

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08478

研究課題名(和文)自己免疫性筋炎に合併する重症間質性肺炎の新規治療法の開発戦略

研究課題名(英文)Strategy for the Development of a Novel Treatment for Severe Interstitial Pneumonia Complicated by Autoimmune Myositis

研究代表者

倉沢 和宏 (Kurasawa, Kazuhiro)

獨協医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：30282479

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)：膠原病に伴う肺疾患は生命予後という点から見て最も重要な合併症である。特に抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎患者で合併する間質性肺炎(ILD)は急速進行性で予後不良であり、治療法は確立していない。また、複数の炎症性サイトカインの産生亢進とマクロファージ活性化が関与する可能性が報告されているが、病態は十分に解明されていない。我々は二本鎖RNA編集酵素であるADAR1のマクロファージ特異的欠損マウスの急速進行性の過剰炎症性ILDモデルを確立した。本研究により、マクロファージにおけるADAR1の機能不全はMDA5の機能亢進を誘導し、過剰免疫・炎症反応により重症肺炎の進展に深く関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は自己免疫疾患で発症する間質性肺炎の急速に難治化する過程に誘導されるサイトカインストームにおいて、特に重要とされるマクロファージの活性化に注目し、ヒト臨床研究と遺伝子改変マウスを利用した動物実験を行った。その結果、過剰炎症性肺炎の難治性病態におけるマクロファージのADAR1機能の異常に病的意義が見出された。この点において学術的意義があると思われる。また、間質性肺炎の難治化メカニズムの解明を目的とした本研究は、予後が極めて不良の抗MDA5抗体陽性間質性肺炎の病態の解明および、その根治的治療の開発に向けた基盤的研究である点において社会的意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary disease associated with collagen disease is the most important complication in terms of prognosis. In particular, interstitial pneumonia (ILD), a complication of anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis, is a rapidly progressive disease with a poor prognosis, and no treatment has been established. Although it has been reported that increased production of multiple inflammatory cytokines and macrophage activation may be involved in ILD, the pathogenesis is not fully understood. We established a model of rapidly progressive hyperinflammatory ILD in mice with macrophage-specific deficiency of ADAR1, a double-stranded RNA editing enzyme. This study revealed that dysfunction of ADAR1 in macrophages induces hyperfunction of MDA5, which is deeply involved in the progression of severe lung inflammation due to hyperimmune and inflammatory responses.

研究分野：Rheumatology

キーワード：interstitial pneumonia

## 様式 C-19, F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚筋炎・多発筋炎は横紋筋の炎症を特徴とする全身性自己免疫疾患で、多臓器障害に伴い多彩な臨床症状を呈する。筋炎は異なる自己抗体の種類によりサブタイプに分類され、その病態に様々なサイトカインが重要な役割を果たすと考えられている。特に I 型インターフェロン (IFN) の産生亢進が報告されているが、自己抗体とサイトカインプロファイルとの関連性や病理的意義については十分に解明されていない。抗 MDA5 抗体自体の病態形成における意義は不明であるが、抗 MDA5 抗体陽性筋炎で合併する急速進行性間質性肺炎 (ILD) の病態の主体はマクロファージの異常活性化とサイトカインストームと考えられている。

(2) ウイルスセンサーである MDA5 は樹状細胞やマクロファージで発現し、外来性 2 本鎖 RNA を認識してウイルス排除のために自然免疫応答として I 型 IFN などの産生を誘導する。この過程で 2 本鎖 RNA 編集酵素 Adenosine Deaminases Acting on RNA-1 (ADAR1) は、自己の細胞内 RNA を保護するために塩基編集をして MDA5 による認識を回避することが示唆されていることから (Deshan et al, Cell Mol Immunol 2015), ADAR1 は RNA ウイルス感染免疫における自己傷害の防衛に極めて重要であると考えられている。一方、樹状細胞やマクロファージにおける ADAR1 の機能不全は MDA5 の機能亢進を誘導し、さらに獲得免疫機構と連動して過剰免疫反応により膠原病など自己免疫疾患の発症を誘発する可能性があることが既に示唆されている (Toyabe et al, J Autoimmun 2004)。我々は本研究開始以前に、マクロファージ特異的 ADAR1 コンディショナルノックアウト (cKO) マウス (Lys-ADAR1-cKO) の気管支喘息モデルを解析したところ、アレルギー性モデルにも拘わらず、急速進行性 ILD を観察したことから、マクロファージの ADAR1 の機能異常が重症肺炎に深く関与することが考えられた。そこで、何らかの誘因で引き起こされる ADAR1-MDA5 機能軸の異常がマクロファージの過剰活性化を誘導し、急速進行性 ILD の難治化に関与する病態モデルを想定した。また、Lys-ADAR1-cKO マウスをサイトカインストームモデルとして有用であると考えた。

(3) 複数の研究グループによって抗 MDA5 抗体陽性 ILD 患者における血清サイトカインの研究が報告されているが、その病態は十分理解されていない。そこで、本研究では抗 MDA5 抗体陽性 ILD の重症化病態についてサイトカインネットワークの意義を問うために Lys-ADAR1-cKO マウスの解析と抗 MDA5 抗体陽性 ILD 患者の検体を用いた臨床研究の複合解析を行う研究を着想した。

### 2. 研究の目的

我々は、各 ILD 患者について血液に加え BALF 中のサイトカインについて多変量解析を行い病態の研究を進めてきた。また Lys-ADAR1-cKO マウスの気管支喘息モデルで、自然免疫系の増強と血中のフェリチンの増加 (マクロファージ活性化とサイトカインストームと相関) を伴った急速進行性 ILD を認めた。そこで、本研究は自己免疫疾患で発症する ILD の急速に難治化する過程におけるサイトカインストームに注目し、今までのヒトおよび動物実験で蓄積されたデータを基に、さらに研究を推進して抗 MDA5 抗体陽性筋炎患者の過剰免疫性肺炎の難治性病態に対するマクロファージにおける ADAR1 の機能異常の病理的意義を解明する。

### 3. 研究の方法

Lys-ADAR1-cKO マウス (C57BL/6) における劇症型肺炎の発症に対する役割を明らかにするた

めに動物モデルとして、今まで継続して研究してきた気管支喘息モデル（抗原誘導性気道炎症モデル）に加え、自己免疫疾患モデルを利用して以下の解析を行う。今回の成果報告書には先行研究として解析が進んだ喘息モデルの研究結果を主に記述する。

(1) OVA/Alum の腹腔内感作後に OVA 抗原の経気道的投与により喘息モデルを作製した。また LR7 刺激薬剤であるイミキモドを経皮的に週 3 回、6 週間反復投与後にレシキモド（イミキモドの構造類縁化合物）と PolyI:C を経気道的に投与して自己免疫疾患肺炎モデルを作製した。

(2) 肺組織の病理組織学的解析およびコラゲナーゼ処理による肺由来の分散細胞（マクロファージサブセット, T 細胞サブセット, B 細胞, NK 細胞, 自然リンパ球サブセット, および顆粒球）について FACS 法解析を行った。また BALF 中サイトカイン・ケモカインを ELISA 法で測定した。

(3) 肺炎モデルの肺組織由来 mRNA および肺を酵素処理した後にセルソーターで分取したマクロファージについて遺伝子発現の動態を網羅的に解析するために RNA-seq 解析を行った。

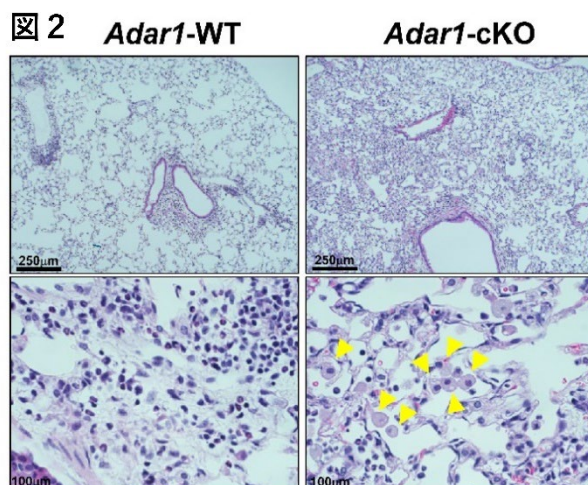
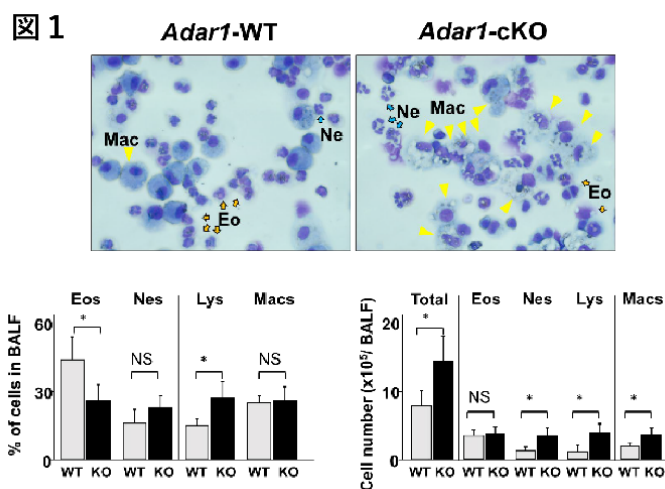
(4) マクロファージ活性化が病態形成に重要とされる MDA5 抗体陽性 ILD (MDA5) (39 例) とマクロファージ活性化症候群 (MAS) を合併した SLE (9 例) や AOSD (9 例) におけるマクロファージ活性化機序の相違を検討するために治療開始前の血清中サイトカインを測定し、そのプロファイル・パターンおよびフェリチンとの関連を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 気管支喘息マウスモデルにおける肺気道炎症に対する解析

Lys-ADAR1-cKO マウス (KO) および野生型 (WT) マウスの OVA 抗原吸入暴露後の BALF の各細胞分画は、WT マウスと比較して KO マウスでリンパ球分画の出現頻度が約 2 倍以上有意に高く、総細胞数はリンパ球, 好中球, マクロファージ数の有意な増加を認め

た (図 1 下)。また、検鏡下の観察で KO マウスのマクロファージの形態は WT マウスと比較して空胞形成を伴う膨大化が観察された (図 1 上)。肺病理組織学的解析では WT マウスにおいて、気道周辺中心に細胞浸潤を認めたのに対し、KO マウスでは驚くことに、気道や血管周囲および肺実質において広範囲に著しい細胞浸潤を伴う肺出血病変を認めた (図 2)。また、WT マウスと比べて KO マウスの肺に対する免疫



組織化学的解析で CD64 陽性細胞（マクロファージ）の増加を認めた（図3）。

（2）気管支喘息マウスモデルにおけるサイトカイン・ケモカインについて肺組織中遺伝子発現および BALF 中蛋白レベルの解析

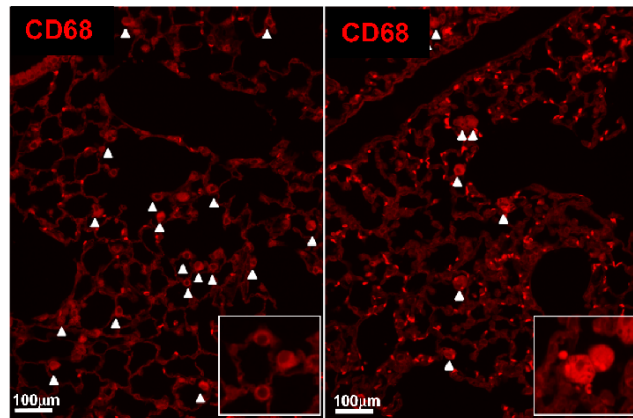
KO および WT マウスの OVA 抗原吸入暴露後の BALF 中の代表的サイトカインについて測定した結果，WT マウスと比べて KO マウスにおいて IL-4（2型サイトカイン）と IL-17（3型サイトカイン）の有意な増加を認めた．一方，代表的な上皮由来2型炎症誘導である IL-25，IL-33，TSLP の BALF 中レベルに有意な差を認めなかった（図4）．さらに，KO マウスの肺組織中の各サイトカインやケモカイン遺伝子の発現増加は多彩で，1型サイトカイン（*Ifng*），2型サイトカイン（*Il4*，*Il5*），3型サイトカイン（*Il17*），上皮由来サイトカイン（*Il25*，*Il33*，*Tslp*），炎症性サイトカイン（*Tnfa*，*Il1a*），炎症性ケモカイン（*Ccl2*，*Ccl3*，*Cxcl2*，*Cxcl3*）の遺伝子の発現が有意な増加を認めた（図5）．

（3）気管支喘息マウスモデルにおける肺組織中の免疫系細胞の解析

OVA 抗原吸入暴露後の肺組織中の造血系細胞総数は WT マウスに対して KO マウスで約3倍以上の有意な増加を認めた．肺組織由来

のマクロファージ（組織滞房型肺泡マクロファージ：TR-AM，単球由来肺泡マクロファージ：Mo-AM，間質マクロファージ：IM，単球：Mo）の解析では，WT マウスと比較して KO マウスで TR-AM の肺マクロファージ・単球の総数が約9倍以上増加し，TR-AM，MO-AM，IM，Mo いずれも有意に増加した（図6）．特に TR-AM の出現頻度が有意に高かった（図7）．他に KO マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞，CD8<sup>+</sup>T 細胞それぞれの総数および活性化メモリー細胞数や好酸球および好中球数も，WT マウスと比べて有意に増加した．

図3 Adar1-WT Adar1-cKO



CD68:Macrophage marker

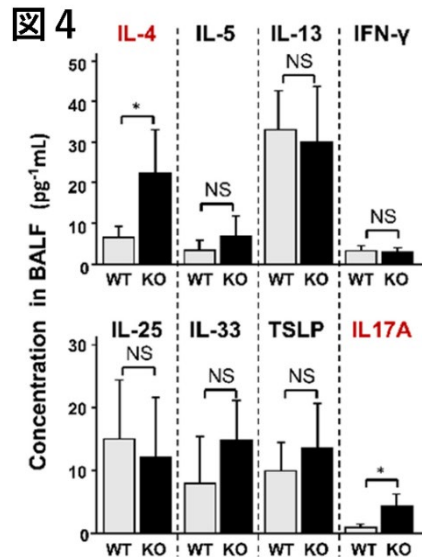
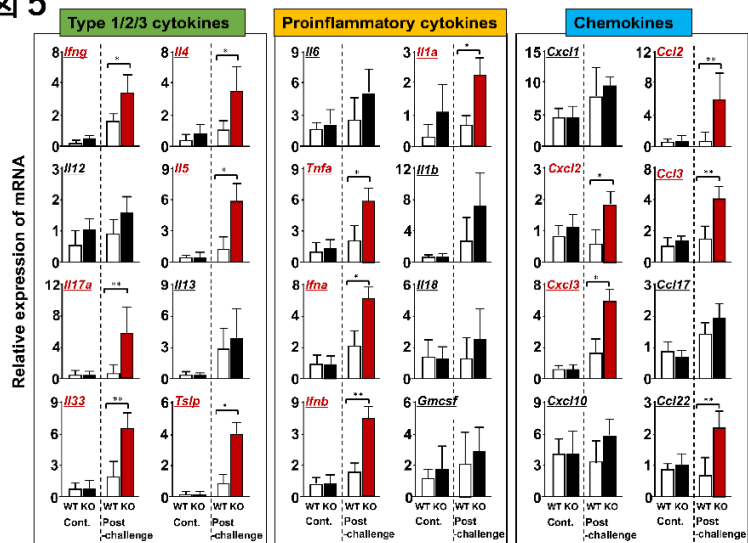


図5



(4) 肺マクロファージの遺伝子発現に対する RNA-seq 解析

OVA 抗原吸入暴露後の肺マクロファージに対する解析の結果, GGO 解析において, WT マウスと比較して KO マウスで多くの炎症性ケモカインや IFN $\alpha/\beta$  (図 8) を含むサイトカイン遺伝子群の増加および IFN 関連遺伝子群の増加を認めたことから ADAR1 欠損により MDA5-IFN 軸の亢進が推測された。

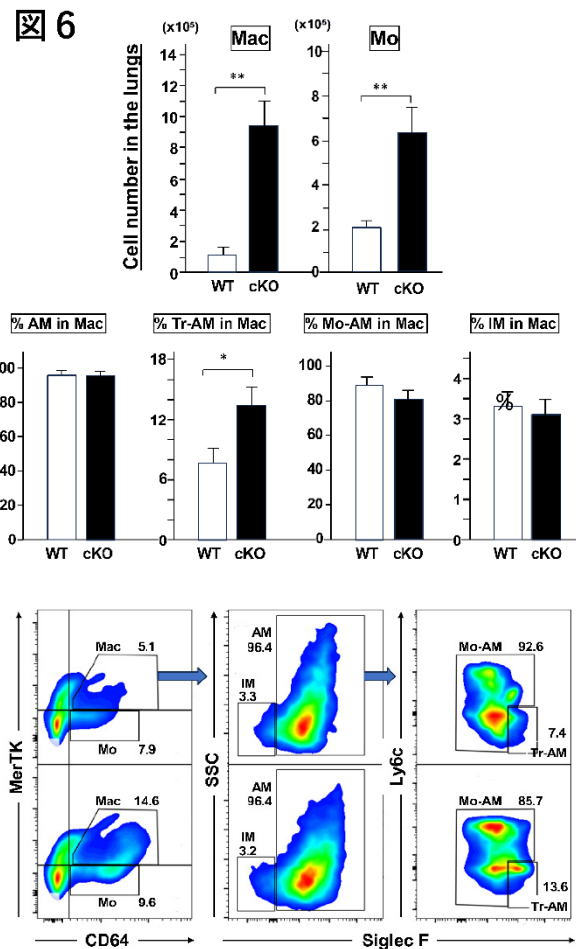
(5) 自己免疫疾患モデルの解析

喘息モデルと同様に自己免疫疾患モデルにおいても KO マウスにおいてマクロファージの増加や活性化および活性化 T リンパ球や好中球の増加を伴 ILD の増悪を認めており, 本研究期間後も解析を継続していく予定である。

図 7

Lys-Adar-WT

Lys-Adar-cKO

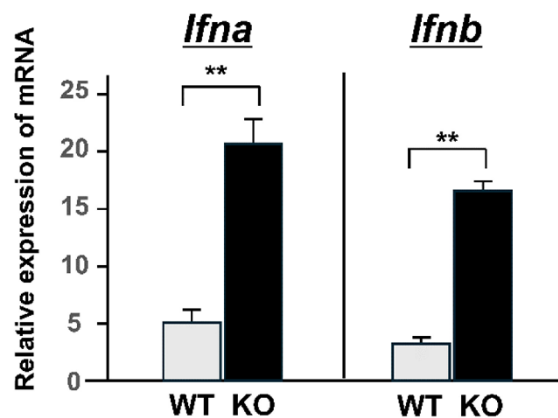


AM :Alveolar macrophage IM: Interstitial macrophage Mac: Macrophage Mo: Monocyte Mo-AM: Monocyte-derived AM Tr-AM: Tissue-resident AM

(6) MDA5 と MAS 症例のサイトカインプロファイルの解析

MDA5, AOSD, SLE 共に健常人と比べ IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF- $\alpha$  が上昇していた. MDA5 では IP-10 が他疾患に比べ上昇していた. SLE, 特に MAS では IFN- $\alpha$  が上昇していた. AOSD では IL-18, フェリチンが他疾患より著明に上昇していた. クラスタ解析では AOSD と SLE/MDA5 に分類され, 後者は SLE と MDA5 に分類された. 主成分分析においても MDA5 は SLE と類似し, AOSD とは異なるパターンを示した. フェリチンとサイトカインの相関は AOSD では認められなかったが, SLE では IFN- $\alpha$ , IP-10 が相関していた. MDA5 では, フェリチンは IFN- $\alpha$ , IP-10 の他に IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF- $\alpha$  と相関していた。

図 8 Alveolar macrophages



以上の本研究の成果より, マクロファージにおける ADAR1 の機能不全は MDA5 の機能亢進を誘導し, 過剰免疫・炎症反応により重症肺炎に深く関与することが考えられた. 今後も更なる研究を推進し, 自己免疫疾患で発症する ILD の急速に難治化するメカニズム, 特に抗 MDA5 抗体陽性筋炎患者の過剰炎症性肺炎の難治性病態に対するマクロファージにおける ADAR1 の機能異常の病理的意義を明らかにし, ヒト重症 ILD の発症メカニズムを明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Misaki Kenta et al.	4. 巻 34
2. 論文標題 Associations of disease duration and anti-citrullinated peptide antibody status with the effectiveness of abatacept in biologic-naive patients with rheumatoid arthritis: Post hoc analysis of a multicentre, real-world observational study in Japan (ORIGAMI)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 297 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mr/road045	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 Furuta Shunsuke, Nakagomi Daiki, Kobayashi Yoshihisa, Hiraguri Masaki, Sugiyama Takao, Amano Koichi, Umibe Takeshi, Kono Hajime, Kurasawa Kazuhiro, Kita Yasuhiko, Matsumura Ryutaro, Kaneko Yuko, Ninagawa Keita, Hiromura Keiju, Kagami Shin-ichiro, Inaba Yosuke, Hanaoka Hideki, Ikeda Kei, Nakajima Hiroshi	4. 巻 83
2. 論文標題 Reduced-dose versus high-dose glucocorticoids added to rituximab on remission induction in ANCA-associated vasculitis: predefined 2-year follow-up study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 96 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/ard-2023-224343	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 Ikeda Kei, Maezawa Reika, Kurasawa Kazuhiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Subclinical myositis in antisynthetase syndrome Does it matter?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 2127 ~ 2129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.14850	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 Hiyama Tomoka, Kurasawa Kazuhiro, Hasegawa Anna, Miyao Tomoyuki, Tanaka Ayae, Arai Satoko, Arima Masafumi, Maezawa Reika	4. 巻 23
2. 論文標題 Differences and similarities in cytokine profiles of macrophage activation syndrome in systemic lupus erythematosus and adult-onset Still's disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 3407 ~ 3416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10238-023-00988-4	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 Tanaka Ayae, Kurasawa Kazuhiro, Soda Sayo, Takamura Yuta, Miyao Tomoyuki, Hasegawa Anna, Hiyama Tomoka, Yamazaki Ryutarō, Arai Satoko, Owada Takayoshi, Arima Masafumi, Arakawa Hiroaki, Maezawa Reika	4. 巻 61
2. 論文標題 Changing patterns of pulmonary abnormalities in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 27 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2022.09.002	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 Sugiyama Takahiro, Furuta Shunsuke, Hiraguri Masaki, Ikeda Kei, Inaba Yosuke, Kagami Shin-ichiro, Kita Yasuhiko, Kobayashi Kei, Kobayashi Yoshihisa, Kurasawa Kazuhiro, Nakagomi Daiki, Nawata Yasushi, Kawasaki Yohei, Shiko Yuki, Sugiyama Takao, Nakajima Hiroshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Latent class analysis of 216 patients with adult-onset Still's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-021-02708-3	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 Hiyama Tomoka, Kurasawa Kazuhiro, Hasegawa Anna, Miyao Tomoyuki, Tanaka Ayae, Arai Satoko, Arima Masafumi, Maezawa Reika	4. 巻 23
2. 論文標題 Differences and similarities in cytokine profiles of macrophage activation syndrome in systemic lupus erythematosus and adult-onset Still's disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 3407 ~ 3416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10238-023-00988-4	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 Tanaka Ayae, Kurasawa Kazuhiro, Soda Sayo, Takamura Yuta, Miyao Tomoyuki, Hasegawa Anna, Hiyama Tomoka, Yamazaki Ryutarō, Arai Satoko, Owada Takayoshi, Arima Masafumi, Arakawa Hiroaki, Maezawa Reika	4. 巻 61
2. 論文標題 Changing patterns of pulmonary abnormalities in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 27 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2022.09.002	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 田中彩絵
2. 発表標題 Pathophysiology of a mouse model of fulminant pneumonitis with increased anti-MDA5 antibodies.
3. 学会等名 日本免疫学会（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田中彩絵
2. 発表標題 二本鎖RNA編集酵素ADAR1のマクロファージ特異的欠損マウスは抗MDA5抗体陽性の劇症型肺炎を 発症する
3. 学会等名 日本リウマチ学会（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 檜山知佳
2. 発表標題 抗MDA5抗体陽性間質性肺炎，SLE，成人型Still病合併におけるマクロファージ活性化機序の相違：サイトカインプロファイルの解析
3. 学会等名 日本リウマチ学会（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小松紗良
2. 発表標題 多発性筋炎・皮膚筋炎2:抗MDA5抗体陽性症例の病態 抗MDA5抗体陽性筋炎患者における抗ADAR抗体陽性例の臨床像とサイトカインプロファイルの検討
3. 学会等名 日本リウマチ学会（国際学会）
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 田中彩絵
2. 発表標題 ADAR1 in bronchial epithelial cells is involved in the airway mucosal immune system in a mouse model of asthma
3. 学会等名 日本免疫学会（国際学会）
4. 発表年 2022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
研究分担者	有馬 雅史  (Arima Masafumi)  (00202763)	獨協医科大学・医学部・教授   (32203)	
研究分担者	大和田 高義  (Owada Takayoshi)  (30456016)	獨協医科大学・医学部・講師   (32203)	
研究分担者	田中 彩絵  (Tanaka Ayae)  (30743067)	獨協医科大学・医学部・助教   (32203)	

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
---------	---------