

博士論文

封入体筋炎の臨床病理像の検討と

筋を用いた遺伝子発現解析による新規病態関連因子の探索

池永 知誓子

封入体筋炎の臨床病理像の検討と
筋を用いた遺伝子発現解析による新規病態関連因子の探索

東京大学大学院博士課程 医学系研究科
脳神経医学専攻 神経内科学

指導教員名: 戸田 達史

申請者名: 池永 知誓子

【要旨】

封入体筋炎は、主に 50 歳代より緩徐進行性に手指の屈筋や大腿四頭筋の筋力低下を来し、病理学的に炎症と変性の所見を呈する難治性の疾患である。本研究では、病理学的に炎症の所見のみを呈する多発筋炎の筋を比較対象とした、封入体筋炎の筋を用いた遺伝子発現解析により、両疾患で変動している経路の多くが共通していることが示された。

その一方で、封入体筋炎では細胞表面抗原の遺伝子の発現が亢進しており、本来上皮細胞の細胞膜に認められる E-cadherin が封入体筋炎症例の骨格筋に発現していることを見出だした。免疫組織化学でも、筋束内の p62 と E-cadherin が陽性の線維は封入体筋炎に特異的であった。

【目次】

[要旨]	3
[目次]	4
[序文]	6
[目的]	9
[方法]	
1. 対象とした症例	9
2. 治療反応性の評価	11
3. 筋病理所見の評価	11
4. RNA-seq による遺伝子発現解析	13
5. Western blotting	14
[結果]	
1. CD8-MHC-1 complex を認めた症例の臨床病理像	16
2. RNA-seq 解析の結果① 主成分分析	17
3. RNA-seq 解析の結果② KEGG pathway enrichment analysis	18
4. RNA-seq 解析の結果③ 発現変動遺伝子	19
5. 免疫組織化学	20
6. Western blotting	21
[考察]	
1. CD8-MHC-1 complex を認めた症例の臨床病理像	22
2. 遺伝子発現解析の結果から見た、封入体筋炎と多発筋炎の関係	23
3. 封入体筋炎の筋における、 <i>E-cadherin</i> の異所性の発現	25
4. 結果の解釈に際して留意すべき点と今後の展望	30
[引用文献]	31
[図表]	
図 1, 封入体筋炎に特徴的な筋病理所見と抗 p62 抗体による免疫組織化学	38
図 2, CD8-MHC-1 complex を認めた症例の分類	39
図 3, 主成分分析	40
図 4, KEGG pathway enrichment analysis の結果	41
図 5, 発現変動遺伝子	42
図 6, CD8-MHC-1 complex を認めた症例の筋における <i>E-cadherin</i> と <i>DR6</i> の発現量	43
図 7, 抗 <i>E-cadherin</i> 抗体と抗 <i>DR6</i> 抗体、抗 p62 抗体による免疫組織化学	
7-1 封入体筋炎	44
7-2 多発筋炎	45
7-3 抗 Mi-2 抗体陽性皮膚筋炎、壊死性筋症	46

7-4 筋線維束周囲の萎縮を認める皮膚筋炎.....	47
7-5 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー.....	48
図 8, Western blotting.....	49
表 1, 封入体筋炎の診断基準 (ENMC 2011).....	50
表 2, RNA-seq による遺伝子発現解析で対象とした症例の臨床病理像.....	51
表 3, 免疫組織化学で用いた抗体.....	52
表 4, CD8-MHC-1 complex を持つ筋炎症例の臨床病理像.....	53
表 5, Steel-Dwass test (表 4 の p 値).....	55
表 6, 免疫抑制薬に対する治療反応性.....	56
表 7, “Unclassifiable”な症例の臨床病理像.....	58
表 8, KEGG pathway enrichment analysis の結果.....	60
表 9, 封入体筋炎における抗 E-cadherin 抗体と抗 DR6 抗体、抗 p62 抗体による免疫組織化学の結果.....	68
表 10, 封入体筋炎における抗 E-cadherin 抗体で染色される線維の割合と臨床像との関連.....	69
[謝辞]	70

【序文】

封入体筋炎 (inclusion body myositis: IBM) は炎症性筋疾患の一種であり、炎症性筋疾患は IBM の他に多発筋炎 (polymyositis: PM)、皮膚筋炎、壊死性筋症、抗合成酵素症候群を含み、四肢や体幹の筋、さらに嚥下や呼吸に関わる筋の筋力低下を来す疾患群である[1、2]。それぞれの疾患は皮疹や筋力低下の分布、筋病理所見、血液中の自己抗体などに特徴があることが知られている[1、2]。

IBM は、主に 50 歳代より緩徐進行性に手指の屈筋や大腿四頭筋の筋力低下を来す疾患であり、日本でも近年増加している事が報告されている[3、4]。現在広く用いられている IBM の診断基準としては European neuromuscular center (ENMC) の基準があり、IBM の診断には発症が 45 歳以降である事、血清のクレアチンキナーゼが正常上限の 15 倍を超えない事、筋力低下の分布においては大腿四頭筋の筋力が腸腰筋の筋力以下である事、深指屈筋の筋力が三角筋の筋力未満であることのいずれか一方、あるいは両方を満たす事が必要とされている[3](表1)。病理学的には p62、SMI-31、TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) やアミロイドなどのタンパク質の蓄積か 15-18 nm のフィラメントの存在に加え、縁取り空胞、major histocompatibility complex (MHC)-class1 抗原の発現亢進を認める事、筋内鞘への炎症細胞浸潤が診断項目として挙げられている[3](表1、図 1)。この炎症細胞は主に細胞傷害性の CD8 陽性の T 細胞であり、IBM の筋では

MHC-class1 抗原の発現が亢進した筋細胞を CD8 陽性の T 細胞が取り囲み、浸潤することが知られている[5]。この MHC-class1 の発現が亢進している非壊死筋線維に CD8 陽性細胞が侵入している像は PM でも認められ、IBM と PM に共通する所見として Dalakas らにより CD8-MHC-1 complex と名付けられている[1](図 1)。

PM では筋力低下の分布は近位筋優位であり、病理学的に縁取り空胞やタンパク質の蓄積は認めず、病理学的に CD8-MHC-1 complex を認める事以外の点では IBM と PM は臨床像、病理像のいずれも異なると考えられているが[6]、実際の臨床の場面においては IBM と PM の区別が困難である事が度々指摘されている。深指屈筋や大腿四頭筋の筋力低下、あるいは筋線維内の縁取り空胞や凝集タンパク質といった IBM に特徴的な所見が無く PM と診断されても、2 回目の生検で縁取り空胞を認めた例が報告されている[7]。また、PM と診断されたものの治療への反応が乏しく、徐々に深指屈筋や大腿四頭筋の筋力低下を示した例も報告されている[8、9]。その一方で治療に反応し PM として経過する症例も少数ではあるものの報告されており[9]、IBM の検討を行う際には PM との異同に特に留意する必要がある、両者を区別する為に様々なマーカーの有用性が検討されている。

p62 は細胞内で凝集したタンパク質に結合してオートファゴソームとつなぐタンパク質の一種であり、p62 自体もオートファジーの基質として選択的に分解される事が知られてい

る[10]。IBM の筋において、p62 は mRNA とタンパク質のいずれのレベルにおいても増加し、リン酸化タンパク質と共在して凝集している事が示されている[11]。また、p62 の免疫組織化学は、TDP-43、SMI-31、ユビキチン、アミロイド β タンパク質、アミロイド β 前駆体タンパク質などの他のタンパク質に対する免疫組織化学との比較においても IBM の診断において感度が優れている事が報告されている[12]。そこで、まず炎症性筋疾患の症例から IBM や PM を含む CD8-MHC-1 complex を持つ症例を抽出し、p62 の免疫組織化学も含め、CD8-MHC-1 complex を持つ症例の臨床病理像の全貌を明らかにする事から研究を始めることとした。

IBM の発症には老化やウイルス感染、発癌に関わる経路、MHC の遺伝子型など複数の要素の関与が疑われているが、その病態の全容は明らかにはされておらず、有効な治療も無いのが現状である[1]。今までに IBM の遺伝学的な研究としては候補遺伝子の Targeted sequencing や Whole exome sequencing、縁取り空胞の質量分析などが行われてきたが、遺伝子の変異がどの様に表現型に寄与しているかは今までに明らかにされてはいなかった[13、14]。本検討では、遺伝子と表現型の間位置する転写産物を解析する事で、IBM の筋で変動している経路を網羅的に明らかにし、診断や治療の鍵になる分子を同定する事を目的とした。

【目的】

CD8-MHC-1 complex を持つ症例の臨床病理像を明らかにし、CD8-MHC-1 complex を持つ筋の遺伝子発現解析を行う事により、IBM の診断や治療の鍵になる分子を同定する。

【方法】

1, 対象とした症例:

1993年から2015年までに東大病院神経内科で病理診断を行った、連続950例の炎症性筋疾患症例のうちCD8-MHC-1 complex を認めた101例中、臨床情報が不十分であった8例を除いた93例を臨床病理像の解析の対象とした(図2)。IBMやPMの診断には、ENMCの診断基準を用いた[3、6](表1)。治療経過などの臨床情報は担当医からのアンケートの回答を参考にし、十分な情報が得られなかった場合は担当医の承諾を得て直接問診や診察を行った。

筋の発現解析に際しては、上記の93例中RNAの抽出に十分な量の凍結標本を確保出来た54例と、2015年から2016年8月までに臨床病理像を確認する事が出来、十分な量の凍結標本が確保出来たCD8-MHC-1 complex を持つ4例の計58例を対象とした。また、コントロールとして、筋病理所見に異常を認めず遺伝子検査

でも疾患特異的な変異が同定されなかった9例を対象とした[表2]。

また、発現解析で同定された遺伝子については、タンパク質のレベルでの増加の有無、また細胞内での局在を確認する目的でIBM27例の凍結筋組織を対象に免疫組織化学を行った。また、免疫組織化学ではblockingを行っても非特異的に背景が染色される場合もある為、PM6例、皮膚筋炎18例(抗melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)抗体陽性3例、抗Mi-2抗体陽性10例を含む)、壊死性筋症10例、抗合成酵素症候群8例、健常コントロール9例の凍結筋組織を比較対象として用いた。また、縁取り空胞を持つ他の筋疾患として、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー10例の凍結筋組織も比較の対照とした。

血清や筋などの検体の使用に際しては、生検時に書面での同意を得ており(ヒト組織を用いた脳神経疾患の病因の解明・治療法の開発に関する研究、G3041-(2)末梢神経筋疾患の病態機序に関する遺伝子解析研究、G1396-(32)神経筋変性疾患の遺伝子解析研究、G2088-(7)免疫性・感染性神経筋疾患についての遺伝子解析研究、G10072末梢神経筋疾患の病態機序解明のための分子病理学的遺伝子解析研究)、院内の倫理委員会の承諾も得た。

2, 治療反応性の評価

治療反応性を評価する指標として、過去の記録からも判定が可能であった治療前後の modified Rankin Scale (mRS)を用いて次の様に評価を行った。①有効:mRS が1年以内に2スコア以上低下、あるいは1年以上の経過観察で1スコア以上低下、②部分的に有効:mRS が1年以内に1スコア低下、③変化無し:1年以上の経過観察で mRS の変化無し、④悪化:経過観察の長さに関わらず mRS が1以上増加。

3, 筋病理所見の評価

筋の凍結切片に対し、ルーチン染色 (Hematoxylin-Eosin (HE)染色、Gomori-Trichrome 染色、NADH-TR 染色)と免疫組織化学を行った。

免疫組織化学に際しては、 -20°C に冷却したアセトンで凍結検体を5分間固定し、phosphate buffered saline (PBS)で洗浄した後、過酸化水素・メタノール溶液で5分間内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った。PBS で洗浄後は10%正常ヤギ血清で blocking を行った。その後 4°C の条件下にて、blocking で使用した10%正常ヤギ血清で希釈した一次抗体 (MHC-class1、MHC-class2、CD45、CD8、p62/SQSTM1、E-cadherin、death receptor 6 で一晩反応させた(表3)。室温にてPBSによる洗浄を行い、ビオチン化二次抗体 (Vector laboratories、Burlingame、CA)を30分反応させ

た。続いてアビジン-ビオチン複合体法を用い、3,3'- Diaminobenzidine 溶液で染色を行った。

抗 p62 抗体による免疫組織化学では、筋線維は①細胞内に濃い顆粒状の凝集体を認める線維、②びまん性に淡く染まる線維、③筋線維の細胞膜のみ染まる線維、④染色性を認めない線維の 4 種類に分類された。②は散在しているという分布の点や、健常コントロールとの対比においてバックグラウンドシグナルとは区別されるものの壊死性筋症でも認められ、頻度は少ないものの認められる③に至っては、p62 が膜タンパク質ではないことを考慮すると、一次抗体が認識している分子が p62 以外の類似した他の物質である可能性も考えられ、凝集タンパク質に p62 が結合した状態と考えられた①の線維のみを p62 陽性と評価した[図 1]。また、一切片内に一つ以上の p62 陽性線維をもつ例を、p62 陽性と定義した。

縁取り空胞を持つ線維についても同様に、一切片内に一つ以上の縁取り空胞を持つ線維がある例を、縁取り空胞陽性の症例と定義した。

また、抗 E-cadherin 抗体や抗 DR6 抗体でびまん性に染色された線維は、筋束あたりの染色された線維の本数により、次のように分類した(0:なし、1:1 本未満 /束、2:1 本以上 3 本未満 /束、3:3 本以上 /束)。

4, RNA-seq による遺伝子発現解析

CD8-MHC-1 complex を認めた 58 例とコントロール 9 例の筋標本の凍結切片 (50 μm 厚 \times 7-15 枚) を、4°C の条件下で 0.75 ml の Trizol に溶解させた。その後 Total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて単離し、RNA の濃度は Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。検体の RNA integrity number については Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて 6 以上であることを確認した。さらに TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep kit with Ribo-Zero Gold (Illumina) を用いて ribosomal RNA を除去した。得られた検体について illumina HiSeq2500 (101 bp, paired end 法) で解析を行い、FastQ file を得た。FastQC (v0.11.5) を用いて file の品質を確認し、R (version 3.3.3) とそのパッケージである Rsubread (version 1.24.2) を用いて hg38 を参照配列として alignment を行った [15]。得られたデータに関しては、全てのサンプルで発現量が 0 であった遺伝子を除いた 27447 個の遺伝子を解析の対象とし、対数変換を行うと正規分布に従うことを Q-Q plot で確認した。さらに R のパッケージである edgeR と limma を用い主成分分析、edgeR の exact test 法を用いて発現変動遺伝子の検出を行い、そこで検出された発現変動遺伝子を用い、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway を参照して KEGG pathway enrichment analysis を行った [16, 17]。

なお、予備検討として、IBM 症例の中で炎症の程度がほぼ同じ、上腕二頭筋から採取した 17 例、大腿四頭筋 9 例をそれぞれ一つのグループとして KEGG pathway enrichment analysis を行ったが、有意差のある pathway は検出されなかった。

また、細胞表面抗原 *CD1A* から *CD371* までの 392 遺伝子各々の発現量について、Dunnett 法で多重比較を行った[18、19]。

5, Western blotting

発現解析で同定された分子のタンパク質レベルでの有無を確認する目的で、Western blotting を行った。IBM6 例とコントロール 3 例 (*E-cadherin* の発現量は IBM で 0.48、0.88、0.91、0.95、0.96、1.07、コントロールで 0.004、0.064、0.073 ; いずれも単位は Reads per kilobase of exon per million mapped reads (RPKM)) の筋を、ホモジナイザーを用い 1%のプロテアーゼ・インヒビターを含む TBS (Tris Buffered Saline: 50 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl)溶液中で破碎し、1%の NP-40 と 1%の TritonX-100 で可溶化した。4°C のロータリーで 1 時間混和した後、20000 g で 10 分間遠心し上清を得、Lowry 法でタンパク質の濃度を測定した。

当初免疫沈降で濃縮するだけではバンドを検出する事が出来なかった為、IBM の筋に含まれる免疫グロブリンなどを除去する目的で、4 mg のタンパク質を含む上清と

20 μ l の protein G セファロースビーズ(GE Healthcare, Pittsburgh, PA) を 4°C のロータリーで 90 分混和した後にビーズを除去した。筋に含まれる E-cadherin は微量と考えられた為、濃縮する目的で上清に 0.7 μ g の抗 E-cadherin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) と 10 μ l の protein G セファロースビーズを入れ、4°C のロータリーで一晩混和した。ビーズは 0.1%の NP-40 と 0.1%の Triton X-100 を含む TBS で 3 回洗浄し、Laemmli sample buffer と混和し 95°C で 3 分間の加熱処理を行った。処理後のサンプルに 4-15% SDS-polyacrylamide gradient gel (BioRad, Hercules, CA)を用いて SDS-PAGE を行い、タンク式の転写装置を用いて polyvinylidene difluoride membranes (Merck Millipore)に転写した。5%のスkimミルクと 0.1% Tween-20 を含む TBS-T 液で 1 時間 blocking を行った後、E-cadherin の細胞内領域を認識する抗 E-cadherin 抗体 (1:1000、BD Biosciences, San Jose, CA) を含む同じ組成のスkimミルク液内で一晩 4°C 下に置いた。同じ組成のスkimミルク液で洗浄を行った後、horseradish peroxidase 標識の抗 mouse IgG2a 抗体 (1:3000、Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) を含む TBS-T 液で 1 時間室温に置いた。TBS-T で洗浄した後、ECL prime western blotting detection system (GE Healthcare, Madison, WI)を用いて、バンドを可視化した。

なお、E-cadherin の陽性コントロールとしてヒト前立腺癌細胞 (PC-3) の溶解液を

用いた。また、免疫沈降で用いた上清に等量のタンパク質が含まれていた事を確認する目的で、上清に対し別途に Western blotting を行い Ponceau 染色を行った。

【結果】

1, CD8-MHC-1 complex を認めた症例の臨床病理像

93 例中 70 例は IBM、17 例は PM で、今までの報告にはない筋力低下の分布をとった例が 6 例いた。その 6 例は近位だけでなく上肢あるいは下肢遠位の筋力低下も認めたが、既報告の IBM の筋力低下の分布とは一致しなかった (“Unclassifiable”) (図 2)。

IBM 症例の男性と女性の症例数は同じであったのに対し、PM 症例では女性の方が男性よりも多く、“Unclassifiable”な症例は全例女性であった(表 4)。診断時の年齢は PM と比較し IBM で高齢であり($p=0.03$)、PM では血清中の抗 C 型肝炎ウイルス(HCV)抗体陽性例は認めなかったのに対し、IBM では 20%、“Unclassifiable”な症例では 33%の症例が陽性であった(表 4、5)。筋炎以外の自己免疫疾患の合併は、IBM では 13 例(19%)、PM では 7 例(41%)、“Unclassifiable”な症例では 4 例で認められた(表 4)。

病理像に関しては、縁取り空胞は IBM 症例のうち 56 例(80%)で認められ、p62 は

IBM 症例のうち 66 例(94%)、“Unclassifiable”症例のうち 2 症例(33%)で陽性であった(表 4)。PM 症例の中には p62 陽性の症例は認めなかった。

治療効果に関しては、IBM では p62 が陽性、陰性を問わず効果を認めた例は無かった(表 6)。16 例の PM 症例はいずれも p62 が陰性で、そのうち 11 例で治療が有効あるいは部分的に有効、3 例は変化無し、2 例が悪化したという結果であった。変化が無かった症例は、mRS1 であったのが 1 例、mRS2 であったのが 2 例と最初から症状が軽度であった。悪化した症例はステロイドの内服を開始して 56 か月後にステロイドミオパチーを発症した例と、ステロイドパルス療法の 6 か月後に前立腺癌で死亡した例の 2 例であった。“Unclassifiable”な症例のうち 2 例は p62 が陽性で悪化、4 例は p62 が陰性で治療反応性は有効、あるいは部分的に有効、という結果であった(表 7)。

2, RNA-seq 解析の結果① 主成分分析

CD8-MHC-1 complex を認めた症例の臨床病理像の検討から、IBM と PM では CD8 陽性のリンパ球による細胞傷害性の免疫応答が起きていることは共通しているものの、p62 の染色性には差があり、筋障害のプロセスも異なると考えられた。

概観を見る目的で行った主成分分析では、コントロールと CD8-MHC-1 complex

を有する疾患群はそれぞれ一群を成していた。一方で、第二主成分までの累積寄与率は 97.4%であったが、第一主成分と第二主成分のどちらも IBM と PM を分けることは無く、両者は一群を成していた(図 3)。

3, RNA-seq 解析の結果② KEGG pathway enrichment analysis

コントロール群と比較して、IBM では 82 個の KEGG pathway において遺伝子の発現が亢進していたのに対し、PM では 99 個の KEGG pathway で亢進を認め、そのうち 75 個の pathway は IBM と PM で共通していた($p < 0.01$)。

一方で、コントロール群と比較して IBM では 29 個の pathway において遺伝子の発現が低下しており、PM では 19 個の pathway において低下を認め、そのうち 16 個の pathway は IBM と PM で共通していた($p < 0.01$)(図 4、表 8)。

IBM と PM を比較すると、IBM では小胞体におけるタンパク質のプロセッシングや細胞死 (p53 signaling pathway やアポトーシス)、nuclear factor-kappa B (NFkB)/ tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway や細胞接着因子の遺伝子の発現が亢進していた($p < 0.01$)。一方で、mammalian target of rapamycin (mTOR)/ calcium AMP-activated protein kinase (AMPK)/ forkhead box O (FoxO) signaling pathway やオートファジーに関する経路の遺伝子の発現は低下していた($p < 0.01$)。

4, RNA-seq 解析の結果③ 発現変動遺伝子

コントロールと比較した際、IBM では 7627 個、PM では 2803 個の発現変動遺伝子を認めた (FDR (false discovery rate) < 0.01)。そのうち 2741 個の遺伝子は IBM と PM で共通していた (図 5)。IBM を PM と比較した際、発現変動遺伝子は 411 個 (FDR < 0.01)、1743 個 (FDR < 0.05) であった (図 5)。この 1743 個の遺伝子のうち、9 個の遺伝子の発現量は PM と比較し IBM では 4 倍以上で、その 9 個中 7 個は免疫グロブリンの遺伝子であった。

また、細胞表面抗原 392 個の遺伝子のうち、コントロールと比較して IBM で発現量に有意な差を認めた遺伝子は 306 個 ($p < 0.01$) で、その中で PM と比較して IBM で発現量に有意な差を認めた遺伝子は 50 個 ($p < 0.01$) であった (図 5)。その 50 個の遺伝子の中で、コントロールで 0.1 RPKM 以下、PM で 0.12 RPKM 以下の遺伝子は、*Epithelial-cadherin (E-cadherin, CD324)*のみであった (図 6)。

その他、これらの 50 個の遺伝子の中には、5 個の TNF receptor superfamilies (TNFRSF; *CD261 (death receptor (DR) 4, TNFRSF10A)*, *CD262 (DR5, TNFRSF10B)*, *CD264 (TNFRSF10D)*, *CD357 (TNFRSF18)*, *CD358 (DR6, TNFRSF21)*) も含まれていた (図 5、図 6)。

5, E-cadherin と DR6 の免疫組織化学

IBM の筋において、RNA のレベルで増加が確認された E-cadherin と DR6 については、タンパク質レベルでの増加の有無や細胞内での局在を確認する目的で免疫組織化学を行った。IBM で p62 陽性の顆粒を認めた線維は抗 E-cadherin 抗体で染色されなかったのに対し、抗 p62 抗体で筋線維の細胞質にびまん性に染色性を認めた線維は抗 E-cadherin 抗体でもびまん性に染色された(図 7-1、表 9)。染色された線維の径に関しては、特に一定の傾向は認めなかった。PM でも 6 例中 1 例で抗 p62 抗体と抗 E-cadherin 抗体でびまん性に細胞質が染色された線維を認めたが、ごく少数に留まり、他の 5 例では抗 p62 抗体でびまん性に染色される線維はあっても抗 E-cadherin 抗体では染色されなかった(図 7-2)。

抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎や壊死性筋症では、壊死線維に一致して p62 陽性の細かい顆粒を認めた他、細胞質がびまん性に染色された線維を筋束毎に 3 個以上認めたが、壊死性筋症ではそれらの線維は抗 E-cadherin 抗体では染色されず、抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎でもごく少数に留まるのみであった(図 7-3)。

抗 MDA5 抗体陽性の皮膚筋炎や抗合成酵素症候群、健常コントロールの筋では抗 p62 抗体や抗 E-cadherin 抗体で染色される線維は認めなかった。

その他、皮膚筋炎のうち、筋線維束周囲に位置し萎縮を認めた 7 例中 3 例の

筋線維の一部に抗 p62 抗体と抗 E-cadherin 抗体によるびまん性の染色性を認めた(図 7-4)。

また、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー10例中1例で、p62 陽性の顆粒を持つ筋線維が集中している筋束において、p62 陽性の顆粒を持つ筋線維のうち萎縮した線維の細胞膜が、抗 E-cadherin 抗体で染色された(図 7-5)。また、同線維の細胞質にも淡い染色性を認めた。この1例は、p62 陽性の顆粒を持つ筋線維が集中している筋束がある一方で隣の筋束はほぼ正常、と部位毎の差が大きい症例であった。

また、DR6 の発現は IBM のみならず PM やコントロールでも認めたが、抗 DR6 抗体を用いた免疫組織化学では抗 E-cadherin 抗体で染色される IBM の筋線維にのみ染色性を認めるという結果であった(表 9)。

なお、今回の検討においては、抗 E-cadherin 抗体で染色される線維が多い症例は男性に多かったが、その他年齢や血中のクレアチンキナーゼの値、合併症には明らかな相関は認めなかった(表 10)。

6, Western blotting

発現解析で同定された *E-cadherin* について、IBM の筋においてタンパク質のレベルでの有無や、筋における分子の大きさを確認する目的で Western blotting を行っ

たが、当初明らかなバンドは検出されなかった。筋に含まれる E-cadherin が微量である事が原因と考えられ、免疫沈降による濃縮を行ったが、それでもバンドは検出されず、組織に免疫グロブリンが多く含まれ免疫沈降を阻害している可能性を考え preclear の過程を追加した。その結果、IBM6 例のいずれにおいても PC-3 で検出されたバンドと大きさが一致した 120 kDa (全長型) と 35 kDa のバンドが検出された (図 8)。一方で、コントロールでは 120 kDa のバンドは検出されず、1 例でわずかに 35 kDa のバンドが検出された。

【考察】

1. CD8-MHC-1 complex を認めた症例の臨床病理像

今回の検討では、CD8-MHC-1 complex を持つ筋炎には、ENMC の IBM や PM の基準に当てはまらない筋力低下の分布をとる“Unclassifiable”な症例が存在する事が示された。また、PM では p62 の陽性例はなく 16 例中 11 例で治療に反応し、IBM では p62 の陽性率が 94%であり、p62 陽性例、陰性例のいずれにおいても治療に反応した症例は認めなかったが、“Unclassifiable”な 6 症例では、p62 陽性例は治療効果を認めず、p62 陰性例は治療に反応し、治療法の選択に際し p62 の免疫組織化学が参考になる可能性が考えられた。

なお、今回は過去の記録からも判定が可能であった mRS を指標として用いたが、mRS では嚥下障害は進行していても四肢の筋力低下は目立たない方を実際よりも軽症であると判断してしまう恐れがあり、今後前方視的な検討を行う上では IBM Functional Rating Scale を用いて評価を行う事が望ましいと考えられた[20]。

2. 遺伝子発現解析の結果から見た、封入体筋炎と多発筋炎の関係

主成分分析では、CD8-MHC-1 complex を有する疾患群とコントロールは独立しているものの、疾患群の中では IBM と PM は完全には区別されず、KEGG pathway analysis でも IBM と PM は変動している経路の多くが共通していることが示された。

IBM の筋では、免疫系や感染症に関連した経路の遺伝子の発現が亢進し、免疫グロブリンの遺伝子の発現が PM やコントロールと比較して多かったが、この結果は microarray を用いた既報告と合致していた[21]。また、RNA-seq を用いた別の報告では、IBM では細胞内のカルシウム代謝に異常を来しているという報告もなされていたが、今回の検討でも IBM では PM と比較し calcium signaling pathway の遺伝子の発現が低下していた[22]。その他、microarray を用いた別の報告では、PM ではなく IBM でのみ RNA の代謝や酸化的リン酸化に関する経路の遺伝子の発現に変化を来しているという報告がなされていた[23]。今回の検討でも IBM では RNA の代謝や

酸化了的リン酸化の遺伝子の発現が低下しており、既報告に矛盾しない結果と考えられた。

一方で、今回の検討では PM でも RNA の代謝や酸化了的リン酸化の遺伝子の発現が低下しているという結果であった。この様に既報告と部分的に異なる結果となった背景として、近位筋の筋力低下がある症例を全て PM とした先行研究と、近位筋の筋力低下に加え病理学的に CD8-MHC-1 をもつことを確認し、さらに他の疾患の可能性を除いた症例を PM とした今回の検討では、前者の PM の定義の方がより広義であり、対象としている例が異なることによる可能性が考えられた。

なお、IBM の病態には持続的な抗原提示に対する T 細胞の応答の関与が示唆されており[24]、IBM では T 細胞大顆粒リンパ球性白血病の診断基準を満たす例が多く、筋線維では T 細胞が腫瘍の様に増加しているという報告もある[25]。今回の検討では、IBM と PM はコントロールと比較し細胞接着因子や NFkB などの経路の遺伝子の発現が亢進していたが、IBM では PM よりもさらにこれらの経路の遺伝子の発現が亢進している事が示唆され、矛盾しない結果と考えられた。

一方で、今回の解析では PM と比較し IBM で系の遺伝子の発現が低下している経路の一つとして mTOR signaling pathway が挙げられた。IBM では mTOR 阻害薬である Rapamycin の第二相治験の結果、6 分間歩行の距離や肺活量、MRI で測定し

た大腿四頭筋の容積などには改善を認めたことが報告されており[26]、今回の解析結果と治験の結果は一見矛盾する様にも見受けられた。mTOR 遺伝子そのものの発現に関してはコントロールや IBM、PM で有意差は認めなかったものの、経路全体としてこの様な相違を来した原因の一つとしては、解析の対象とした検体が筋とリンパ球の両方を含んでいたことが挙げられた。筋肉の免疫染色を行った先行研究では、PM のリンパ球では mTOR が陽性であったのに対し、IBM では mTOR 陽性のリンパ球を認めなかったと報告されている[27]。

3. 封入体筋炎の筋における、E-cadherin の異所性の発現

今回の検討では、本来上皮細胞の細胞膜に存在するはずの E-cadherin が、IBM の筋細胞の細胞質に存在していることが明らかになった。今までに筋の細胞質の p62 陽性の顆粒は IBM の診断に特異的と考えられてきたが[11]、抗 p62 抗体でびまん性に染色される線維も健常コントロールには認めない事から、少なくとも細胞内に通常存在する p62 を反映して染まっているのでは無く、筋束内に抗 p62 抗体と抗 E-cadherin 抗体でびまん性に染まる線維が存在する事も、IBM に特異的であることが示された(図 7-1)。抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎や壊死性筋症では抗 p62 抗体でびまん性に染色される壊死線維は認めたものの、それらは抗 E-cadherin 抗体で

は染色されなかった事からは(図7-3)、抗 E-cadherin 抗体で染色される線維は壊死線維では無いと考えられた。

一方で、皮膚筋炎の線維束周囲の萎縮した線維の一部にも、抗 p62 抗体と抗 E-cadherin 抗体でびまん性に染まる線維を認めた(図7-4)。また、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの 10 例中 1 例で、p62 陽性の顆粒を持つ筋線維が集中している筋束においてのみ、萎縮した線維の細胞膜が抗 E-cadherin 抗体で染色された(図7-5)。

今回 IBM に関しては、筋の Western blotting により陽性コントロールと合致した全長型の E-cadherin と 35 kDa の E-cadherin が検出されており、IBM の筋の免疫組織化学で認めた細胞質のびまん性の染色は E-cadherin を認識したものである事を裏付ける結果であった。免疫組織化学のみでは E-cadherin 以外の物質で E-cadherin に類似したエピトープを持つ分子が認識されて染まっている可能性は否定出来ず、皮膚筋炎の皮膚筋炎の線維束周囲の萎縮した筋線維や縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの 1 例での染色性についての解釈には、慎重を期する必要があると考えられた。

E-cadherin は通常は上皮細胞に存在し、カルシウムイオン依存性に上皮細胞同士の接着結合に寄与しており、骨格筋での存在は今までに報告されていない[28、

29]。E-cadherin は組織間の結合を強める事で腫瘍細胞の播種を抑制する事、 β -catenin を細胞表面に留める事で Wnt / β -catenin シグナル経路を抑制する事が知られている[30、31、32]。

通常は細胞表面に存在している E-cadherin が細胞内に移行する例としては、presenilin-1 などのタンパク質分解酵素により E-cadherin の細胞内領域が切断され細胞内に移行し、それまで細胞膜に留められていた β -catenin も細胞内に移行して核に結合し、標的遺伝子の転写を促す事が報告されている[32]。IBM の筋において、 β -catenin は主に筋線維の核に存在するという先行研究は、細胞内に存在し、免疫組織化学で染色されているのは E-cadherin の細胞内領域である可能性を支持すると考えられた[33]。また、Western blotting では一次抗体として E-cadherin の細胞内領域を認識する抗体を用いており、120 kDa の全長型 E-cadherin のバンド以外に検出された 35 kDa のバンドは、E-cadherin が切断された際の細胞内領域を反映している可能性が考えられた。

E-cadherin が細胞内に移行する他の例としては、細胞外のカルシウムイオンが枯渇すると接着結合が崩壊し、E-cadherin が β -catenin と結合したまま内在化する事も報告されている[34]。ただし、IBM の筋において一見正常に見える筋では細胞表面に E-cadherin の発現は認めず、筋には本来存在しない E-cadherin がそもそも

IBM の筋でなぜ発現しているのかは疑問として残る。

筋における Wnt / β -catenin シグナル経路については、老齢マウスの筋の衛星細胞において Wnt / β -catenin シグナル経路が活性化し、衛星細胞が筋細胞に分化するのではなく線維芽細胞に分化する事が報告されている[35]。IBM の発症は主に 50 歳代からであり、これまでも発症には老化の関与が指摘されてきたが、E-cadherin も Wnt / β -catenin シグナル経路を介して老化に伴う変化に寄与している可能性が考えられた[36]。

また、急性骨髄性白血病の細胞では、 β -catenin が核に移行するとオートファジーの阻害や細胞増殖の促進を来すが、E-cadherin が β -catenin を細胞表面に留める事でオートファジーの阻害や細胞増殖を抑制するという報告もなされている[37]。

この他にも、E-cadherin は CD8 陽性の T 細胞が発現する CD103 に結合して、CD8 陽性の T 細胞が組織に留まり細胞傷害性を発揮することを促す、あるいは Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway や Rho-family GTPase の働きを調整する、NFkB を阻害するといった作用を担う事も知られている[38]。

今回の検討では、E-cadherin が陽性である事は年齢や血中のクレアチンキナーゼの値、癌などの合併疾患の有無とは明らかな関連は認めなかった。IBM の筋において、E-cadherin が細胞の老化や変性に寄与しているかどうか、あるいはその様な変

化に対応して二次的に発現しているのか、今後さらなる検討が必要と考えられた。

その他、細胞表面抗原の中で IBM と PM で発現量に有意な差を認めた 50 個の遺伝子の中には 5 個の TNFRSF が含まれ、これらの分子中 *CD264* を除く 4 個の分子は細胞死のシグナル伝達に関する death domain を細胞内に持つ点が共通しており、アポトーシスやネクローシスなどの細胞死に関与する事が知られている[39、40]。

なお、IBM の筋における TNF superfamilies (TNFSF) の関与はこれまでに複数の報告がなされている。筋における *TNFSF2* (*TNF α*) の mRNA が増加しており、miRNA を介して筋の再生を抑制する事が報告されており[41]、今回の研究でも筋における *TNF α* の発現はコントロールではほぼ認めないのに対し、IBM で亢進していた。他の研究では、*TNF-like weak inducer of apoptosis* (*TWEAK*、*TNFSF12*) の発現が、PM やコントロールと比較して IBM の筋で亢進しており、筋線維の再生を阻害しているという報告もなされている[42]。また、IBM の筋や血清において *B-cell activating factor of the TNF superfamily* (*BAFF*、*TNFSF13B*) の転写産物が増加していたという報告もある[43、44]。

今回 IBM の筋において発現が増加していた *DR6* は、アルツハイマー病では caspase6 を介して軸索の刈り込みや神経細胞の死を引き起こしている可能性や、筋萎縮性側索硬化症のモデルマウス (*SOD1^{G93A}*) や実験的自己免疫性脳脊髄炎を来

したマウスにおいて、caspase3を介して細胞死を引き起こしている可能性などが挙げられている[45-47]。さらに神経細胞以外でも、腫瘍細胞に発現したアミロイド前駆タンパク質のN末端が、血管内皮細胞に発現したDR6と結合する事で血管内皮細胞の壊死を来し、腫瘍の転移が促進されたという報告もある[48]。

この様に、DR6は細胞死に寄与する分子として報告されてきたが、今回抗Mi-2抗体陽性皮膚筋炎、壊死性筋症で多発していた壊死線維は抗DR6抗体では染色されず、IBMの筋においてE-cadherinやDR6が共在する線維がIBMの病態においてどのような役割を担うかを明らかにする為には、さらなる検討が必要と考えられた。

4. 結果の解釈に際して留意すべき点と今後の展望

今回の検討で留意すべき点としては、第一に、コントロール症例の年齢が患者群より若く、同定された変化が加齢による影響を受けている可能性がある点が挙げられる。第二に、PMは症例数が少なく、今回は6例のサンプルを対象としており、IBMとの統計学的検定においてはその影響を考慮する必要がある点である。

今後は、今回の解析結果に加え、他のOmics解析の結果と合わせて解析することや、E-cadherinの発現を制御する因子の解析が有用であると考えられた。

【引用文献】

1. M. C. Dalakas, Inflammatory Muscle Diseases. *N Engl J Med* **373**, 393–394 (2015).
2. J. L. De Bleecker et al., 205th ENMC International Workshop: Pathology diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies part II 28–30 March 2014, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* **25**, 268–272 (2015).
3. M. R. Rose, E. I. W. Group, 188th ENMC International Workshop: Inclusion Body Myositis, 2–4 December 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* **23**, 1044–1055 (2013).
4. N. Suzuki et al., Increase in number of sporadic inclusion body myositis (sIBM) in Japan. *J Neurol* **259**, 554–556 (2012).
5. K. Arahata, A. G. Engel, 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 (1984).
6. J. E. Hoogendijk et al., 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10–12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* **14**, 337–345

(2004).

7. A. A. Amato et al., Inclusion body myositis: clinical and pathological boundaries. *Ann Neurol* 40, 581–586 (1996).
8. M. F. van der Meulen et al., Polymyositis: an overdiagnosed entity. *Neurology* 61, 316–321 (2003).
9. N. Chahin, A. G. Engel, Correlation of muscle biopsy, clinical course, and outcome in PM and sporadic IBM. *Neurology* 70, 418–424 (2008).
10. G. Bjørkøy, T. Lamark, T. Johansen, p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy* 2, 138–139 (2006).
11. A. Nogalska, C. Terracciano, C. D’Agostino, W. King Engel, V. Askanas, p62/SQSTM1 is overexpressed and prominently accumulated in inclusions of sporadic inclusion–body myositis muscle fibers, and can help differentiating it from polymyositis and dermatomyositis. *Acta Neuropathol* 118, 407–413 (2009).
12. O. Dubourg et al., Diagnostic value of markers of muscle degeneration in sporadic inclusion body myositis. *Acta Myol* 30, 103–108 (2011).
13. C. C. Weihl et al., Targeted sequencing and identification of genetic variants in sporadic inclusion body myositis. *Neuromuscul Disord* 25, 289–296 (2015).

14. A. K. Güttches et al., Proteomics of rimmed vacuoles define new risk allele in inclusion body myositis. *Ann Neurol* 81, 227–239 (2017).
15. Y. Liao, G. K. Smyth, W. Shi, The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res* 41, e108 (2013).
16. M. D. Robinson, D. J. McCarthy, G. K. Smyth, edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140 (2010).
17. M. E. Ritchie et al., limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43, e47 (2015).
18. G. Clark et al., Nomenclature of CD molecules from the Tenth Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop. *Clin Transl Immunology* 5, e57 (2016).
19. The National Center for Biotechnology Information
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.)
20. C. E. Jackson et al., Inclusion body myositis functional rating scale: a reliable and valid measure of disease severity. *Muscle Nerve* 37, 473–476 (2008).
21. S. A. Greenberg et al., Molecular profiles of inflammatory myopathies. *Neurology* 59, 1170–1182 (2002).

22. D. R. Amici et al., Calcium dysregulation, functional calpainopathy, and endoplasmic reticulum stress in sporadic inclusion body myositis. *Acta Neuropathol Commun* 5, 24 (2017).
23. A. Cortese et al., Widespread RNA metabolism impairment in sporadic inclusion body myositis TDP43–proteinopathy. *Neurobiol Aging* 35, 1491–1498 (2014).
24. K. Amemiya, R. P. Granger, M. C. Dalakas, Clonal restriction of T–cell receptor expression by infiltrating lymphocytes in inclusion body myositis persists over time. Studies in repeated muscle biopsies. *Brain* 123 (Pt 10), 2030–2039 (2000).
25. S. A. Greenberg, J. L. Pinkus, A. A. Amato, T. Kristensen, D. M. Dorfman, Association of inclusion body myositis with T cell large granular lymphocytic leukaemia. *Brain* 139, 1348–1360 (2016).
26. ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02481453>
27. P. A. Panaite, A. K. Stalder, S. Ipsen, T. Kuntzer, A. J. Steck, mTOR is expressed in polymyositis but not in sporadic inclusion body myositis. *Clin Neuropathol* 34, 371–373 (2015).
28. A. Nagafuchi, Y. Shirayoshi, K. Okazaki, K. Yasuda, M. Takeichi, Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E–cadherin cDNA. *Nature* 329,

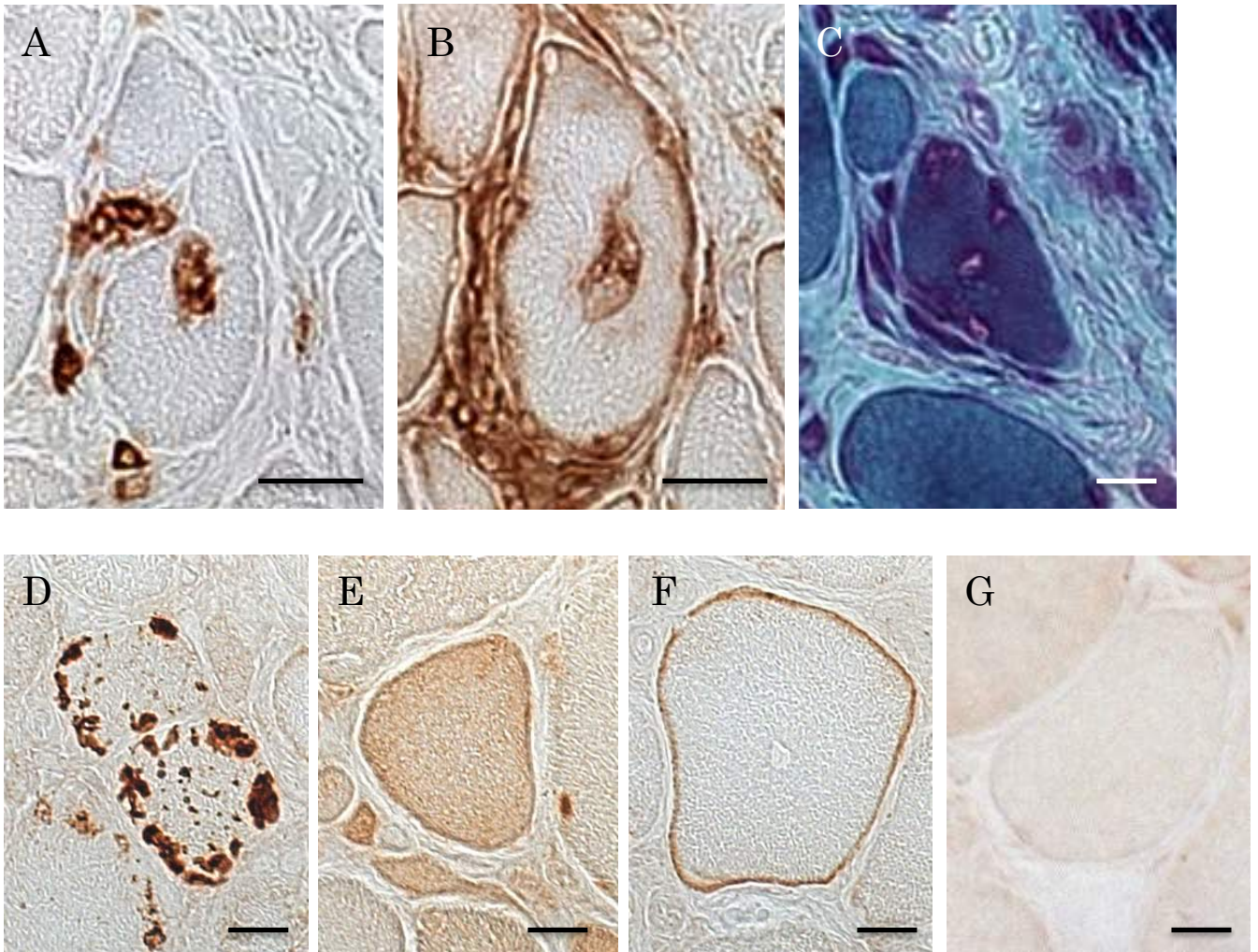
- 341–343 (1987).
29. S. Hirano, A. Nose, K. Hatta, A. Kawakami, M. Takeichi, Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J Cell Biol* 105, 2501–2510 (1987).
 30. G. Berx, F. van Roy, Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a003129 (2009).
 31. J. Paredes et al., Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1826, 297–311 (2012).
 32. J. Heuberger, W. Birchmeier, Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002915 (2010).
 33. R. Morosetti et al., Increased aging in primary muscle cultures of sporadic inclusion-body myositis. *Neurobiol Aging* 31, 1205–1214 (2010).
 34. T. L. Le, A. S. Yap, J. L. Stow, Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol* 146, 219–232 (1999).
 35. A. S. Brack et al., Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317, 807–810 (2007).
 36. V. Askanas, W. K. Engel, A. Nogalska, Sporadic inclusion-body myositis: A

- degenerative muscle disease associated with aging, impaired muscle protein homeostasis and abnormal mitophagy. *Biochim Biophys Acta* 1852, 633–643 (2015).
37. K. Kühn et al., The interplay of autophagy and β -Catenin signaling regulates differentiation in acute myeloid leukemia. *Cell Death Discov* 1, 15031 (2015).
38. J. Van den Bossche, B. Malissen, A. Mantovani, P. De Baetselier, J. A. Van Ginderachter, Regulation and function of the E-cadherin/catenin complex in cells of the monocyte-macrophage lineage and DCs. *Blood* 119, 1623–1633 (2012).
39. N. Corazza, D. Kassahn, S. Jakob, A. Badmann, T. Brunner, TRAIL-induced apoptosis: between tumor therapy and immunopathology. *Ann N Y Acad Sci* 1171, 50–58 (2009).
40. F. Gonzalez, A. Ashkenazi, New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29, 4752–4765 (2010).
41. R. W. Georgantas et al., Inhibition of myogenic microRNAs 1, 133, and 206 by inflammatory cytokines links inflammation and muscle degeneration in adult inflammatory myopathies. *Arthritis Rheumatol* 66, 1022–1033 (2014).
42. R. Morosetti et al., TWEAK in inclusion-body myositis muscle: possible pathogenic role of a cytokine inhibiting myogenesis. *Am J Pathol* 180, 1603–1613 (2012).

43. M. Salajegheh et al., Permissive environment for B-cell maturation in myositis muscle in the absence of B-cell follicles. *Muscle Nerve* 42, 576–583 (2010).
44. O. Krystufková et al., Increased serum levels of B cell activating factor (BAFF) in subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis* 68, 836–843 (2009).
45. A. Nikolaev, T. McLaughlin, D. D. O’Leary, M. Tessier-Lavigne, APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457, 981–989 (2009).
46. G. Huang et al., Death receptor 6 (DR6) antagonist antibody is neuroprotective in the mouse SOD1G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Dis* 4, e841 (2013).
47. S. Mi et al., Death receptor 6 negatively regulates oligodendrocyte survival, maturation and myelination. *Nat Med* 17, 816–821 (2011).
48. B. Strilic et al., Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* 536, 215–218 (2016).

【図表】

図1、封入体筋炎に特徴的な筋病理所見と抗 p62 抗体による免疫組織化学



A、B: CD8 陽性のリンパ球が、MHC-class1 抗原の発現が亢進している非壊死筋線維に浸潤している像 (AとBは連続切片、A: 抗 CD8 抗体による染色、B: 抗 MHC-class1 抗体による染色)

C: 縁取り空胞 (Gomori-Trichrome 染色)

D: p62 陽性の凝集体 (抗 p62 抗体による染色)

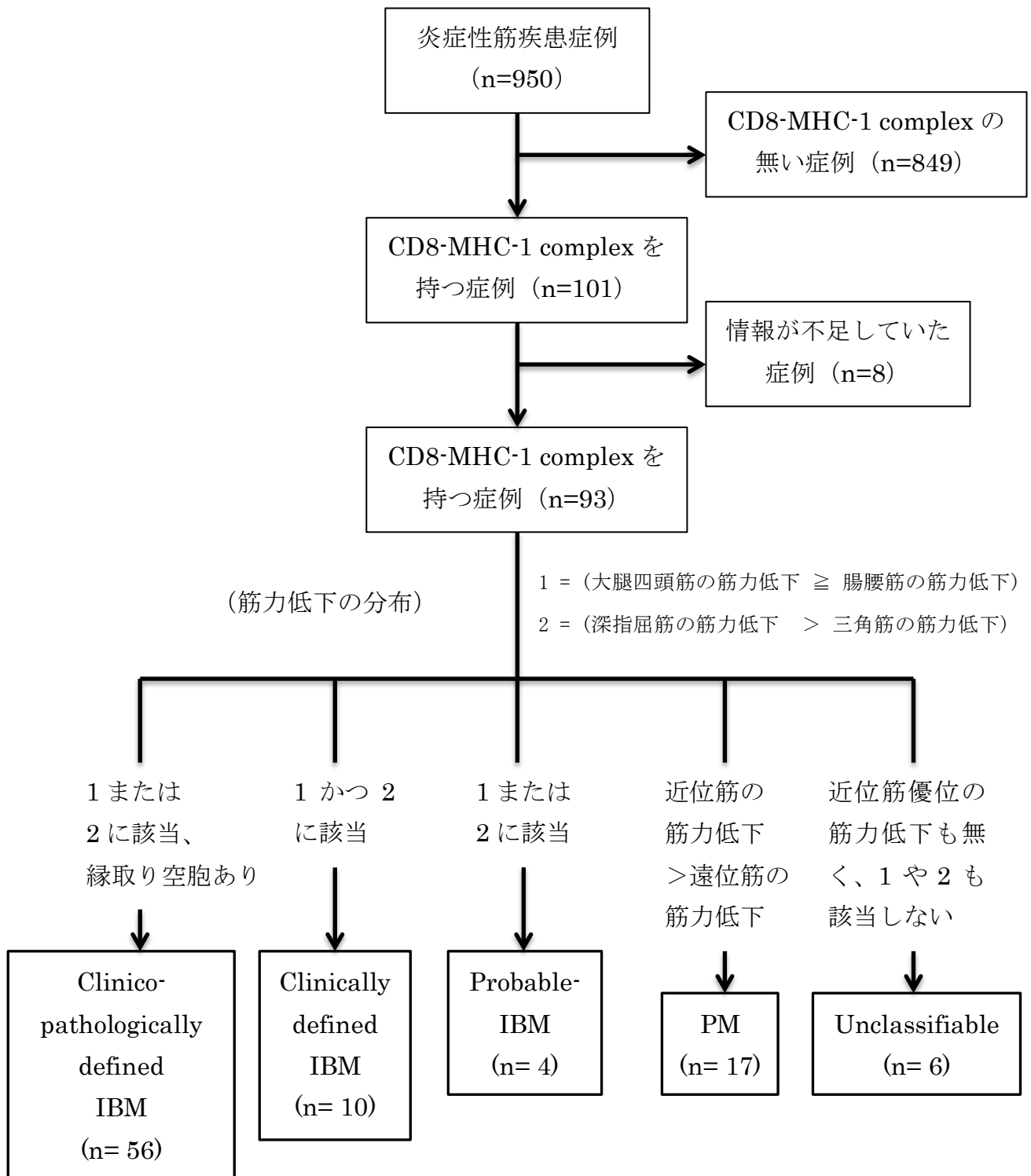
E: 細胞質がびまん性に染まる線維 (抗 p62 抗体による染色)

F: 筋線維の細胞膜のみが染まる線維 (抗 p62 抗体による染色)

G: 健常コントロールの筋 (抗 p62 抗体による染色)

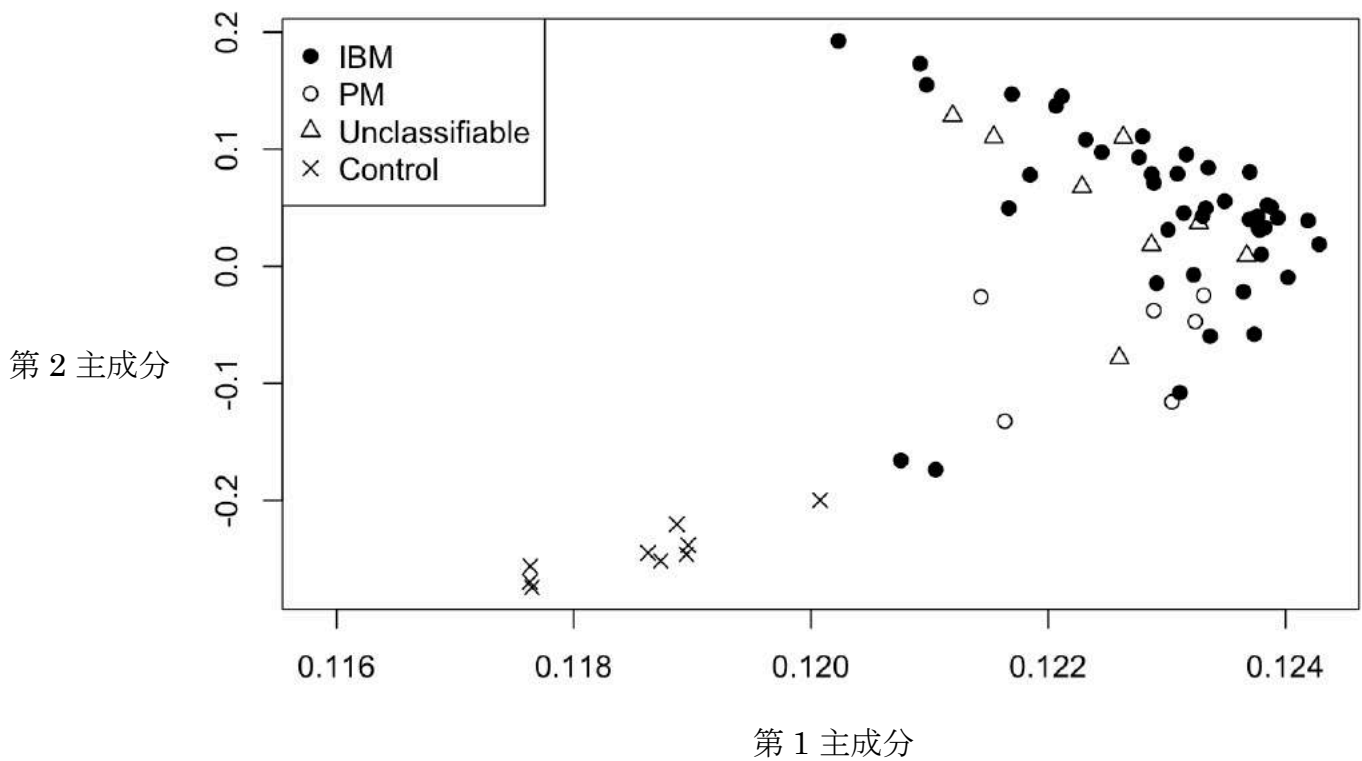
下線は 20 μm

図 2、CD8-MHC-1 complex を認めた症例の分類



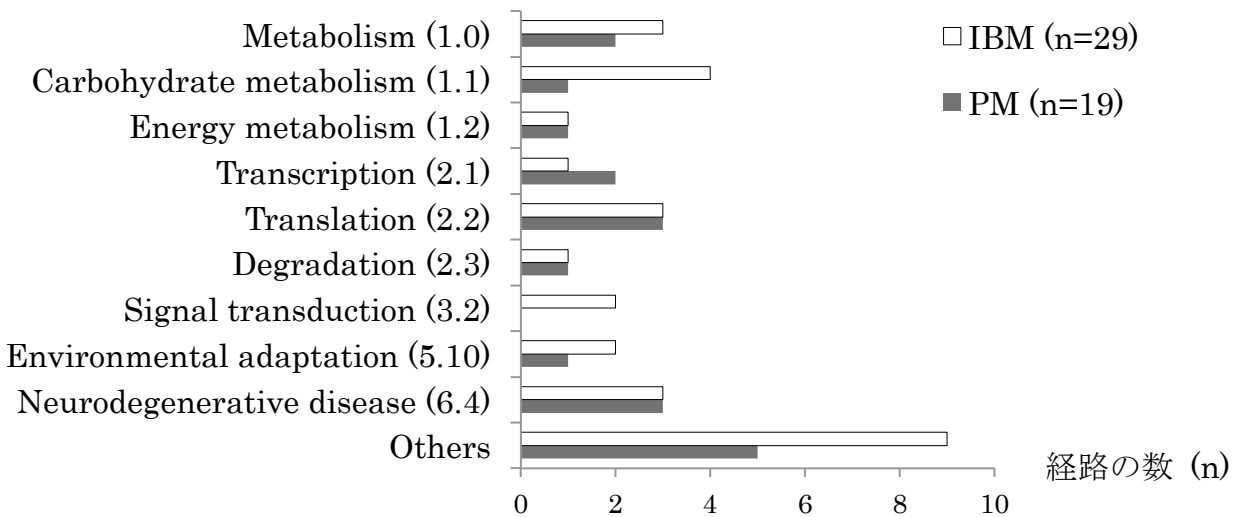
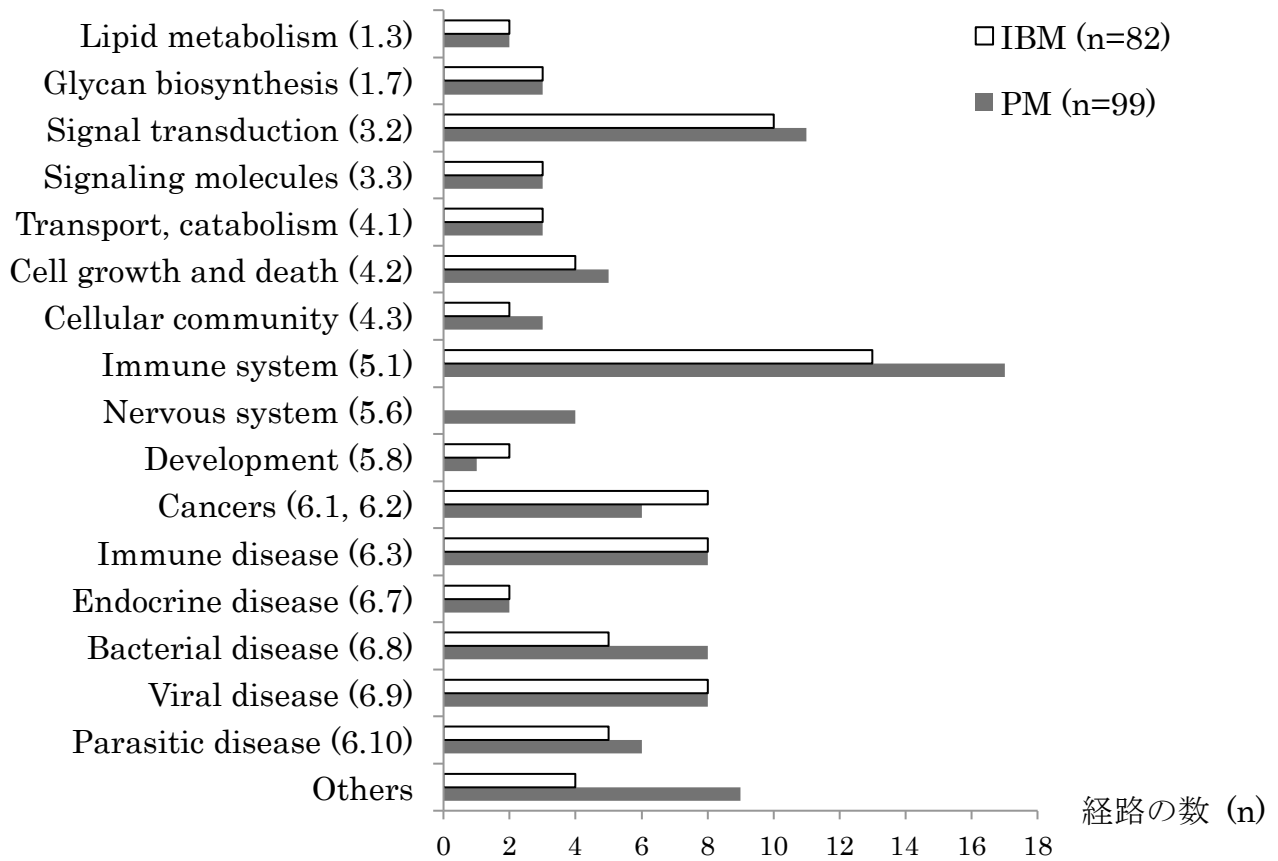
1993年から2015年までに病理診断を行った、950例の炎症性筋疾患症例のうち、CD8-MHC-1 complexを認め、十分な臨床情報が得られた93例を対象とした。ENMCのIBM、PMの基準を参照し分類したところ、IBM70例、PM17例の他、いずれにも分類されない6例を認めた。

図 3、主成分分析



コントロールと CD8-MHC-1 complex を持つ症例はそれぞれ独立した一群を成していた。第 2 主成分までの累積寄与率は 97.4%であったが、第 1 主成分、第 2 主成分のいずれも IBM と PM を分ける事は無く、両者は一群を成していた。

図 4、KEGG pathway enrichment analysis



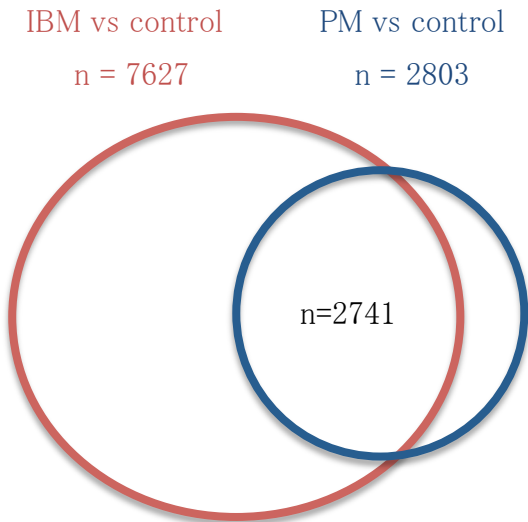
コントロールと比較し、IBM や PM で上段は系の遺伝子の発現が有意に上昇していた経路、下段は系の遺伝子の発現が有意に低下していた経路($p < 0.01$)を示している。

経路の詳細は表 8 を参照。

図 5、発現変動遺伝子

図 5-1 発現変動遺伝子

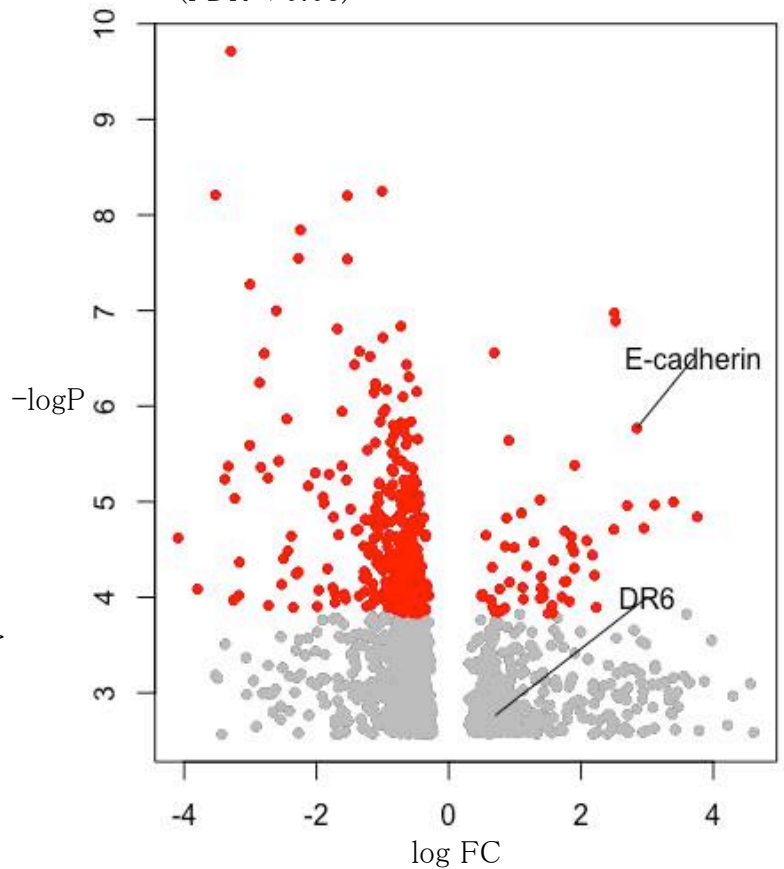
(FDR < 0.01)



コントロールと比較した際、IBM では 7627 個、PM では 2803 個の発現変動遺伝子を認めた (FDR < 0.01)。そのうち 2741 個の遺伝子は IBM と PM で共通していた。

図 5-2 IBMとPMで発現量に差を認めた遺伝子

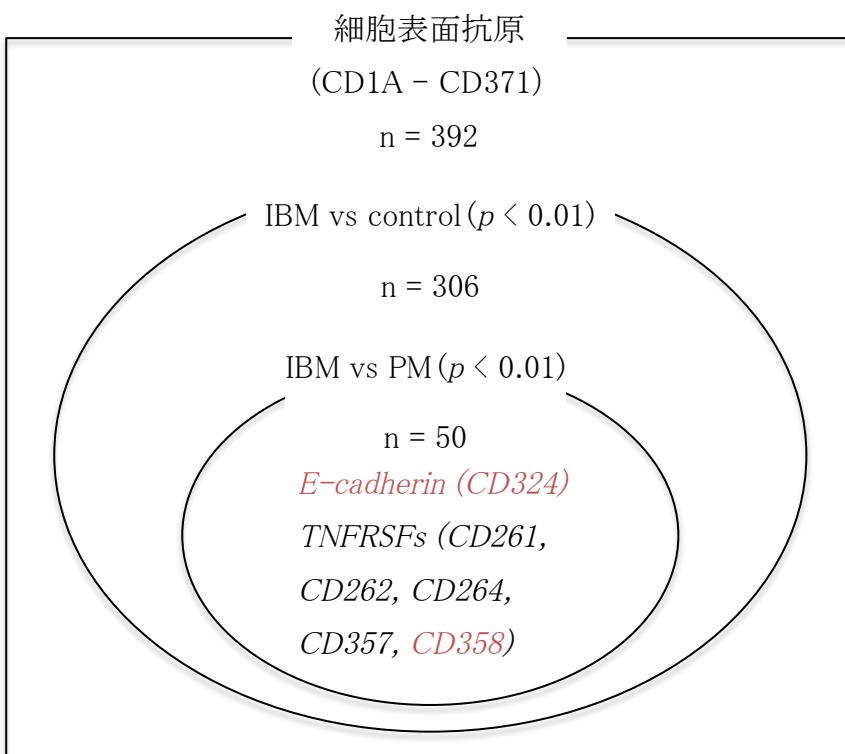
(FDR < 0.05)



IBM と PM で発現量に差を認めた遺伝子。

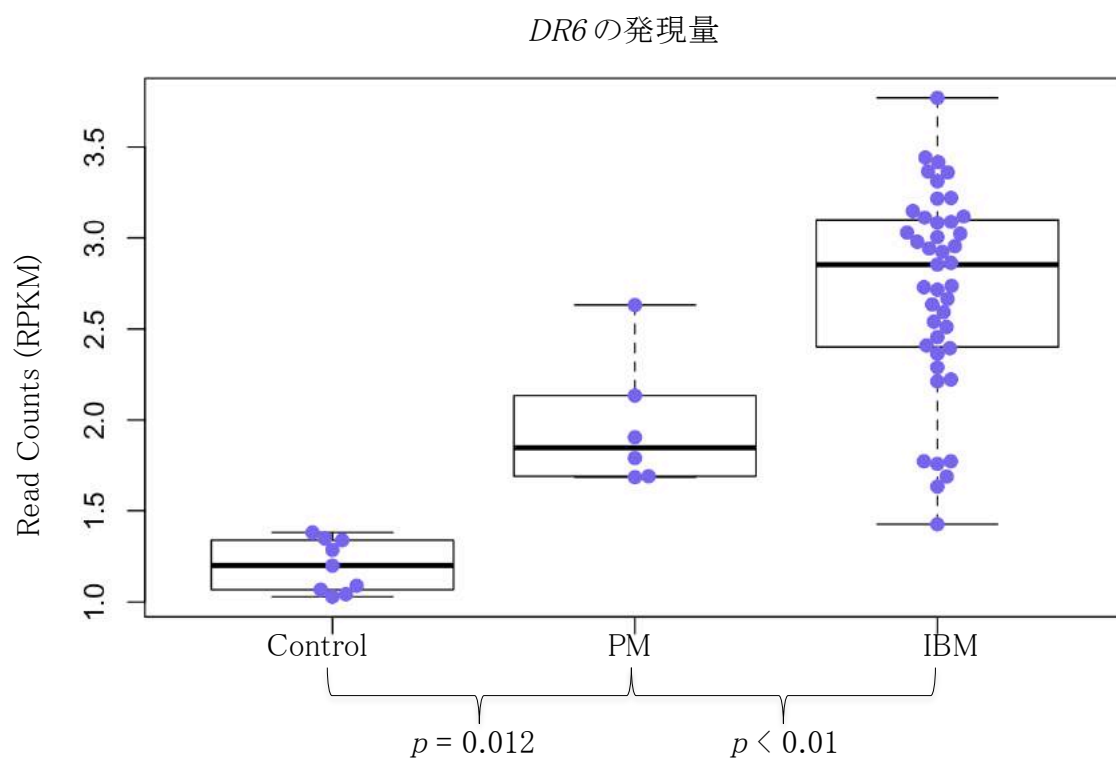
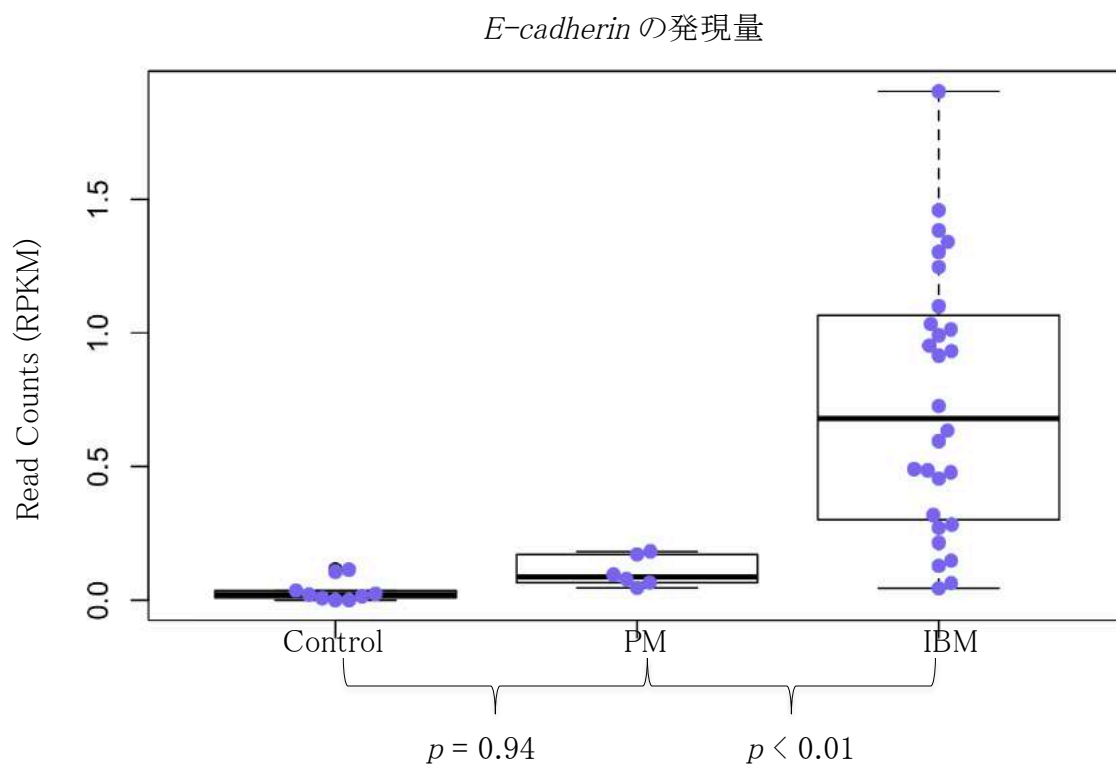
FDR < 0.01 の遺伝子は赤、その他は灰色。

図 5-3 細胞表面抗原の多重比較の結果



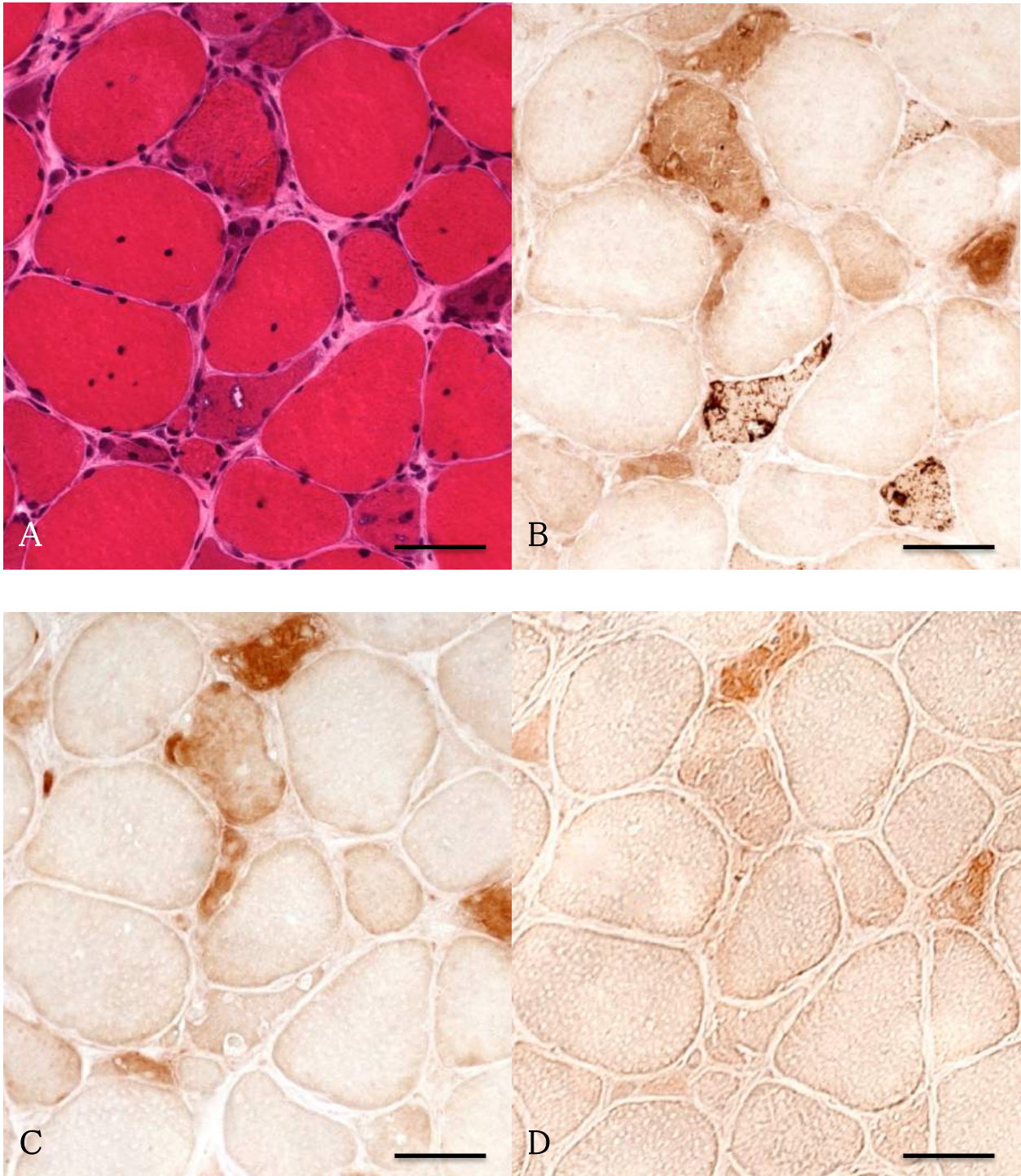
細胞表面抗原 392 個の遺伝子のうち、コントロールと比較して IBM で発現量に有意な差を認めた遺伝子は 306 個 ($p < 0.01$) で、その中で PM と比較して IBM で発現量に有意な差を認めた遺伝子は 50 個 ($p < 0.01$) 存在した。

図 6、CD8-MHC-1 complex を認めた症例の筋における *E-cadherin* と *DR 6* の発現量



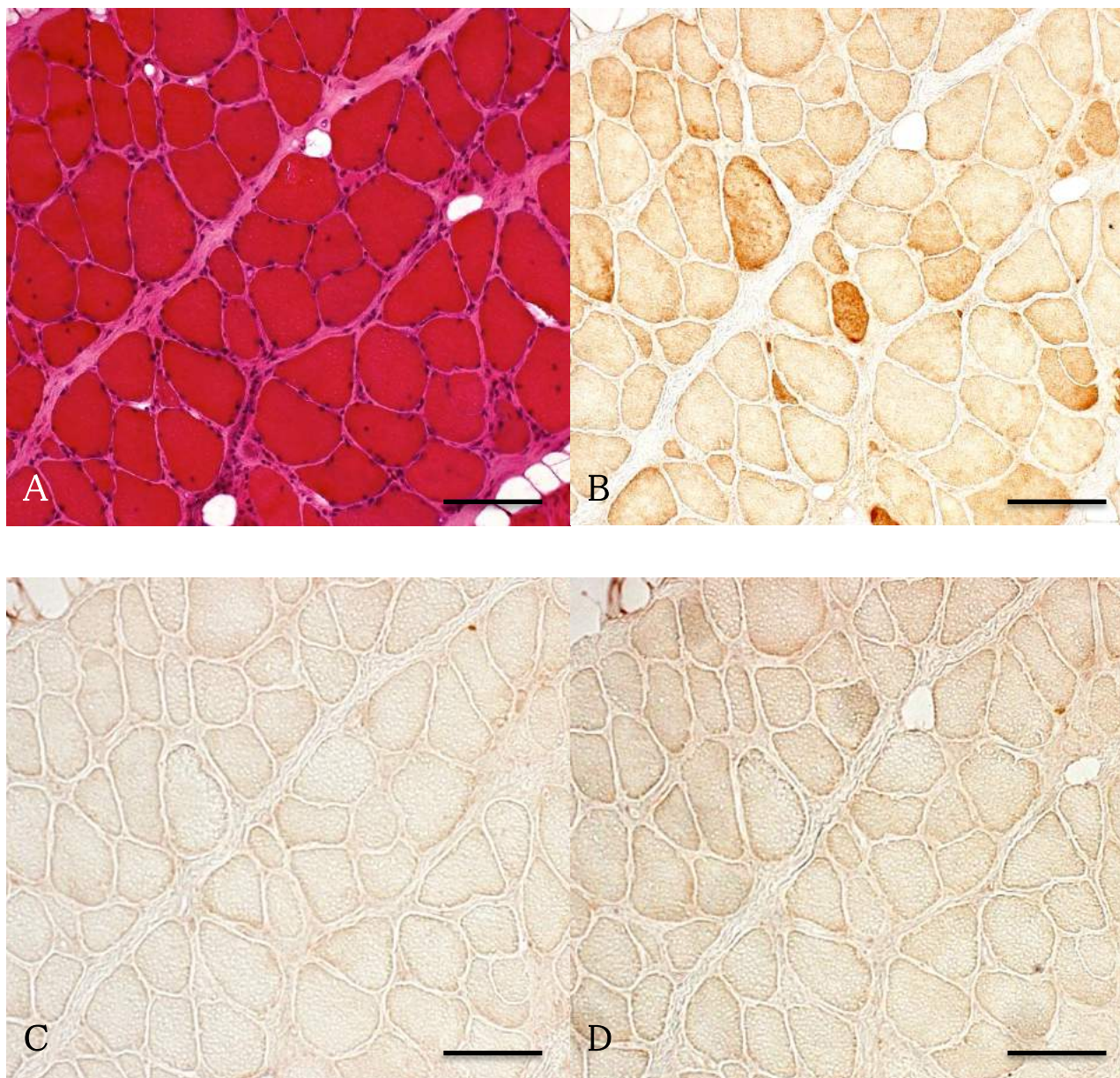
PMと比較してIBMで発現量に有意な差を認めた50個の遺伝子 ($p < 0.01$) の中に、*E-cadherin* と *DR6* が含まれていた。コントロールで0.1 RPKM以下、PMで0.12 RPKM以下の遺伝子は、*E-cadherin* のみであった。

図 7-1、抗 E-cadherin 抗体と抗 DR6 抗体、抗 p62 抗体による免疫組織化学 (IBM)



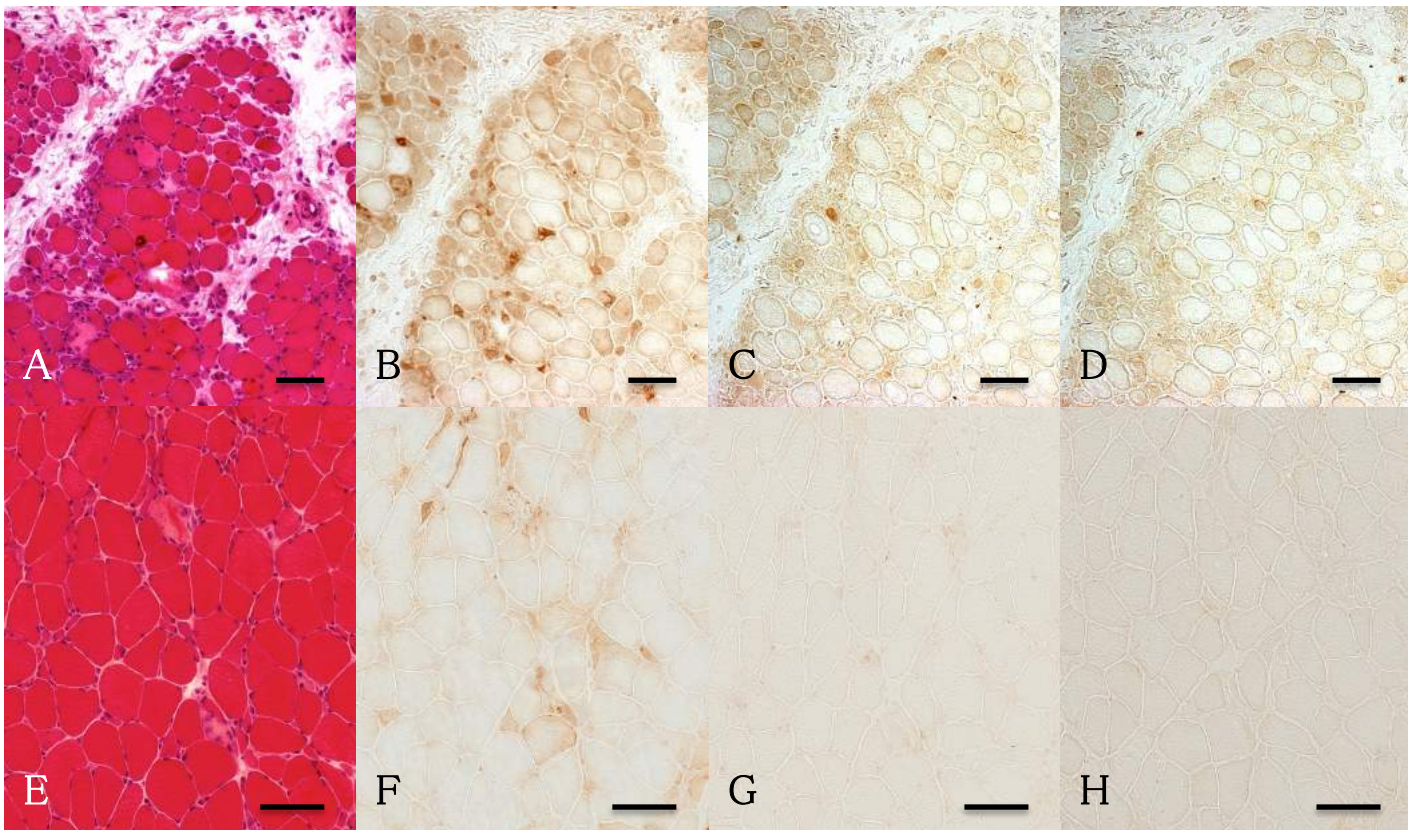
写真は IBM 症例の筋の連続切片。A は HE 染色、B は抗 p62 抗体、C は抗 E-cadherin 抗体、D は抗 DR6 抗体による染色。IBM で p62 陽性の顆粒を認めた線維は抗 E-cadherin 抗体や抗 DR6 抗体では染色されなかったのに対し、抗 p62 抗体で筋線維の細胞質がびまん性に染色された線維は抗 E-cadherin 抗体でもびまん性に染色され、その一部は抗 DR6 抗体でも染色された。下線は 50 μ m。

図 7-2、抗 E-cadherin 抗体と抗 DR6 抗体、抗 p62 抗体による免疫組織化学 (PM)



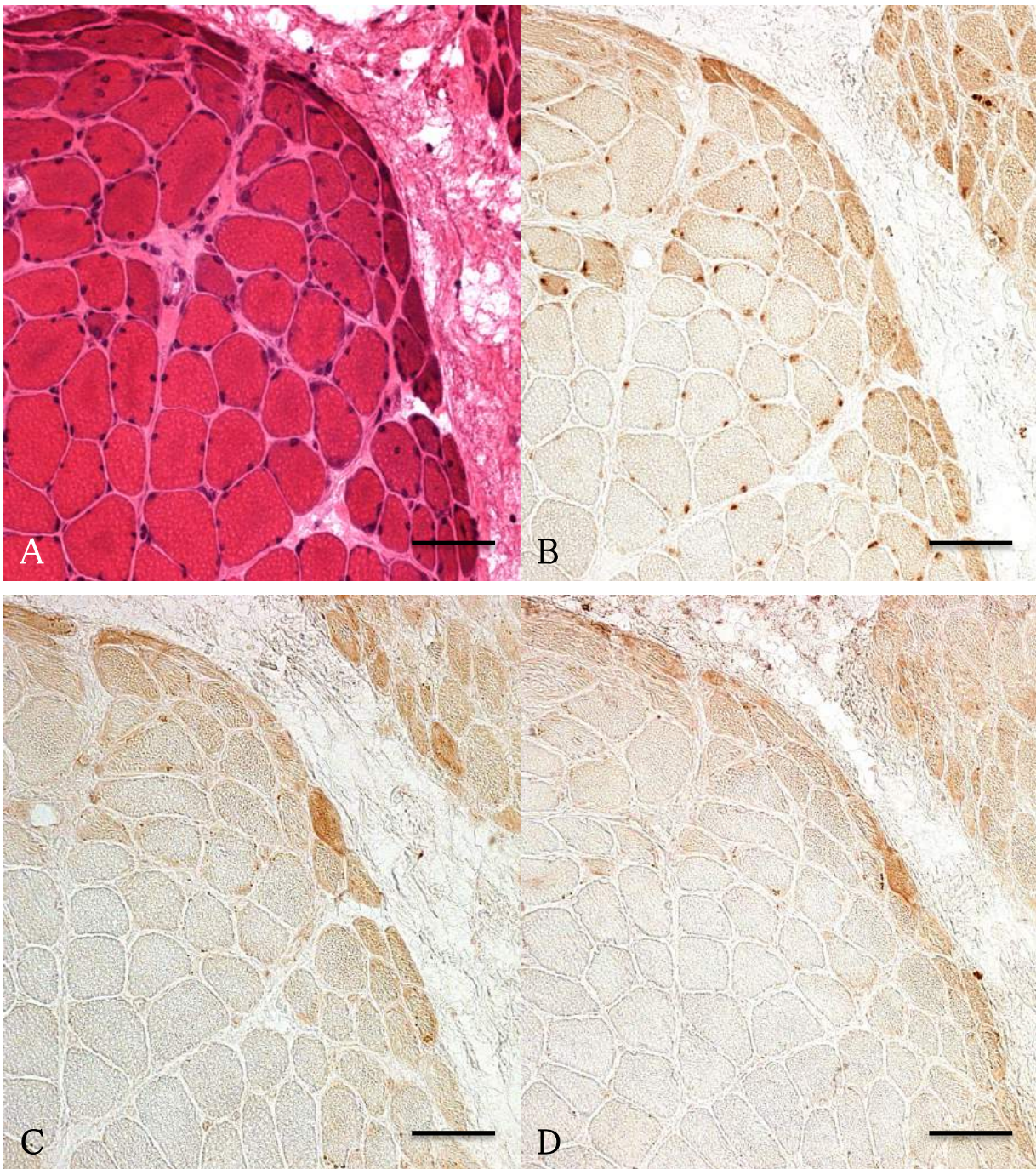
写真は PM 症例の筋の連続切片。A は HE 染色、B は抗 p62 抗体、C は抗 E-cadherin 抗体、D は抗 DR6 抗体による染色。6 例中 1 例で抗 p62 抗体と抗 E-cadherin 抗体でびまん性に細胞質が染色された線維をごく少数認めたが、他の 5 例では抗 p62 抗体でびまん性に染色される線維はあっても抗 E-cadherin 抗体では染色されなかった。下線は 100 μm 。

図 7-3、抗 E-cadherin 抗体と抗 DR6 抗体、抗 p62 抗体による免疫組織化学
(抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎、壊死性筋症)



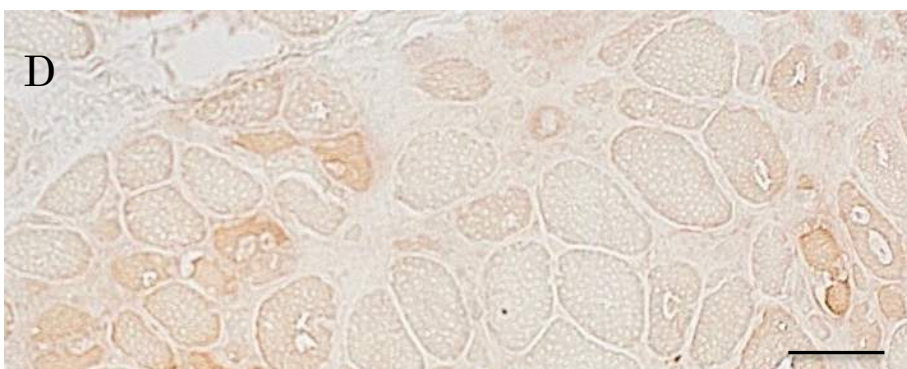
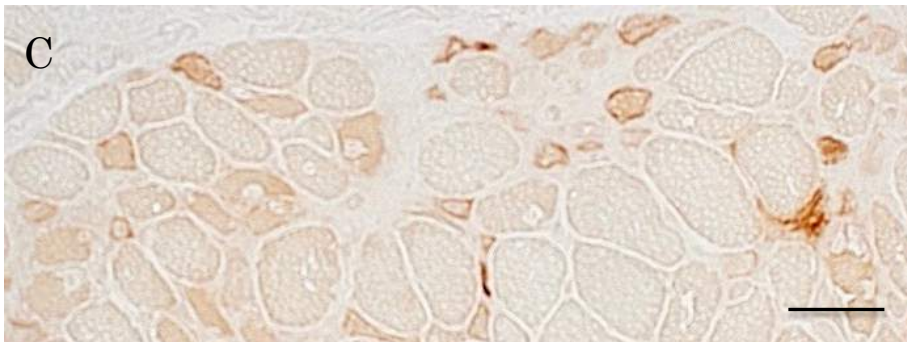
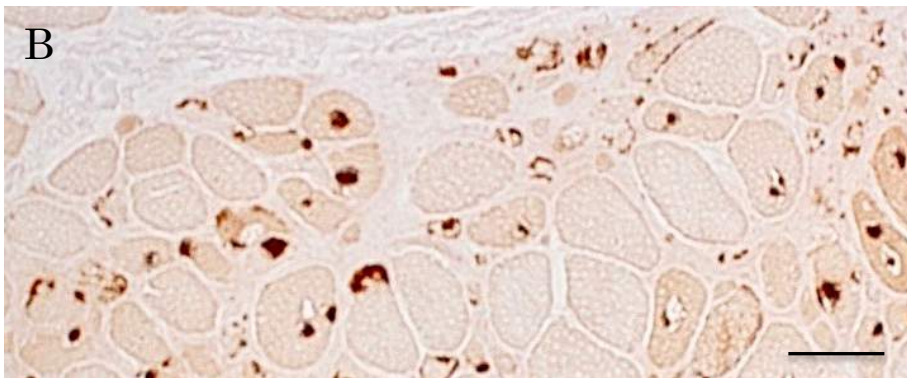
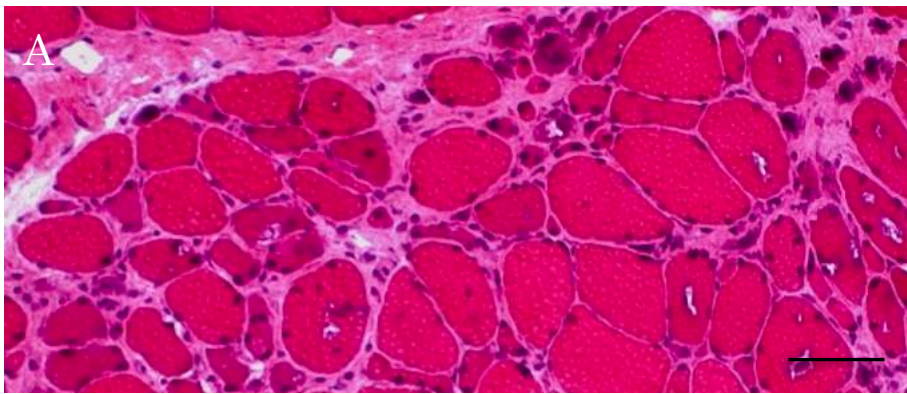
上段は抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎症例、下段は壊死性筋症症例の筋の連続切片の写真。
A、E は HE 染色、B、F は抗 p62 抗体、C、G は抗 E-cadherin 抗体、D、H は抗 DR6 抗体による染色。抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎や壊死性筋症で認められた壊死線維や HE 染色で一見正常に見えた筋線維の一部は抗 p62 抗体で細胞質がびまん性に染色された。しかし壊死性筋症ではそれらの線維は抗 E-cadherin 抗体や抗 DR6 抗体で染色されず、抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎でもごく少数の線維が抗 E-cadherin 抗体や抗 DR6 抗体で染色されるに留まっていた。
下線は 100 μm 。

図 7-4、抗 E-cadherin 抗体と抗 DR6 抗体、抗 p62 抗体による免疫組織化学
(筋線維束周囲の萎縮を認める皮膚筋炎)



写真は筋線維束周囲の萎縮を認める皮膚筋炎症例の筋の連続切片。A は HE 染色、B は抗 p62 抗体、C は抗 E-cadherin 抗体、D は抗 DR6 抗体による染色。筋線維束周囲に位置し萎縮を認めた線維の一部も抗 p62 抗体と抗 E-cadherin 抗体、抗 DR6 抗体によりびまん性に染色された。下線は 100 μm 。

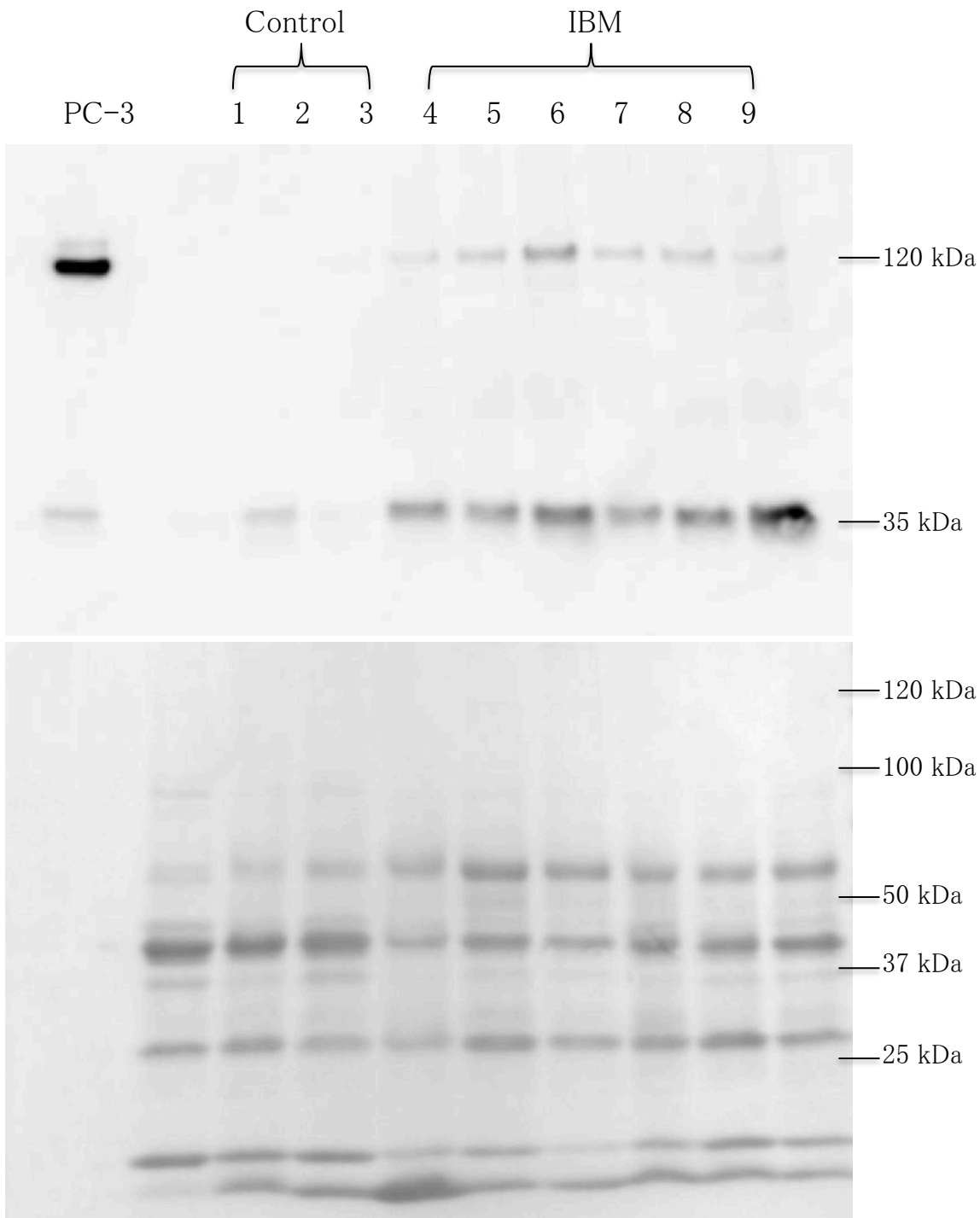
図 7-5、抗 E-cadherin 抗体と抗 DR6 抗体、抗 p62 抗体による免疫組織化学
(縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー)



下線は 100 μm

写真は縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの連続切片。A は HE 染色、B は抗 p62 抗体、C は抗 E-cadherin 抗体、D は抗 DR6 抗体による染色。p62 陽性の顆粒を認めた線維の中で、主に萎縮した線維の細胞膜に抗 E-cadherin 抗体による濃い染色性を認めた。またそれらの線維の細胞質も淡く染色されていた。抗 DR6 抗体では同線維の細胞質にのみ染色性を認めた。

図 8、Western blotting



上段は Western blotting、下段は免疫沈降を行う前の血清を用いて行った Ponceau 染色の結果。免疫沈降による濃縮を行い、一次抗体として抗 E-cadherin 抗体を用い Western blotting を行った。IBM6 例(レーン 4 から 9)のいずれにおいても PC-3 で検出されたバンドと大きさが一致した 120 kDa (全長型) と 35 kDa のバンドをそれぞれ認めた。一方で、コントロール(レーン 1 から 3)では 120 kDa のバンドは検出されず、1 例のコントロールでわずかに 35 kDa のバンドが検出された。

表 1、封入体筋炎の診断基準 (The ENMC IBM research diagnostic criteria 2011) ※文献 3 より引用

臨床所見と検査所見	分類	病理所見
1、発症からの長さが 1 年を超える 2、発症が 45 歳以降 3、血清クレアチンキナーゼが正常上限の 15 倍を超えない 4、a と b の両方、あるいは一方を満たす a 大腿四頭筋の筋力が腸腰筋の筋力以下である b 深指屈筋の筋力が三角筋の筋力未満	Clinico-pathologically defined IBM	1、筋内鞘への炎症細胞浸潤 2、縁取り空胞 3、p62、SMI-31、TDP-43、アミロイドなどのタンパク質の蓄積、あるいは 15-18 nm のフィラメントの存在 上記 1 から 3 の全てを認める
1、発症からの長さが 1 年を超える 2、発症が 45 歳以降 3、血清クレアチンキナーゼが正常上限の 15 倍を超えない 4、a と b の両方、あるいは一方を満たす a 大腿四頭筋の筋力が腸腰筋の筋力以下である b 深指屈筋の筋力が三角筋の筋力未満	Clinically defined IBM	1、筋内鞘への炎症細胞浸潤 2、MHC-class I 抗原の発現亢進 3、縁取り空胞 4、p62、SMI-31、TDP-43、アミロイドなどのタンパク質の蓄積、あるいは 15-18 nm のフィラメントの存在 上記のうち一つ以上を満たすが全て満たしているのではない
1、発症からの長さが 1 年を超える 2、発症が 45 歳以降 3、血清クレアチンキナーゼが正常上限の 15 倍を超えない 4、a と b の両方、あるいは一方を満たす a 大腿四頭筋の筋力が腸腰筋の筋力以下である b 深指屈筋の筋力が三角筋の筋力未満	Probable IBM	1、筋内鞘への炎症細胞浸潤 2、MHC-class I 抗原の発現亢進 3、縁取り空胞 4、p62、SMI-31、TDP-43、アミロイドなどのタンパク質の蓄積、あるいは 15-18 nm のフィラメントの存在 上記のうち一つ以上を満たすが全て満たしているのではない

表 2、RNA-seq による遺伝子発現解析で対象とした CD8-MHC-1 complex を持つ筋炎症例の臨床病理像

	IBM (n=43) ¹			PM (n=6) ¹	Unclassifiable (n=9) ²	コントロール (n=9)
	Clinicopathologically -defined (n=31)	Clinically -defined (n=9)	Probable (n=3)			
性別 (男性:女性)	21:10	1:8	1:2	3:3	1:8	5:4
年齢 (年) ³	68±8.8	75±7.1	70±3.2	65±8.1	64±10.2	49±16.9
発症から生検までの期間の長さ (年) ³	7.7±8.7	5.0±3.8	5.8±3.7	3.2±2.8	2.9±2.6	-
CK (IU/L) ³	813±744	552±347	1445±1676	830±601	654±316	78±27
生検筋						
上腕二頭筋	18	3	2	0	5	8
三角筋	0	0	0	3	0	0
大腿四頭筋	12	4	1	1	4	1
その他	1	2	0	2	0	0
組織所見						
縁取り空胞あり	31	0	0	0	1	0
p62 陽性線維あり	31	5	2	0	4	0

1) IBMとPMの診断には、ENMC基準 (Rose 2013, Hoogendijk 2004) を用いた。

2) “Unclassifiable” はCD8陽性のT細胞がMHC-class I抗原の発現が亢進した非壊死筋線維に浸潤、あるいは取り囲む病理像を持つが、IBMやPMの診断基準は満たさない症例を指す。深指屈筋以外の遠位筋の筋力低下を有する。

3) 平均値±標準偏差

表 3、免疫組織化学で用いた抗体

抗原	会社名	希釈
MHC-class1	Agilent, Santa Clara, CA	1:100
MHC-class2	Agilent, Santa Clara, CA	1:100
CD45	Abcam, Cambridge, UK	1:100
CD8	Nichirei, Tokyo, Japan	1:100
p62/SQSTM1	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX	1:1000
E-cadherin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX	1:100
DR6	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX	1:100

表 4、CD8-MHC-1 complex を持つ筋炎症例の臨床病理像

	IBM	PM	Unclassifiable	<i>p</i>
症例数 (男性:女性)	70 (35:35)	17 (7:10)	6 (0:6)	
診断時の年齢 (年)	70±8.6 (51-86)	63±11 (30-78)	64±9.5 (53-78)	0.03 ^a
発症から生検までの期間の長さ (年)	5.5±5.2	5.5±8.4	3.2±2.9	N.S. ^b
1年以上の症例--n (%)	69 (99)	14 (82)	6 (100)	
経過観察期間 (年)	3.1±3.7 (0.1-19.5)	4.3±3.9 (0.5-13.3)	3.0±1.9 (0.4-5.5)	N.S.
嚥下機能低下--n (%)	24 (34)	7 (41)	2 (33)	N.S.
診断時の modified Rankin scale score --n (%)				N.S.
	6(9)	3(18)	0	
	28(40)	9(53)	2(33)	
	29(41)	4(23)	3(50)	
	7(10)	1(6)	1(17)	
CK (IU/L)	696±621 (45-3622)	1291±2034 (85-8892)	578±352 (203-1128)	N.S.
自己免疫疾患の合併 --n (%)	13(19)	7(41)	4 (67)	0.01 ^c
関節リウマチ	4 ^d	3 ^e	1	
Sjögren 症候群	4	2	1 ^f	
全身性硬化症	0	1	0	
全身性エリテマトーデス	0	0	1 ^f	
甲状腺機能低下症	4 ^d	1 ^e	1	
Basedow 病	1	0	1	
その他	1 ^g	1 ^h	0	
ウイルス感染の合併 ⁱ --n (%)	15 ^j	0	2 ^k	
HCV	13/64(20)	0/17	2/6(33)	0.04 ^l
HBV	1/64(2)	0/17	1/6(17)	N.S.
HTLV-1	2/9	0/5	0/3	N.S.
HIV	0/29	0/12	0/3	N.S.
癌の合併 ^m n (%)	12(17) ⁿ	4(24) ^o	1 (17) ^p	N.S.
組織所見				
縁取り空胞あり	56 (80)	0	0	
p62 陽性線維あり	66 (94)	0	2 (33)	

値は平均値±標準偏差で表示。質的変数の比較には Fisher exact test、量的変数の比較には Kolmogorov-Smirnov test を用いた。三群間の平均値の比較には Steel-Dwass test を用いた。CK:クレアチンキナーゼ、HCV:C型肝炎ウイルス、HBV:B型肝炎ウイルス、HTLV-1:ヒトT細胞白血病ウイルス1型

- a IBM 症例は PM 症例と比較し、高齢であった($p = 0.03$)。
- b N.S.:3群の間に統計学的な有意差は認めなかった(表5)。
- c “Unclassifiable”な症例は、IBM 症例と比較し、より自己免疫疾患を合併する傾向があった($p = 0.01$)。
- d 関節リウマチと甲状腺機能低下症を併発した症例を、一例認めた。
- e 関節リウマチと甲状腺機能低下症を併発した症例を、一例認めた。
- f 全身性エリテマトーデスと Sjögren 症候群を併発した症例を、一例認めた。
- g 尋常性白斑
- h 尋常性乾癬
- i 血清中の抗 HCV/ HTLV-1/HIV 抗体、あるいは HBs 抗原が陽性の症例数/採血検査を受けた症例数
- j 抗 HCV 抗体と抗 HTLV-1 抗体が両方陽性であった症例を、一例認めた。
- k 抗 HCV 抗体と HBs 抗原が両方陽性であった症例を、一例認めた。
- l “Unclassifiable”な症例は、PM 症例と比較し抗 HCV 抗体が陽性である症例が多かった($p = 0.04$)。
- m 筋炎の診断の前後3年以内に癌の診断を受けた場合に、癌の合併があるとみなした。
- n T細胞大顆粒リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、前立腺癌、肺腺癌、腎臓癌、肝内胆管癌、甲状腺癌、上顎洞癌、大腸癌、子宮癌、胃癌2例
- o 肺腺癌、甲状腺乳頭癌、前立腺癌、子宮頸癌
- p 肝細胞癌

表 5、Steel-Dwass test (表 4 の *p* 値)

	IBM - PM	PM - Unclassifiable	IBM - Unclassifiable
診断時の年齢	0.034	0.99	0.25
発症から生検までの期間の長さ	0.99	0.14	0.37
経過観察期間	0.17	0.86	0.68
嚥下機能低下	0.86	0.94	1
診断時の modified Rankin scale score	0.22	0.21	0.66
CK	0.41	0.63	0.98
自己免疫疾患の合併	0.082	0.54	0.012
ウイルス感染の合併			
	HCV	0.039	0.66
	HBV	0.87	0.23
	HTLV-1	NaN*	0.67
癌の合併	0.81	0.94	1

* NaN: Not a number (0 同士の比較の為)

CK:クレアチンキナーゼ、HCV:C 型肝炎ウイルス、HBV:B 型肝炎ウイルス、HTLV-1:ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型

表 6、免疫抑制薬に対する治療反応性

	IBM	PM	Unclassifiable
症例数(合計)	70(66)	17(0)	6(2)
治療された症例の数	44(41)	16(0) ^a	6(2)
治療された症例の経過観察期間(年)	3.6±4.1 (0.1-19.5)	4.3±3.9 (0.5-13.3)	3.0±1.9 (0.4-5.5)
治療反応性			
有効	0	10(0)	3(0)
PSL (1 mg/kg/日)	0	6	2
PSL + 免疫抑制薬	0	4 ^b	0
PSL + IVIG	0	0	1
部分的に有効	0	1(0)	1(0)
PSL (1 mg/kg/日)	0	0	1
PSL + 免疫抑制薬	0	1 ^c	0
PSL + IVIG	0	0	0
変化無し	19(17)	3(0)	0
PSL (0.5-1 mg/kg/日)	6	1	0
PSL + 免疫抑制薬	4	0	0
PSL + IVIG + 免疫抑制薬	2	1 ^d	0
IVIG	7	1	0
悪化	25(24)	2(0)	2(2)
PSL (0.5-1 mg/kg/日)	8	1	0
PSL + 免疫抑制薬	4	1	0
PSL + IVIG	2	0	2
IVIG	9	0	0
免疫抑制薬のみ	2	0	0
導入された免疫抑制薬	MTX 5, TCR 4, AZP 3 CYA 3, MZR 1	MTX 3 TCR 2 AZP 2	無し

括弧内は p22 陽性の症例の数。値は平均値±標準偏差で表示。

PSL=Prednisolone、MTX=Methotrexate、TCR=Tacrolimus、AZP=Azathioprine、
CYA=Cyclosporine A、MZR=Mizoribine、IVIG=Intravenous immunoglobulin

a PM 症例のうち 1 例は、症状が非常に軽微であったことから治療を希望されなかった。

b PSL 1 mg/kg/日に加え、2 症例において MTX 6 mg/週が追加された。また、他の 2 症例においては MTX 7.5 mg/週と AZP 50 mg/日がそれぞれ追加された。

c 関節リウマチを合併した 1 症例では、TCR 5 mg/日も使用された。PMと診断された後、mPSL パルス療法が施行され、後療法として PSL 45 mg/日が開始された。その後 6 か月以内に PSL は 10 mg/日まで減量されたが、再燃は認めなかった。

d PSL 50 mg/日で治療を開始した 1 症例において、3 か月の間に PSL は 20 mg/日まで減量されたが、mRS は 2 から 1 に改善した状態を保っていた。しかしその後 CK は再度上昇し mRS も 2 に戻り、AZP 100 mg/日が追加された。その後約 2 年半の間緩徐に CK の値は上昇し、CK が 1000 IU/L を超えた時点で IVIG が追加された。

表7、“Unclassifiable”な症例の臨床病理像

年齢 / 性別	診断までの期間 (年)	MMTによる筋力評価 (右/左)						握力 (右/左 kg)	嚥下機能低下	CK (IU/L)	合併症	ウイルス感染	組織所見	治療 (初期量→最終診察時の量)	治療効果 (mRS)	経過観察期間 (月)†
		NF / NE	Elbow flex. ext.	WF WE	FF, FE	Ilio, Quad	TA GC									
78 /F	5	3+/4	2+ / 4- / 4-	4- / 4- / 4-	3+ / 3+ / 3+	3 / 3, 4 / 3, 5 / 4	4 / 4, 4 / 4	8 / 6	-	245	RA, PSC	-	+ - *	PSL40→0 mg + IVIG	3→4 (悪化)	56
61 /F	3	4+ / 4 / 5	5- / 4+ / 5 / 4	5 / 5, 5 / 5	5 / 4, 5 / 5	3 / 3, 4- / 4	5 / 5, 5 / 5	19 / 14	-	478	Graves' disease HCC	HCV	+ -	PSL60→20mg + IVIG	2→5 (悪化)	36
53 /F	1	4- / 3+	4- / 4- / 4-	5 / 5, 5 / 5	4+ / 4+ / 4+ / 4+	4+ / 4+ / 5- / 5-	5 / 5, 5 / 5	9 / 10	+	1128	SLE, SjS	-	- -	PSL50→8 mg	2→0 (有効)	36
67 /F	8	2 / 4	4- / 4- / 4-	5 / 4+ / 5 / 5-	4- / 4- / 5- / 4+	3- / 3- / 3 / 3	3+ / 4- / 3+ / 4-	8 / 6	+	605	Hypo- thyroidism	-	- -	PSL50→10 mg e.o.d.	3→2 (有効)	66
68 /F	1	3- / 5	2- / 3- / 3+ / 3+ / 4-	3 / 3, 3 / 3	3 / 3, 4+ / 4+ / 4 / 4	4- / 4- / 4 / 4	5 / 5, 5 / 5	3 / 3	-	203	-	HCV HBV	- -	PSL50→25 mg	4→3 (部分有効)	5
54 /F	1	5 / 5	5 / 5, 5 / 5	5 / 5, 5 / 5	5 / 5, 5 / 4+	4 / 4, 5 / 5	5 / 5, 5 / 5	15 / 10	-	810	-	-	- -	PSL30→8 mg e.o.d.+ IVIG	2→0 (有効)	17

NF=neck flex, NE=neck extensor, SA=shoulder abduction, WF=wrist flexor, WE=wrist extensor, FF=finger flexor, FE=finger extensor, Ilio=iliopsoas, Quad=quadriceps, TA=tibialis anterior, GC=gastrocnemius, CK=creatinine kinase, RV=rimmed vacuoles, PSL=prednisolone, IVIG=intravenous immunoglobulin

RA：関節リウマチ、PSC：原発性硬化性胆管炎、HCC：肝細胞癌、SjS：Sjögren 症候群、e.o.d.:1 日おきに

† 経過観察期間：生検後に経過観察されていた期間の長さ。(2 回生検している症例では、最初の生検からの期間の長さ。)

* 最初の生検は発症から 5 年後に施行。2 回目の生検は発症から 8 年後に施行。最初の生検では炎症性変化と p62 陽性線維を認めしたが、縁取り空胞は観察されなかった。2 回目の生検で縁取り空胞が同定された。

表 8、KEGG pathway enrichment analysis の結果 ($p < 0.01$)

1. IBM をコントロールと比較

1-1 コントロールと比較し IBM で亢進 (n=82)	N	Up	Down	<i>p</i> .up	<i>p</i> .down
Cell adhesion molecules	65	52	5	8.56E-13	1
Lysosome	105	73	11	5.96E-12	1
Phagosome	108	73	19	4.96E-11	1
Staphyrococcus aureus infection	28	26	2	6.67E-10	1
ECM-receptor interaction	51	40	8	1.16E-09	1
Complement and coagulation cascades	36	29	4	8.15E-08	1
Pathways in cancer	353	177	107	8.72E-08	1
Intestinal immune network for IgA production	16	16	0	1.01E-07	1
Viral carcinogenesis	148	85	43	1.70E-07	0.96
Toxoplasmosis	80	52	13	2.11E-07	1
Cytokine-cytokine receptor interaction	86	55	13	2.13E-07	1
Antigen processing and presentation	46	34	9	2.72E-07	1
Allograft rejection	15	15	0	2.76E-07	1
Focal adhesion	159	89	37	4.26E-07	1
Type 1 diabetes mellitus	18	17	1	4.34E-07	1
Nod-like receptor signaling pathway	112	67	24	4.36E-07	1
Hematopoietic cell lineage	36	28	4	5.30E-07	1
Leishmaniasis	47	34	4	6.39E-07	1
Graft-versus-host disease	14	14	0	7.56E-07	1
Regulation of actin cytoskeleton	150	84	37	8.70E-07	1
PI3K-Akt signaling pathway	215	113	61	1.04E-06	1
Human papillomavirus infection	229	119	63	1.16E-06	1
Apoptosis	110	65	23	1.19E-06	1
Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection	132	75	34	1.57E-06	1
Tuberculosis	117	68	29	1.58E-06	1
Small cell lung cancer	74	47	14	2.16E-06	1
Autoimmune thyroid disease	16	15	0	2.91E-06	1
Systemic lupus erythematosus	53	36	10	3.39E-06	1
Hepatitis B	104	61	23	3.55E-06	1
Measles	82	50	20	5.78E-06	0.99

Pathogenic E. coli infection	41	29	4	8.94E-06	1
Proteoglycans in cancer	157	84	46	1.00E-05	0.96
Pertussis	47	32	7	1.10E-05	1
p53 signaling pathway	49	33	6	1.15E-05	1
NK cell mediated cytotoxicity	59	38	13	1.25E-05	1
Leukocyte transendothelial migration	72	44	12	1.92E-05	1
Influenza A	117	65	27	2.06E-05	1
MicroRNAs in cancer	115	64	27	2.21E-05	1
Sphingolipid metabolism	31	23	4	2.22E-05	1
TNF signaling pathway	83	49	18	2.48E-05	1
Bacterial invasion of epithelial cells	63	39	15	3.72E-05	1
Malaria	28	21	3	3.90E-05	1
Glycosaminoglycan degradation	13	12	0	4.89E-05	1
Viral myocarditis	42	28	12	7.03E-05	0.87
Rap1 signaling pathway	141	74	34	7.68E-05	1
Osteoclast differentiation	86	49	19	8.88E-05	1
NFkB signaling pathway	61	37	9	1.09E-04	1
Asthma	9	9	0	1.16E-04	1
Ras signaling pathway	141	73	33	1.50E-04	1
Jak-STAT signaling pathway	83	47	18	1.50E-04	1
Inflammatory bowel disease	30	21	6	2.02E-04	0.98
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	84	47	23	2.21E-04	0.96
Phosphatidylinositol signaling system	84	47	23	2.21E-04	1
N-Glycan biosynthesis	44	28	4	2.36E-04	1
Amoebiasis	59	35	17	3.07E-04	0.89
Phospholipase D signaling pathway	105	56	26	3.20E-04	0.99
Glycosaminoglycan biosynthesis	16	13	0	3.36E-04	1
Apoptosis -multiple species	25	18	4	3.37E-04	0.99
Hepatitis C	86	47	19	4.59E-04	1
Necroptosis	109	57	37	5.51E-04	0.68
Platelet activation	91	49	22	5.54E-04	0.99
Fc gamma R-mediated phagocytosis	69	39	13	5.63E-04	1
Endocytosis	205	98	55	5.83E-04	1
Melanoma	52	31	13	5.94E-04	0.96
HTLV-1 infection	185	89	48	7.91E-04	1

Sphingolipid signaling pathway	88	47	23	9.02E-04	0.98
Axon guidance	118	60	25	1.01E-03	1
Inositol phosphate metabolism	64	36	14	1.02E-03	0.99
Rheumatoid arthritis	45	27	11	1.15E-03	0.96
RIG-1-like receptor signaling pathway	43	26	8	1.21E-03	1
Chemokine signaling pathway	98	51	22	1.21E-03	1
Ether lipid metabolism	21	15	3	1.23E-03	0.99
Herpes simplex infection	136	67	39	1.56E-03	0.97
Hedgehog signaling pathway	34	21	7	2.44E-03	0.98
C-type lectin receptor signaling pathway	71	38	19	2.57E-03	0.96
Chagas disease	69	37	18	2.78E-03	0.97
Primary immunodeficiency	13	10	2	3.65E-03	0.97
Chronic myeloid leukemia	70	37	18	3.85E-03	0.97
Adherens junction	59	32	18	4.15E-03	0.83
Thyroid hormone synthesis	46	26	12	4.53E-03	0.94
Pancreatic cancer	66	35	17	4.54E-03	0.97
Toll-like signaling pathway	58	31	15	6.31E-03	0.96

1-2 コントロールと比較し IBM で低下 (n=29)	N	Up	Down	p.up	p.down
Ribosome	133	1	123	1	1.45E-45
Oxidative phosphorylation	119	8	103	1	9.48E-31
Parkinson's disease	124	14	104	1	1.35E-28
Thermogenesis	203	32	146	1	3.11E-26
Huntington's disease	162	34	108	1	6.69E-16
Alzheimer's disease	149	35	99	1	1.52E-14
Non-alcoholic fatty liver disease	133	32	90	1	4.56E-14
Cardiac muscle contraction	56	8	43	1	3.65E-10
Carbon metabolism	87	17	56	1	4.38E-08
Citrate cycle (TCA cycle)	26	3	22	1	3.85E-07
Retrograde endocannabinoid signaling	92	22	56	1	6.85E-07
Proteasome	42	5	30	1	2.47E-06
Metabolic pathways	887	299	376	0.97	9.60E-06
RNA transport	149	30	77	1	4.08E-05
Spliceosome	128	14	67	1	7.57E-05

Valine, leucine, isoleucine degradation	41	6	27	1	7.87E-05
Mitophagy -animal	60	14	36	0.99	1.01E-04
Pyruvate metabolism	30	2	21	1	1.33E-04
Propanoate metabolism	26	0	18	1	5.05E-04
AMPK signaling pathway	99	33	50	0.78	1.66E-03
Circadian rhythm	28	6	18	0.97	1.89E-03
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	22	2	15	1	1.92E-03
Longevity regulating pathway -multiple species	56	18	31	0.8	1.98E-03
mTOR signaling pathway	122	34	59	0.98	2.53E-03
2-Oxocarboxylic acid metabolism	15	3	11	0.95	3.33E-03
Ribosome biogenesis in eukaryotes	80	12	40	1	5.76E-03
Insulin signaling pathway	116	34	55	0.96	5.85E-03
Folate biosynthesis	14	3	10	0.93	6.99E-03
Base excision repair	31	8	18	0.93	8.92E-03

2. PM をコントロールと比較

2-1 コントロールと比較し PM で亢進 (n=99)	N	Up	Down	<i>p</i> .up	<i>p</i> .down
Phagosome	108	60	6	5.31E-17	1
Staphyrococcus aureus infection	28	23	1	1.26E-12	0.99
Cell adhesion molecules	65	38	0	3.38E-12	1
Leishmaniasis	47	31	1	3.66E-12	1
Antigen processing and presentation	46	30	5	1.26E-11	0.83
Allograft rejection	15	15	0	1.91E-11	1
Nod-like receptor signaling pathway	111	52	6	4.07E-11	1
Graft-versus-host disease	14	14	0	9.91E-11	1
Tuberculosis	117	53	4	1.28E-10	1
Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection	131	57	10	1.82E-10	1
Pertussis	47	29	1	2.03E-10	1
Autoimmune thyroid disease	16	15	0	2.50E-10	1
Lysosome	106	49	2	2.66E-10	1
Apoptosis	110	50	10	3.67E-10	0.97
Influenza A	117	51	10	1.52E-09	0.98
Toxoplasmosis	80	39	4	2.64E-09	1
Pathways in cancer	355	114	36	4.38E-09	1
Complement and coagulation cascades	36	23	2	5.87E-09	0.98

Intestinal immune network for IgA production	16	14	0	8.01E-09	1
Type 1 diabetes mellitus	18	15	0	8.57E-09	1
Cytokine-cytokine receptor interaction	86	40	3	9.25E-09	1
Osteoclast differentiation	86	40	7	9.25E-09	0.98
NK cell mediated cytotoxicity	59	31	3	1.16E-08	1
Hematopoietic cell lineage	36	22	0	4.13E-08	1
Systemic lupus erythematosus	53	28	5	5.08E-08	0.91
Viral myocarditis	42	24	4	6.24E-08	0.89
ECM-receptor interaction	51	27	2	8.30E-08	1
Viral carcinogenesis	149	56	23	1.41E-07	0.45
Inflammatory bowel disease	30	19	3	1.56E-07	0.84
PI3K-Akt signaling pathway	217	74	23	1.65E-07	0.97
Human papillomavirus infection	229	77	20	1.80E-07	1
Platelet activation	92	39	3	3.08E-07	1
NFkB signaling pathway	60	29	6	3.61E-07	0.9
Asthma	9	9	0	3.74E-07	1
MicroRNAs in cancer	114	45	10	4.69E-07	0.98
Th17 cell differentiation	69	31	8	1.09E-06	0.82
Necroptosis	110	43	16	1.14E-06	0.57
Hepatitis B	104	41	10	1.56E-06	0.96
Chemokine signaling pathway	97	39	2	1.56E-06	1
Malaria	28	17	1	1.69E-06	0.99
p53 signaling pathway	49	24	4	2.71E-06	0.94
Measles	82	34	11	3.18E-06	0.68
TNF signaling pathway	82	34	4	3.18E-06	1
Herpes simplex infection	136	49	21	3.45E-06	0.45
Amoebiasis	59	27	5	3.46E-06	0.95
Chagas disease	69	30	3	3.74E-06	1
Rheumatoid arthritis	45	22	5	7.33E-06	0.82
Regulation of actin cytoskeleton	151	52	7	7.99E-06	1
Focal adhesion	159	54	11	8.58E-06	1
Fc gamma R-mediated phagocytosis	70	29	3	1.69E-05	1
HTLV-1 infection	186	60	21	1.71E-05	0.93
Th1 and Th2 cell differentiation	57	25	3	1.98E-05	0.99
Hedgehog signaling pathway	35	18	3	2.06E-05	0.91

AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	85	33	10	2.31E-05	0.83
Leukocyte transendothelial migration	72	29	2	3.19E-05	1
Rap1 signaling pathway	143	48	9	3.75E-05	1
Phospholipase D signaling pathway	106	38	6	4.74E-05	1
Sphingolipid signaling pathway	88	33	5	5.26E-05	1
Glycosaminoglycan degradation	13	9	0	1.25E-04	1
Bacterial invasion of epithelial cells	63	25	4	1.46E-04	0.99
Protein digestion and absorption	46	20	6	1.53E-04	0.69
Thyroid hormone synthesis	46	20	6	1.53E-04	0.69
Parathyroid hormone synthesis	74	28	8	1.58E-04	0.87
Small cell lung cancer	74	28	7	1.58E-04	0.94
Relaxin signaling pathway	94	33	9	2.29E-04	0.95
Sphingolipid metabolism	31	15	0	2.44E-04	1
Pathogenic E.coli infection	41	18	3	2.79E-04	0.95
Ras signaling pathway	144	45	7	4.10E-04	1
Proteoglycan in cancer	157	48	15	4.69E-04	0.98
C-type lectin receptor signaling pathway	71	26	3	4.88E-04	1
Serotonergic synapse	50	20	3	5.81E-04	0.98
Jak-STAT signaling pathway	84	29	2	7.32E-04	1
Endocytosis	206	59	21	7.43E-04	0.98
Salmonella infection	59	22	3	9.76E-04	1
Primary immunodeficiency	13	8	1	9.79E-04	0.88
Glycosphingolipid biosynthesis	8	6	0	1.02E-03	1
Apoptosis -multiple species	25	12	1	1.12E-03	0.98
Hepatitis C	86	29	3	1.12E-03	1
Cholinergic synapse	67	24	5	1.13E-03	0.98
Other glycan degradation	16	9	0	1.14E-03	1
Gap junction	65	23	5	1.72E-03	0.97
Glutamatergic synapse	58	21	1	1.94E-03	1
Toll-like signaling pathway	58	21	4	1.94E-03	0.98
Cellular senescence	121	37	15	1.98E-03	0.81
African trypanosomiasis	17	9	0	2.00E-03	1
Legionellosis	40	16	6	2.01E-03	0.55
MAPK signaling pathway	207	57	26	2.45E-03	0.84
Long-term depression	41	16	5	2.72E-03	0.75

Phosphatidylinositol signaling system	84	27	4	3.55E-03	1
Melanoma	53	19	5	3.55E-03	0.91
Shigellosis	53	19	2	3.55E-03	1
Morphine addiction	43	16	1	4.74E-03	1
RIG-1-like receptor signaling pathway	43	16	2	4.74E-03	0.99
Ether lipid metabolism	22	10	1	4.74E-03	0.97
B cell receptor signaling pathway	51	18	5	5.41E-03	0.89
Inflammatory mediator regulation of TRP channels	63	21	6	5.98E-03	0.92
Fc epsilon RI signaling pathway	44	16	4	6.13E-03	0.91
Prion disease	23	10	4	6.95E-03	0.45
Tight junction	117	34	7	7.09E-03	1

2-2 コントロールと比較し PM で低下 (n=19)	N	Up	Down	<i>p</i> .up	<i>p</i> .down
Ribosome	132	0	111	1	1.86E-71
Oxidative phosphorylation	119	4	83	1	3.83E-42
Parkinson's disease	124	11	84	1	4.36E-41
Huntington's disease	163	17	87	1	4.87E-31
Thermogenesis	203	18	97	1	2.03E-29
Alzheimer's disease	150	25	73	0.83	5.02E-23
Non-alcoholic fatty liver disease	133	22	66	0.82	1.58E-21
Cardiac muscle contraction	56	5	32	0.99	2.42E-13
Retrograde endocannabinoid signaling	92	20	42	0.32	1.27E-12
Spliceosome	127	2	47	1	4.63E-10
Metabolic pathways	891	168	189	0.66	5.08E-08
RNA transport	149	9	43	1	6.95E-06
Carbon metabolism	87	13	25	0.88	5.94E-04
Proteasome	42	5	15	0.93	6.30E-04
Citrate cycle (TCA cycle)	26	3	11	0.9	6.44E-04
RNA polymerase	31	0	12	1	9.58E-04
EB virus infection	172	45	39	0.02	3.58E-03
Ribosome biogenesis in eukaryotes	81	5	21	1	6.05E-03
Metabolism of xenobiotics by cytochrome p450	21	4	8	0.6	7.57E-03

3. IBM を PM と比較

3-1 PM と比較し、IBM で亢進 (n=6)	N	Up	Down	<i>p</i> .up	<i>p</i> .down
p53 signaling pathway	52	10	1	8.87E-05	0.99
Protein processing in endoplasmic reticulum	154	17	17	5.29E-04	0.14
NFkB signaling pathway	69	10	3	9.70E-04	0.94
Cell adhesion molecules	84	10	1	4.35E-03	1
Apoptosis	116	12	9	5.92E-03	0.64
TNF signaling pathway	88	10	7	6.07E-03	0.61
3-2 PM と比較し、IBM で低下 (n=20)	N	Up	Down	<i>p</i> .up	<i>p</i> .down
Insulin signaling pathway	120	2	26	0.98	3.81E-06
Insulin resistance	91	2	21	0.92	1.19E-05
mTOR signaling pathway	123	1	24	1	5.70E-05
ErbB signaling pathway	74	4	16	0.43	2.95E-04
Adipocytokine signaling pathway	55	2	13	0.72	4.36E-04
Neutrophin signaling pathway	102	6	19	0.32	6.23E-04
Calcium signaling pathway	111	5	20	0.57	7.04E-04
Autophagy- animal	122	4	21	0.81	9.72E-04
AMPK signaling pathway	102	1	18	0.99	1.65E-03
Oocyte meiosis	86	1	16	0.98	1.67E-03
Oxytosin signaling pathway	120	5	20	0.64	1.92E-03
FoxO signaling pathway	108	6	18	0.37	3.18E-03
GnRH signaling pathway	77	3	14	0.69	3.99E-03
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	55	2	11	0.72	4.89E-03
Tight junction	122	7	19	0.32	5.37E-03
Glucagon signaling pathway	80	2	14	0.89	5.69E-03
Long-term potentiation	49	0	10	1	6.18E-03
Endocrine resistance	83	2	14	0.9	7.94E-03
Type II diabetes mellitus	29	0	7	1	8.24E-03
cAMP signaling pathway	120	4	18	0.8	9.80E-03

表 9、IBM における抗 E-cadherin 抗体と抗 DR6 抗体、抗 p62 抗体による免疫組織

化学の結果

		抗 E-cadherin 抗体 ^a				
		0	1	2	3	
抗 p62 抗体	0	2	0	0	0	2
	1	4	4	0	0	8
	2	1	3	2	0	6
	3	0	1	2	3	6
		7	8	4	3	22

		抗 DR6 抗体 ^b				
		0	1	2	3	
抗 p62 抗体	0	2	0	0	0	2
	1	4	4	0	0	8
	2	1	3	2	0	6
	3	0	1	3	2	6
		7	8	5	2	22

a、b: 筋束あたりの染色された線維の本数により、次のように分類した。

0:なし、1:1 本未満 /束、2:1 本以上、3 本未満 /束、3:3 本以上 /束

表 10、IBM における抗 E-cadherin 抗体で染色される線維の割合と臨床像との関連

	抗 E-cadherin 抗体			<i>p</i>
	0 ^a	1 ^a	2、3 ^a	
症例数 (男性:女性)	1:6	3:5	7:0	
診断時の年齢 (年)	75±6.3	71±8.5	65±7.7	N.S.
CK (IU/L)	629±552	951±1041	495±392	N.S.
合併疾患	腎臓癌 1 例	急性骨髄性 白血病 1 例	大腸癌 1 例	
ウイルス感染の合併	HCV と HTLV -1 の合併例 1 例	HCV 3 例	なし	

値は平均値±標準偏差で表示。三群間の平均値の比較には Steel-Dwass test を用いた。

CK:クレアチンキナーゼ、HCV:C 型肝炎ウイルス、HTLV-1:ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型、
N.S.:3 群の間に統計学的な有意差は認めなかった。

a: 筋束あたりの染色された線維の本数により、次のように分類した。0:なし、1:1 本未満 /束、2、
3:1 本以上/束

【謝辞】

本研究の機会を下さり、発現解析についてご指導下さいました、国際医療福祉大学医学部神経内科学 後藤順先生に深謝いたします。

本研究についてご指導下さいました、東京大学大学院医学系研究科神経内科学 戸田達史先生、辻省次先生に深謝致します。

発現解析についてご指導下さいました、国立精神・神経医療研究センター 神経内科 伊達英俊先生に深謝致します。

臨床病理像の解析についてご指導下さいました、東京大学大学院医学系研究科神経内科学 清水潤先生に深謝いたします。

免疫沈降および Western blotting について御指導下さいました、神戸大学大学院医学研究科 分子脳科学分野 金川基先生、上中健先生に深謝致します。

病理標本の作製に際し御協力下さいました、東京大学医学部神経内科第3研究室 鷺嶋通子様、時村直子様、西澤雅子様、萩原ゆき様に深謝致します。

本研究にご参加下さった全ての患者さんに感謝すると共に、臨床情報をご提供くださいました次の先生方に、深謝致します。

札幌山の上病院 井上聖啓 先生、上杉春雄 先生

帝京大学医学部附属病院 園生雅弘 先生、畑中裕己 先生、北國圭一 先生、千葉隆司 先生

国立国際医療研究センター 竹内壮介 先生、新井憲俊 先生

三井記念病院 櫻井靖久 先生、杉本泉 先生

虎の門病院 上坂義和 先生、神崎真実先生、関根章成 先生、小口絢子 先生

東京通信病院 椎尾康 先生、NTT 東日本関東病院 吉澤利弘 先生

日本赤十字社医療センター 橋田秀司 先生、松本英之 先生

杏林大学医学部附属病院 千葉厚郎 先生、内堀歩 先生

大阪市立大学医学部附属病院 三野俊和 先生、伊藤和博 先生

大森赤十字病院 山田美菜子 先生

横浜市立脳卒中・神経脊椎センター 桔梗英幸 先生、昭和大学病院 三輪裕介 先生

昭和大学藤が丘病院 板谷一宏 先生、平塚共済病院 桃尾隆之 先生

自治医科大学附属病院 益子貴史 先生、日本大学医学部附属板橋病院 横江勇 先生