

氏名	渡邊萌理
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 606 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	多発性筋炎・皮膚筋炎における新規バイオマーカーの検索
論文審査委員	(委員長) 教授 佐藤 健夫 (委員) 准教授 松原 大祐 准教授 高橋 将文 教授 倉沢 和宏

論文内容の要旨

1 研究目的

多発性筋炎・皮膚筋炎 (polymyositis/dermatomyositis; PM/DM) は骨格筋の炎症と変性を主徴とする自己免疫疾患であり、皮膚、関節、肺、心臓など複数の臓器に炎症を及ぼす。PM/DM の病因は、遺伝性、環境因子、免疫原性など多角的な要因が関与していると考えられているが、未だ十分な解明に至っていない。CD146 は細胞接着分子の免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型糖蛋白である。血管内皮細胞上に恒常的に発現し、vascular endothelial growth factor 受容体や CD44 分子と細胞膜上で会合し、細胞の接着、細胞単層の維持、炎症細胞遊走および血管新生に関わっている。リンパ球 (T 細胞、B 細胞、NK 細胞) にも発現がみられ、CD146 陽性 T 細胞は炎症性サイトカインを分泌し、炎症性疾患の病態に関与していることが報告されている。また、血管内皮細胞の細胞膜上で CD146 と結合する分子に β -galactosidase-binding lectin family に属する galectin-3 がある。galectin-3 は上皮細胞、血管内皮細胞、全ての炎症細胞 (マクロファージ、単球、好中球、T 細胞など)、などに発現し、細胞のアポトーシスや、細胞接着、遊走、血管新生、炎症など様々な生物学的活性を有する。CD146、galectin-3 共に一部の自己免疫疾患において発現が報告されており、その病態に係る因子として注目されている。本研究では CD146 と galectin-3 の PM/DM との関連を調べ、血清中の soluble CD146 (sCD146)、galectin-3、並びにそれらの自己抗体が、PM/DM の疾患活動性や臨床病態を示すバイオマーカーとなる可能性について検討を行った。

2 研究方法

患者血清と健常者 (HC) 血清を用いて、sCD146、抗 CD146 抗体、galectin-3、抗 galectin-3 抗体をそれぞれ特異的な ELISA を用いて測定した。sCD146 の測定は sandwich ELISA 法を構築し測定系を確立した。抗 CD146 抗体は A375 と human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) を用いたフローサイトメトリーを用いて存在を検証した後、抗 CD146 抗体の定量を目的とした direct ELISA を構築し測定を行った。Galectin-3 の測定は ELISA kit を用いて測定し、抗 galectin-3 抗体の測定は direct ELISA を構築し測定を行った。また、それぞれの蛋白について、PM/DM 患者の臨床所見、血清学的データ、血清サイトカイン、筋炎特異抗体との関連を調べた。さらに、CD146 と galectin-3 の組織中での発現部位を検討するために、患者検体を用いて免疫組織染色を行った。

3 研究成果

血清 sCD146 は PM 患者において DM 患者や HC と比較して有意な上昇がみられたが、PM/DM の臨床所見との関連は示さなかった。PM/DM 患者血清中の抗 CD146 抗体の存在を証明するべく、A357 と HUVEC を用いたフローサイトメトリーを行ったところ血清抗 CD146 抗体を確認する事が出来た。さらに、抗 CD146 抗体測定を目的とした direct ELISA を構築し測定を行ったところ、抗 CD146 抗体は DM 患者において PM 患者や HC と比較して有意に高値で存在する事が判明した。また、抗 CD146 抗体は疾患活動性と伴に低下し、一方 sCD146 は疾患活動性と伴に上昇する傾向がみられた。また患者組織において CD146 の発現部位を検討すべく免疫染色を行ったところ、皮膚炎、ILD 組織の増生した小血管の血管内皮細胞に陽性像を認めた。

血清 galectin-3 値については、PM/DM 患者において HC より有意な上昇を見せた。また、血清 galectin-3 は炎症性サイトカインや、C-reactive protein や赤血球沈降速度などの血清炎症マーカーと有意な相関をみせた。臨床所見との関連においては、間質性肺炎 (ILD) を有する群で血清 galectin-3 値は有意に高値となり、中でも acute/subacute interstitial pneumonia (A/SIP) は chronic interstitial pneumonia より有意な高値を示した。さらに、血清 galectin-3 値は ILD の画像的評価とも相関がみられた。疾患活動性との変化においては、血清 galectin-3 値は Myositis Intention to Treat Activities Index との有意な相関を示した他、疾患活動性と伴に有意に低下する事が判明した。Galectin-3 免疫染色では、皮膚炎、筋炎組織の炎症細胞に、ILD 組織の炎症細胞と線維化部位に陽性像が認められ、それぞれに galectin-3 の発現が示唆された。

抗 galectin-3 抗体においては DM 患者において PM 患者や HC より有意な上昇が認められ、疾患活動性と伴に低下する事が判明した。

4 考察

sCD146 の測定においては過去の報告と同様に PM 患者において有意な上昇をみとめた。しかし sCD146 が DM 患者で有意な上昇が認められないという結果は、DM の炎症の首座が筋線維束周囲の小血管にあり PM より血管障害性が強い疾患であることから理論的には説明が困難な結果であった。そこで、DM 患者血清中に抗 CD146 抗体が存在し sCD146 の測定系に影響している、と仮説を立て、A375 と HUVEC への反応性の結果を経て、抗 CD146 抗体測定のための ELISA を構築し定量を行った。抗 CD146 抗体は本研究において初めて存在を証明し、DM 患者において有意な高値を示すことが判明した。また、疾患活動性に伴い抗 CD146 抗体が低下し、反対に sCD146 が上昇する傾向がみられ、抗 CD146 抗体と sCD146 の動態が疾患活動性を反映する指標になり得る可能性が考えられた。

Galectin-3 は炎症性サイトカインを介した炎症性病態に関与する他、transforming growth factor- β を介して線維化に係り、ILD の病因に関与する事が報告されている。PM/DM 患者においても、血清 galectin-3 値は PM/DM の病因に関与する炎症性サイトカインとの有意な関連を示し、線維化病態として PM/DM-ILD との関連を示した。さらに、galectin-3 は PM/DM-ILD 患者における A/SIP の判別に有用であり、且つ ILD の重症度とも相関する有意なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。疾患活動性との変化においてもベースラインの疾患活動性を反映し、活動性と伴に有意に変化するため、PM/DM の疾患活動性の指標にもなり得ると考えられる。

抗 galectin-3 抗体においては、本研究において新規にリコンビナント蛋白を用いた ELISA で測

定を可能とした。抗 galectin-3 抗体は既報において SLE 患者の皮膚血管炎との関連が示唆されている。本研究において抗 galectin-3 抗体は DM 患者において PM 患者より有意に高値を示しており、PM/DM においても抗 galectin-3 抗体が皮膚血管炎と関連がある可能性が考えられる。

5 結論

血清 sCD146、抗 CD146 抗体、galectin-3、抗 galectin-3 抗体についてそれぞれ PM/DM における臨床病態との関連とバイオマーカーとしての可能性を検討した。それぞれ PM/DM の機序に関連がある可能性を示唆し、PM/DM 患者の疾患活動性に応じて変化した。その中でも血清バイオマーカーとして臨床的に最も有意な結果が認められたのは galectin-3 であった。Galectin-3 は PM/DM において炎症と線維化を反映し、中でも PM/DM-ILD 患者において有用なバイオマーカーになると考えられる。本研究の結果について将来的にはより大きな母集団での再検証を必要とする他、今回新規に判明した抗 CD146 抗体や、抗 galectin-3 抗体に関してはより詳細なメカニズムを明らかにする必要がある。

論文審査の結果の要旨

- 本学位論文は筋炎のバイオマーカーの探索を行っている。本研究では CD146, galectin-3 が筋炎で上昇し、これらに対する抗体が皮膚筋炎で陽性となることを示した。以上の中で galectin-3 は筋炎の活動性と関連し、かつ急性/亜急性間質性肺炎のバイオマーカーである点は特に重要な知見である。CD146, galectin-3 に対する抗体については筋炎の病型分類のバイオマーカーである可能性、治療経過のバイオマーカーである可能性があり大変興味深い。
- 本研究で示された CD146, galectin-3 に対する抗体はこれまでに皮膚筋炎での報告がなく新規性があり非常に興味深い知見である。また galectin-3 が筋炎の活動性のバイオマーカーとなる点、急性/亜急性進行性間質性肺炎と関連していることも新しい知見で非常に興味深い。以上の結果は学問的意義が高く、新規性、独創性があると評価できる。
- 研究結果について審査委員からは以下の点が指摘された。
 - 1: 皮膚筋炎で CD146, galectin-3 に対する抗体が証明されたことは非常に興味深い、その臨床的意義についての考察が十分とは言えない。例えばこれらの抗体が筋炎の病型分類のバイオマーカー、治療経過のバイオマーカーである可能性などその臨床的意義についての考察を充実させる必要がある。
 - 2: 病理所見を提示する際は通常は internal positive control は何で行ってどの部位に免疫染色が陽性となるか、細胞のどの部分に染まるか（細胞表面、細胞質、核）を確認したという内容を材料・方法の部分に記載すべきである。また図 11 の説明部分「galectin-3 は全ての組織において発現がみられた」（21 ページ下から 5 行目）という表記は的確ではなく、「陽性となった」と表現するのが適切である。病理写真をみると線維芽細胞 (C)、肺胞腔内マクロファージ (D) は陽性と思われるが肺胞上皮細胞 (D) は陽性とは取りがたい。肺胞上皮細胞とした矢印の部分は不要ではないか。筋生検 (F) の陽性部分はリンパ球である可能性があるが明確ではなく、拡大率の高い病理写真があればそれを採用した方がよい。
 - 3: 今回の一番のキーである galectin-3 が細胞のどこに存在するのか理解しづらく、序章に記載を追加した方がいいであろう。

- 4: HRCT 所見と galectin-3 が相関する点が今回の学位論文で重要なポイントの一つであるが、galectin-3 レベルが血清マーカーである KL-6、SP-D のレベルとも相関するのに興味のあるところである。もし検討しているのであれば図は提示しなくても本文にその結果を記載して欲しい。
- 5: 本文の一部に主語や目的語がわかりにくい点、脱字 (7 ページ目の「 3μ のパラフィン切片」→「 $3\mu\text{m}$ のパラフィン切片」) などが見受けられる。全体を通して表記と誤字・脱字の最終チェックをして欲しい。
- 6: その他、プレゼンテーションの際に審査委員から以下の質問、指摘がされた。
- 1) CD146, galectin-3 は筋炎以外の疾患ではどうであったか。
 - 2) galectin-3 と MITAX が相関しているとのことであるが、コンポーネントごと (臓器ごと) の相関は検討したか。
 - 3) galectin-3 の検討にある「治療抵抗性の肺病変」とは臨床的には具体的にどのような症例か。慢性経過の症例か、急性/亜急性経過の症例か。
 - 4) galectin-3 は何の指標と考えるのか。
 - 5) galectin-3 のアッセイの際に galectin binding protein が影響した可能性はあるか。
 - 6) びまん性肺障害 (DAD) の肺病理での galectin-3 の発現は検討したか。
 - 7) 筋病理で (図 11F)、筋壊死の部分は非特異的に免疫染色が陽性となることがあるが、この病理では陽性として良いか。
 - 8) 肺の部分、血管の部分など全体に免疫染色がうまく染まっていないように思われる。ポジティブコントロールはしっかり調べたのか。
 - 9) CD146, galectin-3 に対する抗体は病態とも関連するのか。
 - 10) sCD146 高値は筋炎の原因なのか結果なのか。
 - 11) 抗 galectin-3 抗体は治療で低下するのか。
 - 12) 総論で「将来的にはより大きな母集団での再検証を必要とする」とあるが今回の結果を再検証するにはどのくらいの症例数を必要とするか。
- ・本学位論文で示された筋炎のバイオマーカーに関する知見は学問的意義、新規性、独創性が高く学位論文に値すると考えるが、審査委員から指摘された 1-5 を修正する必要がある。6 のその他に関しても可能な範囲で論文の修正、加筆を行うのが望ましいと判断した。以上を学位申請者本人に伝えた。その後再提出された学位論文を確認し、委員の指摘に基づいて可能な範囲で適切に改訂されたと判断し論文審査は合格と判定する。

最終試験の結果の要旨

本論文研究内容、評価 (学問的意義、新規性、独創性)、問題点と改訂の指導内容、学位論文としての判断等は「論文審査の結果」に記載した通りである。

プレゼンテーションは的確に行われ、質疑応答にも落ち着いて回答された。プレゼンテーション内容と審査委員から指摘された学位論文の修正箇所を確認の上で最終判定を行うこととした。以上を本人に伝えて、再提出された学位論文が適切に改訂されたことを確認し最終試験は合格と判定する。