

様式 C - 19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号： 12501
研究種目： 基盤研究 (C)
研究期間： 2009 ~ 2011
課題番号： 21590982
研究課題名 (和文)
特発性肺線維症急性増悪特異的自己抗体におけるペプチド・抗体療法の開発

研究課題名 (英文)
Peptides and antibodies therapy by acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis-related autoantigens

研究代表者

黒須 克志 (KUROSU KATSUSHI)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号： 20291106

研究成果の概要 (和文)：

特発性肺線維症急性増悪症例では、アポトーシス関連自己抗体が血清中および気管支肺胞洗浄液中に存在していた。抗アネキシン1抗体、抗 Bax inhibitor 1 抗体は死亡した症例に出現し、抗 Bid 抗体は急性増悪の病状の改善とともに上昇していた。抗原蛋白を用いた ELISPOT 解析および細胞内サイトカインアッセイにより、アポトーシス関連自己抗体は急性増悪症例の末梢血リンパ球の TH2免疫反応を増強し、アポトーシス細胞貪食を抑制する傾向が認められた。

研究成果の概要 (英文)：

Apoptosis-related autoantibodies were elevated in acute exacerbated patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Anti-annexin 1 and anti-Bax inhibitor 1 antibodies were elevated in poor prognosis patients with acute exacerbated IPF. Anti-Bid antibodies were elevated in good prognosis patients. By ELISPOT analysis and intra cytokine assay, autoantibodies enhanced TH2 immune reaction on peripheral lymphocytes and suppressed phagocytosis of apoptotic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺線維症

1. 研究開始当初の背景

アポトーシスによって誘導される自己抗原蛋白が強い免疫原性を有するため、特発性肺線維症急性増悪において亢進した II 型肺胞上皮のアポトーシスによる免疫反応の増強が病状の進展に重要な役割を果たしていることが推察される。我々は、肺胞上皮アポトーシス細胞から流出したアポトーシス関連自己抗原および同抗原に対する自己抗体によるマトリックスの変化が、TH2 免疫反応を増強し、特発性肺線維症の急性増悪に重要な役割を果たしているという仮説をたてている。II 型肺胞上皮癌培養株 (A549) c DNA ライブラリーを用いた SEREX (serological analysis of recombinant cDNA expression libraries) 法により、特発性肺線維症急性増悪関連自己抗体として抗アネキシン 1 抗体を検出し、自己抗体のエピトープ解析を行いエピトープ特異的 ELISA 法を確立した。抗アネキシン 1 抗体のエピトープは N 末端ペプチド内の (Ac1-26) の部分であり、Ac1-26 のペプチド自体もアネキシン 1 の生理活性を有していることが報告されている。phospholipase A2 活性の抑制は肺の線維化を著明に減少させることが知られているが、アネキシン 1 は phospholipase A2 活性を抑制することから抗アネキシン 1 抗体による phospholipase A2 活性の亢進が特発性肺線維症急性増悪に重要な役割を果たしていることが考えられる。

2. 研究の目的

SEREX 法によって発見した特発性肺線維症急性増悪特異的自己抗体に特異的なエピトープを用いた ELISA 法を用いて、特発性肺線維症の急性増悪におけるアポトーシス関連自己抗体について詳細な解析を行

い、自己抗体の意義について詳細な検討を加える。特発性肺線維症急性増悪における自己免疫反応のメカニズムの解明と免疫反応を調節するペプチド・抗体療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

特発性肺線維症急性増悪症例の末梢血から分離した CD4 陽性リンパ球をそれぞれの自己抗原蛋白 (アネキシン 1、Bax inhibitor 1、Bid 蛋白) と IL-2 および 30Gy 照射した末梢血単球と共に培養し、今回作製した自己抗原変異ペプチドを添加培養し、マイクロプレート上に固着化した抗体を用いて細胞から分泌された TH1/TH2 サイトカインを捕獲し、サイトカインが分泌された箇所を ELISPOT リーダーで解析した (ELISPOT 解析)。また、特発性肺線維症症例の末梢血より分離した単核球細胞から、dendritic cell (DC)、マクロファージ (Mφ 1 & Mφ 2) を誘導した。Jurkat 培養細胞、ひと肺胞上皮癌培養細胞 (A549)、健常者末梢血より分離した好中球を carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes) で標識し、抗 Fas IgM 抗体あるいは放射線照射によりアポトーシスを誘導した。DC、Mφ 1 または Mφ 2 マクロファージと標識アポトーシス細胞を混合し、経時的に PE 標識抗 CD14 抗体、または抗 11b 抗体を用いた 2-color flow cytometry によって DC、マクロファージ (Mφ 1、Mφ 2) における CFSE 陽性細胞の貪食能の解析を行った。我々は、アネキシン 1 N 末端ペプチド、Bid 蛋白 C 末端ペプチド、Bax inhibitor 1 に対する monoclonal 抗体を作製した。急性増悪症例の血清から抽出した自己抗体、我々の作製した monoclonal 抗体、自己抗体エピトープペプチド/アナログペプチドのアポトーシス細胞の貪食能に対する作用

を解析した。

4. 研究成果

BAL 液から得られたT細胞及びマクロファージを用いてアネキシン1のN末端ペプチドに対するT細胞のBrdU活性の測定では、アネキシン1が血清中に検出された症例の一部にN末端ペプチドによるBAL液中のT細胞の活性化が認められた。アネキシン1のN末端エピトープに対する免疫反応が特発性間質性肺炎急性増悪において重要な役割を果たしていることが示唆された。特発性肺線維症急性増悪特異的自己抗原蛋白を用いたELISPOT解析および細胞内サイトカインアッセイにより、抗アネキシン1抗原(N末端エピトープ)やBid抗原は急性増悪症例の末梢血リンパ球のTH2免疫反応を増強していることが確認された。同抗原はアポトーシス細胞貪食を抑制し、TH2免疫反応を強める傾向が認められた。付加によって、増強したTH2免疫反応の抑制するアナログペプチドや抗体の同定が可能であった。同ペプチドや抗体の付加によってマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食が回復し、すみやかなアポトーシス関連抗原の除去が観察された。急性増悪特異的自己抗原は、免疫反応をTH2の方向にシフトし、線維化を促進する傾向を有していた。肺胞上皮のアポトーシスによりII型肺胞上皮から遊離した急性増悪関連自己抗原は、抗原自体がマクロファージの抗原貪食による除去を抑制し、肺胞腔内に長期間残存することが示唆された。急性増悪関連自己抗原は急性増悪における肺の線維化に重要な役割を果たしており、アナログペプチドやsingle-chain antibodyによる急性増悪関連自己抗原に対する免疫反応の抑制は、特発性肺線維症の急性増悪における有効な治療法になり得る可能性が示唆された。

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0件)

(学会発表)(計2件)

① 黒須克志、滝口裕一、黒田文伸、坂尾誠一郎、多田裕司、笠原靖紀、田邊信宏、巽浩一郎、特発性肺線維症急性増悪における抗アネキシン1抗体の関与について、日本内科学会総会、2010年4月9日、東京国際フォーラム。

② 黒須克志、滝口裕一、湯本典夫、岡田修、黒田文伸、坂尾誠一郎、多田裕司、笠原靖紀、田邊信宏、栗山喬之、巽浩一郎、特発性肺線維症急性増悪特異的抗アネキシン1抗体の検討、日本呼吸器学会総会、2009年6月12日、東京国際フォーラム。

(図書)(計0件)

(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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒須 克志 (KUROSU KATSUSHI)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20291106

(2)研究分担者

滝口 裕一 (TAKIGUCHI YUUICHI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：30272321

巽 浩一郎 (TATSUMI KOICHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：10207061

(3) 連携研究者

なし。