



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
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
DOI	10.14943/doctoral.k14699
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/87691
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2645
File Information	Kohei_Karino.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

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

学 位 論 文

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

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
1. 要旨	2
2. 略語表	5
3. 緒言	7
4. 第一部 精神神経ループスにおけるミクログリアの病態関与	9
4.1 緒言	10
4.2 目的	11
4.3 MRL/MpJ-Fas ^{lpr} /J(MRL/lpr)マウスにおける異常行動の評価	12
4.3.1 はじめに	12
4.3.2 方法	13
4.3.2.1 Open field 試験	13
4.3.2.2 Y maze 試験	13
4.3.2.3 Novel object recognition 試験	13
4.3.3 結果	15
4.3.4 結論	21
4.4 MRL/lprマウスのミクログリア活性化の評価	22
4.4.1 方法	22
4.4.1.1 ミクログリアの分離方法	22
4.4.1.2 分離したミクログリアの純度についての検討	23
4.4.1.3 RNAの抽出と Real-time PCR	23
4.4.1.4 マウス脳の免疫組織化学染色	23
4.4.1.5 MRL/lprマウスのミクログリアの網羅的遺伝子解析	24
4.4.2 結果	25
4.4.2.1 分離したミクログリアの純度	25
4.4.2.2 MRL/lprマウスのミクログリアにおける週齢毎の炎症性サイトカイン遺伝子発現量の検討	27
4.4.2.3 MRL/lprマウスと MRL/MpJのミクログリアにおける炎症性サイトカイン遺伝子発現量の検討	29
4.4.2.4 マウス脳の免疫組織化学染色によるミクログリア活性化の検討	31
4.4.2.5 MRL/lprマウスのミクログリアの網羅的遺伝子解析	33
4.4.3 考察	37
4.5 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	38

4.5.1 サイトカイン刺激によるミクログリアにおける炎症性サイトカインの発現量の検討.....	38
4.5.1.1 方法.....	38
4.5.1.2 結果.....	39
4.5.2 サイトカインで刺激したミクログリアの網羅的遺伝子解析.....	43
4.5.2.1 方法.....	43
4.5.2.2 結果.....	43
4.5.3 考察.....	50
4.6 IKBKE 阻害によるミクログリア活性化への影響.....	53
4.6.1 Real-time PCR 法によるミクログリアの IKBKE の遺伝子発現の確認.....	53
4.6.2 IKBKE 阻害薬によるミクログリア活性の変化.....	53
4.6.3 <i>Ikkbe</i> ノックダウンによるミクログリア活性の変化.....	53
4.6.4 結果.....	55
4.7 IKBKE 阻害薬によるミクログリアの解糖系への影響の検討.....	61
4.7.1 背景.....	61
4.7.2 方法.....	62
4.7.2.1 細胞外フラックスアナライザーによる解糖系の評価.....	62
4.7.2.2 解糖系の抑制によるミクログリア活性化への影響の検討.....	64
4.7.3 結果.....	65
4.8 IKBKE 阻害薬による MRL/lpr マウスの異常行動への治療効果の検討.....	69
4.8.1 方法.....	69
4.8.2 結果.....	70
4.9 考察.....	78
4.10 結語.....	80
5. 第二部 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.....	81
5.1 緒言.....	82
5.2 研究の目的.....	83
5.3 患者と方法.....	84
5.3.1 研究デザイン.....	84
5.3.2 対象.....	84
5.3.3 評価項目.....	85
5.3.3.1 身体所見と検査所見.....	85
5.3.3.2 画像検査.....	85
5.3.3.3 統計解析.....	87
5.4 結果.....	88

5.4.1	患者背景.....	88
5.4.2	MRI スコアと筋原性酵素・筋力低下との相関.....	91
5.4.3	MRI における異常信号の分布.....	93
5.4.4	全身 MRI スコアリングの再現性の評価.....	96
5.4.5	RPILD 発症のリスク因子.....	100
5.5	考察.....	105
5.6	結語.....	107
6.	結論.....	108
7.	謝辞.....	110
8.	利益相反.....	111
9.	引用文献.....	112

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文に発表した。

1. Kohei Karino, Michihito Kono, Yuki Kudo, Masatoshi Kanda, Nobuya Abe, Kuniyuki Aso, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi, IKBKE contributes to neuropsychiatric manifestations in lupus-prone mice through microglial activation, *Nature Neuroscience*. 2021, *submitted*
2. Kohei Karino, Michihiro Kono, Michihito Kono, Keita Sakamoto, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Olga Amengual, Kenji Oku, Shinsuke Yasuda, and Tatsuya Atsumi, Myofascia-dominant involvement on whole-body MRI as a risk factor for rapidly progressive interstitial lung disease in dermatomyositis, *Rheumatology (Oxford)*. 2020 Jul 1;59(7):1734-1742.

本研究の一部は下記の学会で発表した。

1. Kohei Karino, Michihiro Kono, Michihito Kono, Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Bohgaki Toshiyuki, Olga Amengual, Kenji Oku, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi, Myofascia-dominant inflammation is a novel risk factor for RPILD in dermatomyositis: a study using whole body MRI. 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2019年4月15-17日, 京都
2. Kohei Karino, Michihiro Kono, Michihito Kono, Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Bohgaki Toshiyuki, Olga Amengual, Kenji Oku, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi, Myofascia-dominant inflammation detected on whole body MRI predicts rapidly progressive ILD in patients with dermatomyositis. The Annual European Congress of Rheumatology, 12-15 Jun. 2019, Madrid, Spain
3. Kohei Karino, Michihito Kono, Yuki Kudo, Masatoshi Kanda, Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi, Identification of differentially expressed genes of microglia in lupus-prone mice. 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2021年4月26-28日, 神戸

1. 要旨

<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.

【材料と方法】 NPSLE のモデルマウスとして MRL/MpJ-Fas^{lpr}/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. マウスからミクログリアを採取し, real-time PCR や免疫組織化学染色で活性化を評価した. 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. また, 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 で活性化の評価をするとともに, RNA シークエンシングで網羅的遺伝子解析を施行した. さらにこれらの結果から NPSLE の治療ターゲットとなり得る遺伝子を同定し, 阻害薬や siRNA を用いてミクログリアの活性化抑制効果を検討した. また細胞外フラックスアナライザーを用いて阻害薬がミクログリアの解糖系に与える影響を評価した. さらに, 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.

【結果】 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. 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) α , interleukin (IL)-6, IL-1 β の遺伝子発現量が亢進しており, 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. 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。IFN γ , IL-6, IFN α , TNF α 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 α , IL-6, IL-1 β 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。RNA シークエンシングではサイトカインで刺激したミクログリアは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 97 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 inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase epsilon (IKBKE) をコードする遺伝子である *Ikbke* を同定した。IKBKE 阻害薬によりサイトカイン刺激したミクログリアの活性化は抑制され、siRNA による *Ikbke* のノックダウンでも同様の結果が得られた。IKBKE 阻害薬による細胞内代謝の変化を調べたところ、解糖系が抑制されており、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考えられた。MRL/lpr の脳室内への IKBKE 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】IKBKE は Inhibitor of nuclear factor kappa-B (I κ B) をリン酸化することにより nuclear factor kappa-B (NF- κ B) を核内に移行させる働きを持つが、他の I κ B kinase とは異なり IRF3 や IRF7 をリン酸化することでこれらの活性化にも関わることが知られている。また、IKBKE 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。IKBKE 阻害薬によるミクログリア活性化抑制の機序として、NF- κ B や IRF を阻害することによる下流のシグナル伝達の抑制に加え、解糖系の制御が考えられた。

【結論】IKBKE 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。

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。

2. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ARS	aminoacyl tRNA synthetase
BSA	bovine serum albumin
CADM	clinically amyopathic dermatomyositis
CK	creatine kinase
CRP	C reactive protein
CT	computed tomography
DMEM/F-12	Dulbecco's modified eagle medium: nutrient Mixture F-12
ECAR	extracellular acidification rate
FBS	fetal bovine serum
FPKM	fragments per kilobase of exon per million reads mapped
GWAS	genome wide association study
HBSS	Hanks' balanced salt solution
IFN	interferon
IRF	interferon regulatory factor
IKBKE	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase epsilon
I κ B	inhibitor of nuclear factor kappa-B
IL	interleukin
ILD	interstitial lung disease
IPA	ingenuity pathway analysis
KL-6	Krebs von den Lungen 6
MACS	magnetic-activated cell sorting
MAP-2	microtubule-associated protein 2
MDA5	melanoma differentiation-associated gene 5
MMT	manual muscle test
MRI	magnetic resonance imaging
NF- κ B	nuclear factor kappa-B
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NPSLE	neuropsychiatric systemic lupus erythematosus
NR2	N-methyl-D-aspartate receptor subunit2
OCT	optimal cutting temperature

PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	phosphate buffered saline with Tween 20
PCA	principal component analysis
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PKR	protein kinase R
RNP	ribonucleoprotein
RPILD	rapidly progressive interstitial lung disease
SLE	systemic lupus erythematosus
STIR	short-tau inversion recovery
TNF	tumor necrosis factor
Trem1	triggering receptor expressed on myeloid cells1
VC	vital capacity
2-DG	2-Deoxy-D-glucose

3. 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 SLE に関する研究について述べる。

SLE はループス疹と呼ばれる多彩な皮膚症状を代表とし、多臓器障害をもたらす全身性自己免疫疾患である。好発年齢は 20-40 歳代で、男女比は 1:9 で女性に多い。抗核抗体、抗 DNA 抗体、抗 Sm 抗体などの多彩な自己抗体産生を背景に、皮膚、関節、腎、神経、心、血管など様々な臓器障害による多彩な臨床症状を呈する(Lisnevskaja et al., 2014)。

SLE の発症過程では、遺伝的素因に加え、性ホルモンや喫煙、ウイルス感染、紫外線、薬物などの環境因子が加わり、免疫寛容の破綻が引き起こされ、自己免疫反応が惹起されると考えられている。自己反応性 T 細胞の出現、多クローン性の B 細胞活性化、抗 DNA 抗体をはじめとする自己抗体産生、免疫複合体の形成、補体系の活性化などが炎症を惹起し、臓器組織障害をきたす。SLE の病態形成に重要な役割を果たす因子として、I 型インターフェロン (IFN) である IFN α の形質細胞様樹状細胞 (pDC) からの過剰産生が報告されており(Elkon and Wiedeman, 2012; Rönnblom and Elkon, 2010), SLE 患者の末梢血単核球では IFN 誘導遺伝子群が高発現している(Baechler et al., 2003; Baechler et al., 2004; Shimizu et al., 2018)。IFN α により単球やマクロファージからの B cell Activating Factor (BAFF) 産生の誘導(Vincent et al., 2014)やエフェクター T 細胞の活性化が引き起こされる。

SLE の症状や重症度は症例毎に異なっており、全身倦怠感、発熱、皮疹、関節炎などの一般的な症状のみを認める軽症例から、腎病変、中枢神経病変、心病変、肺臓炎、漿膜炎、血管炎などを合併する重症例まで多岐にわたる。近年、治療・診断技術の進歩により SLE の治療成績は飛躍的に向上しており、以前は 5 年生存率が 50%未満であったが、現在は 10 年生存率が 90%を超えている(Kono et al., 2014; Minowa et al., 2017)。その一方で、依然として難治性の病態が存在し、中でも精神神経ループス (neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: NPSLE) は SLE 患者の 30~40%

に発症し、ループス腎炎と並んで SLE の重症臓器病変である(Aso et al., 2020; Bertias and Boumpas, 2010; Hanly et al., 2007). 時に高次機能障害などの後遺症を来すこともあり, QOL を著しく低下させ, 予後不良な病態である. 病態は未だに不明点が多くであり, 明確なエビデンスのある治療戦略は明らかではなく, 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 の病態に関与していることが示唆されており(Nestor et al., 2018; Schwartz et al., 2019), 今回我々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することとした.

第二部では皮膚筋炎に関する研究について述べる.

皮膚筋炎は骨格筋や皮膚, 関節, 肺などを侵す全身性の自己免疫疾患である. 皮膚筋炎患者において, 間質性肺疾患(interstitial lung disease: ILD)は重要な合併症の一つであり, 死因の多くを占める. 急速進行性 ILD(rapidly progressive ILD: RPILD)は特に治療抵抗性であり, 発症から数か月以内に致死的となり得る(Gono and Kuwana, 2016; Xu et al., 2016; Ye et al., 2007). RPILD の治療には発症早期からの副腎皮質ステロイドと免疫抑制剤の併用による強力な免疫抑制療法が必要である. しかしながら, 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(Kameda et al., 2005). 一方で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. 従って, 我々は皮膚筋炎の新たな予後予測因子を探索することとした. 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)に着目した.

4. 第一部

精神神経ループスにおけるミクログリアの 病態関与

4.1 緒言

NPSLE は 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り, ループス腎炎とならぶ SLE の主要臓器障害のひとつである. SLE 患者の 30~40%に出現する重篤な臓器病変であり, 患者の QOL を著しく低下させ(Hanly et al., 2007), ループス腎炎と同様に生命予後に関連する因子として知られている(Schwartz et al., 2019). アメリカリウマチ学会では 1999 年に NPSLE を臨床症状に応じて 19 項目に分類し, これらは 1. 中枢神経症状(focal manifestations), 2. 中枢神経症状(diffuse manifestations), 3. 末梢神経症状の 3 つのグループに分類されている(Schwartz et al., 2019). 一般に NPSLE はいくつかの病態が合併することが多く, 症状が多彩であり, 診断や治療に難渋することが多い. また感染症や代謝異常, 薬剤などが精神神経症状の原因となり得るため, SLE 患者に精神神経症状が出現した際には, それが SLE によるものかどうか慎重な判断を要する. 特に, SLE の治療薬である副腎皮質ステロイドによって生じ得るステロイド精神病は NPSLE との鑑別が困難となる場合が多い.

NPSLE は様々な臨床症状を呈するが, その病態発生機序は 1. 脳の微小血管を中心とした血管障害, 2. 神経細胞に対する自己抗体の産生, 3. 髄腔内でのサイトカイン等の炎症性メディエーター産生が考えられている. 神経症状を呈する focal manifestations は血管障害を反映しており, 抗リン脂質抗体と血管内皮細胞の活性化と関連していることが示唆されている. 精神症状などの diffuse manifestations は炎症を反映したものであり, 自己抗体やサイトカインなどによる神経細胞の傷害と関連していると考えられている. これに関与する自己抗体として神経細胞上の N-methyl-D-aspartate (NMDA)型グルタミン酸受容体に対する抗体が注目されている. 抗 NMDA receptor subunit 2 (NR2)抗体は抗 2 本鎖 DNA 抗体のサブセットとして, SLE の 30-40%でみられる. NMDA 受容体の活性化は学習や記憶に重要であるが, 抗 NR2 抗体による刺激が持続することによって, 神経細胞死が誘導される. 抗 NR2 抗体は NPSLE の中でも重症病態である acute confusional state の患者の髄液中で上昇していることが報告されており, NPSLE の重症度を反映していると考えられている(Hirohata et al., 2014). この他, 抗リボゾーム P 抗体, 抗内皮細胞抗体, microtubule-associated protein 2 (MAP-2) 抗体, 抗 U1 ribonucleoprotein (RNP)抗体などが NPSLE 患者にみられる自己抗体として報告されている(Govoni et al., 2016). また, 抗リン脂質抗体は NPSLE における血栓症に関与しているが, 認知障害, 痙攣, 舞踏病, 多発性硬化症様疾患, 横断性脊髄炎など多彩な病態とも関連している. これらには非血栓性の病態も含まれることから, 抗リン脂質抗体が直接神経組織を障害する可

能性も示唆されている(Chapman et al., 2003) (Sanna et al., 2005). その他, interleukin (IL)-6 や interferon(IFN) α などの髄液中のサイトカインが NPSLE の病態に関与していると報告されている(Fragoso-Loyo et al., 2007; Hirohata and Miyamoto, 1990; Shiozawa et al., 1992).

さらに近年, SLE 患者ではミクログリアが異常活性化しており, 神経細胞のシナプスが貪食されることが示され, ミクログリアが NPSLE の病態に関与していることが示唆された(Schwartz et al., 2019). ミクログリアは中枢神経系に存在する組織マクロファージであり, 中枢神経系における全細胞の 10%程度を占めている. 他のマクロファージと同様, 免疫細胞として組織内を監視し, 組織傷害や感染に伴って, 炎症性サイトカインや活性酸素を産生する. 近年ミクログリアには多くの細胞型があることが複数の研究で提唱されており, 中枢神経の炎症過程において, 神経障害を促進するサブタイプや保護的に働くサブタイプが存在すると考えられている. しかし, NPSLE におけるミクログリアの役割の詳細は解明されておらず, ミクログリアを標的とした治療はまだ臨床応用されていない.

4.2 目的

本研究の目的は NPSLE におけるミクログリアの病態への関与を明らかにし, 新規治療ターゲットを見出すことである.

4.3 MRL/MpJ-Fas^{lpr}/J(MRL/lpr)マウスにおける

異常行動の評価

4.3.1 はじめに

SLE モデルマウスである MRL/MpJ-Fas^{lpr}/J(MRL/lpr)は不安, 異常行動など NPSLE の症状を呈することが知られている. このマウスを NPSLE モデルとし, MRL/MpJ をコントロールとして, 行動異常を評価することとした.

動物実験は北海道大学の動物実験倫理委員会の承認のもと(承認番号 19-0039), 北海道大学動物実験に関する規定に従った.

4.3.2 方法

8週齢の雌 MRL/lpr マウスと MRL/MpJ マウスを用いて open field 試験, Y maze 試験, Novel object recognition 試験の3種類の行動試験を実施した(Figure 1). 行動試験は SMART 3.0 ビデオ画像行動解析装置を用いて記録した. 統計解析は GraphPad Prism (ver. 7.04; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて行った.

4.3.2.1 Open field 試験

縦 45cm×横 45cm×高さ 40cm の Open field ボックスにマウスを入れ, 5分間自由にボックス内を探索させ, 総移動距離, 中央区画滞在時間を記録した. 中央区画はボックスの中央 15cm 四方の四角形の区域として定義し, 中央区画滞在時間は試験時間(5分)に対する割合をパーセントで示した. 総移動距離を活動量, 中央区画滞在時間を不安傾向の指標とした.

4.3.2.2 Y maze 試験

長さ 30cm, 幅 6cm, 高さ 15cm の3本のアームが 120度の角度で連結された Y maze を用い, maze 内でマウスを 6分間自由に探索させ, アームへの総侵入回数, 3回連続で異なるアームに侵入した回数(alternation triplet)を記録した. 総侵入回数から 2を引いた数に対する alternation triplet の割合をパーセントで示した. マウスは直前に入ったアームとは異なったアームに入ろうとする習性があり, alternation triplet の割合を空間作業記憶の指標とした.

4.3.2.3 Novel object recognition 試験

行動試験の前日に open field ボックス内で 5分間マウスを自由に探索させ, 順化を行った. 当日にマウスを 2つのオブジェクトが置かれた open field ボックス内を 5分間自由に探索させた. 1時間のインターバルを置き, オブジェクトの1つが別の新奇オブジェクトに変更された open field ボックス内を 5分間探索させた. 2つのオブジェクトを探索した時間の合計が 20秒になるまでに, それぞれのオブジェクトを探索した時間を記録した. 20秒間のうち新奇オブジェクトを探索した時間の割合をパーセントで示した. 通常マウスは新奇性のある物体に, より長い時間探索行動を示すため, 新奇オブジェクトに対する探索時間をマウスの視覚的認知記憶の指標とした.

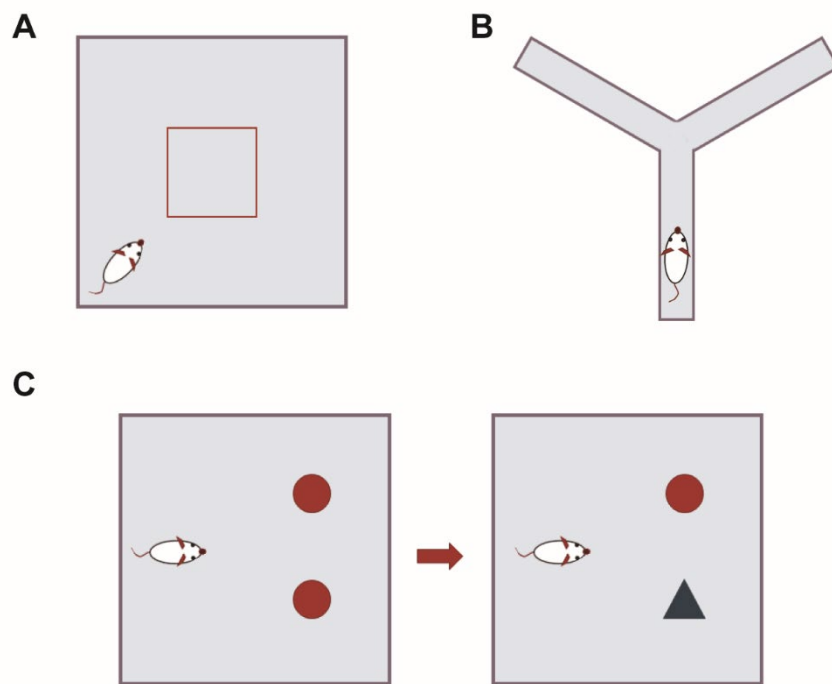


Figure 1. 行動解析装置の模式図

A: Open field 試験ではボックス内の総移動距離及び中央区画(赤い正方形内)滞在時間を記録した. B: Y maze 試験ではアームへの総侵入回数, 3回連続で異なるアームに侵入した回数(alternation triplet)を記録した. C: Novel object recognition 試験では2つのオブジェクト(赤の円)が置かれた open field ボックス内を探索させた後, オブジェクトの1つが別の新奇オブジェクト(緑の三角)に変更された open field ボックス内を探索させ, それぞれのオブジェクトの探索時間を記録した.

4.3.3 結果

Open field 試験において, *MRL/lpr* マウスはコントロールと比較して総移動距離に差は認めず, 探索行動の低下は認めなかった. 中央区画滞在時間はコントロールと比較して有意に短く, 高い不安傾向を有していることが示された (Figure 2).

Open field test

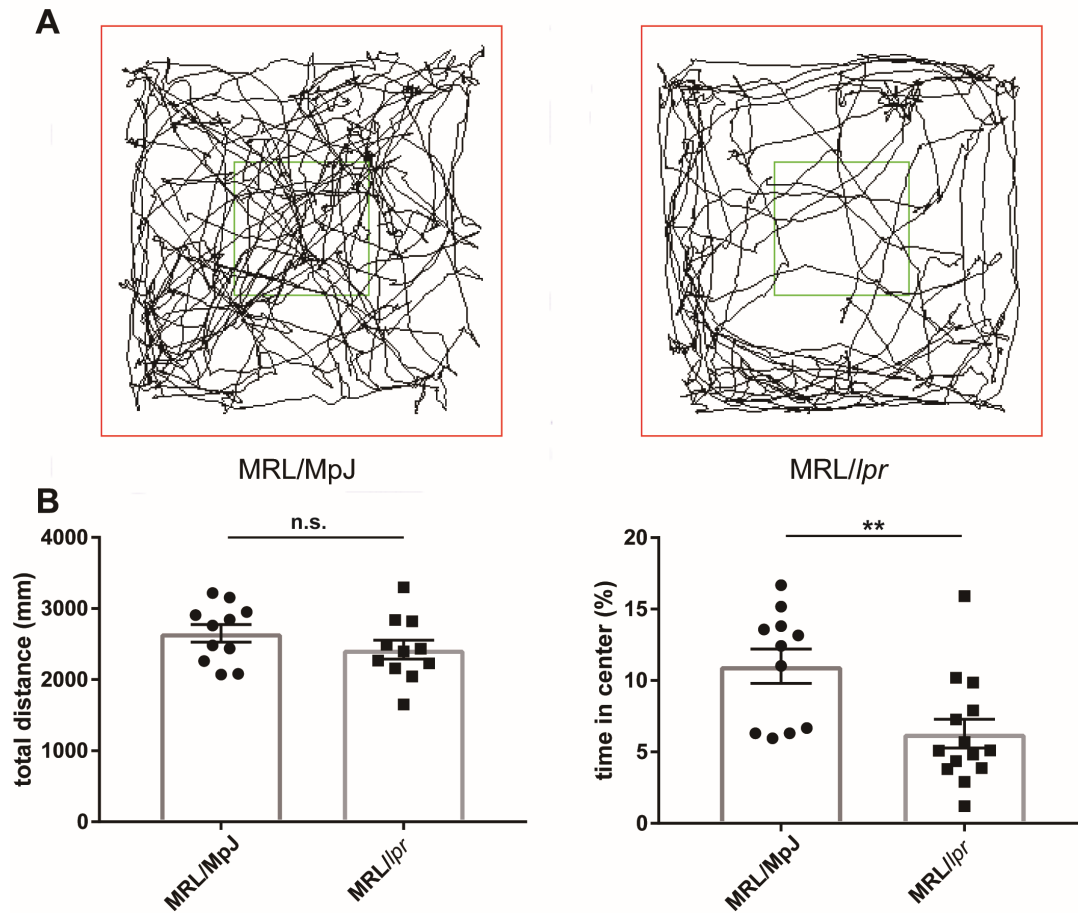


Figure 2. MRL/lpr マウスと MRL/MpJ マウスの Open field 試験

Open field ボックス内でマウスを 5 分間自由に探索させ、総移動距離、中央区画滞在時間を記録した。

A: コントロールと MRL/lpr の代表的な行動軌跡. B: コントロールと MRL/lpr の総移動距離と中央区画滞在時間. データは平均値±標準偏差で示した. **: $p < 0.01$, n.s.: not significant, t-test

Y maze 試験では, *MRL/lpr* マウスはコントロールと比較してアームへの総侵入回数が有意に多く, 総侵入回数に対する alternation triplet の割合が有意に低かった (Figure 3). このことから *MRL/lpr* マウスは空間作業記憶が低下していることが示された.

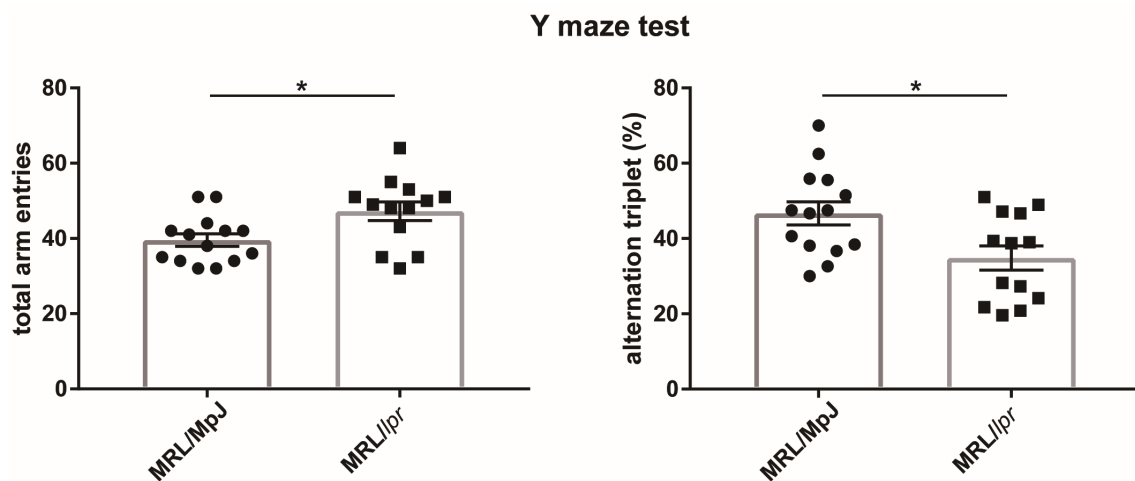


Figure 3. MRL/lprマウスと MRL/MpJ マウスの Y maze 試験

Y maze 内でマウスを 6 分間自由に探索させ、アームへの総侵入回数, 3 回連続で異なるアームに侵入した回数(alternation triplet)を記録した.

データは平均値±標準偏差で示した. *: $p < 0.05$, t-test

Novel object recognition 試験において, *MRL/lpr* マウスはコントロールと比較して新奇オブジェクトへの探索時間が有意に短く, 視覚的認知記憶が低下していることが示された(Figure 4).

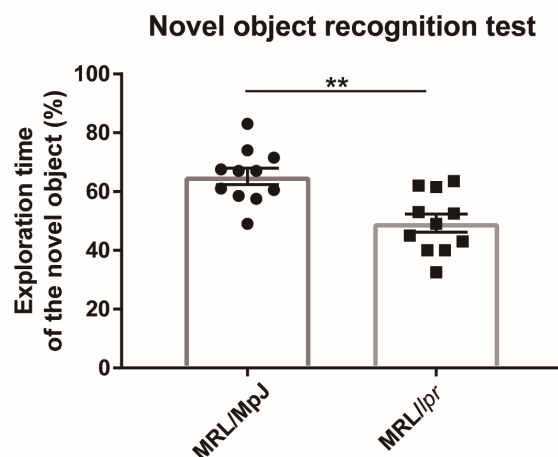


Figure 4. MRL/lpr マウスと MRL/MpJ マウスの Novel object recognition 試験
 マウスを 2 つのオブジェクトが置かれた open field ボックス内を 5 分間自由に探索
 させ、1 時間のインターバルを置き、オブジェクトの 1 つが別の新奇オブジェクトに
 変更された open field ボックス内を 5 分間探索させた。それぞれのオブジェクトを探
 索した時間を記録し、新奇オブジェクトを探索した時間の割合をパーセントで示し
 た。

データは平均値±標準偏差で示した。**: $p < 0.01$, t-test

4.3.4 結論

MRL/*lpr* マウスはコントロールと比較し、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。これらは NPSLE の症状を反映していると考えられた。

4.4 MRL/lprマウスのミクログリア活性化の評価

前述したように近年 NPSLE モデルマウスにおいて、ミクログリアの活性化が報告されている(Crupi et al., 2010; Mondal et al., 2008; Wen et al., 2015). 活性化したミクログリアは tumor necrosis factor alpha (TNF α), IL-6 などのサイトカインを産生し、脳内の炎症に関わっている. 実際 NPSLE 患者の髄液では TNF α , IL-6 などのサイトカインの上昇が報告されている(Jeltsch-David and Muller, 2014). そこで MRL/lpr マウスにおける不安の増強, 空間作業記憶, 視覚的認知記憶の低下の原因がミクログリアの異常によるという仮説をたて、実験を進めることとした.

4.4.1 方法

4.4.1.1 ミクログリアの分離方法

8 週齢, 12 週齢, 16 週齢の雌 MRL/lpr マウスと MRL/MpJ マウスからミクログリアを採取し, Real-time polymerase chain reaction (PCR)法を用いて炎症性サイトカイン遺伝子の発現を評価した.

マウスは麻酔下に安楽死処理し、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)灌流を行った後、大脳皮質を採取した. 6cm ディッシュ上でメス刃による機械的裁断を行った後, Neural Tissue Dissociation Kit (P)(Miltenyi Biotec)を用いて単一細胞を得た. その後ミエリン除去のため, 0.9M スクロース含有 Hanks' balanced salt solution (HBSS)で懸濁し, 700G で 10 分間遠心した. 上清を除去し, 1ml の Magnetic-activated cell sorting (MACS) buffer で懸濁し, 70ul の cell strainer で濾過し, 4°C, 5000G で 30 秒間遠心した. 上清を除去し, MACS buffer で 1ml に懸濁し, 細胞数をカウントした. 1×10^7 個の細胞に対して 90 μ l の MACS buffer で懸濁し, 10 μ l の CD11b microbeads(Miltenyi Biotec)を添加して 4°C で 15 分間 incubate した. 1ml の MACS buffer を添加後に 4°C, 5000G で 30 秒遠心し, 1000 μ l の MACS buffer で懸濁, 100 μ l の cell strainer で濾過して MACS カラムを通して positive selection を行った. 500 μ l の MACS buffer で洗浄後, 1ml の PBS で細胞を抽出した.

4.4.1.2 分離したミクログリアの純度についての検討

分離したミクログリアの純度を検討するため、フローサイトメトリーを施行した。ミクログリアを死細胞除去のため Zombie Aqua (Biolegend 105013)を添加し、静置、洗浄後、抗 CD16/32 抗体(Biolegend 101330)を添加して Fc 受容体ブロッキングを施行した後、ミクログリアの表面抗原である CD11b (Biolegend 101205), CD45 (Biolegend 103129), CX3CR1 (Biolegend 149007), CD39 (Biolegend 143803)を認識する蛍光標識抗体を添加し、静置、洗浄後に BD FACSAria™ II (BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリーを施行した。

4.4.1.3 RNA の抽出と Real-time PCR

RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen)を用いて mRNA を抽出した。抽出した mRNA は濃度を調整後に SuperScript VILO (Invitrogen)を用いて cDNA とし、Taq-Man Gene Expression Assay (Applied Biosystems) による Real-time-PCR 法でマウス TNF α mRNA, IL-6 mRNA, IL-1 β mRNA 及びマウス GUSB mRNA の発現を定量した (使用した probe の Assay ID はそれぞれ Mm00443258m1, Mm00446190m1, Mm00434228m1 及び Mm01197698m1) 。測定には 7500 Fast Realtime PCR system (Applied Biosystems)を用いた。mRNA 発現量は $\Delta\Delta$ CT 法によって各細胞の各遺伝子と GUSB の平均の差を計算し、mRNA 量を算出した。

4.4.1.4 マウス脳の免疫組織化学染色

マウスは麻酔下で安楽死処理し、PBS 灌流を行った。さらに 4%パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde: PFA)灌流を行った後、脳を採取した。脳は 4%PFA で 24 時間固定し、30%スクロース含有 PBS で 48 時間置換した後に optimal cutting temperature (OCT)コンパウンドで包埋した。クライオスタット(Leica CM 1850)で 30 μ m 厚の切片を作成し、フリーフローティング法を用いて染色を行った。作成した切片を Tween 20 含有 PBS (PBS with Tween 20: PBS-T)で洗浄し、0.3% triton・5% ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin: BSA)含有 PBS を添加し、室温で 1 時間ブロッキングした。次に 0.3% triton・2%BSA 含有 PBS で希釈したウサギ抗マウス Iba 抗体(Wako, 019-19741), ラット抗マウス CD68 抗体(Bio-rad, MCA1957), ギニアピッグ抗マウス NeuN 抗体(Sigma-Aldrich, ABN90P)を添加、4°Cで一晩 incubate した。次に PBS-T で洗浄し、0.3% triton・2%BSA 含有 PBS で希釈した二次抗体を添加、2 時間室温で放置した。切片をスライドガラスに張り付け、DAPI 含有

Vectashield Mounting Medium (Vector laboratories, H-1200)でマウントした. 蛍光顕微鏡(Keyence BZ-710)を用いて観察した.

4.4.1.5 MRL/lpr マウスのミクログリアの網羅的遺伝子解析

16 週齢の雌の MRL/lpr マウスと MRL/MpJ マウスからミクログリアを採取し, ミクログリアの活性化に関わる pathway を探索することを目的とし, RNA シークエンシングによる網羅的遺伝子解析を行った. ミクログリアは各 3 匹ずつのマウスから採取し, RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen)を用いて RNA を抽出した. 抽出した RNA は Genewiz (South Plainfield, NJ)に送付し, ライブラリ作成を委託した. Smart-seq v4 ultra low kit (Clontech-Takara Bio)と NEB NEXT Ultra RNA Library Prep Kit for Illumine (E7530; New England Biolabs)を用いてライブラリを作成した. ライブラリは NovaSeq 6000 system (Illumina)を用いてシーケンスし, 150 塩基 paired-end 法で 2500 万以上のリードを取得した. Cutadapt v 2.1 を用いてクオリティが低いリードやアダプター配列を除去した. トリミングされたリードを mm10 (Ensembl 99)にマッピングし, STAR v 2.7.1a を用いて定量化した. 発現変動遺伝子 (Differentially expressed genes; DEGs)は DESeq2 を用いて, サンプル間の発現レベル(\log_2 fold-change > 1, 調整 p 値 < 0.00001)に基づいて同定された. 解析は R software(ver. 4.0.0; R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2020)を用いて施行した. 得られた変動遺伝子のデータを Ingenuity Pathway Analysis(IPA, Ingenuity Systems Inc, Redwood City, CA)を用いて, pathway 解析を施行した.

4.4.2 結果

4.4.2.1 分離したミクログリアの純度

ミクログリアは CD11b 陽性, CD45 中等度陽性, CD39 陽性, CX3CR1 陽性細胞として同定され, 分離した細胞のうち 95%以上の細胞がミクログリアであることを確認した(Figure 5).

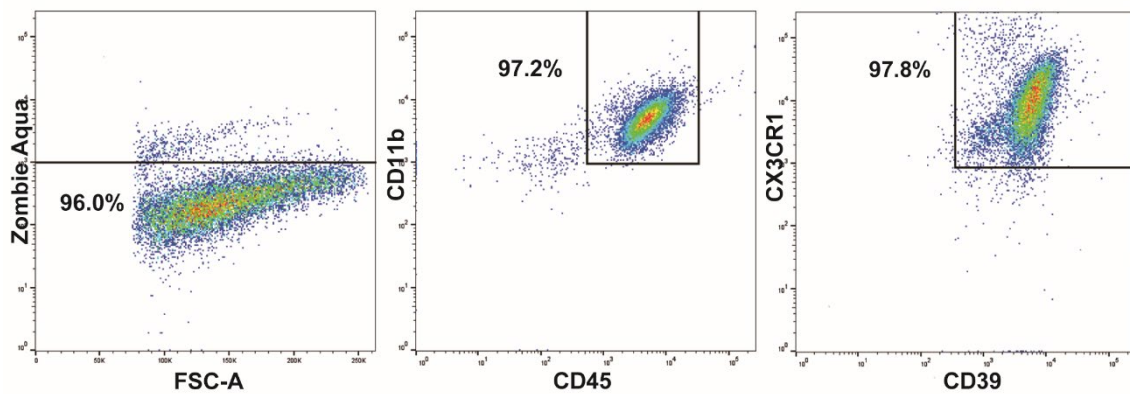


Figure 5. フローサイトメトリーによるミクログリア純度の確認

Zombie Aqua により死細胞の除去を行い, CD11b 陽性, CD45 陽性細胞をゲーティングした. さらに CX3CR1 と CD39 でゲーティングを行い, ミクログリアであることを確認した.

4.4.2.2 MRL/lprマウスのみクログリアにおける週齡毎の炎症性サイトカイン遺伝子発現量の検討

MRL/lprマウスのみクログリアでは8週から16週齡にかけて、週齡依存的にTNF α , IL-6, IL-1 β の遺伝子発現量が増加していた(Figure 6).

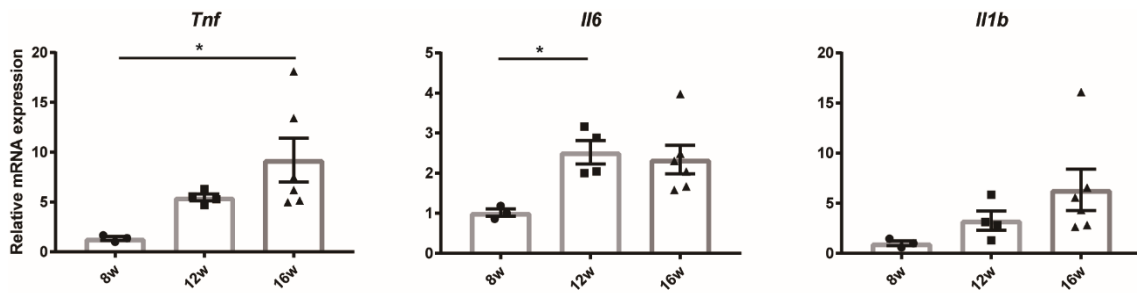


Figure 6. MRL/lpr マウス由来ミクログリアの炎症性サイトカイン遺伝子発現量
 8 週齢, 12 週齢, 16 週齢の雌 MRL/lpr マウスからミクログリアを採取し, Real-time
 PCR 法でマウス TNF α mRNA, IL-6 mRNA, IL-1 β mRNA の発現を定量した.
 データは平均値 \pm 標準誤差で示した. *: $p < 0.05$, one-way ANOVA with Tukey's post
 hoc test

4.4.2.3 MRL/*lpr* マウスと MRL/MpJ のミクログリアにおける炎症性サイトカイン遺伝子発現量の検討

16 週齢の MRL/*lpr* マウスと MRL/MpJ マウス由来のミクログリアを比較すると、MRL/*lpr* マウスのミクログリアで TNF α , IL-6, IL-1 β の遺伝子発現量が亢進していた (Figure 7). これらの結果から MRL/*lpr* マウス由来ミクログリアは MRL/MpJ 由来のものに比べて活性化していることが示唆された.

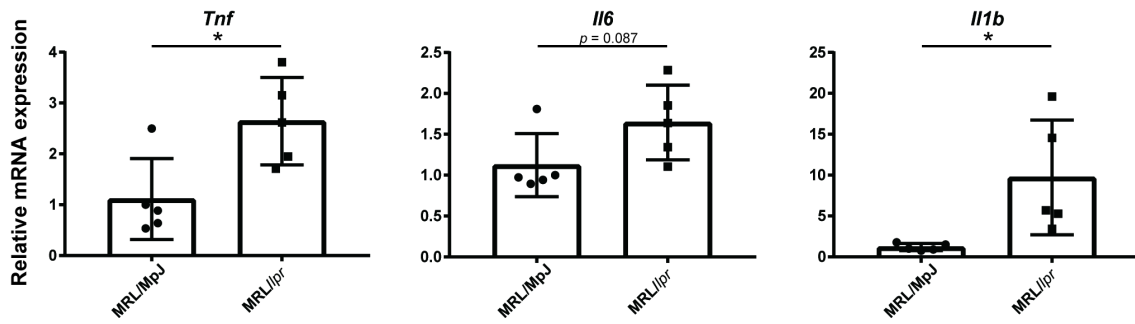


Figure 7. MRL/*lpr* マウスと MRL/MpJ マウスのミクログリアの炎症性サイトカイン遺伝子発現量の比較

16 週齢の MRL/*lpr* マウスと MRL/MpJ マウスからミクログリアを採取し、Real-time PCR 法でマウス TNF α mRNA, IL-6 mRNA, IL-1 β mRNA の発現を定量した。データは平均値 \pm 標準偏差で示した。*: $p < 0.05$, t-test

4.4.2.4 マウス脳免疫組織化学染色によるミクログリア活性化の検討

MRL/*lpr* マウスでは記憶の低下が認められていたことから、海馬におけるミクログリアの活性化の評価を行った。脳組織の免疫染色では、MRL/MpJ マウスと比較し、MRL/*lpr* マウスの海馬においてミクログリアの活性化マーカーである CD68 の発現がコントロールと比較して高く、ミクログリアの活性化を認めた(Figure 8)。

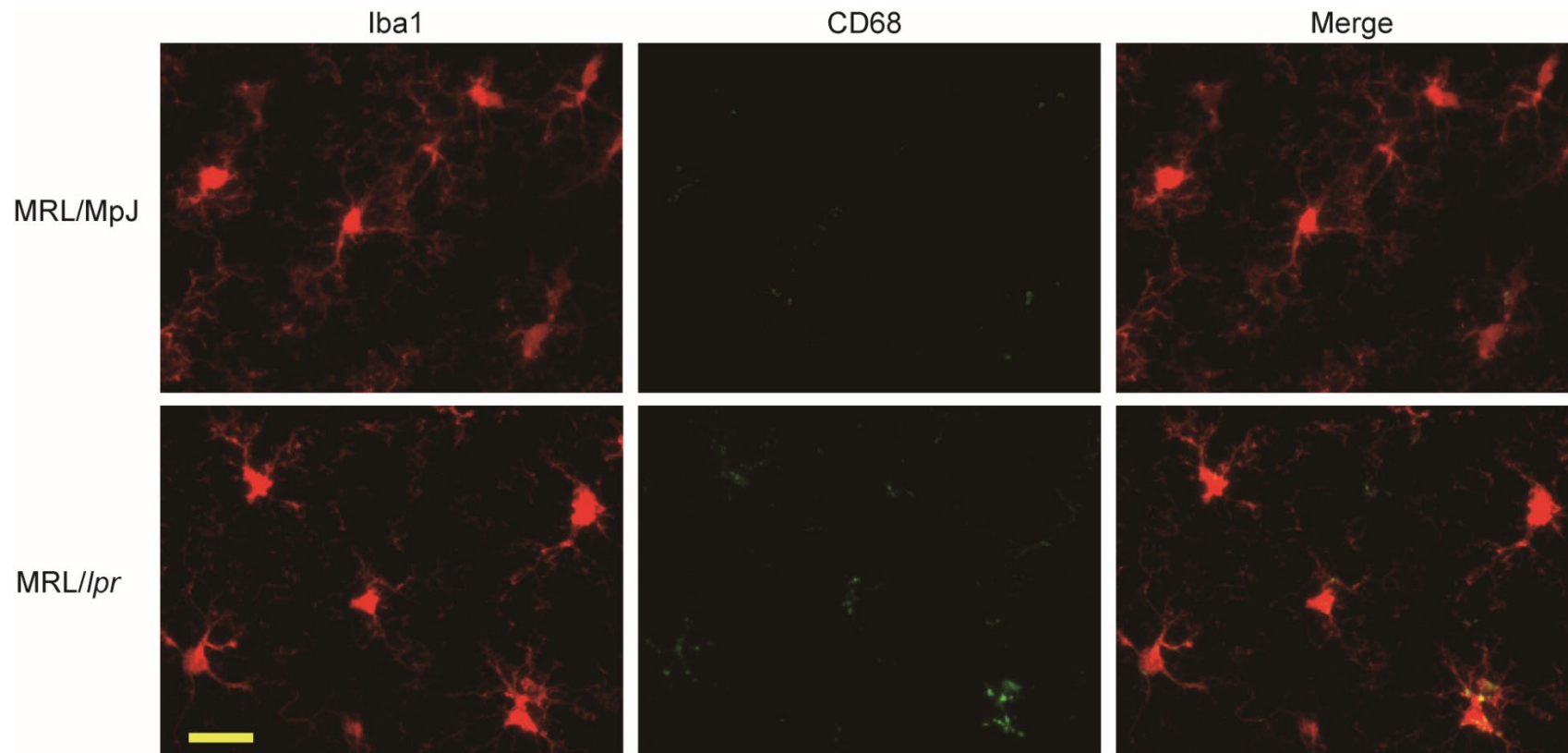


Figure 8. 16 週齢の MRL/*lpr* とコントロールマウスの海馬の免疫組織学的染色

海馬を含む脳切片を作成し、抗 Iba1 抗体(赤)、抗 CD68 抗体(緑)で蛍光免疫染色を施行した。スケールバーは 20 μm を表す。

4.4.2.5 MRL/*lpr* マウスのミクログリアの網羅的遺伝子解析

RNA シークエンシングによって得られたデータから fragments per kilobase of exon per million reads mapped (FPKM)を算出し, FPKM が 1 以上である 10914 個の遺伝子を発現変動解析に用いた. 主成分分析(principal component analysis: PCA)では MRL/*lpr* と MRL/MpJ 由来のミクログリアは PC1 Variance 93%で説明され, それぞれの biological replicates は PC2 Variance 3%で説明された(Figure 9A). このことから MRL/*lpr* と MRL/MpJ のミクログリアは異なる遺伝子発現プロファイルを有していることが示された. MRL/*lpr* のミクログリアはコントロールと比較して 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(\log_2 fold change ≥ 1 , and $p < 0.00001$) (Figure 9B). 次にこれらの発現変動遺伝子に IPA を用いて pathway 解析を行った. Canonical Pathway 解析では, ミクログリアの活性に関わる iNOS Signaling や, 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 が活性化しているものとして抽出された(Figure 10).

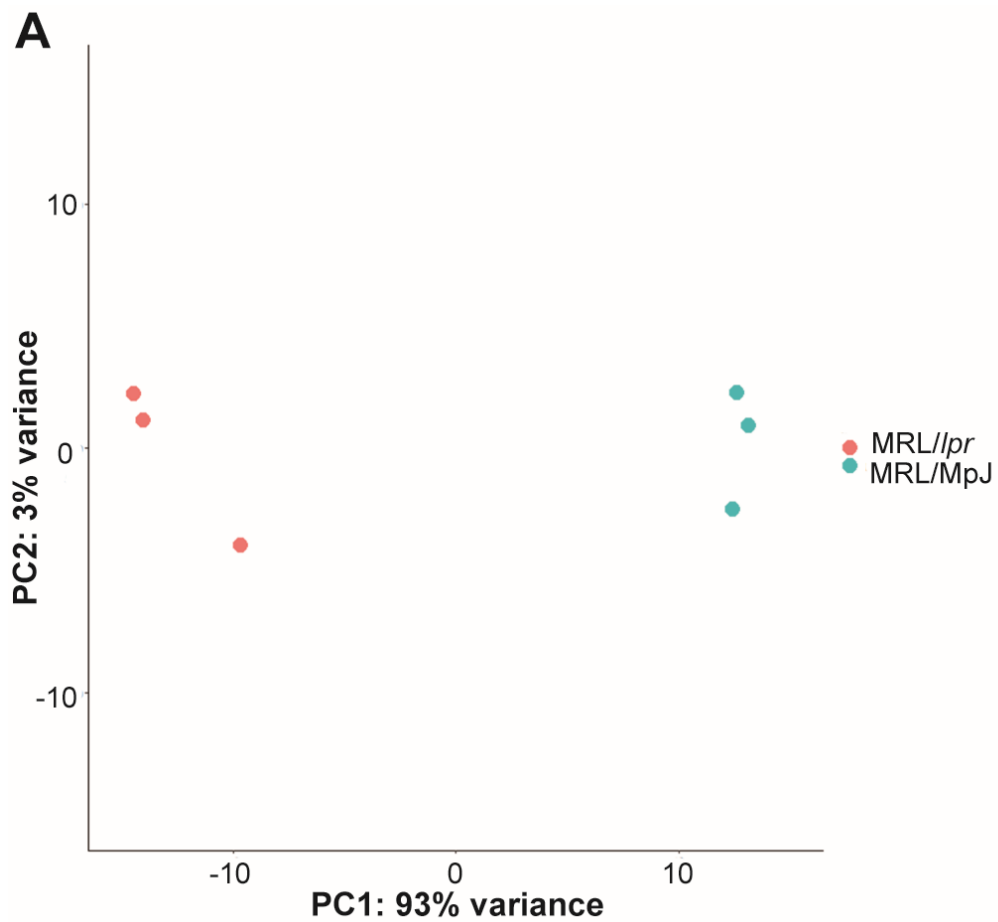


Figure 9. MRL/*lpr* と MRL/MPJ の RNA シーケンシングの結果

A: MRL/MPJ に対する MRL/*lpr* の主成分分析結果. MRL/*lpr* と MRL/MpJ 由来のミクログリアは PC1 Variance 93% で説明され, それぞれの biological replicates は PC2 Variance 3% で説明された.

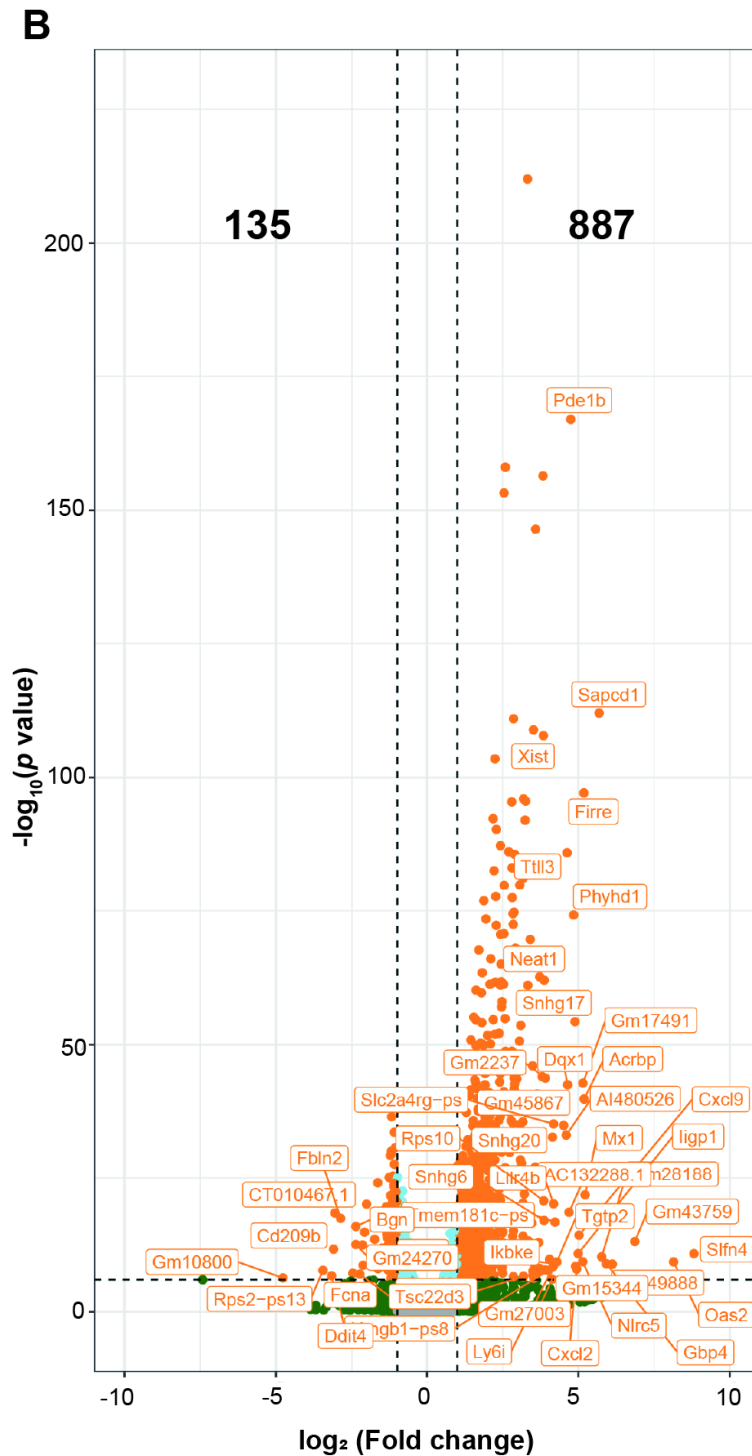


Figure 9. MRL/*lpr* と MRL/MPJ の RNA シーケンシングの結果

B: 変動遺伝子の volcano plot. 887 個の発現亢進遺伝子と 135 個の発現減弱遺伝子が同定された。

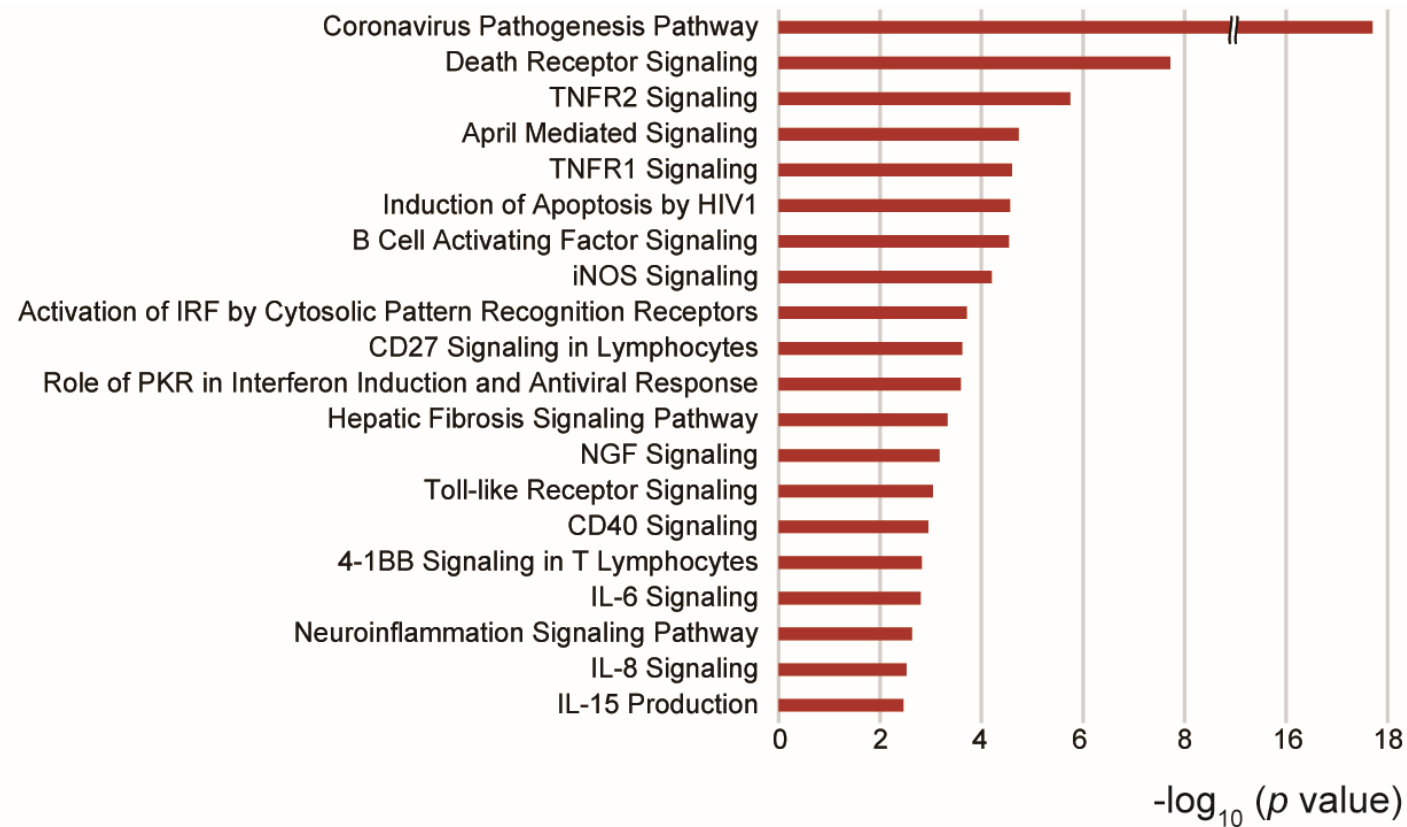


Figure 10 MRL/lpr の発現変動遺伝子の pathway 解析結果

MRL/lpr のミクログリアで認められた発現変動遺伝子について、IPA を用いて Canonical Pathway 解析を施行した。抽出された上位 20 個の pathway を示す。

4.4.3 考察

実験 4.3 では *MRL/lpr* はコントロールマウスと比較して行動異常を呈することが示された。上述の実験より, *MRL/lpr* のミクログリアは炎症性サイトカインの遺伝子発現や活性化マーカーの発現が亢進していた。*MRL/lpr* のミクログリアは, コントロールと比較して活性化していることが示され, 行動異常の原因となっている可能性が示唆された。RNA シーケンスによるミクログリアの網羅的な遺伝子発現解析では, IRF や TNF レセプターなど, サイトカインに関連した pathway の活性化が認められた。IRF は IFN α などの I 型 IFN 遺伝子の転写制御に関わる転写因子である。SLE の病態形成に重要と考えられている IFN α は NPSLE においても重要性が示唆されている (Fragoso-Loyo et al., 2013; Shiozawa et al., 1992)。NPSLE 患者の髄液中では様々なサイトカインが上昇していることが知られており (Yoshio et al., 2016), 髄液中 IL-6 の上昇は NPSLE の最も感度の高い検査と言われている (Hirohata et al., 2009)。また, NPSLE 患者の予後予測因子を検討した研究では, non-responder は responder と比較して, 治療前に採取した髄液中の IL-6, IFN γ , TNF α , IL-10 が有意に高値だったと報告されている (Ichinose et al., 2016)。特に IFN γ , TNF α はミクログリアの炎症性フェノタイプへの極性変化に関わることが知られている (Mecha et al., 2016)。

したがって, 我々はこれまでに NPSLE 患者の髄液で上昇が報告されている IFN α , IFN γ , TNF α , IL-6 がミクログリアの活性化に与える影響を検討することとした。

4.5 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

4.5.1 サイトカイン刺激によるミクログリアにおける炎症性サイトカインの発現量の検討

4.5.1.1 方法

MRL/lprマウスからミクログリアを採取・培養し、サイトカインを添加することによるミクログリアの活性化を評価した。成体マウスから採取したミクログリアは培養困難なことから、生後3日以内のマウスから採取したミクログリアを実験に用いた。マウスから脳を採取し、成体マウスと同様の過程でミクログリアを分離した。生後3日以内のマウスはミエリンが未形成のため、ミエリン除去は施行しなかった。分離したミクログリアを10%非働化ウシ胎児血清(fetal bovine serum: FBS)、ペニシリン、ストレプトマイシン含有 Dulbecco's modified eagle medium : nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, Gibco) で培養した。48時間培養後、IFN γ 20 ng/ml, IL-6 30 ng/ml, IFN α 25 ng/ml, TNF α 10 ng/ml をそれぞれ単独または混合して添加した。これらのサイトカインは Biologend から購入した。6時間後に RLT buffer で細胞を溶解し、mRNA を抽出・cDNA を合成した。Real-time-PCR 法でマウス TNF mRNA, IL-6 mRNA, IL-1 β mRNA の発現量を評価した。

4.5.1.2 結果

個々のサイトカイン刺激による *MRL/lpr* マウス由来ミクログリアの $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL- 1β の遺伝子発現量を Figure11 に示す. サイトカイン刺激により, 炎症性サイトカイン遺伝子の発現は亢進していたが, 刺激するサイトカインによって発現亢進する遺伝子は異なっていた.

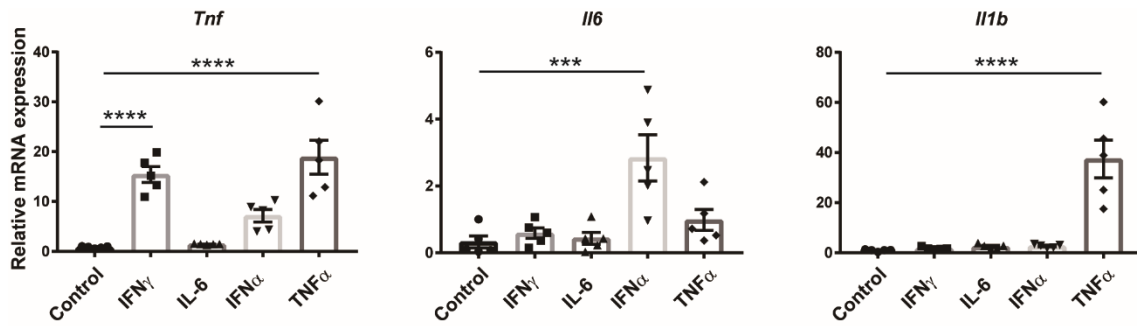


Figure 11. サイトカイン刺激によるミクログリアの炎症性サイトカイン遺伝子発現量の変化

MRL/lprマウスから採取したミクログリアに、IFN γ , IL-6, IFN α , TNF α をそれぞれ単独で添加し、6時間後にRNAを抽出してReal-time-PCR法でマウスTNF mRNA, IL-6 mRNA, IL-1 β mRNAの発現量を評価した。

データは平均値±標準誤差で示した。***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$, one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test

上記4種類の混合サイトカインによる刺激では, TNF α , IL-6, IL-1 β 全ての遺伝子発現が亢進しており (Figure 12), Figure7 に示した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.

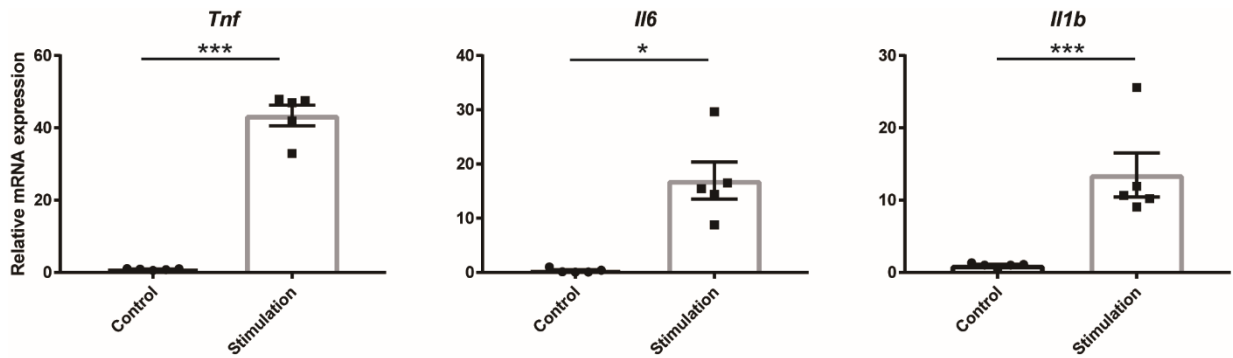


Figure 12. 混合サイトカイン刺激によるミクログリアの炎症性サイトカイン遺伝子発現量の変化

MRL/lprマウスから採取したミクログリアに、IFN γ , IL-6, IFN α , TNF α を混合して添加し、6時間後にRNAを抽出してReal-time-PCR法でマウスTNF mRNA, IL-6 mRNA, IL-1 β mRNAの発現量を評価した。

データは平均値±標準誤差で示した. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, t-test

4.5.2 サイトカインで刺激したミクログリアの網羅的遺伝子解析

4.5.2.1 方法

サイトカイン刺激によるミクログリアの遺伝子発現の変化について網羅的に解析するため、RNA シークエンシングを施行した。上述のようにサイトカインで 6 時間刺激したミクログリアから mRNA を抽出した。上記の結果から、サイトカインは 4 種類を混合して使用し、コントロールとそれぞれのサイトカインの刺激条件で各 3 サンプルずつ施行した。

4.5.2.2 結果

PCA ではコントロールとサイトカインで刺激したミクログリアは PC1 Variance 85% で説明され、それぞれの biological replicates は PC2 Variance 10% で説明された (Figure 13A)。サイトカインで刺激したミクログリアはコントロールと比較して 1341 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 (\log_2 fold change ≥ 1 , $p < 0.00001$) (Figure 13B)。IPA で施行したこれらの発現変動遺伝子の Canonical Pathway では、Protein kinase R (PKR) や triggering receptor expressed on myeloid cells1 (Trem1)、パターン認識受容体などの自然免疫に関わる pathway や、Nuclear factor kappa B (NF- κ B) や IL-6 など炎症に関わる pathway が活性化しているものとして抽出された (Figure 14)。

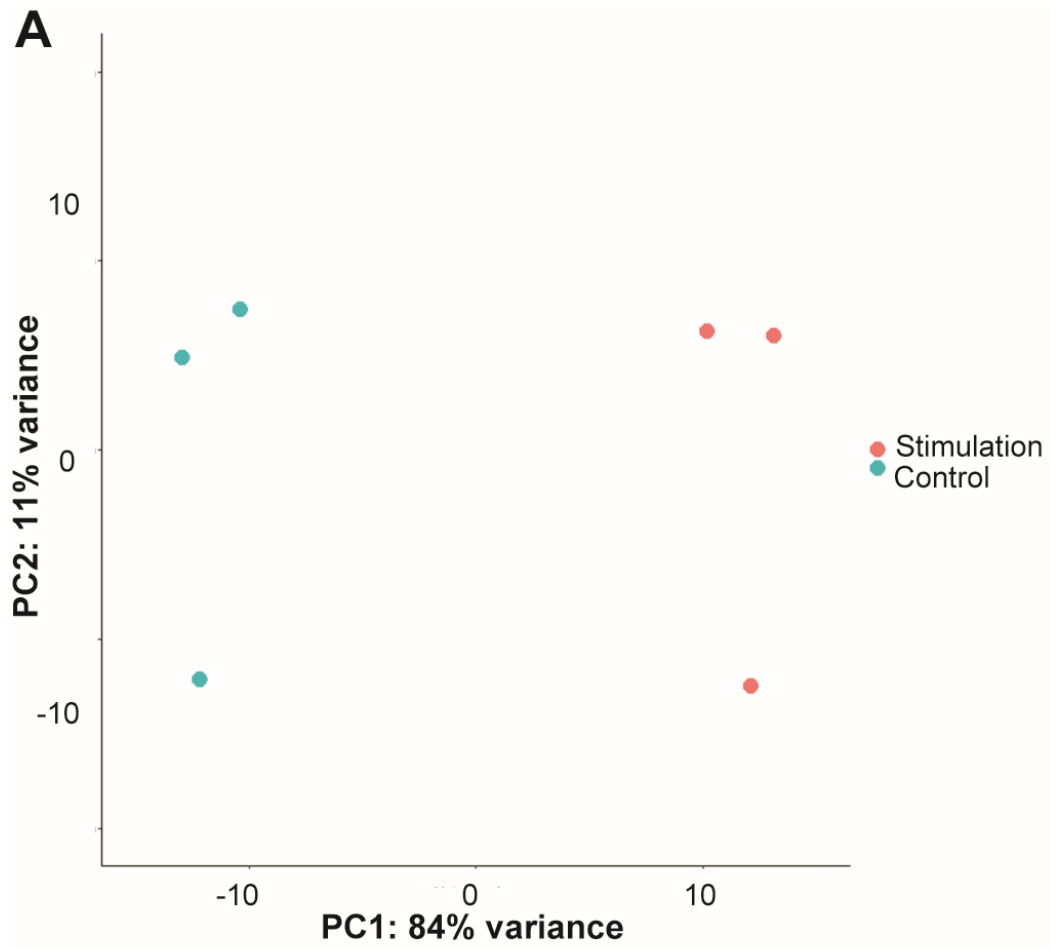


Figure 13. サイトカイン刺激における RNA シークエンシングの結果

A: サイトカイン刺激とコントロールの主成分分析結果. コントロールとサイトで刺激したミクログリアは PC1 Variance 85%で説明され, それぞれの biological replicates は PC2 Variance 10%で説明された.



Figure 13. サイトカイン刺激における RNA シークエンシングの結果
 B: 変動遺伝子の volcano plot. 980 個の発現亢進遺伝子と 387 個の発現減弱遺伝子が同定された.

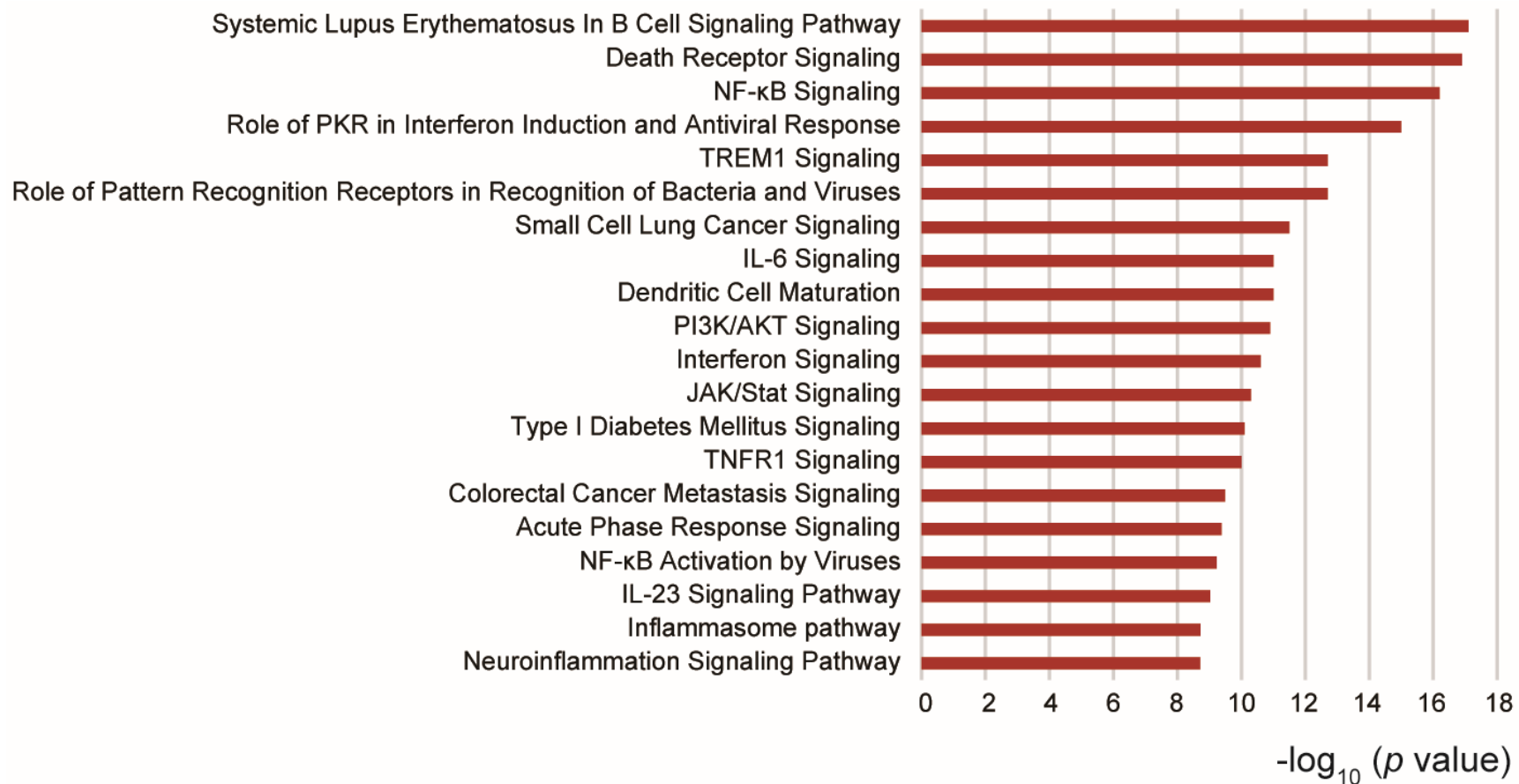


Figure 14. サイトカイン刺激したミクログリアの発現変動遺伝子の pathway 解析結果 IPA を用いた Canonical Pathway で抽出された上位 20 個の pathway を示す.

MRL/*Ipr* 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 97 個, 10 個の遺伝子が, 共に発現上昇または低下していた(Figure 15). MRL/*Ipr* vs MRL/MpJ と stimulation vs control で抽出された上位 20 個の pathway のうち, 両者で共通で見られた Death Receptor Signaling, TNFR1 Signaling, Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response, IL-6 Signaling, Neuroinflammation Signaling Pathway の 5 つの pathway の遺伝子セットについて, MRL/*Ipr* vs MRL/MpJ とサイトカイン刺激 vs コントロールのヒートマップを Figure16 に示す.

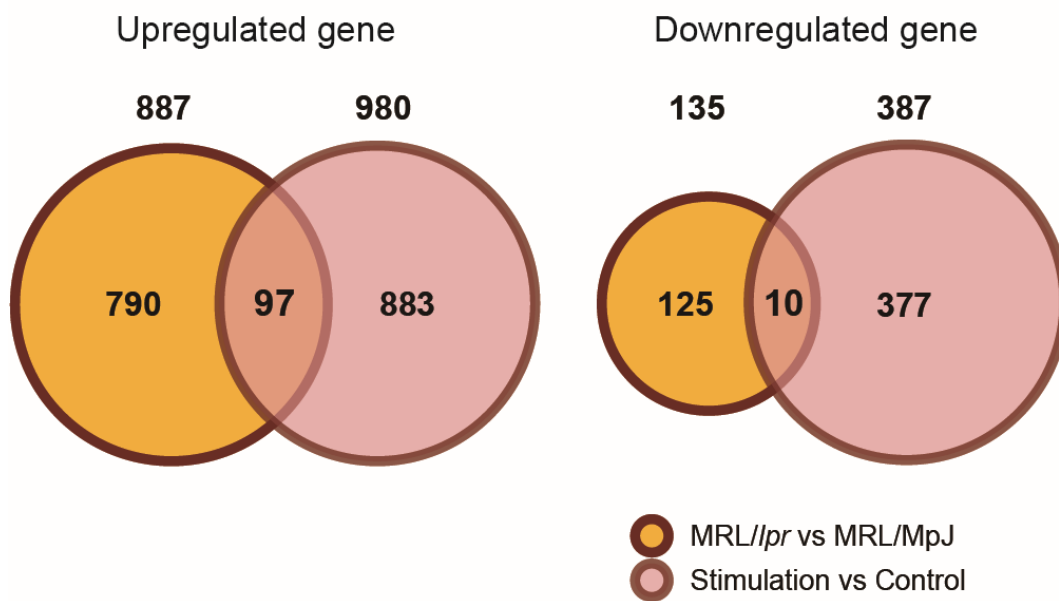


Figure 15. MRL/*lpr* vs MRL/MpJ と Stimulation vs Control の発現変動遺伝子の Venn 図

97 個の遺伝子発現が共通して亢進し, 10 個の遺伝子発現が共通して減弱していた

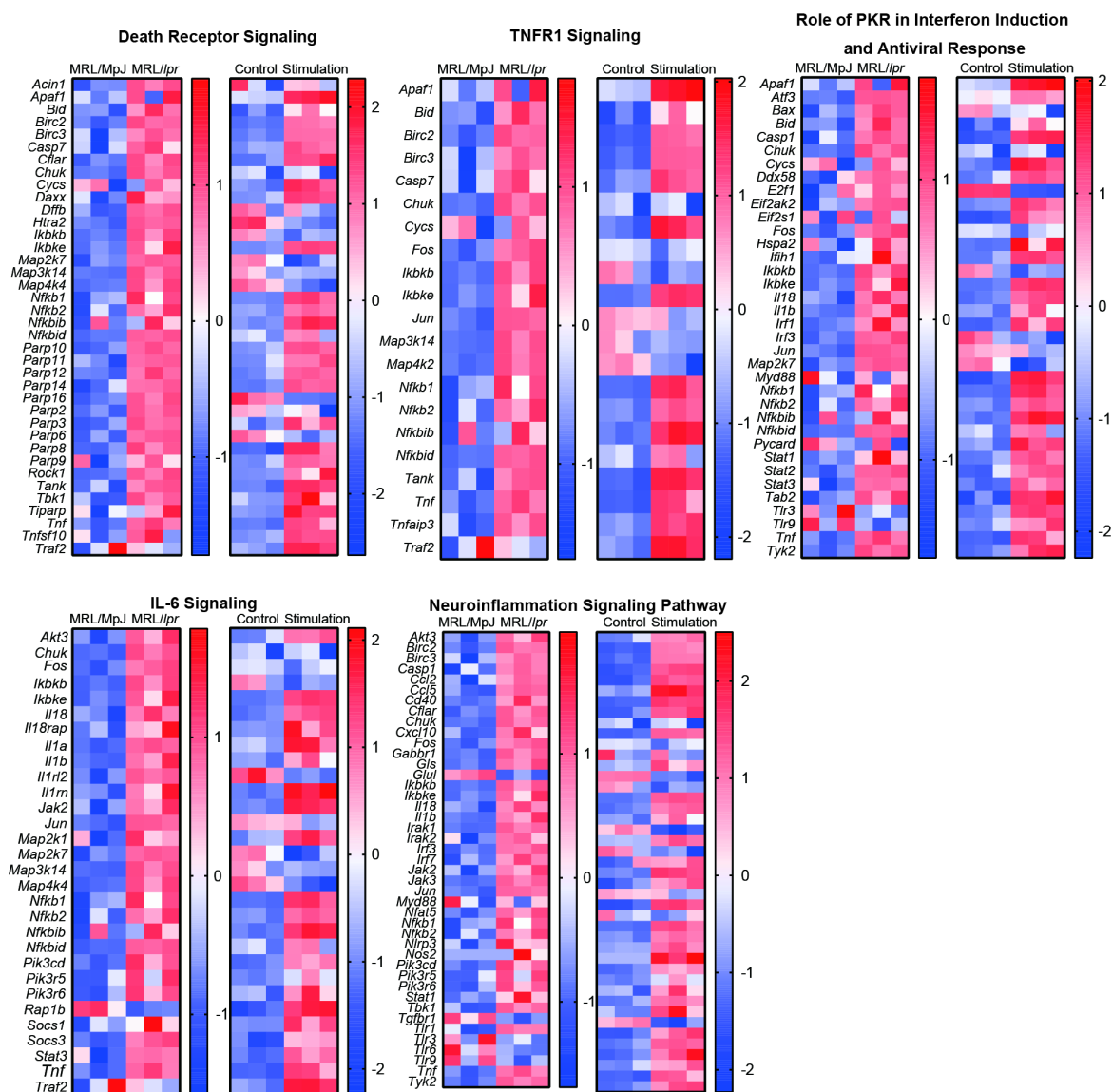


Figure 16. 主要な pathway における遺伝子セットのヒートマップ。

IPA の Canonical Pathway において MRL/lpr vs MRL/MpJ と stimulation vs control で抽出された上位 20 個の pathway のうち、両者で共通で見られた Death Receptor Signaling, TNFR1 Signaling, Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response, IL-6 Signaling, Neuroinflammation Signaling Pathway における遺伝子セットについて、遺伝子発現をヒートマップで示した。ヒートマップは FPKM の z-score で表した。

4.5.3 考察

個々のサイトカイン刺激では、サイトカイン毎にミクログリアの遺伝子発現パターンが異なっていた。4種類を混合したサイトカインで刺激されたミクログリアは、個々のサイトカインで刺激されたミクログリアよりも炎症性サイトカインの遺伝子発現が亢進しており、16週齢の *MRL/lpr* マウスから採取したミクログリアと同様に活性化したフェノタイプを示した。このことから、*MRL/lpr* においては、複数のサイトカインがミクログリアの活性化に関わっていることが示唆された。サイトカインで刺激したミクログリアの網羅的遺伝子解析では自然免疫に関する pathway が亢進していた。また、16週齢の *MRL/lpr* から採取したミクログリアでは IRF に関する pathway の亢進が見られた。IRF は I 型 IFN 遺伝子の転写制御に中心的な役割を担っている転写因子であり、IRF ファミリー転写因子は、9種類のサブタイプ(IRF1-9)が存在している。このうち、IRF5、IRF7、IRF8 がゲノムワイド関連解析(Genome Wide Association Study: GWAS)で SLE の感受性遺伝子として同定されている (Bentham et al., 2015)。また IRF7 はミクログリアの炎症型サブタイプへの極性変化へ重要であると報告されており (Tanaka et al., 2015)、SLE の病態とミクログリアの活性化の双方において重要な因子と考えられる。我々は *MRL/lpr* vs *MRL/MpJ* と Stimulation vs Control で共通して発現が亢進していた 98 個の遺伝子の中から NPSLE の治療ターゲットとなる遺伝子を探索した。*MRL/lpr* vs *MRL/MpJ* と Stimulation vs Control で抽出された pathway のうち、Death Receptor Signaling, TNFR1 Signaling, Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response, IL-6 Signaling, Neuroinflammation Signaling Pathway が両者に共通していた。さらにこれら 5 つの pathway から得られた遺伝子セットの中で、共通する遺伝子を探索したところ *Ikbke* と *Tnfa* が検出され、NPSLE におけるミクログリアの活性化病態に重要であることが予測された。そこで本研究では *Ikbke* に着目して研究を進めることとした。

Ikbke は Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase epsilon (IKBKE) をコードする遺伝子で、Inhibitor of nuclear factor kappa-B (IκB) をリン酸化することにより NF-κB を核内に移行させる働きを持つが、他の IκB kinase とは異なり IRF3 や IRF7 をリン酸化することでこれらの活性化にも関わることが知られている (Fitzgerald et al., 2003; Sharma et al., 2003) (Figure 17A)。RNA シークエンスの結果でも *MRL/lpr* のミクログリアは *MRL/MpJ* と比較して、*Ikbke* に関連する遺伝子の発現が亢進していた (Figure 17B)。*Ikbke* は GWAS で SLE の疾患感受性遺伝子として同定されており (Morris et al., 2016)、SLE の病因である可能性があるが SLE に

おけるその役割については解明されていない。さらにミクログリアにおいてもその機能について研究された報告はない。

したがって、IKBKE が NPSLE の治療ターゲットになり得るかを検討することとした。

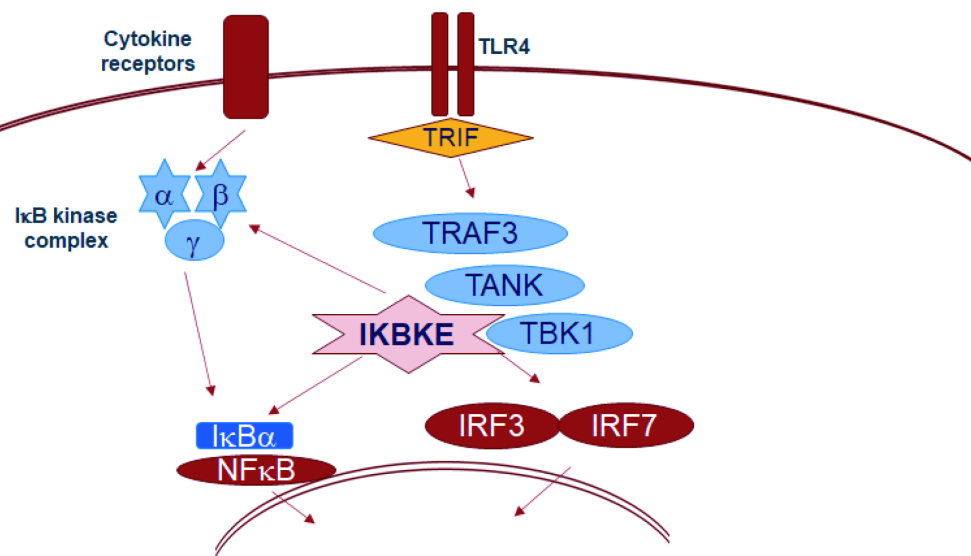
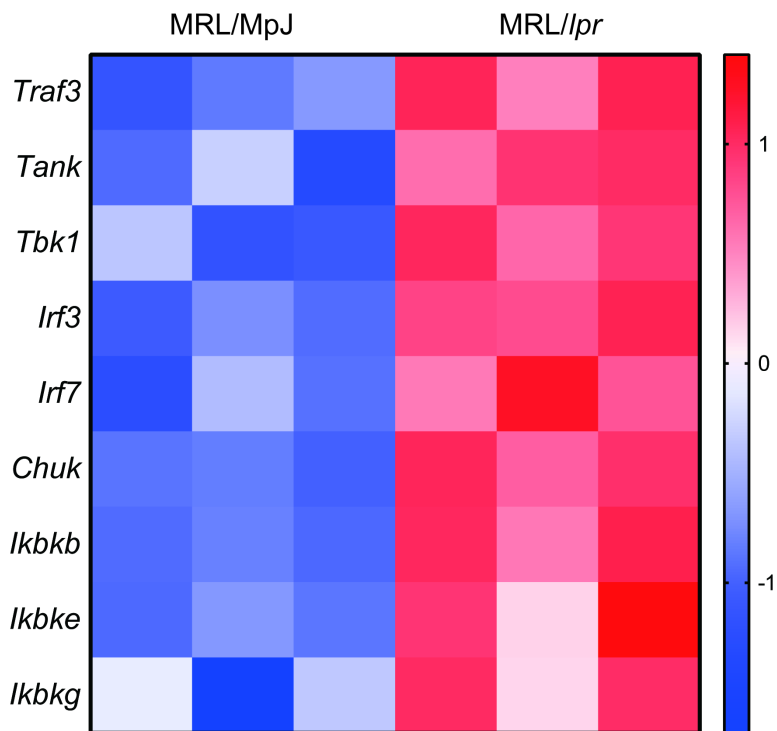
A**B**

Figure 17. IKBKE を介したシグナル伝達経路

A: IKBKE は IκBα のリン酸化のみならず, IRF3, IRF7 をリン酸化し, 核内移行を促進する. B: MRL/lpr と MRL/MpJ を比較した RNA シークエンシングにおける IKBKE のシグナル伝達経路に関わる遺伝子のヒートマップ. ヒートマップは FPKM の z score で示した.

4.6 IKBKE 阻害によるミクログリア活性化への影響

4.6.1 Real-time PCR 法によるミクログリアの IKBKE の遺伝子発現の確認

まず IKBKE の遺伝子発現が MRL/*lpr* のミクログリアやサイトカイン刺激を行ったミクログリアで亢進していることを Real-time PCR 法により確認した。

上述の方法で 16 週齢の雌の MRL/*lpr* と MRL/MpJ マウスからミクログリアを採取し、RNA を抽出した。抽出した mRNA は濃度を調整後に cDNA とした。また、生後 3 日以内の MRL/*lpr* マウスからミクログリアを分離し、48 時間培養後、IFN γ 20 ng/ml, IL-6 30 ng/ml, IFN α 25 ng/ml, TNF α 10 ng/ml を添加して刺激した。6 時間後に RNA を抽出し、cDNA を合成した。Real time PCR 法を用いて、マウス IKBKE の遺伝子発現量を測定した(使用した probe の Assay ID は Mm00444862m1)。

4.6.2 IKBKE 阻害薬によるミクログリア活性の変化

上述の方法で生後 3 日以内の MRL/*lpr* マウスからミクログリアを分離し、48 時間培養後、IFN γ 20 ng/ml, IL-6 30 ng/ml, IFN α 25 ng/ml, TNF α 10 ng/ml を添加して刺激した。同時に IKBKE 阻害薬である MCCK1 1 μ M を添加し 6 時間後に RNA を抽出した。抽出した mRNA は濃度を調整後に cDNA とし、Real-time PCR 法を用いて TNF, IL-1 β の遺伝子発現量を測定した。

4.6.3 *Ikbke* ノックダウンによるミクログリア活性の変化

上述の方法で生後 3 日以内の MRL/*lpr* マウスからミクログリアを分離し、small interfering RNA (siRNA) を用いて *Ikbke* のノックダウンを施行した。1.0 \times 10⁵ 個のミクログリアを 48 well plate に播種し、非働化 FBS 含有 DMEM/F12 で培養した。24 時間後に培地を 200 μ l の Opti-MEM I (Life Technologies) に変更し、siRNA negative Control (Applied Biosystems, Silencer select negative control No. 1 siRNA, 30 nM)-Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, 3 nM) 複合体または *Ikbke*-specific siRNAs (Applied Biosystems, Silencer Select Pre-designed siRNA, s80670 または s80671, 30 nM)-Lipofectamine RNAiMAX (3 nM) 複合体を加えた。

24時間インキュベーション後、培地を非働化 FBS 含有 DMEM/F12 に変更した。さらに 24 時間インキュベーション後、細胞を IFN γ 20 ng/ml, IL-6 30 ng/ml, IFN α 25 ng/ml, TNF α 10 ng/ml を添加して刺激した。6 時間インキュベーション後、細胞を回収し、RNA を抽出した。抽出した mRNA は濃度を調整後に cDNA とし、Real-time PCR 法を用いて IKK β , TNF, IL1 β の遺伝子発現量を測定した。

4.6.4 結果

MRL/*lpr* のミクログリアは MRL/MpJ と比較して、サイトカインで刺激したミクログリアはコントロールと比較して、*Ikbke* の遺伝子発現が有意に高く、RNA シークエンシングの結果が Real-time PCR 法でも証明された (Figure 18).

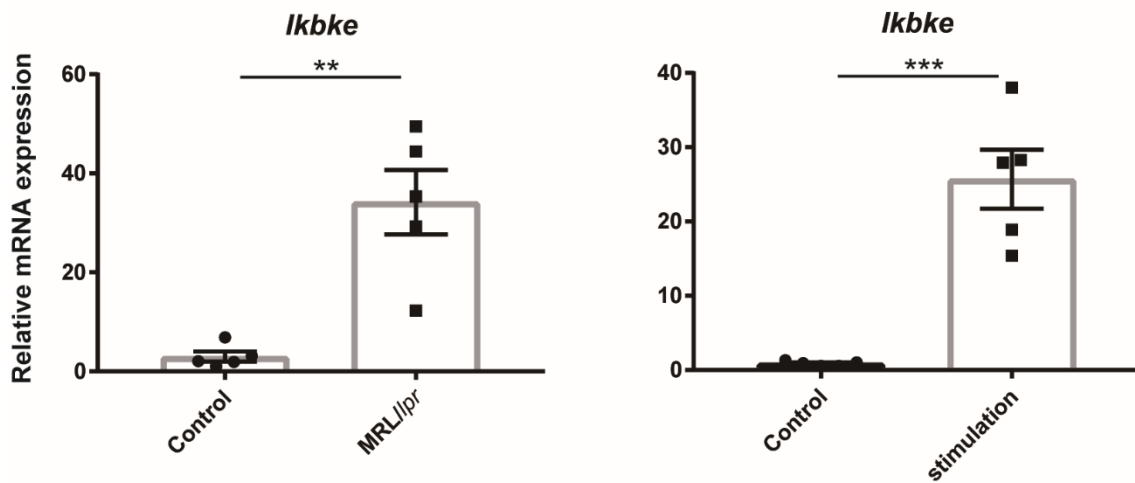


Figure 18. Real-time PCR 法による IKBKE の遺伝子発現の確認

16 週齢の雌の MRL/lpr と MRL/MpJ マウスから採取したミクログリアのマウス IKBKE の遺伝子発現量を Real time PCR 法を用いて測定した。

また、生後 3 日以内の MRL/lpr マウスから分離したミクログリアのサイトカイン刺激(IFN γ , IL-6, IFN α , TNF α)の有無によるマウス IKBKE の遺伝子発現量を測定した。

データは平均値±標準誤差で示した. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, t-test

IKBKE 阻害薬である MCCK1 の添加により、サイトカイン刺激による TNF α , IL-1 β の遺伝子発現量は抑制された (Figure 19). これにより IKBKE 阻害薬によりマイクログリアの活性化を抑制できることが示唆された.

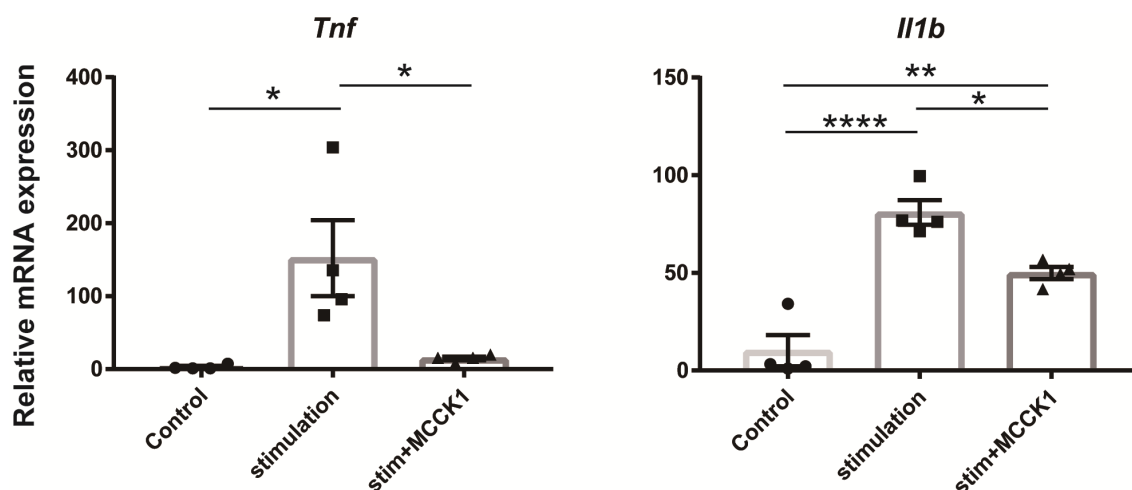


Figure 19. MCCK1 による炎症性サイトカイン遺伝子発現の抑制効果

MRL/lpr マウスから採取したミクログリアに, $IFN\gamma$, IL-6, $IFN\alpha$, $TNF\alpha$ を混合して添加した. MCCK1 の添加の有無による TNF mRNA, IL-1 β mRNA の発現量を Real-time-PCR 法で評価した.

データは平均値±標準誤差で示した. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test

阻害薬の非特異的な作用を除外するため, RNA 干渉を用いた遺伝子の抑制によるミクログリアへの影響についても検討を行うこととした. 最初に異なる 2 種類の *Ikbke* siRNA によって, ミクログリアの *Ikbke* mRNA の発現量がノックダウンされていることを確認した. *Ikbke* のノックダウンにより, サイトカイン刺激による TNF α , IL-1 β の遺伝子発現量は抑制された (Figure 20).

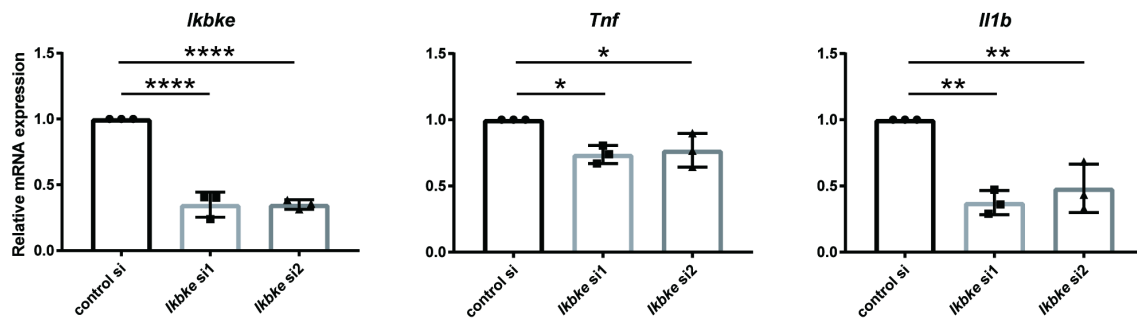


Figure 20. *Ikbke* ノックダウンによる炎症性サイトカイン遺伝子発現の抑制効果
MRL/*lpr* マウスから採取したミクログリアに, siRNA を用いて *Ikbke* をノックダウンした. $\text{IFN}\gamma$, IL-6, $\text{IFN}\alpha$, $\text{TNF}\alpha$ を混合して添加した. *Ikbke* がノックダウンされていることを Real-time-PCR 法により確認し, *Ikbke* ノックダウンの有無による TNF mRNA, IL-1 β mRNA の発現量を評価した.
データは平均値±標準偏差で示した. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$, one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test

4.7 IKBKE 阻害薬によるミクログリアの解糖系への影響の 検討

4.7.1 背景

次に、我々は IKBKE 阻害薬がミクログリアの活性化を抑制する機序について検討した。Figure 17 で示したように、IKBKE は NF κ B や IRF の活性化を介してサイトカイン等の転写を促進する。一方、癌細胞に対する IKBKE 阻害薬の効果を検討した研究では、IKBKE が解糖系を制御しており、IKBKE を阻害することで解糖系を抑制し、癌細胞の増殖を抑制したことが報告されている。近年癌領域を中心に細胞内代謝が細胞の増殖、分化、機能、細胞死に重要であることが示され、免疫担当細胞の細胞内代謝についても研究が進んでいる。これまで我々のグループでは自己免疫性疾患と免疫細胞、特に T 細胞の細胞内代謝に注目して研究を行ってきた(Kono et al., 2019a; Kono et al., 2019b; Kono et al., 2018)。近年ミクログリアの細胞内代謝においても研究が進んでおり、LPS 刺激を行ったミクログリアの解糖系を 2-Deoxy-D-glucose(2-DG)を用いて抑制するとミクログリアの活性化が抑えられたことが報告されている(York et al., 2021) そこで IKBKE 阻害薬がミクログリアの活性化を抑制する機序として、細胞内代謝の変化を介しているという仮説を立て、IKBKE 阻害薬がミクログリアの解糖系へ与える影響について検討した。

4.7.2 方法

4.7.2.1 細胞外フラックスアナライザーによる解糖系の評価

上述の方法で生後 3 日以内の *MRL/lpr* マウスからミクログリアを分離し, 48 時間培養後, IFN γ 20 ng/ml, IL-6 30 ng/ml, IFN α 25 ng/ml, TNF α 10 ng/ml を添加して刺激した. 同時に IKBKE 阻害薬である MCCK1 1 μ M を添加した. 2 時間後に細胞内代謝をリアルタイムに計測できる細胞外フラックスアナライザー(Agilent Seahorse XFp Analyzer)を用いて glycolysis stress test を施行した. Glycolysis stress test による解糖系測定を figure 21 に示す.

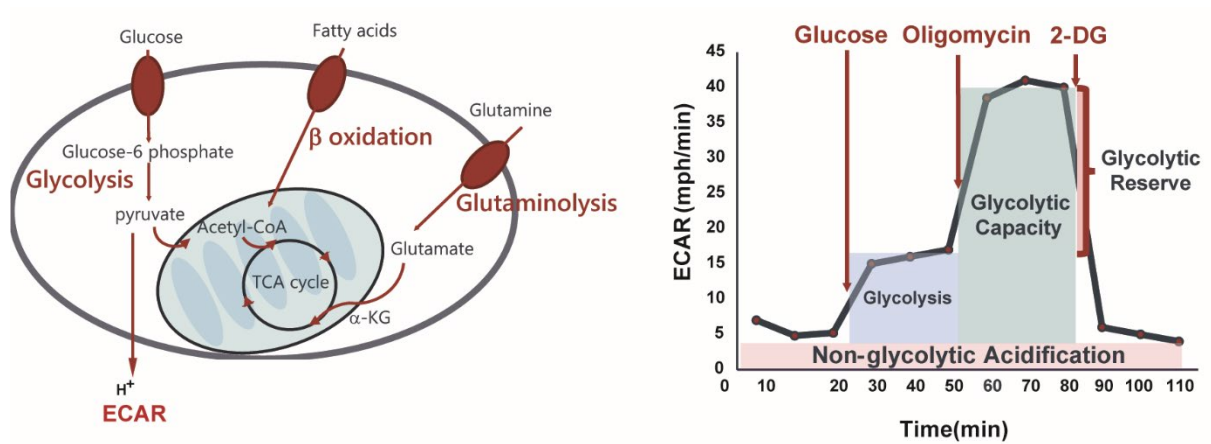


Figure 21. MCCK1 投与によるミクログリアの解糖系の変化

Glycolysis stress test による解糖系測定 の原理. 細胞外フラックスアナライザーは細胞外酸性化速度(extracellular acidification rate; ECAR)を測定することにより解糖系を評価する. グルコース非含有培地で培養された細胞に glucose を添加することにより解糖(glycolysis)を評価する. 次に oligomycin を添加し, ミトコンドリアによる ATP 合成を阻害することで, 解糖能(glycolytic capacity)を評価する.

4.7.2.2 解糖系の抑制によるミクログリア活性化への影響の検討

解糖系の最初の酵素であるヘキソキナーゼを阻害する 2DG を用いて、解糖系の抑制がミクログリアの活性化に与える影響を評価した。生後 3 日以内の MRL/lpr マウスから分離したミクログリアを 48 時間培養し、IFN γ 20 ng/ml, IL-6 30 ng/ml, IFN α 25 ng/ml, TNF α 10 ng/ml を添加して刺激した。同時に 2-DG 30mM を添加した。6 時間インキュベーション後、細胞を回収し、RNA を抽出した。抽出した mRNA は濃度を調整後に cDNA とし、Real-time PCR 法を用いて TNF α , IL1 β の遺伝子発現量を測定した。

4.7.3 結果

Glycolysis stress test では, glycolysis, glycolytic capacity とともに MCCK1 の添加により有意に低下しており, MCCK1 によってミクログリアの解糖系が抑制されていることが示された (Figure 22) .

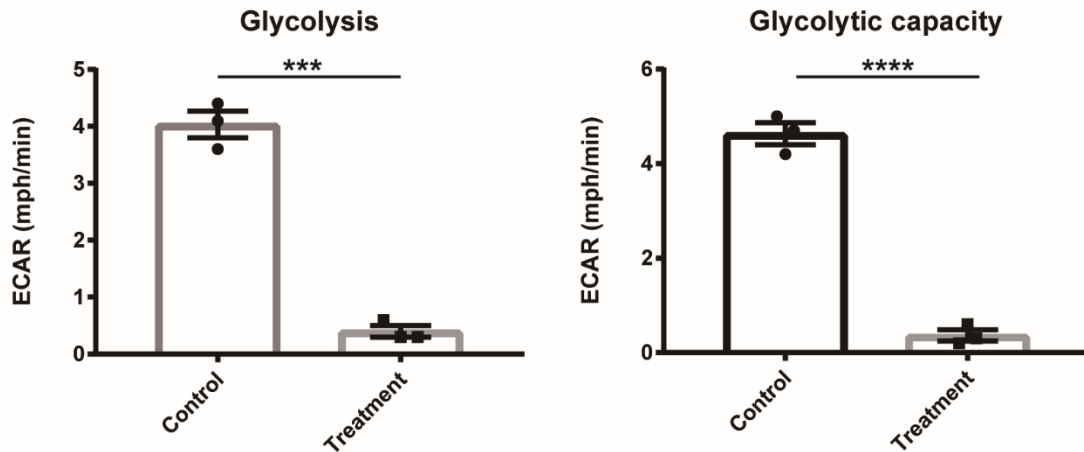


Figure 22. MCCK1 投与によるミクログリアの解糖系の変化

生後 3 日以内の MRL/lpr マウスからミクログリアを分離し, 48 時間培養後, $\text{IFN}\gamma$, IL-6, $\text{IFN}\alpha$, $\text{TNF}\alpha$ を添加して刺激した. MCCK1 の添加の有無による解糖系の変化を細胞外フラックスアナライザーを用いて測定した.

MCCK1 投与群は glycolysis, glycolytic capacity とともに非投与群と比較して有意に低下していた. データは平均値±標準誤差で示した. ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$, t-test

また, 2DG の添加により, サイトカイン刺激による $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ の遺伝子発現量は抑制された(Figure 23). これによりミクログリアの活性化には解糖系が重要であることが示唆された.

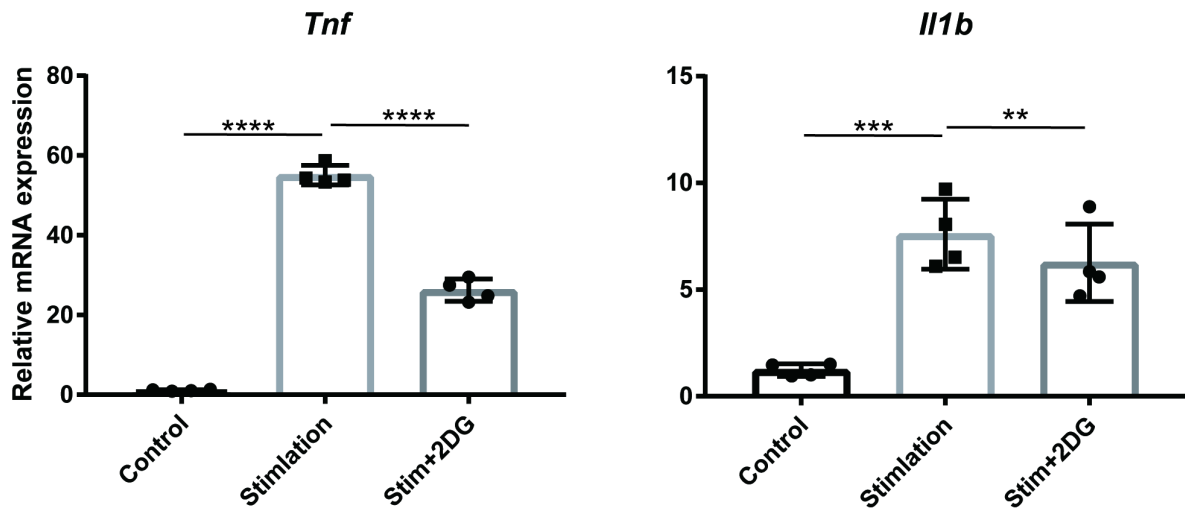


Figure 23. 2-DG による炎症性サイトカイン遺伝子発現の抑制効果

MRL/lpr マウスから採取したミクログリアに, IFN γ , IL-6, IFN α , TNF α を混合して添加した. 2-DG の添加の有無による TNF mRNA, IL-1 β mRNA の発現量を Real-time-PCR 法で評価した.

データは平均値 \pm 標準誤差で示した. *: $p < 0.05$, ****: $p < 0.0001$, n.s.: not significant, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test

4.8 IKBKE 阻害薬による MRL/lpr マウスの異常行動への治療

効果の検討

次に *in vitro* で示された IKBKE 阻害薬によるミクログリアの活性化の抑制が, *in vivo* でも認められるかどうか検討するため, IKBKE 阻害薬の脳室内投与を行うこととした. IKBKE は骨髄球由来マクロファージや T 細胞などにも発現していることから, その他の細胞への影響を最小限にするため, 全身投与ではなく, 局所投与である脳室内投与を選択した.

4.8.1 方法

6 週齢の MRL/lpr マウスの雌に, MCCK1 の脳室内投与を行い, 異常行動, ミクログリアの活性化への影響を検討した. 脳室内への持続投与には, MCCK1 300 ng/ μ l または PBS を充填した浸透圧ポンプ(Alzet)を用いた. イソフルランによる持続麻酔下でステレオタキシックを用いて Bregma 縫合から 1.1mm 外側, 0.5mm 尾側を穿刺し, 脳室内に針を留置した. 針とカテーテルで接続された浸透圧ポンプをマウスの皮下に留置した. 2 週間後に Open field 試験, Y maze 試験, Novel object recognition 試験を行った. 続いて安楽死処理を行い, PBS, 4%PFA 灌流を行った後, 脳を採取した. 採取した脳は実験 3.4.1.4 と同様の方法で免疫組織化学染色を施行した.

4.8.2 結果

Open field 試験において, MCCK1 投与群は PBS 投与群と比較して総移動距離, 中央区画滞在時間に差を認めず, 不安傾向の改善効果は認めなかった. (Figure 24).

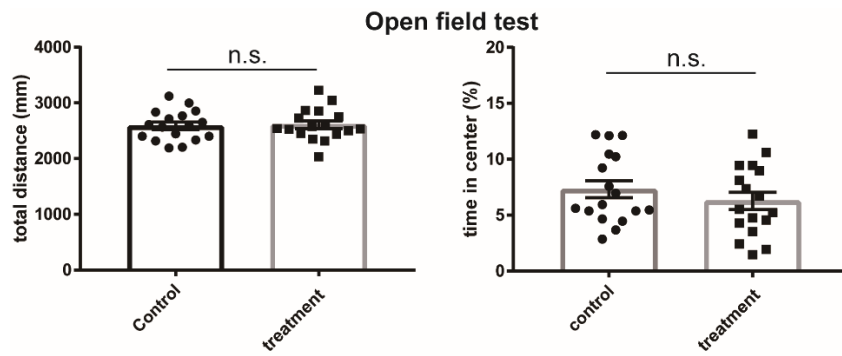


Figure 24. MCCK1 投与後の Open field 試験

Open field ボックス内でマウスを 5 分間自由に探索させ、総移動距離、中央区画滞在時間を記録した。

データは平均値±標準偏差で示した. n.s.: not significant, t-test

Y maze 試験において, MCCK1 投与群は PBS 投与群と比較してアームへの総侵入回数, 総侵入回数に対する alternation triplet の割合に差を認めず, 空間作業記憶に対する MCCK1 の治療効果は認めなかった(Figure 25).

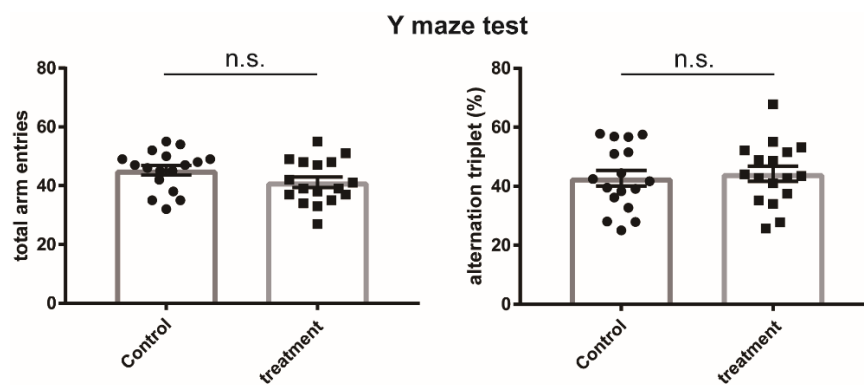


Figure 25. MCCK1 投与後の Y maze 試験結果

Y maze 内でマウスを 6 分間自由に探索させ、アームへの総侵入回数, 3 回連続で異なるアームに侵入した回数(alternation triplet)を記録した.

データは平均値±標準偏差で示した. n.s.: not significant, t-test

Novel object recognition 試験において, MCCK1 投与群では, PBS 投与群と比較して, 新奇オブジェクトへの探索時間が有意に長く, 視覚的認知記憶が改善していることが示された(Figure 26).

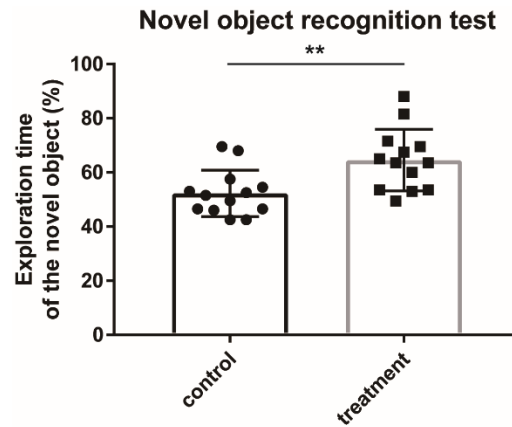


Figure 26. MCCK1 投与後の Novel object recognition 試験結果

マウスを2つのオブジェクトが置かれた open field ボックス内を5分間自由に探索させ、1時間のインターバルを置き、オブジェクトの1つが別の新奇オブジェクトに変更された open field ボックス内を5分間探索させた。それぞれのオブジェクトを探索した時間を記録し、新奇オブジェクトを探索した時間の割合をパーセントで示した。

データは平均値±標準偏差で示した。**: $p < 0.01$, t-test

脳組織の免疫染色では, MCCK1 投与群の脳でミクログリアの活性化マーカーである CD68 の発現が PBS 投与群と比較して減弱しており, ミクログリアの活性化が抑制されていた(Figure 27).

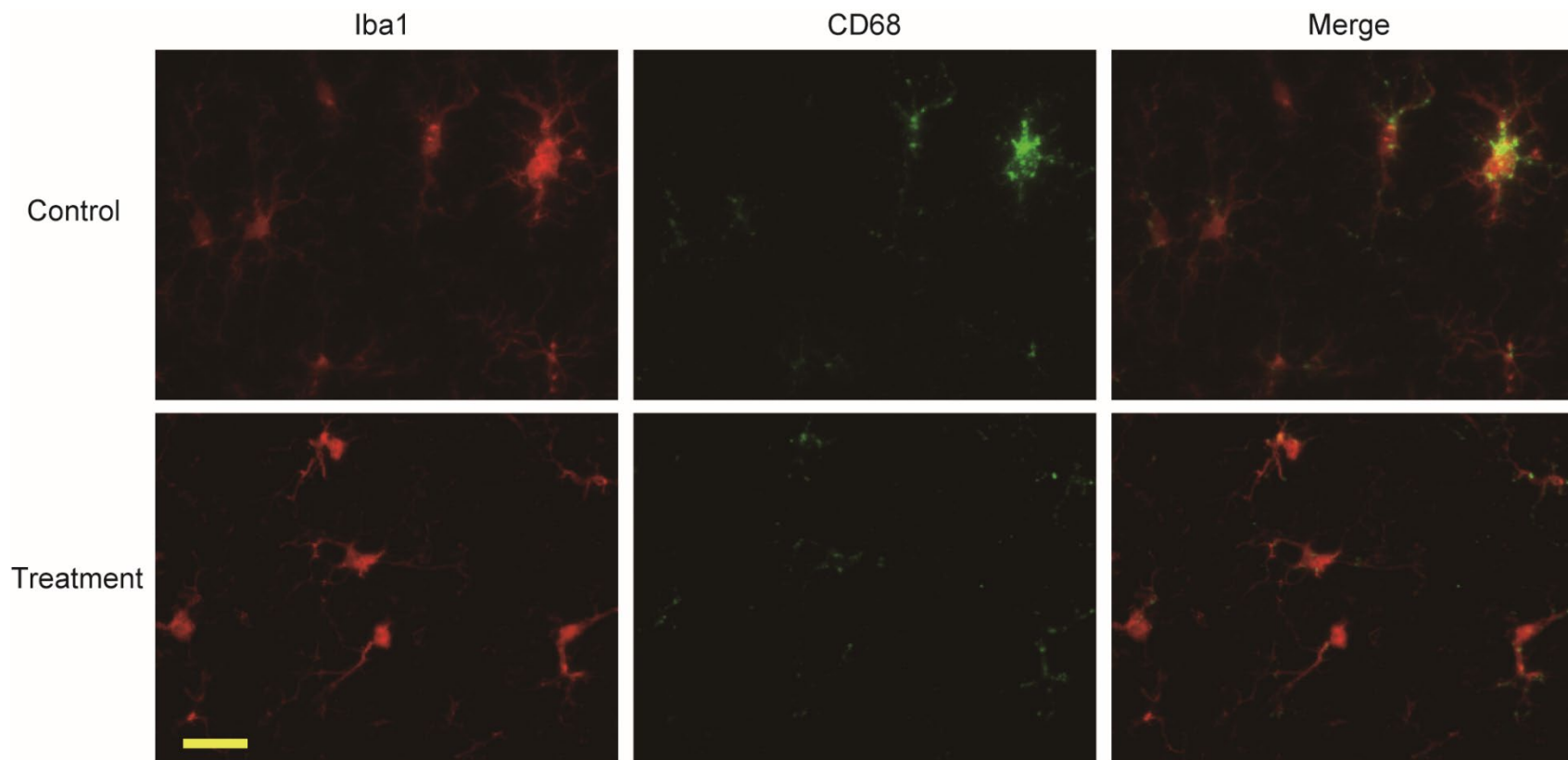


Figure 27. MCCK1 を投与したマウスとコントロールマウスの海馬の免疫組織学的染色

海馬を含む脳切片を作成し, 抗 Iba1 抗体(赤), 抗 CD68 抗体(緑)で蛍光免疫染色を施行した. 上段は PBS 投与(control), 下段は MCCK1 投与(treatment)を示す. スケールバーは 20 μm を表す.

4.9 考察

本研究で我々は、ミクログリアの活性化が NPSLE の病態に関与していること、IKBKE がミクログリアの活性化に関与していることを見出した。さらに IKBKE をターゲットとした治療はミクログリアの活性化を抑制し、モデルマウスの NPSLE 症状を改善した。

NPSLE は SLE の難治性病態の一つで、時に高次機能障害などの後遺症を認める予後不良な病態だが、不明な点が多く経験的な治療に頼っているのが現状である。その病態には脳の微小血管を中心とした血管障害や神経細胞に対する自己抗体の産生、サイトカインやケモカインなどの炎症性メディエーターの髄腔内での産生などが関与していると考えられている。

脳内には神経細胞の他にアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアが存在している。ミクログリアは中枢神経の常在マクロファージであり、脳内の恒常性の維持に重要な役割を担っている。また脳内の免疫細胞としても重要であり、中枢神経の炎症や損傷の際に、貪食能や炎症性サイトカイン産生の亢進がみられる。脳の損傷時やアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患、多発性硬化、脳血管疾患、ウイルス感染や脳腫瘍などの病態時に、ミクログリアが活性化することが見出され、病態との関連が注目されてきた(Kreutzberg, 1996)。また、ミクログリアは I 型 IFN によって活性化されることや、SLE モデルマウスで活性化したミクログリアがみられることが報告されている(Crupi et al., 2010; Mondal et al., 2008; Wen et al., 2015)。活性化したミクログリアは炎症性サイトカインの産生や直接の貪食作用により神経細胞を障害し、種々の神経症状を引き起こすと考えられる。

今回我々の研究では 3 種類の行動試験を施行したが、IKBKE 阻害薬により改善したのは Novel object recognition 試験のみであった。Y maze 試験は Novel object recognition 試験と同様に認知機能を評価する試験だが、Novel object recognition が物体認識記憶を評価するのに対して、Y maze 試験は空間作業記憶を評価する点で異なる。薬剤の脳内注射により海馬を部分的に損傷し、海馬損傷の割合による行動試験への影響を検討した研究では、空間作業記憶は物体認識記憶よりも小さい範囲の海馬損傷で障害されていたことが報告された(Broadbent et al., 2004)。このことから、本研究での IKBKE 阻害薬の投与は、物体認識記憶を改善する程度には海馬機能を改善できたが、空間作業記憶を改善するには効果が不十分であった可能性がある。この点に関しては、薬剤の投与濃度を増やすことにより改善できる可能性があり、今後は阻害薬の投与濃度を検討する必要がある。

また、脳内において IKBKE はミクログリアのみならず、アストロサイトにも発現している(Zhang et al., 2014). したがって本研究での IKBKE 阻害薬の脳室内投与はアストロサイトにも作用した可能性があり、ミクログリアへの作用を検討するためにはノックアウトマウス等を用いた検討が必要である.

本研究ではリンパ球を含めた他の細胞への影響を排除するために脳室内投与を施行したが、実臨床に応用する際には中枢神経系への直接投与は侵襲が高く非現実的であり、全身投与を行うことが想定される. 全身投与を行う際は、血液脳関門の通過が問題となるが、NPSLE 患者では血液脳関門が破綻していることから(Kamintsky et al., 2020), 脳内への移行は問題ないと考えられる. また、IKBKE はループス腎炎の病態に関与しているマクロファージにも発現しており、全身投与することで NPSLE 以外の SLE の病態を改善することも期待される.

IKBKE をターゲットとした治療は NF κ B や IRF を阻害することによる下流のシグナル伝達の抑制によるものが考えられるが、今回我々は異なる機序として解糖系の制御に着目した. IKBKE は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を促進することにより解糖系を亢進させている(Cortese et al., 2014; O'Neill, 2014; Zubair et al., 2016). 癌領域においては、解糖系を抑制することにより癌細胞の増殖を抑制できたとする報告があるが、近年免疫疾患の領域においても解糖系の重要性は注目されている. 本研究においても、解糖系の最初の酵素であるヘキソキナーゼを阻害する 2DG を用いてミクログリアの活性化を抑制できたことから、IKBKE 阻害薬によるミクログリア活性化の抑制の機序として解糖系も一定の役割を果たしていると考えられる.

今後は神経細胞の Golgi 染色等を用いた IKBKE 阻害薬の治療効果の検討や、IKBKE 阻害薬の全身投与を行うことにより、腎炎などの他の SLE の病態に対する治療効果の検討などを予定している.

4.10 結語

IKBKE 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.

5. 第二部

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

5.1 緒言

皮膚筋炎は骨格筋や皮膚、関節、肺などを侵す全身性の自己免疫疾患である(Bohan and Peter, 1975). 皮膚筋炎患者において、間質性肺疾患(ILD)は重要な合併症の一つであり、死因の多くを占める(Johnson et al., 2016). ある研究においては皮膚筋炎関連のILD患者の5年生存率は46,7%と報告されている(Chen et al., 2009; Xu et al., 2016). 急速進行性ILD(RPILD)は特に治療抵抗性であり、数か月以内に致死的となり得る(Gono and Kuwana, 2016; Xu et al., 2016; Ye et al., 2007). RPILDの治療には副腎皮質ステロイドと免疫抑制剤の併用による強力な免疫抑制療法が必要であり、特にILDの発症早期から施行すると有効である(Kotani et al., 2008). したがって、皮膚筋炎患者においてRPILDの発症を予測することは、適切な治療選択並びに予後の改善のために重要である.

筋症状が無いもしくは軽度で、皮膚筋炎に特徴的な皮疹を呈する皮膚筋炎は典型的な皮膚筋炎に対して、無筋症性皮膚筋炎(clinically amyopathic dermatomyositis: CADM)と呼ばれ、RPILDの危険因子として知られている(Galimberti et al., 2016). しかし、CADM患者におけるRPILDの発症率は30%に満たず(Gerami et al., 2006; Moghadam-Kia et al., 2016; Xu et al., 2016), RPILDは典型的な皮膚筋炎にも発症し得る(Moghadam-Kia et al., 2016). 皮膚筋炎関連のILDの予後不良因子として、発熱、高フェリチン血症、リンパ球減少、血清C reactive protein(CRP)高値、高齢発症、抗melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)抗体陽性が知られている(Gono et al., 2010; Sato et al., 2018; Xu et al., 2016). 中でも抗MDA5抗体は、その力価が患者予後と相関することが知られた確立したバイオマーカーであるが(Gono and Kuwana, 2016), 抗MDA5抗体陽性患者の約半数はRPILDを発症しない(Moghadam-Kia et al., 2016). したがって、過剰または過少治療を避けるため、より精度の高いRPILDの予測因子が必要とされている.

Magnetic resonance imaging (MRI)は皮膚筋炎をはじめ、関節リウマチや脊椎関節炎などのリウマチ性疾患の疾患活動性評価に広く用いられてきた(Curiel et al., 2009; Kono et al., 2017; Kubinova et al., 2017; Lecouvet et al., 2018). 近年、関節リウマチや脊椎関節炎において全身MRIの有用性が報告されており(Kono et al., 2017; Lecouvet et al., 2018), 皮膚筋炎においてもその有用性の報告が散見される(Huang et al., 2017; Malattia et al., 2014). MRIは身体所見よりも鋭敏に皮膚筋炎の炎症部位を検出することが可能であり、全身MRIにより検出された炎症部位をスコアリングすることで筋炎の活動性を評価した既報も存在する(Kubinova et al., 2017; Malattia et al., 2014). しかし、全身MRIがRPILDを含めた重症合併症の予測に有用であること

を示した研究は存在しない. 我々は日常臨床において, **RPILD** を発症した皮膚筋炎患者の全身 **MRI** では筋膜の異常信号が筋内の異常信号に比して高い傾向にあることを認識していた. そこで, 筋膜優位の **MRI** 異常が皮膚筋炎患者の **RPILD** 発症の予測因子になるという仮説を立てた.

5.2 研究の目的

本研究の目的は, 全身 **MRI** を用いて皮膚筋炎患者における **RPILD** 発症リスクを検討することである.

5.3 患者と方法

5.3.1 研究デザイン

本研究は後方視的観察研究である。通常診療において全身 MRI を撮像された皮膚筋炎患者を対象とし、診療記録から臨床情報を収集した。本研究はヘルシンキ宣言と臨床研究の基本理念に従い、北海道大学病院の倫理委員会の承認のもとに行った(研究番号 018-0270)。

5.3.2 対象

2014 年 10 月から 2019 年 7 月までに北海道大学病院内科 II で皮膚筋炎と診断され、全身 MRI を撮像された患者を対象とした。皮膚筋炎の診断はヨーロッパリウマチ学会/アメリカリウマチ学会の分類基準に基づき行われた(Lundberg et al., 2017)。RPILD の発症の有無で患者を 2 群に分類した(RPILD 群, 非 RPILD 群)。RPILD は呼吸器症状の発症から 3 か月以内に増悪が確認された ILD と定義した(Gono et al., 2010; Gono et al., 2012; Ishigaki et al., 2013; Xu et al., 2016)。ILD の増悪は呼吸困難・低酸素血症の出現、経過中の胸部 X 線・computed tomography (CT)画像の増悪で判断した。

5.3.3 評価項目

5.3.3.1 身体所見と検査所見

臨床検査ではクレアチンキナーゼ(creatine kinase: CK), アルドラーゼ, CRP, フェリチン, Krebs von den Lungen 6 (KL-6)及び抗アミノアシル tRNA 合成酵素(aminoacyl tRNA synthetase: ARS)抗体, 抗 transcription intermediary factor 1 γ 抗体, 抗 Mi-2 抗体の 4 つの筋炎特異的自己抗体を評価した. 呼吸機能試験では%肺活量(vital capacity: VC)を記録した. 徒手筋力テスト(manual muscle test: MMT)は頸部屈筋, 両側の三角筋, 上腕二頭筋, 上腕三頭筋, 腸腰筋, 大腿四頭筋, 大腿屈筋の計 13 部位において, 0-5 点で評価した. その他発熱, 筋痛, 関節炎, 悪性腫瘍の有無を記録した.

5.3.3.2 画像検査

全身MRIは1.5テスラMRI装置を使用して撮像され, short-tau inversion recovery (STIR) 画像で頸部から足首までの環状断と水平断が撮像された. 全てのMRIは治療開始前に撮像された. 全身MRIのスコアリングシステムは既報に基づき(Malattia et al., 2014), リウマチ医と放射線科医の合意の元に作成された. 筋と筋膜の異常信号は既報に基づきそれぞれ42の筋群(前頸部筋群, 後頸部筋群, 頸部脊柱筋, 三角筋, 棘上筋, 棘下筋と小円筋, 上腕二頭筋, 上腕三頭筋, 前腕屈筋, 前腕伸筋, 臀筋, 腸腰筋, 縫工筋, 内転筋, 大腿四頭筋, 大腿屈筋, 大腿筋膜張筋, 前下腿筋, 外側下腿筋, 後下腿筋, 腹直筋, 胸部脊柱筋)で評価された(Malattia et al., 2014). 左右対称の筋群は左右別に評価され, 異常信号の有無で0点(無し)と1点(有り)にスコアリングされた. 異常信号は2断面以上にわたって確認されたものを有りと定義した. 詳細な評価基準をFigure 28に示す. 筋・筋膜スコアは各筋群のスコアの合計で計算され, 筋, 筋膜でそれぞれ42点を最大とした. 筋膜優位な所見を評価する指標として, 筋膜/筋スコア比を算出した. MRIの読影は患者の臨床情報を不可視化した上で, 2名の読影者により施行された.

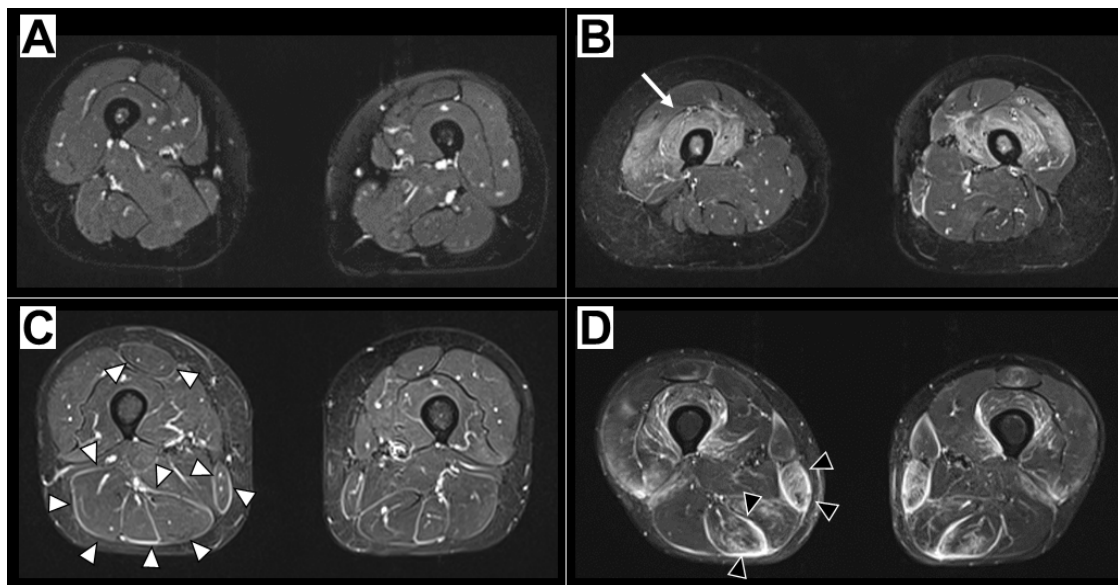


Figure 28. MRI による筋・筋膜の異常信号の評価基準

A-D 全身 MRI により得られた水平断の STIR 画像の代表例

A: 筋・筋膜とも正常, B: 筋の異常信号(白い矢印), C: 筋膜の異常信号(白い矢じり), D: 筋と筋膜両方の異常信号(黒い矢じり).

5.3.3.3 統計解析

全ての臨床情報に関して RPILD 群と非 RPILD 群間で統計解析を施行した。連続変数と名義変数はそれぞれ Mann-Whitney の U 検定, Fisher の正確検定を用いて解析された。また, RPILD の危険因子を同定するため, 単変量および多変量のロジスティック回帰分析を施行した。多変量解析に用いる変数は単変量解析で有意であったものおよび既報においてリスク因子であると報告されているものを選択した。

全身 MRI のスコアリングに関する判定者間一致度は Bland-Altman 分析で評価した(Bland and Altman, 1999)。また, それぞれの筋群におけるスコアリングの一致度は Cohen の κ 係数で評価した(0–0.2 poor, 0.21–0.40 fair, 0.41–0.60 moderate, 0.61–0.80 substantial, 0.81–1 almost perfect) (Cohen, 1960; Landis and Koch, 1977)。相関は Spearman の順位相関係数を用いて評価した。2 つの相関係数の差は Fisher の z 変換を用いて評価した。多重比較には Kruskal-Wallis 検定後に Dunnett の検定を行った。

すべての検定で, p 値が 0.05 未満を統計的有意とした。統計解析は JMP(ver. 13.0; SAS Institute, Cary, NC, USA) および GraphPad Prism (ver. 7.04; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて行った。

5.4 結果

5.4.1 患者背景

41 例 (女性 27 例, 男性 14 例) の皮膚筋炎患者が本研究の対象となった. そのうち 17 人(41.5%)が CADM と診断された. 対象患者の臨床情報, 検査所見を Table1 に示した.

代表的な MRI 画像を Figure 29 に示す. Figure 29A は RPILD を発症した 56 歳女性(最大 CK: 176 U/l, 抗 ARS 抗体陽性)で Figure 29B は RPILD を発症しなかった 34 歳男性(最大 CK: 14139 U/l, 抗 Mi-2 抗体陽性)である. 前者は後者と比較して筋膜/筋スコア比が高かった. またどちらの患者も筋力低下を呈していたが, 後者の方がより筋力低下が高度だった.

Table1. 患者背景

データは中央値(第 1, 第 3 四分位)または%で示した.

	値
年齢, 歳	48 (42;60)
女性, <i>n</i> (%)	27 (65.9)
CADM, <i>n</i> (%)	17 (41.5)
発熱, <i>n</i> (%)	13 (31.7)
筋痛, <i>n</i> (%)	21 (51.2)
関節炎, <i>n</i> (%)	17 (41.5)
CK, U/l	486 (116;4048)
アルドラーゼ, U/l	13.5 (7.7;36.6)
LDH U/l	421 (311;555)
CRP, mg/dl	0.55 (0.09;1.76)
KL6, U/ml	440 (282;713)
フェリチン, ng/ml	257 (88;540)
%VC	79.9 (70.4;96.2)
抗 ARS 抗体, <i>n</i> (%)	10 (24.4)
抗 MDA5 抗体, <i>n</i> (%)	13 (31.7)
抗 Mi2 抗体, <i>n</i> (%)	3 (7.3)
抗 TIF1 γ 抗体, <i>n</i> (%)	4 (9.8)
悪性腫瘍, <i>n</i> (%)	4 (9.8)
ILD, <i>n</i> (%)	30 (73.2)
RPILD, <i>n</i> (%)	10 (24.4)
全身 MRI 筋スコア	15 (9;22)
全身 MRI 筋膜スコア	23 (14;26)
筋膜/筋スコア比	1.529 (1.000;2.000)

CADM: Clinically amyopathic DM; CK: creatine kinase; KL-6: Krebs von den Lungen-6; VC: vital capacity; ARS: Aminoacyl tRNA synthetase; MDA5: Melanoma differentiation-associated gene 5; TIF1 γ : Transcriptional intermediary factor 1 γ ; ILD: Interstitial lung disease; RPILD: Rapidly progressive interstitial lung disease.

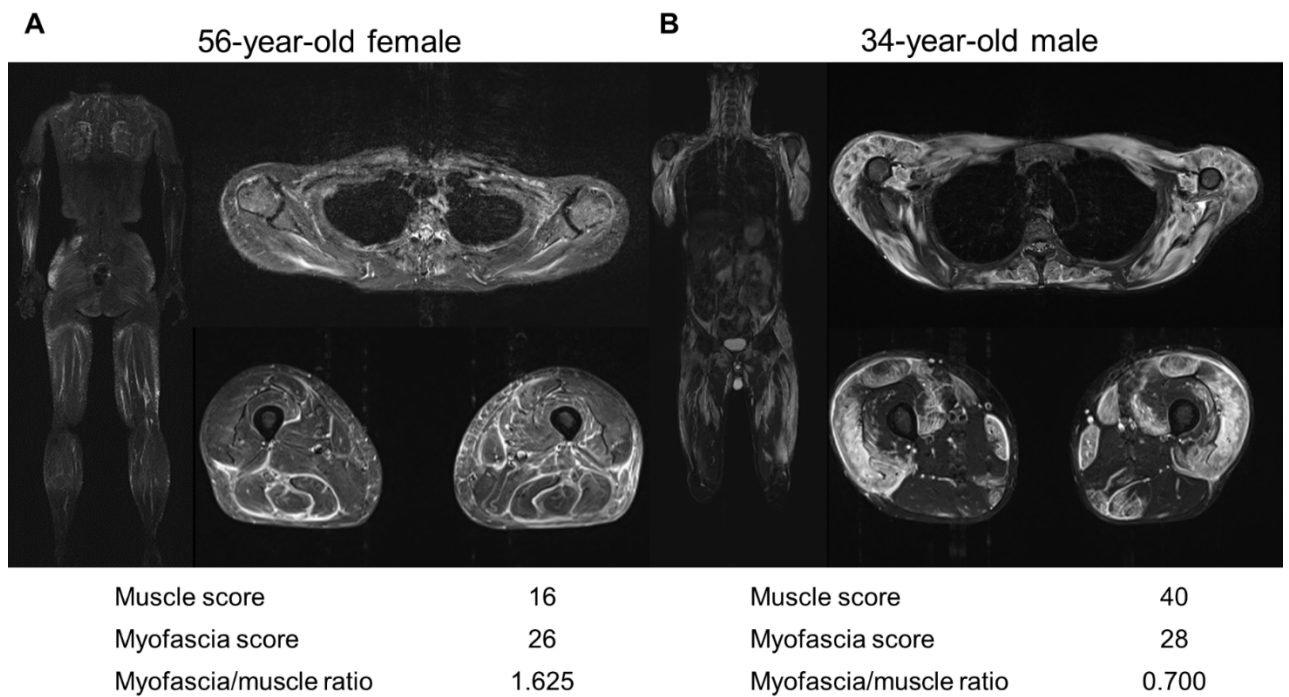


Figure 29. 代表的な 2 症例の MRI 画像

A: RPILD を発症した 54 歳女性と, B: RPILD を発症しなかった 34 歳男性の STIR 画像. 女性患者は男性患者と比較して高い筋膜/筋スコア比を呈した.

5.4.2. MRI スコアと筋原性酵素・筋力低下との相関

MRI スコアと筋原性酵素・MMT スコアとの相関を Figure 30 に示す。筋・筋膜スコアはともに血清の筋原性酵素(CK, アルドラーゼ)と正の相関を示し, MMT スコアとは負の相関を示した。筋スコアは筋膜スコアよりも筋原性酵素とより強い相関を示した(r : 0.714 vs 0.413; p = 0.047)。

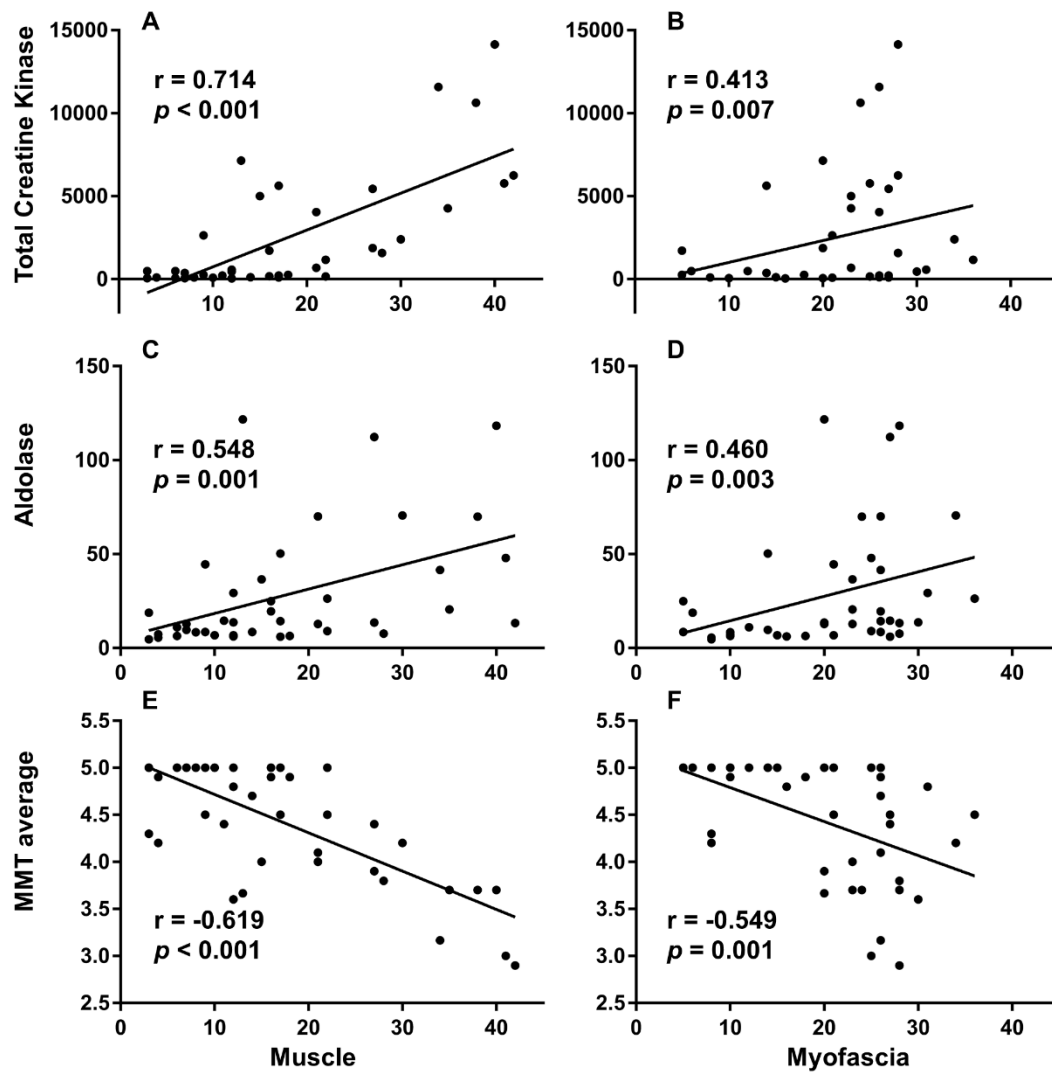


Figure 30. 筋原性酵素・MMT と全身 MRI スコアの相関

A, B: MRI スコアと CK の相関, C, D: MRI スコアとアルドラーゼの相関, E, F: MRI スコアと MMT の相関. Spearman の順位相関係数を用いて解析した.

5.4.3. MRIにおける異常信号の分布

筋・筋膜の異常信号の分布と頻度を Table 2 に示す. 異常信号は遠位筋よりも近位筋に高頻度に認められた. また, CADM を含むほとんどの患者で臀筋に異常信号が認められた. さらに, 筋群を体幹(前頸部筋群, 後頸部筋群, 頸部脊柱筋, 腹直筋, 胸部脊柱筋), 上肢(三角筋, 棘上筋, 棘下筋と小円筋, 上腕二頭筋, 上腕三頭筋, 前腕屈筋, 前腕伸筋), 下肢(臀筋, 腸腰筋, 縫工筋, 内転筋, 大腿四頭筋, 大腿屈筋, 大腿筋膜張筋, 前下腿筋, 外側下腿筋, 後下腿筋)の3グループに分類すると, 筋・筋膜の異常信号は下肢に最も高頻度に認められた(Figure 31).

Table2. 筋と筋膜の全身MRIにおける異常信号の分布と頻度

筋群, n, (%)	筋		筋膜	
	右	左	右	左
前頸部筋群	8 (19.5)	7 (17.1)	10 (24.4)	7 (17.1)
後頸部筋群	11 (26.8)	10 (24.4)	11 (26.8)	13 (31.7)
頸部脊柱筋	15 (36.6)	14 (34.1)	14 (34.1)	14 (34.1)
三角筋	17 (41.5)	20 (48.8)	19 (46.3)	19 (46.3)
棘上筋	19 (46.3)	21 (51.2)	27 (65.9)	31 (75.6)
棘下筋・小円筋	29 (70.7)	24 (58.5)	29 (70.7)	28 (68.3)
上腕二頭筋	12 (29.3)	19 (46.3)	23 (56.1)	23 (56.1)
上腕三頭筋	19 (46.3)	16 (39.0)	23 (56.1)	13 (31.7)
前腕屈筋	5 (12.2)	6 (14.6)	4 (9.8)	3 (7.3)
前腕伸筋	10 (24.4)	9 (22.0)	5 (12.2)	6 (14.6)
腹直筋	9 (22.0)		9 (22.0)	
胸部脊柱筋	17 (41.5)		13 (31.7)	
臀筋	33 (80.5)	35 (85.4)	31 (75.6)	28 (68.3)
腸腰筋	20 (48.8)	21 (51.2)	27 (65.9)	24 (58.5)
縫工筋	15 (36.6)	19 (46.3)	20 (48.8)	23 (56.1)
内転筋	26 (63.4)	25 (61.0)	30 (73.2)	30 (73.2)
大腿筋膜張筋	9 (22.0)	7 (17.1)	19 (46.3)	14 (34.1)
大腿四頭筋	26 (63.4)	26 (63.4)	23 (56.1)	24 (58.5)
大腿屈筋	23 (56.1)	18 (43.9)	29 (70.7)	29 (70.7)
前下腿筋	14 (34.1)	14 (34.1)	24 (58.5)	28 (68.3)
外側下腿筋	11 (26.8)	11 (26.8)	20 (48.8)	18 (43.9)
後下腿筋	21 (51.2)	18 (43.9)	22 (53.7)	23 (56.1)

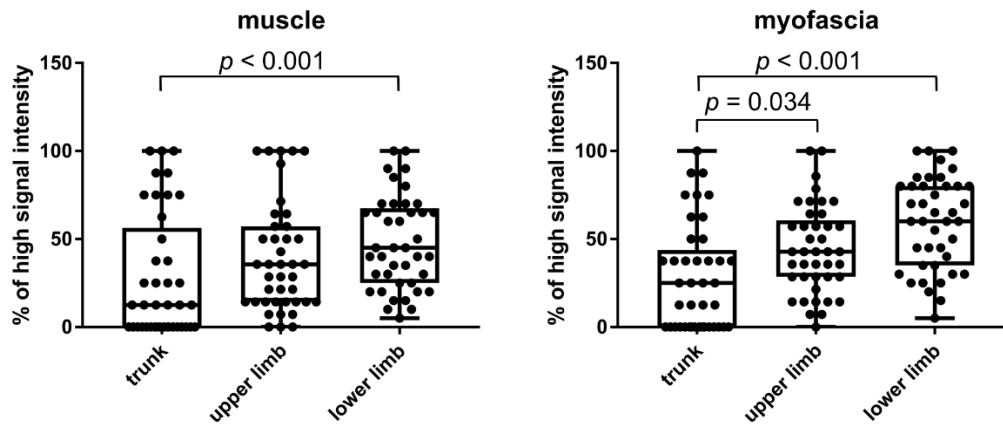


Figure 31. 全身MRI で認めた筋・筋膜の異常信号の分布と頻度

筋群を上肢, 下肢, 体幹の3グループに分類した. 下肢は筋・筋膜ともに最も高頻度に異常信号を認めた. 多重比較には Kruskal-Wallis 検定後に Dunnett の検定を行った. 箱の下端と上端はそれぞれ第1四分位と第3四分位, 箱内の水平線は中央値, ひげは最小値と最大値を示す.

5.4.4. 全身 MRI スコアリングの再現性の評価

全身 MRI の読影による筋・筋膜スコアリングにおいて, Bland-Altman 分析では判定者間で十分に一致していることが示された(Table 3).

Table 3. 全身MRIにおける筋・筋膜スコアの判定者間一致

	スコアの範囲	読影者1の 平均値	読影者2の 平均値	両者の差	95% 一致限界
筋スコア	0-42	16.83	16.93	-0.10	-0.53~0.33
筋膜スコア	0-42	20.09	20.07	0.02	-0.30~0.34

スコアリングに関する判定者間一致は Bland-Altman 分析で評価した.

また、個々の筋群のスコアリングにおいても、Cohen の κ 係数で判定者間の一致度は十分に高いことが示された(Table 4).

Table 4. 全身MRIにおけるそれぞれの筋群の異常信号の有無の一致度
 一致度はCohenのκ係数で分析した(0-0.2 poor, 0.21-0.40 fair, 0.41-0.60 moderate, 0.61-0.80 substantial, 0.81-1 almost perfect).

	筋		筋膜	
	右	左	右	左
前頸部筋群	0.92	0.91	0.87	0.84
後頸部筋群	0.93	0.94	0.94	0.89
頸部脊柱筋	1.00	1.00	1.00	1.00
三角筋	0.78	0.85	0.84	0.89
棘上筋	0.85	0.90	0.94	0.92
棘下筋・小円筋	0.89	0.89	0.80	0.89
上腕二頭筋	0.94	0.95	0.89	0.95
上腕三頭筋	1.00	0.90	0.89	0.84
前腕屈筋	1.00	1.00	1.00	1.00
前腕伸筋	0.91	0.92	0.90	0.89
腹直筋	1.00		1.00	
胸部脊柱筋	1.00		1.00	
臀筋	0.92	0.83	0.84	0.83
腸腰筋	0.95	0.95	0.95	0.80
縫工筋	1.00	0.80	1.00	0.95
内転筋	0.84	0.84	0.92	0.85
大腿筋膜張筋	0.93	1.00	0.85	0.83
大腿四頭筋	0.84	0.89	0.90	0.85
大腿屈筋	0.90	0.95	0.94	0.95
前下腿筋	0.95	0.95	1.00	1.00
外側下腿筋	1.00	0.94	0.90	0.85
後下腿筋	1.00	0.95	0.90	0.95

5.4.5. RPILD 発症のリスク因子

RPILD 群と非RPILD 群の患者背景と、単変量解析の結果を Table 5 に示す。CADM 患者や、抗 MDA5 抗体陽性患者は RPILD 群に多い傾向があった(それぞれ, 60.0% vs 35.5%, 50.0% vs 25.8%)。RPILD 群においては非 RPILD 群と比較して、有意に発熱患者が多く (60.0% vs 22.6%; $p = 0.037$), CRP (中央値: 3.01 vs 0.33; $p = 0.001$) や KL-6 (中央値: 595 vs 421; $p = 0.036$) が高値で、%VC は低値だった(中央値: 67.0 vs 84.7; $p = 0.003$)。また RPILD 群の患者は非 RPILD 群と比較して有意に筋膜/筋スコア比が高かった(中央値: 1.929 vs 1.200; $p = 0.027$)(Figure 32)。

Table 5. RPILD 患者と非 RPILD 患者の背景

	RPILD <i>n</i> = 10	Non-RPILD <i>n</i> = 31	<i>p</i> 値
年齢, 歳	58 (56.00;65.75)	45.0 (37.50;55.50)	0.006*
女性, <i>n</i> (%)	7 (70.0)	20 (64.5)	0.751
CADM, <i>n</i> (%)	6 (60.0)	11 (35.5)	0.171
発熱, <i>n</i> (%)	6 (60.0)	7 (22.6)	0.037*
筋痛, <i>n</i> (%)	3 (30.0)	18 (58.1)	0.100
関節炎, <i>n</i> (%)	5 (50.0)	12 (38.7)	0.580
CK, U/l	195 (118.50;434.75)	1170 (132.50;5224.50)	0.086
アルドラーゼ, U/l	9.70 (7.85;14.00)	16.70 (7.90;46.30)	0.268
LDH U/l	425 (338.25;469.25)	421 (301.50;583.00)	0.485
CRP, mg/dl	3.01 (1.54;6.05)	0.33 (0.07;0.79)	0.001*
KL6, U/ml	595 (455.5;1167.0)	421 (248.0;626.5)	0.036*
フェリチン, ng/ml	448 (242;1109)	209 (77;490)	0.068
%VC	67.0 (59.2;74.5)	84.7 (76.3;98.6)	0.003*
抗 ARS 抗体, <i>n</i> (%)	3 (30.0)	7 (22.6)	0.635
抗 MDA5 抗体, <i>n</i> (%)	5 (50.0)	8 (25.8)	0.153
抗 Mi2 抗体, <i>n</i> (%)	0 (0)	3 (9.7)	0.307
抗 TIF1 γ 抗体, <i>n</i> (%)	0 (0)	4 (12.9)	0.232
悪性腫瘍, <i>n</i> (%)	0 (0)	4 (12.9)	0.807
全身 MRI 筋スコア	12 (7.5;15.5)	17.0 (9.5;27.5)	0.101
全身 MRI 筋膜スコア	22 (14.5;26.0)	23 (13.0;27.0)	0.867
筋膜/筋スコア比	1.929 (1.553;2.458)	1.200 (0.753;1.833)	0.027*

データは中央値(第 1, 第 3 四分位)または%で示した。

連続変数は Mann-Whitney の U 検定, 名義変数は Fisher の正確検定を用いて解析された。**p* 値 0.05 未満

CADM: Clinically amyopathic dermatomyositis; CK: creatine kinase; KL-6: Krebs von den Lungen-6; VC: vital capacity; ARS: Anti-aminoacyl tRNA synthetase antibody; MDA5: Anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody; TIF1 γ : Anti-transcriptional intermediary factor 1 γ antibody; ILD: Interstitial lung disease; RPILD: Rapidly progressive interstitial lung disease.

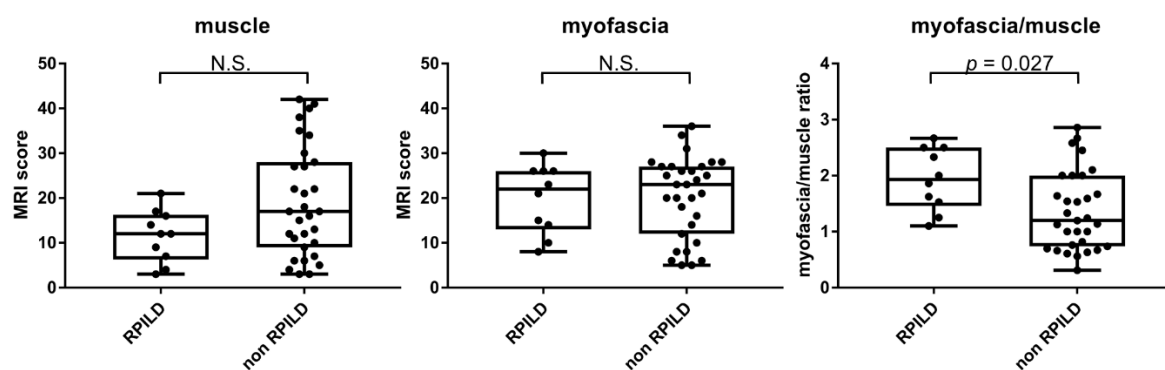


Figure 32. RPILD 患者と非 RPILD 患者間の MRI スコアの比較

筋・筋膜スコアは両群で有意な差を認めなかったが、筋膜/筋スコア比は RPILD 群で有意に高かった。解析には Mann-Whitney の U 検定を用いた。箱の下端と上端はそれぞれ第 1 四分位と第 3 四分位、箱内の水平線は中央値、ひげは最小値と最大値を示す。N.S.: not significant

続いて、年齢、抗 MDA5 抗体の有無、CRP、KL-6、筋膜筋スコア比を変量として多変量解析を施行した。4 例の患者で呼吸機能検査が施行されていなかったため、%VC は変量から除外した。また、発熱は CRP と相関していたため、多変量解析の因子から除外した。多変量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同定された(調整オッズ比: 25.45, 95%信頼区間: 1.71, 379.91, $p = 0.019$) (Figure 33).

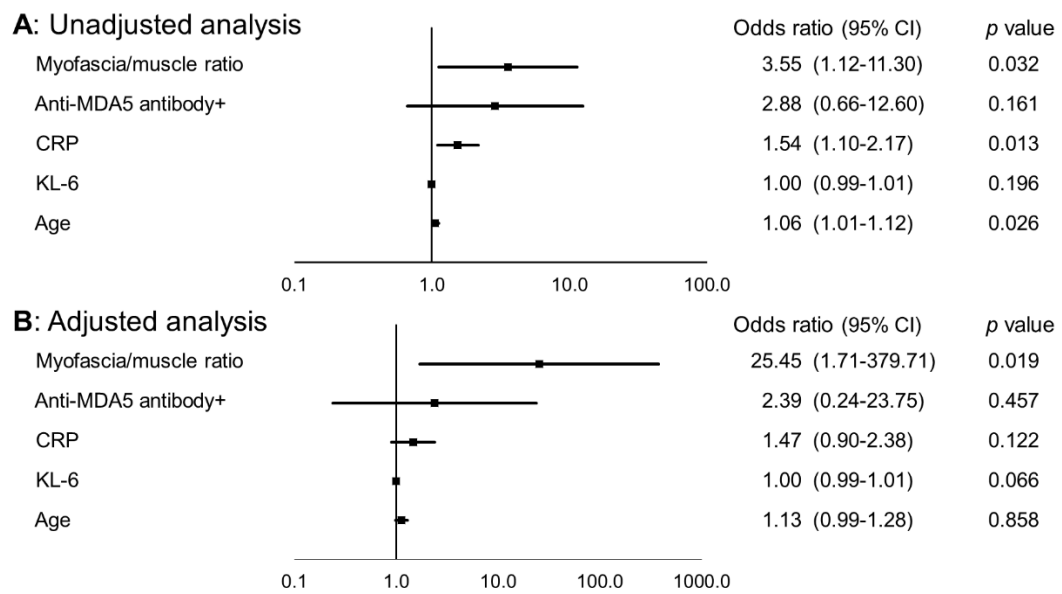


Figure 33. RPILD のリスク因子

単変量ロジスティック回帰分析による未調整オッズ比(A)と多変量ロジスティック回帰分析による調整オッズ比(B)を示す。連続変数は単位オッズ比で示す。

5.5 考察

本研究で我々は、皮膚筋炎患者における RPILD 発症リスク評価の方法として、筋膜優位の MRI 所見を定義し、全身 MRI のスコアリングの有用性を示した。さらに全身 MRI における筋膜優位の所見が RPILD のリスク因子であることを示した。

RPILD の重要なリスク因子の一つに抗 MDA5 抗体があるが、抗 MDA5 抗体陽性患者における RPILD の発症頻度は報告により異なり(44%から 79%)(Gono et al., 2012; Koga et al., 2012; Moghadam-Kia et al., 2016), 抗 MDA5 抗体陽性患者は必ずしも RPILD を発症しない。また、RPILD の症例においても発症時には胸部 CT 所見は軽度であることも多く、初発時の CT 所見から RPILD の発症を予測することは困難なことも多い(Kameda et al., 2005)。

RPILD は発症早期より副腎皮質ステロイドとカルシニューリン阻害薬やシクロフォスファミドの併用による強力な免疫抑制療法を必要とする(Kurita et al., 2015)。シクロフォスファミドは致死的な感染症や、出血性膀胱炎、不妊、二次発癌など多くの副作用があり、必要な患者のみに使用されなければならず、過剰な治療は避けられるべきである(Sasaki and Kohsaka, 2018)。今回我々が示した結果から、全身 MRI は皮膚筋炎患者に適切な強度の免疫抑制療法を選択するための一助となり得る。

皮膚筋炎の病態は、筋やその他の組織に生じた微小血管炎である。筋内微小血管に沈着した膜侵襲複合体が血管壊死、虚血、微小梗塞、炎症、組織低灌流を引き起こし、最終的に筋の萎縮を引き起こす(Dalakas, 2004; Dalakas and Hohlfeld, 2003; Ernste and Reed, 2013)。皮膚筋炎と異なり、多発性筋炎の主な病態生理学的異常は T 細胞による直接の筋損傷であり、筋組織内の微小血管は病態に関与しない(Ernste and Reed, 2013)。さらに近年の研究で MRI における筋膜の高信号は多発性筋炎よりも皮膚筋炎患者に高頻度に認められることが報告された(Ukichi et al., 2019)。したがって、本研究で認められた筋膜優位の MRI 所見は筋炎における血管炎の重症度を示している可能性がある。

血管炎徴候を呈する皮膚筋炎患者は治療抵抗性であることが報告されている。抗 MDA5 抗体陽性患者はしばしば皮膚潰瘍を呈するが(Ono et al., 2018), ある報告では小血管炎による皮膚潰瘍は RPILD の予後因子であるとしている (Kono et al., 2015; Tsujimura et al., 2008)。したがって、筋膜優位の所見は筋膜の血管炎のみならず、重症な ILD を引き起こし得る肺内の血管炎の存在を反映しているのかもしれない。

これまで MRI のスコアリングシステムを筋炎患者の病理学的変化を評価するために用いた研究はいくつか報告されている。そのうちのいくつかは筋と筋膜の異常信号を評価していたが、これらの研究で評価された筋膜の異常信号は本研究ほど詳細な筋

群で評価されていなかった(Andersson et al., 2017; Davis et al., 2011; Kubinova et al., 2017; Malattia et al., 2014; Pinal-Fernandez et al., 2017). 本研究では, 筋と筋膜の異常信号を同じ筋群で評価し, 筋膜/筋スコア比を算出することで筋膜優位の所見を定義した.

本研究にはいくつかの制約がある. 第一に本研究は単施設での後方視研究であり, サンプルサイズが小さく, RPILD を発症した患者は 10 名に過ぎなかった. 第二に, 本研究は診断時に全身状態不良のため MRI を撮像できなかった患者を含んでおらず, バイアスが除外しきれていない. 第三に本研究では MRI と病理所見の比較を行っておらず, MRI 所見が筋膜炎や血管炎を反映しているか証明していない. 我々の仮説を証明するには組織学的所見を含めたさらなる検討が必要となる.

5.6 結語

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。

6. 結論

本研究から得られた新知見は以下の通りである. 1, 2 の知見はそれぞれ第一部, 第二部で得られた知見に該当する.

1.

- ・ミクログリアの活性化は NPSLE の病態形成に重要な役割を担っている.
- ・IKBKE はミクログリアの活性化関わる重要な因子の一つである.
- ・ミクログリアに対する IKBKE をターゲットとした治療は, NPSLE の新規治療となり得る.

2.

- ・皮膚筋炎における全身 MRI の新たな価値を見出した.
- ・全身 MRI における筋膜優位の所見は皮膚筋炎患者の RPILD 発症の予測因子となる.

第一部では, SLE の中でも特に難治性病態である NPSLE を対象とした研究を行った. NPSLE の発症には様々な因子が関わっていることが想定されているが, 未だその病態は解明されていない. 本研究では NPSLE の病態形成に関わる因子として中枢神経の常在マクロファージであるミクログリアに着目し, NPSLE の病態への関与の解明と新規治療ターゲットの探索を行った. NPSLE モデルマウスではミクログリアの活性化を認め, マウスの行動異常に関与している可能性が示唆された. RNA シーケンシングを用いてモデルマウスから採取したミクログリアの網羅的遺伝子解析を施行することで, ミクログリアの活性化および NPSLE の病態形成において重要な因子として IKBKE を同定した. IKBKE 阻害薬が炎症性サイトカインの刺激によるミクログリアの活性化を抑制し, さらにその機序の一つとして解糖系の制御が関与していることを示した. さらに IKBKE 阻害薬を NPSLE モデルマウスの脳室内に投与することで, モデルマウスの神経症状が改善することを示し, IKBKE が NPSLE の新たな治療ターゲットとなる可能性を示唆した. 今後は活性化したミクログリアが神経細胞に及ぼす影響を検討し, より詳細な病態の解明を行う. また, モデルマウスに IKBKE 阻害薬の全身投与を行うことで, NPSLE 以外の SLE の臓器障害に対する IKBKE 阻害薬の有効性の検討も予定している.

第二部では、皮膚筋炎において重要な予後規定因子である RPILD の予測因子を探索する研究を行った。本研究では皮膚筋炎患者における全身 MRI のスコアリングシステムを作成し、筋と筋膜の異常信号から筋膜/筋スコア比を算出することで筋膜優位の所見を定義した。全身 MRI における筋膜優位の所見が、皮膚筋炎患者における RPILD の発症と相関することを見出し、全身 MRI の有用性を示すことができた。全身 MRI を従来の RPILD 予測因子と併用することで、より高い精度で RPILD の発症を予測できる可能性があり、患者に対して適正な治療を提供可能となることが期待される。今後は前向き研究により、全身 MRI の実臨床における有用性の検証を行う。また皮膚筋炎患者の筋・筋膜組織の病理学的検討を行うことにより、本研究の知見の裏付けを行うとともに、さらなる病態の解明を行う予定である。

本研究で得られた結果は、今後さらに研究を重ねていく必要があるが、これらの難治性病態の患者の治療の一助となることを願う。

7. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 内科学分野 免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同教室、渥美達也教授には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

本教室膠原病グループ河野通仁助教には本研究の遂行にあたり、終始、丁寧かつ熱心に御指導、適切な御助言をいただきました。ここに心より深く感謝の意を表します。

第二部における皮膚筋炎の研究に関しては、当院放射線科坂本圭太先生に研究の発案段階からご協力いただき、MRI の読影方法等につき丁寧にご指導いただきました。ここに深く感謝の意を表します。

Olga Amengual 講師、奥健志講師、加藤将講師、藤枝雄一郎助教にはカンファレンスを通じて常に前向きな励ましとご指導をいただきました。

中村浩之先生、河野通大先生、谷村瞬先生、大西直樹先生には基礎実験の基本的な手技について懇切丁寧なご指導を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。嶋村抄苗先生、菅原恵理先生は研究に行き詰まった時など励ましの言葉を下さりました。工藤友喜大学院生はいつもよき研究の相談相手となってくださり、実験の手技指導や多くの助言をいただきました。阿部靖矢先生、下山修平先生には同じ大学院の仲間として、日頃から有益な御助言をいただき、心より感謝しております。

当科実験助手の金子由美子さん、石倉唯さん、寿楽弘子さんの御協力なしに実験を遂行することは不可能でした。心より感謝を申し上げます。この他にもこの論文作成にあたり、ここには記載できないほど多くの御協力、御助言、御支援をいただきました。重ねまして心より感謝を申し上げます。

何より筆者の臨床研究は患者様の御協力なしには成り立たないものです。研究の趣旨に御理解と御協力をいただき、研究の遂行を可能にしてくれた多くの患者様たちに心より感謝申し上げます。

最後にこれまで見守ってくれていた両親、仕事に理解を示し、優しく支え続けてくれた妻と子供たち家族に心から感謝致します。

8. 利益相反

本研究に際し、開示すべき利益相反状態はない。

9. 引用文献

Andersson, H., Kirkhus, E., Garen, T., Walle-Hansen, R., Merckoll, E., and Molberg, O. (2017). Comparative analyses of muscle MRI and muscular function in anti-synthetase syndrome patients and matched controls: a cross-sectional study. *Arthritis Res. Ther.* *19*, 17.

Aso, K., Kono, M., Kono, M., Watanabe, T., Shimizu, Y., Ogata, Y., Fujieda, Y., Kato, M., Oku, K., Amengual, O., *et al.* (2020). Low C4 as a risk factor for severe neuropsychiatric flare in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* *29*, 1238-1247.

Baechler, E.C., Batliwalla, F.M., Karypis, G., Gaffney, P.M., Ortmann, W.A., Espe, K.J., Shark, K.B., Grande, W.J., Hughes, K.M., Kapur, V., *et al.* (2003). Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 2610-2615.

Baechler, E.C., Gregersen, P.K., and Behrens, T.W. (2004). The emerging role of interferon in human systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Immunol.* *16*, 801-807.

Bentham, J., Morris, D.L., Graham, D.S.C., Pinder, C.L., Tomblinson, P., Behrens, T.W., Martín, J., Fairfax, B.P., Knight, J.C., Chen, L., *et al.* (2015). Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* *47*, 1457-1464.

Bertsias, G.K., and Boumpas, D.T. (2010). Pathogenesis, diagnosis and management of neuropsychiatric SLE manifestations. *Nat. Rev. Rheumatol.* *6*, 358-367.

Bland, J.M., and Altman, D.G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical methods in medical research* *8*, 135-160.

Bohan, A., and Peter, J.B. (1975). Polymyositis and dermatomyositis (first of two

parts). *N. Engl. J. Med.* *292*, 344-347.

Broadbent, N.J., Squire, L.R., and Clark, R.E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 14515-14520.

Chapman, J., Rand, J.H., Brey, R.L., Levine, S.R., Blatt, I., Khamashta, M.A., and Shoenfeld, Y. (2003). Non-stroke neurological syndromes associated with antiphospholipid antibodies: evaluation of clinical and experimental studies. *Lupus* *12*, 514-517.

Chen, I.J., Jan Wu, Y.J., Lin, C.W., Fan, K.W., Luo, S.F., Ho, H.H., Liou, L.B., Tsai, W.P., Chen, J.Y., Yang, C.H., *et al.* (2009). Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis. *Clin. Rheumatol.* *28*, 639-646.

Cohen, J. (1960). A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ. Psychol. Meas.* *20*, 37-46.

Cortese, M., Sinclair, C., and Pulendran, B. (2014). Translating glycolytic metabolism to innate immunity in dendritic cells. *Cell Metab.* *19*, 737-739.

Crupi, R., Cambiaghi, M., Spatz, L., Hen, R., Thorn, M., Friedman, E., Vita, G., and Battaglia, F. (2010). Reduced adult neurogenesis and altered emotional behaviors in autoimmune-prone B-cell activating factor transgenic mice. *Biol. Psychiatry* *67*, 558-566.

Curiel, R.V., Jones, R., and Brindle, K. (2009). Magnetic resonance imaging of the idiopathic inflammatory myopathies: structural and clinical aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1154*, 101-114.

Dalakas, M.C. (2004). Inflammatory disorders of muscle: progress in polymyositis, dermatomyositis and inclusion body myositis. *Curr. Opin. Neurol.* *17*, 561-567.

Dalakas, M.C., and Hohlfeld, R. (2003). Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet (London, England)* *362*, 971-982.

Davis, W.R., Halls, J.E., Offiah, A.C., Pilkington, C., Owens, C.M., and Rosendahl, K. (2011). Assessment of active inflammation in juvenile dermatomyositis: a novel magnetic resonance imaging-based scoring system. *Rheumatology (Oxford)* *50*, 2237-2244.

Elkon, K.B., and Wiedeman, A. (2012). Type I IFN system in the development and manifestations of SLE. *Curr. Opin. Rheumatol.* *24*, 499-505.

Ernste, F.C., and Reed, A.M. (2013). Idiopathic inflammatory myopathies: current trends in pathogenesis, clinical features, and up-to-date treatment recommendations. *Mayo Clin. Proc.* *88*, 83-105.

Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., and Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* *4*, 491-496.

Fragoso-Loyo, H., Atisha-Fregoso, Y., Llorente, L., and Sánchez-Guerrero, J. (2013). Inflammatory profile in cerebrospinal fluid of patients with headache as a manifestation of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* *52*, 2218-2222.

Fragoso-Loyo, H., Richaud-Patin, Y., Orozco-Narváez, A., Dávila-Maldonado, L., Atisha-Fregoso, Y., Llorente, L., and Sánchez-Guerrero, J. (2007). Interleukin-6 and chemokines in the neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *56*, 1242-1250.

Galimberti, F., Li, Y., and Fernandez, A.P. (2016). Clinically amyopathic dermatomyositis: clinical features, response to medications and malignancy-associated risk factors in a specific tertiary-care-centre cohort. *Br. J. Dermatol.* *174*, 158-164.

Gerami, P., Schoppe, J.M., McDonald, L., Walling, H.W., and Sontheimer, R.D. (2006). 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.* *54*, 597-613.

Gono, T., Kawaguchi, Y., Satoh, T., Kuwana, M., Katsumata, Y., Takagi, K., Masuda, I., Tochimoto, A., Baba, S., Okamoto, Y., *et al.* (2010). Clinical manifestation and prognostic factor in anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody-associated interstitial lung disease as a complication of dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* *49*, 1713-1719.

Gono, T., and Kuwana, M. (2016). Inflammatory myopathies: Choosing the right biomarkers to predict ILD in myositis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *12*, 504-506.

Gono, T., Sato, S., Kawaguchi, Y., Kuwana, M., Hanaoka, M., Katsumata, Y., Takagi, K., Baba, S., Okamoto, Y., Ota, Y., *et al.* (2012). Anti-MDA5 antibody, ferritin and IL-18 are useful for the evaluation of response to treatment in interstitial lung disease with anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* *51*, 1563-1570.

Govoni, M., Bortoluzzi, A., Padovan, M., Silvagni, E., Borrelli, M., Donelli, F., Ceruti, S., and Trotta, F. (2016). The diagnosis and clinical management of the neuropsychiatric manifestations of lupus. *J. Autoimmun.* *74*, 41-72.

Hanly, J.G., Urowitz, M.B., Sanchez-Guerrero, J., Bae, S.C., Gordon, C., Wallace, D.J., Isenberg, D., Alarcón, G.S., Clarke, A., Bernatsky, S., *et al.* (2007). Neuropsychiatric events at the time of diagnosis of systemic lupus erythematosus: an international inception cohort study. *Arthritis Rheum.* *56*, 265-273.

Hirohata, S., Arinuma, Y., Yanagida, T., and Yoshio, T. (2014). Blood-brain barrier damages and intrathecal synthesis of anti-N-methyl-D-aspartate receptor NR2 antibodies in diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* *16*, R77.

Hirohata, S., Kanai, Y., Mitsuo, A., Tokano, Y., and Hashimoto, H. (2009). Accuracy of cerebrospinal fluid IL-6 testing for diagnosis of lupus psychosis. A multicenter retrospective study. *Clin. Rheumatol.* *28*, 1319-1323.

Hirohata, S., and Miyamoto, T. (1990). Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central

nervous system involvement. *Arthritis Rheum.* *33*, 644-649.

Huang, Z.G., Gao, B.X., Chen, H., Yang, M.X., Chen, X.L., Yan, R., Lu, X., Shi, K.N., Chan, Q., and Wang, G.C. (2017). An efficacy analysis of whole-body magnetic resonance imaging in the diagnosis and follow-up of polymyositis and dermatomyositis. *PloS one* *12*, e0181069.

Ichinose, K., Arima, K., Umeda, M., Fukui, S., Nishino, A., Nakashima, Y., Suzuki, T., Horai, Y., Koga, T., Kawashiri, S.Y., *et al.* (2016). Predictors of clinical outcomes in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Cytokine* *79*, 31-37.

Ishigaki, K., Maruyama, J., Hagino, N., Murota, A., Takizawa, Y., Nakashima, R., Mimori, T., and Setoguchi, K. (2013). Skin ulcer is a predictive and prognostic factor of acute or subacute interstitial lung disease in dermatomyositis. *Rheumatol. Int.* *33*, 2381-2389.

Jeltsch-David, H., and Muller, S. (2014). Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: pathogenesis and biomarkers. *Nat. Rev. Neurol.* *10*, 579-596.

Johnson, C., Pinal-Fernandez, I., Parikh, R., Paik, J., Albayda, J., Mammen, A.L., Christopher-Stine, L., and Danoff, S. (2016). Assessment of Mortality in Autoimmune Myositis With and Without Associated Interstitial Lung Disease. *Lung* *194*, 733-737.

Kameda, H., Nagasawa, H., Ogawa, H., Sekiguchi, N., Takei, H., Tokuhira, M., Amano, K., and Takeuchi, T. (2005). Combination therapy with corticosteroids, cyclosporin A, and intravenous pulse cyclophosphamide for acute/subacute interstitial pneumonia in patients with dermatomyositis. *J. Rheumatol.* *32*, 1719-1726.

Kamintsky, L., Beyea, S.D., Fisk, J.D., Hashmi, J.A., Omisade, A., Calkin, C., Bardouille, T., Bowen, C., Quraan, M., Mitnitski, A., *et al.* (2020). Blood-brain barrier leakage in systemic lupus erythematosus is associated with gray matter loss and cognitive impairment. *Ann. Rheum. Dis.* *79*, 1580-1587.

Koga, T., Fujikawa, K., Horai, Y., Okada, A., Kawashiri, S.Y., Iwamoto, N., Suzuki, T., Nakashima, Y., Tamai, M., Arima, K., *et al.* (2012). The diagnostic utility of anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody testing for predicting the prognosis of Japanese patients with DM. *Rheumatology (Oxford)* *51*, 1278-1284.

Kono, M., Kamishima, T., Yasuda, S., Sakamoto, K., Abe, S., Noguchi, A., Watanabe, T., Shimizu, Y., Oku, K., Bohgaki, T., *et al.* (2017). Effectiveness of whole-body magnetic resonance imaging for the efficacy of biologic anti-rheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: A retrospective pilot study. *Mod. Rheumatol.* *27*, 953-960.

Kono, M., Maeda, K., Stocton-Gavanescu, I., Pan, W., Umeda, M., Katsuyama, E., Burbano, C., Orite, S.Y.K., Vukelic, M., Tsokos, M.G., *et al.* (2019a). Pyruvate kinase M2 is requisite for Th1 and Th17 differentiation. *JCI insight* *4*.

Kono, M., Yasuda, S., Kato, M., Kanetsuka, Y., Kurita, T., Fujieda, Y., Otomo, K., Horita, T., Oba, K., Kondo, M., *et al.* (2014). Long-term outcome in Japanese patients with lupus nephritis. *Lupus* *23*, 1124-1132.

Kono, M., Yasuda, S., Watanabe, T., and Atsumi, T. (2015). Projectile haemorrhage of a brachial artery in a patient with clinically amyopathic dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* *54*, 1530-1531.

Kono, M., Yoshida, N., Maeda, K., Suárez-Fueyo, A., Kyttaris, V.C., and Tsokos, G.C. (2019b). Glutaminase 1 Inhibition Reduces Glycolysis and Ameliorates Lupus-like Disease in MRL/lpr Mice and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Arthritis Rheumatol.* *71*, 1869-1878.

Kono, M., Yoshida, N., Maeda, K., and Tsokos, G.C. (2018). Transcriptional factor ICER promotes glutaminolysis and the generation of Th17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 2478-2483.

Kotani, T., Makino, S., Takeuchi, T., Kagitani, M., Shoda, T., Hata, A., Tabushi, Y., and Hanafusa, T. (2008). Early intervention with corticosteroids and cyclosporin A

and 2-hour postdose blood concentration monitoring improves the prognosis of acute/subacute interstitial pneumonia in dermatomyositis. *J. Rheumatol.* *35*, 254-259.

Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* *19*, 312-318.

Kubinova, K., Mann, H., and Vencovsky, J. (2017). MRI scoring methods used in evaluation of muscle involvement in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Curr. Opin. Rheumatol.* *29*, 623-631.

Kurita, T., Yasuda, S., Oba, K., Odani, T., Kono, M., Otomo, K., Fujieda, Y., Oku, K., Bohgaki, T., Amengual, O., *et al.* (2015). The efficacy of tacrolimus in patients with interstitial lung diseases complicated with polymyositis or dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* *54*, 1536.

Landis, J.R., and Koch, G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* *33*, 159-174.

Lecouvet, F.E., Vander Maren, N., Collette, L., Michoux, N., Triqueneaux, P., Stoenoiu, M., Houssiau, F., Malghem, J., Denis, M.L., Larbi, A., *et al.* (2018). Whole body MRI in spondyloarthritis (SpA): Preliminary results suggest that DWI outperforms STIR for lesion detection. *Eur. Radiol.* *28*, 4163-4173.

Lisnevskaja, L., Murphy, G., and Isenberg, D. (2014). Systemic lupus erythematosus. *Lancet (London, England)* *384*, 1878-1888.

Lundberg, I.E., Tjarnlund, A., Bottai, M., Werth, V.P., Pilkington, C., Visser,

M., Alfredsson, L., Amato, A.A., Barohn, R.J., Liang, M.H., *et al.* (2017). 2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 1955-1964.

Malattia, C., Damasio, M.B., Madeo, A., Pistorio, A., Providenti, A., Pederzoli, S., Viola, S., Buoncompagni, A., Mattiuz, C., Beltramo, A., *et al.* (2014). Whole-body

MRI in the assessment of disease activity in juvenile dermatomyositis. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1083-1090.

Mecha, M., Carrillo-Salinas, F.J., Feliú, A., Mestre, L., and Guaza, C. (2016). Microglia activation states and cannabinoid system: Therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* *166*, 40-55.

Minowa, K., Amano, H., Ando, S., Watanabe, T., Ogasawara, M., Kawano, S., Kaneko, T., Morimoto, S., Yamaji, K., Tamura, N., *et al.* (2017). Disease flare patterns and predictors of systemic lupus erythematosus in a monocentric cohort of 423 Japanese patients during a long-term follow-up: The JUDE study. *Mod. Rheumatol.* *27*, 72-76.

Moghadam-Kia, S., Oddis, C.V., Sato, S., Kuwana, M., and Aggarwal, R. (2016). Anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Is Associated With Rapidly Progressive Lung Disease and Poor Survival in US Patients With Amyopathic and Myopathic Dermatomyositis. *Arthritis Care Res.* *68*, 689-694.

Mondal, T.K., Saha, S.K., Miller, V.M., Seegal, R.F., and Lawrence, D.A. (2008). Autoantibody-mediated neuroinflammation: pathogenesis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus in the NZM88 murine model. *Brain Behav. Immun.* *22*, 949-959.

Morris, D.L., Sheng, Y., Zhang, Y., Wang, Y.F., Zhu, Z., Tomblason, P., Chen, L., Cunninghame Graham, D.S., Bentham, J., Roberts, A.L., *et al.* (2016). Genome-wide association meta-analysis in Chinese and European individuals identifies ten new loci associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* *48*, 940-946.

Nestor, J., Arinuma, Y., Huerta, T.S., Kowal, C., Nasiri, E., Kello, N., Fujieda, Y., Bialas, A., Hammond, T., Sriram, U., *et al.* (2018). Lupus antibodies induce behavioral changes mediated by microglia and blocked by ACE inhibitors. *J. Exp. Med.* *215*, 2554-2566.

O'Neill, L.A. (2014). Glycolytic reprogramming by TLRs in dendritic cells. *Nat. Immunol.* *15*, 314-315.

Ono, N., Kai, K., Maruyama, A., Sakai, M., Sadanaga, Y., Koarada, S., Inoue, T., and Tada, Y. (2018). The relationship between type 1 IFN and vasculopathy in anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis patients. *Rheumatology (Oxford)*.

Pinal-Fernandez, I., Casal-Dominguez, M., Carrino, J.A., Lahouti, A.H., Basharat, P., Albayda, J., Paik, J.J., Ahlawat, S., Danoff, S.K., Lloyd, T.E., *et al.* (2017). Thigh muscle MRI in immune-mediated necrotising myopathy: extensive oedema, early muscle damage and role of anti-SRP autoantibodies as a marker of severity. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 681-687.

Rönnblom, L., and Elkon, K.B. (2010). Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* *6*, 339-347.

Sanna, G., Bertolaccini, M.L., and Hughes, G.R. (2005). Hughes syndrome, the antiphospholipid syndrome: a new chapter in neurology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1051*, 465-486.

Sasaki, H., and Kohsaka, H. (2018). Current diagnosis and treatment of polymyositis and dermatomyositis. *Mod. Rheumatol.* *28*, 913-921.

Sato, S., Masui, K., Nishina, N., Kawaguchi, Y., Kawakami, A., Tamura, M., Ikeda, K., Nunokawa, T., Tanino, Y., Asakawa, K., *et al.* (2018). Initial predictors of poor survival in myositis-associated interstitial lung disease: a multicentre cohort of 497 patients. *Rheumatology (Oxford)*.

Schwartz, N., Stock, A.D., and Putterman, C. (2019). Neuropsychiatric lupus: new mechanistic insights and future treatment directions. *Nat. Rev. Rheumatol.* *15*, 137-152.

Sharma, S., tenOever, B.R., Grandvaux, N., Zhou, G.P., Lin, R., and Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science (New York, NY)* *300*, 1148-1151.

Shimizu, Y., Yasuda, S., Kimura, T., Nishio, S., Kono, M., Ohmura, K., Shimamura, S., Kono, M., Fujieda, Y., Kato, M., *et al.* (2018). Interferon-inducible Mx1 protein is highly expressed in renal tissues from treatment-naïve lupus nephritis, but not in those under immunosuppressive treatment. *Mod. Rheumatol.*

28, 661-669.

Shiozawa, S., Kuroki, Y., Kim, M., Hirohata, S., and Ogino, T. (1992). Interferon-alpha in lupus psychosis. *Arthritis Rheum.* *35*, 417-422.

Tanaka, T., Murakami, K., Bando, Y., and Yoshida, S. (2015). Interferon regulatory factor 7 participates in the M1-like microglial polarization switch. *Glia* *63*, 595-610.

Tsujimura, S., Saito, K., and Tanaka, Y. (2008). Complete resolution of dermatomyositis with refractory cutaneous vasculitis by intravenous cyclophosphamide pulse therapy. *Intern. Med.* *47*, 1935-1940.

Ukichi, T., Yoshida, K., Matsushima, S., Kawakami, G., Noda, K., Furuya, K., and Kurosaka, D. (2019). MRI of skeletal muscles in patients with idiopathic inflammatory myopathies: characteristic findings and diagnostic performance in dermatomyositis. *RMD open* *5*, e000850.

Vincent, F.B., Morand, E.F., Schneider, P., and Mackay, F. (2014). The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* *10*, 365-373.

Wen, J., Doerner, J., Weidenheim, K., Xia, Y., Stock, A., Michaelson, J.S., Baruch, K., Deczkowska, A., Gulinello, M., Schwartz, M., *et al.* (2015). TNF-like weak inducer of apoptosis promotes blood brain barrier disruption and increases neuronal cell death in MRL/lpr mice. *J Autoimmun.* *60*, 40-50.

Xu, Y., Yang, C.S., Li, Y.J., Liu, X.D., Wang, J.N., Zhao, Q., Xiao, W.G., and Yang, P.T. (2016). Predictive factors of rapidly progressive-interstitial lung disease in patients with clinically amyopathic dermatomyositis. *Clin. Rheumatol.* *35*, 113-116.

Ye, S., Chen, X.X., Lu, X.Y., Wu, M.F., Deng, Y., Huang, W.Q., Guo, Q., Yang, C.D., Gu, Y.Y., Bao, C.D., *et al.* (2007). Adult clinically amyopathic dermatomyositis with rapid progressive interstitial lung disease: a retrospective cohort study. *Clin. Rheumatol.* *26*, 1647-1654.

York, E.M., Zhang, J., Choi, H.B., and MacVicar, B.A. (2021). Neuroinflammatory inhibition of synaptic long-term potentiation requires immunometabolic reprogramming of microglia. *Glia* *69*, 567-578.

Yoshio, T., Okamoto, H., Kurasawa, K., Dei, Y., Hirohata, S., and Minota, S. (2016). IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 and G-CSF are significantly increased in cerebrospinal fluid but not in sera of patients with central neuropsychiatric lupus erythematosus. *Lupus* *25*, 997-1003.

Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O'Keeffe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., *et al.* (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* *34*, 11929-11947.

Zubair, H., Azim, S., Srivastava, S.K., Ahmad, A., Bhardwaj, A., Khan, M.A., Patel, G.K., Arora, S., Carter, J.E., Singh, S., *et al.* (2016). Glucose Metabolism Reprogrammed by Overexpression of IKK ϵ Promotes Pancreatic Tumor Growth. *Cancer Res.* *76*, 7254-7264.