

mean  $\pm$  SEM. The difference between two groups of mice was considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### Development of EAM

SJL/J mice were immunized with purified rabbit myosin fraction and CFA on days 0, 7, and 14. On days 0, 7, 14, and 21, the quadriceps femoris muscles of these mice were histologically examined with H&E staining. All muscle specimens of normal SJL/J mice and immunized mice on day 7 showed normal appearance with no inflammatory changes (Fig. 1, A and B, respectively), whereas those of mice immunized with rabbit myosin fraction showed mild mononuclear cell infiltration at day 14 (Fig. 1C). On day 21, a significant number of mononuclear cells were infiltrated among the muscle fibers (endomysium; Fig. 1D), at perivascular areas (perimysium; Fig. 1E), and epimysium (Fig. 1F). Scattered lesions with aggregates of infiltrated mononuclear cells were formed, in which atrophic or necrotic muscle fibers were noted (arrow in Fig. 1D). Injection of PBS and CFA into SJL/J mice did not show infiltration of inflammatory cells in the quadriceps femoris muscles (data not shown).

To determine the subsets of infiltrating mononuclear cells in the quadriceps femoris muscles of EAM mice, we performed immunohistochemical analysis using mAbs against CD4, CD8, and F4/80. CD4<sup>+</sup> T cells were mainly located in the perimysium and some were found in the endomysium (Fig. 2A). CD8<sup>+</sup> T cells were predominantly detected in the endomysium and surrounded nonnecrotic muscle fibers (Fig. 2B). F4/80<sup>+</sup> macrophages were located in the endomysium as well and were especially present around the necrotic muscle fibers (Fig. 2C). Because these histological findings of inflammatory cell infiltration patterns resembled those of affected muscle lesions in IIM patients (34–36), we decided to use the EAM mice as an experimental model of IIM.

To evaluate a time course of cellular infiltration into the muscles, we counted the numbers of infiltrated CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and F4/80<sup>+</sup> cells on days 0, 7, 14, and 21 by immunohistochemical method. The majority of the infiltrating cells on day 14 were F4/80<sup>+</sup> macrophage (Fig. 3). In contrast, the number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was not increased until day 14, and they had significantly migrated into the muscles on day 21. These results were similar to previously reported data (37).

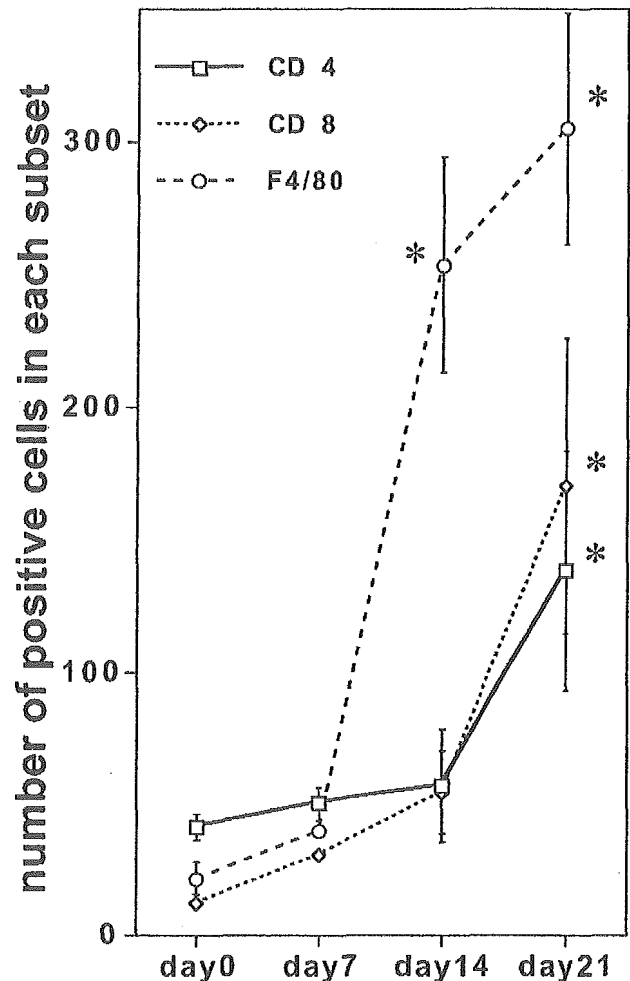
### CX3CL1 and CX3CR1 expression in the muscle of EAM mice

We examined the expression of CX3CL1 in the muscle of normal SJL/J mice and EAM mice by immunohistochemistry. In the quadriceps femoris muscles of normal mice, no CX3CL1 expression was detected (Fig. 4, A and G). In contrast, CX3CL1 was expressed on infiltrated mononuclear cells predominantly in the endomysium and vascular endothelial cells of EAM mice on day 14 (Fig. 4, B and H, respectively) and day 21 (Fig. 4, C and I, respectively).

We next examined the expression of CX3CR1 on the infiltrated mononuclear cells in the quadriceps femoris muscle of EAM mice by double immunohistochemical staining. Some CD4<sup>+</sup> T cells expressed CX3CR1 (Fig. 5, A–C). The majority of CD8<sup>+</sup> T cells and most of the F4/80<sup>+</sup> macrophages expressed CX3CR1 (Fig. 5, D–F and G–I, respectively).

### Effect of anti-mouse CX3CL1 mAb on EAM mice

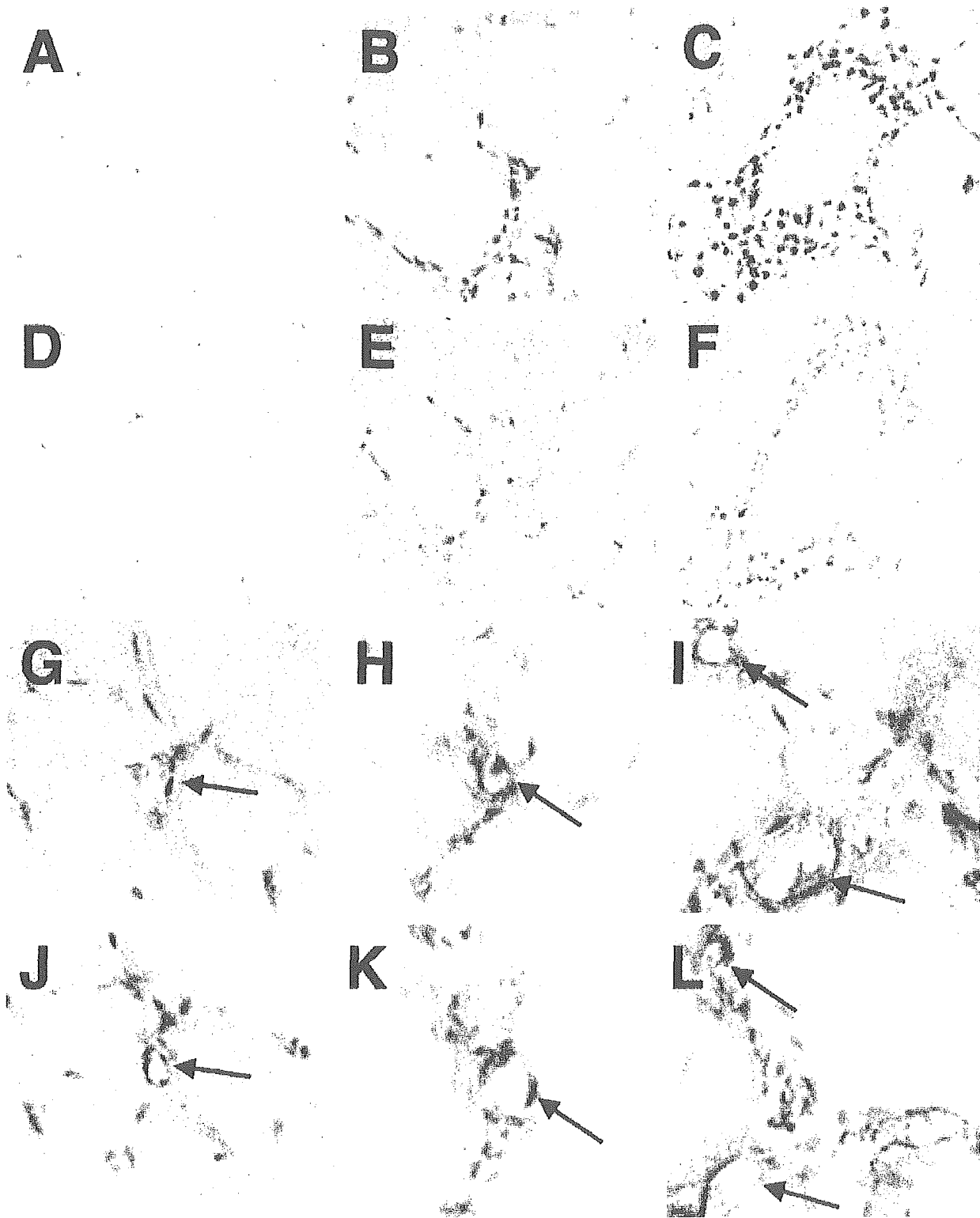
To analyze the effect of anti-CX3CL1 mAb administration on EAM mice, we evaluated the histological changes in quadriceps femoris muscle using H&E staining. The incidence of inflam-



**FIGURE 3.** Time course of inflammatory cell infiltration into the muscle tissue of EAM mice. The numbers of infiltrating CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and F4/80<sup>+</sup> cells into the quadriceps femoris muscles were counted by immunohistochemistry. Data represent the mean  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$ .

matory cell infiltration in control Ab-treated mice was 100% ( $n = 10$ ). Treatment with anti-CX3CL1 mAb did not change the incidence of cellular infiltration (100%;  $n = 10$ ). EAM mice treated with control Ab showed mononuclear cell infiltration with atrophy and necrosis of muscle fibers (Fig. 6A). In comparison, anti-CX3CL1 mAb-treated EAM mice showed milder histological changes (Fig. 6B). Analysis of histological scores of inflammatory changes in the quadriceps femoris muscles indicated that treatment with anti-CX3CL1 mAb significantly reduced inflammatory cell infiltration in the muscles of EAM mice compared with treatment with control Ab (Fig. 6C). Moreover, anti-CX3CL1 mAb treatment reduced the number of necrotic muscle fibers in muscles (Fig. 6D). A similar result was obtained in another independent set of experiments.

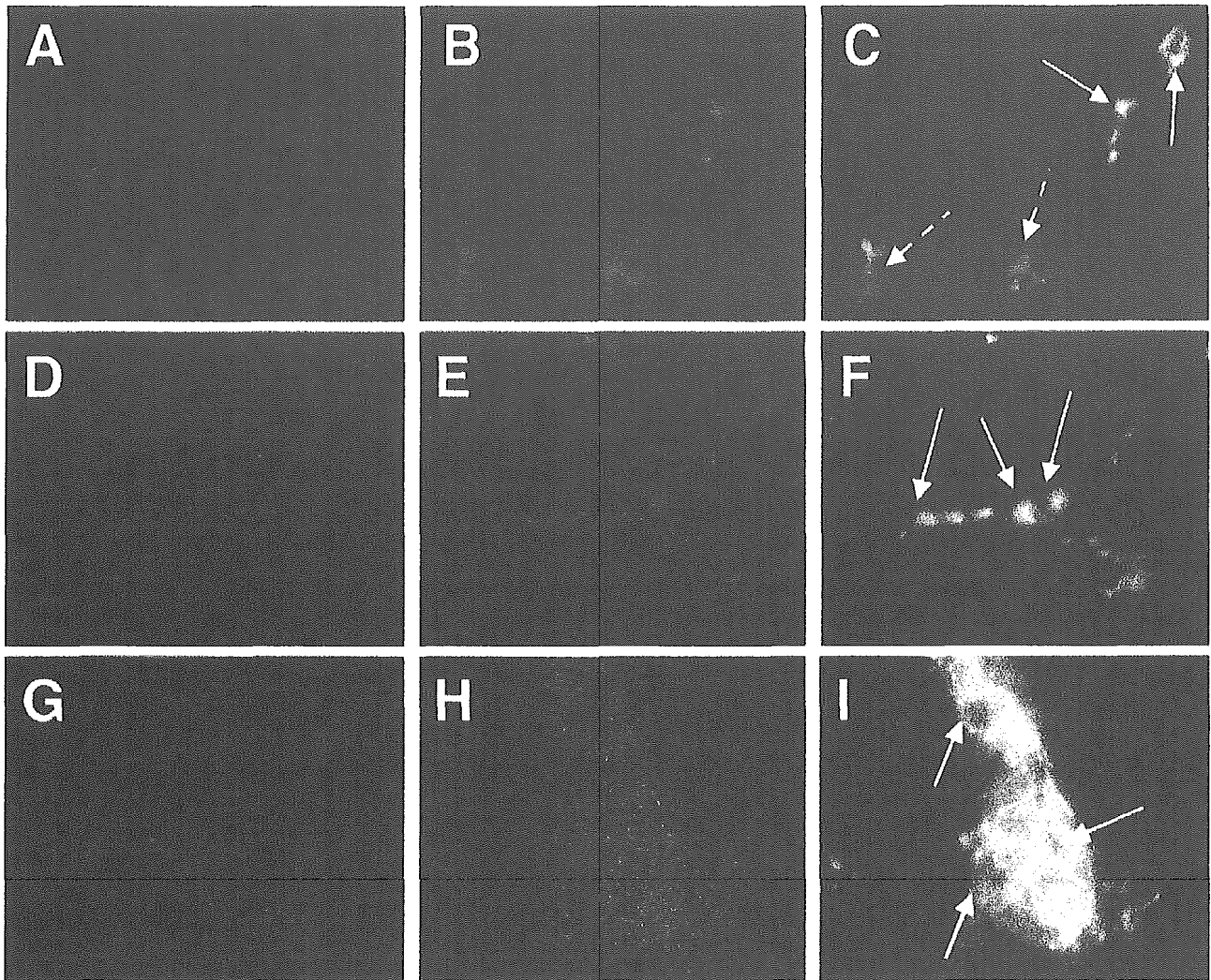
We next examined the effect of anti-CX3CL1 mAb treatment on the numbers of each subset of infiltrating cells. The numbers of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and F4/80<sup>+</sup> cells in quadriceps femoris muscles were counted and compared between mice treated with control Ab and those with anti-CX3CL1 mAb. Anti-CX3CL1 mAb treatment significantly reduced the number of infiltrated CD4<sup>+</sup> T cells by ~30% (Fig. 7A), CD8<sup>+</sup> T cells by ~50%, and F4/80<sup>+</sup> macrophages by up to 50% (Fig. 7, B and C).



**FIGURE 4.** CX3CL1 expression in the muscles of EAM mice. Expression of CX3CL1 was examined by immunohistochemistry in normal mice (*A* and *G*) and EAM mice on day 14 (*B* and *H*) and day 21 (*C* and *I*). Vascular endothelial cadherin expression in the normal mice (*J*) and EAM mice on day 14 (*K*) and 21 (*L*) was also examined using serial sections with *G*, *H*, and *I*, respectively. Stainings with isotype control Ab for CX3CL1 are shown (*D*, normal mice; *E*, EAM on day 14; *F*, EAM on day 21). Arrows indicate vascular endothelial cadherin-positive endothelial cells (*J*–*L*), and corresponding endothelial cells (*G*–*I*). Original magnification,  $\times 400$ .

We finally examined the effects of anti-CX3CL1 mAb treatment on the expression of cytokines and cytotoxic molecule in the quadriceps femoris muscle of EAM mice by quantitative RT-PCR. Although the relative quantities of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and perforin

mRNA were very low in normal SJL/J mice, they were significantly up-regulated in EAM mice that received control Ab treatment ( $p < 0.05$ ). Furthermore, treatment with anti-CX3CL1 mAb strikingly reduced mRNA expression (Fig. 8).



**FIGURE 5.** CX3CR1 expression on CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, or F4/80<sup>+</sup> cells in the EAM muscle. Muscle tissues from EAM mice were double stained with CD4, CD8, or F4/80, and CX3CR1, and analyzed with fluorescent microscopy (A, CX3CR1; B, CD4; C, merged A and B; D, CX3CR1; E, CD8; F, merged D and E; G, CX3CR1; H, F4/80; I, merged G and H). Solid arrows indicate double-positive cells. Dotted arrows indicate CX3CR1-negative CD4 T cells. Original magnification,  $\times 200$ .

Considered together, the above results indicate that treatment with anti-CX3CL1 mAb reduced infiltration of CD4 and CD8 T cells and macrophages and reduced the expression of various inflammatory cytokines and cytotoxic molecule in muscles.

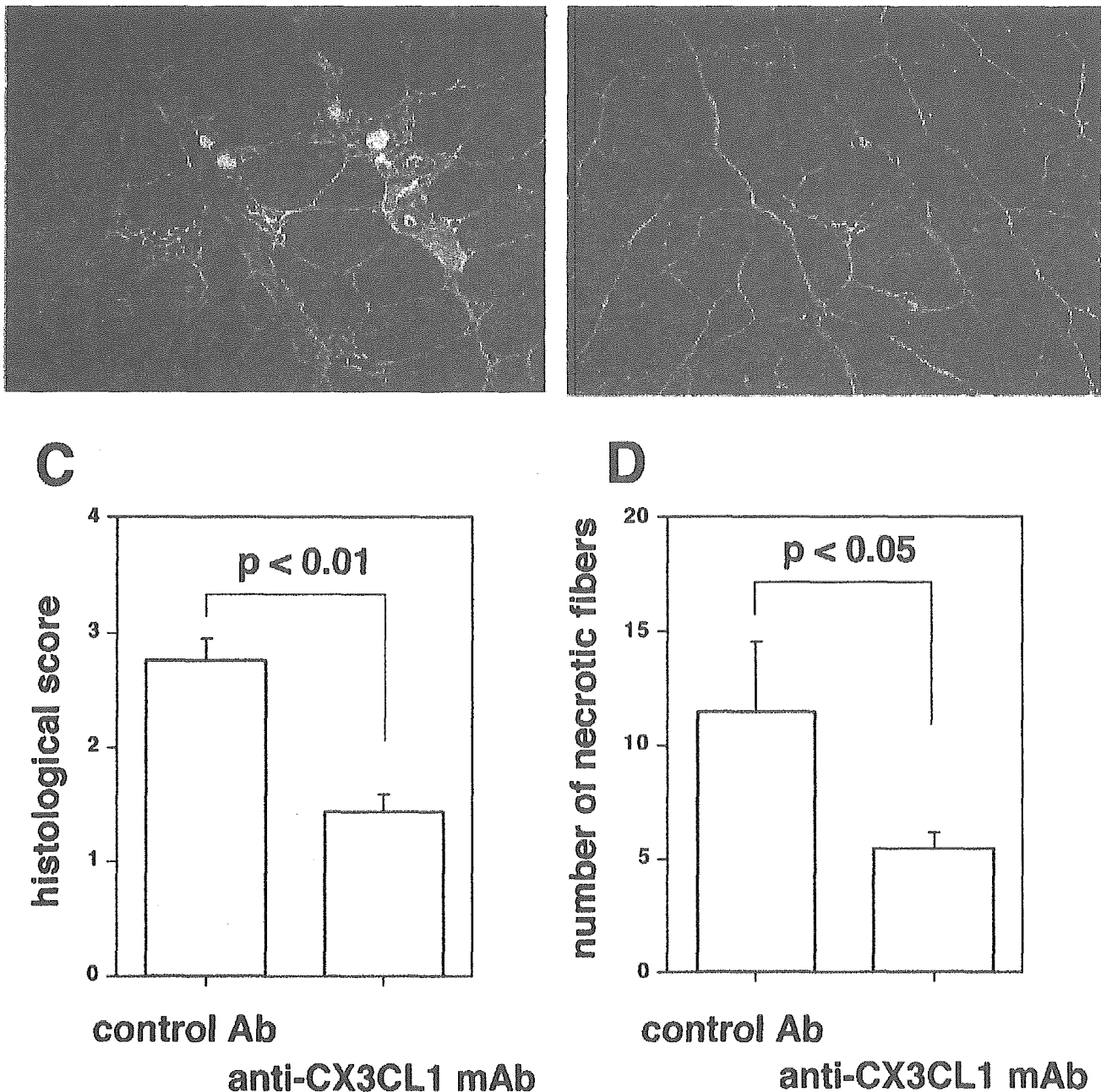
### Discussion

The major findings of the present study were the following. 1) CX3CL1 was expressed on infiltrated mononuclear cells and vascular endothelial cells, and its corresponding receptor, CX3CR1, was expressed on infiltrated inflammatory cells in the muscles of EAM. 2) Treatment with anti-CX3CL1 mAb ameliorated histological inflammatory changes in EAM mice, reduced the numbers of infiltrated CD4 and CD8 T cells and macrophages, and reduced the expression of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and perforin in the muscles. These results suggest that CX3CL1-CX3CR1 interaction seems to play an important role in inflammatory cell migration into the muscles of EAM mice.

Development of EAM in SJL/J mice by immunization with rabbit purified skeletal myosin fraction and CFA was previously reported (37–40). We modified the method by increasing the

amount of immunized myosin and CFA and the addition of *Mycobacterium butyricum*. This modification shortened the period required for the development of myositis from 5 wk, which was thought to be appropriate for the induction (38), to 3 wk. Moreover, although pertussis toxin (PTX) injection into the peritoneal cavity increased the severity of inflammatory changes in the muscle (31), and thus, PTX was administered in the previous models (31, 36, 38), our modified method induces significant myositis without PTX injection. The EAM mice showed inflammatory cell infiltration in the endomysium, perimysium, and epimysium with muscle fiber necrosis. Immunohistochemical analysis showed that the invading cells surrounding nonnecrotic muscle fibers in the endomysium were mainly CD8 T cells, whereas macrophages were predominantly detected in necrotic fibers, and CD4 T cells were located in perimysium. Moreover, quantitative RT-PCR showed up-regulation of expression of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and perforin mRNA in the muscle of EAM mice. These findings in EAM mice are similar to those reported in IIM patients (4–8, 34–36).

Inflammatory cell migration into the affected muscle of IIM is thought to involve chemokine-chemokine receptor interaction



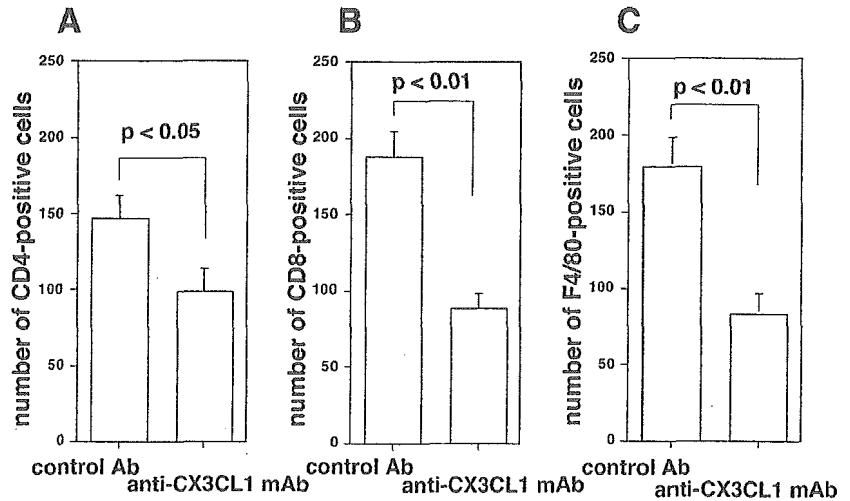
**FIGURE 6.** Inhibition of inflammatory changes in the muscle by treatment with anti-CX3CL1 mAb. Five hundred micrograms of hamster anti-mouse CX3CL1 mAb or control Ab was injected into the peritoneal cavity three times per week from day 0 for 3 wk. On day 21, the quadriceps femoris muscles of EAM mice were examined with H&E staining, histological scores were evaluated, and the numbers of necrotic fibers were counted. Mice treated with control Ab showed inflammatory cell accumulation (A). Mice treated with anti-CX3CL1 mAb showed milder inflammatory changes (B). Representative photomicrographs of histology from 10 animals in each group are shown. Histological scores of inflammatory changes in quadriceps femoris muscles were evaluated (C). The numbers of necrotic fibers were counted in the muscle tissues (D). Data represent the mean  $\pm$  SEM.

(9–14). In the present study we focused on the role of CX3CL1-CX3CR1 interaction in the inflammatory cell migration. We showed the expression of CX3CR1 on some CD4 T cells and most CD8 T cells in EAM mice. It has been reported that CTLs including both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells invade the muscle fibers in IIM patients (3). These cells possess cytotoxic molecules, such as perforin and granzyme B, which are released into muscle cells (4, 5). Furthermore, type 1 cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , were expressed in the inflammatory lesions of IIM patients (6–8). These findings suggest that the cytotoxic

molecules and type 1 cytokines play important roles in the inflammatory lesions in IIM patients. In contrast, we reported previously that peripheral blood CX3CR1<sup>+</sup> T cells express cytotoxic molecules and type 1 cytokines (26, 27). Therefore, the interaction of CX3CL1 and CX3CR1 could induce the migration of T cells, which express cytotoxic molecules and type 1 cytokines, into the affected muscles.

The infiltrated macrophages into the affected muscle also express inflammatory cytokines (9, 41). They express TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , which could stimulate T cells, macrophages, and

**FIGURE 7.** Decreased numbers of infiltrating cells of each subset by anti-CX3CL1 mAb treatment. Numbers of infiltrating CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and F4/80<sup>+</sup> cells were counted in the quadriceps femoris muscles from the experiment shown in Fig. 6. Data represent the mean ± SEM.

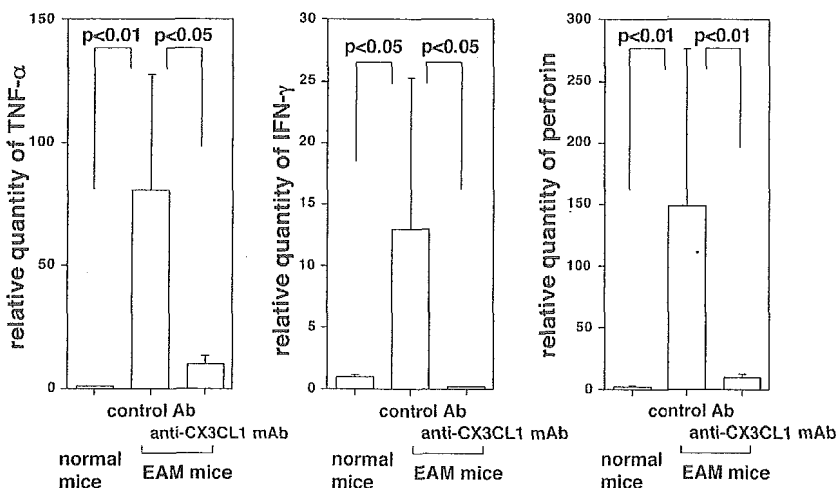


endothelial cells to produce various inflammatory cytokines, chemokines, and adhesion molecules. Moreover, these cytokines might have myocytotoxic effects (42–44). Our results showed that the majority of the F4/80<sup>+</sup> macrophages expressed CX3CR1 in the muscle of EAM mice. Thus, the CX3CL1-CX3CR1 interaction might also play an important role in macrophage migration into the affected muscle in addition to T cell migration.

CX3CL1 was expressed on infiltrated mononuclear cells in the affected muscles of EAM mice. Because CX3CL1 expression was located in the endomysium, infiltrated macrophages and/or CD8 T cells may express CX3CL1 in the muscles. Furthermore, we showed that CX3CL1 was also expressed on vascular endothelial cells in the EAM muscle tissue on days 14 and 21, but not in normal mice. It was reported that CX3CL1 was expressed on endothelial cells activated with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in vitro (19–21). Expressed CX3CL1 on endothelial cells might recruit CX3CR1<sup>+</sup> cells, including macrophages and T cells, into muscle. These cells, in turn, express TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , which induce additional CX3CL1 expression on endothelial cells and also on recruited inflammatory cells. The enhanced expression of CX3CL1 may induce additional inflammatory cell migration. Consequently, these amplification cascades could contribute to the expansion of pathological changes in EAM mice. In fact, inhibition of CX3CL1 reduced the numbers of migrated CD4 and CD8 T cells and macrophages in the affected

muscles of EAM mice and also reduced the expression of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and perforin. These results suggest that CX3CL1 blockade reduces the migration of inflammatory cells, which express cytotoxic molecules and cytokines, into the muscles. Thus, inhibition of CX3CL1-CX3CR1 interaction might be a potentially suitable therapeutic strategy for treatment of IIM.

Our data showed that mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and perforin was almost totally inhibited by anti-CX3CL1 mAb treatment, although the numbers of infiltrated monocytes were decreased by up to 50%. Recently it was reported that stimulation with CX3CL1 enhanced production of proinflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$  as well as the release of cytolytic granules by T cells (45). Thus, blockade of CX3CL1 might inhibit not only cellular migration, but also cytokine and cytotoxic molecule expression, by stimulation with CX3CL1 in the EAM muscle. Alternatively, because CX3CR1<sup>+</sup> T cells express type 1 cytokine and cytotoxic molecules (23, 26, 27), and CX3CR1<sup>high</sup> positive monocytes greatly produce inflammatory cytokines compared with CX3CR1<sup>low</sup> positive monocytes (46–48), treatment with anti-CX3CL1 mAb may selectively inhibit the migration of such specific T cells and macrophages. Therefore, anti-CX3CL1 mAb might be able to inhibit the expression of cytokine and cytotoxic molecules effectively in muscles, but additional study is required.



**FIGURE 8.** Reduction of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and perforin expression by anti-CX3CL1 mAb treatment. Expression of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and perforin mRNA in quadriceps femoris muscles from normal mice ( $n = 10$ ) and from the experiment shown in Fig. 6 were measured using real-time RT-PCR. Data represent the mean ± SEM.

We recently reported that inhibition of CX3CL1 ameliorated collagen-induced arthritis in mice, probably by suppression of inflammatory cell migration into the synovium (30). Others reported that anti-CX3CR1 Ab treatment blocked inflammatory cell infiltration in the glomeruli, prevented crescent formation, and improved renal function in the Wistar-Kyoto crescentic glomerulonephritis model (49). Furthermore, the gene deletion of CX3CR1 resulted in an ~50% decrease in the formation of atherosclerotic lesions and the number of infiltrated macrophages in the lesion in experimental atherosclerosis mice (50, 51). These results together with our findings suggest that blockade of CX3CL1-CX3CR1 interaction might be therapeutically useful for several diseases associated with inflammatory cell infiltration. In this study we propose that such treatment is also suitable for IIM. To our knowledge, this is the first report demonstrating that a chemokine inhibitor could reduce the severity of myositis.

In conclusion, we demonstrated in the present study that inhibition of CX3CL1 significantly improved histopathological changes in the muscles of EAM mice, suggesting that blockade of CX3CL1 might be therapeutically beneficial for IIM.

### Acknowledgments

We thank Dr. Hiroshi Nemoto (Toho University School of Medicine) for providing critical suggestions for the development of EAM mice. We also thank Miyuki Nishimura, Keiko Mizuno, and Yoko Inoue for their excellent technical support.

### Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

### References

- Arahata, K., and A. G. Engel. 1984. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I. Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Ann. Neurol.* 16: 193–208.
- Engel, A. G., and K. Arahata. 1984. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. II. Phenotypes of autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis. *Ann. Neurol.* 16: 209–215.
- Dalakas, M. C. 1991. Polymyositis, dermatomyositis and inclusion-body myositis. *N. Engl. J. Med.* 325: 1487–1498.
- Cherin, P., S. Herson, M. C. Crevon, J. J. Hauw, P. Cervera, P. Galanaud, and D. Emilie. 1996. Mechanisms of lysis by activated cytotoxic cells expressing perforin and granzyme-B genes and the protein TIA-1 in muscle biopsies of myositis. *J. Rheumatol.* 23: 1135–1142.
- Goebels, N., D. Michaelis, M. Engelhardt, S. Huber, A. Bender, D. Pongratz, M. A. Johnson, H. Wekerle, J. Tschopp, D. Jenne, et al. 1996. Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis. *J. Clin. Invest.* 97: 2905–2910.
- Tews, D. S., and H. H. Goebel. 1996. Cytokine expression profile in idiopathic inflammatory myopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 342–347.
- Lepidi, H., V. Frances, D. Figarella-Branger, C. Bartoli, A. Machado-Baeta, and J. F. Pellissier. 1998. Local expression of cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24: 73–79.
- Sugiura, T., Y. Kawaguchi, M. Harigai, K. Takagi, S. Ohta, C. Fukasawa, M. Hara, and N. Kamatani. 2000. Increased CD40 expression on muscle cells of polymyositis and dermatomyositis: role of CD40-CD40 ligand interaction in IL-6, IL-8, IL-15, and monocyte chemoattractant protein-1 production. *J. Immunol.* 164: 6593–6600.
- Lundberg, I. E. 2000. The role of cytokines, chemokines, and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2: 216–224.
- De Bleecker, J. L., B. De Paepe, I. E. Vanwalleghem, and J. M. Schroder. 2002. Differential expression of chemokines in inflammatory myopathies. *Neurology* 58: 1779–1785.
- Liprandi, A., C. Bartoli, D. Figarella-Branger, J. F. Pellissier, and H. Lepidi. 1999. Local expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol.* 97: 642–648.
- Confalonieri, P., P. Bernasconi, P. Megna, S. Galbiati, F. Cornelio, R. Mantegazza. 2000. Increased expression of  $\beta$ -chemokines in muscle of patients with inflammatory myopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59: 164–169.
- Bartoli, C., M. Civatte, J. F. Pellissier, and D. Figarella-Branger. 2001. CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 102: 385–392.
- De Rossi, M., P. Bernasconi, F. Baggi, R. de Waal Malefyt, and R. Mantegazza. 2000. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int. Immunol.* 12: 1329–1335.
- Zlotnik, A., and O. Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121–127.
- Yoshie, O., T. Imai, and H. Nomiya. 2001. Chemokines in immunity. *Adv. Immunol.* 78: 57–110.
- Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greaves, A. Zlotnik, and T. J. Schall. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385: 640–644.
- Pan, Y., C. Lloyd, H. Zhou, S. Dolich, J. Deeds, J. A. Gonzalo, J. Vath, M. Gosselin, J. Ma, B. Dussault, et al. 1997. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387: 611–617.
- Fratice, P., M. Sironi, G. Bianchi, D. D'Ambrosio, C. Albanesi, A. Stoppacciaro, M. Chieppa, P. Allavena, L. Rucco, G. Girolomoni, et al. 2001. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J. Clin. Invest.* 107: 1173–1181.
- Imaizumi, T., H. Yoshida, and K. Satoh. 2004. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J. Atheroscler. Thromb.* 11: 15–21.
- Fujimoto, K., T. Imaizumi, H. Yoshida, S. Takanashi, K. Okumura, and K. Satoh. 2001. Interferon- $\gamma$  stimulates fractalkine expression in human bronchial epithelial cells and regulates mononuclear cell adherence. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25: 233–238.
- Fong, A. M., L. A. Robinson, D. A. Steeber, T. F. Tedder, O. Yoshie, T. Imai, and D. D. Patel. 1998. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J. Exp. Med.* 188: 1413–1419.
- Umehara, H., E. T. Bloom, T. Okazaki, Y. Nagano, O. Yoshie, and T. Imai. 2004. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 34–40.
- Garton, K. J., P. J. Gough, C. P. Blobel, G. Murphy, D. R. Greaves, P. J. Dempsey, and E. W. Raines. 2001. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J. Biol. Chem.* 276: 37993–38001.
- Hundhausen, C., D. Misztela, T. A. Berkhout, N. Broadway, P. Saftig, K. Reiss, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, et al. 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102: 1186–1195.
- Nanki, T., T. Imai, K. Nagasaka, Y. Urasaki, Y. Nonomura, K. Taniguchi, K. Hayashida, J. Hasegawa, O. Yoshie, and N. Miyasaka. 2002. Migration of CX3CR1-positive T cells producing type I cytokines and cytotoxic molecules into the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46: 2878–2883.
- Nishimura, M., H. Umehara, T. Nakayama, O. Yoneda, K. Hieshima, M. Kakizaki, N. Dohmae, O. Yoshie, and T. Imai. 2002. Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin<sup>+</sup>/granzyme B<sup>+</sup> cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J. Immunol.* 168: 6173–6180.
- Imai, T., K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiya, T. J. Schall, et al. 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91: 521–530.
- Combadiere, C., K. Salzwedel, E. D. Smith, H. L. Tiffany, E. A. Berger, and P. M. Murphy. 1998. Identification of CX3CR1: a chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J. Biol. Chem.* 273: 23799–23804.
- Nanki, T., Y. Urasaki, T. Imai, M. Nishimura, K. Muramoto, T. Kubota, and N. Miyasaka. 2004. Inhibition of fractalkine ameliorates murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 173: 7010–7016.
- Kojima, T., N. Tanuma, Y. Aikawa, T. Shin, A. Sasaki, and Y. Matsumoto. 1997. Myosin-induced autoimmune polymyositis in the rat. *J. Neurol. Sci.* 151: 141–148.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(DDC(T)) method. *Methods* 25: 402–408.
- Gutala, R. V., and P. H. Reddy. 2004. The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. *J. Neurosci. Methods* 132: 101–107.
- Dalakas, M. C. 2002. Muscle biopsy findings in inflammatory myopathies. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 28: 779–798.
- Dalakas, M. C., and R. Hohlfeld. 2003. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 362: 971–982.
- Ito, T., T. Kumamoto, H. Horinouchi, K. Yukishige, R. Sugihara, S. Fujimoto, and T. Tsuda. 2002. Adhesion molecule expression in experimental myositis. *Muscle Nerve* 25: 409–418.
- Matsubara, S., T. Kitaguchi, A. Kawata, K. Miyamoto, H. Yagi, and S. Hirai. 2001. Experimental allergic myositis in SJL/J mouse: reappraisal of immune reaction based on changes after single immunization. *J. Neuroimmunol.* 119: 223–230.
- Nemoto, H., K. Nemoto, H. Sugimoto, and M. Kinoshita. 2001. FK506 suppressed the inflammatory change of EAM in SJL/J mice. *J. Neurol. Sci.* 193: 7–11.

39. Rosenberg, N. L., S. P. Ringel, and B. L. Kotzin. 1987. Experimental autoimmune myositis in SJL/J mice. *Clin. Exp. Immunol.* 68: 117-129.
40. Matsubara, S., T. Shima, and M. Takamori. 1993. Experimental allergic myositis in SJL/J mice immunized with rabbit myosin B fraction: immunohistochemical analysis and transfer. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 85: 138-144.
41. De Bleeker, J. L., V. I. Meire, W. Declercq, and E. H. Van Aken. 1999. Immunolocalization of tumor necrosis factor- $\alpha$  and its receptors in inflammatory myopathies. *Neuromuscul. Disord.* 9: 239-246.
42. Kalovidouris, A. E., and Z. Plotkin. 1995. Synergistic cytotoxic effect of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  on cultured human muscle cells. *J. Rheumatol.* 22: 1698-1703.
43. Shelton, G. D., N. A. Calcutt, R. S. Garrett, D. Gu, N. Sarvetnick, W. M. Campana, and H. C. Powell. 1999. Necrotizing myopathy induced by overexpression of interferon- $\gamma$  in transgenic mice. *Muscle Nerve* 22: 156-165.
44. Kuru, S., A. Inukai, Y. Liang, M. Doyu, A. Takano, and G. Sobue. 2000. Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in muscles of polymyositis and dermatomyositis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 99: 585-588.
45. Sawai, H., Y. W. Park, J. Roberson, T. Imai, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand. 2005. T cell costimulation by fractalkine-expressing synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 52: 1392-1401.
46. Ancuta, P., R. Rao, A. Moses, A. Mehle, S. K. Shaw, F. W. Luscinskas, and D. Gabuzda. 2003. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16<sup>+</sup> monocytes. *J. Exp. Med.* 197: 1701-1707.
47. Thieblemont, N., L. Weiss, H. M. Sadeghi, C. Estcourt, and N. Haeflner-Cavillon. 1995. CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur. J. Immunol.* 25: 3418-3424.
48. Belge, K. U., F. Dayyani, A. Horelt, M. Siedlar, M. Frankenberger, B. Frankenberger, T. Espevik, and L. Ziegler-Heitbrock. 2002. The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* 168: 3536-3542.
49. Feng, L., S. Chen, G. E. Garcia, Y. Xia, M. A. Siani, P. Botti, C. B. Wilson, J. K. Harrison, and K. B. Bacon. 1999. Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX3CR1 rapid communication. *Kidney Int.* 56: 612-620.
50. Lesnik, P., C. A. Haskell, and I. F. Charo. 2003. Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 111: 333-340.
51. Combadiere, C., S. Potteaux, J. L. Gao, B. Esposito, S. Casanova, E. J. Lee, P. Debre, A. Tedgui, P. M. Murphy, and Z. Mallat. 2003. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 107: 1009-1016.

●第6回Latest Orthopedics研究会の記録

# 関節リウマチの病態形成における骨髄異常について

*Bone marrow abnormalities in rheumatoid arthritis*

廣畑 俊成

*Hirohata Shunsei*

「骨・関節・靭帯」第18巻第3号 別刷

(2005年3月)

アークメディア



## 関節リウマチの病態形成における骨髄異常について

*Bone marrow abnormalities in rheumatoid arthritis*

廣畑 俊成\*

*Hirohata Shunsei*

### はじめに

関節リウマチ(RA)は関節滑膜の増殖による進行性の骨・軟骨破壊を主徴とする原因不明の炎症性疾患である。増殖した滑膜は軟骨・骨に侵入しパンヌスとなってこれらを破壊してゆく。関節滑膜を構成する主要な細胞としては、マクロファージ様のA型滑膜細胞(M型滑膜細胞)と線維芽細胞様のB型滑膜細胞(F型滑膜細胞)が存在することが知られている<sup>1)</sup>。これまで、このような滑膜増殖は関節滑膜局所に存在する滑膜細胞の異常増殖に起因すると考えられてきた。しかし、近年になって、A型滑膜細胞は骨髄に由来する可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。

一方、RA関節滑膜においては、すでにその早期より血管新生が存在していることが明らかになってきている<sup>3)</sup>。さらに、RA骨髄CD34<sup>+</sup>細胞からの血管内皮細胞への分化能は変形性関節症に比し有意に亢進しているこ

とから、これらの異常が関節滑膜の血管新生に関与している可能性も考えられる<sup>4)</sup>。したがって、RAの病態形成においては骨髄の異常の果たす役割が非常に重要であることが示唆されるわけである。本稿においては、これまでわれわれが明らかにしてきたRAの骨髄の異常について述べるとともに、今後解明されるべき問題等についても触れてみたい。

### I. RAの関節滑膜の病理像の特徴

RAの関節滑膜の病理学的特徴は以下の点に集約される<sup>1)</sup>。

①表層細胞(lining cell)の重層化、②表層下(sublining layer)へのリンパ球、形質細胞、マクロファージ、多形核白血球、樹状細胞の浸潤、③偽性リンパ濾胞の形成、④血管新生。

表層細胞ではA型およびB型の滑膜細胞の増生がみられるが、A型滑膜細胞の増生がより顕著であるといわれる<sup>1)</sup>。表層下には種々の細胞の浸潤がみられるが、特徴的なのはしばしば偽性リンパ濾胞の形成がみられる点である(図1)。また、完成されたRA関節滑膜においては血管新生が顕著である(図2)。しかし、滑膜に炎症性細胞浸潤や表層細胞の重層化がないRAの極めて早期において、すでに血管新生が認められることが明らかになっている<sup>3)</sup>。したがって、RAの発症において

#### Key words ▶

CD34

滑膜(synovium)

血管新生(angiogenesis)

CD14

TNF- $\alpha$

\*帝京大学医学部内科学教室

(〒173-8605 東京都板橋区加賀2-11-1)

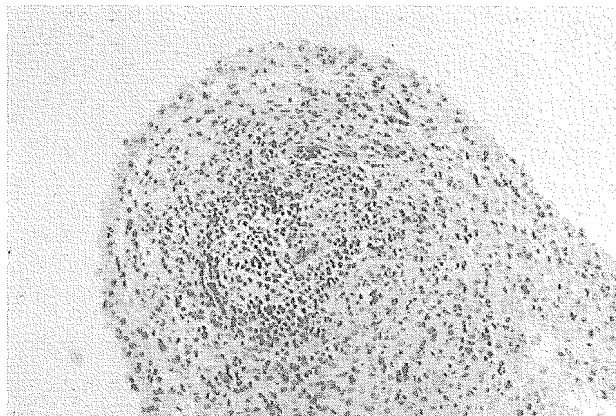


図1 関節リウマチ滑膜の病理組織像 (1)  
偽性リンパ濾胞を認める。(H&E, 原倍率×25)

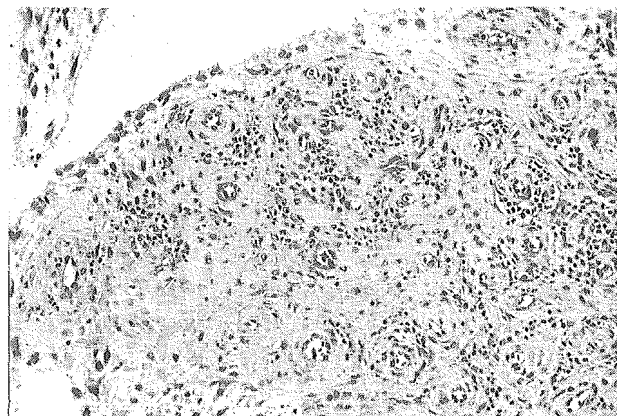


図2 関節リウマチ滑膜の病理組織像 (2)  
著明な血管新生を認める。(H&E, 原倍率×25)

は関節滑膜での血管新生がprimaryの病変である可能性が十分に考えられる。

## II. A型滑膜細胞と骨髄

### 1. RA末梢血単球の異常

RAにおいては関節滑膜および皮下結節内に単球系細胞が存在することが確認されており、前者がA型滑膜細胞であると考えられる<sup>1,5,6)</sup>。これらの単球系細胞は、骨髄から産生された単球系細胞が体循環を介して局所にrecruitされたものであると考えられる。この点においては、動物の実験関節炎モデルにおいては骨髄と関節腔を結ぶcanalを通じて細胞が侵入する経路も確認されているが<sup>7)</sup>、ヒトではいまだ証明されていない。われわれは、これまでにRAの末梢血の単球表面のCD14がRAの疾患活動期に上昇していること、さらに末梢血単球表面のFcγRI, FcγRIIの発現はRAの活動期・非活動期のいずれにおいても上昇していることを示した<sup>8)</sup>。すなわち、RAにおいては単球系細胞の活性化のみならず何らかの内因性の異常があり、これにより末梢血単球の表面抗原の異常を生じている可能性が考えられる。

### 2. RA骨髄CD14<sup>-</sup>細胞からのCD14<sup>+</sup>細胞の分化の亢進

前項で述べたRA末梢血CD14<sup>+</sup>細胞の異常の機序を明らかにするためには、骨髄レベルでの異常の有無を明らかにする必要がある。通常、骨髄血由来の単核球成分よりCD14<sup>-</sup>細胞を精製して単純に培養しておくだけでCD14<sup>+</sup>細胞が分化してくる<sup>9)</sup>。この際、RA骨髄CD14<sup>-</sup>細胞からは培養開始後24～72時間でOA骨髄CD14<sup>-</sup>細胞に比し、有意に多くのCD14<sup>+</sup>細胞に分化することが明らかになった<sup>9)</sup>。さらに、RAにおいては、骨髄CD14<sup>-</sup>細胞より分化したCD14<sup>+</sup>細胞上のHLA-DR発現が増強していることも示されている<sup>9)</sup>。したがって、RAにおいては骨髄からの単球系細胞の分化の亢進が存在し、これが病態に深く関与している可能性が考えられる。一方、活動期・非活動期のRAおよび健康人の間では末梢血中のCD14<sup>+</sup>細胞数には一般には差が認められない。これは、RAでは組織へのCD14<sup>+</sup>細胞のrecruitmentが亢進しているため骨髄からのCD14<sup>+</sup>細胞の産生が亢進していても、末梢血中ではさほどの増加を示さないためではないかと考えられる。事実、電顕上も、RAにおいては滑膜に単球



図3 関節リウマチ滑膜組織の電子顕微鏡像

単球系細胞が滑膜内に侵入しようとしている (矢印).

M: 単球, f: fibroblast-like cell, L: リンパ球, E: 血管内皮細胞  
(スケールは $2\mu\text{M}$ を示す)

系細胞が入り込む像が認められる(図3)。さらに、RA患者の偽関節においても関節滑膜に酷似した組織が形成される。元々偽関節を発生する骨折部分には滑膜組織は存在しないことから、この組織の構成細胞は、骨髄由来細胞が体循環を経由して局所に流入した可能性が高いと考えられる。

このように、RAにおいては骨髄からのCD14<sup>+</sup>細胞の分化が亢進し、全身の組織へとこれらが循環していることがわかる。しかしながら、単球表面上のFc $\gamma$ RI・Fc $\gamma$ RIIの発現の異常がいかなる機序で生じているのかについてはいまだに明らかにはなっていない。

### 3. RA単球系細胞の機能の異常—特にBリンパ球活性化能について

RAの関節滑膜においては、リンパ球の浸潤のみならず、形質細胞の浸潤が顕著に認められる<sup>1)</sup>。こうした形質細胞はリウマトイド

因子をはじめとする自己抗体を産生していると考えられる<sup>10)</sup>。RAにおいては、多量のリウマトイド因子の産生がみられるが、その機序については十分明らかにされていない。一般に健常人の末梢血Bリンパ球をautologousのCD4<sup>+</sup>Tリンパ球とともに抗CD3抗体の存在下に培養するとリウマトイド因子(IgM-RF)の産生が誘導される<sup>11)</sup>。ここにRA患者骨髄CD14<sup>+</sup>細胞から誘導したCD14<sup>+</sup>細胞を加えると、IgMの産生量は変化させずにIgM-RFの産生量だけが特異的に増加することをわれわれは明らかにしてきた(図4)<sup>12)</sup>。したがって、RA患者骨髄由来CD14<sup>+</sup>細胞は、おそらくは直接の細胞間相互作用を介して、特にリウマトイド因子産生Bリンパ球を活性化し、Tリンパ球からのヘルパーシグナルにより容易にIgM-RFを産生するように至らしめるものと考えられる。しかしながら、現在のところはいかなる細胞間相互作用がリウマトイド因子

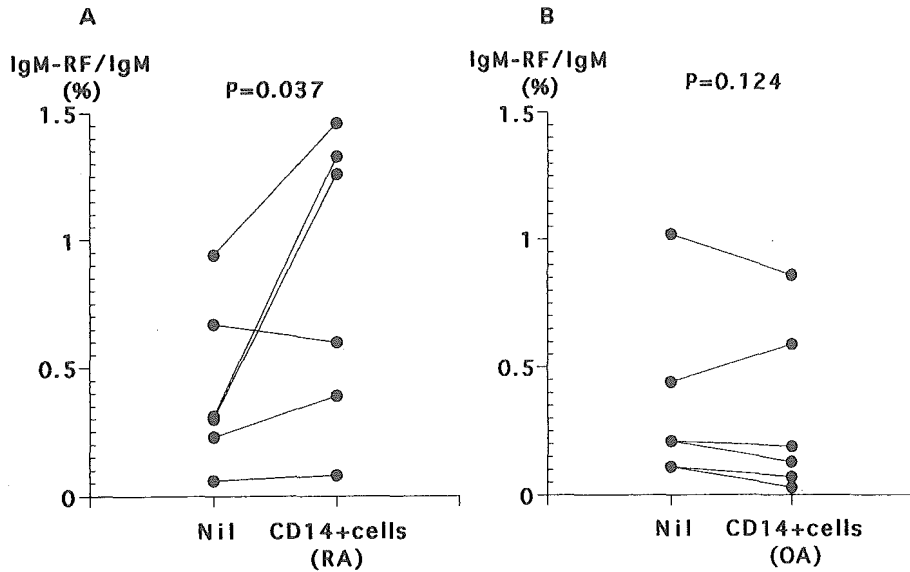


図4 関節リウマチ骨髄由来CD14<sup>+</sup>細胞によるIgMリウマトイド因子(IgM-RF)産生の増強効果

関節リウマチ(RA)骨髄由来CD14<sup>+</sup>細胞は健康人末梢血Bリンパ球によるIgM-RFを選択的に増強している(文献12より引用)。

産生に関与するかについては明らかになっておらず、この点については今後解明してゆく必要がある。

### Ⅲ. B型滑膜細胞と骨髄

前項で述べたように、RAの関節滑膜のA型滑膜細胞が骨髄由来であるということについてはすでにコンセンサスが得られている。一方、線維芽細胞様のB型滑膜細胞の由来についてはなお、さまざまな説があり<sup>13)</sup>、意見の一致をみていない。われわれはRA骨髄のCD34<sup>+</sup>細胞からB型滑膜細胞様の細胞が誘導できるかについて検討を行った。対照群(OAあるいは健康人)の骨髄CD34<sup>+</sup>細胞をstem cell factor(SCF) + granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)の存在下に培養を行い、そこにIL-4あるいはTNF- $\alpha$ を添加したところ、TNF- $\alpha$ の存在下にやや線維芽細胞様細胞が多くなる傾向がみられた<sup>14)</sup>。一方、IL-4を添加した場合は、す

べての細胞は円形の細胞となり、clusterを形成し、さらにIL-4とTNF- $\alpha$ の両者を添加した場合にはapoptosisにより多くの細胞が死滅する傾向がみられた。RA骨髄CD34<sup>+</sup>細胞を同様に培養した際には、SCF+GM-CSFに加えてIL-4あるいはIL-4+TNF- $\alpha$ を添加した場合の形態的变化は、OA骨髄CD34<sup>+</sup>細胞とほぼ同様であった。SCF+GM-CSFのみの存在下ではRA骨髄CD34<sup>+</sup>細胞からは線維芽細胞様細胞への分化がやや多くみられたが、ここにTNF- $\alpha$ を添加するとこの傾向は一層著明となった(図5)<sup>14)</sup>。図6に示すように、flow cytometryでこれらの培養細胞の表面抗原を検索すると、TNF- $\alpha$ の添加時に、RA骨髄CD34<sup>+</sup>細胞からの線維芽細胞への分化の亢進に一致して、CD14抗原、HLA-DR抗原の発現の著明な低下を認めた<sup>14)</sup>。IL-4あるいはIL-4+TNF- $\alpha$ の添加によりCD14抗原の発現は低下するものの、HLA-DR抗原の発現はむしろ増加し、これはdendritic cellへの

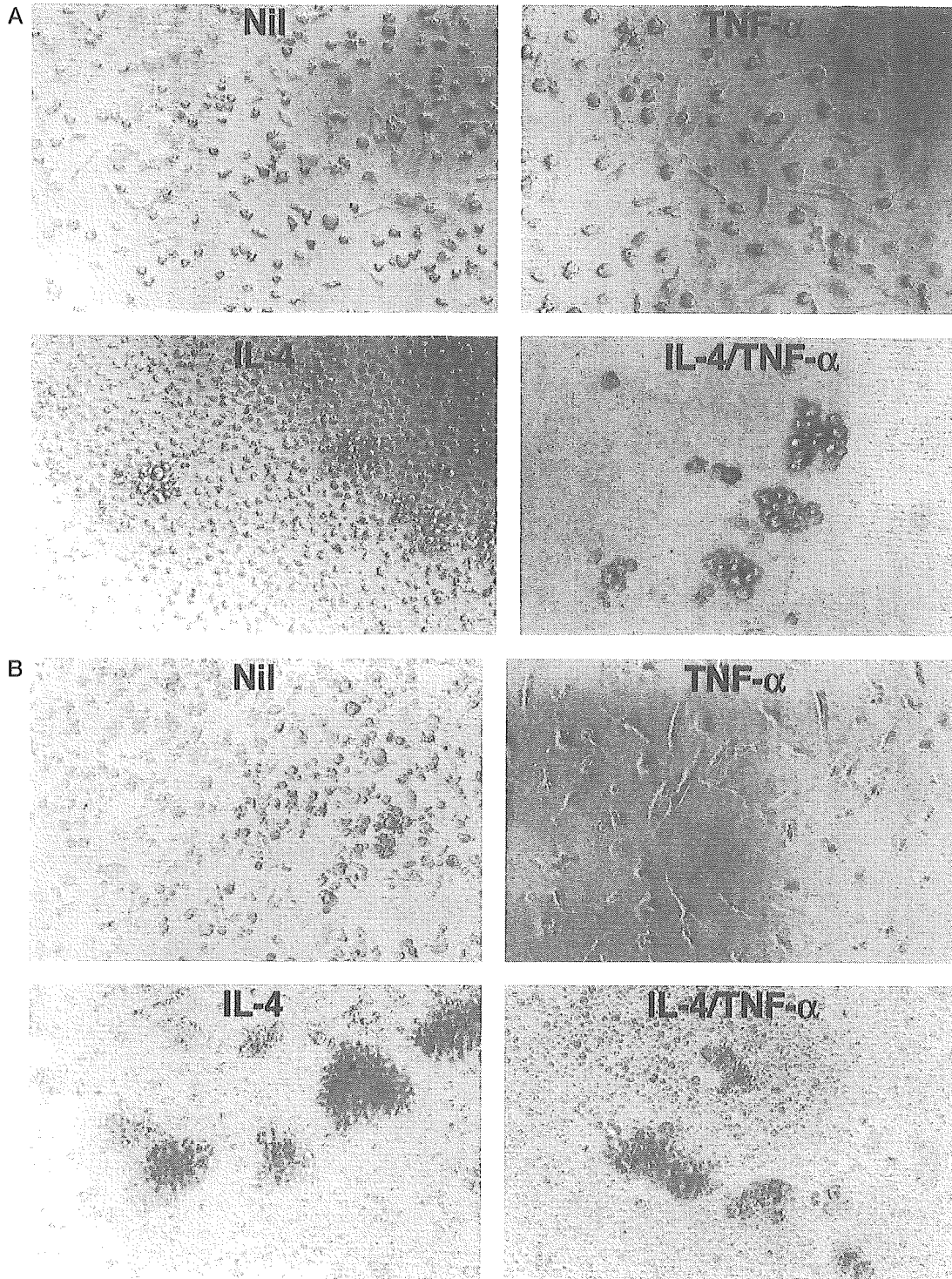


図5 変形性関節症 (A) および関節リウマチ (B) 骨髄CD34<sup>+</sup>細胞からの各種細胞の分化  
 骨髄CD34<sup>+</sup>細胞をSCF+GM-CSFの存在下に、各種サイトカインとともに4週間培養した時の形態変化を示す (文献14を改変)。

分化の誘導を示唆している。これらの結果をまとめてみると、表1に示すように、SCF+GM-CSF+TNF- $\alpha$ の存在下でのRA骨

髄CD34<sup>+</sup>細胞からの線維芽細胞様細胞への分化は、OA骨髄CD34<sup>+</sup>細胞に比し有意に亢進していた。同時に、SCF+GM-CSF+TNF-

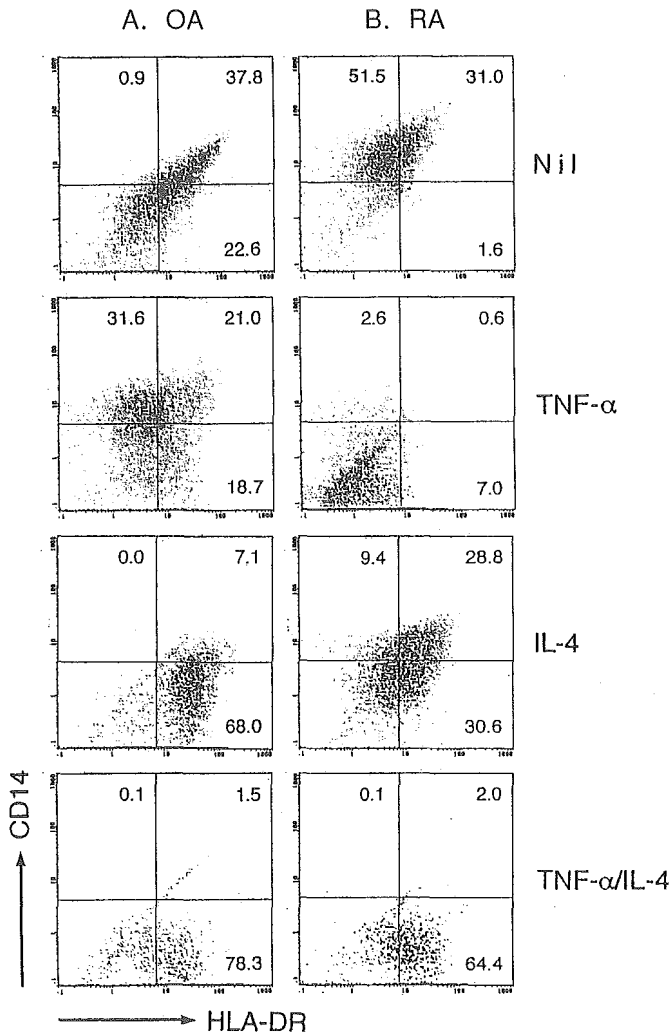


図6 変形性関節症 (A) および関節リウマチ (B) 骨髄 CD34<sup>+</sup> 細胞からの各種細胞の分化  
 骨髄 CD34<sup>+</sup> 細胞を SCF+GM-CSF の存在下に、各種サイトカインとともに 4 週間培養した時の表面抗原 (CD14, HLA-DR) の変化を示す (文献 14 を一部変更)。

$\alpha$  で刺激した培養上清中の matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) の産生も、RA 骨髄 CD34<sup>+</sup> 細胞においては OA 骨髄 CD34<sup>+</sup> 細胞に比して有意に亢進していた。したがって、RA 骨髄 CD34<sup>+</sup> 細胞から SCF+GM-CSF+TNF- $\alpha$  の存在下に分化してくる線維芽細胞様細胞は MMP-1 を産生するという B 型滑膜細胞の性質を有していることが明らかになった<sup>14)</sup>。以上のデータより、RA 関節滑膜に存在する B 型滑膜細胞も骨髄に由来する可能性が高いことが示唆された。

昨今いろいろの生物学的製剤が RA の治療に有用であることが示されており、中でも特に抗 TNF- $\alpha$  抗体や可溶性 TNF レセプター-Ig 融合蛋白の有用性が優れていることから、TNF- $\alpha$  が RA の病態形成上極めて重要な役割を果たすことが確認されている<sup>15)</sup>。上記のわれわれの検討結果は、TNF- $\alpha$  に対する反応性が RA 骨髄 CD34<sup>+</sup> 細胞においては明らかに OA 骨髄 CD34<sup>+</sup> 細胞とは異なっていることを端的に示している<sup>14)</sup>。すなわち、骨髄 CD34<sup>+</sup> 細胞の TNF- $\alpha$  に対する異常反応が RA の病態形成上重要な役割を果たしていることが示唆される。今後、この TNF- $\alpha$  に対する骨髄 CD34<sup>+</sup> 細胞の反応性の異常がいかなる

表1 関節リウマチ患者骨髄 CD34<sup>+</sup> 細胞からの各種細胞の分化

Cytokines	Morphology	RA patients (n=21)	Control (n=18)	Significance*
SCF+	M+D	9	13	P>0.05
GM-CSF	M+D+F	12	5	
	F dominant	0	0	
SCF+	M+D	1	12	P<0.001
GM-CSF	M+D+F	9	5	
TNF- $\alpha$	F dominant	11	1	
SCF+	M+D	21	18	P>0.05
GM-CSF	M+D+F	0	0	
IL-4	F dominant	0	0	

\*Chi-square test for independence (文献 14 より引用)

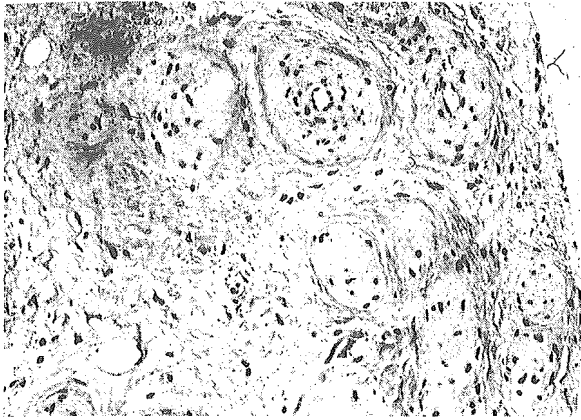


図7 早期関節リウマチ患者の関節滑膜にみられた血管新生 (H&E, 原倍率×40)  
(文献3より引用)

機序によって生じているのかについて検討してゆく必要がある。

#### IV. RAにおける血管新生と骨髄

RAの典型的な臨床像を示す以前に採取された患者の滑膜組織を検索すると、図7に示すように、全く滑膜細胞の増殖や炎症細胞の浸潤がみられないにもかかわらず、血管新生が生じている像が観察される<sup>3)</sup>。これまで、成人にみられる血管新生 (angiogenesis) においては、胎生期の血管形成 (vasculogenesis) とは異なり、既存の血管から新生血管が枝分かれして増殖してくるものと考えられていた。しかし、末梢血中にも骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在することが証明されて以来、こうした骨髄由来の血管内皮前駆細胞の関与する機転 (vasculogenesis) が炎症・腫瘍などにおける血管の増生に関与することが明らかにされた<sup>16,17)</sup>。

骨髄CD34<sup>+</sup>細胞をSCF+GM-CSFの存在下に培養するとvWF<sup>+</sup>細胞への分化がみられるが、RAにおいてはOAに比して、この骨髄CD34<sup>+</sup>細胞からのvWF<sup>+</sup>細胞への分化が有意に亢進していることが最近明らかになっ

た<sup>4)</sup>。さらに、この骨髄CD34<sup>+</sup>細胞からのvWF<sup>+</sup>細胞への分化は関節滑膜の毛細血管密度と正の相関を示していたことから、関節滑膜での血管新生において骨髄由来の血管内皮前駆細胞が重要な役割を果たすことが示唆された<sup>4)</sup>。こうしたvWF<sup>+</sup>細胞の分化の亢進は培養中におけるTNF- $\alpha$ やVEGFなどのサイトカイン産生の亢進に基づくものではなく、RA骨髄CD34<sup>+</sup>細胞自身のintrinsicな異常に基づくものと考えられる<sup>4)</sup>。すなわち、RA骨髄CD34<sup>+</sup>細胞はOA骨髄CD34<sup>+</sup>細胞に比し、VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2)/KDR (kinase domain receptor) のmRNAの発現が有意に亢進していることが明らかになった<sup>4)</sup>。したがって、RA骨髄CD34<sup>+</sup>細胞はVEGFに対する反応性が亢進しており、これにより同じレベルのサイトカインの存在下においてOA骨髄CD34<sup>+</sup>細胞に比しより効率的にvWF<sup>+</sup>細胞へと分化し、関節滑膜での血管新生を支持することにより、関節滑膜の増殖に寄与しているものと考えられる。

#### おわりに

以上、本稿においてはRAの骨髄からはA型滑膜細胞だけでなく、B型滑膜細胞も産生される可能性の高いことを明らかにした。さらに、RA骨髄由来A型滑膜細胞様細胞は機能的にもRF産生Bリンパ球を活性化するという独特の異常を有していることを述べた。さらに、こうした関節滑膜の主要な構成細胞のみならず、これらの細胞が滑膜に侵入するために必要な血管の新生においても骨髄の異常が関与することが明らかになった。このような骨髄の異常は少なくともCD34<sup>+</sup>細胞というhematopoietic stem cellレベルでみられ

ており，こうした細胞において VEGFR2/KDR mRNA の発現亢進という遺伝子異常が存在することも明らかになった．今後は，骨髓 CD34<sup>+</sup> 細胞のもう 1 つの異常である TNF- $\alpha$  に対する反応性の異常がいかなるメカニズムで生じているのかについて解析するとともに，さらにこうした骨髓 CD34<sup>+</sup> 細胞レベルの異常がいかなる機序で生じているのかといった問題について検討を加えてゆくことが，RA の病態のみならず病因を解明する上で重要であると考えられる．

#### 文 献

- 1) Kyogoku M, Sawai T, Murakami K et al : Histopathological characteristics of rheumatoid arthritis –as a clue to elucidate its pathogenesis–. *Nippon Rinsho* 50 : 483–489, 1992
- 2) Burmester GR, Stuhlmüller B, Keyszer G et al : Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum* 40 : 5–18, 1997
- 3) Hirohata S, Sakakibara J : Angiogenesis as a possible elusive triggering factor in rheumatoid arthritis. *Lancet* 353 : 1331, 1999
- 4) Hirohata S, Yanagida T, Nampei A et al : Enhanced generation of endothelial cells from CD34<sup>+</sup> cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: possible role in synovial neovascularization. *Arthritis Rheum* 50 : 3888–3896, 2004
- 5) Hogg N, Palmer DG, Revell PA : Mononuclear phagocytes of normal and rheumatoid synovial membrane identified by monoclonal antibodies. *Immunology* 56 : 673–681, 1985
- 6) Hedfors E, Klareskog L, Lindblad S et al : Phenotypic characterization of cells within subcutaneous rheumatoid nodules. *Arthritis Rheum* 26 : 1333–1339, 1983
- 7) Nakagawa S, Toritsuka Y, Wakitani S et al : Bone marrow stromal cells contribute to synovial cell proliferation in rats with collagen induced arthritis. *J Rheumatol* 23 : 2098–2103, 1996
- 8) Shinohara S, Hirohata S, Inoue T et al : Phenotypic analysis of peripheral blood monocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 19 : 211–215, 1992
- 9) Hirohata S, Yanagida T, Itoh K et al : Accelerated generation of CD14<sup>+</sup> monocyte-lineage cells from the bone marrow of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 39 : 836–843, 1996
- 10) Wernick RM, Lipsky PE, Marban-Arcos E et al : IgG and IgM rheumatoid factor synthesis in rheumatoid synovial membrane cell cultures. *Arthritis Rheum* 28 : 742–752, 1985
- 11) Hirohata S, Inoue T, Miyamoto T : Frequency analysis of human peripheral blood B cells producing IgM-rheumatoid factor. Differential effects of stimulation with monoclonal antibodies to CD3 and *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 145 : 1681–1686, 1990
- 12) Hirohata S, Yanagida T, Koda M et al : Selective induction of IgM rheumatoid factors by CD14<sup>+</sup> monocyte-lineage cells generated from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38 : 384–388, 1995
- 13) Firestein GS : Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 39 : 1781–1790, 1996
- 14) Hirohata S, Yanagida T, Nagai T et al : Induction of fibroblast-like cells from CD34(+) progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol* 70 : 413–421, 2001
- 15) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN : Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14 : 397–440, 1996
- 16) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964–967, 1997
- 17) Gehling UM, Ergun S, Schumacher U et al : In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95 : 3106–3112, 2000

\* \* \*



《内科疾患に伴う treatable dementia》

## 膠原病による痴呆

広畑俊成

特集 痴呆症の最新情報——治せる痴呆を見逃さないために

臨床雑誌「内 科」第95巻 第5号〔2005年5月号〕別 刷

南 江 堂

## 〈内科疾患に伴う treatable dementia〉 膠原病による痴呆

広畑 俊成\*

### 要 旨

- 全身性エリテマトーデス (SLE) および Behçet 病ではしばしば痴呆様の症状を合併する。
- SLE の中枢神経病変 (CNS ループス) の病態形成においては中枢神経内での免疫異常が重要な役割を果たす。すなわち、中枢神経内での Ig 産生の指標である CSF Ig index や、髄液中の IL-6, IL-8, IFN- $\alpha$  の上昇を認める。さらに、血清抗リボソーム P 抗体および髄液抗神経細胞抗体という自己抗体のトロピズムが CNS ループスの病態形成上重要であると考えられる。
- Behçet 病の中枢神経病変 (神経 Behçet 病) は大きく急性型と慢性進行型に分けられ、とくに後者で痴呆様の精神神経症状がみられる。この病型では HLA-B51 の陽性率がきわめて高く、髄液 IL-6 の持続的異常高値を示し、methotrexate の少量パルス療法が有効である。

### はじめに○

膠原病は全身を侵す炎症性疾患であり、多彩な精神神経症状がみられる。中でも、とくに全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) や Behçet 病においては、中枢神経病変は主要な症状の一つであり、CNS ループスあるいは神経 Behçet 病と呼ばれている。これら中枢神経病変を合併する患者においては痴呆様症状を示す場合が少なくない。こうした痴呆様症状は適切な治療により軽快することから、的確な診断を行うことが重要である。

本稿においては、この CNS ループスおよび神経 Behçet 病を中心として、その臨床的特徴・病態・治療について概説してみたい。

### CNS ループス○

#### 1. 臨床的特徴

SLE においては多彩な症状がみられるが、とくに頻度の高いものが、高次脳機能の異常と痙攣である。アメリカリウマチ学会 (ACR) は 1999 年に SLE の神経病変の新分類基準を提唱している (Table 1)<sup>1)</sup>。この分類基準では、中枢神経病変を、局所病変を主とした neurologic syndromes と高次脳機能異常を主とした diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes の 2 つに分け、さらに後者を 5 つの症状に分類している。この中で、cognitive dysfunction が臨床的には痴呆様症状を主徴とするものである。

SLE の増悪に際して副腎皮質ステロイドを増量したあとに精神症状が出現したり増悪したりすることがしばしば経験される。これは単純な副腎皮質ステロイドの副作用 (いわゆる steroid psy-

\* S. Hirohata (助教授) : 帝京大学内科。

**Table 1. アメリカリウマチ学会(ACR)による全身性エリテマトーデスの精神神経症状の分類**

central nervous system
neurologic syndromes
aseptic meningitis
cerebrovascular disease
demyelinating syndrome
headache (including migraine and benign intracranial hypertension)
movement disorder(chorea)
myelopathy
seizure disorders
diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes
acute confusional state
anxiety disorder
cognitive dysfunction
mood disorder
psychosis
peripheral nervous system
acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (Guillain-Barré syndrome)
autonomic disorder
mononeuropathy, single/multiplex
myasthenia gravis
neuropathy, cranial
plexopathy
polyneuropathy

<http://www.rheumatology.org/publications/ar/1999/aprilappendix.asp?aud=mem> [文献 1)より引用, 一部改変]

chosis)ではなく、むしろ潜在的に進行していた CNS ループスが副腎皮質ステロイドの投与によって一気に顕在化したと考えたほうが理解しやすい。事実、以前より steroid psychosis は CNS ループスの患者に発生しやすいことが指摘されており、この両者は必ずしも二律背反の関係にあるのではない<sup>2)</sup>。

CNS ループスにおいては、血中抗 DNA 抗体価・血清補体価・白血球数(リンパ球数)などの全身の疾患活動性の指標は中枢神経病変の活動性を反映しないので注意する必要がある。

## 2. CNS ループスの病態

### 1) 中枢神経内の免疫異常：中枢神経内での

Ig 産生の指標である CSF Ig index や髄液中の IL-6 や IL-8 は、CNS ループスにおいて上昇する<sup>3,4)</sup>。しかしこれらは、CNS ループスの各種病型のあいだでは有意な差が認められない。一方、髄液中の IFN- $\alpha$  も精神症状を示す SLE 患者において特異的に上昇するが、痙攣のみを示す患者ではこうした異常は認めず、これは精神症状特有の病態形成に関与すると考えられる<sup>3)</sup>。また、CNS ループス患者の髄液中で MMP-9 が増加していることが最近報告された<sup>5)</sup>。CNS ループスでは IL-6 や IL-8 により MMP-9 の産生が亢進し、これが神経細胞やグリア細胞を障害することが病態上重要な働きをしていることが示唆されている<sup>5)</sup>。このように、CNS ループスにおいては、中枢神経内での Ig やサイトカインの産生に反映される免疫異常が病態形成に深く関与していると考えられるが、各病型特有の異常についてはいまだ不明な点が多い。

髄液中の IL-6、IFN- $\alpha$  などのサイトカインの上昇は、主として神経細胞による産生増強に起因する可能性が示唆されている<sup>3)</sup>。われわれもループス精神病で死亡した患者の脳皮質および海馬において、とくに神経細胞内に IL-6 mRNA の発現が増強していることを明らかにした (Fig. 1)<sup>6)</sup>。しかし、こうした神経細胞によるサイトカインの産生の異常がいかなる機序によって生じるのかについては今後の解明を待たなくてはならない。

### 2) 血清中の自己抗体——抗リボソーム P 抗体(抗 P 抗体)

a) ループス精神病と抗 P 抗体：SLE 患者血清中にリボソームと反応する自己抗体が存在する。この中でも、P 蛋白に対する抗体(抗リボソーム P 抗体：抗 P 抗体)が近年とくに注目を集めている。リボソーム P 蛋白は P0 (38 kD)、P1 (19 kD)、P2 (17 kD) からなり、抗 P 抗体はこれら 3 つの抗原に共通して存在する C 末端 22 個のアミノ酸からなるエピトープを認識する<sup>3)</sup>。抗 P 抗体とループス精神病との相関については一定の見解が得られていなかったが、純度 99% 以上のリボ

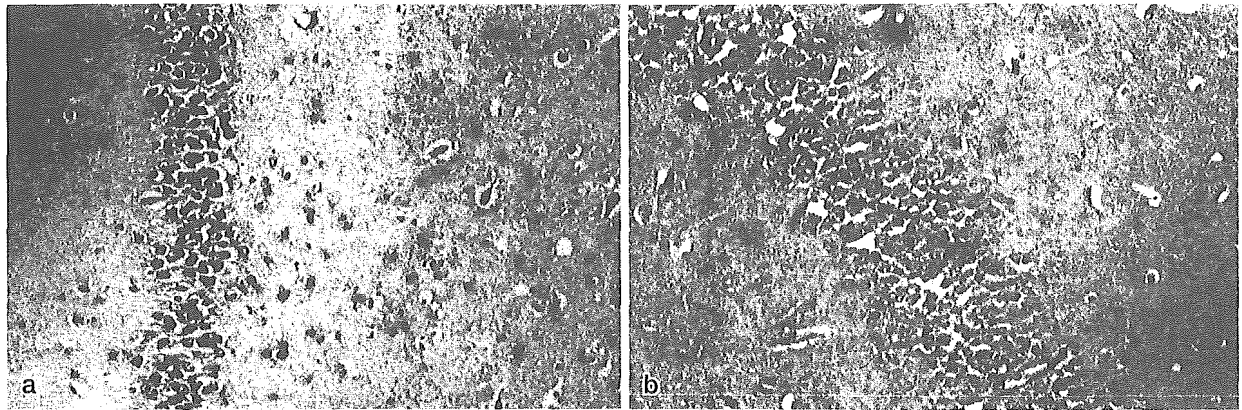


Fig. 1. CNS ループス(ループス精神病)患者の剖検脳(海馬)における IL-6 mRNA の発現  
 CNS ループス患者(a)においては対照患者(b)に比し, IL-6 mRNA の神経細胞内での発現が増強している。

ソーム P ペプチドを用いて検討するとやはり有意の相関がみられたことから, 報告者による不一致の一因は抗原の純度によると考えられる<sup>3)</sup>. 抗 P 抗体のループス精神病の診断における有用性については, 現在国際的な横断的研究によるメタアナリシスが行われている。

抗 P 抗体はループス精神病の約 50%で認められるが, 抗 P 抗体が血清中より消失しない段階でも精神症状に著明な改善がみられることがあり, 逆に症状増悪時に必ずしも血清抗 P 抗体の上昇が認められないこともある. 一方, 抗 P 抗体はループス精神病の髄液中ではほとんど検出されない<sup>3)</sup>. したがって, 抗 P 抗体が中枢神経の障害を直接惹起するのではなく, その下流に髄液異常をきたす何らかのプロセスが存在すると考えられる。

**b) 抗 P 抗体の認識するエピトープの各種細胞表面での発現:** 抗 P 抗体が細胞質のリボソームをターゲットとしていることは考えにくい. これまで抗 P 抗体の認識するエピトープが種々の細胞の表面に発現されていることが明らかになった. これらは, 肝細胞癌由来細胞, 神経芽細胞腫細胞, 線維芽細胞, 血管内皮細胞で, 細胞表面に 38 kD のリボソーム P0 蛋白が発現していることが示された<sup>7)</sup>.

ヒト末梢血の CD4<sup>+</sup>T 細胞, CD8<sup>+</sup>T 細胞, B 細胞は, いずれも無刺激の状態ではリボソーム P エ

ピトープを発現していない. しかし, 抗 CD3 抗体などで活性化すると, CD4<sup>+</sup>T 細胞と CD8<sup>+</sup>T 細胞はいずれもリボソーム P エピトープを発現するが<sup>3)</sup>, B 細胞はいかなる刺激で活性化したあともリボソーム P エピトープを発現しない. 一方, 活性化ヒト末梢血単球表面にもリボソーム P エピトープが発現していることが最近確認された<sup>8)</sup>. さらに, 抗 P 抗体はヒト末梢血単球からの TNF- $\alpha$  や IL-6 の産生およびその mRNA の発現を著明に増強することが明らかになった (Fig. 2)<sup>8)</sup>. この効果は抗 P 抗体を F(ab')<sub>2</sub>にした場合もまったく減弱せず, Fc $\gamma$  レセプターの関与を必要としない<sup>8)</sup>. したがって, 抗 P 抗体は, 単球からの炎症性サイトカインの産生を増強することで, 血管内皮細胞やリンパ球の機能に影響を及ぼすことにより, ループス精神病をはじめとする SLE の病態形成に関与する可能性が示唆されている。

**3) 脳脊髄液中の自己抗体——抗神経細胞抗体:** 血清中の抗神経細胞抗体は SLE 患者では中枢神経障害の有無にかかわらず上昇しており, CNS ループスの病態への関与の可能性は低いと考えられる. 一方, CNS ループスでは髄液中の抗神経細胞抗体が特異的に上昇し, 疾患活動性をよく反映することが報告され, またわれわれもこれを確認している<sup>3)</sup>. CNS ループスにおいては中枢神経内での Ig 産生の亢進を認める. したがって何らかの機序で中枢神経内で産生された抗神経細胞