

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04863

研究課題名(和文) Seed & Soilモデルに基づく多発性筋炎・皮膚筋炎の病態解明と治療法開発

研究課題名(英文) New Theory-driven Treatment Development of Polymyositis and Dermatomyositis

研究代表者

上阪 等 (KOHSAKA, Hitoshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00251554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：研究担当者らのSeed and Soil学説に基づいて、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)の病態解明と新治療法開発を行った。このうちインターロイキン(IL)-23に関する成果を報告する。血中IL-23は、PM/DM患者、マウスPMモデルであるC蛋白誘導性筋炎(CIM)マウスで高かった。IL-23は患者の損傷筋内CD68+細胞が発現しており、その産生は筋損傷と関連していた。IL-23阻害はCIMを改善した。CIMマウスのリンパ節細胞をIL-23レシピエントマウスに移入しても筋炎がおこり、IL-23は筋攻撃性T細胞を活性化していた。IL-23は有望な治療標的と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Based on our Seed and Soil Theory, we conducted some research studies on polymyositis and dermatomyositis (PM / DM) and report here the results of the interleukin (IL) -23 target therapy. As was reported in the patients, serum IL-23 levels were elevated in mice with C protein induced myositis (CIM), a murine model of PM. IL-23p19 was expressed by CD68+ cells in the damaged muscles from the patients. IL-23 were expressed by CD68+ cells in the muscles and draining lymph nodes from CIM mice as well as in chemically injured muscles. Thus, IL-23 production should be associated with the muscle damage. IL-23p19-null mice were resistant to CIM. Administration of anti-IL-23 receptor antibodies ameliorated CIM. When lymph node cells from the CIM mice were transferred into recipients, the myositis was transferred not only to WT but also IL-23p19-null recipients, indicating that IL-23 should activate the autoaggressive T cells. IL-23 should be a promising therapeutic target for PM/DM.

研究分野：膠原病・リウマチ内科

キーワード：多発性筋炎 皮膚筋炎 Cタンパク誘導性筋炎 インターロイキン23

1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎 (PM) は、罹患患者の日常活動を制限するような筋機能低下をきたす特発性炎症性筋症のひとつである。その正確な病因は不明であるため、標準治療は、グルココルチコイドおよび他の免疫抑制剤を含む非特異的免疫抑制剤の投与が主となっている。これらの薬剤は、しばしば副作用を来すうえに、疾患活動性を完全には制御しえないことがある。

PM では、患者末梢血中に存在する活性化細胞傷害性 CD8 + T 細胞が重要な病因論的役割を果たしている。一方、PM 筋の磁気共鳴画像では、炎症を起こした筋および無傷の筋が隣り合わせに存在して斑状を呈する。これらの事実は、自己反応性 CD8 + T 細胞だけでなく、筋局所の因子が筋炎発症に必要であることを意味している。CD8 + T 細胞によって引き起こされる PM マウスモデルである C タンパク質誘発性筋炎 (CIM) において、自己反応性 CD8 + T 細胞は、局所自然免疫が活性化された筋においてのみ、筋炎を養子に移すことができた。この現象をもって、我々は、自己免疫の「種と土壌」モデルを提案した。「種子」は自己反応性 T 細胞を表し、一方、「条件付き」は標的組織の「土壌」を表すものである。

我々は、IL-1 および腫瘍壊死因子 を産生することによって、筋内マクロファージが CIM の「土壌」を活性化することを以前に報告した。しかし、これらのサイトカインは恒常性維持のためにも筋線維が発現している。臨床的に、PM / 皮膚筋炎 (DM) に対してこれらのメディエーターを阻害するオープンラベルおよび二重盲検試験では好ましい結果は得られていない。したがって、PM / DM の治療標的としては、損傷筋で特異的に発現する分子であり、筋損傷なしに誘導され得る非特異的な炎症性メディエーターではないことが望ましい。

IL-23 は、健常者より PM / DM 患者の血清中で高く、PM / DM 筋中マクロファージおよび樹状細胞によって発現されることが報告されている。これらの事実は、PM / DM に対する IL-23 の病理学的寄与を示すものの、その病理学的役割はほとんど知られていない。

IL-23 は、IL-12 ファミリーサイトカインのメンバーであり、IL-23 サブユニット p19 (IL-23p19) および IL-12 サブユニット p40 (IL-12p40) からなる。IL-23R および IL-12R はそれぞれ IL-23 受容体複合体を構成分子として持ち、各サブユニットは IL-23p19 および IL-12p40 にそれぞれ結合する。主として活性化マクロファージおよび樹状細胞が主な IL-23 産生細胞であり、エフェクター分子として IL-17A を含むサイトカイン産生を誘導することによって Th17 細胞を増殖維持する。実は、IL-17A は CIM には必要のないサイトカインであるが、この事実は必

ずしも自己免疫性筋炎において IL-23 が関与しないとするものではない。IL-23 は、マクロファージおよび DC に作用して、抗原提示および前炎症性サイトカイン産生も促進する。自然および獲得免疫を橋渡しするこれらの機能は筋炎において病理学的役割を果たす可能性がある。

本研究では、IL-23 が損傷筋で発現することを見出した。IL-23 の病理学的関与を明らかにするために、我々は、IL-23p19 欠損または抗 IL-23 受容体抗体による IL-23 阻害が CIM に及ぼす影響を試験した。IL-23 が病因における「種子」および/または「土壌」活性化に関与するかどうかを調べるために、CIM の養子移入を行った。我々は、IL-23 は、損傷筋において特異的に発現される分子であり、PM / DM の新規な治療標的であり得ることを見出した。

2. 研究の目的

- (1) マウスモデル CIM で IL-23 がヒト PM / DM と同様に高発現であることを示す。
- (2) IL-23 が筋損傷をきたす PM / DM 患者、CIM マウスで特異的に高発現するかを示す。
- (3) IL-23 産生細胞を明らかにする。
- (4) IL-23 阻害が CIM 治療効果を発揮するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス：雌 C57BL / 6 マウスは Charles River Japan から購入した。IL-23p19 欠損マウスは、理研から入手した。すべての動物実験は、東京医科歯科大学の関連委員会によって承認された。

(2) 患者および筋生検：Bohan と Peter の分類基準と厚生労働省診断基準を満たす未治療の PM と DM 患者から筋生検標本を得た。すべての患者は書面による同意を獲得した。

(3) マウスの治療：CIM 誘導のためにマウスを C タンパク質断片で免疫した。いくつかのマウスに、Merck Sharp & Dohme Corp. から提供された抗 IL-23R モノクローナル抗体 (クローン 21A4) またはアイソタイプ適合対照モノクローナル IgG1 (クローン 27F11) を腹腔内注射した。大腿四頭筋に 50 μ l の 0.5% 塩酸ピバカイン (BPVC) を注射して筋傷害を引き起こした。CIM の養子移入のために、CIM マウス由来のリンパ節 (LN) 細胞と骨髄由来樹状細胞 (BMDC) をヒト組換え IL-2 で 3 日間培養した。800 万個の培養 LN 細胞を、フットパッドに完全フロイトアジュバント (CFA) を皮内注射したナイーブマウスに移入した。

(4) 筋炎の組織学的評価：単核球浸潤および筋線維の変性を、ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) 染色した大腿四頭筋および膝関節の 10 μ m 切片を盲検法で検査した。筋炎の

重症度は、1~6のスケールで組織学的に評価した。1 = 筋線維 1本の障害、2 = 筋線維 2~5本の障害、3 = 筋線維 6-15本の障害、4 = 16~30本の筋線維障害、5 = 31~100本の筋線維障害、6 = 100本以上の筋線維障害。同じ等級の病変が複数発見された場合は、0.5を追加。各筋肉のスコアは、2つの異なるセクションのスコアの平均をとって評価した。個々のマウスの組織学的スコアは、大腿四頭筋およびハムストリングスのスコアの合計で計算した。

(5)ELISAおよび免疫組織化学：IL-23の血清レベルを、Quantikine ELISAキットを用いて定量した。ホルマリン固定およびパラフィン包埋筋の切片を、ウサギ抗マウス/ヒトIL-23p19ポリクローナル抗体(ab115759)、マウス抗ヒトCD68モノクローナルAb(M0814)、ラット抗マウスCD68モノクローナルAb(MCA1957F)、ウサギ抗マウスIL-12p40ポリクローナル抗体(ab106270)およびウサギ抗マウスEbi-3ポリクローナル抗体(ab83896)、1%ウシ血清アルブミン(A7906)で非特異的染色をブロックした。結合した抗体を、ペロオキシダーゼ標識アミノ酸ポリマー結合ヤギ抗ウサギIgG、抗マウスIgGまたは抗ラットIgG(414311F)抗体および関連する基質、ジアミノベンゼンで可視化した。

(6)統計分析：組織学的スコアはマンホイットニーU検定を用いて統計的に分析した。学生t検定を用いてIL-23濃度を分析した。

4. 研究成果

(1) CIMで血清IL-23濃度は上昇していた。PM / DM患者は、健常者よりも血中IL-23濃度が高い。CIMマウスの場合を調べるために、我々は、免疫14日後、筋炎ピークにおけるCIMマウス血清のIL-23p19 / p40複合体濃度を調べた。CIMマウスでは、CFA単独を足底に注射したのみの対照マウスよりも有意に高濃度だった。

(2) IL-23p19は、PM / DMおよびCIM筋内膜でCD68+細胞が発現していた

IL-23発現細胞を見つけるため、PM / DM患者およびCIMマウスの筋におけるIL-23p19発現を免疫組織化学で調べた。PM / DM筋内膜に浸潤しているCD68+単核球は、IL-23p19を発現していた。CIMマウスでは、免疫14日後に筋内膜CD68+細胞がIL-23p19およびIL-12p40を発現した。筋線維はIL-23p19を発現していなかった。IL-23p19はIL-39にも共有されるので、我々はIL-39のもう一つのサブユニットであるEpstein-Barrウイルス誘発3(Ebi3)の発現を調べたところ、筋中IL-23p19+細胞はEbi-3を発現していなかった。したがって、CD68+細胞がIL-23を発現していた。

対照として、我々はCFAのみをマウス足底に皮内注射した。この処置は、筋損傷を招くことなく、同じ脚の筋にマクロファージを集積

させるが、集積したCD68+細胞はIL-23p19を発現していなかった。

以上の結果から、筋線維損傷がIL-23p19発現を促すことが示唆されたため、BPVCの筋肉内注射2日後に筋を調べた。以前報告されたように、この注射は筋壊死を化学的に誘発し、続いて単核球浸潤を誘発した。CIM筋の場合と同様に、BPVCで傷害を受けた筋内のCD68+細胞は、IL-23p19およびIL-12p40が陽性であり、Ebi-3は陰性であった。

CD68+細胞数は、CIMマウス、CFA単独で処置したマウスおよびBPVC処置マウスの筋全てで増加していた。しかし、IL-23p19+細胞はCIMおよびBPVC処置マウスにおいてのみ多く見出され、CIMマウス、CFA単独で処置したマウスおよびBPVC処置マウスからの筋で、IL-23p19+対CD68+細胞の数の比はそれぞれ79%、2%および89%であった。

(3)IL-23p19もCIMマウスの所属リンパ節で増加していた

LNの抗原提示に關与するマクロファージおよび樹状細胞はIL-23を産生する可能性があるため、罹患筋の所属LNにおけるIL-23発現を調べた。その結果、IL-23p19およびIL-12p40の発現は、CFA単独を足底皮内注射したマウスと比較して、CIMマウスで増加していた(図1D)。

(4) IL-23はCIM発症に不可欠であった

IL-23がCIM発症に必要などうかを調べるため、IL-23p19欠損マウスをCタンパク質断片で免疫した。免疫14日後に筋を組織学的に評価した。筋炎の重症度は、野生型(WT)と比較してIL-23p19欠損マウスにおいて有意に抑制されていた。

次に、IL-23R阻害抗体の投与で、CIMに対するIL-23阻害の効果を調べた。免疫前日からマウスに抗IL-23R抗体投与を行ったところ、CIMの発生率および重症度は処置群で有意に抑制された。これらの結果は、IL-23p19欠損マウスの結果と一致し、IL-23はCIM発症に重要な役割を果たすことが示された。

(5)発症後の抗IL-23R抗体の投与によりCIM発症が抑制された

IL-23阻害が自己免疫筋炎の治療戦略であり得るかどうかを調べるために、抗IL-23R抗体をCIMマウスに筋炎発症後から投与した。即ち、筋炎が組織学的に明らかである免疫7日後から治療を開始した。対照抗体で処置したマウスと比較して、抗IL-23R抗体で処置したマウスでは、組織学的スコアが有意に抑制されていた。

(6) IL-23p19欠損マウスでも局所の自然免疫活性化はなされていた

IL-23は、CIMの「種」および/または「土壌」の病理学的プロセスに寄与する可能性がある。IL-23阻害治療の標的を明らかにするために、IL-23p19欠損レシピエントにCIMの養子移入を行った。IL-23が主にT細胞の攻撃を誘発するための「土壌」活性化に作用する場合、IL-23p19レシピエントにおける転移筋

炎は野生型 (WT) マウスよりも重症度が低い可能性がある。CIM マウスの LN 細胞を C タンパク質断片パルス BMDC で 3 日間刺激し、その足底を CFA 皮内注射で処置した IL-23 欠損または WT レシピエントマウスに移した。IL-23 欠損レシピエントにおける筋炎の重篤度および発生率は、WT レシピエントにおけるものと同等であった。従って、IL-23p19 は、筋肉における自然免疫の活性化にほとんど寄与しないと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Umezawa N, Kawahata K, Mizoguchi F, Kimura N, Yoshihashi-Nakazato Y, Miyasaka N, Kohsaka H. Interleukin-23 as a therapeutic target for inflammatory myopathy. Sci Reports (in press)

[学会発表](計 25 件)

梅澤 夏佳、吉橋 洋子、木村 直樹、高村 聡人、川畑 仁人、上阪 等 炎症性筋疾患の治療標的としての IL-23 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (ワークショップ) 2015 年 4 月 23-25 日 名古屋 Hitoshi Kohsaka. Seed and soil model for autoimmunity in myositis. 1st International Conference on Myositis May 8-11, 2015, Stockholm, Sweden

梅澤夏佳、吉橋洋子、木村直樹、川畑仁人、上阪 等 IL-23 は炎症性筋疾患モデルにおいて IL-17A 非依存的に病態に關与する 第 30 回自己免疫研究会 2015 年 7 月 11 日 東京

梅澤 夏佳、吉橋 洋子、木村 直樹、川畑 仁人、上阪 等 IL-23 を標的とした新たな炎症性筋疾患の治療戦略 (ワークショップ) 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2016 年 4 月 21-23 日 横浜

梅澤 夏佳、川畑 仁人、木村 直樹、吉橋 洋子、上阪 等 IL-23 阻害は IL-17A 非依存的に炎症性筋疾患モデルを改善させる 第 44 回日本臨床免疫学会 2016 年 9 月 8-10 日 東京

梅澤夏佳、川畑仁人、木村直樹、吉橋洋子、上阪 等 IL-23 阻害は IL-17A 非依存的に炎症性筋疾患モデルを改善させる 第 3 回日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス 2016 年 10 月 14-15 日 東京

神谷 麻理、木村 直樹、高村 聡人、川畑 仁人、上阪 等 多発性筋炎における細胞傷害性 T 細胞による筋障害の in vitro 解析 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2017 年 4 月 20-22 日福岡

梅澤 夏佳、川畑 仁人、木村 直樹、吉橋 洋子、上阪 等 炎症性筋疾患モデルの病変局所で産生される IL-23 は治療標的として有用である 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2017 年 4 月 20-22 日 福岡

Umezawa N, Kawahata K, Kimura N, Yoshihashi-Nakazato Y, Kohsaka H. Interleukin-23 as a therapeutic target for inflammatory myopathy. 7th East Asian Group of Rheumatology July 7-8, 2017 Tokyo

梅澤 夏佳、川畑 仁人、溝口 史高、木村 直樹、吉橋 洋子、上阪 等 筋傷害で誘導される IL-23 は炎症性筋疾患の治療標的として有用である 第 4 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス 2017 年 10 月 13-14 日 東京

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上阪 等 (KOHSAKA, Hitoshi)

東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 00251554

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()