

図3 MDC -942 (G/A) 多型と血清 MDC 濃度の関係

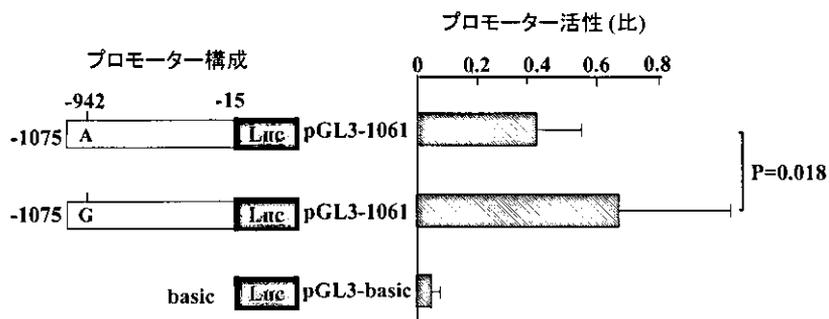


図4 MDC 遺伝子プロモーター活性

血清 MDC 濃度が高かった (図 3)。

細胞株 THP-1 を用いたプロモーター活性は、-942 G が -942 A より一貫して高い活性を示し、対立遺伝子 G では MDC 遺伝子転写レベルがより高いことを示唆した (図 4)。この結果は、血清中 MDC 濃度が遺伝子型 GG, GA, AA の順に高い事実と符合していた。

考 案

今回の研究では、MDC 遺伝子多型の中で、プロモーター配列-942 の位置にある SNP とサルコイドーシス発症との相関が示唆された。特にその傾向は発症年齢 40 歳未満の患者においてより明確だった。発症に関与しているのは、血清 MDC 濃度が高い対立遺伝子 G の方であった。実際血清 MDC 濃度は、遺伝子型をそろえて比較した場合でも、患者群で有意に高く、MDC がサルコイドーシスの発症病態において何らかの役

割を果たしていることが推測される。MDC は Th2 細胞の遊走活性を有するが、今回の結果からサルコイドーシスの発症病態に Th2 が真に関与しているか否かは、より詳細な検討が必要であろう。すなわち MDC 高発現患者における BALF T 細胞のサイトカイン産生プロフィールや、受容体発現動向、血清 IgE 値など他の Th2 マーカーを総合的に検討し、Th1 より Th2 細胞が優位であるのか、あるいは両者が共存しているのが実態なのかを判断する必要がある。

一方、MDC は単球の遊走活性も有する。単球は肺胞マクロファージの前駆細胞であり、血流から肺胞へ移行する過程で、GM-CSF の作用によりマクロファージに分化する。一般にサルコイドーシスの BALF には、CD4+T 細胞が多数集積することがよく知られた事実である。しかし、実際には肺胞マクロファージの実数も増加しており、種々のモノカインの産生を通してサルコイドーシスの病態の一翼を担っている^{17,18)}。また言うまでもなく類上皮細胞も単球か

ら分化した細胞である。したがって MDC は単球の遊走を促して、サルコイドーシスの発症ないし病変維持に関与している可能性が高い。今後 BALF 中の単球遊走活性が MDC に由来するの否かなどを検討する必要がある。

今回の検討では、発症に及ぼす MDC 遺伝子多型の影響は、発症年齢が 40 歳未満患者においてより明確に観察された。同年齢層の女性の大部分は性周期があり、免疫系と内分泌系の相互作用の存在が推測される。実際にエストラジオールが、ある条件下でヒト単球由来未熟樹状細胞の MCP-1, MDC, TARC の産生を亢進させることが報告されている¹⁹⁾。MCP-1 の発現もサルコイドーシスでは上昇しており²⁰⁾、MDC とともに発症促進的に作用すると推測される。以上よりサルコイドーシスの発症病態は、年齢や性により異なった様相を呈し、そこに関与する遺伝子多型の寄与度も異なっていることが推測される。今後、そのような複雑な分子間相互作用を念頭に置いた患者集団での遺伝子多型の役割を検討する必要があると示唆される。

参考文献

- 1) Godiska R, Chantry D, Raport CJ et al. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* 1997; 185: 1595-1604.
- 2) Bonocchi R, Sozzani S, Stine JT et al. Divergent effects of interleukin-4 and interferon- γ on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood* 1998; 64: 2668-2671.
- 3) Rodenburg RJ, Brinkhuis RF, Peek R et al. Expression of macrophage-derived chemokine (MDC) mRNA in macrophages is enhanced by interleukin-1 β , tumor necrosis factor α , and lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 606-611.
- 4) Imai T, Chantry D, Raport CJ et al. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 1998; 273: 1764-1768.
- 5) Chantry D, DeMaggio AJ, Brammer H et al. Profile of human macrophage transcripts: insights into macrophage biology and identification of novel chemokines. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 49-54.
- 6) Imai T, Nagira M, Takagi S et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 1998; 161: 81-88.
- 7) Galli G, Chantry D, Annunziato F et al. Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines. *Eur J Immunol* 2000; 30: 204-210.
- 8) Leung TF, Wong GW, Ko FW et al. Increased macrophage-derived chemokine in exhaled breath condensate and plasma from children with asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 786-791.
- 9) Robinson BW, McLemore TL, Crystal RG. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest* 1985; 75: 1488-1495.
- 10) Minshall EM, Tscopoulos A, Yasrael Z et al. Cytokine mRNA gene expression in active and nonactive pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 1997; 10: 2034-2039.
- 11) Devergne O, Emilie D, Peuchmaur M et al. Production of cytokines in sarcoid lymph nodes: preferential expression of interleukin-1 beta and interferon- γ genes. *Hum Pathol* 1992; 23: 317-323.
- 12) Moller DR, Forman JD, Liu MC et al. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1996; 156: 4952-4960.
- 13) Garlepp MJ, Rose AH, Dench JE et al. Clonal analysis of lung and blood T cells in patients with sarcoidosis. *Thorax* 1994; 49: 577-585.
- 14) Wallace WA, Howie SE. Immunoreactive interleukin 4 and interferon- γ expression by type II alveolar epithelial cells in interstitial lung disease. *J Pathol* 1999; 187: 475-480.
- 15) Asano M, Kohanawa M, Minagawa T et al. Reciprocal action of interferon- γ and interleukin-4

- promotes granulomatous inflammation induced by *Rhodococcus aurantiacus* in mice. *Immunology* 1996; 88: 394-399.
- 16) Nomiya H, Imai T, Kusuda J et al. Human chemokines fractalkine (SCYD1), MDC (SCYA22) and TARC (SCYA17) are clustered on chromosome 16q13. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 81: 10-11.
- 17) Yamaguchi E, Okazaki N, Tsuneta Y et al. Interleukins in pulmonary sarcoidosis. Dissociative correlations of lung interleukins 1 and 2 with the intensity of alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 645-651.
- 18) Baughman RP, Strohofer SA, Buchsbaum J et al. Release of tumor necrosis factor by alveolar macrophages of patients with sarcoidosis. *J Lab Clin Med* 1990; 115: 36-42.
- 19) Bengtsson AK, Ryan EJ, Giordano D et al. 17β -estradiol (E2) modulates cytokine and chemokine expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2004; 104: 1404-1410.
- 20) Car BD, Meloni F, Luisetti M et al. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 655-659.

【平成 16 年度】

サ症患者におけるプロピオニバクテリアの細菌学的検討

渡邊 邦友^{1*} 田中香お里¹ 三嶋 廣繁¹ 森下 宗彦²

エバニノマイシン, メトロニダゾール, アジカナトリウム の 3 つの薬物を使用した選択力の強い選択培地を用いて, 消化管粘膜上におけるプロピオニバクテリアの生態学を検討した。その結果, サルコイドーシス患者の約 70% で, 下部消化管 (糞便) からプロピオニバクテリアが 10 cfu/g 以上に分離され, その菌数は最大 1,000 cfu/g であることが明らかになった。また健康人の唾液 (口腔) 中の 92.1% にプロピオニバクテリアが分離され, その菌数は最大 10,000 cfu/g であることが明らかになった。

Density of Propionibacteria in feces from the patients with sarcoidosis and saliva from the healthy adults

Kunitomo Watanabe, Kaori Tanaka, Hiroshige Mikamo, and Munenori Morishita

Division of Anaerobe Research, Life Science Research Center, Gifu University

Department of Internal Medicine, Aichi Medical University

It is well known that Propionibacteria usually colonize on various skin sites in human adults with the density of 1.15~4.96 log per square centimeter. Although Propionibacteria are also colonized on mucosa, no information of population density in feces and saliva is available. The main reason would be lack of the appropriate selective media. We developed a novel selective agar medium with everninomycin, metronidazole and sodium azide as selective agents and investigated the density of Propionibacteria in feces and saliva. In this study, the density of Propionibacteria in feces from patients with sarcoidosis and saliva from healthy adults is 1.0~3.0 (positive rate 70%) and 1.0~5.0 (positive rate 92%) log per gram, respectively.

1. 研究目的

サルコイドーシスの患者の病巣から、高率に、プロピオニバクテリアが分離されることから、プロピオニバクテリアとサルコイドーシスとの関連性が示唆されている。

病巣から分離されるプロピオニバクテリアの侵入門戸として、皮膚または粘膜が考えられる。本菌の皮膚における分布は、100%、最高 10,000 cfu/cm² である。しかし、本菌が消化管の各部位でどのような分布をしているかの詳細は不明である。その詳細を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

1) 選択分離培地の作製

エバニノマイシン、メトロニダゾール、アジカナトリウム¹⁾の3つの薬物を使用し、粘膜（糞便、唾液）からのプロピオニバクテリアの分離を可能にする選択力の強い選択培地を新規に考案した。

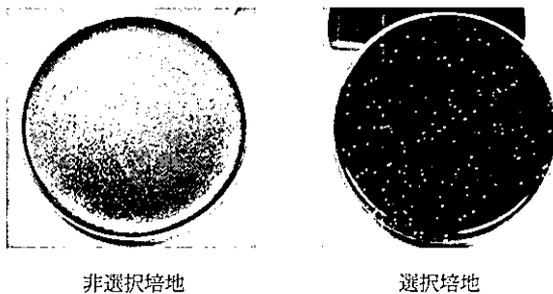
2) 下部消化管（糞便）の解析

愛知医科大学内科（森下宗彦助教授）との共同研究を計画し、愛知県のサルコイドーシス患者 44 名（男 11 名、女 33 名）の糞便検体を収集した。

3) 上部消化管（唾液）の解析

健康成人 38 名の唾液を収集した。

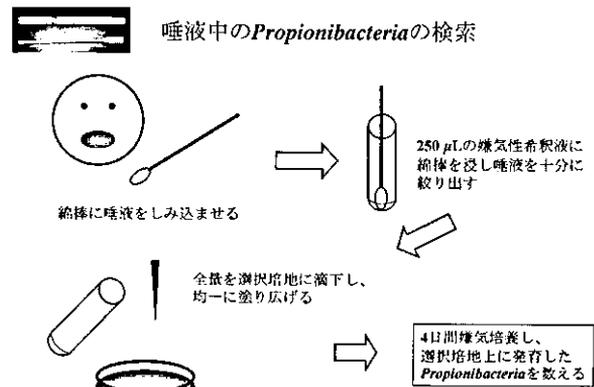
培地の選択性



3. 研究結果と考察

愛知医科大学受診サルコイドーシス患者 44 名の凍結糞便の解凍検体中から 10 cfu/g 以上に菌が検出された検体数は 33 検体で、培養陽性率は 68.2% であった。そして、44 検体中凍結前に培養を行うことができた 24 例中の培養陽性検体数は 16 例で、培養陽性率は 66.7% であった。凍結前の培養結果と凍結後のプロピオニバクテリアの分離率に大きな差異を認めなかった。凍結による顕著な菌数の変化がなかった。工藤班の協力を得て、全国的レベルで過去に実施し報告したサルコイドーシス患者由来の凍結糞便 65 検体で、10 cfu/g 以上に菌が検出された検体数は 25 検体（陽性率 38.5%）であったが、今回の培養陽性率はそれよりも優位に高い結果であった。また、給食部に勤める健康人由来の凍結検体 70 検体中 10 cfu/g 以上に菌が検出された検体数は 29 検体（陽性率 41.4%）であったが、それよりも優位に高い結果であった。

健康成人の唾液 38 検体で 10 cfu/g 以上にプロピオニバクテリアが検出された検体数は 34 検体（陽性率 92.1%）であった。



サ症患者の糞便における Propionibacteria の検索

- ・ 対象検体数 44
- ・ 菌検出率 68 %
- ・ 平均菌量 165.7 cfu /g

検出菌量 (cfu / g)	(検体数)	(%)
< 10	14	31.8
10～99	19	43.2
100～999	11	24.9
1,000≤	0	0

¹⁾ 岐阜大学生命科学総合実験センター

²⁾ 愛知医科大学呼吸器アレルギー内科

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

健康成人における唾液中の *Propionibacteria* の検索

対象：19-25才の健康成人 38人 菌検出率：92.1%

平均菌量：618.4 cfu/g

検出菌量 (cfu/g)	(検体数)	(%)
< 10	4	10.5
10~99	12	31.6
100~999	18	47.4
1,000≤	4	10.5

4. 評 価

1) 達成度

サルコイドーシス患者の糞便中のプロピオニバクテリアの生態学を明らかにした。また、健康人の唾液中の本菌の生態学を明らかにした。これまで収集が困難であった糞便および唾液由来のプロピオニバクテリアの菌株を、今後の研究のために凍結保存した。

2) 研究成果の学術的、国際的、社会的意義

皮膚における分布については詳細な資料があるにもかかわらず、粘膜におけるプロピオニバクテリアの分布の詳細な検討成績はない。その理由は、それを可能にする選択培地がなかったためと考えた。糞便唾液中にこの程度の菌数でしか存在しないプロピオニバクテリアの定量は分子生物学的手法でも不可能である。本研究では、選択性の強力な選択培地を作製、使用し、下部消化管および口腔内の本菌の分布を世界で初めて明らかにすることができた。ここに学術的意味がある。この情報は難病に指定されているサルコイドーシスと本菌の関連を追及していく上で必要不可欠の情報であった。

3) 今後の展望について

研究分担者の一人江石らは、サルコイドーシスとプロピオニバクテリアとの関係は過敏症反応であり、その組織内での排除がうまく行われないこと、組織内での増殖が症状の再燃と関係しているとの仮説を立てている。さらに、本菌の株の中に細胞侵入性を有するものがあること、また本菌が体内でL-formとして存在することを示唆する所見を形態学的に確認しているから、今後江石らとの関係を密にして、この菌の病原性について、免疫学的な面、特に炎症性サイトカインの面から検討し、サルコイドーシスの病態との関係の解析へと進む予定である。

4) 研究内容の効率性について

平成16年度中に、江石らとの情報交換、技術交換を行った。今後の展望に記した研究内容は、平成17年度1年間をめどに実施する予定である。

5. 結 論

サルコイドーシス患者の約70%で、下部消化管(糞便)からプロピオニバクテリアが10 cfu/g以上に分離され、その菌数は、最大1,000 cfu/gである。

健康人の唾液中の92.1%にプロピオニバクテリアが分離され、その菌数は最大10,000 cfu/gである。

6. 研究発表

サルコイドーシス患者におけるプロピオニバクテリアの腸管内保有率に関する検討
(第47回日本感染症学会中日本地方支部総会 和歌山(10/23/2004))

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などを示してきた。

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* のリポテイコ酸を認識する抗体⁶⁾ は研究協力者である江石氏より御提供頂いた。また二次抗体は、HRP 標識抗ラット免疫グロブリン抗体: Biosource International 製, HRP 標識抗マウス免疫グロブリン抗体: DAKO 製, ALP 標識抗ハムスター免疫グロブリン抗体: Cedarlane 製, ビオチン化 ALP: ニチレイ製, Alexa Fluor 488 抗ラット免疫グロブリン, ストレプトアビジン Alexa Fluor 594: Molecular Probes 製を使用した。

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 RNA 1 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⁹⁾ 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 10⁶ 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 $\mu\text{g}/\text{dose}$ (MINO: Wyeth Lederle 製), クリンドマイシン 1.6 mg/dose (CLDM: Pharmacia 製), 硫酸ゲンタマイシン 53 $\mu\text{g}/\text{dose}$ (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。 2×10^6 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

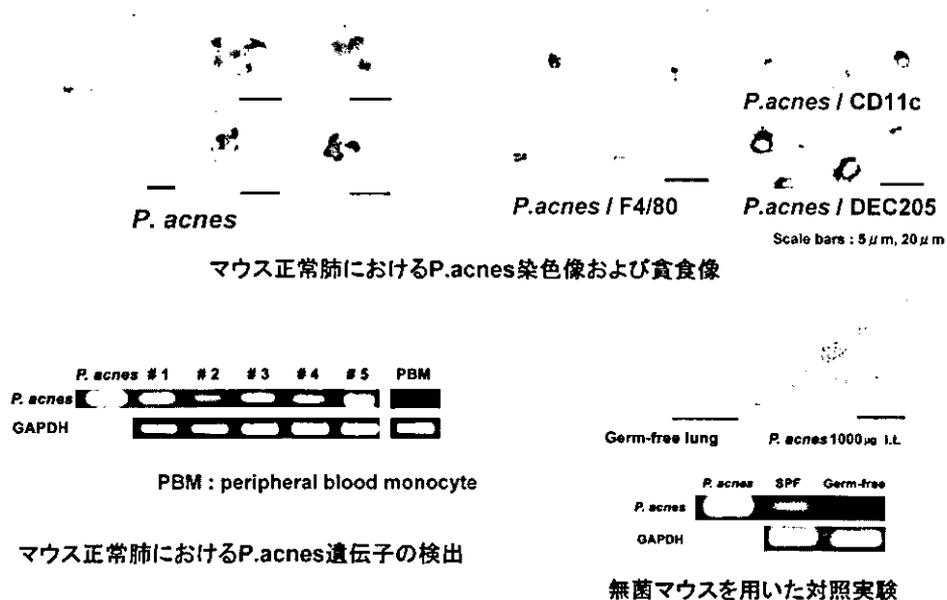


図 1 正常マウス下気道肺における *P. acnes* の同定

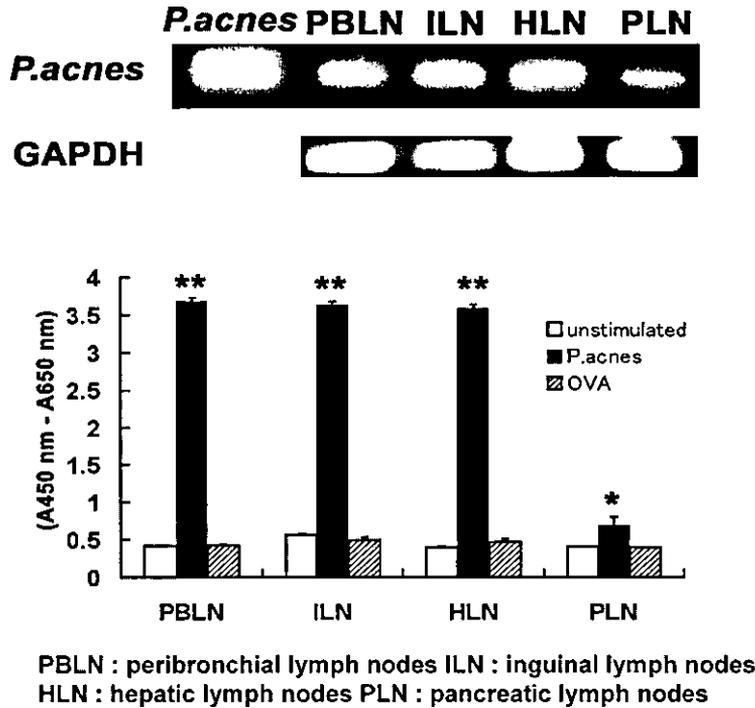


図2 正常マウス肺所属リンパ節における *P. acnes* 遺伝子および特異的免疫応答

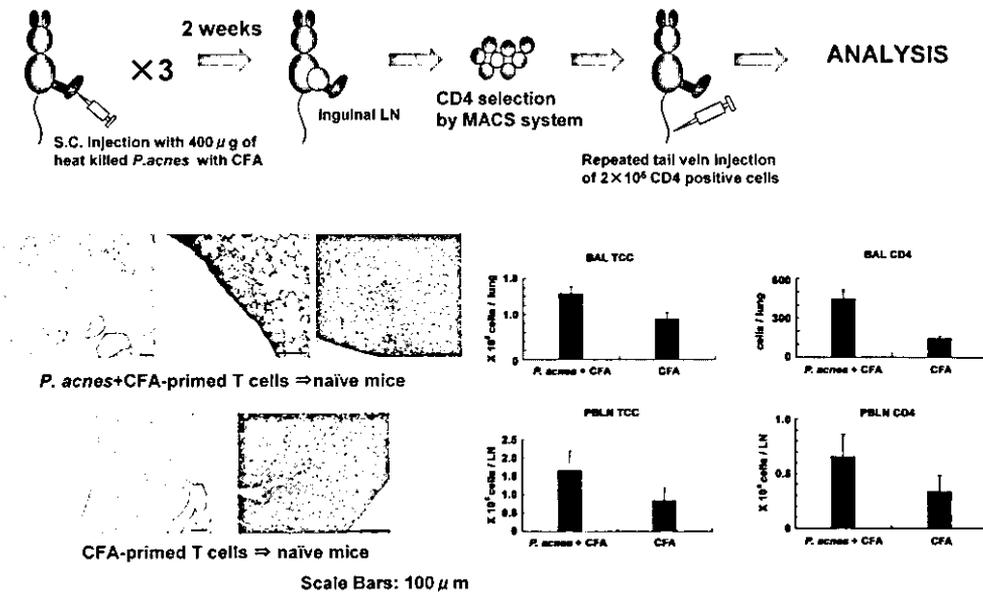


図3 *P. acnes* 感作 T 細胞の正常マウスへの経静脈的移入による肺・肝肉芽腫の誘導

ことで肉芽腫病変を誘導しうる事が示唆されたため、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 (IFNγ)・インターロイキン 4 (IL4) と CD4 との二重免疫染色を

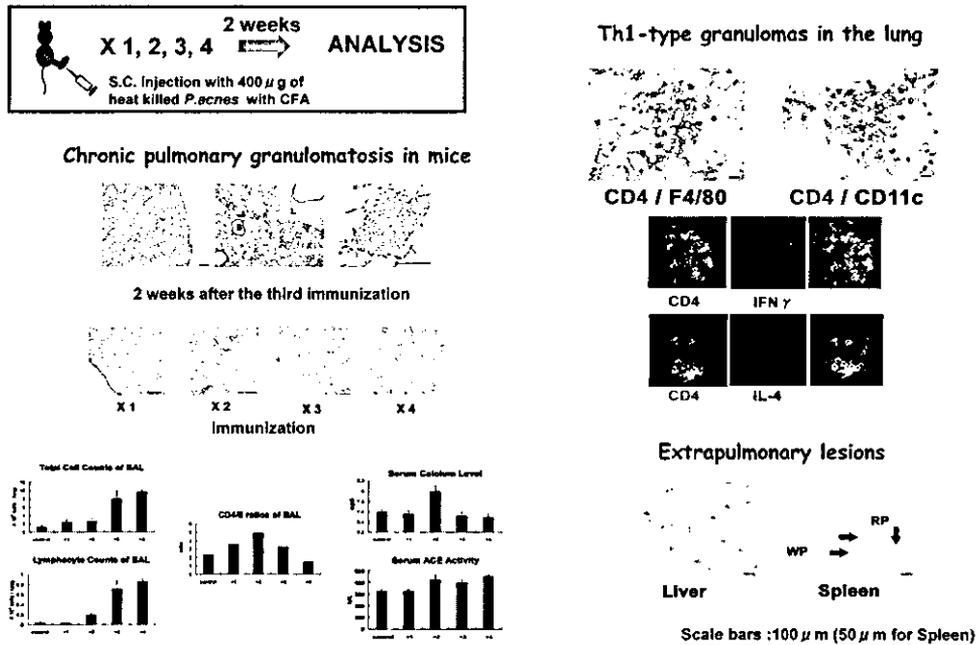


図4 *P. acnes* の反復肺外感作により誘導されるマウスサルコイド様肉芽腫病変

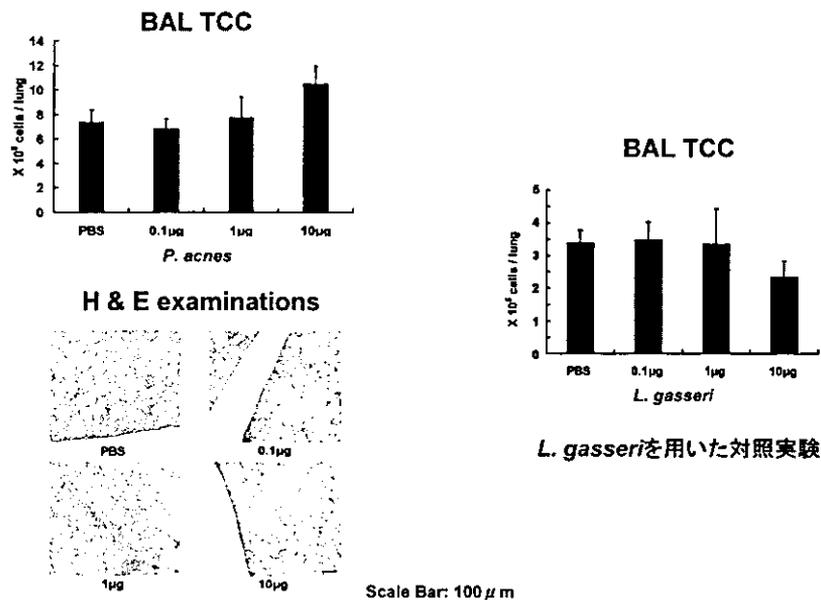


図5 *P. acnes* の反復感作前投与により増強する肺肉芽腫病変

行くと、これらは IFN γ 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

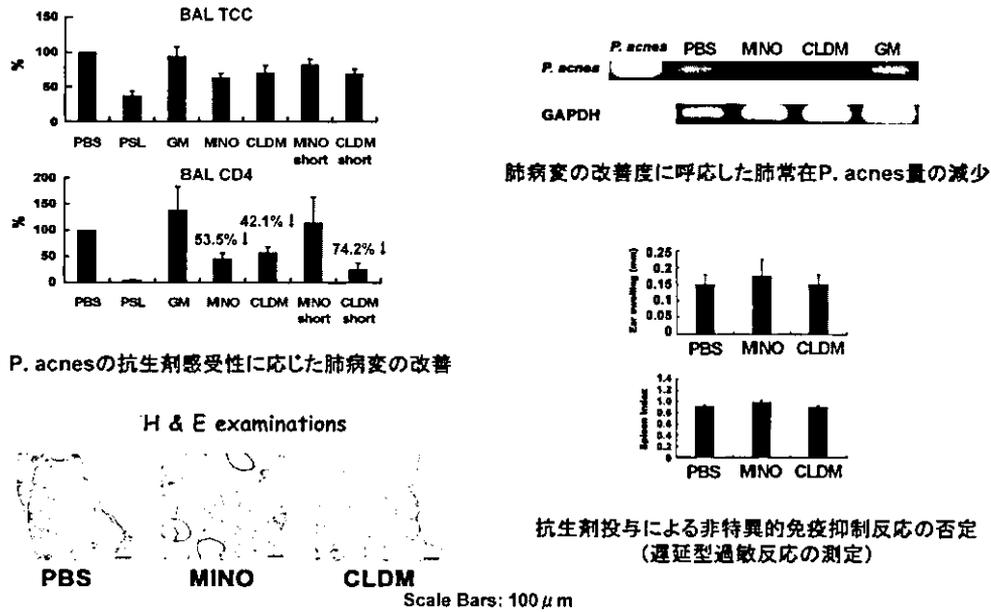


図6 抗生剤による肺常在 *P. acnes* の除菌により改善する肺肉芽腫病変

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・ウイルス肺感染の続発症という観点から研究されることが多かった¹⁾。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^{1*} 土方美奈子¹ 松下 育美¹ 中田 光^{1**}
徳永 勝士² 中田紘一郎³ 田口 善夫^{4**} 吾妻安良太^{5*}
工藤 翔二⁵

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 Keicho¹, Minako Hijikata¹, Ikumi Matsushita¹, Koh Nakata¹,
Katsushi Tokunaga², Koichiro Nakata³, Yoshio Taguchi⁴, Arata Azuma⁵
Shoji Kudoh⁵

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

² Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

³ Division of Respiratory Diseases, Toranomon Hospital

⁴ Department of Respiratory Medicine, Tenri Hospital

⁵ 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.

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⁹⁾.

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-B54, A11 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

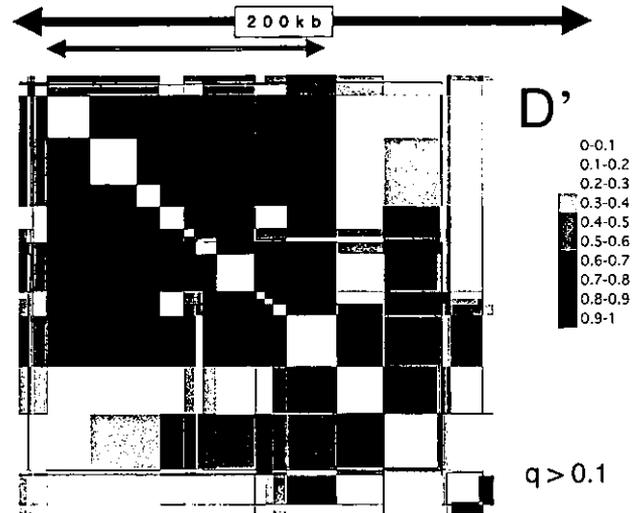


図 1 候補領域内に存在する SNP 間の連鎖不平衡値 D' から推定されるゲノム構造
 200 kb の候補領域のうち, D' 0.9 以上の強い連鎖不平衡を示す領域, 約 80 kb が黒い四角で示されている.

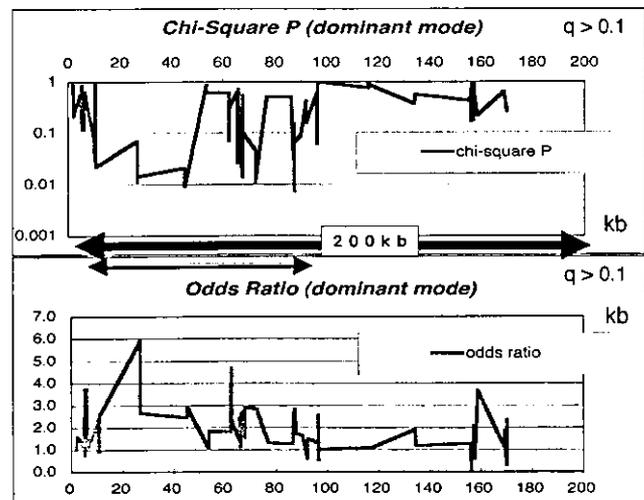


図 2 候補領域内に存在する SNP 頻度の症例対照関連解析におけるカイ 2 乗 p 値 (上段) とオッズ比 (下段)
 カイ 2 乗 p 値は, 左側の 80 kb の領域で低く, 有意差を示す SNP が多く, 右側では, 有意差を示す SNP がみられない. オッズ比は, 頻度の低い SNP では正確な値が得られていない.

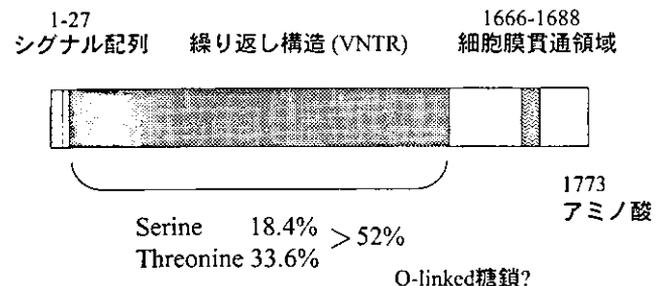


図 3 候補領域内に同定された新規遺伝子
 アミノ酸配列上, 膜型ムチン様構造を取っており, シグナル配列および膜貫通領域も推測される.

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 (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 に限局していた。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。