

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09785

研究課題名(和文)壊死性ミオパチー病態解明のためのNGSによる感受性遺伝子の探索

研究課題名(英文)Genetic Analysis in Immune-mediated necrotizing myopathy

研究代表者

大貫 優子(OHNUKI, Yuko)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：20384927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性筋疾患(筋炎)は、近年病理学的検討や特異的抗体の発見が進み、複数の病型に分類できることが判明してきた。中でも、炎症細胞の浸潤に乏しい免疫介在性壊死性ミオパチー(IMNM)は、筋炎の中で最も多いことが判明している。申請者らは、IMNMを中心に、炎症性筋疾患のHLA遺伝子解析を行った。その結果、IMNMでは、日本人健常者に比し、患者群で有意に多いアレルを認めた。さらに、スタチン内服群、膠原病合併群、特異的抗体陽性群にそれぞれ有意に多いアレルも認めた。また、抗合成酵素症候群、免疫関連副作用筋炎、封入体筋炎の解析も行い、IMNMとの相違を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性筋疾患は、従来筋力低下と筋痛を伴う多発筋炎と、特徴的な皮膚症状を伴う皮膚筋炎の二つに分類されてきた。近年、研究が進んだことにより、上記2病型以外に複数の病型があることが判明した。これらは自己免疫疾患であり、何らかの遺伝学的背景があることは想定されていたが、これまで病理学的検討や自己抗体の解明に比べ、研究が進んでこなかった。今回の成果は、免疫機序に重要な役割を果たすHLA遺伝子のうち、特に日本人患者に特徴的な疾患関連アレルを見出すことができた。これは、筋炎の発症機序を解明する一助となり、診断や治療法の開発における有用なデータとなると確信する。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic inflammatory myopathies (IIM) are a heterogeneous group of subacute, chronic or acute systemic immune-mediated diseases of the skeletal muscles. Recently, research has shown the utility of adding new classifications of myopathies, mainly based on their pathology and the presence of specific autoantibodies. Immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) is a histologic entity characterized by marked necrosis in the absence of prominent lymphocytes. We identified HLA risk alleles of Japanese IIM patients including IMNM. HLA-A\*02:07, B\*46:01, C\*01:02, DRB1\*08:03, DRB1\*11:01, DQB1\*06:01, DPB1\*05:01 were confirmed as risk factors in IMNM patients. We also evaluated differences in risk alleles among IMNM subtypes, and among IIM.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：炎症性筋疾患 免疫介在性壊死性ミオパチー HLA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM)の遺伝子研究

近年、炎症性筋疾患(筋炎)の中でも壊死再生線維の多発を主体とし炎症性リンパ球浸潤の乏しい病理像を特徴とする病型の報告が相次いでおり、免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM)として注目されている。IMNM をきたす疾患は多岐にわたり、免疫介在性のものが大半を占めると考えられている。その他、癌、膠原病、スタチンなどの薬剤も本疾患の誘発要因である。壊死性ミオパチーと関連する代表的な自己抗体も同定されている。IMNM の病態は他の筋炎と異なると推定されており、診断基準や治療法の見直しの観点からも病態解明が急務であった。上記のような筋炎の免疫学的・病理学的な差が明らかになるにつれ、確定診断に詳細な筋生検所見が必須となっているが、筋生検を確実にできる施設は少なく、診断困難な症例を増やしているともいえる。近年自己抗体の発見とその測定法の開発は著しいが、筋炎全体において自己抗体が陽性となる割合は未だ 30-50%である。従って、壊死性ミオパチーの診断の一助となり得るバイオマーカー、とりわけ遺伝子マーカーの開発のニーズは国内外で高いことから、本疾患の疾患関連遺伝子を網羅的かつ多角的に解析し、日本人健常者、臨床データとの比較解析により本疾患の遺伝学的特徴を明確にすることが急務と考えられた。一方、自己免疫疾患に深く関連するヒト白血球抗原(Human leukocyte Antigen; HLA)遺伝子が炎症性筋疾患に関連するという報告は、特に欧米から複数出ていたが、壊死性ミオパチーに関する HLA 解析の研究報告は著しく少なく、国内からの報告は皆無だった。壊死性ミオパチーと関連する真の HLA 多型は何か、という最終的な結論には至っていなかった。

### (2) 炎症性筋疾患の病型分類変遷

申請者らは、臨床データ、病理所見および抗体情報に基づき IMNM と診断された日本人の HLA 解析を進めていたが、炎症性筋疾患の中での遺伝学的差異を検討するためには、他の病型との比較が不可欠であった。一方、国内において HLA 遺伝子と多発筋炎 (PM)の関連を解析した研究は数少なく、*DRB1\*08:03* と関連があるとの報告が 1 報あるのみであった。しかし本報告の対象症例は病理検査を必須としていないため、IMNM が含まれている可能性は否定できない (J Rheumatol. 2004, 31:1768-1774)。病理学的に明確に炎症性筋疾患病型分類された症例において HLA 遺伝子解析を行い、IMNM との比較を行うこと、炎症性筋疾患の病型分類の新たな整備を行うことが急務であった。

## 2. 研究の目的

### (1) HLA 遺伝子多型解析による IMNM 関連アレルの同定

病理学的に IMNM と診断された患者の血液 DNA を用いて、*HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1* の多型に富むエクソンについての多型解析を行う。その後、申請者の研究室が保有する 460 例の日本人健常者との間の比較解析をアレルレベル、ハプロタイプレベルで実施し、各炎症性筋疾患関連 HLA 多型を同定する。さらに上記で得られたリスクアレルを有する症例に対し、HLA 遺伝子全領域 (プロモーター領域から 3' 側非翻訳領域まで)の多型解析を次世代シーケンシング(NGS)により実施し、真の関連多型を同定する。

### (2) HLA 遺伝子多型解析による炎症性筋疾患各病型関連アレルの同定

病理学的に炎症性筋疾患と診断された患者の血液 DNA を用いて、*HLA-DRB1* の多型に富む

キソンについての多型解析を行う。その後、日本人健常者との間の比較解析をアレルレベル、ハプロタイプレベルで実施し、各炎症性筋疾患関連 HLA 多型を同定する。さらに IMNM で得られた結果との比較を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) サンプルの収集

研究協力施設にて十分な説明後同意を得た患者のうち、臨床所見、自己抗体測定、病理学的検討において炎症性筋疾患と診断された者を対象とした。末梢血より一般的な方法にて抽出したゲノム DNA を用いた。日本人健常者群については申請者らが所有する 460 名の HLA タイピングデータをを用いた。

#### (2) SBT 法による HLA 遺伝子の多型解析

HLA6 座 (*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1*, *-DPB1*)を対象として SBT (sequence based typing)法により多型解析を行った。SBT 法にてアレルを特定できない場合は、PCR-SSOP (sequence specific oligonucleotide probe, Luminex®)法を用いた。

#### (3) 本疾患と関連する HLA ハプロタイプの推定

(2)で抽出したリスクアレルで形成するハプロタイプを、日本人に観察されるハプロタイプ頻度 (HLA Laboratory, [hla.or.jp/med/haplo\\_tools](http://hla.or.jp/med/haplo_tools))をもとに推定した。

#### (4) 健常者対照群との関連解析と危険因子及び抗体毎のサブ解析

検定法として<sup>2</sup>検定法および Fisher の直接法を用いて、各 HLA 座や HLA ハプロタイプにおける健常者対照群との関連解析を行った。さらに IMNM においては、スタチン内服群、悪性腫瘍合併群、膠原病合併群および抗 SRP 抗体陽性群、抗 HMGCR 抗体陽性群に分類し、それぞれサブ解析を行った。表現型と遺伝子型頻度における Odds ratios (OR)と 95% confidence intervals (CI)も算出した。

#### (5) 次世代シーケンシングによる超高解像度 DNA タイピング (SS-SBT)

上記にて同定したリスクアレルを有する検体について、申請者らが開発した超高解像度 DNA タイピング(SS-SBT)法を用い、HLA8 座(*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQA1*, *DQB1*, *-DPA1*, *-DPB1*)遺伝子のプロモーター領域から 3'側非翻訳領域までの遺伝子全領域における多型解析を行った。すなわち、それら HLA 座の遺伝子全領域を網羅する PCR を行い、Ion PGM システム (Life Technologies 社)の標準プロトコールに従って次世代シーケンシング用のライブラリーの作成、テンプレートの調整、シーケンシングランを行った。ラン後のアレル判定には、申請者らが開発したアレル判定プログラム SeaBass(特許番号：特願 2014-116217)を用い、既知の日本人アレル塩基配列と比較することにより遺伝子全領域における DNA タイピングを行った。

### 4. 研究成果

#### (1) IMNM における、HLA 多型解析による第一義的疾患関連 HLA アレルの同定

##### 16 歳以上 IMNM

IMNM 患者群 156 名(16 歳以上)の HLA6 座解析において、*A\*02:07*, *B\*46:01*, *C\*01:02*, *DRB1\*08:03*, *DRB1\*11:01*, *DQB1\*06:01*, *DPB1\*05:01* の出現頻度は日本人健常者群よりも

有意に多かった。さらに、IMNM のうち、スタチン内服とスタチン非内服、膠原病合併と合併無し、抗 SRP 抗体陽性と陰性、抗 HMGCR 抗体陽性と陰性を比較解析した結果、以下の結果を得た。

### 【16 歳以上 IMNM の HLA リスクアレル】

HLA アレル	アレル数(%)		患者と健常者との比較		P	オッズ比
	患者	健常者	P	オッズ比		
<i>DRB1*08:03</i>	10/32 (31)	42/280 (15)			$4.1 \times 10^{-2}$	2.6
<i>A*02:07</i>	18/312 (6)	23/920 (3)			$9.4 \times 10^{-3}$	2.4
<i>B*46:01</i>	26/312 (8)	46/920 (5)			$3.6 \times 10^{-2}$	1.7
<i>C*01:02</i>	72/312 (23)	141/920 (15)			$2.4 \times 10^{-3}$	1.7
<i>DRB1*08:03</i>	52/312 (17)	71/920 (8)			$1.6 \times 10^{-5}$	2.4
<i>DRB1*11:01</i>	15/312 (5)	23/920 (3)			$5.6 \times 10^{-2}$	2.0
<i>DQB1*06:01</i>	86/312 (28)	43/228 (19)			$1.9 \times 10^{-2}$	1.6
<i>DPB1*05:01</i>	151/312 (48)	77/228 (34)			$7.9 \times 10^{-4}$	1.8
サブタイプアレル数(%)						
		スタチン内服 (n=32)	スタチン非内服 (n=280)			
<i>DRB1*08:03</i>		10/32 (31)	42/280 (15)		$4.1 \times 10^{-2}$	2.6
		膠原病合併 (n=42)	膠原病合併無し (n=270)			
<i>C*03:04</i>		13/42 (31)	37/270 (14)		$2.9 \times 10^{-3}$	3.4
<i>C*08:03</i>		4/42 (10)	2/270 (1)		$3.5 \times 10^{-3}$	13.9
		抗SRP抗体陽性 (n=124)	抗SRP抗体陰性 (n=188)			
<i>B*52:01</i>		23/124 (19)	17/188 (9)		$1.6 \times 10^{-2}$	2.3
<i>C*12:02</i>		24/124 (19)	18/188 (10)		$1.7 \times 10^{-2}$	2.3
<i>DRB1*12:01</i>		6/124 (5)	1/188 (1)		$1.7 \times 10^{-2}$	9.4
<i>DRB1*15:02</i>		21/124 (17)	15/188 (8)		$1.9 \times 10^{-2}$	2.3
		抗HMGCR抗体陽性 (n=76)	抗HMGCR抗体陰性 (n=236)			
<i>DRB1*13:02</i>		7/76 (9)	5/236 (2)		$1.1 \times 10^{-2}$	4.7
<i>DQB1*06:04</i>		6/76 (8)	4/236 (2)		$1.6 \times 10^{-2}$	4.9

IMNM リスクアレルのうち、*DRB1\*11:01* を除く HLA6 座はハプロタイプを形成する。本ハプロタイプ(*HLA-A\*02:07-B\*01:01-C\*01:02-DRB1\*08:03-DQB1\*06:01-DPB1\*05:01*)を有していた 8 例の遺伝子全長配列を決定したところ、特に IMNM に関連する多型は認めなかった。さらに、以下の方法を用いて、リスクアレルのうちいずれが真のリスクなのかを検討した。すなわち、オッズ比の高い *A\*02:07* と *DRB1\*08:03* を持つ症例、片方を持つ症例、いずれも持たない症例の数を患者群と健常者で比較したところ、*A\*08:03* がより強いリスクを有すると推定された。

### 【*A\*02:07*、*DRB1\*08:03* を有する人数の比較】

disease-associated allele		患者全体 (n=156)	健常者 (n=460)	P	オッズ比
<i>A*02:07</i>	<i>DRB1*08:03</i>				
(+)	(+)	13/156 (8%)	14/460 (3%)	0.011	2.9
(+)	(-)	5/156 (3%)	9/460 (2%)	0.36	1.7
(-)	(+)	34/156 (22%)	55/460 (12%)	0.036	2.0
(-)	(-)	104/156 (67%)	382/460 (83%)	0.000085	0.4

### 小児 IMNM

抗 HMGCR 抗体陽性の日本人小児 IMNM では、*HLA-C\*03:04* と強い関連が観察された (対日本人健常者: OR 6.8,  $p < 0.0005$ 、成人患者: OR 5.2,  $p < 0.005$ )。したがって、IMNM は特定の HLA 多型と関連することが強く示唆された。また、抗 HMGCR 抗体陽性の小児型は成人型と異なるリスクアレルを有することから病態機序に何らかの相違があると考えられた。一方、抗 SRP 抗体陽性の日本人小児 IMNM では、有意なリスクアレルは認めなかった。

6 歳のタイ人の抗 HMGCR 抗体陽性 IMNM 患者について HLA 解析を行い、リスクアレルである *DRB1\*11:01* を認めず、*DRB1\*15:01* をホモ接合体で有することを報告した (Concurrent positive anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase antibody with reducing body myopathy: Possible double trouble. Tanboon J, Ohnuki Y, Nishino I, et al. Neuromus Dis. 29: 543-548, 2019)。

これら IMNM の HLA 解析を継続した実績から、2016 年度「免疫性筋疾患と HLA」(Annual

Review 神経 2017. 中外医学社)、2017 年度「免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM) と HLA 多型」(大貫優子、鈴木重明、椎名隆他. 日本組織適合性学会誌. 24 巻 1 号:46-53、2017)、“Inflammatory myopathies and human leukocyte antigen” (Ohnuki Y, Suzuki S, Shiina T. Clinical and Experimental Neuroimmunology. 8: 313-317, 2017) を上梓した。

## (2) 炎症性筋疾患の HLA 多型解析

### 抗合成酵素症候群 (ASS)

抗アミノアシル tRNA 合成酵素 (aminoacyltransfer RNA synthetase; ARS) 抗体陽性で、筋炎、間質性肺炎、関節炎を高率に合併する抗合成酵素症候群 (antisynthetase syndrome; ASS) 51 例 (日本人) の HLA-DRB1 を解析し、患者群に有意に多い HLA アレルはないことを報告した (Skeletal Muscle Involvement in Antisynthetase Syndrome. Noguchi E, Ohnuki Y, Suzuki S, et al. JAMA Neurology. 74: 992-999, 2017)。これまで日本人 PM 120 例の解析にて、DRB1\*08:03 が PM に有意に多いことが報告されている (J Rheumatol. 2014, 31: 1768-1774) が、申請者らの研究によって、IMNM と ASS は明らかに違う遺伝学的背景を持つこと、これまでの研究では、PM とされていた中に IMNM が多く含まれていた可能性があることを示唆した。

### 免疫関連副作用筋炎

免疫チェックポイント阻害薬の有害事象として筋炎の発生が報告されているが、申請者らは免疫関連副作用筋炎日本人患者 15 例の HLA 遺伝子を NGS にて網羅的に解析し、C\*12:02 が患者群において有意に多いことを報告した (Inflammatory myopathy associated with PD-1 inhibitors. Seki M, Ohnuki Y, Suzuki S. et al. J Autoimmun. 100: 105-113, 2019)。

### 封入体筋炎

封入体筋炎 (IBM) 83 例の HLA 解析を行い、DRB1\*01:01、DRB1\*04:10、DRB1\*15:02 が日本人健常者に比し患者群で有意に多いこと、DRB1\*08:03、DRB1\*09:01 が有意に少ないことを示し、共同演者として国内学会発表を行った (第 31 回日本神経免疫学会学術集会、大山ら、2019 年 9 月、千葉)。DRB1\*09:01 は日本人で最も頻度の高いアレルであることから、他国に比べて日本人に同疾患が少ないことの一因である可能性を示唆した。また、DRB1\*08:03 は IMNM のリスクアレルであることを申請者らが報告しているが、IBM においてはプロテクティブアレルとなることを証明し、2 病型に全く異なる遺伝学的背景があることを示唆した。現在英文誌投稿中である。

#### 【IBM のリスクアレル】

HLAアレル	アレル数 (%)		P	オッズ比
	患者全体 (n=166)	健常者 (n=920)		
DRB1*01:01	28/166 (17)	58/920 (6)	$2.7 \times 10^{-5}$	3.0
DRB1*04:10	14/166 (8)	14/920 (2)	$1.3 \times 10^{-5}$	5.9
DRB1*15:02	40/166 (24)	114/920 (12)	$1.3 \times 10^{-5}$	5.9

#### 【IBM のプロテクティブアレル】

HLAアレル	アレル数 (%)		P	オッズ比
	患者全体 (n=166)	健常者 (n=920)		
DRB1*04:06	0/166 (0)	33/920 (4)	$5.9 \times 10^{-3}$	0
DRB1*08:03	3/166 (2)	71/920 (8)	$3.8 \times 10^{-3}$	0.2
DRB1*09:01	1/166 (1)	128/920 (14)	$5.4 \times 10^{-9}$	0.04
DRB1*12:01	0/166 (0)	32/920 (3)	$9.9 \times 10^{-3}$	0

以上のごとく、日本人 IMNM 患者の HLA 領域を詳細に解析し、日本人患者特有のリスクアレルを抽出するとともに、炎症性筋疾患患者の HLA DNA タイピングを進め、それぞれの遺伝学的特徴の一部を解明した。これらの結果は、現在臨床所見、特異的抗体、病理学的検討が急速に進み、診断治療のパラダイムシフトに立つ炎症性筋疾患の領域において、新たな知見を付与するものとなったと確信する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Seki M., Uruha A., Ohnuki Y., Kamada S., Noda T., Onda A., Ohira M., Isami A., Hiramatsu S., Hibino M., Nakane S., Noda S., Yutani S., Hanazono A., Yaguchi H., Takao M., Shiina T., Katsuno M., Nakahara J., Matsubara S., Nishino I., Suzuki S.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Inflammatory myopathy associated with PD-1 inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Noguchi A, Uruha A, Suzuki S, Hamanaka K, Ohnuki Y, Tsugawa J, Watanabe Y, Nakahara J, Shiina T, Suzuki N, Nishino I	4. 巻 74
2. 論文標題 Skeletal Muscle Involvement in Antisynthetase Syndrome.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 JAMA Neurology	6. 最初と最後の頁 992-999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamaneurol.2017.0934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohnuki Y, Suzuki S, Shiina T	4. 巻 8
2. 論文標題 Inflammatory myopathies and human leukocyte antigen	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 313-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 大貫優子、鈴木重明、重成敦子、鈴木進悟、鈴木則宏、西野一三、椎名隆	4. 巻 24
2. 論文標題 免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM)とHLA多型	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本組織適合性学会誌	6. 最初と最後の頁 46-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12667/mhc.24.46	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大貫優子、重成敦子、椎名隆
2. 発表標題 免疫介在性壊死性ミオパチー（IMNM）とHLA-DRB1多型との関連解析
3. 学会等名 第2回関東HLA研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大貫優子、鈴木重明、漆葉章典、重成敦子、鈴木 進悟、西野一三、椎名 隆
2. 発表標題 封入体筋炎とHLA-DRB1多型との関連解析
3. 学会等名 第27回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大貫優子、鈴木重明、渡邊由里香、漆葉章典、重成敦子、鈴木進悟、鈴木則宏、西野一三、椎名隆
2. 発表標題 免疫介在性壊死性ミオパチー（IMNM）とHLA多型との関連解析
3. 学会等名 第26回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 重明  (SUZUKI Shigeaki)  (50276242)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授    (32612)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	西野 一三  (NISHINO Ichizo)  (00332388)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研 究所 疾病研究第一部・部長    (82611)	
研究 協 力 者	椎名 隆  (SHIINA Takashi)  (00317744)		