

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 特発性肺胞蛋白症の発症機序における抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子自己抗体の役割に関する研究

指導教官 花岡一雄教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 内田寛治

肺胞蛋白症(Pulmonary alveolar proteinosis; PAP)は、肺胞に過剰なサーファクタント脂質と蛋白が貯留し、進行性の呼吸不全を起こす疾患である。後天性の PAP のうち原因不明とされる特発性肺胞蛋白症(idiopathic PAP; iPAP)が PAP の 90%を占めると言われている。近年顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF)欠損マウス(GM^{-/-} mice)やそのリセプター欠損マウス(GM Rβc^{-/-} mice)が、PAP 類似病像を呈し、その病理所見、肺胞マクロファージ(alveolar macrophage; AM)の機能障害がヒト iPAP と類似していることが報告された。ノックアウトマウスの詳細な研究から、iPAP の疾患発症にも GM-CSF シグナルの阻害によるサーファクタントホメオスタシスの障害が関与しているのではないかと考えられていた。1999 年、中田らが iPAP 患者の血清、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid; BALF)中に GM-CSF を中和する自己抗体を同定し、この仮説がより現実味を帯びてきた。この抗体は iPAP 患者に疾患特異的に発現しており、先天性、続発性の PAP、他の肺疾患、健常者には認められなかった。このためこれら自己抗体が肺において重要な役割をもつサイトカインである GM-CSF に結合して GM-CSF 活性を阻害することで、AM の機能的成熟を抑制しサーファクタントの吸収、分解機構を障害した結果、iPAP 発症に到ると想定されたが、これまでこれを裏付ける報告はなされていなかった。そこで申請者は、患者肺内の GM-CSF が自己抗体によって強く障害されていることを示す根拠として以下の 3 点

を明らかにすることとした。1. iPAP 患者の肺内では GM-CSF 活性が実際に抑制されていること、2. またその阻害が自己抗体の存在によるものであること、3. 自己抗体が GM-CSF 活性を中和するに十分な性状（結合力、中和活性、特異性）をもち、また十分量存在すること。これを検証するため、iPAP 患者の肺内における GM-CSF 活性測定、及び自己抗体の肺内の局在と定量および免疫複合体の証明を行い、さらに自己抗体の GM-CSF との結合力、中和能、特異性及びエピトープを検索した。

iPAP 患者から分離した、単球様の形態をした AM を、健常者 BALF あるいはヒトリコンビナント GM-CSF(rhGM-CSF)を加えた培地中で培養すると AM の形態が正常に近づくが、iPAP 患者から採取した BALF を加えた培地中では成熟せず、形態の変化も無かった。そこで iPAP 患者 BALF の GM-CSF 活性を定量するため、GM-CSF 依存性細胞株である TF-1 細胞を、BALF を加えた培地中で培養し、細胞の増殖度を定量した。その結果 iPAP 患者 BALF 中の GM-CSF 活性は $-24.9 \pm 16.4 \text{ ng equivalents/ml BALF}$ (平均 \pm 標準偏差、中間値 -23.3 , 範囲 $-57.5 - -4.3$) とマイナスの値をとり強い中和活性を持つことがわかった (図 1)。健常者の BALF 中 GM-CSF 濃度を enzyme-linked immuno adsorbent assay (ELISA) 法で求めたところ、 $1.07 \pm 0.16 \text{ pg/ml}$ (平均 \pm 標準偏差、範囲 $0.88-1.28$) であったことから、患者 BALF 中に存在する GM-CSF 中和活性は、健常者肺内の GM-CSF 濃度を大きく上回っていることがわかった。一方 GM-CSF に対する免疫染色を行った結果、iPAP 患者の肺胞 II 型上皮に GM-CSF は健常者と同様に発現していることが確認された (図 2)。このため iPAP 患者の肺は GM-CSF を発現しているにも関わらず、その活性が中和されていることが明らかになった。次に iPAP 患者の血清、BALF 中の抗 GM-CSF 自己抗体の濃度を、精製した自己抗体を標準として sandwich ELISA 法で定量した。その結果、iPAP 患者の BALF 中自己抗体価は中間値 $1.15 \mu\text{g/ml}$ 、範囲 $0.09-5.4 \mu\text{g/ml}$ ($n=34$)、血清中自己抗体価は中間値 $88.58 \mu\text{g/ml}$ 、範囲 $16.59-470.2 \mu\text{g/ml}$ ($n=107$) と高い値をとった。一方健常者、他の肺疾患では、何れも検出限界 (BALF では $0.01 \mu\text{g/ml}$ 、血清では $3 \mu\text{g/ml}$) 以下であった。このことから、自己抗体は iPAP 患者の肺内と血清中に発現しており、また疾患特異性が非常に高いことがわかった。抗 GM-CSF 自己抗体の局在を調べるため、iPAP 患者の肺組織をフィコエリスリン標識 rhGM-CSF と、fluorescein isothiocyanate

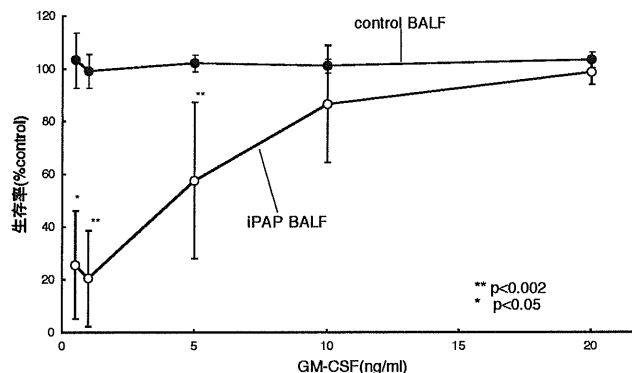


図 1. GM-CSF 依存性細胞株 TF-1 の GM-CSF による容量依存性増殖が iPAP 患者の BALF を培地に加えることで抑制された。BALF を加えない培地の増殖度を 100% としたときの % で表示。

●: 健常者 BALF を加えた場合。

○: iPAP 患者 BALF を加えた場合。

標識抗ヒト IgG を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、肺胞内に強い共染部位が認められ、GM-CSF 結合活性を持つ IgG が肺胞内に存在することがわかった。

次に肺胞内に存在する自己抗体が実際に免疫複合体を形成しているかどうかを protein A Sepharose を用いた免疫沈降法で調べた。

ウェスタンブロッティング法により、iPAP 患者 BALF の protein A 結合画分 (IgG 画分) 中に GM-CSF のバンドが検出された (図 3 A、4 列目)。一方患者 BALF と [¹²⁵I]-GM-CSF を混和し

て、ネイティブポリアクリルアミド電気泳動 (Native-PAGE) 法を行ったところ、[¹²⁵I]-GM-CSF バンドのスーパーシフトが認められ、iPAP 患者の BALF が GM-CSF 結合能力をまだ十分保持していることが明らかとなった (図 3 B、5 - 7 列目)。これらの結果より、iPAP 患者の肺内には GM-CSF 結合性の抗体が存在し、GM-CSF と免疫複合体を形成していると考えられた。

次に iPAP 患者の精製自己抗体と、様々な濃度の [¹²⁵I]-GM-CSF を混和して、protein G Sepharose ビーズに結合させ、自己抗体結合画分の放射活性を測定することで飽和結合曲線を作成し、自己抗体の結合力 (avidity, K_{AV}) 及び結合容量 (capacity, B_{max}) を算出した。その結果 K_{AV} は、対照として用いたヤギ抗ヒト GM-CSF 中和ポリクローナル抗体が 275.4pM であったのに対し、非常に強い値 (19.96 ± 7.54 pM, 平均 ± 標準偏差) を示した。また精製自己抗体による GM-CSF の中和活性を TF-1 細胞を用いて定量したところ、TF-1 の増殖を 50% 抑制する自己抗体の濃度 (IC_{50} : mol/mol rhGM-CSF) はヤギ、マウスの中和抗体の 10 倍、500 倍の強さであることがわかった。Sandwich ELISA 法による自己抗体の特異性測定の結果、抗体の GM-CSF 分子に対する結合に糖鎖修飾が影響しないこと、二カ所のジスルフィド結合で形作られる二次、三次構造が結合に重要である

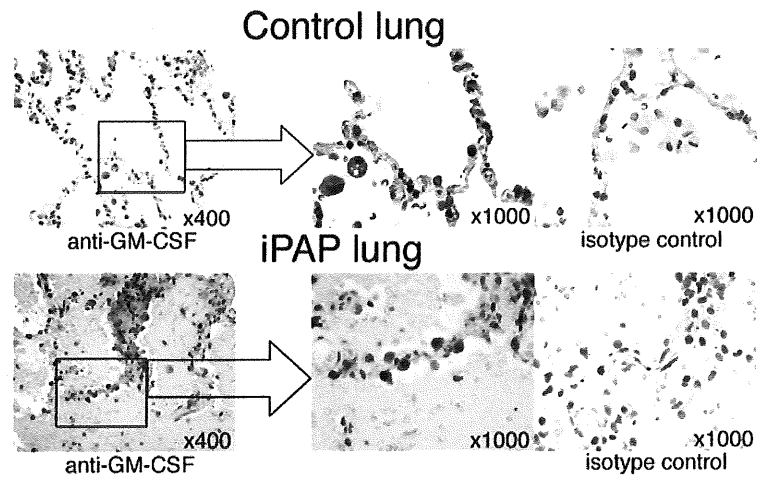
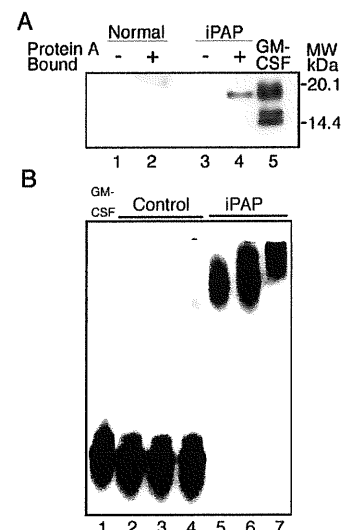


図 2. 健常肺 (上列) と iPAP 患者肺 (下列) の GM-CSF 免疫染色。肺胞上皮に GM-CSF が発現している (赤色)。

図 3. A: BALF 中の protein A 結合、非結合画分中の GM-CSF の検出。B: [¹²⁵I]-GM-CSF と BALF との結合 (本文参照)。



こと、種特異性が高く、またヒトの他のサイトカインとは反応しないことがわかった。

自己抗体の GM-CSF に対する特異的なエピトープを検索するために、あらかじめエピトープが調べられている 4 種類のマウスモノクローナル抗体と、 $[^{125}\text{I}]$ -GM-CSF との結合を自己抗体で阻害する拮抗阻害実験を行った。三者を混和してオーバーナイトでインキュベートした後、マウス IgG に対する抗体をあらかじめコートした FlashPlate Plus[®]に移し、マウスモノクローナル抗体と結合した $[^{125}\text{I}]$ -GM-CSF の放射活性をシンチレータによって検出し、自己抗体による結合の阻害度を算出した。その結果、GM-CSF のアミノ酸残基 1-11, 40-77, 110-127 を認識するマウスモノクローナル抗体(それぞれ No. 4117, 1089, 1022)の結合は自己抗体により部分的に阻害され、またその阻害度は症例間ではばらつきがあった (図 4)。これに対して 78-94 アミノ酸残基を認識するマウス抗体(No. 3092)の GM-CSF との結合は 16 例ではほぼ一様に強く抑制された (図 4)。平均の阻害率は $78.97 \pm 11.71\%$ (平均 \pm 標準偏差)であった。このエピトープは GM-CSF の活性中心との報告も認められるため、この部位が iPAP 患者における抗 GM-CSF 自己抗体が GM-CSF 活性を特異的に強く中和する上での"hot spot"と考えられた。

これらの結果から、自己抗体は高い特異性、強い結合力で GM-CSF と結合し、肺内に十分量存在し、GM-CSF とその受容体との結合を効果的に阻害することが確認された。抗 GM-CSF 自己抗体が GM-CSF シグナルを強力に阻害することで iPAP の発症に関与しているとの仮説を裏付ける結果が得られた。

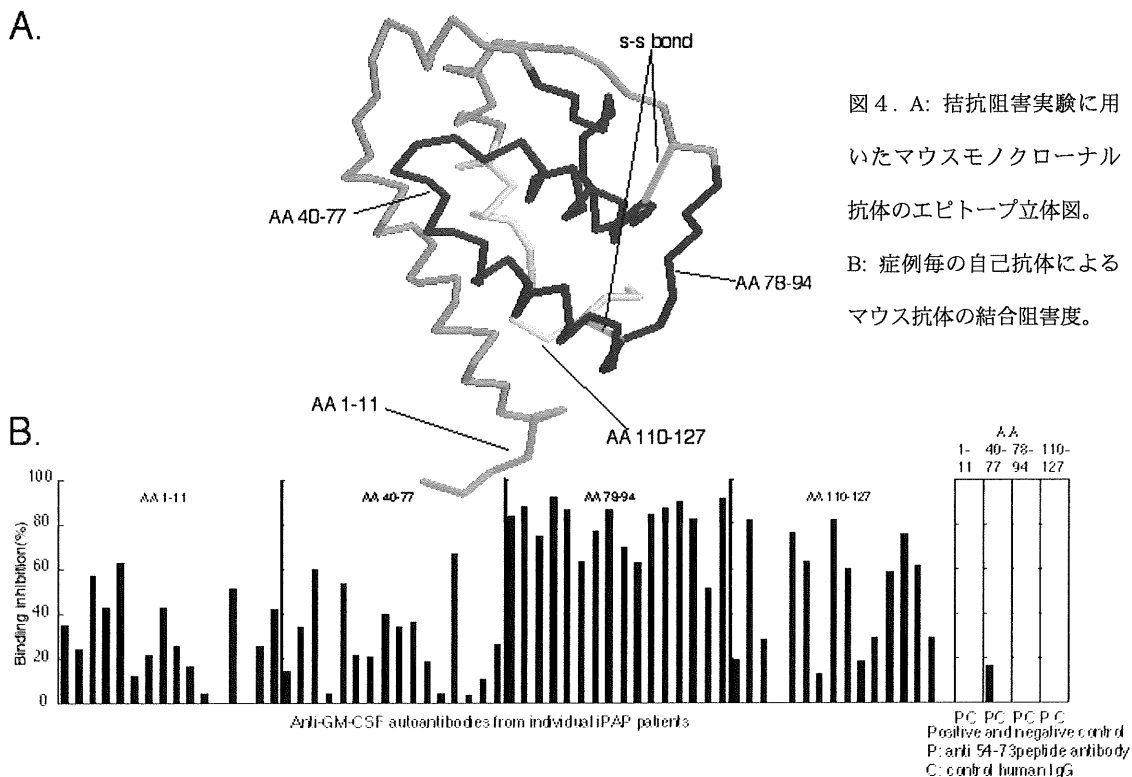


図 4. A: 拮抗阻害実験に用いたマウスモノクローナル抗体のエピトープ立体図。

B: 症例毎の自己抗体によるマウス抗体の結合阻害度。