

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19415

研究課題名(和文)鳥関連過敏性肺炎の病因解明

研究課題名(英文)pathogenesis of bird-related hypersensitivity pneumonitis

研究代表者

古澤 春彦(FURUSAWA, Haruhiko)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40632154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：鳥関連過敏性肺炎は鳥抗原により発症する間質性肺炎であるが抗原となるタンパクは未だ同定されていない。今回我々は、鳥関連過敏性肺炎の原因抗原を質量分析により解析することとした。鳩糞抽出物と血清を用い、鳥関連過敏性肺炎患者と対照者の血清にてwestern blotを行ったところ、患者特異的に反応するバンドを検出、質量分析にて解析し、Immunoglobulin lambda-like polypeptide (IGLL-1)と同定した。IGLLのリコンビナントタンパクを合成し、末梢血単核球に刺激を行い抗原性をELISAとリンパ球刺激試験(LST)で検討したところ患者特異的な反応が認められた。

研究成果の概要(英文)：Bird-related hypersensitivity pneumonitis (BRHP) is an interstitial pneumonia mainly caused by avian antigen, however the causative protein was still unidentified. In the present study, we performed an immunoblot analysis using pigeon dropping extract with sera from patients with BRHP and control. Patient-specific bands were analyzed by mass spectrometry and we identified the causative antigen as Immunoglobulin lambda-like polypeptide (IGLL-1). Then we evaluated the antigenicity of IGLL-1 using recombinant protein by ELISA and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) proliferative assay. BRHP patients exhibited higher levels of serum IgG antibody against the recombinant IGLL-1 compared to the control subjects, as well as a stronger PBMCs proliferative response to the protein.

研究分野：びまん性肺疾患

キーワード：間質性肺炎 過敏性肺炎 IGLL 鳥関連過敏性肺炎

### 1. 研究開始当初の背景

過敏性肺炎は吸入抗原によるアレルギー性疾患であり、急性と慢性の病型に大別される。慢性過敏性肺炎は鳥糞や羽毛が原因となる鳥関連過敏性肺炎が全体の約半数を占め (Respir Investig 15:191.2013)、特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) と類似した臨床経過をとる。両者の鑑別が困難な症例もしばしば経験し、IPF と診断されている症例の約半数が慢性過敏性肺炎であったとの報告もあり (Lancet respir med 1:685.2013) 相当数の患者が鑑別されないまま IPF として治療されていると考えられる。IPF は有効な治療法がなく、平均予後は診断から 2.5~5 年であるが慢性過敏性肺炎も同様に予後不良であり、当研究室の検討では平均生存期間は 31 か月であった (Thorax 60:665, 2005)。一方で適切な抗原回避を行った症例は予後が大きく改善するため、適切な診断と徹底した抗原回避が極めて重要である。未だ鳥関連過敏性肺炎の原因抗原が同定されていないことが診断の大きな障害となっており、我々は抗原を同定する必要があると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、鳥関連過敏性肺炎の原因抗原を同定することである。この診断法が確立されれば原因抗原を排除する指標となるのみならず現在 IPF と誤診されている潜在的な鳥関連過敏性肺炎患者の診断につながると考えられる。

### 3. 研究の方法

鳥関連過敏性肺炎原因抗原の同定：  
ハト血清、腸、ハト糞抽出物 (pigeon dropping extract: PDE) からタンパクを抽出、SDS-PAGE 後、鳥関連過敏性肺炎患者、対照疾患患者、健常者血清を用いて Western blotting を施行した。患者特異的かつすべての材料に共通して認められる band を同定、さらに band 中に含まれるタンパクを 2 次元電気泳動で展開し、再度 Western blotting を施行した。患者特異的に反応する spot について、質量分析を行い、データベース検索によりタンパクを同定した。

同定されたタンパクの抗原性の確認：

大腸菌を用いて同定されたタンパクのリコンビナントタンパクを作製し、ELISA とリンパ球刺激試験を行い抗原性の検証を行った。また、患者、健常者の末梢血単核球をリコンビナントタンパクで刺激し、培養上清中のサイトカイン産生の変化を、multiplex cytokine assay を用いて測定し比較した。

### 4. 研究成果

Western blotting で PDE、ハト血清に共通して認められ、かつ患者特異的な spot から IGLL-1 (Immunoglobulin lambda-like polypeptide-1) が同定された (図 1)。

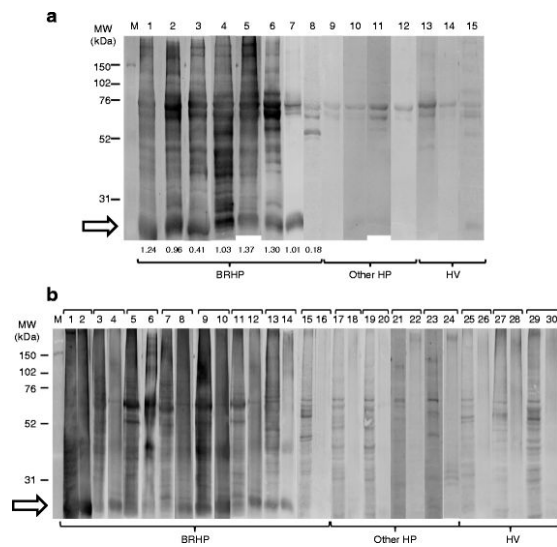


図 1 ハト血清、PDE、ハト腸の Western blotting (1 次抗体：患者血清、2 次抗体 (a) ハト血清 (b) 奇数：ハト腸、偶数：PDE)

同定されたタンパクの抗原性の確認：

6X ヒスチジンタグと融合させた IGLL のベクターを合成し、大腸菌に遺伝子導入、発現を誘導したのち Ni-NTA アガロースにて精製し IGLL-1 のリコンビナントタンパク (rIGLL) を得た。この rIGLL を用いて ELISA を行ったところ患者群で抗体価が高かった (図 2)。

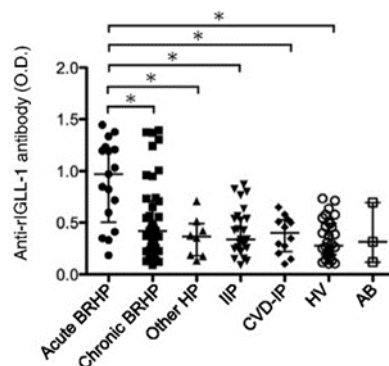


図2 rIGLL-1に対する血清IgG抗体価

患者と健常者の末梢血単核球を用いたリンパ球刺激試験を行ったところ、健常者では明らかな増加を認めなかった一方、患者の約40%で高いStimulation index値(S.I >2)を示した。

また患者PBMCとrIGLL-1を共培養し、培養上清中のサイトカインをmultiplex cytokine assayにて測定した。健常者と比較し鳥関連過敏性肺炎患者群でTNF- $\alpha$ の上昇とIL-10の低下を認め、疾患特異的にTh1優位の反応を示すことが示唆された(図3)。

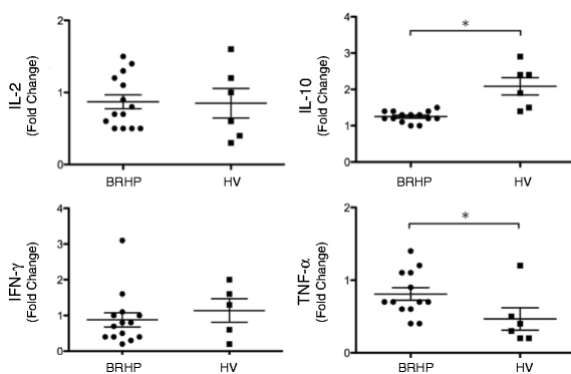


図3 rIGLL-1刺激によるサイトカイン産生

以上より、鳥関連過敏性肺炎の原因抗原としてIGLL-1を同定し、その抗原性についても確認できた。今後IGLL-1を用いたモデルマウスやIGLL-1のモノクローナル抗体の作製を進めていく予定である。

### 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11件)

Furusawa H, Sugiura M, Mitaka C, Inase N. Direct hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibre treatment for acute exacerbation of interstitial pneumonia. *Respirology*.2017;22:1357-62.

doi: 10.1111/resp.13054. 査読有

Shirai T, Furusawa H, Furukawa A, Ishige Y, Uchida K, Miyazaki Y, Eishi Y, Inase N. Protein antigen of bird-related

hypersensitivity pneumonitis in pigeon serum and dropping. *Respir Res*. 2017;18:65. doi:10.1186/s12931-017-0555-4. 査読有

Chiba S, Tsuchiya K, Akashi T, Ishizuka M, Okamoto T, Furusawa H, Tateishi T, Kishino M, Miyazaki Y, Tateishi U, Takemura T, Inase N. Chronic Hypersensitivity Pneumonitis With a Usual Interstitial Pneumonia-Like Pattern: Correlation Between Histopathologic and Clinical Findings. *Chest*. 2016;149:1473-81.

doi:10.1016/j.chest.2015.12.030. 査読有

宮崎泰成、古澤春彦【間質性肺炎・肺線維症 難解な疾患が見えてくる】 実地医家が知っておくべき治療のポイント ステロイド、免疫抑制薬の取り扱い(解説/特集).*Medical Practice*2016;34;633-7. 査読有

宮崎泰成、古澤春彦.サルコイドーシスとその周辺疾患 肺肉芽腫性疾患(総説) 日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会雑誌 2016;36;27-30. 査読有

Okamoto T, Fujii M, Furusawa H, Tsuchiya K, Miyazaki Y, Inase N. The usefulness of KL-6 and SP-D for the diagnosis and management of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respir Med*. 2015;109:1576-81.

doi:10.1016/j.rmed.2015.10.005. 査読有

Yorozu P, Furukawa A, Uchida K, Akashi T, Kakegawa T, Ogawa T, Minami J, Suzuki Y, Awano N, Furusawa H, Miyazaki Y, Inase N, Eishi Y. Propionibacterium acnes catalase induces increased Th1 immune response in sarcoidosis patients. *Respir Investig*. 2015;53:161-9.

doi: 10.1016/j.resinv.2015.02.005.2015 May 23. 査読有

Tsutsui T, Miyazaki Y, Okamoto T, Tateishi T, Furusawa H, Tsuchiya K, Fujie T, Tamaoka M, Sakashita H, Sumi Y, Inase N. Antigen avoidance tests for diagnosis of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respir Investig*. 2015;53:217-24.

doi: 10.1016/j.resinv.2015.04.003 査読有

古澤春彦、稲瀬直彦. 全身性自己免疫疾患

サルコイドーシス(解説/特集)免疫症候群  
その他の免疫疾患を含めて I;2015;705-9.  
査読有

杉浦真貴子、古澤春彦、稲瀬直彦. IPF に  
併発する難治性気胸の管理(解説/特集)呼  
吸器内科 2015;28;365-9. 査読有

古澤春彦、稲瀬直彦. 膠原病・免疫・アレ  
ルギー サルコイド シス(解説/特集)内科  
2015;115;1177-9. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

H.Furusawa, H.Saito, M.Sema,  
T.Tateishi, Y.Miyazaki, N.Inase.  
Bronchoalveolar Lavage in Chronic  
Hypersensitivity Pneumonitis and IPF.  
American thoracic society, Washington DC,  
5/23/2017

H. Saito, Y. Miyazaki, H. Furusawa, Y.  
Yamamoto, H.Yamamoto, N. Inase. A Role of  
RAGE and HMGB-1 in Chronic  
Hypersensitivity Pneumonitis. American  
thoracic society, Washington DC,  
5/21/2017

白井剛、古澤春彦、古川あすか、宮崎泰  
成、江石義信、稲瀬直彦. 鳥関連過敏性肺炎  
責任抗原の同定. 第20回 東京呼吸器病態  
研究会 11/8/2016

H.Furusawa, M.Sugiura, Y.Miyazaki,  
N.Inase. The Usefulness of Direct  
Hemoperfusion with Polymyxin  
B-Immobilized Fiber (PMX-DHP) Treatment  
on Acute Exacerbation of Interstitial  
Pneumonitis. American thoracic society,  
San Fransisco, 5/17/2016.

〔図書〕(計1件)

古澤春彦, 稲瀬直彦. II-B. びまん性間質  
性肺疾患 5. 過敏性肺炎. 気管支肺胞洗浄  
(BAL)法の手引き(改訂第3版). 克誠堂出  
版, 2017.105-110.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

古澤 春彦(FURUSAWA, Haruhiko)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 40632154

### (2)連携研究者

白井 剛(SHIRAI, Tsuyoshi)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00796617