

論文の内容の要旨

論文題目: 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

氏名: 池永 知誓子

封入体筋炎 (inclusion body myositis: 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難治性の疾患である。それに対し、四肢近位の筋力低下を来す多発筋炎 (polymyositis: PM) はステロイドによる治療が奏効する。病理学的には、IBM と PM は 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 (CD8-MHC-1 complex) が共通しており、IBM ではさらに縁取り空胞や、A β などのタンパク質が蓄積した変性線維を認める。

最初は筋病理所見上炎症しか認めず、筋力低下を認めるのも近位筋のみで PM と診断されても、徐々に上肢遠位の筋力低下を認め2回目の生検で縁取り空胞を認める例が報告されている。その一方で、治療に効果を示しその後も悪化しない PM 症例も少数ではあるが報告されている。

本検討ではまず、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、抗 p62 抗体による筋の免疫組織化学の結果も含め、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を目的とした。

また、IBM の発症には老化やウイルス感染、発癌に関わる経路など複数の要素の関与が疑われ、遺伝子の変異のみでは疾患の発症に至るまでの全てを説明することは出来ていないのが現状である。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。

1993 年から 2015 年までに病理診断を行った、連続 950 例の炎症性筋疾患症例中 CD8-MHC-1 complex を認めた 93 例の臨床病理像を解析し、ヨーロッパ神経筋センターの診断基準に照らし合わせた結果、70 例は IBM、17 例は PM の基準を満たした。その一方で、IBM には合致しない遠位の筋力低下を認めた例が 6 例存在した。縁取り空胞は IBM 症例のうち 56 例 (80%) で認めたが、抗 p62 抗体による免疫組織化学で顆粒状に細胞質が染色される線維は IBM 症例のうち 66 例 (94%)、その他 6 症例のうち 2 症例 (33%) で陽性で、PM 症例の中には p62 陽性の症例は認めなかった。また、IBM 症例のうち治療した 44 例では p62 の染色性によらず治療効果を認めた症例は無く、PM 症例では 16 例中 11 例が治療に反応したが、その他の 6 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。

この結果より、CD8-MHC-1 complex を認める症例の中で IBM や PM と診断されない症例では、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。また、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。

次に、CD8-MHC-1 complex を持つ症例の中で RNA の抽出に十分な量の凍結標本を確保出来

た 58 症例 (IBM 43 例、PM 6 例を含む) の筋と筋病理所見に異常を認めなかった 9 例の筋をコントロールとし発現解析を行った。

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いずれも IBM と PM を分けることは無く、両者は一群を成していた。

また、KEGG pathway enrichment analysis ではコントロールと比較して、遺伝子の発現が亢進していた KEGG pathway は IBM では 82 個、PM では 99 個で、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、コントロールと比較し遺伝子の発現が低下していた KEGG pathway は IBM では 29 個、PM では 19 個あり、そのうち 16 個の pathway は IBM と PM で共通していた ($p < 0.01$)。

この様に、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明らかになったが、IBM と PM を比較すると、IBM では PM と比較し細胞接着因子の遺伝子の発現が亢進していた ($p < 0.01$)。そこで細胞表面抗原 392 個の遺伝子の発現量を調べたところ、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 ($p < 0.01$) 認められた。その 50 個の遺伝子の中で、コントロールや PM で 0.12 RPKM 以下の遺伝子は、*Epithelial-cadherin (E-cadherin, CD324)* のみであった。

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行った免疫組織化学では、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。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、ごく少数に留まっていた。抗 MDA5 抗体陽性の皮膚筋炎や抗合成酵素症候群、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。壊死性筋症や抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎では抗 p62 抗体でびまん性に染色される線維は認められたが、それらの線維は抗 E-cadherin 抗体では染色されなかった。

例外的に、皮膚筋炎のうち筋線維束周囲の萎縮を認めた 7 例中 3 例の筋線維束周囲の線維の一部に抗 p62 抗体と抗 E-cadherin 抗体によるびまん性の染色性を認めた。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のみ、主に萎縮した線維の細胞膜や細胞質が抗 E-cadherin 抗体で染色された。

また、発現解析で同定された E-cadherin について、タンパク質レベルでの有無を IBM の筋を用いた Western blotting でも確認した。その結果、IBM 6 例のいずれにおいても陽性コントロールのヒト前立腺癌細胞で検出されたバンドと大きさが一致した 120 kDa と 35 kDa のバンドが検出された。一方で、コントロールでは 120 kDa のバンドは検出されなかった。Western blotting で用いた抗 E-cadherin 抗体は E-cadherin の細胞内領域を認識する抗体であり、検出されたバンドは全長型の E-cadherin と切断された E-cadherin の細胞内領域を反映している可能性が考えられた。

その他、コントロールや PM と比較し IBM で発現量に有意差を認めた遺伝子の中に、5 個の tumor necrosis factor receptor superfamily も含まれ、この中で death receptor 6 を含む 4 個の分子は細

胞死のシグナル伝達に関わる death domain を細胞内に持つ点が共通していた。抗 DR6 抗体を用いた筋線維の免疫組織化学も行ったところ、抗 E-cadherin 抗体で染色される線維に一致して染色性を認めるという結果であった。

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 の骨格筋細胞の細胞質に存在していることが示された。E-cadherin は上皮細胞同士の接着結合に寄与する他に、 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が、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。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。また、death receptor 6 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 death receptor 6 抗体では染色されず、IBM の筋においては細胞死以外の役割を担っている可能性も示唆された。

E-cadherin や death receptor 6 で染色される筋線維を筋束内部に認める事は、IBM の診断において参考になる可能性があるのみならず、IBM の病態を明らかにする上で新たな切り口となる可能性が考えられた。