

阻害が関連していると考えられた（図 13 シェーマ）。

VI-5. 抗 GM-CSF 自己抗体の、特発性肺胞蛋白症の診断、病勢把握との関連、そして病因との関連

抗 GM-CSF 自己抗体が疾患特異的に発現しており、診断に有効であることは、以前報告されているが(41,42,61)、今回さらに多くの血清、BALF を用いた大規模コホート研究で、抗 GM-CSF 自己抗体が、iPAP 患者に疾患特異的に発現していることが確認された。今回の結果から血清中の自己抗体価を、cut off 値を $3\mu\text{g/ml}$ に設定すると、感度、特異性とも 100%で診断が可能であった。この血清診断法を用いることで、肺理学所見と画像所見だけでなく、肺胞洗浄液、肺生検の鏡見像で確定診断していた iPAP の診断をより簡便に、低侵襲で行うことが可能となった。

しかし現在までのところ、iPAP 患者の血清中自己抗体価と疾患重症度との相関は認められていない(60)。自己抗体価の中和活性、認識部位の違いなど、個体差が認められる特徴と、疾患

の臨床的重症度、活動性とで相関する因子が無いかどうかを検討する必要があると考えられる。また、iPAP 患者の抗体価や中和能、エピトープ等の経時的な測定も、疾患の重症度との関連を見る上で重要であると考えられる。治療的な試みとして肺洗浄(62)や、リコンビナント GM-CSF の皮下注射療法(63,64)による症状の改善例もあり、GM-CSF 吸入療法の試みも始まっている。これら治療経過と症状の推移、自己抗体価およびその性状との関連性も引き続き調べることにより、より病因との関連性の深い因子を見付けることができるかもしれない。

VII. 結語

今回の研究では、iPAP 患者に疾患特異的に存在している抗 GM-CSF 自己抗体が、強力な GM-CSF 中和活性を持ち、かつ十分量存在しており、患者肺内の GM-CSF の生物活性を破綻させることが明らかとなった。自己抗体が GM-CSF シグナルを阻害することが、iPAP 発症の病因であるとする仮説を支持する結果が得られたと考えられる。

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

プロリン異性化酵素 Pin1 による転写因子 PU.1 の活性化

研究協力者

1) 東北大学加齢医学研究所・学際科学国際研究センター

2) 財団法人医療機器センター

秋山弘匡^{1,2} 内田隆史¹

分担研究者

東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍研究分野 貫和敏博 田澤立之

1. 要約

GM-CSF 欠損マウスは転写因子 PU.1 の発現が著しく減少しており、PU.1 欠損造血系前駆細胞は IL-3、IL-6 のような様々なサイトカインに応答して増殖するが、GM-CSF には応答しない。PU.1 は GM-CSF の下流で機能している重要な因子であり、GM-CSF シグナル伝達における PU.1 の機能を明らかにすることで特発性肺胞蛋白症の病因解明に役立つと考えられる。そこで、PU.1 はリン酸化されプロリン異性化酵素 Pin1 へ結合するか、Pin1 は PU.1 の局在を変化させ活性化させるのでは、という仮説を立て研究を行った。Pin1 はマクロファージへ分化した

THP-1 細胞内でのみ PU.1 のリン酸化特異的に結合し、Pin1 の WW ドメインを介し PU.1 の pS119-P 配列に結合することが明らかとした。Pin1 と PU.1 は、PMA 処理した THP-1 細胞で共に核に局在し、COS-7 細胞への共発現により Pin1 の局在が細胞質から核へと移行した。これら結果から、Pin1 は、リン酸化された PU.1 と細胞質内で結合し、核へと移行し、PU.1 の構造と活性を変化させ、GM-CSF シグナル伝達および肺胞マクロファージの分化に関わっていると考えられる。

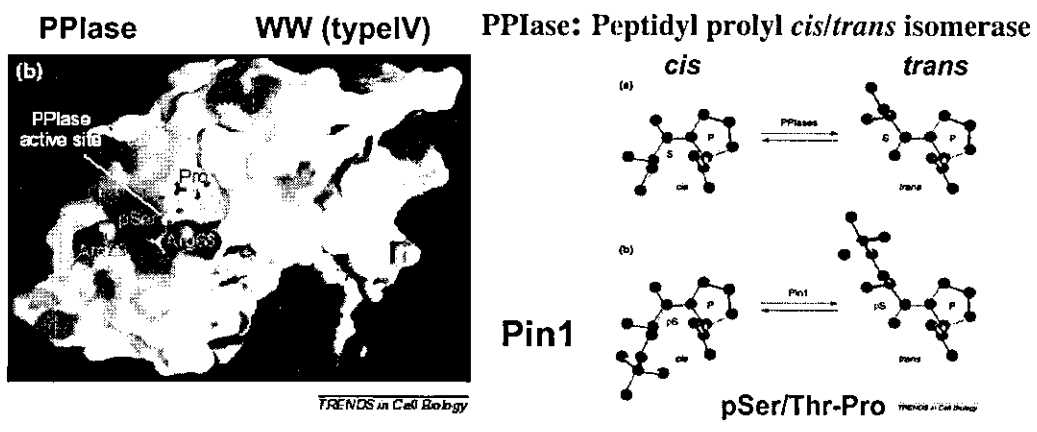
2. 研究目的

特発性肺胞蛋白症 (idiopathic pulmonary alveolar proteinosis) は、肺胞および終末気管支に過剰なサーファクタントの蓄積が認められるまれな疾患である。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) あるいはそのレセプターβ鎖欠損マウスは肺胞蛋白症を発症することが報告されており、GM-CSF シグナルの異常が肺胞マクロファージの機能低下を引き起こし、サーファクタントの分解が障害されている可能性が示唆されている。ヒトの肺は GM-CSF を恒常的に生産しており、肺胞マクロファージは GM-CSF が豊富な環境下で自己増殖し、また、流入してきた単球は GM-CSF の働きで肺胞マクロファージへと分化すると考えられている。GM-

CSF およびそのレセプターの欠損マウスは、骨髄血液系細胞に異常がなく、肺にのみ病変をもたらし、肺胞蛋白症を発症する。GM-CSF 欠損マウスの肺胞マクロファージは maturation arrest を起こしており、付着能、食食能、殺菌能、TNF- α 、IL-6 などのサイトカイン産生能、Toll like receptor 発現などがすべて低下していると報告されている。また、このマウスでは代償的にマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)の産生が亢進しており、肺胞マクロファージの数は保たれている。興味深いことに、GM-CSF 欠損マウスのマクロファージで転写因子 PU.1 の発現が著しく減少しており、GM-CSF を発現させ PU.1 の発現が回復することが報告されている。また、PU.1 欠損造血系前駆細胞は、IL-3、IL-6 のような様々なサイトカインに応答して増殖するが、GM-

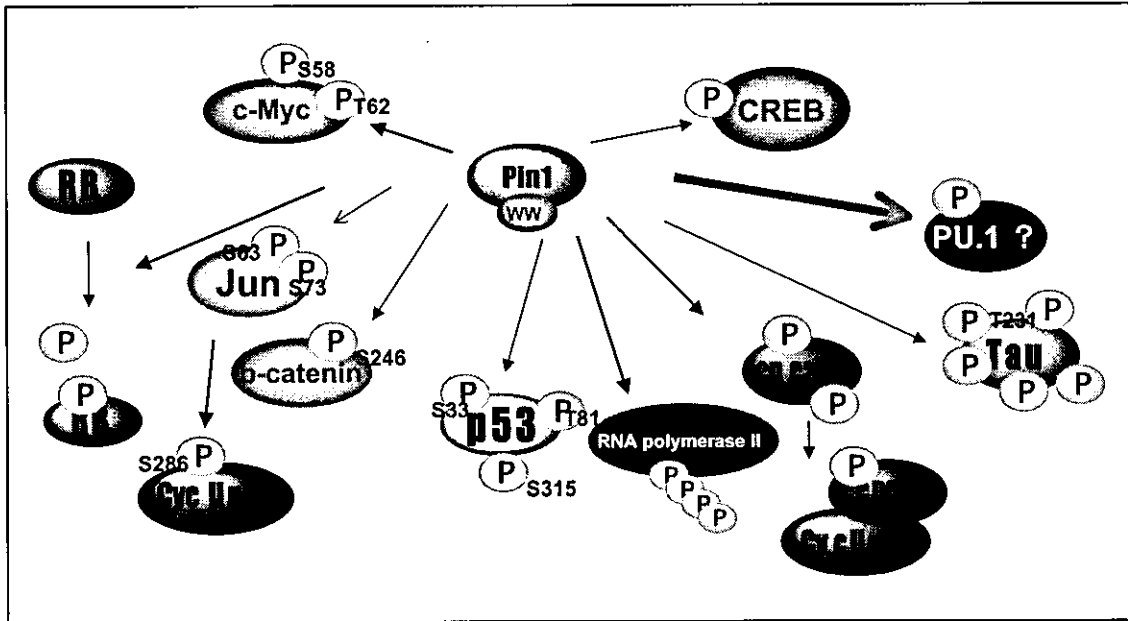
Pin1の構造

Pin1はType IV WWドメインとPPIaseドメインを有している。



CSFには応答しない。このことから、PU.1はGM-CSFの下流でGM-CSFに依存して機能していると考えられる。

し、異性化酵素によりその構造を変えることにより、タンパク質の活性を変化させる事が知られている。Pin1



PU.1は、組織得意的 ets ファミリーの転写因子で造血系の様々な細胞で発現しており、顆粒球、マクロファージ、リンパ球などで、様々な標的遺伝子を転写活性化させることが報告されている。特発性肺胞蛋白症における病因を究明するためにも、GM-CSF シグナル伝達を明らかにする必要がある。そこで、GM-CSF の下流で働く転写因子 PU.1 の機能を明らかにすれば特発性肺胞蛋白症の病因解明に繋がると考えられる。

プロリン異性化酵素 Pin1 は、プロリルイソメラーゼ (PPIase) ドメインとタイプ VI WWドメインを有する分子であり、WW ドメインを介しリン酸化 Ser/Thr-Pro 配列を認識して結合

は、リン酸化された、CREB、c-Myc、c-jun や P53 などの様々な転写因子や、cyclinD1、cdc2 や cdc25 などの cell cycle regulator に結合し、その活性を変化させることが報告されている。

1)PU.1 がリン酸化され Pin1 へ結合するのか？

2)Pin1 は PU.1 の局在を変化させ活性化させるのでは？

そこで、我々は以上の仮説を立て実験を開始した。

3. 材料および方法

3-1. 細胞培養

THP-1 細胞と COS-7 細胞は、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより入手した。COS-7 細胞は、5%ウシ胎仔血清 (fetal calf serum: FCS) を含む DMEM (Sigma, St. Louis, MO) を、THP-1 細胞は、10%FCS を含む RPMI1641 (Sigma) 用い、37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。THP-1 細胞は、10 ng/ml になるように PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate [Sigma]) を加えマクロファージへ分化誘導させた。

3-2. plasmid

PMA 処理しマクロファージへ分化誘導した THP-1 細胞よりセパゾール RNA I (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用い RNA を調製し、TaqMan Gold RT-PCR Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて cDNA を合成した。PU.1 の ORF 領域を PCR で増幅し (EcoRI site-contained 5'-primer: 5'-GTT ACA GAA TTC CAA AAT GAA GGG TTT CC-3'; BamHI site-contained 3'-primer: 5'-GGC GGA TCC TGC GGG CTC AGT GGG GC-3')、EcoRI と BamHI で消化し、フラグメントを pFlag-CMV2 (Sigma) の EcoRI と BamHI サイトに挿入した。PU.1 リン酸化サイトの変異体は、QuickChange Site-Directed

Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて導入した。部位特異的変異体作製用プライマーは以下を用いた。T92A: (5'-primer: 5'-CAC GTC CTC GAT GCC CCC ATG GTG CC-3'; 3'-primer: 5'-GGC ACC ATG GGG GCA TCG AGG ACG TG-3')、S119A: (5'-primer: 5'-GTA CCC ATC CCT CCT GGC CCC AGC CCA GC-3'; 3'-primer: 5'-GCT GGG CTG GGG CCA GGG ATG GGT AC -3')、S134A: (5'-primer: 5'-GCG AGC GGC AGG CCC CCC CAC TGG AG-3'; 3'-primer: 5'-CTC CAG TGG GGG GGC CTG CCG CTC GC-3')。得られた Plasmid の PU.1 の塩基配列は全て確認した。

3-3. GST pull down assay と Western blot

THP-1 細胞は、 2×10^7 cells/9 cm plate で撒き込み PMA 処理後 24 時間と 48 時間後に細胞を回収した。コントロールの 0 時間は DMSO 処理し 24 時間後に回収した。COS-7 細胞は、 2×10^6 cells/9 cm plate で細胞をまき込み、Flag-PU.1 もしくは各種 PU.1 変異体発現ベクターを、トランスフェクション試薬リポフェクトアミン (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて導入し、トランスフェクション開始から 48 時間後に細胞を回収した。細胞に 500 μ l の NP40 lysis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150

mM NaCl, 1% NP40, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 μ g/ml Aprotinin, 50 mM NaF, 25 mM β -glycerophosphate, 1mM Na_3VO_4)を加え on ice で 30 分静置(CIP 処理するサンプルは phosphatase inhibitor は加えない)した。細胞をかき集め、sonication(出力 2.5, cycle 30%, 10 sec)し、4°C、15,000 rpm, で 30 分遠心後、上清をサンプルとした。CIP 処理するサンプルは、30 U の CIP(NipponGene, Tokyo, Japan)を加え、37°C、1 時間処理した。NP40 lysis Buffer で平衡化した(1 サンプルあたり)10 μ l のグルタチオンセファロースビーズと 10 μ g の各種 GST 融合 Pin1 タンパク質を NP40 lysis Buffer で 500 μ l にメスアップし、4°C で 1 時間ローテートさせた。GST 融合 Pin1 タンパク質を結合させたグルタチオンセファロースビーズを、1 ml の NP40 lysis Buffer で 1 回洗浄後(全ての遠心条件:4°C, 2000rpm, 5 分)、回収した 500 μ g 分の細胞 lysate と混ぜて、4°C で 1 時間ローテートさせた。1 ml の NP40 lysis Buffer で 5 回洗浄し、ビーズに 10 μ l の 2 \times SDS Sample Buffer を加え pull down のサンプルとした。サンプルを 5 分ボイルした後、SDS-PAGE し、Transfer 後、ブロッキング液(3%スキムミルク-0.1% Tween20-TBS)で 1 時間以上ブロッキングした。所定のブロッキング液で

希釈した 1 次抗体を用い 4°C で O/N インキュベートした。抗体の希釈は、Pin1 抗体 (CALBIOCHEM, San Diego, CA : 2000 倍)、PU.1 抗体(BD Pharminge, San Diego, CA : 2000 倍)、Flag 抗体 (Sigma : 2000 倍)で用いた。ブロッキング液で 3 回洗浄後、ブロッキング液で希釈した 2 次抗体(マウス IgG:5000 倍, ラビット IgG:5000 倍)(Pin1:ラビット, PU.1, Flag:マウス)で、室温で 1 時間反応。ブロッキング液で 3 回、TBS-T(0.1% Tween20-TBS)で 3 回洗浄後、ECL で発色し、LAS3000 で解析した。

3-4. 免疫細胞化学

COS-7 細胞と THP-1 細胞は Lab-Tek II Chamber slide (Nalge Nunc International, Naperville, IL) 内で培養し、免疫細胞化学のために 4% パラホルムアルデヒドで固定した。細胞は、10% ウサギ正常血清を含むブロッキング液を用いて 37°C で 20 分間ブロッキングした後、TBS で希釈したラビット抗 Pin1 抗体 (2000 倍希釈)、マウス抗 PU.1 抗体(1000 倍希釈)、マウス抗 Flag 抗体(2000 倍希釈)もしくはラビット抗 HA 抗体(2000 倍希釈)を 1 次抗体として用いて 37°C で 2 時間反応させた。PBS(-)で洗浄後、2 次抗体をのせ、37°C で 30 min 反応させた。洗浄後、無蛍光グリセロールを

滴下し、カバーガラスをのせて、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

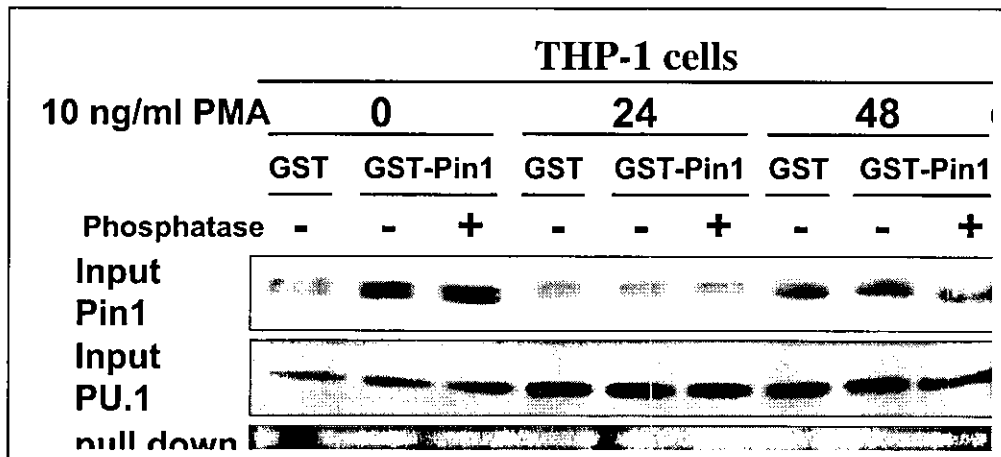
4. 結果

4-1. Pin1 と PU.1 の結合

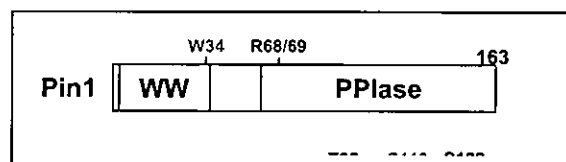
PU.1 と Pin1 の結合を確かめるために、PMA 処理によりマクロファージへ分化するヒト単球系 THP-1 細胞を PMA 処理し、24 時間と 48 時間後に細胞の lysate を回収し、Pin1 との結合を GST-Pin1 を用いた、pull-down assay を行い検討した。PMA 未処理の細胞は、DMSO 処理をし 24 時間後に細胞を回収

その結果、Pin1 との結合が確認された PMA 処理した細胞においても、Pin1 との結合は完全に消失した。これらの結果は、Pin1 と PU.1 との結合は、単球系細胞からマクロファージへの分化誘導シグナルの存在下でのみ結合し、その結合は PU.1 のリン酸化特異的であることを示唆している。

4-2. Pin1 と PU.1 の結合サイトの同定



し、0 時間とした。その結果、Pin1 と PU.1 の結合は、PMA 処理 0 時間では確認出来なかったが、PMA 処理をすることにより GST-Pin1 に結合した PU.1 の特異的なバンドが検出された。また、Pin1 と PU.1 との結合に、PU.1 のリン酸化が関わっているか調べるために、細胞 lysate をアルカリフォスファターゼにより脱リン酸化処理し、GST-Pin1 との結合を検討した。



Pin1 の WW ドメインが結合する pT/S-P 配列は、PU.1 に 3 ヶ所 (T92, S119, S132) 存在し、その領域の

Pin1 と PU.1 の細胞内での局在場所を検討するため、THP-1 細胞を PMA 処理しマクロファージへ分化させた細胞

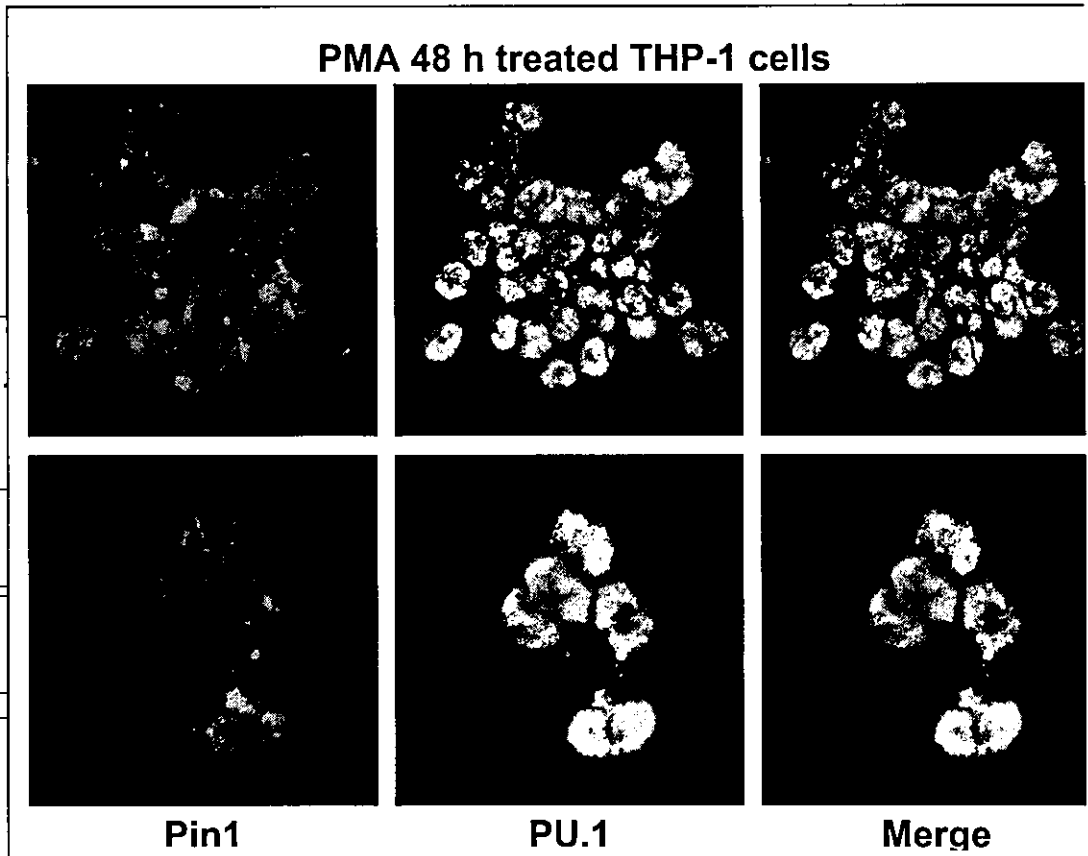
Ala 変異体を作製し、さらに、Pin1 の WW ドメインの変異体 (W34A) と PPIase の活性

GST-Pin1
Flag-PU.1
Input
PU.1
pull down
PU.1

中心の変異体 (R68/69A) も作製し Pin1

と PU.1 との結合を検討した。各種 PU.1 発現ベクターを COS-7 細胞へ導入して、GST-Pin1 との結合を pull down assay で調べた所、PU.1 の S119A 変異体は Pin1 との結合が確認されなかった。さらに、Pin1 の WW ドメインの変異体 W34A は、PU.1 への結合が確認できなかった。この結果より、Pin1 は WW ドメインを介して PU.1 の S119-P 配列へ特異的に結合していることが示された。

4-3. Pin1 と PU.1 の細胞内局在

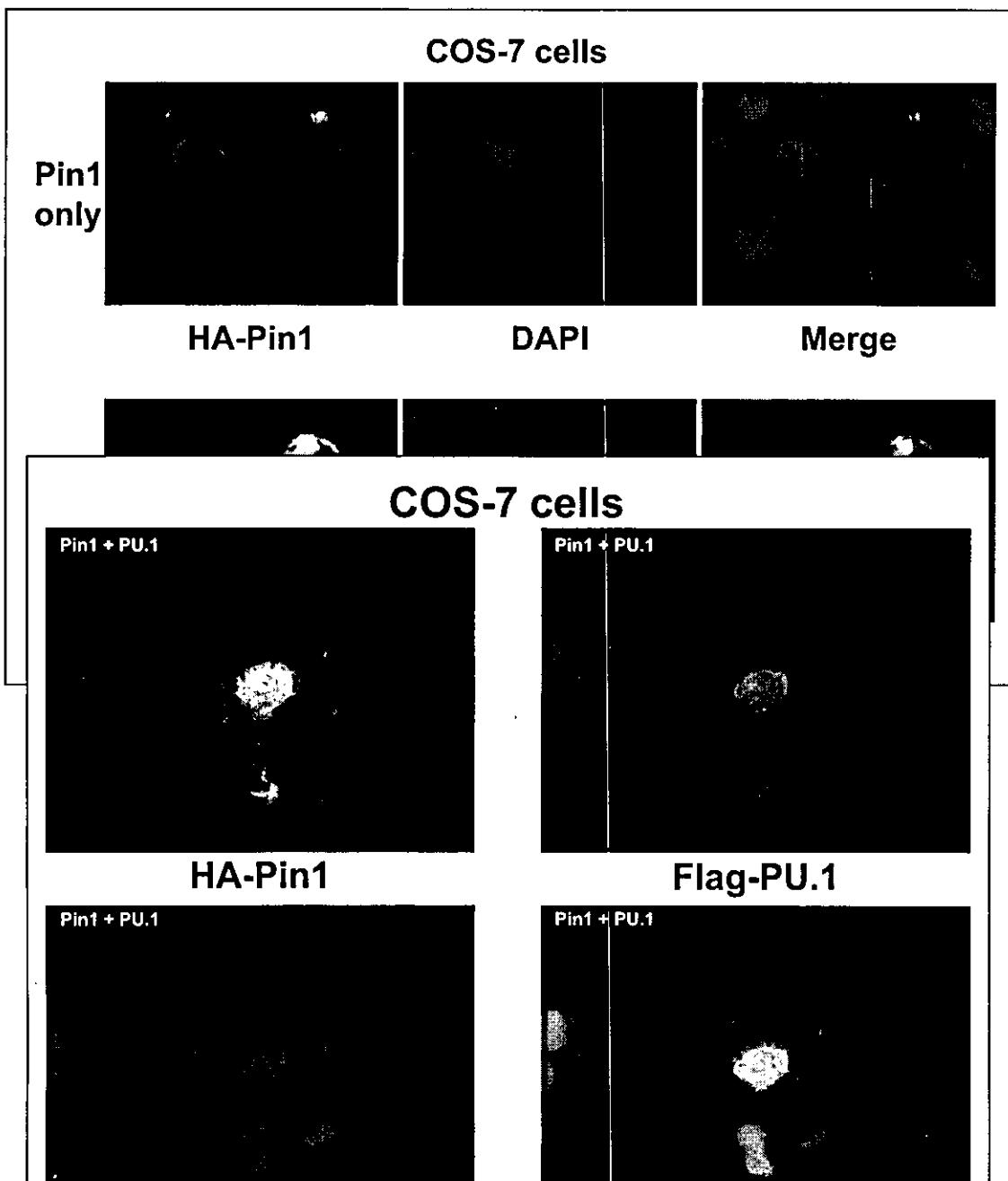


を用い、Pin1 と PU.1 抗体で免疫蛍光染色を行い局在場所を調べた。その結果、Pin1 と PU.1 共に THP-1 細胞の核が染色された。よって、Pin1 と PU.1 は分化したマクロファージでは核で機能している事が示唆される。

4-4. Pin1 と PU.1 の局在変化

PU.1 の細胞内局在が、Pin1 の存在下で変化が見られるか調べるために COS-7 細胞へ Pin1 と PU.1 の発現ベクターを導入し免疫蛍光染色で検討した。Pin1 もしくは PU.1 発現ベクター

のみを導入した際は、PU.1は核にPin1は主に細胞質に局在していた。しかしながら、Pin1とPU.1を共にCOS-7細胞へ導入するとPin1とPU.1は両方とも核に局在が見られた。この結果は、Pin1がPU.1と結合する事により、その局在が核へと変化することを示唆している。



5. 考察

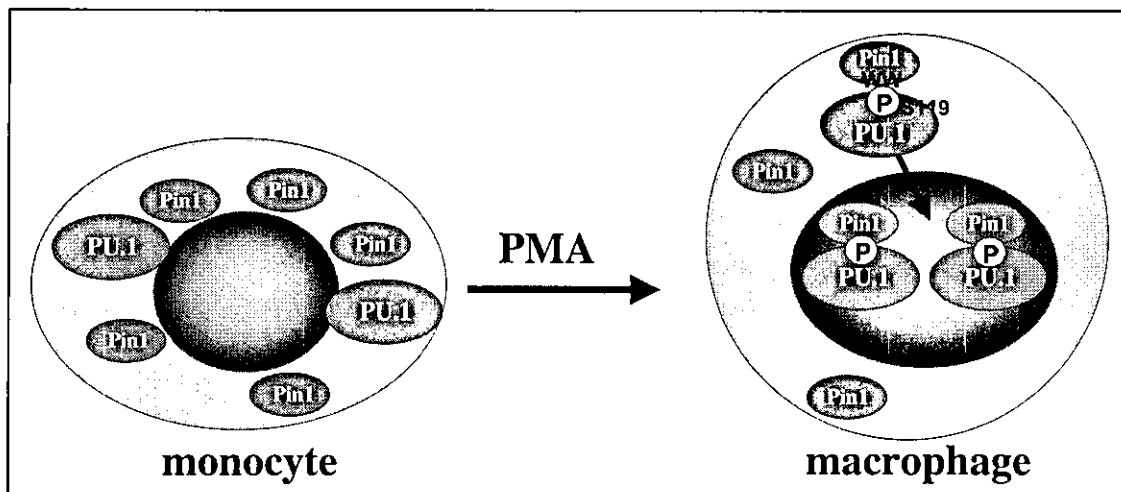
ヒト単球系細胞株 THP-1 を用い Pin1 と PU.1 の結合を検討した結果より、PMA 処理によりマクロファージへ分化誘導した時のみに結合が確認された。PU.1 は造血系の様々な細胞で発現しており、顆粒球、マクロファージ、リンパ球などで、様々な標的遺伝子を転写活性化させ、分化したマクロファージで働く転写因子として報告されている。また、Pin1 はリン酸化されたタンパク質と特異的に結合することが報告されている。さらに、Pin1 と PU.1 との結合は、脱リン酸化処理によって完全に消失した。このことより、PU.1 がマクロファージへの分化に伴って、他の因子によりリン酸化修飾を受け、Pin1 と結合すると考えられる。

Pin1 は type IV の WW ドメインを有しており、リン酸化 T/S-P 配列に特異的に結合する。Tau には T/S-P 配列が 17 ヶ所存在するが、Pin1 の結合するサイトは 231 番目の Thr のみであることが報告されている。PU.1 のどの領域に Pin1 が結合するかを決定することは、PU.1 のリン酸化制御メカニズムを考える上で重要な知見となる。その結果、Pin1 は WW ドメインを介し、PU.1 に 3 ヶ所ある T/S-P 配列のうち 119 番目の Ser に特異的に結合することが明らかとなった。Pin1 が結合す

ることから、おそらく、119 番目の Ser はリン酸化を受けると考えられる。PMA 処理した THP-1 細胞で、Pin1 と PU.1 の結合が確認されたことから、Pin1 と PU.1 は細胞内で同じ場所に局在していると想定される。その結果、PMA 処理した THP-1 細胞で Pin1 と PU.1 の細胞内の核で共に局在していた。このことより、Pin1 と PU.1 は核内で複合体を形成しており、PU.1 の転写活性化等の制御をしているのかもしれない。

PU.1 は成熟したマクロファージでは核に局在しているが、未分化状態の時は細胞質に局在していることが知られている。そこで、Pin1 と PU.1 が結合することにより、その局在に変化が見られれば、Pin1 は PU.1 の機能を制御する重要な因子である可能性が考えられる。COS-7 細胞で Pin1 は主に細胞質に PU.1 は核に局在していた。ところが、Pin1 と PU.1 を共発現させるとその局在は共に核であった。この結果は、PU.1 は核に存在し、PU.1 が Pin1 の局在を細胞質から核へと移行することを意味している。しかしながら、未分化単球細胞では PU.1 は細胞質に局在していることが報告されている。このことから、マクロファージへの分化に伴って PU.1 がリン酸化され細胞質内で Pin1 と結合し、Pin1-PU.1 複合体は、別の因子により、

核へと移行するという可能性も考えられる。



厚生労働科学研究基礎研究成果の臨床応用推進事業

「GM-CSF吸入による特発性肺胞蛋白症の治療研究」

平成16年度分担研究報告書

特発性肺胞蛋白症の全国疫学調査と長期経過例の検討

井上義一⁽¹⁾、中田光⁽²⁾、前田優華⁽¹⁾、松尾さとみ⁽²⁾、新井徹⁽¹⁾、是枝幸子⁽¹⁾、
小堂直彦⁽¹⁾、坂谷光則⁽¹⁾、工藤宏一郎⁽³⁾、慶長直人⁽³⁾、田澤立之⁽⁴⁾、
貫和敏博⁽⁴⁾、檜澤伸之⁽⁵⁾、山口悦郎⁽⁶⁾、江田良輔⁽⁷⁾、大石和徳⁽⁸⁾

⁽¹⁾国立病院機構近畿中央胸部疾患センター、⁽²⁾新潟大学医学部、⁽³⁾国立国際医療センター、⁽⁴⁾東北大学医学部、⁽⁵⁾北海道大学医学部、⁽⁶⁾愛知医科大学、⁽⁷⁾国立病院機構山陽病院、⁽⁸⁾長崎大学医学部

研究要旨：特発性肺胞蛋白症に関して全国疫学調査を行った。176例のデータを解析し、うち115例について経過予後の検討を行った。男女比、年齢分布はこれまでの欧米の報告とほぼ同じであり地域差は認めなかった。重症度は年齢とやや関係を認めたものの、喫煙や粉塵吸入歴と重症度との関係は認めなかった。13%に自然軽快、22.5%は自然安定例であった。27.8%は悪化した。2.6%が死亡した。重症度3以上では、全肺洗浄の35.7%、区域洗浄の35.7%、GM-CSF吸入の37.5%が予後不良であった。GM-CSF治療の長期予後は症例数も少なく、十分予後を評価することは出来ないが、全肺洗浄と同レベルの効果と予後は期待できそうである。各種治療を行っても30%強の患者は予後不良。有効な治療法の開発は今後も必要である。

Epidemiological and longitudinal follow-up study of idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis in Japan

Yoshikazu Inoue⁽¹⁾, Koh Nakata⁽²⁾, Yuuka Maeda⁽¹⁾, Satomi Matsuo, Toru Arai⁽¹⁾, Yukiko Koreeda⁽³⁾, Naohiko Kodoh⁽³⁾, Mitsunori Sakatani⁽¹⁾, Koichiro Kudoh⁽³⁾, Naoto Keicho⁽³⁾, Ryushi Tazawa⁽⁴⁾, Toshihiro Nukiwa⁽⁴⁾, Nobuyuki Hizawa⁽⁵⁾, Etsuro Yamaguchi⁽⁶⁾, Ryosuke Eda⁽⁷⁾, Kazunori Oishi⁽⁸⁾

⁽¹⁾National Hospital organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, Osaka, Japan, ⁽²⁾Niigata University, Niigata, Japan, ⁽³⁾International Medical Center of Japan, ⁽⁴⁾Tohoku University, Miyagi, Japan, ⁽⁵⁾Hokkaido University, ⁽⁶⁾Aichi Medical College, ⁽⁷⁾National Hospital organization Sanyo Hospital, ⁽⁸⁾Nagasaki University
Epidemiological and longitudinal follow-up study was performed about idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. Data of 176 patients were analyzed, and follow-up data was analysed about 115 cases. Male (68%) and female (32%) ratio, age were similar to the previous reports. There was no significant correlation between disease severity score (Inoue 2002) and smoking status, and dust exposure. 13% of the patients showed spontaneous remission, 22.5% patients had stable disease. 27.8% of the patients worsened and 2.6% died. In patients with the disease severity more than 3, 35.7% of patients under total lung lavage, and 35.7% of the patients under segmental lavage, and 37.5% of GM-CSF inhalation were poor prognosis. Although the longitudinal prognosis of GM-CSF therapy is not well known, Development of an effective therapy should be continued in future.

重症度 5 : 50 Torr > PaO₂

表1 特発性肺胞蛋白症全患者 (176名、うち15名は重症度不明) の背景。

severity score	n (f)	age (y)	smoking NS/ES/CS	O/E ¹ Y/N	period from the onset (m) ²	% of symptomatic patient (%) ¹
1	42 (12/30)	48±14*	20/7/15	8/34	31±48	0
2	46 (12/34)	49±16	13/21/12	5/40	29±47	100
3	40 (14/26)	54±12	16/9/15	4/33	46±57	73
4	23 (11/12)	54±12	12/7/4	4/19	27±25	89
5	10 (3/7)	59±11	4/2/3	0/10	31±42	100
total	161(52/109)	51±14	65/46/49	24/136	36±43	62
NA	15	16	16	16		

severity 0: NA: not available, f: female, y: yearly, score 1 and 2: 1: O/E exposure: occupational/hobby/exposure
² mean (s.d.) (s.d. in parentheses), chest P-a-p abnormality to the date of assessment, mean±s.d.
³ stage by spirometry (spirometry or maximal P-a-p), other by serum albumin or total protein, see page 1014

はじめに

特発性肺胞蛋白症(IPAP)は肺胞内にリポ蛋白様物質が蓄積する稀少疾患である。IPAPは稀少疾患であるために自然経過、治療等による長期予後など不明な点が多い。われわれの研究班ではこれまでGM-CSFによる治療研究を行ってきたが、同時に、血清中の抗GM-CSF自己抗体濃度を無料で測定し診療援助を行ってきたが、登録された血液自己抗体測定患者の臨床データを解析し、同時に毎年予後調査を行ってきた。本報告は全国でのIPAPの疫学調査成績と、長期経過観察調査の報告である。

対象および方法

(1)診療補助のために血清中抗GM-CSFを測定した患者。176名のデータを解析した。検体送付と同時に集められた臨床データ票を解析した。重症度(登録時)別の患者背景を表1に示す。

(2)上記患者を対象とし、毎年アンケート形式で重症度の変化と予後調査を行った。

尚、IPAPの重症度はPaO₂と症状によって以下の通り分類した。115名について解析したが重症度別(登録時)の背景は表2に示す。

(3)重症度の分類 (Disease severity score, Inoue 2002)。

重症度 1 : PaO₂ ≥ 70 Torr かつ無症状

重症度 2 : PaO₂ ≥ 70 Torr かつ有症状

重症度 3 : 70 Torr > PaO₂ ≥ 60 Torr

重症度 4 : 60 Torr > PaO₂ ≥ 50 Torr

表2 経過観察を行えた特発性肺胞蛋白症患者の背景。

Disease severity scores of the registered patients were annually checked by questionnaire (mean observer period 3.3y, 0.5 ~ 10y).

Initial disease severity score	n (f/m)	Age	Observed period (y)
1	26(8/18)	45±15*	2.9 ± 2.8
2	30 (10/20)	49 ± 14	2.9 ± 2.2
3	29 (10/19)	54 ± 13	3.8 ± 2.7
4	20 (6/14)	56 ± 12	3.0 ± 2.8
5	10 (2/8)	56 ± 7	3.1 ± 2.9
Total	115 (36/79)	51 ± 14	3.3 ± 2.7

*p<0.05 vs severity score 3, 4, 5

結果

(1)全国例の地域分布：

図1に示すように、北から南まで分布し、人口に応じて分布していた。特に地域差は無いと考えられた。

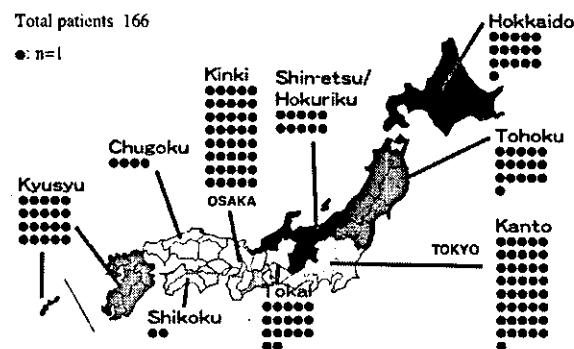


図1 特発性肺胞蛋白症の全国分布 (n=166)

(2)年齢、性別、喫煙歴、粉塵吸入歴について。
性別の分布と年齢分布を図2に示す。男女比は2:1であった。年齢のピークは男女ともに50台であり男女それぞれ平均50才、53才であった。31%は現喫煙者、29%は既喫煙者、40%は非喫煙者であった。14%の患者に粉塵吸入歴を認めた。重症度に応じて年齢は高くなる傾向があった(p<0.01)。
(3)合併症について。
高血圧を53%、糖尿病を4%、33%に高脂血症を認めた。4.1%に真菌症、肺結核、非結核性抗酸菌症の合併を認めた。表3にその一覧を示す。

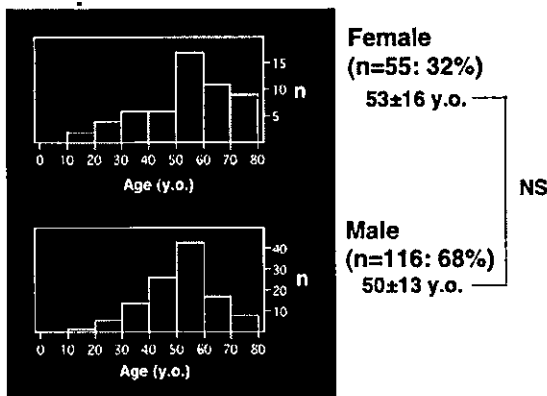


図2 特発性肺胞蛋白症の性別、年齢分布。

表3 特発性肺胞蛋白症の合併症 (n=150)。

Hypertension	8 (5.3%)	Lung cancer	1 (0.7%)
Diabetes mellitus	6 (4.0%)	Coron cancer	1 (0.7%)
Hyperlipidemia	5 (3.3%)	Prostatic cancer	1 (0.7%)
Pulmonary aspergillosis	4 (2.7%)	Heart failure	1 (0.7%)
Bronchial asthma	3 (2.0%)	Angina pectoris	1 (0.7%)
Gastro-duodenal ulcer	3 (2.0%)	Gall stone	1 (0.7%)
Abnormal liver function	3 (2.0%)	Esophagitis	1 (0.7%)
Allergic rhinitis	2 (1.3%)	Nephropathy	1 (0.7%)
Wegener's gran.	2 (1.3%)	Ring worm	1 (0.7%)
Pulmonary tbc.	1 (0.7%)	Mouse ulcer	1 (0.7%)
NTM (MAC)	1 (0.7%)	Sleep apnea synd.	1 (0.7%)
Schizophrenia	1 (0.7%)		
Alzheimer disease	1 (0.7%)		

(4) 長期経過観察例の検討。

115例について0.5年から10年まで平均33年、重症度と予後について経過観察を行った。表2は初期重症度別の内訳である。やはり重症度がますにつれて年齢は高くなる傾向が見られた (p<0.05)。性別、

粉塵吸入歴、喫煙歴を重症に相関は見られなかった。
(5)長期経過観察例の治療内容。

無治療37例、去痰剤のみ8例、気管支鏡による区域洗浄19例、気管支鏡による区域洗浄と去痰剤4例、全肺洗浄29例、全肺洗浄と去痰剤3例、全肺洗浄とGM-CSF吸入3例、全肺洗浄とGM-CSF吸入および去痰剤1例、GM-CSF吸入10例、GM-CSF吸入と去痰剤1例であった。無治療例、去痰剤のみの患者は重症度1から3だけであった。洗浄の有無による分類した場合の重症度の経過を図3に示す。無治療例(去痰剤、GM-CSF吸入例を含む)では7年目まで重症度の平均は順調に低下安定していたが、区域洗浄例、全肺洗浄例では0.5年目1年目には重症度が大きく低下するが、4-5年頃に重症度は再増加する傾向があった。

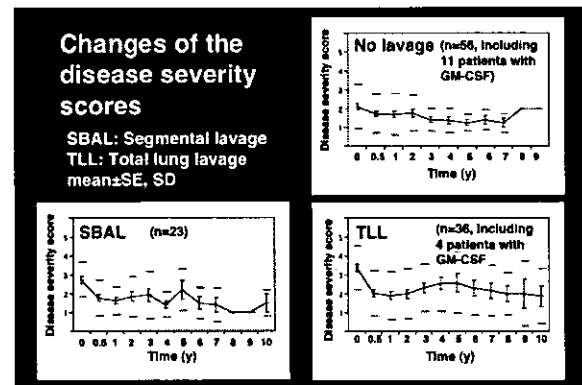


図3 洗浄の種類による重症度の経過。

(6) 治療内容による初期重症度と最終重症度の比較による検討を表4に示す。13%の患者は自然軽快を示した(洗浄やGM-CSF吸入なく重症度が1以上軽快。去痰剤のみを含む)。22.6%の患者は自然安定であった(洗浄やGM-CSF吸入なく重症度不変。去痰剤のみを含む)

自然軽快例、自然安定例は全例、初期重症度は1-3つまりPaO₂は60Torr以上であった。29.6%の患者は洗浄あるいはGM-CSF吸入で改善した(重症度1以上改善)。7%の患者は洗浄あるいはGM-CSF吸入を行うも重症度は不変であった。25.2%の患者は増悪(重症度1以上悪化)した。2.6%の患者(3例)死

亡した。死因は呼吸不全、アスペルギス症、細菌性肺炎であった。

表4 治療内容による初期重症度と最終重症度の比較による検討。

	n (%)	Initial disease severity score (n) ^{***}				
		1	2	3	4	5
Improved without lavage/GM-CSF	15 (13.0)	2	7	6	0	0
No change without lavage/GM-CSF	26 (22.6)	16	8	2	0	0
Improved after lavage/GM-CSF	34 (29.6)	1	5	13	10	5
No change after lavage/GM-CSF	8 (7.0)	3	1	1	2	1
Deteriorate	29 (25.2)	3	9	7	8	2
Dead*	3 (2.6)	1**	0	0	0	2
Total	115 (100.0)	26	30	29	20	10

*Died because of respiratory failure, aspergillosis and bacterial pneumonia.

** gradually worsened and died 10 years later (severity score 5).

Initial disease severity score was below 3 in patients with "Improved or stable without lavage/GM-CSF".

*** χ^2 p<0.05

2010 Kansai-Chuo Chest Medical Center

(7) 臨床経過から判断した予後評価解析。

最終的に1以上の重症度の改善を示す。あるいは重症度1においては陰影がほぼ消失した場合を経過良好例(Well clinical course)、治療の有無にかかわらず重症度に変化が無かった場合を安定例(Stable clinical course)、最終的に1重症度以上悪化あるいは病気が不安定であり2回以上の洗浄(時期を変えて)あるいはGM-CSF吸入を要した場合を経過不良例(Poor clinical course)と定義した。全例で検討した所、初期重症度1であった場合、77%の患者は安定例であった。

治療内容による予後の解析は重症度1,2つまりPaO₂は70Torr以上と、重症度3-5つまりPaO₂が70Torr未満に分けて解析した。

(8) 重症度1,2の治療による予後を表5に示す。

無治療あるいは去痰剤のみを対象療法例(SyT)36例、気管支鏡による区域洗浄例(SBAL)9例、全肺洗浄例(TLL)8例、うちGM-CSF吸入例(TLLGM)2例、GM-CSF吸入例3例である。PaO₂が70Torr未満では51.6%は安定例であったが、23.2%は不良例であった。

表5 初期重症度1,2つまりPaO₂は70Torr以上の治療による予後。

Treatments and Clinical Courses (Initial PaO₂≥70Torr) (Initial disease severity score 1,2, n=58)

Treatment	Total	Well	Stable	Poor
SyT	36 (100)	8 (22.2)	26 (72.2)	2 (5.6)
SBAL	9 (100)	2 (22.2)	3 (33.3)	4 (44.4)
TLL	8 (100)	4 (50)	0 (0)	4 (50)
TLL	6 (100)	4 (66.7)	0 (0)	2 (33.3)
TLLGM	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)
GM	3 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
Total	56 (100)	14 (25)	29 (51.8)	13 (23.2)

n(%), SyT: symptomatic therapy, SBAL: segmental lavage, TLL: total lung lavage, TLLGM: TLL and GM-CSF inhalation, GM: GM-CSF inharation.

(9) 初期重症度3-5の治療による予後を表6に示す。

SyT群9例、SBAL群14例、TLL群28例、GM群8例であった。PaO₂が70Torr未満では30.5%は不良例であった。SBAL群の35.7%、TLL群の35.7%、GM群の37.5%は不良であった。

(10) 予後と臨床像の関係。

予後良好例では喫煙者の比率が多く(p<0.05)、AaDO₂、%VC、%DLco、血液中SP-Dは安定例で有意に良好であった(p<0.05)。これは重症度1に安定例が多かったためと思われる、重症度3以上だけで解析したところこれらの差は無くなった。

表6 初期重症度3-5の治療による予後

Treatments and Clinical Courses (Initial PaO₂<70Torr) (Initial disease severity score 3-5, n=59)

Treatment	Total	Well	Stable	Poor
SyT	9 (100)	7 (77.8)	2 (22.2)	0 (0)
SBAL	14 (100)	8 (57.1)	1 (7.1)	5 (35.7)
TLL	28 (100)	16 (57.1)	2 (7.1)	10 (35.7)
TLL	26 (100)	16 (61.5)	2 (7.7)	8 (30.8)
TLLGM	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)
GM	8 (100)	3 (37.5)	2 (25.0)	3 (37.5)
Total	59(100)	34(57.6)	7 (11.9)	18 (30.5)

n(%), SyT: symptomatic therapy, SBAL: segmental lavage, TLL: total lung lavage, TLLGM: TLL and GM-CSF inhalation, GM: GM-CSF inharation.

考察と結論

(1) 全国疫学調査の結果、176例のデータを解析し、うち115例について経過の検討を行い予後を調査した。

(2) 男女比、年齢分布はこれまでの欧米の報告とほぼ同じであり地域差は認めなかった。

(3) 重症度は年齢とやや関係を認めたものの、喫煙や

粉塵吸入歴とは関係は認めなかった。

(4)13%に自然軽快、22.5%は自然安定例であった。

27.8%は悪化した。2.6%が死亡した。

(5)重症度3以上では全肺洗浄の35.7%、区域洗浄の35.7%、GM-CSF吸入の37.5%が予後不良であった。

(6)GM-CSF治療の長期予後は症例数も少なく、十分予後を評価することは出来ないが、全肺洗浄と同レベルの効果と予後は期待できそうである。いろいろ治療を行っても30%強の患者は予後不良であり。有効な治療法の開発は今後も必要である。

謝辞

アンケート調査等で多大なご協力を頂いた各主治医の先生方に深謝いたします。

文献

1. Arai T, Hamano E, Inoue Y, Tazawa R, Nukiwa T, Sakatani M, Nakata K. Serum neutralizing capacity of GM-CSF reflects disease severity in a patient with pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with inhaled GM-CSF. *Respiratory medicine*. 98: 1227-1230, 2004
2. Presneil IJ, Nakata K, Inoue Y, Seymour JF. Alveolar proteinosis. *Clinics in Chest Med*. 25:593-613, 2004
3. Tazawa R, Hamano E, Arai T, Ohta I 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 Resp Crit Care Med* (in press), 2005
4. Kitamura T, Uchida K, Tanaka N, Tsuchiya T, Watanabe J, Yamada Y, Hanaoka K, Seymour JF, Schoch OD, Doyle I, Inoue Y, Sakatani M, Kudoh S, Azuma A, Nukiwa T, Kanegasaki S, Nakata K. Serological diagnosis of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 162: 658-662, 2000.
5. 井上義一. 肺胞蛋白症, in 呼吸器疾患最近の治療. 工藤翔二, 中田紘一郎, 貫和敏博編集, 2004-2006 : P296-298 南江堂, 2004
6. 井上義一, 審良正則, 田中勲, 西村和英, 新井徹, 源誠二郎, 馬渡秀徳, 小林久美, 黒川恵理, 山本暁, 坂谷光則. 三次元 CT による特発性肺胞蛋白症内リポ蛋白質様物質定量の試みとその意義. *臨床放射線*, 49: 101-107, 2004.
7. 井上義一. 肺胞蛋白症の診断、管理と血清マーカー：肺胞蛋白症の新展開. *細胞* 2002 ; 34 : 8-11
8. 井上義一. 肺胞蛋白症の病勢、重症度と血清マーカー. *日胸* : 62; 223-231, 2003.

特発性肺胞蛋白症と先天性肺胞蛋白症- SP-B 遺伝子に関する基礎的検討
分担研究者 慶長直人（国立国際医療センター呼吸器疾患研究部部長）

研究要旨

肺胞蛋白症は、抗 GM-CSF 抗体陽性の特発性肺胞蛋白症、二次性肺胞蛋白症、先天性肺胞蛋白症に分けられている。特発性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 補充療法では、効果の良好な群と必ずしも良好でない群があり、治療反応性の個人差は、一部遺伝要因により規定される可能性が考えられる。我々は、このような問題にアプローチするための基礎的検討として、先天性肺胞蛋白症の原因として知られる、サーファクタント蛋白 SP-B 遺伝子の配列解析を試みた。その結果、SP-B 遺伝子全長の PCR 増幅に成功し、代表的な 4 箇所の遺伝子多型（single nucleotide polymorphisms: SNPs）の検出系を確立し、アリル頻度を決定した。SP-B 遺伝子の塩基配列解析は、今後、我が国における、SP-B 遺伝子の異常が疑われる先天性肺胞蛋白症の症例や後天的な肺胞蛋白症の病態修飾因子の検討に有用と思われる。

A. 研究目的

肺胞蛋白症は、抗 GM-CSF 抗体陽性の特発性肺胞蛋白症、他の後天的要因により二次的に肺マクロファージ機能が障害される二次性肺胞蛋白症、主に肺の表面活性蛋白の欠損により生じる先天性肺胞蛋白症に分けられている 1)。特発性肺胞蛋白症に対して、研究班では、GM-CSF 補充療法の臨床研究を実施しているが、现阶段で、効果の良好な群と必ずしも良好でない群があり、治療反応性に個人差があることが推測されている。このような個人差は、single nucleotide polymorphism (SNP) などの遺伝的多型の組み合わせにより、規定される可能性がある。我々は、サーファクタント蛋白 B (SP-B) の欠損が先天性肺胞蛋白症の原因になることから、肺胞蛋白症全般にわたる SP-B 遺伝子の意義を探ることが重要と考え、ヒトゲノム上の SP-B の塩基配列解析を試みた。本研究により、SP-B 遺伝子の異常が疑われる先天性肺胞蛋白症の症例については、その責任遺伝子変異部位を同定することが可能になり、SP-B が後天的な肺胞蛋白症の病態修飾因子として働くか否か検討する際には、SP-B 遺伝子全長の多型解析が可能となった。

B. 方法

SP-B 遺伝子のゲノム構造および配列情報は、NCBI データベースからダウンロードして、解析に利用した。

約 15 kb のゲノム増幅には、LA-Taq（タカラバイオ）を用いた、LA-PCR によった。

変異部位の確認については、アジア系集団由来の

連結不可能匿名化された 50 名のゲノム DNA サンプルを対象とした。

（倫理面への配慮）

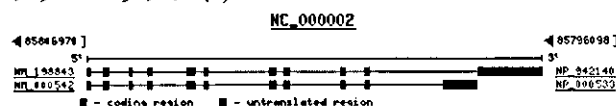
本研究における遺伝子解析に関しては、三省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した当施設の遺伝子解析に係わる倫理委員会の承認を受けている。

C. 結果

1) SP-B 遺伝子のゲノム構造

ヒト SP-B 遺伝子は、遺伝子データベース上では、SFTPB として登録されており、ヒト染色体上の 2p12-2p11.2 に存在する。11 個のエクソンからなり (NM_000542)、現在までに、スプライシングのちがひにより、3'非翻訳領域（エクソン 11）の異なる cDNA（スプライシング・バリエント）が報告されている (NM_198843) が、コーディング領域にかかる選択的スプライシング部位は報告されていない。

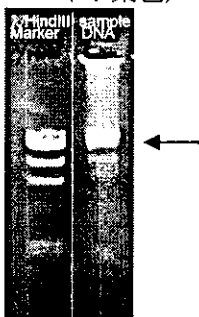
図 1 SP-B 遺伝子のゲノム構造 (上段がスプライシング・バリエント)



2) SP-B 遺伝子全長の増幅系の確立

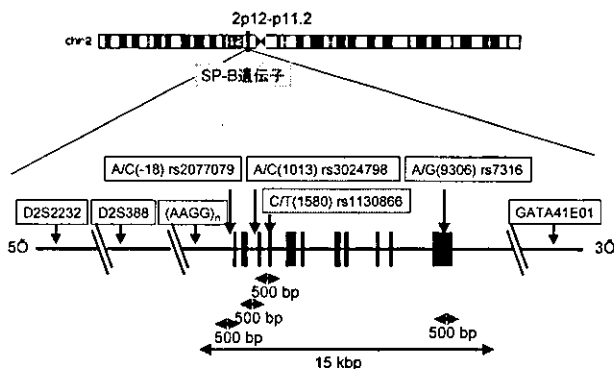
そこで、SP-B 遺伝子全長、約 11kb に 5'側遺伝子制御領域 (-2000)を含む約 15 kb のゲノム増幅を試みた結果、SPB-Lf2 (5'-gta ggc cag gag aag aac cgt cag tag agg-3')と SPB-LR4 (5'-gct ctt ctg caa cca cat cac act ggg aac-3')のプライマーセットにより、LA-Taq を用いた PCR 増幅が可能であった (図 2)。

図 2 増幅された 15 kb の SP-B 遺伝子全長を含む PCR 断片 (アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色)



3) SP-B 遺伝子変異部位の同定

図 3 SP-B 遺伝子の代表的な遺伝子変異部位 (↓) と PCR 増幅箇所 (←→)



SP-B 遺伝子の機能欠損をきたす遺伝子変異は、先天性肺胞蛋白症で報告されているが、一般集団が保有している SP-B の遺伝子多型と呼吸器疾患との関連については、急性呼吸促進症候群の疾患感受性と Thr131Ile (rs1130866) との関連が報告されており 2)、その報告に基づき、4つのマーカーを選択 (図 3)、同定し、アジア系集団約 50 名について、遺伝子タイピングを行った (表 1)。

アジア系集団では、特に非同義置換 Thr131Ile (rs1130866) の主要アレルが C (Thr) であるが、アフリカ系集団では T (Ile) であり、分布が逆転していた。それ以外の SNP は、ほぼアフリカ系集団とヨーロッパ系集団のアレル分布 3) と類似していた。

D. 考察

本研究では、サーファクタントの異常を遺伝子レベルで解析し、SP-B 遺伝子内 4 種の SNP のアレル頻度情報を

rs2077079 (-18)	アジア	アフリカ*	ヨーロッパ*
アレル頻度	2n=100	2n=46	2n=46
A	0.56	0.56	0.65
C	0.44	0.44	0.35

rs3024798 (1013)	アジア	アフリカ*	ヨーロッパ*
アレル頻度	2n=100	2n=34	2n=30
A	0.30	0.12	0.47
C	0.70	0.88	0.53

rs1130866 (1580)	アジア	アフリカ*	ヨーロッパ*
アレル頻度	2n=100	2n=46	2n=44
C	0.82	0.35	0.50
T	0.18	0.65	0.50

rs7316 (9306)	アジア	アフリカ*	ヨーロッパ*
アレル頻度	2n=92	2n=46	2n=44
A	0.74	0.72	0.91
G	0.26	0.28	0.09

* アフリカ、ヨーロッパ集団の頻度情報は、dbSNPより転記
アジア系集団は自験例

ベルで検討するための基礎検討を行った。SP-B 遺伝子の全長および 5'制御領域、スプライシングバリエーションを含む 15 kb を single PCR で増幅し、遺伝子全域の塩基配列を解析することが可能となり、ここでは代表的な 4 種の SNP のタイピングを実施した。SP-B 遺伝子は、コーディング領域に 2 種類の非同義置換 (rs3024809, rs3024801) が報告されているが、比較的マイナーアレル頻度が低く、rs1130866 Thr131Ile に見られるような common SNP はこれまでに同定されていない。今回の検討により、この SNP はアジア系、アフリカ系、ヨーロッパ系集団で、著しく頻度の異なる SNP であり、分子進化上も、また関連解析上も、興味深いものであった。

E. 結論

SP-B 遺伝子全長の多型解析が可能となったため、今後、SP-B 遺伝子の異常が疑われる先天性肺胞蛋白症の症例については、その責任遺伝子変異部位を同定するとともに、SP-B が後天的な肺胞蛋白症の病態修飾因子として働くか否か検討する目的にも応用することが可能である。

(参考文献)

[1] Trapnell, B. C.; Whitsett, J. A.; Nakata, K. Pulmonary alveolar proteinosis. N Engl J Med.

2003;349(26):2527-39.

[2] Lin Z, Pearson C, Chinchilli V, Pietschmann SM, Luo J, Pison U, Floros J. Polymorphisms of human SP-A, SP-B, and SP-D genes: association of SP-B Thr131Ile with ARDS. Clin Genet. 2000;58(3):181-91.

[3] Liu W, Bentley CM, Floros J. Study of human SP-A, SP-B and SP-D loci: allele frequencies, linkage disequilibrium and heterozygosity in different races and ethnic groups. BMC Genet. 2003;4(1):13.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Uchida K, Nakata K, Trapnell B, Terakawa T, Hamano E, Mikami A, Matsushita I, Seymour J, Oh-Eda M, Ishige I, Eishi Y, Kitamura T, Yamada Y, Hanaoka K, Keicho N. High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. Blood 103(3):1089-98, 2004.

濱野栄美, 中田 光, 慶長直人. 肺胞蛋白症の病態と治療. 呼吸 23 (5): 366-372, 2004.

渡辺雅人, 中田 光, 慶長直人. 肺胞蛋白症の治療-GM-CSF療法-. Medical Practice 21 (4): 603-605, 2004.

2. 学会発表

Inoue Y, Arai T, Hamano E, Nakata K, Tazawa R, Nukiwa T, Kudo K, Keicho N, Hizawa N, Yamaguchi E, Eda R, Oishi K, Uchida K, Sakatani M. Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis in Japan (epidemiological study). In: American Thoracic Society, 2004 International Conference, May 21-26, Orlando, USA, 2004.

Uchida K, Nakata K, Trapnell BC, Terakawa T, Hamano E, Mikami A, Matsushita I, Watanabe M, Yamada Y, Hanaoka K, Keicho N. Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis in Japan (epidemiological study). In: American Thoracic Society, 2004 International Conference, May 21-26, Orlando, USA, 2004.

Watanabe M, Nakata K, Hamano E, Terakawa T, Uchida K, Inoue Y, Tazawa R, Goto H, Keicho N. High concentration of GM-CSF-autoantibody immune complex in bronchoalveolar lavage (BALF) and serum from patient with idiopathic pulmonary proteinosis. In: American Thoracic Society, 2004 International Conference, May 21-26, Orlando,

USA, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

VI. 研究成果の刊行に関する一覧表