

令和 2 年 5 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19532

研究課題名(和文) 抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎に対する革新的アプローチ；モデル動物開発と病因解明

研究課題名(英文) Innovative approach to anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis; Development of animal models and understanding of pathogenesis

研究代表者

佐藤 伸一 (Sato, Shinichi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：20215792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではMDA5欠損マウスに完全Freundアジュバントを用いてMDA5全長ペプチドに対する免疫反応を惹起し、B細胞などの免疫細胞を野生型マウスに養子移入することによって抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎モデルマウスを作成し、病理組織学的、血清学的、細胞生物学的に病態を解析する。MDA5は自己抗原であるため、トランスが誘導されていることが予測され、MDA5に対する免疫応答を惹起出来ない可能性がある。従って、MDA5で免疫したMDA5欠損マウスより得た脾臓細胞を野生型マウスへT細胞、B細胞の分画に分けて移入し、病態形成を誘導出来るかを検討する。この実験により、病態形成に重要な細胞の同定も可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎の研究は十分に行われていない。オーファン疾患である皮膚筋炎において、その亜型と捉えられる本疾患は患者数がごく少数に限られており、検討に足るまとまった症例数が得られないからである。また、抗MDA5抗体が病勢と相関することが知られているにも関わらず、抗MDA5抗体の病原性についても不明な点が多い。MDA5は細胞質内蛋白であり、通常抗体は細胞内には侵入しないため、抗MDA5抗体がどの蛋白をターゲットとして病原性を発揮しているかは、ブラックボックスである。本研究で挑戦したモデル動物の開発は、本疾患の解析に役立ち、病因と病態の解明への道を拓く点で意義深い。

研究成果の概要(英文)：In this study, we use complete Freund's adjuvant in MDA5-deficient mice to elicit an immune response to the full-length MDA5 peptide and adoptive transfer of immune-responsive cells such as B cells into wild-type mice to generate a mouse model of anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis and analyze the pathogenesis histopathologically, serologically, and cell biologically. Because MDA5 is a self-antigen, tolerance is predicted to be induced and may not be able to elicit an immune response to MDA5. Therefore, we examined whether splenocytes obtained from MDA5-deficient mice immunized with MDA5 can be transfected into wild-type mice by dividing them into T and B cell fractions and inducing pathogenesis. This experiment will also allow the identification of cells that are important for disease development.

研究分野：膠原病

キーワード：皮膚筋炎 モデル動物 MDA5 自己免疫疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚筋炎は皮膚および筋を中心に炎症を来す自己免疫疾患であり、病因解明と新規治療法の開発が望まれている特定疾患(いわゆる難病)である。皮膚筋炎の中でも、自己抗原である melanoma differentiation associated gene 5(MDA5)に対する自己抗体を有する患者は、その半数に致死的な急速進行性間質性肺炎を来す。抗 MDA5 抗体の抗体価は、急速進行性間質性肺炎の病勢と相関することが示唆されており、MDA5 に対する免疫反応は病態に重要であることが強く想定される。現在、抗 MDA5 抗体価を指標に免疫抑制療法をはじめとする集学的治療が試みられているが、副作用により患者の生活の質は大きく障害され、予後は悪い。このため、抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎における病因解明と、これに基づく新規治療法の開発は、皮膚筋炎の中でも喫緊の課題である。

しかしながら、これまで抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎の研究は十分に行われていない。なぜなら、オーファン疾患である皮膚筋炎において、その亜型と捉えられる本疾患は患者数がごく少数に限られており、検討に足るまとまった症例数が得られないからである。また、前述の通り抗 MDA5 抗体が病勢と相関することが知られているにも関わらず、抗 MDA5 抗体の病原性についても不明な点が多い。その最たるものは、MDA5 は細胞質内蛋白であり、通常抗体は細胞内には侵入しないため、抗 MDA5 抗体がどの蛋白をターゲットとして病原性を発揮しているかは、全くのブラックボックスである。

そこで、本研究では本疾患のモデル動物を開発することを目的とし、これを解析することで病因と病態の解明を行う。

2. 研究の目的

本研究では MDA5 欠損マウスに complete Freund ' s adjuvant を用いて MDA5 全長ペプチドに対する免疫反応を惹起し、B 細胞などの免疫担当細胞を野生型マウスに養子移入することによって抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎モデルマウスを作成し、病理組織学的、血清学的、細胞生物学的に病態を解析する。MDA5 は自己抗原であるため、トレランスが誘導されていることが予測され、MDA5 に対する免疫応答を惹起出来ない可能性がある。従って、MDA5 で免疫した MDA5 欠損マウスより得た脾臓細胞を野生型マウスへ T 細胞、B 細胞の分画に分けて移入し、病態形成を誘導出来るかを検討する。この実験により、病態形成に重要な細胞の同定も可能となる。さらに、これにより抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎の進展に重要な細胞が明らかとなり、治療ターゲットの開発へ結びつくことが期待される。

3. 研究の方法

1. 抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎モデルマウスの作成

本疾患では MDA5 を抗原とした免疫反応が病態に重要であることが強く示唆される。そこで、本研究では少なくとも 10 匹の MDA5 欠損マウス(オリエンタルバイオサービス)を用い、complete Freund ' s adjuvant を用いて MDA5 全長ペプチドに対する免疫反応を複数回にわたり惹起した。

2. 抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎モデルマウスの解析

作成された抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎モデルマウスにおいて、以下の解析を行った。

2-1: 皮膚、筋、肺など各臓器の病理組織学的検討

MDA5 ペプチドと complete Freund ' s adjuvant の免疫を行われたマウスから皮膚、筋、肺を取り出し、病理組織学的に炎症細胞の浸潤や線維化の程度を評価した。

2-2: 血清中サイトカインの測定

MDA5 ペプチドと complete Freund ' s adjuvant の免疫を行われたマウスから血清を採取し、炎症性サイトカインの濃度を測定した。

2-3: リンパ球サブセットの解析

MDA5 ペプチドと complete Freund ' s adjuvant の免疫を行われたマウスから脾臓リンパ球を抽出し、フローサイトメトリーにて T 細胞および B 細胞のサブタイプ、サイトカイン産生能の検討を行った。

3. 免疫細胞の養子移入実験

MDA5 は自己抗原であるため、トレランスが誘導されていることが予測され、野生型 C57BL/6 マウスでは MDA5 に対する免疫応答を惹起出来ない可能性がある。そこで MDA5 で免疫した MDA5 欠損マウスより得られた脾臓細胞を野生型 C57BL/6 マウスへ養子移入し、病態が出現するかを検討した。

さらに脾臓細胞を T 細胞、B 細胞の分画に分けて養子移入することにより、病態形成に重要な細胞を同定した。

4 . 研究成果

MDA5 を抗原として免疫反応を惹起された C57BL/6 バックグラウンドの MDA5 欠損マウスでは抗 MDA5 抗体の出現が確認された。これらのマウスから得られた B 細胞と T 細胞を野生型 C57BL/6 マウスへ養子移入を行ったところ、皮膚、筋肉組織に炎症反応が認められた。さらに、養子移入を行われたマウスでは、間質性肺炎が見いだされた。間質性肺炎は抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎の主な症状の一つであることから、これらのマウスはヒト抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎患者をよく模倣するモデルマウスとなり得ることが示唆された。さらに、血清を用いた検討では、これらのモデルマウスでは炎症性サイトカイン産生が亢進していることが示され、また、T 細胞、B 細胞の活性化亢進が認められた。

以上の事から、抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎では、MDA5 に対する T 細胞と B 細胞が導く免疫反応がその病態の進展に重要であることが示唆された。現在までに、抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎のモデルマウスは樹立されていない。本研究によって作成されたモデルマウスは、抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎の研究の発展に寄与し、新たな治療法の開発への道を拓くことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuzumi A, Yoshizaki A, Fukasawa T, Ebata S, Miura S, Yoshizaki A, Sumida H, Asano Y, Sato S.	4. 巻 In press
2. 論文標題 Serum levels of human α -defensin 2: possible association with fibrosis and vasculopathy in patients with systemic sclerosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Eur Acad Dermatol Venereol.	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdv.15546.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyagawa T, Asano Y, Saigusa R, Hirabayashi M, Yamashita T, Taniguchi T, Takahashi T, Nakamura K, Miura S, Yoshizaki A, Miyagaki T, Sato S.	4. 巻 33
2. 論文標題 A potential contribution of trappin-2 to the development of vasculopathy in systemic sclerosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Eur Acad Dermatol Venereol.	6. 最初と最後の頁 753-760
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdv.15387.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamashita T, Asano Y, Saigusa R, Taniguchi T, Nakamura K, Miura S, Toyama T, Takahashi T, Ichimura Y, Hirabayashi M, Yoshizaki A, Miyagaki T, Sugaya M, Sato S.	4. 巻 93
2. 論文標題 Increased expression of aquaporin-1 in dermal fibroblasts and dermal microvascular endothelial cells possibly contributes to skin fibrosis and edema in patients with systemic sclerosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 24-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2018.09.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamashita T, Lakota K, Taniguchi T, Yoshizaki A, Sato S, Hong W, Zhou X, Sodin-Semrl S, Fang F, Asano Y, Varga J.	4. 巻 8
2. 論文標題 An orally-active adiponectin receptor agonist mitigates cutaneous fibrosis, inflammation and microvascular pathology in a murine model of systemic sclerosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-29901-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Numajiri H, Yoshizaki A, Fukasawa T, Ebata S, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Miura S, Hirabayashi M, Yoshizaki A, Sumida H, Asano Y, Kazoe Y, Mawatari K, Kitamori T, Sato S.	4. 巻 45
2. 論文標題 Rapid alteration of serum interleukin-6 levels may predict the reactivity of i.v. cyclophosphamide pulse therapy in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1221-1224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14580.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 深澤毅倫、吉崎歩、江畑慧、久住藍、平川麻衣子、吉崎麻子、浅野善英、嘉副裕、馬渡和真、北森武彦、佐藤伸一
2. 発表標題 全身性強皮症における血管障害に対するtopoisomerase I特異的B細胞の役割
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久住藍、吉崎歩、遠山聡、深澤毅倫、江畑慧、中村洸樹、三枝良輔、三浦俊介、吉崎麻子、浅野善英、佐藤伸一
2. 発表標題 全身性強皮症患者における血清IL-34値の検討
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suga H, Kuzumi A, Asano Y, Yoshizaki A, Sato S
2. 発表標題 Elevated Serum Interleukin-34 Levels Are Correlated with Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis
3. 学会等名 2018 ACR (82th)/ARHP (53th) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fukasawa T, Yoshizaki A, Ebata S, Nakamura K, Asano Y, Kazoe Y, Mawatari K, Kitamori T, Sato S
2. 発表標題 Direct Interaction between Autoreactive B Cells and Endothelial Colony Forming Cells Induces Cytokine Production from B cells through B Cell Receptor and IL-6-JAK2-STAT3 Signaling Pathway, Suppressing Proliferation of Endothelial Colony Forming Cells in Systemic Sclerosis
3. 学会等名 2018 ACR (82th)/ARHP (53th) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Numajiri H, Yoshizaki A, Fukasawa T, Ebata S, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Miura S, Hirabayashi M, Yoshizaki A, Sumida H, Asano Y, Kazoe Y, Mawatari K, Kitamori T, Sato S.
2. 発表標題 Rapid alteration of serum interleukin-6 levels may predict the reactivity of i.v. cyclophosphamide pulse therapy in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease.
3. 学会等名 The 5th Eastern Asia Dermatology Congress (EADC2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉崎 歩 (Yoshizaki Ayumi) (40530415)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	