

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461265

研究課題名(和文)特発性炎症性筋疾患におけるリンフォイドネオジェンシスと自然免疫の分子病態解析

研究課題名(英文)Clinical, pathological and immunological investigation in idiopathic inflammatory myopathies

研究代表者

豎山 真規 (Tateyama, Maki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：90396490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：特発性炎症性筋疾患は免疫的機序が関与し骨格筋に慢性炎症と筋細胞壊死をおこす疾患の総称であり原因は不明である。本研究では特発性炎症性筋疾患の筋組織における免疫細胞の解析、血管およびリンパ管の解析を行った。特発性炎症性筋疾患では非炎症性疾患に比して血管に対するリンパ管の割合が低く、病変部の浮腫と慢性炎症の持続に関与していることが示唆された。また特発性炎症性筋疾患を全身的に診断、評価するための方法としてのFDG PETの有用性を明らかにした。本疾患では骨格筋FDGの取り込みは増加していた。骨格筋へのFDGの取り込みをSUVの測定と視覚的な評価をして定量化したところ、病理所見との相関が認められた。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic inflammatory myopathy (IIM) is an immune-mediated heterogeneous group of disorders characterized by inflammation and muscle fiber necrosis in skeletal muscles. We immunohistochemically analyzed mononuclear cells, blood vessels and lymphatic vessels in the muscles of IIM. We found that the ratio of lymphatic vessels to blood vessels in the lesions was relatively low as compared with non-inflammatory disorders, which may be associated with edema and chronic inflammation in skeletal muscles. We studied a utility of FDG PET in evaluating skeletal muscle inflammation. SUVmax in four limbs in patients with IIM was significantly higher than those in patients with motor neuron diseases. We also evaluated FDG uptake visually (vFDG). vFDG was recognized in two thirds of IIM with varied distribution. Number of vFDG-positive regions was correlated with SUVmax and histological grades of biopsied muscles. FDG PET also visualized lung lesions, swelling of lymph nodes in IIM patients.

研究分野：神経内科

キーワード：特発性炎症性筋疾患 皮膚筋炎 多発筋炎 筋生検 FDG PET

1. 研究開始当初の背景

特発性炎症性筋疾患は免疫機序により骨格筋に慢性の炎症細胞浸潤と筋細胞の壊死をきたし、四肢筋力低下をひき起こす疾患の総称である。主な疾患として多発筋炎、皮膚筋炎、封入体筋炎が含まれる。封入体筋炎は免疫機序に加えて変性機序が関与し、未だ有効な治療法はない。一方多発筋炎、皮膚筋炎は治療可能であるが、ステロイドを主体とした強力な免疫治療が長期間必要な難病である。

生検筋の組織学的検討により、皮膚筋炎では、微小血管を標的とした液性免疫が主体であり、一方多発筋炎、封入体筋炎では HLA class1 を過剰に発現した筋細胞に細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞が侵入しパーフォリンなどの分子で筋を傷害すると考えられている。しかしながら、これらの典型的な病理像を呈さない特発性炎症性筋疾患は多く、壊死性筋炎、perimysial myopathy など新たな病型も認知されるようになってきた。また筋組織の免疫学的解析により病型によって異なる樹状細胞の関与、自然免疫の関与を示す報告がされている。さらに膠原病や移植片宿主病など慢性炎症において組織内にリンパ節様組織が形成され、病態に関与していることも報告されているが、特発性炎症性筋疾患では十分検討されていない。

臨床的には特発性炎症性筋疾患は肺、皮膚など他の臓器障害や悪性腫瘍を伴う全身疾患である。筋傷害分布は四肢近位筋を主体とするが、体幹筋や呼吸筋が障害されるなど症例によって多彩である。また疾患特異抗体と臨床病理所見の関連の検討もなされている。特発性炎症性筋疾患は従来考えられていたよりもはるかに多彩な臨床、病理所見を示す疾患群であり、病態を明らかにするためには、筋組織の解析と共に、全身的に疾患を評価する新たな手段の開発が必要である。

2. 研究の目的

筋組織を用いた解析と全身的な解析をあわせて検討し、特発性炎症性筋疾患の病態をより明らかにする。

3. 研究の方法

(1) **筋組織学的検討**: 筋組織内の浸潤細胞の解析、筋細胞傷害の様式、リンパ節様組織を有する症例の抽出、筋組織内脈管系の状態などについての組織学的に解析を行った。凍結筋切片を用いて、ルーチンの組織化学染色と免疫染色で検討した。免疫染色はアセトンで固定し、一次抗体は抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD68 抗体、抗 CD70 抗体(いずれも Dako)、抗体 C9 抗体(abcam)、抗 HLA class 1 抗体(Santa cruz)、抗ミオシン重鎖(neonatal)抗体(Leica)、抗 NCAM/CD58 抗体(LSBio)、抗 CD34 抗体(LSBio)、D2-40 リンパ管内皮マーカー抗体(BioLegend)、二次抗体は ビオチン化抗マウ

ス IgG ウマ血清(Vector)を用いた。Vectorstain(Vector)を用いた ABC 法で、DAB で発色させた。顕微鏡(Olympus)を用いて、10 倍の対物レンズで撮影し解析した。

(2) **炎症性疾患と他の神経筋疾患の骨格筋 FDG 取り込みの有無と取り込み部位の比較**: 後方視的に悪性腫瘍の検討のために FDG PET を施行した症例を抽出し、特発性炎症性筋疾患の骨格筋への FDG 取り込み増加の有無を検討した。取り込みの増加は肝臓への取り込みと同等程度が筋内に認められたものを陽性部位とした。評価部位は頸部、傍脊柱筋(頸部・胸部・腰部)、肩甲骨周囲、上肢、体幹、殿部、大腿に分けた。33 例の特発性炎症性筋疾患と 118 例の他の神経疾患(脳疾患、脊髄疾患、末梢神経疾患、非炎症性筋疾患)と比較した。

(3) **特発性炎症性筋疾患の診断・全身的评价の手段としての FDG-PET の有用性の検討**:

特発性炎症性筋疾患症例の内、悪性腫瘍の有無を検討するために過去に FDG-PET を施行された 33 症例を抽出し対象とした。特発性炎症性筋疾患の診断と分類は、Bohan and Peter らの診断基準に準拠し、免疫染色の結果、診断後の治療経過を含めた他疾患の除外によって行った。

FDG PET: 4 時間前から絶飲食とし血糖を測定して 159mg/dl 以上であれば対象に含めなかった。約 185MBq(3.1MBq/Kg)の 18FDG を静注後、1 時間ベット上安静とした。撮影は、PET スキャナー(ECAT EXACT HR+, Siemens) 2009 年以降の症例については PET/CT スキャナー(Biograph Duo or 40, Siemens)を用いて頭部から大腿中央部まで行った。

FDG の取り込みの評価:a. 四肢の SUVmax、SUVmean を測定した。両側の上腕二頭筋、下両側の大腿四頭筋と大腿屈筋で、それぞれ最も FDG 取り込みの多い部位で測定した。

b. FDG PET を特発性炎症性筋疾患の臨床により活用するために、FDG 取り込みを視覚的に評価することが可能であるかを検討した。骨格筋を左右の頸部、上肢、体幹、下肢の全 16 箇所に分け、縦隔血管の取り込みを基準とし同等以上が認められた部位を陽性とした。臨床情報を伏せて 2 人の検者が評価し、個々の症例について陽性筋部位数を得た。2 人の検者が共に陽性とした部位を視覚的陽性(vFDG 陽性)部位とした。

臨床・病理学的所見と FDG PET の比較: 症例の年齢、罹病期間、病型、血清クレアチンキナーゼ値を抽出した。筋病理所見は生検筋の組織障害の程度、細胞浸潤の程度を臨床のデータ、FDG PET の所見を伏せた状態で一人の検者が判定した。これらの因子と FDG PET の SUVmax 値、vFDG 陽性部位数を比較した。

筋 MRI と FDG PET の比較: 症例の内、筋 MRI を施行していた 25 例について、筋 MRI と FDG PET を比較した。筋 MRI は 1.5T スキャナー(Philips)を用いて、治療前に施行されていた。脂肪抑制 T2 画像で炎症の有無を判

定されていた結果を抽出した。

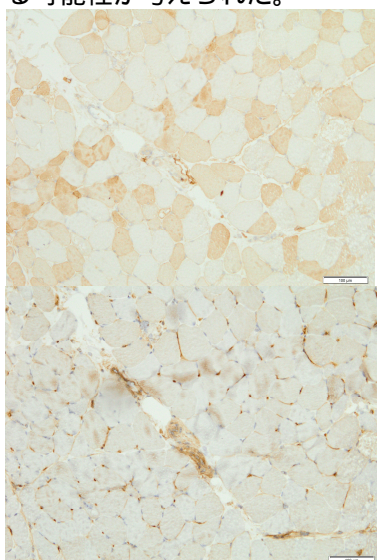
特発性炎症性筋疾患と運動ニューロン病の骨格筋 FDG PET の比較：対象となった特発性炎症性筋疾患症例とほぼ同等の日常生活動作の運動ニューロン病の症例で、悪性腫瘍の検索のために FDG PET を受けた 22 例を抽出し、四肢の SUVmax、SUVmean を測定し、特発性炎症性筋疾患と比較した。

4. 研究成果

(1) 筋組織学的検討：

50 例の症例についてリンパ球表面マーカーを用いた免疫組織化学的解析を行った。貪食細胞、T リンパ球を主体とした細胞浸潤を種々の程度に認めた。2 例で B リンパ球が結節状に集簇している所見を認めた。これらの B 細胞の周囲に T 細胞が取り巻くように存在し、リンパ節様構造であることが考えられた。いずれの症例も数年の経過の慢性筋炎であり、一例は封入体筋炎であった。特発性炎症性筋疾患においても異所性リンパ節が形成されることが示唆された。

特発性炎症性筋疾患と他の神経筋疾患（組織学的に正常であった症例を含む）で、筋組織内の血管およびリンパ管を免疫組織学的に評価した。リンパ管は組織内の水分の調整、免疫環境の調整などをしていると考えられている。筋組織内においてリンパ管は小動脈、小静脈に沿って認められた。小動脈、小静脈、リンパ管がまとまって認められる部位をそれぞれの症例で確認し、その部位における血管、リンパ管を定量的に評価した。特発性炎症性筋疾患においては、慢性の経過の症例においては血管新生により血管の密度が高くなる傾向が認められた。血管とリンパ管の比を特発性炎症性筋疾患と他の神経筋疾患で比較すると、特発性炎症性筋疾患では低下していた。特発性炎症性筋疾患では血管密度とリンパ管密度のバランスが崩れ、慢性炎症に伴う浮腫と炎症の持続に關与している可能性が考えられた。

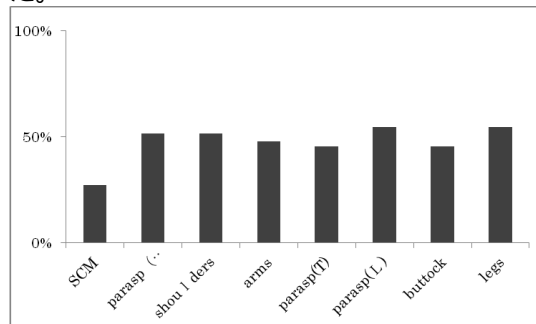


上図リンパ管内皮マーカー、下図抗 CD34 抗体による染色。(特発性炎症性筋疾患症例)

治療開始 3 週間目に筋生検が施行された Jo-1 抗体陽性筋炎症例において、著明な筋線維束周囲萎縮を認めた。ATPase 染色でこれらの小径線維は Type2c の染色性を示し、抗ミオシン重鎖(neonatal)抗体で陽性であり、再生線維と考えられた。皮膚筋炎で認められる筋線維束周囲萎縮と比較検討し、皮膚筋炎とは染色性が異なり、筋線維束周囲に強い筋細胞壊死をきたす Jo-1 抗体陽性筋炎の病態を反映していると考えられた。

(2) 特発性炎症性筋疾患と他の神経筋疾患の骨格筋 FDG 取り込みの有無と取り込み部位の比較：

特発性炎症性筋疾患症例では 88%で骨格筋への取り込み増加があり、72.7%の症例で複数の部位にわたっていた。他の神経筋疾患でも 34.9%の症例で骨格筋への取り込み増加が認められ、その多くは一部位であり、複数個所は 9.2%のみであった。特発性炎症性筋疾患では 54.5%で大腿での取り込みを認めたが、その他の神経筋疾患では 3.3%であった。種々の疾患において骨格筋への FDG の取り込みが認められたが、その頻度と分布は特発性炎症性筋疾患とは異なっていた。特発性炎症性筋疾患では全身の骨格筋に取り込みが分布し、病態を反映している可能性が考えられた。



図は 33 例の特発性炎症性筋疾患の骨格筋 FDG 取り込み部位の別頻度を示す。

(3) 特発性炎症性筋疾患の診断・全体的評価の手段としての FDG PET の有用性の検討：

33 例の特発性炎症性筋疾患の臨床的診断の内訳は他の膠原病を伴わない皮膚筋炎 11 例、他の膠原病を伴わない多発筋炎 11 例、他の膠原病を伴う筋炎 11 例であった。臨床組織学的な分類 (119th European Neuromuscular Centre international workshop) では、11 例の皮膚筋炎で definite DM 7 例、probable DM 4 例、11 例の他の膠原病を伴わない多発筋炎では非特異的筋炎 9 例、definite PM 1 例、probable PM 1 例、他の膠原病を伴う筋炎では非特異的筋炎 8 例、probable PM 2 例、definite PM 1 例であった。FDG PET を受けていたのは 8 症例、FDG PET/CT を受けていたのは 25 例であった。25 例は治療開始前に FDG PET を受けていた。8 例ではステロイド治療開始直後に FDG PET を受けていた。これらの症例の治療開始から FDG PET までの期間は 2 日から 9 日で平均 6.1 日であった。

他臓器への FDG 取り込みは 11 例で肺、16 例でリンパ節に増加が認められた。リンパ節への取り込み増加は皮膚筋炎の 50%、他の膠原病を伴わない多発筋炎の 18.2%、他の膠原病を伴う筋炎の 75% で認められた。3 例で悪性腫瘍と考えられる取り込みが認められた。その他関節、脾臓、甲状腺などへの取り込みを認めた症例もあった。

特発性炎症性筋疾患の四肢骨格筋の SUV を測定し、22 例の運動機能障害が同程度の運動ニューロン病症例と比較したところ、四肢骨格筋平均 SUVmax は特発性炎症性筋疾患 (1.463 ± 0.483) で運動ニューロン疾患 (1.106 ± 0.370) よりも高かった ($p < 0.0001$)。これらのことから、骨格筋 FDG の取り込み増加は特発性炎症性筋疾患において筋障害を反映していると考えられた。

特発性炎症性筋疾患 33 例において、四肢骨格筋の平均 SUV 値と臨床病理学的所見を比較した。平均 SUV 値は組織学的重症度と相関を認め、特に筋細胞壊死・再生所見と相関が強かった。筋生検部位での SUV 値は組織学的重症度と相関を認めた。一方で平均 SUV 値は血清 CK 値と相関を認めなかった。血清 CK 値と組織学的所見の間にも相関を認めなかった。

特発性炎症性筋疾患の個々の四肢 SUV 値には顕著な左右の同一筋部位での相関が認められた。SUV 値は同側の大腿伸筋と屈筋よりも対側の大腿伸筋とより相関が強かった。特発性炎症性筋疾患において対称性の筋障害がおきることが FDG PET でも明らかになった。

FDG PET の視覚的評価による陽性筋部位数と四肢の平均 SUV 値には強い相関を認めた ($r = 0.87, p < 0.0001$)。視覚的陽性部位数は組織学的所見と相関を認めた ($p = 0.0038$)。また 3 箇所以上の取り込み陽性部位を有する症例では、2 箇所以下の症例よりも血清 CK 値が高かった ($p = 0.0179$)。

25 例の FDG PET と筋 MRI の両方を施行している特発性炎症性筋疾患の症例について、筋 MRI は上腕あるいは大腿で施行されている症例がほとんどであった。筋 MRI 施行部位における陽性判断率は筋 MRI が高かった。筋 MRI 陽性例と陰性例において、同部位の SUV 値に有意差を認めなかった。また筋 MRI では筋全体の信号異常、筋を取り巻くような信号異常、筋内の信号異常などを認めた。一方 FDG の取り込みはしばしばより筋の内部に認められた。MRI では炎症や組織傷害に伴う浮腫を検出し、FDG の取り込みは代謝が活発な部位に取り込まれることが画像所見に違いに反映されていると考えられた。

これらの結果から、FDG PET の四肢 SUV 値、vFDG の広がり方は筋組織所見と相関し、特発性炎症性筋疾患の筋障害を知る方法として用いることが可能と考えられた。FDG PET は特発性炎症性筋疾患において、悪性腫瘍の検索のみならず、肺の病変やリンパ節腫脹などの

全身的評価、これまで筋力評価や MRI で検討されてこなかった体幹筋の筋障害の評価も可能であることから、症例の詳細な評価と、病態の解明に役立つと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. 豎山真規 特発性炎症性筋疾患の病理診断病理 2015;32:191-198 査読有
2. Tateyama M, Misu T, Arai A, Kaneta T, Fujihara K, Aoki M. Clinical values of FDG PET in polymyositis and dermatomyositis syndromes. Imaging of skeletal muscle inflammation. BMJ open. 2014;4:e006763, doi:10.1136/bmjopen-2014-006763 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. 鎌田幸子 松田正純 華園晃 三瓶結 豎山真規 菅原正伯 大西洋英. 抗 SRP 抗体陽性筋炎の臨床病理学的検討 2015 年 5 月 20 日-23 日 第 56 回日本神経学会学術大会 (新潟 朱鷺メッセ)
2. 豎山真規 藤原一男 金田朋洋 三須建郎 青木正志. 炎症性筋疾患における FDG-PET, PET/CT の検討. 第 55 回日本神経学会学術大会 (福岡 福岡国際会議場) 2014 年 5 月 21 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豎山真規 (MAKI, Tateyama)
(東北大学・医学系研究科・非常勤講師)
研究者番号：90396490

(2)研究分担者

藤原一男 (KAZUO, Fujihara)
(東北大学・医学系研究科・非常勤講師)
研究者番号：70280873

三須建郎 (TATSURO, Misu)
(東北大学・医学系研究科・非常勤講師)
研究者番号：00396491