

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07956

研究課題名(和文)炎症性筋疾患における免疫チェックポイント分子とマクロファージの役割に関する検討

研究課題名(英文)Role of immune checkpoint molecules and macrophages in inflammatory myopathies

研究代表者

清水 潤 (SHIMIZU, Jun)

東京工科大学・医療保健学部・教授

研究者番号：40260492

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)：免疫チェックポイント阻害薬の副作用としての筋炎(irAE筋炎)の臨床像と病理像の特徴を12例の症例を解析し、免疫チェックポイント分子とマクロファージの役割を明らかにした。また、irAE筋炎と類似の病理像が慢性移植片対宿主病(GvHD)に伴う筋炎でも存在することを示し、慢性GvHD筋炎でも免疫チェックポイントの異常が関与していることも明らかにした。免疫チェックポイントの変化を示す封入体筋炎と多発筋炎の生検筋のmRNA発現解析をおこない、カドヘリン1(CDH1)が多発筋炎と異なり治療抵抗性である封入体筋炎に特異的に発現し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

免疫チェックポイント阻害薬の副作用としての筋炎(irAE筋炎)の筋で炎症の局所に高度のマクロファージ浸潤を認め免疫チェックポイント分子がリンパ球と筋線維に発現していることを明らかにした。本知見はirAE筋炎の病態解明へつながる。多様性のある筋炎分類の観点からは、慢性移植片対宿主病(GvHD)に伴う筋炎でも免疫チェックポイントの異常が関与する可能性があることを明らかにした。また、難治性の封入体筋炎では治療可能な多発筋炎と比較し、筋組織でカドヘリン1(CDH1)が特異的に発現していることを明らかにした。本知見は封入体筋炎の病態解明から治療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The clinical and pathological features of myositis as a side effect of immune checkpoint inhibitors (irAE myositis) were analyzed in 12 cases to clarify the role of immune checkpoint molecules and macrophages. Similar pathology to irAE myositis was shown to be present in Graft-versus-host disease (GvHD) related myositis, revealing that immune checkpoint abnormalities are also involved in chronic GvHD myositis. In RNA-sequencing analysis of muscle samples from patients with inclusion body myositis (IBM) or polymyositis, it was revealed that, CDH1, which encodes the epidermal cell junction protein cadherin 1, was ectopically expressed in the muscles of IBM.

研究分野：神経内科 免疫性神経疾患 筋炎

キーワード：免疫チェックポイント分子 マクロファージ 筋炎 発現解析 封入体筋炎 多発筋炎

1. 研究開始当初の背景

筋炎は出現する筋炎自己抗体と筋病理像に特徴づけられる複数のサブタイプに分類される症候群である。研究開始当初、免疫チェックポイント阻害薬に伴う筋炎 (irAE 筋炎) が従来の既存の筋炎とは、まったく異なる特徴を有する筋炎として注目されつつあった。しかし、irAE 筋炎の報告は散発的で多数例のケースシリーズでの報告は乏しく、irAE 筋炎の臨床病理像の特徴は充分わかっていなかった。一方、我々は、2018年に970例の筋炎症例中で重症筋無力症+筋炎例10例を解析し、irAE 筋炎と類似の臨床病理像を有することを報告した。このことより、irAE 筋炎と類似の免疫チェックポイント pathway の乱れに伴う筋炎機序を有する筋炎が稀ではあるが、従来の筋炎の中にも存在する可能性も示唆されていた。さらに、免疫チェックポイント pathway の変化が特徴的である筋炎のサブタイプを抽出し比較し、病態に関与する key molecule の同定することは、病態解明につながることを予想された。

2. 研究の目的

本研究では、炎症性筋疾患 (筋炎) の生検筋試料を用い免疫チェックポイント pathway の変化が特徴的である症例群を区別化、その臨床病理像を明らかにすること、さらに、免疫チェックポイント pathway の関連した筋炎の病態に関与する key molecule の同定することを目的にした。

3. 研究の方法

筋炎の生検筋試料を用い、免疫組織化学、発現解析の手法を用い、まず、典型的な12例のirAE筋炎の臨床病理像を解析し、免疫チェックポイント pathway の乱れに伴う筋炎の臨床病理像の特徴を解析した。さらに、免疫チェックポイント pathway の乱れに伴う筋炎の特徴を有する筋炎として慢性 GvHD (graft versus host disease; GVHD, 移植片対宿主病) 筋炎が類似の病態をもつと推測し16例の慢性 GvHD の臨床病理像の解析をおこなった。また、免疫チェックポイント pathway が特徴である筋炎のサブタイプとして封入体筋炎・多発筋炎に注目し、免疫チェックポイント pathway, マクロファージ関連 mRNA の発現を比較し、病態に関与する key molecule の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 免疫チェックポイント阻害薬による免疫関連有害事象としての筋炎 (irAE 筋炎) の病理所見と免疫チェックポイント分子の関与

免疫チェックポイント阻害薬による免疫関連有害事象としての筋炎 (irAE 筋炎) の病理像を検討した。(表1) 症例は12例 (男9, 女3)。臨床像では、発症前の投与サイクルは2.2回、免疫チェックポイント阻害薬投与開始から発症までの期間は31.7日。筋痛を58%に認め、筋力低下は全例に認め、遠位25%、眼瞼下垂58%、複視33%、傍脊柱筋筋力低下42%、嚥下障害42%、易疲労性を42%に認めた。生検時の血清CK値は4661IU/L。抗横紋筋抗体を82%、抗AChR抗体を33%に認めた。反復筋電図検査は10例でおこなわれ陽性例はなかった。筋病理像の特徴としては、壊死再生線維の多巢性集簇像92%(11/12)、筋内鞘中心の炎症細胞浸潤83%(10/12)、CD8+細胞筋線維包囲侵入像58%(7/12)、CD68+マクロファージの筋内鞘高度浸潤92%(11/12)、MHC-I

陽性筋線維 100% (12/12), MHC-II 陽性筋線維 83% (10/12), PD-1+細胞筋線維包圍侵入像 67% (8/12), PD-L1 陽性筋線維 92% (11/12), PD-1+リンパ球近傍 PD-L1+筋線維 (PD-1/PD-L1 病理) を 92% (11/12)に認めた。

【結論】 irAE 筋炎では、多巣性に筋束内にマクロファージが侵入し、免疫チェックポイント分子である PD-1 と PG-L1 を発現したリンパ球と筋線維が関与を示唆する病理像である、PD-1+リンパ球近傍 PD-L1+筋線維 (PD-1/PD-L1 病理) を高頻度に認め、PD-1/PD-L1 病理は免疫チェックポイント分子が関与する筋炎に特徴的な変化であることが示唆された。

(2) 慢性移植片対宿主病 (GvHD) に伴う筋炎の病理所見と免疫チェックポイント分子の関与

慢性 GvHD に伴う筋炎の病理像の特徴を 16 例で検討した (男 10, 女 6). 平均年齢 41 歳 (22-59 歳). 臨床像では、亜急性に増悪し CK 値が 1000IU/L 以上が 5 例 (平均 4441IU/L)

(CK 高値群), CK 値が 1000IU/L 以下 11 例 (平均 119IU/L, 15-304IU/L) (CK 低値群) の 2 群に特徴付けられた. 病理所見では、壊死・再生線維の頻度は、多巣性の筋線維食集簇像 3 例 (図 1), MHC-I 発現亢進は全例で認め、筋束周辺部に強調 (PF-MHC-I) 8 例 (50%), MHC-II 発現亢進 11 例 (69%), 筋束周辺部に強調 (PF-MHC-II) 9 例 (56%), CD8+リンパ球筋線維包圍像 4 例 (25%), CD11c+マクロファージ (CD11c+MP) 筋内鞘高度浸潤 6 例 (38%), CD11c+MP 筋線維包圍侵入像 4 例 (25%), ヘモジデリン沈着 3 例 (19%) であった. ヘモジデリン沈着は炎症像の乏しい症例に認めた. 皮膚筋炎に特徴的な C5b9 補体沈着や MxA 陽性線維は認めなかった. CK 高値群の 5 例の病理所見の特徴は、多巣性の筋線維食集簇像 (3/5), MHC-class I および-II 発現亢進 (5/5), PF-MHC-I

(2/5), PF-MHC-II (3/5), CD8+リンパ球および CD11c+MP 筋線維包圍像 (3/5), PD-1+リンパ球筋内鞘高度浸潤 (5/5;100%), PD-L1+筋線維 (4/5;80%) であった. PD-L1+筋線維は PD-1+リンパ球近傍に存在した (PD-1/PD-L1 病理).

【結論】 慢性 GvHD に伴う筋炎は臨床病理像から 2 群に特徴づけられ、CK 高値群 (筋炎活動群) では、活動性の筋傷害に関連した CD11c+MP, CD8+リンパ球を認め、免疫チェックポイント分子に関係する病理変化 (PD-1/PD-L1 病理) として PD-1+リンパ球近傍 PD-L1+筋線維像を高頻度 (80%) で認めた.

表1 免疫チェックポイント阻害薬に伴う筋炎 (irAE筋炎) の臨床病理像

	irAE筋炎 (n=12)
年齢	70.8±11.8
性(男性)	9/12
発症までの投与サイクル	2.2±1.0 (1-4)
投与から発症まで(日)	31.7±13.8 (14-57)
症状	
筋症状	
筋痛	7/12 (58%)
筋力低下	12/12 (100%)
遠位	3/12 (25%)
眼瞼下垂	7/12 (58%)
複視	4/12 (33%)
傍脊柱筋障害	5/12 (42%)
嚥下障害	5/12 (42%)
易疲労性	5/12 (42%)
検査所見	
CK (IU/L)	4661±6951
抗横紋筋抗体	9/11 (82%)
抗体AChR 抗体 (titer <0.3)	4/12 (33%)
筋電図	
安静時放電	7/12 (58%)
反復刺激筋電図陽性	0/10 (0%)
病理所見	
壊死・再生線維の分布	
多巣性集簇像	11/12 (92%)
散在瀰漫性	0/12 (0%)
炎症の分布	
筋周膜 < 筋内鞘	10/12 (83%)
CD8+細胞包圍侵入像	7/12 (58%)
CD68+マクロファージの筋内鞘高度浸潤	11/12 (92%)
MHC-I 発現線維	12/12 (100%)
MHC-II発現線維	10/12 (83%)
PD-1/PD-L1 免疫組織変化	
PD-1+細胞包圍侵入像	8/12 (67%)
PD-L1+筋線維	11/12 (92%)
PD-1+細胞の近傍のPD-L1+筋線維	11/12 (92%)

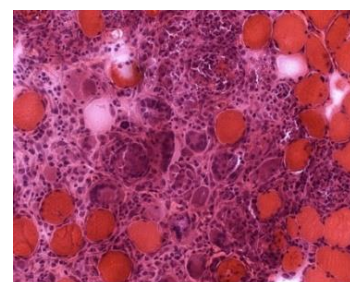


図1 慢性GvHDによる筋炎

(3) 免疫チェックポイント pathway の変化が特徴である封入体筋炎・多発筋炎における病態に
関与する key molecule の発現解析手法を用いた同定

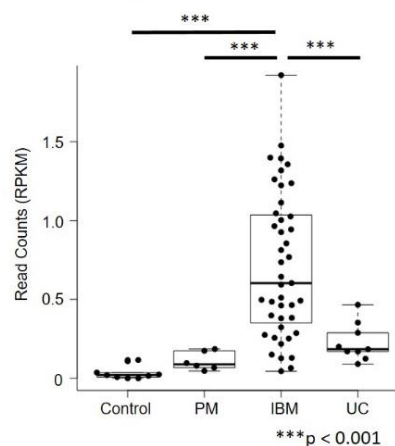
筋炎の生検筋試料を次世代シーケンサーを用い mRNA の網羅的発現解析をおこない、封入体筋炎
(Inclusion body myositis; IBM) および多発筋炎 (Polymyositis; PM) では PD-1, PD-L1, PD-
L2 などの免疫チェックポイント分子と CD11b, CD68, CD11c, CD163 などのマクロファージマ-
ーカーの亢進を認めることを確認した。(表 2)

表2 筋炎のタイプ別の免疫チェックポイント分子と代表的マクロファージマ-
ーカーの mRNA の変化
(正常との差を P 値で示す)

		PD-1	PD-L1	PD-L2	CD11b	CD68	CD11c	CD163
Control vs	DM(皮膚筋炎)	0.0072	4.00E-05	2.90E-05	4.00E-05	2.90E-07	6.50E-02	
	IBM(封入体筋炎)	5.40E-06	7.70E-07	3.00E-06	5.40E-06	3.80E-09	8.60E-06	
	PM(多発筋炎)	0.00063	0.00033	0.0012	8.20E-05	8.20E-05	8.20E-05	
	HMGCR(壊死性ミオパチー)	0.0024	0.88	0.014	3.90E-05	8.00E-07	3.80E-05	0.00015
	SRP(壊死性ミオパチー)	0.37	0.24	0.088	6.30E-05	1.70E-06	1.00E-04	3.30E-05
	SSc(強皮症ミオパチー)	0.0056	0.24	0.0012	2.80E-05	0.00019	0.0012	1.00E-05

IBM は治療抵抗性であるが PM は治療反応性を有する。同じ免疫チェックポイント pathway の活
性化を伴う筋炎でありながら、治療反応性が異なる病態背景を明らかにするために、IBM および
PM の生検筋検体を用い mRNA の発現解析をおこなった。MHC クラス I を発現する CD8 陽性 T 細胞
が非壊死性筋線維に侵入している病理所見を有する患者 58 名 [IBM43 名, PM6 名, 分類不能 (臨
床像が IBM にも PM にも当てはまらない例) 9 名] と、組織学的異常のない対照 9 名からなる 67
名の筋試料について RNA-シーケンス解析を行った。得られたデータのクラスター解析, 主成
分分析, pathway 解析の結果, IBM と PM で同定された免疫チェックポイントおよびマクロファ-
ージ関連の発現遺伝子と pathway はほぼ同等であった。しかし, 細胞接着分子に関する pathway は,
PM およびコントロールと比較して, IBM で発現が増加していた ($p < 0.01$)。特に, 表皮細胞接
合タンパク質であるカドヘリン 1 をコードするカドヘリン 1 (CDH1) が IBM の筋組織で異所的に
発現していることが確認された。(図 2) ウェスタンブロットングにより, IBM の筋肉にカドヘ
リン 1 が存在することが確認された。免疫組織化学的にも, 対照群では抗カドヘリン 1 抗体陽性
筋線維はなく, 他の炎症性筋疾患ではほとんど陽性にならないのに, IBM の筋肉では抗カドヘ
リン 1 抗体陽性であることが確認された。抗カドヘリン 1 抗体で染色された筋線維には縁取り空胞や異常な蛋
白蓄積は見られなかった。実験的骨格筋再生・分化系
の発現解析では, 骨格筋再生時に発現する多くの遺伝
子は, IBM を含む様々なタイプの炎症性筋疾患におい
て共通して発現が上昇していたが, CDH1 の過剰発現は
IBM に特異的であった。筋線維における CDH1 の発現は
IBM に特異的であり, IBM の病態解明への手がかりと
なる可能性が明らかになった。

図2 封入体筋炎における cadherin 1 の発現



(4) 研究成果のまとめ

12 例の典型的 irAE 筋炎の臨床病理像の解析より免疫チェックポイントの免疫異常の関連する
筋炎の特徴を明らかにした。病理所見として CD8+細胞および PD-1+細胞の筋線維包圍侵入像,
PD-1+リンパ球近傍 PD-L1+筋線維 (PD-1/PD-L1 病理) が特徴的であった。同様の所見は慢性 GvHD
による筋炎の活動群でも認め, 慢性 GvHD も免疫チェックポイントの免疫異常の関連する筋炎で
あることが示唆された。病態機序に関連する key molecules の解明をめざし, 免疫チェックポイ

ント pathway が特徴である IBM と PM の生検筋組織を用い次世代シーケンサーで mRNA の網羅的発現解析をおこなった。その結果、免疫チェックポイント pathway や発現マクロファージ遺伝子には差がなかったが、治療抵抗性の IBM においてカドヘリン 1 (CDH1) が発現亢進し、異所的に出現していることが確認された。

<引用文献>

1. Uchio N, Taira K, Ikenaga C, Kadoya M, Unuma A, Yoshida K, et al. Inflammatory myopathy with myasthenia gravis: Thymoma association and polymyositis pathology. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2019;6(2):e535.
2. Ikenaga C, Kubota A, Kadoya M, Taira K, Uchio N, Hida A, et al. Clinicopathologic features of myositis patients with CD8-MHC-1 complex pathology. *Neurology*. 2017;89(10):1060-8.
3. Uchio N, Taira K, Ikenaga C, Unuma A, Kadoya M, Kubota A, et al. Granulomatous myositis induced by anti-PD-1 monoclonal antibodies. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2018;5(4):e464.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uchio Naohiro, Unuma Atsushi, Kakumoto Toshiyuki, Osaki Masao, Zenke Yoshitaka, Sakuta Kenichi, Kubota Akatsuki, Uesaka Yoshikazu, Toda Tatsushi, Shimizu Jun	4. 巻 4
2. 論文標題 Pembrolizumab on pre-existing inclusion body myositis: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Rheumatology	6. 最初と最後の頁 4:48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41927-020-00144-5	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 Ikenaga Chiseko, Date Hidetoshi, Kanagawa Motoi, Mitsui Jun, Ishiura Hiroyuki, Yoshimura Jun, Pinal Fernandez Iago, Mammen Andrew L., Lloyd Thomas E., Tsuji Shoji, Shimizu Jun, Toda Tatsushi, Goto Jun	4. 巻 91
2. 論文標題 Muscle Transcriptomics Shows Overexpression of Cadherin 1 in Inclusion Body Myositis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 317 ~ 328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ana.26304	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水潤
2. 発表標題 教育委員会セミナー2 現代における筋生検の適応と炎症性筋疾患診断
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水潤
2. 発表標題 第15回専門医育成教育セミナー 実臨床から筋病理へ筋病理から実臨床へ
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会（招待講演）
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
研究 分担者	久保田 暁 (KUBOTA Akatsuki) (30771589)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究 分担者	石浦 浩之 (ISHIURA Hiroyuki) (40632849)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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