



Title	自己免疫疾患の難治性臓器病変における新規治療戦略の探索 [全文の要約]
Author(s)	狩野, 皓平
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14699号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/83096">http://hdl.handle.net/2115/83096</a>
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号 : 2645
Note(URL)	<a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>
File Information	Kohei_Karino_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文  
(要約)

自己免疫疾患の難治性臓器病変における

新規治療戦略の探索

(A novel therapeutic approach for refractory organ

involvement in autoimmune diseases:

systemic lupus erythematosus and dermatomyositis)

2021年9月

北 海 道 大 学

狩 野 皓 平

【緒言】膠原病は、自己免疫応答の異常を共通の病態基盤とする全身性自己免疫疾患の総称である。その多くは慢性の経過で様々な臓器障害を引き起こし、患者の QOL や生命予後に大きな影響を与えることがあるが、近年の診断技術の向上や副腎皮質ステロイド・免疫抑制剤による治療の進歩により、膠原病の治療成績は飛躍的に向上した。しかしながら、依然として診療に難渋する病態が存在し、膠原病診療の *unmet needs* となっている。本研究ではそれらの難治性病態の診断・治療法の解明を目的とし、その中でも全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus; SLE)の精神神経症状と皮膚筋炎に合併する間質性肺炎に焦点を当てた。第一部では精神神経ループスにおけるミクログリアの病態関与、第二部では皮膚筋炎における急速進行性間質性肺炎のリスク因子の検討、の独立した2つの研究結果について述べる。

<第一部>

【背景と目的】精神神経ループス (neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: NPSLE) は全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)を基礎疾患として中枢神経、末梢神経、自律神経、精神症状等を呈する症候群である。時に高次機能障害などの後遺症を来すこともあり予後不良な病態だが、明確なエビデンスのある治療戦略はなく、病態の解明と新たな治療が求められている。近年の研究で中枢神経の常在マクロファージであるミクログリアが NPSLE の病態へ関与していることが示唆されているため、本研究ではミクログリアに着目し、NPSLE の新たな治療ターゲットを探索した。

【方法と結果】

#### 1. NPSLE モデルマウスの異常行動の評価

NPSLE のモデルマウスとして MRL/MpJ-Fas<sup>lpr</sup>/J (MRL/lpr), コントロールマウスとして MRL/MpJ を使用した。マウスの行動異常は Open field 試験, Y maze 試験, Novel object recognition 試験で評価した。MRL/lpr は MRL/MpJ と比較して不安の増強と、空間作業記憶, 視覚的認知記憶の低下を認めた。

#### 2. MRL/lpr マウスのミクログリア活性化の評価

マウスから脳を摘出し、ミクログリアの表面抗原である CD11b を標識した磁気ビーズによる positive selection によってミクログリアを採取した。RNA を抽出し、real-time PCR で炎症性サイトカイン遺伝子の発現を評価した。MRL/lpr マウスのミクログリアでは MRL/MpJ と比較して tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ , interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$  の遺伝子発現量が亢進していた。次にマウスの脳で免疫組織化学染色を施行し、ミクログリアの活性化マーカーである CD68 の発現を評価した。MRL/lpr マウスの脳組織の免疫染色では、海馬においてミクログリアの活性化マーカーである CD68 の発現が MRL/MpJ と比較して高く、ミクログリアの活性化を認めた。

続いてミクログリアの活性化に関わる pathway を探索するため、RNA シークエン

シングによる網羅的遺伝子解析を行った。MRL/lpr のミクログリアは MRL/MpJ と比較して 1022 の遺伝子が有意差をもって変動しており、そのうち 887 が発現上昇、135 が発現低下していた。Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いた pathway 解析では、TNF レセプター、Interferon Regulatory Factor (IRF)、IL-6 や IL-8 などサイトカインに関連する pathway が抽出された。

### 3. ミクログリアの活性化におけるサイトカインの関与の検討

RNA シークエンシングの結果から、MRL/lpr のミクログリアの活性化にはサイトカインが関与している可能性が示唆された。そこでミクログリアの活性化にサイトカインが与える影響を評価するため、MRL/lpr から採取したミクログリアにサイトカインを添加し、real-time PCR で活性化を評価した。IFN $\gamma$ 、IL-6、IFN $\alpha$ 、TNF $\alpha$  4 種類の混合サイトカインによる刺激では、コントロールと比較して TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  の遺伝子発現が亢進しており、16 週の MRL/MpJ と MRL/lpr のミクログリアの遺伝子発現量の結果と類似していた。さらに、サイトカインで刺激したミクログリアについても RNA シークエンシングで網羅的遺伝子解析を施行したところ、コントロールと比較して 1367 の遺伝子が有意差をもって変動しており、そのうち 980 が発現上昇、387 が発現低下していた。Pathway 解析では自然免疫や炎症に関わる pathway が抽出された。MRL/lpr と MRL/MpJ、サイトカイン刺激とコントロールの比較では、それぞれ 98 個の遺伝子が共に発現上昇していた。また共通して抽出された pathway の中で、すべてに共通して見られた遺伝子として X を同定した。

### 4. X の阻害によるミクログリア活性化への影響の検討

X の阻害薬や X の siRNA を用いてミクログリアの活性化抑制効果を real-time PCR を用いて評価した。X の阻害薬の添加により、サイトカインで刺激したミクログリアの炎症性サイトカイン遺伝子発現は抑制され、siRNA による X のノックダウンでも同様の結果が得られた。

### 5. X の阻害薬によるミクログリアの解糖系への影響の検討

細胞外フラックスアナライザーを用いて X の阻害薬によるミクログリアの細胞内代謝の変化を評価した。X の阻害薬の添加により、サイトカインで刺激したミクログリアの解糖系が抑制されており、X の阻害薬によりミクログリアの活性化が抑制されるメカニズムのひとつとして解糖系の抑制が重要と考えられた。

### 6. MRL/lpr マウスに対する X の阻害薬の治療効果の検討

MRL/lpr の脳室内に浸透圧ポンプを用いて阻害薬を持続投与し、異常行動への治療効果の検討ならびに免疫組織化学染色によるミクログリアの活性化の評価を行った。MRL/lpr の脳室内への X の阻害薬の持続投与により、視覚的認知記憶の改善を認め、脳組織の免疫組織化学染色ではミクログリアの活性化が抑制されていた。

【考察】 NPSLE モデルマウスではミクログリアの活性化が認められ、それにはサイ

トカインの影響が考慮された。また NPSLE モデルマウスのミクログリアでは X が活性化しており、X の阻害によりミクログリアの活性化の抑制ならびに視覚的認知機能の改善を認めた。X は解糖系の最初の酵素であるヘキソキナーゼの遺伝子発現亢進や、ミトコンドリア膜への移行促進により解糖系を亢進させている。X の阻害薬によるミクログリア活性化抑制の機序として、解糖系の制御が考えられた。

【結論】 X を標的とした治療は、ミクログリアの活性化抑制を介して NPSLE の新たな治療となり得る。

#### <第二部>

【背景と目的】急速進行性間質性肺疾患(rapidly progressive ILD: RPILD)は皮膚筋炎患者における重要な予後規定因子である。RPILD の治療には発症早期からの強力な免疫抑制療法が必要だが、皮膚筋炎の発症早期から RPILD の発症を予測することは困難である。また、不必要な患者に対する強力な免疫抑制療法は有害事象が問題となることから、個々の症例への適切な治療選択が課題となっている。本研究では特に近年皮膚筋炎の臨床において有用とされている magnetic resonance imaging (MRI)に着目し、皮膚筋炎の新たな予後予測因子を探索した。

【対象と方法】2014年10月から2019年7月まで当院で全身MRIを撮像された41名の皮膚筋炎患者を対象に、後ろ向き観察研究を行った。42の筋群において、筋と筋膜の異常信号を記録し、点数化した。筋膜優位の所見を評価する指標として、筋膜/筋スコア比を定義した。患者をRPILDの発症の有無で2群に分類し、RPILDの予測因子を評価した。

【結果】41名の患者の内、10名がRPILDを発症していた。MRIでは筋スコア、筋膜スコアともに血清中の筋原性酵素と正の相関を示し、患者の筋力と負の相関を示した。RPILDを発症した患者では、発症しなかった患者と比較して筋膜/筋スコア比が有意に高値だった。ロジスティック回帰分析では筋膜/筋スコア比がRPILDの独立したリスク因子として抽出された。

【結論】MRIにおける筋膜優位の所見は皮膚筋炎患者においてRPILDを発症するリスク因子であった。抗MDA5抗体やCADMに加え、筋膜優位の所見をMRIで評価することは皮膚筋炎患者の予後推定に有用であり、適切な免疫抑制療法を提供する一助となり得る。

【総括】膠原病の臓器病変の中でも最も治療が難しい疾患を対象にした2つの研究を通して新たな診断法や治療法発見の糸口を掴むことができた。さらに研究を重ねることが難治性疾患患者の利益になると考える。

なお特許取得のため一部の結果を伏せております。