

表1 検体の属性

サルコイドーシス		対照疾患				
縦隔内臓器	肺	23例	肺結核	12例	全51例	
			過敏性肺炎	8例		
			膠原病関連肺炎	7例		
			特発性間質性肺炎	6例		
			肺癌正常部	18例		
縦隔リンパ節	40例	肺癌非転移所属リンパ節		18例		
		リンパ節結核		3例		
縦隔外臓器	表在リンパ節	33例	リンパ節結核		17例	
			壊死性リンパ節炎		11例	
			反応性リンパ節腫大		26例	
	皮膚	23例	酒さ		7例	全22例
			結節性紅斑		6例	
			Bazin硬結性紅斑		2例	
			ハンセン病		2例	
			顔面播種状粟粒性狼瘡(LMDF)他		5例	
	脾	6例	胃癌手術時に摘出された脾臓		10例	
	脳・神経	6例	てんかん		10例	
心臓	6例	拡張型心筋症		10例		
筋肉	7例	正常横紋筋		10例		

【はじめに】

サルコイドーシス(サ症)は肺や眼, 心臓, 皮膚, リンパ節などに非乾酪壊死性の類上皮細胞肉芽腫を形成する全身性肉芽腫疾患である。肉芽腫は何らかの抗原により惹起されたTh1型過敏性免疫応答であるが^{1,2)}, サ症は何らかの疾病素因を有する宿主におけるサ症起因体に対する過敏性免疫反応として発症するものと考えられている。この抗原としては, 培養³⁾や定量的PCR⁴⁾, ISH⁵⁾などでサ症病変部から菌体成分が確認できた唯一の細菌である *Propionibacterium acnes*(*P. acnes*)が想定されている⁶⁾。*P. acnes*感染とサ症の関連について検討するため, 本研究室で作成した *P. acnes* 特異的モノクローナル抗体(PAB抗体)を用い諸臓器のサ症病変部組織における本菌の検出頻度と局在について検討を行った。

【材 料】

本研究には東京医科歯科大学附属病院において診断されたサ症と表1に示すような他疾患群から採取された検体のホルマリン固定パラフィン切片を用いた。

【方 法】

1. *P. acnes*特異的モノクローナル抗体(PAB抗体)作製
超音波破碎させた *P. acnes* の菌体を免疫原とし,

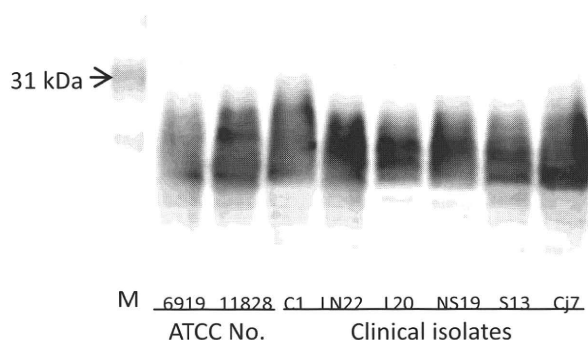


図1 PAB抗体を用いた Western blotting

感作免疫させたマウスの脾細胞を採取し, 骨髄腫細胞とのハイブリドーマを作製した。スクリーニングは抗 *P. acnes* 抗体産生のハイブリドーマに, 免疫原に使用した抗原でELISA法を行った。さらに陽性を示したハイブリドーマを, *P. acnes*を感染させたラットの肝臓のホルマリン固定パラフィン切片上での免疫染色で染色強度の高い抗体を選別した。最終的にヒト組織切片に対し最も特異的に反応した抗体を産生するハイブリドーマを選別し, 限界希釈法で2度クローニングを行い, SCIDマウスの腹腔内に単一のハイブリドーマクローンを移植し, 1-2週間後に採取した腹水を未精製のモノクローナル抗体原液とした。得られたモノクローナル抗体は, Western blotting法にて *P. acnes* の細胞壁を貫通する脂質の一種であるリポテイコ酸に特異的であることを確認した(図1)。

2. 免疫染色

3μmに薄切した組織標本をマイクロウェーブ処理(99℃, 60分), 内因性ペルオキシダーゼ処理(室温10分)後, R.T.U. NORMAL HORSE SERUM (Vectastain Universal Elite ABC Kit; Vector Laboratories社)でブロッキングし(室温30分), 1次抗体:PAB抗体(15,000倍希釈)をかけ室温一晩反応させた. 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分反応させた. 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(ニチレイバイオサイエンス社)を用いて発色させた. マイヤー・ヘマトキシリンにて核染色後, 水洗, 脱水, 透徹し, 封入した. 光学顕微鏡下(倍率400倍)にて観察し, 全視野中に陽性細胞が1つでも認められる場合をPAB陽性群, 1つも陽性細胞がない場合をPAB陰性群とした.

3. 免疫二重染色

リンパ節を用い, *P. acnes*陽性細胞の貪食細胞内同定を行った. 同定に用いた抗体はマクロファージに対する抗ヒトCD68抗体(KP-1; DAKO), 樹状細胞に対する抗ヒトFascin抗体(55K-2; DAKO)を用いた. 2μmの組織切片を脱パラフィンし, マイクロウェーブ処理(99℃, 60分)を行った. 正常ウマ血清でブロッキングを行った後, PAB抗体(15,000倍希釈)を室温で30分反応させた. 二次抗体反応は前述と同様に行った. 次にfluoresceinisothiocyanate(FITC)-conjugated streptavidin (DAKO)と室温で30分後, 遮光して反応させた. 再びマイクロウェーブで20分処理したあと, 適切な希釈倍率の抗体(CD 68抗体;1:8000, fascin抗体;1:100)を室温, 一晩反応させた. 次に, tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)標識二次抗体(DAKO)を室温で30分間, 遮光して反応させた. 最後に蛍光抗体用の封入剤(DAKO)で封入し, 蛍光顕微鏡BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan)にて観察, 撮影を行った.

【結果】

1. 免疫染色

肺における免疫染色ではサ症の74%の症例で肉芽腫に, その周囲の炎症巣の83%にPAB抗体が陽

表 1-1 肺における免疫染色の結果

疾患名	N	各部位にPAB抗体で陽性を認めた症例数(%)			
		肉芽腫内	炎症巣	肺胞内マクロファージ	気道上皮
サルコイドーシス	23	17 (74%)	19 (83%)	12 (53%)	7 (30%)
結核	12	0	0	3 (25%)	1 (8%)
間質性肺炎	21	—	0	2 (11%)	0
肺癌	18	—	—	7 (39%)	4 (17%)

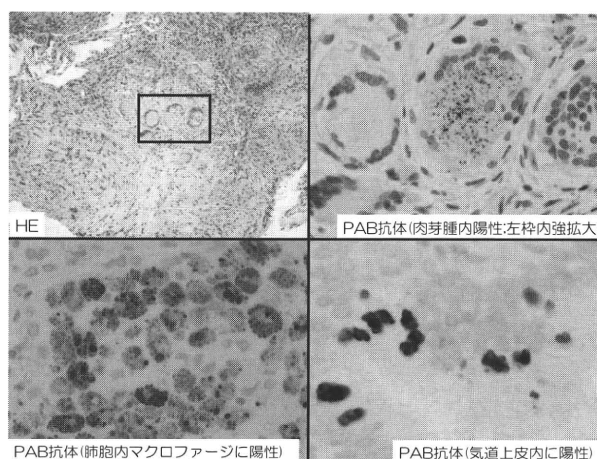


図 1-1 サ症(肺)における免疫染色像

表 1-2 リンパ節における免疫染色の結果

疾患名	N	各部位にPAB抗体で陽性を認めた症例数(%)			
		肉芽腫内	リンパ洞内(HW小体)	傍皮質領域	
縦隔リンパ節	サルコイドーシス	40	35 (88%)	25 (63%)	13 (33%)
	リンパ節結核	3	0	0	0
	肺癌所属リンパ節	18	—	1 (6%)	0
末梢リンパ節	サルコイドーシス	33	29 (88%)	14 (42%)	5 (15%)
	リンパ節結核	17	0	2 (12%)	2 (12%)
	反応性腫大	26	—	2 (8%)	2 (8%)
	壊死性リンパ節炎	11	—	0	0

性となった. 結核の肉芽腫には染まらなかった. またサ症では半数の症例で肺胞内マクロファージに陽性となり, 30%の症例で一部の気道上皮内に陽性となった. 次に, 対照群においては, 気道上皮内やマクロファージ内にもサ症患者よりは低率ながらも一部で陽性となった. (表 1-1, 図 1-1)

次に, リンパ節の結果を示す(表 1-2, 図 1-2). サ

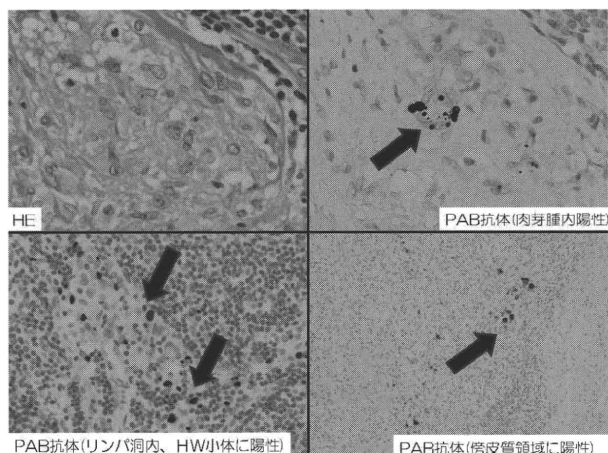


図1-2 サ症(リンパ節)における免疫染色像

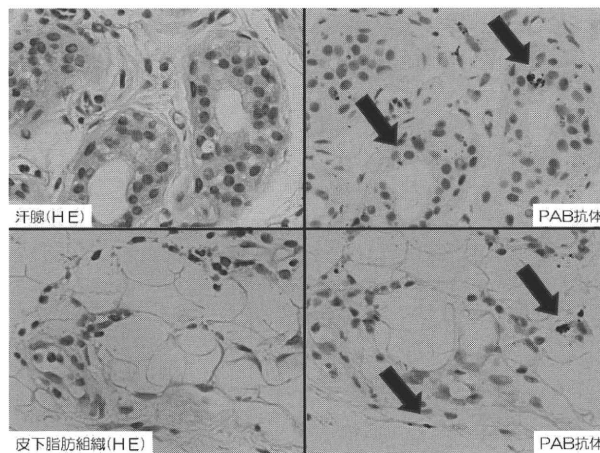


図1-4 サ症(皮膚)の肉芽腫以外の陽性像

表1-3 皮膚における免疫染色の結果

疾患名	N	各部位にPAB抗体で陽性を認めた症例数(%)			
		肉芽腫内	炎症巣	汗腺・脂肪	全体
サルコイドーシス	23	19 (83%)	16 (70%)	2 (9%)	20 (87%)
その他の肉芽腫を有する疾患					
酒さ	7	0	0	0	0
結節性紅斑	3	0	0	0	0
Bazin 硬結性紅斑	2	0	0	0	0
ハンセン病	2	0	0	0	0
LMDF その他	5	0	0	0	0

表1-4 その他の臓器における免疫染色の結果

臓器名	N	サルコイドーシス		対照疾患	
		肉芽腫内の陽性検体数(%)	血管・脂肪組織の陽性数(%)	N	陽性数(%)
脾臓	6	5 (83%)	3 (50%)	10	0
脳・神経	6	6 (100%)	1 (17%)	10	0
心臓	6	5 (83%)	0	10	0
筋肉	7	7 (100%)	1 (14%)	10	0

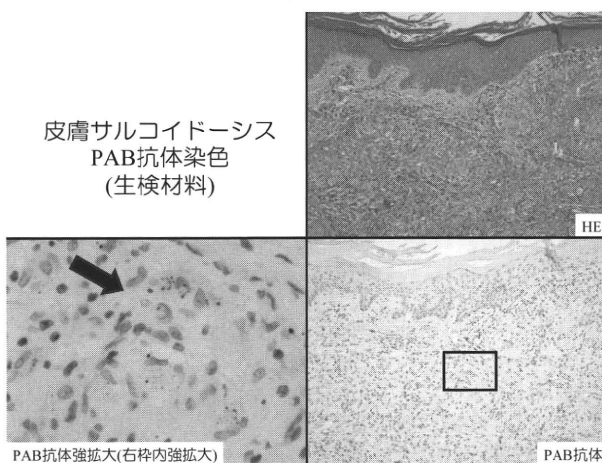


図1-3 サ症(皮膚)の免疫染色像

症リンパ節では、縦隔、末梢いずれにおいても、肉芽腫内に約90%の症例で陽性となる。結核の肉芽腫にはPABは染まらない。肉芽腫以外の部位で、リンパ洞内のHW小体や傍皮質領域に陽性細胞が散見され、なかでもサ症の縦隔内リンパ節では他と比

べて陽性率が高い傾向が見られた。

皮膚においては、サ症では83%の症例の肉芽腫内に、周囲の炎症巣にも70%の症例で陽性となった他(表1-3, 図1-3), 汗腺や脂肪組織にも一部で陽性となった(図1-4)。それに対し、その他の肉芽腫を有する皮膚疾患では、肉芽腫を含むすべての部位に陰性であった。

最後に、症例数は少ないがサ症発症頻度が比較的まれな臓器である、脾臓、脳神経、心臓、筋肉についても示す(表1-4)。サ症の肉芽腫内には80%以上の症例で陽性となり、肉芽腫以外にも、血管や脂肪にも陽性となる部分を認めた(図1-5)。対照群においては、すべて陰性であった。

以上の免疫染色の結果のまとめを表1-5に示す。

まず、いずれの臓器においても PAB 抗体はサ症肉芽腫に高い陽性率を示した。サ症患者検体においては、肉芽腫以外にも、肺における気道上皮や肺胞内マクロファージ、リンパ節、とりわけ縦隔リンパ節における HW 小体や傍皮質領域のマクロファージ



図1-5 脾動脈の血管平滑筋・内皮細胞に陽性

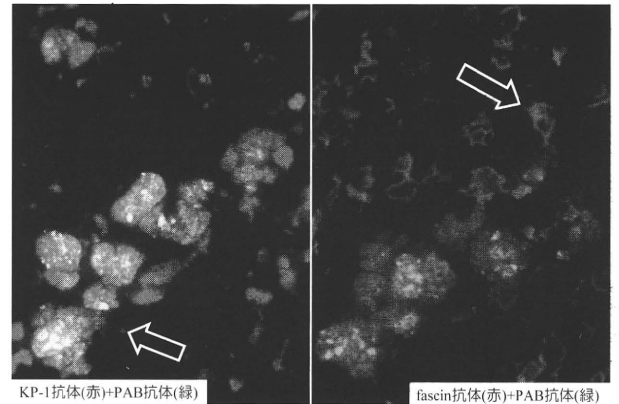


図2-1 PAB抗体のリンパ節傍皮質領域内マクロファージ内陽性像(蛍光二重染色)

表1-5 免疫染色の結果のまとめ

臓器別	N	サ症患者の検体中で PAB抗体の肉芽腫内陽性数(%)	N	非サ症患者の PAB抗体の陽性数(%)
肺	23	17 (74%)	44	13 (30%)
リンパ節	73	64 (88%)	75	7 (9%)
皮膚	23	19 (83%)	22	0
脾	6	5 (83%)	10	0
脳・神経	6	6 (100%)	10	0
心臓	6	5 (83%)	10	0
筋肉	7	7 (100%)	10	0

には、陽性となる頻度が高いことがわかった。それに対し、非サ症患者においては、肉芽腫以外の部位において、肺やリンパ節に低率ながら陽性を示す部位を認めた。それ以外の臓器においては、非サ症患者では陰性となった。

2. 免疫二重染色

図2-1の左の写真では、サ症リンパ節の傍皮質内において、KP-1抗体で染色されるマクロファージ内にPAB陽性像が顆粒状に存在することが分かる。右の写真では、fascin抗体で染色される樹状細胞のなかには、PAB陽性の顆粒は存在しないことが分かる。

同様に、図2-2では、リンパ洞内においては、HW小体内に充満するPAB陽性像がマクロファージ内に取り囲まれるようにして存在することが左の写真から分かる。右の写真が示すように、樹状細胞のなかにPAB陽性のHW小体は存在しない。

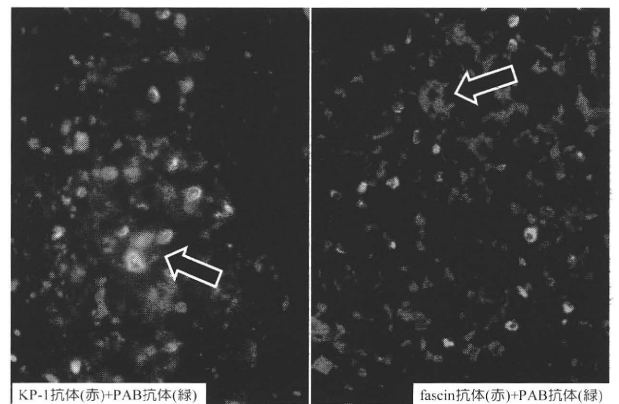


図2-2 PAB抗体のリンパ節のリンパ洞内マクロファージ内陽性像(蛍光二重染色)

【考 察】

本抗体はサ症肉芽腫で7-8割以上という高い陽性率を示した。肺やリンパ節だけでなく、全身の諸臓器のサ症肉芽腫においても、同様の頻度で検出された。本抗体は結核をはじめとした他の肉芽腫性疾患には陰性であり、サ症の診断的価値が高いと考える。

肺サ症肉芽腫内に2割程度検出されなかったことについては、以下の可能性があると考えられる。第一に、肉芽腫形成の原因菌が異なっている可能性がある。以前我々は、サ症のリンパ節に定量的PCRを施行し、15例中12例から*P. acnes*を多量に検出したが、*P. acnes*が検出できなかった3例いずれからも*P. granulosum*(*P. acnes*同様に皮膚に常在する近縁種)由来のDNAを検出したと報告しており⁴⁾、頻度は少ないながらも*P. acnes*以外の菌による発症の経路も考えうる。欧米では結核が根強く支持されているが、サ症に伝染性はなく、また結核菌がサ症病変部から

培養されることもない。第二には、採取された検体の肉芽腫は、病理学的に幼若なものから線維化の目立つものまで新旧混在していたため、肉芽腫内に捉えられた菌体成分が処理されてしまったものが含まれており、一部は検出されなかった可能性がある。

また、肺やリンパ節については、肉芽腫以外の部位、例えば、肉芽腫周囲の炎症巣や、気道上皮内、肺胞/リンパ洞内/傍皮質領域マクロファージにPABが少量陽性となった。これらの部位には対照疾患の検体にもサ症検体よりは低率ながら陽性となる像がみられた。これらのことから、外界から直接*P. acnes*に暴露される部位である肺およびリンパ節には、*P. acnes*の潜伏感染が示唆された。

さらに、サ症の患者検体では、肺・リンパ節以外の臓器においても、病変部以外の末梢の血管や間質組織内に*P. acnes*が陽性となった。古川らは、*P. acnes*の2種類のserotypeのうち、type 1分離株の約7割が細胞侵入能を有すると報告しており⁷⁾、今回免疫組織化学的にもその現象が確認できた。血管壁に*P. acnes*陽性細胞が見られることは、肉芽腫病変がしばしば血管壁に観察されることも関連し、血管壁から組織内に侵入した*P. acnes*のうちの一部は過剰な免疫応答の結果、侵入部位で肉芽腫を形成している可能性が示唆される。

PAB抗体とマクロファージとの蛍光二重染色において、リンパ節傍皮質領域およびリンパ洞内のマクロファージ内にPABは陽性となることが確認できた。樹状細胞内には陰性であった。これらの結果から、体内に侵入した*P. acnes*はマクロファージに捕捉され、一部はリンパ洞内に潜伏感染の状態として観察され(HW小体と考えられる)、一部は活発な免疫応答が起こるリンパ節の傍皮質領域へと移動することが予測される。つまり、*P. acnes*の潜伏感染には、マクロファージや血管内皮細胞などに受動的に捕捉される場合と、気道上皮などに能動的に侵入する場合のいずれかあるいは両方が関わっていることが推測される。

肺・リンパ節以外の臓器では、潜伏感染の像は非サ症患者では全く見られない。肺・リンパ節において潜伏感染した微量の*P. acnes*は、血行性に全身に散布されることが予測されるが、サ症においては末梢の組織に侵入したあとマクロファージに処理されることなく、そこで再度潜伏感染の状態となると推

測される。非サ症においてはすぐにマクロファージに処理されてしまい、肺・リンパ節以外の部位での潜伏感染は成立しないことが予測される。

肉芽腫病変が起こりやすい臓器・部位と、潜伏感染が確認できる臓器・部位とは一致しており、「潜伏感染していた*P. acnes*が内因性活性化により細胞内増殖し、肉芽腫の形成を引き起こす」という我々の仮説を支持するものである。なにより、生体が体内から異物を隔離しようと形成した肉芽腫内に*P. acnes*の菌体を確認できうることは、本菌が肉芽腫形成に積極的に関与しているということの強い証拠となりうる。

【参考文献】

- 1) C. Agostini et al. Alveolar Macrophage – T Cell Interactions During Th1-type Sarcoid Inflammation. *Microscopy research and technique*. 2001; 53:278-287.
- 2) 杉山幸比古ら. サルコイド肉芽腫の成因機序 サイトカイン・ケモカインの関与. *日本臨床* 2002; 9:1728-1733.
- 3) Abe C et al. Frequent isolation of *Propionibacterium acnes* from sarcoidosis lymph nodes. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]* 1984; 256:541-547.
- 4) Ishige I et al. Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. *Lancet*. 1999; 354:120-123.
- 5) Yamada T et al. In situ localization of *Propionibacterium acnes* DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalyzed reporter deposition. *Journal of Pathology* 2003; 198:541-547.
- 6) 江石義信. サルコイドーシスの成因論 成因にかかわる候補起因体研究の最新動向. *日本臨床* 2002; 9:1688-1696.
- 7) Furukawa A et al. Characterization of *Propionibacterium acnes* isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues with special reference to cell invasiveness, serotype, and trigger factor gene polymorphism. *Microbial Pathogenesis*. 2009; 46:80-87.

C. びまん性汎細気管支炎・
閉塞性細気管支炎

閉塞性細気管支炎における病理学的再構築 および免疫組織学的検討

杉野 圭史^{1,3} 蛇澤 晶² 植草 利公³
畑中 一仁³ 阿部 寛¹ 本間 栄^{1*}

【目的】閉塞性細気管支炎(BO)の病理学的再構築像,免疫組織学的特徴を明らかにする。

【対象および方法】BO 7症例を対象に,初めに病変部を組織学的に再構築し,次に病変の主座における浸潤リンパ球とそのサブセット(CD3, 4, 8, 20),マクロファージ(CD68),リモデリング関連因子(smooth muscle actin: SMA, TIMP-1, MMP-9),血管(CD34),リンパ管(D2-40)の局在・分布に関して,免疫組織学的に検討した。

【結果】再構築の結果,気道壁の既存構造が保たれたまま内腔が閉塞した constrictive BO (CoB),気道壁全層が強い細胞浸潤により破壊された cellular and destructive BO (CDB)の2型に分類できた。CoB/CDB: 4/3例で,CoB 4例の基礎疾患は,GVHD: 2例, Castleman病: 1例, Stevens-Johnson症候群: 1例, CDB 3例の基礎疾患は全例RAであった。閉塞部位はいずれも膜性細気管支が主体で, CDBはCoBに比し連続的な病変分布を示した。さらにCDBは,気管支拡張が顕著で,呼吸細気管支領域にも小円形炎症細胞や泡沫状組織球が浸潤していた。

病変部の細胞浸潤はCoBよりCDBで多く, Tリンパ球サブセットでは, CD8陽性細胞が優位であった。又, CD68およびCD34陽性細胞は気道内腔に, CD3, CD20, D2-40陽性細胞は気道周囲に主に分布していた。閉塞部のSMA陽性細胞は, CDBに比べてCoBで多く認められた。

【考察】BOは病理形態学的にCoBとCDBの2型に分類でき,免疫組織学的に病変形成機序の相違点が明らかとなった。

キーワード: 閉塞性細気管支炎, 絞扼性閉塞性細気管支炎, 細胞性・破壊性閉塞性細気管支炎, 組織学的再構築, 免疫組織化学

Histopathological Bronchial Reconstruction and Immunohistochemical Analysis of Human Bronchiolitis Obliterans

Keishi Sugino^{1,3}, Akira Hebisawa², Toshimasa Uekusa³,
Kazuhito Hatanaka³, Hiroshi Abe¹ and Sakae Homma¹

¹Department of Respiratory Medicine, Toho University Omori Medical Center, Omorinishi 6-11-1, Ota-ku, Tokyo 143-8541, Japan

²Department of Pathology, Tokyo National Hospital

³Department of Pathology, Labor Health and Welfare Organization Kanto Rosai Hospital

¹Department of Pathology, Juntendo University School of Medicine

Objective and Methods: To clarify morphological and immunohistochemical mechanisms of airway obliteration in bronchiolitis obliterans (BO) associated with various causes, we conducted a retrospective study of 7 patients with a histologically proven BO by autopsy or surgical lung biopsy. We investigated the immunohistochemical characteristics and differences of infiltrating cells in the primary lesions of BO by avidine biotin complex method using the following antibodies: CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, SMA, TIMP-1, MMP-9, CD34 and D2-40.

Results: BO was classified into two major histopathological subtypes as follows: constrictive BO (CoB) and cellular and destructive BO (CDB). CoB is a disorder characterized by narrowing of the airway lumen due to submucosal fibroblastic proliferation, while the elastic fiber layer and smooth muscle layer of their walls were spared. In contrast, CDB is a disorder characterized by narrowing of the airway lumen due to intraluminal, mural and peribronchiolar infiltration of inflammatory cells. Subtypes were CoB in 4 (2 GVHD, 1 Castleman's disease, 1 Stevens-Johnson syndrome) and CDB in 3 RA. Microscopically, the localization of occlusion was mainly membranous bronchioli. In CoB, intermittent luminal narrowing of membranous bronchioli were observed, whereas the lesions of obliteration in CDB revealed more continuous than that in CoB. The degree of bronchodilatation in CDB was more prominent than that in CoB. The cellularity in the primary lesions was higher in CDB than that in CoB. CD3, CD4, CD8, CD20 and CD68 were localized in lymphocytes and macrophage infiltrating the primary lesions of membranous bronchioles in both subtypes. The expression of CD8 was higher than that of CD4. CD68- and CD34-positive cells were distributed in the bronchiolar lumens and epithelia. CD3-, CD20-, and D2-40-positive cells were mainly distributed in the peribronchiolar lesions in both subtypes. The number of SMA-positive myofibroblasts in the bronchiolar lumens was higher in CoB than that in CDB.

Conclusions: These findings suggest that there were morphological and immunohistochemical differences in the mechanisms of airway obliteration between CoB and CDB.

Key words: Bronchiolitis obliterans, Constrictive bronchiolitis obliterans, Cellular and destructive bronchiolitis obliterans, Histopathological reconstruction, Immunohistochemistry

緒 言

BOは最近、骨髄移植、肺移植などの臓器移植後の発症例が増加しており、種々な治療法が試みられているが、細気管支の閉塞性変化は非可逆性で、予後は極めて不良である。また近年、BOの動物実験モデルとしてマウスの気管を皮下に移植するheterotopic tracheal transplant model (HTTモデル)が開発されたが¹⁾、膜性細気管支レベルが病変の主座となるヒトに発症するBOの再現性という点で問題が残っている。このように病理形態学的に呼吸細気管支より中枢側の膜性細気管支領域が選択的に障害される病変形成機序などは全く解明されていない。

本研究では、人体例における種々な原因によるBOの肉眼的、組織学的再構築を行うことにより、病変の詳細な形態学的特徴を捉え、さらに病変部に浸潤する炎症細胞、細気管支内腔の線維化や病変内

および周囲の血管、リンパ管の局在・分布を免疫組織学的に検討する。

対象および方法

人体例におけるBO 7症例の胸腔鏡下肺生検組織あるいは剖検肺組織を凍結切片またはパラフィン包埋法で3-5 μ m幅に薄切した。初めにこれらの薄切標本を用いて、肺組織内におけるBOの局在を同定し、次にその各々のパラフィンブロック毎に4 μ m幅の連続切片を500-1200枚ずつ作製後、Hematoxylin and eosin染色およびElastica van Gieson染色を行い、細気管支病変を組織学的に再構築した。さらに、これら病変部の連続切片標本の一部を用いて、CD3 ポリクローナル抗体 (Dako)、CD4 (1F6) モノクローナル抗体 (Novo castra)、CD8 (C8/144B) モノクローナル抗体 (Dako)、CD20 (L26)

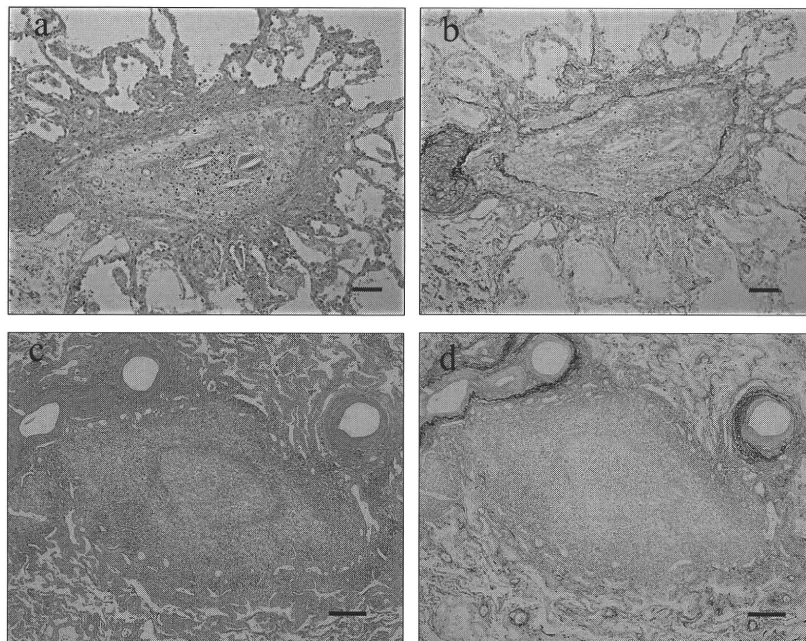


Figure. 1 a) CoB is characterized by concentric narrowing or complete obliteration of bronchial lumen due to submucosal concentric fibrosis (Hematoxylin-Eosin stain) (Scale bar=100 μ m). b) The elastic fiber and smooth muscle layer of the bronchiolar wall are well preserved (Elastica van Gieson' s stain) (scale bar=100 μ m). c) Cellular bronchiolitis is characterized by narrowing of the lumen due to numerous inflammatory cells involving both bronchiolar lumen and wall (Hematoxylin-Eosin stain) (Scale bar=0.5 mm). d) Cellular and destructive bronchiolitis is frequently associated with complete destruction of bronchial wall (Elastica van Gieson' s stain) (scale bar=0.5 mm).

¹ 東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科

² 独立行政法人国立病院機構東京病院臨床検査科病理

³ 独立行政法人労働者健康福祉機構関東労災病院病理診断科

⁴ 順天堂大学医学部第一病理学教室

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

Table 1 Patient Characteristics

Case	Age/Sex	Subtype of BO	Smoking	Underlying Disorders	Complication	Clinical Symptoms	Duration from the Onset of RS to Autopsy or SLB
1	27/F	CoB	NS	SJS	Aspiration pneumonia	D, F, S	17 y
2	35/F	CoB	CS	CMD, NTM, Chronic paranasitis		C, D	2 y
3	36/M	CoB	NS	IgA nephropathy	Autologous GVHD	D	1 mo
4	47/F	CoB	NS	AML	GVHD	C, D	6 mo
5	47/M	CDB	NS	RA		C, D, S	3 mo
6	65/F	CDB	NS	RA, Amyloidosis, Chronic paranasitis		C, S	4 mo
7	52/F	CDB	FS	RA, IgA nephropathy, Chronic paranasitis		C, S	1 y

CoB: Constrictive bronchiolitis obliterans, CDB: Cellular and destructive bronchiolitis, RS: Respiratory symptoms, SLB: Surgical lung biopsy, NS: Never smoker, CS: Current smoker, FS: Former smoker, SJS: Stevens-Johnson syndrome, CMD: Castleman's disease, AML: Acute myelogenous leukemia, RA: Rheumatoid arthritis, NTM: Non-tuberculous mycobacteria, GVHD: Graft-versus-host disease, D: Dyspnea, F: Fever, S: Sputum, C: Cough

モノクローナル抗体 (Dako), CD68 (KP1) モノクローナル抗体, α -smooth muscle actin モノクローナル抗体 (Dako), CD34モノクローナル抗体 (Novo castra), D2-40モノクローナル抗体 (Novo castra), Matrix metalloproteinase 9モノクローナル抗体 (Novo castra), Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1モノクローナル抗体(Novo castra)を免疫組織学的手法(Avidin Biotin Complex 法)により染色し, 病変内の局在・分布を顕微鏡で検討した。

結 果

BO 7例の性別は男性2例, 女性5例で, 平均44.1歳(27～65歳)であった。病理組織学的診断は, 胸腔鏡下肺生検2例, 剖検5例により行われた。基礎疾患は, 関節リウマチ(RA)3例, 移植片対宿主反応病2例, Castleman病1例, Stevens-Johnson症候群1例であった。組織学的には, 気道壁の既存構造は保たれたまま, 内腔が肉芽組織によって閉塞したCoBと気道壁全層が強い細胞浸潤により破壊されたCDBの2型に分類できた(Figure 1)。分類の内訳は, CoB 4例, CDB 3例で, CDB 3症例の基礎疾患は, すべてRAであった。臨床症状はCoBで呼吸困難, CDBで咳嗽, 喀痰を多く認めた。症状出現から病理組織学的診断まで1ヵ月から17年であった(Table 1)。胸部画像所見は, CoBで過膨張ならびに

air trappingを認め, 典型的なモザイクパターンを呈していた。一方, CDBでは両肺に粒状・結節影を認め, さらに細気管支壁の肥厚が目立っており, 多彩な像を呈していた(Figure 2)。

肉眼的再構築所見(症例1, 2): 気管支閉塞は, 区域気管支を1次として4～5次末梢枝から始まることが多く, 一度閉塞・狭窄した後に再び内腔が開く気管支も確認された。さらにStevens-Johnson症候群に合併した剖検例(症例1)では, 上記所見に加えて, 両下葉気管支の管状および嚢状拡張を認めた(Figure 3)。

組織学的再構築所見: CoBの病変は, 小気管支から膜性細気管支にほぼ限局しており, 気道内腔は線維性組織あるいは肉芽組織の突出や同心円状の線維化により, ほぼ完全に閉塞していた。その肉芽組織には, 異物型多核巨細胞, 泡沫状組織球やリンパ球浸潤を伴っていた。気道壁の弾性線維ならびに平滑筋は残存し, 壁構造は保たれていた。また, これらの病変の時期は一致していた。一方, CDBの病変は, 膜性細気管支を中心に肺胞まで連続性に認められた。膜性細気管支および終末細気管支では, 細気管支壁に好中球, リンパ球および泡沫状組織球の集簇から成る肉芽組織がみられ, 内腔は狭窄ないし閉塞していた。さらに気道壁の構造は, 完全に破壊されていた。炎症は呼吸細気管支から肺泡領域にまで波及し, 泡沫状組織球の浸潤を主体とする肉芽組織

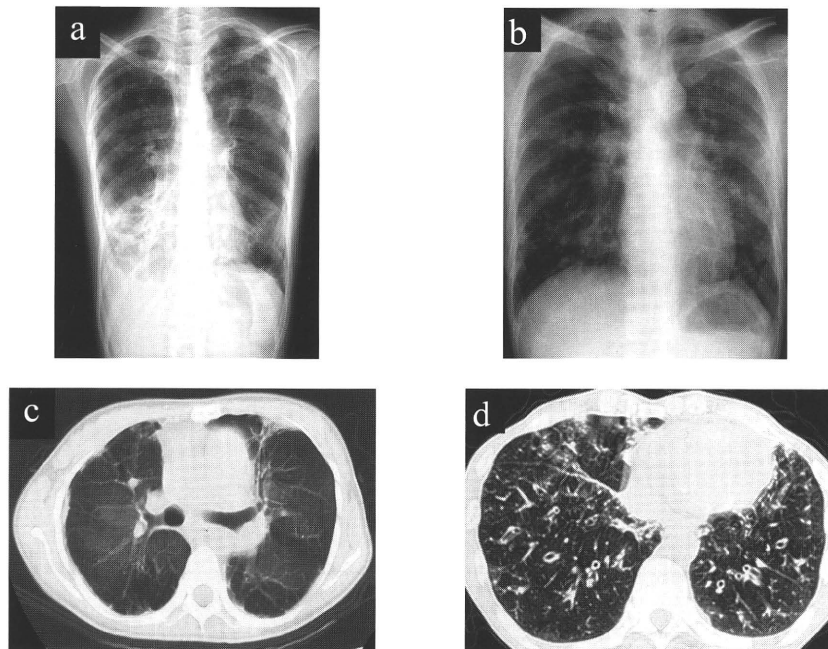


Figure. 2 a) CoB with Stevens-Johnson syndrome (Case 1): Chest X-ray shows pleural adhesion in the right lower lung field associated with hyperinflation and bronchiectasis in both lower lung fields.
 b) CDB with rheumatoid arthritis (Case 5): The chest X-ray shows diffuse small nodules and focal infiltrative shadow, accompanying with tram line in both middle and lower lung fields.
 c) CoB with Stevens-Johnson syndrome (Case 1): Chest computed tomography (CT) reveals a widespread mosaic pattern demonstrating air trapping associated with bronchiectasis in both lung fields.
 d) CDB with rheumatoid arthritis (Case 5): Chest CT reveals centrilobular small nodules, consolidation, and marked bronchiolar wall thickening.

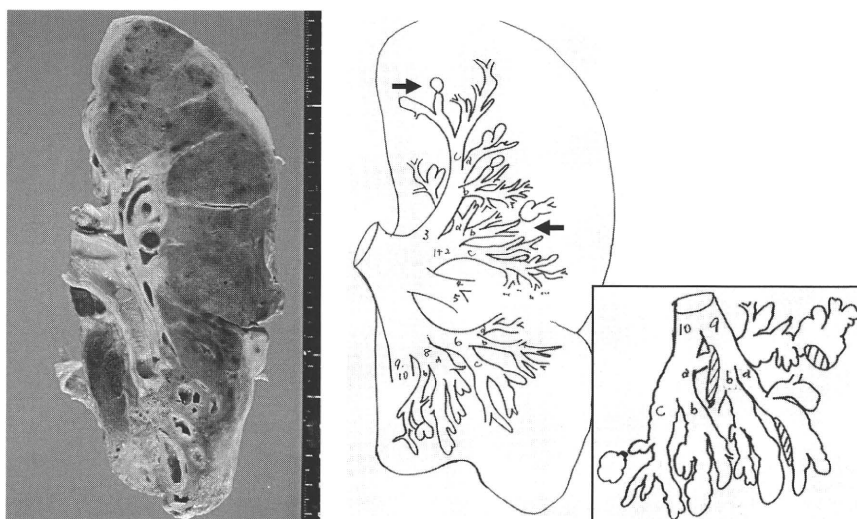


Figure. 3 Schematic reconstruction of the left lung (Case 1), showing that diffuse pleural adhesion is indicated and obliterated bronchi are frequently found in the upper and lower lobes (arrows). The beginning of the upper bronchial obliteration is in the fourth to fifth branches, numbering from each segmental bronchus. Once they are obliterated, the distal and proximal bronchi are dilated. Bronchodilatation and some cyst-like dilatation are seen in lower lobar bronchus.

により内腔は閉塞・狭窄を示していたが、膜性細気管支領域の病変に比べて、壁の弾性線維が所々で保たれていた (Table 2,3). また閉塞部より中枢側の気管支において、明らかな拡張を認めた. 以上の所見をもとに両者の組織学的再構築像の差をシェーマに

示す (Figure 4).

次に、病変部の細胞浸潤はCoBよりCDBで多く、Tリンパ球サブセットでは、CD8陽性T細胞が優位であった. 又、CD68陽性マクロファージは気道内腔に、CD3陽性T細胞、CD20陽性B細胞は気道

Table.2 Histopathological Findings-1

Case	Subtype	Localization of obliteration	Epithelium	
			Erosion	Goblet cell hyperplasia
1	CoB	SB~MB* (fifth branches†)	(-)	(++)
2	CoB	SB~MB* (fourth branches†)	(-)	(-)
3	CoB	SB~MB	(-)	(+)
4	CoB	SB	(-)	(-)
5	CDB	MB~RB	(++)	(-)
6	CDB	MB	(++)	(-)
7	CDB	MB~RB	(+)	(-)

CoB: Constrictive bronchiolitis obliterans, CDB: Cellular and destructive bronchiolitis, SB: Small bronchus, RB: Respiratory bronchiole, MB: Membranous * Performed gross reconstruction, † Number from each segmental bronchus, (-): Negative for given finding, (+): Positive for given finding, (++) : Marked positive for given finding

Table.3 Histopathological Findings-2

Case	Subtype	Lumen				Wall								
		Mucus	IC exudation	GT	Fibrosis	Elastosis	Elastolysis	Smooth muscle hyperplasia	NE infiltrate	SRIC infiltrate	FH infiltrate	Complete destruction	Ectasis	
1	CoB	(+)	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	
2	CoB	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	
3	CoB	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	
4	CoB	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
5	CDB	(-)	(+)	(++)	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(++)	(++)	(+)	(++)	
6	CDB	(-)	(+)	(++)	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(++)	(++)	(+)	(++)	
7	CDB	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(-)	(+)	(++)	

CoB: Constrictive bronchiolitis obliterans, CDB: Cellular and destructive bronchiolitis, IC: Inflammatory cell, GT: Granulation tissue, NE: Neutrophil, SRIC: Small round inflammatory cell, FH: Foamy histiocyte, (-): Negative for given finding, (+): Positive for given finding, (++) : Marked positive for given finding

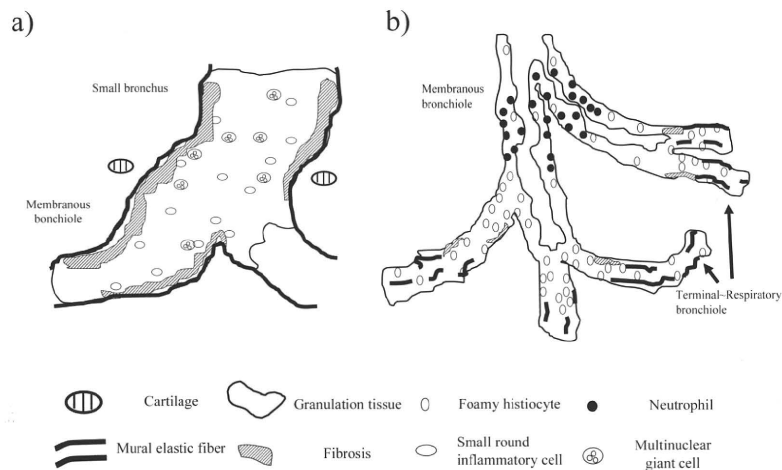


Figure. 4 a) Histopathological reconstruction of CoB with graft-versus-host disease (Case 4): The lumen of small bronchus and membranous bronchiole is completely obliterated with granulation tissues accompanying with infiltration of foreign body giant cells. b) Histopathological reconstruction of CDB with rheumatoid arthritis (Case 5): The lumen of a membranous bronchiole is obliterated and its wall destructed by granulation tissues with an accumulation of foamy histiocytes. In addition, the proximal bronchi of the primary lesion are dilated and infiltrated by neutrophils and small round inflammatory cells. The lesions extend to alveoli from terminal bronchiole, and there are remaining elastic fibers in its wall in places.

Table 4 Semiquantitative Analysis of Immunohistochemistry

Case	Subtype	CD3	CD4	CD8	CD20	CD68	SMA	TIMP-1	MMP-9	CD34	D2-40
1	CoB	++	+	++	++	+	+++	-	-	+	+++
2	CoB	++	+	++	++	++	+++	-	-	+	+++
3	CoB	++	+	++	+	++	+	-	-	+	+++
4	CoB	+	-	+	+	+	++	-	-	+	++
5	CDB	+++	+	+++	+++	+++	+++	-	+++	++	+++
6	CDB	+++	+	+++	+++	+++	+	-	-	++	++
7	CDB	+++	-	++	+++	++	I	-	-	+	++

Key to scoring of immunoreactivity: - = negative; + = weak; ++ = moderate; +++ = intense

周囲に主に分布していた。閉塞部のSMA陽性細胞は、CDBに比べてCoBで多かった。さらにRAに伴うCDBの1症例で、MMP-9陽性、TIMP-1陰性のimbalanceが認められた。CD34陽性細胞は、主に気道周囲に分布しており、気道内腔の線維化部では乏しかった。一方、D2-40陽性細胞は、病変部にほぼ均一に分布していた(Table 4)。

考 察

BOは最近、骨髄移植、肺移植などの臓器移植後の発症例が増加しており、欧米を中心に種々な治療法が試みられているが、細気管支の閉塞性変化は非可逆性で、予後は極めて不良である。また、動物実験による研究では、炎症性サイトカイン²⁾、ケモカイン³⁾、成長因子⁴⁾、細胞外マトリックス⁵⁾、血管新生因子⁶⁾、上皮・間葉転換(epithelial mesenchymal transition; EMT)⁷⁾などがBOの発症に関与している可能性が報告されているが、ヒトに発症する末梢膜性細気管支レベルが病変の主座となるBOの再現性の点で問題が残っている。このように病理形態学的に呼吸細気管支より中枢側の膜性細気管支領域が選択的に障害される病変形成機序などは全く解明されていないのが現状である。

BOは、呼吸細気管支より中枢側の膜様細気管支および小気管支の内腔が肉芽組織や線維性組織により、著しく狭窄・閉塞した状態である⁸⁾。蛇澤ら⁹⁾は、慢性気道感染を伴う閉塞性障害により死亡した症例

を病理組織学的に検索し、細気管支壁構造が完全に破壊され、膠原線維に置き換えられてしまった小気管支・細気管支の所見をdestructive BOと表現している。さらに本間ら¹⁰⁾はBOとDPBの臨床ならびに病理組織学的比較において、両疾患の相違点を示すとともに、BOを気道壁の構造が保たれたまま、線維性組織あるいは肉芽組織が気道内腔に突出して閉塞・狭窄するconstrictive BOと高度の炎症細胞浸潤あるいは線維化が気道壁全層に及び、気道壁の破壊とともに内腔が閉塞・狭窄するcellular BOに大別し、両者の臨床的相違点も明らかにしている。

これらの知見から、今回の対象症例を病理形態学的に検討したところ、CoBとCDBの2種類に分類できることが明らかとなった。両者の閉塞部位を組織学的に再構築したところ、CoBはCDBと異なり、病変の局在・分布は膜性細気管支からそれより太い小気管支に限局し、内腔はほぼ完全に閉塞していた。また気道壁構造の破壊はみられず、Stevens-Johnson症候群に合併したCoB(症例1)を除いて、気管支拡張は軽度であった。症例1では、ほぼ全肺の小気管支から膜性細気管支にCoBの所見を認めたが、両下葉に管状、嚢状の気管支拡張を伴っていた。気道壁は完全に破壊され、高度の線維化を認めたが、これら気道の末梢ではCoBによる閉塞部位が確認され、さらに同部位に食物繊維やActinomycesなどの感染巣がみられたことより、気道感染に続発して二次的に拡張したものと推察された¹¹⁾。一方、CDBでは、呼吸細気管支および肺胞まで炎症が及んでお

り、膜性細気管支内腔は狭窄に留まり、完全閉塞は呼吸細気管支の一部に見られるのみであった。さらに気道壁構造の破壊ならびに明らかな気管支拡張も認められた。このような病理組織学的所見の相違が、胸部画像所見にも反映されており、CoBでは、膜性細気管支内腔の完全閉塞により、胸部CT上、モザイクパターンを呈し、一方、CDBでは、広範囲の炎症の波及による細気管支周囲の病変を、小葉中心性粒状病変や細気管支拡張所見として捉えられるものと考えられた。

BOの発症機序に関しては、不明な点が多く、臓器移植、膠原病、中毒などで好発することから、何らかの免疫学的反応の異常が発症に重要な役割を果たしているものと考えられる。最近のHTTモデルを用いた研究などから、傷害を受けた細気管支で、fibroblastなどによる修復機転が過剰に起こり、病変周囲の線維化や構造改築(リモデリング)が進行し、気道内腔の閉塞につながると推測されている¹²⁾。本検討では、病変に浸潤する炎症細胞であるCD3陽性T細胞、CD20陽性B細胞およびCD68陽性マクロファージがCDBに多く見られ、間葉系細胞のマーカーである α -smooth muscle actin(α -SMA)陽性細胞が、CoBで優位に認められたが、これは基礎疾患あるいは治療に伴う宿主の免疫抑制状態やBO罹患期間の相違により、炎症細胞および筋線維芽細胞の浸潤程度に差が生じた可能性がある。Tリンパ球のサブセットは、本検討と同様にCD8陽性T細胞がCD4陽性T細胞より優位に存在することが報告されているが¹³⁾、一方でCD8陽性T細胞を除去してもBOが形成されることも報告されており¹⁴⁾、BOにおけるTリンパ球の役割については更なる検討が必要である。また、Hübnerら⁵⁾は、BOS 8症例において、BAL中のMMP-9/TIMP-1比が健常者群に比べて有意に上昇していることを報告しており、MMPとTIMPのimbalanceがBOのリモデリングに関与している可能性を示唆した。本検討ではRAに伴うCDBの1症例のみで、MMP-9陽性細胞が強陽性であったが、他の症例は共に発現を認めず、肺組織での評価は困難であった。さらに最近では、骨髄由来のfibrocyteやEMTを起こした上皮細胞等もfibroblastの起源の一つとして考えられている⁷⁾。

今回我々は、BOの病理学的再構築により、病理形態学的に2病型に分類されることを示し、さらに

免疫組織学的手法を用いて、これら2病型の特徴ならびに相違点を明らかにすることができた。今後は、病変の線維化過程のメカニズムの解明のために、EMTやprofibroticな増殖因子(TGF- β 、PDGF等)の関与を検討する必要がある。

文 献

- 1) Hertz MI, Jessurum J, King MB, et al: Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of mouse airways. *Am J Pathol* 1993; 142: 1945-1951.
- 2) Smith C, Jaramillo A, Lu KC, et al: Neutralization of tumor necrosis factor-alpha or interleukin-1 prevents obliterative airway disease in HLA-A2 transgenic murine tracheal allografts. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 166-167.
- 3) Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, et al: Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest* 2001; 108: 547-556.
- 4) Aris RM, Walsh S, Chalermkulrat W, et al: Growth factor upregulation during obliterative bronchiolitis in the mouse model. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 417-422.
- 5) Hübner RH, Meffert S, Mundt U, et al: Matrix metalloproteinase-9 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Eur Respir J* 2005; 25: 494-501.
- 6) Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, et al: CXCR2/CXCR2 ligand biopsy during lung transplant ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 2005; 175: 6931-6939.
- 7) Ward C, Forrest IA, Murphy DM, et al: Phenotype of airway epithelial cells suggests epithelial to mesenchymal cell transition in clinically stable lung transplant recipients. *Thorax* 2005; 60: 865-871.
- 8) 山中 晃: 慢性閉塞性細気管支炎. *日本胸部臨床* 1986; 45: 539-54.
- 9) 蛇澤 晶, 馬場基男, 安田公彦: びまん性気管支拡張症の病理. *病理と臨床* 2002; 20: 898-903.
- 10) Homma S, Sakamoto S, Kawabata M, et al: Comparative clinicopathology of obliterative

bronchiolitis and diffuse panbronchiolitis. *Respiration* 2006; 73: 481-487.

11) 杉野圭史, 木村一博, 佐野 剛ら: Stevens-Johnson 症候群に合併した閉塞性細気管支炎の1剖検例. *日呼吸会誌* 2006; 44: 511-516.

12) Nicod LP. Mechanisms of airway obliteration after lung transplantation. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 444-449.

13) West EE, Lavoie TL, Orens JB, et al: Pluripotent allospecific CD8⁺ effector T cells traffic to lung in murine obliterative airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34: 108-118.

14) Higuchi T, Jaramillo A, Kaleem Z, et al: Different kinetics of obliterative airway disease development in heterotopic murine tracheal allografts induced by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Transplantation* 2002; 74: 646-651.

【平成22年度】

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¹ 松下 育美¹ 伊藤 秀幸² 大橋 順³ 徳永 勝士¹
本間 栄^{5*} 田口 善夫^{6**} 吾妻安良太^{7*} 工藤 翔二⁸ 慶長 直人^{1**}

HLA領域のびまん性汎細気管支炎 (DPB) 疾患感受性候補領域の中には、我々がクローニングした2つの新規ムチン様遺伝子 *PBMUCL1*, *PBMUCL2* と、*DPCRI*, *MUC21* のあわせて4つのムチン(様)遺伝子がクラスターを形成していた。これらの遺伝子のヒト気道上皮細胞での役割については不明の点が多い。ヒト気道上皮細胞を用いてこれらムチン(様)遺伝子の発現をRT/PCRで検討したところ、*PBMUCL1* mRNA 発現が気相液相培養・poly(I:C)刺激により著しく誘導されることがわかったが、他の3つの遺伝子にはこのような誘導性の性質はなかった。*PBMUCL1* の2つある転写開始点のうち、誘導性のものはより上流の方の5' exonであった。

Expression of candidate genes in the susceptibility region of diffuse panbronchiolitis

Minako Hijikata¹, Ikumi Matsushita¹, Hideyuki Ito², Jun Ohashi³, Katsushi Tokunaga¹,
Sakae Homma⁵, Yoshio Taguchi⁶, Arata Azuma⁷, Shoji Kudoh⁸ and Naoto Keicho¹

¹ Department of Respiratory Diseases, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine

² Department of Thoracic Surgery, National Center for Global Health and Medicine

³ Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba

⁴ Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

⁵ Department of Respiratory Diseases, Toho University School of Medicine

⁶ Department of Respiratory Medicine, Tenri Hospital

⁷ Division of Pulmonary Medicine, Infectious Diseases and Oncology,

Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

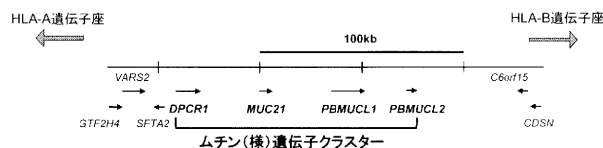
⁸ Fukujiji Hospital

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 200kb in the class I region 300kb telomeric of the HLA-B locus on the chromosome 6p21.3. We cloned novel mucin-like genes *PBMUCL1* and *PBMUCL2* in the candidate region, which form a mucin-like gene cluster together with two adjacent genes, *DPCRI* and *MUC21*. We investigated the mRNA expression of *PBMUCL1* mRNA in human bronchial epithelial cells and found that the expression was upregulated in air-liquid interface culture and by poly(I:C).

はじめに

びまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis, DPB) は、アジア系集団にみられる 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¹⁾²⁾、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³⁾。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 TFIID 遺伝子までの 200kb までせばめられた⁴⁾。この 200kb 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 80kb までせばめられたが、この 80kb 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 (*PBMUCL1*, *PBMUCL2*) をクローニングし、この度報告した⁵⁾。既に報告されている *DPCR1* 遺伝子⁶⁾ と *MUC21* 遺伝子⁷⁾ 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を形成していた。

今年度、*PBMUCL1* 遺伝子を中心に、気道におけるその役割を検討するため、初代培養ヒト気道上皮細胞を気相液相培養により再分化させ、mRNA 発現を RT/PCR により解析した。



	type	A.A.	Pro	Thr	Ser
DPCR1	membrane	1,393	10.8%	18.5%	8.4%
MUC21	membrane	566	2.3%	19.3%	30.0%
PBMUCL1	membrane	1,773	1.3%	33.6%	18.4%
PBMUCL2	secreted	251	8.0%	18.7%	7.6%

図1 ムチン(様)遺伝子クラスター

対象と方法

国立国際医療研究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初代培養を行った。一部は気相液相培養を行った。

RNeasy Mini Kit (Qiagen)にて total RNA を抽出した後、total RNA 1 μg・SuperScriptIII reverse transcriptase (Invitrogen)・pd (N)⁸⁾ (TaKaRa)を用いて逆転写反応を行った。

200kbの候補領域にあるムチン様遺伝子について、増幅産物が約200～300bpの範囲になるような RT/PCR用のプライマーを作成した。Real time PCR系は、同上プライマーを用いて、KAPA SYBR FAST Bio-Rad iCycler 2X qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS)により構築した。RT/PCRのコントロールとしてはβ-actin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)ムチン様遺伝子クラスターのmRNA 発現

候補領域に存在するムチン様遺伝子クラスターを図1に示す。6番染色体のclass I HLA領域の *SFTA2* と *C6orf15* の間にムチン、ムチン様遺伝子が4遺伝子並んで存在していた。*DPCR1*, *MUC21*, *PBMUCL1* は膜型ムチンであるが、*PBMUCL2* は分泌される事が予測されるアミノ酸配列であった。それぞれのアミノ酸配列は、Serine, Threonine, Proline を多く含む繰り返し配列を有していた。

¹⁾ 独立行政法人国立国際医療研究センター 研究所 呼吸器疾患研究部

²⁾ 同・病院 呼吸器外科

³⁾ 筑波大学大学院人間総合科学研究科

⁴⁾ 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室

⁵⁾ 東邦大学 呼吸器内科

⁶⁾ 天理よろづ相談所病院 呼吸器内科

⁷⁾ 日本医科大学 内科学(呼吸器・感染・腫瘍部門)

⁸⁾ 複十字病院

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

** びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

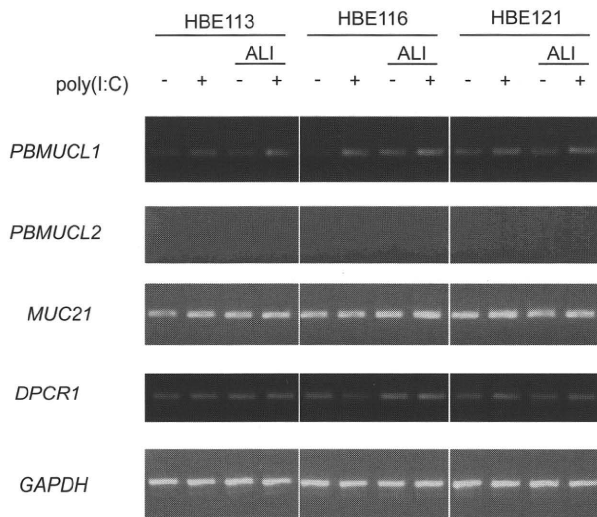


図2 ムチン(様)遺伝子のmRNA発現

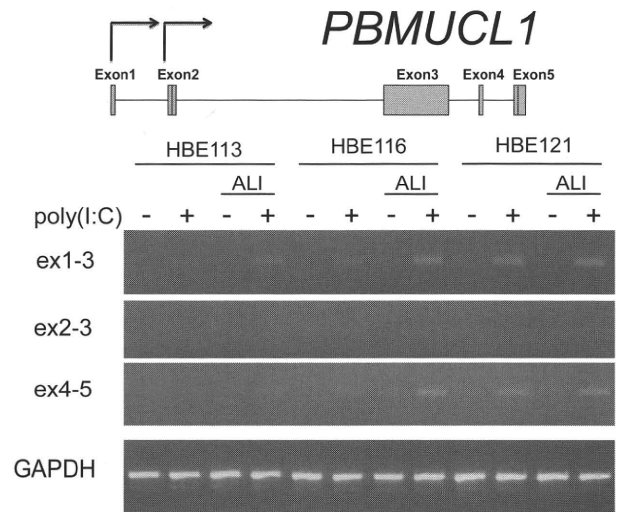


図3 *PBMUCL1*の遺伝子構造と誘導時の5'exon

(2) 気相液相培養, poly(I:C) 刺激時の各遺伝子の発現
初代培養ヒト気道上皮細胞を14日間気相液相培養(ALI)で再分化させ, さらにpoly(I:C) (100 µg/ml)の刺激を加え, 24時間後に細胞を回収したところ, poly(I:C) 刺激下で*PBMUCL1* mRNAの発現が誘導され, real-time RT/PCRで100倍以上であった。

一方, *DPCR1*, *MUC21*, *PBMUCL2* 遺伝子の発現は, poly(I:C) 刺激により大きな変化は認められなかった。図2にRT/PCRの結果を示す。

(3) *PBMUCL1* 発現誘導時の5'exon

*PBMUCL1*には2つの転写開始点があり, より5'側に存在するexonが初代培養ヒト気道上皮細胞で使われ, exon2のsplice acceptor siteより少し上流から始まる転写開始点はNCI-H292細胞で用いられていた。上記気相液相培養での再分化, poly(I:C)での誘導は, 5'側の転写開始点からの誘導であった(図3)。

考案・結論

DPB疾患感受性候補領域内に新しくクローニングしたムチン様遺伝子*PBMUCL1*のmRNAは, ヒト気道上皮細胞において発現していたが, 気相液相培養による発現の増強, さらにpoly(I:C)刺激による著しい発現誘導が認められた。今まで知られているムチン遺伝子の発現は基本的に恒常的なものが多く, このように刺激により著しく発現量が変化するものはない。同じムチン(様)遺伝子クラスターに存在

する他の遺伝子, *DPCR1*, *MUC21*, *PBMUCL2*にもこのような誘導性の発現パターンはみられなかった。

*PBMUCL1*には2カ所の転写開始点があるが, 誘導性の性質を持つのはより5'側のexonで, がん細胞由来のcell line NCI-H292細胞における*PBMUCL1*の転写開始点はこれとは異なっていた。それぞれの転写開始点上流で, どのような遺伝子発現制御が行われているのか検討が必要であると思われる。

このような検討を通して気道上皮細胞に発現する新規ムチン様遺伝子*PBMUCL1*の役割を明らかにしていく必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Sugiyama Y, Ohno S, Kano S, et al: Diffuse panbronchiolitis and rheumatoid arthritis: a possible correlation with HLA-B54. Intern Med 1994;33:612-4.
- 2) Keicho N, Tokunaga K, Nakata K, et al: Contribution of HLA genes to genetic predisposition in diffuse panbronchiolitis. Am J Respir Crit Care Med 1999;158:846-50.
- 3) Park MH, Kim YW, Yoon HI, et al: Association of HLA class I antigens with diffuse panbronchiolitis in Korean patients. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:526-9.
- 4) Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, et al: Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. Am J Hum Genet.

2000;66:501-7.

- 5) Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Tsuchiya T, Ito H, Tokunaga K, Ohashi J, Homma S, Kobashi Y, Taguchi Y, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Molecular cloning of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Hum Genet* 129:117-128, 2011.
- 6) Matsuzaka Y, Tounai K, Denda A, et al:

Identification of novel candidate genes in the diffuse panbronchiolitis critical region of the class I human MHC. *Immunogenetics* 2002;54:301-9.

- 7) Itoh Y, Kamata-Sakurai M, Denda-Nagai K, et al: Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin. *Glycobiology* 2008;18:74-83.

研究成果の刊行に関する一覧表

平成20年度 研究報告

英語論文(146報)

1. Yamasawa, H., Sugiyama, Y., Bando, M., Ohno, S.: Drug-induced pneumonitis associated with imatinib mesylate in a patient with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration* 75: 350-354, 2008.
2. Bando, M., Takahashi, M., Ohno, S., Hosono, T., Hironaka, M., Okamoto, H., Sugiyama, Y.: Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis with primary lung cancer. *Respirology* 13: 263-269, 2008.
3. Tajima, S., Soda, M., Bando, M., Enomoto, M., Yamasawa, H., Ohno, S., Takada, T., Suzuki, E., Gejyo, F., Sugiyama, Y.: Preventive effects of edaravone, a free radical scavenger, on lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Respirology* 13: 646-653, 2008.
4. Daimon, T., Johkoh, T., Sumikawa, H., Honda, O., Fujimoto, K., Koga, T., Arakawa, H., Yanagawa, M., Inoue, A., Mihara, N., Tomiyama, N., Nakamura, H., Sugiyama, Y.: Acute eosinophilic pneumonia: Thin-section CT findings in 29 patients. *Eur J Radiol* 65: 462-467, 2008.
5. Ohno, S., Nakaya, T., Bando, M., Sugiyama, Y.: Idiopathic pulmonary fibrosis-results from a Japanese nationwide epidemiological survey using individual clinical records. *Respirology* 13: 926-928, 2008.
6. Tajima, S., Bando, M., Ishii, Y., Hosono, T., Yamasawa, H., Ohno, S., Takada, T., Suzuki, E., Gejyo, F., Sugiyama, Y.: Effect of edaravone, a free radical scavenger, on bleomycin-induced lung injury in mice. *Eur Respir J* 32: 1337-1343, 2008.
7. Kishi M, Miyazaki Y, Jinta T, Furusawa H, Ohtani Y, Inase N, Yoshizawa Y: Pathogenesis of cBFL in common with IPF? Correlation of IP10/TARC ratio with histological pattern. *Thorax* 63: 810-816, 2008.
8. Ohtani Y, Ochi J, Mitaka K, Takemura T, Jinta T, Kuramochi J, Miyazaki Y, Inase N, Yoshizawa Y: Chronic summer-type hypersensitivity pneumonitis initially misdiagnosed as idiopathic pulmonary fibrosis. *Intern Med* 47: 857-862, 2008.
9. Tsuchiya K, Isogai S, Tamaoka M, Inase N, Akashi T, Martin JG, Yoshizawa Y: Depletion of CD8(+) T cells enhances airway remodeling in a rodent model of asthma. *Immunology* 126: 45-54, 2008.
10. Miyazaki Y, Tateishi T, Akashi T, Ohtani Y, Inase N, Yoshizawa Y: Clinical predictors and histologic appearance of acute exacerbation in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 134: 1265-1270, 2008
11. Iwata Y, Furuichi K, Sakai N, Yamauchi H, Shinozaki Y, Zhou H, Kurokawa Y, Toyama T, Kitajima S, Okumura T, Yamada S, Maruyama I, Matsushima K, Kaneko S, Wada T.: Dendritic Cells Contribute to Autoimmune Kidney Injury in MRL-Fas^{lpr} Mice. *J Rheumatol.* 36(2):306-14, 2009.
12. Hashimoto S, Qu W, Ahsan B, Ogoshi K, Sasaki A, Nakatani Y, Lee Y, Ogawa M, Ametani A, Suzuki Y, Sugano S, Lee CC, Nutter RC, Morishita S, Matsushima K. : High-resolution analysis of the 5'-end transcriptome using a next generation DNA sequencer. *PLoS ONE.* 4(1):e4108, 2009.
13. Sasaki S, Mello CC, Shimada A, Nakatani Y, Hashimoto S, Ogawa M, Matsushima K, Gu SG, Kasahara M, Ahsan B, Sasaki A, Saito T, Suzuki Y, Sugano S, Kohara Y, Takeda H, Fire A, Morishita S. : Chromatin-associated periodicity in genetic variation downstream of transcriptional start sites. *Science.* 323(5912):401-4, 2009.
14. Grimstad O, Sawanobori Y, Vestergaard C, Billsborough J, Olsen UB, Grønhøj-Larsen C, Matsushima K. : Anti-interleukin-31-antibodies ameliorate scratching behaviour in NC/Nga mice: a model of atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 18(1):35-43, 2009.
15. Abe J, Ueha S, Suzuki J, Tokano Y, Matsushima K, Ishikawa S.: Increased Foxp3(+) CD4(+) regulatory T cells with intact suppressive activity but altered cellular localization in murine lupus. *Am J Pathol.* 173(6):1682-92, 2008.
16. Gamo K, Kiryu-Seo S, Konishi H, Aoki S, Matsushima K, Wada K, Kiyama H.: G-protein-coupled receptor screen reveals a role for chemokine receptor CCR5 in suppressing microglial neurotoxicity. *J Neurosci.* 28(46):11980-8, 2008.
17. Ishibe T, Kimura A, Ishida Y, Takayasu T, Hayashi T, Tsuneyama K, Matsushima K, Sakata I, Mukaida N, Kondo T. : Reduced acetaminophen-induced liver injury in mice by genetic disruption of IL-1 receptor antagonist. *Lab Invest.* 89(1):68-79, 2009.
18. Wu Y, Li YY, Matsushima K, Baba T, Mukaida N. : CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process. *J Immunol.* 181(9):6384-93, 2008.
19. Yasui F, Kai C, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, Kase R, Sekiguchi S, Morita K, Hishima T, Suzuki H, Karamatsu K, Yasutomi Y, Shida H, Kidokoro M, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M.: Prior immunization with severe