

TABLE 1 Comparison of clinical manifestations between patients with anti-MDA5 Ab and patients without anti-MDA5 Ab

Variable	Anti-MDA5 Ab		P-value
	Positive (n = 17)	Negative (n = 62)	
Age at onset, years	55.5 (13.0)	55.3 (15.0)	0.27
Female, n (%)	15 (88)	37 (60)	0.056
Skeletal muscle and skin features			
Muscle weakness, n (%)	4 (24)	38 (62)	<b>0.005</b>
Gottron's sign, n (%)	13 (76)	32 (52)	0.07
Ulcer region, n (%)	10 (59)	7 (12)	<b>0.00007</b>
Heliotrope rash, n (%)	8 (47)	23 (39)	0.56
Palmar papules, n (%)	11 (65)	13 (22)	<b>0.0014</b>
Periungual erythema, n (%)	10 (59)	24 (41)	0.2
Clinical diagnosis			
CADM, n (%)	14 (82)	7 (11)	<b>4.2 × 10<sup>-9</sup></b>
Pulmonary involvement and malignancy			
ILD, n (%)	16 (94)	37 (61)	<b>0.008</b>
RPILD, n (%)	12 (71)	4 (7)	<b>9.8 × 10<sup>-9</sup></b>
Mediastinal emphysema, n (%)	6 (35)	1 (2)	<b>2.1 × 10<sup>-5</sup></b>
Malignancies, n (%)	0 (0)	6 (10)	0.17
Laboratory data			
CPK, IU/l	173 (53–468)	905 (107–1607)	<b>0.00024</b>
KL-6, U/ml	1361 (825–1903)	1040 (345–1510)	0.36
Ferritin, ng/ml	1365 (894–1751)	180 (90–244)	<b>0.016</b>
Therapy			
Maximum PSL, mg/day	40 (35–50)	40 (22.5–50)	0.99
Immunosuppressant, n (%)	16 (94)	29 (47)	0.17
Outcome			
Death, n (%)	7 (41)	3 (5)	<b>6.6 × 10<sup>-6</sup></b>
MSA profile			
Anti-140 Ab positive, n (%)	16 (94)	0 (0)	<b>3.76 × 10<sup>-15</sup></b>
Anti-155/140 Ab positive, n (%)	0 (0)	7 (11)	0.35
Anti-ARS Ab positive, n (%)	0 (0)	30 (48)	<b>0.002</b>
Autoantibody negative	1 (6)	25 (40)	<b>0.005</b>
Anti-MDA5 Ab titre	230 (22–448)	1.3 (1.1–1.9)	<b>1.62 × 10<sup>-10</sup></b>

Ages are presented as mean (s.d.) values, while laboratory markers are medians (interquartile range). P-values were established using Fisher's exact test or the Mann-Whitney U-test. Bold indicates significant values. CPK: creatinine phosphokinase; PSL: prednisolone.

diagnosed pathologically with dermatitis consistent with DM. One patient revealed only mild mucin deposition, and another revealed only hyperpigmentation. A potential limitation of the present study is the fact that biopsies were taken from only a small number of patients. EMG was performed in one anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patient, revealing myogenic conversion consistent with myositis. Only one patient was found to have preceding ILDs among anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients. Skin manifestations preceded ILDs in the other patients. We showed the typical images about mediastinal emphysema, palmar pustule and regional ulcers in anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients with CADM (Fig. 1). In the frequency of cancer, anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients have no malignancy (0/17), whereas 6 of 62 (10%) patients in anti-MDA5 Ab<sup>-</sup> group were complicated malignancies. Anti-155/140 Abs were found in all six patients with cancer. We confirmed the profile of autoantibodies regarding the presence or absence of anti-MDA5 Ab: namely, all DM patients positive for anti-ARS Abs, anti-155/140 Abs and other types of autoantibodies

were among the anti-MDA5 Ab<sup>-</sup> group. There was no overlap between anti-MDA5 Ab and any other types of autoantibodies. Immunoprecipitation of anti-CADM-140 Abs from patients with anti-MDA5 Ab is shown in Fig. 2.

#### Survival rate of anti-MDA5<sup>+</sup> patients

Ten (12%) patients died within 5 years from the first treatment. The cumulative 6-month survival rates were 57.4 and 98.4% for DM with anti-MDA5 Ab and those without anti-MDA5 Ab, respectively (Fig. 3). The survival rates from the first visit to our hospital after adjusting for age, gender, with or without CSs and with or without immunosuppressants were significantly different between each subset ( $P=0.0151$ ). The first visit to our hospital was almost identical to the diagnosis of each patient. The presence of anti-MDA5 Ab was independently associated with mortality (relative hazard 6.33; 95% CI 1.43, 28.0) in a multivariable Cox regression model that included patient age at onset, gender, with or without CSs and with or without immunosuppressants. We have tried to compare

Fig. 1 Typical clinical manifestations of patients with anti-MDA5 Ab. The palmar pustules (A) were mainly located near the MCP and PIP joints (arrows) and multiple ulcer regions (B) were also observed. Chest CT scan (C) shows mediastinal emphysema in the middle of the chest cavity (arrows).

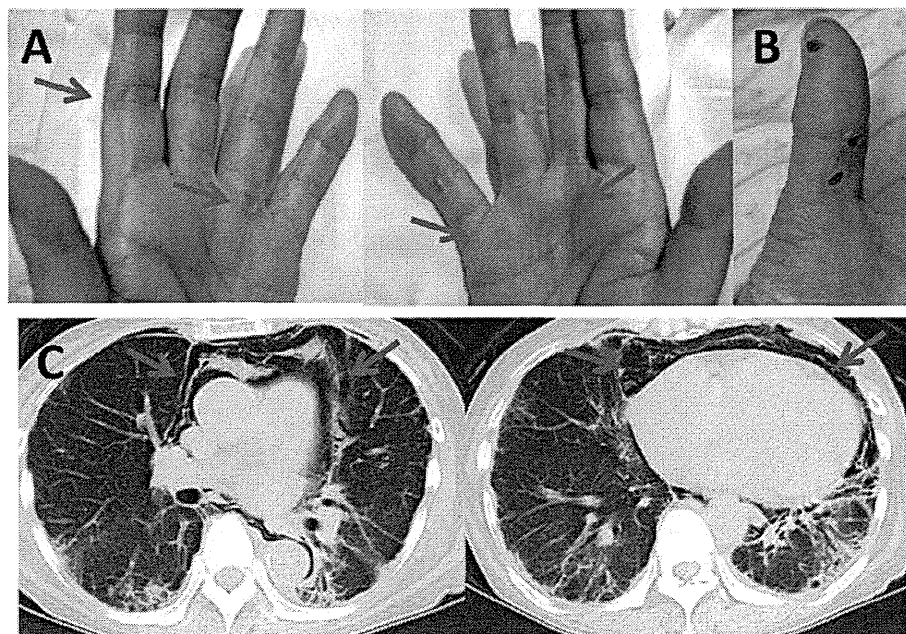
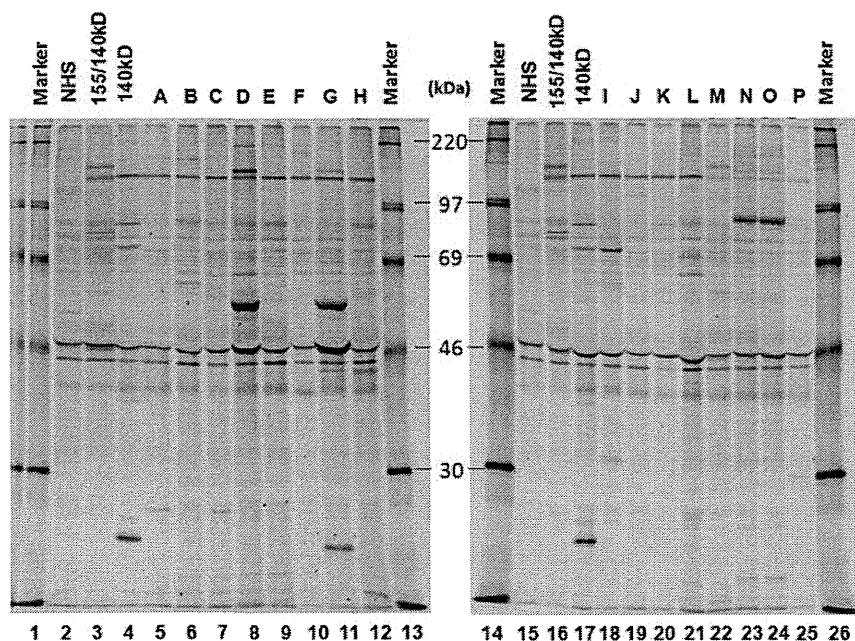
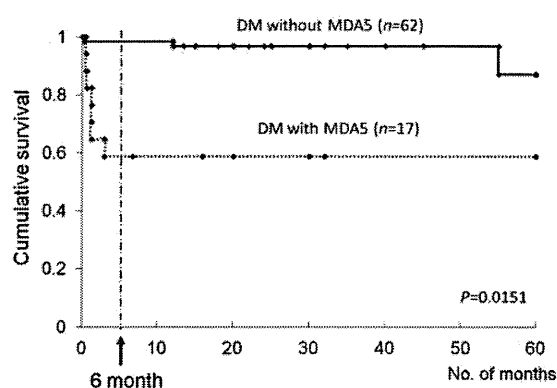


Fig. 2 Immunoprecipitation with anti-CADM-140 Ab from the 35S-labelled K562 cell extract. Lanes 5–12 and 18–25 show the results with anti-CADM-140-positive sera from DM patients with anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> (A–P). The results of the prototype sera of anti-155/140 Abs and anti-CADM-140 Abs are also shown (lanes 3, 16 and 4, 17, respectively). One sera of an anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patient immunoprecipitated not anti-CADM-140 Abs, but anti-U1-RNP Ab, which was deleted from Fig. 2.



the variables within anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> DM patients who were alive or dead and found that the regime of therapy was not different between two groups although the PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> and serum CPK levels were higher in the former. The value of anti-MDA5 Ab is significantly lower in the former (Table 2). All the deaths in the anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients were attributed to respiratory failure of RPILD. However, importantly, there was no acute exacerbation or progressive worsening of ILD by CT images after initial treatments in any of the anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients. In fact, all of the deaths of anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients occurred within the first 6 months (Fig. 3). In addition, no patient required home oxygen

**Fig. 3** The adjusted cumulative survival rates in the presence or absence of anti-MDA5 Ab. The cumulative survival rates from the first visit to the hospital with DM-related symptoms up to 5 years were examined as described in the text. Survival rate of anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients was significantly low compared with that of anti-MDA5 Ab<sup>-</sup> patients.  $P=0.0151$ , between the two groups.



**TABLE 2** Comparison of clinical parameters between alive and dead anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients

Variable	Anti-MDA5 Ab positive (n = 17)		P-value
	Alive (n = 10)	Dead (n = 7)	
Age at onset, years	52 (42–58.5)	59 (53–70)	0.051
Female, n (%)	9 (90)	6 (86)	1.00
Ulcer region, n (%)	5 (50)	5 (71)	0.70
Palmar papules, n (%)	7 (70)	5 (71)	1.00
CPK, IU/l	208 (90.3–864)	169 (33.5–359)	<b>0.014</b>
Anti-MDA5 Ab titre	168 (16.3–436)	230 (76.0–478)	<b>0.032</b>
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> before treatment, mmHg	395 (370–462)	203 (114–240)	<b>0.027</b>
Therapy			
Steroid pulse therapy, n (%)	5 (50)	7 (100)	0.09
CYC, n (%)	4 (40)	4 (57)	0.84
Oral calcinurin inhibitor, n (%)	6 (60)	7 (100)	0.18
I.V. calcinurin inhibitor, n (%)	1 (10)	3 (43)	0.32

Ages are presented as mean (s.d.) values, while laboratory markers are medians (interquartile range). P-values were established using Fisher's exact test or the Mann-Whitney U-test. Bold indicates significant values. PaO<sub>2</sub>: partial pressure of arterial oxygen; FiO<sub>2</sub>: fractional inspired oxygen concentration.

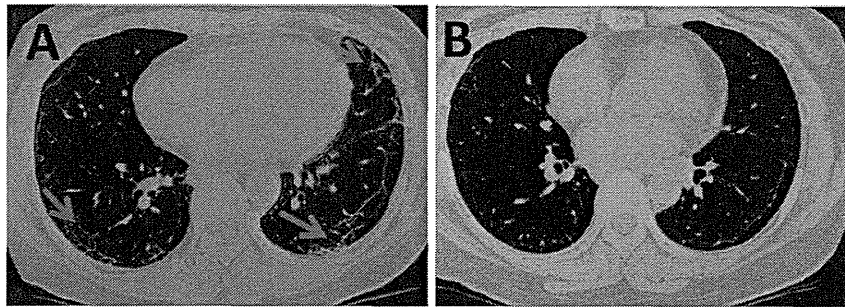
therapy after discharge among anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients who were alive during the first 6 months. We showed a short case presentation describing a patient with CADM positive for anti-MDA5 Ab. A 60-year-old female developed erythemas on the upper eyelids, fingers and elbows in July 2005. Three months later she developed exertional dyspnoea. A CT scan revealed interstitial lung shadow (Fig. 4A). We measured anti-CADM-140 Ab levels and anti-MDA5 Ab levels, which were both positive (anti-140 kDa Abs were detected by immunoprecipitation assay, and the titre of anti-MDA5 Abs was 544.109 U). She has been treated at our outpatient department and is in a stable condition (Fig. 4B).

## Discussion

Other Japanese groups recently identified the characteristics of anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> DM patients [11]. Our present data confirmed their findings. Additionally, we have shown some new characteristics of these patients, such as high frequencies of palmar papules, skin ulcers and mediastinal emphysema, as well as no overlapping of other types of autoantibodies. These data may help physicians to recognize features of anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients among DM patients. Since physicians are urged to start intense immunosuppressive therapy early for anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> DM patients, this information may be clinically indispensable.

Although the prognosis of anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients was worse than that of anti-MDA5 Ab<sup>-</sup> patients, none of the surviving anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients experienced acute exacerbation or progressive worsening of ILD after the initial treatment. This is quite different from anti-MDA5 Ab<sup>-</sup> patients, since ILD recurred in several of these patients and death ensued during long-term follow-up (Fig. 3). One of the characteristics of anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients is hyperferritinaemia [11, 16]. There are many

Fig. 4 A chest CT scan before and after treatment. A reticular shadow was revealed in the lower lung field (A) and it improved 4 years after disease onset (B). Arrows indicate the region that improved with treatment.



reports evaluating hyperferritinaemia in patients with autoimmune diseases [17]. The highest ferritin levels in autoimmune disorders are typically seen in patients with macrophage activation syndrome (MAS), often associated with adult-onset Still's disease (AOSD) [18]. It is well known that many viruses produce double-stranded (ds) RNA that can be recognized by two major arms of the innate immune system: the toll-like receptors (TLRs) and the Rig-I-like receptors (RLRs). MDA5 is a member of the RLR family that recognizes dsRNA within the cytosolic compartment and induces the production of inflammatory cytokines and cell surface molecules involved in the anti-viral response [19]. Considering that MAS could be induced by various infectious agents [20], and given the critical role of MDA5 in innate immune defence against viruses, one hypothesis is that the production of anti-MDA5 Ab is an epiphenomenon during virus infection that is associated with the onset of CADM and RPILD; namely, infection of the skin and lung epithelium by certain viruses. In general, innate immune responses do not recur; therefore we have not found exacerbation of ILD during the follow-up periods of anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> DM patients.

Most patients with ILD-complicated DM appear to be well controlled by CSs and immunosuppressants [21]. In contrast, patients with RPILD observed in DM were resistant to a variety of treatments [22, 23]. We have introduced CSs, cyclophosphamide and calcineurin inhibitor to anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients with RPILD. We could not find any significant difference in therapy between alive and dead patients. PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, serum CPK level and the value of anti-MDA5 Ab before treatment were prognostic factors. We showed the significance of the duration of preceding symptoms in patients positive for anti-MDA5 Abs. Although we do not have any definitive evidence, shorter duration of preceding symptoms to treatment could lead to better outcomes (supplementary Table 1, available as supplementary data at *Rheumatology* Online). Thus it is recommended that anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> patients who have typical CADM with signs of ILD be treated promptly with the combination of CSs, cyclophosphamide and calcineurin inhibitor.

In conclusion, the measurement of anti-MDA5 Ab by ELISA enables us to predict the prognosis of patients with CADM-complicated fatal RPILD. The characteristics of anti-MDA5 Ab<sup>+</sup> DM patients could be explained by the nature of MDA5 in innate immune responses to viruses. A multicentre, prospective study is warranted to confirm our results.

#### Rheumatology key messages

- Anti-MDA5 Ab is associated with characteristic pulmonary and skin involvement in patients with DM.
- Anti-MDA5 Ab predicts patients with CADM complicated by RPILD.

#### Acknowledgements

We thank Tomoko Hayashi (Department of Dermatology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University) for assisting in immunoprecipitation assays.

**Funding:** This study was supported in part by research grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan.

**Disclosure statement:** The authors have declared no conflicts of interest.

#### Supplementary data

Supplementary data are available at *Rheumatology* Online.

#### References

- 1 Yoshifuji H, Fujii T, Kobayashi S *et al*. Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* 2006;39:233–41.
- 2 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;52:1571–6.
- 3 Kaji K, Fujimoto M, Hasegawa M *et al.* Identification of a novel autoantibody reactive with 155 and 140 kDa nuclear proteins in patients with dermatomyositis: an association with malignancy. *Rheumatology* 2007;46:25–8.
  - 4 Ge Q, Wu Y, James JA *et al.* Epitope analysis of the major reactive region of the 100-kd protein of PM-Scl autoantigen. *Arthritis Rheum* 1996;39:1588–95.
  - 5 Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP *et al.* The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 1998;95:279–89.
  - 6 Espada G, Maldonado Cocco JA *et al.* Clinical and serologic characterization of an Argentine pediatric myositis cohort: identification of a novel autoantibody (anti-MJ) to a 142-kDa protein. *J Rheumatol* 2009;36:2547–51.
  - 7 Fujikawa K, Kawakami A, Kaji K *et al.* Association of distinct clinical subsets with myositis-specific autoantibodies towards anti-155/140-kDa polypeptides, anti-140-kDa polypeptides, and anti-aminoacyl tRNA synthetases in Japanese patients with dermatomyositis: a single-centre, cross-sectional study. *Scand J Rheumatol* 2009;38:263–7.
  - 8 Mukae H, Ishimoto H, Sakamoto N *et al.* Clinical differences between interstitial lung disease associated with clinically amyopathic dermatomyositis and classic dermatomyositis. *Chest* 2009;136:1341–7.
  - 9 Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S *et al.* The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology* 2010;49:433–40.
  - 10 Sato S, Hoshino K, Satoh T *et al.* 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* 2009;60:2193–200.
  - 11 Gono T, Kawaguchi Y, Satoh T *et al.* Clinical manifestation and prognostic factor in anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody-associated interstitial lung disease as a complication of dermatomyositis. *Rheumatology* 2010;49:1713–9.
  - 12 Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:344–7.
  - 13 Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:403–7.
  - 14 Sontheimer RD. Dermatomyositis: an overview of recent progress with emphasis on dermatologic aspects. *Dermatol Clin* 2002;20:387–408.
  - 15 Gerami P, Schope JM, McDonald L *et al.* A systematic review of adult-onset clinically amyopathic dermatomyositis (dermatomyositis sine myositis): a missing link within the spectrum of the idiopathic inflammatory myopathies. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:597–613.
  - 16 Gono T, Kawaguchi Y, Ozeki E *et al.* Serum ferritin correlates with activity of anti-MDA5 antibody-associated acute interstitial lung disease as a complication of dermatomyositis. *Mod Rheumatol* 2011;21:223–7.
  - 17 Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Ferritin in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2007;6:457–63.
  - 18 Grom AA, Mellins ED. Macrophage activation syndrome: advances towards understanding pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:561–6.
  - 19 Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* 2008;20:17–22.
  - 20 Maakaroun NR, Moanna A, Jacob JT *et al.* Viral infections associated with haemophagocytic syndrome. *Rev Med Virol* 2010;20:93–105.
  - 21 Yamasaki Y, Yamada H, Yamasaki M *et al.* Intravenous cyclophosphamide therapy for progressive interstitial pneumonia in patients with polymyositis/dermatomyositis. *Rheumatology* 2007;46:124–30.
  - 22 Kameda H, Nagasawa H, Ogawa H *et al.* Combination therapy with corticosteroids, cyclosporin A, and intravenous pulse cyclophosphamide for acute/subacute interstitial pneumonia in patients with dermatomyositis. *J Rheumatol* 2005;32:1719–26.
  - 23 Nobutoh T, Kohda M, Doi Y *et al.* An autopsy case of dermatomyositis with rapidly progressive diffuse alveolar damage. *J Dermatol* 1998;25:32–6.

# 炎症と免疫

別刷

---

発行：株式会社 先端医学社

〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町2-17-8 KDX浜町ビル

# 全身性エリテマトーデスと microRNA

石井智徳\* 張替秀郎\*

免疫担当細胞において、microRNA (miRNA) が種々の messengerRNA (mRNA) の発現量を調節し免疫反応を調整する重要な役割を担っていることが判明してきた。さまざまな自己免疫疾患で、免疫担当細胞における miRNA の発現異常が病態と関連することが報告されてきているが、全身性エリテマトーデス (SLE) は、最近とくにその報告が急速に増え注目される疾患である。いくつかの miRNA で、SLE 患者由来免疫担当細胞における発現異常と、それに伴って起こる免疫反応に関連する蛋白質の量的変化をもとにした現象が、疾患との関連で詳細に解析されている。今後も SLE の病因、病態の解明を目的に miRNA の解析が進むと考えられるが、さらに SLE の診断、病状の把握、活動性判定などに用いられる新規バイオマーカーとして、あるいは免疫異常の是正をする新規治療薬として種々の臨床応用も期待されている。

## はじめに

ヒトにおいても DNA 配列のすべてが解読され、DNA から RNA が転写され、その RNA が蛋白質に翻訳されヒトの形質が発現するというセントラルドグマだけでは、ヒトの多様性を説明できないことが明らかになった。そんな中、蛋白質に翻訳されない non-coding RNA (ncRNA) が、さまざまな生理活性をもち蛋白発現に重要な役割を担っていることが判明してきた。約 20 塩基の小分子 ncRNA である microRNA (miRNA) は、DNA メチル化やヒストン修飾などとともに、epigenetic に遺伝子発現を調節する機能をもち、細胞増殖、

分化などの生理的機能に大きくかかわっている<sup>1)2)</sup>。免疫応答においても免疫担当細胞の遺伝子発現に影響を与え免疫反応の調整などに深く関連していることが、つぎつぎと明らかにされてきている。

## 1. SLE の病態

SLE は、多彩な自己抗体産生とその各種臓器への沈着によって引き起こされる炎症性疾患であり、自己免疫疾患の最も代表的な疾患の 1 つとして多くの研究がなされている。近年全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE) においても、遺伝子配列の違いとならんで、遺伝子発現の調整異常を検討する研究が注目されており、その対象の 1 つが miRNA 発現である。SLE は臓器障害性自己抗体の出現が本態であるが、抗体産生細胞以外の免疫担当細胞にも多彩な異常が報告されている。樹状細胞、T 細胞、B 細胞、NK 細胞などそれぞれにサブセットの異常や、各種刺激への応答の異常があることが報告されている。

### [キーワード]

microRNA  
SLE  
バイオマーカー  
インターフェロン  
メチル化

\*ISHII Tomonori, HARIGAE Hideo/東北大学大学院医学系  
研究科血液免疫疾患制御分野

表 1. SLE における miRNA の発現異常(機能が解析されているもののみ抜粋) (文献 7~13 を参考に作成)

発現する細胞	Micro RNA の発現		掲載論文
	SLE で上昇	SLE で低下	
全血		miR-31, miR-146a	8)
PBMC	miR-21, miR-198	miR-184	7)
	miR-21		11)
T 細胞		miR-31	9)
		miR-125a	10)
CD4 陽性 T 細胞	miR-21		11)
	miR-21, miR-148a		12)
	miR-126		13)

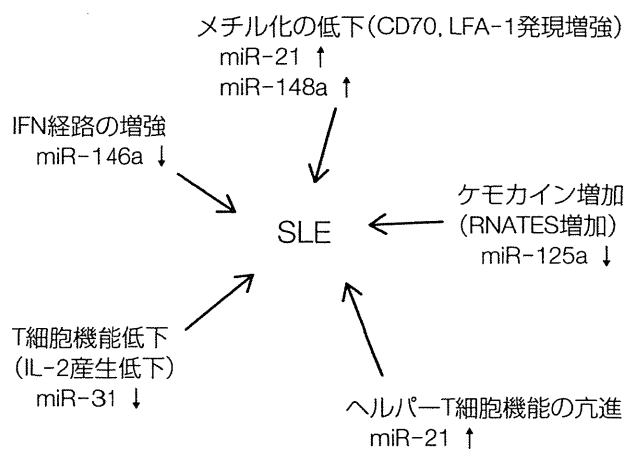


図 1. SLE 病態と miRNA 発現異常の関係

また、細胞の活性化やアポトーシスの異常<sup>3)</sup>、DNA メチル化の異常<sup>4)</sup>なども報告されている。最近、最も注目されている SLE の病態はインターフェロン(IFN)関連シグナルの異常である<sup>5)6)</sup>。SLE においては typeI IFN の発現が亢進しており自己抗体産生に大きく関与しているとされ、いくつかの IFN シグナルを抑制する薬剤の治験がはじまっている。

## 2. SLE の病態における miRNA の関与

miRNA の主要な機能は特定の遺伝子発現を制御することであるが、細胞の種類、また細胞のおかれた状態によってその発現は変わり役割も変わる。SLE での miRNA の発現異常も、どの細胞でどんな状況下で起こっているかは重要である。多くの研究で miRNA array による解析がおこなわれ、多数の miRNA が SLE において変動することが報告されているが、本稿ではヒト SLE に限定し、さらにその機能について明らかにされている miRNA を中心に最新の研究の成果を紹介する(表 1, 図 1)。ヒト SLE において miRNA の発現異常に関する報告の口火を切ったのは Dai ら<sup>7)</sup>の報告であった。彼らは SLE 患者から得られた末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)における miRNA の発現を、正常人および同様の自己抗体産生疾患である血小板減少性紫斑病(idiopathic thrombocytopenic purpura: ITP)患者由来の PBMC と array により比較し SLE において 7 つの miRNA の発現抑制、9 つの miRNA の発現増加を見出し、さらに、疾患活動性に



より発現量の変動する8つのmiRNAを同定した。

### 1) 全血でのmiRNAの変動

全血でSLEに発現低下が認められるmiRNAとしてTangら<sup>8)</sup>がmiR-146aを報告した。miR-146aはSLEで発現が低下しているのみでなく、その発現量はsystemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI)などの疾患活動性とも逆相関していた。miR-146aはSLEの病態で重要な役割をしているとされるIFN関連のシグナルに深く関与している。miR-146aの発現はToll-like receptor (TLR)やIFN受容体からのシグナルで誘導される。一方で誘導されたmiR-146aの標的はIRAK1, TRAF6, IRF5などのtype I IFNを誘導する際に重要な分子で、さらにINF受容体からの細胞内へのシグナルに重要であるSTAT1も標的である。このためmiR-146aにはIFNシグナルを負に制御する生理的役割がある。したがって、SLEにおけるmiR-146aの発現低下は、IFN経路の活性化というSLEの病態を説明できる現象として注目される。

### 2) T細胞でのmiRNAの変動

分離精製したT細胞において、正常人に比較しSLEで発現低下を認めたmiRNAとして、miR-31<sup>9)</sup>とmiR-125a<sup>10)</sup>が挙げられる。miR-31の標的の1つはRhoAである。RhoAはT細胞の活性化において、nuclear factor of activated T-cells (NFAT)を介したIL-2産生を抑制する機能があるが、SLE患者T細胞においてはmiR-31の発現低下とともに、RhoAの発現の上昇があり、これにより刺激後起こるNFATを介したIL-2産生が抑制されることが示された<sup>9)</sup>。これは、SLE T細胞における代表的な機能異常であるIL-2産生能の低下を説明する現象であり、実際SLE T細胞へのmiR-31の過剰発現によりIL-2産生能の回復が認められた。miR-125aは、T細胞で産生されるRANTESの転写を正に調節する

Kruppel-like factor 13 (KLF13)を標的とするmiRNAである。正常人T細胞では、活性化によりmiR-125aが誘導されKLF13の発現が減少しRANTESが減少するという負の制御が成立している。一方、SLE T細胞ではmiR-125aの減少とそれに伴うKLF13、およびRANTESの発現上昇が認められ、SLEの病態との関連が推察された<sup>10)</sup>。

### 3) CD4陽性T細胞

SLE CD4陽性T細胞において発現が上昇するmiRNAとしてmiR-21が挙げられる<sup>11)12)</sup>。さらにmiR-21の発現量はSLEDAIと正の相関を示す。SLE病態に影響するmiR-21の機能的な役割が2つ報告されている。Stagakisら<sup>11)</sup>は、miR-21のSLEと関連した標的としてprogrammed cell death protein 4 (PDCD4)を候補として挙げた。筆者らはmiR-21の発現上昇により、SLE T細胞刺激時のIL-10の産生増強、T細胞上のCD40Lの発現上昇、T細胞補助によって起こるB細胞の抗体産生細胞への分化促進と抗体産生の増加、さらにそれらがPDCD4の発現低下と連動していることを示し、SLEにおける抗体産生異常とつながるとした。一方Panら<sup>12)</sup>はmiR-21とDNAメチル化との関連を報告している。彼らはmiR-21の標的としてRAS guanyl-releasing protein 1 (RASGRP1)を挙げ、miR-21の上昇によるRASGRP1の低下が間接的にDNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 (DNMT1)の発現低下を引き起こしSLEにみられるDNAメチル化の低下とかわっていることを示した。Panら<sup>12)</sup>は同時にmiR-148aのSLE CD4陽性T細胞における発現上昇と、その発現量とSLEDAIの正の相関を報告している。miR-148aは直接DNMT1遺伝子のcoding sequenceに結合しその発現を低下させメチル化を抑制する。このメチル化の低下はT細胞におけるCD70やLFA-1の発現を上昇させSLEの病態の一部を形成することが以前より報告されている。Zhaoら<sup>13)</sup>はSLE CD4陽性細胞で

表 2. 疾患活動性パラメーターと各サンプル中 miRNA の関係

相関のタイプ	パラメーター	血球	血漿	尿沈渣
正の相関	SLEDAI	21, 25, 106b, 148a, 148b		155
	GFR		146a, 155, 192, 200b, 200c, 205, 429	146a
	尿蛋白		146a	155
負の相関	SLEDAI	196a, 146a, 379	146a, 200a	
	GFR			
	尿蛋白		146a, 200a, 429	

GFR：糸球体濾過量 (glomerular filtration rate)

のメチル化低下の機序として miR-126 の関与を報告した。miR-126 の標的は DNMT1 であり、SLE CD4 陽性細胞においては miR-126 の発現上昇に伴い DNMT1 発現の抑制からメチル化の低下が起り SLE の病態の一部に関与する。一方 miR-126 は SLE CD4 陽性細胞での発現量が SLEDAI と相関していない点に 1 つの特徴がある。

#### 4) B 細胞

SLE B 細胞においてもいくつかの miRNA の増減が認められている。たとえば T 細胞と同時に B 細胞で増加するものとして miR-21, miR-25, B 細胞のみで増加が認められるものとして miR-155, B 細胞のみで減少する miR-15a, miR-16, miR-150 などが報告されているが<sup>11)</sup>、その及ぼす機能はいずれも不明で今後の研究が待たれる。

#### 5) 腎組織

SLE 腎組織と健常腎組織とのあいだで発現に違いが認められる miRNA が報告されている<sup>14)15)</sup>。血球系細胞で検討された結果は腎組織のそれとは大きく異なり、たとえば miR-146a など血球系では SLE で低下を認めた miRNA が腎糸球体においては発現上昇を認めていた。Lu ら<sup>15)</sup>は腎組織をさらに糸球体と尿細管間質に分けて検討してい

るが、糸球体、尿細管間質のあいだでも発現に差異を認めている。今後、miRNA の局所分布は ISN/RPS 分類などと違った観点で腎局所での病態把握に役立つ可能性はあるが現時点では断片的なデータでしかない。

### 3. SLE におけるバイオマーカーとしての miRNA

免疫担当細胞における miRNA のいくつかは上述のように SLE により増減し、さらに多くの miRNA において疾患活動性がその発現量に影響し SLEDAI と相関を示すため活動性を判定するバイオマーカーの候補となる。一方活動性に影響を受けない miR-126 の発現は逆に興味深い。SLE における特異性についてはほとんど検討されておらず今後の課題である。またバイオマーカーとしては血清、血漿、尿を使用するの検討が重要になるが、これらの検討はいまだ報告は少ない。Wang ら<sup>16)</sup>は正常人、関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA), SLE のプール血漿から得た RNA を使用して microarray をおこない miR-126 が SLE 特異的に増加していることを報告した。同報告では、SLE 血漿で miR-125a, 155, 146a が減少、miR16, 21, 223, 451 が増加していたが、これらは RA においても同様の変化を認め

た。Wangらは血清のみでなく尿沈渣、尿上清におけるmiRNA発現について検討し、いくつかの報告をしているが<sup>17)~19)</sup>とくに尿沈渣におけるmiR-146aとmiR-155のバイオマーカーとしての可能性を示唆している。疾患活動性パラメーターと各種サンプルとの関連について、現時点で有用と報告されているものを表2に示す。ただし、これらの中には統計的には有意な変化であるが変化量は微小であるものも多く、実際臨床検査としての活用はまだ難しい。

### おわりに—治療薬としてのmiRNA—

SLEで発現異常を認めるmiR-21, 31, 125a, 126, 146a, 148aに関しては、miRNA発現異常の是正により*in vitro*におけるリンパ球反応の正常化が示されており、治療への可能性が示唆されている。しかしながら、現時点ではそれぞれの細胞における部分的な反応が改善されたことが示されただけであり、疾患全体としての免疫反応をどれだけ制御できるかは未知である。遺伝子導入による治療となりえ、また、まったく新しい機序の薬剤として今後の研究が待たれる分野である。

### 文献

- 1) Baulcombe D : DNA events. An RNA microcosm. *Science* **297** : 2002-2003, 2002
- 2) Friedman RC *et al* : Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19** : 92-105, 2009
- 3) Elkon KB : Apoptosis and SLE. *Lupus* **3** : 1-2, 1994
- 4) Javierre BM *et al* : A new epigenetic challenge : systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol* **711** : 117-136, 2011
- 5) Chugh PK : Lupus : novel therapies in clinical development. *Eur J Intern Med* **23** : 212-218, 2012
- 6) Elkon KB *et al* : Type I interferon and systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res* **31** : 803-812, 2011
- 7) Dai Y *et al* : Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* **16** : 939-946, 2007
- 8) Tang Y *et al* : MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* **60** : 1065-1075, 2009
- 9) Fan W *et al* : Identification of microRNA-31 as a novel regulator contributing to impaired IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **64** : 3715-3725, 2012
- 10) Zhao X *et al* : MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **62** : 3425-3435, 2010
- 11) Stagakis E *et al* : Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis : miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression. *Ann Rheum Dis* **70** : 1496-1506, 2011
- 12) Pan W *et al* : MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol* **184** : 6773-6781, 2010
- 13) Zhao S *et al* : MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4+ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase 1. *Arthritis Rheum* **63** : 1376-1386, 2010
- 14) Dai Y *et al* : Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Rheumatol Int* **29** : 749-754, 2009
- 15) Lu J *et al* : Glomerular and tubulointerstitial miR-638, miR-198 and miR-146a expression in lupus nephritis. *Nephrology(Carlton)* **17** : 346-351, 2012
- 16) Wang H *et al* : Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res* **160** : 198-206, 2012
- 17) Wang G *et al* : Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **20** : 493-500, 2011

- 18) Wang G *et al* : Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **37** : 2516-2522, 2010
- 19) Wang G *et al* : Expression of miR-146a and miR-155 in the urinary sediment of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* **31** : 435-440, 2012

