

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業））  
希少難治性筋疾患に関する調査研究班 分担研究報告書

## 孤発性封入体筋炎の治療法探索を目指した 新たなモデルマウスの開発

研究協力者：山下 賢<sup>1)</sup>

共同研究者：俵 望<sup>1)</sup>、張 子微<sup>1)</sup>、張 霄<sup>1)</sup>、原 健太郎<sup>1)</sup>、  
道鬼 つかさ<sup>1)</sup>、中根 俊成<sup>1)</sup>、安東 由喜雄<sup>1)</sup>

1) 熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学

### 研究要旨

【目的】孤発性封入体筋炎（sIBM）は難治性筋疾患であり、今日まで有効な治療法はない。近年 sIBM 患者血清において cytosolic 5'-nucleotidase 1A（cN1A）に対する自己抗体が同定され、本疾患の病態における鍵を握る抗体として注目されている。本研究では cN1A ペプチド能動免疫マウスを作成し、sIBM の病態解析および治療法開発研究のツールとしての有用性を検証した。

【方法】抗 cN1A 抗体のエピトープ部位を含むペプチド 3 種類を作成し、C57B6 マウスを用いて、コントロール群および cN1A ペプチド 1 群、cN1A ペプチド 3 群、cN1A ペプチド 5 群の各群 5 匹ずつに対して、ペプチド群では各ペプチド+完全アジュバント混合液を皮下接種するとともに百日咳毒素を腹腔内に単回投与し、ペプチド免疫を 1 週毎に 3 回反復した。コントロール群ではアジュバント溶液と百日咳毒素のみ投与した。経時的体重測定、トレッドミルテスト、血清学的および分子病理学的手法により表現型を解析した。

【結果および考察】cN1A ペプチドを能動免疫したマウスの全例で血清中に抗 cN1A 抗体が検出され、一部のペプチド免疫マウスで運動機能が低下した。病理学的解析では、コントロールマウスにおいても結合組織での炎症細胞浸潤はみられたが、ペプチド免疫マウスで高頻度に直接的な非壊死線維への炎症細胞浸潤を認めた。さらに一部のペプチド免疫マウスにおいて、p62 発現量および LC3- / の比が上昇した。

【結論】cN1A ペプチド能動免疫マウスは sIBM の病態の一部を再現しており、病態解析および治療法開発研究のツールとして有用である可能性がある。

## A：研究目的

孤発性封入体筋炎（Sporadic inclusion body myositis: sIBM）は、「炎症」と「蛋白分解機構の障害」が関与する難治性筋疾患であり、今日まで有効な治療法は開発されていない。sIBM の治療法開発のための問題点として、「炎症」および「蛋白分解機構の障害」の双方を再現する病態解析や治療研究に有用な動物モデルが存在しない点が挙げられる。

2013年 Larman らと Pluk らの2つのグループは、sIBM 患者血清中に見出されていた自己抗体の標的抗原が Cytosolic-5' nucleotidase 1A (cN1A) であることを報告した。cN1A は分子量 41,000 の細胞質蛋白であり、骨格筋に多く発現し、アデノシン-リン酸（AMP）を分解し、細胞質内での核酸代謝に関与することが報告されている。

我々は sIBM の病態における抗 cN1A 抗体の病原性を明らかにするために、*in vivo* 受動免疫モデルを作成し、p62 陽性凝集筋線維の増加と筋内鞘へのマクロファージ浸潤を明らかにした（Tawara, Yamashita et al., Ann Neurol. 2017）。しかしながら本モデルを sIBM モデルとして応用することの問題点として、1) 体重や運動機能に影響しないこと、2) 種々の解析に際して抗 cN1A 抗体陽性患者血清が多量に必要となること、3) 自己抗体以外のリンパ球などの細胞性免疫の関与について解析できないことなどが挙げられる。そこで本研究は、cN1A ペプチド能動免疫マウスを作成し、sIBM の病態解析および治療法開発研究のツールとしての有用性を検証することである。

## B：研究方法

### 1) cN1A ペプチドの作成

既報告における抗 cN1A 抗体のエピトープ部位として、Pluk らは aa25-aa50 と aa221-aa243、aa341-aa368 領域を、Larman らは aa30-aa65 と aa59-aa94、aa204-aa239、aa334-368 領域を報告している（Pluk et al., Ann Neurol. 2013、Larman et al., Ann Neurol. 2013）。我々はこの2つの報告で重複していた3部位から、それぞれ20アミノ酸のペプチド3種類を作成した（ペプチド1、ペプチド3、ペプチド5と定義）。

### 2) ペプチド免疫方法

13週齢雌の C57B6 マウスを用いて、コントロール群および cN1A ペプチド1群、cN1A ペプチド3群、cN1A ペプチド5群の各群5匹ずつに対して、コントロール群は完全 Freund アジュバント (CFA: M. tuberculosis 400 µg + IFA 100 µl) のみを接種し、ペプチド群では初回は1匹あたり各ペプチド+CFA 混合液 200 µg/200 µl を後肢の両足底、尾根部に 1/3 ずつ皮下接種するとともに百日咳毒素 350 ng を腹腔内に単回投与した。免疫は1週毎3回、1匹あたり各ペプチド+CFA 混合液 200 µg/200 µl を尾根部に皮下接種した。

### 3) 表現型の評価方法

表現型の解析として、経時的体重測定、トレッドミルテスト (exercise capacity test) による運動機能、血清学的評価として Dot blot 法による抗 cN1A 抗体の有無、分子病理学的評価として HE 染色による炎症細胞浸潤の有無、ウエスタンブロットによる p62 および LC3 発現量を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、熊本大学動物実験等に関する規則第 11 条第 2 項の規定に基づいて熊本大学学長より承認を受けた (C29-177)。

## C: 研究結果

### 1) 体重変化の推移

各ペプチド投与群とコントロール群で経時的体重変化を比較したところ、ペプチド 3 群のみがコントロール群に比較して、体重が減少する傾向を示したが有意差はなかった。

### 2) 運動機能評価 (トレッドミルテスト)

各ペプチド投与群とコントロール群でトレッドミルテスト脱落速度を比較したところ、ペプチド 3 群およびペプチド 5 群で有意に脱落速度が低く、運動機能の低下が示唆された。

### 3) 血清学的評価

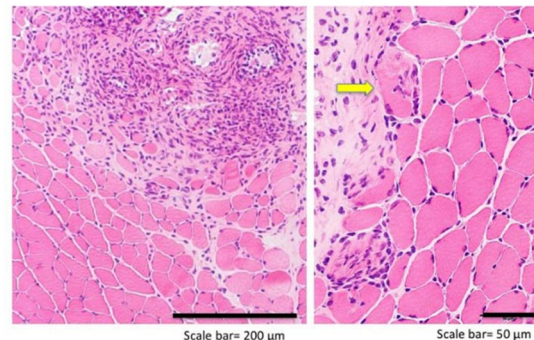
各マウス血清中におけるペプチド 1 およびペプチド 3、ペプチド 5 に対する抗 cN1A 抗体の有無を検討したところ、コントロール群ではいずれのマウスにおいても自己抗体は検出されなかったが、ペプチド投与群では全てのマウスにおいて投与された cN1A ペプチドに対する自己抗体を検出した。

### 4) 筋病理学的評価

HE 染色によって炎症細胞浸潤の有無を評価したところ、コントロール群では血管周囲や間質の一部に炎症細胞浸潤を認めるのみであったが、ペプチド 1 群では非壊死線維を包囲する炎症細胞浸潤がみられ、ペプチド 3 および 5 群では非壊死線維内部への炎症細胞の迷入像を認めた。すなわち結合組織および血管周囲の炎症細胞浸潤はコントロール群、ペプチド群双方で認めたが、非壊死線維への炎症細胞浸潤はペプチド 3 群で高頻度であった

(図 1)。また内在核を有する筋線維を各群で比較したところ、腓腹筋ではコントロール群に比較してペプチド 3 および 5 群で有意に増加し、また前脛骨筋ではコントロール群に比較してすべてのペプチド群で有意に増加した。

図 1. cN1A ペプチド能動免疫マウスにおける非壊死線維への炎症細胞浸潤



### 5) 分子病理学的評価

各ペプチド投与群とコントロール群で p62 および LC3 の発現量を比較したところ、ペプチド 1 群において p62 発現量と LC3- / 比が有意に上昇し、他のペプチド群においてもコントロール群より発現が亢進している傾向がみられた。

## D: 考察

本研究結果において、cN1A ペプチドを能動免疫したマウスの全例で血清中に抗 cN1A 抗体が検出され、一部のペプチド免疫マウスで運動機能が低下する可能性が示された。病理学的解析では、コントロールマウスにおいても結合組織での炎症細胞浸潤はみられたが、ペプチド免疫マウスで高頻度に直接的な非壊死線維への炎症細胞浸潤を認めた。さらに一部のペプチド免疫マウスにおいて、p62 発現量および LC3 / の比が上昇しており、蛋白分解機構への影響が示唆された。すなわち cN1A ペプチド能動免疫マウスは、抗 cN1A 抗体を有し、運動機能低下、病理学的

な筋炎所見、p62 および LC3 の発現変化を伴う点で sIBM の病態の一部を模倣すると考えられる。

今後の課題として、マウス MHC class 染色や p62、LC3、TDP-43 免疫染色、コンゴレッド染色等のさらに詳細な病理学的解析が不可欠である。また抗 cN1A 抗体の病原性を検証するために、能動免疫マウス由来 IgG を健常マウスに移入することで表現型の再現を確認する実験が必要と考えられる。さらに自己抗体のみならず、cN1A 抗原により感作されたリンパ球の病原性について解明するために、cN1A 抗原特異的リンパ球の移入実験も検討すべきである。

#### **E：結論**

cN1A ペプチド能動免疫マウスは sIBM の病態の一部を再現しており、病態解析および治療法開発研究のツールとして有用である可能性がある。

#### **F：健康危険情報**

なし

#### **G：研究発表**

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

##### **1：論文発表**

1. Ishizaki M., Kedoin C., Ueyama H., Maeda Y., Yamashita S., Ando Y. Utility of skinfold thickness measurement in non-ambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.*, 27, 24-28 (2017).
2. Yamamoto F., Yamashita S., Kawano H., Tanigawa T., Mihara Y., Gono T., Ando Y.

Meningitis and ventriculitis due to *Nocardia araoensis* infection. *Intern. Med.*, 56, 853-859 (2017).

3. Nakahara K., Nakane S., Nakajima M., Yamashita S., Mori T., Ando Y. Effect of thymectomy for thymic atrophy in myasthenia gravis: A retrospective study on 93 patients. *J Neuroimmunol.*, 305, 182-185 (2017).
  4. Tawara N., Yamashita S., Zhang X., Korogi M., Zhang Z., Doki T., Matsuo Y., Nakane S., Maeda S., Sugie K., Suzuki N., Aoki M., Ando Y. Pathomechanisms of anti-cN1A autoantibodies in sporadic inclusion body myositis. *Ann Neurol.*, 81, 512-525 (2017).
  5. Ikenoshita S., Yamashita S., Sakamoto T., Misumi Y., Ando Y. Hemi-atrophy of tongue with contralateral hemiparesis in a patient with MADSAM. *J. Clin. Neurol.*, 13, 422-423 (2017).
  6. Yamashita S., Tawara N., Ando Y. Anti-NT5C1A autoantibodies for the diagnosis and study of the pathogenesis of sporadic inclusion body myositis. *Clin. Exp. Neuroimmunol.*, 8, 292-301 (2017).
  7. Yamashita S., Nakama T., Ueda M., Honda S., Kimura E., Konagaya M., Ando Y. Tongue strength in patients with subacute myelo-optico-neuropathy. *J. Clin. Neurosci.*, 47, 84-88 (2018).
- ##### **2：学会発表**
1. Yamashita S, et al. Dysregulation of CYLD is involved in the pathogenesis of sporadic inclusion body myositis. XXIII World Congress of Neurology, Sept 20,

- 2017, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan
2. Tawara N, Yamashita S., et al. Predominant atrophy in type 2 myofibers of sporadic inclusion body myositis with anti-cN1A autoantibody. XXIII World Congress of Neurology, Sept 20, 2017, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan
3. Yamashita S., et al. CYLD is a possible therapeutic target for sporadic inclusion body myositis. 22nd International Congress of the World Muscle Society, Oct 4, 2017, Palais du Grand LArge, Saint Malo, France
4. Tawara N., Yamashita S., et al. Establishment of novel autoimmune animal model for sporadic inclusion body myositis. 22nd International Congress of the World Muscle Society, Oct 4, 2017, Palais du Grand LArge, Saint Malo,

- France
5. Zhang Z., Yamashita S., et al. Mitochondrial analysis in wild-type TDP-43 transgenic mice mimicking sporadic inclusion body myositis. 22nd International Congress of the World Muscle Society, Oct 4, 2017, Palais du Grand LArge, Saint Malo, France
6. 山下 賢. 封入体筋炎における抗 cN1A 抗体：診断および病因的意義について. 第 3 回日本筋学会学術集会, Aug 5, 2017, 東京 (シンポジウム)

**H：知的所有権の取得状況（予定を含む）**

**1：特許取得**

なし

**2：実用新案登録**

なし

**3：その他**

なし