

令和元年6月4日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04829

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる肺胞蛋白症重症化の分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation on molecular mechanism for progression of pulmonary alveolar proteinosis by next generation sequencing.

研究代表者

中田 光 (Nakata, Koh)

新潟大学・医歯学総合病院・教授

研究者番号：80207802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性肺胞蛋白症の患者末梢血B細胞中の抗GM-CSF自己抗体可変部の次世代シーケンサーによるcDNA data baseを作成した結果、体細胞超変異(SHM)により生じた多様性は高々0.6%であった。VH領域では6 alleleが頻繁に用いられ、J領域では、60%のクローンがJ4を用いていた。IgG型クローンは、変異率が平均7.8%と活発に変異していたが、IgM型クローンのそれは、平均0.5%と低く、ほとんどがNaive B細胞であった。以上のことから、IgG型自己抗体クローンの多様性は、由来するNaive B細胞の多様性によるものであることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗サイトカイン自己抗体が引き起こす疾患はいくつか知られているが、自己抗体濃度ばかりでなく、自己抗体の多様性が発症に重要であることがわかっている。我々は10人の自己免疫性肺胞蛋白症患者の末梢血B細胞より、自己抗体可変部のcDNA data baseを作成し、多様性の由来を調べた。その結果、重鎖、軽鎖ともに体細胞超変異はさかんに起こしているが、それが、クローンの多様性には繋がらず、クローンの多様性は、Naive B細胞の多様性に起因していることがわかった。自己免疫疾患の発症を解明する意味で重要な知見と思われた。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune pulmonary alveolar proteinosis is caused by GM-CSF autoantibodies. We investigated the mechanism for polyclonality of the autoantibody and assessed the process for the clonal selection and expansion of autoreactive B cells against GM-CSF. We first generated bias-free full-length cDNA library from the circulating GM-CSF autoreactive B cells in ten patients, then amplified Ig specific PCR amplicons, and performed the deep sequencing. Most clones belonged to each one unique B cell lineage in one-to-one relationship. Somatic hyper mutation accounted for only up to 0.6% of the total. Thus, polyclonality of Igs in GM-CSF autoreactive B cell clones was mostly dependent on the variability of naive B cell clones.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺胞蛋白症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

肺胞蛋白症(PAP)は、肺胞や終末気管支にサーファクタントが貯留し、呼吸不全が進行する希少疾患である。長年原因が不明であったが、申請者は、特発性 PAP の患者の肺や血清中に GM-CSF 自己抗体が高濃度に存在することを発見し(J. Exp. Med. 1999)、血清診断法を開発した(Am. J. Respir. Med. Crit. CareMed.2000.特許 4372904 号)。同症の自己抗体の質的・量的研究(申請者ら、BLOOD.2004)から、自己抗体が病因であり、特発性 PAP を自己免疫性 PAP と呼ぶことを提唱した(申請者ら、NewEngl.J.Med.2003)。

2009 年、米国のグループがサルに患者自己抗体を投与し発症させることに成功し、この説を裏付けた。一方では、我が国の同症の大規模コホート研究の結果から、血清自己抗体濃度は、動脈血酸素分圧から定義された重症度と関連しない(KL-6, CEA, SP-A は関連する)ことが明らかとなり(申請者ら、Am. J. Respir. Med. Crit. Care Med. 2008)、重症化には自己抗体の量ではなく、質が関係しているのではないかと考えるようになった。

そこで、本抗体を多面的に解析し、以下のことが明らかとなった。1 健常者血清中にも微量ながら普遍的に存在し、その大半が GM-CSF と複合体を形成している(申請者ら、BLOOD. 2009)。2 IgG 型ばかりでなく、IgM 型、IgA 型があるが、pathogenic なのは、IgG 型である(申請者ら、Am. J. Physiol. 2012)。3 患者 IgG 型自己抗体の軽鎖は、重症になるにつれて鎖が増加し、低下し、結果、 / 比は重症度と逆相関がある(申請者ら、Clin. Immunol. 2013)。

## 2. 研究の目的

自己免疫性 PAP の発症と重症化には、特定の配列を持った IgG 型クローンの選択的増殖が重要なのではないかと考えた。本研究では、この仮説を証明するため、様々な重症度の患者の IgG 型 GM-CSF 自己抗体可変部のアミノ酸配列を次世代シーケンスにより求め、重症化に関連する自己抗体遺伝子の分子機構を解明したい。

## 3. 研究の方法

自己免疫性 PAP10 例、健常者 5 例の末梢血単核球から、B 細胞を negative selection し、さらにビオチン化 GM-CSF と結合する細胞をアビジン MACS と反応させ、マグネットソートする。抗体遺伝子は、軽鎖、重鎖ともに 5' 側に多様なシーケンスを持つため、細胞から抽出した total RNA から 5' 端に共通配列を結合させる SMART system を用いて完全長 cDNA を作製する(5' RACE 法)。その cDNA を template として、IgG/IgA 軽鎖、重鎖の PCR amplicon を得て精製後、次世代シーケンスを行う。得られる配列は数百万万リードに及ぶが、PRINSEQ や MixCR などの Bioinformatics tool により質の低い配列を除去する。さらに抗体解析ソフト(IMG-T-High V-Quest)により、抗体可変部遺伝子配列のみをソートし、1) allele 解析、2) 体細胞超変異頻度解析 3) CDR1,2,3 の配列解析を行う。しかし、この時点で、配列には、多くの PCR エラーによる多様性を含んでいるので、Change-O software により、V allele, J allele, junction length によりクラスターに分類し、クローンに分類する。

## 4. 研究成果

10 人の患者で、重鎖が 450 万 read、軽鎖が 15 万 read の粗配列データを得、質の低い read を bioinformatic tool により除去し、国際免疫グロブリン情報システム(IMG-T/High V-QUEST)により、偽遺伝子を排除し、V、J 領域の germline 配列を推定し、かつ Junction 領域の配列を annotate した。

非常に多くの PCR error による多様性について、全ての配列を 1) 使用している V 領域アリ

ル 2) J領域アリル 3) Junction領域の塩基数 でクラスターに分類し、Hamming Distance法により、PCR error による variation をまとめ、全シーケンスをクローンにまとめた。自己抗体クローンは、IgG型が100~400クローン、IgM型が50~600クローンあることが分かった。

抗 GM-CSF 自己抗体の deep sequence を行い、得られたデータベースから判明したことは、  
1) 体細胞超変異により生じた variation は高々0.6%であり、ほとんどのクローンが異なる Naïve B 細胞に由来することがわかった。

2) 重鎖では、V領域の germline allele のうち、6 allele が頻繁に用いられ、J領域では、60%のクローンが J4 allele を用いていた。つまり、V,J領域ともに usage は偏っていた。

3) IgG型クローンは、体細胞超変異率が平均7.8%と活発に変異していたが、IgM型クローンのそれは、平均0.5%と低く、ほとんどが Naïve B 細胞であることが示唆された。

以上のことから、IgG型自己抗体クローンの多様性は、由来する Naïve B 細胞の多様性によるものであり、体細胞超変異を頻繁に起こしているが、それによる多様性は生じていないことが判明した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

Nakano R, Nakagaki K, Itoh Y, Seino U, Ueda T, Tazawa R, Kitamura N, Tanaka T, Nakata K. Assay system development to measure the concentration of sargramostim with high specificity in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after single-dose inhalation. Journal of immunological methods, 査読有, 113 1-9, 2018

Imura Y, Yukawa N, Handa T, Nakashima R, Murakami K, Yoshifuji H, Ohmura K, Ishii H, Nakata K, Mimori T, Two cases of autoimmune and secondary pulmonary alveolar proteinosis during immunosuppressive therapy in dermatomyositis with interstitial lung disease. Modern rheumatology, 査読有, 28(4) 724-729, 2018

Cho K, Yamada M, Agematsu K, Kanegane H, Miyake N, Ueki M, Akimoto T, Kobayashi N, Ikemoto S, Tanino M, Fujita A, Hayasaka I, Miyamoto S, Tanaka-Kubota M, Nakata K, Shiina M, Ogata K, Minakami H, Matsumoto N, Ariga T, Heterozygous Mutations in OAS1 Cause Infantile-Onset Pulmonary Alveolar Proteinosis with Hypogammaglobulinemia. American journal of human genetics, 査読有, 102(3) 480-486, 2018

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. Peripheral alveolar nitric oxide concentration reflects alveolar inflammation in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. ERJ open research, 査読有, 4(1), 2018

Tokura S, Akira M, Okuma T, Tazawa R, Arai T, Sugimoto C, Matsumuro A, Hirose M, Takada T, Nakata K, Ishii H, Kasahara Y, Hojo M, Ohkouchi S, Tsuchihashi Y, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Nei T, Morimoto K, Nasuhara Y, Ebina M, Ichiwata T, Tatsumi K, Yamaguchi E, Inoue Y. A Semiquantitative Computed Tomographic Grading System for Evaluating Therapeutic Response in Pulmonary Alveolar Proteinosis. Annals of the American Thoracic Society, 査読有, 14(9) 1403-1411, 2017

Ohkouchi S, Akasaka K, Ichiwata T, Hisata S, Iijima H, Takada T, Tsukada H, Nakayama H, Machiya JI, Irokawa T, Ogawa H, Shibata Y, Ichinose M, Ebina M, Nukiwa T, Kurosawa

H, Nakata K, Tazawa R. Sequential Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Inhalation after Whole-Lung Lavage for Pulmonary Alveolar Proteinosis. A Report of Five Intractable Cases. *Annals of the American Thoracic Society*, 査読有, 14(8) 1298-1304, 2017

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. Elderly-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis and its cytokine profile. *BMC pulmonary medicine*, 査読有, 17(1) 40, 2017

Takada T, Mikami A, Kitamura N, Seyama K, Inoue Y, Nagai K, Suzuki M, Moriyama H, Akasaka K, Tazawa R, Hirai T, Mishima M, Hayashida M, Hirose M, Sugimoto C, Arai T, Hattori N, Watanabe K, Tamada T, Yoshizawa H, Akazawa K, Tanaka T, Yagi K, Young LR, McCormack FX, Nakata K. Efficacy and Safety of Long-Term Sirolimus Therapy for Asian Patients with Lymphangiomyomatosis.

*Annals of the American Thoracic Society*, 査読有, 13(11) 1912-1922, 2016

Akira M, Inoue Y, Arai T, Sugimoto C, Tokura S, Nakata K, Kitaichi M, Osaka Respiratory Diseases Symposia Group. Pulmonary Fibrosis on High-Resolution CT of Patients With Pulmonary Alveolar Proteinosis. *AJR. American journal of roentgenology*, 査読有, 207(3) 544-551, 2016

Campo I, Luisetti M, Griese M, Trapnell BC, Bonella F, Grutters J, Nakata K, Van Moersel CH, Costabel U, Cottin V, Ichihata T, Inoue Y, Braschi A, Bonizzoni G, Iotti GA, Tinelli C, Rodi G, WLL International Study Group. Whole lung lavage therapy for pulmonary alveolar proteinosis: a global survey of current practices and procedures.

*Orphanet journal of rare diseases*, 査読有, 11(1) 115, 2016

Campo I, Luisetti M, Griese M, Trapnell BC, Bonella F, Grutters JC, Nakata K, Van Moersel CH, Costabel U, Cottin V, Ichihata T, Inoue Y, Braschi A, Bonizzoni G, Iotti GA, Tinelli C, Rodi G, WLL International Study Group. A Global Survey on Whole Lung Lavage in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Chest*, 査読有, 150(1) 251-253, 2016

Takaki M, Tanaka T, Komohara Y, Tsuchihashi Y, Mori D, Hayashi K, Fukuoka J, Yamasaki N, Nagayasu T, Ariyoshi K, Morimoto K, Nakata K. Recurrence of pulmonary alveolar proteinosis after bilateral lung transplantation in a patient with a nonsense mutation in CSF2RB. *Respiratory medicine case reports*, 査読有, 19 89-93, 2016

Moriyama M, Yano T, Furukawa T, Takada T, Ushiki T, Masuko M, Takizawa J, Sone H, Tazawa R, Saijo Y, Ishii H, Nakata K. Possible Involvement of Lung Cells Harboring an Abnormal Karyotype in the Pathogenesis of Pulmonary Alveolar Proteinosis Associated with Myelodysplastic Syndrome. *Annals of the American Thoracic Society*, 査読有, 12(8) 1251-1253, 2015

〔学会発表〕(計 14 件)

田澤立之, 鈴木雅, 大河内真也, 朝川勝也, 巽浩一郎, 泉信有, 石井晴之, 山口悦郎, 半田知宏, 井上義一, 富井啓介, 江田良輔, 森本浩之輔, 三上礼子, 田中崇裕, 上田隆宏, 北村信隆, 中田光. 自己免疫性肺胞蛋白症の GM-CSF 吸入療法. 第 53 回日本肺サーファクタント関連医学会, 2017

Ishii H, Tazawa R, Ishida M, Saraya T, Inoue Y, Oda M, Nakata K. The analysis of alveolar macrophage form in secondary pulmonary alveolar proteinosis complicated with myelodysplastic syndrome. ERS2017, 2017

Arai T, Kitaichi M, Akira M, Nakata K, Yamaguchi E, Setoguchi Y, Ichiwata T, Ebina M, Cho K, Tazawa R, Ishii H, Uchida K, Kida H, Sugimoto C, Matsumuro A, Hirose M, Imai Y, Kasai T, Inoue Y. Autoimmune pulmonary alveolar proteinosis complicated with infections: a nationwide surveillance study in Japan. ERS2017, 2017

Inoue Y, Arai T, Akira M, Nakata K, Yamaguchi E, Setoguchi Y, Ichiwata T, Ebina M, Cho K, Tazawa R, Ishii H, Uchida K, Kida H, Sugimoto C, Matsumuro A, Hirose M, Imai Y, Kasai T, Kitaichi M. Comorbid interstitial lung diseases and collagen vascular diseases in pulmonary alveolar proteinosis: a nationwide surveillance in Japan. ERS2017, 2017

Tazawa R, Nakagaki K, Ito Y, Iizuka M, Hashimoto A, Nakano R, Tanaka T, Akasaka K, Takeuchi S, Nakata K. Chronic Inhalation of Recombinant Human Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) and GM-CSF Antibody in Nonhuman Primates. ATS2017, 2017

Tsuyuzaki H, Uchida K, Tamai Y, Akasaka K, Ichiwata T, Nakata K, Inoue Y, Yamada Y. Change in Distribution of Pulmonary Blood During Whole Lung Lavage in Patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis: A Simulation-Based Study. ATS2017. 2017

Ohkouchi S, Hirano T, Sugiura H, Tabata M, Ogawa H, Kurosawa H, Inoue Y, Tazawa R, Nakata K, Ichinose M. Peripheral Alveolar Nitric Oxide Concentration Reflects Macrophage Inflammation of Auto-Immune Pulmonary Alveolar Proteinosis. ATS2017, 2017

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. 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. 第57回日本呼吸器学会学術講演会, 2017

中田光. Strategy for Development of New Drug against Intractable Rare Diseases. DIA 日本年会, 2016

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. ATS2016, 2016

松室昭子, 広瀬雅樹, 新井徹, 杉本親寿, 審良正則, 井上義一, 自己免疫性肺胞蛋白症患者の血清中抗 GM-CSF 自己抗体の変化と予後の関係. 第56回日本呼吸器学会学術講演会. 2016

田澤立之, カニクイザルでの GM-CSF 反復吸入投与と抗体産生. 第56回日本呼吸器学会学術講演会, 2016

田澤立之, GM-CSF 吸入療法: 前臨床試験. 第56回日本呼吸器学会学術講演会, 2016

Tazawa R, Nakagaki K, Ito Y, Hashimoto A, Tanaka T, Akasaka K, Nakata K. Inhalation of Recombinant Human Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor and Induction of the GM-CSF Antibody in Pulmonary Alveolar Proteinosis. ATS2015, 2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: 酵母由来組換えヒト GM-CSF に特異的に結合するモノクローナル抗体

発明者: 中田光, 中垣和英, 田澤立之

権利者: 国立大学法人 新潟大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-65437

出願年月日: 平成 28 年 3 月 29 日

国内外の別：国内

## 6 . 研究組織

### 研究分担者

研究分担者氏名：坂上 拓郎

ローマ字氏名：(SAKAGAMI, takuro)

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 00444159

研究分担者氏名：田澤 立之

ローマ字氏名：(TAZAWA, ryushi)

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合病院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70301041

研究分担者氏名：牛木 隆志

ローマ字氏名：(Ushiki, takashi)

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 80579152

研究分担者氏名：北村 信隆

ローマ字氏名：(KITAMURA, nobutaka)

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合病院

職名：特任教授

研究者番号(8桁): 90224972

研究分担者氏名：井上 義一

ローマ字氏名：(INOUE, yoshikazu)

所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構（近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター）

部局名：臨床研究センター

職名：臨床研究センター長

研究者番号(8桁): 90240895

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。