

令和元年6月10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：2017～2018

課題番号：17H06653

研究課題名(和文)マクロファージを標的とした炎症性筋疾患の新規治療法開発

研究課題名(英文)A new therapeutic approach for the inflammatory myopathy targeting macrophages

研究代表者

梅澤 夏佳(UMEZAWA, Natsuka)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90801530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性筋疾患の治療開発は自己反応性T細胞が主な標的とされてきたが、本代表者の先行研究において病変筋組織中のマクロファージの重要性が示唆されたため、本研究においてはマクロファージを標的とした新たな治療法開発を目的とした。患者筋検体を用いた検討ではマクロファージの単離法につき条件を確立した。しかし、得られる細胞数は限られていたことから、当初予定していた手法でなくsingle cell RNA-seqなど別の手法を用いて引き続き解析を進める方針とした。疾患モデルを用いた検討では、表面抗原を標識としてマクロファージを除去する遺伝子改変マウスを用い、今後も検証を継続することとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のT細胞を標的とした治療法に加え、本研究で目的とするマクロファージを標的とした治療を開発することで、治療抵抗性の患者や、副腎皮質ステロイドをはじめとした従来の治療に不耐用であった患者の治療に貢献できる。また、従来筋組織は固定標本の免疫組織学的染色にとどまったが、本研究で確立した手法を用いることにより、筋組織から生細胞を採取することで、生体内での機能をより反映した解析を行うことが可能となった。

研究成果の概要(英文)：We previously found that the macrophages in inflamed muscles from mice with experimental myositis exacerbated myositis through the production of IL-23. In this study, we focused on the precise role of macrophages in idiopathic inflammatory myopathies (IIMs) other than IL-23 production. The techniques to obtain the macrophages in the muscles from patients with IIMs were established for the first time in this study. However, the number of the obtained macrophages was insufficient to separate to subsets or to analyse the molecular expression. In the future experiments, we analysis the limited number of macrophages with single cell RNA-seq. In addition, we obtained mice with human diphtheria toxin receptor to deplete the macrophages. Induction of experimental myositis in the mice would help understanding on the roles of macrophages in IIM.

研究分野：炎症性筋疾患

キーワード：多発性筋炎 皮膚筋炎 マクロファージ

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

1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM) は自己炎症性筋疾患であり、特異的な治療法が存在しないため多くの患者で筋力が回復せず日常生活動作が障害される。T細胞が病態の中心と考えられてきたが、患者の筋組織や我々の開発した多発性筋炎のマウスモデルではマクロファージ (MP) が病変に多数浸潤し、その機能は明らかでなかった。

本研究代表者は、大学院博士課程において自己炎症性筋疾患に特異的な新たな治療標的として interleukin (IL)-23 の役割を明らかにした。これまで臨床試験で治療標的とされたサイトカインは、病変のない筋でも産生される非特異的なメディエーターであり、その阻害は筋炎改善に有効でなかった。申請者は、IL-23 が障害を伴わない筋では産生されず傷害を受けた筋に浸潤する MP で産生されること、また IL-23 阻害が多発性筋炎モデルマウス (CIM) を治療的に改善することを明らかにした。これらの結果から、今後の探索項目として病変に浸潤する MP に注目した。近年、MP には炎症の促進だけでなく収束に関わるサブセットの存在が知られ、その可塑性から臓器内で機能が変化すると考えられているが、筋炎患者組織での MP サブセットについては詳細に解析されておらず、筋炎を増悪させるサブセット、筋炎を改善させるサブセットの特徴を IL-23 の発現レベルに注目して検証することで、新規治療法の開発につながると考えられた。

2. 研究の目的

炎症促進/筋萎縮、炎症収束/筋再生に関与する MP が存在し炎症性筋疾患の病態の増悪や軽快に関与する、筋特異的な MP の機能誘導には、病変のニッチを形成する骨格筋細胞が関与する、との2つの仮説を立てた。これらを検証することで、炎症性筋疾患に特異的な MP のエフェクター分子と機能誘導因子を対象とした多発性筋炎/皮膚筋炎の新規治療を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PM/DM の筋生検検体を用いたマクロファージの解析

採取直後の生検検体からマクロファージを単離した。また、それらの細胞の蛋白発現を解析して、サブセットにソートし、ソートした細胞集団ごとに機能分子の mRNA 発現解析を行うことを予定した。

(2) 疾患動物モデルにおけるマクロファージ (MP) のサブセットと機能解析

PM の動物モデルの骨格筋から MP を単離し、表面分子の発現解析をフローサイトメトリーで行った。また、MP の表面抗原を標識として MP を除去した場合の筋炎の重症度を判定するため、DTR マウスを用いた。

(3) 骨格筋によるマクロファージの形質変化誘導の解析

MP へ筋細胞が与える影響を評価するため、刺激を加えた骨格筋細胞株 (C2C12) の培養上清を加えた。

4. 研究成果

(1) PM/DM の筋生検検体を用いたマクロファージの解析

ヒト筋組織からのマクロファージの単離法について、使用する酵素などについて条件検討を行い、平均して 1,000 個程度の細胞を得る方法を確立した。これまで過去にはヒト筋組織から採取した MP の解析はされてこなかったことから、細胞単離の手法を確立したことは今後の研究開発において大きな意義があった。しかし、得られた細胞数では、これらの細胞をさらにフローサイトメトリーでソーティングして解析する方法には耐えられず、細胞数が不足していた。今後は少ない細胞数でも可能な解析手法に変更し、今後行う研究計画の中において解析を継続する方針とした。

(2) 疾患動物モデルにおけるマクロファージ (MP) のサブセットと機能解析

複数の表面分子の発現を解析し、CD206 を発現する細胞が筋炎モデルの最重症期に増多することから、CD206 陽性細胞除去のため CD206-DTR マウスを入手した。DT による細胞の除去効率を評価するため条件検討を行ったが、安定した条件が得られなかったため CD206-DTR マウスでの CIM の誘導までには至らなかった。

(3) 骨格筋によるマクロファージの形質変化誘導の解析

対象となる MP について、ヒト末梢血単球からどのような刺激誘導で得られた MP を用いるのが適切か、4 - 1 で採取できた MP の結果も用いて判断する予定であった。しかし、4 - 1 が達成されなかったため、本研究期間内では、ヒト末梢血単球から複数の刺激条件を用いて所謂

M1、M2 など誘導できることを確認した段階にとどまった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Natsuka Umezawa, Kimito Kawahata, Fumitaka Mizoguchi, Naoki Kimura, Yoko Yoshihashi-Nakazato, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka, Interleukin-23 as a therapeutic target for inflammatory myopathy. Scientific Reports 2018;8:5498.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1)Natsuka Umezawa, Kimito Kawahata, Naoki Kimura, Yoko Yoshihashi-Nakazato, Hitoshi Kohsaka, Interleukin-23 as a therapeutic target for inflammatory myopathy, 7th East Asian Group of Rheumatology, July 2017, Tokyo,

Young Investigator Award 受賞

(2)梅澤夏佳、川畑仁人、木村直樹、吉橋洋子、上阪等, 炎症性筋疾患モデルの病変局所で産生される IL-23 は治療標的として有用である, 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会, April 2017, 博多

(3)梅澤 夏佳、木村 直樹、吉橋洋子、上阪 等, 多発性筋炎/皮膚筋炎 12 例の前脛骨筋を対象としたコンコトーム筋生検の有用性, 第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会, April 2018, 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者：なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。