

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591178

研究課題名（和文） 皮膚筋炎で見出された抗 CADM-140 抗体の臨床応用に関する研究

研究課題名（英文） Clinical application of anti-CADM-140 antibodies detected in patients with dermatomyositis.

研究代表者

佐藤 慎二 (SATO SHINJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90276238

研究成果の概要：

臨床的に筋炎症状に乏しい皮膚筋炎(C-ADM)に見出された抗CADM-140抗体の対応抗原がMDA5 (Melanoma Differentiation-Associated Gene 5)であることを明らかにし、同抗体測定ELISAを確立した。同抗体陽性例は、急速進行性間質性肺炎(RP-ILD)を有意に併発していた。今回の研究成果は、予後不良のRP-ILD併発C-ADMの早期診断に有用で、予後の改善につながることを期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：Myopathies, Autoimmune Diseases, Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 (MDA5), Clinically Amyopathic Dermatomyositis (C-ADM), Interstitial Lung Disease (ILD)

1. 研究開始当初の背景

膠原病を自己免疫疾患とする基本的特徴は、種々の細胞成分に対する自己抗体の産生である。これら自己抗体の対応抗原の多くは、生命現象に必須な酵素や調節因子であることが知られており、自己抗体とその対応抗原（自己抗原）の分子構造と生物学的機能の追究は自己抗体産機序・病因解明につながることを期待される。

多発性筋炎/皮膚筋炎 (Polymyositis/Dermatomyositis: PM/DM)は、骨格筋の炎症にともなう近位筋の筋力低下・筋痛を主症状とする炎症性筋疾患であり、特にヘリオトロープ疹やゴットロン徴候などの典型的な皮膚症状を呈する場合にはDMと診断される。本疾患は、自己免疫疾患のひとつで、様々な自己抗体が、出現することが知られている。これまで、PM/DM患者血清中には、抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体(抗ARS抗体)、抗SRP抗体や抗Mi-2抗体などの筋炎に特異的に検出される抗体や抗U1RNP抗体や抗SS-A抗体など筋炎と関連するとされる自己抗体が報告されている。これら同一筋炎特異自己抗体陽性症例は、同様の臨床的特徴を有していることが知られており、臨床的に、診断、病型分類、治療法の選択、予後の推定などに有用である。

一方、PM/DMのサブタイプである臨床的に筋炎症状に乏しいDM (Clinically amyopathic DM: C-ADM)症例では、自己抗体陰性がひとつの特徴とされ、特異的な自己抗体の存在は明らかではなかった。また、C-ADM症例は、临床上、治療抵抗性で予後不良の急速進行性間質性肺炎(Rapidly progressive Interstitial Lung Disease: RP-ILD)を合併することが知られている。RP-ILDに対しては、パルス療法を含む大量ステロイド療法に、早期から免疫抑制剤を併用する強力な治療が推奨されている。かかる点で、RP-ILD併発ADMの早期診断は臨床的に重要であり、早期診断に有用な新たな指標の確立が望まれている。

以上のような背景をふまえ、我々は、当教室および関連施設のC-ADM 15例を含む膠原病、IPFおよび健常人306例の血清を、白血球細胞由来K562細胞抽出物を用いた免疫沈降法(Immunoprecipitation: IP)で検討し、C-ADM患者血清15例中8例が分子量約140kDaの蛋白を免疫沈降することを見出した(*Arthritis Rheum.* 46(9):S398, 2003)。これらC-ADM患者血清が免疫沈降する140kDa蛋白を既知の自己抗体と比較検討したところ、140kDa蛋白を認識する新たな自己抗体の

存在が示唆され、この新規自己抗体を抗CADM-140抗体と命名した。抗CADM-140抗体は、C-ADM 15例中8例(53%)に認められたが、他の膠原病、IPFおよび健常人では認められなかった。興味深いことに、抗CADM-140抗体陽性DM例と陰性例との比較で、抗CADM-140抗体陽性例はRP-ILD併発が有意に高頻度であり、同抗体とRP-ILDとの関連が示唆された(*Arthritis Rheum.* 52(5): 1571-1576, 2005)。

近年、我々以外でも、C-ADMの新たな自己抗体の報告がなされている。2000年に、Targoffらは、HeLa細胞抽出物を用いたIPPおよび免疫ブロット法(Immunoblotting: IB)で、C-ADMの自己抗体について検討し、IPPでC-ADM患者血清18例中13例が155kDa蛋白、6例が95kDa (Se)蛋白を免疫沈降したとし、IBの検索結果と総合して、18例中16例(89%)で、155kDa蛋白またはSe蛋白を認識する新たな自己抗体を見いだしたと報告している(*Arthritis Rheum.* 43 (Suppl 9): S194, 2000)。Targoffらの報告した抗155kDa蛋白を認識する抗体は、C-ADM以外に、DM症例(小児DMを含む)に見いだされ、臨床的にDMに典型的な皮疹を認め、血管炎に起因する皮膚症状である皮膚潰瘍などを併発する重症型が一つの特徴であった。興味深いことに、これらの症例は全例でILD併発を認めず、その臨床症状や対応抗原の分子量からは、抗CADM-140抗体とは異なる抗体と考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果をふまえ、(1)RP-ILD併発ADM特異自己抗体として見出された抗CADM-140抗体の対応抗原遺伝子をクローニングし、対応抗原蛋白の分子配列を明らかにすること。

(2)対応抗原蛋白を精製し、ELISA法を用いて、CADM-140抗体測定系を作成すること。

(3)作成した抗CADM-140抗体測定法の感度および特異度を検討し、実際の臨床で同抗体の測定を可能とする測定法を確立すること。

(4)他施設と共同して、抗CADM-140抗体陽性症例を集積し、確立した測定系を用いた抗CADM-140抗体陽性症例の臨床的特徴を明らかにすること、を目的とした。

3. 研究の方法

(1)C-ADMと関連する自己抗体(抗CADM-140抗体)が認識する対応抗原蛋白の分析

①対応抗原蛋白cDNAのクローニング: ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞cDNA導入λZAP

ファージを感染させた大腸菌 XL1-Blue MRF' 株を寒天プレートに撒き、IPTG 処理ニトロセルロースフィルターをプレート上におのせ、溶菌蛋白を吸着させる。このフィルターを、抗 CADM-140 抗体陽性血清と反応させ、陽性のプラークを採取し大腸菌 XL1-Blue MRF' 株に再感染させ上記の手技を繰り返し、抗原蛋白をコードする cDNA クローンを得た。

② 得られた候補クローンを pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®] ベクターにサブクローニングし、さらに形質転換させた大腸菌で増幅、精製した。次に、pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®] ベクターの T7 プロモーターの下流側に挿入されたクローン遺伝子をそれぞれ *in vitro* で転写・翻訳反応し、蛋白を発現させた。発現蛋白と抗 CADM-140 抗体陽性・陰性血清との反応性を S³⁵ メチオニン標識 HeLa 細胞抽出物を用いて、IP で検討した。

③ 最終的に候補となった陽性クローンの cDNA を精製した後、PCR で増幅し、ABI prism automated sequencer を用いて解析、NCBI のデータベースによる BLAST サーチ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて塩基配列を決定した。

④ アフリカミドリザル腎臓由来細胞株 COS7 細胞に、MDA5 遺伝子導入し、全長 MDA5 発現細胞を作成した。COS7 細胞抽出物と抗 CADM-140 抗体陽性血清、陰性血清との反応性をウサギ抗ヤギ MDA5 抗体をプローブとして IP-IB 法で検討した。

⑤ NM 末端に FLAG 蛋白が付加されたバキュロウイルス発現リコンビナント RIG-I ファミリー (RIG-I, MDA5, LGP-2) 精製蛋白を抗原とした抗 CADM-140 抗体陽性および健常人血清の IB で検討した。

(2) 抗 CADM-140 抗体の臨床応用の検討

抗 CADM-140 抗体の定量的抗体測定法の開発：リコンビナント抗原蛋白を ELISA プレートに固相化し、同抗体検出のための ELISA を開発した。

さらに、同抗体測定法の感度、特異度を検討した。

(3) 抗 CADM-140 抗体の臨床的意義の追究
他施設と共同して、抗 CADM-140 抗体陽性症例を集積し、確立した測定系を用いた抗 CADM-140 抗体陽性症例の臨床的特徴を検討した。

4. 研究成果

(1) 抗 CADM-140 抗体の対応抗原同定

対応抗原蛋白をコードする cDNA のクローニングの結果、9つの陽性クローンが得られた。そこで、同様のファージ発現系を用いて、陽性クローンと抗 CADM-140 抗体陽性・陰性血清との反応性を検討した。その結果、クローン#1 と #8 は、有意に陽性率が高かった(クローン#1: 78% 対 20%, P = 0.004, クローン#8:

100% 対 13%, P = 0.0004)。そこで、*In vitro* 転写・翻訳によるクローン#8 の発現蛋白は、IP で C-ADM 患者血清と反応を検討した。クローン#8 は、抗 CADM-140 抗体陽性血清全例で反応したが、陰性血清 (図 1) および健常人血清とは反応しなかった。

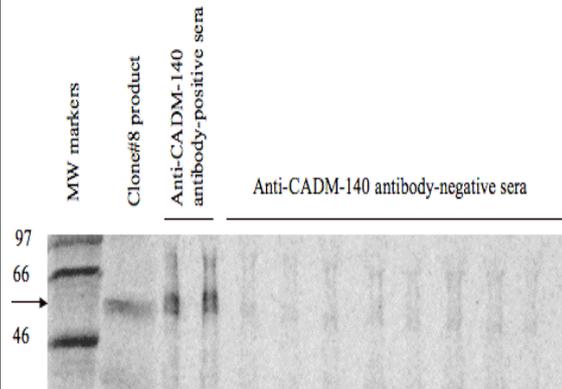


図 1

そこで、クローン#8 の塩基配列について、NCBI データベースサイトを用いて詳細なホモロジーサーチを行った結果、クローン#8 は Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 (MDA5: Accession No. NM_022168) の 3' 末端領域+1743~+3449 と一致した。

全長 MDA5 発現 COS7 細胞抽出物を基質とした IP-IB 法の検討で、抗 CADM-140 抗体陽性血清を用いた場合、140kDa 蛋白バンドが検出されたが、陰性血清では認められなかった(図 2)

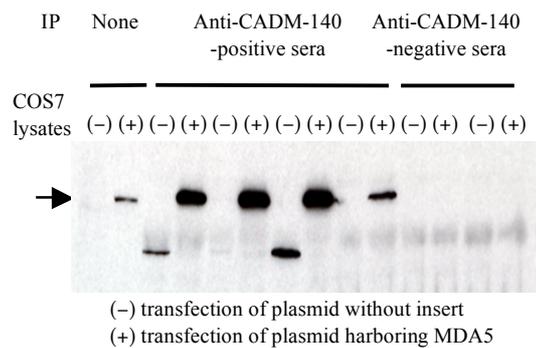


図 2

さらに、リコンビナント RIG-1, MDA5, LGP-2 精製蛋白を抗原とした抗 CADM-140 抗体陽性および健常人血清の IB での検討では、抗 CADM-140 抗体陽性患者血清は、リコンビナント MDA5 とのみ反応したが、健常人では反応しなかった(図 3)。

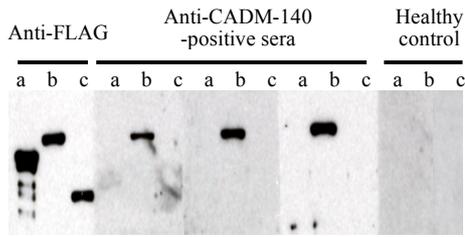


図 3

a: rRIG-I
b: rMDA5
c: rLGP-2

(2) 抗 CADM-140 抗体の特異性の検討
バキュロウイルス発現リコンビナント MDA5 蛋白を用いた抗 CADM-140 抗体測定 ELISA による検討(図 4)で、C-ADM 患者血清中の ELISA

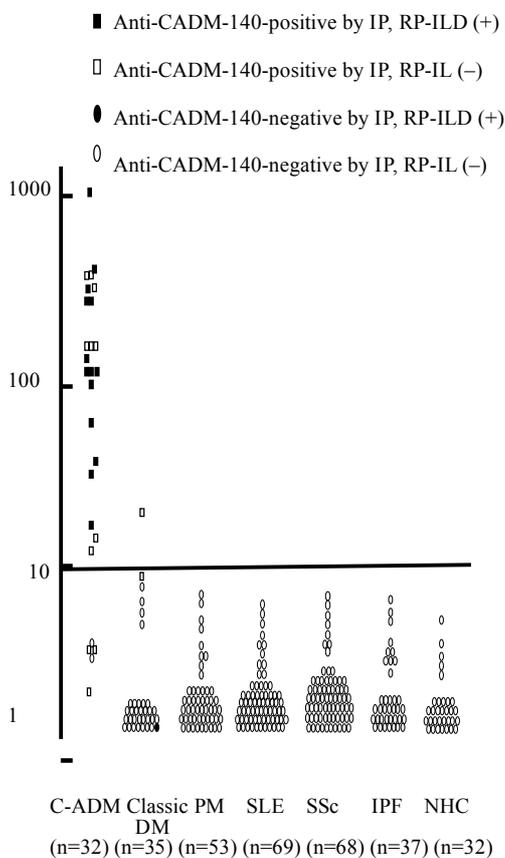


図 4

抗体価は疾患コントロール、または健康人
に比べ、有意に高かった(それぞれ対古典的 DM,
PM, SLE, SSc, IPF, 健康人 $P < 0.001$). また、
健康人血清の平均値+標準偏差の 10 倍の 8
ユニットをカットオフとした時、この ELISA
測定系による analytical sensitivity は
88%, analytical specificity は 100% と
なり、感度・特異度ともにきわめて優れた抗
CADM-140 抗体の検出法であることが明らか
となった(表 1).

		Anti-CADM-140 by IP		
		Positive	Negative	Total
Anti-CADM-140 by ELISA	(+)	23	0	23
	(-)	4	267	271
Total		27	267	294

表 1

ELISA 陽性となったのは C-ADM32 例中 22 例
(69%), 古典的 DM35 例中 1 例(3%)であり、臨
床的感度は 69%であった。健康人は全例陰性
であった。また、C-ADM 以外の検体 262 例中、
ELISA 陰性となったのは 261 例であり、臨床
的特異度は 99.6%であった。

(3) 抗 CADM-140 抗体の特異性の追
究
臨床症状の判明している 49 例の DM 患者の
うち、ELISA で抗 CADM-140 抗体陽性となっ
たのは 10 例(20%), 同抗体陰性となったのは
39 例(80%)であった。ELISA による抗 CADM-
140 抗体陽性 DM 患者は陰性患者に比べ、筋
力低下が見られず(10% 対 74%, $P < 0.01$),
血清クレアチニンキナーゼ値の上昇も軽度
であった(20% 対 69%, $P < 0.01$)。また、
陽性例は、全例筋炎特異自己抗体が陰性で
あり、陰性例と比較して陽性率が有意に低
かった(0% 対 44%, $P < 0.01$)。さらに、
RP-ILD 併発は、陽性例で有意に多かった
(80% 対 10%, $P < 0.0001$)。RP-ILD 併
発率は、C-ADM 患者に限った検討におい
ても同様の結果であった(89% 対 39%,
 $P = 0.049$)。

急速進行性 ILD を併発した DM の治療に
ついて検討したところ、全例で、パルス療法
を含む大量ステロイド療法にシクロスポリン、
タクロリムスなどの免疫抑制薬の併用、 γ -
グロブリン大量療法など強力な治療がおこ
なわれたが、各治療法と予後の間に一定の
傾向は認められなかった。

DM に併発する急速進行性 ILD の治療は、
可能な限り早期から、パルスを含む高用量の
ステロイドに免疫抑制薬を併用する強力な治
療が推量されている。しかしながら、各治療
法の有効性は証明されておらず、エビデンス
のある治療法がないのが現状で、今後、有
効性を客観的に評価する臨床試験の実施が望
まれている。しかし、どのような治療を選
択するにしても、可能な限り早期に治療を
開始し、初期に炎症の進展を抑えてしまうこ
とが予後改善するひとつの重要なポイントと
考えられている。この観点から、抗 CADM-
140 抗体測定は、急速進行性 ILD 併発の予
測のみならず、治療開始時期すなわち The
windows of opportunity を逃さないという点
からも有用性が示唆される。

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 2 件)

①Sato S, Hoshino K, Satoh T, Fujita T, Kawakami Y, Fujita T, Kuwana M. RNA Helicase Encoded by Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 is a Major Autoantigen in Patients with Clinically Amyopathic Dermatomyositis. Arthritis & Rheum. (In press). 2009 査読有り.

②佐藤慎二. 皮膚筋炎と抗 CADM-140 抗体. リウマチ科. 40, 231-238, 2008 査読無し.

[学会発表] (計 6 件)

①Sato S, Hoshino K, Satoh T, Yamaguchi Y, Hirakata M, Kuwana M: MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated Gene 5) as an Autoantigen Recognized by Anti-CADM-140 Antibody in Patients with Clinically Amyopathic Dermatomyositis. Dermatomyositis. The 72nd ACR Annual scientific meeting (San Francisco), 2008. 10. 29

②佐藤慎二, 星野香菜, 佐藤隆司, 桑名正隆: シンポジウム 15 自己抗体研究の進歩: 皮膚筋炎に見出された抗 CADM-140 抗体の病因的・臨床的意義. 第 52 回日本リウマチ学会総会(札幌), 2008. 4. 23

③佐藤慎二: 皮膚筋炎に見出された抗 CADM-140 抗体の病因的・臨床的意義. 第 15 回自己抗体と自己免疫シンポジウム(東京), 2008. 2. 16

④Sato S, Hoshino K, Satoh T, Yamaguchi Y, Hirakata M, Kuwana M: Classification of dermatomyositis using myositis-specific autoantibodies and newly found autoantibodies in patients with dermatomyositis. The 71nd ACR Annual scientific meeting (Boston), 2007. 11. 10

⑤佐藤慎二, 星野香菜, 佐藤隆司, 平形道人, 桑名正隆: 皮膚筋炎に見出される自己抗体による皮膚筋炎の病型分類および病型別の治療戦略. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会(横浜), 2007. 11. 2

⑥佐藤慎二, 星野香菜, 佐藤隆司, 山口由衣 諏訪 昭, 平形道人, 桑名正隆: 筋炎特異および関連自己抗体を用いた皮膚筋炎の病型分類の検討. 第 51 回日本リウマチ学会総会(横浜), 2007. 4. 27

[図書] (計 1 件)

①佐藤慎二. 皮膚筋炎で見出された抗 CADM-140 抗体の臨床的・病因的意義. 第 15 回「自己抗体と自己免疫」シンポジウム: 筋

炎と自己免疫 講演録集, 株式会社医学生物学研究所 pp37-44, 2008

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 1 件)

名称: 皮膚筋炎の診断方法および診断キット

発明者: 佐藤慎二、桑名正隆、藤田尚志

権利者: 学校法人 慶應義塾

番号: 特許出願 2008-223789

出願年月日: 2008 年 9 月 1 日

国内外の別: 国内

○ 取得状況 (計 0 件)

該当無し.

[その他]

該当無し.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 慎二 (SATO SHINJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 90276238

(2) 研究分担者

藤田 知信 (FUJITA TOMONOBU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 20199334

(3) 連携研究者

高橋 一夫 (TAKAHASHI KAZUO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号: 40264618