

機関番号：12601  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2010  
 課題番号：19390403  
 研究課題名（和文） 血清中顆粒球マクロファージコロニー刺激因子自己抗体の同定及びその生理学的役割の解明  
 研究課題名（英文） Identification and characterization of autoantibody against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in healthy individuals.  
 研究代表者  
 山田 芳嗣（YAMADA YOSHITSUGU）  
 東京大学・医学部附属病院 教授  
 研究者番号：30166748

## 研究成果の概要（和文）：

1999年に中田らが報告した特発性肺胞蛋白症患者血清中に高濃度検出される抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)自己抗体が健常者血清にも存在することを証明し、その抗体が中和活性をもち、血清中で免疫複合体を形成することで大部分のGM-CSFを不活性化していること、また濃度依存性に好中球機能を制御している可能性などを示して、この抗体が健常生体における、GM-CSFの活性緩衝作用を持っている可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）:Autoantibodies against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) were reported by Nakata et al. in 1999. We detected low level of anti-GM-CSF autoantibody in serum from healthy individuals. It has neutralizing capacity and forms circulating immune complex in the serum, and may modulate myeloid cell immune functions. Anti-GM-CSF autoantibody may have a buffering effect to modulate GM-CSF bioactivity in vivo.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：周術期管理学，GM-CSF，自己抗体，好中球機能，急性肺傷害，SIRS，サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性肺胞蛋白症患者の血清中および気管支肺胞洗浄液中に、サイトカインである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に対する中和自己抗体が高濃度検出される。

(2) この抗体はGM-CSFに対する強い中和活性を持ち、GM-CSF活性を完全に枯渇させ、これが本疾患の病因である可能性がある。

(3) GM-CSF ノックアウトマウスでは同様の肺病変が認められ、GM-CSF シグナルが本疾患の病因として重要であることが推測されるが、抗GM-CSF自己抗体が本疾患の病因物質であることの直接的な証明は無い。またこれまで抗GM-CSF自己抗体濃度とその病勢との相関は認められていない。

(4) 特発性肺胞蛋白症は稀少疾患のため、世界中で統一された形での抗体価測定法は確

立されていない。

(5) 健常者には抗 GM-CSF 抗体が従来検出されないと言われていたが、健常供血者血清から精製される、イムノグロブリン製剤中には高頻度で抗 GM-CSF 自己抗体が検出される。

以上の知見より、GM-CSF 自己抗体が、肺胞蛋白症発症の病因物質である可能性が強く示唆される。

また、抗 GM-CSF 自己抗体は健常者血清にも微量存在している可能性がある。もしそうだとすると、抗 GM-CSF 自己抗体は生体において何らかの役割を担っており、肺胞蛋白症は、健常時に存在しない異常な蛋白の出現というよりも、健常者にも存在する抗体の異常増加している状態であると考えられる。

## 2. 研究の目的

- (1) 抗 GM-CSF 自己抗体を大量投与することが、肺内のマクロファージ機能を抑制し、肺胞蛋白症発症の病因となることを証明する。
- (2) 抗 GM-CSF 自己抗体は、健常者血清にも微量存在することを証明する。
- (3) 抗 GM-CSF 自己抗体の生体における生理学的役割を明らかにする
- (4) 抗 GM-CSF 自己抗体および GM-CSF シグナルが、炎症状態でどのような挙動を示すかを明らかにする

## 3. 研究の方法

- (1) 特発性肺胞蛋白症患者より抽出した抗 GM-CSF 自己抗体をカニクイザルに大量長期間投与して、肺胞マクロファージ機能の変化、および肺の組織所見から肺胞蛋白症類似の病変が出現するかどうかを確認する。これは共同研究者である、シンシナティ小児病院研究所肺生化学部門のトラップネル教授のグループと共同で行う。
- (2) 抗 GM-CSF 自己抗体を定量する Sandwich Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) の感度、正確性、再現性を向上させる。
- (3) 健常者血清から、プロテイン G カラム、酸性環境での限外濾過、GM-CSF アフィニティカラムを通して抗 GM-CSF 自己抗体を同定する。
- (4) 健常者血清由来のイムノグロブリン製剤から抽出した抗 GM-CSF 自己抗体の中和活性を検定し、肺胞蛋白症患者血清由来の抗体と比較する。
- (5) 抗 GM-CSF 抗体の健常者における役割を明らかにするため、血清中の GM-CSF と抗 GM-CSF 抗体との免疫複合体を検出する。
- (6) 骨髄球系細胞機能を測定し、血清中の抗 GM-CSF 自己抗体価との関連を検討する。
- (7) マウス脾臓から作成したハイブリド-

マをスクリーニングし、抗 GM-CSF 抗体産生クローンを抽出し、その中和活性を検討する。  
(8) 高侵襲手術を受ける患者血液を採取して、抗 GM-CSF 抗体価の推移と術後早期回復との関連性を検討する。

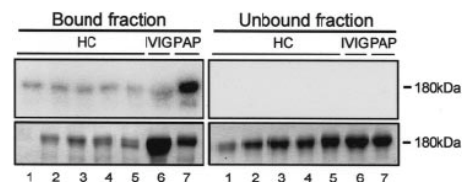
## 4. 研究成果

(1) 特発性肺胞蛋白症患者より抽出した抗 GM-CSF 自己抗体をカニクイザルに投与し、40  $\mu\text{g/ml}$  以上の血中濃度を 11 ヶ月維持させることに成功した。本研究はシンシナティ小児病院で行われ、抗 GM-CSF 抗体が肺胞蛋白症の病因物質であることを最終的に証明した画期的な成果であったが、抗 GM-CSF 抗体の精製、定量、および投与中の GM-CSF 活性の測定の面でこの成果に我々は貢献した。



(2) 抗 GM-CSF 抗体を定量する ELISA の再現性、正確性、感度を高め、それを検証した。米国食品衛生局他の推奨する、商品化する上で必要な検定をクリアする精度、再現性を得る ELISA 法であることが示された。肺胞蛋白症は稀少疾患であり、全世界的な患者の血清抗体価の統一的な測定方法の開発が必要であるが、本測定法はそれにあたるものとして現在投稿準備中である。

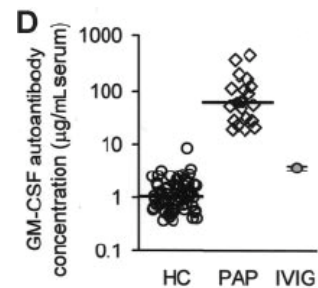
(3) 方法の (3) で記した方法により、180kDa の単一のバンドを抽出し、そのバンドが質量分析器によって IgG であることが確認された。



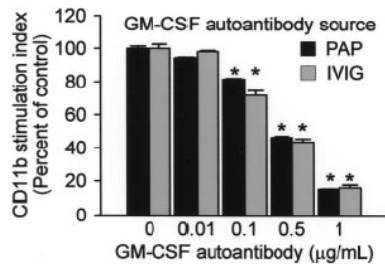
(上段) 放射ラベル GM-CSF の結合するバンド

(下段) IgG 蛋白染色

その抗体は IgG1, IgG2 優位なポリクローナル抗体で、また 72 名の健常者すべてに低濃度検出された。

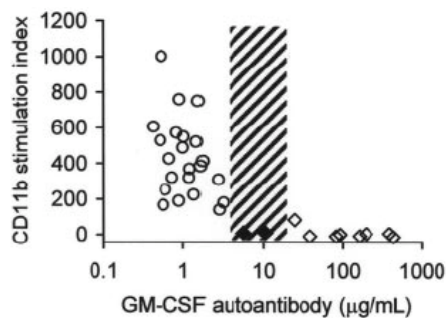


(4) イムノグロブリン製剤から抽出された抗 GM-CSF 自己抗体は、健常者血液中の好中球の GM-CSF 刺激による活性化(表面抗原 CD11b 発現の上昇)を、肺胞蛋白症患者から抽出した抗体と同程度、容量依存性に抑制した。



(5) 血清中の GM-CSF と抗 GM-CSF 抗体との免疫複合体そのものの検出は困難で、免疫複合体を SDS で処理して乖離させ、フリーになった GM-CSF を測定する検出系を開発し、血清中の全 GM-CSF を測定したところ、数ナノグラム/ml 程度の GM-CSF を検出した。これは、通常血清中で検出される GM-CSF 濃度 (0-10pg/ml) を大きく上回る量であり、血清中の GM-CSF の 99%以上は免疫複合体の状態で存在していることが示唆された。

(6) 健常者および肺胞蛋白症患者の血清中抗体濃度と、好中球機能の指標として用いた GM-CSF stimulation index (GM-CSF で好中球を刺激した時の CD11b 発現量上昇率)とを比較すると、健常者血液の中では濃度依存性に機能が抑制され、健常者のレベルを上回ると、好中球が全く活性化されなくなることが示された。



○：健常者、◇：肺胞蛋白症患者（肺病変あり）、◆：肺胞蛋白症患者（軽快患者、肺病変無し）

(7) マウスから取り出した脾臓にミエローム細胞を合体させてハイブリドーマを作製し、この中で GM-CSF に結合する抗体を賛成する 6 つのクローンを分離した。抗体価およびその性状分析を行っている。

(8) 食道癌手術を受けた患者を対象に、好中球活性化指標である CD11b stimulation

index を測定したが、術中より抑制傾向が認められ、術後 3 日後～5 日後に正常に戻るまでは抑制される傾向が認められた。しかし抗 GM-CSF 自己抗体価には大きな変化は認められなかった。

#### 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 7 件)

- ① Uchida K, Carey B, Suzuki T, Nakata K, Trapnell B. Response: Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy persons. *Blood*. 2010 Jan 14;115(2):431-3. 査読無
- ② 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 granulocyte/macrophage colony-stimulating factor autoantibodies reproduce pulmonary alveolar proteinosis in nonhuman primates. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Jul 1;182(1):49-61. 査読有
- ③ Watanabe M, Uchida K, Nakagaki K, Trapnell BC, Nakata K. High avidity cytokine autoantibodies in health and disease: pathogenesis and mechanisms. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010 Aug;21(4):263-73. 査読有
- ④ Uchida K, Nakata K, Suzuki T, Luisetti M, Watanabe M, Koch DE, Stevens CA, Beck DC, Denson LA, Carey BC, Keicho N, Krischer JP, Yamada Y, Trapnell BC. Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy subjects. *Blood*. 2009 Mar 12;113(11):2547-56. 査読有
- ⑤ Han X, Uchida K, Jurickova I, Koch D, Willson T, Samson C, Bonkowski E, Trauernicht A, Kim MO, Tomer G, Dubinsky M, Plevy S, Kugathasan S, Trapnell BC, Denson LA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies in murine ileitis and progressive ileal Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2009 Apr;136(4):1261-71. 査読有
- ⑥ Trapnell BC, Carey BC, Uchida K, Suzuki T. Pulmonary alveolar proteinosis, a primary immunodeficiency of impaired GM-CSF stimulation of macrophages. *Curr*

Opin Immunol. 2009 Oct;21(5):514-21. 査読有

⑦Sakagami T, Uchida K, Suzuki T, Carey BC, Wood RE, Wert SE, Whitsett JA, Trapnell BC, Luisetti M. Human GM-CSF autoantibodies and reproduction of pulmonary alveolar proteinosis. N Engl J Med. 2009 Dec 31;361(27):2679-81. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

①Uchida K, Nakata K. Meet the Professor Seminar; MP401: GM-CSF AUTOANTIBODY; DISCOVERY, FUNCTIONS AND FUTURE APPLICATIONS. American Thoracic Society Annual International Conference. May 16, 2010. New Orleans, Louisiana, USA

②内田寛治、張京浩、山田芳嗣. 食道癌手術患者の侵襲に応じた好中球機能低下は術後早期回復に影響する. 日本麻酔科学会学術集会. 2009年8月17日. 東京都

③ Uchida K, Chang KH, Yamada Y. Reduced Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Bioactivity with Surgical Stress Associated with Early Postoperative Complications. American Thoracic Society International Conference. May 19, 2009. San Diego, USA

④Uchida K, Yamada Y. Serologic Diagnosis of Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP). American Thoracic Society International Conference. May 18, 2009. San Diego, USA

⑤内田寛治. ワークショップ3「基礎:炎症細胞の分離と機能的解析」「好中球」. 日本アレルギー学会秋季学術集会. 2008年11月27日. 東京都

⑥内田寛治、張京浩、山田芳嗣. フローサイトメトリー法による簡易好中球活性化指標測定法の開発. 日本麻酔科学会学術集会 2008年6月12日、横浜市、神奈川県

⑦Uchida K. A Standardized, Serum-Based Approach For Diagnosing PAP. American Thoracic Society International Conference May 21, 2008. Toronto, Canada

〔図書〕(計1件)

① Uchida K, Trapnell BC. Pulmonary Alveolar Proteinosis in Interstitial Lung Diseases. European Respiratory Monograph. 2009. pp. 208-224.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 芳嗣 (YAMADA YOSHITSUGU)  
東京大学・医学部附属病院 教授  
研究者番号: 30166748

### (2) 研究分担者

張 京浩 (CHANG KYUNGHO)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 50302708  
北村 享之 (KITAMURA TAKAYUKI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 50302609  
内田 寛治 (UCHIDA KANJI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 60302709

### (3) 連携研究者 ( )

研究者番号: