

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461656

研究課題名(和文)皮膚筋炎におけるDNAミスマッチ修復酵素に対する自己免疫応答の解明

研究課題名(英文) Analysis of autoimmune responses against DNA mismatch repair enzymes in dermatomyositis

研究代表者

室 慶直 (Muro, Yoshinao)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80270990

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)：DNAのミスマッチ修復は細菌からヒトまで保存されている重要な生命機構であり、最初のステップであるミスマッチ認識には、ヒトでは7種の酵素が関与する。我々は炎症性筋疾患を始めとする膠原病患者にこれらの酵素群のうちの4種に対する自己抗体が存在することを報告したが、さらなる研究でそれらの主要対応抗原はMLH1、PMS1の2種であり、他の筋炎マーカー抗体が併存している例とそうでない例が存在した。これら抗体のスクリーニング検査として従来使用されている培養細胞基質が適さないことが判明し、適当な基質を見出すことに成功した。また、培養角化細胞への紫外線照射がこれらの自己抗原の発現に変化を与える可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：DNA mismatch repair is an important life system, which is conserved from bacteria to human, and starts by mismatch recognition where seven kinds of enzymes are involved in human. We reported that patients with collagen diseases including inflammatory myopathy carry autoantibodies against four kinds of these enzymes. Further studies clarified that major targets of these antibodies are MLH1 and PMS1 and that some patients who had these antibodies also simultaneously carried other myositis-marker autoantibodies and other patients did not. We have found that commercially available substrates for indirect immunofluorescence tests were not suitable for the screening of autoantibodies against these enzymes and the suitable fixed cultured cells for the screening. Moreover, we have found the possibility that ultraviolet irradiation to cultured keratinocytes might influence the expression of these enzymes (autoantigens).

研究分野：膠原病学

キーワード：皮膚筋炎 自己抗体 DNAミスマッチ修復酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の免疫沈降法を用いた研究により、皮膚筋炎/多発性筋炎 (以下、DM/PM) と関係の深い自己抗体が多数同定された。我々は、それらの臨床的意義を明らかにするため、リコンビナントタンパク質を用いた免疫沈降法や、新規 ELISA 法を開発してきた。従来の免疫沈降法は、網羅的な探索を可能にするが、結果までの長時間、放射性物質による危険、反応タンパクの分子量を根拠とする判定の曖昧さ、などの欠点を有した。我々は以上の欠点を克服する独自の手法により、迅速かつ的確に、多数の DM/PM 特異抗体の臨床的特徴や、病勢との関連を明らかにしてきた。単施設 100 名に及ぶ患者血清の研究により、抗 TIF1 抗体と悪性腫瘍、抗 MDA5 抗体と急速進行性間質性肺炎、といった生命予後に重要な臨床的意義を示し、病勢寛快期における抗 MDA5 抗体の消失、抗 MDA 抗体の疫学研究、DM 特異抗体が一人の患者に併存しないという説は必ずしもそうでないこと、NXP2、SAE といった新規抗体の意義、などを世界に先駆けて報告してきた。

(2) Jo-1 を始めとする複数の tRNA 合成酵素や Mi-2、MDA5、TIF1、NXP2、SAE に対する抗体など、多数の特異抗体が明らかにされても、3 割程度の患者で自己抗体が未だ同定できない。一方、2001 年に米国 Johns Hopkins 大学より、DM/PM 患者に存在する PMS1、PMS2、MLH1 という DNA ミスマッチ修復 (mismatch repair、以下 MMR) に関する酵素に対する抗体が報告された。これら 3 種抗体のうち、いずれかを DM 25 例中 3 例 (12%)、PM 24 例中 2 例 (8%) に認めた。これは、我々が発表した NXP2 抗体や SAE 抗体の陽性率を上回る。その後、2005 年に慶応・東北大学の共同研究で、PMS1 に対する抗体を DM/PM 119 例中 8 例 (7%) に、MSH2 という別の MMR 酵素に対する抗体を 102 例中 5 例 (5%) に認めたというプレリナリーな発表があるのみで、それ以来、これらの抗体に関する報告がない。

(3) がんや細胞死の原因になる DNA 損傷を修復する機構の中で、MMR は DNA の複製エラーによって生じる損傷を修復する系である。ヒト MMR の初期反応に関わる酵素は、上記の 4 種に MSH3、MSH6、MLH3 を加えた合計 7 種類から成る。これらの分子量は 80kDa から 160 kDa に集中しており、DM/PM の自己抗原が多数存在する領域でもある。我々は、次のような予備的研究結果を得ていた。測定しうる自己抗体がすべて陰性で、抗核抗体陽性の DM 患者を 2 例経験した。免疫沈降 - ウエスタン法により、1 例では 4 種類の MMR 酵素に対する抗体が陽性、もう 1 例は 2 種類の MMR 酵素に対する抗体が陽性であることが判明していた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は MMR に関する 7 つの酵素に対する自己抗体の測定法を確立し、それらの DM における臨床的意義を解明し、さらには MMR 酵素の自己免疫応答に関わる因子の探索を行うことで、DM の発症病態の解明に展開していくための研究を行うことを目的とする。

MMR に関する 7 種の酵素 (MSH2、MSH3、MSH6、MLH1、MLH3、PMS1、PMS2) をコードする cDNA を入手し、リコンビナントタンパクを作成し、それぞれの抗体測定系 (ELISA 等) を確立する。

確立した測定系により自施設 DM 患者における抗体陽性例を検索し、各抗体の陽性率を検討する。

DM に対する抗体の特異性を検討するために、対象疾患となるエリテマトーデス (SLE)、強皮症 (SSc)、シェーグレン症候群 (SS) での陽性率を検討する。

各抗体陽性例の臨床病型や合併病態などを検討し、7 種酵素との反応性や ELISA で測定した抗体価により、各抗体の DM におけるバイオマーカーとしての意義を検討する。

MMR 酵素に対する自己抗体のスクリーニングに、従来より臨床の現場で広く用いられている HEp-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法が有用であるか検討する。

MMR 酵素に対する自己免疫応答に関わる因子の探索のため、紫外線照射により、ヒト皮膚培養細胞において各酵素の発現様式に変化が起きるか検討する。

3. 研究の方法

(1) 7 種 MMR 酵素遺伝子によるリコンビナントタンパクの発現

ヒト MMR 初期反応に関わる酵素は MSH2、MSH3、MSH6、MLH1、MLH3、PMS1、PMS2 の 7 種である (図 1)。

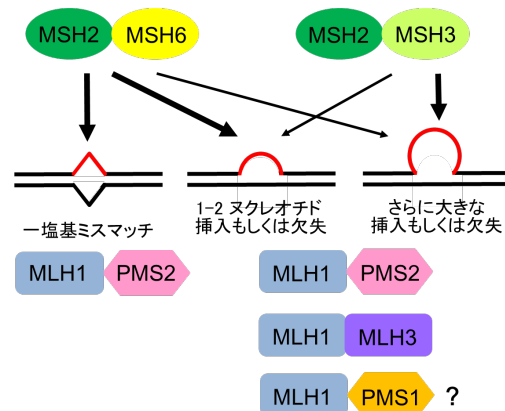


図 1 ヒトの DNA ミスマッチ認識モデル それら全てについて、T7 プロモーターを有するベクターに挿入された cDNA を購入し、大腸菌の形質転換、プラスミド DNA の大量調整と精製を行う。制限酵素処理や DNA シークエンシングにより塩基配列の確認を行ったのち、ウサギ網状赤血球抽出液を用いた *in vitro* 転写翻訳系によりプロテイン化したリコンビナントタンパクを調整する。合成確認後、ストレプトアビジンをコートした市販 ELISA

プレートを用い、ELISAを進める。7種タンパク質に対する市販のポリクローナル抗体を陽性コントロールとし、陽性検体が見つかったタンパクについては最高値を示す検体を標準曲線の作成に用いて、ELISA unitを算出する。

(2) 7種のリコンビナントタンパクを用いたELISAの測定系による自己抗体探索をDM患者全例に行い、陽性検体の探索、およびELISAのカットオフ値設定を7種のタンパクについて進める。また、SLE、SSc、SS患者の血清もELISAでスクリーニングする。陽性検体、およびカットオフ値付近の検体については免疫沈降法で反応性の確認を行う。

(3) 各抗MMR酵素抗体陽性例の臨床を検討して、DMの各病態と抗体の有無や、抗体価との関連性を検討する。継時血清が入手できた場合は、ELISAの結果と病勢との関連を検討する。

(4) 各抗MMR酵素抗体陽性例による間接蛍光抗体法による抗核抗体検査の染色像の結果から、同抗体のスクリーニングに市販の間接蛍光抗体検査キット(HEPANAテスト, MBL, 名古屋)が有用であるかを市販精製ポリクローナル抗体を用いて検討する。有用でない場合、培養ケラチノサイト(HaCaT細胞)や培養メラノーマ細胞(A375細胞)を基質として、複数の固定法によりスクリーニングに適した基質を得ることができないか検討する。

(5) 紫外線とDM自己抗原の関連を示唆する研究として、Mi-2/NuRDタンパク複合体のうち、紫外線照射によりMi-2抗原の発現が選択的に上昇する、という報告がある。小型紫外線照射装置(3UV-34, UVP, 米国)と紫外線強度計(UVK-40M, ジェフコム, 尾張旭)を用いて一定量の紫外線照射を行ったHaCaT細胞を用いた間接蛍光抗体法で、各MMR酵素の細胞内局在や発現量に変化が生じるかについて検討する。

4. 研究成果

(1) 図2に示す如く、7つの酵素タンパクを

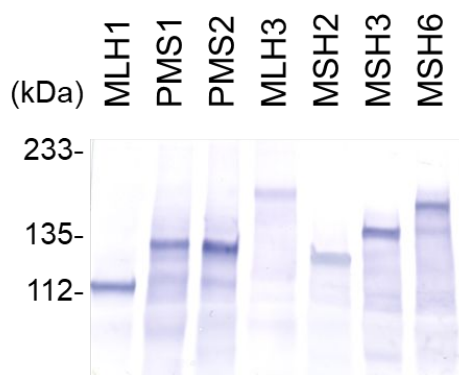


図2 avidin-biotin結合による蛋白確認 *in vitro*転写翻訳系によりビオチン化したり

コンピナントタンパクとして発現することに成功したので、これらを用いてELISAおよび免疫沈降を施行した。ELISAは20名の健康人の平均値+5S.D.をカットオフ値として、名古屋大学皮膚科を受診した筋炎患者144例(連続的検体で、DM73例、無筋炎性DM:CADM38例、小児DM:JDM12例、PM7例、重複症候群:OL14例)について測定したところ、MLH1、MSH2、PMS1、PMS2に対する反応を有する血清を見出した。一方、MLH3、MSH3、PMS2に対する反応は一例も見出せなかった。ELISAにて上記4種のタンパクに対する反応を有した血清(カットオフ付近の血清も含む)については免疫沈降を行い、4種ともにカットオフ値の妥当性が示された。

(2) 筋炎、SLE40例、SSc20例、SS20例について調べた結果、筋炎9例(6.3%)とSLE3例(7.5%)に上記4種のタンパクのいずれか、もしくはそのうちの複数に反応を認めた。筋炎における陽性例の内訳はDM4例(5.5%)、CADM1例(2.6%)、JDM2例(16.7%)、OL2例(14.3%)とJDMとOLにやや多い傾向を認めた。反応したタンパクはMLH10例、PMS17例、MSH22例、PMS21例であった。

(3) いずれかの抗体が陽性であった12例中10例については筋炎やSLEに認められる他の疾患特異的もしくは関連自己抗体が併存していた。他の2例は抗MMR酵素抗体が単独陽性だった。抗MMR酵素抗体陽性例に特徴的な臨床像(皮疹、関節痛、間質性肺炎の有無、CK値など)は見いだせなかったが、観察期間中に死亡例は存在せず、特に筋炎群では悪性腫瘍の合併例が一例も存在しなかった。抗MMR酵素抗体陽性例は予後良好の一群を形成する可能性がある。

(4) 他院主治医による検査希望で測定した検体については非連続検体になるが、JDM6例、PM5例、DM3例、CADM2例、OL1例にいずれかの抗MMR酵素抗体を認め、PMS114例、MLH19例、MSH24例、PMS22例に反応を認めた。当院症例と合わせると、PMS1に21例、MLH1に19例、MSH2に6例、PMS2に3例が反応していた。いずれかの抗体が陽性であった症例は合計29例で、そのうち他の疾患特異自己抗体の併存が見つからなかった症例は10例(筋炎群では10/26例;38.5%)に上った。この結果より、少数例ではあるが、MMR酵素に対する自己抗体を検索することは自己免疫性筋炎の補助診断に有用であると考えた。反応する抗原の組み合わせでは、PMS1+MLH1が最も多く11例(4種全てに反応する2例を含む)、PMS1単独が8例、MLH1単独が6例、その他が4例であった。

(5) 2種以上の抗体が陽性で継時血清が取得できた7例の検体については、いずれの症例においても抗体の変動はパラレルで、病勢の

変化とも一致していた。図1で示したように、7つの酵素は幾つかのヘテロダイマーを形成することが判明しており、ヒトではMLH1-PMS1の複合体の機能が最も解明されていない現状だが、そのMLH1-PMS1に対する反応が自己免疫応答において最も見られたことは、今後、この複合体の機能解明が病態の解明においても重要になる可能性がある。

(6) 市販の間接蛍光抗体検査キットを使用した抗核抗体検査で、MMR酵素群に対する抗体陽性例の染色像が一定しなかったことより、入手できなかったMLH3を除く他の6種類のMMR酵素に対する市販ポリクロナル抗体で、キットのHEp-2細胞、メタノール固定(M)培養HaCat細胞、パラホルムアルデヒド固定(P)HaCat細胞、パラホルムアルデヒド固定メラノーマ細胞を基質として間接蛍光抗体を行った結果を図3に示した。

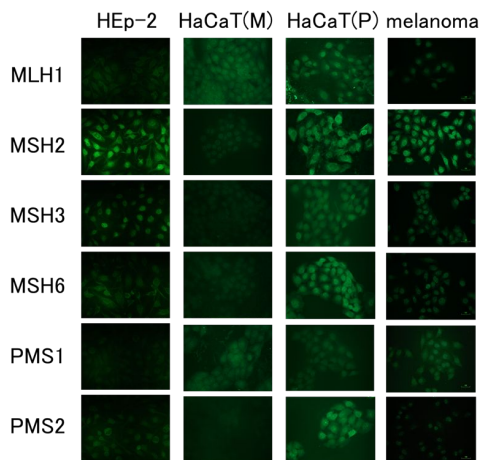


図3 種々の基質細胞による染色像

この結果からP固定のHaCaT細胞を用いるのが、市販ポリクロナル抗体の染色性は最も良いと考えられた。しかし、市販抗体と患者抗体ではエピトープの差異から染色像や染色強度が異なる可能性もあるので、次にMMR酵素に対する抗体陽性の患者血清で市販キットでは明らかな染色が得られなかった検体についてP固定HaCaT細胞を用いて結果を比較してみた。図4には3症例の結果を示したが、いずれもP固定HaCaT細胞では陽性所見が得られた。

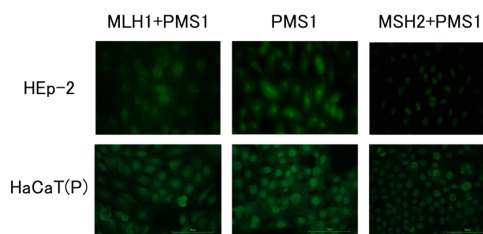


図4 異なる基質での患者抗体の染色像

患者抗体は併存抗体の影響もあるので、今回の結果について特異性を論じるには、抗原を用いた吸収実験が必要であり、また、多数の健常コントロールや他の自己免疫血清を使用する追加評価が重要と考える。

(7) 抗体陽性のSLE症例や一部のDM症例で日光過敏が認められたことより、MMR酵素の自己免疫応答に紫外線照射が及ぼす役割も想定されることから、上記のポリクロナル抗体と紫外線照射を行ったHaCaT細胞を用いて間接蛍光抗体法を行った結果を図5に示した。

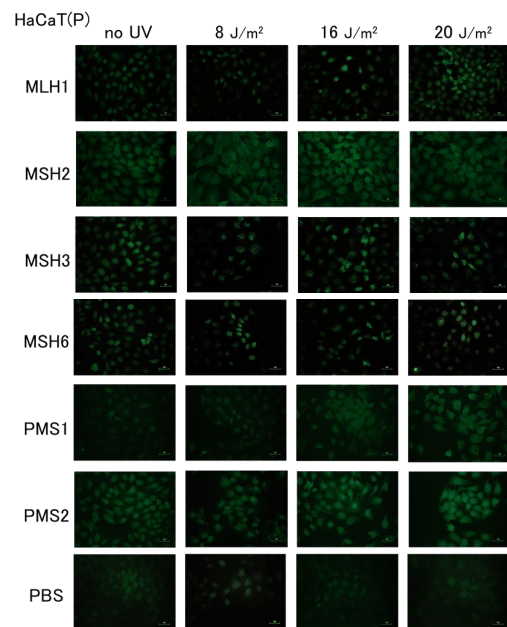


図5 紫外線照射HaCaT細胞の染色像(1) 興味深いことに、自己抗体の標的となるMLH1、PMS1、PMS2で(MSH2は変化に乏しいが)紫外線照射量に依存して染色が強くなっているのに対して、自己抗体の標的にならないMLH3やMSH6ではあまり変化が認められなかった。発現量の変化を確認するにはウエスタンブロットやRT-PCRなどを用いた定量的な解析が必要であるが、今回の研究では所有の紫外線照射装置で可能な間接蛍光抗体法のみを行った。

(8) 前述の照射実験の陽性コントロールとしての抗Mi-2/CHD4モノクローナル抗体と患者抗Mi-2抗体、ならびに患者MMR酵素抗体(併存抗体が同定できなかった症例)による同実験の結果を図6に示した。

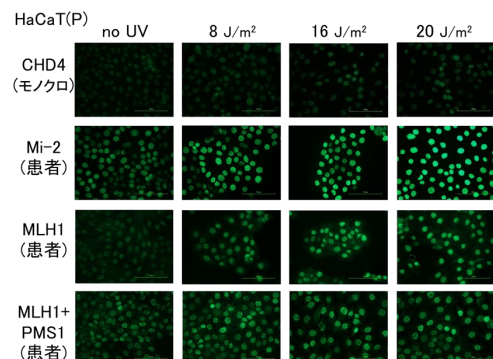


図6 紫外線照射HaCaT細胞の染色像(2) Mi-2抗原はモノクローナル抗体でも患者抗体でも紫外線照射量に依存して染色が強く

なった。既報の実験でも照射量は95J/m²なので、今回の実験条件の設定および実験結果は妥当と考えた。MLH1に対する抗体陽性の患者血清、およびMLH1/PMS1に対する抗体陽性の患者血清は図5のポリクロナル抗体を用いた実験結果よりもさらに変化が見取れた。以上の結果より、今後の研究で紫外線とMMR酵素群に対する自己免疫応答、さらにはDMやSLEといった膠原病の病因や病態に及ぼす影響についてさらなる研究が必要であると考へた。

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55件)

Fujita-Tanaka H, Ogawa Y, Muro Y, Ogawa-Momohara M, Asashima H, Tsuboi H, Sumida T, Akiyama M. Pansclerotic morphea associated with hypohidrosis and anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies. *Br J Dermatol*, 査読有、2018,178:e210-e211. DOI:10.1111/bjd.16021.

Adachi R, Muro Y, Kono M, Akiyama M. Intramuscular haemorrhage in a patient with dermatomyositis and anti-TIF1gamma antibodies. *Eur J Dermatol*, 査読有、2018,28:116-118. DOI:10.1684/ejd.2017.3168.

Kohara A, Yanaba K, Muro Y, Ito H, Nakagawa H, Noda K, Kurosaka D. Anti-PM/Scl antibody-positive dermatomyositis in a Japanese patient: a case report and review of the literature. *Int J Rheum Dis*, 査読有、2017,20:2186-2189. DOI:10.1111/1756-185X.13019.

Muro Y, Nakanishi H, Katsuno M, Kono M, Akiyama M. Prevalence of anti-NT5C1A antibodies in Japanese patients with autoimmune rheumatic diseases in comparison with other patient cohorts. *Clin Chim Acta*, 査読有、2017,472:1-4. DOI:10.1016/j.cca.2017.07.002.

Ogawa-Momohara M, Muro Y, Satoh M, Akiyama M. Autoantibodies to Su/Argonaute 2 in Japanese patients with inflammatory myopathy. *Clin Chim Acta*, 査読有、2017,471:304-307. DOI:10.1016/j.cca.2017.06.022.

Taki T, Muro Y, Ogawa Y, Akiyama M. Palmoplantar hyperkeratosis in dermatomyositis with anti-PM/Scl antibodies. *Br J Dermatol*, 査読有、2017,176:e94. DOI:10.1111/bjd.15371.

Muro Y, Iwata N, Tanaka Y, Kodera M, Kono M, Akiyama M. Anti-dense fine speckled 70 autoantibodies in Japanese children with dermatomyositis, localized

scleroderma, and idiopathic arthritis with iridocyclitis. *J Rheumatol*, 査読有、2017,44:711-712.

DOI:10.3899/jrheum.161409.

Tanaka N, Muro Y, Suzuki Y, Nishiyama S, Takada K, Sekiguchi M, Hashimoto N, Ohmura K, Shimoyama K, Saito I, Kawano M, Akiyama M. Anticentromere antibody-positive primary Sjögren's syndrome: Epitope analysis of a subset of anticentromere antibody-positive patients. *Mod Rheumatol*, 査読有、2017,27:115-121.

DOI:10.1080/14397595.2016.1176327

Murase C, Muro Y, Akiyama M. Rapid increase of serum anti-MDA-5 antibodies and exacerbation of clinically amyopathic dermatomyositis/interstitial lung disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 査読有、2017,31:e43-e44.

DOI:10.1111/jdv.13670.

Taki E, Shimizu M, Soeda Y, Shirai M, Muro Y. Anti-TIF1- γ -positive young adult dermatomyositis with germ cell tumour. *Eur J Dermatol*, 査読有、2016,26:623-624. DOI:10.1684/ejd.2016.2856.

Ogawa M, Sugiura K, Yokota K, Muro Y, Akiyama M. Anti-transcription intermediary factor 1- γ antibody-positive clinically amyopathic dermatomyositis complicated by interstitial lung disease and breast cancer. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 査読有、2016,30:373-375. DOI:10.1111/jdv.12797.

Muro Y, Sugiura K, Akiyama M. Cutaneous manifestations in dermatomyositis: key clinical and serological features-a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*, 査読有、2016,51:293-302. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12016-015-8496-5>

Muro Y, Hosono Y, Sugiura K, Ogawa Y, Mimori T, Akiyama M. Anti-PM/Scl antibodies are found in Japanese patients with various systemic autoimmune conditions besides myositis and scleroderma. *Arthritis Res Ther*, 査読有、2015,17:57.

Muro Y, Sugiura K, Nara M, Sakamoto I, Suzuki N, Akiyama M. High incidence of cancer in anti-small ubiquitin-like modifier activating enzyme antibody-positive dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*, 査読有、2015,54:1745-1747. DOI:10.1093/rheumatology/kev247.

Muro Y, Sugiura K, Mimori T, Akiyama M. DNA mismatch repair enzymes: Genetic defects and autoimmunity. *Clin Chim Acta*,

査読有、2015,442;102-109.
DOI:10.1016/j.cca.2015.01.014.

Muro Y, Nakashima R, Hosono Y, Sugiura K, Mimori T, Akiyama M. Autoantibodies to DNA mismatch repair enzymes in polymyositis/dermatomyositis and other autoimmune diseases: a possible marker of favorable prognosis. *Arthritis Rheumatol*, 査読有、2014,66:3457-3462.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/art.38866>

〔学会発表〕(計 89 件)

松島 由明、欠田 成人、横山 智哉、尾本 陽一、波部 幸司、山中 恵一、室 慶直、水谷 仁、重度嚥下障害と間質性肺炎を伴った抗 MJ 抗体陽性皮膚筋炎の 1 例、第 68 回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2017 年 11 月 19 日

水野 絵里香、満間 照之、花村 拓哉、牧 優貴、浅井 理玲、白井 三由希、相山 明輝、笠原 嵩翔、室 慶直、経過中に抗 MDA5 抗体が陽性になった皮膚筋炎、第 116 回日本皮膚科学会総会、2017 年 6 月 4 日

松尾 陽香、築場 広一、梅澤 慶紀、中川 秀己、室 慶直、尋常性乾癬を合併した抗 SAE 抗体陽性皮膚筋炎の 1 例、第 80 回日本皮膚科学会東京支部学術大会、2017 年 2 月 11 日

山本真有子、本田由美、中島喜美子、室 慶直、佐野栄紀、筋力低下が遷延し治療に難渋した抗 MJ 抗体陽性の皮膚筋炎、第 40 回皮膚脈管・膠原病研究会、2017 年 1 月 20 日

吉川 真人、室 慶直、桃原 真理子、河野 通浩、伊藤 理、秋山 真志、Sjögren 症候群および抗 ARS 抗体陽性多発性筋炎を併発した IgG4 関連自己免疫性膵炎 の 1 例、第 67 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2016 年 10 月 22 日

Ogawa-Momohara M, Muro Y, Akiyama M, Kodera M, Satoh M、Autoantibodies to Su/Argonaute 2 in Japanese patients with inflammatory myopathy、The 13th International workshop on autoantibodies and autoimmunity、2016 年 10 月 12 日

Kakeda M, Omoto Y, Gyobu M, Habe K, Yamanaka K, Muro Y, Mizutani H、Anti-NXP-2 (MJ) antibody-positive dermatomyositis developing severe dysphagia and immune thrombocytopenic purpura with generalized subcutaneous edema: a case report、The 25th European Academy of Dermatology and Venereology Congress、2016 年 10 月 2 日

室 慶直、筋炎特異/関連抗体：総論、第 115 回日本皮膚科学会総会、2016 年 6 月 4 日

室 慶直、皮膚筋炎の新しい診断基準と将来の展望、第 114 回日本皮膚科学会総会、2015 年 5 月 30 日

室 慶直、杉浦 一充、中嶋 蘭、細野 祐司、三森 経世、DNA ミスマッチ修復酵素に対する自己抗体は筋炎特異的か、第 59 回日本

リウマチ学会総会・学術大会、2015 年 4 月 24 日

〔図書〕(計 7 件)

室 慶直、抗核抗体陽性患者を紹介されたら？、文光堂、リウマチ・膠原病診療ハイグレード リウマチ・膠原病の合併症や諸問題を解く、2016、434 (2-11)。

室 慶直、皮膚筋炎、日本臨床社、免疫性神経疾患 基礎・臨床研究の最新知見、2015、883 (567-573)。

上阪等、富満弘之、太田晶子、三森経世、川口鎮司、神田 隆、清水 潤、藤本 学、室 慶直、神人正寿、石原正一郎、砂田芳秀、診断と治療社、多発性筋炎・皮膚筋炎治療ガイドライン、2015、50 (31,32,37-39)。

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/derma/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室 慶直 (MURO YOSHINA O)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80270990

(2) 研究協力者

桃原 真理子 (MOMOHARA MARIKO)

山本 恵理 (YAMAMOTO ERI)