

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09530

研究課題名(和文) サイトカインパネル解析を用いた自己免疫性肺胞蛋白症の病態変化機序の解明

研究課題名(英文) Disease activity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis

研究代表者

赤坂 圭一 (Akasaka, Keiichi)

新潟大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50364542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性肺胞蛋白症22例で66検体の血清において、サイトカインプロファイルを調べた。難治重症例の1例では増悪時と改善時を含めて3年間で6回の測定を行い、病勢の改善時にINF- γ 、IL-1 β 、IP-10の上昇を認めた。これはマクロファージがM1マクロファージに分化することが関与している印象であった。このため、他の21例においても前記サイトカインに加えIL-4、IL-10、IL-13といったM2マクロファージへの分化に関与するサイトカインに注目して病勢とサイトカインの変動を検討した。しかし、これらの症例においてサイトカイン濃度と病勢との検討を行ったが、なんらかの傾向を見出すことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫性肺胞蛋白症においてサイトカインレベルと病勢の関係ははっきりとせず、何らかのサイトカインもしくはM1/M2マクロファージの分化が病勢に影響を及ぼしている可能性は低い。今まで肺胞蛋白症の病勢に関する研究は幾つかあるが、いずれも病勢マーカーをみつけられていない。このため、病勢に関与する因子は複合的である可能性が高い。現在、GM-CSF吸入療法が有効であることが分かり保険収載に向けて動いているが、この薬での効果はそれほど高いものではない。一方で、なんらかの他のサイトカイン製剤を加えてやれば効果がでそうという簡単な理論はなさそうである。

研究成果の概要(英文)：We evaluated comprehensive serum cytokine/chemokine levels of 66 samples that were obtained from 22 cases of autoimmune alveolar proteinosis. As an intractable severe case showed each condition of progression and remission, cytokine/chemokine levels were measured six times among three years, we confirmed elevated levels of INF- γ , IL-1 β , and IP-10 at the remission phase. These elevated inflammatory cytokines are concerning to macrophage differentiation towards M1 macrophage. According to these analyzations, we hypothesized that differentiation to M1 macrophage could induce remission. Therefore, of 21 other cases, we measured serum cytokine/chemokine panel and collected clinical conditions. However, we could not detect any correlation with cytokine/chemokine levels and disease severity.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：肺胞蛋白症 病勢 サイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺胞蛋白症 (Pulmonary alveolar proteinosis; PAP) は、肺胞や終末細気管支にサーファクタントの老廃物が貯留し、呼吸不全に陥る希少肺疾患である。PAP の約 90%を占める自己免疫性肺胞蛋白症(autoimmune PAP; aPAP)は、GM-CSF 自己抗体(GM-CSF autoantibody; GMAb)による肺胞マクロファージの成熟障害が起き、サーファクタントクリアランス能が低下するため、肺胞内にサーファクタントの老廃物が蓄積して発症する。しかし、多数症例の横断的、後ろ向き研究の結果から、血液および肺胞洗浄液中の GMAb 濃度は、aPAP の重症度とは相関せず、予後予測因子にもならないことが報告されている。本疾患の病因は自己抗体であるにも関わらず、通常自己免疫疾患の治療に用いられ抗体価を下げる作用があるステロイド薬は効果がなく、むしろ重症度を増悪させる(申請者ら, 文献 1)。全肺洗浄術は aPAP の標準治療として実施されているが、術の数ヵ月後に改善する例や非洗浄肺の改善例を経験する。さらに aPAP の自然寛解例もしばしば観察される。これらのことより、GMAb 以外の液性成分の変化により、肺胞マクロファージが活性化され病勢を改善させている可能性があると仮説を立てた。

2. 研究の目的

PAP における病勢や予後に関与する液性因子をみつけだすこと。

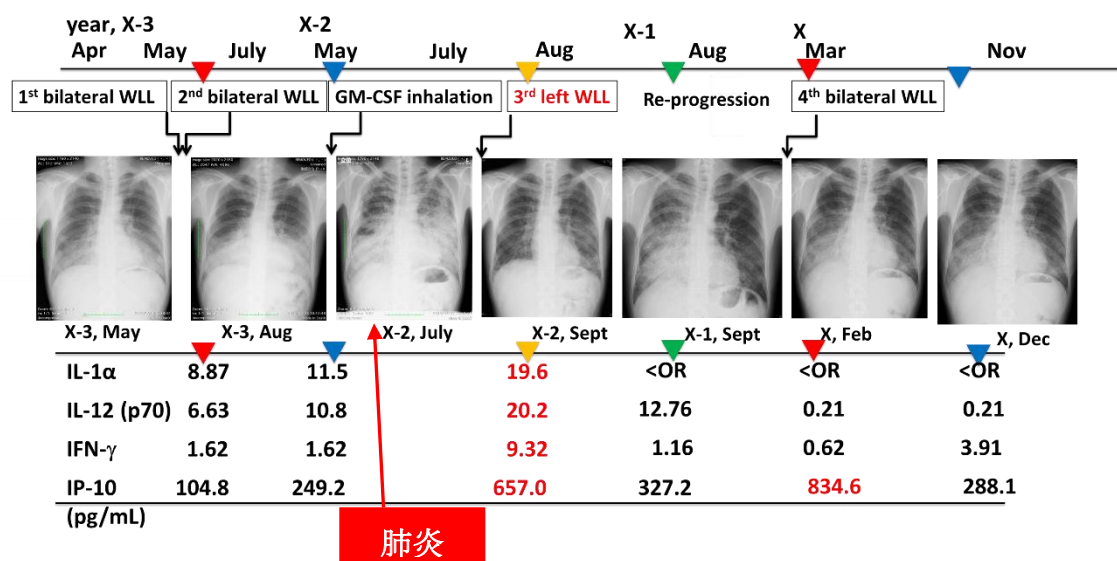
3. 研究の方法

2013 年 4 月から 2020 年 3 月までの間に新潟大学医歯学総合病院およびさいたま赤十字病院を受診した aPAP の 22 例においてカルテより臨床情報を入手。患者より血清を得て、LuminexR/マルチプレックス R サスペンションアレイを用いて、網羅的に 38 種類のサイトカインパネル解析を行った。解析は Spearman の順位相関係数を用いた。難治重症例で軽快と増悪を繰り返した aPAP の 1 例では増悪時と改善時を含めて 3 年間で 6 回の測定を行い検討した。遺伝性肺胞蛋白症(Hereditary PAP; hPAP)の 1 例で全肺洗浄後に著明な改善を認め、全肺洗浄の前後でいくつかのサイトカインの変化を確認した。皮膚筋炎に伴う間質性肺炎の経過中に aPAP を発症した 1 例では既報の皮膚筋炎に伴う間質性肺炎におけるサイトカインの傾向と比較した。

4. 研究成果

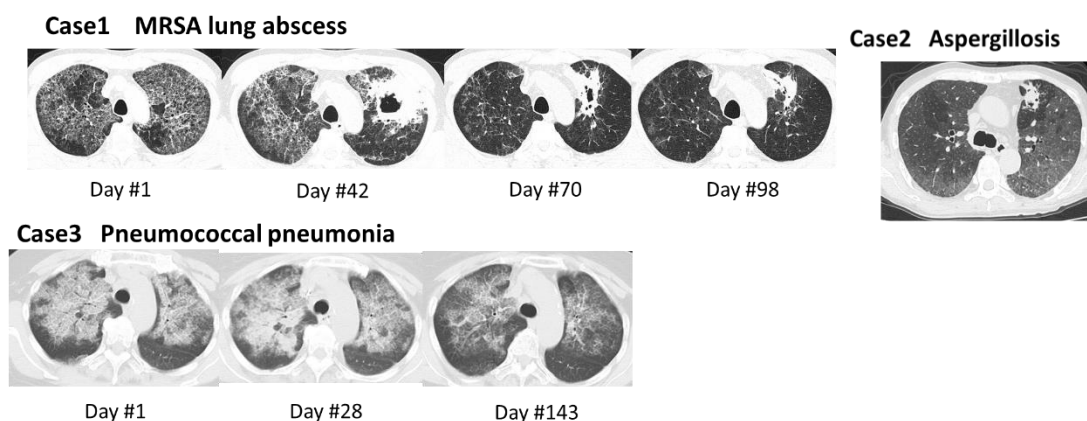
今回、自己免疫性肺胞蛋白症 22 例における 66 検体の血清において、本疾患の病勢に影響を及ぼすサイトカインを明らかにすることを目的として、サイトカインプロファイルを調べた。15 例においては 1 症例複数回の血清で検討した。難治時重症例の 1 例では増悪時と改善時を含めて 3 年間で 6 回の測定を行い、病勢の改善時に INF- γ 、IL-1 α 、IP-10 の上昇を認めた。これはマクロファージが M1 マクロファージ側に分化することが関与している印象であった(図 1)。

図 1



このため、他の 21 例においても前記サイトカインに加え IL-4、IL-10、IL-13 といった M2 マクロファージへの分化に関与するサイトカインに注目して病勢とサイトカインの変動を検討した。22 例中経過中に改善を示したのが 11 例、悪化したのが 10 例、不変であったのが 4 例であった。3 例は悪化と改善を認めた。これらの症例においてサイトカイン濃度と病勢との検討を行ったが、現在までのところ網羅的解析において一切の傾向を見いだせていない。前記症例とは別の 1 例では改善時に INF- γ 、IL-1 α 、IP-10 の上昇を認めた。この 2 例では肺炎を併発していた。過去の報告でも別の方法で本疾患におけるサイトカインの検討は行われているが、病勢マーカーとなるサイトカインは特定されていない。一方で感染症併発後に本疾患が改善する現象を認めることは我々が既報している(文献 1)。このことより、何らかのサイトカインもしくは M1/M2 マクロファージの分化が病勢に影響を及ぼしている可能性は低い、肺の感染症により様々な炎症性サイトカインが産生されることは病勢に影響が及ぶ可能性があると考えられた。このため、肺炎を含めた肺の感染症合併症例について画像の検討を行うこととした。新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センターの肺胞蛋白症に関するデータベースより肺の感染症合併症例後に PAP の陰影が改善した症例を 10 例抽出した。代表的な 3 例を提示する。

図 2



1 例目は MRSA 肺膿瘍併発の第 42 病日に左肺の陰影が改善傾向を示し、その後に両肺の改善を認めている。2 例目は肺アスペルギローマを併発しているが、この病変周囲での陰影が目立たない。3 例目は右肺に肺炎球菌肺炎を併発しているがその後に両肺野の陰影の改善を認めている。現在まで、肺の感染症合併後に PAP が改善した症例をまとめた報告は存在しない。マクロファージの機能不全が本態である本症において肺の感染症併発は重症化しやすく危険ではあるが、その後に改善することがあるということを確認できた。これは、感染症併発により肺胞マクロファージが活性化したためであると思われ、今回の検討では前記の 2 例で IFN- γ 等の M1 マクロファージへ誘導する炎症性サイトカインの上昇を確認できたことになる。このため、PAP における病勢や予後に関与する液性因子の特定はできなかったが、感染症併発による炎症性サイトカインの産生は病勢を改善させる一因であると思われた。

GM-CSF レセプター α 鎖異常の遺伝性肺胞蛋白症(Hereditary PAP; hPAP)の 1 例においては、全肺洗浄後に著明な病勢の改善を確認でき、全肺洗浄前後でいくつかのサイトカインの変化を確認できた。IL-2、IL-5、IL-17 は全肺洗浄後の減少を確認できたが、IL-3、M-CSF は変化を認めなかった(文献 2)。更には、患者より採取した好酸球と対照の健常者より得た好酸球に対して In vitro で IL-3 および IL-5 を投与すると、患者の好酸球において過剰な接着能の増強を認めた(文献 3)。しかし、これらのサイトカインに関連する知見より、なんらかの生理学的共通点を見つけることはできず、病勢マーカーをみいだすことはできなかった。

皮膚筋炎に併発した間質性肺炎で IL-6、IL-8、TNF- α 、IP-10 が高値であって(文献 4)、IP-10 が疾患活動性への関与が疑われるとの報告がある(文献 5)。これと自験例の皮膚筋炎に併発した間質性肺炎に aPAP を併発した症例につきサイトカインの傾向を検討した。しかし、サイトカインの変化を自験例と比較して傾向をみつけだすことはできなかった。しかし、自験例と同様に、自己免疫性疾患に対するステロイド治療中に PAP を認めた症例において既報の 7 例をまとめた(文献 6)。この結果、ステロイド薬投与期間が数ヶ月から数年の症例ではステロイド薬減量で PAP の改善を認め、投与期間が数年から 10 年以上に及ぶ症例ではステロイド薬の減量のみでは改善せず全肺洗浄術まで要していたことを見出した。ステロイドは病勢悪化の因子であるが、長期投与例ではやめただけでは病勢は改善しない。このことは、単に炎症性サイトカインが分泌されるのか、否かのみによって病勢が変化するのではないと思われる。

以上より、何らかの特定のサイトカインもしくは M1/M2 マクロファージの分化が病勢に影響を及ぼしている可能性は低い、肺の感染症により様々な炎症性サイトカインが産生されることは病勢の改善に関与している可能性が高いと考えられた。しかし、これは病勢に関与する一因で

あって、全てを説明することはできないと思われた。

- 文献1: Akasaka K, et al. Outcome of corticosteroid administration in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis: a retrospective cohort study. *BMC Pulm Med.* 12;15:88. 2015
- 文献2: Ito M, Akasaka K, et al. Elderly-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis and its cytokine profile. *BMC Pulm Med.* 17;17:40. 2017
- 文献3: Uchida Y, Akasaka K, et al. Modified eosinophil adhesion in pulmonary alveolar proteinosis caused by CSF2RA deletion. *Allergol Int.* 68S:S14-S16. 2019
- 文献4: Gono T, Kaneko H, et al. Cytokine profiles in polymyositis and dermatomyositis complicated by rapidly progressive or chronic interstitial lung disease. *Rheumatology (Oxford)*;53:2196-203. 2014
- 文献5: Asakawa K, Takada T, et al. Comparison of cytokine profiles between anti-ARS antibody-positive interstitial lung diseases and those with anti-MDA-5 antibodies. *Clin Rheumatol.* 2020 Jul;39(7):2171-2178.
- 文献6: Sato S, Akasaka K, et al. Autoimmune pulmonary alveolar proteinosis developed during immunosuppressive treatment in polymyositis with interstitial lung disease: a case report. *BMC Pulm Med.* 2020;20:84.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hirano T, Ohkouchi S, Tode N, Kobayashi M, Ono M, Satoh T, Mitsuishi Y, Watanabe A, Tabata M, Irokawa T, Ogawa H, Sugiura H, Kikuchi T, Akasaka K, Tazawa R, Inoue Y, Nakata K, Kurosawa H, Ichinose M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Peripheral alveolar nitric oxide concentration reflects alveolar inflammation in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ERJ Open Res.	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1183/23120541.00071-2017. eCollection 2018 Jan.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ohkouchi S, Akasaka K, Ichiwata T, Hisata S, Iijima H, Takada T, Tsukada H, Nakayama H, Machiya J, Irokawa T, Ogawa H, Shibata Y, Ichinose M, Ebina M, Nukiwa T, Kurosawa H, Nakata K, Tazawa R.	4. 巻 8
2. 論文標題 Sequential Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Inhalation after Whole-Lung Lavage for Pulmonary Alveolar Proteinosis. A Report of Five Intractable Cases.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ann Am Thorac Soc.	6. 最初と最後の頁 1298-1304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1513	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ito M, Nakagome K, Ohta H, Akasaka K, Uchida Y, Hashimoto A, Shiono A, Takada T, Nagata M, Tohyama J, Hagiwara K, Kanazawa M, Nakata K, Tazawa R	4. 巻 40
2. 論文標題 Elderly-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis and its cytokine profile	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Pulm Med	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12890-017-0382-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchida Yoshitaka, Nakagome Kazuyuki, Tazawa Ryushi, Akasaka Keiichi, Ito Masayuki, Haga Yoshiyuki, Komiyama Ken-ichiro, Soma Tomoyuki, Nakata Koh, Nagata Makoto	4. 巻 68
2. 論文標題 Modified eosinophil adhesion in pulmonary alveolar proteinosis caused by CSF2RA deletion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 S14 ~ S16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2019.05.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato S., Akasaka K., Ohta H., Tsukahara Y., Kida G., Tsumiyama E., Kusano K., Oba T., Nishizawa T., Kawabe R., Yamakawa H., Amano M., Matsushima H., Takada T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Autoimmune pulmonary alveolar proteinosis developed during immunosuppressive treatment in polymyositis with interstitial lung disease: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12890-020-1110-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Keiichi Akasaka, Tomotaka Nishizawa, Tomohiro Oba, Kazumasa Ohashi, Rie Kawabe, Hideaki Yamakawa, Shintaro Satoh, Masako Amano, Hidekazu Matsushima, Toshinori Takada
2. 発表標題 Disease Activity in Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis Analyzed by a Multiplex Immunoassay System.
3. 学会等名 23th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 A Case of Exogenous Lipoid Pneumonia Caused by Sesame Oil Pulling Successfully Treated with Whole Lung Lavage.
2. 発表標題 Keiichi Akasaka, Yuta Tsukahara, Tomotaka Nishizawa, Tomohiro Oba, Masako Amano, Hidekazu Matsushima
3. 学会等名 American Thoracic Society 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤坂圭一, 太田啓貴, 森田喜久子, 木田言, 塚原雄太, 積山慧美里, 西沢知剛, 大場智広, 川辺梨恵, 山川英晃, 佐藤新太郎, 天野雅子, 松島秀和
2. 発表標題 当院で経験した自己免疫性肺胞蛋白症9例における画像所見の検討
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤坂圭一、塚原雄太、栗岩早希、西沢知剛、大場智広、川辺梨恵、佐藤新太郎、天野雅子、松島秀和。
2. 発表標題 全肺洗浄術が著効したごま油うがいによる外因性リポイド肺炎の1例。
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田義孝、中込一之、田澤立之、赤坂圭一、芳賀佳之、小宮山謙一郎、杣知行、中田光、永田真。
2. 発表標題 GM-CSF受容体鎖変異による成人発症遺伝性肺胞蛋白症における好酸球接着能。
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1. Keiichi Akasaka, Kazumasa Ohashi, Tmotaka Nishizawa, Tomohiro Oba, Rie Kawabe, Shintaro Satoh, Masako Amano, Kazuhide Matsushima, Toshinori Takada
2. 発表標題 Disease Activity in Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis Analyzed by a Multiplex Immunoassay System.
3. 学会等名 American Thoracic Society, May 20 2017, Washington D.C, USA. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 2. Hitoshi Tsuyuzaki, Kanji Uchida, Yuho Tamai, Keiichi Akasaka, Toshio Ichiwata, Koh Nakata, Yoshikazu Inoue, Yoshitsugu Yamada
2. 発表標題 Change in Distribution of Pulmonary Blood During Whole Lung Lavage in Patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis: A Simulation-Based Study.
3. 学会等名 American Thoracic Society, May 20 2017, Washington D.C, USA. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 3. Ryushi Tazawa , Kazuhide Nakagaki , Yuko Ito , Mariko Iizuka , Atsushi Hashimoto , Ryu Nakano , Takahiro Tanaka , Keiichi Akasaka , Shiho Takeuchi , Koh Nakata
2. 発表標題 Chronic Inhalation of Recombinant Human Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) and GM-CSF Antibody in Nonhuman Primates.
3. 学会等名 American Thoracic Society, May 20 2017, Washington D.C, USA. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 1. 赤坂 圭一, 内田 寛治, 福田 のぞみ, 栗岩 早希, 西沢 知剛, 大場 智広, 川辺 梨恵, 佐藤 新太郎, 天野 雅子, 松島 秀和
2. 発表標題 全肺洗浄術での体位の違いによる低酸素血症の程度に関する検討.
3. 学会等名 第56回日本呼吸器学会学術講演会. 東京, 2017, 4
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 2. 田澤 立之, 中垣 和英, 伊藤 祐子, 橋本 淳史, 中野 龍, 田中 崇裕, 赤坂 圭一, 中田 光
2. 発表標題 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)慢性吸入動物での抗体中和能の推移.
3. 学会等名 第56回日本呼吸器学会学術講演会. 東京, 2017, 4
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 4. 赤坂 圭一, 塚原 雄太, 木田 言, 江本 かおり, 積山 慧美里, 栗岩 早希, 西沢 知剛, 大場 智広, 川辺 梨恵, 佐藤 新太郎, 天野 雅子, 松島 秀和
2. 発表標題 全肺洗浄術が著効したごま油うがいによる外因性リポイド肺炎の1例.
3. 学会等名 第164回日本呼吸器内視鏡学会関東支部会, 東京, 2018.3
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	26. Ryushi Tazawa, Masayuki Ito, Kazuyuki Nakagome, Keiichi Akasaka, Hiromitsu Ohta, Yoshitaka Uchida, Ayako Shiono, Toshinori Takada, Makoto Nagata, Jun Tohyama, Koichi Hagiwara, Minoru Kanazawa, Koh Nakata
2. 発表標題	Elderly-Onset Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis and CSF2RA Mutation
3. 学会等名	American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年	2016年

1. 発表者名	27. Atsushi Hashimoto, Takahiro Tanaka, Astushi Hayakawa, Yuko Itoh, Takahito Nei, Keiko Shiya, Maiko Higuchi, Kazuhide Nakagaki, Toshinori Takada, Keiichi Akasaka, Ryushi Tazawa, Koh Nakata
2. 発表標題	Light Chain Genotype Analysis of GM-CSF Autoantibody in Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis by Next Generation Sequencing
3. 学会等名	American Thoracic Society, (国際学会)
4. 発表年	2016年

1. 発表者名	60. 赤坂 圭一, 石山 貴章, 大橋 和政, 鈴木 和夫, 日比 美智子, 中込 一之, 高田 俊範
2. 発表標題	片側肺の全肺洗浄術で対側肺の改善を認めた肺胞蛋白症の検討
3. 学会等名	第55回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年	2016年

1. 発表者名	61. 田澤 立之, 中垣 和英, 伊藤 祐子, 橋本 淳史, 田中 崇裕, 赤坂 圭一, 中田 光
2. 発表標題	びまん性肺疾患の基礎 カニクイザルでのGM-CSF吸入薬の反復吸入投与と抗体産生
3. 学会等名	第55回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年	2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本呼吸器学会びまん性肺疾患学術部会/厚生労働省難治性疾患政策研究事業びまん性肺疾患に関する調査研究班	4. 発行年 2017年
2. 出版社 克誠堂出版	5. 総ページ数 9
3. 書名 気管支肺胞洗浄【BAL】法の手引き 改訂第3版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高田 俊範 (Takada Toshonori) (40361919)	新潟大学・医歯学総合病院・特任教授 (13101)	
研究分担者	田澤 立之 (Tazawa Ryushi) (70301041)	新潟大学・医歯学総合病院・准教授 (13101)	
研究分担者	中田 光 (Nakata Koh) (80207802)	新潟大学・医歯学総合病院・教授 (13101)	
研究分担者	谷野 功典 (Tanino Yoshinori) (10443863)	福島県立医科大学・医学部・准教授 (21601)	
研究分担者	福島 康次 (Fukushima Yasutsugu) (00254996)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	