

神経筋疾患における熱ショック蛋白の発現

著者名	小島 進
雑誌名	東京女子医科大学雑誌
巻	63
号	11
ページ	1377-1388
発行年	1993-11-25
URL	http://hdl.handle.net/10470/8866

原 著

神経筋疾患における熱ショック蛋白の発現

東京女子医科大学 脳神経センター神経内科学教室 (主任:丸山勝一教授)
三宿病院神経内科

コ 小 島 進

(受付 平成5年7月19日)

Heat Shock Proteins in Neuromuscular Diseases

Susumu KOJIMA

Department of Neurology (Director: Prof. Shoichi MARUYAMA), Neurological Institute,
Tokyo Women's Medical College
Department of Neurology, Mishuku Hospital

Heat shock proteins (HSP) are produced by prokaryotic and eukaryotic cells in response to a variety of insult. Involvement of HSPs in various neuromuscular diseases has not been clearly elucidated. Using antibodies against 65-kd HSP, 72-kd HSP, ubiquitin, HLA-ABC, HLA-DR, and neural cell adhesion molecules (N-CAM), immunocytochemical studies were performed on muscle biopsy specimens from 36 patients with inflammatory myopathy, 14 with muscular dystrophy, 24 with other myopathies, 18 with neurogenic muscular atrophy, and 4 normal controls.

Regenerative fibers exhibited N-CAM, 72-kd, 65-kd HSP, and ubiquitin reactivity. 72-kd HSP positive regenerative fibers were seen more frequently than those positive for 65-kd HSP and ubiquitin. In some cases of inflammatory myopathy, 72-kd HSP were detected in non-regenerating fibers. Nearly all HSP-positive fibers were reactive for HLA-ABC antigen, but not for HLA-DR antigen. 72-kd HSP were detected in rimmed vacuoles, tubular aggregates, and in the vicinity of cores.

HSP may play an important role in the regenerating processes of muscle fibers and in the modulation of abnormal structures such as rimmed vacuoles, tubular aggregates, and cores. In inflammatory myopathy, 72-kd HSP may also perform an important function during antigen processing or presentation without HLA-DR molecules.

緒 言

熱ショック蛋白 (heat shock proteins: HSP) は、熱などのストレス時に発現する蛋白であるが¹⁾²⁾、高熱以外のストレス状態(irradiation, viral infection, anoxia, various chemical agents)でも出現し、侵害に対して防衛的役割をなしている。筋疾患においても tubular aggregates(TA), rimmed vacuoles (RV)などの筋細胞内の異常構造物での発現が指摘され、変性蛋白の三次構造の変化との関連でその発現機序が推定された³⁾⁴⁾。また炎症性ミオパチーの一部で HSP の発現が報告され

たように⁵⁾⁶⁾、自己免疫疾患において特に抗原提示の過程における HSP の役割が注目されている^{7)~9)}。

著者は多発筋炎・皮膚筋炎 (PM・DM) において正常では発現していない主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 分子が筋細胞膜上に発現していることを確認した。また慢性甲状腺炎や糖尿病などの一部の自己免疫性疾患と同様に¹⁰⁾¹¹⁾、抗原提示細胞ではない筋細胞上に MHC クラス II 分子 (HLA-DR) の aberrant expression が見られることを指摘した¹²⁾¹³⁾。MHC は T 細胞と抗原

提示細胞や標的細胞間での抗原の認識過程に必要である。PM・DMで筋線維においてHSPが抗原提示の過程に関連しているならHSPとMHCが同一の筋線維に発現することが期待される。

そこでHSPと、MHC、筋の再生現象の指標となる神経細胞接着因子(neural cell adhesion

molecules: N-CAM)^{14)~16)}の発現様式を比較検討し、筋の再生現象やRVやTAなどの筋内異常構造物などでのHSPの役割を知ること、および炎症性ミオパチーにおいてHSPがMHCと関連した抗原提示過程に関与しているか否かを知ingことを目的として本研究を行った。

表1 免疫組織化学染色の結果(多発筋炎, 皮膚筋炎)

Case	Age	Diagnosis	Ubiquitin	HSP65	HSP72	HLA-ABC	HLA-DR	N-CAM
I. 多発筋炎・皮膚筋炎								
1	35	PM	nd	nd	+	+	+	-
2	29	PM	nd	nd	+	++	++	+f
3	26	PM	nd	nd	+	++	-	++
4	55	PM	nd	nd	+	++	-	+f
5	61	PM	nd	nd	+	++	-	+f
6	54	PM, CH(c)	-	-	-	+	-	+
7	31	PM	nd	nd	+	+	+	+
8	58	PM	nd	nd	-	+	-	+
9	50	PM	-	-	++	+	-	+
10	67	PM	-	-	-	+	++	+
11	32	PM	-	-	-	+	±	-
12	18	PM	-	-	+	+	+	+
13	53	PM	-	-	-	++	++	+
14	49	PM, HAM	nd	nd	+	++	++	++
15	23	DM	nd	nd	+f	++	+pf	+f
16	31	DM, AD	nd	nd	+pf	++	+pf	+pf
17	70	DM	-	-	-	nd	-	+
18	70	DM	+	+	+	nd	-	+
19	51	DM, IP	nd	nd	+	++	++	+f
20	64	DM, IP	-	-	-	nd	++pf	++f
21	61	PM, IP, Jo-1	-	-	+	++	++	-
22	56	PM, IP, Jo-1	-	-	-	nd	+	+
23	72	PM, IP	nd	nd	+f	++	+pf	+f
24	65	PM, IP	nd	nd	+f	++	+pf	+f
25	20	PM, IP	+	-	-	nd	++	++f
26	64	PM, IP	nd	nd	-	++	++	nd
27	51	PM, IP, RA, Peni	nd	nd	+	++	++	++pf
28	52	PM, RA	nd	nd	+	++	++	-
29	44	PM, MCTD	nd	nd	-	+	+	+
30	50	PM, MCTD	+	-	+	+	++	++
31	55	PM, PSS	-	-	-	nd	-	+
32	52	PM, PBC	nd	nd	+	++	+pf	+f
33	54	PM, PBC	nd	nd	-	+	-	+f
34	67	DM, esophageal Ca	nd	nd	+	++	+	+
35	54	DM, colon Ca	-	-	++	+	++pf	++pf
36	57	PM, gastric Ca	nd	nd	+	++	-	nd

HSP: heat shock protein, HLA: human leucocyte antigen, N-CAM: neural cell adhesion molecules, PM: polymyositis, DM: dermatomyositis, CH: chronic hepatitis, HAM: HTLV-I associated myelopathy, AD: atopic dermatitis, IP: interstitial pneumonitis, Jo-1: positive Jo-1 antibody, PSL+: steroid therapy had started prior to muscle biopsy, RA: rheumatoid arthritis, Peni: penicillamin, MCTD: mixed connective tissue disease, PSS: progressive systemic sclerosis, PBC: primary biliary cirrhosis, Ca: cancer, nd: not determined, f: focal, pf: perifascicular fibers, +, ++: estimated relative intensity of reactivity, +=mild to moderate reactivity, ++=strong reactivity.

対象および方法

1. 対象

筋生検 cryostat 試料のうち1988年12月から1992年12月の期間に施行された多発筋炎・皮膚筋

炎 (Bohan と Peter の診断基準¹⁷⁾を満たすもの) 36例, 筋ジストロフィー14例 (病型は dystrophin 染色を参考にして分類), 他のミオパチー24例, 神経原性筋萎縮症18例, 正常対照4例を対象とした。

表2 免疫組織化学染色の結果 (筋ジストロフィー, そのほかのミオパチー)

Case	Age	Diagnosis	Ubiquitin	HSP65	HSP72	HLA-ABC	HLA-DR	N-CAM
II. 筋ジストロフィー								
1	45	LG	nd	nd	+	+	-	+
2	17	LG	nd	nd	-	+	-	+
3	40	Becker	nd	nd	-	++	-	+f
4	27	Becker	-	-	-	++	-	+
5	17	Becker	-	-	-	++	-	++
6	22	Down, Becker	-	-	-	nd	±	++
7	8		-	-	-	nd	-	+
8	46	LG	nd	nd	+	nd	-	+
9	25	LG	-	-	-	nd	-	+
10	43	LG	-	-	-	nd	-	+
11	24	LG	-	-	-	nd	-	+
12	46	MD	nd	nd	+	-	-	-
13	42	MD	-	-	-	-	-	++
14	51	ARDM	-	-	-	nd	-	+
III. ミオパチー								
1	40	DMRV	+	+RV	+RV	+	+	++RV
2	46	DMRV, Cardiomyopathy	-	-	+RV	+	-	++f
3	42	Familial PP	-	+TA	+TA	nd	-	++
4	45	Congenital myopathy	-	-	+core	+	-	++f
5	26		nd	nd	+	+	-	+f
6	18	MG	-	-	+	nd	-	-
7	55	Hypothyroidism	nd	nd	-	+f	-	+
8	64	PMR	-	-	-	-	-	-
9	65	PMR	-	-	-	-	-	+
10	72	PMR	-	-	-	-	-	+
11	81	PMR	-	-	-	-	-	-
12	36	Sarcoidosis	nd	nd	-	++	-	+pf
13	34	Sarcoidosis	-	-	-	-	-	+
14	37	Sarcoidosis	-	-	-	+	-	-
15	28	Sarcoidosis	-	-	+	-	-	+
16	62	Sarcoidosis	-	-	-	-	+	+
17	51	Sarcoidosis	+	-	-	-	±	+
18	28	Sarcoidosis	-	-	-	-	-	-
19	50	Sarcoidosis	-	-	-	-	-	-
20	45	SLE myopathy	-	-	-	nd	-	+
21	59	mRA	nd	nd	-	++	-	+f
22	40	Rhabdomyolysis	-	-	+	nd	-	+
23	16	MH の Hx	-	-	-	nd	-	-
24	56	fibromyalgia	nd	nd	-	+f	-	nd

BMD: Becker muscular dystrophy, LG: limb-girdle type muscular dystrophy, MD: myotonic muscular dystrophy, ARDM: autosomal recessive distal myopathy, DMRV: distal myopathy with rimmed vacuoles, RV: rimmed vacuoles, PP: periodic paralysis, PMR: polymyalgia rheumatica, SLE: systemic lupus erythematoses, mRA: malignant rheumatoid arthritis, MH: malignant hyperthermia, nd: not determined, f: focal, pf: perifascicular fibers, +, ++: estimated relative intensity of reactivity, +=mild to moderate reactivity, ++=strong reactivity.

2. 方法

免疫組織化学的方法は基礎的検討で得られた条件に基づき, cryostat 連続標本ですでに報告したものと同様の immunoperoxidase 法(ABC法)で施行した¹²⁾¹³⁾. 生検筋は急速凍結後6 μ mの連続切片を作製, 4℃の冷アセトンで10分間固定した.

一次抗体は抗 N-CAM(Leu 19(CD56), MY31, Becton Dickinson; $\times 2$)¹⁴⁾¹⁵⁾, 抗 HLA-ABC(W6/32, Dakopatts; $\times 100$), 抗 HLA-DR (L243, Becton Dickinson; $\times 2$), 抗 72-kd HSP (RPN1197, Amersham; $\times 500$)¹⁸⁾, 抗 65-Kd HSP (B97, Wako; $\times 500$)¹⁹⁾の各マウスモノクローナル抗体と, 家兎抗ユビキチンポリクローナル抗体(221M, Biomeda; $\times 1$)を用いた.

10%正常家兎血清にて10分間ブロッキング後, 0.01M phosphate-buffered saline(PBS), pH 7.2

で洗浄, 一次抗体を室温で切片に60~120分間反応させた. 0.01M PBS, pH 7.2で10分間3回の洗浄後, 二次抗体は Vecstain ABC kit-elite(PK-6102)もしくはビオチン化抗家兎 IgG (BA-1000: Vector; 10 μ g/ml)を使用した ABC法で行い, 発色は Graham-Karnovsky 溶液(DAB-H₂O₂)を用いた. 対照は一次抗体を PBSへ替え施行した. 連続切片上で hematoxylin eosin 染色を施行し比較検討した.

統計学的手法は χ^2 検定, Fisher の直接確率法を用いた.

結 果

免疫組織化学染色の結果を表1~3に示した.

1. 72-kd HSP の発現に関して

72-kd HSP は筋炎群24/36例(67%), 筋ジストロフィー群3/14例(21%), ミオパチー群7/24例

表3 免疫組織化学染色の結果(神経原性筋萎縮症, 正常対照)

Case	Age	Diagnosis	Ubiquitin	HSP65	HSP72	HLA-ABC	HLA-DR	N-CAM
神経原性筋萎縮								
1	46	ALS	nd	nd	±	+	-	-
2	42	ALS	nd	nd	±	+	-	-
3	56	ALS	-	-	-	+	-	+f
4	55	ALS	-	-	+	nd	-	+
5	71	MND	-	-	-	nd	-	+f
6	39	MND	-	-	-	nd	-	+f
7	57	MND	-	-	-	nd	-	+
8	56	MND	-	-	-	nd	-	+
9	14	KW	-	-	-	nd	-	-
10	29	KAS	-	-	-	-	-	+
11	58	KAS	-	-	-	+	-	+
12	56	CIDP	-	-	+	+	-	+
13	53	CIDP	-	-	-	-	-	++
14	41	CIDP, CRF	-	-	+	+	-	+
15	56	CIDP	-	-	-	nd	-	++
16	65	MM: Churg Strauss	-	-	-	nd	-	++
17	52	MM: Angitis	-	-	-	nd	-	+
18	50	HSMN-1	-	-	-	-	-	-
正常								
1	24		nd	nd	-	-	-	-
2	27		nd	nd	±	-	-	-
3	31		-	-	-	-	-	-
4	56		-	-	-	-	-	-

ALS: amyotrophic lateral sclerosis, MND: motor neuron disease, KW: Kugelberg-Wellander disease, KAS: Kennedy-Alter-Sung bulbospinal muscular atrophy, CIDP: chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy, MM: multiple mononeuropathy, HSMN: hereditary sensori-motor neuropathy, nd: not determined, f: focal, pf: perifascicular fibers, +, ++: estimated relative intensity of reactivity, +=mild to moderate reactivity, ++=strong reactivity.

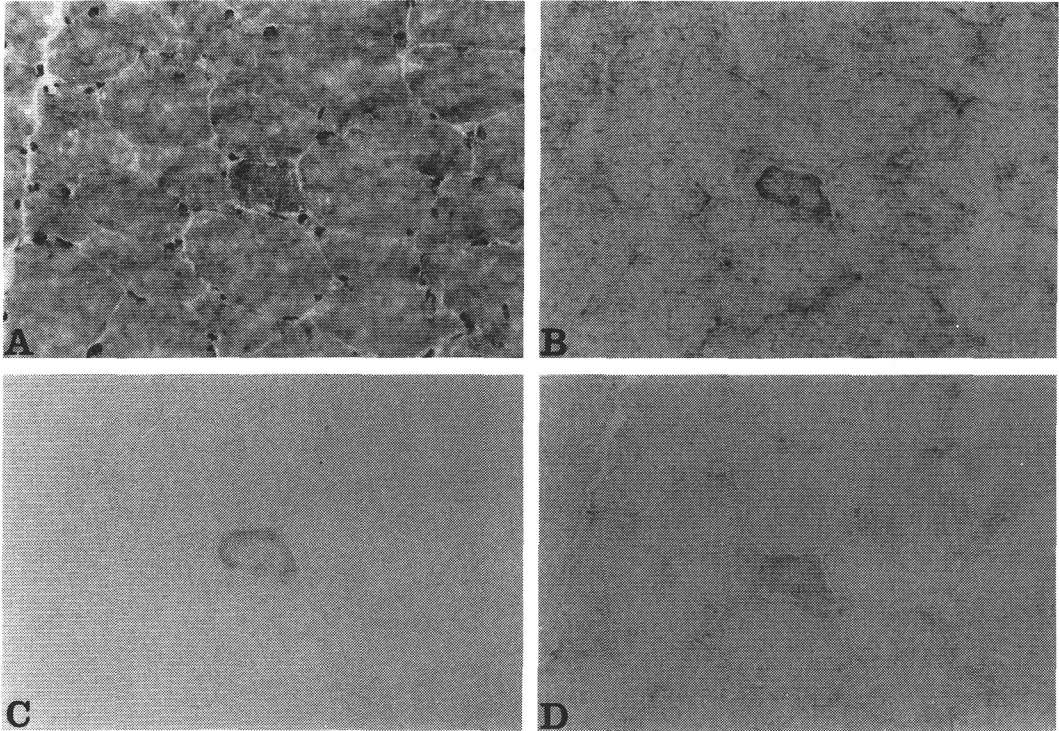


図1 皮膚筋炎例 (Case I-18) 例における免疫染色

A: hematoxylin eosin (HE) 染色, B: 抗72-kd HSP, C: 抗65-kd HSP, D: 抗ユビキチン, ×400.
HE 染色 (A) で好塩基性の萎縮線維は抗72-kd HSP (B), 抗65-kd HSP (C), 抗ユビキチン (D) すべてに陽性である。筋細胞膜下に染色性が強いが細胞質も染色されている。

(29%), 神経原性筋萎縮群5/18例(28%), 正常対照0/4例で発現を認めた。疾患群による比較では筋炎群に72-kd HSP 発現例が多い傾向を認めたが、他の疾患群でも認められ疾患特異性に乏しかった。72-kd HSP の発現様式は筋細胞膜に発現がみられるものと、さらに細胞質にも発現がみられる2つが認められた。いずれも少数の筋線維にみられることが多く、細胞質にも発現しているものは再生線維と考えられる萎縮線維であることが多かった (図1)。

72-kd HSP 陽性線維は N-CAM 陽性線維で、HE 染色上再生線維であることが多かった。しかし、筋炎群では72-kd HSP 陽性線維が N-CAM の発現とは関連なく多数見られる例があった (図2)。また多発筋炎で、少数の抗72kd HSP 陽性線維の近傍の血管周囲に抗 N-CAM (anti Leu-19 (CD56)) 陽性の単核球が認められる例 (症例 I-

7) があった (図3)。

72-kd HSP 陽性線維は図4に示すように MHC クラスII分子 (HLA-DR) 陰性であることが多かった。筋炎群で72-kd HSP の発現がみられる症例につき、HLA-ABC, HLA-DR 発現との関連を統計学的に検討した (表4)。MHC クラスI分子 (HLA-ABC) は1例を除き、すべての筋線維が陽性でありその関連については結論が得られなかった。MHC クラスII分子 (HLA-DR) 陽性線維群では陰性線維群と比較し、72-kd HSP の出現率が有意に多い例は17例中1例のみで、残りの9例は出現率に有意差がなく、7例はむしろ有意に出現率が少なかった ($p < 0.001$)。

RV は72-kd HSP 陽性であり、かつ RV を持つ線維の細胞質も陽性であった (図5)。TA は陽性のものと陰性のものとが混在していた (図6)。コアはその周囲が淡染していた。

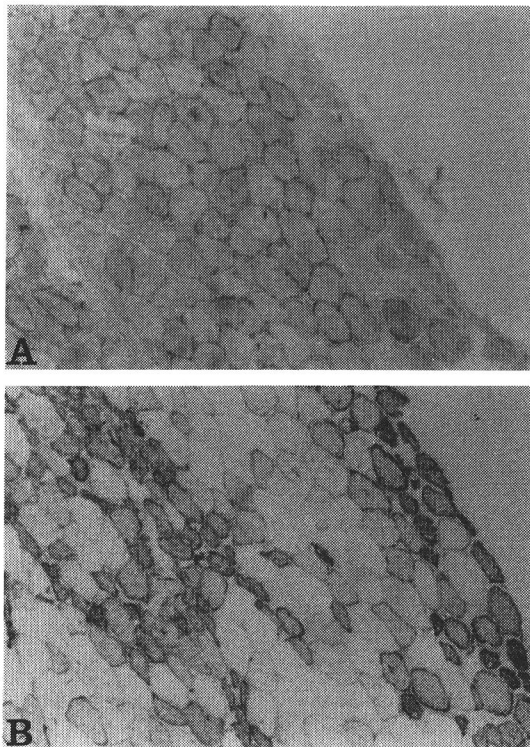


図2 大腸癌に伴った皮膚筋炎例 (Case I-35) における免疫染色

A: 抗72-kd HSP, B: 抗 N-CAM, ×200.

筋束周囲の筋線維に N-CAM 陽性線維を認めるが、多数の72-kd HSP 陽性線維は抗 N-CAM 陰性で、この72-kd HSP の発現は壊死再生現象とは関連なく発現していることが示唆される。

2. 65-kd HSP の発現に関して

65-kd HSP は筋炎群1/15例(7%), 筋ジストロフィー群0/9例, ミオパチー群2/19例(11%; 各々の症例で RV, TA に一致して陽性), 神経原性群0/16例, 正常対照0/2例で発現が認められた。筋炎群での陽性例は72-kd HSP の陽性線維が多数見られた症例で、その陽性線維は萎縮した再生線維と考えられる線維であり(図1), 非萎縮再生線維での発現は認められなかった。

3. ユビキチンの発現に関して

ユビキチンは筋炎群3/15例(20%), 筋ジストロフィー群0/9例, ミオパチー群2/19例(11%), 神経原性群0/16例, 正常対照0/2例で発現が認められた。ユビキチン陽性線維には72-kd, 65-kd HSP が

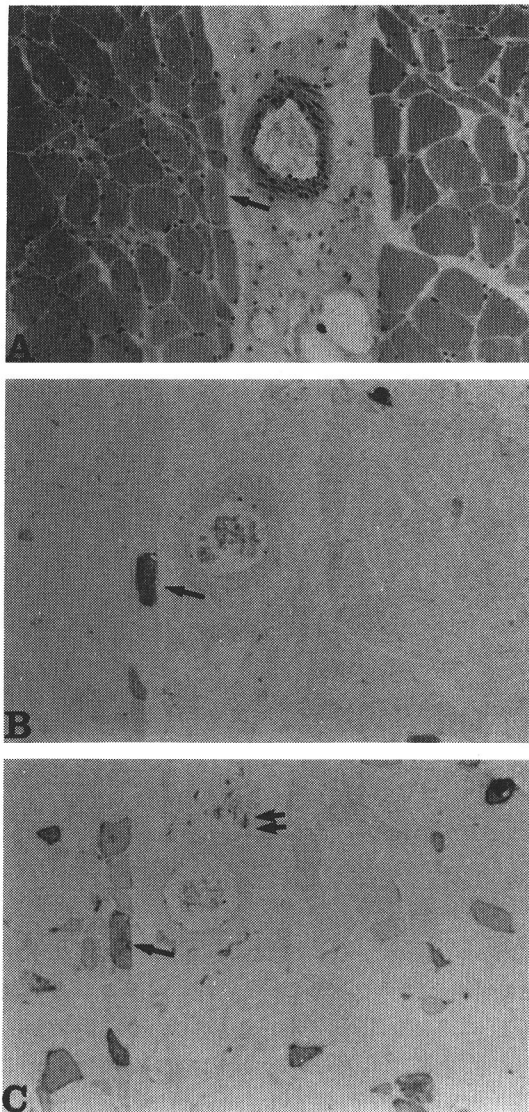


図3 慢性多発筋炎例 (Case I-7) における免疫染色
A: HE 染色, B: 抗72-kd HSP, C: 抗 N-CAM, ×200.

少数の抗72-kd HSP 陽性筋線維(↑)が、おもに perifascicular fibers に認められる。間質の血管周囲に認められる単核球の一部(↑↑)は抗 N-CAM (anti Leu-19) (CD56) 陽性で NK 細胞、もしくは MHC 非拘束性の T 細胞と考えられる。

陽性である萎縮線維が多く(図1), 非萎縮再生線維での発現は認められなかった。TA, RV はともに陰性であった。

表4 72-kd HSP 発現と HLA-ABC, HLA-DR の関連

症例番号	筋線維総数	HSP 陽性線維	HSP+/ HLAABC+	HSP+/ HLAABC-	HSP+/ HLA-DR+	HSP+/ HLA-DR-
I-1	5,368	61	0/278 =	61/5,090	0/7 =	61/5,361
2	18,448	901	901/18,448	—	7/3,019 <	894/15,429
3	4,736	13	13/4,736	—	—	—
4	5,976	2	2/5,976	—	—	—
5	3,457	65	65/3,457	—	—	—
7	8,108	107	107/8,108	—	0/152 =	107/7,956
9	6,528	216	216/6,528	—	—	—
12	4,804	4	4/4,804	—	0/63 =	4/4,741
14	2,960	2	2/2,960	—	1/1,050 =	1/1,940
15	10,952	101	101/10,952	—	6/684 =	95/10,286
16	15,552	299	299/15,552	—	58/1,972 >	241/13,580
18	10,896	3	3/10,896	—	—	—
19	12,288	376	376/12,288	—	67/606 <	309/11,682
21	2,420	2	2/2,420	—	0/44 <	2/2,376
23	12,083	136	136/12,083	—	22/3,594 <	114/8,489
24	2,280	89	89/2,280	—	23/1,188 <	66/1,092
27	11,136	282	282/11,136	—	54/3,541 <	228/7,595
28	8,384	6	6/8,384	—	0/2,751 =	6/5,633
30	12,848	3	3/12,848	—	0/4,396 =	3/8,452
32	10,848	36	36/10,848	—	0/394 =	36/10,454
34	18,285	585	585/18,285	—	106/5,368 <	479/12,917
35	10,752	1,440	1,440/10,752	—	31/240 =	1,409/10,512
36	11,064	54	54/11,064	—	—	—

HSP⁺: 72-kd heat shock protein 陽性線維, HLAABC⁺: HLAABC 陽性線維, HLAABC⁻: HLAABC 陰性線維, HLADR⁺: HLADR 陽性線維, HLADR⁻: HLADR 陰性線維.

<, >: $p < 0.001$ で有意に出現率に差を認める, =: 出現率に有意差を認めない (χ^2 検定, Fisher の直接確率法).

4. MHC クラス II 分子 (HLA-DR) の発現に関して

HLA-DR は筋炎群25/36例(69%), 筋ジストロフィー群2/14例(14%), ミオパチー群3/23例(13%), 神経原性群0/18例, 正常対照0/4例で発現があった. 発現パターンは筋線維の一部に陽性で, 特に perifascicular muscle にみられることが多く既報告と同様の所見であった¹²⁾¹³⁾. 72-kd, 65-kd HSP と HLA-DR の発現の間には関係は認められなかった (図4).

5. MHC クラス I 分子 (HLA-ABC) の発現に関して

HLA-ABC は筋炎群30/30例(100%), 筋ジストロフィー群5/7例(71%), ミオパチー群では9/19例(47%), 神経原性群では6/9例(67%), 正常対照0/4例で陽性であった. 筋炎例ではすべての筋線維で陽性のことが多く既報告と同様のパターンで

あったが¹²⁾¹³⁾, 今回の検討では陽性症例が全例にみられ, 既報告の63%より高頻度であった¹³⁾. 使用した二次抗体の差を考えた.

6. Rimmed vacuoles (RV), tubular aggregates (TA), コアとの関連について

RV 型 distal myopathy の2例 (症例 III-1, 2) において, RV は HSP 陽性であり RV をもつ線維の多くはその細胞質が N-CAM, MHC クラス I 分子の両者が陽性であった (図5). RV 型 distal myopathy 2例中1例では65-kd HSP, ユビキチンも同様の染色パターンを認めた. ネマリン小体とコアを伴った先天性ミオパチーの1例 (症例 III-4) でコアの周囲に HSP が陽性であった. 家族性低カリウム血症性周期性四肢麻痺例 (症例 III-3) に認められた TA は72-kd HSP, 65-kd HSP 陽性的ものと陰性的のものが存在したが (図6), ユビキチンは染色されなかった. TA は N-CAM

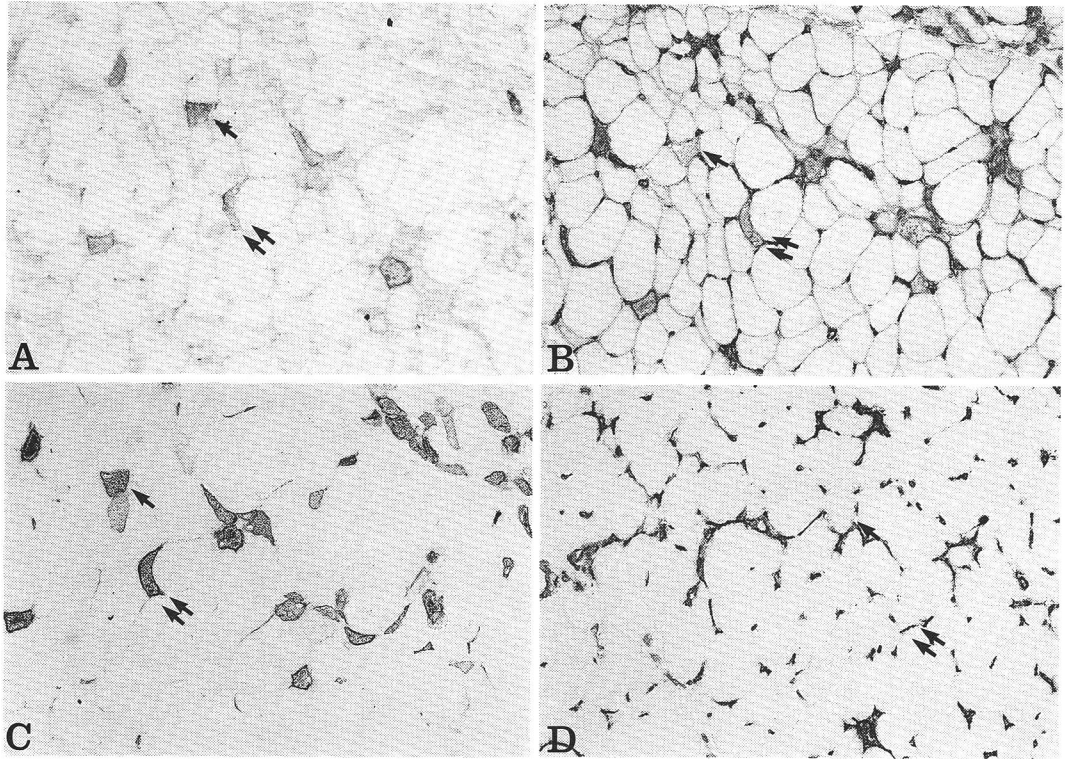


図4 多発筋炎 (Case I-9) 例における免疫染色

A: 抗72-kd HSP, B: 抗 HLA-ABC, C: 抗 N-CAM, D: 抗 HLA-DR, ×200.

抗72-kd HSP 陽性筋線維の多くは N-CAM 陽性線維 (↑, ↑↑) でありかつ HLA-DR 陰性であった。HLA-ABC はすべての筋細胞膜での発現がみられた。

にて染色され、TA を持つ線維の細胞質も染色性がみられた。

考 案

今回の検討では、HSP が筋線維において再生線維や、RV、TA、コアの近傍に発現することを確認指摘した。また PM・DM で 65-kd HSP のみならず 72-kd HSP が非再生線維に発現している例があること、この発現は MHC クラス II 分子と関連が少ないことを明らかにした。

HSP 陽性線維は再生途上の小径線維であることが多く、多くの 72-kd HSP 陽性線維は N-CAM 陽性であった。N-CAM は細胞表面に存在する糖蛋白で、おもに神経系の細胞間接着に関与している。筋組織では筋衛星細胞、脱神経筋、再生筋での発現が報告されている^{14)~16)}。すなわち 72-kd HSP 発現線維の多くは再生線維と考えられた。し

かし一部の筋炎例では N-CAM 陰性の非再生線維に 72-kd HSP の発現がみられた。この場合再生現象とは別の発現機序が推定される。その一つの可能性として抗原提示への関連があげられる。

HSP は immunomodulation に関与していると考えられている^{7)~9)}。一部の HSP (65-kd HSP, HSP70 など) は抗原の処理・提示の過程で、MHC クラス I もしくは II 分子と抗原ペプチドとの結合に関与している。また感染症や腫瘍免疫において HSP 自体が抗原として働いている。これらのことから HSP 自体の自己免疫疾患の発生機序への関与が考えられている^{7)~9)}。実際、ヒトでも慢性関節リュウマチでマイコバクテリアの HSP60 に対して強く反応する関節液 T 細胞が証明された²⁰⁾。

多発筋炎においては、Hohlfeld ら⁴⁾ は 65-kd HSP と MHC クラス I 分子がすべての筋線維に

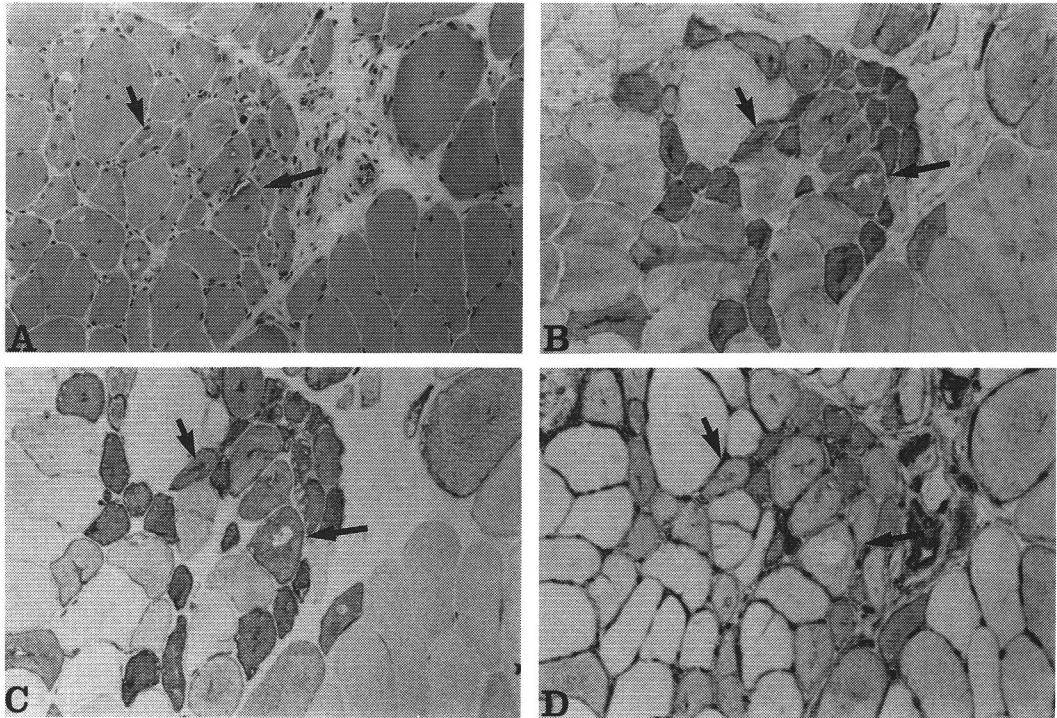


図5 Rimmed vacuole (RV) を伴う遠位型ミオパチー (Case III-1) における免疫染色

A: HE 染色, B: 抗72-kd HSP, C: 抗 N-CAM, D: 抗 HLA-ABC, $\times 200$.

RV (↑) は72-kd HSP 陽性であり, RV を持つ線維自体も細胞質に染色性が認められる. このパターンは N-CAM, HLA-ABC の染色性と非常に類似している.

発現し, 浸潤細胞が γ/δ T 細胞である 1 例を報告した. γ/δ T 細胞は HSP60 を認識することから²¹⁾, 65-kd HSP の immunomodulation への関与が示唆された. その後, 彼らは他の多発筋炎例での検討で65-kd HSP が炎症性細胞が侵入している非壊死再生線維に陽性であり, 皮膚筋炎では筋細胞束の周囲の細胞に陽性であると報告した⁵⁾.

筋細胞束周囲の筋線維は MHC クラス II 分子 (HLA-DR) が陽性であることが多く¹²⁾, HLA-DR と 65-kd HSP との関連が示唆されたが, 今回の検討では関連は認められなかった. また65-kd HSP が非再生線維に発現している症例もなかった. むしろ PM・DM において65-kd HSP より72-kd HSP の陽性率の方が高く, 72-kd HSP が非再生線維に発現していた. PM-DM では血液中の HSP60 に対する自己抗体は証明されているが,

HSP70 の抗体は証明されていない²²⁾. しかし最近の研究では HSP60 のみならず HSP70 も抗原提示に関与していることが示唆されている^{7)~9)23)}. 今後, HSP70 との関連に関する検討が必要である.

通常の抗原提示は MHC 拘束が存在し, MHC の発現が T 細胞への抗原提示に必要である. HSP が抗原として PM・DM の発症に関与しているなら, MHC クラス I, II 分子との関連があることが期待される²¹⁾²⁴⁾. 今回の検討では PM・DM 群では多くの症例で MHC クラス I 分子はすべての筋線維で陽性で, 72-kd HSP の出現率を MHC クラス I 分子発現の有無で検討できなかった. MHC クラス I 分子の関連は否定できないが, 多くの MHC クラス I 分子陽性線維は HSP が陰性であり両者の関連についてはさらに検討を要する. しかし HSP と MHC クラス II 分子は同一筋線維に両者が発現しているものは有意に少なく,

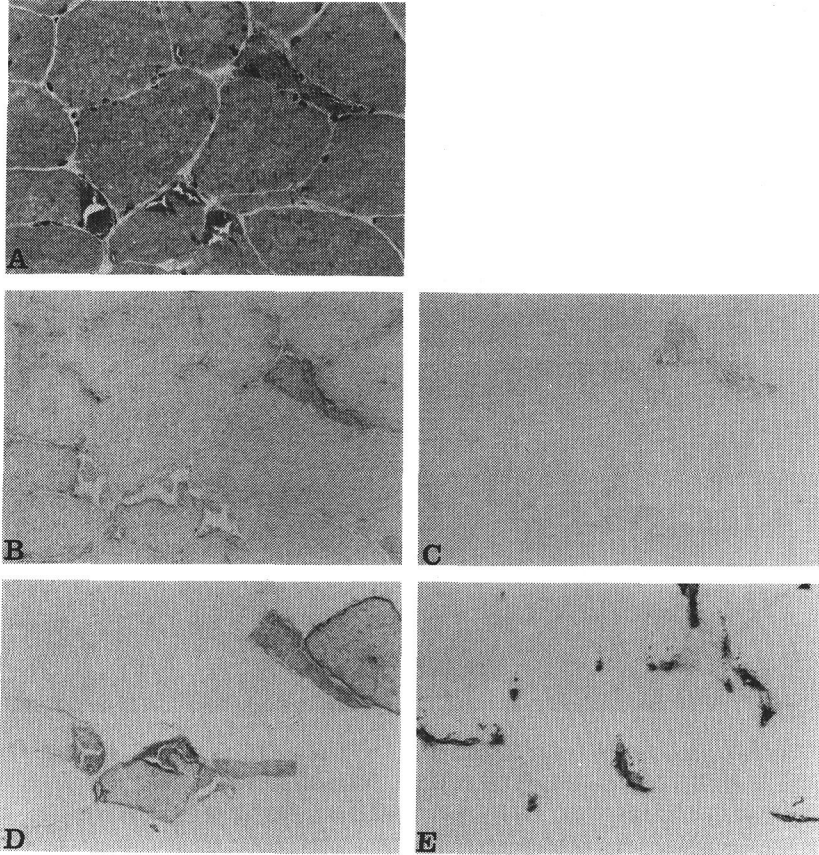


図6 家族性低カリウム血症性周期性四肢麻痺例 (Case III-3) における免疫染色
 A: HE 染色, B: 抗72-kd HSP, C: 抗65-kd HSP, D: 抗 N-CAM, E: 抗 HLA-DR, $\times 400$
 左下にある3つの tubular aggregates は B: 抗72-kd HSP, C: 抗65-kd HSP では染色されない。しかし、右上の壊死線維においては各々染色性がみられる。D: TA は抗 N-CAM にて細胞質とともに染色性がみられる。しかし HLA-DR では染色性を認めない。

関連は少ないと考えられた。MHC クラス I 分子は内因性抗原の提示を、MHC クラス II 分子は外因性抗原の提示をする²⁵⁾。HSP は内因性抗原と考えられ、クラス II 分子の発現とは関連が少ないことは矛盾しない所見と考えられる。

この点で興味深いのは、少数の抗72-kd HSP 陽性筋線維がおもに perifascicular fiber に認められ、間質の血管周囲に認められる単核球の一部が抗 Leu-19 (CD56) 陽性で NK 細胞、もしくは MHC 非拘束性の T 細胞と考えられた例である。PM・DM においては NK/K 細胞の関与は少ないとされているが²⁶⁾、MHC 非拘束性の障害が関与

している可能性は否定できない。今回、この単核球に関する検討はできていないが、MHC 非拘束性の HSP 関連抗原に対する細胞障害も存在するとされており²⁷⁾、PM・DM においても MHC 非拘束性の細胞障害を示唆する所見と考える。

一方、筋炎以外の筋疾患では Martin ら²⁾は TA が72-kd HSP に対する抗体で特異的に染色されることを報告し蛋白の三次構造の変化との関連でその発現機序を推定した²⁷⁾。また HSP はタンパク質の折り畳みや集合形成を助けるが最終的な集合体には含まれないシャペロン (付き添い婦) 分子と呼ばれている²⁸⁾。今回の我々の検討では TA

には HSP 陽性のものと陰性のものがあり, TA 形成においても HSP の関与は一時的と考えられ, このシャペロン仮説と矛盾しない所見と考えた. コアの周囲や rimmed vacuoles (RV) にも同様の所見がみられた. RV は 72-kd HSP で染色され, ライソゾームへの変性蛋白の移行に関与していると考えられた⁴⁾. HSP 陽性線維は N-CAM 陽性の再生線維であり, HSP は筋の再生過程に関与していると考えられる. しかし HSP がみられない N-CAM 陽性線維も多数みられ, 再生過程の蛋白の移送や再構成などに関連した一時的な関与と考えられるが, その役割の詳細については今後の検討を要する.

ユビキチンは eucaryotic 細胞すべてにみられ, やはり熱により誘導される HSP の一種である. ユビキチンはライソゾームを経由せず細胞質で行われる蛋白分解機構において重要な役割をなしている¹⁾. ストレス状態ではユビキチンへの要求が高い. このユビキチンの機構の不活化, overloading が他の HSP の誘導を引き起こすとされている¹⁾. しかし今回の検討では 72-kd, 65-kd HSP よりユビキチンの発現は頻度が少なく少数例にしか見られなかった.

結 論

神経筋疾患において HSP は, ①筋の再生現象や, ②RV や TA の形成に関与していると考えられる. ③一部の PM・DM では従来報告のあった 65-kd HSP のみならず 72-kd HSP が抗原提示に関連していると考えられる症例がある. しかし MHC クラス II 分子との関連は少ないと考えられる. HSP は MHC クラス I 分子が関連した, もしくは MHC 非拘束性の, 抗原提示に関与している可能性がある.

稿を終えるに当たり, 御指導, 御校閲を賜りました東京女子医科大学脳神経センター神経内科学教室丸山勝一教授に深甚なる謝意を表します. また御助言頂いた虎の門病院神経内科高木昭夫部長, ならびに太田熱海病院脳神経センター神経内科山根清美副院長に深謝致します.

文 献

- 1) Lindquist S: The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631-677, 1988
- 2) Shelesinger MJ: Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265: 12111-12114, 1990
- 3) Martin JE, Mather K, Swash M et al: Expression of heat shock protein epitopes in tubular aggregates. *Muscle Nerve* 14: 219-225, 1991
- 4) 清水輝夫, 川合 充, 山崎峰雄ほか: Rimmed vacuole myopathy における熱ショック蛋白 hsp72 の局在. 厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法開発に関する研究, 平成3年度研究報告書: 51-54, 1992
- 5) Hohlfeld R, Engel AG, Ii K et al: Polymyositis mediated by T lymphocytes that express the γ/δ receptor. *N Engl J Med* 324: 877-881, 1991
- 6) Hohlfeld R, Engel AG: Expression of 65-kd heat shock proteins in the inflammatory myopathies. *Ann Neurol* 32: 821-823, 1992
- 7) DeNagel DC, Pierce SK: Heat shock proteins and immune responses: An early view. *Immunol Res* 10: 66-78, 1991
- 8) Kaufman SHE: Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 11: 129-136, 1990
- 9) Young RA: Stress proteins and immunology. *Annu Rev Immunol* 8: 401-420, 1990
- 10) Hanafusa T, Pujol-Borrell R, Chiovato L et al: Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: Relevance for autoimmunity. *Lancet* 2: 1111-1115, 1983
- 11) Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM et al: In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med* 313: 353-360, 1985
- 12) 小島 進, 高木昭夫: 炎症性ミオパシーにおける主要組織適合遺伝子複合体クラス II 分子の aberrant expression. *臨床神経* 33: 612-619, 1993
- 13) Kojima S, Takagi A, Ida M et al: Muscle pathology in polymyalgia rheumatica: Histochemical and immunohistochemical study. *Jpn J Med* 30: 516-523, 1991
- 14) Schubert W, Zimmermann K, Cramer M et al: Lymphocyte antigen Leu-19 as a molecular marker of regeneration in human skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 307-311, 1989
- 15) Lanier LL, Testi R, Bindl J et al: Identity of

- Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169 : 2233-2238, 1989
- 16) **Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC** : Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Ann Neurol* 31 : 46-52, 1992
 - 17) **Bohan A, Peter JB** : Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 292 : 344-347, 1975
 - 18) **Vass K, Welch WJ, Nowak TS** : Localization of 70-kDa stress protein induction in gerbil brain after ischemia. *Acta Neuropathol* 77 : 128-135, 1988
 - 19) **Hara I, Sato N, Matsuura A et al** : Development of monoclonal antibodies reacting against mycobacterial 65 kDa heat shock protein by using recombinant truncated products. *Microbiol Immunol* 35 : 995-1007, 1991
 - 20) **van Eden W, Thole JER, van der Zee R et al** : Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331 : 171-173, 1988
 - 21) **Haregewoin A, Soman G, Hom RC et al** : Human $\gamma\delta^+$ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature* 340 : 309-312, 1989
 - 22) **Jarjour WN, Jeffries BD, Davis JS et al** : Autoantibodies to human stress proteins. A survey of various rheumatic and other inflammatory diseases. *Arthritis Rheum* 34 : 1133-1138, 1991
 - 23) **Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J et al** : Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 1968-1972, 1989
 - 24) **Koga T, Wand-Württenberger A, DeBruyn J et al** : T cells against a bacterial heat shock protein recognize stressed macrophages. *Science* 245 : 1112-1115, 1989
 - 25) **Bevan MJ** : Antigen recognition. Class discrimination in the world of immunology. *Nature* 325 : 192-194, 1987
 - 26) **Arahata K, Engel AG** : Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV: Cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis. *Ann Neurol* 23 : 168-173, 1988
 - 27) **Holoshitz J, Koning F, Coligan JE et al** : Isolation of CD4⁺CD8⁻ mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature* 339 : 226-229, 1989
 - 28) **Hightower LE** : Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66 : 191-197, 1991