

【先天性肺胞蛋白症の診断、治療】

1. 概念

肺サーファクタント代謝に関連する遺伝子の先天的な異常が原因と考えられる肺胞蛋白症を先天性肺胞蛋白症性(congenital pulmonary alveolar proteinosis : CPAP)と呼ぶ。CPAPの多くは新生児期から乳児期早期に発症するため、従来は乳児肺胞蛋白症と呼ばれた。しかし、先天的な遺伝子異常によるPAPが成人期に発症する例がある。また、理論的には新生児期にも母体由来の移行抗体による同種免疫性のPAPが発生し得る。一方で、家族歴の存在などから遺伝子異常によるPAPと考えられるものの責任遺伝子が同定されていない症例もある。

2. 分類

CPAPは、II型肺胞上皮細胞に発現する遺伝子の異常によるCPAPと、肺胞マクロファージの成熟を規定する遺伝子の異常によるCPAPに大別される。前者はSP-B欠損症¹⁾、SP-C異常症²⁾、およびABCA3異常症³⁾であり、後者はGM-CSFレセプター異常症⁴⁾⁵⁾である。また、抗GM-CSF抗体高値がなく、生後早期の発症や家族内発症などから遺伝子異常が想定されるものの、責任遺伝子の同定に至っていない症例もある⁶⁾。

1) SP-B欠損症

II型肺胞上皮細胞内でpro SP-CがSP-Cに成熟するためにはSP-Bが必要であるため、SP-Bが欠損しているとSP-BとSP-Cの両方が欠乏する。肺サーファクタントが表面活性を発現するためには、少なくともSP-BかSP-Cのいずれかが必要であるため、SP-B欠損症患者は出生時から肺サーファクタント欠乏による呼吸窮迫症状を呈する。一方、SP-AとSP-Dはラメラ体とは独立してII型肺胞上皮細胞から分泌される。SP-B欠損症患者の肺胞内にはSP-Aが蓄積し、肺胞マクロファージが泡沫化する。SP-B欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとる。代SP-B欠損症の代表的な遺伝子異常である121ins2は欧米で報告されたCPAPの第一位原因であるが、本邦では未だ報告がない。

2) SP-C異常症

SP-C異常症は家族性間質性肺炎の原因となるが、SP-C異常症の一部はCPAPの病型をとる。SP-C異常症は常染色体性優性遺伝形式をとる。同一家系内の症例でも発症時期や病型に大きな差がみられることが知られている。

3) ABCA3異常症

ABCA3(ATP-binding cassette A3)はABCファミリーに属する脂質輸送蛋白であり、II型肺胞上皮細胞に特異的に発現し、肺サーファクタント脂質とSP-B、SP-Cのラメラ体への輸送を担当する。ABCA3の完全な欠損症では、ラメラ体が形成されず、出生時よりSP-B欠損症と同様の呼吸窮迫症状を呈する。しかし、ABCA3異常症には多くの病型があり、発症時期も出生時から成人までに分布する。ABCA3は常染色体性劣性遺伝形式をとる。

4) GM-CSFレセプター異常症

GM-CSFは肺胞マクロファージの成熟を規定する物質であり、GM-CSFおよびGM-CSFレセプター(-R)のノックアウト・マウスは肺胞マクロファージの機能低下を介してPAPを発症する。ヒトでも、GM-CSF-R α 鎖および β 鎖の異常によるCPAPが報告されている。GM-CSF-Rの α 鎖はX染色体の偽常染色体領域にコードされ、その異常症は β 鎖の異常と同様に常染色体性劣性遺伝形式をとる。GM-CSF-Rの機能はSTAT-5のリン酸化を指標に評価することができる。

3. 診断

CPAPの「PAPとしての診断」の流れは他のPAPと同様である。まず、進行性の低酸素血症からPAPであることを疑い、画像診断結果からPAPと診断する。抗GM-CSF抗体値が高くないことから、

免疫性の PAP を否定する。気管支肺胞洗浄が可能であれば、肺胞洗浄液中の SP-B の有無を調べる。洗浄液中の肺胞マクロファージの形態が泡沫状であれば II 型肺胞上皮細胞側の異常である可能性が高く、小型で未分化であれば肺胞マクロファージ側の異常である可能性が高い。CPAP の原因として既知の遺伝子について遺伝子解析を行う。また、STAT-5 のリン酸化から GM-CSF-R の機能解析を行う。

4. 治療

現時点では CPAP の遺伝子異常そのものに対する治療法は確立していない。

II 型肺胞細胞の異常による CPAP に対しては肺移植が唯一の治療法である。また、肺胞マクロファージの成熟異常による CPAP に対しては骨髄移植が有効である。低ガンマグロブリン血症を伴う肺胞マクロファージ異常症に対してはガンマグロブリン投与が有効であるが、その機序は未だ判明していない。

【文献】

- 1) Wert SE, Whitsett JA, Nogee LM. Genetic disorders of surfactant dysfunction. *Pediatr Dev Pathol.* 2(4), 2009, 253-74
- 2) Whitsett, JA. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med* 347(26), 2002, 347, 2141-8.
- 3) Bullard JE, Wert SE, Nogee LM. ABCA3 deficiency: neonatal respiratory failure and interstitial lung disease. *Semin Perinatol.* 30(6), 2006, 327-34
- 4) Suzuki T, Sakagami T, Rubin BK, et al. Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *Exp Med* 205(12), 2008, 2703-10
- 5) Dirksen U, Nishinakamura R, Groneck P, et al. Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression. *J. Clin. Invest.* 100, 1997, 2211 - 2217
- 6) Cho K, Nakata K, Ariga T, et al. Successful treatment of congenital pulmonary alveolar proteinosis with intravenous immunoglobulin G administration. *Respirology* 11, 2006, S74-77,

(長和俊)

【111】 参考情報（関連ホームページ）

以下関連情報発信ホームページを示す。

- (1) 肺胞蛋白症研究班公式ホームページ（医療従事者用、一般用）
 - 肺胞蛋白症専用情報（医療従事者向け） <http://www.pap-guide.jp/index.html>
 - 英語版肺胞蛋白症専用情報（医療従事者向け） <http://www.pap-guide.jp/en/>
 - 肺胞蛋白症一般利用者向け情報サイト <http://www.pap-support.jp/>

- (2) 難病情報センター
<http://www.nanbyou.or.jp/>

- (3) 日本肺胞蛋白症患者会
http://www006.upp.so-net.ne.jp/PAP_Japan/

- (4) Pulmonary alveolar proteinosis foundation (米国患者会)
<http://www.papfoundation.org/>

- (5) EU PAP Net
<http://www.alveolarproteinosis.eu/>

許可無く無断転用を禁ずる

肺胞蛋白症の診断、治療、管理の指針（案）

2011年3月31日 ver.5.1

監修 井上義一、中田光

平成22年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
肺胞蛋白症の難治化要因の解明、診断、治療、管理の標準化と指針の確立研究班
(課題番号 H22-難治-一般-146)

研究代表者 井上義一

〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

臨床研究センター呼吸不全・難治性肺疾患研究部

Phone: 072-252-3021、Fax: 072-252-3688

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

抗GM-CSF自己抗体の無細胞系中和能測定系の開発に関する研究

研究分担者 中田 光 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター長
田澤立之 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター
研究協力者 金子千夏、元井奈都紀、根井貴仁、浦野慎也
新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

研究要旨

今年度の研究目標として、①可溶性 GM-CSF 受容体 α を用いた無細胞系 GM-CSF 中和能測定システムの開発に関する研究 ②成人発症の GM-CSF 受容体 common beta 鎖発現異常による遺伝性肺胞蛋白症症例の分子機序の解明、③自己免疫性肺胞蛋白症における抗 GM-CSF 自己抗体産生機序に関する研究 ④本研究班が昨年作成公開した医療従事者向け肺胞蛋白症ホームページの英語版作成を掲げて日々努力してきたが、①は、本年6月に Journal of Immunological Methods に受理され、②は、10月に Journal of Medical Genetics に受理された。③については、論文はすでに作成済みで、BLOOD に投稿予定である。④については、すでに校正済みであり、3月初旬に公開予定である。

A. 研究の背景と目的

肺胞蛋白症の診断と治療技術の発展には基盤技術と病態解明が不可欠であり、そのための研究を10年来続けている。幸いそれらの努力が実り、1昨年より、長短7報の英文学術論文を分担施設から国際誌に報告することができた。肺胞蛋白症の分子病態解明に日本人が果たしてきた貢献は大きく、我が国がイニシアティブをもって、国際的に情報発信していくことが重要である。そのためには、論文投稿ばかりでなく、分かりやすく有益なホームページの公開が重要と考え、昨年本研究班が昨年作成公開した医療従事者向け肺胞蛋白症のホームページの英語版作成を行った。

B. 研究方法と結果

演題

- ①可溶性 GM-CSF 受容体 α を用いた無細胞系 GM-CSF 中和能測定システムの開発に関する研究 (演題毎の研究報告書 1)
- ②成人発症の GM-CSF 受容体 common beta 鎖発現異常による遺伝性肺胞蛋白症症例の分子機序の解明 (演題毎の研究報告書 2)
- ③自己免疫性肺胞蛋白症における抗 GM-CSF 自己抗体産生機序に関する研究 (演題毎の研究報告書 3)
- ④本研究班が昨年作成公開した医療従事者向け肺胞蛋白症ホームページの英語版作成 (演題毎の研究報告書 4)

C. 健康危険情報

特記すべきことはありません。

D. 研究発表

論文

1. 中田光. リンパ脈管筋腫症(LAM)の新展開 大規模臨床試験の現状と展望. 呼吸と循環 Vol.58 No.12 2010. P.1233-1240
2. Tanaka T, Motoi N, Tsuchihashi Y, Tazawa R, (8人略) Nakata K, Morimoto K. Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB. *J. Med. Genetics*, 2010.
3. Ishii H, Tazawa R (10人略), Nakata K. Clinical features of secondary pulmonary alveolar proteinosis: pre-mortem cases in Japan. *European Respir. J.*, in press
4. Watanabe M, Uchida K, Nakagaki K, Trapnell BC, Nakata K (corresponding author) High avidity cytokine autoantibodies in health and disease: Pathogenesis and Mechanisms. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2010, 21:263-273
5. Sakagami T, (6人略) Nakata K, (5人略), Trapnell BC. Patient-derived GM-CSF Autoantibodies Reproduce Pulmonary Alveolar Proteinosis in Non-human Primates. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, 182(1):49-61
6. 中田光, 田澤立之. 稀少疾患をどう克服するか? -国際コンソーシアムの試み-. THE LUNG perspectives 別冊 Vol.18 No.2 2010. P.129-132
7. Costabel U, Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis associated with dust inhalation: not secondary but autoimmune? *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, 181(5):427-8
8. Tazawa R, Trapnell BC, (23人略), Nakata K (corresponding author). Inhaled

Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor as Therapy of Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*.

2010, 181(12):1345-54

9. Urano S, (8人略), Nakata K (corresponding author). A cell free assay to estimate the neutralizing capacity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies. *J Immunol. Methods* 2010, 360(1-2):141-8

著書

1. 垣下榮三, (34人略) 中田光, (72人略) 吉矢和久. T. 肺胞タンパク症, 疾病と治療 I, 南江堂, 2010, 96
2. Trapnell BC, Nakata K, Kavuru M, Pulmonary Alveolar Proteinosis, Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine, 2010, 63, 1516-36
3. 安保徹, (18人略) 中田光, (5人略) 渡辺雅人. 病態のしくみがわかる免疫学. 8. 肺疾患 P.176-18. 株式会社 医学書院. 2010年10月
4. 藤田次郎, 久保恵嗣, (69人略) 中田光, (3人略) 岸本卓巳. 間質性肺疾患 診療マニュアル. IV 間質性肺疾患の病態と治療マニュアル E. 肉芽腫形成性疾患・その他の間質性肺疾患 6, 肺胞蛋白症 (PAP) P.309-311. 株式会社 南江堂. 2010年10月

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

可溶性GM-CSF受容体 α を用いた無細胞系GM-CSF中和能測定システムの
開発に関する研究

研究分担者 中田 光 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター長
田澤立之 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター
研究協力者 元井奈都紀 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター
浦野真也 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター
富田正浩、安達隆弘 株式会社 免疫生物研究所

研究要旨

GM-CSF シグナル伝達は、細胞膜上に存在している GM-CSF 受容体と GM-CSF が結合することによって惹起されている。我々は、ビオチン標識した GM-CSF とプレートに固相化した可溶性 GM-CSF 受容体 α を用いた無細胞アッセイを作成した。このアッセイを用いて、自己免疫性肺胞蛋白症の患者血漿からアフィニティ精製した GM-CSF 精製抗体と患者血清中の IgG 分画の GM-CSF 受容体結合阻害能を調べた結果、従来の中和能測定法である GM-CSF 依存性の TF-1 細胞を用いたバイオアッセイに比べ、再現性が良く、且つ結合阻害能と中和能は相関していた。これらの結果は、我々の無細胞アッセイで求めた結合阻害能が GM-CSF 自己抗体の中和能を反映していることを示している。

A. 研究目的

GM-CSF 自己抗体は自己免疫性肺胞蛋白症の原因物質である。自己免疫性肺胞蛋白症は、肺腔内にサーファクタントが貯留するまれな疾患である。肺胞はガス交換を行う場であり、サーファクタントが蓄積することで、十分なガス交換ができなくなり呼吸困難をきたす。

(Trapnell et al., 2003)

これは、肺の中に存在する GM-CSF 自己抗体が、GM-CSF と結合することで GM-CSF が GM-CSF 受容体に結合できなくなることにより肺胞マクロファージの機能と分化が阻害され、サーファクタントの代謝ができなくなるためである。(Kitamura et al., 1999; Tanaka et al., 1999;

Uchida et al., 2004; Uchida et al., 2009) また GM-CSF 自己抗体は健常者にも存在し、好中球の機能を制御していると考えられている。

(Uchida et al., 2009)

GM-CSF の生理活性は、GM-CSF に特異的に結合する GM-CSF 受容体 α と、GM-CSF、IL-3、IL-5 と共通の受容体である GM-CSF 受容体 β の二つの異なる受容体によって仲介されており、二つの受容体が結合することで、GM-CSF に対するアフィニティが上昇し、細胞内にシグナルが伝達される。結晶構造解析によって細胞膜上の GM-CSF/GM-CSF 受容体は、12 量体を形成することが示されている。(Hansen et al., 2009) さらに GM-CSF 濃度の違いにより GM-CSF 受容体

は異なるシグナルを伝達し、異なる機能を発揮する。(Hercus et al., 2009)

GM-CSF 受容体 α の膜貫通ドメインを欠失した sGMR α は、GM-CSF との結合能を保持しており、GM-CSF のアンタゴニストとして機能する。(Raines et al., 1991) sGMR α は常に単球より分泌されており、炎症性メディエーターによって亢進される。

sGMR α は、選択的スプライシングだけでなく、細胞膜上の GM-CSF 受容体 α がプロテアーゼにより切断されることによっても生じており

(Prevost et al., 2002)、この可溶性 GM-CSF 受容体 α (sGMR α) は、in vivo で GM-CSF と拮抗し、細胞膜の GM-CSF 受容体に GM-CSF が結合することを阻害する。(Brown et al., 1997) また、GM-CSF 依存性の細胞株の細胞増殖や骨髄細胞のコロニー形成を阻害する。(Raines et al., 1991; Williams et al., 1994; Prevost et al., 2002)

GM-CSF の生物活性は、GM-CSF 刺激によって増殖した細胞の割合を求めるヒト骨髄細胞コロニー形成法や赤白血病の TF-1 細胞を使用したバイオアッセイによって測定されており、GM-CSF 自己抗体の中和能も、これらのアッセイによって評価されている。(Kitamura et al., 1999; Uchida et al., 2004)

しかし、GM-CSF の刺激による細胞増殖応答が骨髄細胞と TF-1 細胞間で異なっているように、異なる時点や多施設間でのデータの比較が困難である。そこで我々は、sGMR α を使用した細胞膜上の GM-CSF 受容体 α を模倣する無細胞アッセイを開発した。このアッセイは、プレート上に固相化した sGMR α を GM-CSF 自己抗体が存在する中で、GM-CSF と結合させ、結合割合を求めること GM-CSF 自己抗体の中和能を評価することができるアッセイである。

B. 研究方法

1. 研究で使用した検体

患者検体は、自己免疫性肺胞蛋白症研究に参加している日本の 7 病院から集めた。本研究は、各大学医学部倫理委員会の承認を受け、登録時に研究参加者に説明し、書面での同意を得て実施した。自己免疫性肺胞蛋白症は、気管支肺胞洗浄液か肺の病理組織診、もしくはその両方で診断した。

2. GM-CSF のビオチン標識法

遺伝子組み換えヒト型 GM-CSF (leukine) を透析によって PBS(pH 7.4)に置換し、NHS-PEO-biotin kit (Pierce 社)を用いて GM-CSF をビオチン標識した。次に monomeric Avidin kit (Pierce 社)を用いてビオチン標識された GM-CSF だけを溶出した。溶出液中の GM-CSF は、ほぼ全てビオチン標識されていた。

3. sGMR α の作製

sGMR α (GenBank Accession nos. X54935)の cDNA は TAKARA 社のヒト胎盤 cDNA ライブラリーから PCR 法によってクローニングした。次に sGMR α の 5'末端に昆虫ウイルス由来ポリヘドリン配列を、3'末端に RGS His タグ配列を付加し、pMSG1.1MG ベクターに挿入した。そのベクターをカイコの卵に注入し、遺伝子組み換えカイコ発生させた。組み換え型 sGMR α は、遺伝子組み換えカイコの繭を 500mM NaCl を含んだ PBS に浸潤させることにより抽出し、ニッケルアフィニティカラムを用いて精製した。

4. ビオチン標識 GM-CSF と sGMR α の結合分析

sGMR α (1.6 μ g/ml)とビオチン標識した GM-CSF(10 μ g/ml)と Miltenyi 社のストレプトアビジンビーズを PBS 中に一昼夜 (4 $^{\circ}$ C) 反応させる。その混合溶液を Miltenyi 社の MACS カラムを通すことによりストレプトアビジンビーズに結合した複合体を分離した。その複合体を還元状態で SDS-PAGE 電気泳動し、ウェスタン解析した。sGMR α の検出には、メンブレン膜 (Millipore 社) を HRP 標識した抗 poly H istidine

抗体(シグマ社)を用いた。ビオチン標識 GM-CSF の検出には、ビオチン標識抗 GM-CSF 抗体(R&D 社)を反応させた後、HRP 標識ストレプトアビジン抗体(AbD 社)を用いた。

5. GM-CSF 自己抗体の定量

GM-CSF 自己抗体濃度は、従来の方法にしたがい、ELISA 法によって定量した。(Inoue et al., 2008)

6. GM-CSF 自己抗体の精製

論文に記載された方法で、精製 GM-CSF 自己抗体は自己免疫性肺胞蛋白症の患者血漿から精製した。(Uchida et al., 2004) 精製した GM-CSF 自己抗体の IgG 抗体に対する純度は、82.8% (Bethyl 社の ELISA kit により測定) であった。血清 IgG 分画は、ProteinA/G セファロースビーズ(GE 社)を用いて自己免疫性肺胞蛋白症患者血清から単離した。

7. 無細胞アッセイの方法

96 ウェルのアミノプレート(Nunc 社)に polyHistidine 抗体(シグマ社)を一昼夜、4℃で固相化した。0.1% tween20/PBS (PBST)で洗浄した後、スタビルコート(SurModics 社)でブロッキングした。スタビルコート中の sGMR α (5.0 μ g/ml) を各ウェルに添加し、一昼夜、4℃中で反応させた。洗浄後、精製 GM-CSF 自己抗体か血清 IgG 分画を各ウェルにビオチン標識 GM-CSF と共に添加し、反応させる。洗浄後、sGMR α に結合したビオチン標識 GM-CSF をアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン(Invitrogen 社)、CDP-Star(Applied 社)で発光させ、プレートリーダー(Berthold 社)で検出した。解離定数は、GM-CSF と sGMR α の最大結合量の 50%値から推定し、ラインウィーバーバークプロットを用いて算出した。

8. TF-1 細胞を用いた GM-CSF 中和能アッセイ

精製 GM-CSF 自己抗体や血清 IgG 分画の中和能は、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で測定した。(Uchida et al.,

2004)

9. 統計分析法

統計分析は、JMP ソフトウェア(SAS 社)を用いて計算し、ノンパラメトリックデータはマンホイットニーの U 検定を用いた。バイオアッセイと無細胞アッセイの値の相関度は、ピアソンの有意差検定(P<0.05)を用いて、検定した。

(倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医学部倫理委員会の承認を受け、登録時に被験者全員に説明し書面での同意を得て施行した。

C. 研究結果

1. sGMR α と GM-CSF の特異的結合

GM-CSF のシグナル伝達は、細胞膜上の GM-CSF 受容体 α に GM-CSF が結合することで開始される。自己免疫性肺胞蛋白症患者の GM-CSF 自己抗体は、GM-CSF で刺激中の TF-1 細胞の増殖を阻害するが、IL-3 刺激中の TF-1 細胞の増殖は阻害しない。それは GM-CSF と GM-CSF 受容体 α との結合を GM-CSF 自己抗体が阻害するからだと考えられる。(Kitamura et al., 1999; Tanaka et al., 1999)

カイコ由来 sGMR α の非還元 SDS-PAGE 分析で、45KDa の単量体と 90KDa の二量体の二つの構造を形成していることが示されている。また還元状態では、単量体構造しか形成していないことが示された (図 1)。

これは、精製した sGMR α が単量体とジスルフィド結合で形成された二量体の混合物であることを示している。次にビオチン標識 GM-CSF と sGMR α を反応させ、ストレプトアビジンビーズを用いて MACS カラムを通すことで、GM-CSF と sGMR α が結合するかどうか確認した (図 2)。

無細胞アッセイでは、sGMR α と GM-CSF との結合は、典型的な飽和結合曲線を描き、GM-CSF 濃度依存的に増加する。ラインウィー

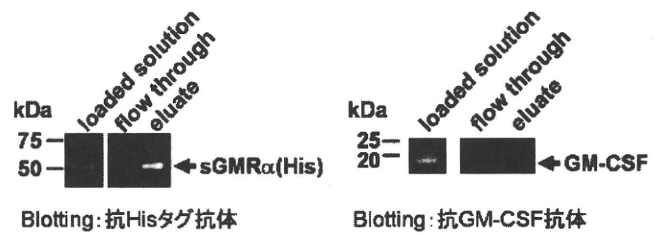
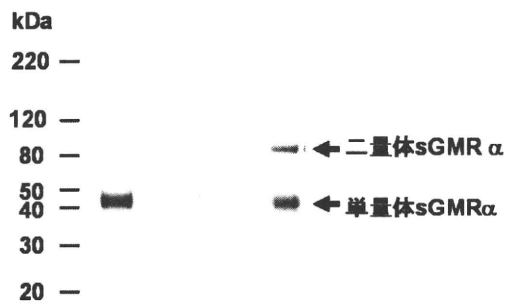


図2 GM-CSF と sGMR α の結合分析

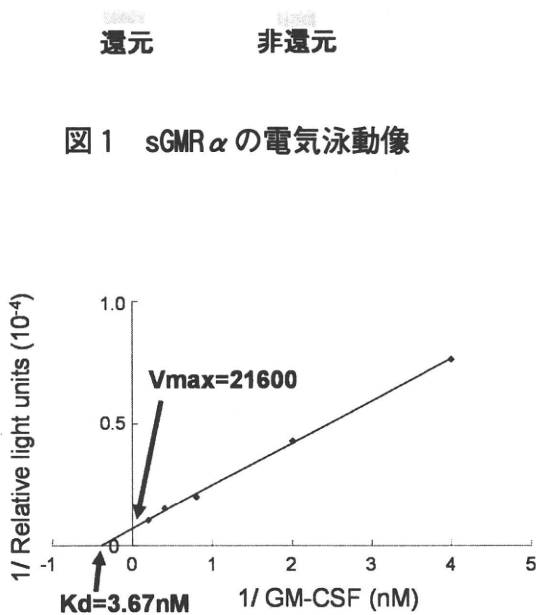


図1 sGMR α の電気泳動像

図3 飽和結合曲線の逆数プロット
(ラインウィーバーバークプロット分析)

バーバークプロット分析では、sGMR α の GM-CSF に対する結合部位は一箇所であり、解離定数は細胞膜上の GM-CSF 受容体 α と同等の 3.7nM を示した。GM-CSF と結合する最大結合量は固相化する sGMR α の濃度依存的に上昇する (図3)。

また、sGMR α の結合特異性を未標識 GM-CSF による結合阻害を用いて確かめた (図4)。

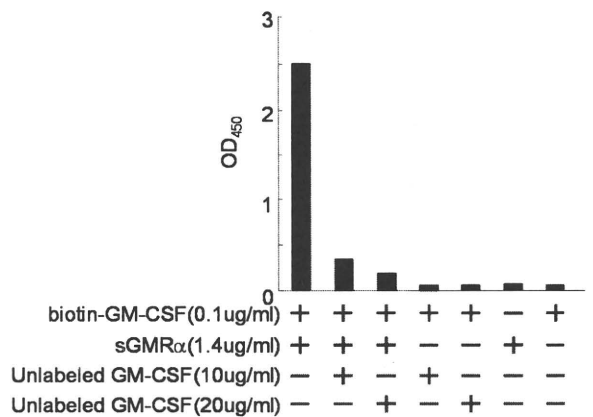


図4 sGMR α の結合特異性

2. 精製 GM-CSF 自己抗体による GM-CSF と sGMR α の結合阻害

無細胞アッセイを使用して、精製 GM-CSF 自己抗体の GM-CSF と sGMR α の結合の阻害度を評価した。精製 GM-CSF 自己抗体が低濃度(0~10ng/ml)の場合、GM-CSF と sGMR α の結合は予想外なことに増強する作用があった (図5)。

しかし、高濃度(100ng/ml~)では、結合を阻害し、さらにラインウィーバーバークプロット分析により、Vmax は変化しないが、解離定数が抗体の濃度依存的に増加し、拮抗阻害の系であることがわかった (図6)。

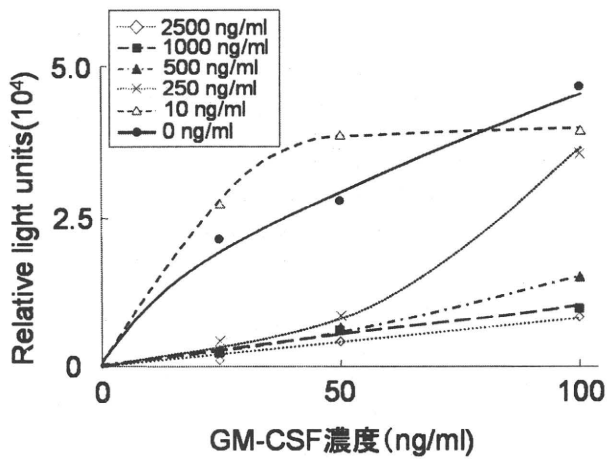


図5 精製 GM-CSF 自己抗体の飽和曲線

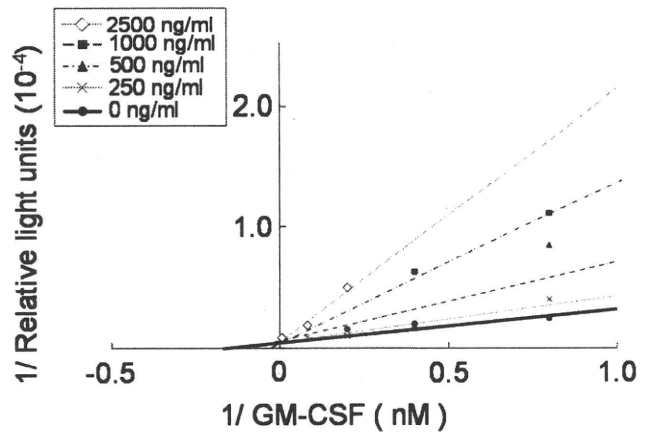


図6 精製 GM-CSF 自己抗体の逆数プロット
(ラインウィーバープロット分析)

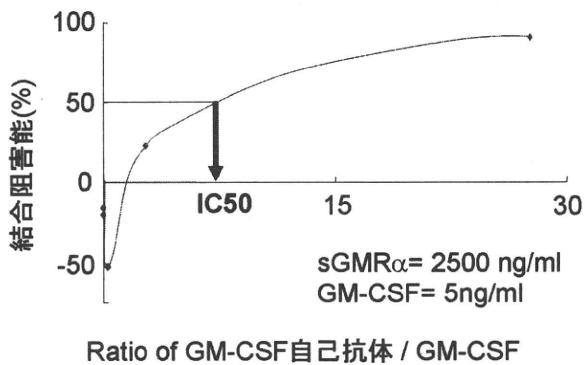


図7 GM-CSF 自己抗体の結合阻害能

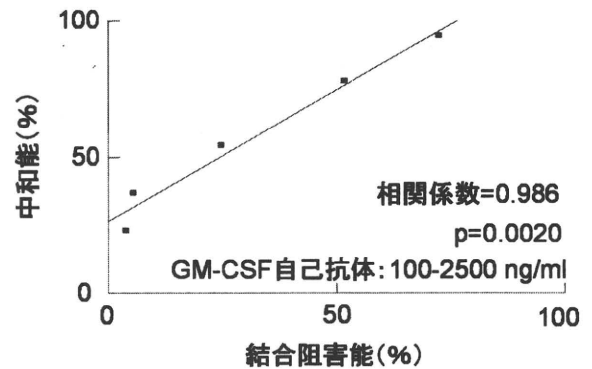


図8 中和能と結合阻害能の相関

精製 GM-CSF 自己抗体における、結合阻害能の 50%抑制濃度(IC_{50})は、 $7.0 \text{ mol}_{\text{IgG}}/\text{mol}_{\text{GM-CSF}}$ であり、バイオアッセイの中和能の IC_{50} は、 $4.15 \text{ mol}_{\text{IgG}}/\text{mol}_{\text{GM-CSF}}$ だった (図7)。

精製 GM-CSF 自己抗体を用いた場合、TF-1 アッセイによる中和能と結合阻害能には有意な相関がみられた(相関係数=0.986、 $p=0.0020$) (図8)。

3. 自己免疫性肺胞蛋白症患者血清から単離した血清 IgG 分画での結合阻害能

自己免疫性肺胞蛋白症患者 40 人の血清から IgG 分画のみを単離した。総 IgG 抗体中、0.113 ~ 1.820% の IgG 型 GM-CSF 抗体が含まれていた。各分画の解離定数は、中央値 291.3nM (150.9 ~ 809.8nM) であり、各々の患者における結合阻害能と中和能はよく相関していた (図9、10)。

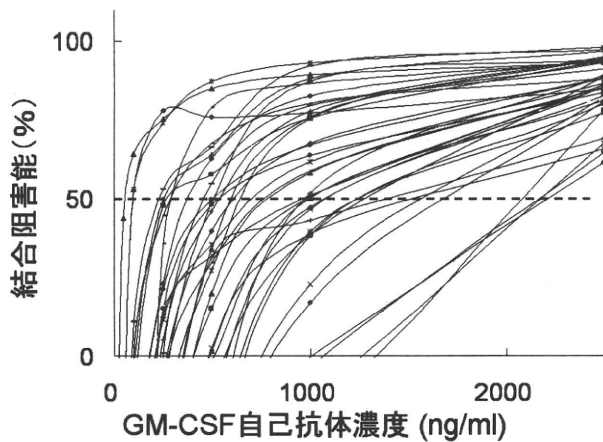


図9 血清 IgG 分画による結合阻害能

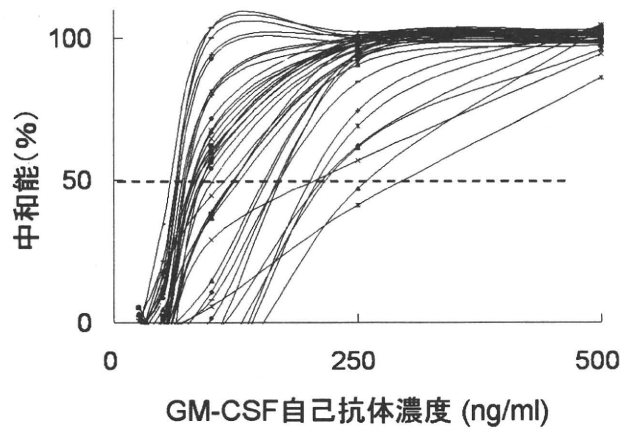


図10 血清 IgG 分画による中和能

Table 1. 自己免疫性肺胞蛋白症患者血清中の GM-CSF 自己抗体 の性状

| Patient no. | 1 GM-CSF自己抗体 /total IgG | 中和能のIC ₅₀ (mol-IgG/mol-GM-CSF) | 結合阻害能のIC ₅₀ (mol-IgG/mol-GM-CSF) | 解離定数 (nM) |
|-------------|-------------------------|---|---|---------------------|
| 1 | 1.291 | 5.959 | 14.19 | 316.9 |
| 2 | 0.2696 | 3.902 | 35.47 | 809.8 |
| 3 | 0.3707 | 3.459 | 1.706 | 392.8 |
| 4 | 1.033 | 4.565 | 12.99 | 249.2 |
| 5 | 0.3231 | 2.819 | 20.95 | 189.7 |
| 6 | 0.4322 | 2.468 | 52.98 | 314.5 |
| 7 | 0.1127 | 5.908 | 30.18 | 296.2 |
| 8 | 0.6000 | 3.346 | 35.39 | 280.8 |
| 9 | 0.9764 | 5.577 | 27.19 | 277.8 |
| 10 | 0.3908 | 2.416 | 8.662 | 401.6 |
| 11 | 1.820 | 7.163 | 17.96 | 310.9 |
| 12 | 0.6184 | 1.909 | 17.83 | 346.2 |
| 13 | 0.9061 | 1.306 | 15.07 | 291.3 |
| 14 | 1.007 | 5.796 | 19.10 | 236.2 |
| 15 | 0.2436 | 1.021 | 101.3 | 294.1 |
| 16 | 0.2327 | 4.237 | 57.74 | 243.5 |
| 17 | 1.089 | 2.112 | 16.11 | 310.0 |
| 18 | 0.2929 | 2.622 | 15.14 | 229.2 |
| 19 | 0.3629 | 2.196 | 6.386 | 249.2 |
| 20 | 0.4360 | 2.129 | 2.697 | 254.2 |
| 21 | 0.4893 | 3.077 | 56.71 | 345.6 |
| 22 | 0.4305 | 2.169 | 2.707 | 305.5 |
| 23 | 0.5133 | 2.301 | 20.29 | 196.0 |
| 24 | 0.6770 | 3.376 | 35.81 | 316.4 |
| 25 | 0.4538 | 2.358 | 40.43 | 231.7 |
| 26 | 0.2607 | 2.597 | 11.00 | 257.3 |
| 27 | 0.3759 | 4.226 | 58.15 | 204.8 |
| 28 | 0.7759 | 2.050 | 8.156 | 380.7 |
| 29 | 0.3267 | 3.343 | 56.67 | 281.6 |
| 30 | 0.3241 | 2.401 | 27.29 | 326.8 |
| 31 | 0.5767 | 4.626 | 41.80 | 276.4 |
| 32 | 0.4253 | 2.368 | 29.45 | 574.9 |
| 33 | 0.6347 | 4.313 | 44.20 | 307.2 |
| 34 | 0.3815 | 2.566 | 8.052 | 248.3 |
| 35 | 0.4725 | 1.819 | 22.36 | 393.0 |
| 36 | 0.3545 | 1.844 | 6.445 | 372.0 |
| 37 | 0.3176 | 6.029 | 23.67 | 200.1 |
| 38 | 0.3380 | 1.810 | 34.10 | 340.3 |
| 39 | 0.6573 | 2.348 | 13.99 | 195.3 |
| 40 | 0.3457 | 7.929 | 35.77 | 466.2 |
| 41 | 0.6936 | 4.194 | 27.89 | 190.9 |
| 中央値 (範囲) | 0.4305 (0.1127-1.820) | 2.819 (1.619-10.21) | 23.67 (1.706-101.3) | 291.3 (150.9-809.8) |

各分画内の中和能と結合阻害能は、GM-CSF抗体濃度依存的に増加し、IC₅₀は各々、中央値23.67 mol-IgG/mol-GM-CSF (1.706~101.3)、2.819

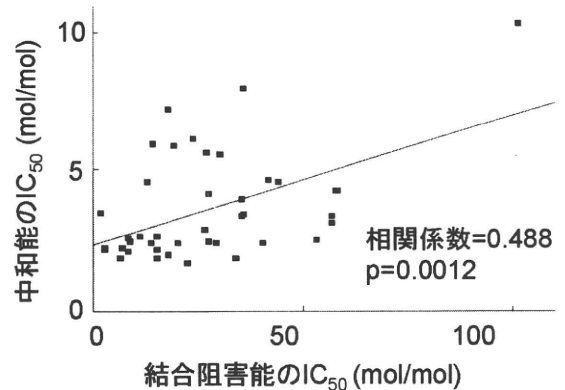


図11 血清 IgG 分画による中和能と結合阻害能の IC₅₀ の相関

mol-IgG/mol-GM-CSF (1.619~10.21)であり、共に広範囲の値を示し、GM-CSF抗体の性状が患者固有であることを示唆している (Table 1)。

また中和能と結合阻害能には有意な相関がみられた (相関係数=0.488, p=0.001) (図11)。

中和能と結合阻害能は、どちらも解離定数とは相関せずに二つのパラメーターが結合親和性に影響を受けていないことを示している。また再現性を比較した場合、中和能の変動係数が34.9±25.9 (mean±SD) に比べて、結合阻害能

は 6.6 ± 1.5 であり、無細胞アッセイは良好な再現性を示した (Table 2)。

これらの結果は、結合阻害能が肺胞蛋白症患者中の GM-CSF 自己抗体の機能を反映していることを示唆している。それゆえ、無細胞アッセイは生体外の GM-CSF 自己抗体の中和能を評価する手段として有用である。

D. 考察

我々は GM-CSF 自己抗体の中和能を評価する手段として、可溶性 GM-CSF 受容体 α (sGMR α) を用いた新たな無細胞アッセイを構築した。今回、このアッセイを使用して、自己免疫性肺胞蛋白症患者の血清及び血漿から精製 GM-CSF 自己抗体と血清 IgG 分画を単離し、これらの抗体の結合阻害能を評価した。またバイオアッセイを用いた中和能と結合阻害能がよく相関していることが示された。血清 IgG 分画の場合、中和能と結合阻害能のどちらも患者間で広い範囲で分布しているが、患者ごとに中和能と結合阻害能はよく相関している。現在、この GM-CSF 自己抗体の中和能を測定する方法は、GM-CSF 依存性の細胞株 TF-1 を用いたバイオアッセイが主流であるが、細胞の状態によって値が変動するため、再現性に難があり、多施設間や、異なる時点で測定したデータの比較が困難である。今回の無細胞アッセイは、GM-CSF 自己抗体の中和能を再現性良く、多検体を同時に短時間で評価できる手段である。

液相では、sGMR α は、単量体と二量体やそれ以上の多量体構造をとることが知られているが、GM-CSF との結合能を持つのは、単量体構造のみである。細胞膜上の GM-CSF 受容体と GM-CSF との結合を模倣するため、sGMR α の C 末端に付加した His タグをプレートに固相化した His 抗体で、一個の抗体に対して一個の sGMR α が結合するように誘導した。この結果、構築された無細胞アッセイは、他の論文で報告

Table 2. バイオアッセイと無細胞アッセイの再現性の比較

| | 血清検体 | 実験1回目 | 実験2回目 | 実験3回目 | 変動係数 (%) [*] |
|---------------------|------|-------|-------|-------|-----------------------|
| 無細胞アッセイによる結合阻害能 (%) | 血清A | 69 | 59 | 60 | 9 |
| | 血清B | 68 | 67 | 60 | 6 |
| | 血清C | 68 | 76 | 72 | 6 |
| バイオアッセイで求めた中和能 (%) | 血清A | 89 | 65 | 55 | 25 |
| | 血清B | 91 | 43 | 70 | 36 |
| | 血清C | 72 | 46 | 52 | 24 |

* $p < 0.05$

されている sGMR α と同等の親和性と特異性を示した。(Prevost et al., 2002)

GM-CSF の単一箇所での sGMR α が結合するため、精製 GM-CSF 自己抗体の存在下で、無細胞アッセイが拮抗阻害の系であるということは、GM-CSF 自己抗体中に GM-CSF の活性中心に結合する抗体の存在を示唆している。低濃度の精製 GM-CSF 自己抗体存在下で GM-CSF と sGMR α の結合が増強されていることは、GM-CSF と sGMR α の結合を増強するような IgG 抗体の存在を示唆している。

自己免疫性肺胞蛋白症患者血清中に含まれる GM-CSF 自己抗体は、ポリクローナル抗体であり、GM-CSF の色々な配列部分を認識する様々な抗体が混在している。(Uchida et al., 2004) よって、中和能と結合阻害能の IC₅₀ が、様々な値を示している。重要なことにすべての血清 IgG 分画が、バイオアッセイと無細胞アッセイで阻害効果を示しており、中和能と結合阻害能には有意な相関がみられた。(相関係数=0.488、 $p=0.0012$)。

無細胞アッセイは、細胞膜上にある高親和性 GM-CSF 受容体 (α/β の複合体)ではなく、低親和性の GM-CSF 受容体 α と GM-CSF との結合のみを模倣している。これは、GM-CSF の細胞内シグナル伝達が細胞膜上の GM-CSF 受容体 α に結合することで、惹起されるからである。また

GM-CSF 受容体は GM-CSF 高親和性の 12 量体構造を構築することがわかっている。(Hansen et al., 2008) これに関し、1 つの GM-CSF と結合する受容体は、単量体 GM-CSF 受容体 α と二量体 GM-CSF 受容体 β なので、sGMR α のみからなる無細胞アッセイの代わりに、単量体 GM-CSF 受容体 α と二量体 GM-CSF 受容体 β が結合するようなシステムを構築する必要があるかもしれない。

今回の報告では、GM-CSF 自己抗体濃度に対して、中和能と結合阻害能の IC₅₀ は相関しなかった。以前の研究で、病勢と GM-CSF 自己抗体濃度が相関しないことは示されている。(Uchida et al., 2009) 我々の最近の研究で、GM-CSF 自己抗体は患者ごとに様々な性状を持っており、無細胞アッセイの結合阻害能と自己免疫性肺胞蛋白症患者の病勢や予後の関係調べることで、さらなる知見が得られるかもしれない。GM-CSF 自己抗体は、抗体医薬として自己免疫性疾患や炎症性疾患の治療薬として有望である。(Uchida et al., 2009) その際、無細胞アッセイは GM-CSF 抗体のスクリーニングとして利用が可能かもしれない。

E. 結論

今回、GM-CSF 自己抗体の中和能を評価できる無細胞アッセイを開発した。このアッセイは、多検体を短時間で評価でき、生体内外における GM-CSF 自己抗体の多面的な機能を探るための有用な手段として役立つだろう。

参考文献

1. Brown, C., Pihl, C. and Murray, E., 1997, Oligomerization of the soluble granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: identification of the functional ligand-binding species. *Cytokine* 9, 219-25.
2. Hansen, G., Hercus, T., McClure, B., Stomski, F., Dottore, M., Powell, J., Ramshaw, H., Woodcock, J., Xu, Y., Guthridge, M., McKinstry, W., Lopez, A. and Parker, M., 2008, The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell* 134, 496-507.
3. Hayashida, K., Kitamura, T., Gorman, D., Arai, K., Yokota, T. and Miyajima, A., 1990, Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9655-9.
4. Hercus, T., Thomas, D., Guthridge, M., Ekert, P., King-Scott, J., Parker, M. and Lopez, A., 2009, The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood* 114, 1289-98.
5. Inoue, Y., Trapnell, B., Tazawa, R., Arai, T., Takada, T., Hizawa, N., Kasahara, Y., Tatsumi, K., Hojo, M., Ichiwata, T., Tanaka, N., Yamaguchi, E., Eda, R., Oishi, K., Tsuchihashi, Y., Kaneko, C., Nukiwa, T., Sakatani, M., Krischer, J. and Nakata, K., 2008, Characteristics of a large cohort of patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan. *Am J Respir Crit Care Med* 177, 752-62.
6. Kitamura, T., Tanaka, N., Watanabe, J., Uchida, Kanegasaki, S., Yamada, Y. and Nakata, K., 1999, Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 190, 875-80.
7. Prevost, J., Pelley, J., Zhu, W., D'Egidio, G.,

- Beaudry, P., Pihl, C., Neely, G., Claret, E., Wijdenes, J. and Brown, C., 2002, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and inflammatory stimuli up-regulate secretion of the soluble GM-CSF receptor in human monocytes: evidence for ectodomain shedding of the cell surface GM-CSF receptor alpha subunit. *J Immunol* 169, 5679-88.
8. Raines, M., Liu, L., Quan, S., Joe, V., DiPersio, J. and Golde, D., 1991, Identification and molecular cloning of a soluble human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8203-7.
9. Tanaka, N., Watanabe, J., Kitamura, T., Yamada, Y., Kanegasaki, S. and Nakata, K., 1999, Lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis express a factor which neutralizes granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *FEBS Lett* 442, 246-50.
10. Trapnell, B., Whitsett, J. and Nakata, K., 2003, Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 349, 2527-39.
11. Uchida, K., Nakata, K., Suzuki, T., Luisetti, M., Watanabe, M., Koch, D., Stevens, C., Beck, D., Denson, L., Carey, B., Keicho, N., Krischer, J., Yamada, Y. and Trapnell, B., 2009, Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy subjects. *Blood* 113, 2547-56.
12. 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. and Keicho, N., 2004, High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood* 103, 1089-98.
13. Williams, W., VonFeldt, J., Rosenbaum, H., Ugen, K. and Weiner, D., 1994, Molecular cloning of a soluble form of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha chain from a myelomonocytic cell line. Expression, biologic activity, and preliminary analysis of transcript distribution. *Arthritis Rheum* 37, 1468-78.
- F. 健康危険情報**
記載すべきことなし。
- G. 研究発表**
- 1. 論文発表**
1. Urano S, Kaneko C, Nei T, Motoi N, Tazawa R, Watanabe M, Tomita M, Adachi T, Kanazawa H, Nakata K. A cell-free assay to estimate the neutralizing capacity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies. *J Immunol Methods* 360, 141-148, doi:S0022-1759(10)00197-3 [pii]10.1016/j.jim.2010.07.001 (2010).
- 2. 学会発表**
1. 浦野真也, 富田正浩, 金子千夏, 根井貴仁, 元井奈都紀, 田澤立之, 中田 光 : Soluble GM-CSF receptor alpha を用いた無細胞系 GM-CSF 中和能測定システムの確立. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会, 京都府, 2010 年 3 月 (日本呼吸器学会雑誌, 第 48 巻増刊号, 2010 年 3 月発行)
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
【発明の名称】中和抗体など生理活性タンパク質の活性と拮抗し制御する物質の測定方法、

生理活性タンパク質とその受容体との結合を
制御する物質のスクリーニング方法、及び、
生理活性タンパク質の受容体への結合を制御
する物質を検出するためのキット

整理番号:000012DP 特願 2009-119320 (Proof)

提出日：平成 21 年 5 月 15 日

【国際特許分類】 C07K 16/24

【発明者】

【住所又は居所】 新潟県新潟市中央区旭町
通 1-7-54 新潟大学医歯学総合病院生命科学
医療センター内

【氏名】 中田 光

【住所又は居所】 広島県東広島市鏡山三丁
目 13 番 26 号 株式会社ネオシルク内

【氏名】 富田 正浩

【特許出願人】

【識別番号】 304027279

【氏名又は名称】 国立大学法人新潟大学

【特許出願人】

【識別番号】 506309456

【氏名又は名称】 株式会社ネオシルク

1. 特許取得

特許第 4372904 号

発明の名称：抗 GM-CSF 自己抗体及びその
定試薬

特許権者：中田 光

2. 実用新案登録

記載すべきことなし。

3. その他

記載すべきことなし。

肺胞蛋白症ホームページ（医療従事者向け）の
英語版

別冊2-4 平成22年度医療動向の研究報告書

肺胞蛋白症ホームページ(医療従事者向け)の英語版

○田邊かえ 中田光
新潟大学医学部総合病院生命科学医療センター

厚生労働省難治性稀発病研究事業「肺胞蛋白症の難治化要因の解明と診断・治療・管理の標準化と指針の確立」に関する研究(橋本井上)にて昨年度作成公開した肺胞蛋白症ホームページは、医療従事者向け、一般向けともにアクセス回数が2万件を越え、ともに我が国を代表する肺胞蛋白症の情報発信の地位を確立した。本分野は日本人の負担が大きく、できれば、国際的にも広く情報源として活用していただきたいとの願いから、22年度に英語版の作成を行った。

Information on Pulmonary Alveolar Proteinosis for Medical Staff
Introduction Clinical Features and Treatment Link

What is Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP)?
PAP is a rare lung disorder characterized by the excessive accumulation of phospholipids and surfactant apoproteins in the lower respiratory tracts (alveoli and terminal bronchioli), which causes gradual but progressive respiratory failure. The prevalence is estimated to be 6.2 per million.

The aim of this site is to promote the development of new therapies and to construct a support system for patients by providing medical staff with accurate information about PAP and encouraging communication.

This site was established by The "Pulmonary Alveolar Proteinosis Research Group" grant by the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan (H21-Nanchi-Japan-161).

Link
Rare Lung Disease Consortium
PAP Foundation
EuroPAP

GM-CSF autoantibody Measurement

はじめに INTRODUCTION

Outline of Clinical Features

Concepts of PAP

Pulmonary alveolar proteinosis (PAP) is a syndrome caused by defects in the generation or degeneration of surfactant that leads to abnormal accumulation of surfactant-derived material in the alveoli and terminal bronchioli.

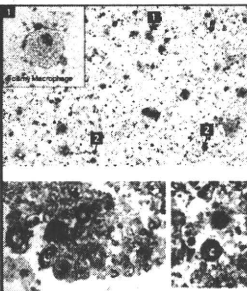
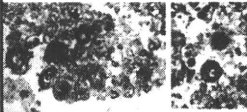
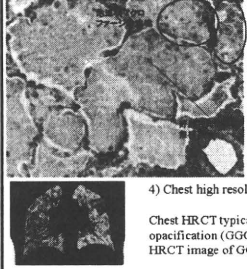
Definition of PAP

PAP is defined by

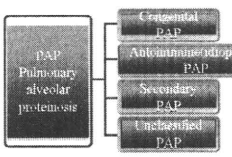
- 1) Pathologically proven abnormal accumulation of surfactant-derived material in the alveoli and terminal bronchioli.
- 2) Radiological lesions that are typically diffuse and bilaterally distributed.

Characteristics of PAP

- 1) Bronchoalveolar lavage fluid
The appearance of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) is "milky" or "waxy". Upon standing, it forms sediment.
- 2) Microscopic features of BALF-cytospin preparation
BALF is composed of granular, acellular, amorphous material and a small number of cells. Cell components consist of large, foamy alveolar macrophages (1) and small monocyte-like macrophages (2).
- 3) Pathological Findings
Microscopically, alveoli and terminal bronchioli are filled with a fine eosinophilic material that stains strongly for surfactant proteins with periodic acid-Schiff reagent. The alveolar wall and interstitial architecture are relatively well-preserved.
- 4) Chest high resolution CT
Chest HRCT typically shows ground glass opacification (GGO). The image to the left is a 3D HRCT image of GGO distribution in PAP.

Classification of PAP



1) Congenital PAP
Congenital PAP is caused by congenital defects in the surfactant generation or degeneration process. Deficiency or mutation of granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) receptor a or b, surfactant protein B or C, or ATP-binding cassette transporter A3 have been reported as causes of congenital PAP. In most cases, however, the cause is unknown. In congenital PAP, serum is negative for GM-CSF autoantibody. The incidence of congenital PAP is unknown.

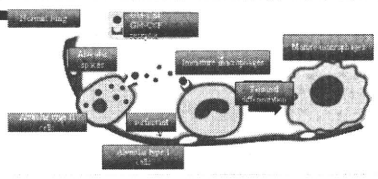
2) Autoimmune (idiopathic) PAP
Most cases originally diagnosed as primary or idiopathic PAP have been shown to be positive for GM-CSF autoantibody. The presence of GM-CSF autoantibodies in pathologically proven PAP is termed autoimmune PAP, and constitutes 90% of acquired PAP. Except for congenital or secondary causes, cases of PAP in which the occurrence of GM-CSF autoantibody is unknown is deemed idiopathic PAP until further examination demonstrates otherwise.

3) Secondary PAP
Secondary PAP develops secondarily to hematological disorders (especially myelodysplastic syndrome), pulmonary infections (carinii pneumonia and non-tuberculous mycobacteriosis), and some autoimmune diseases (Behcet disease), and constitutes 10% of acquired PAP. Serum is negative for GM-CSF autoantibody.

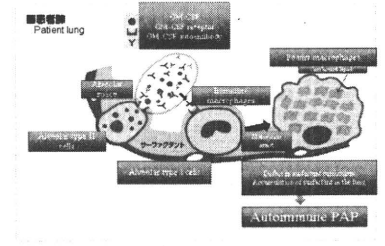
4) Unclassified PAP
PAP other than 1), 2) or 3).

Pathogenesis of autoimmune PAP

In normal lung, GM-CSF released from alveolar type II cells binds to GM-CSF receptors on immature alveolar macrophages and initiates GM-CSF signaling in these cells. This promotes the expression of transcription factors, PU.1 and PPARγ in the nuclei and triggers the terminal differentiation of alveolar macrophages into mature macrophages that maintain homeostasis in the lung by incorporating and degrading surfactant lipids and proteins.



In autoimmune PAP, GM-CSF released from alveolar type II cells is neutralized by abundant GM-CSF autoantibodies present in the alveoli. This prevents GM-CSF from binding to GM-CSF receptors on immature alveolar macrophages. Consequently, terminal differentiation of alveolar macrophages does not occur, thus impairing surfactant catabolism in the lung.



Introduction Pulmonary alveolar proteinosis and the treatments GM-CSF autoantibody Links

肺胞蛋白症とその治療

What is PAP?
Clinical Features of PAP
Diagnostic Criteria
Treatments
References

What is PAP?
Outline of PAP
Classification of PAP
Pathogenesis of PAP

Clinical Features of PAP
Epidemiology
HRCT findings
Laboratory data
BALF findings

Diagnostic Criteria
Diagnostic criteria
Measurement of GM-CSF autoantibody

Treatments
Standard treatment
Case Report of WLL
GM-CSF inhalation therapy
Case report of inhalation

References

肺胞蛋白症とその治療

Pulmonary Alveolar Proteinosis and the Treatment

肺胞蛋白症の臨床像 Clinical Features

★ Epidemiology

Autoimmune PAP

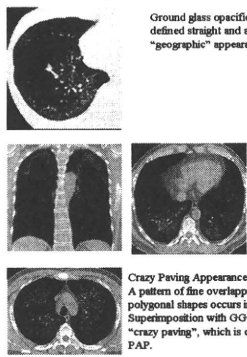
- 90% of adult onset acquired PAP
- The median onset is in the 5th decade
- Male to female ratio is 2.1:1
- 25% of patients have a history of occupational dust inhalation
- Serum is positive for GM-CSF autoantibodies
- Prognosis is generally good
- Rarely, respiratory failure may develop
- 30% of patients are asymptomatic
- Dyspnea on exertion, cough, and sputum are frequent, while fever is uncommon

Secondary PAP

- 10% of adult onset acquired PAP
- The median onset is in the 4th and 5th decades of life
- Male to female ratio is 1.5:1
- Underlying diseases such as hematological disorders, especially myelodysplastic syndrome, are most frequently followed by pulmonary infection and autoimmune disease
- GM-CSF autoantibody negative
- Prognosis is poor (2 year survival is 49%, 5 years survival is 35%)
- Most patients are symptomatic
- Symptoms are variable
- Fever is seen in 22% of cases

HRCT Findings

★HRCT findings in autoimmune PAP

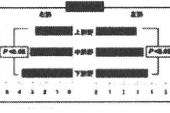


Ground glass opacification generally has sharply defined straight and angulated margins, giving a "geographic" appearance.

Subpleural sparing GGO in the peripheral lung is escaping from subpleural regions.

Crazy Paving Appearance
A pattern of fine overlapping lines forming 3-10 mm polygonal shapes occurs in the majority of cases. Superimposition with GGO gives an appearance known as "crazy paving", which is characteristic but not diagnostic of PAP.

To evaluate craniocaudal distribution, the proportion of the involved area of GGO was compared by a visual scoring system among the upper, middle, and lower lung fields. The mean score for autoimmune PAP was smaller in the upper lung field (2.8 and 2.9, respectively, for the right and left lung fields) compared to the lower lung field (3.8 and 3.7, respectively, for the right and left lung fields; p < 0.05). The visual scores were not different between the right and left lung.



★HRCT findings in secondary PAP

A diffuse pattern with predominant GGO in patients with secondary PAP (62%).

Major 3 patterns seen in patients with secondary PAP

A: Geographic GGO

B: Diffuse GGO

C: Diffuse GGO with interlobular septal thickening.

To evaluate craniocaudal distribution, the proportion of the involved area of GGO was compared by a visual scoring system among the upper, middle, and lower lung fields. The visual scores were even among lung fields, with a mean value of 3.4 for both the right and left lung fields.

<自己免疫性と続発性での画像所見の比較>
Ishii H, et al. Chest 136:1348-1355, 2009

| | Total n=42 | Autoimmune PAP n=21 | Secondary PAP n=21 | P value |
|---------------------------|---------------|------------------------|-----------------------|---------|
| Appearance of GGO | | | | |
| Patchy geographic pattern | 48% | 71% | 34% | 0.002 § |
| Diffuse pattern | 49% | 19% | 63% | 0.005 § |
| Mixed pattern | 32% | 19% | 34% | 0.634 |
| Sub pleural sparing | 52% | 71% | 33% | 0.013 § |
| Crazy paving appearance | 43% | 71% | 14% | 0.001 § |

HRCT findings for both autoimmune and secondary PAP demonstrated GGO, consolidation, interlobular septal thickening, and a low-attenuation area. Honeycombing was not seen in any case. GGO was recognized bilaterally in all patients with autoimmune and secondary PAP and consolidation was also frequently seen. The consolidation consisted of small nodular features (mostly 5 mm), typical of both autoimmune and secondary PAP, although some large consolidations with an air bronchogram, also were also observed.

Laboratory Findings

★ Autoimmune PAP

- * In 50% of patients, arterial oxygen (PaO₂) is under 70 mmHg. Arterial carbon dioxide is typically within normal limits.
- * %VC is within the normal range except in advanced disease.
- * %DLCO is reduced in the early stage.
- * Normal FEV1 * CRP and ESR are normal. * RBC often increases * Elevated KL-6, CEA, SP-A, SP-D and LDH. These are higher than in IPF, sarcoidosis, collagen vascular disease. * KL-6 and CEA are correlated with A-αDO₂
- * Serum GM-CSF autoantibody is positive.

★ Secondary PAP

- * %VC is within the normal range except in advanced disease.
- * %DLCO is reduced in the early stage.
- * Normal FEV1 * Elevated KL-6, CEA, SP-A, SP-D and LDH. KL6 and CEA are higher than in other diffuse lung diseases. * KL-6 and CEA are correlated with A-αDO₂
- * Serum GM-CSF autoantibody is negative.

Findings of Bronchoalveolar Lavage Fluid Sediment

In autoimmune PAP, BALF has a characteristic "milky" appearance. Cytologic examination of BALF reveals numerous granular, acellular, eosinophilic, and amorphous material in the background. Alveolar macrophages comprise large foamy- and small monocyte like- macrophages. The former have an enlarged and engorged cytoplasm with a foamy, vacuolated appearance. The nucleus is usually small and deviated. In the early stages, lymphocyte and neutrophil levels are increased, probably as a consequence of elevated MCP-1, although whole cell levels are decreased in advanced disease.

In secondary PAP, BALF also has a characteristic "milky" appearance. Large foamy macrophages are usually seen which sometimes have atypical nuclei. Lymphocytes and neutrophils levels are frequently increased.

Diagnostic Criteria for autoimmune PAP

The diagnosis of PAP is based on the following criteria.

- 1) Radiographic findings on HRCT characteristic of autoimmune PAP include a diffuse or patchy "geographic" pattern of ground glass opacification superimposed on interlobular septal thickening in multiple lobes.
- 2) Pathological/Cytological Findings: a. Characteristic pathological features include intraalveolar, eosinophilic, periodic acid-Schiff positive material in the biopsy specimen. b. Macroscopically, BALF is turbid. Microscopically, there is granular, eosinophilic, amorphous, or periodic acid-Schiff positive material and foamy macrophages.
- 3) The serum is positive for GM-CSF autoantibodies.

Notes: 1. Of 223 cases with autoimmune PAP in Japan, 131 cases were diagnosed by CT and BALF findings, 76 cases were diagnosed by CT, BALF, and pathological features in TBLB specimens. 16 cases were diagnosed by CT and pathological findings in VATS samples. Inoue Y, Tazawa R, Arata T, Takada T, Hisawa N, Karahara Y, Teitani K, Hojo M, Ichikawa T, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Oishi K, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Nukawa T, Sakata M, Kirschner JP, Nakata K. Characteristics of a large cohort of patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan. Am J Respir Crit Care Med. 2008;177:752-62.

Diagnostic Criteria for autoimmune PAP

Measurement of GM-CSF autoantibody

Anti-GM-CSF antibody concentrations are measured in a similar manner to that previously described (ref. 4). Briefly, serum samples are diluted 1:3000 with phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1% goat serum and 0.1% Tween 20. Separate 50 µl aliquots of diluted serum and the purified anti-GM-CSF antibody standard are incubated at room temperature for 40 minutes in ELISA plates previously coated overnight at 4° C with 1 mg/ml rhGM-CSF and blocked for 1 hour with 1% bovine serum albumin/PBS. After washing four times with PBS 0.1% Tween 20 (PBST), 50 µl of 10 mM ammonium acetate buffer (pH 6.0) is added to each well and the plates are incubated at room temperature for a further 15 minutes. The plates are washed with PBS. Antibody captured by rhGM-CSF are detected by peroxidase labeled anti-human IgG F(ab)₂ antibody (Dako). Tetramethylbenzidine is used as a substrate and absorbance is measured at 450 nm. All assays are performed in duplicate and the mean of the two results used.

For further inquiry of GM-CSF antibody testing for research purposes, please contact us at the following email address.

Treatments for Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP)

Standard therapy
Whole lung lavage under general anesthesia
Using a double-lumen intratracheal tube, more than 20L of saline is infused into each lung to remove the accumulated surfactant, while mechanical ventilation is applied to the other lung. Although safe in the majority of cases, the highly invasive nature of the procedure remains a concern, especially in patients with severe disease.

Bronchoscopic lavage
Bronchoscopic segmental lavage is repeated using 500-1000 ml of saline as a safe alternative in patients with severe hypoxemia.

Treatment for secondary PAP
Secondary PAP can be improved through treatment of the underlying diseases in some cases. Whole lung lavage may improve non-resolving secondary PAP, but its efficacy remains unclear.

Treatments for Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP)

A case of PAP treated with whole lung lavage
A 50 year old man complaining of persistent cough visited his family physician. Ground glass opacities in both lower lung fields were demonstrated on chest X-ray. Administration of antibiotics had no effect and he was temporally diagnosed with interstitial pneumonia. Bronchoscopy was performed but only provided limited data and a diagnosis could not be reached due to severe coughing during the procedure. As hypoxemia progressed, corticosteroids were administered but resulted in no improvement. He was referred to a hospital where the diagnosis of PAP was established. He underwent whole lung lavage which successfully improved the disease.

Before WLL on left lung Before WLL on right lung Just after WLL 1 year after WLL

Treatments for Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP)

GM-CSF inhalation

Method
Treatments include high-dose GM-CSF administration (125 -150 mcg twice daily on days 1-8, none on days 9-14) for six 2-week cycles followed by low-dose administration (125-150 mcg once daily on days 1-4, none on days 5-14) for six 2-week cycles. 125-150 mcg of lyophilized Leukine dissolved in 2 ml of sterile saline is inhaled as an aqueous aerosol using a LC-Plus or LC-Star nebulizer with a manual, interrupter valve connected to a PARI Turbo BOY compressor (PARI GmbH, Starnberg, Germany) (ref. 6).

Efficacy
When a clinical response is defined as a reduction in A-αDO₂ by at least 10 torr at the end of treatment compared to baseline, the response rate has been reported to be 62% (ref. 6).

Advantages
*No need to be hospitalized.
*The duration is 20-30 minutes for each daily inhalation at home.

Disadvantages
*The reagent is expensive.
*Some skills are required for reagent preparation and inhalation.
*Long period (6 months) of treatment.