

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：23302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07494

研究課題名(和文)重症筋無力症の病態における免疫チェックポイント分子の関与と新たな治療薬への応用

研究課題名(英文)The effect of Immune checkpoints in myasthenia gravis and application of its to new therapeutic medications

研究代表者

岩佐 和夫 (Iwasa, Kazuo)

石川県立看護大学・看護学部・教授

研究者番号：10345613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：重症筋無力症(MG)の病態におけるPD-L1の関与を明らかにした。MG骨格筋においてはPD-L1の発現が亢進しており、mRNAレベルにおいても発現亢進が示された。PD-L1の発現と臨床症状との関連について一般化加法モデルにおいて解析したところ、PD-L1の発現が不十分であった場合MGの症状が重症化することが示された。つまり、MG骨格筋におけるPD-L1の発現がMGの病態に関わることを明らかとなった。さらに、血清中の可溶性PD-L1の測定を行ったところ、この濃度が高い症例ほどMG症状の改善が期待できる可能性が示された。これらの結果は、PD-L1を利用した新たな治療薬の可能性を示したと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント分子(PD-L1)は免疫機能を調整する重要な因子であるが、重症筋無力症(MG)の病態における関与は明らかでなかった。今回、MGの骨格筋におけるPD-L1の発現がMGの病態に関与するのみでなく、血液中の可溶性PD-L1も病態に関与することが明らかとなった。このことは、PD-L1を利用したMGの新たな治療薬の可能性が示されたと考えられることができる。

研究成果の概要(英文)：We clarified that the muscle expression of PD-L1 was involved in the pathogenesis of myasthenia gravis (MG).

The association between PD-L1 expression and clinical parameter was analyzed in a generalized additive model. It showed that MG symptoms were more severe when PD-L1 expression was inadequate. Consequently, we concluded that PD-L1 expression of MG muscle may be important factor for the pathogenesis of MG. In addition, we focused on the concentration of soluble PD-L1 (sPD-L1) in serum of MG and indicated that MG symptoms may be improved in cases with higher sPD-L1 concentrations. These results were suggested that PD-L1 may have the possibility of a new therapeutic agent in the future.

研究分野：神経免疫学

キーワード：重症筋無力症 骨格筋 免疫チェックポイント分子 PD-L1

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症(MG)は、神経筋接合部の骨格筋側に発現する機能的蛋白(アセチルコリン受容体(AChR)、筋特異性受容体型チロシンキナーゼ、LDL受容体関連蛋白4)を標的とする自己抗体が産生され、この自己抗体により神経筋接合部が破壊または機能不全となることで易疲労性などの臨床症状を呈する自己免疫疾患である。2018年の全国臨床疫学調査によると日本国内に約2万9千人のMG患者がいると推定される。MGの免疫機序に関する研究では、胸腺を中心とした免疫寛容システムの異常や自己抗体産生における機序が明らかにされ、免疫システムに関わる因子の重要性が報告されてきた。

一方で、MGでは抗AChR抗体価と臨床重症度との乖離は臨床の現場で経験されることであり、抗AChR抗体価と臨床症状との乖離に関する報告もある。つまり、「MGでは抗AChR抗体だけでは説明できない病態があり、抗AChR抗体以外の因子がMGの発症や病態に関与している」と推定される。我々は、この仮説に基づきMGで発現する抗AChR抗体以外の自己抗体の探索、サイトカインと病態の関係、MG骨格筋において発現が亢進する分子について研究を行ってきた。しかし、この想定した本質的な因子については解明できていない。

骨格筋は、これまで運動器官としての機能以外は重要視されることがなく骨格筋が免疫反応を制御する臓器の一つであることについては注目されることがなかった。しかし、骨格筋における様々な因子の発現に注目が集まってきており、特に免疫制御因子発現に注目した研究においては、CD40の発現、B7-H3の発現などがあり、筋炎など病的な状態に陥った骨格筋において免疫に関連する因子の発現が報告されている。

骨格筋における免疫制御因子の発現の先行研究および我々のMG骨格筋における研究結果から、我々はMG骨格筋において免疫チェックポイント分子; Programmed death-1 ligand 1(PD-L1)が発現しMGの病態に関与している可能性を考えた。さらに、近年、悪性腫瘍における免疫チェックポイント分子阻害薬による治療によりMGを発症することが報告され、MGと免疫チェックポイント分子には関連がある可能性が高まっている。

本研究において、MGの病態における免疫チェックポイント分子の関与が明らかにされることで、免疫チェックポイント分子を利用したMGの新たな治療法の開発の可能性を提示することができると考えた。

2. 研究の目的

MGの病態における免疫チェックポイント分子の関与について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋におけるPD-L1の発現

MG、炎症性筋疾患、非筋原性疾患の患者から採取した骨格筋を使用し、PD-L1に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色やqRT-PCRにおけるmRNAの相対的定量化にて骨格筋におけるPD-L1の発現状態を評価した。

(2) 骨格筋におけるPD-L1の発現と臨床症状との関連の評価

骨格筋におけるPD-L1発現とMGの病状や治療反応性との関連を一般化加法モデルにて評価した。

(3) MG血清中の可溶性PD-L1(sPD-L1)測定

MG患者21例、正常者22例の血清を使用しsPD-L1濃度をELISAにて測定した。

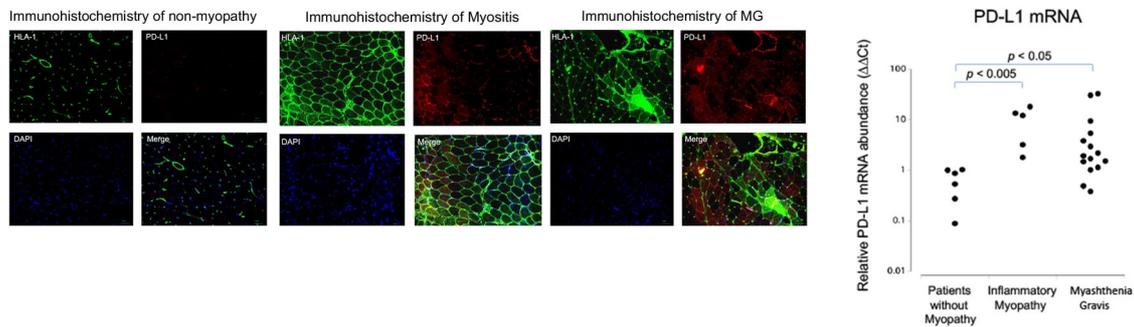
(4) sPD-L1とMG病態との関連

MG患者の血清中のsPD-L1濃度とMG臨床重症度(MGFA分類、QMGスコア、MG-ADLスコア)、抗AChR抗体価との関連について解析した。

4. 研究成果

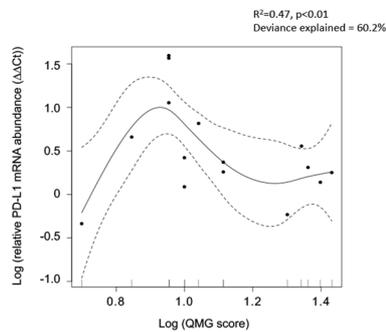
(1) 骨格筋におけるPD-L1の発現

MG、筋炎、非筋原性疾患の骨格筋を用いてPD-L1および2-microglobulin(2-mg)の発現状況を免疫組織染色およびqRT-PCRを用いて確認した。免疫組織染色では、MGおよび筋炎骨格筋において、これらの蛋白の発現が亢進していた。また、MG及び筋炎の骨格筋では両蛋白のmRNA発現が亢進していることが確認された。



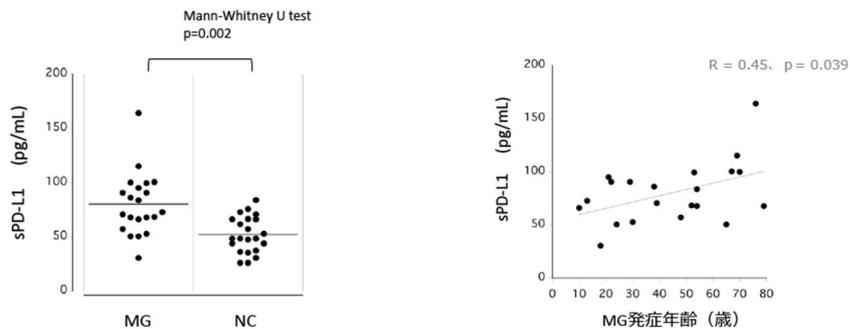
(2) 骨格筋における PD-L1 の発現と臨床症状との関連の評価

一般化加法モデルにおける解析では、PD-L1の発現量とQMGスコアの間には一峰性の関連があることが示された。つまり、MG症状の軽い時点ではPD-L1の発現は弱く、中等度の症状でPD-L1の発現がピークとなり、重症例ではPD-L1の発現は低値を示した。このことは、症状に応じPD-L1の発現が誘導されるが、PD-L1の発現が不十分であった場合、MGの症状が重症化することを示しており、MG骨格筋におけるPD-L1の発現がMGの病態に関わることを明らかにしたものであった。



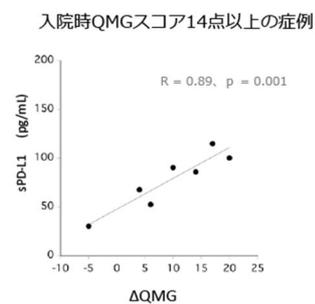
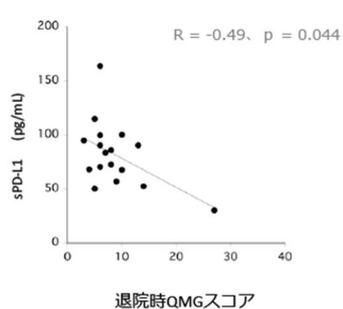
(3) MG 血清中の可溶性 PD-L1 (sPD-L1) 測定

MGにおける血清中の可溶性PD-L1 (sPD-L1) の測定を行った。MG患者のsPD-L1の平均濃度は79.9 pg/mL、正常対象のsPD-L1の平均濃度は51.9 pg/mLであり、MG患者にて有意に高値を示した (p=0.002)。またsPD-L1濃度は発症年齢と正相関を認めた。



(4) sPD-L1 と MG 病態との関連

MG患者におけるsPD-L1値は、退院時QMGスコアと負の相関を示した (R = -0.49、p = 0.044)。一方、MGFA分類、入院時QMGスコア、MG-ADLスケール、抗アセチルコリン受容体抗体価との関連はみられなかった。入院時のQMGスコアが14以上の症例について入院時と退院時のQMGの差 (QMG) とsPD-L1値と関連を検討したところ、これらに強い正の相関が認められた (R = 0.89、p = 0.001)。



5. 考察

MG骨格筋におけるPD-L1の発現および血清中のsPD-L1がMGの病態に関わることが明らかとなった。さらに、血清中のsPD-L1濃度が高い症例ほどMG症状の改善が期待できる可能性が示された。

PD-L1は免疫機能を調整する重要な因子であるが、MGの病態における関与は明らかでなかった。我々の研究によりMGの骨格筋におけるPD-L1の発現がMGの病態に関与するのみでなく、血液中のsPD-L1も病態に関与することが明らかとなった。このことは、PD-L1を利用したMGの新たな治療法の開発に結びつく可能性が示されたと考えることができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwasa K, Yoshikawa H, Furukawa Y, Yamada M	4. 巻 325
2. 論文標題 Programmed cell death ligand 1 expression is upregulated in the skeletal muscle of patients with myasthenia gravis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 74-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneuroim.2018.09.012. Epub 2018 Sep 27.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩佐和夫、吉川弘明、山田正仁
2. 発表標題 重症筋無力症患者血清中における可溶性PD-L1濃度
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩佐和夫、吉川弘明、古川裕、山田正仁
2. 発表標題 重症筋無力症の初期治療における症状改善度は可溶性PD-L1濃度と関連する
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩佐和夫、吉川弘明、山田正仁
2. 発表標題 重症筋無力症患者血清中における可溶性PD-L1濃度
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuo Iwasa, Hiroaki Yoshikawa, Yutaka Furukawa, Masahito Yamada
2. 発表標題 Upregulation of programmed cell death ligand 1 expression in the skeletal muscle of patients with myasthenia gravis
3. 学会等名 XXIV World Congress of Neurology (WCN 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩佐和夫、吉川弘明、古川裕、山田正仁
2. 発表標題 重症筋無力症骨格筋におけるProgrammed cell death ligand 1の発現について
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩佐和夫、吉川弘明、古川裕、山田正仁
2. 発表標題 重症筋無力症骨格筋に発現したPD-L1 mRNAと臨床重症度との関連
3. 学会等名 第30回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Putting The Brakes On Myasthenia Gravis https://www.asianscientist.com/2018/12/in-the-lab/immune-checkpoint-myasthenia-gravis/ Medical research news https://medicalxpress.com/news/2018-11-immune-checkpoints-key-autoimmune-disease.html Science News https://www.sciencedaily.com/releases/2018/11/181130094325.htm Latest Research News https://www.kanazawa-u.ac.jp/latest-research/62719/ Putting The Brakes On Myasthenia Gravis https://www.asianscientist.com/2018/12/in-the-lab/immune-checkpoint-myasthenia-gravis/ Medical research news https://medicalxpress.com/news/2018-11-immune-checkpoints-key-autoimmune-disease.html Science News https://www.sciencedaily.com/releases/2018/11/181130094325.htm

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
---------	---------