

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19423

研究課題名(和文) 過敏性肺炎における免疫複合体解析

研究課題名(英文) Immune complexome analysis in patients with hypersensitivity pneumonia

研究代表者

原 敦子 (HARA, Atsuko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：70736420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々の大学で独自開発された免疫コンプレキソーム解析法を用い、過敏性肺炎の免疫複合体を網羅的に解析することで、過敏性肺炎の原因抗原の同定方法を確立することを目的とした研究である。夏型過敏性肺炎の気管支肺胞洗浄液(BALF)を用いて、該当する蛋白データベースも用いて検討したところ、他の群と比較してHuman Apolipoprotein Eが高頻度に検出されることを見だし、Apolipoprotein EをELISAで定量化したところ、他群と比較して有意に高値であり、さらに各種臨床パラメーターとの有意な相関を認めた。この蛋白が夏型過敏性肺炎の発症あるいは病態に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify the antigens of hypersensitivity pneumonia by immune complexome analysis. Immune complexome analysis revealed Human Apolipoprotein E was frequently detected in bronchoalveolar lavage fluid in patients with summer type hypersensitivity pneumonia compared with disease controls. Furthermore, Human Apolipoprotein E levels in bronchoalveolar lavage fluid elevated compared with disease controls and were associated with clinical parameters in patients with summer type hypersensitivity pneumonia. These results suggest that Human Apolipoprotein E play a role in the pathogenesis of summer type hypersensitivity pneumonia.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：夏型過敏性肺炎 Human Apolipoprotein E イムノコンプレキソーム解析法 気管支肺胞洗浄

1. 研究開始当初の背景

過敏性肺炎は、真菌、細菌、鳥類の蛋白、イソシアネートなどの有機あるいは無機塵埃を抗原とし、これを反復吸入しているうちに感作されて起こるアレルギー性肺炎の総称である。抗原が沈着する呼吸細気管支を中心に型(免疫複合体)および型(細胞免疫)アレルギー反応の機序により惹起される非乾酪性肉芽腫性間質性肺炎を特徴とし、発症様式から急性型、慢性型に分けられる。その診断には臨床症状(咳嗽、息切れ、発熱等)、画像所見、抗原に対する免疫反応の証明(特異抗体陽性あるいは特異抗原によるリンパ球幼若反応陽性)、吸入誘発試験陽性(特異抗原吸入あるいは環境暴露による臨床像の再現)、病理学的所見、のうち臨床症状を含む少なくとも3項目以上を満たすことが必要とされている(90'厚生省「びまん性肺疾患」調査研究班作成の診断基準)。しかしながら慢性型の過敏性肺炎は時に病初期には急性症状がなく、徐々に症状が進行するため、原因不明の特異性間質性肺炎と診断されていることもある。一方、過敏性肺炎と診断でき、抗原を特定することができれば、予後の改善が期待できることが報告されている。過敏性肺炎には生活環境や抗原の種類によって50以上の疾患が含まれ、原因抗原が特定されていない疾患も多数あること、診断の根拠となる特異抗体は多くの場合限られた施設でしか測定できず、また測定できる特異抗体の数も少ないこと、さらに血清中の抗体陽性が必ずしも疾患発症との直接的な関与に断言できない場合もあることから、原因抗原を特定できずに確定診断や治療が困難であった症例をしばしば経験してきた。以上のような背景から、過敏性肺炎における原因抗原に関して直接的な原因抗原を推定する方法の確立および発症機序の解明が強く求められている。

我々の大学の大山らは、独自開発した免疫複合体の網羅的解析法(イムノコンプレキソーム解析法)を用いて、自己免疫疾患患者の免疫複合体を網羅的に解析し、自己抗原を同定することで、病態の根本的で包括的な解明を目指しており、本解析による関節リウマチの患者血清を用いた免疫複合体解析では、特筆すべき成果(Ohyama et al. *Clin Chem.*, 2011, *Ann. Rheum. Dis.*, 2012)をあげている。イムノコンプレキソーム解析法では、ヒト以外のタンパク質データベースを利用することで、外来抗原の特定も可能である。

そこで我々は、過敏性肺炎の病態では免疫複合体を形成する型アレルギーから始まり、環境上に存在する抗原に暴露し続けることで体内に継続的に一定量の免疫複合体形成が行われていることを想定し、イムノコンプレキソーム解析法による免疫複合体の網

羅的解析により、過敏性肺炎の特異抗原の同定ができるのではないかと考え本研究を計画した。

2. 研究の目的

イムノコンプレキソーム解析法による免疫複合体の網羅的解析により、過敏性肺炎の特異抗原の同定および発症機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

対象は、長崎大学病院および関連施設において診断した、夏型過敏性肺炎(トリコスポロン・アサヒ抗体陽性)6例、夏型を除く住居関連過敏性肺炎18例、健常成人20例、疾患コントロールとしてサルコイドーシス16例、関節リウマチ関連間質性肺炎18例、強皮症関連間質性肺炎18例の計112症例。

対象患者の気管支肺胞洗浄液(BALF)を用いて、イムノコンプレキソーム解析法を行い、検出されたペプチドに対して、Human、*Trichosporon asahii*、*Cephalosporium acremonium*、*Aspergillus flavus*、*Cladosporium*のデータベースを用いて解析した(Swiss-prot)。

検出された蛋白については、ELISAキットを用いてBALF中の定量を行い、各種臨床データとの関連をレトロスペクティブに検討した。

4. 研究成果

各種真菌のデータベースで探索し、100~200種類の蛋白が解析したBALFから検出された。過敏性肺炎に特異的に、あるいは高頻度に認める蛋白は検出できなかった。夏型過敏性肺炎の原因抗原としては真菌の*Trichosporon*が同定されているが、*Trichosporon Asahii*のデータベースでの探索で、夏型過敏性肺炎に特異的に、あるいは高頻度に認める蛋白は検出できなかった。

次にHumanのデータベースで探索したところ、約500種類の蛋白が解析したBALFから検出された。疾患特異的な蛋白は検出されなかったが、夏型過敏性肺炎で他の群と比較して有意に高頻度に検出されるApolipoprotein Eという蛋白を見いだした。Human Apolipoprotein E結合免疫複合体は、健常成人で20例中0例(検出割合0%)、夏型を除く住居関連過敏性肺炎で34例中7例(21%)、サルコイドーシスで16例中2例(13%)、関節リウマチ関連間質性肺炎で18例中6例(33%)、強皮症関連間質性肺炎で18例中6例(33%)に検出されたのに対し、夏型過敏性肺炎で6例中5例(83%)と有意

に高頻度に検出した (p=0.0211, Fisher's exact test)。

Apolipoprotein E とは、VLDL、HDL、IDL などのリポ蛋白を構成している主要なアポリポ蛋白のひとつで、肝臓やマクロファージで合成・分泌される 34 kDa の蛋白である。細胞内へ脂質を運び込む際のリガンドとして機能し、また細胞からのコレステロールやリン脂質などを引き抜く作用を有し、これら双方の機能から脂質代謝異常を制御している。主な合成・分泌は肝実質細胞で行われるが、Apolipoprotein E の mRNA は、肺、脳、脾臓、副腎、腎臓、精巣、卵巣、心臓などでも確認されており、この幅広い発現から脂質代謝以外の機能もあると考えられている。

次に対象患者の BALF 中の Human Apolipoprotein E を ELISA キット (R&D Systems) を用いて測定した。各疾患群での比較では、夏型過敏性肺炎で有意に高値であった (図 1)。Human Apolipoprotein E 結合免疫複合体検出の有無による比較では、Human Apolipoprotein E 結合免疫複合体検出有りの群で無しの群より有意に Human Apolipoprotein E の濃度が高値であった (図 2)。

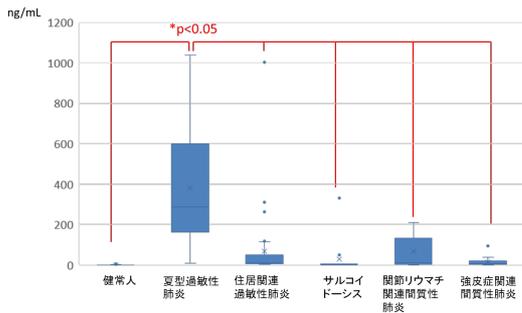


図 1. Human Apolipoprotein E in BALF (ELISA): 各疾患群による比較

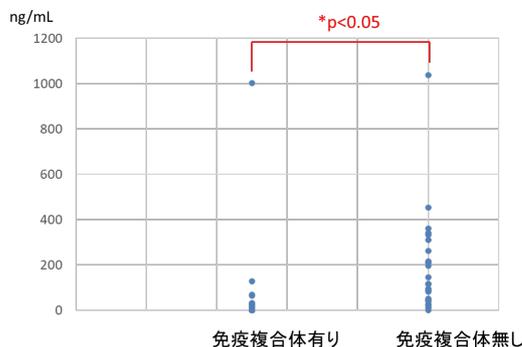


図 2. Human Apolipoprotein E in BALF (ELISA): Human Apolipoprotein E 結合免疫複合体検出の有無による比較

次に、BALF 中の Human Apolipoprotein E と各種臨床データとの相関を検討した (表 1)。BALF 中の Human Apolipoprotein E 濃度は、血清 LDH、CRP、間質性肺炎マーカー (KL-6、SP-D、SP-A)、BALF 細胞濃度およびリンパ球比率と正の相関を示した。

	r (相関係数)	p value
年齢	-0.066	0.516
LDH	0.645	<0.0001
CRP	0.227	0.034
TC	0.101	0.431
KL-6	0.727	<0.0001
SP-D	0.397	0.0006
SP-A	0.267	0.034
BALF 細胞濃度	0.591	<0.0001
好中球比率	0.082	0.449
リンパ球比率	0.430	<0.0001
好酸球比率	0.101	0.352
%VC	0.05	0.668
FEV1%	-0.106	0.376
%DLCO	-0.146	0.253

表 1. BALF-Human Apolipoprotein E と各種臨床データとの相関

Apolipoprotein E はリンパ球、特に T 細胞の増殖を抑制するという報告 (Pepe MG, et al. *J Immunol.* 1986, Kelly ME, et al. *Cell Immunol.* 1994, Tenger C, et al. *Immunology.* 2003) や、TLR4、TLR3 を介した IL-12 産生調節することで Th1 反応を抑制する (Ali K, et al. *Circ Res.* 2005)、抗微生物活性や免疫調節作用を有する (Katia Pane, et al. *The FEBS Journal.* 2016) という報告がある。夏型過敏性肺炎では Th1 サイトカイン・ケモカインにより肉芽腫と胞隔炎を形成すると考えられており、リンパ球増殖抑制や Th1 反応抑制の報告がある Apolipoprotein E が夏型過敏性肺炎患者の BALF で高濃度に検出されたことは、生体の反応を反映している可能性がある。また、Apolipoprotein E は抗微生物活性を有するという報告もあり、夏型過敏性肺炎の原因と考えられる真菌 (*Trichosporon Asahii*) に対する抗微生物ペプチドとして Apolipoprotein E の産生がさらに促された可能性がある。結果として過剰産生された Apolipoprotein E が免疫複合体を形成し、夏型過敏性肺炎の病態に関与しているという仮説がたてられる。

今回の研究により、Apolipoprotein E が夏型過敏性肺炎の病態に関与している可能性が示唆された。今後さらに研究をすすめていく必要がある。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Sakamoto N, Hara A (8 番目) (14 人省略). Elevated alpha-defensin levels in plasma and bronchoalveolar lavage fluid from patients with myositis-associated interstitial lung disease. BMC Pulm Med、査読有、18、2018、44.

DOI: 10.1186/s12890-018-0609-5

Yura H, Hara A (11 番目) (17 人省略). Clinical characteristics of patients with anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibody positive idiopathic interstitial pneumonia. Respir Med、査読有、132、2017、189-94.

DOI: 10.1016/j.rmed.2017.10.020

Harada T, Hara A (3 番目) (10 人省略). Premedication with Clarithromycin Is Effective against Secondary Bacterial Pneumonia during Influenza Virus Infection in a Pulmonary Emphysema Mouse Model. J Pharmacol Exp Ther、査読有、358、2016、457-63.

DOI: 10.1124/jpet.116.233932.

Kakugawa T, Hara A (7 番目) (12 人省略). Risk factors for an acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res、査読有、17、2016、79.

DOI: 10.1186/s12931-016-0400-1

[学会発表](計 1 件)

原 敦子、由良博一、中島章太、角川智之、石本裕土、城戸貴志、坂本憲穂、松元信弘、石井 寛、矢寺和博、石松祐二、迎 寛、過敏性肺炎患者気管支肺胞洗浄液における免疫複合体の検討、第 40 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会(2017 年)

優秀演題賞受賞

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 敦子 (HARA, Atsuko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

客員研究員

研究者番号：7 0 7 3 6 4 2 0

(2)研究協力者

中島 章太 (NAKASHIMA, Shota)

原田 達彦 (HARADA, Tatsuhiko)

朝長 正臣 (TOMONAGA, Masaomi)

由良 博一 (YURA, Hirokazu)