

論 文 概 要

論文題目：

抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎関連の
間質性肺炎における病態解析

指導教員：

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻
乃村 俊史 教授

所 属：筑波大学大学院人間総合科学研究科
疾患制御医学専攻

氏 名：市村 裕輝

目 的：

抗 melanoma-differentiation associated gene 5 (MDA5)抗体陽性急速進行性間質性肺炎(RP-ILD)は急速に肺病変が進行する致死率に高い疾患であるが、病変組織の解析研究は乏しく、また病態モデルとなりうるものもなく、その病態解明が進んでいない。今回の研究では、抗 MDA5 抗体陽性 RP-ILD 症例の肺組織の遺伝子解析を行い、その病態に関与している因子を探索する。また、マウス実験にて、症例における自己抗原である MDA5 に対する自己免疫反応が ILD 発症の病態に関与しているかを検討することにより、本疾患の発症病態を解明する。

対象と方法：

抗 MDA5 抗体陽性 RP-ILD により死亡した 74 歳女性の剖検肺サンプルの RNA シークエンス解析を行った。対照肺として、年齢性別をマッチさせた肺癌患者手術検体の非癌部肺凍結組織を用いた。遺伝子の発現量が対照肺と比し 5 倍以上異なる遺伝子を“発現量の異なる遺伝子 (DEG)”とした。Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html>)にて DEGs を用い、Gene enrichment 解析、Protein-protein interaction network 解析を行った。マウス実験では、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系にてリコンビナントマウス MDA5 全長蛋白を作成し、これを完全フロイドアジュバント (CFA) と 1:1 で混和しエマルジョン化したものを 8-10 週齢の C57BL/6 マウスに、週 1 回計 4 回皮下投与することで免疫した。また初回免疫時には同時に百日咳毒素の腹腔内投与を行った。最終免疫から 14 日目に肺・リンパ節・血漿または血清の回収を行った。対照群は、CFA のみからなるエマルジョン投与群とした。一部のマウスには、最終免疫時に polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)] を経鼻投与した。同様の実験を μ MT マウス・Rag1 欠損マウスに対しても施行した。また、上述のように poly(I:C) 投与を行った MDA5 免疫マウスに抗 CD4 除去抗体・抗 CD8 除去抗体・抗インターロイキン(IL)-6 受容体抗体をそれぞれ投与した。血清は EL4 細胞破碎液と免疫沈降を行った後、抗 MDA5 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、血清中の抗マウス MDA5 抗体を検出した。また、マウスリンパ節より CD3 陽性 T 細胞を単離し、リコンビナント MDA5 蛋白を提示した骨髄由来樹状細胞と共培養した後、WST-I 試験にて、MDA5 反応性 T 細胞増殖反応の有無を評価した。肺組織はヘマトキシリン-エオジン染色、マッソントリクローム染色、CD4・CD8・CD11b の免疫組織化学染色にて、病理学的に評価した。

poly(I:C)投与 14 日目のマウスでは Hydroxyproline アッセイを用い、肺のコラーゲン量の定量を行った。また、肺組織より mRNA を抽出し、インターフェロン (IFN) 関連遺伝子、IL-6 の発現について定量評価を行った。

結 果：

肺組織の Gene enrichment 解析により、GO:0003123 Antigen Binding が最も強い因子として抽出された。サイトカインでは、IL-1 β 、IL-6、IL-8、LIF の発現上昇を認めた。MDA5 免疫マウスでは、MDA5 反応性 T 細胞と抗マウス MDA5 抗体の存在が確認され、MDA5 に対する自己免疫応答が誘導されていた。poly(I:C)経鼻投与マウスでは、1 日後には急性肺傷害を呈するものの、2 週間には肺病変は回復していたが、MDA5 免疫マウスでは肺病変が遷延し、間質における線維化を伴う炎症細胞浸潤という、ILD 様の病変を呈し、肺コラーゲン含有量は増加していた。また、気管支周囲では CD4 陽性細胞が優位に浸潤し、ILD 様所見は CD4 陽性細胞除去マウスでは消退した一方で、CD8 陽性細胞除去マウスでは残存していた。poly(I:C)経鼻投与では投与 1 日時点で一過性に IL-6 の mRNA 発現が亢進するが、MDA5 免疫マウスでは 14 日目でも持続していた。抗 IL-6 受容体抗体による治療実験にて、poly(I:C)投与 2 週間後の MDA5 免疫マウスにおける ILD 様病変は軽快した。

考 察：

MDA5 に対する自己免疫が確立したマウスでは、ウイルス感染症などを模した Toll-like receptor 3 を介した急性肺傷害が遷延化し、間質線維化を伴う ILD を発症することが本実験より示され、これは抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎関連 ILD のマウスモデルと考えられる。この ILD 発症に CD4 陽性 T 細胞が必須であり、かつ ILD 病態の進行において IL-6 が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。実際、抗 MDA5 抗体陽性 RP-ILD 症例剖検肺の transcriptome 解析でも肺における IL-6 の発現亢進を認めており、これらの結果より IL-6 が治療標的になりうると推定される。

結 論：

今回の研究において、MDA5 に対する自己免疫応答を基盤とした新規 ILD マウスモデルを確立した。本モデルのさらなる解析により疾患メカニズム解明に大きく寄与すると考える。