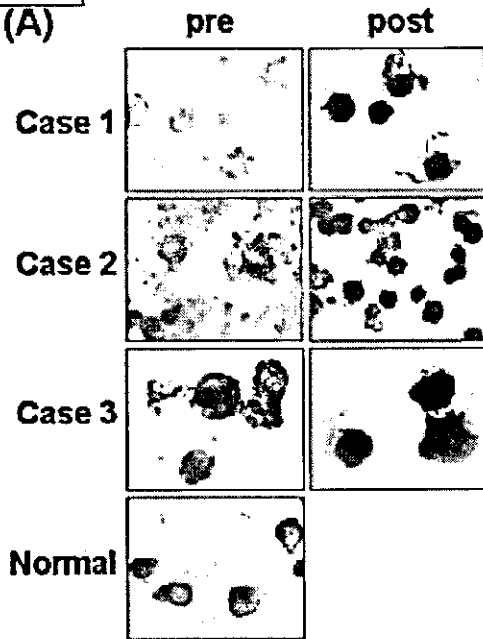


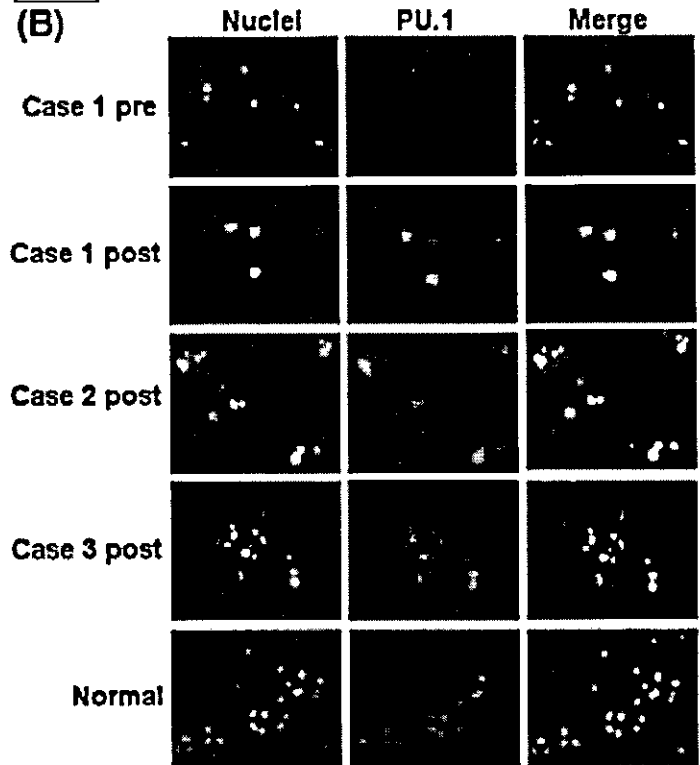
5

(A)



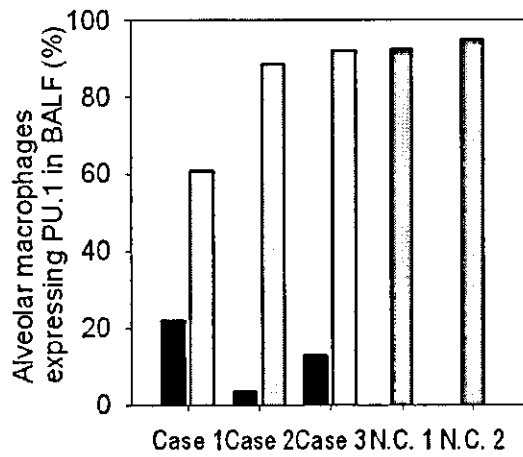
5

(B)



5

(C)



り込む際の重要な分子であるマンノース受容体の発現, およびマクロファージの分化と成熟を制御する重要な転写因子である PU.1 の発現は, ともに治療後増加した (図 5, 6). これらの結果は, GM-CSF 治療が, 肺胞マクロファージの分化を促し, 正常機能を回復させることを示唆する.

[治療後の BALF 中の GM-CSF 中和能と自己抗体価の減少]

特発性肺胞蛋白症患者での抗 GM-CSF 抗体は幅広い標的エピトープをもつ. さらに, 自己抗体量は生物学的効果や病勢と相関しない可能性がある (Blood 103:1089). そこで, GM-CSF 吸入が肺内の自己抗体価に与える影響を調べるため, 治療後の BALF について① GM-CSF 依存性細胞株を用いて GM-CSF 生物活性を抑える中和能を調べ, さらに② 酵素免疫アッセイにより, GM-CSF に結合している IgG 量を調べた (表 3). 本研究での 3 例では, GM-CSF 中和能は GM-CSF 治療後, 著明に低下した ( $p < 0.05$ ). 同様に, 抗 GM-CSF 抗体価も, GM-CSF 治療後, 著明に低下した. 血清中の抗体価は治療後, 治療前の 60-70% 程度になった. BALF 中の GM-CSF 中和能は, CEA ( $r = 0.886$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.0476$ ), 血清 SP-D ( $r = 0.943$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.035$ ), および血清 KL-6 ( $r = 0.943$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.035$ ) と有意の相関を示した. また BALF 中の抗 GM-CSF 抗体 ( $r = 0.829$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.0639$ ),  $PO_2$  ( $r = -0.829$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.0639$ ) とも相当の相関をみたが, 血清中の抗 GM-CSF 抗体 ( $r = 0.143$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.7494$ ) との相関はみられなかった. これらの結果は GM-CSF 吸入が, BALF 中の GM-CSF 中和能および自己抗体価を減らすことにより, 肺胞蛋白症患者の肺内の GM-CSF の生物活性を回復させたことを示唆する.

[治療後の GM-CSF-自己抗体免疫複合体の減少]

GM-CSF 吸入後, GM-CSF 中和能と自己抗体価の減少をみたことから, 外来性の GM-CSF が自己抗体に結合し, これにより, ELISA や生物活性解析により検出される遊離自己抗体を減少させたことが示唆された. もしこれが現実に生じているなら, 自己抗体に結合している GM-CSF は治療後, 増加している可能性がある. これを明らかにするため, BALF 中の自己抗体に結合している GM-CSF と結合していない GM-CSF の濃度を調べた. 予想に反して, 自己抗体に結合している GM-CSF も, 治療後, 検出限界以下に減少した (表 4). 一方, BALF 中で, 自己抗体に結合していない GM-CSF の濃度は, 治療前後とも, 検出限界以下で, 肺胞

蛋白症患者の肺では BALF 中の GM-CSF は完全に自己抗体に捕捉されていることが示唆された. 自己抗体に結合している GM-CSF を調べるため, 第 1 例の BALF 中の免疫複合体から GM-CSF を遊離させて, 免疫ブロット解析をおこなった. この解析では, 内在性の GM-CSF に相当する 23 kDa のバンドが検出され, 外来性の 14.5 kDa の GM-CSF より大きかった. 興味深いことに, 外来性の GM-CSF に相当するバンドは検出されなかった.

#### D. 考察

重症特発性肺胞蛋白症患者の BALF 中の肺胞マクロファージでは, 成熟したマクロファージの持つ機能が障害されている. 転写因子 PU.1 で制御されるサーファクタント代謝や宿主防御免疫などはそうした機能の典型である. 我々の先の報告は, 肺胞マクロファージの成熟障害が, 肺内の豊富な自己抗体により引き起こされることを示唆された (Blood 103:1089). 外来性の GM-CSF 投与による治療効果が過去 10 年の間に臨床試験により確立されてきたことから, 投与された GM-CSF が, 肺内微小環境における GM-CSF と自己抗体との未解明のバランスを, 変化させる, との仮説を立てることは可能であると考えられる.

特発性肺胞蛋白症の病的状態に対する外来性の GM-CSF の作用機序については, これまでいくつかの報告がある. Seymour らは GM-CSF 治療を受けた特発性肺胞蛋白症患者において, 造血系の反応がみられないことを報告した. Shoch らは, 特発性肺胞蛋白症患者において GM-CSF 治療が肺胞マクロファージの形態と, 接着能が回復することを示した. GM-CSF ないし血漿交換で治療された患者で, 特発性肺胞蛋白症の改善とともに, 血清中の抗 GM-CSF 抗体が減少したと報告された. Bonfield らは, 肺胞蛋白症患者での肺胞マクロファージにおける PU.1 と MCSF 受容体の発現の低下が, GM-CSF 治療により上昇することを *in vitro* での実験と, *in vivo* での皮下注射で示した.

これらの研究では, 治療が肺胞マクロファージの成熟を促すことを示されているが, 肺胞マクロファージが存在する肺内微小環境での変化については調べられていない. そこで, 本研究では, 以下の 2 点を探るために解析をおこなった. すなわち①治療中の BALF 中の GM-CSF 中和能の評価, および② GM-CSF-自己抗体免疫複合体の解析, である. 本研究で明らかになったことは, ① GM-CSF 吸入治療後, 特発性肺

胞蛋白症患者の BALF 中の GM-CSF 中和能と抗体価が減少した (表 3), ②治療後, BALF 中の GM-CSF-自己抗体免疫複合体量も減少した (表 4), ③第 1 例では, BALF 中の免疫複合体に結合している GM-CSF は外来性のリコンビナント GM-CSF ではなくて, 内在性の糖鎖をもつ GM-CSF であった, の 3 点である.

ヒトリコンビナント GM-CSF の吸入は, サルを用いた検討では, 静脈注射よりも効果的に, BALF 中の総細胞数を増加させた. また, GM-CSF ノックアウトマウスへの GM-CSF の吸入投与は, 肺組織所見, 肺胞マクロファージの分化, および SP-B 免疫染色の所見を改善させた. これらの結果は GM-CSF の吸入が, 肺胞マクロファージの増殖と機能的な成熟に効果的に影響をあたえる手段であることを示唆する.

先にわれわれは, 特発性肺胞蛋白症患者の肺では, 抗 GM-CSF 抗体が豊富に存在する一方, GM-CSF も, 正常肺と同等レベルに産生されていることを示した (Blood 103;1089). 治療後の患者の BALF 中で抗 GM-CSF 抗体と免疫複合体の減少をみたことから, GM-CSF 吸入が, 肺局所あるいは全身的に, 抗 GM-CSF 抗体の産生ないし除去の制御機構に影響することが示唆された.

そこで, われわれは, 抗体の減少が, 内在性の GM-CSF の生物活性を回復させ, 肺胞マクロファージの増加をもたらすと推論した. この推論を確かめるため, GM-CSF 依存性細胞株 TF-1 を用いて, BALF 中の生物学的に活性のある内在性 GM-CSF の存在を示そうとした. しかし, 正常者の BALF も, 治療後の肺胞蛋白症患者の BALF もこの細胞株の生存を維持できず, その GM-CSF 活性は検出限界以下であった (データは示していない).

なぜ外来性の GM-CSF が特発性肺胞蛋白症患者の BALF 中で GM-CSF 中和能と自己抗体価がともに減少するかは不明のままである. 第 2 例で免疫抑制剤処方中にもかかわらず, BALF 中の GM-CSF 中和能と自己抗体価が減少したことは興味深い所見である. さらなる研究の課題として以下の 2 点が挙げられる. すなわち①免疫複合体が自己抗体産生を制御する T 細胞群のプロファイルを変化させる可能性, および②抗 GM-CSF 抗体産生 B 細胞のアポトーシスが, 外来性 GM-CSF と自己抗体からなる免疫複合体により, B 細胞の negative selection の過程における抑制性の Fc $\gamma$ RIIB のような Fc 受容体を介して惹起される可能性, である.

臨床的な面で, 本研究は, BALF 中の抗 GM-CSF 抗体の定量が, それぞれの患者の GM-CSF 治療に対する反応を予測する際に有用であることを示唆する. BALF 中の GM-CSF 中和能は血清 CEA, KL-6, SP-D と有意に相関し, BALF 中の自己抗体価や PO2 とも相当の相関を示した. GM-CSF 治療の臨床試験で, PO2 や CT, 肺機能検査等でまったく改善を示さない患者の存在が明らかになった. さらに, これらの臨床指標の改善が遅れる例がしばしばあった. BALF 中の GM-CSF 中和能や自己抗体価を評価する技術は, 患者における GM-CSF 治療の効果の予測に有用と考えられる.

#### E. 結論

本研究は特発性肺胞蛋白症患者における肺胞マクロファージの機能のみならず, 肺内のマクロファージを取り囲む微小環境の評価の重要性を示した. BALF 中の GM-CSF 中和能と自己抗体価の測定技術は特発性肺胞蛋白症患者の治療法の最適化に貢献できる可能性がある.

#### F. 健康危険情報

GM-CSF 製剤 (Novartis 社 Leucomax) 吸入による副作用, 健康被害は本研究における 3 例にはまったく見られなかった.

#### G. 研究発表

##### 論文発表

Tazawa R, Hamano E, Arai T, Ohta H, Ishimoto O, Uchida K, Watanabe M, Saito J, Takeshita M, Hirabayashi Y, Ishige I, Eishi Y, Hagiwara K, Ebina M, Inoue Y, Nakata K, Nukiwa T. Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor and Lung Immunity in Pulmonary Alveolar Proteinosis. Am J Respir Crit Care Med. 2005 Feb 25; [Epub ahead of print]

田澤立之: 特発性肺胞蛋白症の GM-CSF 吸入治療と今後の展望. THE LUNG perspectives. 第 13 巻 91-92 頁, 2005 年.

##### 著書

田澤立之, 貫和敏博: 肺胞蛋白症のトランスレーショナル研究と新しい治療. 工藤翔二, 中田紘一郎, 貫和敏博編「呼吸器疾患最新の治療 2004-2006」, 南江堂, 東京, 26-31 頁, 2004 年.

田澤立之: 肺胞蛋白症. 萩原弘一編「呼吸器研修医ノート」, 診断と治療社, 東京, 604-606 頁, 2004 年.

学会発表

Tazawa R, Hamano E, Ohta H, Ishimoto O, Arai T, Uchida K, Watanabe M, Ebina M, Inoue Y, Nakata K, Nukiwa T. Effects of aerosolized GM-CSF therapy on alveolar macrophages in patients with pulmonary alveolar proteinosis. American Thoracic Society 100<sup>th</sup> International Conference, Orlando, May 2004.

田澤立之, 濱野栄美, 太田洋充, 新井徹, 石本修, 内田寛治, 渡辺雅人, 海老名雅仁, 井上義一, 中田光, 貫和敏博: 肺胞蛋白症患者におけ

る顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 吸入治療が肺胞マクロファージに及ぼす影響. 第44回日本呼吸器学会学術講演会, 東京都, 2004年3月.

\*学会賞

第17回内科学会奨励賞(日本内科学会) 2004年4月8日

田澤立之 「特発性肺胞蛋白症 (PAP) に対する顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 吸入療法」

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

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

研究協力者

国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部

内田 寛治

要約：特発性肺胞蛋白症 (idiopathic PAP; iPAP) 患者の血清中及び気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 中に、サイトカインである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) に対する中和自己抗体が存在することが報告されている。GM-CSF は肺胞腔内において肺胞マクロファージ (alveolar macrophage; AM) の終末分化を促し、サーファクタント代謝に重要な役割を担っているということが、GM-CSF シグナルのノックアウトマウスの研究からわかっている。GM-CSF ノックアウトマウスが PAP 類似の病像を呈することから、ヒト iPAP でも抗 GM-CSF 自己抗体による GM-CSF シグナル伝達の阻害が疾患発症と関連しているという仮説を立て、検証した。iPAP 患者より分離した AM 及び GM-CSF 依存性の細胞株である TF-1 を用いたバイオアッセイから、iPAP 患者 BALF 中に、GM-CSF 活性を中和する作用が認められた。また iPAP 患者血清中および BALF 中に、高濃度の抗 GM-CSF 自己抗体が疾患特異的に存在することがわかった。さらに、抗 GM-CSF 自己抗体は、肺胞内に局在しており、一部は GM-CSF と免疫複合体を形成していることが確認された。iPAP 患者から分離した自己抗体の結合力、中和能、特異性を検討した結果、自己抗体は GM-CSF とその受容体との間の結合力よりも強い結合力を持っており、非常に強い中和活性をもち、更に GM-CSF の立体構造を認識してその結合は高い特異性を持つことがわかった。自己抗体のエピトープ検索をした結果、自己抗体は GM-CSF の活性中心と言われるドメインを特に強く認識することがわかった。これらの結果から、iPAP 患者に特異的に発現している抗 GM-CSF 自己抗体は、肺内の GM-CSF 活性を効果的かつ強力に中和して、GM-CSF のシグナル伝達を阻害することにより、AM の成熟を抑制していると考えられる。

研究目的

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 (1-3)。1958 年に Rosen らが報告して以来、現在までに 200 以上の報告があり、400 名以上の症例が確認されている。発病率は 0.36、有病率は 3.7 (人口 100 万対) (4)、診断確定時年齢の平均値は 37.8 ± 13.3 歳で、2:1 ~ 4:1 で男性に多い疾患とされている (5-7)。臨床的に PAP は先天性、後天性に分類され、後天性はさらに、血液疾患、呼吸器感染症、粉塵吸入などに続いて発症する続発性と原因不明

とされる特発性に分類される。このうち特発性肺胞蛋白症 (idiopathic PAP; iPAP) は、PAP の 90% を占めると言われている (2)。iPAP は、自然緩解する症例から、高度の呼吸不全を呈する症例まで、その臨床経過は様々である (2)。

iPAP の病因は現在も不明であるが、近年サイトカインである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<sup>-/-</sup> mice) やそのリセプター欠損マウス (GM-RBc<sup>-/-</sup> mice) が、PAP 類似の病態を呈することから、GM-CSF シグナル伝達の異常が疾患発症と関連があるのではな

いかと考えられている(8-11)。

GM-CSF は、分子量 23kDa の糖蛋白で、肺の組織から分離された。造血系の前駆細胞の中で顆粒球、マクロファージのコロニー増殖を促す作用をもつことからこの名が命名された(12)。単球、マクロファージなど食食系細胞の増殖因子として働くほか、好酸球、赤血球、樹状細胞の産生も刺激することが知られている(13-16)。また、造血系前駆細胞だけでなく、GM-CSF は肺胞マクロファージ(alveolar macrophage; AM)などの成熟した血球系細胞や、血球系細胞以外の肺胞上皮細胞なども刺激することがわかっている(17-20)。GM-CSF のサーファクタント内発現濃度は、血清中の数百倍とも言われており(21)、また血液細胞以外の、肺線維芽細胞、気管支、気管上皮、肺胞 II 型上皮でも産生されている(22-25)ことから、肺内で特に大きな作用を持つものと思われていたが、GM-CSF 欠損マウス(GM<sup>-/-</sup> mice)やそのリセプター欠損マウス(GM-Rβc<sup>-/-</sup> mice)が造血系には異常を来さないのに対し、肺にはサーファクタント脂質が貯留する肺胞蛋白症類似の病像を呈した(8-11)ことで、GM-CSF の肺における重要性が特に認識されるようになった。

GM<sup>-/-</sup>マウスの肺胞蛋白症様病像あるいは病態は、[1]リコンビナント GM-CSF を全身ではなく肺に投与すること(26)、[2]ベクターを用いて気道上皮に GM-CSF を強発現させること(27)、[3]気道上皮に肺特異的プロモーターを用いて GM-CSF を強発現させる(28, 29)ことによって改善した。また GM-Rβc<sup>-/-</sup>マウスの PAP 類似病像は、ワイルドタイプドナーから骨髓移植することで改善した(30)。GM<sup>-/-</sup>マウスの AM はサーファクタント脂質、蛋白の貯留による、“泡沫状 (foamy appearance)” を呈し、食食能が低下し、接着力が低下するなど多くの機能低下が認められる(31-34)。これらの機能不全は GM<sup>-/-</sup>マウスにおいて GM-CSF を補充することで改善した(26-28, 32, 34)。また肺胞腔内における GM-CSF 発現が、骨髓系細胞の分化を誘導する転写因子である PU.1 の AM における発現を維持し、AM の終末分化を促すのに必須であるこ

とも確認されている(29, 33-35)。終末分化した AM はサーファクタントを代謝分解するという非常に重要な役割を担っていると考えられる。

ヒトの iPAP と GM-CSF<sup>-/-</sup>マウスとの病態の類似点には、以下の共通点が認められる。[1]iPAP 患者の組織像が GM<sup>-/-</sup>マウスのそれと非常に似ている(1, 8-11, 36, 37)。[2]iPAP のヒトと GM<sup>-/-</sup>マウスの AM にはいくつかの形態的機能的異常が認められる。すなわち“foamy”な形態(8, 9, 36, 38)、食食能の低下(32, 33, 36, 37, 39)、そして付着能の低下(32, 36)である。

このためヒト iPAP においても 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が、1999 年、中田らが iPAP 患者の血清、BALF 中に GM-CSF を中和する自己抗体を発見した(40, 41)。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(41, 42)。

これらの知見より、患者肺において肺が産生する GM-CSF が自己抗体により中和され、その生物活性が阻害される結果、GM-CSF 欠損マウス同様に肺胞マクロファージの分化障害が惹起されることが想定されたが、これまでこの仮説を裏付ける根拠となる報告はなされていなかった。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明らかにすべき点は以下の 3 点であると考えた。

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. またその障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

今回以上の各点を検討した。

#### IV. 対象と方法

#### IV-1. 材料

iPAP 患者 107 人、他の肺疾患患者 10 人 (特発性肺線維症 3 名、急性呼吸窮迫症候群 2 名、サルコイドーシス 3 名、膠原病性血管疾患 2 名)、健常者 19 人から血清を採取し、また iPAP 患者 34 人、他の肺疾患患者 14 人(サルコイドーシス 3 名、過敏性肺臓炎 2 名、好酸球性肺炎 4 名、特発性肺線維症 4 名、好酸球性肉芽腫 1 名)、健常者 18 人から気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)を採取した。また診断的肺生検を行った症例の肺組織を 3 検体、iPAP にアスペルギルス感染症を合併し、肺葉切除を行った症例の非感染肺を 1 検体、肺癌の肺葉切除症例の肺健常部を 4 検体得た。

iPAP は、臨床症状、胸部レントゲン写真、胸部 CT 写真、BALF の生化学的性状の解析 (proteinaceous material の存在、明らかな感染の否定、BALF 中の肺胞マクロファージの形状) で行い、肺生検を施行した症例は、組織病理学的な所見も含めて診断した。二次性 PAP の原因とされる、血液疾患、感染症などの基礎疾患を合併せず、toxic inhalation も無いことを確認した。また GM-CSF による治療歴の無い症例を対象とした。すべての患者から、文書によるインフォームドコンセントを得た。自己抗体価の測定用に採取した血清は自己抗体の血清診断目的で採取したものを使用した。抗体の性状解析用の血清、BALF、肺組織の採取は、本研究班に参加している 7 施設で行い、それぞれの施設の倫理委員会による承認を得た。

#### IV-2. 試薬

以下のリコンビナント試薬、抗体、細胞株は、併記した方々、施設から無償供与を受けた。大腸菌由来ヒト、マウス GM-CSF はキリンビール株式会社、Chinese hamster ovary cell (CHO)由来ヒト GM-CSF はノバルティスファーマ(株)、酵母由来ヒト GM-CSF は Immunex Corp.、リコンビナントウシ GM-CSF は横溝祐一氏 (家畜衛生試験場)。エピトープを決定した抗 GM-CSF マウス抗体(No. 4117, 1089, 3092, 1022 それぞれ GM-CSF のアミノ

酸残基 1-11, 40-77, 78-94, 110-127 を認識する) (43) は、金倉謙氏(大阪大学)。GM-CSF、IL-3、エリスロポイエチン依存性に増殖する細胞株(cell line)である TF-1 cell (44)は、北村俊雄氏(東京大学医学部附属医科学研究所)。

以下の試薬、抗体等は併記の企業より購入した。 [<sup>125</sup>I]-Bolton-Hunter 標識ヒトリコンビナント GM-CSF(recombinant human GM-CSF; rhGM-CSF)は NEN Life Science Products。リコンビナントヒトサイトカイン(Interleukin (IL)-3, IL-4, IL-10, 顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)、腫瘍壊死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、インターフェロン  $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、フィコエリスリン標識 rhGM-CSF (phycoerythrin labeled GM-CSF, PE-GM-CSF)は R & D Systems。Fluorescein isothiocyanate (FITC)ラベル抗ヒト IgG マウス抗体は BD Biosciences 社。パーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ウサギ F(ab')<sub>2</sub> ポリクローナル抗体、非標識抗ヒト IgG ヤギポリクローナル抗体は DAKO Corporation。パーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体は株式会社ニチレイ。抗ヒト GM-CSF ウサギ抗体、ヤギ中和抗体、マウス中和抗体は R&D Systems。ヒト精製 IgG は Sigma-Aldrich, Inc.。

GM-CSF 分子のアミノ酸残基 54-73 特異的ウサギ抗体は、同ペプチドをウサギに免疫し、アフィニティークロマトグラフィーで精製して得た。GM-CSF の 4 カ所のシステイン残基をカルボキシメチル化することで、S-S 結合を切断した GM-CSF (carboxymethylated)を作成した(45)。トリプシン消化した GM-CSF (trypsin fragment)は酵素/基質比を 1:50(wt/wt)で 37°C 18 時間反応させた後、high performance liquid chromatography (HPLC)で精製した(46)。

#### IV-3. 特発性肺胞蛋白症患者および健常者の気管支肺胞洗浄

iPAP 患者、健常者の BALF は、リドカ

インによる局所麻酔下、気管支ファイバースコープを用いて採取した。50ml の生理食塩水を右の中葉あるいは左の舌区に注入し、ただちに回収した。BALF から、細胞成分と上清を遠心分離し、細胞成分は細胞数を数えた後、集細胞遠心装置 (Cytospin®, Thermo Electron Corp.) を用いてプレパラート上に単層細胞標本作製し Wright-Giemsa 染色を行って、細胞分画を測定した。

#### IV-4. 特発性肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液が患者肺胞マクロファージの *in vitro* の成熟に及ぼす影響

肺胞蛋白症患者の肺胞マクロファージは、大きく 3 つの形態的特徴を持っているとされる (38,47)。このうち iPAP 患者の肺胞マクロファージの典型的形態とされる泡沫状マクロファージ (foamy macrophage)、死細胞様マクロファージ (ghost-like macrophage) は、プラスチックプレート付着能が弱く、単球様マクロファージ (monocyte-like macrophage) といわれる細胞成分が付着する。

iPAP 患者の気管支肺胞洗浄液から肺胞マクロファージを分離し、プラスチックプレート上で、RPMI1640 培地 (日本製薬株式会社) 中で 2 時間培養した後、付着細胞をトリプシン・エチレンジアミンテトラ酢酸 (trypsin ethylenediaminetetraacetic acid; trypsin-EDTA, Invitrogen Corp.) で処理し、セルスクレーパー (住友ベークライト) を用いて回収した。回収した付着細胞を  $5 \times 10^4$  cells / well で 96 穴プレートに播いた。培地中に、rhGM-CSF、及び 5 倍希釈の iPAP 患者または健常者の BALF を添加して、2 週間培養した。培養終了後、細胞の形態を位相差顕微鏡 (Diaphot 300, ニコン) で観察し、生細胞率をトリパンブルー色素排除試験で測定した。また細胞のフォルマザン形成能を 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) アッセイ法を用いて測定した (41, 48)。培地中に MTT (Sigma Chemical Co.)  $5 \mu\text{g/ml}$  を加えて 5 時間培養し、フォルマザンの針状結晶が形成された後、isopropanol/0.1N HCl で結晶を可溶化し、595nm の

吸光度を測定した。

#### IV-5. 特発性肺胞蛋白症患者肺および正常肺における GM-CSF の免疫組織学的証明

iPAP 患者の診断的胸腔鏡下肺生検組織を 10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋したサンプル 3 症例から、 $5 \mu\text{m}$  切片を作成した。また iPAP 経過中に肺アスペルギルス症に罹患した患者の切除肺で、病理学的に感染していない部分を periodate / lysine / paraformaldehyde で 10 時間  $4^\circ\text{C}$  で固定した (49)。サッカロースで組織を脱水したのち、Tissue Tek® (Sakura Finetechnical Co., Ltd.) に包埋して、液体窒素中で凍結し、Kryostat (Leitz) を用いて  $5 \mu\text{m}$  切片を作成した。コントロールとして肺癌患者 4 例の切除肺のうち、正常部の組織切片を用いた。これらの切片を室温でブロッッキング液 (10mM Tris, 5mM EDTA, 0.15M NaCl, 0.25% gelatin, 0.05% (vol/vol) Tween 20, pH 8.0) に 30 分浸透し、Tris buffered saline (TBS) で洗浄したのち、一次抗体として 100 倍希釈抗ヒト GM-CSF マウス抗体 (R&D Systems) を加えて 1 時間インキュベートした。TBS で洗浄し、パーオキシダーゼ標識抗マウス抗体 (ニチレイ) を加えて 30 分インキュベートした。洗浄後、3-amino-9-ethyl carbazole (AEC) liquid Substrate Chromogen (DAKO) を用いて発色させた。

また連続した切片で、サーファクタントアポ蛋白 A (surfactant apoprotein A, SP-A) の免疫染色も行った。上記と同じ方法で、一次抗体に 100 倍希釈マウス抗ヒト SP-A (DAKO) を用い、発色には Diaminobenzidine (DAB) (ニチレイ) を用いた。

#### IV-6. 特発性肺胞蛋白症患者および健常人の気管支肺胞洗浄液中 GM-CSF 生物活性の測定

Macrophage-SFM medium (Invitrogen Corp.) に、iPAP 患者 (n=8) の BALF、あるいは健常者 (n=6) の BALF を 5 倍希釈で添加した培地を作成し、GM-CSF 依存性細胞株である TF-1 細胞を 96 穴プレート中で培養した。各ウェルに段階的に濃度を変化させた rhGM-CSF を加えた (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20ng/ml)。 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  で 3 日間培養した



のち、細胞のフォルマザン形成能を前述の MTT アッセイ法を用いて測定した。

結果をもとに、細胞生存の割合を以下の計算式で求めた。

$$\text{Cell survival (\%)} = 100 \times [\text{Absorbance(A)} - \text{Absorbance(B)}] / [\text{Absorbance(C)} - \text{Absorbance(B)}]$$

Absorbance(A): 各ウェルで測定した吸光度

Absorbance(B): GM-CSF 濃度 0ng/ml のウェルの吸光度

Absorbance(C): BALF を添加せず、GM-CSF 濃度 20ng/ml のウェルの吸光度

TF-1 細胞の 50%増殖率を得るために必要な rhGM-CSF 濃度(50% survival concentration: SC<sub>50</sub>, ng/ml)を各 BALF で算出し、以下の計算式により、各患者 BALF による GM-CSF 中和能を求めた。

$$\text{GM-CSF neutralizing capacity (ng equivalents / ml BALF)} = \text{SC}_{50}(\text{C}) - \text{SC}_{50}(\text{B})$$

SC<sub>50</sub>(C): BALF 非添加群の SC<sub>50</sub>

SC<sub>50</sub>(B): BALF 添加群の SC<sub>50</sub>

また、健常者 BALF 中の GM-CSF 濃度を高感度 enzyme-linked immuno adsorbent assay (ELISA)キット(AN' ALYSA®, R&D Systems)を用いて定量した。このキットはマイクロプレートに抗ヒト GM-CSF マウス抗体がコートされている。製造元の指定プロトコールに従って、200 μl のサンプルを加えて室温で 3 時間インキュベートし、アルカリホスファターゼ標識された抗ヒト GM-CSF 抗体で検出した。650nm での吸光度を測定した。

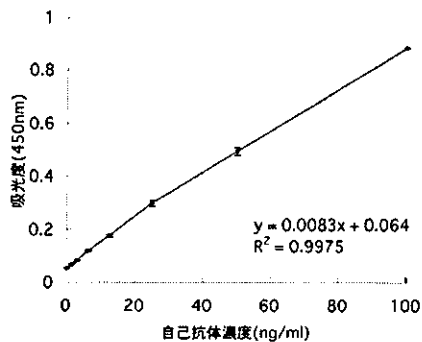
#### IV-7. 特発性肺胞蛋白症患者血清中の自己抗体の精製と純度の検討

iPAP 患者血清を、33%硫酸アンモニウム沈殿法によって、粗精製を行った。10mM リン酸バッファーで透析を行ったのち、NHS-activated Hi-Trap (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.)に大腸菌由来の rhGM-CSF を重合させたアフィニティーク

ロマトグラフィーカラムにかけて精製した。リガンドに結合した自己抗体は 0.1M のリン酸バッファー pH7.5 で洗浄後、同じバッファーと pH2.0 のクエン酸バッファーのグラディエントにより pH を低下させて(pH7.5-2.0)溶出させた。分離した抗体の純度は、ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulphate;SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE)で確認した。また精製した抗体価は、Bradford 法による蛋白定量(Bio Rad Co. Ltd.)と、非標識抗ヒト IgG 抗体(DAKO)とパーオキシダーゼ標識の抗ヒト IgG 抗体(DAKO)を用いた ELISA 法を用いて定量した。標準液としてヒト IgG(Sigma-Aldrich, Inc.)を用いた。

#### IV-8. 特発性肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液中、血清中の自己抗体価の定量

BALF 中、血清中の自己抗体価は、上述の精製した抗 GM-CSF 自己抗体を標準として、sandwich ELISA 法で定量した。ELISA 用マイクロタイタープレートを、リコンビナントヒト GM-CSF 1 μg/ml で 4℃一晩コートし、1%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin; BSA)で室温 1 時間ブロッキングした。希釈バッファー(phosphate buffered saline(PBS) / 0.1% ヤギ血清 / 0.1% tween 20)で BALF は 10 倍、血清は 3000 倍に希釈して、50 μl をプレートに加えた。室温 1 時間インキュベートし、洗浄後、パーオキシダーゼ標識の抗ヒト IgG ウサギ F(ab)<sub>2</sub> 抗体(DAKO)を加えて rhGM-CSF に結合した自己抗体を検出した。Tetramethylbenzidine (DAKO)を用いて発色させ、450nm での吸光度を測定した。この方法は、0.78-100ng/ml の範囲で非常に良い直線相関が得られた(図 1)。



IV-9. 特発性肺胞蛋白症患者肺における抗 GM-CSF 自己抗体の局在

IV-5 で述べた肺組織切片のうち、iPAP 患者肺 1 サンプル、健常肺 1 サンプルを使用した。肺切片を、1% BSA/PBS で 30 分ブロッキングし、同じバッファーで 100 倍希釈した PE 標識 rhGM-CSF と FITC 標識抗ヒト IgG を加えて 1 時間室温でインキュベートした。PBS で洗浄後、蛍光シグナルを共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss Co., Ltd.)で観察した。連続切片をヘマトキシリン-エオジン(hematoxylin and eosin, HE)染色し、対照とした。

#### IV-10. 特発性肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液中の GM-CSF と自己抗体の免疫複合体の証明

iPAP 患者 BALF 中の GM-CSF と自己抗体との免疫複合体をイムノプロット法を用いて証明した。

##### IV-10-1. 免疫沈降法による証明

iPAP 患者の BALF 10ml を、水飽和した 1-butanol 10ml と混和し、分離した下層(水層部分; 親水性物質が溶出)を採取し、-20℃で 4 倍量のアセトンを加えて蛋白を濃縮した。析出蛋白を 2000 x g で遠心分離して、沈殿を PBS に溶解し、BALF のブタノール-アセトン抽出サンプルとした。このサンプル 27 μg を protein A Sepharose™ 4 Fast Flow (Amersham Biosciences)と混和し 4℃16 時間インキュベートしたのち、遠心分離して上清(分画 1: protein A beads に結合しない蛋白を含む)と protein A beads を回収した。protein A 結合蛋白は、100mM glycine-HCl(pH2.7)で溶出させた(分画 2)。分画 1,2 を 80%冷アセトンで再び抽出し、SDS sample buffer

(0.025M tris, 10%w/v glycerol, 1%w/v SDS, 0.05M β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue)に溶解した。陰性コントロールとして、健常者からの BALF に同様の処理を行った。40mA、30 分電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、引き続いて polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Millipore Corp.) に 12V, 75 分で転写した。PVDF 膜を 2.5% skimmed milk / PBS / 0.1% tween 20 で 4℃、16 時間ブロッキングし、引き続いて抗ヒト GM-CSF ウサギ抗体 1 μg/ml と室温、1 時間インキュベートし、洗浄後 100 倍希釈パーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体(ニチレイ)と室温 1 時間インキュベートした。抗体が結合した GM-CSF は、化学発光(ECL® plus; Amersham Pharmacia Biotech)させ、写真フィルム (Hyperfilm® ECL®, Amersham Pharmacia Biotech)に感光し、検出した。

##### IV-10-2. Native PAGE による証明

IV-10-1 で述べたブタノール-アセトン抽出サンプル 20 μg を、native PAGE 用サンプルバッファー(0.025M Tris-HCl, 10%w/v glycerol, 0.01% bromophenol blue)に溶解し、native PAGE を行った。40mA、40 分で電気泳動(SDS-PAGE)を行った。泳動後、IV-10-1 と同様に PVDF 膜へ転写し、抗ヒト GM-CSF ウサギ抗体による GM-CSF の検出を行った。また同様の操作で、パーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ウサギ抗体によるヒト IgG の検出も行った。

#### IV-11. 特発性肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液中の自己抗体による免疫複合体の *de novo* 形成

iPAP 患者 BALF 100 μl 相当の蛋白を濃縮し、0.03pmol の [<sup>125</sup>I]-GM-CSF と混和後、サンプルバッファー(100mM tris HCl pH7, 20%[vol/vol] glycerol, 0.1%[vol/vol] nonidet P-40, 0.025 bromophenol blue)に溶解して 30mA, 40 分電気泳動 (native PAGE)を行った。同量の健常者 BALF を対照とした。泳動後ゲルを乾燥し、BAS2500(FUJIFILM)を用いてゲル中の放射活性を画像化した。

#### IV-12. 抗 GM-CSF 自己抗体の性状解析—中和活性

GM-CSF 依存性細胞株である TF-1 細胞を用いて自己抗体の中和活性を定量した。患者血清より Protein G を用いたカラムクロマトグラフィーを用いて IgG 画分を精製し、前述の ELISA 法で自己抗体濃度を定量したものを材料とした。対照として、抗ヒト GM-CSF 中和マウス抗体(R&D Systems)、抗ヒト GM-CSF 中和ヤギ抗体(R&D Systems)、ヒト標準 IgG(DAKO)を用いた。TF-1 細胞( $4 \times 10^4$  cells/well)を、rhGM-CSF 5ng/ml と様々な濃度の自己抗体(または他動物種の抗 GM-CSF 抗体、ヒト IgG)を含む RPMI1640 培地中で 3 日間培養した後、細胞の生残率を前述の MTT アッセイ法で定量した。

抗体による TF-1 cells の%阻害を以下の式で計算した。

$$\text{Growth inhibition (\%)} = 100 \times [\text{Absorbance(A)} - \text{Absorbance(B)}] / [\text{Absorbance(A)} - \text{Absorbance(C)}]$$

Absorbance(A): 抗体(-)、GM-CSF 5ng/ml(+)の well の吸光度

Absorbance(B): 各 well の吸光度測定値

Absorbance(C): rhGM-CSF(-)の well の吸光度

各抗体の増殖阻害曲線から、50%の細胞増殖抑制を起こす抗体濃度(inhibitory concentration:  $IC_{50}$ )を求めた。

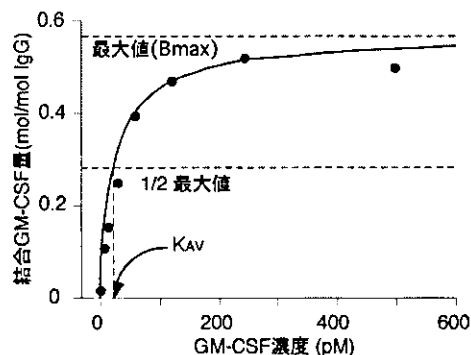
#### IV-13. 抗 GM-CSF 自己抗体の性状解析—結合力

自己抗体と rhGM-CSF との結合の強さ(avidity,  $K_{AV}$ )と結合容量(Capacity,  $B_{max}$ )は、iPAP 患者血清から protein A カラムクロマトグラフィーによって抽出した IgG 画分を用い、Svensonらの方法で測定した(50)。0-500pM の様々な濃度に設定した $^{125}I$ -GM-CSF を、リン酸バッファー(PBS / 0.1%Triton X / 2%BSA)中で、10pM の自己抗体と 4℃、16 時間反応させた。非特異的結合は、標準ヒト IgG(DAKO)を用いて測定した。その後反応液を Protein G Sepharose<sup>(TM)</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences) 100  $\mu$ l(この Protein G 量は、反応液中の自己抗体をすべて結合するのに十分量である)を入れたカラムに加え、4℃で反応させた。カラム

を容量の 6 倍量の PBS / 0.1% Triton X と 2 倍量の 10mM 酢酸アンモニウムで洗浄して自己抗体と非結合の $^{125}I$ -GM-CSF を回収した後、自己抗体、及び自己抗体と結合した $^{125}I$ -GM-CSF を 100mM の glycine-HCl pH 2.2 で溶出させ、回収した。

自己抗体結合 $^{125}I$ -GM-CSF と、非結合 $^{125}I$ -GM-CSF の放射活性をガンマカウンター(Packard Instrument Co. Ltd.)で測定した。その結果得られた飽和結合曲線のプラトー値を Binding capacity ( $B_{max}$ , sites/mol IgG)として算出し、また患者個々の抗体に対して、50% $B_{max}$  を得る時の free GM-CSF 濃度を平均 affinity(avidity,  $K_{AV}$ )として算出した(図2)。

図2：抗 GM-CSF 自己抗体と $^{125}I$ -GM-CSF との



飽和結合曲線 (典型例)

曲線のプラトー値を  $B_{max}$ 、1/2 $B_{max}$  を得る GM-CSF 濃度を  $K_{AV}$  とした。

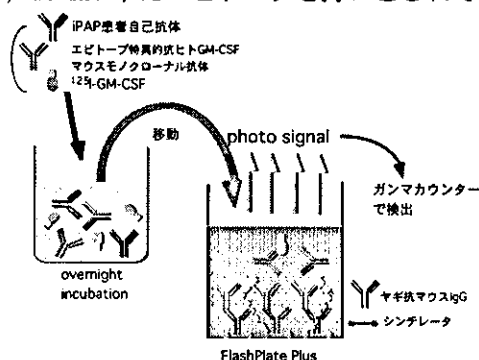
#### IV-14. 抗 GM-CSF 自己抗体の性状解析—結合の特異性

抗 GM-CSF 自己抗体と各種 rhGM-CSF、他の動物種の GM-CSF 及び同種の他のサイトカインとの結合を ELISA 法を用いて検討した。IV-8 で述べた方法と同様、上記サイトカインを 1  $\mu$ g/ml でマイクロプレートにコートし、洗浄、ブロッキングしたものに、iPAP 患者 12 例の血清から Protein G カラムクロマトグラフィー法で精製した自己抗体 100ng/ml を 50  $\mu$ l 加え、室温 1 時間反応させた。

洗浄後パーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ウサギ F(ab)<sub>2</sub> 抗体(DAKO)と室温 1 時間インキュベートし、再び洗浄後 Tetramethylbenzidine (DAKO)を用いて発色させ、450nm での吸光度を測定した。positive control として、*E. coli* 由来の rhGM-CSF をコートしたウェルの吸光度を基準にとり、これに対するパーセンテージで各蛋白と自己抗体との結合度を比較した。

#### IV-15. 抗 GM-CSF 自己抗体の性状解析—GM-CSF 分子の認識部位の同定

4 種類の抗ヒト GM-CSF マウスモノクローナル抗体 (No. 4117, 1089, 3092, 1022、これらはそれぞれ GM-CSF のアミノ酸残基 1-11, 40-77, 78-94, 110-127 中にエピトープを持つとされている



FlashPlate Plus®を用いた拮抗阻害試験の該略図。自己抗体、マウスモノクローナル抗体および放射ラベルの GM-CSF とを混合してインキュベートし、それを FlashPlate Plus®に移動する。マウス抗体は底面に固相化されているヤギ抗マウス抗体によって補足される。マウス抗体と結合した放射ラベル GM-CSF の放射活性が、シンチレータと反応して photo signal を発生する。これをガンマカウンターで検出する。

(43))1 μg/ml と、0-1 μg/ml の iPAP 患者自己抗体とを混和した。対照として、ウサギ抗 GM-CSF 54-73 アミノ酸残基に対するペプチド抗体(IV-2. 試薬の項参照)、ヒト標準 IgG(DAKO)を用いた (図 3)。混合液に<sup>125</sup>I-GM-CSF 1ng/ml を加えて2%BSA/0.1% Triton X-100/PBS 中で4℃、一晩インキュベートした。その後混合液を抗マウス IgG ヤギ抗体がコートされているプラスチック

シンチレータを底面に含む 96 穴の FlashPlate Plus®(Perkin-Elmer)に移し、更に 2 時間インキュベートした。マウスモノクローナル抗体と結合した<sup>125</sup>I-GM-CSF をシンチレーションカウンター (TopCount®, Perkin-Elmer)で測定した。自己抗体によるマウスモノクローナル抗体と<sup>125</sup>I-GM-CSF との結合阻害の割合は以下の計算式で算出した。

$$\text{Percent inhibition (\%)} = 100 \times [\text{Cpm(A)} - \text{Cpm(B)}] / [\text{Cpm(A)} - \text{Cpm(C)}]$$

Cpm(A): 自己抗体(-)、マウスモノクローナル抗体 (+)、<sup>125</sup>I-GM-CSF(+)

Cpm(B): 各ウェルの測定放射活性

Cpm(C): 自己抗体(-)、マウスモノクローナル抗体 (-)、<sup>125</sup>I-GM-CSF(+)

#### IV-16. 統計解析

統計解析は StatView version 4.0 software (Abacus Concepts, Inc.)を用いて行った。ノンパラメトリックデータの群間有意差は、マン・ホイットニ検定またはクラスカル・ワーリス検定で判定した。P 値が 0.05 未満を有意と判定した。

## V. 結果

### V-1. 特発性肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液による肺胞マクロファージの成熟抑制

iPAP 患者(n=34)の BALF 中の細胞(BALF cell)の分画および細胞数を健常者(n=18)のそれらと比較すると、健常者が 90%以上 AM であるのに対して、iPAP 患者は AM の数が約 3 分の 1 まで減少し (中間値: 健常者 13.2 x10<sup>4</sup>/ml, iPAP 患者 4.2 x10<sup>4</sup>/ml)、リンパ球の数が有意に増加していた (中間値: 健常者: 0.8 x10<sup>4</sup>/ml, iPAP 患者 3.2 x10<sup>4</sup>/ml) (表 1)。

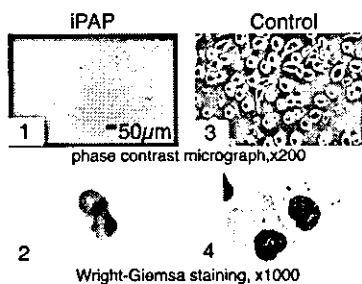
表1：iPAP患者と健常者気管支肺胞洗浄液中細胞数、分画

| 患者数    | 性別<br>(男女) | 年齢<br>中央値(範囲) | BAL中央腔数<br>( $\times 10^6/ml$ )<br>中央値(範囲) | 細胞分画                            |                                    |                                   |                                |                              |
|--------|------------|---------------|--|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
|        |            |               |  | 表上腔腔数( $\times 10^6/ml$ ):中央腔腔数 |                                    |                                   |                                |                              |
|        |            |               |  | macrophage                      | lymphocyte                         | neutrophil                        | eosinophil                     |                              |
| iPAP患者 | 34         | 10(7-24)      | 52(28-79)                                  | 10.5(2.8-55.9)                  | 4.2(2.17-36.5)*<br>30.0(3.9-90.9)* | 3.2(0.5-52.6)*<br>32.5(6.8-94.1)* | 0.3(0.0-4.8)<br>2.3(0.0-15.0)* | 0.0(0.0-0.3)<br>0.3(0.0-6.3) |
| 健常者    | 18         | 10(7-24)      | 50(27-72)                                  | 14.0(2.8-42.2)                  | 13.2(3.3-39.8)<br>93.3(84.0-96.8)  | 0.8(0.2-3.1)<br>6.0(2.9-14.0)     | 0.1(0.0-0.4)<br>0.3(0.0-2.0)   | 0.0(0.0-0.2)<br>0.0(0.0-1.0) |

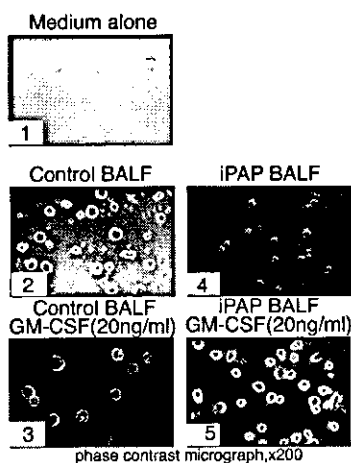
\*健常者と比較して有意差あり (p<0.05)

プラスチックプレート付着分離法によって得られた iPAP 患者の肺胞マクロファージ(iPAP-AM)は、健常者の AM と比較して小さい単球様の形態を示した(図 4-A)。この iPAP-AM の GM-CSF 存在下での成長に、iPAP 患者の BALF が抑制効果をもつかどうかを検証するために、BALF を培地

A：分離直後



B：2週間培養後の形態

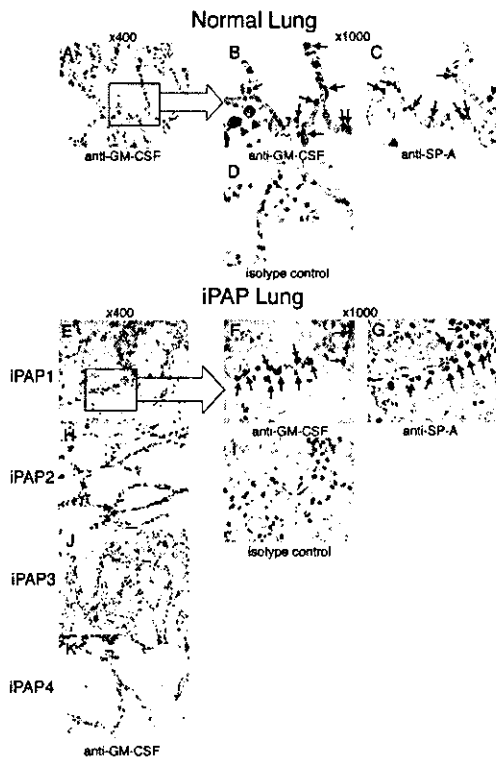


中に添加して形態の変化、成長を観察した。5 倍希釈の健常者 BALF 存在下で 14 日間培養したところ、iPAP-AM は培養前(図 4-A-1)、あるいは培地のみで 14 日間培養したもの(図 4-B-1)と比較して成長していた(図 4-B-2)。

健常者 BAL に 20ng/ml の rhGM-CSF を加えると細胞の成長はさらに促進された(図 4-B-3)。しかし iPAP-BALF を加えた場合は、細胞の成長は阻害された(図 4-B-4)。20ng/ml の GM-CSF を加えることで、この阻害は解除された(図 4-B-5)。健常者 BALF(n=3)、iPAP-BALF(n=3)と rhGM-CSF による iPAP-AM の成長を MTT アッセイ法で確認したところ、培地のみウェルの 595nm 吸光度を 100%とすると、健常者 BALF 添加群で 101.4±9.3(%、平均±標準偏差)、健常者 BALF+GM-CSF20ng/ml 添加群で 119.8±8.9、iPAP-BALF 添加群で 83.8±8.6、iPAP-BALF+GM-CSF20ng/ml 添加群で 122.0±17.1 と、形態の変化とほぼ同様の結果が得られた(図 4-C)。すべての培養条件で、トリパンプルーを用いた色素排除試験による生存率は 90%以上であった。この結果から、GM-CSF の bioactivity は、iPAP-BALF 中では阻害されており、またこの阻害効果は過剰な GM-CSF を投与することで解除できることがわかった。

V-2. 特発性肺胞蛋白症患者の肺における GM-CSF 発現

V-1 の結果から、iPAP 患者の BALF 中には GM-CSF 活性が欠失していると考えられる。そこで iPAP 患者の肺組織での GM-CSF 発現があるかどうかを免疫組織化学染色で検討した。また連続切片上で、肺胞 II 型上皮を Surfactant protein-A(SP-A)を染色することにより同定した。その結果、正常肺では GM-CSF が、肺胞 II 型上皮(赤、図 5-A,B、矢印)に強く発現しており、AM(5-B;矢印頭)にも発現が認められた。また iPAP 肺でも、



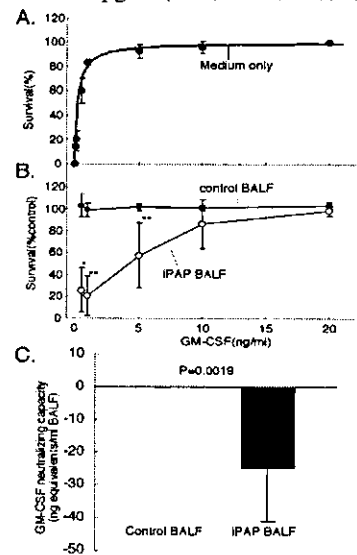
肺胞 II 型上皮に GM-CSF の局在がみられた (赤、図 5-E, F 矢印, H, J, K)。また、iPAP4 例、正常肺 4 例の全肺胞上皮細胞中、GM-CSF 陽性細胞の割合は、iPAP 肺が  $50.5 \pm 8.4\%$  (平均±標準偏差)、正常肺が  $40.8 \pm 5.0\%$  (平均±標準偏差)であり、少なくとも iPAP 肺では正常肺と同レベルであることがわかった( $p=0.08$ )。

V-3. 特発性肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液中の

GM-CSF の生物活性の測定

V-1,2 の結果、iPAP 患者では、肺組織中に GM-CSF の発現は認められるが、BALF 中にはその生物活性が存在しないということが示唆された。そこで GM-CSF 依存性細胞株である TF-1 細胞を使って、実際に BALF 中の GM-CSF 生物活性を定量した。TF-1 細胞は、GM-CSF によって用量依存的に増殖し、2-3ng/ml という低濃度で生存率が極大に達した(図 6-A)。培地に 20%vol/vol の健常者 BALF(n=6)を加えても、GM-CSF 依存性の細胞増殖には影響を来さなかった。このことから健常者 BALF には、GM-CSF 活性阻害効果が存在しないと考えられた (図 6-B)。一方 iPAP 患者(n=8)の BALF を加える(20%vol/vol)と、生存曲線が有意に右方へ移動し、GM-CSF の阻害活性が存在することが明らかになった(図 6-B)。添加する GM-CSF を 20ng/ml まで増加させると、この阻害活性は消滅した。

BALF 中の GM-CSF の生物活性を TF-1 細胞の生存曲線の回帰曲線から求めると、iPAP 患者 BALF では、 $-24.9 \pm 16.4$ ng equivalents/ml BALF(平均±標準偏差、中間値 -23.3、範囲 -57.5 - -4.3)で、健常者 BALF では、 $0.017 \pm 0.387$ ng/ml(中間値 -0.126、範囲 -0.341-0.635)であった(図 6-C)。BALF 中の GM-CSF 濃度を ELISA 法で定量した結果、健常者では  $1.07 \pm 0.16$ pg/ml(n=6、平均±標準偏差、範囲 0.88-1.28)であったことから、iPAP 患者 BALF が中和しうる GM-CSF 量は、健常者に存



在する GM-CSF 量を 4000 倍以上大きく上回っていることがわかった。

#### V-4. 特発性肺胞蛋白症患者血清中抗 GM-CSF 自己抗体 の精製

33%硫酸アンモニウム沈殿法による粗精製後、*E. coli* 由来のリコンビナント GM-CSF をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーによって自己抗体を精製した。典型的な精製過程は表 2 にまとめた。精製の過程で、IgG 濃度と蛋白濃度を測定した。IgG の内 GM-CSF 結合抗体の割合を吸光度 450nm の sandwich ELISA 法で測定した。

抗GM-CSF自己抗体の精製

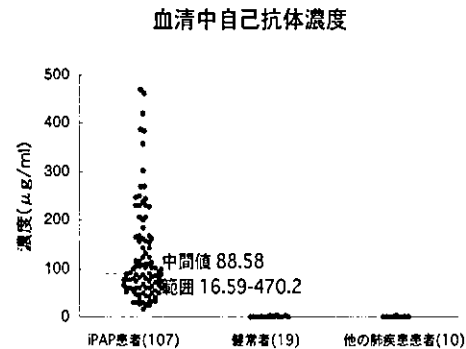
| サンプル                    | 総蛋白 (mg/ml) | IgG (mg/ml) | IgG 濃度 (%) | GM-CSF 特異的活性割合 (0.01450 濃度蛋白 1 とした時) | 純度 (血清を 1 とした時) |
|-------------------------|-------------|-------------|------------|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 血清                   | 117         | 31.7        | 27.1       | 50.23                                | 1               |
| 2. 硫酸アンモニウムによる粗精製画分     | 38.9        | 15.7        | 40.4       | 748.3                                | 14.9            |
| 3. アフィニティークロマトグラフィー精製画分 | 0.082       | 0.08        | 97.6       | 1792.7                               | 35.7            |

・GM-CSF 特異的活性は、アンチゲンキャプチャーアッセイによる 450nm の吸光度で測定した。  
 ・GM-CSF 特異的活性割合は GM-CSF 特異的活性を総蛋白で割ったもの。

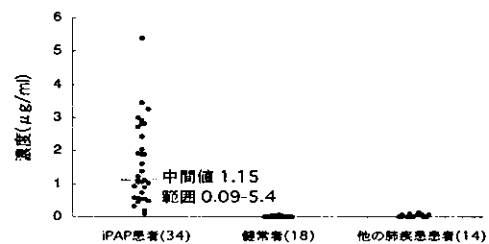
GM-CSF に結合した自己抗体は、バッファーと酸のグラディエントにより溶出したが、pH 6.6-5.8 の部分で小さなピークが認められ、これは GM-CSF との非特異的結合蛋白と考えられた(図 7A)。主要なピークは pH 3.5-2.7 の部分にあり、これは rhGM-CSF と強力に結合するものと考えられ、この部分を回収した(図 7A)。最終標品中の抗体-総蛋白比は 0.98 で、SDS-PAGE 上も単一のバンドになり、純度が高いことが確認された(図 7B)。

表 2 : 抗 GM-CSF 自己抗体精製のプロフィール

#### V-5. 特発性肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液および血清中の抗 GM-CSF 自己抗体の定量



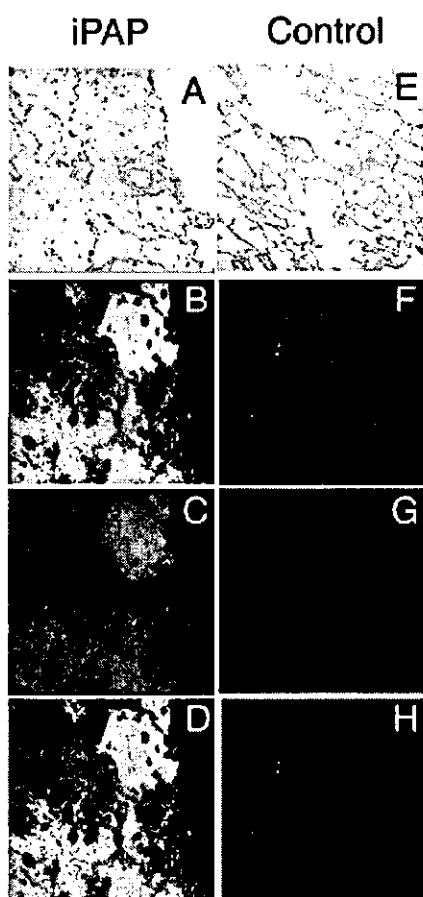
BALF中自己抗体濃度



V-4.で精製した抗 GM-CSF 自己抗体をスタンダードとして、sandwich ELISA 法によって iPAP 患者 (BALF 34 名、血清 107 名) および健常者 (BALF 18 名、血清 19 名)、他の肺疾患患者 (BALF 14 名、血清 10 名) の BALF、血清中の抗 GM-CSF 自己抗体を定量した。その結果、iPAP 患者の BALF 中自己抗体価は中央値 1.15  $\mu\text{g/ml}$ 、範囲 0.09-5.4  $\mu\text{g/ml}$ 、血清中自己抗体価は中央値 88.58  $\mu\text{g/ml}$ 、範囲 16.59-470.2  $\mu\text{g/ml}$ (n=107)と高い値を示した。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(図 8)。このことから、自己抗体は iPAP 患者の肺内と血清中に高濃度に存在しており、また疾患特異性が非常に高いことがわかった。

#### V-6. 非結合性の抗 GM-CSF 自己抗体の特発性肺胞蛋白症患者肺における局在

V-5 の結果から、iPAP 患者に存在する抗 GM-CSF 自己抗体が肺胞腔に局在すると考えられる。このことを検証するため、iPAP 患者の肺組織を PE 標識 rhGM-CSF と、FITC 標識抗ヒト IgG を用いて蛍光抗体染色した。その結果 IgG (図 9B、緑) と GM-CSF 結合活性部位 (図 9C、赤) は iPAP 患者の肺胞腔内の貯留物に強い co-localization を示した (図 9D、黄)。これに対して健常者肺では、iPAP 肺と比較して血管以外の部位で IgG は少なく (図 9F、緑)、また GM-CSF 結合活性部位も殆ど認められず (図 9G、赤)、両者の co-localization は認められなかった (図 9H、黄)。以上のことから患者の肺胞腔内には GM-CSF と結合しうる自己



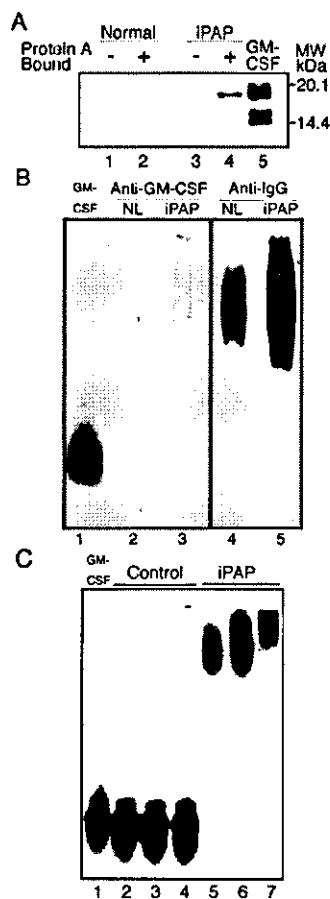
抗体が存在していることが確認された。

#### V-7. 特発性肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液中の GM-CSF と自己抗体の免疫複合体形成の証明

V-2 で証明された、iPAP 患者の肺内で産生されている GM-CSF は、V-5 により証明された

過剰量の自己抗体により、免疫複合体を形成していると考えられる。これを証明するために以下の3つの方法を用いた。第一に、免疫沈降法により、免疫複合体を回収後、還元剤で GM-CSF と自己抗体とを分離し、ウェスタンブロット法により GM-CSF を直接検出した。第二に、免疫複合体を分解せずに BALF 蛋白中を電気泳動し、免疫複合体中の GM-CSF を抗 GM-CSF ポリクローナル抗体により直接検出した。第三に iPAP 患者の BALF 中に存在するフリーの自己抗体と放射ラベルした GM-CSF とを反応させ、免疫複合体の生成を *in vitro* で確認した。

その結果、iPAP 患者 BALF 中蛋白の protein A 結合画分中に、GM-CSF が認められ、非結合画分中には認められなかった。健常者 BALF では、何れの画分にも GM-CSF は検出されなかつた (図 10A)。



BALF 中の免疫複合体を前処理なしに泳動し、ウェスタンブロット法により GM-CSF を検出すると、GM-CSF は IgG の位置に一致した高い分子量の位置に検出された (図 10B)。これらの結果より、iPAP 患者 BALF 中には、GM-CSF が IgG と免疫複合体を形成して存在していることが示唆された。

また、 $[^{125}\text{I}]$ -GM-CSF は iPAP 患者 BALF とを混和して電気泳動することにより、より大きい分子量の位置に "supershift" した (図 10C)。前述の結果より、この現象は  $[^{125}\text{I}]$ -



GM-CSFが自己抗体と結合したためと考えられた。なおこの現象は健常者 BALF では起こらなかった (図 10C)。このことより iPAP 患者の肺では、GM-CSF と結合しうる自己抗体の存在が確認された。

#### V-8. 抗 GM-CSF 自己抗体の中和活性

V-3 の結果から、iPAP の自己抗体は中和活性を持つことが示唆されたが、バイオアッセイにより定量した。すなわち、培地に添加された rhGM-CSF を中和して TF-1 cell の増殖を 50%抑制する自己抗体の必要量 (IC<sub>50</sub>: mol/mol rhGM-CSF) は、ヤギ中和ポリクローナル抗体、マウス中和モノクローナル抗体のそれぞれ 1/10、1/500 であった。このことから、iPAP 患者中に発現する抗 GM-CSF 自己抗体の中和活性は非常に強いことが示された (表 3)。

#### V-9. 抗 GM-CSF 自己抗体の結合力、結合容量

患者抗 GM-CSF 自己抗体が強い中和能をもつことから、それは GM-CSF とその受容体との結合力 (GM-CSF と GM-CSF 受容体  $\alpha$  鎖との親和性は 5-10nM, 高親和性受容体との親和性は 25-100pM) に拮抗するに足る十分強い結合力を持つ

| 患者No.                             | 結合力<br>(Avidity, K <sub>AV</sub> )<br>(pM) | 結合容量<br>(Capacity, Bmax)<br>(sites/mol IgG) | 中和活性, 50%<br>inhibitory concentration,<br>IC <sub>50</sub><br>(mol/mol rhGM-CSF) |
|-----------------------------------|--|---|--|
| 1                                 | 20.1                                       | 0.129                                       | 5.54   |
| 2                                 | 13.3                                       | 0.153                                       | 4.43   |
| 3                                 | 16.7                                       | 0.168                                       | 3.83   |
| 4                                 | 24.9                                       | 0.253                                       | 6.65   |
| 5                                 | 11.1                                       | 0.134                                       | 8.66   |
| 6                                 | 24.8                                       | 0.332                                       | 6.65   |
| 7                                 | 12.1                                       | 0.194                                       | 2.42   |
| 8                                 | 15   | 0.184                                       | 11.88  |
| 9                                 | 22.3                                       | 0.565                                       | 2.42   |
| 10                                | 37   | 0.273                                       | 12.08  |
| 11                                | 22.3                                       | 0.281                                       | 12.69  |
| Av. $\pm$ SD                      | 19.96 $\pm$ 7.54                           | 0.24 $\pm$ 0.13                             | 7.05 $\pm$ 3.81  |
| commercialized goat anti-GM-CSF*  | 275.4                                      | 0.402                                       | 74.91  |
| commercialized mouse anti-GM-CSF* | nd   | nd  | > 4000   |

| 患者No.                             | 結合力<br>(Avidity, K <sub>AV</sub> )<br>(pM) | 結合容量<br>(Capacity, Bmax)<br>(sites/mol IgG) | 中和活性, 50%<br>inhibitory concentration,<br>IC <sub>50</sub><br>(mol/mol rhGM-CSF) |
|-----------------------------------|--|---|--|
| 1                                 | 20.1                                       | 0.129                                       | 5.54   |
| 2                                 | 13.3                                       | 0.153                                       | 4.43   |
| 3                                 | 16.7                                       | 0.168                                       | 3.83   |
| 4                                 | 24.9                                       | 0.253                                       | 6.65   |
| 5                                 | 11.1                                       | 0.134                                       | 8.66   |
| 6                                 | 24.8                                       | 0.332                                       | 6.65   |
| 7                                 | 12.1                                       | 0.194                                       | 2.42   |
| 8                                 | 15   | 0.184                                       | 11.88  |
| 9                                 | 22.3                                       | 0.565                                       | 2.42   |
| 10                                | 37   | 0.273                                       | 12.08  |
| 11                                | 22.3                                       | 0.281                                       | 12.69  |
| Av. $\pm$ SD                      | 19.96 $\pm$ 7.54                           | 0.24 $\pm$ 0.13                             | 7.05 $\pm$ 3.81  |
| commercialized goat anti-GM-CSF*  | 275.4                                      | 0.402                                       | 74.91  |
| commercialized mouse anti-GM-CSF* | nd   | nd  | > 4000   |

\*: neutralizing antibodies

表 3 : 患者血清から精製した抗 GM-CSF 自己抗体の結合力、結合容量、中和活性

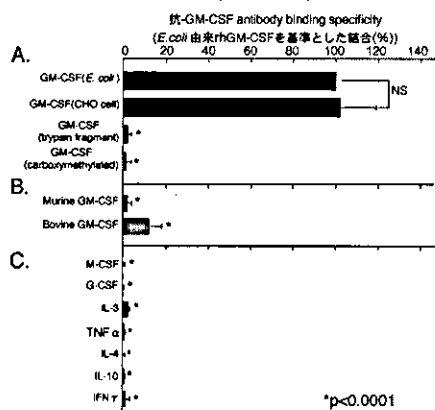
と考えられる。このことを確認するために、iPAP 患者 11 例の血清から精製した自己抗体の結合力 (avidity)、結合容量 (capacity) を検討した。自己抗体と [<sup>125</sup>I]-GM-CSF を用いた飽和結合曲線を作成して、自己抗体と GM-CSF との結合力 (avidity; K<sub>AV</sub>) と結合容量 (capacity; Bmax) を測定した (図 2) とところ、K<sub>AV</sub> は一様に非常に強い値 (19.96 $\pm$ 7.54pM, 平均 $\pm$ 標準偏差) を示した。対照として用いたヤギ抗ヒト GM-CSF 中和ポリクローナル抗体では 275.4pM であった (表 3)。自己抗体の結合容量 (Bmax) は 0.24 $\pm$ 0.13 sites/mol IgG (平均 $\pm$ 標準偏差) で、これは自己抗体が GM-CSF 1 分子につき 1.8-7.8 分子結合することを意味した (表 3)。

#### V-10. 抗 GM-CSF 自己抗体の結合特異性

抗 GM-CSF 自己抗体が、患者肺内で十分量存在し、強い結合力を持つことがわかったが、特異的に GM-CSF と結合するかどうかは未確認のままであった。iPAP 患者 12 人から精製した自己抗体は、*E. coli* 由来の rhGM-CSF (糖鎖修飾なし)、CHO cell 由来の rhGM-CSF (糖鎖修飾あり) に同程度に結合した (図 11-A)。このことから、自己抗体の認識に糖鎖部分は含まれていないと考えられた。また GM-CSF 分子に 2 箇所存在する s-s 結合が切断された、カルボキシメチル化 GM-CSF 分子に対しては全く結合しなかったことから、自己抗体は 2 次、3 次構造を認識していると考えられた (図 11-A)。また自己抗体はトリプシン消化を行った GM-CSF 分子にも結合しなかった (図 11-A)。トリプシン消化後の GM-CSF 分子では、2 つの s-s 結合は保存されているが、1-30, 59-85, 108-111 のアミノ酸残基が脱落している。このことから、脱落部に結合エピトープが含まれている可能性が考えられた。

自己抗体はヒト GM-CSF とアミノ酸配列で 68% 相同なウシリコンビナント GM-CSF には弱く結合した。しかし 53% 相同なマウスリコンビナント GM-CSF には結合しなかった(図 11-B)。

同種の他のサイトカインである、M-CSF、G-CSF、IL-3,4,10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  に対しても自己抗体は結合しなかった(図 11-C)。

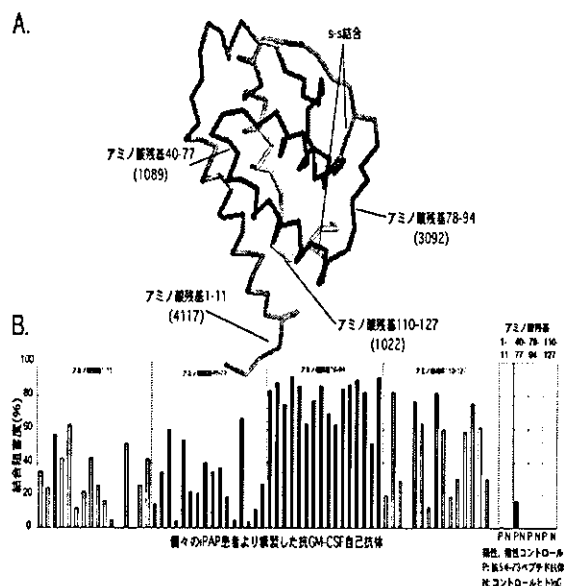


自己抗体の性状を解析した V-8 - 10 より、自己抗体は GM-CSF の非糖鎖修飾部を複数箇所認識し、結合には高次構造が保持されている必要があり、また高い特異性と結合力をもって、強力に GM-CSF を中和することがわかった。

## V-11. 抗 GM-CSF 自己抗体の GM-CSF 上のエピトープ検索

自己抗体が強い中和活性を持つことから、自己抗体は GM-CSF の活性中心を効率よく認識し、そこをブロックする可能性が考えられた。そこで自己抗体の GM-CSF に対する特異的なエピトープを、エピトープ特異的なマウスモノクローナル抗体と [ $^{125}$ I]-GM-CSF を用いた拮抗阻害実験 (competitive binding assay) で検討した。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, 図 12-A)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によりばらつきがあった。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 例でほぼ一様に強く抑制された (図 12-B)。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 の活性中心であるとする報告も認められる(43, 46, 51, 52)。従って、GM-CSF 認識部位は患者間で様々であるが、自己抗体は GM-CSF の活性にとって重要である部位を一様に強く認識することから、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" であると考えられる。



## VI. 考察

### VI-1. 結果のまとめ

肺内にサーファクタント脂質が貯留するという、ヒト iPAP と類似の病像を呈する GM-CSF シグナル欠損マウスの研究から、GM-CSF はマウス肺において、AM の終末分化を誘導することによってサーファクタント代謝を促進し、肺内のサーファクタント恒常性を維持するという役割をもつ、肺において特に重要なサイトカインであるということが認められている(29,35)。iPAP 患者の血清及び BALF 中に、特異的に発現している抗 GM-CSF 自己抗体の存在が報告されたことから、ヒトにおいてもこの抗体が iPAP 発症の病因であると推測されていた。

しかしながら、この抗体が実際に肺内の GM-CSF 活性を阻害しているかどうかを証明する報告はこれまでなかった。このため、

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

以上の点を検討することで、自己抗体が患者の肺内の GM-CSF の生物活性を破壊させようことを証明し、iPAP 発症の機序の解明を試みた。

その結果、以下のような結果が得られた。

1. iPAP 患者の肺組織中に GM-CSF の発現は確認されたが、iPAP 患者の BALF 中に、AM の成熟及び GM-CSF 依存性細胞株 TF-1 の増殖を強く抑制する物質が存在しており、GM-CSF 生物活性は存在しない。
2. iPAP 患者の肺内には、GM-CSF 結合性の自己抗体が存在しており、一部は GM-CSF と免疫複合体を形成し、フリーな自己抗体も十分量存在していた。
3. iPAP 患者血清から精製した自己抗体の結合力は GM-CSF と受容体  $\alpha$  鎖とのそれを遙かに凌駕し、また中和能は非常に強かった。
4. 自己抗体は、GM-CSF の立体構造を認識し、その特異性は非常に高かった。
5. 自己抗体は、GM-CSF の活性中心として報告されている部分（アミノ酸残基 78-94）を特に強く認識していた。

これらの結果より、iPAP 患者に特異的に発現している抗 GM-CSF 自己抗体は、肺内の GM-CSF 生物活性を十分中和して、そのシグナルをブロック

できるものであることが確認された。

#### VI-2. 特発性肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液中の GM-CSF 活性測定

GM-CSF は、もともと肺内では BALF 中で数 pg/ml オーダーの微量なサイトカインである(21,53)。iPAP 患者の BALF 中には抗 GM-CSF 自己抗体が存在していることから、ELISA で使用する抗体と拮抗阻害を起こす可能性もあり、これらより iPAP 患者 BALF 中の GM-CSF 活性測定を ELISA 法で行うことは、非常に困難であると考えられる。このため我々は BALF の GM-CSF 生物活性を測定する上で、GM-CSF 依存性細胞株である TF-1 細胞と iPAP 患者 BALF 中から付着法により分離した AM を用いた。その結果、患者 BALF 中には、AM の成熟、増殖を阻害する作用が認められ、その効果は rhGM-CSF を加えることで解除された。また BALF 中の GM-CSF を中和する活性が、 $-24.9 \pm 16.4$  ng equivalents/ml BALF（平均  $\pm$  標準偏差）と非常に強いこともわかった。今回免疫染色法で GM-CSF 産生細胞の数を定量したが、GM-CSF 産生細胞の割合は、健常者のそれと大差認めなかったことから、iPAP 患者 BALF 中の GM-CSF 濃度も健常者と同程度（数 pg/ml 程度）だと仮定すると、数千～数万倍の GM-CSF 中和活性を持つ BALF 中で、これら GM-CSF は直ちに中和されると考えられる。

#### VI-3. 特発性肺胞蛋白症患者自己抗体の量とその性状からみた中和活性の検討

自己抗体価定量の結果、患者の血清中、BALF 中の自己抗体価は非常に高かった。この測定法自体は、高度に精製した自己抗体を標準としているので、非常に正確で信頼できると思われる。前述の GM-CSF 濃度と比較しても、中和に十分な量が存在していると考えられる。

自己抗体は他動物種の抗ヒト GM-CSF 抗体よりも遙かに強い結合力 (avidity) を示した。興味深いことに、binding avidity は、過去の報告で認められる健常者血清由来のヒト IgG 製剤中に認

められる抗 GM-CSF 自己抗体とほぼ同程度の強さであった(4-11pM)(54)。過去に報告されている抗サイトカイン抗体の avidity は、IL-1 $\alpha$  に対する自己抗体が 5.5-11pM(55)、IL-5 自己抗体が 15pM(54)、IL-10 自己抗体が

80-351pM(54)、IFN- $\alpha$  自己抗体が 30pM(56)とどれも非常に強い。これらは生体内のサイトカイン受容体の親和性と非常に近い(50, 54-57)ことから、これら自己抗体は *in vivo* でも受容体とリガンドの結合に効果的に拮抗し、サイトカインシグナルを調節するという機能を発揮できる重要な存在なのかもしれない。

GM-CSF の受容体との結合のメカニズムを考えると、まず低親和性(5-10nM)である GM-CSF 受容体  $\alpha$  鎖と結合し、引き続いてこの複合体が GM-CSF 受容体  $\beta$  鎖と結合し、親和性が高くなるとされている。この  $\beta$  鎖はそれ自体は GM-CSF と結合しないが、 $\alpha$  鎖の結合力を高親和性(25-100pM)に変換する(35, 58, 59)。今回の結果から、GM-CSF と抗 GM-CSF 自己抗体との avidity( $\sim$ 20pM)は、 $\alpha$  受容体との親和性よりは明らかに強い。このため、自己抗体は、GM-CSF と  $\alpha$  受容体との結合をまず阻害してそのシグナルをブロックすると考えられる。今回自己抗体と GM-CSF との免疫複合体が確認されたことから、このメカニズムの可能性が高いと考えられる。

今回のデータから、自己抗体は、糖鎖修飾を受けている rhGM-CSF、受けていない rhGM-CSF とともに同じように結合した。このことは糖鎖部分は自己抗体のエピトープに含まれないということの意味する。カルボキシメチル化によって s-s 結合を切断した GM-CSF を自己抗体が認識しなかったことから、自己抗体の認識部位は、一次構造ではない、すなわち二次構造、三次構造を認識すると考えられる。

これらの結合特徴から、自己抗体のエピトープは、ペプチドフラグメントを用いて同定することは困難であると考えられた。そこで今回 Kanakura らにより報告されているエピトープ特異的モノクローナル抗体による自己抗体と GM-CSF

の結合の拮抗阻害によってエピトープの予測を行う方法を採用した(43)。この方法では、自己抗体が結合することが GM-CSF 分子の構造変化をおこし、マウスモノクローナル抗体の結合を阻害する可能性もあるため、今回の結果が、詳細なエピトープを決定するものではないと考えられる。しかし自己抗体が GM-CSF 分子のなかで、78-94 アミノ酸残基をエピトープとする抗体と特に強く、かつ一様に拮抗阻害をしたことは、この部位が GM-CSF の活性部位であるとする説があること(43, 46, 51, 52)から、自己抗体がこの活性中心と結合することによって中和活性を示す可能性を示唆するものである。また加えて、この部位を認識する抗体画分の量、割合が疾患の重症度と相関する可能性もあるかもしれない。血清中の単純な自己抗体価の総量と、患者の肺胞一動脈血酸素分圧格差([A-a]DO<sub>2</sub>)を指標とした重症度との相関はこれまでの報告では認められていない(60)。しかしこれらの仮説を確認するには、患者の重症度と自己抗体の結合力、中和能、エピトープの変化を経時的に調べる必要がある。

#### VI-4. 肺内での GM-CSF 活性阻害と肺胞マクロファージ機能との関連

肺内の GM-CSF 活性を中和するのに、十分な結合力があり、かつ十分量存在しているという自己抗体は、iPAP の病因と密接な関連があると考えられる。今回の結果では、これら自己抗体が、肺内で GM-CSF 活性を効果的に抑制していることが示された。

ヒト AM に対する GM-CSF の真の役割は完全には解明されていないが、マウスではノックアウトマウスによる研究で多くの知見が得られている。GM-CSF が、AM の終末分化において中心的な役割を果たし、サーファクタントの分解を促進させるとされている(29, 33, 34)。GM-CSF、あるいはその受容体欠損マウスは、肺胞蛋白症類似の病態を呈する(8-11)だけでなく、分子細胞的特徴も類似していることから(1, 3, 8-11, 32, 33, 36-39)、ヒト iPAP の発症にも、肺の GM-CSF シグナルの