

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08263

研究課題名(和文)皮膚筋炎特異的自己抗原誘導モデルマウスの確立と免疫機構解析

研究課題名(英文) Establishment of murine models of myositis depending on autoimmunity to dermatomyositis-specific antigens

研究代表者

沖山 奈緒子 (Okiyama, Naoko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10581308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚筋炎患者に特異的に検出される自己抗体のうち、抗transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) 抗体陽性例のモデル動物として、TIF1 遺伝子組み換え蛋白を免疫することで新規の実験的筋炎モデルマウスを確立した。また、この筋炎が細胞傷害性T細胞によって惹起されていることやI型インターフェロンが病態に關与していることを証明した。つまり、患者より検出される自己抗体は疾患特異的ではあるが、病態は抗体ではなくT細胞免疫によって形成されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗TIF1 抗体陽性の皮膚筋炎患者は、小児であれば筋力低下が顕著であること、成人であれば内臓悪性腫瘍を合併していることが知られていますが、現状の治療としては、非特異的免疫抑制療法しか存在しません。本研究で確立したモデルマウスは、患者の体内で起こっている自己免疫機構を忠実に模しており、より効果的で、かつ悪性腫瘍治療の邪魔をしない、筋炎治療法の開発に貢献することが期待されます。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether autoimmunity to TIF1, a ubiquitous nuclear autoantigen for myositis-specific autoantibodies detected in patients with dermatomyositis (DM) is pathogenetic for inflammatory myopathy. Immunization with TIF1-induced experimental myositis successfully in wild-type mice. The incidence and severity of myositis were significantly lower in 2-microglobulin-null or CD8-depleted mice, while Igμ-null mice developed myositis normally. Adoptive transfer of CD8+ T cells induced myositis in recipients, while transfer of CD4+ T cells or IgG did not. Treatment with tofacitinib inhibited TIF1-induced myositis. Here we show that TIF1 is immunogenic enough to cause experimental myositis, in which CD8+ T cells and type I interferons, but not CD4+ T cells, B cells or antibodies, are required. This murine model would be a tool for understanding the pathologies of DM.

研究分野：皮膚科

キーワード：自己免疫疾患 炎症性筋疾患 疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎(PM)や皮膚筋炎(DM)は、炎症性筋疾患に含まれ、筋炎と間質性肺炎、DMではさらに皮膚炎を呈する膠原病の一つである。近年、抗 transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) 抗体、抗 melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)抗体、抗 Mi2 抗体などの筋炎特異的的自己抗体が種々同定され、それぞれの特徴的な臨床像が分析されてきている。同定された自己抗原は、臓器非特異的に細胞内にユビキタスに発現している蛋白である。これらの自己抗体自身が病原性であるのか、またこの自己抗体を産生する自己免疫機構は病態に關与するのかなどは明らかになっていない。

2. 研究の目的

背景を踏まえ、これらの抗原に対する自己免疫機構を基盤とした新規モデルマウスを開発し、その病態解析を行うことで、DMの成立条件を同定し、新規治療法開発の基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子組換え手法を用いて His-tag 標識ヒト TIF1 蛋白の全長遺伝子配列を作成し、バキュロウイルス - 昆虫系にて蛋白を産生、Ni-NTA アフィニティーカラムにて精製した。これらの蛋白をアジュバントと共にマウスへ複数回免疫する。さらに、 $\alpha 2$ ミクログロブリン欠損マウス、パーフォリン欠損マウス、Ig μ 欠損マウス、I型インターフェロン受容体欠損マウスといった遺伝子改変マウスへも免疫する。また、免疫マウスのリンパ節 T 細胞、もしくは血中 IgG を精製し、レシピエントマウスへ養子移入する。これらのマウスの筋炎発症を、大腿筋病理解析にて評価する。

4. 研究成果

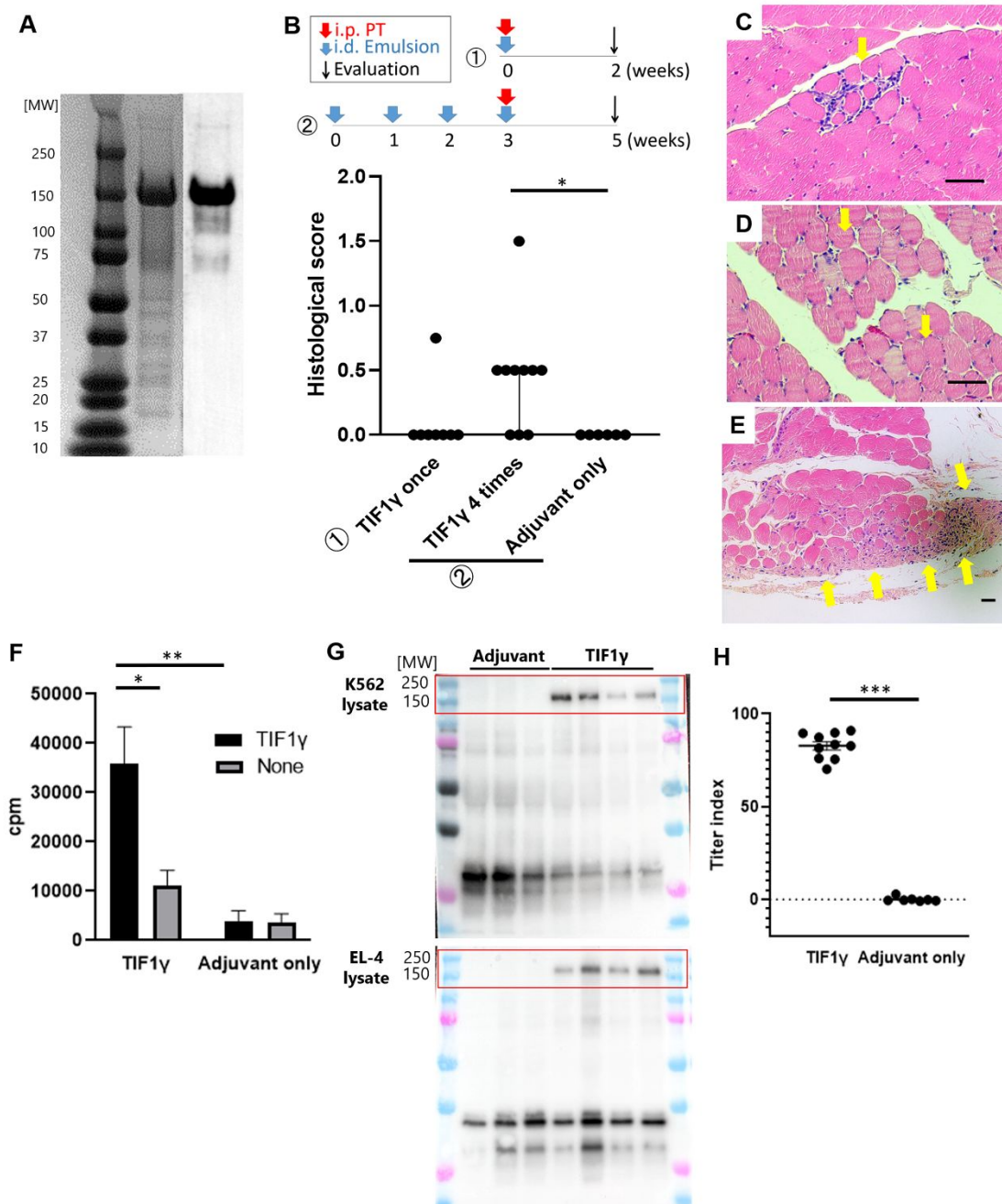
ヒト TIF1 全長蛋白免疫にて、B6 マウス大腿筋へ実験的筋炎を誘導できた。その際、TIF1 特異的 T 細胞、ヒトもしくはマウス TIF1 特異的抗体も誘導できていた。(次ページ図 1)

この TIF1 誘導性筋炎は、MHC クラス I 欠損マウス ($\alpha 2$ ミクログロブリン欠損マウス)には惹起出来ず、パーフォリン欠損マウスでも減弱し、B 細胞欠損マウスでは野生型マウスと同様に発症が認められた。養子移入系では、免疫マウスのリンパ節から回収した CD8 T 細胞移入で筋炎を起こせる一方、リンパ節 CD4 T 細胞移入、もしくは血清 IgG 移入では起こせない。これらのことから、この筋炎は CD8 T 細胞が病原性細胞と考えられる。このことは、ヒト DM の筋病理組織像解析では CD4 T 細胞や抗体が病原性であると示唆されてきたこととは一致せず、CD8 T 細胞は筋炎成立の初期に主に作用すると考えられた。

また、I型インターフェロン受容体欠損マウスでは筋炎発症が抑制された。さらに、TIF1 誘導性筋炎は JAK 阻害薬トファシチニブで用量依存的に、部分的に治療可能であった。トファシチニブ治療の際、TIF1 特異的 T 細胞、もしくは TIF1 特異的抗体の産生は障害されておらず、I型インターフェロン含む抗サイトカイン療法は、自己免疫成立以外の病態を標的としていると考えられた。

これらの研究成果を、Ann Rheum Dis 誌 (2021 Apr 2;annrheumdis-2020-218661. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-218661) へ論文発表した。

図 1 TIF1 誘導性筋炎



A ヒト TIF1 全長リコンビナント蛋白 (SDS-PAGE 図、ウェスタンブロット図)

B TIF1 免疫プロトコールと大腿筋筋炎スコア

C E TIF1 誘導性筋炎大腿筋病理組織像 (HE 染色)

F TIF1 特異的 T 細胞誘導: TIF1 誘導性筋炎マウスリンパ節 T 細胞の抗原刺激細胞増殖反応 (サイミジンアップテイク)

G TIF1 特異的抗体誘導: TIF1 誘導性筋炎マウス血漿による免疫沈降法 (ヒトもしくはマウスセルラインライゼート使用)

H TIF1 特異的抗体誘導: TIF1 誘導性筋炎マウス血漿による TIF1 リコンビナント蛋白を用いた ELISA 法

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 16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 Okiyama N., Inoue S., Saito A., Nakamura Y., Ishitsuka Y., Fujisawa Y., Watanabe R., Fujimoto M.	4. 巻 180
2. 論文標題 Antihelix/helix violaceous macules in Japanese patients with anti melanoma differentiation associated protein 5 (MDA5) antibody associated dermatomyositis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1226 ~ 1227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjd.17431	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 -
1. 著者名 Nakamura Naoko, Izumi Rumiko, Hoshi Yosuke, Takai Yoshiki, Ono Risako, Suzuki Naoki, Nagai Taichi, Ishii Yusho, Ishii Tomonori, Harigae Hideo, Okada Shuko, Aiba Setsuya, Okiyama Naoko, Fujimoto Manabu, Kuroda Hiroshi, Tateyama Maki, Aoki Masashi	4. 巻 58
2. 論文標題 FDG-PET detects extensive calcinosis cutis in anti-NXP2 antibody-positive dermatomyositis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1888 ~ 1888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/kez083	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 -
1. 著者名 Inoue M., Tanboon J., Okubo M., Theerawat K., Saito Y., Ogasawara M., Indrawati L. A., Uruha A., Okiyama N., Fujimoto M., Suzuki S., Nishino I.	4. 巻 45
2. 論文標題 Absence of sarcoplasmic myxovirus resistance protein A (MxA) expression in antisynthetase syndrome in a cohort of 194 cases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropathology and Applied Neurobiology	6. 最初と最後の頁 523 ~ 524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nan.12551	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 -
1. 著者名 Okiyama Naoko, Yamaguchi Yukie, Kodera Masanari, Hamaguchi Yasuhito, Yokozeki Hiroo, Ishiguro Naoko, Fujimoto Manabu	4. 巻 155
2. 論文標題 Distinct Histopathologic Patterns of Finger Eruptions in Dermatomyositis Based on Myositis-Specific Autoantibody Profiles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JAMA Dermatology	6. 最初と最後の頁 1080 ~ 1080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamadermatol.2019.1668	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 -

1. 著者名 Okiyama Naoko, Fujimoto Manabu	4. 巻 8
2. 論文標題 Cutaneous manifestations of dermatomyositis characterized by myositis-specific autoantibodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 F1000Research	6. 最初と最後の頁 1951 ~ 1951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12688/f1000research.20646.1	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 -

1. 著者名 Saito A, Okiyama N, Tanaka R, Maruyama H, Fujimoto M	4. 巻 98
2. 論文標題 A Case of Refractory Subcutaneous Panniculitis-like T-cell Lymphoma with Bone Marrow and Lung Involvement Treated Successfully with Oral Etoposide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Dermato Venereologica	6. 最初と最後の頁 610 ~ 611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/00015555-2932	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 -

1. 著者名 Mimura Toshihide, Kondo Yuya, Ohta Akihide, Iwamoto Masahiro, Ota Akiko, Okamoto Nami, Kawaguchi Yasushi, Kono Hajime, Takasaki Yoshinari, Takei Shuji, Nishimoto Norihiro, Fujimoto Manabu, Asanuma Yu Funakubo, Mimori Akio, Okiyama Naoko, Kaneko Shunta, Takahashi Hiroyuki, Yokosawa Masahiro, Sumida Takayuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Evidence-based clinical practice guideline for adult Still's disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 736 ~ 757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1465633	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 -

1. 著者名 Saito Akimasa, Okiyama Naoko, Kubota Noriko, Nakamura Yoshiyuki, Fujisawa Yasuhiro, Watanabe Rei, Ishitsuka Yosuke, Bleackley R. Chris, Fujimoto Manabu	4. 巻 138
2. 論文標題 Blockade of Granzyme B Remarkably Improves Mucocutaneous Diseases with Keratinocyte Death in Interface Dermatitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2079 ~ 2083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.03.1507	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 -

1. 著者名 Okiyama Naoko, Asano Yoshihide, Hamaguchi Yasuhito, Jinnin Masatoshi, Motegi Sei-ichiro, Koizumi Haruka, Hasegawa Minoru, Ishikawa Osamu, Sato Shinichi, Takehara Kazuhiko, Yamamoto Toshiyuki, Fujimoto Manabu, Ihn Hironobu	4. 巻 45
2. 論文標題 Impact of a new simplified disability scoring system for adult patients with localized scleroderma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 431 ~ 435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14214	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 -

1. 著者名 Nakamura Yoshiyuki, Fujisawa Yasuhiro, Okiyama Naoko, Watanabe Rei, Tanaka Ryota, Ishitsuka Yosuke, Tahara Hideaki, Fujimoto Manabu	4. 巻 90
2. 論文標題 Surgical damage to the lymphatic system promotes tumor growth via impaired adaptive immune response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 46 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2017.12.016	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 -

1. 著者名 Okiyama Naoko, Ichimura Yuki, Shobo Miwako, Tanaka Ryota, Kubota Noriko, Saito Akimasa, Ishitsuka Yosuke, Watanabe Rei, Fujisawa Yasuhiro, Nakamura Yoshiyuki, Murakami Akihiro, Kayama Hisako, Takeda Kiyoshi, Fujimoto Manabu	4. 巻 Online
2. 論文標題 Immune response to dermatomyositis-specific autoantigen, transcriptional intermediary factor 1 can result in experimental myositis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 0 ~ 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2020-218661	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 -

1. 著者名 Okiyama Naoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical Features and Cutaneous Manifestations of Juvenile and Adult Patients of Dermatomyositis Associated with Myositis-Specific Autoantibodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1725 ~ 1725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10081725	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 -

1. 著者名 Tanboon Jantima, Inoue Michio, Hirakawa Shinya, Tachimori Hisateru, Hayashi Shinichiro, Noguchi Satoru, Suzuki Shigeaki, Okiyama Naoko, Fujimoto Manabu, Nishino Ichizo	4. 巻 96
2. 論文標題 Pathologic Features of Anti-Mi-2 Dermatomyositis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e448 ~ e459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000011269	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 -

1. 著者名 Miyake Zenshi, Ishii Akiko, Okiyama Naoko, Tamaoka Akira	4. 巻 13
2. 論文標題 Amyopathic dermatomyositis combined with peripheral neuropathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Case Reports	6. 最初と最後の頁 e237250 ~ e237250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bcr-2020-237250	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 -

1. 著者名 Inoue Michio, Tanboon Jantima, et al. Okiyama Naoko, Fujimoto Manabu, Nishino Ichizo	4. 巻 77
2. 論文標題 Association of Dermatomyositis Sine Dermatitis With Anti-Nuclear Matrix Protein 2 Autoantibodies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JAMA Neurology	6. 最初と最後の頁 872 ~ 872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamaneurol.2020.0673	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 -

1. 著者名 Okiyama Naoko, Fujimoto Manabu	4. 巻 8
2. 論文標題 Cutaneous manifestations of dermatomyositis characterized by myositis-specific autoantibodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 F1000Research	6. 最初と最後の頁 1951 ~ 1951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12688/f1000research.20646.1	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 -

1. 著者名 Oya Kazumasa, Inoue Sae, Saito Akimasa, Nakamura Yoshiyuki, Ishitsuka Yosuke, Fujisawa Yasuhiro, Watanabe Rei, Taguchi Shijima, Fujimoto Manabu, Okiyama Naoko	4. 巻 59
2. 論文標題 Pregnancy triggers the onset of anti-transcriptional intermediary factor 1 antibody-positive dermatomyositis: a case series	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1450 ~ 1451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/kez527	査読の有無 無
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5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 沖山奈緒子
2. 発表標題 筋炎特異抗体からみた皮膚筋炎の病理
3. 学会等名 第117回日本皮膚科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沖山奈緒子
2. 発表標題 限局性強皮症の診断と治療戦略
3. 学会等名 第117回日本皮膚科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沖山奈緒子、山口由衣、小寺雅也、濱口儒人、横関博雄、石黒直子、藤本 学
2. 発表標題 皮膚筋炎手指皮疹の病理組織学的な筋炎特異抗体サブグループ分類
3. 学会等名 第117回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沖山奈緒子
2. 発表標題 BAFF標的療法の将来的可能性
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoko Okiyama and Manabu Fujimoto
2. 発表標題 Immunization of dermatomyositis-specific autoantigen transcriptional intermediary factor (TIF1)- induces myositis in mice
3. 学会等名 3rd Global Conference on Myositis（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 細胞傷害アッセイ方法	発明者 井川奈緒子、齊藤明允、市村裕輝、正保美和子	権利者 国立大学法人筑波大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-144490	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 免疫関連副作用の予防および治療の少なくとも一方を行う薬剤、遺伝子改変非ヒト動物、および免疫関連副作用モデル非ヒト動物	発明者 井川奈緒子、田中亮多	権利者 国立大学法人筑波大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-014945	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞傷害アッセイ方法	発明者 井川奈緒子、齊藤明允、市村裕輝、正保美和子	権利者 国立大学法人筑波大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/027655	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 免疫関連副作用の予防および治療の少なくとも一方を行う薬剤、遺伝子改変非ヒト動物、および免疫関連副作用モデル非ヒト動物	発明者 井川奈緒子、田中亮多	権利者 国立大学法人筑波大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/3050	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------