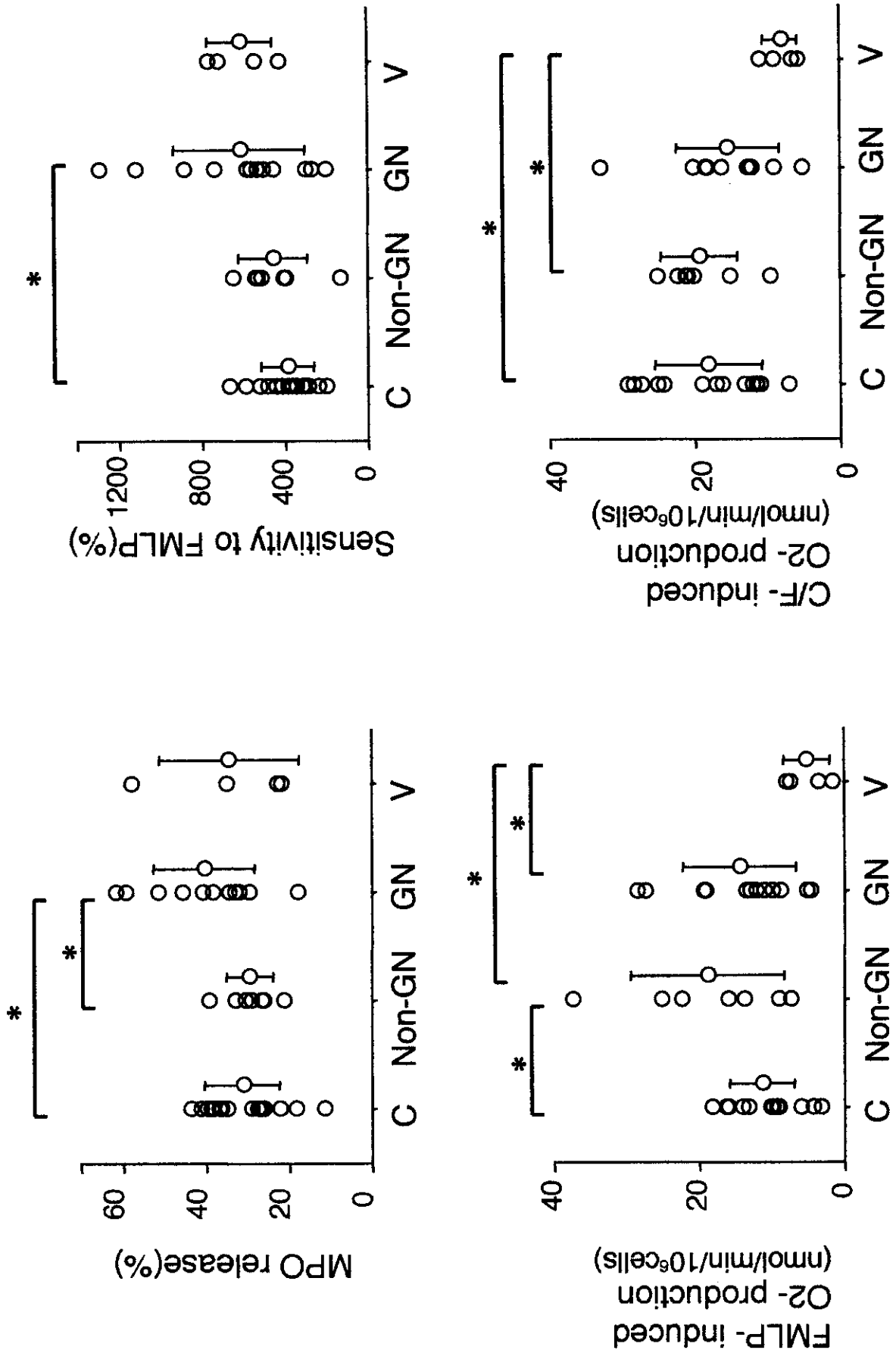


Fig. 3

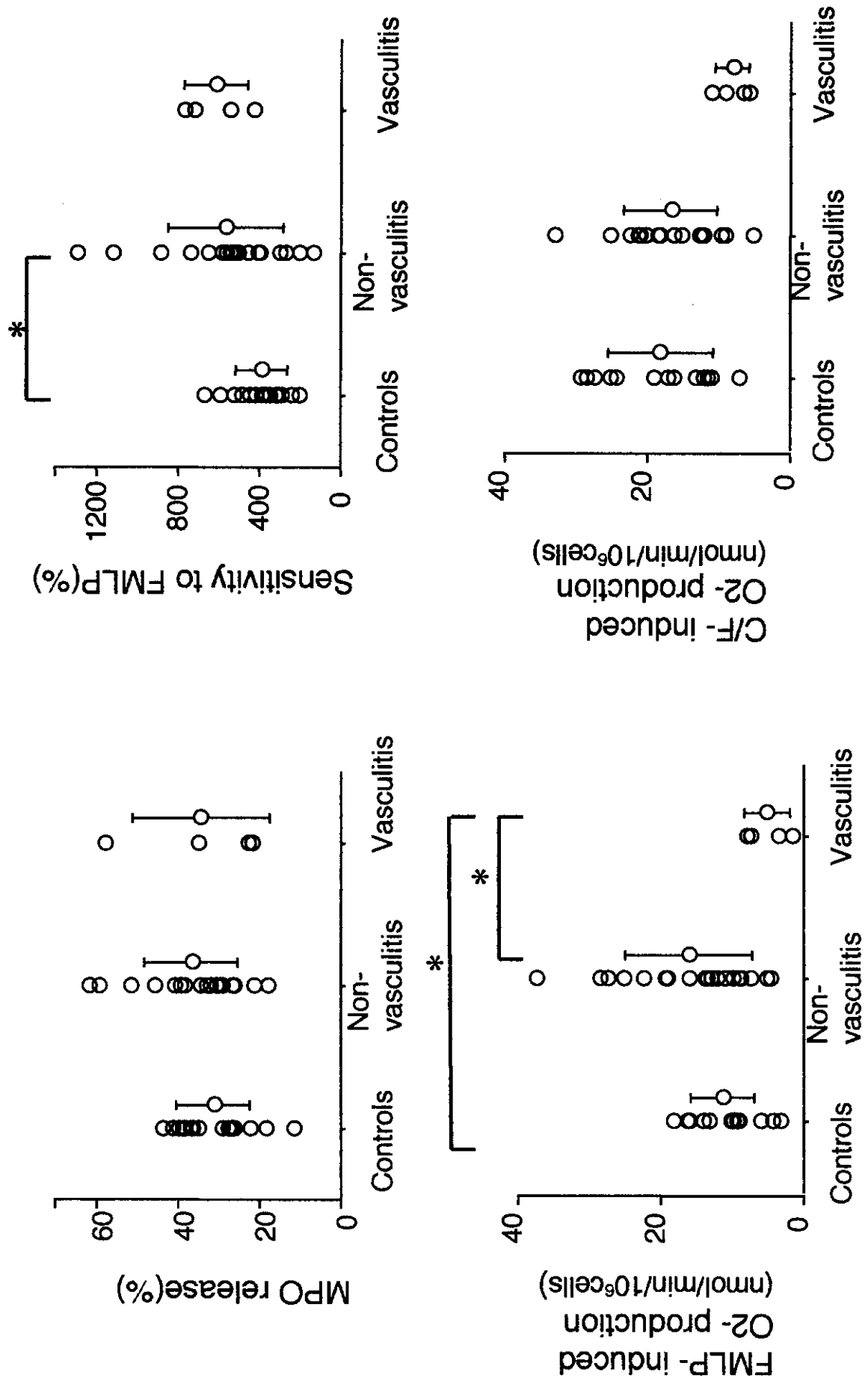
PMN function among diseases



C: N=16, Non-GN: N=7, GN: N=13, V; N=4 * P<0.05

Fig. 4

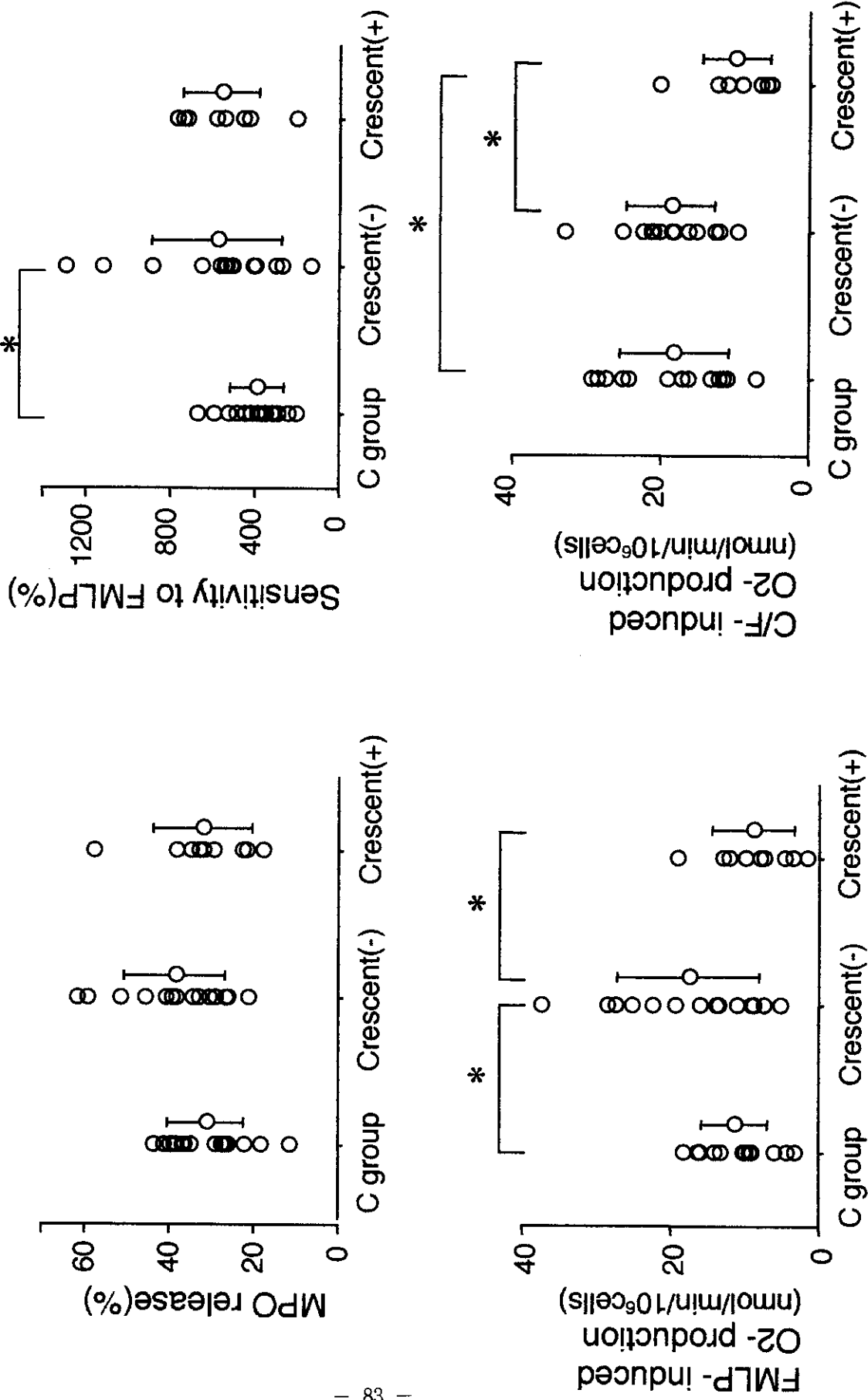
Comparison with histological findings 1: Influence of vasculitis on PMN function



Controls :N=16, Non- vasculitis:N=20, Vasculitis: N=4, *: P<0.05

Fig.5

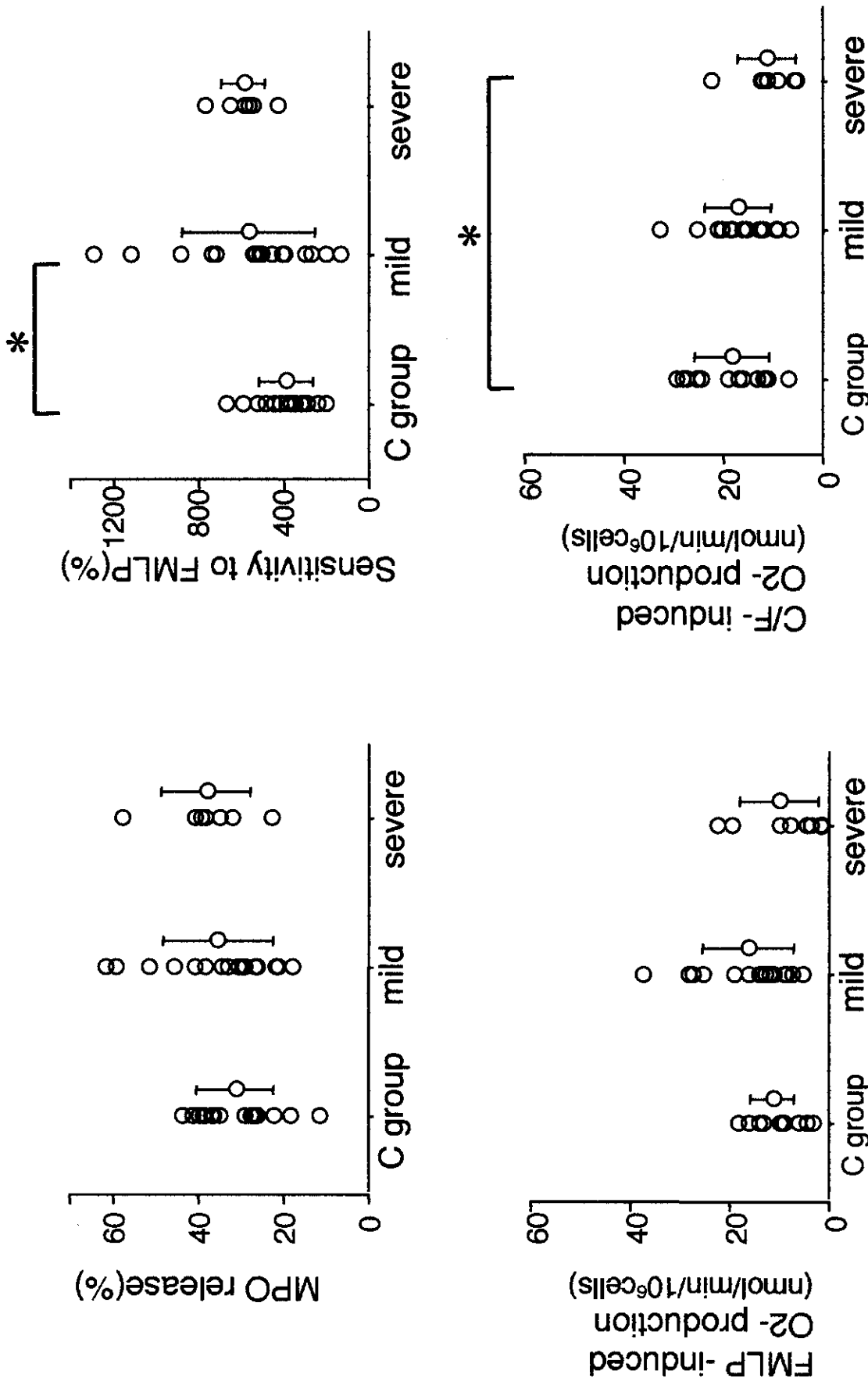
**Comparison with histological findings 2:
PMN function in renal disease with and without crescents**



C group: N=16, Crescent(-): absence of crescent ; N=15, Crescent(+): presence of crescent ; N=9, *; P<0.05

Fig. 6

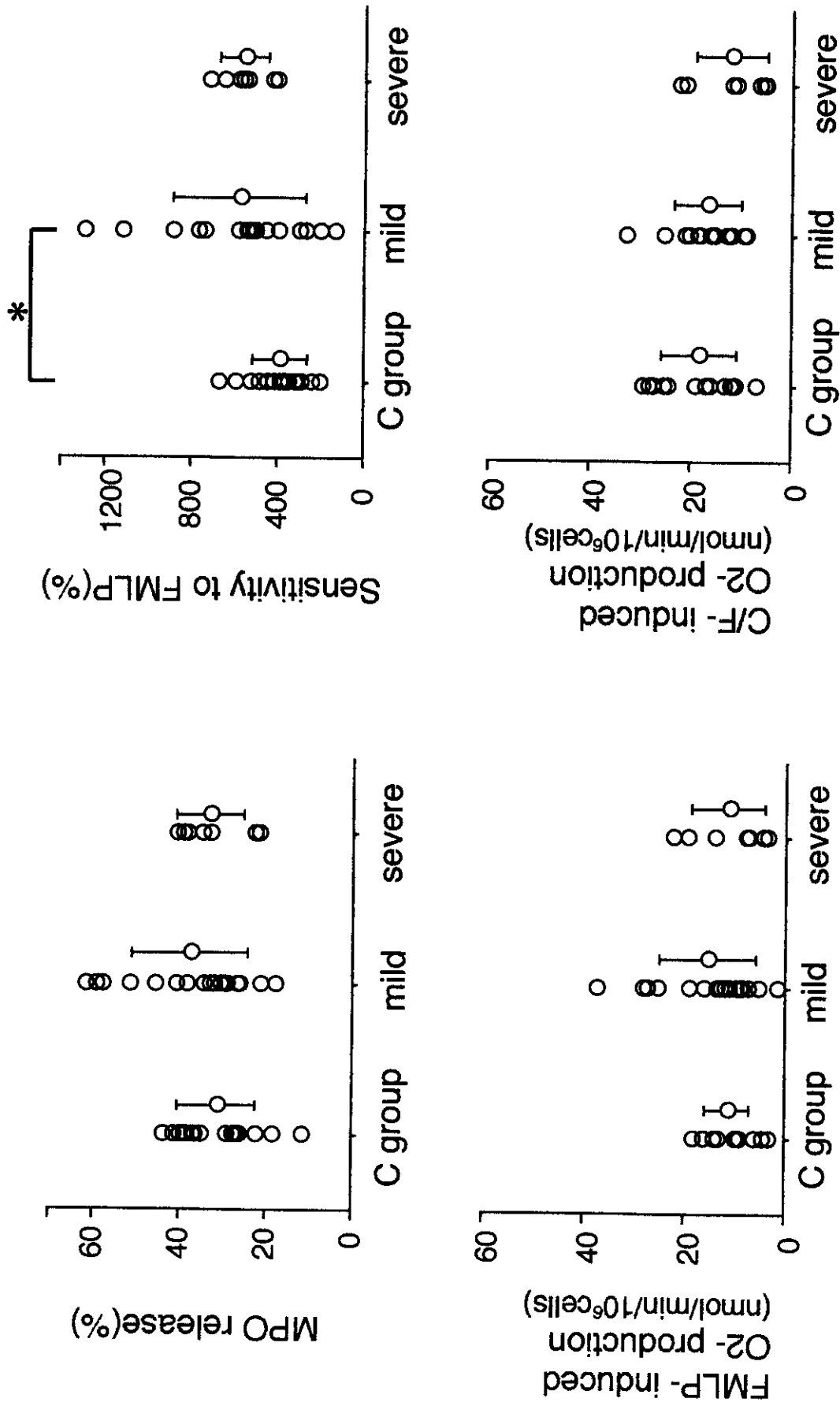
Comparison with histological findings 3:
 Relationship in PMN function with the stages of Interstitial cell infiltration



C group; N=16, mild; N=17, severe; N=7, *, P<0.05

Fig. 7

**Comparison with histological findings 4:
Relationship in PMN function with the stages of Interstitial fibrosis**



C group: N=16, mild :N=7, severe: N=7, *:P<0.05

Figure.8

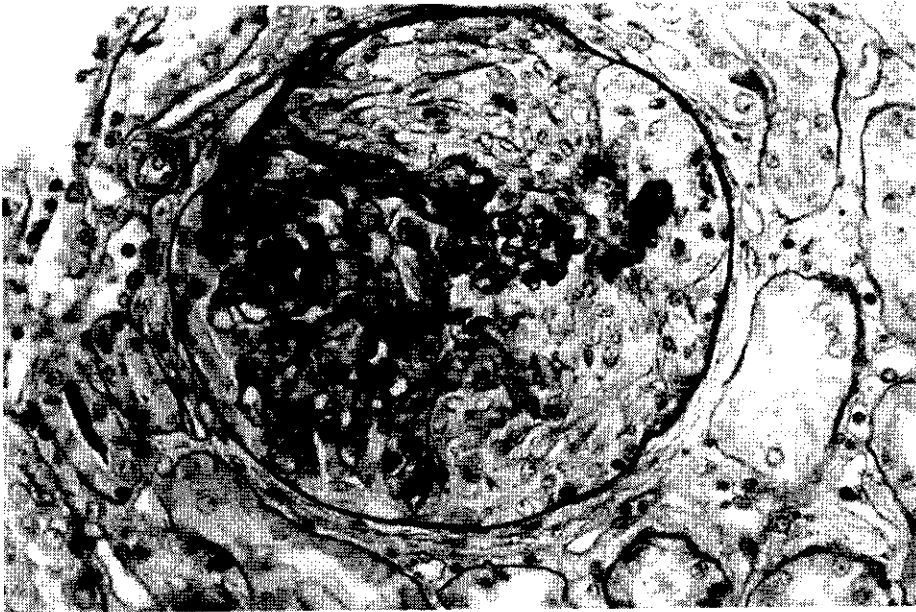
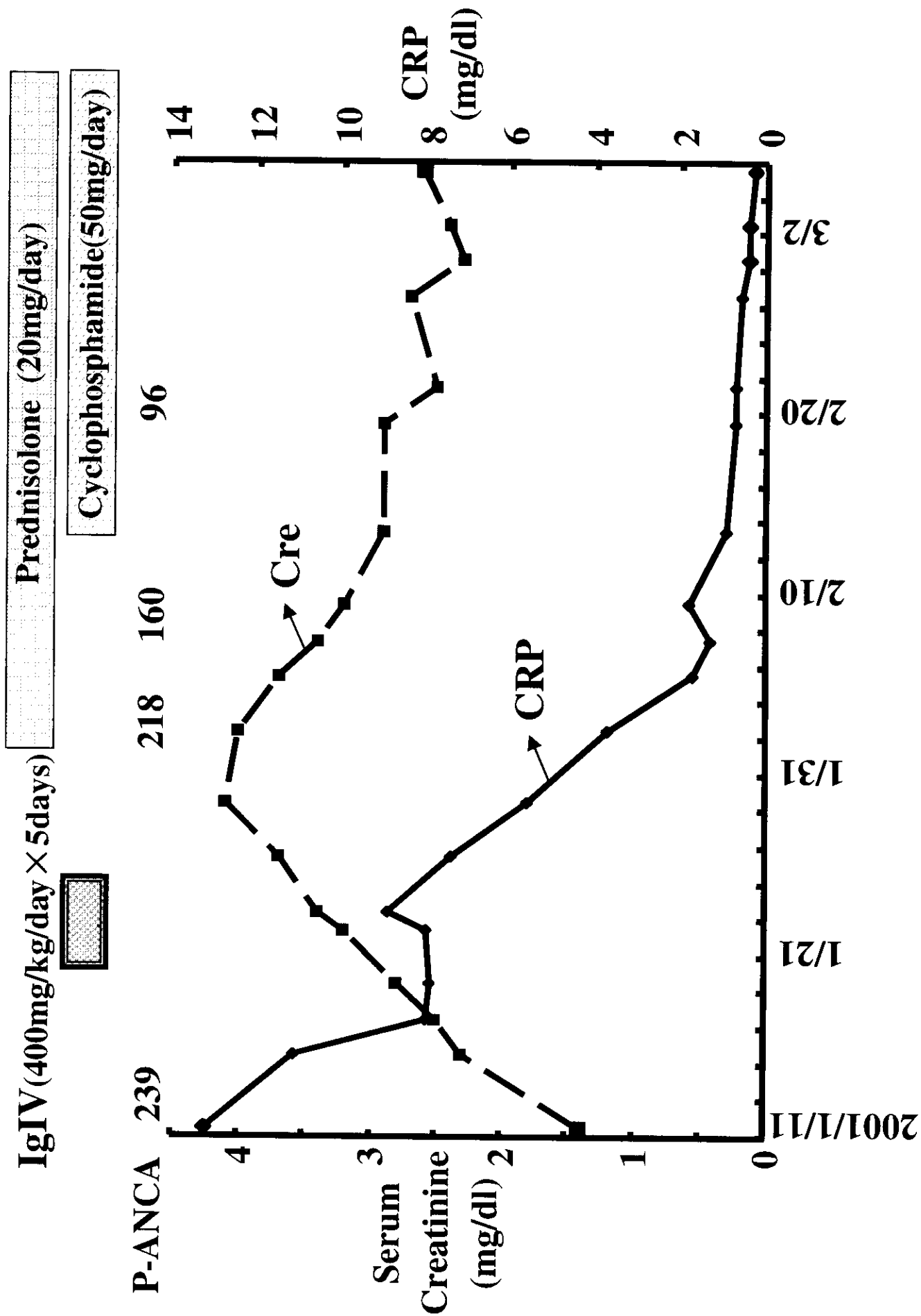


Figure.9

Clinical Course (case N.M.)



厚生科学研究費補助金(高度先端医療研究事業)

分担研究報告書

特発性肺胞蛋白症の抗 GM-CSF 自己抗体のエピトープ決定

分担研究者 中田 光 国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部
細菌性呼吸器疾患研究室長

研究要旨:特発性肺胞蛋白症は、肺胞及び終末気管支に過剰なサーファクタントの貯留がおこり、進行性の呼吸困難を来す疾患である。分担研究者は最近、患者の肺胞及び血液中に抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF) 中和自己抗体が大量に存在することを発見した。マウスモノクローナル抗体、ウサギポリクローナル抗体と競合実験を行った結果、アミノ末端より78番目から96番目までを認識する抗体ともっともよく競合し、GM-CSFの高次構造を認識していると予想された。

A. 研究目的

抗GM-CSF自己抗体は、特発性肺胞蛋白症のほか、重症筋無力症、Eaton Lambert 症候群、胎児臍帯血などでも検出される。しかし、それらの多くは非中和抗体であり、特発性肺胞蛋白症の自己抗体が全例中和抗体であることを考えると、肺胞蛋白症のそれは他の抗GM-CSF自己抗体とはことなるエピトープを認識していると予想される。このエピトープを決定し、それが、患者の治療や自然経過中にどのように変化していくかを調べるのが本研究の目的である。

B. 研究方法

*抗GM-CSF自己抗体の精製
患者血清を33%硫酸分画にて粗精製し、GM-CSFをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーをもちいて精製した。
*抗GM-CSF自己抗体の中和能測定:
GM-CSF依存性に増殖するTF-1細胞の増

殖を MTT 法で検出した。

*抗GM-CSFモノクローナル抗体・ポリクローナル抗体

用いた抗体とそのエピトープは以下の通りである。

モノクローナル抗体

クローン番号 エピトープ

1089 39-75

3092 77-94

2118 77-94

2114 77-94

1022 88-127

G3 7/3 14-24

G430/1630-41

ポリクローナル抗体

N19 1-19

C20 108-127

*GM-CSF合成ペプチド

用いた合成ペプチドは以下のとおりである。

(番号は全てN端からの残基数)

14.96

1.121

14.121

16.121

22.121

1.19

108.127

*Tryptic core peptide の作製

recombinant GM-CSF をトリプシンで消化し、得られたペプチド断片 (31.58, 86.107, 112.127 が二本のジスルフィド結合で連結したもの) をゲル濾過カラムで精製した。

*カルボキシメチル化GM. CSF の作製

GM. CSF を DTT で還元後、モノヨード酢酸でSH基をカルボキシメチル化した。

*モノクローナル抗体・ポリクローナル抗体との競合実験

精製自己抗体を非還元 SDS-PAGE にかき、PVDF膜に転写後、モノクローナル抗体・ポリクローナル抗体の存在下でラジオアイソトープラベルしたGM. CSF と反応させ、得られる180 kD のバンドをオートラジオグラフィにて検出した。

*recombinant GM-CSF または合成ペプチド、tryptic core peptide, カルボキシメチル化GM. CSF をナイロン膜にスポットし、風乾、ブロッキング後、自己抗体と反応させ、パーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG を2次抗体として、DAB で発色させた。

(倫理面への配慮)

自己抗体陽性の患者からの血清採取にあたって、同意書を用意し、主治医から研究の主旨と

患者のプライバシーの守秘について説明し、署名捺印のもとに行った。

C. 研究結果

1. 異なる4人の特発性肺胞蛋白症患者の血清より自己抗体を精製し、TF. 1細胞の培養系に1ng/mlのGM. CSFの存在下で様々な量の自己抗体を添加し4日間培養後、増殖抑制を測定した。4人の患者の自己抗体は全く一致した抑制パターンを示した。このことから、本症の自己抗体はGM. CSFの同一エピトープを認識している可能性が示唆された。

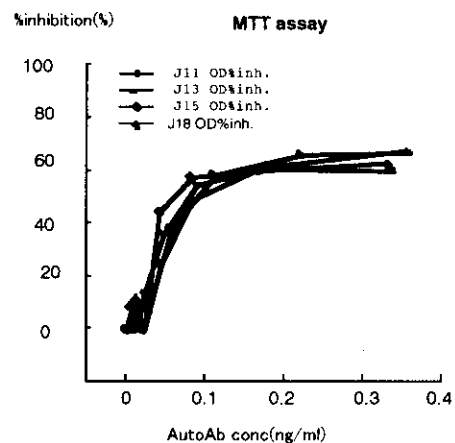


図1: 4人の患者血清から精製された抗GM. CSF自己抗体によるTF. 1細胞の増殖阻害

2. モノクローナル抗体・ポリクローナル抗体によるGM. CSFと自己抗体の結合阻害の結果は下記の通りである。

モノクローナル抗体

クローン番号	エピトープ	結合阻害
	(阻害ありが+, なしがー)	
1089	39.75	-
3092	77.94	+++

2118	77.94	++	ペプチド	結合
2114	77.94	++	14.96	+
1022	88.127	+	1.121	+
G3・7/314.24		-	14.121	+
G4・30/1630.41		-	16.121	+
ポリクローナル抗体			22.121	+
N19 1.19		-	1.19	-
C20 108.127		-	108.127	-
			1.53	-

以上の結果から抗GM. CSF自己抗体は、77.94を認識するモノクローナル抗体ともっともよく競合することが明らかとなった。

tryptic core peptide -
carboxy methylated GM-CSF -

3. GM. CSFペプチドと自己抗体の結合
用意したGM. CSFのペプチド断片と自己抗体との結合実験の結果を下記に示した。

4. GM. CSF立体構造上の結合部位の予測
抗体による競合実験とペプチドとの結合実験の結果、自己抗体はGM. CSFの立体構造を認識し、72.94にその結合の主座があると思われる。このことは、59.85までを欠損している tryptic peptide と全く反応しないことから示唆される。この部分は、N端から4番目のαヘリックスを含みGM. CSFの活性中心のひとつである。ペプチド1.53に結合せず、14.96が結合することを考慮すると、50.100に結合部位があることが予測された。

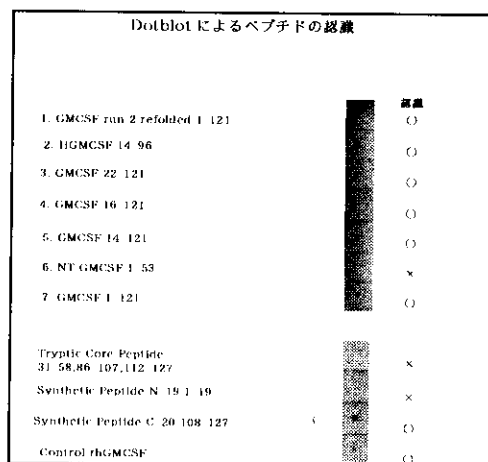


図2：ペプチドと自己抗体の結合



図3：抗GM. CSF自己抗体結合部位の予測図（赤色が結合部位）

D. 考察

特発性肺胞蛋白症の発症機序は長い間ベールにつつまれていた。GM-CSF の受容体を欠く先天性の肺胞蛋白症が存在することや、このサイトカインやそのノックアウトマウスが類似の症状を起こすことから、GM-CSF の関与が考えられてきたが、自己抗体によりマクロファージの機能が障害され、サーファクタントのクリアランスが低下したものと考えられる。この患者の自己抗体が例外なく中和抗体であることも、自己抗体が発症に深く関わっていることを示唆している。その自己抗体の性質を明らかにすることは、本疾患の病因解明や治療法の開発に寄与するものと思われる。中でも自己抗体のエピトープの決定は抗体産生の機序を明らかにする上で最も重要なテーマである。

今回の我々の検討により、この自己抗体はGM-CSF の立体構造のられ部分を認識することが明らかとなった。それは、4番目の α ヘリックスを含む78、96までの部分であるが、GM-CSF の2本のジスルフィド結合を切断すると自己抗体と反応しなくなることから、もう1カ所立体的に78、96に近接した部分が結合に関与している可能性がある。その可能性は、3番目の α ヘリックス54、63と5番目102、112であるが、後者は107、120を認識するポリクローナル抗体と競合しないことから、可能性が低い。今後これらのペプチド抗体を用いた拮抗阻害実験などが必要となろう。

E. 結論

特発性肺胞蛋白症の患者血清中の抗GM-CSF 自己抗体のエピトープ解析の結果、GM-

CSFの78、96を含む立体構造を認識することがわかった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1, 論文発表

英文原著

1. Therapeutic efficacy of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Patients with Idiopathic Acquired Alveolar Proteinosis, *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*. 163, 524-531, 2001, Seymour JF, Presneill JJ, Schoch OD, Downie GH, Moore PE, Doyle IR, Vincent JM, Nakata K, Kitamura T, Langton D, Pain MC, Dunn AR

2. Serological diagnosis of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000, 162, 658-662 Kitamura T, Uchida K, Tanaka N, Watanabe J, Kanegasaki S, Yamada Y, and Nakata K

3. Idiopathic Pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte macrophage colony stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine* 1999, 190(6), 875-880, Kitamura T, Tanaka N, Watanabe J, Uchida K, Kanegasaki S, Yamada Y, and Nakata K

4. Augmented proliferation of human

alveolar macrophages after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1999, 93(2):667-673, Nakata K, Gotoh H, Watanabe J, Uetake T, Kudoh S, and Shimada K.

5. Lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis express a factor which neutralizes granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *FEBS Letters* 1999, 442 (2-3):246-252, Tanaka N, Watanabe J, Kitamura T, Yamada Y, Kanegasaki S, and Nakata K
邦文

1. 特発性肺胞蛋白症と抗GM. CSF自己抗体

Annual Review 免疫 2001, 2000年、328. 333、共著

中田 光、内田寛治、慶長直人

2. 肺胞蛋白症最近の話題—肺胞蛋白症の原因物質。現代医療 1999、31(2):160-164、中田光

3. 自己免疫疾患としての特発性肺胞蛋白症、「クリニカ」2000、27(4)、7. 10、中田 光

4. 特発性肺胞蛋白症と抗GM. CSF自己抗体、臨床免疫、2000、34(1)、7. 14、中田 光、北村亨之、内田寛治、慶長直人

5. びまん性肺疾患の病態形成とサイトカイン：別冊・医学のあゆみ、2000年、44. 47、中田 光 11月

H. 知的所有権の取得状況

1, 特許取得

出願番号 特願平11. 244595

出願日 平成11年8月31日

優先権主張番号 特願平10. 303858

名称: 抗GM. CSF自己抗体およびその測定

厚生科学研究費補助金(高度先端医療研究事業)

分担研究報告書

MPO の立体構造に関する研究

分担研究者 田之倉 優 東京大学大学院 農学生命科学研究科教授
研究協力者 鈴木倫太郎、伊藤三恵、入本慶宣

研究要旨：抗好中球細胞質抗体(ANCA)の一つである MPO-ANCA は、血管炎などの疾患においてその量が上昇する。本研究は、治療のためのブロック抗体の開発に資するために、MPO 分子の立体構造上の特徴と MPO フラグメントのリスクの実験結果と比較して、MPO 上の MPO-ANCA との分子間相互作用部位の可能性について検討した。その結果、MPO の MPO-ANCA 結合部位は MPO の活性部位周辺で、MPO-ANCA が MPO の活性部位を覆うようにして結合する可能性が高いと結論された。

A. 研究目的

ミエロペルオキシダーゼ(MPO)は好中球で見つかった酵素であり、過酸化水素を用いて塩素イオンを過酸化し、次亜塩素酸を生成する反応を触媒する。次亜塩素酸やその二次代謝物は好中球に貪食された細菌やウイルスを殺す働きを持つ。一方、血管炎などの疾患において、抗好中球細胞質抗体(ANCA)の一つである P-ANCA の量が上昇することが知られているが、この抗体に対応する抗原は主として MPO である。そのため P-ANCA は MPO-ANCA とも呼ばれる。MPO あるいは MPO-ANCA が疾患を引き起こす作用機作は不明であるが、これらの相互作用が原因となっていると考えられる。

本研究は MPO と MPO-ANCA の分子間相互作用と作用機作を明らかにし、治療のためのブロック抗体の開発に資することを目的とする。

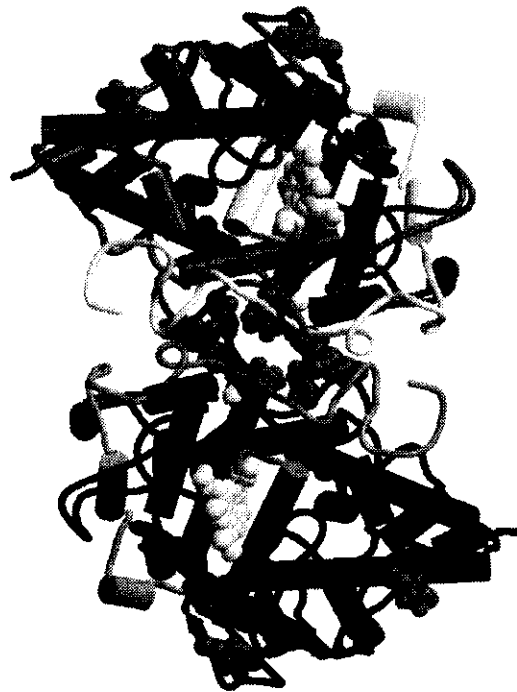


図 1 MPO の立体構造(PDB ID: 1CXP)
2本の重鎖を黒および濃い灰色、2本の軽鎖を薄い灰色および白で示した。
また、ヘムおよび塩素イオンを白で、カルシウムイオンを黒で、糖鎖を灰色で示した。

B. 研究方法

MPO の立体構造はすでに明らかになっているので、これをもとに相互作用部位を特定する。相互作用部位を特定するために、MPO フラグメントのエピトープとしてのリスクの実験結果と、MPO 分子表面の電荷分布の計算結果を用いる。

C. 研究結果

MPO は重鎖と軽鎖からなるヘテロダイマーが2つ結合したヘテロテトラマーである(図1)。それぞれのヘテロダイマーに糖鎖付加部位が3ヶ所あり、反応中心にヘムを持つ。また、塩素イオン結合部位とカルシウムイオン結合部位がある。

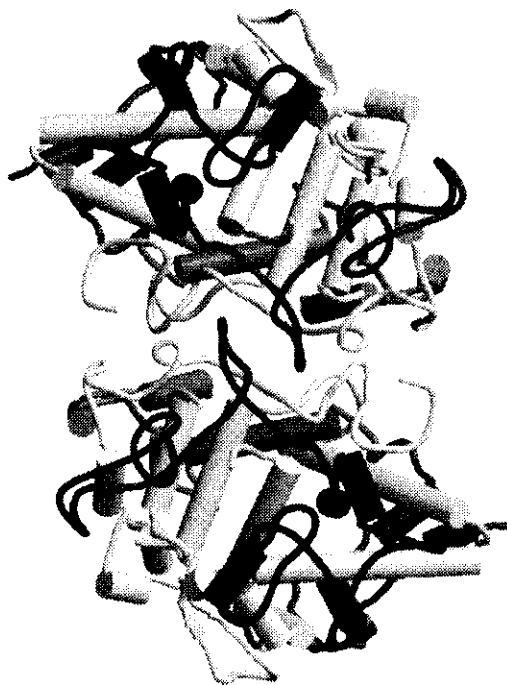


図2 リスクの高いフラグメント
リスクの高い重鎖のN末端の2つのフラグメントを黒および濃い灰色で、C末端の2つのフラグメントを灰色と薄い灰色で示した。

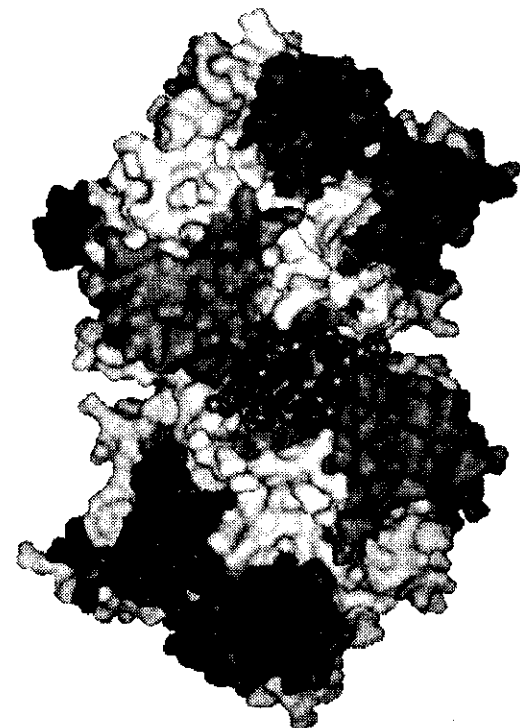
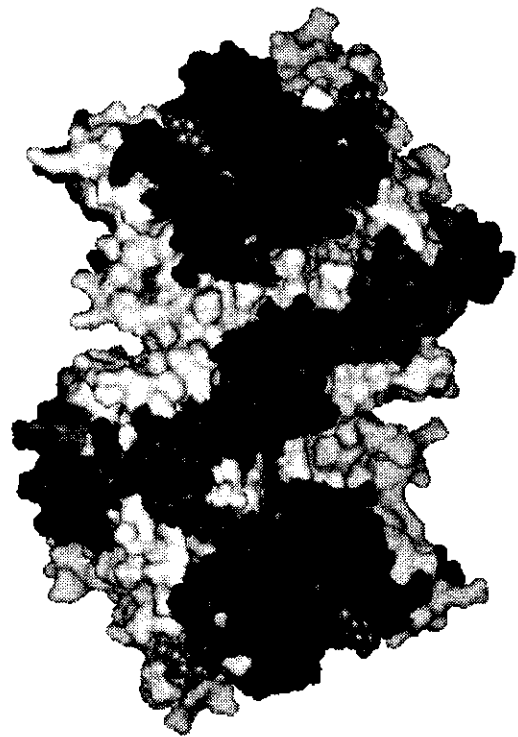


図3 MPO の分子表面にリスクの高いフラグメントが露出している部位
上と下は MPO 分子を逆の側から見たものである。色は図2に準じる。

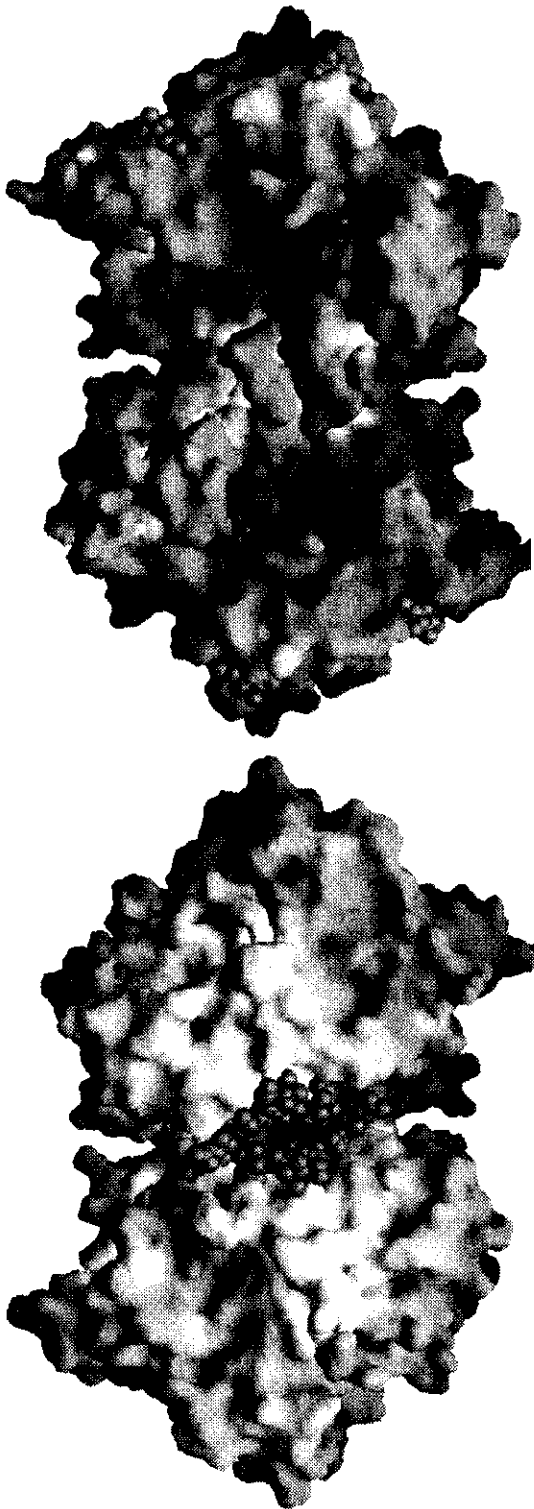
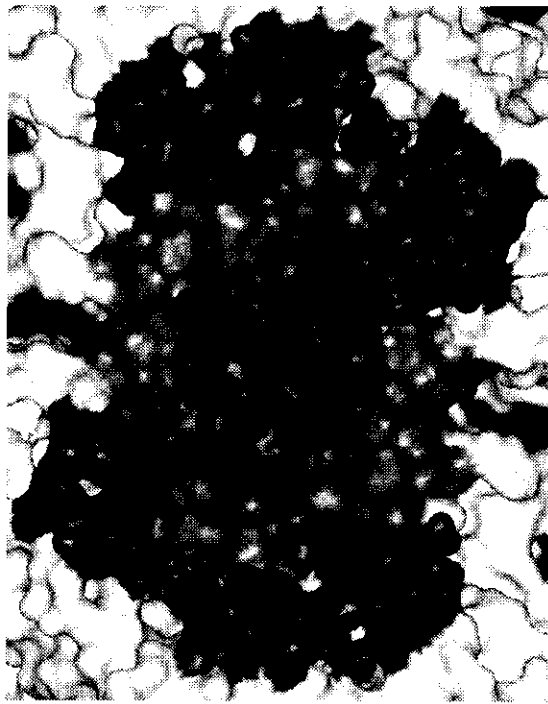


図4 MPOの分子表面の電荷分布
正電荷を白、負電荷を黒とする濃淡で表している。上と下はMPO分子を逆の側から見たものである。

MPOフラグメントのリスクの実験結果は、結節性多発動脈炎(PN)および顕微鏡的多発血管炎(MPA)患者で、MPOの重鎖のN末端に2つ、C末端に2つの計4つのフラグメントに単独で反応する抗体がその重症度と関連していることを示していた。MPO軽鎖にはこのようなリスクは認められなかった。この結果を分子上で示



軽鎖
VTCPEQDKYR TITGMCNRR SPTLGASRA FVRWPAEYE DGFSLPYGWT PGVKRNGFPV
ALARAVSNEI VRFPTDQLTQ DOERSLMFMQ WQQLDHDLD FTPEPAARAS FVTG
重鎖
VNCETSCVQQ PFCFLKIPP NDPRIKNQAD CIPFFRSCPA CPGSNITIRN QINALTSFVD
ASMVYGSEEP LARNLRNMSN QLGLLAVNOR FQONGRALLP FDNLHDDPCL LTNRSARIPC
FLAGDTRSE MPELTSMHTL LLREHNRLAT ELKSLNPRWD GERLYQEARQ IVGAMVQIIT
RYDYLPLVLG PTAMRKYLPT YRSYNDSDVP RIANVFTNAFR YGHTLIQPF MFRONRYQP
MEPNRPVPLS RVFFASWRVV LEGGIDPILR GLMATPAKLNQ ONQIAVDEI RERLFEQVMR
IGLDLPALNM QRSRDHGLPG YNAWRRFCGL POPETVGQGT VLRNLKLAR KLMEQYGTPI
NIDIWGGVYS EPLKRKGRVG PLLACIIGTO FRKLRDGRFW WENEGVFSM QQRQALAQIS
LPRIICONTG IITVSKNNIF MSNSYPRDFV NCSTLPALNLA SWREAS

図5 エピトープ部位の候補となるアミノ酸配列

活性部位付近の分子表面のうち、軽鎖を薄い灰色で、重鎖を濃い灰色で示した。また、これらの表面に対応するアミノ酸配列を下に下線で示した。

すと、図2のようになる。リスクの高いフラグメントはMPO分子の様々な部分にその位置を占めている。

さらに、分子表面を計算し、その上にマッピングすると図3のようになる。これらのフラグメントは分子表面のほぼ全域に渡って分布しており、4つないし3つのフラグメントが1ヶ所に集まるような部分は見られなかった。そこで、4つのうち2つが集まる部位に着目した。このような部位は、活性部位付近(図3の濃い灰色と黒)、N-アセチル-D-グルコサミン糖鎖の付加するAsn189周辺(黒と灰色)、Arg136のあるループ付近(濃い灰色と薄い灰色)、大きな糖鎖付近(薄い灰色と灰色)の4ヶ所存在する。

抗原抗体反応では疎水性相互作用は少なく、極性基を持つ残基による相互作用が主であることが知られている。そこで、分子表面の電荷分布を計算した(図4)。

MPOの表面は活性部位の側に正負両方の電荷が見られ、裏側は正電荷で占められていた。裏側の正電荷は糖鎖で覆われていて、抗原抗体反応にかかわるとは考えにくい。したがって、MPO-ANCAとの相互作用部位は活性部位周辺と考えられる。活性部位周辺で表面に露出している残基を図5に示す。MPOのMPO-ANCA結合部位はこれらの中にあることが期待される。

D. 考察

本研究により、MPOのMPO-ANCA結合部位はMPOの活性部位周辺である可能性が高いと考えられる。現在の所、MPO-ANCAが疾患にどのように関わるかは明らかになってい

ないので、MPOの活性と疾患との関係も不明である。しかし、MPO-ANCAによりMPOの活性が阻害など何らかの影響を受け、これにより疾患が起きると考えるのが自然である。したがって、MPO-ANCAがMPOの活性部位を覆うようにして結合するとする我々の結果は、合理的なものである。

今後はさらに細かい結合部位の検討を行い、より確からしいエピトープ部位の特定を行う。さらに、その結果を元にMPO-MPO-ANCA複合体のモデルを構築し、MPO-ANCAの作用機作と解明とこれを阻害するブロック抗体のデザインを行う予定である。

E. 結論

本研究でMPOの結晶構造とMPOフラグメントのリスクの実験結果を詳細に比較した結果、MPO-ANCAはMPOの活性部位を覆うようにして結合する可能性が高いと結論された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kazuo Suzuki	Epitope analysis of myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated glomerulonephritis.	Clin. Nephrology	53	242-252	2000
Kazuo Suzuki	Modulation of chemotaxis, O ₂ -production and myeloperoxidase release from human polymorphonuclear leukocytes by the ornithine-containing lipid and serineglycine-containing lipid of Flavobacterium.	FEMS Immunol. Med. Microbiol.	28	205-209	2000
Kazuo Suzuki	Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase.	J. Infectious Diseases	182	1276-1279	2000
鈴木和男	血管炎と自己抗体—抗好中球細胞質抗体を中心に—	最新医学	52	2636-2646	2000
Takao Arai	Construction of ELISA system to quantify human ST2 protein in sera of patients.	Hybridoma	19	151-159	2000
Takao Arai	Synergism between the calmodulin-binding and auto-inhibitory domains on calcineurin is essential for the induction of their phosphatase activity.	J. Biol. Chem.	275	11728-11734	2000
Takao Arai	The cloning and nucleotide sequence of human ST2L cDNA.	Genomics	67	284-290	2000
Takao Arai	Application of cationic liposomes to introduction of monoclonal antibodies into live cells.	Bioimages	8	57-64	2000
Eri Muso	Significantly high incidence and high morbidity of acute renal failure with respiratory tract involvement of p-ANCA-related angitis revealed in Kobe city and the environs after the Kobe earthquake in 1995.	Clinical Nephrology (Letter)	51	190-191	1999
Eri Muso	Significantly high regional morbidity of MPO-ANCA related angitis and/or nephritis with respiratory tract involvement after the 1995 great earthquake of Kobe (Japan).	Am. J. Kid. Dis.	35	889-895	2000

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koh Nakata	Therapeutic efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with idiopathic acquired alveolar proteinosis.	Am. J. Respir. Crit. Care Med.	163	524-531	2001
Koh Nakata	Serological diagnosis of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis.	Am. J. Respir. Crit. Care Med.	162	658-662	2000
Koh Nakata	Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte macrophage colony stimulating factor.	J. Exp. Med.	190	875-880	1999
Koh Nakata	Augmented proliferation of human alveolar macrophages after allogeneic bone marrow transplantation.	Blood	93	667-673	1999
Koh Nakata	Lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis express a factor which neutralizes granulocyte-macrophage colony stimulating factor.	FEBS Lett.	442	246-250	1999
中田 光	特発性肺胞蛋白症と抗GM-CSF自己抗体	Annual Review 免疫 2001		328-333	2000
中田 光	肺胞蛋白症最近の話題-肺胞蛋白症の原因物質	現代医療	31	160-164	1999
中田 光	自己免疫疾患としての特発性肺胞蛋白症	クリニカ	27	7-10	2000
中田 光	特発性肺胞蛋白症と抗GM-CSF自己抗体	臨床免疫	34	7-14	2000
中田 光	びまん性肺疾患の病態形成とサイトカイン	別冊・医学のあゆみ		44-47	2000

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kazuo Suzuki	Prevalence of inherited myeloperoxidase deficiency in Japan.	Petrides P.E., Nauseef W.M.	The peroxidase multigene family of enzymes.	Springer	Berlin	2000	145-149

20000490

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。