博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏　　名	橋本　淳史
学　　位	博士（医学）
学位記番号	新大院博（医）第　924　号
学位授与の日付	令和２年３月23日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
博士論文名	Proteogenomic analysis of granulocyte macrophage colony-stimulating factor autoantibodies in the blood of a patient with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis （肺胞蛋白症患者血清中GM-CSF 自己抗体のプロテオゲノミクス解析）
論文審査委員	主査　教授　菊地　利明 副査　教授　松本　壮吉 副査　教授　味岡　洋一

博士論文の要旨

背景と目的

自己免疫性肺胞蛋白症は、Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor（GM-CSF）に対する自己抗体が産生されることにより肺胞マクロファージの分化成熟が阻害されることで発症する難治性の呼吸器疾患である。 抗GM-CSF 自己抗体は、患者健常者双方に見られるが、病原性と考えられるIgG 型の抗体の血清中濃度は健常者に比べて500 倍以上であり、その血清中和能すなわち、IC50 は20,000 倍に及ぶ。しかしながら、抗GM-CSF 自己抗体過剰産生の機序は未だに不明である。

GM-CSF 自己抗体のClonarity についての研究の多くはEBV やPhage display を用いてモノクローナル抗体を樹立してクローン解析したものが主であったが、サンプリング時の選択バイアスの問題を払拭できなかった。これらの方法では、実際の患者の血清中の抗体を反映しているとは言いがたい。また複数の自己抗体の組み合わせによって中和能を高めGM-CSF を阻害することが知られており、血清中の抗体の全体像を解き明かすことが非常に重要である。

近年のproteome 技術の発達によって、液体クロマトグラフィーとマススペクトルの間にイオントラップを搭載したorbitrap 型デバイスにより自己抗体の配列多様性を決定する研究が可能になってきた。本研究の目的は、従来のイオントラップとは異なり、並行してイオンを蓄積し、順番に排出しながら連続的に断片化することでイオン分解能をさらに高めることのできる PASEF 技術を搭載したマススペクトロメトリー（timsTOF Pro）を使い、次世代シーケンサーより得られた自己抗体cDNA 配列情報と比較することで、患者血清中の自己抗体の多様性がどの程度精密に解析できるのかを明らかにすることである

方法

自己免疫性肺胞蛋白症患者の血液から、血清分離後、密度勾配遠心とB 細胞ネガティブセレクション法を用いて末梢血B 細胞を取得。さらに、biotin 化GM-CSF と反応するB 細胞を磁気分離した。そこから

Total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて、5’側に共通配列となる SMARTer 配列を付与しつつ bias-free な完全長二本鎖 cDNA を作製、 SMARTer 配列相補的 5’primer、 3’側には IgG- Heavy chain Variable region (IgHV) 特異的プライマーを用いて増幅し cDNA アンプリコンを作製後、Illmina Miseq を用いて次世代シーケンス (NGS) を行った。

取得したシーケンスデータは解析プログラムを用いて、高品質なデータのみを抽出、ヒト IgG データベース(IMGT/HighV-QUEST)による annotation を行い、実際に存在している抗体遺伝子の配列 database とした。その段階では、無数の PCR error による多様性を含んでいたので、Change-O プログラムを用いて配列のクラスター化を行い、自己抗体クローン配列を得た。

同時に採取した 6ml の血清より、HiTrap rProtein A を用いて IgG を分離後、GM-CSF coupledaffinity chromatography を用いて、185・g の抗 GM-CSF 自己抗体を精製した。そのうち 5・g の自己抗体を in-gel digestion でペプチドに分解し、C18 カラムを用いて精製後、timsTOF Pro に投入してマススペクトル測定を行った。出てきた raw data は PEAKS Studio 8.5 を使用し cDNAdatabase を reference として配列の同定を行った。また de novo 解析として、超可変部位の CDR3 を含む CDR3-FR4 領域と IgG の特徴である ASTK 配列でペプチド配列の抽出を行い、次に IMGT/LIGM-DB 参照し J 領域を特定、さらにもう一度 cDNA database を参照し clone の検索を行った。

結果

NGS 解析により raw reads として 491,966 reads、Preprocessing を行い 56,928 reads、IMGT/HighV-QUEST により 54,619 reads になり、最終的に Change-O プログラム により配列のクラスター化を行い 162 clone を得た。NGS 解析により得られた 162 clone のうち、156clone がマススペクトルにより同定されたペプチド断片と同一の配列を含んでいた。cDNA 配列全体におけるペプチドカバー率は 63.4% [50.4%, 79.3%]であった。

また蛋白質レベルでの発現をみると、抗体の clonarity を決定する上で最も重要な部位である CDR3 領域を完全に検出できたのは 9 clone あり、部分的に検出できたのは 132 clone あった。

得られたペプチド配列を de novo 解析したところ、cDNA database にはない 4 つの配列 (FR4 ペプチドが 1 つ、CDR3 から FR4 部分にまたがっているペプチドが少なくとも 3 つ) が検出された。

考察

患者由来の自己抗体のプロテオーム解析では、多くの場合 CDR 以外の領域はクローン間で高い配列相同性を持っているため、クローン同定の決め手は CDR3 の配列同定である。しかし、CDR3 は非常に多様であるため従来の LC-MS / MS による検出では感度の点で難があった。

特に GM-CSF 自己抗体の場合、複数のポリクローナル抗体が相互作用により中和能を高めていることから包括的な抗体情報の取得が必須であった。今回、我々が使用した timsTOF pro は Orbitrap 型などの従来型と異なり、PASEF 技術と呼ばれるイオン分離・濃縮段階に TIMS(trapped ion mobility spectrometry) を使用しており、これにより並行してイオンを蓄積し順番に排出しながら連続的に断片化して解析が行うことができる。これにより ion mobility が上昇し高い感度とイオン分解能を実現している。

本研究において、141 clone ものCDR3 領域をカバーしたという事実はこのシステムがポリクローナルな自己抗体の可変部の多様性解析に対して非常に有効な手段であることの証明だろう。また、自己抗体可変部を次世代シークエンスにより調べると、そのほとんどのクローンは末梢血に蛋白として存在している IgG 型抗 GM-CSF 自己抗体のペプチドと一致することが示された。さらに timsTOF Pro による de novo 解析により、cDNA データベースにある clone 以外の少数の clone が血清中に存在することが示唆された。この新技術により、今までは困難であったポリクローナル抗体のより精密で包括的な同定が可能になったと

いえるだろう。

審査結果の要旨

自己免疫性肺胞蛋白症は、肺胞マクロファージの分化成熟が Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) に対する自己抗体で阻害されることで発症する。しかしながら、抗 GM-CSF 自己抗体過剰産生の機序は十分に解明されていない。そこで本研究では、患者血液中の抗 GM-CSF 自己抗体を網羅的に解析できる可能性を調べるために、質量分析法と cDNA 配列情報の両面から解析した。その結果、GM-CSF と反応する末梢血 B 細胞の cDNA 配列情報から得られた 162 クローンのうち、156 クローンが質量分析法で同定された抗 GM-CSF 自己抗体のペプチド断片と同一の配列を含んでいた。また蛋白質レベルでの発現をみると、抗体の clonarity を決定する上で最も重要な部位である CDR3 領域を完全に検出できたのは 9 クローン あり、部分的に検出できたのは 132 クローンあった。

本論文は、今まで困難であったポリクローナル抗体の全体像をより精密に解析できる可能性を示した点において、学位論文としての価値を認める。