

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590882

研究課題名（和文）特発性肺線維症急性増悪特異的自己抗体の臨床応用に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Analysis of autoantibodies associated with patients of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

氏名（ローマ字）：黒須 克志（KATSUSHI KUROSU）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20291106

研究成果の概要：

抗アネキシン1抗体特異的エピトープはN末端ペプチドであり、抗アネキシン1抗体はBAL液中に好中球が著増している症例に上昇する傾向がみられた。Western blot 解析では、抗アネキシン1抗体の上昇している急性増悪症例において、N末端が欠損したアネキシン1蛋白が強くBAL液中に発現していた。アネキシン1のN末端エピトープのペプチドは、BAL中のCD4陽性細胞を刺激し増殖を亢進させる作用を有していた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺線維症

## 1. 研究開始当初の背景

アポトーシスによって誘導される自己抗原蛋白が強い免疫原性を有するため、特発性肺線維症急性増悪において亢進したII型肺胞上皮のアポトーシスによる免疫反応の増強が病状の進展に重要な役割を果たしていることが推察される。アポトーシスによって

誘導される自己抗体が強い免疫原性を有するという報告が散見されている。我々は、肺胞上皮アポトーシス細胞から流出したアポトーシス関連自己抗原および同抗原に対する自己抗体によるマトリックスの変化が、TH2免疫反応を増強し、特発性肺線維症の急性増悪に重要な役割を果たしているという

仮説をたてている。II 型肺胞上皮癌培養株 (A549) c DNA ライブラリーを用いた SEREX (serological analysis of recombinant cDNA expression libraries) 法により、特発性肺線維症急性増悪関連自己抗体として抗アネキシン 1 抗体を検出し、自己抗体のエピトープ解析を行いエピトープ特異的 ELISA 法を確立した。抗アネキシン 1 抗体のエピトープは N 末端ペプチド内の (Ac1-26) の部分であり、Ac1-26 のペプチド自体もアネキシン 1 の生理活性を有していることが報告されている。phospholipase A2 活性の抑制は肺の線維化を著明に減少させることが知られているが、アネキシン 1 は phospholipase A2 活性を抑制することから抗アネキシン 1 抗体による phospholipase A2 活性の亢進が特発性肺線維症急性増悪に重要な役割を果たしていることが考えられる。

## 2. 研究の目的

SEREX 法によって発見した特発性肺線維症急性増悪特異的自己抗体に特異的なエピトープを用いた ELISA 法を用いて、特発性肺線維症の急性増悪におけるアポトーシス関連自己抗体について詳細な解析、病状の進展との比較検討を行い、自己抗体の意義について詳細な検討を加える。特発性肺線維症急性増悪における自己免疫反応のメカニズムの解明と免疫反応を調節するペプチド・抗体療法の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

QIA express 蛋白質精製システムを用いて 6XHis タグ標識アネキシン 1 抗原蛋白を作成し、Ni-NTA HisSorb Plate による ELISA 解析で血清中および BAL 液中の自己抗体を測定した。一部の特発性肺線維症急性増悪症例においては、自己抗体の経時的な測定を行い、

病状の進展における関与について検討を行った。

さらに独自に抗アネキシン 1 N 末端エピトープに対する抗体および同部ペプチドを作成し、BAL 液中のリンパ球への刺激作用の有無について検索を行った。抗アネキシン 1 抗体の上昇のみられた特発性肺線維症急性増悪症例と抗アネキシン 1 抗体の上昇のみられなかった症例の BAL 液から CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞の分離を行った。得られたリンパ球サブセットとアネキシン 1 N 末端ペプチドおよび N 末端以外のアネキシン 1 ペプチドをそれぞれ培養し、BrdU cell proliferation assay によって細胞増殖の有無について検討を行った。

## 4. 研究成果

特発性肺線維症急性増悪症例の血清と BAL 液中に複数のアポトーシス関連自己抗体 (抗アネキシン 1 抗体、抗 Bax inhibitor 1 抗体、抗 Bid 抗体) が出現していることを発見した。興味深いことに、抗アネキシン 1 抗体、抗 Bax inhibitor 1 抗体は急性増悪後に死亡した症例に出現し、抗 Bid 抗体は急性増悪の病状の改善とともに上昇する傾向を有していた。さらに、病状が安定した特発性肺線維症や膠原病関連間質性肺炎、間質性肺炎以外の慢性肺疾患においてはこれらの抗体の増加は急性増悪症例に比較して軽度であった。増悪後に病状が改善した症例においては、抗アネキシン 1 抗体および抗 Bax inhibitor 1 抗体が低値または経過とともに減少し、抗 Bid 抗体が上昇する傾向を有していた。

Western blot 解析では、抗アネキシン 1

抗体の上昇している急性増悪症例において、N末端が欠損した short form のアネキシン 1 蛋白が強く発現していた。特発性肺線維症急性増悪症例の血清中および BAL 液中に出現した抗アネキシン 1 抗体は生理活性のある N 末端ペプチドに特異的に結合する特性を有し、N 末端ペプチド自体が特発性肺線維症症例の縦隔リンパ節や BAL 液から得られた B 細胞および T 細胞の抗体産生やサイトカイン産生を増強する作用を有していることを解明した。アネキシン 1 の N 末端エピトープのペプチドは、BAL 液中の CD4 陽性細胞を刺激し増殖を亢進させる作用を有していた。

#### 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 1 件)

Identification of annexin 1 as a novel autoantigen in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. J. Immunol. 181: 756-767;2008. Kurosu K, Takiguchi Y, Okada O, Yumoto N, Seiichiro Sakao, Yuji Tada, Yasunori Kasahara, Nobuhiro Tanabe, Koichiro Tatsumi, Michael Weiden, William N Rom, Takayuki Kuriyama. 査読 有.

[学会発表](計 2 件)

黒須克志、滝口裕一、湯本典夫、岡田修、坂尾誠一郎、多田裕次、笠原靖紀、田邊信宏、栗山喬之、巽浩一郎、特発性肺線維症急性増悪特異的抗アネキシン 1 抗体の検討、日本呼吸器学会総会、2009年6月12日、東京国際フォーラム。

黒須克志、滝口裕一、湯本典夫、岡田修、坂尾誠一郎、多田裕次、笠原靖紀、

田邊信宏、栗山喬之、巽浩一郎、特発性肺線維症急性増悪における抗アネキシン 1 抗体の関与について、日本呼吸器学会総会、2008年6月17日、神戸国際展示場。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒須 克志 (KUROSU KATSUSHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：20291106

(2) 研究分担者

滝口 裕一 (TAKIGUCHI YUJICHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30272321

巽 浩一郎 (TATSUMI KOICHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10207061

栗山 喬之 (KURIYAMA TAKAYUKI)

千葉大学・大学院医学研究院・旧教授

研究者番号：20009723

(3)連携研究者

なし。