

# AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

耳鼻咽喉科免疫アレルギー (2003.06) 21巻2号:84～85.

掌蹠膿疱症扁桃におけるSmadの解析

高原幹, 野澤はやぶさ, 岸部幹, 柳内充, 片山昭公, 今田正  
信, 林達哉, 野中聡, 原渕保明

### 37. 掌蹠膿疱症扁桃における Smad の解析

○高原 幹, 野澤はやぶさ, 岸部 幹, 柳内 充, 片山昭公, 今田正信, 林 達哉, 野中 聡, 原淵保明  
旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

Analysis of Smad proteins in tonsils of pustulosis palmaris et plantaris

Takahara M, Nozawa H, Kishibe K, Yanai M, Katayama A, Imada M, Hayashi T, Nonaka S, Harabuchi Y  
Dept. of Otolaryngology-Head and Neck surgery, Asahikawa Medical College

#### 1. 目的

掌蹠膿疱症は主として手掌、足底に無菌性膿疱を形成する慢性皮膚疾患であり、扁桃病巣感染症の最も代表的な疾患として知られている。本疾患における口蓋扁桃リンパ球を用いた発症機序の検討は種々報告されているが、その中でも口腔常在菌である $\alpha$ 溶連菌に対する過剰免疫応答が注目されている。免疫反応は一般的に抗原提示細胞とT細胞の抗原の受け渡しから始まるとされるため、我々はT細胞を制御するサイトカインであるTGF- $\beta$ に着目し検討を進めてきた。しかし、掌蹠膿疱症扁桃にてCD25陽性の活性化Tリンパ球は増加しているものの、扁桃T細胞のRT-PCRではTGF- $\beta$  mRNAの発現に疾患群間の差は認められなかった。最近、TGF- $\beta$ の細胞内シグナル伝達物質であるSmad蛋白が同定された。そのSmad群の中でもその伝達経路を抑制し、TGF- $\beta$ 細胞内不応答を助長する抑制型smad (Smad 7) が特に注目を集めている。自己免疫疾患との関わりでは、掌蹠膿疱症と同様に粘膜免疫異常がその病因に関与するとされるクローン病にてSmad 7の発現上昇が報告されている<sup>1)</sup>。我々の検討でも扁桃T細胞のRT-PCRにて掌蹠膿疱症群でのSmad 7 mRNA過剰発現を認めた。今回はその発現を蛋白レベルにて検討したので報告する。

#### 2. 対象・方法

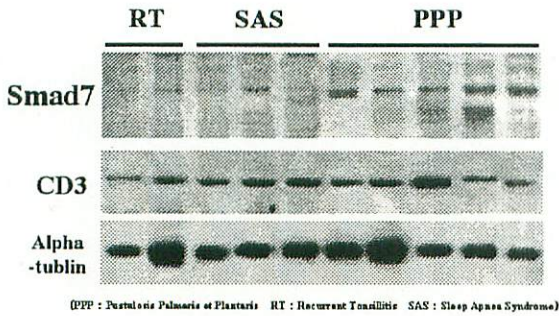
旭川医科大学医学部付属病院耳鼻咽喉科にて扁桃摘出術にて得られた口蓋扁桃を用いた。対象の内訳はuvulopalatopharyngoplasty (UPPP)を試行した睡眠時無呼吸症例3例(男:女=1:2、37-65歳、中央値37歳)、習慣性扁桃炎症例2例(男:女=1:2、31-46歳、中央値38歳)、掌蹠膿疱症例5例(男:女=1:4、23-62歳、中央値51歳)

である。

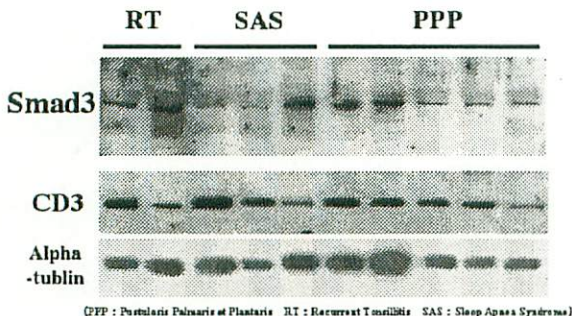
方法としては、比重遠沈法により扁桃リンパ球を分離し、磁気ビーズ法(CD3 microbeads: Miltenyi Biotec)によりCD3陽性細胞を選択した。次に超音波粉碎器により蛋白を抽出し、BCA assayにより蛋白濃度測定、蛋白濃度を均一化した後、NuPAGE Bis-Tris Gel (Invitrogen)によるSDS-PAGEを行った。泳動後のゲルをセミドライ方式によりPVDF膜(MILLIPORE)へ転写し、膜を5%スキムミルクにより一晩ブロッキングを行った。翌朝一次抗体(ウサギ抗ヒトSmad 3, Smad 7抗体: SANTA CRUZ:  $\times 200$ )(マウス抗ヒトCD3抗体: ニチレイ:  $\times 200$ )(マウス抗ヒト $\alpha$ -Tubulin抗体: SANTA CRUZ:  $\times 500$ )溶液、二次抗体(HRPウサギ/マウスIgG抗体: Amersham:  $\times 2500$ )溶液内で各1時間振盪し、ECL (Amersham)による化学発光を行った後、X線フィルムへ現像を行った。現像後のフィルムのバンド濃度をデンシトメータにて測定し、 $\alpha$ -Tubulinにて補正を行った後、疾患群間での有意差を検討した。

#### 3. 結果

Smad 7のウエスタンプロットの結果を図1に示す。掌蹠膿疱症群にてバンド濃度の上昇を認めた。CD3、 $\alpha$ -Tubulinのバンド濃度は比較的均一であり、T細胞の蛋白が確実に抽出されていることが解る。Smad 3のウエスタンプロットの結果を図2に示す。疾患群間に明らかな差は認められなかった。 $\alpha$ -Tubulinにて補正後したバンド濃度の解析結果を図3に示す。掌蹠膿疱症扁桃Tリンパ球においてSmad 7蛋白が有意に過剰発現していた。



(PPP: Postulosis Palmaris et Plantaris RT: Recurrent Tonsillitis SAS: Sleep Apnea Syndrome)  
 図1 扁桃 CD3<sup>+</sup> 細胞における Smad 7 蛋白の Western Blotting



(PPP: Postulosis Palmaris et Plantaris RT: Recurrent Tonsillitis SAS: Sleep Apnea Syndrome)  
 図2 扁桃 CD3<sup>+</sup> 細胞における Smad 3 蛋白の Western Blotting

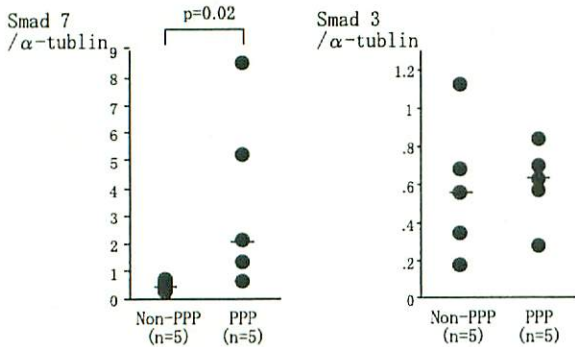


図3 デンシドメーターによる半定量的解析

#### 4. 考察

掌蹠膿疱症扁桃 T リンパ球では、Smad 7 の過剰発現により TGF- $\beta$  の細胞内シグナル伝達が抑制され、その活性化を促す可能性が示唆された。これらの変化は T リンパ球の活性化の根幹に位置するものなのか、2 次性的変化に過ぎないのかは不明であるが、少なくとも T リンパ球の過剰な活性化は B 細胞のポリクローナルな活性化を促す危険性があり、自己抗体等を産生する地盤になり得ることが予想される。

問題はなぜ Smad 7 が過剰発現しているのかである。残念ながら Smad は最近同定された蛋白であり、その制御に関してはほとんど解明されていない。過剰な TGF- $\beta$  刺激に対する negative feed-back 機能を持つとする論文も認められるが<sup>2)</sup>、今回は TGF- $\beta$  自体の過剰発現は認められないためそれが関与する可能性は少ないと考える。しかし、Smad 蛋白の研究は急速に進んでおり、今後それを制御する因子も多数同定される事が予想される。それをふまえ、今後も検討を進めてゆくつもりである。

#### (参考文献)

- 1) Monteleone, G., Kumberova, A., et al.: Blocking Smad 7 restores TGF- $\beta$  signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 108: 601-609, 2001.
- 2) Takase, M., Imamura, T., et al.: Induction of Smad 6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 244: 26-29, 1998.