

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09985

研究課題名(和文)皮膚筋炎の新たな標的臓器である筋膜組織における網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文)Transcriptome analysis for the fascia as a target organ in dermatomyositis

研究代表者

吉田 健 (Yoshida, Ken)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20398796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、過去の研究により皮膚筋炎における炎症は筋膜から始まり徐々に骨格筋に進展する傾向があることをMRIと筋膜を含む筋生検によって示した。本研究は、多発性筋炎と比較して皮膚筋炎の筋膜に発現している遺伝子を網羅的に解析し、皮膚筋炎の病態に関連する発現遺伝子を明らかにすることを目的とした。生検組織を筋膜と骨格筋に分け、それぞれの組織からRNAを抽出し、RNAシーケンスを行った。骨格筋では皮膚筋炎群と多発性筋炎群の2群間で有意差のある発現遺伝子は検出されなかったが、皮膚筋炎群の筋膜ではいくつかのケモカインや転写因子など有意に高発現している多くの遺伝子が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚筋炎の治療は、現在においてもステロイド薬と免疫抑制薬が中心であり、これらの薬剤を投与しても再発例や難治例が多く、病態解明が急務である。また、長期薬剤投与による副作用も問題となる。本研究結果から通常筋膜炎を伴わない多発性筋炎由来筋膜組織と比較して皮膚筋炎由来筋膜組織において、有意に高発現している多くの遺伝子が検出された。今後、これら病態候補遺伝子の発現部位や発現細胞種など更なる研究により皮膚筋炎の病態解明が進めば、それらの病態関連因子を標的とした新たな治療開発につながる可能性があり、意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies showed by en bloc biopsy combined with MRI that inflammatory cell infiltration progressed from the fascia into the muscle in patients with dermatomyositis (DM). We aimed to investigate more highly expressed genes in the fascia of patients with DM compared with polymyositis (PM). Frozen sections from biopsied tissues were divided into the fascia and muscle, and total RNA was extracted from each tissue. The total RNA obtained from each tissue was analyzed by RNA sequencing. No significant difference found in expressed genes in the muscle between patients with DM and PM. We found that the levels of expressed genes including chemokines and transcription factors were significantly higher in the fascia of patients with DM compared with PM.

研究分野：炎症性筋疾患

キーワード：皮膚筋炎 多発性筋炎 筋膜

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

炎症性筋疾患である皮膚筋炎(DM)や多発性筋炎(PM)は、主に骨格筋や皮膚に慢性炎症をきたす原因不明の自己免疫性炎症性疾患である。ほとんどの症例はステロイド薬の長期投与を余儀なくされ、再発を繰り返す難治例も少なくないため病態の解明が急務となっている。申請者は、過去の研究によってDMでは炎症細胞浸潤が筋膜から始まり、徐々に骨格筋に進展することを示した。炎症性筋疾患では骨格筋が病態解析対象臓器となることが一般的であり、筋膜はその対象臓器とされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、DMの筋膜に発現している遺伝子を網羅的に解析し、通常筋膜炎を伴わないPMの筋膜と比較してDMの病態に関連する発現遺伝子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 筋・筋膜組織の採取

本研究に同意をされたPM/DM患者において、確定診断のために行った筋膜を含む筋生検で得られた生検組織の一部を用い解析した。得られた組織をOCTコンパウンドに包埋し、液体窒素で凍結させて -80°C で保存した。

(2) 組織の切り出しとtotal RANの抽出

受託業者が凍結ブロックからHE染色標本を作製し、その標本の顕微鏡画像をもとに申請者が切り出し部分を指示した。そして、受託業者がその指示に従って筋膜層と筋層とを別々に切り出してtotal RANを抽出した。

(3) RNA-seqライブラリー作製とシーケンス

生検組織から抽出されたtotal RANのクオリティーチェックを行った後にRNA-seqライブラリーを作製し、当施設に装備してある次世代シーケンサー(Ion Proton System)によりRNAシーケンスを行った。そして、PMの筋膜と比較してDMの筋膜において統計学的に有意に高発現している遺伝子を解析した。

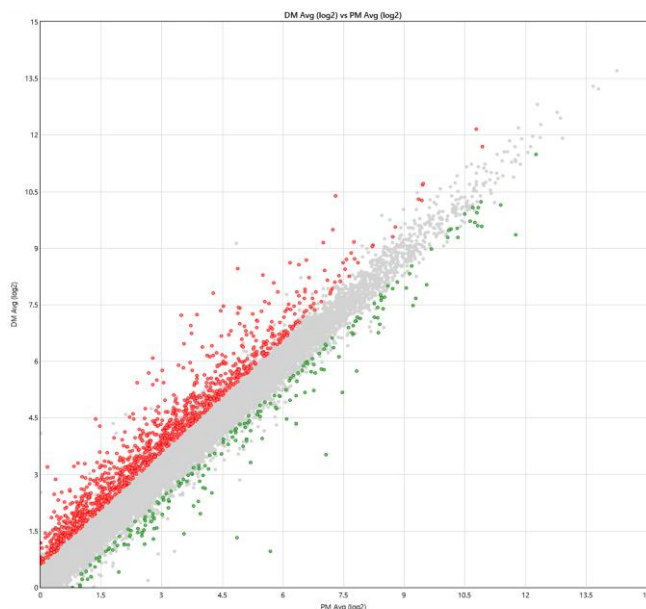
4. 研究成果

(1) 組織RNAのクオリティーチェック

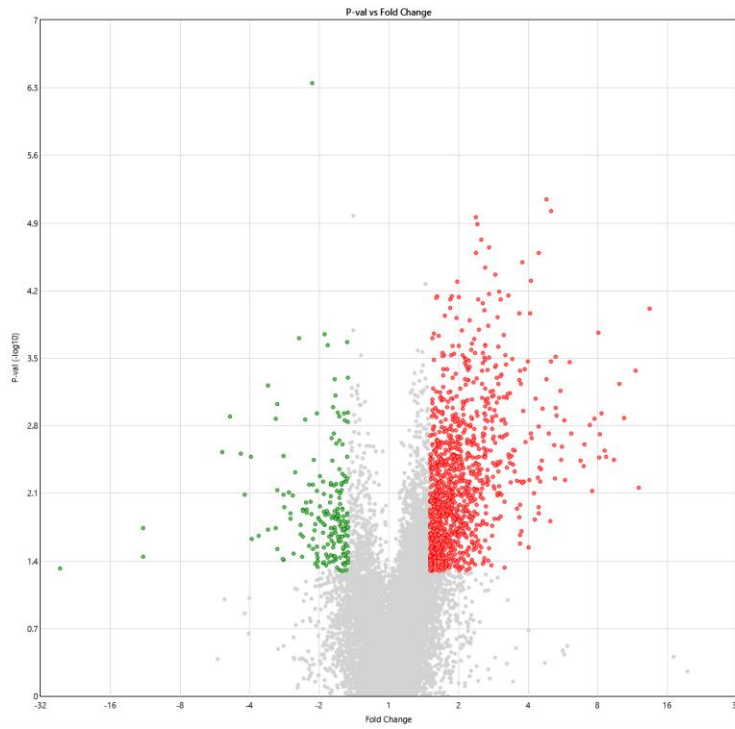
筋膜と骨格筋からそれぞれ抽出したtotal RANをバイオアナライザーにてクオリティーチェックを行った。LIN値は概ね7~9台と良質のRNAであることが確認できた。

(2) RNAシーケンスと発現解析

DM患者10症例(抗ARS抗体5例、抗Mi2抗体2例、抗TIF1 γ 2例、抗MDA5抗体1例)とPM患者6症例(組織学的分類:PM1例、免疫介在性壊死性ミオパチー2例、非特異的筋炎3例)において骨格筋と筋膜のRNAシーケンスを行った。骨格筋におけるRNAシーケンス解析結果では、PMと比較してDMで統計学的に有意差のある発現遺伝子は検出できなかったが、筋膜においてはDMで有意に高発現している遺伝子が検出された。PM群と比較してDM群の筋膜においてFDR P-value <0.1 でfold change >2 の条件を満たす発現遺伝子は約80種類検出された。DM群の筋膜において上昇していた発現遺伝子の詳細は論文発表前であるため割愛させていただく。



上の図はDM群とPM群の筋膜における遺伝子の発現量を比較したScatter Plotである。赤いプロットはDMの筋膜で発現が上昇している遺伝子、緑のプロットはPMの筋膜で発現が減少している遺伝子を表している。灰色のプロットは、DMとPMでの発現変動が1.5倍以下のために、解析から除外された遺伝子である。



左の図はDM群とPM群の筋膜における遺伝子の発現量を比較したVolcano Plotである。Scatter Plotと同様に赤いプロットはDMで緑のプロットはPMを示す。X軸はFold Changeで、1を中心として右側に行けば行くほど大きくなる。Y軸はp値(-log10)を表しており、上に行けば行くほどp値が小さくなる。

今後はDM患者由来筋膜において、Fold Changeが上位の発現遺伝子の局在と発現細胞種を免疫染色やin situハイブリダイゼーション等で確認予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------