

# AMCoR

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

口腔・咽頭科 (2002.06) 14巻3号:299～304.

掌蹠膿疱症扁桃でのホーミングケモカインの検討

高原幹, 岸部幹, 野沢はやぶさ, 石田芳也, 柳内充, 片山昭  
公, 林達哉, 今田正信, 原淵保明

掌蹠膿疱症扁桃でのホーミングケモカインの検討  
A study of homing chemokins SLC, ELC,  
and BLC in tonsils of pustulosis palmaris et  
plantaris .

略題：扁桃組織でのケモカイン

旭川医科大学耳鼻咽喉科

高原 幹、岸部 幹、野沢 はやぶさ、  
石田 芳也、柳内 充、片山 昭公、  
林 達哉、今田 正信、原渕 保明

別刷り、校正先

〒078-8510

北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1番1号

旭川医科大学耳鼻咽喉科教室

高原 幹

## 要約

掌蹠膿疱症の口蓋扁桃組織の特徴として、T細胞領域の拡大とB細胞領域の縮小が報告されている。この特徴は掌蹠膿疱症の免疫異常を反映している可能性があり、その病理学的特徴の成因を検討することは、本疾患の発症機序の解明に繋がると考えられる。

その検討の一つとして、今回我々はSLC、ELC、BLCのホーミングケモカインに注目し、RT-PCRにて習慣性扁桃炎3例、睡眠時無呼吸症候群3例、掌蹠膿疱症4例におけるそれぞれのケモカインmRNAを検討した。

キーワード：

掌蹠膿疱症、ケモカイン、扁桃病巣感染症

初めに

掌蹠膿疱症は主に手掌及び足蹠に無菌性小膿疱を生じる難治な原因不明の慢性皮膚疾患であり、扁桃摘出術による有効率が90%と極めて高く、代表的な扁桃病巣感染症2次疾患とされている<sup>1)</sup>。この掌蹠膿疱症扁桃の組織構築の特徴としてB細胞領域が縮小し、T細胞領域が拡大する<sup>2)</sup>ことが報告されている。B細胞領域の縮小はMRL/lpr自己免疫疾患マウスのリンパ節でも言われており<sup>3)</sup>、自己免疫疾患としての掌蹠膿疱症を反映している可能性がある。よって掌蹠膿疱症の発症機序を解明するためには、B細胞領域の縮小、T細胞領域の拡大をきたす原因を検討することが重要であると思われる。

二次リンパ組織に発現し、リンパ球のホーミングを司るものとしてSLC(secondary lymphoid tissue chemokine)、ELC(EBI-1 ligand chemokine)、BLC(B lymphocyte chemoattractant)が挙げられる。SLC,ELCはT細胞領域を形成するのに必須なケモカインであり、BLCはB細胞のB

細胞領域へのホーミングを担うケモカインであると言われている<sup>4)</sup>。今回、これらのケモカインが掌蹠膿疱症扁桃のB細胞領域の縮小、T細胞領域の拡大に関与しているか検討するために、睡眠時無呼吸症候群、習慣性扁桃炎、掌蹠膿疱症の各口蓋扁桃におけるSLC, ELC, BLCのmRNA発現を検討した。

## 対象

旭川医科大学医学部附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=3:0、32-49歳、中央値37歳)、習慣性扁桃炎症例3例(男:女=1:2、28-34歳、中央値34歳)、掌蹠膿疱症例4例(男:女=1:2、38-47歳、中央値42歳)である。

## 方法

1 : RNA の抽出

RNA の抽出は acid

guanidinium-phenol-chloroform 法 (AGPC 法) を用いて行った。すなわち、扁桃組織をセパゾール RNA I (チオシアン酸アンモニウム、酢酸ナトリウム、フェノール、8-キノリノール、グリセロールを含有：ナカライタスク) 1 ml を加え溶解し、室温で 5 分間放置した後、クロロホルム 200 ml を加え混合した。分離した水層を回収し、等量のイソプロピルアルコールを加えて沈殿させ、エタノールで洗浄を行った。得られた RNA 量は分光光度計 (Genequant pro, Amersham pharmacia biotech, Cambridge, England) による吸光度測定から算出された。

## 2 : DNase 処理

DNA の汚染を防ぐため DNase 処理を行った。

得られた RNA 25 ug を総量 25 ul とし、 $10\times$  DNase Buffer 2.8 ul (MessageClean : GenHunter, Nashville, USA)、DNase I 0.5 ul (MessageClean : GenHunter, Nashville, USA) を加え  $37^{\circ}\text{C}$  にて 30 分反応させた。次に酸性フェ

ノール 15  $\mu$ l、クロロホルム 5  $\mu$ l を混合し、氷上で 10 分静置した後、遠沈分離した水層を回収し、3 M 酢酸ナトリウム溶液 2.5  $\mu$ l、100% エタノール 100  $\mu$ l を混和した。-80  $^{\circ}$ C にて 1 時間静置し、遠沈にて RNA を沈殿させ、エタノールで洗浄を行った。再度分光光度計により RNA 量を算定した。

3 : reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR には DNA サーマルサイクラー (PTC-0100; MJ - Research, Waltham, USA) を用いた。DNase 処理を行った RNA 0.3  $\mu$ g に 250 mM dNTP 2.4  $\mu$ l、5  $\times$  RT Buffer 6  $\mu$ l (GenHunter, Nashville, USA)、2  $\mu$ M Oligo d(T) 3  $\mu$ l (GenHunter, Nashville, USA) を加え 65  $^{\circ}$ C 5 分、37  $^{\circ}$ C 10 分反応させた後 MMLV reverse transcriptase (GenHunter, Nashville, USA) を 1.5U 混和した。その後 37  $^{\circ}$ C 50 分、75  $^{\circ}$ C 5 分と反応を継続し cDNA を作成した。引き続き、得られた cDNA をテンプレートとして 2  $\mu$ M の PCR プライマーおよび 1 U AmpliTag Gold

DNA polymerase (Roche Molecular Systems, Branchburg, USA)を加えて 95 °C、10 分のホットスタートを行った後、95 °C 1 分、60 °C 1 分、72 °C 1 分の反応を 1 サイクルとして PCR 反応を行った。得られた PCR 産物はエチジウムブロマイドを含む 1 % アガロースゲルにて電気泳動を行い、紫外線照射により増幅された DNA 断片を可視化した。

今回検討したものはヒト  $\beta$ -アクチン、SLC、ELC、BLC であり使用したプライマー、増殖される DNA 断片の大きさ、PCR のサイクル数を表 1 に示した。ケモカインに対するプライマーはすべて異なるエクソンをまたいだ配列となっている。また、各症例において得られた RNA の内部標準として  $\beta$ -アクチンの mRNA の検出も同時に行った。陰性対象として逆転写反応の際に逆転写酵素を加えずに同様の反応を行ったものを作成し、PCR 産物が認められないことを確認した。

#### 4 : mRNA の半定量的解析

mRNA の半定量的解析は、電気泳動にて検出された



PCR 産物のバンド濃度をデンシドメーターにて測定し検討した。RNA 量の指標には、各実験の誤差を補正するために、同一症例の  $\beta$ -アクチンのバンド濃度に対する比率を算出した。

## 5 : 統計

疾患群別のサイトカイン mRNA 発現量の比較には Kruskal - Wallis の検定を、各ケモカイン発現の相関には Spearman の順位検定を用いて統計学的解析を行い、危険率 5 % 未満を有意とした。

## 結果

対象の 10 症例におけるケモカイン SLC、ELC、BLC それぞれの mRNA の発現を検討した。電気泳動の結果を図 1 に示す。半定量的解析では BLC 発現において掌蹠膿疱症症例では習慣性扁桃炎症例に対して有意に低下を認めた。(図 2)。それ以外には有為な相関を認めなかった。

## 考察

身体のいずれかの部位に限局した慢性炎症があ

り、それ自体はほとんど無症状か、ときに軽敏な症状にとどまるが、それが原病巣となり、遠隔の諸臓器に反応性の器質的あるいは機能障害としての二次疾患を引き起こす病態が病巣感染症である。原病巣と考えられる臓器としては口蓋扁桃が最も多く、扁桃病巣感染症の二次疾患として掌蹠膿疱症、IgA腎症、尋常性乾癬、アレルギー性紫斑病、ベーチェット病、胸肋鎖骨過形成症などがある。その中でも、掌蹠膿疱症は、主に手掌及び足蹠に無菌性小膿疱を生じる難治な原因不明の慢性皮膚疾患であり、扁桃摘出術による有効率が90%と極めて高く、代表的な扁桃病巣感染症二次疾患とされている<sup>1)</sup>。

この掌蹠膿疱症扁桃の組織構築の特徴としてB細胞領域が縮小し、T細胞領域が拡大する<sup>2)</sup>ことが報告されている。当科での検討でも掌蹠膿疱症、IgA腎症、尋常性乾癬、アレルギー性紫斑病扁桃において同様の特徴がある<sup>5、6)</sup>ことを報告した。B細胞領域の縮小はMRL/lpr自己免疫疾患マウスのリンパ節でも言われており、自己免疫疾患とし

ての掌蹠膿疱症を反映している可能性がある。現在までの精力的な掌蹠膿疱症の発症機序に関する研究から、口腔常在細菌である $\alpha$ 溶連菌への過剰反応がきっかけとなり、抗ケラチン抗体などの自己抗体が産生され、その免疫複合体が掌蹠皮膚に沈着し組織障害を起こす、いわゆる3型アレルギーが病態の中心であることが推測されている<sup>7)</sup>。しかしこの様な3型アレルギーの代表的疾患であるSLEの2次リンパ組織はB細胞領域の拡大を伴っており<sup>8)</sup>、重症筋無力症の胸腺でもB細胞領域の拡大が認められる<sup>9)</sup>。この組織構築の違いは掌蹠膿疱症の発症機序に3型アレルギー以外の機序も働いている可能性を示唆する。この機序を解明するためには、B細胞領域の縮小、T細胞領域の拡大をきたす原因を検討することが重要であると思われる。

リンパ球を初めとして樹状細胞、単球、顆粒球を含めた白血球に遊走を促す一群のサイトカインをケモカインと総称している。これらのケモカインは遊走を促すだけでなく、白血球の活性化や、

発生、分化、造血、炎症などさまざまな生物学的反応に関与していることが報告されている。最近、二次リンパ組織における T 細胞領域と B 細胞領域の形成には、ケモカインが重要な働きをしていることが分かってきた。そのケモカインのなかでも、二次リンパ組織に発現し、リンパ球のホーミングを司るものとして SLC (secondary lymphoid tissue chemokine) 、 ELC (EBI-1 ligand chemokine)、BLC (B lymphocyte chemoattractant) が特に注目されている。リンパ球の血流からリンパ節へのホーミングの窓として血管内皮に存在する HEV (High Endothelial Venule: 高内皮細胞) が挙げられるが、SLC はその HEV に発現している<sup>10)</sup>。また、SLC と受容体を共有する ELC は主に活性化した樹状細胞から分泌される<sup>11)</sup>。両ケモカインともにノックアウトマウスを使った実験から、ナイーブ T 細胞の強力な遊走因子であり、T 細胞領域を形成するのに必須なケモカインであると言われている<sup>10)、11)</sup>。一方、濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell: FDC) から分泌さ

れると言われている BLC は B 細胞の B 細胞領域へのホーミングを担うケモカインであると言われている<sup>1,2)</sup>。今回、これらのケモカインが掌蹠膿疱症扁桃の B 細胞領域の縮小、T 細胞領域の拡大に関与しているか検討するために各疾患での睡眠時無呼吸症候群、習慣性扁桃炎、掌蹠膿疱症の各口蓋扁桃における SLC, ELC, BLC の mRNA 発現を解析した。

結果は、バンド濃度の半定量的解析にて習慣性扁桃炎扁桃と比較して、掌蹠膿疱症扁桃における BLC の mRNA 発現低下を認めた。

症例数が少なく結果の解釈には慎重にならざるを得ないが、慢性関節リウマチにおける B 細胞領域を含む滑膜にて BLC の mRNA 発現が増加している報告<sup>13)</sup>も加味すると、掌蹠膿疱症扁桃での BLC 発現低下が B 細胞領域の縮小に関与している可能性が示唆された。BLC の産生細胞は上述したように FDC と言われており、発現の低下は FDC の機能異常が原因となっている可能性がある。FDC の役割は抗原を分解しないまま、数年にわたって抗原を

その細胞内に保持し、免疫グロブリン遺伝子の変異によって多様化した胚中心 B 細胞の選択を行うことであると言われて<sup>1,4)</sup>。この選択が障害されると、自己抗体を産生する B 細胞がアポトーシスを免れ、自己免疫疾患を促す可能性がある。実際に MRL/lpr 自己免疫疾患マウスのリンパ節は掌蹠膿疱症扁桃と同様に B 細胞領域が小さく、T 細胞領域が大きいという組織像を呈すが、その原因は FDC の機能異常に起因すると言われ、その機能異常が自己抗体を産生する機序の一つであろうと言われている<sup>3)</sup>。よって掌蹠膿疱症扁桃でも同様に FDC の機能異常がその発症機序に関与している可能性がある。今後 FDC を始めとしたより上流に位置する免疫応答についてさらに検討する予定である。

## まとめ

1. 睡眠時無呼吸症候群、習慣性扁桃炎、掌蹠膿疱症の各口蓋扁桃における SLC, ELC, BLC の mRNA 発現を RT-PCR にて検討した。
2. バンド濃度の半定量的解析にて、習慣性扁桃炎と比較して掌蹠膿疱症症例での BLC mRNA 発現低下を認めた。

## 引用論文

- 1) 原 潤 保 明 : 扁桃病巣感染症と扁桃摘出術の有用性 . 日本醫事新報 3943. 37-43、1999.
- 2) Sakai T, Kawaguchi M, Ishizawa S, et al : Histological features of palatine tonsils in pustulosis palmaris et plantaris: A morphometric study. Pathol Int 44: 186-193、

1994.

- 3) Masuda A, Kasajima T: Follicular dendritic cell dysfunction and disorganization of lymphoid structures in MRL/lpr mice. Lab Invest 79: 849-857, 1999.
- 4) 恒内 史堂、中野 秀樹: リンパ組織形成とケモカイン. 臨床免疫 34: 648-655, 2000.
- 5) 高原 幹、板東 伸幸、今田 正信、他: 乾癬における扁桃摘出術の有用性と扁桃の免疫組織学的検索. 日耳鼻 104: 13-27, 2001.
- 6) 高原 幹、荻野 武、小林 吉史、他: アレルギー紫斑病での扁桃摘出術 -その有用性と免疫組織学的検索-. 耳鼻臨床 94: 525-530, 2001.
- 7) 原渕 保明: 扁桃病巣感染症の発症機序、形浦昭克 編: 今日の扁桃学. 金原出版、東京、1999、159-172 頁.
- 8) Kojima M, Nakamura S, Morishita Y, et al: Reactive follicular hyperplasia in the lymph



node lesions from systemic lupus

erythematosus patients:

clinicopathological and immunohistological  
study of 21 cases. Pathol Int 50 : 304-312、  
2000.

9) 吉竹 毅、高浜 龍彦、金井 福栄、他 : 重  
症筋無力症胸腺における

B細胞分布とその自己抗体産生活性. 胸部外  
科 46 : 1083-1086、1993.

10) Nagira M, Imai T, Hieshima K, et al :  
Molecular cloning of a novel human CC

chemokine secondary lymphoid-tissue  
chemokine that is a potent chemoattractant for  
lymphocytes and mapped to chromosome 9p13..

Biol Chem 272 : 19518-19524、1997.

11) Ngo VN, Tang HL, Cyster JG, et al :  
Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand  
chemokine

is expressed by dendritic cells in lymphoid  
tissues and strongly attracts native T cells

and

activated B cells. J. Exp. Med 188: 181-191、  
1998.

1 2 ) Forster R, Mattis AE, Kremmer E, et al: A  
putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell  
migration to defined lymphoid organs and  
specific anatomic compartments of the spleen.  
Cell 87: 1037-1047、1996.

1 3 ) Kenrin S, Hyashida K, Kaneko M, et al: Lymphoid  
Chemokine B cell-attracting chemokine-1  
(CXCL13) is expressed in germinal center of  
ectopic lymphoid follicles within the synovium of  
chronic arthritis patients. J. Immunol: 650-655、  
2001.

1 4 ) 増田 昭博、笠島 武：濾胞樹状細胞の機能。  
臨床免疫 33：762-766、2000.