

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591618

研究課題名(和文) 悪性腫瘍合併皮膚筋炎における TIF1- γ が関与する二段階病態仮説の検証

研究課題名(英文) Investigation of two-step theory involved with TIF1-gamma in cancer-associated with dermatomyositis

研究代表者

室 慶直 (MURO, YOSHINAO)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80270990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍が合併する皮膚筋炎における病態形成機構は未だ持って解明されていない。しかし、悪性腫瘍合併という皮膚筋炎の病型に特異的な自己抗体の対応抗原がTIF1- γ であることが判明している。抗体陽性例の悪性腫瘍組織においてTIF1- γ 分子の異常発現が存在するのか、その組織内では関連分子との相互作用によってTIF1- γ が免疫制御機構に重要な役割を果たすTGF- β などの分子と強調する可能性についても調べた。腫瘍組織中のTIF1- γ は高発現していることが示され、IL-6を介したSTAT3のリン酸化により腫瘍進展の可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pathogenic mechanisms has been still unknown in cancer-associated dermatomyositis (CADM). We investigated whether malignant tissues in CADM have the aberrant expression of TIF1- γ , which is a serological marker of CADM, and also investigated the possibility of interaction between TIF1- γ , and TGF- β and other associated molecules. We showed the high expression of TIF1- γ in malignant tissues in patients with anti-TIF1- γ and suggested the possibility of tumor growth by the phosphorylation of STAT3 through IL-6.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚筋炎 悪性腫瘍 抗TIF1- γ 抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚筋炎 (Dermatomyositis; DM) は皮膚と筋肉を病変の主座とする代表的な膠原病の一つである。その生命予後は、二大合併病態である悪性腫瘍と間質性肺炎が左右するとも言え、これらの病態解明とそれに基づく治療法の確立が急務である。近年、DM 患者血清中の自己抗体の解析が急速に進展し、自己抗体からの病型分類が可能になってきた。その中でも、急速進行性の間質性肺炎を合併する amyopathic DM に特異的とされる抗 MDA-5 抗体と、悪性腫瘍を合併する DM に特異的とされる抗 TIF1- 抗体は、それらが対応する病型の予後の悪さからも、特に重要な自己抗体として注目されている。

(2) 抗 TIF1- 抗体は、従来その対応抗原の分子量から抗 p155 抗体とか抗 p155/p140 抗体と呼ばれていたもので、transcriptional intermediary factor (TIF) 1- という分子と反応する自己抗体である事が判明している。これまでの報告によれば、同抗体陽性 DM 患者の半数から全例に悪性腫瘍の存在が見つかり、我々は、TIF-1 遺伝子を用いたリコンビナント蛋白による免疫沈降法によるこの自己抗体の特異的測定系を開発した (Hoshino et al, Rheumatology, 2010)。従来の測定は、放射性物質で標識した細胞抽出蛋白を用いた免疫沈降法に頼っていたが、放射性物質を使用することによる危険性や、DM の自己抗原が分子量にして 100 から 200kDa の間に位置するものが多数有り、対応抗原の決定が必ずしも容易でない、等の欠点があった。我々の方法はこれらの点を克服した実験法であり、抗体の同定を容易にした。しかし、抗 p155/p140 抗体が認識する分子の p155 は TIF1- であることは同定されたが、p140 は TIF1- とは異なる分子なのか、TIF1- の分解産物なのかについては判明していない。

(3) 一方、これまでに担癌患者の血清中に存在する数多くの自己抗体が報告されている。それらが認識する“癌抗原”はデータベース上、1,500 を超えており、論文として詳細が報告されているものも多い。興味深いことに、TIF-1 分子が担癌患者 (DM と関係なく) 血清中の自己抗体対応抗原として詳細に報告された事は無く、このことは悪性腫瘍合併の DM の発症機転を考える上で、同分子が DM の発症に大きく関与していることを想像させる。以前から担癌患者に生じる神経疾患として、傍腫瘍性神経症候群が知られている。腫瘍細胞と神経組織に共通に発現する抗原に対して生じた免疫反応が、神経組織を攻撃する機序が考えられており、癌種-自己抗体-神経病変部の関連にある程度の一定性が認められる。悪性腫瘍合併の DM においても、腫瘍組織に発現した皮膚や筋組織との共通抗原を標的とした自己免疫反応で DM が発症す

るといふ仮説は、説明が容易で、またその可能性を否定するデータも無いが、担癌患者の癌抗原として TIF-1 の報告が散見されなかったこと、DM に合併する癌種に一定性がないこと、などを考えると、単純に癌組織と筋組織の共通抗原や交差反応のみで発症機序を語り尽くせるとは考えにくい。

(4) すでに全身性エリテマトーデスや関節リウマチといった膠原病においては、Treg や NKT 細胞の数的・機能的異常が指摘されており、ごく最近、DM においても末梢血のみならず、皮膚組織や筋組織における Treg や NKT 細胞の減少が報告されるようになった。TGF- β が役割を担う免疫制御機構として Foxp3 陽性 Treg 産生能があるが、Foxp3 陽性 Treg の誘導は Smad2/3 に依存することがわかっており、近年、TIF1- が Smad2/3 と複合体を形成して TGF- β のシグナル伝達経路に重要な役割を演ずることが報告された。また、NKT 細胞の分化を TIF1- が制御していることが昨年報告され、NKT を含めた調節性 T 細胞の動態に TIF1- が大きく関与していることが想定される。TIF1- の作用機序には、TGF- β シグナル伝達制御機構 Smad2/3 との結合が Smad4 より TIF1- に優位になる agonistic model と、TIF1- が Smad4 をユビキチン化して各 Smad を解離させる antagonistic model の二つのモデルがあるが、各種の病態によってどちらのモデルが優位に働いているかはよくわかっていない。

2. 研究の目的

(1) TIF-1 の分子機能から、悪性腫瘍合併の DM 発症における TIF-1 の関与に二つのステップがあることを想定した。最初に悪性腫瘍合併の DM 患者の腫瘍組織に自己抗体産生を誘導すると考えられる異常な TIF-1 分子動態が認められ、さらには抗 TIF-1 抗体が自己免疫応答を誘導すると考えられる免疫調節細胞の変動に影響を及ぼす、という二段階仮説である。

(2) 研究期間中に他のグループより報告された (Fujimoto M, et al. Arthritis Rheum. 2012;64:513-22) p140 が同じ TIF1 ファミリーに属する TIF1- であるという発見に基づき、我々の症例における抗 TIF-1 抗体と抗 TIF1- 抗体の陽性頻度について調べる。

(3) 抗 TIF-1 抗体陽性の皮膚筋炎患者に合併した悪性腫瘍の腫瘍組織において、TIF1- やその関連分子の発現様式に正常組織と比べて異常をきたしていないか、を明らかにする。

(4) TIF1- が高発現している腫瘍組織では、IL-6 を介して STAT3 がリン酸化され、リン酸化 STAT3 は上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) を引き起こし、

腫瘍の進展に寄与するという仮説を検証する。

3. 研究の方法

(1) リコンビナント蛋白を用いた ELISA 法、免疫沈降反応により抗 TIF1- 抗体と抗 TIF1- 抗体陽性患者を同定する。家兎網状赤血球と cDNA プラスミドを用いた in vitro 転写翻訳系により TIF1- および TIF1- リコンビナント蛋白を合成し、既報の方法により、悪性腫瘍合併の DM 患者血清中に両抗体がどの程度存在するか調べる。また、悪性腫瘍を有しない DM 患者についても同様に調べる。

(2) 抗 TIF1- 抗体陽性・悪性腫瘍合併 DM 患者の腫瘍組織における TIF1- および関連分子であるリン酸化 Smad2/3、Smad4、p53、TIF1-、STAT3、リン酸化 STAT3 について免疫組織染色を行う。皮膚部においても同様の検討を行う。

(3) TIF1- と TIF1- の間に相互の発現調節作用があるか調べるために、HepG2 細胞に TIF1- 遺伝子をトランスフェクションした細胞にて、TIF1- の発現の変化を検討し、また RNA 干渉により HaCaT 細胞の TIF1- の発現量を低下させた細胞を樹立し、TIF1- の発現の変化を検討する。

(4) 乳癌の cell line である MCF-7 細胞に、TIF1- 遺伝子をトランスフェクションし過剰発現させ、STAT3 のリン酸化の有無、E-cadherin の発現量をウェスタンブロットにおいて検討する。

4. 研究成果

(1) リコンビナント蛋白を用いた ELISA、免疫沈降法により抗 TIF1- /- 抗体陽性患者の同定を自施設皮膚筋炎患者 108 人について試みたところ、抗 TIF1- 抗体陽性かつ抗 TIF1- 抗体陽性は 7 人（うち腫瘍合併が 2 人）抗 TIF1- 抗体陽性かつ抗 TIF1- 抗体陰性は 5 人（うち腫瘍合併が 0 人）抗 TIF1- 抗体陰性かつ抗 TIF1- 抗体陽性が 11 人（うち腫瘍合併 7 人）であった。これまで抗 TIF1- 抗体陽性例は必ず抗 TIF1- 抗体も陽性と考えられていたが、5 例の陽性例において抗 TIF1- 抗体が陰性であったことは驚くべきことで、さらに興味深い結果として、それら 5 例はすべて抗 Mi-2 抗体であることが判明した。抗 Mi-2 抗体は皮膚筋炎のマーカー抗体であるが、間質性肺炎や悪性腫瘍を伴わない予後良好のマーカーとして有名である。抗 Mi-2 抗体と抗 TIF1- 抗体の並存例は存在しなかったことより、抗 TIF1- 抗体が、かたや悪性腫瘍合併のマーカー抗体の抗 TIF1- 抗体と併存し、かたや悪性腫瘍合併のほとんどない抗 Mi-2 抗体と併存することは驚くべき事実であった。

(2) 抗 TIF1- 抗体、抗 Smad4 抗体、抗リン酸化 Smad2/3 抗体を用いて、抗 TIF1- 抗体が陽性の DM 患者 5 人からの 6 つの腫瘍組織（胃癌 3、乳癌、肺癌 1）について免疫組織化学を行った。腫瘍組織中の TIF1- は 5 つの標本において周囲の正常組織と比べて高発現していた（図 1）。Smad4 はいずれの組織でも

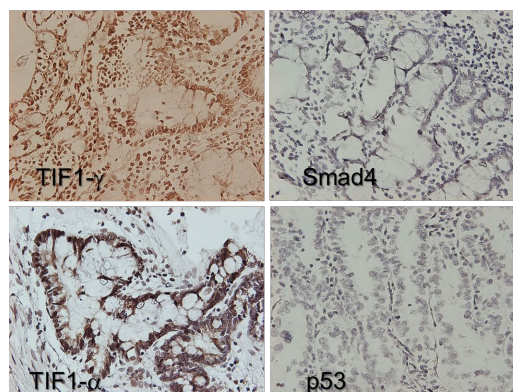


図 1 胃癌の免疫組織染色

発現は低下しており、リン酸化 Smad2/3 は核内に強く染まったことより発現は上昇していると考えられた。これらの染色結果から、使用した癌組織における TIF1- の作用機序には、TGF- シグナル伝達制御機構 Smad2/3 との結合が Smad4 より TIF1- に優位になる agonistic model の方が優位に働いていることが示唆された。

(3) Hep G2 細胞に TIF1- 遺伝子をトランスフェクションした細胞では、ウェスタンブロットにより TIF1- の発現量が低下することが示された。しかし、RNA 干渉により TIF1- 発現量を低下させた HaCaT 細胞においては、ウェスタンブロットにて検討した結果、TIF1- の発現に変化は見られなかった。上記の結果の乖離については異なる培養細胞種によるものかどうかは更なる検討を要する。なお、TIF1- の発現量を変動させる培養系の実験は、試みたものの成功しなかった。マウスの肝臓癌モデルではこれら 2 分子の協調作用が報告されている (Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:8212-7) が、肝臓以外の固形癌では報告がない。われわれの抗体陽性例の癌種には肝臓癌の症例はなく、過去の報告にも肝臓癌の報告は見当たらない。これについては、ヒトとマウスの差異はあるが、臓器による協調作用の差異を示唆しているかもしれない。

(4) 悪性腫瘍合併 DM 患者の腫瘍組織中の、STAT3、リン酸化 STAT3 の発現量を免疫組織染色にて検討した結果、DM 患者の胃癌組織では正常胃組織と比較して、STAT3、リン酸化 STAT3 の発現に差は見られなかった。それに対して、乳癌組織では、正常乳腺組織と比較して、リン酸化 STAT3 の発現が増加していた。

そこで TIF1- を過剰発現させた乳癌由来 MCF-7 細胞で、STAT3 のリン酸化の有無、E-cadherin の発現量をウェスタンブロットにおいて検討したが、STAT3 およびリン酸化 STAT3、E-cadherin、Smad4 のいずれも変化が見られなかった。IFN- 発現を反映する MxA は発現が増加していた。この実験については、RNA 干渉により TIF1- 発現量を低下させた MCF-7 細胞において、STAT3 のリン酸化の有無、E-cadherin の発現量を、TGF- β や IL-6 刺激の有無などの条件を変化させ検討していく必要があると考えられた。

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 60 件)

Ogawa M, Sugiura K, Yokota K, Muro Y, Akiyama M. Anti-transcription intermediary factor 1-antibody-positive clinically amyopathic dermatomyositis complicated by interstitial lung disease and breast cancer. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 査読有、2015 (in press).

Sugiura K, Muro Y, Akiyama M. Annular erythema associated with Sjögren's syndrome preceding overlap syndrome of rheumatoid arthritis and polymyositis with anti-PL-12 autoantibodies. *Acta Derm Venereol*, 査読有、2014,94:470-471.

Hane H, Muro Y, Watanabe K, Ogawa Y, Sugiura K, Akiyama M. Establishment of an ELISA to detect anti-glycyl-tRNA synthetase antibody (anti-EJ), a serological marker of dermatomyositis/polymyositis and interstitial lung disease. *Clin Chim Acta*, 査読有、2014,431:9-14.

Muro Y, Sugiura K, Akiyama M. A new ELISA for dermatomyositis autoantibodies: rapid introduction of autoantigen cDNA to recombinant assays for autoantibody measurement. *Clin Dev Immunol*. 査読有、2013,2013:856815.

室 慶直. 皮膚筋炎の病因と治療、日皮会誌、査読無、2013,123:2733-2735.

Sugiura K, Muro Y, Akiyama M. Autoantibodies to nuclear matrix protein 2/MJ in adult-onset dermatomyositis with severe calcinosis. *J Am Acad Dermatol*, 査読有、2012,67:e167-e168.

Muro Y, Ishikawa A, Sugiura K, Akiyama M. Clinical features of anti-TIF1-antibody-positive dermatomyositis patients are closely associated with coexistent dermatomyositis-specific autoantibodies and anti-TIF1- or anti-Mi-2 autoantibodies. *Rheumatology*

(Oxford)、査読有、2012,51:1508-1513.

Ishikawa A, Muro Y, Sugiura K, Akiyama M. Development of an ELISA for detection of autoantibodies to nuclear matrix protein 2. *Rheumatology* (Oxford)、査読有、2012,51:1181-1187.

Muro Y, Sugiura K, Hoshino K, Akiyama M. Disappearance of anti-MDA-5 autoantibodies in clinically amyopathic DM/interstitial lung disease during disease remission. *Rheumatology* (Oxford)、査読有、2012,51:800-804.

Muro Y, Sugiura K, Hoshino K, Akiyama M, Tamakoshi K. Epidemiologic study of clinically amyopathic dermatomyositis and anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibodies in central Japan. *Arthritis Res Ther*, 査読有、2011,13:R214.

室 慶直. 抗 Mi-2 抗体と抗 TIF1- 抗体。医学のあゆみ、査読無、2011,239:83-87.

[学会発表](計 70 件)

室 慶直、[皮膚病変を伴う全身性疾患診療の現状と目指すもの] 皮膚筋炎、第 65 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2014 年 10 月 26 日、大阪府大阪市、グランフロント大阪

小川真理子、室 慶直、杉浦一充、平敷安希博、秋山真志、HLA class II ハプロタイプを同定した抗 small ubiquitin-like modifier activating enzyme 抗体陽性の皮膚筋炎、第 65 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2014 年 10 月 25 日、大阪府大阪市、グランフロント大阪

室 慶直、杉浦一充、抗 Mi-2 抗体検出のための高感度 ELISA 開発とその臨床的意義、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014 年 4 月 26 日、東京都港区、グランドプリンスホテル新高輪

室 慶直、皮膚筋炎を見出す、第 77 回日本皮膚科学会東京支部学術大会、2014 年 2 月 16 日、東京都千代田区、国際フォーラム

室 慶直、Quality Indicator 講演 皮膚筋炎 1、第 64 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2013 年 11 月 3 日、愛知県名古屋市、名古屋国際会議場

相山明輝、白井三由希、清水久美子、笹田佳江、満間照之、平林祥、牛島洋子、室 慶直、当院において 1 年間で経験した抗 TIF1- 抗体陽性皮膚筋炎の 3 例、第 64 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2013 年 11 月 2 日、愛知県名古屋市、名古屋国際会議場

大西章史、洪藤宣行、垣尾勇樹、福本真理絵、比嘉深雪、桃木律也、丸山啓輔、平松信、室 慶直、山村昌弘、非進行性間質性肺炎を呈する抗 CADM-140 抗体 (抗 MDA-5 抗体) 陽性の皮膚筋炎の 1 例、第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2012 年 4 月 26 日、東京都港区、グランドプリンスホテル新高輪 棚橋華奈、杉浦一充、室 慶直、秋山真

志、抗 transcriptional intermediary factor 1g(TIF1-)抗体が治療方針決定に有用であった悪性腫瘍合併皮膚筋炎の1例、35回皮膚脈管膠原病研究会、2012年2月17日、東京都新宿区、京王プラザホテル

室 慶直、皮膚科医がみる膠原病 皮膚筋炎、第111回日本皮膚科学会総会、2012年6月2日、京都府京都市、国立京都国際会館

室 慶直、皮膚筋炎の最新治療、第62回日本皮膚科学会中部支部総会、2011年11月19日、三重県四日市市、四日市市文化会館

〔図書〕(計3件)

室 慶直、皮膚筋炎の概念・疫学・病因・診断基準、中山書店、皮膚科臨床アセット7 皮膚科膠原病診療のすべて、2011、398(214-217)。

室 慶直、皮膚筋炎の皮膚症状、皮膚病理組織所見、中山書店、皮膚科臨床アセット7 皮膚科膠原病診療のすべて、2011、398(218-222)。

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/derma/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

室 慶直 (MURO YOSHINAO)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80270990

(2)研究分担者

杉浦 一充 (SUGIURA KAZUMITSU)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70335032

小川 靖 (OGAWA YASUSHI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10567754