

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：84412

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09203

研究課題名(和文)自己免疫性肺胞蛋白症におけるB細胞活性化因子の役割と治療応用に関する研究

研究課題名(英文) A study on the role and therapeutic application of B cell activation factor in autoimmune alveolar proteinosis

研究代表者

広瀬 雅樹 (HIROSE, MASAKI)

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)・臨床研究センター・流動研究員

研究者番号：90470195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞活性化因子であるBAFFおよびAPRILが自己免疫性肺胞蛋白症(APAP)患者血清および気管支洗浄液中で健常者および肺疾患コントロールと比べ過剰産生されていることを明らかにした。肺局所のPAP病変域においてもマクロファージがBAFFおよびAPRILを発現していることを免疫組織学的に確認した。B細胞活性化因子の過剰産生を認めたことより、B細胞自体の増加も考えられたが、APAP病態においてB細胞が顕著に増加していることは認められなかった。以上の我々の結果は、APAP治療には全肺洗浄、GM-CSF吸入、B細胞活性化因子抑制という集学的治療の必要性を示唆するものであると考える。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that B cell activation factors, BAFF and APRIL, were overproduced in the patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis (APAP) in serum and bronchial alveolar lavage fluid compared to healthy subjects and other lung diseases. And we also confirmed that alveolar macrophages express BAFF and APRIL in the PAP lesion immunohistochemically. As a result of overproduction of B cell activating factor, an increase in B cells was considered but a remarkable increase could not be confirmed. Our results suggest that the need for multidisciplinary treatment such as total lung lavage, inhalation of GM-CSF, suppression of B cell activating factor is indicated for APAP treatment.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：自己免疫性肺胞蛋白症 自己免疫性疾患 B細胞

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫性肺胞蛋白症 (APAP : Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis)は抗 GM-CSF 自己抗体が病因として考えられ、サーファクタント代謝異常を伴う進行性の肺疾患である。APAP の治療は全肺洗浄、区域洗浄および GM-CSF 吸入が標準治療として行われているが治療の効果は限定的であり新たな治療方法の解明が急務である。我々は、全身性エリテマトーデス等の自己免疫性疾患患者血清中で過剰産生が報告されている B 細胞活性化因子として、B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF)、A proliferation-inducing ligand (APRIL)に注目した。

## 2. 研究の目的

全身性エリテマトーデス等の自己免疫性疾患において過剰産生が認められる B 細胞活性化因子 (BAFF, APRIL)の自己免疫性肺胞蛋白症での評価。

B 細胞活性化因子の過剰産生と共に自己免疫性肺胞蛋白症において増加が示唆される B 細胞数の評価。

自己免疫性肺胞蛋白症の標準治療である全肺洗浄、GM-CSF 吸入療法の BAFF, APRIL 値に与える影響の評価。

自己免疫性肺胞蛋白症における各種サイトカインの網羅的評価。

自己免疫性肺胞蛋白症における B 細胞活性化因子の治療ターゲットとしての評価。

## 3. 研究の方法

血清中、全肺洗浄液中の BAFF, APRIL は、それぞれ R&D Systems, eBioscience 社製の ELISA kit を使用して測定を行う。免疫組織学的評価は ABC サンドイッチ法を用いて評価する。得られた測定値の意義は臨床データを用いて統計学的に評価を行う。

末梢血、肺胞洗浄液中に含まれる B 細胞数はフローサイトメトリー法を用いて評価する。

血清中の各種サイトカイン濃度は Bio-Rad 社製の Bio-Plex を用いて網羅的に解析を行う。

本研究によって得られた結果、関連文献を用いて総合的に評価する。

## 4. 研究成果

自己免疫性肺胞蛋白症患者血清中の BAFF, APRIL 値は健常者と比べ有意に過剰産

生されていることを確認した ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.05$ )。

自己免疫性肺胞蛋白症においては血清中のみならず気管支肺胞洗浄液中における BAFF, APRIL 値も肺疾患コントロールと比べ有意に高値であることを確認した ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ )。また、肺局所の PAP 病変部位にてマクロファージ等が BAFF, APRIL を産生していることを免疫組織学的に確認した。

血清中の BAFF 値は、自己免疫性肺胞蛋白症の血清マーカーである KL-6 ( $p < 0.05$ )、SP-D ( $p = 0.01$ )、SP-A ( $p < 0.0001$ )、CYFRA ( $p = 0.001$ ) と強い相関を認めた。抗 GM-CSF 自己抗体とは相関を認めなかった。また、血清中の BAFF, APRIL 値は肺機能とは相関を認めなかった。

これまで自己免疫性肺胞蛋白症病態の重症度を反映するバイオマーカーの報告はないが、気管支肺胞洗浄液中の BAFF 値が重症度と相関することを確認した ( $p < 0.05$ )。

末梢血中の CD19 ポジティブ B 細胞数は健常者と比べ増加を認めたが ( $p < 0.001$ )、CD20 ポジティブ細胞は健常者、肺疾患コントロールと比べ増減を認めなかった。肺胞洗浄液中の CD19, CD20 ポジティブ細胞は肺疾患コントロールと比べ有意に増減は認めなかった。自己免疫性肺胞蛋白症病態では B 細胞活性化因子の過剰産生は認めるが、B 細胞自体の数の増加は認めなかった。

全肺洗浄、GM-CSF 吸入療法の前後における BAFF, APRIL の有意な減少は認めなかった。しかし、一部の症例で標準治療により BAFF, APRIL 値が減少する症例が確認できた。B 細胞活性化因子減少を治療反応者と定義した際、喫煙歴が大きく影響し、非喫煙者にレスポonderが多く認められた。過去に喫煙歴がある者、現在喫煙中の者は今回の治療反応性の定義においてはノンレスポonderが多く認められた。

Th2 タイプのサイトカインである IL-5 ( $p < 0.001$ )、IL-10 ( $p < 0.001$ )が健常者と比べ過剰産生していることが確認できた。一方、Th1 タイプのサイトカインである IFN- $\gamma$  ( $p < 0.05$ )、TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$ )も健常者と比べ過剰産生していることが確認できた。

自己免疫性肺胞蛋白症に対する現行の標準治療効果は十分とは考えられない。よって、自己免疫性肺胞蛋白症病態において過剰産生を認める B 細胞活性化因子を新たな治療ターゲットとすることは有益であると考えられる。しかし、B 細胞活性化因子の阻害だけでは自己免疫性肺胞蛋白症治療効果は限定的であると考えられる。

我々は全肺洗浄による肺胞腔内の物理的クリアランス、GM-CSF 吸入による肺胞マクロファージの機能的な活性化、さらに B 細胞活性化因子の機能阻害を用いた集学的治療が自己免疫性肺胞蛋白症の治療に有益であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

- (1) Keiichi Akasaka, Takahiro Tanaka, Nobutaka Kitamura, Shinya Ohkouchi, Ryushi Tazawa, Toshinori Takada, Toshio Ichiwata, Etsuro Yamaguchi, Masaki Hirose, Toru Arai, Kentaro Nakano, Takahito Nei, Haruyuki Ishii, Tomohiro Handa, Yoshikazu Inoue and Koh Nakata. Outcome of corticosteroid administration in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis: a retrospective cohort study. BMC Pulmonary Medicine, Aug 12;15:88
- (2) Keiichi Akasaka, Takahiro Tanaka, Takashi Maruyama, Nobutaka Kitamura, Atsushi Hashimoto, Yuko Ito, Hiroyoshi Watanabe, Tomoshige Wakayama, Takero Arai, Masachika Hayashi, Hiroshi Moriyama, Kanji Uchida, Shinya Ohkouchi, Ryushi Tazawa, Toshinori Takada, Etsuro Yamaguchi, Toshio Ichiwata, Masaki Hirose, Toru Arai, Yoshikazu Inoue, Hirosuke Kobayashi, and Koh Nakata. 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, 2014 Apr;29 (Suppl 1):1-545
- (3) Kobayashi T, Arai T, Hirose M, Matsumuro A, Sugimoto C, Kitaichi M, Akira M, Inoue Y. Improvement of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after infectious episodes. Sarcoidosis Vas Diffuse Lung Dis. 2017, vol34, No1
- (4) Olivier Nunˆez · Antonio Romˆn · Simon R. Johnson · Yoshikazu Inoue · Masaki Hirose · Aˆlvoro Casanova · Gorka Ruiz de Garibay · Carmen Herranz · Gema Bueno-Moreno · Jacopo Boni · Francesca Mateo · Anna Petit · Fina Climent · Teresa Soler · August Vidal · Joseˆ Vicente Saˆnchez-Mut · Manel Esteller · Joseˆ Ignacio Lopez · Nadia Garcˆa · Anna Gumaˆ · Rauˆl Ortega · Marˆa Jesuˆs Plaˆ · Miriam Campos · Emilio Ansoˆtegui · Marˆa Molina-Molina · Claudia Valenzuela · Piedad Ussetti · Rosalˆa Laporta · Julio Ancochea · Antoni Xaubet · Marina Pollaˆn · Miguel Angel Pujana. Breast Cancer Res Treat. Study of breast cancer incidence in patients of lymphangioleiomyomatosis. 2016 Feb;156 (1):195-201
- (5) 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 Lymphangioleiomyomatosis. Ann Am Thorac Soc, 2016 Nov;13 (11): 1912-1922
- (6) Hamano, Y. Kida, H. Ihara, S. Murakami, A. Yanagawa, M. Ueda, K. Honda, O. Tripathi, L.P. Arai, T. Hirose, M. Hamasaki, T. Yano, Y. Kimura, T. Kato, Y. Takamatsu, H. Otsuka, T. Minami, T. Hirata, H. Inoue, K. Nagatomo, I. Takeda, Y. Mori, M. Nishikawa, H. Mizuguchi, K. Kijima, T. Kitaichi, M. Tomiyama, N. Inoue, Y. Kumanogoh, A.
- (7) Classification of idiopathic interstitial pneumonias using anti-myxovirus resistance-protein 1 autoantibody. Sci Rep. 2017 Feb 23;7:43201  
Kitamura, N. Seyama, K. Inoue, Y. Nagai, K. Suzuki, M. Moriyama, H. Takada, T. Tazawa, R. Hirai, T. Mishima, M. Hayashida, M. Hirose, M. Arai, T. Sugimoto, C. Hattori, N. Watanabe, K. Tamada, T. Akazawa, K. Tanaka, T. Nakata, K. Risk factors for stomatitis in patients with lymphangioleiomyomatosis during treatment with sirolimus: A multicenter investigator-initiated

prospective study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2017 Oct;26(10):1182-1189

- (8) Koba, T. Arai, T. Kitaichi, M. Kasai, T. Hirose, M. Tachibana, K. Sugimoto, C. Akira, M. Hayashi, S. Inoue, Y. Efficacy and safety of transbronchial lung biopsy for the diagnosis of lymphangiomyomatosis: A report of 24 consecutive patients. *Respirology.* 2018 Mar;23(3):331-338
- 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. Ichihata, T. Tatsumi, K. Yamaguchi, E. Inoue, Y. A Semiquantitative Computed Tomographic Grading System for Evaluating Therapeutic Response in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Ann Am Thorac Soc.* 2017 Sep;14(9):1403-1411

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) 広瀬雅樹. LAM の分子マーカーと標的治療の進展. 2015, 呼吸 34 (12-suppl):5030-5043
- (2) 広瀬雅樹, 井上義一. 自己免疫性肺胞蛋白血症血清中における B 細胞活性化因子. 2017, 分子呼吸器病, vol.21, No.1
- (3) 広瀬雅樹, 松室昭子, 杉本親寿, 新井徹, 井上義一. 2017, 日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌, 自己免疫性肺胞蛋白血症血清中における B 細胞活性化因子. 48 (1)17-17
- (4) 広瀬雅樹, 井上義一. 自己免疫性肺胞蛋白血症血清中における B 細胞活性化因子. 2018, 分子呼吸器病, vol.22, No.1

〔学会発表〕(計 件)

- (1) 広瀬雅樹. LAM の分子マーカーと標的治療の進展. 第 43 回箱根呼吸討論会, 2015
- (2) Masaki Hirose, Akiko Matsumuro, Toru Arai, Chikatoshi Sugimoto, Masanori Kitaichi, Masanori Akira, Yoshikazu Inoue. Serum B cell activating factors levels in patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Thoracic Society International Conference, 2015

- (3) 広瀬雅樹, 松室昭子, 新井徹, 杉本親寿, 審良正則, 井上義一. 自己免疫性肺胞蛋白血症における B 細胞活性化因子. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会, 2015
- (4) Masaki Hirose, Akiko Matsumuro, Toru Arai, Chikatoshi Sugimoto, Masanori Akira, Yoshikazu Inoue. Increased concentration of BAFF and APRIL in patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. Increased concentration of BAFF and APRIL in patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis American Thoracic Society International Conference, 2016.
- (5) 広瀬雅樹, 井上義一. 自己免疫性肺胞蛋白血症の血清中における B 細胞活性化因子. 第 15 回肺サーファクタント分子病態研究会. 2016.
- (6) 広瀬雅樹, 松室昭子, 杉本親寿, 新井徹, 井上義一. 自己免疫性肺胞蛋白血症の血清中における B 細胞活性化因子. 第 52 回日本肺サーファクタント・界面医学会, 2016.
- (7) 広瀬雅樹, 新井徹, 杉本親寿, 井上義一. シロリムス血中濃度測定. 第 1 回 LAM 研究会. 2016.
- (8) 広瀬雅樹, 松室昭子, 新井徹, 杉本親寿, 審良正則, 井上義一. 自己免疫性肺胞蛋白血症の血清中における B 細胞活性化因子. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 2016.
- (9) Masaki Hirose, Akiko Matsumuro, Toru Arai, Chikatoshi Sugimoto, Yoshikazu Inoue. The elevation of BAFF and APRIL in patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. Rare Lung Disease Consortium 2016.
- (10) Masaki Hirose, Akiko Matsumuro, Toru Arai, Chikatoshi Sugimoto, Yoshikazu Inoue. Serum level of B cell activating factors in patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. Asian Pacific Society of Respirology 2016.
- (11) 広瀬雅樹, 松室昭子, 新井徹, 杉本親寿, 審良正則, 井上義一. 自己免疫性肺胞蛋白血症における B 細胞活性化因子. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会, 2017.
- (12) Masaki Hirose, Akiko Matsumuro, Toru Arai, Chikatoshi Sugimoto, Masanori Akira, Kazunari Tsuyuguchi, Yoshinobu Matsuda, Maiko Naito, Yoshikazu Inoue. B cell activating factors in patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Thoracic Society International Conference, 2017.
- (13) 広瀬雅樹, 井上義一. 自己免疫

性肺胞蛋白症における B 細胞活性化因子.  
第 16 回 肺サーファクタント分子病態研究会, 2017.

- (14) 広瀬 雅樹. シロリムス投与による VEGF-D 値 変動とその意義. 平成 29 年度 日本医療研究開発機構研究費 リンパ脈管筋腫症に対するラパマイシン長期内服の効果と安全性評価のためのコホート調査班会議
- (15) Masaki Hirose, Akiko Matsumuro, Toru Arai, Chikatoshi Sugimoto, Yoshikazu Inoue. B cell activating factors in patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. Asian Pacific Society of Respiriology 2017
- (16) 広瀬雅樹、松室昭子、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における B 細胞活性化因子. 第 71 回 国立病院機構総合医学会, 2017.

〔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：  
出願年月日：  
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

広瀬 雅樹 (MASAKI HIROSE)  
独立行政法人国立病院機構 近畿中央胸部  
疾患センター 研究員  
研究者番号： 90470195

### (2) 分担協力者

井上 義一 (YOSHIKAZU INOUE)  
独立行政法人国立病院機構 近畿中央胸部  
疾患センター 臨床研究センター長