

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09784

研究課題名(和文)壊死性ミオパチーに関連する自己抗体の病態機序の解明と臨床応用に向けて

研究課題名(英文) Autoantibodies associated with immune-mediated necrotizing myopathy: pathogenesis and clinical implication

研究代表者

鈴木 重明 (Suzuki, Shigeaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：50276242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性筋疾患(筋炎)は免疫学的機序により筋線維が障害される疾患の総称である。「筋炎の統合的診断研究」は、筋病理診断を基にした筋炎のデータベースであり、症例登録数は800例を超える。筋病理では多発筋炎と皮膚筋炎は別々の病態機序を背景とした異なる疾患である。炎症細胞浸潤をほとんど認めず、筋線維の壊死・再生所見が特徴的な筋病理所見に基づいた免疫介在性壊死性ミオパチー(immediate-mediated necrotizing myopathy, IMNM)やアミノアシルtRNA合成酵素に対する自己抗体が陽性となる抗合成酵素症候群について、臨床像、筋病理、自己抗体の立場から固有の病型として確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、新たな病型や自己抗体の登場があり、筋炎の疾患概念には大きな変遷があった。我々の研究グループの一連の成果により、自己抗体の重要性が証明され、実地の臨床現場でも必須の検査となった。IMNMの患者血清中に特異的な自己抗体である抗SRP抗体と抗HMGR抗体が検出される。「筋炎の統合的診断研究」では最も頻度の高い病型であるIMNMにおいて40%で抗SRP抗体、25%で抗HMGR抗体が検出された。両者が同一の患者血清中に存在することはなく、互いに独立した血清マーカーである。我々はこれらの自己抗体の測定系を樹立し、実臨床で使用されている。今後、筋炎における自己抗体の病態機序の解明が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory myopathies are a heterogeneous group of immune-mediated diseases that involve skeletal muscle as well as many other organs. In addition to a histological diagnosis at muscle biopsy, the clinical phenotypes of inflammatory myopathies can be defined by various autoantibodies that are originally detected by RNA or protein immunoprecipitation. Immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM), characterized by significant necrotic and regeneration muscle fibers with minimal or no inflammatory cell infiltration, is associated with the presence of autoantibodies. IMNM is now classified as a distinct category of inflammatory myopathies. We divided autoantibodies into three groups: those associated with IMNM, those against aminoacyl transfer RNA synthetase, and those associated with dermatomyositis. The screening of autoantibodies has clinical relevance for managing patients with inflammatory myopathies.

研究分野：神経内科

キーワード：自己抗体 炎症性筋疾患 免疫介在性壊死性ミオパチー 抗SRP抗体 抗HMGR抗体 抗合成酵素症候群 抗ARS抗体

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性筋疾患（筋炎）は多発筋炎，皮膚筋炎，封入体筋炎，免疫介在性壊死性ミオパチー（immune-mediated necrotizing myopathy, IMNM）に大別されるが，いずれの病型にも該当しない症例も存在し，極めて不均一な疾患である．炎症性筋疾患の診療に神経内科だけでなく膠原病内科，皮膚科，呼吸器内科，小児科も関与し，それぞれの科で独自の疾患概念が存在している．したがって診療科を超えた一定のコンセンサスがない状態で，炎症性筋疾患の臨床が行われているのが現状である．近年，あらたな自己抗体の登場や疾患概念の変遷から，自己抗体の臨床的意義ならびに病態機序についての解明が必要である．

### 2. 研究の目的

本研究課題は炎症性筋疾患の患者検体（血清，genomic DNA，生検筋）を用いた臨床研究である．臨床像，human leukocyte antigen (HLA)，自己抗体，筋病理，病態機序解明など多面的な検討を行い，自己抗体の意義につき多面的に解析を行う．最終的には自己抗体測定を実地医療で行うための保険収載を目標として測定キットの開発を行う．

### 3. 研究の方法

本研究の対象は筋炎の統合的診断研究データベースに登録された患者である．国立精神神経センター研究所第一部（NCNP）と慶應義塾大学神経内科と共同で行っている「筋炎の統合的診断研究」は筋病理を基にした800症例を超える炎症性筋疾患のデータベースである．筋病理，自己抗体，臨床像のデータが完備した本研究は世界でも類のない規模と多面的な要素が包括されている．自己抗体はRNA免疫沈降法とELISAが中心である．RNA免疫沈降法は細胞抽出液と患者血清中のIgGを吸着させたプロテインA-セファロース粒子と反応させ，形成された免疫沈降物からRNAをフェノール抽出し，7M尿素-10%ポリアクリルアミドゲルで泳動のうえ銀染色する．この方法で多様な自己抗体をスクリーニングが可能である．その他にも皮膚筋炎に関連した自己抗体などはenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で行う．筋病理についてはNCNPで各種染色や疫染色から筋病理診断を行う．遺伝子診断や特殊な生化学検査を追加することで，炎症性筋疾患以外の筋疾患を完全に除外できるのが最大の利点である．

### 4. 研究成果

#### (1) 炎症性筋疾患の統合的診断研究データベースの完成



図1. 炎症性筋疾患における病型

最終的な病型の割合は図1に示すような割合となった．

#### (2) 抗合成酵素症候群

アミノアシル tRNA 合成酵素 (aminoacyl transfer RNA synthetase, ARS) に対する自己抗体（抗ARS抗体）は筋炎で検出される代表的な自己抗体である．陽性となる症例は特徴的な臨床像から「抗合成酵素症候群」（antisyntetase syndrome）と呼ばれている．筋炎以外に，間質性肺炎，多発関節炎，レイノー現象，発熱，手指の角質化と色素沈着（機械工の手）などを特徴としている．抗ARS抗体の対応抗原は，Jo-1をはじめ，PL-7，EJ，OJ，PL-12，KSなど複数の自己抗原が同定されている．抗OJ抗体の頻度はこれまでの報告以上に多く，また重篤な筋症状を呈する場合があり，ELISAで抗ARS抗体が陰性の場合であっても抗OJ抗体が陽性の可能性があることに注意を要することを報告した．また筋病理診断においても抗合成酵素症候群は従来の筋病理診断とは異なる新たな病型として考えられるようになり，筋束周囲の筋線維に認められる壊死（perifascicular necrosis）が特徴的である．

#### (3) 新規自己抗体の検索

IMNM患者の35%は抗SRP抗体，抗HMGR抗体いずれも陰性である．それ以外の新規自己抗体がIMNMの病態に関与している可能性がある．すでに多くの自己抗体の発見に貢献してきたRNA免

疫沈降法とは別の測定系が必要である．横紋筋細胞 (RD) を S-35 で標識した抗原に用いる蛋白免疫沈降法で未同定の蛋白バンドから，matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight 法による mass spectroscopy から自己抗原の同定を試みた．結果として IMNM の自己抗原として有望な標的分子を確認することはできなかった．一方，既知の自己抗体である抗ミトコンドリア M2 抗体や抗 U1RNP 抗体が IMNM に関連した自己抗体であることを，ドイツやフランスとの共同研究で明らかにした．

#### (4) 免疫遺伝学的背景

免疫遺伝学的背景との関連については注目した．すでに HLA-DRB1 遺伝子の DNA タイピングを PCR-SSOP 法により行い，DRB1\*08:03 ( $p=0.000021$ ) と DRB1\*11:01 ( $p=0.04$ ) が日本人健常者群に比し IMNM 患者群で有意に多いことが明らかにした．さらに次世代シーケンサーを用いて，多型性に富む HLA 遺伝子 6 座位 (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) を中心に大規模な多型解析をおこなった (投稿準備中)．さらに封入体筋炎についても HLA-DRB1 遺伝子の解析をすすめ，健常人と比較し DRB1\*01:01 (17% vs. 6%,  $p=0.00003$ )，DRB1\*04:10 (8% vs. 2%,  $p=0.00001$ )，DRB1\*15:02 (24% vs. 12%  $p=0.0002$ ) の頻度が高かった．

#### (5) 自己抗体の病態機序

抗 SRP 抗体や抗 HMGCRCR 抗体が骨格筋の自己免疫反応を引き起こし，IMNM を発症する病態機序を解明した研究はない．また受動免疫，能動免疫いずれの方法でも IMNM モデル動物の作成には至っていない．IMNM の筋病理は炎症細胞浸潤がなく，補体を介在して筋障害を誘発し，自己抗体が筋再生に阻止する仮説を立てて研究をすすめた．*in vivo* の系として cardiotoxin をマウス大腿直筋に注入し 5-7 日後に骨格筋再生が観察される skeletal muscle injury model を用いた．患者血清を toxin 投与 3-5 日後に筋注射し筋再生への影響を運動機能や組織で解析を行ったが，現時点においては確実な研究成果は得られておらず継続中である．

#### (6) IMNM 関連自己抗体測定の臨床応用

IMNM 診断に有用な自己抗体の測定が臨床で広く使用されるためには迅速な結果判明と再現性の高いアッセイ系が必要である．慶應義塾大学とコスミックコーポレーションと共同で，IMNM 関連自己抗体の定量可能な新たな ELISA を開発し，現在は受託研究として臨床現場で使用されている (図 2)．体外診断用医薬品としての承認をめざしている．

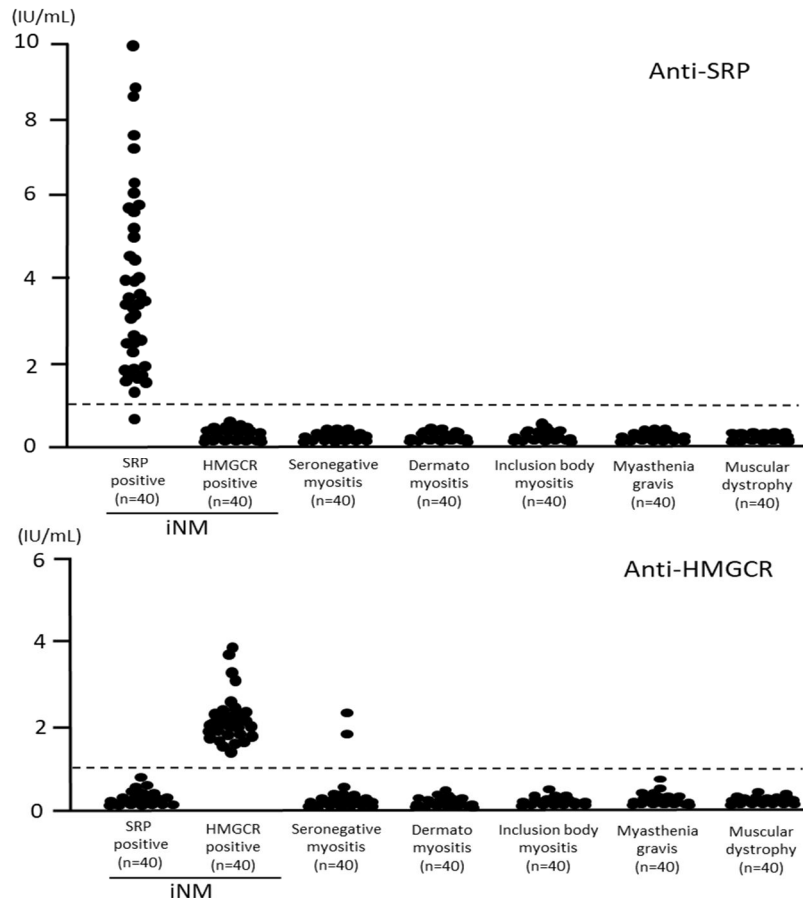


図 2. 抗 SRP 抗体と抗 HMGCRCR 抗体の ELISA

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Seki M, Uruha A, Ohnuki Y, Kamada S, Noda T, Onda A, Ohira M, Isami A, Hiramatsu S, Hibino M, Nakane S, Noda S, Yutani S, Hanazono A, Yaguchi H, Takao M, Shiina T, Katsuno M, Nakahara J, Matsubara S, Nishino I, Suzuki S.	4. 巻 100
2. 論文標題 Inflammatory myopathy associated with PD-1 inhibitors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Autoimmun	6. 最初と最後の頁 105 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2019.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kufukihara K, Watanabe Y, Inagaki T, Takamatsu K, Nakane S, Nakahara J, Ando Y, Suzuki S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Cytometric cell-based assays for anti-striational antibodies in myasthenia gravis with myositis and/or myocarditis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 5284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41730-z	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 -

1. 著者名 Noguchi Eri, Uruha Akinori, Suzuki Shigeaki, Hamanaka Kohei, Ohnuki Yuko, Tsugawa Jun, Watanabe Yurika, Nakahara Jin, Shiina Takashi, Suzuki Norihiro, Nishino Ichizo	4. 巻 74
2. 論文標題 Skeletal Muscle Involvement in Antisynthetase Syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 JAMA Neurology	6. 最初と最後の頁 992 ~ 992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamaneurol.2017.0934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Shigeaki, Ishikawa Nobuhisa, Konoeda Fumie, Seki Nobuhiko, Fukushima Satoshi, Takahashi Kikuko, Uhara Hisashi, Hasegawa Yoshikazu, Inomata Shinichiro, Otani Yasushi, Yokota Kenji, Hirose Takashi, Tanaka Ryo, Suzuki Norihiro, Matsui Makoto	4. 巻 89
2. 論文標題 Nivolumab-related myasthenia gravis with myositis and myocarditis in Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 1127 ~ 1134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000004359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木重明
2. 発表標題 抗ARSミオパチー
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木重明
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬と神経・筋における有害事象
3. 学会等名 第16回日本臨床腫瘍学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗横紋筋抗体の測定方法および測定試薬	発明者 鈴木重明・稲垣貴之	権利者 鈴木重明・株式会社TKResearch
産業財産権の種類、番号 特許、2017-229248	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

慶應義塾大学医学部神経内科ホームページ <a href="https://www.neurology.med.keio.ac.jp/staff/6-2/">https://www.neurology.med.keio.ac.jp/staff/6-2/</a>
--

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