

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461157

研究課題名(和文)びまん性肺疾患における疾患特異的自己抗体の検索

研究課題名(英文)The research on disease-specific autoantibodies in diffuse lung diseases

研究代表者

木田 博(Kida, Hiroshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80512988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：外科的肺生検を必要とする現在の特発性間質性肺炎(IIPs)診断基準は、患者負担が大きい。またIIPsは経過中、膠原病等の背景疾患が顕在化し、診断が変わるケースもしばしばである。私たちは、5-10年間の経過観察で正真正銘のIIPsを選定し、蛋白アレイ法(約8,000種の自己抗体をスクリーニングする方法)で抗MX1抗体に辿りついた。抗MX1抗体は、IIPs中、予後良好の一群患者(約17%)で陽性になった。現在のIIPs診断基準は、分子病態的観点に基づくバイオマーカーによって補完する必要がある。

研究成果の概要(英文)：The current diagnostic criteria for idiopathic interstitial pneumonia (IIPs), which need surgical lung biopsy, sometimes forces patients a big burden. In addition, the diagnosis may change when the underlying diseases, such as collagen vasucular diseases, becomes apparent, during the follow-up period. In a trial to find disease-specific autoantibodies in idiopathic non-specific interstitial pneumonia (INSIP), we found anti-myxovirus resistance-protein 1 (MX1) autoantibody. The titer of anti-MX1 autoantibody elevated in about 17% of patients with chronic fibrosing IIPs. The positivity of anti-MX1 autoantibody was associated with better prognosis among patients with non-idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). The current diagnostic criteria for IIPs must be complemented by molecular biomarker, such as the anti-MX1 autoantibody.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：MX1 INSIP IPF surgical lung biopsy protein array IIPs diagnostic criteria autoantibody

1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎 (IIPs) には異なった臨床像を持つ様々な疾患が含まれている。IIPs の中で慢性経過を辿る疾患には特発性肺線維症 (IPF) と非特異的間質性肺炎 (INSIP) がある。IPF はステロイドが無効、診断後生存期間が 3-5 年の予後不良疾患である。対照的に INSIP はステロイドが有効で、予後良好疾患である。この対照的な 2 疾患を、診断時に鑑別することは実は非常に困難であり、侵襲度の高い外科的肺生検、さらに多種職種で診断を協議する multi-disciplinary diagnosis (MDD) を必要とするなど、患者、医療者双方にとって負担が大きいものとなっている。

INSIP は、患者血清中にしばしば自己抗体が検出されることや、長期経過中に他の膠原病と診断されるケースも存在することなどから、自己免疫性疾患である可能性が示唆されてきた。INSIP に特異的な自己抗体が存在するかもしれない。またそのような自己抗体は、抗 MDA5 抗体や抗 ARS 抗体のように、INSIP の中に存在するサブグループを認識するバイオマーカーになるかも知れない。我々は研究開始当初利用可能となった、蛋白アレイという網羅的自己抗体測定方法を用いて、IPF、INSIP、自己免疫性肺胞蛋白症 (aPAP)、サルコイドーシス及び健常者の血清自己抗体スクリーニングを行うことにした。

2. 研究の目的

(1) IPF、INSIP、aPAP、サルコイドーシスの新たな疾患特異的自己抗体を発見すること。

(2) INSIP の疾患特異的自己抗体の中から、INSIP 中に存在するサブグループを認識する診断バイオマーカーを発見すること。

3. 研究の方法

(1) IPF10 名、INSIP8 名、aPAP10 名、サルコイドーシス 10 名、健常人 10 名 (計 48 名) の血清自己抗体を、蛋白アレイ法を用いて測定した。

(2) 得られた蛋白アレイデータを先行研究に従って解析し、疾患特異的自己抗体を選び出した。選び出した疾患特異的自己抗体を TargetMine を用いてバイオインフォマティクス手法で解析した。

(3) INSIP 特異的自己抗体から抗 myxovirus resistance-protein 1 (MX1) 抗体に着目した。免疫沈降実験を行うために FLAG タグを付着した MX1 発現ベクターを作成した。

(4) 肺組織における MX1 蛋白局在を明らかにするため抗 MX1 抗体を用いた免疫組織化学実

験を行なった。

(5) 血清抗 MX1 抗体を測定する Enzyme-linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) を作成するために、昆虫細胞・バキュロウイルスによる発現系を用いたリコンビナント MX1 蛋白精製を行なった。

(6) 大阪大学医学部附属病院へ通院中の慢性線維化性 IIPs の連続コホート (2014 年 2 月から同年 10 月) を作成し、血清抗 MX1 抗体価、抗 ARS 抗体価と臨床パラメータとの関係を横断的に解析した。

(7) 抗 MX1 抗体陽性 IIPs の予後を調べるため、国立病院機構近畿中央胸部疾患センターで 2005 年から 2009 年に登録されたレトロスペクティブコホートを用いて nested case-control study を行なった。

4. 研究成果

(1) 蛋白アレイデータ解析の結果、IPF、INSIP、aPAP、サルコイドーシスそれぞれに対して、40、51、57、44 個の疾患特異的自己抗体を発見した。2 つ以上の疾患で同時に疾患特異的自己抗体とされた自己抗体は 1 つも存在しなかった。疾患特異的自己抗体に対応する自己抗原と Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG) pathway との関連を調べ、IPF、INSIP、aPAP、サルコイドーシスそれぞれに対して、7、13、7、2 個の KEGG pathway との相関を発見した。1 つの KEGG pathway "Influenza A" (hsa05164) のみが INSIP と aPAP 両疾患との相関を認めた以外、2 つ以上の疾患と同時に相関を認めた pathway は 1 つも存在しなかった。この結果より IPF と INSIP は血清学的に区別可能な疾患である可能性が示唆された。

(2) これらの疾患特異的自己抗体の中から、抗 MX1 抗体に着目した。HEK293 細胞に発現させた FLAG タグ付加リコンビナント MX1 を INSIP 由来の血清は免疫沈降させることができたが、IPF や健常人由来の血清は免疫沈降させることができなかった。この結果により、我々が蛋白アレイにて確認した抗 MX1 抗体は実際に INSIP 患者血清に存在することを確認した。

(3) 肺組織における MX1 蛋白の局在は知られていない。我々は抗 MX1 抗体を使用した免疫組織化学を行い、正常肺において MX1 は細気管支上皮のクララ細胞、II 型肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージに発現していることを明らかにした。また IPF、INSIP を含む間質性肺炎では、過形成上皮細胞や気腔内に集簇するマクロファージに発現し、正常肺と比較して MX1 発現細胞数は増加していることを明らかにした。

(4)多検体の抗 MX1 抗体を測定するため、ELISA を作成した。昆虫細胞・バキュロウイルスによる発現系により精製した His タグ付加リコンビナント蛋白を固相化することによって作成した我々の ELISA はアッセイ内、アッセイ間の変動係数が 10%未満であり、高い再現性を認めた。また、健康人ボランティア 30 名の血清抗 MX1 抗体測定値の平均値+6SD をカットオフ値に設定した。

(5)血清抗 MX1 抗体は慢性線維化性 IIPs の 17.5%で陽性となった。抗 MX1 抗体と抗 ARS 抗体は相互排他的であり、2 つの自己抗体を同時に持つ患者は非常に稀であった。抗 MX1 抗体陽性 IIPs の臨床的特徴は、女性が多く、HRCT 画像所見では、“下肺野優位”“末梢優位”が少ないという、INSIP 臨床的特徴の一部と一致した。抗 MX1 抗体陽性 IIPs は INSIP と臨床像を共有するサブグループである可能性が示唆された。

(6) 現在の American Thoracic Society/European Respiratory Society/Japanese Respiratory Society/Latin American Thoracic Association (ATS/ERS/JRS/ALAT) 基準では、HRCT 画像所見で UIP-pattern を認めた症例は外科的肺生検を行わなくても IPF と診断することが可能となった。しかし、HRCT 画像診断で IPF と診断できる症例は少数であり、依然、外科的肺生検を行うか、診断未確定のまま経過観察されているケースが多い。慢性線維化性間質性肺炎において IPF 診断確定例を除いた、non-IPF で、抗 MX1 抗体陽性群は抗 MX1 抗体陰性群と比較して予後良好であった (Wilcoxon test, $P=0.037$)。

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 2 件)

Hamano Y, Kida H(*corresponding author), 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. Classification of idiopathic interstitial pneumonias using

anti-myxovirus resistance-protein 1 autoantibody. *Sci Rep* 査読あり 23, 2017, 43201.

DOI: 10.1038/srep43201

Development of microscopic polyangiitis-related pulmonary fibrosis in a patient with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. Kinehara Y, Kida H*, Inoue Y, Hirose M, Nakabayashi A, Takeuchi Y, Hayama Y, Fukushima K, Hirata H, Inoue K, Minami T, Nagatomo I, Takeda Y, Funakoshi T, Kijima T, Kumanogoh A. *BMC pulmonary medicine* 査読あり 14, 2014, 172.

DOI: 10.1186/1471-2466-14-172

〔学会発表〕(計 5 件)

木田博、網羅的自己抗体検索による INSIP 特異的マーカー、抗 Mx1 抗体の同定、第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014 年 4 月 27 日(大阪)

濱野芳匡、Identification of anti-myxovirus resistance protein-1 autoantibody as a specific marker for idiopathic nonspecific interstitial pneumonia、American Thoracic Society International Conference 2014 2014 年 5 月 21 日(サンディエゴ)

濱野芳匡、慢性間質性肺炎のフェノタイプ分類及び自己免疫性肺胞蛋白症における重症度バイオマーカーに関わる自己抗体研究、第 24 回 Pneumo Forum、2015 年 11 月 7 日(東京)

濱野芳匡、慢性特発性間質性肺炎の新たな entity を形成する抗 MX1 自己抗体の意義、日本臨床免疫学会、2015 年 10 月 22 日(神戸)

新井徹、Serum anti-myxovirus resistance protein-1 autoantibody; a

possible novel biomarker for disease severity and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis、American Thoracic Society Conference 2016、2016年5月15日(サンフランシスコ)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：非特異的間質性肺炎の診断のためのバイオマーカー
発明者：木田博
権利者：国立大学法人 大阪大学
種類：特許
番号：特願 2015-506765
出願年月日：平成 26 年 3 月 17 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

朝日新聞朝刊(平成 29 年 3 月 16 日、23 面)
朝日新聞 DIGITAL(平成 29 年 3 月 16 日)
<http://www.asahi.com/articles/ASK3J6X1LK3JUBQU018.html>
日経バイオテク ON LINE(平成 29 年 3 月 16 日)
<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/release/17/03/14/03644/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木田 博 (KIDA, Hiroshi)
大阪大学大学院医学系研究科呼吸器・免疫内科学講座・助教
研究者番号：80512988

(2)研究分担者

井上 義一 (INOUE, Yoshikazu)
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・センター長
研究者番号：90240895

(3)研究協力者

熊ノ郷 淳 (KUMANOGOH, Atsushi)