

IIPs 12 症例の外科的肺生検組織から抽出した RNA を用いてマイクロアレイによる網羅的発現解析を施行した。クラスター解析では、IIPs 12 症例は図 1 に示すように 159 遺伝子で 3 群に分かれる傾向を認めたが、IPF と f-NSIP を明確には分けることはできなかった。

正常肺と比較して IIPs では、10 倍以上の発現上昇を 12 症例中 8 症例以上で認めた 1594 遺伝子を同定した。次にこれらの 1594 遺伝子の機能的分類を行った。Biological process によって分類すると cell cycle, RNA processing, cell cycle process, negative regulation of cellular biosynthetic process, DNA metabolic process などに関連する遺伝子が多かった(図 2)。さらに Molecular function によって分類すると nucleotide binding, purine nucleotide binding, ribonucleotide binding, purine ribonucleotide binding などに関連する遺伝子が多かった(図 3)。発現上昇遺伝子の属する Pathway 解析では、KEGG pathway 上の Cell cycle, ABC transporters, p53 signaling pathway などに関連する遺伝子が多かった(図 4)。

D. 考察

本研究では IIPs 12 症例の外科的肺生検組織から抽出した mRNA をマイクロアレイによる網羅的発現解析を施行した。IIPs のクラスター解析において

は、IPF と f-NSIP の発現プロファイルは非常に似通っており、両者を分子レベルより分けることは困難であった。これは、欧米人の肺組織を用いたマイクロアレイ解析でも IPF と NSIP の違いが乏しかったという今までの報告に合致するものであった。この理

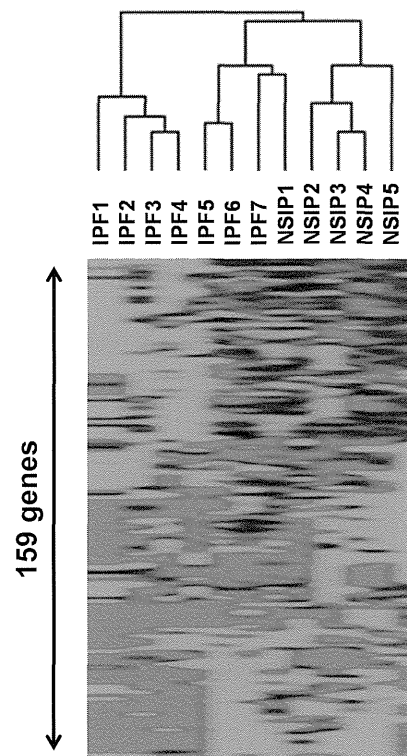


Figure 1 Hierarchical clustering analysis

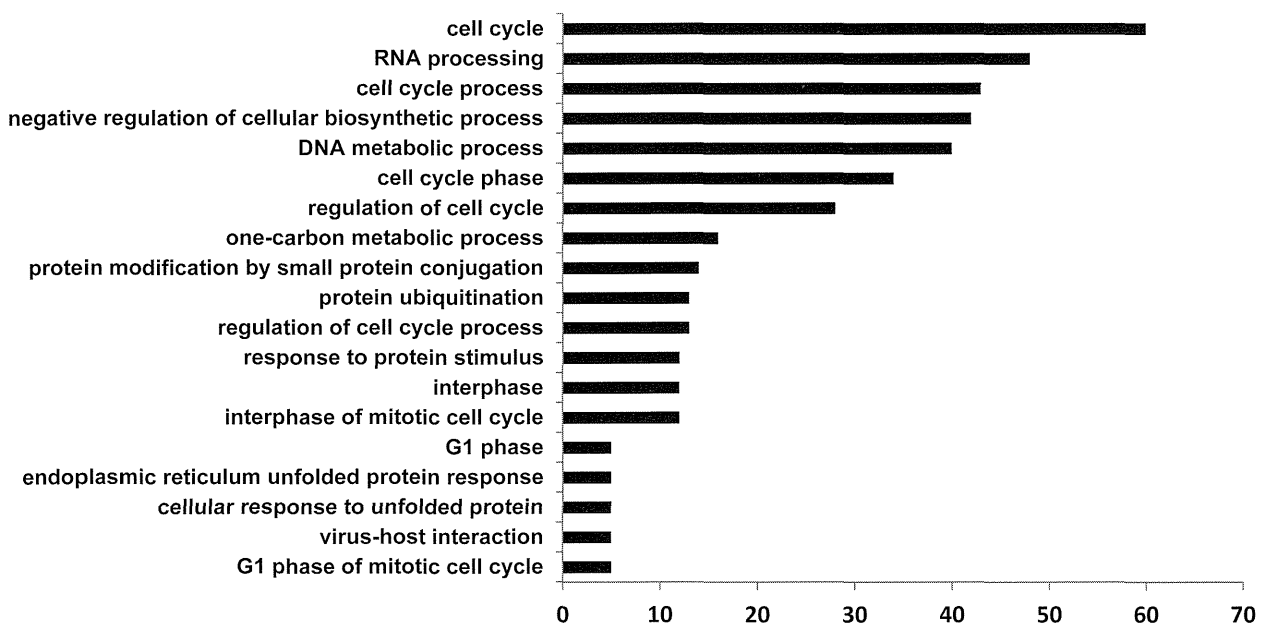


Figure 2 Functional classification of up-regulated genes: Biological process

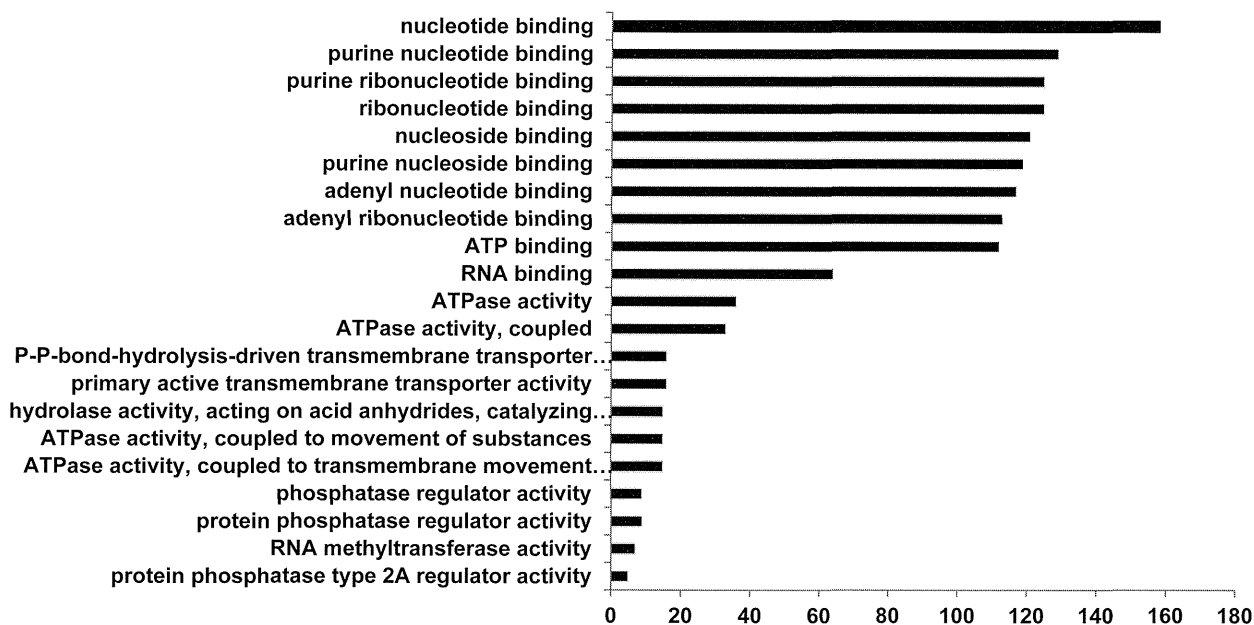


Figure 3 Functional classification of up-regulated genes: Molecular function

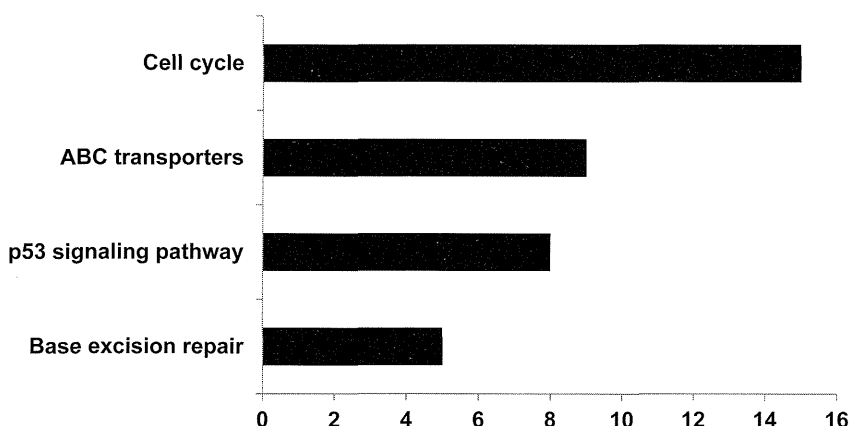


Figure 4 Functional classification of up-regulated genes: KEGG pathways

由として、IIPの外科的肺生検標本では同一症例において、IPF/UIPパターンとNSIPパターンの混在が見られることなどが考えられる。また、IPFとf-NSIPは病理学的にも鑑別が困難であり、予後も変わらないとする報告もある。その他の理由としては、本症例ではNSIPの中でもf-NSIPのみを対象としていることも考えられよう。近年ではNSIPはIPFと臨床像と予後の異なるIIPsの独立した疾患概念として考えられつつあるが、将来的にはIIPsの疾患概念の再構築が必要かもしれない。

本研究ではIIPs症例の肺組織における発現レベルが、健常人の肺組織と比較して高頻度に上昇している分子を多数同定したが、これらの中にはすでに間

質性肺炎のバイオマーカーとして有用性が報告されているMMP-1やKL-6/MUC1などが含まれていた。臨床応用の観点から、間質性肺炎において発現が上昇している分子の中から、1)抗体療法の標的分子として膜蛋白ならびに分泌蛋白、2)分子標的治療の標的分子としてキナーゼ・ドメインを有する分子をスクリーニングする探索戦略を取ることによって、新規血清バイオマーカー・治療標的の候補分子として、約50分子を抽出している。今後、これらの分子については肺組織における発現レベルの亢進を組織免疫染色で確認する予定にしている。さらに、肺局所における発現も含めて病理学的意義を詳細に検討することを考えている。

発現上昇している遺伝子群の機能的分類では、Biological processによる分類では、cell cycle, RNA processing, cell cycle process, negative regulation of cellular biosynthetic process, DNA metabolic processに関連する遺伝子がIIPsに特徴的な遺伝子と考えられた。また、KEGG pathway上のCell cycle, ABC transporters, p53 signaling pathwayなどに関連する遺伝子が多く、IIPsの発現プロファイルは肺腺癌の発現プロファイルと類似していた。さらに、私たちが治療の標的分子として抽出したいくつかの分子は既存の分子標的治療薬により抑制されることが報告されているため、悪性腫瘍に対する分子標的治療薬が間質性肺炎の治療薬としても有用であるという仮説を立てている。今後は、ブレオマイシン肺線維症モデルにおいて、上記の分子標的治療薬と治療標的分子に特異的に作製するsiRNAを経気管支的、経鼻的、経口的に投与することにより、病態の進行を抑制しうるかを検討したいと考えている。

E. 結論

IIPsの分子像の解析より、IIPsの分子学的病態を明らかにした。網羅的発現解析情報から、新規のバイオマーカーならびに治療標的の候補分子を多数同定した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Kawase S, Tanaka S, Yoshioka K, Yokoyama A, **Kohno N**, Bonella F, Guzman J, Ohshimo S, Costabel U. Different MUC1 gene polymorphisms in German and Japanese ethnicities affect serum KL-6 levels. *Respir Med* 2012; 106: 1756-64.
 - 2) Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, **Kohno N**. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respir Investig* 2012; 50: 3-13.
 - 3) Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Horimasu Y, Deguchi N, Takano A, Tomoda Y, Yoshioka K, Fujitaka K, Arihiro K, Okada M, Yokoyama A, **Kohno N**. Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2 is a prognostic biomarker for lung cancer. *Pathobiology* 2012; 79: 24-33.
 - 4) Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Shoda H, Takano A, Nishino R, Okada M, Arihiro K, Inai K, Hamada H, Yokoyama A, **Kohno N**. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a prognostic biomarker in patients with surgically resected nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 2012; 130: 377-87.
- ### 2. 学会発表
- 1) Ohshimo S, Horimasu Y, Bonella F, Ishikawa N, Hattori N, Tanigawa K, **Kohno N**, Guzman J, Costabel U. KL-6 and CCL18 as predictors for acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis. American Thoracic Society International Conference (2012.5.18-23, San Francisco).
 - 2) Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Tanaka S, Yoshioka K, Bonella F, Ohshimo S, Guzman J, **Kohno N**, Costabel U. Different serum cut-off values of KL-6 for German and Japanese to diagnose idiopathic interstitial pneumonias are related to different Mucin-1 gene polymorphisms. American Thoracic Society International Conference (2012.5.18-23, San Francisco).
 - 3) Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Tanaka S, Yoshioka K, Bonella F, Ohshimo S, Guzman J, Costabel U, **Kohno N**. Different cutoff values of serum SP-D for German and Japanese to diagnose idiopathic interstitial pneumonias are related to different SFTPD gene polymorphisms. European Respiratory Society Annual Congress (2012.9.1-5, Vienna).
 - 4) **Kohno N**, Ishikawa N, Deguchi N, Iwamoto H, Ohshimo S, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Hattori N. KL-6 is a useful serum biomarker for early detection of interstitial lung disease. European Respiratory Society Annual Congress (2012.9.1-5, Vienna).
 - 5) Ishikawa N, Hattori N, Taniwaki M, Horimasu Y, Matsuda T, **Kohno N**. Gene expression profiles of

idiopathic interstitial pneumonias: Identification of disease-specific diagnostic markers and molecular therapeutic targets. European Respiratory Society Annual Congress (2012.9.1-5, Vienna).

- 6) 石川暢久, 谷脇雅也, 藤高一慶, 春田吉則, 村井博, 服部登, 河野修興. 間質性肺炎合併肺癌の分子病態と治療. 第53回日本肺癌学会学術総会(2012年11月8日 - 9日, 岡山市)
- 7) 石川暢久, 谷脇雅也, 堀益靖, 大下慎一郎, 藤高一慶, 春田吉則, 村井博, 服部登, 河野修興. 慢性過敏性肺炎の分子像の網羅的解析. 第62回

日本アレルギー学会秋季学術大会(2012年11月30日 - 12月1日, 大阪市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし.
2. 実用新案登録
なし.
3. その他
なし.

B. サルコイドーシス

サルコイドーシス部門(山口哲生)

「サルコイドーシス診療Q&A集」の作成

研究協力者 山口哲生 JR東京総合病院副院長・呼吸器内科

最近の疫学調査でもわかってきたように、サルコイドーシスは高齢者が増加している。その臨床像は多彩、かつ多様であり、患者への説明、観察、治療の選択には豊富な知識と経験が必要となる。しかしながら、サルコイドーシスという全身にわたる複雑な疾患を十分に診療できる医師は少なく、適切な診療のための診療の手引きになるものが必要であるといわれるようになった。厚生労働省びまん性肺疾患に関する調査研究サルコイドーシス部門では、日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会と共同で主に非専門医を対象とした、診療の手引きにかわるようなサルコイドーシスQ&A集を作成することとした。

【目 的】

サルコイドーシスの診療に関しては、現在までに、当班会議と日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会との共同で、「サルコイドーシス治療に関する見解—2003」、および「サルコイドーシスの診断基準と診療の手引き—2006」を作成してきた。しかし、サルコイドーシスは日常診療においては稀な疾患であり、多くの医師にこの内容が十分にいきわたっているとはいいがたく、本症の非専門医にもわかりやすい内容で診療の手引きになるものの作成が必要とされている。本症の診療に必要な幅広い内容をQ&A方式で網羅して、サルコイドーシスの診療にあたる一般医家に対する知識の敷衍を目的として、この「サルコイドーシス診療Q&A集」を作成することとした。

【方 法】

日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会の会員(おもに役員)および当班のメンバーに依頼して、本症の診療における必要な事柄をQ&A形式で執筆し作成した。以下の事柄に配慮した。

- ①Q&Aは、医師・医療者が患者さんからの質問に答えるための参考になるものにする。また、サルコイドーシスという疾病を理解するために通読する著述物として適したものとする。
- ②コメディカルや患者自身が読む場合も想定して

平易な文章で作成する。

- ③将来的にはWEB掲載も視野におく。

本書の全体の構成に関しては、I. 総論 II. 各論 III. よくある患者さんからの質問と回答に大別して作成した。各々の項目で非専門家の医療者でもわかるようなできるだけわかりやすい回答をこころがけた。大きな内容を含む質問事項もいくつかの小さな質問に分けて回答するようにして読者にわかりやすくすることをこころがけた。

また、執筆に関しては倫理面へ配慮した。

【結 果】

内容を以下に記す。

I. サルコイドーシスについて—総論編—

1. サルコイドーシスとはどのような病気なのか? 山口哲生
2. どのような臓器に影響を与えますか? 宮崎英士
(各臓器障害, 全身症状についてあらましを書く)
3. どのような経過をたどりますか? 長井苑子
(急性発症型, 難治化, 慢性化, 自然改善, 人種による違い, 致死的臓器)
4. 原因はわかっていますか? (病因) 森下宗彦
5. 体の中ではどのような免疫反応がおこっているのでしょうか? 宮崎泰成
6. 組織像はどうなっていますか? (病理) 武村民子
(肉芽腫病変, 肉芽腫性血管炎, MPA, 線維化)

7. 疫学について教えてください 吾妻安良太
(地理疫学, 性, 年齢, 発生数, 罹患数など)
8. 診断はどのように行われますか? 四十坊典晴
(現在の厚労省, 学会の診断の流れと検査の必要性, 組織生検の必要性)
9. ○行うべき検査とその意味を教えてください(循環器以外) 四十坊典晴
胸部X線写真, 血液検査(血算, 生化学(肝機能, 腎機能, カルシウムなど), 蛋白分画, 免疫グロブリン, リゾチーム, ACE, 可溶性I2R, KL-6, など)
胸部CT, ガリウムシンチグラム, PET, ツベルクリン反応, 気管支鏡, BALF, TBLB, 表在リンパ節生検, など, これらの必要性)
○心臓で行なう検査について教えてください
土田哲人
(心電図, 心臓エコー, ホルター心電図, 心臓MRI, 心臓の核医学検査, PET等)
10. サルコイドーシスと鑑別が必要になるのはどのような疾患ですか? 渡辺憲太朗
11. サルコイドーシスにはどんな治療法がありますか? 大道光秀
保険適用のもの と 適用外のもの ステロイド薬, 吸入ステロイド, 免疫抑制剤, 抗菌剤, 抗TNF α 阻害薬, 抗マラリア薬
12. サルコイドーシスの治療薬による副作用はどのようなものがありますか?
副作用を防止するためにどのような工夫(併用治療)が必要ですか? 赤川しのぶ
13. 難病認定・医療費助成について教えてください. 坂東政司

II. サルコイドーシスについて—各論—

各々について①特徴, ②診断 ③治療 ④予後 ⑤注意点等を基本のQとする.

1. 呼吸器病変(BHL, 肺, 胸膜)について 須田隆文
(0型~IV型. 急速進展型肺病変, 空洞形成型肺病変, 下肺野優位型(間質性肺炎型)についても簡単に触れる)
2. 肺野病変のCT所見を教えてください 酒井文和
3. 気管支鏡所見と生検(TBLB, EBUS-TBNA)について 石井芳樹
4. 肺サルコイドーシスの呼吸機能について 新美 岳

5. 眼病変について(基本図をいれる, 診断も含む) 石原麻美
6. 最近の眼病変の検査方法, 治療方法, 一般経過 後藤 浩
7. 皮膚病変について(診断も含む) 岡本祐之
8. 皮膚病変の鑑別診断について 伊崎誠一
9. 心病変について(診断も含む) 森本紳一郎
10. 心臓病変の特殊治療方法(ペースメーカー, 除細動器, CRT, MTXなど) 矢崎善一
11. 神経病変について(診断も含む) 西山和利
12. 筋病変について 熊本俊秀
13. 骨, 関節病変 玉田 勉
14. 腎, 泌尿器病変 鈴木栄一
15. 肝, 脾, 消化管病変 立花暉夫
16. 内分泌, 高カルシウム血症 濱田邦夫
17. 上気道病変 山口哲生
18. 唾液腺, 涙腺など 森 由弘

多臓器病変の症候群, 特殊な症候群

19. Heerfordt 症候群 生島壮一郎
20. Lofgren 症候群 佐藤滋樹
21. Blau 症候群 金澤伸雄

III. よく質問されるQ & A

1. サルコイドーシスはうつる病気ですか? 遺伝しますか? 山口悦郎
2. サルコイドーシスの全身症状はどのようなものがありますか? 山口哲生
痛み, 息切れ, 全身倦怠感, 発熱 など
3. サルコイドーシスは妊娠・出産に影響しますか? 四十坊典晴
4. サルコイドーシスは悪性腫瘍を合併しやすいですか? 片岡幹男
5. サルコイドーシスと膠原病は関係がありますか? 高橋和久
シェーグレン症候群など
6. 喫煙や飲酒はサルコイドーシスに影響を与えますか? 今野 哲
7. どのような合併症がありますか? 山口哲生
尿路結石, 帯状疱疹, 耳症状, アスペルギルス症, SFN など
8. どんなことで発病したり悪化したりするのでしょうか? 山田嘉仁

外因, 素因, 誘因, ストレスフルライフスタイル,
戦争後や消防夫の多発

9. どんなことを注意する必要がありますか?

四十坊典晴

【考 案】

本Q&A集は, なお作成中であるが, 医師・医療者が患者さんからの質問に答えるために, また, サルコイドーシスという疾病を理解するために通読する著述物として適したものとなっていると考えられる.

【参考文献】

- 1) サルコイドーシス治療に関する見解－2003. 日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会, 日本呼吸器学会, 日本心臓病学会, 日本眼科学会, 厚生省科学研究－特定疾患対策事業－びまん性肺疾患研究班; サルコイドーシス/肉芽腫性疾患, 23 : 105-114, 2003.
- 2) Hunninghake GW, Costabel U, Ando M, Baughman R, Cordier JF, du Bois R, Eklund A, Kitaichi M, Lynch J, Rizzato G, Rose C, Selroos O, Semenzato G, Sharma OP. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 1999 Sep;16(2):149-73.

サルコイドーシスにおけるアクネ菌 Cpn60 の 免疫抗原性についての検証

掛川 智也 古川あすか 相川 裕樹 上野友理佳
萬 巴里子 内田 佳介 江石 義信*

【背景】

サルコイドーシスはIV型アレルギー反応によって肉芽腫が形成される疾患であり、皮膚常在菌アクネ菌(*Propionibacterium acnes*)が原因菌として疑われている。当研究室では過去に、本菌由来の Trigger factor を責任抗原候補として同定したが、本症の責任抗原として断定するには不十分であった。そこで本研究では Trigger factor 以外の抗原候補が存在する可能性を考慮し、抗原性を持つアクネ菌由来の蛋白を選別するために、サルコイドーシス患者分離株であるアクネ菌株のゲノムDNAを持つファージライブラリーと本菌感作マウス血清を用いたライブラリースクリーニングを施行した。

【方法と結果】

3個体の感作マウス血清を用いて計138,000個のプラークに対してライブラリースクリーニングを施行し、66個の陽性プラークを得た。その中で最も多く得られたのは Trigger factor 同様シャペロン蛋白である Cpn60 であった。この蛋白は多様な生物種において存在している一方、その抗原性の高さから様々な疾患の病因として疑われている。したがって、この蛋白がサルコイドーシスの責任抗原になりうるかと考え疾患特異的な免疫反応を有するか、本症患者と健常人における液性免疫・細胞性免疫についてそれぞれ調べた。その結果、患者でわずかながら抗体価の上昇は見られたが健常人と有意な差は現れず、細胞性免疫においても疾患特異的な反応は確認されなかった。一方で、これと同時に Cpn60 に対する単クローン抗体を樹立し病変部組織に対する免疫染色を行った結果、サルコイドーシスの肉芽腫内およびHW小体に陽性を認めた。

【考察】

結果として本蛋白はサルコイドーシスの責任抗原と言えなかったが、Cpn60 が肉芽腫内およびHW小体に陽性となったことから、アクネ菌が L-form 状態で病変部組織に不顕性感染しているという考えを支持することができた。

【背景】

サルコイドーシス(以下サ症)は、肺や眼・リンパ系などをはじめ全身の諸臓器に非乾酪性の類上皮肉芽腫を形成する疾患である。免疫系統の異常や感染症が関係すると考えられているが、依然発症メカニズムは不明である。本症はマクロファージの凝集により肉芽腫を形成することから細胞性免疫反応が関わっていると推測されるが、その抗原については未だ同定されていない¹⁾。

一方で、サ症の原因菌として過去の研究から皮膚常在菌のアクネ菌(*Propionibacterium acnes*)が疑われている^{2,3,4)}。当研究室では過去に、本症に細胞性免疫反応が関わるならば本菌由来の抗原性物質が存在すると考え、本菌ゲノムライブラリーとサ症患者血清を用いた抗体スクリーニングを施行しこれの同定を行った。そして、シャペロン蛋白のTrigger factorを責任抗原候補として得ている⁵⁾。これをマウスへ感作免疫することで肉芽腫の形成を確認したが約3割に過ぎず、サ症患者において疾患特異的な細胞性反応を示すも、その割合は約2割であった。これよりアクネ菌がサ症の原因菌であることを支持する結果は得られたが、肉芽腫形成の要因物質を断定するには不十分であった。

そこで本研究ではTrigger factor以外の責任抗原候補が存在すると考え、抗原性のあるアクネ菌由来蛋白を選別し、責任抗原を同定することを目的とした。本研究でも本菌ゲノムライブラリーを用いた抗体スクリーニングを施行することにしたが、過去の研究における患者血清を用いたスクリーニングでは十分に抗原候補蛋白を得ることが出来なかった。そこで今回は、抗原性を持つ蛋白の検出に重点を置き、アクネ菌感作マウス血清を用いることにした。そして、得られた候補蛋白について本疾患に特異的な免疫反応を有するかを液性免疫・細胞性免疫についてそれぞれ検証し、責任抗原かどうかを調べていくことにした。このようにして、今回の研究では責任抗原候補としてTrigger factorと同様にシャペロン蛋白であるCpn60を得るに至り、これについて抗原性を検証した。

【材料と方法】

アクネ菌ゲノムライブラリー

当研究室で過去に作製されたもので、 λ gt11ファージミド [Stratagene]を用いたファージライブラリーである。アクネ菌はサ症患者の皮膚病変部から分離培養された臨床分離株を使用した。

アクネ菌感作マウス

C57BL/6J マウス [Crea Japn inc.]にアクネ菌 lysate に Complete Freund's Adjuvant [BD]を加えたエマルジョンを後足底から免疫した。その後1週間おきに尾起始部の皮下に計3-4回免疫を行った。最終免疫から1-2週間の個体を実験に使用した。血清は眼球採血したものを5,000 rpm・5分で遠心分離して回収した。また、鼠径・腋窩・膝下・腹腔からリンパ節を採取し、生理食塩水中でホモジナイズした。得られた細胞液について4°C・1,500 rpm・10分で遠心分離して細胞を回収し、Lysis bufferで赤血球を溶血させた。続いてPBSで細胞を洗い、4°C・1,500 rpm・5分で遠心分離した。この操作を2度行いRPMI (+FCS, Penicillin/Streptomycin) [SIGMA-ALDRICH]を加えて細胞数をカウントした。また対照マウスとして、アクネ菌 lysateではなく、生理食塩水で免疫した未感作マウスを用意した。

患者・健常人検体

本研究では、2006-2011年に当大学医学部附属病院の組織診断でサ症と診断された患者の検体を使用した。実験への使用にあたり、本学医学部倫理委員会の承認を得た(承認番号:877)。また、当研究室の所属者を健常人検体として用いた。いずれの健常人も過去にサ症と診断されていない。

抗体スクリーニング法⁵⁾

Luria-Bertani(LB)broth に 1M MgSO₄・20% Maltose・50 mg/ml Ampicillinを加えて培養液を作製し*E. coli* Y=1090r⁻株を37°C・140-150 rpm・4時間で振盪培養した。その後、3000 rpm・10分で遠心分離して集菌し、滅菌水 + 0.1M MgSO₄でサスペンドしてOD₆₀₀ = 0.5に調整した。

SM buffer (NaCl, MgSO₄, Tris/HCl, gelatin, H₂O)に、大腸菌液・ファージライブラリーの順に加え、

37°C・15分水中で加温した。調整したファージライブラリーに50°Cの水中で恒温維持したTop agar (NZY broth, 0.7% Bacto agar)を加え、NZY plateに植菌した。15分静置後、42°C・4時間で培養した。プラークの形成を確認した後、10 mM IPTGに浸しておいたProtran ニトロセルロースメンブレン [GE Healthcare]で覆い、37°C・5時間でインキュベートして発現蛋白を転写した。転写後、室温・1時間ブロッキングし、一次抗体に200倍希釈したアクネ菌感作マウスおよび未感作マウス血清を用いてそれぞれ室温・2時間反応させた。二次抗体に1000倍希釈したCy-2 conjugated Anti-mouse Igs [Invitrogen]を用い、室温・1時間反応させ、遮光状態で37°C・30分乾燥した。最後にQuantity One V4.6.9 [BIO-RAD]を用いて染色結果を観察して、陽性プラークの有無を確認した。検出した陽性プラークは、SM bufferにChloroformを加えた溶液に回収した。

アクネ菌Cpn60 (PaCpn60)のリコンビナント蛋白作製

ゲノムライブラリー作製に用いたアクネ菌株のゲノムDNAに対して制限酵素(Sma I/Not I)付きのプライマーを用いてCpn60全長配列をPCRにて増幅した。PCR産物を精製後pT7Blue T vector [TaKaRa]に組み込み、大腸菌JM109株にサブクローニングした。続いて、Sma I/Not Iで処理した挿入配列部分を、pGEX-6p-1 vector [Amersham pharmacia biotech]に組み込み、同じく大腸菌JM109株に形質転換してクローニングした。この形質転換体の培養液からPaCpn60-GST fusion蛋白をGlutathione Sepharose 4B [GE Healthcare]により精製し、PreScission Protease [GE Healthcare]で単体にした。

ELISA

96 well plate [Nunc]に1 wellあたり1 µg/ml PaCpn60を37°C・90分で固相化した。一次抗体としてヒト、マウスともに100倍希釈した血清を加え、それぞれ室温・2時間反応させた。二次抗体として5000倍希釈したBiotin conjugated Anti-ヒト IgG/IgM/IgA [Dako], Anti-マウス Igs [Dako]をそれぞれ室温・30分反応させ、続いて5000倍希釈したPeroxidase conjugated Streptavidin [Dako]で室温・30分反応させた。発色液(OPD, citrate buffer, H₂O₂)で発色させ、最後に2N HClを加えて反応を停止し490 nmの吸光

度(A₄₉₀)を測定した。結果は2 wellの平均として求めた。

ELISPOT

96 well Multiscreen plate [Millipore]に1 µg/wellのAnti-human / Anti-mouse IL-2, INF-γ[MABTECH]を4°C・一晚固相化した。次にヒト、マウスともに1.0 × 10⁵ cell/well, 10 µg/ml PaCpn60を加えて37°C・一晚インキュベートした。二次抗体に1 µg/ml Biotin conjugated Anti-human / Anti-mouse IL-2, IFN-γ [MABTECH]を加え、室温・2時間反応させた。続いて5000倍希釈したPeroxidase conjugated Streptavidin [DAKO]で室温・1時間反応させ、その後AEC kit [Vector Labs]で室温・30分発色させた。最後に乾燥して測定した。それぞれ3 wellの平均を求め、それから未刺激細胞の平均を引いてsfc (spot forming count) に表し結果とした。また、二次抗体以降の反応は全て遮光状態で行った。

リンパ球幼若化試験(LST)

ヒト、マウスともに細胞数を5.0 × 10⁶ cell/mlに調整し、96well flat bottom plate [Coster]に100 µl/well加えた。続いて10 µg/ml PaCpn60を加え、RPMI (+FCS,P/S)で200 µlにメスアップし37°C・3日間、その後20倍希釈の³H- Thymidineを加え37°C・24時間インキュベートした。Filter plateに回収し、乾燥後にシンチレーション液を加えた。測定は本大学のアイソトープセンターに依頼した。各細胞について3 wellの平均を求め、それを未刺激細胞の平均で割ることでSI (Stimulation Index; 刺激指数) に表し結果とした。

モノクローナル抗体の作製

BALB/c マウス [Crea Japn inc.]にPaCpn60にComplete Freund's Adjuvantを加えたエマルジョンを後足底から免疫した。その後1週間おきに尾起始部の皮下に計4-6回免疫を行い、最後にPaCpn60を腹腔内に投与した。3日後、脾臓からB細胞を採取し、Lysis bufferで溶血させた。脾臓細胞:P3細胞=10:1となるよう混合し、PEGで融合させた。この融合細胞をHAT [Invitrogen]を添加したRPMI (+ FCS,P/S)培地で1週間、続いてHT [Invitrogen]を添加したRPMI (+ FCS,P/S)培地で1週間、それぞれ培養した。

その後、PaCpn60, アクネ菌を固相化したELISAと肉芽腫病変を有するサ症の脾臓症例のパラフィン切片に対する免疫組織化学染色とともに陽性となる抗体を選別した。それらについて上記同様2週間培養し、ELISAと免疫染色により抗体を選別した。得られた抗体を拡大培養し、SCID マウス [Crea Japn inc.]の腹腔内に投与した。腹水を採取し、PaCpn60に対するモノクローナル抗体を得た。

抗体の特異性の検証

Fischer344/Jcl rat [Crea Japn inc.]にTable. 1に挙げた菌株のlysateを静注し、30分後に肝臓を摘出し、パラフィン包埋切片(カクテル切片)を作製した。これに対し、PaCpn60抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、交差の有無を確認した。

免疫組織化学染色

サ症パラフィン切片(脾臓1症例, 心臓1症例, リンパ節21症例)に対して脱パラフィン処理し、クエン酸bufferを加えて97°C・1時間Microwave処理で賦活化した。続いてメタノール・H₂O₂を用いて室温・10分で内因性Peroxidase処理し、30分ブロッキング後、一次抗体として8,000倍希釈したPaCpn60抗体もしくは30,000倍希釈したPAB抗体を4°C・一晩反応した。その後、二次抗体にABC KitのAnti-rabbit/マウス IgG [VECTOR]を、続いて同kitのPeroxidase conjugated Streptavidinをそれぞれ室温・30分反応させた。DABで室温・10分発色し、Mayer's Hematoxylinで1分核染した。水洗後、脱水・透徹した。

【結 果】

抗体スクリーニングによる責任抗原候補の選別

三個体のマウス血清を用いた抗体スクリーニングでは、それぞれ46,000個・12,000個・80,000個のプラークから21個・8個・37個の陽性プラークが得られた。これらのプラークからDNAを抽出し挿入配列をアクネ菌全ゲノムdata baseと照合したところ、複数の遺伝子名が得られた。この中で唯一複数同定されたのは60 kDa chaperon TCP-1/Cpn60で、二個体それぞれで4/21個・1/8個のプラークであった。なお、未感作マウス血清では10,000プラーク中陽性プラーク

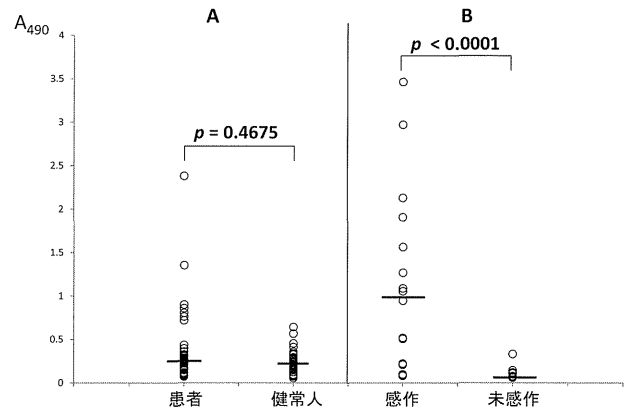


Fig. 1 ヒト(A)とマウス(B)における抗体価の分布 humanは抗IgG抗体における結果。青線は各分布の中央値を示す。

は1個も検出されなかった。

PaCpn60の免疫学的検証

まず、PaCpn60についてELISAで抗体価を測定し液性免疫反応について調べた。サ症患者(n = 53) / 健常人(n = 39)及び感作(n = 16) / 未感作(n = 14) マウスの血清を一次抗体とした。抗IgG抗体に対する患者血清では数症例で健常人の最大値を越したが、両者に有意差は見られなかった(p = 0.4673, Fig. 1A)。また、感作マウスと比較しても中央値の違いが示すように全体的に抗体価は低かった(Fig. 1B)。さらに、オッズ比(OR)を用いてサ症とCpn60の抗体価の間に関連性があるかも統計的に調べた⁶⁾。A₄₉₀について、健常人の中央値 + 1SDを基準値としてそれ以上なら関与、以下なら非関与とした。基準値は0.373であった。結果は、OR = 1.28 (CI 95% of 0.36 - 4.51)となり、抗体価と疾患に関連性は見られなかった。抗IgM / IgA抗体に対しても有意差・関連性はなかった。

続いて、ELISPOTとLSTを用いて細胞性免疫反応について調べた。実験には患者(n = 5) / 健常人(n = 5)の末梢単核球、及び感作(n = 5) / 未感作(n = 4) マウスのリンパ節を用いた。

ELISPOTではINF- γ 抗体に対し、健常人に比べて患者細胞でわずかに高値が出たが、IL-2抗体に対しては両者に差はなかった(Fig. 2A)。さらに、マウスにおいては両抗体に対して感作マウス細胞で患者細胞より大きな反応が見られた(Fig. 2B)。Positive Controlとして抗CD3抗体を用いたwellはいずれの場合も300 sfc以上となった。一方LSTでは、患者

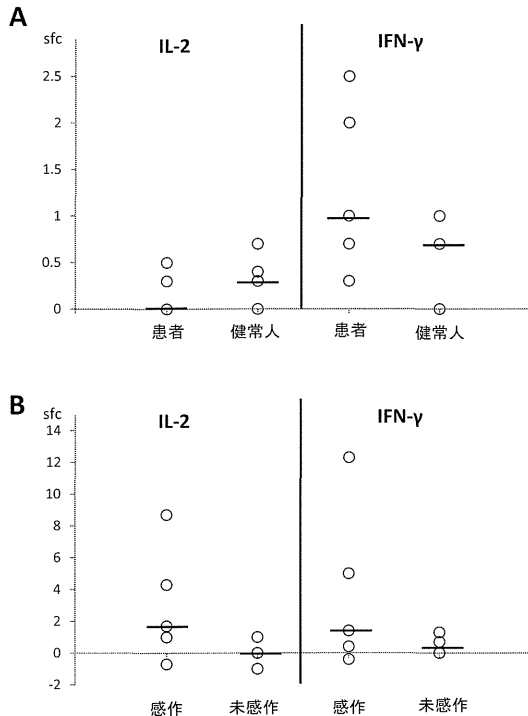


Fig. 2 ELISPOTの結果
 A) ヒト 患者 (n=5) / 健康人 (n=5)
 B) マウス 感作 (n=5) / 未感作 (n=4)
 sfc = spot forming count. Bar は各分布の中央値を示す

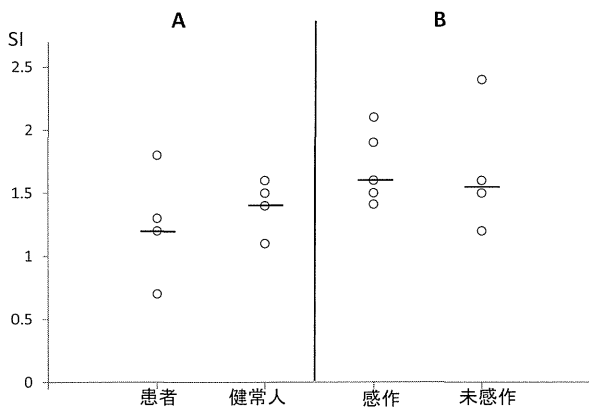


Fig. 3 LSTの結果
 A) ヒト 患者 (n=5) / 健康人 (n=5)
 B) マウス 感作 (n=5) / 未感作 (n=4)
 SI = Stimulation Index. Bar は各分布の中央値を示す

と健康人で結果に差は現れなかった(Fig. 3A). また、マウスにおいても感作・未感作に違いは見られなかった(Fig. 3B). Positive Controlとして用いた抗CD3抗体では、患者及び感作マウスではSI = 5-10, 健康人及び未感作マウスではSI = 2-4となった. 以上の結果から、PaCpn60に対する免疫反応において疾患特異的な反応を確認することは出来なかった.

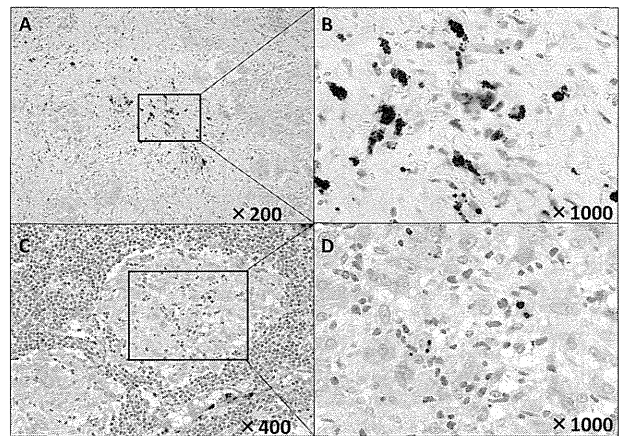


Fig. 4 肉芽腫内における染色像
 A, B) サ症脾臓 C, D) サ症リンパ節

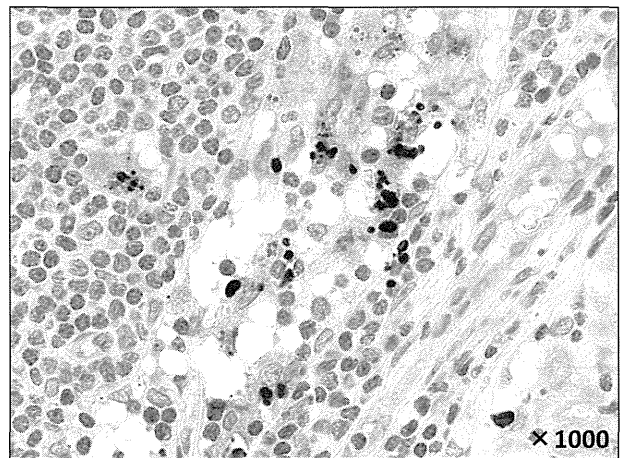


Fig. 5 サ症リンパ節のHW小体における染色像

PaCpn60の病変部における局在について

PaCpn60に対するモノクローナル抗体を用いてサ症病変部のパラフィン切片に対して免疫組織化学染色を行い、PaCpn60の局在を調べた. 脾臓、心臓および11/21症例のリンパ節症例において肉芽腫内に陽性となった(Fig. 4). 陽性像としてはFig. 4Bのような小型円形状や、細顆粒状、ときに粒子状ではなく薄く細胞質に均一に染まる3通りに観察された. HW小体は脾臓、心臓および15/21症例のリンパ節症例において陽性となった(Fig. 5).

PaCpn60は他菌種のHSP60と高い相同性を有する⁶⁾. Fig. 6に同属で常在菌である*Propionibacterium granulosum*, *Propionibacterium avidum*および欧米でサ症の原因菌と疑われている*Mycobacterium tuberculosis*のHSP60アミノ酸配列との比較を示す.

```

1                               60
Pa: MAKLEFNIEARRGLEAGMNTLADAVKVTLPKGRNVVLEKSWGAPTITNDGVSIAKHEE
Pg: MAKLEFNIEARRLEQGMNTLADAVKVTLPKGRNVVLEKSWGAPTITNDGVSIAKHEE
Pv: MAKLEFNIEARRGLEAGMNTLADAVKVTLPKGRNVVLEKSWGAPTITNDGVSIAKHEE
Mt: MAKTAYDEEARRGLERGLNALADAVKVTLPKGRNVVLEKSWGAPTITNDGVSIAKHEE
61                               120
Pa: LDDPYEKIGAEELVKEVAKKTDVAGDGTTTATVLAQAMVREGLRNVTAGANPMLGKKGIE
Pg: LDDPYEKIGAEELVKEVAKKTDVAGDGTTTATVLAQAMVREGLRNVTAGANPMLGKKGIE
Pv: LDDPYEKIGAEELVKEVAKKTDVAGDGTTTATVLAQAMVREGLRNVTAGANPMLGKKGIE
Mt: LDDPYEKIGAEELVKEVAKKTDVAGDGTTTATVLAQALVREGLRNVVAGANPLGLKRGIE
121                               180
Pa: AAVQAVSARLSMDAIDI ETKDQ IASTASISAADPTVGEIIAEAMDKVGKGVITVEESNT
Pg: AAVEVISARLSEMAI D I ETKEHIAATATISAGDPSVGETIAEAMDKVGKGVITVEESNT
Pv: AAVQAVSARLSMDAIDI ETKDQ IASTASISAADPTVGEIIAEAMDKVGKGVITVEESNT
Mt: KAVEKVTETLLKGAKEVETKFEQIAATAAISAGDQS IGDLIAEAMDKVGNEGVITVEESNT
181                               240
Pa: FGLELELTEGMRFDKGYISPYFVTDTERMEAVLEDPYILVNSKISSLKDILLPVLEKVMQ
Pg: FGDLELLETEGMRFDKGYISPYFVTDTERMEAVLEDPYILVNSKISSLKDILLPVLEKVMQ
Pv: FGLELELTEGMRFDKGYISPYFVTDTERMEAVLEDPYILVNSKISSLKDILLPVLEKVMQ
Mt: FGLELELLETEGMRFDKGYISGYFVTDPERQEALEDPYILVNSKISSVTVKDLLLLEKVIQ
241                               300
Pa: SGKPLFVIAEDVEGEALAGLIVNKIRGTFK SVAVKAPGFGDRRKAMLNDIAILTGGQVIS
Pg: SSKPLFVIAEDVEGEALAGLIVNKIRGTFKSVAVKAPGFGDRRKAMLNDIAILTGGQVIS
Pv: SGKPLFVIAEDVEGEALAGLIVNKIRGTFKSVAVKAPGFGDRRKAMLNDIAILTGGQVIS
Mt: AGKPLFVIAEDVEGEALSTLVVKNIRGTFKSVAVKAPGFGDRRKAMLNDIAILTGGQVIS
301                               360
Pa: EEVGLSLDAVTLDDLGRARQVVVTKDEATIVDAGDSEQIAGRVSQIRKEIENSDDSDYDR
Pg: EEVGLSLDAVTLDDLGRARQVVVTKDECTIVDAGDAEQIAGRVTQIRKEIENSDDSDYDR
Pv: EEVGLSLDAVTLDDLGRARQVVVTKDEATIVDAGDSEQIAGRVSQIRKEIENSDDSDYDR
Mt: EEVGLTLENADLSLLGKARKVVVTKDETTIVEGAGDTEAIAGRVAQIRKEIENSDDSDYDR
361                               420
Pa: EKLQERLAKLAGGVAVIKVGAATEVELKERKHRIEDAVRNAKAAVEEGIIPGGVALLQA
Pg: EKLQERLAKLAGGVAVIKVGAATEVELKERKHRIEDAVRNAKAAVEEGIIPGGVALLQA
Pv: EKLQERLAKLAGGVAVIKVGAATEVELKERKHRIEDAVRNAKAAVEEGIIPGGVALLQA
Mt: EKLQERLAKLAGGVAVIKVGAATEVELKERKHRIEDAVRNAKAAVEEGIIPGGVALLQA
421                               480
Pa: SKAAEIEGLEDELTAQIVLAACTAPLKQIAINAGLEGGVVAEKVAGLPAGQGLNAAND
Pg: SKAAEIEGLEDELTAQIVLSACSAPLKQIATNAGLEGGVVAEKVANLPAGEGLNAATG
Pv: SKAAEIEGLEDELTAQIVLAACTAPLKQIAINAGLEGGVVAEKVAGLPAGEGLNAATG
Mt: APTLDELKLEGGDEATGANIVKVALEAPLKQIAFNSGLEPGVVAEKVRLNLPAGHGLNAQTG
481                               540
Pa: EYVDMVEAGHIDPAKVTRRSALQNAASIAALFLTTEAVIADKPEPVKAPAGGDMMDGMGGM
Pg: EYVDMVKAHIDPAKVTRRSALQNAASIAALFLTTEAVIADKPEPAAPAG
Pv: EYVDMVKTGIDPAKVTRRSALQNAASIAALFLTTEAVIADKPEPVKAPAG
Mt: VYEDLLAAGVADPVKVTRRSALQNAASIAALFLTTEAVIADKPEKKA
    
```

Paとアミノ酸が一致する箇所にマーカーした

Identity: Pg = 92%
Pv = 97%
Mt = 79%

Pa : *P. acnes* C1
Pg : *P. granulorum* ATCC25564
Pv : *P. avidum* ATCC25577
Mt : *M. tuberculosis* H37Rv

Fig. 6 他菌HSP60との同源性比較

Table. 1 他菌種との交差確認

bacteria	cross-reaction	bacteria	cross-reaction
<i>H. hepaticus</i>	-	<i>S. aureus</i>	+
<i>H. bilis</i>	±	<i>S. pneumoniae</i>	-
<i>H. pylori</i>	±	<i>E. faecalis</i>	-
<i>E. coli</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	-
<i>C. coli</i>	+	<i>H. influenzae</i>	-
<i>C. jejuni</i>	+	<i>P. aeruginosa</i>	±
<i>V. parahaemolyticus</i>	±	<i>P. gingivalis</i>	-
<i>S. enteritidis</i>	+	<i>P. nigrescens</i>	-
<i>B. fragilis</i>	±	<i>M. paratuberculosis</i>	-
<i>S. epidermis</i>	-	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	±
<i>S. sanguis</i>	-	<i>T. denticola</i>	±
<i>P. acnes</i> Type1	+	<i>T. forsythensis</i>	±
<i>P. acnes</i> Type2	+	<i>S. mutans</i>	-
BCG	+	<i>M. avium</i>	±
<i>B. vulgatus</i>	±	<i>M. intracellulare</i>	+
<i>F. nucleatum</i>	-	<i>M. tuberculosis</i>	+
<i>F. varium</i>	-	<i>M. fortuitum</i>	+
<i>S. pvoogenes</i>	-		

全長に渡り同源性が高いため、本研究で樹立した抗体はアクネ菌のCpn60蛋白に特異的ではなく、広く他菌種に交差するものであった (Table. 1)。

そのため、この陽性像がアクネ菌のCpn60を検出しているかを確認するために本菌特異的抗体であるPAB抗体⁷⁾を用いた染色も行い、陽性像が一致するかを確認した。PaCpn60が肉芽腫、リンパ節ともに陽性となったリンパ節症例の連続切片を用いて比較

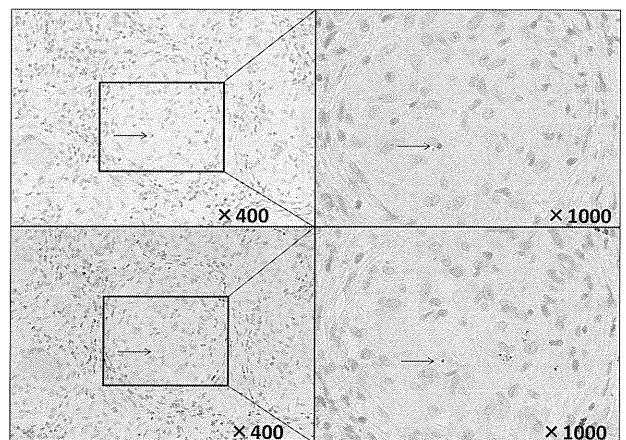


Fig. 7 サ症リンパ節における2種類の抗体の陽性像
A, B) PaCpn60抗体 C, D) PAB抗体

観察したところPaCpn60抗体とPAB抗体の陽性部位の局在は重なった (Fig. 7)。

【考 察】

PaCpn60の免疫原性について

本研究で免疫抗原性を検証したCpn60はHeat Shock Protein 60 (HSP60)とも呼ばれており、その抗

Table. 2 マウスにおける免疫アッセイ結果の比較

個体		A	B	C	D	E
ELISA (A ₄₉₀)		0.946	2.970	0.100	2.129	0.209
ELISPOT (sfc/1 × 10 ⁵ cells)	IL-2	2.0	1.0	1.3	2.7	1.0
	IFN-γ	1.7	1.7	2.3	2.3	12.3
LST (SI)		1.4	1.5	1.9	1.6	2.1

原性の高さについてはベーチェット病や関節リウマチなどをはじめ多くの疾患で言及されている^{8,9)}。しかしながら、感作マウスにおいては半数以上の個体で液性免疫の反応性を見せるも、サ症患者および健常人においては一部の個体で反応を示したに過ぎなかった。サ症の肉芽腫形成に関わる細胞性免疫においては感作・未感作マウス・サ症患者・健常人いずれにおいても反応しなかった。強い抗原性が指摘されている本蛋白に対し免疫反応が現れない理由として、本蛋白の高い交差性ゆえに宿主内で菌由来のHSP60に対するに末梢トレランスが誘導されている可能性が挙げられる¹⁰⁾。

抗体価と細胞性免疫反応の不均衡性について

PaCpn60に対する免疫反応において、アクネ菌感作マウスの半数以上では高い抗体価を有している一方、細胞性免疫反応は全く誘導されないといった興味深い結果を得た (Table. 2)。非常に微々たるものであるが、むしろ抗体価の低い個体の方でわずかに細胞性免疫の結果が高くなっていると見ることもできる。これは前述した末梢トレランスが、抗体価の高い個体でより活発に働いたと捉えることも可能である。いずれにせよ、今回検討した個体数が十分でないことを考慮すると現状で結論を出すことは難しい。

抗体スクリーニングの結果について

本研究の目的は抗原性を持つアクネ菌由来の蛋白候補の選別であり、それらが疾患特異的な免疫作用を引き起こす責任抗原であるかを検証することである。

今回の感作マウス血清を用いた抗体スクリーニングでは、Cpn60以外にもジスルフィド結合導入酵素 (DsbA) が2プラーク得られたのをはじめ11種類の酵素が1プラークずつ陽性として挙がった。

ここで注目したいのは、陽性プラークの検出に差があったことである。Cpn60では一個体のマウス血

清で4プラーク得られたが、他の二個体では1プラーク・0プラークとほとんど得られなかった。DsbAも一個体の血清から2プラーク得られたのみである。これについて、抗体作製の優先度が個体毎に異なる可能性が挙げられる。Fig. 1Bで示したPaCpn60に対する抗体価と別のアクネ菌由来蛋白の抗体価を照合したところ、同個体においていずれかが高値になった場合もう一方は低値になっていた。この比較に用いたアクネ菌由来蛋白も病原性について多数報告されている¹¹⁾。このことより、本菌のある抗原性蛋白に反応した場合、他の本菌由来の蛋白に対する免疫反応が抑えられてしまうと考えることもできる。今回は三個体の血清を用いたが、さらに数を増やせばより抗原性の高い蛋白を検出できる可能性もあると考える。

免疫組織化学染色の結果について

PaCpn60はサ症病変組織において、肉芽腫・HW小体ともに半数以上の症例で検出された。かつて責任抗原候補として得られたTrigger factorに対する抗体は、HW小体に陽性を示したのみで肉芽腫内に陽性は得られなかったのに対し⁷⁾、今回得られたPaCpn60抗体はHW小体だけでなく肉芽腫内にも反応した。本抗体はサ症肉芽腫内にアクネ菌由来の蛋白を検出した初めての抗体である。さらにはHW小体にPaCpn抗体とPAB抗体とが陽性となった事実は、本菌がL-form(細胞壁欠失型)の状態に細胞内に不顕性感染しているという報告⁷⁾を支持する大きな証拠になった。Cpn60もTrigger factorと同様シャペロン蛋白であるが、その抗原性の高さやストレス蛋白の一種であることから、肉芽腫内に本蛋白が局在していたことには何らかの意味があるものと推察される。

Cpn60以外の責任抗原候補について

今回最も多い陽性プラークとして得られたCpn60は抗原性を有しながらもその交差性の高さゆえにヒトでは末梢トレランスが誘導され、サ症の責任抗原である可能性は低いと考えられた。もうひとつ複数プラーク得られたDsbAもまた、宿主細胞への接着やマクロファージ内での複製を可能にすることで宿主に対する病原性を高める機能が報告されており、今後同様の検討する意義があるものとする。

【文 献】

- 1) GW. Hunninghake, U. Costabel, M. Ando, et al. ATS/ ERS/WASOG statement on sarcoidosis. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.** 1999. 6:149-173.
- 2) I. Ishige, Y. Usui, T. Takemura, et al. Quantitative PCR of micobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes with Japanese patients with sarcoidosis. **Lancet.** 199. 354:120-123.
- 3) Y. Eishi, M. Suga, I. Ishige, et al. Quantitative analysis of micobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes with Japanese and European patients with sarcoidosis. **J Clin Microbiol.** 2002. 40:198-204.
- 4) T. Yamada, Y. Eishi, S. Ikeda, et al. In situ localization of *Propionibacterium acnes* DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. **J Pathol.** 2002. 198:541-547.
- 5) Y. Ebe, S. Ikushima, T. Yamaguchi, et al. Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and levels of antibody to recombinant protein from *Propionibacterium acnes* DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.** 2000. 3:256-65.
- 6) ME. Cancino-Diaz, M. Sanchez-Becerra, C. Elizondo Olascoaga, et al. Amino acid regions 357-368 and 418-427 of *Streptococcus pyogenes* 60 kDa heat shock protein are recognized by antibodies from glaucomatous patient sera. **Microb Pathog.** 2010. 48:239-244.
- 7) M. Negi, T. Takemura, J. Guzman, et al. Localization of *Propionibacterium acnes* in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. **Mod Pathol.** 2012. 25(9):1284-97.
- 8) O. Shaker, MA. Ay El-Deen, H. El Hadidi, et al. The role of heat shock protein 60, vascular endothelial growth factor and antiphospholipid antibodies in Behçet disease. **Br J Dermatol.** 2007. 1:32-7.
- 9) H. de Jong, FF. Lafeber, W. de Jager, et al. Pan-DR-binding Hsp60 self epitopes induce an interleukin-10 mediated immune response in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** 2009. 7:1966-76.
- 10) HE. Wilcox, MD. Farrar, WJ. Cunliffe, et al. Resolution of inflammatory acne vulgaris may involve regulation of CD4+ T-cell responses to *Propionibacterium acnes*. **Br J Dermatol.** 2007. 156:60-465.
- 11) T. Nakatsuji, DC. Tang, L. Zhang, et al. *Propionibacterium acnes* CAMP factor and host acid sphingomyelinase contribute to bacterial virulence potential targets for inflammatory acne treatment. **PLoS ONE.** 2011. 6(4):e14797.

サルコイドーシス患者血漿を用いた アクネ菌由来責任抗原の網羅的検索

掛川 智也 上野友理佳 馬場健太郎 萬 巴里子
関谷 高弘 峰岸 佳菜 富井 翔平 今田安津子
内田 佳介 古川あすか 江石 義信*

【背景】

サルコイドーシスにおいて、アクネ菌が肉芽腫形成の原因菌となっていることが明らかになった今、責任抗原を同定することが本症の診断・治療法の開発へと繋がる。本研究室では、これまでにサルコイドーシス患者プール血漿や本菌感作動物血清および細胞を用いたアクネ菌ゲノムライブラリーに対するスクリーニングを試みてきたが、感作動物で反応性を見せるも疾患特異的に過剰な細胞性免疫反応が引き起こされる責任抗原の同定には至っていない。そこで本研究では、患者及び健常人の血漿を用いた2段階の液性免疫反応の解析により、患者に有意な免疫反応を起こしうるアクネ菌の菌体成分を同定することを目的とした。

【方法と結果】

第一段階として、53症例のサルコイドーシス患者血漿、36症例の健常人血漿を用いてアクネ菌の菌体成分に対してWestern blot法を施行した。検出されたバンドは分子量解析ソフトにより分子量を決定し、陽性バンドのサイズごとにグループ化を行った。患者特異的かつ複数の症例で認められたバンドの大きさは、IgGクラスでは、78, 67 kDa, IgAクラスでは、91, 87, 78, 74, 29, 24 kDa, IgMクラスでは、56, 51, 34 kDaであったが、いずれも陽性頻度は6% (IgAクラスの78kDaのみ8%)と低率であった。また、サルコイドーシス患者および健常人での陽性頻度が高いサイズについて陽性バンドの定量解析を行ったところ、IgAクラスの50 kDaのバンドについてはサルコイドーシスで有意に強い陽性であった。次に第二段階として、Western blot法で陽性を示したバンドの蛋白を同定する為に、アクネ菌ゲノムライブラリーを用いた抗体スクリーニング法を施行した。スクリーニングには、Western blot法で3種類以上の患者特異的な陽性バンドを示した症例、およびサルコイドーシス患者、健常人共に高い陽性頻度を認めた7症例を用いた。その結果Western blot法での陽性バンドのサイズに近似する12種類の蛋白の候補を同定した。

【考察】

また同定した12種類のうち、8種類についてはアクネ菌の膜蛋白であり、高い抗原性を有する可能性がある。現在組み換え蛋白の作成を進めており、今後ELISA法やWestern blot法によって液性免疫反応の抗原となっていることを確認するとともに、リンパ球刺激試験などによる細胞性免疫反応の解析により、本症の責任抗原であるかを検証したい。

【はじめに】

サルコイドーシスは原因不明の全身性疾患であり、病理学的には壊死を伴わない類上皮細胞肉芽腫病変の形成を特徴とする。主な病変部位はリンパ節・眼・肺・神経・心臓・皮膚である。

本症病変部からは唯一アクネ菌が分離培養されており^{1,2)}、近年本菌に対する2種類の特異的抗体を用いた免疫組織化学によりサルコイドーシス病変組織に疾患特異的に陽性所見が認められたことから、本菌が肉芽腫形成の原因菌であるとの見方が強まった³⁾。またアクネ菌は皮膚に常在しているだけでなく肺などの深部臓器に不顕性感染していることが示唆されており⁴⁾、その内因性活性化による細胞内増殖が本症の発症を引き起こしているという説が提唱されている⁵⁾。

サルコイドーシスの病因に関しては、疾患感受性のある宿主が環境中の何らかの抗原蛋白に暴露されて誘導される過敏性免疫反応に起因することは分かっているが⁶⁾、肉芽腫性炎症反応が本菌のどの成分を抗原としているかは依然として不明である。

本研究室ではこの責任抗原同定を目的として、サルコイドーシス患者プール血漿を用いたアクネ菌ゲノムライブラリーに対するスクリーニングを施行してきた。本法は液性免疫反応を指標としているが、スクリーニングにより Trigger factor というシャペロン蛋白が同定され、本蛋白がサルコイドーシス患者の約2割に疾患特異的に細胞性免疫反応を誘導することが確認された⁷⁾。

またアクネ菌感作マウス血清を用いての同様のライブラリースクリーニング、および感作マウス細胞を用いた細胞性免疫反応を指標とした抗原スクリーニングではいずれも候補蛋白が得られるも、サルコイドーシス患者において細胞性免疫反応を誘導するものではなかった。

以上のことから感作動物ではなくサルコイドーシス患者検体を用いたスクリーニングを行う必要性があるとの結論に至り検出感度を向上させた血漿スクリーニングを施行したが、使用している λ gt11 ファージミド由来の蛋白に対して1次抗体である患者血漿が非特異的に反応し、陽性反応がバックグラウンドに埋もれてしまうという問題点が浮上した。

このことを受け、本研究ではまずサルコイドーシ

ス患者および健常人の血漿を用いて、アクネ菌の菌体成分に対して Western blot法を行い、認められる陽性バンドについて分子量解析、定量解析を行った。これらの結果より、サルコイドーシスにのみ認められる陽性や、高い検出感度を示す陽性を認める患者血漿を用いて、アクネ菌ゲノムライブラリーに対するスクリーニングを行うこととし、これら2段階の液性免疫反応の解析により、サルコイドーシス患者に有意な免疫反応を起こしうるアクネ菌菌体成分を同定することを目的とした。

【材料と方法】

血漿サンプル

当大学医学部附属病院にてサルコイドーシスと組織診断された患者53例および健常人ボランティア36例の末梢血から血漿を分離し、Western blot法、ライブラリースクリーニング法の1次抗体として使用した。

これらの臨床検体を用いた解析、研究を行うにあたっては、本学医学部研究倫理審査委員会の承認を受けた(承認番号:877)。

ファージゲノムライブラリー

皮膚サルコイドーシス患者から分離培養されたアクネ菌臨床分離株(C1株)のゲノムDNAを λ gt11 ファージミド(Stratagene)にLigation後、Gigapack III Plus Packaging Extract kit (Stratagene)にてパッケージングしたライブラリーを使用した。

Western blot法

Western blot法にはアクネ菌C1株の菌体破砕液を250 μ g/laneで使用した。12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis(SDS-PAGE)により分離を行い、その後Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad)でpolyvinylidene difluoride membraneに転写した。Block Ace(DS Pharma Biomedical Co.,Ltd)で室温30分ブロッキングを行った後、患者血漿(100倍希釈)及び健常人血漿(200倍希釈)を室温で90分反応させた。2次抗体はBiotin標識されているAnti human IgG,A,M (500倍希釈 invitrogen)を、3次反応としてCy3標識 Streptavidin(3000倍希釈 GE Healthcare)を各々室温で30分反応させた。各反応の前後でT-PBSで洗浄を

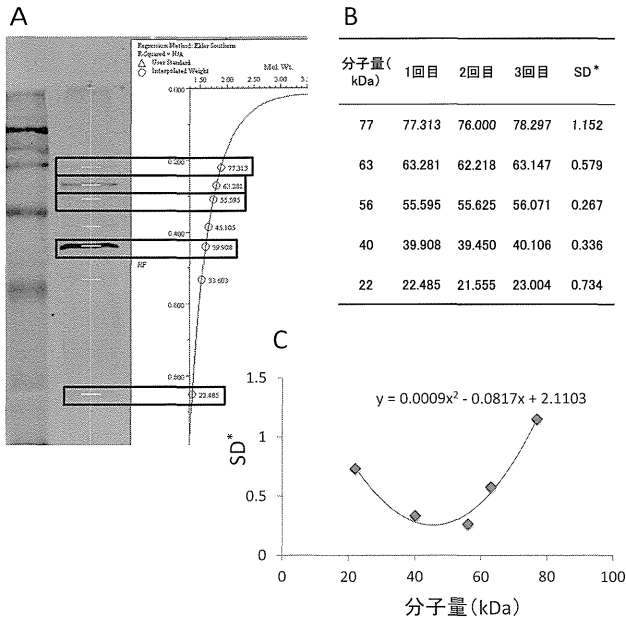


図1 分子量解析ソフトの正確性の検討
 A. 分子量解析ソフトの正確性を検討するために用いた陽性バンド
 B. 同症例の血漿を用いて3回施行したWestern blotの解析ソフトより得られた分子量とそのSD値
 C. Bで算出したSD値をプロットしたことで得られた近似曲線

行った。最後にPBSで洗浄を行い、メンブレンを乾燥させ、MOLECULAR IMAGER FX(Bio-Rad)でCy3の蛍光を読み取り解析を行った。

陽性バンドの分子量解析および定量解析

Western blot法により検出した陽性バンドはQuantity One (Bio-Rad)の分子量解析ソフトにより分子量の同定を行った。また、本解析ソフトの解析精度を検討するために、多数の陽性を認めた1例に関して3回同様にWestern blot法を行った。その後、陽性を認めた77, 63, 55, 39, 22 kDa付近のバンドについて分子量解析ソフトによりその大きさを算出した(図1A)。その後これらの結果から各々の分子量についてSD値を算出し(図1B)、SD値と分子量の平均値を用いたグラフから近似曲線を求めた(図1C)。今回作成した、近似曲線のSD最小値は0.262であった。その後、全ての症例において検出したバンドを分子量順にリストアップし、その前後の差が0.262より小さいものを同じサイズのグループとして分類を行った。陽性バンドの定量解析についても同様にQuantity Oneのソフトを用いて行った。

ライブラリースクリーニング法⁸⁾

0.7 %Bacto agarの入ったNZY brothにSM buffer, ファージゲノムライブラリー, 吸光度600nm=0.5に調整した大腸菌Y=1090r株液を混合し, NZY plateに撒いて5時間培養した。小さなプラークの形成を確認し, IPTGに浸漬したセルロースメンブレンをNZY plateにのせて転写を5時間行った。メンブレンを剥がして免疫染色を施行した。免疫染色はWestern blot法と同様の方法で施行した。免疫染色後, メンブレンをイメージャーに取り込んで陽性シグナルを確認し, プレートと照らし合わせて陽性プラークをSM buffer+クロロホルムに回収し, プラーク溶解液とした。

Direct Sequence法による挿入配列の解読

陽性プラーク溶解液に対してλgt11ファージミドのアーム配列で作成したプライマーを用いてPCRで挿入配列部分を増幅した。プラーク溶解液は94℃ 15分煮沸したものをtemplateとして用いた。PCR産物をアガロース電気泳動にて確認し, バンドを切り出し, DNAをガラスビーズ吸着法(MagExtractor -PCR&Gel Clean up- Kit : TOYOBO)で精製した。精製したDNA溶液をPCRで使用したものと同一のプライマーでBig Dye Terminatorと反応させ蛍光色素を標識した。スピнкаラムで精製し, ホルムアミドに溶解して, Applied Biosystems社のオートシーケンサー AB3100にて挿入配列の解読を施行した。得られた遺伝子配列はアミノ酸配列に翻訳し, BLASTpで遺伝子名を同定するとともにシグナルペプチド予測解析(SignalP 4.1; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)および菌体における局在予測解析(PSORT; <http://psort/hgc.jp>)を行った。

【結 果】

Western blot法による検出結果

サルコイドーシス患者血漿および健常人血漿によるWestern blot法の検出結果の一例を図2に示す。IgGクラスでは, ほぼすべての症例で20 kDa付近にアクネ菌の菌壁中に多量に存在するリポテイコ酸と思われるラダー状の陽性が認められたが, IgA, IgMでは一部の症例でラダー状の陽性を認めたのみであった。

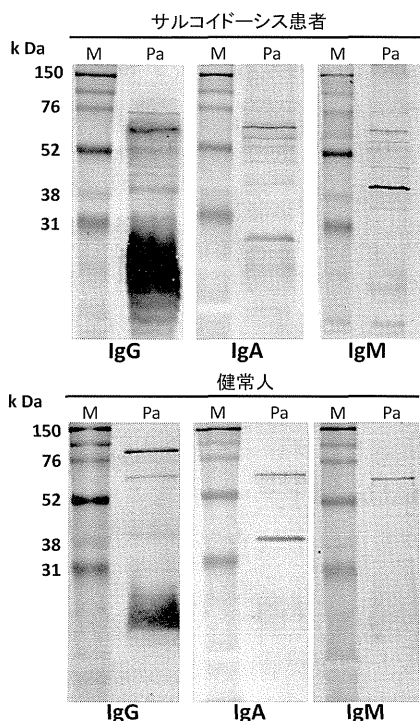


図2 Western blot法による結果 (一例)
M: サイズマーカー
Pa: アクネ菌菌体破砕液 (250 μg/lane)

患者、健常人ともに多くの症例でアクネ菌菌体成分に対する多数の陽性バンドを認めた。それらは一定のパターンは示さず、個体ごとに異なるパターンを示した。

分子量解析による陽性サイズのカテゴリ

サルコイドーシス患者 53 例、および健常人 36 例で認められたすべての陽性バンドについて分子量解析を行い、大きさのカテゴリを行った。図3にカテゴリした陽性バンドの検出頻度を示す。

患者特異的かつ複数症例認められたバンドの大きさは、IgGクラスでは78, 67 kDa, IgAクラスでは91, 87, 78, 74, 29, 24 kDa, IgMクラスでは56, 51, 34 kDaであった。陽性頻度はIgAクラスの78 kDaでは8%, それ以外は全て6%であった。

Western blot法における陽性バンドの定量解析

分子量解析により得られたカテゴリ結果より、サルコ

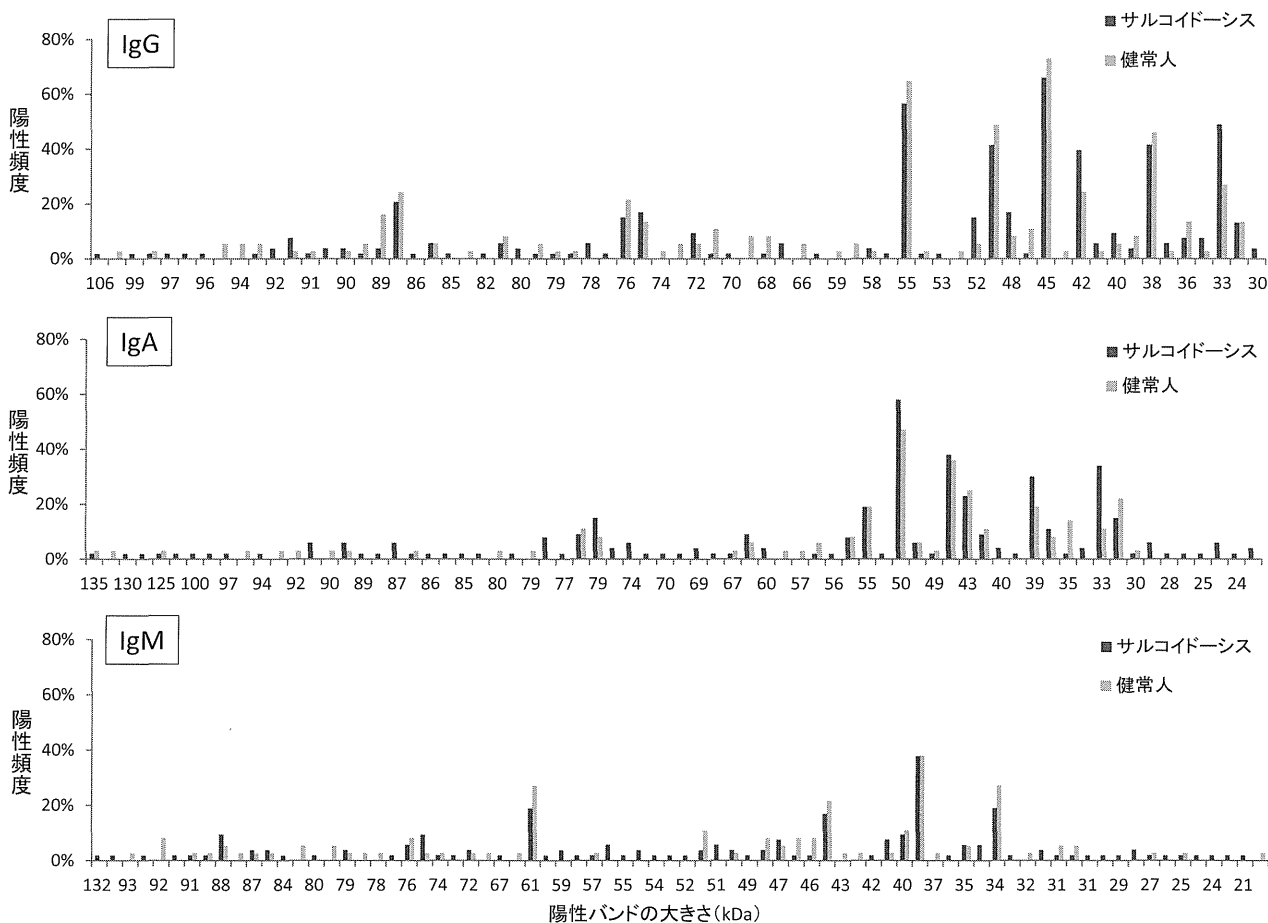


図3 各クラスにおける陽性バンドの大きさごとの頻度