

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07911

研究課題名（和文）壊死性ミオパチー発症メカニズムに関与する遺伝子の探索

研究課題名（英文）Search for genes involved in the mechanism of immune-mediated necrotizing myopathy

研究代表者

大貫 優子（Ohnuki, Yuko）

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：20384927

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、炎症性筋疾患のうち、免疫介在性壊死性ミオパチー（IMNM）日本人250例のHLA6座解析を実施した。その結果、成人患者では特定のHLAアレルが解析対象とした全てのHLA座においてIMNMと関連し、特にDRB1*08:03が最も強い感受性を示した。サブグループ層別化した際の関連解析とともに、2022年度論文にて報告した（HLA.101:449-457,2023）。IMNMのみならず、封入体筋炎（IBM）83例や皮膚筋炎（DM）158例についても解析し、病型ごとに違うリスクアレルを有することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IMNMは比較的新しい疾患概念であることなどから、これまでその遺伝学的背景は十分に解明されてこなかった。HLA遺伝子は自己免疫疾患において極めて重要な役割を果たすことが知られているため、この領域における詳細な解析を行い、日本人患者におけるリスクアレルを示したことは、病型分類や易罹患性を検討する上で意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We performed the six-locus HLA analysis of the patients with immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM). We found that specific HLA alleles were associated with IMNM in adult patients at all HLA loci analyzed, with DRB1*08:03 showing the strongest susceptibility. We reported these results (HLA.101:449-457,2023). We analyzed not only IMNM but also inclusion body myositis (IBM) and dermatomyositis (DM) and showed that each disease type has different risk alleles.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：炎症性筋疾患 免疫介在性壊死性ミオパチー HLA

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM)の遺伝子研究

近年、炎症性筋疾患(筋炎)の中でも壊死再生線維の多発を主体とし炎症性リンパ球浸潤の乏しい病理像を特徴とする病型の報告が相次いでおり、免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM)として注目されている。IMNM をきたす疾患は多岐にわたり、免疫介在性のものが大半を占めると考えられている。癌、膠原病、スタチンなどの薬剤も本疾患の誘発要因である。IMNM と関連する代表的な自己抗体も同定されている。IMNM の病態は他の筋炎と異なると推定されており、診断基準や治療法の見直しの観点からも病態解明が急務であった。上記のような筋炎の免疫学的・病理学的な差が明らかになるにつれ、確定診断に詳細な筋生検所見が必須となっているが、筋生検を確実にできる施設は少なく、診断困難な症例を増やしているともいえる。近年自己抗体の発見とその測定法の開発は著しいが、遺伝学的背景は十分に解明されていない。本疾患の疾患関連遺伝子を網羅的かつ多角的に解析し、日本人健常者、臨床データとの比較解析により本疾患の遺伝学的特徴を明確にすることが急務と考えられた。一方、自己免疫疾患に深く関連するヒト白血球抗原(Human leukocyte Antigen; HLA)遺伝子が炎症性筋疾患に関連するという報告は、特に欧米から複数出ていたが、IMNM に関する HLA 解析の研究報告は著しく少なく、IMNM と関連する真の HLA 多型は何か、という最終的な結論には至っていなかった。

(2) 炎症性筋疾患の病型分類変遷

申請者らは、臨床データ、病理所見および抗体情報に基づき IMNM と診断された日本人の HLA 解析を進めていたが、炎症性筋疾患の中での遺伝学的差異を検討するためには、他の病型との比較が不可欠であった。一方、国内において HLA 遺伝子と多発筋炎 (PM)の関連を解析した研究は数少なく、*DRB1*08:03* と関連があるとの報告が 1 報あるのみであった。しかし本報告の対象症例は病理検査を必須としていないため、IMNM が含まれている可能性は否定できない (J Rheumatol. 2004, 31:1768-1774)。病理学的に明確に炎症性筋疾患病型分類された症例において HLA 遺伝子解析を行い、IMNM との比較を行うこと、炎症性筋疾患の病型分類の新たな整備を行うことが急務であった。

2. 研究の目的

(1) HLA 遺伝子多型解析による IMNM 関連アレルの同定

病理学的に IMNM と診断された成人および若年患者の血液 DNA を用いて、**HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1** の多型に富むエキソンについての多型解析を行う。その後、申請者の研究室が保有する 460 例の日本人健常者との間の比較解析をアレルレベル、ハプロタイプレベルで実施し、疾患関連 HLA 多型を同定する。患者を自己抗体や合併症により層別化したうえでさらに比較解析を行う。

(2) HLA 遺伝子多型解析による炎症性筋疾患各病型関連アレルの同定

病理学的に炎症性筋疾患と診断された患者の血液 DNA を用いて、HLA 多型解析を行う。その後、日本人健常者との間の比較解析をアレルレベル、ハプロタイプレベルで実施し、各炎症性筋疾患関連 HLA 多型を同定する。さらに IMNM で得られた結果との比較を行う。

3. 研究の方法

(1) IMNM サンプル収集

研究協力施設にて十分な説明と同意の上収集された日本人 IMNM250 例の末梢血または筋より抽出したゲノム DNA を用いた。すべての症例において、筋生検が可能であり、完全な臨床情報を伴う血清が提供されており、筋病理検査によって IMNM に合致する所見を認めることを参加条件とした。

(2) 炎症性筋疾患他病型 サンプル収集

研究協力施設にて十分な説明と同意を得た患者のうち、臨床所見、自己抗体測定、病理学的検討において炎症性筋疾患と診断された者を対象とした。末梢血より一般的な方法にて抽出したゲノム DNA を用いた。

(3) PCR-SBT 法および PCR-SSOP 法による HLA 遺伝子の多型解析

収集した DNA サンプルを用い、HLA 遺伝子 6 座 (*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1*, *-DPB1*) を対象として PCR-SBT (sequence based typing) 法および PCR-SSOP (sequence specific oligonucleotide probe) 法により多型解析を行った。統計解析は Fisher's exact test を R ソフトウェア (version R-3.5.1)を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 成人免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM)と HLA 多型との関連性

臨床所見、病理学的特徴および自己抗体情報に基づいて IMNM と診断された日本人 237 名 (18 歳以上) の 6 つの HLA 遺伝子座 (*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1*, *-DPB1*)を遺伝子型判定し、日本人健常者との比較解析を実施した。この結果、*DRB1*08:03* が患者群において極めて有意に多く、その他以下の表のとおりリスクアレルを抽出した。

Table 1. Frequencies of HLA alleles in IMNM patients

HLA allele	IMNM patients allele number (%)	Healthy Controls allele number (%)	P value	OR	95% CI
<i>A*02:07</i>	28/474 (6)	23/920 (3)	0.0023	2.4	1.3-4.5
<i>B*46:01</i>	42/474 (9)	46/920 (5)	0.0072	1.8	1.2-2.9
<i>C*01:02</i>	104/474 (23)	141/920 (15)	0.0029	1.6	1.2-2.1
<i>DRB1*08:03</i>	82/474 (17)	71/920 (8)	0.00000017	2.5	1.8-3.6
<i>DRB1*11:01</i>	25/474 (5)	23/920 (3)	0.012	2.2	1.2-4.1
<i>DQB1*06:01</i>	140/474 (30)	43/228 (19)	0.0024	1.8	1.2-2.7
<i>DPB1*02:02</i>	29/474 (6)	5/228 (2)	0.024	2.9	1.1-9.7
<i>DPB1*05:01</i>	210/474 (44)	77/228 (34)	0.0087	1.6	1.1-2.2

OR and 95% CI means odds ratio and 95% confidence interval, respectively. These were calculated using Fisher's exact test. Alleles with $P < 0.05$ are shown in this table.

また、IMNM のサブグループと HLA の関係を検討するため、237 名の患者群を、抗 SRP 抗体、抗 HMGCR 抗体、スタチン内服歴、膠原病合併、悪性腫瘍合併、重症度、球麻痺の有無によって

層別化した。これらの臨床的特徴を持つ患者と日本人健常者との間で HLA アレルを比較した。以下のように、*DRBI*08:03* は殆どのサブグループでリスクアレルとして抽出されたが、その他のアレルはサブグループごとに違いがみられた。

Table 2. Frequencies of HLA alleles associated with clinical characteristics in IMNM patients

(A) with anti-SRP antibody					
HLA genotype	IMNM patients	Healthy Controls	P value	OR	95% CI
	allele number (%)	allele number (%)			
<i>DRBI*08:03</i>	26/148 (18)	71/920 (8)	0.00033	2.5	1.5-4.2
<i>DQBI*06:01</i>	51/148 (34)	43/228 (19)	0.00094	2.3	1.4-3.7
<i>DPBI*05:01</i>	74/148 (50)	77/228 (5)	0.0018	2.0	1.3-3.1
(B) with anti-HMGCR antibody					
HLA genotype	IMNM patients	Healthy Controls	P value	OR	95% CI
	allele number (%)	allele number (%)			
<i>A*02:07</i>	12/124 (9)	23/920 (2)	0.00036	4.2	1.8-9.0
<i>DRBI*08:03</i>	22/124 (18)	71/920 (8)	0.00068	2.6	1.5-4.4
(C) without anti-SRP nor anti-HMGCR antibodies					
HLA genotype	IMNM patients	Healthy Controls	P value	OR	95% CI
	allele number (%)	allele number (%)			
<i>DRBI*08:03</i>	34/204 (16)	71/920 (8)	0.00026	2.4	1.5-3.8
(D) with taking statin					
HLA genotype	IMNM patients	Healthy Controls	P value	OR	95% CI
	allele number (%)	allele number (%)			
<i>A*02:07</i>	9/92 (9)	23/920 (2)	0.0014	4.2	1.7-9.8
<i>B*46:01</i>	14/92 (15)	46/920 (5)	0.00052	3.4	1.7-6.6
<i>DRBI*08:03</i>	24/92 (26)	71/920 (8)	0.00000065	4.2	2.4-7.3
<i>DQBI*06:01</i>	34/92 (36)	43/228 (18)	0.00087	2.5	1.4-4.5
(E) with connective tissue disease					
HLA genotype	IMNM patients	Healthy Controls	P value	OR	95% CI
	allele number (%)	allele number (%)			
<i>C*03:04</i>	18/58 (31)	117/920 (12)	0.00051	3.1	1.6-5.7
(F) with severe symptom					
HLA genotype	IMNM patients	Healthy Controls	P value	OR	95% CI
	allele number (%)	allele number (%)			
<i>DRBI*08:03</i>	26/154 (16)	71/920 (8)	0.00068	2.4	1.4-4.0
<i>DQBI*06:01</i>	50/154 (32)	43/228 (18)	0.0034	2.1	1.3-3.4
(G) with chronic progression					
HLA genotype	IMNM patients	Healthy Controls	P value	OR	95% CI
	allele number (%)	allele number (%)			
<i>DRBI*08:03</i>	26/150 (17)	71/920 (8)	0.00057	2.5	1.5-4.2
<i>DRBI*11:01</i>	12/150 (8)	23/920 (3)	0.0017	3.4	1.5-7.3
(H) with bulbar palsy					
HLA genotype	IMNM patients	Healthy Controls	P value	OR	95% CI
	allele number (%)	allele number (%)			
<i>A*02:07</i>	11/138 (7)	23/920 (2)	0.0025	3.4	1.4-7.4
<i>C*01:02</i>	36/138 (26)	141/920 (15)	0.0031	1.9	1.2-3.0
<i>DRBI*08:03</i>	32/138 (23)	71/920 (8)	0.00000031	3.6	2.2-5.8
<i>DQBI*06:01</i>	49/138 (35)	43/228 (18)	0.00048	2.4	1.4-3.9

OR and 95% CI means odds ratio and 95% confidence interval, respectively. These were calculated using Fisher's exact test. Alleles with $P < 0.05$ are shown in this table.

(2) 若年免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM)と HLA 多型との関連性

18歳未満の抗SRP抗体陽性IMNM患者7名と抗HMGR抗体陽性IMNM患者6名のサンプルを用いて、HLA遺伝子解析を行った。成人患者に比し、抗SRP抗体陽性患者には有意なリスクアレルは認められなかった。一方、抗HMGR抗体陽性患者では、*B*13:01*と*C*03:04*が有意に多いリスクアレルとして抽出された。*C*03:04*は、6名中5名が有しており、そのうち1人はホモ接合体であった。

Table 3. Frequencies of HLA alleles in juvenile patients with anti-HMGR antibody

HLA allele	Allele number (%)		P value	OR
	juvenile patients n=12	adult patients n=124		
<i>B*13:01</i>	2 (17)	1 (0)	0.021	23.2
<i>C*03:04</i>	6 (50)	18 (15)	0.0074	5.8

OR and 95% CI means odds ratio and 95% confidence interval, respectively. These were calculated by Fisher's exact test. Alleles with $P < 0.05$ are shown in this table.

以上の結果を論文報告した (Association of immune-mediated necrotizing myopathy with HLA polymorphisms. Ohnuki Y, Suzuki S, Shiina T, et al. HLA. DOI: 10.1111/tan.14950)。

(3) 封入体筋炎 (IBM)の HLA-DRB1 解析

日本人IBM83名のHLA-DRB1解析を上記と同様の方法で行った。*DRB1*01:01*、*DRB1*04:10*、*DRB1*15:02*が患者群に有意に多い一方、*DRB1*08:03*と*DRB1*09:01*が有意に少ないことを報告した。*DRB1*09:01*は日本人で最も頻度の高いアレルであることから、他国に比べて日本人に同疾患が少ないことの要因である可能性を示唆した。また、*DRB1*08:03*はIMNMのリスクアレルであることを申請者が報告しているが、IBMにおいてはプロテクティブアレルとなることを証明し、2病型に全く異なる遺伝学的背景があることを示唆した (HLA-DRB1 allele and autoantibody profiles in Japanese patients with inclusion body myositis. Oyama M, Ohnuki Y, Inoue M, et al. PLoS ONE. 15: e0237890, 2020)。

(4) 皮膚筋炎 (DM)の HLA 解析

日本人皮膚筋炎158名のHLAを上記と同様の方法で行った。*A*02:07*、*B*46:01*、*DRB1*04:07*、*DRB1*08:03*、*DQB1*06:01*が患者群に有意に多く、自己抗体ごとのサブ解析では抗Mi2抗体陽性のDM患者において*DRB1*04:07*が極めて多い (Odds比 28.9, $p = 9.7 \times 10^{-8}$) ことを示した。現在論文投稿中である。

以上のごとく、日本人IMNM患者のHLA領域を詳細に解析し、日本人患者特有のリスクアレルを抽出するとともに、炎症性筋疾患患者のHLADNAタイピングを進め、それぞれの遺伝学的特徴の一部を解明した。これらの結果は、現在臨床所見、特異的抗体、病理学的検討が急速に進み、診断や治療のパラダイムシフトに立つ炎症性筋疾患の領域において、新たな知見を付与するものになったと確信する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Munenori Oyama, Yuko Ohnuki, Michio Inoue, Akinori Uruha, Satoshi Yamashita, Sachiko Yutani, Jantima Tanboon, Jin Nakahara, Shingo Suzuki, Takashi Shiina, Ichizo Nishino, Shigeaki Suzuki	4. 巻 15
2. 論文標題 HLA-DRB1 allele and autoantibody profiles in Japanese patients with inclusion body myositis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0237890	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 大貫 優子	4. 巻 37
2. 論文標題 筋炎の遺伝学的背景	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 神経治療学	6. 最初と最後の頁 156-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15082/jsnt.37.2_156	査読の有無 無
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 椎名 隆、鈴木 進悟、大貫 優子、岡 晃	4. 巻 74
2. 論文標題 HLA関連疾患研究の最新情報	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 441-449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ohnuki Yuko, Suzuki Shigeaki, Uruha Akinori, Oyama Munenori, Suzuki Shingo, Kulski Jerzy K., Nishino Ichizo, Shiina Takashi	4. 巻 101
2. 論文標題 Association of immune mediated necrotizing myopathy with HLA polymorphisms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 HLA	6. 最初と最後の頁 449 ~ 457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tan.14950	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大貫優子、鈴木重明、漆葉章典、重成敦子、鈴木進悟、井上道雄、西野一三、椎名隆
2. 発表標題 皮膚筋炎とHLA-DRB1多型との関連解析
3. 学会等名 第29回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Ohnuki, Shigeaki Suzuki, Akinori Uruha, Sachiko Yutani, Shingo Suzuki, Michio Inoue, Ichizo Nishino, Takashi Shiina
2. 発表標題 Association of HLA-DRB1 alleles in dermatomyositis
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
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	椎名 隆 (Shiina Takashi) (00317744)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	西野 一三 (Nishino Ichizo) (00332388)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第一部・部長 (82611)	
研究分担者	鈴木 重明 (Suzuki Shigeaki) (50276242)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授 (32612)	

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