

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名

日下部良臣

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進行性の呼吸不全と二次性の感染症リスクの増大を来す稀な呼吸器疾患であり (Rosen, 1958)、本邦ではおよそ 1000 人の患者が報告されている。これはいくつかの原因が知られ、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)、急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群などの肺胞マクロファージ機能に異常が観察され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、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。

これまで、自己免疫性肺胞蛋白症は抗 GM-CSF 自己抗体による直接的な GM-CSF シグナル障害が原因であることが明らかになっている (Kitamura et al., 1999; Trapnell et al., 2003; Uchida et al., 2004, 2007)。

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、健常成人では低いレベルにコントロールされているが、好中球の生体防御機能発現、および肺胞マクロファージの生体防御機能、サーファクタントのホメオスタシス維持機能の発現において、極めて重要な役割を果たしている (Lieschke and Burgess, 1992; Condliffe et al., 1998)。

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GM-CSF受容体遺伝子の欠損で肺胞蛋白症に類似した病態となり(Dranoff et al., 1994; Nishinakamura et al., 1995)、一方GM-CSFの過剰発現は肺胞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(Lang et al., 1987)。

ヒトではGM-CSFの活性は、自己免疫性肺胞蛋白症以外では関節リウマチ、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亢進していると考えられており、GM-CSFアンタゴニスト療法に関するヒトでの臨床試験がいくつか試みられている(Hamilton, 2008)。

CD11b は好中球表面の接着分子で、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(Graves et al., 1992; Condliffe et al., 1998)。

好中球表面のCD11b(これをCD11b_{Surface}とする)の上昇度を利用する機能解析について既に報告がある(Uchida et al., 2007)。これはヘパリン採血した全血をGM-CSFで刺激することによる好中球表面のCD11b_{Surface}の上昇の程度をフローサイトメーターで測定するものであるが、診断的重要度が高いにも関わらず、実験条件の影響を受けやすい。

本研究は、自己免疫性肺胞蛋白症患者の血液においてGM-CSFシグナルの障害を検出する上で、この測定方法を最適な形で標準化することを目的とし、その応用性について検討した。

まず採血の抗凝固薬について検討した。EDTAではCD11b_{Surface}の上昇が抑制されており、ヘパリンを使用することが適切であることが分かった。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と矛盾しない(Silliman et al., 2003)。

GM-CSFによる刺激で、健常血液ではGM-CSFの濃度の上昇に応じてCD11b_{Surface}が上昇する一方、自己免疫性肺胞蛋白症ではこの上昇が大きく抑制されているが、この2群の差を最も鋭敏に検出できるGM-CSFの濃度として10ng/mLが適切であることを示した。

また、採血後時間を置くとおそらくリソフォスファチジルコリン生成によるCD11b_{Surface}のベースラインの上昇のために刺激時の上昇度が低く測定されることを明らかにし、採血後速やかに刺激と染色、固定を行う必要があることが分かった。

さらに、温度変化の影響が大きいことを明らかにし、採血後は冷蔵庫や氷上での保存は適切ではなく全ての行程を室温で行うことが必要であることが分かった。

複数の健常者で検討すると、1人の被験者の複数測定内での変動幅は被験者間での測定の変動幅よりも十分小さく、この測定方法は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た。

また CD11b_{Surface} 上昇のメカニズムの一つとして、細胞内外の CD11b を別々に染色する方法によって、健常血液で GM-CSF は好中球を刺激してあらかじめ形成されていた CD11b を細胞表面に非常に迅速に移行させていることを示した。

これらの標準化された行程に従って GM-CSF で全血を刺激した時の好中球の CD11b_{Surface} の上昇率を、CD11b-Stimulation index と定義した。Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線によると、自己免疫性肺胞蛋白症の GM-CSF シグナル障害を検出する上での CD11b-Stimulation index のカットオフ値は 112 で、これは感度、特異度とも 100%となり診断上の有用性が非常に高いことを明らかにした。

この方法には、採血後速やかに検査を行う必要があること、および血液周囲の環境として温度変化が好ましくないことなどいくつかの制約があるが、採血後の全血からの好中球の分離精製の時間や手間が必要無く、臨床検査においても基礎研究においても迅速に行うことが出来、非常に有用であると考えられる。

肺胞蛋白症の検査として血清中の抗 GM-CSF 自己抗体を直接測定する ELISA が既に報告されており (Schoch et al., 2002; Uchida et al., 2014)、その診断閾値は $5\mu\text{g/mL}$ であることが示されている。閾値の周囲の値をとる場合には ELISA の診断精度が弱まることが懸念されているが、今回報告している CD11b-Stimulation index では、閾値に近い場合にも明確に GM-CSF シグナル異常を検出することが出来る。

以上より、CD11b-Stimulation index は自己免疫性肺胞蛋白症患者の GM-CSF シグナル異常を検出する上で、正確さと簡潔さを兼ね備えたルーチンな臨床検査となりうるものである。

抗 GM-CSF 自己抗体の ELISA による測定と CD11b-Stimulation index の組み合わせによる診断も応用性がある。例えば遺伝性肺胞蛋白症のうち GM-CSF 受容体の機能異常である患者に議論を限定すると、CD11b-Stimulation index で反応が見られない。従って、ELISA で測定した抗 GM-CSF 自己抗体が正常範囲でかつ CD11b-Stimulation index が無反応であると、遺伝性肺胞蛋白症と診断することが出来る。さらに、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も CD11b_{Surface} を上昇させることができるが、遺伝性肺胞蛋白症ではこの反応が起こらない。これを利用して遺伝性肺胞蛋白症および自己免疫性肺胞蛋白症を診断することが出来る可能性がある。

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、炎症部位への遊走や接着に重要な CD11b_{Surface} が好中球の活性化状態を反映した物であると考え、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病勢や治療効果の判定に有用である可能性がある。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現在進行しているいくつかの臨床試験 (Cook et al., 2013) での効果判定や、リコンビナントヒト GM-CSF 製剤を使用中の患者に生じた中和抗体 (Wadhwa et al., 1999) の機能評価、またヒトでの炎症性腸疾患など抗 GM-CSF 自己抗体の関与が示唆される疾患 (Han et al., 2009) についても臨床的に有用に応用出来る可能性がある。

臨床のみでなく研究面においても、患者血液から精製した抗 GM-CSF 中和抗体を注射したサルの自己免疫性肺胞蛋白症の動物モデル (Sakagami et al., 2009, 2010) での評価などに使用できる可能性があり、応用性が高いと考えられる。