

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07527

研究課題名(和文)皮膚筋炎における骨格筋微小血管障害の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)The elucidation of molecular mechanisms of capillary dysfunction with dermatomyositis.

研究代表者

佐野 泰照 (Sano, Yasuteru)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20379978

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(dermatomyositis: DM)では筋微小血管のタイトジャンクション(TJ)の破綻が認められ、病勢を悪化させている。まず、皮膚筋炎患者の血清が骨格筋微小血管のアポトーシスを促進させる可能性があることを明らかにした。また、ヒト骨格筋ペリサイト株(HSMPC)の培養上清に含まれるbFGFやGDNFがヒト骨格筋微小血管内皮細胞株(TSM15株)のバリア機能を高めることを証明した。また、活性化ビタミンDがTSM15のバリア機能を高めることが明らかになった。これらの知見は、DMの新たな治療法開発へ発展する可能性を秘めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、皮膚筋炎の新たな治療法開発へと発展する可能性を秘めている。また、我々が樹立したヒト骨格筋内皮細胞株とペリサイト株は骨格筋微小血管の生理学の理解に役立つだけでなくデュシェンヌ型筋ジストロフィーなど骨格筋微小血管に障害がみられる筋疾患の病態理解に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Dermatomyositis (DM) is an immune-mediated disorder that most prominently involves muscle and skin. The loss of tight junction (TJ) of some remaining microvasculature is a hallmark of DM. Firstly, we demonstrated the possibility that sera from DM patients bring apoptosis of endothelium derived from endomysial capillaries. Then, we disclosed that GDNF and bFGF released from human skeletal muscle pericyte cell (HSMPC) line increase the barrier function of human skeletal muscle microvascular endothelial cell line, TSM15. In addition, we also demonstrated that activated vitamin D strengthen the barrier function of TSM15. These results indicate that bFGF and GDNF, as well as activated vitamin D, might ameliorate the pathophysiology of DM via restoring the fragile barrier of endomysial endothelium.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：皮膚筋炎 タイトジャンクション 微小血管内皮細胞 ペリサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚筋炎(dermatomyositis: DM)は全身、特に四肢近位筋と体幹筋に自己免疫機序にもとづく炎症が生じ、臨床的に筋力低下があらわれる難治性炎症性筋疾患である。病理学的には筋内血管周囲の炎症細胞浸潤と筋束周囲の筋線維萎縮、筋内微小血管への免疫複合体の沈着、微小血管の数の減少等が認められる (Dalakas M.C. Lancet, 2003; 362:971-982)。さらに筋内鞘の微小血管の数の減少が皮膚筋炎の初期の特徴的な病理学的変化であると報告されており、筋内小血管を首座とした炎症と筋内微小循環の破綻が皮膚筋炎の病態形成のためにきわめて重要であると考えられている (Emsile-Smith et al, Ann Neurol, 1990; 27: 343-356)。皮膚筋炎の現在の治療としては細胞性免疫や液性免疫を抑制する副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤などの副作用の多い治療薬が主流となっており、さらにこれらの治療にも抵抗性を示す難治性の患者が存在することが広く知られている。上記のように皮膚筋炎では筋微小血管障害が筋肉の炎症や壊死に先駆けて生じる最上流の病態に位置付けられていることから、筋微小血管障害の分子メカニズムを明らかにし、筋微小血管障害に深くかかわっている重要な分子に特異的に作用する薬剤を開発することこそがこの難治性筋疾患を克服するための最重要課題ではなかろうか、という学術的な問いが浮上した。また、DM では筋微小血管のタイトジャンクション (TJ) の破綻が認められ、炎症性サイトカインなど筋線維にとって有害な液性因子のさらなる筋内鞘への流入を促進し、DM の病態を悪化させていると考えられる。また、近年、血液神経関門(BNB)を構成するペリサイトが BNB 構成内皮細胞のバリア機能を高めるとする報告があり、筋ペリサイトも筋微小血管内皮細胞のバリア機能を高める可能性がある。

2. 研究の目的

我々が樹立したヒト骨格筋微小血管内皮細胞株(TSM15株)およびペリサイト株(HSMPCT株)を用い DM における微小血管障害の分子学的機序を明らかにするとともに、骨格筋微小血管の破綻したタイトジャンクションを修復させる因子を数多く同定することを目的とした。

3. 研究の方法

DM 患者血清が筋微小血管内皮細胞に与える影響を明らかにする目的で、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。皮膚筋炎患者 3 例の治療前血清を DM 血清とし、

健常者 3 例のプール血清を control 血清とした．すべての血清を非働化したのちこれらの血清（10%）を含む培養液を TSM15 株に 37 で 12 時間作用させた．作用後の TSM15 株から total RNA を抽出し，DNA マイクロアレイにより両群の遺伝子発現の相違を網羅的に解析した．

また，我々が樹立したヒト骨格筋微小血管内皮細胞株(TSM15)およびペリサイト株(HSMPCT)を用い，HSMPCT が TSM15 のバリア機能に与える影響につき解析を行った．TSM15 のバリア機能は電気抵抗値(TEER)および FITC-dextran の透過性を用いて評価した．さらに bFGF および GDNF が HSMPCT に発現するか否かをウエスタンブロットにて評価し，これらの蛋白が TSM15 のバリア機能に与える影響につき解析した．また，近年の血液脳関門を構成する血管内皮細胞のバリア機能を活性化ビタミン D が高めるとする報告をもとに，活性化ビタミン D が TSM15 に与える影響につき解析した．

4．研究成果

DM 血清群は control 血清群に比し *CASP3* や *BCL2L11* などアポトーシス促進遺伝子の発現が有意に上昇した．DM 患者血清はヒト骨格筋微小血管内皮細胞のアポトーシスを促進させる可能性が考えられた．また HSMPCT は TSM15 のバリア機能を高めることが明らかになった．さらに，HSMPCT は bFGF と GDNF を蛋白レベルで発現しており，それらが TSM15 のバリア機能を高めることを解明した．また，活性化ビタミン D は TSM15 の cludin-5 の発現を増加させ，

バリア機能を高める一方で，TSM15 の VCAM-1 や ICAM-1 などの細胞接着因子の発現を低下させた．すなわち活性化ビタミン D は骨格筋内鞘内の微小血管の破綻した TJ を修復し，炎症細胞浸潤の筋内鞘への侵入を阻害する可能性が示された．一連の本研究の研究結果は，皮膚筋炎の新たな治療法開発へと発展する可能性を秘めている．また，我々が樹立したヒト骨格筋内皮細胞株とペリサイト株は骨格筋微小血管の生理学の理解に役立つだけでなく，デュシェンヌ型筋ジストロフィーなど骨格筋微小血管に障害がみられる DM 以外の筋疾患の病態理解に役立つものと考えられる．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasuteru Sano, Eri Ishiguchi, Fumitaka Shimizu, Masatoshi Omoto, Toshihiko Maeda,
2. 発表標題 The role of pericytes for the barrier function of the endomysial endothelium
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会 大阪 2019年6月1日
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野泰照, 清水文崇, 前田敏彦, 本田真也, 竹下幸男, 古賀道明, 神田隆
2. 発表標題 活性化ビタミンDの骨格筋微小血管内皮細胞への効果に関する検討
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuteru Sano, Hironori Sano, Fumitaka Shimizu, Toshihiko Maeda, Masatoshi Omoto, and Takashi Kanda
2. 発表標題 Establishment of a new human skeletal muscle microvascular endothelial cell line
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野泰照, 石口絵梨, 清水文崇, 尾本雅俊, 竹下幸男, 前田敏彦, 神田隆
2. 発表標題 骨格筋微小血管のバリア機能に対するペリサイトの役割
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

1. 発表者名 Yasuteru Sano, Eri Ishiguchi, Toshihiko Maeda, Fumitaka Shimizu, Yukio Takeshita, Masaya Honda, and Takashi Kanda
2. 発表標題 Activated vitamin D increases the barrier function of the endomysial endothelium
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会 岡山 2020.8.31
4. 発表年 2020年

〔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