

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16145

研究課題名(和文) 抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎の病態におけるCX3CL1-CX3CR1の重要性の検討

研究課題名(英文) CX3CL1-CX3CR1 plays an important role in the pathophysiology of anti-MDA5-positive dermatomyositis

研究代表者

中嶋 蘭(笹井蘭)(Nakashima, Ran)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10599525

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)：抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎(DM)例の治療前血清中CX3CL1は同抗体陰性DM例と比べて有意に高値を示し、各種筋炎特異的自己抗体で分類される患者群間で比較しても、抗MDA5抗体陽性例ではCX3CL1の濃度が特に高かった。また重症例では、軽症例に比べて治療経過中にCX3CL1濃度が有意に上昇した。抗MDA5抗体陽性DM例の末梢血においてはnon-classical単球(CD14^{low}CD16⁺⁺)が増加していたが、CX3CR1の発現量が低下していたことから、CX3CR1を介して単球が病変組織へ遊走し、組織においてマクロファージへ分化し、病態形成している可能性について病理組織学的に検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎は、膠原病の中でも最も予後不良な一群であり、急速進行性間質性肺炎を合併し短期間で死亡するリスクが高い。同疾患に対する治療は従来の免疫抑制薬を組み合わせで行われるが、未だに救命できない症例が存在し、新規治療法の開発が切に望まれている。病態背景には単球やマクロファージの異常活性化が示唆されるが、その機序は明らかではない。一方、ケモカインと細胞接着分子の2つの活性を持つCX3CL1とそのレセプターCX3CR1は単球の遊走や分化において重要な役割を果たすことが示唆されている。本病態にCX3CL1-CX3CR1が関与することを示すことができれば、新規治療戦略につながる考えた。

研究成果の概要(英文)：Anti-MDA5-positive dermatomyositis (DM) patients showed significantly higher serum CX3CL1 (fractalkine) levels than anti-MDA5-negative DM. Even compared among patient groups defined with each myositis-specific autoantibodies, anti-MDA5-positive group tended to show the highest level of CX3CL1. Moreover, among anti-MDA5-positive patients, CX3CL1 increased much more in the intractable cases than in the favorable group during the disease course. Peripheral non-classical monocyte (CD14^{low}, CD16^{high}) was significantly increased in anti-MDA5-positive patients, but their expression of CX3CR1 seemed to be reduced, which might suggest that monocytes had been migrated into the tissue lesion. We are proceeding immune histopathological examination on the CX3CR1-positive monocytes or macrophages, assessing their distribution and association with CX3CL1 positive cells.

研究分野：免疫・膠原病内科

キーワード：皮膚筋炎 抗MDA5抗体 フラクタルカイン CX3CR1 単球

1. 研究開始当初の背景

抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎は、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)の中でも最も予後不良な一群であり、急速進行性間質性肺炎を併発し短期間で死亡するリスクが高い。同疾患に対する治療は未だ確立しておらず、従来の免疫抑制薬を組み合わせても約 25%の症例が 6 ヶ月以内に命を落としている。抗 MDA5 抗体陽性例の病態背景に関する研究は近年増加してきており、抗 MDA5 抗体陽性 DM は同抗体陰性 DM に比し、フェリチン値や IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, IFN- γ など多くの炎症性サイトカインが血清中で有意に高いことが明らかになってきた。このことから本疾患の病態背景には単球やマクロファージの異常活性化によるサイトカインストームが関与していることが示唆されているものの、その機序については未だ明らかではない。一方、近年、ケモカインと細胞接着分子の 2 つの活性を持つ CX3CL1(フラクタルカイン)とそのレセプター CX3CR1 が自己免疫疾患の慢性炎症において注目されるようになってきている。CX3CR1 は NK 細胞や cytotoxic effector T 細胞や成熟マクロファージ、単球にも発現することが知られており、単球の生存にも関わるとされる。PM/DM においては患者血清中の CX3CL1 が健常者より高く、その値が筋炎(クレアチンキナーゼ値・筋力テスト)や間質性肺炎(肺泡気動脈血酸素分圧較差)の活動性と相関する報告がある。しかし雑多な疾患背景を持つ PM/DM 患者集団の中において、どのような病態に CX3CL1-CX3CR1 が影響しているのか十分解明されていない。そこで、抗 MDA5 抗体陽性 DM の特徴的病態と考えられる単球・マクロファージの活性化において、CX3CL1-CX3CR1 が関与していることを示すことができれば、本疾患における新規治療戦略につながる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

抗 MDA5 抗体陽性 DM の病態における単球・マクロファージのプロファイルを解析し、CX3CL1-CX3CR1 軸の病態への関与を探究する。

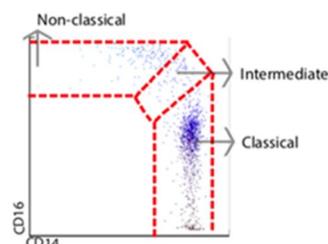
- (1) 抗 MDA5 抗体陽性 DM 例の末梢血リンパ球・単球プロファイルと CX3CR1 発現を解析し、健常人や、他の自己抗体陽性 PM/DM 例と比較する。
- (2) 抗 MDA5 抗体陽性 DM 例と他の自己抗体陽性 PM/DM 例、健常人で血清中 CX3CL1 値を比較する(治療前)。また抗 MDA5 抗体陽性 DM 例の治療経過における CX3CL1 の推移を検討し、重症度との相関の有無を検討する。
- (3) 抗 MDA5 抗体陽性 DM 例の病変組織における単球・マクロファージの分布と CX3CR1 の発現を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 抗 MDA5 抗体陽性 DM 例の末梢血リンパ球・単球プロファイルと CX3CR1 発現解析

抗 MDA5 抗体陽性 DM 治療前(活動期)14 例と寛解期 6 例、抗 MDA5 抗体陰性 PM/DM9 例、健常人 9 例の末梢血を採取し、Ficoll Paque を用いて末梢血単核球を分離し、蛍光抗体による色素染色後フローサイトメトリー(8color FACS)にかけ、各種 T 細胞、単球のプロファイルを確認した。特に単球は CD14⁺⁺CD16⁻細胞を classical type、CD14⁺⁺CD16⁺細胞を intermediate type、CD14^{low}CD16⁺⁺細胞を non classical type と 3 つのサブタイプに分類し、それぞれのサブタイプに属する単球の割合を群間で比較した。

さらに CX3CR1 陽性細胞がどのような種類の細胞であるか検討する(T 細胞・単球)。特に単球においては前述のサブタイプの中でどれが最もよく発現しているのか検討し、3 群間で比較した。



- (2) 血清中 CX3CL1 値の検討比較

PM/DM 患者における治療前血清サンプルについて自己抗体別に CX3CL1 濃度 (ELISA 法) の比較をした。具体的には抗 MDA5 抗体陽性例 42 例と同抗体陰性 DM 例 46 例に大きく分けて比較したが、サブ解析として抗 MDA5 抗体・抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体(28 例)・抗 SRP 抗体(6 例)・抗 transcriptional intermediary factor 1(TIF1)-抗体(12 例)の 4 群に分けて比較した。

さらに抗 MDA5 抗体陽性例中で経過良好例と難治例(免疫抑制薬に抵抗もしくは死亡例)に分け、治療前・治療経過中の血清中 CX3CL1 濃度を比較した。

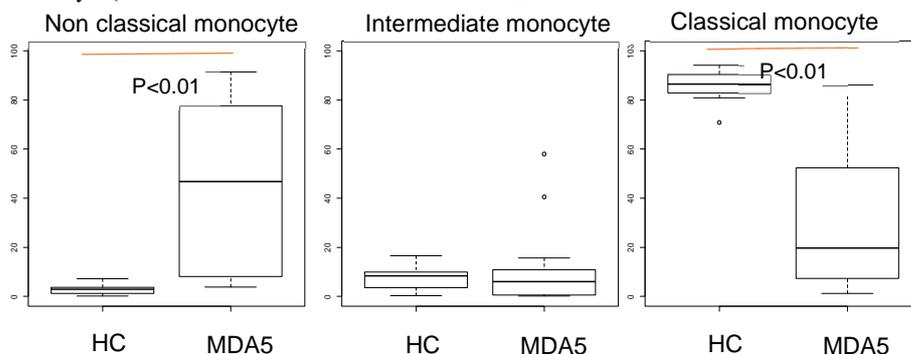
- (3) 抗 MDA5 抗体陽性 DM 例の病変組織における単球・マクロファージの分布と CX3CR1 の発現

抗 MDA5 抗体陽性例の皮膚組織における単球・マクロファージの分布と CX3CR1 の発現を抗

CD68、抗 CD206、抗 CX3CR1 抗体を用いて蛍光免疫組織化学染色により検討した。

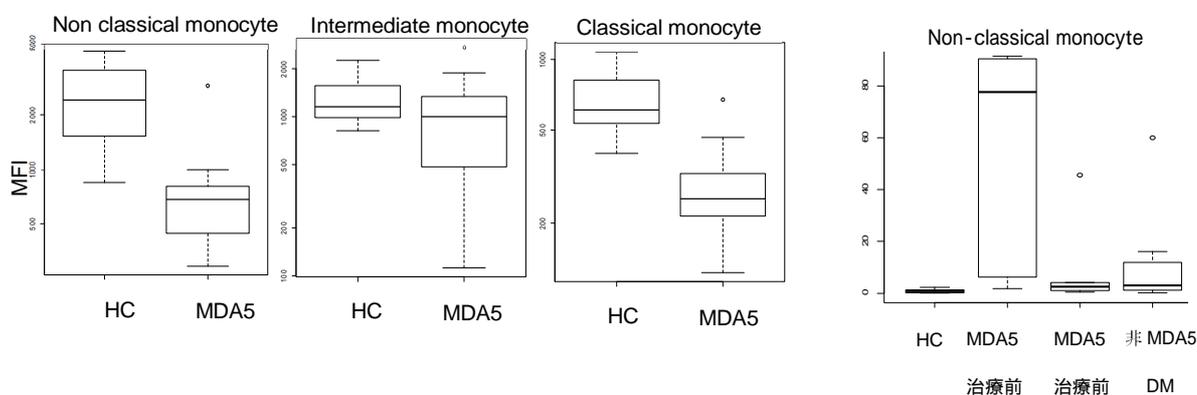
4. 研究成果

(1) 抗 MDA5 抗体陽性例は健常人と比較して有意に non classical monocyte (CD14^{low}CD16⁺⁺)分画の割合が増加し、classical monocyte(CD14⁺⁺CD16⁻)分画の割合が減少していた。intermediate monocyte(CD14⁺⁺CD16⁺)分画の割合に有意差は認めなかった。

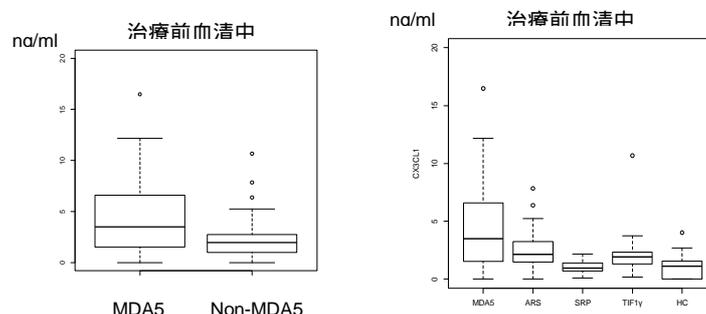


次に各単球分画における CX3CR1 の発現を検討したところ、non classical monocyte (CD14^{low}CD16⁺⁺)分画と classical monocyte(CD14⁺⁺CD16⁻)分画における CX3CR1 の発現量が有意に低下していた。intermediate monocyte(CD14⁺⁺CD16⁺)分画における CX3CR1 発現量の優位差は認めなかった。

さらに抗 MDA5 抗体陽性例の治療前・寛解期、抗 MDA5 抗体陰性 DM 例で non-classical monocyte 分画の割合を比較すると、治療前抗 MDA5 抗体陽性 DM において non-classical monocyte 分画の割合増加しており、寛解期にはその割合は健常人と同等レベルに低下することが示された。



(2) PM/DM 患者における治療前血清サンプルについて抗 MDA5 抗体陽性例 42 例と同抗体陰性 DM 例 46 例で CX3CL1 濃度を比較したところ抗 MDA5 抗体陽性例において有意に高かった。また各種筋炎特異自己抗体別に CX3CL1 濃度を比較しても抗 MDA5 抗体陽性例は他の自己抗体陽性例に比べて高いことが分かった。



また抗 MDA5 抗体陽性例の治療経過中における CX3CL1 の血清中濃度の推移について、経過良好例と免疫抑制治療抵抗例に分けて比較すると後者の方が CX3CL1 濃度が経過中に上昇し、有意に高くなっていることが分かった。

MDA5 陽性患者の CX3CL1 推移

	0w		4w		8w		12w		24w	
	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B
n	28	14	24	10	23	11	20	11	24	10
平均濃度	4.1	11.6	12.9	66.5	19.7	52.4	6.9	26.6	1.5	6.4
p	0.54		<0.01		<0.05		<0.05		0.061	

G:経過良好例 B:治療抵抗例

(3) 病変組織における単球・マクロファージの分布と CX3CR1 の発現

抗 CD68 抗体(M1・M2 マクロファージ)、抗 CD206 抗体(M2 マクロファージ)、抗 CX3CR1 抗体の 3 抗体により、Opal^R fluorescent dye を用いた多重蛍光免疫組織染色を行い、Mantra システムを用いて解析するよう進めている。

皮膚筋炎患者において診療上必要となった皮膚生検の保存検体を用い、上記 3 重染色を行う(京都大学医の倫理委員会承認番号 R2022)。

現在多重染色のための抗体濃度条件・染色プロトコールの調整を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Tsuji H, Nakashima R, Hosono Y, Imura Y, Yagita M, Yoshifuji H, Hirata S, Nojima T, Sugiyama E, Hatta K, Taguchi Y, Katayama M, Tanizawa K, Handa T, Uozumi R, Akizuki S, Murakami K, Hashimoto M, Tanaka M, Ohmura K, Mimori T.	4. 巻 72
2. 論文標題 Multicenter Prospective Study of the Efficacy and Safety of Combined Immunosuppressive Therapy With High-Dose Glucocorticoid, Tacrolimus, and Cyclophosphamide in Interstitial Lung Diseases Accompanied by Anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5-Positive Dermatomyositis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 488-498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.41105	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 -
1. 著者名 Nakashima R	4. 巻 41
2. 論文標題 Clinical significance of myositis-specific autoantibodies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunol Med.	6. 最初と最後の頁 103-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/25785826.2018.1531188.	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 -
1. 著者名 Nakatsuka Y, Handa T, Nakashima R, Tanizawa K, Kubo T, Murase Y, Sokai A, Ikezoe K, Hosono Y, Watanabe K, Tokuda S, Uno K, Yoshizawa A, Tsuruyama T, Uozumi R, Nagai S, Hatta K, Taguchi Y, Mishima M, Chin K, Mimori T, Hirai T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Serum matrix metalloproteinase levels in polymyositis/dermatomyositis patients with interstitial lung disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford).	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/kez065.	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 -

1. 著者名 Nishioka A, Tsunoda S, Abe T, Yoshikawa T, Takata M, Kitano M, Matsui K, Nakashima R, Hosono Y, Ohmura K, Mimori T, Sano H.	4. 巻 29
2. 論文標題 Serum neopterin as well as ferritin, soluble interleukin-2 receptor, KL-6 and anti-MDA5 antibody titer provide markers of the response to therapy in patients with interstitial lung disease complicating anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 814-820.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1548918.	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 -

1. 著者名 Shirakashi M, Nakashima R, Tsuji H, Tanizawa K, Handa T, Hosono Y, Akizuki S, Murakami K, Hashimoto M, Yoshifuji H, Ohmura K, Mimori T.	4. 巻 59
2. 論文標題 Efficacy of plasma exchange in anti-MDA5-positive dermatomyositis with interstitial lung disease under combined immunosuppressive treatment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford).	6. 最初と最後の頁 3284-3292.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keaa123.	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6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tsuneo Sasai, Ran Nakashima, Hideaki Tsuji, Shuji Akizuki, Kosaku Murakami, Motomu Hashimoto, Hajime Yoshifuji, Masao Tanaka, Koichiro Ohmura, Tsuneyo Mimori
2. 発表標題 Maintenance Therapy for Anti-MDA5-Positive Dermatomyositis Patients with Interstitial Lung Disease - Can They Achieve Drug-Free Remission ?-
3. 学会等名 American College of Rheumatology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋 蘭
2. 発表標題 特発性炎症性筋疾患におけるマネジメントと自己抗体
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋 蘭
2. 発表標題 成人皮膚筋炎における筋炎特異的自己抗体と間質性肺炎
3. 学会等名 第29回日本小児リウマチ学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Tsuji, Ran Nakashima, Yoshitaka Imura, Masato Yagita, Hajime Yoshifuji, Shintaro Hirata, Takaki Nojima, Eiji Sugiyama, Kazuhiro Hatta, Yoshio Taguchi, Masaki Katayama, Shuji Akizuki, Kosaku Murakami, Motomu Hashimoto, Masao Tanaka, Koichiro Ohmura, Tsuneyo Mimori
2. 発表標題 Efficacy and Safety of Combined Immunosuppressive Therapy with High-Dose Glucocorticoid, Tacrolimus, and Cyclophosphamide in Interstitial Lung Disease Accompanied by Anti-MDA5-Positive Dermatomyositis -A Multicenter Prospective Study -
3. 学会等名 American College of Rheumatology 2018 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻 英輝, 中嶋 蘭, 細野 祐司, 井村 嘉孝, 八木田 正人, 吉藤 元, 平田 信太郎, 野島 崇樹, 杉山 英二, 八田 和夫, 田口 義夫, 片山 昌紀, 秋月 修治, 村上 孝作, 橋本 求, 田中真生, 大村 浩一郎, 三森 経世
2. 発表標題 抗MDA5抗体陽性間質性肺炎合併皮膚筋炎患者に対するステロイド、タクロリムス、シクロフォスファミド併用療法の有効性と安全性に関する多施設前向き研究
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋 蘭
2. 発表標題 Treatment strategy if systemic rheumatic diseases; Lessons from clinical trials
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究協力者	笹井 恒雄 (Sasai Tsuneo)	京都大学・大学院医学研究科臨床免疫学・大学院生 (14301)	
研究協力者	納田 安啓 (Nohda Yasuhiro)	京都大学・大学院医学研究科臨床免疫学・大学院生 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------