

図 1

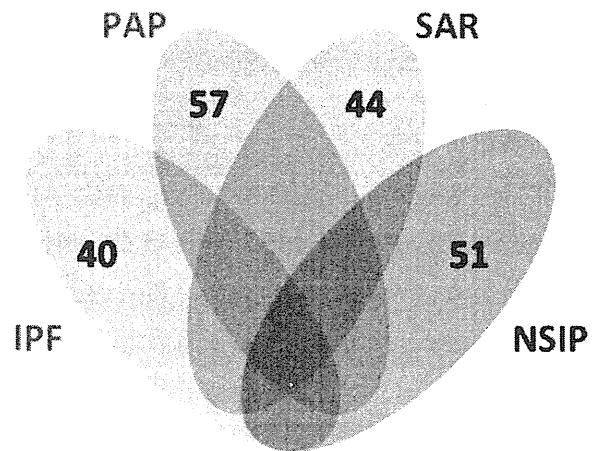


図 2

表 1

Gene	Symbol	Frequency in PAP, %	Frequency in control, %	Intensity in PAP	Intensity in control	Overall score
NM_000758.2	CSF2	100	0	28.46	0	305.33
NM_000758.2	CSF2	100	0	16.18	0	252.93
.....	70	15.79	7.26	18.34	117.2
.....	50	10.53	13.34	11.23	107.35
.....	90	39.47	4.51	44.29	104.38
.....	30	0	34.28	0	97.45
.....	30	10.53	57.92	21.38	94.7
.....	30	7.89	35.82	8.87	90.02
.....	30	7.89	31.43	9.03	85.65
.....	40	7.89	13.51	9.73	85.54
.....	50	10.53	9.92	26.23	81.2
.....	50	5.26	5.08	6.84	79.13
.....	20	10.53	88.5	14.29	74.83
.....	40	13.16	12.12	17.2	74.68
.....	50	5.26	4.24	6.98	73.98

表 2

Pathway	q-value
Striated Muscle Contraction	1.36E-04
Negative regulators of RIG-I/MDA5 signaling	2.29E-04
Innate Immune System	2.29E-04
RIG-I/MDA5 mediated induction of IFN-alpha/beta pathways	2.29E-04
Immune System	3.05E-04
Muscle contraction	6.01E-04
Oxygen-dependent Proline Hydroxylation of Hypoxia-inducible Factor Alpha	0.001632107
Signaling by BMP	0.00267122
Smooth Muscle Contraction	0.002906561
Regulation of Hypoxia-inducible Factor (HIF) by Oxygen	0.003147099
Cellular responses to stress	0.003147099
Cellular response to hypoxia	0.003147099
Nicotinate and nicotinamide metabolism	0.003400594

コア値の分布を示した (図 1)。疾患に特徴的な分布はなく、類似した分布を示した。いずれの疾患でもスコア 20 点台にピークがあり、高スコア側に長く裾野を引く形となった。

次に疾患特異的自己抗体と判断するための、スコア値の閾値について検討した。Gnjatic らの報告ではスコア > 5 を採用しているが、炎症性疾患を対象とした我々の検討には不適であった。コントロール疾患との重なりがないように検討した結果、スコア ≥ 57.1 を閾値として設定し、57 個 APAP 特異的自己抗体を決定した (図 2)。

57 個の APAP 特異的自己抗体の内、スコア値

トップ 2 はアレイ内に 2 カ所プロットされている GM-CSF (CSF2) を抗原とする自己抗体であったが (表 1)、その他にも APAP の病態への関与の可能性がある蛋白に対する自己抗体が検出された。

また 57 個の APAP 特異的自己抗体間の生物学的経路に基づく関係を明らかにするために、TargetMine を用いた KEGG pathway 解析を行ったところ、合計 49 個の有意な生物学的経路が検出された。内 q 値 < 0.005 の経路のみを示した (表 2)。検出された経路の中にはウイルス感染や自然免疫に関与する経路が含まれ、病態へ

の関連が疑われた。

D. 考察

今回我々は蛋白アレイを用いて、自己抗体の網羅的検索を行い、APAP 57 個、IPF 40 個、NSIP 51 個、SAR 44 個の疾患特異的自己抗体を決定した。従来の概念からすると、生体においては自己抗原に対して免疫寛容が成立しているはずであり、これらの数は予想外に多い。しかし今後技術革新を背景として、様々な疾患において新たな、また予想外の自己抗体が発見されてくる可能性は充分あると考えられる。

自己抗体を個々の抗体側から解釈した場合、疾患マーカーとしての有用性、機能阻害抗体として病態修飾や病因に関与する可能性が考えられる。一方、抗原側から解釈した場合は、疾患における過剰産生、局在変化、遺伝子変異等に伴う 3 次構造変化を起こした蛋白群に対する生体反応であると考えられる。生体側の要素としてこれらの疾患において免疫寛容レベルの低下があるのかどうか、今後の検討が必要と考えられる。

疾患特異的自己抗体としての各抗体のスコアリングを既報告の方法に従って行った^{4,5)}。このスコアは、疾患特異的自己抗体の値が対象疾患においてカットオフ値を上回る頻度と抗体価の強さ双方を考慮したものである。また対象疾患内の一部症例に非常に高い抗体価を示すような場合にも、疾患特異的自己抗体として有用との考えから、高いスコアが得られるようになっている。

では、スコア値何点以上を疾患特異的自己抗体と判断すればよいのか？この閾値設定に関して定石法はない。低く取ると非特異的自己抗体も含まれてくる一方、高く取ると貴重な疾患特異的自己抗体を失う可能性がある。我々はコントロール疾患も含めた全疾患間の重なりがなく、なるような閾値設定が妥当であると考え、閾値

を漸増して検討した結果、本研究における閾値を決定した。

APAP 疾患特異的自己抗体として、最もインパクトが高かったのはやはり抗 GM-CSF 抗体であった。抗 GM-CSF 抗体は APAP の原因として確立されており²⁾、この結果は当然と言える。しかし本研究により APAP では抗 GM-CSF 抗体以外にも多彩な疾患特異的自己抗体が産生されていることが判明した。これらの自己抗体が APAP の病態にどのような影響を与えるか、個別に検討する必要がある。

本研究における APAP 特異的自己抗体 57 個を対象としたバイオインフォマティクス的手法による生物学的経路解析で、ウイルス感染や自然免疫に関与する経路、筋肉の収縮に関与する経路が検出された。これらの経路と APAP 病態との関連は現時点では不明であり、今後の検討を要するが、肺胞蛋白症の患者は易感染性で、感染が予後を規定する重要な因子である点においてウイルス感染、自然免疫に関与する蛋白を抗原とする自己抗体が検出されたことは注目に値する。また CT 上の肺線維化所見が予後を規定する因子であることが報告されている点において⁷⁾、筋肉の収縮に関与する蛋白を抗原とする自己抗体と CT 上の肺線維化所見、さらに予後との関連を検索する必要があると考えられる。

E. 結論

APAP においては抗 GM-CSF 抗体以外にも多数自己抗体が産生されていることが解った。中でも自然免疫や筋収縮に関与する蛋白に対する自己抗体が APAP 特異的自己抗体として検出されている点が興味深い。次年度においては、APAP 特異的自己抗体の個々について解析を進め、病態関与について明らかにする必要がある。

参考文献

1. 中田光 (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) 自己免疫性肺胞蛋白症の病態と概念. 肺胞蛋白症の診断、治療、管理の指針 (平成 24 年) 37-38.

2. Sakagami T, et al. Human GM-CSF autoantibodies and reproduction of pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 2009; 361:2679-81.
3. Inoue Y, et al. Characteristics of a large cohort of patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:752-762.
4. Gnjatic S, et al. Seromic profiling of ovarian and pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:5088-5093.
5. Gnjatic S, et al. Seromic analysis of antibody responses in non-small cell lung cancer patients and healthy donors using conformational protein array. *J Immunol Methods* 2009; 341:50-58.
6. Chen YA, et al. TargetMine, an integrated data warehouse for candidate gene prioritization and target discovery. *PLoS ONE* 2011; 6:e17844.
7. 審良雅則、他(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). 肺胞蛋白症の CT 上の肺線維化所見に関する研究 平成 23 年度総括・分担研究報告書 94-98.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ihara S, Kida H, Arase H et al. Inhibitory roles of signal transducer and activator of transcription 3 in antitumor immunity during carcinogen-induced lung tumorigenesis. *Cancer Research*. 72:2990-2999, 2012.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究報告書

次世代シークエンサーによる GM-CSF 自己抗体産生機序の解明

1) 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

2) 日本獣医生命大学獣医学部

3) 近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター

中田 光¹、根井貴仁¹、伊藤祐子¹、浦野真也¹、金子千夏¹、
元井奈都紀¹、田澤立之¹、瀧澤 淳¹、中垣和英²、井上義一³

はじめに

我々は、1999年に特発性肺胞蛋白症の病因は血液及び肺に存在する GM-CSF 自己抗体であると唱えた。その後、患者由来の同抗体をサルに静脈注射すると発症することが確認され、仮説が実証された。残された課題は、GM-CSF 自己抗体が過剰に産生される機序の解明である。末梢血を用いた予備的検討から、患者も健常者も低親和性の IgM 型自己抗体を産生する B 細胞が同頻度にあるが、高親和性 IgG 型自己抗体を産生する B 細胞は患者にのみ増加していることを見いだした。患者のリンパ組織において 体細胞突然変異による高親和性/高中和能クローン出現と class switch が亢進していると予想している。このことを 次世代シークエンサーを用いた抗体可変部の大量クローンの一挙解読により証明し、同領域のレパトアと難治化との関連を明らかにする。

目的

肺胞蛋白症は、肺胞や終末気管支にサーファクタントの老廃物が貯留し、呼吸不全が進行する希少疾患である。長年原因が不明であったが、申請者は、肺胞蛋白症の患者の肺や血清中に抗 GM-CSF 自己抗体が高濃度に存在することを発見し(J. Exp. Med.1999)、血清診断法を開発した(Am. J. Respir. Med. Crit. Care Med.,2000, 特許 4372904号)。GM-CSF やその受容体欠損マウスが肺胞蛋白症を発症することや、同症の自己抗体の質的量的研究 (BLOOD,2004)から、自己抗体が肺の

GM-CSF 活性を中和し、肺胞マクロファージの分化を障害することが病因であり自己免疫性肺胞蛋白症と呼ぶことを提唱してきた(New Engl.J.Med. 2003)。最近、米国のグループがカナクイザルに患者自己抗体を投与し、発症させることに成功し、自己抗体説を裏付けた。残された最大の課題は、『何故、患者で GM-CSF 自己抗体の過剰産生が起こるのか?』であるが、これまでに申請者らは以下のことを明らかにした。

- ① 223 例の疫学研究から、家系内発症がなく、他の自己免疫疾患との合併や他の自己抗体の出現頻度が健常者とかわらない(Am. J. Respir. Med. Crit. Care Med., 2008)。
- ② 患者の抗 GM-CSF 自己抗体は、GM-CSF 分子上の様々なエピトープと強く結合することから、抗原は、GM-CSF そのものである(BLOOD, 2004)。

GM-CSF 自己抗体には、量的には少ないが、IgG 型以外に IgM 型抗体が、患者にも健常者にも存在し、結合親和性や中和能や特異性は IgG 型に比べて著しく低く、クラススイッチを経る前のプロトタイプ抗体が血中に出てきていると思われる(Am. J. Physiol., 2012)。

患者の抗 GM-CSF 自己抗体は GM-CSF 上の複数のエピトープを認識しているポリクローナル抗体であり、非常に avidity が強いことがわかっている(BLOOD, 2004)。

以上のことから、IgG 型自己抗体が本症の病因であり、その産生亢進の原因を突き止めることが本研究の狙いである。次世代シークエンサー

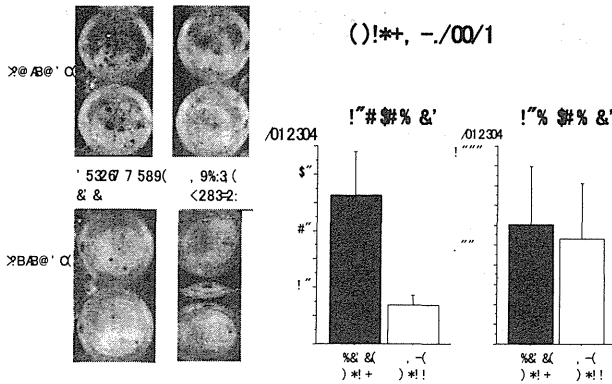


図1:患者と健常者の末梢血単核球中のB細胞-K-D自己抗体産生細胞の検出

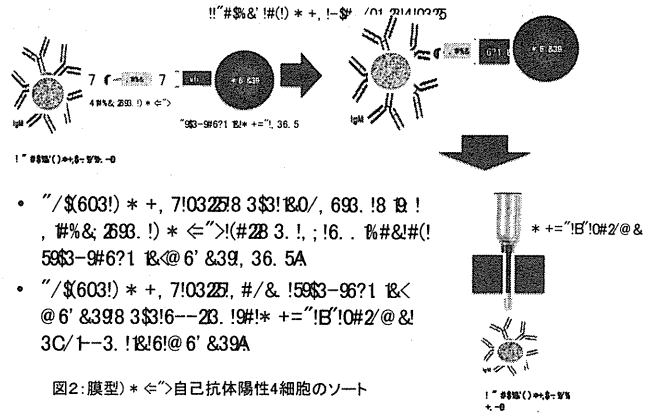


図2:膜型自己抗体陽性B細胞のソート

の活用によりGM-CSF自己抗体をB細胞受容体にもつ抗体H鎖、L鎖可変領域のmRNA遺伝子配列の解析から、利用レパトアのプロファイリングと体細胞突然変異の頻度を患者と健常者の間で比較し、結合親和性と中和能が高いIgG抗体が産生される機構を解明する。

対象と方法

新潟大学医学部遺伝子倫理委員会の承認を得て、健常者、自己免疫性肺胞蛋白症患者5人ずつより末梢血を採取し、抗体重鎖、軽鎖 mRNA配列の一次解読を行い、① CDR1/2 の配列から体細胞突然変異の頻度、② CDR3 の配列からパライトープの解析を行った。それによって、患者では体細胞突然変異が高頻度に起こり、また特定のクローンの増幅が起こることを証明したい。

結果

末梢血単核球より memory B 細胞を純化し、単球とともに EB virus で刺激し、IgM 型及び IgG 型抗 GM-CSF 自己抗体産生 memory B 細胞を ELISPOT 法により検出した。それによると、IgM 型クローンは、健常者と患者で同程度の頻度で存在するが、IgG 型クローンは、5 倍程度患者血に多く存在した (図1)。

つぎに、末梢血 PBMC より、図2のようにピオチン化 GM-CSF を用いて膜型 GM-CSF 自己

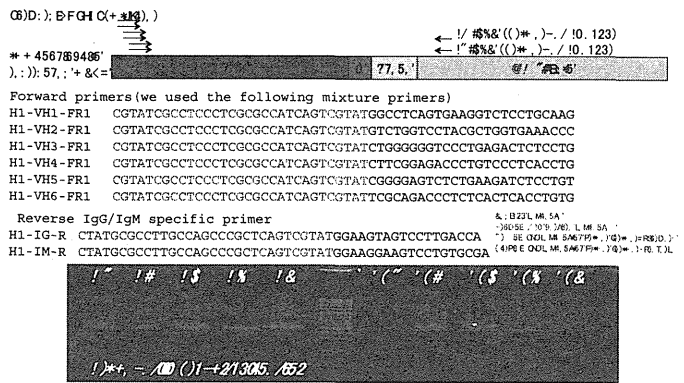


図3:F鎖可変部450bpの増幅

抗体陽性 B 細胞をソートし、RNA 抽出し、cDNA を作製した。

次に cDNA を template として、抗体重鎖可変部の PCR amplicon を被験者毎に得て、定量し、次世代シーケンシングにかけた (図3)。

その結果、患者5人から 54970 reads, 健常者5人から 68213 reads のシーケンシングが得られ、それをバイオインフォマティクスのソフト IMGT にかけてところ、次のような結果を得た。

	患者	健常者
IgG	6480 reads	3331 reads
IgM	40593 reads	19273 reads

つまり、遺伝子解析の結果は、IgM 型と IgG 型の割合は、患者、健常者ともに 6 : 1 であり、

頻度は変わらないことがわかった。

シーケンスを IgM 型と IgG 型の間、また、患者と健常者の間で比較したところ、

- ・患者、健常者ともに IgG 型と IgM 型のシーケンスには顕著な差がみられる。CDR 1, 2 の変異率は IgG が圧倒的に高い。
- ・患者、健常者ともにほぼ等しい割合で、IgG 型と IgM 型のシーケンスを持つ。
- ・IgG 型と IgM 型はことなる germline allele の組み合わせを使っていることがわかった。
- ・患者と健常者の間には、超可変部 CDR 1, 2, 3 の差がみられなかった。
- ・IgG 型自己抗体で、J 領域のアミノ酸数が患者の方が健常者よりも優位に多かった。
- ・これは、体細胞超変異のためではなく、選択される J 領域の germline allele の種類が異なるためであることがわかった。
などの所見がみられた。

考案

患者血清と健常者血清の間には、病因である IgG 型 GM-CSF 自己抗体濃度が 100 倍程度異なることが知られているが、cDNA レベルでは、IgM 型と IgG 型自己抗体の比率に差がなく、クラススイッチは、健常者でも起こっていることがわかった。今回の結果は、post germinal center での抗体産生の活性化が患者における自己抗体過剰産生の原因であるということを示唆している。

結論

末梢血の膜型 GM-CSF 自己抗体陽性細胞の IgM : IgG 比は、患者、健常者ともに 6 : 1 で変わらず、クラススイッチは両者で同等であることがわかった。

謝辞

今回の一連の研究において、大阪大学微生物

病研究所 安居輝人准教授に多大なご助言を頂きました。深謝いたします。

健康危険情報

特記すべきことはありません。

研究発表

論文

1. Nei T, Urano S, Motoi N, Takizawa J, Kaneko C, Kanazawa H, Tazawa R, Nakagaki K, Akagawa KS, Akasaka K, Ichiwata T, Azuma A, Nakata K. IgM-type GM-CSF Autoantibody is Etiologically a Bystander but Associated with IgG-type Autoantibody Production in Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Physiol.* 2012; 1:302(9)
2. Ohashi K, Sato A, Takada T, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Reduced GM-CSF autoantibody in improved lung of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Eur. Respir. J.* 2012; 39(3)
3. Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Nei T, Kasahara Y, Motoi N, Hojo M, Urano S, Ishii H, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Nasuhara Y, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Kanazawa H, Ebina M, Yamaguchi E, Kirchner J, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Direct evidence that GM-CSF inhalation improves lung clearance in pulmonary alveolar proteinosis. *Respir Med.*; 106(2):284-93, 2012
4. Satoh H, Tazawa R, Sakakibara T, Ohkouchi S, Ebina M, Miki M, Nakata K, Nukiwa T. Bilateral peripheral infiltrates

- refractory to immunosuppressants were diagnosed as autoimmune pulmonary alveolar proteinosis and improved by inhalation of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor. *Intern Med.* 2012;51(13):1737-42
5. Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, Satake M. Runx1 deficiency in CD4+ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells. *J Immunol.* 2012 Jun 1;188(11):5408-20
 6. Nagata M, Hoshina H, Li M, Arasawa M, Uematsu K, Ogawa S, Yamada K, Kawase T, Suzuki K, Ogose A, Fuse I, Okuda K, Uoshima K, Nakata K, Yoshie H, Takagi R. A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: coordinated activation of bone formation and resorption. *Bone.* 2012;50(5):1123-9
 7. Saraya T, Nakata K, Nakagaki K, Motoi N, Iihara K, Fujioka Y, Oka T, Kurai D, Wada H, Ishii H, Taguchi H, Kamiya S, Goto H. Identification of a mechanism for lung inflammation caused by *Mycoplasma pneumoniae* using a novel mouse model. *Results in Immunology* 1, 2011
 8. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Brantly ML, Stocks JM, Brown KK, Lynch JP 3rd, Goldberg HJ, Young LR, Kinder BW, Downey GP, Sullivan EJ, Colby TV, McKay RT, Cohen MM, Korbee L, Taveira-DaSilva AM, Lee HS, Krischer JP, Trapnell BC; National Institutes of Health Rare Lung Diseases Consortium; MILES Trial Group. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med.* 364:1596-1606, 2011
 9. Ishii H, Tazawa R, Kaneko C, Saraya T, Inoue Y, Hamano E, Kogure Y, Tomii K, Terada M, Takada T, Hojo M, Nishida A, Ichiwata T, Trapnell BC, Goto H, Nakata K. Clinical features of secondary pulmonary alveolar proteinosis: pre-mortem cases in Japan. *European Respir. J.* 37:465-468, 2011
 10. Miyabayashi T, Kagamu H, Koshio J, Ichikawa K, Baba J, Watanabe S, Tanaka H, Tanaka J, Yoshizawa H, Nakata K, Narita I. Vaccination with CD133+ melanoma induces specific Th17 and Th1 cell-mediated antitumor reactivity against parental tumor. *Cancer Immunol Immunother*, 60(11): 1597-1608, 2011
 11. Masuko H, Hizawa N, Chonan T, Nakata K, Hebisawa A. Indium-Tin Oxide Does Not Induce GM-CSF Autoantibodies. *Am J Respir Crit Care Med.* 184:741, 2011

12. Tanaka T, Motoi N, Tsuchihashi Y, Tazawa R, Kaneko C, Nei T, Yamamoto T, Hayashi T, Tagawa T, Nagayasu T, Kuribayashi F, Ariyoshi K, Nakata K, Morimoto K. Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB. *J. Med. Genetics*, 2010
13. 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*, 21:263-273, 2010
14. Sakagami T, Beck D, Uchida K, Suzuki T, Carey BC, Nakata K, Keller G, Wood RE, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Luisetti M, Davies S, Krischer JP, Brody A, Ryckman F, Trapnell BC. Patient-derived GM-CSF Autoantibodies Reproduce Pulmonary Alveolar Proteinosis in Non-human Primates. *Am J Respir Crit Care Med*. 182(1):49-61, 2010
15. Costabel U, Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis associated with dust inhalation: not secondary but autoimmune? *Am J Respir Crit Care Med*. 181(5):427-8, 2010
16. Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, Arai T, Takada T, Nasuhara Y, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ishii H, Yokoba M, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Tsuchihashi Y, Morimoto K, Akira M, Terada M, Otsuka J, Ebina M, Kaneko C, Nukiwa T, Krischer JP, Akazawa K, Nakata K. Inhaled Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor as Therapy of Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 181(12):1345-54, 2010
17. 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(1-2):141-8, 2010
- 著書
- 井上典子, 梶昌美, 小神晴美, 渡辺真理, 関根優, 白山早起, 藤本陽子, 瀧澤淳, 牧口智夫, 布施一郎, 中田光, 細胞プロセッシング室運営マニュアル, 青雲社, 2012, 18-31
 - 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
 - Trapnell BC, Nakata K, Kavuru M, Pulmonary Alveolar Proteinosis, Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine, 2010, 63, 1516-36
 - 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

5. 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 6, 肺胞蛋白症 (PAP) P.309-311. 株式会社 南江堂. 2010 年 10 月

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

自己免疫性肺胞蛋白症の GM-CSF 自己抗体はどこからきたか？ - 数学モデルによる解析

- 1) 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター
- 2) 獨協医科大学越谷病院呼吸器内科
- 3) 東京医大八王子医療センター呼吸器内科

中田 光¹、赤坂圭一²、伊藤祐子¹、浦野真也¹、根井貴仁¹、金子千夏¹、
元井奈都紀¹、橋本敦史¹、田澤立之¹、一和多俊男³

はじめに

中田らは、特発性肺胞蛋白症の肺と血液に GM-CSF 自己抗体が存在することを 1999 年に報告し、自己抗体による肺胞マクロファージの成熟障害が病因であると唱えた。その後、仮説を支持する報告が続き、「特発性」は「自己免疫性」と改められるに至った。病因・病態解明の研究に残された課題の一つとして、GM-CSF 自己抗体はどこから肺にくるのか？ということがある。サルに患者自己抗体を静脈投与して本症が惹起されたことから、自己抗体は肺局所で産生されるのではなく、「血液中から肺胞へと移行し、蓄積する」と考えている。本研究では、全肺洗浄時に排出される洗浄液中の自己抗体濃度の測定値から、血液中からサーファクタントへの自己抗体移行の数学モデルを勘案し、シミュレーションすることにより、自己抗体の肺胞蓄積の機構を解明する。

目的

肺胞蛋白症は、肺胞や終末気管支にサーファクタントの老廃物が貯留し、呼吸不全が進行する希少疾患である。長年原因が不明であったが、申請者は、肺胞蛋白症の患者の肺や血清中に抗 GM-CSF 自己抗体が高濃度に存在することを発見し(*J. Exp. Med.*1999)、血清診断法を開発した(*Am. J. Respir. Med. Crit. Care Med.*,2000, 特許 4372904 号)。GM-CSF やその受容体欠損マウスが肺胞蛋白症を発症すること

や、同症の自己抗体の質的量的研究(申請者ら、*BLOOD*,2004)から、自己抗体が肺の GM-CSF 活性を中和し、肺胞マクロファージの分化を障害することが病因であることを主張してきた(申請者ら、*New Engl.J.Med.* 2003)。残された最大の課題は、①何故、患者で GM-CSF 自己抗体の過剰産生が起こるのか？② 肺胞に存在する自己抗体は何処から来るか？-であるが、①は、24 年度本事業基盤研究 B に採択され、すでに研究を開始した。本研究の目的は、課題②を解明することである。これまでの研究により、以下のことがわかっている。

- 1) Cyclophosphamide+CD20 抗体で conditionig したカニクイザルに患者由来 GM-CSF 自己抗体を静脈投与すると肺胞蛋白症が惹起される(*AJRCCM*,2009, Sakagami,申請者、Trapnell ら)。
- 2) 同時に気管支肺胞洗浄液(BALF)と血清を採取した 27 例において、BALF 中と血清中の IgG 型 GM-CSF 自己抗体の全 IgG に占める割合は、強く相関する ($r=0.83$, $p<0.0001$)。このとき、前者の割合は、後者に比べて常に低い。
- 3) 2) の検体において、軽鎖 κ λ 比及び GM-CSF に対する結合力は、BALF と血清自己抗体の間で強く相関する (軽鎖比： $r=0.868$, $p<0.0001$, 結合力： $r=0.79$, $p<0.0001$)。

4) 血清中には IgM 型の GM-CSF 自己抗体が存在するが、BALF 中にはほとんどない。

以上から、「IgG 型の GM-CSF 自己抗体は血中から肺胞腔内に移行する」という仮説を立てた。本研究の目的は、この仮説を全肺洗浄の時に血中自己抗体が肺胞に移行する数学モデルを作成し、実測値で修正しつつ、証明するものである。

対象と方法

本研究は獨協医大越谷病院で治療目的で実施される自己免疫性肺胞蛋白症の全肺洗浄の洗浄排液と血液検体を用いる観察研究である。時刻、注入量、排液量などのデータを術中に正確に記録し、排液中及び血清中の自己抗体濃度は、新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センターで定量される。得られたデータは、Excel 上で予めプログラムされた数式に入力され、① 血中からの自己抗体の浸透がなかった場合の理論値 ② 血中から絶えず肺胞中への自己抗体の浸透がある場合の理論値を 5-10 例の患者で求め、それぞれの症例で、実測値とのずれを検討し、「自己免疫性肺胞蛋白症の肺胞自己抗体は血中から浸透する」という仮説を証明する。この浸透係数をもとめ、それが個体間でどの程度ばらつくかということを検討する。

結果

平成 10 年度中に獨協越谷病院との協議を終え、倫理承認を経て、平成 11 年より同院で実施される全肺洗浄の洗浄液中及び血清中自己抗体測定のパイロットスタディーを開始した。これまでに 3 例の自己免疫性肺胞蛋白症患者の検体を測定したが、一致した知見として ① 洗浄初期は、急速に自己抗体濃度が下がる (図 3 第 I 相) が、中期に対数的に減少する時期がある (図 3 第 II 相)。② 洗浄終期において、洗浄液中の自己抗体濃度はプラトーとなる (図 3 第 III 相)。

相)。③ 洗浄中の血清自己抗体濃度は一定である。がわかった。そこで第 II 相の貯留サーファクタント内自己抗体の移動速度を

$$\frac{dm_{s-l}}{dt} \text{ と}$$

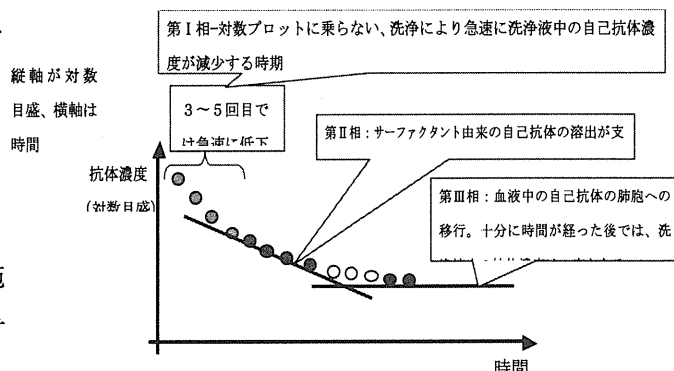


図 3：全肺洗浄中の洗浄排液中自己抗体濃度の経時的変化の模式図

表すと、 $\frac{dm_{s-l}}{dt} = A_s K_s (C_s(t) - C_l(t))$ となり、第

III 相の血中自己抗体の移動速度を $\frac{dm_{b-l}}{dt}$ と表すと、

$$\frac{dm_{b-l}}{dt} = A_b K_b (C_b - C_l(t)) \text{ となる。ここで、}$$

A: 片肺の肺胞表面積 Ks: サーファクタントから洗浄液への浸透係数、Kb: 血中から洗浄液への浸透係数 Cs(t), Cl(t), Cb(t): サーファクタント、洗浄液、血中の自己抗体濃度とした。

洗浄方程式の第 2 項について、実測値とのシミュレーションを試みた。第 II 相のほとんどは、血中から洗浄液への自己抗体の移行量を無視できるので、以下の式によって、洗浄液中への自

$$\frac{dm}{dt} = AK(C_s - C_l)$$

己抗体移行は表される。(m: 自己抗体量 A: 肺サーファクタント表面積、K: 浸透係数、Cs: サーファクタント中自己抗体濃度、Cl: 洗浄液中自己抗体濃度) この式を解くと、 $C_l(t) = B + D \exp(-Et)$

という式になるため、横軸に時間、縦軸に洗浄液中の自己抗体濃度の対数をとって、プロットすると直線となる。直線の傾き切片から B と D を求める。実際に実測値と理論値のずれを検討すると、図 4 のようになった (図中の Cs

cal が理論値、Cs obs が実測値)。

第Ⅲ相の式も基本的に第Ⅱ相と同様な解となるが、血中の自己抗体濃度が洗浄前後でほとんど変動しないことから、血中からの自己抗体の移動は一定で、 $C(t)=C_{\infty}$ となる。

考案

今後、5回の全肺洗浄時の肺洗浄液と血清のサンプリングを予定している。今回仮説として立てた第Ⅱ相、第Ⅲ相の方程式を実測値により修正し、各被験者で移行係数を決定する。被験者間での係数のばらつきを検討する。血中からの自己抗体の肺胞への移行があると仮定した場合とないと仮定した場合の理論値と実測値を比較して、血中から肺胞への自己抗体の移行を証明したい。

結論

全肺洗浄中の排液中の自己抗体濃度の推移から、IgG型のGM-CSF自己抗体は、血中から肺胞へと移行することが予想された。

謝辞

今回の一連の研究において、京都大学防災研究所 丸山敬先生に多大なご助言を頂きました。深謝いたします。

健康危険情報

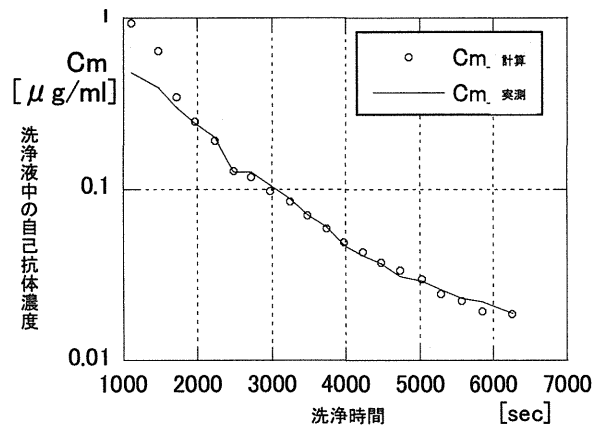
特記すべきことはありません。

研究発表

論文

1. Nei T, Urano S, Motoi N, Takizawa J, Kaneko C, Kanazawa H, Tazawa R, Nakagaki K, Akagawa KS, Akasaka K, Ichiwata T, Azuma A, Nakata K. IgM-type GM-CSF Autoantibody is Etiologically a

図4: 洗浄第Ⅱ相の理論値と実測値



Bystander but Associated with IgG-type Autoantibody Production in Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. Am. J. Physiol. 2012; 1:302(9)

2. Ohashi K, Sato A, Takada T, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Reduced GM-CSF autoantibody in improved lung of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. Eur. Respir.J. 2012; 39(3)
3. Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Nei T, Kasahara Y, Motoi N, Hojo M, Urano S, Ishii H, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Nasuhara Y, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Kanazawa H, Ebina M, Yamaguchi E, Kirchner J, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Direct evidence that GM-CSF inhalation improves lung clearance in pulmonary alveolar proteinosis. Respir Med.; 106(2):284-93,2012
4. Satoh H, Tazawa R, Sakakibara T, Ohkouchi S, Ebina M, Miki M, Nakata K, Nukiwa T. Bilateral peripheral infiltrates

- refractory to immunosuppressants were diagnosed as autoimmune pulmonary alveolar proteinosis and improved by inhalation of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor. *Intern Med.* 2012;51(13):1737-42
5. Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, Satake M. Runx1 deficiency in CD4+ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells. *J Immunol.* 2012 Jun 1;188(11):5408-20
 6. Nagata M, Hoshina H, Li M, Arasawa M, Uematsu K, Ogawa S, Yamada K, Kawase T, Suzuki K, Ogose A, Fuse I, Okuda K, Uoshima K, Nakata K, Yoshie H, Takagi R. A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: coordinated activation of bone formation and resorption. *Bone.* 2012;50(5):1123-9
 7. Saraya T, Nakata K, Nakagaki K, Motoi N, Iihara K, Fujioka Y, Oka T, Kurai D, Wada H, Ishii H, Taguchi H, Kamiya S, Goto H. Identification of a mechanism for lung inflammation caused by *Mycoplasma pneumoniae* using a novel mouse model. *Results in Immunology* 1, 2011
 8. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Brantly ML, Stocks JM, Brown KK, Lynch JP 3rd, Goldberg HJ, Young LR, Kinder BW, Downey GP, Sullivan EJ, Colby TV, McKay RT, Cohen MM, Korbee L, Taveira-DaSilva AM, Lee HS, Krischer JP, Trapnell BC; National Institutes of Health Rare Lung Diseases Consortium; MILES Trial Group. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med.* 364:1596-1606, 2011
 9. Ishii H, Tazawa R, Kaneko C, Saraya T, Inoue Y, Hamano E, Kogure Y, Tomii K, Terada M, Takada T, Hojo M, Nishida A, Ichihata T, Trapnell BC, Goto H, Nakata K. Clinical features of secondary pulmonary alveolar proteinosis: pre-mortem cases in Japan. *European Respir. J.* 37:465-468, 2011
 10. Miyabayashi T, Kagamu H, Koshio J, Ichikawa K, Baba J, Watanabe S, Tanaka H, Tanaka J, Yoshizawa H, Nakata K, Narita I. Vaccination with CD133+ melanoma induces specific Th17 and Th1 cell-mediated antitumor reactivity against parental tumor. *Cancer Immunol Immunother.* 60(11): 1597-1608, 2011
 11. Masuko H, Hizawa N, Chonan T, Nakata K, Hebisawa A. Indium-Tin Oxide Does Not Induce GM-CSF Autoantibodies. *Am J Respir Crit Care Med.* 184:741, 2011
 12. Tanaka T, Motoi N, Tsuchihashi Y,

- Tazawa R, Kaneko C, Nei T, Yamamoto T, Hayashi T, Tagawa T, Nagayasu T, Kuribayashi F, Ariyoshi K, Nakata K, Morimoto K. Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB. *J. Med. Genetics*, 2010
13. 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*, 21:263-273, 2010
14. Sakagami T, Beck D, Uchida K, Suzuki T, Carey BC, Nakata K, Keller G, Wood RE, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Luisetti M, Davies S, Krischer JP, Brody A, Ryckman F, Trapnell BC. Patient-derived GM-CSF Autoantibodies Reproduce Pulmonary Alveolar Proteinosis in Non-human Primates. *Am J Respir Crit Care Med*. 182(1):49-61, 2010
15. Costabel U, Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis associated with dust inhalation: not secondary but autoimmune? *Am J Respir Crit Care Med*. 181(5):427-8, 2010
16. Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, Arai T, Takada T, Nasuhara Y, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ishii H, Yokoba M, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Tsuchihashi Y, Morimoto K, Akira M, Terada M, Otsuka J, Ebina M, Kaneko C, Nukiwa T, Krischer JP, Akazawa K, Nakata K. Inhaled Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor as Therapy of Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 181(12):1345-54, 2010
17. 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(1-2):141-8, 2010
- 著書
- 井上典子, 梶昌美, 小神晴美, 渡辺真理, 関根優, 白山早起, 藤本陽子, 瀧澤淳, 牧口智夫, 布施一郎, 中田光, 細胞プロセッシング室運営マニュアル, 青雲社, 2012, 18-31
 - 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
 - Trapnell BC, Nakata K, Kavuru M, Pulmonary Alveolar Proteinosis, Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine, 2010, 63, 1516-36
 - 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
 - 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 6, 肺胞蛋白症 (PAP) P.309-311.
株式会社 南江堂. 2010 年 10 月

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

44 歳発症の遺伝性肺胞蛋白症の遺伝子解析

1) 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

2) 帯広厚生病院第一内科

伊藤祐子¹、橋本淳史¹、田澤立之¹、伊藤健一郎²、中田 光¹

はじめに

我々が経験した遺伝性肺胞蛋白症の遺伝子解析の途中経過に関する報告である。8年前に発症し、徐々に呼吸不全が進行し、現在は HOT が導入されている。患者は 50 歳で HRCT 上両側肺にびまん性のスリガラス陰影を呈し、下肺野に線維化と嚢胞形成が見られる。GM-CSF 自己抗体陰性であること、BAL 中、血清中の GM-CSF が異常高値であることから、GM-CSF 受容体異常を疑い、遺伝子解析に踏み切った。患者末梢血 PBMC は、GM-CSF 及び IL-3 の刺激下で STAT 5 のリン酸化が見られず、CD116(GM-CSF α 鎖)、CD123(IL-3 α 鎖)の発現がなかった。しかしながら、GM-CSF 受容体 β 鎖の cDNA, genomic DNA は正常に発現していた。そのため、GM-CSF 受容体 α 鎖、IL-3 受容体 α 鎖を中心に解析を進めたところ、同領域を含む X 染色体偽常染色体領域に 600 kb の広範な homozygous な遺伝子の欠損があることがわかった。

目的

肺胞蛋白症の血清診断の目的で新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センターに全国から寄せられた 600 検体ほどの血清のうち、自己抗体が陰性で、かつ血液疾患などの基礎疾患が明らかでない特発性肺胞蛋白症は、7 例ほどあったが、そのうち、BALF と血清の GM-CSF 濃度が著しく高い症例は、遺伝性肺胞蛋白症が疑われる。我々は、2011 年に GM-CSF 受容体 β 鎖の homozygous な欠損例を報告した (元井ら、J. Med. Genetics, 2011)。今回、GM-CSF 受容体

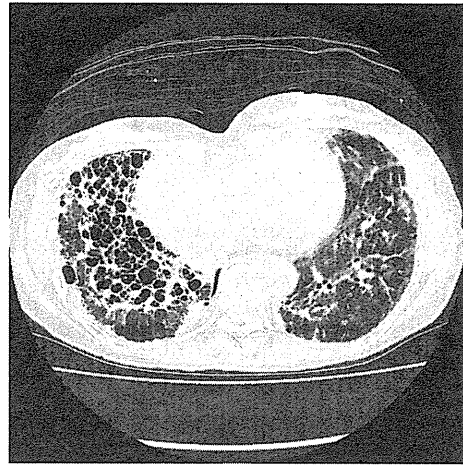


写真 1 2012 年 11 月の HRCT

α 鎖と IL-3 受容体 α 鎖の二重欠損例を見いだしたので報告する。

対象と方法

患者は 51 歳の女性で、両親は従兄弟婚であり、4 人の同胞がいるが、本人を含めて 3 人に短肢症がある。7 年前より徐々に労作時呼吸困難が進行し、2008 年に BALF、VATS で肺胞蛋白症と診断されている。HRCT で広範な蜂巣肺を呈し、高度な呼吸不全の進行のため、本年 1 月に在宅酸素が導入された (写真 1)。

倫理面の配慮

患者の個人情報秘匿しつつ検討を進めている。本研究を行うにあたり、新潟大学医学部遺伝子倫理委員会、帯広厚生病院倫理委員会の承認を得た。また、検体採取に際して、臨床遺伝専門医による遺伝カウンセリングを実施した。

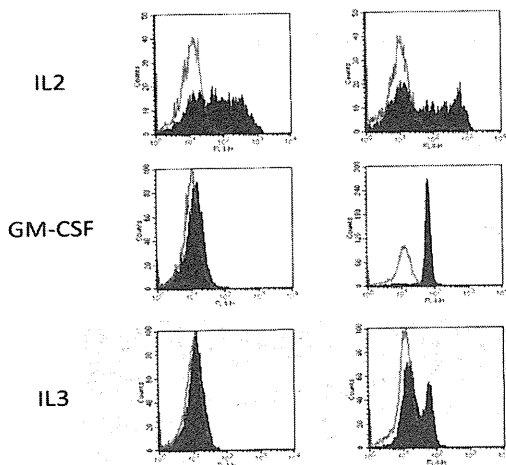


図1 患者(左)と健常者(右)のSTAT5リン酸化

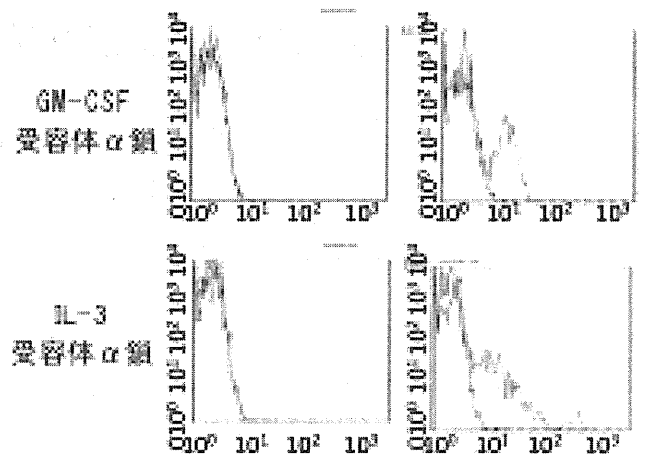


図2 患者(左)と健常者(右)のGM-CSF受容体α鎖およびIL-3受容体α鎖の発現

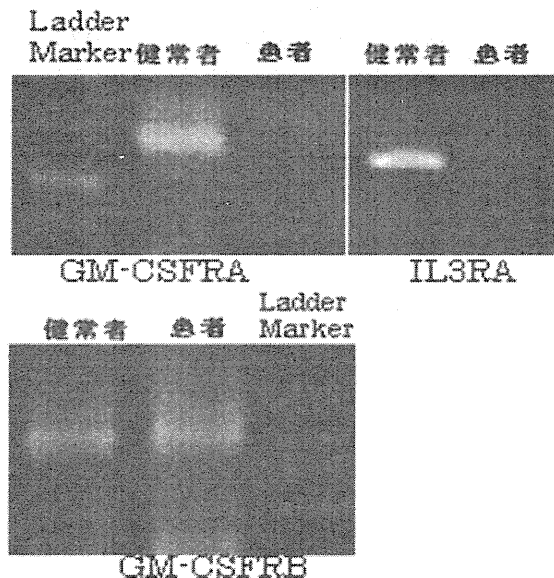


図3 totalRNAからのRT-PCR

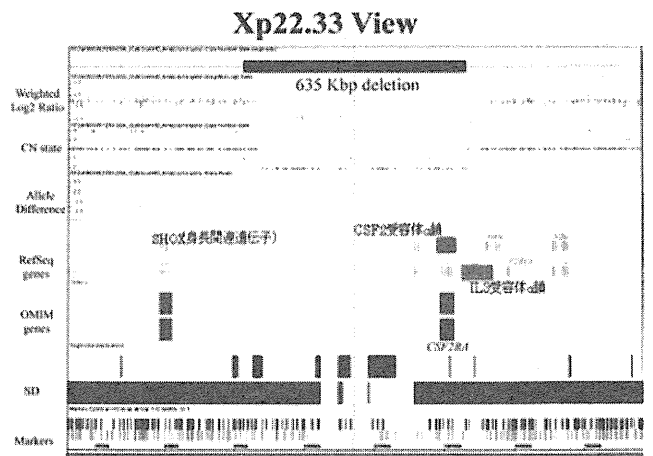


図4 SNPアレイ染色体検査結果

結果

患者末梢血をGM-CSFあるいはIL-3を添加したときのSTAT5リン酸化をフローサイトメトリーで検出したところ、図1のように、IL-2のシグナルは正常であるのに対し、GM-CSFシグナル、IL-3シグナルともに入らないことがわかった。

そこで、末梢血単核球におけるGM-CSF受容

体α鎖(CD116)、IL-3受容体α鎖(CD123)の発現をフローサイトメトリーで確認したところ、患者ではともに発現が見られず(図2)、また、RT-PCRではGM-CSF受容体β鎖の発現は見られたが、受容体α鎖の発現が見られなかったことから(図3)、GM-CSF受容体α鎖、IL-3受容体α鎖の同時欠損が疑われた。

患者のゲノムDNAをSNP array法により、

欠損遺伝子領域の検索を行ったところ、X 染色体偽常染色体領域に 635 b p にわたり、homozygous な欠損が認められた(図 4)。同部位は、GM-CSF 受容体 α 鎖の全てのエクソンと IL-3 受容体 α 鎖のエクソン 2 までを含んでいた。

考案

両親が近親婚であることから、劣性遺伝を考え、両親の遺伝子解析を行っている。短肢症が同胞 2 人に発現していることが、本症と一元的に説明がつかない点である。今後検討を重ねたい。

結論

X 染色体偽常染色体領域の GM-CSF 受容体 α 鎖、IL-3 受容体 α 鎖同時欠損の遺伝性肺胞蛋白症の一例を報告する。

謝辞

症例の解析に多大なご助言をいただいたシンナティ小児病院 鈴木拓児先生に感謝いたします。

健康危険情報

特記すべきことはありません。

研究発表

論文

1. Nei T, Urano S, Motoi N, Takizawa J, Kaneko C, Kanazawa H, Tazawa R, Nakagaki K, Akagawa KS, Akasaka K, Ichiwata T, Azuma A, Nakata K. IgM-type GM-CSF Autoantibody is Etiologically a Bystander but Associated with IgG-type Autoantibody Production in Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Physiol.* 2012; 1:302(9)

2. Ohashi K, Sato A, Takada T, Inoue Y,

Nakata K, Tazawa R. Reduced GM-CSF autoantibody in improved lung of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Eur. Respir. J.* 2012; 39(3)

3. Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Nei T, Kasahara Y, Motoi N, Hojo M, Urano S, Ishii H, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Nasuhara Y, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Kanazawa H, Ebina M, Yamaguchi E, Kirchner J, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Direct evidence that GM-CSF inhalation improves lung clearance in pulmonary alveolar proteinosis. *Respir Med.* 106(2):284-93, 2012

4. Satoh H, Tazawa R, Sakakibara T, Ohkouchi S, Ebina M, Miki M, Nakata K, Nukiwa T. Bilateral peripheral infiltrates refractory to immunosuppressants were diagnosed as autoimmune pulmonary alveolar proteinosis and improved by inhalation of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor. *Intern Med.* 2012;51(13):1737-42

5. Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, Satake M. Runx1 deficiency in CD4+ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells. *J Immunol.* 2012 Jun 1;188(11):5408-20

6. Nagata M, Hoshina H, Li M, Arasawa M,

- Uematsu K, Ogawa S, Yamada K, Kawase T, Suzuki K, Ogose A, Fuse I, Okuda K, Uoshima K, Nakata K, Yoshie H, Takagi R. A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: coordinated activation of bone formation and resorption. *Bone*. 2012;50(5):1123-9
7. Saraya T, Nakata K, Nakagaki K, Motoi N, Iihara K, Fujioka Y, Oka T, Kurai D, Wada H, Ishii H, Taguchi H, Kamiya S, Goto H. Identification of a mechanism for lung inflammation caused by *Mycoplasma pneumoniae* using a novel mouse model. *Results in Immunology* 1, 2011
 8. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Brantly ML, Stocks JM, Brown KK, Lynch JP 3rd, Goldberg HJ, Young LR, Kinder BW, Downey GP, Sullivan EJ, Colby TV, McKay RT, Cohen MM, Korbee L, Taveira-DaSilva AM, Lee HS, Krischer JP, Trapnell BC; National Institutes of Health Rare Lung Diseases Consortium; MILES Trial Group. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med*. 364:1596-1606, 2011
 9. Ishii H, Tazawa R, Kaneko C, Saraya T, Inoue Y, Hamano E, Kogure Y, Tomii K, Terada M, Takada T, Hojo M, Nishida A, Ichiwata T, Trapnell BC, Goto H, Nakata K. Clinical features of secondary pulmonary alveolar proteinosis: pre-mortem cases in Japan. *European Respir. J.* 37:465-468, 2011
 10. Miyabayashi T, Kagamu H, Koshio J, Ichikawa K, Baba J, Watanabe S, Tanaka H, Tanaka J, Yoshizawa H, Nakata K, Narita I. Vaccination with CD133+ melanoma induces specific Th17 and Th1 cell-mediated antitumor reactivity against parental tumor. *Cancer Immunol Immunother*, 60(11): 1597-1608, 2011
 11. Masuko H, Hizawa N, Chonan T, Nakata K, Hebisawa A. Indium-Tin Oxide Does Not Induce GM-CSF Autoantibodies. *Am J Respir Crit Care Med*. 184:741, 2011
 12. Tanaka T, Motoi N, Tsuchihashi Y, Tazawa R, Kaneko C, Nei T, Yamamoto T, Hayashi T, Tagawa T, Nagayasu T, Kuribayashi F, Ariyoshi K, Nakata K, Morimoto K. Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB. *J. Med. Genetics*, 2010
 13. 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*, 21:263-273, 2010
 14. Sakagami T, Beck D, Uchida K, Suzuki T, Carey BC, Nakata K, Keller G, Wood RE, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Luisetti M, Davies S, Krischer JP, Brody