

また、いかなる状況下で、ApoE 発現が増強するかに関しては、神経由来線維芽細胞に対する冷却ストレス⁹⁾、LPS の静脈内注射¹⁷⁾、スタウロスポリンによるヒト線維芽細胞のアポトーシス誘導時¹⁰⁾などにおいて、ApoE 発現が増強することが報告されている。さらに近日、高濃度酸素による肺傷害で、肺組織における ApoE 蛋白発現が増強することも示されており¹¹⁾、種々のストレス下で ApoE 発現が増強することが示されているが、ApoE がストレス保護的に働くのか、あるいは起炎物質として働くのかに関しては不明な点が多い。

この点に関しては、ApoE ノックアウトマウスに対するリステリア腹腔内感染モデルで、菌体排除が障害され、血清 TNF- α も上昇し、致死率が高いことが報告されており¹⁸⁾、ApoE は正常な免疫反応形成に必要な、保護的分子として働いていることが示唆されている。

また、Chen らは、野生型ラットにおける高濃度酸素による肺傷害が、ApoE2 の気管内先行投与で抑制されたことを報告している¹¹⁾。ApoE2 投与で、胸水量、肺の水分含有量、血管透過性亢進が抑制されたとしており、肺傷害保護的作用が示唆されている。これは、ApoE 欠損マウスで肺局所の炎症が抑制された我々の結果とは異なっている。興味深い報告として、ApoE が、マクロファージによるアポトーシス細胞貪食を促進し、ApoE 欠損マウスではアポトーシス細胞の処理障害が出現することが示されている¹⁹⁾。今回の我々の結果を考察すると、ApoE 欠損マウスでは、シリカによってアポトーシスに陥ったマクロファージ²⁰⁾ やシリカ粒子自体の貪食・処理が減弱した結果、局所の炎症が減弱したことが仮説として想定されるが、今後の検証が必要である。Chen らの報告は、肺傷害のトリガーとして、高濃度酸素を用いており、シリカによる肺傷害においては ApoE が異なる役割を果たす可能性もある。今後は、様々なトリガーによる肺傷害における ApoE の発現動態及び、その役割を明らかにしていくことが必要と考えられる。

結 論

本研究では、シリカ肺傷害モデルにおいて発現増強する分子を、cDNA アレイを用いて同定した。さ

らに、これまで肺傷害における役割が不明であった ApoE に注目し、ApoE 欠損マウスではシリカ投与で惹起される炎症細胞浸潤や、肺局所でのサイトカイン・ケモカイン濃度が減少していることから、ApoE はシリカ肺傷害モデルにおいて、向炎症作用を有していることが示唆された。

文 献

- 1) Matsushima Y, Sakurai T, Ohoka A, Ohnuki T, Tada N, Asoh Y, et al. Four strains of spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice: phenotypic distinctions determined by genetic backgrounds. *J Atheroscler Thromb* 2001; 8: 71-9.
- 2) Katsuma S, Nishi K, Tanigawara K, Ikawa H, Shiojima S, Takagaki K, et al. Molecular monitoring of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by cDNA microarray-based gene expression profiling. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 747-51.
- 3) Kaminski N, Allard JD, Pittet JF, Zuo F, Griffiths MJ, Morris D, et al. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1778-83.
- 4) van den Brule S, Misson P, Buhling F, Lison D, Huaux F. Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF- β . *Respir Res* 2005; 6: 84.
- 5) Shibata Y, Berclaz PY, Chronos ZC, Yoshida M, Whittsett JA, Trapnell BC. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 2001; 15: 557-67.
- 6) Nakayama S, Mukae H, Ishii H, Kakugawa T, Sugiyama K, Sakamoto N, et al. Comparison of BALF concentrations of ENA-78 and IP10 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia. *Respir Med* 2005; 99: 1145-51.
- 7) Driscoll DM, Getz GS. Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1984; 25: 1368-79.
- 8) Zannis VI, Breslow JL, SanGiacomo TR, Aden DP, Knowles BB. Characterization of the major

- apolipoproteins secreted by two human hepatoma cell lines. *Biochemistry* 1981 ; 20 : 7089-96.
- 9) Saada A, Dunaevsky-Hutt A, Aamar A, Reichert F, Rotshenker S. Fibroblasts that reside in mouse and frog injured peripheral nerves produce apolipoproteins. *J Neurochem* 1995 ; 64 : 1996-2003.
- 10) Quinn CM, Kagedal K, Terman A, Stroikin U, Brunk UT, Jessup W, et al. Induction of fibroblast apolipoprotein E expression during apoptosis, starvation-induced growth arrest and mitosis. *Biochem J* 2004 ; 378 : 753-61.
- 11) Chen J, Chen Z, Chintagari NR, Bhaskaran M, Jin N, Narasaraju T, et al. Alveolar type I cells protect rat lung epithelium from oxidative injury. *J Physiol* 2006 ; 572 : 625-38.
- 12) Van Eck M, Herijgers N, Yates J, Pearce NJ, Hoogerbrugge PM, Groot PH, et al. Bone marrow transplantation in apolipoprotein E-deficient mice. Effect of ApoE gene dosage on serum lipid concentrations, (beta) VLDL catabolism, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 ; 17 : 3117-26.
- 13) Linton MF, Atkinson JB, Fazio S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science* 1995 ; 267 : 1034-7.
- 14) Avila EM, Holdsworth G, Sasaki N, Jackson RL, Harmony JA. Apoprotein E suppresses phytohemagglutinin-activated phospholipid turnover in peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 1982 ; 257 : 5900-9.
- 15) Laskowitz DT, Lee DM, Schmechel D, Staats HF. Altered immune responses in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 2000 ; 41 : 613-20.
- 16) Terkeltaub RA, Dyer CA, Martin J, Curtiss LK. Apolipoprotein (apo) E inhibits the capacity of monosodium urate crystals to stimulate neutrophils. Characterization of intraarticular apo E and demonstration of apo E binding to urate crystals in vivo. *J Clin Invest* 1991 ; 87 : 20-6.
- 17) Van Oosten M, Rensen PC, Van Amersfoort ES, Van Eck M, Van Dam AM, Breve JJ, et al. Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 8820-4.
- 18) Roselaar SE, Daugherty A. Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. *J Lipid Res* 1998 ; 39 : 1740-3.
- 19) Grainger DJ, Reckless J, McKilligin E. Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol* 2004 ; 173 : 6366-75.
- 20) Sarih M, Souvannavong V, Brown SC, Adam A. Silica induces apoptosis in macrophages and the release of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta. *J Leukoc Biol* 1993 ; 54 : 407-13.

サルコイドーシス

【平成 19 年度】

アクネ菌によるオートファジー誘導とサルコイドーシス病変部におけるアクネ菌蘇生促進因子の免疫組織学的証明

古川あすか¹ 内田 佳介¹ 石下 由紀¹ 石下 郁夫²
鈴木 好美¹ 鈴木 高成¹ 西川 絵理¹ 三輪 彩¹
瀧澤真奈美¹ 小林 寅喆³ 武村 民子⁴
岩井 和郎⁵ 江石 義信^{1*}

【目的】サルコイドーシス (サ症) の病因は、細胞内に潜伏感染しているアクネ菌が内因性活性化して細胞内増殖する際、疾患感受性のある宿主において Th1 型過敏性免疫反応を惹起するものと想定される。細胞内増菌現象が Th1 型過敏性免疫反応を誘導する機序としては autophagy との関連が示唆されている。また潜伏感染菌の内因性活性化にともなう細胞内増菌には Resuscitation promoting factor (RPF 蛋白) が注目されている。本研究では、アクネ菌感染による autophagy の誘導および病変組織における RPF 蛋白の関与を検討した。【材料と方法】アクネ菌は細胞内侵入能を有する臨床分離株を用いた。各実験にはそれぞれ HeLa-LC3 細胞, A549 細胞, HEK293T 細胞を用いた。病変部の検討には HW 小体が認められたサ症リンパ節 28 例および対照リンパ節群 10 例を用いた。細胞内アクネ菌の観察には細胞小器官のマーカである EEA-1 抗体および LAMP-1 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、隔離膜のマーカである LC3 の発現と合わせて観察した。細胞内の詳細な観察については電子顕微鏡を用いた。アクネ菌 RPF 蛋白は結核菌 RPF 蛋白のホモログから同定し、そのリコンビナント蛋白を作製した。リコンビナント蛋白はアクネ菌培養に添加しその増菌促進機能を確認するとともにアクネ菌感染細胞の細胞内外から添加し、細胞内アクネ菌への影響を検討した。また、BALB/c マウスに免疫して RPF 蛋白特異的なモノクローナル抗体を作製し、サ症病変部における RPF 蛋白の関与を免疫染色により検討した。【結果】アクネ菌は endocytosis により細胞内に侵入し、その後 lysosome との融合により細胞内消化されていた。一部の菌体は autolysosome を形成し、アクネ菌感染が autophagy を誘導していることが明らかとなった。アクネ菌 RPF 蛋白は細胞外添加においてその作用をみせた。免疫染色では RPF 蛋白はサ症リンパ節に特異的に検出され、約半数の症例において HW 小体に一致した陽性像を呈した。【考察】アクネ菌の細胞内感染により autophagy が誘導されることが判明した。今後は細胞内に潜伏感染したアクネ菌が細胞内増殖する際に誘導される急激な autophagy の誘導を *in vitro* で再現する必要がある。RPF 蛋白がサ症病変部の HW 小体に特異的に検出されたことは、サ症の病因と考えられている細胞内増菌を裏付ける根拠となった。

***Propionibacterium acnes*-induced autophagy and intracellular reactivation of latent *P. acnes* in the sarcoid lymph nodes by *P. acnes* resuscitation promoting factor**

Asuka Furukawa¹, Keisuke Uchida¹, Yuki Ishige¹, Ikuo Ishige², Yoshimi Suzuki¹, Takashige Suzuki¹, Eri Nishikawa¹, Aya Miwa¹, Manami Takizawa¹, Intetsu Kobayashi³, Tamiko Takemura⁴, Kazuro Iwai⁵, 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

⁵Division of Molecular Pathology, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

【Background】 Our previous studies have suggested that *P. acnes* can persist intracellularly as latent infection in susceptible hosts and that the reactivation and proliferation of the intracellular *P. acnes* may trigger sarcoidosis. This has led us to speculate that intracellular *P. acnes* proliferation elicits Th1 hypersensitivity in susceptible hosts. One possible explanation of such hypersensitivity is *P. acnes*-induced autophagy triggered by intracellular proliferation of the reactivated *P. acnes*. **【Materials and Methods】** We examined *P. acnes*-induced autophagy by *in vitro* assay and the reactivation status of *P. acnes* in the sarcoid lymph nodes by immunohistochemistry with the antibody to *P. acnes* resuscitation promoting factor (RPF), a protein implicated to be involved in the reactivation of intracellular latent bacteria. An cell-invasive isolate of *P. acnes* and cell lines (HeLa-LC3 cells, A549 cells and HEK293T cells) used in the *in vitro* assay. Fluorescent immunostaining of *P. acnes*-infected HeLa-LC3 cells was done using EEA1 antibody and LAMP-1 antibody, and intracellular *P. acnes* was scrutinized by electron microscopy. In the colony assay, the recombinant RPF was introduced both extracellularly and intracellularly. Immunohistochemical examination of *P. acnes* RPF in sarcoid lesions was done using anti-*P. acnes* RPF monoclonal antibody prepared in our laboratory. For the immunohistochemistry, lymph nodes from 28 sarcoid patients and from 10 non-sarcoid patients, all of which included HW bodies (dormant form of *P. acnes*), were used. **【Results】** *P. acnes* entered the cell by endocytosis and was soon degraded by endosome-lysosome fusion. Autophagy was induced for some of intracellular *P. acnes*. Extracellular *P. acnes* RPF promoted the proliferation of intracellular *P. acnes*. Immunohistochemically, *P. acnes* RPF was found in 12 (43%) of the 28 sarcoid lymph nodes and none of the 10 non-sarcoid lymph nodes. The antibody reacted only with HW bodies in the sarcoid lymph nodes. **【Discussion】** We found *P. acnes*-induced autophagy in the cells infected by cultured *P. acnes*. The result suggests that more autophagy can be induced in cells with proliferating *P. acnes* after reactivation from the latent phase. Our finding that *P. acnes* RPF was found in the HW bodies only in sarcoid lymph nodes supports the hypothesis that intracellular proliferation of the bacterium is involved in the etiology of sarcoidosis.

はじめに

サルコイドーシス (サ症) は原因不明の全身性肉芽腫疾患である。近年、「皮膚常在菌として知られるアクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の細胞内潜伏感染が原因となり Th1 型過敏性免疫反応を惹起する結果として本症が発症する」とするという病因論が提唱されている¹⁾。

細胞内増菌現象が肉芽腫形成にいたる Th1 型過敏性免疫反応を誘導する機序としては、autophagy との関連が注目されている。Autophagy (自食現象) は蛋白質を分解し細胞内蛋白質の品質管理や飢餓適応を行う機構であるとされているが²⁾、食食機構から逃れて生存を図る多くの細胞内侵入性細菌の殺菌・分解という自然免疫反応にも関与していることが近年報告されている (図 1)。

細胞による細胞内侵入性細菌の消化と細菌によるその回避機構は前述の autophagy を介するメカニズムなど様々な経路が知られている。最も一般的なものは endosome か phagosome により細胞内に取り込まれた細菌が直接 lysosome と結合し消化を受けるものである。一方、赤痢菌やリステリア菌では endosome あるいは phagosome 膜を突き破って細胞質内に脱出して、細胞質内で増殖する。また、結核菌やサルモネラ菌では、endosome と lysosome との結合を阻害したり、殺菌因子に抵抗を示すことにより生存できる (図 2)。

本研究ではアクネ菌の細胞内感染によるサ症発症のメカニズムを探るために、培養細胞株を使用しアクネ菌の細胞内感染後の動態の解明を試みた。

また、サ症発症のトリガーとなりうるアクネ菌の細胞内増菌現象に関して、潜伏感染性結核などの再燃においてその関与が示唆されている RPF (Resuscitation promoting factor) と呼ばれる分泌型蛋白に注目した³⁾。RPF は *Micrococcus luteus* の培養上清から発見された分泌型蛋白である⁴⁾。冬眠期の状態から蘇生、増

殖を促進する機能を持つことが知られており、グリシンとシトシンを多く含む G+C rich-gram 陽性菌においても相同性の高い配列が認められ⁵⁾、同様な機能を持つことが確認されている。

本研究では細胞内アクネ菌の活性化現象における RPF の関与を検討するために、アクネ菌の RPF を同定し、アクネ菌感染細胞への内外からの RPF 作用に対する増菌活性の検定を試みた。また、アクネ菌 RPF に対するモノクローナル抗体を作製し、病変部リンパ節における RPF の存在およびその局在を検索した。

材 料

アクネ菌は細胞内侵入能を有する臨床分離株を用いた。GAM プイヨン (GAM, Nissui Co., Tokyo) にて 37°C 3 日間嫌気培養した菌体を実験に使用した。

細胞内感染後のアクネ菌の観察には A549 細胞と GFP-LC3 融合蛋白を遺伝子導入した HeLa-LC3 細胞を、RPF 蛋白添加における細胞内アクネ菌の増菌を検討する colony assay には A549 細胞および HEK293T 細胞を使用した。各細胞株は 10%FBS 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Gaithersburg, MD, USA) にて継代培養した。

病変部の検討には冬眠型アクネ菌と想定される Hamazaki-Wesenberg (HW) 小体の存在が確認されているサ症例リンパ節 28 例および対照例として反応性リンパ節炎 1 例、肺癌リンパ節 4 例、胃癌リンパ節 4 例、大腸癌リンパ節 1 例 (パラフィン切片) を使用した。

方 法

研究 1: 細胞内感染後の動態の観察

1. 細胞感染

各細胞株は感染前日抗生剤 (-) DMEM にて chamber slide または 24-well plate (HeLa-LC3; 5×10⁴ cells/ml, A549, HEK293T; 1×10⁵ cells/ml) に播種して使用した。電子顕微鏡用試料の場合は直径 3 cm の culture dish に播種した。アクネ菌は PBS で 2 回洗浄後吸光度 (OD₆₀₀) にて一定濃度に調整した菌体浮遊液を作製し、前日播いておいた細胞株に加えた。また、長時間感染させる場合は 37°C の CO₂ インキュベーター内での感染 2 時間後に PBS にて 3 回洗浄し、

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 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

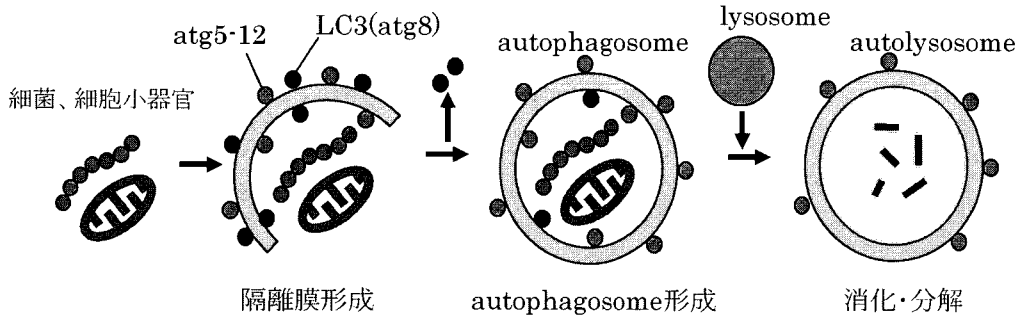


図1 autophagy 形成メカニズム

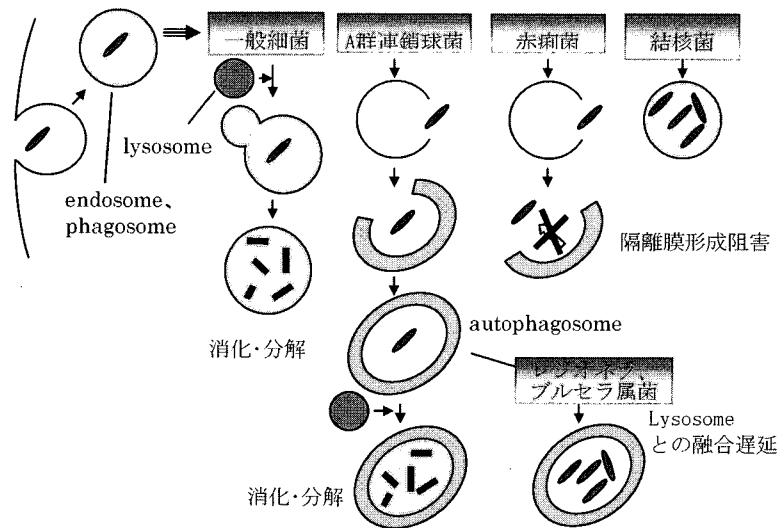


図2 病原細菌と autophagy

細胞外殺菌するために高濃度抗生剤 (400 U/ml penicillin-G, 1 mg/ml streptomycin) を添加した DMEM に替え, さらに 3 時間培養した. その後タイムコースで細胞を回収するまでは抗生剤 (-) DMEM にて培養を続けた.

2. 蛍光標識による観察

初期 endosome, phagolysosome のマーカーとして EEA-1 (early endosome antigen1) および LAMP-1 抗体を用い, 免疫染色を行った.

1) EEA-1 抗体による免疫染色

3%PFA で細胞を固定後ジギトニンにより細胞膜に穴をあける. NH_4Cl にて細胞を処理した後 3%BSA にてブロッキングする. EEA-1 抗体をかけ, 室温にて 1 時間反応させる. 二次抗体として FITC-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins を用い, 室温にて 1 時間反応させる. DAPI 含封入剤にて封入する.

2) LAMP-1 抗体による免疫染色

4%PFA で細胞を固定後 0.1% Triton/PBS により細

胞膜に穴をあける. ブロッキング剤に RNase を加え, RNase 処理する. LAMP-1 抗体をかけ, 室温にて 1 時間反応させる. 二次抗体として Cy5-conjugated anti-mouse IgG を用い, 室温にて 30 分反応させる. PI にて核染色後, 封入する.

3. 電子顕微鏡による観察

2% グルタルアルデヒドで固定後オスミウムにより後固定し, エポキシ樹脂にて包埋する.

超薄切片はウラン・鉛染色後透過型電子顕微鏡にて観察した.

研究 2: RPF 蛋白についての検討

1. アクネ菌, 結核菌リコンビナント RPF 蛋白作製
リコンビナント蛋白は, 既知である結核菌の RpfB のゲノム配列およびその配列とアクネ菌の全ゲノム配列データ・ベースにおいて相同性の高い配列を検索し, アクネ菌の Rpf と思われる配列を PCR にて増幅した. PCR product は pT7 blue プラスミドベクターにクローニング後シークエンスを確認し, 変異のないク

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⁹⁾。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 (OD₆₀₀) を測定し、菌体数が 10⁵/ml になるように PBS で希釈した。OD₆₀₀=1 を 9×10⁸/ml とした。GAM プイヨン 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: 10²/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 OD₆₀₀ 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 CO₂ 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、室温一晚反応させる。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 CO₂ インキュベーター内で培養 8 時間後新しい抗生剤 (-) DMEM に液替えした。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 RPF 抗体) をかけ、室温一晚反応

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

作製したりコンビナント 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)。

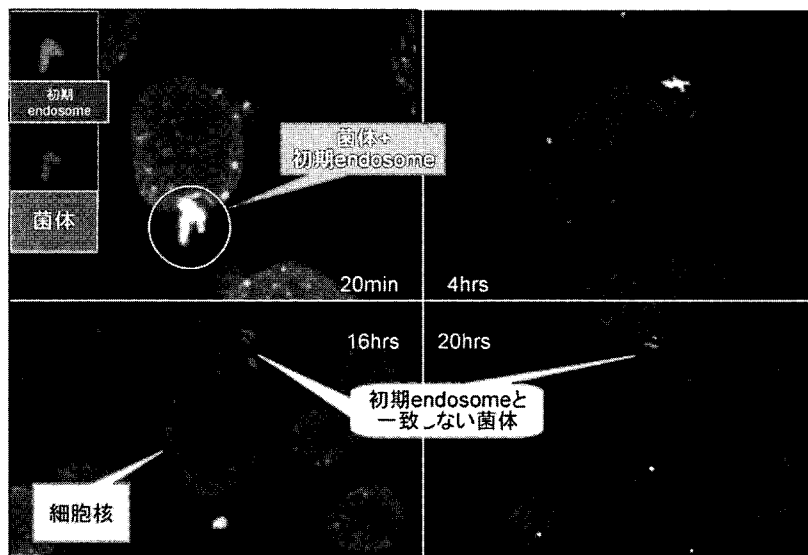


写真 1 アクネ菌と初期 endosome の局在

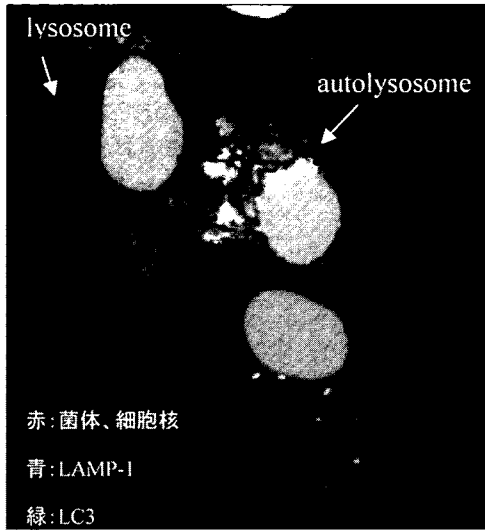


写真2 アクネ菌感染細胞における LAMP-1 および LC3 の局在

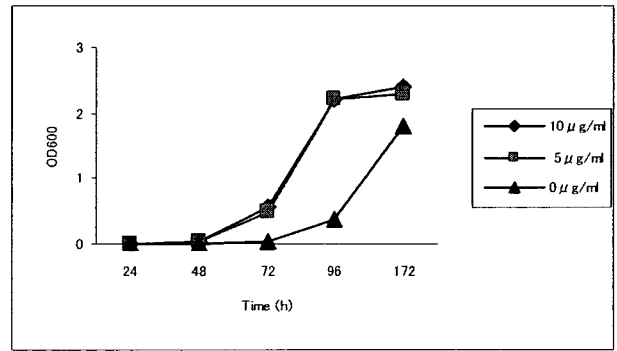


図3 RPF 蛋白による増菌速度の亢進効果

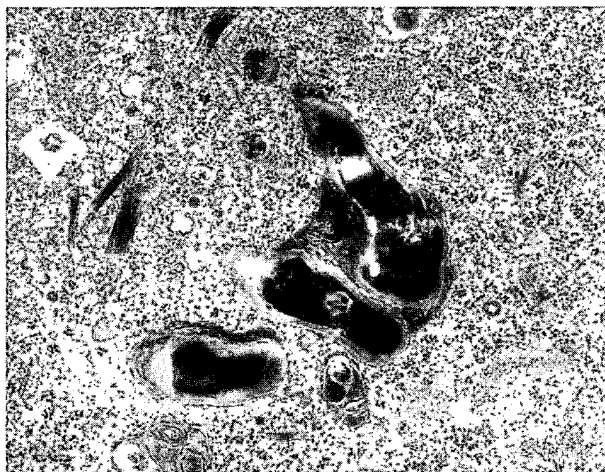
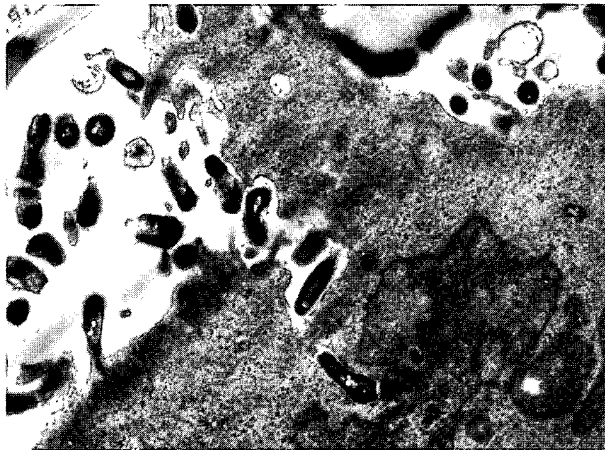


写真3 アクネ菌の細胞内侵入および細胞内局在 (透過型電子顕微鏡像)

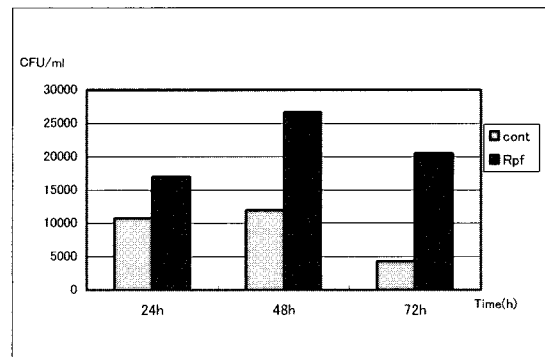


図4 RPF 蛋白による細胞内菌体への影響

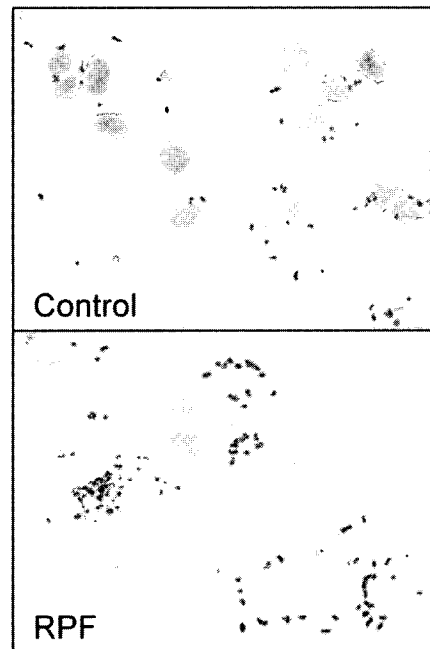


写真4 免疫染色による細胞内菌体の検出

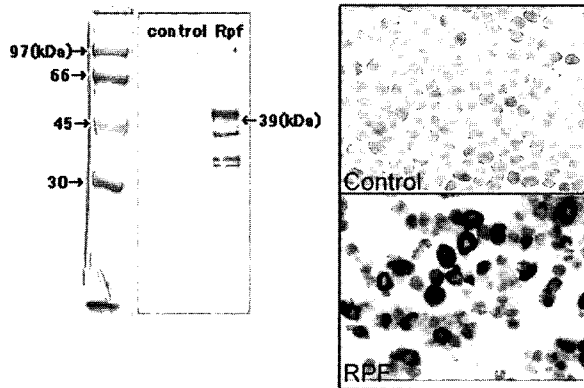


写真5 Western blot, 免疫染色による RPF 発現の確認

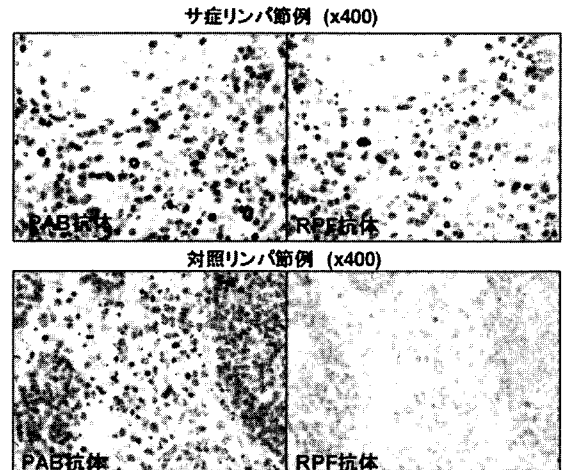


写真7 PAB 抗体および RPF 抗体による免疫染色像

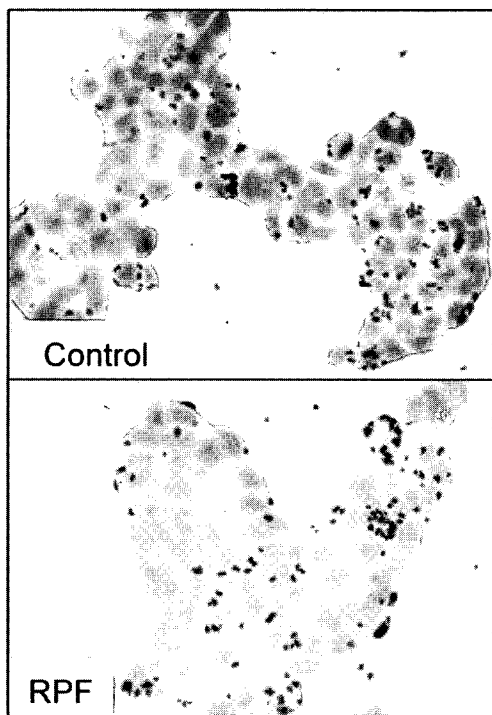


写真6 免疫染色による細胞内菌体の観察 (24 時間後)

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⁷⁾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³⁾ 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⁷⁾。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があると考える。

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.

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 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。

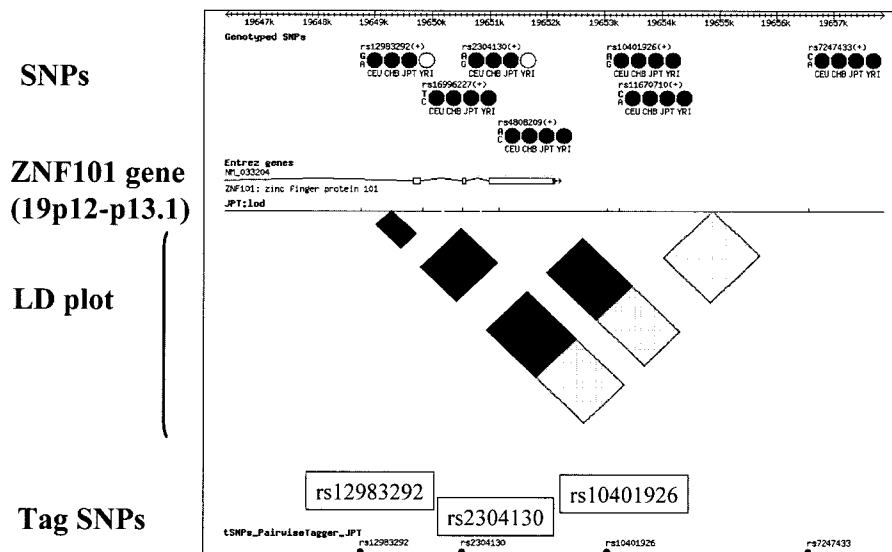


図 1

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る。

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	$453 \times 10^4/\mu$ l	γ -GTP	26IU/L	血液ガス分析	
Hb	14.3g/dl	T-Bil	0.6mg/dl	(室内気)	
Hct	41.7%	BUN	8mg/dl	pH	7.450
PLT	$307 \times 10^3/\mu$ l	Cr	0.8mg/dl	PaO ₂	88.8Torr
		UA	3.7mg/dl	PaCO ₂	38.9Torr
		Na	140mEq/L	HCO ₃	26.4mmol/L
		K	4.0mEq/L	SaO ₂	97.1%
		Cl	104mEq/L		
		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

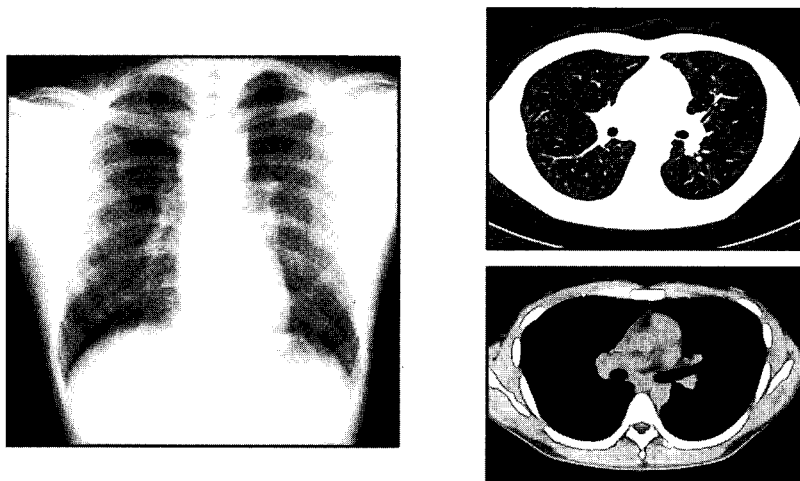


図 1 胸部単純レントゲン写真及び胸部 CT

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.

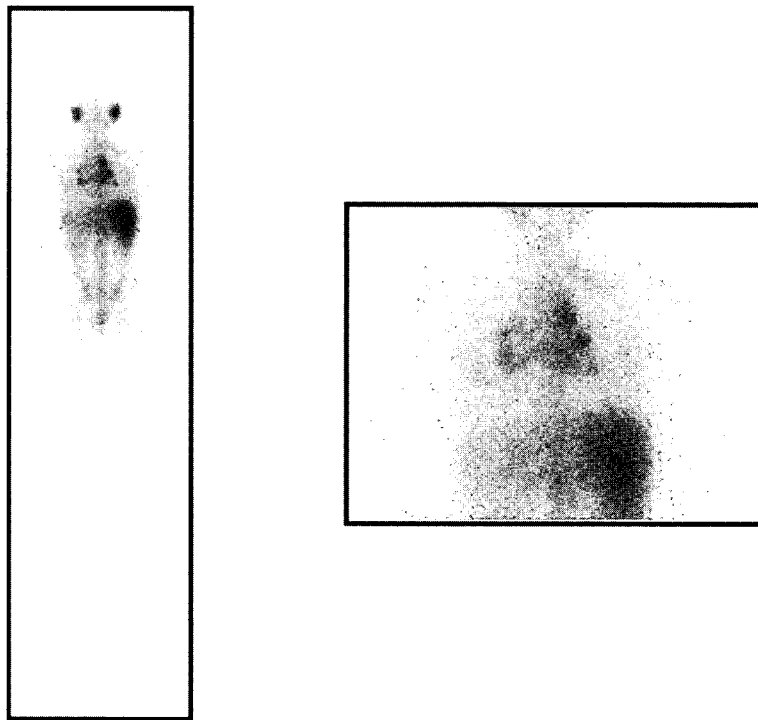


図 2 Ga シンチグラム

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

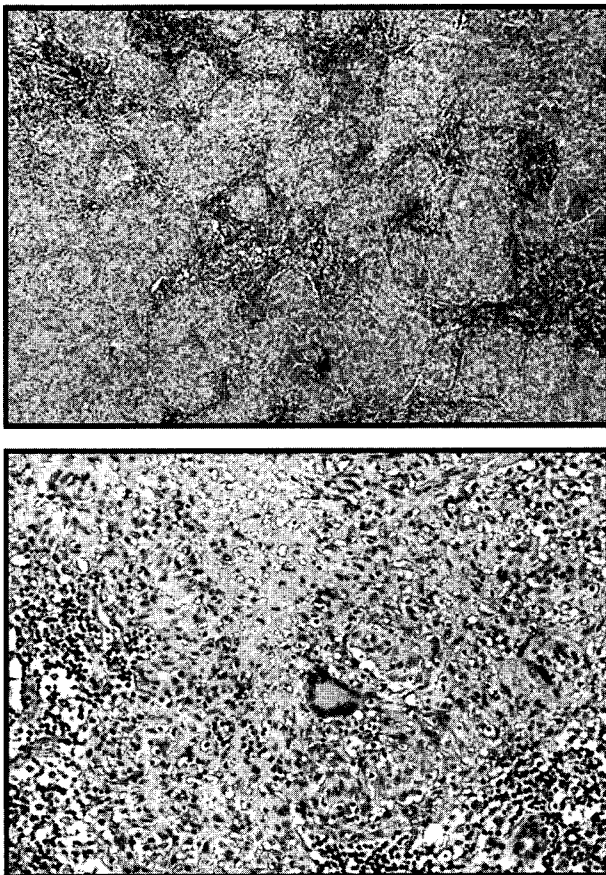


図3 病理所見 (A: ×100, B: ×400)

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ついても諸説があるが, 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