

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860808

研究課題名(和文) 抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎の病因・病態解明

研究課題名(英文) Investigation of pathogenesis and pathophysiology of anti-MDA5-positive dermatomyositis

研究代表者

中嶋 蘭 (NAKASHIMA, Ran)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10599525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎(DM)において病態を探究し、MDA5もしくは抗MDA5抗体の病原性について検討することを目的とした。

抗MDA5抗体陽性DMの剖検肺組織標本では肺胞腔内へマクロファージが浸潤し、その周囲にIP-10の発現を認めた。健康人(NC)の単球をIgG(抗MDA5抗体陽性例もしくはNC)+polyI:Cで刺激したところ、抗MDA5抗体陽性例の方がより強くIL-6産生を刺激する可能性が示唆された。さらに、患者血清中にはNCに比べMDA5が高頻度・高濃度で存在し、病態に関与している可能性がある。

疾患遺伝的背景としてHLAclass のハプロタイプが関連していた。

研究成果の概要(英文)：The purpose was to investigate the pathophysiology of anti-MDA5-positive DM and the pathogenicity of MDA5 or anti-MDA5 antibody.

An autopsy of anti-MDA5-positive DM with rapidly progressive interstitial lung disease(ILD) revealed that a lot of macrophages infiltrated to alveoli in the lesion of ILD. Moreover, IP-10, which stimulate the activation of monocyte and macrophage, was highly expressed in the damaged alveoli and fibrotic change after inflammation. In vitro, it was suggested that anti-MDA5-positive IgG stimulated monocytes producing more IL-6 than normal control(NC) in the coexistence of poly I:C. MDA5 was detected more frequently in anti-MDA5-positive patients than NC and its concentration was also higher in the patients than in HC. Serum MDA5 may react with anti-MDA5 and play some role in the pathophysiology in anti-MDA5-positive DM. HLA DRB1*13:02-DQB1*06:04 -DQB1*06:04 was associated with anti-MDA5-positive dermatomyositis as a genetic background.

研究分野：免疫・リウマチ・膠原病

キーワード：皮膚筋炎 抗MDA5抗体 間質性肺炎 単球 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

抗 MDA5 抗体陽性例は急速進行性間質性肺炎を併発する頻度が高く、皮膚筋炎(DM)の中でも最も予後の悪い一群である。同抗体陽性例では血清フェリチン値と肝胆道系酵素が高値を示し病勢と相関することや血清中 IL-6、IL-18、M-CSF が高値を示すことから同抗体陽性 DM の病態には単球やマクロファージの異常活性化が存在している可能性が考えられた。また、同抗体陽性患者は、何らかの感染症を契機に原疾患の活動性が増悪することをしばしば経験し、自然免疫が自己免疫現象に影響を及ぼす可能性が予想される。また同抗体の対応抗原である MDA5 はウイルス RNA を結合し型インターフェロンを誘導する RIG-I ファミリー分子であり、自然免疫において重要な役割を担うことも興味深いものである。しかし自己抗体・自己抗原自体の病原性や病態に対する影響は未だ不明であった。

2. 研究の目的

抗 MDA5 抗体陽性例の病因・病態を解明するため、

- (1) 抗 MDA5 抗体陽性 DM 例において単球・マクロファージ活性化の有無を *in vivo*, *in vitro* で検討する
- (2) 抗 MDA5 抗体もしくは MDA5 抗原自体の病態への関与を検討する
- (3) 抗 MDA5 抗体陽性例の遺伝学的背景を検討する

3. 研究の方法

(1) 抗 MDA5 抗体陽性 DM の免疫病理組織学的検討

同抗体陽性例の 1 剖検例より病変主座である肺病変部位から病理標本を作製し、免疫組織染色を行った。

(2) 抗 MDA5 抗体の単球に対する刺激の有無の検討

IgG 精製カラム(GE healthcare, Hi Trap Protein G HP)を用い、抗 MDA5 抗体陽性患者と健常人の血清 IgG を精製した。Ficoll-Paque を用いて健常人 PBMC を回収し、MACS による CD14 positive selection を行った。それによって得られた CD14 陽性細胞を 10%FBS、1%PS(penicillin, streptomycin) 添加 RPMI 培地に浮遊させ、24 well plate に 1 well あたり 1×10^5 個まいた。そこへ、抗 MDA5 抗体陽性(MDA5(+))IgG もしくは健常人(NC)IgG を 50ug/ml または 100ug/ml で投与し、poly I:C を 0.1ug/ml、1ug/ml、10ug/ml と濃度をふって刺激した。刺激 12 時間後と 24 時間後の培養上清中の IL-6 濃度を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)(R&D systems, Quantikine R ELISA Human IL-6)を用いて測定した。

(3) 末梢血中における MDA5 抗原の有無の検討

抗 MDA5 抗体によるサンドイッチ ELISA(1

次抗体:ウサギモノクローナル抗 MDA5 抗体 (Cell Signaling 社), 2 次抗体:ヤギポリクローナル抗 MDA5 抗体(Santa Cruz 社), 3 次抗体:サル抗ヤギ IgG 抗体 HRPconjugated(Bethyl Laboratories))を作成した。MDA5 の定量検定には MDA5 の C 末端半分(520a.a.)を大腸菌に発現させ精製した蛋白を用いた。抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎患者 13 例、健常人 10 例について血清中の MDA5 タンパク量を検討した。

(4) 抗 MDA5 抗体陽性例と陰性皮膚筋炎例における遺伝学的背景の差についての検討

20 例の抗 MDA5 抗体陽性例について HLA class I (A, B, and C) と class II (DRB1, DQA1, DQB1, and DPB1) のジェノタイピングを WAKFlow システムを用いて行った。コントロールとしての日本人健常人の HLA の各タイプの頻度は HLA 研究所のウェブサイト (<http://www.hla.or.jp/>) より情報を得た。

4. 研究成果

(1) 抗 MDA5 抗体陽性 DM の剖検肺組織において、CD8 陽性細胞が肺胞空内に浸潤していた一方、CD4 陽性細胞はほとんど認めなかった。CD56 陽性細胞も認めなかった。しかし CD68 陽性細胞は肺胞空内に浸潤していた。IP-10(CXCL10)は正常肺部分には認めず、炎症後のつぶれた肺胞・線維化部に染色された。MDA5 陽性細胞は明らかではなかった。これらのことは、抗 MDA5 抗体陽性例の肺病変局所においてマクロファージの活性化とそれを刺激する因子が存在することを示唆するものであった。

(2) 抗 MDA5 抗体の単球に対する刺激の検討について健常人(NC) 2 例の CD14 陽性細胞を用いた結果では、刺激 12 時間では NC IgG による刺激も、MDA5(+)IgG による刺激も差はなく、poly I:C 単独刺激をした場合とも差を認めなかった。しかし刺激 24 時間後においては、poly I:C 濃度 1ug/ml または 0.1ug/ml + IgG100ug/ml で刺激した場合には NC IgG より MDA5(+) IgG で刺激した方がより高濃度の IL-6 を分泌している可能性が示唆された。(poly I:C 1ug/ml+IgG100ug/ml; 58.2pg/ml(NC) v.s. 84.3pg/ml(MDA5(+)), poly I:C 0.1ug/ml+IgG 100ug/ml; 37.0pg/ml(NC) v.s. 326.9pg/ml(MDA5(+)) 今回、検討数が少ないため、統計学的有意差を検討するまでには至っておらず、今後症例数を増やして検討する必要がある。また、未治療の抗 MDA5 抗体陽性例の CD14 陽性細胞を得る機会が得られなかったが、今後、患者リンパ球を用いることによる IL-6 産生の差も検討課題である。

(3) 血清中 MDA5 抗原の有無を ELISA で検討したところ表 1 に示す結果であった。MDA5 抗体陽性例 13 例中 5 例で、健常人 10 例中 4 例で血清中の MDA5 蛋白の測定が可能であり、その濃度は抗 MDA5 抗体陽性患者 v.s. 健常人 $9.02 \pm 5.97 \mu\text{g/ml}$ v.s. $1.67 \pm 2.21 \mu\text{g/ml}$ で

あり抗 MDA5 抗体陽性例で有意に血清中 MDA5 蛋白が検出された。しかしこれらの血清中に実際 MDA5 蛋白が存在するかどうかは、Western blot を含めた他の方法でも検証が必要である。

(表 1)

	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4
吸光度	0.376	1.200	1.546	0.588
濃度(ng/μl)	ND	12.0	15.6	ND
	Pt5	Pt6	Pt7	Pt8
吸光度	0.825	0.210	1.199	0.356
濃度(ng/μl)	3.9	ND	12.0	ND
	Pt9	Pt10	Pt11	Pt12
吸光度	0.247	0.724	0.500	0.300
濃度(ng/μl)	ND	1.6	ND	ND
	Pt13	HC1	HC2	HC3
吸光度	0.603	0.257	0.672	0.178
濃度(ng/μl)	ND	ND	0.5	ND
	HC4	HC5	HC6	HC7
吸光度	0.307	0.320	0.664	0.690
濃度(ng/μl)	ND	ND	0.3	0.9
	HC8	HC9	HC10	
吸光度	0.873	0.470	0.285	
濃度(ng/μl)	4.9	ND	ND	

(5) 抗 MDA5 抗体陽性例と陰性皮膚筋炎例における遺伝学的背景の差については HLA class については抗 MDA5 抗体との有意な相関を認めなかったが、HLA class に関しては HLA DRB1 *13:02-DQB1 *06:04 -DQB1 *06:04 のハプロタイプの頻度が抗 MDA5 抗体陽性例において健常人よりも有意に高かった (12.6% v.s. 3.6% ; P = 0.0030, OR:3.79 (95%CI 1.47-9.76))。今後さらなる症例の集積とともに検証が必要である。

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 8 件)

Imura Y, Yukawa N, Handa T, Nakashima R, Murakami K, Yoshifuji H, Ohmura K, Ishii H, Nakata K, Mimori T. Two cases of autoimmune and secondary pulmonary alveolar proteinosis during immunosuppressive therapy in dermatomyositis with interstitial lung

disease. Mod Rheumatol. 査読有 2016 Mar 11:1-6.

Hozumi H, Enomoto N, Kono M, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Sumikawa H, Johkoh T, Nakashima R, Imura Y, Mimori T, Suda T. Prognostic significance of anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in polymyositis/dermatomyositis-associated interstitial lung disease: a retrospective case control study. PLoS One. 査読有 2015 Mar 19;10(3):e0120313. doi: 10.1371

Muro Y, Nakashima R, Hosono Y, Sugiura K, Mimori T, Akiyama M. Autoantibodies to DNA mismatch repair enzymes in polymyositis/dermatomyositis and other autoimmune diseases: a possible marker of favorable prognosis. Arthritis Rheumatol. 2014 Dec;66(12):3457-62.

Iijima Y, Furusawa H, Tateishi T, Tsuchiya K, Fujie T, Tamaoka M, Sakashita H, Miyazaki Y, Sumi Y, Hosono Y, Nakashima R, Mimori T, Inase N. Amyopathic dermatomyositis complicated with eosinophilic pneumonia. Intern Med. 査読有 2014;53(14):1539-44.

Nakashima R, Imura Y, Hosono Y, Seto M, Murakami A, Watanabe K, Handa T, Mishima M, Hirakata M, Takeuchi T, Fujio K, Yamamoto K, Kohsaka H, Takasaki Y, Enomoto N, Suda T, Chida K, Hisata S, Nukiwa T, Mimori T. The multicenter study of a new assay for simultaneous detection of multiple anti-aminoacyl-tRNA synthetases in myositis and interstitial pneumonia. PLoS One. 査読有 2014 Jan 14;9(1):e85062. doi: 10.1371

Ishigaki K, Maruyama J, Hagino N, Murota A, Takizawa Y, Nakashima R, Mimori T, Setoguchi K. Skin ulcer is a predictive and prognostic factor of acute or subacute interstitial lung disease in dermatomyositis. Rheumatol Int. 査読有 2013 Sep;33(9):2381-9.

中嶋 蘭、三森 経世、Anti-MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) antibody and dermatomyositis with rapidly progressive interstitial pneumonia 日本臨床免疫学会誌 査読無 2013;36(2):71-6.

Tanizawa K, Handa T, Nakashima R, Kubo T, Hosono Y, Aihara K, Ikezoe K, Watanabe K, Taguchi Y, Hatta K, Oga T, Chin K, Nagai S, Mimori T, Mishima M. The prognostic value of HRCT in myositis-associated interstitial lung disease. Respir Med. 査読有 2013 May;107(5):745-52.

[学会発表](計 10 件)

Yuji Hosono, Ran Nakashima, Yoshitaka Imura, Naoichiro Yukawa, Hajime Yoshifuji, Koichiro Ohmura and Tsuneyo Mimori Risk factors for life prognosis of interstitial lung

disease in dermatomyositis patients with anti-MDA 5 antibody 2015 American College of Rheumatology

細野祐司, 北郡宏次, 井村嘉孝, 中嶋蘭, 湯川尚一郎, 吉藤元, 大村浩一郎, 三森経世 抗 ARS 抗体陽性間質性肺炎に対する免疫抑制薬の早期併用の有用性 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2015

曾我部愛由子, 遠藤功二, 細野祐司, 中嶋蘭, 野島崇樹, 山崎聡士, 熊谷和彦, 三森経世, 杉山英二 多彩な臨床症状を呈した抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎の一例 日本リウマチ学会総会・学術集会 2015

谷澤公伸, 半田知宏, 中嶋蘭, 細野祐司, 田口善夫, 八田和夫, 長井苑子, 陳和夫, 三森経世, 三嶋理晃 抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体陽性間質性肺炎の長期予後 日本内科学会総会 2015

Yuji Hosono, Ran Nakashima, Yoshitaka Imura, Naoichiro Yukawa, Hajime Yoshifuji, Motomu Hashimoto, Koichiro Ohmura, Takao Fujii and Tsuneyo Mimori Detection of anti-Th/To antibodies in patients with various rheumatic diseases and their clinical features. 2014 The European League against Rheumatism

細野祐司 中嶋蘭 三森経世 筋炎における難治性間質性肺炎の治療 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014

中嶋蘭 膠原病内科医の診る筋炎 自己抗体と筋炎の治療戦略 日本神経免疫学会・日本臨床免疫学会 2 学会合同シンポジウム 2013

細野祐司, 中嶋蘭, 井村嘉孝, 湯川尚一郎, 吉藤元, 大村浩一郎, 三森経世 多発性筋炎・皮膚筋炎の自己抗体と生命予後及び間質性肺炎の関連 日本臨床免疫学会 2013

Yuji Hosono, Ran Nakashima, Yoshitaka Imura, Naoichiro Yukawa, Hajime Yoshifuji, Motomu Hashimoto, Koichiro Ohmura, Takao Fujii and Tsuneyo Mimori The onset of myositis with myositis-specific autoantibodies (MSAs) are associated with the seasons. 2013 The European League against Rheumatism

中嶋蘭, 細野祐司, 井村嘉孝, 湯川尚一郎, 吉藤元, 大村浩一郎, 藤井隆夫, 三森経世 急速進行性間質性肺炎を合併する抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎の強力免疫抑制療法による生命予後の改善 日本内科学会総会 2013

〔図書〕(計 1 件)

中嶋蘭(分担執筆)他、文光堂、リウマチ・膠原病ハイグレード リウマチ・膠原病の合併症や諸問題を解く、2016年1月21日発行

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中嶋 蘭 (NAKASHIMA, Ran)

京都大学大学院医学研究科臨床免疫学
助教

研究者番号： 10599525

(2)研究分担者

(3)連携研究者