

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23839

研究課題名(和文)筋細胞死の制御を標的とした多発性筋炎の治療法開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy of polymyositis targeting muscle fiber death

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・特任助教

研究者番号：20844377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性筋炎(PM)患者の筋組織や、PMの培養細胞モデル、あるいはマウスモデルを用いた解析の結果、PMの筋細胞はネクロトーシスというプログラム細胞死に至ることが判明した。ネクロトーシスは炎症誘導性の細胞死と知られ、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することが知られる。よって、筋細胞のネクロトーシスを抑えることが、PMの治療になるのではないかと考えた。そこで、PMのマウスモデルに対してネクロトーシスの阻害剤であるnecrostatin 1sを投与したところ、対照群と比較して、筋炎に伴うマウスの握力低下が抑制され、さらに筋における炎症の改善が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性筋炎(PM)の既存治療は副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬であるが、これらは免疫細胞を標的とした治療であり、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存在することが臨床的問題であり、PMに対する免疫抑制療法の限界と考えざるを得ない。

我々は本研究において、筋の細胞死の制御が、PMの新たな治療戦略として期待されることを示した。

筋の細胞死を直接の標的とする治療は、既存治療とは全く異なる仕組みを介した治療であり、既存の治療で炎症が抑制できない症例や、治療開始後も筋力低下が更に進行する症例への有効性が期待できる。

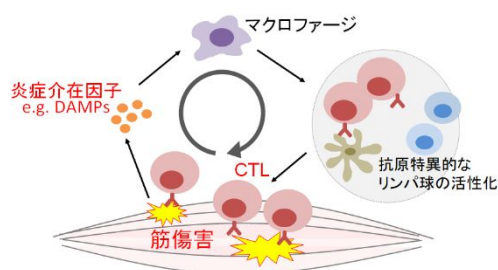
研究成果の概要(英文)：We clarified that the pattern of cell death of muscle fibers in polymyositis (PM) is FAS ligand-dependent necroptosis, while that of satellite cells and myoblasts is perforin 1/granzyme B-dependent apoptosis, using human muscle biopsy specimens of PM patients and models of PM in vitro and in vivo. While apoptosis is an anti-inflammatory cell death, necroptosis is known as one of inflammatory forms of cell death, as necroptotic cells release inflammatory mediators such as damaged molecular patterns (DAMPs) and cytokines. Treatment with a necroptosis inhibitor ameliorated myositis-induced muscle weakness as well as muscle cell death and inflammation in the muscles in murine model of PM. 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

## 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存在することが臨床的問題であり、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。CTL による傷害を受けた結果、細胞死に至った筋細胞より high mobility group box 1 (HMGB1) をはじめとする Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) など、炎症介在性因子の放出が報告されている (Rayavarapu et al. *Skeletal Muscle* 2013, Zong et al. *Ann Rheu Dis* 2013)。筋細胞死が炎症を促進しているのであれば、免疫細胞を標的とする治療では筋細胞からの炎症介在性因子の放出を阻止できないため、これが既存治療で筋炎抑制効果が不十分である理由ではないかと考えた。筋細胞死を直接の治療標的とすることが、既存の治療との併用療法や単独療法として優れた治療戦略になるのではないかと考えたが、PM の筋細胞死は未解明であった。我々の研究室における過去の検証では、PM マウスモデルの C タンパク誘導性筋炎 (CIM) における perforin 欠損による筋炎の改善は部分的であり (Sugihara et al, *Arthritis Rheum* 2010)、他の細胞死誘導機序の存在が疑われた。



## 2. 研究の目的

本研究において、PM における CTL を介した筋傷害や、その結果誘導される筋細胞死機序の解明と、PM モデルに対する筋細胞死阻害効果を検証することを目的とした。

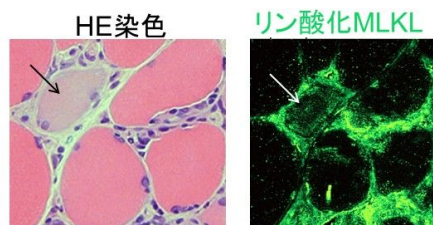
## 3. 研究の方法

PM 筋組織に対して、アポトーシス検出法である terminal deoxynucleotidyl transferase nick-end labeling (TUNEL) 法と、細胞死関連分子に対する免疫染色を行った。In vitro において、OVA ペプチドと MHC クラス I 分子 (H2Kb) を発現させた C2C12 由来の筋芽細胞・筋管細胞と OT-I マウス由来の CTL との共培養を用い、それぞれ PM における筋芽細胞 (衛星細胞) 傷害・筋細胞傷害のモデルとして用い、それぞれにおける細胞死様式の解析を行った。PM の in vivo モデルとして C 蛋白誘導性筋炎 (CIM) を用いた。

## 4. 研究成果

(1) PM の筋組織において、アポトーシスを示す TUNEL 陽性の衛星細胞が認められた一方で、筋細胞は TUNEL 陰性であった。さらに PM 筋組織においてはプログラム細胞死の一種であるネクローシス関連分子である RIPK1, RIPK3, MLKL, リン酸化 MLKL などの発現が認められた (図 1)。

(2) In vitro において、CTL による筋芽細胞



リン酸化MLKL; ネクローシス関連分子  
→: 壊死筋細胞

図1. PMの壊死筋細胞にネクローシス関連分子の発現が認められた

死は PRF1 あるいは GZMB 依存性であったが、筋管細胞死はこれらの分子に非依存性であり、FAS/FASLG 依存性であった。さらに、細胞死阻害剤を用いた検証の結果、CTL による筋芽細胞死は pan-caspase 阻害剤により阻害されるアポトーシスであった一方で、筋管細胞死はネクローシス阻害剤である necrostatin 1s によって阻害されるネクローシスであった。

(3) 以上の検証により、筋細胞の細胞死様式がネクローシスと考えられたこと、さらにネクローシスが DAMPs などの炎症介在因子の放出を伴う細胞死と知られることから、その阻害が筋炎の治療として有効ではないかと考え、CIM に対して necrostatin 1s を投与した。対照と比較して、necrostatin 1s の投与によって筋炎に伴うマウスの握力低下が抑制され(図2) 組織学的な筋細胞壊死面積が減少し、さらに筋における組織学的な炎症所見の抑制が認められた(図3)。

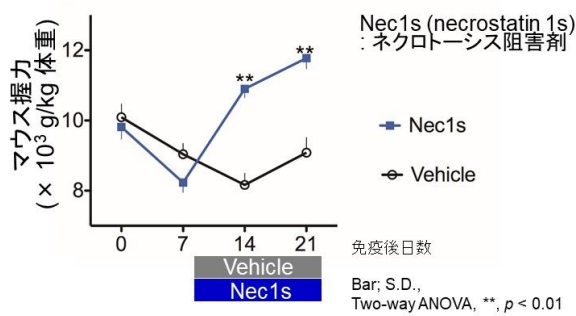


図2. ネクローシス阻害剤はCIMにおける握力低下を抑制した

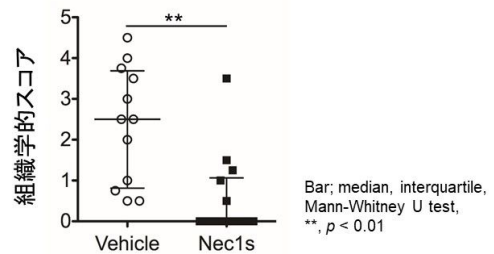


図3. ネクローシス阻害剤はCIMにおける組織学的な炎症所見を抑制した

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kamiya Mari, Mizoguchi Fumitaka, Takamura Akito, Kimura Naoki, Kawahata Kimito, Kohsaka Hitoshi	4. 巻 59
2. 論文標題 A new in vitro model of polymyositis reveals CD8+ T cell invasion into muscle cells and its cytotoxic role	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 224 ~ 232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/kez248	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0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 2021.04.27（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷 麻理、川畑 仁人、上阪 等、溝口 史高
2. 発表標題 Necroptosis阻害は実験的多発性筋炎モデルにおいて筋細胞死と炎症細胞浸潤を抑制し筋力を改善させる
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神谷 麻理、川畑 仁人、上阪 等、溝口 史高
2. 発表標題 Necroptosis阻害は実験的多発性筋炎モデルにおいて筋細胞死と炎症介在因子の放出、炎症細胞浸潤を抑制し筋力を改善させる
3. 学会等名 第5回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mari Kamiya, Fumitaka Mizoguchi, Kimito Kawahata, Hitoshi Kohsaka
2. 発表標題 Inhibition of Necroptosis Suppresses Muscle Cell Death and Inflammatory Infiltrate, and Improves Muscle Strength in Experimental Polymyositis
3. 学会等名 2019 ACR/ARP Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

雑誌論文について、  
表題 Targeting necroptosis in muscle fibers ameliorates inflammatory myopathies (筆頭著者 Mari Kamiya)が、Nature Communicationsにてrevisionとなり、近日中に再投稿の予定である。

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