

## 論文の内容の要旨

論文題目 封入体筋炎における筋再生に関する転写因子の検討

指導教員 辻 省次 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 久保田 暁

【背景】 封入体筋炎 ( inclusion body myositis IBM ) は炎症と変性の二つの病態をあわせもつ病理像を呈する慢性進行性の筋疾患である。中高年以降に発症し、前腕屈筋群・大腿四頭筋に強い筋力低下を来す。他の炎症性筋疾患 ( Idiopathic inflammatory myopathy, IIM ) とは異なり、あらゆる免疫抑制療法に抵抗性である。

IBM で見られる炎症は、MHC ( major histocompatibility complex ) class I を異所性発現した筋線維に CD8 陽性 T 細胞が浸潤する細胞障害性機序が主体であり、多発筋炎と類似している。また IBM では封入体・縁取り空胞を有する変性線維が出現する。封入体には A $\beta$ ・リン酸化 tau など、様々なタンパクが異常蓄積していることが知られており、ubiquitin-proteasome system の障害・小胞体ストレスといった病態が生じていると考えられている。縁取り空胞は自己貪食性空胞であり、macroautophagy の異常によって生じると考えられている。炎症と変性の関係については未だ明らかでない。

IBM では筋再生も障害されていると考えられている。IBM は慢性経過を取るが、筋再生による臨床的改善は見られない。また病理学的にも再生所見に比較的乏しい。しかし IBM の筋再生についての検討は少なく、筋再生障害の原因は不明である。

筋組織の高い再生能力は、主に筋細胞膜と基底膜の間に存在する筋衛星細胞によって司られている。平時には筋衛星細胞は休眠状態にあり、筋に障害が生じると活性化されて増殖・分化し、障害された筋線維への融合または新たな筋線維の形成を行う。分化の過程では後述する転写因子が大きな役割を果たしている。

休眠状態にある筋衛星細胞の大半は転写因子 Pax7 を発現している。Pax7 は筋衛星細胞の維持や自己複製に重要である。筋衛星細胞が筋線維へ分化する際には、分化段階により複数の転写因子が発現し、重要な役割を果たしている。特に転写因子の myf-5・MyoD1・myogenin・MRF-4 は myogenic regulatory factors と総称され、筋再生の制御に中心的な役割を果たしているとされている。Myf-5 は休眠状態から分化初期の筋衛星細胞に発現し、分化の調節を行っている。MyoD1 は分化初期の筋衛星細胞に発現し、休眠状態の筋衛星細胞を分化へ誘導する。Myogenin は分化後期の筋衛星細胞に発現し、分化誘導された筋衛星細胞が筋線維へ融合・成熟するために必要な転写因子である。MRF-4 は分化した筋衛星細胞が筋線維へ融合する前後に発現しており、機能は未だ明らかでない。これらの転写因子のうち、Pax7 (休眠期)・MyoD1 (分化早期)・myogenin (分化後期) は筋衛星細胞の分化状態のマーカーとして有用である。

【目的】 IBM 生検筋における，再生線維の頻度と筋衛星細胞の転写因子の解析を行い，IBM における筋再生障害の原因を明らかにする．

【方法】 生検筋検体（IBM 13 例，IIM 32 例，コントロール 4 例）における，再生線維の頻度を HE 染色で解析した．また転写因子 Pax7（休眠状態）・MyoD1（分化初期）・myogenin（分化後期）の状態を，免疫染色・Western blot・real-time reverse transcription PCR (real-time RT-PCR)で解析した．IBM 群と IIM 群の比較には Student's t test を用いて解析を行った．コントロール群は症例数が少なく，臨床的特徴が疾患群と大きく異なっていたため統計解析は行わなかった．

【結果】 HE 染色による観察では，再生線維は間質増生の強い症例に多く見られ，コントロール群には再生線維は見られなかった．疾患間での比較では，IBM 群 平均  $\pm$  SD 1.78  $\pm$  1.05（単位 本 / 筋線維 100 本），IIM 群 3.02  $\pm$  2.96 と差は無かった（ $p = 0.15$ , Student's t test）．

転写因子の免疫染色では，コントロール群ではいずれの転写因子においても陽性細胞はわずかであり，疾患群では増加していた．疾患群での比較では，IBM 群（Pax7 平均  $\pm$  SD 19.6  $\pm$  8.9，MyoD1 5.1  $\pm$  4.1，myogenin 4.3  $\pm$  1.6（単位 個 / 筋線維 100 本）），IIM 群（Pax7 13.7  $\pm$  10.5，MyoD1 4.3  $\pm$  5.0，myogenin 5.6  $\pm$  3.7）の間に差は認めなかつ

た ( Pax7  $p = 0.08$ , MyoD1  $p = 0.64$ , myogenin  $p = 0.24$ , Student's t test ).

Western blot の定量的解析では , IBM 群 ( Pax7 平均  $\pm$  SD  $0.38 \pm 0.40$  , MyoD1  $0.11 \pm 0.05$  , myogenin  $0.051 \pm 0.031$  ( actin で補正した相対量 ) ) , IIM 群 ( Pax7  $0.24 \pm 0.16$  , MyoD1  $0.14 \pm 0.08$  , myogenin  $0.084 \pm 0.048$  ) で Pax7 および MyoD1 のタンパク発現量は同等だったが , myogenin のタンパク発現量は IBM 群で有意に低かった ( Pax7  $p = 0.08$ , MyoD1  $p = 0.19$ , myogenin  $p = 0.028$ , Student's t test ). コントロール群では免疫染色とは逆に疾患群よりもタンパク発現量が高かった .

Real-time RT-PCR の定量的解析では , 疾患群はコントロール群に比べて mRNA 発現量が多かった . 疾患群での比較では , IBM 群 ( Pax7 平均  $\pm$  SD  $0.0043 \pm 0.0032$  , MyoD1  $0.062 \pm 0.033$  , myogenin  $0.26 \pm 0.16$  ( GAPDH に対する相対量 ) ) , IIM 群 ( Pax7  $0.0047 \pm 0.0042$  , MyoD1  $0.110 \pm 0.097$  , myogenin  $0.27 \pm 0.24$  ) で差は無かった ( Pax7  $p = 0.75$ , MyoD1  $p = 0.10$ , myogenin  $p = 0.94$ , Student's t test ).

以上定量的解析をまとめると , 1 ) IBM 群と IIM 群の比較では Western blot 解析による myogenin タンパク発現のみ IBM 群で有意に低かった , 2 ) コントロール群の解析では免疫染色および real-time RT-PCR と Western blot の結果が矛盾した .

また , IBM 生検筋の抗 myogenin 抗体免疫染色では , 変性線維内部に核とは明らかに異なる形状の陽性所見を認め , 封入体との関連が疑われた . 抗 myogenin 抗体と抗 A $\beta$ 42 抗体の二重蛍光免疫染色では , 変性線維内部で myogenin と A $\beta$ 42 が共存してい

た。Pax7 および MyoD1 は変性線維内部に陽性所見を認めず、IIM 群では同様の所見は確認されなかった。以上より、IBM の変性線維内部の A $\beta$ 42 陽性封入体に myogenin が異常沈着していることが示された。

【考察】 HE 染色による再生線維の頻度の解析では、IBM 群と IIM 群に差は見られなかった。ただし再生線維は間質増生の強い症例に多く見られ、IBM 群では IIM 群に比較して間質増生の強い症例が多かったことが影響を与えたと考えられる。また IBM 群と IIM 群の病理変化の差は筋再生に関する転写因子の解析にも影響を与えた可能性も考えられる。

筋再生に関する転写因子 (Pax7, MyoD1, myogenin) の解析で、疾患群の間では Pax7 および MyoD1 のタンパクおよび mRNA 発現は同等と考えられた。また IBM 群では myogenin のタンパク発現量が有意に低かったが、後述するように IBM では myogenin が封入体に沈着しており、不溶画分に含まれていた可能性も考えられる。免疫染色や real-time RT-PCR では差が無く、myogenin についても IBM 群と IIM 群でタンパクおよび mRNA 発現には差が有るとは言えなかった。

また今回の検討では myogenin が A $\beta$ 42 陽性封入体に沈着していることが示された。Myogenin は成熟筋線維には発現せず、変性線維内部での発現は異所性発現と言える。

意義は不明であるが、IBM の筋再生障害に関係している可能性を考えた。

コントロール群では免疫染色およびreal-time RT-PCR と Western blot の結果が矛盾した。この矛盾については原因は明らかでなかったが、コントロール群と疾患群とで組織を組成する細胞の違いなどが背景にあると考察した。

**【結論】** IBM 生検筋における筋再生に関係する転写因子( Pax7 ,MyoD1 ,myogenin ) のタンパクおよび mRNA 発現は IIM と同等であった。IBM の A $\beta$ 42 陽性封入体に myogenin が沈着している事が明らかとなった。後者は IBM の筋再生障害に関係している可能性があると考えた。

コントロール生検筋の解析では Western blot と免疫染色およびreal-time RT-PCR の結果に乖離があったが、原因は明らかで無かった。