

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, 何らかの遺伝的な背景の存在が疑われてきた.

この遺伝的な背景については, 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こり, 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¹⁰⁾. (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¹⁰⁾. 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¹⁰⁾.

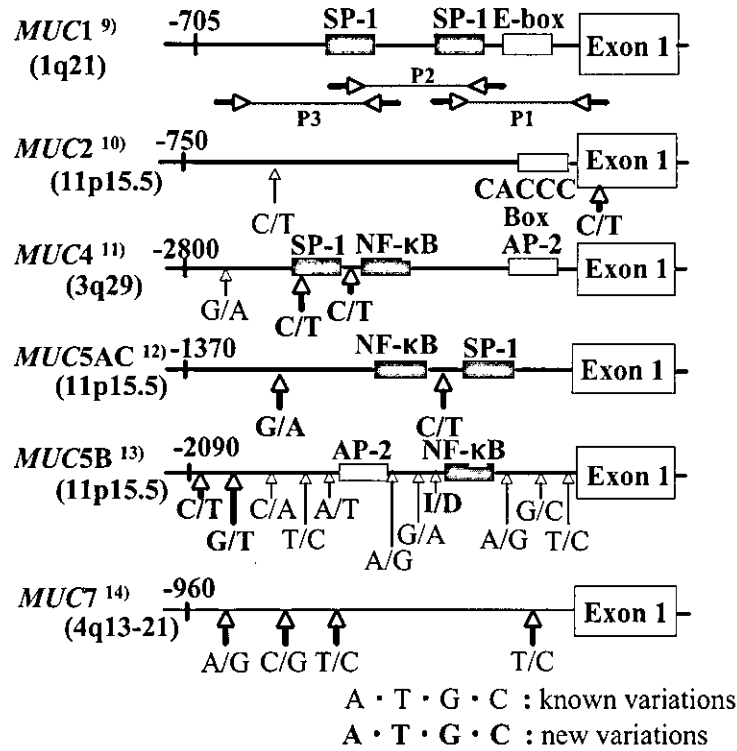


図1 各ムチン遺伝子について、解析したプロモーター領域ならびに変異の相対位置を示している。転写開始点を+1とし、それより上流側の位置を-で示してある。例えば *MUC1* では、プロモーター領域をカバーできるように P1, P2, P3 のように3つのプライマーセットを作成し解析した。↑は変異の位置を示しており、細字はデータベースに登録済みの変異、太字は今回同定された新規の変異を示している。SP-1, NF-κBなどは文献に記載のある転写因子が結合するコンセンサス配列の位置を示している。各遺伝子の右肩に、参照文献を示してある。*MUC5B* の I, D はそれぞれ CA の Insertion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

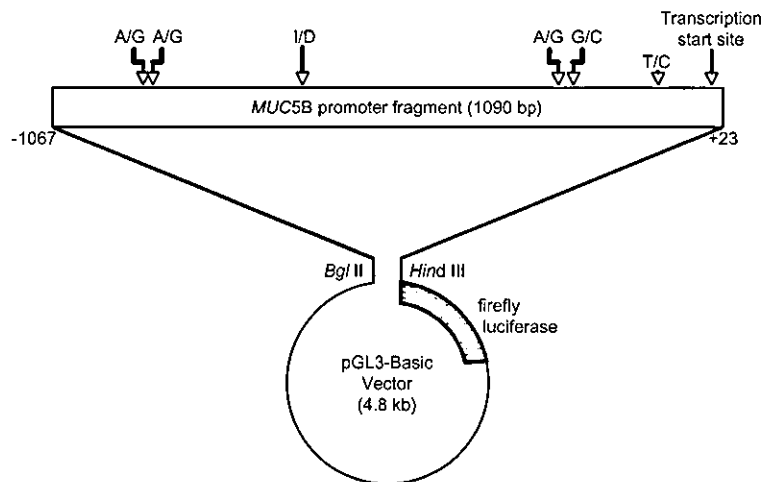


図2 *MUC5B* プロモーター領域に認められた代表的な3つのハプロタイプに関して、ルシフェラーゼアッセイを用いた機能解析を行った。6つの変異を含む1090塩基の領域を、制限酵素 *Bgl* II サイト及び *Hind* III サイトを付加したプライマーセットで増幅し、これらの制限酵素で処理した後、pGL3-Basic Vector にクローニングした。I, D はそれぞれ CA の Insertion と Deletion を示している。

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	53	F	-	DPB, Bronchiectasis, Chronic sinusitis
-2				Infection of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DPB2-1	71	M	-	DPB, Bronchiectasis, Chronic sinusitis
-2				Post-operative state of mitral stenosis
DPB3-1	60	M	+	DPB, Bronchiectasis, Chronic sinusitis
-2				Infection of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DPB4-1	43	M	-	DPB, Bronchiectasis, Chronic sinusitis
-2				
DPB5-1	67	M	-	DPB, Bronchiectasis, Chronic sinusitis
-2				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

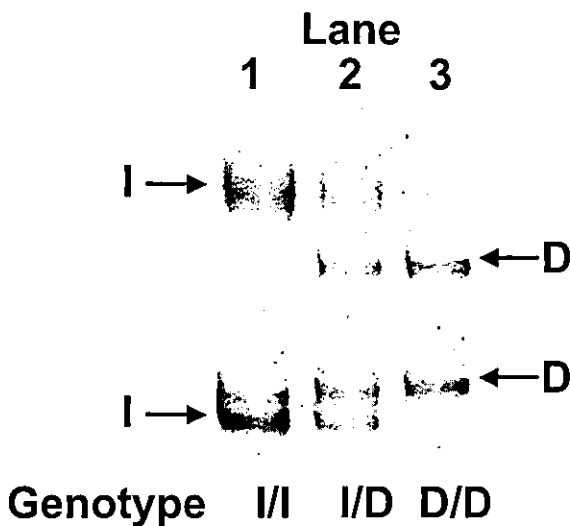


図 3 *MUC5B* プロモーター領域に認められた I/D 多型の PCR-SSCP 法による genotyping. Lane 1 と 3 はそれぞれ insertion と deletion のホモである。Lane 2 にはヘテロを示してある。

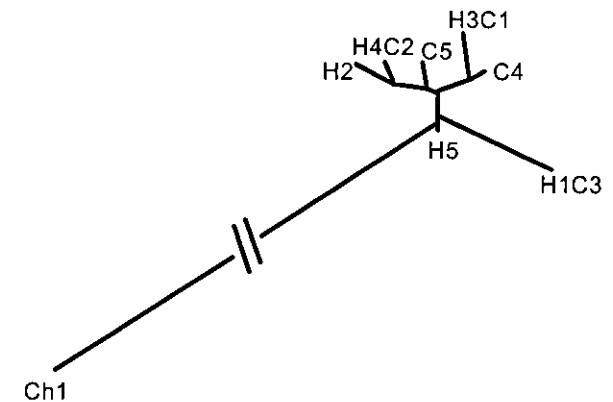


図 4 ハプロタイプを用いた系統解析。日本人と Caucasian それぞれに頻度の高いハプロタイプ 5 つずつと、チンパンジーで最も頻度の高いハプロタイプを用いて系統樹を作成した。H1 から H5 は表 4 の日本人のハプロタイプである。C1 から C5 は Caucasian のハプロタイプを示すが、C1, C2, C3 はそれぞれ H3, H4, H1 に相当する。C4 は AGIGCC であり、C5 は GGIGCT である。Ch1 はチンパンジーで最も頻度の高いハプロタイプを示す。

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 C allele	46.5 53.5	
	2	11319	ss28514118	C allele T allele	28.7 71.3	
<i>MUC 4</i> (AF241535)	3	909	rs2641770	A allele G allele	15.6 84.4	
	4	977	ss28514119	A allele G allele	13.3 86.7	
	5	998	ss28514120	T allele C allele	11.7 88.3	
<i>MUC 5AC</i> (AF016834)	6	142	ss28514121	A allele G allele	38.7 61.3	
	7	1203	ss28514122	T allele G allele	38.7 61.3	
<i>MUC 5B</i> (AF107890)	8	2107	ss23142225	T allele C allele	40.6 59.4	
	9	2179	ss23142226	G allele T allele	31.6 68.4	
	10	2389	rs868902	C allele A allele	23.4 76.6	
	11	2571	rs868903	T allele C allele	43.8 56.3	
	12	2691	rs868904	A allele T allele	50.8 49.2	
	13	3259	rs885455	A allele G allele	19.9 80.1	
	14	3272	rs885454	A allele G allele	33.2 66.8	
	15	3518-19	ss23142227	Insertion Deletion	74.6 25.4	
	16	3941	rs7115457	A allele G allele	37.9 62.1	
	17	3961	rs7118568	G allele C allele	38.3 61.7	
	18	4100	rs2735738	T allele C allele	48.4 51.6	
	<i>MUC 7</i> (L42983)	19	648	rs4629524	G allele A allele	8.2 91.8
		20	686	rs4452506	C allele G allele	8.2 91.8
		21	768	rs4694067	C allele T allele	26.2 73.8
		22	1377	rs7662264	C allele T allele	8.2 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 p 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

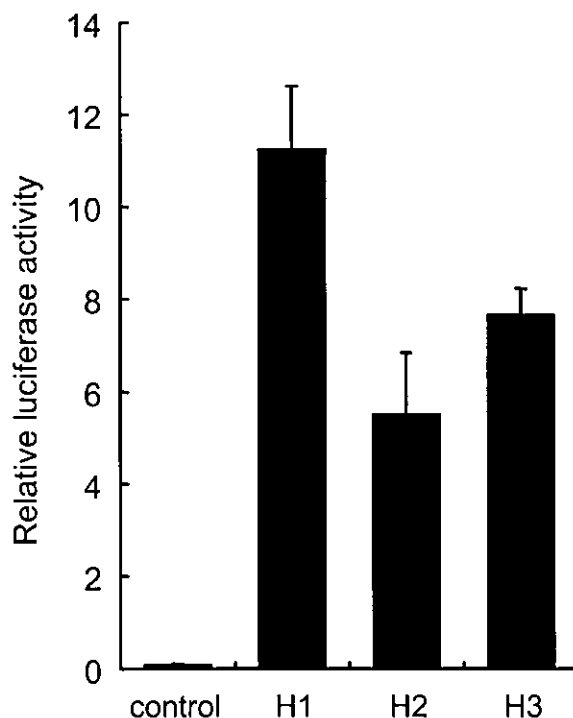


図5 MUC5B 遺伝子のプロモーター活性を検討するため、3つの代表的なハプロタイプを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。コントロールとして、プロモーターの配列を挿入していない pGL3-Basic Vector を用いた。H1 で転写活性が最も高く ($p < 0.0001$), H2 の転写活性は3つのハプロタイプの中で最も低かった ($p < 0.01$).

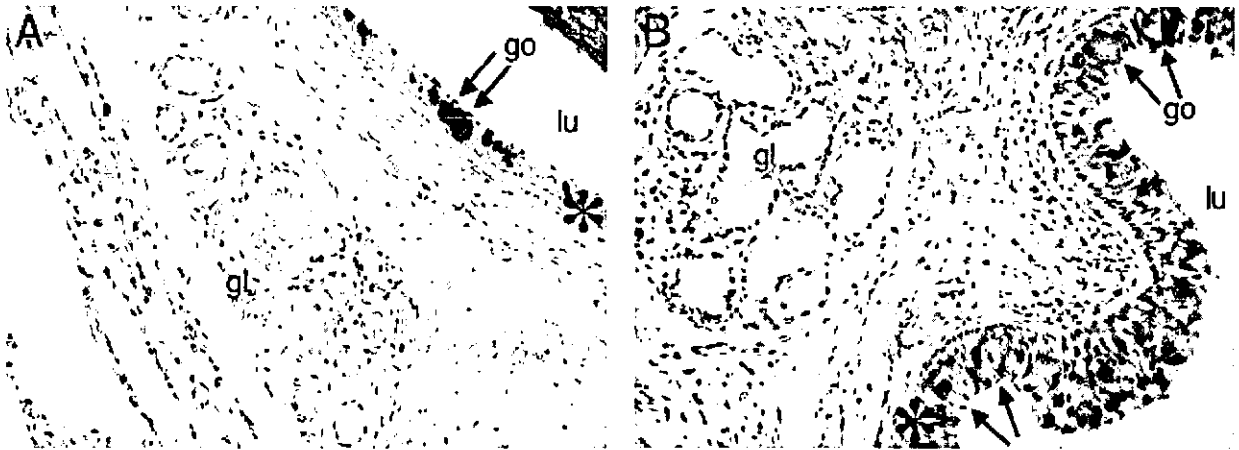


図6 呼吸器病変の無い患者における *MUC5AC* の局在 (A), *MUC5AC* の染色は気管支上皮の goblet cell に限局していた。DPB 患者における *MUC5AC* の局在 (B), DPB 患者では goblet cell の数は増加しており、これらに *MUC5AC* の染色が認められた。(=; 上皮, gl; 粘膜下腺, lu; 気管支腔, go; goblet cell; goblet cell の代表的なものを矢印で示してある。Original magnifications are $\times 200$ for A and B.)

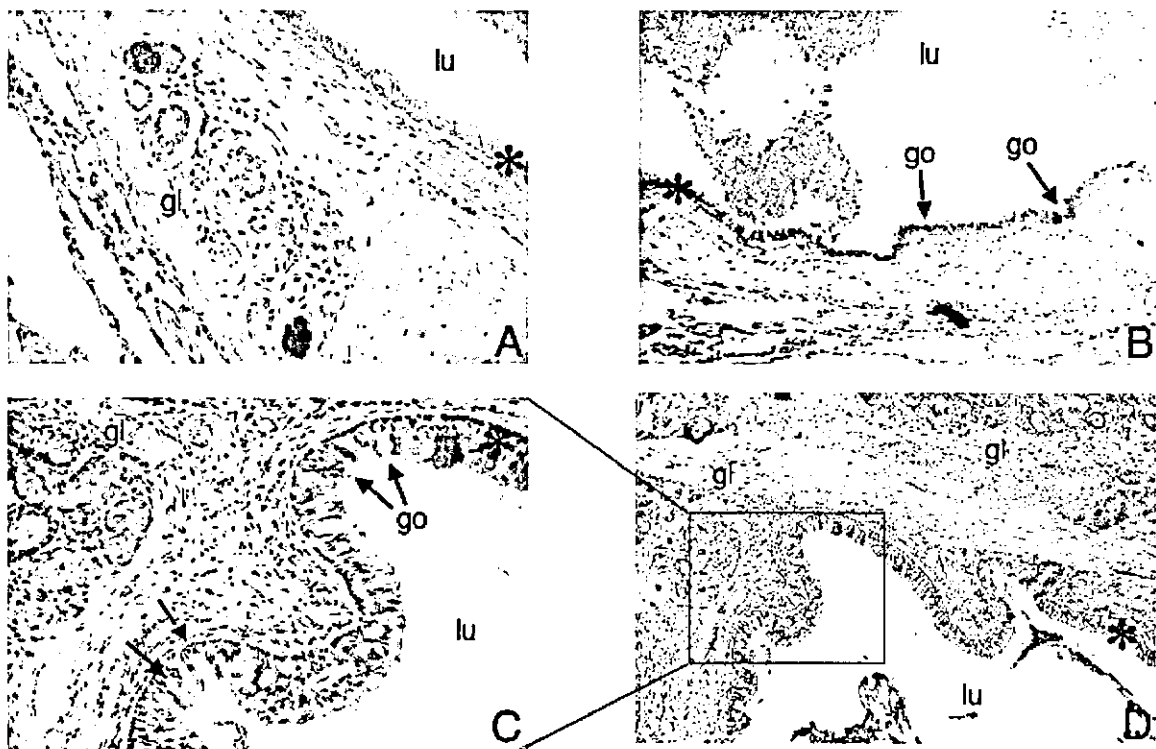


図7 肺病変の無い患者における *MUC5B* の局在と (A, B), DPB 患者における局在 (C, D), 肺病変の無い検体では *MUC5B* の染色は粘膜下腺に限局し、上皮の goblet cell には見られなかった (A), 同じ患者の他の部分には、少数の goblet cell が陽性に染色される箇所も認められた (B), DPB 患者では *MUC5B* の染色は粘膜下腺と上皮の goblet cell に強く認められた (C, D), 図 C は図 D の一部を拡大したものである。(=; 上皮, gl; 粘膜下腺, lu; 気管支腔, go; goblet cell; goblet cell の代表的なものを矢印で示してある。Original magnifications are $\times 200$ for A and C, $\times 50$ for B and D.)

cell は染色されなかった (図 7A), 同じ患者で、例外的にまばらに *MUC5B* 陽性の goblet cell が認められる部分もあった (図 7B), Lu-2 でも同様の結果であった。一方 DPB 患者では (DPB1-2), 粘膜下腺は肥大しており *MUC5B* によって強く染色され、上皮の goblet cell も強く陽性の所見が得られた (図 7C, D), 他の 3

例でも同じ所見が得られた (DPB2-1, DPB3-2, DPB4-1, DPB4-2),

DPB 患者の呼吸細気管支で *MUC5AC* と *MUC5B* の免疫染色を行った。両者とも呼吸細気管支の上皮では陰性であった (図 8A, B), 間質には foamy macrophage とリンパ球の集積が認められ、内腔には

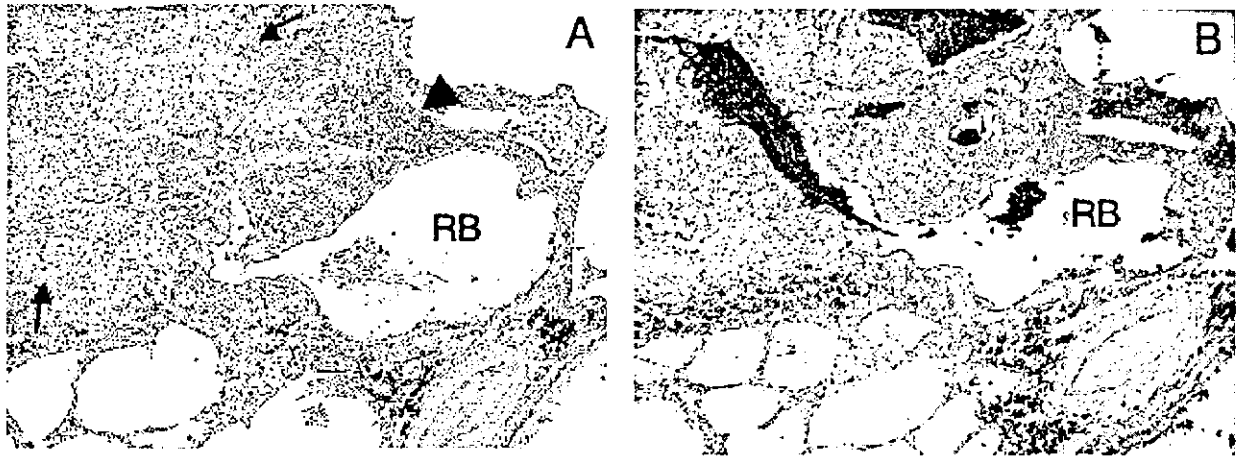


図8 DPB 患者の呼吸細気管支における、*MUC5AC* (A) と *MUC5B* (B) の局在。呼吸細気管支の上皮では両者とも陰性であった。Foamy macrophage (矢印) とリンパ球 (矢頭) の集積が呼吸細気管支の間質に認められる。図 7B では細気管支の内腔に *MUC5B* が分泌されている所見が得られた。(RB; 呼吸細気管支, Original magnifications are $\times 100$ for A and B.)

MUC5B の分泌が観察された。

考案・結論

今回のムチン遺伝子群の解析では、*MUC5B* の転写調節領域の複数の変異で疾患との関連が認められた。このうち最も強い関連を示した変異は 2 塩基 CA の I/D 多型であり、CA の欠失が $p=0.0001$ で DPB 群で有意に低下しており、疾患抵抗性に関与していることが考えられた。

ムチン遺伝子はコード領域の VNTR (variable numbers of tandem repeat) 多型を特徴とする²³⁾。例えば *MUC1* では 20 残基のアミノ酸の繰り返しが見られ、これは制限酵素による解析で 2.8 kb から 8.0 kb の範囲に渡る事が報告されている^{24,25)}。ムチンの個体間での大きさの違いは粘液の性状に影響を及ぼす事が考えられ、機能的な相違に関与していることが予想される。しかしながら *MUC5B* ではこの VNTR 多型はほとんど見られない事が報告されている²⁶⁾。一方今回の検討で *MUC5B* のプロモーター領域に他のムチンに比べて多数の変異が同定されたが、このことは *MUC5B* 遺伝子が発現レベルで個体間の相違を有している可能性を示唆している。

MUC5B プロモーター領域の 3 つの変異が DPB と関連を示し、またこれらを含む 6 つの変異は強い連鎖不平衡の状態にあるため、ハプロタイプ解析を行った。CA の欠失を含むハプロタイプ H2 は DPB と負の関連を示した。我々は Caucasian のサンプルも解析したがこの変異は認められず、さらに主要なハプロタイ

プの頻度も異なっており、DPB 患者に多く認められた H1 は Caucasian では 10% 以下であった。またチンパンジーはヒトとは異なる変異を有しており、系統解析の結果では日本人と Caucasian に存在する主要なハプロタイプはヒトへの進化後に出現した事が考えられ、アジア人に特異的と考えられる H2 はさらにその後出現した事が予想される。

ルシフェラーゼアッセイを用いた機能解析の結果では、日本人の主要な 3 つのハプロタイプ間では転写活性が有意に異なる事が確認され、H2 が最も低く、H1 が最も高く、H3 がその中間を示した。この定常状態での転写活性の相違はそれぞれのハプロタイプの疾患への相関と平行な関係にあり、欠失変異は *MUC5B* の転写活性を低下させ、疾患抵抗性に働く可能性が考えられた。

MUC5AC の発現制御に関する報告は多く見られるが、*MUC5B* に関してはこれまでの所不明な部分が多い。転写因子の結合配列をコンピューター推定した所、I/D 多型は Vitamin D receptor/Retinoid X receptor heterodimer site, interferon-stimulated response element and STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) site に含まれる可能性が考えられた。Retinoid X receptor に関しては、RARs と RXRs が協調して *MUC2* と *MUC5AC* の発現を誘導するとの報告がある²⁷⁾。また STAT6 については IL-4 と IL-13 のシグナルで *MUC2* の分泌を増加させると報告されている²⁸⁾。

DPB における *MUC5B* の役割を更に明らかにするため、我々は免疫染色でその発現の分布を確認する事

を試みた。呼吸器病変の無い肺では *MUC5AC* は上皮の goblet cell に発現しており、*MUC5B* の発現は粘膜下腺が主体であり、一部少数の goblet cell にも認められた。これらの所見はこれまで報告されたものと一致していた^{29,30)}。DPB では goblet cell の数が増大し、粘膜下腺の肥大が観察された。*MUC5AC* はこの増大した goblet cell のほとんどに発現していたが、粘膜下腺での発現は見られなかった。一方 *MUC5B* は粘膜下腺だけではなく上皮の goblet cell にも多く発現が見られ、DPB ではその発現の分布が本来の粘膜下腺だけではなく上皮の goblet cell にもシフトしている事が観察された。炎症性疾患で *MUC5B* の上皮での発現が増加することはこれまでも報告されているが、そのメカニズムは不明である²⁹⁾。この発現の変化は DPB では比較的中枢の気道に見られたものであり、DPB で特徴的な呼吸細気管支での慢性炎症とどのように関連するものであるのかはこれからの解明を待たなければならない。

これまでの所 DPB と *MUC5B* の関連は明らかではなかったが、今回の検討で疾患と関連のある変異が同定され、機能解析ならびに免疫染色による発現分布の検討により、*MUC5B* と DPB との関連が示唆された。HLA class I の領域で新規のムチン遺伝子のクローニングが進行していることから、*MUC5B* を含めてムチンが DPB の病態形成に及ぼす役割は注目される。

参考文献

- 1) 山中 晃ほか。慢性気管支閉塞性疾患の問題点 — とくにびまん性汎細気管支炎について —。内科 1969; 23: 422.
- 2) Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M et al. Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1829-1832.
- 3) Sugiyama Y, Kudoh S, Maeda H, Suzaki H, Takaku F. Analysis of HLA antigens in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1459-1462.
- 4) 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* 1998; 158: 846-850.
- 5) Park MH, Kim YW, Yoon HI, Yoo CG, Han SK, Shim YS, Kim WD. Association of HLA class I antigens with diffuse panbronchiolitis in Korean patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 526-529.
- 6) 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* 2000; 66: 501-507.
- 7) Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 1774-1775.
- 8) Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Marquette CH, Wurtz A, Aubert JP, Gosselin B, Porchet N. From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. *Int. J. Cancer* 2000; 86: 162-168.
- 9) Kovarik A, Lu PJ, Peat N, Morris J, Taylor-Papadimitriou J. Two GC boxes (Sp1 sites) are involved in regulation of the activity of the epithelium-specific *MUC1* promoter. *J Biol Chem* 1996; 271: 18140-18147.
- 10) Gum JR, Hicks JW, Kim YS. Identification and characterization of the *MUC2* (human intestinal mucin) gene 5'-flanking region: promoter activity in cultured cells. *Biochem J* 1997; 325: 259-267.
- 11) Perrais M, Pigny P, Ducourouble MP, Petitprez D, Porchet N, Aubert JP, Van Seuning I. Characterization of human mucin gene *MUC4* promoter: importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 30923-30933.
- 12) Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human *MUC5AC* mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J Biol Chem* 1998; 273: 6812-6820.
- 13) Chen Y, Zhao YH, Di YP, Wu R. Characteriza-

- tion of human mucin 5B gene expression in airway epithelial and genomic clone of the amimo-terminal and 5'-flanking region. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 ; 25 : 542-553.
- 14) Bobek LA, Liu J, Sait SN, Shows TB, Bobek YA, Levine MJ. Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene, MUC7. *Genomics* 1996 ; 31 : 277-82.
- 15) Kudoh S, Keicho N. Diffuse panbronchiolitis. *Semin Respir Crit Care Med* 2003 ; 24 (5) : 607-617.
- 16) Kamio K, Matsushita I, Tanaka G, Ohashi J, Hijikata M, Nakata K, Tokunaga K, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Direct determination of MUC5B promoter haplotypes based on the method of single-strand conformation polymorphism and their statistical estimation. *Genomics* 2004 ; 84 : 613-622.
- 17) Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 1998 ; 23 : 403-405.
- 18) Felsenstein J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 1989 ; 5 : 164-166.
- 19) Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 1995 ; 12 : 921-927.
- 20) Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001 ; 68 : 978-989.
- 21) Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003 ; 73 : 1162-1169.
- 22) Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector : new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 1995 ; 23 : 4878-4884.
- 23) Fowler J, Vinall L, Swallow D. Polymorphism of the human MUC genes. *Front Biosci* 2001 ; 6 : D1207-1215.
- 24) Vinall L, Pratt WS, Swallow DM. Detection of mucin polymorphism. *Methods Mol Biol* 2000 ; 125 : 337-350.
- 25) Carvalho F, Seruca R, David L, Amorim A, Seixas M, Bennett E, Clausen H, Sobrinho-Simoes M. MUC1 gene polymorphism and gastric cancer—an epidemiological study. *Glycoconj J* 1997 ; 14 : 107-111.
- 26) Vinall LE, Hill AS, Pigny P, Pratt WS, Toribara N, Gum JR, Kim YS, Porchet N, Aubert JP, Swallow DM. Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5. *Hum Genet* 1998 ; 102 : 357-366.
- 27) Koo JS, Jetten AM, Belloni P, Yoon JH, Kim YD, Nettesheim P. Role of retinoid receptors in the regulation of mucin gene expression by retinoic acid in human tracheobronchial epithelial cells. *Biochem J* 1999 ; 338 : 351-357.
- 28) Blanchard C, Durual S, Estienne M, Bouzakri K, Heim MH, Blin N, Cuber JC. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression : requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol* 2004 ; 172 : 3775-3783.
- 29) Chen Y, Zhao YH, Di YP, Wu R. Characterization of human mucin 5B gene expression in airway epithelial and genomic clone of the amimo-terminal and 5'-flanking region. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 ; 25 : 542-553.
- 30) Wickström C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman EC, Carlstedt I. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix : identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J* 1998 ; 334 : 685-689.

【平成 16 年度】

エリスロマイシンの抗炎症作用：包括的遺伝子発現解析から (第三報)

滝澤 始^{1*} 月舘 利治² 中島 敏治² 斉藤 博久²

びまん性汎細気管支炎の特効薬である 14 員環マクロライド系抗生物質の抗炎症作用を包括的に検討するために、初年度はヒト気管支上皮細胞株を用いて、2 年目はヒト正常末梢気管支上皮細胞の定常状態においてトランスクリプトーム解析を行った。最終年度となる本年度は、ヒト正常末梢気管支上皮細胞の炎症性刺激 (TNF α) 下で、エリスロマイシン (EM) 及びその抗菌作用のない類縁体 EM703 を前処置し、遺伝子発現への作用をジーンチップにより包括的に評価した。TNF α で 2 倍以上遺伝子発現が上昇した 420 遺伝子のうち、EM で 30% 以上抑制された遺伝子は 72 個で、そのうち EM703 でも同様に抑制されたものが 45 個 (62.5%) あった。さらに EM703 で 25% 以上抑制されたものは 55 個 (76.4%) にのぼった。既知のもので気道炎症に関連性が推測されるものには、CCL5 (RANTES) や CXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2) などのケモカイン、IFNAR2 (interferon 受容体), RAB, RAPIA などの Ras 関連分子, mitogen-activated protein kinase 3 などのシグナル関連分子, TCF2 などの転写因子, tissue plasminogen activator や cell death activator CIDE-3 などがあった。

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

Hajime Takizawa¹, Toshiharu Tsukidate², Toshiharu Nakajima², and Hirohisa Saito²

¹The Department of Respiratory Medicine, University of Tokyo, Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan

²National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan

Macrolide antibiotics have an anti-inflammatory activity, which is believed to be one of the important mechanisms of therapeutic efficacy for the treatment of diffuse panbronchiolitis.

To investigate the molecular mechanisms of their actions, we explored to utilize the array analysis of mRNA transcripts in normal human peripheral airway epithelial cells. The normal human bronchial epithelial cells were treated with therapeutic dosage of erythromycin (EM, 10^{-6} M) or its analogue EM703, or vehicle alone for 24 hrs. TNF α (10^{-7} M) was added to the cells, and total cellular RNA were extracted and subjected to gene transcription analysis by Gene-Chip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. EM showed modulatory effects on transcription of several genes. These genes included chemokines such as CCL5 (RANTES) and CXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2), receptors such as IFNAR2 (interferon receptor), Ras-related molecules (RAB, RAPIA), mitogen-activated protein kinase 3, transcription factors such as TCF2, and other molecules (tissue plasminogen activator, cell death activator CIDE-3). This approach seemed to help elucidating the important genes involved in the therapeutic effectiveness of the macrolides.

はじめに

エリスロマイシン (EM) をはじめとする 14 員環マクロライド抗生物質の慢性気道炎症性疾患における有効性の機序について、これまでに気道上皮細胞のサイトカイン/ケモカイン、接着分子の発現ないし産生、遊離を抑制することを報告してきた¹⁾²⁾³⁾。これらの多くに共通して重要な転写調節因子 (NF κ B, AP-1) の活性化についてもゲルシフトアッセイにより検討し、薬剤と刺激の同時処置では明らかな抑制作用はないが⁴⁾、治療域濃度のエリスロマイシン (EM, 10⁻⁶M) およびクラリスロマイシン (CAM) を種々の条件で前添加した系においては 24 時間の前処置により、明らかな NF κ B, AP-1 の活性化抑制作用を見出した⁵⁾。さらに、前年度には、マクロライドの抗菌作用を有しない各種誘導体が転写調節因子 (NF κ B, AP-1) の活性化を抑制しうることを、I κ B のリン酸化には直接作用しないことを示した⁶⁾。マクロライドの作用点のひとつに核内結合過程が存在することを示唆する結果も得られた。

しかし、マクロライド抗生物質には、きわめて多彩

な作用があることも判明しており、従来の候補分子を選んだ研究では把握できない網羅的な遺伝子発現解析の必要性が指摘されていた。一昨年我々は、びまん性汎細気管支炎などに対するマクロライドの有効性を解明するため、エリスロマイシンを作用させた気道上皮細胞株 (BET-1A) における遺伝子発現をマイクロアレイ (GeneChip) を用いて網羅的に検討した⁷⁾。そして昨年度は、より実際の上皮に近い実験系をめざして、ヒト正常末梢気道上皮細胞を用いて、検討を行った⁸⁾。

今年度は、さらに気道炎症の病態を考慮して、炎症性刺激下で正常ヒト細気管支上皮細胞にマクロライド添加を行い、遺伝子発現への影響を網羅的に検討した。

対象と方法

1) 既報のごとく⁵⁾、正常ヒト細気管支上皮細胞 (SAEC, CloneticsTM) 1×10⁶ cells を、ホルモン・成長因子を添加した Small Airway Epithelial Cell Medium without hydrocortisone and BPE を用いて培養した。

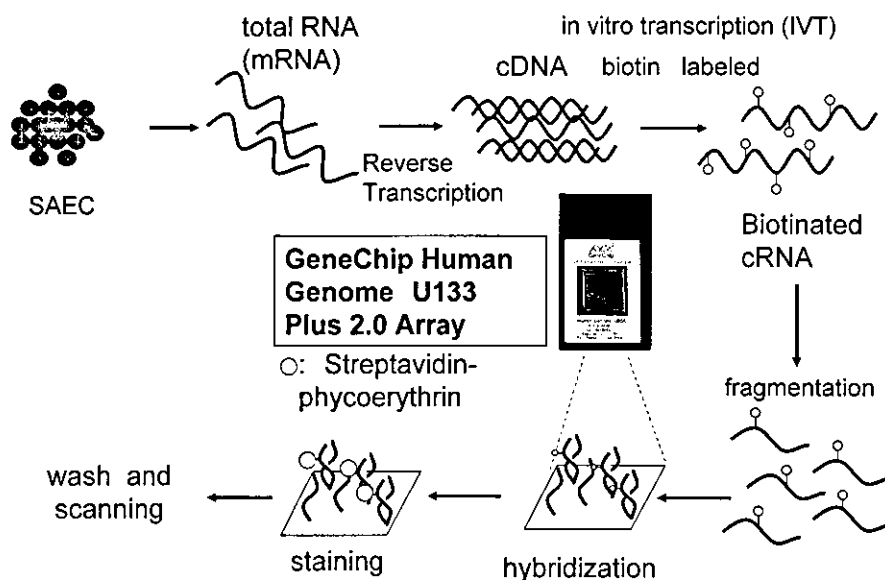


図1 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いた包括的遺伝子発現の検討方法。

¹ 東京大学医学部呼吸器内科

² 国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

2) コントロール (TNF α 10^{-7} Mのみ), および Erythromycin (EM) 10^{-6} M か EM の抗菌作用をもたない類縁体である EM703 10^{-6} M を 24 時間前処理して, 37°C 24 時間インキュベートしたのち, total RNA を精製し (RNeasy キット), 引き続き包括的な遺伝子発現解析を行った。用いたキットは昨年までの Human Genome U133A (Affymetrix 社) より多くの遺伝子発現解析が可能な, GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array である。これにより, 35,500 の既知遺伝子を含む約 47,000 遺伝子を解析できる (図 1)。

3) それぞれの遺伝子発現で発現強度の平均値の差が 100 を超えているものを検討の対象とした。

結 果

- (1) Control, EM, EM703, TNF, TNF+EM, TNF+EM703 の 6 群で, β -actin, GAPDH に差はなかったため, 遺伝子発現の補正は行わなかった (図 2)。
- (2) TNF で 2 倍以上上昇したもの: 420 個
- (3) TNF と比較して, TNF+EM で低下したもの (抑制率 > 30%): 72 個

- (4) そのうち, EM703 も抑制したもの: 45 個 (62.5% が一致)
- (5) さらに, EM703 の抑制率が 25% 以上のものを含めると: 55 個 (76.4% が一致) であった。
- (6) 気道炎症に関連の深いサイトカイン・ケモカインについての結果を図 3 に示す。このうち, CCL5 (RANTES) や CXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2) においては, EM の処理により, 30% 以上の減弱を示した。
- (7) 受容体, シグナル分子に関しては, 図 4 に示す 9 個の遺伝子発現が 30% 以上抑制された。
- (8) その他の分子で強い抑制を認めたのは, 図 5 にように Fanconi anemia complementation group C/FANCC を始めとして 6 種が 30% 以上の抑制を認めた。

考 案

びまん性汎細気管支炎に対する特効的な効果を示す 14 員環マクロライド療法 (15 員環も有効) は, 最近では従来からの慢性副鼻腔炎, 副鼻腔気管支症候

Gene Title	cont	EM	EM703	cont +TNF	EM +TNF	EM703 +TNF
actin, beta / ACTB	9831P	9515P	9535P	9346 P	9829 P	9173 P
glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase / GAPDH	9197P	9044P	9057 P	8786 P	8929 P	8552 P

図 2 β -actin, GAPDH の遺伝子発現強度の比較。Control, EM, EM703, TNF, TNF+EM, TNF+EM703 の 6 群で, 有意な差はなかった。

Gene Title	cont +TNF	EM +TNF	EM703 +TNF (%)	inhibition by EM (%)	inhibition by EM703
RANTES/CCL5	639 P	330 P	316 P	48.4	50.4
GCP-2/CXCL6	408 P	251 P	233 P	38.5	42.7
interleukin 1 family, member 9 / IL1F9	879 P	642 P	554 P	27.0	36.9
interleukin 24 / IL24	113 P	89 P	92 P	21.2	18.0
CXCL3 /GRO γ	238 P	194 P	197 P	18.4	17.4
interleukin 8 / IL-8	3676 P	3064 P	2398 P	16.6	34.8
platelet-derived growth factor beta / PDGFbeta	349 P	311 P	346 P	10.9	0.8

図 3 気道炎症に関連の深いサイトカイン・ケモカインについての結果。

Gene Title	cont +TNF	EM +TNF	EM703 +TNF	inhibition (%) by EM	inhibition (%) by EM703
mitogen-activated protein kinase 3/MAPK3	285 P	118 A	172 A	58.7	39.8
inhibin, beta A (activin A 926P		506 P	614P	45.4	33.7
RAB40B, member RAS oncogene family/RAB40B	169P	94 P	105 M	44.7	37.8
interferon (alpha, beta and omega) receptor 2/IFNAR2	118P	68P	77P	42.4	34.3
transcription factor 2, hepatic/ TCF2	239P	141A	116A	40.9	51.7
cell death activator CIDE-3	107P	66P	67P	38.4	37.7
guanylate binding protein 2, interferon-inducible /GBP2	205 P	128P	163P	37.8	20.4
tumor protein p53 inducible protein 5 / TP53I5	226P	145A	178A	36.0	21.2
RAP1A, member of RAS oncogene family		114P	80P 78P	30.0	31.5

図4 受容体, シグナル分子で影響を認めたもの。

Gene Title	cont +TNF	EM +TNF	EM703 +TNF	inhibition (%) by EM	inhibition (%) by EM703
Fanconi anemia, complementation group C/FANCC	263 P	91 P	172 P	65.6	34.7
plasminogen activator, 216 tissue / PLAT	P	130 P	129 P	39.8	40.2
Calpastatin/CAST	150 P	97 P	135P	35.8	10.2
angiopoietin-like 4/ 1066 P	P	692 P	745 P	35.1	30.1
contactin 3 (plasmacytoma associated)/CNTN3	188 P	123 P	85 P	34.8	55.0
neuronal cell adhesion molecule /NRCAM	127 P	87 P	107 P	31.4	15.8

図5 その他の分子で抑制を認めたもの。

群, 気管支拡張症への応用に加え, 欧米ではのう胞線維症の標準的治療選択になり, またわが国では COPD の急性増悪を減少するなど, さらに広範囲かつ重要な治療法として注目されつつある。一方で, 肺炎球菌をはじめとする呼吸器感染症起炎菌のマクロライド抗生物質への耐性も問題となっており, 本療法の標的分子の解明, さらに抗菌作用のない誘導体のスクリーニングに期待が集まっている。

これまでの研究により, 14 員環マクロライド抗生物質が, 炎症の局面で重要な各種の分子, すなわち IL-8, IL-1 β , IL-6 などの炎症性サイトカイン, ケモカイン, や接着分子の発現を遺伝子レベルで抑制ないし正常化することがあきらかにされてきた。さらに, これら炎症性サイトカインなどの発現に重要な転写調節因子 (NF κ B, AP-1) の活性化を抑制することが明らかになり, びまん性汎細気管支炎の気道炎症を改善する 1 機序として推定されるに到っている。この作用

は, 気道上皮細胞のみならずマクロファージ, リンパ球, 線維芽細胞においても認められ⁹⁻¹²⁾, 生体に対するかなり普遍的な作用である可能性がある。一方, マクロライドには, 気道分泌抑制作用, 細胞のアポトーシスへの作用, リンパ球の増殖抑制作用など, きわめて多面的な作用も示されており, 以上述べた機構だけで薬効を説明しきることはできない。

そこで近年応用が行われているマイクロアレー法により, マクロライド療法の標的遺伝子の抽出を試みた。初年度は, ヒト気管支上皮細胞株である BET-1A 細胞を用いて, ささまざまな条件で検討を行い, Affymetrix 社のジーンチップを用いて, 約 2 万以上の遺伝子についてその発現への影響を検討できた。このうち, ヒト気道上皮細胞において検出可能であったのは, 約半分の 1 万個であった。第 2 年度は, 細胞株よりも一層病態的意義付けが可能な正常ヒト末梢気管支上皮細胞を用いて, EM の処理をより長時間とし

た。予備的な実験により、細胞の生存率に影響を与えない最長時間として72時間のインキュベーションを行った。この処理により、72時間後のIL-8遺伝子発現レベルは減弱傾向を示した。他の炎症性サイトカイン・ケモカインでははっきりしたものは認めなかった。この系では、既報の報告同様炎症性サイトカインによる刺激をせず、EMを添加したためか、細胞の生存率は比較的長時間保たれたが、72時間を越えると明らかに生存率や細胞数の減少を認めた。また、EMの処理により、発現が増強する遺伝子が11個みられ、一方減弱する遺伝子が12個存在した。どちらもBET-1Aで行った昨年度の結果よりも大幅に少ない数であった。この原因は不明であるが、従来からマクロライドの炎症病態での効果は抑制作用というよりも正常レベル(baseline)への回復作用である(つまりsuppressionではなくmodulation)と考えられており、非刺激下の検討では限界があると思われた。

そこで、最終年度の今回は、炎症性刺激としてTNF α を用いて、マクロライドの前処理での検討を行った。さらに、従来の検討で抗炎症作用が認められ、かつ抗菌作用やモチリン様作用をもたない誘導体EM703も同様に検討を行った。そして、解析にあたっては、昨年度までのものより多数の遺伝子について解析可能なGeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用いた。

その結果、TNF α で2倍以上遺伝子発現が上昇した420遺伝子のうち、EMで30%以上抑制された遺伝子は72個で、そのうちEM703でも同様に抑制されたものが45個(62.5%)あった。さらにEM703で25%以上抑制されたものは55個(76.4%)にのぼった。EMと抗菌作用のない誘導体EM703に共通する遺伝子は特に有望と思われた。既知のもので気道炎症に関連性が推測されるものには、CCL5(RANTES)やCXCL6(granulocyte chemotactic protein-2)などのケモカイン、IFNAR2(interferon受容体)、RAB、RPIAなどのRas関連分子、mitogen-activated protein kinase 3などのシグナル関連分子、TCF2などの転写因子、tissue plasminogen activatorやcell death activator CIDE-3などがあった。現在、そのいくつかについて定量的RT-PCRなどにより確認中である。

マクロライドの作用機構を解明する上で、今回のアプローチは、同時にほぼ全部の遺伝子発現への影響を網羅的に検出できる点が最大の利点と思われる。しか

し、一方で、細胞内でリン酸化されるシグナル分子の動きなどはとらえられないことなど、限界もまた存在する。さらに、マクロライドの効果発現には少量で長期の投与が必要であることを考慮するとマクロライドの試験管内での作用時間にも工夫が必要である。我々は、以上の点にも留意しながら、マクロライドの作用する遺伝子群の検索を推進する予定である。

結 論

マクロライドの抗炎症作用解明のために、ヒト正常末梢気道上皮細胞を用いてジーンチップによる包括的遺伝子発現の検討を行い、いくつかの候補遺伝子がピックアップされた。

謝 辞

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

参考文献

- 1) Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, et al.: Erythromycin suppresses interleukin 6 expression by human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 781-786, 1995.
- 2) Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, et al.: Erythromycin modulates IL-8 expression in human bronchial epithelial cells: Studies with normal and inflamed airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 266-271, 1997.
- 3) Kawasaki S, Takizawa H, Ohtoshi T, et al.: Roxithromycin inhibits cytokine production and neutrophil attachment with human bronchial epithelial cells in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1499-1502, 1998.
- 4) 滝沢 始, 出崎真志, 河崎 伸, 他: エリスロマイシン療法の機序解明: ヒト気道上皮細胞の転写調節に対するマクロライド抗生物質の作用. 厚生省特定疾患呼吸器系疾患調査研究班びまん性肺疾患分科会平成10年度研究報告書, 124-127.
- 5) Desaki M, Takizawa H, Ohtoshi T, et al.: Eryth-

- romycin suppresses nuclear factor- κ B and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 124-128, 2000.
- 6) Desaki M, Okazaki H, Sunazuka T, Omura S, Yamamoto K, Takizawa H: Molecular mechanisms of an anti-inflammatory action of erythromycin in human bronchial epithelial cells: a possible role in the signaling pathway that regulates nuclear factor- κ B activation. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1581-5, 2004.
- 7) 滝澤 始, 中島敏治, 斎藤博久, 梅田 啓: エリスロマイシンの抗炎症作用: 包括的遺伝子発現解析から (第一報). 厚生労働科学研究 特定疾患対策研究事業 びまん性肺疾患研究班 平成 14 年度研究報告書, 203-206.
- 8) 月館利治, 中島敏治, 斎藤博久, 滝澤 始: エリスロマイシンの抗炎症作用: 包括的遺伝子発現解析から (第二報). 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 びまん性肺疾患調査研究班 平成 15 年度研究報告書, 193-196.
- 9) Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, et al.: Clarithromycin inhibits NF- κ B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 44-47, 2001.
- 10) Miyanohara T, Ushikai M, Matsune S, et al.: Effects of clarithromycin on cultured human nasal epithelial cells and fibroblasts. *Laryngoscope* 110: 126-131, 2000.
- 11) Aoki Y, Kao PN: Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF- κ B, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2678-2684, 1999.
- 12) Kikuchi T, Hagiwara K, Honda Y, et al.: Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF- κ B transcription factors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49(5): 745-55, 2002.

追 加

追

加

「アマメシバ」摂取と関連したと思われる閉塞性 細気管支炎の本邦での発生 —— 緊急報告 ——

松山 航¹ 大中原研一¹ 東元 一晃¹ 納 光弘^{1*}
林 美保² 小倉 高志² 長谷川好規³ 下方 薫^{3*}

閉塞性細気管支炎は病理学的には細気管支の狭窄及び閉塞の認められる予後不良の稀な疾患である。閉塞性細気管支炎は膠原病、感染症、薬剤、粉塵吸入、骨髄を含めた臓器移植など多くの原因で発症するがその病態は未だ解明されていない。1995年に台湾での「アマメシバ」摂取に関連した閉塞性細気管支炎の大量発生がLaiらにより報告された。「アマメシバ」は植物の一種で体重コントロール目的に使用される。我々はここに日本での「アマメシバ」摂取に関連した閉塞性細気管支炎5例を報告する。全症例、閉塞性呼吸機能障害を認めステロイド治療に抵抗性であった。日本での年間「アマメシバ」生産量は3,000トンにのぼり、まださらに多くの「アマメシバ」摂取に関連した呼吸器疾患についての全国調査の必要性を提案する。

Outbreak of bronchiolitis obliterans associated with consumption of *Sauropus androgynus* in Japan

Wataru Matsuyama¹, Ken-ichi Oonakahara¹, Ikkou Higashimoto¹, Mitsuhiro Osame¹
Miho Hayashi², Takashi Ogura², Yoshinori Hasegawa³, Kaoru Shimokata³

¹Department of Neurology and Geriatrics, Kagoshima University Graduate School of
Medical and Dental Science, Kagoshima Japan.

²Department of Respiratory Medicine, Kanagawa Cardiovascular and Respiratory Center, Kanagawa Japan

³Department of Medicine, Division of Respiratory Diseases, Nagoya University Graduate School of Medicine

Bronchiolitis obliterans (BO) is a rare disease with poor prognosis characterized by stenosis and obstruction of bronchioles, pathologically. It has been reported that BO is caused by many factors such as collagen diseases, infections, drugs, toxic fumes and bone marrow or lung transplantation, however detailed pathogenesis of BO has not been elucidated. In 1995, Lai et al reported an outbreak of BO, which were associated with the consumption of uncooked *Sauropus androgynus* (SA). SA is a vegetable that is used for weight control. Here, we report new five cases of BO associated with consumption of SA in Japan. All cases showed obstructive pulmonary dysfunction and steroid therapy was not effective. Total production amount of SA is 3000t per year in Japan, therefore it is possible that there are more patients with pulmonary disorder associated with SA consumption. We propose the necessity to investigate the nation-wide case search of SA-associated pulmonary disorders.

はじめに

1995年、台湾において健康食品として販売されていた「アマメシバ (Sauropus androgynus)」が原因と見られる重篤な閉塞性細気管支炎で200～300例の犠牲者の報告がなされた。これらはいずれもステロイドなどの免疫抑制剤や気管支拡張薬の治療に反応せず、その中には死亡例や肺移植を要する例など予後不良症例も少なくなかった¹⁾。2003年、我々は本邦で初めて「アマメシバ」が原因と考えられる閉塞性細気管支炎の緊急症例報告²⁾を行った。その後、相次いで4例の「アマメシバ」摂取が原因と考えられる肺疾患の症例が見つかった³⁾。以下に本邦での「アマメシバ」摂取が原因と考えられる肺疾患患者について報告する。

症 例 (表 1)

症例 1. 47歳女性。生来健康。平成14年4月より4ヶ月間「アマメシバ」(総量1kg) 摂取していたところ呼吸困難、咳が出現。呼吸困難は Hugh-Jones IV 度まで進行、呼吸機能検査で閉塞性肺機能障害、胸部 CT にてモザイクパターン (図 1a)、肺換気シンチにてびまん性に欠損を認め (図 1b) 臨床的に閉塞性細気管支炎と診断された。「アマメシバ」摂取中止し、ステロイド治療開始されたが呼吸困難進行し、平成16年現在生体肺移植待ちの状態である。

症例 2. 55歳女性。生来健康。平成14年8月から約3ヶ月間「アマメシバ」(総量1.44kg) 摂取したところ呼吸困難、咳、喘鳴が出現。近医受診し呼吸機能検査



図 1a. 胸部 CT (呼吸時)

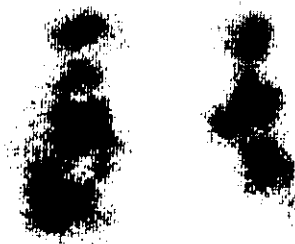


図 1b. 肺換気シンチ

で閉塞性肺機能障害を認めた。「アマメシバ」摂取中止し、気管支拡張薬、ステロイド治療をされたが症状の改善は認めていない。

症例 3. 29歳女性。生来健康。平成14年8月より約9ヶ月「アマメシバ」(総量1.2kg) 摂取したところ咳、喘鳴、呼吸困難出現。近医受診し呼吸機能検査で閉塞性肺機能障害を認めた。「アマメシバ」摂取中止し、気管支拡張薬、ステロイド治療をされたが症状の改善は認めていない。

症例 4. 73歳女性。生来健康。平成13年6月より約6ヶ月間「アマメシバ」(総量0.3kg) 摂取したところ口腔内腫脹、味覚異常が出現したため摂取中止したが約3ヵ月後から労さじ呼吸困難出現。近医受診し呼吸機能検査で閉塞性肺機能障害を認め、気管支拡張薬、ステロイド治療をされたが症状の改善は認めていない。

症例 5. 50歳女性 (症例4の娘)。生来健康。平成13年9月より約3ヶ月間「アマメシバ」(総量0.36kg) 摂取したところ舌の違和感出現し摂取中止した。しかし、その3ヵ月後労さじ呼吸困難出現。近医受診し呼吸機能検査で閉塞性肺機能障害を認め、気管支拡張薬、ステロイド治療をされたが症状の改善は認めていない。

表 1

症例	1	2	3	4	5
年齢(歳)・性	47・女	55・女	29・女 (2の娘)	73・女	50・女 (4の娘)
アマメシバ					
総摂取量(g)	1000	1440	2190	300	400
摂取期間(日)	130	360	360	180	120
1秒量(L)	0.64	0.62	1.00	0.45	0.53
1秒率(%)	36.4	40.3	54.3	29.0	24.0
治療反応性	無	無	無	無	無

¹⁾ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学講座 神経内科・老年病学分野

²⁾ 神奈川県立循環器呼吸器病センター呼吸器科

³⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科機能調節内科学

* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者