

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17689

研究課題名(和文)慢性好酸球性肺炎における好酸球特異的自己抗体の検索

研究課題名(英文)Eosinophil-specific autoantibodies in patients with eosinophilic pneumonia

研究代表者

川端 宏樹 (Kawabata, Hiroki)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：80649054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性好酸球性肺炎は原因不明の好酸球性肺疾患である。喘息などのアレルギー疾患を高率に合併し、副腎皮質ステロイドが著効するが、30～50%の患者ではステロイドの漸減/中止に伴い再発する。慢性好酸球性肺炎の発症や病勢を反映するマーカーは知られていない。今回我々は種々の手法で慢性好酸球性肺炎の疾患マーカーとなりうる自己抗体を検出を試みた。今回の検討では最終的に疾患特異的自己抗体の検出には至らなかったが、ヒト急性骨髄芽球性白血病細胞を起源としたAML14.3D10細胞を用いた免疫沈降法の手法を確立することができた。今後はこの手法を用いて慢性好酸球性肺炎に特異的な自己抗体を検出することが可能と考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において増加の一途にあるアレルギー疾患の診断・治療のためには疾患特異的なマーカーの発見が急務である。今回我々は原因不明のアレルギー疾患である慢性好酸球性肺炎の疾患マーカーの候補として好酸球に対する自己抗体に注目し、血液中の自己抗体を検出を試みた。現状では疾患特異的自己抗体の特定に至っていないが、ヒト好酸球性白血病細胞株であるAML14.3D10を用いた自己抗体検出法を確立できた。この手法により今後疾患特異的な自己抗体が同定されれば、慢性好酸球性肺炎を含めたアレルギー疾患の病態解明につながる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Chronic eosinophilic pneumonia is an eosinophilic lung disease of unknown cause. It is associated with a high rate of asthma and other allergic diseases and responds markedly to corticosteroids, although 30-50% of patients relapse following tapering/withdrawal of steroids. There are no known markers that reflect the onset or disease course of chronic eosinophilic pneumonia. In this study, we used various methods to detect autoantibodies that may serve as disease markers for chronic eosinophilic pneumonia. Although we were unable to detect disease-specific autoantibodies in this study, we were able to establish an immunoprecipitation method using AML14.3D10 cell lines, which are derived from human acute myelogenous leukemia cells. We believe that this method can be used to detect disease-specific autoantibodies in chronic eosinophilic pneumonia in the future.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：Eosinophil Autoantibody

1. 研究開始当初の背景

原因不明の好酸球性肺疾患のひとつである慢性好酸球性肺炎は、1ヶ月以上持続する臨床症状・胸部異常陰影より疑われ、感染症などの他疾患、原因の明らかな好酸球性肺炎を除外した上で、特徴的な生検組織像、組織、BALF あるいは末梢血の好酸球増加、などにに基づき診断される(望月ら. 日呼吸会誌 40: 851 - 855, 2002)。約 50%の症例で気管支喘息を合併し(Marchand E, et al. *Medicine (Baltimore)* 77: 299-312, 1998)、副腎皮質ステロイドが著効するが、30~50%の患者ではステロイドの漸減/中止に伴い再発するため長期間のステロイド内服が必要となる(Cottin V, et al. *Allergy*, 60: 841-57, 2005 など)。慢性好酸球性肺炎は長年知られた疾患であるが、今日に至るまで、その診断や活動性の評価に有用なマーカーは知られていない。このため現状では血液バイオマーカーとして末梢血好酸球数が治療効果の参考にされているが、疾患特異性は低く、診断・治療における有用性は限られているため、慢性好酸球性肺炎の診断に有用かつ病状・治療反応性・予後を反映する疾患特異的血清マーカーの同定、確立は呼吸器診療における重要な課題である。

膠原病領域においては、疾患特異的な自己抗体が全身性エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎/多発性筋炎、関節リウマチなどのそれぞれの疾患において多数確立され、その多くは疾患の分類基準にも含まれていることから、日常的に臨床に用いられている。また、抗好中球細胞質抗体(ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibody)関連血管炎においても、ANCA が診断、活動性の指標として臨床で日常的に用いられている。ANCA は間接蛍光抗体法の蛍光染色パターンにより核周囲の p-ANCA, 細胞質の c-ANCA に分類されていたが、それぞれ MPO (myeloperoxidase) と PR3 (proteinase 3) が主要抗原として同定され、これらに対する抗体を測定する半定量的免疫アッセイが、日常臨床で診断や疾患活動性の評価のために用いられている。このように、好中球に特異的な自己抗体は既に確立され、臨床的に盛んに使われているが、好酸球に特異的な自己抗体に関してはこれまで検討されていない。

好中球の細胞死の機序の一つに NETosis がある。感染等による刺激により好中球が活性化され、細胞死に至る際に DNA と細胞質内タンパク質を混合したもの(Neutrophil extracellular DNA traps; NETs) が細胞外に網状に放出されて病原微生物を補足することで好中球が細胞死に至った後も効率よく殺菌を行うことが可能となる(Brinkmann, V. et al. *Science*, 303:153-1535, 2004)。NETosis は感染防御において有利に働くが、MPO などの細胞質内タンパク質により組織障害を来すリスクもある。また、NETs は ANCA の産生に関与していることが示唆されており(Kessenbrock K, et al. *Nat Med*, 15:623-625, 2009)、ANCA の対応抗原としてはラクトフェリン・ディフェンシンなど、好中球顆粒タンパク質が多数同定されている。

好酸球顆粒タンパク質は、好酸球顆粒内に認められるタンパク質の総称で、好酸球の脱顆粒により細胞外へ放出され寄生虫の排除を行う一方、病的状態においては臓器障害を来すことが明らかとなっている。好酸球顆粒タンパク質には major basic protein(MBP-1, MBP-2), eosinophil peroxidase(EPX), eosinophil cationic protein(ECP), eosinophil-derived neurotoxin(EDN), the Charcot-Leyden crystal protein/Galectin-10 (CLC/Gal-10) が含まれる。近年、好酸球においても、extracellular DNA traps を介した細胞死機序(EETosis)があることが報告されている(Ueki S, et al. *Blood*. 121; 2074-2083, 2013)。さらに、好酸球性気管支喘息患者の喀痰上清中で EPX に対する自己抗体が増加していることが示されており(Mukherjee M, et al. *J Allergy Clin Immunol.*, 141; 1269-1279, 2018)、我々は慢性好酸球性肺炎患者の血清中においても好酸球顆粒タンパク質に対する自己抗体が産生され、それらの自己抗体が存在することに臨床的意義があるのではないかと考え本検討を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、各種免疫学的手法を用いて慢性好酸球性肺炎症例の血清中の好酸球顆粒タンパク質に対する好酸球特異自己抗体を同定し、さらに得られた自己抗体の慢性好酸球性肺炎における意義を明らかにすることである。

3. 研究の方法

慢性好酸球性肺炎と診断した患者から文書による同意を得た上で、通常の保険診療で行われる採血と同時に自己抗体検出のための採血(8ml 程度)を行い、血清は産業医科大学呼吸器内科学及び産業保健学部成人・老年看護学の研究室で保存した。血清中の好酸球および好酸球顆粒タンパク質に対する自己抗体を後述の方法で検索した。また、併せて、既知の自己抗体や新規自己抗体の同定についても検討した。

1) 免疫沈降法 (immunoprecipitation; IP)

好酸球顆粒タンパク質に対する自己抗体の同定には、³⁵S-メチオニン標識 K562(骨髓球由来のヒト赤白血病細胞)及びヒト急性骨髓芽球性白血病細胞株を起源とし、いくつかの好酸球の特徴を備えた AML14.3D10 を用いた免疫沈降を行った。両者の免疫沈降パターンを比較し、K562 に存在せず AML14.3D10 に存在する蛋白バンドが好酸球特異的自己抗体に認識される抗原の可能性が有る。多数の血清で同一の好酸球特異的蛋白バンドが同定されれば、免疫沈降法で蛋白を精製し、質量分析で抗原の同定を行うこととした。既知の自己抗体の同定は標準血清との免疫沈降パターンの比較、必要によりウエスタンブロット、ELISA などを併用して確定することとした。

2) 酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)

好酸球特異顆粒タンパク質 (MBP-1, MBP-2, EPX, ECP, EDN, CLC/GaI-10) のリコンビナントタンパク質を抗原として ELISA を行い、好酸球顆粒タンパク質に対する自己抗体の検索を行った。また広く自己抗体について検討するため、既知の自己抗体(MDA5, Jo-1, EJ, PL-7, PL-12, KS, Ro60, Ro52, CENP-A, CENP-B, DFS70 など)の検索も併せて行った。

3) 間接蛍光抗体法 (indirect immunofluorescence; IIF)

血清中に好酸球と特異的に反応する自己抗体が存在するかどうか、その標的抗原の細胞内局在の確認のために行った。今回の検討では、自己抗体の検索で標準的に用いられるヒト培養細胞 HEp-2 細胞スライドでの検討に加えて、健常者及び慢性好酸球性肺炎患者の血液を EDTA 採血管に採取し、遠心分離後に塩化アンモニウム溶血剤を加えて白血球細胞のスライドを作成し、好酸球に特異的な自己抗体の検出を試みた。ライト・ギムザ染色で好中球、好酸球、好塩基球の区別が可能であるので、この固定標本を用いて蛍光抗体法を行い、好酸球に特異的な反応を確認した。

4. 研究成果

研究開始当初はヒト好酸球性白血病細胞株 EoL-1 で IP を行う予定であったが、培養した EoL-1 に好酸球特異顆粒タンパク質が認められなかったことから、細胞株を AML14.3D10 に変更して免疫沈降法を行った(図1.参照)。その結果、K562 を用いた従来法では認められないバンドが AML14.3D10 を使用した症例のみで 2 例認められた。最終的に 20 例の慢性好酸球性肺炎患者の血清で IP を行ったが、その 2 例以外に同様のバンドが認められた症例はなかった。

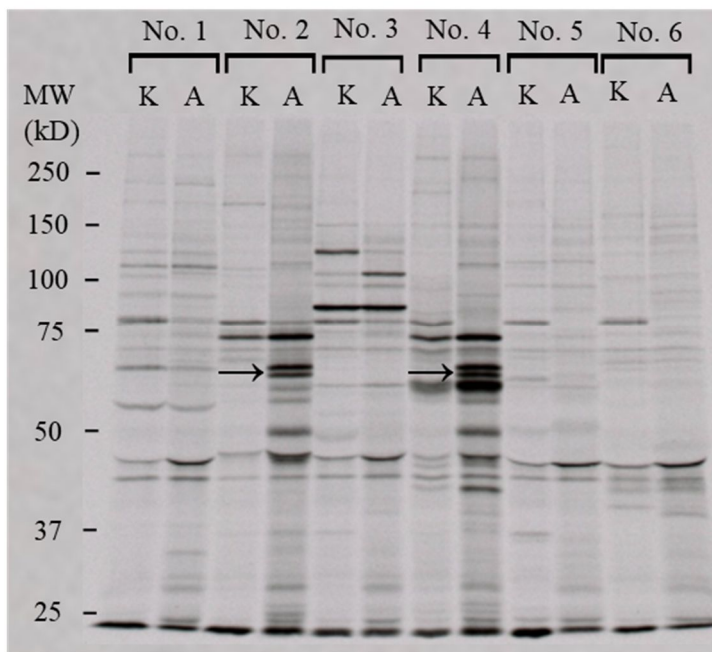


図1. 慢性好酸球性肺炎症例での免疫沈降法の一例
各レーン患者血清、縦軸は分子量を示している。
AML14.3D10を使用した免疫沈降法ではK562での従来法では認められないバンドを認めた(→)。
K:K562
A:AML14.3D10

また、EDN、CLC/GaI-10 のリコンビナントタンパクを抗原として ELISA を行ったところ、複数の患者血清で抗体価が上昇していた。しかしこれらの症例においては IP でこれらの抗原の分子量付近に共通のバンドが得られず、また IIF でも抗原の存在を証明できなかったため、これらの好酸球特異顆粒タンパク質に対する自己抗体が産生されているとは断定できなかった。

今回の検討では、最終的に IP で多数の症例で認められるようなバンドの検出には至らなかったため、質量分析法による自己抗体の同定は行わなかった。しかし我々は今回の検討で AML14.3D10 を用いた IP の手法を確立することができた。今後はこの手法を用いてより多数の慢性好酸球性肺炎症例で自己抗体の検索を行うことで、同疾患に特異的な自己抗体を検出することが可能と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroki Kawabata, Minoru Satoh, Kazuhiro Yatera	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of Rheumatoid Arthritis During Anti-Interleukin-5 Therapy in a Patient with Refractory Chronic Eosinophilic Pneumonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Asthma and Allergy	6. 最初と最後の頁 1425, 1430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/JAA.S342993	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroki Kawabata, Minoru Satoh, Tomoko Hasegawa, Kei Yamasaki, Toshinori Kawanami, Kazuhiro Yatera
2. 発表標題 Clinical significance of serum autoantibodies in patients with sarcoidosis.
3. 学会等名 第39回日本サルコイドーシス肉芽腫性疾患学会総会・世界サルコイドーシス学会合同（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------