

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

2022 年 3 月 29 日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 医学研究科内科学講座 臨床免疫学

職 名 助教

氏 名 笹井 蘭

助 成 の 種 類	令和 3 年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	抗MDA5抗体陽性間質性肺炎合併皮膚筋炎のモデルマウスを基盤にした病態解明			
上記以外で助成金を 充 当 した 研 究 内 容	なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 大学院生 吉田 常恭			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 本研究成果について現時点では発表していないが、今後研究成果が蓄積した段階で論文化予定			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		研究用消耗品	677,826	
		動物飼育管理費(マウス)	162,974	
		解剖センター組織標本作製費	147,200	
学会参加費 (第49回日本臨床免疫学会)		12,000		
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 今回、私は研究推進にあたり、資金調達にとても苦心しておりましたところ、貴財団助成をいただくことができましたこと、心より感謝申し上げます。本助成のおかげで研究を進めることができ、無事2022年度の科研費基盤Cに採択されることができ、今後も研究を継続・発展させることが可能となりました。難病の病態解明・新規治療薬開発への長い道のりを、歩を止めず進むことができましたのは、貴財団助成のおかげと存じます。今後も後進の研究者がその恩恵を受け、研究に邁進できますこと、心より願っております。重ね重ねありがとうございます。			

## 成果の概要 / 笹井 蘭

### 【研究内容】

抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎(DM)は、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)の中でも最も予後不良な一群であり、治療抵抗性の急速進行性間質性肺炎 (RP-ILD) を高率に合併し短期間で死亡する率が高い。同疾患には、従来治療を多剤組み合わせた強力な免疫抑制を行うことが現状であるが、副作用が多く、治療抵抗例が多く存在することなど問題点が多い。その病態背景として著明な *interferonopathy* とマクロファージ(M $\phi$ )活性化を生じていることが示唆されているが、病態機序は十分解明されていない。その大きな障壁の一つが、本疾患モデルマウスが開発されていないことである。

本研究では多彩な自己免疫現象を生じる SKG マウスを用い、「PolyI:C による刺激 (MDA5 を刺激)により *Interferonopathy* とともに臓器において MDA5 蛋白の高発現と組織障害を生じることで、自己免疫の素因を持つ個体では抗 MDA5 抗体産生を伴う ILD の発症に至る」との仮説のもとに動物モデルの構築を図り、その病態を探究する。

### 【研究成果】

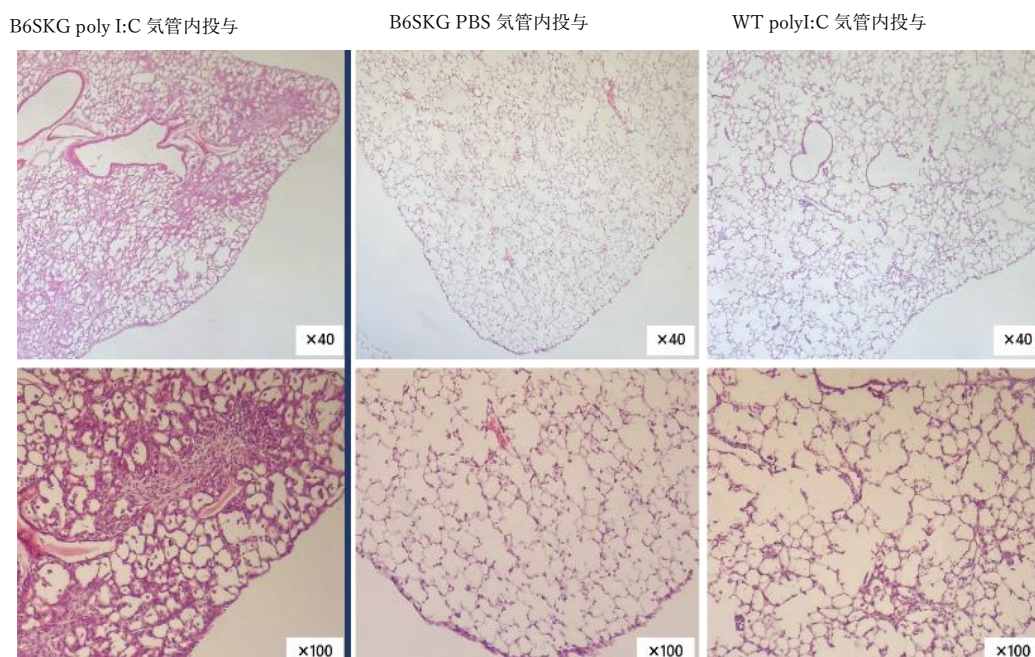
B6 野生型(WT)マウス・ B6SKG マウス・ B6.Foxp3 DTR マウスに対して polyI:C もしくは PBS を 1 日置きに 24 日間反復吸入させたところ図 1 のように B6SKG マウスに吸入させた時のみ、間質性肺障害を惹起することができた。

しかし、抗 MDA5 抗体の存在の有無を免疫沈降法で確認したところ (マウス MDA5 の cDNA を導入したプラスミド(pET21a)を用い、*in vitro* transcription-translation system (TnT® Quick Coupled Transcription/Translation System; Promega)を用いてマウス MDA5 蛋白を合成し(35S メチオニン標識)、免疫沈降法により沈降した抗原をオートラジオグラフィで確認する)、抗 MDA5 抗体の産生を確認することができなかった。つまり、慢性に肺局所において自然免疫の活性化刺激を行うことで、間質性肺炎という臓器障害を惹起できるものの、自己免疫現象 (自己抗体) を十分惹起できていないと考えられた。

そこで、自己抗体を産生させるため、リコンビナント MDA5 を用いた免疫を計画した。ヒト MDA5 の C 末端約 800 アミノ酸をコードする cDNA を組み込んだプラスミドを大腸菌に導入し、MDA5 を合成・精製 (His-tag 精製) してヒト MDA5 蛋白を得た。B6 野生型(WT)マウス・ B6SKG マウス・ B6.Foxp3 DTR マウスに対してヒト MDA5 蛋

白約 200ug/回を 1 週間毎に 4 回免疫し、自己抗体産生を確認した。しかし残念ながら自己抗体の産生を惹起できなかった。そのため、アジュバント (Complete Freund's adjuvant) とともに免疫することを計画し、現在実験継続中である。

図 1 マウス polyI:C 慢性気管内投与の肺病理



#### 【今後の見通し】

マウスに十分量免疫できるだけの大量の MDA5 蛋白を得るため、ヒト MDA5 蛋白の合成・精製をバキュロウイルス-昆虫細胞合成系で大量生産し、His-tag 精製・ヘパリン精製を用いて精製度を向上させることで、免疫する MDA5 蛋白量と純度を上げるべく、京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学と共同研究を行い、技術指導を受けている。

純度の高い十分量の MDA5 蛋白をアジュバントとともに免疫することで、抗 MDA5 抗体産生誘導が見込める。そうすれば、(1) I 型 IFN の亢進、(2) 間質性肺炎、(3) 抗 MDA5 抗体産生の 3 条件を満たすモデルマウスを構築でき、病態解明研究へ進めていきたいと考えている。