

ローンのプラスミドから Rpf 領域を制限酵素により切り出し、pCold TF プラスミド発現ベクターにサブクローニングした。発現ベクターでトランスフォームした大腸菌を 37°C で 2 時間半培養後、16°C で 24 時間発現誘導させ、Ni-NTA ビーズを用いて精製した。

## 2. リコンビナント RPF 蛋白添加による増殖促進効果

作製したリコンビナント蛋白の機能を確認するために液相培地中の菌に添加し、その効果をみた<sup>6)</sup>。培養開始の菌量を一定にするために菌体浮遊液は吸光度 (OD<sub>600</sub>) を測定し、菌体数が 10<sup>8</sup>/ml になるように PBS で希釈した。OD<sub>600</sub>=1 を 9×10<sup>8</sup>/ml とした。GAM プイオン 15 ml に調整した菌液を 15 μl 加え、5 ml ずつ 3 チューブに分注し (最終菌体数: 10<sup>2</sup>/ml)、それぞれのチューブに最終濃度が 10, 5, 0 μg/ml となるように Rpf を添加後嫌気培養を開始した。培養開始から 24 時間ごとに OD<sub>600</sub> を測定した。

## 3. リコンビナント RPF 蛋白の細胞外添加における細胞内増菌への影響

A549 細胞にアクネ菌を感染させ (Multiplicity of infection; 以下 MOI=1,000), 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 2 時間培養した。PBS にて 3 回洗浄後高濃度抗生剤+DMEM に替え、細胞外の菌を殺菌した。3 時間後再度 PBS にて洗浄し、細胞内への抗生剤の影響を避けるために抗生剤 (-) DMEM に替え、さらに RPF を加え (最終濃: 10 μg/ml) 培養を継続し、その後 24 時間ごとに細胞を回収した。回収した細胞は以下の 2 つの方法にて細胞内の菌体を観察、測定した。

### 1) Colony assay

回収した細胞を高浸透圧の GAM+16% sucrose broth にて浮遊させ、GAM+16% sucrose 寒天培地にまき、嫌気培養を行った。4 日後発育したコロニー数を測定した。

### 2) 免疫染色

チャンバースライドにまきなおした細胞を 70% エタノールで固定する。マイクロウェーブ処理 (97°C 40 分)、内因性ペルオキシダーゼ処理 (室温 30 分) の後、R.T.U. NORMAL HORSE SERUM 2.5% でブロッキングを行う (室温 20 分)。一次抗体 (抗アクネ菌抗体; PAB 抗体) をかけ、室温一晩反応させる。二次抗体反応として R.T.U. BIOTINYLATED UNIVERSAL ANTI-RABBIT/Mouse IgG を用い、室温にて 30 分反

応させる。VECTASTAIN R.T.U. Elite ABC REAGENT をかけ室温にて 30 分反応後、ヒストファイン シンプルステイン DAB 溶液 (ニチレイ) を用いて発色させる。マイヤー・ヘマトキシリンにて核染色後、水洗、脱水、透徹し、封入する。

## 4. RPF 蛋白の細胞内発現における細胞内増菌への影響

HEK293T 細胞に、塩化カルシウム法を用いて pcDNA-Rpf ベクターまたはコントロールとして pcDNA ベクターのみを Transfection した。37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養 8 時間後新しい抗生剤 (-) DMEM に液替えた。蛋白の発現がピークに達する 24 時間後一定濃度に調整した菌体浮遊液を感染させ (MOI=100), 感染 24 時間後に細胞を回収し実験 2 と同様の方法で細胞内の増菌を確認した。蛋白の発現については Western blot および免疫染色にて確認を行った。

### 1) Western blot

細胞を lysis buffer で溶解し、SDS PAGE にて泳動、PVDF メンブレンに転写した。一次抗体にはリコンビナント RPF 蛋白免疫マウス抗血清 (1,000 倍希釈) を用い、室温で 2 時間反応させた。二次抗体 (抗マウス Ig's 抗体, 2,000 倍希釈), SAPx (2,000 倍希釈) それぞれ室温 30 分反応後 DAB にて発色させた。

### 2) 免疫染色

細胞はコロジオンバッグに回収し、ホルマリン固定した。その後パラフィン包埋、薄切し、免疫染色を行った。一次抗体には Western blot と同じリコンビナント RPF 蛋白免疫マウス抗血清 (128,000 倍希釈) を用いた。そのほかについては前述の通り。

## 5. アクネ菌 RPF 蛋白のモノクローナル抗体作製

BALB/c マウスにリコンビナント RPF 蛋白を 3 回免疫 (50 μg/head) 後脾細胞を摘出し、P3 細胞と cell fusion を行った。ELISA 法にて titer と specificity の確認をしながらスクリーニングし、最終的にモノクローナルな抗体産生細胞を得た。

## 6. 病変部の免疫染色

脱パラフィン後マイクロウェーブ処理 (97°C 40 分)、内因性ペルオキシダーゼ処理 (室温 30 分) を行う。

R.T.U. NORMAL HORSE SERUM 2.5% でブロッキングを行う (室温 20 分)。一次抗体 (PAB 抗体または抗アクネ菌 RPR 抗体) をかけ、室温一晩反応

させる。二次抗体反応として R.T.U. BIOTINYLATED UNIVERSAL ANTI-RABBIT/Mouse IgG を用い、室温にて 30 分反応させる。VECTASTAIN R.T.U. Elite ABC REAGENT をかけ室温にて 30 分反応後、ヒストファイン シンプルステイン DAB 溶液 (ニチレイ) を用いて発色させる。マイヤー・ヘマトキシリンにて核染色後、水洗、脱水、透徹し、封入する。

## 結 果

### 研究 1: 細胞内感染後の動態の観察

感染 10, 30 分, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 時間後の観察を行った。感染直後から菌体と初期 endosome のマーカーである EEA1 は一致し、その後一致しない菌体が増加した (写真 1)。Lysosome のマーカーである LAMP-1 は感染後 16 時間で LC3 とともに菌体を覆っていた (写真 2)。その後 LC3 のシグナルは減少し、LAMP-1 に囲まれた菌体も短桿菌様が崩れ、消化像が観察された。電顕像からも菌体が endosome と思われる一重膜に囲まれて細胞内侵入し、その後 24 時間まで消化像が多く観察されるようになった (写真 3)。

### 研究 2: RPF 蛋白について

#### 1. RPF 蛋白添加による増殖促進効果

作製したリコンビナント RPF 蛋白の菌単体における増菌活性を確認できた。培養開始 48 時間以降 RPF 添加の培養液の増菌速度は著しく加速したが、無添加では 72 時間後より増殖を始めていた。RPF 蛋白濃度

による増菌速度の差は認められなかった (図 3)。

#### 2. リコンビナント RPF 蛋白細胞外添加における細胞内増菌への影響

Colony assay において、control は感染後 24 時間内に細胞内で急激に菌の消化が行われるためにコロニー数は激減する。一方で、RPF 添加の細胞は 24 時間から 48 時間の間にも細胞内増菌が確認された (図 4)。免疫染色においても RPF 添加細胞内では無添加に比べ細胞内陽性 (菌体) は多かった (写真 4)。

#### 3. 細胞内発現における細胞内増菌への影響

細胞内へ pcDNA-Rpf ベクター導入後、Western blot と免疫染色により RPF 蛋白の細胞内発現が行われていることが確認できた (写真 5)。しかしながら、細胞内で RPF が発現しているにも関わらず、Colony assay では増菌現象を確認することができなかった。さらに、免疫染色においても細胞内陽性数は control との差がなかった (写真 6)。

4. RPF 抗体を用いたサ症病変部の免疫染色本検討に用いる症例の選出のために、先にアクネ菌の存在を確認した。アクネ菌を認識する PAB 抗体で HW 小体が確認されたのはサ症リンパ節で 53 例中 28 例 (53%)、対照リンパ節で 141 例中 10 例 (7%) であった。よって本検討にはサ症 28 例および対照リンパ節 10 例を用いた。アクネ菌 RPF 蛋白はサ症例の 43% (12/28) において HW 小体に一致する陽性所見をみせた。PAB 抗体が対照リンパ節群においても陽性となるのに対し、RPF 抗体は 1 例も染まらず、RPF の存在はサ症に特異的であった (表 1) (写真 7)。

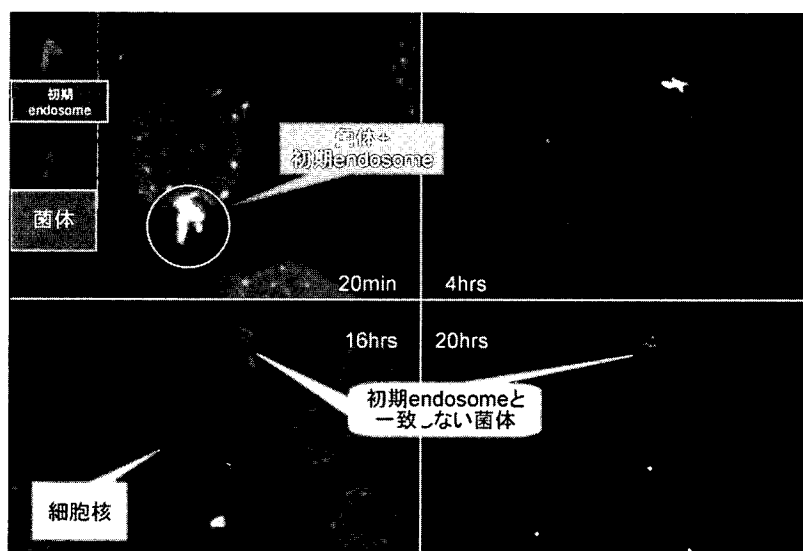


写真 1 アクネ菌と初期 endosome の局在

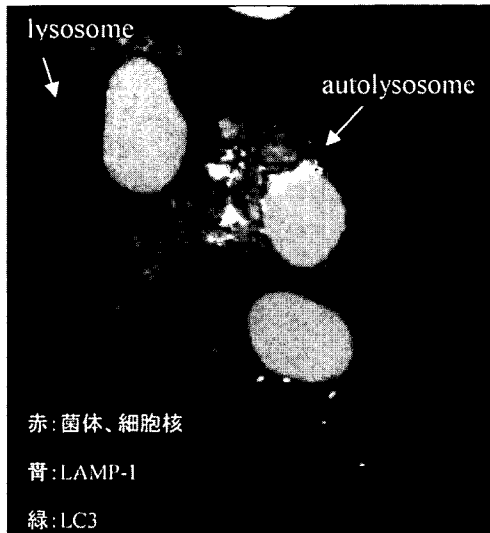


写真2 アクネ菌感染細胞における LAMP-1 および LC3 の局在

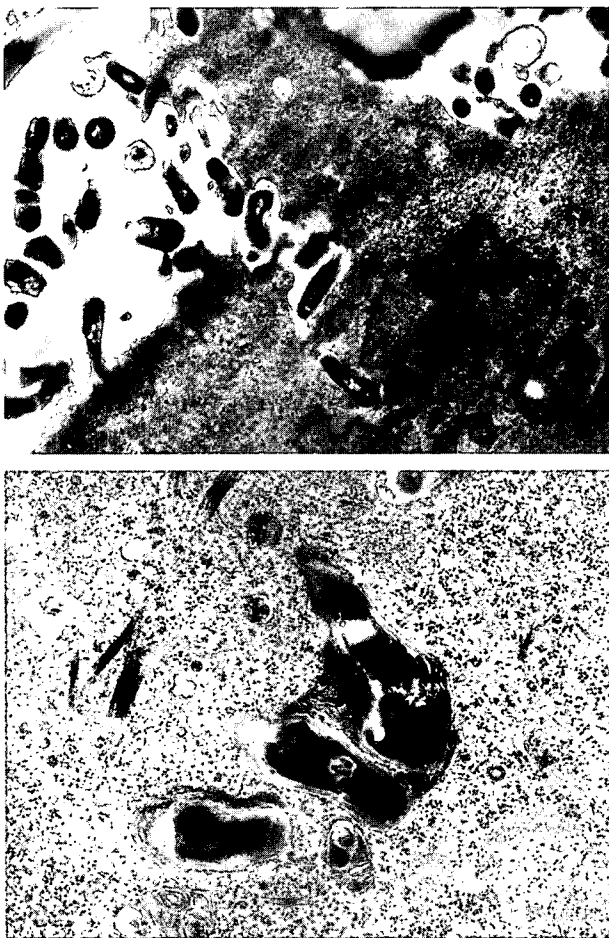


写真3 アクネ菌の細胞内侵入および細胞内局在 (透過型電子顕微鏡像)

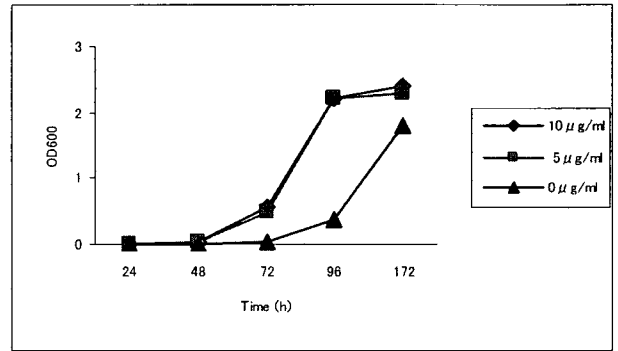


図3 RPF 蛋白による増菌速度の亢進効果

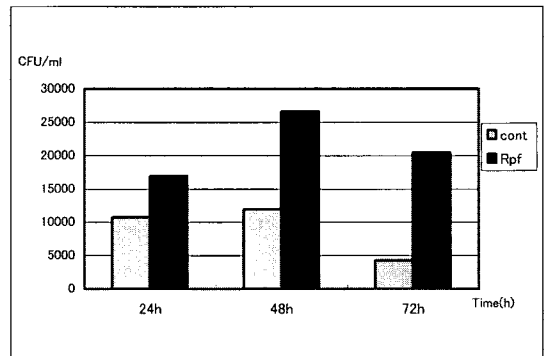


図4 RPF 蛋白による細胞内菌体への影響

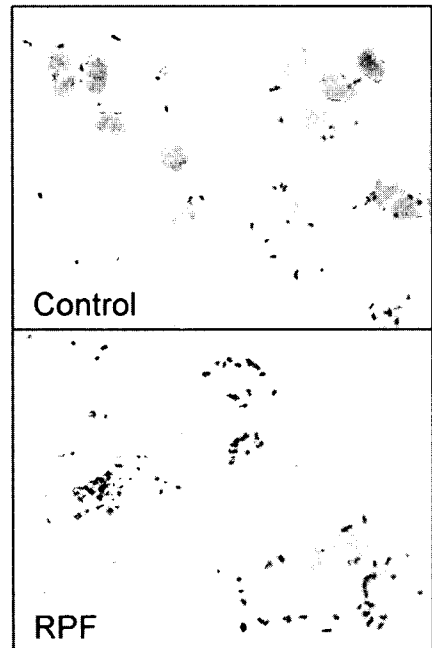


写真4 免疫染色による細胞内菌体の検出

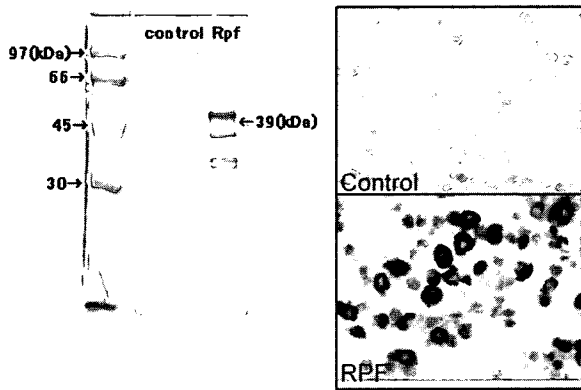


写真5 Western blot, 免疫染色による RPF 発現の確認

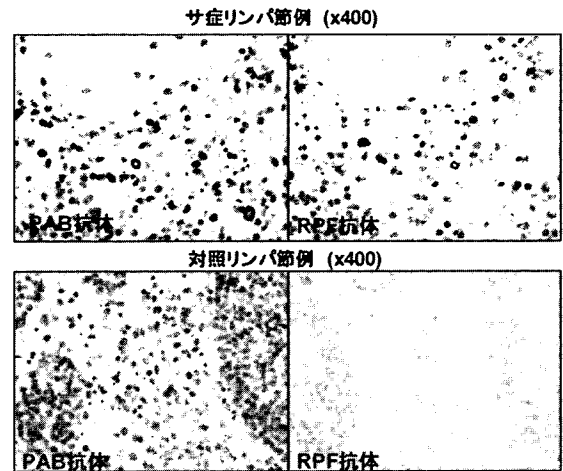


写真7 PAB 抗体および RPF 抗体による免疫染色像

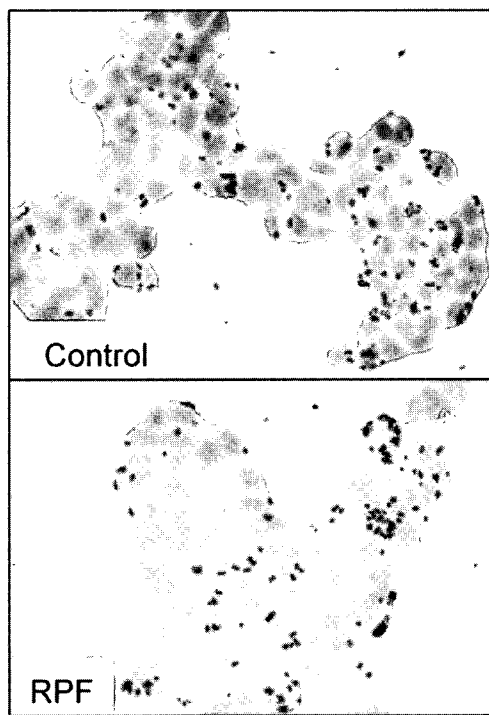


写真6 免疫染色による細胞内菌体の観察 (24 時間後)

表1 病変部 HW 小体の PAB 抗体・RPF 抗体陽性率

症例	n	PAB 抗体	RPF 抗体
サ症リンパ節	28	28 (100%)	12 (43%)
対照リンパ節	10	10 (100%)	0 (0%)

## 結 論

アクネ菌は endosome により細胞内に侵入し、その後大半の菌体は endosome-lysosome 系で細胞内消化される。しかしながら一部の菌体は細胞質に逃れている。細胞質内に逃れた菌体は autophagy 機構に認識さ

れ、autolysosome を形成することで再び細胞内消化される。

結核菌 RPF 蛋白のホモログとして同定したアクネ菌 RPF 蛋白は本研究からアクネ菌においても蘇生促進因子として機能していることが明らかとなった。またサ症病変部における HW 小体は約半数の症例において RPF 蛋白を発現しており、これが病変局所における本菌の内因性活性化に関与している可能性がある。

## 考 察

今回の観察から、アクネ菌感染に対する細胞の防御機構とこれに対するアクネ菌の回避、および細胞内アクネ菌に対し autophagy 機構が関与している可能性が明らかになった。

Autophagy の機能低下は宿主細胞内への病原細菌の停留を起こしうる。また機能亢進は過剰な Th1 型過敏性免疫反応の誘導を惹起しうる。本来哺乳類に普遍的に備わっている機能ではあるが、宿主要因としてアレルギー疾患と同様、過剰な機能亢進は起こりえるのではないだろうか。

これまでの報告<sup>7)</sup>から、ヒトの深部臓器にはアクネ菌が潜伏感染していると示唆される。疾病素因を有する患者において、冬眠型の細胞内潜伏感染アクネ菌が何らかの内因性活性化因子により細胞内増殖することでサ症を発症すると考えられる。その内因性活性化因子として RPF に注目したが、アクネ菌の RPF に対するモノクローナル抗体でサ症病変部に特徴的な

HW 小体と一致する陽性所見が検出されたことは、アクネ菌の細胞内内因性活性化を捉えているものと思われる。本研究で作製した RPF 蛋白に対するモノクローナル抗体での免疫染色の結果から、サ症病変部に潜伏感染している冬眠型アクネ菌は、なんらかの環境要因を契機として、潜伏感染内で自らが産生分泌する蘇生促進因子により活性化し、細胞内増菌しているものと考えられる。

今回の細胞株を用いた実験からは、細胞内細菌の活性化が細胞外からも作用しうることが明らかになった。冬眠期にある菌への内因性再燃の機序については、免疫力低下により常在性弱毒細菌の活性化に伴い分泌される RPF に代表される内因性活性化因子が常在局所に存在する細胞内冬眠型細菌にも作用する可能性、もしくは分泌された RPF が血流などより全身性へ移行し、潜伏感染している細胞内冬眠型細菌に作用する<sup>3)</sup>という2つ様式が想定されうる。前者は、加齢などで免疫力が低下し細菌性肺炎を起こした場合、陳旧性の結核病巣を巻き込むことで結核が再燃するという再燃性結核が1つの例として挙げられる。後者は、過去に心サ症発症歴のある患者が偽膜性腸炎を起こしたことにより、心病変に新たな肉芽腫を形成したという報告がある。よって、本研究でサ症もまた合併感染を契機として細胞内冬眠型アクネ菌の内因性活性化が誘導される可能性が示唆された。SPF 環境下にあるマウスの肺からも2~3割合でアクネ菌が培養されるという報告がある<sup>7)</sup>。今後ヒトと同様にアクネ菌が深部臓器に潜伏感染しているマウスを用い、*in vivo* の系でも細胞内活性化現象の確認をする必要性があると考えられる。

## 参考文献

- 1) 江石義信. 肉芽腫性疾患をめぐる最近のトピックス, サルコイドーシスの病因をめぐる. 病理と臨床 2006; 24(1).
- 2) 水島昇監修. autophagy 自己分解と細胞高次機能との関わり. 細胞工学 2005; 24(1): 558-596.
- 3) Timo U, Stefan HE K. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. J Pathol 2006; 208: 261-269.
- 4) Galina V.M., Obolbek A.T., Konstantin K., et al. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. Molecular Microbiology 2002; 46(3): 611-621
- 5) Galina V.M, Arseny S.K, Danielle I.Y, et al. A bacterial cytokine. Microbiology 1998; 95: 8916-8921.
- 6) N. Panutdaporn, K. Kawamoto, H. Asakura, et al. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived *Salmonella* Typhimurium strain LT2. International J. of Food Microbiology 2006; 106: 241-247.
- 7) Ishige I, Eishi Y, Takemura T, 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(1): 33-42.

# サルコイドーシスにおける Cathepsin S 遺伝子多型の意義

山口 悦郎\*

これまで我々は、サルコイドーシスの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 を試みて来た。今年度の研究では cathepsin S (CTSS) の遺伝子多型の意義について検討した。

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。それより抽出した 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の中で3番目に高い発現を示した遺伝子は、CTSS であった。CTSS は主としてマクロファージ系細胞で発現されており、IFN- $\gamma$  によって誘導される。エンドゾーム中で不変鎖の分解を介して、抗原ペプチドがクラス II 分子に結合するのを促す役割を有する。HapMap project の結果を参考に、CTSS 遺伝子内いわゆる tagSNP を2個 (rs11576175 [イントロン4] と rs10888390 [エクソン4]) 同定した。それらについて遺伝子型を決定し、その意義について195名の対照者と256名のサルコイドーシス患者を対象として症例・対照研究を行った。個別の SNP はサルコイドーシスの発症と相関してはいなかった。しかし、2つの SNP によるハプロタイプ頻度とそれら2つの組み合わせであるディプロタイプ頻度は、全体としてサルコイドーシスと対照群間で有意な相違がみられた。また rs11576175 は臨床経過と、rs10888390 は罹患臓器数と相関する傾向が認められた。

今後 CTSS の蛋白発現の解析を通して、さらにその臨床的意義を検討する意義があろう。

## The role of cathepsin S gene polymorphisms in sarcoidosis

Etsuro Yamaguchi

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

We have attempted to conduct a transcriptome scan which seeks for disease susceptibility genes at the gene expression level, but not at the genome level. We investigated the significance of gene polymorphism for cathepsin S (CTSS) in the current study.

We purified alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage using a bead method from a few patients with sarcoidosis and control subjects. We searched for overexpressed genes for RNA extracted from alveolar macrophages in patients with sarcoidosis using an oligonucleotide array (CodeLink®, Amersham Biosciences) in comparison with that from controls. Among overexpressed genes in sarcoidosis whose expression ratio was higher than that for GAPDH, a house keeping gene, CTSS was the third. CTSS is principally expressed in macrophage-lineage cells and induced by IFN- $\gamma$ . It promotes binding of antigen peptides with class II molecules by degrading invariant chains in endosomes. According to information provided by the HapMap project, we have identified two tag single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs11576175 [intron 4] and rs10888390 [exon 4]) in the CTSS gene. We conducted a case-control study for those SNPs in 195 controls and 256 patients with sarcoidosis. None of the individual SNPs was associated with the occurrence of sarcoidosis. However, there was significant difference in the overall distributions of haplotypes composed of those SNPs and diplotypes, the combination of two haplotypes. Also, rs11576175 was marginally associated with clinical course, and rs10888390 with the number of affected organs in sarcoidosis.

Further study including analysis of protein expression is needed to clarify clinical significance of CTSS.

## 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。実際にそのような遺伝子は存在しない可能性もある。

過去 10 年以上にわたり、網羅的にゲノム全体で疾患感受性遺伝子を検索しようとするいわゆるゲノムスキャンが種々の疾患で実施されている。サルコイドーシスでも近年そのような試みの結果、BTNL2 がその候補として提唱されているが、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る。そのような背景から我々は、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 を試みて来た。昨年まで発現上位 2 つの遺伝子の多型の意義について解析したが、今年度は 3 番目に強い発現を示した cathepsin S (CTSS) について検討した。

## 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<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をプールし各 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。3 番目に強発現していたのは CTSS 遺伝子であった。その一塩基多型 (SNP) のうち、日本人において一定の割合で多型があり、相互に連鎖不平衡の弱い、すなわち独立した tagSNP となり得る rs11576175 (イントロン 4) と rs10888390 (エクソン 4) を選び出した (図 1)。rs10888390 はミスセンス SNP で A (Trp) → G (Arg) 変異を示す。これら 2 つの SNP について 195 名の対照者と 256 名のサルコイドーシス患者 DNA を用い、TaqMan probe<sup>®</sup> 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比較検定、およびハプロタイプとディプロタイプの推定頻度算出とその検定は、SNPAlyze<sup>®</sup> (DYNACOM) を用いて行った。サルコイドーシス患者の臨床諸指標と多型との関連は、 $\chi^2$  検定や Mann-Whitney 検定を、臨床経過との関連は Cox 比例ハザードモデルによる検定を行った。

本研究は「アレルギー性呼吸器疾患の遺伝素因に関する研究」として、本学の倫理委員会により許可されている。

## 結 果

CTSS の二つの SNP の連鎖不平衡の指標である  $D'$  は、対照群で 0.37 であり、HapMap project による結果と類似していた。一方サルコイドーシス患者群ではそれが 0.95 であり、連鎖不平衡が強く、共通の祖先由来であることを示唆していた。しかし、両 SNP を個別に検討した場合、遺伝子型を優性遺伝型、劣性遺伝型、共優性遺伝型いずれの遺伝様式で検定してもサルコイドーシス発症との関連は証明されなかった (表 1, 2)。アリル頻度でも同様であった。別にロジステック回帰分析を行っても同様の結果であった (データ非提示)。

両 SNP のアリルにより、4 種のハプロタイプが構成される。その頻度分布は対照群とサルコイドーシス患者群で全体として高度に有意差が認められ、その意味で両 SNP はサルコイドーシスの発症と相関していた (表 3)。個別のハプロタイプでは、rs10888390=A/

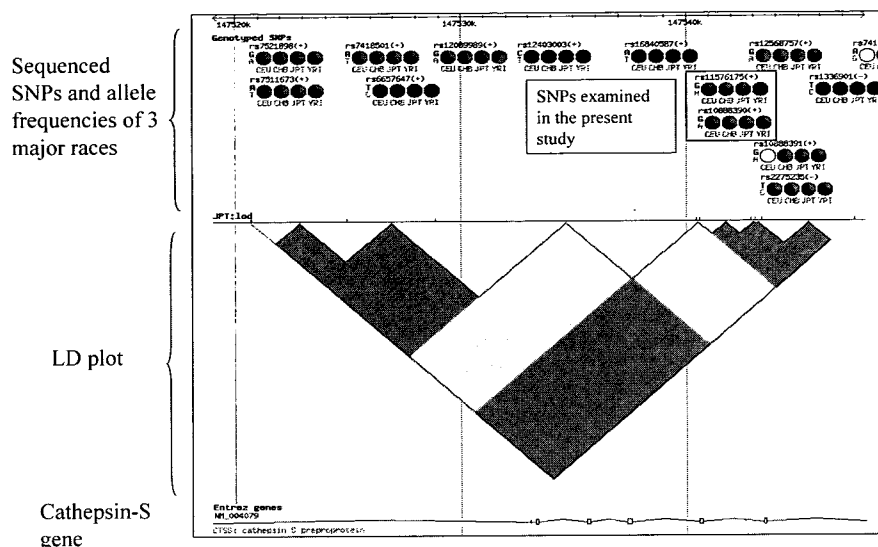


Figure 1 Sequenced SNPs for cathepsin-S gene and linkage disequilibrium (LD) plot (from HapMap Project)

Table 1 Association between sarcoidosis and a SNP, rs11576175 (G/A).

		sarcoidosis	control	AIC(IM-DM)	-1.4727
Dominant model	GG+AG	257	187	Chi-square	0.533
	AA	11	11	Df	1
	Total	268	198	p-value	0.4653
Recessive model	GG	173	141	AIC(IM-DM)	0.3134
	AA+AG	95	57	Chi-square	2.298
	Total	268	198	Df	1
				p-value	0.1295
Codominant model	GG	173	141	AIC(IM-DM)	-0.0166
	AG	84	46	Chi-square	3.9428
	AA	11	11	Df	2
	Total	268	198	p-value	0.1393
Allele	G	430	328	AIC(IM-DM)	-0.9764
	A	106	68	Chi-square	1.0174
	Total	536	396	Df	1
				p-value	0.3131

AIC, Akaike's information criteria ; IM-DM, independent model-dependent model

Table 2 Association between sarcoidosis and a SNP, rs10888390 (G/A).

		sarcoidosis	control	AIC(IM-DM)	-0.6308
Dominant model	GG+AG	216	172	Chi-square	1.3512
	AA	40	23	Df	1
	Total	256	195	p-value	0.2451
Recessive model	GG	113	84	AIC(IM-DM)	-1.9491
	AA+AG	143	111	Chi-square	0.0509
	Total	256	195	Df	1
				p-value	0.8215
Codominant model	GG	113	84	AIC(IM-DM)	-2.1674
	AG	103	88	Chi-square	1.817
	AA	40	23	Df	2
	Total	256	195	p-value	0.4031
Allele	G	329	256	AIC(IM-DM)	-1.814
	A	183	134	Chi-square	0.1858
	Total	512	390	Df	1
				p-value	0.6664

AIC, Akaike's information criteria ; IM-DM, independent model-dependent model

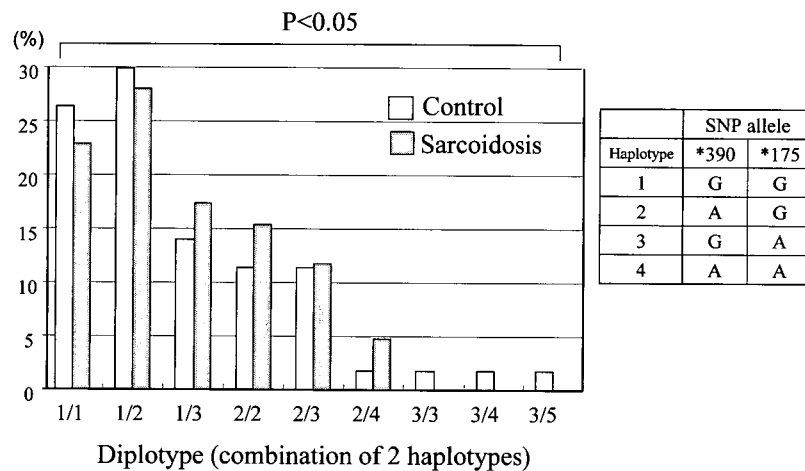


**Table 3** Haplotype analysis of rs10888390 and rs11576175

Haplotype *390.*175	Overall	sarcoidosis	control	Chi-square	p-value	Permutation p-value
G-G	0.4821	0.4541	0.5197	3.7929	0.0515	0.062
A-G	0.3341	0.3549	0.3059	2.3827	0.1227	0.133
G-A	0.1660	0.1876	0.1367	4.1389	0.0419	0.075
A-A	0.0178	0.0033	0.0377	14.5551	0.0001	0.0052

Chi-square      p-value      Permutation p-value  
 21.2934      0.00009      0.0051

\*390=rs10888390; \*175=rs11576175



**Figure 2** Association between sarcoidosis and diplotype composed of rs10888390 and rs11576175  
 \*390=rs10888390; \*175=rs11576175

**Table 4** Association between patient characteristics and genotypes of SNPs

		Age at onset	ACE	Number of affected organs	VC	FEV1/FVC	DLCO
rs10888390	$\chi^2$	3.34	4.57	5.69	2.07	2.79	1.71
	df	2	2	2	2	2	2
	p	0.188	0.102	0.058	0.356	0.248	0.425
rs11576175	$\chi^2$	2.46	0.79	2.75	1.50	1.91	2.76
	df	2	2	2	2	2	2
	p	0.292	0.675	0.252	0.472	0.384	0.251

rs11576175=A の頻度がサルコイドーシス患者群で有意に高く、G/G が高い傾向があり G/A が低い傾向を示した (表 3)。4 種のハプロタイプの組み合わせであるディプロタイプは 10 通りあるが、SNPAlyze により推定されるディプロタイプは実際には 9 通りであった。その頻度を両群で比較すると全体として有意な偏りが認められた (図 2)。以上より CTSS のふたつの

SNP はハプロタイプレベルでサルコイドーシスの発症と相関していた。

サルコイドーシス患者の臨床諸指標との関連では、rs10888390 について罹患臓器数と関連する傾向を認められた。また rs11576175 は臨床経過と関連する傾向を認められた (表 4)。

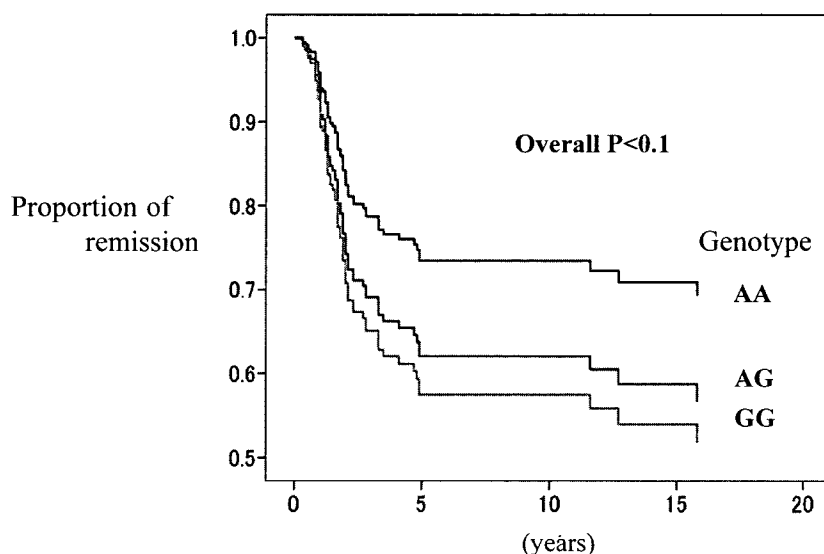


Figure 3 Association between clinical course of sarcoidosis and rs11576175

## 考 案

CTSS はシステイン蛋白分解酵素の一つで、他のカテプシンと同じ基質特異性を持つ。当初前駆体として産生され、早期活性化が防止されると共にその立体構造が保持される。小胞体からゴルジ体を経てエンドゾームに移行してから N 端の一部が酵素的に切断されて活性化し、クラス II 分子と結合している不変鎖 (Ii) を分解する<sup>3)</sup>。その結果クラス II 分子は抗原ペプチドと結合し提示される。また CTSS は主としてマクロファージ系細胞で発現されており、IFN- $\gamma$  によりその発現が誘導される<sup>4)</sup>。サルコイドーシスの原因は今日なお不明であるが、皮膚常在菌との関連が種々の傍証より強く示唆されている。また BAL 細胞はクラス II 分子の発現が亢進していること、古くからクラス II 遺伝子多型との相関が繰り返し報告されていること、いわゆる Th1 細胞が BAL で増加していることなどから、何らかの抗原分子がクラス II 分子を介して提示され、IL-12 および IFN- $\gamma$  発現を優位とした免疫応答を来している可能性は高いと考えられる。CTSS の産生挙動とその機能は、前述のようなサルコイドーシ

スの病態と合致している。本研究によりその遺伝子多型がある程度サルコイドーシスの発症や経過と関連していることが示唆された。今後蛋白発現も多型の影響下にあるかなど、検討を加えて行きたい。

## 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) Hsing L, Rudensky A. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 207: 229-241, 2005.
- 4) Cao H, Wolff RG, Meltzer MS, Crawford RM. Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by IFN- $\gamma$  and IL-4. *J Immunol* 143: 3524-3531, 1989.

# びまん性汎細気管支炎 (DPB)

# びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子研究

土方美奈子<sup>1</sup> 松下 育美<sup>1</sup> 伊藤 秀幸<sup>2</sup> 森田 敬知<sup>2</sup>  
大橋 順<sup>3</sup> 徳永 勝士<sup>3</sup> 本間 栄<sup>4</sup> 田口 善夫<sup>5\*\*</sup>  
吾妻安良太<sup>6\*</sup> 工藤 翔二<sup>6</sup> 慶長 直人<sup>1\*</sup>

びまん性汎細気管支炎 (DPB) の疾患感受性候補領域の中には、ムチン様遺伝子などいくつかの遺伝子が存在しているが、これらの遺伝子のヒト気道上皮細胞での発現については不明の点が多い。ヒト気道上皮細胞を用いて RT/PCR で発現を調べたところ、2つの遺伝子の transcripts が検出できた。候補領域の遺伝的多型と発現量に関連がみられるのかを、今後さらに検討する必要がある。

## Expression of candidate genes in the susceptibility region of diffuse panbronchiolitis

Minako Hijikata<sup>1</sup>, Ikumi Matsushita<sup>1</sup>, Hideyuki Ito<sup>2</sup>, Takatomo Morita<sup>2</sup>, Jun Ohashi<sup>3</sup>,  
Katsushi Tokunaga<sup>3</sup>, Sakae Homma<sup>4</sup>, Yoshio Taguchi<sup>5</sup>, Arata Azuma<sup>6</sup>,  
Shoji Kudoh<sup>6</sup>, and Naoto Keicho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Diseases, Research Institute, <sup>2</sup>Department of Thoracic Surgery, International Medical Center of Japan

<sup>3</sup>Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

<sup>4</sup>Department of Respiratory Diseases, Toho University School of Medicine

<sup>5</sup>Department of Respiratory Medicine, Tenri Hospital

<sup>6</sup>Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

Diffuse panbronchiolitis (DPB) is a complex genetic disease affecting East Asians and is strongly associated with the class I human leukocyte antigens (HLA)-B54 in Japan and HLA-A11 in Korea. We recently showed that an HLA-associated major susceptibility gene for DPB is probably located within the 200 kb in the class I region 300 kb telomeric of the HLA-B locus on the chromosome 6p21.3. We cloned two novel mucin-like genes *G2* and *G4* in the candidate region, which form a mucin gene cluster together with two reported genes, *C6orf205* and *DPCR-1*. We investigated their expression in human bronchial epithelial cells and found that *G4* and *C6orf205* were expressed.

## はじめに

びまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis, 以下 DPB と略す) は, アジア人にみられる HLA class I 関連疾患である。日本人では HLA-B54 との関連が非常に強いことはいくつかの報告で確認されているのに対し<sup>1,2)</sup>, 韓国人では HLA-B54 との関連はなく, かわりに HLA-A11 との関連が強いとされた<sup>3)</sup>。このことから, HLA そのものが DPB に関連しているのではなく, HLA-B 遺伝子座と HLA-A 遺伝子座の間に DPB の疾患感受性遺伝子が存在するという仮説がたてられ, 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, 候補領域はおおよそ S 遺伝子から TFIIB 遺伝子までの 200 kb までせばめられた<sup>4)</sup>。この 200 kb の領域をさらに一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) を用いて検討したところ, 候補領域は 80 kb までせばめられたが, この 80 kb の領域は非常に連鎖不平衡の強い領域であるために, 複数の遺伝子多型が同程度に疾患に関連しており, 関連解析によるそれ以上の絞り込みは困難と思われた。一方で我々は候補領域内で新規遺伝子のクローニングを試み, 2つのムチン様遺伝子 (*G2*, *G4*) をクローニングした。データベースに登録されている配列 C6orf205 と, 既に報告された *DPCR1* 遺伝子<sup>5)</sup> をあわせると, 候補領域内は4つのムチン様遺伝子がクラスターとなっている。ムチンには繰り返し構造があり, そのユニット数が可変である VNTR (variable number of tandem repeat) 領域がある。平成 17 年度に, このムチン様遺伝子のエクソン内の VNTR を中心に解析を加え, DPB との関連を検討したが, 日本人集団では HLA-B\*5401 との関連が非常に強く, これを超える強い関連を有する遺伝的多型は VNTR を含めても同定されなかった。平成 18 年度に, 200 kb の領域内ではあるが, 上述 80 kb の範囲ではない HLA-A 側の遺伝子

領域についての検討を加え, B\*5401 と B\*5504 を有する疾患感受性ハプロタイプ構造を検討したところ, *DPCR1* 遺伝子領域はすでに疾患感受性ハプロタイプに共有されないセグメントに属すると考えられ, 200 kb の候補領域のうち, HLA-A 側の 50 kb は候補領域から除外された。今年度は, 200 kb の候補領域に存在する遺伝子のヒト気道上皮細胞での発現を調べ, 疾患感受性遺伝子としての役割の可能性を検討した。

## 対象と方法

細胞株としては, NCI-H292, A549, BET1A, BEAS2B, NCI-H441, Calu-3 を用いた。また, human lung total RNA (Stratagene), human trachea total RNA (Stratagene) も用いた。

国立国際医療センターの呼吸器外科において, 同意の上で提供をうけた切除肺・気管支の一部より, 気道上皮細胞を得て, 培養を行った。

Trizol (Invitrogen) にて total RNA を抽出した後, total RNA 5  $\mu$ g  $\cdot$  SuperScriptIII reverse transcriptase (Invitrogen)  $\cdot$  pd (N)<sub>9</sub> (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行った。

200 kb の候補領域にある遺伝子, *SFTPG*, *DPCR1*, *C6orf205*, *G4*, *G2*, *STG* について, 増幅産物が約 200 ~ 300 bp の範囲になるような RT/PCR 用のプライマーを作成した。すべてイントロンを間にはさむように設計したので, ゲノム DNA の増幅と cDNA の増幅の区別は可能である。RT/PCR のコントロールとしては, G3PDH Control Amplimer Set (CLONTECH) を使用した。

(倫理面への配慮)「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関する倫理委員会の承認を受けている。

## 結 果

## (1) Cell line における発現

図 1 に示すように, 今回検討した cell line および, 肺・気管支の total RNA の中では NCI-H441 細胞が対象とした遺伝子を比較的多く発現していることがわかった。平成 17 年度の関連解析の結果では, これらの遺伝子領域で一番関連が強かったのは, *G4* 遺伝子の SNP (*G4* exon4 SNP, OR 2.27, 95%CI 1.24-4.18) であ

<sup>1</sup> 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部

<sup>2</sup> 同 呼吸器外科

<sup>3</sup> 東京大学 大学院医学系研究科人類遺伝学教室

<sup>4</sup> 東邦大学呼吸器内科

<sup>5</sup> 天理よろづ相談所病院呼吸器内科

<sup>6</sup> 日本医科大学第四内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

\*\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

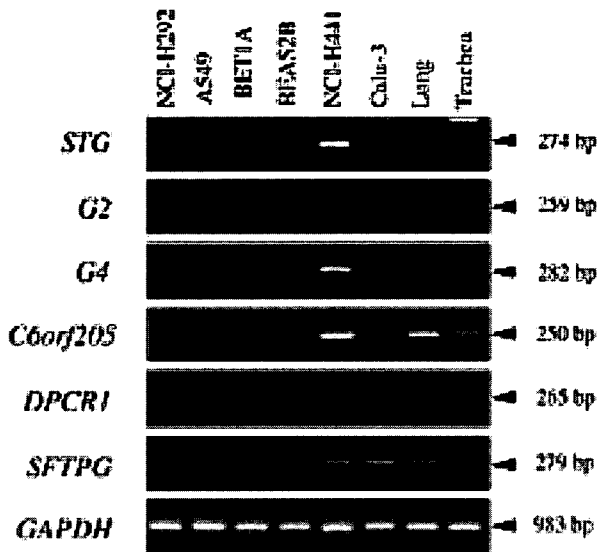


図1 細胞株における候補領域の遺伝子の発現

り、G4 遺伝子の発現は特に注目されるため、NCI-H441 細胞から G4 遺伝子のほぼ全長 (約 5 kb) cDNA の増幅を long PCR にて試みたところ、増幅可能であった。塩基配列の確認を行ったところ、上記の一番関連が強かった SNP に関しては T のホモ接合体であった他、特記すべき VNTR 多型などは見いだされなかった。

### (2) ヒト気道上皮細胞 primary culture における発現

切除気管支から単離培養したヒト気道上皮細胞については、まず passage 1 細胞, passage 2 細胞, air liquid interface (ALI) culture を行った細胞をいくつか用いて発現の比較を行ったが、対象遺伝子の中には ALI 培養を行わないと発現が確認できないものは特になかったため、以後の検討は主に passage 1 細胞で行うことにした。また、ヒト気道上皮細胞で発現が確認できたのは、G4 遺伝子と *C6orf205* であったので、この 2 遺伝子の発現を passage 1 細胞で検討することとした。

ヒト気道上皮細胞 44 検体を用いて G4 遺伝子と *C6orf205* の発現を調べたところ、*C6orf205* は全例で陽性であったが、G4 遺伝子は 40 検体で陽性、4 検体で陰性であった。

### (3) 遺伝子型と発現の関係の検討

上記 (2) の検討で、G4 遺伝子発現が陰性であった 4 検体について、疾患感受性のアリルを有しているかどうかゲノム DNA の PCR とシーケンスで調べたところ、いずれも疾患感受性アリルは有していなかつ

た。

### 考案・結論

200 kb の DPB 疾患感受性候補遺伝領域にはムチン様遺伝子が存在するが、今年度の検討で、ヒト気道上皮細胞での mRNA 発現が認められるのは、G4 遺伝子と *C6orf205* であることがわかった。今までの疾患関連解析の結果で一番注目されるのは G4 遺伝子であるが、その発現には個体差があり、発現が少ない場合があることもわかった。

しかし、疾患感受性アリルの検討を行ったところ、G4 遺伝子の発現が少ないものは、疾患感受性アリルを有していないものであった。そうすると、G4 遺伝子の発現が少ないことが疾患に関連するのではなく、逆に多い事が疾患に関連するのではないかという推測ができる。DPB の症状としての気道過分泌、また、過去の関連解析結果から dominant を仮定すると最も有意差が出る事とあわせても、疾患感受性アリルでの高発現という仮説には矛盾がないと思われる。今回の方法では、発現量が多いことを検出できる系を組んでいないので、今後は、疾患感受性アリルで発現が多い可能性を検討できる実験系を構築することが必要であり、また、さらに検体数を増やすことも必要と考える。

### 参考文献

- 1) Sugiyama Y, Ohno S, Kano S, Maeda H, Kitamura S. Diffuse panbronchiolitis and rheumatoid arthritis: a possible correlation with HLA-B54. Intern Med. 1994 Oct; 33(10): 612-4.
- 2) Keicho N, Tokunaga K, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Bannai M, Emi M, Ohishi N, Yazaki Y, Kudoh S. Contribution of HLA genes to genetic predisposition in diffuse panbronchiolitis. Am J Respir Crit Care Med. 1998 Sep; 158(3): 846-50.
- 3) 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 Feb; 159(2): 526-9.
- 4) Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Ohishi N, Emi M, Park MH, Inoko

H, Tokunaga K, Kudoh S. Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet.* 2000 Feb ; 66(2): 501-7.

5) Matsuzaka Y, Tounai K, Denda A, Tomizawa M,

Makino S, Okamoto K, Keicho N, Oka A, Kulski JK, Tamiya G, Inoko H. Identification of novel candidate genes in the diffuse panbronchiolitis critical region of the class I human MHC. *Immunogenetics.* 2002 Aug ; 54(5): 301-9. Epub 2002 Jul 9.

# 狭窄性細気管支炎 (CBO)



# ラット移植肺へのインターロイキン-10 経気道的遺伝子導入が 同種免疫反応に伴うグラフト細気管支上皮細胞傷害に 及ぼす影響

大石 久<sup>1</sup> 岡田 克典<sup>1</sup> 菊地 利明<sup>2</sup>  
松村 輔二<sup>1</sup> 貫和 敏博<sup>2\*</sup> 近藤 丘<sup>1\*\*</sup>

【背景・目的】肺移植後にみられる閉塞性細気管支炎は、レシピエントの長期予後を規定する合併症である。本症の発症には、同種免疫反応に伴う細気管支上皮細胞傷害とこれに引き続き起こる細気管支内腔への反応性の線維性結合組織増生が関与することが推測されているものの、発症機序の詳細は未だ不明であり、治療法も確立されていないのが現状である。我々は、摘出ドナー肺へのインターロイキン-10 (IL-10) 経気道的遺伝子導入が、移植肺の急性拒絶反応を抑制することをラット肺移植モデルを用いて示してきた。我々が用いた経気道的遺伝子導入法により、目的遺伝子はI型肺胞上皮細胞、マクロファージに加え、細気管支上皮細胞にも導入される。今回は、本法が、ラット移植肺の細気管支上皮細胞傷害を抑制するか否かにつき病理学的に検討した。【方法】BNラットより左肺を摘出し、あらかじめ作成した遺伝子 (IL-10 群: pCMVh-IL10, コントロール群: pCMV $\beta$ ) をカチオン性脂質とともに経気道的に注入した後、MHC不適合Lewラットに同所性左片肺移植を行った。移植後6日目に移植肺を摘出して病理標本を作成し、切片中のすべての細気管支をその上皮細胞脱落の割合にしたがって、「脱落なし」=上皮細胞脱落なし、「中等度脱落」=全周の1-50%の上皮細胞脱落、「重度脱落」=全周の51-100%の上皮細胞脱落3つのカテゴリーに分類しそれぞれの個数を記録した。上皮細胞脱落の程度の分布に両群間で差があるかどうかを $\chi^2$ 検定を用いて検討した。【結果】コントロール群 ( $n=6$ ) の切片中の総細気管支数は180個で、「脱落なし」を示したのは47 (26.1%), 「中等度脱落」は60 (33.3%), 「重度脱落」は73 (40.6%)であった。一方、IL-10群 ( $n=7$ ) の切片中の総細気管支数は212であり、「脱落なし」は124 (58.5%), 「中等度脱落」は57 (26.9%), 「重度脱落」は31 (14.6%)であった。気道上皮細胞脱落の程度の分布に両群間で有意差を認め ( $p<0.001$ )、IL-10群で気道上皮細胞の脱落が有意に抑制されていた。【結論】摘出肺へのIL-10遺伝子の経気道的子導入が、同種免疫反応に伴うグラフト細気管支上皮細胞傷害を有意に抑制することが明らかとなった。本法は閉塞性細気管支炎の予防・治療へつながる可能性がある。

## Cationic liposome-mediated interleukin-10 gene transfer to the airway prevents bronchiolar epithelial cell injury in a rat model of lung allograft rejection

Hisashi Oishi<sup>1</sup>, Yoshinori Okada<sup>1</sup>, Toshiaki Kikuchi<sup>2</sup>, Yuji Matsumura<sup>1</sup>, Toshihiro Nukiwa<sup>2</sup>, and Takashi Kondo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

<sup>2</sup>Department of Respiratory Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine

**【Background】** Bronchiolitis obliterans (BO) is a complication that limits a long term survival of lung transplant recipients. Although the pathogenesis of BO remains unclear, the most plausible explanation is that BO develops as a result of tissue repair and remodeling in response to bronchiolar epithelial injury, which is primarily caused by alloimmune response. We have previously reported that cationic liposome-mediated trans-bronchial interleukin-10 (IL-10) gene transfer to the lung allograft significantly improved parameters of inflammation associated with acute rejection in a rat model of lung transplantation. In this model, we found that a target gene was transferred into type I alveolar cells, alveolar macrophages and bronchiolar epithelial cells. Here, we examined whether trans-bronchial IL-10 gene transfer prevented bronchiolar epithelial cell injury in a rat model of lung transplantation.

**【Methods】** The left lung was extracted from the donor BN rat and intrabronchially instilled with 50  $\mu$ g of pCMVIL-10 (IL-10 group) or pCMV $\beta$  (control group) mixed with 20  $\mu$ g of cationic liposome. The lung graft was transplanted to the histoincompatible recipient Lew rat. The lung allograft was harvested on day 6 post-transplant, fixed in formalin and a hematoxylin-eosin-stained section was made from a cut surface through the hilum. All bronchioles in the section were examined and assigned to one of the following categories according to the degree of the epithelial cell injury; “no epithelial loss”: all circumferential epithelial cells are retained, “moderate epithelial loss”: 1 to 50% of circumferential epithelial cells are lost, “severe epithelial loss”: 51 to 100% of circumferential epithelial cells were lost.

**【Results】** Among the 180 bronchioles counted in the control group ( $n=6$ ), 47 (26.1%) were assigned to “no epithelial loss”, 60 (33.3%) to “moderate epithelial loss”, and 73 (40.6%) to “severe epithelial loss”. In marked contrast, among the 212 bronchioles counted in the IL-10 group ( $n=7$ ), 124 (58.5%) were assigned to “no epithelial loss”, 57 (26.9%) to “moderate epithelial loss”, and 31 (14.6%) to “severe epithelial loss”. The distribution of the categories of epithelial cell loss was significantly different between the both groups ( $p<0.001$  with  $\chi^2$  test) and the epithelial cell injury was significantly improved in the IL-10 group.

**【Discussion and Conclusion】** Cationic liposome-mediated IL-10 gene transfer to the airway prevented bronchiolar epithelial cell injury in a rat model of lung allograft rejection. Whether this therapeutic method prevents or treat BO has to be further determined.

肺移植は終末期肺疾患患者に対する有効な治療法として確立しているが、術後5年生存率は今日でも50%にとどまっておらず、未だ満足すべきものではない<sup>1)</sup>。国際心臓移植学会の報告によると、術後遠隔期の死因の4分の1以上を閉塞性細気管支炎が占めていることから、本合併症の予防法・治療法の開発は、肺移植の手術成績向上のために不可欠である。閉塞性細気管支炎は、移植肺における慢性拒絶反応と位置づけられている。同種免疫反応に伴う細気管支上皮細胞傷害とこれに引き続き起こる内腔への反応性の線維性結合組織の増生が本体であることが推測されているが、発症機序の詳細は未だ不明である。

我々は、これまで、摘出肺へのインターロイキン-10 (IL-10) 経気道的遺伝子導入が、移植肺の急性拒絶反応を抑制することをラット肺移植モデルを用いて示してきた<sup>2)</sup>。このモデルにおいては、カチオン性脂質を遺伝子導入媒体として、摘出ドナー肺への経気道的遺伝子導入により、目的遺伝子が、I型肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージの他に、細気管支上皮に発現することが確認された。IL-10は、Th1細胞の活性ならびに細胞傷害性T細胞のエフェクター作用を抑制するとともに、抗アポトーシス作用を有することから、我々が用いたIL-10遺伝子導入の手法により、同種免疫反応に伴うグラフト細気管支上皮細胞傷害が抑制される可能性があるのではないかと考えた。本研究の目的は、摘出ドナー肺へのインターロイキン-10 (IL-10) 経気道的遺伝子導入が、ラット移植肺の細気管支上皮細胞傷害を抑制するか否かを病理学的に明らかにすることである。

## 方 法

プラスミド作成：大腸菌由来の $\beta$ -galactosidase 遺伝子を内包した市販のプラスミド (pCMV $\beta$ ) を購入した。ヒトIL-10 (hIL-10) のcDNAを polymerase chain reaction 法で作成し、これをpCMV $\beta$  から $\beta$ -galactosidase 遺伝子を切り取った後に組み込み、ヒトIL-10 遺伝子を内包したプラスミド (pCMVhIL-10)

を作成した。pCMV $\beta$  および pCMVIL-10 は、カチオン性脂質 (Lipofectamine 2000, インビトロジェン株式会社, 東京) を遺伝子導入媒体として、まず培養 Cos 7 細胞へ導入し、前者は X-gal 溶液を用いた染色で、後者は ELISA 法で培養液上清中の hIL-10 濃度を測定することで、それぞれ目的とする蛋白の産生を確認した。

肺移植実験：BN ラットをドナー、Lew ラットをレシピエントとする主要組織適合性抗原不適合の組み合わせで同所性左片肺移植を行った<sup>3)</sup>。ドナー肺を摘出後、pCMVIL-10 (IL-10 群,  $n=7$ ) または pCMV $\beta$  (コントロール群,  $n=6$ ) それぞれ 50  $\mu$ g を 20  $\mu$ l のカチオン性脂質と混合した後、蒸留水で希釈して総量を 200  $\mu$ l として経気道的に注入した。移植後6日目に移植肺を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液で浸漬固定した。固定後の移植肺を肺門を通る前額断にて切断し、パラフィン包埋し、薄切して Hematoxylin-Eosin 染色を行った。切片中のすべての細気管支を、その上皮脱落の割合にしたがって、「脱落なし」=上皮細胞脱落なし、「中等度脱落」=全周の1-50%の上皮細胞脱落、「重度脱落」=全周の51-100%の上皮細胞脱落3つのカテゴリーに分類し、それぞれの個数を記録した (図1)。

統計処理：2群間における気道上皮細胞脱落の程度を表すカテゴリーの分布の比較には  $\chi^2$  検定を用い、危険率 5% 以下を有意とした。

## 結 果

コントロール群 ( $n=6$ ) の切片中の総細気管支数は 180 個で、「脱落なし」を示したものは 47 (26.1%)、「中等度脱落」は 60 (33.3%)、「重度脱落」は 73 (40.6%) であった。一方、IL-10 群 ( $n=7$ ) の切片中の総細気管支数は 212 であり、「脱落なし」は 124 (58.5%)、「中等度脱落」は 57 (26.9%)、「重度脱落」は 31 (14.6%) であった。気道上皮脱落の程度の分布に両群間で有意差を認め ( $p<0.001$ )、IL-10 群で拒絶反応に伴う気道上皮細胞傷害が有意に抑制されていた (図2)。

## 考 察

我々は、ラット肺移植モデルを用いた研究で、摘出ドナー肺への経気道的IL-10遺伝子導入により、急性

<sup>1</sup> 東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野

<sup>2</sup> 東北大学大学院医学系研究科呼吸器病態学分野

\* 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 分担研究者

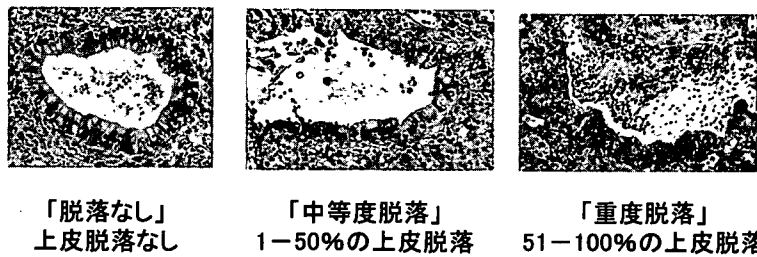


図1 移植肺細気管支上皮細胞脱落のカテゴリー。作成した病理切片内の全ての細気管支を、図に例示するような3つのカテゴリーに分類し、それぞれの個数を記録した。

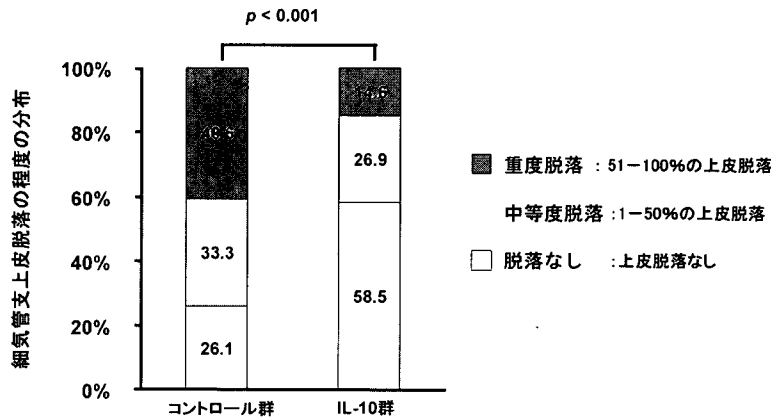


図2 インターロイキン-10 経気道的遺伝子導入が拒絶反応に伴うグラフト細気管支上皮細胞傷害に及ぼす影響。ドナー肺を摘出後、ヒトインターロイキン-10 遺伝子を内包するプラスミド (pCMVIL-10) またはコントロールとして  $\beta$ -galactosidase を内包するプラスミド (pCMV $\beta$ ) それぞれ 50  $\mu$ g を 20  $\mu$ l の cationic liposome と混合した後、蒸留水で希釈して総量を 200  $\mu$ l として経気道的に注入し、主要組織適合性抗原不一致のレシピエントラットに同所性に移植した。移植後 6 日目に移植肺を摘出し、病理標本を作成した。切片中のすべての細気管支を、その上皮脱落の割合にしたがって、「脱落なし」= 上皮脱落なし、「中等度脱落」= 1-50% の上皮脱落、「重度脱落」= 51-100% の上皮脱落 3 つのカテゴリーに分類し、それぞれのカテゴリーの分布を両群間で比較検討 ( $\chi^2$  検定) した。

拒絶反応に伴う移植肺の炎症所見 (浮腫, 肺胞内出血, 壊死) が有意に抑制されることを病理学的に示した<sup>2)</sup>。本研究で用いたカチオン性脂質を遺伝子導入媒体とした経気道的遺伝子導入手法により, 目的遺伝子は細気管支上皮細胞にも導入されることから, 我々は IL-10 遺伝子導入により, 同種免疫反応に伴う細気管支上皮細胞傷害が軽減される可能性があるのではないかと考えた。そこで, 移植肺の細気管支上皮細胞傷害の程度を病理学的に定量し, IL-10 群とコントロール群とで比較検討した。この結果, hIL-10 遺伝子導入により, 細気管支上皮細胞脱落の程度が有意に抑制されることが示された。すなわち, コントロール群では 70% 以上の細気管支上皮が「中等度脱落」以上の所見を呈したのに対し, IL-10 群では半数以上の細気管支が「脱落なし」を示し, 気道上皮脱落の程度の分布には 2 群間で有意差を認めた。肺移植後の慢性拒絶反応とされる閉塞性細気管支炎の病態が, 同種免疫反応に伴う細気管支上皮細胞傷害と脱落, そしてその後に反応性に起こる気道内腔への線維性結合組織増生で

あると理解されていることを考えると, 経気道的な hIL-10 遺伝子導入による移植肺細気管支上皮細胞保護効果が, 閉塞性細気管支炎の予防や治療へつながる可能性が期待でき, 今後さらなる検討が望まれる。これまで, 肺移植モデルを用いて IL-10 遺伝子導入の閉塞性細気管支炎に対する予防・治療効果を検討した報告はないが, Boehler らはラット異所性気管移植のモデルにおいて, recombinant IL-10 の全身投与および IL-10 の全身性の遺伝子導入が, 気管グラフト内腔の閉塞性気道病変を抑制することを報告している<sup>4)</sup>。我々のモデルは, IL-10 遺伝子を細気管支上皮細胞に直接導入するものであり, 効果と全身的な副作用の軽減の両方の観点から, より臨床応用に向けて期待できるものと考えられる。

本研究の結果から, 摘出肺への IL-10 遺伝子の経気道的子導入が, 同種免疫反応に伴うグラフト細気管支上皮細胞傷害を有意に抑制することが明らかとなった。本法が閉塞性細気管支炎の予防・治療において有効か否かについて明らかにするためには, 今後の検討