される微生物が当該疾患患者に多く存在し、それに対する免疫応答が有意に高いことは前提となるべき証左であるが、因果関係をより強固に実証し、発症の詳細なメカニズムに迫るためには、その微生物が実験動物に類似病態を誘導しうることを示し、モデル動物を作製することが有用である。

サルコイドーシス病因論においては、これまでに多くの病因候補微生物が挙げられてきた。なかでも、結核菌は長年にわたり有力な候補とされてきたが、それを否定する報告も多く、いまだに賛否両論である。一方、*P. acnes* は結核菌と同様、Th1 型肉芽腫や局所炎症を誘導する能力に長けており、尋常性痤瘡により、今もなお苦しんでいる患者が多いことは言うまでも無い。この *P. acnes* が肺内に常在しているとなれば、他の炎症性・感染性疾患や遺伝的素因等により、宿主側の基礎免疫状態に変化が生じた場合、この肺常在 *P. acnes* が新たな肺疾患発症の起点となりうる可能性がある、というのが本研究の発端となった仮説である。

従って、本報告では、まず *P. acnes* が健常マウスの下気道肺に存在していることを立証するために、免疫

組織化学的・遺伝子学的側面からの多角的な検証を行った。また、実際に免疫応答が成立する場である肺所属リンパ節においても、*P. acnes* が存在することを確認し、同時に、肺所属リンパ節においては定常時より *P. acnes* に対する免疫応答が成立していることを確認した (図1・図2)。

肺肉芽腫症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⁸⁾。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・ウィ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かった⁹⁾。しかし、上述のように、健常時より、下気道肺に抗原となる *P. acnes* が存在しているのであれば、肺に直接抗原が投与されなくても、十分量の *P. acnes* 感作リンパ球が肺内、さらには正常リンパ循環に流入するだけでも、肺病変を形成する可能性がある。*P. acnes* 感作ヘルパーT細胞の正常マウスに対する移入実験の結果 (図3) は、この考えを支持するものである。米山らの一連の仕事で詳細に解明された、樹状細胞を中心とした局所免疫応答における免疫担当細胞動態によれば^{6,9)}、生体は局所で抗原に感作されると、樹状細胞をはじめとした抗原提示細胞が所属リンパ節に抗原情報を伝播し、そこで抗原特異的リンパ球が増殖し、輸出リンパ管を経て血流中に再循環した後、抗原曝露部位に帰還する。この細胞動態を基に考えると、異所性に *P. acnes* 感作リンパ球が増殖した場合であっても、それらの細胞が肺循環に流入した際、肺病変を形成する現象は、免疫細胞生物学的にも矛盾しない。

上記の理由により、図4以降の実験で使用している *P. acnes* 反復免疫による肺肉芽腫誘導モデルは、図3の移入実験の応用型として捉えうるものであり、より慢性型の病像を呈しているものと考えられる。事実、BALの細胞数、リンパ球分画や血清ACE活性・カルシウム値も肉芽腫病変を反映している結果が得られ、肺サルコイドーシスと類似する点が散見される。

この慢性肺肉芽腫モデルにおける肺病変が、本当に肺常在 *P. acnes* に依存して形成されていることを検証することは、今後このモデルを用いた研究結果を解釈するうえで重要である。図5・図6の実験は、常在 *P. acnes* を人工的に増した状態と減じた状態を設定して

いるものである。とくに図6では、抗生剤投与により感受性に準じた肺常在 *P. acnes* 量の減少と、それに呼応する肺病変の軽減がみられている。これは、このサルコイド様マウス肺肉芽腫モデルにおいて、病変形成に肺常在 *P. acnes* の存在が重要であることが示唆するだけでなく、「肺の常在菌をターゲットとした治療」が、ひとつの肺肉芽腫形成病態に適用され得る可能性を見出すものとなった。

サルコイドーシスとは、ヒトにおける極めて限定された疾患であり、本報告における肺肉芽腫モデルマウスが、それと全く同一の病態機序を有しているとはいえない。しかし、*P. acnes* の肺外感作を用いた系において、少なくともサルコイドーシスといくつかの共通点をもつ病態がマウスで再現でき、それが肺常在 *P. acnes* をターゲットとした抗菌治療により改善したことは注目すべきであり、*P. acnes* の内因性感染とサルコイド病態との因果関係をより強く支持したことを期待し、ここに報告する。

参考文献

- 1) Newman LS, Rose CS, Maier LA: Sarcoidosis. *N. Engl J Med* 336: 1224-1234, 1997.
- 2) Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y: Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. *Lancet* 354: 120-123, 1999.
- 3) Eishi Y, Suga M, et al.: Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. *J Clin Microbiol* 40: 198-204, 2002.
- 4) Yamada T, Eishi Y, et al.: 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.
- 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) 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.

- 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) 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, 2001.

- 9) 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: 1257-1266, 2002.

D P B

D

P

B

びまん性汎細気管支炎 (DPB) における *MUC5B* 遺伝子 プロモーター多型と病態との関連の検討

神尾孝一郎^{1,2} 松下 育美¹ 土方美奈子¹ 田中 剛¹
中田 光^{1**} 石田 貴文³ 徳永 勝士⁴ 小橋陽一郎⁵
田口 善夫^{6**} 本間 栄⁷ 中田紘一郎⁸ 吾妻安良太^{2*}
工藤 翔二² 慶長 直人^{1*}

びまん性汎細気管支炎 (DPB) では、これまで HLA class I 領域との関連が強く示唆されており、DPB の疾患感受性遺伝子の存在する可能性のある候補領域が HLA-A 遺伝子座と HLA-B 遺伝子座の間の約 80 kb にまで絞り込まれている。ここには既知の遺伝子の報告はないが、現在新たにムチン様の遺伝子のクローニングが進行中である。さらに DPB の特徴的な病態の一つには気道の過分泌が挙げられ、気道粘液の主成分であるムチン遺伝子の分泌制御は注目される。これらの背景をもとに、我々は気道で分泌されているムチン遺伝子に着目して検討を開始した。

正常気道で分泌が認められる *MUC1*, *MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC7* のプロモーター多型を解析した結果、*MUC5B* の 3 つの変異で疾患との関連が認められた。このうち 2 塩基 CA の insertion/deletion polymorphism (I/D 多型) は疾患群で有意に低下しており、疾患と最も強い関連が認められた ($p=0.0001$)。さらにこれらの変異を含む 6 個の変異は、強い連鎖不平衡の状態にあることが確認されているため、ハプロタイプ構造を決定した。その結果代表的な 3 つのハプロタイプが認められ、I/D 多型を含むハプロタイプが疾患と最も強い負の関連を示した ($p=0.0002$)。

この 3 つのハプロタイプごとの転写活性の相違を検討するためにルシフェラーゼアッセイを行った所、I/D 多型を含むハプロタイプが最も低い転写活性を示した。このハプロタイプは関連解析から疾患抵抗性を有すると考えられるが、低い転写活性により *MUC5B* の分泌に対して抑制的に働き、気道の過分泌を抑制している可能性が考えられた。

MUC5B の組織での発現の状態を確認するために、*MUC5AC* と併せて免疫染色を行った。*MUC5AC* は DPB では上皮の goblet cell で発現が増加しているものの、通常の肺組織と同様に goblet cell に局限していた。一方 *MUC5B* は DPB では肥大した粘膜下腺で多く発現が見られるとともに、通常は発現が乏しい goblet cell にも多く見られた。このことから DPB では *MUC5B* の発現分布が、通常観察される粘膜下腺のみでなく goblet cell へもシフトすることが考えられた。

今回の検討で DPB の病態に対する *MUC5B* の関連が遺伝子レベルで想定され、機能解析でも確認されるとともに、*MUC5B* の発現状態・分布の変化が組織学的に示された。

Promoter analysis and aberrant expression of *MUC5B* gene in diffuse panbronchiolitis

Koichiro Kamio^{1,2}, Ikumi Matsushita¹, Minako Hijikata¹, Goh Tanaka¹,
Koh Nakata^{1**}, Takafumi Ishida³, Katsushi Tokunaga⁴, Yoichiro Kobashi⁵,
Yoshio Taguchi^{6**}, Sakae Homma⁷, Koichiro Nakata⁸, Arata Azuma^{2*},
Shoji Kudoh², and Naoto Keicho^{1*}

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

²Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School, Tokyo, Japan;

³Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan;

⁴Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan;

⁵The Department of Pathology, Tenri Hospital, Nara, Japan;

⁶The Department of Respiratory Medicine, Tenri Hospital, Nara, Japan;

⁷Department of Respiratory Medicine, Respiratory Center, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan;

⁸Department of Pulmonary Medicine, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan

The candidate region where one of the major susceptibility genes for diffuse panbronchiolitis (DPB) could be located is narrowed to 80 kb within the HLA class I region. The cloning of newly identified mucin-like genes within the region is now underway. Mucin is one of the most important constituents of airway secretion and the secretory mechanisms of mucin genes are noteworthy considering the mucous hypersecretion in DPB. Thus we hypothesized that the transcriptional activity of mucin genes may be altered in DPB. We analyzed nucleotide sequences of regulatory region of six mucin genes *MUC1*, *MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B* and *MUC7* and detected their promoter polymorphisms. Among them, insertion/deletion polymorphism identified in the *MUC5B* gene was significantly associated with the disease ($p=0.0001$). Six polymorphisms including this are reported to be in strong linkage disequilibrium and the haplotype analysis revealed three major haplotypes in *MUC5B* promoter region. Transcriptional activity observed in the three major promoter haplotypes corresponded to the strength of the disease association in which these haplotypes are involved. Immunohistochemistry of the lung tissues of DPB revealed that *MUC5B* was abundantly expressed not only in bronchial glands but also in increased numbers of goblet cells on the bronchial surface, where *MUC5AC* is predominant and *MUC5B* expression is generally scarce in the normal lung. Marked mucous hypersecretion observed in DPB may be partly explained by increased and aberrant expression of *MUC5B*. The possible involvement of *MUC5B* gene in DPB was demonstrated.

¹ 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部

² 日本医科大学第四内科

³ 東京大学人類生物学・遺伝学研究室

⁴ 東京大学人類遺伝学教室

⁵ 天理よろづ相談所病院病理

⁶ 天理よろづ相談所病院呼吸器内科

⁷ 虎ノ門病院呼吸器科

⁸ 東邦大学呼吸器内科

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

** びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

はじめに

びまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis, 以下 DPB と略す) は特徴的な臨床症状, 画像所見, 病理所見を呈する疾患であるが, それまで分類されていた慢性閉塞性肺疾患とは別の新しい疾患として, 1960 年代後半にその概念が確立された¹⁾. 晩期には呼吸不全を来す致死的な疾患であったが, エリスロマイシンの少量長期投与によりその予後は著しく改善し, 治癒しうる疾患となった²⁾. 一方で DPB の病因は現在も明らかではなく, 難治例も存在することから, 様々なアプローチから解明の努力が続けられている. 疫学的な観点から DPB に特徴的なこととして, 国際的にその疾患概念が認知されるに至った現在においてもなお報告が主として日本・韓国・中国など東アジアからが中心であることが挙げられる. 欧米からの報告も少数あるものの多くはアジア系の移民に発症したものであり, その発症に人種差が見られることから, 何らかの遺伝的背景の存在が疑われてきた.

この遺伝的背景については, 特に HLA class I 領域との関連が強く示されており, 日本人ではアジア人に特徴的な HLA class I 抗原である HLA-B54 (以前の Bw54 抗原) との関連が報告されている^{3,4)}. その一方で, 韓国からの報告は HLA-A11 との関連を示すものであった⁵⁾. 同じアジア人に発症した DPB でも関連する HLA が民族間で相違することの説明として, HLA-A11 と HLA-B54 の両方を保有する共通祖先において, この間の領域にある未知の遺伝子に疾患への感受性を有する変異が起り, その後 A11 と B54 の間で組み換えが生じたという仮説が立てられている. この様な仮説に基づきマイクロサテライトマーカーなどの遺伝マーカーを用いてこの領域を解析した結果, DPB の疾患感受性遺伝子の存在が予想される候補領域が, HLA-A 遺伝子座と HLA-B 遺伝子座の間の約 200 kb の領域にまで絞り込まれた⁶⁾. しかしながら, HLA 関連疾患感受性遺伝子のクローニングと遺伝子変異解析の現状については, 知的財産権の関連などから, 本年度は報告を見合わせたい.

DPB では過剰な気道分泌が特徴的な病態の一つであるため, DPB と関連を示す HLA の領域に, 気道分泌中の主要な成分であるムチン様の遺伝子の存在が予想されることは非常に興味深い事実である. ムチンは主に気道上皮の杯細胞や粘膜下腺より分泌され, 気

道粘膜の潤滑化や外来異物や微生物からの粘膜保護の役割を果たしていると考えられている. DPB は慢性気道炎症性疾患の中でもとりわけ気道粘液分泌の亢進が顕著であり, その主要な成分であるムチン遺伝子の転写制御のメカニズムに関心が持たれる. これらのことから我々は, 気道での発現が確認されているムチン遺伝子である, MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7 遺伝子に着目し, これらの転写調節領域の変異が転写活性に及ぼす影響の検討を開始した.

対象と方法

ヒトの正常気道における発現が報告されているムチン遺伝子 MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7 遺伝子を解析の対象とした⁸⁾. これらのムチン遺伝子群のプロモーター活性を検討した各報告に基づき, それぞれの転写調節領域 1~2 kb をカバーするようにプライマーセットを作成し, 多型のスクリーニングを行った (図 1). スクリーニングは健常者 16 名で direct sequence 法で行った. Direct sequence には ABI PRISM 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems) を使用した. これにより検出された minor allele の頻度が 5% 以上の変異について対照群と疾患群の間で関連解析を行った. 健常者 128 例を対照群とし, 1995 年厚生省班診断基準に基づき DPB と診断された 92 例を疾患群とした¹⁵⁾. (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.

MUC5B プロモーター領域のハプロタイプ解析

MUC5B プロモーター領域の 11 個の変異のうち, 転写開始点に近い 6 個の変異は強い連鎖不平衡の状態にあることが確認されている¹⁶⁾. この 6 個の変異から成るハプロタイプ頻度を正確に比較するために, ハプロタイプの直接決定を行った. これには SSCP (Single-strand conformation polymorphism) 法を応用した SSCP-based direct haplotype determination (SSDHD) method を用いた¹⁶⁾.

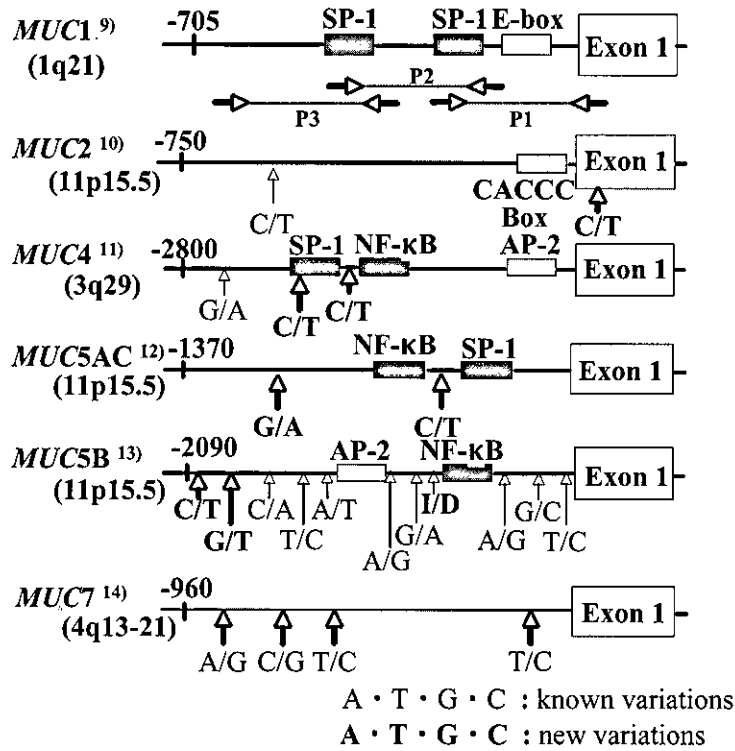


図1 各ムチン遺伝子について、解析したプロモーター領域ならびに変異の相対位置を示している。転写開始点を+1とし、それより上流側の位置を-で示してある。例えば *MUC1* では、プロモーター領域をカバーできるように P1, P2, P3 のように 3 つのプライマーセットを作成し解析した。↑ は変異の位置を示しており、細字はデータベースに登録済みの変異、太字は今回同定された新規の変異を示している。SP-1, NF-κB などは文献に記載のある転写因子が結合するコンセンサス配列の位置を示している。各遺伝子の右肩に、参考文献を示してある。*MUC5B* の I, D はそれぞれ CA の Insertion と Deletion である。

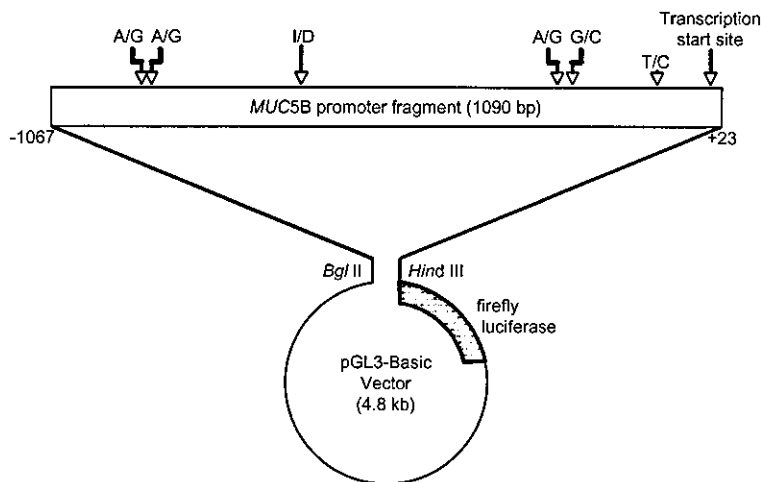


図2 *MUC5B* プロモーター領域に認められた代表的な 3 つのハプロタイプに関して、ルシフェラーゼアッセイを用いた機能解析を行った。6 つの変異を含む 1090 塩基の領域を、制限酵素 *Bgl* II サイト及び *Hind* III サイトを付加したプライマーセットで増幅し、これらの制限酵素で処理した後、pGL3-Basic Vector にクローニングした。I, D はそれぞれ CA の Insertion と Deletion を示している。

MUC5B プロモーター領域の Insertion/Deletion polymorphism (以下、I/D 多型) の PCR-SSCP 法を用いた genotyping

MUC5B プロモーター領域の I/D 多型に関しては、通常の SSCP 法を追加して genotyping を行った。

ルシフェラーゼアッセイを用いた機能解析

MUC5B プロモーター領域のハプロタイプ解析の結果認められた代表的な 3 つのハプロタイプに関して、転写活性の相違を検討する目的で、ルシフェラーゼアッセイを行った。6 つの変異を含む 1090 塩基の領

域を, 制限酵素 *Bgl* II サイト及び *Hind* III サイトを付加したプライマーセットで増幅し, これらの制限酵素で処理した後, pGL3-Basic Vector (Promega, Madison, WI, USA) にクローニングした (図 2). この plasmid を大腸菌に導入・増幅し, 抽出後に pulmonary mucopidermoid carcinoma 由来のヒト気管支上皮細胞株 NCI-H292 細胞に transfection し, 24 時間培養後に Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) にて活性を測定した.

系統樹の解析

MUC5B のプロモーター領域中, 強い連鎖不平衡にある 6 つの変異を含む領域 (nt 3195-4203 in AF107890) について, Caucasian 40 例, チンパンジー 10 例においても変異の解析を行った. 日本人および Caucasian でそれぞれに代表的な 5 つずつのハプロタイプ, およびチンパンジーで最も代表的なハプロタイプを用いて系統樹を作成した. 解析には PHYLIP 3.6 neighbor program^{17,18)} を用い, neighbor-joining method を行った.

抗 MUC5AC 抗体, 抗 MUC5B 抗体を用いた免疫染色

気道で分泌される代表的なムチンである MUC5AC および MUC5B の発現分布を確認するた

め, DPB 患者の剖検肺と, 他疾患で死亡した肺病変の無い患者の剖検肺を用いて, 免疫染色を行った. 検体の臨床情報は表 1 に示してある.

MUC5AC の染色には anti-MUC5AC mouse monoclonal antibody (1:1,000 dilution; Clone 45M1, NeoMarkers, Fremont, CA, USA) を用い, MUC5B の染色には anti-MUC5B rabbit polyclonal antibody (1:400 dilution; raised against a recombinant protein corresponding to amino acids 1201-1500 of MUC5B, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) を用いた. 4°C で一晩 incubation 後, ペルオキシダーゼでラベルした 2 次抗体を用い, 発色には 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC) liquid substrate chromogen (DAKO, USA) を使用した.

統計学的処理

疾患とマーカーの関連解析では χ^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. Hardy-Weinberg 平衡の検定には Arlequin program を用いた¹⁹⁾. ハプロタイプの統計学的な推定および推定されたハプロタイプを用いた case-control permutation test には PHASE program (version 2.1) を使用した^{20,21)}. 転写因子の結合するコンセンサス配列は, MatInspector[®] (Genomatix, Munich, Federal Republic of Germany) を用いて推定した²²⁾.

表 1 Clinical information of autopsy samples

Tissue No.	Age	Sex*	Smoking history	Clinical and Pathological Diagnosis [†]
Lu-1	68	M	+	No lung disease; died of esophageal carcinoma
Lu-2	45	F	unknown	No lung disease; died of liver cirrhosis
DPB1-1 -2	53	F	-	DPB, Bronchiectasis, Chronic sinusitis Infection of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DPB2-1 -2	71	M	-	DPB, Bronchiectasis, Chronic sinusitis Post-operative state of mitral stenosis
DPB3-1 -2	60	M	+	DPB, Bronchiectasis, Chronic sinusitis Infection of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DPB4-1 -2	43	M	-	DPB, Bronchiectasis, Chronic sinusitis
DPB5-1 -2	67	M	-	DPB, Bronchiectasis, Chronic sinusitis Infection of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
COPD-1	68	M	+	Pulmonary emphysema, Cor pulmonale
COPD-2	66	M	+	Pulmonary emphysema, Pneumothorax
COPD-3	69	M	+	Pulmonary emphysema

*M: male, F: female

[†]Brief information in autopsy summaries is described. Clinical information of autopsy samples

結 果

1. ムチン遺伝子群プロモーター領域の変異のスクリーニング

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, 表 2)。

2. 各変異についての疾患群と対照群の間の関連解析
各ムチン遺伝子に同定されたそれぞれの変異について、疾患群と対照群間で関連解析を行った。*MUC5B* の I/D 多型が DPB と最も強い関連を示し ($p=0.0001$)、この関連は今回解析した変異数で補正後も強く認められた (表 3)。*MUC5B* ではこの周辺の 2 つの変異でも疾患との関連が認められたが、他のムチン遺伝子の変異では関連は認められなかった。I/D 多型はさらに PCR-SSCP 法も用いて確認した (図 3)。

3. *MUC5B* プロモーター領域のハプロタイプ解析およびその関連解析

MUC5B プロモーター領域の転写開始点に近い 6 個の変異 (表 2: rs885455, rs885454, rs17235353, rs7115457, rs7118568, rs2735738) は日本人集団では強い連鎖不平衡の状態にあることが報告されている。この 6 個の変異から成るハプロタイプ頻度を疾患・対照群間で直接比較するために、SSDHD 法を用いてハプ

ロタイプを直接決定した。結果を表 4 に示す。日本人では 13 種類のハプロタイプが認められ、このうち 3 つのハプロタイプは control 集団でそれぞれ 10% 以上の頻度であり、全体の約 80% を占める代表的なものであった。ハプロタイプ H2 は CA の deletion を含むものであるが、DPB で有意に低下していた ($p=0.0002$)。H1 は DPB で増加していたが、統計的な有意差は認められなかった ($p=0.063$)。

PHASE program で推定したハプロタイプ頻度も決定値と同様の結果が得られ、疾患群と対照群のハプロタイプ頻度差は permutation test の結果でも有意であった ($p=0.03$)。

4. ハプロタイプの系統解析

Caucasian 40 サンプルで上述の 6 個の変異を含む領域を解析した所、CA の I/D 多型は認められなかったが、他の 5 つの変異は日本人集団と同様であった。PHASE program によるハプロタイプ推定では、日本人の H3 に相当するハプロタイプが Caucasian で最も頻度が高く 76.3% であった。日本人で最多の H1 は 6% のみであった。同じ領域の解析をチンパンジーでも行い 6 つの変異を認めたが、これらはいずれもヒトとは異なる変異であった。

日本人と Caucasian それぞれに代表的な 5 つずつのハプロタイプとチンパンジーで 40% を占める最も頻度の高いハプロタイプを用いて、系統解析を行った (図 4)。ヒトのハプロタイプはチンパンジーとの共通祖先からヒトへ進化した後に出現してきたと考えら

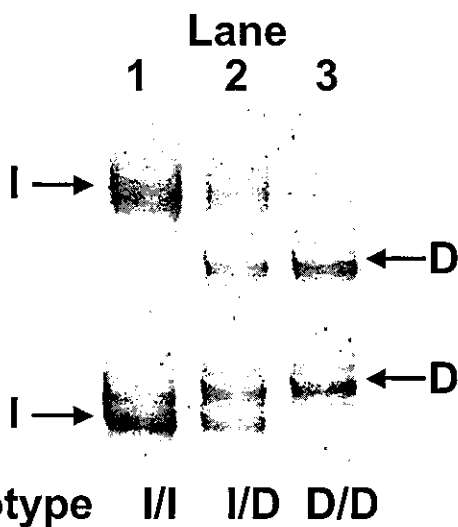


図 3 *MUC5B* プロモーター領域に認められた I/D 多型の PCR-SSCP 法による genotyping. Lane 1 と 3 はそれぞれ insertion と deletion のホモである。Lane 2 にはヘテロを示してある。

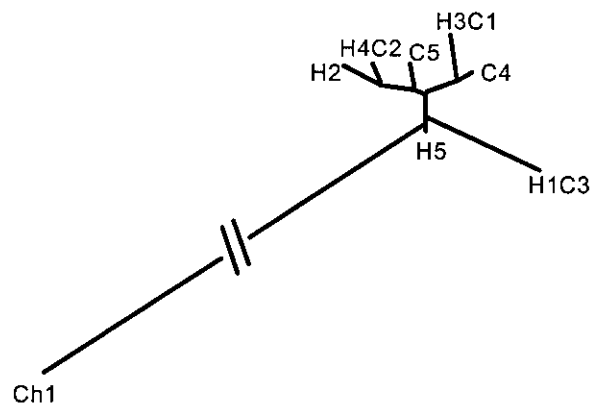


図 4 ハプロタイプを用いた系統解析。日本人と Caucasian それぞれに頻度の高いハプロタイプ 5 つずつと、チンパンジーで最も頻度の高いハプロタイプを用いて系統樹を作成した。H1 から H5 は表 4 の日本人のハプロタイプである。C1 から C5 は Caucasian のハプロタイプを示すが、C1, C2, C3 はそれぞれ H3, H4, H1 に相当する。C4 は AGIGCC であり、C5 は GGIGCT である。Ch1 はチンパンジーで最も頻度の高いハプロタイプを示す。

表 2 Identified polymorphisms in the promoter region of each mucin gene. No polymorphism was found in the screened promoter region of *MUC1* gene.

Gene *	No. [†]	Position ‡	dbSNP §	Polymorphism	Allele frequency (%)
<i>MUC 2</i> (U67167)	1	10799	rs2071175	T allele	46.5
				C allele	53.5
	2	11319	ss28514118	C allele	28.7
				T allele	71.3
<i>MUC 4</i> (AF241535)	3	909	rs2641770	A allele	15.6
				G allele	84.4
	4	977	ss28514119	A allele	13.3
				G allele	86.7
	5	998	ss28514120	T allele	11.7
				C allele	88.3
<i>MUC 5AC</i> (AF016834)	6	142	ss28514121	A allele	38.7
				G allele	61.3
	7	1203	ss28514122	T allele	38.7
				G allele	61.3
<i>MUC 5B</i> (AF107890)	8	2107	ss23142225	T allele	40.6
				C allele	59.4
	9	2179	ss23142226	G allele	31.6
				T allele	68.4
	10	2389	rs868902	C allele	23.4
				A allele	76.6
	11	2571	rs868903	T allele	43.8
				C allele	56.3
	12	2691	rs868904	A allele	50.8
				T allele	49.2
	13	3259	rs885455	A allele	19.9
				G allele	80.1
	14	3272	rs885454	A allele	33.2
				G allele	66.8
	15	3518-19	ss23142227	Insertion	74.6
				Deletion	25.4
	16	3941	rs7115457	A allele	37.9
				G allele	62.1
	17	3961	rs7118568	G allele	38.3
				C allele	61.7
	18	4100	rs2735738	T allele	48.4
				C allele	51.6
<i>MUC 7</i> (L42983)	19	648	rs4629524	G allele	8.2
				A allele	91.8
	20	686	rs4452506	C allele	8.2
				G allele	91.8
	21	768	rs4694067	C allele	26.2
				T allele	73.8
	22	1377	rs7662264	C allele	8.2
				T allele	91.8

*Genbank Accession numbers listed in parentheses under each gene name are referenced sequences.

[†] Consecutive numbers are assigned for each polymorphism identified in this study.

[‡] Positions in the referenced database for each polymorphism are listed. Bold letters indicate polymorphic loci identified by our group.

[§] The reference SNP identifiers in dbSNP for each polymorphism are listed.

^{||} Insertion and Deletion indicate insertion of CA and deletion of CA, respectively.

表3 Genotype and allele frequencies of polymorphisms identified in the promoter region of MUC 5B gene showing association with DPB.

dbSNP*	Genotype [†] frequency	DPB (n=92)	control (n=128)	p value	Allele [†] frequency	DPB (n=92)	control (n=128)	p value
rs885454	AA	5 (5.4%)	14 (10.9%)	0.0177	A	40 (21.7%)	87 (34.0%)	0.0052
	AG	30 (32.6%)	59 (46.1%)		G	144 (78.3%)	169 (66.0%)	
	GG	57 (62.0%)	55 (43.0%)					
ss23142227	II	73 (79.3%)	70 (54.7%)	0.0006	I	164 (89.1%)	191 (74.6%)	0.0001
	ID	18 (19.6%)	51 (39.8%)		D	20 (10.9%)	65 (25.4%)	
	DD	1 (1.1%)	7 (5.5%)					
rs7115457	AA	19 (20.7%)	18 (14.1%)	0.1280	A	87 (47.3%)	97 (37.9%)	0.0488
	AG	49 (53.3%)	61 (47.7%)		G	97 (52.7%)	159 (62.1%)	
	GG	24 (26.1%)	49 (38.3%)					

*The reference SNP identifiers in dbSNP are listed.

[†]I and D indicate insertion and deletion of CA, respectively.

れる。日本人のみに見られるハプロタイプ H2 は、H4 から派生してきたことが考えられた。

5. ルシフェラーゼアッセイ

MUC5B 遺伝子プロモーター領域に認めた3つの代表的なハプロタイプを用いて行ったルシフェラーゼアッセイの結果を図5に示す。疾患群で有意に低下していた H2 で、最も転写活性が低かった。

6. 免疫染色

気道における主要な分泌型のムチンである MUC5AC と MUC5B について、発現の状態を確認するために免疫染色を行った。

呼吸器病変の無い患者の剖検肺では (表1, Lu-1), MUC5AC は気管支上皮の goblet cell にのみ染色され、粘膜下腺は染色されなかった (図6A)。同様の結果は他の呼吸器病変の無い患者でも得られている (Lu-2)。DPB 患者では (DPB1-2), goblet cell は増加しており、その90%以上が MUC5AC に陽性であった (図6B)。粘膜下腺は陰性であった。同様の結果は他の DPB 患者でも得られた (DPB2-1, DPB3-2, DPB4-1, DPB4-2)。表1中の残りの DPB の検体は末梢肺のものである。

呼吸器病変の無い患者肺で MUC5B の免疫染色を行った所 (Lu-1), 粘膜下腺が染色され、上皮の goblet

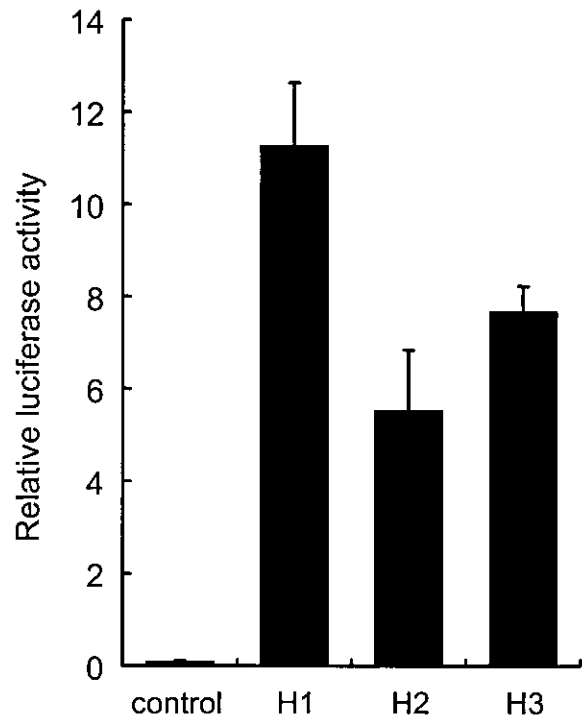


図5 MUC5B 遺伝子のプロモーター活性を検討するため、3つの代表的なハプロタイプを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。コントロールとして、プロモーターの配列を挿入していない pGL3-Basic Vector を用いた。H1 で転写活性が最も高く (p<0.0001), H2 の転写活性は3つのハプロタイプの中で最も低かった (p<0.01)。