

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17448

研究課題名(和文) MDA5の発現様式に着目した、皮膚筋炎に伴う急速進行性間質性肺疾患の発症機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of dermatomyositis-associated rapidly progressive interstitial lung disease, focusing on the expression of MDA5

研究代表者

木田 節 (Kida, Takashi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：20848501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Melanoma differential gene 5(MDA5)に対する特異的自己抗体が陽性の皮膚筋炎は、治療抵抗性の急速進行性間質性肺疾患を高頻度に合併する。これまで、抗MDA5抗体とその対応抗原であるMDA5がどのように病態に関与しているかはわかっていなかった。本研究では、細菌やウイルス感染など様々な誘因により肺の局所に浸潤した炎症細胞、とくに好中球がMDA5を産生することを明らかにした。産生されたMDA5を抗MDA5抗体が認識することが、急速進行性間質性肺疾患の病態形成に関与している可能性があり、さらなる検証を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Melanoma differential gene 5(MDA5)は細胞内に存在するウイルスセンサーであり、皮膚筋炎患者にみられる抗MDA5抗体の病的意義や、どのようにして急速進行性間質性肺疾患の発症に関与しているのかについてはわかっていなかった。

本研究では、炎症細胞におけるMDA5の産生により、細胞外にMDA5が抗原として提示されることで急速進行性間質性肺疾患の病態が形成されている可能性が示唆された。さらなる検証により、急速進行性間質性肺疾患の発症メカニズムの理解、新規治療標的の発見のみならず、トリガーとしての感染症への対策を含めた新たな発症予防戦略の提唱にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Dermatomyositis with positive anti-melanoma differential gene 5 (MDA5) antibodies is frequently associated with rapid progressive interstitial lung disease (RP-ILD). To date, it has been unknown whether and how anti-MDA5 antibodies and their corresponding antigen, MDA5, are involved in the pathogenesis of RP-ILD. In this study, we elucidated that inflammatory neutrophils infiltrating into the lungs, triggered by various factors such as bacterial or viral infections, produce MDA5. Recognition of the produced MDA5 by anti-MDA5 antibodies may be involved in the pathogenesis of RP-ILD, and we are now conducting further investigations.

研究分野：膠原病学

キーワード：MDA5 皮膚筋炎 間質性肺炎 好中球

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚筋炎は炎症性の筋症状と皮膚症状を特徴とする自己免疫疾患で、**Melanoma differential gene 5 (MDA5)**に対する特異的自己抗体が関連した、急速進行性の間質性肺疾患 (**RP-ILD**) を高頻度に合併する。この自己抗体の対応抗原である **MDA5** は、**Retinoic acid-inducible gene-1** ファミリーとして細胞質に発現し、ピコルナウイルスなどに由来する核酸を認識するセンサーである。ウイルス感染と自己免疫疾患の発症を関連づけるものとして興味深いのが、**RP-ILD** における **MDA5** の発現様式や病的意義については解明されておらず、細胞内に存在する **MDA5** に対する自己抗体がどのようにして **RP-ILD** の発症に関与しているのかについては不明である。**RP-ILD** は治療抵抗性で予後も不良であるため、病態解明により特異的な治療法や **RP-ILD** の発症を予防するような方策の開発が急務である。

ここで申請者は、**RP-ILD** が急性肺傷害と類似した病理組織学所見を示すことに着目した。急性肺傷害ないし **acute respiratory distress syndrome (ARDS)** は、ウイルスのみならず細菌感染や、胃液の誤嚥、薬剤などさまざまな要因による組織傷害に対する宿主の過剰な免疫応答を本態とし、好中球が主体となった急性炎症とそれに引き続く線維化で特徴づけられる。好中球は細胞質に存在する **MDA5** を細胞膜上にも発現しうることで、さらに炎症環境下で活性化すると、細胞質内の抗菌物質や **DNA** を好中球細胞外トラップ (**neutrophil extracellular traps; NETs**) として放出することも知られている。以上より、抗 **MDA5** 抗体陽性皮膚筋炎に伴う **RP-ILD** において、好中球が **MDA5** を抗原として供給し、病態形成にも関与しているのではないかと、という問いを立て、本研究を計画した。

**RP-ILD** の発症における好中球の役割が明らかとなれば、好中球における **MDA5** 発現や **NETs** 形成が新規治療標的となるだけでなく、免疫寛容の破綻 (自己抗体の産生) から発症 (抗原抗体反応の開始) につながるトリガーが明確となることで、ワクチンなどによる感染防御を含めた新たな発症予防戦略の提唱にもつながると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、下記に述べる仮説を検証することで、抗 **MDA5** 抗体陽性皮膚筋炎患者における **RP-ILD** の発症機構を解明することを目的とした。

感染症などをトリガーとして、肺に組織傷害が起こり、好中球が遊走・活性化される。好中球が **MDA5** を産生して細胞表面に提示、ないし細胞外に放出する。ここで抗 **MDA5** 抗体陽性皮膚筋炎の患者では **MDA5** を抗原とした免疫応答が起こり、好中球のさらなる活性化を介して **RP-ILD** の病態が形成される。

## 3. 研究の方法

本研究の仮説を検証するために、以下のステップにより研究を進めた。

### (1) マウス急性肺傷害モデルを用いた **MDA5** 発現細胞の同定

リポポリサッカライド (**LPS**) や **poly I:C**、塩酸などの薬剤を **C57BL/6** マウスに気管内投与することで急性肺傷害を誘導した。コントロールとして生理食塩水を気管内投与したマウスを用いた。投与翌日に気管支肺胞洗浄液 (**BALF**) と肺組織を回収し、定量 **PCR** や免疫組織染色により **MDA5** 発現について評価を行った。

また、磁気ビーズを用いて **BALF** 細胞を好中球とそれ以外とに分離し、同じく定量的 **PCR** で **MDA5** の発現量を比較した。

### (2) 好中球における **MDA5** 発現様式の確認

(1) と同様に、**LPS** を用いてマウスに急性肺傷害を誘導し、**BALF** 中の **MDA5** の発現を **ELISA** で評価した。また、**BALF** 中の好中球における **MDA5** の発現部位について免疫細胞染色を用いて評価した。

### (3) ヒトにおける、肺傷害に起因して **MDA5** を発現する細胞の同定

当初、抗 **MDA5** 陽性皮膚筋炎の患者から診療の際に採取された **BALF** や肺組織を用いて **MDA5** 発現細胞の同定を行うことを計画していたが、新型コロナウイルス感染拡大の情勢下で実施が困難となった。そのため、当施設で保有している既存検体 (**BALF** 細胞のシングルセル **RNA** シークエンスのライブラリデータや組織標本) を用いて、**MDA5** を発現している細胞につ

いての解析を行うこととした。また、培養細胞における **MDA5** の発現部位について免疫細胞染色を用いて評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス急性肺傷害モデルにおける **MDA5** の発現細胞

**LPS**、**poly I:C**、塩酸で急性肺傷害を誘導した 24 時間後のマウスの **BAL** 細胞における **MDA5** (遺伝子名: **IFIH1**) の **RNA** 発現量を、生理食塩水を投与したマウスと比較したところ、**LPS** と **Poly I:C** を投与したマウスにおいてその発現量の増加が確認された。塩酸を投与したマウスにおいては明らかな発現増加は認めなかった (図 1A)。

また、**MDA5** の発現についての免疫組織染色では、**LPS** および **Poly I:C** を投与したマウスの肺組織において、浸潤した炎症細胞、とくに好中球において **MDA5** の発現が亢進していることが確認された。そこで、磁気ビーズを用いて **LPS** 投与マウスの **BAL** 細胞を好中球とそれ以外とに分離し、定量的 **PCR** で **MDA5** の発現量を比較したところ、やはり好中球において **MDA5** の発現がより亢進していることが示された (図 1B)。

**LPS** は細菌の菌体成分、**Poly I:C** はウイルスの **RNA** を模倣する自然免疫活性化のリガンドである。以上の結果は、細菌感染やウイルス感染を契機として肺に浸潤した好中球が **MDA5** を発現することを示していると考えられた。

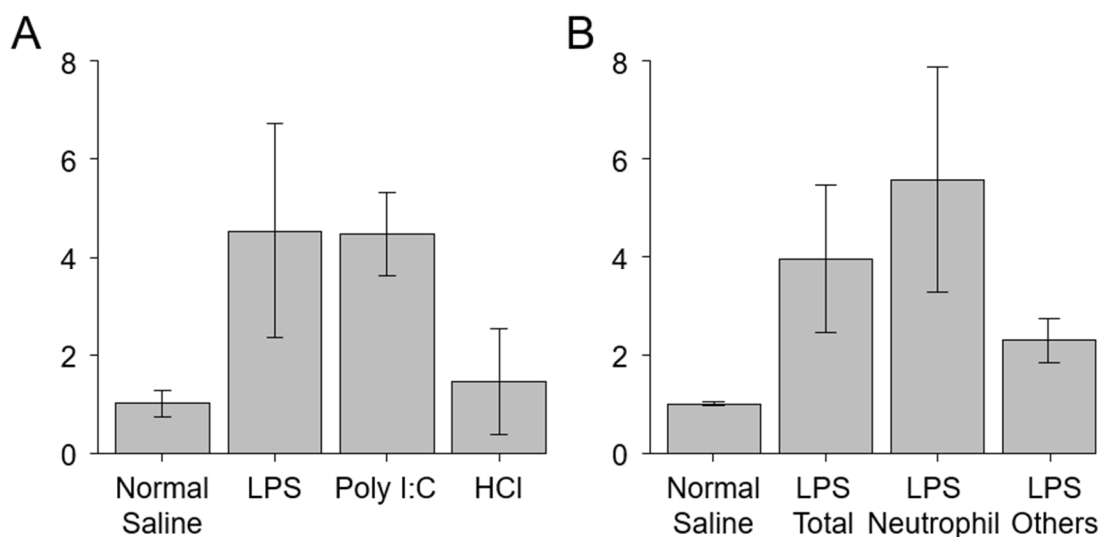


図 1. **MDA5** (遺伝子名 **IFIH1**) についての定量 **PCR**

**A**: 生理食塩水、**LPS**、**poly I:C**、塩酸をマウスに気管内投与し、24 時間後に **BAL** 細胞を回収し、**IFIH1** の **GAPDH** に対する **mRNA** 相対発現を評価した。**B**: **LPS** をマウスに気管内投与し、24 時間後に **BAL** 細胞を回収し、磁気ビーズを用いて好中球とそれ以外とに細胞分離を行った。生理食塩水を投与したマウスの **BAL** 細胞を対照として、**LPS** を投与したマウスの **BAL** 細胞全体 (**Total**)、好中球分画 (**Neutrophil**)、それ以外 (**Others**) における **IFIH1** の **GAPDH** に対する **mRNA** 相対発現を評価した。

##### (2) マウス急性肺傷害における **MDA5** の発現様式

**LPS** や **Poly I:C** で急性肺傷害を誘導した 24 時間後のマウスの **BALF** において、液相中に **MDA5** の発現が確認された。**BALF** 中の好中球における **MDA5** 発現部位について解析を行っているところであるが、肺に浸潤した好中球が **MDA5** を産生し、これが細胞外に漏出している可能性を示唆する結果であり、種々の細胞死に伴う受動的な放出なのか、能動的な分泌によるものなのか、メカニズムについての検討を進めている。

##### (3) ヒトの間質性肺炎における **MDA5** 発現細胞

皮膚筋炎やその他の膠原病に伴う間質性肺疾患を呈する患者由来の **BALF** 中の免疫細胞を用いたシングルセル **RNA** シークエンスの結果、好中球を含む肺に浸潤した炎症細胞における **MDA5** の発現が確認された。現在、ヒト好中球を用いた培養細胞の系で **MDA5** の発現機序の同定を進めている。

以上より、ヒトおよびマウスにおける様々なトリガーによる急性肺傷害において、好中球が

**MDA5** を発現していることが示されたが、抗 **MDA5** 抗体陽性の皮膚筋炎に伴う **RP-ILD** の病態との関わりについてはさらなる検討が必要である。今後、**MDA5** を抗原として免疫することにより抗 **MDA5** 抗体を保有するマウスを作成し、これを用いて **RP-ILD** の自然発症や **LPS**、**Poly I:C** などの気管内投与による誘導の有無について確認を行い、その病態メカニズムについて検証を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaneshita S, Kida T, Yoshioka M, Nishioka K, Raje M, Sakashita A, Hirano A, Sagawa T, Kasahara A, Inoue T, Fujioka K, Nagahara H, Wada M, Kohno M, Strovel JW, Fletcher S, Ashihara E, Kawahito Y	4. 巻 70
2. 論文標題 CG223, a novel BET inhibitor, exerts TGF- 1-mediated antifibrotic effects in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pulmonary Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 102057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pupt.2021.102057.	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 該当する

1. 著者名 Sagawa T, Honda A, Ishikawa R, Miyasaka N, Nagao M, Akaji S, Kida T, Tsujikawa T, Yoshida T, Kawahito Y, Takano H	4. 巻 15(10)
2. 論文標題 Role of necroptosis of alveolar macrophages in acute lung inflammation of mice exposed to titanium dioxide nanoparticles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanotoxicology	6. 最初と最後の頁 1312-1330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/17435390.2021.2022231.	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0件

〔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	藤岡 数記  (Kazuki Fujioka)		
研究協力者	藤井 渉  (Wataru Fujii)		

6. 研究組織（つづき）

	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	河野 正孝  (Kohno Masataka)		
研究協力者	川人 豊  (Kawahito Yutaka)		
研究協力者	小西 英一  (Konishi Eiichi)		

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