

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10022

研究課題名(和文) MDA5、抗MDA5抗体の機能解析による重症間質性肺障害発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of severe interstitial lung injury by analysis of MDA5 and anti-MDA5 antibodies

研究代表者

小林 法元 (KOBAYASHI, NORIMOTO)

信州大学・医学部・特任准教授

研究者番号：00362129

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)：MDA5はウイルスなどのRNAを認識しI型インターフェロン(IFN)主体の免疫を誘導する細胞質内受容体である。MDA5に対する自己抗体は間質性肺炎を合併する若年性皮膚筋炎で認められるが、血液中MDA5についての検討はされていない。本研究では、若年性皮膚筋炎と全身性エリテマトーデス患者の一部において血清中のMDA5をELISAにより確認した。MDA5とIFNは同じ症例で増加しており、I型IFNが病態に重要な役割を果たしていると考えられている皮膚筋炎の病態に血清MDA5が関係している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、若年性皮膚筋炎や全身性エリテマトーデス患者において、血液中のMDA5をELISAにより検出した。MDA5は、それらの疾患の病態に重要な役割を果たしていると考えられているI型IFNと関連している可能性が示唆された。これらの結果は、疾患の診断や病勢の評価への応用や病態解明を通して新たな治療法の開発につながる可能性がある。ただし、症例数が限られており、今後の検討が必要である

研究成果の概要(英文)：MDA5 is a cytoplasmic receptor that recognizes viral RNA and induces type I interferon (IFN)-based immunity. Autoantibodies against MDA5 are found in juvenile dermatomyositis with interstitial pneumonia, but serum MDA5 has not been investigated. In this study, soluble MDA5 was confirmed in serum in some patients with juvenile dermatomyositis and systemic lupus erythematosus by ELISA. MDA5 and IFN increased in the same cases, suggesting that serum MDA5 may be involved in the pathophysiology of dermatomyositis, type I IFN is thought to play an important role in pathology.

研究分野：小児科学、リウマチ・膠原病

キーワード：MDA5 若年性皮膚筋炎 I型インターフェロン 抗MDA5抗体 間質性肺炎 インターフェロノパチー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗 melanoma differentiation-associated gene 5(MDA5)抗体は、成人発症の皮膚筋炎(dermatomyositis: DM)および若年性皮膚筋炎(juvenile dermatomyositis: JDM)患者で検出される筋炎特異的自己抗体(myositis specific antibodies: MSA)の一つである。日本の JDM では 30~35%ともっとも高頻度に陽性となる MSA であるが、欧米での陽性率は 7~8%と少ない。また、日本を含めた東アジアの抗 MDA5 抗体陽性 JDM では、80~90%において間質性肺障害(ILD)合併し、急速に進行し呼吸不全から死に至る急速進行性の転帰をとることも少なくないが、英国での ILD 合併率は約 20%であり、臨床症状にも人種差が存在する。これらの人種差の理由は明らかにされていない。

その抗原である MDA5 は helicase C domain-containing protein 1 (IFIH1)とも呼ばれる細胞質内に存在するパターン認識受容体である。RNA ウィルスが有する 2 本鎖 RNA を認識し、I 型インターフェロン (IFN)産生を誘導する。その機能獲得型変異は Aicardi-Goutiere 症候群の責任遺伝子の一つでありインターフェロノパチーをきたし、神経症状、脳室内石灰化、凍瘡様皮疹、自己抗体産生などの所見を認める。また、異なる責任遺伝子であるが同様のインターフェロノパチーをきたす STING associated vasculopathy with onset in infancy (SAVI)では ILD を認めることが知られている。

興味深いことに、血清抗 MDA5 抗体価は DM の病勢と相関することから、抗体が皮膚筋炎及びその合併症である ILD の発症病態に関与している可能性がある。また、内因性の抗原に対する自己抗体の産生には、崩壊した細胞からの抗原の暴露が必要であると考えられており、抗 MDA5 抗体の産生を認める症例では、細胞質外に放出された MDA5 が存在する可能性がある。しかし、細胞外 MDA5 の有無や機能、及び、抗 MDA5 抗体を含めた病態への関与は不明である。

2. 研究の目的

JDM における、血清中の MDA5 の有無を確認し、ILD などの臨床症状および抗 MDA5 抗体などの MSA や I 型 IFN および I 型 IFN により誘導されるケモカインとの関連を検討する。

3. 研究の方法

信州大学小児医学教室において若年性皮膚筋炎と診断された 8 症例を対象とした。MSA は抗 MDA5 抗体陽性 3 例、抗 NXP2 抗体陽性 2 例、抗 Mi-2 抗体陽性 1 例、抗 Jo-1 抗体陽性 1 例、抗体陰性 1 例である。血清 MDA5 の比較対象として、若年発症全身性エリテマトーデス(SLE)3 例、健常対象者 1 例を用いた。検討した血液は診断時または再燃時に採取し、血清に分離後-40℃以下で保存した。臨床情報は診療録より収集した。

血清 MDA5/IFIH1 (LS-F33771, LSBio, Seattle, WA, USA) および IFN (BMS216, Invitrogen, Sandiego, CA, USA)、IFN (DY814,R and D systems, Minneapolis, MN, USA)、CXCL10/IP-10(DIP100, R and D systems)は各メーカーのプロトコールに基づいて ELISA により測定した。

血清 MDA5 の確認のため当研究室にて ELISA を作成した。固相用抗体として A67670 (rabbit polyclonal, Epigentek, Farmingdale, NY, USA)、検出抗体としてピオチン化 21751-1-AP (rabbit polyclonal, proteintech, Chicago,IL, USA)、標準曲線用コントロール抗原にはリコンビナント全 IFIH1 蛋白(NP_071451, Origene, Rockville, MD, USA)を使用した。

4. 研究成果

対象症例の臨床的特徴

表 1 に本研究で検討した JDM 8 例の臨床的特徴を示す。平均発症年齢は 7.6 歳、男女比は 3:5 であった。抗 MDA5 抗体陽性の 1 例は筋所見に乏しく無筋炎性 JDM(CAJDM)と診断された。抗 MDA5 抗体陽性 3 例(#1,2,3)全例で ILD を合併しており、そのうち 1 例は RP-ILD で亡くなった(#1)。抗 NXP2 抗体陽性 JDM は比較的筋炎所見が強いとされるが、今回検討した 2 例(#4,5)も明らかな筋力低下を認めた。抗 Mi-2 抗体陽性例(#6)は、発症後診断まで 2 年が経過しており、初診にすでに皮膚の石灰化を認めた。抗 Jo-1 抗体陽性例(#7)は、ILD や機械工の手など成人と同様の抗 ARS 抗体症候群の症状を認めた。以上の MSA 陽性例は既報の各抗体陽性例でみられる臨床的特徴と合致していた。MSA 陰性例は、筋病理所見は皮膚筋炎と合致していたが、皮膚症状は認めず、四肢及び体幹の関節拘縮と低身長、凍瘡様皮疹といった非特異的な臨床症状を示した。

表 1) JDM 患者の臨床的特徴

	MSA	発症年齢	性別	type	ILD	発熱	ゴットロン徴候	ヘリオトローブ疹	皮膚潰瘍	その他の症状	CK	AST	ALT	LDH	Aldolase	KL-6	予後
1	MDA5	4	F	CADM	RP-ILD	+	+	+	-		18	310	192	624	15.7	2,740	死亡
2	MDA5	7	F	DM	C-ILD	+	+	+	+	関節炎	1,895	84	59	532	23.2	424	生存
3	MDA5	11	M	DM	C-ILD	+	+	+	-		326	108	128	380	12	579	生存
4	NXP2	5	M	DM	-	+	+	-	-		4,787	170	80	778	39.4	196	生存
5	NXP2	10	F	DM	-	+	+	+	-		1,879	139	88	780	29.3	391	生存
6	Mi-2	5	M	DM	-	-	+	+	-	皮膚石灰化	2,561	80	80	526	45.3	214	生存
7	Jo-1	14	F	DM	C-ILD	+	+	+	-	関節痛	5,183	103	128	590	111.8	278	生存
8	-	5	F	PM	-	-	-	-	-	凍瘡様皮疹, 関節炎	66	42	16	430	13.6	360	生存

JDM 患者および若年発症 SLE 患者における血清 MDA5 の検出。
MDA5/IFIH1 ELISA キット (LS-F33771) を用いて、JDM8 例と SLE3 例、健常コントロール 1 例の血清中に存在する MDA5 値を測定した (図 1)。MSA 陰性例 (#8) において著明な血清 MDA5 値高値を認めた。JDM の一部において血清 MDA5 が上昇している可能性が示唆された。SLE でも 1 例で高値を示し、1 例は弱陽性であった。一方、抗 MDA5 抗体陽性の 3 例では検出されなかった。また、抗 MDA5 抗体以外の MSA 陽性 4 例と健常コントロールでも血清 MDA5 は陰性だった。ILD 合併例は 4 例とも血清 MDA5 が陰性だった。

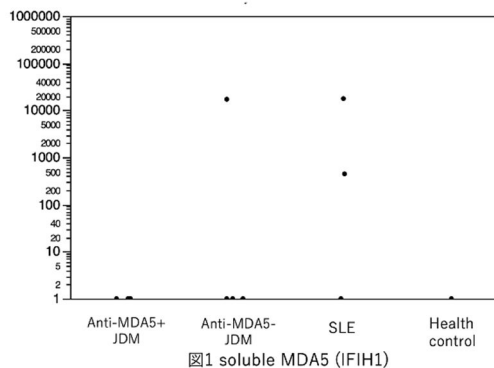


図1 soluble MDA5 (IFIH1)

JDM 患者の血清 I 型 IFN と IP-10

JDM における血清 MDA5 と I 型 IFN の

関連を検討するため、IFN、IFN および I 型 IFN により誘導される IP-10 を ELISA を用いて測定した。表 2 に示すように、IFN は、MDA5 陽性例 (#8) で増加していた。IFN は、正常コントロールと比較し高値を示した症例はなかった。IP-10 は、皮膚筋炎の症例すべてで増加を認め、MDA5 陽性例の方が高値を示す傾向は無かった。

	MSA	sMDA5-1	sMDA5-2	IFN	IFN	IP-10
1	MDA5	<78	11,763	ND	ND	ND
2	MDA5	<78	<200	<35	135	2,967
3	MDA5	<78	<200	<35	70	1,797
4	NXP2	<78	ND	<35	87	2,235
5	NXP2	<78	ND	<35	95	4,399
6	Mi-2	<78	ND	<35	95	140
7	Jo-1	<78	ND	<35	107	689
8	-	17,129	<200	114	67	3,686

すべて単位は pg/ml. sMDA5-1: LS-F33771, -2:house made ELISA

血清 MDA5 陽性例の血清 MDA5 値と I 型 IFN との関連

血清 MDA5 陽性例 (#8) の治療経過中の血清 MDA5 値と IFN、IP-10 値の推移を示す (図 2)。各検査は少なくとも 2 月以上の間隔である。治療により血清 MDA5 値は低下し、IFN、IP-10 も類似した動きを示したことから、血清 MDA5 と、I 型 IFN 産生が関連している可能性が考えられた。

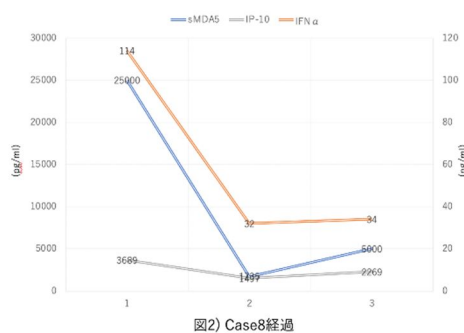


図2) Case8経過

当研究室で作成した MDA5 ELISA との関連

MDA5/IFIH1 ELISA キット (LS-F33771) について偽陽性の可能性を確認するため市販されている 2 種類の polyclonal 抗 MDA5 抗体を用いて ELISA を作成した。コントロールにはヒト HEK293 細胞株より産生された合成全 IFIH1 蛋白を用いた。この方法では、RP-ILD を合併した抗 MDA5 抗体陽性例 (#1) のみ高値であり、一致した結果が得られなかった (表 2)。

本研究では、ELISA により若年性皮膚筋炎の血清中に可溶性 MDA5 を確認した。可溶性 MDA5 と IFN は同じ症例で増加しており、I 型 IFN が病態に重要な役割を果たしていると考えられている皮膚筋炎の病態に関係している可能性がある。血清 MDA5 陽性 JDM (#8) は、低身長、関節拘縮、凍瘡様皮疹があり、インターフェロノパチーが疑われている症例であった。一方、抗 MDA5 抗体や ILD との関連は認めなかった。

この研究の今後の課題としては、ELISA 以外の方法による MDA5 の確認と症例数の増加による統計学的な検討が挙げられる。また、SLE では 3 症例中 2 例で MDA5 が陽性であった。SLE における MDA5 の診断的意義や病態への関与も検討課題として残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeuchi Y, Seki T, Kobayashi N, Sano K, Shigemura T, Shimojo H, Matsumoto K, Agematsu K.	4. 巻 28(6)
2. 論文標題 Analysis of serum IL-38 in juvenile-onset systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1069-1072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林法元
2. 発表標題 皮膚筋炎の多様性:小児と成人、日本と世界 本邦における若年性特発性炎症性筋疾患に合併する間質性肺炎と筋炎特異的自己抗体
3. 学会等名 小児リウマチ学会（招待講演）
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