

Multicentric Castleman's Disease 患者に認められた T細胞芽球化抑制因子の同定

佐野 徹明 辰巳 陽一 木村 英嗣
嶋田 高広 金丸 昭久

近畿大学医学部第3内科学教室

抄 録

Multicentric Castleman's Disease は非定型リンパ球増殖性疾患の1つであり、多クローン性形質細胞性リンパ腫の組織像を呈し、臨床像としては発熱、貧血、高ガンマグロブリン血症等の急性炎症性変化を来す疾患群である。またその臨床経過中免疫異常を来し、感染症や悪性疾患を合併するものもあるが、その原因は不明である。本研究では、Multicentric Castleman's Disease 患者血清中にレクチン誘導性T細胞芽球化を著明に抑制する分画を見だし、分離後検討を加えた。患者血清より分離精製されてきたT細胞芽球化抑制因子の候補として、IL-6 依存性急性炎症性タンパクである $\alpha 2$ マクログロブリンが考えられた。同分子は以前より免疫機構への関与が考えられている720 kDの巨大分子である。この患者由来の $\alpha 2$ マクログロブリンは健常人由来のそれと比較して強い芽球化抑制能を示し、また一方ではペプチドマッピングにおいて泳動パターンの相違を認め、両者間の質的差異が示唆された。これらのことから、患者由来の $\alpha 2$ マクログロブリンが何らかの修飾を受けることによって、より強い芽球化抑制能を獲得していると考えられた。

Key words: Castleman's disease, immune suppression, $\alpha 2$ macroglobulin

緒 言

Castleman's Disease は1956年に Castleman ら³ が、ほぼ無症状に経過しながら縦隔内に限局したリンパ節腫瘍についてその病理所見を報告したことに始まる。組織上の特徴は、リンパ濾胞の過形成、濾胞内への血管侵入と増殖 (hyaline vascular type)、胚中心の過形成と濾胞間の形質細胞の増殖 (plasma cell type) であった¹⁻³。以降、類似の組織型でかつ多発性のリンパ節腫脹をきたす症例の報告が続き、Frizzera ら² が plasma cell type の組織型を呈し、発熱、貧血、低アルブミン血症、肝脾腫等の全身徴候を来す疾患群を Multicentric Castleman's Disease (以下 MCD) と定義した²。近年 Human immunodeficiency virus (HIV) 感染患者のリンパ節腫脹を調べてみると、MCD と診断される例が多く見られること、またそれらの大部分はカポジ肉腫に移行している事が多いこと⁴ から注目されつつある疾患である。病態としては、MCD 患者のリンパ節か

ら IL-6 の有意な産生亢進が認められており、そのリンパ節切除後は、血清の IL-6 濃度が低下したことから、IL-6 と MCD の関連性が強く示唆されている⁴。原因としては Kaposi's Sarcoma Herpes Virus (KSHV) のゲノムが MCD 患者に見いだされること^{7,8}、またそのゲノム内に IL-6 様の塩基配列が存在する^{9,10}ことから、IL-6 を介した KSHV の関与が指摘されているが、一定の見解は未だ得られていない。一方では、その臨床経過中に免疫不全から悪性リンパ腫やカポジ肉腫に移行する例も報告されているが、やはりその詳細は不明である^{5,6}。我々は MCD 患者において、その血清中にレクチン誘導性T細胞芽球化を著明に抑制する分画を見だし、その分子を分離同定するとともに、生理活性について検討を加えた。本研究により、MCD のみならず他の自己免疫疾患、免疫不全症の病態解明の一助となると考えられる。

材料と方法

MCD 患者血漿

近畿大学医学部附属病院に入院された MCD 患者 1 例に対して、臨床経過中 Double Filtration Plasma Pheresis (DFPP) を施行することにより得られたサンプルを、患者の同意を得た上で使用した。

T細胞芽球化抑制活性の検定

丸底96穴プレート上で、MCD 患者血清25 μ l と Con A (Sigma Immuno Chemicals; St. Louis, USA) もしくは PHA (Sigma), 60 μ g/ml, 25 μ l を 1 時間プレインキュベートした後、健常人末梢血より Ficoll-Paque (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) で分離した単核球 2×10^6 /ml, 50 μ l を加え 36 時間後トリチウムチミジン [^3H]-thymidine 1.48 MBq/ml, (Amersham LIFE SCIENCE, Bucks, UK) 25 μ l をパルスし、8 時間後の取り込みをシンチレーションカウンター (PACKARD 650C, Meriden, USA) により測定した。また Jurkat 細胞芽球化反応は Jurkat 細胞 2×10^6 /ml, 50 μ l に ConA 40 μ g/ml, 25 μ l を加え、2 時間インキュベートした時の48穴プレートの状態を観察した。

リンホカイン活性化キラー細胞 (LAK) 活性試験

MCD 患者及び正常コントロールとして健常人より分離した末梢血単核球 (PBMNC) を、それぞれリコンビナント IL-2 (シオノギ) 10 U/ml の濃度で 6 日間培養しエフェクター細胞とした。一方 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, 100 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$ (Amersham LIFE SCIENCE) を加えて45分間インキュベートすることにより、クロミウムラベルされた Daudi 細胞を標的細胞とした。96穴プレート上で標的細胞とエフェクター細胞を E/T 比20 : 1 になるよう添加し 4 時間インキュベートした後、培養上清の放射性を γ カウンター (PACKARD, USA) で測定した。

細胞障害試験 (CTL アッセイ)

健常人より分離した末梢血単核球 (PBMNC) 4×10^6 /ml, 10 ml に、1500 rad 照射済みの Daudi 細胞 2×10^6 /ml, 10 ml を加え、5 日培養した後 PBS で 3 回洗浄し、エフェクター細胞とした。一方 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, 100 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$ (Amersham LIFE SCIENCE) を加え45分間インキュベートし、クロミウムラベルされた Daudi 細胞を標的細胞とした。96穴プレート上で標的細胞とエフェクター細胞を図 3 に示した E/T 比になるよう添加し、陰性対照としてのヒトアルブミン血清 (Sigma, 20% w/v), DFPP サン

プル (20% v/v, 10% v/v) を加え 4 時間培養した後、培養上清の放射性を γ カウンター (PACKARD) で測定した。

好中球貪食能の測定

MCD 患者及び、正常コントロールとして健常人よりヘパリン採決した検体と PBS で希釈した墨汁をスライドガラス上で30分もしくは120分インキュベートした後ライト染色し、細胞質内に墨粒の存在する細胞の比率を算出した。

ナチュラルキラー細胞活性の測定 (NK アッセイ)

健常人より分離した末梢血単核球を 1×10^7 /ml の濃度でプラスチックデッシュ上で 1 時間インキュベートし、非付着細胞を回収した。これらの細胞をナイロンウール (和光純薬) カラムに添加し、非付着細胞をエフェクター細胞とした。標的細胞として Yac-1 細胞を用いた。即ち、 1×10^6 /ml 濃度の Yac-1 細胞と $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, 100 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$ (Amersham LIFE SCIENCE) を 1 時間振盪した後、3 回遠心洗浄した。96穴プレート上でエフェクター細胞と Yac-1 細胞を上記と同様に健常人血清、DFPP サンプルを添加後 4 時間培養し、培養上清の放射性を γ カウンター (PACKARD) で測定した。

芽球化抑制因子の分離精製

上記 T 細胞芽球化抑制を指標として、DFPP サンプルを硫酸アンモニウム分画、FPLC ゲル濾過カラム (Superdex 200; Pharmacia LKB), 陰イオン交換カラム (Resource Q; Pharmacia LKB) そして SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) と順次活性分画の分離精製を行った。一方で大量のサンプルを得る目的で、上記の方法とは別に DFPP サンプルを Blue sepharose カラム (Pharmacia LKB) に添加し、FPLC ゲル濾過 (Superdex 200; Pharmacia LKB), および還元下 SDS-PAGE (アクリルアミド濃度 8%) にて同じプロファイルの抑制活性陽性分画を得た。

芽球化抑制活性陽性分画のアミノ酸配列決定

SDS-PAGE で得られたフラクションを PVDF 膜に転写後、N 末端側のアミノ酸配列をアミノ酸オートシーケンサー (Applied Biosystems, California, USA) を使用したエドマン法にて決定した。

芽球化抑制因子の候補としての $\alpha 2$ マクログロブリンの精製

先に記載した方法とは別に、上記 Blue sepharose

カラムの素通り分画を, ウサギ抗ヒト $\alpha 2$ マクログロブリン抗体 (DAKO Japan) を固定した CNBr 活性化 Sepharose カラム (Pharmacia LKB) に添加し, 3M NaSCN を用いて溶出分画を得た。

ペプチドマッピング

患者血清中の $\alpha 2$ マクログロブリン (以下 $\alpha 2M$) と正常対照としてのヒト $\alpha 2M$ (Sigma, St. Louis, USA, プール血清より電気泳動にて抽出したもの) をそれぞれポリアクリルアミドゲル上で, V8 プロテアーゼ (Sigma) と 2 時間インキュベートした後, 非還元下で SDS-PAGE (アクリルアミド濃度 15%) にて展開した。

$\alpha 2M$ RNA の塩基配列の決定

Poller ら³の方法に従い¹¹, $\alpha 2M$ における 2 カ所の機能部位 (bait region, thiolester site) にプライマーを設定した。プライマー配列は bait region に対し (5'-AAGGCATTCACCAACTCAAAG-3') と (5'-AAATCCCAGATCCATGTCTCA-3'), thiolester site に対し (5'-CTGAAGAATTATCCCTGAAAC-3') と (5'-TGGTTCCTGCCATATCGCTC-3') とした。患者リンパ節より RNA を抽出し, cDNA 合成後 RT-PCR を行い, その PCR 産物の塩基配列を島津 DNA シーケンサー DSQ-1NE を使用してダイレクトシーケンス法により決定した。

成 績

臨床経過中の DFPP の効果

MCD 患者は臨床経過中に NK 活性, LAK 活性, PHA によるリンパ球幼若化検査, 好中球貪食能の低下を認めたが, DFPP を施行し, 高分子量分画を除去することによって, それらの著明な回復をみた (表 1)。この事実は DFPP サンプル中に何らかの免疫抑制物質が存在する事を示唆し, 以下分離精製を行った。

表 1 MCD 患者臨床経過中の DFPP の効果

	Pre-DFPP	DFPP	Post-DFPP
LAK 活性 (20-80%)	5% ↓	DFPP	22%
NK 活性 (14-80%)	5% ↓		32%
PHA-Tリンパ球幼若化検査	6600cpm (12300cpm)		18000cpm (20100cpm)
好中球貪食能	7.6% (30分: 23.4%)		14.0% (30分: 73.6%)

DFPP 前と DFPP 後の免疫機能の比較を行った。LAK および NK 活性は, ⁵¹Cr でラベルした Daudi あるいは K562 を標的細胞とし患者単核細胞の細胞障害性により表記した。PHA-T 細胞芽球化反応においては健康人及び患者末梢単核球の PHA 刺激後の ³H-チミジン取り込みにより測定した。好中球貪食能は, 健康人及び患者末梢単核球の墨汁貪食能を測定した。

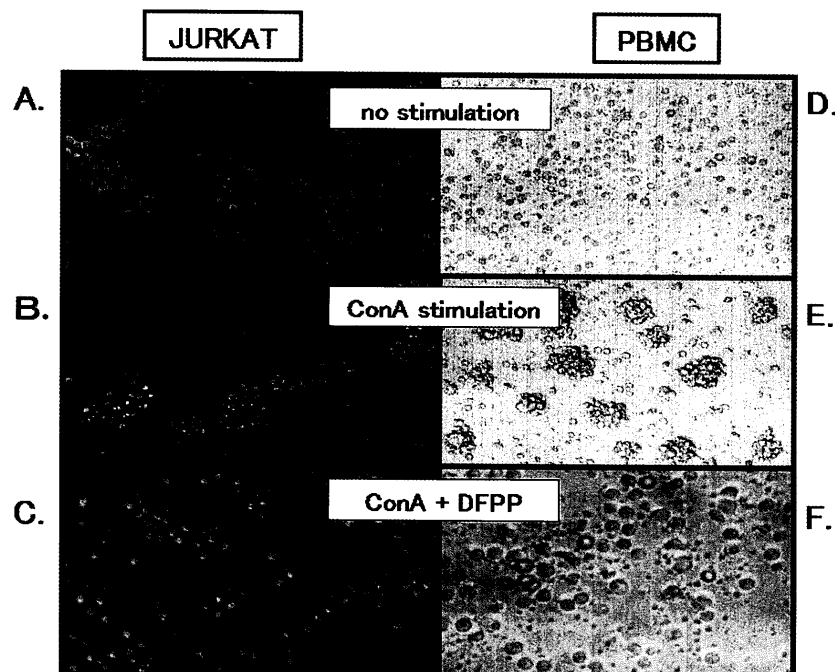


図 1 MCD 患者由来 DFPP サンプルの末梢 T リンパ球芽球化に対する影響の検討

Jurkat 細胞又は健康人末梢単核球 (PBMNC) の無刺激時 (A, D), conA (10 μ g/ml) 刺激後 (B, E), MCD 患者由来 DFPP サンプル (10% v/v) 添加後 (C, F) 各々 4 時間, 37 度, 4% CO₂ 下で培養し, その芽球化像を位相差顕微鏡 (A, B, C, F: $\times 400$, D, E: $\times 100$) にて検討した。

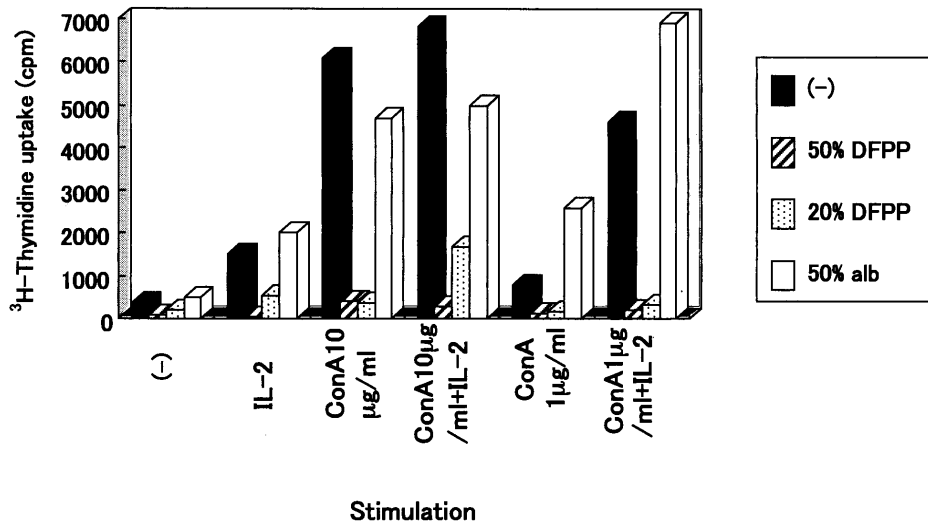


図2 DFPPサンプルを用いたT細胞増殖能の検定
健康人末梢単核球をConAまたはIL-2で刺激し、インヒビターとしてはDFPPサンプルを使用した。

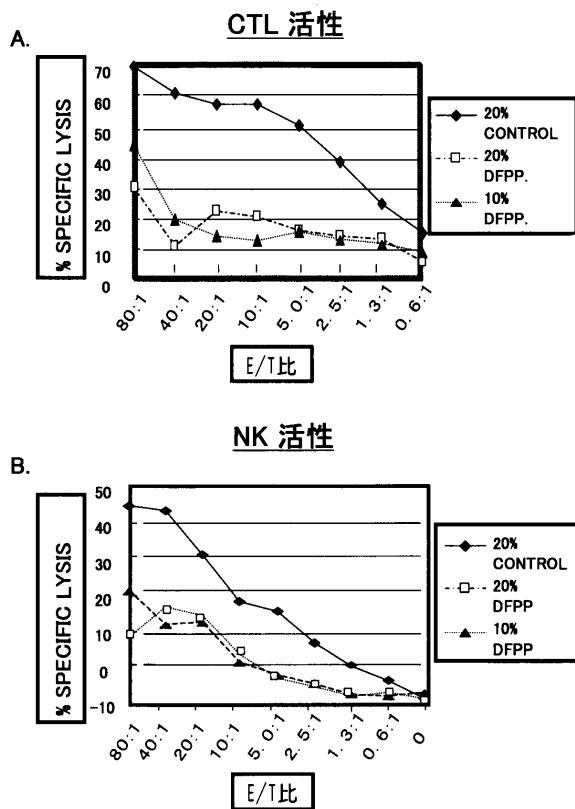


図3 DFPPサンプルの細胞障害性またはナチュラルキラー活性に与える影響の検討
DFPPサンプルまたはコントロールとしてのアルブミンを細胞障害試験(A)またはナチュラルキラー活性測定(B)の系に添加し、⁵¹CrでラベルしたJurkat,あるいはYac-1を標的細胞とし、健康人由来末梢単核細胞を図に示したE/T比にして添加し4時間インキュベートした後細胞障害性を培養上清に含まれた⁵¹Cr活性をγカウンターで測定することにより定量化した。

DFPPサンプルによるT細胞増殖抑制能の検定

Jurkat細胞,健康人PBMNCをConAで刺激すると約2時間後から芽球の形成を認める(図1-B, E)。この培養系にDFPPサンプルを添加すると芽球化の著明な抑制を認めた(図1-C, F)。この芽球化抑制の機序として、①分子間相互作用即ちLFA-1/ICAM-1の直接的な抑制または②細胞周期あるいはタンパク合成に対する抑制の2種類の可能性が考えられた。またDFPPサンプル(50% v/v)は、ConA単独刺激のみならず、ConAにIL-2刺激を加えても、またはIL-2の単独刺激においても対照血清としてのアルブミン(Sigma, 50% w/v)と比較して健康人PBMNCの増殖を有意に抑制した(図2)。またその増殖抑制能は20%の濃度においても維持されていた。

DFPPサンプルによる細胞障害性またはナチュラルキラー細胞活性抑制能の検定

表1の臨床経過で示すように、DFPPサンプルにはT細胞活性化抑制以外にもいくつかの細胞機能に対する影響が認められた。そこでin vitroでのDFPPの免疫抑制能をCTLアッセイまたはNKアッセイを用いて検討した。DFPPサンプルは健康人末梢単核球細胞のNK活性またCTLアッセイにおけるエフェクター細胞のkilling活性も有意に抑制した(図3)。

MCD患者血清のHPLCゲル濾過による分画

Blue sepharoseカラムの素通り分画をゲル濾過カラムに添加し、得られた各ピークにおいて図2と同様にTリンパ球増殖抑制能について検討した(図4)。カラムの排除限界に相当する約600 kD以上の

高分子量分画に相当するフラクション #1 に, Tリンパ球増殖抑制活性を認めた。

SDS-PAGE による芽球化抑制分画の解析およびそのホモロジーリサーチ

ゲル濾過カラムで得られた各フラクションを還元下で SDS-PAGE により展開し, #1 フラクションにおいて約 180 kD, 80 kD, 60 kD, 45 kD, 40 kD の計 5 本のバンドを得た (図 5)。各バンド N 末端アミノ酸配列を決定し, BLAST SEARCH によりホモロジーリサーチを施行した結果 (図 6), 芽球化抑制因子の候補として $\alpha 2$ マクログロブリン, 免疫グロブリン

重鎖, ハプトグロブリンの 3 分子が挙げられた。ここでその分子量の妥当性と生理活性として以前より

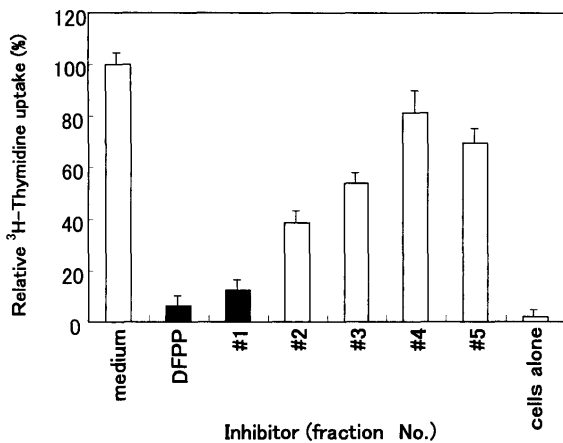


図 4 ゲル濾過カラムによる分画後の各ピークにおける T 細胞増殖抑制能の検定
96 穴プレート上で, 健康人末梢単核細胞 (PBMNC) 1×10^6 /well を ConA (10 μ g/ml) で刺激する系に図に示す濃度の FPLC ゲル濾過で得られた各ピークのサンプルを加え, それらの細胞増殖に対する影響を ³HTdR の取り込みにより検討した。

	Match %	
B-1	1. $\alpha 2$ -macroglobulin-human	91.7
	2. pregnancy zone protein-human	81.8
	3. pregnancy zone protein-human	88.9
	4. pregnancy zone protein-human	81.8
	5. $\alpha 2$ -macroglobulin precursor-green sea turtle	88.9
B-2	1. Ig heavy chain V region-human	78.6
	2. Ig heavy chain V region-human	78.6
	3. Ig heavy chain V region(M72)-human	78.6
	4. Ig heavy chain V region(M49)-human	78.6
	5. Ig heavy chain V region-human	78.6
B-3	1. Ig heavy chain V region-human	89.5
	2. Ig heavy chain V region-human	84.2
	3. Ig heavy chain V precursor V-III region	84.2
	4. Ig heavy chain V-III region-human	89.5
	5. Ig heavy chain V region-dog	84.2
B-4	1. haptoglobin-2 precursor-human	100
	2. haptoglobin-1 precursor-human	100
	3. haptoglobin-related protein precursor-human	100
	4. haptoglobin beta chain-rabbit	90
	5. haptoglobin beta chain-bovine	90
B-5	1. haptoglobin-2 precursor-human	95
	2. haptoglobin-related protein precursor-human	95
	3. haptoglobin-1 precursor-human	95
	4. haptoglobin beta chain-rabbit	85
	5. haptoglobin beta chain-bovine	85

図 6 T 細胞芽球化抑制分画中の各バンドのホモロジーリサーチ。
図 5 において T 細胞増殖抑制能を有していた #1 のフラクション中に検出された 5 本のバンドを PVDF 膜に転写した後, エドマン法にて各サンプルの N 末端アミノ酸配列を決定した。そのホモロジーリサーチを BLAST SEARCH にて行った。

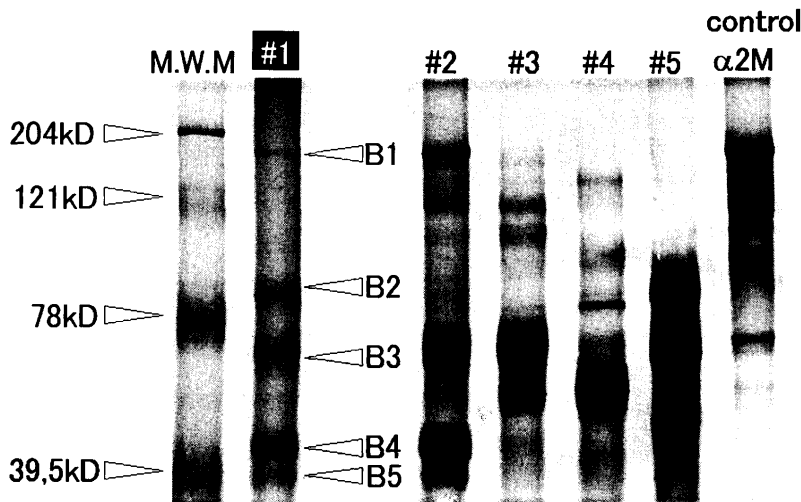


図 5 ゲル濾過カラム各ピークの SDS-PAGE
ゲル濾過流出パターンにおいて, 各ピークに相当するフラクションを還元下で 8% SDS-PAGE に展開し, 銀染色で検出した。
M.W.M.; Molecular Weight Marker

免役機構への関与が指摘されていることから、 $\alpha 2$ マクログロブリン ($\alpha 2M$) を免疫抑制因子の第1候補と考えその精製を行った。

CNBr 活性化アフィニティカラムによる $\alpha 2M$ 分子の単離とその芽球化抑制能の検定

健常人由来および MCD 患者血清を Blue sepharose に添加して得られた分画を抗 $\alpha 2M$ 抗体を固定した CNBr 活性化 sepharose に添加し、 $\alpha 2M$ を分離精製した。各フラクションについて前法の通りレクチン誘導性 T リンパ球増殖に対する影響を検討した。その結果、得られた MCD 患者由来の $\alpha 2M$ は著明な T 細胞増殖抑制能を濃度依存性に示した。また以前から指摘されているように¹² 健常人由来の $\alpha 2M$ も軽度ではあるが、T 細胞の増殖を抑制した。しかしその細胞増殖抑制能は明らかな用量依存性を示さなかった (図 7)。検定は unpaired T test にて行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

MCD 患者由来 $\alpha 2M$ のペプチドマッピングによる検討

MCD 患者より単離した $\alpha 2M$ は健常人 $\alpha 2M$ との間に泳動パターンの相違を認め (図 8)、両者間のタンパク質レベルでの質的差異の存在が考えられた。この差異が遺伝子レベルで規定されているか否かを検討する目的で、MCD 患者由来 $\alpha 2M$ RNA の遺伝子配列をダイレクトシーケンス法で解析した。

MCD 患者由来 $\alpha 2M$ の機能部位における遺伝子検索

RT-PCR 法、ダイレクトシーケンス法を用い

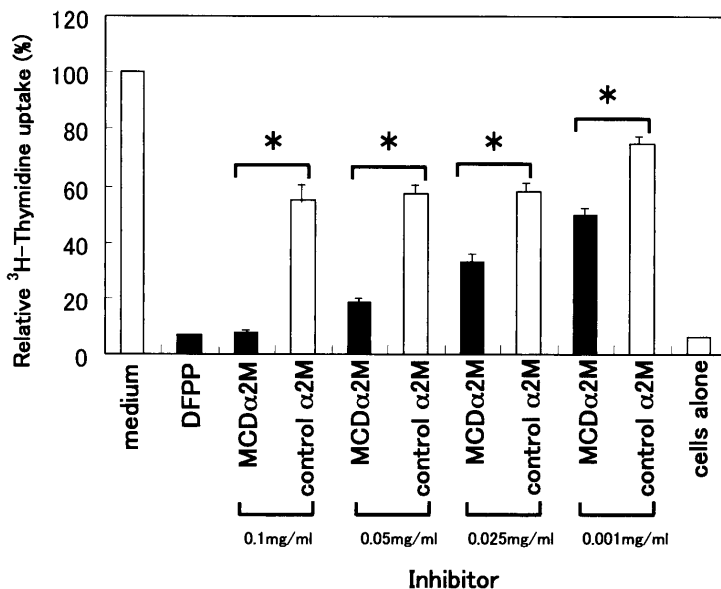


図 7 MCD 患者より分離した $\alpha 2M$ の T 細胞増殖抑制能の検討
CNBr 活性化セファロースを用いて MCD 患者より分離した $\alpha 2M$ と健常人由来 $\alpha 2M$ の両サンプルを、図 4 同様 PBMNC を ConA で刺激する系に添加し、その細胞増殖抑制能を検討した。
* ; $p < 0.05$

て、患者由来 $\alpha 2M$ の cDNA 塩基配列を正常 $\alpha 2M$ と比較したが bait region, thiolester site のいずれ

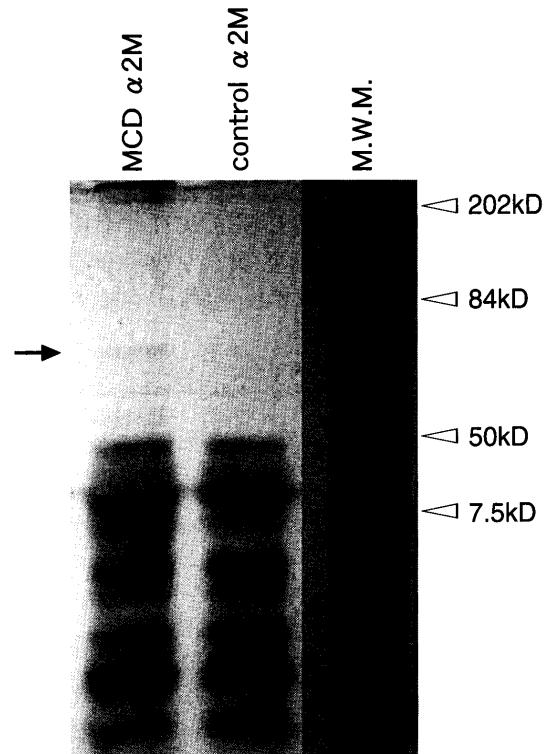


図 8 MCD 患者由来および健常人由来 $\alpha 2M$ のペプチドマッピングによる比較
MCD 患者由来および、正常コントロールとしての健常人由来 $\alpha 2M$ の両者を V8 プロテアーゼ (Sigma) とともに 2 時間上層ゲル上でインキュベートした後、15% SDS に非還元下で展開した。M.W.M.; Molecular Weight Marker

bait region

Castleman's disease pt. attcgtaaacccaaaatgtgtccacagcttcaacagatgaaatgcatggacct
 I R K P K M C P Q L Q Q Y E M N G P
 Known sequence I R K P K M C P Q L Q Q Y E M N G P
 attcgtaaacccaaaatgtgtccacagcttcaacagatgaaatgcatggacct

gaaggtctacgtgtaggtttttatgagtcagatgtaatgggaagaggccatgcacgcctggtgcatgttgaagag
 E G L R V G F Y E S D V M G R G H A R L V H V E E
 E G L R V G F Y E S D V M G R G H A R L V H V E E
 gaaggtctacgtgtaggtttttatgagtcagatgtaatgggaagaggccatgcacgcctggtgcatgttgaagag

cctcacacggagaccgtacgaaagtacttcct
 P H T E T V R K Y F P
 P H T E T V R K Y F P
 cctcacacggagaccgtacgaaagtacttcct

thiolestele site

Castleman's disease pt. tgccaccaaattgtgtagaagaatctgcccagcttctgctcagttttgggag
 P P N V V E E S A R A S V S V L G
 Known sequence P P N V V E E S A R A S V S V L G
 tgccaccaaattgtgtagaagaatctgcccagcttctgctcagttttgggag

acatattaggctctgccatgcaaaacacacaaaatcttccagatgccctatggctgtggagagcagaatattggtc
 D I L G S A M Q N T Q N L L Q M P Y G C G E Q N M V
 D I L G S A M Q N T Q N L L Q M P Y G C G E Q N M V
 acatattaggctctgccatgcaaaacacacaaaatcttccagatgccctatggctgtggagagcagaatattggtc

ctctttgctcctaacaactctgactggattatcctaataaacaacagcagcttactccagaggtcaagccaaggcc
 L F A P N I Y V L D Y L N E T Q Q L T P E V K S K A
 L F A P N I Y V L D Y L N E T Q Q L T P E V K S K A
 ctctttgctcctaacaactctgactggattatcctaataaacaacagcagcttactccagaggtcaagccaaggcc

attggctatctcaaacactgttaccagagacagttgaactcaaacactatgatggctcctacagcacctttgggg
 I G Y L N T G Y Q R Q L N Y K H Y D G S Y S T F G
 I G Y L N T G Y Q R Q L N Y K H Y D G S Y S T F G
 attggctatctcaaacactgttaccagagacagttgaactcaaacactatgatggctcctacagcacctttgggg

図 9

MCD 患者由来 $\alpha 2M$ の生理機能部位の塩基配列の検討

$\alpha 2M$ の機能部位, bait region, thiolestele site の塩基配列を, MCD 患者の RNA から RT-PCR 法, ダイレクトシーケンシング法を用いて決定した

の機能部位においても塩基配列の差異は認めなかった (図 9)。この結果, $\alpha 2M$ の遺伝子レベルで異常の存在は否定的であると考えられた。

考 察

MCD 患者に悪性リンパ腫やカポジ肉腫の合併が多いこと^{5,6}, その原因といわれているヒトヘルペスウイルス 8 (HHV8) のゲノムを高頻度に見出すこと^{7,8}, HHV8 ゲノム内に IL-6 様塩基配列が存在すること^{9,10}, また MCD 患者リンパ節において IL-6 産生の亢進がみられること⁴, その症状として急性炎症性の変化をきたすこと¹⁻⁴ 等から, MCD の病態について IL-6 の関与が指摘されている。また MCD 患者では免疫抑制状態が存在するとの報告もいくつか認められている^{13,14}。この事実は MCD 患者において① MCD 発症, ②免疫抑制状態, ③感染, がサーキットを形成しているのではないかと考えられる。しかし免疫抑制物質を MCD 患者に見いだした報告は未だなく, MCD における免疫抑制状態についての説明は全くなされていない。また血清中に存在する免疫抑制蛋白については特に担癌患者血清中に増加する免疫抑制因子を中心として以前より探索が続けられている。1974年に正常人にも存在し癌になると

増加する血清蛋白としての IRA (Immunoregulatory α -globulin)¹⁵ が報告された。また, よく知られるところでは1979年に担癌マウス血清中に見出された酸性蛋白 (Immunosuppressive acid protein: IAP)¹⁶ があり, 近年も血清中免疫抑制物質の報告は散見される。検討した MCD 患者 DFPP サンプル中にも著明な免疫抑制活性を認め, このサンプルから T 細胞増殖抑制フラクションを精製したところ, IL-6 依存性急性炎症性糖タンパクである $\alpha 2M$ に強いレクチン誘導性 T 細胞増殖抑制活性を認めることが明らかになった。 $\alpha 2M$ は以前よりレクチン, 抗 CD3 抗体, 及び抗原刺激における T 細胞活性化を抑制することが指摘されており¹⁴, またプロテアーゼインヒビターとして知られている。他にもサイトカイン, ウィルス, 細菌, またはその toxin 等のタンパク質をリガンドとして持つとされている¹⁷⁻¹⁹。本症例では質的異常を備えた MCD 患者由来 $\alpha 2M$ がより強い芽球化抑制能を有していると考えられた。当初リンパ球への影響について単一のサイトカイン, 可溶性サイトカインレセプターの関与を予想していたが, 分離精製の過程においてその分子量の妥当性から否定的であると考えた。同時に上記の生理活性から, $\alpha 2M$ を T 細胞芽球化抑制因子の第 1 候

補と考えた。 $\alpha 2M$ はその機能からプロテアーゼと結合する activated form と、付属分子を有しない native form の構造上 2 種類の形態をとっている¹⁷⁻²⁰。この分子は肝細胞、マクロファージ、B細胞等で合成され^{21,22} native form の形で血中に存在するが、bait regionにおけるプロテアーゼによる cleavage が誘因となり、立体構造の変化がおきると、thiolestele 結合部位にプロテアーゼやサイトカインが結合する。ここで我々が分離した MCD 患者由来の $\alpha 2M$ のアイソタイプについて考察してみたい。 $\alpha 2M$ は 180 kD 分子のホモ 4 重合体であること、加えて bait region は分子のほぼ中央に位置していることから、還元下 SDS-PAGE において native form では 180 kD のバンドのみがみられ、cleavage を受けた後の activated form では先の 180 kD に加えて約 90 kD のバンドがみられる²⁰。FPLC ゲル濾過における高分子量分画では約 180 kD と 90 kD にバンドを認めたが、後者は重鎖に高いホモロジーを示していた。また CNBr 活性化アフィニティーカラムにより単離された分子においては約 180 kD の単一バンドを確認した。以上より MCD 患者血清より得られた $\alpha 2M$ 分子は native form であると考えられた。レクチン刺激による T 細胞芽球化の抑制機序については① $\alpha 2M$ とプロテアーゼの複合体 (activated form) の場合、修飾を受けたプロテアーゼは分子量の小さいリガンドにはその活性を発揮し、刺激時に分泌される IL-2 を酵素処理し、不活性化することが知られている²⁴⁻²⁶。また、② native form の場合、ConA セファロースを用いた実験において、 $\alpha 2M$ はレクチン側に対してアフィニティーを示した^{28,29}。このことより $\alpha 2M$ はレクチンと細胞の相互間作用を阻害している^{28,29}との考察が現在までなされている。T 細胞芽球化抑制能の検定の際 PBMNC の ConA 刺激に対し、刺激の 1 時間前に DFPP サンプルを加えると芽球化は抑制された。この事実と、これまでの $\alpha 2M$ が ConA に対してアフィニティーを示したという報告から、本論文で検討した芽球化抑制活性に、少なくとも ConA との相互作用が関わっていることが考えられた。ただデータは示さないが、PBMNC と $\alpha 2M$ を 1 時間プレインキュベートし、ConA を加えた実験においても軽度の抑制を認めた事から $\alpha 2M$ が細胞表面の何らかの分子に結合している可能性も否定できない。患者由来 $\alpha 2M$ と健常人由来 $\alpha 2M$ との質的差異の原因としては、前述の機能部位における遺伝子異常^{13,30}、付属分子としてのサイトカインの存在³¹、糖鎖修飾の異常³²の報告がある。我々は MCD 患者由来 $\alpha 2M$ における生理機能部位の塩基配列を検討したが、

RNA レベルでの変異はその機能部位である bait region, thiolestele site のいずれについても検出されなかった。この事実は、MCD 患者由来 $\alpha 2M$ 分子の修飾は post-transcriptional レベルでおこなわれていることを示唆している。一方、 $\alpha 2M$ 機能とサイトカインの相互作用を考慮すると、 $\alpha 2M$ の主要付属分子として TGF- β がその候補として挙げられる。しかし $\alpha 2M$ は健常人において生理的に TGF- β と結合しており、TGF- β が本症例における key molecule として作用している可能性は否定的と考えた。 $\alpha 2M$ の糖鎖修飾異常については 1993 年、Saso L ら³ が自己免疫疾患における $\alpha 2M$ の糖鎖異常を報告している³²が、この点については現在検討中である。以上、Multicentric Castleman's Disease 患者血清中に存在した芽球化抑制因子は、タンパクレベルで修飾を受けることによってより強い抑制活性を獲得した $\alpha 2$ マクログロブリンであると考えられた。またその作用機序としてはレクチンと細胞の相互作用を阻害していることが考えられた。 $\alpha 2M$ は IL-6 のキャリアータンパクであり、IL-6 を周囲からのプロテアーゼ処理から保護し、その活性を保持しているという報告がなされており³³、その観点からも $\alpha 2M$ は MCD の病態に大きく関与している可能性が考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました近畿大学医学部堀内篤教授に深甚なる謝意を捧げます。また直接御助言、御指導をいただいた近畿大学医学部第 3 内科学教室諸兄に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、平成 11 年 4 月 21 日、第 61 回日本血液学会 (東京) において発表した。

文 献

1. 東原正明, 堀江良一, 米山彰子, 森 茂郎 (1992) Multicentric castleman's disease (MCD), 臨床血液 33: 1649-1660
2. Bruce AP, Frizzera (1993) Multicentric castleman's disease. Semin Oncol 20: 636-647
3. Matthew JM, Svetislava JV, Peter MB, Raymond B W (1995) Angiofollicular lymph node hyperplasia. Cancer Treat Rev 21: 291-310
4. Yoshizaki M, Matsuda T, Nishimoto N, Kuritani T, Lee T, Aozasa K, Nakahata T, Kawai H, Tagoh H, Komori T, Kishimoto S, Hirano T, Kishimoto T (1989) Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in castleman's disease. Blood 74: 1360-1367
5. Yuan C, Ethel C, Melisa SP, Frank L, Janice C, Daniel M Knowls, Patric SM (1994) Identification of herpesvirus-like DNA sequence in AIDS-Associated kaposi's sarcoma. Science 266: 1865-1869
6. Foussat A, Fior R, Girard T, Boue F, Wijdenes J,

- Galanaud P, Emilie D (1999) Involvement of human interleukin-6 in systemic manifestations of human herpesvirus type 8-associated multicentric castlemans disease. *AIDS* 13: 150-152
7. Mario L, Giuseppe T (1996) The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV-8) and hepatitis C virus (HCV) in human lymphoproliferative disease: an overview. *Hematologica* 31: 265-281
8. Jean S, Laurence G, Eric O, Patrice C, Dominique CH, Paul B, Marie F, Jean PC, Martine R, Laureny D, Francois S (1995) Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric castlemans disease. *Blood* 86: 1276-1279
9. Neipel F, Albrecht JC, Ensser A, Huang YQ, Li JJ, Friedman-Kien AE, Fleckenstein B (1997) Human herpesvirus 8 encodes a homolog of interleukin-6. *J Virol* 71: 839-842
10. Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, Sandford G, Wan X, Ciuffo D, Hendrickson SB, Guo HG, Hayward GS, Reitz MS (1997) Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Natl Med* 3: 287-292
11. Lowenthal DA, Filippa DA, Richardson ME, Bertoni M, Straus DJ (1987) Generalized lymphadenopathy with morphologic features of Castleman's disease in an HIV-positive man. *Cancer* 60: 2454-2457
12. Goutner A, Simmler MC, Tapon J, Rosenfeld C (1976) Modulation by $\alpha 2$ -Macroglobulin of human lymphocyte proliferation in response to mitogens and antigen. *Differentiation* 5: 171-173
13. Ishiyama T, Nakamura S, Akimoto Y, Koike M, Tomoyasu S, Tsuruoka N, Murata Y, Sato T, Wakabayashi Y, Chiba S (1994) Immunodeficiency and IL-6 production by peripheral blood monocytes in multicentric Castleman's disease. *Br J Hematol* 86: 483-486
14. Poller W, Faber JP, Klobeck G, Olek K (1992) Cloning of the human $\alpha 2$ -macroglobulin gene and detection of mutations in two functional domains: the bait region and the thiolester site. *Hum Genet* 88: 313-319
15. Arthur H, Richard B, Nimberg, James O, Menzoian, Inna S, Sidney R, Cooperband, Kearl S, John AM (1974) Association of anergy with an immunosuppressive peptide fraction in the serum of patients with cancer. *New Engl J Med* 291: 1263-1267
16. 松本好史, 本木宏昭, 北目文郎, 石田名香雄 (1979) 担癌マウス血清中に見出された免疫抑制活性を示す酸性蛋白. *医学のあゆみ* 102: 747-749
17. 猪飼 篤 (1994) チオールエステル蛋白質における情報伝達機構. *蛋白質 核酸 酵素* 39: 1184-1189
18. 猪飼 篤 (1992) 巨大蛋白質 $\alpha 2$ -マクログロブリン. *蛋白質 核酸 酵素* 37: 1481-1490
19. Wolfgang B. (1992) $\alpha 2$ -Macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J* 6: 3345-3353
20. Wolfgang B $\alpha 2$ -Macroglobulin, a multifunctional binding and targeting protein with possible roles in immunity and autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 737: 267-272
21. Anita MT, James K (1974) Preliminary studies on the synthesis of alpha 2-macroglobulin by human lymphocytes invitro. *Clin Exp Immunol* 17: 697-701
22. Tanpani H, Deane M, Antti V (1977) Cultured human monocytes synthesize and secrete $\alpha 2$ -macroglobulin. *J Exp Med* 145: 1580-1589
23. Lars SJ Role of internal thiol esters in the $\alpha 2$ -macroglobulin-protease binding mechanism. *Ann NY Acad Sci* 737: 172-187
24. Didier H, Thomas LV (1988) Immunomodulation by $\alpha 2$ -macroglobulin and $\alpha 2$ -macroglobulin-protease complexes: the effect on the human T lymphocyte response. *Eur J Immunol* 18: 755-760
25. Borth W, Teodorescu M (1985) Inactivation of human interleukin-2 (IL-2) by $\alpha 2$ -macroglobulin-trypsin complexes. *Immunology* 57: 367-371
26. Claus MP, Ejler E, Soren KM, Poul HJ, Ole S, Lars SJ (1989) Immunosuppressive effects of electrophoretically "slow" and "fast" form $\alpha 2$ -macroglobulin. *J Immunol* 142: 629-635
27. Josef WM, Wolfgang Borth, Martha ME (1996) Modulation of antigen induced T cell proliferation by $\alpha 2$ M-trypsin complexes. *J Immunol* 136: 2792-2799
28. Miyanaga O, Okubo H, Kudo J, Ikuta T, Hirata Y (1982) Effect of $\alpha 2$ -macroglobulin on the lymphocyte response. *Immunology* 47: 351-356
29. Philip SC (1972) The effects of human serum fractions on Phytohemagglutinin and Con A-stimulated human lymphocyte cultures. *Cell Immunol* 5: 544-554
30. Luc VR, Torik A, WimVV, Peter M (1997) Inhibition of intracellular proteolytic processing of soluble proteins by an engineered $\alpha 2$ -macroglobulin containing a furin recognition sequence in the bait region. *Biochem J* 326: 507-514
31. Maureen DOM, Lalage MW (1987) Latent Transforming Growth Factor- β in serum. *J Biol Chem* 262: 14090-14099
32. Luciano S, Bruno S, Angelo G, Robert L, Cheng CY (1993) Abnormal glycosylation of $\alpha 2$ -macroglobulin, a non acute phase protein, in patients with autoimmune disease. *Inflammation* 17: 465-479
33. Matsuda T, Hirano T, Nagasawa S, Kishimoto T (1989) Identification of $\alpha 2$ -macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *J Biol Chem* 142: 148-152