

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 2 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461169

研究課題名(和文)自己免疫性肺胞蛋白症の自己抗体エピトープ解析

研究課題名(英文) Epitope mapping of autoantibody in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis

研究代表者

山口 悦郎 (Yamaguchi, Etsuro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：10201831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性肺胞蛋白症は肺胞マクロファージの分化と成熟を促すGM-CSFに対する自己抗体が産生されることにより発症する疾患である。GM-CSF分子のどこに対して優先的に抗体が産生されているかを検討するために、血清抗体のエピトープマッピングを試みた。ELISA法では、GM-CSFをいくつものペプチドに分解して結合度をみたが、ペプチドによる差異や患者と健常者との差異を認めなかった。表面プラズモン共鳴法では、特異的な結合シグナルを検出できず、現状で信頼に足るエピトープマッピングは達成できていない。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune pulmonary alveolar proteinosis is caused by the production of autoantibody against GM-CSF that support maturation and proliferation of alveolar macrophages. We made an attempt of epitope mapping for serum antibodies to elucidate the site of GM-CSF molecules to which antibodies preferentially bind. No significant difference was observed by ELISA among individual peptides derived from GM-CSF or between patients and healthy volunteers. We could not establish reliable method to detect specific binding signals by surface plasmon resonance method. Thus, we have not succeeded in mapping epitopes.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：自己免疫性肺胞蛋白症 自己抗体 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 エピトープマッピング  
表面プラズモン共鳴法

## 1. 研究開始当初の背景

肺胞蛋白症の原因は古くにはサーファクタントの産生亢進あるいは処理能の低下という相反する仮説が提起されていたが、いずれとも決め手となる根拠を欠き、永らくその病態は不明のままであった。しかし 1999 年に Kitamura、Nakata らが、抗 GM-CSF 自己抗体により肺胞マクロファージの分化が阻害され、サーファクタントの処理能が低下することにより発症することを明らかにした (文献 1)。その結果を踏まえて現在では以前の特発性肺胞蛋白症は、自己免疫性肺胞蛋白症 (autoimmune alveolar proteinosis: APAP) とも呼ばれるようになった。

ほどなく厚労省の研究班が組織され、申請者も分担研究者に加わり、希少肺疾患でありながら患者 223 名に関する世界で初めての大規模疫学調査結果が発表された (文献 2)。そこで得られた大変興味深い観察は、抗体濃度と疾患の重症度や発症時点の様々な臨床指標とは何ら相関が認められなかった点である。抗 GM-CSF 抗体が原因であるとするれば、医学の常識としてその多寡と臨床像とは何らかの関連を持つはずである。少なくとも GM-CSF の皮下投与および吸入療法の効果に関する探索的成果を踏まえて実施された 24 週間の吸入療法試験では、69% の患者で一定の効果を示した。またヒトから抽出した抗 GM-CSF 抗体をカニクイザルに投与することにより肺胞蛋白症が再現できた。さらに自然緩解例では徐々に血清抗体濃度が低下することなどから、抗体と疾患との間には因果関係があることは、ゆるぎない真実であると考えられている。その意味で上述の疫学観察結果は不可解な印象を覚える。その後、この疑

問を解く試みはなされておらず、発症に至る抗体濃度の閾値説とすべての疾患に当てはまる病態の個体差で説明されようとしている。

## 2. 研究の目的

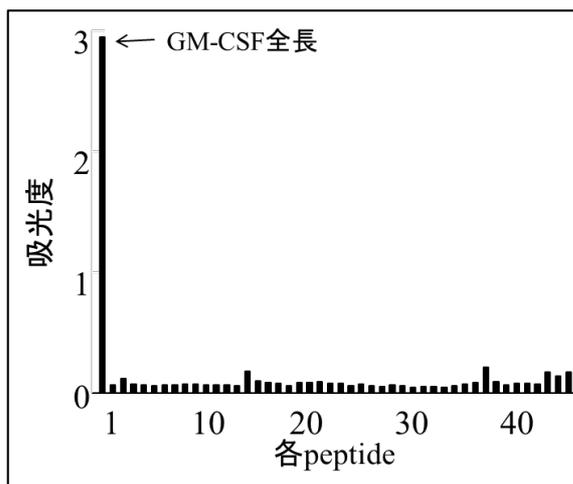
申請者は以前から、他疾患でも低濃度ながら血清中に抗 GM-CSF 自己抗体が存在していることを見出している。しかし APAP 以外では肺胞蛋白症の兆候は無く、その抗体の意義は不明である。これらの疑問に関して申請者は以前から現在測定している GM-CSF 分子全体に対する IgG 抗 GM-CSF 自己抗体の中で、より APAP の病態に関連した抗体分子が認識する抗原エピトープ、換言するとより疾患特異性の高い抗原エピトープが存在するのではないかと仮説を抱いている。患者で産生されている自己抗体に対応する GM-CSF エピトープに関しては、ごく最近カナダから 1 報発表された (文献 3)。それは GM-CSF が結合する B 細胞をソーティングにより選別し、それを T 細胞共存下で刺激して B 細胞クローン株を樹立し、その抗体の性状や他の単クローン抗体との相互関連を表面プラズモン共鳴法で解析したものである。本研究はそれと異なり、患者の血清中抗体のエピトープ解析を未処理血清について実施し、いわばありのままの抗体プロフィールと臨床像との関連を追及することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ELISA 法による検討

自己免疫性肺胞蛋白症の抗原である GM-CSF は 144 アミノ酸から構成されている。そこで 12 あるいは 13 アミノ酸残基からなり、隣接するものとは 3 アミノ酸残基重複するペプチドを 45 種合成した。それをジメチルホルムアミドで溶解後 10 µg/ml の濃度に希釈し、通常の 96 穴 ELISA プレーに固相化した。次いでそこに患者あるいは健常者血清を 1000 倍希釈して添加し、2 時間後に洗浄した。次いでピオチン

標識抗ヒトIgG抗体を添加し、洗浄後にストربتアビジン・ペプチド複合体を添加し、洗浄後に基質による発色を波長450nmの吸光度を測定し、IgG抗体価とみなした。結果として一部のペプチドで他と比較して吸光度の上昇を認めたと、健常者との差は確認できず、非特異的な結合のみと考えられた(下図)。その



理由として、エピトープの位置をより狭くとらえようとした結果、ペプチド長を短くし過ぎ、そのためエピトープが分断されて抗体の特異的結合が成立しなかったと考えた。そこで次に全長29ないし30残基で、隣接するものと6アミノ残基重複するペプチドを合成し、同様に検討した。その結果24-52番アミノ酸と115-144アミノ酸で他より高い吸光度を呈したが、健常者でも同様だった。GM-CSF全長に対する吸光度との比率でも同様であり、健常者との差異を確認できず、結果はペプチドとの非特異的結合であると考えられた。用いるELISAプレートを変更しても同様であった。またプレート底面に固相化することが、非特異的結合を生むと考え、ストربتアビジン被覆プレートに、ビオチン標識ペプチド(24-52番アミノ酸)を結合させた後、同様に血清中IgGの結合をみたが、やはり健常者との差を認めなかった。

## (2) 表面プラズモン共鳴法

以上からELISAプレートに固相化することによるエピトープマッピングはあきらめて、表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いた解析に

転換することとした。GE Healthcare社のBiacore:sensor chip SAを使用し、ビオチン化したGM-CSFあるいはビオチン化GM24-52(ペプチド24-52)をチップに固定した。次いで患者血清から精製したIgG(抗GM-CSF活性があるはず)との相互作用を検討したところ、当初GM-CSFとの相互作用のみ確認されたが、接触時間を長くすることでGM24-52との結合も認められるようになった。濃度系列を作成し、Kd、Ka、KDを算出しようとしたが、うまく理論的にカーブフィットできなかった。チップ作製元に照会したところ、アナライトがポリクローナル抗体の場合、機器附属のソフトではかならずしも最適に解析できないことが判明した。すなわちアナライトがポリクローナル抗体の場合、1分子に結合サイトが2つあるので、結合様式はbivalent modelになる。そこでsのモデルで解析したが、やはりうまくフィットせず、多価結合で複雑になっており解析できないようであった。またアナライト濃度が高くなるにつれてレスポンスが減少する割合が増えている場合は多価結合しているか、単純な1:1 bindingではない可能性があり、センサーグラムの形状からやはり複雑な多価結合しているようであった。

一方抗体活性がない健常者から精製したIgGは、GM-CSFを固定化したチップとの相互作用は認められず、上記の患者血清との相互作用は、特異的であろうと考えられた。

表面プラズモン共鳴法についてリファレンスセルとリガンド固定化セルのレスポンスの位置が、ヒトIgG(健常者血清精製品)添加時と患者から精製したGM-CSF抗体添加時で異なっていたため、精製時のバッファー交換量を検討した。その結果おおもとのセルのレスポンスはほぼ同等になり、改善された。それにともない、ヒトIgG添加時に現れていたレスポンスがなくなり、相互作用は認められないことが分かった。そこで血清を直接希釈して連続インジェクションとシングルインジェク

ションで重ね書きをし、ELISAで用いている精製GM-CSF抗体の標準品と比較して、特定のペプチドに対する結合度を比較することとした。そのために確認することとして、以下の点が挙げられた。

1) デキストランを添加することによって直接希釈が可能か。リファレンスへの非特異的結合が起こらないか。

2) 直接希釈が不可であれば、GM-CSF抗体まで精製する必要があるか、その場合試料量は足りるかどうか。

3) 今現在チップに固定化しているペプチドはGM24-52のみなので、他のペプチドでも確認する必要がある。

4) チップにペプチドを固定化するにはペプチドをbiotin化する必要があるが、研究室でできるタイプのbiotin化試薬は第一級アミノ基をbiotin化するタイプのものになるので、Lys基もbiotin化されてしまう。GM-CSF固定化チップ(第一級アミノ基をbiotin化)とGM24-52固定化チップ(末端biotin化)への抗体の結合レスポンスを比較するとGM-CSF固定化チップのレスポンスが低いので立体障害が起きていると推測され、末端biotin化の必要がある。

今後これらの検討を経て、さらに解析を重ねる予定である。

#### 4. 研究成果

上記のように信頼に足る方法を確立することができなかったため、患者血清のエピトープマッピングは成功しておらず、そのプロフィールと臨床像との関連を検討するに至っていない。

#### <引用文献>

1. Kitamura T, et al., J Exp Med. 1999, 190 (6):875-80.

2. Inoue Y, et al., Am J Respir Crit Care Med. 2008, 177 (7):752-62.

3. Wang Y, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013, 110 (19):7832-7.

#### 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 5件)

Tazawa R, Inoue Y, Arai T, Takada T, Kasahara Y, Hojo M, Ohkouchi S, Tsuchihashi Y, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Ishii H, Nei T, Morimoto K, Nasuhara Y, Ebina M, Akira M, Ichiwata T, Tatsumi K, Yamaguchi E, Nakata K, Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled GM-CSF therapy. Chest, 査読有, 145 巻, 2014, 729-737

Akasaka K, Tanaka T, Maruyama T, Kitamura N, Hashimoto A, Ito Y, Watanabe H, Wakayama T, Arai T, Hayashi M, Moriyama H, Uchida K, Ohkouchi S, Tazawa R, Takada T, Yamaguchi E, Ichiwata T, Hirose M, Arai T, Inoue Y, Kobayashi H, Nakata K, A mathematical model to predict protein wash out kinetics during whole-lung lavage in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 査読有, 308 巻, 2015, L105-17

Akasaka K, Tanaka T, Kitamura N, Ohkouchi S, Tazawa R, Takada T, Ichiwata T, Yamaguchi E, Hirose M, Arai T, Nakano K, Nei T, Ishii H, Handa T, Inoue Y, Nakata K, Outcome of corticosteroid administration in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis: a retrospective cohort study. BMC Pulm Med, 査読有, 15 巻, 2015, 88

DOI: 10.1186/s12890-015-0085-0.

Takahashi A, Yamaguchi E, A case of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis with fluctuating lung shadows in parallel with cigarette smoke burden, Sarcoidosis vasculitis and diffuse lung disease, 査読有, 2017 in press.

Ito S, Wakahara K, Kojima T, Takahashi N, Nishiwaki K, Yamaguchi E, Hasegawa Y, Two cases of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis with rheumatoid arthritis, Allergol Int, 査読有, 66 巻, 2017, 507-509

〔学会発表〕(計 3 件)

Takahashi A, Yamaguchi E, Kosaka K, Hamanaka R, Matsubara A, Nishimura M, Tanaka H, Asai N, Yokoe N, Kubo A and Baba K, Temporal changes of the serum levels of autoantibodies Against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in natural clinical course of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis (APAP) American Thoracic Society 2015, May 19, 2015, Denver, Colorado.

Yamaguchi E, Takahashi A, Matsubara A, Kosaka K, Nishimura M, Tanaka H, Yokoe N, Kubo A, A case of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis showing fluctuating clinical activity in parallel with tobacco smoke burden, (Poster) ATS 2016, May 17, 2016, San Francisco, USA

Yamaguchi E, Takahashi A, Matsubara A, Kosaka K, Nishimura M, Tanaka H, Yokoe N, Kubo A, The cut off value of serum KL-6 levels for discrimination of autoimmune alveolar proteinosis and

interstitial pneumonia, 21st Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory (APSR 2016), November 13, 2016, Bangkok, Thailand

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口悦郎 (YAMAGUCHI, Etsuro)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10201831

### (2) 研究分担者

高橋 歩 (TAKAHASHI, Ayumu)  
愛知医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30374292

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )