

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09529

研究課題名(和文) サイトカインパネル解析を用いた急速進行性間質性肺疾患の難治化機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of intractable mechanism of rapidly progressive interstitial lung disease using cytokine panel analysis

研究代表者

高田 俊範 (Takada, Toshinori)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：40361919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：2000年から2017年3月までに治療した、間質性肺疾患(ILD)をともなう抗MDA-5抗体陽性皮膚筋炎(ADM)を対象とした。生存群17例と呼吸不全により死亡した9例の保存血清を用いてサイトカインパネル解析を行ったところ、治療前のIL-15が非生存群で生存群に比し有意に上昇していた($p<0.05$)。ついで、生存群11名と非生存群6名を対象に、治療期間のサイトカインの変化を比較した。非生存群では、生存群に比しIL-10とIL-15の傾きが有意に高かった($p<0.01$)。以上より、IL-15およびIL-10は、抗MDA-5抗体陽性ADM-ILDの増悪に重要な役割を果たしている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性筋炎-皮膚筋炎は指定難病の一つで、約30～50%に間質性肺疾患(ILD)を合併する。このうち筋症状に乏しい皮膚筋炎(ADM)は、約半数で急速進行性ILDを合併する。ADMにともなうILDはもっぱら本邦にみられる難治性疾患で、比較的若年者に発症し致死率も高い。しかし、未だに有効な治療法は確立されていない。これまで、ADM-ILD症例を対象としてILDの増悪に関する免疫炎症学的変化を網羅的に探索した報告はなかった。本研究で得られた結果は、本疾患の進行にIL-10やIL-15が関わることを示唆するもので、将来的に抗IL-10抗体や抗IL-15抗体治療に道を開くものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We enrolled patients with anti-MDA-5 antibody-positive amyopathic dermatomyositis (ADM) with interstitial lung disease (ILD) treated from 2000 to March 2017 at the Niigata University Medical and Dental Hospital and Uonuma Kikan Hospital. We performed cytokine panel analysis for preserved serum samples of 17 survival patients and 9 ones who died from respiratory failure. Comparison of concentrations of serum cytokines before treatment showed that IL-15 was significantly higher than those dead ($p<0.05$). Next, we compared changes in cytokines during the treatment period between 11 survival cases and 6 non-survival. The slopes (rates of change) of IL-10 and IL-15 were significantly higher in the non-surviving group than in the other ($p<0.01$). We conclude that IL-15 and IL-10 may play an essential role in the progression of anti-MDA-5 antibody positive ADM-ILD.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：皮膚筋炎 間質性肺疾患 抗MDA-5抗体 サイトカインパネル IL-10 IL-15

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膠原病は、比較的高頻度に間質性肺疾患 (ILD) を合併する。これらの ILD は、原因となる膠原病によって特徴的な HRCT 所見 (JCAT, 2002) や BAL 所見を示す (Respirology, 2003)。多発性筋炎-皮膚筋炎 (PM-DM) では、約 30-50% に ILD を合併し時に致死的となる。特に、筋症状に乏しい皮膚筋炎 (ADM) は、約半数で難治性 ILD を合併する (Chest, 2009)。抗 MDA-5 抗体は、RNA ヘリカーゼの一種である melanoma differentiation-associated gene (MDA)-5 を認識する自己抗体で、ADM に特異的に発現している (ArthritisRheum, 2005)。従来、抗 MDA-5 抗体陽性例は陰性例に比べ急速進行性 ILD を合併しやすいこと、また抗 MDA-5 抗体価は、ADM-ILD の予後予測因子となることが報告されてきた (ModRheumatology, 2012)。

(2) 当科において ADM-ILD と診断され治療を行った 13 例を対象に、治療前の抗 MDA-5 抗体価と 38 種の血清サイトカイン濃度との相関を調べたところ、1) 0.4 以上の相関係数を示すサイトカインが 13 種類みられ、特に 2) 抗 MDA-5 抗体価と CX3CL1 の間に強い正の相関 ($r=0.8897$) がみられた (H25-27 基盤 (C)、RespMed, 2015)。CX3CL1 は活性化血管内皮細胞上に発現する細胞膜結合型ケモカインで、ケモカインと細胞接着分子の 2 つの活性を持つ。CX3CL1 は、関節リウマチ、筋炎、SLE などの自己免疫疾患の病態に関与することが明らかにされている。

2. 研究の目的

(1) 前述の学術的背景から、“ADM では肺胞上皮細胞の傷害により細胞表面に露出した MDA5 を抗 MDA-5 抗体が認識し、CX3CL1 を過剰産生する。難治性 ADM-ILD では、多剤併用免疫抑制療法にもかかわらず CX3CL1 が持続的に産生されるため、肺病変が進行・増悪する”と仮説を立てた。

(2) 上記の仮説を検証するため、ADM-ILD の生存群と死亡群との間で CX3CL1 とその関連サイトカインの差を比較する。また、ADM-ILD 死亡群では、治療にもかかわらず CX3CL1 やその関連サイトカインが持続的に増加するかどうかを調べることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 当施設で診断と治療を行った、抗 MDA-5 抗体陽性 ADM-ILD の症例データベースを作成する。ADM の診断は、以下の基準 (DM に典型的な皮疹、筋原性酵素正常あるいは軽度上昇、正常または軽度の筋力低下) に従う。ILD は、診察 (fine crackles の聴取) 所見、画像 (胸部高分解能 CT) 所見、呼吸機能検査を複数の呼吸器専門医が総合的に判断し診断する。診療記録から患者基礎データや診療情報を後ろ向きに収集する。この症例データベースに基づき、受診時あるいは気管支肺泡洗浄の際に採取されたステロイド治療前の保存血清を収集する。

(2) 次に、保存血清を対象としてサイトカインパネル解析を行う。この際、Luminex[®]/マルチプレックス[®] サスペンションアレイを用いて 38 種類のサイトカインを同時に測定する。なお精度の高い解析を行うため、本工程は株式会社ジェネティックラボに委託する。治療経過を追えた症例の病勢、抗体価、サイトカイン濃度の推移を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 2000 年から 2017 年 3 月までの期間に、新潟大学医歯学総合病院あるいは魚沼基幹病院において、抗 MDA-5 抗体陽性の ADM-ILD と診断され、免疫抑制治療を受け、治療前の血清が保存されていたのは 27 例あった。ELISA 法による抗 MDA-5 抗体価測定は、連携研究者の東海大学佐藤慎二博士が実施した。27 例のうち 17 例は治療が奏功し呼吸機能が改善していたが、10 例は多剤併用免疫抑制療法にもかかわらず死亡した。なお、死亡した 10 例のうち 1 例の死因は、肺病変の増悪による呼吸不全ではなく TTP による失血死であった (申請者ら Rheumat Int. 2009)。

(2) 生存 17 例のうち 1 例は、ステロイドパルス療法、それに引き続く高用量ステロイド内服、シクロスポリン内服、および経静脈的シクロホスファミド投与にもかかわらず肺病変が徐々に増悪していた。そこで、本邦では保険適応がないミコフェノール酸モフェチル (MMF) を追加したところ、呼吸状態が徐々に改善し、経口ステロイド薬の減量が可能となった (ClinRheumatol 2017)。

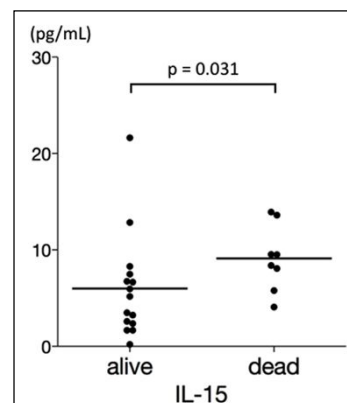
MMF は海外では膠原病に伴う間質性肺疾患に対する治療薬として広く使用されているが、日本では各種臓器移植後の免疫抑制療法とループス腎炎のみ適応疾患となっている。上述の経過から、ステロイド薬やシクロホスファミドでは制御できないサイトカインが MMF により抑制された可能性が推測された。そこで、本症例の保存血清を対象としてサイトカインパネル解析を行った。パネル解析の対象 38 サイトカインは以下の通り; epidermal growth factor (EGF), eotaxin, fibroblast growth factors-2 (FGF-2), FMS-like tyrosine kinase-3 (Flt-3) ligand, chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage-CSF (GM-CSF), growth related oncogene (GRO), interferon- α 2 (IFN- α 2), IFN- γ , interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IFN- γ inducible protein 10 (IP-10), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), MCP-3,

macrophage-derived chemokine (MDC), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , sCD40L, sIL-2R α , transforming growth factor- α (TGF- α), tumor necrosis factor- α (TNF- α), TNF- β , and vascular endothelial growth factor (VEGF)。

MMF 追加 11 週前、7 週前、4 週後、11 週後、および 15 週後の血清サイトカインの変化をみると、MMF 内服後は FGF-2、CX3CL1、IL-1ra、IL-17A、IP-10、および MCP-1 の低下がみられた。このことから、MMF はステロイド薬やシクロホスファミドでは制御できないサイトカインを抑制する働きがあること、また、これらのサイトカインが肺病変増悪に関与している可能性があることが示された (RespirolCaseRep 2017)。

(3) はじめに、サイトカインパネル解析の対象となる生存群17例と死亡群9例の臨床所見を比較した。死亡群は生存群に比し有意に高齢 (67.4 \pm 10.3歳対50.6 \pm 14.2歳)、血清フェリチン値高値 (855 \pm 593ng/mL対420 \pm 326ng/mL)、P/F比低値 (293 \pm 63対363 \pm 65) および短い罹患期間であった (63 \pm 33日対138 \pm 114日)。一方、性別、抗MDA-5抗体価、血清CK値、血清KL-6値には差がなかった。どちらの群も、副腎皮質ステロイド薬を含む多剤併用免疫抑制療法が行われていた。

(4) 生存群17例と死亡群9例の治療前血清を対象に、上述の38のサイトカインを測定するパネル解析を行った。なお、生存群17例のうち2例および死亡群9例のうち1例では、治療経過中の2ポイント以上で血清が保存されていたが治療前の保存血清はなかった。そのため、実際には生存群15例と死亡群8例を比較の対象とした。また、測定された38のサイトカインのうち10サイトカインでは、死亡群8例中4例以上で測定限界外の測定値であった。そのため、これらのサイトカインは、比較の対象から除いた。

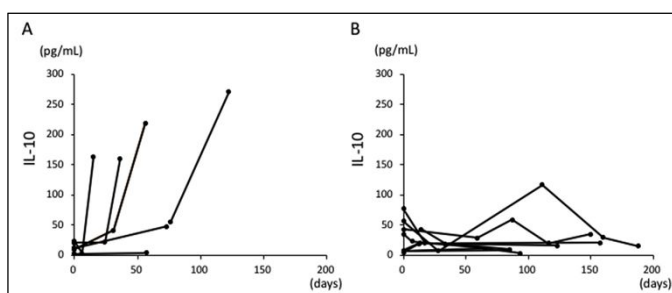


残りの28サイトカインを対象として、生存群と死亡群でマンホイットニーのU検定を用いて比較した。その結果、28のサイトカインのうち、IL-15のみ両群間で有意差が認められた。それによれば、死亡群のほうが生存群に比し有意に治療前の血清IL-15が高値であった (P<0.05、右図)。

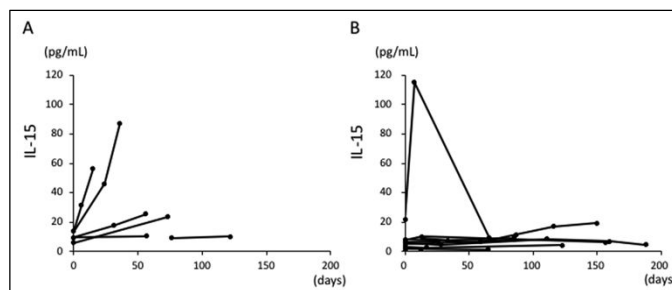
(5) 17名の生存者のうち11名、一方9名の死亡患者のうち6名で、血清が複数回保存されていた。これら17名を対象に、各サイトカイン濃度における1日あたりの変化率 (傾き) を算出した。なお、治療前を含めて3回以上血清が保存されている場合は、最初と最後の値を代表値として傾きを算出した。測定された38のサイトカインのうち22サイトカインは、死亡6例中2例以上で測定限界外の結果であったため、比較の対象から除いた。

生存群と死亡群との間で、治療期間における各サイトカインレベルの傾きを比較した。マンホイットニーのU検定では、比較された16のサイトカインのうち、IL-10とIL-15のみ両者の間に有意差が認められた。それによれば、死亡群のほうが生存群に比し、有意に血清IL-10とIL-15の傾きが高値であった (P<0.01)。

(6) 治療開始から200日間のIL-10とIL-15の変化を、スパイダープロットで示した (右図、どちらのパネルもAが死亡群、Bが生存群)。なお、いずれのパネルも1200日以上にわたり経過を観察された1症例は除外してある。



死亡した6例では、治療経過中に全例で血清IL-10とIL-15が増加していた。一方生存群11例では、IL-10が100pg/mL以上を示したのは1ポイントのみであった。また、同じくIL-15が20pg/mLを超えたのはわずか3ポイントであった。



(7) 生存群17例と死亡群9例の保存血清を対象として、サイトカインパネル解析を行った。治療前血清の比較では、死亡例のIL-15が生存例に有意に高値であった。また、治療中の推移をみると、血清IL-10とIL-15が有意に増加していた。以上の結果より、IL-15およびIL-10は、抗MDA-5抗体陽性ADM-ILDの増悪に重要な役割を果たしている可能性がある。

<引用文献>

Saito Y, Terada M, Takada T et al. Pulmonary involvement in mixed connective tissue disease: Comparison with other collagen vascular diseases using high resolution ct. J Comput Assist Tomogr. 2002;26:349-57.

Enomoto K, Takada T, Suzuki E et al. Bronchoalveolar lavage fluid cells in mixed connective tissue disease. Respirology. 2003;8:149-56.

Mukae H, Ishimoto H, Sakamoto N et al. Clinical differences between interstitial lung disease associated with clinically amyopathic dermatomyositis and classic dermatomyositis. Chest. 2009 Nov;136(5):1341-7.

Sato S, Hirakata M, Kuwana M et al. Autoantibodies to a 140-kd polypeptide, CADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. Arthritis Rheum. 2005;52:1571-1576.

Sato S, Kuwana M, Fujita T et al. Anti-CADM-140/MDA5 autoantibody titer correlates with disease activity and predicts disease outcome in patients with dermatomyositis and rapidly progressive interstitial lung disease. Modern rheumatology. 2013; 23: 496-502.

Takada T, Aoki A, Asakawa K et al. Serum Cytokine Profiles of Patients with Interstitial Lung Disease Associated with anti-CADM-140/MDA5 antibody positive Amyopathic Dermatomyositis. Respiratory Medicine 109 (2015) 1174-1180

Takada T, Asakawa K, Sakagami T et al. Effects of Direct Hemoperfusion with Polymyxin B-immobilized Fiber on Rapidly Progressive Interstitial Lung Diseases. Intern Med. 2014;53(17):1921-6.

Yamagishi M, Tajima S, Suetake A et al. Dermatomyositis with hemorrhagic myositis. Rheumatology international. 2009;29:1363-6.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Role of IL-15 in Interstitial Lung Diseases in Amyopathic Dermatomyositis with anti-MDA-5 Antibody. T Takada, K Ohashi, M Hayashi, K Asakawa, T Sakagami, T Kikuchi, S Sato. Respir Med. 2018 Aug; 141: 7-13. doi: 10.1016/j.rmed.2018.06.012.

Cytokine profiles of amyopathic dermatomyositis with interstitial lung diseases treated with mycophenolate. Hayashi M, Aoki A, Asakawa K, Sakagami T, Kikuchi T, Takada T. Respirol Case Rep. 2017 Apr 11;5(4):e00235. doi: 10.1002/rcr2.235

Mycophenolate mofetil for the patients with interstitial lung diseases in amyopathic dermatomyositis with anti-MDA-5 antibodies. M Hayashi, T Kikuchi, T Takada. Clinical Rheumatology 2017 Jan;36(1):239-240 doi: 10.1007/s10067-016-3443-2

〔学会発表〕(計 7件)

高田俊範、吉澤和孝、木村陽介、大橋和政、林正周、菊地利明、佐藤慎二、抗MDA-5抗体陽性皮膚筋炎にともなう間質性肺炎におけるIL-15の役割、第21回間質性肺炎細胞分子病態研究会、2018年08月25日砂防会館別館(東京都千代田区)

T Takada, K Yoshizawa, K Asakawa, T Sakagami, T Kikuchi, S Sato. Serum Cytokine Profiles of Patients with Interstitial Lung Diseases in Amyopathic Dermatomyositis with anti-MDA-5 Antibody, ATS2018, 2018年05月21日, サン・ディエゴ・コンベンションセンター、サン・ディエゴC(米国)

高田俊範、吉澤和孝、林正周、朝川勝明、坂上拓郎、菊地利明。筋症状に乏しい抗MDA-5抗体陽性皮膚筋炎にともなう間質性肺疾患に対するミコフェノール酸モフェチル治療、第58回日本呼吸器学会学術講演会、2018年04月29日大阪国際会議場(大阪府大阪市)

T Takada, K Asakawa, A Aoki, M Hayashi, T Sakagami, T Kikuchi. Mycophenolate Mofetil for Japanese Patients with Interstitial Lung Diseases in Amyopathic Dermatomyositis with Anti-MDA-5 Antibody, ATS2017, 2017年05月23日ウォルターE・ワシントン・コンベンションセンター、ワシントンDC(米国)

高田俊範、青木亜美、朝川勝明、坂上拓郎、森山寛史、菊地利明。抗CADM-140/MDA5抗体陽性皮膚筋炎に伴う間質性肺疾患患者の血清サイトカインプロファイル、第19回間質性肺炎細胞分子病態研究会、2016年08月20日砂防会館別館(東京都千代田区)

T Takada, A Aoki, K Asakawa, T Sakagami, H Moriyama, T Kikuchi, S Sato. Serum Cytokine Profiles of Anti-CADM140/MDA5 Positive Patients with Amyopathic Dermatomyositis And Rapidly Progressive Interstitial Lung Disease, ATS2016, 2016年05月15日、モスコーン・センター、サンフランシスコ(米国)

高田俊範、青木亜美、朝川勝明、坂上拓郎、森山寛史、菊地利明. 抗CADM-140/MDA5抗体陽性皮膚筋炎に伴う間質性肺疾患患者の血清サイトカインプロファイル, 第56回日本呼吸器学会学術講演会, 2016年04月10日国立京都国際会館(京都府京都市)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森山 寛史

ローマ字氏名：MORIYAMA, Hiroshi

所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構西新潟中央病院（臨床研究部）

部局名：統括診療部

職名：呼吸器内科医師

研究者番号（8桁）：60463981

研究分担者氏名：坂上 拓郎

ローマ字氏名：SAKAGAMI, Takuro

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部（医）

職名：教授

研究者番号（8桁）：00444159

研究分担者氏名：朝川 勝明

ローマ字氏名：ASAKAWA, Katsuaki

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：60599158

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。