

博士論文

フローサイトメーターを用いた

GM-CSF シグナル異常検出法の標準化と応用

日下部 良臣

目次

略語	3
要旨	5
序文	6
方法	
対象者	23
試薬	25
フローサイトメトリー	26
ウエスタンブロッティング	30
統計解析	32
結果	
CD11b-Stimulation Index 測定手順の標準化	33
CD11b-Stimulation index の応用	50
CD11b-Stimulation index のカットオフ値	54
考察	57
謝辞	65
引用文献	67

略語

ANOVA	analysis of variance
BCL2A1	BCL2-related protein A1
C5a	complement fragment 5a
DEP	diesel exhaust particulate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FcR	Fc receptor
FITC	fluorescein isothiocyanate
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon
IL	interleukin
Jnk	c-Jun N-terminal kinase

MFI	mean fluorescent intensity
MR	Mannose receptor
PAP	pulmonary alveolar proteinosis
PE	phycoerythrin
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
PVDF	polyvinylidene difluoride
ROC	receiver operating characteristic
SHIP	SH2 domain containing inositolpolyphosphate 5-phosphatase
SI	Stimulation index
STAT	signal transducers and activator of transcription
TNF	Tumor necrosis factor
TLR	Toll-like receptor

要旨

自己免疫性肺胞蛋白症は、肺胞へのサーファクタント貯留による呼吸不全を来たす稀な呼吸器疾患で、抗 GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor) 中和抗体による GM-CSF シグナル障害がその原因である。本研究では GM-CSF の刺激による好中球表面の CD11b の上昇率の観点で GM-CSF シグナルの障害を検出する方法を最適化した。結果、GM-CSF の刺激濃度を 10ng/ml とし、採血後迅速に測定を行う必要があった。診断上のカットオフ値は 112 であり、これは感度、特異度とも 100%で、ルーチンな臨床検査となりうる。

序文

肺胞蛋白症 (pulmonary alveolar proteinosis) は、肺胞へのサーファクタント貯留による呼吸不全と感染症リスクの増大を来たす稀な呼吸器疾患で、1958年にRosen によって報告された[1]。多くは労作時の呼吸困難感を主訴としており、本邦ではおよそ1000例の報告がなされている。診断は、図1で見られるような画像所見を認め、侵襲的検査である胸腔鏡下または気管支鏡下で行う肺生検組織で肺胞腔にPAS陽性に染まるサーファクタント脂質・蛋白を確認するか、あるいは気管支肺胞洗浄液中に光沢の有る白濁したサーファクタントと泡沫状マクロファージを確認することでなされる(図2、表1)。

この肺胞蛋白症にはいくつかの原因による分類が知られ、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor; GM-CSF) 受容体の遺伝子変異や肺サーファクタント産生に関わる遺伝子変異などによる遺伝性(あるいは先天性)肺胞蛋白症 (hereditary pulmonary alveolar proteinosis) [2][3]、急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群などに続発する、肺胞マクロファージ機能に関わる様々な病態で観察される二次性(あるいは続発性)肺胞蛋白症 (secondary

pulmonary alveolar proteinosis)があるが[4]、9割に相当する大部分は自己免疫性(あるいは特発性)肺胞蛋白症(autoimmune pulmonary alveolar proteinosis)に分類される(表2)。

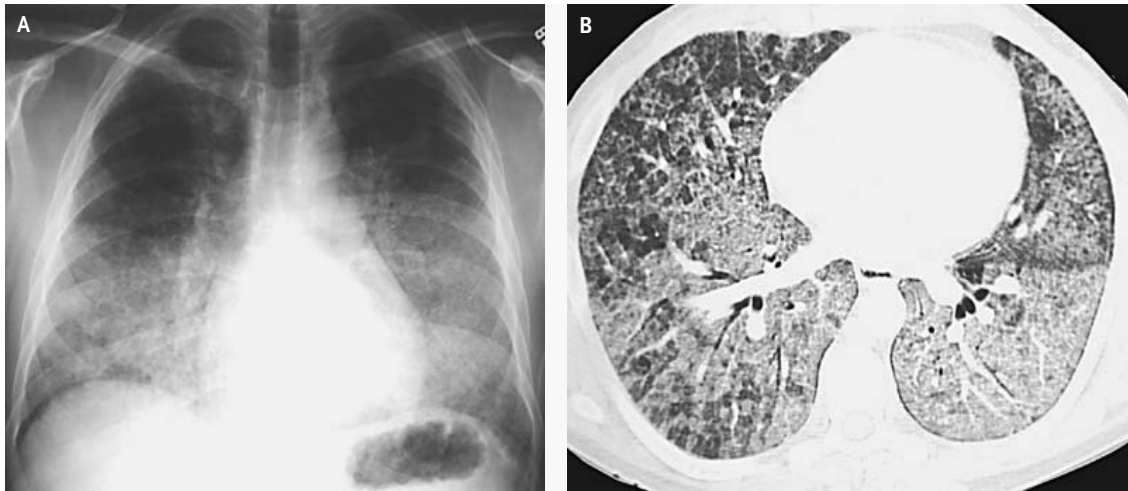


図1 肺胞蛋白症の画像所見。A.非対称性の両側性の浸潤影。B.斑状のスリガラス陰影 ([5]より改変して引用)。

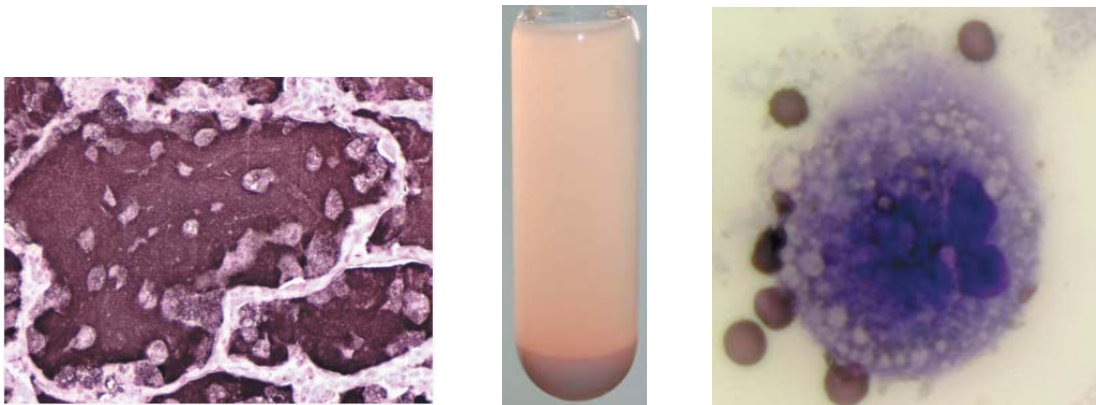


図2 自己免疫性肺胞蛋白症の病理・細胞学的所見。左.肺生検で肺胞腔内へのサーファクタント貯留を認める(サーファクタント蛋白の免疫染色画像)。中.気管支肺胞洗浄で光沢のある白濁した洗浄液が回収される。右.サーファクタントを内部に取り込んだ泡沫マクロファージ(foamy macrophage)が観察される(気管支肺胞洗浄液のサイトサイトスピンのアズールエオジン染色画像) ([5]より改変して引用)。

表1 厚生労働省難治性疾患克服研究事業による自己免疫性肺胞蛋白症の診断検査。3つを満たして自己免疫性肺胞蛋白症と診断される。

【1】画像所見	肺高分解能CT撮影で、地図状のスリガラス様陰影を呈する
【2】病理・細胞学的所見: a項またはb項を満たす	a. 肺生検(TBLBまたは外科的肺生検)で肺胞蛋白症を支持する所見がみられる b. 気管支肺胞洗浄(BAL)液で白濁の外観を呈し、顕微鏡で、顆粒状の外観を呈する好酸性、無構造物質の沈着や、泡沫マクロファージ(foamy macrophage)がみられる
【3】血清学的所見	血清中の抗GM-CSF抗体が陽性である

表2 肺胞蛋白症(pulmonary alveolar proteinosis; PAP)の分類。

分類	頻度	原因と特徴
遺伝性(先天性)肺胞蛋白症 Hereditary PAP	稀	<ul style="list-style-type: none"> ● GM-CSF受容体の遺伝子変異によるGM-CSFシグナル障害 ● サーファクタント関連蛋白の遺伝子異常
二次性(続発性)肺胞蛋白症 Secondary PAP	稀	血液悪性疾患などに続発し予後不良
自己免疫性(特発性)肺胞蛋白症 Autoimmune PAP	9割	抗GM-CSF自己抗体によるGM-CSFシグナル障害

これまでの研究で、自己免疫性肺胞蛋白症は抗GM-CSF中和抗体によるGM-CSFシグナル障害がその原因であることが明らかにされた[6][7][8]。その抗GM-CSF中和抗体によりGM-CSFシグナルが障害され[7]、転写因子PU.1の核内移行が阻害され、肺胞マクロファージの前駆体からの最終的な成熟が阻害されている[8]。未成熟な肺胞マクロファージは、肺サーファクタント脂質および蛋白を貪食することが出来てもそれを代謝分解することが出来ず、泡沫状マクロファージ(foamy macrophage)となる[9]。その結果肺にサーファクタントが貯留し、進行性の呼吸不全を来す[5]。

また、患者から抽出した抗GM-CSF中和抗体をサルに投与する実験で、肺胞蛋白症類似の肺病理所見が得られたことより、抗GM-CSF抗体が直接的な原因であることが確認されている[10][11]。

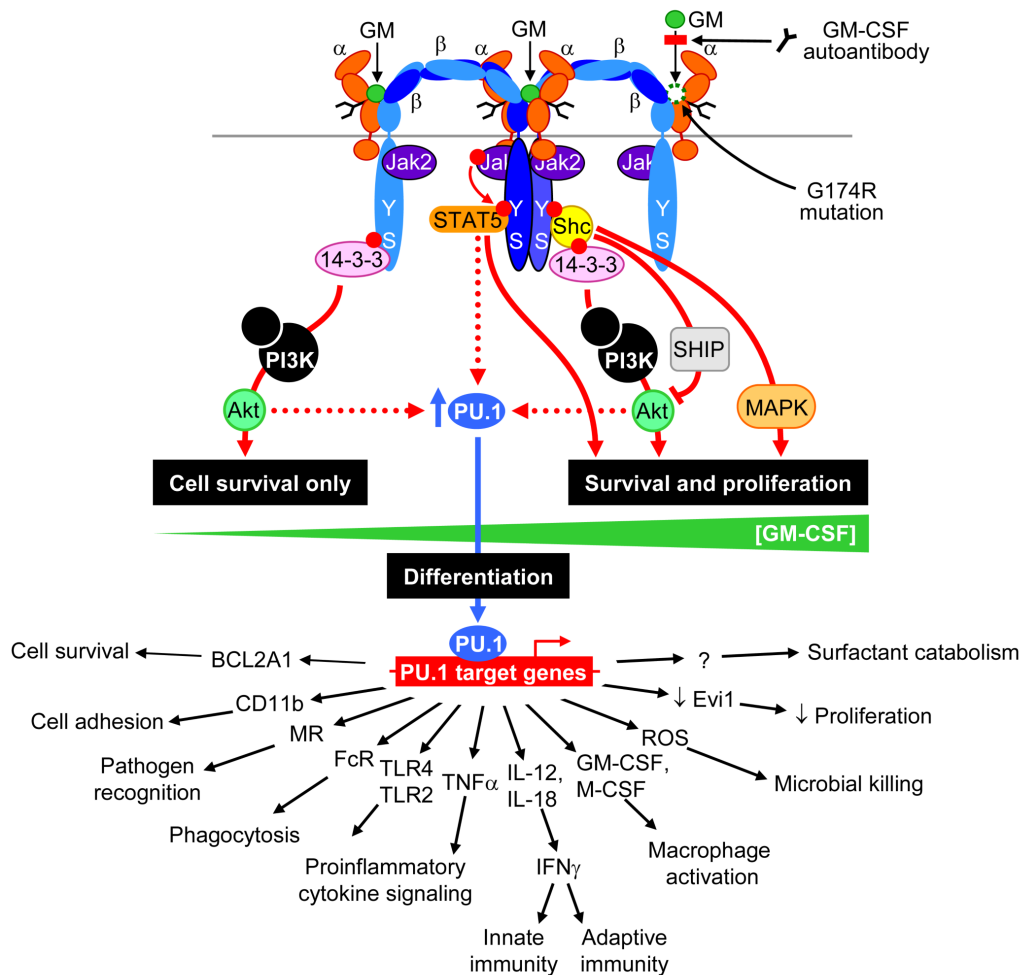


図3 GM-CSFシグナリング。GM-CSFは受容体α鎖に結合し、シグナル伝達を担うβ鎖を経由してJak2およびSTAT5を介してそのシグナルを細胞内に伝える。STAT5のリン酸化を検出することによりGM-CSFシグナルが細胞内に有効に伝達された指標となる([12]より改変して引用)。

GM-CSFは骨髄前駆細胞の分化増殖に関わるサイトカインであり、成熟したマクロファージや好中球を刺激する機能を担い、生体防御能に関わっている[13][14]。

GM-CSFは、正常時の血中濃度は非常に低いか全く検出できないにもかかわらず[15]、好中球の生体防御機能発現[8]、肺胞マクロファージの生体防御機能およびサーファクタントのホメオスタシス維持機能の発現[16]に極めて重要な役割を果たしている(図4)。抗GM-CSF自己抗体は健常者にもごく低いレベルで存在しており[15]、肺胞蛋白症の重症度と血中の抗GM-CSF自己抗体濃度には相関は見られないとの報告がある[17]。原因物質である抗GM-CSF自己抗体の血中濃度が自己免疫性肺胞蛋白症の病勢と関連しない理由は、抗GM-CSF自己抗体の濃度に閾値が存在し、この閾値を超えることでGM-CSFシグナルに依存している機能、例えば肺胞マクロファージによる肺サーファクタントの除去能などが低下し、閾値を超えれば濃度そのものは重症度に影響しないという考え方で説明することが出来る[18]。

遺伝性肺胞蛋白症は、GM-CSF受容体の α 鎖をコードしている*CSF2RA*および β 鎖をコードしている*CSF2RB*などの遺伝子変異が原因となるが[19]、肺の組織学的な検討においては自己免疫性肺胞蛋白症との差異を認めない[20][21][22]。

二次性肺胞蛋白症は、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群などの血液疾患に続発して見られ、肺胞マクロファージ機能への影響が観察されている[4]。

動物モデルにおいては、遺伝子改変マウスを用いた実験で、GM-CSF遺伝子の欠損や[23]、GM-CSF受容体遺伝子の欠損で[24]、肺胞蛋白症に類似した病態を示すモデルマウスを作成することが出来る(図5)。一方GM-CSFの過剰発現マウスはマクロファージの異常集積と組織障害を来たして死亡することが知られている[25]。

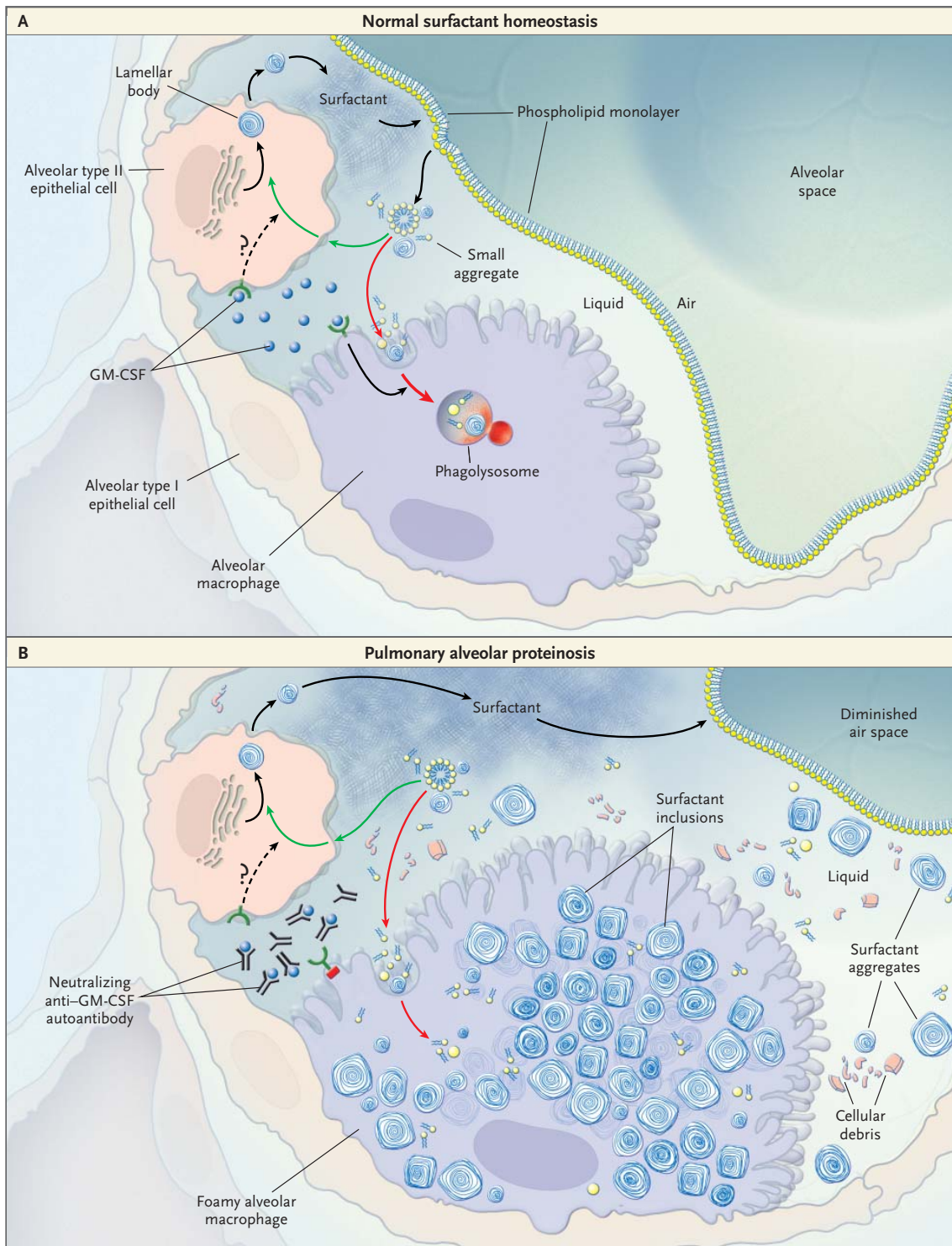


図4 肺サーファクタントのホメオスタシスと、自己免疫性肺胞蛋白症におけるその破綻。自己免疫性肺胞蛋白症では、抗GM-CSF自己抗体によってサーファクタントの除去機構が阻害されている。A.サーファクタントはII型肺胞上皮で産生され、肺胞表面の微量

な液体スペースに分泌されて肺胞の全表面を覆う。これにより肺の表面張力を減少させ、肺の虚脱を防ぐ。正常な状態ではその一部はII型肺胞上皮により回収されて再び分泌されるが、残りの多くは肺胞マクロファージにより除去されていることが知られ、この除去機構にGM-CSFが関与している。B.GM-CSFシグナリングが破綻すると、肺胞マクロファージが最終的な成熟段階に至らず、サーファクタントの除去能を示すことが出来ない。これによりサーファクタントが貯留して肺胞換気が低下し、結果的に呼吸不全を呈する([5]より改変して引用)。

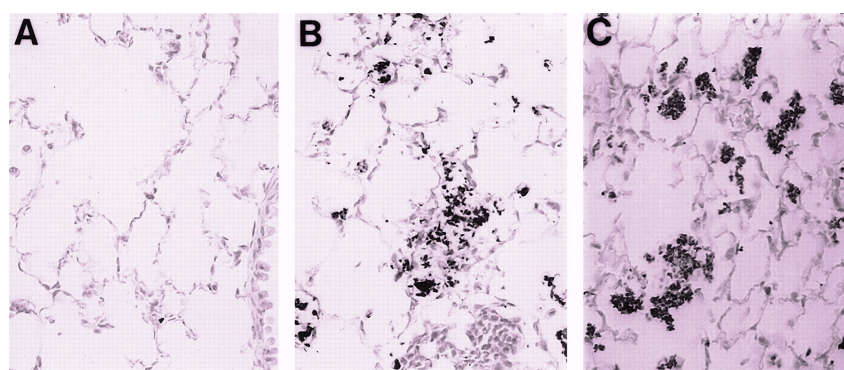


図5 サーファクタント蛋白Bを染色した肺組織の免疫染色画像。A.野生型マウス。B.月齢2のGM-CSF受容体変異マウス。C.月齢2のGM-CSF欠損マウスの肺の免疫染色画像。BやCではGM-CSFシグナル異常が見られ、肺胞マクロファージの最終的な成熟が阻害されている。するとサーファクタントの除去機能が働かずに肺胞腔へのサーファクタント貯留が見られる([26]より改変して引用)。

GM-CSFの活性は、関節リウマチ、多発性硬化症、およびその他の炎症性疾患や自己免疫性疾患で変化していると考えられている。動物モデルにおいては、関節リウマチ(図6)や気管支喘息(図7)ではGM-CSFシグナルの遮断が病勢を和らげ、逆に炎症性腸疾患モデルではGM-CSFの投与が症状を軽快させることが知られている[27]。

一方ヒトでは、例えば関節リウマチにおいて抗GM-CSF抗体療法やGM-CSF受容体アンタゴニスト療法に関する臨床試験がいくつか試みられている[27]。

以上より、GM-CSFの活性は健常な状態では厳密にコントロールされており、その破綻は、その中和抗体が直接的な原因となっている自己免疫性肺胞蛋白症を除いてもいくつかの疾患の病態と関連していると考えられる。したがってGM-CSFのシグナル障害を測定することは重要な意味を持つ。

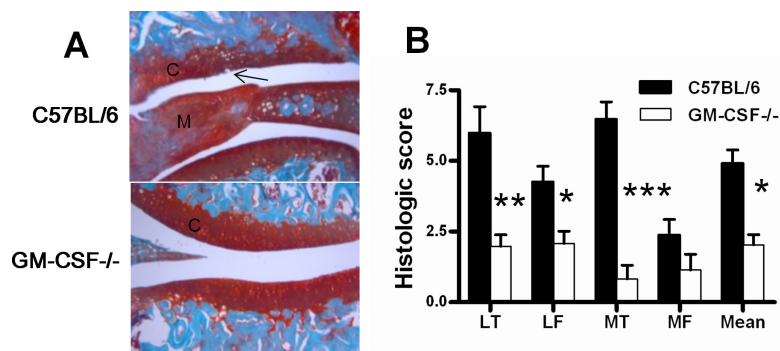


図6 GM-CSFと関節炎マウスモデル。関節腔内にコラゲナーゼを注入することでマウスに関節炎を誘導することが出来るが、野生型マウス(図のC57BL/6)とGM-CSF欠損マウス(図のGM-CSF^{-/-})では組織損傷の程度が異なる。A. 矢印は軟骨損傷部位を示す。コラゲナーゼ注入6週間後の組織を比べると、GM-CSF欠損マウスでは損傷が少ない。B. 組織の損傷度をスコア化した場合、GM-CSF欠損マウスではいずれの骨でも軽症である。つまりこの病態の成立にGM-CSFシグナルが関与していると考えられる。LF: lateral femur; LT: lateral tibia; M: meniscus; MF: medial femur; MT: medial tibia ([28]より改変して引用)。

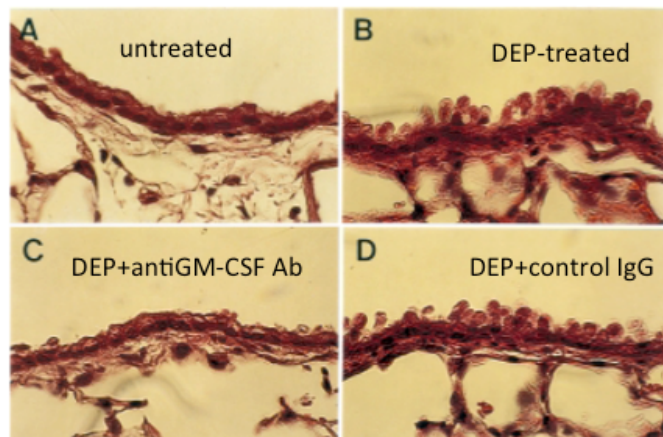


図7 GM-CSFと気管支喘息マウスモデル。Diesel exhaust particulate (DEP)の吸入によりマウス気管上皮に気管支喘息に類似した弾性組織の増加を認めるが、抗GM-CSF中和抗体を事前に投与したマウスではこの増加が起こらず、この病態の成立にGM-CSFシグナルが関連していると考えられる ([29]より改変して引用)。

一方好中球機能とGM-CSFの関連についてもこれまで研究がなされてきた。図8はヒトの全血から好中球を単離し、貪食ビーズを蛍光染色してその貪食能を見たものであるが、GM-CSFシグナルが障害された肺胞蛋白症患者では貪食能が低下している様子が確認できる。一方、肺胞蛋白症モデルとして抗GM-CSF中和抗体を投与したマウスやGM-CSF欠損マウスにおいて、その蛍光強度をもとに貪食能を定量した場合には、GM-CSFシグナル異常の見られる肺胞蛋白症モデルでは貪食能の低下が観察されている(図9)。しかし電子顕微鏡による好中球の構造自体は、自己免疫性肺胞蛋白症患者でも健常との差が無いことが明らかになっている[8]。そこで、機能面で好中球の活性化度を反映する分子としてその表面抗原のCD11bに着目した。

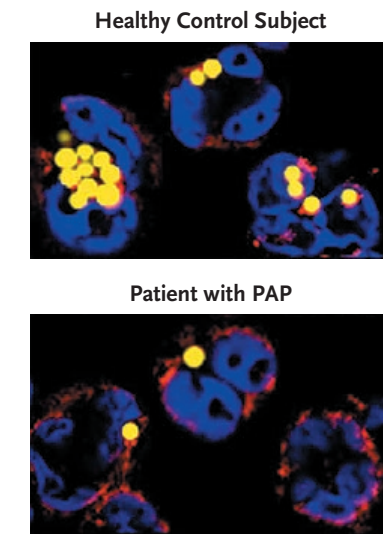


図8 健常者と肺胞蛋白症 (PAP) の好中球の蛍光顕微鏡画像。貪食ビーズを蛍光染色することで好中球あたりの貪食能を観察すると、肺胞蛋白症患者の好中球では貪食能が低下しており、GM-CSFシグナル障害による好中球機能の低下が示唆される ([8]より改変して引用)。

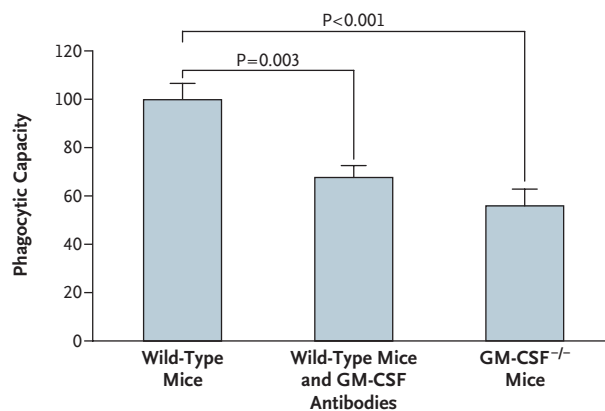


図9 貪食ビーズの蛍光強度をフローサイトメーターで定量したもの。抗GM-CSF中和抗体を投与したマウス、およびGM-CSF欠損マウスでは、貪食能が低下している ([8]より改変して引用)。

CD11bは主に血中の正常好中球表面に存在する細胞接着分子で、炎症部位への遊走や接着に極めて重要であり、好中球の活性化やGM-CSFの濃度上昇に伴って細胞表面の発現度が上昇する[14][30]。我々はヒトの全血を試料として、GM-CSF刺激による好中球表面のCD11bの上昇率を測定することでGM-CSFシグナルについて評価する手法について報告している[8]。これは、ヒトのヘパリン化全血をGM-CSFの存在下でインキュベートし、表面抗原のCD16強陽性かつサイトグラム上で好中球であると判断される細胞集団を対象とするもので、そのCD11bの蛍光強度をフローサイトメーターで測定することで好中球表面のCD11b(これを $CD11b_{\text{Surface}}$ とする)を測定し、GM-CSFの刺激を加えない場合の $CD11b_{\text{Surface}}$ からの上昇率の形で評価するものである。健康成人ではGM-CSF刺激に伴い好中球表面のCD11bが大きく上昇するが、自己免疫性肺胞蛋白症や遺伝性肺胞蛋白症の患者では極めて低い値となる。これは、自己免疫性肺胞蛋白症においてはGM-CSFが抗GM-CSF自己抗体と結合し、GM-CSF受容体へ結合することが出来ないことにより、また遺伝性肺胞蛋白症ではGM-CSF受容体の遺伝子異常により、細胞内にGM-CSFシグナルを伝達することが出来ないことによるものである[8][15][21]。

本研究では、GM-CSFによって刺激された好中球表面のCD11b発現量の変化を観察してそのメカニズムを検討すること、またGM-CSFシグナルの測定法として好中球表面のCD11b発現量の変化を検出する標準的な測定法を確立することを目的とした。その上でこの測定法の再現性と信頼性を検討し、自己免疫性肺胞蛋白症患者と健常者の間のカットポイントを推定することを目的としたものである。

方法

対象者

シンシナティ小児病院メディカルセンター (Cincinnati Children's Hospital Medical Center; CCHMC)、および東京大学大学院医学系研究科の倫理委員会の承認を得て本研究を開始した。臨床症状、画像診断、肺の組織生検、肺胞洗浄液においてそれぞれ陽性所見で、抗GM-CSF抗体ELISA[31]における診断閾値の $5\mu\text{g/mL}$ [31]以上である、自己免疫性肺胞蛋白症の診断基準を満たす10名を対象とした[8][15][32]。また健常群として、喫煙歴や特記すべき既往歴のない健常成人34人を対象とした(表3)。

これら全ての対象者から文書での同意を取得している。

表3 本研究の対象者の詳細

分類	人数 (男:女)	平均年齢 (最小-最高)	条件
自己免疫性 肺胞蛋白症	10人 (6:4)	47歳 (16-68)	<ul style="list-style-type: none"> ● 画像所見が陽性、病理・細胞学的基準が陽性で、血清学的所見として抗GM-CSF抗体がELISAにより$5 \mu\text{g/mL}$以上と測定される
健常者	34人 (13:21)	31歳 (21-57)	<ul style="list-style-type: none"> ● 喫煙歴が無い ● 特記すべき既往が無い ● 採血時点で活動的な感染症や炎症性疾患が無い

試薬

一次抗体として、FITC (fluorescein isothiocyanate) もしくはPE (phycoerythrin) で標識した抗ヒトCD11b抗体、抗ヒトCD16抗体 (Miltenyi Biotec K.K., Tokyo, Japan)、アイソタイプコントロールとしてrat IgG (abcam, Cambridge, UK)、ラット抗ヒトCD11bモノクローナル抗体 (BioLegend, San Diego, CA)、マウス抗ヒトリン酸化STAT (Signal Transducers and Activator of Transcription)-5抗体 (Millipore, Billerica, MA)、二次抗体としてCD11bはラット抗ラットIgG-HRP抗体 (Horseradish Peroxidase) (HAF005) (R&D systems, Minneapolis, MN)、リン酸化STAT5はヒツジ抗マウスIgG-HRP抗体 (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK)、アクチンはHRP標識抗アクチン抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) を使用した。また、刺激試薬として大腸菌由来リコンビナントヒトGM-CSF製剤 (ATGen, Seongnam, South Korea) を使用した。

フローサイトメトリー

図10のように、1.5mLのポリプロピレン製チューブに200 μ Lの全血を入れ、GM-CSFをさまざまな濃度となるよう混和して37°Cで30分インキュベーションし、その後すばやく氷上に静置した。そのうち一部(50 μ L)を、抗体原液4 μ L(原液1 μ Lあたり 1×10^6 までの細胞の染色に適する濃度である)を含む氷冷PBSの50 μ Lとよく混和し、ポリスチレンラウンドボトムチューブ(BD Bioscience, San Jose, CA)の中で暗所にて氷上で30分の反応時間を置いた。精製水で使用濃度に希釈した2mLのFACS™ Lysing Solution(BD Bioscience, San Jose, CA)(ホルムアルデヒドとジエチレングリコールを主成分とする)を加えて室温で10分静置して赤血球を溶血し白血球を固定した後、高速遠心機で300 \times gで5分室温にて遠心した。沈降した細胞成分を200 μ LのPBSで再懸濁し、フローサイトメーターで測定するまで4°Cの暗所で保存した。CD16強陽性の白血球集団を好中球とし、好中球表面のCD11bの量(CD11b_{Surface})を平均蛍光強度(mean fluorescent intensity; MFI)の形で測定した。

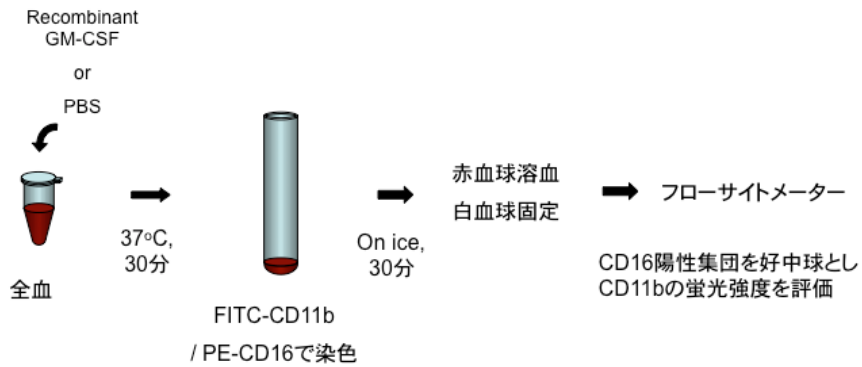


図10 実際の実験手順の図解。37°C30分のGM-CSFによる刺激時間ののちに、氷上で30分の抗体結合時間を置く。

無刺激の好中球表面のCD11b発現量を基準とし、GM-CSFで刺激した好中球表面の

CD11b発現量のパーセント上昇率を以下の式で計算した。

$$CD11b \%increase = \frac{([CD11b_{Surface}]_{+GM-CSF} - [CD11b_{Surface}]_{NoGM-CSF})}{[CD11b_{Surface}]_{NoGM-CSF}} \times 100$$

ここで、 $[CD11b_{Surface}]_{+GM-CSF}$ とは、GM-CSFで30分刺激したときの好中球表面のCD11b ($CD11b_{Surface}$)を意味し、 $[CD11b_{Surface}]_{NoGM-CSF}$ はGM-CSFで刺激していない状態での $CD11b_{Surface}$ を意味している。特に、GM-CSF 10ng/mLで刺激した時のパーセント上昇率をCD11b-Stimulation indexと定義した。この濃度は図15で後述するように健常群と自己免疫性肺胞蛋白症群を最も明確に識別することの出来る濃度である。

細胞質中のCD11b ($CD11b_{Cytosol}$)は、図11の手順によりサポニンによる細胞膜透過性を利用したIntracellular Cytokine Staining Kit (eBioscience, San Diego, CA)を使って、50 μ Lに対し原液4 μ L (原液1 μ Lあたり 1×10^6 までの細胞の染色に適する濃度である)のPE標識CD11b抗体で染色した。

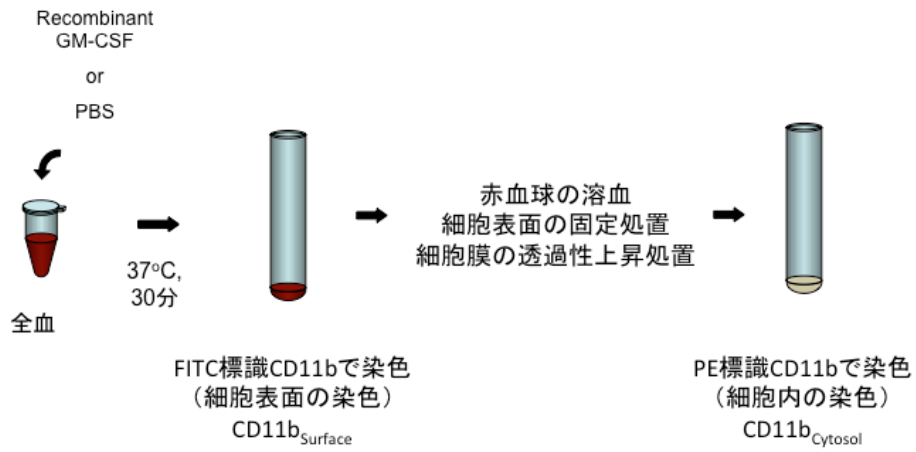


図11 細胞内外のCD11bの染色手順の図解。細胞表面抗原を染色した後に細胞膜透過処置を行い、その後細胞内抗原を染色する。

ウエスタンブロッティング

ヘパリン採血した全血を10ng/mLのGM-CSFで刺激(37°C、15分)し、赤血球をBD Pharmlyse™(BD Bioscience, San Jose, CA)で溶血させた。氷冷PBSで残った白血球を洗浄したのち、protease inhibitor cocktail (0.5% v/v) (Thermo Scientific, Rockford, IL)、phosphatase inhibitor cocktail (1% v/v) (Thermo Scientific, Rockford, IL)、EDTA (5 mM)を含むprotein extraction buffer(M-PER® #78501) (Thermo Scientific, Rockford, IL)で抽出した。抽出されたタンパク質はサンプルローディングバッファー中に懸濁し、Mini-PROTEAN® TGX™ Gels(Bio-rad, Hercules, CA)を用いて電気泳動し(100V、150分)、PVDF(Polyvinylidene difluoride)メンブレン(Immobilon, Merck Millipore, Billerica, MA)に24V、1時間の転写条件で転写した(Transblot™, Bio-rad, Hercules, CA)。サンプル中のCD11b蛋白およびリン酸化STAT5蛋白を、以下の方法で検出した。PVDFメンブレンを1%ドライミルク入りPBS/0.1% Tween 20で4°C オーバーナイトブロッキングした後、一次抗体として50倍希釈したラット抗ヒトCD11bモノクローナル抗体、または200倍希釈したマウス抗ヒトリン酸化STAT5抗体とともに室温で60分インキュベートした。洗浄後二次抗体として、CD11bタンパク検出には1000倍希釈のラッ

ト抗ラットIgG-HRP抗体とともに、リン酸化STAT5タンパク検出には3000倍希釈のヒツジ抗マウスIgG-HRP抗体とともに室温で60分インキュベートした。またアクチン検出には、500倍希釈の抗アクチン-HRP抗体とともに室温で60分インキュベートした。洗浄後、ECL plus™ (GE healthcare, Little Chalfont, UK)を取扱説明書通りに使用した。CD11bのバンドのシグナル強度はImage Quant TL Analysis Toolbox Ver 7.0 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA)で定量化した。

統計解析

数的データは、Kolmogorov-Smirnov検定を用いて確率分布を評価し、Levene検定によって等分散性の検定を行った。変数データは平均±標準偏差で示し、非変数データは中央値とinterquartile range (IQR) で表した。変数データの統計比較は2群間のStudent's t検定およびone-way analysis of variance (ANOVA) で、Holm-Sidak法で多群間比較、Dunnett法で多群と対照群の間で比較を行った。非変数データはMann-Whitney rank-sum testで比較を行った。1人の被験者からの複数回採血での変動係数は平均との差から算出した。また、被験者間での変動係数は各被験者の測定平均の分布から算出した。Receiver operating characteristic (ROC) 曲線や他の全ての統計解析はSigmaPlot version 12 (Systat Software, SanJose, CA)を使用して行った。P値0.05以下を統計学的有意として扱い、アスタリスクを付加して示した(* = P<0.05; ** = P<0.01; *** = P<0.001)。全ての結果は、少なくとも2回以上繰り返し、同様の結果を得た。

結果

CD11b-Stimulation index測定手順の標準化

へパリン採血後時間の経っていない全血200 μ Lで、図12のサイトグラム上で好中球と知られている集団と、図13のヒストグラムでCD16強陽性集団の共通集合を好中球として解析の対象とした。

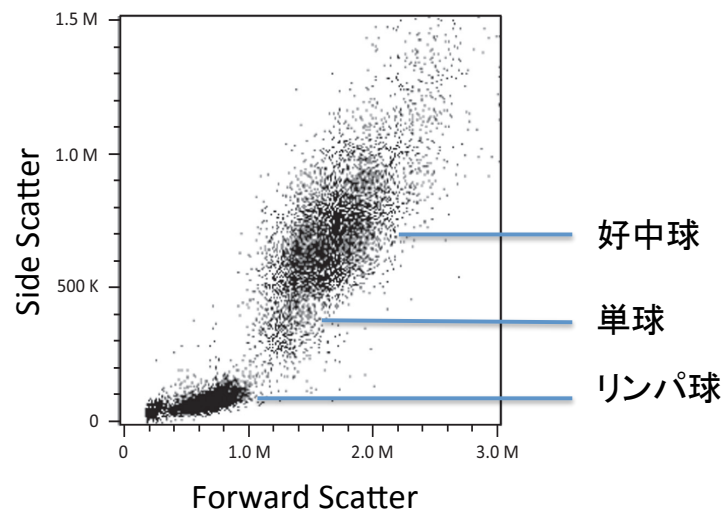


図12 ヒト全血の実際の代表的サイトグラム。正しく溶血された血液は図の位置にそれぞれの細胞集団が存在することが知られている ([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

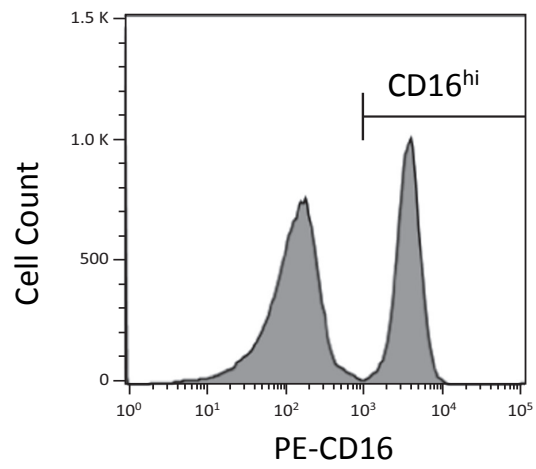


図13 CD16のヒストグラム。ヒト白血球では図のように明確にCD16陽性集団を識別できた([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

この細胞表面CD11bに関し、健常者の代表例の全血中の好中球のベースライン、肺胞蛋白症患者の代表例の全血中の好中球のベースラインは次の図14の白のヒストグラムのようになる。GM-CSFによる刺激で健常者の血液でのCD11b_{Surface}はグレーのヒストグラムのように大きく上昇したが、自己免疫性肺胞蛋白症患者の血液ではこの上昇は見られなかった。

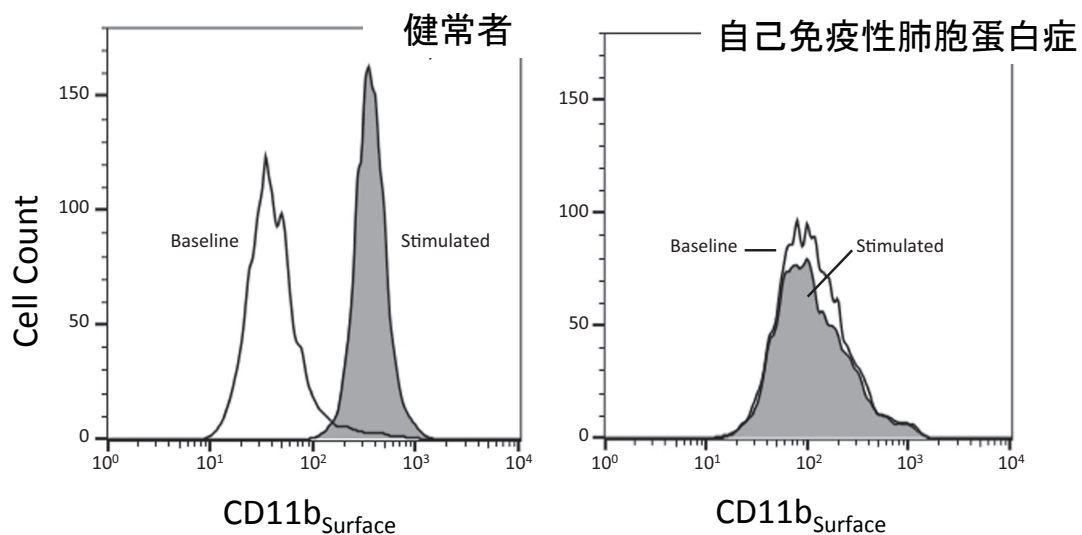


図14 好中球表面のCD11b_{Surface} の実際のヒストグラム。白い曲線は無刺激の状態であり、グレーの曲線はGM-CSFで刺激している状態である。GM-CSFの刺激に応じて健常者血液ではCD11b_{Surface}は上昇し(左)、自己免疫性肺胞蛋白症患者ではこれが上昇しない(右) ([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

健常群では、図15のように刺激のGM-CSF濃度の上昇に応じてCD11b_{Surface}の上昇率も大きくなり、10ng/mLでプラトーに達するのに対し、自己免疫性肺胞蛋白症患者ではこの反応が強く抑制されていた。よってこの10ng/mLのGM-CSFを本論文の標準刺激濃度とした。

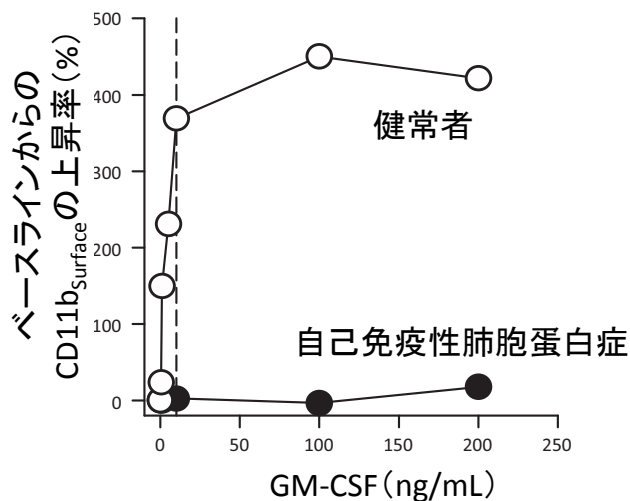


図15 種々の濃度のGM-CSFで刺激した際のCD11b_{Surface}の上昇率。○は健常群、●は自己免疫性肺胞蛋白症患者群を示す。点線は10ng/mLの刺激濃度を示す([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

次に、実際の測定を行う上でGM-CSF刺激によるCD11b_{Surface}の上昇度に影響を与える因子について検討し、最適な実験条件の設定を試みた。

まず採血チューブ内の抗凝固薬についての検討を行った。EDTAとヘパリンそれぞれを含むチューブで採血し、その存在下でGM-CSFによる刺激を行った。GM-CSF刺激の無い状態でのCD11b_{Surface}のレベルには差は無かった(P = 0.174)が、GM-CSF刺激によるCD11b_{Surface}の上昇度は、EDTA採血サンプルで有意に低く、ヘパリン採血サンプルでは良く保たれていた(図16) (P < 0.001)。

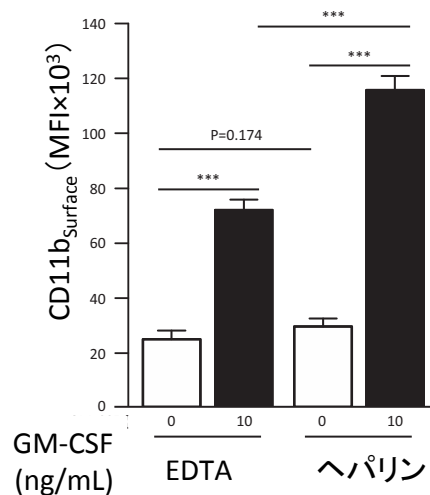


図16 抗凝固薬がCD11b_{Surface}に与える影響。10ng/mLのGM-CSFで刺激した場合のCD11b_{Surface}の上昇度をEDTAチューブとヘパリンチューブで比較した。白は無刺激、黒はGM-CSF刺激後のCD11bレベルを示す。平均±SDで示した。ANOVA with Dunnett's test、*** = P < 0.001 ([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

通常血液は室温で採血され、室温、氷上(もしくは冷蔵庫)、37°Cなど種々の条件で保存される。そこで、これらの温度変化によるCD11b_{Surface}への影響を検討した。図17に示すように、血液を室温(25°C)に30分静置したのちに37°Cで30分インキュベーションした群と、はじめから37°Cで60分インキュベーションした群では、ベースラインのCD11b_{Surface}は差異が無かった。しかし、一度0°Cで30分静置したのちに37°Cで30分インキュベーションした群では、CD11b_{Surface}は140%上昇していた。従って、引き続き実験は採血した後冷蔵庫に保存すること無く、全て室温で行うものとした。

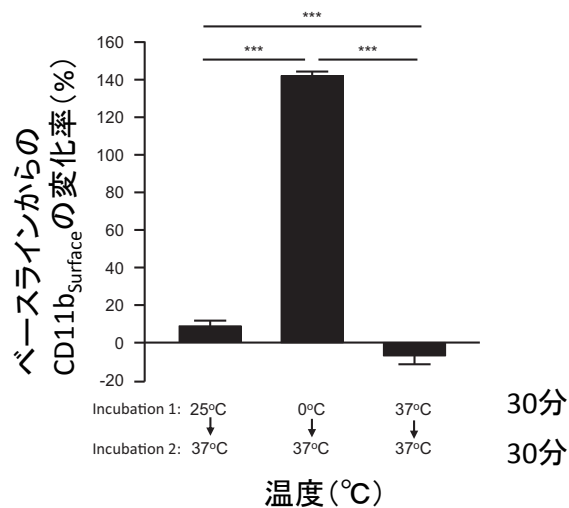


図17 CD11b_{Surface}の測定までの血液の保存状態によるCD11b_{Surface}。それぞれ25°C、0°C、37°Cで30分インキュベートしCD11b_{Surface}を測定、その後37°C30分インキュベートして、CD11b_{Surface}を測定した。ベースラインに対する変化率を、平均±SDで示した。ANOVA with Dunnett's test、*** = P<0.001 ([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

次に、採血後の経過時間による $CD11b_{Surface}$ への影響を評価した。10ng/mLのGM-CSF刺激による $CD11b_{Surface}$ 上昇の程度は、採血直後に刺激した場合には良く反応するが、1日以上静置したのちにGM-CSFで刺激して抗体による染色と白血球表面の固定まで行った場合は、 $CD11b_{Surface}$ の上昇の程度は大きく減弱していた。一方、採血後速やかにGM-CSFにより刺激し、抗体による染色と白血球表面の固定まで行ったのちに検体を数日間室温で静置した場合には、採血後6日目まで大きな変化無く $CD11b_{Surface}$ を測定することが可能であった(図18)。

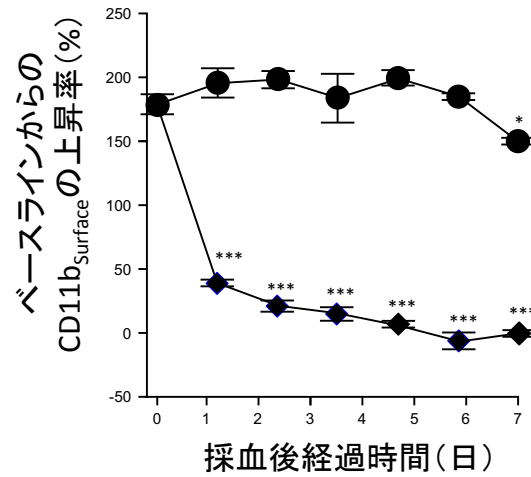


図18 GM-CSF刺激からフローサイトメーターでのCD11b_{Surface}測定までの時間の影響を示す。●は採血後速やかにGM-CSFで刺激して染色、固定まで行い、数日室温で保存してからCD11b_{Surface}を測定した群、◆は数日室温で保存してからGM-CSFで刺激してCD11b_{Surface}を測定した群を示す。ANOVA with Dunnett's test、* = P<0.05、*** = P<0.001 ([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

さらに時間と温度によるCD11b_{Surface}への影響を見るために、種々の温度で一定時間保存したのちの比較を行った。CD11b_{Surface}は氷上に静置した場合には低下し、逆に37℃に置いた場合には採血後2時間の時点から上昇が見られており、室温に置いていた場合でもCD11b_{Surface}は4時間の時点から上昇が見られた(図19上)。

一方、測定値としての蛍光強度ではなく10ng/mLのGM-CSF刺激に伴うCD11b_{Surface}のパーセント上昇率に着目した場合、室温に置く時間の長さによって低下が見られた(図19下)。

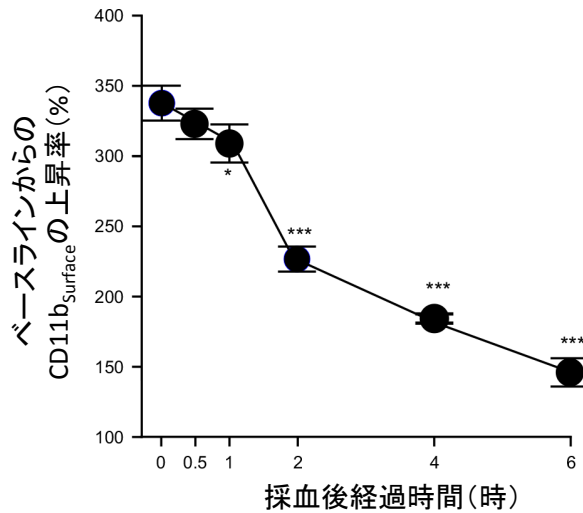
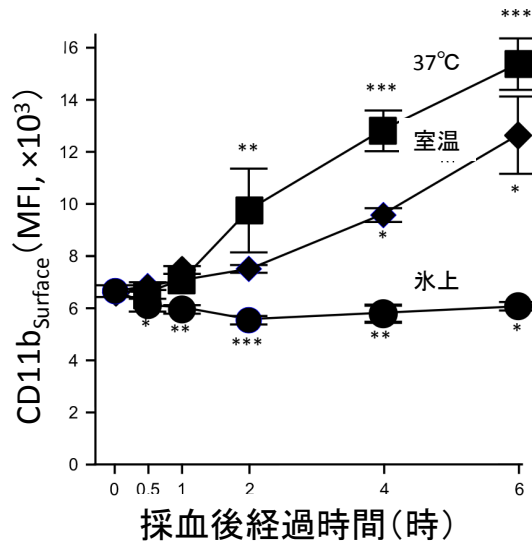


図19 CD11b_{Surface} への温度と時間の影響。上.血液をそれぞれの温度で一定時間保存してCD11b_{Surface}を測定した。下.採血後25°Cで一定時間保存したのちに10ng/mLのGM-CSFで刺激したときのCD11b_{Surface}の上昇率を示した。ANOVA with Dunnett's test、* = P<0.05、** = P<0.01、*** = P<0.001 ([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

GM-CSFによるCD11b_{Surface}の変化のメカニズムを明らかにするために、好中球におけるCD11bの細胞表面と細胞質の局在分布を評価した。細胞表面のCD11b

(CD11b_{Surface})と細胞質のCD11b(これをCD11b_{Cytosol}とする)を同時に検出するために、

CD11b_{Surface}をFITC標識抗CD11bで、CD11b_{Cytosol}をPE標識抗CD11bで染色した。

GM-CSF刺激に伴い、フローサイトメーターのサイトグラム上好中球集団がシフトしており、CD11b_{Surface}が上昇してCD11b_{Cytosol}が低下している様子が見られた(図20)。

細胞内外のCD11bの総量をCD11b_{Total}とすると、フローサイトメーターによる蛍光強度

の測定でCD11b_{Surface}がGM-CSF刺激により上昇する一方、CD11b_{Cytosol}は低下が見ら

れ、CD11b_{Total}は刺激前後で差が無かった。CD11b_{Surface}とCD11b_{Cytosol}を同じFITC標識

CD11bで染色しフローサイトメーターで測定すると、CD11b_{Total}はGM-CSF刺激前後で

の変化は見られなかった(図21)。

GM-CSFがGM-CSF受容体 α 鎖に結合すると、GM-CSF受容体 β 鎖よりシグナルが細胞内に伝達される。この直下の変化であるSTAT5のリン酸化を検出することで、

GM-CSFシグナルが正常に細胞内に伝達されたことを見ることができる。ウエスタンブ

ロットニングで観察した場合、GM-CSF刺激によりリン酸STAT5の上昇は認められるが、

細胞内外のCD11b蛋白の総量($CD11b_{Total}$)はGM-CSF刺激前後での変化は見られなかった(図22)。

GM-CSF刺激による $CD11b_{Surface}$ の上昇だけでなく採血後の経時的な $CD11b_{Surface}$ の上昇に着目した場合にも、 $CD11b_{Surface}$ の上昇に従って $CD11b_{Cytosol}$ が徐々に低下するのが観察された(図23)。

これらを合わせると、CD11bは刺激に備えて好中球内で予め貯蔵されていたものが、GM-CSFの刺激で細胞表面に移動していると考えられる。

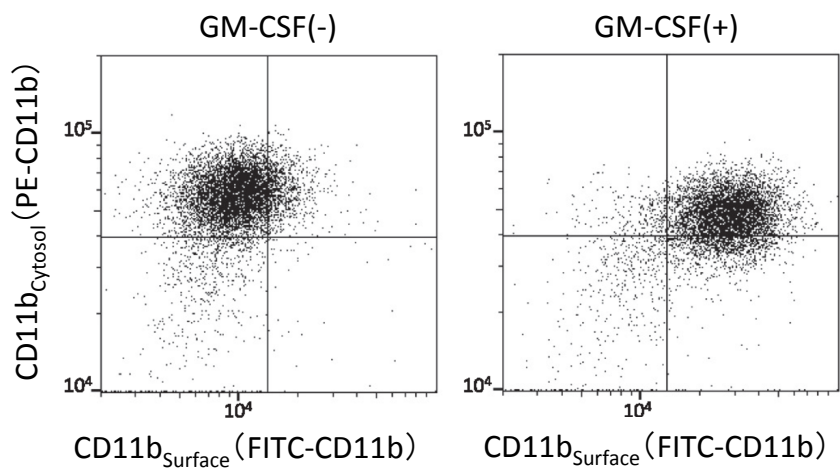


図 20 GM-CSF 刺激による CD11b の細胞表面への移動を示すサイトグラム。好中球表面の CD11b を FITC 標識 CD11b で染色 ($CD11b_{Surface}$) し、細胞内 CD11b を PE 標識 CD11b で染色 ($CD11b_{Cytosol}$) した時の典型的なサイトグラム像を示す。細胞集団は全体として右下にシフトしており、これは GM-CSF 刺激による $CD11b_{Surface}$ の上昇に伴って $CD11b_{Cytosol}$ が低下しているものと判断した ([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

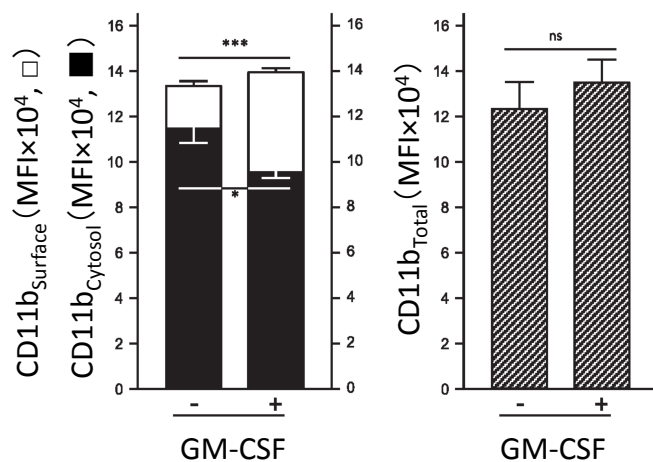


図 21 好中球の CD11b_{Surface}、CD11b_{Cytosol}、CD11b_{Total} の定量。左.好中球の CD11b_{Surface} (白)と CD11b_{Cytosol} (黒)の定量。GM-CSF 刺激により CD11b_{Surface} が上昇するにつれて CD11b_{Cytosol} には低下がみられた。右. CD11b_{Surface} と CD11b_{Cytosol} を同じ FITC 標識 CD11b で染色したときの合計の蛍光強度。CD11b_{Total} は GM-CSF 刺激の前後で変化が無かった。Student's t test、* = P<0.05、*** = P<0.001 ([33]共著者と出版社の許可を得て転載)。

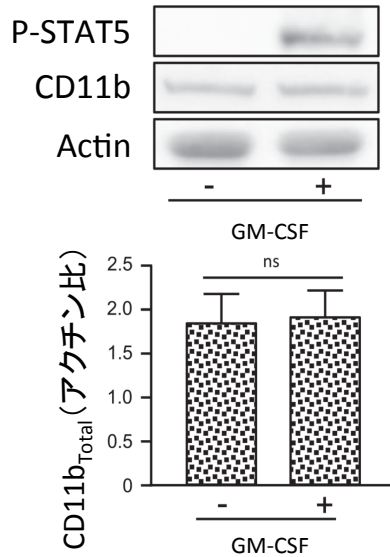


図22 ウェスタンブロッティングによるCD11b_{Total}の定量。健常者の血液を2つに分け、GM-CSF10ng/mLで刺激する群および刺激しない群の白血球から抽出したタンパク質で、リン酸化STAT5、アクチンを定量した。図3に示したようにGM-CSFの刺激によりその直下のリン酸化STAT5が出現することがGM-CSFシグナルが細胞内に伝達された指標となるが、総量としてのCD11bは変化が無かった([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

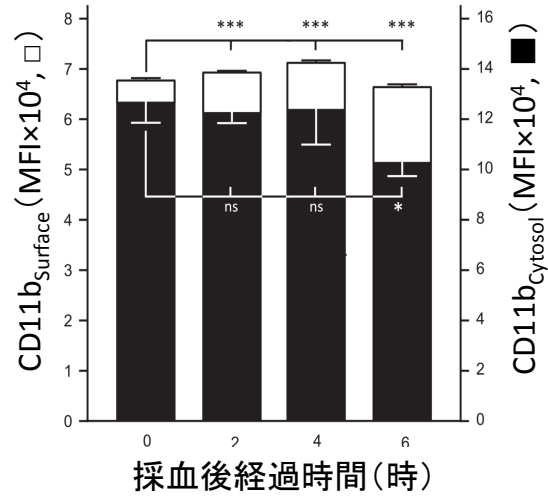


図23 好中球のCD11b_{Surface} (白)とCD11b_{Cytosol} (黒)の経時的変化。採血後時間が経つとCD11b_{Surface}が上昇し、それに伴ってCD11b_{Cytosol}が減少する。ANOVA、* = P<0.05、*** = p<0.001 ([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

CD11b-Stimulation indexの応用

次にCD11b-Stimulation indexが、高濃度の抗GM-CSF中和抗体によってGM-CSFシグナルが障害されている自己免疫性肺胞蛋白症患者と正常なGM-CSFシグナルである健常群を区別して検出する力について検討した。

CD11b-Stimulation indexと定義した標準刺激濃度(10ng/mL)のGM-CSFでは、健常群では450%程度までの上昇が見られたのに対し、自己免疫性肺胞蛋白症群では上昇が見られなかった(図24)。健常群と自己免疫性肺胞蛋白症群の違いは、より低いGM-CSF刺激濃度(1ng/mL)でも明らかであった。より高い刺激濃度(100ng/mL)のGM-CSFでは、健常群では10ng/mLでの刺激と違いが少なく、自己免疫性肺胞蛋白症群では有意に上昇していた。

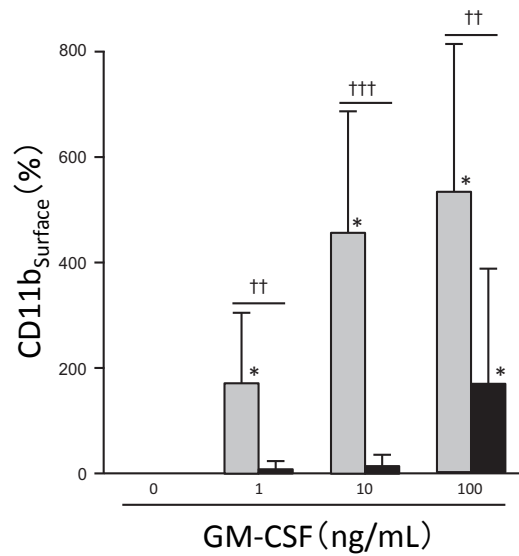


図24 GM-CSFシグナル障害の検出。種々のGM-CSF濃度で刺激した健常群 (n = 22) のCD11b_{Surface}の上昇率(グレー)、および自己免疫性肺胞蛋白症 (n = 5) のCD11b_{Surface}の上昇率(黒)を示した。GM-CSF 0ng/mLの群と比べて、刺激により健常群では1 ng/mL、10ng/mL、100ng/mL群で、また自己免疫性肺胞蛋白症群では100ng/mL群で有意にCD11b_{Surface}の上昇が見られた。* = P < 0.05; また、どの刺激濃度でも、肺胞蛋白症群では健常群より有意に低かった。†† = P < 0.01、††† = P < 0.001 ([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

GM-CSFシグナル障害を検出する方法としてのCD11b-Stimulation indexの信頼性を検討するために、9人の健常者でそれぞれ複数回のCD11b-Stimulation indexを測定し、1人の被験者内での複数回測定の変動の幅と被験者間での変動の幅を比較した。

1人の被験者内の複数回測定の変動係数は $5.3 \pm 3.5\%$ であり、これは標準検査の正確性に関する米国食品医薬品局（Food and Drug Administration of the United States Department of Health and Human Service; FDA）のガイドラインである15%以内に収まっている[34]。また、被験者内の複数回測定の変動係数は被験者間の変動係数よりも有意に小さかった(図25)。以上を合わせ、CD11b-Stimulation indexはGM-CSFシグナル異常を検出する上で、個々の持つ値が有意に違うことを検出することが出来るアッセイであると考えられる。

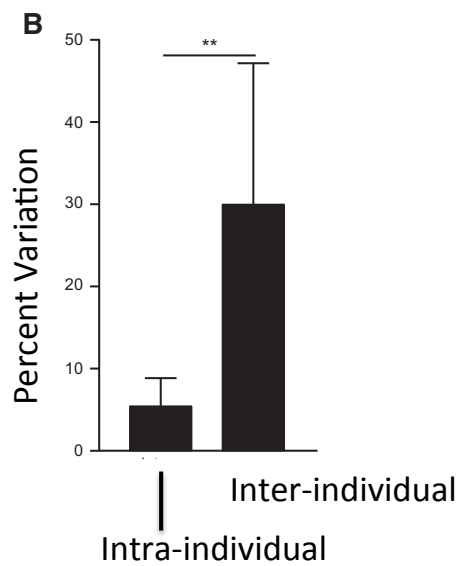
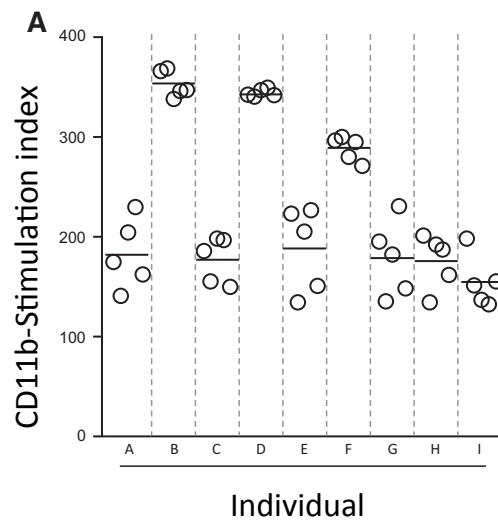


図25 CD11b-Stimulation indexの変動幅に関する検定。9人の健常者の血液を用いて、被験者1人あたり5回独立した行程によりCD11b-Stimulation indexを測定した。A. それぞれの測定を円で示し、分布を表した。B. 1人の被験者内での変動の幅 (intra-subject) は、被験者間の変動の幅 (inter-subject) よりも小さい。Student's t検定、** = $P < 0.01$ ([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

CD11b-Stimulation indexのカットオフ値

ヒトの臨床検体においてGM-CSFのシグナル障害を検出する方法としての

CD11b-Stimulation indexの診断能力を見るために、自己免疫性肺胞蛋白症および健

常群においてこれを測定した。自己免疫性肺胞蛋白症患者のCD11b-Stimulation

index (3.61[-7.97 - 10.95]; n = 10)は健常者 (321[195-524]; n = 34)よりも顕著に低く、

この2つの間には明確な違いを認めた(図26、図27)。

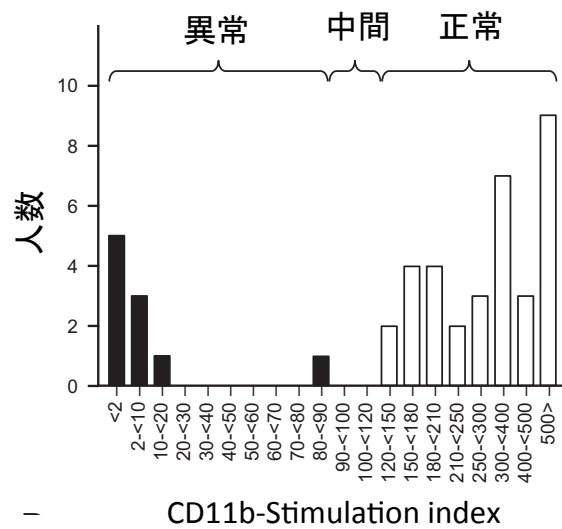
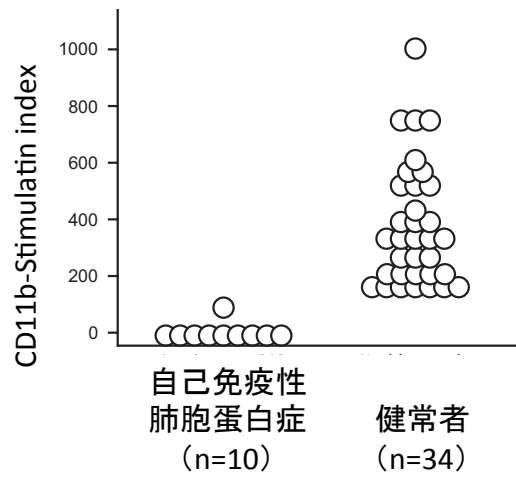


図26 CD11b-Stimulation indexの分布。上.自己免疫性肺胞蛋白症(10人)と健常者(34人)の分布。下.自己免疫性肺胞蛋白症(■、10人)と健常者(□、34人)のヒストグラム([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

ROC曲線で解析すると、CD11b-Stimulation indexによる自己免疫性肺胞蛋白症の診断能力は、感度、特異度ともに100%であり、最適なカットオフ値は112であった(図27)。

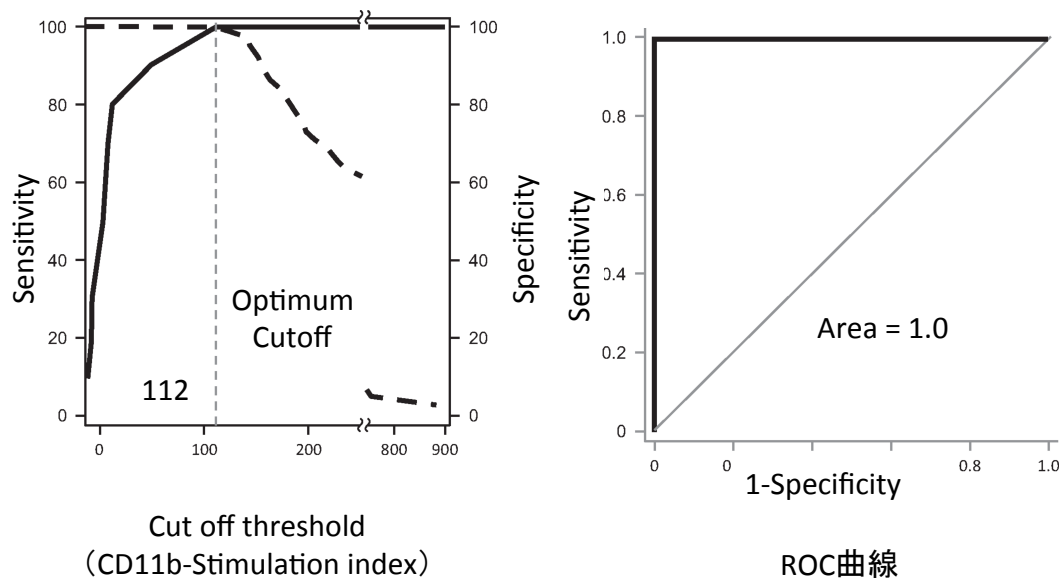


図27 ROC曲線による感度と特異度の検討。自己免疫性肺胞蛋白症(n = 10)、健常群(n = 34)。Area under the curve (AUC)は1.0となる([33]より共著者と出版社の許可を得て転載)。

考察

本研究では、ヒト全血を対象試料として、GM-CSFで刺激した際の好中球表面のCD11bの上昇の程度によりGM-CSFシグナル障害を検出する手法の信頼性について評価し、測定系の最適化および標準化を試みたものである。

健常人では、GM-CSFは好中球を刺激してその細胞内であらかじめ形成されていたCD11bを細胞表面に迅速に移行させるが、一方自己免疫性肺胞蛋白症患者はこの反応が認められない。10ng/mLのGM-CSFで30分刺激した際の好中球表面のCD11bの上昇の程度を見る手法であるCD11b-Stimulation indexは、このGM-CSFシグナルが障害されている自己免疫性肺胞蛋白症患者と健常人を区別する上で感度、特異度とも100%であるため、侵襲的な気管支鏡検査や血液の精製の手間や時間を必要としない簡便さもあわせて、ルーチンな検査となりうるものである。

血清中の抗GM-CSF自己抗体を測定する抗GM-CSF抗体のELISAテスト(GMAb ELISA) [35]は既に報告されているが、これも自己免疫性肺胞蛋白症の診断において感度、特異度とも100%となるよう近年標準化への検討がなされた[31]。抗GM-CSF自己抗体は、自己免疫性肺胞蛋白症で観察される単なる随伴現象で無く原因物質であ

るとされるため、GMAb ELISAの診断的利用価値は高い[10][11]。これは、抗GM-CSF自己抗体による自己免疫性肺胞蛋白症の発症における閾値の存在[18]、また患者血液中の抗GM-CSF自己抗体を注射し肺胞蛋白症の症状を呈する閾値に関する動物実験[11]によってもその意味は明確である。

抗GM-CSF抗体を直接測定するELISAで、肺胞蛋白症の診断閾値は $5 \mu\text{g/mL}$ であると示されている[31]。この論文中では抗GM-CSF自己抗体価は、健常者では $3 \mu\text{g/mL}$ 未満で、自己免疫性肺胞蛋白症患者では $9 \mu\text{g/mL}$ 以上であったが、抗体価が閾値の $5 \mu\text{g/mL}$ 近辺($3-9 \mu\text{g/mL}$)の検体では、直接的な抗GM-CSF自己抗体測定の診断精度が弱まることが懸念される。全血でGM-CSFシグナル障害を測定する手法であるCD11b-Stimulation indexは、このようにELISAで測定した抗GM-CSF自己抗体のレベルが閾値に近い場合でも、そのシグナル異常を評価出来る。これまで述べたように、CD11b-Stimulation indexのカットオフ値を112とすることでGM-CSFシグナル障害つまり自己免疫性肺胞蛋白症を適確に診断することが出来ることが期待される。しかしCD11b-Stimulation indexもカットオフ値112に近い場合には判断が難しい場面が存在しうると考えられ、このCD11b-Stimulation indexのルーチン検査としての正確性を高め手法を洗練させていくためにさらなる研究が必要である。

遺伝性肺胞蛋白症のうちGM-CSF受容体の遺伝子異常が原因である場合、GM-CSF刺激では好中球表面のCD11bの値には変化が見られない[22]。従って、臨床症状や画像診断と合わせて、ELISAで測定した抗GM-CSF自己抗体レベルが正常範囲で且つCD11b-Stimulation indexが低値であると、遺伝性肺胞蛋白症と判断することが出来る。また、極端に高い濃度のGM-CSFで刺激すると自己免疫性肺胞蛋白症ではCD11b_{Surface}を上昇させることが出来るが、遺伝性肺胞蛋白症ではこの反応が起こらない。つまりより高いGM-CSFの刺激濃度によるCD11b_{Surface}の上昇度の測定が、遺伝性肺胞蛋白症および自己免疫性肺胞蛋白症を診断し分けることができる(表4)。二次性肺胞蛋白症では健常に類似した反応を示す可能性があるが、原疾患の背景が多様であるため一概に示すことが出来ない。

表4 CD11b-Stimulation indexを利用した肺胞蛋白症の細分類。

	CD11b-Stimulation index (10ng/mL)	極端なGM-CSF刺激	抗GM-CSF自己抗体ELISA
自己免疫性肺胞蛋白症	低値	反応あり	高値
遺伝性肺胞蛋白症 (GM-CSF受容体異常によるものに限定した場合)	低値	反応なし	正常範囲
健常	高値	反応あり	正常範囲

CD11b-Stimulation indexは抗GM-CSF自己抗体によるGM-CSFシグナルの障害の程度を機能面から定量するものである。自己免疫性肺胞蛋白症の患者において、ELISAで直接的に測定した抗GM-CSF自己抗体の値が閾値以下の場合でも寛解や再発をモニターするのに有用である可能性が考えられる。さらに、CD11b-Stimulation indexは臨床的に肺胞蛋白症以外にも応用の余地が残されている。例えばCD11b_{Surface}が好中球の活性化状態を反映したものであると考えると、GM-CSF活性が上昇している重症感染症や炎症性疾患などでも応用できる可能性がある[28][36][37]。さらに、自己免疫性疾患でGM-CSF活性を低下させることを目的とする臨床試験[28]での治療効果の判定や、もしくは悪性疾患の化学療法中にリコンビナントヒトGM-CSF製剤を使用している患者に生じた中和抗体[38]の機能評価について有用であると考えられる。この測定方法にはいくつかの問題点や短所がある。

ひとつは、採血後迅速に検査を開始しなければいけないということがある。GM-CSFによるCD11b_{Surface}の上昇の程度は採血後1時間で低下し始め、6時間後には大きく減弱しており、24時間の時点ではほとんどGM-CSF刺激に反応しない。これは好中球を刺激するリソフォスファチジルコリンが経時的に生成されてくることによって[39]、刺激前のベースラインのCD11b_{Surface}が上昇することが原因の一つであると考えられる。採血後

放置しておく好中球は自発的にアポトーシスを来すが、3時間までは検査結果に大きな影響を与えない[8][40]。これらの時間的な影響を避けるためには、本研究の結果によると採血1時間以内に迅速にGM-CSFによる刺激と溶血、固定のステップを終了させることが必要であり、これにより冷暗所に保管することでおよそ6日後まで大きな影響なくフローサイトメーターでの測定を行うことが出来る。

また、血液に例えば氷冷から室温や37°Cなどへの急激な温度変化を与えることでCD11b_{Surface}は影響を受けることが明らかになり、これは過去の報告と矛盾しない[41]。さらに、採血後に室温周囲の温度で保存および測定することで好中球の表面抗原に関して安定した結果を繰り返し得ることが出来るとする報告があり[42]、今回の結果からも室温で保存、測定を行うことが重要であると考えられる。血液の抗凝固薬としてEDTAを使用すると、ベースラインとしてのCD11b_{Surface}には変化が無いがGM-CSFによるCD11b_{Surface}の上昇度が減弱したが、これはCD11bの細胞表面への移動にカルシウムイオンが必須であるとする過去の報告[43]と合致している。

CD11b_{Surface}の測定は、フローサイトメーターの測定器自体の誤差(レーザーや機械の設定など)による影響はあり得ると考えられ、蛍光強度の絶対値で議論する場合には特に影響が無視できない。しかし、CD11b-Stimulation indexつまり無刺激状態の

CD11b_{Surface}に対するGM-CSF刺激後のCD11b_{Surface}の上昇率の形で表現することで、別の測定日や多施設での比較にも応用できると考えられる。さらに、GM-CSF刺激によるCD11b_{Surface}の上昇度や自己免疫性肺胞蛋白症のGM-CSFシグナル障害の検出感度は、刺激に用いるGM-CSFの濃度の影響を受ける[18]。

このように、CD11b_{Surface}の値には、測定以前の血液準備状態、保存状態が影響する[44]ことに注意しなければならない。

我々はこれらの問題点にそれぞれ適切に対応できる方法として、今回の標準化を試みた。我々の行っている方法では、血液をヘパリン入りチューブ内に採血し、その後の保存は25°Cの室温で行い、採血後1時間以内に全血のままGM-CSF 10ng/mLの標準濃度で刺激し、即座に抗体による染色、溶血、および白血球表面の固定を行う。その後は冷暗所に保存し、検体はおおよそ24時間以内の出来るだけ早い時点でフローサイトメーターでの測定を行い、結果は、GM-CSFによって上昇したCD11b_{Surface}をベースラインのCD11b_{Surface}に対する上昇率として示した。この方法は、侵襲的な気管支鏡検査や採血後の血液の分離精製の時間や手間が必要無く、臨床検査の場においても基礎研究の場においても迅速に行うことが出来る。

自己免疫性肺胞蛋白症の好中球は構造上には健常好中球と差異を認めず、通常と同じ表面マーカーを発現している。この患者血液から好中球のみを分離してGM-CSFで刺激するとCD11b_{Surface}の上昇が認められるため、CD11b-Stimulation indexが低い原因は、好中球の機能異常では無く血中に中和能を持つ因子例えば抗GM-CSF自己抗体が存在するためと考えられる[8][15]。患者血清中の抗GM-CSF自己抗体レベルとCD11b-Stimulation indexの間には図29のような相関が報告されおり、全体として負の相関を示し、両者は密接に関連しているものと考えられる。

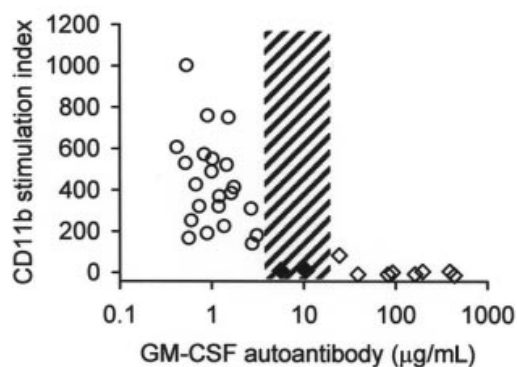


図28 健常者と自己免疫性肺胞蛋白症患者の抗GM-CSF自己抗体の血中レベルとCD11b-Stimulation indexの関係。○は健常者、◇は自己免疫性肺胞蛋白症で、黒い斜線は境界領域を示す([15]より改変して引用)。

以上より、今回標準化した手順によるCD11b-Stimulation indexは、自己免疫性肺胞蛋白症の患者のGM-CSFシグナル障害を評価する際にはもちろんであるが、患者血液から精製した抗GM-CSF自己抗体による自己免疫性肺胞蛋白症の動物モデルで [10][11]、またその他の炎症性疾患[32]で評価するのに応用できる、簡便で再現性の高い手法であると考える。

謝辞

はじめに、本研究を行う機会を頂き当初よりご指導頂きました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻生体管理医学講座麻酔学分野の山田芳嗣教授に心より感謝申し上げます。同じく本研究を一貫してご指導頂き終始温かく支えて下さった東京大学大学院医学系研究科外科学専攻生体管理医学講座麻酔学分野の内田寛治准教授に深く感謝申し上げます。

東京大学大学院医学系研究科麻酔学教室の第一研究室のメンバーである鈴木洋子さん、戸津ときえさんには、実験手技やデータの取得、そのまとめ方をご指導頂きました。また、米国Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Perinatal Institute, Division of Pulmonary BiologyのBruce C. Trapnell教授、鈴木拓児先生、Brenna C. Carey先生の研究室より生み出された膨大な成果が本研究の根幹にあり、深甚なる敬意と感謝を申し上げます。

最後に、本研究は以下の資金的な援助を受けたことをここに報告し、感謝申し上げます。

- National Heart Lung and Blood Institute (R01 HL085453)
- National Center for Research Resources (U54 RR0198498)
- 日本学術振興会 (A232490720001、B24390364)
- 厚生労働省 (難治等(難)-一般-035、臨研推-一般-003)

引用文献

1. Rosen, S.H., Castleman, B., Liebow, A.A. Pulmonary alveolar proteinosis. *N. Engl. J. Med.* 258, 1123., 1958.
2. Noguee, L.M. Genetic basis of children's interstitial lung disease. *Pediatr. Allergy Immunol. Pulmonol.* 23, 15., 2010.
3. Whitsett, J.A., Wert, S.E., Trapnell, B.C. Genetic disorders influencing lung formation and function at birth. *Hum. Mol. Genet.* 13, R207., 2004.
4. Ishii, H., Trapnell, B.C., Tazawa, R., Inoue, Y., Akira, M., Kogure, Y., Tomii, K., Takada, T., Hojo, M., Ichihata, T., Goto, H., Nakata, K. Comparative study of high-resolution CT findings between autoimmune and secondary pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* 136, 1348., 2009.
5. Trapnell, B.C., Whitsett, J.A., Nakata, K. Pulmonary alveolar proteinosis. *N. Engl. J. Med.* 349, 2527., 2003.
6. Kitamura, T., Tanaka, N., Watanabe, J., Uchida, Kanegasaki, S., Yamada, Y., Nakata, K. Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease

- with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 190, 875., 1999.
7. Uchida, K., Nakata, K., Trapnell, B.C., Terakawa, T., Hamano, E., Mikami, A., Matsushita, I., Seymour, J.F., Oh-Eda, M., Ishige, I., Eishi, Y., Kitamura, T., Yamada, Y., Hanaoka, K., Keicho, N. High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood* 103, 1089., 2004.
 8. Uchida, K., Beck, D.C., Yamamoto, T., Berclaz, P.Y., Abe, S., Staudt, M.K., Carey, B.C., Filippi, M.D., Wert, S.E., Denson, L.A., Puchalski, J.T., Hauck, D.M., Trapnell, B.C. GM-CSF autoantibodies and neutrophil dysfunction in pulmonary alveolar proteinosis. *N. Engl. J. Med.* 356, 567., 2007.
 9. Ikegami, M., Jobe, A.H., Huffman Reed, J.A., Whitsett, J.A. Surfactant metabolic consequences of overexpression of GM-CSF in the epithelium of GM-CSF-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 273(4 Pt 1):L709., 1997.

10. Sakagami, T., Uchida, K., Suzuki, T., Carey, B.C., Wood, R.E., Wert, S.E., Whitsett, J.A., Trapnell, B.C., Luisetti, M. Human GM-CSF autoantibodies and reproduction of pulmonary alveolar proteinosis. *N. Engl. J. Med.* 361, 2679., 2009.
11. Sakagami, T., Beck, D., Uchida, K., Suzuki, T., Carey, B.C., Nakata, K., Keller, G., Wood, R.E., Wert, S.E., Ikegami, M., Whitsett, J.A., Luisetti, M., Davies, S., Krischer, J.P., Brody, A., Ryckman, F., Trapnell, B.C. Patient-derived granulocyte/macrophage colony-stimulating factor autoantibodies reproduce pulmonary alveolar proteinosis in nonhuman primates. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 49., 2010.
12. Trapnell, B.C., Carey, B.C., Uchida, K., Suzuki, T. Pulmonary alveolar proteinosis, a primary immunodeficiency of impaired GM-CSF Stimulation of macrophages. *Curr Opin Immunol.* 21, 514., 2009.
13. Lieschke, G.J., Burgess, A.W. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (1). *N. Engl. J. Med.* 327, 28., 1992.

14. Condliffe, A.M., Kitchen, E., Chilvers, E.R. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin. Sci. (Lond.)* 94, 461., 1998
15. Uchida, K., Nakata, K., Suzuki, T., Luisetti, M., Watanabe, M., Koch, D.E., Stevens, C.A., Beck, D.C., Denson, L.A., Carey, B.C., Keicho, N., Krischer, J.P., Yamada, Y., Trapnell, B.C. Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy subjects. *Blood* 113, 2547., 2009.
16. Trapnell, B.C., Whitsett, J.A. Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 775., 2002.
17. Seymour, J.F., Doyle, I.R., Nakata, K., Presneill, J.J., Schoch, O.D., Hamano, E., Uchida, K., Fisher, R., Dunn, A.R. Relationship of anti-GM-CSF antibody concentration, surfactant protein A and B levels, and serum LDH to pulmonary parameters and response to GM-CSF therapy in patients with idiopathic alveolar proteinosis. *Thorax* 58, 252., 2003.

18. Bendtzen, K., Svenson, M., Hansen, M.B., Busch, T., Bercker, S., Kaisers, U., Uchida, K., Beck, D.C., Trapnell, B.C. GM-CSF autoantibodies in pulmonary alveolar proteinosis. *N. Engl. J. Med.* 356, 2001., 2007.
19. Nogee, L.M. Genetic basis of children's interstitial lung disease. *Pediatr. Allergy Immunol. Pulmonol.* 23, 15., 2010. Whitsett, J.A., Wert, S.E., Trapnell, B.C. Genetic disorders influencing lung formation and function at birth. *Hum. Mol. Genet.* 13, R207., 2004.
20. Martinez-Moczygemba, M., Doan, M.L., Elidemir, O., Fan, L.L., Cheung, S.W., Lei, J.T., Moore, J.P., Tavana, G., Lewis, L.R., Zhu, Y., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., Huston, D.P. Pulmonary alveolar proteinosis caused by deletion of the GM-CSFRalpha gene in the X chromosome pseudoautosomal region 1. *J. Exp. Med.* 205, 2711., 2008.
21. Suzuki, T., Sakagami, T., Rubin, B.K., Nogee, L.M., Wood, R.E., Zimmerman, S.L., Smolarek, T., Dishop, M.K., Wert, S.E., Whitsett, J.A., Grabowski, G., Carey, B.C., Stevens, C., van der Loo, J.C., Trapnell, B.C. Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *J. Exp. Med.* 205, 2703., 2008.

22. Suzuki, T., Sakagami, T., Young, L.R., Carey, B.C., Wood, R.E., Luisetti, M., Wert, S.E., Rubin, B.K., Kevill, K., Chalk, C., Whitsett, J.A., Stevens, C., Nogee, L.M., Campo, I., Trapnell, B.C. Hereditary pulmonary alveolar proteinosis: pathogenesis, presentation, diagnosis, and therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 1292., 2010.
23. Dranoff, G., Crawford, A.D., Sadelain, M., Ream, B., Rashid, A., Bronson, R.T., Dickersin, G.R., Bachurski, C.J., Mark, E.L., Whitsett, J.A., et al. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 264, 713., 1994.
24. Nishinakamura, R., Nakayama, N., Hirabayashi, Y., Inoue, T., Aud, D., McNeil, T., Azuma, S., Yoshida, S., Toyoda, Y., Arai, K. Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 beta c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while beta IL3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity.* 2, 211., 1995.
25. Lang, R.A., Metcalf, D., Cuthbertson, R.A., Lyons, I., Stanley, E., Kelso, A., Kannourakis, G., Williamson, D.J., Klintworth, G.K., Gonda, T.J., et al.

Transgenic mice expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage. *Cell* 51, 675., 1987.

26. Reed, J.A., Ikegami, M., Robb, L., Begley, C.G., Ross, G., Whitsett, J.A. Distinct changes in pulmonary surfactant homeostasis in common beta-chain- and GM-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 278, 1164., 2000.
27. Hamilton, J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 533., 2008.
28. Cook, A.D., Pobjoy, J., Sarros, S., Steidl, S., Dürr, M., Lacey, D.C., Hamilton, J.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a key mediator in inflammatory and arthritic pain. *Ann Rheum Dis.* 72, 265., 2013.
29. Ohta, K., Yamashita, N., Tajima, M., Miyasaka, T., Nakano, J., Nakajima, M., Ishii, A., Horiuchi, T., Mano, K., Miyamoto, T. Diesel exhaust particulate induces airway hyperresponsiveness in a murine model: essential role of GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol.* 104, 1024., 1999.

30. Graves, V., Gabig, T., McCarthy, L., Strour, E.F., Leemhuis, T., English, D.
Simultaneous mobilization of Mac-1 (CD11b/CD18) and formyl peptide
chemoattractant receptors in human neutrophils. *Blood* 80, 776., 1992.
31. Uchida, K., Nakata, K., Carey, B., Chalk, C., Suzuki, T., Sakagami, T., Koch,
D.E., Stevens, C., Inoue, Y., Yamada, Y., Trapnell, B.C. Standardized serum
GM-CSF autoantibody testing for the routine clinical diagnosis of autoimmune
pulmonary alveolar proteinosis. *J. Immunol. Methods* 402, 57., 2014.
32. Han, X., Uchida, K., Jurickova, I., Koch, D., Willson, T., Samson, C., Bonkowski,
E., Trauernicht, A., Kim, M.O., Tomer, G., Dubinsky, M., Plevy, S., Kugathsan,
S., Trapnell, B.C., Denson, L.A. Granulocyte-macrophage colony stimulating
factor autoantibodies in murine ileitis and progressive ileal Crohn's disease.
Gastroenterology 136 (1261-71), e1., 2009.
33. Kusakabe, Y., Uchida, K., Hiruma, T., Suzuki, Y., Totsu, T., Suzuki, T., Carey,
B.C., Yamada, Y., Trapnell, B.C. A standardized blood test for the routine
clinical diagnosis of impaired GM-CSF signaling using flow cytometry. *J. Immunol.*
Methods 413, 1., 2014.

34. Anonymous. Guidance for industry bioanalytical method validation. Guidance Documents, vol. 2012. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Bethesda., 2001.
35. Schoch, O.D., Schanz, U., Koller, M., Nakata, K., Seymour, J.F., Russi, E.W., Boehler, A. BAL findings in a patient with pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with GM-CSF. *Thorax* 57, 277., 2002.
36. Shakoor, Z., Hamblin, A.S. Increased CD11/CD18 expression on peripheral blood leucocytes of patients with sarcoidosis. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 99., 1992.
37. Palmer, S., Hamblin, A.S. Increased CD11/CD18 expression on the peripheral blood leucocytes of patients with HIV disease: relationship to disease severity. *Clin. Exp. Immunol.* 93, 344., 1993.
38. Wadhwa, M., Skog, A.L., Bird, C., Ragnhammar, P., Lilljefors, M., Gaines-Das, R., Mellstedt, H., Thorpe, R. Immunogenicity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) products in patients undergoing combination therapy with GM-CSF. *Clin. Cancer Res.* 5, 1353., 1999.

39. Silliman, C.C., Clay, K.L., Thurman, G.W., Johnson, C.A., Ambruso, D.R.
Partial characterization of lipids that develop during the routine storage of blood
and prime the neutrophil NADPH oxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 124, 684., 1994.
40. Homburg, C.H., de Haas, M., von dem Borne, A.E., Verhoeven, A.J.,
Reutelingsperger, C.P., Roos, D. Human neutrophils lose their surface FcγRIII
and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85, 532.,
1995.
41. Shalekoff, S., Page-Shipp, L., Tiemessen, C.T. Effects of anticoagulants and
temperature on expression of activation markers CD11b and HLA-DR on human
leukocytes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 695., 1998.
42. Youssef, P.P., Mantzioris, B.X., Roberts-Thomson, P.J., Ahern, M.J., Smith,
M.D. Effects of ex vivo manipulation on the expression of cell adhesion molecules
on neutrophils. *J. Immunol. Methods* 186, 217., 1995.
43. Silliman, C.C., Elzi, D.J., Ambruso, D.R., Musters, R.J., Hamiel, C., Harbeck,
R.J., Paterson, A.J., Bjornsen, A.J., Wyman, T.H., Kelher, M., England, K.M.,
McLaughlin-Malaxecheberria, N., Barnett, C.C., Aiboshi, J., Bannerjee, A.

Lysophosphatidylcholines prime the NADPH oxidase and stimulate multiple neutrophil functions through changes in cytosolic calcium. *J. Leukoc. Biol.* 73, 511., 2003.

44. Latger-Cannard, V., Besson, I., Doco-Lecompte, T., Lecompte, T. A standardized procedure for quantitation of CD11b on polymorphonuclear neutrophil by flow cytometry: potential application in infectious diseases. *Clin. Lab. Haematol.* 26, 177., 2004.