

解禁日時:2022年1月10日(月)午後7時(日本時間)

プレス通知資料 (研究成果)



国立大学法人
東京医科歯科大学
TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY

報道関係各位

2022年1月6日

国立大学法人東京医科歯科大学

「筋細胞のネクローシスを標的とした治療が炎症性筋疾患モデルを改善させる」 — 炎症性筋疾患に対する新たな治療法開発の糸口 —

【ポイント】

- 炎症性筋疾患において、免疫細胞からの傷害を受けて細胞死に至った筋細胞自体が、炎症を加速させることを示しました。
- 筋細胞は、様々な炎症介在因子の放出を伴い炎症を促進させる細胞死である、ネクローシスに至ることを発見しました。
- 炎症性筋疾患のマウスモデルに対するネクローシス阻害が筋の炎症や筋力低下を改善させることを示しました。
- ネクローシスに至った筋細胞から放出される HMGB1 が炎症や筋力低下を悪化させる要因の一つであることを発見しました。
- 筋細胞の細胞死や、それに伴い放出される炎症介在因子を標的とした、いわば“筋指向型”の炎症性筋疾患の新しい治療法として期待されます。

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学分野の保田晋助教授、溝口史高講師、神谷麻理助教の研究グループは、岡山大学、豪州 The Walter and Elisa Hall Institute of Medical Research との共同研究で、炎症性筋疾患において、細胞傷害性 T リンパ球からの傷害を受けて細胞死に至った筋細胞自体が、炎症や筋力低下を誘導することをつきとめました。この研究は文部科学省科学研究費補助金などのもとでおこなわれたもので、その研究成果は、国際科学誌 Nature Communications (ネイチャーコミュニケーションズ)において、2022年1月10日午前10時(英国時間)にオンライン版で発表されます。

【研究の背景】

多発性筋炎などの炎症性筋疾患は、体幹や上腕、大腿などの四肢の筋力低下を主な症状とする慢性疾患です。原因不明の疾患ですが、その本態は自己反応性の(自身の体の構成成分と反応してしまう)細胞傷害性 T リンパ球(Cytotoxic T Lymphocytes; CTL)を主体とした免疫細胞が筋細胞を傷害する、自己免疫疾患であると考えられています。炎症性筋疾患の治療には副腎皮質ステロイド薬や種々の免疫抑制剤が用いられます。これらは免疫細胞を標的とした治療ですが、免疫力を非特異的に(疾患において本質的な部分だけではなく、

広く抑えてしまうことから、感染症などの副作用が問題となります。また、副腎皮質ステロイド薬はステロイド筋症を誘導して更なる筋力低下を引き起こします。さらに、これらの治療が有効でない患者さんや、筋の炎症が制御できた後にも筋力回復に長期間を要する患者さんが多数存在することも大きな課題です。これらの多くのアンメットニーズを抱え、炎症性筋疾患の病気の成り立ちの解明と、安全かつ筋力の改善に有効な治療方法の開発が求められています。

非特異的な免疫抑制を作用点とした現行の治療法が効果不十分である現状から、東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科の研究グループは炎症性筋疾患における筋の役割に着目した解析を行ってきました。本研究グループは炎症性筋疾患のマウスモデルであるC蛋白誘導性筋炎(C protein induced-myositis; CIM)を開発(Sugihara T, et al. *Arthritis Rheumatism* 2007)し、筋細胞は、CTL からの傷害を受けた結果、細胞死に至り、種々の炎症介在因子を放出して炎症を悪化させることをつきとめました(Kimura N, et al. *Arthritis Rheumatol* 2015, Umezawa N, et al. *Sci Rep* 2018)。筋細胞の細胞死が更なる炎症を誘導する、いわば炎症の悪循環の機構が疑われることから、筋細胞の細胞死や、それに伴い炎症を増悪させる炎症介在因子の制御が炎症性筋疾患の治療に結びつくのではないかと考えられます(図 1)。しかし、炎症性筋疾患における筋細胞の細胞死の機序は未解明の状況でした。

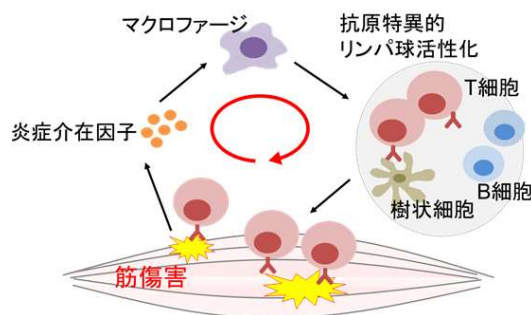


図 1 傷害を受けた筋細胞が更なる炎症を誘導する

炎症性筋疾患の筋に浸潤している CTL は、標的細胞を傷害する分子である perforin 1 (PRF1)、granzyme B (GZMB)、さらに Fas ligand (FASLG)を発現しています。PRF1 と GZMB は協調して標的細胞を傷害しますが、CIM を用いた検証では PRF1 の欠損では筋炎の抑制効果は不十分であった(Sugihara T, et al. *Arthritis Rheumatism* 2009)ため、本研究チームは筋傷害への FASLG の関与を疑いました。

また、過去数十年において、傷害をうけて機能不全になった細胞が至る細胞死は、遺伝子の発現によって計画的・能動的に執行されるプログラム細胞死であるアポトーシスと、細胞が受動的に融解・破裂するいわば受動的な細胞死であるネクローシスとに分類されていました。炎症性筋疾患における筋細胞にはアポトーシスの所見が乏しく、かつアポトーシス遂行経路を阻害する CFLAR などの内因性分子の発現がみられることから、筋細胞の細胞死はネクローシスと考えられてきました(Nagaraju K, et al. *J Immunol* 2000, Dalakas MC, et al. *Lancet* 2003)。しかし近年、かつてはネクローシスと考えられてきた細胞死の中にも、プログラム細胞死が含まれることが判明しました。特に、CFLAR などの抗アポトーシス分子の存在下における、FASLG などの細胞死誘導刺激が「ネクローシス」というプログラム細胞死を誘導すると報告されています。ネクローシスは RIPK1, RIPK3, MLKL などの分子に依存し、細胞死の

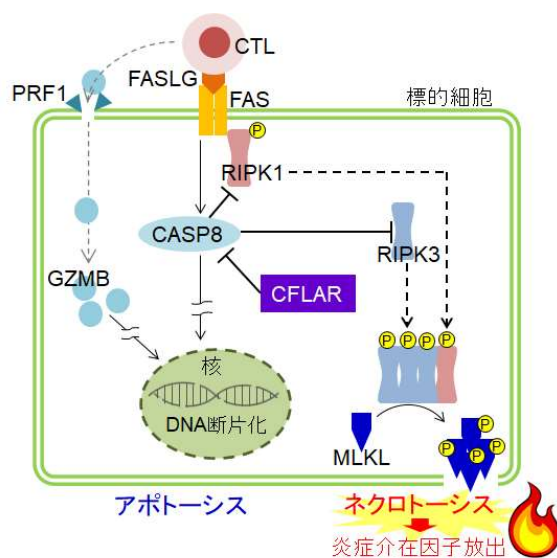


図 2 CTL は標的細胞にアポトーシスとネクローシスを誘導する

際に damage-associated molecular patterns (DAMPs)やサイトカインなどの炎症介在分子の放出(Choi ME, et al. *JCI insight* 2019)を伴う炎症誘導性の細胞死と知られます(図 2)。

以上より、本研究グループは、炎症性筋疾患における筋細胞の細胞死が、FASLG を介したネクローシスではないかと仮説を立て、炎症性筋疾患の患者さん由来の筋組織や、炎症性筋疾患のマウスモデル・細胞モデル(Kamiya M, et al. *Rheumatology* 2020)を用いて、筋細胞の細胞死の機序と、その制御が病態へ及ぼす影響を検証しました。

【研究成果の概要】

まず、炎症性筋疾患である多発性筋炎、皮膚筋炎の筋組織における細胞死関連分子の発現を免疫染色にて確認したところ、傷害を受けた筋細胞は、FASLG の受容体である FAS や CFLAR に加え、RIPK1, RIPK3, MLKL, リン酸化 MLKL などのネクローシス関連分子の高発現を認めました(図 3)。一方で、筋細胞における、アポトーシスの指標である TdT-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)染色は陰性であり、FAS/FASLG の下流でアポトーシスを誘導する活性化型 CASP8 の発現も認められませんでした。

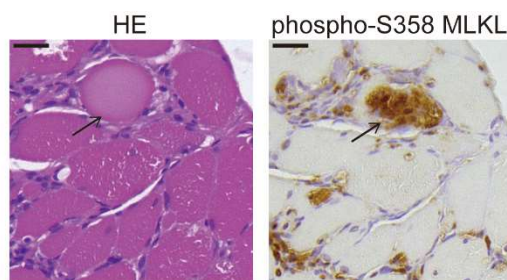


図 3 多発性筋炎の壊死筋細胞(矢印)にリン酸化(phosphor-S358) MLKL などのネクローシス関連分子が高発現していた

次に、炎症性筋疾患の細胞モデルを用いて、筋細胞のモデル細胞の筋管細胞に対して細胞死を誘導する分子を検証したところ、PRF1 や GZMB ではなく、FASLG が筋管細胞の細胞死誘導に必須であることが分かりました。また、CTL によって傷害された筋管細胞にもアポトーシスの所見は認められず、FAS や CFLAR に加えて RIPK1, RIPK3, MLKL, リン酸化 MLKL などの発現が確認されました。筋管細胞の細胞死はアポトーシス阻害剤で抑制されず、ネクローシス阻害剤である necrostatin-1s (Nec1s)や、筋管細胞における *Ripk3* の発現阻害によって抑制されました。以上より、筋管細胞の細胞死がネクローシスであると考えられました。さらに、CTL による筋管細胞の傷害に伴って、細胞培養液中のインターロイキン(IL-)1, IL-6 などの炎症性サイトカインや、代表的な DAMPs の一つである HMGB1 の濃度が上昇し、これらがネクローシスに伴い筋管細胞から放出されたものと考えられました。さらに、これらの濃度の上昇は Nec1s によるネクローシス阻害によって抑制されました。

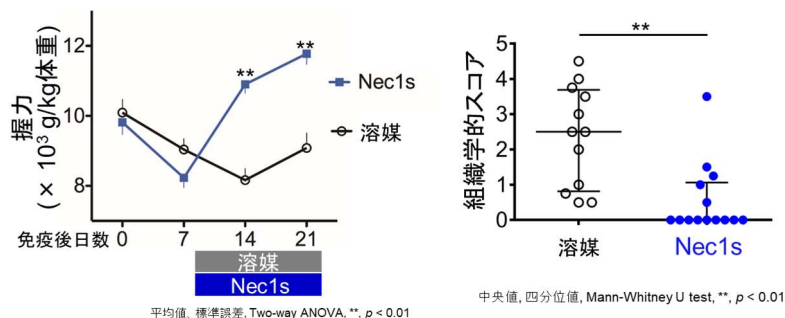


図 4 CIM に対する Nec1s によるネクローシス阻害が筋力低下や炎症(組織学的スコア)を改善させた

また、炎症性筋疾患のマウスモデルである CIM の筋組織においても、炎症性筋疾患の患者さんの筋組織の所見と同様に、筋細胞にはアポトーシスの所見は認められず、ネクローシス関連分子の高発現が確認されました。*Ripk3* や *Mkl1* を欠損したマウスに対して CIM を発症させると、これらについて野生型

のマウスと比較して、筋の壊死面積が減少したのみならず、筋への炎症細胞浸潤が軽減しました。さらに、CIM に対して Nec1s の投与によりネクローシスを阻害したところ、筋の壊死面積の減少、筋の炎症の軽減に加え、筋力の改善が得られました(図 4)。

ネクローシスに伴って放出される代表的な DAMPs の一つが HMGB1 と知られるため、CIM 血清中の HMGB1 の濃度を測定したところ、筋炎を誘導しないマウスと比較して HMGB1 の濃度の著明な上昇が確認されました。さらに、血清中 HMGB1 濃度は Nec1s によるネクローシス阻害治療によって低下することも示されました。さらに、炎症性筋疾患の患者さんや CIM の筋組織において、傷害を受けた筋細胞に HMGB1 の高発現が確認されたことから、細胞モデルにおける検証結果と併せて、HMGB1 はネクローシスに至った筋細胞より放出されたと考えられました。

HMGB1 は免疫応答を増強する作用を有する(Scaffidi P, et al. *Nature* 2002)ため、その阻害が CIM の炎症を改善させると考え、CIM に対して抗体を用いて HMGB1 を阻害したところ、対照と比較して抗 HMGB1 抗体を

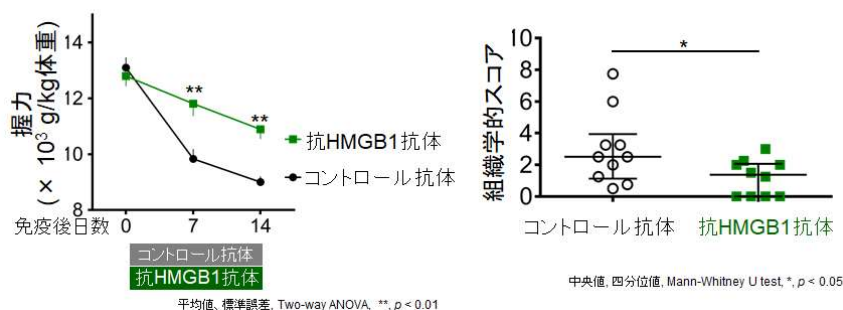


図 5 CIM に対する抗 HMGB1 抗体による HMGB1 阻害が筋力低下や炎症を改善させた

投与されたマウスでは筋の壊死面積の減少、筋の炎症の軽減に加え、筋力の改善が得られました(図 5)。よって、ネクローシス阻害による CIM の炎症改善効果の要因の一つが、筋細胞からの HMGB1 放出の抑制であったと考えられました。また、HMGB1 は非免疫的な機序

により筋機能低下を誘導することも知られ(Zong M, et al. *Ann Rheum Dis* 2013)、ネクローシス阻害による筋力改善効果にも HMGB1 放出抑制が関与していたと考えられました。

【研究成果の意義】

本研究によって、炎症性筋疾患において、免疫細胞からの傷害を受けた筋細胞はネクローシスに至り、HMGB1 などの炎症介在因子の放出を介して更なる炎症を誘導することが明らかとなりました。この発見により、従来は、いわば免疫細胞の単なる標的と考えられていた筋細胞が、ネクローシスを介して炎症性筋疾患の病態を増悪させる攻撃者として機能することが示されました。筋細胞の細胞死や、それに伴い放出される炎症介在因子を標的とした治療は、炎症性筋疾患の新しい治療戦略として期待されます。このような“筋指向型”の治療は、現行の炎症性筋疾患の治療法のように免疫細胞を非特異的に抑制するものではないため、感染症などの副作用が少なく、現行加療で効果不十分な症例への効果も期待できる、有望な治療法である可能性があります。

【論文情報】

掲載誌: *Nature Communications*

論文タイトル: Targeting necroptosis in muscle fibers ameliorates inflammatory myopathies

【研究者プロフィール】

保田 晋助（ヤスダ シンスケ） Shinsuke Yasuda

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

膠原病・リウマチ内科学分野 教授

・研究領域

膠原病・リウマチ性疾患

COVID-19



神谷 麻理（カミヤ マリ） Mari Kamiya

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

膠原病・リウマチ内科学分野 助教

・研究領域

膠原病・リウマチ性疾患

細胞死



【問い合わせ先】

＜研究に関すること＞

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

膠原病・リウマチ内科学分野 氏名 保田 晋助（ヤスダ シンスケ）

TEL:03-5803-5204 FAX:03-5803-5998

E-mail: syasuda.rheu@tmd.ac.jp

＜報道に関すること＞

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

TEL:03-5803-5833 FAX:03-5803-0272

E-mail: kouhou.adm@tmd.ac.jp