

ヒト多発筋炎発症機構の研究
 —樹状細胞移植による実験的アレルギー性筋炎
 モデルマウスの解析をもとに—

新潟大学脳研究所神経内科学教室 (主任: 辻 省次教授)

河内 泉

Mechanism of Autoimmunity in Human Polymyositis,
 Based on the Experimental Allergic Myositis
 Induced by Inoculating Dendritic Cells

Izumi KAWACHI

*Department of Neurology,
 Brain Research Institute, Niigata University
 (Director: Prof. Syoji TSUJI)*

Abstract

Polymyositis (PM) is an inflammatory muscle disease caused by autoimmune dysfunction, and considered to be caused by cytotoxic CD8 T cells. To date no autoantigens have been identified. We attempted to induce an experimental allergic myositis (EAM) in BALB/c mice by inoculating syngeneic dendritic cells (DCs) presenting peptides that are expected to match the binding anchor motif of H-2K^d (BALB/c). We selected peptides that are abundantly expressed in skeletal muscle as the candidate antigens. Only when we inoculated syngeneic bone-marrow-derived DCs presenting pyruvate kinase M1/M2 peptide 464-472 in BALB/c mice, 41.7% of the mice (EAM) developed pathological changes in skeletal muscle compatible to human-PM. Under other conditions (when we inoculated DCs presenting sodium channel protein (skeletal muscle alpha-subunit) peptide 1264-1274 into BALB/c or C57BL/6 mice, or DCs presenting pyruvate kinase M1/M2 peptide into C57BL/6 mice), there were no necrotizing and inflammatory lesions. Induction of EAM in the same manner as above also induced CTL activity against P815 cells with the pyruvate kinase M1/M2 peptide and syngeneic differentiated-cultured-myotubes without peptides by the chromium release assay. Consistent with the similarity of the binding anchor motifs of H-2K^d (BALB/c) and HLA A*2402, we found that pyruvate kinase M1/M2 peptide-specific

Reprint requests to: Izumi KAWACHI
 Department of Neurology
 Brain Research Institute
 Niigata University
 1-757 Asahimachi-dori,
 Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先: 〒951-8585 新潟市旭町通り1-757
 新潟大学脳研究所神経内科学教室 河内 泉

and interferon γ - producing T lymphocytes existed in peripheral blood of human-PM with the HLA A*2402 allele by the enzyme linked immunospot (ELISPOT) assay. Therefore we concluded that pyruvate kinase M1/M2 peptide is a candidate autoantigen not only in BALB/c-EAM but also in human-PM with the HLA A*2402 allele.

Key words: Polymyositis, Dendritic cells, MHC-binding anchor motif, T cell epitope, Cross-priming

はじめに

多発筋炎 (Polymyositis; PM) と皮膚筋炎 (Dermatomyositis; DM) は、主に全身骨格筋に炎症性病変を形成する自己免疫疾患である。両者ともに四肢近位及び体幹骨格筋に筋力低下を認め、筋病理学的に炎症細胞浸潤、筋線維壊死が認められる。しかし、PM では骨格筋が、DM では骨格筋と皮膚が障害されるという臨床的な違いのみでなく、病態形成機序の見地からも、以下に示すような相違点が集積されつつある。PM では、非壊死筋線維を活性型 CD8 陽性 T 細胞が取り囲むように浸潤していること¹⁾⁻⁴⁾、更に筋組織浸潤 CD8 陽性 T 細胞は、培養自己分化筋細胞に対して細胞傷害活性を有すること⁵⁾ から、細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞による細胞性免疫を機転とした筋細胞傷害が病態形成機序として推測されている。一方、DM では、筋内血管周囲に CD4 陽性 T 細胞と B 細胞を主体としたリンパ球が浸潤し、血管壁には免疫複合体、membrane attacking components (MAC) の沈着を伴い、更に血管性障害による虚血を推測させる perifascicular atrophy が認められることから、ヘルパー CD4 陽性 T 細胞が関与する液性免疫による血管障害を介した筋細胞傷害機序が推測されている⁶⁾。両疾患共に、各種自己抗体 (抗 Jo-1 抗体に代表されるアミノシル tRNA 合成酵素抗体等) の存在が報告されているものの、PM 特異的あるいは DM 特異的抗体は知られておらず、更に抗体が直接関与する病態形成機序は報告されていない。また、両疾患共に、T 細胞を介した免疫性機転の関与が推測されているものの、T 細胞エピトープ及び自己標的抗原さえも解明されていない。

PM の発症機構に深く関与すると考えられてい

る細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞は、一般に、major histocompatibility complex (MHC) class I 分子に強く結合した抗原ペプチドを、T 細胞受容体 (T cell receptor; TCR) complementarity-determining region 3 (CDR 3) 領域で認識する。MHC class I 分子に結合している自己抗原の解析から、それぞれの MHC に結合している抗原ペプチドは、それぞれの class I 分子ごとに特異的アミノ酸配列をもっていることがわかっている。例えば、HLA A*2402 に結合するペプチドの結合アンカーモチーフは X-Y-XXXXXX-I/L/F である⁷⁾⁸⁾。

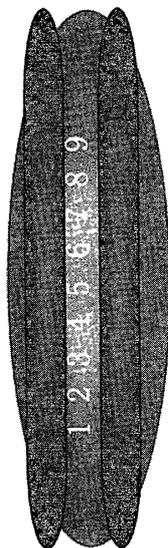
筋炎において、MHC すなわち human leukocyte antigen (HLA) の関連性は、報告されているものの、症例の不均一性の問題から、一定の見解が得られていない⁹⁾⁻¹⁴⁾。我々は、臨床的にも病理学的にも均一な、すなわち筋線維周囲に CD8 陽性細胞の浸潤を認め、更に perifascicular atrophy を認めない PM 症例を解析することにより、HLA A24 を有する症例が多数存在することを確認した (HLA A24 を有する PM 患者が 60% (n=10) に対し、健常者は 18% (n=9585) であった)¹⁵⁾。HLA A*2402 に結合するペプチドの結合アンカーモチーフ X-Y-XXXXXX-I/L/F は、BALB/c マウス H-2K^d の結合アンカーモチーフ X-Y-XXXXXX-I/L⁷⁾⁸⁾ と同一モチーフであることから (図 1)、我々は、HLA A*2402 ヒト多発筋炎モデル動物として、BALB/c マウス (H-2K^d) を、実験的アレルギー性 (骨格筋) 筋炎 (Experimental allergic myositis; EAM) 対象動物と設定した。更に、候補抗原としては、骨格筋に高い発現量を有する蛋白で、かつヒト HLA A*2402 及び BALB/c マウス H-2K^d 結合アンカーモチーフに一致するペプチド群とした。

これまでに報告のある EAM としては、

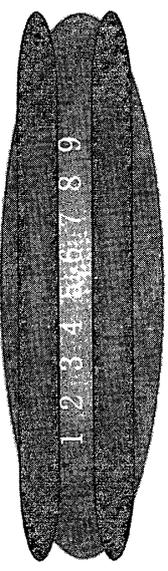
MHC class I and peptide

Binding peptides from class I molecules

C57BL/6 (H-2K^b)



BALB/c (H-2K^d)



binding cleft
holding antigenic
peptides

Position		Position
1		1
2		2
3		3
4	F	4
5	Y	5
6		6
7		7
8		8
9		9
	dominant anchor residue	
	strong anchor residue	
Y	M	N P M K T
		I I F N
		L

HLA A*2402
XYXXXXXI
L F

Pyruvate kinase M1/ M2
464 - 472
LYRGIFPVL

Sodium channel
Skeletal muscle
1264 - 1274
MYLYFVIFIF

図1 MHC class I分子に結合するペプチドのアンカーモチーフ構造

MHC分子に結合するペプチドは規則性があることがわかっている。H-2K^dとHLA A*2402に結合するペプチドのアンカーモチーフ構造は同一であることがわかっている。両者のアンカーモチーフ構造に適合し、かつ骨格筋に非常に発現が高い

Matsubara ら¹⁶⁾によるモルモットへのミオシン B 粗分画免疫に始まり、以降、Kojima ら¹⁷⁾による Lewis ラットへのミオシン粗分画免疫モデル、Matsubara ら¹⁶⁾¹⁸⁾による SJL/J マウスへのミオシン B 分画免疫モデル、Kohyama ら¹⁹⁾による Lewis ラットへの精製 C-protein 免疫モデルが報告されている。しかし、いずれのモデルも臨床的に明らかな筋力低下を認めず、病理学的に軽度もしくは中等度の筋炎の存在が証明されているにすぎない。また、T 細胞が認識する抗原ペプチドは同定されておらず、アミノ酸や分子レベルの解析への道は開かれていない。実験的アレルギー性心筋炎モデルが、その標的臓器である心筋において免疫誘導を起こしやすく、心筋炎を容易に発症し易く、既に数種の抗原ペプチドが同定されていることとは対照的である。横紋筋である骨格筋 myotube の特殊性、すなわち、第一に、多核で巨大な (25mm 長 X 50 μm 幅; 紡錘状腫瘍細胞の 28000 倍の大きさ) 細胞であるということ、第二に、human IAP-like protein が myotube で発現していること (この為に、T 細胞による筋線維の apoptosis が起こりにくい)²⁰⁾ 等の特異な性格の為、心筋とは対照的に骨格筋を標的臓器とする EAM の作成は難しいと言われている²¹⁾。そこで、我々は、骨格筋に容易にかつ強力に免疫誘導を起こす為に、細胞傷害性 T 細胞を誘導する能力の高い樹状細胞²²⁾ を使って、EAM の作成を試みた。実際には、MHC class I 結合モチーフに一致し、骨格筋に発現量が高い Pyruvate kinase M1/M2 (PKM1/M2) ペプチドを呈示させた樹状細胞移植 BALB/c マウスで、病理学的及び細胞免疫学的に EAM の誘導を確認することができた。

次に、ヒト PM の発症機構の解析を試みた。これまでに報告された、ヒト PM の病変筋組織の TCR repertoire 解析では^{23)–26)}、T 細胞は、PM で oligoclonal に、DM で polyclonal に浸潤しているとされる。しかし報告により、優位に出現する TCR repertoire 及び CDR 3 motif 構造が異なっている。また、PM の病態機序に CD 8 陽性細胞傷害性 T 細胞が関与していることが推測されてい

るにも関わらず、MHC class I を限定した TCR の解析がないことから、我々は、PM との関連が強く示唆される HLA A*2402 を有する PM 患者に限定した筋組織 TCR CDR 3 解析から、T 細胞の浸潤様式を再検討した。HLA A*2402 PM では、T 細胞は antigen-driven な形式で標的臓器内に浸潤し、更にその標的自己抗原は比較的均一であること、すなわち均一な標的抗原による CD 8 陽性細胞による細胞傷害活性の存在を推測することができた。更に、樹状細胞移植によって EAM 誘導を可能とした PKM1/M2 ペプチドが、均一な標的自己抗原が推測されるヒト HLA A*2402 PM においても病因ペプチドになり得ることを、the enzyme linked immunospot (ELISPOT) assay により確認した。

材料と方法

1. 実験的アレルギー性筋炎モデルマウス

1) マウス

年齢 (4 週から 8 週齢) 及び性別 (メス) を均一にした BALB/c (H-2K^d), C57BL/6 (H-2K^b) マウス (Charles River Japan Inc.) を使用した。

2) Cell Lines

P815 (H-2K^d) (a mastocytoma cell line, TIB-64) (the American Type Culture Collection) をペプチド特異的細胞傷害試験の標的細胞とした。また、同系マウス骨格筋筋芽細胞ラインは既報の如く^{5)27)–29)} 確立し、同細胞を 2% 馬血清 (GIBCO BRL) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO BRL) 培地で 1 週間培養することにより、培養分化骨格筋細胞を誘導し、骨格筋細胞特異的細胞傷害試験の標的細胞とした。

3) 樹状細胞の分離とマウスへの免疫

同系マウス骨髄由来樹状細胞は、既報の如く作成³⁰⁾ した。すなわち、大腿骨及び脛骨から骨髄を分離し、リンパ球及び接着性マクロファージを除去した後、recombinant murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (10³ U/ml) (Genzyme Corp.), recombinant murine interleukin 4 (IL-4) (10³ U/ml)

(Genzyme Corp.), 10% 牛胎仔血清 (FCS) (GIBCO BRL), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 250ng/ml amphotericin B (GIBCO BRL), and 50 μ M β -mercaptoethanol (GIBCO BRL) 含有 RPMI1640 培養液 (GIBCO BRL) で7日間培養することにより, 樹状細胞を誘導した. 合成ペプチド (LYRGIFPVL 及び MYLYFVIFHF) (Sawady Technology Co. Ltd.) (100 μ g/ml) を4時間添加することにより, 上記の骨髄由来樹状細胞に呈示させ, 1×10^6 細胞を同系マウス鼠径リンパ節に移植し, 同時に *Bordetella pertussis* (2×10^9) (WAKO Pure Chemical Industries, Ltd.) を腹腔内に注射した. この操作を週2回, 計4回繰り返すことで, EAM の誘導を試みた. 最終免疫の1週間後に, 全身骨格筋 (大腿四頭筋, 膝屈筋群, 前脛骨筋, 腓腹筋, 腸腰筋) を採取し, 液体窒素下で急速凍結した後, クリオスタット切片を作成した.

4) フローサイトメトリー解析

樹立した骨髄由来樹状細胞は, fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス樹状細胞抗体 (33D1 clone: Leinco Technologies, Inc.) で染色し, フローサイトメトリー (FACScan: Becton Dickinson) で特異的誘導の有無を解析した.

5) 組織学的検討

凍結骨格筋は8 μ m 厚のクリオスタット切片とし, ヘマトキシリン・エオジン染色 (H.E.) を施した. また, 免疫組織化学的検索は, 冷却アセトンで10分間固定後, 10%ヤギ血清加 PBS で室温1時間, その後一次抗体としてラット抗マウスモノクローナル抗体 (抗 CD8 (53-6.7 clone: Phamingen Int.), CD4 (RM4-5 clone: Phamingen Int.)) で1時間, 二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Biosource Int.) で1時間, 室温でインキュベーションした. アビジン・ペルオキシダーゼ (VECTASTAIN Elite ABC Kit) (Vector, Burlingame, CA, U.S.A.) とインキュベーションの後, 3-3'-diaminobenzidine (Sigma Fast DAB Tablet set) (Sigma) により発色させた. 各骨格筋は10切片化し, 定量解析の為, 各筋当たり少なくとも2000筋線維検討し, 壊死筋線維及び非

壊死筋線維周囲細胞浸潤を呈す筋線維を比率化した.

6) 細胞傷害活性試験

上記の如く作成したマウスより脾臓細胞を分離し, ペプチド (50 μ g/ml) 添加10%FCS 含有 RPMI1640 培地で培養を開始し, 24時間後, 175 JRU/ml ヒト recombinant interleukin 2 (IL-2) (Hymedium; Nipro) を添加する. 5日後, CD8a (Ly-2) MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH) 及び MACS separator (Miltenyi Biotec GmbH) により, CD8 陽性細胞を分離し (実際には, 脾臓細胞平均 5×10^7 cells/mouse より, CD8 陽性細胞平均 5×10^6 cells/mouse が得られ, MACS 分離群は CD8 陽性細胞を98.8%含んでいる), エフェクター細胞とする. 一方, ペプチド特異的細胞傷害試験に対しては, 標的細胞を P815細胞とし, 筋細胞特異的細胞傷害試験に対しては, 培養分化骨格筋細胞株とした. 常法に従い³¹⁾, 各標的細胞を chromium ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$: 18.5 Mbq / 0.5ml; Daiichi Radioisotope Labs., Ltd.) で標識した後, 設定したエフェクター / 標的細胞比 (E/T) に従い, triplicate で96ウェルプレートに配分し, 更にペプチド (50 μ g/ml) を添加し, 4時間培養し, 細胞傷害試験を試みた⁵⁾. %lysis を ((実験⁵¹Cr 遊離 (cpm) - 自然⁵¹Cr 遊離 (cpm)) \times 100 / ((最大⁵¹Cr 遊離 (cpm) - 自然⁵¹Cr 遊離 (cpm))) として計算した. 自然遊離は, P815細胞に対しては常に10%以下, 同系培養分化骨格筋細胞株に対しては常に30%以下であった.

2. ヒト多発筋炎骨格筋組織及び末梢血リンパ球解析

1) ヒト多発筋炎筋組織浸潤リンパ球の T 細胞受容体解析

臨床的及び組織学的に診断したヒト PM の疾患活動期 (未治療) に採取した凍結筋生検組織 (湿重量50mg) より, ISOGEN (Nippon Gene) で RNA を抽出し, プロトコールに従いオリゴ dT プライマー及び AMV reverse transcriptase XL (TaKaRa, Biomedicals) で42°Cにて逆転写反応を行うことで cDNA を作成した. 既報³²⁾に従い, 22個の特異的 T 細胞受容体 (TCR) V β 鎖 5' プラ

イマーと、共通した T 細胞受容体 C β 鎖特異的 3' プライマーを使い、200 μ M dNTP, 0.5U ExTaq DNA polymerase (TaKaRa, Biomedicals), 94 $^{\circ}$ C で 2 分間変性した後、変性温度 94 $^{\circ}$ C 1 分間、アニーリング温度 60 $^{\circ}$ C 1 分間、伸長温度 72 $^{\circ}$ C 1 分間で 35 サイクルの条件下で PCR 反応をすることにより、TCR V β CDR 3 領域 PCR 産物を増幅した。特に、得られた TCR V β 13.1 PCR 産物を TA クローニングベクター (Original TA Cloning Kit, Invitrogen) によりサブクローン化し、インサートを含む 10 から 40 コロニーをランダムに選択し、自動 DNA シークエンサー (Applied Biosystems, Inc.) を使い塩基配列を決定し、その出現頻度を算出することで骨格筋浸潤 T 細胞のクローナリティーを検討した。

2) HLA 遺伝子型解析

既報³³⁾ に従い、Sequence-based typing (SBT) から、HLA A 型を決定した。

3) ELISPOT assay

既報³⁴⁾ に従い、Ten-day interferon (IFN)- γ ELISPOT 法を行った。HLA A*2402 を有す PM 患者より同意を得、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) を分離 (LymphoprepTM; Nycomed) し、EAM にて使用したペプチド (50 μ g/ml) と共培養 (1 \times 10⁶/ml) する。8 日後、同一患者から採取した放射線照射後の PBMC (1 \times 10⁶/ml) を抗原提示細胞として使うことで、ペプチド (50 μ g/ml) で再刺激し、更に 1 日培養する。次に ELISPOT 法 (ELISPOT for human Interferon- γ ; Mabtech) で IFN- γ 産生リンパ球を算定する。Triplicate で検討し、10⁶ 細胞中の IFN- γ 産生細胞数 (spot-forming cells; SFC) として定量化した。ペプチドの有無で IFN- γ 産生細胞数に有意な差 (Mann-Whitney 検定) が存在したものを、ペプチド特異的リンパ球が存在すると推測した。尚、症例間では、ペプチド非存在下での SFC をサブトラクションして比較し、疾患群間で one-way ANOVA 解析をした。今回、疾患対照としては、同 HLA (HLA A*2402) を有する寛解期の筋無力症患者及び MCTD 患者とした。また、使用した

ペプチドは、EAM 作成で使用した Pyruvate kinase M1/M2 peptide (LYRGIFPVL), Sodium channel protein skeletal muscle alpha-subunit (MYLYFVIFIIF) とした。

結 果

1. 樹状細胞移植による実験的アレルギー性筋炎モデルマウス

1) 骨髄由来樹状細胞の誘導

GM-CSF 及び IL-4 にて誘導した骨髄由来樹状細胞は、95.2% の頻度で樹状細胞マーカー 33D 1 陽性であった (図 2)。

2) 樹状細胞提示ペプチドの選択

MHC 分子に結合するペプチドには規則性があることがわかっており、HLA A*2402 と H-2K^d は同一結合アンカーモチーフを有することから (図 1), HLA A*2402 ヒト多発筋炎モデル動物として、BALB/c マウス (H-2K^d) を対象とすることにした。また、細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T cell; CTL) エピトープを同定するために、MHC 結合アンカーモチーフ構造を有するペプチドを、骨格筋に発現が多いことが想定されるタンパク群から選択し (reverse immunogenetics 法)³⁵⁾、樹状細胞に提示し免疫することで、EAM の作成を試みた。実際には、pyruvate kinase M1/M2 (PKM1/M2) ペプチド 464-472 (LYRGIFPVL) もしくは sodium channel protein, skeletal muscle alpha-subunit (SCSM) ペプチド 1264-1274 (MYLYFVIFIIF) を、GM-CSF 及び IL-4 にて誘導した骨髄由来樹状細胞に提示させ、*Bordetella pertussis* とともに免疫した (図 1, 3)。

3) 臨床症状及び骨格筋組織学的検討

上記のように作成したいずれのマウスも、経過中、明らかな筋力低下は顕在化しなかったが、PKM1/M2 ペプチドを提示した樹状細胞移植 BALB/c マウスのみで、病理学的に全身、特に近位骨格筋に筋線維の大小不同、筋線維壊死 (図 4)、非壊死筋線維を取り囲むように CD8 及び CD4 陽性リンパ球浸潤を認めた (41.7% (5/12)) (表 1)。この所見は、perifascicular atrophy を伴

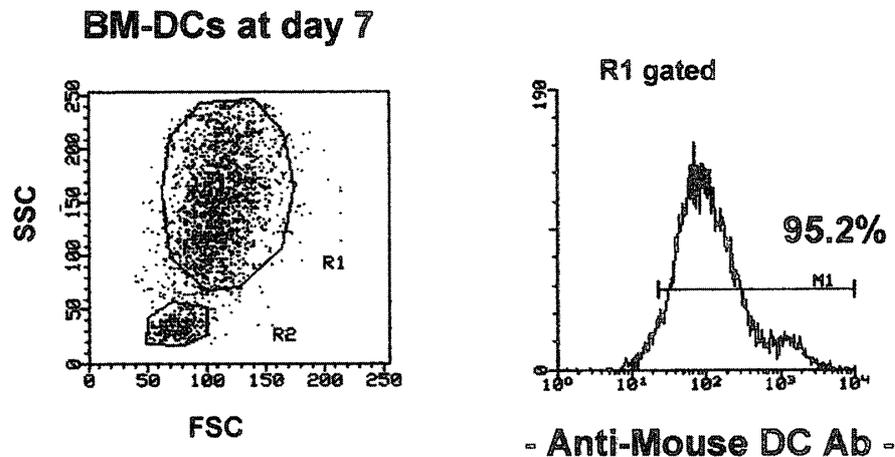


図2 マウス骨髄由来樹状細胞誘導

GM-CSF 及び IL-4 にて誘導した骨髄由来樹状細胞を, FITC 標識抗マウス樹状細胞抗体 (33D1) でフローサイトメトリー解析した. Region 1 (R1) ゲート細胞は, 高頻度 (95.2%) 樹状細胞が誘導されていた.

わず, ヒト DM というよりも, ヒト PM の病理像と同一であった. 定量的検討では, 全筋線維の 9.1% に壊死線維や貪食像が得られ, 更にリンパ球が 5 個以上取り囲んだ非壊死筋線維 (炎症像) は, 6.6% であった. 尚, 他の条件, すなわち PKM1/M2 ペプチド呈示樹状細胞を C57BL/6 (H-2K^b) マウスや, SCSM ペプチド呈示樹状細胞を BALB/c (H-2K^d) 及び C57BL/6 (H-2K^b) マウスに移植した時には, 上記の所見は得られなかった (表 1).

4) ペプチド特異的細胞傷害活性

EAM の組織像が得られた免疫動物 (PKM1/M2 呈示樹状細胞移植 BALB/c マウス) の脾臓 CD8 陽性細胞は, ⁵¹Cr 標識した P815 (H-2K^d) 細胞 (ペプチド添加) に対し, 細胞傷害活性が認められ, ペプチド特異的細胞傷害活性を確認した (40%: 2/5) (図 5). また, EAM を免疫誘導できなかったマウス (SCSM 呈示樹状細胞移植 BALB/c マウス) でも, ペプチド特異的細胞傷害活性を認めた (20%: 1/5) (図 6). 尚, 他の条件, すなわち PKM1/M2 または SCSM 呈示樹状細胞移植 C57BL/6 マウスでは, ペプチド特異的細胞傷害活性は得られなかった.

5) 培養分化筋細胞特異的細胞傷害活性

上記で, ペプチド特異的細胞傷害活性を認めたマウスのうち, PKM1/M2 呈示樹状細胞移植 BALB/c マウスのみで, ⁵¹Cr 標識培養分化筋細胞を標的細胞 (ペプチド無添加) とした時にも, 培養分化筋細胞特異的細胞傷害活性を認めた (表 2). 一方, SCSM 呈示樹状細胞移植 BALB/c マウスでは, 培養分化筋細胞特異的細胞傷害活性を認めなかった.

以上のように, PKM1/M2 呈示樹状細胞移植 BALB/c マウスは, 臨床的に筋力低下は認められなかったものの, 病理学的にヒト PM と同一の筋病理所見が認められ, 更にペプチド特異的及び培養分化筋細胞特異的細胞傷害活性を得ることができたこと, 及び H-2K^d と HLA A*2402 の MHC 結合アンカーモチーフ構造の類似性から, HLA A*2402 ヒト PM のモデルマウスと言える.

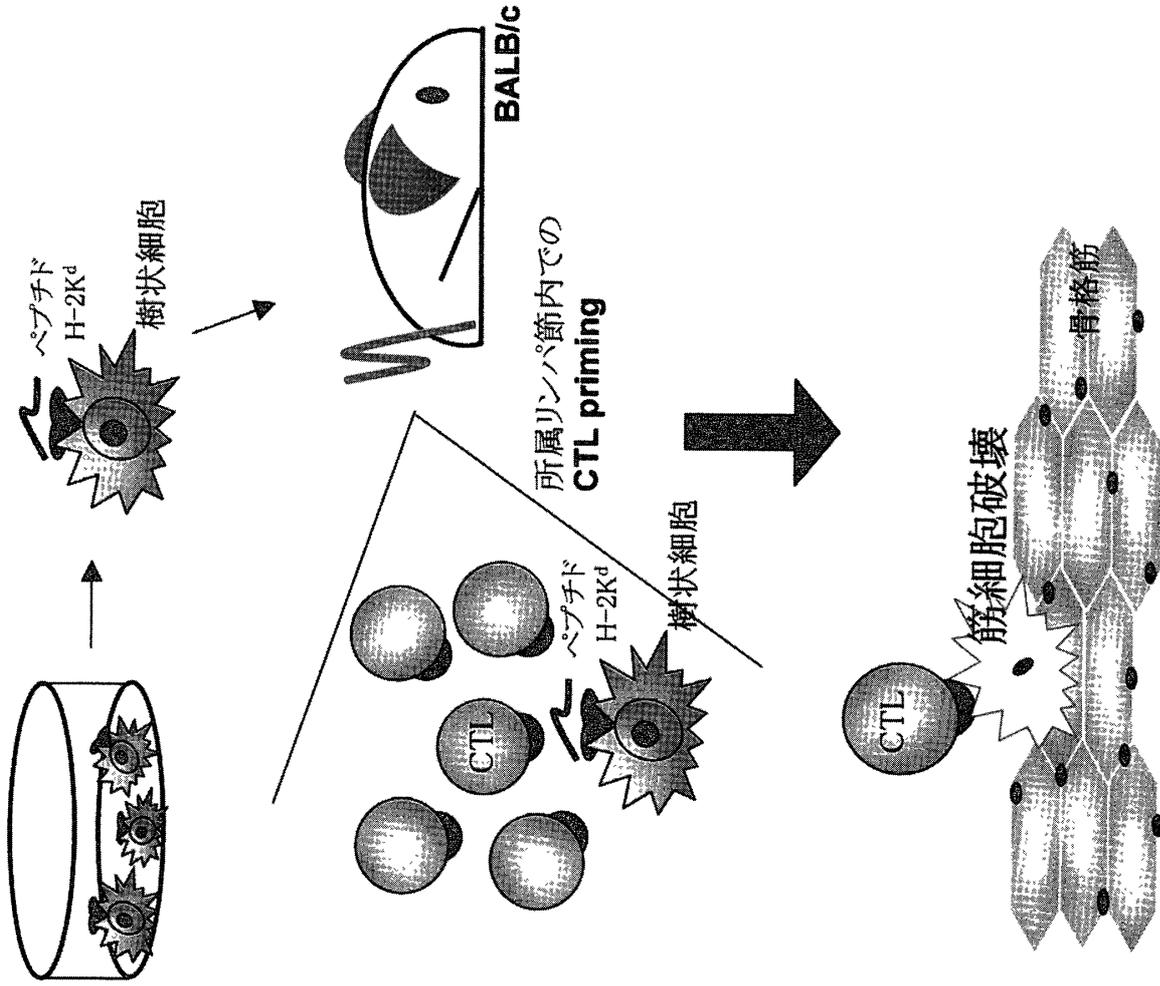
2. ヒト多発筋炎骨格筋組織及び末梢血リンパ球解析

1) ヒト多発筋炎筋組織浸潤リンパ球の T 細胞受容体解析

当院神経内科で, 臨床的及び病理学的に診断した HLA A*2402 を有する PM, DM, 混合性結合組織病 (mixed connective tissue disease; MCTD)

EAM作成方法

同系マウス由来骨髄細胞を GM-CSF, IL-4 存在下で 7 日間培養し、樹状細胞を作成



樹状細胞にペプチドをパルスし、同系マウスそけいリンパ節に移植 (計 4 回) (アジュバント：百日咳毒素を投与)

EAM

図 3 樹状細胞移植による Experimental allergic myositis (EAM) 作成方法

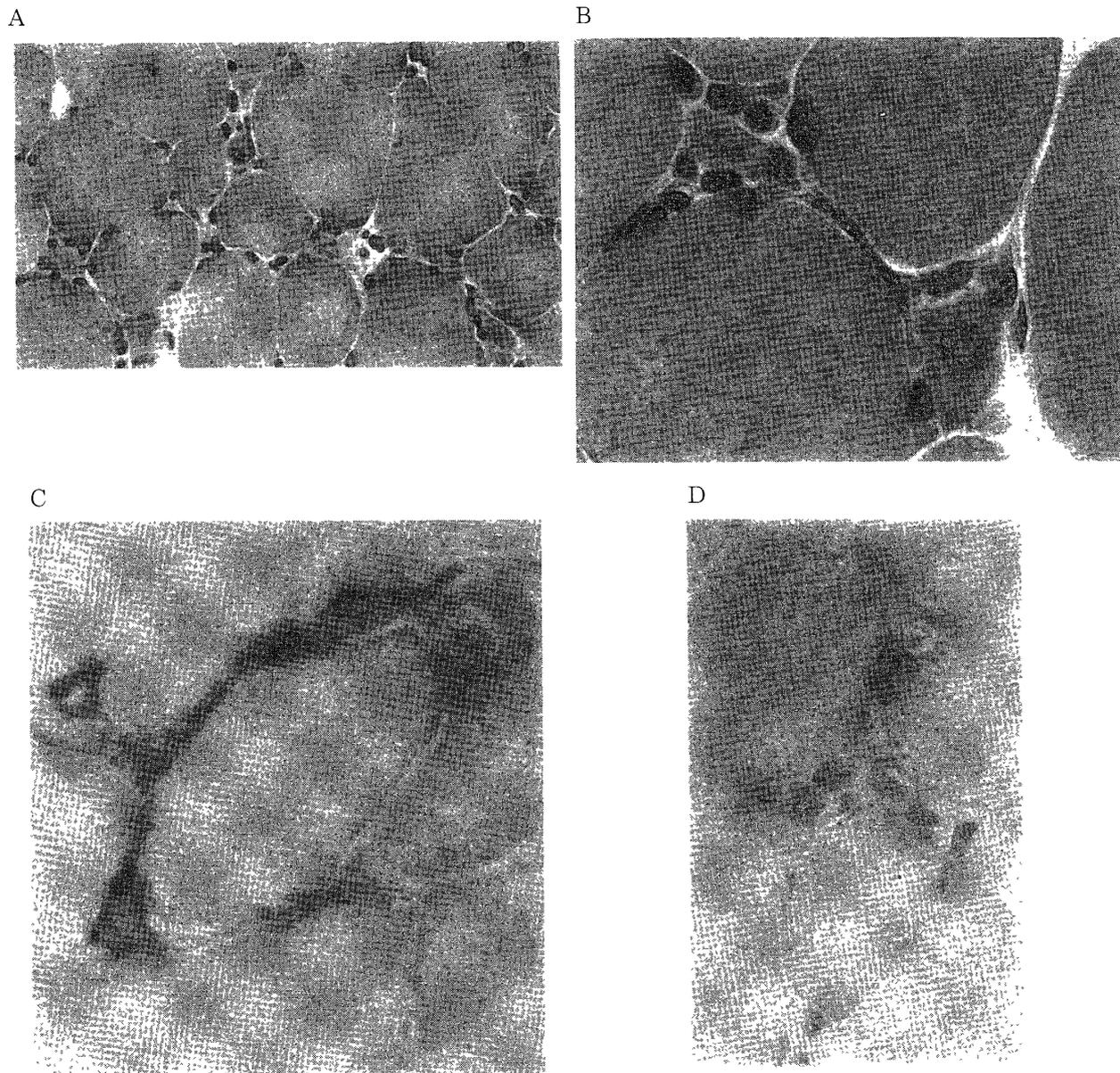


図4 Pyruvate kinase M1/M2 ペプチド呈示樹状細胞移植により作成した EAM の病理学的所見

A, B: ヘマトキシリン・エオジン染色 C: CD4 陽性細胞 D: CD8 陽性細胞

同ペプチド呈示による樹状細胞移植により, 筋線維の大小不同, 筋線維壊死, 及び非壊死線維周囲には CD4, CD8 陽性 T 細胞の浸潤を認める.

(表3) の生検筋凍結標本を対象にした. HLA A*2402を有する PM 全てで, V β 13.1鎖を有する T細胞の CDR3 領域に, 優位に出現する clone が得られ, oligoclonal に T細胞が浸潤していることが推測された(表4). 一方, DM, MCTD では, 優位に出現する clone は得られず, polyclonal な出現様式をとることが推測された(表5). 更に, PM では, J β 鎖が比較的限定して出現し, CDR3

領域に特定のモチーフ構造 (G-X-GSG, YS-XXX-G, G-XX-G) が認められることから, PM 筋組織では, T細胞は antigen-driven な形式で標的臓器内に浸潤し, 更にその標的自己抗原は, 比較的均一であることが推測された(表6). 以上, MHC class I を限定した解析で DM, MCTD とは対照的に, PM は比較的均一な自己標的抗原の存在が推測され, 均一な標的抗原に対する CD8 陽性細

表1 樹状細胞移植による EAM の誘導結果

	BALB/c <H-2K ^d >	C57BL/6 <H-2K ^b >
PKM1/M2 peptide - DCs	5 / 12 (41.7%)	0 / 5 (0%)
SCSM peptide - DCs	0 / 12 (0%)	0 / 5 (0%)
Peptide (-) - DCs	0 / 12 (0%)	0 / 5 (0%)

Pyruvate kinase M1/M2 (PKM1/M2) ペプチドを免疫した BALB/c マウスの41.7%に病理学的に EAM を誘導可能であったが, Sodium channel protein, skeletal muscle alpha-subunit (SCSM) ペプチドを呈示した樹状細胞や, 全くペプチドを添加しない樹状細胞では EAM を誘導することができなかった. また, いずれのペプチドも C57BL/6 マウスでは EAM を誘導することが不可能であった.

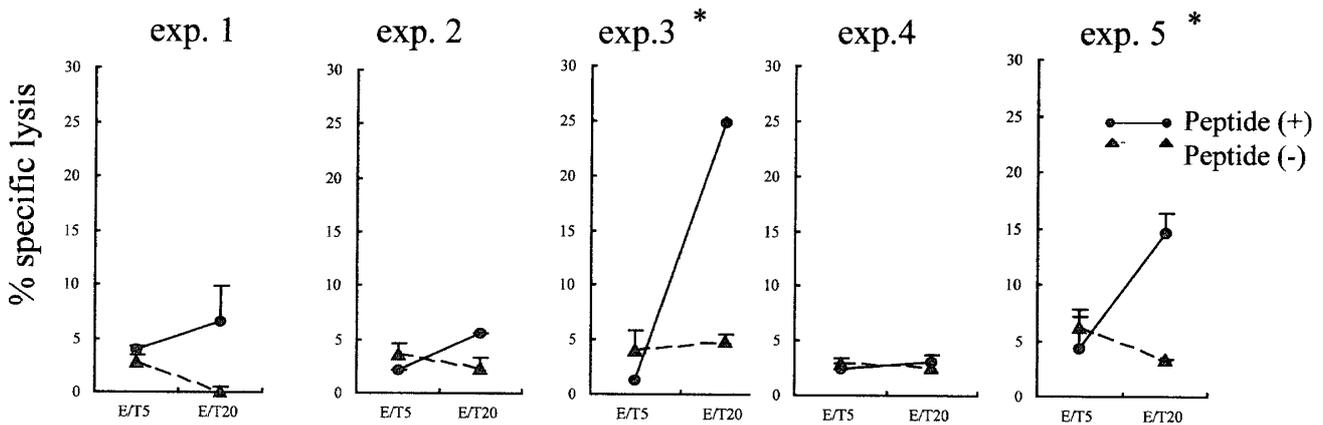


図5 Pyruvate kinase M1/M2 ペプチドに対する H-2K^d 拘束性細胞傷害活性

Pyruvate kinase M1/M2 ペプチドを免疫したマウス脾臓より MACS system にて CD8 陽性細胞を分離しエフェクター細胞とし, また⁵¹Cr 標識 P815細胞 (H-2K^d) を標的細胞とし, ペプチドを添加, 未添加の条件で細胞傷害試験を施行した. Exp. 3 及び Exp. 5 のマウスでペプチド特異的細胞傷害活性を有する CD8 陽性細胞を認めた. Spontaneous lysis <10%, Results are mean +SD of triplicate wells.

胞による細胞傷害活性が, 筋炎発症機序に関与していることが推測された.

2) ELISPOT assay

①臨床症例結果

ELISPOT 法に関しては, HLA A*2402 を有す PM 4 名, MCTD 2 名, 重症筋無力症 (Myasthenia gravis; MG) 3 名を対象とした. 尚, PM 患者に関しては全例治療中である為, 可能な限り罹病期間の短い症例を対象とした (表7).

②Pyruvate kinase M1/M2ペプチド反応 T 細胞についての検討

HLA A*2402を有す PM 患者の半数(4名中2名)で, 各症例において, PKM1/M2 ペプチド特異的リンパ球の存在を認めた. 尚, HLA A*2402を有す MCTD 及び MG 患者には, 有意に反応するリンパ球を認めなかった (図7A).

③Sodium channel protein skeletal muscle alpha-subunit ペプチド反応 T 細胞についての検討

HLA A*2402を有す PM 患者の半数(4名中2

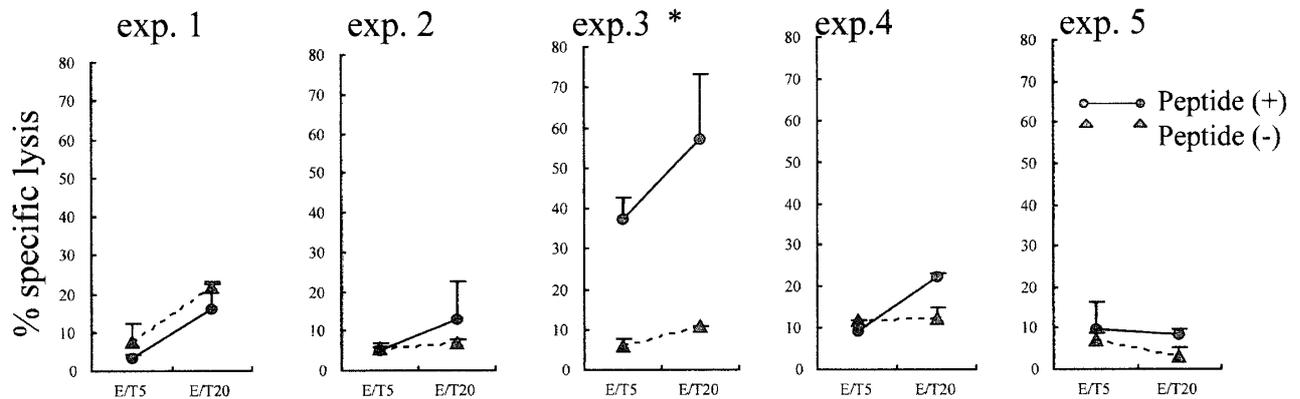


図6 Sodium channel skeletal muscle ペプチドに対する H-2 K^d 拘束性細胞傷害活性

Sodium channel skeletal muscle ペプチドを免疫したマウス脾臓より MACS system にて CD8 陽性細胞を分離し効果細胞とし, また⁵¹Cr 標識 P815細胞 (H-2K^d) を標的細胞とし, ペプチドを添加, 未添加の条件下で細胞傷害試験を施行した. Exp. 3マウスのみにペプチド特異的細胞傷害活性を有する CD8 陽性細胞を認めた. Spontaneous lysis < 10%, Results are mean +SD of triplicate wells.

表2 培養分化筋細胞特異的細胞傷害活性

	% specific lysis (E/T 20)	
PKM1/M2 peptide - DCs	exp. 3	28.0 % *
	exp. 5	22.1 % *
SCSM peptide - DCs	exp. 3	3.91%
Peptide (-) - DCs	(n=5)	3.29%

ペプチド特異的細胞傷害活性を有する脾臓 CD8陽性細胞をエフェクター細胞とし, ⁵¹Cr 標識培養分化筋細胞を標的細胞に, 細胞傷害活性を検討した. Pyruvate kinase M1/M2 (PKM1/M2) ペプチドを呈示した樹状細胞移植免疫動物のうち, ペプチド特異的細胞傷害活性を認めた群 (exp. 3, exp. 5)(図5) で, 同様に培養分化筋細胞に対しても細胞傷害活性を認めた (*).

表3 T細胞受容体解析対象症例の臨床所見及び HLA A 型解析

Case	duration	CPK	HLA A locus
PM			
1	5M	5676	*2402/*2402
2	4M	3886	*2402/*2402
3	3M	10865	*2402/*2402
MCTD			
4	6M	normal	*2402/*3303
DM			
5	11M	2727	*2402/*3101

対象症例はいずれも HLA A*2402 locus を含み, 臨床的及び病理学的に診断された症例である.

表4 T細胞受容体V β 13.1 CDR3領域アミノ酸配列(ヒト多発筋炎)

BV family	BV	BD	BJ family	BJ	BC	No.
PM (Case 1 HLA A*2402/*2402)						
13.1	FCAS	SPLGQGS	GELFFGEEG	2.2	2	3/12 (25%)
13.1	FCA	TYSWD	SGNTIYFGE	2.1	1	3/12 (25%)
13.1	FCAS	YNVRADT	QYFGPGTRL	2.3	2	2/12 (17%)
13.1	FCAS	KVS	SYNEQFFGPG	2.1	2	2/12 (17%)
13.1	FCAS	SKTGEP	YNEQFFGPGT	2.1	2	1/12
13.1	FCAS	SPSGAS	SYNEQFFGPG	2.1	2	1/12
PM (Case 2 HLA A*2402/*2402)						
13.1	FCAS	SRDSNLF	DEQFFGPGT	2.1	2	9/24 (38%)
13.1	FCAS	SGFLGLAAGE	QFFGPG	2.1	2	6/24 (25%)
13.1	FCAS	SDGEVGY	GYTFGSGTR	1.2	1	5/24 (21%)
13.1	FCAS	SEGYA	YEQYFGPGTRL	2.7	2	4/24 (17%)
PM (Case 3 HLA A*2402/*0201)						
13.1	FCAS	SYSMGGSGT	DTQYFGP	2.3	2	4/12 (33%)
13.1	FCAS	SYSIKGADI	QYFGAGTR	2.3	2	4/12 (33%)
13.1	FCAS	RLTGQGG	YGYTFGSGTR	1.2	1	2/12 (17%)
13.1	FCAS	RPYREGLY	DEQFFGPGT	2.1	2	2/12 (17%)

HLA A*2402陽性多発筋炎筋組織内には、優位に出現する clone が存在し、J β 鎖は限定される傾向があり、CDR3領域にはモチーフ構造が存在し、oligoclonal な様式で浸潤していることが推測される。

名)で、SCSM ペプチド特異的リンパ球を認めた。尚、同陽性症例は、前述の PKM1/M2 ペプチドに反応しない症例であった。また、HLA A*2402を有す MCTD 患者1名でも、反応リンパ球を認めたが、MG 患者全例では有意に反応するリンパ球を認めなかった(図7B)。

④疾患群での検討

PKM1/M2 ペプチド及び SCSM ペプチド両者において、PM 群では、疾患コントロールである MG 群に比較して、SFC が高い傾向にあったが、有意差を見出すことができなかった。検討症例数が少ないことも影響していると考えられる(図8A, 8B)。

考 察

我々の作成した PKM1/M2 ペプチド呈示樹

状細胞移植動物(BALB/c)は、病理学的に筋細胞の壊死と非壊死筋周囲の CD4 及び CD8 陽性細胞浸潤を呈し、更に同ペプチド特異的細胞傷害活性及び骨格筋特異的細胞傷害活性を有す細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞を誘導していた。同免疫動物は、病理学的類似性及び MHC 結合アンカーモチーフの類似性から、ヒト HLA A*2402 PM のモデル動物として位置付けることが可能であり、自己抗原のアミノ酸や分子レベルの解析に繋がる強力なツールになる可能性を秘めている。

樹状細胞がヒト自己免疫疾患の発症に関与しているか否かは知られていないが、樹状細胞移植は、実験的自己免疫動物モデル(実験的自己免疫性糖尿病モデル、実験的アレルギー性脳脊髄炎、実験的傍腫瘍症候群(心筋炎))を誘導し得ることが知られている。Ludewig ら³⁶⁾は、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(lymphocytic choriomeningitis

表 5 T細胞受容体 V β 13.1 CDR3領域アミノ酸配列 (ヒト MCTD, 皮膚筋炎)

BV family	BV	BD	BJ family	BJ	BC	No.
MCTD (Case 4 HLA A*2402/*3101)						
13.1	FCAS	RL	EAFFGQGTRL	1.1	1	2/17
13.1	FCAS	PFDADLG	NIQYF	2.4	2	1/17
13.1	FCAS	AYRSAF	TGELFF	2.2	2	1/17
13.1	FCAS	KWTGRSHS	YNSP	1.6	1	1/17
13.1	FCAS	SGPKRDRD	NQPQ	2.3	1	1/17
13.1	FCAS	SEW	GELFFGEHS	2.2	2	1/17
13.1	FCAS	SYSRKDT	QYFGPG	2.3	2	1/17
13.1	FCAS	SYRGPR	DTQYFGPG	2.3	2	1/17
13.1	FCAS	SGGDRGPGRLHFGNG		1.6	1	1/17
13.1	FCAS	SYSWDRG	NTEAFFGQ	1.1	1	1/17
13.1	FCAS	SPGGGN	EQYFGPG	2.7	2	1/17
13.1	FCAS	GEGGDSRWDEQFFGPG		2.1	2	1/17
13.1	FCAS	SYIPGGAL	NTEAFFGQG	1.1	1	1/17
13.1	FCAS	SEAGAYN	EQFFGPG	2.1	2	1/17
13.1	FCAS	SYSGDD	EQFFGPG	2.1	2	1/17
13.1	FCAS	SYWTN	TEAFFGQG	1.1	1	1/17
DM (Case 5 HLA A*2402/*3303)						
13.1	FCAS	SYAQGS	YGYTFGSGTR	1.2	1	4/21
13.1	FCA	EDRG	HTEAFFGQGTRL	1.1	1	3/21
13.1	FCAS	KGTV	SGANVLTFGAGS	2.6	2	2/21
13.1	FCAS	SWGQGA	YGYTFGSGTR	1.2	1	1/21
13.1	FCAS	STATGY	YGYTFGSGTRL	1.2	1	1/21
13.1	FCAS	SEVPGLN	TEAFFGQGT	1.1	1	1/21
13.1	FCAS	SSTGEMN	TEAFFGEGSRLT	1.1	1	1/21
13.1	FCAS	RFTGA	GELFFGEGSRLT	2.2	2	1/21
13.1	FCAS	SYRRGGY	EQYFGPGTRL	2.7	2	1/21
13.1	FCAS	KIPRD	SNSGANVLTFGA	2.6	2	1/21
13.1	FCAS	GWGQGA	YGYTFGGSST	1.2	1	1/21
13.1	FCAS	SEVVS	QPQHFGDGTRLS	1.5	1	1/21
13.1	FCAS	SFMIAGG	GELFFGEGSR	2.1	2	1/21
13.1	FCAS	SYEGGFG	TQYFGPGTRL	2.5	2	1/21
13.1	FCAS	SLGGTHD	EQYFGPGTRL	2.7	2	1/21

HLA A*2402皮膚筋炎, MCTD 筋組織内には, 優位に出現する clone は存在せず, polyclonal な様式で浸潤していることが推測された.

表6 ヒト多発筋炎 HLA A*2402では, TCR V β 鎖 n-D-n 領域にモチーフ構造を有する

Motif	n-D-n region
G-X-GSG	
YS-X-X-G	
G-X-X-G	

表7 ELISPOT assay 対象症例

Case	age / gender	duration	treatment
HLA A*2402 POLYMYOSITIS			
1	61y.o. / male	1.5Y	PSL 10mg / CPA 50mg
2	55y.o. / male	4 Y	PSL 20mg
3	34y.o. / female	4 Y	PSL 14mg
4	56y.o. / female	1 Y	PSL 12mg / CyA 150mg
HLA A*2402 MCTD			
5	47y.o. / female	6Y	PSL 12.5mg / MTX
6	43y.o. / female	5Y	PSL 10mg
HLA A*2402 MYASTHENIA GRAVIS			
7	61y.o. / female	8Y	PSL 2mg
8	72y.o. / man	10Y	PSL 7.5mg
9	64y.o. / man	8Y	PSL 0mg

症例は全て, HLA A*2402を有する症例である. いずれの症例もステロイド療法を主体とした治療を受けている.

(PSL; prednisolone, CPA; cyclophosphamide, CyA; cyclosporin A, MTX; methotrexate)

virus; LCMV) 糖タンパク特異的な CTL エピトープを構成的に発現している樹状細胞を, ラットインスリンプロモーターを用いて膵島特異的に LCMV 糖タンパクを発現させたトランスジェニックマウスに移入することによって, 膵臓に CD8 陽性細胞主体のリンパ濾胞を伴う膵島炎, 更に臨床的にも高血糖を証明し, 実験的自己免疫性糖尿病モデルを作成した. Dittel ら³⁷⁾ は, ミエリン塩基性タンパク (myelin basic protein; MBP) 由来脳炎奮起性ペプチド (Ac₁₋₁₁) をパルスした樹状細胞を, 同ペプチド特異的 TCR トランスジェニックマウス由来 CD4 陽性 T 細胞と共に移入した時に, 実験的アレルギー性脳脊髄炎, すなわち

ヒト多発性硬化症のモデル動物を誘導することができた. 更に, Ludewig ら³⁸⁾ により, β -galactosidase ペプチドでパルスした樹状細胞を, 同ペプチドを心筋細胞, 動脈平滑筋細胞に強制発現したトランスジェニックマウスに移入した時に, 血管炎, 心筋炎, 時に心筋症を発症した. このモデルは, 樹状細胞を移入する前に, 同ペプチドを発現する EL-4 thymoma cells を移植したことから, 傍腫瘍症候群のモデル動物の側面を有す. 我々の EAM モデルマウスは, 樹状細胞を使って作成した自己免疫性疾患モデルの第4報, すなわち自己免疫疾患発症における樹状細胞関与の可能性を示す側面を有す貴重なモデルである.

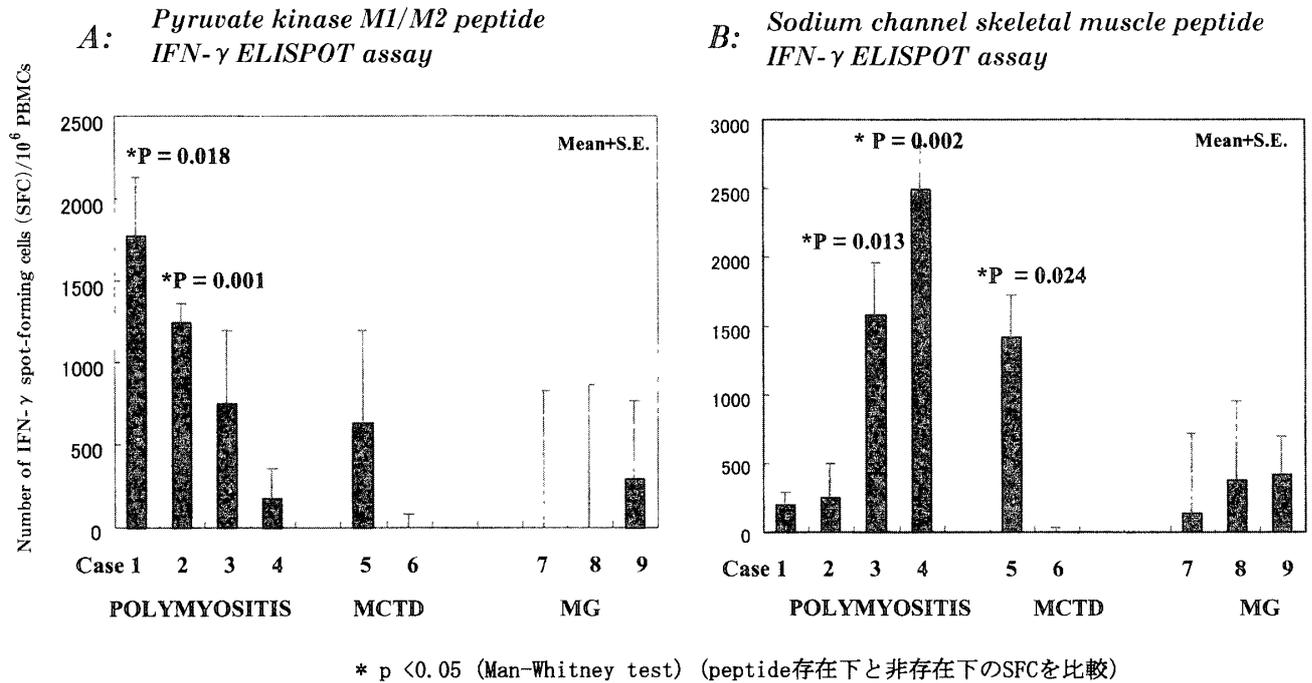


図 7

A. ELISPOT assay; Pyruvate kinase M1/M2 ペプチド反応性 T 細胞についての検討

HLA A*2402を有す多発筋炎(polymyositis; PM) 患者の半数(4名中2名)で、ペプチド特異的リンパ球の存在を認めた。尚、HLA A*2402を有す混合性結合織病(mixed connective tissue disease; MCTD)及び重症筋無力症(Myasthenia Gravis; MG)患者には、有意に反応するリンパ球を認めなかった。(ペプチドの有無でIFN- γ 産生細胞数に有意な差(Mann-Whitney検定)が存在したものを、ペプチド特異的リンパ球が存在すると推測した。)

B. ELISPOT assay; Sodium channel protein skeletal muscle alpha-subunit ペプチド反応性 T 細胞についての検討

HLA A*2402を有す PM 患者の半数(4名中2名)で、ペプチド特異的リンパ球を認めた。尚、同陽性症例は、前述の pyruvate kinase M1/M2 ペプチドに反応しない症例であった。また、HLA A*2402を有す MCTD 患者1名でも、反応リンパ球を認めたが、MG 患者全例では有意に反応するリンパ球を認めなかった。(ペプチドの有無でIFN- γ 産生細胞数に有意な差(Mann-Whitney検定)が存在したものを、ペプチド特異的リンパ球が存在すると推測した。)

生体内の種々の組織、器官に分布する樹状細胞はその表現型の違いから不均一な集団と考えられている。樹状細胞が由来する前駆細胞の前駆細胞系列を反映するという面(いわゆるミエロイドもしくはリンパ系樹状細胞等)のみではなく、末梢組織に分布する未熟な細胞が所属リンパ器官へと移動するその過程における成熟度も、同様に不均一性の一翼を呈す。一般に、強力な貪食能と弱い共刺激分子の発現を特徴とする未熟樹状細胞は、感染細胞、ウイルス由来産物(lipopolysaccharide, DNA, CpGモチーフ)、炎症性サイトカイン、

CD40L等による刺激により、容易に強力な T 細胞活性化を有す成熟樹状細胞に変化する。今回、使用した未熟な骨髄由来樹状細胞は、一般には T 細胞活性化能が弱いことが予想されるが、同時に *Bordetella pertussis* をアジュバントとして投与したことが所属リンパ節における成熟化を誘導し、モデル作成を可能にしたものと考えられる。更に、樹状細胞が、免疫寛容ではなく免疫誘導に向かう、すなわちクロストランスではなくクロスプレゼンテーションの方向へ向かうには、CD4陽性 T 細胞のヘルプ³⁹⁾⁻⁴¹⁾ もしくは keyhole

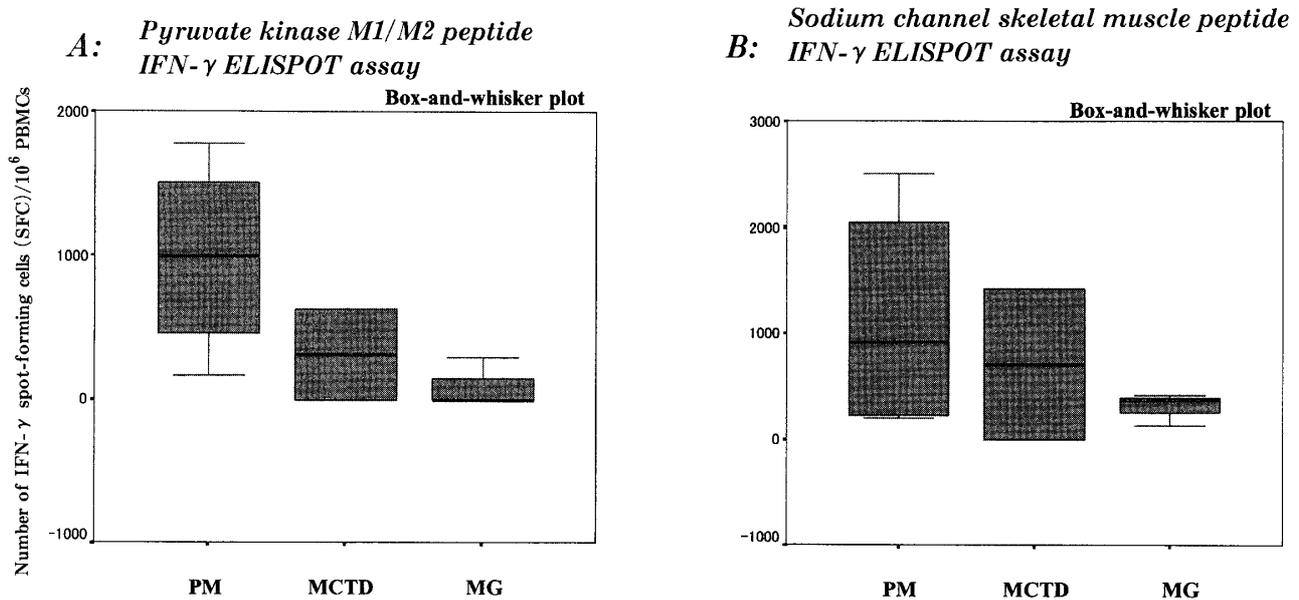


図 8

A : ELISPOT assay; Pyruvate kinase M 1 / M 2 ペプチド反応性 T 細胞; 疾患群での検討

B : ELISPOT assay; Sodium channel protein skeletal muscle alpha-subunit ペプチド反応性 T 細胞; 疾患群での検討

Pyruvate kinase M 1 / M 2 ペプチド及び Sodium channel skeletal muscle ペプチド両者において, PM 群では, 疾患コントロールである MG 群に比較して, SFC が高い傾向にあったが, 有意差を見出すことができなかった。

limpet hemocyanin, lipopolysaccharide 等のアジュバント⁴²⁾の存在が必要とされる。当モデルにおいて, 抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の同時移入なしにクロスプレゼンテーションに方向付けできたことは, *Bordetella pertussis* の存在が大きいものと推察される。今後, PKM 1 / M 2 が標的抗原であることを確実にする為には, 抗原特異的 T 細胞ライン作成と同細胞による adoptive transfer モデルが必須になるものと考ええる。

今回, 我々の EAM モデルは, SCSM ペプチドでは誘導が不可能で, PKM 1 / M 2 ペプチドのみで誘導が可能であった。MHC class I を介したクロスプレゼンテーションと活性型細胞傷害性 T 細胞による組織障害を誘導する為には, 標的臓器における高い蛋白発現量が必要とされる⁴³⁾。PKM 1 / M 2 分子は, 骨格筋に高発現していることから, EAM を誘導可能であったと考えられる。しかし, 骨格筋における内在性蛋白のユビキチン・プロテアソーム分解機構の詳細が不明である現状

からは, 今回使用したペプチドが, 実際に分解されたペプチドと偶然一致したに過ぎないかもしれない。今後, 骨格筋におけるユビキチン・プロテアソームによる内在性抗原プロセッシング及び抗原呈示機構の解明が必至である。

さて, 我々の EAM モデルマウスから類推された標的抗原 PKM 1 / M 2 は, 実際にヒト PM においても標的抗原になり得るのであろうか。

TCR のクローナリティーの解析は, 標的抗原の均一性を示唆する。過去に, PM 及び DM の病変筋組織に浸潤した TCR repertoire 解析は, 欧米で数編報告されているに過ぎない。Lindberg ら²³⁾により, 免疫組織化学的に PM で V β 3 が, Bender ら²⁴⁾により, 免疫組織学的検討と RT-PCR 法から, PM 患者筋に浸潤している CD8 陽性 T 細胞は V α 33.1/V β 13.1, V β 3 が優位に出現し, 更に均一な CDR 3 領域を有することから, PM 筋組織内では T 細胞はクローナルに浸潤していることが示された。Mantegazza ら²⁵⁾も, PM 筋組織で

$V\alpha 1$, $V\alpha 5$, $V\beta 1$, $V\beta 15$ repertoire が優位であり, 更に $V\beta 15$ 陽性クローンの90%を $J\beta 2.1$ が占め, CDR 3 領域にモチーフ構造を有することを示し, 同様に O'Hanrlon ら²⁶⁾ も, 抗 Jo-1抗体陽性 PM 患者で, $V\alpha 1$, $V\beta 6$ repertoire の優位な出現と, 更に $V\beta 6$ 陽性クローンは限定した $J\beta$ 鎖を有することを示し, PM 筋組織内 T 細胞は抗原刺激により誘導されることを推測した. 一方, DM に関しては, O'Hanrlon ら²⁶⁾ により, $V\beta$, $J\beta$ 鎖に限定した使用がなく, CDR 3 領域で優位に出現するクローンを認めなかったことから, polyclonal な T 細胞の浸潤が推測された. 我々の検討でも, MHC class I を限定した解析で, DM, MCTD とは対照的に, PM 筋組織では, T 細胞は antigen-driven な形式で標的臓器内に浸潤することが確認されたことから, その標的自己抗原は比較的均一であることが推測され, 均一な標的抗原による CD8 陽性細胞による細胞傷害活性が, HLA A*2402 PM 発症機序に関与していることが推測された.

また, マウスに筋炎惹起性を呈した PKM1/M2 ペプチドに反応し IFN- γ を産生するリンパ球は, HLA A*2402 PM 症例の中で半数存在した. この事実は, 同ペプチドがヒト HLA A*2402 PM においても, 標的自己抗原の可能性があること, 更に同ペプチドが T 細胞エピトープになりうることを推測させる. 一方で, 今回解析に使用した検体採取が疾患寛解期であることから, 単に epitope spreading の結果を見ている可能性もある. また, PKM1/M2ペプチドよりも SCSM ペプチドに反応を示す症例もあり, 実際の患者では病因ペプチドは症例により異なる可能性も考えられる. 今後は, ペプチド反応性リンパ球を単離し, 病初期に筋組織内に浸潤している TCR との関連を解析する必要がある.

さて, pyruvate kinase (PK; ATP: pyruvate 2-O-phosphotransferase, EC 2.7.1.40) には4種のアイソザイム (R, L, M1, M2) が知られており, それぞれ組織特異的な分布を呈している. EAM を誘導し得た pyruvate kinase M1/M2 アイソザイムは, 骨格筋に非常に強く発現している

タンパクである. しかし, 同タンパクがどのように骨格筋内においてユビキチン・プロテアソーム系で消化され, MHC class I 分子にどのような形で呈示されるのか詳細は不明であるし, また他臓器での発現も少ないながら認められている. 最近, 臓器特異的な自己免疫疾患である慢性関節リウマチ自然発症モデル動物 (K/BxN TCR トランスジェニックマウス) 及びヒト慢性関節リウマチ患者の血清, 関節液中には, 全身に広範に発現している glucose-6-phosphate isomerase (GPI) に対する自己抗体が認められ, 同抗体が積極的に関節局所で病態を形成することが示された⁴⁴⁾⁴⁵⁾. 広範に発現する自己抗原に対する免疫が, どのように限局的な臓器特異的な自己免疫疾患を形成するのか詳細は不明であるが, この知見は, 我々の EAM の標的自己抗原を考える際に興味深い.

おわりに

今回, 樹状細胞移植により作成したヒト HLA A*2402 PM モデル動物を報告した. このモデルは, 以下の特徴を有す. 第一に, 従来, 横紋筋である骨格筋を標的に免疫誘導する困難性から EAM の誘導は難しいとされ, T 細胞が認識する抗原ペプチドの同定, アミノ酸や分子レベルの解析が困難であったが, 我々のモデルは分子レベルでの抗原解析の一助になる可能性を有すること. 第二に, 樹状細胞移植が実験的自己免疫動物モデルを誘導し得ることが知られており, 当モデルも自己免疫性疾患に樹状細胞が関与する可能性を示したこと. 第三に, 依然として未同定であった PM 標的自己抗原候補の一つに, PKM1/M2 の可能性を示唆したことである. 更に, 同ペプチド特異的 T 細胞は, ヒト HLA A*2402 PM 患者末梢血中に存在しているという事実は, MHC-ligand 治療等の治療モデルにもなり得る可能性を秘めている重要なモデルと言える.

謝 辞

本研究の一部は, 平成11年度から平成13年度神経免疫疾患に関する調査研究班 (Grants-in-Aid for

Scientific Research (C) (No.11670614-00) の助成により行われた。

本稿を終えるにあたり、直接御指導いただいた田中恵子助教授(新潟大学脳研究所神経内科学分野)、田中正美先生(国立西新潟中央病院神経内科)、辻省次教授(新潟大学脳研究所神経内科学分野)、渡部久美先生(新潟大学医動物学教室)に謹んで感謝の意を表します。また筋組織標本解析に多大な御協力を頂きました戸松ユリさんに深謝いたします。

文 献

- 1) Arahata K and Engel AG: 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.
- 2) Arahata K and Engel AG: Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV: Cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis. *Ann Neurol* 23: 168-173 1988.
- 3) Lemoine NR, Ryan JF, Cox EL, Mayston V, Revell PA and Swash M: Immunohistochemical analysis of mononuclear cell subsets in inflammatory and non-inflammatory myopathies. *J Clin Pathol* 39: 271-274 1986.
- 4) Behan WM, Behan PO, Durward WF and McQueen A: The inflammatory process in polymyositis: monoclonal antibody analysis of muscle and peripheral blood immunoregulatory lymphocytes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50: 1468-1474 1987.
- 5) Hohlfeld R and Engel AG: Coculture with autologous myotubes of cytotoxic T cells isolated from muscle in inflammatory myopathies. *Ann Neurol* 29: 498-507 1991.
- 6) Kissel JT, Mendell JR and Rammohan KW: Microvascular deposition of complement membrane attack complex in dermatomyositis. *N Engl J Med* 314: 329-334 1986.
- 7) Ibe M, Moore YI, Miwa K, Kaneko Y, Yokota S and Takiguchi M: Role of strong anchor residues in the effective binding of 10-mer and 11-mer peptides to HLA-A*2402 molecules [published erratum appears in *Immunogenetics* 1997; 46(2): 169]. *Immunogenetics*, 44: 233-241 1996.
- 8) Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA and Stevanovic S: SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213-219 1999.
- 9) Behan WM, Behan PO and Dick HA: HLA-B8 in polymyositis [letter]. *N Engl J Med* 298: 1260-1261 1978.
- 10) Cumming WJ, Hudgson P and Wilcox CB: HL-A antigens in adult polymyositis [letter]. *N Engl J Med* 299: 1365 1978.
- 11) Furuya T, Hakoda M, Higami K, Ueda H, Tsuchiya N, Tokunaga K, Kamatani N and Kashiwazaki S: Association of HLA class I and class II alleles with myositis in Japanese patients. *J Rheumatol* 25: 1109-1114 1998.
- 12) Garlepp MJ: Genetics of the idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 8: 514-520 1996.
- 13) Hirsch TJ, Enlow RW, Bias WB and Arnett FC: HLA-D related (DR) antigens in various kinds of myositis. *Hum Immunol* 3: 181-186 1981.
- 14) Walker GL, Mastaglia FL and Roberts DF: A search for genetic influence in idiopathic inflammatory myopathy. *Acta Neurol Scand* 66: 432-443 1982.
- 15) Kawachi I, Tanaka K, Tanaka M and Tsuji S: Dendritic cells presenting pyruvate kinase M1/M2 isozyme peptide can induce experimental allergic myositis in BALB/c mice. *J Neuroimmunol* 117: 108-115 2001.
- 16) Matsubara S and Takamori M: Experimental allergic myositis: strain 13 guinea pig immunised with rabbit myosin B fraction. *Acta Neuropathol (Berl)* 74: 158-162 1987.
- 17) Kojima T, Tanuma N, Aikawa Y, Shin T, Sasaki A and Matsumoto Y: Myosin-induced autoimmune polymyositis in the rat. *J Neurol Sci* 151: 141-148 1997.
- 18) Matsubara S and Okumura S: Experimental autoimmune myositis in SJL/J mice produced by immunization with syngeneic myosin B fraction. Transfer by both immunoglobulin G and T cells. *J Neurol Sci* 144: 171-

- 175 1996.
- 19) Kohyama K and Matsumoto Y: C-protein in the skeletal muscle induces severe autoimmune polymyositis in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 98: 130-135 1999.
 - 20) Li M and Dalakas MC: Expression of human IAP-like protein in skeletal muscle: a possible explanation for the rare incidence of muscle fiber apoptosis in T-cell mediated inflammatory myopathies. *J Neuroimmunol* 106: 1-5 2000.
 - 21) Arahata K and Engel AG: Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. III: Immunoelectron microscopy aspects of cell-mediated muscle fiber injury. *Ann Neurol* 19: 112-125 1986.
 - 22) Inaba K, Young JW and Steinman RM: Direct activation of CD 8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J Exp Med* 166: 182-194 1987.
 - 23) Lindberg C, Oldfors A and Tarkowski A: Restricted use of T cell receptor V genes in endomysial infiltrates of patients with inflammatory myopathies. *Eur J Immunol* 24: 2659-2663 1994.
 - 24) Bender A, Ernst N, Iglesias A, Dornmair K, Wekerle H and Hohlfeld R: T cell receptor repertoire in polymyositis: clonal expansion of autoaggressive CD 8+ T cells. *J Exp Med* 181: 1863-1868 1995.
 - 25) Mantegazza R, Andretta F, Bernasconi P, Baggi F, Oksenberg JR, Simoncini O, Mora M, Cornelio F and Steinman L: Analysis of T cell receptor repertoire of muscle-infiltrating T lymphocytes in polymyositis. Restricted V alpha / beta rearrangements may indicate antigen-driven selection. *J Clin Invest* 91: 2880-2886 1993.
 - 26) O'Hanlon TP, Dalakas MC, Plotz PH and Miller FW: Predominant TCR-alpha beta variable and joining gene expression by muscle-infiltrating lymphocytes in the idiopathic inflammatory myopathies. *J Immunol* 152: 2569-2576 1994.
 - 27) Blau HM and Webster C: Isolation and characterization of human muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5623-5627 1981.
 - 28) Hohlfeld R and Engel AG: Lysis of myotubes by alloreactive cytotoxic T cells and natural killer cells. Relevance to myoblast transplantation. *J Clin Invest* 86: 370-374 1990.
 - 29) Hohlfeld R and Engel AG: Induction of HLA-DR expression on human myoblasts with interferon-gamma. *Am J Pathol* 136: 503-508 1990.
 - 30) Inaba K, Inaba M, Roman N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S and Steinman RM: Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte / macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693-1702 1992.
 - 31) Falo LD Jr, Kovacovics-Bankowski M, Thompson K and Rock KL: Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nat Med* 1: 649-653 1995.
 - 32) Choi YW, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P and Kappler J: Interaction of Staphylococcus aureus toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8941-8945 1989.
 - 33) Norgaard L, Fugger L, Jakobsen BK and Svejgaard A: Sequencing-based typing of HLA-A locus using mRNA and a single locus-specific PCR followed by cycle-sequencing with AmpliTaq DNA polymerase, FS. *Tissue Antigens* 49: 455-465 1997.
 - 34) Fiorillo MT, Maragno M, Butler R, Dupuis ML and Sorrentino R: CD 8 (+) T-cell auto-reactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. *J Clin Invest* 106: 47-53 2000.
 - 35) Shiga H, Shioda T, Tomiyama H, Takamiya Y, Oka S, Kimura S, Yamaguchi Y, Gojoubori T, Rammensee HG, Miwa K and Takiguchi M: Identification of multiple HIV-1 cytotoxic T-cell epitopes presented by human leukocyte antigen B35 molecules. *Aids* 10: 1075-1083 1996.
 - 36) Ludewig B, Odermatt B, Landmann S, Hengartner H and Zinkernagel RM: Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *J Exp Med* 188: 1493-1501

- 1998.
- 37) Dittel BN, Visintin I, Merchant RM and Janeway CA Jr.: Presentation of the self antigen myelin basic protein by dendritic cells leads to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 163: 32-39 1999.
- 38) Ludewig B, Ochsenbein AF, Odermatt B, Paulin D, Hengartner H and Zinkernagel RM: Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J Exp Med* 191: 795-804 2000.
- 39) Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF and Heath WR: Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling [see comments]. *Nature* 393: 478-480 1998.
- 40) Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF and Heath WR: Induction of a CD 8 + cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD 4+ T cell help. *J Exp Med* 186: 65-70 1997.
- 41) Kurts C, Carbone FR, Barnden M, Blanas E, Allison J, Heath WR and Miller JF: CD 4+ T cell help impairs CD 8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med* 186: 2057-2062 1997.
- 42) Gallucci S, Lolkema M and Matzinger P: Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5: 1249-1255 1999.
- 43) Kurts C, Miller JF, Subramaniam RM, Carbone FR and Heath WR: Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med* 188: 409-414 1998.
- 44) Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C and Mathis D: From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 10: 451-461 1999.
- 45) Schaller M, Burton DR and Ditzel HJ: Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol* 2: 746-53 2001.

(平成14年1月29日受付)