

自己免疫性肺胞蛋白症患者の末梢血 B 細胞単細胞レパトア解析

大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫内科学

二見 真史

1. 諸言

自己免疫性肺胞蛋白症 (autoimmune pulmonary alveolar proteinosis : aPAP) は、体内に生じた自己抗体 (抗 GM-CSF 抗体) によって肺胞マクロファージの成熟不全をきたし、肺胞腔におけるサーファクタントの異常貯留によって、呼吸不全をきたす難治性稀少肺疾患である。

抗 GM-CSF の病原性は患者血清由来の抗 GM-CSF 抗体をカニクイザルに投与したところ、肺病変が再現されたりことから明らかであるが、抗 GM-CSF 抗体はポリクローナル抗体であり、血清中の抗体価は重症度と相関しない²⁾ことから病原性抗体と非病原性抗体が含まれると考えられる。現在可能な治療としては、侵襲性の高い全肺洗浄のみであるため、治療の必要性を判断するための予後予測バイオマーカーの開発が必要であり、合わせてより侵襲性の低い効果的な治療の開発が急務とされる。そのためには病原性に強く関わる抗体を同定していくことが重要であると考えられる。

本研究では、病原性抗体を同定していくために、GM-CSF を認識する B 細胞からリコンビナントモノクローナル抗体 (rAb) を作成し、その結合力 (アフィニティ) やどの部位を認識しているか (エピトープ) を解析するとともに、GM-CSF 依存的な細胞株を用いた中和能の評価系を確立した。

2. 方法

aPAP 患者の末梢血から、血漿と末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells : PBMC) を分離し、PBMC から GM-CSF 特異的に結合する B 細胞を単細胞でフローサイトメトリーを用いて単離した。単離した B 細胞の cDNA から B 細胞受容体の可変部領域をクローニングし、シーケンサーを用いて可変部領域の塩基配列を評価し、クローニングしたプラスミドから Expi293F 細胞を用いてリコンビナントモノクローナル抗体 (rAb) を作成した。

2.1 クラスタリング解析

抗体の可変部領域の塩基配列をもとに、クラスタリング解析を行い、機能的な類似性を予

測した。

2.2 rAb のアフィニティ、競合アッセイ

生体分子間相互作用解析システム (Octet RED96e システム) を用いて、GM-CSF と rAb のアフィニティを測定するとともに、競合アッセイを行うことでエピトープごとのグループ分けを行った。

2.3 *In vitro* 中和活性

GM-CSF 依存的な細胞株である TF-1 を用いて、GM-CSF と rAb、もしくは GM-CSF と患者血漿を混合して培養し、細胞増殖がどの程度阻害されるか評価することで、抗体による中和能を評価した。

3.結果

10 人の aPAP 患者 (重症例 3 人、軽症例 7 人) から 89 個の GM-CSF 特異的に結合する B 細胞を単離し、B 細胞受容体の可変部領域のクローニングを行った。

3.1 クラスタリング解析

クラスタリング解析を行ったところ、2 個以上の B 細胞受容体を含むクラスターは 15 個に分類された。重症例 2 名由来の 38 個の B 細胞受容体が 9 個のクラスターに分類され、軽症例 3 名由来の 49 個の B 細胞受容体が 6 個のクラスターに分類された (図 1)。クラスター内の B 細胞受容体のレパトアはすべて同一であったが、体細胞変異のため CDR には違いがあった。

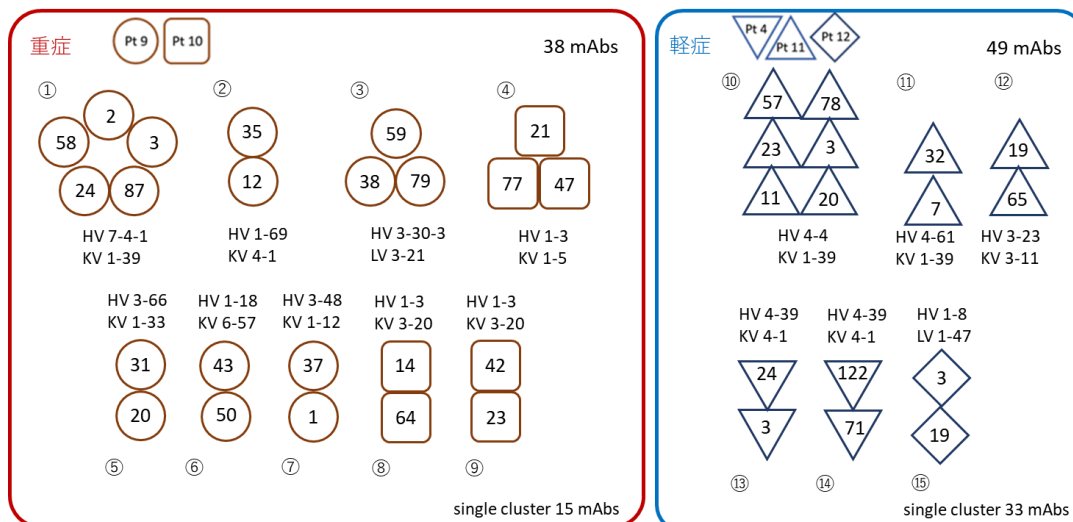


図1. aPAP患者のB細胞受容体クラスタリング解析

3.2 rAb のアフィニティ、競合アッセイ

rAb のアフィニティを測定したところ、重症例と比較して軽症例ではアフィニティの低い

rAb を認めた (図 2)。

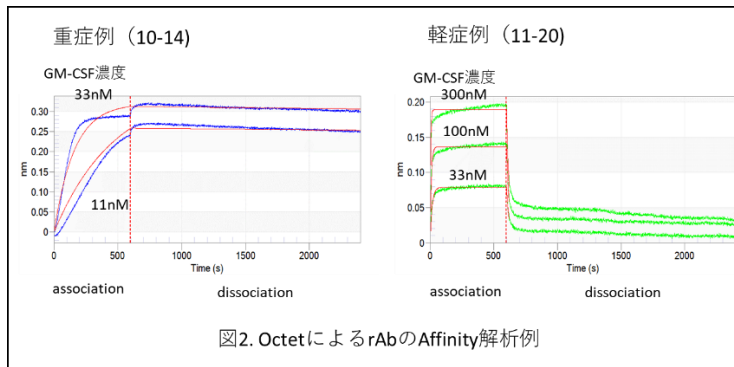


図2. OctetによるrAbのAffinity解析例

競合アッセイを行い (図 3)、6 種類のエピトープに分類されることを確認した。

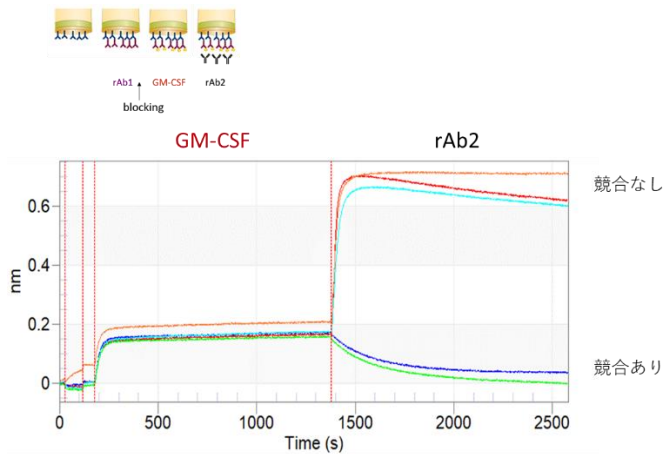


図3. OctetによるrAbの競合アッセイ例

3.3 *In vitro* 中和活性

TF-1 の細胞株を用いることで、rAb の中和活性 (IC₅₀) を評価した。アフィニティが強い抗体はより高い中和活性を持つ傾向を認めた。

同様の手法で患者血漿の中和活性を評価した。重症例で中和活性が高い傾向はあったが、重症例においても活性が低いものも認めた (図 4)。

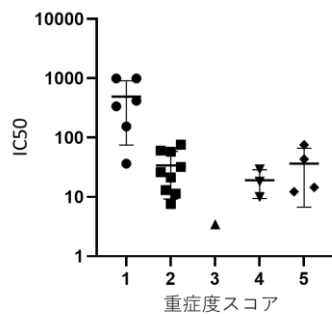


図4. 重症度スコア別の患者血漿の中和活性 (IC₅₀)

4.考察

本研究では、重症度の異なる aPAP 患者由来の B 細胞受容体の可変部領域をクローニングし、GM-CSF を認識する抗体をリコンビナントで作成することでその機能の解析を行った。クラスタリング解析では、1つのクラスター内の抗体は同一の患者由来の同一の V 領域が使用されている抗体のみで構成されていた。また、1つのクラスター内に含まれる抗体にはアフィニティが弱いものも強いものも含まれていた。

競合アッセイを行うことで、異なるクラスターの抗体でも同じエピトープを認識しているものが存在し、軽症例・重症例由来の抗体でも同一のエピトープを認識しているものがあつた。

同一のエピトープを認識する抗体でもアフィニティによって中和活性に差を認めており、アフィニティが上がることによって、病原性が高くなることが考えられた。

中和活性の強い抗体について、その作用機序を明確にするため、今後 GM-CSF と rAb 複合体の結晶構造を明らかにしていくことで、バイオマーカーや治療ターゲット開発につながることを期待される。

5.結語

GM-CSF 特異的に結合する B 細胞から可変部領域をクローニングし、レパトア解析を行った。

Octet RED96e システムを用いることで、GM-CSF に対する抗 GM-CSF 抗体のアフィニティやエピトープによる分類が可能であつた。

GM-CSF 依存的な細胞株を用いて、rAb および患者血漿の中和活性の評価が可能であつた。

6.文献

- 1) Takuro Sakagami, David Beck, Kanji Uchida, Takuji Suzuki, Brenna C Carey, Koh Nakata, et al. Patient-derived granulocyte/macrophage colony-stimulating factor autoantibodies reproduce pulmonary alveolar proteinosis in nonhuman primates. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(1):49-61.
- 2) J F Seymour, I R Doyle, K Nakata, J J Presneill, O D Schoch, E Hamano, et al. 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.* 2003;58(3):252-7.

7.成果発表

学会発表

- 二見真史, 木田博, 井上毅, 広瀬雅樹, 井上義一, 黒崎知博ほか. 自己免疫性肺胞蛋白症における B 細胞受容体の単細胞レパトア解析. 第 60 回日本呼吸器学会学術講演会. Web 開催. 2020.