

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390208

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いたGM-CSF自己抗体産生機序の解明

研究課題名(英文)Investigation on mechanism for expansion of GM-CSF autoantibody 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) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血を用いた予備的検討から、患者も健常者も低親和性のIgM型自己抗体を産生するB細胞が同頻度にあるが、高親和性IgG型自己抗体を産生するB細胞は患者にのみ増加していることを見いだした。患者のリンパ組織において体細胞突然変異による高親和性/高中和能クローン出現とclass switchが亢進していると予想し、次世代シーケンサーを用いたH鎖抗体可変部の大量クローンの一挙解読により証明し、同領域のレパトアと難治化との関連の解明を目指した。結果、IgM型では、CDR1,2,3領域のシーケンスは、患者も健常者も多様であり、特定の配列の選択的増加はないが、IgG型では、同領域の選択的増殖が観られた。

研究成果の概要(英文)：It remains unclear why GM-CSF autoantibody is excessively produced in the patients. By preliminary evaluation using blood lymphocytes obtained from the patients and healthy subjects, we found high affinity IgG type GM-CSF autoantibody producing B cells expanded only in the patients but not in the healthy subjects, although IgM type producing B cells were even between them. It is suggested that class switching and clonal expansion are proceeding in the peripheral lymphnodes in the patients. To elucidate this, we tried to analyze the amino acid sequences of heavy chain variable regions using the next generation sequencing and a bioinformatics tool. Our analysis revealed that CDR1,2,and 3 amino acid sequences were variable and even in IgM clones but some specific sequences were exclusively used in IgG-type clones, suggesting oligo clonal expansion of IgG-type GM-CSF autoantibody clones in the patients.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺胞蛋白症 自己免疫疾患 肺胞マクロファージ 自己抗体 次世代シーケンス バイオインフォマティクス クラススイッチ 体細胞超変異

1. 研究開始当初の背景

肺胞蛋白症は、肺胞や終末気管支にサーファクタントの老廃物が貯留し、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、肺胞蛋白症の患者の肺や血清中に抗 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. Care Med.* 2000, 特許 4372904 号)。

GM-CSF やその受容体欠損マウスが肺胞蛋白症を発症することや、同症の自己抗体の質的量的研究 (*BLOOD*, 2004) から、自己抗体が肺の GM-CSF 活性を中和し、肺胞マクロファージの分化を障害することが病因であり自己免疫性肺胞蛋白症と呼ぶことを提唱してきた(*New Engl. J. Med.* 2003)。

最近、米国のグループがカニクイザルに患者自己抗体を投与し、発症させることに成功し、自己抗体説を裏付けた。残された最大の課題は、『何故、患者で GM-CSF 自己抗体の過剰産生が起こるのか?』である。

2. 研究の目的

IgG 型自己抗体の産生亢進の原因を突き止めることが本研究の狙いである。

次世代シーケンサーの活用により GM-CSF 自己抗体を B 細胞受容体にもつ抗体 H 鎖可変領域の mRNA 遺伝子配列の解析から、利用レパトアのプロファイリングと体細胞突然変異の頻度を患者と健常者の間で比較し、結合親和性と中和能が高い IgG 抗体が産生される機構を解明する。

抗体重鎖 mRNA 配列の一挙解読を行い、

CDR1/2 の配列から体細胞突然変異の頻度、CDR3 の配列からパラトープの解析を行った。

それによって、患者では体細胞突然変異が高頻度に関与し、また特定のクローンの増幅が起こることを証明したい。

3. 研究の方法

(1) データの収集

新潟大学医学部遺伝子倫理委員会の承認を得て、健常者、自己免疫性肺胞蛋白症患者 5 人ずつより末梢血を採取し、抗体重鎖 mRNA 配列の一挙解読を行った。

PAP 患者、健常者の IgG 型、IgM 型それぞれにおける Allele Usage と体細胞突然変異の頻度、CDR1/2 の配列から体細胞突然変異の頻度と樹形図解析を行った。

(2) データの解析

全てのデータの解析は JMP 10.0.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina)、R version 2.15.2 (2012-10-26) 並びに Microsoft Excel (Microsoft Co., Redmond, WA) によって作成した。得られたデータは、Excel ファイルに集計され、データの特徴を定義したのち、JMP ファイルもしくは CSV ファイルに変換した。取得した次世代シーケンス結果について cdhit-v4.2-2010-09-16 を用いて、98% 相同でクラスター化ファイルを作成した。続いて得られた遺伝子配列データを IMGT/V-QUEST (the international ImMunoGeneTics information system®) により解析した。また CDR1/2 の樹形図については ClustalW2 の Kimura Method を用いて作成した。

4. 研究成果

末梢血単核球より memory B 細胞を純化し、単球とともに EB virus で刺激し、IgM 型及び IgG 型抗 GM-CSF 自己抗体産生 memory B 細胞を ELISPOT 法により検出した。それによると、IgM 型クローンは、健常者と患者で同程度の頻度で存在するが、IgG 型クローンは、5 倍患者血に多く存在した。

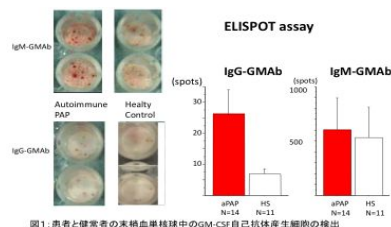


図1. 患者と健常者の末梢血単核球中のGM-CSF自己抗体産生細胞の検出

についてはほとんど使われていなかった。また健常者と PAP 患者の比較では VH1 で PAP 患者の方が使用率が高く、反対に、VH3-4 では患者の使用率が低い傾向が見られた(図 5)。

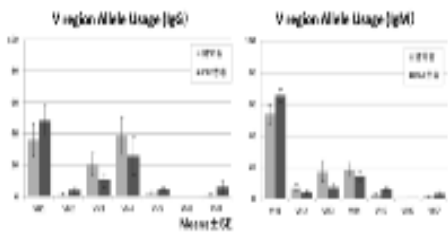


図 5 . V 領域の VH1-VH7 の Allele Usage

(3) Cluster 頻度と V-領域のアミノ酸変異数
 クラスター毎の頻度と V 領域のアミノ酸変異数を図 6 に示した。健常群においては IgG、IgM とともに変異数が少ないことが確認された。一方、PAP 患者群においては特に IgG 型の頻度の高いクラスターにおいて変異数の多い群が含まれる傾向が見られた。

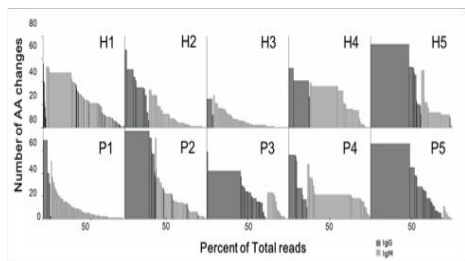


図 6 . Cluster 頻度と V 領域アミノ酸変異
 (4) クラスター read 数と V 領域の変異率

IgG 型と IgM 型それぞれのリード数と V 領域の変異率の関係を図 7 に示した。IgG 型のクラスターに含まれるリード数は 15487 reads (健常者 5501 reads, PAP 患者 9986 reads) であり、V 領域の変異率は 7.9%(健常者 7.9%, PAP 患者 7.9%) であった。

また IgM 型のクラスターに含まれるリード数は 61178 reads (健常者 29512 reads, PAP 患者 31666 reads) であり、V 領域の変異率は 2.6%(健常者 2.7%, PAP 患者 2.5%) であった (図 7)。

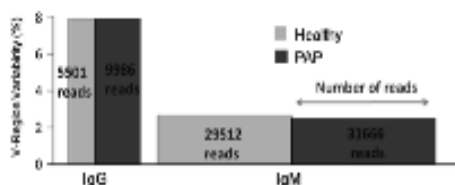


図 7 . クラスター毎の IgG/ IgM の read 数と V-Region の変異率

(5) 被験者毎の Allele Usage の重なり

被験者毎のクラスター数と Allele の組合せを図 8 に示した。その結果、健常者の H5 で 1 クラスター、PAP 患者では P1 で 1 クラスター、P3 で 2 クラスターで IgG 型、IgM 型に共通の Allele の組合せが見られた。

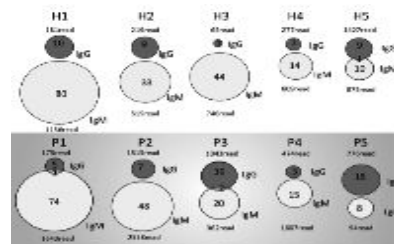


図 8 . 被験者毎の Allele Usage の重なり

(6) 樹形図解析

CDR-1、CDR2 領域について IMGT/V-QUEST により解析した配列情報について ClustalW2 の Kimura Method で樹形図を作成した。CDR-1 について健常者では発散して上手くクラスターを形成していない部分もあるが、全体として疾患群でクラスターを形成する傾向が見られた。また CDR-2 については重症疾患群で顕著なクラスターを形成し、軽症患者については健常者と同じクラスターに属する例も見られた。

考察

PAP 患者において B 細胞の変異率が高いことが確認されている。より変異がたくさん起きているにもかかわらずクラスターが収束していることから特定のクローンの集団が選択され、体細胞変異が起こっていると推定した。樹形図解析の結果、軽症 PAP 患者の頻度の高いクラスターは健常群の頻度の高いクラスターと同じ幹を形成していることから軽症 PAP 患者が重症化するにあたって、クローンの選択が進んで行くのではないかと考えられた。

Naiive B 細胞のうち GM-CSF 反応性のク

ローンは、一つは濾胞に入り、GM-CSF と GM-CSF 反応性 T 細胞の働きで、体細胞変異とクラススイッチを起こし、IgG 型 GM-CSF 自己抗体産生 B 細胞あるいは形質細胞に分化する。もう一つは、perifollicular region で GM-CSF 反応性 T 細胞の働きにより体細胞変異を起こし、IgM 型 GM-CSF 自己抗体産生 B 細胞と形質細胞となると考えられた (図 11)。

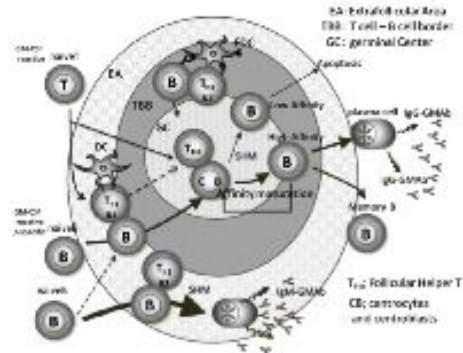


図11 . GM-CSF自己抗体の産生機構の概念図
まとめ

1 . PAP 患者 5 例、健常者 5 例の B 細胞を選択的に取得し、次世代シーケンスによる解析を行った。総リード数 123182 reads(健常者 54969 reads、PAP 患者 68213 reads)であった。CD-HIT によるクラスター化を行ったところ、525 クラスターに分類された(健常者 97 クラスター、PAP 患者 425 クラスター)。

2 . V-Region の VH1-VH7 の Allele Usage については VH1 と VH3、VH4 の比率が高く、VH6 についてはほとんど使われていなかった。また健常者と PAP 患者の比較では VH1 で PAP 患者の方が使用率が高く、反対に、VH3、VH4 では PAP 患者の使用率が低い傾向が見られた。また健常群においては IgG、IgM ともに変異数が少なく、PAP 患者群では IgG 型の頻度の高いクラスターにおいて変異数が多かった。

3 . 被験者毎のクラスター数と Allele の組合せを図 5 に示した。その結果、健常者の H5

で 1 クラスター、PAP 患者では P1 で 1 クラスター、P3 で 2 クラスターで IgG 型、IgM 型に共通の Allele の組合せが見られた。

4 . CDR-1、CDR2 領域について IMGT/V-QUEST により解析した配列情報について ClustalW2 の Kimura Method で樹形図を作成した。CDR-1 について健常者では発散して上手くクラスターを形成していない部分もあるが、全体として疾患群でクラスターを形成する傾向が見られた。また CDR-2 については重症疾患群で顕著なクラスターを形成し、軽症患者については健常者と同じクラスターに属する例も見られた。

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 6 件)

1, Akasaka K, Tanaka T, Maruyama T, Kitamura N, Hashimoto A, Ito Y, Watanabe H, Wakayama T, Arai T, Hayashi M, Moriyama H, Uchida K, Ohkouchi S, Tazawa R, Takada T, Yamaguchi E, Ichihata T1, Hirose M, Arai T, Inoue Y, Kobayashi H, Nakata K. A mathematical model to predict protein wash out kinetics during whole-lung lavage in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015; 308(2):L105-17. 査読有

2, Nakagaki K, Nunomura Y, Uchida K, Nakata K, Tazawa R. Up-regulation of cluster of differentiation (CD) 11b expression on the surface of canine granulocytes with human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). J Vet Med Sci. 2014; 76(8):1173-6. 査読有

3, Hashimoto A, Tanaka T, Itoh Y, Yamagata A, Kitamura N, Tazawa R,

Nakagaki K, Nakata K. Low concentrations of recombinant granulocyte macrophage-colony stimulating factor derived from Chinese hamster ovary cells augments long-term bioactivity with delayed clearance in vitro. Cytokine. 2014; 68(2):118-26. 査読有

4, Ishii H, Seymour JF, Tazawa R, Inoue Y, Uchida N, Nishida A, Kogure Y, Saraya T, Tomii K, Takada T, Itoh Y, Hojo M, Ichihata T, Goto H, Nakata K. Secondary pulmonary alveolar proteinosis complicating myelodysplastic syndrome results in worsening of prognosis: a retrospective cohort study in Japan. BMC Pulm Med. 2014; 14:37. 査読有

5, Handa T, Nakatsue T, Baba M, Takada T, Nakata K, Ishii H. Clinical features of three cases with pulmonary alveolar proteinosis secondary to myelodysplastic syndrome developed during the course of Behçet's disease. Respir Investig. 2014 ; 52(1):75-9. 査読有

6, Nei T, Urano S, Itoh Y, Kitamura N, Hashimoto A, Tanaka T, Motoi N, Kaneko C, Tazawa R, Nakagaki K, Arai T, Inoue Y, Nakata K. Light chain (κ/λ) ratio of GM-CSF autoantibodies is associated with disease severity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. Clin Immunol. 2013 ; 149(3):357-64. 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計2件)

1,中田光, 肺胞蛋白症(PAP),全部見える呼吸器疾患. 成美堂出版, 2013;149-151

2,中田光, 肺胞蛋白症, 内科学(第10版). 朝倉書店, 2013; 814-816

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕ホームページ等 <http://bmrctr.jp/>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

田澤 立之 (TAZAWA, Ryushi)

新潟大学医歯学総合病院・准教授

研究者番号: 70301041

(3)研究分担者

中垣 和英 (NAKAGAKI, Kazuhide)

日本獣医生命科学大学獣医学部・准教授

研究者番号: 90143635

(4)研究分担者

井上 義一 (INOUE, Yoshikazu)

近畿中央胸部疾患センター

臨床研究センター

センター長

研究者番号: 90240895

(5)研究分担者

根井 貴仁 (NEI, Takahito)

日本医科大学医学部・助教

研究者番号: 30597670

(6)研究分担者

瀧澤 淳 (TAKIZAWA, Jun)

新潟大学医歯学総合病院 准教授

研究者番号: 70463990

(7)研究分担者

横崎 恭之 (YOKOSAKI, Yasuyuki)

広島大学保健センター 准教授

研究者番号: 70463990