





TRANSLATIONAL SCIENCE

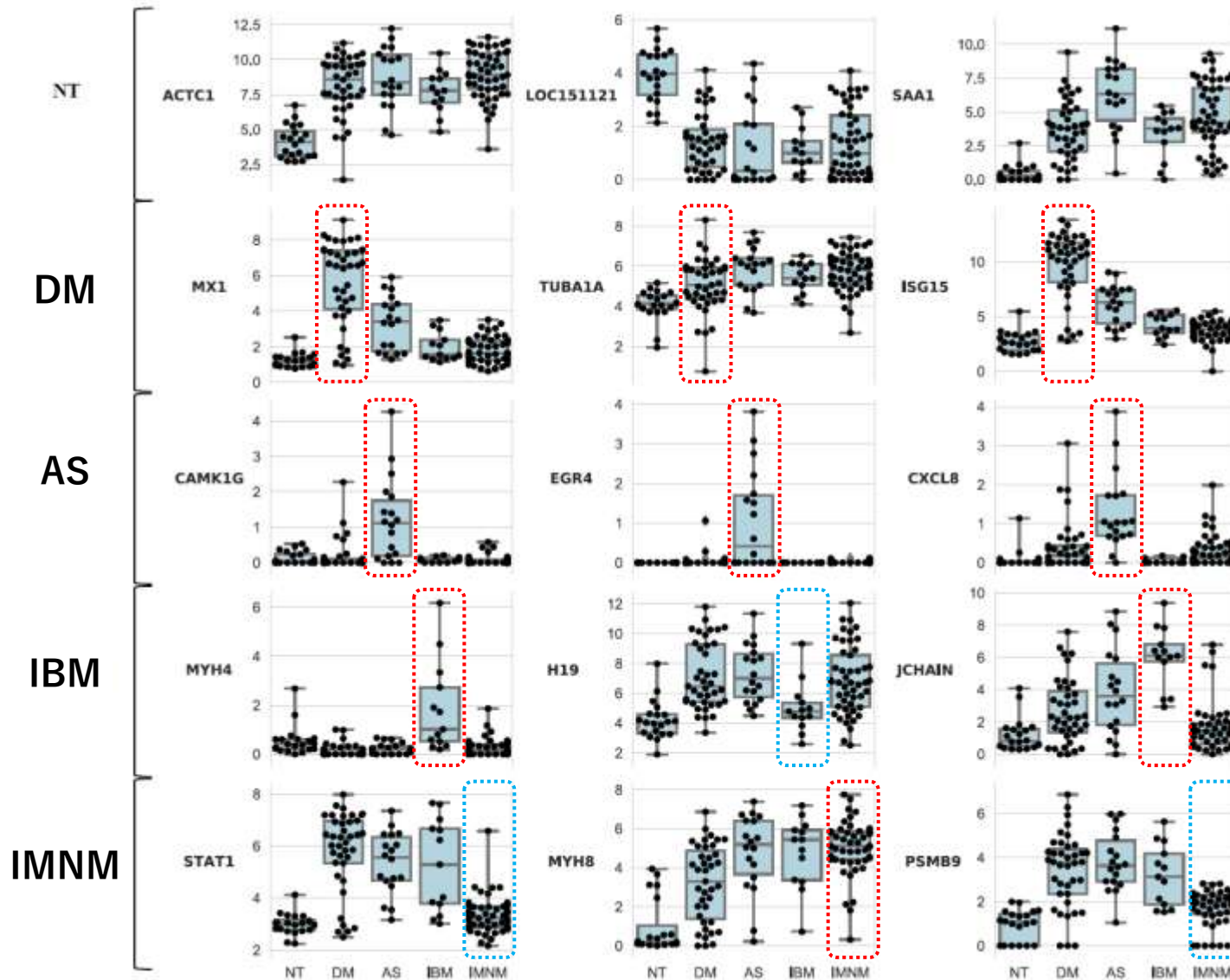
Transcriptomic profiling reveals distinct subsets of immune checkpoint inhibitor induced myositis

Iago Pinal-Fernandez ^{1,2}, Angela Quintana ^{1,3}, Jose Cesar Milisenda,^{1,4,5}
Maria Casal-Dominguez,^{1,2} Sandra Muñoz-Braceras,¹ Assia Derfoul,¹
Jiram Torres-Ruiz,^{1,6} Katherine Pak,¹ Stefania Dell'Orso,¹ Faiza Naz,¹
Gustavo Gutierrez-Cruz,¹ Margherita Milone,⁷ Shahar Shelly,⁸ Yaiza Duque-Jaimez,⁴
Ester Tobias-Baraja,⁴ Ana Matas-Garcia,^{4,5} Gloria Garrabou,^{4,5} Joan Padrosa,⁵
Javier Ros,⁹ Ernesto Trallero-Araguás,¹⁰ Brian Walitt,¹¹ Lisa Christopher-Stine,^{2,12}
Thomas E Lloyd,² Chen Zhao,¹³ Shannon Swift,¹³ Arun Rajan,¹³
Josep Maria Grau-Junyent,^{4,5} Albert Selva-O'Callaghan ^{3,14} Teerin Liewluck,⁷
Andrew Lee Mammen ^{1,2,12}

IIM (idiopathic inflammatory myopathy)

	DM 皮膚筋炎	AS 抗ARS抗体症候群	IMNM 免疫介在性壊死性ミハチ	IBM 封入体筋炎
臨床的特徴	<ul style="list-style-type: none"> 近位筋力低下 皮疹 (Heliotrope疹, Gottron丘疹) MRI: 筋周囲T2 ↑ 	<ul style="list-style-type: none"> ILD Raynaud現象 Mechanic hand 	<ul style="list-style-type: none"> 対称性近位筋力 ↓ (下肢>上肢) 亜急性の経過 筋力低下の程度: SRP > HMGCR 	<ul style="list-style-type: none"> >50歳, 緩徐進行 左右非対称筋萎縮 (大腿四頭筋, 遠位筋 [深指屈筋, 手関節屈筋, 足関節背屈])
筋病理所見	<ul style="list-style-type: none"> 筋束周囲性萎縮 (perifascicular atrophy) MxA, RIG-1 特異的 中径動脈周囲, 筋周膜に細胞浸潤 	<ul style="list-style-type: none"> 筋束周囲性萎縮 筋束周囲性壊死 Nuclear actin aggregation (電顕) 	<ul style="list-style-type: none"> 壊死 or 再生像 炎症細胞は乏しい MACが非壊死筋線維に沈着 	<ul style="list-style-type: none"> 縁取り空胞 (Rimmed vacuoles) Tubulofilamentous inclusion (電顕)
MSA (筋炎特異的抗体)	Mi-2, NXP2, SAE, MDA5, TIF-1γ	Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, KS, OJ	SRP, HMGCR	cN1A

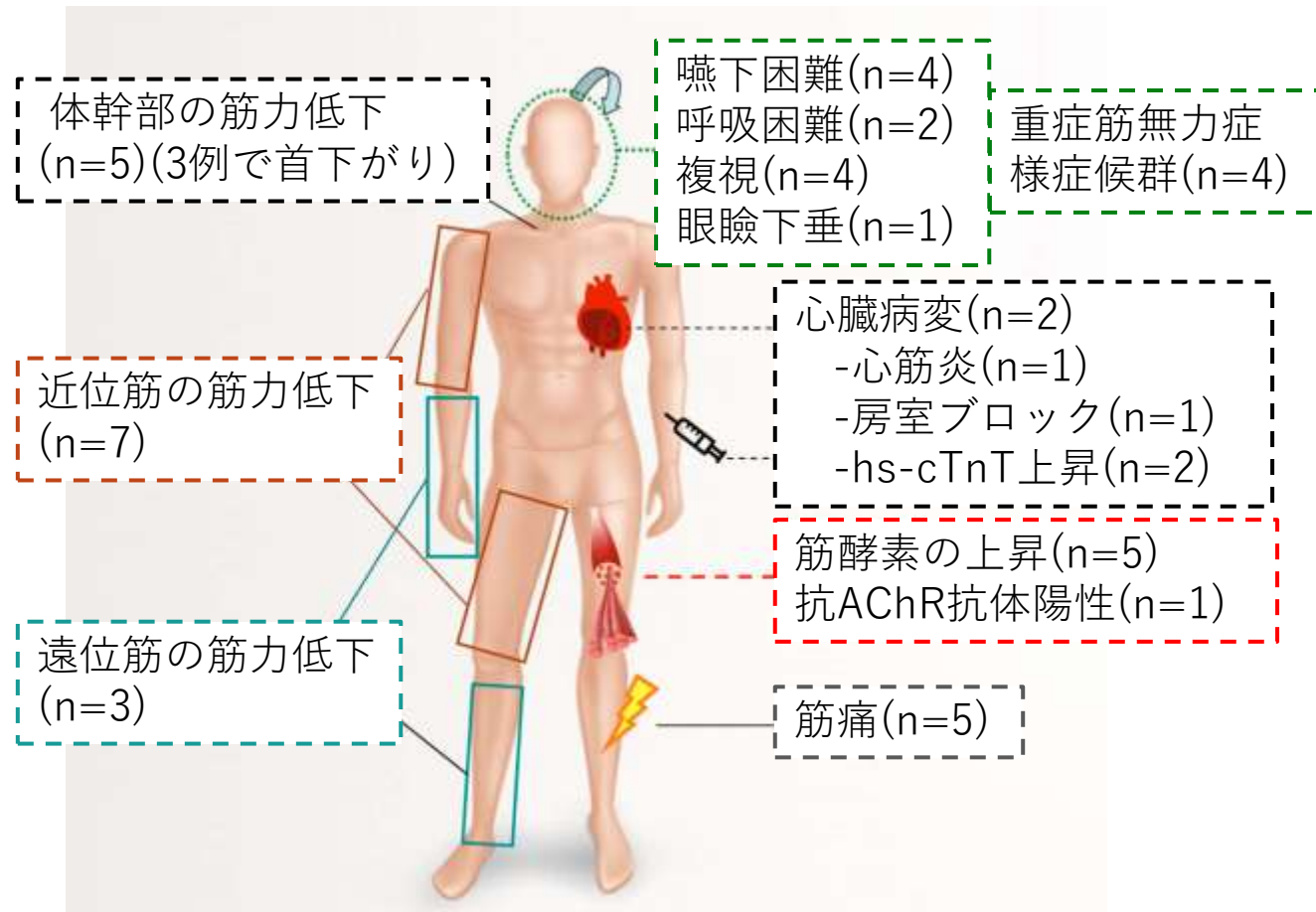
IIM筋組織のRNA-seq



- DM, AS, IMNM, IBM (計119人)と健常人 (20人) の筋RNA-seq.
- IIMは特異抗体陽性例 (NXP2, Mi2, TIF1 γ , MDA5, Jo-1, HMGCR, SRP)
- 機械学習で筋炎特徴的な遺伝子を抽出
- DM: **MX1, ISG15** (type I INF ISG)
- AS: **CAMK1G, EGR4, CXCL8** (AS特異的3gene)
- IBM: **MYH4, JCHAIN** (PC), **H19** (他群と鑑別点)
- IMNM: **STAT1, PSMB9** (ISG \downarrow), **MYH8**
- HMGCR: APOA4 (cholesterol逆輸送)
- Mi-2+: MADCAM1 ($\alpha 4\beta 7$ integrin ligand, 他DMよりリンパ球浸潤多いことと関連か)
- Pathway解析 (IPA, 各群 vs 他群)
DM: IFN signaling \uparrow
AS, IBM共通: Th1, ICOS-ICOSL, CD28-T \uparrow
- Top 10 gene (正常筋と比較)
DM: **Type I IFN** (ISG15/IFI6/MX1)
AS, IBM: **Type II IFN** (PSMB8/ GBP2/GBP1)

免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) 誘発性筋炎

PD-1/PD-L1阻害薬による筋疾患(n=9)の特徴



- DM, AS, IMNM, IBMとは異なる臨床・病理学的特徴.
- 心筋炎, 眼症状 (眼瞼下垂, 複視), 一部でDM様皮疹を認める.
- 筋病理: CD68⁺MΦ・T細胞浸潤を伴う壊死性筋線維の集簇

Touat M, Maisonobe T, Knauss S, et al. Neurology 2018;91:e985-94.
Shelly S, Triplett JD, Pinto MV, et al. Brain Commun 2020;2:fcaa181.

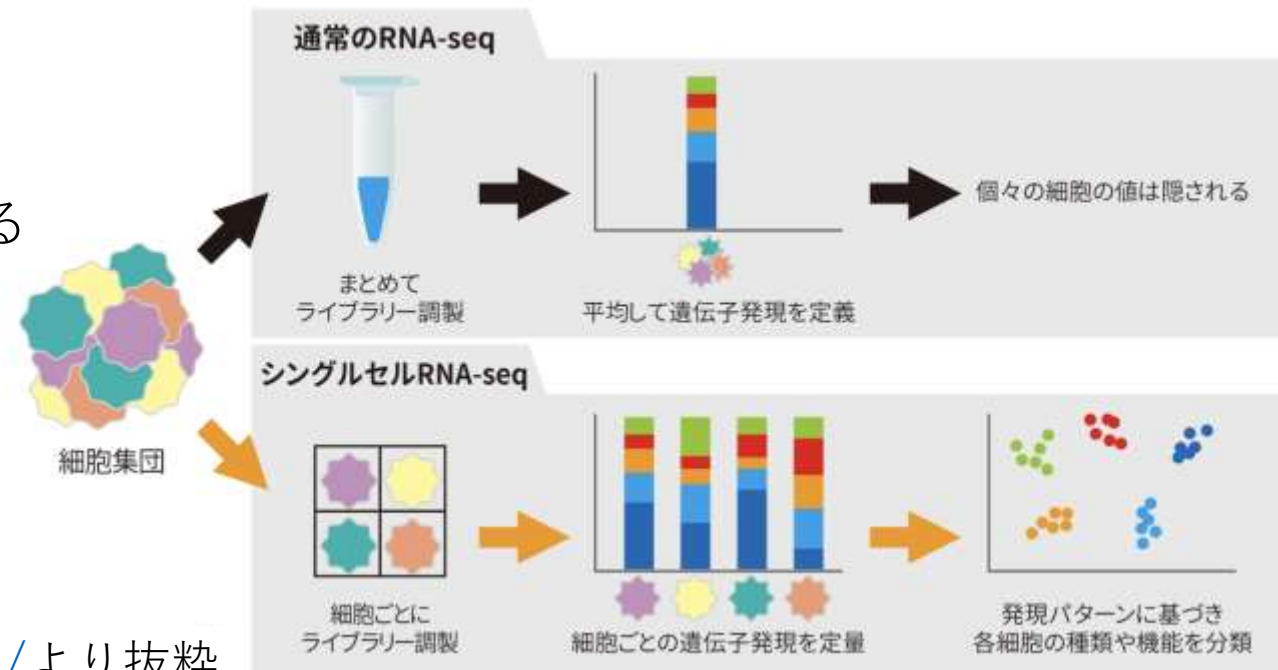
Matas-García A, Milisenda JC, Selva-O'Callaghan A, et al. Autoimmun Rev. 2020;19(2):102455.

目的

- ICI筋炎患者の筋生検組織のトランスクリプトーム解析での特徴や遺伝子発現パターンは不明.
- ICI筋炎患者の筋生検組織の遺伝子発現パターンを，正常筋組織，IIM筋組織 (DM, AS, IMNM, IBM)と比較する.
- バルク解析とシングル核解析：

構成細胞が混ぜ合わされ，平均値が結果となる

凍結検体の各細胞の遺伝子発現量を網羅的に計測可能

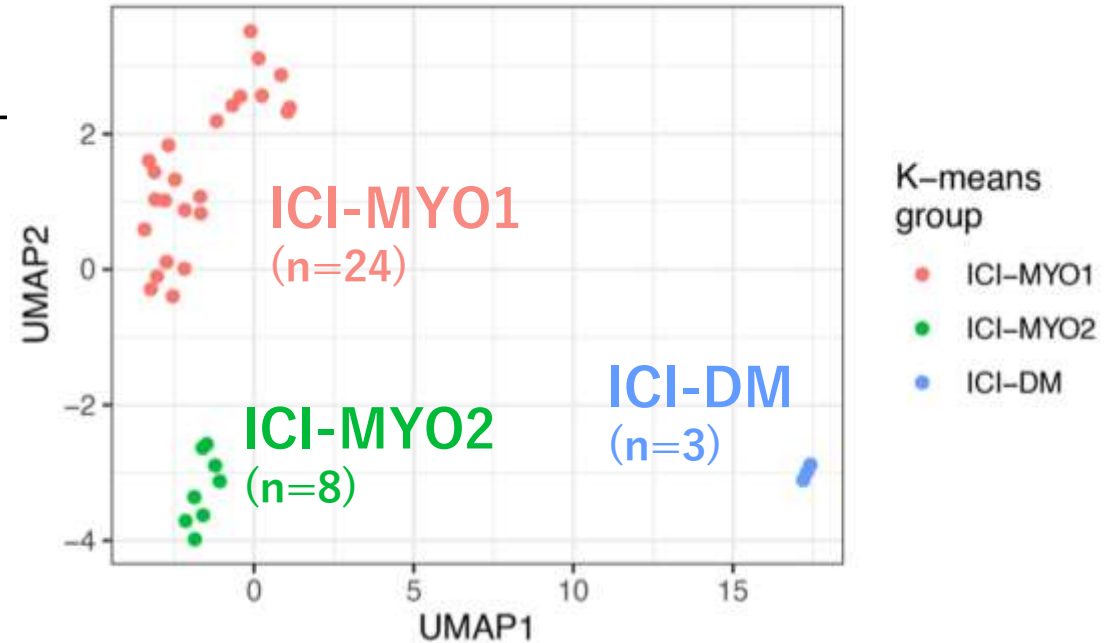


方法

- ICI筋炎の定義: 筋力低下の既往, またはICI治療後の筋病理で筋病変が存在する.
- ICI (抗PD-1/PD-L1阻害薬単独 or 抗CTLA-4阻害薬併用) 筋炎の筋生検組織 (35例)
- 正常な筋生検組織 (33例)
- IIM筋生検組織 (132例)
 - IBM (16例): Loyd基準を満たす
 - AS (抗ARS症候群, 18例): 抗Jo-1抗体が陽性
 - DM (44例): 抗Mi-2 or NXP2 or MDA5 or TIF-1 γ 抗体が陽性
 - IMNM (54例): 抗SRP抗体 or 抗HMGCR抗体陽性→ CasalとPinalの基準を満たす
- 筋組織のbulk/single-nuclei RNA sequenceを行い, 比較解析した.

クラスタリングと筋病理

- ICI筋炎の筋生検組織 bulk RNA-seq を教師なしクラスタリング
- ICI-MYO1, ICI-MYO2, ICI-DMの3群に分けられた。

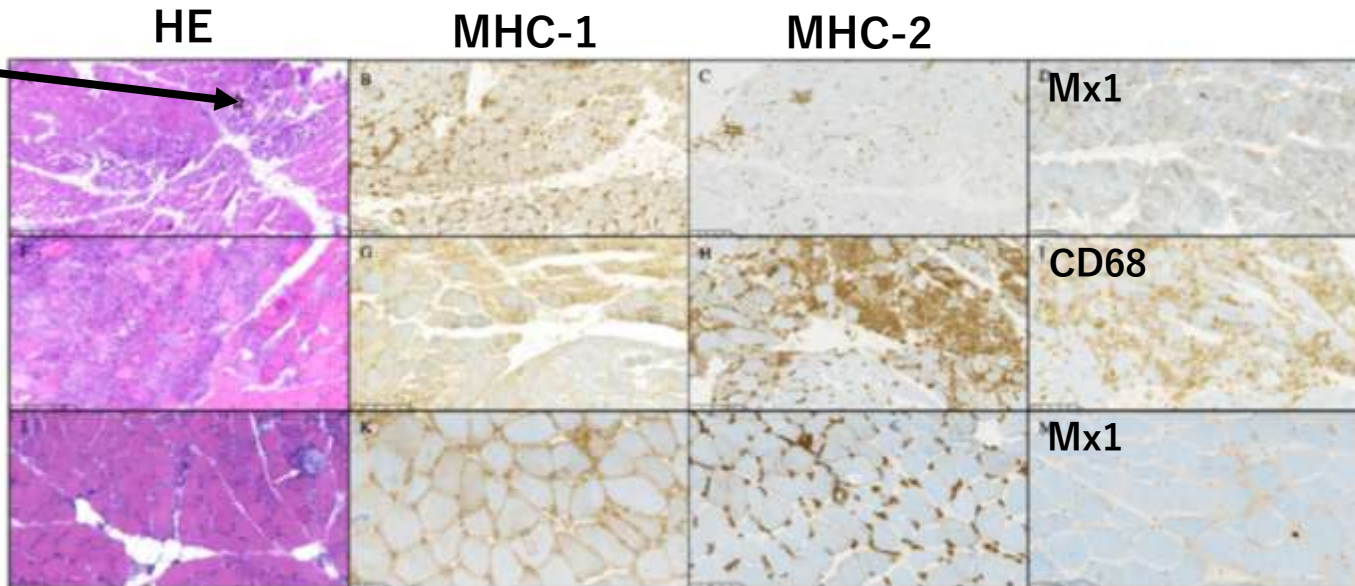


血管周囲に強い炎症を伴う筋線維壊死

ICI-DM

ICI-MYO1

ICI-MYO2



筋束周囲性萎縮

炎症 > 壊死
Mφ, CD8⁺T細胞

壊死 > 炎症

Mx1 : type I IFN誘導タンパク, CD68 : 単球・Mφ marker

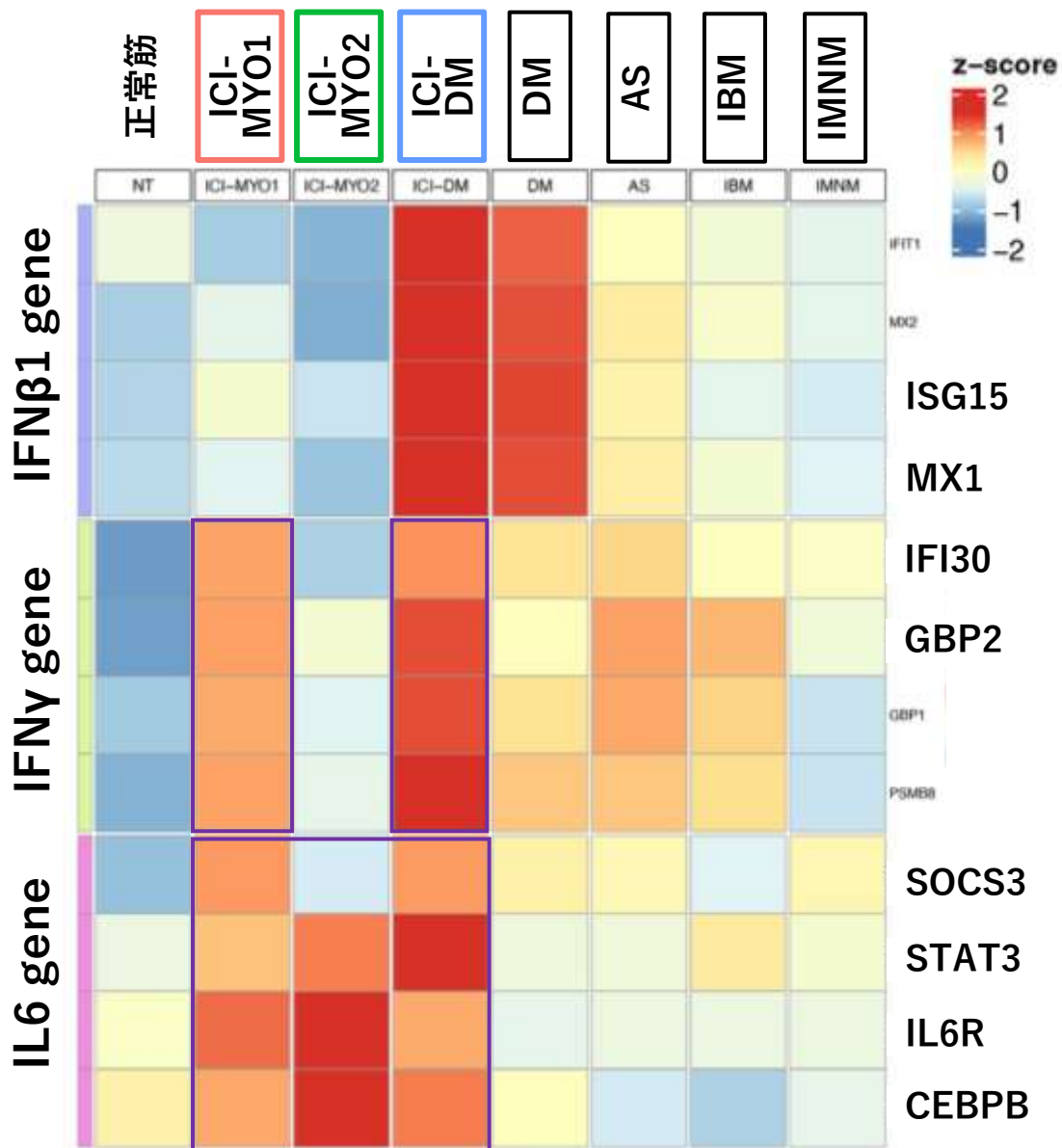
各ICI筋炎群の臨床的背景

Characteristic	Overall, n=35*	ICI-DM, n=3*	ICI-MYO1, n=24*	ICI-MYO2, n=8*	P value†
Female	11 (31)	1 (33)	8 (33)	2 (25)	>0.9
Age at biopsy	67 (60–74)	73 (58–74)	64 (60–72)	69 (67–72)	0.6
<u>Dermatomyositis</u> 皮膚筋炎	3 (8.6)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	<u><0.001</u>
Inflammatory infiltrates	25 (71)	3 (100)	19 (79)	3 (38)	0.056
Treatment cycle					>0.9
1	16 (46)	1 (33)	11 (46)	4 (50)	
2	13 (37)	2 (67)	8 (33)	3 (38)	
3	5 (14)	0 (0)	4 (17)	1 (12)	
4	1 (2.9)	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)	
PD1 inhibitor	24 (69)	2 (67)	14 (58)	8 (100)	0.065
PD-L1 inhibitor	11 (31)	1 (33)	10 (42)	0 (0)	0.065
CTLA4 inhibitor	5 (14)	0 (0)	2 (8.3)	3 (38)	0.11
<u>Myocarditis</u> 心筋炎	13 (37)	0 (0)	13 (54)	0 (0)	<u>0.006</u>
<u>Diplopia</u>	7 (20)	0 (0)	6 (25)	1 (12)	0.8
Dysphagia	4 (11)	0 (0)	2 (8.3)	2 (25)	0.5
Antistriational	15 (43)	0 (0)	11 (46)	4 (50)	0.6
<u>Anti-AChR</u> 抗AChR抗体	14 (40)	0 (0)	12 (50)	2 (25)	<u>0.010</u>
<u>Other myositis autoantibodies</u>	16 (46)	3 (100)	12 (50)	1 (12)	0.051
Creatine kinase at biopsy	1184 (462–6118)	428 (278–4758)	896 (278–1394)	427 (62–830)	0.3
Peak creatine kinase	1184 (462–6118)	428 (278–4758)	1240 (899–6565)	652 (379–4771)	0.4

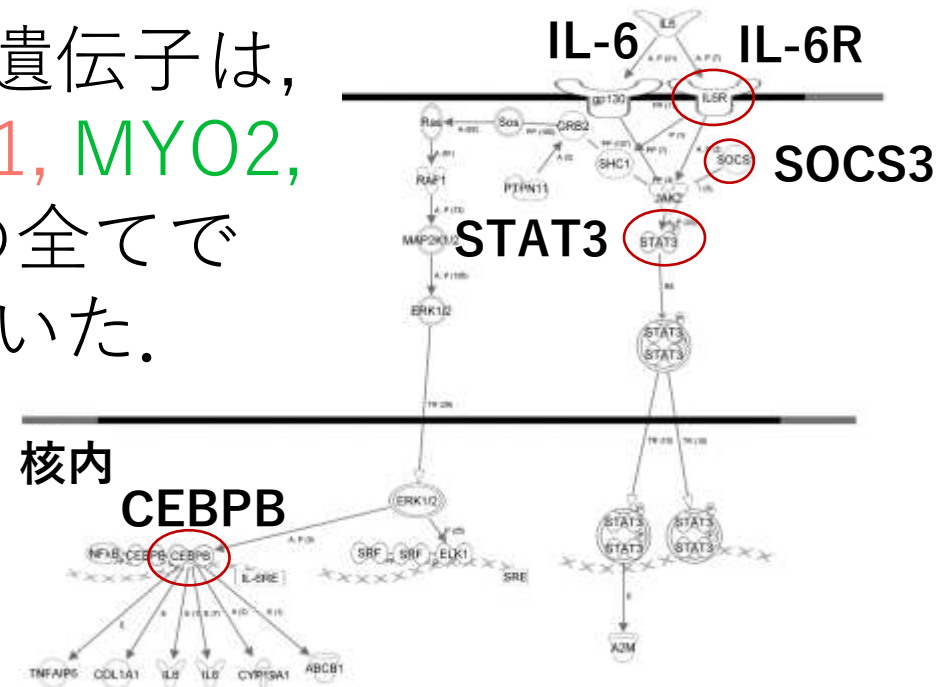
- 抗AChR抗体陽性 14人 (全体の40%)
- 皮膚筋炎と診断される3名は全員ICI-DMに分類.
- 心筋炎のある患者は全員ICI-MYO1に分類.
- ICI-DM: 抗TIF-1 γ 抗体 +
- ICI-MYO1: 抗AChR抗体+ (50%), 抗Ro60, Ro52, SRP, Mi2a, TIF1 γ , HMGCR, NT5c1A, NXP2, PM/Sc100抗体 (50%)

抗TIF-1 γ 抗体

遺伝子発現解析

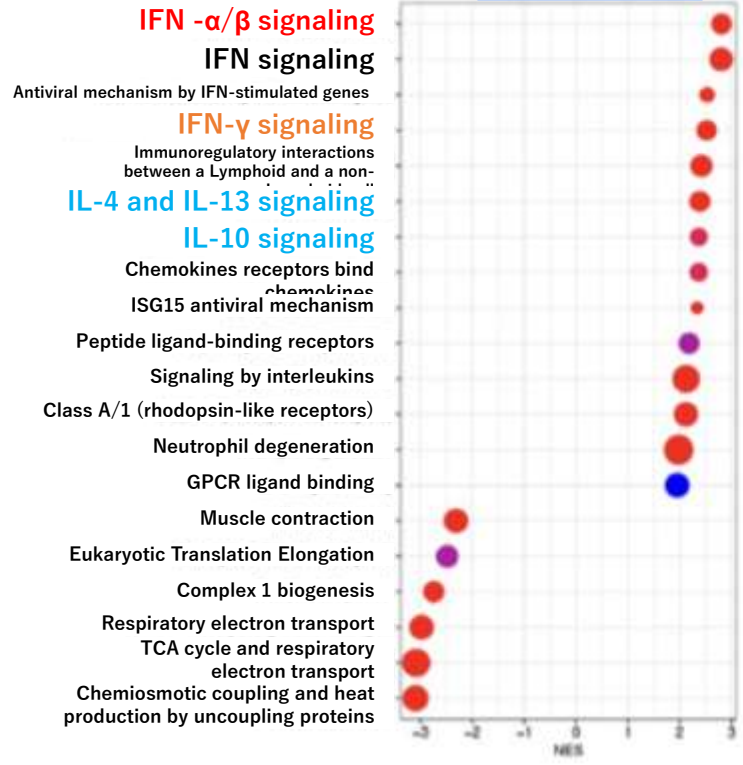


- IFNβ1関連遺伝子(ISG15, MX1)はICI-DMで上昇 (DMと同様)
- IFNγ関連遺伝子(GBP2)はICI-MYO1, ICI-DMで上昇
- IL-6関連遺伝子は, ICI-MYO1, MYO2, ICI-DMの全てで上昇していた。

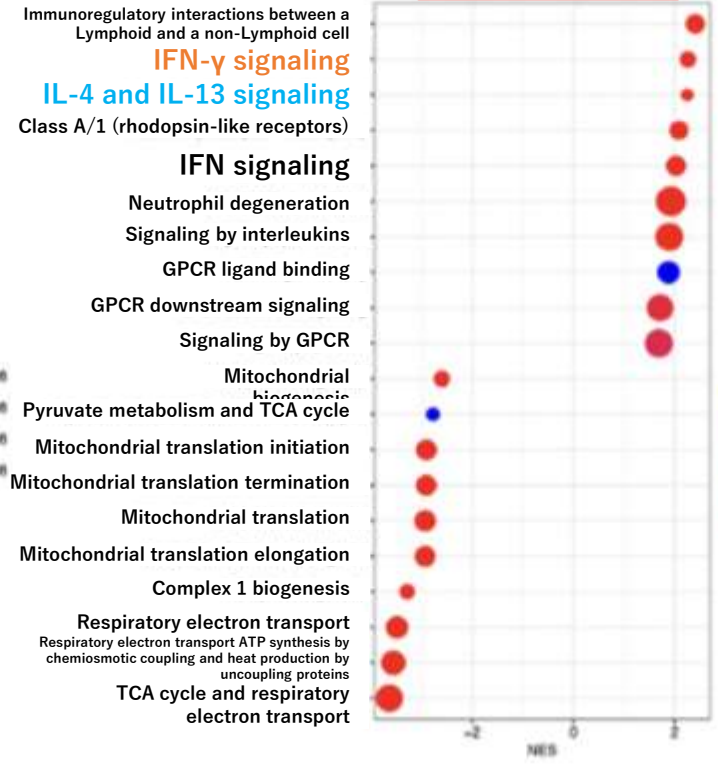


Pathway 解析

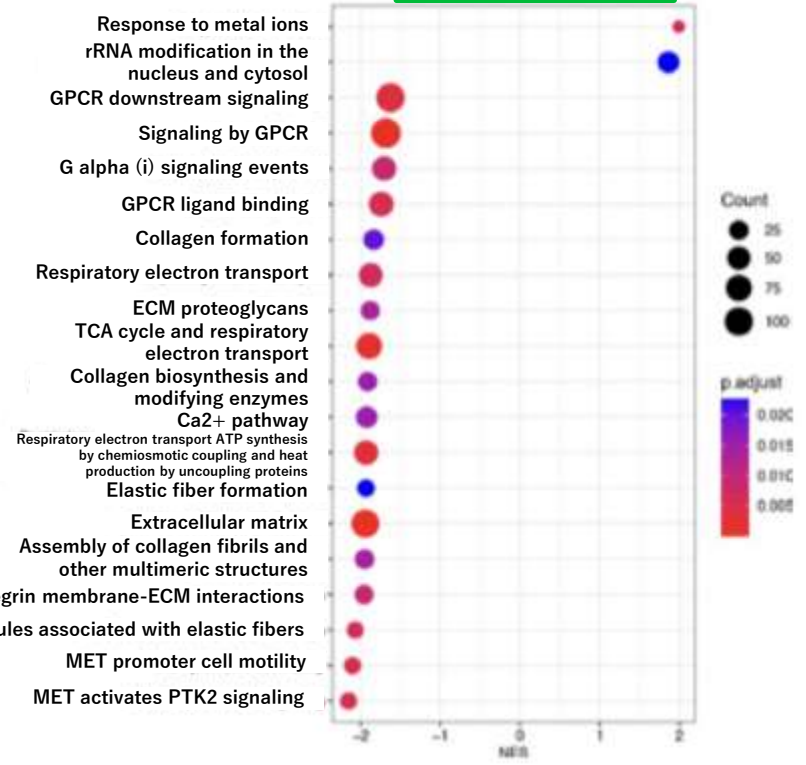
ICI-DM



ICI-MYO1



ICI-MYO2



- IFN- α/β シグナル経路
- IFN- γ シグナル経路
- インターロイキン経路

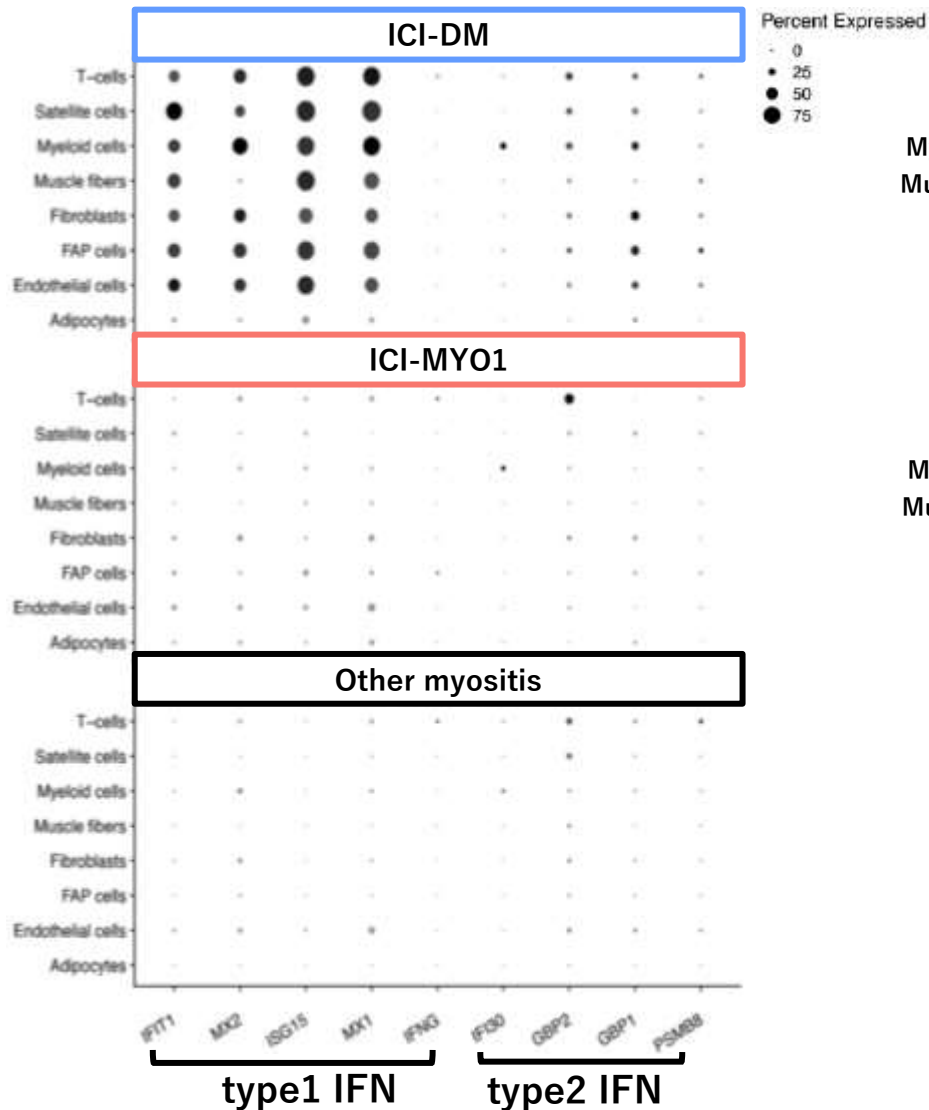
ICI-DMで亢進

ICI-DM・ICI-MYO1で亢進

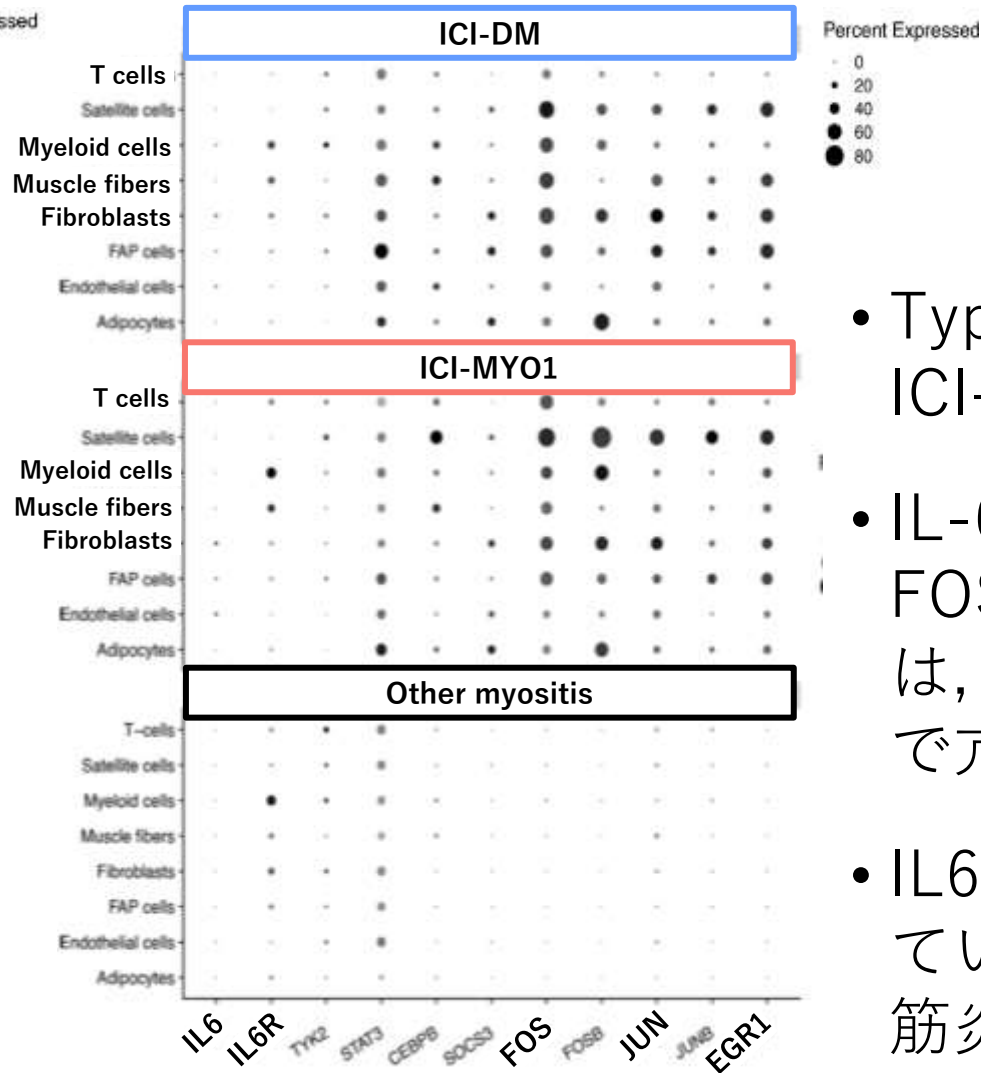
ICI-DM・ICI-MYO1で亢進

Single-nuclei RNA seq

IFN pathway gene



IL6 pathway gene

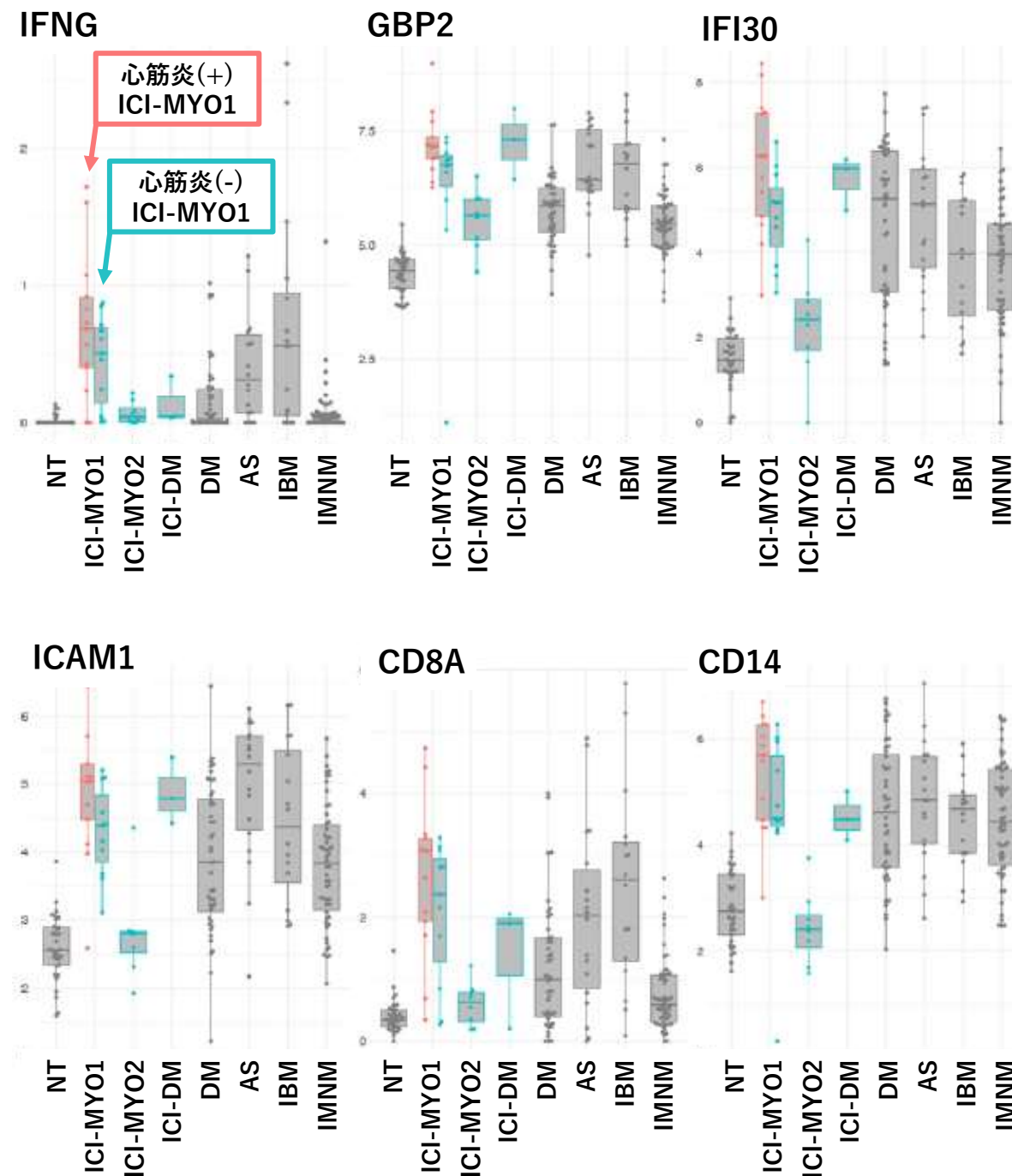


- Type I IFN経路遺伝子がICI-DMで亢進 (DM同様).
- IL-6経路遺伝子と, JUN, FOS, EGR1(IL6発現と相関)は, ICI-DMとICI-MYO1で亢進.
- IL6Rは主にMΦで発現していたが, 発現量が低く筋炎群間差は検出困難.

ICI-MYO1と心筋炎

- 心筋炎患者はすべてICI-MYO1群.
- IFNG, IFN- γ 誘導遺伝子 (GBP2, IFI30), ICAM1, CD8A, CD14は, ICI-MYO1の中でも心筋炎(+)群で高かった.

IFI30: MHC class I を介したcross-presentationや,
MHC class II を介した抗原プロセッシングに関与
GBP2: IFN誘導性GTPase群で細胞内病原体複製を制御
CD14: 単球のマーカー
CD8a: CD8⁺T細胞のマーカー



ICI-DM

- 筋束周囲性萎縮
- 皮膚筋炎 3 例，全例抗TIF-1 γ 抗体陽性
- Type I/II IFN経路の亢進

ICI-MY01

- CD8⁺T細胞, M Φ 浸潤を伴う強い炎症
- 心筋炎, 複視
- 抗AChR抗体陽性例の70%
- IFN- γ 経路が過剰発現

ICI-MY02

- 病理で壊死 > 炎症

IL-6経路
の亢進

▶ 筋炎がなくてもICIそのものがIFN- γ やIL-6経路へ影響を及ぼすか？

- 公開されているICI治療前後のメラノーマのRNA seq data (GEO: GSE91061) では, ICI治療後のIFN γ 及びIFN- γ 刺激性遺伝子の発現亢進あり.
- メラノーマではICI治療前後でのIL6経路の有意な活性化を示さなかった.

考察 ICI-MY01

- ICI-MY01の心筋炎, 抗AChR抗体や抗横紋筋抗体陽性の傾向は他の炎症性ミオパチーには見られなかった.
- 複視を認める患者が多く臨床的には重症筋無力症に特徴的だった.
- 心筋炎患者で, IFN- γ 誘導性遺伝子・T細胞マーカー・血管接着分子の発現が最も亢進していた.
- 筋線維に結合した自己抗体がT細胞を引き寄せるとも考えられる.

考察 ICI筋炎はなぜ起こるか？

- 仮説：既に存在する自己免疫機構がICI治療により顕在化。
 - 治療前の活性化CD4+メモリーT細胞量↑やTCR多様性が重篤なirAE発症と関連がある。
Lozano AX, Chaudhuri AA, Nene A, et al. Nat Med 2022;28:353–62.
 - 治療前の抗mAChR抗体+やB細胞量↓が胸腺腫患者におけるICI関連筋炎と関連がある。
Mammen AL, Rajan A, Pak K, et al. Ann Rheum Dis 2019;78:150–2.
- ICI筋炎の治療にはこれまでグルココルチコイドや免疫グロブリン¹，アバタセプト²が用いられてきたが，有効性の程度は不明である。
 - 1 Diamanti L, Picca A, Bini P, et al. Neurol Sci 2022;43:2031–41.
 - 2 Salem J-E, Allenbach Y, Vozy A, et al. N Engl J Med 2019;380:2377–9.
- ICI筋炎でのIL-6経路やtype1/2 IFNの過剰発現は，IL-6受容体阻害薬やJAK-STAT阻害薬の有用性を支持するかもしれない。