

2. 肺サルコイドーシスにおける肺胞マクロファージ及び肺胞上皮関連自己抗原および自己抗原反応性 single-chain antibody の解析

千葉大学大学院医学研究院 加齢呼吸器病態制御学

黒 須 克 志, 滝 口 裕 一

岡 田 理, 巽 浩一郎

栗 山 喬 之

はじめに

肺サルコイドーシスは全身性の非乾酪性肉芽腫病変形成を主張とする原因不明の疾患であるが、眼病変（眼サルコイドーシス）から発見されることも多い。眼サルコイドーシスには特徴的な眼病変が揃い、眼サルコイドーシスが強く疑われるが、全身検査陽性所見が乏しく、診断基準を満たさずに疑診にとどまる症例も稀ではない。肺サルコイドーシスの診断には気管支肺胞洗浄検査（以下BAL）が行われており、BAL液中に多くの炎症細胞、とりわけCD4陽性リンパ球の増加が確認されたことの報告があり、PCR法によるBAL液中のCD4陽性T細胞Vα/β遺伝子再構成の検索では、抗原特異的なT細胞増生が肺サルコイドーシスに認められ、HLAクラスII抗原の抗原収容溝に収まった抗原ペプチドとHLA抗原の複合体と適切に結合する構造を持ったT細胞抗原受容体を有するT細胞レパトリーが抗原特異的免疫反応によって増殖したことを意味し、疾患関連抗原の存在が示唆されている。

方 法

II型肺胞上皮癌培養株からmRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成後、得られたcDNAライブラリーを蛋白発現ベクター（ZAP発現ベクター）に組み込み作成したファージを大腸菌に感染させ、cDNAのコードする蛋白を大腸菌に発現させた。そしてcolony hybridization法によって、肺サルコイドーシスの血清およびBAL液中の免疫グロブリンと結合するプラークを選別し、陽性ファージをファジェミドベクターに変換後、シークエンスによって特異的蛋白の塩基配列を決定した。ホモロジー検索によって蛋白の構造を決定し、肺サルコイドーシス/眼サルコイドーシスの血清中およびBAL液中に存在する自己抗体の認識自己抗原の同定を行った。

結 果

肺サルコイドーシス特異的自己抗体として、抗poly a binding protein 1抗体、抗1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5 kinase isoform c抗体、抗retinal short-chain dehydrogenase/reductase (ret SDR2)抗体、抗S-adenosylhomocysteine hydrolase抗体、抗macrophage

migration inhibitory factor抗体、抗protein synthesis initiation factor 4a-II抗体、抗cytochrome c reductase core protein抗体、抗oxidoreductase protein抗体、抗transforming growth factor beta 2抗体の検出に成功した。また、眼サルコイドーシスの検出マーカー（肺胞&眼共通抗原）として抗retinal short-chain dehydrogenase/reductase (ret SDR2)抗体、抗trabecular meshwork構成蛋白（accession number: CD676906, CD677025, CD677068）抗体、抗ocular pericyte構成蛋白（CD 066293）抗体、抗網膜構成蛋白（BQ637781）抗体、抗レンズ構成蛋白（CD674.39）抗体を認めた。

考 察

SEREX法は、約1万個のcDNAの中で数個程度しか存在しない自己抗原発現cDNAに対しても検出が可能であり、微量の自己抗原の検出に適した方法である。このSEREX法により肺癌をはじめとする様々な腫瘍関連抗原が同定されている。即ちSEREX法は自己抗原検索においては強力で有用な手法であり、これを用いた報告として、サルコイドーシス関連自己抗体の検索に関して一文献のみ報告がある[1]が、同報告はPropionibacterium acnes菌のDNAを組み込んだファージを用いたSEREX解析であり、ひと組織における自己抗原の検索は報告がない。肺胞内腔にはその構成細胞として、II型肺胞上皮と肺胞マクロファージがあげられる。肺胞腔内でサルコイドーシス特異的な抗原抗体反応が生じているのであれば、構成細胞として大部分を占める肺胞上皮やマクロファージが有する蛋白が抗原として働いているのではないかと推察した。肺胞上皮が発現する蛋白を非常に鋭敏な方法（SEREX法）で解析を行うことで、肺サルコイドーシスの患者血清中に存在する自己抗体の検出が可能であることを見いだした。以下具体的に示すが、我々の発見した9種類の自己抗体は比較的高頻度で肺サルコイドーシス症例の血清中に存在し、これらのうちのひとつであるretinal short-chain dehydrogenase/reductase (ret SDR2)とtrabecular meshwork構成蛋白（accession number: CD676906, CD677025, CD677068）、ocular pericyte構成蛋白（CD066293）、網膜構成蛋白（BQ 637781）、レンズ構成蛋白（CD674.39）は肺胞上皮と網膜に共通に存在する蛋白であることから、肺胞腔内で肺胞上皮やマクロファージから流出した自己抗原蛋白が抗原となって抗体産生が生じ、この蛋白は網膜にも発現している蛋白のため、これらの異常な自己抗体が眼サルコイドーシスの眼病変の病因の一因であり、これらの自己抗体の測定は眼サルコイドーシスの診断に有用であることを発見した。これらを組み合わせることによって、肺サルコイドーシスおよび眼サルコイドーシスの正確な血清学的診断が可能となると思われた。

文 献

- 1) Ebe Y, Ikushima S, Yamaguchi T, Kohno K, Azuma A, Sato K, Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y. Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and levels of antibody to recombinant protein from *Propionibacterium acnes* DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis, *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2000; 17: 256-65.

3. 肝細胞癌におけるエピジェネティック修飾異常による発現異常蛋白の網羅的解析

千葉大学医学部附属病院 消化器内科
深 井 健 一

はじめに

多くの癌の発育や進展において癌抑制遺伝子の機能低下が深く関与している。近年、遺伝子の体細胞変異や欠損、染色体異常などのジェネティックな異常ではなく、DNAのメチル化やヒストン蛋白のアセチル化といったエピジェネティックな変化により発現が抑制されている癌抑制遺伝子の存在が明らかになってきた。これらの変化の多くは癌特異的であることから診断的価値が高く、また可逆性であるので治療の面からも癌特異的な効果が期待される。これまでに癌における異常メチル化はp16遺伝子をはじめとして20種類以上の遺伝子に関して報告されている。肝細胞癌に関してはp16、E-カドヘリン、SOCS-1、14-4-3σ、GST-P1などがメチル化により発現抑制されていることがわかっているが、多数の遺伝子についての網羅的な解析はほとんどなされていない。そこでわれわれは肝臓においてメチル化異常により転写が抑制されている遺伝子を検出するために、肝癌培養細胞を脱メチル化剤で処理することにより発現が回復する遺伝子についてcDNAマイクロアレイを用いて解析し発癌の抑制に関与する遺伝子の同定を試みた[1,2]。さらにメチル化と密接に関連するヒストンアセチル化に関してもヒストン脱アセチル化酵素阻害剤で処理することで肝細胞癌の増殖が抑制されることを確認し、エピジェネティック修飾の異常により抑制された遺伝子の解析を行った[3]。

方 法

1. 脱メチル化剤処理により発現上昇した遺伝子のプロモーター領域CpGアイランドのメチル化の解析: ①まず脱メチル化剤5-Aza-CdRを用いて6種類の肝癌培養細胞(HLE, HuH7, Hep3B, HepG2, HuH6, PLC/PRF/5)を処理した後に発現の増加する遺伝子を

DNAマイクロアレイにより検出した。②次に各肝癌培養細胞からDNAを抽出し、Sodium bisulfiteにより化学修飾した後、2段階PCRにより増幅した産物をTAクローニング法にてサブクローニングし、シーケンスを行った。③肝癌組織および非癌部肝組織よりDNAを抽出し、bisulfite sequencingにより決定されたメチル化マップに基づいてプライマーを設定し、methylation-specific PCR (MSP) 法を用いて、多数の肝癌症例での各遺伝子のメチル化の頻度を検討した。2. 脱メチル化剤およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理で発現上昇する遺伝子の検討: ①肝癌細胞を5-Aza-CdRおよびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(Trichostatin A)で処理した後に発現の増加する遺伝子をDNAマイクロアレイにより検出した。②次に発現変化が見られた遺伝子のDNAメチル化とヒストンアセチル化状態についてbisulfite sequencing法および抗アセチル化ヒストンH3抗体およびH4抗体を用いたchromatin immunoprecipitation (ChIP) assayにて検討した。

結 果

DNAマイクロアレイの結果、5-Aza-CdRにより5倍以上の発現増加が認められた遺伝子は50個あった。その中で転写開始領域にCpGアイランドが存在するものは34個であった。それらのプロモーター領域のメチル化状態を検討した結果、HGF activator inhibitor 2/placental bikunin (HAI-2/PB)をはじめとして、COL1A2, CTGF, IGFBP2, CSRP1, NQO1, FN1, CAV1, KLF6 geneの異常メチル化が肝癌細胞において起こっていることが明らかとなった。HAI-2/PB, NQO1 geneについて実際の肝癌症例で検討したところ、非癌部に比較して癌部において有意に異常メチル化の頻度が高いことが分かった($P<0.001$)。RT-PCR法によりこれら遺伝子のmRNA発現量を解析したところ、異常メチル化が認められた癌部においては非癌部よりも転写が抑制されていることが確認され、プロモーター領域の異常メチル化と発現量とは逆相関を認めた。ChIP assayによる解析では各遺伝子のDNAメチル化状態とヒストン蛋白のアセチル化には相関が見られ、この2種類のエピジェネティック修飾は共同して該当する遺伝子の転写を制御していると考えられた。

考 察

肝癌細胞を用いた解析により多数の遺伝子の異常メチル化が新たに同定された。この方法をより多くの遺伝子を対象として行うことにより、未知の癌抑制遺伝子を発見する可能性が考えられた。また癌抑制的に機能する遺伝子が脱メチル化剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の投与により発現回復することで肝癌の発育増殖が抑えられ、新たな治療法の開発につながることを期待される。