

2. 非典型例：急性サルコイドーシスおよび亜急性サルコイドーシス

(1) 結節性紅斑 (Erythema nodosum)<sup>1)</sup>

結節性紅斑は従来結核に伴って出現する下腿の伸側の発赤を伴う浮腫性紅斑である。しかし最近ではその約半数がサルコイドーシスに合併して起こる。その病態は免疫複合体によって起こるといわれている。

(2) Lofgren 症候群<sup>2,3)</sup>

スウェーデンの Lofgren は若年女性に多く、彼が初めて記載した結節性紅斑に関節炎、両側性肺門リンパ節腫脹、発熱を伴って急性発症するサルコイドーシスを primary pulmonary sarcoidosis と記載し、予後良好で高頻度に胸部レ線所見が正常化すると報告した。後に Lofgren 症候群と命名された。しかし結節性紅斑の発現頻度には地域差、人種差があり、我が国では低頻度であり<sup>3)</sup>、Lofgren 症候群も同様である。また予後に関しても我が国の症例では必ずしも胸部レ線所見の経過が良好でない<sup>4)</sup>。

(3) Heerfordt 症候群<sup>5,6)</sup>

デンマークの Heerfordt は慢性あるいは亜急性のぶどう膜炎、耳下腺腫脹、顔面神経麻痺、発熱を伴う症候群を “Febris uveo-parotidea subchronica” と記載した。後に Heerfordt 症候群とよばれるようになり、前記 4 主徴を伴って発病する一群を uveo-parotid fever とよばれている。完全型 (4 主徴を満たすもの) と不全型 (前 3 症状のうち 2 症状と発熱) に分けられている。

文 献

- 1) Lofgren S: Erythema nodosum. Studies on etiology and pathogenesis in 185 adult cases. Acta Med Scand 124 (Suppl): 1-197, 1946.
- 2) Lofgren S: Primary pulmonary sarcoidosis. I Early signs and symptoms. Act Med Scand 145: 424-431, 1953.; II Clinical course and prognosis. Act Med Scand 145: 465-474, 1953.
- 3) James DG, Hosoda Y: Epidemiology. In: James DG ed. Lung Biology in Health and Disease Vol 73: Sarcoidosis and other granulomatous disorders. Marcel Dekker, NY 729-743, 1994.
- 4) 立花暉夫: サルコイドーシスの急性発症. 臨床医 7: 104-105, 1981.

5) Heerfordt CF: On febris uveo parotidea subchronica localized in the parotid gland and uvea of the eye, frequently complicated by paralysis of the cerebrospinal nerve. Ugeskr Laeger 71: 417-421, 1909.

6) 高橋典明, 堀江孝至: Heerfordt 症候群. 肺外サルコイドーシスの臨床 日本臨床 60: 1822-1826, 2002.

VI. サルコイドーシスの診断基準

サルコイドーシスの診断は以下に示す組織診断群と臨床診断群に分けて診断するが、サルコイドーシスは多臓器疾患である関係上、臓器病変の詳細は各臓器病変診断の手引きを参照する。また類似の臨床症状を示す他疾患を除外して診断する。一部の症例では下記の診断基準をみたさないものの臨床的にサルコイドーシスが強く疑われる場合がありその場合は疑診 (possible) として長期の経過観察することが重要である。

1. 組織診断群

1 臓器に組織学的に非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を認める場合、下記の 1)~3) のいずれかの項目を認める場合は組織診断とする。

- 1) 他の臓器に非乾酪性類上皮細胞肉芽腫をみとめる。
- 2) 他臓器で臨床的にサルコイドーシスが疑われる場合。
- 3) 下記に示す 3 検査所見の 6 項目中 2 項目以上を認める場合。

2. 臨床診断群

組織学的に非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を認めない場合。

2 臓器以上で各臓器病変の診断の手引きで臓器病変臨床診断群に相当する所見を認め、下記 3 検査所見の項目中 2 項目以上を認める時は臨床診断群とする。

3. 検査所見

- ① BHL を認める
- ② 血清 ACE 高値
- ③ ツベルクリン反応陰性
- ④ <sup>67</sup>Ga シンチグラムグラフィー集積著明
- ⑤ 気管支肺泡洗浄液検査 (リンパ球増加または CD4/CD8 比高値)
- ⑥ 血清あるいは尿中カルシウム値の増加

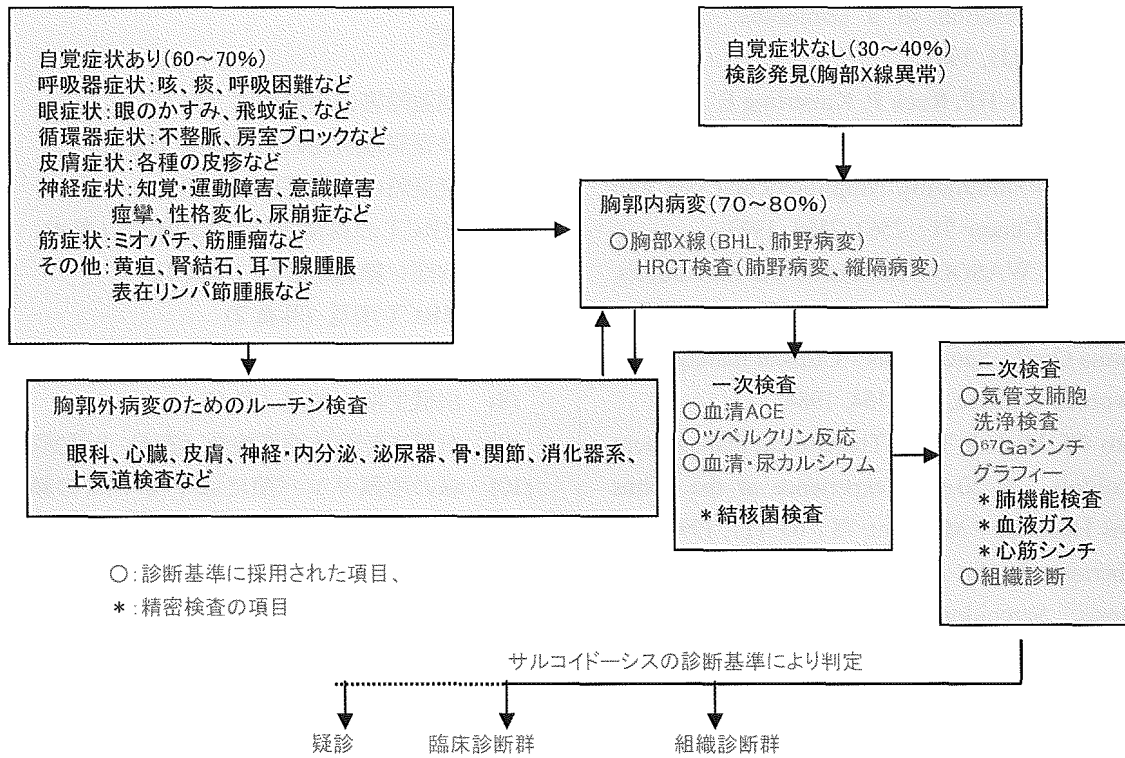


図1 サルコイドーシスの診断の手順

4. 除外項目

各臓器別診断の手引きの除外項目に記載された疾患は除外する。

異物、癌等によるサルコイド反応は除外する。

5. サルコイドーシスの診断のための手順 (図1)

VII. 我が国における「サルコイドーシスの診断基準」の外国文献からみた妥当性

現在我が国で使用されている「サルコイドーシスの診断基準」は組織診断群と臨床診断群を認め多くの症例の診断を容易にしている。その診断基準の中心は臨床症状、画像所見、検査所見、組織診断、除外項目からなっている。この考え方は外国文献に共通する診断の基本理念と一致する。ATS/ERS/WASOGのStatement on sarcoidosis<sup>5)</sup>では1. 特徴的な臨床像および画像所見, 2. 組織所見, 3. 他疾患の除外の3項目を挙げ、更に、組織学的診断が陰性の場合 stage I, II の症例なら臨床所見と X 線学的診断で診断可能であるとしている。また classical Lofgren も診断可能としている。ACE 高値は必ずしも診断には有用ではないと記している。Sharma<sup>6)</sup>は彼の著書で、1. 特徴的な臨床像および画像所見, 2. 組織所見, 3. 他疾患除外と同様の項目をあげている。また Johns<sup>7)</sup>も同様の項目を挙げ

ている。次に検査項目も含めて、Lieberman<sup>8)</sup>は臨床像、胸部 X 線、肺機能、ACE、生検、次に、ガリウムシンチ、BAL 所見、ツ反、免疫グロブリン、高カルシウム血症、高カルシウム尿症を挙げている。Tierstein<sup>9)</sup>は診断では胸部 X 線と生検を重視し、BAL, ACE, ガリウムは診断には有用ではないと断言している。USA の ACCESS study (A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis)<sup>10)</sup>では生検を重視している。以上のように現在我が国の診断基準に採用されている項目と諸外国の診断に必要な項目はほぼ同じであると考えてよい。しかし、各項目の重要度は各国で異なることが出来るので、十分に我が国の特徴を考えた診断基準が必要である。

文 献

1) Brincker H: Sarcoid reactions in malignant tumors. Cancer Treat Rev 13: 147-156, 1986.  
 2) Romer F: Sarcoidosis and Cancer. In: James DG ed. Lung Biology in Health and Disease Vol 73, Sarcoidosis and other granulomatous disorders. Marcel Dekker NY 729-743, 1994. pp 401-415, 1994.  
 3) Pickard WR, Clark AH, Abel BJ: Florid

- granulomaous reaction in a seminoma. Postgrad Med J59 : 334-335, 1983.
- 4) Dietl J, Horny HP, Ruck P, Kaiserling E ; Dysgerminoma of the ovary. An immunohistochemical study of tumor-infiltrating lymphoreticular cell and tumor cells. Cancer 71 : 2562-2568, 1993.
  - 5) ATS/ERS/WASOG : Statement on Sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med 160 : 736-755, 1999.
  - 6) Sharma OmP : Sarcoidosis : Clinical management Butterworths, London, 159-164, 1984.
  - 7) Johns CJ, Michele TM : The clinical management of sarcoidosis. A 50-year experience at the Johns Hopkins Hospital. Medicine 78 : 65-111, 1999.
  - 8) Lieberman J : An overview of the diagnosis of sarcoidosis. Sarcoidosis Ed by Lieberman J Grune & Stratton, Orland, p 191-193, 1985.
  - 9) Teirstein AS : Diagnosis. In James DG Ed. Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. Marcel Dekker, Inc, New York pp 747-752, 1994.
  - 10) Judson MA, Baughman RP, Teirstein AS, et al : Defining organ involvement in Sarcoidosis: the ACCESS proposed instrument. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 16 ; 75-86, 1999.

## 付 記

- (1) 臓器障害の出現頻度 (表 1)
- (2) 検査異常所見の出現頻度 (表 2)
- (3) 発見時の自覚症状 (表 3)
- (4) HRCT の異常所見の出現頻度 (表 4)
- (5) 胸部レ線病期分類 (写真 1)
- (6) HRCT 所見 (写真 2)
- (7) サルコイドーシスの組織所見 (図 1)
- (8) 組織生検の頻度 (表 5)
- (9) 気管支肺胞洗浄液検査 (表 6) と注意事項
- (10) 癌の所属リンパ節には平均 4.4% の頻度で非乾酪性類上皮細胞肉芽腫 (サルコイド反応) が見られる<sup>1,2)</sup>。Seminoma<sup>3)</sup> や dysgerminoma<sup>4)</sup> の場合のように 3~7% の癌患者では原発巣に肉芽腫が見られることもある。

## おわりに

現在サルコイドーシスの肺, 心臓, 眼, 神経・筋, 皮膚病変の手引きが各分野において最終調整中である。近くこれらも含めた最終決定がなされる予定となっている。

# サルコイドーシス肺病変診断のてびき (案) の策定

杉崎 勝教<sup>1\*</sup> 折津 愈<sup>2\*</sup>

今回サルコイドーシス基本診断基準の改訂に伴い、新たに各臓器別病変について診断のてびきを策定することとなった。肺病変についても従来から用いられてきた診断基準を援用しながら一部追加し新たに診断のてびきを策定した。改訂された点としては HRCT 所見を含めた画像所見の記述である。さらに組織診断群と臨床診断群にわけ、臨床診断群は両側肺門リンパ節腫脹 (BHL) のある群とない群に分けた。これはサルコイドーシスの肺病変を診断する上で BHL がきわめて特異的な所見と考えられたからである。最後に類似疾患の鑑別を行い最終的な診断とした。

## New Japanese diagnostic criteria of lung disease in sarcoidosis

Katsunori Sugisaki<sup>1</sup>, and Masaru Oritu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Internal Medicine, Nishibeppu National Hospital*

<sup>2</sup>*Department of Respiratory Disease, Japanese Red Cross Medical Center*

We tried to renew the Japanese criteria of sarcoidosis and each organ involvement. In this background, we made the new diagnostic criteria for lung disease. First, we described the radiological findings of lung disease including HRCT findings. According to this new diagnostic criteria, lung disease is divided into two groups, one is the group of patients with histological evidence (Histological group) and the other is the group of patients with only clinical evidence (Clinical group). In the clinical group, we put stress on BHL (bilateral hilar lymphadenopathy) because it is very specific for lung involvement of sarcoidosis. Finally, we need to differentiate the other similar lung diseases.

## はじめに

現在使用されているサルコイドーシス（以下サ症）の診断基準は1989年にびまん性肺疾患調査研究班により作成されたものである。この診断基準には肺病変に対する独立した診断のてびきはなく基本診断基準に含まれる形となっていた。今回基本診断基準自体の診断法が大きく変化したことに伴い肺病変についても新たな診断のてびきが作成された。

## 結果と考案

サ症において肺は最も罹患頻度の高い臓器でありサ症肺病変の診断はサ症診断の要である。新しく策定されたサ症肺病変の診断のてびき（案）ではまずサ症肺病変のHRCTを含めた画像所見についての記載を改訂した。ついで組織診断群と臨床診断群を設定した。すなわち組織診断群はサ症に矛盾しない画像所見や内視鏡所見をもちかつ病変局所からTBLBやVATSなどにより十分量の類細胞細胞肉芽腫を含む組織が得られた症例である。一方臨床診断群は組織学的検査を施行できなかったか組織学的検査を行ったが陽性所見が得られなかった症例で臨床的にサ症肺病変の存在を強く疑う症例である。この群については両側肺門リンパ節腫大（BHL）を持つ症例と持たない症例にわけ、持つ群では基本検査所見5項目中1項目以上を満たした場合、またBHLをもたない症例では5項目中2項目以上を満たした症例とした。BHLの有無により診断基準を区別したのはBHLがサ症肺病変の診断にきわめて特異的な所見と考えたからである。最後に鑑別すべき主な疾患をあげ除外診断が必要であることを記載した。

最終的に策定された肺病変のてびき（案）を別に示す。この診断のてびきに従って診断された肺病変は基本診断基準の診断基準に従いさらに全身的な多臓器病変の一つとして評価が行われた後、最終的にサルコイドーシスの一臓器病変として診断される。

新しく策定されたサルコイドーシス肺病変診断のてびきについては今後各専門施設で診断の有効性に

についての検証を行い、もし問題点がでてくれば再度改訂してゆく予定である。

## サルコイドーシス肺病変の診断の手引き（案）

サルコイドーシスの肺病変には肺泡領域の病変（胞隔炎）および、肺門リンパ節病変、気管・気管支の病変、胸膜病変が含まれる。

- A. 自覚症状：咳、呼吸困難、喘鳴、胸痛を伴うことがあるが、まったく自覚症状を伴わないことが多い。  
B. 身体所見：頻脈、多呼吸、喘息様の笛声ラ音を伴うこともあるが一般的には他覚所見に乏しい。

### C. 検査項目

1. 胸部X線所見<sup>1)</sup>
  - a) 両側肺門リンパ節腫大（BHL）.
  - b) 上肺野優位でびまん性の分布をとる肺野陰影。粒状影、斑状影が主体。
  - c) 気管支の肥厚、血管影腫大。
  - d) 進行すると上肺野を中心に肺野の収縮を伴う線維化病変をきたす。
2. CT・HRCT所見<sup>2-5)</sup>
  - a) 両側肺門リンパ節の腫大を認める。
  - b) 肺野陰影は小粒状影、気管支血管周囲間質の肥厚像が多く見られ、局所的な収縮も伴う。粒状影はリンパ路に沿って分布することを反映し、小葉中心部にも小葉辺縁部（胸膜、小葉間隔壁、気管支肺動脈に接して）にも見られる。
  - c) 結節影、塊状影、均等影も頻度は少ないが見られるが、胸水はまれである。進行し線維化した病変が定型的な蜂窩肺を示すことは少なく、牽引性気管支拡張を伴う収縮した均等影となることが多い。
3. 肺機能所見
 

一般的には肺機能所見が正常である症例が多いが、胸部X線分類でstage 2やstage 3の症例を中心に%VCの低下、一秒量や一秒率の低下、%DLcoの低下を伴うことがある。PaO<sub>2</sub>の低下は重症化した場合のみに認められる。
4. 気管支鏡所見
  - a) 網目状毛細血管怒張（network formation）.
  - b) 小結節。
  - c) 気管支狭窄。
5. 胸腔鏡所見
 

胸膜の結節、肥厚、胸水、肺結節。

<sup>1</sup> 独立行政法人国立病院機構西別府病院内科

<sup>2</sup> 日赤医療センター呼吸器内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

6. <sup>67</sup>Ga シンチグラム所見
- a) 肺門・縦隔リンパ節集積著明.
  - b) 肺野集積著明.
7. 気管支肺胞洗浄検査所見
- a) 回収細胞数の増加.
  - b) リンパ球比率の増加.
  - c) CD4/8 比の増加.
- 但し気管支肺胞洗浄液所見は喫煙の有無により正常範囲が変化するのでその点を考慮して評価する。
- これらの所見のうち 1a)b), 2a)b), 4a) 6a), 7b)c) はサルコイドーシスに比較的特徴的な所見である。
- D. 組織診断:
- a) 経気管支肺生検・気管支生検.
  - b) 胸腔鏡下肺生検, 胸膜生検, 開胸肺生検.
  - c) 縦隔鏡下リンパ節生検.

上記により得られた生検組織において, 十分量の非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を認める. 肺類上皮細胞肉芽腫は気管支・血管周囲に多く形成されるが, 気管支粘膜, 小葉間隔壁, 胸膜, 肺胞壁にも形成される. また肺胞壁にはリンパ球を主体とする胞隔炎を伴うことも多い.

#### 診断基準

1. 胸部画像, 気管支鏡所見  
サルコイドーシスに合致する画像所見や気管支鏡所見をもつ.
2. 検査所見
  - (1) 血清 ACE の高値
  - (2) ツベルクリン反応陰性
  - (3) <sup>67</sup>Ga シンチグラムで肺門・縦隔リンパ節集積著明
  - (4) 気管支肺胞洗浄検査でリンパ球比率の増加または CD4/8 比の増加を認める.
  - (5) 血清または尿中カルシウムの高値

組織診断群 診断基準 1 のいずれかの項目を満足し, 組織学的に非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を認めるもの

臨床診断群 1) 胸部 X 線または胸部 CT 上 BHL を認め, 診断基準 2 の検査所見で

- 1 項目以上陽性
- 2) BHL は認めないが診断基準 1 のいずれかの所見を認め, 診断基準 2 の検査所見で 2 項目以上陽性
- 除外診断 慢性ベリリウム肺, じん肺, 結核および感染性肉芽腫症, 悪性リンパ腫, 他のリンパ増殖性疾患, 過敏性肺炎, ウェゲナー肉芽腫症, 転移性肺腫瘍などを除外する
- 付記 1) 気管支肺胞洗浄液所見ではリンパ球比率 > 17%, CD4/8 > 3.5 を増加の基準として参考にする<sup>6)</sup>. また喫煙の有無を考慮する.
- 2) サルコイドーシスの診断については各臓器別病変と検査結果を基本診断基準に従って評価した後, 最終的に診断される.

#### 参考文献

- 1) Scadding JG and Mitchell DN: Chapter 4 Lung changes Sarcoidosis. 2nd Edition. Chapman and Hall Ltd; 101-180, 1985.
- 2) Müller NL, Kulling P, Miller RR: The CT findings of pulmonary sarcoidosis: analysis of 25 patients. AJR 152: 1179-1182, 1989.
- 3) Muller NL, Frazer RS, Lee KS, Johkoh T: Sarcoidosis. Diseases of the lung, radiologic and pathologic and pathologic correlations. Lippincott Williams & Wilkins: 352-364, 2003.
- 4) Wells A: High resolution computed tomography in sarcoidosis: a clinical perspective. Sarcoidosis Vasc Diffuse lung Dis 15: 140-146, 1998.
- 5) Gruden JF, Webb WR, Warnock M: Centrilobular opacities in the lung on high-resolution CT: diagnostic considerations and pathologic correlation. AJR 162: 569-574, 1994.
- 6) Costabel U: Sensitivity and specificity of BAL findings in sarcoidosis. Sarcoidosis 9 (Suppl. 1): 211-214, 1992.

# 細胞内 *P. acnes* 認識能低下を生じる NOD1 遺伝子変異とサルコイドーシス

江石 義信<sup>1\*</sup> 田辺 剛<sup>2</sup> 石下 郁夫<sup>1</sup> 鈴木 好美<sup>1</sup> 曾田 雪絵<sup>2</sup>  
古川あすか<sup>1</sup> 内田 圭介<sup>1</sup> 武村 民子<sup>3</sup> 生島壮一郎<sup>4</sup> 折津 愈<sup>4</sup>

【目的】 近年種々の肉芽腫性疾患で NOD2 遺伝子異常が報告されたがサ症との関連は否定されている。我々は、細胞侵入性を有する *P. acnes* 患者分離株が NOD1 および NOD2 依存性に NF- $\kappa$ B を活性化することから、サ症における NOD1 遺伝子異常の可能性を検索した。

【方法と結果】 サ症患者 50 名の NOD1 遺伝子全長を解読し、一個のアミノ酸変異を伴う 2 種類のハプロタイプ (野生型 G 型と変異型 A 型) を検出した。サ症患者 73 名、間質性肺炎患者 52 名、健常人 215 名を対象に TaqMan PCR 法によるアリル解析を行った結果、間質性肺炎患者 ( $p=0.036$ ) および健常人 ( $p=0.011$ ) と比較して NOD1-A/A 型の頻度がサ症患者で有意に高頻度であった。間質性肺炎 (OR 1.831; 95% CI 1.374-2.435) 健常人 (OR 1.757; 95% CI 1.322-2.296) いずれの対照群と比較しても NOD1-A 型アリル頻度はサ症と有意な相関を示した。また、A 型 NOD1 遺伝子を有する HEK293T 細胞は G 型 NOD1 遺伝子を有する細胞と比較して *P. acnes* 細胞内感染に対する NF- $\kappa$ B 活性化能が有意に低下していた。

【結論】 NOD1 蛋白による細胞内 *P. acnes* の認識能低下はサ症疾患感受性になんらかの影響を与えている。病因との関連性を追求するには臨床所見との対比解析が必要と考えられる。

## Sarcoidosis and NOD1 variation with impaired recognition of intracellular *Propionibacterium acnes*

Yoshinobu Eishi<sup>1</sup>, Tsuyoshi Tanabe<sup>2</sup>, Ikuo Ishige<sup>1</sup>, Yoshimi Suzuki<sup>1</sup>, Yukie Aita<sup>2</sup>, Asuka Furukawa<sup>1</sup>,  
Keisuke Uchida<sup>1</sup>, Tamiko Takemura<sup>3</sup>, Soichiro Ikushima<sup>4</sup>, and Masaru Oritsu<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Human Pathology, Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup>Age Dimension Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<sup>3</sup>Department of Pathology and <sup>4</sup>Respiratory Medicine, Japanese Red Cross Medical Center

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown etiology. NOD2 mutations have been shown to predispose to granulomatous diseases, including Crohn's disease, Blau syndrome and early-onset sarcoidosis, but not to adult sarcoidosis. We found that intracellular *Propionibacterium acnes*, a possible causative agent of sarcoidosis, activated NF- $\kappa$ B in both NOD1- and NOD2- dependent manners. Systematic search for NOD1 gene polymorphism found in 50 Japanese sarcoidosis patients identified two alleles, G-haplotype and A-haplotype. Allelic discrimination of 73 sarcoidosis patients and 215 normal controls revealed that the NOD1-A/A-genotype was dominant ( $P=0.011$ ) in sarcoidosis patients and the A-allele was associated with this disease [OR 1.757; 95% CI 1.322-2.296]. Functional studies showed that the NOD1 A-allele was associated with reduced ability to activate NF- $\kappa$ B in response to intracellular *P. acnes*. The results indicate that impaired recognition of intracellular *P. acnes* by NOD1 affects the susceptibility to sarcoidosis.

## 緒 言

サルコイドーシスは原因不明の肉芽腫生疾患で遺伝的感受性を持った個体が感染性因子であろう特異的な環境因子に暴露されることにより発症すると考えられている。これまで、疾患感受性あるいは重症度を規定する遺伝子としてビタミン D 受容体<sup>1)</sup>、CC ケモカイン受容体<sup>2)</sup>、RANTES ケモカイン受容体<sup>3)</sup>、TNF- $\beta$ <sup>4)</sup>、IL-18<sup>5)</sup>などをコードする遺伝子の多型が報告がなされている。

*Propionibacterium acnes* はサ症病変部から唯一分離される細菌で定量 PCR 法によりサ症リンパ節において多量の本菌 DNA が検出される<sup>6)</sup>。また in situ hybridization 法により本菌 DNA はサ症肉芽腫内に見出された<sup>8)</sup>。これらの結果はサ症における本菌の病因的関与を示唆するものであった。

NOD1 蛋白は N 末端の caspase-recruitment domain (CARD)、中央部の nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)、C 末端の Leucine-rich 領域 (LRR) の 3 個のドメインから構成される蛋白である<sup>9)</sup>。NOD1 はグラム陰性菌や *Listeria monocytogenes* などのある種のグラム陽性菌の一群に存在している iE-DAP 構造をふくむ細菌のペプチドグリカンに対するパターン認識受容体として働いている<sup>10)</sup>。NOD1 の活性化は炎症性サイトカインの産生につながる NF- $\kappa$ B の活性化を誘導する<sup>11)</sup>。近年、NOD1 の遺伝子多型と喘息、IgE 上昇や炎症性腸疾患との関連を示唆する報告がなされている<sup>12)13)</sup>。

NOD 関連分子である NOD2 遺伝子の変異は肉芽腫性疾患であるクローン病<sup>14)</sup>、ブラウ症候群<sup>15)</sup>、若年発症型サルコイドーシス<sup>16)</sup>の素因であることが報告されている。ブラウ症候群および若年発症型サルコイドーシスにおいては同一の変異が報告されているが、NOD2 の変異とサルコイドーシスの間には関連性が認められない<sup>17)</sup>。

NOD1 は構造的、機能的に NOD2 と類似性を有することから、本研究ではサルコイドーシスの発症素因

としての NOD1 遺伝子多型を検索するとともに、サルコイドーシスの起因体の可能性が示唆されている細胞内寄生性 *P. acnes* に対する NOD1 の認識能について検討した。

## 材料と方法

### 1. 検体および DNA 抽出

本研究では検体として生検によって確定診断されたサルコイドーシス (サ症) 患者 73 名、健常人 215 名、疾患対照群として間質性肺炎 (IP) 患者 52 名から採取した末梢血を使用した。疾患の診断はすべて日赤医療センター病院において行われ、健常人に関しては同病院検診センターにおいて異常が認められなかった血液を供与された。本研究開始にあたり、全患者からインフォームドコンセントにより了承得ると同時に、日赤医療センター倫理委員会において了承を得た。

末梢血からのゲノム DNA 抽出は QIAamp DNA mini kit (QIAGEN 社) を用いて行った。

### 2. サ症患者における NOD1 遺伝子多型の検出

サ症患者 50 名における NOD1 遺伝子の 11 エクソンに対して PCR 産物のダイレクトシーケンシング法を用いて検索した。PCR 反応液 50  $\mu$ l 中の組成は 3  $\mu$ l のサンプル DNA, 5 pmol の各プライマー, 10 nmol の各 dNTP, 100 nmol の MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U の ExTaq (宝酒造), 5  $\mu$ l の 10 $\times$ ExTaq Buffer とした。プライマーの配列はこれまでに報告されているもの<sup>18)</sup>を使用し、PCR 反応条件は 95°C30 秒, 58°C30 秒, 72°C 30 秒を 35 サイクル行った。PCR による増幅をアガロースゲル電気泳動にて確認した後、PCR 産物を DNA Fragment Purification kit (TOYOBO 社) を用いて精製した。精製した PCR 産物に対して ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (ABI 社) にてシーケンス反応を行い、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (ABI 社) によりシーケンス解析を行った後、シーケンス結果を GenBank に登録されている NOD1 配列 (NM\_006092) と比較した。

### 3. 遺伝子タイピング

NOD1 遺伝子の一塩基多型の遺伝子タイピングは TaqMan<sup>®</sup> PCR を用いた Allelic discrimination 法によ

1 東京医科歯科大学大学院人体病理学

2 産業技術総合研究所年齢軸生命工学研究センター

3 日赤医療センター病理部

4 日赤医療センター呼吸器内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者



り行った。PCR 反応液 25  $\mu$ l 中の組成は 15 ng のサンプル DNA, 12.5  $\mu$ l の TaqMan Universal PCR Master mix (2 倍濃度), および 0.625  $\mu$ l の Assay mix (40 倍濃度) とした。遺伝子タイピング用のプライマーおよび TaqMan プローブは ABI 社の Custom TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay Service により設計・合成され、NOD1 mRNA 配列中の変異が確認された箇所のグアニン残基, アデニン残基を検出する TaqMan プローブの 5' 末端にはそれぞれ蛍光色素 VIC および 6-FAM で標識した。これらのプライマーおよびプローブは Assay mix 中に至適な濃度で溶解されている。PCR 反応は 95°C 5 分間インキュベートの後, 92°C 15 秒, 60°C 1 分を 40 サイクル行った。PCR 反応および PCR 後の蛍光強度測定は ABI PRISM 7900HT Sequence Detection system (ABI 社) を用いて行った。VIC シグナルのみ, あるいは 6-FAM シグナルのみを検出したサンプルをそれぞれ G/G 型, A/A 型と判定し, 両方の蛍光シグナルを検出したサンプルを G/A 型と判定した。Allelic discrimination 法による遺伝子タイピングは, サ症患者 50 例における Direct Sequencing 解析の結果と完全に一致したことから, 本遺伝子タイピング法は十分に信頼しうるものとみなした。

#### 4. 感染実験および NF- $\kappa$ B 活性測定

本研究では 2 種類の *P. acnes* 株 (サ症患者からの分離株, 標準株 (ATCC6919)) を使用した。患者分離株は 25 歳女性のサ症患者の皮膚病変から当研究室で分離したものである。これら 2 つの株において細菌学および 16S rRNA の配列に差異は認められないものの, A549 細胞および HEK293T 細胞に対する細胞侵入能は患者分離株のみに認められた (図 1)。*P. acnes* 株は GAM プイオンを用いて 37°C, 嫌気条件化で 3 日間培養したものを用いた。

12 穴プレートに 10% 牛胎児血清加 DMEM 培地でプレート底の 80% を占めるように培養した HEK293T 細胞に対して, リン酸カルシウム法を用いてプラスミドを導入させた。レポータープラスミドとして pBxlIV-Luc (7.3 ng/well), pEF-BOS- $\beta$ -gal (73 ng/well) を, 検索対象の受容体プラスミドとして pcDNA3-NOD1-FLAG (0.3 ng/well), pcDNA3-NOD2 (0.01 ng/well), pFLAG-CMV1-TLR2 (1.0 ng/well) を用いた。導入 8 時間後, 細胞に細胞 1 個あたり 100 個の菌, またはリガンドとして NOD1 導入細胞に

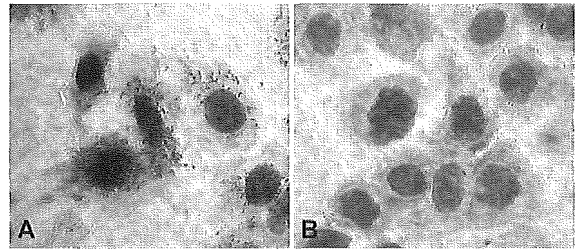


図 1. *P. acnes* の上皮細胞への侵入性

ヒト肺癌由来細胞株 A549 に臨床分離株 (A), 標準株 (B) をそれぞれ 6 時間感染させた後, 細胞外の細菌を殺すために高濃度のペニシリン・ストレプトマイシンにて 2 時間処理した。ギムザ染色によって臨床分離株のみ細胞内に菌体が認められる。

は iE-DAP (100 ng/ml), NOD2 導入細胞には MDP (10 ng/ml), TLR2 導入細胞には Pam3-CSK4 (10 ng/ml) を加え培養した。6 時間培養した後, 細胞外の菌を 37°C に加温した PBS で洗い, ルシフェラーゼ活性測定まで残存している細胞外の菌を殺すために 300 g/ml のゲンタマイシンを含んだ培地で培養した。また, *P. acnes* 株の侵入能の影響を評価するためにプラスミド導入と同様にリン酸カルシウム法を用いた菌感染についても同時に検討した。レポーター遺伝子導入 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。同時に導入した  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性によりレポーター遺伝子の導入効率の標準化を行った。pcDNA3-NOD1-FLAG プラスミドおよび pcDNA3-NOD2 プラスミドの構築は過去の記載のとおり行った<sup>9)10)</sup>。TLR2 を発現するプラスミドはエール大学の Dr. Medzhitov より供与された。iE-DAP は過去の報告のとおり合成した<sup>10)</sup>。合成 MDP および Pam3-CSK4 はペプチド研究所 (大阪) および Invitrogen 社 (アメリカ) からそれぞれ購入した。

NOD1 遺伝子に変異を導入したプラスミドは Quik-Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を用いて作製し, 上記と同様に解析に用いた。細胞内での野生型遺伝子と変異型遺伝子の NOD1 蛋白の発現量を比較検討するために, HEK293T 細胞に野生型 NOD1 プラスミドおよび変異型 NOD1 プラスミドをそれぞれ 20 ng, 40 ng 導入し, 導入 24 時間後に 0.2% Nonidet P-40 緩衝液にて細胞を溶解し, 溶解液に対して 10% SDS-PAGE 電気泳動を実施し, 抗 FLAG 抗体 (SIGMA 社) を用いた Western blot により発現した蛋白量を検定した。

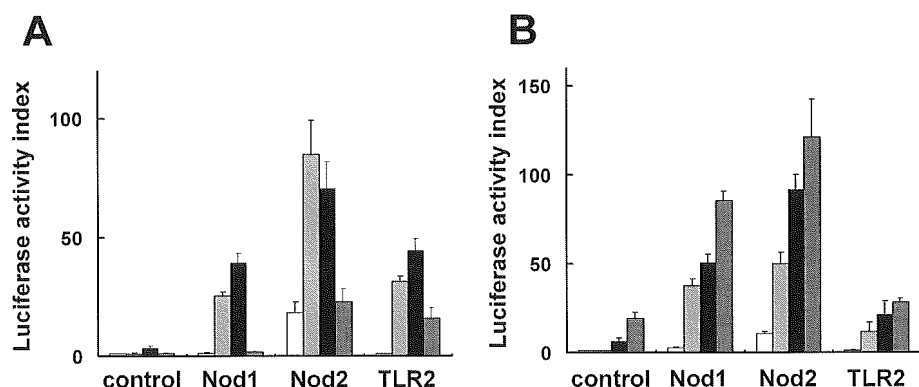


図2. NOD1 および NOD2 を介した細胞内 *P. acnes* による NF- $\kappa$ B 活性化

A: 菌またはリガンドとともにインキュベート, B: リン酸カルシウム法により菌またはリガンドを強制的に細胞内に導入  
無刺激 (□), リガンド (▨), 臨床分離株 (■), 標準株 (▩)

表1. サ症および対照群における各ハプロタイプの出現頻度

	検体数	出現頻度(%)			P値
		G/G	G/A	A/A	
サ症	73	11 (15)	42 (58)	20 (27)	0.036
間質性肺炎	52	14 (27)	32 (62)	6 (12)	
健常人	215	66 (31)	112 (52)	37 (17)	

表2. サ症および対照群における各アレルの出現頻度

	出現頻度(%)		Odds ratio [95% CI]
	Gタイプ	Aタイプ	
サ症	0.43	0.57	1.831 [1.374-2.435]
間質性肺炎	0.58	0.42	
健常人	0.57	0.43	

## 5. 統計学的解析

すべての統計学的解析は Stat View version 5.0 (SAS Institute 社) を用いて行った。実験群間の定性的解析の検定には  $\chi^2$  検定を、定量的解析の検定には ANOVA with Bonferroni correction を用いた。P 値が 0.05 未満を有意差ありと判定した。また 95% 信頼領域 (CI) および Odds ratio (OR) の算出には Logit 法を用いた。

## 結 果

### 1. NOD1 および NOD2 による細胞内 *P. acnes* の認識

宿主における *P. acnes* に対する NOD1 蛋白による認識機構について検討するために HEK293T 細胞に

おける蛋白過剰発現系による解析を行った。臨床分離株の感染によって NOD1, NOD2 および TLR2 導入細胞においてルシフェラーゼ活性の増強が認められた (図 2A)。この結果は TLR2 および NOD 蛋白は *P. acnes* に反応して NF- $\kappa$ B 活性を亢進させることを示唆するものであった。対照的に標準株を感染させた細胞においては NOD1 および NOD2 依存性の NF- $\kappa$ B 活性の上昇は認められなかった。このことは、NOD シグナル伝達において *P. acnes* の細胞侵入性が重要な役割を果たしていることを示唆するものであった。いずれの菌株においても TLR2 依存性の NF- $\kappa$ B 活性の上昇が認められた。さらに、リン酸カルシウム法を用いて菌を強制的に細胞内に移入させた場合、NOD1, NOD2 いずれの場合にも NF- $\kappa$ B の活性化が認められた (図 2B)。これらの結果から NOD1 および

NOD2 は細胞内に存在する *P. acnes* を認識するものであると考えられた。

### 2. NOD1 遺伝子多型と遺伝子型

我々は 50 名のサ症患者に対して NOD1 遺伝子全 11 エクソンに関するシークエンス解析を行った。解析の結果、エクソン 1 内に 1ヶ所およびエクソン 3 内に 4ヶ所の変異が見出された。5ヶ所のうち 2ヶ所はアミノ酸変異を起こし、それぞれ Nucreotide 結合ドメイン、Leucine-rich 繰り返しドメイン内にあった。また、1ヶ所の変異は 1名の患者に独立して生じていたために、今回の研究では他の 4ヶ所に焦点を当てることとした。なぜなら、他の 4ヶ所の変異は例外なく連動しており、2つのハプロタイプ、G ハプロタイプおよび A ハプロタイプに分類されたからである。

Allelic Discrimination 法による遺伝子型解析をサ症患者 73 名、間質性肺炎患者 52 名、健常人 215 名に対して行った結果を表 1 に示す。A/A 遺伝子型はサ症患者において間質性肺炎患者および健常人にくらべて有意に高頻度に見出された。(対間質性肺炎：25% vs 12%,  $P=0.036$ , 対健常人：27% vs 17%,  $P=0.011$ )

G タイプおよび A タイプのアレル頻度の算出結果を表 2 に示す。サ症患者と健常人を比較すると、A タイプの出現はサ症発症に関連性が認められ (OR 1.757, 95% CI 1.322-2.296), サ症患者と間質性肺炎患者との間にも同様の結果が得られた (OR 1.831, 95% CI 1.374-2.435)。間質性肺炎と健常人の間には有意な相関は認められなかった (OR 0.960, 95% CI 0.721-1.278)。

### 3. A タイプ NOD1 変異蛋白の細胞内 *P. acnes* の認識

NOD1 遺伝子の変異が蛋白の発現および機能に影響があるか否かを検討するために変異を含む cDNA を作製し、その発現量をイムノブロットにより検討した。その結果、A タイプ NOD1 遺伝子は G タイプ NOD1 遺伝子に比べ発現する蛋白量が減少し、その発現量は G タイプ NOD1 遺伝子の 58%であることが判明した (図 3A)。

さらに G タイプ NOD1 遺伝子および A タイプ NOD1 遺伝子を導入した HEK293T 細胞における細胞内 *P. acnes* に対する反応性を NF- $\kappa$ B 活性測定により検討した結果、A タイプ NOD1 遺伝子を導入したものは G タイプ NOD1 遺伝子を導入したものに比

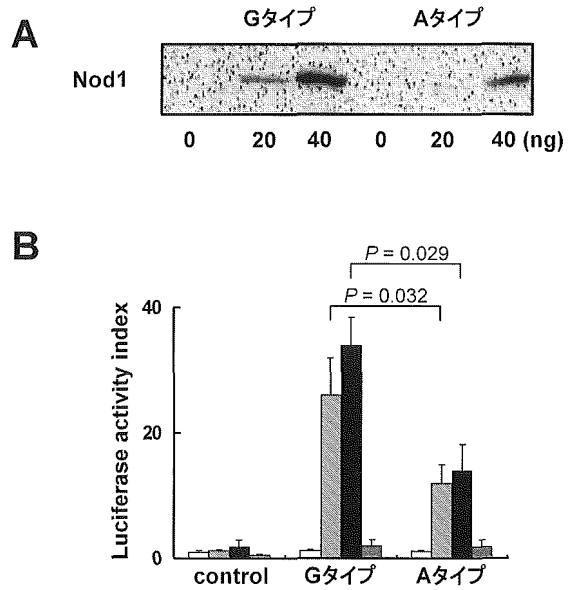


図 3. NOD1 遺伝子変異による NOD1 タンパク発現抑制と、*P. acnes* に対する反応性低下  
 A: イムノブロットによる G タイプおよび A タイプタンパク発現量の検討  
 B: G タイプおよび A タイプ NOD1 の反応性無刺激 (□), リガンド (■), 臨床分離株 (■), 標準株 (■)

べ、iE-DAP, 細胞内 *P. acnes* いずれに対する反応性も低下していることがわかった (図 3B)。

### 考 察

本研究において、*P. acnes* に対する宿主反応における NOD1 蛋白の役割およびその遺伝子多型とサ症との関連性について検討した。我々は NOD 蛋白が細胞内 *P. acnes* を認識すること、そして A タイプ NOD1 蛋白は *P. acnes* に対する反応性が低下するとともにサ症と関連があることを初めて提示した。

サ症は遺伝的因子と環境因子が組み合わさることにより発症し、Th1 免疫反応への偏向および炎症性細胞の蓄積が病態生理学的に特徴付けられる。我々はこれまでにサ症肉芽腫内における *P. acnes* ゲノムの集積を示し、*P. acnes* とサ症との病因的関連について報告してきた<sup>6)7)8)</sup>。クベイム現象に示されるように宿主因子がサ症病因においてより重要であるかも知れない。*P. acnes* からクローニングされたトリガーファクター蛋白は一部のサ症患者において健常人では起こりえない細胞性免疫反応を引き起こし<sup>20)</sup>、さらにこの蛋白をアジュバントとともにマウスに感作することにより肺に肉芽腫形成を誘導することも可能であ

る<sup>21)</sup>。また *P. acnes* は肺や縦隔リンパ節におけるもっとも一般的な常在菌で<sup>22)23)</sup>、この常在菌の局所における増殖が遺伝的素因を有する個体において肉芽腫形成を引き起こすきっかけとなる可能性がある<sup>24)</sup>。

これまでに *P. acnes* 感染に対する TLR2, TLR4, および TLR9 を介した現象の結果から、その免疫調整的役割について検討されている<sup>25)26)</sup>。しかしながら、これらの研究は細胞侵入能のない *P. acnes* に対してのみ検討されている。本研究で我々が示したように、細胞侵入能を有する *P. acnes* の臨床分離株は TLR2 と同様に NOD1 や NOD2 も刺激し、NOD 分子の反応とサ症病因との関連の可能性を示唆するものである。TLR2 が *P. acnes* に対する最前線の受容体ではあるが、細胞内に感染した段階では NOD 分子が主たる役割を果たしている可能性がある。*P. acnes* 臨床分離株は抗菌ペプチドやケモカインの発現を調整する働きに差があることが報告されている<sup>27)</sup>。これらの違いは *P. acnes* の侵入能の違いやその結果起こる NOD 分子による反応によって説明付けられるかもしれない。

NOD2 分子は単球系に限って発現しているが<sup>19)</sup>、NOD1 分子は種々の組織に発現が認められる。本研究において NOD1 遺伝子中にサ症に関連するアミノ酸変異が見出されたが、サ症患者において NOD2 遺伝子の変異は報告されていない<sup>17)</sup>。NOD1 分子と NOD2 分子の細胞内細菌に対する受容体としての機能の違いについてはほとんど明確にはなっていないが、サ症が NOD1 分子と関連性があり、NOD2 分子に関連が認められないことは組織内分布の違いによるものかも知れない。

NOD1 分子は N 末端の CARD, 中央部の NOD, C 末端の LRR の 3 個のドメインから構成されている。サ症に関連したアミノ酸変異は NOD 領域に存在し、これは NOD1 分子の活性化に関与する重合効率を左右するものである<sup>28)</sup>。また、このアミノ酸変異は炎症性腸疾患との関連は認められていない<sup>18)</sup>。この変異箇所はいくつかの種の NOD1 分子間で保存されており、機能的に重要な箇所である可能性がある。イムノプロットにおいて変異型の NOD1 分子の発現の低下が確認されたことは、蛋白の不安定性を示唆するものであった。この変異による蛋白の不安定性および重合効率の低下によって、*P. acnes* に対する反応性の低下を引き起こしているものと考えられた。

我々は、NOD2 の機能低下によりクローン病が引き

起こされ、NOD2 分子の恒常的活性化によりブラウ症候群が引き起こされることを示してきた<sup>29)</sup>。NOD1 分子のアミノ酸変異はサ症発症の初期因子というよりもむしろクローン病における NOD2 分子の役割のように *P. acnes* に対する反応性の低下によりサ症を進展させる働きをしているものと考えられる。我々の結果が示すとおり、健常人においてもアミノ酸変異のホモ接合が 17% に見出されたことは、NOD1 変異に加え、他の遺伝的因子や環境因子がサ症の進展に関与していることを示唆するものである。今後は NOD1 変異の機能的影響やそのサ症における意義を評価するためにサ症患者の臨床知見と NOD1 多型の関連について調査する必要がある。

我々の結果は NOD1 多型がサ症における疾患感受性を規定する重要な因子であり、細胞内の *P. acnes* に対する反応性の変化がサ症の病因として重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

## 参考文献

- 1) T. Niimi, H. Tomita, S. Sato, H. Kawaguchi, K. Akita, H. Maeda, Y. Sugiura, R. Ueda, Vitamin D receptor gene polymorphism in patients with sarcoidosis, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 160 (1999) 1107-1109.
- 2) M. Petrek, J. Drabek, V. Kolek, J. Zlamal, K.I. Welsh, M. Bunce, E. Weigl, R. Du Bois, CC chemokine receptor gene polymorphisms in Czech patients with pulmonary sarcoidosis, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 162 (2000) 1000-1003.
- 3) T. Takada, E. Suzuki, T. Ishida, H. Moriyama, H. Ooi, T. Hasegawa, H. Tsukuda, F. Gejyo, Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects extent of sarcoidosis in a Japanese population, *Tissue Antigens* 58 (2001) 293-298.
- 4) E. Yamaguchi, A. Itoh, N. Hizawa, Y. Kawakami, The gene polymorphism of tumor necrosis factor-beta, but not that of tumor necrosis factor-alpha, is associated with the prognosis of sarcoidosis, *Chest* 119 (2001) 753-761.
- 5) T. Takada, E. Suzuki, K. Morohashi, F. Gejyo, Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with sarcoidosis in a Japanese popula-

- tion, *Tissue Antigens* 60 (2002) 36–42.
- 6) I. Ishige, Y. Usui, T. Takemura, Y. Eishi, Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis, *Lancet* 354 (1999) 120–123.
  - 7) Y. Eishi, M. Suga, I. Ishige, D. Kobayashi, T. Yamada, T. Takemura, T. Takizawa, M. Koike, S. Kudoh, U. Costabel, J. Guzman, G. Rizzato, M. Gambacorta, R. du Bois, A.G. Nicholson, O.P. Sharma, M. Ando. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis, *J. Clin. Microbiol.* 40 (2002) 198–204.
  - 8) T. Yamada, Y. Eishi, S. Ikeda, I. Ishige, T. Suzuki, T. Takemura, T. Takizawa, M. Koike, In situ localization of *Propionibacterium acnes* DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition, *J. Pathol.* 198 (2002) 541–547.
  - 9) N. Inohara, T. Koseki, L. del Peso, Y. Hu, C. Yee, S. Chen, R. Carrio, J. Merino, D. Liu, J. Ni, G. Nunez, Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- $\kappa$ B, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 14560–14567.
  - 10) M. Chamaillard, M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M.A. Valvano, S.J. Foster, T.W. Mak, G. Nunez, N. Inohara, An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 702–707.
  - 11) N. Inohara, Y. Ogura, F.F. Chen, A. Muto, G. Nunez, Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 2551–2554. Epub 2000 Oct 31.
  - 12) P. Hysi, M. Kabesch, M.F. Moffatt, M. Schedel, D. Carr, Y. Zhang, B. Boardman, E. von Mutius, S.K. Weiland, W. Leupold, C. Fritzsche, N. Klopp, A.W. Musk, A. James, G. Nunez, N. Inohara, W.O. Cookson, NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 935–941.
  - 13) D.P. McGovern, P. Hysi, T. Ahmad, D.A. van Heel, M.F. Moffatt, A. Carey, W.O. Cookson, D.P. Jewell, Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 1245–1250.
  - 14) Y. Ogura, D.K. Bonen, N. Inohara, D.L. Nicolae, F.F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R.H. Duerr, J.P. Achkar, S.R. Brant, T.M. Bayless, B.S. Kirschner, S.B. Hanauer, G. Nunez, J.H. Cho, A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* 411 (2001) 603–606.
  - 15) C. Miceli-Richard, S. Lesage, M. Rybojad, A.M. Prieur, S. Manouvrier-Hanu, R. Hafner, M. Chamaillard, H. Zouali, G. Thomas, J.P. Hugot, CARD15 mutations in Blau syndrome, *Nat. Genet.* 29 (2001) 19–20.
  - 16) N. Kanazawa, I. Okafuji, N. Kambe, R. Nishikomori, M. Nakata-Hizume, S. Nagai, A. Fuji, T. Yuasa, A. Manki, Y. Sakurai, M. Nakajima, H. Kobayashi, I. Fujiwara, H. Tsutsumi, A. Utani, C. Nishigori, T. Heike, T. Nakahata, Y. Miyachi, Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor- $\kappa$ B activation: common genetic etiology with Blau syndrome, *Blood* 105 (2005) 1195–1197. Epub 2004 Sep 30.
  - 17) M. Schurmann, R. Valentonyte, J. Hampe, J. Muller-Quernheim, E. Schwinger, S. Schreiber, CARD15 gene mutations in sarcoidosis, *Eur. Respir. J.* 22 (2003) 748–754.
  - 18) H. Zouali, S. Lesage, F. Merlin, J.P. Cezard, J.F. Colombel, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. O'Morain, M. Gassull, S. Christensen, Y. Finkel, R. Modigliani, C. Gower-Rousseau, J. Macry, M. Chamaillard, G. Thomas, J.P. Hugot, EPWG group, EPIMAD group, CARD4/NOD1 is not involved in inflammatory bowel disease, *Gut* 52 (2003) 71–74.
  - 19) Y. Ogura, N. Inohara, A. Benito, F.F. Chen, S. Yamaoka, G. Nunez, Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4812–4818. Epub 2000 Nov 21.
  - 20) Y. Ebe, S. Ikushima, T. Yamaguchi, K. Kohno, A. Azuma, K. Sato, I. Ishige, Y. Usui, T. Takemura, Y.

- Eishi, Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and levels of antibody to recombinant protein from *Propionibacterium acnes* DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis, *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 17 (2000) 256–265.
- 21) J. Minami, Y. Eishi, Y. Ishige, I. Kobayashi, I. Ishige, D. Kobayashi, N. Ando, K. Uchida, S. Ikeda, N. Sorimachi, H. Karasuyama, T. Takemura, T. Takizawa, M. Koike, Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a recombinant trigger-factor protein of *Propionibacterium acnes*, *J. Med. Dent. Sci.* 50 (2003) 265–274.
- 22) I. Ishige, Y. Eishi, T. Takemura, I. Kobayashi, K. Nakata, I. Tanaka, S. Nagaoka, K. Iwai, K. Watanabe, T. Takizawa, M. Koike, *Propionibacterium acnes* is the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis, *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 22 (2005) 33–42.
- 23) T. Nishiwaki, H. Yoneyama, Y. Eishi, N. Matsuo, K. Tatsumi, H. Kimura, T. Kuriyama, K. Matsu-shima, Indigenous pulmonary *Propionibacterium acnes* primes the host in the development of sarcoid-like pulmonary granulomatosis in mice, *Am. J. Pathol.* 165 (2004) 631–639.
- 24) Y. Eishi, I. Ishige, Y. Ishige, T. Yamada, J. Minami, S. Ikeda, M. Koike, Etiology of sarcoidosis: the role of *Propionibacterium acnes*, *Acta Histochem. Cytochem.* 36 (2003) 15–26.
- 25) I. Nagy, A. Pivarcsi, A. Koreck, M. Szell, E. Urban, L. Kemeny, Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors, *J. Invest. Dermatol.* 124 (2005) 931–938.
- 26) C. Kalis, M. Gumenscheimer, N. Freudenberg, S. Tchaptchet, G. Fejer, A. Heit, S. Akira, C. Galanos, M.A. Freudenberg, Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*, *J. Immunol.* 174 (2005) 4295–4300.
- 27) U. Jappe, R. Boit, M.D. Farrar, E. Ingham, J. Sandoe, K.T. Holland, Evidence for diversity within *Propionibacterium acnes*: a comparison of the T-cell stimulatory activity of isolates from inflammatory acne, endocarditis and the laboratory, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 18 (2004) 450–454.
- 28) N. Inohara, T. Koseki, J. Lin, L. del Peso, P.C. Lucas, F.F. Chen, Y. Ogura, G. Nunez, An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27823–27831.
- 29) T. Tanabe, M. Chamaillard, Y. Ogura, L. Zhu, S. Qiu, J. Masumoto, P. Ghosh, A. Moran, M.M. Predergast, G. Tromp, C.J. Williams, N. Inohara, G. Nunez, Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition, *EMBO J.* 23 (2004) 1587–1597. Epub 2004 Mar 25.

# サルコイドーシスの遺伝要因

## —— 肺胞マクロファージの transcriptome scan ——

山口 悦郎\*

サルコイドーシスの発症や臨床像を規定する遺伝素因を明らかにすべく近年報告されたゲノムスクランでは、ゲノム全域にわたって網羅的に遺伝子を検索するため、新規遺伝子の発見に至る期待もある。しかしながら一方で、その結果にはサルコイドーシスにおいて実際に発現されているか否か不確定な遺伝子も含まれ得る。そこで今回我々は、疾患感受性遺伝子のスクリーニングをゲノムではなく発現遺伝子レベルで行ういわば transcriptome scan を試みた。

複数名のサルコイドーシス患者と対照者の気管支肺胞洗浄細胞から、ビーズ法により肺胞マクロファージを分離した。抽出した RNA について oligo DNA microarray (CodeLink, Amersham Biosciences) を用い、対照と比較する形でサルコイドーシスで強発現している遺伝子を検索した。house keeping gene である GAPDH より発現比の高い遺伝子が 12 個見出された。その中でもっとも高い発現を示した遺伝子は、leukocyte-derived arginine aminopeptidase (LRAP) であった。理化学研究所で同定した JSNP 中には、LRAP の一塩基多型 (SNP) が 24 個含まれており、そのうち coding region の 3 つの SNP とサルコイドーシス発症との相関を検討した。その結果、第 9 エクソンの JST039064 (A/G) はサルコイドーシスの発症と相関していた。

本法は疾患感受性遺伝子をスクリーニングする方法として、効果細胞において強発現しているものを選択することで標的遺伝子数を縮減することが出来る点、遺伝子機能とその変異の意義を解釈しやすい点において有用であると考えられる。

## Genetic components in sarcoidosis

### —— Transcriptome scan for alveolar macrophages ——

Etsuro Yamaguchi

*Division of Respiratory Medicine and Allergology, Department of Medicine, Aichi Medical University School of Medicine*

The genome scans recently reported to clarify genetic components that determine the development of sarcoidosis and its clinical features may offer a great hope to find entirely novel genes, since it is a whole genome-wide screening. However, the results may include genes whose expression in sarcoidosis has not been verified. In view of this drawback, we first performed a transcriptome scan which seeks for disease susceptibility genes at the gene expression level, but not at the genome level.

We purified alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage using a bead method from a few patients with sarcoidosis and control subjects. The extracted total RNA was pooled for patients or controls, and subjected to hybridization to an oligonucleotide array (CodeLink®, Amersham Biosciences). Genes whose expression was stronger in sarcoidosis than in controls were selected. Among them, 12 genes whose expression ratio was higher than that for GAPDH, a house keeping gene ordinarily used as a reference gene, were found. The highest expression ratio was noted for the leukocyte-derived arginine aminopeptidase (LRAP) gene. Among Japanese single nucleotide polymorphisms (JSNP) identified by Riken, 24 SNPs were found for LRAP. Among them, three SNPs at the coding regions were examined for association with the development of sarcoidosis. Results demonstrated that one of the SNPs in the 9<sup>th</sup> exon, JST039064 (A/G), was associated with sarcoidosis.

Our method may be useful for conducting a screening of disease susceptibility genes in that it can diminish the number of target genes by selecting ones strongly expressed by effector cells, and in that it can easily lead to mechanistic explanation of the significance of variations in gene functions.

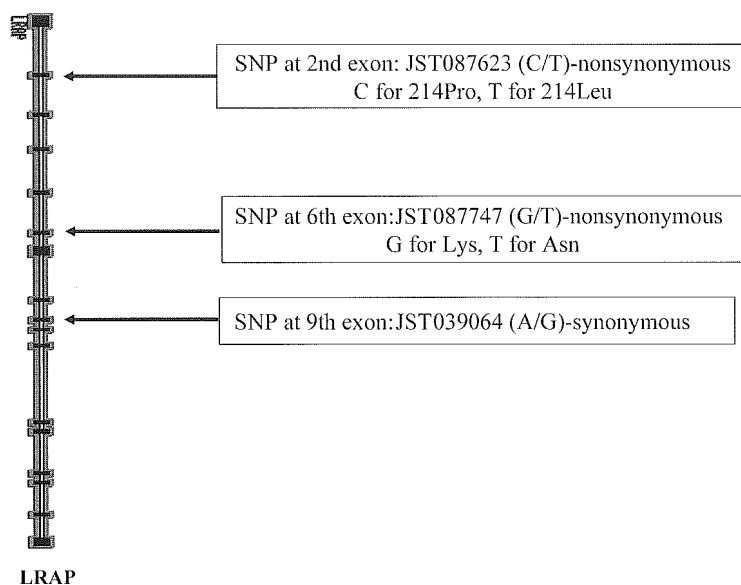


図1 解析した LRAP の SNP

表1 LRAP 遺伝子多型とサルコイドーシスの相関

	AIC	$\chi^2$	Df	p-value	Fisher's exact test
LRAP 064* (A/G)	5.0501	8.9463	2	0.0114	0.0116
LRAP 747* (G/T)	-2.8535	1.1473	2	0.5635	0.56
LRAP 623* (C/T)	-3.9251	0.0757	2	0.9629	1

\*064: JST039064, 747: JST087747, 623: JST087623

表2 LRAP ハプロタイプとサルコイドーシスの相関

Haplotype (064/747/623)*	Overall Sar	Con	$\chi^2$	p-value	Permutation p-value	
A-G-C	0.3361	0.3168	0.3638	1.3176	0.2510	0.305
G-T-C	0.2839	0.2534	0.3274	3.5644	0.0590	0.097
G-G-C	0.1298	0.1638	0.0820	7.9620	0.0050	0.011
G-T-T	0.0974	0.0958	0.0983	0.0095	0.9224	0.938
A-T-C	0.0947	0.1113	0.0700	2.6800	0.1016	0.233
G-G-T	0.0464	0.0430	0.0515	0.2156	0.6425	0.731
A-G-T	0.0118	0.0159	0.0070	0.9068	0.3410	0.524

\*表1と同じ

## はじめに

サルコイドーシスでは、病巣に集積する炎症細胞が T 細胞とマクロファージ系細胞が主体である。したがって、原因抗原は不明であるものの盛んな免疫応答

が病態の根幹をなすと信じられている。HLA 抗原をはじめサイトカインや細胞膜表面抗原など免疫応答に関与する分子は多岐にわたる。そのどれもが量的、質的変異を介して、サルコイドーシスの発症や病像の個体差を形成すると考えられる。これまでそれらの一部についてかなりの知見が集積されている。しかし、単一の遺伝子でその変異がサルコイドーシスの発症や経過を大きく左右するものは見出されていない。

愛知医科大学医学部 呼吸器・アレルギー内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者



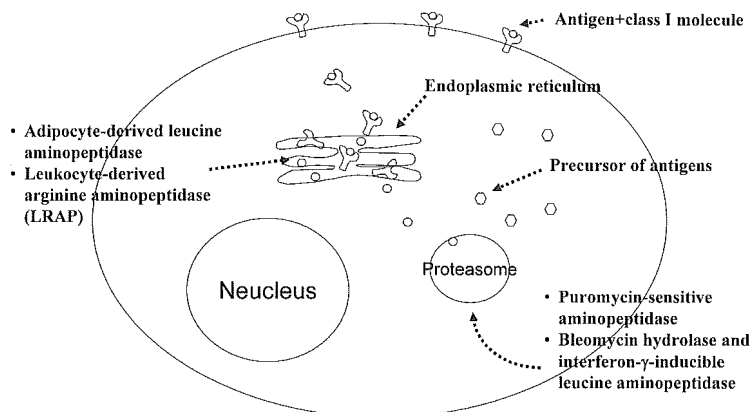


図2 クラス I 分子と抗原処理に関連する酵素群

1990年頃から主に気管支喘息に関して、ヒトゲノム全域の遺伝子を網羅的に検索し、疾患感受性遺伝子を同定しようとするいわゆるゲノムスキャンが多数試みられている。サルコイドーシスでも近年そのような報告がいくつか存在するが、人種の相違を超えた追認には至っていない<sup>1,2)</sup>。ゲノムスキャンは疾患感受性遺伝子であると想定されないものを含めて検索することから、想定外の新規遺伝子の発見に至る期待もある。しかしながら一方で、その結果には当該疾患において実際に発現されているか否か不確定な遺伝子も含まれ得る。そこで今回我々は、疾患感受性遺伝子のスクリーニングを発現遺伝子レベルで行ういわば transcriptome scan を試みた。

## 対象・方法

3名のサルコイドーシス患者と2名の疾患対照者の気管支肺胞洗浄細胞から、ビーズ法によりCD2陽性のリンパ球を除去する形で肺胞マクロファージを分離した。いずれの検体にも、顆粒球系細胞はほとんど含まれていないことを確認した。マクロファージからEZ1 RAN Cell Mini kit<sup>®</sup>とBioRobot EZ1<sup>®</sup> (いずれもQiagen)を用いてRNAを抽出し、サルコイドーシスと対照検体はそれぞれプールし各1検体とした。次いで得られたRNAについて、oligo DNA microarray<sup>®</sup> (CodeLink, Amersham Biosciences)を用い、対照と比較する形でサルコイドーシスで強発現している遺伝子を検索した。

サルコイドーシスと対照間の遺伝子多型頻度の検定、およびハプロタイプの推定頻度算出とその検体などは、SNPAlyze<sup>®</sup> (DYNACOM)を用いて行った。

## 結果

今回の測定システムではサルコイドーシス検体と対照検体を別個に解析する。その際アレイスポットの発現が良好と判定された遺伝子に関して、サルコイドーシスと対照の発現比率を算出した結果、2を超える遺伝子は1,863個存在した。しかし、その中にはhouse keeping geneであるglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)も含まれ、その比率が6.7であった。そこでそれより発現比の高い遺伝子を選択すると12個残った。その中でもっとも高い発現を示した遺伝子は、leukocyte-derived arginine aminopeptidase (LRAP)であった。

理化学研究所で同定したJSNP中には、LRAPの一塩基多型 (SNP) が24個含まれており、そのうちcoding regionの3つのSNP (図1)とサルコイドーシス発症との相関を検討した。その結果、第9エクソンのJST039064 (A/G)はサルコイドーシスの発症と相関していた (表1)。3つのSNPで構成されるハプロタイプの推定値は表2に示す通りで、そのうち039064G/087747G/087623Cがサルコイドーシスで有意に高い頻度を示した (表2)。

## 考案

炎症性疾患の効果細胞は疾患によりある程度特徴がある。サルコイドーシスにおいては、T細胞とマクロファージ系細胞であり、臨床的には気管支肺胞洗浄細胞が入手しやすく、また病態をある程度反映することから解析の対象とされて来た。今回はそのうち分離が容易であり、得られるmRNA量も一定量が確保で

きる肺胞マクロファージの mRNA を用いた。その遺伝子発現を網羅的に解析し、対照検体と比較した際の発現比率を算出し、GAPDH 以上の発現比率を示す遺伝子を 12 個見出した。GAPDH 以下の発現比率を有する遺伝子の役割は必ずしも否定されるものではない。しかし、今回はアレイ結果の再現性の検証は実施していないので、よりデータの信頼性が高いと考えられる発現比率の高いものを選択した。

その結果最も発現比率が高かったのは、LRAP であった。LRAP は 960 個のアミノ酸で構成されており、placental leucine aminopeptidase と adipocyte-derived leucine aminopeptidase と共に、zinc metalloproteinase の M1 family のうちのひとつの独立した subfamily を成している<sup>3)</sup>。LRAP は骨格筋、心筋、白血球、脾臓、肺など多くの臓器で発現されており、細胞内局在としては小胞体にある。機能として多くの基質の N 末端を切断することから、小胞体の中で各種の抗原を処理し、クラス I 抗原との結合を促進することを介して抗原提示過程に関与していると考えられる(図 2)。LRAP は他の多くの抗原提示に関連する蛋白同様 IFN- $\gamma$  によって発現が誘導される。サルコイドーシスでは IFN- $\gamma$  発現が亢進しており、その意味において今回の結果は首肯できる。しかしながら、サルコイドーシスの原因抗原と病態に鑑みて、現在のところ HLA クラス I 抗原の役割が必ずしも明確ではない。したがってむしろ LRAP の基質は抗原蛋白の前駆体ではなく、何らかの生理活性物質でありその代謝を介してサルコイドーシスの発症や病態に影響を与える可能性もある。

今回の検討の対象とした LRAP の SNP は、現在判明しているものの一部に過ぎない。しかも、今回有意な相関が証明された JST039064 (A/G) は、第 9 エクソンに存在しているが同義置換であり、機能変異は期

待されない。相関の本質は他の多型にあると考えられ、今後の検討課題である。

## おわりに

本研究により transcriptome レベルの網羅的遺伝子探索と、多型解析の融合が有効である可能性が示された。今後は今回多型解析の対象とされなかった遺伝子や T 細胞についても同様な手法で解析を広げて行きたい。

## 文 献

- 1) Schurmann M, Reichel P, Muller-Myhsok B, Schlaak M, Muller-Quernheim J, Schwinger E, Results from a genome-wide search for predisposing genes in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 ; 164 : 840-846.
- 2) Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A, Nagy M, Gaede KI, Franke A, Haesler R, Koch A, Lengauer T, Seegert D, Reiling N, Ehlers S, Schwinger E, Platzer M, Krawczak M, Muller-Quernheim J, Schurmann M, Schreiber S, Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet* 2005 ; 37 : 357-364.
- 3) Tanioka T, Hattori A, Masuda S, Nomura Y, Nakayama H, Mizutani S, Tsujimoto M, Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 32275-32283.

# サルコイドーシス症例における呼気 NO 測定の有用性

石井 芳樹\*

サルコイドーシスの活動性や予後を反映する種々のマーカーが検討されているが、あまり適切なものがないのが現状である。呼気 NO 測定は、非侵襲的にかつ簡便に気道炎症を知る方法として喘息や慢性咳嗽の診断管理に極めて有用性の高い検査法として確立している。サルコイドーシスにおいても気道炎症のマーカーとして呼気 NO 測定が有用である可能性が報告されているが反論もある。当科におけるサルコイドーシス症例について呼気 NO と臨床的活動性や他の活動性マーカーとの相関性を検討した。当科に通院中のサルコイドーシス症例のうち 3ヶ月以内に眼病変や皮膚病変などが発症し、新規にサルコイドーシスと診断され症例や経過観察中に新たな肺野病変の出現を認めた症例を活動性例 (n=13) とした。サルコイドーシスの診断後、経過観察中の症例のうち肺野病変や BHL の縮小改善を認め 1年以上安定している症例を改善例 (n=21)、肺野病変や BHL が残存するものの 1年以上変化がなく安定している症例を残存安定例 (n=23) とした。呼気 NO 測定と同時に血清 ACE, soluble IL-2R を測定し比較した。呼気 NO 値は健常者 (n=20) で  $22.7 \pm 4.6$  ppb に対してサ症全例 (n=51) では、 $40.8 \pm 17.5$  と有意に高値であった。活動度別では、改善例  $30.2 \pm 15.9$ 、残存安定例  $49.38 \pm 18.7$ 、活動性例  $33.3 \pm 16.0$  ppb であり、活動度とは相関せず、病変が残存している例で高値を示す傾向が見られた。血清 sIL-2R は、活動性例で高値を示すが改善例では低下し活動性を比較的良く反映するマーカーと考えられた。呼気 NO と sIL-2R の相関は見られなかった。サルコイドーシス症例では呼気 NO の上昇が見られた。しかし、活動性との相関は明確でなく、治療や管理のマーカーとはなりにくいと考えられた。

## Exhaled nitric oxide measurement in clinical management of sarcoidosis

Yoshiki Ishii

*Department of pulmonary Medicine and Clinical Immunology  
Dokkyo Medical University School of Medicine*

Various markers reflecting activity and prognosis of sarcoidosis were examined, but the appropriate marker has not been established yet. Measurement of exhaled nitric oxide (eNO) is an easy and non-invasive method to detect the airway inflammation and it has been established as a diagnostic and management tool for bronchial asthma. There is a possibility that the eNO measurement is useful to know the activity of sarcoidosis. We investigated the correlation of clinical activity and eNO level in patients with sarcoidosis. Newly diagnosed cases in which ocular or cutaneous involvements developed within 3 months or cases with progression of lung involvement were defined as active cases (n=13). Cases with the improved lesions which were stable at least for a year was defined as improved cases (n=21) and cases with significant lesions which were unchanged for over a year were defined as persistent cases (n=23). eNO was measured using a Sievers 280 NO analyzer. Serum ACE and soluble IL-2R were measured at the same time. The mean value of eNO in all cases with sarcoidosis (n=51) was higher than that in healthy controls (n=20) ( $40.8 \pm 17.5$  ppb vs  $22.7 \pm 4.6$  ppb,  $p < 0.01$ ). When the data were compared among the three groups, there was no significant difference according to the disease activity ( $30.2 \pm 15.9$  ppb in the active group,  $49.38 \pm 18.7$  ppb in the improved group,  $33.3 \pm 16.0$  ppb in the persistent group). Serum sIL-2R showed higher values in the activity group than in the improved group and it seems to be a good marker for disease activity in sarcoidosis. However, there was no correlation between sIL-2R and eNO. These findings suggest that eNO level is high in the patients with sarcoidosis but it shows no correlation with disease activity. We concluded that measurement of eNO is not a clinically useful surrogate marker reflecting the disease activity for diagnosis and management of sarcoidosis.

## はじめに

サルコイドーシスの活動性や予後を反映する種々のマーカーが検討されているが、あまり適切なものがないのが現状である。呼気 Nitric oxide (NO) 濃度測定は、非侵襲的にかつ簡便に気道炎症を知る方法として喘息や慢性咳嗽の診断管理に極めて有用性の高い検査法として確立している。サルコイドーシスにおいても気道炎症のマーカーとして呼気 NO 測定が有用である可能性が報告されているが反論もあり、その有用性や意義は確立していない。そこで当科におけるサルコイドーシス症例について呼気 NO と臨床的活動性および他の活動性マーカーとの相関性を検討した。

## 対象と方法

対象症例は、当科に受診しサルコイドーシスと診断された症例であり、以下のように 3 群に分類した。

1) 活動性例 (n=13): 3ヶ月以内に眼病変や皮膚病変などが発症し、新規にサルコイドーシスと診断され症例および経過観察中に新たな肺野病変の出現を認めた症例。

2) 改善例 (n=21): サルコイドーシスの診断後、経過観察中の症例のうち肺野病変や BHL の縮小改善を認め 1 年以上安定している症例。

3) 残存安定例 (n=23): 肺野病変や BHL が残存するものの 1 年以上変化がなく安定している症例。気管支喘息やアレルギー性鼻炎を合併する症例は除外した。呼気 NO は、Sievers 280 NO analyser を用いて ATS の推奨する方法で測定した。呼気 NO 測定と同時に血清 ACE, soluble IL-2R を測定し比較した。

## 結 果

サルコイドーシス 57 症例全体の呼気 NO 平均値は健常コントロール 23 症例と比較し有意に高値を示した ( $40.8 \pm 17.4$  vs  $22.6 \pm 4.6$  ppb,  $p < 0.001$ )。活動性によって群別に解析すると活動性例  $37.1 \pm 15$  ppb, 残存安定例  $49.3 \pm 18.7$  ppb, 改善例  $30.2 \pm 15.9$  ppb であり、残存安定例、活動性例では健常者と比較し有意な上昇

を認めたが、改善群では健常者と有意差がなかった。活動性例、残存安定例、改善例の血清 ACE 値は、それぞれ、 $30.8 \pm 23.6$ ,  $17.9 \pm 9.1$ ,  $19.4 \pm 7.7$  IU/L であり、血清 sIL-2R 値は  $1328.2 \pm 1017.3$ ,  $894.5 \pm 622.7$ ,  $683.4 \pm 477.2$  U/ml であった。いずれのマーカーも活動例でのみ他の 2 群に比較し高値であった。呼気 NO 値は、血清 ACE 値とも血清 sIL-2R 値とも有意な相関は認めなかった。

## 考 察

サルコイドーシス症例では呼気 NO の上昇が認められ、活動性を有する症例や陰影が残存する症例では高値を示し、陰影改善例では低下する傾向が見られた。しかし、臨床的活動性や他の活動性マーカーとの相関は明確でなく、治療や管理のマーカーとはなりにくいと考えられた。これまでのサルコイドーシス症例における呼気 NO の測定の報告では O'Donnell<sup>1)</sup> や Wilsher<sup>2)</sup> は活動性サルコイドーシスでも呼気 NO は健常者と差がなかったとしている。一方、Moodley<sup>3)</sup> や Ziora<sup>4)</sup> はサルコイドーシス症例で呼気 NO は増加すると報告している。サルコイドーシスに伴う気道炎症の場合においては IL-2 や IFN- $\gamma$  など iNOS の発現を亢進させるサイトカインが豊富な環境であることから呼気 NO 濃度が上昇している可能性は高いと考えられる。実際、Moodley<sup>3)</sup> はサルコイドーシス症例の肺の上皮細胞や肉芽腫で iNOS の発現が亢進していたことを報告している。また、Ziora<sup>4)</sup> は、サルコイドーシスで呼気 NO が上昇しているものの活動性との相関はないとしており、本研究の結果と一致するものであった。

## 結 論

サルコイドーシス症例では健常人と比較して、呼気 NO の上昇が見られた。しかし、活動性との相関は明確でなく、治療や管理のマーカーとはなりにくいと考えられた。

## 文 献

- 1) O'Donnell, DM, et al. Am J Respir Crit Care Med 156, 1892-1896, 1997.