

SJL/J マウスにおける T 細胞惹起性筋炎

新潟大学大学院医学研究科神経内科学分野

(主任: 辻 省次教授)

出 塚 次 郎

T Cell-Mediated Myositis in SJL Mice

Jiro IDEZUKA, M.D.

Department of Neurology, Brain Research Institute,

Niigata University

(Director: Prof. Shoji TSUJI)

In order to study the animal model of polymyositis, a CD4 positive and CD8 negative T cell line was established from SJL/J mice immunized with a rabbit crude myosin fraction. The T cell line reacted with the crude myosin fraction but not with the purified six major muscular constitutional proteins. The histological examination showed myositis in SJL/J mice at 3 weeks after the injection of the T cell line. This is the first report that CD4 positive T cells reacting with crude muscle protein can cause myositis in mice.

Key words: Myositis, SJL/J mouse, Myosin, T cell line

筋炎, SJL/Jマウス, ミオシン, T細胞株

多発性筋炎の動物モデルである実験的筋炎を解析するために、家兎ミオシン粗分画で免疫した SJL/J マウスから CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞株を樹立した。この株はミオシン粗分画に対して増殖反応を示したが、精製した 6 種類の主要筋構造蛋白に対して増殖反応を認めなかった。この T 細胞株を注射した SJL/J マウスは 3 週後に筋炎を発症した。これはミオシン粗分画反応性の CD4 陽性 T 細胞でマウスに筋炎が惹起できることを証明した初めての動物モデルである。

I は じ め に

実験的アレルギー性脳炎 (Experimental Allergic Encephalitis, EAE) は多発性硬化症の動物モデルで

あり、惹起抗原として MBP¹⁾ や PLP²⁾ などが明らかになっている。また、抗原決定部位のマウスの種差も明らかになっており³⁾⁴⁾、これら EAE の知見をもとに MBP 特異的 T 細胞の受容体のペプチドを用いた治療が多発性硬化症で試みられている⁵⁾。一方多発性筋炎の動物モデルである実験的アレルギー性筋炎 (Experimental Allergic Myositis, EAM) では当初惹起抗原として筋 homogenate が使用され⁶⁾⁻¹⁰⁾、その後粗製ミオシンの免疫によって多発性筋炎類似の組織像を呈することが報告されているが¹¹⁾、筋炎惹起性の特異的抗原は未だ不明である。effector については組織学的所見などから CD8 陽性細胞障害性 T 細胞の関与が大きいと考えられているが、一方で CD4 陽性 T 細

Reprint requests to: Jiro Idezuka,
Department of Neurology,
Brain Research Institute, Niigata University
Niigata City, 951-8585 JAPAN.

別刷請求先: 〒951-8585 新潟市旭町通 1 番町
新潟大学脳研究所神経内科学分野 出塚次郎

胞の補助的な役割も示唆されている¹²⁾。多発性筋炎の診断、活動性の判定及び抗原特異的治療法開発のためにはこれら対応抗原や effector の同定が必要と考えられ、これらを解明するために動物モデルの作製を試みた。その結果 SJL/J マウスからミオシン粗分画反応性の T 細胞株を樹立し、同細胞を移入することにより筋炎が惹起された。株化された T 細胞によりマウスに筋炎を惹起した報告はなく、今回が初めての報告である。

II 材料と方法

1) 抗原の調製

ミオシン粗分画は日本産家兎の腰背部筋から Szent-Györgyi の方法に従って精製した¹³⁾。家兎を屠殺、筋肉をミンチし、筋肉100gにつきWeber-Edsall液(0.6 M KCl, 0.04 M NaHCO₃, 0.01 M Na₂CO₃)を300 ml 加え、4℃で24時間攪拌した。混和液に0.6 M KCl 溶液を200 ml 添加し、20,000×g で1時間遠心した。更に上清を蒸留水で4倍に希釈し、10分間8,000×gで遠心した。沈澱に同量の1 M KCl 溶液を添加し、10分間8,000×gで遠心した。同処理を2回繰り返し、0.6 M KCl 溶液中に6時間透析、20,000×g で1時間遠心し、上清をミオシン粗分画として使用した。

2) T 細胞株の樹立

12週齢 SJL/J マウス(Gokita Bleeding)を1週おきに3回、1匹当たり6 mg のミオシン粗分画を完全フロインドアジュバントと共に皮下に免疫した。最終免疫から10日後、全身麻酔下にリンパ節を採取した。リンパ節は金網越しに擦りつぶした後、10%牛胎児血清含有 Gibco 社 RPMI 1640 培地に懸濁して培養した。培養3日後、20%牛胎児血清含有ヒトリコンビナント IL-2 (175 JRU/ml, コージンバイオ株式会社)を加え、培養10日後細胞懸濁液で限界希釈を行い、2週間おきに100 µg/ml のミオシン粗分画を添加、フィーダー細胞として30 Gy の放射線を照射した同種マウス脾細胞を加えてIL-2存在下に培養し、リンパ球細胞株を樹立した。

3) リンパ球芽球化反応

SJL/J マウスから樹立した株化リンパ球1×10⁴個に、2×10⁵個の同種マウス放射線照射脾細胞を抗原提示細胞として加え、各種濃度のミオシン粗分画を添加して培養した。また、アクチン、α-アクチニン、ミオシン軽鎖・重鎖、トロポニン、トロポミオシンの各種精製抗原については、抗原蛋白が1 µg/ml の濃度になるように調製した。増殖活性は72時間培養の [³H]-thymidine の取り込みにて測定した。パルス時間は

回収前24時間とし、4.0 µCi/ml (148 kBq/ml) の濃度でパルスした。

4) フローサイトメトリーによる解析

樹立した T 細胞株は phycoerythrin 標識抗マウス CD 4 抗体(クローン RM 4-5, Pharmingen 社)及び FITC 標識抗マウス CD 8 抗体(クローン 53-6・7, Pharmingen 社)で染色し、フローサイトメトリー(FACScan, Becton-Dickinson 社)で解析した。

5) T 細胞受動免疫

16週齢雌 SJL/J マウスに、1.0×10⁷個の培養 T 細胞株を静脈注射した。注射3週後に腸腰筋・大腿四頭筋・腓腹筋を採取した。

6) 組織学的検索

採取筋肉の一部はドライアイス・イソペンタンで急速凍結した。また一部は4%パラホルムアルデヒド/PBSで固定、パラフィン包埋した。凍結筋肉は8 µm 厚のクリオスタット切片とし、ヘマトキシリン-エオジンで染色した。浸潤細胞の免疫染色は、クリオスタット切片を風乾後冷却アセトンで10分間固定、10%ヤギ血清加 PBS で室温1時間反応させた。その後一次抗体としてマウスモノクローナル抗体(抗 CD 4・抗 CD 8・抗 CD 11b, Pharmingen 社、各200倍)で1時間、二次抗体としてビオチン化抗マウス IgG (100倍)で1時間反応させ、アビジン・ペルオキシダーゼと反応させた後、ジアミノベンチジンにより発色させた。

III 結 果

1) ミオシン粗分画の調製

得られたミオシン粗分画を10%ポリアクリルアミドゲルの SDS 電気泳動を行った。この分画にはミオシン・C 蛋白・アクチン・トロポミオシンなどの筋構造蛋白がバンドとして認められた(図1)。

2) リンパ球芽球化反応

前記の方法で8種類のリンパ球株を樹立し、これらの株のうち1種でミオシン粗分画との反応が認められた(C127, 図2)。この株を6種類の主要精製筋構造蛋白で刺激したが、いずれの蛋白でもリンパ球芽球化反応は陰性であった(図3)。更に各種濃度のミオシン粗分画で刺激したところ、抗原量に比例した増殖反応が認められたが、200 µg/ml 以上の濃度では増殖は抑制され、高濃度での毒性が示唆された。また、このリンパ球株 C127 はフローサイトメトリーにて CD 4 陽性、CD 8 陰性の T 細胞株であることが明らかとなった(図4)。この T 細胞株を12週齢の雌 SJL/J マウスに注射した。

注射したマウスには明らかな筋力低下を認めなかったが、3 週後屠殺して作製した筋肉切片では筋炎と考えられる筋線維壊死及び単核球の細胞浸潤が認められた (図 5)。細胞浸潤は遠位筋に比して腸腰筋で強く認められた。浸潤単核球細胞を免疫組織学的に検索したところ、浸潤細

胞の多くは抗 CD11b 抗体陽性であることから、マクロファージと考えられた。浸潤細胞のうち少数は抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体で陽性であった。対照群としてミオシン粗分画に無反応 T 細胞株を同週齢のマウスに静脈注射したが、細胞浸潤等の筋炎の所見は認められなかった。

IV 考 察

T 細胞で免疫したマウス骨格筋に認められた筋線維壊死及び細胞浸潤の所見はこれまでの EAM の報告と同様のものであった^{14) - 17)}。今回、炎症の程度を筋各部位の切片で比較したが、細胞浸潤の程度は遠位筋に比較して近位筋で優位であり、よりヒト多発性筋炎類似の傾向を示した。SJL/J マウスは骨格筋内血管内膜に Class II 抗原を発現する特殊なマウスであり筋炎感受性が高いこと¹⁵⁾、また高齢で筋炎を自然発症することが分かっているが、筋線維壊死を認めるのは通常 6 カ月以降であり、若年成熟マウスでは壊死の所見はごく軽微であると報告されている¹⁸⁾。他の T 細胞株を注射した同胞マウスに組織学的検索を行ったが筋線維には炎症等の所見は殆んど認められず、今回認めた筋炎の所見は自然発症の筋炎所見とは別の過程で進行したものと考えられた。

実験的筋炎の T 細胞を用いた受動免疫はこれまでもモルモット⁸⁾、ラット¹⁰⁾、マウス¹⁷⁾で報告されている。松原らはミオシン粗分画で免疫した SJL/J マウス T 細胞を用いた受動免疫を報告し、筋炎惹起性の T リンパ球の存在を示唆した。しかし用いた T リンパ球はマウスから採取直後のものであり、反応性を異にする

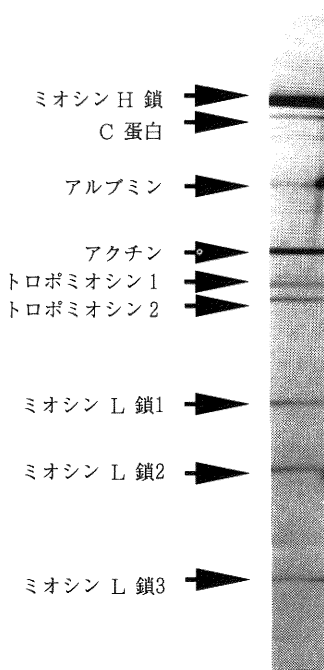


図1 ミオシン粗分画の SDS-ゲル電気泳動
ミオシン粗分画の SDS-ゲル電気泳動パターン。
ミオシン軽鎖・重鎖, C 蛋白, アクチン, トロポ
ミオシンがこの分画に認められた。

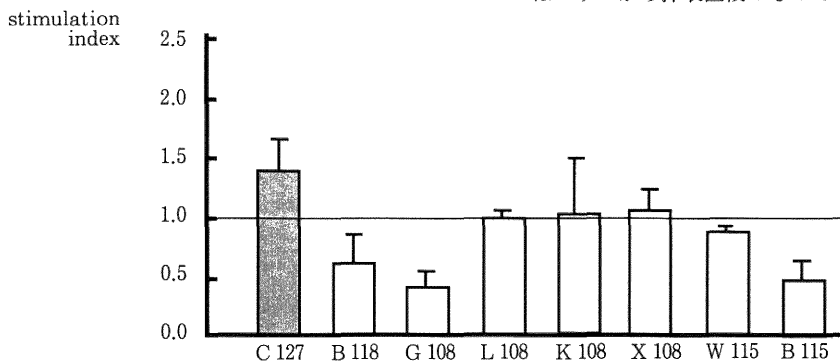


図2 各 T 細胞株のミオシン粗分画への反応性

ミオシン粗分画で刺激した SJL/J マウスから分離したリンパ球株の増殖活性。 1×10^4 ケの細胞を 2×10^5 ケの同種マウス放射線照射後脾細胞を抗原提示細胞と共に各種濃度のミオシン粗分画にて培養した。増殖活性は 24 時間の $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込みを triplicate にて測定した。結果は stimulation index (抗原添加群の平均 cpm/抗原非添加群の平均 cpm) で表した。

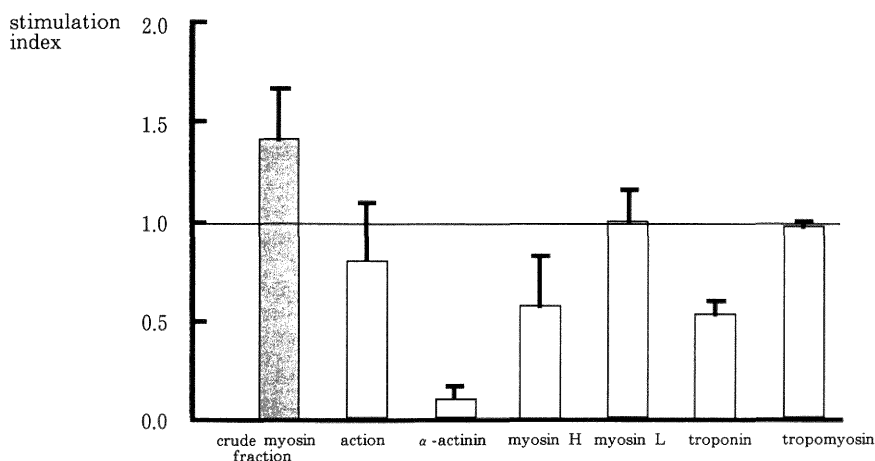


図3 T細胞株 C127 の各種抗原下における³H-thymidine の取り込み

ミオシン粗分画, アクチン, α-アクチニン, ミオシン軽鎖・重鎖, トロポニン, トロポミオシンにてリンパ球を刺激した結果を示す。リンパ球の刺激条件は図2と同様である。各抗原は Sigma 社のものを使用した。それぞれの抗原蛋白は1 μg/ml の濃度にて調製した。増殖活性は培養72時間の [³H]-thymidine の取り込みをパルス時間回収前24時間にて, triplicate にて測定した。結果は stimulation index (抗原添加群の平均 cpm/抗原非添加群の平均 cpm) で表した。

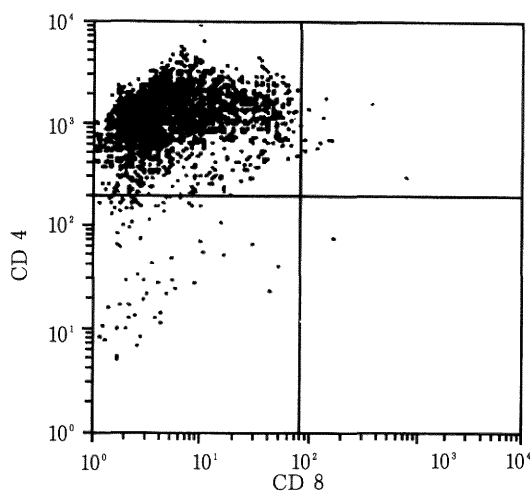


図4 T細胞株 C127 のフローサイトメトリーによる解析。

T細胞株 C127 を phycoerythrin 標識抗マウス CD4 抗体 (クローン RM4-5, Pharmingen 社) 及び FITC 標識抗マウス CD8 抗体 (クローン53-6・7, Pharmingen 社) で染色し, フローサイトメトリー (FACSscan, Becton-Dickinson 社) で解析した。T 細胞株の 95.8% は CD4 陽性 CD8 陰性細胞であった。

多種類のリンパ球を含んでいると考えられる。また同時に IgG を用いた受動免疫も可能と報告していることなどから, この系は effector が複数存在する複雑な系と考えられ, 以降の解析が困難であった¹⁷⁾。今回作製した実験的筋炎では, 株化して一定の特性を有する T 細胞が使用されており, 特定の筋含有抗原反応性の CD4 陽性 T 細胞によって筋炎が惹起できることが明らかとなった。株化された T 細胞を介して疾病を発症する動物モデルとしては, 実験的アレルギー性脳炎¹⁹⁾・実験的甲状腺炎²⁰⁾・実験的神経炎²¹⁾ において報告されているが, EAM では初めてであり, 今後抗原 epitope の解析に有用なモデルと考えられた。

これまで抗原として, 実際の筋炎に近付ける目的で同種マウスの骨格筋からミオシン粗分画を抽出して免疫に用いた報告があるが¹⁵⁾¹⁷⁾, 組織像は家兎ミオシン粗分画で免疫した場合と類似したものであることから, 抗原蛋白は比較的異種間で共通した抗原である可能性が示唆された。小島らは精製ミオシンに百日咳毒を用いた強力なアジュバントによるラットの実験的筋炎を報告しているが²²⁾, 今回ミオシン粗分画反応性株についてミオシンを含めた 6 種類の主要筋構造蛋白への反応性を検索したが抗原は明らかでなかった。精製ミオシンではこれまでも筋炎の惹起が困難であるとの報告もあり¹¹⁾, ミオシンの精製度を含めて評価には一考を要する。今後は

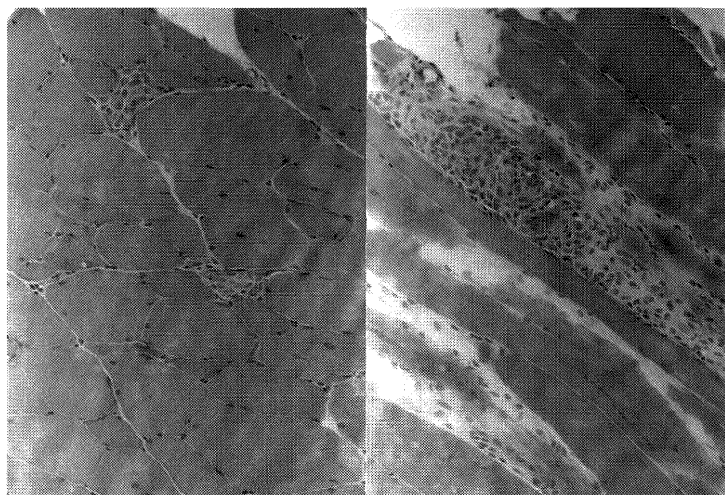


図5 T細胞株 (C127) 注射3週間後のマウス腸腰筋 (HE染色, 50倍)
筋線維の大小不同, 壊死筋線維の散在を認める。壊死筋線維はマクロファージによる貪食像を認める (左: 横断像, 右: 縦断像)。

得られたT細胞株の刺激抗原について, 更に多種類の抗原を対象に検索を進める予定である。

今回作製したの筋炎モデルの組織所見では, 免疫組織学的に筋肉内にマクロファージを多数認める一方でCD4陽性細胞は僅かであり, CD8陽性細胞の浸潤は極少数であった。ヒト多発性筋炎ではCD8陽性細胞が優位に筋線維に浸潤していること²³⁾²⁴⁾, 筋炎患者由来CD8陽性リンパ球が*in vitro*で同一患者由来の筋芽細胞にeffectorとして働くとの報告がある事などから²⁵⁾CD8陽性細胞の関与が強く指摘されているが, その動物モデルであるEAMでは今回と同様にこれまでもマクロファージが優位に浸潤した所見が報告されている^{15)~17)}。一方で抗体が免疫反応の主なmediatorと考えられているヒト皮膚筋炎類似の組織所見は認められず, EAM及びヒト多発性筋炎, ヒト皮膚筋炎におけるT細胞関与の相違は筋炎の病態を解明する上で注目に値する。今回注射したT細胞は長期培養後であるため抗体そのものの混入はないと考えられるが, EAMでT細胞はB細胞を介して筋炎の病態に関与しているのか, マクロファージがどのような経路で賦活化されるのかについて検索が更に必要であると考えられた。

謝 辞

本稿を終えるに当たり, 御校閲覧頂きました辻 省次教授, また直接御指導・御助言を頂きました新潟大学神経内科学教室田中正美先生・田中恵子先生, 新

潟大学医動物学教室渡部久実先生に心から感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Laatsch, R. H., Kies, M. W., Gordon, S. and Alvord, E. C. Jr.: The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation. *J. Exp. Med.*, 115: 777~788, 1962.
- 2) Yoshimura, T., Kunishita, T., Sakai, K., Endoh, M., Namikawa, T. and Tabira, T.: Chronic experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs induced by proteolipid protein. *J. Neurol. Sci.*, 69: 47~58, 1985.
- 3) Fritz, R. B., Chou, C. -H. J. and McFarlin, D. E.: Induction of experimental allergic encephalomyelitis in PL/J and (SJL/J × PL/J) F1 mice by myelin basic protein and its peptides: localization of a second encephalitogenic determinant. *J. Immunol.*, 130: 191~194, 1983.
- 4) Fritz, R. B., Skeen, M. J., Chou, C. -H. J., Gracia, M. and Egorov I. K.: Major histocompatibility complex-linked control of the murine immune response to myelin basic protein. *J. Immunol.*, 134: 2328~2332, 1985.
- 5) Vandenbark, A. A., Chou, Y. K., Whitham, R., Mass, M., Buenafe, A., Liefeld, D., Kavanagh,

- D., Cooper, S., Hashim, G. A., Offner, H. and Bourdette, D. N.: Treatment of multiple sclerosis with T-cell receptor peptides: Result of a double-blind pilot trial. *Nature Med.*, **2**: 1109~1115, 1996.
- 6) Pearson, C. M.: Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**: 95~101, 1956.
 - 7) Dawkins, R. L.: Experimental myositis associated with hypersensitivity to muscle. *J. Path. Bact.*, **90**: 619~625, 1965.
 - 8) Currie, S.: Experimental myositis. The in vivo and in vitro activity of lymph-node cells. *J. of Pathol.*, **105**: 169~185, 1971.
 - 9) Morgan, G., Peter, J. B. and Newbould, B. B.: Experimental allergic arthritis in rats. *Arthritis Rheum.*, **14**: 599~609, 1971.
 - 10) Esiri, M. M. and MacLennan, I. C. M.: Experimental myositis in rats. I. Histological and creatine phosphokinase changes, and passive transfer to normal syngenic rats. *Clin. Exp. Immunol.*, **17**: 139~150, 1974.
 - 11) Matsubara, S. and Takamori, M.: Experimental allergic myositis: strain 13 guinea pig immunized with rabbit myosin B fraction. *Acta. Neuropathol.*, **74**: 158~162, 1987.
 - 12) Engel, A. G. and Arahata, K.: Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. II: Phenotype of autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis. *Ann. Neurol.*, **16**: 209~215, 1984.
 - 13) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of muscle contraction, 2nd edn. Academic Press, New York, pp.151~152, 1951.
 - 14) Rosenberg, N. L., Ringel, S. P. and Kotzin, B. L.: Experimental autoimmune myositis in SJL/J mice. *Clin. Exp. Immunol.*, **68**: 117~129, 1987.
 - 15) Rosenberg, N. L. and Kotzin, B. L.: Aberrant expression of class II MHC antigens by skeletal muscle endothelial cells in experimental autoimmune myositis. *J. Immunol.*, **142**: 4289~4294, 1989.
 - 16) Matsubara, S., Shima, T. and Takamori, M.: Experimental allergic myositis in SJL/J mice immunized with rabbit myosin B fraction: immunohistochemical analysis and transfer. *Acta. Neuropathol.*, **85**: 138~144, 1993.
 - 17) Matsubara, S. and Okumura, S.: Experimental autoimmune myositis in SJL/J mice produced by immunization with syngenic myosin B fraction. Transfer by both immunoglobulin G and T cells. *J. Neurol. Sci.*, **144**: 171~175, 1996.
 - 18) Wella, A. H., Magliato, S. A., Bell, K. P. and Rosenberg, N. L.: Spontaneous myopathy in the SJL/J mouse: Pathology and strength loss. *Muscle & Nerve*, **20**: 72~82, 1997.
 - 19) Richert, J. R., Driscoll, B. F., Kies, M. W. and Alvord, E. C. Jr.: Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis: incubation of rat spleen cells with specific antigen. *J. Immunol.*, **122**: 494~496, 1979.
 - 20) Romball, C. G. and Weigle, W. O.: Transfer of experimental autoimmune thyroiditis with T cell clones. *J. Immunol.*, **138**: 1092~1098, 1987.
 - 21) Linington, C., Izumo, S., Suzuki, M., Uyemura, K., Meyermann, R., and Wekerle, H.: A permanent rat T cell line that mediates experimental allergic neuritis in the Lewis rat in vivo. *J. Immunol.*, **133**: 1946~1950, 1984.
 - 22) 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.
 - 23) Arahata, K. and Engel, A. G.: 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.
 - 24) Arahata, K. and Engel, A. G.: Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. V: Identification and quantitation of T 8⁺ cytotoxic and T 8⁺ suppressor cells. *Ann. Neurol.*, **23**: 493~499, 1988.
 - 25) Hohlfed, R. and Engel, A. G.: Coculture with autologous myotubes of cytotoxic T cells isolated from muscle in inflammatory myopathies. *Ann. Neurol.*, **29**: 498~507, 1991.

(平成10年2月5日受付)