

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：84425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09537

研究課題名(和文)びまん性肺疾患における新規疾患特異的自己抗体

研究課題名(英文) Novel disease-specific autoantibodies of diffuse interstitial lung diseases

研究代表者

木田 博(Kida, Hiroshi)

独立行政法人国立病院機構大阪刀根山医療センター(臨床研究部)・独立行政法人国立病院機構大阪刀根山医療センター・呼吸器内科部長

研究者番号：80512988

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)：蛋白アレイを使用した慢性呼吸器疾患における網羅的自己抗体検索により、特異性非特異性間質性肺炎特異的自己抗体として発見された抗MX1抗体は、抗ARS抗体と同様に慢性線維化性特異性間質性肺炎の中に潜むサブグループを標識する自己抗体である。また蛋白アレイで同定したIPFやINSIPの疾患特異的自己抗体群はグループとして、肺病理を反映すると考えられ、外科的肺生検を補完する検査になり得る。自己免疫性肺胞蛋白症患者末梢血単核球一細胞から、GM-CSF結合性B細胞受容体可変部領域遺伝子のクローニング、可変部領域配列のクラスター化、抗GM-CSFモノクローナル抗体作成、抗体機能評価系に至る系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性線維化性間質性肺炎における抗MX1抗体発見は単に慢性線維化性特異性間質性肺炎を層別化するマーカーに止まらず、ウイルス感染と間質性肺炎の分子病態学的関係を解明する手がかりとなる。IPFとINSIPにおける疾患特異的自己抗体群は、肺病理を反映し、侵襲が大きい外科的肺生検に取って変わる、或いは補完する検査となる可能性がある。末梢血B細胞からモノクローナル自己抗体を作成、可変部領域の塩基配列データベースから構造予測に基づくクラスター解析、作成したモノクローナル抗体の機能解析を行う一連の手法は、自己抗体産生による自己免疫疾患全般の病態解析、有効な抗ウイルスワクチン開発に即応可能である。

研究成果の概要(英文)：By the comprehensive analysis of serum autoantibodies among patients with chronic lung diseases using protein array, we found anti-MX1 antibody as idiopathic non-specific interstitial pneumonia (INSIP)-specific autoantibody. Similar to anti-ARS antibody, anti-MX1 antibody can cluster a sub-group of patients among chronic fibrosing idiopathic interstitial pneumonias. Both idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and INSIP-specific autoantibodies, which were identified by protein array, can mirror the lung pathology, therefore, possibly become, so called “non-invasive lung biopsy”. We established the method to clone variable region of B cell-receptor (BCR) gene, cluster the sequences of variable region of BCR, and produce monoclonal anti-GM-CSF antibodies derived from single peripheral monocytes in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis patients. We also established the method to measure the function of these antibodies.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：抗MX1抗体 抗GM-CSF抗体 蛋白アレイ IPF NSIP 自己免疫性肺胞蛋白症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自己抗体は、自己細胞や自己組織の構成成分に対して反応する抗体である。自己免疫性肺胞蛋白症における抗顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) 抗体のように、体内で産生された自己抗体が明らかに病原性を持つ場合 (病原性抗体) もあるが、慢性線維化性間質性肺炎における抗アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) 抗体のように、自己抗体の病原性が明らかになっていない自己抗体も多数存在することが知られている。疾患病変部においては、量的、質的に正常組織とは異なった構成成分が存在し、場合によっては構成成分の細胞内 subcellular localization が変化する場合も報告されている。このような変化の結果生じた自己抗体は、疾患病変部由来の破片・残骸を速やかに除去するために産生された合目的な自己抗体 (自然抗体) であるという考え方も存在している。

慢性線維化性特発性間質性肺炎は、特発性肺線維症 (IPF) と特発性非特異性間質性肺炎 (INSIP)、及び分類不能群からなる。IPF や INSIP は、顕微鏡的に炎症や線維化病変の病理学的な分布の差に基づいて分類される疾患である。IPF は診断後平均生存期間が 3~5 年の予後不良疾患であるのに対して、INSIP はステロイドや免疫抑制剤が有効な予後良好の疾患であり、臨床経過には大きな差がある。しかし、IPF や INSIP の生検サンプルにおける分子レベルでの差は明らかになっていない。同一個体から採取した複数の外科的肺生検サンプルが異なった組織パターンを示すといった例も報告されているため、今後は肺全体の構成成分の変化を反映する解析方法が必要になる。慢性線維化性間質性肺炎 (主として INSIP) においては、抗 MDA5 抗体や抗 ARS 抗体などの自己抗体の存在が知られ、これらの自己抗体が陽性になる症例は、それぞれ一定の臨床的特徴を共有することが知られている。我々は、びまん性肺疾患における自己抗体の意義を明らかにするために、IPF、INSIP、自己免疫性肺胞蛋白症 (aPAP)、サルコイドーシスを対象疾患とした自己抗体網羅的検索を、蛋白アレイを用いて行い、それぞれの疾患特異的自己抗体群を同定した。さらに INSIP 特異的自己抗体群より抗 MX1 抗体に着目し、IgG, A, M 型それぞれの抗 MX1 抗体を測定可能な ELISA を作成した。抗 MX1 抗体陽性の慢性線維化性 IIPs は抗 ARS 抗体陽性群とは独立して存在するサブグループであり、ある一定の臨床的特徴を有することを阪大病院通院中の慢性線維化性間質性肺炎患者を対象とした横断的研究によって示した。

自己免疫性肺胞蛋白症における抗 GM-CSF 抗体は病原性抗体である。しかし、抗 GM-CSF 抗体の血中濃度が aPAP の疾患重症度と相関しないことや、抗 GM-CSF 抗体は一部、健常人や他疾患の患者にも存在することが知られているため、抗 GM-CSF 抗体の病原性とは何かと言う問題が未解決のまま存在している。患者の体内に存在する抗 GM-CSF 抗体はポリクローナル抗体であるが、クローンによるエピトープの違い、アフィニティーの違いが病原性に影響するのか、同一個体内に存在する抗 GM-CSF 抗体のエピトープ多様性が病原性に影響するのか、など様々な問題が明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

- (1) 抗 MX1 抗体陽性慢性線維化性特発性間質性肺炎の臨床パラメーター、予後との関連を明らかにすること。
- (2) 抗 MX1 抗体陽性慢性線維化性特発性間質性肺炎の抗線維化剤に対する反応性を明らかにすること。
- (3) 疾患特異的自己抗体の慢性線維化性特発性間質性肺炎鑑別診断における意義を明らかにすること。
- (4) 自己免疫性肺胞蛋白症患者の末梢血より抗 GM-CSF モノクローナル抗体を作成すること。
- (5) 作成した自己抗体の病原性を明らかにすること。

### 3. 研究の方法

- (1) 2005~2009 年にかけて近畿中央呼吸器センターにて登録された慢性線維化性特発性間質性肺炎 155 症例コホートにて、血清抗 MX1 抗体測定を行い、抗 MX1 抗体と臨床パラメーター、生命予後との関連を解析した。大阪大学医学部附属病院において過去 3 回以上肺機能検査が施行されている 463 症例をレトロスペクティブに層別化するため、Group-based trajectory model によって解析した。
- (2) 抗線維化剤 (ピルフェニドン、ニンテダニブ) 内服患者の血清及び DNA を保存するとともに、多施設による前向きコホートを作成した。患者登録には Redcap を利用した。
- (3) 疾患特異的自己抗体群の生物学的特徴を明らかにするため、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway でのエンリッチメント解析を行った。
- (4) aPAP 患者末梢血単核球より GM-CSF に結合する B 細胞をソーティングし、シングル細胞に分離した。シングル細胞より RNA を抽出し、RT-PCR を行った後、B 細胞受容体 H 鎖、L 鎖可変部領域をベクターにクローニング後、シーケンスを行い、BCR レパトアデータベースを構築した。また培養細胞を用いてリコンビナント・モノクローナル抗 GM-CSF 抗体を作成した。
- (5) 作成した抗体の病原性を明らかにするために、BCR レパトアデータベースの立体構造予測に基づいたクラスター解析、Octet を用いた親和性、既存抗体との競合アッセイ、GM-CSF 依存性細胞株 (TF-1) を用いたシグナル阻害活性評価を行なった。

#### 4. 研究成果

(1) 近畿中央呼吸器センター、慢性線維化性特発性間質性肺炎 155 症例コホートより、病理学的或いは臨床的に IPF と診断された 71 例を除いた、non-IPF84 症例の中で、抗 MX1 抗体陽性者は 20 例、抗 ARS 抗体陽性者は 5 例、抗 MX1-抗 ARS どちらの抗体も陽性者は 0 例であった。抗 ARS 抗体陽性者 5 例を除いた non-IPF において、抗 MX1 抗体陽性 20 例と抗 MX1 抗体陰性 59 例の予後を比較検討したところ、抗 MX1 抗体陽性群の予後が良好であり、特に登録時の重症度 (ILD-GAP index) で補正すると統計学的に有意差を持って、抗 MX1 抗体陽性群の予後が良好であった。次に、慢性線維化性特発性間質性肺炎の予後と抗 MX1 抗体との関連に関する考察をより深めるために、大阪大学医学部附属病院において 1993~2018 年の期間に 3 回以上努力肺活量 (FVC) が施行された 463 症例を Group-based trajectory model によってレトロスペクティブに、肺機能の経過 (軌跡) にしたがって層別化した (論文作成中)。FVC の軌跡は予後に直結する指標であり、この手法を用いることにより、今後、慢性線維化性間質性肺炎における抗 MX1 抗体の意義がより明らかとなる。MX1 は I 型インターフェロンによって誘導される重要な抗ウイルス蛋白であり、我々の得た知見は、ウイルス感染と間質性肺炎の分子病態学的機序の関係を解明する手がかりとなる。

(2) 抗線維化剤 (ピルフェニドン、ニンテダニブ) に対する有効性と抗 MX1 抗体との関係を明らかにするために、Redcap システムを利用した多施設前向きコホートを作成し、現在進行中である。全例、登録時の血清と DNA を保存している。肺機能、血液検査、自覚症状や QOL など様々な指標を時間経過に沿って記録しており、抗線維化剤内服によって生じる様々な反応を明らかにするための貴重なプラットフォームとなる。

(3) 我々は、蛋白アレイ法を用いた網羅的検索により、特発性非特異性間質性肺炎 (INSIP) を含む 4 つの原因不明の慢性びまん性肺疾患の疾患特異的自己抗体群を同定した。IPF と INSIP の疾患特異的自己抗体群の生物学的特徴を明らかにするため、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway でのエンリッチメント解析を行った。IPF と INSIP、両疾患に共通する KEGG pathway は一つもなく、IPF と INSIP は生物学的に異なった特徴を持つことを分子生物学的に初めて証明した。疾患特異的自己抗体群は、疾患病変部で過剰産生、異所性産生された蛋白、non-coding RNA に対する抗体であり、その機能は十分に明らかにはされていないが、疾患病変部を構成する病理を反映していると考えられる。蛋白アレイはわずか 10 $\mu$ L の血清で可能であり、極めて非侵襲性であることより、今後、外科的肺生検に代る、或いは補完する検査として期待できる。

(4) aPAP は抗 GM-CSF 自己抗体を原因とする疾患である。抗 GM-CSF 自己抗体はポリクローナルである。我々は計 12 名の aPAP 患者の末梢血より、B 細胞単細胞ソーティング法により、これまでに計 69 個の B 細胞受容体可変部領域の DNA 塩基配列情報を得るとともに、同数の抗 GM-CSF モノクローナル抗体を作成した。

(6) DNA 塩基配列情報を用いた立体構造予測クラスター分類や作成したモノクローナル抗体を用いた対 GM-CSF 結合アフィニティー計測、GM-CSF に対する結合競合アッセイ、GM-CSF 依存的細胞株 (TF-1) を用いたシグナル阻害活性評価を行なった。研究は完結していないが、末梢血 B 細胞からモノクローナル自己抗体を作成、可変部領域の塩基配列データベースから構造予測に基づくクラスター解析、作成したモノクローナル抗体の機能解析を行う一連の手法は、自己抗体産生による自己免疫疾患全般に応用可能であり、またより有効な抗ウイルスワクチン開発にも即応用可能である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Arai Toru, Kida Hiroshi, Ogata Yoshitaka, Marumo Satoshi, Matsuoka Hiroto, Gohma Iwao, Yamamoto Suguru, Mori Masahide, Sugimoto Chikatoshi, Tachibana Kazunobu, Akira Masanori, Eda Hiro Ryuya, Hamasaki Toshimitsu, Inoue Yoshikazu, on behalf of the Osaka Acute Exacerbation of Interstitial Pneumonia Research Group	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Recombinant thrombomodulin for acute exacerbation in idiopathic interstitial pneumonias	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respirology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/resp.13514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamano Y, Kida H, Ihara S, Murakami A, Yanagawa M, Ueda K, Honda O, Tripathi LP, 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 T, Tomiyama N, Inoue Y, Kumanogoh A	4. 巻 23
2. 論文標題 Classification of idiopathic interstitial pneumonias using anti-myxovirus resistance-protein 1 autoantibody	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 43201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep43201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arai Toru, Kida Hiroshi, Ogata Yoshitaka, Marumo Satoshi, Matsuoka Hiroto, Gohma Iwao, Yamamoto Suguru, Mori Masahide, Sugimoto Chikatoshi, Tachibana Kazunobu, Akira Masanori, Inoue Yoshikazu	4. 巻 7
2. 論文標題 Efficacy of recombinant thrombomodulin for poor prognostic cases of acute exacerbation in idiopathic interstitial pneumonia: secondary analysis of the SETUP trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 e000558 ~ e000558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmj resp-2020-000558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kagawa Hiroyuki, Tsujino Kazuyuki, Yamamoto Yuji, Iwai Ami, Hara Reina, Matsuki Takanori, Fukushima Kiyoharu, Oshitani Yohei, Yoshimura Kenji, Miki Mari, Miki Keisuke, Kitada Seigo, Mori Masahide, Kida Hiroshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Acute lung injury after plasma exchange in a patient with anti-MDA5 antibody-positive, rapidly progressive, interstitial lung disease: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine Case Reports	6. 最初と最後の頁 101016 ~ 101016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmcr.2020.101016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima Kiyoharu, Tsujino Kazuyuki, Futami Shinji, Kida Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Natural Autoantibodies in Chronic Pulmonary Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1138 ~ 1138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21031138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima Kiyoharu, Kida Hiroshi	4. 巻 16
2. 論文標題 A host lncRNA regulates the innate immune response to an RNA virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 841 ~ 842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-019-0280-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 濱野芳匡、木田博、熊ノ郷淳
2. 発表標題 Interstitial pneumonia with autoimmune features (IPAF)の概念拡張の可能性を持つ抗MX1抗体
3. 学会等名 第3回骨免疫学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Arai T, Kida H, Ogata Y, Matumo S, Matsuoka H, Gohma I, Mori M, Yamamoto S, Sugimoto C, Tachibana K, Hamasaki T, Akira M, Inoue Y
2. 発表標題 Prospective single arm open labeled multicenter trial for safety and efficacy of recombinant human thrombomodulin for acute exacerbation in idiopathic interstitial pneumonias (SETUP trial)
3. 学会等名 American Thoracic Society 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新井徹、木田博、緒方嘉隆、丸毛聡、松岡洋人、郷間巖、高田創、杉本親寿、橘和延、濱崎俊光、森雅秀、加藤元一、審良正則、井上義一
2. 発表標題 特発性間質性肺炎の急性増悪に対するリコモジュリンの有効性および安全性に関する前向き多施設共同試験 (SETUP試験) ~ 中間報告 ~
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱野芳匡、木田博、熊ノ郷淳、井上義一、Yan Jiang、荒瀬尚
2. 発表標題 自己免疫性肺胞蛋白症における抗GM-CSF/HLA class II複合体抗体の意義
3. 学会等名 第56回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Arai T, Kida H, Hamano Y, Hirose M, Murakami A, Kagawa T, Matsumuro A, Koba T, Sugimoto C, Akira M, Kitaichi M, Ihara S, Kumanogoh A, Inoue Y
2. 発表標題 Serum anti-myxovirus resistance protein-1 autoantibody; a possible novel biomarker for disease severity and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis
3. 学会等名 American Thoracic Society Conference 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名	Hamano Y, Kida H, Hirose M, Matsumuro A, Suenaga T, Sarashina H, Hamasaki T, Inoue Y, Arase H, Kumanogoh A
2. 発表標題	Autoantibody against GM-CSF presented by MHC class II in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis
3. 学会等名	American Thoracic Society Conference 2016 (国際学会)
4. 発表年	2016年

1. 発表者名	木田 博, 濱野芳匡、熊ノ郷淳、井上義一、末永忠広、荒瀬尚
2. 発表標題	自己免疫性肺胞蛋白症における抗GM-CSF/HLA class II複合体抗体の意義
3. 学会等名	第2回 日本骨免疫学会
4. 発表年	2016年

1. 発表者名	Inoue Y, Nakata K, Yamaguchi E, Arai T, Sugimoto C, Setoguchi Y, Ichiwata T, Ebina M, Cho K, Tazawa R, Ishii H, Kasai T, Akira M, Uchida K, Kida H, Homma S, Tatsumi K, Azuma A, Hagiwara K, Tomii K, Kitaichi M, Suzuki M, Morimoto K, Takada T, Nakayama H, Ohkouchi S, Tanaka T, Hirose M, Matsumuro A
2. 発表標題	Establishment of the consecutive registration system for pulmonary alveolar proteinosis in Japan: Updated incidence, prevalence and surveillance for intractable cases
3. 学会等名	ERS International Congress 2016 (国際学会)
4. 発表年	2016年

1. 発表者名	Kida H, Hamano Y, Hirose M, Suenaga T, Sarashina H, Inoue Y, Arase H, Kumanogoh A
2. 発表標題	Anti-GM-CSF/HLA class II complex autoantibody in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis
3. 学会等名	Asian Pacific Society Spirology Congress 2016 (国際学会)
4. 発表年	2016年

1. 発表者名 Futami S, Inoue T, Kumanogoh A, Kurosaki T
2. 発表標題 Single-cell repertoire analysis of BCR in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis
3. 学会等名 第48回日本免疫学会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 義一  (Inoue Yoshikazu)  (90240895)	独立行政法人国立病院機構近畿中央呼吸器センター・臨床研究センター・臨床研究センター長    (84412)	