

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591469

研究課題名(和文) 皮膚筋炎発症におけるCADM-140抗原(MDA5)の病因的役割の追究

研究課題名(英文) Pathogenic role of CADM-140 antigen (MDA5) in patients with dermatomyositis

研究代表者

佐藤 慎二 (SATO, Shinji)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90276238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：膠原病の一つである皮膚筋炎で見出された抗CADM-140/MDA5抗体の測定は、皮膚筋炎に合併する急速進行性間質性肺炎の予測、治療開始時期の判定、活動性の評価、予後の推定に有用であると考えられた。また抗CADM-140/MDA5抗体および反応する抗原は、急速進行性間質性肺炎を合併する皮膚筋炎の病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Anti-CADM-140/MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated Gene 5) antibody is a recently-reported antibody that recognized a 140 kDa polypeptide in patients with dermatomyositis (DM). This autoantibody has a close association with rapidly progressive interstitial lung disease (RP-ILD) and may be useful marker for presence of RP-ILD. In this study, we demonstrated close association between anti-CADM-140/MDA5 antibody titer by ELISA and RP-ILD disease activity in patients with DM and RP-ILD. Our findings also highlight the usefulness of this antibody not only in the prediction of RP-ILD but also in monitoring of the disease activity and prediction of disease outcome in daily clinical practice. Moreover, our data might be suggested that complexes of MDA5 and anti-CADM-140/MDA5 antibody might play a significant role in pathogenesis of RP-ILD and DM rather than being an epiphenomenon.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：皮膚筋炎 急速進行性間質性肺炎 抗CADM-140抗体 抗MDA5抗体

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚筋炎 (Dermatomyositis:DM)は、骨格筋の炎症にともなう近位筋の筋力低下・筋痛を主症状とする炎症性筋疾患であり、ヘリオトロープ疹やゴットロン徴候などの典型的な皮膚症状を呈することが特徴である。本疾患は、自己免疫疾患のひとつで、これまでDMに特異的に出現する自己抗体の存在が知られている。これら特異自己抗体の対応抗原の多くは、生命現象に必須な酵素や調節因子であり、それらの追究は病因解明につながる事が期待される。

一方、DMのサブタイプである臨床的に筋炎症状に乏しいDM(Clinically amyopathic DM: CADM)では、自己抗体陰性がひとつの特徴とされ、特異的な自己抗体の存在は明らかではなかった。また、CADMは、治療抵抗性で予後不良の急速進行性間質性肺炎(Rapidly progressive Interstitial Lung Disease: RP-ILD)を合併することも知られている。RP-ILDの治療法はいまだ確立されておらず、早期から強力な治療を開始しなければ致死的となることが多く、かかる点で、RP-ILD併発ADMの病態解明は、有効な新規治療法開発の観点から臨床的に非常に重要である。

以上のような背景をふまえ、我々は、CADM 15例を含む膠原病および健常人 306例の血清を、白血球細胞由来 K562 細胞抽出物を用いた免疫沈降法で検討し、CADM患者血清が分子量約 140kDa の蛋白を免疫沈降することを見出し、この新たな自己抗体を抗 CADM-140 抗体と命名した(*Arthritis Rheum.* 50(9):S398, 2003)。抗 CADM-140 抗体は、CADMに認められたが、他の膠原病および健常人では認められなかった。非常に興味深いことに、抗 CADM-140 抗体陽性例は陰性例と比較して RP-ILD 併発が有意に高頻度であり、同抗体と RP-ILD との関連が示唆された(*Arthritis Rheum.* 52(5): 1571-76, 2005)。そこで、我々は、抗 CADM-140 抗体の対応抗原を追究するために、HeLa 細胞由来 cDNA ライブラリーを使用して、対応抗原遺伝子のクローニングをおこない、その発現蛋白について検討したところ、対応抗原が、自然免疫におけるウイルス感染防御で重要な役割を果たしている分子である MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) であることが明らかになった(*Arthritis Rheum.* 60(7): 2193-200, 2009)。MDA5 は、Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)ファミリー

に属する蛋白質で、細胞内ウイルス感染を認識し、抗ウイルス作用を有する I 型インターフェロン (IFN) を誘導することで、自然免疫におけるウイルス感染防御に重要な役割を果たす。RIG-I, MDA5 とともに、ウイルス感染防御機構を促進し、MDA5 はピコルナウイルスを認識するために必要である。これまで、ピコルナウイルス科のコクサッキーウイルスの抗体価が小児 DM 患者では若年性関節リウマチやウイルス感染症患者と比較して高かったと報告されるなどウイルス感染が炎症性筋疾患の病因の一つと推測されている。この点で、CADM-140 抗原が、ウイルス感染防御に關与する MDA5 であることは、非常に重要な意味を持つ。なぜなら、MDA5 (CADM-140 抗原) が認識するピコルナウイルス感染が、予後不良の RP-ILD 併発 CADM の病因になっている可能性が考えられるからである。これまでも、筋炎特異自己抗原やその分解産物が、筋炎の発症に關与するとする仮説が提唱されている。Casciola-Rosen らは、セリンプロテアーゼのグランザイム B が、筋炎特異自己抗体の抗 Jo-1 抗体の対応抗原 (ヒスチジル tRNA 合成酵素) を通常とは異なる N 末端領域で分解し、産生された分解産物が自己免疫応答を引き起こすことを報告した。また、Levine らも、免疫担当細胞の筋組織への浸潤が、感染やアポトーシスによって血中に放出された筋炎特異自己抗原であるアミノアシル tRNA 合成酵素分子やその分解産物によって引き起こされたことを報告している。これら従来の研究成果・報告をふまえると、CADM-140 抗原 (MDA5) は、ウイルス感染により、感染細胞内で高発現され、引き続いておこるウイルス感染防御機構が、感染細胞のアポトーシスを引き起こし、多量の MDA5 あるいはその分解産物やウイルスとの複合体などが血中に流出する。それらが、組織への免疫担当細胞の遊走を促進あるいは抗原提示細胞によって自己抗原として処理され、MHC 分子とともに提示されることで、CADM-140 抗原特異的な自己免疫現象を引き起こす。また、それらに対する免疫応答の結果、MDA5 に対する自己抗体が産生され、さらに、MDA5 に対する自己免疫応答は自己抗体依存的・非依存的に組織障害を進展させる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、RP-ILD 併発 DM 発症における抗 CADM-140/MDA5 抗体の臨床的意義および

CADM-140 抗原 (MDA5) の病因的役割の追究を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### <抗 CADM-140/MDA5 抗体価と臨床症状との検討>

抗 CADM-140 抗体陽性であった DM 14 例の抗 CADM-140/MDA5 抗体価を初診時 (治療前) および治療後で経時的に ELISA で測定し、その抗体価と臨床経過・転帰との関連を検討した。

#### <RP-ILD 併発 DM におけるインターフェロン $\gamma$ (IFN $\gamma$ ), インターロイキン 18 (IL-18) などサイトカイン濃度の検討>

DM 病態に關与が示唆されているインターフェロン (IFN  $\gamma$ ), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-23 (IL-23) などのサイトカインについて、RP-ILD 併発 DM 10 例、慢性型 ILD 併発 DM 4 例、非併発 DM 3 例、非併発の DM 以外の膠原病 3 例および健常人 4 例の血清を用いて、IFN  $\gamma$  および IL-18 を経時的に測定し、RP-ILD の臨床経過と比較検討した。

#### <小児 DM (Juvenile DM: JDM) における抗 CADM-140/MDA5 抗体の臨床的意義>

JDM 患者 35 例 (JDM: 26 例, JCADM: 9 例) の血清中の抗 CADM-140 抗体価を ELISA 法で測定し、陽性症例の臨床経過、転帰および抗体価を検討した。

#### <抗 CADM-140/MDA5 抗体陽性 RP-ILD 併発 DM に対する大量ステロイドおよびエンドキサン間歇静注 (IVCY)/シクロスポリン A (CyA) 併用療法の効果と同抗体力価の関連>

RP-ILD を併発した CADM 患者 10 例における大量ステロイドと IVCY/CyA 併用療法前後の臨床症状、胸部 CT での炎症を反映する alveolar スコアと線維化を反映する interstitial スコアと抗 CADM-140/MDA5 抗体力価との関連を後ろ向きに検討した。

#### <抗 CADM-140/MDA5 抗体陽性の DM/ RP-ILD の治療成績の検討>

抗 CADM-140/MDA5 抗体陽性の RP-ILD 併発 DM 患者 19 例を対象として大量ステロイドおよびシクロホスファミド間欠静注療法 (IVCY)/シクロスポリン (CyA) 併用療法の治療効果・転帰および抗 CADM-140/MDA5 抗体測定時期との関連を検討した。

### 4. 研究成果

#### <抗 CADM-140/MDA5 抗体価と臨床症状との検討>

リコンビナント MDA5 を用いた酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA) での検討で、治療前の抗 CADM-140/MDA5 抗体を測定できた 10 例中、治療反応群 (生存例: 4 例) では治療無効群 (死

亡例: 6 例) と比較して有意に抗体価が低値であった (101.3 vs. 346.9,  $P=0.019$ )。また、生存例と死亡例で抗体価の経時的推移をみたところ、生存例の抗体価は 30 週から 60 週と長い時間をかけて徐々に減少し、最終的には RP-ILD の改善とともにカットオフ値以下に低下した ( $n=3$ , 113.4 units [before treatment] vs. 1.6 units [after treatment],  $P=0.033$ )。それに対して、死亡例の抗体価の変動には一定の傾向はみられず、全例でカットオフ値以下に減少する前に死亡した ( $n=4$ , 372.5 units [before treatment] vs. 198.4 units [after treatment],  $P=0.31$ )。今後さらなる症例の蓄積による検証が必要であるが、抗 CADM-140/MDA5 抗体 ELISA は、疾患活動性の評価、治療効果の判定、予後の予測などにも有用である可能性が示唆され、その予後の改善につながるものと期待される。

#### <RP-ILD 併発 DM におけるインターフェロン $\gamma$ (IFN $\gamma$ ), インターロイキン 18 (IL-18) などサイトカイン濃度の検討>

血清 IFN  $\gamma$  は、DM 17 例中 4 例 (24%) で検出されたが、他の膠原病および健常人では検出されなかった。RP-ILD 併発 DM 症例の治療前後の血清 IFN  $\gamma$  の推移を検討したところ、治療前に検出された 4 例の血清 IFN  $\gamma$  は治療後に検出されなかった。血清 IFN  $\gamma$  は、RP-ILD 併発 DM 症例 10 例全例で検出され、DM 17 症例中 14 例 (82%) と高頻度に検出された。それに対して、他の膠原病および健常人では 7 例中 1 例 (14%) で検出されたのみであった。ILD 併発 DM の治療前後の血清 IFN  $\gamma$  の検討では、治療後に IFN  $\gamma$  は有意に低下した。

血清 IL-18 は、DM、他の膠原病および健常人とともに全例で検出された。ILD 併発 DM 症例の治療前後の血清 IL-18 の推移は、ばらつきが大きく明らかな傾向は認めなかった。しかしながら、RP-ILD 併発 DM 症例に限って、治療反応群と無効群に層別化して検討したところ、生存例では 7 例中 6 例 (86%) で治療後に減少を認めた。

血清 IL-17A および IL-23 は、DM、他の膠原病、健常人全例で検出されなかった。血清 BAFF は RP-ILD 併発 DM 3 例で検出されたが、いずれも低濃度であった。以上、今回の検討で、血清 IFN  $\gamma$  および IL-18 濃度は、DM との関連し、ILD 併発 DM の疾患活動性の指標となる可能性があり、その病態への關与が示唆された。

#### <小児 DM (Juvenile DM: JDM) における抗 CADM-140/MDA5 抗体の臨床的意義>

JDM 35 例中 11 例 (31%) が抗 CADM-140/MDA5 抗体陽性であった (JDM: 6 例, Clinically amyopathic JDM (CAJDM): 5 例)。11 例全例で ILD を併発し、うち 6 例は RP-ILD で、4 例

は治療に反応せず死亡した。抗 CADM-140/MDA5 抗体陽性例は、陰性例と比較して、RP-ILD 併発が、有意に高頻度であった (P=0.0017)。抗 CADM-140 抗体陽性例の RP-ILD 併発例は、慢性型 ILD 併発例と比較して、治療前の抗体価が有意に高値であった (166.7 unit vs. 57.4 unit, P=0.048)。また、RP-ILD 併発死亡例は、成人 DM 例同様に、治療後の抗体価が投与前と比較して有意に低下せず、高値にとどまっていた (197.2 units vs. 76.2 units, P=0.17, n=3)。以上、抗 CADM-140/MDA5 抗体は、JDM においても RP-ILD 併発の推定や治療反応性の評価に有用である可能性が示唆された。

#### <抗 CADM-140/MDA5 抗体陽性 RP-ILD 併発 DM に対する大量ステロイドおよびエンドキサン間歇静注(IVCY)/シクロスポリン A(CyA)併用療法の効果と同抗体力価の関連>

RP-ILD を併発した CADM 患者 10 例における大量ステロイドと IVCY/CyA 併用療法前後の臨床症状、高解像度 CT での Kazerooni らの CT スコアと抗 CADM-140/MDA5 抗体力価との関連を後ろ向きに検討したところ、RP-ILD 併発 DM 患者 10 例中 8 例で治療は有効で、有効例(生存例)では治療後に抗 CADM-140/MDA5 抗体の有意な低下を認め (125.4 units vs. 8.6 units, P=0.019)、全例でカットオフ値以下に低下した。それと平行して、総 alveolar スコアは有意に低下したが (10.13 vs. 7.13, P=0.012)、平均 interstitial スコアに変化を認めなかった。無効例(死亡例)では、同抗体力価および平均 alveolar スコアの低下は認めなかった。以上の結果から、抗 CADM-140/MDA5 抗体力価は RP-ILD の活動性を反映し、治療効果の評価に有用である可能性が示唆された。

#### <抗 CADM-140/MDA5 抗体陽性の DM/ RP-ILD の治療成績の検討>

19 例中 11 例 (58%) で RP-ILD の改善を認めたが、8 例は大量ステロイドと IVCY/CyA 併用療法にも関わらず、呼吸器症状は悪化して全例死亡した。初診時に、同抗体を測定して直ちに治療を開始した群と治療開始後あるいは死亡後に後ろ向きに測定した群に層別化すると前者では、11 例中 9 例 (82%) が生存していたが、後者では 8 例中 6 例 (75%) で死亡していた (P=0.024)。抗 CADM-140/MDA5 抗体測定は、RP-ILD 併発 DM の予後改善に寄与する可能性が示唆された。

#### <まとめ>

今回の検討において、リコンビナント MDA5 を用いた ELISA による同抗体測定は、DM の RP-ILD 併発の予測、治療開始時期の判定、活動性の評価、予後の推定に有用である可能性が示唆された。さらに、DM 患者血清中のサイトカインプロファイルから、同抗原あるいは

抗原抗体複合体は、RP-ILD 併発 DM の病態に關与している可能性が示唆された。今後、さらに症例を集積し、同抗体 ELISA の臨床における実用化および RP-ILD 併発 DM の病態解明が望まれる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Sato S, Kuwana M, Hirakata M, Nogi S, Sasaki N, Chinen N, Honda K, Saito E, Wakabayashi T, Yamada C, Suzuki Y. Clinical Phenotype of Japanese Patients with Dermatomyositis - Classification Based on Dermatomyositis-Specific Autoantibodies- Open Journal of Rheumatology and Autoimmune Diseases. (in press). (査読あり)
2. Teruya A, Kawamura K, Ichikado K, Sato S, Yasuda Y, Yoshioka M. Successful polymyxin B hemoperfusion treatment associated with serial reduction of serum anti-CADM-140/MDA5 antibody levels in rapidly progressive interstitial lung disease with amyopathic dermatomyositis. Chest. 2013; 144: 1934-6. (査読あり)
3. 佐藤慎二. 皮膚筋炎に見出される自己抗体の臨床的意義 -抗 CADM-140/MDA5 抗体を中心に- Therapeutic Research 2013; 34(6): 737-42, (査読なし)
4. Sato S, Kuwana M, Fujita T, Suzuki Y. Anti-CADM-140/MDA5 autoantibody titer correlates with disease activity and predicts disease outcome in patients with dermatomyositis and rapidly progressive interstitial lung disease. Mod Rheumatol. 2013 23(3): 496-502. (査読あり)
5. 佐藤慎二. 抗 CADM-140/MDA5 抗体(急速進行性間質性肺炎を併発した皮膚筋炎のバイオマーカー) 生物化学研究所 BIO-TOVO 2013; 15: 2, (査読なし)
6. 佐藤慎二. 抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎の臨床的および免疫学的特徴 リウマチ科 2013; 50(1): 147-154. (査読なし)
7. Gono T, Sato S, Kawaguchi Y, Kuwana M, Hanaoka M, Katsumata Y, Takagi K, Baba S, Okamoto Y, Ota Y, Yamanaka H. Anti-MDA5 antibody, ferritin and IL-18

are useful for the evaluation of response to treatment in interstitial lung disease with anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis. *Rheumatology* (Oxford). 2012 51(9):1563-70.

(査読あり)

8. **佐藤慎二**. 膠原病 最近の動向(Update 2012): 多発性筋炎・皮膚筋炎 成人病と生活習慣病 42(8): 963-6, 2012
9. **佐藤慎二**, 鈴木康夫. 自己抗体研究の新たな展開: 多発性筋炎・皮膚筋炎 抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体, 抗 p155/TIF-1 抗体および抗 CADM-140/MDA5 抗体. 分子リウマチ治療 2012; 5(4): 49-52. (査読なし)
10. **Sato S**, Kuwana M, Fujita T, Suzuki Y. Amyopathic dermatomyositis developing rapidly progressive interstitial lung disease with elevation of anti-CADM-140/MDA5 autoantibodies. *Mod Rheumatol*. 2012; 22(4): 625-9. (査読あり)
11. **佐藤慎二**. ほかの膠原病に伴う筋炎 中外医学社 2012; 30(3): 319-21. (査読なし)
12. **佐藤慎二**, 鈴木康夫. 皮膚筋炎の急速進行性間質性肺炎と自己抗体 呼吸器内科 2011; 19(3): 236-41. (査読なし)

[学会発表](計 10 件)

1. **佐藤慎二**, 倉林賢慶, 佐々木 翔, 小山泰, 野木真一, 佐々木則子, 知念直史, 本田 桐, 齋藤榮子, 山田千穂, 若林孝幸, 鈴木康夫. 皮膚筋炎の併発する急速進行性間質性肺炎に対する大量ステロイドおよびシクロホスファミド間歇静注/シクロスポリン A 併用療法の効果は抗 CADM-140/MDA5 抗体力価と関連する. 第 587 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (東京) 2014. 4.26
2. Sasaki N, **Sato S**, Nogi S, Chinen N, Honda K, **Saito E**, Yamada C, Suzuki Y. Efficacy of Intermittent Intra-venous Cyclophosphamide and Cyclosporin A Combination Therapy for Rapidly Progressive Interstitial Lung Disease with Dermatomyositis Associated with Anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Autoantibody Titer. The 77th Annual scientific meeting of American College of Rheumatology (San Diego). 2013.10.29

3. **Sato S**, Sasaki N, Nogi S, Chinen N, Honda K, **Saito E**, Yamada C, Suzuki Y. Serum Interferon , and Interleukin-18 Are Associated With Disease Activity Of Rapidly Progressive Interstitial Lung Disease In Patients With Clinical Amyopathic Dermatomyositis. The 77th Annual scientific meeting of American College of Rheumatology (San Diego). 2013.10.29
4. **佐藤慎二**. 多発性筋炎/皮膚筋炎の病態と自己抗体 第 57 回日本臨床免疫学会総会・学術集会(下関) 2013. 11.27
5. **佐藤慎二**, 野木真一, 佐々木則子, 知念直史, 本田 桐, 齋藤榮子, 若林孝幸, 山田千穂, 鈴木康夫. 皮膚筋炎の併発する急速進行性間質性肺炎患者血清中におけるインターフェロン および IL-18 濃度の検討 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (京都) 2013. 4.18
6. **Sato S**, Kobayashi N, Yamazaki K, Suzuki Y: Clinical Utility of Anti-CADM-140/Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Autoantibody Titers in Patients with Juvenile Dermatomyositis and Rapidly Progressive Interstitial Lung Disease. The 76th Annual scientific meeting of American College of Rheumatology (Washington DC). 2012.11.11
7. **佐藤慎二**, 小林法元, 山崎和子, 鈴木康夫. 小児皮膚筋炎における抗 CADM-140/MDA5 抗体の臨床的意義の検討. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (東京) 2012. 4.27
8. **Sato S**, Kuwana M, Fujita T, Suzuki Y: Anti-CADM-140 Autoantibody Titer Correlates with Disease Activity in Patients with Dermatomyositis and Rapidly Progressive Interstitial Lung Disease. The 75th Annual scientific meeting of American College of Rheumatology (Chicago). 2011.11.6
9. **佐藤慎二**. 急速進行性間質性肺炎を併発した皮膚筋炎に見出された抗 CADM-140/MDA5 抗体の臨床的意義について シンポジウム【膠原病に伴う肺病変】 第 52 回日本呼吸器学会学術集会 (神戸) 2012.4.20
10. **佐藤慎二**. 皮膚筋炎に見出された抗 CADM-140 抗体の臨床的意義について 第 21 回日本小児リウマチ学会 シンポジウム【若年性皮膚筋炎に合併する間質性肺炎: 早期診断と治療】 (神戸) 2011.10.16

[図書](計 5 件)

1. **佐藤慎二**. 1. 肺病変 (2) 間質性肺病変 3) びまん性肺胞障害(DAD). 日本臨

床 増刊号 最新関節リウマチ, 日本臨床社, 72(3): 570-3, 2014

2. **佐藤慎二**. 多発性筋炎・皮膚筋炎 (Polymyositis/ Dermatomyositis: PM/DM). 鈴木則宏監修「神経内科ゴールデンハンドブック」改訂第2版, 南江堂, 東京, pp256-62, 2014.4
3. **佐藤慎二**. 多発性筋炎・皮膚筋炎. 泉 孝英編集主幹 ガイドライン 外来診療 2014 日経メディカル開発 pp 518-21, 2014.4
4. **佐藤慎二**. 抗 CADM-140/MDA5 抗体と間質性肺炎. 永井厚志 巽 浩一郎 桑野和善, 高橋和久編集 Annual Review 呼吸器 中外医学社 pp 79-85, 2014.1
5. **佐藤慎二**. 抗 CADM-140 抗体の臨床的・病因的意義 別冊・医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 pp77-82, 2012.9

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 慎二 (Shinji Sato)  
東海大学医学部  
准教授  
研究者番号: 90276238

### (3)連帯研究者

若林 孝幸 (Takayuki Wakabayashi)  
東海大学医学部  
助教  
研究者番号: 40349410

齋藤 榮子 (Eiko Saito)  
東海大学医学部  
助教  
研究者番号: 70514503