

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791119

研究課題名(和文)細菌性肺炎で抗G-CSF自己抗体が好中球機能を制御するメカニズムの解析

研究課題名(英文)Anti-G-CSF autoantibodies regulate neutrophil function in patient with bacterial pneumonia

研究代表者

渡辺 雅人(Masato, Watanbe)

杏林大学・医学部・その他

研究者番号：00458902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの血液中に微量に存在する抗G-CSF自己抗体(自己抗体)を測定する方法を開発した。自己抗体は、健常者、肺炎患者の両方に存在した。肺炎患者では、診断時よりも治療開始後に自己抗体価が上昇した。自己抗体価は炎症反応の指標である、白血球、好中球、CRPと相関した。自己抗体はG-CSF活性を阻害しなかった(非中和抗体)。肺炎患者の血液中には、G-CSFと自己抗体が結合した免疫複合体が存在した。よって、自己抗体は、G-CSFの輸送蛋白として働くことがわかった。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel method to measure serum levels of anti-G-CSF autoantibody (G-CSF autoantibody) which conventional method failed to quantify. Both healthy individuals and patients with bacterial pneumonia had G-CSF autoantibodies in their sera. Serum G-CSF autoantibody levels positively correlated with white blood cell counts, neutrophil counts, and C-reactive protein levels. G-CSF autoantibodies did not neutralize G-CSF bioactivity (non-neutralizing antibody). G-CSF-autoantibody immune complex were present in sera of pneumonia patients. Thus, G-CSF autoantibodies works as carrier protein for G-CSF.

研究分野：アレルギー・免疫、呼吸器内科

キーワード：自己抗体 G-CSF 免疫複合体 細菌性肺炎

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでに我々は、健常者の血清中に、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)に対する自己抗体 (G-CSF 自己抗体)がユビキタスに存在することを明らかにした。しかし、定性的手法で存在のみを明らかにしたため、G-CSF 自己抗体の生物学的意義は不明である。

(2) G-CSF は顆粒球の増殖に関与することから、G-CSF 自己抗体は、好中球機能の機能を制御すると考えた。そこで、細菌性肺炎患者と健常者の血清を解析することで、G-CSF 自己抗体機能を明らかにしようとした。

2. 研究の目的

G-CSF 自己抗体の生物学的意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) G-CSF 自己抗体の測定系の開発。

G-CSF 自己抗体の濃縮: G-CSF を結合したカラムに血清を反応させ、カラムを洗浄後に、カラムに結合した G-CSF 結合物質を溶出した。溶出液中には、G-CSF 自己抗体が高濃度に存在し、その他の非特異的な免疫グロブリン G(IgG)は取り除かれる。

G-CSF 自己抗体の測定: G-CSF(または、リン酸バッファー [PBS]のみ)を補足抗原、抗ヒト IgG を検出抗体とした酵素免疫測定法 (ELISA)を確立した。G-CSF 自己抗体の検出には化学発光法を用い、シグナル強度は Relative light unit (RLU)であらわした。前述の方法で G-CSF 自己抗体を濃縮したサンプル中の G-CSF 自己抗体を測定した。これにより、従来の ELISA 単独の測定系よりもシグナル/ノイズ(S/N)比が格段に向上し、検出感度の高い測定系を確立した。

G-CSF 標準抗体の精製: グロブリン製剤(IVIG)を G-CSF 結合カラムに反応させ、カラムの溶出液を再度 G-CSF カラムに反応させて、高純度の G-CSF 自己抗体を精製した。これを標準抗体として上記の ELISA に用い、血液サンプル中の自己抗体価を決定した。

(2) ヒト血清中の G-CSF 自己抗体の測定。

健常者血清(N=27)、肺炎患者血清(N=50; 治療開始前、治療開始 3、7、14 日後)、 グロブリン製剤(IVIG, 6 ロット)の自己抗体価を測定した。IVIG は、IgG 10mg/ml(ヒト血清の生理的な IgG 濃度)中の自己抗体価を計算した。

(3) G-CSF 自己抗体の機能解析。

G-CSF 依存性細胞株である、M-NSF-60 細胞を培養してバイオアッセイを行った。M-NSF-60 細胞を、段階希釈した G-CSF(0、10、100、1000 pg/ml)と自己抗体(または、コントロールのヒト IgG)と共培養し、細胞の増殖を解析した。

(4) G-CSF-自己抗体免疫複合体の機能解析。

肺炎患者の血清をプロテイン G(IgG を精製す

る時に用いる)に反応させ、カラムを洗浄後、結合した IgG 成分を溶出後、透析により溶出液のバッファーを PBS に置換した。G-CSF-自己抗体複合体は、プロテイン G に結合し、溶出液中に含まれる。溶出液を添加した培地で M-NSF-60 細胞を培養し、増殖を解析した。また、G-CSF-自己抗体複合体を含む溶出液に、ラットの抗ヒト G-CSF 抗体、抗ヒト M-CSF 抗体、抗ヒト IL-3 抗体を添加した培養実験も行った。

4. 研究成果

(1) G-CSF 自己抗体の測定系の開発。

従来の ELISA 法では、G-CSF 自己抗体を測定することが出来なかった。理由は、血清中に大量に存在する非特異的な IgG がノイズとなり、G-CSF 自己抗体(IgG 抗体)のシグナルが上手く検出できないためである。そこで、自己抗体を濃縮する前処理を行った後に(図 1)、ELISA 法を行った(図 2)。 グロブリン製剤(IVIG)から、抗 G-CSF 自己抗体の標準品を精製した。

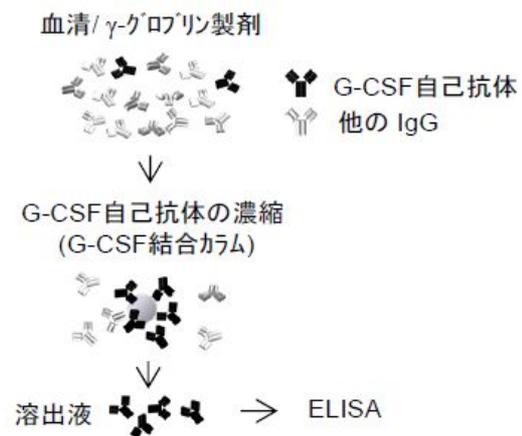


図1 G-CSF 自己抗体の測定系

血清/γ-グロブリン製剤を G-CSF を結合させたカラムに反応させ、溶出液を回収する。非特異的な IgG が除かれ、G-CSF 自己抗体濃度が高い溶出液中の G-CSF 自己抗体濃度を ELISA で測定する。

(2) G-CSF 自己抗体の測定。

G-CSF 自己抗体は、健常者、肺炎患者の両方の血清中に存在した(図 2A)。肺炎患者では、肺炎と診断した時点から治療開始後にかけて G-CSF 自己抗体価が上昇した(図 2B)。肺炎患者の治療経過中の G-CSF 自己抗体の最大値と抗体陽性率は健常者よりも高かった(図 2C,D)。肺炎患者の G-CSF 自己抗体価は、肺炎と診断した時点の炎症の指標(白血球数、好中球数、CRP)と相関した(表 1)。よって、細

菌感染症による、好中球性の炎症が、G-CSF 自己抗体の産生と関連していると考えられた。

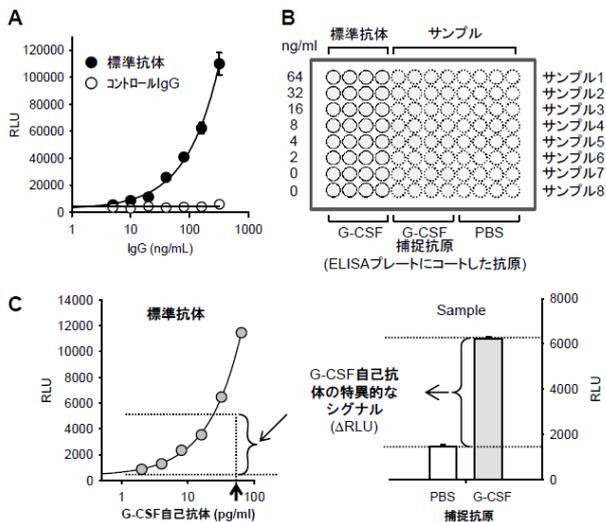


図2 G-CSF 自己抗体の測定

(A) 標準抗体の G-CSF 結合特異性。標準抗体のシグナルは濃度依存性に高く、コントロール IgG (IVIg) のシグナルは低いため、標準抗体の G-CSF 結合特異性は高い。(B) ELISA プレートのサンプルと標準抗体の配置。(C) G-CSF 自己抗体価の求め方。サンプルを G-CSF または PBS をコートしたウエルに反応させ、RLU(バックグラウンドを差し引いた G-CSF 自己抗体のみのシグナル)を求め、標準曲線から G-CSF 自己抗体濃度を求める。

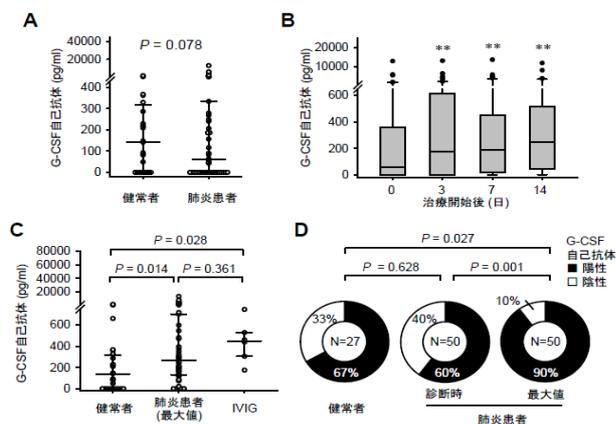


図3 ヒト血清中の G-CSF 自己抗体価

(A) 健常者(27例)、肺炎患者(50例、診断時)の抗 G-CSF 自己抗体価の比較。(B) 肺炎患者(50例)の G-CSF 自己抗体価の推移(診断時、治療開始 3、7、14 日後)。** $P < 0.01$ (vs. 診断時)。(C) 健常者(27例)、肺炎患者(50例、経過中の最大値)、IVIg(6ロット)の抗 G-CSF 自己抗体価の比較。(D) 健常者、肺炎患者の G-CSF 自己抗体陽性率の比較。

表1 抗 G-CSF 自己抗体価と炎症の指標との相関

		Laboratory data at day 0			
		WBC	Neu	CRP	
G-CSF autoantibodies	day 0	r	0.323	0.364	0.202
		P	0.022*	0.013*	0.160
		N	50	46	50
	day 3	r	0.353	0.365	0.269
		P	0.012*	0.013*	0.059
		N	50	46	50
	day 7	r	0.382	0.353	0.370
		P	0.006**	0.016*	0.008**
		N	50	46	50
	day 14	r	0.459	0.459	0.435
		P	0.002**	0.003**	0.003**
		N	44	40	44

Spearman の相関係数を計算

(3) G-CSF 自己抗体の機能解析。G-CSF 自己抗体には、G-CSF 生物活性を妨げる作用はなかった(非中和抗体)(図 3)。そこで、G-CSF 自己抗体は、G-CSF と結合することで G-CSF 活性を安定させる、輸送蛋白として働くのではないかと考えた。

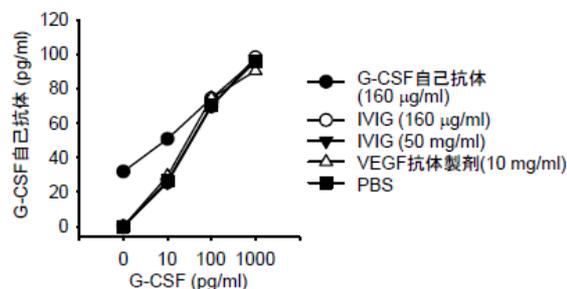


図3 G-CSF 自己抗体の中和活性

M-NSF-60 細胞に G-CSF (0、10、100、1000 pg/ml) と G-CSF 自己抗体(または、IgG 製剤)を添加し細胞の増殖を観察。G-CSF 自己抗体を添加することで、M-NSF-60 細胞の増殖は抑制されなかった。よって、G-CSF 自己抗体は日中和抗体と考えられた。

(4) G-CSF-自己抗体免疫複合体の機能解析。G-CSF-自己抗体免疫複合体(免疫複合体)を精製する方法を考案した(図 4A)。免疫複合体は、肺炎患者の血清から精製できた。免疫複合体には、G-CSF と同じ生物活性があった(図 4B)。肺炎患者の免疫複合体価は、肺炎と診断した時点よりも治療開始 3 日後が高く、治療開始 7、14 日後に測定感度以下だった。よって、G-CSF 自己抗体は、G-CSF の輸送蛋白として働くことがわかった。

(5) 結果のまとめ

ヒト血清中に G-CSF 自己抗体の測定系を確立した。G-CSF 自己抗体は健常者血清、肺炎患者血清、IVIg に広く存在した。肺炎患者では、好中球性炎症の程度と、G-CSF 自己抗体価に

相関があった。G-CSF 自己抗体は非中和抗体であり、G-CSF-自己抗体免疫複合体が G-CSF 活性を示すことから、G-CSF 自己抗体は G-CSF の輸送蛋白である。

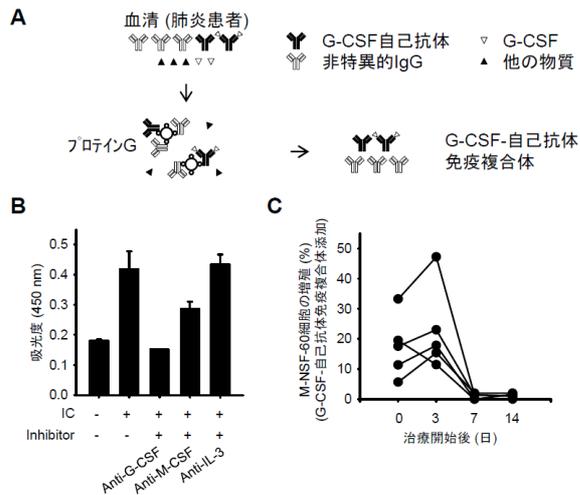


図 4 G-CSF-自己抗体免疫複合体の機能解析 (A) G-CSF-自己抗体免疫複合体の生成。血清をプロテイン G カラムに反応させ、IgG を含む溶出液を回収する。免疫複合体は、プロテイン G に結合するため、溶出液中に含まれる。(2) G-CSF 自己抗体複合体(IC)を含む溶液を添加すると、M-NSF-60 細胞の増殖が亢進する。IC の活性は、抗ヒト G-CSF 抗体で著明に抑制され、抗ヒト IL-3 抗体では抑制されない。抗ヒト M-CSF 抗体で僅かに抑制されるのは、M-NSF-60 細胞を継代する際に、M-CSF を添加しているためである。(3) 肺炎患者での、G-CSF 自己抗体免疫複合体活性の経時変化。5 例の肺炎患者では、診断時、治療開始 3 日後に活性が高く、7 日 14 日後に活性が低かった。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

[図書](計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 雅人 (MASATO, Watanabe)

杏林大学・医学部・その他

研究者番号 : 00458902

(2)研究協力者

内田 寛治 (KANJI, Uchida)

中垣 和英 (KAZUHIDE, Nakagaki)

中田 光 (KOH, Nakata)

後藤 元 (HAJIME, Goto)