

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17422

研究課題名(和文) 傷害筋が誘導する免疫応答や筋機能障害を起点とした炎症性筋疾患の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of inflammatory myopathies in the light of immune response and muscle dysfunction induced by injured muscle fibers

研究代表者

神谷 麻理 (Kamiya, Mari)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20844377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性筋疾患において、免疫細胞からの傷害を受けた筋細胞が、ネクロトーシスと呼ばれる炎症誘導性の細胞死に至ることを発見しました。ネクロトーシスに至った細胞は様々な炎症介在因子を放出して、炎症を悪化させます。炎症性筋疾患のマウスモデルに対するネクロトーシス阻害は筋の炎症や筋力低下を改善させることを示しました。さらに、ネクロトーシスに至った筋細胞から放出される炎症介在因子の一つであるHMGB1が炎症や筋力低下を悪化させる要因の一つであることを発見しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、炎症性筋疾患において、免疫細胞からの傷害を受けた筋細胞がネクロトーシスに至り、HMGB1などの炎症介在因子の放出を介して炎症や筋機能障害を更に悪化させることを明らかにしました。この発見により、従来は免疫細胞の単なる標的と考えられていた筋細胞が、ネクロトーシスを介して病態を増悪させる攻撃者として機能することが示されました。筋細胞の細胞死や、それに伴い放出される炎症介在因子を標的とした治療は、ステロイドや免疫抑制剤のように免疫細胞を非特異的に抑制するものではないため、感染症などの副作用が少なく、これらの標準治療で効果不十分な症例への効果も期待できる、有望な治療法である可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Polymyositis is a chronic inflammatory myopathy, which affects proximal muscles leading to progressive and persistent disability.

Here, we showed that the pattern of cell death of muscle fibers inflammatory myopathies is necroptosis using human muscle biopsy specimens of PM patients and models of PM in vitro and in vivo. The inhibition of necroptosis suppresses not only muscle fiber death but also the release of inflammatory molecules including HMGB1, one of damage associated molecular patterns (DAMPs). Treatment with a necroptosis inhibitor or anti-HMGB1 antibodies ameliorates myositis-induced muscle weakness as well as muscle cell death and inflammation in the muscles. Thus, targeting necroptosis in muscle cells is a promising strategy for treating PM providing an alternative to current therapies directed at leukocytes.

研究分野：膠原病・リウマチ内科学

キーワード：炎症性筋疾患 細胞死 ネクロトーシス HMGB1

1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎(PM)は四肢近位や体幹の筋力低下や嚥下障害をきたす炎症性筋疾患で、その主要なエフェクターは細胞傷害性 T 細胞(CTL)であることが知られる。既存治療は副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬であり、これらは非特異的な免疫抑制を作用機序とするが、感染症を合併するほどの免疫抑制状態を誘導してすら筋炎を抑制できない例や、筋炎抑制に長期間を要し筋力低下が更に進行する例が多数存在することが臨床の問題であり、PM に対する免疫抑制療法の限界と考えざるを得ない。

既存の免疫細胞を標的とする治療法が筋炎抑制に不十分である現状から、我々は PM の病態における筋細胞の役割に注目した。筋細胞は CTL による傷害を受けた結果、細胞死に至り、種々の炎症介在因子を放出して炎症を悪化させる (Kimura N, et al. *Arthritis Rheumatol* 2015)。筋細胞の細胞死が更なる炎症を誘導する、いわば炎症の悪循環の機構が疑われる (図 1) ことから、筋細胞の細胞死やそれに伴い放出される炎症介在因子の制御が PM の治療に結びつくのではないかと着想したが、PM を含む炎症性筋疾患における筋細胞の細胞死の機序はこれまで不明であった。

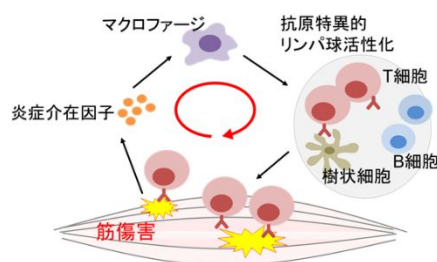


図 1 傷害を受けた筋細胞が更なる炎症を誘導する

近年、分子によって制御される細胞死である、プログラム

ム細胞死(PCD)が多種報告されている。申請者らは筋傷害のエフェクターが CTL であることから、筋傷害を誘導する CTL 関連分子の特定が筋の PCD 解明に繋がると考え、モデル抗原である OVA ペプチドを発現した筋管細胞と、OVA 特異的 T 細胞レセプターを有するトランスジェニックマウスである OT-I 由来の CTL(OT-I CTL)を用いた、*in vitro* における筋傷害モデルを確立し (Kamiya M, et al. *Rheumatology* 2020)、筋細胞に細胞死を誘導する分子が FASLG であることを特定した。FASLG は標的細胞にアポトーシスもしくはネクローシスを誘導する(図 2)。アポトーシスが炎症介在性分子の放出を伴わない抗炎症性の PCD

である一方、ネクローシスは炎症介在性因子の放出を伴う向炎症性の PCD と知られる。我々は PM の筋 PCD は向炎症性と考えられることからネクローシスと予想し、PM 患者組織を用いて、アポトーシス検出法である TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)法と、ネクローシス関連分子に対する免疫染色を行ったところ、壊死筋細胞は TUNEL 陰性の非アポトーシスで、ネクローシス関連分子の RIPK3 や MLKL を発現していた。さらに先述の *in vitro* モデルにおいてアポトーシスの阻害剤の benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone は筋管細胞の細胞死を抑制せず、ネクローシス阻害剤の Necrostatin1s (Nec1s)や siRNA による *Ripk3* の発現抑制が筋管細胞の細胞死を抑制することを明らかにした。これらのことから PM における筋細胞死がネクローシスであることが特定された。ネクローシスは向炎症性の細胞死と知られ、その阻害が PM の治療に結び付くと期待された。

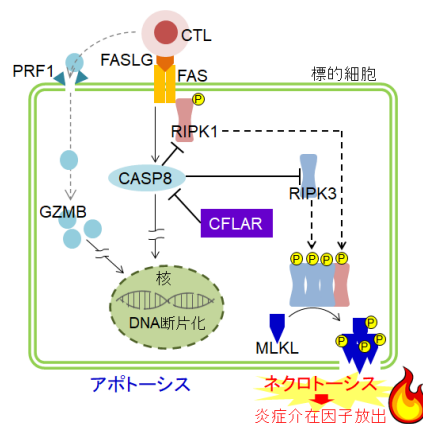


図 2 CTL は標的細胞にアポトーシスとネクローシスを誘導する

2. 研究の目的

本研究では先述した *in vitro* の系、PM マウスモデルである C 蛋白誘導性筋炎(CIM)、そして患者筋組織を用いて、PM のネクローシス制御を標的とした治療効果を検証する。さらに筋細胞の細胞死が誘導する炎症を作用点とした筋疾患治療戦略の糸口を見出すことを目標とした。

3. 研究の方法

PM 患者由来の筋生検検体を用いた組織学的検証、マウスモデル(CIM), そして PM における筋傷害を再現した *in vitro* モデルを用いた介入的検証による統合的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) CIM に対するネクローシス阻害効果の検証

ネクローシスが筋炎に及ぼす影響を検証するため、ネクローシス関連分子である *Ripk3*, *Mkl1* を欠損したマウスと、これらの分子を有するマウスとに CIM を誘導した。*Ripk3*, *Mkl1* を欠損したマウスでは、これらの分子を有するマウスと比較して筋炎の軽症化が確認された。さらに、CIM を誘導したマウスに *Nec1s* を投与したところ、筋力は速やかに改善し、筋の炎症も軽症化した(図3)。なお、*Nec1s* を投与されたマウスにおいて体重減少や便通異常を含む明らかな有害事象は確認されなかった。

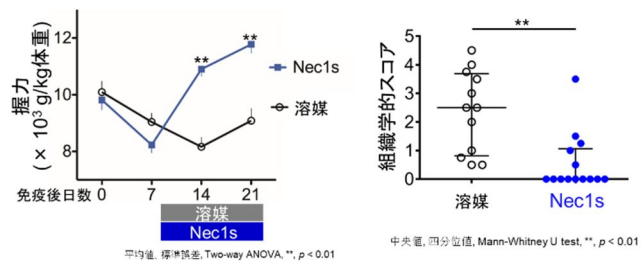


図3 CIM に対する *Nec1s* によるネクローシス阻害が筋力低下や炎症(組織学的スコア)を改善させた

(2) 筋のネクローシスと炎症を繋ぐ分子の検証: HMGB1

ネクローシスに至った細胞より放出される代表的な炎症性介在因子として HMGB1 が知られることから、CIM 血清中における同分子の濃度を測定したところ、CIM の誘導に伴い、HMGB1 の濃度の著明な上昇が確認された。一方で、*Nec1s* による治療は CIM 血清中の HMGB1 濃度を低下させた。さらに、HMGB1 は PM 患者や CIM の壊死筋線維においてその発現亢進が確認された。また、*in vitro* モデルにおいて筋管細胞にネクローシスを誘導すると培養上清中へ HMGB1 が放出され、*Nec1s* の併用にてその放出が抑制された。これらの結果より、HMGB1 はネクローシスに至った筋細胞より放出されたものと考えられた。

(3) HMGB1 の制御を介した筋炎抑制効果の検証

HMGB1 は innate adjuvant 作用を有し炎症を促進させることが知られるため、その抑制が筋炎の治療になるのではないかと着想した。CIM に対して抗 HMGB1 阻害抗体を投与したところ、筋力は速やかに改善し、炎症の抑制も確認された(図4)。

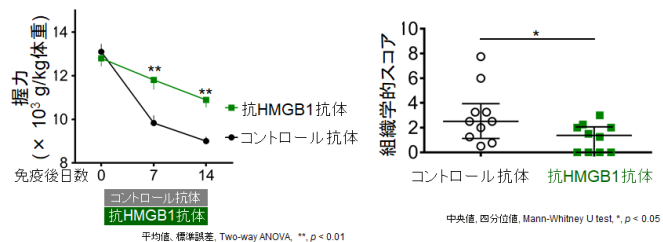


図4 CIM に対する抗 HMGB1 抗体を用いた HMGB1 阻害が筋力低下や炎症を改善させた

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kamiya M, Mizoguchi F, Kawahata K, Wang D, Nishibori M, Day J, Louis C, Wicks IP, Kohsaka H, Yasuda S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Targeting necroptosis in muscle fibers ameliorates inflammatory myopathies.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27875-4.	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mari Kamiya, Kimito Kawahata, Hitoshi Kohsaka, Fumitaka Mizoguchi.
2. 発表標題 Targeting necroptosis in muscle cells ameliorates inflammatory myopathies.
3. 学会等名 64th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神谷 麻理、王 登莉、保田 晋助、西堀 正洋、溝口 史高.
2. 発表標題 炎症性筋疾患においてHMGB1は傷害筋線維に発現し筋炎の病態の悪化に寄与する.
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mari Kamiya, Shinsuke Yasuda, Fumitaka Mizoguchi
2. 発表標題 HMGB1 is highly expressed in injured muscle fibers and accelerates inflammation and muscle injury in inflammatory myopathies.
3. 学会等名 65th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mari Kamiya, Shinsuke Yasuda
2. 発表標題 Targeting necroptosis in muscle fibers ameliorates experimental inflammatory myopathies.
3. 学会等名 The 50 th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷麻理
2. 発表標題 筋線維の細胞死を標的とした炎症性筋疾患の新規治療法開発
3. 学会等名 第7回 ORENCIA Rising Seminar (招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 神谷麻理
2. 発表標題 筋細胞死や筋細胞から放出される炎症介在因子を標的とした炎症性筋疾患の新規治療法開発
3. 学会等名 Next Generation Fellowship in Rheumatology (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース「筋細胞のネクロトーシスを標的とした治療が炎症性筋疾患モデルを改善させる」 https://www.tmd.ac.jp/press-release/20220110-1/</p> <p>EurekaAlert! NEWS RELEASE 1-MAR-2022 https://www.eurekaalert.org/news-releases/944937</p> <p>TMDU Research Activities 2021-2022 https://youtu.be/GI03LMeF-5o</p>
--

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			
オーストラリア	WEHI			