

緒 言

Nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) は 1994 年, Katzenstein と Fiorelli¹⁾ によって提唱された臨床病理学的概念である。病理学的には時間的空間的にはほぼ一様な病変分布を呈することを特徴として, Usual interstitial pneumonia (UIP) とは異なった病理像をとる。また臨床的には一般にステロイド製剤等への治療反応性は良く, 予後良好とされている^{2,4)}。これらの結果は原因不明の間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia: IIP) においては比較的多くの報告で裏付けられているものの, 膠原病関連間質性肺炎 (interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases: IP-CVD) においてはその臨床像や予後を詳細に検討した報告は極めて少ない。

膠原病は多臓器にわたって障害をきたすが, その中でも肺は比較的高頻度に侵される臓器であり, 予後を規定することも多い。膠原病に関連する肺病変については様々な組織型をとるとされているが, 膠原病関連間質性肺炎症例も含めその詳細を言及した報告は極めて少ない。NSIP の報告前ではあるが, Yousem ら⁵⁾ や Tazelaar ら⁶⁾ は慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) および多発筋炎/皮膚筋炎 (polymyositis/dermatomyositis: PM/DM) における外科的肺生検の有用性を指摘している。また最近 Bouros ら⁷⁾ は全身性硬化症 (progressive systemic sclerosis: PSS) における間質性肺炎では NSIP の頻度が高く, 予後については組織型よりもむしろ病状の進行の程度により依存することを報告している。このように IP-CVD における NSIP の頻度や予後は未だ明らかではない。今回我々は, 外科的肺生検を施行し得た 67 例の膠原病患者を, 間質性肺炎の組織型別で分類し, NSIP を中心に臨床像および予後を IIP との比較も交え検討した。

対象と方法

対象は 1980 年より 1999 年の間に当院および関連病院で開胸または胸腔鏡下肺生検を施行し, 予後の判定が可能であった膠原病に伴う肺病変症例 67 例中, 気道病変等を除き最終的に間質性肺炎の分類基準に合致した 43 例である。患者の内訳は RA 14 例, sjögren syndrome (Sjs) 7 例, PM/DM 12 例, PSS 7 例, systemic lupus erythematosus (SLE) 2 例, mixed connective tissue disease (MCTD) 1 例で, これらの患者において, 外科的肺生検の組織型別の臨床所見および予後を比較検討した。さらに IIP 117 例との比較も同様に行った。尚, 今回の検討では観察開始日は生検施行日とし, 病理組織分類は Katzenstein らの分類に従った⁸⁾。

統計的手法

2 群間の背景因子の比較には, student t 検定及び χ^2 検定を用いた。また, 生存率の計算は Kaplan-Meier 法を用い, log-rank 検定を行った。さらに年齢, 性差, 喫煙歴を補正する目的で cox proportional hazards regression モデルによる解析も行った。

結 果

1. 病理組織診断

IP-CVD の対象症例の組織診断は 26 人 (60%) が NSIP, 17 例 (40%) が UIP で, bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) の診断例は認められなかった (Table 1)。一方 IIP においては 76 例 (65%) が UIP, 22 例 (19%) が NSIP, 13 例 (11%) が BOOP, そして 6 例 (5%) が desquamative interstitial pneumonia / respiratory bronchiolitis associated with interstitial lung disease (DIP/RB-ILD) であった。

Table 1 Pathological diagnosis of IP-CVD or IIP

	Overall	IP-CVD						IIP
		RA	PM/DM	Sjs	PSS	SLE	MCTD	
UIP	17	5	2	5	4	1	0	76
NSIP	26	9	10	2	3	1	1	22

2. 患者背景および臨床検査所見

臨床所見のまとめを Table 2 に示す。IP-CVD においては UIP 群 (UIP-CVD) は NSIP 群 (NSIP-CVD) に比し有意に高齢であったが, その他の項目に相違はみられなかった。また 70% 以上の症例でステ

浜松医科大学第二内科

* びまん性肺疾患研究班 研究協力者

ロイド製剤による治療が為されていた。IIP においては NSIP 群 (NSIP-IIP) では UIP 群 (UIP-IIP) に比し有意に若年で女性が多く、UIP-IIP は喫煙者が多く、ステロイドの投与例が少なかった。ついで初診時の検査成績を Table 3 に示す。IP-CVD では NSIP-CVD と UIP-CVD の間に何れの項目においても差はみられなかったが、IIP においては、NSIP-IIP は UIP-IIP に比し有意に LDH が高値、FVC においては有意に低値を示していた。

気管支肺胞洗浄液検査所見では、IP-CVD では総細胞数に差はみられなかったものの、洗浄液中のリンパ球分画が NSIP-CVD において UIP-CVD に比し有意に高値を示し、マクロファージ分画は低値を示した。また CD4/8 比は UIP-CVD で NSIP-CVD に比し有意に高値を示した。IIP では NSIP-IIP は IP-CVD 同様、UIP-IIP に比し有意にリンパ球分画が上昇している一方、マクロファージ分画は低下していた。また総細胞数は UIP-IIP において NSIP-IIP に比し有意に増加していた (Table 4)。

Table 2 Clinical characteristics of patients with IIP or IP-CVD

	IP-CVD		IIP	
	UIP	NSIP	UIP	NSIP
Number of patients	17	26	76	22
Sex				
male/female	7/10	12/14	62/14**	11/11 [†]
Age(years)	58.5±8.58	52.7±8.56 [†]	62.2±7.26 [‡]	55.8±9.65 [§]
Smoking				
Smoker (%)	6 (35)	9 (35)	64 (84)**	10 (45) [†]
Symptom				
Dyspnea on effort (%)	7 (41)	13 (50)	31 (40)	18 (82)**
Cough (%)	14 (82)	12 (46)	41 (54)	13 (59)
Sign				
Crackle (%)	16 (94)	18 (69)	74 (97) [†]	21 (95)
Clubbing (%)	2 (12)	4 (15)	29 (38)	7 (32)
Corticosteroid treatment (%)	13 (76)	18 (69)	13 (17)**	12 (54) [†]

*p<0.01 Compared with UIP patients with IP-CVD
[†]p<0.05 Compared with UIP patients with IP-CVD
[‡]p<0.01 Compared with NSIP patients with IP-CVD
[§]p<0.05 Compared with NSIP patients with IP-CVD
^{||}p<0.01 Compared with UIP patients with IIP

Table 3 Laboratory findings and pulmonary function test of IIP or IP-CVD

	IP-CVD		IIP	
	UIP	NSIP	UIP	NSIP
WBC (/mm ³)	6882±2603	7628±2365	6827±1655	7344±3770
CRP (mg/dl)	0.82±1.12	1.34±1.47	0.71±1.54	1.36±1.94
LDH (IU/l)	360±156	398±212	346±122	422±197 [†]
PaO ₂ (Torr)	81.2±10.4	79.3±9.51	82.3±11.5	77.9±12.9
PaCO ₂ (Torr)	41.6±9.59	38.7±3.66	40.0±3.93	39.1±3.41
FVC (%)	81.6±19.4	77.7±20.3	86.1±19.9	67.7±20.4**
FEV1.0 (%)	83.5±9.35	80.4±11.7	82.4±9.58	80.5±13.4

*p<0.05 Compared with UIP patients with IP-CVD
[†]p<0.05 Compared with NSIP patients with IP-CVD
[‡]p<0.05 Compared with UIP patients with IIP

Table 4 Bronchoalveolar lavage fluid cell analysis of patients with IIP or IP-CVD

	IP-CVD		IIP	
	UIP	NSIP	UIP	NSIP
Number of patients	15	23	60	20
Total cell counts (x10 ⁵)	4.04±4.04	3.36±3.04	4.69±3.83	3.18±2.32 [†]
Alveolar Macrophages (%)	87.8±10.4	76.3±21.0*	85.0±17.0	61.0±30.2 [†]
Neutrophils (%)	4.09±9.52	3.56±6.99	2.33±3.84	4.91±9.06
Lymphocytes (%)	6.48±4.99	16.6±18.2 [†]	11.1±16.1	30.8±30.0**
Eosinophils (%)	1.52±1.79	3.10±8.16	1.17±2.20	3.05±5.40
CD4/8 ratio	3.29±2.58	1.44±1.62 [†]	2.37±2.06	1.45±1.66*

*p<0.05 Compared with UIP patients with IP-CVD
[†]p<0.01 Compared with UIP patients with IP-CVD
[‡]p<0.05 Compared with UIP patients with IIP
[§]p<0.01 Compared with UIP patients with IIP

3. 予後

IP-CVD および IIP それぞれにおける、NSIP と UIP の生存曲線を示す (Figure 1, 2)。IP-CVD においては UIP と NSIP の間に差は認めなかった ($p = 0.3863$) (5 年生存率 89% vs. 83%, 10 年生存率 71% vs. 47%)。しかし IIP においては UIP は NSIP に比し有意に予後が不良であった ($p = 0.0215$) (5 年生存率 65% vs. 77%, 10 年生存率 38% vs. 77%)。IP-CVD と IIP の間で同組織型間で生存率を比較すると UIP-CVD は UIP-IIP に比し有意に予後が良好であった ($p = 0.0282$) が、NSIP-CVD と NSIP-IIP の間には差はみられなかった ($p = 0.5528$) (Figure 3, 4)。Cox proportional hazards model においても年齢 [risk ratio 1.385, 95% confidence interval (CI) 0.683 to 2.807, $p = 0.366$], 性別 (risk ratio 0.716, 95% CI 0.346 to 1.485, $p = 0.370$), 喫煙歴 (risk ratio 0.900, 95% CI 0.560 to 1.447, $p = 0.664$) で死亡率に変化はみられなかった。

死因については NSIP-CVD は、呼吸不全およびステロイド製剤の副作用による死亡が 2 例ずつであった。また UIP-CVD は、呼吸不全、ステロイド関連死、PM に合併した咽頭癌、および PSS に合併した腎不全が 1 例ずつであった。一方 NSIP-IIP では 5 人が呼吸不全、1 人が心不全、UIP-IIP では 11 人が呼吸不全、8 人が肺癌、8 人がその他 (脳梗塞、心不全等) であった。

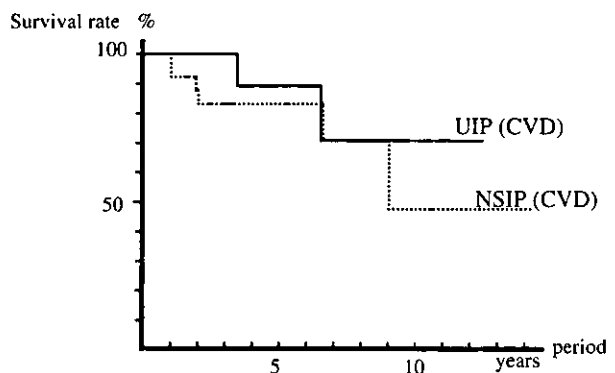


Fig. 1 Comparison of survival between UIP and NSIP patients with interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases (IP-CVD). No significant difference was noted between UIP and NSIP patients with IP-CVD ($p = 0.3863$).

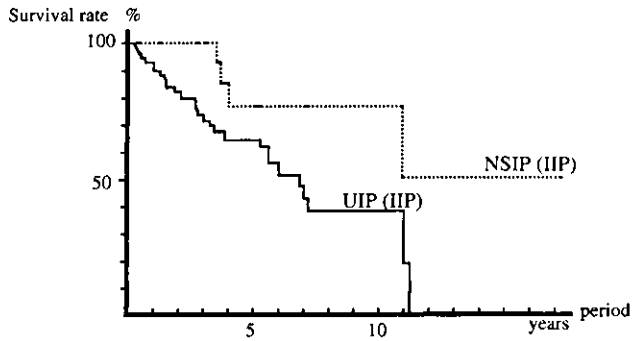


Fig. 2 Comparison of survival between UIP and NSIP patients with idiopathic interstitial pneumonia (IIP). UIP had a significant worse prognosis than NSIP in IIP ($p=0.0215$).

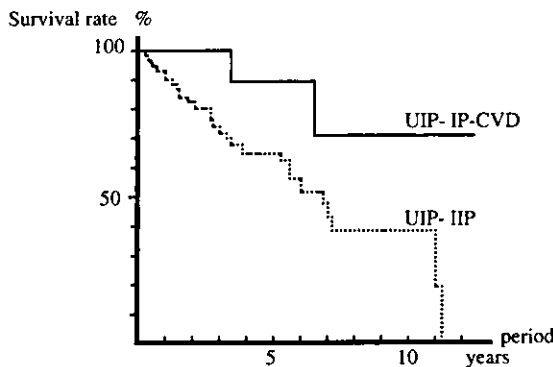


Fig. 3 Comparison of survival between UIP patients with interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases (IP-CVD) and idiopathic interstitial pneumonia (IIP). Survival for UIP patients with IP-CVD was significantly better than that with IIP ($p=0.0282$).

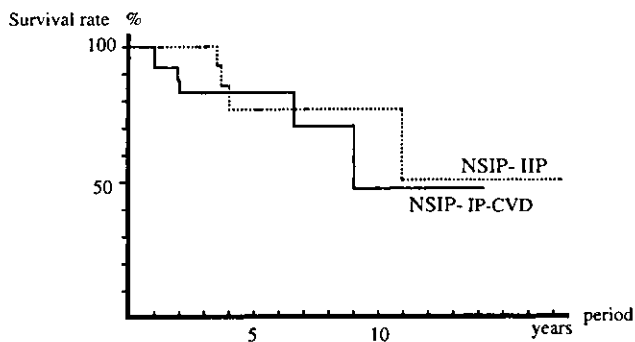


Fig. 4 Comparison of survival between NSIP patients with interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases (IP-CVD) and idiopathic interstitial pneumonia (IIP). There was no significant difference in survival for NSIP patients between IP-CVD and IIP ($p=0.5528$).

考 察

今回我々は外科的肺生検を施行した IP-CVD 患者の組織型別の臨床像および予後を、NSIP を中心に IIP 患者との比較も含め検討した。NSIP は IP-CVD において最も良くみられる組織型であった。予後においては、IIP では従来の報告通り NSIP は

UIP に比し有意に生存率が良好であったが、IP-CVD では両者に差を認めなかった。更に IP-CVD における UIP は IIP における UIP に比し有意に予後良好であった。

IP-CVD においては、以前より様々な組織所見をとることが言われている。しかし間質性肺炎の組織型を言及した報告は少ない。PSS においては最近相次いで 3 報の報告^{7,9,10)}がなされたが、これらのどれもが 50-70% の症例が NSIP を呈していたとしている。さらに PM/DM においても Douglas WW ら¹¹⁾は外科的生検を施行した 22 例中 18 例が NSIP を呈していたと報告した。我々の今回の結果もこれらの結果を支持するものであり、IIP においては多くの症例が UIP (65%) を呈し NSIP (19%) に比し明らかに頻度の高い組織型であったが、IP-CVD においては NSIP が約 60% と UIP を上回る頻度で認められた。しかし、症例数は少ないものの各々の疾患別に検討すると Sjs では UIP が NSIP を上回っており、今後更なる症例の集積を待った上での検討が必要である。

今回の我々の検討における IP-CVD の臨床像については、UIP に比し NSIP で有意に患者の年齢が若く、さらに気管支肺胞洗浄液所見も NSIP で UIP に比し有意にリンパ球分画の上昇がみられた。これらの結果は IIP における結果と一致していた。

しかし組織型別の予後については、IP-CVD と IIP の間に明らかな相違が認められた。IIP においては従来の報告^{2,3,12)}通り、NSIP は UIP に比し有意に予後が良好であったが、IP-CVD では両者に差が認められなかった。また IIP および IP-CVD における NSIP を比較すると、双方に差は認めなかったが、双方の UIP を比較すると IP-CVD における UIP が IIP における UIP に比し有意に予後が良好であった従って IP-CVD における NSIP と UIP の予後に差がみられなかった原因の一つには IIP と IP-CVD における UIP の予後の相違が挙げられる。一般に UIP の組織型を呈する病態は、予後不良を示唆する指標として広く知られているが、今回の検討からはこれらの認識を一考すべき結果となった。また、最近 Bouras ら⁷⁾により、PSS 症例のみにおける検討であるが、NSIP と UIP の間で差はみられなかったとする報告がなされており、IIP との比較は行っていないものの少なくとも IIP における NSIP と

UIP の関係とは異なるという点においては我々の結果と一致している。

最後に治療に関しては、IIP における UIP のステロイド製剤による治療反応性の鈍さは以前より知られており、今回の検討でも UIP-IIP で有意に治療歴が少なかった。また症例によっては各種免疫抑制剤の使用、ステロイド製剤を使用した症例でも使用期間や使用量、製剤の種類等の違いがあり、これらの予後に対する影響は完全には否定できない。これらに関しても今後更に症例の集積が必要である。

以上、膠原病関連間質性肺炎の病理組織型別の臨床像および予後を NSIP を中心に検討した。膠原病関連間質性肺炎においては原因不明の間質性肺炎症例での検討結果とは異なり、臨床における病理組織型分類の意義について今後更に検討して行く必要があると思われた。

謝辞：病理組織診断に多大なご協力を頂いた Mayo Clinic の Thomas V. Colby 博士に深謝致します。

参考文献

- 1) Katzenstein, AL, RF Fiorelli: Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 136-147.
- 2) Bjraker, JA, JH Ryu, MK Edwin, *et al*: Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 199-203.
- 3) Nagai, S, M Kitaichi, H Itoh, *et al*: Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis and BOOP. *Eur Respir J* 1998; 12: 1010-1019.
- 4) 中村祐太郎, 千田金吾, 須田隆文, 他: 原因不明の間質性肺炎および特発性 BOOP 症例における組織学的分類による予後の比較—本邦例での検討—。日呼吸会誌 2000; 38: 442-446.
- 5) Yousem, SA, TV Colby, CB Carrington: Lung biopsy in rheumatoid arthritis. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 770-777.
- 6) Tazelaar, HD, RW Viggiano, J Pickersgill, *et al*: Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis. Clinical features and prognosis as correlated with histologic findings. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 727-733.
- 7) Bouros, D, AU Wells, AG Nicholson, *et al*: Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1581-1586.
- 8) Katzenstein, AL, JL Myers: Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1301-1315.
- 9) Fujita, J, T Yoshinouchi, Y Ohtsuki, *et al*: Nonspecific interstitial pneumonia as pulmonary involvement of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 281-283.
- 10) Kim, DS, B Yoo, JS Lee, *et al*: The major histopathologic pattern of pulmonary fibrosis in scleroderma is nonspecific interstitial pneumonia. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2002; 19: 121-127.
- 11) Douglas, WW, HD Tazelaar, TE Hartman, *et al*: Polymyositis-dermatomyositis-associated interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1182-1185.
- 12) Daniil, ZD, FC Gilchrist, AG Nicholson, *et al*: A histologic pattern of nonspecific interstitial pneumonia is associated with a better prognosis than usual interstitial pneumonia in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 899-905.

Hermansky-Pudlak 症候群 (HPS) の *HPS1* 遺伝子解析

河野 修興* 池上 靖彦 中島 正光 檜山 桂子

Hermansky-Pudlak 症候群 (HPS) は全身性白皮症, 出血傾向, 細胞質内のセロイド様顆粒の蓄積を 3 徴とする常染色体劣性遺伝性疾患で, 成人において肺線維症を高率に発症する。現在のところ, 原因遺伝子の一つとして染色体 10 番長腕の *HPS1* 遺伝子等の異常が報告されている。【目的】HPS の確定診断のために胸腔鏡下肺生検, *HPS1* 遺伝子の解析を行った。【対象と方法】患者胸腔鏡下肺生検組織より mRNA を抽出し, *HPS1* 遺伝子全コード領域をカバーする 7 組のプライマーセットを用いて RT-PCR を行い, 塩基配列を決定した。また, 患者および両親の末梢血 DNA を抽出し, ゲノム解析も行った。【結果】患者 *HPS1* 遺伝子のスプライス供与部位の変異と, それに由来するスプライス異常と考えられる新たな mRNA の配列異常を認め, この異常が本症の発症に関与していると考えられた。

Novel aberrations of *HPS1* mRNA detected in a case of Hermansky-Pudlak syndrome

Nobuoki Kohno, Yasuhiko Ikegami, Masamitsu Nakajima, Keiko Hiyama

Department of Molecular and Internal Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) consists of oculocutaneous albinism, platelet storage-pool deficiency, and ceroid lipofuscinosis. Until now, nucleotide substitutions, deletions, and insertions in the *HPS1* gene have been reported to be responsible for the phenotype of HPS. OBJECTIVE: Molecular diagnosis of HPS. SUBJECTS AND METHODS: A lung tissue sample was taken from an HPS patient for definite diagnosis, under informed consent. RNA was extracted from the lung tissue sample, reverse-transcribed into cDNA, amplified by use of seven primer sets, which cover the entire 2.1-kb coding region of the *HPS1* cDNA, then sequenced. Genomic DNA extracted from the patient and her parents was also analyzed. RESULTS: Novel aberrations of *HPS1* mRNA, possibly due to alternative splicing caused by a mutation at the splice-donor site, were observed in the patient's lung tissue.

はじめに

Hermansky-Pudlak 症候群 (HPS) は 1959 年に Hermansky らによって初めて報告¹⁾された, 全身性白皮症, 出血傾向, 細胞質内のセロイド様顆粒の蓄積を 3 徴とする稀な常染色体劣性遺伝性疾患で, 肺線維症を 60% 程度と, 高率に発症することが本邦で報告されている. 本疾患の原因遺伝子として, 現在まで HPS1²⁾, AP3B1³⁾, HPS3⁴⁾, HPS4⁵⁾ が報告されており, それぞれの原因遺伝子が引き起こしている HPS を, HPS1, HPS2, HPS3, HPS4 と区別する試みもされるようになっていく. このなかで HPS1 がもっとも頻度が高く, 現在までのところ日本人症例では, HPS1 遺伝子の異常が報告^{6,8)}されている.

HPS1 遺伝子は, 第 10 染色体に遺伝子座を持ち, 全長約 30.5 kb, 20 のエクソンより構成されている. HPS1 遺伝子は 700 のアミノ酸からなる膜貫通性蛋白をコードし, 細胞内蛋白輸送に関与していると考えられている⁹⁾.

我が国の症例とプエルトリコの症例は高率に重症の肺線維症を発症し, 40 歳代までに死亡することが多い. 一方で, 同じく HPS1 遺伝子の異常によるスイス症例では肺線維症を合併せず天寿を全うすることが多いといわれている. このように, 肺線維症の発症の差は HPS1 遺伝子の異常部位の違いに関連する可能性が推測される¹⁰⁾.

本研究では当科で経験した症例の肺組織から抽出した mRNA, 末梢血から抽出した DNA で, 上記 HPS1 遺伝子の解析を行い, 現在までに遺伝子解析が行われている日本人症例と比較検討した.

対象と方法

症 例

症 例: 37 歳, 女性.

主 訴: 咳, 労作時の息切れ.

既往歴: 特記事項なし.

家族歴: 近親婚なし.

現病歴: 出生時から, 白皮症, 斜視を認めた. 特

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 分子内科学

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

に, 出血異常の既往はない.

1998 年頃より乾性咳と労作時の息切れを自覚したが, 放置していた. 1999 年 1 月頃, 胸部単純レントゲン写真上, 異常陰影を認め, 肺線維症と診断された.

2000 年 2 月, 手指のこわばり, 膝関節痛が出現するようになり, 他医を受診し, 関節リウマチの診断を受け, ステロイド投与を開始された. その後, 手指の症状改善は認められたが, 息切れ, 咳が徐々に増悪した. このため, 2000 年 6 月, 精査加療のため当科に入院した.

入院時現症: 体温 36℃, 脈拍 70/分, 呼吸数 20 回/分, 血圧 110/70 mmHg.

身体所見: 頭頸部, 髪の毛は栗毛色, 口唇の周囲に橙色の色素沈着を認めた. 両睫毛, 両虹彩に色素低下, 眼底所見で網膜の色素低下と黄斑部の発達不良を認めた. 結膜には黄疸, 貧血は見られず. 表在リンパは触知しなかった. 胸部両側全肺野で fine crackles を聴取し, 心音は整で, 腹部に異常所見を認めなかった. 両手指に腫脹を認めた.

検査所見: 白血球は 15,080/μl と高値を示したが, その他, 末梢血検査に異常は認めなかった. 凝固系では, Ivy 法で 15 分と延長しているが, PT, aPTT に異常を認めなかった. KL-6 は 1050 U/ml と上昇していた. 呼吸機能検査では, vital capacity が 1.22 L (%VC, 36.8%) と低下, 動脈血液ガスは, PaO₂ 71.7 torr であった. 胸部単純レントゲン写真および, 胸部 CT 写真は, 胸膜直下の淡い濃度上昇を認めた.

本症例では, 臨床的に血小板機能異常を認めず. また, リウマチ肺との鑑別が必要であったため, 右 S⁸ 胸腔鏡下肺生検を行った. 生検肺組織は, 胸膜および肺胞隔壁にリンパ球を中心とした, 強い炎症細胞の浸潤, 肺胞腔内には多数のマクロファージをみとめ, UIP 様の像を示していた. 肺胞腔内のマクロファージに, セロイド様顆粒を認め, 臨床所見と合わせて HPS と診断した.

方 法

Hazelwood らの報告¹¹⁾を参考に HPS1 遺伝子全コード領域をカバーする 7 組のプライマーセット (表 1) を作成し, 診断目的で行った. HPS 患者の胸腔鏡下肺生検組織より抽出した mRNA を用いて,

RT-PCR を行った。また、ABI310 シークエンサーを用いて、塩基配列も決定した。さらに、患者および、患者両親の末梢血より抽出した DNA を用いて、ゲノム塩基配列を比較検討した。この DNA の解析に対して、上記とは別に、二つのプライマー（表 1）を設定した。患者および、両親より遺伝子解析の同意を得た。

表 1 プライマーのシーケンス

HP-1	5 -GCTTGCCAAGATGAAGTGCCTC-3 5 -TCGGTGTGGTCACCATTGATG-3
HP-2	5 -GGAGAATGCCTGTTTCATTGC-3 5 -TGGCTAGAGTAGAATGCCAG-3
HP-3	5 -TCCTGCTCGTGCCTCCAACGT-3 5 -GCTTTCCTCCACGTTGGCATC-3
HP-4	5 -ACACCCTCCAAACTGGTTCC-3 5 -TAAACTCCAGCCAGGTGCTCTG-3
HP-5	5 -TTGTCAAGAATCGAGGGGCAC-3 5 -CCAACTCCGACGAGGTCTTTTG-3
HP-6	5 -CGGCTGAACCTTCTGACCACAG-3 5 -ACCCCATGTTCATTCTCGAAC-3
HP-7	5 -GGATTCTACTGCTCTACTTC-3 5 -GAACAGTGGCAAGCAAGGGTG-3
HP-8	5 -ACGGCATCTTATCAAACCCG-3 5 -AAAATGGCAGCTTACAGGG-3

プライマーセット HP-1 から HP-7 は cDNA 解析用であり

HP-8 は DNA 解析用である

結 果

患者肺組織から抽出した患者 RNA の解析で① exon 5 の 3' 側 72 塩基の欠失を homogenous に認めた。② exon 4 の 3' 末端に intron 4 の挿入を heterogenous に認めた。③ exon 5, 297 番目の塩基に C から T への silent mutation を homozygous に認めた。両親の末梢血から抽出した DNA では、この変異を heterozygous に認めた。

また、DNA の intron 5 の 5' 末端から 5 塩基目即ち、intervening sequence (IVS) 5+5 の G から A の変異を、本人で homozygous に、両親で heterozygous に認めた。

考案・結論

2000 年に Margaglione らはフィブリノーゲン欠損症で、フィブリノーゲン遺伝子の IVS 3+5 の G から A への変異がスプライシング異常を招いたと報告¹²⁾している。我々の今回の検討では、患者末梢血における IVS 5+5 の G から A への変異が、患者肺組織から抽出した mRNA レベルでの exon 5 の 3' 側 72 塩基の homogenous な欠失という、スプライス異常を起こしている可能性が示唆された。患者両親の末梢血から抽出した DNA の解析では IVS 5+5 の G から A への変異を heterozygous に認め、これが本症例で、homozygous に認めた同様の変異の原因となったと考えられた。

HPS1 遺伝子解析が行われている過去の日本人報告例は 6 例⁶⁻⁸⁾あり、その報告例の中には、我々が報告した、IVS 5+5 の G から A への変異を、homozygous に認めるものが 1 例、heterozygous に認めるものが 1 例あった。現在までの解析は少数であるため判断は困難であるが、日本人以外で、この変異の報告がないことを考えると、非常に興味深い。この変異と日本人における本症例発症の関連について、症例の積み重ねが必要と考えられた¹³⁾。また、本症でみられる遺伝子異常を究明することによって、同様な肺線維症を認める特発性肺線維症や膠原病関連間質性肺炎の発症機序解明にも、多大な貢献をなすものと考えている。

参考文献

- 1) Hermansky F, Pudlak P. Albinism associated with hemorrhagic diathesis and unusual pigmented reticular cells in the bone marrow: report of two cases with histochemical studies. *Blood* 1959; 14: 162-9.
- 2) Oh J, Bailin T, Fukai K, *et al.* Positional cloning of a gene for Hermansky-Pudlak syndrome, a disorder of cytoplasmic organelles. *Nat Genet* 1996; 14 (3) : 300-6.
- 3) Shotelersuk V, Dell'Angelica EC, Hartnell L, *et al.* A new variant of Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in a gene responsible for vesicle formation. *Am J Med* 2000; 108 (5) : 423-7.

- 4) Anikster Y, Huizing M, White J, *et al.* Mutation of a new gene causes a unique form of Hermansky-Pudlak syndrome in a genetic isolate of central Puerto Rico. *Nat Genet* 2001; 28 (4) : 376-80.
- 5) Suzuki T, Li W, Zhang Q, *et al.* Hermansky-Pudlak syndrome is caused by mutations in HPS4, the human homolog of the mouse light-ear gene. *Nat Genet* 2002; 30 (3) : 321-4.
- 6) Oh J, Ho L, Ala-Mello S, *et al.* Mutation analysis of patients with Hermansky-Pudlak syndrome: A frameshift hot spot in the HPS gene and apparent locus heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1998; 62 (3) : 593-8.
- 7) Horikawa T, Araki K, Fukai K, *et al.* Heterozygous HPS1 mutations in a case of Hermansky-Pudlak syndrome with giant melanosomes. *Br J Dermatol* 2000; 143 (3) : 635-40.
- 8) Mitsui H, Komine M, Watanabe T, *et al.* Does Hermansky-Pudlak syndrome predispose to systemic lupus erythematosus? *Br J Dermatol* 2002; 146 (5) : 908-11.
- 9) Spritz RA. Hermansky-Pudlak syndrome and pale ear: melanosome-making for the millennium. *Pigment Cell Res* 2000; 13 (1) : 15-20.
- 10) 木戸健治, 田村尚亮, 福地義之助: Hermansky-Pudlak 症候群: 責任遺伝子と線維化肺. *現代医療* 2001; 31: 151-4.
- 11) Hazelwood S, Shotelersuk V, Wildenberg SC, *et al.* Evidence for locus heterogeneity in Puerto Ricans with Hermansky-Pudlak syndrome. *Am J Hum Genet* 1997; 61 (5) : 1088-94.
- 12) Margaglione M, Santacroce R, Colaizzo D, *et al.* A G-to-A mutation in IVS-3 of the human gamma fibrinogen gene causing afibrinogenemia due to abnormal RNA splicing. *Blood* 2000; 96 (7) : 2501-5.
- 13) Ikegami Y, Hiyama K, Haruta Y, *et al.* Novel aberrations of HPS1 mRNA detected in a case of Hermansky-Pudlak syndrome with pulmonary fibrosis. (Submitted)

剝離性間質性肺炎の気管支肺胞洗浄液のプロテオーム解析

中田 光^{1*} 寺川 貴裕¹ 濱野 栄美¹ 内田 寛治¹
渡辺 雅人¹ 武村 民子^{2*} 山内 広平³ 別役 智子⁴
西村 正治⁴ 慶長 直人^{1**}

剝離性間質性肺炎 (DIP) は肺胞腔内の肺胞マクロファージが異常増殖し, II 型上皮の過形成で起こるとともに乾湿の肥厚・線維化が進行する稀な疾患である。DIP では, 早期から肺底部において肺胞虚脱を示唆するベルクロラ音が聴取される。我々は, この原因が肺胞を覆っているサーファクタント成分の変性にあるのではないかと考え, 患者気管支肺胞洗浄液と健常気管支肺胞洗浄液のプロテオーム解析を試みた。その結果, DIP では, α 1 アンチトリプシン, α 1 アンチキモトリプシン, イムノグロブリン, MMP-12, 変性アルブミンなどが増加していた反面, 健常者に見られる house keeping 蛋白である SP-A, D, haptoglobin, apolipoprotein A1 など肺ホメオスタシスを保つのに重要な蛋白が減少していた。DIP におけるサーファクタント成分の異常は, 病態形成に深く関わっている可能性がある。

Proteomic Analysis of Proteins in Broncho Alveolar Lavage Fluid from Patients with Desquamative Interstitial Pneumonia

K Nakata, T Terakawa, T Takemura, K Yamauchi,
K Uchida, E Hamano, M Watanabe, and N Keicho

Department of Respiratory Diseases, Research Institute, The Internatinal Medical Center of Japan

Desquamative interstitial pneumonia (DIP) is a rare lung disease characterized by abnormal increase of alveolar macrophages in the alveoli and terminal bronchiole followed by hypertrophy of alveolar type II cells and interstitial fibrosis. The cause for the abnormal increase of AM is not clear, but it may alter alveolar microenvironment drastically, because AM catabolize surfactant proteins and lipids *in vivo*. To elucidate this, we performed a differential 2D-electrophoresis of proteins in broncho alveolar lavage fluid from the patients and normal volunteers using 2D-DIGE system. Semiquantitative change of each protein spot was analysed by a computer. We found that α 1-antitrypsin, α 1-antichymotrypsin, immunoglobulin, MMP-12, and denatured albumin were increased in DIP, whereas various house keeping proteins, such as surfactant protein A, -D, haptoglobin, transferrin, lipoapoprotein A1 were decreased. Thus, drastic change of protein component may proceed in alveolar microenvironmet in patients with DIP.

はじめに

DIP 患者の多くは中年以降の喫煙者であり、発病率は、10万人に5人程度と言われている。その臨床経過は慢性で、5年生存率が73%、平均余命は12年である。DIPは肺胞および終末気管支に、肺胞マクロファージが異常に増加し、肺胞II型上皮の増生、間質の線維化が進行する。炎症が進むと肺胞間質が肥厚し、肺胞の形も不整となり、肺胞のコンプライアンスが低下する。その結果、肺活量が落ちると同時に、毛細血管への酸素透過性が低下する。さらに進行すると、肺胞は線維性成分の固まりとなり、この部分での肺としての機能が失われる。比較的病状早期から吸気時に聴診上Velcroラ音が聴かれるが、これは虚脱した肺胞に空気が入る音である。この肺胞虚脱の原因として、肺胞を覆っているサーファクタントの表面張力の低下が予想されるが、これはサーファクタントの質的量的変化に原因があるのかもしれない。またDIPにおける肺胞マクロファージの異常な増加の原因は明らかになっていないが、病理学的には大型の成熟した肺胞マクロファージが肺胞腔内に集塊となって観察される。このように、DIP BALFタンパク質組成は、健常者のBALFタンパク質組成とプロテオーム解析により比較した場合、十分な差が見られることが予想された。

目 的

- 気管支肺胞洗浄液の蛋白組成がDIP肺と健常肺でどのように異なるかを知る。
- 現在用いられているプロテオーム解析技術を用いて上記の目的がどこまで達成できるかを知る。
- 気管支肺胞洗浄液から得られる情報をDIPの病態解明に役立てる。

健常者BALFとDIP患者BALFの2D-DIGEによる比較

2001年にアマシャムバイオサイエンスにより開発された2D-DIGEシステムは、異なる吸収波長を持つ複数の蛍光色素を用いて、比較したい複数のタンパク質を標識し、同一ゲル上で2次元電気泳動展開する技術で、異なる検体間での同一タンパク質のスポット位置のずれはなく、また、異なる励起波長によって励起した別々の蛍光を測定することにより検体間の同一タンパク質スポットの量的な差を検出することができるため、別々のゲルで泳動していたこれまでの解析に比べ、より精度の高いディファレンシャルディスプレイ解析が可能である。本項では、この技術を健常者BALFとDIP患者BALFのタンパク質組成の相違を検出するために用いることを試みた。

材料と方法

材料

27名の健常者ボランティアのBALF、7例のDIP患者BALF、および7例の健常喫煙者BALFを採取後速やかに -80°C に保存されていたものを試料とした。使用時には 4°C で静置して解凍した。前述したように健常者BALFには個体差が見られたので、患者BALFと比較するためには、健常者BALFを規格化する必要がある。そこで、健常者27名のBALFを等量プールし混合したものを芳醇健常者BALFとした。

泳動タンパク質標識

2D-DIGEはあらかじめ泳動するタンパク質試料を蛍光色素Cy2, Cy3, Cy5(アマシャムバイオサイエンス販売)によって標識しておく。このため、泳動した後に染色する必要はなく、専用の画像取り込み装置Master Imager(アマシャムバイオサイエンス, 試作品)によって蛍光色素を励起させ、励起光をCCDカメラで検出して泳動像を可視化した。今回使用した蛍光色素について以下に概略を示した。

2D-DIGEのための1次元目等電点電気泳動

1次元目の等電点電気泳動装置は、IPG Phor(アマシャムバイオサイエンス)を用いた、IPG ストリップは泳動等電点範囲3-10NL(Non Linear) 24cm 1次元ストリップ(アマシャムバイオサイエンス)を使用

¹ 国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部

² 日赤医療センター 病理部

³ 岩手医科大学 第三内科

⁴ 北海道大学 第一内科

* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

** びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

した。

泳動試料は 3.1.2 の方法により処理したタンパク質 50 μg が含まれるよう調整したタンパク質溶液に対して 500 pmol の Cy 色素をよく混合し、氷上で 30 min 静置して標識した。その後比較対象となる異なる Cy Dye で標識済みのもう一方のタンパク質と混合した後、2 倍濃度の泳動バッファーを標識タンパク質溶液と等量体積加え、さらに終容量 450 μl になるように 1 倍泳動バッファーを加えて 1 次元目泳動試料液とした。この試料液を 1 次元目泳動セルに均等に添加し、泳動等電点範囲が 3-10 NL の 24 cm 1 次元ストリップを 12 時間膨潤させた。1 次元目終了後のゲルは平衡化せず、なるべく光に当てないようにして速やかに 2 次元目電気泳動に供した。

5.2.1.4 2D-DIGE のための 2 次元等電点電気泳動

Cy 色素によって標識した試料は 1 次元目電気泳動終了後、ただちに 2 次元目電気泳動を行った。24 cm の 1 次元目 IPG ストリップの 2 次元目 SDS-PAGE の場合は、2 次元目の電気泳動ゲルは、21 cm \times 27 cm の EttanDALT (アマシャムバイオサイエンス) を用いて自作した。アクリルアミドゲルゲル硬度は 12.5% に統一した。ゲル作製に用いたアクリルアミド、ビスアクリルアミド、TEMED、APS はアマシャムバイオサイエンスのものを使用した。SDS-PAGE バッファー調製に使用した、SDS、グリシン、Tris は生化学用ないしは特級の和光純薬製を使用した。泳動槽は専用の EttanDALTsix (アマシャムバイオサイエンス) を用いて、2 W 一定の印加条件で 17 時間泳動した。泳動中

は、泳動槽底部にある熱交換器と泳動槽内攪拌ポンプによって泳動槽内の泳動バッファー温度を一定温度に保った。

健常非喫煙者標準 BALF と DIP 患者 BALF の 2D-DIGE 法による比較

27 例のプールした健常非喫煙者 BALF と 5 例の個別の DIP 患者 BALF の 2D-DIGE 法によるディファレンシャル 2 次元電気泳動の結果を参考データとして以下に示した (図 1)。

健常非喫煙者 BALF 27 例を等量 1 ml ずつプールして規格化した BALF および 5 例の DIP 患者 BALF よりタンパク質を抽出し、その 50 μg を pI 範囲 3-10 non linear で 1 次元目の泳動を行った。2 次元目の PAGE 終了後、MasterImager (アマシャムバイオサイエンス：試作品) により CCD カメラによって蛍光を撮影し可視化した。取り込んだ画像は画像解析ソフト PD-Quest によってディファレンシャルディスプレイのため重ね合わせた。泳動スポットの色は、健常非喫煙者 BALF は緑色、DIP 患者 BALF は赤色に処理した。このため、両者で共通のスポットは黄色に表示される。

A~E までの泳動を相互に観察すると、健常者を規格化して統一した場合でも、5 例の泳動像にはある程度のばらつきが散見された。DIP 患者の A, B, D, E ではイムノグロブリン H 鎖, L 鎖の双方が患者側で強く発現していた。予想どおり、アルブミンがゲルの中央付近で目立ったスポットとなっていた。DIP 患者 C のアルブミンのスポットが他の泳動像のアルブミンの

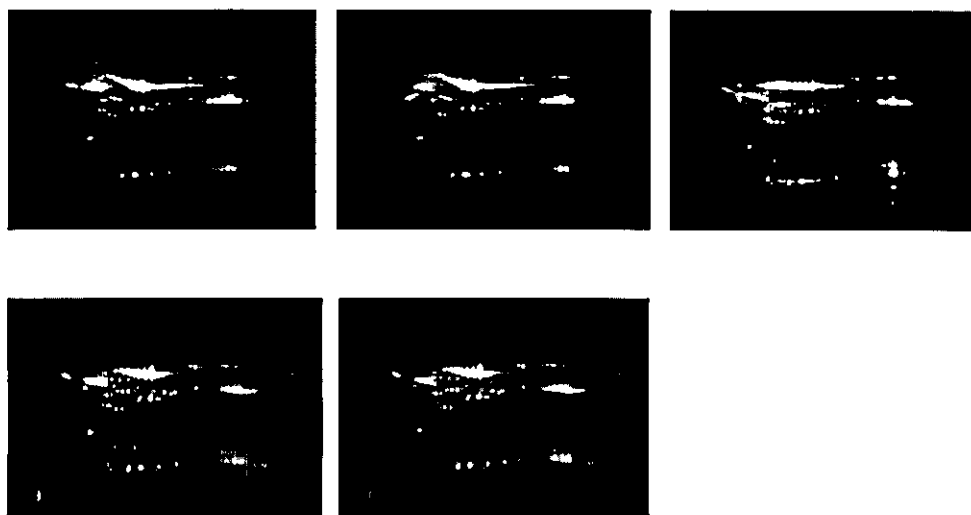


図 1 健常規格化 BALF と 5 例の疾患 BALF の 2D-DIGE によるディファレンシャルディスプレイ解析

スポットと比較するとその形が平坦になっていたことから、他のアルブミンと等電点が異なっていることが考えられた。また、DIP 患者 A, B, D では α 1-アンチトリプシン、 α 1-アンチキモトリプシンが患者で強く発現していた。また、全般的に銀染色と比較して、酸性側のスポット検出が悪いように思われた。その理由としては、Cy 色素がリジン残基に結合して蛍光標識されるため、酸性側とアルカリ側で蛍光強度が異なることが考えられた。

プールした健常非喫煙者 BALF と規格化した 5 例の DIP 患者 BALF の 2D-DIGE による比較

前項で健常非喫煙者と 5 例の個別の DIP 患者 BALF を泳動して比較したが、DIP 患者の間でもばらつきがあったことから、DIP も 5 例の BALF をまとめてプールすることで規格化をはかり、DIP 患者 BALF 総体としての健常非喫煙者 BALF との違いを明らかにすることを考えた。規格化した健常非喫煙者 BALF タンパク質と同様に 5 例の DIP 患者 BALF をタンパク質量として等量プールして規格化し、健常者規格化 BALF 50 μ g を Cy3 で、DIP 患者規格化 BALF 50 μ g を Cy5 色素によって標識し、2D-DIGE によるディファレンシャルディスプレイ解析を行った。

プールした健常非喫煙者 BALF、プール健常喫煙者 BALF とプール DIP 患者 BALF の 2D-DIGE による相互比較

DIP が喫煙者による疾患であることから、前述した健常非喫煙者 BALF と DIP BALF の間のタンパク質組成の相違は、疾病によるものではなく、喫煙によるものである可能性がある。このことを検証するため、健常非喫煙者、健常喫煙者、DIP 患者相互の 2D-DIGE 法によるディファレンシャルディスプレイ解析を行った。

DIP 患者は喫煙者であるため、5.3.2 の 2D-DIGE の結果を考える上で、喫煙による変化と病気による変化が区別できないという問題を解決するため、健常喫煙者と健常非喫煙者の BALF 2次元電気泳動像をディファレンシャルディスプレイによって表示した結果、健常喫煙者は、炎症性タンパク質である α 1-アンチトリプシンと肺サーファクタントプロテイン A が健常非喫煙者と比較して、強く発現していた。また、DIP BALF と健常喫煙者 BALF を比較した場合でも、健常喫煙者において肺サーファクタントプロテイン A の増加が見られた。逆に、DIP 患者において α 1-アンチキモトリプシン、イムノグロブリン H 鎖、L 鎖が健常喫煙者よりも増加していた。

以上のことから、DIP 患者 BALF における肺サー

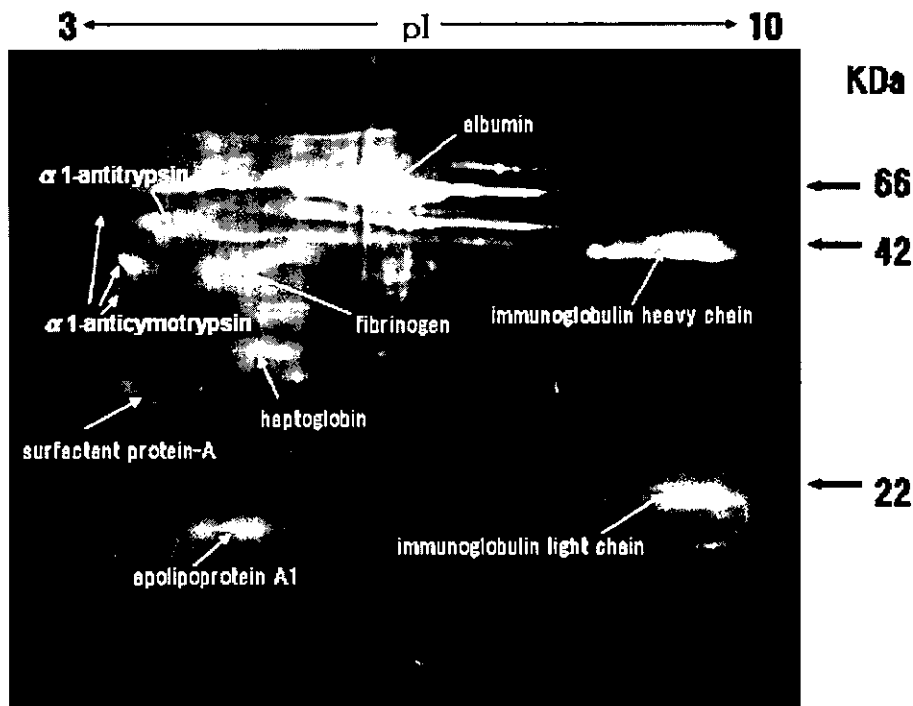


図2 2D-DIGE による規格化した健常者と DIP 患者 BALF のディファレンシャルディスプレイ解析結果

ファクタントプロテイン-A の減少, α 1-アンチトリプシン, α 1-アンチキモトリプシンの増加, イムノグロブリン H 鎖, L 鎖の増加は疾病による変化であると考えられた。以下に結果をまとめた。

DIP BALF と健常喫煙者 BALF を比較して DIP BALF で増加していたタンパク質

健常喫煙者 BALF で増加していたタンパク質

α 1-antichymotrypsin

Pulmonary surfactant protein A

Immunoglobulin heavy chain γ

Immunoglobulin light chain κ , I

健常非喫煙者 BALF と健常喫煙者 BALF を比較して

健常非喫煙者 BALF で増加していたタンパク質

健常喫煙者 BALF で増加していたタンパク質

α 1-antichymotrypsin

α 1-antitrypsin

Immunoglobulin heavy chain γ

Pulmonary surfactant protein A

Immunoglobulin light chain κ , I

アルブミン, およびグロブリンを除去したプール健常非喫煙者 BALF とプール DIP 患者 BALF の 2D-DIGE による相互比較

これまでの解析結果から, アルブミンは健常喫煙者, 健常非喫煙者, DIP 患者のそれぞれの BALF においても主要な成分として存在し, 大きな違いのないことがわかった。また, イムノグロブリンに関しては, DIP 患者 BALF において増加している様子が観察された。これらの泳動像を見ても明らかのように, BALF の 2次元電気泳動像で pI 5.5-6.0, M.W. 66 kDa 付近にアルブミンが多量に含まれており, また, イムノグロブリン H 鎖と L 鎖がそれに次いで多い。2次元電気泳動による BALF タンパク質分離には, これら 2つのタンパク質によって, 等電点, 分子量に近いその他のタンパク質の検出が困難となっている問題がある。特に pI 6-7 付近のタンパク質スポットはアルブミンおよびグロブリンのフラグメントの夾雑によって解析が困難であった。この問題を解決するため, アルブミンとイムノグロブリンの除去を行い, 微量に含まれているがまだ検出できていないタンパク質の検出を目的としたディファレンシャル 2次元電気泳動展開を

行った。除去にはヒトアルブミンおよびイムノグロブリンのモノクローナル抗体結合カラム (アマシャム バイオサイエンス) を用いた。この処理後に泳動して切り出した 2次元スポットを番号化し, 前述したように LC-MS による同定作業を行った。

材料と方法

前項で処理した健常非喫煙者および DIP 患者 BALF 試料を, アルブミン IgG 除去キット (アマシャム バイオサイエンス) のヒトモノクローナルカラムに通し, アルブミンと IgG を除去したのち, -20°C 冷アセトンで沈澱させ, アルブミン, IgG 除去試料とした。この試料を $50\ \mu\text{g}$ Cy 色素でラベルして, 2D-DIGE 法による泳動を行った。

アルブミン, グロブリン除去した試料による 2D-DIGE 結果

図に示したように, アルブミンとイムノグロブリン H 鎖, L 鎖に特徴的なスポットがほぼ除かれ, これまで検出できなかった微量なタンパク質スポットを新たに検出することが可能となり, これによって同定できるタンパク質が増えるものと期待された。

タンパク質同定のためのスポットの切り出しとゲル消化, マススペクトルによる同定

これまでインターネット上に公開されているデータベースによって視認できる同定を試みていたが, LC-MS を使用できる環境が整ったので, LC-MS によるペプチドシーケンス解読とデータベースサーチによるスポットの同定を試みた。

材料と方法

スポット同定のために 2D-DIGE ゲルと同じ条件でスポットピックゲルを泳動した。アルブミンと IgG を除去した健常 BALF および DIP 患者 BALF を等量混合したのち, 1, 2次元電気泳動した。泳動後 SYPRO Ruby stain (BioRad) によってゲルを染色したのち, MasterImager (アマシャム バイオサイエンス) によって泳動画像を得たのち, 画像解析ソフトウェア BVA, DIA (アマシャム バイオサイエンス) によって解析を行い, 同定対象とするスポットを選択した。対

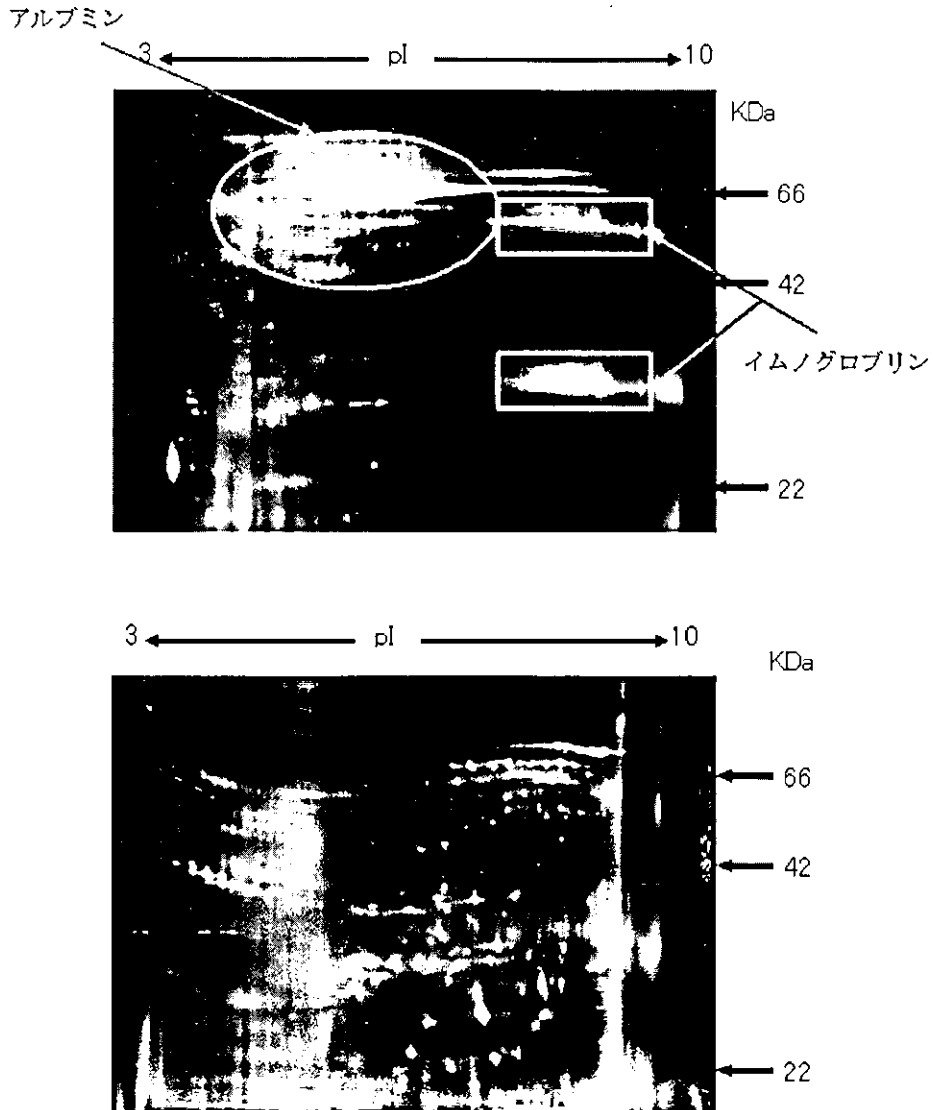


図3 アルブミンとIgGを除去する前と後の2次元電気泳動像の比較
 上: アルブミン, IgG 除去前の2D-DIGE 泳動像
 下: アルブミン, IgG 除去後の2D-DIGE 泳動像

象となったスポットはゲルピッカー (アマシャムバイオサイエンス) による自動切り出しによって直径2 mmのゲルディスクとして96ウェルのV字型プレートに1個ずつ回収した。得られたゲルは脱色, 脱水, トリプシンによるタンパク質消化を行ったのち, LC-MSによるマスペクトルの測定を行った。使用したLCはMAGIC2002 (AMR社) とMSはThermoFinnigan LCQ-DecaXpの組み合わせであった。得られた測定結果は, Mascot (MatrixScience) によるデータベースサーチを行い, それぞれのスポットのタンパク質をスコアリングして予測した (図4)。

1. LDL related protein; alpha-2-macrog-

lobulin.

2. fibrillin3 or ATP-binding cassetteA5.

3. hemopexin precursor.

4. Human serum albumin in A complex with myristic acid and tri-iodobenzoic acid

5. serum albumin.

6. serum albumin.

7. transferrin [Homo sapiens]

8. transferrin.

9. transferrin.

10. transferrin.

11. PRO1400 [Homo sapiens] (transferrin)

12. transferrin.

13. transferrin.
14. transferrin.
15. transferrin.
16. transferrin.
17. laminin alpha 3 subunit isoform 1
18. Chain A. Crystallographic Analysis of The Human Vitamin D Binding Protein
19. Vitamin D-binding protein precursor (DBP) (Group-specific component) (GC-globulin) (VDB)
20. N.D
21. Chain A. Human Serum Transferrin. Recombinant N-Terminal Lobe. Apo Form
22. ① unnamed protein product [Homo sapiens]
 ② microtubule-associated protein 1B isoform 1
 ③ VAV-3 protein beta isoform [Homo sapiens]
23. serum albumin
24. serum albumin
25. transferrin
26. N.D
27. transferrin
28. Human serum asbumin in A complex with myristic acid and tri-iodobenzoic acid
29. LDL related protein ; alpha-macroglobulin
30. transferrin
31. transferrin [Homo sapiens]
32. meraloproteinase 12
33. serum albumin
34. transferrin
35. transferrin
36. transferrin
37. complement component 3 precursor ; acylation-stimulating protein cleavage product [Homo sapiens]
38. complement component 3 precursor ; acylation-stimulating protein cleavage product [Homo sapiens]
39. Haptoglobin-1 precursor
40. Haptoglobin-1 precursor
41. Haptoglobin-1 precursor
42. Haptoglobin-1 precursor
43. PRO1400 [Homo sapiens] (transferrin [Homo sapiens])
44. complement component 3 precursor
45. cyclin-dependent kinase-like 5. serine/threonine kinase 9
46. Chain A. Annexin V
47. Vitamin-D binding protein precursor
48. myosin IXA or Fibrillin 1
49. transferrin
50. transferrin
51. transferrin
52. immunoglobulin lambda light chain VLJ
53. N.D.
54. polymerase (DNA directed)
55. macrophin 1 isoform 2
56. LDL related protein ; alpha-2-macroglobulin
57. Vitamin-D binding protein precursor
58. Human serum albumin in A complex with myristic acid and tri-iodobenzoic acid
59. Human serum ablumin in A complex with myrisric acid and tri-iodobenzoic acid
60. Human serum albumin in A complex with myristic acid and tri-iodobenzoic acid
61. Tenascin N precursor
62. serum albumin precursor
63. haptoglobin alpha 1s
64. haptoglobin
65. complement component 3 precursor
66. haproglobin-1 precursor
67. haproglobin-1 precursor

このピックゲルの解析結果をアルブミン、グロブリン除去後の中性付近のタンパク質スポットの 2D-DIGE による解析結果と重ね合わせて同定した結果を図 3 に示した。緑色は健常者優位のスポット、赤色は DIP 患者に優位のスポット、黄色は両者共通に現れたスポットである。下表にこれらのスポットのタンパク質同定結果をまとめ、そのプロファイルを示した。

健常者 BALF で優位であったタンパク質スポット

3. hemopexin precursor

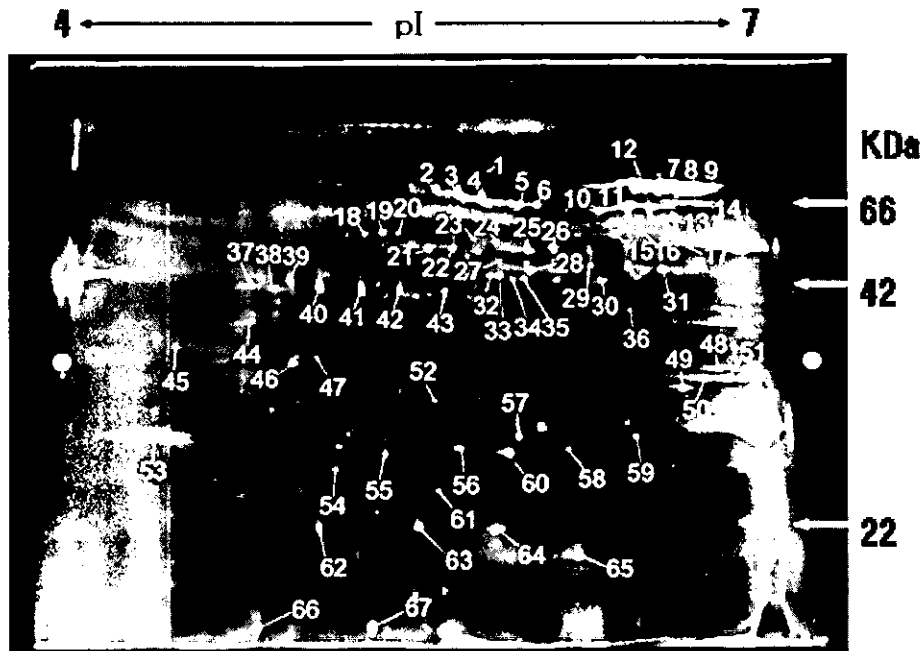


図4 タンパク質同定のためのピックゲル画像

- 8. transferrin
- 10. transferrin
- 15. transferrin
- 25. transferrin
- 34. transferrin
- 63. haptoglobin alpha 1s
- 64. haptoglobin
- 65. complement component 3 precursor

DIP 患者で優位であったタンパク質スポット

- 28. serum albumin
- 29. LDL related protein ; alpha-2-macroglobulin
- 32. metalproteinase-12
- 52. immunoglobulin lambda light chain VLJ
- 56. LDL related protein ; alpha-2-macroglobulin
- 58. Human serum in A complex with myristic acid and tri-iodobenzoic acid
- 59. Human serum in A complex with myristic acid and tri-iodobenzoic acid

両者に共通のタンパク質スポット

- 57. Vitamin-D binding protein precursor
- 60. Human serum in A complex with myristic acid and tri-iodobenzoic acid

健常者 BALF で増加していたタンパク質のうち、トランスフェリンの鉄の貯蔵、運搬に關与する分子量 80,000 の鉄結合性糖タンパク質である。ヘモペキシンはヘム結合タンパク質であり、体内でヘムの運搬を担う。また、後述するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の構成成分である。MMP の基本的な一次構造は、シグナルペプチド、プロドメイン、触媒ドメイン、ヒンジ、ヘモペキシンドメインからなる。ハプトグロビンは肝臓から血液中に分泌される糖タンパク質で、遊離状態のヘモグロビンと特異的に結合する。溶血で減少し、炎症性疾患で血中に増加する。complement component 3 precursor (C3) は、分子量 19 万で 2 本のポリペプチド鎖からなる糖タンパク質である。血中補体成分の中では最も高濃度に存在する。主として肝臓で産生されるほか、単球やマクロファージにおいても産生される。C3 は膠原病や自己免疫疾患、腎疾患など補体系、免疫系がその病態に關与すると考えられる疾患の診断や治療効果、経過の觀察などを目的として測定する。また、疾患に優位であったタンパク質のうち LDL α 2-マクログロブリンは血中に最も多量に存在しているプロテアーゼインヒビターである。特に注目すべきは、マトリックスメタロプロテアーゼ 12 (MMP-12) が検出されたことである。MMP-12 の過剰産生は、肺気腫や肺線維症において報告されている。肺胞構造の破壊や、線維化過程での MMP-12 は、

主としてマクロファージから分泌され、肺と破壊と、修復への関与が示唆されている。MMP-12 は 1981 年に炎症性マクロファージにより分泌されるエラスチン分解性金属プロテアーゼとして精製された (Banda ら, 1981)。MMP-12 は活性中心に亜鉛イオンを含み、マクロファージメタプロテアーゼとして知られており、53 kDa のプロエンザイムが分解を受けて約 22 kDa の活性型酵素となる。この酵素は、肺の組織構築、および生理機能に重要な役割を演じているエラスチンを特異的に分解する。MMP-12 は I 型コラーゲンに対しては全く活性がないが、ファイブロンネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、IV 型コラーゲン、ヘパリン硫酸などに対する分解活性を示す (Chandler ら, 1996)。このことから、MMP-12 は炎症時に基底膜を破壊し、炎症巣へのマクロファージや白血球の遊走を容易にすると考えられている。イムノグロブリン L 鎖には κ (カップ) 鎖と λ (ラムダ) 鎖の 2 種類があり、それぞれの H 鎖とはいずれも結合するが、イムノグロブリン 1 分子を構成する 2 本の L 鎖は、 κ 、 λ のいずれか一方のみに決まっている。アルブミンは肝臓で合成され、分子量 66,000、586 個のアミノ酸からなるペプチド鎖で、糖鎖をもたない均一な単純タンパク質である。生体でのアルブミンは、血漿膠質浸透圧力の保持や、各種物質の運搬に関与している。アルブミンと結合する主な物質は、脂肪酸、二価遷移金属イオンである、銅、カルシウム、マンガン、亜鉛、水銀、鉛などの金属やホルモン、アミノ酸である。今回同定されたアルブミンのうち、58, 59 のミリスチン酸結合ヒト血清アルブミンは、脂肪酸であるミリスチン酸と結合するタイプのアルブミンであり、前処理に用いたアフィニティカラムによって除去されなかったアルブミン誘導体である。共通に検出されたタンパク質であるビタミン D 結合タンパク質は、ビタミン D と特異的に結合して体内でビタミン D を輸送する役割を持ち、アルブミンと α フェトプロテインに相同性が高い。このタンパク質は肺胞内での免疫に関係しているという報告がある (Sandford ら, 2001)。

まとめ

アルブミンを除去した 2D-DIGE 法による解析によって、健常者と患者の相違解析の精度が向上し、違いのあるスポット同定が可能となり、67 のスポットを同定した。その中で、DIP 患者 BALF で増加している

タンパク質の中で代表的なものは、 α 1-アンチトリプシン、 α 1-アンチキモトリプシンなどの炎症性タンパク質であり、逆に DIP 患者 BALF で減少しているタンパク質には、サーファクタントプロテイン A、D があつた。これらが直接病因病態に関連しているかどうかはこの解析結果のみでは断定することはできないが、このような違いが BALF を 2 次元電気泳動することにより検出できたことで、呼吸器疾患領域に新たな解析方法を提示できたと考える。この方法の信頼性を高めるためには、従来の生化学的な解析法と結果が矛盾しないことが必要であるので、今後は BALF の生化学的解析を行い、今回の結果と相互比較して信頼性の検証を試みることを考えられた。

参考文献

- Alba F.J. and Daban J.R. (1998) Rapid fluorescent monitoring of total protein patterns on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and western bolts before immunodetection and sequencing. *Electrophoresis*, 19: 2407-2411.
- Banda M.J. and Werb Z. (1981) Mouse macrophage elastase. Purification and characterization as a metalloproteinase. *Biochem. J.*, 193: 589-605.
- Bartlett G.R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 234: 466-468.
- Bernhard W., Gebert A., Vieten G., Rau G.A., Hohlfeld J.M., Postle A.D. and Freihorst J. (2001) Pulmonary surfactant in birds: coping with surface tension in a tubular lung. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 129: R327-R337.
- Bjellqvist B., Ek K., Righetti P.G., Gianazza E., Gorg A., Westermeier R. and Postel W. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 6: 317-339.
- Blanchard J. (1981) Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr.*, 226: 455-460.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem., 72 : 248-254.

Bridges J.P., Davis H.W., Damodarasamy M., Kuroki Y., Howles G., Hui D.Y. and McCormack F.X. (2000) Pulmonary surfactant proteins A and D are

potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury. J. Biol. Chem., 278 : 38848-38855.

肺細胞による骨髄再建能の検討

阿部 信二¹ 吾妻安良太^{1*} 榎本 達治¹ 白杵 二郎¹
JG Sharp² SI Rennard² 工藤 翔二¹

骨髄および骨髄幹細胞が肺を含む様々な臓器の細胞に分化することが報告されている。一方、脳、筋肉といった非造血性臓器の細胞が骨髄再建能を有していることが報告されている。肺細胞の多分化能を検討する目的で、雄の EGFP (enhanced green fluorescent protein expressing) マウスから採取した、肺細胞 (whole lung cell), SP (side population) 肺細胞, CD45+/-肺細胞を放射線照射した雌マウスに投与した。末梢血に GFP 陽性細胞を認め、各マーカー (CD3, CD4, CD8, B220, Gr-1, Mac-1) の発現を認めた。肺の SP 細胞はヘテロな細胞分画であり、骨髄の SP 細胞と比較すると骨髄再建能は低かった。骨髄再建能を持つのは CD45 陽性肺細胞であった。

Lung cells transplanted to irradiated recipients generate lymphohematopoietic progeny

Shinji Abe¹, Arata Azuma¹, Tatsuji Enomoto¹, Jiro Usuki¹, JG Sharp²
SI Rennard² and Shoji Kudoh¹

¹The 4th department of internal medicine, Nippon Medical School

²University of Nebraska Medical Center

Bone marrow (stem) cells can differentiate into cells in multiple tissues, including lung. Conversely there are reports that cells of non-hematopoietic tissues (brain, muscle) can give rise to lymphohematopoietic cells. Here we show lung contains cells capable of giving rise to lymphohematopoietic cells when transplanted to irradiated recipients. Whole lung cell suspensions, lung side population (SP) cells and CD45+/- lung cells obtained from male transgenic enhanced green fluorescent protein expressing (EGFP)-mice were transplanted intravenously to total body irradiated (TBI) female mice. Green fluorescent cells were recovered from the circulation and phenotyped for their expression of lymphohematopoietic markers (CD3, CD4, CD8, B220, Gr-1 and Mac-1). Lung SP cells were composed of heterogeneous populations and had less ability to give rise to lymphohematopoietic cells than did bone marrow SP cells. Furthermore, the ability of cells from the lung of aged mice to generate lymphohematopoietic progeny was equivalent to that of cells from young mice. Cells from lung with radioprotective and lymphohematopoietic reconstituting abilities were CD45+. CD45+ cells in the lung cells have lymphohematopoietic stem/progenitor cell characteristics and this has implications for cell or gene therapy applications.

はじめに

骨髄および骨髄幹細胞が気道上皮細胞、I型およびII型肺胞上皮細胞、肺血管内皮細胞、肺線維芽細胞などの肺を構成する細胞に分化することが報告されている^{1),2),3)}。一方、脳、筋肉といった非造血性臓器の細胞が骨髄再建能を有していることが報告されている^{4),5)}。本研究は肺細胞の多分化能を検討する目的でマウスの肺細胞並びに肺の side population (SP) 細胞を用い、これらの細胞を放射線照射したマウスに投与して骨髄再建能を調べた。近年、骨髄の SP 細胞が幹細胞の性質を有していることが報告されている^{6),7)}が、肺における SP 細胞については、その存在は報告されているものの、幹/前駆細胞としての性質を持つか否かは明確な報告はない。

研究方法

マウスは C57Bl/6 マウス (6-8 週令, 雌) と Green Fluorescent Protein (GFP) マウス (6-8 週令) を用いた。また、加齢による影響を検討する目的で 2ヶ月令と 25ヶ月令の雄の C57Bl/6 マウスも用いた。これらのマウスより骨髄細胞と肺細胞を取り出し、ヘキスト 33,342 による染色を行ってフローサイトメトリー (FACS) によって SP 細胞を得た。骨髄細胞 (1×10^6 個)、骨髄 SP 細胞 (2,000 個)、肺細胞 (1×10^6 個)、骨髄 SP 細胞 (2,000 個) を全身照射 (7 Gy) したマウスに経静脈的に投与し、末梢血中の GFP 陽性細胞を経時的に観察した。マウス肺 SP 細胞を電子顕微鏡にて形態学的観察を行い、また、雌牛の肺 SP 細胞を LHC-9/RPMI1640 液にて培養を行った。さらに肺細胞を CD45+/- の fraction で分けて放射線照射マウスに投与して生存曲線による解析を行った。

結 果

これまでの報告されていたように、マウス肺には骨髄と同様に SP 細胞が存在していた (Fig 1)。肺 SP 細胞は骨髄 SP 細胞と同様、ベラパミルの添加によって

濃度依存性にその比率の低下が認められ、Bcrp1 (ABCG2) 等の ATP-binding cassette transporter protein の関与が示唆された。雌牛の肺においてもマウスの場合とほぼ同等 (~0.3%) の SP 細胞が存在していた (Fig. 1)。これらの雌牛肺 SP 細胞は顕微鏡レベルでは小型リンパ球の形態を有していたが、LHC-9/RPMI1640 液にて 14 日間培養すると、サイトケラチン陽性の上皮細胞様の細胞に変化することが観察されたことから肺 SP 細胞には上皮細胞の成分が含まれていることが示唆された (Fig. 2)。マウス肺 SP 細胞を電子顕微鏡にて検討すると、上皮細胞、マクロファージ、小型リンパ球、リンパ芽球などが認められ肺 SP 細胞が heterogeneous な細胞成分であることが判明した (Fig. 3)。この肺 SP 細胞 (2,000 個) を全身放射線照射したマウスに投与し、経時的に末梢血中の GFP 陽性細胞の陽性率を FACS にて測定したが、GFP 陽性細胞はほとんどなく、骨髄 SP 細胞と比較すると肺 SP 細胞による骨髄再建能は認められなかった (Fig. 4)。しかしながら、肺細胞全体 (1×10^6 個) を投与すると末梢血中に GFP 陽性細胞を認めることから肺細胞の中に骨髄を再建できる細胞が含まれていると考えられる。そこで GFP マウス肺細胞の CD45+/- の fraction についての検討を行ったが、全身放射線照射 (9.5 Gy) したマウスに CD45+ 肺細胞を投与した群は CD45- 肺細胞を投与した群に比べて有意に生存率の増加を認め (Fig. 5)、さらに末梢血中の GFP 陽性細胞率も有意な増加を認めたこと (Fig. 6) から肺細胞のうちの CD45 の fraction に骨髄を再建させる細胞、すなわち造血幹/前駆細胞が含まれていることが示された。

考 察

SP 細胞は元来は種々の動物において骨髄における幹細胞活性の大部分を占める細胞成分として報告された。マウス骨髄 SP 細胞は heterogenous な細胞群であり、その幹細胞活性は CD34 の発現と逆相関することが知られている。マウス肺においても SP 細胞の存在は報告されていたが、その生物活性は明らかでなかった。我々はマウスおよび雌牛から肺 SP 細胞を抽出して、形態学的並びに機能学的な解析を行った。マウス肺 SP 細胞は骨髄 SP 細胞同様、ベラパミルに感受性のある細胞成分であったが、放射線照射した同系

¹ 日本医科大学第四内科

² University of Nebraska Medical Center

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者