

難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発

岡山吉道¹⁾, 豊島翔太¹⁾, 鐘ヶ江佳寿子¹⁾, 三嶋信太郎¹⁾, 高橋恭子²⁾, 浅野正岳³⁾,
李賢鎬¹⁾, 齋藤修¹⁾, 松本健治⁴⁾, 村上誠⁵⁾, 伊東真奈¹⁾, 伊崎聡志¹⁾, 西盛信幸¹⁾,
遠藤嵩大¹⁾, 柏倉淳一¹⁾, 葉山惟大¹⁾, 藤田英樹¹⁾, 坂本朋美¹⁾, 羅智靖¹⁾, 都築広¹⁾,
長澤洋介¹⁾, 岩田光浩¹⁾, 入山規良¹⁾, 北村登¹⁾, 丸岡秀一郎¹⁾, 八田善弘¹⁾, 武井正美¹⁾,
徳橋泰明¹⁾, 権寧博¹⁾, 照井正¹⁾

Development of new therapeutic strategy and investigation of the pathogenesis of severe immunological and allergic diseases

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Shouta TOYOSHIMA¹⁾, Kazuko KANEGAE¹⁾, Shintaro MISHIMA¹⁾,
Kyoko TAKAHASHI²⁾, Masatake ASANO³⁾, Kenko Li¹⁾, Shu SAITO¹⁾, Kenji MATSUMOTO⁴⁾,
Makoto MURAKAMI⁵⁾, Mana ITOU¹⁾, Satoshi IZAKI¹⁾, Nobuyuki NISHIMORI¹⁾,
Takahiro ENDO¹⁾, Jun-ichi KASHIWAKURA¹⁾, Koremasa HAYAMA¹⁾, Hideki FUJITA¹⁾,
Tomomi SASAKI-SAKAMOTO¹⁾, Chisei RA¹⁾, Hiroshi TSUDUKI¹⁾, Yosuke NAGASAWA¹⁾,
Mitsuhiro IWATA¹⁾, Noriyoshi IRIYAMA¹⁾, Noboru KITAMURA¹⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾,
Yoshihiro HATTA¹⁾, Masami TAKEI¹⁾, Yasuaki TOKUHASHI¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾

要旨

1. 整形外科分野

関節リウマチ (RA) のマスト細胞が免疫複合体の刺激によって過剰な PGD2 を産生することにより, RA の炎症を制御している可能性が示唆された。

2. 皮膚科分野

慢性特発性じん麻疹におけるシクロスポリンの治療反応性のバイオマーカーとして自己血清皮内テスト (ASST) が陽性であること, 血清 IgE 値が低値であることが示唆された。

3. 血液膠原病内科分野

Dsatinib は NK 細胞の JAK-STAT 経路を活性化し perforin 発現を更新させる。
HLA-DR-0405 (+) NOG マウスの EBV 感染びらん性関節炎発症を試みた。

4. 呼吸器内科分野

気道上皮バリア形成初期におけるウイルス感染が上皮バリアの脆弱化を惹起することを証明した。また, 特発性肺線維症の新規バイオマーカーとして抗 UBE2T 抗体を同定した。

I. はじめに

罹患率が増加し社会問題にもなっている免疫・アレルギー疾患は, 遺伝因子と環境因子が複雑に関与した多因子疾患である。近年, 疾患モデル動物の解

析により免疫・アレルギー疾患の病態の解明が進み治療法の開発が進んでいるが, 未だに既存の治療法では効果が少ない難治例が存在する。難治例の病態解明には, 個々の疾病の臨床検体からの取り組みが

1) 日本大学医学部
2) 日本大学生物資源科学部
3) 日本大学歯学部
4) 独立行政法人国立成育医療研究センター
5) 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター
岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp
照井正: terui.tadashi@nihon-u.ac.jp

必須である。本事業は、免疫・アレルギー疾患を扱う4つの臨床各科のベットのサイドから得られた臨床検体を基に臨床医、免疫・アレルギー学者と生物学者が連携し研究拠点を形成し、難治性免疫・アレルギー疾患の予防と治療に資する研究を行うことを目的とした。具体的な目的は、1. 免疫・アレルギー疾患の病態におけるマスト細胞の役割の解明 2. 感染による関節リウマチ、気管支喘息の発症と増悪の機序の解明である。

また各分野の研究に際して倫理的配慮を行っている。生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている。安全対策に関しては、日本大学遺伝子組換え実験実施規定に定める学長の確認を受けて実施している。

以下に各領域の研究の概要について述べる。

II. 整形外科領域

関節リウマチにおける滑膜マスト細胞の特徴

1. 背景

凝集IgGがFcεRIとFcγRIIを介してヒト滑膜マスト細胞を活性化しTNF-αを産生すること、さらに凝集IgG刺激による滑膜マスト細胞からのTNF-αの産生はIL-33によって相乗的に増加すること、凝集IgG刺激によって滑膜マスト細胞から産生されるsubstance Pは同時に分泌されるchymaseによって分解され炎症の抑制にもマスト細胞は働いていること、滑膜マスト細胞は関節リウマチ(RA)の滑膜組織でIL-17Aの主要な産生細胞ではないことを報告してきた。しかしながら、RAにおける滑膜マスト細胞の特徴は未だに明らかにされていない。

2. 目的

RAの炎症の場におけるマスト細胞のフェノタイプの解析を行い、疾患特異的な分子の発現を解析する目的にてRAの病態に関連する分子を同定し、その分子の発現や活性化を制御する機序の解明を行った。

3. 対象及び方法

細胞：ヒト滑膜マスト細胞は、RAおよび変形性関節症(OA)の滑膜組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑膜組織を採取後ただちに2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1% fungizoneを含んだIMDMに入れ、はさみを用いてできるだけ細切した。collagenaseとhyaluronidaseを用いて細胞を

酵素的に分散させた。赤血球を除去した後SCF (200 ng/ml) とIL-6 (50 ng/ml) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium とIMDM) で培養した。42日目にPBSでIscove methylcellulose mediumを洗浄し、SCF (100 ng/ml) とIL-6 (50 ng/ml) を含んだIMDMで培養した。また、滑膜組織を酵素で細胞を分散後培養し、プレートに接着した線維芽細胞を採取した。

マスト細胞の精製：滑膜組織から酵素的に分散してマスト細胞の精製は以下の抗体を用いて細胞を染色した後FACS Aria IIu (BD Biosciences) を用いて行った。Alexa 647標識抗FcεRIαモノクローナル抗体(クローンCRA1, eBioscience, San Diego, CA)およびPE標識抗Kitモノクローナル抗体(クローンYB5.B8, BD Biosciences, San Jose, CA)である。

RT-PCR：マスト細胞の総RNAはRNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて抽出し精製した。500 μg/mL oligo (dT12-18) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 5 x first strand buffer (Invitrogen), 0.1 M DTT (Invitrogen), SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) およびRNase OUT (Invitrogen) を用いてcDNAに逆転写を行った。PTGS1, PTGS2, LTC4S, TBXAS1, HPGDS, miR-199a-3p, RNU48およびGAPDHのprimerとprobeはAssays-on-Demand™ service (Applied Biosystems, 東京) のものを使用した。

DNA chip解析：OAマスト細胞とRAマスト細胞の発現遺伝子をDNA chipを用いて網羅的解析を行った。OAマスト細胞とRAマスト細胞からRNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いてtotal RNAを抽出し、前述の方法でcDNAに逆転写した。逆転写したcDNAとbiotin標識されたヌクレオチド三リン酸を用いて、ビオチン化相補的RNA (Biotin-cRNA) を合成した。Biotin-cRNAとHuman Genome U133 (Affymetrix) を45°Cで16時間反応させ、ハイブリダイゼーションした。その後、streptavidin-phycoerythrin (PE) と反応させ、Hewlett-Packard Gene Array Scanner (Palo Alto, CA, USA) を用いて蛍光強度を読み取った。各プローブの蛍光強度は、GeneChip Analysis Suite 5.0 (Affymetrix) で数値化した。数値化したデータをGenespring software (Agilent Technologies) を用いて解析し、RAマスト細胞における発現量がOAマスト細胞と比較して高かった遺伝子群を抽出

した。

miRNAの網羅的発現解析：OAおよびRAマスト細胞（それぞれ3ドナー）からmiRNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてmiRNAを抽出した。抽出したmiRNA(100 ng)に, miRNA Spile-In solution (Agilent Technologies [Santa Clara, CA, USA]), CIP Master Mixを添加し, 37°Cで30分間反応させ脱リン酸化させた。その後, DMSOを添加し, 100°Cで10分間反応させ氷上で冷却し反応を停止させた。脱リン酸化処理したmiRNA溶液にCy3を含んだLigation Master Mix (Agilent Technologies) を添加し16°Cで2時間反応させた。Cy3でラベルしたmiRNAを精製しmiRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies) と55°Cで20時間反応させハイブリダイゼーションさせた。その後miRNAを抽出した。miRNAの網羅的発現解析はヒトmiRNA Micro assay kit Release16.0 (Agilent Technologies [Santa Clara, CA, USA]) を用いて行った。

マスト細胞の活性化：IgE感作したマスト細胞を0.1, 1.0, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗Fc ϵ RI α モノクローナル抗体(クローンCRA1, eBioscience, San Diego, CA)あるいはカルシウムイオノフォアA23187 (10 \cdot 6M)で30分間刺激した。Fc γ RIの架橋は, マスト細胞を1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ヒトFc ϵ RI抗体のF(ab')₂ fragments (F(ab')₂ α Fc γ RI, clone 10.1)で30分間刺激した。コントロールとしてマウスIgG1のF(ab')₂ fragments (F(ab')₂mIgG1, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA)で30分間刺激した。細胞を1度洗浄後Fc γ RIの架橋のため抗マウスIgG F(ab')₂ fragmentsのヤギF(ab')₂ fragments (gF(ab')₂ α mF(ab')₂, Jackson Immune Laboratory)を添加しさらに30分間刺激した。ヒスタミン遊離とPGD₂産生を測定するためその細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。

OAマスト細胞とRA線維芽細胞との共培養：OAマスト細胞とRA線維芽細胞をcollagen coatingの24穴プレートを用いてマスト細胞培地で96時間共培養した。まずRA線維芽細胞をプレートに線維芽細胞培地とともに加え, 48時間インキュベートしコンフルエントにした。その後培地をマスト細胞培地に置き換え, 一穴につき3 \times 105個ずつOAマスト細胞を加えた。96時間後マスト細胞のみ単離した。RA線維芽細胞は底面に張り付くため弱クピペティングするとOAマスト細胞のみ単離可能であった。

脱顆粒, PGD₂産生：ヒスタミン遊離とPGD₂産生は酵素免疫法を用いた。

統計解析：OAとRAの2群間の検定においては正規分布に従っていない分布の中心分布の差を検定するため, Mann-WhitneyのU検定を用いた。miR-199a-3pとPTGS2の発現量の相関はSpearmanの順位相関係数を用いて相関の強さを検定した。解析には, GraphPad Prism 6 (MDF, Tokyo, Japan) を用いた。p < 0.05を統計学的に有意差があるとした。

4. 結果

DNA chipの結果, prostaglandin synthase 1 (PTGS1), prostaglandin synthase2 (PTGS2), thromboxane synthase 1 (TBXAS1), leukotriene C4 synthase (LTC4S) mRNAの発現量はOAマスト細胞と比較してRAマスト細胞の方が有意に高かった。

また, IgE依存性刺激においてPGD₂産生量はRAマスト細胞の方が有意に高かった。一方LTB₄産生量はOAマスト細胞で有意に高かった。IgG依存性刺激においてPGD₂産生量はRAマスト細胞のほうが有意に高かった。したがって, OAおよびRAマスト細胞は, 異なった性質を有していることが明らかになった。RA線維芽細胞においてPTGS1, PTGS2, TBXAS1, LTC4S mRNAの発現量はOA線維芽細胞と同程度であった。OAマスト細胞をRA線維芽細胞と共培養してもPTGS1, PTGS2, TBXAS1, LTC4S mRNAの発現量に変化は見られなかったことから, 両マスト細胞の性質の違いは, 線維芽細胞に起因しないことが示唆された。次にmiRNA chipの結果, OAマスト細胞の方が, RAマスト細胞より3倍以上発現量が高いmiRNAを20個見出した。これら20個のmiRNAのうちPTGS2の発現制御に寄与するmiRNAはmiR199a-3pであった。miR-199a-3pとPTGS2の発現量の相関を調べたところOAマスト細胞では相関がなかったが, RAマスト細胞では負の相関がみられた。関節液中のPGD₂量は, RAの方が有意に高かったのに対し, PGE₂量は両群間に有意な差は見られなかった。

5. 結論

PGD₂は各種炎症モデルで炎症の抑制効果を持つことが示唆されており, この報告と本研究の結果から, RAマスト細胞が免疫複合体の刺激によって過剰なPGD₂を産生することにより, RAの炎症を制御している可能性が示唆された。

Ⅲ. 皮膚科領域

慢性特発性蕁麻疹 (CSU) 患者のシクロスポリンの 治療効果の検討

1. 背景

CSUとは、特定の誘発因子がなく、6週間以上の掻痒と膨疹の消褪を繰り返す皮膚疾患である。とされている。自己血清を皮内に注射するASSTは患者の一部で陽性となることから、血清中に誘発因子が存在すると考えられている。この原因として高親和性IgE受容体 (FcεRI) のα鎖およびIgEに対する自己抗体 (抗FcεRIα鎖自己抗体, 抗IgE自己抗体) の関与が推測されているが、ASSTとこれら自己抗体の関係は不明である。抗ヒスタミン薬の治療に抵抗性である重症なCSU患者においてオマリズマブやシクロスポリンが投与される。オマリズマブの治療反応性のバイオマーカーとして血清IgEが高値であることや末梢血好塩基球のFcεRI発現高いことが報告されている。しかし、シクロスポリンの治療反応性のバイオマーカーは報告されていない。

2. 対象および方法

(1) プロトコール

抗ヒスタミン薬の2倍量の加療にて効果不十分のCSU患者34名 (女性20人, 男性14人) を対象とした。シクロスポリンは3 mg/kg/dayで4週間の投与を行った。治療前後の蕁麻疹の重症度はUAS7を用いて評価した。治療後のUAS7が6以下を効果ありとした。ASSTの陽性群と陰性群の間の罹病期間, 血清IgE値, 末梢血好塩基球数, 抗核抗体陽性率, 抗サイログロブリン抗体陽性率, 抗マイクログローム抗体陽性率, 抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE抗体自己濃度を比較した。

(2) 重症度 (Urticaria Activity Score 7; UAS7)

UAS7とは患者の痒みの程度と (0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe) 膨疹の数 (0 = none, 1 = 1~20, 2 = 21~50, 3 = 50以上) によるスコアを1日ごとに合計し (スコア: 0~6), さらにそのスコアを1週間分合計したものである (スコア: 0~42)。

(3) 自己血清皮内テスト (ASST)

静脈血を採取し15分静置した後, 3000 rpmで15分遠心分離し血清を回収した。1mLシリンジと27G針を用い, 血清50 μLを前腕屈側に皮内注射した。陰性コントロールとして血清注射部位から3~5 cm離れた部位に生理食塩水を50 μL皮内注射した。30

分後に判定し, 膨疹の直径が陰性コントロールより1.5 mm以上あるものを陽性とした。

(4) 抗IgE自己抗体濃度の測定

Ab-Rapid SPiN EXを用いて, 患者の血清からIgG分画を精製した。maxisorp plateに1 μg/mLのヒトIgE, myelomaを100 μL添加し, 4°Cで一晩静置して固相化した。洗浄液 (Tween 20を0.1%になるように加えたTBS) でプレートを4回洗浄した。非特異的な結合を防ぐため, 100 μLのブロッキング液 (FBSをPBSに溶解し10% FBSとした) を加え, 室温で1時間ブロッキングした。洗浄液でプレートを4回洗浄した。PBSで10倍に希釈した精製IgG分画を100 μL加え, 室温で2時間静置した。洗浄液でプレートを4回洗浄し, PBSで1万倍に希釈したhorseradish peroxidase (HRP) 標識マウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体を100 μL加え, 室温で1時間反応させた。洗浄液でプレートを4回洗浄した後, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) microwell peroxidase substrate systemを用い発色させた。2N H2SO4で反応を停止させ, Multiskan Go microplate spectrometerを用いて, 450 nmの吸光度を測定した。また定量的に行うために, ヒトIgGを倍々希釈し, HRP標識マウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体で検出された吸光度をもとに検量曲線作成し, 基準となる精製IgGに含まれる抗IgE抗体濃度をELISAで測定した。プレート間の補正のため, この基準となる精製IgGの抗IgE抗体で毎回検量線を作成し, 検体の精製IgGに含まれる抗IgE抗体濃度を算出した。

(5) 抗FcεRIα鎖自己抗体濃度測定

過去の報告の方法 (Pachlopnik JM et al. 2004. 22. 43-51) に従い精製IgGに含まれる抗FcεRIα鎖自己抗体濃度を測定した。Maxisorp platesに1 μg/mLのリコンビナント可溶性α鎖を100 μL加え, 4°Cで一晩静置し固相化した。固相化以降は, 抗IgE自己抗体濃度測定と同様の方法を用いた。検量曲線はヒト化抗FcεRIα抗体 (clone CRA2) を用いて作成した。

(6) 統計解析

統計学的解析は, GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan) を使用した。2群間の連続変数はMann-Whitney U test, 非連続変数は2-sided Fisher's exact testを行った。p値は, 0.05未満の場合, 統計学的に有意な差があると判断した。

3. 結果

シクロスポリン投与によってASST陽性群のUAS7 ≤ 6 を達成率は、ASST陰性群よりも有意に高値であった ($p = 0.0048$)。ASSTの陽性群と陰性群では臨床的背景において有意差はみられず、また抗FcεR1α鎖自己抗体濃度および抗IgE自己抗体濃度も有意な差はみられなかった。ASST陽性群および陰性群においては、血清IgE値に有意差はみられなかったが、治療後のUAS7 ≤ 6 群では治療後のUAS7 > 6 群と比較し、血清IgEが有意に低値であった ($p = 0.0003$)。ROC曲線から得られた最適なカットオフ値は88.5 IU/mLであり、その感度は81.0%、特異度は69.2%であった。

4. 考察

ASST陰性群よりもASST陽性群ではシクロスポリンは有効であることから、ASSTは治療を選択するバイオマーカーになると考えられる。また血清IgE値が88.5 IU/mL以下であることはシクロスポリンに反応性があるといえるASSTと血清IgE値の間に有意な関係はなかったことから独立したパラメーターであることが考えられた。今後この作用機序について検討を行う。

IV. 血液膠原病内科領域

① Dasatinib 治療例におけるNK細胞のperforin発現の解析

1. 背景と目的

Dasatinibは慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) など治療に用いられる tyrosine kinase inhibitor (TKI) である。Dasatinibが腫瘍免疫を増強させる機序を明らかにする。

2. 方法

NK細胞内のリン酸化シグナル解析にはFACSのphospho-flow法を用いて行った。末梢血単核のCD3-CD56+分画をNK細胞と定義し、細胞内染色によりpJAK1, pJAK2, pSTAT1, pSTAT3およびperforinの発現強度を測定した。血清IFN- γ とIL-2濃度はELISA法で測定した。

3. 結果

40例のTKI治療中のCML患者 (dasatinib治療例23例, imatinib治療例11例, nilotinib治療例6例)を解析した。また、9例の無治療寛解期 (treatment free remission, TFR) CML患者の検体をcontrol検体

として用いた。

Dasatinib治療例のNK細胞のperforin発現は他のTKI治療例やTFR例よりも高値であった。Perforinの発現強度はpSTAT1, pSTAT3発現強度と有意に相関した。IFN- γ はTKI治療例がTFR例よりも高値であった。IL-2はdasatinib治療例とTFR例は同等であったが、imatinib治療例とnilotinib例では低値であった。

4. 考察

Dasatinib治療例のNK細胞ではperforin発現が高く抗腫瘍活性が高まると考えられた。DasatinibはIL-2の抑制を伴わずFN- γ の発現を増強し、NK細胞のJAK-STAT経路を活性化していると考えられた。

② Epstein-Barrウイルスと関節リウマチ

1. 背景

前回 (岡山吉道, 他. 日本大学医学部総合医学研究所紀要. 2017. 5. 49-53) ヒト化NOG (hu-NOG) マウスにEpstein-Barrウイルス (EBV) を感染させ、ヒト破骨細胞が関与する関節リウマチ (RA) 類似びらん性関節炎を発症するモデルの作製し、ヒトのreceptor activator nuclear factor- κ B ligand (RANKL) を産生することも証明した。本年はNOG-HLA-DR-0405Tg, I-AbのノックアウトマウスにHLA-DR-0405ヒト臍帯血を移植しヒト免疫化し、EBVを感染させ、遺伝的因子の特徴を再現したRAマウスモデルを確立し、びらん性関節炎発症とEBVとの関連性を検討した。

2. 方法

過去と同様の方法 (岡山吉道, 他. 日本大学医学部総合医学研究所紀要. 2017. 5. 49-53) でHLA-DR-0405ヒト化マウスを作製し、EBVを感染させた後、8~10週で解剖し、びらん性関節炎発症の程度やEBVの関与について検討した。

3. 結果

NOG-HLA-DR-0405Tg,I-AbのノックアウトマウスにHLA-DR-0405を保有するヒト臍帯血をCD34のpositive selectionかけて移植を試みたが、細胞数少なく生着不全を起こしたため、全血で移植したところ、急性GVHD類似の現象を確認した。いずれもEBVを感染させたが、びらん性関節炎は見られなかった。

4. 考察

今回はCD34の細胞数が少なく、生着不全を起こ

したが、今後移植細胞数を増やして移植後、EBVを感染させれば、よりRA類似の環境でびらん性関節炎を発症させる事が出来ると思われる。

5. 結 語

HLA-DR-0405ヒト化マウスの作製を試みたが、生着不全を来し、EBV感染によるびらん性関節炎は証明出来なかった。今後CD34の細胞数の調整により、生着不全が改善される事で、EBV感染によるRA類似のびらん性関節炎が証明される事と思われる。

V. 呼吸器内科領域

難治性炎症性呼吸器疾患の病態解明

1. 背 景

我々はこれまで難治性炎症性呼吸器疾患における気道上皮のバリア機能や免疫応答を中心に分子病態を解明してきた。今回着目したのは、気管支喘息(以下、喘息)の病態解明へのアプローチとして気道上皮前駆細胞である基底細胞による上皮バリア形成と、特発性肺線維症(IPF: idiopathic pulmonary fibrosis)の病態解明へのアプローチとして血中自己抗体である。これらの観点から本研究では、喘息病態形成につながる気道上皮バリアの脆弱化機序の解明と、IPFの新規バイオマーカーを同定し、臨床的意義を検証することを目的とした。そのために細胞レベルでは、初代ヒト気管支上皮細胞(NHBE)および気道基底細胞株VA10を用いて、ウイルス感染を模倣するdsRNA刺激による上皮バリア形成に及ぼす影響について検討した。また、患者レベルでは、IPFに特異的な新規血中自己抗体の探索を行い、バイオマーカーとしての有用性について検討した。

2. 対象及び方法

NHBE, VA10はTranswell上で3日間培養液中で培養した後、気道上皮細胞への分化を誘導する培養系Air Liquid Interface (ALI)を用いて培養した。上皮バリア機能はTrans Electric Resistance (TER)を用いて経時的に測定した。NHBEに基底細胞が存在することを確認するために基底細胞マーカーであるCK5, CK14, p63の免疫染色を行なった。ALI前3日間のみdsRNAで刺激し、その後、dsRNA非存在下のALIでTERを測定した。

ヒトタンパク質マイクロアレイを用いて、IPF及び健常者の血清中に存在する9000種類の蛋白に対する自己抗体を探索し、患者群で抗ubiquitin enzyme

2T (UBE2T)抗体が有意に高いことを同定した。血清抗UBE2T抗体のEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)による測定系を確立し、健常者65例、IPF40例、またIPFの類似疾患である線維化性非特異性間質性肺炎22例、過敏性肺炎16例、サルコイドーシス16例、器質化肺炎1例の抗UBE2T抗体濃度を測定した。IPF肺組織におけるUBE2T発現を免疫組織染色で検討した。

3. 結 果

NHBEに基底細胞が存在することを確認した。dsRNA刺激群はコントロール群と比較してALI培養下のNHBEのTER減弱を認めた。VA10においても同様の結果が得られた。

血中抗UBE2T抗体の平均値(ELISA法)はIPF群が有意に高値であった。IPF肺組織におけるUBE2Tは、肺胞上皮細胞で高い発現が認められた。また、少数例での検討において、抗UBE2T抗体はIPFにおける呼吸器症状の出現や治療反応性と関連している可能性が示唆された。

4. 考 察

dsRNAは気道上皮分化誘導前の基底細胞に作用し、気道上皮バリア形成を減弱させると考えられた。基底細胞へのウイルス感染が、その後の上皮バリア形成を減弱させ、喘息病態形成に関与する可能性が示唆された。

IPF患者血清中で抗UBE2T抗体が特異的に上昇していることを発見した。血清中抗UBE2T抗体はIPFの診断・病勢のバイオマーカーとして有用である可能性がある。

5. 結 語

難治性呼吸器疾患の病態解明を気道上皮バリア機能、患者検体における自己抗体の側面から解析し、ウイルス感染による気道上皮バリアの脆弱化機構の存在および特発性肺線維症に特異的な新規血中自己抗体を同定することができた。今後は、気道上皮バリア形成初期へのウイルス感染が、どのような細胞内シグナル伝達経路を介しているのかを検証し、診断、治療につながりうる標的分子の探索を行う予定である。また、本研究で同定した抗UBE2T抗体のIPFにおける臨床的意義、UBE2Tとその自己抗体の線維化過程における役割を、肺胞上皮細胞を用いて検討する予定である。