

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	伊藤 正行
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博 (医) 第 1802 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
博士論文名	Elderly-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis and its cytokine profile (高齢発症の遺伝性肺胞蛋白症とそのサイトカインプロファイル)
論文審査委員	主査 教授 菊地 利明 副査 准教授 田澤 立之 副査 教授 中田 光

博士論文の要旨

背景と目的

肺胞蛋白症 (pulmonary alveolar proteinosis: PAP) は、肺胞内にサーファクタント蛋白を貯留し呼吸不全を引き起こす稀な疾患である。抗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) 自己抗体により生じる自己免疫性肺胞蛋白症 (autoimmune PAP: aPAP) が 9 割を占める。GM-CSF シグナルは、シグナル伝達兼転写活性化因子 5 (STAT5) を介して、細胞表面の GM-CSF 受容体に伝達される。GM-CSF 受容体は、リガンド特異的アルファ (GM-CSF-R α , CD161) およびベータ (GM-CSF-R β , CD131) サブユニットからなる十二量体複合体であり、GM-CSF-R β は、インターロイキン (IL)-3 および IL-5 受容体と共有される。

近年、小児の進行性呼吸困難において、GM-CSF-R α をコードする対立遺伝子 (*CSF2RA*) の異常による遺伝性 PAP (hereditary PAP: hPAP) が報告されているが、GM-CSF 受容体の欠陥を有する高齢者発症症例はこれまで報告されていなかった。申請者らは 77 歳で症状が現れ、1 回の全肺洗浄 (whole lung lavage: WLL) で改善が見られた、最も高齢の hPAP の本邦例で血清のサイトカイン解析を行い、高齢まで肺胞マクロファージの機能が維持された機序について検討した。

症例

3 年前の健診の胸部 X 線写真は正常であった 77 歳の主婦。1 ヶ月前に労作時の呼吸困難のため受診。喫煙歴、既往歴、家族歴なし。身体診察では異常は認められなかった。胸部 X 線検査は両下肺ですりガラス影を示し、コンピュータ断層撮影 (CT) スキャンでは crazy-paving pattern が確認された。

血液データは、KL-6 (4314 U/mL)、サーファクタントタンパク質 D (SP-D; 400 ng/mL)、および癌胎児性抗原 (CEA; 13.2 ng/mL) は著明高値、 β -D グルカンおよびアスペルギルス抗原の結果は陰性であった。動脈血ガス分析では、WLL 直前の酸素分圧 (PaO₂) が 47 mmHg と明らかに低値を示し、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) は、リンパ球増加 (マクロファージ 64%; リンパ球 26%; 好中球 9%; 好酸球 1%)、泡沫マクロファージ、および乳白色の外観を示した。

患者は胸部 CT スキャンおよび BALF の典型的な所見に基づいて PAP と診断された。

方法と結果

GM-CSF 自己抗体は、血清または BALF のいずれにおいても検出されなかった。一方、高レベルの血清 GM-CSF (91.3 pg/mL) が検出され、GM-CSF 受容体の遺伝子異常によるシグナル伝達異常の可能性が示された。

まず、GM-CSF のシグナリング異常をスクリーニングするために、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を GM-CSF および IL-2 (対照) で刺激し、STAT5 のリン酸化をウェスタンブロットで解析した。リン酸化 STAT5 は IL-2 刺激では検出されたが、GM-CSF 刺激においては検出されず、GM-CSF シグナル伝達の欠陥が示唆された。また、フローサイトメトリーにおいても同様の確認を行い、GM-CSF 刺激における STAT5 のリン酸化が認められないことを確認した。次に、PBMC においてウェスタンブロットティングおよび RT-PCR による GM-CSF 受容体 α 鎖および β 鎖の発現解析を行った。GM-CSF-R β は健常者と同等のレベルで発現していたが、GM-CSF-R α の発現はみられず、GM-CSF-R α の遺伝子 (*CSF2RA*) の異常を示唆する結果となった。

シーケンス解析は、患者 PBMC から DNA を抽出し、*CSF2RA* 遺伝子の各エクソンを Table S1 記載のプライマーを用いて PCR で増幅して行った。その結果エクソン 7 の nt508 でホモ接合性一塩基変異 C>T が明らかになった。この変異は終止コドン (Q170X) を生じるナンセンス変異であった。

比較ゲノムハイブリダイゼーション (array-comparative genomic hybridization: aCGH) での解析により、*CSF2RA* 遺伝子を包含する Xp22.33p22.11 におけるヘテロ接合性 (LOH) での喪失領域 (22.8 Mb) が確認された。

さらに、症例の発症後期の機能的背景を調べるために、IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-17 および M-CSF の血清レベルの変化を比較した。IL-2, IL-4, および IL-5 のレベルは WLL 後に著しく減少し、その後徐々に増加した。IL-17 では、WLL 後約 7 ヶ月間低いままであった。一方、IL-3 および M-CSF のレベルは、WLL 後も高値を維持した。GM-CSF は、WLL 後に減少する傾向を示した。

考察

本研究は、*CSF2RA* 突然変異を有する高齢者発症 hPAP の最初の報告である。

患者はグルタミン 170 のコドンを終止コドンに変え、GM-CSF-R α の正常な発現を妨げ、GM-CSF の適切なシグナル伝達を妨げるホモ接合性変異を有していた。

発症後の hPAP の背景を調べるために、様々なサイトカインの血清プロファイルを解析した結果、本症例では、WLL の治療が IL-2, IL-5 および IL-17 を含む種々のサイトカインの血清レベルを低下させており、Th1 および Th17 リンパ球の炎症性活性化の緩和がうかがわれた。対照的に IL-3 および M-CSF の血清レベルは、WLL の後も高いままであり、これらサイトカインは治療後もマクロファージの機能維持に必要なのではないかと推測された。本例においては、IL-3 および M-CSF の高い活性は、遅発性 hPAP の臨床経過と関連している可能性がある。

GM-CSF, IL-3, IL-4, および IL-5 は、5q31.1 に位置する隣接遺伝子によってコードされ、単球およびマクロファージの機能に影響を及ぼすこと、IL-3 および IL-5 の受容体が、 β 鎖の

GM-CSF 受容体と共有することは興味深い。

患者の IL-4, IL-5 および GM-CSF の血清レベルが, WLL の後に減少したが, IL-3 レベルは依然として高いままであった。GM-CSF 受容体の α 鎖の破綻は, β 鎖の量に影響を及ぼす可能性があり, IL-3 および IL-5 シグナル伝達に変化を引き起こしたのかもしれない。

結論

本研究は, GM-CSF-R α の発現不良およびシグナル伝達障害を引き起こした *CSF2RA* の遺伝子変異に関連する高齢者発症 hPAP の最初の報告である。これらの結果は, GM-CSF シグナル伝達が, 他のシグナル伝達経路によって補償され, 高齢者発症または非症候性 PAP につながることを示唆している。

審査結果の要旨

小児の進行性呼吸困難において, *CSF2RA* の遺伝子異常による遺伝性肺胞蛋白症が報告されているが, GM-CSF 受容体の欠陥を有する高齢者発症症例はこれまで報告されていなかった。本研究では 77 歳で症状が現れた, 最も高齢の遺伝性肺胞蛋白症の本邦例で血清のサイトカイン解析を行い, 高齢まで肺胞マクロファージの機能が維持された機序について検討した。

患者 PBMC の DNA シークエンス解析では, *CSF2RA* 遺伝子のエクソン 7 の nt508 でホモ接合性一塩基変異 C>T が明らかになった。この変異は終止コドン (Q170X) を生じるナンセンス変異であった。IL-2, IL-4, および IL-5 の血清レベルは全肺洗浄後に著しく減少し, その後徐々に増加した。IL-17 では, 全肺洗浄後約 7 ヶ月間低いままであった。一方, IL-3 および M-CSF の血清レベルは, 全肺洗浄後も高値を維持した。GM-CSF は, 全肺洗浄後に減少する傾向を示した。

本論文は「GM-CSF シグナル伝達が, 他のシグナル伝達経路によって補償され, 高齢者発症または非症候性肺胞蛋白症につながることを示した点に, 博士論文としての価値を認める。