

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04885

研究課題名(和文)皮膚筋炎におけるB細胞と自己抗体の病態関与メカニズムの解明

研究課題名(英文)B cell and autoantibody in the pathogenesis of dermatomyositis

研究代表者

藤本 学 (Fujimoto, Manabu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90272591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトTIF1 蛋白を完全アジュバントとともにマウスに免疫することにより、C56BL/6野生型マウスにおいて抗TIF1 抗体が産生されることが確認され、また抗原特異的T細胞も誘導されることが確認された。筋炎は、野生型マウスにおいて誘導されることが組織学的に確認された。筋力低下や皮膚炎等の症状は出現しなかった。筋炎が誘導されたマウスからのT細胞の移入によって、ナীবマウスに筋炎が惹起されることが確認された。免疫マウスからの精製IgGの移入によっては、筋炎は惹起されなかった。しかしながら、CD19が欠損したマウスにおいては、筋炎は惹起されず、B細胞も何らかの役割をもっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：By immunizing mice with human TIF1 protein together with complete adjuvant, it was confirmed that anti-TIF1 antibody was produced in C56BL/6 wild type mice, and antigen-specific T cells were also induced. It was histologically confirmed that myositis is induced in wild type mice. No symptoms such as muscle weakness or dermatitis appeared. It was confirmed that myositis was induced in naive mice by transfer of T cells from mice in which myositis was induced. By contrast, myositis was not caused by transfer of purified IgG from immunized mice. However, in mice deficient in CD19, myositis was not induced, suggesting that B cells also had some role.

研究分野：皮膚科学

キーワード：免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚筋炎は、皮膚および筋の炎症性変化を呈する自己免疫疾患であるが、その病因や病態に関してはいまだに不明の点が多い。皮膚筋炎は、内臓悪性腫瘍や間質性肺炎をしばしば合併することもあるが、その生命予後は他の膠原病と比べても悪く、病態の解明とそれに立脚した治療法の開発が急務であると考えられている。

(2) 皮膚筋炎は、例えば多発性筋炎と比べても、筋組織へのB細胞や形質細胞の浸潤も多く、B細胞や液性免疫の筋病変形成への関与が強いことが従来から想定されてきた。Greenbergらは、皮膚病変(液状変性)と筋病変(perifascicular atrophy)の類似性を指摘して、液性免疫の関与による「ボーダーライン効果」を提唱している¹⁾。また、実地臨床においては、皮膚筋炎患者に対する抗CD20抗体を用いたB細胞除去療法が有効であることが報告されている²⁾⁻⁴⁾。これらは、本症においてB細胞が重要な役割を担っており、B細胞や液性免疫が治療ターゲットとして有望であることを示唆している。そのため、その詳細な分子機構の解明およびそれに立脚した新たな治療法の探索が有望であると考えられる。

(3) 近年になって、疾患特異的な自己抗体が新しく報告され⁵⁾⁻⁷⁾、これらの自己抗体は臨床症状と強く相関し、その抗体価は疾患活動性を反映することから、自己抗体そのものが病態に関する可能性も推測されている。実際に、抗Jo-1抗体の抗原であるヒスチジル tRNA 合成酵素はサイトカイン類似的作用をもち⁸⁾、ヒスチジル tRNA 合成酵素をマウスに免疫すると、筋炎と間質性肺炎の発症が誘導されることが報告されている⁹⁾。しかしながら、どのような機序によって疾患特異的な自己抗体が出現するのか、また自己抗体が実

際にどのような機序で病態に関与しているのかは不明であり、その解明は重要な命題である。

(4) 多発性筋炎・皮膚筋炎の基礎研究は、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなど他の膠原病に比べて遅れている観があるが、これは適切な疾患モデルがなかったことに大きく起因している。近年、上に述べたようにヒスチジル tRNA 合成酵素を免疫するマウスモデルや筋特異的に発現する分子であるC蛋白を免疫して誘導するマウスモデルなどが作成されている¹⁰⁾が、多様な筋炎の病態を完全にはカバーできておらず、特に皮膚筋炎に近い病態を呈する実験系の樹立が必要である。このような背景をふまえて、皮膚筋炎の病態におけるB細胞の関与を包括的にアプローチすることが重要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 皮膚筋炎における悪性腫瘍関連自己抗体の出現機序、(2) B細胞・液性免疫の病態への関与メカニズムの解明と治療法の探索、(3) 皮膚筋炎特異的自己抗原から誘導する皮膚筋炎モデルマウスの樹立の3つの関連したテーマの解明を目的とした。

特に、皮膚筋炎特異抗体の対応抗原であるTIF1等をマウスに免疫し、筋炎や間質性肺炎が誘導されるかどうかを検討し、病態解明を試みることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ヒト TIF1 の全長リコンビナント蛋白をバキュロウイルスに発現させる系を用いて作製した。

(2) 野生型マウスである C57BL/6 マウスに TIF1 蛋白と完全アジュバントを皮下に繰り返し免疫して、筋炎が誘導されるかどうかを検討した。

また、野生型マウスのほかに、B細胞欠損マウスである mMT マウス、B細胞特異的表面分子である CD19 を欠損したマウスを用いて、同様の実験を行った。

(3) 筋炎を誘導したマウスの T 細胞あるいは血清 IgG を精製して、免疫していないマウスに移入し、筋炎が誘導されるかどうかを検討した。

(4) 筋炎の評価は、ヘマトキシリン・エオジン染色および種々の免疫染色を用いた病理組織学的検査によりスコア化して検討を行った 10)。

4. 研究成果

ヒト TIF1 蛋白は、バキュロウイルスの系により産生が確認され、約 155kD の正常な長さの蛋白としてウエスタンブロットで検出された。これを精製して完全アジュバントと混合して、マウスに免疫を行った。繰り返し免疫により、C56BL/6 野生型マウスにおいて抗 TIF1 抗体が産生されることが確認され、また抗原特異的 T 細胞も誘導されることが確認された。

筋炎は、野生型マウスにおいて誘導されることが組織学的に確認された。筋力低下や皮膚炎等の症状は出現しなかった。

筋炎が誘導されたマウスからの T 細胞の移入によって、ナイーブマウスに筋炎が惹起されることが確認された。一方、免疫マウスからの精製 IgG の移入によっては、筋炎は惹起されなかった。

しかしながら、CD19 が欠損したマウスにおいては、筋炎は惹起されず、B 細胞も何らかの役割をもっていることが示唆された。

現在、さらに詳細な分子メカニズムを解析中である。

また、皮膚筋炎患者末梢血では制御性 B 細胞の異常が見出された。

本研究によって、皮膚筋炎患者において高率に検出される自己抗体の対応抗原を免疫することにより、実験的に筋炎を実際に誘導することが明らかに也、今後、筋炎特異抗体自己抗原の病的意義についての解明が進むことが期待される。

<引用文献>

- 1) Greenberg SA, Fiorentino D. Similar topology of injury to keratinocytes and myofibres in dermatomyositis skin and muscle. *Br J Dermatol* 2009;160:464-5.
- 2) Nalotto L, et al. Rituximab in refractory idiopathic inflammatory myopathies and antisynthetase syndrome. *Immunol Res* 2013;56:362-70.
- 3) Fasano S, et al. Rituximab in the treatment of inflammatory myopathies: a review. *Rheumatology (Oxford)* 2017;56:26-36.
- 4) Aggarwal R, et al. Predictors of clinical improvement in rituximab treated refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:740-9.
- 5) Fujimoto M, et al. Myositis-specific anti-155/140 autoantibodies target transcriptional intermediary factor family proteins. *Arthritis Rheum.* 2012;64:513-522.
- 6) Kaji K, et al. Identification of a novel autoantibody reactive with 155- and 140-kDa nuclear proteins in patients with dermatomyositis: an association with malignancy. *Rheumatology.* 2007;46: 25-28.
- 7) Fujimoto M, et al. Myositis-specific autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol.* 2016;28:636-44.
- 8) Howard OM, et al. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine

receptors on T lymphocytes and immune dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;196:781-91.

- 9) Katsumata Y, et al. Species-specific immune responses generated by histidyl-tRNA synthetase immunization are associated with muscle and lung inflammation. *J Autoimmun* 2007;29:174-86.
- 10) Sugihara T, et al. A new murine model to define the critical pathogenic and therapeutic mediators of polymyositis. *Arthritis Rheum.* 2007;56:1304-14.

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 10 件)

1. Kochi Y, Kamatani Y, Kondo Y, Suzuki A, Kawakami E, Hiwa R, Momozawa Y, Fujimoto M, Jinnin M, Tanaka Y, Kanda T, Cooper RG, Chinoy H, Rothwell S, Lamb JA, Vencovský J, Mann H, Ohmura K, Myouzen K, Ishigaki K, Nakashima R, Hosono Y, Tsuboi H, Kawasumi H, Iwasaki Y, Kajiyama H, Horita T, Ogawa-Momohara M, Takamura A, Tsunoda S, Shimizu J, Fujio K, Amano H, Mimori A, Kawakami A, Umehara H, Takeuchi T, Sano H, Muro Y, Atsumi T, Mimura T, Kawaguchi Y, Mimori T, Takahashi A, Kubo M, Kohsaka H, Sumida T, Yamamoto K. Splicing variant of WDFY4 augments MDA5 signaling and the risk of clinically amyopathic dermatomyositis. *Ann Rheum Dis.* 2018;77:602-11. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-212149.
2. Koguchi-Yoshioka H, Okiyama N, Iwamoto K, Matsumura Y, Ogawa T, Inoue S, Watanabe R, Fujimoto M. Intravenous immunoglobulin contributes to control anti-melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) antibody-associated dermatomyositis with palmar violaceous macules/papules. *Br J Dermatol.* 2017;177:1442-6. doi: 10.1111/bjd.15499.
3. Takeuchi A, Matsushita T, Kaji K, Okamoto Y, Yasui M, Hirata M, Oishi N, Higashi A, Seishima M, Asano T, Fujimoto M, Kuwana M, Takehara K, Hamaguchi Y. Autoantibody to scaffold attachment factor B (SAFB): A novel connective tissue disease-related autoantibody associated with interstitial lung disease. *J Autoimmun.* 2017;76:101-107. doi: 10.1016/j.jaut.2016.09.006.
4. Matsushita T, Mizumaki K, Kano M, Yagi N, Tennichi M, Takeuchi A, Okamoto Y, Hamaguchi Y, Murakami A, Hasegawa M, Kuwana M, Fujimoto M, Takehara K. Antimelanoma differentiation-associated protein 5 antibody level is a novel tool for monitoring disease activity in rapidly progressive interstitial lung disease with dermatomyositis. *Br J Dermatol.* 2017;176:395-402. doi: 10.1111/bjd.14882.
5. Ang CC, Anyanwu CO, Robinson E, Okawa J, Feng R, Fujimoto M, Hamaguchi Y, Werth VP. Clinical signs associated with an increased risk of interstitial lung disease: a retrospective study of 101 patients with dermatomyositis. *Br J Dermatol.* 2017;176:231-233. doi: 10.1111/bjd.14801.
6. Matsushita T, Le Huu D, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Naka K, Hirao A, Muramatsu M, Takehara K, Fujimoto M. A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses an allergic disease via PI3K-Akt pathway activation. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:1170-1182. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1319.
7. Fujimoto M, Murakami A, Kurei S, Okiyama N, Kawakami A, Mishima M, Sato S, Seishima M, Suda T, Mimori T, Takehara K, Kuwana M. Enzyme-linked

immunosorbent assays for detection of anti-transcriptional intermediary factor-1 gamma and anti-Mi-2 autoantibodies in dermatomyositis. *J Dermatol Sci.* 2016;84:272-281. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.09.013.

8. Sato S, Murakami A, Kuwajima A, Takehara K, Mimori T, Kawakami A, Mishima M, Suda T, Seishima M, Fujimoto M, Kuwana M. Clinical utility of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting anti-melanoma differentiation-associated gene 5 autoantibodies. *PLoS One.* 2016;11:e0154285. doi: 10.1371/journal.pone.0154285
9. Mugii N, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Oohata S, Okita H, Yahata T, Someya F, Inoue K, Murono S, Fujimoto M, Takehara K. Oropharyngeal dysphagia in dermatomyositis: associations with clinical and laboratory features including autoantibodies. *PLoS One.* 2016;11:e0154746. doi: 10.1371/journal.pone.0154746.
10. Fujimoto M, Watanabe R, Ishitsuka Y, Okiyama N. Myositis-specific autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol.* 2016;28:636-44. doi: 10.1097/BOR.0000000000000329.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤本 学 (FUJIMOTO Manabu)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：90272591

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

沖山 奈緒子 (OKIYAMA, Naoko)

筑波大学・医学医療系・講師
松下 貴史 (MATSUSHITA Takashi)
金沢大学・医薬保健研究域・講師