

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19449

研究課題名(和文) 間質性肺疾患合併多発性筋炎/皮膚筋炎における筋炎特異的抗体とバイオマーカーの研究

研究課題名(英文) Clinical significance of myositis-specific autoantibodies and novel biomarkers in polymyositis/dermatomyositis-associated interstitial lung disease

研究代表者

穂積 宏尚 (Hozumi, Hironao)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40771457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性筋炎/皮膚筋炎に合併した間質性肺疾患患者の気管支肺胞洗浄液や血清を用いて新規バイオマーカーの探索を行った。筋炎特異的抗体(MSA)を網羅的に解析した結果、MSAサブグループによって臨床的表現型や治療反応性、予後が大きく異なるため、診断時のMSA測定が治療戦略決定のために重要であることが示唆された。LC-MS/MSを用いたショットガンプロテオーム解析によって、CD163分子やキチナーゼ3様タンパク1(YKL-40)などが候補分子として挙げられた。患者血清で検証したところ、いずれも本疾患群の重症度や疾患活動性、予後と関連し、新規バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We explored novel biomarkers using bronchoalveolar lavage fluids and sera of patients with polymyositis/dermatomyositis-associated interstitial lung disease (PM/DM-ILD). The comprehensive analysis of serum myositis-specific autoantibodies suggested that the clinical features, treatment responses, and prognoses differed depending on MSA status, and therefore, therapeutic strategy should be considered according to MSA status. The shotgun proteomics using LC-MS/MS suggested that soluble CD163 and chitinase-3-like-1 (YKL-40) molecules may be candidate biomarkers for PM/DM-ILD. The validation analysis using the patients' sera demonstrated that the two molecules were promising biomarkers for evaluating disease severity/activity and predicting prognosis.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：間質性肺疾患 皮膚筋炎 多発性筋炎 YKL-40 CD163 筋炎特異的抗体 プロテオーム 間質性肺炎

1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎や皮膚筋炎 (PM/DM) は骨格筋や皮膚、呼吸器、その他の臓器を障害する全身性自己免疫疾患である。PM/DMにおいて、間質性肺疾患 (ILD) は頻度が多い合併症の一つであり、予後に大きく影響している。

PM/DM-ILD の臨床経過は多彩である。大きくわけて慢性型と急性/亜急性型に分類できるが、後者の中には、しばしば治療抵抗性できわめて予後不良な経過を呈する症例が存在する。このような症例に対して、ステロイド薬に免疫抑制薬 2 剤を併用する強力な免疫抑制療法や、免疫グロブリン大量療法などを含む集学的治療が行われているが、いまだに有効な治療法は確立していない。一方、強力な治療を行わなくともステロイド薬単剤に反応し良好な長期予後を示す症例や、経過観察のみで緩徐にしか進行しない症例も存在する。したがって、PM/DM-ILD の診療において、「どのような患者群が予後不良なのか?」、あるいは「どのような患者群に強力な治療介入が必要なのか?」といったクリニカルクエスチョンを明らかにすることは、治療戦略を決定するうえで非常に重要であり、そのためにも治療反応性や予後を正確に予測する客観的なバイオマーカーの確立が求められていた。

筋炎特異的自己抗体 (MSA)

PM/DM において、抗 ARS 抗体や抗 MDA-5 抗体、抗 Mi-2 抗体、抗 TIF1- γ 抗体など、MSA と呼ばれる自己抗体が検出され、臨床経過に影響することがわかってきた。したがって、MSA は予後予測や治療方針へ影響する有用なバイオマーカーになる可能性が高いと推測された。しかしながら、PM/DM-ILD において、各 MSA の意義を検討した個別的な研究はあるものの、網羅的に MSA を評価し、臨床像や治療反応性、予後との関連性を検討した報告はなかった。

ショットガンプロテオーム解析

近年、プロテオミクスが飛躍的に発展している。特に Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) を用いたショットガンプロテオーム解析技術の開発によって、数千ものペプチド・タンパク分子を一斉に同定・定量化することが可能となった。さらに、バイオインフォマティクス手法を利用して、病態に関わる分子の探索が可能になってきている。これまでの総当たりの手法では無数のバイオマーカー候補からの絞り込みに時間がかかり、限られた時間・人的資源での探索は非効率的であった。しかし、このショットガンプロテオーム解析の発展によって、バイオマーカー探索が網羅的かつ効率的に行う環境が整ってきた。

2. 研究の目的

PM/DM-ILD における治療戦略確立に貢献

するために、以下の手法を用いて、疾患活動性や重症度の評価、治療反応性や予後予測に有用なバイオマーカーを開発することを目的とする。

網羅的に MSA を測定し、そのバイオマーカーとしての有用性を検討する。ショットガンプロテオーム解析を用いて、新規バイオマーカーを探索する。

3. 研究の方法

PM/DM-ILD 患者における MSA 毎の臨床像・治療反応性・予後の調査

PM/DM-ILD 患者の連続 60 症例の診断時保存血清を用いて、免疫沈降法による網羅的 MSA 評価を行った。MSA プロファイルと、臨床的パラメーター(患者背景・血清マーカー・呼吸機能検査)や胸部画像所見、治療反応性や予後との関連性を統計学的に解析した。

ショットガンプロテオーム解析を用いた新規バイオマーカーの探索

- (1) 気管支肺胞洗浄液(BALF)を用いた探索
<ディスカバリーステップ>
PM/DM-ILD の軽症例 (5 例)と重症例 (5 例)の BALF を用いてショットガンプロテオーム解析を行った。BALF を濃縮した後タンパクを抽出し、抽出タンパクを還元・アルキル化・トリプシン消化・脱塩処理し、LC-MS/MS を用いて解析した。検出されたタンパクリストにおいて軽症群と重症群をノンラベル比較し、重症群にのみ検出されるもの、あるいは変動の大きいものをリストアップし、候補タンパクとした。
<バリデーションステップ>
候補タンパクの臨床的有用性を検証するために、PM/DM-ILD 患者 69 例の保存血清を用いて候補タンパクを定量性の高い ELISA 法にて測定し、臨床的パラメーターや治療反応性、予後との関連性を統計学的に解析した。
<免疫組織染色による評価>
候補タンパクの発現を、PM/DM-ILD 患者の外科的肺生検検体を用いて検証した。非喫煙・非喘息の肺癌患者の切除肺における健常部分を比較対照とした。
- (2) 血清を用いたバイオマーカー探索
<ディスカバリーステップ>
PM/DM-ILD の軽症例(5 例)と重症例(5 例)、健常人(5 例)の血清を用いてプロテオーム解析を行った。まず、ヒト血清の 99%以上を占めるアルブミンや免疫グロブリンなど 12 種類の高存在量タンパクを除去した。次に、高存在量タンパク除去後の溶液を濃縮し、還元・アルキル

化・トリプシン消化を行った。軽症群・重症群・健常群から得られたこれらの消化サンプルは、安定同位体試薬によって標識され、脱塩・分画化の後、LC-MS/MSにて解析された。解析結果リストにおいて、健常群・軽症群・重症群の順に段階的に上昇するものをリストアップし、候補タンパクとした。

<パスウェイ解析>

ディスカバリーステップにて検出された各群のタンパク変動リストを用いて、パスウェイ解析を行った。これによって疾患の重症化に重要な役割を果たすパスウェイを探索した。

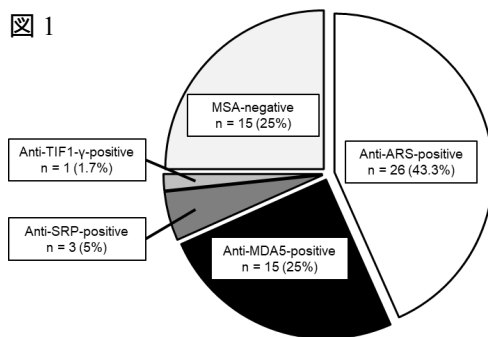
4. 研究成果

PM/DM-ILD 患者における MSA 毎の臨床像・治療反応性・予後の調査

PM/DM-ILD 患者 60 例の MSA を網羅的に測定した結果を図 1 に示す。

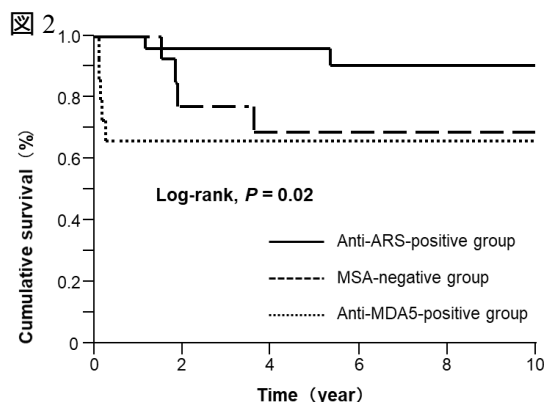
抗 ARS 抗体陽性例が 43.3%、抗 MDA5 抗体陽性例が 25%、MSA 陰性例が 25%であった。

図 1



抗 ARS 抗体陽性群と抗 MDA5 抗体陽性群、MSA 陰性群の臨床的特徴を統計学的に比較した結果、抗 MDA5 抗体陽性群では、抗 ARS 抗体陽性群や MSA 陰性群と比較してILDが急性/亜急性に発症することが多く(86.7 vs. 42.3 vs. 46.7%, $P = 0.01$)、血清フェリチンの中央値が高かった(923 vs. 106 vs. 105 ng/mL, $P < 0.01$)。

PM/DM-ILD 患者の MSA 毎の初期治療後生存曲線を図 2 に示す。



初期治療後 90 日の生存率では、抗 MDA5 抗体陽性群は抗 ARS 抗体陽性群や MSA 陰性群と比較して有意に低かった(66.7 vs. 100 vs. 100%, $P < 0.01$)。

5 年生存率では、図 2 のように抗 ARS 抗体陽性群や抗 MDA5 抗体陽性群、MSA 陰性群の中で、抗 ARS 抗体陽性群が最も良好であった(96 vs. 66.7 vs. 68.3%, $P = 0.02$)。

これらの結果より、PM/DM-ILD は抗 ARS 抗体や抗 MDA5 抗体など MSA のプロファイルによって臨床像や初期治療反応性、長期予後が異なるため、MSA プロファイルに応じた治療戦略の開発が必要であると考えられた。

ショットガンプロテオーム解析を用いた新規バイオマーカーの探索

(ア) 気管支肺胞洗浄液(BALF)を用いた探索

PM/DM-ILD の重症度マーカーの探索
軽症 5 例と重症 5 例の BALF を用いてショットガンプロテオーム解析を行い、ノンラベルにて比較した。BALF では、回収率によって候補タンパクの存在量が異なることから、検出タンパクシグナルはアルブミンシグナルにて補正した。その結果、sCD163 分子や chitinase-3-like-1 protein (YKL-40)などが候補分子として挙げられた。

sCD163 の有用性

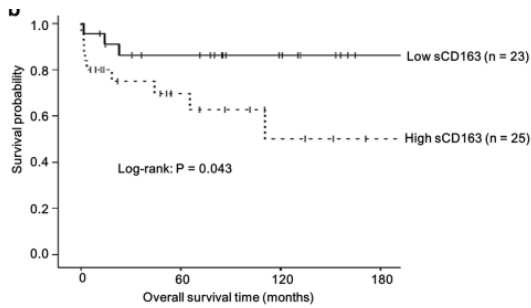
PM/DM-ILD 患者 48 例と健常人コントロール 20 例の血清を用いて血清 sCD163 の濃度を測定したところ、患者群の方が健常コントロールと比較して有意に高値であった(中央値 818 vs. 340 ng/mL, $P < 0.01$)。

PM/DM-ILD 患者における血中 sCD163 値と臨床的パラメータの相関を解析した。sCD163 値は、CRP ($r = 0.322$, $P = 0.03$) や%FVC ($r = -0.301$, $P = 0.045$)と弱い相関が認められた。すなわち、炎症状態や呼吸機能の悪化を反映している可能性が示唆された。

sCD163 の予後的な意義について検討した。年齢・性別で調整した単変量 cox hazard 解析では、sCD163 高値は予後不良と関連した(HR 1.27, $P < 0.001$)。

sCD163 と死亡との関連性について ROC 曲線にて解析したところ、800 ng/mL をカットオフとした場合に AUC = 0.652 であった。このカットオフを用いて sCD163 高値群と低値群の生存曲線を解析した結果、高値群は有意に予後不良であった。(図 3)

図 3

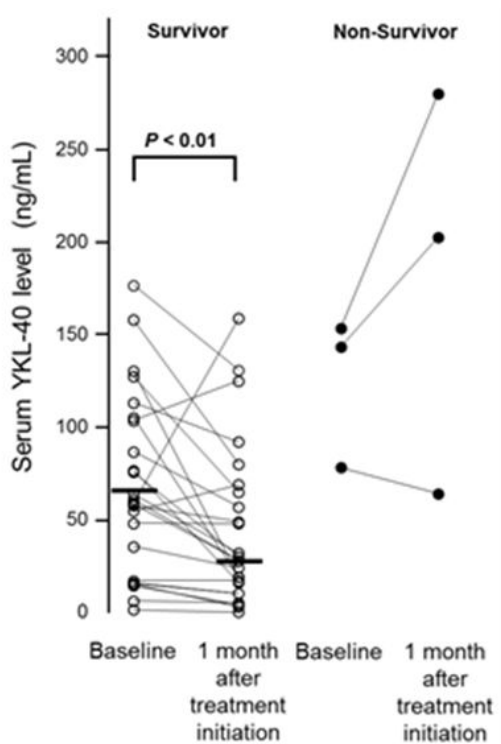


YKL-40 の有用性

PM/DM-ILD 患者 69 例と健常人コントロール 34 例の血清を用いて血清 YKL-40 の濃度を測定したところ、患者群の方が健常コントロールと比較して有意に高値であった(中央値 56.7 vs. 26.4 ng/mL, $P < 0.01$)。

PM/DM-ILD 患者における血中 YKL-40 値と臨床的パラメーターの相関を解析した。YKL-40 値は、動脈血酸素分圧(Torr) ($r = -0.40, P < 0.01$)や%DLCO ($r = -0.41, P < 0.01$)のような酸素化の指標と負の相関が認められた。また、初期治療後の生存例において、治療前値と比較して、治療一か月後の血清 YKL-40 値は有意に低下していた(図 4)。以上より、血清 YKL-40 値は本疾患の重症度や疾患活動性を反映していることが示唆された。

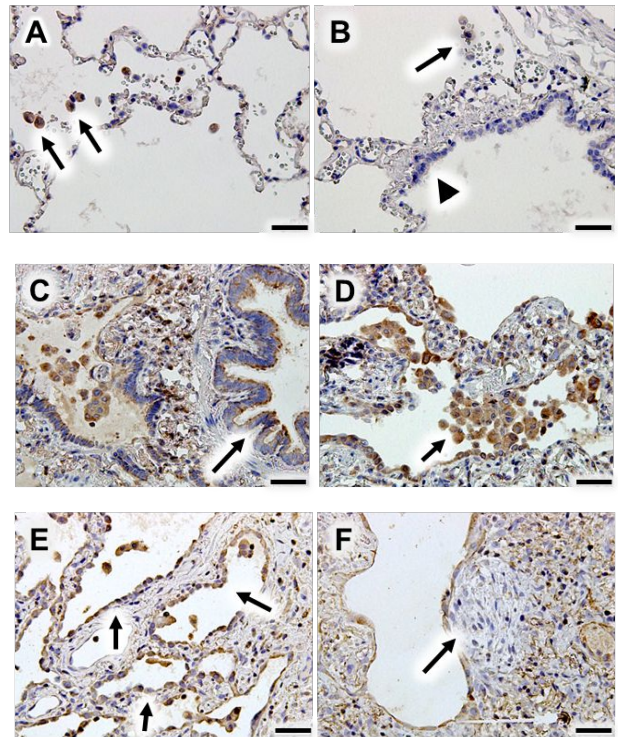
図 4



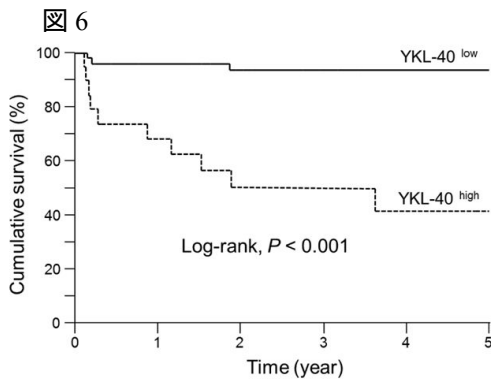
コントロール肺と PM/DM-ILD 患者の外

科的肺生検組織における YKL-40 の発現を、免疫染色法を用いて比較した。正常肺では、肺胞腔内に少数の YKL-40 陽性マクロファージと(図 5A)、わずかに YKL-40 を発現していた気道上皮細胞が認められた(5B)。一方、PM/DM-ILD 患者では、気道上皮における強い YKL-40 発現だけでなく(5C)、YKL-40 を強く発現したマクロファージが肺胞腔内に集簇し(5D)、線維化領域に隣接した領域では YKL-40 陽性肺胞上皮細胞が高度に増殖していた(5E)。しかし、幼若な線維芽細胞巣を含む線維化組織には YKL-40 は発現していなかった(5F)。以上の所見から、PM/DM-ILD では、すでに線維化に至った病変ではなく、活動性の炎症や肺胞上皮過形成が、YKL-40 の産生源であることが推測された。

図 5



血清 YKL-40 の予後的意義を検討した。多変量 Cox 比例ハザード解析では、血清 YKL-40 高値は独立した予後不良因子であった (HR 1.13, $P = 0.02$)。ROC 曲線を用いて、診断後 2 年以内の死亡を予測する YKL-40 のカットオフ値を算出した。カットオフ値を 105 ng/mL と設定した場合、AUC は 0.78、感度 75%、特異度 82.6%であった。このカットオフ値を用いて PM/DM-ILD 患者を YKL-40 低値群と高値群に分割し、Kaplan-Meier 法で比較したところ、YKL-40 高値群の 5 年生存率は低値群と比較して、有意に予後不良であった。(図 6)



以上より、PM/DM-ILDにおいて、sCD163 や YKL-40 は重症度評価や予後予測に有用な新規バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

(イ) 血清を用いたバイオマーカー探索

抗 MDA5 抗体陽性の DM-ILD は他の MSA グループと比較して最も予後不良であった。そこで、健常群と抗 MDA5 抗体陽性群長期生存例、早期死亡例の血清を用いてショットガンプロテオーム解析を行い、TMT ラベルにて比較定量した。その結果、健常人・長期生存例・早期死亡例の順に段階的に存在量が変動する約 30 タンパク分子が同定された。

また、健常群と抗 MDA5 抗体陽性群において変動するタンパクリストを用いたパスウェイ解析では、線溶系、MMP シグナル伝達、インテグリンファミリー、CCN シグナル伝達、TG2 シグナル伝達、血液凝固経路が上位にランクした。さらに変動タンパクに共通する上流因子は p160SRC シグナル伝達、C/EBP、SMAD、S100 ファミリー、HNF、GR、ATG シグナル伝達との関連が強かった。

今後はこれらの分子やパスウェイ解析の結果を検討し、候補分子の絞り込みと、多数例での検証作業を行う方針である。

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 8 件)

1. Kato S, Inui N, Hozumi H, Inoue Y, Yasui H, Karayama M, Kono M, Suzuki Y, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Watanabe H, Suda T. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with sarcoidosis. *Respir Med.* 2018 Jan 11. pii: S0954-6111(18)30005-2.
2. Enomoto Y, Nakamura Y, Satake Y,

Sumikawa H, Johkoh T, Colby TV, Yasui H, Hozumi H, Karayama M, Suzuki Y, Furuhashi K, Fujisawa T, Enomoto N, Inui N, Iwashita T, Kuroishi S, Yokomura K, Koshimizu N, Toyoshima M, Imokawa S, Yamada T, Shirai T, Hayakawa H, Suda T. Clinical diagnosis of idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis: A retrospective multicenter study. *Respir Med* 133: 1-5, 2017.

3. Hozumi H, Fujisawa T, Enomoto N, Nakashima R, Enomoto Y, Suzuki Y, Kono M, Karayama M, Furuhashi K, Murakami A, Inui N, Nakamura Y, Mimori T, Suda T. Clinical Utility of YKL-40 in Polymyositis/dermatomyositis-associated Interstitial Lung Disease. *J Rheumatol* 44: 1394-1401, 2017.
4. Enomoto Y, Nakamura Y, Colby TV, Johkoh T, Sumikawa H, Nishimoto K, Yoshimura K, Matsushima S, Oyama Y, Hozumi H, Kono M, Fujisawa T, Enomoto N, Inui N, Iwashita T, Suda T. Radiologic pleuroparenchymal fibroelastosis-like lesion in connective tissue disease-related interstitial lung disease. *PLoS One* 12: e0180283, 2017.
5. Fujisawa T, Hozumi H, Kono M, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Nakashima R, Imura Y, Mimori T, Suda T. Predictive factors for long-term outcome in polymyositis/dermatomyositis-associated interstitial lung diseases. *Respir Investig* 55: 130-137, 2017.
6. Enomoto Y, Suzuki Y, Hozumi H, Mori K, Kono M, Karayama M, Furuhashi K, Fujisawa T, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Suzuki D, Ogawa N, Nakashima R, Mimori T, Iwashita T, Suda T. Clinical significance of soluble CD163 in polymyositis-related or dermatomyositis-related interstitial lung

- disease. Arthritis Res Ther 19: 9, 2017.
7. Hozumi H, Fujisawa T, Nakashima R, Johkoh T, Sumikawa H, Murakami A, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Hosono Y, Imura Y, Mimori T, Suda T. Comprehensive assessment of myositis-specific autoantibodies in polymyositis/dermatomyositis-associated interstitial lung disease. Respir Med 121: 91-99, 2016.
 8. Hozumi H, Enomoto N, Oyama Y, Kono M, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Suda T. Clinical Implication of Proteinase-3-antineutrophil Cytoplasmic Antibody in Patients with Idiopathic Interstitial Pneumonias. Lung194: 235-242, 2016.
- 〔学会発表〕(計 6件)
1. Hironao Hozumi, Tomoyuki Fujisawa, Masato Kono, Yuzo Suzuki, Masato Karayama, Kazuki Furuhashi, Noriyuki Enomoto, Naoki Inui, Yutaro Nakamura, Takafumi Suda. YKL-40 Is a Useful Biomarker for Evaluating Disease Activity and Predicting Prognosis in Patients with Polymyositis/Dermatomyositis-Associated Interstitial Lung Disease. American Thoracic Society 2017 International Conference, 2017.
 2. Hironao Hozumi, Tomoyuki Fujisawa, Masato Kono, Noriyuki Enomoto, Naoki Inui, Yutaro Nakamura, Takafumi Suda. Serum Anti-ARS and Anti-MDA-5 Antibodies Are Useful Biomarkers for Predicting the Prognosis in Patients with Polymyositis/Dermatomyositis-Associated Interstitial Lung Disease. American Thoracic Society 2016 International Conference, 2016.
 3. 穂積宏尚, 河野雅人, 柄山正人, 鈴木勇

- 三, 古橋一樹, 榎本紀之, 藤澤朋幸, 乾直輝, 中村祐太郎, 須田隆文. 間質性肺疾患合併多発性筋炎/皮膚筋炎患者におけるキチナーゼ3様タンパク1の意義. 第57回日本呼吸器学会学術講演会, 2017.
4. 穂積宏尚, 河野雅人, 柄山正人, 鈴木勇三, 古橋一樹, 榎本紀之, 藤澤朋幸, 乾直輝, 中村祐太郎, 須田隆文. 間質性肺炎を合併した多発性筋炎/皮膚筋炎患者におけるYKL-40の臨床的有用性の検討. 第66回日本アレルギー学会学術大会, 2017.
5. 穂積宏尚, 榎本紀之, 藤澤朋幸, 乾直輝, 中村祐太郎, 須田隆文. 多発性筋炎/皮膚筋炎に合併した間質性肺疾患患者における筋炎特異的抗体の意義. 第56回日本呼吸器学会学術講演会, 2016.
6. 穂積宏尚, 榎本紀之, 藤澤朋幸, 乾直輝, 中村祐太郎, 須田隆文. 間質性肺疾患を合併した多発性筋炎/皮膚筋炎患者における抗ARS抗体と抗MDA-5抗体測定の意義. 第65回日本アレルギー学会学術大会, 2016.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0件)
- 取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

穂積 宏尚 (Hozumi Hironao)

浜松医科大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 40771457