

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10045

研究課題名(和文) プロテオミクスを用いた若年性皮膚筋炎における特異的マーカーの検出とその人種別評価

研究課題名(英文) Detection of disease biomarkers in juvenile dermatomyositis using proteomics and assessment of racial differences

研究代表者

唐澤 里江 (Karasawa, Rie)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50434410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：若年性皮膚筋炎(JDM)で同定された抗血管内皮細胞抗体(AECA)の対応抗原であるHSC70に対する自己抗体陽性率は、健常小児、若年性特発性関節炎および川崎病に比べJDMで有意に高値であった。JDMでは抗HSC70抗体陽性者は陰性者に比べ筋炎自己抗体の出現、血清中のAST値および疾患活動性指標が有意に高値であった。JDMの発熱、皮膚潰瘍および車いすやデバイスの使用は抗HSC70抗体の出現と有意に関連していた。まとめると、これらの結果は抗HSC70抗体の出現が重度の疾患フェノタイプと相関することを示唆する。AECAがJDMにおける血管壁の炎症や自己免疫の病態生理に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

若年性皮膚筋炎(JDM)では皮膚や筋肉に加え、他の臓器にも血管炎症状が起こり得ることが報告されているが、今までその炎症の場である血管に焦点を当てている研究はほとんどない。JDMで報告されている自己抗体に関しても同様である。本研究で得られた成果は、血管炎患者に高率に認められる自己抗体である抗血管内皮細胞抗体(AECA)がJDMで検出され、AECAの対応抗原であるHSC70に対する自己抗体の出現が重度の疾患フェノタイプと相関することを示した点である。したがって、AECAがJDMにおける血管壁の炎症や自己免疫の病態生理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)：HSC70 was one of the target autoantigens for anti-endothelial cell antibodies (AECA) identified in children with juvenile dermatomyositis (JDM). The frequency of anti-HSC70 autoantibodies (Abs) in plasma was significantly higher in JDM than in juvenile idiopathic arthritis, Kawasaki disease and healthy individuals. The presence of anti-HSC70 Abs was significantly increased in the presence of myositis autoantibodies. Mean levels of serum AST in JDM children with anti-HSC70 Abs were significantly higher than those without anti-HSC70 Abs. The presence of anti-HSC70 Abs was strongly associated with physician global damage assessment (MDDMAVAS). A history of fever, skin ulcers and the use of wheelchairs and/or devices were associated with anti-HSC70 Abs. Taken together, these findings suggest a correlation between the presence of anti-HSC70 Abs and more severe disease phenotypes. AECA may be involved in the pathophysiology of autoimmune inflammation of blood vessels in JDM.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：若年性皮膚筋炎 抗血管内皮細胞抗体 プロテオミクス 国際共同研究

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における若年性皮膚筋炎 (JDM) の有病率は、小児リウマチ性疾患のなかで3番目に高く、皮膚所見のみで身体および検査所見で明らかな筋炎症状を認めず、診断が遅れ、さらに疾患活動性評価が困難である症例も少なくない。また約30%の症例で皮下石灰化を合併し、重篤な機能障害による著しいQOLの低下をきたす症例もあり、JDMの診断および疾患活動性を評価できる特異的マーカーの同定に対して早急な対応が求められている。

(2) JDMでは皮膚や筋肉に加え、他の臓器にも血管炎症状が起こり得ることが報告されているが、今までその炎症の場である血管に焦点を当てている研究はほとんどない。JDMで報告されている自己抗体に関しても同様である。

(3) 抗血管内皮細胞抗体 (AECA) は、JDMをはじめ血管炎患者に高率に認められる自己抗体であり、疾患活動性との相関が指摘されているが、その対応抗原に関してはほとんど解明されておらず、このことがAECAを理解する上で大きな問題となっている。

2. 研究の目的

(1) プロテオミクス的手法を用いて血管炎を伴う難治性リウマチ性疾患の一つであるJDMで、早期診断や疾患活動性評価に有用な特異的マーカーを検出・同定する。

(2) 同定された個々の特異的マーカーとフェノタイプとの関連性や血管傷害との関連性についても検討し、人種間で評価する。

3. 研究の方法

(1) 我々がすでにJDMを含めた小児リウマチ性疾患患者からの血液検体を用いてプロテオミクスで同定したAECAの対応抗原候補蛋白から30-40個の蛋白を選択し、それらに対する自己抗体陽性率を国内外のJDM、対照疾患および健常小児でELISAにて評価する。

(2) さらに再度JDM患者からの血液検体と大動脈血管内皮細胞からの抽出蛋白を用いたプロテオミクスでAECAの対応抗原を同定し、同様にELISAにて評価する。

(3) 次に個々の自己抗体と疾患活動性、フェノタイプとの関連性およびJDMに特異的であるか否かに関して検討し、人種別に評価する。

(4) 特異的なマーカーとなり得る自己抗体で、血管傷害との関連性についても検討する。

4. 研究成果

(1) JDM患者からの血漿と大動脈血管内皮細胞からの抽出蛋白を用いたプロテオミクスで同定されたAECAの対応抗原候補蛋白である3つのシャペロン蛋白のheat shock cognate 71kDa (HSC70) heat shock protein HSP 90-beta (HS90B) および stress-induced-phosphoprotein 1 (STIP1) に対する自己抗体を検出したところ、IgG型HSC70抗体がJDM患者 (n=39) の23%に検出された (図1)¹⁾。興味深いことに、疾患活動性が高い未治療のJDM患者 (n=10) ではその

半数に IgG 型 HSC70 抗体が検出され、若年性特発性関節炎 (n=15、7%) および健常児 (n=20、5%) に比べ有意に高値であった。さらに疾患活動性が高く治療中の JDM 患者 (n=15) および疾患活動性が低い JDM 患者 (n=14) における IgG 型 HSC70 抗体の検出率は 13~14%であった。一方、IgG 型 HS90B 抗体は JDM 患者 (n=31) の 6%に検出され、IgG 型 STIP1 抗体は JDM 患者では検出されなかった。

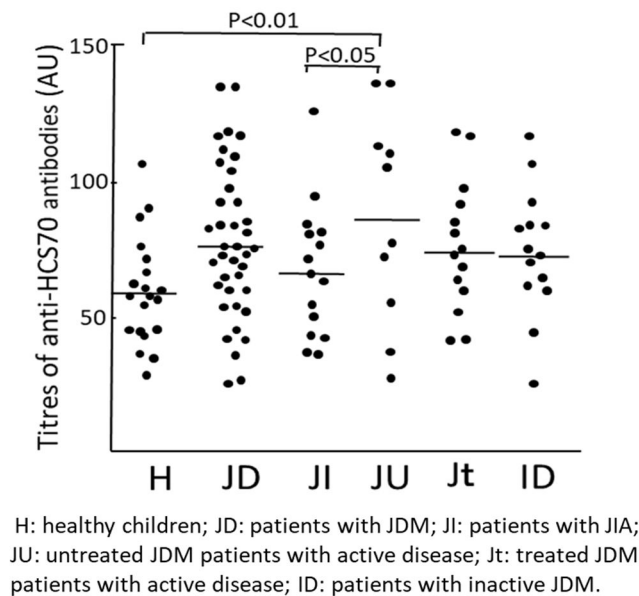


図 1 ELISA による抗 HSC70 抗体の検出 (Karasawa et al. Rheumatology 2018)

(2) 次に HSC70 に加え、JDM 患者で同定された AECA の対応抗原候補蛋白であるモータータンパク質もしくは筋蛋白である myosin light polypeptide 6 (MYL6)、myosin-9 (MYH9)、moesin (MSN) および tropomyosin alpha-4 (TPM4)、酸化還元酵素の peroxiredoxin 6 (Prx6) に対する IgG 型自己抗体を、63 人の JDM 患者および 40 人の健常小児からの血漿を用いて ELISA にて検出した。HSC70、MYL6、MYH9、MSN、TPM4 および Prx6 に対する自己抗体陽性率は JDM 患者では健常小児に比べ有意に高値であった。さらに JDM 患者に見出されることがすでに報告されている NT5C1A および Ro52 に対する自己抗体の出現は、両者とも MSN、TPM4、HSC70 および Prx6 に対する自己抗体の出現とそれぞれ有意に関連していた。興味深いことに JDM 患者における血管炎症状の 1 つである皮膚潰瘍は、HSC70、MYL6、MYH9、MSN、TPM4 および Prx6 に対する自己抗体の出現とすべて有意に関連していた。

(3) さらに JDM における AECA の臨床的意義を明らかにするために、JDM 患者で最も高頻度に検出された抗 HSC70 抗体に関して詳細に検討した。HSC70 に対する IgG 型自己抗体は、JDM 患者 (n=63) の 35%、健常小児 (HC; n=40) の 0% (P<0.001)、若年性特発性関節炎患者 (JIA; n=50) の 0% (P<0.001)、川崎病患者 (KD; n=19) の 11% (P<0.005) で検出された (図 2)。JDM 患者において抗 HSC70 抗体陽性患者では陰性患者に比べ、筋炎関連自己抗体である抗 Ro52 抗体および抗 NT5C1A 抗体や筋炎特異的自己抗体の抗 MDA5 抗体に対する自己抗体の出現が有意に高値であった。JDM 患者における皮膚潰瘍や発熱は、HSC70 に対する自己抗体の出現とそれぞれ有意に関連していた。さらに JDM 患者における車いすやデバイスの使用も、抗 HSC70 抗体の出現と有意に関連していた。生化学検査では抗 HSC70 抗体陽性の JDM 患者では陰性の JDM 患者に比べ、血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) が有意に高値であったが、クレアチンキナーゼ (CK) やアルドラーゼでは有意差は認められなかった。また JDM の疾患活動性を評価する

physician global damage assessment (MDDMAVAS) は、抗 HSC70 抗体陽性の JDM 患者では陰性の JDM 患者に比べ有意に高値であった。まとめると、これらの結果は抗 HSC70 抗体の出現が重度の疾患フェノタイプと相関することを示唆する。AECA が JDM における血管壁の炎症や自己免疫の病態生理に関与している可能性が示された。

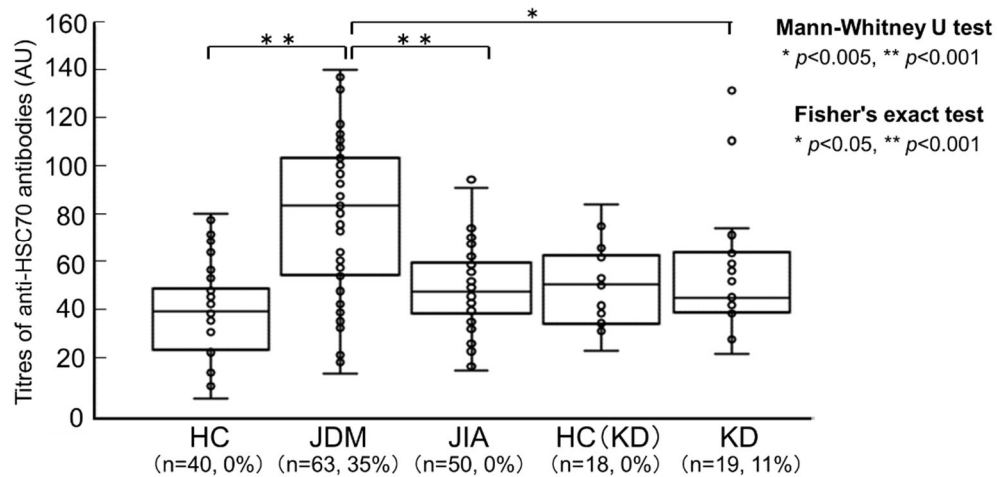


図2 ELISAによる抗HSC70抗体の検出

<まとめ>

本研究で得られた成果は、血管炎患者に高率に認められる自己抗体である抗血管内皮細胞抗体 (AECA) が JDM で検出され、AECA の対応抗原である HSC70 に対する自己抗体の出現が重度の疾患フェノタイプと相関することを示したことである。したがって、AECA が JDM における血管壁の炎症や自己免疫の病態生理に関与している可能性が示唆された。JDM における AECA の臨床的意義や JDM の病態形成における AECA の役割を理解するためにさらなる研究が必要である。

<参考文献>

1. Karasawa R, Tamaki M, Sato T, Tanaka M, Nawa M, Yudoh K, Jarvis JN. Multiple target autoantigens on endothelial cells identified in juvenile dermatomyositis using proteomics. Rheumatology (Oxford). 2018;57:671-676.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 唐澤 里江	4. 巻 26
2. 論文標題 血管炎動物モデル	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 75-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Karasawa R, Tamaki M, Sato T, Tanaka M, Nawa M, Yudoh K, Jarvis JN	4. 巻 57
2. 論文標題 Multiple target autoantigens on endothelial cells identified in juvenile dermatomyositis using proteomics.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford).	6. 最初と最後の頁 671-676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/kex468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Jiang K, Karasawa R, Hu Z, Chen Y, Holmes L, O'Neil KM, Jarvis JN	4. 巻 17
2. 論文標題 2 Plasma exosomes from children with juvenile dermatomyositis are taken up by human aortic endothelial cells and are associated with altered gene expression in those cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Rheumatol Online J.	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12969-019-0347-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Karasawa R, Jarvis JN	4. 巻 31
2. 論文標題 Using the Tools of Proteomics to Understand the Pathogenesis of Idiopathic Inflammatory Myopathies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Opin Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 617-622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/BOR.0000000000000643.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 唐澤 里江
2. 発表標題 Anti-Endothelial Cell Antibodies in Pediatric Rheumatic Diseases.
3. 学会等名 The American College of Rheumatology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rie Karasawa, Mayumi Tamaki, Toshiko Sato, Megumi Tanaka, Kazuo Yudoh and James N. Jarvis.
2. 発表標題 Antiendothelial Cell Antibodies in Juvenile Dermatomyositis: A Proteomics-Based Approach.
3. 学会等名 The American College of Rheumatology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Kaiyu Jiang, Zihua Hu, Rie Karasawa, Yanmin Chen and James Jarvis
2. 発表標題 Plasma Exosomes from Children with Juvenile Dermatomyositis Are Taken up By Human Aortic Endothelial Cells and Are Associated with Altered Gene Expression in Those Cells.
3. 学会等名 The American College of Rheumatology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Rie Karasawa, Mayumi Tamaki, Toshiko Sato, Megumi Tanaka, Kazuo Yudoh and James N. Jarvis
2. 発表標題 Anti-endothelial cell antibodies in juvenile dermatomyositis.
3. 学会等名 2017 Pediatric Rheumatology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Rie Karasawa
2. 発表標題 Novel autoantigens for endothelial cell antibodies in pediatric rheumatic diseases identified by proteomics.
3. 学会等名 Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance(CARRA) Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Rie Karasawa
2. 発表標題 Novel Autoantigens for Anti-Endothelial Cell Antibodies in Pediatric Rheumatic Diseases Identified By Proteomics.
3. 学会等名 The American College of Rheumatology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Rie Karasawa
2. 発表標題 Identification of target antigens for anti-endothelial cell antibodies in patients with juvenile dermatomyositis using proteomics.
3. 学会等名 The 18th International Vasculitis & ANCA Workshop 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Rie Karasawa, James N. Jarvis, Toshiko Sato, Megumi Tanaka, Mark Hicar, Kazuo Yudoh, Terrance P O' Hanlon, Payam Noroozi-Farhadi, Lisa G. Rider
2. 発表標題 Clinical Correlations of Autoantibodies Against Heat Shock Cognate 71 kDa Protein in Patients with Juvenile Dermatomyositis
3. 学会等名 The American College of Rheumatology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	遊道 和雄 (Yudoh Kazuo) (60272928)	聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授 (32713)	