

令和元年9月1日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09347

研究課題名(和文) 筋炎の病型・病理像ごとの筋組織を用いた網羅的発現プロファイルによる筋炎の病態解明

研究課題名(英文) Gene expression profiling of inflammatory myopathy in correlation with autoantibodies

研究代表者

清水 潤 (Shimizu, Jun)

東京大学・医学部附属病院・届出診療医・客員研究員

研究者番号：40260492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：301例の筋炎生検症例を用いて筋炎特異抗体と特徴的な病理変化との関係を明らかにした上で、筋束周辺部萎縮を有した症例：抗Jo-1抗体(n=4)、抗Tif1抗体(n=5)、抗Mi2抗体(n=5)の生検筋でmRNA発現プロファイル解析をおこなったところ3群はそれぞれ固有のグループを形成した。さらに、明らかな炎症・組織破壊像のない筋組織症例：抗Jo-1抗体(n=4)、抗MDA5抗体(n=4)、抗Tif1抗体(n=4)を用いてmRNA発現プロファイル解析をおこなったところ3群はそれぞれ固有のグループを形成した。形態変化の現れる初期より筋自己抗体ごとに特徴的なmRNAが動いていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋炎特異抗体と特徴的な筋病理所見の関係検討や、筋炎特異抗体ごとの筋組織mRNA発現プロファイル解析は過去に充分になされていない。本研究では多数例を用い網羅的に統計的に検討した点、組織所見を対応させた上でmRNA発現プロファイル解析を行った点で意義がある。病理変化の初期より抗体ごとに特徴的なmRNAの変化が存在したことは、これらの変化が組織変化の結果ではなく原因であることを示す。本検討は病理変化の初期のmRNAの変化を筋炎特異抗体ごとに捉えることで筋炎亜群ごとの最も初期の病態解明が可能であることを示した。ステロイドなどの非特異的な治療とは異なる病態特異的な治療方法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed mRNA microarray analysis of biopsied muscles from patients with IIMs and analyzed the relation with myositis specific antibodies (MSAs). In analysis of muscles with perifascicular atrophy, specific sets of mRNAs allow for molecular classification of patients with anti-Jo1 (n=4), -TIF1 (n=5), and -Mi-2 (n=5) antibodies. In analysis of muscles with early pathological findings with anti-Jo1(n=4), -TIF1 (n=4), and -MDA5 (n=4) antibodies, a total of 1705 mRNAs were significantly expressed (fold change>3, p<0.05). Pathway analysis for the 192 mRNAs commonly significantly changed in three groups were Toll-like and NOD-like receptor pathways. In analysis of mRNAs with significant changes, specific sets of mRNAs allow for molecular classification of patients with MSAs, respectively. Our findings showed that there are characteristic mRNAs expression profiles in relation with the types of MSAs even in muscles with mild pathological changes.

研究分野：臨床神経内科、筋病理、炎症性筋疾患

キーワード：炎症性筋疾患 発現解析 筋炎自己抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋炎はさまざまな病態機序が背景にあり臨床・筋炎特異自己抗体・病理所見の特徴づけられる疾患である。15以上の筋炎自己抗体は知られ、もし、抗体が出現すると筋炎患者にはひとつの筋炎自己抗体が出現。さらに抗体ごとに特徴的な臨床像、合併症、治療経過が対応する。一方、筋病理変化にも自己抗体に応じた特徴的な変化が存在することが明らかになりつつある状況であるが、出現する抗体の種類と特徴的な病理変化との関係については統計的な解析手法を用いての網羅的関連検討はなされていない。また、特徴的な筋病理組織変化の背景で抗体ごとに特徴的な遺伝子群の変動が存在するかは不明である。さらに、遺伝子変動が存在した場合、形態変化の結果であるのか原因であるのかの区別の検討も不十分であった。これらは、出現抗体ごとの筋炎の病態解明および治療方法の開発の上では必要なことである。

2. 研究の目的

以下の3点を目的にした。

- 1) 筋炎特異抗体の種類と特徴的な病理変化との関係を明らかにする。
- 2) 1)の結果に基づき perifascicular atrophy (PFA)所見を解析ターゲットとし、同所見を呈する組織内で抗体ごとに特徴的発現変動遺伝子変化の有無が存在するかを確認する。
- 3) 筋炎組織早期段階から抗体ごとに特徴的な遺伝子変化が存在するか明らかにする。

3. 研究の方法

1) 筋炎における自己抗体と特徴的な病理所見の関連解析

対象：2000年1月～2012年10月の期間で無治療または維持量以下の治療で生検をした301例の筋炎の症例を検討。筋炎自己抗体測定：生検時の血清を用いRNA免疫沈降法で抗アミノアシル tRNA 抗体 (抗-Jo-1, EJ, OJ, PL-7, PL-12, KS 抗体)を測定、免疫沈降法で抗 TIF-1, Ku, Mi-2, PM-Scl, MDA5 抗体、ELISA で抗 HMGCR, NXP2 抗体を測定。病理所見評価：ルーチン組織化学染色と以下の免疫染色 (抗 MHC class I, MHC class II, CD45, C5b-9 CD8 の各染色)をおこなった。炎症細胞浸潤の程度、壊死再生線維の頻度は半定量的に評価。筋炎の臨床病理分類はヨーロッパ神経筋センターの筋炎分類基準を用い、筋炎の特徴的所見として、同分類基準に対応し、perifascicular atrophy (PFA)、筋束周辺部 MHC class I 発現(PFA-MHC-)、補体 (C5b-9)の筋内鞘血管への沈着 (MAC)、壊死性筋症病理 (NAM pathology)、多発筋炎病理像 (PM) の各所見を用いた。なお、濃い沈着 (dMAC) と顆粒状と濃い沈着をあわせた全沈着 (all MAC) の2タイプに分けて評価した。統計解析：多変量解析を行った。

2) 特徴的な病理所見の背景にある発現遺伝子変化

組織所見で perifascicular atrophy (PFA)を有する症例：抗 Jo-1 抗体陽性 PFA; 4例、抗 Tif1 抗体陽性 PFA; 5、Mi2 抗体陽性 PFA; 5例。発現解析：診断に用いた凍結ブロックを用い検討。PFA 所見が確認されたブロックより筋組織を切りだし total RNA を抽出し、マイクロアレイ法 (Agilent Technology 社: SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60K v2, 43798 probe sets) にて抗体ごとにヒートマップを作成して解析した。

3) 筋炎病理の初期段階における組織での mRNA 発現の検討

筋病理所見上非壊死筋線維上の MHC-class I 抗原の発現亢進を認めるが、炎症細胞浸潤や壊死線維変化が乏しい組織像を示した皮膚筋炎症例のうち、抗 Jo-1 抗体陽性 4例、抗 MDA5 抗体陽性 4例、抗 Tif1 抗体陽性 4例を検討。有意な筋病理所見を認めない4例をコントロールとし

で使用。マイクロアレイ解析を施行。パスウェイ解析としてKEGG PathwayはDAVID Bioinformatics Resources 6.7 Functional Annotationで同定し、EASE scoreのp値の順に評価した(p<0.05)。

4. 研究成果

結果(1) 筋炎における自己抗体と特徴的な病理所見の関連解析

301例中の241例(80%)で筋炎特異抗体または筋炎関連抗体を認めた。その内容は、193例は筋炎特異抗体(27例は筋炎関連抗体が同時に出現)、48例は筋炎関連抗体のみ出現であった。筋炎特異抗体は82.5%の皮膚筋炎症例(n=120)に出現[抗TIF-1(27.5%),ARS(21.7%),MDA5(17.5%),Mi-2(7.5%),NXP2(5.0%),SAE(2.5%),HMGR抗体(0.8%)]、48.8%の非特異的筋炎症例(n=123)に出現[抗ARS Abs(35%),MSAs(13.8%)]、89.2%の壊死性筋症例(n=37)に出現[抗SRP(67.6%),HMGR(18.9%),PL7 Abs(2.7%)]、4.8%の多発筋炎症例に認めた。筋炎特異抗体と特徴的な病理所見の関係解析では、PFAはMi-2,TIF-1,Jo-1,SAE,SS-A抗体と関係、perifascicular MHC-はMi-2,TIF-1,SAE,U1-RNP,EJ抗体と関係、NAM病理はSRP,HMGR抗体と関係、all-MACはTIF1,NXP-2抗体と関係、dMACはTIF1,MDA5,NXP-2,SAE,U1-RNP抗体と関係していた。(表1)

表1. 自己抗体と特徴的な病理変化の関係

病理所見	オッズ比(95%CI) ^a	P値
PFA (n=25)		
Jo-1	10.22 (2.51-41.64)	0.001
Mi-2	65.40 (12.62-338.81)	<0.001
TIF-1γ	26.84 (6.93-103.91)	<0.001
SAE	39.24 (2.75-559.30)	0.007
SS-A	4.22 (1.05-17.00)	0.042
perifascicular MHC- I (n=25)		
EJ	6.86 (1.07-43.96)	0.042
Mi-2	48.94 (8.41-284.91)	<0.001
TIF-1γ	40.96 (9.58-175.08)	<0.001
SAE	42.82 (2.84-645.03)	0.007
U1-RNP	7.32 (1.45-36.88)	0.016
dMAC (n=37)		
TIF-1γ	263.16 (45.91-1508.43)	<0.001
MDA5	44.86 (6.79-296.16)	<0.001
NXP-2	191.39 (21.43-1709.65)	<0.001
SAE	287.09 (16.05-5133.77)	<0.001
U1-RNP	9.27 (1.16-74.26)	0.036
all-MAC (n=105)		
TIF-1γ	7.29 (3.14-16.92)	<0.001
NXP-2	5.46 (1.03-28.90)	0.046
NAM pathology (n=37)		
SRP	254.17 (67.19-961.44)	<0.001
HMGR	53.38 (12.95-219.94)	<0.001
PM (n=21)		
No associated antibody		

結果(2) Jo1, TIF1, Mi2抗体陽性PFAの組織のmRNA発現解析

Jo1抗体は抗アミノアシルtRNA抗体の1つであり抗アミノアシル合成抗体症候群の臨床像をとり病理組織も筋束周辺部の萎縮と同時に壊死線維の多発、MHC-class II抗原の発現亢進を認める。TIF1抗体は癌合併を高頻度に認め補体沈着と虚血性病理所見を特徴とする。Mi2抗体は、典型的皮疹と壊死再生の多発、治療反応性良好の特徴をとる。同じ、PFAの病理組織基準に分類されるのにもかかわらず、抗体ごとに異なるmRNAが発現していることが明らかになった。(図1)

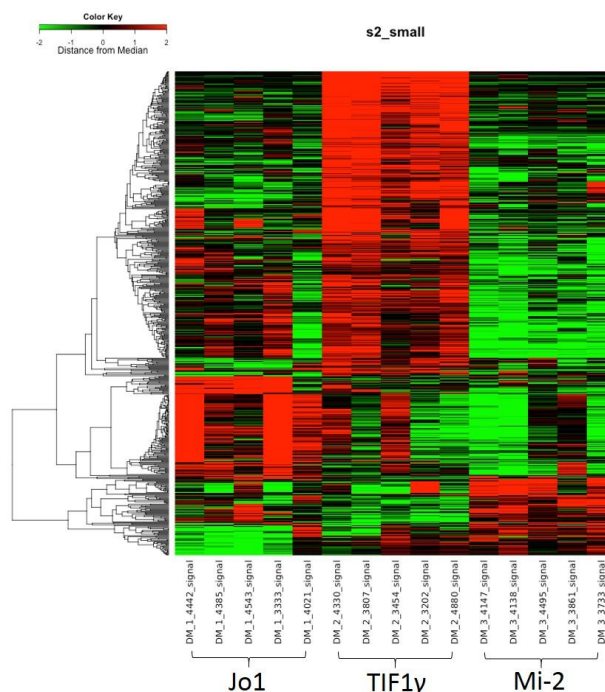


図1.筋束周辺部萎縮(PFA)部組織のtotalマイクロアレイ解析

結果 (3) 筋炎病理の初期段階における組織での mRNA 発現の検討

発現解析に用いた 12 症例についてヨーロッパ神経センター基準では 9 例が probable DM に相当し, 3 例は DM に典型的な皮疹を認めないことから probable DM 未満であった。

マイクロアレイを施行し, 各群とコントロールを比較して有意に Fold change >3 で発現変動した遺伝子 (DEGs: differentially expressed genes) を抽出した (図 2) .

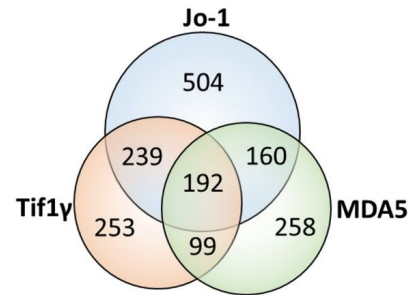


図2. 各MSA群におけるDEG数

筋炎特異抗体の各群とコントロールをそれぞれ比較して, 有意にFold change >3で発現変動を示した遺伝子を抽出し(t-test, p<0.05), Entrez Genbank IDでカウント.

3 群に共通する 192 個の DEG からパスウェイ解析を行ったところ, 自然免疫の経路 (Toll-like receptor signaling pathway や NOD-like receptor signaling pathway) や 補体活性化の経路 (Complement and coagulation cascades) が含まれた. 各 MSA 群でのみ抽出された DEG (Jo-1 群で 504 個, Tif1 群で 253 個, MDA5 群で 258 個) に含まれるパスウェイの内容はそれぞれ異なった (表 2)

KEGG pathway	Count	%	p-Value	Fold Enrichment
Jo-1群, Tif1y群, MDA5群共通				
Cytokine-cytokine receptor interaction	13	6.8	1.3E-04	3.7
NOD-like receptor signaling pathway	5	2.6	8.7E-03	6.0
Systemic lupus erythematosus	6	3.1	9.4E-05	4.5
Toll-like receptor signaling pathway	6	3.1	1.0E-02	4.4
Chemokine signaling pathway	8	4.2	1.1E-02	3.2
Complement and coagulation cascades	5	2.6	1.3E-02	5.4
Pantothenate and CoA biosynthesis	3	1.6	1.6E-02	15.0
Cytosolic DNA-sensing pathway	4	2.1	3.5E-02	5.4
Jo-1群のみ				
Graft-versus-host disease	14	2.8	8.5E-11	11.2
Allograft rejection	12	2.4	7.4E-09	10.4
Autoimmune thyroid disease	13	2.6	9.9E-08	8.0
Type 1 diabetes mellitus	12	2.4	4.5E-08	8.9
Antigen processing and presentation	15	3.0	2.5E-07	5.6
Intestinal immune network for IgA production	12	2.4	2.5E-07	7.6
Viral myocarditis	14	2.8	2.5E-07	6.2
Cell adhesion molecules (CAMs)	18	3.6	7.0E-07	4.3
Natural killer cell mediated cytotoxicity	18	3.6	7.8E-07	4.2
Systemic lupus erythematosus	14	2.8	1.2E-05	4.4
Asthma	8	1.6	2.5E-05	8.6
Cytokine-cytokine receptor interaction	20	4.0	5.9E-04	2.4
Leukocyte transendothelial migration	12	2.4	1.2E-03	3.2
Primary immunodeficiency	6	1.2	4.6E-03	5.3
Hematopoietic cell lineage	8	1.6	1.9E-02	2.9
Fc gamma R-mediated phagocytosis	8	1.6	3.1E-02	2.6
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	7	1.4	3.3E-02	2.9
Chemokine signaling pathway	12	2.4	3.5E-02	2.9
Regulation of actin cytoskeleton	13	2.6	4.1E-02	1.9
Cell cycle	9	1.8	4.5E-02	2.2
Tif1y群のみ				
Cytokine-cytokine receptor interaction	8	3.2	2.6E-02	2.7
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	4	1.6	2.9E-02	5.8
Drug metabolism	4	1.6	3.2E-02	5.7
Histidine metabolism	3	1.2	4.1E-02	9.1
MDA5群のみ				
Circadian rhythm	3	1.2	9.8E-03	19.2
Jak-STAT signaling pathway	6	2.3	3.5E-02	3.2

3 群間で発現が有意に変動する DEG 全てでクラスタリングを行うと, 各 MSA 群はそれぞれ別個のクラスタを形成した (図 3A) . DEG のうち 1 型インターフェロンのシグナル伝達経路の分子に限定してクラスタリングを行うと, MDA5 群は 1 個のクラスタを形成した (図 3B) .

表2. MDA5群, Jo-1群, Tif1y群共通のDEG, 各群のみでのDEGに含まれるパスウェイ.

Fold enrichment はreferenceを全ヒトゲノムとした時の各KEGG pathwayにおけるmagnitude of enrichment.

成果のまとめ

本研究では, まず, 301 例の筋炎生検症例を用いて筋炎特異抗体と特徴的な病理変化との関係を明らかにした。その上で, 皮膚筋炎に診断的な筋束周辺部萎縮所見 : perifascicular atrophy (PFA) を解析標的とし, PFA 所見を呈する抗 Jo1 抗体, 抗 TIF1 抗体, 抗 Mi2 抗体の組織では mRNA 発現が抗体ごとに異なることを示した。さらに, 抗体ごとに特徴的な mRNA 変化が筋炎の病理像形成の初期からはじまっていることを病理変化の乏しい抗 Jo-1 抗体, 抗 MDA5 抗体, 抗 Tif1 抗体陽性症例の組織の mRNA 発現解析を用いて示し, 初期より mRNA レベルでの変化が特異抗体ごとに存在することを明らかにした。

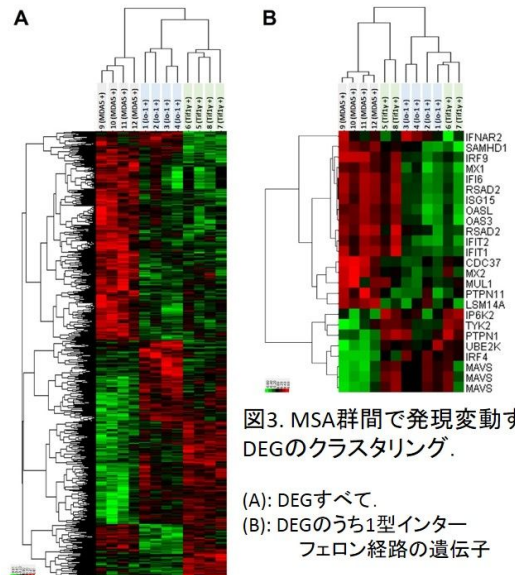


図3. MSA群間で発現変動するDEGのクラスタリング.

(A): DEGすべて.
(B): DEGのうち1型インターフェロン経路の遺伝子

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- 1) Naohiro Uchio, Kenichiro Taira, Chiseko Ikenaga, Atsushi Unuma, Masato Kadoya, Akatsuki Kubota, Tatsushi Toda and Jun Shimizu. Granulomatous myositis induced by anti-PD-1 monoclonal antibodies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* April 2018 5:e464

- 2) Uchio N, Taira K, Ikenaga C, Kadoya M, Unuma A, Yoshida K, Nakatani-Enomoto S, Hatanaka Y, Sakurai Y, Shio Y, Kaida K, Kubota A, Toda T, Shimizu J. Inflammatory myopathy with myasthenia gravis: Thymoma association and polymyositis pathology. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018 Dec 24;6(2):e535.

- 3) Ikenaga C, Kubota A, Kadoya M, Taira K, Uchio N, Hida A, Maeda MH, Nagashima Y, Ishiura H, Kaida K, Goto J, Tsuji S, Shimizu J. Clinicopathologic features of myositis patients with CD8-MHC-1 complex pathology. *Neurology*. 2017 Sep 5;89(10):1060-1068.

- 4) Kadoya M, Hida A, Hashimoto Maeda M, Taira K, Ikenaga C, Uchio N, Kubota A, Kaida K, Miwa Y, Kurasawa K, Shimada H, Sonoo M, Chiba A, Shio Y, Uesaka Y, Sakurai Y, Izumi T, Inoue M, Kwak S, Tsuji S, Shimizu J. Cancer association as a risk factor for anti-HMGCR antibody-positive myopathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 3: e290, 2016

- 5) Hida A, Yamashita T, Hosono Y, Inoue M, Kaida K, Kadoya M, Miwa Y, Yajima N, Maezawa R, Arai S, Kurasawa K, Ito K, Shimada H, Iwanami T, Sonoo M, Hatanaka Y, Murayama S, Uchibori A, Chiba A, Aizawa H, Momoo T, Nakae Y, Sakurai Y, Shio Y, Hashida H, Yoshizawa T, Sakiyama Y, Oda A, Inoue K, Takeuchi S, Iwata NK, Date H, Masuda N, Mikata T, Motoyoshi Y, Uesaka Y, Maeda MH, Nakashima R, Tsuji S, Kwak S, Mimori T, Shimizu J. Anti-TIF1-gamma antibody and cancer-associated myositis: A clinicopathologic study. *Neurology* 87: 299-308, 2016

〔学会発表〕(計5件)

- 1) Jun Shimizu. Muscle pathological changes of cancer associated myositis. ICN 2018, 19th International Congress of Neuropathology. Sept. 23-27 2019 Tokyo

- 2) 清水 潤. 筋炎の最前線 悪性腫瘍と筋炎(癌合併筋炎). 第59回 日本神経学会学術大会シンポジウム 2018年5月 札幌

- 3) 清水 潤 筋病理と自己抗体. 第46回日本臨床免疫学会総会イブニングディスカッション 2018年11月 軽井沢

- 4) Jun Shimizu. MYOPATHY PATHOLOGY. XXIII World Congress of Neurology, September 16-21 2017, Kyoto

- 5) 清水 潤. 炎症性筋疾患の病態に関する最近の知見. 第3回 日本筋学会学術集会 サル

〔図書〕(計4件)

- 1) 前田 明子, 清水 潤. 科学評論社. ミオパチー:最近のトピックス 孤発性遅発性ネマリ
ンミオパチー(解説/特集) 神経内科 86巻3号 p315-323
- 2) 前田 明子, 清水 潤. 科学評論社. ミオパチー:最近のトピックス 抗ミトコンドリア抗
体陽性筋炎(解説/特集) 神経内科 86巻3号 p330-341
- 3) 角谷 真人, 清水 潤. 中外医学. Annual Review 神経 2018.鈴木則宏 編集 抗 HMGR 抗
体陽性筋症 2018年 pp270-280
- 4) 清水 潤. 病理と臨床. 病理診断に直結した組織学 2017年04月号 [雑誌]: 病理と臨床
監修 深山正久, 森永正二郎 骨格筋 清水潤 2017年4月号 p45-53

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 後藤 順

ローマ字氏名: (GOTO, Jun)

所属研究機関名: 国際医療福祉大学

部局名: 大学病院

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10211252

研究分担者氏名: 石浦 浩之

ローマ字氏名: (ISHIURA, Hiroyuki)

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 助教

研究者番号(8桁): 40632849

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。