

サイトメトリー：種々の細胞の同定には、抗 CD 3 抗体、抗 B220 抗体、抗 Gr 1 抗体、抗 Mac1 抗体を用いた。CD40L の発現は抗 CD40L 抗体を用いて解析した。

ELISA：IgM および IgG 量は、それぞれ抗 IgM 抗体および抗 IgG 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により測定した。抗 DNA 抗体は牛胸腺 DNA を固相化し、アルカリフォスファターゼ結合抗 IgM 抗体または抗 IgG 抗体を用いてクラス別に測定した。抗ニトロフェノール (NP) 抗体は NP 化牛血清アルブミンを固相化し、アルカリフォスファターゼ結合抗 IgM 抗体または抗 IgG 抗体を用いてクラス別に測定した。

免疫：NP 化ニワトリ免疫グロブリンをアラムとともにマウス腹くう内に投与し、7 および 14 日目に採血した。

尿蛋白の測定：濾紙に付着させた尿をプロモフェノールブルーにより発色し、段階希釈した牛血清アルブミンと比較することにより計測した。

組織学的解析：組織をホルマリン固定後、ヘマトキシリン・エオジン染色または PAS 染色を行なった。

免疫組織学的解析：凍結切片を FITC 標識抗 IgM 抗体、抗 IgG 抗体、抗 C3 抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

### C. 研究結果

免疫グロブリンエンハンサー (H鎖イントロンエンハンサーおよびκ鎖 3'エンハンサー) により発現が制御される CD40L 遺伝子をマウス受精卵に導入し、CD40L トランスジェニックマウスを樹立した。CD40L トランスジェニックマウスにおけ

る CD40L の発現をフローサイトメトリーで解析したが、CD40L の発現を確認することができなかった。CD40 の存在下では、CD40L が蛋白分解やインターナリゼーションにより細胞表面での発現が消失することが示されている(8)ので、CD40L トランスジェニックマウスを CD40 欠損マウス (大阪大学菊谷博士より供与) と交配した。CD40 欠損 CD40L トランスジェニックマウスの末梢リンパ臓器の細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、B 細胞でトランスジェン由来の CD40L の発現を認めたが、T 細胞やマクロファージ、顆粒球などのその他の血液細胞ではトランスジェン由来の CD40L の発現は認めなかった。これらの結果から、CD40L トランスジェニックマウスでは、トランスジェン由来の CD40L が B 細胞で発現するが CD40 存在下では、CD40 との反応により細胞表面からその発現が速やかに失われると考えられた。

フローサイトメトリーで種々のリンパ臓器を検索したところ、CD40L トランスジェニックマウスの末梢リンパ臓器では、B 細胞数が正常マウスの 2-3 倍に増加していた。また、無刺激マウスの血清免疫グロブリン量を測定したところ、CD40L トランスジェニックマウスでは正常マウスに比べ、IgM、IgG ともに正常マウスの 2-3 倍に増加していた。次いで、特異抗体産生能を検索する目的で、CD40L トランスジェニックマウスをニトロフェノール (NP) と重合したニワトリ免疫グロブリンで免疫し、血清中の NP に特異的に反応する抗体量を ELISA 法により測定した。CD40L トランスジェニックマウス血清中

には、IgM、IgG ともに正常マウスにくらべ約10倍のNP特異抗体を認めた。以上の結果から、CD40L トランスジェニックマウスでは、おそらくB細胞上に発現したCD40L を介してオートクライン経路でCD40 シグナルが誘導されることにより、液性免疫応答が亢進していることが明らかになった。

CD40L トランスジェニックマウスで自己抗体産生や自己免疫疾患の発症があるか検索する目的で、約12カ月齢のCD40L トランスジェニックマウスの血清中の抗DNA抗体価を測定したところ、約半数のマウスで有意な抗DNA抗体の産生を認め、一部のマウスではMRL/lpr マウスに匹敵する抗体価を認めた。さらに、約半数のCD40Lトランスジェニックマウスで有意な尿蛋白を認めたため、腎臓の組織学的、免疫組織学的検索をおこなった。その結果、CD40L トランスジェニックの約半数で、糸球体へのPAS陽性物質のびまん性の沈着とメサンギウムの増殖を認めたが、同じ月齢の正常リッターメイトではこのような変化は認めなかった。さらに、免疫蛍光抗体法によりCD40Lトランスジェニックマウスでは糸球体への免疫グロブリンと補体の沈着を認めたが、正常リッターメイトではこのような変化は認めなかった。以上の結果から、CD40L トランスジェニックマウスでは自己抗体産生がおこり、さらに免疫複合体沈着を伴う糸球体腎炎を発症することが明らかとなった。

#### D. 考察

本研究では、CD40L トランスジェニックマウスにおいて、IgMクラスおよびIgG

クラスともに抗原刺激に対する抗体産生の亢進があることが明らかとなった。これまで、CD40 欠損マウスの解析から、CD40 シグナルが生体内でクラススイッチに重要な役割を果たすことが示されていた。しかし、我々の結果は、CD40 シグナルがIgMクラスの抗体産生も促進することを示している。したがって、CD40 シグナルがB細胞の共刺激として働き、抗原と反応したB細胞の活性化を効率化することが示唆される。この結果は、CD40 シグナルが抗原受容体シグナルによるB細胞アポトーシスを阻害し、B細胞の増殖を促進するという、これまでのin vitroの結果とよく合致する。

さらに、CD40L トランスジェニックマウスでは、自己抗体産生や免疫複合体の沈着を伴う糸球体腎炎の発症などSLE様の症状を呈することが示された。この結果は、CD40シグナルの過剰により自己トレランスが破綻し、全身性自己免疫疾患が発症することを示している。CD40Lの過剰発現やB細胞での異所性発現は、これまでにSLE患者やSLEモデルマウスBXSBで示されている(5-7)。我々の結果は、これらの患者やモデルマウスのSLE発症において、CD40Lの発現異常が重要な役割を果たすことを強く示唆している。したがって、SLEの病因を解明し、病因に添ったより根本的な治療法を開発する際に、CD40Lは重要な標的分子となろう。CD40Lトランスジェニックマウスにおけるトレランス破綻の機構についてはまだ不明である。しかしながら、我々が示唆してきた、CD40シグナルが自己抗原と反応したB細胞のアポトーシスを阻害することにより(3,4)、自

己反応性 B 細胞のクローン除去を阻害する可能について、今後検討する必要がある。

また、CD40L トランスジェニックマウスでは、B 細胞の増多や液性免疫応答の亢進、さらに、全身性自己免疫疾患の発症など、種々の免疫異常が認められるにも関わらず CD40 の存在下では CD40L の発現を確認することはできなかった。この結果は、CD40 存在下では CD40L の発現が低下するため(8)、免疫異常をおこすのに十分な CD40L の発現があっても、通常のフローサイトメトリーでは検出できないということを示している。したがって、SLE 患者などで CD40L の発現を検索する際には、十分注意する必要がある、今後、CD40 存在下での CD40L 発現検索法の開発が必要である。

#### E. 結論

CD40L を過剰発現する CD40L トランスジェニックマウスでは、液性免疫応答の亢進、自己抗体の産生、SLE 様の全身性自己免疫疾患の発症がおこる。CD40L の過剰発現は SLE 患者や SLE モデルマウス BXSB で示されているので、SLE の発症において CD40L が重要な役割を果しているものと推察される。また CD40 存在下では CD40L の発現が減弱するため、その検出が困難となる場合がある。したがって、SLE 患者などで CD40L の発現を検索する際には、十分注意する必要がある、CD40 存在下での CD40L 発現検索法の開発が必要である。

#### F. 参考文献

(1). Tsubata, T., Murakami, M. and Honjo, T.:

Antigen-receptor cross-linking induces peritoneal B-cell apoptosis in normal but not autoimmunity-prone mice. *Curr. Biol.* 1994 4: 8-17.

(2). Nomura, T., Han, H., Howard, M. C., Yagita, H., Yakura, H., Honjo, T., and Tsubata, T.: Antigen receptor-mediated B cell death is blocked by signaling via CD72 or treatment with dextran sulfate and is defective in autoimmunity-prone mice. *Int. Immunol.* 1996 8: 867-875.

(3). Yoshida, T., Higuchi, T., Hagiwara, H., Strasser, A., Nishioka, K., and Tsubata, T.: Rapid B cell apoptosis induced by antigen receptor ligation does not require Fas (CD95/APO-1), the adapter protein FADD/MORT1 or CrmA-sensitive caspases but is defective in both MRL-+/+ and MRL-lpr/lpr mice. *Int. Immunol.* 2000 (in press).

(4). Tsubata, T., Wu, J. and Honjo, T.: B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by T-cell signal through CD40. *Nature* 1993 364: 645-648.

(5). Desai-Mehta, A., Lu, G.R., Ramsey, and S.K. Datta : Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J. Clin. Invest.* 1996 97: 2063-2073.

(6). Koshy, M., D. Berger, and M.K. Crow.: Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1996 98: 826-837.

(7). Blossom, S., E.B. Chu, W.O. Weigle, and K.M. Gilbert.: CD40 ligand expressed on B cells in the BXSB mouse model of systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 1997 159:

4580-4586.

(8). Yellin, M.J., K. Sippel, G. Inghirami, L.R. Covey, J.J. Lee, J. Sinning, E.A. Clark, L. Chess, and S. Lederman: CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *J. Immunol.* 1994 152: 598-608.

## 多発性筋炎・皮膚筋炎に合併した間質性肺炎に対する シクロスポリン療法に関する全国調査

分担研究者 宮坂信之

(東京医科歯科大学医学部内科学第一講座)

### 研究要旨

多発性筋炎・皮膚筋炎 (PM/DM) に伴う間質性肺炎 (IP), 特に急速進行性間質性肺炎は生命予後を左右する重要な合併症であり, 確立された有効な治療法がないのが実情である。しかし近年, 本病態に対してシクロスポリン (CyA) が有効であるとする報告が散発的にみられていることから, CyA 療法の有効性の検討及び標準的治療指針の作成等を目的として, 昨年度より本研究班により CyA を用いた臨床試験が開始された。

PM/DM に合併した IP に対し CyA が投与された症例を対象にして全国アンケート調査を中心とした retrospective study を行った。IP の分類は主治医の判定に基づき, 急性の発症あるいは急激な増悪を急性型, 慢性に進行したものを慢性型と定義した。

アンケート調査は全国 13 施設より 40 症例の解答を得た (PM11 例, DM29 例)。全例がステロイド剤を内服しており, 17 例がステロイドパルス療法を併用していた。自覚症状, 理学所見, 画像所見, 動脈血ガス分析の 4 項目について CyA 投与開始時および 28 日後の比較検討を行ったところ, 自覚症状, 理学所見, 動脈血ガス分析について統計学的に有意な改善が認められた。これらの 4 項目から 28 日後の有効性を総合的に評価したところ, 著効 27%, 有効 17%, やや有効 23%, 不変 13%, 増悪 20% であった。疾患別にみると, PM では著効 45%, 有効 22%, やや有効 33%, 不変および増悪は 0% であるのに対して, DM では著効 19%, 有効 14%, やや有効 19%, 不変 19%, 増悪 29% であった。なお, 増悪した症例はすべて DM に合併した急性型の IP であった。また DM の急性型 IP を有効/不変群と増悪群にわけ, 種々の因子について解析したが両者に有意な差はみられなかった。これらの症例で転帰が明らかなものは 38 例で, PM10 例では改善 50%, 不変 30%, 死亡は 20% であり, DM28 例では, 改善は 53%, 不変 11%, 増悪 7%, 死亡 29% であった。DM の死亡例はすべて急性型であった。有害事象は 20 例 28 件, 感染症はこのうち 9 例 10 件に認められ, 6 例が死亡した。

本研究においても PM/DM に合併する間質性肺炎に対する CyA の有効性が明らかとなった。また, これまでの報告と同様, 予後不良群は DM に合併する急性間質性肺炎であった。

今後, 症例の予後追跡を行うと共に, 予後に影響を与える因子を検索し, さらには CyA 療法の正確な評価を行うべく, 多施設共同研究による前向き研究が必要であると考えられる

## A. 研究目的

PM/DMに合併したIPに対するCyAの有効性の検討と、標準的治療指針の作成を目的として、アンケート調査とその解析を行う。

## B. 研究方法

PM/DMに合併したIPにCyAを投与した症例を対象に、全国13施設にアンケート調査を行った(表1)。アンケートの内容として、診断、シクロスポリンの投与量および投与期間、併用薬剤、治療前後の臨床所見および検査所見、転帰、有害事象を調査した。CyAはトラフレベル100~200ng/mlを目標に経口投与し、14日間以上シクロスポリンが投与された症例を評価の対象とした。IPの分類は、主治医の判定に基づき、急性の発症あるいは、急激に増悪した場合を急性型、慢性に進行したものを慢性型とした。治療評価項目は、自覚症状(呼吸困難、咳嗽、喀痰)、理学的所見(聴診音)、画像所見(胸部X-P)、動脈血液ガス分析として、respiratory index (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>)の4項目を設けた。自覚症状は-10~0点、理学所見は-3~0点、画像所見は-4~0点とスコア化し、治療開始時および28日後に採点を行った。評価基準は各項目ごとに改善、不変、増悪の3段階を設け、自覚症状、理学的所見、画像所見については、スコアが上昇した場合を改善、変化がない場合を不変、減少したものを増悪とした。

Respiratory indexは50以上の上昇を改善、50以上の減少を増悪、それ以外を不変とした。更に、これらの4項目から、総合評価を行い、4項目中3項目以上が改善

したものを著効、2項目が改善したものを有効、1項目が改善したものをやや有効、すべての項目で変化がないものを不変、それ以外を増悪とした。

統計学的解析は、カイ二乗検定、Mann-WhitneyのU検定、Wilcoxonの符号付順位検定、ロジスティック回帰分析を用い、P値0.05未満をもって有意と判定した。

## C. 研究結果

### 1) 患者背景

アンケートを配布した13施設よりPM11例、DM29例、計40症例の解答を得た。PMの患者背景を表2-1に、DMの患者背景を表2-2に記す。PMは急性型2例、慢性型9例で、全例が女性でステロイド剤を内服しており、急性型は2例がステロイドパルス療法を、1例がエンドキサンパルス療法を併用していたCK/LDH比は急性型が低い傾向にあった。DMは急性型18例、慢性型11例であった。全例がステロイド剤を内服していたが、その他の併用薬剤は急性型と慢性型で大きく異なっていた。CK/LDH比は急性型で著しく低値であった。なお、ステロイドパルス療法の併用、CK/LDH比については急性型と慢性型で有意差を認めた(P<0.05)。

### 2) 各評価項目の治療前後の推移

PM/DM全体では自覚症状、理学所見、respiratory indexについて、治療28日後には有意な改善を認めた(P<0.05)(図1-1)。PMの急性型IPでは両症例とも、自覚症状、理学所見、画像所見、respiratory indexと、すべての項目で改善を認めた(図1-2)。PMの慢性型IPでは、自覚症状、respiratory indexでは有意な改善を認め

たが ( $P < 0.05$ )，理学所見，画像所見では変化のない症例が目立った (図 1-3)。

DM に合併した急性型 IP 18 例での治療前後の各項目の推移を図 1-4 に示す。DM の急性型 IP ではいずれの項目においても一定の傾向は見られず，改善，不変，増悪の 3 群とも同程度にみられた。一方，DM の慢性型 IP ではほとんどの症例が改善あるいは不変であり，自覚症状，理学所見，respiratory index の 3 項目において有意な改善を示していた ( $P < 0.05$ ) (図 1-5)

### 3) 総合評価

PM/DM 全体では，総合評価可能な症例は 30 例であり，有効以上は 44% であった。PM ( $n=9$ ) は，有効以上は 67%，全例がやや有効以上と，高い有効性を示した。DM ( $n=21$ ) は，PM とは対照的に有効以上は 33% に留まり，増悪例が目立った (図 2-1)。さらに，PM，DM を IP の発症様式別に分けて，同様の解析を行った。PM の急性型 ( $n=2$ ) はいずれも著効であった。慢性型 ( $n=7$ ) でも有効以上が 58% と，PM に合併した IP では CyA は非常に高い有効性を示した (図 2-2) 一方，DM に合併した急性型 IP ( $n=17$ ) は，有効以上は 29%，不変 24%，増悪 35% であった。慢性型 IP ( $n=4$ ) は，著効 50%，やや有効が 50% であった。DM に合併した急性型 IP は，PM，あるいは DM の慢性型 IP に比して有効性は劣り，全症例を通じて不変および増悪例はこのグループに含まれていた (図 2-3)。

### 4) 治療効果予測因子の検索

DM に合併した急性型間質性肺炎の 17 例を対象に，従属変数を治療効果の有無としてロジスティック解析を行い，治療効果と相関する因子の検索を試みた。独立変数を

年齢，CK/LDH 比，CyA 開始時の各所見 (自覚症状，理学所見，画像所見，respiratory index) として解析を行ったが，有意な所見は認められなかった。

### 5) 増悪群の解析

DM に合併した急性型 IP を，総合評価をもとに有効不変群と増悪群の 2 群に分けて，特に増悪群の特徴について検討した (表 3)。CK/LDH 比，respiratory index について両群間に差がみられたが，いずれも有意ではなかった。

### 6) 転帰

観察し得た最後の時点を転帰とし，主治医の判定に基づき改善，不変，増悪，死亡に分類した。PM ( $n=10$ ) では，改善は 50%，不変 30%，死亡は 20% であった。死亡した 2 例のうち，1 例は急性型 IP で IP の増悪により死亡，1 例は慢性型 IP で感染症を併発し死亡した (図 3-1)。DM ( $n=28$ ) では，改善は 53%，不変 11%，増悪 7%，死亡 29% であった。死亡例はすべて急性型で，死因は IP 増悪，感染症，および両者の合併であった (図 3-2)。

### 7) 有害事象

有害事象は 20 例 (50%)，28 件に認められた (表 4-1)。感染症が最多で 10 件，肝機能障害が 5 件，糖尿病と高血圧が 2 件であった。特に感染症が多く，死亡例も認められた。感染症の内訳を表 4-2 に示す。感染症を併発した 9 例のうち 6 例が死亡しており，なかでも真菌感染およびその疑いによる死亡は 3 例にみられた。カリニ肺炎および疑い例は 2 例あったが，投薬により治癒した。この他の有害事象についてはコントロールが可能であった。

#### D. 考察

IPはPM/DMにおいてしばしば遭遇する合併症であり、佐藤ら<sup>2)</sup>によれば、PMの54.6%、DMの58.1%にIPが認められる。さらに、PM/DMに合併したIPは予後を決定する重要な因子であるため、IPの治療がPM/DM患者の生命予後のみならず、QOLをも改善するといっても過言ではない。

従来の治療法では無効とされた本病態にCyAが奏功したとする報告は本邦を中心に見られている。しかしこれらはいずれも少数例での検討であること、また有効であるが故に報告された可能性があり、CyAの本来の有用性を評価することは困難である。また、本研究班により前回行われたCyA療法の多施設共同研究では多数例であるものの、効果の判定が主治医に委ねられていること、効果判定時期が最も改善した時点で行われたこと、などの問題点があった。今回、効果判定時期を28日後と設定し、かつ各評価項目をスコア一化し、客観的評価を試みた。

まず、PM/DMに合併したIPに対しCyAは有効以上が44%であり、本研究においてもPM/DMに合併するIPに対するCyAの有効性が明らかとなった。特にPM、およびDMに合併した慢性型IPでは有効例が多く、かつ全症例が1カ月後には何らかの改善を示しており、過去の報告例と同様、CyAは有用であると考えられる。一方でDMに合併した急性型IPではCyAの治療効果は他の群に比して劣っており、特に増悪例が多いことから、本病型は治療抵抗性であることが再確認された。しかし一方で、同様の臨床像をとりながらCyAが奏功し

た症例が多数含まれていたことも確認された。従って、両者の差を検討することでCyAの適応症例を選択することは可能であると思われたが、ロジスティック解析および有効/不変群と増悪群の比較においても有意な所見は得られず、アンケート調査内容のみではCyA適応症例の選択は困難であった。

PM/DMに合併したIPの予後については、治療前における肺の病理組織所見と相関することが報告されており<sup>4)</sup>、肺の病理組織所見と胸部CT所見の比較検討も行われている。従って、胸部CT検査や肺生検を積極的に施行することで、CyAの治療効果を予測しうる可能性がある。さらに、Ⅱ型肺胞上皮細胞の破壊を示し肺線維化マーカーとなるKL-6や、PM/DMの病因と考えられているT細胞の活性化マーカーである可溶性IL-2レセプター、さらには新たな筋炎のマーカーなど、指標となりうる分子マーカーの検討が必要と考えられる。

また、本研究では、今後検討すべきいくつかの課題がある。まず、治療期間が数ヶ月と短い症例が含まれており短期的な治療効果が必ずしも長期予後を反映しない可能性がある点であり、今後引き続き予後を調査し、長期予後を追跡した上でCyAの治療効果を確認することが重要である。次に、ステロイド剤を併用したCyA投与群のみでの解析であるためCyAそのものの治療効果を評価しづらい点であり、ステロイド単独投与群との比較検討を行うことでより正確な評価が可能と考えられる。さらには、PM/DMが希な疾患であること、CyAが本病態に対し有用であることを考慮し、多施設共同による前向き試験を行うことが必要



であると考えられた。さらに、今回の臨床試験において製薬会社より CyA の無料給付を受けることはできたが、これを新 G C P に基づく臨床試験とすることに会社は合意しなかった。このため、有害事象発生時の対応に困難を生ずるため、多くの施設において本臨床試験が当該大学の倫理審査委員会をパスできなかったという事情があったことを付記したい。今後は、このような臨床試験を新 G C P の基準に合致させるような努力が必要であると思われる。

### E. 結論

PM/DM に合併した IP に対する CyA の有効性が確認された。

### F. 参考文献

1. 齊藤栄造, 小川武彦, 定本清美: 多発性筋炎/皮膚筋炎における間質性肺炎に関する研究: 予後および予後に関する因子について. 厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班平成 5 年度研究報告書. 1994, 125-127.
2. 佐藤篤彦, 千田金吾, 早川哲史, 他: 多発性筋炎/皮膚筋炎に伴う肺病変について: 全国調査. 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成 7 年度研究報告書. 1995, 61-64.
3. Gruhn, WB., Diaz-Buxo, DJ. Cyclosporine treatment of steroid resistant interstitial pneumonitis associated with dermatomyositis /polymyositis. J.Reumatol.1987,14,1045-1047
4. Tazelaar, HD., Viggiano, RW., Pickersgill, J., et al. : Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis: clinical

features and prognosis as correlated with histologic findings. Am Rev Respir Dis.1990,141,727-733.

表 1: 協力施設

北海道大学	東京医科歯科大学
東北大学	東京女子医科大学
埼玉医科大学	金沢医科大学
杏林大学	大阪大学
慶応義塾大学	(NTT西日本大阪病院)
順天堂大学	産業医科大学
東京大学	長崎大学

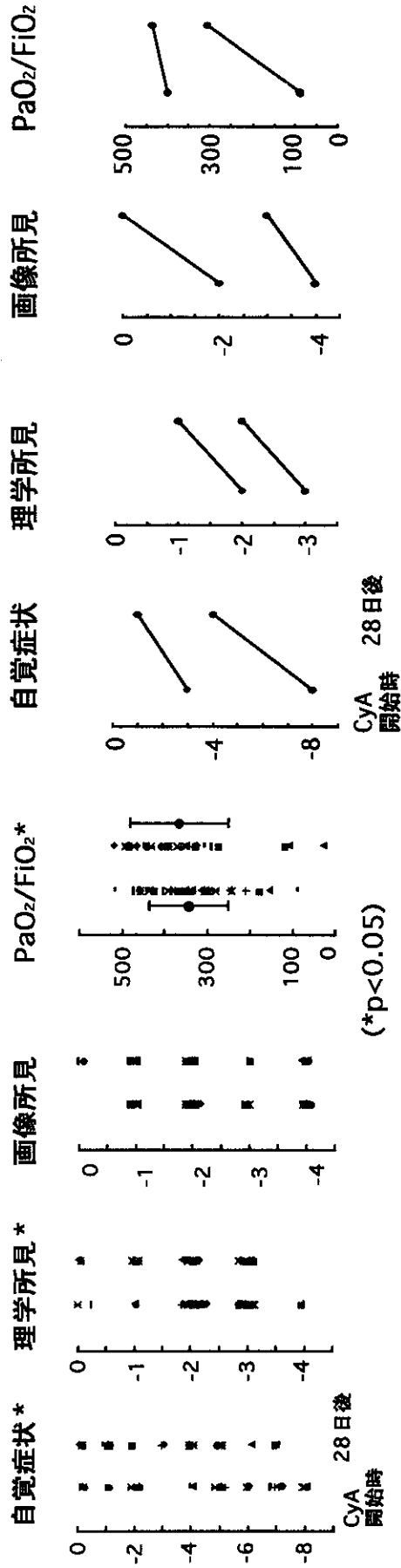


図 1-1 : 治療前後の各項目の推移  
(PM/DM, n=40)

図 1-2 : 治療前後の各項目の推移  
(PM急性型, n=2)

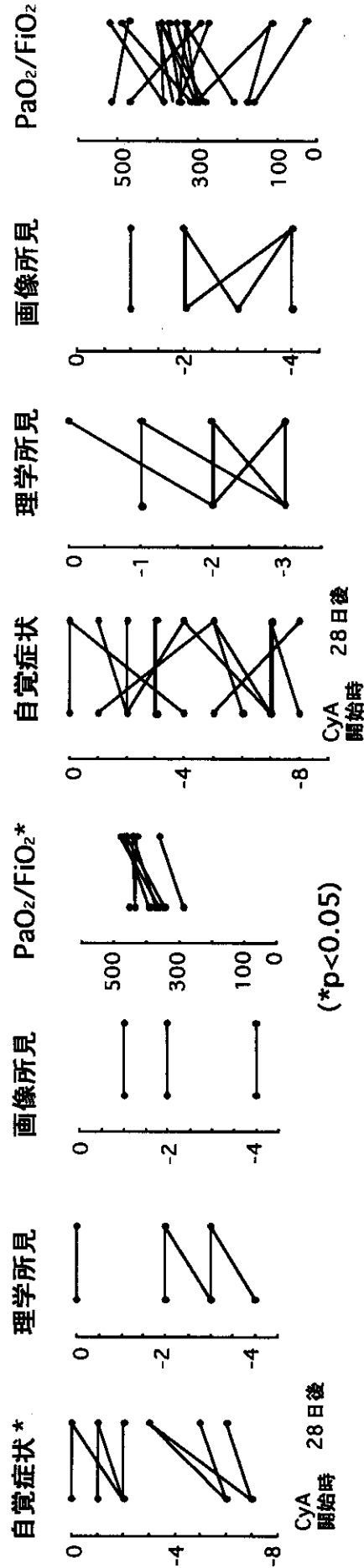


図 1-3 : 治療前後の各項目の推移  
(PM慢性型, n=9)

図 1-4 : 治療前後の各項目の推移  
(DM急性型, n=18)

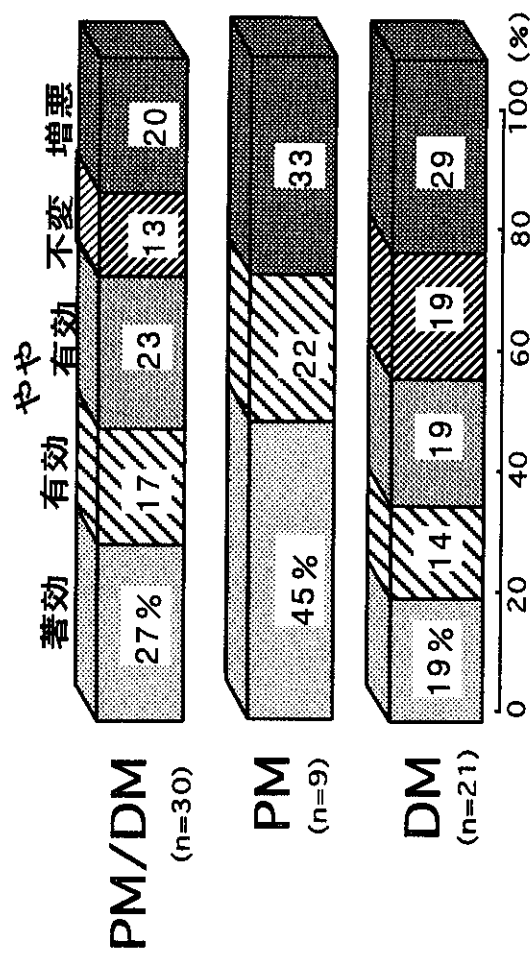


図 2-1：総合評価

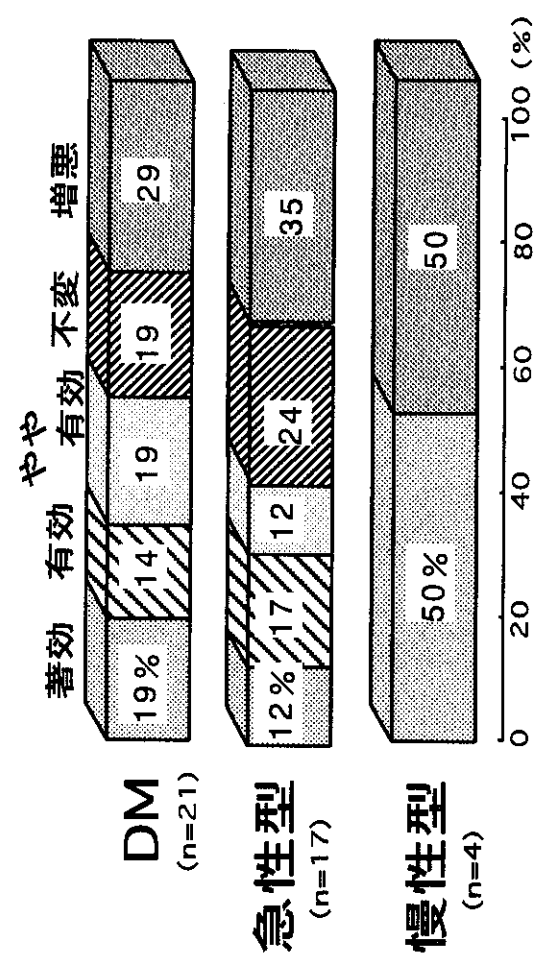


図 2-3：総合評価 (DM)

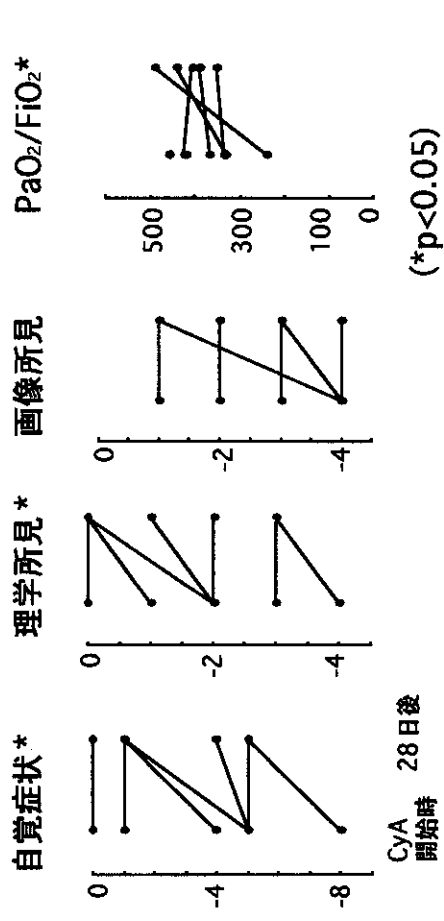


図 1-5：治療前後の各項目の推移 (DM慢性型, n=11)

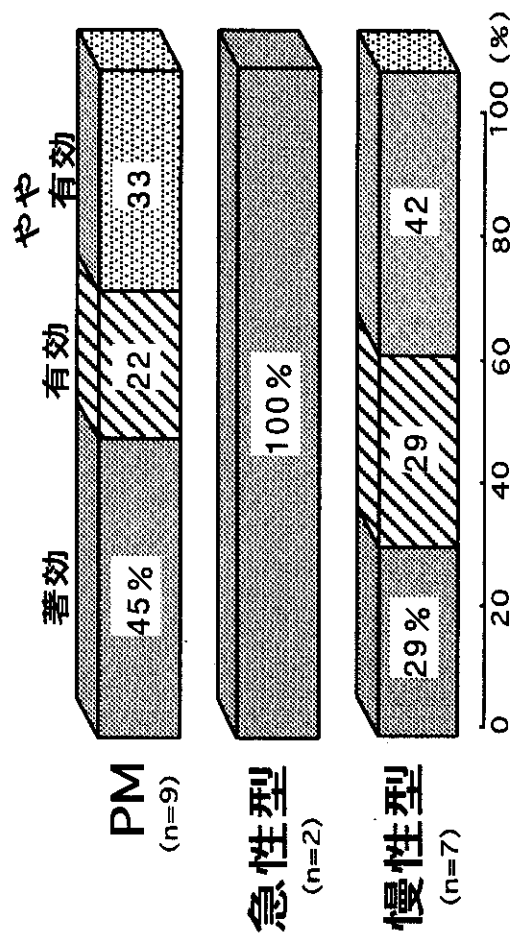


図 2-2：総合評価 (PM)

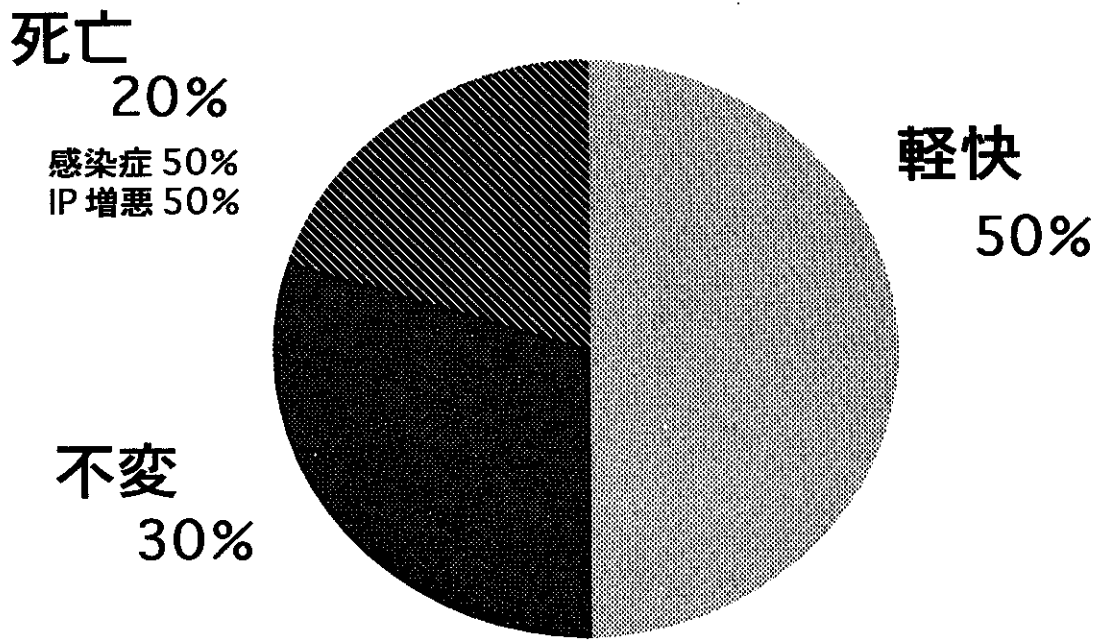


図 3-1 転帰  
(PM,n=10)

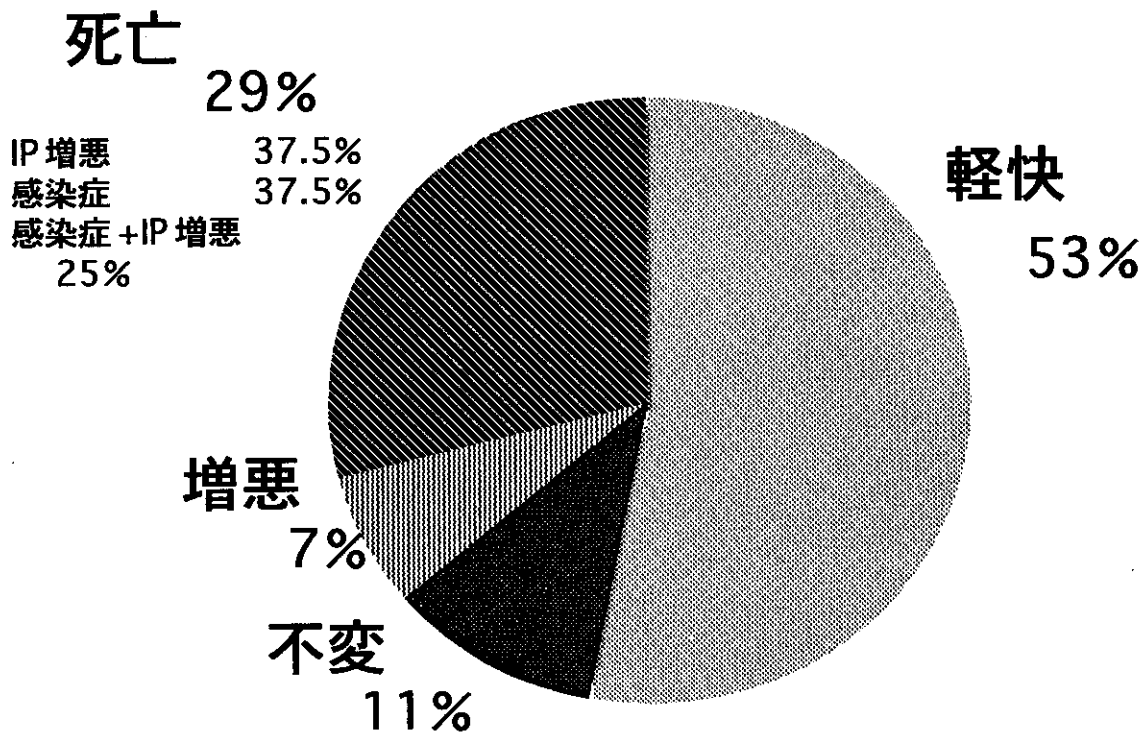


図 3-2 : 転帰  
(DM,n=28)

表 2-1 : 患者背景 (PM)

	急性	慢性	計
症例数	2	9	11
性比 (M/F)	0/2	0/9	0/11
年齢	52 ± 8.5	53 ± 10	51 ± 9
CYA 投与量 (mg / kg / 日)	4.7 ± 2.7	2.9 ± 0.8	3.2 ± 1.3
CYA 投与期間 (月)	3.0 ± 0	23 ± 19	20 ± 19
アジド内服量	2	9	11
アジド内服量 (PSL 換算, mg / kg / 日)	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.5	0.9 ± 0.5
アジド内服量	2	2	4
CPAN 内服量	1	0	1
免疫抑制剤内服量	0	0	0
抗 Jo-1 抗体陽性	1	3	4
CK/LDH	0.9 ± 1.2	1.5 ± 1.6	1.4 ± 1.5

(各数値は症例数, あるいは平均 ± SD を表す)

表 4 : 有害事象

感染症	10	多毛	1
肝機能障害	5	歯肉肥厚	1
糖尿病	2	浮腫	1
高血圧	2	鼻出血	1
腎機能障害	1	血小板減少	1
電解質異常	1	気胸	1
皮疹	1		

表 2-2 : 患者背景 (DM)

	急性	慢性	計
症例数	18	11	29
性比 (M/F)	9/9	4/7	13/16
年齢	47 ± 11	53 ± 7.4	49 ± 9.8
CYA 投与量 (mg / kg / 日)	3.0 ± 1.1	2.8 ± 0.5	2.9 ± 0.9
CYA 投与期間 (月)	6.7 ± 6.3	11 ± 10	8.4 ± 8.2
アジド内服量	18	11	29
アジド内服量 (PSL 換算, mg / kg / 日)	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.4
アジド内服量	13	0	13
CPAN 内服量	3	0	3
免疫抑制剤内服量	1	0	1
抗 Jo-1 抗体陽性	0	3	3
CK/LDH	0.3 ± 0.4	2.1 ± 1.9	0.8 ± 1.4

(\*p<0.05)

(各数値は症例数, あるいは平均 ± SD を表す)

表 3 : 治療効果別にみた各因子の比較  
(DM 急性型, n=17)

CYA 開始時の各因子	有効 / 不変群 (n=11)	増悪群 (n=6)	p 値
年齢	45 ± 11	54 ± 5.9	NS
性別 (男 / 女)	5 / 6	3 / 3	
CK/LDH	0.33 ± 0.42	0.11 ± 0.07	NS
自覚症状*	- 4	-3.5	NS
理学所見*	- 2	-2	NS
画像所見*	- 2	-2	NS
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	335 ± 75	299 ± 108	NS

(平均値 ± SD)  
(\* : 中央値)

表5：感染症の内訳  
(9例10件)

緑膿菌・MRSA 混合感染症	死亡
CMV・真菌性肺炎	死亡
真菌性肺炎疑い	死亡
真菌感染症疑い	死亡
誤嚥性肺炎	死亡
B型肝炎	死亡
帯状疱疹	治癒
カリニ肺炎	治癒
カリニ肺炎疑い	治癒
副鼻腔炎	治癒

## PM/DM における IL-15 の発現とその役割

研究協力者：原まさ子  
(東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター)

### 研究要旨

99 年の本研究班の報告会において私たちは筋芽細胞 cell line を用い、CD40 架橋刺激にて筋芽細胞からの IL-6、8、15 及び MCP-1 の産生亢進が起こることを示した。今回筋生検より得られた患者由来の筋芽細胞を用いて CD40 架橋刺激を加え、これらサイトカインの産生を検討した。また、特に IL-15 についてその産生制御機構等につき検討した。

PM/DM 患者の生検筋組織を酵素処理し得られた初代培養細胞から抗 CD56 抗体を用いて筋芽細胞を分離した。このようにして得られた培養ヒト筋芽細胞にリコンビナント CD40 リガンド蛋白を用いて CD40 架橋刺激を加えたところ、IL-6,8,15 及び MCP-1 の産生亢進が起こった。また免疫染色にて PM/DM 患者の筋細胞は正常例に比べて強く IL-6、IL-15、MCP-1 を発現していた。培養筋芽細胞に各種 cytokine、LPS 刺激を加え、48 時間後の培養上清、細胞溶解液を回収し、IL-15 の濃度を ELISA にて測定した。IL-15 産生は IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\alpha$ 、LPS 刺激にて濃度依存的に亢進した。また、刺激後 6 時間にて RNA を抽出し、IL-15mRNA 発現量を定量的に測定したところ、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\alpha$  刺激は mRNA レベルにて IL-15 の発現亢進をおこすことが明らかとなった。PM/DM において筋細胞 から過剰に産生された IL-15 は T 細胞の活性化などを介して炎症進展に関わっている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

私たちは 99 年の本研究班の報告会において多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM) では炎症局所の筋細胞が CD40 分子を発現しており、CD40 リガンド (CD40L) を発現する浸潤単核細胞と相互作用している可能性があることを示した。一方、炎症局所ではインターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を産生する単核細胞が浸潤しており、培養筋芽細胞 cell line である SkMC 2859 を用いた検討にて主に IFN- $\gamma$  刺激にて CD40 分子の発現が誘導されることから、炎症局所の筋細胞に発現される CD40 は局所で産生された IFN- $\gamma$  に

よってその発現が誘導されていると考えられた。さらに IFN- $\gamma$  にて刺激を加え CD40 分子を発現させた SkMC 2859 にリコンビナント CD40L 蛋白にて CD40 架橋刺激を加えると、IL-6、8、15、MCP-1 などのサイトカインの産生が亢進することを示した。

今回私たちは PM/DM 患者の筋生検から得られた筋組織より筋芽細胞を分離し、CD40 架橋刺激を加えてこれらのサイトカインの産生を検討した。これらのサイトカインのうち IL-15 は IL-2 といくつかの生物活性を共有するもののその mRNA の発現は免疫担当細胞のみならず間葉系細胞にて

も認められる<sup>(1)</sup>。IL-15はPM/DMではT細胞の活性化、炎症局所への遊走、NK細胞の活性化に参与すると想定され、今回筋芽細胞での産生制御機構などについて検討した。

## B. 研究方法

筋芽細胞の分離：筋生検から得られた筋組織から筋芽細胞を分離する方法を確立した。多発性筋炎 (PM) 1例、皮膚筋炎 (DM) 1例に施行された筋組織を細切し、トリプシンにて処理し Goebels らの方法 (2) に従って初代培養を得た。さらに線維芽細胞の混入をさけるため以下のように筋芽細胞に発現している CD56 分子を利用して筋芽細胞を分離した。初代培養筋細胞をマウス抗ヒト CD 5 6 抗体 (Becton-Dickinson) と反応させ、更に抗マウス IgG 抗体を結合させた磁気ビーズ (Miltenyl Biotec) と反応させた後、磁気スタンドにて分離した。得られた筋芽細胞を 10% FCS を含む DMEM にて培養し、実験に用いた。

サイトカイン濃度測定：培養上清中または細胞溶解液中のサイトカインの濃度は特異的な抗体を用い、サンドイッチ ELISA にて測定した。

免疫染色 (ABC 法)：PM 患者 2 例、DM 患者 2 例に施行された筋生検から得られた筋組織より凍結切片を作成した。また、筋疾患が疑われて筋生検を施行されたが、組織学的に正常であった 3 例を正常コントロールとして用いた。組織切片を固定後、ヤギ抗ヒト IL-6、マウス抗ヒト IL-8、IL-15 および MCP-1 またはヤギ IgG、マウス

IgG1 と反応させた後、ビオチン化抗ヤギ IgG 抗体またはビオチン化抗マウス IgG 抗体と反応させ、さらにアビジンペルオキシダーゼと反応後、diaminobenzidine にて発色させた。

免疫染色 (蛍光抗体法)：マウス組織切片を抗ヒト IL-15 抗体と反応後 PE 標識抗マウス IgG にて発色させ、共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。

mRNA の定量：刺激後 6 時間にて筋芽細胞から totalRNA を抽出し、逆転写酵素にて cDNA に変換した。1.5 ng 相当の cDNA をパーキンエルマー社の Pre-Developd TaqMan Assay Reagents for IL-15 を用い、同じくパーキンエルマー社の ABI PRISM7700 Sequence Detection System にて解析した。IL-15 の mRNA の発現量は同一検体の 18 SrRNA の発現量との比によって相対的に表した。

## C. 研究結果

筋炎患者筋組織から抗 CD56 抗体を用いて分離した筋芽細胞はほぼ 100% CD56 陽性で、アセチルコリンレセプターを発現していた (図 1A)。また容易に多核の巨大な筋管細胞を形成した (図 1B)。2 例の PM/DM 患者から分離した筋芽細胞は非刺激培養下ではほとんど CD40 分子を発現していなかったが、IFN- $\gamma$  刺激によりその発現が濃度依存性をもって誘導された (図 2A)。このような筋芽細胞に図 2B に示すような方法で CD40 架橋刺激を加えた。培養筋芽細胞を 48 時間 100U/ml の IFN- $\gamma$  にて刺激し、細胞表面に CD 4 0 分子を発



現させた。ここに種々の濃度のリコンビナン CD40L 蛋白を加え、48 時間後に培養上清中或いは細胞溶解液を回収し、ELISA 法にてサイトカイン濃度を測定した。

リコンビナント CD40L 蛋白は IFN- $\gamma$  にて刺激した筋芽細胞からの IL-6、8、15 及び MCP-1 の産生を濃度依存的に亢進させた (図 3)。IFN- $\gamma$  にて刺激していない筋芽細胞からのこれらのサイトカインの産生も亢進させたものの、有意ではなかった。またサイトカイン産生量は培養上清中と細胞溶解液中の合計で表しているが、IL-6、8、MCP-1 は殆どが培養上清中に検出されるのに対して IL-15 は 50% 以上が細胞溶解液中に検出された。

実際に罹患筋組織において筋細胞がこれらのサイトカインを産生するか否かを免疫染色にて確認した。PM 患者の筋組織において図 4 に示すように径の小さい筋細胞に IL-6 及び MCP-1 の発現が見られ、MCP-1 は浸潤細胞の一部にも発現していた。正常コントロール例では筋組織に IL-6 及び MCP-1 の発現は見られなかった。IL-15 は正常コントロール例の筋細胞でも顆粒状にわずかに発現していたが、多発性筋炎患者の筋細胞においては強く発現していた。

IL-8 は多発性筋炎患者の筋細胞において浸潤細胞の一部に発現していたが筋細胞の発現は見られなかった。図には示していないが、同様の結果は他の PM1 例、DM2 例においても見られた。CD40 架橋刺激にて産生されるサイトカインのうち、特に T 細

胞の活性化、遊走に関与すると思われる IL-15 についてさらにその産生制御機構などについて検討した。患者由来の筋芽細胞を IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  及び LPS にて刺激したところ、これらの刺激は濃度依存的に筋芽細胞からの IL-15 の産生を亢進させた (図 5)。図には示していないが TNF- $\alpha$ 、または IL-6 単独では IL-15 産生亢進作用は認めなかった。PM/DM 患者の筋組織では IFN- $\gamma$  産生単核細胞や IL-1 $\alpha$  産生単核細胞も多く浸潤していることから (未発表データ)、実際に *in vivo* では CD40 分子を介する刺激以外に浸潤細胞から産生されるサイトカインの刺激によっても筋細胞からの IL-15 産生が亢進している可能性が示唆された。

また、細胞内に多くの IL-15 が検出されたことから、筋芽細胞内の IL-15 の局在を検討した。免疫染色にて細胞内 IL-15 は ABC 法で細胞質に存在していることがわかった (図 6 A)。蛍光抗体法で染色したものを共焦点顕微鏡で観察すると、特に核の周囲の細胞質に局在していることが観察された (図 6 B)。細胞内の IL-15 についてその分子量や機能などについてこれから検討を加えてゆく予定である。培養筋細胞に各種の刺激を加え、刺激後 6 時間後に totalRNA を抽出し IL-15 mRNA 発現量の定量を行った。IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  刺激では非刺激のものに比べて IL-15 発現量は有意に上昇した。LPS、TNF- $\alpha$  刺激では発現の増強は見られなかった (図 7)。

#### D. 考察

今回筋炎患者筋組織からの筋芽細胞の分離、培養法を確立した。このような患者筋組織から直接分離した筋芽細胞は *in vivo* の状況にある程度反映していると考えられ、今後の研究に有益であると思われた。

昨年私たちが筋芽細胞 cell line である SkMC2859 で得られた結果と同様、筋炎患者から得られた筋芽細胞でも CD40 架橋刺激による IL-6、8、15 及び MCP-1 の産生亢進を認めた。これらのサイトカイン、ケモカインは罹患筋組織においても発現され、マクロファージ、T 細胞など免疫担当細胞の炎症局所への浸潤などに関与していると考えられた。IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、LPS 刺激は用量依存的に培養筋細胞からの IL-15 の産生を亢進させ、また IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  は mRNA レベルで IL-15 の発現を亢進させた。IL-15 の発現には様々な段階での制御機構が推測されているが<sup>(3)</sup>、今回の我々の結果は少なくとも IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  刺激は mRNA レベルでの IL-15 発現亢進を示すものであった。筋芽細胞に IL-15 を添加すると筋芽細胞の体積を増大させたり<sup>(4)</sup>、分化を促進するという報告<sup>(5)</sup>はある。しかし炎症性筋疾患における筋細胞の IL-15 発現の研究は少なく、炎症との関わり、また筋細胞内 IL-15 の役割など、今後解明すべき点が多い。

#### E. 結論

PM/DM において炎症性サイトカイン刺激により筋細胞からの IL-15 産生が亢進し、過剰に産生された IL-15 は T 細胞の活性化、遊走、NK 細胞の活性化などをひきおこし炎症の進展に関与していると考えられた。筋細胞の IL-15 産生抑制を治療に応

用できる可能性があることが示唆された。

#### F. 参考文献

1. Grabstein, K. H., Eisenman J., Shanebeck K., Rauch C., Srinivasan S., Fung V., Beers C., Richardson J., Schoenborn M. A., Ahdieh M., Johnson L., Alderson M.R., Watson J. D., Anderson D. M., Giri J. G.. Cloning of a T cell grow factor that interacts with the  $\alpha$  chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994, 264 : 965-968.
2. Goebels N. Michaelis D., Wekerle H., Hohlfeld R. Human myoblasts as antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 1992, 149: 661-667.
3. Bamford R.N., Tagaya Y., Waldmann T.A. Interleukin15-What it does and how it is controlled. *Immunologist* 1997, 5:52-56.
4. Quinn, L.S., Haugk K. L., Grabstein K. H. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology* 1995,136: 3669-3672.
5. Quinn, L.S., Haugk K. L., Damon S. E. Interleukin-15 stimulates C2 skeletal myoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 239: 6-10.

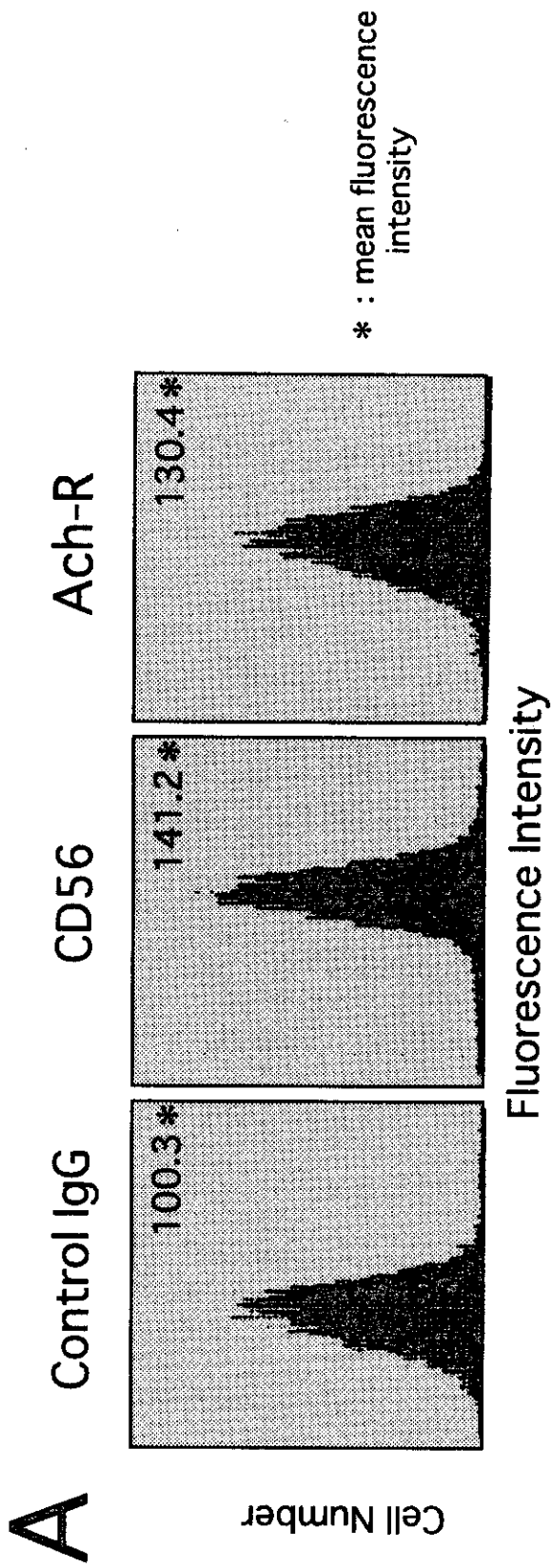


図1. 患者筋組織から抗CD56抗体を用いて分離した筋芽細胞の性状

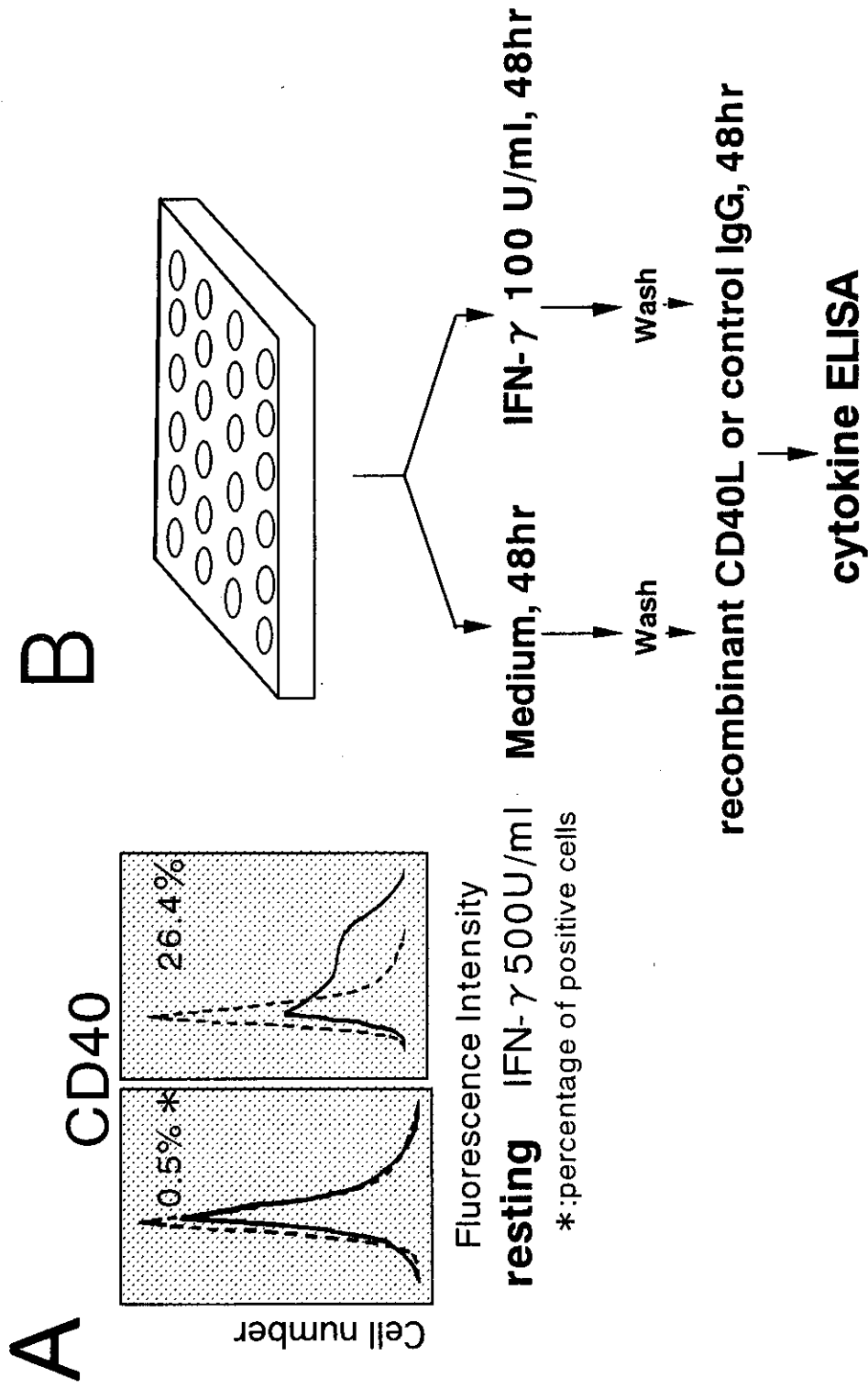


図2. 筋芽細胞におけるCD40の発現及びCD40架橋刺激