

D. 考察

自己免疫性肺胞蛋白症のGM-CSF自己抗体の主成分は、IgG型GM-CSF自己抗体であることは、これまでの研究から明らかであるが、本研究から、分泌型IgA型自己抗体が存在することがわかった。その正確な定量や機能は、今後の研究を待たなければならないが、患者の血清中にこれだけ多くの分泌型IgA型自己抗体が存在する機序は興味ぶかい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tazawa R, Inoue, Y(19名略), Nakata, K
Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled GM-CSF therapy. *CHEST in press*.
2. Uchida K, Nakata K, Carey B, Chalk C, Suzuki T, Sakagami T, Koch DE, Stevens C, Inoue Y, Yamada Y, Trapnell BC. Standardized serum GM-CSF autoantibody testing for the routine clinical diagnosis of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *J Immunol Methods*. 2013 Nov 23. pii: S0022-1759(13)00327-X
3. Nei T, Urano S(10名略), Tazawa R, Nakata K. Light chain (κ/λ) ratio of GM-CSF autoantibodies is associated with disease severity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis *Clin Immunol*. 2013 Dec;149(3):357-64.
4. Young LR, Lee HS, (5名略), Koh Nakata, (14名略) McCormack FX. Serum VEGF-D concentration as a biomarker of lymphangiomyomatosis severity and treatment response:a prospective analysis of the Multicenter International Lymphangiomyomatosis Efficacy of Sirolimus (MILES) trial. *Lancet Respir Med*. 2013 Aug;1(6):445-452.
5. Handa T, (3名略), Nakata K, Ishii H. Clinical features of three cases with pulmonary alveolar proteinosis secondary to myelodysplastic syndrome developed during the course of Behçet's disease *Respiratory Investigation*. 2014 ;52(1):75-9.
6. Kurai D, Nakagaki K, (3名略) Nakata K, Takizawa H, Goto H. Mycoplasma pneumoniae extract induces an IL-17-associated inflammatory reaction in murine lung: implication for mycoplasmal pneumonia. *Inflammation*. 2013, 36(2):285-93. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2013. 33(3):281-7.
7. Satoh H, Tazawa R (4名略), 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.
8. Wong WF, Kofu K,(10人略), 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. 188(11):5408-20.

9. Nagata M(12 人略), 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. 査読有
10. Nei T,(5 人略), Tazawa R,(3 人略), 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 Lung Cell Mol Physiol.* 2012 May 1;302(9):L959-64.
11. Ohashi K, (3人略),Nakata K, Tazawa R. Reduced GM-CSF autoantibody in improved lung of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Eur. Respir.J.* 2012; 39(3)

2. 学会発表

1. 中田 光、稀少肺難病の克服に向けて、第53回日本呼吸器学会総会特別講演、2013年5月19日、東京国際フォーラム

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
記載すべきことなし
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

次世代シーケンサーを用いた GM-CSF 自己抗体可変部 CDR2、CDR3 領域の解析

新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

田中崇裕、橋本淳史、伊藤裕子、田澤立之、中田 光

A. 研究の目的と必要性

肺胞蛋白症 (PAP) は、肺胞や終末気管支にサーファクタント脂質及び蛋白が貯留し、呼吸不全が進行する希少疾患である。研究協力者は、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り自己免疫性肺胞蛋白症と呼ぶことを提唱してきた (申請者ら、*New Engl.J.Med.* 2003)。最近、米国のグループがカニ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。自己免疫性 PAP では、GM-CSF に対する中和自己抗体が存在し、肺胞マクロファージ、好中球の機能障害が病態に関与する。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が見出された。そこで、GM-CSF 自己抗体が過剰に産生される機序の解明を目的として患者 5 名、健常者 5 名の末梢血 B 細胞を用いた次世代シーケンズ解析を行った。

B. 計画と方法

(1) データの収集

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 mRNA 配列の一挙解読を行った。

PAP 患者、健常者の IgG 型、IgM 型それぞれにおける Allele Usage と体細胞突然変異の頻度、CDR1/2 の配列から体細胞突然変異の頻度と樹形図解析を行った。

(2) データの解析

全てのデータの解析は JMP 10.0.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina)、R version 2.15.2 (2012-10-26)並びに Microsoft Excel (Microsoft Co., Redmond, WA) によって作成した。得られたデータは、Excel ファイルに集計され、データの特徴を定義したのち、JMP ファイルもしくは CSV ファイルに変換した。

取得した次世代シーケンス結果の raw data について cdhit-v4.2-2010-09-16 を用いて、98% 相同でクラスター化ファイルを作成した。続いて得られた遺伝子配列データを IMGT/V-QUEST (the international ImMunoGeneTics information system®) により解析した。また CDR1/2 の樹形図については Clustal W2 の Kimura Method を用いて作成した。

C. 研究結果

(1) read 数、クラスター数

PAP 患者 5 例、健常者 5 例の B 細胞を選択的

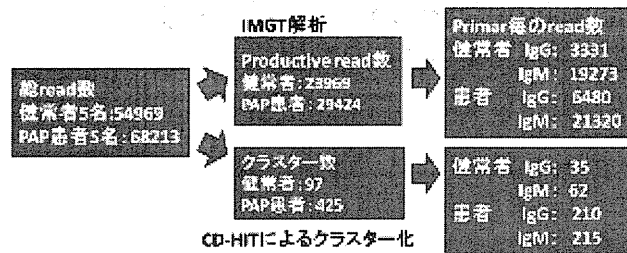


図1 解析の流れの中でのread数、
クラスター数の推移

に取得し、次世代シーケンスによる解析を行ったところ、総リード数 123182 reads (健康者 54969 reads、PAP 患者 68213 reads) であった。IMGT による配列の解析を行ったところ、Productive なリード数は 53393 reads (健康者 23969 reads, PAP 患者 29424 reads) であり、IgG 型 GM-CSF のリード数は 9811 reads (健康者 3334 reads, PAP 患者 6480 reads) で、IgM 型 GM-CSF のリード数は 40593 reads (健康者 19273 reads, PAP 患者 21320 reads) であった。CD-HIT によるクラスター化を行ったところ、525 クラスターに分類された (健康者 97 クラスター, PAP 患者 425 クラスター)。その内訳は IgG 型 GM-CSF のクラスター数は 245 クラスター (健康者 35 クラスター, PAP 患者 210 クラスター)、IgM 型 GM-CSF のクラスター数は 277 クラスター (健康者 62 クラスター, PAP 患者 215 クラスター) であった (図 1)。

(2) V-Region の VH1-VH7 の Allele Usage

V-Region について使用されている Allele について健康者と PAP 患者について平均値の比較を行った。その結果 IgG、IgM について、VH1 と VH3、VH4 の比率が高く、VH6 についてはほとんど使われていなかった。また健康者と PAP 患者の比較では VH1 で PAP 患者の方が使用率が高く、反対に、VH3、VH4 では PAP 患

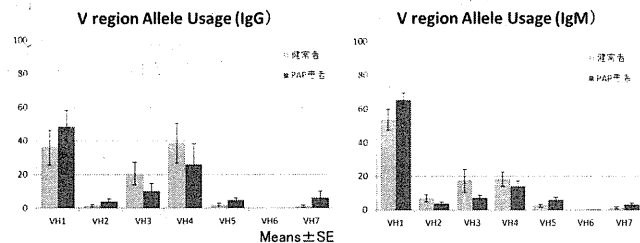


図2 V-RegionのVH1-VH7のAllele Usage

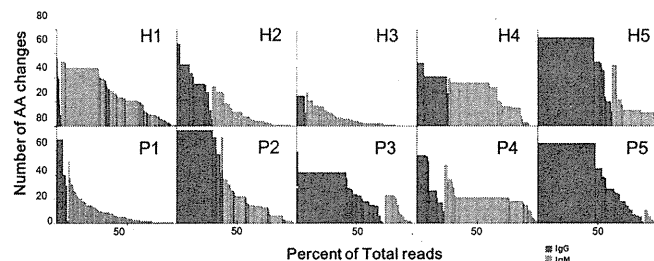


図3 Cluster 頻度と V-Region のアミノ酸変異数

者の使用率が低い傾向が見られた (図 2)。

(3) Cluster 頻度と V-Region のアミノ酸変異数
クラスター毎の頻度と V-Region のアミノ酸変異数を図 3 に示した。健康群においては IgG、IgM ともに変異数が少ないことが確認された。一方、PAP 患者群においては特に IgG 型の頻度の高いクラスターにおいて変異数の多い群が含まれる傾向が見られた。

(4) クラスター毎の IgG/IgM の read 数と V-Region の変異率

IgG 型と IgM 型それぞれのリード数と V-Region の変異率の関係を図 4 に示した。IgG 型のクラスターに含まれるリード数は 15487 reads (健康者 5501 reads, PAP 患者 9986 reads) であり、V-Region の変異率は 7.9% (健康者 7.9%, PAP 患者 7.9%) であった。また IgM 型のクラスターに含まれるリード数は 61178 reads (健康者 29512 reads, PAP 患者

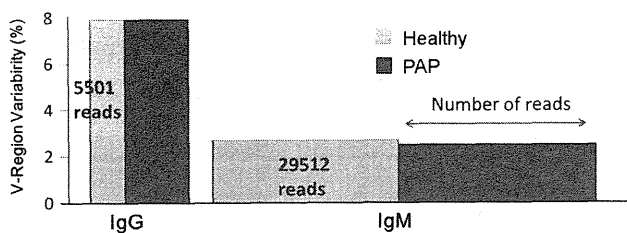


図4 クラスター毎のIgG/IgMのread数とV-Regionの変異率

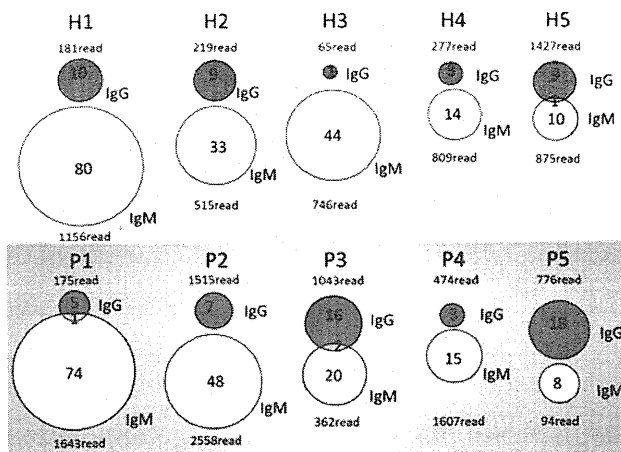


図5 被験者毎のAllele Usage の重なり

31666 reads)であり、V-Regionの変異率は2.6% (健常者 2.7%, PAP患者 2.5%)であった。

(5) 被験者毎の Allele Usage の重なり

被験者毎のクラスター数と Allele の組合せを図5に示した。その結果、健常者のH5で1クラスター、PAP患者ではP1で1クラスター、P3で2クラスターでIgG型、IgM型に共通のAlleleの組合せが見られた。

(6) 樹形図解析

CDR-1、CDR2領域についてIMGT/V-QUESTにより解析した配列情報についてClustal W2のKimura Methodで樹形図を作成した。CDR-1について健常者では発散して上手くクラスターを形成していない部分もあるが、全体として疾患群でクラスターを形成する傾向が見られた(図6)。またCDR-2については重症疾患群で顕著なクラスターを形成し、軽症患者については健常者と同じクラスターに属する例も見られた(図7)。

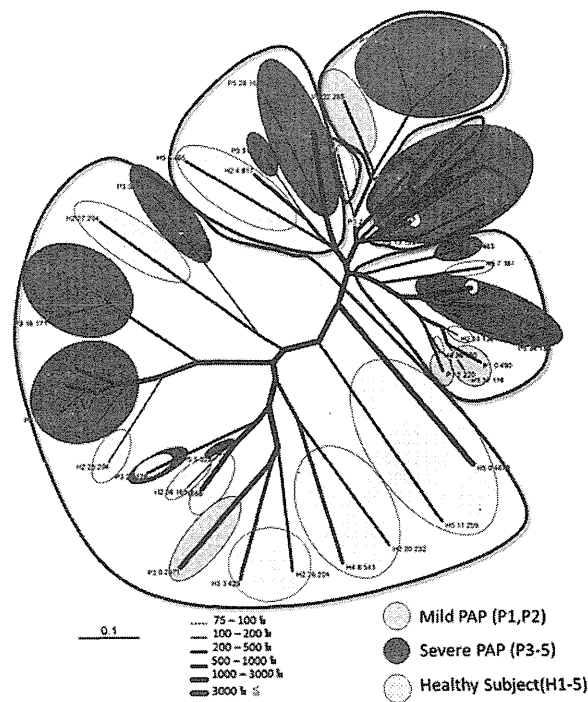


図6 CDR-1領域の樹形図解析

D. 考察

PAP患者においてB細胞の変異率が高いことが確認されている。より変異がたくさん起きているにもかかわらずクラスターが収束していることから特定のクローンの集団が選択され、体細胞変異が起こっていると推定した。

樹形図解析の結果、軽症PAP患者の頻度の高いクラスターは健常群の頻度の高いクラスターと同じ幹を形成していることから軽症PAP患者が重症化するにあたって、クローンの選択が進んで行くのではないかと考えられた。

Naive B細胞のうちGM-CSF反応性のクローンは一つは濾胞に入り、GM-CSFとGM-CSF

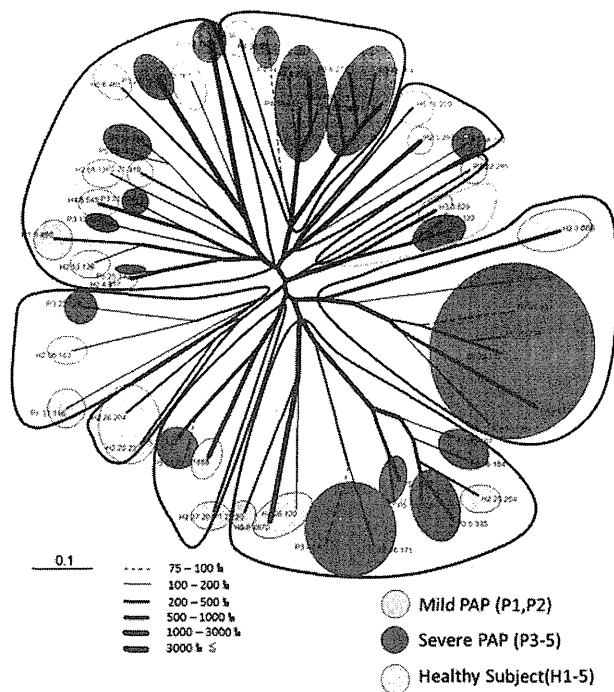


図7 CDR-2領域の樹形図解析

反応性 T 細胞の働きで、体細胞変異とクラススイッチを起こし、IgG 型 GM-CSF 自己抗体産生 B 細胞あるいは形質細胞に分化する。もう一つは、perifollicular region で GM-CSF 反応性 T 細胞の働きにより体細胞変異を起こし、IgM 型 GM-CSF 自己抗体産生 B 細胞と形質細胞となると考えられた (図 8)。

E. まとめ

1. PAP 患者 5 例、健常者 5 例の B 細胞を選択的に取得し、次世代シーケンスによる解析を行った。総リード数 123182 reads (健常者 54969 reads、PAP 患者 68213 reads) であった。CD-HIT によるクラスター化を行ったところ、525 クラスターに分類された (健常者 97 クラスター、PAP 患者 425 クラスター)。

2. V-Region の VH1-VH7 の Allele Usage については VH1 と VH3、VH4 の比率が高く、VH6 についてはほとんど使われていなかった。また健常者と PAP 患者の比較では VH1 で PAP 患者

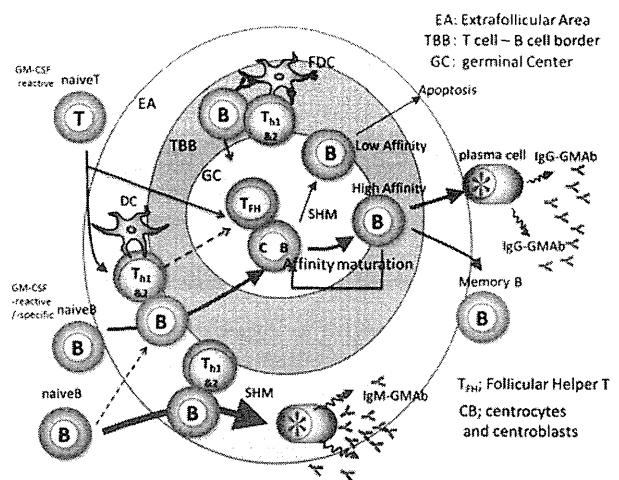


図8 GM-CSF自己抗体の産生機構

健常者と PAP 患者の比較では VH1 で PAP 患者の方が使用率が高く、反対に、VH3、VH4 では PAP 患者の使用率が低い傾向が見られた。また健常群においては IgG、IgM ともに変異数が少なく、PAP 患者群では IgG 型の頻度の高いクラスターにおいて変異数が多かった。

3. 被験者毎のクラスター数と Allele の組合せを図 5 に示した。その結果、健常者の H5 で 1 クラスター、PAP 患者では P1 で 1 クラスター、P3 で 2 クラスターで IgG 型、IgM 型に共通の Allele の組合せが見られた。

4. CDR-1、CDR2 領域について IMGT/V-QUEST により解析した配列情報について ClustalW2 の Kimura Method で樹形図を作成した。CDR-1 について健常者では発散して上手くクラスターを形成していない部分もあるが、全体として疾患群でクラスターを形成する傾向が見られた (図)。また CDR-2 については重症疾患群で顕著なクラスターを形成し、軽症患者については健常者と同じクラスターに属する例も見られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tazawa R, Inoue, Y(19名略), Nakata, K
Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled GM-CSF therapy. *CHEST in press*.
2. Uchida K, Nakata K, Carey B, Chalk C, Suzuki T, Sakagami T, Koch DE, Stevens C, Inoue Y, Yamada Y, Trapnell BC. Standardized serum GM-CSF autoantibody testing for the routine clinical diagnosis of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *J Immunol Methods*. 2013 Nov 23. pii: S0022-1759(13)00327-X
3. Nei T, Urano S(10名略), Tazawa R, Nakata K. Light chain (κ/λ) ratio of GM-CSF autoantibodies is associated with disease severity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis *Clin Immunol*. 2013 Dec;149(3):357-64.
4. Young LR, Lee HS, (5名略), Koh Nakata, (14名略) McCormack FX. Serum VEGF-D concentration as a biomarker of lymphangiomyomatosis severity and treatment response:a prospective analysis of the Multicenter International Lymphangiomyomatosis Efficacy of Sirolimus (MILES) trial. *Lancet Respir Med*. 2013 Aug;1(6):445-452.
5. Handa T, (3名略), Nakata K, Ishii H. Clinical features of three cases with pulmonary alveolar proteinosis secondary to myelodysplastic syndrome developed during the course of Behçet's disease *Respiratory Investigation*. 2014 ;52(1): 75-9.
6. Kurai D, Nakagaki K, (3名略) Nakata K, Takizawa H, Goto H. Mycoplasma pneumoniae extract induces an IL-17-associated inflammatory reaction in murine lung: implication for mycoplasmal pneumonia. *Inflammation*. 2013, 36(2): 285-93. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2013. 33(3):281-7.
7. Satoh H, Tazawa R (4名略), 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.
8. Wong WF, Kofu K,(10人略), 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. 188(11):5408-20.
9. Nagata M(12 人略), 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. 査読有

10. Nei T,(5 人略), Tazawa R,(3 人略),
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 Lung Cell
Mol Physiol.* 2012 May 1;302(9):L959-64.

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

2. 学会発表

1. 中田 光、稀少肺難病の克服に向けて、第5
3回日本呼吸器学会総会特別講演、2013年5
月19日、東京国際フォーラム

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

記載すべきことなし

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

肺洗浄時の肺胞洗浄液中物質移行を予測する数理モデルに関する研究

- 1) 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター
 - 2) 東京医科大学八王子医療センター呼吸器内科
 - 3) 東北大学病院呼吸器内科
 - 4) 愛知医科大学呼吸器・アレルギー内科
 - 5) 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
- 赤坂圭一¹、田中崇裕¹、一和多俊男²、橋本淳史¹、伊藤祐子¹、大河内真也³、田澤立之¹、山口悦郎⁴、井上義一⁵、中田 光¹

はじめに

血中物質の肺毛細血管から肺胞腔に移行する機構および速度は明らかでない。血液と肺胞の間を移動する物質の代表は、酸素と二酸化炭素であるが、実は血中のほとんどの物質が肺胞へと移動する。自己免疫性肺胞蛋白症 (aPAP) 患者由来の GM-CSF 自己抗体をカニクイザルに静脈投与したところ PAP が惹起され、BALF からもヒト型の GM-CSF 自己抗体が検出された。このことより、低分子の化合物のみならず高分子の蛋白質も移行すると考えられる。今回我々は、物質の移行に関する数学モデルを作成し、実測値と比較することでこれを検証した。

対象と方法

全肺洗浄術は生理食塩水を肺内に注入して排液することを繰り返す手技であるが、これを 1) 注入期、2) 滞留期、3) 排液期、4) 残留期の 4 期に分け正確な時間を記録。注入量と排液量も記録。各回に回収された洗浄液中の GM-CSF 自己抗体、IgG、トランスフェリン、アルブミン、 $\beta 2$ ミクログロブリン、ガストリン、尿素窒素濃度、SP-D、を測定した。

それぞれの物質は aPAP 2 例～5 例で全肺洗浄時の洗浄排液で測定を行い、時間経過と各回の洗浄排液中の濃度の関係を確認した。

数理モデルは、肺毛細血管と肺胞腔の物質移

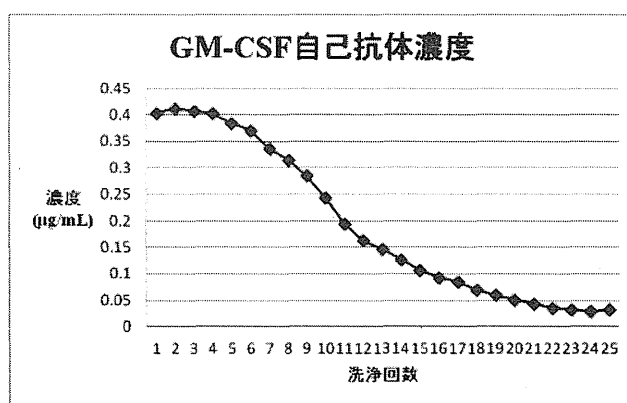


図 1 全肺洗浄術における各回での肺洗浄液中の GM-CSF 自己抗体濃度

動速度は浸透圧の原理に基づきそれぞれに存在する物質の濃度差に比例するものとして、この移動について時間を関数とする微分方程式を勘案、係数を変動させてシミュレーションし、実測値に合致するときのサーファクタントから洗浄液および血中から洗浄液への移行係数を求めた。

結果

図 1 は重症度分類 5 の aPAP での左全肺洗浄各回における GM-CSF 自己抗体濃の実測値である。肺洗浄は初回 900ml の生理食塩水を左肺へ注入して滞留期は 2 分として 400ml を排液。その後は滞留期 2 分で 500-800ml/回を注入して 400-800ml/回排液として計 25 回の洗浄

を行った。このとき、洗浄 4 回目までは抗体濃度の低下が緩やかだが、11 回目までは急激でかつ直線的の濃度低下を来す。その後は緩やかな低下を示し、20 回を過ぎるとほぼ一定値となる。これを Y 軸を対数表示、X 軸を時間表示として、以下のようなグラフのモデル化を考えた。

洗浄初期から中期にかけて自己抗体濃度は急速に低下するが、中期に対数的に減少する時期が必ず存在する（第 I 相）。後期においては低値で一定となる傾向にあるが、決して検出限界以下には至らない（第 II 相）（図 2）。

この、第 I 相の変化を肺胞に貯留したサーファクタント中の自己抗体が生理食塩水中に溶出してくる時期と考え、第 II 相の変化は血中から肺胞へ IgG が浸透する時期と考え、物質が膜を通過する速度は、膜の内側と外側の物質の濃度差に比例するという原理に基づいて数学モデルを作成した。この考えから 2 つの浸透圧式の線形結合による微分方程式が成立する。m：自己抗体質量(μg)、t：時間(秒)、As：肺サーファクタント表面積(cm²)、Ks：サーファクタントから洗浄液への浸透係数(cm/秒)、Cs：サーファクタント中自己抗体濃度(μg/mL)、Cl：洗浄液中自己抗体濃度(μg/mL)、Ab：肺血管床(cm²)、Kb：サーファクタントから洗浄液への浸透係数(cm/秒)、Cb：血中物質濃度(μg/mL) として、IgG の肺胞洗浄液への移行は微分方程式を用い、

$\frac{dm}{dt} = AsKs(Cs - Cl) + AbKb(Cb - Cl)$ の式で表わされる。

計算は注入期、滞留期、排液期、残留期の 4 期に分割して、Microsoft Excel 2010 VBA を用い、肺内の洗浄液量および物質濃度は術中に増減を繰り返すものとして、各ステージにおける微分方程式を計算単位時間ごとにステップワイズ法を用い逐次計算し、計算値と実測値が一致する調整係数の Ks および Kb を決定した。

図 3 は、前記数式での理論値と全肺洗浄で得られた肺胞洗浄液での実測値のグラフである。

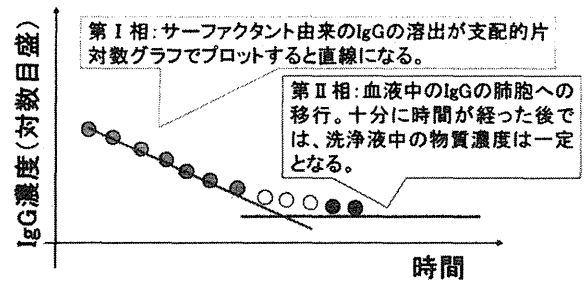


図 2 洗浄排液中の GM-CSF 自己抗体濃度 (IgG 濃度) の経時変化

Ks を 1.5 ± 0.1 と固定して Kb を物質ごとに変動させたところ、理論値と実測値は極めて近似している。

同様に 5 例のシミュレーションを行い、ほぼ同様な傾向を示すことを確認した。

これらより小さな物質であるガストリンと尿素窒素においては数理モデルに従わなかった。また、SP-D も従わないことを確認した。

考察

今回の検討により、分子量 10kDa 以上の IgG、トランスフェリン、アルブミン、β2 ミクログロブリンにおける移行係数は被験者および物質に依らず Ks が 1.5×10^{-7} cm/s と一定、Kb は被験者に依らず物質に固有の値を取ることが分かった。

これらより小さな物質であるガストリンと尿素窒素においては数理モデルに従わない。これは、分子量が小さなものは毛細血管からサーファクタントへの移行が容易であるためと思われる。SP-D は分子量 43kDa と十分な大きさであるが数理モデルに従わない。これは、肺胞上皮より肺胞腔への分泌があるためと思われる。

結論

分子量 10kDa 以上の物質の肺毛細血管から肺洗浄液への移行は、比較的簡単な微分方程式

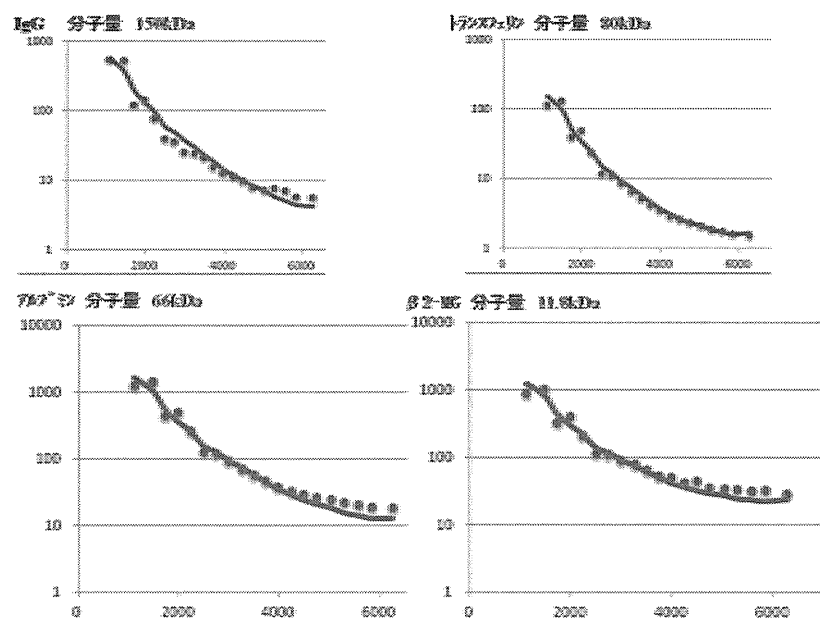


図3 全肺洗浄術における各回での肺洗浄液中の物質濃度(点)と微分方程式より求めた理論値(実線)

で表わした浸透圧の原理に基づく数学モデルに従うと思われる。今回の検討において、数理モデルに従わない物質は、分子量の小さな物質と肺で産生される物質であった。数理モデルに従う物質において、物質の種類、個体、および洗浄方法に依らず、サーファクタントから洗浄液への移行係数(Rks)は一定で、血中からの係数(Rkb)は、物質固有の数値を持つことが分かった。

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。深謝致します。

参考文献

1. T Sakagami, K Uchida, T Suzuki et al:
Human GM-CSF Autoantibodies and
Reproduction of Pulmonary Alveolar
Proteinosis. N Engl J Med :361: 2679-81
2009

シアリル化糖鎖修飾がサイトカインの生物活性に及ぼす影響について

新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

橋本淳史、田中崇裕、伊藤祐子、田澤立之、中田 光

はじめに

自己免疫性肺胞蛋白症に対するGM-CSF吸入療法は、同疾患に対する非侵襲的治療として、全肺洗浄法に代わりうる新治療として期待されている。世界で入手しうるGM-CSFは、*E.coli*由来組み替えGM-CSFとYeast由来組み替えGM-CSFであるが、どちらも我が国では未承認薬であり、吸入療法剤として使用するには、前臨床試験と治験を経なければならない。日本ケミカルリサーチ社は、同症の吸入療法剤としてCHO細胞由来GM-CSFを開発し、前臨床試験用に田澤らに提供している。本研究は、CHO細胞を含む哺乳動物のサイトカインに特徴的なシアリル酸付加の意義を*E.coli*およびyeast由来GM-CSFと比較検討して明らかにすることで、よりヒトに近く効率的な吸入薬の作製が期待される。

対象と方法

CHO細胞由来GM-CSFは、研究用試薬として日本ケミカルリサーチ社が試作したものを用いた。コントロールとしてAmoytop社の大腸菌由来ヒト組み替えGM-CSF(Molgramostigm)、Genzyme社の酵母由来ヒト組み替えGM-CSF(Salgramostigm)を用いた。GM-CSFの生物活性を調べるために、GM-CSF依存株TF-1細胞または健常者末梢血単核球を用いてshort term stimulation(30分刺激)ではSTAT5リン酸化、intermediate term stimulation(24時間刺激)ではMIP-1 α 産生、long term stimulation(72,168時間刺激)ではMTT assayを行った。また、同細胞の細胞死をAnexinV蛍光抗体及びDNAラダーを用いて検出した。その

後、TF-1細胞におけるGM-CSFクリアランスを測定した。

目的

哺乳動物のサイトカインにはシアリル化糖鎖が付加されているものが多く、*E.coli*由来に比べて、*in vivo*で半減期が長くなることが知られている。しかしながら、*in vitro*におけるシアリル化糖鎖の生物学的意義は不明である。我々は、哺乳動物細胞由来のGM-CSFは*E.coli*あるいはyeast由来のGM-CSFに比べて、低濃度において細胞の増殖や生存をより強く促進することを見出した。これは、シアリル酸付加による、細胞への結合と細胞内へのinternalization、つづく分解が遅れ、結果としてGM-CSFの効果が長時間持続するためであると考え、検証を進めている。

結果

*E.coli*由来GM-CSFは分子量14.5kDaの単一ピークで、yeast由来GM-CSFは14.2-17.0kDaで平均分子量は14.6kDa、CHO由来GM-CSFは16-30kDaで平均分子量は18.9kDaであった(図1)。

図1 GM-CSF質量分析

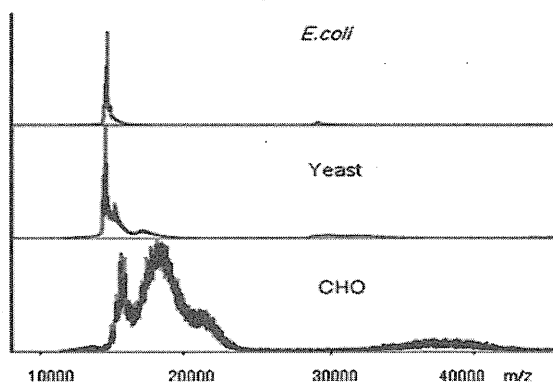


図2 STAT5リン酸化測定

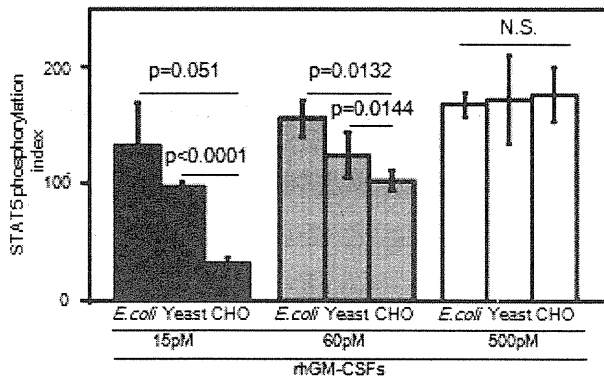


図3 MIP-1 α の産生増強測定

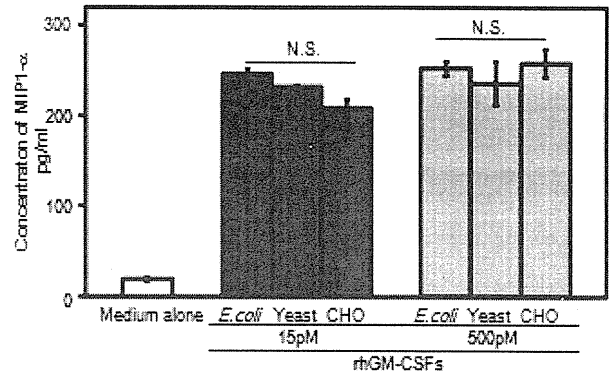


図4 TF-1細胞によるMTT assay

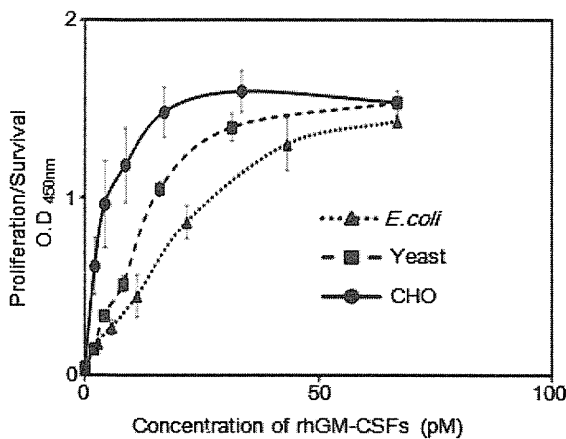


図5-1 脱シアルル化による質量分析の変化

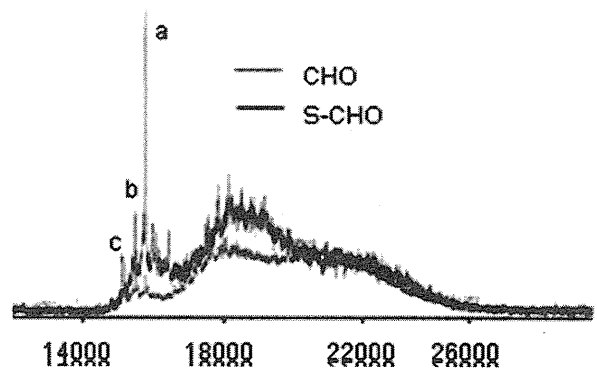
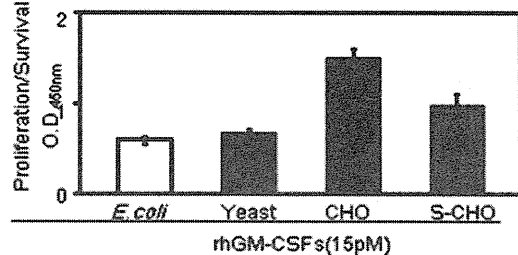


図5-2 脱シアルル化による細胞増殖/活性の変化



Short term stimulation では、濃度 15、60、500pM の範囲で健常者で好中球/単球の STAT5 リン酸化を測定した。15pM および 60pM の範囲では CHO 由来 GM-CSF は *E.coli* 由来及び yeast 由来 GM-CSF に比べて活性が低かったが、500pM では差は見られなかった(図2)。

Intermediate term stimulation として、15pM および 500pM の濃度において好中球 MIP1- α 産生増強を測定したところ、CHO 由来、*E.coli* 由来、yeast 由来 GM-CSF 間での差は見られなかった (図3)。

Long term stimulaation として TF-1 細胞を GM-CSF 存在下で 72 時間培養した後に、細胞増殖/生存活性を測定したところ CHO 由来

GM-CSF は低濃度において *E.coli* 由来、yeast 由来 GM-CSF に比べてその活性が高かった (図4)。

次に CHO 由来 GM-CSF に対して脱シアルル化処理(S-CHO 由来 GM-CSF)(図5-1)を行い、脱シアルル化 CHO 由来 GM-CSF を含めた4つの GM-CSF を使い MTT assay にて評価したと

図6-1 アポトーシス細胞の測定 (フローサイトメトリ)

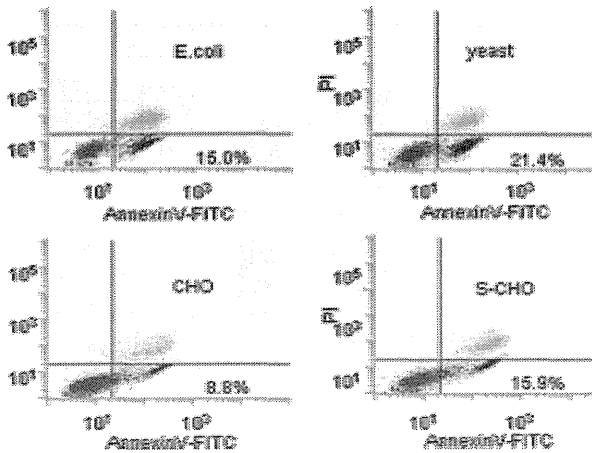
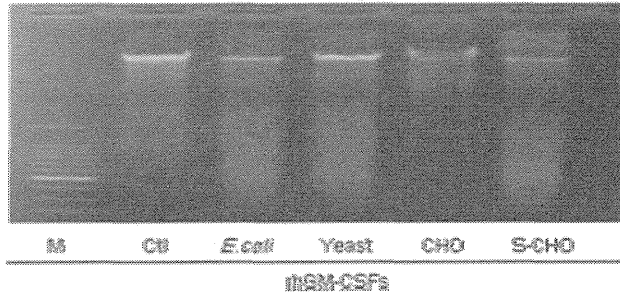


図6-2 アポトーシス細胞の測定 (DNA ladder)



ころ、CHO 由来 GM-CSF は脱シアル化することでその活性が減少することがわかった (図5-2)。

各種 rhGM-CSF を添加して 72 時間後のアポトーシス細胞の割合を測定したところ、*E.coli* 由来、yeast 由来 GM-CSF に比べて CHO 由来 GM-CSF ではよりアポトーシスの抑制が見られた。しかしながら脱シアル化を行うとその効果はなくなった (図6-1)。この結果は DNA Ladder によって確認された (図6-2)。

PBMCs に対して、各種 rhGM-CSF を添加して 5、10、24、48 時間後の上清を採取し、その上清中に残存する rhGM-CSF を測定したところ、crhGM-CSF は erhGM-CSF、yrhGM-CSF、s-crhGM-CSF に比べて、24、48 時間の残存率

図7-1 PBMCsにおけるクリアランス測定

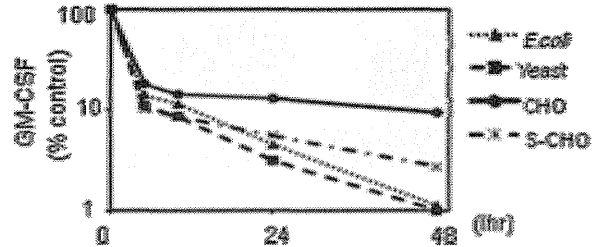
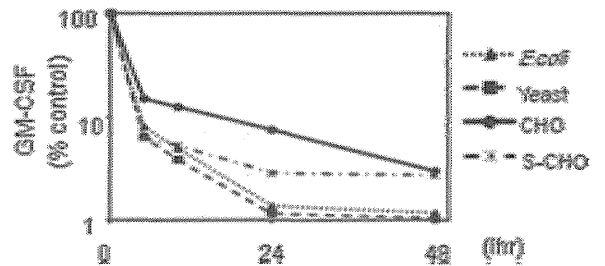


図7-2 TF-1におけるクリアランス測定



が高かった (図7-1)。同様の方法で TF-1 細胞における rhGM-CSF 残存率を測定したところ、crhGM-CSF は他の 3 つの rhGM-CSF に比べて 24、48 時間の残存率は高かった (図7-2)。

考察

E.coli 由来および yeast 由来 GM-CSF と異なり哺乳動物細胞である CHO 由来 GM-CSF はシアル酸修飾を受けており、脱シアル化することで、その生物活性が減少することから、哺乳動物に特徴的なシアル酸修飾は生物活性に重要であると示唆される。

結論

In vitro において CHO 細胞由来 GM-CSF は、

シアル酸修飾により GM-CSF の細胞への internalization を遅らせることで、効果を延長し、細胞の増殖/生存活性を維持している。

謝辞

CHO 細胞由来 GM-CSF のご提供と情報の提供をしてくださった日本ケミカルリサーチ(株)研究本部 研究所 浅野正寛様、立花克彦様、西野勝哉様に感謝いたします。

参考文献

1. Tomohiro Handaa, Takeshi Nakatsueb, Motoo Babac, Toshinori Takadad, Koh Nakata, Haruyuki Ishii. Clinical features of three cases with pulmonary alveolar proteinosis secondary to myelodysplastic syndrome developed during the course of Behçet's disease in press,2013.
2. Tazawa R, Inoue, Y(19 名略), Nakata, K Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled GM-CSF therapy CHEST in press,2013.
3. Nei T, Urano S(10 名略), Tazawa R, Nakata K, Light chain (κ/λ) ratio of GM-CSF autoantibodies is associated with disease severity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis Clin Immunol. in press.
4. Okuda K, Kawase T, Nagata M, Yamamiya K, Nakata K, Wolff LF, Yoshie H. Tissue-engineered cultured periosteum sheet application to treat infrabony defects: case series and 5-year results. Int J Periodontics Restorative Dent. 2013 May-Jun;33 (3) :281-7.
5. Kurai D, Nakagaki K, Wada H, Saraya T, Kamiya S, Fujioka Y, Nakata K, Takizawa H, Goto H. Mycoplasma pneumoniae extract induces an IL-17-associated inflammatory reaction in murine lung: implication for Mycoplasmal pneumonia.Inflammation. 2013, 36(2), 285-93.
6. Young LR, Lee HS, (5 名略), Koh Nakata, (14 名略) McCormack FX. Serum VEGF-D concentration as a biomarker of lymphangioliomyomatosis severity and treatment response:a prospective analysis of the Multicenter International, Lymphangioliomyomatosis Efficacy of Sirolimus (MILES) trial, 2013, 1 (6) , 445-452.
7. 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.
8. 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
9. 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
10. 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 Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(9)
11. 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;39:777-780
12. 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*. 2011; 184:741
13. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Blantly ML et al. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med*. 2011;364(17):1595-606
14. Ishii H, Tazawa R(10 人略),Nakata K. Clinical features of secondary pulmonary alveolar proteinosis: pre-mortem cases in Japan. *European Respir. J.* 2011;37,465 -468
15. 中田 光, LAM 勉強会講演集 2012 年 10 月 7 日 於順天堂大学 有山記念講堂
16. 中田 光 リンパ脈管筋腫症 (LAM) の最前線—LAM の病因 日本胸部臨床 2011, 70, 1001-1006

遺伝性出血性末梢血管拡張症（オスラー病）における肺動静脈奇形に関する研究

1) 秋田大学大学院医学系研究科保健学専攻理学療法学講座

2) 秋田大学大学院医学系研究科循環器・呼吸器内科科学講座

塩谷隆信¹、佐竹將宏¹、佐藤一洋²、佐野正明²、三浦 肇²、
守田 亮²、浅野真理子²、奥田祐道²、小坂俊光²、渡邊博之²、伊藤 宏²

はじめに

遺伝性出血性末梢血管拡張症（hereditary hemorrhagic telangiectasia: HHT、オスラー病）は、多臓器疾患であるために臨床症状が極めて多岐にわたり、患者は内科のみならず、外科、耳鼻咽喉科、皮膚科、歯科など極めて多くの科を初診する。さらに、合併する脳動静脈奇形あるいは、肺動静脈奇形の破裂により時に致命的となることも稀ではない。本研究は、日本におけるオスラー病の発生頻度や罹病率について遺伝疫学的に検討を行ない、本疾患による致命的合併症の予防、治療のための診療ガイドライン作成、日本においてオスラー病に関する診療ネットワークの構築をめざすものである。さらに、オスラー病に関する全国診療ネットワークの構築と運用により、これらの患者の QOL と ADL 向上を計るものである。

本研究の目的は、日本における肺動静脈奇形（pulmonary arteriovenous malformation: PAVM）の診断と治療成績に関して検討を行なうことである。

対象と方法

2001 年から 2011 年までの秋田大学医学部呼吸器内科におけるオスラー病合併 PAVM にする塞栓術治療を行った 10 症例に関して臨床的な検討を行なった。

結果

毛細血管末梢血管拡張などの合併部位は、鼻

出血、舌、口唇などに多く、ほとんどの症例で複数部位の異常を認めた。合併症は小球性低色素性貧血、膿瘍が多かった。PAVM は 10 例中 8 例が多発例であり、平均 3.5 箇所あった。下葉に多発する傾向にあったが、治療の適否による PAVM の分布に違いはなかった。PAVM は 10 治療中 6 治療で残存するも、全例で息切れや PaO₂、AaDO₂ シャント率が改善し、良好な治療効果が得られた。残存した PAVM が増大しなければ、自覚症状や合併症は出現しなかった。塞栓をした血管の再開通は 1 例のみであった。PAVM において、当院で採用した適応基準により行ったコイル塞栓術は低酸素血症や息切れの改善において有効であると考えられた。呼吸困難感、息切れは 6 例で自覚していたが、その全例で改善または消失した。塞栓術後の長期予後は良好であるが、1 例でコイル塞栓後の血管の再開通を認めた。

次に、PAVM 塞栓術によりすべての PAVM が塞栓された完全塞栓群 4 例と一部閉塞できなかった不完全塞栓群 6 例に分けて諸指標を検討した。その結果、完全塞栓群において、不完全塞栓群に比較して、塞栓術後 PaO₂、AaDO₂、右左シャントが有意に改善した（図 1）。さらに、両群において無症状生存率に関して Kaplan-Meier 法で検討したところ、完全閉塞群において生存曲線が有意に延長していた（図 2）。

考察

PAVM においては、重篤な合併症が高頻度に

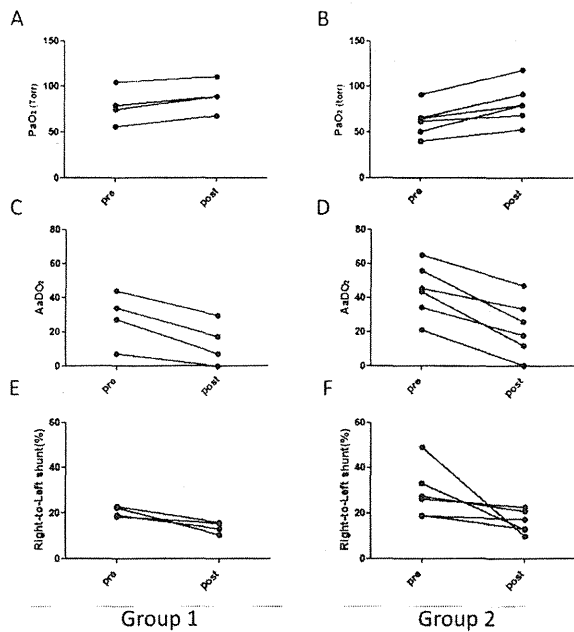


図1

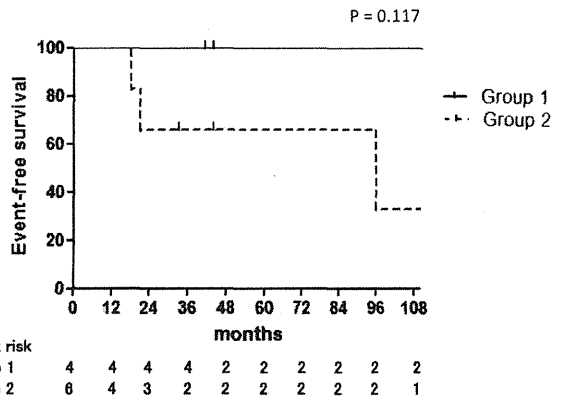


図2

みられることより、自覚症状がなくてもこのような合併症の予防のため治療適応となる。低酸素血症に関しては、単一病変の場合は一般的に2 cm を超えると出現する。さらに、異常血管の直径が2~3 cm 以上の症例や、流入動脈径が3 mm 以上の症例では、TIA や脳梗塞、脳膿瘍を生じる危険性が増大する。そのため、このような血管径を呈する PAVM に対し早期に治療が望まれる。White らは、PAVM の流入血管径が3 mm 以上の患者の30~40%に中枢神経系の合併がみられることから、流入血管径3 mm 以上がカテーテル塞栓術の適応であると報告している。

無症状時の治療適応に関しては、PAVM のサイズを用いるものと、流入血管径を用いるものの報告があるが、著者らの検討では PAVM サイズと流入血管は強い相関をもっており、これまで報告された PAVM 2cm と流入動脈径3 mm とはほぼ同義であり、どちらを用いてもよいと考えられる。25%前後の PAVM 症例中、25%の症例では経年的に大きさが増大する

とされており、年間0.3~2.0 mm 増大するため、増大時には早めの治療が考慮されるべきである。

今回の我々の症例のように、オスラー病における PAVM では多発例が多いことが最大の特徴である。実際我々の症例において PAVM の数は1症例あたり、平均3.5であった。PAVM の経カテーテル塞栓術の基本は、可視可能な PAVM をすべて塞栓することである。しかしながら、流入血管が小さい、末梢に存在するなどの条件により、1回の経カテーテル塞栓術により必ずしもすべての血管が塞栓できるわけではない。実際に我々の症例においても60%の症例で未塞栓の PAVM が残存していた。今回の我々の検討では、不完全閉塞 PAVM 症例では、PaO₂、AaDO₂、右左シャントの改善率が低く、長期予後が悪いという成績であった。可能であれば、繰り返し塞栓術を行なうことにより、できるだけ PAVM を塞栓することが大切であると考えられた。オスラー病においては、塞栓を行なった PAVM の再灌流の発生、塞栓術後の血流分布の

変化による新たな PAVM の出現がみられることから、塞栓術後の慎重な経過観察が重要であることが示唆された。

結論

PAVM では、重篤な合併症が高頻度に見られることより、自覚症状がなくても合併症の予防のため治療適応となる。さらに、異常血管の直径が 2~3 cm 以上の症例や、流入動脈径が 3 mm 以上の症例では、TIA や脳梗塞、脳膿瘍を生じる危険性が增大することから、経カテーテル塞栓術の適応と考えられる。

オスラー病に合併する PAVM は多発例あるいはびまん性例が多いことから、経カテーテル塞栓術後に未閉塞 PAVM の残存あるいは PAVM の再開通が起こりうる。このように、不完全閉塞群では合併症の出現が多いことから慎重な経過観察が必要である。

参考文献

1. 塩谷隆信, 佐竹將宏, 守田亮, 三浦肇, 小高英達, 佐藤一洋, 佐野正明, 橋本学, 伊藤宏. 家族性肺動静脈奇形を合併した遺伝性出血性末梢血管拡張症 (オスラー病). 日本内科学会雑誌 99(10): 141-144, 2010.
2. Nakayama, M, Nawa, T, Chonan, T, Endo, K, Morioka, S, Bando, M, Wada, Y, Shioya, T, Sugiyama, Y, Fukai, S. Prevalence of pulmonary arteriovenous malformations as estimated by low-dose thoracic CT screening. *Internal Medicine* 51:1677-1681, 2012.
3. Sato, K, Watanabe, H, Sano, M, Shioya, T, Ito, H. Caput Medusae in the Mediastinum. *Am J Respir Crit Med* 186(8): 803, 2012.
4. Sato, K, Shioya, T, Asano, M, Okuda, Y, Miura, H, Sano, M, Iino, K, Kosaka, T, Watanabe, H, Hashimoto, M, Ito, H. Embolization of pulmonary arteriovenous malformations: outcomes and long-term follow-up in 10 patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Akita J Med* 40: 13-21. 2013.
5. 塩谷隆信. 肺動静脈瘻 (肺動静脈奇形). 貫和敏博, 杉山幸比古, 門田淳一編集. 呼吸器疾患. 最新の治療. 2013-2015. pp440-444, 南江堂, 東京, 2013.
6. 塩谷隆信. 肺動静脈瘻 (肺動静脈奇形). 北村諭, 巽浩一郎, 石井芳樹編集. 医学のあゆみ呼吸器疾患-states of arts- ver.6. 医歯薬出版社, 東京, pp304-307, 2013.
7. 塩谷隆信. 遺伝性出血性末梢血管拡張症 (オスラー病). 朝倉英策編集. 血栓止血学. 中外医学社, 東京, pp152-pp160, 2013.
8. 佐野正明, 塩谷隆信, 伊藤 宏. 遺伝性出血性末梢血管拡張症 循環器内科. 74(1): 98-106, 2013.
9. Terata Y, Shioya T, Watanabe H, et al. Multiple pulmonary arteriovenous malformations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 1999; 37(11): 915-21.
10. Maruyama J, Watanabe M, Onodera S, et al. A case of Rendu-Osler-Weber disease with cerebral hemangioma, multiple pulmonary arteriovenous fistulas and hepatic arteriovenous fistula. *Jpn J Med*. 1989; 28(5): 651-6.
11. Boshier LH Jr, Blake DA, Byrd BR. An analysis of the pathologic anatomy of pulmonary arteriovenous aneurysms with particular reference to the applicability of local excision. *Surgery*. 1959; 45(1): 91-104.

12. White RI Jr, Lynch-Nyhan A, Terry P, et al. Pulmonary arteriovenous malformations: techniques and long-term outcome of embolotherapy. *Radiology*. 1998; 169(3): 663-9.
13. Moore BP. Automation in the blood transfusion laboratory: I. Antibody detection and quantitation in the technicon autoanalyzer. *Can Med Assoc J*. 1969; 100(8): 381-7.
14. White RI Jr, Mitchell SE, Barth KH, et al. Angioarchitecture of pulmonary arteriovenous malformations: an important consideration before embolotherapy. *AJR Am J Roentgenol*. 1983; 140(4): 681-6.
15. Remy J, Remy-Jardin M, Giraud F, et al. Angioarchitecture of pulmonary arteriovenous malformations: clinical utility of three-dimensional helical CT. *Radiology*. 1994; 191(3): 657-64.
16. Remy J, Remy-Jardin M, Wattinne L, et al. Pulmonary arteriovenous malformations: evaluation with CT of the chest before and after treatment. *Radiology*. 1992; 182(3): 809-16.
17. Vrachliotis TG, Bis KG, Kirsch MJ, et al. Contrast-enhanced MRA in pre-embolization assessment of a pulmonary arteriovenous malformation. *J Magn Reson Imaging*. 1997; 7(2): 434-6.
18. Saluja S, Henderson KJ, White RI Jr. Embolotherapy in the bronchial and pulmonary circulations. *Radiol Clin North Am*. 2000; 38(2): 425-48, ix.
19. Faughnan ME, Lui YW, Wirth JA, et al. Diffuse pulmonary arteriovenous malformations: characteristics and prognosis. *Chest*. 2000; 117(1): 31-8.
20. White RI Jr, Pollak JS, Wirth JA. Pulmonary arteriovenous malformations: diagnosis and transcatheter embolotherapy. *J Vasc Interv Radiol*. 1996; 7(6): 787-804.
21. Barzilai B, Waggoner AD, Spessert C, et al. Two dimensional contrast echocardiography in the detection and follow-up of congenital pulmonary arteriovenous malformations. *Am J Cardiol*. 1991; 68(15): 1507-10.
22. Nanthakumar K, Graham AT, Robinson TI, et al. Contrast echocardiography for detection of pulmonary arteriovenous malformations. *Am Heart J*. 2001; 141(2): 243-6.
23. White RI, Kaufman SL, Barth KH, et al. Embolotherapy with detachable silicone balloons: techniques and clinical results. *Radiology*. 1979; 131: 619-27.
24. White RI, Lynch-Nyhan A, Terry P, et al. Pulmonary arteriovenous malformations: techniques and long-term outcome of embolotherapy. *Radiology*. 1988; 169: 663-9.
25. Remy J, Remy-Jardin M, Wattinne L, et al. Pulmonary arteriovenous malformations: evaluation with CT of the chest before and after treatment. *Radiology*. 1992; 182: 809-16.
26. White RI, Pollak JS. Pulmonary arteriovenous malformations: diagnosis with three-dimensional helical CT: a breakthrough without contrast media. *Radiology*. 1994; 191: 613-4.