

- ニューロパチーと自律神経障害」、東京 2012.10.25.
5. 神田 隆 認知症の原因となりうる稀な神経疾患. 第 31 回日本認知症学会教育講演 1 「診断アラカルト」、つくば 2012.10.26.
6. 神田 隆 足のしびれ. 第 23 回日本末梢神経学会学術集会市民公開講座「手足のしびれ」福岡市 2012.9.2.
7. 神田 隆 NMO の病気の原因を探る研究. 第 9 回 MS/NMO フォーラム 東京 2012.12.9.
8. 清水文崇, 佐野泰照, 斎藤和幸, 安部真彰, 前田敏彦, 春木明代, 松井尚子, 宮城 愛, 梶龍兒, 神田 隆. 多巣性運動ニューロパチー血清は血液神経関門を破壊させる. 第 53 回日本神経学会学術集会総会. 東京, 2012 年 5 月 23 日.
9. 清水文崇, 佐野泰照, 古賀道明, 田崎彩子, 安部真彰, 前田敏彦, 春木明代, 松井尚子, 宮城 愛, 梶龍兒, 神田 隆. 多巣性運動ニューロパチー血清による血液神経関門破壊メカニズムの解析. 第 23 回日本末梢神経学会学術集会. 福岡, 2012 年 9 月 1 日.
10. 清水文崇, 佐野泰照, 古賀道明, 田崎彩子, 安部真彰, 前田敏彦, 春木明代, 松井尚子, 宮城 愛, 梶龍兒, 神田 隆. 多巣性運動ニューロパチー血清による血液神経関門破壊メカニズムの解析. 第 24 回日本神経免疫学会学術集会. 軽井沢, 2012 年 9 月 21 日.
11. 清水文崇, 佐野泰照, 田崎彩子, 古賀道明, 神田 隆. 血液神経関門の破壊が慢性炎症性脱髄性根神経炎の臨床病型を決定するか. 平成 24 年度「難治性ニューロパチーの診断技術と治療法の開発に関する研究」班. 平成 24 年度班会議. 東京, 2012 年 12 月 3 日.
12. 清水文崇, 斎藤和幸, 佐野泰照, 本田真也, 尾本雅俊, 田崎彩子, 神田 隆. 抗 SRP 抗体陽性ミオパチー患者由来 IgG は筋内小血管ペリサイトの細胞死を誘導する. 「自己免疫疾患に関する調査研究」班. 平成 23 年度班会議. 東京, 2012 年 12 月 14 日.
13. Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Toshiyuki Takahashi, Hiroyo Haruki, Kazuyuki Saito, Michiaki Koga, and Takashi Kanda. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. NMO Sendai . Sendai, 14 July 2012
14. Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Hiroyo Haruki, and Takashi Kanda. The effect of advanced glycation end-products on blood-brain barrier. Neworiens, Neuroscience 13 Oct 2012.
15. 古賀道明 楠進 海田賢一 上原里程 中村好一 郡山達男 神田 隆. ビッカーstaff型脳幹脳炎の全国疫学調査:脳幹脳炎の中での位置づけと臨床像・治療の現状の解析. 厚労省免疫性神経疾患に関する調査研究班平成 23 年度班会議. 2012 年 1 月 25-26 日、東京.
16. 古賀道明 佐野宏徳 本田真也 尾本雅俊 清水文崇 小笠原淳一 川井元晴 神田 隆. 神経サルコイドーシスにおける疼痛の評価 厚労省「難治性神経因性疼痛の基礎疾患の解明と診断・治療精度を向上させるための研究」班平成 23 年度班会議. 2012 年 1 月 27 日、東京 (KKR ホテル東京).
17. 古賀道明、楠進、海田賢一、上原里程、中村好一、郡山達男、神田 隆. Bickerstaff 型脳幹脳炎の全国疫学調査:脳幹脳炎の中での位置づけと臨床像・治療の現状. 第 53 回日本神経学

会学術大会. 2012年5月22-15日、東京.

18. 古賀道明、田崎彩子、大石真莉子、小笠原淳一、川井元晴、神田隆. Fisher 症候群は免疫療法の適応となりえるか? :初診時の診断からみた検討. 第23回日本末梢神経学会学術集会. 2012年8月31日-9月1日、福岡.

19. 古賀道明 佐野宏徳 藤川 晋 西原秀昭 尾本雅俊 小笠原淳一 川井元晴 神田 隆. 上肢から発症するニューロパチー. 厚生省「難治性神経因性疼痛の基礎疾患の解明と診断・治療精度を向上させるための研究」班平成23年度ワークショップ. 2012年9月14日、長野(軽井沢. 明神館).

20. 古賀道明、楠 進、海田賢一、上原里程、中村好一、郡山達男、神田 隆. Bickerstaff 型脳幹脳炎の全国疫学調査:脳幹脳炎の中での位置づけと臨床像・治療の現状. 第24回日本神経免疫学会学術集会. 2012年9月20-21日、長野(軽井沢).

21. 春木明代, 佐野泰照, 清水文崇, 尾本雅俊, 安部真彰, 前田敏彦, 斎藤和幸, 神田 隆. 抗 AQP4 抗体陽性患者血清によるアストロサイト細胞死とその機序について. 免疫性神経疾患に関する調査研究班 平成23年度 班会議, 東京, 1月25日.

22. 春木明代, 佐野泰照, 清水文崇, 尾本雅俊, 安部真彰, 前田敏彦, 斎藤和幸, 神田 隆. 抗 AQP4 抗体陽性患者血清によるアストロサイト細胞死とその機序について. 第53回日本神経学

会学術大会, 東京, 5月24日.

23. 春木明代, 佐野泰照, 清水文崇, 尾本雅俊, 安部真彰, 前田敏彦, 斎藤和幸, 神田 隆. 抗 AQP4 抗体陽性患者血清によるアストロサイト細胞死とその機序について. 第24回日本神経免疫学会学術集会, 軽井沢, 9月20日.

24. 春木明代, 尾本雅俊, 中野雄太, 小笠原淳一, 古賀道明, 川井元晴, 神田 隆. 難聴, 視神経障害, 嚥下障害, 右室心筋症を呈した筋原線維性ミオパチーの45歳男性例 第40回臨床神経病理懇話会, 津, 11月17日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし

2. 実用新案登録:なし

抗ミトコンドリア抗体陽性筋炎の臨床病理学的特徴に関する研究

研究分担者 清水 潤 東京大学医学系研究科神経内科 講師
研究協力者 前田明子、辻省次 東京大学医学系研究科神経内科

研究要旨

212例の筋炎連続症例で抗ミトコンドリア抗体(AMA)を測定し、24例のAMA陽性例と188例のAMA陰性例の臨床像、病理組織像を比較検討した。AMA陽性筋炎の中には、慢性経過、筋萎縮、心筋障害、肉芽腫性炎症を持つ症例が高頻度に含まれることが明らかになった。AMA陽性筋炎のうち原発性胆汁性肝硬変合併群で心合併症をより高頻度で認めた。抗ミトコンドリア抗体は筋炎のうち特徴的な臨床病理像を有するサブグループのマーカーとなることが明らかになった。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は胆管上皮細胞を標的とする自己免疫疾患であり、血清中の抗ミトコンドリア抗体(AMA)が約95%において出現することが知られている。過去に症例報告レベルで少数例であるが原発性硬化性胆管炎と筋炎の合併の報告がされており、これらの中には、PBCを合併する筋炎の特徴として、慢性経過、心筋障害、呼吸筋障害、骨格筋萎縮が目立つなどの特徴を指摘するものがあるが系統的な検討はなされていない。本研究では212例の筋炎症例より抗ミトコンドリア抗体陽性筋炎を確認し、これらの臨床病理像の特徴に関して検討した。

B. 研究方法

筋炎の診断基準を満たす212例の連続症例について、AMAをELISAにてスクリーニングをおこない24例のAMA陽性例を確認した。24例のAMA陽性例と188例のAMA陰性例について、後方視的に臨床像、病理組織像を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究でおこなわれている臨床病理像の解析の実施にあたっては、各被検者に対してその内容を説明し、文書による同意を得た上で実施した。

C. 研究結果

212例中の24例(11.3%)において抗ミトコンドリア抗体が陽性であり、そのうち7例はPBC合併、17例はPBC非合併であった。7例のPBC合

併例のうち3例においてPBCが筋炎に先行しており4例で同時に診断をうけていた。24例のAMA陽性筋炎では、男9例女15例であり、診断までの期間は平均20ヶ月(1~60ヶ月)であり、13例において12ヶ月以上の慢性経過をとっていた。初発症状は、筋力低下または筋萎縮が18例、不整脈2例、血清CK上昇のみが4例であった。神経所見では、1例で瀰漫性筋力低下を認めていたが残りの23例では近位筋優位の筋力低下を認めた。13例で筋萎縮を認め、長期経過例の3例で傍脊柱筋の障害による脊髄前彎を認めた。血液CK値は232~15132IU/Lであった。心臓合併症として8例で不整脈(上室性頻脈5例、心室性頻脈2例、AVブロック1例)を認め、6例で心拍出率の低下(<50%)を認めた。不整脈を認めた2例ではカテーテルアブレーションによる治療をうけていた。呼吸筋合併症として6例で肺活量が80%以下であり、2例では人工呼吸器を用いた治療が行われていた。

治療経過が追えた15例のうち11例が副腎皮質ステロイド、1例がアザチオプリンで治療されていたが3例では治療拒否のため無治療であった。治療された12例では、少量副腎皮質ステロイドで治療された1例を除き全例で3ヶ月以内にCKは正常化していた。6例で筋力は改善を認め、残りの症例では期間中の改善は認めていなかった。3例の無治療例では2例で新たに不整脈を発症しており1例でペースメーカーが装着されていた。

筋病理では筋炎に合致する所見に加え、間質の線維化を伴う慢性変化を15例に認めた。また、6例において肉芽腫性炎症性変化を認め、そのう

ち4例では炎症細胞浸潤はCD4陽性Tリンパ球がCD8陽性リンパ球の浸潤より優位であった。

統計学的検討では、AMA陽性筋炎の臨床像では、診断までの期間が長く、骨格筋萎縮および心臓合併症が高頻度、皮疹の合併が低頻度、病理像では、筋線維の大小不同および間質の線維化所見、肉芽腫性炎症所見が高頻度であった。AMA陽性筋炎の中でPBCの合併の有無での差は、PBC合併例で心筋障害が高頻度である点を除きその他の臨床病理像では差を認めなかった。

AMAの抗体値と臨床病理像の関係解析では、心臓合併症や肉芽腫性変化を有する例で抗体値が高い傾向があった。また疾患の期間とAMA抗体値の間に有意の正の相関を認めた。

D. 考察

AMAはPBCに特徴的な抗体であるが、抗体価とPBCの病勢との関係は知られておらず、PBCの病態には抗体による作用よりもCD4陽性Tリンパ球やCD8陽性Tリンパ球の病態への関与が推定されている。一方、PBCにおいてはAMA以外のさまざまな抗体が出現することが知られており、これらの中には核に対する抗体やレセプターに対する機能的抗体などの存在が指摘されている。本検討で明らかになったAMA陽性筋炎の臨床病理学的特徴には、AMAと同時に存在する機能的抗体が関係する可能性も推定される。AMA陽性筋炎の頻度は多くはないが、多様性がある筋炎の診断、治療、病態を考える上で重要な1群であると考えた。

E. 結論

AMA陽性筋炎の中には、慢性経過、筋萎縮、心筋障害、肉芽腫性炎症を持つ症例が高頻度に含まれることが明らかになった

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Maeda MH, Tsuji S, Shimizu J.
Inflammatory myopathies associated with anti-mitochondrial antibodies.
Brain. 2012 Jun;135(Pt 6):1767-77.

2. 学会発表

前田 明子、上坂 義和、辻 省次、清水 潤
抗ミトコンドリア抗体陽性筋炎症例の心臓合併症の特徴に関する検討
第24回日本神経免疫学会学術集会抄録集 p76

H. 知的財産権の出願・登録状況

(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

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Myositis Disease Activity Core Setを用いた
多発性筋炎/皮膚筋炎の疾患活動性の評価に関する研究

研究分担者 川口 鎮司 東京女子医科大学
膠原病リウマチ痛風センター 臨床教授
協力者 五野 貴久 東京女子医科大学
膠原病リウマチ痛風センター 助教

研究要旨

近年、臨床研究や治験において多発性筋炎（PM）/皮膚筋炎（DM）の疾患活動性の評価としてInternational Myositis Assessment & Clinical Studies Groupが提案しているMyositis Disease Activity Core Set（MDACS）が欧米で用いられるようになったが、本邦ではまだ普及していないため日本人のPM/DM症例でMDACSを用いて疾患活動性の評価をした。方法は、patient global assessment（PGA）、evaluator GA（EGA）、Health assessment questionnaire（HAQ）、徒手筋力テスト（MMT）、筋原性酵素（CPK）、MYOACT（筋外症状をVASで評価）、MITAX（筋・筋外症状の活動性スコア）を用いて加療前後でPM/DM12症例の疾患活動性の評価を行った。加療前後でPGA（ $P = 0.03$ ）、EGA（ $P = 0.004$ ）、HAQ（ $P = 0.03$ ）、CK（ $P = 0.04$ ）、MYOACT（ $P = 0.02$ ）、MITAX（ $P = 0.0003$ ）は統計学的に有意に改善を認めたが、MMT（ $P = 0.31$ ）は有意差が明らかでなかった。

治療後短期間においてMMTの改善度は乏しい可能性があるが、MDACSはPM/DMにおける疾患活動性を総合的に評価することが可能である。

A. 研究目的

近年、臨床研究や治験において多発性筋炎（PM）/皮膚筋炎（DM）の疾患活動性の評価としてInternational Myositis Assessment & Clinical Studies Groupが提案しているMyositis Disease Activity Core Set（MDACS）が欧米で用いられるようになったが、本邦ではまだ普及していないため日本人のPM/DMにおいてMDACSを用いて疾患活動性の評価について検討した。

B. 研究方法

2010年から2012年に当科に入院し解析可能であったPM/DM12症例でMDACSにて評価を行った。MDACSの各ドメインであるpatient global assessment（PGA）、evaluator GA（EGA）、Health assessment questionnaire（HAQ）、徒手筋力テスト（MMT）、筋原性酵素（CPK）、Myositis disease activity assessment visual analogue scales（MYOACT：筋外症状をVASで評価）、Myositis intension to treat activity index（MITAX：筋・筋外症状の活動性スコア）を用いて加療前後で疾患活動性の評価を行った。

C. 研究結果

患者背景は、PM7例、DM5例で、年齢は 50 ± 15 歳、間質性肺病変5例、心筋障害1例で、悪性腫瘍の併発を認めなかった。加療前後（平均2.2カ月間）でPGA（ $P = 0.03$ ）、EGA（ $P = 0.004$ ）、HAQ（ $P = 0.03$ ）、CPK（ $P = 0.04$ ）、MYOACT（ $P = 0.02$ ）、MITAX（ $P = 0.0003$ ）は統計学的に有意に改善を認めたが、MMTの改善（ $P = 0.31$ ）は有意差が明らかでなかった。また、各パラメータとの相関について検討した結果、PGAとEGA（ $r_s = 0.56$ ）、PGAとMMT（ $r_s = -0.58$ ）、PGAとHAQ（ $r_s = 0.84$ ）、EGAとCK（ $r_s = 0.46$ ）に有意な関係を認めた。さらに多変量解析で同定したPGAの規定因子は、HAQであった。

D. 考察

皮膚、関節、肺、心臓などのPM/DMの筋外病変の活動性の評価が、MDACSにより可能であるが、関節リウマチで用いるDAS28、CDAI、SDAIのような各コンポーネントを組み合わせた疾患活動性のスコアリングは現状では明解となっていない。また、治療後短期間においてMMTスコアの改善度が乏し

いことから、MMT の検査感度、入院安静に伴う筋力低下、ステロイドミオパチーの影響も推察され、MMT 以外の評価法を用いて PM/DM 疾患活動性を評価する必要がある。

E. 結論

MDACS は、PM/DM における疾患活動性を総合的に評価することが可能である。

F. 健康危険情報

特記なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

JCR2013 で発表予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(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

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

多発性筋炎・皮膚筋炎の筋力改善に関する非臨床研究

研究分担者 上阪 等 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 准教授
研究協力者 田形 勇輔 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

研究要旨

多発性筋炎・皮膚筋炎の標準的な治療法では、疾患活動性の低下後にも筋力低下が残存するケースがしばしば見られており、十分な筋力改善効果が得られているとは言えない。本研究では、筋炎治療における筋力低下の新たな治療法を考案するために、筋萎縮の改善効果が報告されている分岐鎖アミノ酸 (Branched-chain amino acids (BCAA)) の有効性を C protein 誘導型筋炎モデルマウス (C protein-induced myositis (CIM) マウス) を用いて検証した。筋炎治療の第一選択薬である Prednisolone (PSL) は CIM マウスの炎症を抑制したにも関わらず、筋萎縮と筋力低下への効果は乏しい結果であった。しかし、PSL に BCAA を併用することにより、炎症のみならず筋萎縮と筋力低下を予防できることが明らかとなった。本結果より、従来のステロイド治療に BCAA を併用することにより、筋萎縮を予防して筋力改善効果が得られることが期待される。

A. 研究目的

多発性筋炎・皮膚筋炎における筋力低下は、日常生活動作を障害することから患者にとっては生活の質を低下させる問題の一つであり、疾患活動性の低下後にも残ることがしばしば見受けられている。本研究班が臨床調査個人票を用いて行った調査においても、新規登録者と比較して更新者では CK が高値の割合が大幅に少ないにも関わらず筋力低下の症状が過半数で認められており、疾患活動性の低下の後にも筋力低下が残されている実態が浮彫りになった。このような筋力低下の遷延は、原疾患に起因した炎症性サイトカインによる筋萎縮や細胞傷害性 T 細胞の浸潤による筋線維壊死に加えて、ステロイド筋症を併発するなどした複合的要因で筋萎縮が進行することが原因と考えられる。現状ではステロイドの減量と運動を行いながら自然回復を待つ以外に有効な手段はないが、治療早期から筋萎縮の進行を予防することができれば治療後の筋力低下を回避することができると考えられる。そこで本研究では、筋萎縮に対する効果が報告されている BCAA を用いて、多発性筋炎モデルマウスの筋萎縮と筋力低下に対する有効性を評価した。

B. 研究方法

骨格筋の構成因子である C protein をマウスに免疫することにより筋炎を発症する CIM マウスを用いて評価を行った。CIM マウスに PSL (20 mg/kg) と BCAA (0.75 g/kg) を単剤もしくは併用して免疫後 3 日目から 20 日まで連日経口投与し、免疫後 20 日目に grip test によって前肢筋力を測定した。さらに免疫後 21 日目に、筋萎縮評価のために筋重量 (大腿四頭筋、大腿屈筋、上腕三頭筋) を測定するとともに、筋炎の炎症の程度を表す組織学的スコアを求めた。

尚、本研究は本学動物倫理委員会の認可を得て実施した。

C. 研究結果

CIM マウスでは組織学的スコアの上昇と共に筋重量の低下が認められたことより、筋炎に起因した筋萎縮が生じていることが確認された (図 1 A, B)。CIM マウスの組織学的スコアは BCAA 併用の有無に関わらず PSL によって有意に抑制され、BCAA 単剤の場合も PSL よりは弱いものの部分的な低下を認めた。一方、CIM マウスの筋重量に対しては PSL 単剤では低下予防効果がなく、BCAA を単剤もしくは PSL と併用した何れの場合にも低下を予防した。この筋重量の結果と同様に、筋力に対しても PSL 単剤と比較して BCAA の併用もしくは単剤の場合の方が有意に大きな筋力低下の予防効果を示した (図 1 C)。

D. 考察

PSL 単剤が組織学的スコアを抑制しながらも筋萎縮と筋力低下には効果がなかったことより、PSL は筋萎縮の予防効果に乏しいことが示された。その背景には、PSL が組織学的スコアを完全に抑制していないことから筋炎に起因する筋萎縮が残存している可能性や、PSL の副作用として生じるステロイド筋症の発症などの複合的な筋萎縮要因があるためと考えられる。この点において、PSL と BCAA の併用が筋萎縮と筋力低下を防いだことから、BCAA には筋炎のステロイド治療後にも残存する筋萎縮と筋力低下の予防効果があることが判明した。

BCAA にはタンパク合成を制御するキナーゼである

mTOR を活性化する作用がある。活性化した mTOR は筋タンパク合成を促進することで筋肉の肥大をもたらすことが知られており、健康人を対象にした試験にて筋量と筋力の増加をもたらすことが報告されている。加えて、mTOR の活性化はステロイドによって誘導される筋萎縮遺伝子の発現を抑制して、ステロイド筋症の発症を予防する効果があることも動物試験の結果から明らかにされている。このことから、CIM マウスの筋萎縮および筋力低下に対する BCAA の効果も、これらのメカニズムを介して得られている可能性が推察される。さらには、BCAA が単剤で CIM マウスの筋萎縮を予防した結果からは、BCAA には炎症性サイトカインによる筋萎縮の予防にも効果があると考えられる。

尚、BCAA 単剤により組織学的スコアが低下する結果が得られたが、効果の確認およびメカニズム解明の両面において更なる精査が必要と考える。

多発性筋炎・皮膚筋炎の標準的な治療に使用されているステロイドは、抗炎症作用により筋肉の炎症改善を介して筋力回復を期待するものである。BCAA はこれとは異なり、筋萎縮を予防することを介して筋力を改善する作用機序を持つものである。このことから、ステロイド治療に BCAA を併用することにより、従来の治療法では期待できなかった筋力の改善効果が期待できると考えられる。

E. 結論

PSL には効果の乏しい筋萎縮と筋力低下が、BCAA の併用により改善できることが CIM マウスの試験から明らかとなった。臨床においても、従来の標準治療の課題であった筋力低下の残存に対し、BCAA が新たな治療法として有効である可能性が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願済み(出願番号 2012-023521)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

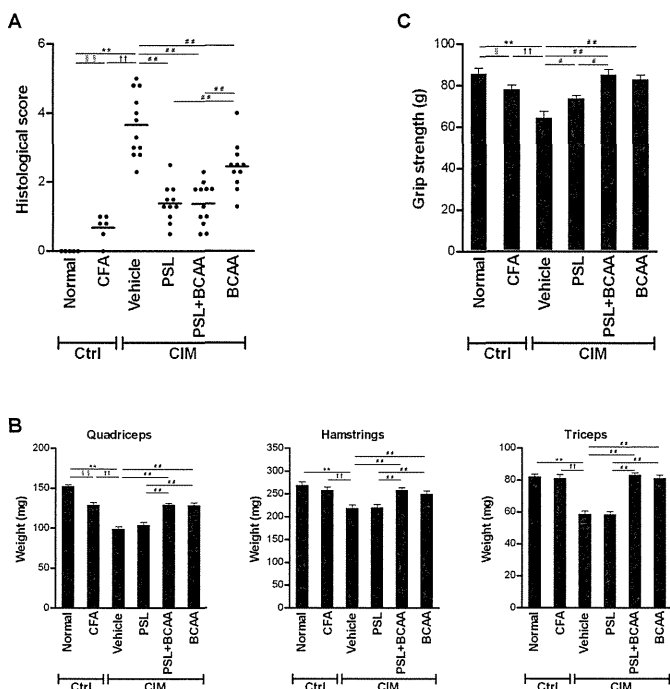


図1. CIMマウスに対するPSLとBCAAの効果

(A) 組織学的スコア 大腿四頭筋と大腿屈筋の個体ごとの平均値をプロットし、各群の組織学的スコアの平均を黒ラインにて示す。n= Normal;5, CFA;6, Vehicle;12, PSL;11, PSL+BCAA;12, BCAA;11.

(B) 筋重量 大腿四頭筋(Quadriceps)、大腿屈筋(Hamstrings)、上腕三頭筋(Triceps)の筋重量を各群の平均値±標準誤差にて示す。n= Normal;8, CFA;13, Vehicle;14, PSL;11, PSL+BCAA;12, BCAA;11.

(C) 筋力 Grip testによって測定した前肢筋力を各群の平均値±標準誤差にて示す。n= Normal;8, CFA;13, Vehicle;14, PSL;12, PSL+BCAA;12, BCAA;11.

統計解析: §はNormal群とCFA群の、*はNormal群とVehicle群の、†はCFA群とVehicle群のStudent's t test (two tails)の結果を表す(§; p<0.05, §§; p<0.01, *; p<0.05, **; p<0.01, †; p<0.05, ††; p<0.01)。#はVehicle群、PSL群、PSL+BCAA群、BCAA群間のTukey-Kramer's testの結果を表す(#; p<0.05, ##; p<0.01)。

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

IMCCP が提示した PM/DM の診断基準の妥当性に関する研究

研究分担者	石原 正一郎	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学	助教
研究協力者	太田 晶子	埼玉医科大学医学部公衆衛生学	講師
	神人正寿	熊本大学大学院皮膚病態治療再建学	講師
	上阪 等	東京医科歯科大学大学院膠原病・リウマチ内科	准教授

研究要旨

International Myositis Classification Criteria Project (IMCCP) 作成の IIM 診断基準案のうち、PM/DM の診断性能について検証作業に使用する予定の調査項目につき検討した。

(1) 現在 PM/DM の診断に用いられることが多い診断基準、Bohan and Peter の診断基準や厚生省自己免疫疾患調査研究班が発表した診断基準はいずれも 20 年以上前に作成されたものであるため、2005 年、IMCCP による診断基準作成プロジェクトが開始され、2012 年 8 月、IMCCP から IIM (Idiopathic inflammatory myopathy) の国際診断基準案 (IMCCP 案) が公表された。

我々は、特に PM/DM について新たにわが国の患者の情報を収集し、これを対象として、IMCCP によって示された IMCCP 案の妥当性を検討するとともに、IMCCP 案をどのように改善すべきかを検討することを目的とする疫学調査を開始することとした。

厚生労働省「自己免疫疾患に関する調査研究班」の研究分担者及び研究協力者の施設で診断された PM/DM 患者、および PM/DM との鑑別を要する非 PM/DM 患者を対象として既存の臨床データ (診療録) から、患者の性別、生年月、診断時年月、診断名、診断に関する所見などを収集する計画とした。目標症例数は PM/DM 患者 800 例 (PM350 例、DM400 例 (ADM50 例含む)、その他 50 例)、非 PM/DM 患者 800 例。収集データを用いて、国際診断基準案 (IMCCP 案) 他、現在わが国で使用されている診断基準等の Sensitivity、Specificity、その他診断基準の性能を示す指標を求め、診断基準の妥当性を検討し、改善方法を提案するための解析を行う計画とした。

調査項目として、IMCCP data collection sheet 記載の 109 項目から 68 項目を選択した。

今後は IMCCP 側とも協議して項目の調整を図り、調査結果については IMCCP 案の改訂にも反映されるよう働きかけてゆく予定である。

A. 研究目的

現在、PM/DM の診断基準は国際的には 1975 年に発表された Bohan and Peter の診断基準が、また国内では 1992 年に厚生省自己免疫疾患調査研究班が発表した診断基準が用いられている。いずれも 20 年以上前に作成されたものであり、診断・検査法の進歩に十分対応していないと考えられるようになっている。そこで、2005 年に International Myositis Classification Criteria Project (IMCCP) として Working group が結成され、診断基準作成プロジェクトが開始された。同プロジェクトにより大規模な症例集積が行われ、現在その解析が進められている。また、2012 年 8 月に IMCCP から IIM (Idiopathic inflammatory myopathy) の新たな国際診断基準案 (IMCCP 案) が公表され、内容についての討議が行われている。

我々は、特に PM/DM について新たにわが国の患者の情報を収集し、これを対象として、IMCCP によって示

された IMCCP 案の妥当性を検討するとともに、IMCCP 案をどのように改善すべきかを検討することを目的とする疫学調査を開始することとした。

B. 研究方法

調査対象は、厚生労働省「自己免疫疾患に関する調査研究班」の研究分担者及び研究協力者の施設で診断された PM/DM 患者、および PM/DM との鑑別を要する非 PM/DM 患者である。原則として、2008 年 1 月 1 日から 2012 年 10 月 31 日に確定診断された患者を対象としたが、いくつかの患者数が非常に多い疾患 (接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎など) については患者数の上限を設定し、解析結果に対するそれらの疾患の影響が課題とならぬよう配慮した。調査は、既存の臨床データ (診療録) から、患者の性別、生年月、診断時年月、診断名、診断に関する所見 (筋力や筋萎縮、皮疹などの診察所見、その他の臨床所見、筋生検所見、血液検査所見、筋電図所見、MRI 所

見、皮膚生検所見など)などを収集する。

また、PM/DM患者800例(PM350例、DM400例(ADM50例含む)、その他50例)、非PM/DM患者800例の収集を目標とし、調査対象施設に対して郵送あるいは電子メールを利用して調査を行う。対象となる患者について、性、生年月、患者背景、診断年月、診断名、診断に関する所見等の詳細情報を記載し、事務局に提出する。収集したデータを用いて、国際診断基準案(IMCCP案)他、現在わが国で使用されている診断基準等のSensitivity、Specificity、その他診断基準の性能を示す指標を求め、診断基準の妥当性を検討し、改善方法を提案するための解析を行う。

本研究については倫理審査手続きが進行中であり、研究期間は、倫理委員会承認から2014年3月31日までとする。

(倫理面への配慮)

本研究は既に行われた診療行為によって生じた臨床データを収集する後ろ向き研究であり、新たに検体などの収集は行わないため、被験者には不利益が生じない。プライバシーの保護に関しては、患者個人情報の収集に際して各施設に於いて匿名非連結化したデータをセンターに集積するなど、個人情報の保護に対する配慮を行う。

C. 研究結果

上記の調査に用いる項目として、IMCCP data collection sheetに記載された項目のうち、筋力等に関する23項目のうち8項目(進行性の上肢・下肢筋力低下(対称性)、頸部の屈筋群優位の筋力低下、近位優位の上肢・下肢筋力低下、遠位優位の上肢・下肢筋力低下、筋の把握痛)、皮疹に関する14項目から10項目(ヘリオトロープ疹、ゴットロン丘疹、ゴットロン徴候、Shawl徴候、V-neck徴候、四肢伸側の紅斑:肘、膝関節などの背面の軽度隆起性の紫紅色紅斑石灰沈着、爪囲紅斑あるいは爪郭部毛細血管異常、Mechanic's hands、多形皮膚萎縮)、その他の臨床所見から13項目中11項目(自己免疫疾患(記載要領にある表2)の家族歴、筋疾患(記載要領にある表3)の家族歴、発症形式が急性(2週間以内)、発症形式が亜急性(2週間を超えて2か月以内)、発症形式が慢性(2か月を超える)、(骨破壊を伴わない)関節炎、(骨破壊を伴わない)多関節痛、原因不明の発熱、間質性肺炎、嚥下障害・食道蠕動障害、ステロイド・免疫抑制剤投与による症状の改善)、筋生検関連項目では21項目中18項目(筋生検施行、タイプI・II線維の壊死・貪食・筋線維の変性、再生線維、筋線維束内への単核球浸潤(筋線維を浸潤しない)、単核球浸潤が見られる非壊死線維の存在、筋線維束周囲と/または血管周囲への単核球浸潤、Perifascicular atrophy、縁取り空胞、赤色ぼろ線維またはチトクロムc活性が消失した線維の存在、MHC class I発現の亢進した線維、

MHC class I発現が亢進した線維周囲へのCD8+細胞浸潤、小血管壁への補体の沈着、筋線維束周辺優位のMHC Class I発現亢進、血管内皮細胞の

Tubuloreticular inclusions、筋細胞内のアミロイド沈着、15-18 nm tubulofilamentsの沈着)、検査所見については31項目中14項目(血清CK値、血清ALT(ALAT/ALT/SGPT)値、血清アルドラーゼ値、赤沈(1時間)値、CRP値、抗核抗体、抗Jo-1抗体、抗SSA抗体、抗La/SSB抗体、抗ribonucleoprotein(RNP)-70K(U1RNP)抗体、抗Centromere B(ACA抗体)、抗Topoisomerase-1/Sc170抗体、抗Sm抗体、抗CCP抗体)と指定外の抗dsDNA抗体、筋電図所見については3項目全て(筋電図施行の有無、線維自発電位・陽性鋭波・complex repetitive dischargesなどの所見、短持続・低電位な多相性運動単位活動電位(MUAPs))、MRI所見については3項目中2項目(MRI施行の有無、STIRまたはT2WIでの筋浮腫)、皮膚生検については2項目(皮膚生検施行の有無、皮膚筋炎に合致する所見の有無)あったものをそのまま採用し、調査項目と定めた。

D. 考察

今後は調査項目や対象症例数の妥当性について筋炎分科会内や自己免疫班内で討議し、また、Karolinska研究所のAnna TjärnlundとMatteo Bottaiなどとも協議し、調査項目について更なる検討を行い、調査結果についてはIMCCP案の改訂にも反映されるよう働きかけてゆく予定である。

E. 結論

IMCCP作成のIIM診断基準案のうち、PM/DMの診断性能について検証作業に使用する予定の調査項目につき検討した。

F. 健康危険情報

本研究は各施設において既に行われた過去の診療行為によって生じた臨床データを収集する後ろ向き研究であり、新たに検体などの収集は行わないため、被験者には健康被害などの不利益は生じておらず、今後も生じる可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (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

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

M3R を分子標的とした自己免疫性唾液腺炎に関する研究 II

分担研究者 住田 孝之
筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー） 教授
研究協力者：飯塚 麻菜、浅島 弘充、坪井 洋人、松本 功
筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）

研究要旨

シェーグレン症候群(SS)患者血清中にムスカリン作働性アセチルコリン受容体 3(M3R)に対する自己抗体が存在すること、末梢血単核球に M3R 反応性 CD4+T 細胞が存在することを明らかにしてきた。本研究では、M3R 分子に対する免疫応答が自己免疫性唾液腺炎発症を誘導するか否かを検討する事を目的とした。M3R-/-マウスに M3R ペプチドを免疫しその脾細胞を Rag-1-/-マウスに経静脈的に細胞移入した。その結果、1) M3R-/-→Rag-1-/-マウスにおいて唾液腺炎が認められ、その主体は CD4+T 細胞であった、2) M3R 反応性 T 細胞の移入により唾液腺炎が誘導された、3) 唾液腺に INF- γ および IL-17 発現が認められ、M3R 反応性 T 細胞から IFN- γ および IL-17 が有意に産生されていた、4) M3R-/-xIFN- γ -/-→Rag-1-/-マウス (IFN- γ 欠損マウス) では唾液腺炎スコアが有意に低下していた、5) M3R の主要 T 細胞エピトープは、N 領域および細胞外第一ドメインであった、6) M3R の細胞外第一ドメインの変異ペプチド候補、などを明らかにしてきた。以上の研究成果から、M3R を認識する T 細胞が SS 類似の自己免疫性唾液腺炎発症に必須であり、IFN- γ および IL-17 ともに発症に重要であることが判明した。今後、M3R の主要 T 細胞エピトープ (N 領域、細胞外第一ドメイン) に対するアナログペプチドを選択し、自己免疫性唾液腺炎の抗原特異的制御法を開発する。

A. 研究目的

免疫難病の一つであるシェーグレン症候群 (SS) の発症機序に、唾液腺に浸潤した自己反応性 T 細胞が重要な役割を果たしている。特に、ムスカリン作働性アセチルコリン受容体 M3 (M3R) に対する T 細胞は唾液腺破壊に関わるばかりでなく、サイトカイン産生を介して抗 M3R 自己抗体を誘導している。本研究では、M3R 分子を標的とした免疫応答がシェーグレン症候群様の自己免疫性唾液腺炎を誘導するか否かを検討する事および抗原特異的制御戦略の確立を目的とした。

B. 研究方法

- 1) M3R-/-マウス (B6 バック) に、M3R の各領域をコードした合成アミノ酸、N 領域、細胞外第一ドメイン、細胞外第二ドメイン、細胞外第三ドメインを合成して day0 および day10 に腹腔内に免疫した。初回免疫 20 日後の脾細胞を Rag1-/-マウス (B6 バック) に経静脈的に投与した。M3R-/-→Rag-1-/-マウスから day45 に唾液腺を取り出し H-E 染色により組織学および免疫組織化学的解析を施行した。
- 2) M3R-/-マウスより採取した脾細胞を flowcytometry で CD3+細胞と CD3-細胞とに分離し、それぞれを Rag-1-/-マウスに細胞移入して唾液腺炎の有無について検討した。
- 3) M3R-/-→Rag-1-/-マウスの唾液腺における IFN- γ 、

IL-17 発現を IF で検討した。さらに in vitro で M3R ペプチドと共培養して産生サイトカインを ELISA 法で測定した。

- 4) M3R-/-xIFN- γ -/-→Rag-1-/-マウス および M3R-/-xIL-17-/-→Rag-1-/-マウスにおいて唾液腺組織の解析、および M3R 反応 T 細胞からの IFN- γ 、IL-17 産生を検討した。
- 5) M3R の T 細胞エピトープを決定するために M3R-/-マウスに M3R mix ペプチドを免疫し、各領域に対する T 細胞からのサイトカイン産生を検討した。
- 6) 主要な T 細胞エピトープの変異ペプチドを作成しアナログペプチド (APL) を in vitro で選定した。

(倫理面への配慮)

ヒトの検体を使用する際には、大学の倫理委員会の承認を得た上で、患者さんにインフォームド・コンセントを施行し、十分に研究内容を理解してもらい、本人の同意を得た上で研究を実行した。マウスの実験においては疼痛を与えないために麻酔科で対処した。

C. 研究結果

- 1) 単核球を主体とした細胞浸潤、唾液腺腺房の破壊が認められた。浸潤細胞の多くは、Thy-1+CD4+T 細胞であり、一部に B 細胞浸潤および IgG の沈着が認められた。
- 2) CD3+細胞を単独移入したマウスにおいて有意な唾

唾液腺炎が認められたが、CD3⁺細胞のみの細胞移入マウスでは唾液腺炎は認められなかった。

3) 唾液腺に INF- γ および IL-17 発現が認められ、M3R 反応性 T 細胞から INF- γ および IL-17 が有意に産生されていた。

4) M3R^{-/-}xIFN- γ ^{-/-}Rag-1^{-/-}マウスでは唾液腺炎スコアが有意に低下していた。

5) M3R の N 領域および第一細胞外ドメインを認識する T 細胞から INF- γ および IL-17 産生が認められた。

6) 現在、第一細胞外ドメインの APL を選定中。

D. 考察と結論

M3R^{-/-}と Rag-1^{-/-}の二つのノックアウトマウスを使用することにより、シェーグレン症候群様の自己免疫性唾液腺炎を惹起する事に成功した。M3R 分子に対する T 細胞応答は自己免疫性唾液腺炎発症に必須であり、INF- γ および IL-17 の両方がその発症に関わっている事、および M3R の T 細胞エピトープが N 領域と第一細胞外ドメインに存在することが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ito S, Ogishima H, Kondo Y, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Sumida T: Early diagnosis and treatment of steroid-induced diabetes mellitus in patients with rheumatoid arthritis and other connective tissue diseases. Mod Rheumatol (in press).

2. Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Tomonori I, Horita T, Saito K, Okamoto A, Nishimoto N, Myouzen K, Hirakata M, Sumida T, Takasaki Y, Yamada R, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Yamamoto K: An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes. Rheumatology (in press).

3. Umeda N, Matsumoto I, Ito I, Kawasaki A, Tanaka Y, Inoue A, Tanaka Y, Tsuboi H, Suzuki T, Hayashi T, Ito S, Tsuchiya N, Sumida T: Anti-citrullinated glucose-6-phosphate isomerase peptide antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with HLA-DRB1 shared epitope alleles and disease activity. Clin Exp Immunol (in press).

4. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T: Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjogren's syndrome in Japanese patients. Mod Rheumatol (in press).

5. Horikoshi M, Goto D, Seiji Segawa, Yohei Yoshiga,

Keiichi Iwanami, Asuka Inoue, Yuki Tanaka, Matsumoto I, Sumida T: Activation of invariant NKT cells with glycolipid ligand α -galactosylceramide ameliorates glucose-6-phosphate isomerase peptide-induced arthritis. PLoS One;7(12):e51215,2012.

6. Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M, Asashima H, Matsumoto I: Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. Mod Rheumatol (in press).

7. Iizuka M, Tsuboi H, Matsuo N, Kondo Y, Asashima H, Matsui M, Matsumoto I, Sumida T: The crucial roles of IFN-g in the development of M3 muscarinic acetylcholine receptor induced Sjogren's syndrome-like sialadenitis. Mod Rheumatol (in press).

8. Sumida T, Iizuka M, Asashima H, Tsuboi H, Matsumoto I: Pathogenic role of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor immune response in Sjogren's syndrome. Presse Med;41(9 Pt 2):e461-6,2012.

9. Suzuki T, Horikoshi M, Sugihara M, Hirota T, Ogishima H, Umeda N, Kondo Y, Tsuboi H, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Sumida T: Therapeutic efficacy of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor inhibitors: One year follow-up by low-field extremity MRI. Mod Rheumatol (in press).

10. Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Tanaka Y, Mihara M, Takahashi S, Sumida T: TIARP (TNFAIP9) deficiency leads to arthritis via IL-6 overproduction with enhanced NF- κ B, STAT3 signaling and dysregulated apoptosis of macrophages. Arthritis Rheum;64(12):3877-85,2012.

11. Ishiguro N, Yamamoto K, Katayama K, Kondo M, Sumida T, Mimori T, Soen S, Nagai K, Yamaguchi T, Hara M, Igaratimod-Clinical Study Group: Concomitant iguratimod therapy in patients with active rheumatoid arthritis despite stable doses of methotrexate: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Mod Rheumatol (in press).

12. Tsuboi H, Matsuo N, Iizuka M, Tsuzuki S, Kondo Y, Tanaka A, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T: Analysis of IgG4 class switch-related molecules in IgG4-related disease. Arthritis Res Ther;14(4):R171,2012.

13. Anami A, Fukushima K, Takasaki Y, Sumida T, Waguri M, Murashima A, Wake N: The predictive value of SS-A antibody titration in pregnant women with fetal congenital heart block. Mod Rheumatol (in press).

14. Yamaguchi T, Ito S, Takano Y, Umeda N, Goto M, Horikoshi M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T: A case of a disseminated sporotrichosis patient treated with prednisolone, immunosuppressants, and tocilizumab under the diagnosis of rheumatoid arthritis.

Intern Med;51(15):2035-9,2012.

15.Hashizume M, Yoshida H, Tanaka K, Suzuki M, Matsumoto I, Sumida T, Mihira M: Interleukine-6 regulates anti-arthritic effect of methotrexate via the reduction of SLC19A1 expression in mouse arthritis model. Arthritis Res. Ther;14(2):R96,2012.

16.Sakai R, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Atsumi T, Koike T, Nakajima A, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Tohma S, Sugihara T, Ueki Y, Hashiramoto A, Kawakami A, Hagino N, Miyasaka N, Harigai M, for the REAL Study Group: Drug retention rates and relevant risk factors for drug discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving anti-cytokine therapy with different target molecules. Ann Rheum Dis ; 71(11): 1820-1826, 2012.

17.Sakai R, Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Nakajima A, Atsumi T, Koike T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Tohma S, Tamura N, Fujii T, Sugihara T, Kawakami A, Hagino N, Ueki Y, Hashiramoto A, Nagasaka K, Miyasaka N, Harigai M, for the REAL Study Group: Time-dependent increased risk for serious infection from continuous use of TNF antagonists during three years in rheumatoid arthritis patients. Arthritis Care Res;64(8):1125-1134,2012.

18.Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N: Association of PRRF1-IRF7 region polymorphism with clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a Japanese population. Lupus; 21(8): 890-5, 2012.

19.Hasebe N, Kawasaki A, Ito I, Kawamoto M, Hasegawa M, Fujimoto M, Furukawa H, Tohma S, Sumida T, Takehara K, Sato S, Kawaguchi Y, Tsuchiya N: Association of UBE2L3 polymorphisms with diffuse cutaneous systemic sclerosis in a Japanese population. Ann Rheum Dis; 71(7): 1259-60, 2012.

20.Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Yoshino T, Nakamura S, Kawa S, Hamano H, Kamisawa T, Shimosegawa T, Shimatsu A, Nakamura S, Ito T, Notohara K, Sumida T, Tanaka Y, Mimori T, Chiba T, Mishima M, Hibi T, Tsubouchi H, Inui K, Ohara H: Comprehensive Diagnostic Criteria (CDC criteria) for IgG4-related disease (IgG4-RD),2011. Mod Rheumatol;22:21-30,2012.

21.Tanaka Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Umeda N, Tanaka Y, Sugihara M, Hayashi T, Ito S, Sumida T: Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4 (STEAP4) is expressed on monocytes/neutrophils, and is regulated by TNF antagonist in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol;30(1):99-102,2012.

22.Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M,

Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Sumida T, Mimori T, Tanaka Y, Tsubota Y, Toshino T, Kawa S, Suzuki R, Takegami T, Tomosugi N, Kurose N, Ishigaki Y, Azumi A, Kojima M, Nakamura S, Inoue D: A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4RD): general concept and details. Mod Rheumatol; 22(1): 1-14,2012.

23.Tsuboi H, Nakamura Y, Iizuka M, Matsuo N, Matsumoto I, Sumida T: Generation and functional analysis of monoclonal antibodies against the second extracellular loop of human M3 muscarinic acetylcholine receptor. Mod Rheumatol; 22(2): 264-271, 2012.

24.Kondo Y, Iizuka M, Wakamatsu E, Yao Z, Tahara M, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Yoh K, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T: Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis. Arthritis Rheum; 64: 162-172, 2012.

25.Tanaka Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Minami R, Umeda N, Kanamori A, Ochiai N, Miyazawa K, Sugihara M, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sumida T: Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4(STEAP4) is TNFalpha-induced protein that regulates IL-6, IL-8, and cell proliferation in synovium from patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol; 22:128-136,2012.

26.Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed W O, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K: A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese. PLoS Genet;8(1): e1002455,2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得
申請準備中
2. 実用新案登録：なし
3. その他：特記事項なし

図1 M3R^{-/-}→Rag-1^{-/-}マウスにおける唾液腺組織 (H-E 染色) と免疫化学染色像

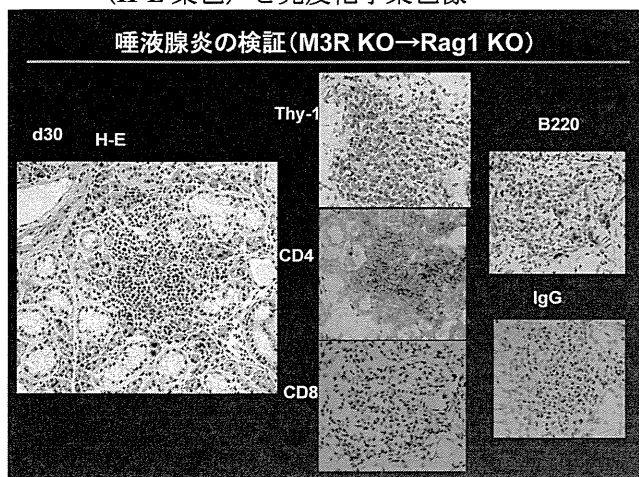


図2 M3R^{-/-}CD3⁺→Rag-1^{-/-}マウスにおける唾液腺組織像 (H-E 染色、免疫化学染色、Tunel 染色)

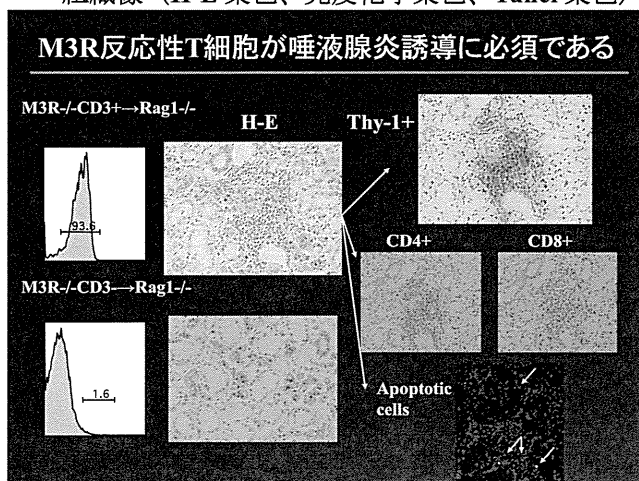


図3 M3R^{-/-}→Rag-1^{-/-}マウス唾液腺組織における IL-17、IFN- γ 発現

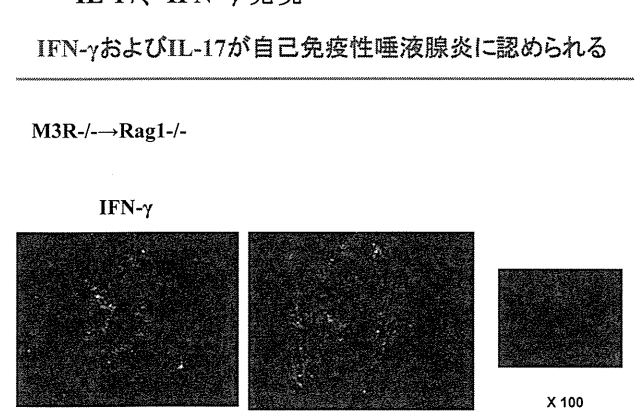


図4 M3R^{-/-}xIFN- γ ^{-/-}マウスにおける唾液腺組織 (H-E 染色) および M3R 反応性 T 細胞からの サイトカイン産生

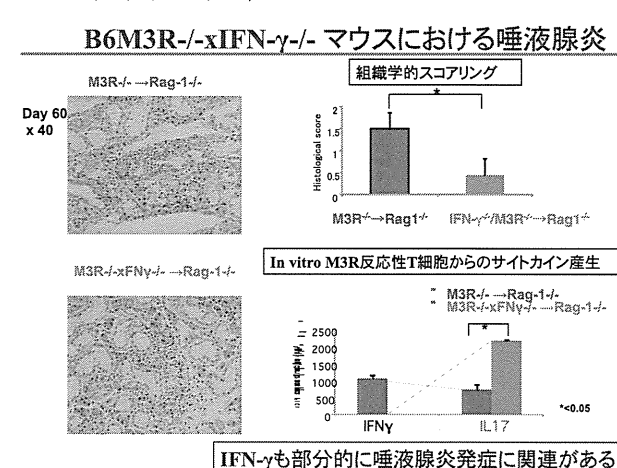


図5 M3R における主要 T 細胞エピートープ解析

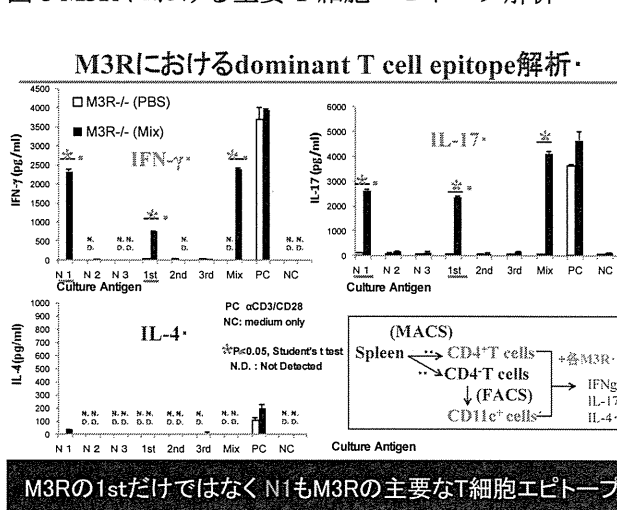


図6 M3R 細胞外第一ドメインの変異ペプチド候補

Methods 2-2 M3R 第1細胞外領域における APL 候補のデザイン

1st FTTYIMNRWALGNLACDLW

M3R 1st	I M N R W A L G N L A C D L W	IC50	8種類
APL1	- - - - F - - - - -	72.78	APL①
APL2	- - - - Y - - - - -	72.78	APL②
APL3	- - - - V - - - - -	114.55	APL③
APL4	- - - - L - - - - -	149.62	
APL5	- - - - I - - - - -	192.75	
APL6	- - - - M - - - - -	139.00	
APL7	- - - - A - - - - -	69.82	APL④
APL8	- - - - V - - - - -	81.28	APL⑤
APL9	- - - - V - - - - -	227.51	APL⑥
APL10	- - - - L - - - - -	242.10	APL⑦
APL11	- - - - I - - - - -	397.19	
APL12	- - - - M - - - - -	227.51	APL⑧

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞における Toll-like receptor3 による細胞死調節
シグナルに関する研究

研究分担者 川上 純 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学
講座（第一内科） 教授
研究協力者 中村 英樹 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学
講座（第一内科） 講師
寶來 吉朗 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学
講座（第一内科） 大学院生

研究要旨

培養唾液腺上皮細胞（SGEC）には TLR3 でアポトーシスが誘導される。今回、TLR3 を介したアポトーシスにおける会合分子である TRIF やその下流シグナル（Rip, FADD, caspase 8 など）およびリン酸化 Akt の発現を、in vivo 条件としてシェーグレン症候群（SS）および正常コントロール（NC）口唇小唾液腺の免疫組織染色により確認し、in vitro 条件としては、口唇小唾液腺生検から得られた SGEC を用いて評価した。組織学的には（in vivo）、SS における TLR3 に関連する唾液腺細胞死関連蛋白のうち、TRIF、RIPK3 の発現は観察されたが、p-FADD/caspase-8 の発現は SS では殆どみられなかった。一方、TLR3 リガンド poly:IC 刺激により、SGEC では、cleaved caspases を含め、これらの蛋白発現は明らかに誘導された。以上の結果より、SS 唾液腺 in vivo では、細胞死を抑制する機構が働いていることが示唆された。

A. 研究目的

私たちはシェーグレン症候群（SS）における唾液腺細胞死に拮抗する分子として PI3K-Akt 経路の関与、および Toll 様受容体（TLR）のなかで TLR2-4 の唾液腺組織での発現を報告した。これに加え、TLR3 のリガンドである poly:IC によって培養唾液腺上皮細胞（SGEC）死を誘導できることも明らかとなったため今回は TLR3 下流の分子発現について検討した。

B. 研究方法

TLR3 を介したアポトーシスにおける会合分子である TRIF やその下流シグナル（RIPK, FADD, caspase 8 など）およびリン酸化 Akt の発現を、SS および正常コントロール（NC）口唇小唾液腺の免疫組織染色により確認した。リン酸化 Akt についてはどの分子と共発現しているか、蛍光組織染色で確認した。組織染色での発現が確認できた分子については SGEC を用いて、TLR3 のリガ

ンドである poly:IC 刺激時（24 時間）での発現を蛍光染色および WB 法で検討している。

（倫理面への配慮）

口唇唾液腺の本研究への使用にあたっては、長崎大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得ており、患者へのインフォームド・コンセント取得した症例のみ研究に参画している。

C. 研究結果

陽性コントロールの肝細胞癌組織での TLR3 下流シグナル TRIF、RIPK3、p-FADD、cleaved-caspase-8 の発現を確認した。SS 唾液腺（n=11）では TRIF は浸潤単核球に密に発現し、NC（n=5）では軽度の発現であった（図 1）。一方 RIPK3 は SS 導管に軽度発現し、NC では見られなかった。一方 p-FADD/caspase-8 の発現は SS/NC とも殆どみられなかった。SGEC を poly:IC で 24 時間刺激した蛍光染色では、TRIF は刺激後減弱し（図 2）、RIPK3/p-FADD/cleaved-caspase8 は増強していた（図 3、図 4）。WB においても poly:IC 刺激後の

SGEC ライセートにおけるこれらの分子発現を検討中である。

D. 考察

TLR3 下流分子では、TRIF のみ他分子とは異なる分布を示した。SGEC を poly:IC 刺激した結果からは、caspase-3 へ向かうアポトーシスシグナルが動いていることが確認されたが、SS 組織では p-FADD/caspase-8 の発現が減弱していることから、in vivo においては下流の細胞死シグナルが抑制されている可能性が示唆された。

E. 結論

SS 唾液腺組織 (in vivo)、SGEC (in vitro) における TLR3 下流シグナルには発現の差が観察された。これらの結果よりアポトーシスから細胞を保護する PI3K-Akt 経路や他の生存シグナルの関与について検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura H, Horai Y, Suzuki T, Okada A, Ichinose K, Yamasaki S, Koji T, Kawakami A. TLR3-mediated apoptosis and activation of phosphorylated Akt in the salivary gland epithelial cells of primary Sjögren's syndrome patients. *Rheumatol Int.* 2012 Mar 29. [Epub ahead of print]
2. Origuchi T, Yano H, Nakamura H, Hirano A, Kawakami A. Three cases of IgG4-related orbital inflammation presented as unilateral pseudotumor and review of the literature. *Rheumatol Int.* 2012 Nov 9.
3. Nakamura H, Horai Y, Tokuyama A, Yoshimura S, Nakajima H, Ichinose K, Yamasaki S, Nakamura T, Hayashi T, Kawakami A. HTLV-I virological and histopathological analysis in two cases of anti-centromere-antibody-seropositive Sjögren's syndrome. *Mod Rheumatol.* 23 (1): 133-139, 2013.

4. Ohyama K, Kawakami A, Tamai M, Baba M, Kishikawa N, Kuroda N. Serum immunocomplex containing thrombospondin-1: a novel biomarker for early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012 Nov;71(11):1916-7.

2. 学会発表

1. 早期関節炎の鑑別診断. 川上 純. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012 年 4 月.
2. HTLV-1 関連脊髄症及び抗セントメア抗体陽性シェーグレン症候群を合併した多発性筋炎」の 1 例. 寶來吉朗, 住吉玲美, 中島好一, 鈴木貴久, 岡田覚丈, 川尻真也, 一瀬邦弘, 玉井慎美, 山崎聡士, 中村英樹, 折口智樹, 川上 純. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012 年 4 月.
3. IgG4 関連眼窩疾患 3 例の検討. 折口智樹, 中島好一, 鈴木貴久, 岡田覚丈, 川尻真也, 有馬和彦, 玉井慎美, 山崎聡士, 中村英樹, 江口勝美, 川上 純. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012 年 4 月.
4. IgG4 関連疾患とシェーグレン症候群が併存した 1 例. 中島好一, 西野文子, 住吉玲美, 鈴木貴久, 寶來吉朗, 岡田覚丈, 川尻真也, 一瀬邦弘, 玉井慎美, 山崎聡士, 中村英樹, 折口智樹, 川上 純. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012 年 4 月.
5. 抗 HTLV-1 抗体および抗セントロメア抗体陽性シェーグレン症候群 2 症例の検討: HAM と HTLV-1 キャリアの比較から. 中村英樹, 寶來吉朗, 川上 純. 第 21 回日本シェーグレン症候群学会学術集会. 2012 年 9 月.
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

唾液腺の病態形成に関わる T 細胞サブセットの解析に関する研究

研究分担者 中村 誠司 九州大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座（教授）

研究要旨

われわれは従来、シェーグレン症候群(SS)の病態形成と T 細胞サブセットとの関連に注目してきたが、過去の研究結果から、Th2 細胞が SS の病態進展に関与していることを報告している。近年新しく同定された IL-33 が、その受容体である ST2 を介して Th2 細胞を活性化し、Th2 サイトカイン産生を誘導することが報告されている。そこで本研究では、SS の病態形成と IL-33 との関連について検討を行った。これらの結果より、SS の唾液腺障害によって導管上皮から分泌された IL-33 は、ST2 を発現している Th2 細胞に作用し、Th2 サイトカインの産生が誘導され、SS の病態進展に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

シェーグレン症候群(SS)は、唾液腺などの外分泌腺が特異的に障害を受ける自己免疫疾患である。病理組織学的には導管周囲のリンパ球浸潤や腺房細胞の線維化を特徴とする。その病因・病態進展については、TM 細胞の関与が多数報告されているが、今だ不明な点が多い。過去の研究でわれわれは、SS の病態進展に Th2 が産生する IL-4 などのサイトカインが重要な役割をしていることを報告している。近年新しく同定された IL-33 は、受容体である ST2 を介して Th2 細胞を活性化し、Th2 サイトカイン産生を誘導するとされていることから、本研究では IL-33 の発現と局在について検討を行った。

B. 研究方法

SS 患者 15 例、健常者 15 例を対象とし、口唇腺における IL-33、ST2、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13)、の発現について real-time PCR 法および免疫組織化学染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は生体材料を使用するため、主治医が説明文書を使用して患者に説明し、患者及び家族から書面で同意書を得る。解析結果の論文などでの公表に際しては、患者の個人を識別できる情報は公表しない。個人情報保護のため、検体は符号により匿名化し、符号を結びつける対応表および個人情報は実験責任者が厳重に保管する。

C. 研究結果

SS 患者は健常者と比較して、ST2 と Th2 サイトカインの mRNA 発現の亢進を認めたと、IL-33 は有意な差はなかった。免疫組織化学染色にて各分子の発現と局在を確認したところ、健常者では IL-33 のみ導管上皮内に発現を認め、ST2 と Th2 サイトカインの発現はほとん

ど認めなかった。一方、SS 患者ではリンパ球の浸潤が軽度の症例では、健常者と同様に IL-33 のみ導管上皮内に発現を認めたが、重度の症例で導管上皮だけではなく、その周囲にも発現を認め、導管周囲に ST2 と TH2 サイトカインの強い発現を認めた。

D. 考察

これらの結果より、SS の唾液腺導管上皮が障害されると、導管上皮から分泌された IL-33 が、導管周囲の Th2 細胞に ST2 を介して作用し Th2 サイトカイン産生を惹起している可能性が示唆された

E. 結論

現在 SS の治療法は根治的治療はなく、対症療法が主体である。ステロイド投与は病態進展を予防するとされているが、長期投与は骨粗鬆症などの副作用のため、使用は限定的である。本研究の結果から、IL-33 の中和抗体などの抗サイトカイン療法が開発されれば、SS の新たな治療に貢献できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maehara T, Moriyama M, Nakashima H, Miyake K, Hayashida JN, Tanaka A, Shinozaki S, Kubo Y, Nakamura S. Interleukin-21 contributes to germinal centre formation and immunoglobulin G4 production in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. Ann Rheum Dis. 2012;71:2011-2020.
- 2) Maehara T, Moriyama M, Hayashida JN, Tanaka A,

Shinozaki S, Kubo Y, Matsumura K, Nakamura S.
Selective localization of T helper subsets in labial
salivary glands from primary Sjögren's syndrome
patients. Clin Exp Immunol. 2012 Aug;169(2):89-99.
3) Moriyama M, Hayashida JN, Toyoshima T, Ohyama Y,
Shinozaki S, Tanaka A, Maehara T, Nakamura S.
Cytokine/chemokine profiles contribute to
understanding the pathogenesis and diagnosis of
primary Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol.
2012;169(1):17-26.

2. 学会発表

- 1) ○Sachiko Furukawa, Masafumi Moriyama,
Jun-Nosuke Hayashida, Akihiko Tanaka
Takashi Maehara, Keiko Ohyama, Kubo Yoshiaki,
Shinsuke Ieda, and Seiji Nakamura "IL-33 promotes
the pathogenesis of Sjögren syndrome and Mikulicz's
disease." Japanese Association for Dental Research,
Niigata, December 13, 2012
- 2) ○森山雅文 シンポジウム「シェーグレン症候群の
病態形成における Th サブセットの関与」第 21 回日本
シェーグレン症候群学会、京都、2012. 9. 8
- 3) ○森山雅文、清水真弓、田中昭彦、前原隆、中村誠
司 「ドライマウスならびに関連疾患の診断基準の up
to date」第 11 回九州シェーグレン症候群研究会、福
岡、2012. 5. 26
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(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

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

シェーグレン症候群における口腔内病変と唾液中 EGF の関係に関する研究

研究分担者 佐野 統 兵庫医科大学医学部医学科 リウマチ・膠原病科（職名）主任教授
研究協力者 東 直人 兵庫医科大学医学部医学科 リウマチ・膠原病科（職名）助教

研究要旨

平成 23 年度当会議において我々は SS では進行に伴い唾液分泌量のみではなく唾液中 EGF 分泌量が低下し、SS ではこの「唾液の質」の低下が口腔内病変の修復の遷延化による口腔内病変の難治化や、それに伴う口腔内 QOL の低下と関連する可能性がある」と提唱した。本年は SS 患者における唾液中 EGF の動態と口腔内 QOL の変化および病期との関連性について解析した。その結果、SS では唾棄量分泌の低下が発症早期から見られるが、進行とともにそれに遅れて唾液中 EGF 分泌量が低下する。この唾液中 EGF の低下と口腔内 QOL の低下の間に強い関連性が確認され、唾液中 EGF 低下という唾液の「質」の低下が加わることが SS における口腔内 QOL の低下が明らかに増強すると考えられた。

A. 研究目的

シェーグレン症候群（SS）患者では口腔乾燥症状に加え、口腔粘膜の萎縮、難治性口内炎、舌乳頭平低化などを生じ、口腔内の疼痛や強い不快感を伴い quality of life (QOL) が著しく低下する。このような口腔内病変の形成は、主に唾液分泌量の減少による口腔内クリアランスの低下に起因すると考えられている。しかし、唾液には種々の生理機能作用があり、その障害が病態形成に関与している可能性があると考えた。

Epidermal growth factor (EGF) は上皮細胞の細胞分裂と増殖を促進する分子量約 6kDa のサイトカインである。人体では唾液腺（特に耳下腺）と十二指腸のブルネル腺で主に産生され、消化管粘膜の保護作用や組織修復に促進的な役割を果たすとされる。我々は平成 23 年度当会議において SS では進行に伴い唾液分泌量のみではなく、唾液中 EGF 分泌量が低下することを報告した。SS ではこのような「唾液の質」の低下が口腔内病変の修復の遷延化による口腔内病変の難治化や、それに伴う口腔内 QOL の低下と関連する可能性がある」と提唱した。

今回我々は、SS 患者における唾液中 EGF の動態と口腔内 QOL の変化および病期との関連性について解析し、SS における口腔内病変の形成と唾液中 EGF の関連性を検討することによって、将来の治療介入の可能性を追求する。

B. 研究方法

対象は兵庫医科大学リウマチ・膠原病科（以下当科とする）受診中の SS 患者 61 人から口腔内病変の形成、唾液や EGF の分泌、口腔内 QOL に影響し得る要因（喫煙者、歯科治療中の者、SS 以外の病態のため口内炎などの口腔粘膜病変を有する者、抗パーキンソン薬・抗

うつ薬・抗不安薬などを服用している者、コントロール不良の糖尿病に罹患している者、コントロール不良の逆流性食道炎に罹患している者、頭頸部悪性腫瘍の既往のある者、頭頸部に放射線照射を受けたことがある者など）を有する者を除外した 40 人とコントロール群として非 SS 患者 23 人である（非 SS 群）。尚、SS 症例は本邦厚生省研究班による改訂診断基準（1999 年）およびアメリカ・ヨーロッパ基準（2002 年）をともに満たす症例とした。SS 群は原発性 SS（1° SS）が 27 人、続発性 SS（2° SS）が 13 人であり、2° SS における併存疾患の詳細内訳は関節リウマチ（RA）4 人、全身性エリテマトーデス（SLE）3 人、全身性強皮症 3 人、CREST 症候群 1 人、皮膚筋炎（DM）1 人、混合性結合組織病 1 人であった。また、非 SS 群の詳細内訳は健常者 3 人、RA7 人、リウマチ性多発筋痛症 4 人、好酸球増多症 2 人、気管支喘息 2 人、再発性多発性軟骨炎 1 人、SLE1 人、DM2 人、胸鎖関節炎 1 人、サルコイドーシス 1 人、成人発症ステイル病 1 人であった（複数の疾患を重複している症例あり）。

（1）唾液採取および唾液中 EGF 測定

全症例で早朝起床直後（朝食前かつ内服薬服用前）に同一のチューインガム（フリーズーングム（ハイミント）；ロッセ）を用いたガム試験で得た刺激下全唾液を採取した。この唾液試料を遠心分離して得られた上清を -20℃ で凍結保存し、EGF 濃度の測定直前に融解後再度遠心分離して得られた上清を使用して、EGF 濃度を ELISA 法（Quantikine; R & D System, Minneapolis, MN）で測定した。

（2）口腔内病変・QOL の定量的評価

口腔内病変・QOL の定量的評価法として、口腔内 QOL の指標として諸外国で活用されている OHIP（Oral