

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18385

研究課題名(和文) IL-6を標的とした筋疾患の骨格筋内線維化抑制

研究課題名(英文) IL-6 as a target for delay the progression of muscular dystrophy

研究代表者

和田 英治 (WADA, EIJI)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60756948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋におけるインターロイキン-6(IL-6)は筋変性や炎症に関与するだけでなく、マイオカインとして筋肥大などにも関わっている。一方、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者(DMD)やモデルマウスの血中と骨格筋内IL-6は亢進しているが、その役割については分かっていない。本研究ではDMDモデルマウスを用いて、抗IL-6受容体抗体投与によるIL-6経路の阻害効果を検討した。その結果、IL-6阻害により筋症状進行の遅延が認められ、IL-6関連因子(STAT3)のリン酸化抑制により筋再生能が向上したことが要因であると示唆した。本研究より、抗IL-6受容体抗体はDMDの新規治療薬として期待できる。

研究成果の概要(英文)：Interleukin-6 (IL-6) is related to inflammation and fibrosis but is also known as a myokine in skeletal muscle. Elevated IL-6 levels in blood and skeletal muscle are observed in patients and model animals of Duchenne muscular dystrophy (DMD); however, its contribution to the progression of muscular dystrophy is unclear. This study aimed to evaluate the effects of IL-6 receptor (IL-6R) blockage on the muscle pathology in DMD model mice. Treatment of IL-6R blockage successfully inhibited IL-6 pathway in skeletal muscle and significantly increased regenerating fibers. A significant reduction of phosphorylated STAT3 in skeletal muscle of treated mice supported the effects of IL-6R blockage on promoting muscle regeneration. Consistently, decreased serum CK levels, enlarged muscle diameter and reduced fibrosis in quadriceps muscle were seen. These results indicate that anti IL-6R antibody is a potential therapy for dystrophic muscle particularly for activating skeletal muscle regeneration.

研究分野：筋ジストロフィー

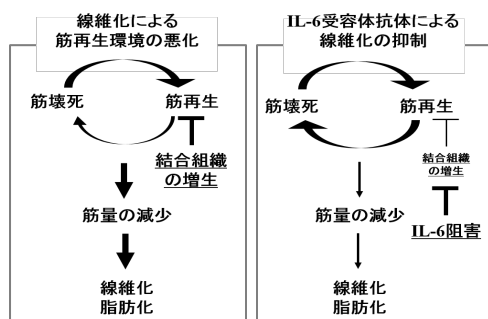
キーワード：デュシェンヌ型筋ジストロフィー 筋疾患 IL-6 線維化 筋再生 筋衛星細胞 炎症

1. 研究開始当初の背景

遺伝性筋疾患や筋炎では病気の進行に伴い骨格筋内に結合組織の増生が認められ、筋再生環境悪化の要因となる。組織の線維化には単核食細胞等から産生され、T細胞を活性化するインターロイキン6(IL-6)が関与する。骨格筋において、IL-6はマイオカインとしても知られ、骨格筋の肥大に関与していると報告されている(Muñoz-Cánoves P et al., FEBS J. 2013)。一方、遺伝性・炎症性の筋疾患や加齢に伴う筋障害・変性過程においては骨格筋のIL-6は亢進するが、具体的な作用は明らかとなっていない。

抗IL-6受容体抗体(IL-6阻害剤)は、関節リウマチなど様々な病気に対する症状改善効果が証明されている。基礎研究においては、網膜下線維症や強皮症モデルへの線維化抑制効果(Cui W et al., Int J Ophthalmol. 2014; Kitaba S et al., Am J Pathol. 2012)や心筋梗塞モデルマウスの心筋線維化を有意に減少することが報告されている(Kobara M et al., Cardiovasc Res. 2010)。

最も頻度が高く、かつ重篤なデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は近年、人工呼吸療法などの進歩によって寿命が延びているが、有効な根本的治療法は未だ開発されていない。そこで本研究は、DMDの重篤なモデルマウスであるジストロフィン/ユートロフィン二重欠損マウス(dKOマウス)と、骨格筋内の線維化が顕著なメロシン欠損型筋ジストロフィーのモデルマウス(dy/dyマウス)を用いて、抗IL-6受容体抗体投与による骨格筋症状の改善効果を検討した。



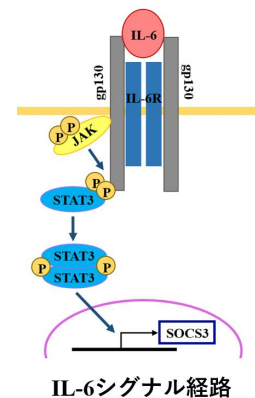
2. 研究の目的

本研究では2種類の筋疾患モデルマウスを用いて、抗IL-6受容体抗体投与による筋病態への改善効果を検討した。特に、骨格筋変性に伴う線維化と筋再生能に焦点を当て病態解析を行った。

3. 研究の方法

マウスに対してIL-6の機能を阻害する抗IL-6受容体抗体(MR16-1)投与を生後14日から開始し、90日齢に達するまで行った。抗体は初回体重1kgあたり200mg、その後1週間に1度体重1kgあたり25mgで投与を継続した。尚、MR16-1抗体は中外製薬株式会社からご供与頂いた。コントロール群にはラットIgG抗体(CB-0108-01, SouthernBiotech)を投与した。

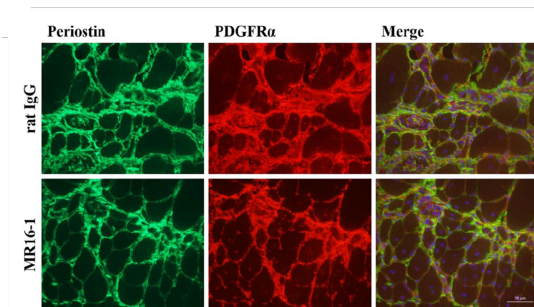
マウスを安楽死させ体重を測定後、血液を採取し、筋壊死の指標となる血中クレアチンキナーゼ(CK)値を測定した。骨格筋(大腿四頭筋)と心臓、横隔膜をサンプリング後、凍結ブロックを作成し、組織学的ならびに生化学的評価を行った。またELISA法を用いて、血清と骨格筋のIL-6値を測定した。マウス骨格筋はホルマリンで固定し、マイクロCTスキャナーを用いて脊柱側弯の程度を評価した。組織学的検討では、H&E染色とMasson's Trichrome染色、免疫染色を行い、線維化領域、筋線維サイズ、再生筋線維の割合、筋幹細胞(筋衛星細胞)の数と増殖能、筋変性領域と炎症細胞浸潤を評価した。生化学的検討ではウェスタンブロット(WB法)と定量PCRを用いて、IL-6シグナル関連因子の発現、線維化関連タンパク質の発現、線維化・炎症マーカーの発現等を評価した。



4. 研究成果

1) dKO マウス骨格筋症状に対する抗 IL-6 受容体抗体投与の効果

本研究ではまず、dKO マウスに対する抗体投与を行い、骨格筋症状に対する効果を検討した。生後 14 日から 90 日齢に達するまで長期投与を行った結果、コントロール群と治療群で体重や側弯の度合いに差は認められなかった。筋損傷の指標となる血中 CK 値を測定した結果、治療群で有意に低下した。この結果をふまえ、骨格筋の病理解析を行ったところ、壊死筋線維の割合が減少しており、IL-6 阻害による筋症状進行の遅延を認めた。また、筋壊死・再生を繰り返す dKO マウスは症状進行に伴い、筋衛星細胞が枯渇していくことが知られているが、治療群では筋衛星細胞数が有意に保たれており、さらに再生筋線維の占める領域が有意に増加していた。このことから、IL-6 阻害剤によって筋再生能力が維持されることが明らかとなった。筋線維径を測定した結果、治療群では小径筋線維の割合が有意に減少し、筋線維径の回復が認められた。さらに骨格筋内の線維化を評価したところ、治療群 (MR16-1 群) で線維化に関与する periostin や PDGFR 陽性の領域が有意に減少した (下図)。



また、WB 法ならびに定量 PCR 法による解析から、抗 IL-6 受容体抗体投与による筋肥大・萎縮関連遺伝子の発現に差はなかったものの、炎症や線維化に関与する遺伝子発現が有意に減少していることが明らかとなった。

2) 抗 IL-6 受容体抗体投与による骨格筋内

IL-6 シグナル経路の解析

正常対照マウスと比較して、dKO マウスの血中 IL-6 濃度は有意に増加していることを確認しており、その結果をふまえて ELISA 法を用いた検討を行った。その結果、コントロール群と比較して治療群では血中 IL-6 濃度が有意に増加することが明らかとなった。一方、骨格筋内の IL-6 濃度を測定したところ、治療群で減少傾向にあることが分かった。そこで、定量 PCR 法を用いて IL-6 シグナル経路を確認した結果、治療群で IL-6 とその下流にある *Socs3* の遺伝子発現が有意に減少した。また WB 法により、治療群では IL-6 シグナル経路の下流にある STAT3 のリン酸化が有意に減少した。これらの結果から、IL-6 阻害薬を投与することによって血中 IL-6 濃度は顕著に増加するものの、筋組織レベルでは IL-6 シグナル経路が抑制されることが明らかとなった。これらの現象は抗 IL-6 受容体抗体治療を行ったリウマチ患者やキャスルマン病患者でも確認されており、IL-6 とその受容体の結合を阻害することで、遊離した IL-6 が血中で増加したことに起因すると考えられている (Nihimoto N et al., Blood. 2008)。すなわち抗 IL-6 受容体抗体治療によって血中 IL-6 濃度は増加したものの、dKO マウス骨格筋においては IL-6 シグナル経路が効果的に阻害され筋症状の改善に寄与したと示唆した。一方で、治療薬投与を中断した時に、増加した IL-6 が筋症状に及ぼす影響については明らかとなっていない。

3) 骨格筋、呼吸筋、心筋における IL-6 シグナル経路と治療薬投与による効果の差異

本研究では、骨格筋 (四肢筋) を中心に解析を進めたが、DMD 患者ならびに dKO マウスは呼吸筋 (横隔膜) と心筋の障害も顕著である。そこで、dKO マウスの横隔膜と心筋の病理変化を観察したところ、治療群とコントロール群で線維化などの症状ならびに IL-6 シ

グナル因子の挙動に差は認められなかった。そこで通常飼育した dKO マウスの骨格筋と横隔膜、心筋を比較した結果、IL-6 シグナル経路は骨格筋で顕著に増加していることを見出した。骨格筋における壊死・再生、そして炎症には IL-6 が重要な役割を持つことが改めて明らかとなった。

4) dy/dy マウスに対する抗 IL-6 受容体抗体投与の結果と今後の検討

dKO マウスと同様に dy/dy マウスへの治療薬を投与し、実験を進めている。dy/dy マウスの骨格筋症状は dKO マウスとは異なる点があり、特に筋再生不良と線維化領域の増加が認められる。また dKO マウスは筋細胞膜直下に存在するジストロフィン/ユートロフィンを欠損しており、dy/dy マウスは基底膜に位置するラミニン 2 を欠失している。そのことから、IL-6 受容体抗体投与による筋衛星細胞（筋線維の形質膜と基底膜の間に局在する）の挙動についても焦点を当てて解析している。

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 1 件)

1. Eiji Wada, Jun Tanihata, Akira Iwamura, Shin'ichi Takeda, Yukiko K. Hayashi, Ryoichi Matsuda. "Treatment with the anti-IL-6 receptor antibody attenuates muscular dystrophy via promoting skeletal muscle regeneration in dystrophin-/utrophin-deficient mice" *Skeletal Muscle* (2017) Oct 27;7(1):23. (査読有り)

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 和田英治、濱野高行、辻田誠、林由起子。"末期腎不全における骨格筋の病理学・生化学的検討" 第 95 回日本生理学会。2018 年 3 月 28-30 日。サンポートホール高松（香川）。
2. 和田英治、華藤恵美、山下香、林由起子。"核膜病モデルマウスにおける骨格筋の病態と機能解析" 筋生理の集い。2017

年 12 月 16 日。東京慈恵会医科大学(東京)。

3. 和田英治、谷端淳、岩村憲、武田伸一、林由起子、松田良一。"デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する抗 IL-6 受容体抗体投与による効果" 第 12 回筋ジストロフィー治療研究会。2017 年 11 月 11 日。熱海大観荘（静岡）。
4. 和田英治、谷端淳、岩村憲、武田伸一、林由起子、松田良一。"抗 IL-6 受容体抗体投与によるデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスの筋病態改善効果" 第 247 回生理学東京談話会。2017 年 10 月 21 日。東京医科大学（東京）。
5. 和田英治、濱野高行、辻田誠、林由起子。"末期腎不全における骨格筋の病理学・生化学的検討" 第 3 回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会。2017 年 8 月 25-26 日。海運クラブ（東京）。
6. 和田英治、林由起子。"核膜病モデルマウスにおける骨格筋障害機序の解明" 第 3 回日本筋学会。2017 年 8 月 4-5 日。国立精神・神経医療研究センター(東京)。
7. Eiji Wada, Jun Tanihata, Akira Iwamura, Shin'ichi Takeda, Yukiko K. Hayashi, Ryoichi Matsuda. "The effects of anti-IL-6 receptor antibody on muscle pathology in dystrophin/utrophin dKO mice" 2017 年 6 月 3 日。第 179 回 東京医科大学医学会総会。東京医科大学（東京）。
8. 和田英治、谷端淳、岩村憲、武田伸一、林由起子、松田良一。"デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスに対する抗 IL-6 受容体抗体の長期投与による効果" 第 94 回日本生理学会。2017 年 3 月 28-30 日。アクトシティ浜松（静岡）。
9. 和田英治、林由起子。"モデルマウスを用いた核膜関連筋疾患の病態解明" 第 5 回骨格筋生物学研究会。2017 年 3 月 3-5 日。東京大学（東京）。
10. 和田英治、谷端淳、岩村憲、武田伸一、林由起子、松田良一。"デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスに対する抗 IL-6 受容体抗体投与による効果" 2017 年 2 月 24 日。第 4 回 東京医科大学記念会館ポスター発表懇談会。東京医科大学（東京）。
11. 和田英治、谷端淳、岩村憲、武田伸一、林由起子、松田良一。"デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する抗 IL-6 受容

体抗体の長期投与による効果” 第4回
若手による骨格筋細胞研究会. 2016年11
月14-15日. ウィンクあいち(愛知).

12. 和田英治、濱野高行、辻田誠、林由起
子. “末期腎不全における骨格筋の病理
学・生化学的検討” 第2回日本筋学会.
2016年8月5-6日. 国立精神・神経医療
研究センター(東京).

13. Eiji Wada, Jun Tanihata, Akira Iwamura,
Shin'ichi Takeda, Yukiko K. Hayashi,
Ryoichi Matsuda. “Anti-IL-6 receptor
antibody attenuates muscular
dystrophy via promoting skeletal
muscle regeneration in
dystrophin/utrophin deficient mice”
New Directions in Biology and Disease
of Skeletal Muscle Conference,
2016.06.29-07.02. Orlando, FL, USA.

14. Eiji Wada, Ryoichi Matsuda.
“Preventing the progression of
dystrophic phenotypes of mdx mice by
sevelamer, a phosphate binding
drug” New Directions in Biology and
Disease of Skeletal Muscle Conference,
2016.06.29-07.02. Orlando, FL, USA.

〔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 0 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
[https://tokyo-med-pathophysiol.jimdo.co
m/](https://tokyo-med-pathophysiol.jimdo.com/)

6. 研究組織
(1) 研究代表者

和田 英治(EIJI WADA)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：60756948

(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
()