

皮膚筋炎における microRNA 解析

研究分担者 神人正寿

熊本大学医学部皮膚科 講師

研究要旨

蛋白をコードしていない non coding RNA の一種で平均 22 塩基程度の長さを持つ microRNA は様々な mRNA の 3' UTR の相補的配列に結合し遺伝子翻訳を阻害する事で遺伝子発現調節をしている。近年の研究により microRNA が様々な疾患の病態に関与していることが明らかになっているが、PM/DM における働きは未だ分かっていない。本研究において DM 患者および CADM 患者の手指背の皮疹（ゴットロン徴候）より採取した皮膚組織のパラフィン切片より抽出した microRNA を用いて PCR array を行ったところ、複数の microRNA の発現が正常皮膚組織に比べて DM・CADM の皮疹で増加あるいは減少していた。我々はその中で miR-223 の減少に注目した。DM および CADM 皮膚における miR-223 の低下は表皮細胞において PKC- ϵ の増加を通じて増殖能を刺激しゴットロンをはじめとする皮疹の形成に関与している可能性が示唆された。また、miR-223 の発現は血清中でも特に CADM 患者において減少していた。CADM における血清 miR-223 の減少は臨床的に有用なマーカーとなる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

「ポストゲノム」時代の生命科学における最も重要な研究領域の一つがエピジェネティクスと呼ばれる、DNA への後天的な修飾による遺伝子発現の制御機構を研究する分野である。これまでに DNA メチル化やヒストン修飾などの複数のシステムがクロマチン動態を介してエピジェネティクスを制御している事が明らかになっている。さらに、これらと共に遺伝子発現に影響するファクターとして、microRNA などの non-coding RNA による RNA サイレncing も注目されている。タンパク質をコードしていない non coding RNA の一種で平均 22 塩基程度の長さを持つ microRNA は様々な mRNA の 3' UTR の相補的配列に結合し遺伝子の翻訳を阻害する事で遺伝子発現調節をしている。ヒトゲノムには 1000 種類以上の microRNA が存在し、60%以上の遺伝子を制御しようと考えられている。近年の研究により、microRNA が生体内で様々な遺伝子発現を調節することで細胞増殖や分化において重要な働きをしていることが明らかになっているが、microRNA の各疾患における役割も検討されつつある。自己免疫疾患においても特に関節リウマチや全身性エリテマトーデスで精力的に研究されているが、多発筋炎 (PM) および皮膚筋炎 (DM) での microRNA の病態への関与は未だ明らかになっていない。PM/DM で microRNA の関与を検討した報告はこれまでのところ一つだけであり、Eisenberg らが Duchenne 型筋ジストロフィー、Becker 型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、三好型ミオパチー、ネマリニンミオパチー、封入体筋炎、PM、DM など様々な筋疾患の筋組織における microRNA の発現をアレイで網羅的に比較したところ、上記のほとんどの疾患で正常筋組

織と比べて miR-146b、miR-132 および miR-19b などが増加しているが、中でも PM でもっとも強く増加していた。一方 DM では他の疾患と比べて全体に変化が弱く、DM で特異的に増加あるいは減少している microRNA は明らかではなかった (Eisenberg I et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2007)。本研究の目的は DM および臨床的筋無症候性皮膚筋炎 (CADM) において皮疹の形成に関与する microRNA を同定し、その役割を明らかにする事である。

B. 研究方法

Total microRNA は miRNeasy FFPE kit および miRNeasy RNA isolation kit (Qiagen) を用いて皮膚のパラフィン切片や血清から抽出した。microRNA の発現は microRNA PCR array、real-time PCR、および in situ hybridization を用いて評価した。蛋白発現の解析には免疫ブロットおよび免疫染色を行った。microRNA の機能は microRNA inhibitor を用いて評価した。microRNA の target の予測には Target scan (<http://www.targetscan.org/>) を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は Declaration of Helsinki に基づき、倫理委員会の審査を経て、患者および健常対象者の同意を得て行った。

C. 研究結果

まず DM 患者および CADM 患者の手指背の皮疹 (ゴットロン徴候) より採取した皮膚組織のパラフィン切片より抽出した total microRNA を用いて PCR array を行ったところ、複数の microRNA の発現が正常皮膚組織

に比べて DM・CADM の皮疹で増加あるいは減少していた (表 1)。我々はその中で miR-223 の減少に注目した。In situ hybridization を用いて皮膚での miR-223 の発現パターンを調べたところ、miR-223 は in vivo において表皮に局在していた。一方、DM/CADM 皮疹部の表皮ではアレイ同様 miR-223 発現が減少していることがわかった (図 1)。

次に DM/CADM の表皮細胞で miR-223 が減少する事により生じる変化を確認するため、ウェブ上のプログラムである Target Scan を用いて miR-223 が結合しうるターゲット遺伝子の候補を検索した。表皮細胞に発現しているターゲット候補の中で我々は表皮細胞の増殖に関わる PKC- ϵ に着目した。まず PKC- ϵ が miR-223 の真のターゲットであることを確かめるため、in vitro で培養ヒト表皮細胞において miR-223 を抑制する事で PKC- ϵ の発現が変化するかどうか免疫ブロットで評価した (図 2)。miR-223 inhibitor を用いて miR-223 を抑制する事で PKC- ϵ の発現が増加することから miR-223 は PKC- ϵ をターゲットにしていることが確かめられた。実際、皮膚筋炎の表皮細胞の核では PKC- ϵ 発現が増加しており (図 3)、DM 皮疹では実際に in vivo でも miR-223 が減少して PKC- ϵ が増加するという変化が生じていると考えられた。

さらに、血清中には微量ながら microRNA が含まれている事が近年注目されている。そこで正常人および患者血清から microRNA を抽出し、miR-223 の特異的プライマーを使った PCR にて血清 miR-223 濃度を測定した。図 4 にしめすごとく、DM 患者、なかでも CADM 患者において皮膚のみならず血清でも miR-223 が減少している事が示唆された。一方、血清 miR-223 濃度と DM 患者の臨床症状の関連を調べたが、特定の臨床所見・検査所見との有意な相関は見られなかった (表 2)。

D. 考察

ゴットロン徴候は病理組織学的に表皮の肥厚すなわち表皮細胞の増加を特徴とする。DM および CADM 皮膚における microRNA-223 の低下は表皮細胞において細胞増殖に関与している PKC- ϵ の増加を通じて増殖能を刺激しゴットロンをはじめとする皮疹の形成に関与している可能性が示唆された (図 5)。本症において筋病変と皮膚病変では病態に関与する microRNA が異なる可能性があり、それぞれの特異的な変化を明らかにする事で本症の病態の解明が進むことが期待される。また、CADM では CK の上昇などが見られず時に皮疹のみからの診断を強いられることがあるため診断マーカーや治療マーカーの開発が喫緊の課題であるが、CADM における血清 miR-223 の減少は臨床的に有用なマーカーとなる可能性がある。さらに最近 miR-146a をコラーゲン誘導性関節炎モデルマウスに静脈注射する事で関節炎の改善効果がみられること

が報告されるなど (Nakasa T et al. Arthritis Rheum, 2011) microRNA を実際に臨床使用する試みが本格化してきており、DM・CADM においても microRNA の治療への応用が期待される。

E. 結論

DM・CADM では皮膚組織および血清にて miR-223 が減少しており、PKC- ϵ の発現調節を通じて病態に関与している可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 自己免疫疾患に関する調査研究
平成 23 年度 班会議

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図の説明

図 1: 正常・DM 患者及び CADM 患者皮膚組織における miR-223 発現の in situ hybridization による検出

図 2: ヒト表皮細胞における PKC- ϵ の発現にあたる miR-223 inhibitor の効果

図 3: 正常及び DM 患者皮膚組織における PKC- ϵ の発現

図 4: 正常人・DM 患者・CADM 患者および PM 患者における血清 miR-223 濃度

図 5: 皮膚筋炎の皮疹における miR-223 の役割

表 1. microRNA PCR アレイの結果 ($\Delta \Delta Ct$)

	normal skin	DM	CADM		normal skin	DM	CADM
let-7a	-0.44	ND	ND	miR-22	2.27	ND	ND
let-7b	12.205	0.35	24.06	miR-23b	-1.16	ND	-0.9
let-7c	2.99	3.04	1.2	miR-24	-0.73	-0.02	15.99
let-7d	6.86	ND	22.91	miR-26a	-2.26	ND	ND
let-7e	2.81	ND	19.07	miR-33a	6.22	ND	8.94
let-7f	8.82	13.07	ND	miR-92a	-0.88	ND	35.26
let-7g	1.52	ND	50.55	miR-93	4.63	3.32	27.62
Let-7i	2.84	9.61	3.72	miR-96	6.02	ND	47.74
miR-1	-1.21	ND	-0.98	miR-99a	0.23	ND	0.98
miR-7	7.15	ND	ND	miR-100	0.51	2.4	14.1
miR-9	7.43	6.65	40.7	miR-101	3.78	0.99	-0.15
miR-10a	3.13	ND	ND	miR-103	2.83	25.33	1.04
miR-10b	1.38	3.92	ND	miR-106b	4.75	4.91	59.65
miR-15a	4.24	3.61	1.96	miR-122	10.44	8.71	8.14
miR-15b	2.08	1.79	48.95	miR-124	8.98	ND	14.43
miR-16	-1.6	ND	-1.5	miR-125a-5p	-0.31	1.56	1.35
miR-17	3.48	ND	0.62	miR-125b	-3.55	-1.37	-2.89
miR-18a	6.48	11.87	49.36	miR-126	-0.87	ND	-0.54
miR-18b	7.62	ND	ND	miR-127-5p	10.86	9.93	10.16
miR-20a	3.02	ND	3.39	miR-128a	3.53	3.05	ND
miR-20b	7.12	ND	43.17	miR-129-5p	9.19	ND	ND
miR-21	-2.09	ND	20.41	miR-130a	5.9	5.55	4.02

	normal skin	DM	CADM		normal skin	DM	CADM
miR-132	6.19	ND	5.53	miR-210	5.65	ND	5.62
miR-133b	4.25	ND	1.58	miR-214	3.19	ND	4.28
miR-134	6.3	ND	ND	miR-215	9.4	ND	ND
miR-137	10.03	39.9	14.42	miR-218	ND	4.59	2.35
miR-141	3.42	ND	7.75	miR-219-5p	9.24	ND	ND
miR-142-3p	4.89	ND	1.66	miR-222	4.1	ND	15.67
miR-142-5p	9.79	ND	34.66	miR-223	1.88	ND	17.11
miR-146a	2.58	ND	23.59	miR-301a	9.19	ND	7.09
miR-146b-5p	2.88	ND	ND	miR-302a	12.51	11.03	56.92
miR-150	1.03	2.43	0.64	miR-302c	15.83	12.91	ND
miR-155	6.67	ND	5.07	miR-345	7.99	ND	ND
miR-181a	5.25	5.33	5.13	miR-370	10	7.43	6.84
miR-182	4.58	ND	4.36	miR-371-3p	13	10.29	13.32
miR-183	7.07	7.74	ND	miR-375	4.78	6.21	15.12
miR-185	5.29	ND	5.2	miR-378	2.19	ND	56.14
miR-192	6.58	ND	ND	miR-424	4.67	ND	ND
miR-194	6.04	ND	23.57	miR-452	7.62	7.5	16.4
miR-195	-1.75	-0.99	-2.22	miR-488	13.91	11.52	11.88
miR-196a	3.64	4.73	3.43	miR-498	16.05	14.49	ND
miR-205	-1.01	-1.18	-2.71	miR-503	ND	8.03	10.86
miR-206	2.79	-1.48	ND	miR-518b	16.64	ND	ND
miR-208	10.3	7.56	10.3	miR-520g	9.83	8.17	10.16

△ △Ct 値 (各 microRNA の Ct 値-housekeeping microRNA の Ct 値) を示す。

表 2. 血清 miR-223 濃度と DM の臨床症状との相関

Clinical and laboratory features	Patients with normal miR-223 (n=15)	Patients with decreased miR-223 (n=18)
Laboratory findings		
MRI change	44.4	50.0
electromyography change	77.8	83.0
muscle biopsy findings	88.9	100.0
elevated CK	64.3	62.5
elevated myoglobin	76.9	100.0
elevated aldolase	45.5	50.0
elevated IgG	25.0	26.6
Organ involvement		
Gottron's eruption	64.3	76.9
Heliotrope eruption	54.5	61.5
Muscle weakness	66.7	78.6
Interstitial pneumonia	23.1	30.7
Dysphagia	11.1	25.0
Joints	0.0	22.2
Cancer	23.1	7.6
ANA specificity		
Anti Jo-1	25.0	0.0
Anti U1 RNP	0.0	22.2

数字はパーセンテージ

图 1

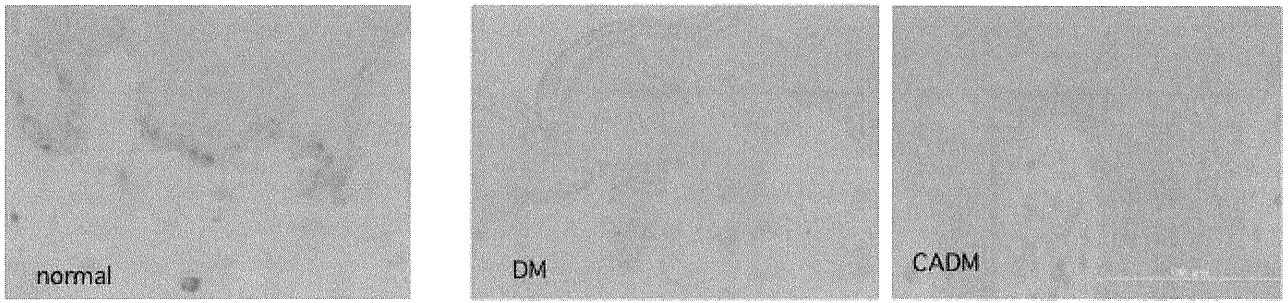


图 2

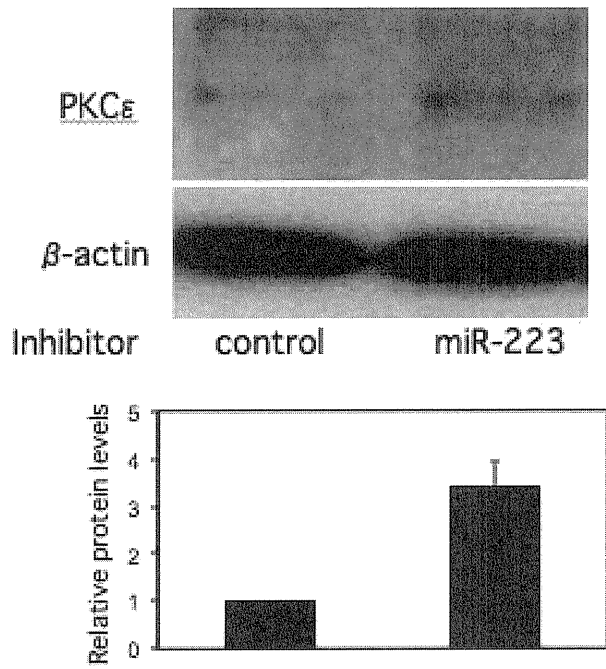


图 3

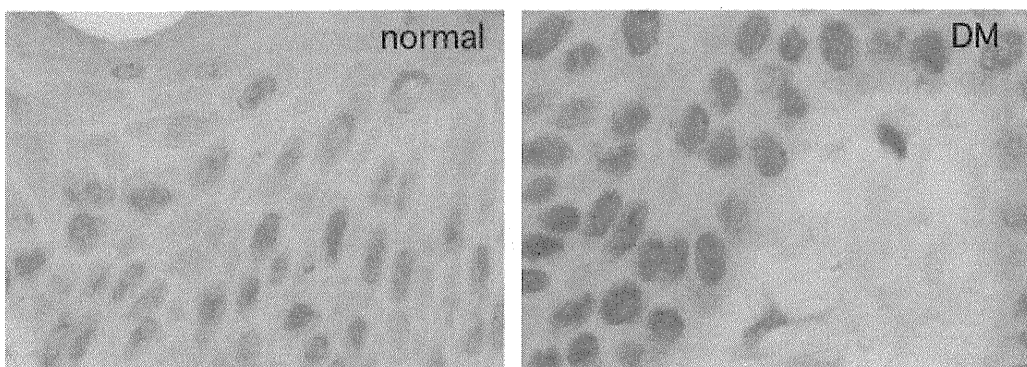


图 1, 2, 3
神人正寿

図 4

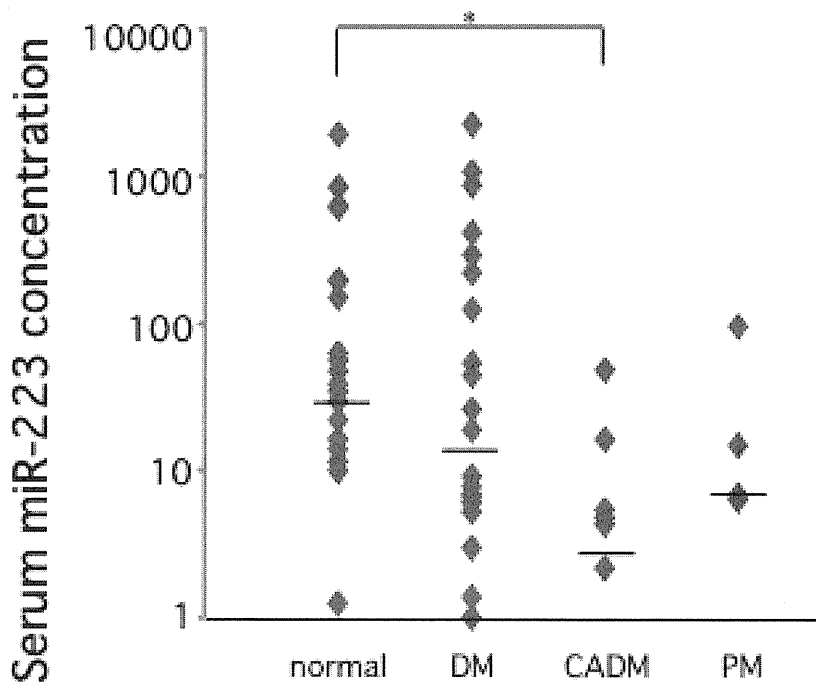


図 5

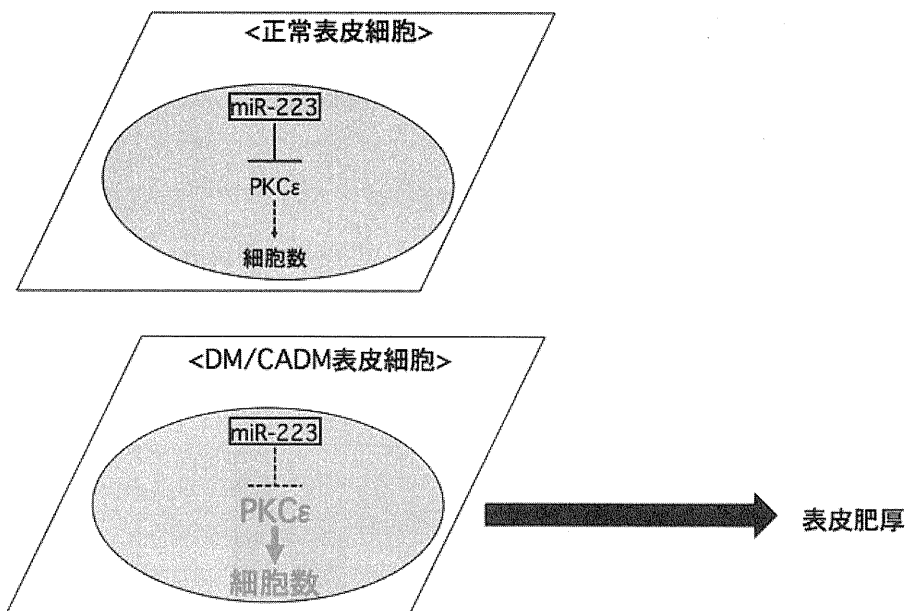


図 4, 5
神人正寿

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

自己免疫性筋炎における再生筋線維の役割に関する研究

研究分担者 上阪等 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科 准教授
研究協力者 木村直樹 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 膠原病・リウマチ内科学 大学院生
中里洋子 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 膠原病・リウマチ内科学 大学院生
高村聡人 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科 助教

研究要旨

多発性筋炎の動物モデルである C 蛋白誘導性筋炎 (C-protein induced myositis, CIM) の発症には、自己反応性 CD8 陽性 T 細胞の活性化とともに、筋局所の自然免疫の活性化が不可欠である。すなわち、CIM マウス由来の CD8 陽性 T 細胞をレシピエントマウスに養子移入する際に、足底に CFA や LPS などの TLR ligands を注射すると、注射した側の下肢筋には筋炎が起きるが、IFA を注射した側には筋炎を誘導できない。足底に CFA のみを注射すると注射した側の下肢筋にマクロファージが動員されることから、TLR 刺激による局所の自然免疫の活性化が CIM 発症に必要であると言える。ヒトの筋炎発症においても、筋局所の要因が重要であると考えられ、様々な原因による筋壊死とそれに続く筋再生がこれを担う可能性を示すために、片側の足底と背部にのみ C 蛋白ペプチド/CFA を免疫し、もう片足に筋壊死を起こす薬剤を筋注したところ、筋注部位に一致して見られる再生筋線維の周囲に筋炎が誘導された。その機序として、筋再生過程において活性化する筋衛星細胞や、それが分化した再生筋線維が分泌するケモカインが自己反応性 T 細胞の局所への誘導に寄与している可能性が考えられ、再生筋線維のケモカインの発現を調べたところ、CCL8 と CXCL10 が発現していることが分かった。さらに、CIM の病変部に浸潤する細胞がこれらのレセプターである CXCR3、CCR2、CCR5 を発現していることが分かった。筋壊死・再生が、筋炎発症に必要な局所の自然免疫活性化をもたらし、特に再生筋線維がケモカインを分泌することで、その役割を担っている可能性が示された。

A. 研究目的

多発性筋炎の動物モデルである C 蛋白誘導性筋炎 (C-protein induced myositis, CIM) を用いた実験により、CIM の発症には、自己反応性 T 細胞の活性化だけでは不十分で、筋局所の自然免疫の活性化が不可欠であることが明らかとなった。すなわち、CIM マウス由来の CD8 陽性 T 細胞を、C 蛋白ペプチドでパルスした骨髄樹状細胞と IL-2 存在下で共培養した後に、レシピエントマウスに移入し、足底に CFA や LPS などの TLR ligands を注射すると、注射した側の下肢筋には筋炎が起きるが、IFA を注射した側には筋炎を誘導できない。足底に CFA のみを注射すると注射した側の下肢筋にマクロファージが動員されることから、TLR 刺激による局所の自然免疫の活性化が CIM 発症に必要であると言える。これはヒトの筋炎において罹患筋が patchy に分布するという事実とも関連し得る。逆に治療的観点から見れば、筋局所の自然免疫活性化を抑えることが、筋炎の治療・再発予防につながる可能性があり、ヒト筋炎において CFA に代わり自然免疫の活性化に寄与する因子を同定することが重要となる。本研究の目的は、筋壊死とそれに続く筋再生が筋局所の免疫賦活化に関与するという仮説の下に、(1) 薬剤性の筋壊死が CFA に代わって筋炎を誘導するかどうか、さらに筋再生の過程で筋組織内に存在する筋原性幹細胞である衛星細胞 (satellite cell) が活性化し再生筋線維へと分化す

るが、これらが様々なケモカインを分泌することが知られており、(2) 再生筋線維が筋炎誘導に関与し得るかどうかを検証することである。

B. 研究方法

C 蛋白ペプチド (fragment 2) を終濃度 1 μ g/ μ l となるように CFA と混ぜて乳化し、200 μ g/body を C57BL/6 マウスの背部と右足底に打ち分け、pertussis toxin を 250ng 腹腔内投与した (day0)。day7 に左大腿四頭筋に 0.5% bupivacaine 100 μ l もしくは PBS 100 μ l を筋注し、day21 に筋炎を組織学的に評価した。

続いて、再生筋線維が T 細胞の遊走に関わるケモカインを分泌しているかをスクリーニングするために、mysphere 法によりマウス筋組織から得た筋芽細胞を筋管細胞に分化させ、16 種類のケモカインの発現を RT-PCR 法にて評価した。発現を認めたケモカインについては、筋管細胞の培養上清中のケモカインを ELISA 法により定量した。In vivo での再生筋線維のケモカイン発現を見るために、0.5% bupivacaine 100 μ l を筋注して 7 日後の筋切片より再生筋線維を Laser Capture Microdissection 法 (LCM 法) により切り出し、RNA 抽出して RT-PCR 法で発現を評価した。さらに、CIM の病変部に浸潤している細胞が、上記の方法で同定されたケモカインのレセプターを発現しているか、LCM 法を用いて同様に評価した。

(倫理面への配慮)

本学動物実験委員会の許可を得ている。

C. 研究結果

C 蛋白ペプチドを右足底と背部に免疫後 7 日目に、左大腿四頭筋に PBS を筋注しても、注射部位に一致して再生筋線維をわずかに認めるのみで、筋炎は誘導されなかったが、bupivacaine を筋注した群では、注射部位に一致して再生筋線維を認め、その周囲に筋炎像を認めた。その組織学的スコアは、右側、即ち足底に CFA を投与された側の大腿四頭筋に見られた筋炎のそれと同程度であった。

mysosphere 法により得た筋芽細胞を筋管細胞に分化させ、16 種類のケモカインについて RT-PCR 法で発現を調べたところ、CCL8、CXCL9、CXCL10、CX3CL1 の発現を認めた。これら 4 つのケモカインのうち CXCL9 を除く 3 つは筋管細胞の培養上清の ELISA によりタンパク質レベルでも発現、分泌されていることが確かめられた。0.5% bupivacaine 100 μ l を筋注して 7 日後の筋切片より LCM 法で再生筋線維を切り出し、RT-PCR 法にて上記 4 つのケモカインの発現を調べたところ、CCL8、CXCL9、CXCL10 の発現を認めた。これらの結果から、再生筋線維は少なくとも CCL8 と CXCL10 を発現していると考えられた。これらのケモカインのレセプターを CIM の病変部に浸潤している細胞が発現しているか調べるため、LCM 法により、浸潤細胞を切り出し、RT-PCR を行ったところ、CCR2 と CCR5 (CCL8 のレセプター)、CXCR3 (CXCL10 のレセプター) の発現を確認できた。

D. 考察

0.5% bupivacaine を筋注すると、速やかにその部位に筋壊死を起こし、1~3 日後をピークに好中球やマクロファージの浸潤が見られる。その過程で satellite cell が増殖、活性化し、分化して再生筋線維となる。この一連の過程が、筋局所の自然免疫の活性化に寄与し得ると考え、0.5% bupivacaine の筋注により筋炎が誘導できるか検証した。免疫時に CFA を投与しなかった側の大腿四頭筋に PBS を筋注しても筋炎はおきず、bupivacaine を筋注すると筋炎を誘導できたことから、筋壊死・再生に伴う筋局所の変化が CFA に代わって筋炎を誘導し得る下地を作ったと言える。

しかし、筋壊死・再生の過程には壊死筋線維、好中球、マクロファージ、satellite cell、再生筋線維など様々な要素が関与している。この中で、satellite cell は平常時から筋組織内に存在し、筋壊死や筋負荷などの刺激で活性化し、筋再生時には様々なケモカインを分泌することが知られていることから、筋局所へ T 細胞を誘導しうることが想像された。筋芽細胞を用いた in vitro の実験と、bupivacaine にて誘導した再生筋線維を対象とした in vivo の実験により、こ

れらに共通して発現しているケモカインとして、CCL8 と CXCL10 が同定され、これらのレセプターを CIM の病変に浸潤している細胞が発現していることが確認された。この結果から、再生筋線維が分泌するケモカインが自己反応性 T 細胞を筋組織へ誘導し、筋炎を発症あるいは持続させる可能性が示唆された。

今後は、CIM やヒト筋炎の病変中に見られる再生筋線維もこれらのケモカインを発現しているか確認し、ケモカインの中和抗体が CIM の治療に有効であるかどうか検証する必要がある。

E. 結論

再生筋線維は、自己反応性 T 細胞の病変局所への誘導を介して、自己免疫性筋炎の発症、持続に寄与している可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugihara T, Okiyama N, Watanabe N, Miyasaka N and Kohsaka H. IL-1 and TNF- α blockade for treatment of experimental polymyositis. Arthritis Rheum (in press)
2. 杉原毅彦、上阪 等 多発性筋炎モデルの治療法開発における有用性 リウマチ科 45(2); 158-163, 2011
3. 豊本雅康、上阪 等 ユビキチンリガーゼによる炎症性サイトカインの産生抑制 臨床免疫・アレルギー科 55(2):160-166, 2011
4. 上阪 等 三科の診る多発性筋炎・皮膚筋炎 医学のあゆみ 239(1)1-5, 2011
5. 上阪 等 ここまでわかった自己免疫疾患 多発性筋炎/皮膚筋炎 臨床検査 55(11), 1150-1155, 2011
6. 上阪 等 生物学的製剤 T 細胞活性化阻害薬 日本内科学会雑誌 100(10), 2979-2984, 2011
7. 上阪 等 炎症性筋疾患の病態と治療 炎症と免疫 20(1), 32-33, 2011
8. 上阪 等 多発性筋炎・皮膚筋炎 ガイドライン 外来診療 2011 泉 孝英編集 466-467 頁 日経メディカル開発 2011 年 3 月 21 日
9. 平田真哉、上阪 等 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) と C タンパク誘導性筋炎 (CIM) 岩倉洋一郎編 免疫疾患-疾患モデルの作成と利用 92-97 頁 エル・アイ・シー 2011 年 6 月 30 日
10. 木村直樹、上阪 等 多発性筋炎モデル動物による病態解析 炎症と免疫 先端医学社 20(1) 56-63 頁 2011

2. 学会発表

1. Shinya Hirata, Naoki Kimura, Nobuyuki Miyasaka and Hitoshi Kohsaka Chemokines expressed by the regenerating muscle cells in murine myositis model. 第 55 回日本リウマチ学会学術集

会 神戸 2011年7月17-20日

2. Kimura N, Hirata S, Maeda A, Miyasaka N, Kohsaka H. Proinflammatory muscle fiber regeneration in autoimmune myositis. (Poster) Gordon Research Conference on Myogenesis, Waterville Valley, New Hampshire, August 28 - September 2, 2011

3. 加勢優子、久保佳史、柏原純一、結城隆、藤井明啓、中江孝、宮坂信之、上阪等 免疫グロブリン製剤によるCタンパク誘導性筋炎の抑制とT細胞活性化に及ぼす影響 第23回日本神経免疫学会 平成23年9月15-17日 東京

4. 上阪 等、木村直樹、沖山奈緒子、宮坂信之 多発性筋炎における抗サイトカイン治療の標的—Seed and Soil Model— 第39回日本臨床免疫学会 平成23年9月15-17日 東京

5. 横田 雅也、鈴木 浩太郎、中込 大樹、岩田 有史、常世田 好司、中山 俊憲、上阪 等、中島 裕史 多発性筋炎マウスモデルにおける肥満細胞の役割の解析 第40回日本免疫学会学術集会 平成23年11月27-29日 幕張

6. HARADA Masaya, KAMIMURA Daisuke, OKUYAMAYuko, NAKATSUJI Yuji, KOHSAKA Hitoshi, MIYASAKA Nobuyuki, HIRANO Toshio, MURAKAMI Masaaki Enhancement of IL-6 amplifier activation by a soluble factor, SFX, which accelerates the development of autoimmune diseases 第40回日本免疫学会学術集会 平成23年11月27-29日 幕張

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

筋炎特異自己抗体の抗 155/140 抗体に関する研究

研究分担者	藤本 学	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科	准教授
研究協力者	濱口 儒人	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科	講師
研究協力者	松下 貴史	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科	助教
研究協力者	長谷川 稔	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科	講師
研究協力者	竹原 和彦	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科	教授

研究要旨

皮膚筋炎に特異的に検出される抗核抗体である抗 155/140 抗体について、その対応抗原と臨床的相関について検討した。対応抗原のうち、155 kD 蛋白は transcriptional intermediary factor 1- γ (TIF1- γ) と確認され、また 140 kD 蛋白は TIF1- α であることが明らかになった。さらに一部の例では TIF1- β に対する自己抗体ももっていた。このような TIF1 ファミリーに対する自己抗体は、皮膚筋炎全体の 17% に陽性であり、成人例では悪性腫瘍合併皮膚筋炎がきわめて高頻度であった。

A. 研究目的

多発性筋炎 (polymyositis, PM) および皮膚筋炎 (dermatomyositis, DM) は自己免疫がその発症機序に関与すると考えられており、自己抗体の解析はその診断および治療方針の決定においてもきわめて有用である。筋炎に特異的な自己抗体 (myositis-specific autoantibody) は、それぞれ特徴的な臨床症状と強く相関することが知られている。近年報告された抗 155/140 抗体および抗 p155 抗体は、DM 患者血清に特異的に検出される自己抗体で、小児 DM と悪性腫瘍合併成人 DM に高率に陽性になることが明らかになっている。抗 p155 抗体の対応抗原は transcriptional intermediary factor 1- γ (TIF1- γ) と報告されているが、抗 155/140 抗体の 155 kD 抗原も同一であるかどうか (すなわち抗 155/140 抗体と抗 p155 抗体は同一であるか)、また 140kD 抗原がどのような分子であるかは明らかになっていない。そこで、われわれは抗 155/140 抗体の対応抗原を解析し、さらに抗 155/140 抗体の臨床的相関についても検討を加えた。

B. 研究方法

対象は DM 患者 456 例であり、373 例は Bohan & Peter による診断基準を満たしており、残り 83 例は Sontheimer らによる clinically amyopathic DM の診断基準を満たしていた。また 11 例が小児 DM、445 例が成人 DM であった。コントロールとして多発性筋炎 (PM) 62 例、全身性エリテマトーデス 108 例、全身性強皮症 433 例を用いた。

これら患者の血清中の IgG をプロテイン G セフ

アロースビーズと結合させた後、35S で標識または未標識の K562 細胞溶解液と混合し反応させて免疫沈降を行った。次いで、SDS-PAGE により分離し、フィルムに感光させるか、ニトロセルロース膜に転写した後にウエスタンブロット法により検討を行った。TIF1- α , β , γ との一致性は、それぞれに対するポリクローナル抗体を用いて確認し、さらに、これらのリコンビナント蛋白に対する反応性をウエスタンブロット法により確認した。

さらに悪性腫瘍合併をはじめとする臨床的相関について後ろ向きに検討した。

(倫理面への配慮)

本研究には遺伝子解析は含まれていない。また、疫学研究や臨床研究に関する指針等を遵守して行った。

C. 研究結果

抗 155/140 抗体の対応抗原のうち、155 kD 抗原は、抗 155/140 抗体陽性血清にて免疫沈降した蛋白がウエスタンブロット法にて、TIF1- γ に対するポリクローナル抗体と反応したこと、免疫沈降前に TIF1- γ に対するポリクローナル抗体にて抗原を除去すると、155 kD のバンドが消失すること、リコンビナント TIF1- γ 蛋白と血清がウエスタンブロット法にて反応することなどから、TIF1- γ であることが確認された。

次に、140 kD という分子量から 140 kD 抗原は TIF1- α である可能性が考えられたため、TIF1- α に対する反応性を検討した。TIF1- γ の場合と同様に、抗 155/140 抗体陽性血清にて免疫沈降した蛋白がウエ

スタンブロット法にて、TIF1- α に対するポリクローナル抗体と反応したこと、免疫沈降前に TIF1- α に対するポリクローナル抗体にて抗原を除去すると、140 kD のバンドが消失すること、リコンビナント TIF1- α 蛋白と血清がウエスタンブロット法にて反応することなどから、TIF1- α であることが示された。

さらに、TIF1- α および TIF1- γ と相同性の高い分子として TIF1- β があるので、検討を行った。TIF1- β は約 100 kD の分子であり、100 kDa に太いバンドを有する例が確認された。これも同様の手法を用いて検討したところ、いくつかの症例において TIF1- β に対する抗体が存在することが明らかになった。さらに、1 例においては抗 TIF1- α 抗体および抗 TIF1- γ 抗体が陰性で、抗 TIF1- β 抗体のみが単独で陽性であることも確認された。

以上をまとめると、52 例が抗 TIF1- α/γ 抗体陽性で、25 例が抗 TIF1- γ 抗体単独陽性であった。抗 TIF1- α 単独陽性例はいなかった。さらに、TIF1- β に反応する例が 7 例あり、うち 4 例が $\alpha/\beta/\gamma$ すべてに陽性、2 例が β/γ に陽性、1 例が抗 TIF1- β 抗体単独陽性であった。このように、TIF1 ファミリー分子のいずれかに反応する抗体（抗 TIF1 抗体）をもつ例は DM 全体の 17% であった。一方、コントロールとした他の膠原病では抗 TIF1 抗体の陽性例はみられず、本抗体が DM において特異性が高いことが示された。

悪性腫瘍の合併（発症前後 3 年以内）は抗 TIF1 抗体陽性 DM の成人 74 例中 48 例（65%）に見出された。抗 TIF1- α/γ 抗体陽性群は抗 TIF1- γ 抗体単独陽性群に比べて悪性腫瘍合併率が有意に高かった

（73% v.s. 50%, $p < 0.05$ ）。一方、悪性腫瘍の臓器や組織には一定の傾向は認められなかった。小児例では悪性腫瘍のある例はなく、さらに 15-40 歳の若年成人でも悪性腫瘍は認められず、clinically amyopathic DM の病型が多かった。このように、悪性腫瘍合併例はすべて 45 歳以上であり、中年以降の抗 TIF1 抗体陽性 DM 症例は、悪性腫瘍合併のリスクが高いことが確認された。悪性腫瘍合併率は 40 歳以上で 75%、60 歳以上で 86% であった。

D. 考察

抗 155/140 抗体と抗 p155 抗体は、われわれおよび Targoff らによりそれぞれ報告された抗体であるが、これらは同一の 155 kD 抗原に反応することが確認され、症例により TIF1- α との反応性に違いが存在することが示された。TIF1 サブファミリーは、tripartite motif-containing (TRIM) ファミリーに属する分子であり、このサブファミリーには TIF1- α (TRIM24) TIF1- β (TRIM28) TIF1- γ (TRIM33)、TIF1- δ (TRIM66) があり、N 末端に PHD ドメインと BR ドメインをもつのが共通した特徴である。TIF1- α

や TIF1- γ は "chromatin reader" として種々の分子の発現を制御しており、p53 のユビキチン化などにも関与している。これらの分子の発現の変化は腫瘍形成に大きく関与することがこれまでに様々な報告で明らかになっており、例えば、TIF1- α は乳癌が悪性化するほど発現量が増加することが示されているし、TIF1- β は胃癌などの種々の悪性腫瘍で発現が増加していることが示されている。このような分子に対する自己抗体が出現することは、DM の発症における腫瘍免疫の役割を示唆するものであり興味深い。今後、このような分子に対する自己抗体の出現機序を明らかにすることによって、DM の発症機序の一端が明らかにできることが期待できる。

PM/DM では抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体（抗 Jo-1 抗体、抗 PL-12 抗体など）、抗 Mi-2 抗体、抗 CADM140 抗体などの自己抗体が臨床症状と強い相関をもつことが示されている。本抗体は DM の中でもっとも高頻度に出現する自己抗体の一つであり、成人では悪性腫瘍合併 DM の病型と密接に相関していることが示された。このように、本抗体は、DM の診断およびそのサブセット分類（小児 DM、成人悪性腫瘍合併 DM）にきわめて有用であり、今後、簡便に測定できる ELISA などの測定系の確立と普及が望まれる。

E. 結論

DM に特異的に検出される抗核抗体である抗 155/140 抗体の対応抗原は、155 kD 蛋白は TIF1- γ 、140 kD 蛋白は TIF1- α であることが明らかになった。さらに一部の例では TIF1- β に対する自己抗体もっており、TIF1 サブファミリーに対する自己抗体が存在することが示された。このような TIF1 サブファミリーに対する自己抗体は、皮膚筋炎全体の 17% に陽性で、成人例では悪性腫瘍合併皮膚筋炎の血清学的マーカーとなる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujimoto M, Hamaguchi Y, Kaji K, Matsushita T, Ichimura Y, Koder M, Ishiguro N, Ueda-Hayakawa I, Asano Y, Ogawa F, Fujikawa K, Miyagi T, Mabuchi E, Hirose K, Akimoto N, Hatta N, Tsutsui K, Higashi A, Igarashi A, Seishima M, Hasegawa M, Takehara K. Myositis-specific anti-155/140 autoantibodies target transcriptional intermediary factor family proteins. *Arthritis Rheum.* 2012; 64:513-522.

Hamaguchi Y, Kuwana M, Hoshino K, Hasegawa M, Kaji K, Matsushita T, Komura K, Nakamura M, Koder M, Suga N, Higashi A, Ogusu K, Tsutsui K,

Furusaki A, Tanabe H, Sasaoka S, Muro Y, Yoshikawa M, Ishiguro N, Ayano M, Muroi E, Fujikawa K, Umeda Y, Kawase M, Mabuchi E, Asano Y, Sodemoto K, Seishima M, Yamada H, Sato S, Takehara K, Fujimoto M. Clinical correlations with dermatomyositis-specific autoantibodies in adult Japanese patients with dermatomyositis. *Arch Dermatol*, 2011;147:391-8.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

TIF1- α を用いた皮膚筋炎特異的自己抗体検出に関する特許を出願中である。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

筋炎に合併する難治性間質性肺炎の診断と治療に関する研究

研究分担者 三森 経世 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学・教授
研究協力者 中嶋 蘭 京都大学医学部附属病院免疫・膠原病内科・医員

研究要旨

抗MDA5(melanoma differentiation-associated gene 5)抗体陽性例は筋炎に合併する間質性肺炎(IP)の最重症病型を示し、6か月生存率が約50%と最も予後不良である。同抗体陽性例は陰性例に比べ、筋症状に乏しく、急速進行性間質性肺炎を高率に併発し、血球減少・血清フェリチン値高値・肝胆道系酵素上昇などの特徴的な臨床所見を示すことが知られているが、その病態を示唆する所見として血清IL-6、IL-18、M-CSF高値を示しマクロファージ活性化病態が示唆された。同抗体陽性例の生存例と死亡例の臨床的背景を比較したところ、高齢・発症からIPの進行の速さ・呼吸不全が死亡リスクであった。治療は早期の3剤併用免疫抑制療法（ステロイド大量・シクロスポリン・シクロホスファミド）が奏功し、中でもシクロホスファミドはIPの病勢指標である血清フェリチン値の上昇を抑制することができ、病勢コントロールに重要である可能性が示唆された。

A. 研究目的

抗CADM-140(MDA5)抗体陽性皮膚筋炎(DM)患者の生存率を改善するため、その背景である病態を探究し、新規治療プロトコルを開発する。

B. 研究方法

①2005年～2011年に当科を無治療で初診したDM患者の血清を用い、³⁵S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。対照となる抗MDA5抗体(-)DM例は2005年～2007年に受診した患者を抽出した。
②抗MDA5抗体(+) (n=24)と抗MDA5抗体(-)DM(n=23)の血清サイトカインを測定し比較した。IL-6(e-Bioscience)、IL-18(MBL)、IL-22、IFN- γ 、M-CSF(R&D Systems)、IFN- β (PBL)はELISAで、IL-12p40、IL-10、IL-1 β 、TNF- α はCytometric Bead Array(Becton, Dickinson)を用いて測定した。
③抗MDA5抗体(+)例を生存例(n=11)と死亡例(n=13)に分け、臨床的背景・血清フェリチン値を比較した。
④3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)）を抗MDA5抗体(+)例に投与し、生存率の改善と病勢コントロールを検討した。

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は少なくとも最初の4回までは2週毎(できれば6回目まで)、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/ μ Lもしくは白血球数が半減する程度まで投与量を増量していく。

(倫理面への配慮)

患者血清の採取は京都大学医の倫理委員会の承認を得て、患者よりインフォームドコンセントを取得して行った。また、個人情報が変わらないようにするため、匿名符号を用いて実験および解析をした。患者に対する治療プロトコルの適応に関しては現在京都大学医の倫理委員会へ申請中である。

C. 研究結果

抗MDA5抗体(+)例では抗体(-)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、IL-22値は有意に低値であった(図1)。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。

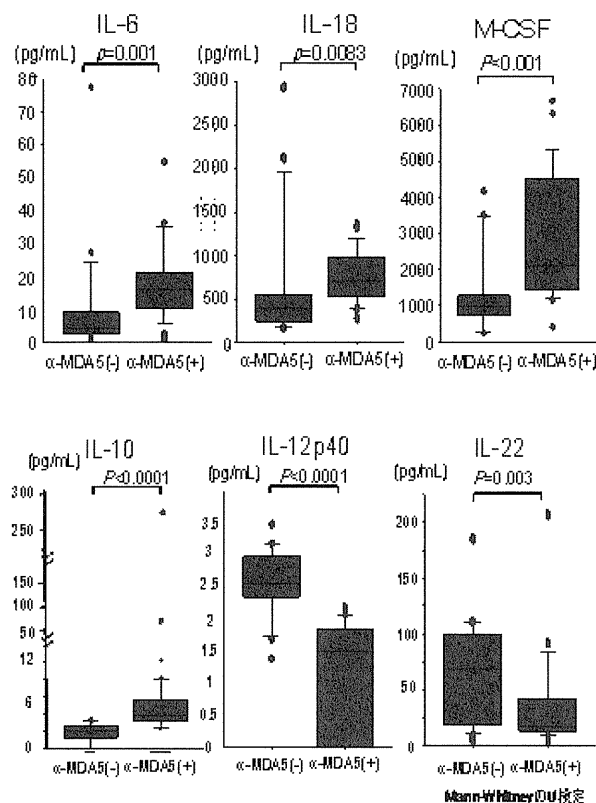


図1. 抗 MDA5 抗体(+)例と(-)例の血清中サイトカイン濃度

抗 MDA5 抗体(+)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 IP 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有意差は得られなかった。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。IP 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得られなかった（表 1）。

	αMDA5(+) Pts		p values
	生存 n=11	死亡 n=13	
治療前の血清フェリチン値 (ng/mL)	864.6±610.3	914.4±788.5	p*=0.96
免疫抑制薬投与前の血清フェリチン値 (ng/mL)	992.6±748.5	3394.3±5506.9	p*=0.42
年齢	49.6±9.7	58.7±8.1	p* <0.05
DMの皮疹発症から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(O ₂ 投与)(n(%))	2(18%)	12(92%)	p** <0.01

*Mann-Whitney U test, **Fisher's exact test

表 1. 抗 MDA5 抗(+)例の生存例と死亡例の比較

3 剤併用免疫抑制療法を最初から適用した例と、そうでない例（ステロイド大量で開始し病勢に応じて免疫抑制薬を追加）の生存率を比較すると、6 ヶ月生存率は前者で 57.1%、後者で 28.6%であり、前者で生存率の高い傾向にあった（図 2）。

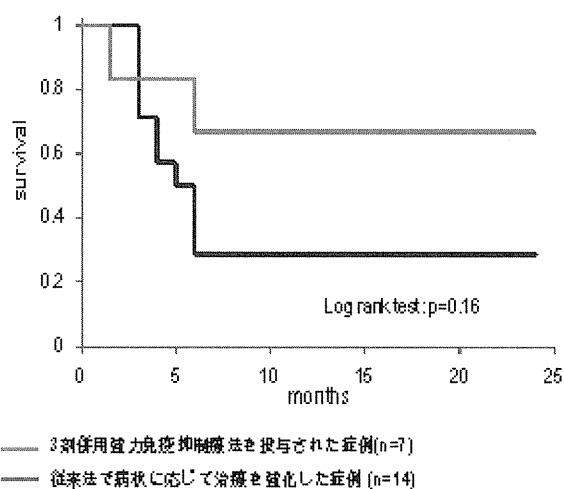
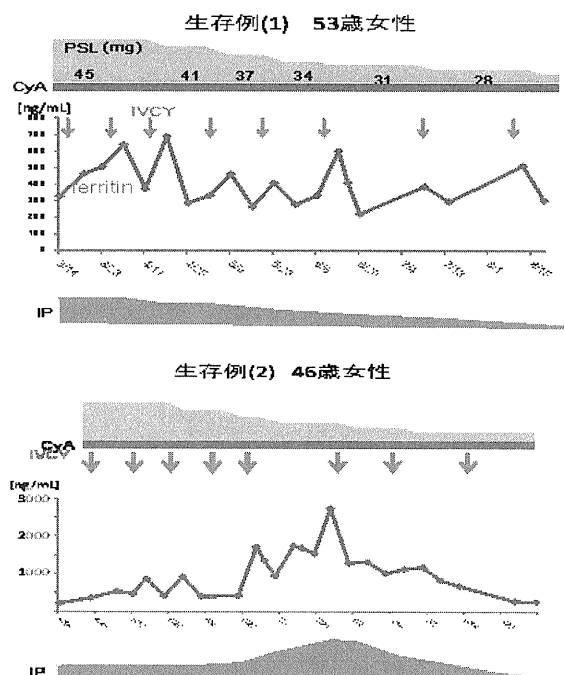


図 2. 抗 MDA5 抗体(+)例の治療による生命予後

抗 MDA5 抗体(+)例の疾患活動性指標としてフェリチンに注目すると、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（図 3）。



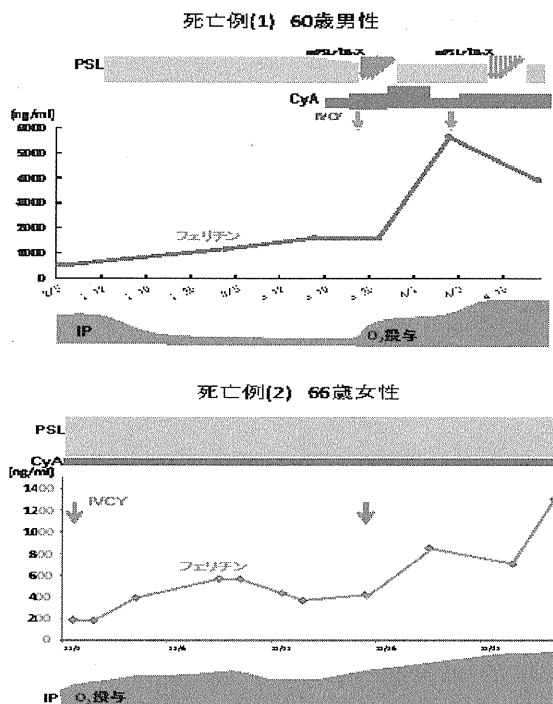


図3. 治療による血清フェリチンの変化

D. 考察

抗 MDA5 抗体(+)例における血清 IL-6、M-CSF、IL-18 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似ており、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と考え合わせると、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ものが存在する可能性がある。抗 MDA5(+)例の中で治療介入前に生命予後を予測する明らかな指標は指摘できなかったが、死亡例では IP がより急性発症であることや、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（酸素投与）をきたした場合には、肺障害が不可逆的になり、治療に反応しないことが確認された。

治療に用いた 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(+)例治療のキードラッグになることが示唆された。

E. 結論

- 1) 抗 MDA5 抗体(+)DM 例においてマクロファージの異常活性化が病態の背景に存在すると考えられた。
- 2) 抗 MDA5 抗体(+)例における生存群と死亡群を予測する明らかな指標は現時点ではなく、同抗体陽性を診断次第、早期に 3 剤併用免疫抑制

療法を開始することが望ましい。

- 3) IVCY が抗 MDA5 抗体(+)例の治療においてキードラッグとなる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishikawa Y, Yukawa N, Ohmura K, Hosono Y, Imura Y, Kawabata D, Nojima T, Fujii T, Usui T, Mimori T: A case of anti-synthetase syndrome in a rheumatoid arthritis patient with anti-PL-12 antibody following treatment with etanercept. *Clin Rheumatol* 30(3):429-32, 2011.
- 2) 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.
- 3) 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. *Resp Med* 105(9):1380-7, 2011.
- 4) Mimori T, Nakashima R, Hosono Y: Interstitial lung disease in myositis: Clinical subsets, biomarkers and treatment. *Curr Rheumatol Rep* (in press)

2. 学会発表

- 1) 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, 川端 大介, 大村 浩一郎, 臼井 崇, 藤井 隆夫, 三森 経世: 抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体症候群を診断するための新規 ELISA の開発。第 39 回日本臨床免疫学会、東京、2011 年 9 月 15 日
- 2) 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. 75th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, Chicago, Nov 6, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

筋無症候性皮膚筋炎および抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎に関する臨床疫学研究

研究分担者 室 慶直 名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚結合組織病態学 准教授
研究協力者 杉浦一充 名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚病態学 准教授
研究協力者 秋山真志 名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚病態学 教授
研究協力者 玉腰浩司 名古屋大学医学部保健学科 看護学 教授

研究要旨

皮膚筋炎（DM）においては、その発症や活動性に季節や居住緯度などの環境因子の影響が報告されている。急速進行性間質性肺炎を合併する臨床的筋無症候性（CA）DM と関連の深い抗 MDA5 抗体陽性例が、自施設では 2 割の患者に陽性であったことを過去に報告した。そこで、自施設の 36 人の CADM を含む 95 人の DM 患者について疫学的な検討を行ったところ、DM 全体における CADM および抗 MDA5 抗体陽性の割合は増加傾向にあり、さらに居住区人口とも関連が認められた。また、抗 MDA5 抗体陽性者に地域偏在性が見られたことは、MDA5 がウイルスに対する宿主防御に機能する分子であることから示唆的な所見と考える。

A. 研究目的

皮膚筋炎（dermatomyositis;DM）においては、その発症や活動性に季節や居住緯度などの環境因子の影響が報告されている。我々の施設における DM 患者の集積検討では、急速進行性の間質性肺炎をしばしば合併する臨床的筋無症候性（clinically amyopathic;CA）DM と関連の深い自己抗体である抗 MDA5 抗体が、2 割以上の患者に陽性であったことを過去に報告した。今回の研究では、単施設における CADM 患者や抗 MDA5 抗体陽性患者の増加傾向および居住地域や居住区人口についての検討を行った。

B. 研究方法

1994 年 10 月から 2011 年 6 月までに採血をした、36 人の臨床的 CADM 患者を含む 95 人の DM 患者について、CADM の発症数と抗 MDA5 抗体陽性数が罹患年齢、発症季節、年代区分、発症年次、居住区人口などと関連を有するかについて検討した。DM の診断は Bohan と Peter の診断基準により、CADM の診断は Sontheimer の診断基準に準じたが、CADM の中には発症後半年以内に間質性肺炎が発症し、治療が開始されている例も含んでいる。また、転居等の理由により、遠隔地より紹介された患者は除き、居住区人口に関しては各地方自

治体が発表した 2010 年の人口統計を用いた。抗 MDA5 抗体の有無は既報のリコンビナント MDA5 タンパクを用いた免疫沈降法によって同定した。統計学的検討は、 χ^2 乗検定およびコクラン-アーミテージ検定を使用した。なお、本研究は学内倫理委員会の認可を得ている。

C. 研究結果

採血年代で 3 区分（1994～1995、1996～2003、2004～2011）すると、全 DM は各区分に 32 例、30 例、33 例存在し、そのうち CADM の割合は 19%、40%、55%と有意に増加していた（ $p < 0.012$ ）。抗 MDA5 抗体陽性患者の割合も 6%、33%、42%と有意に増加していた（ $p < 0.003$ ）。なお、これら 3 区分における症例の平均発症年齢、発症から採血までの平均期間に関しては有意差を認めなかった。

1994～1995 年の区分にはそれ以前の発症の患者が多数存在したため、発症年次が 1994 年からの 72 患者に限定し、毎年次の CADM と抗 MDA5 抗体陽性患者の割合を検討した。その結果、双方とも有意に年次ごとに増加していることが判明した（CADM については $p = 0.029$ 、抗 MDA5 抗体については $p = 0.044$ ）。

居住都市の人口（x 千人）で 3 区分（0.5～108、130～826、2,200）すると、全 DM は各区分に 31 例、26 例、38 例存在し、

そのうち CADM の割合は 52%、39%、26% と、人口が少ない地域に多い傾向が見られ ($p < 0.096$)、抗 MDA5 抗体陽性患者の割合に関しては 45%、27%、13% と、人口が少ない地域に有意に多いことが明らかとなった ($p < 0.012$)。

抗 MDA5 抗体陽性例を地図上にプロットすると、愛知県北西部 (9 例) ならびに岐阜県東南部 (6 例) といった、いずれも木曾川周辺の一部地域に多い傾向が認められた。興味深いことに、これら 15 例のうち 5 例が 2002 年に、4 例が 2010 年に発症しており、これら地域の症例においては発症年にも特徴が認められた。

最後に、発症季節が明らかであった 78 例について季節性の検討を行ったところ、CADM、抗 MDA5 抗体陽性例に明らかな傾向は見られなかった。しかし、抗 MDA5 抗体陽性例に限って、居住区人口を 130x 千人以下 (14 例) と以上 (11 例) で、9~11 月の秋発症の症例数を検討すると、それぞれ 8 例と 1 例に陽性で、人口の少ない地域で秋に発症する抗 MDA5 抗体陽性例が多く見られた ($p = 0.033$)。

D. 考察

わが国中部地区における DM フェノタイプの疫学研究を行った。類似の研究はこれまでわが国では行われておらず、また抗 MDA5 抗体に関する疫学研究は世界的にも今回の研究が我々の知る限り初めてである。

今回の研究は population-based でも community-based でもないので、CADM や抗 MDA5 抗体陽性患者の発症率が増加しているかは不明である。また単施設における疫学研究であるので、病院までのアクセス状況や各地域における医療環境の差異、さらには当施設が大学病院であるという特性など様々なバイアスがかかり、その評価は必ずしも単純ではないが、今回の結果からは全 DM における CADM や抗 MDA5 抗体陽性患者の割合の増加傾向が示唆された。CADM に関しては、最近 10 年間で、その疾患概念が医師サイドに定着してきたバイアスも考慮されるべきであろうが、抗 MDA5 抗体については、当施設が外部に積極的に働きかけて症例を集めているわけではない。他の自己抗体は 1994~1995 年の区分における患者にも多数認められたことより、抗 MDA5 抗体陽性患者の割合の増加は確

かな事実であり、特筆すべきと思われる。

抗 MDA5 抗体陽性患者が大都市よりも非都市部に多かったことや、地域偏在性が認められたことは、MDA5 がピコルナウイルス等のある種のウイルスに対する宿主防御に機能する分子であることを考えると興味深い。以前より、DM の発症におけるコクサッキーウイルスなどピコルナウイルスの関与が言われており、当地区ではないものの、日本のある河川でのコクサッキーウイルス量の季節変動に関する報告も見られる。DM の発症因子や特定の自己抗体産生の原因を単一の環境因子に求めるのは困難であり、そこには遺伝的な要因も関与すると考えられるので、今回のような研究を基に、種々の疫学的側面からの case-controlled study が期待される。

E. 結論

DM のさらなる病態理解のために疫学研究は非常に重要であり、CADM や抗 MDA5 抗体陽性 DM 患者の増加傾向や居住地域についての今後の多施設共同研究が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Muro Y, Sugiura K, Hoshino K, Akiyama M, Tamakoshi K. Epidemiologic study of clinically amyopathic dermatomyositis and anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibodies in central Japan. *Arthritis Res Ther.* 2011; 13: R214.

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

皮膚筋炎の病態解明に向けてのヒト筋肉由来微小血管内皮細胞株樹立の試み

分担研究者 神田 隆¹⁾

共同研究者 ○清水文崇¹⁾, 斎藤和幸²⁾, 佐野泰照¹⁾, 前田敏彦¹⁾, 安部真彰¹⁾, 春木明代¹⁾

所属:1) 山口大学大学院医学系研究科 神経内科

2) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 脳神経病態学

研究要旨

皮膚筋炎では筋内血管周囲の炎症細胞浸潤と筋束周囲萎縮が際立った病理学的所見であり, 筋内小血管を首座とした炎症と筋内微小循環の破綻が皮膚筋炎の病態形成のために重要であると考えられている. 筋内小血管は筋内微小血管内皮細胞とペリサイトの 2 者から構成され, 正常状態ではこれらが筋内の内部環境を調整している. 皮膚筋炎では筋内小血管内皮細胞障害が生じることで, 炎症細胞の筋内浸潤を誘導し, 炎症性サイトカインを放出することで炎症を惹起し, 皮膚筋炎の発症・増悪に大いに関わる. これまでの皮膚筋炎での筋内小血管内皮障害の知見は筋組織の免疫組織学的検索により解明されてきたものが主流であるが, 血管内皮をターゲットとした皮膚筋炎の新規治療法を開発するためには, 筋内小血管由来内皮細胞やペリサイトの細胞生物学的知見・分子生物学的知見の理解が重要である. 我々は, ヒト筋内小血管を構成する筋内小血管由来内皮細胞とペリサイトの単離に成功した. これらの細胞は皮膚筋炎の血管内皮障害を分子レベルで解明する有用な病態モデルになりうる.

A. 研究目的

皮膚筋炎では筋内の間質に存在する小血管が免疫反応の標的のひとつと考えられている. このことは炎症細胞浸潤が筋線維束周囲の間質にある小血管に強くしばしば免疫複合体の沈着が認められること, 電顕標本で血管内皮の形態異常がみられ血管数が減少していることなどから裏付けられている. 皮膚筋炎の治療として, 副腎皮質ステロイド, 免疫抑制剤, 大量ガンマグロブリン静注療法などの自己免疫を抑制, あるいは調節することを目的とした治療法の有効性が確立されているが, これらの治療のいずれにも反応しない患者がある一定数いることも厳然たる事実である. したがって, 皮膚筋炎における筋内小血管障害の分子メカニズムを解明し, 皮膚筋炎の病態の本質である筋内小血管内皮細胞障害を修復, あるいは操作することによる皮膚筋炎の新規治療法開発が期待される. しかし, これまでの研究は筋組織の免疫組織学的観点からの知見がほとんどであり, 細胞生物学的見地からの皮膚筋炎における血管内皮障害の分子機構に関する研究成果は極めて少なかった. 皮膚筋炎の筋内小血管障害の分子メカニズムを解明するために, 我々はヒト筋小血管由来の

内皮細胞とペリサイトを単離培養し, それらの不死化細胞株を樹立することを試みた.

B. 研究方法

文書により同意が得られたヒト皮膚筋炎患者の生検筋より定法に従い, 細胞を単離した. 筋肉より血管内皮分画を分離し, plastic dish へ播種し培養した. ヒト細胞の不死化を目的として播種 4 日後に温度感受性 SV40 をレトロウイルスベクターを用いて導入した. クローニングカップを用いて血管内皮細胞とペリサイトの純粋なコロニーを単離した. 内皮細胞は von Willebrand 因子の発現, ペリサイトは α -smooth muscle actin (α -SMA)の発現で同定した.

(倫理面への配慮)

ヒト筋肉の採取に当たり, 山口大学医学部倫理委員会による承認を得た後研究への協力を文書で説明し同意を得た. 個人が特定できないようにサンプルの匿名化に配慮し, プライバシーの保護に万全を尽くした.

C. 研究結果

ヒト筋内小血管を構成する筋内小血管由来内皮細胞とペリサイトの単離に成功した. 単離した筋内小血管内皮細胞は, 免疫染色法で内皮細胞のマーカー