

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461151

研究課題名(和文) 皮膚筋炎に伴う難治性急速進行性間質性肺炎における抗CADM-140抗体の役割

研究課題名(英文) A role of anti-CADM-140/MDA5 antibodies in rapidly progressive interstitial lung disease associated with amyopathic dermatomyositis

研究代表者

高田 俊範 (TAKADA, Toshinori)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：40361919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗CADM-140/MDA5抗体陽性ADM-ILD症例を対象に、血清中サイトカインの発現を調べた。症例は13例で、4例は死亡していた。保存血清を用いて、ELISA法で抗CADM-140/MDA5抗体価を、またLuminexSystemRにより38種のサイトカイン濃度を測定した。死亡群の抗CADM-140/MDA5抗体価は、生存群と比べ有意に高値を示した。スピアマンの順位相関係数を用いて抗CADM-140/MDA5抗体価と各種サイトカイン濃度との関連を調べたところ、13種のサイトカインで中等度以上($r > 0.4$)の相関がみられ、特にCX3CL1との間には強い相関($r=0.8897$)が観察された。

研究成果の概要(英文)：Patients with amyopathic dermatomyositis (ADM) sometimes develop rapidly progressive interstitial lung disease (ILD). Although anti-CADM-140/MDA5 antibody titer could predict the course of ADM-ILD, it is not clear how this antibody is involved in the pathogenesis of the disease. We retrospectively collected clinical records and preserved serum before treatment of consecutive patients with ADM-ILD since 2000 to 2014. Of 13 patients enrolled, four did not respond to therapy and died. The mean anti-CADM-140/MDA5 antibody titer was significantly higher in patients who did not respond ($p < 0.05$). Then we measured serum cytokine/growth factor (GF) protein concentration using a multiplex immunoassay system. Relationship analyses between the antibody titer and each cytokine/GF protein concentration revealed that Spearman's rank correlation coefficients were more than 0.4 in 13 cytokine/GF proteins. The strongest correlation was found between the antibody titer and CX3CL1 ($r=0.8897$).

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：皮膚筋炎 間質性肺炎 抗CADM-140/MDA5抗体 サイトカイン CX3CL1

1. 研究開始当初の背景

(1) 膠原病は、比較的高頻度に間質性肺疾患を合併する。これらの間質性肺疾患は、原因となる膠原病によって特徴的な HRCT 所見 (JCAT, 2002) や BAL 所見を示す (Respirology, 2003)。PM-DM では約 30-50% に間質性肺疾患を合併するが、間質性肺疾患は時にその症例の予後を左右する。特に、筋症状に乏しい皮膚筋炎 (ADM) は、約半数で治療抵抗性の急速進行性間質性肺炎を合併する (Chest 2009)。これら治療抵抗性の間質性肺炎症例は、治療反応症例と比べて、発症早期より低酸素血症を呈し、BAL 液中の CD4/8 比が比較的高値を示すなど特徴的な臨床像を持つ (Idiopathic Inflammatory Myopathies, 2011)。また間質性肺炎の経過中に血管病変を合併し、致死的な経過をとる症例も経験する (Rheumatol Int. 2009)。

(2) 最近 ADM に特異的に発現している自己抗体が発見され、その抗体が 140kDa の蛋白を認識していることから抗 CADM-140 抗体と命名された (Arthritis Rheum 2005)。その後、抗 CADM-140 抗体陽性例は、陰性例に比べ急速進行性間質性肺炎を合併しやすいこと、また抗 CADM-140 抗体価は、疾患活動性と比例し予後予測因子となることが報告された (Mod Rheumatology 2013)。

また、抗 CADM-140 抗体の対応抗原は MDA5 (melanoma differentiation associated gene 5) であることも判明した (Arthritis Rheum 2009)。このことから、本抗体は抗 CADM-140/MDA5 抗体とも呼ばれる。MDA5 は自然免疫に関わる RNA ヘリカーゼの一種で、TLR3 と共同で二本鎖 RNA ウイルスを認識する。RNA ウイルスを認識した MDA5 は、細胞内シグナル伝達を介して IFNs 遺伝子を活性化することで感染防御に関与していることが明らかになっている。これらの背景から、ADM では抗 CADM-140/MDA5 抗体が MDA5 を介してサイトカイン産生の異常をきたし、難治性急速進行性間質性肺炎を発症している可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 抗 CADM-140/MDA5 抗体が認識する MDA5 は細胞質内タンパクのため通常は抗体と直接接触しないが、上皮障害があれば露出されて抗原抗体反応が起きる。感染症や粉塵吸入などにより肺胞上皮細胞が傷害された際、細胞表面に露出した MDA5 を抗 CADM-140/MDA5 抗体が認識し、細胞内シグナル伝達の異常から炎症性サイトカインの過剰産生をきたすことにより難治性の急速進行性間質性肺炎を発症する可能性がある。

(2) 上記の仮説のもと、間質性肺炎を伴う ADM 患者、特に抗 CADM-140/MDA5 抗体価が高値の症例の血液中で高発現しているタンパク質を検出する。次に、救命例の治療前後の血液

を対象として、検出されたタンパク質が治療後に減少していることを確認する。さらに、検出されたタンパク質について、他の難治性間質性肺疾患症例の血清、気管支肺胞洗浄液、および肺組織中での存在と発現を確認し、間質性肺炎における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 2000 年から 2014 年 4 月までに、当科においてと診断し治療された ADM-ILD のうち、治療前の血清が保存されていた症例を対象とする。診療記録から、検査成績、治療内容、予後などの臨床情報を後ろ向きに抽出する。

(2) 保存血清を対象に、ELISA 法で抗 CADM-140/MDA5 抗体価を測定する。死亡例と生存例との間で、抗体価を統計学的に比較する。

(3) 抗 CADM-140/MDA5 抗体価高値群と低値群のプール血清を、プロテオーム解析で比較する。陽性スポットのタンパク質を質量分析で同定した後、ELISA またはウェスタンブロットで発現の差を検証する。同定されたタンパク質が、生存例の治療後に減少しているかどうかを確認する。さらに ADM 以外の間質性肺炎の血清、BAL 液、肺組織を対象に、その発現を確認する。

4. 研究成果

(1) 上述の期間に、当施設で ADM-ILD と診断され、治療が行われた症例は 20 例以上あった。このうち、治療前の血清が保存されていたのは 13 例であった。13 例の内訳は、男性 4 名女性 9 名で、平均年齢は 53 歳であった。13 例中 12 例は、診断 1 ヶ月以内に呼吸器症状を発症していた。もう 1 例も、診断 2 ヶ月以内の呼吸器症状発症であった。一方、2 例においては、診断の一年以上前から皮膚病変がみられていた。抗 Jo-1 抗体が測定されていた 12 例全員同抗体が陰性で、このうち 2 例に抗 Scl-70 抗体と抗 SS-A 抗体が陽性であった。全例高容量グルココルチコイドとシクロスポリンによる治療が行われ、これに加えて経静脈的シクロフォスファミド (IVCY) 投与が 4 例、ミコフェノール酸モフェチル内服が 2 例、ポリミキシン B 吸着カラム吸着療法 (PMX-DHP) が 1 例、IVCY と PMH-DHP を行った症例が 1 例あった。これらの治療にもかかわらず、13 例中 4 例は死亡していた。生存例 9 例と死亡例 4 例の検査成績や呼吸機能の比較では、WBC、CRP、肝機能、CK、Alb、KL-6、および治療前 P/F 比に有意な差はなかった。

(2) 13 例の治療前に採取され保存されていた血清を対象に、ELISA 法で抗 CADM-140/MDA5 抗体価を測定した (東海大学佐藤慎二博士に依頼)。13 例の平均抗 CADM-140/MDA5 抗体価は、96 unit であった。同抗体価を生存群 9 例と死亡群 4 例とで比較したところ、後者は前

者に比し有意に高値を示した (平均 ± 標準偏差 58 ± 41 vs 182 ± 85 unit, $p < 0.05$, 図 1)。

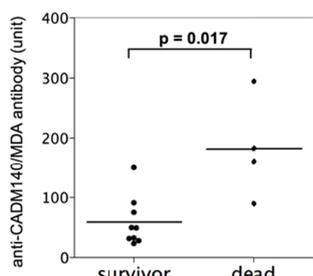


図1. 抗CADM-140/MDA5抗体価の比較

このことから、当施設のADM-ILD症例コホートでも、本抗体価は本疾患の予後予測因子となる可能性が示唆された。

(3)次に、“ADMでは抗CADM-140/MDA5抗体がMDA5を介してサイトカイン産生の異常をきたし、難治性急速進行性間質性肺炎を発症している可能性がある”という仮説を検証するため、本抗体価とサイトカイン発現との関連を明らかにすることを試みた。

まず、抗CADM-140/MDA5抗体価高値群と低値群の血清を3例ずつプールし、プロテオーム解析を行った。本解析の行程は、保存血清を群ごとにプール 前処理(アルブミンなどの除去) (群別に)二次元電気泳動 染色(タンパク質可視化) ソフトウェアによる定量化解析(群間比較) 質量分析(陽性スポットのタンパク質同定)の順に行った。なお精度の高い解析を行うため、本工程は東和環境科学プロフェニックス事業部(準備状況参照)に依頼した。抗CADM-140/MDA5抗体価高値群(A)と低値群(B)に認められた複数スポットを比較し、A>Bの9スポットおよびA<Bの4スポットに対してアミノ酸分析を行い、タンパク質を同定した。これらのうち、炎症・自己免疫病帯に関連ありそうなFetuinとビタミンD結合タンパクについて、13例を対象にELISA測定を行った。しかし、FetuinあるいはビタミンD結合タンパクと抗CADM-140/MDA5抗体価との関連はみられず、これらのタンパク質と病態との関連は不明であった。

(4)そこで、13例(1例は残検体がなく、実際は12例)の保存血清を対象に、Luminex System®により38種のサイトカイン(epidermal growth factor (EGF), eotaxin, fibroblast growth factors-2 (FGF-2), FMS-like tyrosine kinase-3 (Flt-3) ligand, chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage-CSF (GM-CSF), growth related oncogene (GRO), interferon- α 2 (IFN- α 2), IFN- γ , interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13,

IL-15, IL-17A, IFN- γ inducible protein 10 (IP-10), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), MCP-3, macrophage-derived chemokine (MDC), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , sCD40L, sIL-2R α , transforming growth factor- α (TGF- α), tumor necrosis factor- α (TNF- α), TNF- β , and vascular endothelial growth factor (VEGF))濃度を測定した。こうして得られたそれぞれの血清サイトカイン濃度と、抗CADM-140/MDA5抗体価との相関を調べた。それによれば、13種類のサイトカイン(CX3CL1, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 (p70), IP-10, MIP-1 α , TGF- α , VEGF)で、Spearmanの順位相関係数0.4以上の正の相関がみられた。

(5)これらのうち、抗CADM-140/MDA5抗体価とCX3CL1の間に、最も強い正の相関($r = 0.8897$, $p = 0.0001$)がみられた。

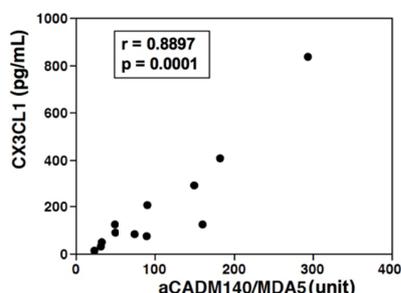


図2. 抗CADM-140/MDA5抗体価とCX3CL1濃度の相関

CX3CL1は活性化血管内皮細胞上に発現する細胞膜結合型ケモカインで、フラクタルカインとも呼ばれる。CX3CL1は、炎症系サイトカインであるTNF- α 、IL-1やIFN- γ などの炎症性刺激により、活性化血管内皮細胞、神経細胞、樹状細胞及び腸管上皮細胞で発現が誘導される。CX3CL1は、生体内では膜結合型と分泌型の二つの形態をとり、ケモカインとしてのみならず、インテグリン非依存的に細胞接着能を示す細胞接着分子としても機能する。近年、CX3CL1は、関節リウマチ、筋炎、SLEなどの自己免疫疾患の病態に関与することが明らかにされている。しかし、CX3CL1がどのようにADM-ILDの発症や難治化に関与しているかは明らかでない。

(6)最後に、抗CADM-140/MDA5抗体価と相関がみられたサイトカインが、治療によりどのように変化するかを調べた。当施設でADM-ILDと診断され治療を受けた症例のうち、サイトカイン濃度を複数回測定できた8例(2014年5月以降の症例を含む)を対象に、抗CADM-140/MDA5抗体価とサイトカイン濃度の変化を調べた。その結果、抗CADM-140/MDA5抗体価は治療前後で有意に低下していた。一方2名の死亡例では、CXCL3, IL-10, IL-15, MCP-1は低下がみられず、むしろ経過に伴い増加していた。これらの結果から、抗

CADM-140/MDA5 抗体は本疾患の発症に関与するが、進展には必ずしも関わっていない可能性が示唆された。

<引用文献>

Saito Y, Terada M, Takada T et al. Pulmonary involvement in mixed connective tissue disease: Comparison with other collagen vascular diseases using high resolution ct. *J Comput Assist Tomogr.* 2002;26:349-57.

Enomoto K, Takada T, Suzuki E et al. Bronchoalveolar lavage fluid cells in mixed connective tissue disease. *Respirology.* 2003;8:149-56.

Clinical differences between interstitial lung disease associated with clinically amyopathic dermatomyositis and classic dermatomyositis. Mukae H, Ishimoto H, Sakamoto N et al. *Chest.* 2009 Nov;136(5):1341-7.

Takada T, Suzuki E, Narita I. Interstitial lung disease associated with clinically amyopathic dermatomyositis. In: Gran JT eds., *Idiopathic inflammatory myopathies-recent developments: InTech,* 2011.

Yamagishi M, Tajima S, Suetake A et al. Dermatomyositis with hemorrhagic myositis. *Rheumatology international.* 2009; 29: 1363-6.

Sato S, Hirakata M, Kuwana M et al. Autoantibodies to a 140-kd polypeptide, CADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* 2005;52:1571-1576

Sato S, Kuwana M, Fujita T et al. Anti-CADM-140/MDA5 autoantibody titer correlates with disease activity and predicts disease outcome in patients with dermatomyositis and rapidly progressive interstitial lung disease. *Modern rheumatology.* 2013; 23: 496-502.

Sato S, Hoshino K, Satoh T et al. (2009) RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: Association with rapidly progressive interstitial lung disease. *Arthritis Rheum.* Vol. 60, No. 7: pp. 2193-2200

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5件)

T Takada, A Aoki, K Asakawa, T Sakagami, H Moriyama, I Narita, S Sato, Serum Cytokine Profiles of Patients with

Interstitial Lung Disease Associated with anti-CADM-140/MDA5 antibody positive Amyopathic Dermatomyositis (査読有), *Respiratory Medicine* 109 (2015) 1174-1180

Ethnic Differences in Development of Interstitial Lung Disease Associated with Anti-CADM-140/MDA5 Antibody Positive Amyopathic Dermatomyositis (査読無), Takada T, Austin J *Pulm Respir Med* 2015;2(3) 1031

Asakawa K, Takada T. PMX-DHP: A column to breathe new life into the treatment of ILD? (査読無) *World J Respirol* 2015 March 28; 5(1): 1-3

Effects of Direct Hemoperfusion with Polymyxin B-immobilized Fiber on Rapidly Progressive Interstitial Lung Diseases (査読有), T Takada, K Asakawa, T Sakagami, H Moriyama, J Kazama, E Suzuki, I Narita, *Intern Med.* 2014;53(17):1921-6.

Time to stand up; are Japanese prone to diffuse alveolar damage? (査読無) T Takada Austin J *Pulm Respir Med* 2014;1(2): 3.

[学会発表](計7件)

T Takada, A Aoki, K Asakawa, T Sakagami, H Moriyama, E Suzuki, I Narita, S Sato, Serum Cytokine Profiles of Anti-CADM140/MDA5 Positive Patients with Amyopathic Dermatomyositis And Rapidly Progressive Interstitial Lung Disease, ATS2015, 2015年05月17日 The Colorado Convention Center、デンバー(米国)

高田俊範、青木亜美、朝川勝明、坂上拓郎、森山寛史、成田一衛、本邦の膠原病にともなう間質性肺疾患に対するミコフェノール酸モフェチルの安全性と有効性、第55回日本呼吸器学会学術講演会、2015年04月18日東京国際フォーラム(東京都千代田区)

高田俊範、朝川勝明、坂上拓郎、森山寛史、成田一衛、鈴木栄一、佐藤慎二、皮膚筋炎に伴う難治性急速進行性間質性肺炎における抗CADM-140/MDA5抗体の役割、第17回間質性肺炎細胞分子病態研究会、2014年08月23日砂防会館別館(東京都千代田区)

T Takada, K Asakawa, T Sakagami, H Moriyama, I Narita, Effects of mycophenolate mofetil in connective tissue disease-associated interstitial lung disease, ATS2014, 2014年05月18日サン・ディエゴ コンベンションセンター、サン・ディエゴ(米国)

高田俊範、朝川勝明、坂上拓郎、森山寛史、鈴木栄一、成田一衛、抗CADM-140/MDA5自己抗体は間質性肺炎を伴う皮膚筋炎の予後予測因子となる、第54回日本呼吸器学会学術講演会、2014年04月26日大阪国際会議場(大阪府大阪市)

T Takada, K Asakawa, T Sakagami, H Moriyama, E Suzuki, I Narita,

Anti-CADM-140/MDA5 autoantibody titer predicts disease outcome in patients with dermatomyositis and rapidly progressive interstitial lung disease, 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, 2013年11月13日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

T Takada, K Asakawa, T Sakagami, H Moriyama, J Kazama, E Suzuki, I Narita, Effects Of Direct Hemoperfusion With Polymyxin B-immobilized Fiber For Rapidly Progressive Interstitial Lung Diseases, ATS2013, 2013年05月21日 Pennsylvania Convention Center、フィラデルフィア(米国)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 俊範 (TAKADA, Toshinori)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：40361919

(2)研究分担者

坂上 拓郎 (SAKAGAMI, Takuro)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00444159