

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07719

研究課題名(和文) 多発性筋炎、皮膚筋炎における悪性腫瘍合併予測バイオマーカーの探索と実用化研究

研究課題名(英文) Practical research for biomarkers predicting tumorigenesis in polymyositis and dermatomyositis

研究代表者

加藤 和則 (KATO, KAZUNORI)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：60233780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、間質性肺炎を発症した自己免疫性筋炎患者の血清や組織におけるガレクチン3を定量し、ガレクチン3と病態の活性化状態との関連の解明を目的とした。その結果、血清中のガレクチン3は健常人と比較して、自己免疫性筋炎患者で優位に高値を示していた。さらに間質性肺炎を発症している筋炎患者では、肺炎を発症していない筋炎患者よりも血清中のガレクチン3値は高く、急性期の患者のほうが慢性期よりも高いことが示された。さらに血清ガレクチン3値は、治療薬の効果と相関した。以上の結果より、ガレクチン3は自己免疫性筋炎の急性期の間質性肺炎を予知できる新しい血清バイオマーカー候補としての有用性が示めされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、突発性間質性肺炎などの病態悪化に関連する新規バイオマーカー「ガレクチン3」を同定し、多発性筋炎/PM・皮膚筋炎/DM患者の病態悪化を予測または早期診断を促す検査マーカーの可能性を示すことができた。今後は、多施設によるデータの測定および医療データの入力を行い、実用化を目指す。更に筋炎以外の自己免疫性疾患にも応用が可能となれば、非常に大きな医療効果に繋がると確信する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the expressions of galectin-3 in sera and tissues of patients with idiopathic inflammatory myopathies (IIM) and assess the associations of galectin-3 with patient characteristics and disease activity. Serum galectin-3 levels were significantly higher in IIM patients than HC. The serum galectin-3 levels positively correlated with serum levels of inflammatory markers and the Myositis Intention-to-Treat Activity Index. Stratification analysis revealed that patients with IIM-associated ILD had significantly higher levels of serum galectin-3 than those without IIM-ILD. In addition, patients with acute/subacute interstitial pneumonia had significantly higher levels of serum galectin-3 than those with chronic interstitial pneumonia. Furthermore, serum galectin-3 levels in IIM-ILD patients correlated with treatment response. Galectin-3 may serve as a potential biomarker of disease activity, especially in patients with IIM-ILD.

研究分野：病態検査学

キーワード：自己免疫性筋炎 血清バイオマーカー 皮膚筋炎 ガレクチン3 CD146 間質性肺炎 病態悪化マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎/皮膚筋炎 (polymyositis/dermatomyositis; PM/DM) は骨格筋の炎症と変性を主徴とする自己免疫疾患であるが、皮膚、関節、肺、心臓など複数の臓器に炎症を及ぼし、中でも皮膚筋炎に合併する間質性肺炎は、時に急速進行性に病状が悪化し致死的な経過をたどる事があり、難治性の病態として知られている。PM/DM の病因は、遺伝性、環境因子、免疫原性など多元的であるとされ、十分な解明に至っていない。DM では病理学的に筋線維束周囲の間質にある血管に CD4 陽性 T 細胞を中心とした炎症細胞浸潤を来している事、筋内小血管の血管数減少や血管内皮細胞の形態異常がみられることより、筋内小血管を首座とした免疫反応と筋内微小循環の破綻が病態形成に関与していると考えられている。したがって、血管内皮細胞障害の見地から病態を検討する事は重要なアプローチの一つであると考えられる。

血管内皮障害に着目して本研究を開始するに当たって、これまでに血管内皮細胞の機能に重要な分子に着目して、研究を行ってきた。その中で CD146 は、細胞接着分子の免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型糖蛋白である。血管内皮細胞上に恒常的に発現し、VEGF 受容体や CD44 分子と細胞膜上で会合し、細胞の接着、細胞単層の維持、炎症細胞遊走および血管新生に関わっている。リンパ球 (T 細胞、B 細胞、NK 細胞) の 1-2%にも発現がみられ、CD146 陽性 T 細胞は IL-17、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  など炎症性サイトカインを分泌し、炎症性疾患の病態に関与していることが報告されている。CD146 は当初悪性黒色腫の細胞接着因子として特定され、melanoma cell adhesion molecule として報告され、癌細胞の転移や血管新生に係る因子として知られているが、近年炎症・免疫にかかわる分子として、自己免疫性疾患においても注目されている。CD146 は炎症や酸化ストレスが加わるとメタロプロテアーゼにより切断され、soluble CD146 (sCD146) となる。自己免疫疾患において、これらのリンパ球の活性化や血管内皮細胞障害により CD146 が活動性や病態に関連があるとされており、当研究室においては全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc)、Behçet 病における血清 sCD146 の上昇を証明してきた。PM/DM に関しては、既報において血清 sCD146 の上昇と筋内小血管における CD146 の高発現が示されているが、血清 sCD146 上昇とその臨床病態との関連や意義については明らかになっていない。

また、血管内皮細胞の細胞膜上で CD146 と結合する分子に  $\beta$ -galactosidase-binding lectin family に属する galectin-3 がある。galectin-3 は上皮細胞、血管内皮細胞や全ての炎症細胞 (マクロファージ、単球、樹状細胞、T 細胞、B 細胞、NK 細胞など) や癌細胞に発現し、細胞のアポトーシスや、細胞接着、遊走、血管新生、炎症など様々な生物学的活性を有する。炎症においては、急性期の炎症のみならず、慢性炎症や組織の線維化にも関与している事が明らかとなっている。近年、関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA)、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE)、SSc、Behçet 病などの膠原病疾患や、肝線維症、腎線維症、肺線維症など様々な線維症において細胞内外の galectin-3 の高発現が報告されている。また、galectin-3 の自己抗体である抗 galectin-3 抗体の存在も少数の膠原病疾患で認められている。PM/DM においては、少数の患者において血清 galectin-3 値の上昇、血清抗 galectin-3 抗体の存在を示した論文が一つずつ存在するが、疾患の詳細なプロフィールや臨床病態との関連は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究においては、CD146 並びに galectin-3 が、自己免疫異常、血管内皮細胞障害を伴う全身性疾患である PM/DM の病態に関与し、血清中の sCD146、galectin-3、並びにそれらの自己抗体が疾患活動性や臨床病態を示すバイオマーカーとなる可能性について検討を行った。

## 3. 研究の方法

### 3.1 対象

研究協力者 (渡邊萌理) が所属する自治医科大学附属さいたま医療センターを受診した、PM/DM 患者 71 人を対象とした。PM/DM の診断は Bohan and Peter の基準に基づき、amyopathic dermatomyositis (CADM) の診断は Sontheimer の基準を用いた。健常コントロール (HC) は既往の無い 24 人とし、対象患者と年齢と性別に大きな差異の無い集団とした。いずれも自治医大さいたま医療センターの倫理委員会の承認を受けた患者検体を本研究に使用した。

### 3.2 臨床評価

臨床的所見や血液検査結果は、検体採取時点での評価とし、診療録より後ろ向きに抽出した。間質性肺炎の評価は high-resolution chest computed tomography (HRCT) を用いて行い、Acute/subacute interstitial pneumonia (A/SIP) は 3 カ月以内の急性発症の呼吸困難や低酸素血症を伴う、画像上の間質性変化を指し、Chronic interstitial pneumonia (CIP) は A/SIP の基準に従わないものと定義した。疾患活動性の評価は Myositis Intention to Treat Activities Index (MITAX) を用いた。

### 3.3 sCD146 測定のための sandwich ELISA

sCD146 の定量を目的とした sandwich ELISA 法を市販抗体と独自に樹立した抗体を用いて確立し、測定系を構築した。詳細な方法は以下の論文に記載している。

Clinical rheumatology 36(1) 119-124 2017。

### 3.4 血清 galectin-3 測定を目的とした ELISA 法

血清 galectin-3 の測定は、Human Galectin-3 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を用い、測定方法は製造元のプロトコールに従った。血清検体は ELISA assay diluent で 1:4 に希釈し、測定に用いた。

### 3.5 統計学的手法

統計解析には JMP®13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)、GraphPad Prism7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。2 群間の比較には Mann-Whitney U test を用いた。相関には Spearman's rank correlation coefficient を用いた。ペア検定には Wilcoxon's signed-rank test を用いた。p value < 0.05 を統計学的有意と定めた。

## 4. 研究成果

### 4.1 PM/DM 患者における血清 sCD146

sCD146 の測定においては PM (n = 18)、DM (n = 49)、HC (n = 22) において測定を行った。PM/DM 患者の発症時年齢は中央値 60 歳 (四分位範囲; 60–68)、男女比は女性 75.8%であった。sCD146 値は PM/DM 患者全体と HC を比較して有意な差は認められなかったが、PM 患者における血清 sCD146 値は HC より有意に高値を示し [351.7 ng/mL vs 290.8ng/mL, p = 0.028]、DM 患者より有意に高値を示した [351.7 ng/mL vs 264.2 ng/mL, p = 0.031] (Figure 1A–B)。PM/DM の臨床所見の比較において MSAs、ILD、悪性腫瘍、関節炎を含む臨床的特徴においてそれぞれ比較を行ったが、有意な関連は認められなかった。血清 sCD146 値と、PM/DM の血清学的マーカーやサイトカイン/ケモカインとの関連を調べたところ、sCD146 は creatinine kinase (CK) 値のみ相関が得られた (rs = 0.33, p = 0.007)。

### 4.2 PMDM における血清 galectin-3 値

血清 galectin-3 の測定においては PM (n = 19)、classic DM (n = 33)、CADM (n = 19)、HC (n = 24) において測定を行った。血清 galectin-3 値は HC と比較して PM/DM 患者において有意に高値を示した [p < 0.001, Figure 2A]。PM/classic DM/CADM の血清 galectin-3 値はそれぞれ 12.7、13.77、9.35 ng/mL であった。PM/classic DM/CADM の血清 galectin-3 値はそれぞれ HC と有意差があったが (p < 0.001)、PM/classic DM/CADM 間では血清 galectin-3 値に有意な差は示さなかった (Figure 2B)。MSAs 間の比較では anti-ARS [11.53ng/mL, p < 0.001]、anti-MDA5 [13.92ng/mL, p < 0.001]、anti-SAE [13.34 ng/mL, p = 0.006]、anti-SRP [12.65 ng/mL, p < 0.001]、anti-TIF1-γ [11.48ng/mL, p < 0.001] antibodies、MSAs-negative [8.57 ng/mL, p = 0.004] において HC より有意に高値を示したが、MSAs 相互間では有意な差は示さなかった (data not shown)。

### 4.3 血清 galectin-3 値と血液検査、サイトカイン/ケモカインとの関係

次に血清 galectin-3 値と PM/DM における疾患活動性を示す血清学的マーカーやサイトカイン/ケモカインとの関連を調べた。血清 galectin-3 値はサイトカイン/ケモカインに関しては、IL-6 (rs = 0.36, p = 0.003)、IL-8 (rs = 0.36, P = 0.002)、TNF-α (rs = 0.60, p < 0.001)、INF-γ (rs = 0.35, p = 0.003)、CCL2 (rs = 0.47, p < 0.001)、CXCL10 (rs = 0.48, p < 0.001) において血清 galectin-3 値と有意な相関が得られた (data not shown)。

### 4.4 血清 galectin-3 値と PMDM-ILD との関係

galectin-3 は線維化に関与し、IPF との関係があることから、PM/DM-ILD と galectin-3 との関係調べた。ILD を有する PM/DM 患者 (n = 47) は、ILD を有さない PM/DM 患者 (n = 24) と比較して血清 galectin-3 値は有意な高値を示した [12.70 (9.15–17.47) ng/mL vs 7.77 (5.48–14.96) ng/mL, p = 0.025] (Figure 3A)。さらに、間質性肺炎の中でも、A/SIP を有する患者 (n = 11) は、CIP を有する患者 (n = 36) と比較して有意な高値を示した [16.61 (11.75–27.91) ng/mL vs 11.09 (8.42–15.63) ng/mL, p = 0.007, Figure 3B]。

### 4.5 血清 galectin-3 値と PM/DM の疾患活動性について

PM/DM の治療反応性と血清 galectin-3 値の変化を調べるため、PM/DM 患者 15 人において治療前後の血清を採取し評価を行った。12 人の患者においては免疫抑制療法に奏功しているが、3 人の患者においては寛解導入後も ILD の活動性が持続し線維化が徐々に進行した症例であった (category A–B in pulmonary MITAX) (Figure 4B)。治療前後で血清 galectin-3 値は有意に低下を見せたが (p = 0.013, Wilcoxon's signed-rank test)、ILD の疾患活動性が残存した 3 人において血清 galectin-3 値は上昇を示していた (Figure 4C)。

#### 4.6 考察

PM/DMにおける血中のsCD146、galectin-3について、それぞれに特異的なELISAを用いて測定を行い、バイオマーカーとしての可能性を検討した。

その結果、sCD146については、過去の報告と同様にPMにおいてDMやHCに比して有意な高値を示すことが判明した。しかしこの結果は、DMの炎症の首座が筋線維束周囲の小血管にありPMより血管障害性が強い疾患であること、CD146が血管障害のマーカーの一つであることから考えると、理論的には説明が困難な結果であった。そこで、DM患者血清中に抗CD146自己抗体が存在しsCD146の測定系に影響していると仮説を立て自己抗体の測定系を独自に樹立した結果、抗CD146抗体はDMにおいてPMやHCと比べ有意に高値で存在する事が判明した。DM患者における抗CD146抗体の存在についてはこれまで報告が無く、新規性のある事象である。さらに疾患活動性との関連において抗CD146抗体が低下するに従いsCD146が上昇する傾向にあることは、仮説を支持する結果となっている。今後は患者の数を増やして再度検証を行う必要がある。

galectin-3は様々なサイトカイン/ケモカインと関連して、炎症の発症に重要な役割を果たす。過去の報告によると、単球の細胞株においてgalectin-3はTNF- $\alpha$ とINF- $\gamma$ により産生が誘導され、マクロファージの細胞株においてgalectin-3誘発mRNAはTNF- $\alpha$ とIL-8を産生する。本研究においては、PM/DM患者血清においてIIMの免疫機能に重要な役割を果たすサイトカイン/ケモカインとgalectin-3に相関があることを証明した。PM/DMにおける血清galectin-3はサイトカインを介した炎症に係っていると考えられ、炎症に伴う疾患活動性を表していると考えられる。

また、galectin-3はtransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )を介した線維化の機序に関与している事が報告されている。ILDにおいてはTGF- $\beta$ が上皮間葉転換や細胞外基質の産生、肺胞上皮細胞のアポトーシスに関与している。したがって、TGF- $\beta$ シグナルに関与するgalectin-3はILDの病態に関与するとされている。本研究においてはPM/DM-ILDにおいてもgalectin-3と関連があることを血清と組織を用いて証明した。さらに、PM/DM-ILDのうちA/SIP患者においてgalectin-3はより高値になることを示した。PM/DMのA/SIPにおいてはマクロファージの活性化が病因に関与しているとされ、A/SIPの患者はCIPの患者と比較して、炎症性サイトカインのうちIL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、CXCL10、INF- $\gamma$ が高値となり、高い炎症状態にあることが知られている。Galectin-3は自然免疫に関与し、単球/マクロファージの走化性因子として働くこととされて、今回我々の実験においてgalectin-3がこれらのA/SIPに関連するサイトカインと相関する事を示している事から、galectin-3がA/SIPの高炎症状態と線維化の病因に関与している事が示唆される。また、本研究においてgalectin-3はHRCT score、GGO score、fibrosis scoreと有意に相関する事を示した。HRCT scoreとGGO scoreはPM/DM-ILDの疾患活動性と関連する事が報告されている。したがってgalectin-3はPM/DM-ILDの疾患活動性と相関する事が示唆される。HRCT scoreなどのCT scoreは肺病変の正確な評価をするために有用であるが、その測定方法の性質上、観測者単独の判定では測定バイアスを含む可能性が十分ある。一方、血清galectin-3値の測定は客観的な評価が可能であり、新たなPM/DM-ILDの評価方法として有用であると考えられる。さらに、galectin-3がPM/DMの治療反応性とも関連があることを示した。多数の患者において疾患活動性と伴にgalectin-3が低下する中、線維化が進行した肺病変を有する3人の患者において、galectin-3が上昇したことは注目すべき点である。これらの患者においては線維化の進行に伴いgalectin-3値が上昇したと考えられる。したがって、galectin-3はPM/DM-ILDの経時的な評価の指標としても有用であると考えられる。

また、本研究では抗galectin-3抗体の測定を目的としたhome-made ELISAを作成しPM/DM患者血清中の抗galectin-3抗体を測定する事が出来た。PM/DM患者血清中の抗galectin-3抗体はHCと比較して有意な上昇を認め、その中でもDM患者血清中の抗galectin-3抗体はPM患者やHCと比較して有意な高値を示した。SLE患者における抗galectin-3抗体を調べた研究によると、抗galectin-3抗体は皮膚病変のあるSLE患者で有意に上昇し、さらにマウスに抗galectin-3抗体の皮下注射を行うと皮膚血管炎(血管の壊死と炎症細胞浸潤)が生じるとされる。したがって、本研究においてDM患者で抗galectin-3抗体が最も高値になることは、抗galectin-3抗体が皮膚血管炎と関連があることを反映している可能性がある。PM/DM患者における抗galectin-3抗体のより詳細なメカニズムの解明にはさらなる研究が必要である。

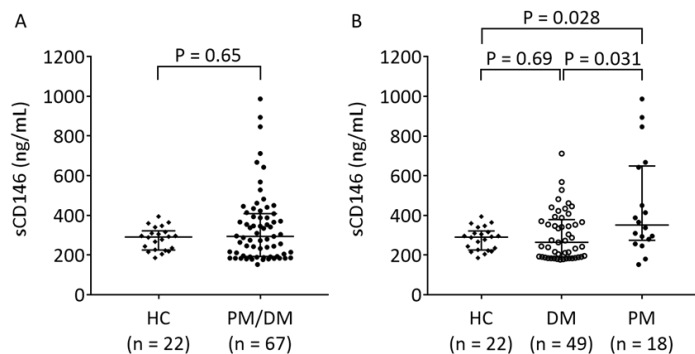


Figure 1. PM/DM 患者、HC における血清 sCD146  
 (A) HC vs PM/DM、(B) HC vs DM vs PM。中央値 ± 四分位範囲を示す

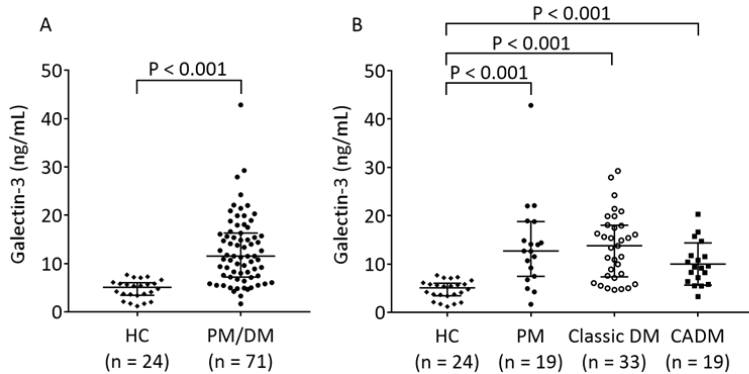


Figure 2. PM/DM 患者、HC における血清 galectin-3 (A) HC vs PM/DM、(B) HC vs DM vs PM

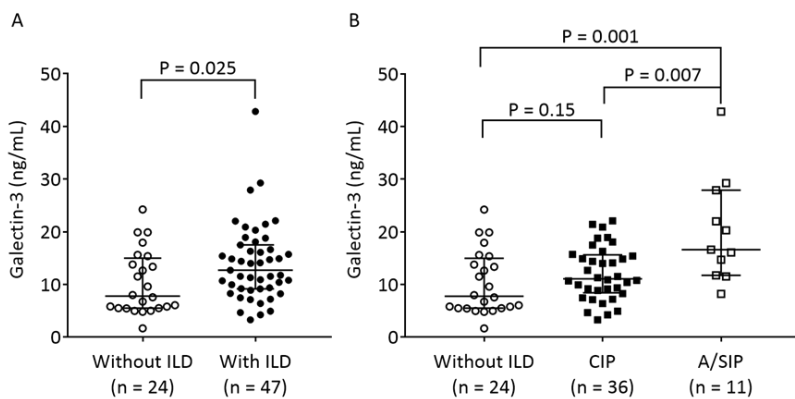


Figure 3. 血清 galectin-3 と PM/DM-ILD の関係

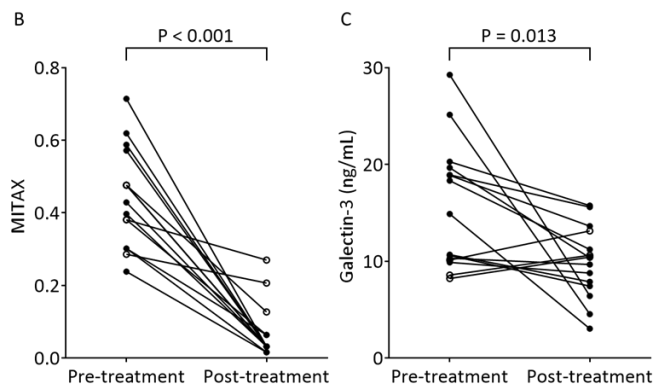


Figure 4. PM/DM の疾患活動性と血清 galectin-3 値の関係  
 (B-C) PM/DM 患者の治療前後における血清 galectin-3 と MITAX の関係 (n = 15)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe Eri, Kato Kazunori, Gono Takahisa, Chiba Emiko, Terai Chihiro, Kotake Shigeru	4. 巻 60
2. 論文標題 Serum levels of galectin-3 in idiopathic inflammatory myopathies: a potential biomarker of disease activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 322 ~ 332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keaa305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 S Kaneko, T Yamazaki, K Kohno, A Sato, K Kato, T Yano.	4. 巻 65
2. 論文標題 Combination Effect of Bowman-Birk Inhibitor and -Tocopheryl Succinate on Prostate Cancer Stem-Like Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol	6. 最初と最後の頁 272-277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.65.272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	渡邊 萌理  (WATANABE ERI)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------