

強皮症にともなう筋障害の臨床的および病理学的研究

奈良県立医科大学神経内科学教室

杉江 和馬

CLINICAL AND PATHOLOGICAL STUDY ON MUSCLE INVOLVEMENT IN SYSTEMIC SCLEROSIS

KAZUMA SUGIE

Department of Neurology, Nara Medical University

Received October 13, 2000

Abstract: In terms of the presence of clinical and pathological changes in the muscles, systemic sclerosis (SSc) is classified into two types: SSc-polymyositis overlap syndrome (SSc-PM), which is associated with lymphocyte infiltration in the muscle tissues, and simple myopathy (SSc-SM), without the infiltration. SSc-PM showed more severe muscular weakness, more myopathic electrophysiological changes, and more prominent proliferation of lymphocytes in the muscle biopsies than SSc-SM. To examine whether the muscle fibers of SSc-PM patients function as professional antigen presenting cells (APC), we investigated the expression of costimulatory molecules BB-1, B7-1 and B7-2, and their counterreceptors, CD28 and CTLA-4 (CD152), in the muscle biopsies of SSc-PM patients, polymyositis (PM) patients, and other disease controls. In SSc-PM patients, major histocompatibility complex (MHC) class II expressing muscle fibers reacted with monoclonal antibody against BB-1, but not against B7-1 or B7-2. CD4+ T cells constituting the majority of inflammatory cells at perivascular and endomysium expressed the counterreceptor CD28 and CTLA-4. In PM patients, BB-1+ muscle fibers, expressing MHC class I, bound in cell-to-cell contact with CD8+ T cells. Our findings indicate that SSc-PM muscle fibers may function as professional APC in a way distinct from that in PM.

(奈医誌. J. Nara Med. Ass. 51, 483~492, 2000)

Key words: systemic sclerosis, inflammatory myopathy, BB-1 molecule, costimulatory molecules, overlap syndrome

緒 言

強皮症(全身性硬化症, systemic sclerosis: SSc)は皮膚硬化を主症状とし, さらに骨格筋を含む全身組織に結合織の線維化や炎症性変化をきたす原因不明の自己免疫性疾患である。SSc患者の約22%に筋力低下や筋痛などの筋症状がみられるが¹⁾, 病理学的に筋組織への細胞浸潤の有無によって2つの病型に分類される。1つは細胞浸潤をともなうcomplicated myopathy / 強皮症一多発筋炎重複症候群(SSc-PM)と呼ばれるもので, 細胞

浸潤がない simple myopathy(SSc-SM)とは区別される¹⁻⁶⁾。いわゆる炎症性ミオパチーの範疇にあるSSc-PMでは, 患者血中に抗PM/Scl抗体, 抗Scl-70抗体, 抗Ku抗体などの自己抗体および補体価の上昇が認められる⁷⁻¹⁰⁾。病理学的にはendomysium, 筋線維束周囲の結合織や小血管周囲にT細胞浸潤, また小血管内皮細胞に補体の沈着がみられることから, 細胞性および液性免疫異常によってSSc-PMが発症すると考えられる。

1999年, Murata & Dalakasは多発筋炎(PM)において, 主要組織適合遺伝子複合体(MHC)class I陽性の筋

線維が、抗原提示細胞(antigen presenting cells: APC)として機能することを報告した¹¹⁾。したがってPMにみられる炎症性筋病変と類似の病理変化をとまなうSSc-PMの筋線維も、APCとしての役割を担う可能性が考えられる。そのためには、SSc-PM筋線維表面にMHCとともにcostimulatory分子のB7ファミリー分子が発現し、その筋線維周囲に浸潤したT細胞はB7ファミリー分子の受容体であるCD28またはCTLA-4(CD152)陽性であることが必要である¹²⁾。

本研究では、筋症状を有するSSc 17例の臨床のおよび病理学的特徴を述べ、つぎに、SSc-PMの発症機序を明らかにする目的で、PMと比較しながら、生検筋におけるリンパ球浸潤、costimulatory分子とその受容体の発現様式を解析して、筋線維がAPCとして機能する可能性について検討した。

対象および方法

1. 対象

奈良県立医科大学附属病院神経内科においてSScの診断基準¹³⁾を満たし、筋力低下や筋痛などの筋症状を呈し、電気生理学のおよび病理学的検査から筋病変の存在が確認された17例(男性3例、女性14例、年齢14~82歳)を対象とした。さらに筋生検から細胞浸潤の有無によりSSc-SM 8例とSSc-PM 9例に分類した。SSc-SMでは3例、SSc-PMでは全例に筋症状に対してステロイド剤が投与された。対照は多発筋炎(polymyositis: PM)の診断基準¹⁴⁾を満たした8例、Duchenne型筋ジストロフィー症(DMD)3例と神経筋疾患以外の疾患5例、合計16例とした。

2. 臨床検査

SSc-SMとSSc-PMの各群で、筋症状、血液検査と筋電図検査所見を比較した。針筋電図検査は、全例について安静臥位で上下肢近位および遠位部で施行した。徒手筋力試験(Manual muscle testing: MMT)は左右上肢、左右下肢と頸部筋について0~5点の6段階評価をおこない、MMT scoreを算定した(正常筋力は25点)。SSc-SMとSSc-PMの2群間でのMMT scoreと血清Creatine kinase (CK) 値の比較は、Mann-Whitney U検定により $p < 0.01$ をもって有意とした。

3. 病理学的検討

筋生検は全例の上腕二頭筋または大腿直筋で施行し、筋組織採取直後にイソペンタンドライアイス中で凍結し厚さ5 μ mの連続切片を作製して、組織化学染色をおこなった。

1) 組織化学染色

Hematoxylin & Eosin 染色, Gomori-trichrome 変法染色, NADH-TR 染色, ATPase 染色(routine および pH 4.6, 4.2), PAS 染色をおこない検討した。

2) 免疫組織化学染色

既報告にしたがい^{11,15,16)}、切片を4℃アセトンで10分間固定、0.01 M phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後4℃で1時間風乾した。2% bovine saline albumin (BSA) を加えた0.01 M PBS で希釈した5%正常ヤギ血清にて30分間ブロッッキングした後、1次抗体としてマウスモノクローナル抗体を用いて反応をおこなった(Table 1)。0.01 M PBS で洗浄後、IgM 抗ヒト CD80 (BB-1) についてはビオチン標識ヤギ抗マウス IgM 10 μ g/ml を、他の1次抗体についてはbiotin 標識ヤギ抗マウス IgG 10 μ g/ml を、2次抗体として60分間反応させた。再び0.01 M PBS で洗浄、遮光下でFITC 標識 avidin D 20 μ g/ml を用いて蛍光発色させた。0.01 M PBS で洗浄後、水溶性封入剤にて包埋し蛍光顕微鏡で観察した。対照実験には、1次抗体と同濃度に希釈したマウス IgG, IgM を用いた。

4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

全 RNA は凍結筋生検切片(10 切片, 20 μ m 厚)を総量 0.2 ml の TRIZOL (Gibco BRL, Grand Island 社, New York) 中でホモジナイズし、プロトコールにしたがって抽出した。RNA は水 12 μ l (RNase-free) に溶解し、10 分間 56℃ で加温後、-80℃ で保存した。

RNA 1 μ g を RNase-free の DNase 1 (Boehringer Mannheim 社, Indianapolis, IN) 処理後、random primers と GeneAmp RNA PCR kit (Perkin-Elmer, Roche Molecular 社, Branchburg, NJ) を用い、プロトコールにしたがって RT 反応をおこなった。反応液に 50 pmol の CTLA-4, CD28, GAPDH の primers (Table 2)¹⁷⁻¹⁹⁾ を加え、95℃ 1分, 55℃ 1分, 72℃ 1分 で 45 cycle 増幅した (Perkin Elmer Model 480 thermocycler)。PCR 産物 (10 μ l) は 3% アガロースゲル電気泳動後、ethidium bromide (0.5 μ g/ml) 染色し、ポラロイドフィルム 667 記録を、512 x 512-pixel gray-scale images でデジタル化した。

結 果

1. 臨床症状と検査所見 (Table 3)

SSc-PM 群の MMT score (9 例: 16.0 \pm 3.1 点) は SSc-SM 群 (8 例: 21.8 \pm 1.8 点) より有意 ($p < 0.01$) に低く (Fig. 1)、両群とも近位優位に筋力は低下していた。血清 CK 値は SSc-PM 群が有意に高く (SSc-SM 群:

Table 1. Anti-human mouse monoclonal antibodies for the immunohistochemical analysis

Antibody	Clone	Manufacturer
IgG CD4	MT310	Dako
IgG CD8	DK25	Dako
IgG CD28	L293	Becton Dickinson
IgG CD74	M-B741	Pharmingen
IgM CD80 (BB-1)	BB-1	Pharmingen
IgG CD80	L307.4	Pharmingen
IgG CD86	BU63	Ancell
IgG CD152 (CTLA-4)	BNI3	Pharmingen
IgG CD163	Ber-MAC3	Dako
IgG B	L26	Dako
IgG HLA-ABC	W6/32	Dako
IgG HLA-DR	DK22	Dako

Table 2. Sequences of primer sets

		Nucleotides	Fragment length (bp)
CTLA-4	sense	AGTATGCATCTCCAGGCAAAGC	316
	antisense	CCAGAGGAGGAAGTCAGAAATCTG	
CD28	sense	GTTTGAGTGCCTTGATCATGTGC	238
	antisense	GCGCATCTGCTTCACCAAATC	
GAPDH	sense	TGAAGGTCGAGTCAACGGATTTGG	398
	antisense	GTTACACCCATGACGAACATGG	

Table 3. Characteristics of the patients of systemic sclerosis with muscle involvement

	patient	age/sex	MMT score	CK(IU/l)	ANA	EMG		steroid response
						myogenic change	denervation potential	
SSc-SM	1	14/F	20	89	1280	+	-	effective(low dose)
	2	34/F	20	118	10240	+	-	effective(low dose)
	3	22/F	23	203	2560	+	-	n.d.
	4	53/M	23	215	2560	+	-	n.d.
	5	82/F	19	452	10240	+	-	n.d.
	6	43/M	23	737	2560	+	-	effective(low dose)
	7	51/F	24	857	160	+	-	n.d.
	8	41/F	22	880	20480	+	-	n.d.
SSc-PM	9	38/F	20	398	5120	++	+	effective(high dose)
	10	42/F	19	508	5120	++	+	effective(high dose)
	11	73/F	11	1054	40960	+++	++	effective(high dose)
	12	50/F	12	1151	10240	++	++	effective(high dose)
	13	25/F	15	1862	2560	++	+	effective(high dose)
	14	44/F	16	2529	40960	++	++	effective(high dose)
	15	76/M	18	2535	10240	++	++	effective(high dose)
	16	62/F	15	2921	2560	++	+++	effective(high dose)
	17	63/F	18	3816	10240	+++	++	effective(high dose)

ANA : antinuclear antibody

n.d : not done

low dose : less than 0.5 mg/kg/day

high dose : more than 1 mg/kg/day

444±336 IU/l, SSc-PM 群 : 1864±1171 IU/l, $p<0.01$) (Fig. 2), 血中抗核抗体は全例で陽性であった. SSc-PM 群全例(9例)において筋電図検査では上下肢に低振幅,

短持続の電位を示す筋原性変化を, 安静時には陽性鋭波や線維束攣縮などの脱神経電位を認めた. 筋症状は, SSc-SM 群は5例(63%)が安静のみで, 残り3例(37%)は短期間の低用量ステロイド剤(0.5 mg/kg/day 以下)が著効を示した. SSc-PM 群では, 全例に長期間の高用量(1 mg/kg/day 以上)のステロイド剤を投与し, 筋力低下に対して有効であった. 合併症として, 間質性肺炎がSSc-SM 群1例(13% : 症例8)とSSc-PM 群4例(44% : 症例12, 14, 16, 17)で認められたが, 強皮症腎や強皮症心はみられず, 今回の症例は骨格筋病変が主体であった.

2. 病理学的検討

1) 組織化学的検討

SSc-SM 全例において, 筋束内および筋束周囲に細胞浸潤はなく, 壊死・再生線維もほとんどみられない. SSc-PM 9例全例で, 血管周囲, perimysium および endomysium にリンパ球が浸潤し, 筋束内や筋束周囲に壊死・再生線維が散在性にみられ, perifascicular atrophy は9例中6例(67%)に認めた. SSc-SM とSSc-PM のいずれの群でも小角化線維や群集萎縮などの神経原性変化, また rimmed vacuoles や ragged red fiber はなかった.

2) 免疫組織化学的検討

(1) 浸潤リンパ球サブセット解析

SSc-PM では, 血管周囲に主にリンパ球は浸潤し, 同部位でのリンパ球のCD4+/CD8+ T細胞比はSSc-PM がPM より高かった(Table 4). さらにリンパ球は, perimysium や endomysium にも浸潤し, 血管周囲と同様にCD4+ T細胞が優位に浸潤していた(Fig. 3). PM では, endomysium でCD8+ T細胞が優位に浸潤していた. 他疾患コントロールではリンパ球は認めなかった.

(2) B7 ファミリー分子

SSc-PM において, BB-1 はMHC class II 陽性の非壊死筋線維で発現し(Fig. 4), B7-1 および B7-2 はともに陰性であった. BB-1 の発現は, PM ではMHC class I 陽性の筋線維でみられた(Fig. 5). CD74 はリンパ球表面で強度陽性, 筋線維では陰性であった(Fig. 6).

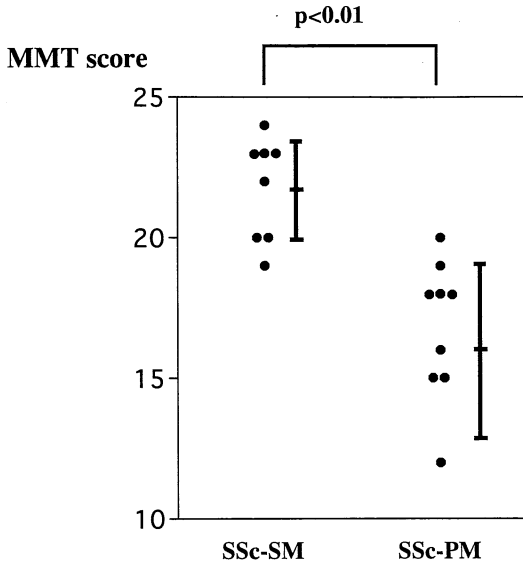


Fig. 1. MMT score

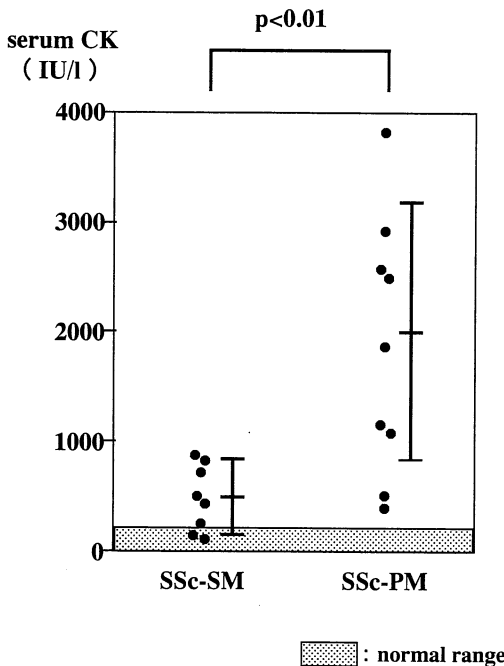


Fig. 2. Serum CK levels.

Table 4. CD4+/CD8+ ratios at perivascular sites

	CD4+/CD8+ ratios at perivascular sites	
Sugie (2000)	SSc-PM	1.82±0.53
	PM	1.16±0.73
Arahata & Engel ²⁰⁾ (1984)	PM	1.22±1.14
	IBM	0.55±0.13

IBM : Inclusion body myositis

(3) B7ファミリー分子の受容体

SSc-PMの非壊死筋線維を取り囲むリンパ球は、CD4+ T細胞が主体であり、CD8+ T細胞やマクロファージ(CD163)はごく少数でB細胞はほとんど認めなかった。また、周囲にリンパ球が浸潤している筋線維はMHCclass II陽性であった。さらに、SSc-PMのBB-1

陽性筋線維周囲のT細胞は、BB-1の受容体であるCD28またはCTLA-4を発現していた(Fig. 4)。浸潤リンパ球の検討で、CD28あるいはCTLA-4陽性細胞のほとんどが、CD4+ T細胞であった(Fig. 4)。

一方、PMでは、BB-1陽性の非壊死筋線維はMHC class I陽性で、その周囲に浸潤するCD8+ T細胞が

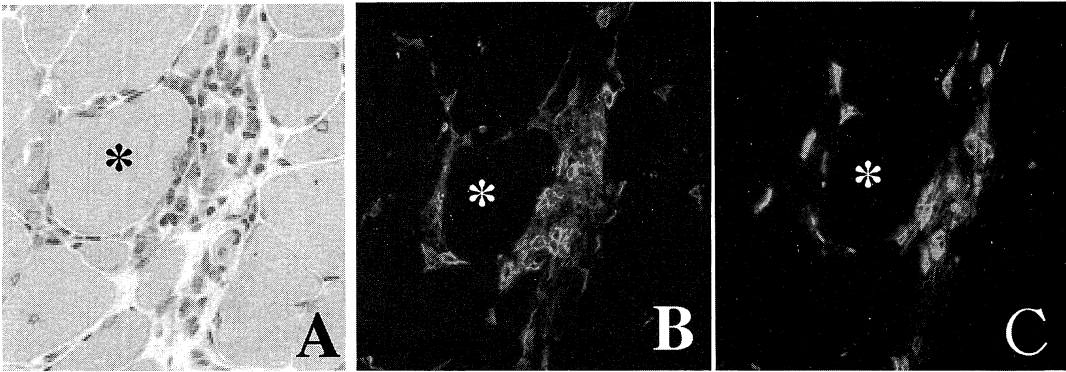


Fig. 3. Transverse serial frozen sections of a muscle biopsy specimen from a patient with SSc-PM, stained with Hematoxylin and Eosin (A) and with monoclonal antibodies against CD4 (B) and CD8 (C). The autoinvasive lymphocytes invaded nonnecrotic(*) fibers (A) are dominantly CD4+ T cells more than CD8+ T cells. Original magnification, $\times 400$.

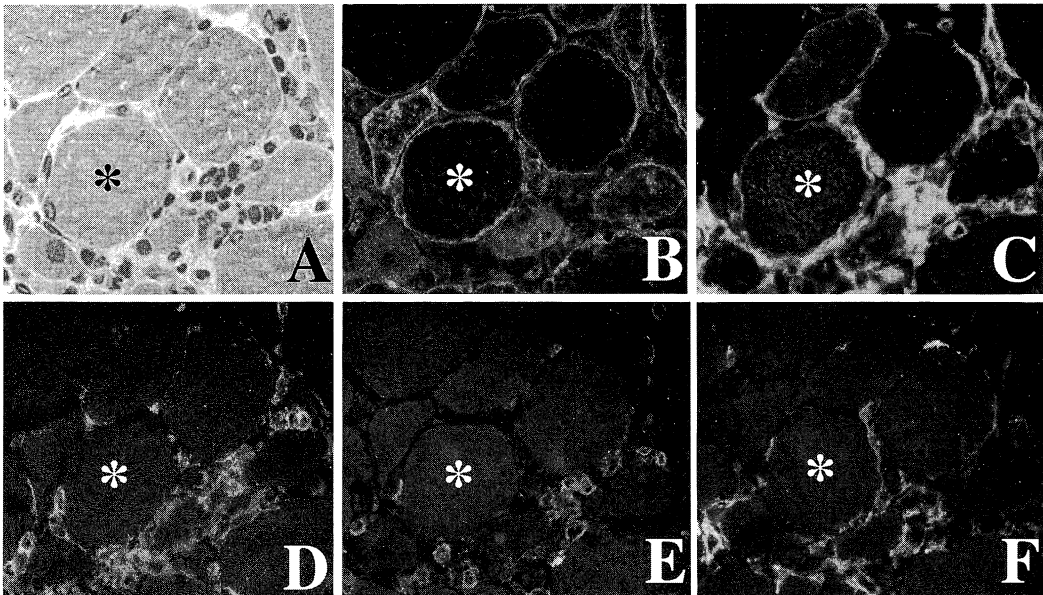


Fig. 4. Transverse serial frozen sections of a muscle biopsy specimen from a patient with SSc-PM, stained with Hematoxylin and Eosin (A) and with monoclonal antibodies against BB-1 (B), MHC class II antigen (C), CD4 (D), CD28 (E), and CTLA-4(F). The nonnecrotic(*) fibers (A) invaded by CD4+ T cells (D) express MHC class II antigen (C) and BB-1 (B). Many of the autoinvasive cells express CD28 (E) or CTLA-4 (F). Original magnification, $\times 400$.

CD28 あるいは CTLA-4 を発現していた (Fig. 5). DMD と他疾患コントロールでは, CD28, CTLA-4 は認めなかった.

3. RT-PCR 法 (Fig. 7)

生検筋からの mRNA の発現は症例により程度の差はあるものの, CD28, CTLA-4 とも, SSc-PM の患者でのみ増幅が確認され, 他疾患コントロールでは増幅されなかった.

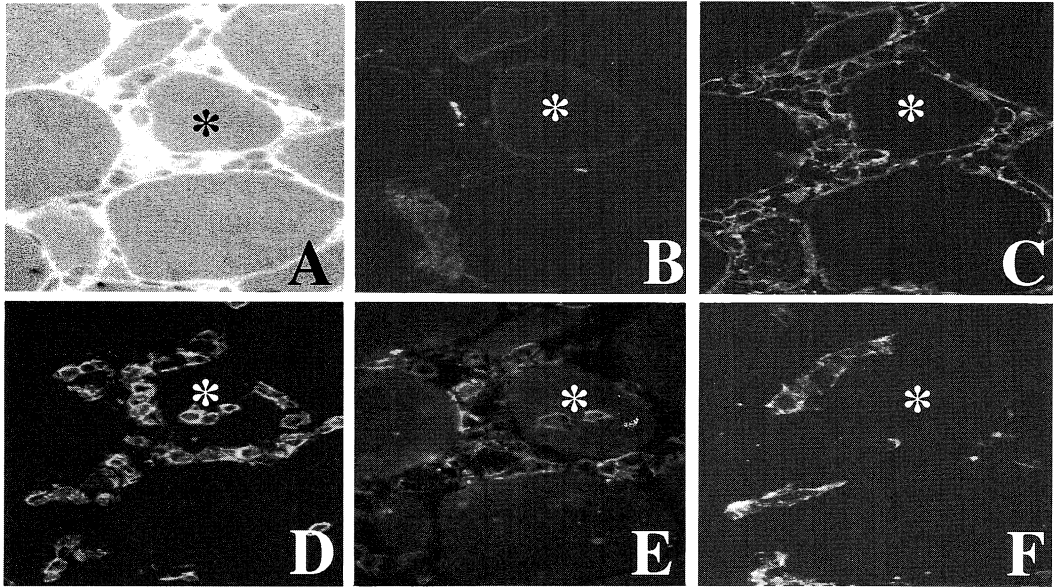


Fig. 5. Transverse serial frozen sections of a muscle biopsy specimen from a patient with PM, stained with Hematoxylin and Eosin (A) and with monoclonal antibodies against BB-1 (B), MHC class I antigen (C), CD8 (D), CD28 (E), and CTLA-4(F). The nonnecrotic(*) fibers (A) invaded by CD8+ T cells (D) express MHC class I antigen (C) and BB-1 (B). Many of the autoinvasive cells express CD28 (E) or CTLA-4 (F). Original magnification, $\times 400$.

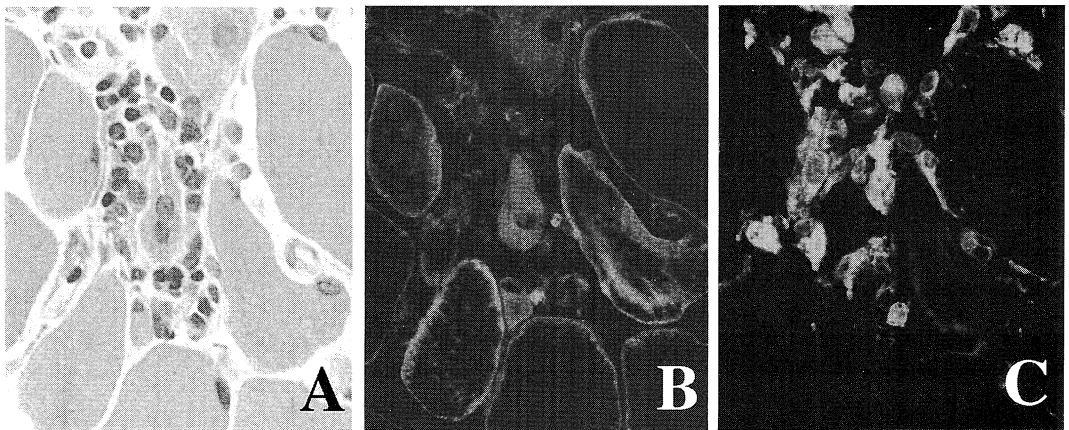


Fig. 6. Transverse serial frozen sections of a muscle biopsy specimen from a patient with SSc-PM, stained with Hematoxylin and Eosin (A) and with monoclonal antibodies against BB-1 (B) and CD74 (C). Note that BB-1 is expressed only on the muscle fibers but not on the surrounding lymphoid cells. CD74 (C) expression is detected on the surface of some autoinvasive lymphocytes. Original magnification, $\times 400$.

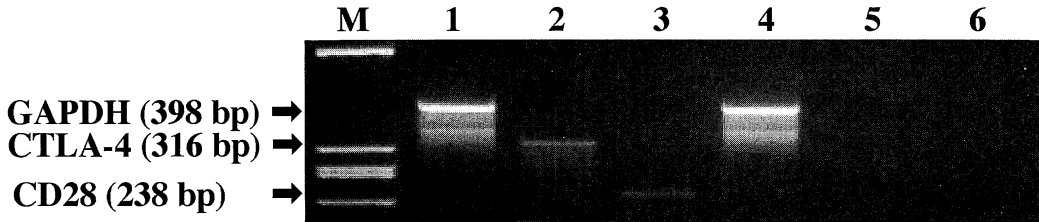


Fig. 7. RT-PCR analysis of mRNA for CTLA-4 (316bp), CD28 (238bp), and control enzyme GAPDH (398bp) in the muscle biopsies of patients with SSc-PM (lanes 1~3) and controls (lanes 4~6). M indicates the size marker. Strong GAPDH and CTLA-4 mRNA expression and weak CD28 mRNA expression is seen in SSc-PM. Neither CTLA-4 nor CD28 mRNA expression was amplified in the normal control specimens.

考 察

筋症状を有するSScは病理学的にSSc-SMとSSc-PMに区別され、SSc-SM群の筋障害は、臨床的、電気生理学および病理学的検討のいずれによってもSSc-PM群の筋障害より明らかに軽微であった。したがって、SSc-SM群は症例によっては積極的な治療を必要とせず看過されることもある。筋組織内に免疫異常を示唆する細胞浸潤が乏しいことから、筋障害の発症機序としては筋線維の1次的な炎症によるものではなく、虚血や結合織異常などによる2次的変化による可能性も推察される。一方、SSc-PM群は、臨床的にも電気生理学的にも中等度以上の筋原性変化を呈し、病理学的にはいわゆる炎症性ミオパチーであることから、通常の組織化学染色のみではPMとの鑑別が困難なことも多い。PMの筋障害については浸潤細胞、接着因子、浸潤T細胞受容体などの解析が精力的におこなわれてきたが²⁰⁻²⁴⁾、特発性の炎症性ミオパチーであるPMと、SScにともなうSSc-PMとは発症機序が異なることは十分予測される。

SSc-PM自験例では、血管周囲およびendomysiumに浸潤しているT細胞はCD8+よりCD4+が主体であった。SSc-PMにおけるリンパ球浸潤については、血管周囲ではCD4+T細胞主体であるという報告が唯一であり²⁰⁾、endomysiumについての知見は得られていない。本研究のSSc-PMでは、細胞浸潤の主体は血管周囲であるものの、endomysiumでの細胞浸潤を認めることもあり、浸潤リンパ球はいずれの部位でもCD4+T細胞優位であった。これらはPMの浸潤リンパ球の発現様式とは異なる結果であり、両者の免疫機序の相違を反映しているものと考えられる。

本研究は、SSc-PMの非壊死筋線維におけるBB-1発

現を確認した最初の報告である。costimulatory分子であるB7ファミリーに属するBB-1は、その受容体と結合することで免疫応答に際し抗原提示に必須の役割を担う²⁵⁻²⁷⁾。BB-1の他に、B7ファミリーには、B7-1(CD80, B7)、B7-2(CD86, B70)が知られ、それらはBB-1と同様にCD28やCTLA-4という受容体を持つが、いずれも骨格筋での発現は認められていない。本研究では、SSc-PM筋線維でBB-1発現を確認したが、その確定にはいくつかの点で注意すべきである。1)BB-1とB7-1の異同については議論があるが、B7-1陰性細胞にBB-1が発現することから両者は異なる分子と考えられる^{28,29)}。2)BB-1とCD74は共通のエピトープを有し免疫学的類似性が報告されている²⁶⁾。しかし、今回の研究で用いた抗CD74抗体による検索ではT細胞は陽性、筋線維で陰性、抗BB-1抗体では筋線維で陽性、T細胞は陰性であった。この免疫染色の結果は、抗体の交差性によるものではなくBB-1が筋線維に特異的に発現していることを確定し、既報告¹¹⁾と一致する。3)BB-1は、他の筋疾患の再生筋線維でも発現していることが報告されているが¹¹⁾、それら筋線維においてはBB-1の受容体であるCD28やCTLA-4との共発現はなく、したがって筋線維はAPCとして機能しない。すなわち、SSc-PMの筋線維における、受容体発現をともなうBB-1発現とは病因論的意義も異なるものと考えられる。

本研究におけるSSc-PMでは、BB-1を発現している非壊死筋線維はMHC class II陽性で、さらにCD28あるいはCTLA-4を発現しているCD4+T細胞とcell to cell contactしていた。また、SSc-PMの生検筋のRT-PCRでも、SSc-PMではCD28とCTLA-4の特異的な発現を確認できた。これらの成績から、SSc-PMにおいては、筋線維がB7ファミリー分子およびMHCを発現

する APC として作用し、BB-1 の受容体が陽性の CD4 + T 細胞との相互作用により免疫応答が開始されると考えられる。一方、PM では、BB-1 陽性の筋線維の MHC が class I であり、この筋線維周囲の CD28 あるいは CTLA-4 陽性の T 細胞の多くが CD8+ である。したがって、PM の筋線維が APC である可能性が考えられるが、SSc-PM と PM では抗原提示の機序が異なることが示唆される。この相違が、SSc-PM と PM の発症基盤の相違によるものかは推測の域を出ないが、多少とも臨床像の差異に影響している可能性も考えられる。

以上より、SSc にともなう筋障害は、臨床的、電気生理学および病理学的検討から SSc-SM と SSc-PM に明瞭に区別できる。したがって、SSc は単一疾患ではなく、いくつかの病因、病態からなる syndrome と考えられる。本研究では、筋組織への細胞浸潤がみられる SSc-PM について、浸潤細胞の免疫学的性格、costimulatory 分子とその受容体の発現様式から、PM とは異なる機序によって筋線維が APC として作用する可能性を示した。

結 語

強皮症(SSc)にともなう筋障害は SSc-PM 群と SSc-SM 群に分類される。SSc-PM 群は、筋症状、血清 CK 値上昇、筋電図変化、生検筋のリンパ球浸潤において炎症性ミオパチーの特徴を有していたが、SSc-SM 群ではこれらすべてが軽微であった。

SSc-PM の免疫組織学的検討で、血管周囲、perimysium, endomysium で CD4 + T 細胞が優位に浸潤していることを確認した。筋線維に発現している costimulatory 分子は BB-1 に限られ、BB-1 陽性の非壊死筋線維には MHC class II が発現し、その周囲に CD4 + T 細胞が浸潤していた。この CD4 + T 細胞には BB-1 の受容体である CD28 および CTLA-4 陽性で、BB-1 陽性の筋線維と cell-to-cell contact を認めることから、筋線維が APC として作用することが考えられる。PM では、BB-1 陽性の筋線維の MHC が class I であり、この筋線維周囲を囲む CD28 あるいは CTLA-4 陽性の T 細胞が CD8 + 主体であることから、筋線維が APC として作用することは明らかであるが、抗原提示の機序は SSc-PM のそれとは異なることが考えられる。

本研究では、SSc-PM において筋線維が APC であること、しかし、その機序は PM における抗原提示とは異なることを示した。

本研究の一部は第 39 回日本神経学会総会(1998 年 5 月京都)、第 41 回日本神経学会総会(2000 年 5 月松本)に

おいて発表した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました奈良県立医科大学神経内科学教室上野聡教授に深甚なる謝意を捧げますとともに、研究の遂行に終始御指導いただきました同教室村田顕也講師に深謝致します。

文 献

- 1) Averbuch-Heller, L., Steiner, I. and Abramsky, O. : Neurologic manifestations of progressive systemic sclerosis. *Arch. Neurol.* **49** : 1292-1295, 1992.
- 2) Clements, P. J., Furst, D. E., Campion, D. S., Bohan, A., Harris, R., Levy, J. and Paulus, H. E. : Muscle disease in progressive systemic sclerosis : diagnostic and therapeutic considerations. *Arthritis Rheum.* **21** : 62-71, 1978.
- 3) Hietaharju, A., Jääskeläinen, S., Kalimo, H. and Hietarinta, M. : Peripheral neuromuscular manifestations in systemic sclerosis (scleroderma). *Muscle Nerve* **16** : 1204-1212, 1993.
- 4) Ringel, R. A., Brick, J. E., Brick, J. F., Gutmann, L. and Riggs, J. E. : Muscle involvement in the scleroderma syndromes. *Arch. Intern. Med.* **150** : 2550-2552, 1990.
- 5) Olsen, N. J., King, L. E. and Park, J. H. : Muscle abnormalities in scleroderma. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **22** : 783-796, 1996.
- 6) 杉江和馬, 村田顕也, 錫村明生, 高柳哲也, 宮川幸子 : 進行性全身性硬化症(PSS)に伴うミオパチーについての臨床病理学的検討. *臨床神経.* **39** : 236, 1998.
- 7) Mimori, T. : Scleroderma-polymyositis overlap syndrome. Clinical and serologic aspects. *Int. J. Dermatol.* **26** : 419-425, 1987.
- 8) Venables, P. J. : Polymyositis-associated overlap syndromes. *Br. J. Rheumatol.* **35** : 305-306, 1996.
- 9) Jablonska, S., Chorzelski, T. P., Blaszczyk, M., Jarzabek-Chorzelska, M., Kumar, V. and Beutner, E. H. : Scleroderma/polymyositis overlap syndromes and their immunologic markers. *Clin. Dermatol.* **10** : 457-472, 1992.
- 10) Jablonska, S. and Blaszczyk, M. : Scleromyositis : a scleroderma/polymyositis overlap

- syndrome. *Clin. Rheumatol.* **17** : 465-467, 1998.
- 11) **Murata, K. and Dalakas, M. C.** : Expression of the costimulatory molecule BB-1, the ligands CTLA-4 and CD28, and their mRNA in inflammatory myopathies. *Am. J. Pathol.* **155** : 453-460, 1999.
 - 12) **Reiser, H. and Stadecker, M. J.** : Costimulatory B7 molecules in the pathogenesis of infectious and autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.* **335** : 1369-1377, 1996.
 - 13) 石川英一 : 全身性硬化症(PSS)の改訂診断基準. *リウマチ.* **24** : 198-203, 1984.
 - 14) **Dalakas, M. C.** : Polymyositis, dermatomyositis and inclusion body myositis. *N. Eng. J. Med* **325** : 1487-1498, 1991.
 - 15) **Murata, K. and Dalakas, M. C.** : Expression of the co-stimulatory molecule BB-1, the ligands CTLA-4 and CD28 and their mRNAs in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain* **123** : 1660-1666, 2000.
 - 16) **Illa, I., Dinsmore, S. and Dalakas, M. C.** : Immune-mediated mechanisms and immune activation of fibroblasts in the pathogenesis of eosinophilia-myalgia syndrome induced by L-tryptophan. *Hum. Pathol.* **24** : 702-709, 1993.
 - 17) **Dariavach, P., Mattëi, M. G., Golstein, P. and Lefranc, M. P.** : Human Ig superfamily CTLA-4 gene : chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur. J. Immunol.* **18** : 1901-1905, 1988.
 - 18) **Lee, K. P., Taylor, C., Petryniak, B., Turka, L. A., June, C. H. and Thompson, C. B.** : The genomic organization of the CD28 gene implications for the regulation of CD28 mRNA expression and heterogeneity. *J. Immunol.* **145** : 344-352, 1990.
 - 19) **Ercolani, L., Florence, B., Denaro, M. and Alexander, M.** : Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* **263** : 15335-15341, 1988.
 - 20) **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 muscles fibers invaded by T cells. *Ann. Neurol.* **16** : 193-208, 1984.
 - 21) **Dalakas, M. C.** : Molecular immunology and genetics of inflammatory muscle diseases. *Arch. Neurol.* **55** : 1509-1512, 1998
 - 22) **Mantegazza, R., Andreetta, F., Bernasconi, P., Baggi, F., Oksenberg, J. R., Simoncini, O., Mora, M., Cornelio, F. and Steiman, L.** : Analysis of T cell repertoire of muscle-infiltrating T lymphocytes in polymyositis. *J. Clin. Invest.* **91** : 2880-2886, 1993
 - 23) **Tews, D. S. and Goebel, H. H.** : Expression of cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *J. Neuroimmunol.* **59** : 185-194, 1995
 - 24) **Lundberg, I., Brengman, J. M. and Engel, A. G.** : Analysis of cytokine expression in muscles in inflammatory myopathies, Duchenne dystrophy, and non-weak controls. *J. Neuroimmunol.* **63** : 9-16, 1995
 - 25) **Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Daley, J., Gray, G. and Nadler, L. M.** : Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 11059-11063, 1993.
 - 26) **Freeman, G. J., Cardoso, A. A., Boussiotis, V. A., Anumanthan, A., Groves, R. W., Kupper, T. S., Clark, E. A. and Nadler, L. M.** : The BB1 monoclonal antibody recognizes both cell surface CD74 (MHC class II-associated invariant chain) as well as B7-1 (CD80), resolving the question regarding a third CD28/CTLA-4 counterreceptor. *J. Immunol.* **161** : 2708-2715, 1998.
 - 27) **Behrens, L., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., Goebels, N., Wekerle, H. and Hohlfeld, R.** : Human muscle cells express a functional costimulatory molecule distinct from B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) in vitro and in inflammatory lesions. *J. Immunol.* **161** : 5943-5951, 1998.
 - 28) **Nickoloff, B. J., Mitra, R. S., Lee, K., Turka, L. A., Green, J., Thompson C. and Shimizu, Y.** : Discordant expression of CD28 ligands, BB-1, and B7 on keratinocytes in vitro and psoriatic cells in vivo. *Am. J. Pathol.* **142** : 1029-1040, 1993.

- 29) Simon, J. C., Dietrich, A., Mielke, V., Wuttig, C., Vanscheidt, W., Linsley, P. S., Schöpf, E. and Sterry, W. : Expression of the B7/BB1 activation antigen and its ligand CD28 in T-cell-mediated skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* **103** : 539-543, 1994.