

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号： 14301
 研究種目： 挑戦的萌芽研究
 研究期間： 2010～2011
 課題番号： 22659185
 研究課題名(和文) 筋症状のない皮膚筋炎における新規抗 IFIH1/MDA5 抗体の臨床的・病因的意義
 研究課題名(英文) Clinical and pathophysiological significance of novel identified anti-IFIH1/MDA5 autoantibody in amyopathic dermatomyositis
 研究代表者
 三森 経世 (MIMORI TSUNEYO)
 京都大学・医学研究科・教授
 研究者番号： 10157589

研究成果の概要(和文)： 生命予後不良な急性間質性肺炎を合併する無筋症性皮膚筋炎患者に特異的に検出される抗 CADM-140 抗体の対応抗原を分析し、ウイルス RNA の細胞質内受容体である IFIH1/MDA5 であることを突き止めた。同抗体陽性患者は血清中フェリチンが高値を示し、IL-6、IL-10、IL-18、M-CSF が高値であり、マクロファージ活性化状態にあることが示唆された。同抗体陽性患者に病初期から強力な免疫抑制薬併用療法（ステロイド大量＋シクロスポリン＋シクロホスファミドパルス療法）を導入することによって従来よりも生命予後が改善する可能性が得られた。

研究成果の概要(英文)： A disease-specific autoantibody, termed anti-CADM-140 antibody, is found in patients with amyopathic dermatomyositis accompanied with lethal acute interstitial pneumonia. We identified that the target autoantigen recognized by anti-CADM-140 antibody was IFIH1/MDA5, a viral RNA receptor in cytoplasm. The patients with anti-CADM-140 antibody revealed higher level of serum ferritin as well as IL-6, IL-10, IL-18 and M-CSF than antibody-negative dermatomyositis patients, suggesting the macrophage activating state. The intensive immunosuppressive therapy (high-dose glucocorticoids, cyclosporine and intravenous cyclophosphamide pulse) appeared to improve a life prognosis of antibody-positive patients when compared with the conventional step-up therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	
2011 年度	1,100,000	330,000	
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード： IFIH1、MDA5、CADM-140、自己抗体、皮膚筋炎、間質性肺炎、サイトカイン、HLA

1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎・皮膚筋炎 (PM/DM) は、骨格筋の炎症とともに、皮膚、肺、心臓、関節などの全身臓器障害を併発する全身性自己免疫疾患である。PM/DM 患者血清中には疾患特異的な種々の自己抗体が検出されることが特徴で、筋炎の病型分類にきわめて有用

である。たとえば抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体は間質性肺炎合併率が極めて高く、抗 SRP 抗体は難治性・重症筋炎との関連がよく知られている。「筋症状のない」皮膚筋炎 (amyopathic dermatomyositis (ADM)) は、DM に特徴的な皮疹を認めるにもかかわらず筋症状や筋原性酵素上昇を認

めない PM/DM の亜型であるが、わが国では致死的な急速進行性間質性肺炎を合併しやすく生命予後が悪いことが報告されてきた。これまで、ADM には筋炎特異的自己抗体が検出されず、むしろ自己抗体陰性であることが特徴と考えられていたが、慶応大佐藤らは ADM 患者血清に未知の 140kD 蛋白を免疫沈降する新たな特異的自己抗体を見出し、抗 CADM-140 抗体と名付けて報告した (Sato S: Arthritis Rheum 2005、研究代表者は共著者)。この抗体は ^{35}S -メチオニン標識培養細胞上清を用いた蛋白免疫沈降法で 140kDa 蛋白を確認することによってのみ検出することが可能で、同抗体陽性例は致死的な急性間質性肺炎の併発率が高いことを確認している。

我々はこの抗 CADM-140 抗体が認識する対応抗原の同定に成功し、自然免疫に関与してある種の RNA ウイルス感染を感知しインターフェロン産生をつかさどる IFIH1 (Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1) または MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) として知られる細胞内分子であることをつきとめた (Nakashima R: Rheumatology 2010)。この分子は肺マクロファージの活性化にも関与することが報告されており、ADM の急性間質性肺炎の発症メカニズムとの関連性からきわめて興味深い。抗 CADM-140 抗体とその対応抗原の発見は、生命予後の悪い ADM 間質性肺炎の病因・病態解明と新たな治療戦略への可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究は、ADM で見出される抗 CADM-140 抗体およびその対応抗原の ADM と急性型間質性肺炎における臨床的意義と病態形成における役割を追究するため、1) 抗 CADM-140 抗体が認識する対応抗原の同定、2) リコンビナント IFIH1/MDA5 を用いた抗 CADM-140 抗体検出法の開発、3) 同抗体陽性 ADM 患者の血清サイトカインプロファイル、4) 同抗体陽性患者の免疫遺伝学的検討、5) 同抗体陽性患者の予後因子と治療の効果の検討を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗 CADM-140 抗体が認識する対応抗原の同定

抗 CADM-140 抗体陽性患者血清より IgG を精製し、CNBr 活性化セファロース 4B にカップリングさせてアフィニティカラムを作成した。ここに HeLa 細胞の細胞質抽出物を通して反応させ、結合した成分を 3.0M-MgCl₂ 溶液で溶出した。この溶出物を透析後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で泳動し、患者血清が反応する 140kDa 蛋白をゲルから切り出して、トリプシンで分解した。この産

物を MALDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) を用いたペプチドマスマフィンガープリンティング法 (Ultraflex TOF/TOF、Bruker Daltonics 社) で分析し、NCBI データベースに登録された蛋白の理論的ペプチド質量分析の結果と比較して蛋白の種類を同定した。

(2) 抗 MDA5/IFIH1 抗体陽性患者のサイトカインプロファイル

^{35}S メチオニン標識 HeLa 細胞を用いた免疫沈降法により抗 MDA5 抗体を同定した。無治療初診の抗 MDA5 抗体(+)患者 24 例と抗 MDA5 抗体(-) DM 患者 23 例の血清サイトカインを測定し比較した。IL-6 (e-Bioscience 社)、IL-18 (MBL)、IL-22、IFN- γ 、M-CSF (R&D Systems)、IFN- β (PBL) は ELISA を用いて、IL-12p40、IL-10、IL-18、TNF- α は Cytometric Bead Array (Becton Dickinson 社) を用いて測定した。

(3) 抗 MDA5/IFIH1 抗体陽性患者の免疫遺伝学的検討

抗 MDA5/IFIH1 抗体陽性 20 例の末梢白血球より DNA を抽出し、HLA-クラス I 抗原遺伝子 (A および B) とクラス II 抗原遺伝子 (DRB1、DQB1、DPB1) を測定した。結果は日本人健常者の HLA データベースと比較した。

(4) 抗 MDA5/IFIH1 抗体陽性患者の予後因子と治療の効果

抗 MDA5 抗体(+)例を生存例(n=11)と死亡例(n=13)に層別化し、臨床的背景・血清フェリチン値を比較した。

抗 MDA5 抗体陽性例に対して、初期から下記の 3 剤併用強力免疫抑制療法 (プレドニゾロン(PSL)大量、シクロスポリン(CyA)、シクロホスファミド大量静注療法(IVCY)) を投与し、生存率の改善と病勢コントロールを検討した。それ以前の従来治療法 (PSL 大量で開始し、病状増悪後に免疫抑制薬を追加) を施行した患者をヒストリカルコントロールとして比較した。

治療プロトコール: PSL は 1mg/kg/day で開始し 4 週間継続後、約 2 週毎に漸減する。CyA は 3mg/kg で開始し、トラフ 100~200ng/mL、C2 (内服後 2 時間値) 700~1000ng/mL を目標にする。IVCY は最初の 4 回・6 回までは 2 週毎、以後は 4 週毎に計 10~15 回続ける。初回投与量 500mg/m² とし、10~14 日後の白血球減少が 2000~3000/ μL もしくは白血球数が半減する程度まで投与量を増量する。

4. 研究成果

(1) 抗 CADM-140 抗体が認識する対応抗原の同定

アフィニティカラムで部分生成した蛋白 (3M-MgCl₂ 溶出分画) を SDS-PAGE 後に

ウェスタンブロットで解析すると、抗 CADM-140 抗体陽性血清は全例が 140kDa 付近のバンドを認識した (図 1)。このバンドをゲルから切り出し、ペプチドマスマフィンガープリンティング法で解析したところ、IFIH1 (MDA5) と一致した (図 2)。

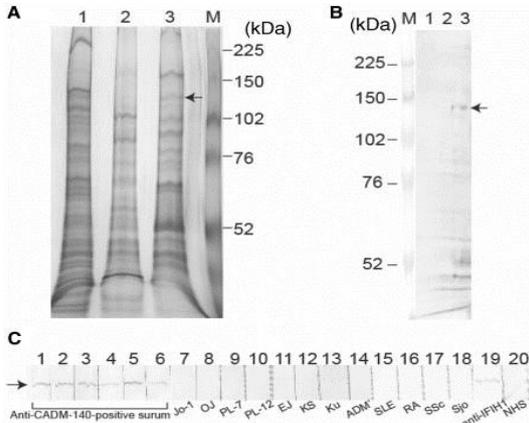


図 1. 抗 CADM-140 抗体の対応抗原分析

```

1 MSNGYSTDEN FRYLISCFRA EVKMYIQVEP VLDYLTFLPA EVKEQIQRTV
51 ATSGNMQAVE LLLSTLEKGV WHLGWTFREVALRRRTGSPLAARYMNPFLT
101 DLSPSPSFENA HDEYLLQLNL LQPTLVDKLL VRDVLDKGME EELLTIEDRN
151 RIAAAENNGN ESGVRELLKR IVQKENWFSA FLNVLRLQGN NELVQLTGS
201 DGSSENAEIE NLSQVDGPQV EEQLLSTTVQ FNLEKEVWGM ENNSSESSFA
251 DSSVVSSEDT SLAEGSVSCL DESLGHNSNM GSDSGTMGSD SDEENVAARA
301 SPFELQLRP YQMEVAQPAL ECKNIICLP TGSGKTRVAV YIAKDHLDKK
351 KKASEPGKVI VLNKVVLYE QLRKEFPF LKWKYRVIGL SGDTQLKISF
401 PEVVKSCDH ISTAQILENS LLLENGEDA GWQLSDFSLI HDECHHTNK
451 EAVYNNMRHYLMQKLNNE LKKNKVPV LPQLGLTAS PGVCGATHQA
501 KAEEHILKLC ANLDAFTIK VKENLDQLKN QIQEPCKHFA IADATREDPF
551 KEKLEIMTR IQTYCQMSPM SDPQTQPYEQ WAIQMEKKA AKEGNKREVC
601 AEHLRKYNEALQINDTIRMI DAYTHLETIFY NEEKDKKFAVIDDSDEGGD
651 DEYCDGDEDE DDLKPLKLD ETRDFMLTF FENNKMLKRL AENPEYENEK
701 LTKLRNTIME QYTRTEESAR GIPTKTRQS AYALSQWITE NEKFAEYGVK
751 AHHLIGAGHS SEPKPMTQNE QKEVSKPRT OKINLLIAT VAEGLDIKE
801 CNIVIRYGLV TNEIAMVQAR GRARADESTY VLVAHSGSGV IEHETVNDPR
851 EKMMYKAIHC VQNMKPEEYA HKILELQMQS IMEKKMKTKR NIAKHYNKNP
901 SLITFLQKNG SVLACSGEDI HVIEKMHVNV MTPPEKELYI VRENKALQKK
951 CADVQNGEI IKCGQAWGT MMVHKGLDLP CLKIRNFVVV FKNNSHKQY
1001 KKWVLPITF PNLDYSECL FSDSD

```

Sequence Coverage: 11%

図 2. 対応抗原である IFIH1/MDA5 の同定

この対応抗原が真に IFIH1/MDA5 であることは、抗ヒト IFIH1 抗体 (Life Span Biosciences 社) との反応 (図 1B)、および IFIH1 cDNA より転写・翻訳させたポリペプチドが抗 CADM-140 抗体陽性患者血清により特異的に免疫沈降することから証明された。

(2) 抗 MDA5/IFIH1 抗体陽性患者のサイトカインプロファイル

抗 MDA5 抗体陽性例では抗体陰性 DM 例に比べて血清 IL-6、IL-18、M-CSF、IL-10 値が有意に高値であり、血清 IL-12(p40)、IL-22 値は有意に低値であった (図 3)。IFN- γ 、IFN- β 、TNF- α 、IL-1 β に関しては血清の濃度に有意差を認めなかった。

(3) 抗 MDA5/IFIH1 抗体陽性患者の免疫遺伝学的検討

抗 MDA5/IFIH1 抗体陽性例は、DRB1*1302 (15.0%)、DQB1*604 (12.5%)、

DPB1*401 (12.5%) の頻度が健常人より有意に高いことが示された (5.5%、5.0%、5.0%)。また DRB1*13:02 - DQB1*06:04 - DPB1*04:01 のハプロタイプ頻度は抗体陽性患者で健常人と比して有意に高かった (OR=3.79、p=0.0030)。

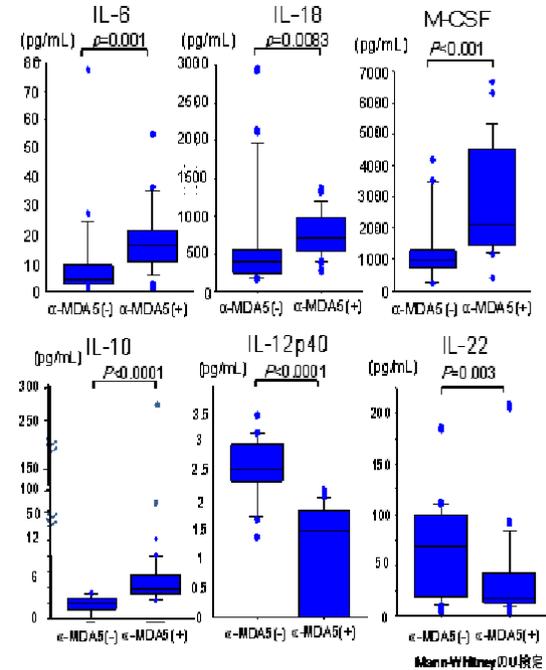


図 3. 血清サイトカイン濃度の比較

(4) 抗 MDA5/IFIH1 抗体陽性患者の予後因子と治療の効果

抗 MDA5 抗体陽性例において生存例は死亡例に比べて有意に若く、DM 特異的皮疹の発症から間質性肺炎診断までの期間が有意に長かった。治療前のフェリチン値には有意差は認められなかった。呼吸不全をきたした (酸素投与を必要とした) 例における生存率は極めて低く、14 例中 2 例 (18%) しか生存できなかった。間質性肺炎の診断から治療開始までの期間は生存群で短い傾向にあったが有意差はなかった (表 1)。

表 1. 抗 MDA5/IFIH1 抗体陽性患者の生存例と死亡例の比較

	抗 MDA5 陽性 症例		p 値
	生存 n=11	死亡 n=13	
治療前血清フェリチン値 (ng/mL)	865±610	914±788	p=0.96*
IVCY 投与前の血清フェリチン値 (ng/mL)	993±748	3394±5507	p=0.42*
年齢	49.6±9.7	58.7±8.1	p<0.05*
DM 皮疹発症から IP 診断までの期間 (月)	3.7±2.9	1.2±1.1	p<0.01*
IP 診断から治療開始までの期間 (月)	0.3±0.4	0.7±0.7	p=0.09*
呼吸不全 (酸素投与) (n(%))	2 (18%)	12 (92%)	p<0.01**

* Mann-whitney's U test ** Fisher's exact test

3 剤併用免疫抑制療法を最初から適用した例の 6 ヶ月生存率は 57.1%であり、ヒストリカルコントロールである従来の治療法での 28.6%と比較すると、前者で生存率が高い傾向にあった (図 4)。

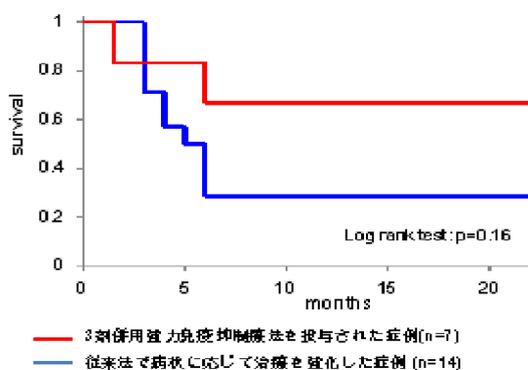


図 4. 抗 MDA5/IFIH1 抗体陽性患者の治療による生命予後の比較

抗 MDA5 抗体陽性例の疾患活動性指標としてフェリチンに着目すると、疾患活動期においてフェリチンは増加し続ける傾向にあったが、IVCY だけがその投与後にフェリチンを減少させており、フェリチンの持続的上昇を抑制する効果があると考えられた。

考 察

これまで特異的自己抗体が陰性であることがむしろ特徴とされてきた ADM において、140kD 蛋白を免疫沈降する新たな特異的自己抗体 (抗 CADM-140 抗体) が見出された (Sato S: Arthritis Rheum 2005、申請者は共著者)。わが国では ADM には致死的な急速進行性間質性肺炎を合併することが多く (間質性肺炎合併例の致死率は 50%以上とされる)、その有効な治療法はまだ得られていないのが現状である。病早期のステロイド大量療法と強力な免疫抑制薬併用が本症に有効であったとの症例報告があり、早期治療が重要と考えられるものの、早期診断には困難が多く同様の病態を有する他疾患・他病型との鑑別が問題となる。

本研究で明らかにした抗 CADM-140 抗体の対応抗原である IFIH1/MDA5 分子は、ピコルナウイルスなどの一本鎖 RNA ウイルス感染を感知して I 型インターフェロン産生をつかさどる自然免疫に重要な役割を果たす RIG-I 様レセプターファミリー分子の一種であり、肺マクロファージの活性化にも関与することが報告されている。PM/DM の病因として、以前よりウイルス感染が想定されており、特に小児 PM/DM においてはピコルナウイルスであるコクサッキー B ウイルスの抗体価が有意に高値を示すことが報告されていた。ピコルナウイルスの細胞内センサーであ

る IFIH1/MDA5 に対する自己抗体が ADM 患者で見いだされたことは、この疾患・病態の発症に何らかのウイルス感染が関与している可能性を強く示唆しており、生命予後の極めて不良な ADM 急性間質性肺炎の発症メカニズム解明に重要な手掛かりを与えてくれる可能性が高く、新たな治療戦略を見出すことができる可能性を秘めている。

我々は ADM の間質性肺炎増悪時に血清フェリチンが異常高値を示す例が多いことを見出しており、本疾患を肺マクロファージ活性化症候群と位置づけることができるかもしれないと考えている。抗 MDA5 抗体 (+) 例における血清 IL-6、M-CSF、IL-18 などの上昇はマクロファージ活性化症候群で認められる血清サイトカインプロファイルと類似しており、血清フェリチン高値や血球減少・肝胆道系酵素上昇をきたす臨床像も合わせると、抗 MDA5 抗体 (+) DM の病態の背景にはマクロファージ活性化症候群に共通する因子が存在する可能性が強く示唆される。

抗 MDA5 陽性例の死亡例は生存例と比較すると IP がより急性発症であること、高齢であること、治療介入が遅れていた可能性が示唆された。また、呼吸不全をきたした場合には、肺障害が不可逆的になり、治療に反応しない可能性が示唆された。今回導入した強力免疫抑制療法は従来のステップアップ治療に比べると生存率が高い傾向が示された。しかし、症例が少なくまだ有意差には至らず、今後多施設での大規模な臨床研究が必要である。治療で用いた 3 剤の免疫抑制薬のうち、フェリチンを明らかに低下させる作用を示したのはシクロホスファミドであり、抗 MDA5 抗体陽性患者治療のキードラックになることが示唆された。

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 11 件)

- 1) Mimori T, Nakashima R, Hosono Y: Interstitial lung disease in myositis: Clinical subsets, biomarkers, and treatment. *Curr Rheumatol Rep* 14(3):264-74, 2012. (査読有) DOI: 10.1007/s11926-012-0246-6
- 2) 三森経世, 中嶋蘭, 細野祐司: 多発筋炎・皮膚筋炎の発症機序と動物モデル—自己抗体. *Clinical Neuroscience* 30(3):301-305, 2012. (査読無) DOI: 該当なし
- 3) 三森経世, 中嶋蘭, 細野祐司: 多発性筋炎・皮膚筋炎における自己抗体研究の進歩—筋炎合併間質性肺炎のバイオマーカー. *日本内科学会雑誌* 101(2):488-494, 2012. (査読無) DOI: 該当なし
- 4) Tanizawa K, Handa T, Nakashima R, Kubo T, Hosono Y, Watanabe K, Aihara K, Oga T, Chin K,

Nagai S, Mimori T, Mishima M: HRCT features of interstitial lung disease in dermatomyositis with anti-CADM-140 antibody. *Respir Med* 105(9):1380-7, 2011. (査読有)
DOI: 10.1016/j.rmed.2011.05.006

5) Watanabe K, Handa T, Tanizawa K, Hosono Y, Taguchi Y, Noma S, Kobashi Y, Kubo T, Aihara K, Chin K, Nagai S, Mimori T, Mishima M: Detection of antisynthetase syndrome in patients with idiopathic interstitial pneumonias. *Respir Med*. 105(8):1238-47, 2011. (査読有)
DOI: 10.1016/j.rmed.2011.03.022

6) 三森経世、細野祐司、中嶋蘭：膠原病肺における自己抗体の意義。 *呼吸器内科* 19 (3):255-262, 2011. (査読無) DOI: 該当なし

7) 中嶋蘭、三森経世：抗 CADM-140 抗体の対応抗原と臨床的意義。 *リウマチ科* 45 (2):145-152, 2011. (査読無) DOI: 該当なし

8) Nakashima R, Mimori T: Clinical and pathophysiological significance of myositis-specific autoantibodies and myositis-associated antibodies. *Int J Clin Rheumatol*. 5(5): 523-536, 2010. (査読有) DOI: 10.2217/IJR.10.48

9) Kang EH, Nakashima R, Mimori T, Kim J, Lee I YJ, Lee EB, Song YW: Myositis autoantibodies in Korean patients with inflammatory myositis: Anti-140-kDa polypeptide antibody is primarily associated with rapidly progressive interstitial lung disease independent of clinically amyopathic dermatomyositis. *BMC Musculoskelet Disord*. 11(1):223, 2010. (査読有)
DOI: 10.1186/1471-2474-11-223

10) Hoshino K, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y, Nakashima R, Mimori T: Anti-MDA5 and anti-TIF1 γ antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 49(9):1726-33, 2010. (査読有) DOI:10.1093/rheumatology/keq153

11) Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Okawa K, Mimori T: The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen recognized by anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology (Oxford)* 49(3):433-40, 2010. (査読有)
DOI: 10.1093/rheumatology/kep375

[学会発表] (計 6 件)

1) Nakashima R, Hosono Y, Yukawa N, Yoshifuji H, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Mimori T: Clinical features and treatment of dermatomyositis patients with anti-CADM-140 (melanoma differentiation-associated protein 5: MDA5) antibody; recommendation of combined immunosuppressive therapy with intensive intravenous cyclophosphamide. 2011 American

College of Rheumatology (ACR2011), Chicago, Nov. 5-9, 2011.

2) Mimori T: Clinical and Pathogenic Significance of Autoantibodies in Autoimmune Myositis and Interstitial Lung Disease. 11th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity (IWAA 2011), Shanghai, May 12-15, 2011.

3) 中嶋蘭, 井村嘉孝, 瀬戸美苗, 村上昭弘, 小林志緒, 細野祐司, 湯川尚一郎, 吉藤元, 川端大介, 大村浩一郎, 臼井崇, 藤井隆夫, 三森経世: 自己抗体 抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体を検出するための新規 ELISA の開発. 第 39 回日本臨床免疫学会, 東京, September 15-17, 2011.

4) Nakashima R, Imura Y, Seto M, Murakami A, Kobayashi S, Hosono Y, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Mimori T: A new ELISA system for detecting autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetases: Usefulness in myositis and interstitial pneumonia. 2010 American College of Rheumatology, Atlanta, November 6-11, 2010.

5) Nakashima R, Hosono Y, Yukawa N, Yoshifuji H, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii F, Mimori T: High serum level of ferritin and abnormalities of cytokines are the characteristic features of amyopathic dermatomyositis patients with anti-CADM-140 (IFIH1/MDA5) autoantibody. 14th International Congress of Immunology, Kobe, August 22-27, 2010

6) 中嶋蘭, 三森経世：炎症性筋疾患－筋炎特異的自己抗体. 第 54 回日本リウマチ学会, 東京, April 22-25, 2010

[図書] (計 1 件)

三森 経世 (編集)：リウマチ・膠原病内科 クリニカルスタンダード. 文光堂、総ページ数 331 ページ、2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三森 経世 (MIMORI TSUNEYO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号： 10157589

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

① 中嶋 蘭 (RAN NAKASHIMA)

京都大学医学部附属病院免疫・膠原病内科 医員

② 細野 祐司 (YUJI HOSONO)

京都大学大学院医学研究科内科学講座 臨床免疫学 大学院生