

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 13 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：20K17423

研究課題名（和文）多発性筋炎の病態におけるPD-L1の機能解析及び治療への応用

研究課題名（英文）Verification of a protective role of PD-L1 in myositis and its application to the treatment

研究代表者

佐々木 広和（Sasaki, Hirokazu）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座助教

研究者番号：30822639

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）：IFN γ 存在下でPD-L1を高発現させた筋線維はPD-1陽性T細胞による傷害から保護していることがわかった。マウス筋炎モデルでもIFN γ が筋組織におけるPD-L1の重要な誘導因子であることがわかった。

筋炎患者の末梢血のフローサイトメトリー解析において、多重染色のパネルを用いて、治療前活動期の10症例、及び寛解期の症例5名において免疫表現型の解析を行った。活動期の筋炎患者におけるPD-1陽性細胞はエフェクター分子を高発現していた。本研究によって、筋線維におけるPD-L1は筋炎の重症化抑制に重要であり、PD-1発現細胞がエフェクター細胞として作用している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋炎患者において、PD-1陽性細胞はエフェクター細胞として機能していることが示された。これまで病態が不明であった炎症性筋疾患の病態の一部が明らかになった。また、PD-1陽性細胞を標的とした治療が有効である可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Myofibers with high expression of PD-L1 in the presence of IFN γ were found to be protected from injury by PD-1 positive T cells. In a mouse model of myositis, IFN γ was also found to be an important inducer of PD-L1 in muscle tissue. Immunophenotypes in 10 patients in active phase and 5 patients in the remission were analyzed with flow cytometry. PD-1-positive cells in patients with active myositis expressed high levels of effector molecules. This study indicates that PD-L1 in muscle fibers is important in suppressing the severity of myositis and that PD-1-expressing cells may act as effector cells.

研究分野：膠原病・リウマチ

キーワード：PD-L1 筋炎

1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎(PM)は細胞傷害性 CD8+T 細胞(CTL)により骨格筋が傷害される自己免疫疾患である。PM の標準治療では、副腎皮質ステロイドや細胞傷害性免疫抑制薬による非特異的な免疫抑制療法が用いられるが、これらの治療薬に対する抵抗例も多く存在するため、新規治療の開発は重要な課題である。

当研究室では PM の病態解析のため、CTL による筋傷害を特徴とした PM のマウスモデル(C 蛋白誘導性筋炎(CIM))を開発し、筋炎の病態における様々なサイトカインの役割を検討してきた。IFN γ はマクロファージや NK 細胞の活性化、MHC 発現誘導を介し、免疫を賦活化させる。他方で、programmed cell death 1 ligand(PD-L1)の発現誘導やインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)の産生誘導等を介して、T 細胞の活性化や増殖を抑制する。このように IFN γ は多彩な生理活性を有し、状況に応じて、免疫賦活性にも免疫抑制性にも作用しうる。実際、癌領域では IFN γ の抗腫瘍効果だけでなく腫瘍免疫の抑制効果も報告されている。当研究室の CIM における検討では、IFN γ 欠損(GKO)マウスで筋炎が増悪し、IFN γ が CIM の発症において免疫抑制性に作用することがわかった。IFN γ 欠損下における CIM 増悪に関与する責任分子を明らかにすることで、PM の新規治療の開発につながると考えられる。

申請者らのこれまでの研究により、in vitro では IFN γ が筋管細胞の PD-L1 発現を誘導することがわかった。また、CIM を用いた検討では、野生型(WT)マウスと比較して GKO マウスでは筋炎が増悪し、筋組織における単核球、および筋線維上の PD-L1 発現が低下することをフローサイトメトリー及び免疫組織染色で確認した。一般に、PD-L1 のリガンドである PD-1 は活性化した T 細胞に発現する。PD-1 に PD-L1 が結合すると、T 細胞の活性化及び増殖が抑制される。これらの事実から、CIM の筋局所における PD-L1 は IFN γ 依存性に誘導され、筋線維上に発現する PD-L1 は筋傷害を抑制する保護的な因子であると考えられた。しかし、CIM や PM において、筋局所に発現する PD-L1 が生体内で意味のある炎症抑制効果を発揮するかはわかっていない。CIM の制御における筋局所での PD-L1 の重要性が明らかになれば、PD-L1 や PD-1 を標的とした新規治療の開発につながると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では PM において筋傷害を抑制する因子として PD-L1 に着目し、筋線維に発現する PD-L1 の筋傷害抑制効果を明らかにし、さらにリコンビナント PD-L1 の筋炎に対する有効性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. 筋線維に発現する PD-L1 の筋傷害抑制効果の検討

筋管に発現する PD-L1 の筋傷害抑制効果を in vitro モデルを用いて検証する

当研究室では MHC class I である H2Kb 上にモデル抗原として Ovalbumin(OVA)由来のペプチドを発現する筋芽細胞株 C2C12(以下、C2C12OVA)を作製した。筋管へと分化させた C2C12OVA と OT-1 マウス由来の OVA 特異的 CD8T 細胞(OVA 特異的 CTL)を共培養することで、C2C12OVA が傷害される(Kamiya, et al. Rheumatology. 2019)。申請者らは予備検討において、Cr51 を用いた細胞傷害アッセイにより、IFN γ 存在下で PD-L1 を高発現させた C2C12OVA では、IFN γ 非存在下で PD-L1 未発現の C2C12OVA よりも OVA 特異的 CTL による筋傷害が軽減することを確認した。この結果を踏まえ、IFN γ 存在下で PD-L1 を高発現させた C2C12OVA と OVA 特異的 CTL を共培養する際、抗 PD-L1 抗体及びアイソタイプコントロールを添加し、OVA 特異的 CTL による筋管傷害能を比較する。また、C2C12OVA の PD-L1 発現を siRNA を用いてノックダウン後、IFN γ 存在下で培養した C2C12OVA と OVA 特異的 CTL を共培養する。これにより、PD-L1 ノックダウンによる筋管傷害能への影響を検討する。これらの実験により、IFN γ により誘導される筋管上の PD-L1 の筋傷害抑制効果が明らかになる。

2. リコンビナント PD-L1 による筋傷害抑制効果の検討

リコンビナント PD-L1 の筋傷害抑制作用を in vitro モデルを用いて検証する

リコンビナント PD-L1 と免疫グロブリン Fc 部分の融合タンパクである PD-L1-Fc は T 細胞の増殖、サイトカイン産生を抑制することが報告されている。C2C12OVA と OVA 特異的 CTL の共培養時にリコンビナント PD-L1 (mouse PD-L1 Fc, R&D Systems)を添加し、筋管傷害能を評価する。この実験によりエフェクター相でのリコンビナント PD-L1 の効果が明らかになる。

リコンビナント PD-L1 の CIM に対する有効性を検証する

WT マウスに CIM を誘導後、リコンビナント PD-L1 を投与し、筋炎の重症度を評価する。この実験により CIM に対するリコンビナント PD-L1 の有効性が明らかになる。

3. PM 患者の末梢血、筋組織に存在する T 細胞における PD-1 発現の検討

PM 患者および健常者の末梢血 T 細胞上の PD-1 発現をフローサイトメトリーで解析する。また、筋炎患者においては筋組織中の T 細胞上の PD-1 発現を免疫組織染色で解析する。これにより、PM においてもリコンビナント PD-L1 が現実的な治療となるか明らかになる。

4 . 研究成果

in vitro の検証において、IFN γ により誘導される筋管細胞上の PD-L1 は CD8+T 細胞からの筋傷害を保護していることがわかった。当研究室で作製したリコンビナント PD-L1 を用いた検証では、リコンビナント PD-L1 の投与によりマウス筋炎は増悪した。これはリコンビナント PD-L1 が PD-1 に対してアンタゴニスティックに作用していた可能性が考えられた。ヒト検体を用いた検証では筋炎患者の筋組織では PD-1 陽性 T 細胞の浸潤と、筋線維上の PD-L1 の発現亢進が見られた。また、筋炎患者の末梢血における解析では、PD-1 陽性 T 細胞はエフェクター分子を高発現していた。これらの結果から、筋炎において PD-1 陽性細胞はエフェクター細胞として、筋組織における PD-L1 は保護因子として、働いていると考えられた。

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