

- Chin K, Nagai S, Mimori T, Mishima M.: The prognostic value of HRCT in myositis-associated interstitial lung disease. *Respir Med.* 2013 May;107(5):745-52.
- 6) Muro Y, Sugiura K, Nakashima R, Mimori T, Akiyama M.: Low prevalence of anti-DFS70/LEDGF antibodies in patients with dermatomyositis and other systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol.* 2013 Jan;40(1):92-3.
- 7) Shoji T, Bando T, Fujinaga T, Chen F, Sasano H, Yukawa N, Mimori T, Date H: Living-donor lobar lung transplantation for rapidly progressive interstitial pneumonia associated with clinically amyopathic dermatomyositis: report of a case. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 61(1):32-4, 2013.

2.学会発表

- 1) Yuji Hosono, Ran Nakashima, Yoshitaka Imura, Naoichiro Yukawa, Hajime Yoshifuji, Motomu Hashimoto, Koichiro Ohmura, Takao Fujii and Tsuneyo Mimori : The onset of myositis with myositis-specific autoantibodies (MSAs) are associated with the seasons. EULAR Madrid June 12-15. 2013

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

自施設膠原病患者における抗 EJ 抗体の臨床的意義に関する研究

研究分担者 室 慶直 名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚結合組織病態学 准教授
研究協力者 杉浦一充 名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚病態学 准教授
研究協力者 秋山真志 名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚病態学 教授

研究要旨

皮膚筋炎 (DM) / 多発性筋炎 (PM) における疾患マーカー自己抗体のうちアミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) に対する自己抗体は抗 Jo-1 抗体をはじめとする 6 種類の抗体についてよく知られている。いずれの抗体陽性例も間質性肺疾患 (ILD)・関節炎・筋炎などを有することが特徴と言われていたが、6 種類の抗体陽性例はそれぞれ異なる臨床的側面を有することもわかってきた。今回は、その中でも比較的 PM や ILD よりも DM に出現することが多いとされる抗 EJ 抗体について、ELISA による測定法を確立し、自施設を受診した膠原病患者における同抗体の臨床的意義を調べた。その結果、同抗体は DM、PM、ILD のいずれの症例にも存在したが、抗体価との関連では ILD との関係が示唆された。今後は抗体の臨床的意義をより明確にしていくために、このアッセイ系を用いて経時検体を多数調べていく必要がある。

A. 研究目的

皮膚筋炎 (DM) / 多発性筋炎 (PM) における疾患マーカー自己抗体が続々と新たに同定され、それらと DM/PM の患者病型が非常によく相関することから、臨床的意義が重要視されている。アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) に対する自己抗体は抗 Jo-1 抗体をはじめとする 6 種類の抗体についてよく知られている。いずれの抗体の陽性例も間質性肺疾患 (ILD)・関節炎・筋炎などを有することが特徴と言われていたが、6 種類の抗体陽性例はそれぞれ異なる臨床的側面を有することもわかってきた。今回は、その中でも比較的 PM や ILD よりも DM に出現することが多いとされる抗 EJ 抗体について、ELISA による測定法を確立し、名古屋大学皮膚科を受診した膠原病患者における同抗体の臨床的意義を調べた。また、抗 EJ 抗体の産生機序を探っていく目的で、胎児肺線芽細胞における EJ 抗原の発現とサイトカインの関係についても調べた。

B. 研究方法

名古屋大学附属病院皮膚科を受診した 453 例の膠原病患者を対象とした。DM は 19 例の clinically amyopathic DM (CADM) を含めた 85 例、PM は 10 例で、ILD が 14 例（後にシェーグレン症候群 [SS] が判明した 3 例を含む）、全身性エリテマトーデス (SLE) が 119 例、強皮症が 225 例であった。

20 人の健常人血清を ELISA のカットオフ値算出のために使用した。

大腸菌発現系によるヒスチジンタグを付加した全長の精製 EJ リコンビナントタンパクと、抗 EJ 抗体陽性標準血清を用いて ELISA を構築し、抗体の有無について調べた。また、in vitro 転写翻訳系を用いたリコンビナントタンパクによる免疫沈降も行い、ELISA の結果と比較検討を行った。

WI-38 培養細胞を用いて、IL-1・、IFN-・、IFN-・刺激による EJ 抗原の発現変化について、RT-PCR とイムノブロットにより調べた。

検体使用に関しては、名古屋大学医学部の倫理委員会の承認を得て遂行されている。

C. 研究結果

ELISA において、カットオフ値を健常人の平均値 +5SD としたとき、5 例に抗 EJ 抗体が検出された。5 例は免疫沈降でも陽性が確認されたのに対し、健常人の平均値 +3SD ~ +5SD の値を示した 9 例は免疫沈降では陰性であった。5 例の内訳は CADM を含まない DM2 例 (2.4%)、PM1 例 (10%)、ILD1 例（後に SS が判明）(7.1%)、SLE1 例 (0.8%) であり、ELISA 値の上位 3 例が ILD を有していた。筋力低下は 5 例中 3 例に認められたが、悪性腫瘍の合併は無かった。抗体陽性であった SLE 症例に関しては、ELISA 値が抗体陽性症例のうち最も低かったので、3 つの経時血清を

用いて、ELISA の希釈試験およびコンビナントタンパクを使用した免疫沈降により抗体陽性であることを追加確認した。

以上の実験で、抗 EJ 抗体と間質性肺炎の関連が示唆されたことから、DM/PM 患者の血清や筋組織での発現上昇が報告されている IFN- γ 、IFN- β や、ある種の筋炎関連自己抗原の発現を培養細胞の実験系において上昇させるという報告がある IL-1 β について、それらがヒト肺線維芽細胞における EJ 抗原の発現量を変化させるかについて検討した。

24 時間通常の培養を行った WI-38 細胞を PBS で洗浄後、IFN- γ 2a、IFN- β 、IL-1 β をそれぞれ 1000IU/ml、15ng/ml、10ng/ml の濃度で培養液に加え、培養 24 時間、48 時間、72 時間後の抽出液について調べた。RT-PCR の結果、IFN- γ 2a の刺激により無刺激状態と比較して 24 時間、72 時間後については EJ 抗原 mRNA の有意な発現上昇を確認したが、それ以外では刺激による mRNA の発現上昇は確認できなかった。次にイムノブロットにより、EJ 抗原タンパクの発現変化の有無を上記 mRNA の場合と同様な条件で調べたが、無刺激状態と比べて刺激による明らかなタンパク発現の増減は確認できなかった。

D. 考察

抗 ARS 抗体の臨床的重要性は確立されていると言ってもよいが、抗 Jo-1 抗体を除いてはその検出に関して、一部の施設でしか行われていない放射性物質標識を用いた RNA およびタンパク免疫沈降に殆ど頼らざるを得ない現状である。今回の研究で、我々は抗 ARS 抗体の 1 種である抗 EJ 抗体の測定を、簡便な ELISA により可能にした。我々が当初予想したよりも DM における陽性率は低かったものの、間質性肺炎と抗体の関連も示唆され、今後、病勢と抗体価の関連などの検討を要すると思われる。また最近、抗 ARS 抗体と ILD を伴った原発性 SS の関連に言及した報告も散見され、今回の研究で同様な 1 症例に抗 EJ 抗体が認められたことより、肺病変を伴った SS における陽性頻度も今後の検討事項と思われた。

サイトカインによる培養細胞刺激で EJ 抗原の発現量変化の有無を調べる実験は、DM/PM の病態において重要視されるサイトカインが自己抗体産生においても関わっていないかを調べていく目的で行ったものである。残念ながら、今回使用したサイトカイン 3 種による実験では、EJ の発現量に明らかな変化は見出されなかった。培養細胞にすでにライン化された細胞を用いたこと、各サイトカインの濃度が適切でなかったことが影響した可能性は残され

る。なお、抗体陽性例で、今回使用したサイトカインが血中や組織中で変動していた事実は検体の関係上、調べることはできなかった。

E. 結論

我々の開発した抗 EJ 抗体の ELISA は、患者血清中の抗体検出に有用であると考えられた。今後は、病勢との関係を探るために経時検体を多数、この方法により解析していきたい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hane H, Muro Y, Watanabe K, Ogawa Y, Sugiura K, Akiyama M. Establishment of an ELISA to detect anti-glycyl-tRNA synthetase antibody (anti-EJ), a serological marker of dermatomyositis/polymyositis and interstitial lung disease. Clin Chim Acta (in press)

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

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

皮膚筋炎患者血清が微小血管構成細胞に与える影響に関する検討

研究分担者 神田 隆 山口大学大学院医学系研究科 神経内科学 教授
研究協力者 佐野泰照 山口大学大学院医学系研究科 神経内科学 助教
清水文崇 山口大学大学院医学系研究科 神経内科学 助教

研究要旨

皮膚筋炎(DM)では、筋束内の毛細血管の減少、残存毛細血管の拡張、毛細血管周囲の基底膜の肥厚などが報告されており、筋内血管の障害がその病態に深く関与していると考えられている。今回われわれは、筋内の微小血管の構成細胞のモデルとして、ヒト血液脳関門由来血管内皮細胞株(TY10)とヒト末梢神経内微小血管由来ペリサイト株(HPPCT)の2つの細胞を用い、DM患者血清が微小血管モデルに与える影響について検討した。われわれが樹立したTY10とHPPCTに急性期DM患者3例の血清を作用させ、37°Cで24時間incubationを行った。対照には健常者血清を用いた。血清を作用させた後、TY10細胞株からRNAを抽出し、タイトジャンクション(TJ)構成分子(claudin-5, occludin, Zonula Occludens(ZO-1))の発現をreal time PCRを用い解析した。また、血清作用後のHPPCTからRNAを抽出し、基底膜の構成因子(collagen type IV及びfibronectin)の発現をreal time PCRで解析した。DM患者血清を作用させたTY10細胞では、健常者血清を作用させたTY10細胞に比べclaudin-5のmRNA発現レベルに有意差はなかったが、occludin及びZO-1のmRNA発現が低下した。一方、DM患者血清はHPPCTのcollagen type IVとfibronectinのmRNA発現レベルには有意な影響を及ぼさなかった。筋束内の毛細血管の内皮細胞どうしはTJを介して密に結合していることが知られているが、DMではこのTJが消失することが報告されている。DM患者の血清に含まれる液性因子により筋内微小血管のoccludinとZO-1の発現が低下し、TJが破綻することがDMの病態に関与していることが推察された。

A. 研究目的

皮膚筋炎では、筋内の間質に存在する小血管が免疫反応の標的のひとつになっていると考えられている。皮膚筋炎における筋束周囲萎縮は微小血管障害と関連づけられており、具体的には筋束内の毛細血管の減少、残存毛細血管の拡張、毛細血管周囲の基底膜の肥厚などが報告されている。電顕では小血管内皮の腫脹や壊死などの破壊像や、内皮細胞内に小管状封入体や変性産物を含む空砲が認められ、これらは皮膚筋炎の血管内皮細胞障害を示す所見として知られている。このように皮膚筋炎では筋内血管の障害がその病態に深く関与していることは明らかではあるが、その病態解明のツールとしてはこれまでは筋組織を用いた免疫組織学的解析を含んだ病理組織学的解析が主流であった。しかし、さらなる詳細な分子メカニズムを解明するためには、ヒト微小血管構成細胞を用いた細胞生物学的側面からのアプローチが必須となる。今回我々は筋内の微小血管の構成細胞のモデルとして、ヒト脳微小血管内皮細胞株およびヒト末梢神経神経内膜内ペリサイト株の2つの細胞を用い、皮膚筋炎患者の血清が微小血管モデルにどのような影響を与えるかについて検討を行った。

B. 研究方法

我々が樹立したヒト血液脳関門由来血管内皮細胞株(TY10)とヒト末梢神経内微小血管由来ペリサイト株(HPPCT)を用いた。これらの細胞に急性期皮膚筋炎患者3例(37歳男性, 62歳女性, 58歳女性)の血清を作用させ、37°Cで24時間incubationを行った。対照として健常者血清を用いた。血清を作用させた後、TY10細胞株からRNAを抽出し、タイトジャンクション(TJ)構成分子(claudin-5, occludin, Zonula Occludens-1 (ZO-1))の発現をreal time PCRを用いて解析した。また、血清作用後のHPPCTからRNAを抽出し、基底膜の構成因子(collagen type IVおよびfibronectin)の発現についてreal time PCRを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト脳および末梢神経組織を材料として用いるため、山口大学医学部倫理委員会による承認を得た上で研究を開始した。組織提供者に対し十分な説明の後、同意を得た上で組織を採取した。サンプルの匿名化に配慮し、プライバシーの保全に万全を尽くした。

C. 研究結果

皮膚筋炎患者血清を作用させたTY10細胞では、健常者血清を作用させたTY10細胞に比しclaudin-5のmRNA発現レベルに有意な差は認められなかったが、occludin

および ZO-1 の mRNA 発現が低下した。一方、皮膚筋炎患者血清は HPPCT の collagen type IV と fibronectin の mRNA 発現レベルには有意な影響を及ぼさなかった。

D. 考察

筋束内の毛細血管の内皮細胞どうしは TJ を介して密に結合していることが知られている。皮膚筋炎患者の血清をヒト由来バリア構成微小血管内皮細胞に作用させると、TJ 構成分子のうち occludin と ZO-1 の発現が低下した。このことは、皮膚筋炎では、筋内微小血管の TJ の破綻が病態の進展に関与している可能性があることを示している。一方、皮膚筋炎患者血清は、ペリサイトの基底膜構成分子の発現には影響を及ぼさなかったが、基底膜を分解する酵素である MMP9 やそれを阻害する TIMP-1 の発現なども合わせて解析する必要があると考えられた。

E. 結論

皮膚筋炎患者血清はヒト由来バリア構成内皮細胞の TJ 関連分子の発現を低下させた。この結果は、筋内微小血管を構成する内皮細胞どうしを連結している TJ の破綻が、皮膚筋炎の病態に関与している可能性を示すものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kanda T.

Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013; 84: 208-212.

2) Sano Y and Kanda T

Blood-neural barrier: Overview and latest progress
Clin Exp Neuroimmunol. 2013; 4: 220-227

3) Shimizu F, Omoto M, Sano Y, Mastui N, Miyashiro A, Tasaki A, Maeda T, Koga M, Kaji R, Kanda T. Sera from patients with multifocal motor neuropathy disrupt the blood-nerve barrier.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013 in press (doi: 10.1136/jnnp-2013-305405).

4) Shimizu F, Kanda T. The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammation. In Suzumura A, Ikenaka K, editors. Neuron-Glia Interaction in Neuroinflammation. New York, NY: Springer Science+Business Media New York. 2013; pp. 157-179.

5) Shimizu F, Sano Y, Tominaga O, Maeda T, Abe M, Kanda T. Advanced glycation end-products disrupt the blood-brain barrier by stimulating the release of TGF- β by pericytes and VEGF and MMP-2 by endothelial cells in vitro. Neurobiol aging 2013; 34: 1902-1912.

6) Nakamichi K, Kishida S, Tanaka K, Suganuma A, Sano Y, Sano H, Kanda T. Maeda N, Kira J, Itoh A, Kato N, Tomimoto H, Kurane I, Lim CK, Mizusawa H, Saijo M.

Sequential changes in the non-coding control region sequences of JC polyomaviruses from the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy

Arch Virol. 2013; 158: 639-550.

7) Haruki H, Sano Y, Shimizu F, Omoto M, Tasaki A, Oishi M, Koga M, Saito K, Takahashi T, Nakada T, Kanda T.

NMO sera down-regulate AQP4 in human astrocyte and induce cytotoxicity independent of complement.

J Neurol Sci. 2013; 331:136-44.

8) Tasaki A, Shimizu F, Sano Y, Fujisawa M, Takahashi T, Haruki H, Abe M, Koga M, Kanda T.

Autocrine MMP-2/9 secretion increases the BBB permeability in neuromyelitis optica.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013, in press (doi: 10.1136/jnnp-2013-305907).

9) Maeda T, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Ueda M, and Kanda T.

Establishment and characterization of spinal cord microvascular endothelial cell lines

Clin Exp Neuroimmunol 2013. 4: 326-338.

10) 清水文崇, 神田 隆. 血液神経関門と自己免疫性ニューロパチー. Peripheral Nerve 2013; 24: 54-62.

清水文崇, 神田 隆. 血液脳関門と神経免疫疾患.

Brain and Nerve 2013; 65: 165-76.

11) 小笠原 淳一, 神田 隆

【感染症症候群(第2版)[下]-症候群から感染性単一疾患までを含めて-】中枢神経系感染症 髄膜炎 亜急性髄膜炎、髄膜脳炎(解説/特集)

日本臨床 別冊感染症症候群(下) 2013. 104-108

12) 小笠原 淳一, 神田 隆

神経疾患-その多彩な症状と診断手順】診断の方法と手順 感覚障害

Clinical Neuroscience 2013; 31 巻 5 号: 584-586.

13) 古賀道明, 神田 隆

重症筋無力症

免疫疾患イラストレイテッド(田中良哉 編)

羊土社, 東京 2013; 213-217

14) 古賀道明 神田 隆

神経疾患の新しい治療:現場での必須の知識と今後の展望:脳炎、プリオン病

日内会誌 2013; 102: 1958-1964

2. 学会発表

1) Yasuteru Sano, Kazuyuki Saito, Fumitaka Shimizu, Hiroyo Haruki, and Takashi Kanda

Role of LRP1 and ATP-binding cassette transporters in efflux of amyloid- β at the human blood-brain barrier
Neuroscience 2013, San Diego, USA. Nov 12, 2013

2) Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Naoko Mastui, Ai Miyashiro, Ryuji Kaji, Takashi Kanda. The effect of sera from multifocal motor neuropathy on blood-nerve barrier. San Diego, Neuroscience, 10 Nov 2013.

3) Fumitaka Shimizu, Ayako Tasaki, Yasuteru Sano,

Takashi Kanda, Sera from remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients disrupt the blood-brain barrier. Kyoto, PACTRIMS, 1 Nov 2013

4) Sano Y, Abe M, Shimizu F, Maeda T, Kashiwamura Y, Omoto M, Kawai M, and Kanda T

Novel human immortalized cell lines for the BBB/BBB research 第25回日本神経免疫学会学術集会. 山口, 2013年11月28日.

5) 尾本雅俊, 神田 隆: 抗 SRP 抗体陽性筋炎の筋内鞘小血管の形態学検討. 第54回日本神経学会学術大会. 東京, 2013年5月29日-6月1日

6) 佐野泰照, 齋藤和幸, 清水文崇, 春木明代, 前田敏彦, 安部真彰, 神田隆: アミロイドβ蛋白の血液脳関門を介した輸送機構の解析～続報 第54回日本神経学会学術大会. 東京, 2013年5月31日.

7) 佐野泰照, 大石真莉子, 春木明代, 清水文崇, 安部真彰, 前田敏彦, 田崎彩子, 神田隆: 血液脳関門を構成する内皮細胞がアストロサイトの AQP4 蛋白発現に与える影響 第25回日本神経免疫学会学術集会. 山口, 2013年11月27日.

8) 清水文崇, 田崎彩子, 佐野泰照, 朱 美和, 前田敏彦, 大石真莉子, 古賀道明, 神田 隆: 多発性硬化症患者血清が血液脳関門に及ぼす影響の解析. 第54回日本神経学会学術集会総会. 東京, 2013年5月29日

9) 佐藤亮太, 西原秀昭, 尾本雅俊, 小笠原淳一, 古賀道明, 川井元晴, 神田 隆: 脳実質病変と肥厚性硬膜炎を来した血管炎の38歳女性例. 第108回日本内科学会. 中国地方会. 岡山, 2013年6月1日

10) 佐藤亮太, 石口絵梨, 前田敏彦, 尾本雅俊, 佐野泰照, 小笠原淳一, 古賀道明, 川井元晴, 神田 隆: 潰瘍性大腸炎治療中に発症したインフリキシマブ関連筋炎の55歳女性例. 第94回日本神経学会. 中国・四国地方会, 松山, 2013年6月29日

11) 清水文崇, 澤井 摂, 佐野泰照, 別府美奈子, 三澤園子, 前田敏彦, 古賀道明, 桑原 聡, 神田 隆: 血液神経関門の破綻が慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチーの臨床病型を決定する. 第24回日本末梢神経学会学術集会. 新潟, 2013年8月23日.

12) 清水文崇, 澤井 摂, 佐野泰照, 別府美奈子, 三澤園子, 前田敏彦, 古賀道明, 桑原 聡, 神田 隆: 血液神経関門の破綻が慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチーの臨床病型を決定する. 第25回日本神経免疫学会学術集会. 下関, 2013年11月28日.

13) 清水文崇, 本村政勝, 中田るか, 白石 裕一, 佐野泰照, 神田 隆: 傍腫瘍性小脳変性症を合併した Lambert-Eaton 筋無力症候群では血液脳関門が破綻する. 第25回日本神経免疫学会学術集会. 下関, 2013年11月28日.

14) 古賀道明, 高橋正樹, 神田 隆:
ギラン・バレー症候群における IgM 型抗ガングリオンド抗体の意義.

第25回日本神経免疫学会学術集会. 山口, 2013年11月27-29日.

15) 佐藤亮太, 清水文崇, 尾本雅俊, 佐野泰照, 小笠原淳一, 古賀道明, 川井元晴, 神田 隆: 脊髄円錐部病変を呈した脊髄サルコイドーシスの41歳男性例

第95回日本神経学会. 中国・四国地方会, 鳥取. 2013年11月30日

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. 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

多発筋炎/皮膚筋炎の病態と治療法解明のための統合的検討

研究分担者 清水 潤 東京大学医学部神経内科 講師
研究協力者 肥田あゆみ, 前田明子 東京大学医学部神経内科
研究協力者 細野祐司 中嶋 蘭 三森経世 京都大学内科学講座臨床免疫学

研究要旨

筋炎の病態は多様であり、臨床像、筋組織像の特徴、出現する自己抗体の種類により多面的に特徴づけられ、病態解明と治療法の開発には、これらの要素を考慮した統合的な把握が不可欠である。406 例の筋炎症例を対象とし、筋炎の特徴的組織所見と筋炎自己抗体（抗 ARS, 抗 Mi-2, 抗 SRP, 抗 TIF1- γ , 抗 MDA5, 抗 PM/Sc1 100）との関連検討をおこなった。筋束周辺部萎縮所見を有する 27 例中 22 例（抗 Tif1 γ 9 例, 抗 Jo1 7 例, 抗 Mi-2 5 例, 抗 MDA5 1 例）、筋内鞘血管補体沈着所見を有する 49 例中 33 例（抗 Tif1 γ 24 例, 抗 Jo1 2 例, 抗 MDA5 4 例, 抗 OJ 1 例, 抗 SRP 1 例, 抗 Mi-2 1 例）で筋炎自己抗体陽性であった。壊死性筋症 43 例中 33 例で抗 SRP 抗体が陽性であった。CD8 陽性細胞による非壊死筋線維アタック像は検討抗体と関連は乏しかった。筋炎の特徴的組織所見と筋炎自己抗体の関連性が明らかになった。

A. 研究目的

筋炎は臨床像、筋組織像の特徴、出現する自己抗体の種類によりさまざまな分類がなされる。筋炎の特徴的組織所見と出現自己抗体の関連を明らかにする。

B. 研究方法

406 例の筋炎患者を対象とした。自己抗体の測定は RNA 免疫沈降法(京都大学)に Dot Blot 法 (Mi-2, SRP54, PM/Sc1 100), 蛋白免疫沈降法 (TIF1- γ , MDA5) (当施設) を併用した。

特徴的組織像は、1) MHC-class I 抗原を発現した非壊死筋線維への CD8 陽性細胞浸潤像 (CD8 像), 2) rimmed vacuole (RV 像), 3) perifascicular atrophy (PFA 像), 4) 小血管への C5b9 沈着 (C5b9 像), 5) 壊死再生線維の多発を認め MHC-class I の発現やリンパ球の集簇が乏しい (NAM 像) とした。

臨床病理分類は、組織 PM: CD8 像, 封入体筋炎 (IBM): CD8+RV 像, DM: 典型的な皮疹を有する例, 壊死性筋炎: NAM 像, 多発筋炎 (PM): 皮疹がなく IBM, 組織 PM, NAM に合致しない例とした。

(倫理面への配慮)

本研究でおこなわれている臨床組織像および筋炎自己抗体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

筋炎自己抗体は 288 例 (71%) で出現 (重複あり)。ARS 78 (19%; Jo-1 38, PL-7 10, PL-12 2, EJ 22, OJ 7, KS 2), HMW (Ku) 12 (3%), 7-2RNP 5 (1%), SRP 33 (8%), Mi-2 18 (4%), Tif-1 γ 39 (10%), MDA5 22 (5%), 抗ミトコンドリア抗体 (AMA) 10 (2%), SSA 39 (10%), SSB8 (2%), U1RNP 32 (8%), PM/Sc1100 4 (1%), リボソーム 18 (4%), Sm10 (2%) であった。

筋炎に特徴的な組織像は 148 例 (36%) で出現 (重複あり)。特徴的組織像での筋炎特異抗体の出現は CD8 像 3/41 (KS1, Mi2 1, Tif1 γ 1), PFA 22/27 (Jo1 7, Mi-2 5, Tif1 γ 9, MDA5 1), C5b9 像 33/49 (Jo1 2, OJ 1, SRP 1, Mi-2 1, Tif1 γ 24, MDA5 4), NAM 像 33/43 (SRP 33) であった (表 1)。臨床病理分類での筋炎特異抗体の出現は組織 PM 1/15 (KS1), IBM 2/26 (Mi2 1, Tif1 γ 1), DM 93/132 (Jo1 13, PL-7 6, PL-12 2, EJ 5, OJ 2, Mi-2 12, Tif1 γ 31, MDA5 22), NAM 33/43 (SRP 33), PM 65/190 (Jo1 25, PL-7 4, EJ 17, OJ 5, KS 1, Mi-2 6, Tif1 γ 7) であった (表 2)。

D. 考察

組織 PM, IBM は PM と比較して筋炎自己抗体の出現頻度は低く両者は異なる病態であることが自己抗体の観点からも示唆された。NAM の 1/4 は抗 SRP 抗体陰性であり別の機序が存在する可能性がある。PFA, C5b9 に関連する筋炎自己抗体は複数存在する。

E. 結論

筋炎特異・関連抗体を用いた分類と組織像分類は相互に補う関係にある。両者の関連解析は病態が多様性である筋炎の病態解明の上で必須である。

表 1

406例の筋炎自己抗体と特徴的組織像の対応

組織所見	非壊死筋線維CD8 ⁺ リンパ	筋束周辺部萎縮	筋内鞘血管補体沈着	壊死性筋症
自己抗体 症例数	41	27	49	43
Jo-1 38		7	2	
PL-7 10				
PL-12 2				
EJ 22				
OJ 7			1	
KS 2	1			
SRP 33			1	33
Mi-2 18	1	5	1	
Tif1 γ 39	1	9	24	
MDA5 22		1	4	
抗体出現頻度(%)	7	81	67	77

表 2

406例の筋炎の抗体と病理分類の対応

自己抗体 症例数	組織PM	封入体筋炎	皮膚筋炎DM	壊死性筋炎	PM
自己抗体 症例数	15	26	132	43	190
Jo-1 38			13		25
PL-7 10			6		4
PL-12 2			2		
EJ 22			5		17
OJ 7			2		5
KS 2	1				1
SRP 33				33	
Mi-2 18		1	12		6
Tif1 γ 39		1	31		7
MDA5 22			22		
抗体出現頻度(%)	7	8	70	77	34

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

第 54 回日本神経学会学術大会抄録集 p 526

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

細胞傷害性 T 細胞阻害による自己免疫性筋炎治療に関する研究

研究分担者 上阪 等 東京医科歯科大学大学院 膠原病・リウマチ内科学 教授
研究協力者 建石奈緒、平田真哉 東京医科歯科大学大学院 膠原病・リウマチ内科学
渋谷彰 筑波大学免疫学 人間総合科学研究科 教授

研究要旨

今年度の研究は、我々の提唱する自己免疫疾患の Seed and soil モデルにおいて発症に大切な要素、自己反応性 T 細胞の活性化、病的組織たる筋組織自然免疫活性化のうち、前者を抑制する治療の研究を行った。治療標的とした分子は CD226 であり、細胞傷害性 T 細胞上の CD226 分子がリガンドと結合すると、細胞傷害活性が増強するとされる。本研究で筋細胞が CD226 リガンドである CD155 を表出し、活性化を阻害する抗 CD226 抗体投与が多発性筋炎モデルである C タンパク誘導性筋炎を軽快させることが明らかとなった。抗 CD226 抗体は新たな治療薬となると期待される。

A. 研究目的

多発性筋炎 (PM) モデルマウスである C タンパク誘導性筋炎 (CIM) 研究を通じて、我々は、筋特異的細胞傷害性 T 細胞の活性化と筋組織の自然免疫活性化とが筋炎発症に重要であることを見いだした。

本研究班では m 初年度に筋組織自然免疫活性化機構について報告したが、今年度は、細胞傷害性 T 細胞の特異的阻害療法について検討する。

治療標的分子としたのは、CD226 (DNAM-1) 分子であり、T 細胞や NK 細胞上に発現している。これらの細胞が標的細胞を傷害する際に、標的細胞上にそのリガンドである CD112 や CD155 が発現していると細胞傷害が促進され、CD226 は細胞傷害の補助刺激分子である。

我々は、CIM が PM 同様に細胞傷害性 T 細胞に依存する病態をもつことから、抗体による CD226 阻害が CIM に治療効果をもつかどうかを検討することとした。

B. 研究方法

マウス C2C12 筋芽細胞、同細胞由来筋管における CD226 リガンド発現を、抗 CD112 抗体、抗 CD155 抗体による免疫染色法により検討した。

抗 CD226 抗体である Tx42 の in vitro 活性をマウス脾臓由来 CD8T 細胞を抗 CD3 抗体、Tx42 を固相化したマイクロウエル内で培養し、培養上清のインターフェロニン γ を定量した。Tx42 からは、ペプシン処理により F(ab')₂ 部分のみからなる Tx42 F(ab')₂ を調整した。

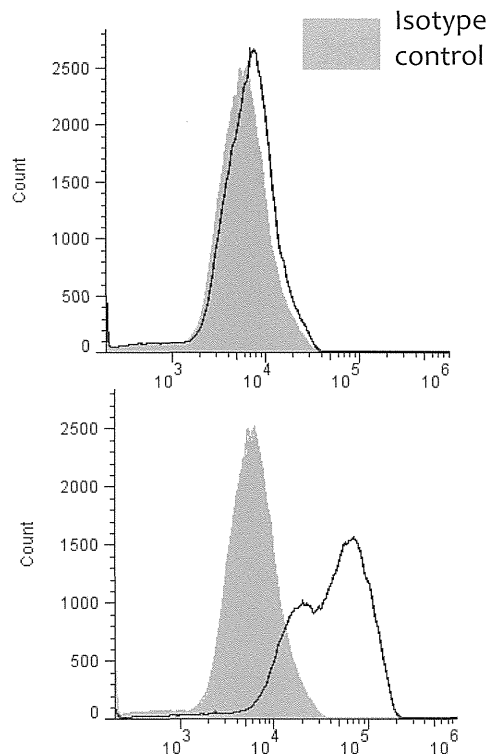
CIM 治療には、C タンパク断片による免疫で筋炎を誘導する前から、ないし筋炎発症後の 7 日後から Tx42 ないし Tx42 F(ab')₂ を隔日腹腔投与した。筋炎の活動性は、免疫 14 日後に下肢筋群を組織学的に評価した。

(倫理面への配慮)

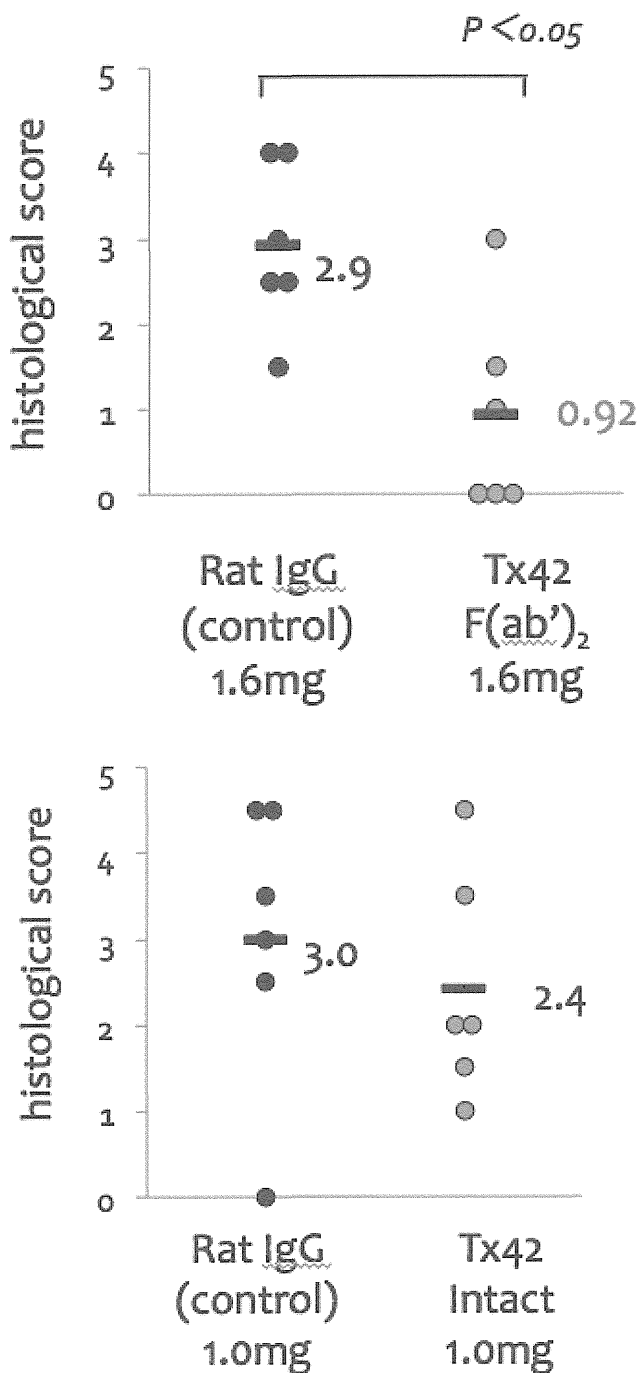
実験動物の使用に際し、本学実験動物センターの倫理規定に従った。

C. 研究結果

フローサイトメトリ法による解析で、マウス C2C12 筋芽細胞は CD112 陰性 (下図上段) で CD155 陽性 (下図下段) であった。



C2C12 由来筋幹細胞の免疫染色でも、CD112 陰性で CD155 陽性であった。筋組織由来の mRNA からの RT-PCR 解析でも CD155 mRNA のみが検出されたことと併せ、筋組織には、CD226 リガンドのうち CD155 が発現すると考えられた。脾臓由来 CD8T 細胞の固相化抗 CD226 抗体による刺激は、抗 CD3 抗体による刺激がある時にのみ IFN γ 産生を亢進させた。この亢進は、抗 CD3 抗体による刺激が最大時には失われた。抗 CD226 抗体による CIM マウスの治療では、発症前から開始しても（下図上段）発症後から開始しても、Tx42 F(ab')₂ が筋炎を抑制したが、無処理 Tx42 は抑制しなかった（下図下段：発症前投与）。



D. 考察

キラーT細胞の細胞傷害活性を増強するCD226を抗体で阻害する治療法は、CIM治療に有効であった。発症後の治療開始でも有効であったことは臨床応用の可能性を示す。

一方で、CD226アゴニスト活性を有する抗体は、TCRを介する刺激が弱い状況では、かえってCD8T細胞を活性化すると考えられる。実際に、無処置Tx42に治療効果は認められなかった。

E. 結論

アゴニスト活性を持たない抗体によるCD226阻害は筋炎治療に有効である。この治療法は病態特異的な筋炎新治療法となるものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Nao Tateishi¹, Shinya Hirata¹, Kazuko Shibuya², Akira Shibuya², Nobuyuki Miyasaka¹, Hitoshi Kohsaka. Killer T cell inhibition by CD226 blockade for treatment of autoimmune polymyositis. American College of Rheumatology 77th National Meeting, San Diego, California, October 27-30, 2013

Nao Tateishi, Shinya Hirata, Kazuko Shibuya, Akira Shibuya, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Killer T cell inhibition by CD226 blockade for treatment of autoimmune polymyositis. Asia Congress of Autoimmunity 2013, 20-22 November, 2013, Hong Kong

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

2012年3月21日 日本国特許出願 特発性炎症性筋疾患の予防又は治療剤 (出願番号:特願2012-063595)

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

外来における多発性筋炎/皮膚筋炎患者の疾患活動性と身体機能の現状把握に関する研究

研究分担者 川口 鎮司 東京女子医科大学リウマチ科 (臨床教授)
研究協力者 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

背景・目的：多発性筋炎（PM）/皮膚筋炎（DM）は、多くの症例で何かしら日常生活に支障をきたす慢性疾患である。本研究は、Myositis Disease Activity Core Set（MDACS）を用いて外来通院中のPM/DM患者の疾患活動性や身体機能障害の現状を明らかにする。方法：72症例を研究対象とし、患者による疾患全般評価（PGA：VAS10cm）、医師による疾患全般評価（EGA：VAS10cm）、徒手筋力テスト（MMT8：8部位で評価。80点満点）、J-HAQ-DI、医師による筋外病変の活動性評価（MYOACT：VAS10cm）を用いた。結果：平均PGA（標準偏差）は25（24）mmで、0mmであったのは症例の1割のみであった。一方、平均EGA（標準偏差）は5（7）mmで、半数の症例で0mmであった。4割の症例で筋力低下を認めたが、6割の症例で筋外病変の活動性を認めなかった。J-HAQ上、半数で身体機能障害を認めた。J-HAQ上身体機能障害を認めた群において、身体機能障害を認めない群と比較して、発症年齢は高いが、罹病期間に有意差を認めなかった。身体機能障害を認めない群と比較して、身体機能障害を認めた群においてPGA（ $P<0.0001$ ）が高く、MMT8（ $P=0.008$ ）が低かった。結論：PM/DM外来患者の半数以上に何かしらの身体機能障害を認め、その結果は可逆性炎症性病態よりむしろ、不可逆的蓄積障害を反映している可能性がある。

A. 研究目的

多発性筋炎（PM）/皮膚筋炎（DM）は、疾患活動性の持続しないし再燃、その結果生じる不可逆的障害、プレドニゾロンなどの治療薬の影響にて多くの症例で何かしら日常生活に支障をきたす慢性疾患である。PM/DMの疾患活動性評価には、International Myositis Assessment & Clinical Studies Groupが提案しているMyositis Disease Activity Core Set（MDACS）が国際的に使用されている。これまで、本邦において疾患活動性や身体機能レベルなど、外来におけるPM/DM患者の健康状態の詳細は明らかとなっていない。今回、MDACSを用いて当施設に通院中のPM/DM患者の病状を明らかにするため、MDACSを用いて疾患活動性や身体機能障害の現状について評価を行う。

B. 研究方法

当科外来通院中のPM/DM患者およびその担当医師より必要な医学的情報を収集し、解析可能であった72症例を研究対象とした。PM/DMの疾患活動性および日常生活動作における身体機能についてMDACSで評価を行った。具体的には、患者による疾患全般評価（PGA：VAS10cm）、医師による疾患全般評価（EGA：VAS10cm）、徒手筋力テスト（MMT8：8部位で評価。80点満点）、J-HAQ-DI、医師による筋外病変の活動性評価（MYOACT：VAS10cm）を用いた。

C. 研究結果

登録時平均年齢（標準偏差）は54（15）歳、男女比は1：4で、平均罹病期間（標準偏差）は9（6）年であった。PM、DM、CADMの割合は、各々、48%、43%、9%であった。平均PGA（標準偏差）は25（24）mmで、0mmであったのは症例の1割のみであった。一方、平均EGA（標準偏差）は5（7）mmで、半数の症例で0mmであった。平均MMT8（標準偏差）は77（6）であったが、4割の症例で筋力低下を認めた。筋外病変の活動性の指標であるMYOACTの平均（標準偏差）は5（10）mmで、6割の症例で全く筋外病変の活動性を認めなかった。J-HAQ-DIは半数で0であったが、2割の症例でスコア1以上の身体機能障害を認めた。J-HAQの中でも、特に「届く範囲」、「握力」、「家事や雑用」の項目でより多くの症例が日常生活動作の支障を訴えていた。J-HAQ上身体機能障害を認めた群において、身体機能障害を認めない群と比較して、発症年齢は高いが、罹病期間に有意差を認めなかった。この2群間でEGAやMYOACTは有意差を認めないが、身体機能障害を認めない群と比較して、身体機能障害を認めた群においてPGA（ $P<0.0001$ ）が高く、MMT8（ $P=0.008$ ）が低かった。また、PGAはMMT8（ $P=0.0001$ ）やJ-HAQ-DI（ $P<0.0001$ ）と有意な相関関係を認めたが、EGA（ $P=0.08$ ）やMYOACT（ $P=0.85$ ）とは有意な相関を認めなかった。

D. 考察

当施設に通院している PM/DM 患者は、平均罹病期間が約 10 年経過しており、症例の半数においては医師により「活動性なし(寛解)」と判断されていた。一方、半数の患者では筋力低下や日常生活動作の支障をきたしていたが、今回の横断的な解析においては、疾患活動性と身体機能障害の有意な関連は明らかでなかった。PM/DM 患者の訴える病状は、筋力低下の度合いや日常生活動作レベルを反映しており、これらは発症してからの疾患活動性に伴う蓄積障害と関連している可能性があり、特に高齢発症の症例ではその傾向が強い可能性がある。

E. 結論

PM/DM 外来患者の半数以上に何かしらの身体機能障害を認め、その結果は可逆性炎症性病態よりむしろ、不可逆的蓄積障害を反映している可能性がある。

F. 健康危険情報

特記なし

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中。

2. 学会発表

JCR2014 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

IMCCP が提示した PM/DM の診断基準の妥当性に関する疫学調査

－ 調査の進捗状況の報告－

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	教授

研究要旨

昨年度には International Myositis Classification Criteria Project (IMCCP) 作成の特発性炎症性筋疾患 (IIM) の診断基準案に対し、多発筋炎 (PM) / 皮膚筋炎 (DM) に対する感度、特異度などの診断能力と検証する目的の疫学調査を立案し、調査の際に使用する項目について検討した。

調査項目は IMCCP data collection sheet に記載された項目から選択し、筋力等に関する 23 項目のうち 8 項目、皮疹に関する 14 項目から 10 項目、その他の臨床所見から 13 項目中 11 項目、筋生検関連項目では 21 項目中 18 項目、血液検査所見については 31 項目中 14 項目、筋電図所見については 3 項目全て、MRI 所見については 3 項目中 2 項目、皮膚生検については 2 項目あったものをそのまま採用し、調査項目と定めた。

これらの調査項目を用いて厚生労働省「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の収集を開始した。この調査の進行状況につき報告する。

この調査の調査票の回収は間もなく終了する予定であるが、このデータを解析することにより今後わが国での診断基準作成に資するものと考えられる。

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きている。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。

我々は昨年度に、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した。

今年度は、その経過について報告する。

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、2007 年 1 月 1 日から 2012 年 12 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、ステロイド筋症など）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過大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）などを収集することとした。

また、PM/DM 患者 400 例、非 PM/DM 患者 400 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った。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 2015 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った。

C. 研究結果

上記の調査に用いる項目として、昨年度の研究によ

り IMCCP data collection sheet に記載された項目から選択された、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、筋線維束周辺萎縮、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。

これらの項目を使用して研究協力者に調査を依頼し、調査票の回収が進んでいる。調査に対する協力を表明した 21 施設のうち 15 施設で調査が終了し、調査票の回収と並行して調査票の記載内容に対するチェック、各施設への問合せが進行している。

D. 考察

調査票回収・チェックの終了後は記載内容に基づいて IMCCP 案や従来使用されてきた診断基準 (厚生労働省の診断基準、Bohan and Peter の診断基準など) の sensitivity、specificity など、診断能力に関連する各種パラメーターを算出し、診断基準の診断力向上のために必要な追加や変更などについて検討する予定である。

E. 結論

IMCCP 作成の IIM 診断基準案に対する日本人コホートをを用いた疫学調査を立案・実行しており、その進捗状況につき報告した。

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

石原正一郎、太田晶子、神人正寿、上阪等、水澤英洋：皮膚筋炎・多発筋炎に対する新たな国際診断基準に対する検証プロジェクト。第 54 回神経学会学術大会、2013 年 5 月 30 日、東京

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 III

研究代表者 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、廣田 智哉、近藤 裕也、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 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 (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^{-/-}xIL-17^{-/-}→Rag-1^{-/-}マウス (IL-17 欠損マウス) においても唾液腺炎スコアが有意に低下していた、6) 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、7) M3R の N 領域および細胞外第一ドメインの変異ペプチド候補からアナログペプチド (APL) を *in vitro* で選定した、8) N1 領域の APL7 投与により *in vivo* において MIS の優位な抑制が認められた、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、INF- γ および IL-17 ともに発症に重要であることが判明した。さらに、M3R の主要 T 細胞エピトープのアナログペプチドを用いて、自己免疫性唾液腺炎を *in vivo* において抗原特異的制御することに成功した。

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 細胞は慢性炎症および唾液腺破壊に関わっている。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 Rag-1^{-/-}マウス(B6 バック)に経静脈的に投与して、M3R 誘導自己免疫性唾液腺炎 (MIS) マウスを作成した。
2) MIS における INF- γ および IL-17 の病因的役割を明らかにするために、M3R^{-/-}xIFN- γ ^{-/-}→Rag-1^{-/-}マウスおよび M3R^{-/-}xIL-17^{-/-}→Rag-1^{-/-}マウスを作成し、唾液腺発症、M3R 反応 T 細胞からの INF- γ 、IL-17 産生を解析した。

3) 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。
4) 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。
5) 選定した APL を MIS マウスに投与し唾液腺炎に対する治療効果を検討した。

(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、INF- γ および IL-17 の産生が認められた。
2) M3R^{-/-}xIFN- γ ^{-/-}→Rag-1^{-/-}マウスおよび M3R^{-/-}xIL-17^{-/-}→Rag-1^{-/-}マウスにおいて、唾液腺炎スコアが有意に低下していた。
3) M3R の主要な T 細胞エピトープは N1 領域および第

一細胞外ドメインであることが判明した。

4) *in vitro* の解析により、N1 領域の APL 候補は、APL5(AA15S→T)、APL6(AA15S→C)、APL7(AA15S→N) であること、第一細胞外ドメインの APL 候補は、APL8(AA140A→M) であることが判明した。

5) N1 領域の APL7 投与により *in vivo* において MIS の優位な抑制が認められた。

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、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事、N 領域の APL により MIS を有意に抑制することが明らかとなった。以上の結果から、自己免疫性唾液腺炎の抗原特異的制御が可能であることが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Ito I, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusai M, Amano H, Nagai T, Hirohara S, Setoguchi K, Kono H, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Katayama M, Migita K, Suda A, Ohno S, Hashimoto H, Takasaki Y, Sumida T, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S.: Human Leukocyte Antigens and Systemic Lupus Erythematosus: A Protective Role for the HLA-DR6 alleles DRB1*13:02 and *14:03. PLoS One (in press)
2. Seror R, Theander E, Brun JG, Ramos-Casals M, Valim V, Dorner T, Bootsma H, Tzioufas A, Solans Laque R, Mandl T, Gottenberg JE, Hachulla E, Moser K, Ng WF, Fauchais AL, Bombardieri S, Valesin G, Gerli R, Bartoloni E, Saraux A, Praprotnik S, Tomsic M, Sumida T, Nishiyama S, Caporali R, Kruize AA, Vollenweider C, Ravaud P, Vitali C, Mariette X, Bowman SJ.: Validation of EULAR primary Sjogren's Syndrome disease activity and patient indexes. Ann Rheum Dis (in press)
3. Dieud P, Sumida T, Tsuchiya N, MartinIbanez J. et al. Identification of Secreted Phosphoprotein 1 Gene as a new Rheumatoid Arthritis Susceptibility Gene. Ann Rheum Dis (in press)
4. Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M, Hirota T, Asashima H, Matsumoto I. : The role of M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells in Sjogren's syndrome: A Critical Review. J Autoimmunity (in press)
5. Hara M, Ishiguro N, Katayama K, Kondo M, Sumida T, Mimori T, Soen S, Nagai K, Yamaguchi T, Yamamoto K; Igratimod-Clinical Study Group.: Safety and efficacy of combination therapy of igratimod with methotrexate for patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to methotrexate: An open-label extension of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Mod Rheumatol (in press)
6. Ikeda K, Seto Y, Natita A, Kawakami A, Kawahito Y, Ito H, Matsushita I, Ohno S, Nishida K, Suzuki T, Kaneko A, Ogasawara M, Fukae J, Henmi M, Sumida T, Kamishima T, Koike T, JCR-CoSMUS : Ultrasound assessment of synovial pathologies in rheumatoid arthritis using comprehensive multi-plane images of the 2nd metacarpophalangeal joint. Arthritis Rheum (in press)
7. Tsuboi H, Asashima H, Takai C, Hagiwara S, Hagiya C, Yokosawa M, Hirota T, 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, Yoshifuji H, Ohta A, Matsumoto I, Sumida T.: Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjogren's syndrome in Japan. Mod Rheumatol (in press)
8. Hagiya C, Tsuboi H, Yokosawa M, Hagiwara S, Takai C, Hirota T, Asashima H, Miki H, Umeda N, Horikoshi M, Kondo Y, Sugihara M, Ogishima H, Suzuki T, Hiraoka T, Kaji Y, Matsumoto I, Ohshika T, Sumida T.: Clinicopathological features of IgG4-related disease complicated with orbital involvement. Mod Rheumatol (in press)
9. Yokosawa M, Tsuboi H, Nasu K, Hagiya C, Hagiwara S, Ogishima H, Hirota T, Horikoshi M, Kondo Y, Sugihara M, Suzuki T, Minami M, Bukawa H, Matsumoto I, Sumida T.: Usefulness of MR imaging of the parotid glands in patients with Sjogren's syndrome. Rheumatology (Oxford) (in press)
10. Yoon J, Sudo K, Han J, Chae M, Park S, Weinstein M, Nakae S, Yamashita T, Lee , Sumida T, Kuroda M, Mamura M: SMAD2 MEDIATES DENDRITIC CELL SUPPRESSION BY TGF- β Smad2 is the TGF- β receptor-regulated Smad to suppress the immunogenicity of mouse and human dendritic cells. Eur J Immunol (in press)

11. Ogishima H, Tsuboi H, Naoto Umeda, Horikoshi M, Kondo Y, Sugihara M, Suzuki T, Matsumoto I, Sumida T.: Analysis of subclinical synovitis detected by ultrasonography and low-field magnetic resonance imaging in patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol 24(1):60-8,2014
12. 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 21(1):52-9,2014
13. Yoon JH, Jung SM, Park SH, Kato M, Yamashita T, Lee IK, Sudo K, Nakae S, Han JS, Kim OH, Oh BC, Sumida T, Kuroda M, Ju JH, Jung KC, Park SH, Kim DK, Mamura M.: Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing Eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. EMBO Mol Med 5(11):1720-39,2013
14. Kawasaki A, Inoue N, Ajimi C, Sada K, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Sumida T, Tohma S, Miyasaka N, Matsuo S, Ozaki S, Hashimoto H, Makino H, Harigai M, Tsuchiya N.: Association of IRF5 polymorphism with MPO-ANCA positive vasculitis in a Japanese population. Genes Immun 14(8):527-9, 2013
15. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Shimada K, Masui T, Ikenaka T, Hashimoto A, Okazaki Y, Takaoka H, Futami H, Komiya A, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Takasaki Y, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Suda A, Nagaoka S, Kono H, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Fukui N, Hashimoto H, Sumida T, Ono M, Tsuchiya N, Tohma S: Association of a Single Nucleotide Polymorphism in the SH2D1A Intronic Region with Systemic Lupus Erythematosus. Lupus 22(5):497-503,2013
16. 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 172(1):44-53,2013
17. 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(Oxford) 52(7):1172-82,2013
18. Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M, Asashima H, Matsumoto I.: Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. Mod Rheumatol 23(5): 841-5,2013
19. 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 23(3):614-6,2013
20. 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 23(4):782-7,2013
21. 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-blinded, placebo-controlled trial. Mod Rheumatol 23(3):430-9,2013
22. 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 23(3):430-9,2013
23. 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 23(2):219-25,2013

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^{-/-}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

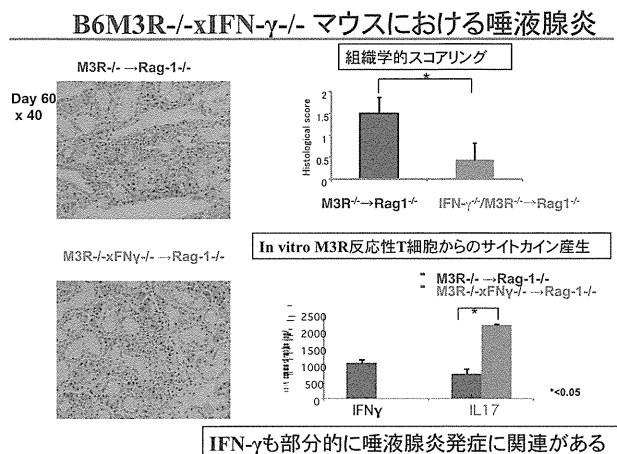


図2 M3R^{-/-}xIL-17^{-/-}マウスにおける唾液腺組織(H-E染色)と focus score

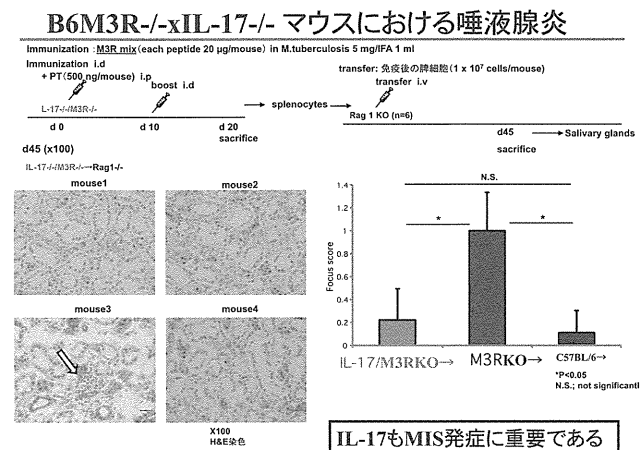


図3 M3Rにおける主要T細胞エピトープ解析

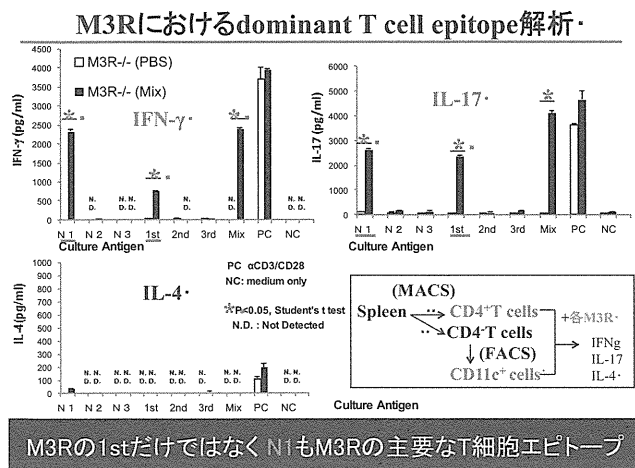


図4 M3R N1領域の変異ペプチド候補

N1-APL候補 ペプチド

N1: MTLHSNSITSPFPN(SSSWVHSPSEAGLP) C57BL/6: MHC class II-A^bにおけるIC50 (nM)

M3R N1	T	T	S	P	L	F	P	N	I	IC50 (nM)	APL
M3R N1	T	T	S	P	L	F	P	N	I	101.62	
Mutant 1	-	C	-	-	-	-	-	-	-	143.88	APL1
Mutant 2	-	N	-	-	-	-	-	-	-	143.88	
Mutant 4	-	S	-	-	-	-	-	-	-	116.95	
Mutant 5	-	-	T	-	-	-	-	-	-	122.74	
Mutant 6	-	-	C	-	-	-	-	-	-	147.23	APL2
Mutant 7	-	-	N	-	-	-	-	-	-	171.79	
Mutant 8	-	-	-	-	I	-	-	-	-	246.60	APL3
Mutant 9	-	-	-	-	P	-	-	-	-	290.40	APL4
Mutant 10	-	-	-	-	-	-	-	T	-	89.95	APL5
Mutant 11	-	-	-	-	-	-	-	C	-	92.47	APL6
Mutant 12	-	-	-	-	-	-	-	S	-	92.47	APL7

図5 M3R N1領域のAPL候補はAPL5,6,7

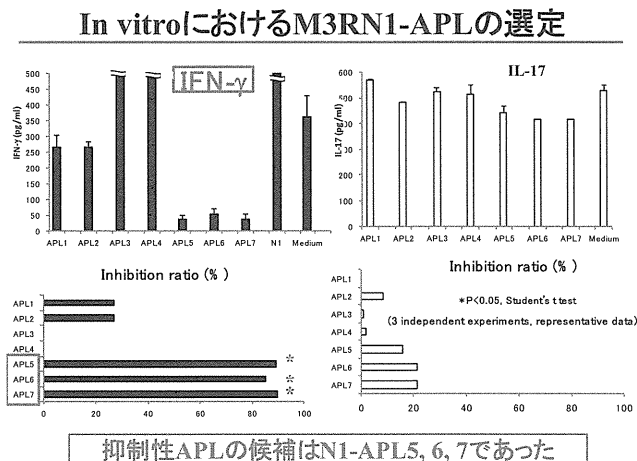


図6 M3R細胞外第一ドメインの変異ペプチド候補

M3R第1細胞外領域におけるAPL候補のデザイン

1st FTTYIIMNRWALGNLACDLW

M3R 1st	I	M	N	R	W	A	L	G	N	L	A	C	D	L	W	IC50	APL
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	APL④
APL7	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	69.82	APL⑤
APL8	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81.28	APL⑥
APL9	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	227.51	APL⑦
APL10	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	242.10	
APL11	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	397.19	
APL12	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	227.51	APL⑧

図7 M3R 細胞外第一ドメインの APL の候補は APL8

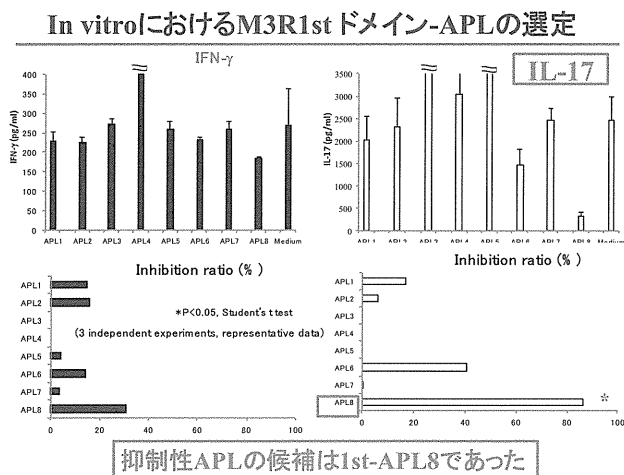


図8 M3R N1 領域の APL7 投与により MIS の優位な抑制が認められた

3. APLペプチド

