

201442077A

厚生労働科学研究委託事業
難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業)

『肺胞蛋白症、遺伝性間質性肺疾患に関する研究：
重症難治化要因とその克服』

平成 26 年度 委託業務成果報告書

研究代表者 井 上 義 一

平成 27 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業））による委託業務として、国立病院機構近畿中央胸部疾患センターが実施した平成26年度『肺胞蛋白症、遺伝性間質性肺疾患に関する研究：重症難治化要因とその克服』の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託事業
難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業)

『肺胞蛋白症、遺伝性間質性肺疾患に関する研究：
重症難治化要因とその克服』

平成 26 年度 委託業務成果報告書

研究代表者 井 上 義 一

平成 27 年 3 月

平成 26 年度 厚生労働科学研究委託事業
難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業)

『肺胞蛋白症、遺伝性間質性肺疾患に関する研究：
重症難治化要因とその克服』

目 次

研究班組織 (平成 26 年度)	1
I. 総括研究報告書	井上 義一 2
II. 分担/協力研究報告書	
1. 自己免疫性肺胞蛋白症の病態解明	中田 光 他 20
2. APAP-GWAS 試料収集状況と中間報告	山口 悦郎 24
3. 不十分な全肺洗浄後に陰影が著明に改善した自己免疫性肺胞蛋白症の 1 例	山口 悦郎 26
4. SP-C 遺伝子変異間質性肺炎の分子標的治療	瀬戸口靖弘 28
5. 遺伝性間質性肺疾患の指定難病へ向けての新規枠組みの提案	瀬戸口靖弘 30
6. 肺胞蛋白症に対する全身麻酔下全肺洗浄方法の コンセンサスの確立と問題点に関する研究	一和多俊男 32
7. 難治性肺胞蛋白症に対する肺移植および骨髄移植の有効性の検討	海老名雅仁 39
8. 遺伝性間質性肺疾患の診断に関する研究	長 和俊 他 42
9. GM-CSF 吸入製剤開発に向けた基盤整備 ー非臨床試験・治験プロトコル・参加者リクルート方法の検討ー	田澤 立之 他 46
10. 続発性肺胞蛋白症の肺胞マクロファージの形態学的特徴に関する研究	石井 晴之 他 53
11. 肺胞蛋白症(PAP)の予後因子に関する研究： 第 2 回大阪呼吸器疾患シンポジウムでの検討成績から	北市 正則 他 56
12. 肺胞蛋白症の治療効果判定のための 新しい HRCT 画像解析法に関する研究	審良 正則 60
13. 肺アスペルギルス症が自己免疫性肺胞蛋白症の 病態に関与した可能性が考えられた一例	新井 徹 他 64
14. 全肺洗浄時の生理学的変化の検討 ー安全な肺洗浄を目指してー	内田 寛治 他 68

15. 抗 GM-CSF/HLA class II 抗体に関する研究	木田 博	72
16. 家族性間質性肺炎と診断した若年姉弟 3 名の 5 年間の経過.....	森本浩之輔 他	75
17. 左全肺洗浄後に右肺陰影の改善を認めた自己免疫性肺胞蛋白症の一例...	高田 俊範 他	79
18. 全肺洗浄数式モデルの検証及び自己抗体におけるモデル適応の検討.....	田中 崇裕 他	81
19. ステロイドは自己免疫性肺胞蛋白症を悪化させるのか?	赤坂 圭一 他	86
Ⅲ. 学会等発表実績		88

**『肺胞蛋白症、遺伝性間質性肺疾患に関する研究：重症難治化要因とその克服』班
(平成 26 年度)**

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	井上義一	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	臨床研究センター長
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	教授・センター長
	山口悦郎	愛知医科大学医学部内科学講座、 呼吸器・アレルギー内科	教授
	瀬戸口靖弘	東京医科大学、呼吸器内科学分野	教授
	一和多俊男	東京医科大学八王子医療センター、呼吸器内科	教授
	海老名雅仁	東北薬科大学病院	教授 呼吸器センター長 難治性呼吸器疾患研究部長
	長 和俊	北海道大学病院周産母子センター	診療教授
	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	准教授
	石井晴之	杏林大学医学部附属病院、呼吸器内科学	講師
	北市正則	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター、 臨床検査科	部長、臨床研究センター室長
	審良正則	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター、放射線科	部長、臨床研究センター室長
	新井 徹	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	部長
	内田寛治	東京大学医学部附属病院、麻酔科・痛みセンター	講師
	木田 博	大阪大学大学院医学系研究科呼吸器・免疫アレルギー 内科学講座・呼吸器内科学	助教
研究協力者	本間 栄	東邦大学医学部内科学講座呼吸器内科学分野	教授
	巽浩一郎	千葉大学医学部、呼吸器内科	教授
	吾妻安良太	日本医科大学内科学講座、呼吸器・感染・腫瘍部門	教授
	萩原弘一	埼玉医科大学、呼吸器内科	教授
	富井啓介	神戸市立医療センター中央市民病院、呼吸器内科	部長
	南須原康行	北海道大学病院、医療安全管理部	准教授
	森本浩之輔	長崎大学病院、感染症内科（熱研内科）	准教授
	高田俊範	新潟大学医歯学総合病院魚沼地域医療教育センター	特任教授
	中山秀章	東京医科大学病院、呼吸器内科	准教授
	大河内眞也	東北大学大学院医学系研究科産業医学分野	講師
	田中崇裕	新潟大学医歯学総合病院、生命科学医療センター	特任助教

総括研究報告書

平成 26 年度厚生労働科学研究委託（難治性疾患等実用化研究事業）
総括研究報告書

『肺胞蛋白症、遺伝性間質性肺疾患に関する研究：重症難治化要因とその克服』班
（課題番号 H26－委託（難）－一般－077）

研究代表者 井上義一

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター長

研究要旨

肺胞蛋白症 (PAP)

- (1) 自己免疫性 PAP の重症難治化例の全国調査
- (2) 自己免疫性 PAP の重症難治化例の臨床病理学的検討
- (3) 自己免疫性 PAP に対する GM-CSF 吸入療法実用化に向けた準備。治験実施に向けた基盤整備
- (4) 全肺洗浄法の標準化と検証、麻酔科と呼吸器内科合同ワークショップを開催
- (5) 続発性 PAP の疫学調査、自己免疫性 PAP との比較。血液内科と合同症例検討会の開催
- (6) 自己免疫性 PAP の網羅的遺伝子解析を目的に、GWAS を進めるため検体収集
- (7) 自己免疫性 PAP の病態解析
- (8) 抗 GM-CSF 自己抗体以外の自己抗体開発
- (9) ステロイドの自己免疫性 PAP 病状悪化への関与
- (10) PAP に関する情報発信：患者（会）支援、PAP 勉強会開催とホームページの更新

遺伝性/先天性間質性肺疾患 (HILD)

- (1) 診療照会システム、登録システムを用いた前向き検討
- (2) HILD の新たな治療の開発

研究分担者氏名(所属機関名・職名)

中田光(新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター・教授・センター長)、山口悦郎(愛知医科大学医学部内科学講座・呼吸器・アレルギー内科教授)、瀬戸口靖弘(東京医科大学・呼吸器内科教授)、一和多俊男(東京医科大学八王子医療センター・呼吸器内科教授)、海老名雅仁(東北薬科大学病院・呼吸器センター長)、長和俊(北海道大学病院周産母子センター・診療教授)、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・准教授)、石井晴之(杏林大学医学部附属病院呼吸器内科学・講師)、内田寛治(東京大学医学部麻酔科・

講師)、木田博(大阪大学大学院医学系研究科呼吸器・免疫アレルギー内科学講座・助教)、北市正則(国立病院機構近畿中央胸部疾患センター・臨床検査科部長・臨床研究センター研究室長)、審良正則(国立病院機構近畿中央胸部疾患センター・放射線科部長・臨床研究センター研究室長)、新井徹(国立病院機構近畿中央胸部疾患センター・呼吸器医長・臨床研究センター部長)

A. 研究目的

本研究班は、平成 26 年から肺胞蛋白症 (PAP)、遺伝性（先天性）間質性肺疾患（HILD）を研

究対象として研究を続けているが本年度は3年計画の1年目である。

PAPは肺胞腔内にサーファクタント様物質が蓄積し機能障害を生じる難治性稀少肺疾患である。分担研究者中田らによる抗 GM-CSF 自己抗体発見から、病因に基づく新分類、重症度分類、疫学調査、予後調査、GM-CSF 吸入療法の開発、麻酔科と合同で全肺洗浄の標準化、血液内科と合同で続発性 PAP、新生児科と合同で先天性/遺伝性 PAP、間質性肺疾患の研究を実施し成果を世界に発信し、かつ患者の支援を実施してきた。

本研究班においては、新たなクリニカルアクションとして、PAP、HILD の重症難治化例の克服をめざして、重症難治化要因である、呼吸不全、肺線維化、感染症、重篤な肺外疾患合併を合併する症例、環境要因等について検討する。図 1 に研究の流れ、図 2 に中長期的展望を示す。

図 1 本研究の流れ



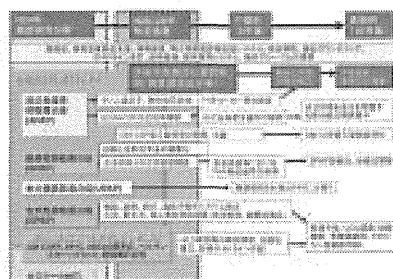
PAP

抗 GM-CSF 自己抗体を用いた新しい PAP の診断と分類（自己免疫性 PAP、続発性 PAP、先天性 PAP、未分類 PAP）に基づいて対象症例を

選定して、以下の検討を行う。平成 26 年の目的は以下の通りである。

- (1) 自己免疫 PAP の重症難治化例の全国調査。
- (2) 自己免疫性 PAP の重症難治化例の臨床病理学的検討。
- (3) 自己免疫性 PAP に対する GM-CSF 吸入療法の実用化に向けた基盤整備。
- (4) 全肺洗浄法の標準化に向けたコンセンサスの作成と検証。
- (5) 続発性 PAP の疫学調査、血液内科との合同ワークショップ開催。自己免疫性 PAP との比較。
- (6) 自己免疫性 PAP の網羅的遺伝子解析。
- (7) 自己免疫性 PAP の病態解明。
- (8) 他のバイオマーカー、自己抗体開発。
- (9) ステロイドの自己免疫性 PAP の病状悪化への関与。
- (10) PAP に関する情報発信。患者（会）支援、PAP 勉強会開催、ホームページ更新。

図 2 本研究の中長期的展望



HILD

小児科領域では、検査が限られ、びまん性肺疾患は、早期に診断される事は少なく、成人発症例も報告されるようになった。Surfactant

protein C(SP-C)遺伝子や ATP-binding cassette transporter A3(ABC-A3)遺伝子、GM-CSF 受容体遺伝子等の変異症例について、先天性/遺伝性 PAP 詳細が明らかでない症例も総称して遺伝性間質性肺炎 (HILD) としてまとめて議論される事が多い。欧米の疾患概念との比較から新たな枠組みの必要性について検討する。現在、確立されている診断支援システムにて診断された症例の臨床像を明らかにする。新たな治療についても検討する。

B. 研究方法

PAP

- (1) 自己免疫 PAP の重症難治化例の全国調査。
呼吸不全例、間質性肺炎／肺線維症合併症例、他の自己免疫性疾患合併例、難治性感染症合併症例、重篤な肺外合併症症例を集積するため、まず、全国の呼吸器内科へ一次アンケートを送付し、詳細な二次アンケートを行う基礎データとする。
(井上、新井、北市、審良、中田、他 PAP 関係全員)。
- (2) 自己免疫性 PAP の重症難治化例の臨床病理学的検討。研究対象は近畿中央胸部疾患センター症例、国立病院機構 の各病院からの症例、第 3 回京滋呼吸器疾患研究会で検討した症例を基礎として第 2 回大阪呼吸器疾患シンポジウムとして 2007 年 8 月 30-31 日に病理検討会と臨床・画像・病理・総合検討会を行い、49 例の検討を行った。(井上、北市、審良、新井、他 PAP 関係全員)。
- (3) 自己免疫性 PAP の治療効果判定のための新

- しい HRCT 画像解析法に関する研究。(審良、井上、新井、田澤、中田、山口、他)。
- (4) 自己免疫性 PAP に対する GM-CSF 吸入療法の実用化。治験実施に向けた基盤整備。(田澤、中田)。
 - (5) 全身麻酔下全肺洗浄法のコンセンサスの確立。麻酔科と呼吸器内科合同ワークショップ開催。(一和多、内田、新井、井上、山口)。
 - (6) 全肺洗浄中の生理学的変化。(内田、赤坂、中田、他)。
 - (7) 全肺洗浄数式モデルの検証及び自己抗体におけるモデル適応の検討。肺の全肺洗浄液における肺胞中蛋白質の物質移行に関して構築された数学モデル式の一般化可能性を検証し、さらに GM-CSF 自己抗体のモデル適応を検討した。(中田、田中、赤坂、一和多、山口、井上、新井)。
 - (8) 自己免疫性 PAP に対する全肺洗浄例の報告；不完全な全肺洗浄後の改善、片肺の洗浄後に反対側肺の改善を認めた症例。(山口、高田)。
 - (9) 自己免疫性 PAP に合併する感染症。症例提示および文献的検索による問題点の洗い出し。(新井、井上、森本、他)。
 - (10) 続発性 PAP 調査：1999 年以降に抗 GM-CSF 自己抗体陰性で気管支肺胞洗浄液所見 (BALF) から肺胞蛋白症が確定診断された続発性 PAP 10 例を対象に、既存資料である BALF の標本における肺胞マクロファージ形態をデジタル蛍光顕微鏡によって評価した。血液内科との合同症例検討会実施。(石井、富井、中田、井上、他)。

- (11) 自己免疫性 PAP における抗 GM-CSF /HLA class II 抗体の検討: 近年、自己抗体産生に関わる HLA class II の新たな機能が発見されたが、自己免疫性 PAP とこの機序との関わりは不明である。本研究において我々は GM-CSF が HLA class II の peptide-binding groove に結合して細胞表面輸送され、提示されることを、発現ベクターを用いたトランスフェクション実験により示した。(濱野、木田)。
- (12) 自己免疫性 PAP の病態解明。(プロジェクト 1) GM-CSF 自己抗体軽鎖の次世代シーケンスによる解析。(プロジェクト 2) ヒト GM-CSF におけるシアル酸修飾の意義。(プロジェクト 3) 間葉系幹細胞との共培養による in vitro 自己抗体産生系の確立(中田、橋本、田澤、他)。
- (13) 自己免疫性 PAP、網羅的遺伝子解析準備。GWAS を進めるための検体収集等の基盤を整備する。(山口、井上、中田)。
- (14) ステロイドの自己免疫性 PAP の病状悪化への関与。全国 165 施設へ、自己免疫性肺胞蛋白症でかつステロイド投与された症例の有無につき、一次アンケート調査を実施。45 例が抽出され、この中より、1) GM-CSF 自己抗体濃度 1.0mcg/mL 以上、2) 投与期間が 1 ヶ月以上で、3) 他の自己免疫性疾患をもたないことを選択基準として、31 例を抽出した。これらの症例の主治医へ、臨床情報、重症度(DSS; disease severity score)、薬歴、合併症の有無を問う二次アンケート調査を実施して、集積された情報の検討を

行った。(赤坂、中田、田澤、他)。

- (15) 恒例となった患者、家族と PAP 勉強会を開催(山口、一和多、中田、石井、井上)。
- (16) ホームページの更新(井上)。
- (17) 難治性肺胞蛋白症に対する肺移植および骨髄移植の有効性の検討。(海老名、他)。

HILD

- (1) 遺伝性間質性疾患の指定難病へ向けての新規枠組みの提案。これまで本邦において遺伝性間質性肺疾患という枠組みでとらえられてきている呼吸器疾患は、「先天性間質性肺疾患」「家族性間質性肺疾患」など遺伝子変異や遺伝性疾患に関わる間質性肺疾患を指しているが、対象が明確になっていない。また、欧米における遺伝性間質性肺疾患とは異なる部分も多く、診断治療法を確立する上でも対象疾患や枠組みを再構築することが必要と考え、欧米とくに米国において用いられている遺伝性間質性肺炎の分類と比較検討を試みた。米国における文献、書籍から遺伝性間質性肺疾患について検索を行い、分類を確認する手法を行った。遺伝性間質性肺疾患の英文表記については、「hereditary interstitial lung disease(s) (HILD)」「inherited interstitial lung disease(s) (IILD)」で、またそれに近似する表現で検索を行った。(瀬戸口)。
- (2) 遺伝性間質性肺疾患の診断に関する研究。すでに構築された診療支援システムにより、遺伝性間質性肺疾患の前方視的サーベイランスを行った。対象は、1 歳未満で発症し

た治療抵抗性の呼吸不全の症例、または16歳未満の小児で肺胞蛋白症、間質性肺炎などの間質性肺疾患が疑われたあるいは診断された症例のうち、本研究の診断支援システムに紹介された症例とした。既知の原因により説明可能な呼吸不全を除外した。症例の紹介があった場合に、当センターにおいて、診断に有用な検査、検査結果の解釈、鑑別診断などについての相談を受け、遺伝性間質性肺疾患の可能性があり家族の同意が得られた場合に以下の検査を提供した。

1) Surfactant (SP)-C 遺伝子、ABCA3 遺伝子のシーケンスを行った。2) SP-B 欠損症の可能性のある症例に BAL 液または気道吸引液を用いた SP-B 蛋白の検出と SP-B 遺伝子のシーケンスを行った。3) 肺胞マクロファージの異常の可能性のある症例に末梢血単球を用いた GM-CSF 受容体機能を反映する STAT-5 のリン酸化測定を行った。

4) ACD/MPV と診断された症例、もしくは治療抵抗性の重度の肺高血圧が遷延する症例に FOXF1 遺伝子のシーケンスを行った。(長、井上、中田)。

(3) 家族性間質性肺炎と診断した若年姉弟3名の5年間の経過。(高木、森本)。

(4) SP-C 遺伝子変異間質性肺炎の分子標的治療。これまで SP-C 遺伝子変異を伴う間質性肺疾患について SP-C 遺伝子の転写翻訳産物である前駆 SP-C 蛋白の C 末端から 100 アミノ酸の部分は、ある種の分泌蛋白に共通のアミノ酸配列を有し BRICHOS ドメインと呼ばれる。この部分に変異がある前駆

SP-C 蛋白は、小胞体における翻訳蛋白の折りたたみの品質管理機構によって小胞体

(ER) ストレスを誘導し、肺胞 II 型上皮細胞の細胞死、線維化関連のサイトカイン分泌が起こることが明らかになっている。ER では、蛋白の折りたたみに失敗した不良品蛋白質の蓄積による ER の破綻、細胞死を回避する機構として小胞体関連分解 (ERAD) が存在する。ERAD に関わる酵素の一つ E3 ユビキチン化酵素シノビオリンは、RA の滑膜細胞で過剰発現することで発見された。更にサイトカインの質の制御を司るのがシノビオリンであることも明らかになった。シノビオリンのコンディショナル・ノックアウトマウスのサイトカイン、小胞体関連因子の発現解析では、炎症性サイトカインの発現が抑制されていたことから説明される。SP-C 遺伝子変異特に代表的な BRICHOS ドメインの変異を呈し ER ストレスを起こす exon4 欠失 SP-C 遺伝子 (Δ exon4SP-C) を用いてシノビオリンの発現とサイトカインの発現を調べ、治療法への糸口を探ることが本研究の目的である。(瀬戸口)。

(5) 学会との連携(長、瀬戸口、井上、中田)。
日本呼吸器学会、小児呼吸器学会等との連携。

(倫理面への配慮)

(1) 疫学研究は、疫学研究に関する倫理指針を遵守し各施設で倫理委員会の承認の下行う。調査結果、患者検体は匿名化し保存する。

データの管理は匿名化番号を用いて行い、個人情報保護する。

- (2) 患者検体採取保存に際して、書面による同意を得て実施する。包括的同意を得て過去に保存された検体を用いる場合、ホームページへの掲示等、施設倫理委員会の指示に従う。
- (3) 遺伝子解析実施に関して、担当施設の倫理委員会の承認、書面による同意を得て「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して実施する。

C. 研究結果（方法の番号の順に以下結果を列挙する）

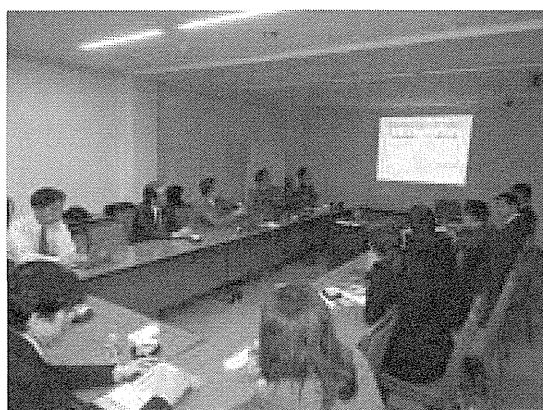
- (1) 自己免疫性 PAP の重症難治化例の全国調査。
一次アンケートを送付した。二次アンケートにて詳細を検討する予定。(井上、新井、北市、審良、中田、他 PAP 関係全員)。
- (2) 自己免疫性 PAP の重症難治化例の臨床画像病理学的検討。対象症例 49 例中、自己免疫性 PAP は 22 例、特発性 PAP 症例（抗 GM-CSF 自己抗体未測定）は 13 例であった。これらのうち、外科的肺生検、肺部分切除術または剖検で、肺胞蛋白症以外の肺病変の詳細が検討できた症例は 24 例であった。肺組織に Usual interstitial pneumonia (UIP) pattern の肺病変を認めた 2 例は死亡し、nonspecific interstitial pneumonia (NSIP)、cellular and fibrosing pattern の肺病変を認めた 6 例中 3 例は死亡した。線維化間質性肺炎のパターンが PAP の予後因子となることが判明した。(北市、井上、新井、中田、他)。

- (3) 自己免疫性 PAP の治療効果判定のための新しい HRCT 画像解析法。肺胞蛋白症の治療効果判定のための新しい HRCT 画像評価法を検討した。PAP 病変の陰影の程度(opacity score)を 3 ポイント・スケール（軽度のすりガラス影＝1 ポイント；中等度のすりガラス影＝2 ポイント；高度の肺野高吸収 consolidation＝3 ポイント）で評価し、それぞれの陰影の広がり（extent score）を 5 ポイント・スケールで評価した。全体の severity score は左右上中下肺の 6 肺野領域で陰影の程度に広がり掛け合わせた値の合計で計算した。この new grading system は治療効果判定に有用と考えられた。（審良、井上、北市、新井、中田、山口、他）。
- (4) 自己免疫性 PAP に対する GM-CSF 吸入療法の実用化。（臨床試験の結果は既に AJRCCM に発表）。薬剤開発は他研究費を用いて前臨床試験実施中。自己免疫性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入製剤の開発に向けて、これまで、非臨床試験の方法の検討、治験プロトコルの策定を医薬品医療機器総合機構（PMDA）の薬事戦略相談の事前面談を利用して進めてきた。今回、2014 年 10 月に正式の対面助言を受けた。その結果、今後新たな問題点が認められない場合には、非臨床試験に関して提示のデータパッケージおよびこれから実施予定の GLP 適応の 6 か月反復吸入毒性試験の結果により製造販売承認申請の可能性が考えられること、治験では、健常成人での単回投与薬物動態試験をできるだけ早期に行うこと

(検証的試験と同時で可)、提示の第Ⅲ相試験（検証的試験）の試験デザインで概ね受け入れ可能であること等が示された。今後 PMDA の意見に沿って実験計画、治験プロトコルの修正を進め、あわせて日本医療研究開発機構の研究予算への応募のための各種書面の準備を開発協力企業と協議して進める予定である。将来の治験実施に向けて本研究班は治験受け皿の基盤整備を行った。

- (5) 全身麻酔下全肺洗浄法のコンセンサス確立、検討会開催。平成 26 年 11 月 23 日東京にて麻酔科、呼吸器内科合同の全肺洗浄合同検討会開催。平成 25 年度に行われた全国アンケートに基づき、全肺洗浄症例数の多い、コアの 6 施設代表が集まり標準的全肺洗浄について討議。全肺洗浄の適応、禁忌、体位、degassing、ECMO 使用の適応、洗浄方法について、おおむね合意を得た。これに基づき、今後の症例の洗浄結果も合わせて、全肺洗浄の標準法を策定する。(一和多、内田、新井、井上、山口)。(図 3)

図 3 麻酔科、呼吸器内科合同の全肺洗浄合同検討会



- (6) 全肺洗浄中の生理学的変化。肺洗浄中の酸素化や肺血管抵抗、肺コンプライアンスなどの生理学的指標を検討した。洗浄液排出時に肺動脈酸素飽和度が急激に低下し、非換気側へのシャント血流が急激に上昇していることを伺わせた。洗浄中の肺血流分布を予測するため、電気抵抗回路を用いた簡略化モデルを考案したところ、洗浄液排出時は、非換気側へ 70%程度の肺血流がシフトしていることが推定された。(内田、赤坂、中田)。
- (7) 全肺洗浄数式モデルの検証及び自己抗体におけるモデル適応の検討。全肺洗浄が必要とされる重症例については数学モデルを一般化して適用可能であると考えられた。モデル作成症例のサーファクタントから洗浄液への移行係数 KS 、血中から洗浄液への移行係数 Kb の箱ヒゲ図に追加症例について KS 及び Kb の値をプロットしたところ、ほぼ全てで KS 、 Kb の値がモデル作成症例の KS 、 Kb の範囲内に収まることが確認された。一部 KS が範囲外になった症例については濃度曲線が上に凸になった（傾きが変わった）グラフとなっており、途中でサーファクタント量が大きく変化してしまった可能性が考えられた。さらに GM-CSF 自己抗体について拡張されたモデル式を構築のために、肺胞洗浄液中 GM-CSF 自己抗体実測値と血清中の IgG/GM-CSF 自己抗体比率から推測される推定値との比較したところ、ほぼ一致した結果が得られた。産生された GM-CSF は全て複合体を形成していると考え

えられるため、その単位時間あたりの複合体生成量は貯留している GM-CSF 自己抗体に比して微量であると考えられた。そこで、既存の数学モデル式により GM-CSF 自己抗体濃度を計算し、移行パラメータを求めたところ、サーファクタントから血中への移行係数である KS の値は $GMAb: 1.58E-7$ 、 $IgG: 1.67E-7$ と、ほぼ一致していた。一方、血中からの移行係数である Kb は $GMAb: 1.30E-9$ 、 $IgG: 5.02E-10$ とオーダーが異なり、分布も異なっていた。GM-CSF 自己抗体については GM-CSF と複合体を形成する関係上、低濃度において既存のモデル式にのらないと考えられる。そこで、 Kb の値は IgG と GM-CSF 自己抗体で同値であると仮定して、GM-CSF との複合体生成項を加えることとした。現在、洗浄液及び血清中の複合体濃度を測定し、式の検討を進めている。(中田、田中、一和多、赤坂、山口、井上、新井)。

(8) 自己免疫性 PAP に対する全肺洗浄例の報告。

①46 歳男性。左肺を 2 回、明らかに不十分な全肺洗浄を行ったにもかかわらず、その後約 1 ヶ月の経過で著明に陰影と呼吸状態が改善した。機序として、自然軽快、血清抗体濃度の低下、肺局所の抗体濃度の低下、禁煙、FSC の吸入などが考えられる。②左全肺洗浄後に非洗浄側である右肺陰影の改善を認めた自己免疫性肺胞蛋白症の一例を経験した。全肺洗浄後に血中サイトカインレベルが上昇し、非洗浄肺のマクロファージ機能を正常化させたため肺病変が改善し

た可能性がある。(山口、高田)。

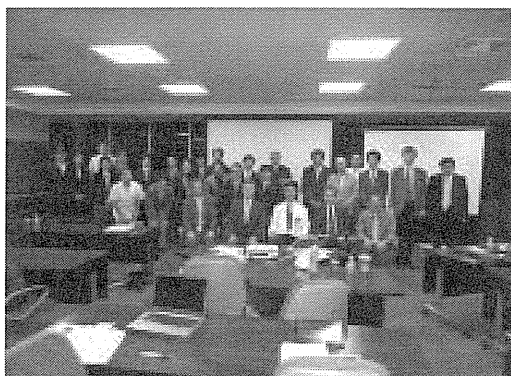
(9) 自己免疫性 PAP に合併する感染症。症例提示および文献的検索による問題点の洗い出し。肺アスペルギルス症の治療中に発症した自己免疫性 PAP (aPAP) 症例を経験した。GM-CSF による治療を行ったが、反応乏しく、治療開始後 4 ヶ月で死亡された。アスペルギスは肺胞マクロファージの機能を低下させること、肺胞 II 型上皮からのサーファクタント産生を増加させることから、aPAP の発症や悪化にかかわる可能性、さらに GM-CSF 療法の反応性にも影響した可能性が考えられた。また、アスペルギルス症に対する治療により、aPAP が改善する報告があること、感染症治療を行いながら、aPAP に対しても積極的な治療を検討する必要があることが示された。(新井、井上、森本、他)。

(10) 続発性 PAP 調査：肺胞蛋白症の気管支肺胞洗浄液(BALF)では泡沫状に腫大した肺胞マクロファージ(AM)が特徴的所見とされている。しかし抗 GM-CSF 自己抗体陽性の aPAP と、同自己抗体陰性の続発性肺胞蛋白症(sPAP)において病型による AM の形態異常は不明であり、本研究において評価した。両群間で BALF 中の AM サイズ、AM 核サイズ、AM 核・細胞比率(N/C)を比較検討すると、sPAP は aPAP より AM サイズと核サイズは小さく、N/C が高い結果であった。これは sPAP の AM 自体が未熟な細胞で貪食能力も aPAP より低下している傾向があることを意味する。今回の研究結果から

sPAP は GM-CSF シグナル異常による機能低下ではなく、AM 自体が異常細胞である可能性が示唆された。平成 26 年 11 月 8 日、東京にて血液内科と合同続発性 PAP 検討会を開催した。(石井、富井、中田、井上、他)。

(図 4)

図 4 血液内科と合同続発性 PAP 検討会



- (11) 自己免疫性 PAP (aPAP) における抗 GM-CSF /HLA class II 抗体の検討。細胞表面の GM-CSF/HLA class II complex に対する自己抗体、抗 GM-CSF/HLA class II 抗体を aPAP 患者 21 名と健常人 21 名で測定した結果、抗 GM-CSF/HLA class II 抗体は感度 90.48%、特異度 100%で aPAP 患者を識別した。興味深いことに、抗 GM-CSF/HLA class II 抗体価は、従来の ELISA 法で測定した抗 GM-CSF 抗体濃度と相関しなかった。それぞれの自己抗体と aPAP 患者重症度 (DSS, disease severity score) との関連を明らかにするためにロジスティック解析を行ったところ、これまでの報告通り抗 GM-CSF 抗体と aPAP 重症度の間には弱い相関しか認められなかった ($R^2 = 0.0318$, $p = 0.2180$) が、

驚くべきことに、抗 GM-CSF/HLA class II 抗体は aPAP 重症度とより良い相関を示すことが明らかとなった ($R^2 = 0.2851$, $p = 0.0002$)。Spearman 順位相関係数も求めたが、同様に抗 GM-CSF 抗体 ($\rho = 0.3584$, $p = 0.1107$) より、抗 GM-CSF/HLA class II complex 抗体 ($\rho = 0.5806$, $p = 0.0058$) で良好な相関を認めた。(濱野、木田)。

- (12) 自己免疫性 PAP の病態解明。(プロジェクト 1) 現在、手技の基礎検討を繰り返しており、方法が確定次第、次世代シーケンスに進みたい。(プロジェクト 2) GM-CSF の 27 番、37 番目に結合する糖鎖により、GM-CSF は速効型と遅効型の 2 種に分かれると思われる。これらの見分け方であるが、GM-CSF の二次元展開とウェスタンブロットによるスポットの検出を試みた。自己免疫性 PAP の GM-CSF は、遺伝性 PAP、市販のヒト由来 GM-CSF 比べてアルカリ側、低分子側にシフトしていることが示唆された。これを確かめるために、二次元スポットのマージを行った。自己免疫性 PAP の GM-CSF は右下方へのシフトが確認された。(プロジェクト 3) 以下の 3 つの技術的な壁がある。①共培養による自己抗体産生がわずかで、ELISA の感度の問題がある。②産生された IgG の非特異的反応をどのように抑えるか。③MSC 自体が GM-CSF を産生するために共培養した B 細胞が自己抗体を産生しても複合体を形成し、細胞内に取り込まれてしまう。ここにあげた 3 つのプロジェクトは、いずれも道半ばであるが、

GM-CSF 自己抗体は何故過剰産生されるのかという問題を解決するために、複数の方法論が重要と考え、突破をねらっている。

(中田、橋本、田澤、他)。

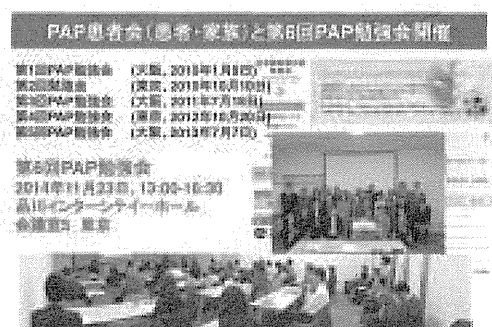
- (13) 自己免疫性 PAP、網羅的遺伝子解析準備：ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を進めるため、愛知医科大学、新潟医科大学、近畿中央胸部疾患センターを中心として遺伝子収集を開始した。2013 年から GWAS を開始し、これまで共同研究施設の理化学研究所に患者 77 名の試料を送付した。それら比較的少数例の中間的解析で、aPAP には遺伝素因が存在することが示唆された。今後、多数例の検討においてそれを確定し、並行して、関連する可能性のある分子の、肺胞蛋白症における役割の解析も必要である。(山口、井上、中田)。

- (14) ステロイドの自己免疫性 PAP の病状悪化への関与。31 例中 29 例で自己免疫性 PAP の確定診断前にステロイド投与が始まっていた。ステロイド投与時の臨床診断の理由の中で最も多かったのは特発性間質性肺炎と診断されたためであり 23 例 (74%) を占めた。ステロイドの総投与量はプレドニゾロンに換算して 1000mg 未満が 3 例、1000～10000mg が 22 例、それ以上が 6 例であった。投与期間の中央値は 6 ヶ月 (範囲 1～50 ヶ月) であった。ステロイド投与前とステロイド投与 3 ヶ月後の DSS の比較では、悪化 16 例 (52%)、不変 12 例 (38%)、改善 3 例 (10%) であった。ステロイド投与期間中の感染症合併を 7 例で認めた ($p < 0.05$)。 (赤坂、

中田、田澤、他)。

- (15) 患者、家族との PAP 勉強会 (山口、一和多、中田、井上)：平成 26 年 11 月 23 日東京にて第 6 回 PAP 勉強会開催。51 人の参加。

図 5 第 6 回 PAP 勉強会 (患者会支援、教育)



- (16) 患者用、医療従事者用ホームページを更新した (井上)：公式ホームページによる情報発信：医療従事者用 (<http://www.pap-support.jp/>)、一般利用者向け (<http://www.pap-guide.jp/>) ホームページを作成し、概要について英語版も作成し、ヨーロッパ研究グループと相互リンク。

図 6 患者、医療従事者ホームページ更新



(17) 難治性肺胞蛋白症に対する肺移植および骨髄移植の有効性の検討。骨髄移植後 7 年後に狭窄性細気管支炎による慢性呼吸不全と考えられた 14 歳患者に対する右片肺生体肺移植術の結果は、摘出された右肺の主病変が肺胞蛋白症であることが判明した。肺移植後残存している左肺の肺胞蛋白症病変まで著明に改善し、呼吸状態は良好となった。このことは抗 GM-CSF 抗体陰性難治性肺胞蛋白症に対する肺移植療法の可能性を示す。また Bach2 欠損マウスにみられた骨髄異常由来の二次性肺胞蛋白症に対する骨髄移植の有効性を以前報告したが、GM-CSF 受容体欠損肺胞蛋白症マウスモデルに対する正常マクロファージの細胞移植による治療効果を示した最近の報告もまた難治性肺胞蛋白症に対する移植療法の臨床応用の可能性が示される。(海老名、他)。

HILD

(1) 遺伝性間質性肺疾患の指定難病へ向けての新規枠組みの提案。ILD 或いは IILD という表記では、文献、書籍は検索にのぼって来なかった。近似する表記としては「genetic interstitial lung disease」「genetic background of interstitial lung disease」という表現が多く認められた。これは、「hereditary」「inherited」は、血縁において受け継がれるという意味合いが強く、家族性であり de novo の変異によるものは含まない用である。本邦で使われている遺伝性間質性肺疾患は、特に小児領域においては、血縁で遺伝している

疾患というよりも出生後するに発症した症例を指していることが多く、言葉の意味するところとは齟齬が生じている。一方

「genetic」という表現は、より広く de novo の変異までも含んでいる。したがって、genetic interstitial lung disease とする方が好ましいと考える。欧米においては、文献や書籍の中にでてくる genetic interstitial lung disease ではメンデル型遺伝および非メンデル型遺伝を有する間質性肺疾患の中で (A) 全身性疾患の一部分症として間質性肺疾患を呈するものと (B) 唯一間質性肺疾患のみを有するものに大きく分類されている。指定難病として取り扱う場合、臨床的に症状、病態が比較的明瞭なまとまりを持っていることが疫学調査、診断、重症度、治療を考える上で重要である。従って、「遺伝性間質性肺疾患」としてまとめるよりは、surfactant metabolism dysfunction や成人発症家族性間質性肺疾患などといった、より特徴的な疾患群として遺伝子変異や遺伝性の間質性肺疾患の枠組みの再編が必要であると考ええる。(瀬戸口)。

(2) 遺伝性間質性肺疾患の診断に関する研究。
2010 年 4 月から 2014 年 10 月までの期間において、本研究の診断システムに 75 例の紹介があり、68 例に研究への参加を依頼し全例で家族の同意が得られた。68 例の最終的な臨床診断は、間質性肺炎 6 例、肺胞蛋白症 6 例、ACD/MPV4 例、歌舞伎症候群 1 例、重症複合免疫不全症 1 例、胃食道逆流症 1 例、先天性副腎低形成 1 例であり、48 例は

原因が特定されなかった。*SFTPC* 遺伝子、*ABCA3* 遺伝子の遺伝子検査を 65 例で施行した。*SFTPC* 遺伝子検査にて 3 例に 2 つの既報変異(p.Leu45Arg, Ser61Gly)と、3 例に 4 つの新規変異(p.Gln145fs, p.Ser72Asn, p.Gly100Ala, p.Lys63Glu)を検出し、6 例を SP-C 異常症と診断した。*ABCA3* 遺伝子検査では、3 例で新規変異のヘテロ接合を認めた。臨床経過などから 2 例は *ABCA3* 異常症が否定的であり

(p.Pro73+eu/p.Gly1205Arg, p.Thr761Met/p.Alal362Val)、1 例を *ABCA3* 異常症と診断した(p.Arg1583Trp/ p.Val1495Cysfs21X)。*SFTPB* 遺伝子解析を 21 例に、SP-B 蛋白の解析を 17 例に行い、解析を行った全例において異常は認められず、SP-B 欠損症が否定された。GM-CSF 刺激による STAT-5 リン酸化の解析の対象は 3 例あり、異常は認められなかった。*FOXF1* の遺伝子解析を臨床的に ACD/MPV と診断された 4 症例および治療抵抗性の肺高血圧症 7 例に行い、ACD/MPV の 2 例に遺伝子変異 (p.Leu300ArgfsX79, p.Try284X)を認めた。ACD/MPV と診断された他の 2 例においては、遺伝子検査が不能であった。(長、井上、中田)。

- (3) 家族性間質性肺炎と診断した若年姉弟 3 名の 5 年間の経過。我々は健診を契機として発症前の家族性肺線維症の症例を見出し、成長過程の若年肺線維症患者 3 名を約 5 年間経過観察した。呼吸機能検査では 3 名共に %DLco の経時的な低下を認めた。1 名の

患者では肺活量の絶対値は増加したが、%肺活量は減少しており、成長期特有の現象が認められた。胸部 CT の変化はいずれも軽微であったが線維化の進行が認められた。何らかの治療介入の必要性を注意深く考慮しつつ、疾患の進行速度には個人差があり、生活環境と線維化の進行度との関連を観察して進行を加速する外的要因検索していく必要がある。(高木、森本)。

- (4) SP-C 遺伝子変異間質性肺炎の分子標的治療。正常及び Δ exon4SP-C を A549 細胞株へ遺伝子導入し線維化に関与する代表的な細胞外マトリックスであるコラーゲン発現を調べた。その結果、野生型と比較して Δ exon4SP-C 導入 A549 細胞では、線維化関連サイトカインの発現の転写レベルでの上昇、また培養液中の分泌コラーゲン量の増加が確認できた。また、シノビオリンの発現も高まっていた。次にシノビオリンの関与を評価するためにシノビオリンプロモーターで発現制御されたルシフェラーゼ遺伝子を有するプラスミドを構築し、 Δ exon4SP-C 発現プラスミドとともに A549 細胞へ遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、exon4 欠失 SP-C 遺伝子において 1.6 倍の活性化がみられ、内在シノビオリン発現量も RNA および蛋白質レベルで上昇していることが明らかになった。正常及び exon4 欠失 SP-C 遺伝子を A549 細胞株へ遺伝子導入し、シノビオリン阻害剤 LS102 を培地へ添加し、LS102 によりコラーゲン分泌量が低下することを確認

した。すなわち、シノビオリン阻害剤 LS102 の投与によりコラーゲン発現の抑制が可能となることを示した。今後、SP-C 遺伝子変異による間質性肺疾患の治療への発展性が考えられる。(瀬戸口)。

- (5) 遺伝性間質性肺疾患の診断支援システムの周知、学会との連携。電子メールを用いて国内の小児科診療施設、周産母子センター等新生児診療施設に対して遺伝性間質性肺疾患の診断支援の周知を行った。日本未熟児新生児学会の新生児希有疾患(病態)前方視的サーベイランス事業を通して症例の集積を開始すると同時に、同学会のホームページ、学会誌にて診断支援の周知を行った。(長、瀬戸口、井上、中田)。

- (6) 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 (総会)にて、米国バンダービルト大学 Lisa Young Dr. を招聘し、当研究班が主体となり、日本未熟児新生児学会、日本小児呼吸器学会と日本呼吸器学会合同シンポジウム「先天性／遺伝性 ILD を巡る最新の話題」を開催した。詳細は参考資料参照。

D. 考察

PAP

我が国では継続的に世界トップレベルの PAP の研究が実施され世界のレベルを牽引している。自己免疫性 PAP の標準的療法と考えられる全肺洗浄法については、麻酔科とも連携し、効果的な洗浄、安全な洗浄を目的とした検討を行い、具体的な洗浄法のコンセンサスを構築中である。また、すでに GM-CSF 吸入療法の有効性

について、我々は報告してきたが、保険適応となる治療でなく、あくまでも実験的な治療であった。GM-CSF 吸入療法の実用化に向け、治験実施の基盤整備を行っており、近日中に具体的な治験計画を示したい。

基礎的な病態解析、組織 (血清) バンク等を用いた網羅的自己抗体、網羅的遺伝子解析も現在進行中であり、新たな診断方法、新たな治療法が開発される事が期待される。

先天性 PAP から遺伝性/先天性 PAP の研究体制へと、肺のサーファクタントの恒常性、免疫学的研究から肺線維症、間質性肺炎のメカニズムにも研究が広がってきた。今後の展開が期待される。

HILD

診療支援システムが構築され、学会等を通じて、このシステムを周知する方策も講じられている。また、このシステムを通じて新たな症例の蓄積が進行している。また、実験レベルではあるが、SP-C 遺伝子変異間質性肺炎に関しては治療の可能性が示された。今後、さらに病態解析を進め、治療開発につなげていくことが必要である。

E. 研究計画 (委託事業) の実施状況と 3 年間の中での進捗状況

〈総括〉

本年度は採用決定、予算の遅れから、研究開始も遅かった。実質的な研究期間は短かったが、これまでの計測として研究は確実に実施され、論文学会発表は満足のいく成果が得られた。ま