

アクネ菌分離株のサルコイドーシス疾患特異性と 細胞侵入能に関する検討

古川あすか¹ 内田 佳介¹ 石下 郁夫² 石下 由紀¹
鈴木 好美¹ 鈴木 高成¹ 小林 寅喆³ 武村 民子⁴
清水辰一郎⁵ 岩井 和郎⁶ 江石 義信^{1*}

【目的】アクネ菌は皮膚毛包内に細胞外生息し炎症性ニキビの原因となるが、一部の人では深部臓器の細胞内にも不顕性感染しており、これが内因性に活性化して細胞内増殖することで、全身性肉芽腫疾患サルコイドーシスの原因にもなりうると言われている。本研究では、サルコイドーシスを引き起こすアクネ菌に疾患特異的な細菌学的形質が存在するかどうか、特にその細胞内感染能力（細胞侵入能）に着目して検討した。

【材料と方法】サルコイドーシス病変部分離株 35 株、および皮膚や腸管など常在性臓器からの分離株 128 株を用いて比較検討した。細胞侵入能は HEK293T 細胞株を用いた invasion assay 法、遺伝子多型は trigger factor 遺伝子を direct sequencing 法、transcarboxylase 12S 遺伝子を PCR 法、血清型は whole-cell ELISA 法、表現形質としてリポタイコ酸型は通常の ELISA 法にてそれぞれ解析判定した。また、細胞侵入能と関連する結核菌 mce 蛋白と高い相同性を示すアクネ菌蛋白 PAmce を同定し、その遺伝子解析を行った。

【結果】細胞侵入能を有する株は全 163 分離株中 85 株 (52%) で、その頻度は各分離株群において差はなかった。遺伝子多型 (trigger factor および transcarboxylase 12S 遺伝子)、血清型、リポタイコ酸型によりアクネ菌分離株は Type 1, Type 2 の 2 群に分類できた。細胞侵入能を有する菌株はすべて Type 1 に分類され、Type 2 に分類される菌株はすべて細胞侵入能を欠如していた。PAmce の遺伝子解析では、アミノ酸変異のパターンから 5 グループに分類することが可能であった。細胞侵入能のない菌株にはすべて複数のアミノ酸変異が認められ、PAmce はアクネ菌において細胞侵入に必須の蛋白のひとつであることが判明した。

【考察】サルコイドーシス病変部分離株に有意な特性は認められず、発症には細胞内感染したアクネ菌に対して過敏性免疫反応を引き起こすという宿主要因の方がより重要であると考えられた。本研究では細胞侵入能を有するアクネ菌のタイプ、および細胞侵入における必須蛋白が明らかになった。貪食能を持たない上皮細胞への細胞内感染はマクロファージへの細胞内感染とは異なった病態への関与が想定されることから、今後新たな視点から治療法の開発が進められるかもしれない。

Characterization of *Propionibacterium acnes* isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues with special reference to their capacity of intracellular invasion

Asuka Furukawa¹, Keisuke Uchida¹, Ikuo Ishige², Yuki Ishige¹, Yoshimi Suzuki¹, Takashige Suzuki¹, Intetsu Kobayashi³, Tamiko Takemura⁴, Shinichiro Shimizu⁵, Kazuro Iwai⁶, and Yoshinobu Eishi¹

¹Department of Human Pathology, Tokyo Medical and Dental University

²Laboratory of Stem Cell Therapy, The Institute of Medical Science The University of Tokyo

³Chemotherapy Division, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratory

⁴Department of Pathology, Japanese Red Cross Medical Center

⁵Department of Pathology, Funabashi Municipal Medical Center

⁶Division of Molecular Pathology, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

【Backgrounds】 *Propionibacterium acnes*, a possible causative agent of sarcoidosis, has been isolated from lungs and lymph nodes of patients with and without sarcoidosis. A series of our study suggests that *P. acnes* can infect to host cells and persist intracellularly and that sarcoidosis may be triggered by reactivation and proliferation of the intracellular *P. acnes*. In this study, we examined genotypic and phenotypic characters of isolates from tissues including sarcoid lymph nodes, with special reference to their capacity of intracellular invasion.

【Materials and Methods】 Thirty-five isolates of *P. acnes* from sarcoid patients and 128 isolates from non-sarcoid people were used in this study. Invasiveness of each isolate into epithelial cells was determined by invasion assay with cultured HEK293T cells. Genotypes (trigger factor gene and trans-carboxylase 12S gene), serotype, and phenotype of lipoteichoic acid were examined by direct sequencing (trigger factor) or PCR (12S), whole-cell ELISA, and conventional ELISA, respectively. We searched for the hypothetical protein that is homologous to mammalian cell entry (Mce) protein of *Mycobacterium tuberculosis*. The protein we found in the *P. acnes* genome database was named PAMce, and the DNA sequence of each isolate was determined by direct sequencing.

【Results】 Invasiveness was found in 85 (52%) of 163 isolates and the frequency did not differ between isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues. According to the genotypes, serotype and phenotype examined, isolates were divided into two major types (either type 1 or type 2), but the frequency of each type did not differ between isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues. All isolates with invasiveness were of type 1, while all isolates of type 2 were non-invasive. According to the number of PAMce amino acid changes, isolates were classified to 5 groups. All isolates without invasiveness possessed more than single amino acid change of the PAMce protein.

【Discussion】 We could not find any characters specific to isolates from sarcoidosis. Our results suggest that host factors inducing hypersensitivity to this indigenous bacterium are more important in the etiology of sarcoidosis than agent factors. Close association between lack of invasiveness and frequency of amino acid changes suggests that PAMce is one of the *P. acnes* proteins essential for invading into host cells.

¹ 東京医科歯科大学 人体病理学分野

² 東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究分野

³ 三菱化学 BCL 臨床微生物

⁴ 日本赤十字医療センター 病理部

⁵ 船橋市立医療センター 病理部

⁶ 結核予防会結核研究所 病理検査科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

はじめに

サルコイドーシス sarcoidosis (以下サ症) は, 肺, リンパ節, 皮膚, 眼, 心臓, 筋肉など全身諸臓器に乾酪壊死のない類上皮細胞肉芽腫が形成される全身性肉芽腫性疾患で, その原因は未だ不明である. サ症の病因に関して, 疾患感受性のある宿主が環境中のなんらかの抗原物質に暴露されて誘導される Th1 型の過敏性免疫反応に起因するらしいことはわかっているが, その原因物質の確定までには至っていない.

サ症の有力な原因物質としてアクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) が考えられている. アクネ菌は日本人サ症患者の病変部リンパ節から分離された唯一の微生物で, サ症病変部から高率かつ多量に分離培養されることが知られている. また, アクネ菌の trigger factor (tig) 蛋白は約 2 割のサ症患者において本症特異的な細胞性免疫反応を誘導可能であり¹⁾, 本蛋白抗原をアジュバントとともにマウスに皮下免疫するだけで実験的肺肉芽腫症が誘導されることが報告されている²⁾. さらに, 定量系 PCR によりアクネ菌 DNA がサ症患者のリンパ節から多量に検出され³⁾, *In situ* hybridization 法によりアクネ菌 DNA の病変組織内分布も明らかにされたことにより⁴⁾, サ症病変部に存在するアクネ菌が肉芽腫の形成に積極的に関与している可能性が示唆されている.

皮膚常在性細菌であるアクネ菌は, 通常毛包内に細胞外生息しているが, 近年ヒトやマウスの末梢肺組織から分離培養され, 細胞内に不顕性感染している可能性が示唆されている⁵⁾.

これまでにアクネ菌が細胞内に侵入するという報告はないが, 本研究室ではアクネ菌を特異的に認識するモノクローナル抗体 (PAB 抗体) を用いた免疫染色で, 病変部リンパ節のマクロファージ内や上皮細胞内に多数の陽性像を観察している (Figure 1). また, 一部のサ症患者分離株は上皮細胞系の培養細胞 (A549 細胞, 293T 細胞) に感染することが確認されている (Figure 2, 3). このことから, アクネ菌は細胞内に冬眠状態で存在しており, なんらかの環境要因により内因性活性化の際, 疾病素因を有する宿主において過敏性免疫反応を引き起こし, 肉芽腫を形成するものと想定される.

本研究では, サ症を引き起こすアクネ菌に疾患特異的な細菌学的形質が存在するかどうか, 特にそのアク

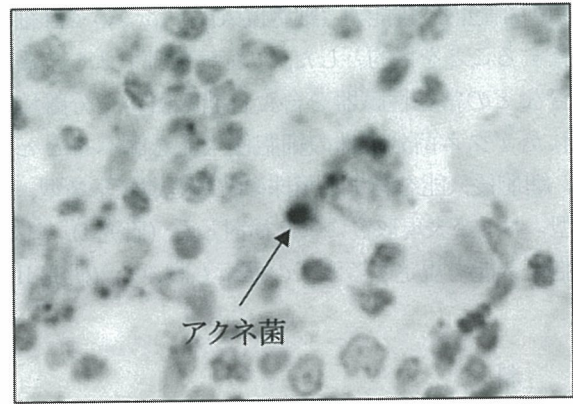


Figure 1 サ症病変部リンパ節 (PAB 抗体を用いた免疫染色)

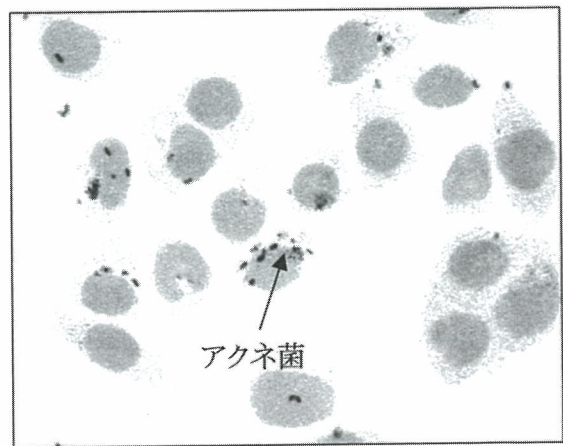


Figure 2 サ症患者分離株を感染させた A549 細胞 (PAB 抗体を用いた免疫染色)



Figure 3 サ症患者分離株を感染させた A549 細胞 (透過型電子顕微鏡像)

ネ菌の細胞内感染能力（細胞侵入能）について詳細に調査することを目的とした。サ症病変部および皮膚や腸管などの常在性臓器を含む各諸臓器から分離培養されたアクネ菌分離株の細胞侵入能を調べるとともに、細胞侵入能を有する菌株の特徴を遺伝子多型、血清型、および表現形質により検討した（研究 I）。また、細胞侵入能を規定する因子の検索も試みた（研究 II）。

材 料

本研究に用いたアクネ菌分離株 163 株を Table 1 に示す。サ症病変部分離株は、文部科学省難病研究班においてサ症患者リンパ節より分離された菌株を結核研究所岩井先生より譲って頂いたものである（35 株）。リンパ節分離株は肺癌患者、胃・大腸癌患者の非転移縦隔リンパ節および胃・大腸所属リンパ節より分離した（22 株）。肺および皮膚分離株は video-assisted thoracoscopic surgery (VATS) 施行患者の肺（25 株）、および前額部ぬぐい液（37 株）より、結膜分離株は健康人結膜ぬぐい液（15 株）より、腸管分離株は健康人糞便（12 株）よりそれぞれ分離した。前立腺分離株（17 株）は前立腺癌患者全摘出症例より分離されたもので、船橋市立医療センター清水先生の協力のもと三菱化学 BCL の小林先生より譲って頂いたものである。

各分離株は GAM ブイヨン (GAM, Nissui Co., Tokyo) にて 37°C 3 日間嫌気培養し、培養液を遠心して回収した菌体を実験に使用した。

研究 I の遺伝子多型および研究 II の遺伝子解析には、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿法にて精製した DNA を用いた。

Table 1 本研究に使用した菌株

臓器由来	株数
サ症病変部リンパ節分離株	35 株
非サ症リンパ節分離株	22 株
非サ症肺分離株	25 株
健康人皮膚分離株	37 株
健康人結膜分離株	15 株
健康人腸管分離株	12 株
非サ症前立腺分離株	17 株

方 法

研究 I: アクネ菌分離株の細胞侵入能と遺伝子多型、血清型、および表現形質によるタイピング

1. 細胞侵入能

10% FBS 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Gaithersburg, MD, USA) にてヒト腎細胞由来 293T 細胞を前日にまいておく。翌日、同一濃度に調整した各分離株の菌体浮遊液を細胞に加え、CO₂ インキュベーターにて 37°C 2 時間感染させた。PBS で 3 回洗浄後、ペニシリン (400 U/ml)・ストレプトマイシン (1 mg/ml) 添加 DMEM に替え、CO₂ インキュベーターで 37°C 3 時間反応させ、細胞外の細菌を殺菌した。再び PBS で洗浄後、滅菌水を加え室温に 20 分置き、細胞を破裂させ細胞内の細菌を放出させた。その菌液を GAM 寒天培地にて 37°C 4 日間嫌気培養し、発育したコロニー数で判定した (Figure 4)。

2. 遺伝子多型

1) tig 遺伝子型

本症の責任抗原として病因的役割を果たしている可能性が高い tig 蛋白については、全長の遺伝子解析を行った。本研究室で同定されたアクネ菌標準株 (ATCC6919) の tig 遺伝子配列 (1,590 bps) を基にプライマーを設計し、その両端のプライマーで PCR を行った。PCR 産物は精製し、ダイレクト・シーケンス (3100 Genetic Analyzer: Applied Biosystems, Foster City, California) を行った。シーケンスには全長を網羅するために、加えて 4 つのプライマーを使用した。解読されたそれぞれの塩基配列を DNASIS. Ver2 を用いてつなげ合わせ tig 遺伝子配列全長を決定し、アミノ酸配列に翻訳した。次に、GenomeNet CLUS-

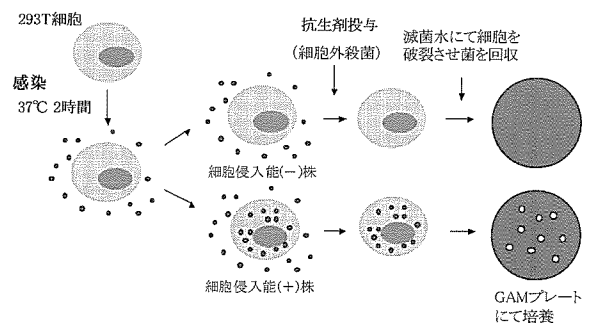


Figure 4 Method of Invasion assay

TALW Server (Kyoto Center) を利用して各株群とアクネ菌標準株の tig アミノ酸配列との相同性を確認し、変異の種類により分類した。

2) 12S 遺伝子型

解析されているアクネ菌 transcarboxylase 12S gene (12S 遺伝子) 配列を基に⁶⁾ A 型, B 型に対応する 2 つのプライマーを設計し, PCR 産物が確認できた型を 12S 遺伝子型とした。PCR 産物の確認は 1.5% アガロースゲルを用いた電気泳動にて行った。

3. 血清型

1) 抗血清の作製

抗血清はウサギにアクネ菌 ATCC11827 (血清型 I 型) 株および ATCC11828 (血清型 II 型) 株を免疫して得た血清, 抗 11827 血清および抗 11828 血清を使用した。非特異的凝集を避けるため, ウサギから採血後抗 11827 血清はアクネ菌 ATCC11828 株で, 抗 11828 血清は ATCC11827 株でそれぞれ相互吸収を行ってから使用した。

2) whole-cell ELISA 法

PAB3 抗体 (アクネ菌を特異的に認識するモノクロナール抗体) を固相化用プレートにて 37°C 2 時間固相化を行った後, GAM ブイオンで一晩ブロッキングを行った。同一濃度に調整した菌液を加え 37°C 2 時間反応させ, 最終濃度が 20,480 倍になるように希釈したそれぞれの抗血清を加え, さらに 37°C 2 時間反応させた。二次抗体はビオチン標識抗ウサギ Igs を使用し, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させ 490 nm の吸光度を測定した。最高希釈倍率は吸光度値が低下する直前のところと考え, その値が高値を示したほうを血清型として判定した。菌液の調整には GAM ブイオン, 抗血清の希釈には PBS を用いた。

4. リポタイコ酸型

1) 菌液の調整・抗体の作製

各分離株の菌液を固相化バッファーで溶解し, 超音波破碎機にかけ 30 秒ホモジナイズしたものを使用した。抗体はマウスにアクネ菌 ATCC6919 (リポタイコ酸 1 型) 株および ATCC11828 (リポタイコ酸 2 型) 株を免疫して得たりポタイコ酸 1, 2 型を特異的に認識するモノクロナール抗体, PAB1 および PAB2 抗体

を使用した。

2) ELISA 法

同一濃度に調整した菌液を固相化用プレートにて 37°C 90 分固相化を行った後, PAB1 および PAB2 抗体をそれぞれ加え, 37°C にて 90 分反応させた。二次抗体はビオチン標識抗マウス Igs を使用し, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させ, 490 nm の吸光度を測定した。吸光度を比較し, 高値を示したほうをリポタイコ酸型とした。

研究 II: 細胞侵入能を規定する遺伝子の検索

結核菌で報告されている mammalian cell entry (mce) 蛋白^{7,8)} に注目し, アクネ菌の全ゲノム・データベースにおいて相同性検索を行ったところ, 相同性の高い hypothetical protein のアミノ酸配列 (310 アミノ酸) を得ることができた。この蛋白を PAmce と名付け, 各分離株の遺伝子解析を行った。PAmce の遺伝子配列よりプライマーを設計し, PCR をかけ, PCR 産物を精製後同じプライマーでダイレクト・シークエンスを行った。解析は, データベースとの比較によりアミノ酸置換をとまなう変異の種類により分類した。

結 果

研究 I: アクネ菌分離株の細胞侵入能と遺伝子多型, 血清型, および表現形質によるタイピング

1. 細胞侵入能

各分離株群における細胞侵入能の結果を Table 2 に示す。細胞侵入能を有する株は全 163 分離株中 85 株 (52%) で, その頻度は各分離株群において差はなかつ

Table 2 各分離株群における細胞侵入能有無の頻度

分離株由来	株数	侵入能(+)	侵入能(-)
サ症病変部リンパ節	35	14 (40%)	21 (60%)
非サ症リンパ節	22	14 (64%)	8 (36%)
非サ症肺	25	18 (72%)	7 (28%)
健常人皮膚	37	23 (62%)	14 (38%)
健常人結膜	15	6 (40%)	9 (60%)
健常人腸管	12	4 (33%)	8 (67%)
非サ症前立腺	17	6 (35%)	11 (65%)
合計	163	85 (52%)	78 (48%)

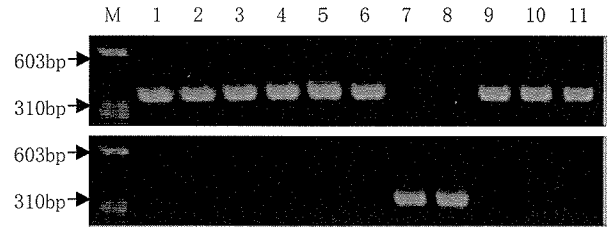
た。

2. 遺伝子多型

tig 遺伝子型は、全長のシーケンス解析により lysine-rich 領域と呼ばれる本菌特有のアミノ酸配列内部で 15 個のアミノ酸が欠失する遺伝子多型 (D 型) が 163 株中 48 株 (29%) に検出された。本多型は反復塩基配列 (15 bps) の存在による遺伝子組み換えが原因で生じていた (Figure 5, 6)。

欠失部位以外での置換型アミノ酸多型は、野生型 (W 型) で 5 種類 (Wa-We 型) と多彩であるにもかかわらず、欠失型 (D 型) では 48 株中 45 株が全長にわたりまったく同一のアミノ酸 (塩基) 配列を示した (Da 型)。

12S 遺伝子型は PCR 産物が確認できた型を遺伝子型とし (Figure 7), A 型が tig 遺伝子 W 型と B 型が tig 遺伝子型 D 型と完全一致をしたが、判定可能な株



上段:12S 遺伝子型 A 型(1-6, 9-11)

下段:12S 遺伝子型 B 型(7,8)

Figure 7 PCR 産物による 12S 遺伝子型の判定

は 133 株 (91%) であり、判定ができない株が見られた。判定不能であった原因としてプライマー領域における遺伝子配列の変異が考えられた。

3. 血清型

血清型 (I 型/II 型) は以前より知られている直接凝集反応を行ったが、非特異的凝集反応を起こす株が多く見られ 146 株中 84 株 (58%) で判定不能であった。そのため、PAB3 抗体と抗血清のサンドイッチ法を用いた whole-cell ELISA 法を行ったところ吸光度により血清型が判定できることが分かり (Figure 8), 全株にて血清型を分類することが可能であった。

4. リポタイコ酸型

リポタイコ酸型はアクネ菌リポタイコ酸に特異的な PAB1 および PAB2 抗体を使用した ELISA 法にて判定したところ、全株で PAB1 もしくは PAB2 に反応することが分かり (Figure 9), それぞれをリポタイコ酸 1 型, リポタイコ酸 2 型と判定できた。

P. acnes trigger factor の構造と機能

番号はN末端からのアミノ酸の位置を示す。

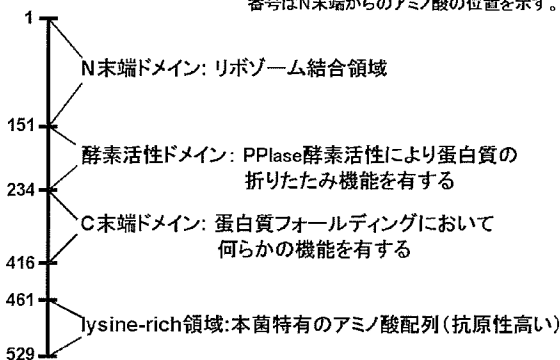
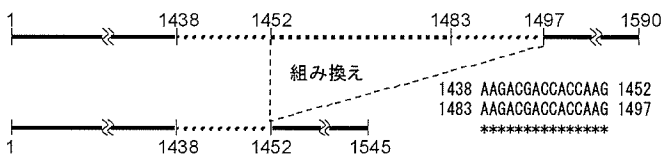


Figure 5 アクネ菌 trigger factor の構造と機能

A Trigger factor蛋白遺伝子における欠失型遺伝子組換

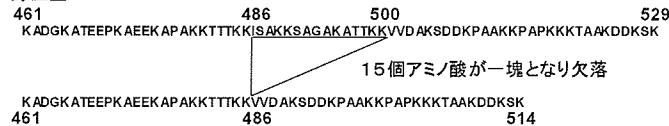
野生型



欠失型

B 遺伝子組換によるlysine-rich領域欠失型アミノ酸多型

野生型



欠失型

Figure 6

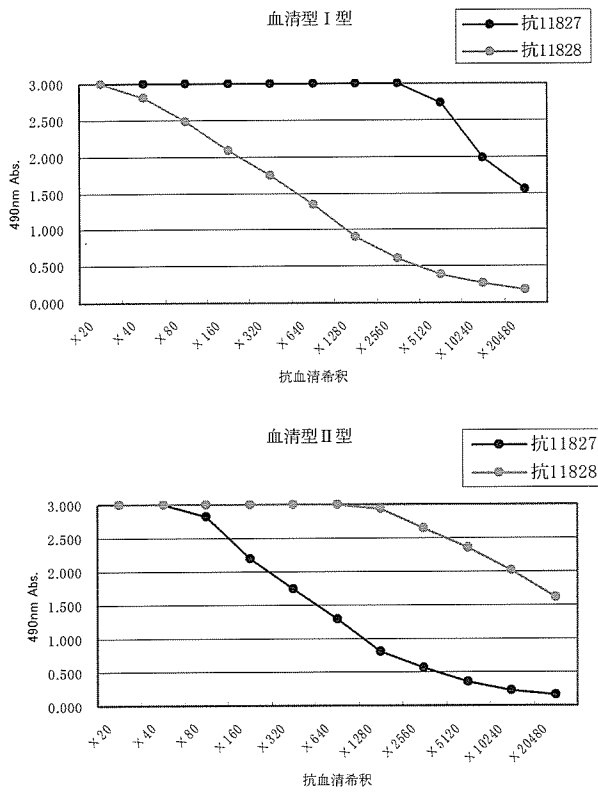


Figure 8 whole-cell ELISA 法 吸光度

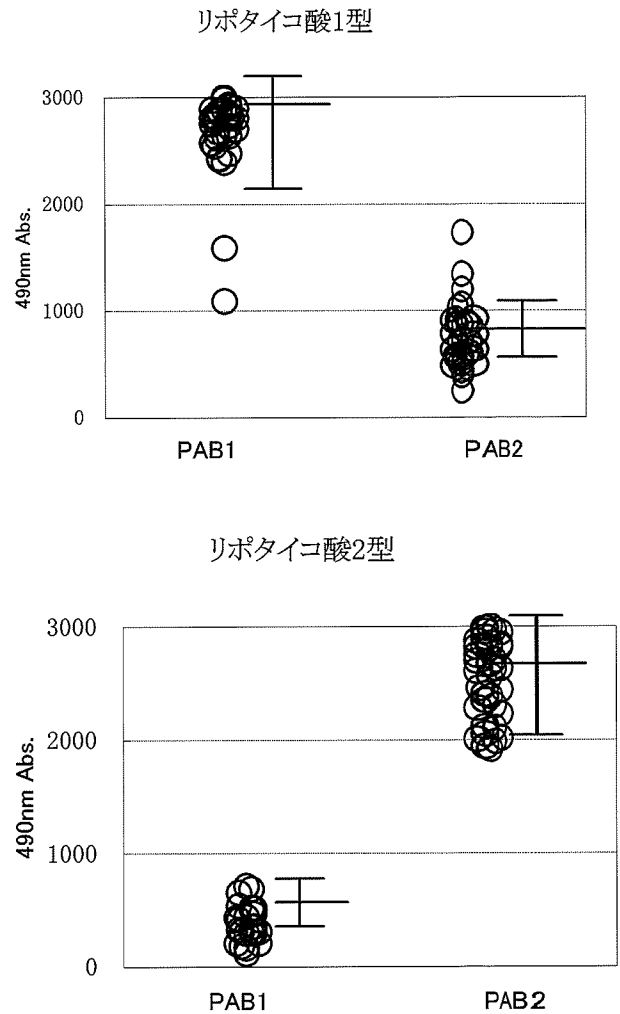


Figure 9 リポタイコ酸の PAB1/PAB2 抗体に対する 反応

Table 3 アクネ菌分離株 tig 遺伝子 アミノ酸変異による型の定義

(アミノ酸置換型変異位置) * は類似性質を持つアミノ酸同士の置換	
W 型	標準株と同様全長が 1590bps のもの
Wa	標準株と全長のアミノ酸配列が一致するもの
Wb	1 箇所のアミノ酸置換が生じているもの (A263V or T481A)
Wc	連動する 3 ヶ所のアミノ酸置換を有するもの (A176V, S300N, P470S)
Wd	連動する 13 ヶ所のアミノ酸置換を有するもの (D33N, E155D, S300N, I302V, A318T, V335A, Q399E, A462V, K465E, T483A, I486T, V502A, K514E)
We	亜型
D 型	lysine-rich 領域に 15 アミノ酸の欠失(486-500)を生じているもの
Da	連動する 8 ヶ所のアミノ酸置換を伴うもの (A159V, S300N, A459V, A462V, G464S, E474Q, V502A, A504V)
Db	連動する 40 ヶ所のアミノ酸置換を伴うもの (N36A, A73T, D136N, E212Q, S300K, A318S, S418A, K447E, A449P, E451K, D452E, A453T, P454A, D457G, A459V, K461E, C464N, K465E, E469A, K471A, A472E, E474P, P477E, A478E, K480A, T481E, T482A, T483K, K485S, V501A, V502A, D503K, A504K, K505T, S506T, D507T, D508K, P510S or P510N, A511S, P517A)

Table 4 アクネ菌分離株 tig 遺伝子 変異群型別頻度(%)

分離株由来	数	W型					計	D型		計
		Wa	Wb	Wc	Wd	We		Da	Db	
サ症リンパ節	35	8(24) ^b	5(14) ^d	7(22)	2(5)	0(0)	22(65)	12(32)	1(3)	13(35)
非サ症リンパ節	22	10(43) ^{a,d}	6(26)	2(9)	0(0)	0(0)	18(78)	4(22)	0(0)	4(22) ^f
非サ症肺	25	12(48) ^{b,c,d}	5(20)	3(12)	1(4)	0(0)	21(84)	4(16)	0(0)	4(16) ^f
健常人皮膚	37	8(22) ^{b,k}	15(41) ^d	5(14)	1(3)	0(0)	29(78)	8(22)	0(0)	8(22) ^f
健常人結膜	15	4(27) ^j	4(27)	0(0)	0(0)	2(13)	10(67)	5(33)	0(0)	5(33)
健常人腸管	12	0(0) ^{a,c}	4(33)	1(8)	0(0)	0(0)	5(42) ^{d,k}	6(50)	1(8)	7(58) ^{e,l}
非サ症前立腺	17	0(0) ^{b,k,l}	3(18)	6(35)	1(6)	0(0)	10(59)	6(35)	1(6)	7(41)
合計	163	42(26)	42(26)	24(15)	5(3)	2(1)	115(71)	45(28)	3(2)	48(29)

χ^2 検定 a: p=0.0069, b: p=0.029, c: p=0.0035, d: p=0.0089, e: p=0.030, f: p=0.0084, g: p=0.0017, h: p=0.0321, i: p=0.0013, j: p=0.0007, k: p=0.0378, l: p=0.0228

研究 II: 細胞侵入能を規定する遺伝子の検索

PAmce の遺伝子解析では、アミノ酸変異のパターンから 5 グループに分類することが可能であった (Table 5).

細胞侵入能との関連を確認したところ、アミノ酸変異が存在したのは全 163 株中 58 株 (35.6%) で、そのうち 55 株 (94.8%) は侵入能を示さない非侵入株であった。残り 3 株 (5.2%) は侵入株で、3 株とも 143 番目に 1 アミノ酸置換を認めた。これに対し、非侵入株の 55 株には共通する 5 箇所の置換を含む複数のアミノ酸置換が存在した。このため、これらのアミノ酸変異が蛋白の三次構造に影響を及ぼし、侵入能を欠落さ

せている可能性が考えられた (Table 6).

したがって PAmce に複数のアミノ酸変異があるとアクネ菌は細胞に侵入出来ないことから、PAmce はアクネ菌において細胞侵入に必須の蛋白であることが判明した (Table 7).

結 論

アクネ菌の細胞侵入能は全 163 株中 85 株 (52%) に認められた。侵入株の割合が最も高かったのは非サ症肺分離株 72%, 低かったのは健常人腸管分離株であった。一部の分離臓器間に有意差を認めるも、各分離臓器とサ症病変部分離株間には有意な差はなかった。

今回のタイピングの結果、tig 遺伝子型は W 型/D 型, 12S 遺伝子型は A 型/B 型, 血清型は I 型/II 型, ま

Table 5 PAmce のアミノ酸変異による分類

グループ	アミノ酸変異	株数
a	: なし	105
b	: 1 箇所のアミノ酸置換	3
c	: 5 箇所のアミノ酸置換	5
d	: 8 箇所のアミノ酸置換	47
e	: 27 箇所のアミノ酸置換	3

Table 7 PAmce 変異と細胞侵入能

アミノ酸変異	株数	侵入	非侵入
なし	105	84	21
あり	58	3	55

χ^2 検定 p<0.0001

Table 6 PAmce のアミノ酸変異位置

グループ	アミノ酸変異位置 (●は共通)
b	: T143I
c	: T32A, S89N, G100V, H164R, R236Q
d	: T32A, S89N, G100V, S149R, H164R, R174P, W179S, R236Q
e	: L30V, T32A, G48A, D78E, S89N, G95R, G100V or A, G106D, V125L, D133G, L140M, T143A, V145A, S149N, A160T, H164R, I184T, N223S, R224S, A226T, H227N, S231R, R236Q, A242T, H246T, S247R, S248R

Table 8 遺伝子と表現形質の相関関係

	Type1	Type2	
遺伝子型			
tig遺伝子	W型	D型	
12S遺伝子	A型	B型	
血清型	I型	II型	
表現形質			
リポタイコ酸型	1型	2型	
細胞侵入能(+)*	79%	0%	*:p<0.0001

Table 9 各分離株群における Type 1 株と Type 2 株の頻度

分離株由来	株数	Type1	Type2
サ症病変部リンパ節	35	22 (63%)	13 (37%)
非サ症リンパ節	22	17 (77%)	5 (23%)
非サ症肺	25	21 (84%)	4 (16%)
健常人皮膚	37	29 (78%)	8 (22%)
健常人結膜	15	9 (60%)	6 (40%)
健常人腸管	12	5 (42%)	7 (58%)
非サ症前立腺	17	10 (59%)	7 (41%)
合計	163	113 (69%)	50 (31%)

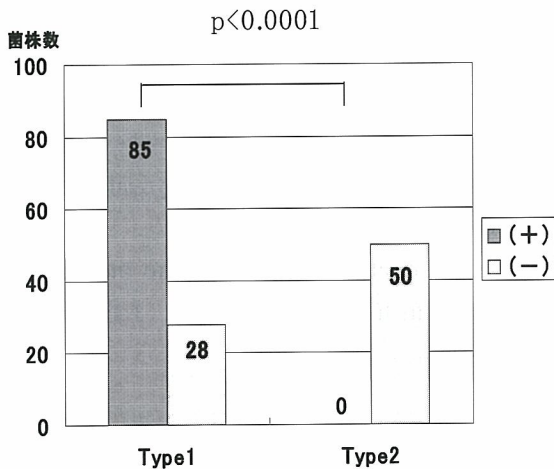


Figure 10 細胞侵入能と Type 1, Type 2 との相関

リポタイコ酸型は 1 型/2 型とそれぞれ 2 群に判定することができた。これらは検討したすべての分離株において連動しており、アクネ菌分離株は Type 1, Type 2 の 2 群に分類できた (Table 8)。全 163 株中 Type 1 は 69%, Type 2 は 31% であったが、各分離臓器とサ症病変部分離株には Type 1, Type 2 の分布に有意な差は認められなかった (Table 9)。この分類において、Type 1 では 79% に細胞侵入能が認められたにもかかわらず、Type 2 には 1 株も認められなかった ($p <$

0.0001) (Figure 10)。

ヒトの全身にはアクネ菌が実に多臓器に生息しており、そのいずれにおいても 2 つのタイプの株が同程度混在して生息していた。皮膚や腸管など、本来細胞外に常在している臓器においても侵入能を有するアクネ菌は存在しており、深部臓器に潜伏感染していない個体であっても、多くの人は常在性部位から細胞侵入性アクネ菌が深部臓器に感染する可能性が推測できた。

また、本研究で新たに同定した PAMce はアクネ菌の細胞侵入能を規定する必須蛋白であった。PAMce にアミノ酸変異のない株の中にも非侵入性の株が存在したが、これは本蛋白が細胞侵入を規定する必須蛋白の中の 1 つであり、少なくともあと 1 つは同様の機能をもつ蛋白が存在する可能性を示唆している。今回アミノ酸変異が見つからなかった非侵入株は、PAMce 以外の細胞侵入必須蛋白になんらかの機能異常を有していると考えられる。

考 察

アクネ菌はサ症原因細菌として病的因果関係が指摘されてきたが、いまだその原因となる因子は確定できていない。アクネ菌はサ症病変部から唯一分離される細菌であるにもかかわらず、ヒトの常在性細菌であるという理由から病因との因果関係が長く解明されなかった。現在では、皮膚や腸管だけでなく、健常人の肺やリンパ節にまで常在することが知られており、サ症は体外からの微生物が体内に侵入して発症するものではなく、もともと常在したアクネ菌がなんらかの要因により (ストレスなどの環境要因や宿主の免疫反応など) 増殖した結果、サ症を発症するとの説が固まってきた。

細胞内寄生菌として有名な結核菌においても、いわゆる「結核の再燃」といわれる同様の病因論が展開されている⁹⁾。結核菌とさまざまな点で類似性を持つアクネ菌においても、細胞内潜伏感染→蘇生→増殖→細胞性免疫の誘導という状態は起こりえる。しかし結核とサ症で大きく異なるのは、結核菌が病原性細菌であるのに対し、アクネ菌は常在性細菌であり、毒性が弱いという点である。よってサ症の発症には宿主要因が大きな鍵を握ることになる。体外から異物が侵入してくると患者側の内在性素因に起因してアレルギー反

応が誘導されることは知られている。しかしサ症の場合、常在しているアクネ菌に対し、なんらかの要因が加わるにより通常では起こり得ないアレルギー反応が患者特有の免疫反応を誘導し、サ症という全身性肉芽腫性疾患を引き起こしていると考えられる。

本研究で細胞侵入能を有するアクネ菌のタイプ、および細胞侵入における必須蛋白が明らかになったことから、細胞内感染しているアクネ菌が原因であれば、2つの治療法が考えられる。1つは抗生物質による除菌後、細胞侵入能を持たないアクネ菌で細菌叢を満たし、細胞侵入能を有するアクネ菌の住み着きを防ぐ方法である。もうひとつは細胞侵入に必須であるPAmceの機能を阻害し、アクネ菌の侵入を抑制する方法である。

今後、病因解明のため宿主側の要因の同定を進めるとともに、サ症発症のトリガーとなる細胞内増菌を引き起こす環境要因の解明、およびPAmceの蛋白レベルでの解析を進め、治療法も検討し、確立していきたい。

参考文献

- 1) Ebe Y, et al. : 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* 2000 ; 17 : 256-265.
- 2) Minami J, et al. : Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a recombinant trigger-factor protein of *Propionibacterium acnes*. *J Med Dent Sci* 2003 ; 50 : 265-274.
- 3) Ishige I, Usui Y, Takemura T, et al. : Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes with Japanese patients with sarcoidosis. *Lancet* 1999 ; 354 : 120-123.
- 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* 2002 ; 198 : 541-547.
- 5) Ishige I, et al. : *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* 2005 ; 22 : 33-42.
- 6) Ronald J. Cohen, Beverley A. Shannon, et al. : *Propionibacterium acnes* associated with inflammation in radical prostatectomy specimens : A possible link to cancer evolution. *J Urol* 2005 ; 173 : 1969-1974.
- 7) Sadhana C, et al. : Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cellular Microbiology* 2001 ; 4(4) : 247-254.
- 8) Sangwei Lu, et al. : A cell-penetrating peptide derived from mammalian cell uptake protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Analytical Biochemistry* 2006 ; 353 : 7-14.
- 9) Timo U, et al. : New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 2006 ; 208 : 261-26.

ZNF101 遺伝子多型のサルコイドーシス発症における意義

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リーンでは、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 2 番目に高い発現を示した遺伝子は、ZNF101 であった。ZNF101 は Kruppel associated box (KRAB) を介して、遺伝子転写の抑制に関与すると推測されている。HapMap project によると ZNF101 遺伝子内およびその周辺にはいわゆる tagSNP が 3 個ある。今回はそれらの SNP について、163 名の対照者と 225 名のサルコイドーシス患者 DNA を用い、症例・対照研究を行った。しかしいずれの SNP もサルコイドーシスの発症と相関してはいなかった。

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。

The Role of ZNF101 Gene Polymorphisms in Sarcoidosis

Etsuro Yamaguchi

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

The genome scans recently conducted 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 2nd highest expression ratio was noted for the ZNF101 gene. ZNF101 is supposed to be a transcription factor associated with the repression of gene expression by its Kruppel associated box (KRAB). According to information provided by the HapMap project, there are three tagSNPs in and around ZNF101. We conducted a case-control study for those SNPs in 163 controls and 225 patients with sarcoidosis. Results showed that none of the SNPs 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.

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。

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^{1,2)}。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後から確認した。マクロファージからEZ1 RAN Cell Mini kit[®]とBioRobot EZ1[®](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[®](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。着目した遺伝子周辺のtag-SNPのうち、日本人で一定の割合に多型があるものを選び出した(図1)。次いで163名の対照者と225名のサルコイドーシス患者DNAを用いて、TaqMan probe[®]によりSNPタイピングを行った。

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定は、SNPAlyze[®](DYNACOM)を用いて行った。

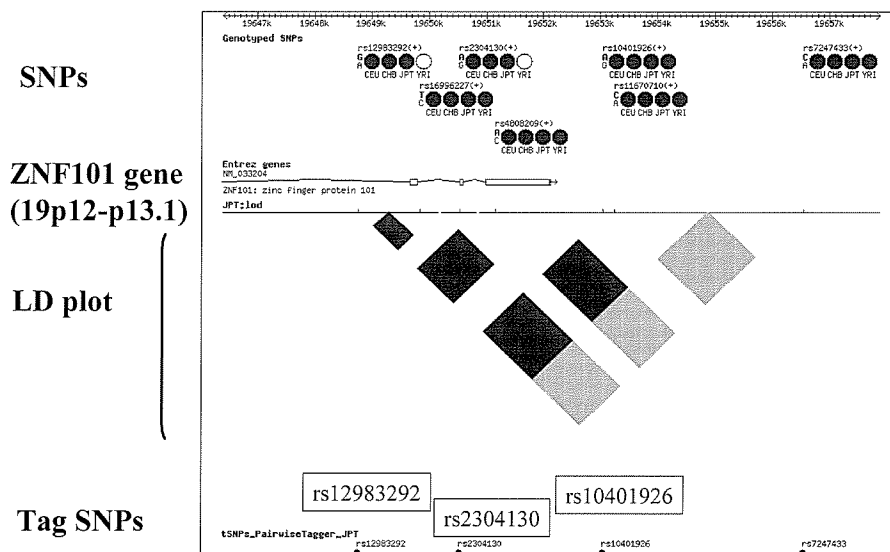


図 1

愛知医科大学呼吸器・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

結 果

今回の遺伝子発現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比較した結果、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比を示した遺伝子は、昨年報告した leukocyte-derived arginine aminopeptidase (LRAP) であった。次に高い発現比を示したのは ZNF101 であった。

ZNF101 周辺で現在判明している一塩基多型 (SNP) は、約30個ある。HapMap project によるとその tagSNP は3つとされているので、それらとサルコイ

ドーシス発症との相関を検討した。しかし、そのうち rs10401926 については今回検討した日本人集団では、すべて遺伝子型 AA のホモ接合体であり、その意義は検討し得なかった。さらに他のいずれの SNP もサルコイドーシスとの相関は認められなかった (表1, 表2)。2つの SNP で構成されるハプロタイプの推定値は表3に示す通りで、それらもサルコイドーシスと有意な相関をしめしたものはなかった。

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、それらは気管支肺胞洗浄細胞として入手しやすく、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

表1 rs12983292 とサルコイドーシスとの相関

	AIC	χ^2	Df	p-value	Fisher's exact test p value
Dominant model	-1.9583	0.0419	1	0.8378	1
Recessive model	-0.8717	-0.8717	1	0.2898	0.2999
Codominant model	-2.5946	1.3932	1	0.4983	0.4838

表2 rs2304130 とサルコイドーシスとの相関

	AIC	χ^2	Df	p-value	Fisher's exact test p value
Dominant model	-1.9916	0.008403	1	0.9278378	1
Recessive model	--1.2922	-0.7123	1	0.3987	0.4263
Codominant model	-3.2007	0.805	1	0.6687	0.7164

表3 rs12983292 と rs2304130 によるハプロタイプとサルコイドーシスとの相関

Haplotype (*92-*30)	Overall	sarcoidosis	control	Chi-square	p-value	Permutation p-value
G-A	0.7587	0.7523	0.7646	0.1497	0.6988	0.676
A-A	0.1477	0.1636	0.1292	1.71	0.191	0.22
G-G	0.0889	0.0841	0.0979	0.4257	0.5141	0.544
A-G	0.0047	0.0000	0.0083	3.5853	0.0583	0.119

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 2 番目に発現比率が高かったのは、ZNF101 であった。ZNF101 は 316 個のアミノ酸で構成されている。その遺伝子は他の 40 余りの zinc finger protein 遺伝子と共に、染色体 19p12-p13.1 上にクラスターを成して位置している³⁾。それらには Kruppel Associated Box (KRAB) と呼ばれる蛋白ドメインがある。KRAB は TIF1 β との相互作用により、遺伝子発現の強力な repressor として機能することが判明している⁴⁾。サルコイドーシスは臨床徴候に比較して発熱などの炎症症状が乏しいことが特徴であり、調節性 T 細胞の働きなどを介して、何らかの抗炎症機構の存在が示唆される。その意味で遺伝子転写抑制蛋白であると推定される ZNF101 遺伝子多型の意義が注目されたが、今回の検討では有意な相関は証明されなかった。しかし、tagSNP 以外にも蛋白のアミノ酸残基置換を伴う SNP が発見されており、今後その役割を検討

する必要がある。

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 et al: Results from a genome-wide search for predisposing genes in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 840-846, 2001
- 2) Valentonyte R, Hampe J, Huse K et al: Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet* 37: 357-364, 2005
- 3) Looman C, Hellman L, Abrink M: A novel Kruppel-Associated Box identified in a panel of mammalian zinc finger proteins. *Mamm Genome* 12: 35-40, 1993
- 4) Bellefroid EJ, Marine JC, Ried T et al: Clustered organization of homologous KRAB zinc-finger genes with enhanced expression in human T lymphoid cells. *EMBO J* 12: 1363-1374, 1993

サルコイドーシスの病態に関わる宿主因子の研究

五味 和紀 田澤 立之 海老名雅仁** 貫和 敏博*

最近の欧米における研究から *BTNL2* (butyrophilin-like protein 2) 遺伝子変異とサルコイドーシスの関連が分かってきた。しかしながら、*BTNL2* 遺伝子変異に関する本邦の研究報告はなく、本邦における *BTNL2* 遺伝子変異の宿主因子としての役割は不明である。

我々は、同一家系内に4例のサルコイドーシスの発症を認めた、サルコイドーシス症例を経験した。症例は22歳男性。2004年6月初旬にマイコプラズマ気管支炎罹患後、6月下旬の会社の健康診断で両側肺門リンパ節腫脹を指摘され、当科関連病院呼吸器科を受診した。喫煙指数40。父方叔父とその次男、母方叔母にサルコイドーシスの家族歴がある。胸部CTにて縦隔リンパ節及び両肺門リンパ節腫大、両肺のびまん性小粒状影を認めた。血清ACE 27.7 IU/L、リゾチーム 13.0 μ g/ml。右上腕内側、左前腕内側、右鎖骨上窩に結節を触知したため、右鎖骨上窩リンパ節の生検を行い、病理所見よりサルコイドーシスと診断した。本症例において *BTNL2* 遺伝子変異をダイレクトシーケンスにて解析したところ、同遺伝子変異を認めた。本症例は近親者にサルコイドーシスが多発しており、*BTNL2* 遺伝子変異がサルコイドーシス発症の宿主因子となっている可能性がある。今後、*BTNL2* 遺伝子の遺伝子学的解析を端緒にして、サルコイドーシスの病因解明を目指したい。

A study of a risk factor of sarcoidosis

Kazunori Gomi, Ryushi Tazawa, Masahito Ebina, and Toshihiro Nukiwa

Department of Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

Rationale: Recently a relation between the *BTNL2* (butyrophilin-like protein 2) gene polymorphism and sarcoidosis was reported in Europe. However, the genetic variant of *BTNL2* gene in the Japanese case had not been investigated. Methods: To Detect of *BTNL2* gene polymorphism, a genomic DNA of a patient was extracted from whole blood, amplified to the 404 bp fragment including SNP rs2076530 in exon 5 of *BTNL2* gene by PCR, and sequenced directly. Results: The case is 22-years old male. A swelling of bilateral hilar lymphadenopathy (BHL) was pointed out by a regular health-check, and was referred to our hospital. His brinkman index is 40. Interestingly, his paternal uncle and his cousin, and his maternal aunt have a familial medical history of sarcoidosis. His chest CT revealed swelling of mediastinal lymph nodes, BHL, and a plenty of small granular lesions in both lungs fields. Serum ACE was 27.7 IU/L (>21.8 IU/L) and lysozyme was 13.0 mg/ml (>10.2 mg/ml). Physical examination revealed subcutaneous lymph nodes swelling of his right upper arm, left lower arm, and right supraclavicular fossa. Biopsy of the right supraclavicular lymph node was done and histologically diagnosed as sarcoidosis. Further genetic examination revealed that he is homovariant of *BTNL2* gene (SNP rs2076530). Conclusion: In this study, we first demonstrated genetic variant of *BTNL2* gene in the Japanese familial sarcoidosis patient. The genetic variant of *BTNL2* gene of this case is likely a risk factor of his familial sarcoidosis. The role of *BTNL2* in sarcoidosis in the context of function of genetic variant of *BTNL2* should be investigated in future studies.

はじめに

サルコイドーシスは非乾酪性類上皮肉芽腫を形成する原因不明の全身性疾患である。1869年に本症による皮膚病変が Hutchingson によって報告されてから、130年以上経過した今日でも病因はいまだ解明されていない。サルコイドーシスの発症に感染症が関与している可能性に関しては、古くから抗酸菌等が指摘され、他にもヘルペスウイルス、レトロウイルス、クラミジア、リケッチアなど諸説があるが、近年では本邦の江石らの研究による、アクネ菌の内因性感染が原因となりクームスⅣ型のアレルギー性免疫反応が惹起されることにより肉芽腫形成が起こる、という仮説が今のところ最も有力である。しかしながらサルコイドーシスの分子病態機序は、一方で単なる病的微生物による感染だけの問題でなく、宿主の内的免疫反応が関与すると思われる。

2005年にドイツのグループと米国のグループが第6染色体短腕6p21に関連遺伝子の存在を疑わせる先行研究から、SNP解析によりこの領域に存在する *BTNL2* (butyrophilin-like protein 2) 遺伝子の Exon5 に存在する SNP が *BTNL2* 分子の構造変異を起こし、このことがサルコイドーシスの宿主因子になる可能

性を報告した^{1,2)}。

今回、我々は同一家系内に4例のサルコイドーシスの発症を認めた、サルコイドーシス症例を経験した。本症例において遺伝的宿主因子が関わっている可能性があると考え、遺伝子学的解析を行ったところ、*BTNL2* 遺伝子変異を認めた。このことから、この *BTNL2* 遺伝子変異がサルコイドーシス発症の宿主因子となっている可能性があると思われた。

症例提示

【症例】 22歳男性。主訴：胸部異常影。既往歴：特記事項なし。家族歴：父方叔父、従兄、母方叔母がサルコイドーシス。職業：運送業、粉塵吸入歴・石綿暴露歴なし。喫煙歴：20本×2年、喫煙指数40。

【現病歴】 平成16年6月上旬にマイコプラズマ気管支炎で近医にて加療。6月下旬の会社健診において、胸部単純レントゲン写真で縦隔陰影拡大を指摘され、7/6近くの総合病院にて二次検査を行い、胸部CT写真で縦隔リンパ節腫大を指摘され、精査加療目的で当科関連病院を受診した。咳、痰、息切れなどの自覚症状はなし。

【初診時現症】 身長167cm、体重60.1kg、血圧120/

表1 血液検査所見
血清ACE、リゾチーム値の上昇、sIL-2R値の上昇を認める

末梢血		生化学		腫瘍マーカー	
WBC	5800/ μ l	TP	7.5g/dl	CEA	3.0ng/ml
Neut	67.6%	Alb	4.8g/dl	SCC	0.7ng/ml
Eos	4.1%	AST	21IU/L	CYFRA	1.0ng/ml
Baso	0.5%	ALT	16IU/L	proGRP	18.3pg/ml
Lymph	18.2%	LDH	175IU/L	sIL-2R	2040U/ml
Mono	9.6%	ALP	204IU/L		
RBC	453×10 ⁴ / μ l	γ -GTP	26IU/L		
Hb	14.3g/dl	T-Bil	0.6mg/dl	血液ガス分析	
Hct	41.7%	BUN	8mg/dl	(室内気)	
PLT	307×10 ³ / μ l	Cr	0.8mg/dl	pH	7.450
		UA	3.7mg/dl	PaO ₂	88.8Torr
		Na	140mEq/L	PaCO ₂	38.9Torr
		K	4.0mEq/L	HCO ₃	26.4mmol/L
		Cl	104mEq/L	SaO ₂	97.1%
		CRP	0.05mg/dl		
		Lysozyme			
			13.0 μ g/ml		
		ACE	27.7IU/l		

東北大学病院 遺伝子・呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 主任研究者

** びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

80 mmHg, 脈拍 80/min, 体温 37.0°C, 意識清明. 結膜に貧血, 黄疸無し. 右鎖骨上窩, 右上腕内側, 左前腕内側に 7~8 mm 大の結節を触知. 心雑音なし. 肺ラ音なし. 腹部平坦, 軟. 肝脾触知せず. 下腿浮腫認めず.

【検査所見】 血清 ACE, リゾチーム値の上昇, sIL-2R 値の上昇を認めた (表 1). 胸部単純レントゲン写真で両側肺門リンパ節の腫脹, 胸部 CT で両側肺門及び縦隔リンパ節の腫脹, 両肺のびまん性小粒状影を認

めた (図 1). Ga シンチグラムで耳下腺, 顎下腺, 縦隔, 両側肺門リンパ節に集積像を認めた (図 2). 心電図: 洞調律, 脈拍 80/分, 不整脈なし. 心エコー: 心サルコイドーシスの所見なし. 眼検査: ぶどう膜炎なし, 眼サルコイドーシスの所見なし.

【病理所見】 右鎖骨上窩, 右上腕内側, 左前腕内側に 7~8 mm 表在リンパ節を触知し, 呼吸器外科にて右鎖骨上窩リンパ節生検を行った. 採取リンパ節全体

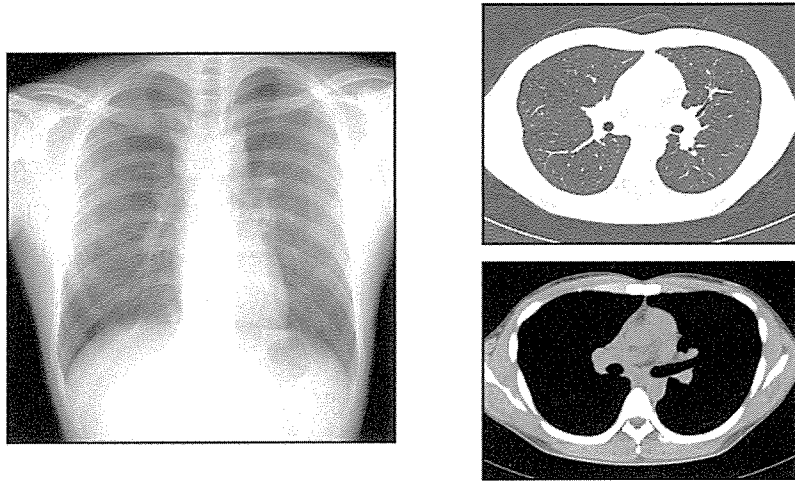


図 1 胸部単純レントゲン写真及び胸部 CT
初診時の胸部単純レントゲン写真及び胸部 CT. 胸部単純レントゲン写真にて両側肺門リンパ節の腫脹, 胸部 CT で両側肺門及び縦隔リンパ節の腫脹, 両肺のびまん性小粒状影を認める.

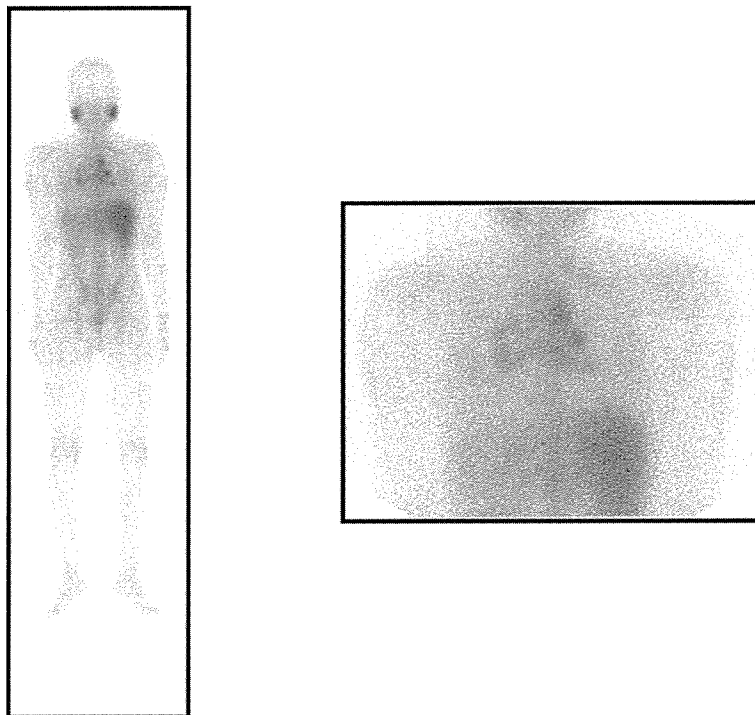


図 2 Ga シンチグラム
耳下腺, 顎下腺, 縦隔, 両側肺門リンパ節に集積像を認める

にわたって類上皮型の肉芽腫が密に観察された。ラングハンス型の多核巨細胞を含んだ肉芽腫も混在していた。サルコイドーシスに一致する病理組織所見と診断された (図 3)。

【臨床経過】 画像所見, 病理所見より肺サルコイドーシスと診断した。投薬は行わず, 定期的に外来で経過観察を行った。右上腕, 左前腕の表在リンパ節は 2ヶ月ほどで消失し, 両側肺門リンパ節腫脹も目立たなくなった。その後も, 2~3ヶ月に 1 回のペースで通院中であるが, サルコイドーシス症の増悪は認められ

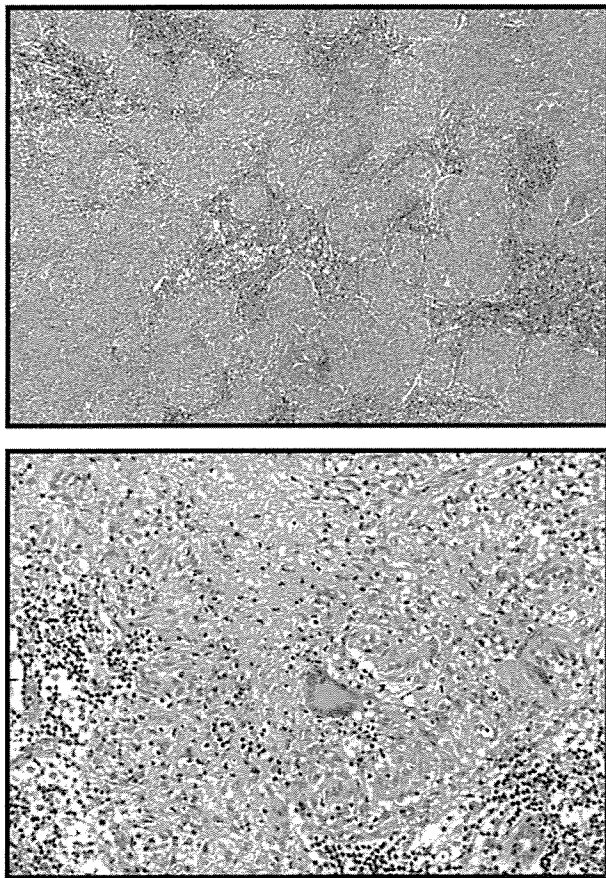


図 3 病理所見 (A: ×100, B: ×400)
右鎖骨上窩リンパ節。採取リンパ節全体にわたって類上皮型の肉芽腫が密に存在する。ラングハンス型の多核巨細胞を含んだ肉芽腫も混在している。

ない (表 2)。

方 法

(1) 診断

厚生省特定疾患「びまん性肺疾患」調査研究班の診断基準に沿って, サルコイドーシスを診断した。画像所見, 病理所見ともに, 診断基準を満たした。

(2) 血液検体からのゲノム DNA の抽出

末梢血 10 ml より QUICKGENE 全血 DNA 抽出キット (FUJIFILM 社) を用いて, ゲノム DNA を抽出した。

(3) *BTNL2* 遺伝子多型の解析

BTNL2 遺伝子 Exon5 に存在する多型部位を含む, 約 404 bp の遺伝子断片を PCR によって増幅し, ダイレクトシーケンスを行ない, 遺伝子配列を決定した。

結果と考察

本症例では父方叔父とその次男, 母方叔母にサルコイドーシスの既往があることから, 本症例のサルコイドーシス発症には, 遺伝的素因がある可能性があると考えた (図 4)。

2005 年に欧米のグループが第 6 染色体短腕 6p21 に関連遺伝子の存在を疑わせる先行研究から, SNP 解析によりこの領域に存在する *BTNL2* 遺伝子の Exon5 に存在する SNP がサルコイドーシス発症の宿主因子になる可能性を報告した。本症例において同遺伝子多型の解析を行ったところ, risk alleles (rs2076530, G16071A) の homo variant であった (図 5)。

サルコイドーシスはクームス IV 型のアレルギー性免疫反応による肉芽腫形成がその病態機序だと考えられている。免疫反応の発端となる感染症に関しても諸説があるが, アクネ菌の内因性感染が原因であると

表 2 血清マーカーの推移
血清 ACE, リゾチーム, sIL-2R 値は速やかに正常値に戻った

	H16. 7. 28	H16. 12. 15	H17. 4. 13	H18. 7. 12
ACE	27. 7	18. 4	14. 4	11. 9
Lysozyme	13. 0	6. 5	4. 9	4. 9
sIL-2R	2040	891	477	485

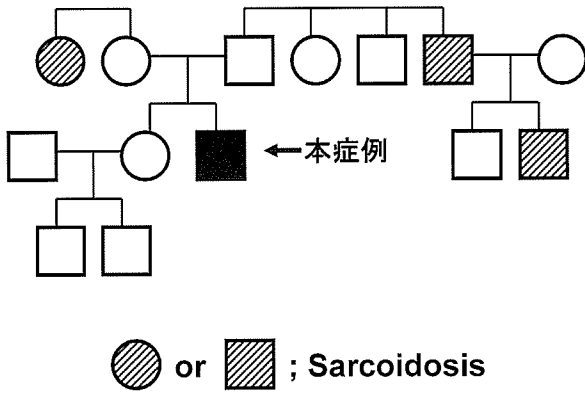


図4 本症例の家族歴
本症例 (矢印) の他, 父方叔父とその次男, 母方叔母にサルコイドーシス発症を認めた

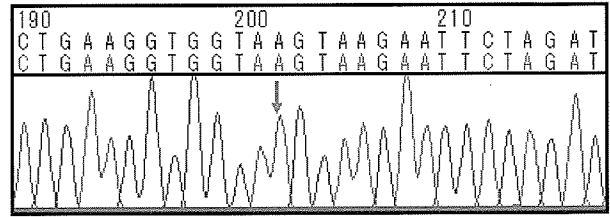


図5 BTNL2 遺伝子解析

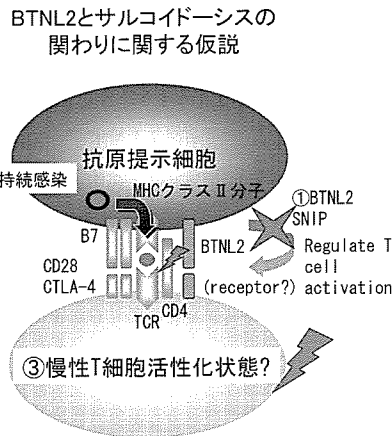
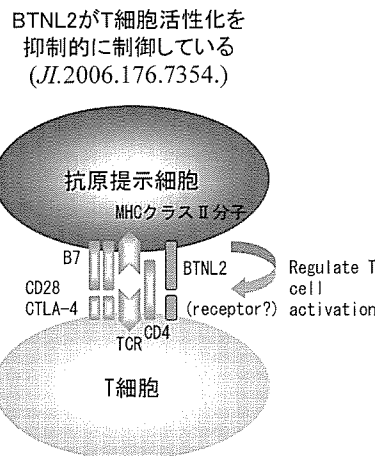


図6 BTNL2 遺伝子変異とサルコイドーシス発症に関する仮説
左: 報告された BTNL2 分子の作用機序. 右: BTNL2 遺伝子変異とサルコイドーシス発症に関する仮説. ① BTNL2 遺伝子に SNP があることにより Th1 細胞抑制的制御の機能不全が生じる. ② さらに病的微生物等による免疫活性化が起こった際に, ③ BTNL2 分子による Th1 細胞の制御機能不全のため慢性 T 細胞活性化状態が生じ, サルコイドーシス病変を生じる.

いう仮説が今のところ最も有力である. しかしながら病原微生物による感染だけの問題でなく, 宿主の内的免疫反応が関与することは疑いもない. サルコイドーシスの宿主因子としては HLA 型や, TNF- α promotor 領域遺伝子, NOD 遺伝子多型との関連を示唆する報告がある³⁻⁵⁾.

また近年, 先述のように BTNL2 遺伝子の Exon5 に存在する SNP がサルコイドーシスの宿主因子である可能性が報告された. この BTNL2 分子は, 遺伝子学的な解析から 2 つの免疫グロブリン可変領域 (IgV) ドメインと免疫グロブリン定常領域 (IgC) ドメインより構成されると推測され, また SNP の存在により IgV ドメインと IgC ドメイン間で切断された spliced form になることが予測されている. さらに 2006 年, 2007 年には, この BTNL2 分子は抗原提示細胞による

Th1 細胞応答における補助刺激分子に類似した構造を有し, 実際に Th1 細胞応答を抑制的に制御している分子であることが報告された^{6,7)}. これらのことは BTNL2 遺伝子に SNP があることにより, 病的微生物等による免疫活性化が起こった際に, BTNL2 分子による Th1 細胞の制御が機能不全に陥り, サルコイドーシス病変が生じてしまう可能性を示唆する (図 6). しかしながら, BTNL2 遺伝子の SNP に関して本邦の研究はなく, 本邦における BTNL2 遺伝子 SNP の病原因子としての役割は不明である. 今後, BTNL2 遺伝子 SNP の疫学的頻度解析を端緒にして, サルコイドーシスの病因解明を目指したい.

文 献

- 1) 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: 357-64.
- 2) Rybicki BA, Walewski JL, Maliarik MJ, Kian H, Iannuzzi MC; ACCESS Research Group. The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 491-9.
- 3) Rybicki BA, Maliarik MJ, Poisson LM, Sheffer R, Chen KM, Major M, Chase GA, Iannuzzi MC. The major histocompatibility complex gene region and sarcoidosis susceptibility in African Americans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 444-9.
- 4) Grutters JC, Sato H, Pantelidis P, Lagan AL, McGrath DS, Lammers JW, van den Bosch JM, Wells AU, du Bois RM, Welsh KI. Increased frequency of the uncommon tumor necrosis factor-857T allele in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 1119-24.
- 5) Kambe N, Nishikomori R, Kanazawa N. The cytosolic pattern-recognition receptor Nod2 and inflammatory granulomatous disorders. *J Dermatol Sci.* 2005; 39: 71-80.
- 6) Nguyen T, Liu XK, Zhang Y, Dong C. BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J Immunol.* 2006; 176: 7354-60.
- 7) Arnett HA, Escobar SS, Gonzalez-Suarez E, Budelsky AL, Steffen LA, Boiani N, Zhang M, Siu G, Brewer AW, Viney JL. BTNL2, a Butyrophilin/B7-Like Molecule, Is a Negative Costimulatory Molecule Modulated in Intestinal Inflammation. *J Immunol.* 2007; 178: 1523-33.