

## 「自己貪食空胞性ミオパチーの診断基準作成に関する臨床的検討」

研究分担者 小牧 宏文 国立精神・神経センター病院小児神経科 医長

### 研究要旨

自己貪食空胞性ミオパチーの診断基準を作成するために、自己貪食空胞性ミオパチーの病型である、Danon病1例、X-linked myopathy with excessive autophagy (XMEA) 2例の臨床的、筋病理学的、遺伝学的解析を行った。臨床症状ではDanon病の一例で、心筋症、知的障害、肝障害、ブドウ膜炎などを呈し、XMEAで筋力低下、呼吸障害、著明な骨格変形などの特徴を示した。筋病理で autophagic vacuoles with unique sarcolemmal features (AVSFs)を呈するのが本症の特徴であり、臨床症状や筋生検以外の検査で自己貪食空胞性ミオパチーの診断は困難であり、筋生検は診断に必須であった。

### A. 研究目的

自己貪食空胞性ミオパチーの診断基準を作成するため、その基礎データを作成するために個々の症例の臨床・病理・遺伝学的解析を行い、それらの特徴について解析を行った。

### B. 研究方法

国立精神・神経センター病院小児神経科で経験した、自己貪食空胞性ミオパチー3例について、臨床症状、筋病理学的解析、遺伝学的解析を行い、それらの特徴について後方視的に検討した。

#### （倫理面への配慮）

本研究は後方視的検討で、それぞれ通常の診療の範囲内で行っている評価であるため、倫理委員会への申請は行わなかった。筋病理学的解析と遺伝学的解析については、国立精神・神経センター倫理委員会で認を受けている承諾書に代諾者の署名を得たうえで施行した。

### C. 研究結果

症例1：診断Danon病、13歳男児、6歳時に肥大型心筋症を指摘された。この時に高CK血症（1000～2000 U/L）、高トランスアミナーゼ血症（AST・ALT 200～300 U/L）を指摘された。知的障害、注意欠陥多動性障害のため特別支援学級での支援を受けていた。13歳視力低下が出現、ぶどう膜炎、左眼網膜剥離と診断された。ぶどう膜炎に対してステロイドの点眼

と内服を行ったところ、眼症状の改善とともにCK値も400台まで低下したが、ステロイドを中止するとブドウ膜炎が再燃するという経過を繰り返した。13歳時に当科で精査を行った。一般身体所見は軽度の下腿肥大を認めるほかは異常なし。神経学的所見では、軽度知的障害、左上方の視野狭窄、低緊張を認めた。血液・生化学的検査にて、AST 361 IU/L、ALT 279 IU/L、LD 971 IU/L、CK 20151 IU/L（CK-MB 1%、MM 99%）とそれぞれ高値を示した。炎症反応、自己抗体はすべて陰性であった。心電図で左軸偏位、心室内伝導障害、左室肥大パターンを示した。呼吸機能検査では異常は認めなかった。脳MRIでは脳萎縮や信号異常などはみられなかった。脳波では背景波は年齢相当で突発波も認めなかった。骨格筋CTでは筋の容量は正常で、低吸収域はみられなかった。骨格筋MRIでは腓腹筋などの下腿屈筋群に高信号域を認めた。脳誘発反応のうち視覚誘発電位、聴性脳幹反応、瞬目反射は正常所見であったが、体性感覚誘発電位では中枢伝導時間の延長を示した。全身麻酔下に上腕二頭筋より筋生検を行った。筋線維の径は30～80 μmと軽度の大小不同を認め、HE染色で好塩基性の小さい顆粒が集簇する筋線維が散在していた。強拡大で顆粒は空胞状の構造をしており、空胞壁はNSE、AChE染色陽性であり、autophagic vacuoles with unique sarcolemmal features (AVSFs)の所見を呈していた。LAMP-2遺伝子遺伝子解析を行ったところエクソン3に2塩基の欠失を認め、フレー

ムシフトを引き起こし終止コドンを生じるものであった。

症例 2 & 3 : XMEA(X-linked myopathy with excessive autophagy)の兄弟例、家族歴：血族結婚なし。父はアメリカ人、母は中国人。母は 6 人兄弟でそのうち男性は 3 名。その全員が新生児肺炎と嚥下障害のため生後 2 週間で死亡。母方祖母は 5 人兄弟でそのうち男性は 3 名。うち 2 名が新生児肺炎と嚥下障害のため生後 2 週間で死亡。

症例 2 : 16 歳男性。病歴：胎児期より胎動は少なかった。在胎 39 週経膈分娩にて出生。生後 1 時間でチアノーゼあり、低緊張、哺乳障害を認めた。出生直後の CK は 2000 程度。経管栄養管理を要した。1 歳 2 ヶ月より経口摂取が可能となり、1 歳 9 ヶ月には数歩歩行できるようになった。2 歳~3 歳頃より下腿・足の変形が目立つようになった。5 歳、歩行不可能となった。10 歳まで頻回に肺炎を繰り返していた。10 歳時に右上腕骨折、11 歳時に右足首骨折。12 歳頃より側弯や股関節・膝関節の拘縮が進行、声が小さくなった。14 歳夜間非侵襲的換気療法導入。嚥下造影にて誤嚥と嚥下障害を認めた。

現症：身長 164cm、体重 20kg、頭囲 53cm、漏斗胸あり、右に凸の高度の側弯あり。いざり移動は数歩可能、寝返りは不能、坐位・臥位とも股関節は 180 度屈曲して体育座りの姿勢となる。筋緊張は著明に低下しており、筋力は近位筋優位に低下していた。肘関節伸展、股関節伸展、膝関節伸展、足関節背屈制限を認めた。深部腱反射は消失していた。病的反射は認めず。小脳症状・不随意運動・自律神経症状は認めなかった。

検査所見：血算・一般生化学・尿検査では異常なし。骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) 93.0 U/L (男性基準値 13.0-33.9), NTX 68.4 nmolBCE/L (男性正常値 9.5-17.7)。全身レントゲン Cobb 角 95° の側弯を認めた。長管骨は非常に細くかつ彎曲していたが、骨透瞭および硬化については明らかでなかった。足の第 1 中節骨の彎曲が目立った。骨格筋 CT：上下肢ともに骨格筋は著明に萎縮しており、脂肪変性が目立つ。傍脊柱筋の低信号も目立っていた。骨密度検査 (腰椎正面) BMD 0.392 g/cm<sup>2</sup>, 健常若年層と比較した値は 37%

と低値を示した。心電図異常なし、心エコー異常所見なし。聴性脳幹反応異常所見なし。

症例 3 : 14 歳男児、症例 2 の弟、病歴：病歴：在胎 7 か月から胎動低下あり。在胎 38 週、出生時体重 3664g、経膈分娩で仮死なく出生。生後 2 時間で人工呼吸器管理となった。CK2352 と高値だった。生後 3 日目で抜管し、経管栄養を開始。口腔内の唾液貯留と SpO<sub>2</sub> 低下を繰り返し、頻回に吸引を要した。1 歳 3 か月時に SpO<sub>2</sub> 低下があり、肺高血圧を認めた。の所見があり在宅酸素療法を開始した。2 歳には肺高血圧消失し酸素療法中止。以降つたい歩きが可能になった。2 歳で経口摂取が可能になった。2 歳過ぎから次第に筋力低下した。3 歳、肺炎で気管内挿管を一時施行。6 歳、起立不能となった。12 歳、慢性呼吸不全を認め、夜間非侵襲的換気療法導入。側弯・前弯が進み長時間座位が難しくなった。13 歳、感冒時粘稠痰が詰まって一時気管内挿管。14 歳、物をとろうとして左上腕を骨折した。

現症：身長 168cm、体重 24kg、頭囲 55cm、ミオパチー顔貌、高口蓋あり。四肢：上下肢とも細く、両側肘・手・股・膝・足関節拘縮あり。咽頭反射弱く、唾液貯留あり、いざり移動は 5m 程度可能、仰臥位可能、座位では股・膝関節をほぼ 180° 近くまで屈曲し体育座りの状態、両上肢は肩までは挙がらない。筋緊張低下が著明。筋力は近位優位に低下していた。深部腱反射は消失、病的反射はなし、小脳症状、不随意運動、自律神経症状なし。

検査所見：血算・一般生化学・尿検査では CK 619IU/l、と軽度高値を示すほか異常なし。BAP 114 U/l, NTX 80.0 nmolBCE/l 以上。全身レントゲン Cobb 角 46° の側弯を認めた。長管骨は非常に細くかつ彎曲していたが、骨透瞭および硬化については明らかでなかった。骨格筋 CT：頸部筋群、両上肢帯筋群、傍脊柱筋群の筋量減少、脂肪化が著明、両上下肢も筋量少なく、脂肪化が目立つ。骨密度 (腰椎正面) BMD 0.367 g/cm<sup>2</sup>, 健常若年層と比較した値は 35%、心電図：洞性不整脈、不完全右脚ブロックあり、心エコー異常所見なし。聴性誘発電位：左右ともに波形の形成は良好で潜時も正常範囲。胃内 24 時間 pH モニタリング：食事摂取時以外はほぼ pH 0.5-2 を推移し、pH >4 が全体の 80% で正常所見を示した。

筋病理所見 (症例 3 : 7 歳時)

著明な筋線維の大小不同あり、肥大線維を認める、intracytoplasmic vacuoles を含有する筋線維が散在、壊死・再生線維が軽度みられる、endomysial fibrosis あり、中心核をもつ筋線維あり。Type2 線維の萎縮を認める。Acid phosphatase: 空胞は強陽性。NSE/AChE: 細胞質内空胞の膜が染色された。AChE: 空胞膜で AChE 活性が見られた。Dystrophin 染色: ほとんどの空胞膜で dystrophin 陽性。酸フォスファターゼ染色: 空胞内は自己貪食のため、酸フォスファターゼの高活性を有した。LAMP-2 染色: 筋線維の表面膜と細胞質内でリソソーム膜蛋白である LAMP-2 陽性。LIMP-1/CD63 染色: 筋細胞膜と細胞質内に LIMP-1/CD63 (リソソーム膜蛋白) が強陽性に染色された。LC3 染色: 細胞質内に LC3 (自己貪食に関与する蛋白) が一部顆粒状に存在していた。C5b-9 染色: ほとんどの筋線維に筋細胞膜に補体の沈着物である MAC(membrane attack complex C5b-9) の沈着を認めた。Alizarin red 染色: 筋細胞膜と細胞質内にカルシウム沈着を認めた。電顕所見: 筋細胞膜下や多層性の基底膜間に一層の膜に囲まれた高密度の球体と無構造顆粒が多数みられる。球体は一部二層性の膜をもつ。空胞の一部は筋細胞膜と癒合している。病理像のまとめ: 筋と筋線維鞘下に多数の自己貪食空胞 (autophagic vacuoles with sarcolemmal features : AVSF) が認められた。空胞膜にはほぼすべての筋鞘膜蛋白質が発現しており、かつ通常は神経筋接合部にしか認められないアセチルコリンエステラーゼ活性を有する特徴がある。また、筋鞘膜部の基底核が多層化し、層間にも自己貪食空胞内と同様の各種分解産物が存在するという基底核の異常があること、また C5b-9、カルシウム沈着を認めること、Danon 病でみられる LAMP-2 欠損を認めないことから XMEA と診断した。

遺伝子解析: *LOC203547* の intron 2 c. 164-6T>G の変異を認めた。この変異は既報告例の変異部位とは 1 塩基のみずれるものであった。なぜ本児の家系がこれまでの報告と異なり重症であるのか、その理由については不明であるが、変異部位の相違に起因する可能性もある。

#### D. 考察

Danon 病: 肥大型心筋症、高CK血症、知的障害、ぶどう膜炎を示した児である。筋病理での autophagic vacuoles with unique sarcolemmal features (AVSFs) の所見を認め、Danon 病や XMEA などの自己貪食空胞性ミオパチーで認める所見に一致した。LAMP-2 ノックアウトマウスでは、骨格筋・心筋に加えて肝・腎・脾・小腸・胸腺と幅広い発現がある。これまでに眼症状に関する報告はなかったが、最近になって Danon 病と retinopathy の合併例が報告された。Schorderet らは retinopathy を合併した Danon 病 3 例 (2 人の兄弟と母方叔母) を報告した。全例で視力低下と視野狭窄を認め、眼底所見では、全例で黄斑部の色素変性とびまん性の salt-and-pepper appearance を示していた。その中で、脈絡膜に比べて網膜での LAMP-2 の発現が低下している記載、本症例でみられたぶどう膜炎と Danon 病との関連性が示唆された。ただしステロイド投与で CK 値が減少した点はいままでに報告はない。Danon 病に免疫学的な病態が関与する可能性が示唆された。

XMEA: 2009 年に XMEA の原因遺伝子として *LOC203547* 遺伝子 (VMA21 遺伝子) が同定され、XMEA は本遺伝子の hypomorphic alleles に起因して発症することがわかった。本研究により日本で初めて VMA21 変異による XMEA を同定した。この遺伝子は VMA21 蛋白という V-ATPase のシャペロンをコードしており、本遺伝子の変異により VMA21 の mRNA が減少することが XMEA 発症の主因と考えられている。

V-ATPase は酸を分泌する細胞の形質膜にのみ偏在するプロトンポンプである。全身に存在するが、特に精巣や精管、腎、破骨細胞、膀胱、内耳細胞などの特定の細胞に多く分布する。13 のサブユニットからなり、それぞれ V0 セクターと V1 セクターの 2 つのセクターを構成している。これらのサブユニットには複数のアイソフォームを持つものがあり、それぞれのアイソフォームは特定の組織や細胞に特異的であるという特徴を持つ。VMA21 蛋白は、V-ATPase の V0 セクターの形成に必須な、小胞体膜アセンブリー因子で、V-ATPase の複合体を形成するための鍵となる物質である。

VMA21 遺伝子の変異→VMA21 の mRNA が減少→V-ATPase のアセンブリー不全→V-ATPase の

活性が低下→ライソゾーム内の酸分泌も低下→ライソゾーム内の pH が上昇→蛋白分解の活性が低下→アミノ酸のリサイクルが減少→細胞内のアミノ酸プールが減少→mTOR 経路を不活化(\*mTOR:細胞増殖を調整する情報伝達因子(蛋白キナーゼ))→過剰な自己食を惹起→形成された autophagosome は分解されないため、細胞内に蓄積していくことが病態として考えられる。

V-ATPase 活性の低下に起因する臨床症状の可能性について:本疾患が V-ATPase の機能低下に起因するのであれば、V-ATPase を発現する他の臓器にも何らかの症状がみられる可能性があるため、今回検索をおこなった。

V-ATPase は骨代謝にも関与しており、破骨細胞にある V-ATPase により酸が放出されることで、骨ミネラルが分解される。破骨細胞の V-ATPase の異常により骨吸収が正常に行われなくなると、異常な骨硬化が起こり、もろく折れやすい骨が形成され、大理石病を呈するようになることがわかっている。XMEA の原因が V-ATPase の機能低下に起因するのであれば、同様の骨病変を合併する可能性がある。

症例は両者とも幼児期より進行する著明な骨変形と関節拘縮があり、これまでに複数回の骨折の既往がある。単純骨 Xp では長管骨の菲薄化と弯曲が目立つが、大理石病を示唆するような骨硬化像は認めなかった。骨密度検査では骨密度の著明な低下を認め、これらの異常所見は、廃用性の骨萎縮で説明可能と考える。骨代謝マーカーは骨形成のマーカーである BAP、骨吸収のマーカーである NTX の両者とも著明に上昇しており、骨代謝回転の異常な亢進が示唆される。この異常な骨代謝亢進が原疾患と関連している可能性もある。

胃液や尿などの pH 測定、および内耳機能についても検索を行ったが、いずれも異常は認めなかった。また、V-ATPase 活性の低下により mTOR 経路が不活化されるため、耐糖能異常などが生じる可能性を考え検索を行ったが、こちらも正常であった。

V-ATPase は全身に存在するプロトンポンプであるが、そのサブユニットのアイソフォームには臓器特異性があることが知られている。VMA21 蛋白はこのうち c” サブユニットに作用すると考えられているが、このサブユニットには臓器特異性は認めていない。そもそもなぜ XMEA では筋のみが特異的に侵されるが、その

理由についてもはっきりわかっていない。XMEA の患者の V-ATPase 活性は、筋とその他の細胞とで差は認めておらず、少なくとも筋に特異的に V-ATPase 活性が低下することが原因ではないようである。

本児らの病態が V-ATPase の機能低下に起因することが判明したことで、本症例は XMEA 例中では重症であるが、彼らがなぜ既報告例と異なる、より重症な臨床型を示すのか、今後とも検討が必要である。

## E. 結論

筋病理で autophagic vacuoles with unique sarcolemmal features (AVSFs) を呈するのが本症の特徴であり、臨床症状や筋生検以外の検査で自己食空胞性ミオパチーの診断は困難であり、筋生検は診断に必須であった。希少疾病の中でも特に頻度の低い自己食空胞性ミオパチーは一例毎の遺伝子型表現型の関連を検討することは意義があり、今後も検討を進めていく。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

「成人型自己貪食空胞性ミオパチー症例における臨床的・病理学的研究」

研究分担者 金田 大太 大阪赤十字病院神経内科 医師  
研究協力者 新宅 雅之 大阪赤十字病院病理部 部長  
西野 一三 国立精神・神経センター疾病研究第一部部長

**研究要旨**

成人型自己貪食空胞性ミオパチー症例について、臨床的・病理学的検討を行った。臨床的には、網膜色素変性症の後、労作時筋痛を伴う体幹筋・骨格筋優位のミオパチーと心筋症が前景に立った。腎障害は軽度で、胸膜肥厚と呼吸筋麻痺両者からなる呼吸不全と心不全により死亡した。中枢神経症状は生前明らかではなかった。病理学的には、著明な心筋症と胸膜・肝脾臓皮膜の肥厚と癒着、腎皮質の萎縮を認めた。死後筋病理では、横隔膜・下肢遠位筋に神経原性変化の混在を認めた。中枢神経では黒質ドーパミン細胞の著明な脱色素所見を認めた。この所見は、類縁疾患であるDanon病において認められる精神遅滞に、ドーパミン系の障害が関与する可能性を示唆する。

**A. 研究目的**

特異な筋鞘膜の性質を有する自己貪食空胞 (AVSF) の出現を特徴とする自己貪食空胞性ミオパチーには、LAMP-2欠損によるDanon病、VMA21変異による過剰自己貪食を伴うX連鎖性ミオパチー (XMEA) が原因遺伝子として知られているが、その他に乳児型・成人型が報告されている。

本研究は、成人型症例についての臨床像、並びに病理学的解析を行い、AVSFを伴う自己貪食空胞性ミオパチーの臨床像の理解の一助とすると共に、診断基準の確立に寄与するものである。

**B. 研究方法**

研究対象は、以前我々が報告した成人発症・多臓器にわたる障害を示した自己貪食性空胞ミオパチー症例 (Neurology. 2003 Jul 8;61(1):128-31) とした。臨床的解析に加え、死後の病理解剖にて得られた、網膜を除く各臓器につき、病理学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

剖検ならびにその研究的使用に関しては、臨床研究に関する倫理指針および当該研究施設で定めた倫理規定を遵守して、同施設倫理委員会で承認された説明書を用いて、生検筋ならび各臓器の研究利用について十分な説明の上、所定の同意書に家族からの署名をして頂いた。

**C. 研究結果**

<臨床所見>

症例は享年48歳男性。23歳よりCKの上昇を指摘され25歳時に、視力低下。網膜色素変性症の診断を受けている。34歳時より、下肢筋痛が出現、38歳より筋力低下が進行、40歳には労作時呼吸困難が出現し、41歳初診。近位筋・体幹筋の筋萎縮に加え、網膜色素変性症、心筋症、肺線維症、肝被膜肥厚を合併した。

筋生検上、autophagic vacuoleが多数認められ、リンパ球のacid maltase活性は正常。空胞壁はNSE, AChE活性を有し、免疫染色にてメロシン、ジストロフィンなどの筋鞘膜特異蛋白の存在が認められた。

46歳から心不全の増悪、47歳からNPPV 導入、48歳で呼吸不全・心不全にて死亡。経過中、明らかな中枢神経症状は認められなかった。

全身の剖検所見では、著明な心筋症と胸膜・肝脾臓被膜の著明な繊維性肥厚と癒着、腎皮質の萎縮を認めた。死後筋病理では呼吸筋・下肢遠位筋に神経原性変化の混在を認め、下位運動ニューロン障害が示唆された。中枢神経病理は、脳重1,560g。肉眼的に黒質に限局し著明な脱色素を認めた。鏡検上黒質・青斑核の神経メラニンの明らかな減少と軽度の神経脱落・軽度びまん性のastrocytosisを認めるが、 $\alpha$ -synuclein陽性の構造物は明らかではない。下オリブ核にも軽度の神経細胞脱落。残存神経細胞にはlipofuscin沈着が強い。大脳皮質では側頭葉皮質に軽度のAlzheimer神経原線維変化を認め、脊髄前角細胞に軽度の神経細胞脱落とgliosisを認めた。

#### D. 考察

当症例における黒質の変化は、Danon病における精神遅滞とドーパミン系の異常の関与を示唆する可能性がある。リソソーム機能異常はパーキンソン病やアルツハイマー病の発症要因としても注目されており、その病態に係る知見を得られる可能性を有し、さらなる検討を必要とする。

#### E. 結論

成人発症型自己貪食性空胞ミオパチーにおいて、臨床的には網膜色素変性症、心筋症、胸膜癒着による拘束性換気障害、ミオパチーが認められた。临床上、中枢神経所見は明らかではなかったが、病理学的には黒質の顕著な変性を認めた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 金田大太、加藤智信、新宅雅之、西野一三. 黒質変性を特徴とした autophagic vacuolar myopathy の一部検例. 第37回臨床神経病理懇話会、2009年11月7日、姫路。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

### Ⅲ. 自己貪食空胞性ミオパチーの診断基準

1. Danon病 診断基準
2. 過剰自己貪食を伴うX連鎖性ミオパチー 診断基準  
(XMEA)
3. その他の自己貪食空胞性ミオパチー 診断基準

## 1. Danon 病 診断基準

(MIM# 300257, Danon disease, LAMP-2 deficiency)

### ● 診断に有用な特徴

#### A. 臨床的特徴 (男性は a,b 必須、女性は a 必須、c-g は参考所見)

- a. 肥大型または拡張型心筋症
- b. 進行性の筋力低下および筋萎縮

(以下は参考所見)

- c. X連鎖性優性遺伝または孤発性
- d. 発症年齢は、男性は 10 歳代から、女性は 30 歳代からが多い
- e. 知的遅滞を伴うことが多い。
- f. 血清 CK 値は、正常から軽度高値 (1,000IU/L 以下)
- g. 針筋電図で筋原性変化 (fibrillation potential や高振幅 MUP) が認められることがある

#### B. 筋生検所見 (a,b は必須、c,d は参考所見)

- a. 自己貪食空胞を伴う筋線維
- b. 空胞膜上でのアセチルコリンエステラーゼ活性  
(骨格筋での組織化学染色)

(以下は参考所見)

- c. 空胞膜上での筋鞘膜蛋白 (ジストロフィン、サルコグリカン、ラミニン  $\alpha$  2、カベオリン-3 など) 発現  
(骨格筋での免疫組織化学染色)
- d. (電子顕微鏡にて) 自己貪食空胞周囲の基底膜の存在

#### C. LAMP-2 の評価 (a または b)

- a. LAMP-2 欠損 (免疫組織化学染色またはウェスタンブロット解析)
- b. *LAMP-2* 遺伝子変異

### ● 除外すべき疾患

臨床的鑑別

- ・他のミオパチーや筋ジストロフィーなどの筋疾患
- ・神経原性疾患

病理学的鑑別

- ・自己貪食空胞を来す他のミオパチー

### ● 診断カテゴリー

確実例 A または B の少なくとも一方を満たし、かつ C を満たすもの

疑い例 A+B を満たすもの

## 2. 過剰自己貪食を伴うX連鎖性ミオパチー 診断基準

(MIM# 310440, X-linked Myopathy with excessive autophagy: XMEA)

### ● 診断に有用な特徴

#### A. 臨床的特徴 (aは必須、b-fは参考所見)

- a. 緩徐進行性の筋力低下および筋萎縮  
(以下は参考所見)
- b. X連鎖性遺伝または孤発性
- c. 発症は幼児期
- d. 心筋障害や知能低下は伴わない
- e. 血清 CK 値は、正常から中等度高値(1,500IU/L 以下)
- f. 針筋電図で筋原性変化(fibrillation potential や高振幅 MUP)が認められることがある

#### B. 筋生検所見 (a,bは必須、c-fは参考所見)

- a. 自己貪食空胞を伴う筋線維
- b. 空胞膜上でのアセチルコリンエステラーゼ活性の上昇 (骨格筋での組織化学染色)  
(以下は参考所見)
- c. 空胞膜上での筋鞘膜蛋白(ジストロフィン、サルコグリカン、ラミニン $\alpha$ 2、カベオリン-3 など)発現  
(骨格筋での免疫組織化学染色)
- d. 筋鞘膜への補体 C5b-9 の沈着 (骨格筋での免疫組織化学染色)
- e. 筋線維の基底膜の重層化 (電子顕微鏡)
- f. 自己貪食空胞膜上の基底膜 (電子顕微鏡)

#### C. 遺伝子解析

- a. *VMA21* 遺伝子変異

### ● 除外すべき疾患

#### 臨床的鑑別

- ・他のミオパチーや筋ジストロフィーなどの筋疾患
- ・神経原性疾患

#### 病理学的鑑別

- ・自己貪食空胞を来す他のミオパチー

### ● 診断カテゴリー

- 確実例 A または B の少なくとも一方を満たし、かつ C を満たすもの
- 疑い例 A+B を満たすもの

### 3. その他の自己貪食空胞性ミオパチー 診断基準

筋鞘膜の性質を有する自己貪食空胞 (Autophagic vacuoles with sarcolemmal features: AVSF) を伴う自己貪食空胞性ミオパチーには、Danon 病、過剰自己貪食を伴うX連鎖性ミオパチー (XMEA) 以外に、原因遺伝子の同定されていないものを含め各種の報告がある。

ここでは、比較的疾患概念が確立しつつあるものを挙げるが、今後、疾患概念や分類が変わる可能性もある。

- 乳児型自己貪食空胞性ミオパチー
  - ・遺伝形式は常染色体劣性あるいはX連鎖性
  - ・骨格筋線維は多数の AVSF を呈し、進行性の筋力低下・筋萎縮を認める。
  - ・補体 C5b-9 の筋鞘膜への沈着と基底膜の重層化を認める。
  - ・心肥大を伴う。
  
- 先天性自己貪食空胞性ミオパチー
  - ・遺伝形式はX連鎖性
  - ・骨格筋線維は多数の AVSF を呈し、進行性の筋力低下・筋萎縮を認める。
  - ・補体 C5b-9 の筋鞘膜への沈着と基底膜の重層化を認める。
  - ・心筋症を伴うことは少ない。
  
- 成人型自己貪食空胞性ミオパチー
  - ・遺伝形式は不明
  - ・成人発症
  - ・骨格筋線維は多数の AVSF を呈し、進行性の筋力低下・筋萎縮を認める。
  - ・脳や心、肝、肺、腎など多臓器障害を合併する。
  
- その他

#### IV. 研究班名簿

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業 研究奨励分野

自己貪食空胞性ミオパチーの疾患概念確立と診断基準作成のための研究班  
(H21-難治-一般-172)

研究者名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	杉江 和馬	公立大学法人 奈良県立医科大学 医学部 神経内科学	講 師
研究分担者	西野 一三	国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第一部	部 長
	木村 彰方	東京医科歯科大学 難治疾患研究部門 分子病態分野	教 授
	小牧 宏文	国立精神・神経センター病院 小児神経科	医 長
	金田 大太	大阪赤十字病院 神経内科	医 員
事務局	竹林 美穂	奈良県立医科大学 神経内科学 〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840 TEL 0744-22-3051(内線 3417) FAX 0744-24-6065 e-mail neurology@narmed-u.ac.jp	
経理事務 担当者	木下 信	奈良県立医科大学 法人企画部 研究推進課 TEL 0744-22-3051(内線 2556) FAX 0744-29-4746 e-mail s-kino@narmed-u.ac.jp	

## V. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
木村彰方	循環器疾患 発症の分子機序 13.心筋症 2.拡張型心筋症	小室一成	循環器疾患の サイエンス	南山堂	東京	2010	印刷中

### 雑誌

<p>発表者氏名(研究分担者名にはアンダーライン): 論文タイトル名. 発表誌名 巻号: ページ, 出版年</p> <p><u>Sugie K</u>, <u>Noguchi S</u>, <u>Kimura A</u>, <u>Komaki H</u>, <u>Kaneda D</u>, Nonaka I, Ueno S, <u>Nishino I</u>. Clinical features of cardiac involvement in autophagic vacuolar myopathies characterized by autophagic vacuoles with sarcolemmal features (AVSF). Korean Journal of the Neuromuscular Disorders, In press.</p>
<p><u>西野一三</u> 自己貪食空胞性ミオパチーの病態解明と治療法開発. 臨床神経学, 50(1):1-6, 2010.</p>
<p>Kim HM, Cho A, Lim BC, Kim MJ, Chae JH, Kim KJ, Hwang YS, <u>Nishino I</u>. A 13-year-old girl with proximal weakness and hypertrophic cardiomyopathy with Danon Disease. Muscle Nerve, In press.</p>
<p><u>Kimura A</u>. Molecular basis of hereditary cardiomyopathy: abnormalities in calcium sensitivity, stretch response, stress response and beyond. J Hum Genet, Epub ahead of print.</p>
<p>Arimura T, Sato R, Machida N, Bando H, Zhang DY, Morimoto S, Tanaka R, Yamane Y, Bonne G, <u>Kimura A</u>. Improvement of left ventricular dysfunction and survival prognosis of dilated cardiomyopathy by administration of calcium sensitizer SCH00013 in a mouse model. J Am Coll Cardiol, In press.</p>

## VI. 研究成果の刊行物・別刷

## 自己貪食空胞性ミオパチーの病態解明と治療法開発

西野 一三\*

要旨：自己貪食空胞性ミオパチー (AVM) は、筋病理学的に自己貪食空胞の出現により定義される一群の遺伝性筋疾患である。歴史的にもっとも研究が進んでいる Pompe 病以外に、最近 2 つの AVM のカテゴリーが新たに認識されつつある。一つは、Danon 病を初めとする一連の筋疾患である。この筋疾患群は、特異な筋鞘膜の性質を有する自己貪食空胞 (AVSF) の出現を特徴とする。AVSF では、アセチルコリンエステラーゼをふくむ、ほぼすべての筋鞘膜蛋白質が空胞膜に発現する。Danon 病はライソゾーム膜蛋白質 LAMP-2 の原発性欠損による。興味深いことに、本疾患における AVSF の数は年齢とともに増加する。AVSF ミオパチーとしては、他に、最近 VMA21 変異によることが明らかとなった、過剰自己貪食をともなう X 連鎖性ミオパチー (XMEA) がある。もう一方の AVM は、縁取り空胞の出現を特徴とするミオパチーである。縁取り空胞は電顕的には自己貪食空胞の集塊である。もっともよく知られた疾患として、縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチー (DMRV) がある。本疾患は、欧米では遺伝性封入体ミオパチー (HIBM) と呼ばれる。DMRV はシアル酸生成経路酵素遺伝子 *GNE* の変異により発症する。DMRV モデルマウスにおいては、シアル酸補充療法によりほぼ完全に筋症状を抑制することができる。このことは、シアル酸低下がミオパチーの原因であることとシアル酸補充がヒトでも有効である可能性を示唆している。現時点で原因遺伝子が明らかとなっている AVSF ミオパチーはともにライソゾーム機能異常を根本原因としている。一方、縁取り空胞は、DMRV/HIBM が低シアル化を原因としているように、ライソゾーム外の異常が根本原因であり、二次的に形成されるものである。

(臨床神経 2010;50:1-6)

Key words：自己貪食、遠位型ミオパチー、遺伝性封入体ミオパチー、縁取り空胞、シアル酸、*GNE*

## はじめに

正常骨格筋組織で自己貪食やライソゾームを見ることはほとんどないため、骨格筋では自己貪食の果たす役割は大きくないと考えられていた時代もあった。しかしながら、近年の研究により、骨格筋においても、自己貪食が重要な役割を担っていることが徐々に明らかにされてきている。実際、ある種の筋疾患は自己貪食空胞の出現を特徴とする。その内、歴史的にもっとも研究が進んでいるのが Pompe 病であるが、Pompe 病以外の筋疾患については、その原因は比較的最近まで、まったく不明であった。筋病理学的観察では、Pompe 病以外には、2 つのタイプの自己貪食空胞性ミオパチー (autophagic vacuolar myopathy : AVM) がある<sup>1)2)</sup>。一つは、筋鞘膜の性質を有する膜で覆われた自己貪食空胞 (autophagic vacuole with sarcolemmal features : AVSF) する AVM であり、Danon 病などがその代表である。もう一方は、縁取り空胞の出現を特徴とする一連の縁取り空胞性ミオパチー (rimmed vacuolar myopathy : RVM) であり、縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles : DMRV) が

その代表である。本稿では、Danon 病およびその類縁疾患と DMRV に関するこれまでの研究状況を紹介したい。

## 1. Danon 病

## a) 臨床症状

「酸性マルターゼが正常なライソゾーム性糖原病」と題して、1981 年に Danon らが報告した疾患で、その後様々な疾患名で呼ばれたが、現在は Danon 病と呼ばれている。肥大型心筋症、ミオパチー、精神遅滞臨床的三徴である<sup>3)</sup>。発端者は全例男性で、典型的には 10 歳代で心症状が出現し、30 歳代で心不全または不整脈で死亡する<sup>4)</sup>。網膜も障害されることが知られている<sup>5)6)</sup>。今のところ、根本的治療は心臓移植しかない。ミオパチーは比較的軽度なことが多いが、血中クレアチニン・キナーゼ (CK) はほぼ例外なく 1,000IU/l 程度に上昇している。精神遅滞は軽微で、約 1/3 の例は、IQ が正常範囲にある。また、ほぼすべての例で、発端者の母親も軽度な心筋障害を中年期に発症する<sup>7)</sup>。これは、X 連鎖性遺伝の可能性を強く示唆している。

\*Corresponding author: 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部 (〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1)  
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部  
(受付日：2009 年 11 月 17 日)

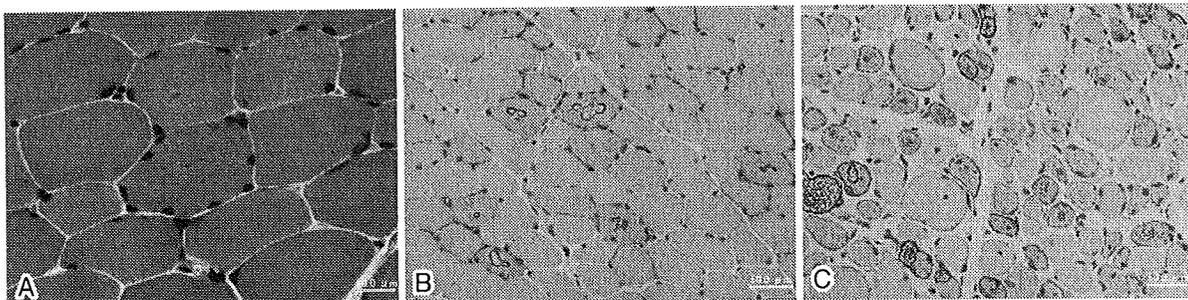


Fig. 1 Muscle pathology of Danon disease and X-linked congenital AVM.

- A. Tiny vacuoles in Danon disease look more like basophilic granules rather than vacuoles (hematoxylin and eosin).  
 B. Vacuolar membranes express acetylcholinesterase in Danon disease, showing the nature of AVSF (acetylcholinesterase stain).  
 C. AVSF can also be seen in X-linked congenital AVM (acetylcholinesterase stain)

#### b) 筋病理

筋病理では、筋線維内に小空胞をみとめることが特徴である<sup>7)</sup>。これは電顕レベルでは自己貪食空胞であるが、光顕レベルでは、むしろ好塩基性の小顆粒にみえる (Fig. 1)。興味深いのは、一部の空胞は、その膜に AChE を発現していることである。これは、AChE や NSE の活性染色で確認することができる<sup>7-9)</sup>。AChE は通常は神経筋接合部の筋線維側の基底膜部に存在している。いいかえれば、特殊な筋鞘膜に局在しているのである。このことは、空胞膜が何らかの特殊な筋鞘膜の性質を有していることを示唆している。そこで、各種筋鞘膜蛋白質に対する抗体をもちいて免疫染色をおこなってみると、この筋線維内空胞膜には、ほぼすべての筋鞘膜蛋白質が発現していることが確認される<sup>7)</sup>。電顕的にもこれらの空胞は、基底膜を有しており、筋鞘膜の性質を有していることが確認できる。われわれは、この筋鞘膜の性質を有し AChE を発現する自己貪食空胞を AVSF (autophagic vacuoles with sarcolemmal features) と名付けた<sup>12)7)</sup>。

一方、Danon 病の筋線維内には、基底膜を有していない自己貪食空胞もみとめられる。ライソゾーム膜蛋白質の一つ LIMP-1 と筋鞘膜蛋白質ジストロフィンとの二重免疫染色をおこなってみると、LIMP-1 陽性のライソゾームあるいは自己貪食空胞がジストロフィンでかこまれているもの (すなわち AVSF) とかこまれていないものの 2 種類あることがわかった。これを患者年齢と比較してグラフを描いてみると興味深いことに、前者は年齢とともに増加するのに対し、後者は年齢とともに減少した。しかも、その総和は年齢にかかわらずほぼ同じであった。このことは、筋鞘膜でかこまれていない自己貪食空胞が先行する本質的な変化であり、筋鞘膜様の膜はその後から二次的に形成されることを強く示唆している<sup>7)</sup>。

#### c) 原因遺伝子

Danon 病が X 連鎖性のライソゾーム病であり、細胞膜と空胞膜の間に何らかの異常な関連をみることから、その時点までに報告されていた Danon 病家系の検体を全世界より集め、X 染色体に注目した連鎖解析をおこなった。その結果、候補領

域内に遺伝子座があり、ライソゾーム膜蛋白質 lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2) をコードする LAMP-2 を、Danon 病の重要な候補遺伝子と考え、LAMP-2 遺伝子のシークエンスをおこなった。その結果、Danon らの最初の症例報告中にある 1 例をふくむ全例の患者で変異をみいだした<sup>10)</sup>。変異は、一例を除いて、全例 null またはフレーム・シフト変異であり、変異体では膜貫通ドメインが失われていた。つまり、変異体はもはや膜蛋白として機能しえないことになる。ウエスタン・ブロットおよび骨格筋の免疫染色では、しらべた全例で LAMP-2 蛋白が消失していた<sup>10)</sup>。一方、同時期に発表された LAMP-2 ノックアウトマウスでも同様に骨格筋や心筋をふくむ臓器に自己貪食空胞が出現したことから、Danon 病は原発性 LAMP-2 欠損症であることが確定した<sup>11)</sup>。

#### d) LAMP-2 の機能と病態

LAMP-2 は、ライソゾーム膜の主要な糖蛋白質である。発現量がきわめて多いことから、その常染色体上の相同体である LAMP-1 とともに、ライソゾーム膜をほぼ完全に埋め尽くし、ライソゾーム膜および細胞質をライソゾーム腔内の多様な消化酵素から守っていると考えられている<sup>12)</sup>。しかし、一方で、このタンパク質はライソゾームだけでなく細胞膜にも少量発現しており、その生物学的な意味は不明であるが、転移性癌細胞など様々な状況で、細胞表面での発現が増えている。

LAMP-2 は、ライソゾーム膜を 1 回貫通する膜蛋白で、N 端側アミノ酸残基の約 90 パーセントがライソゾーム腔内に存在し、強力な糖修飾を受けている。このドメインには、システイン残基間のジスルフィド結合により形成される 4 つのループが存在する。細胞質ドメインは小さく、C 端の 11 残基のみで構成され、ライソゾーム移行シグナルと考えられるチロシン残基が存在している<sup>12)</sup>。

LAMP-2 オープン・リーディング・フレームは、1233 ヌクレオチドからなり、410 アミノ酸をコードする。mRNA は、9 個のエクソンがスプライシングを受けて作られる。第 9 エクソンがエクソン 9A、9B、9C の 3 種類あり、オルタネイ

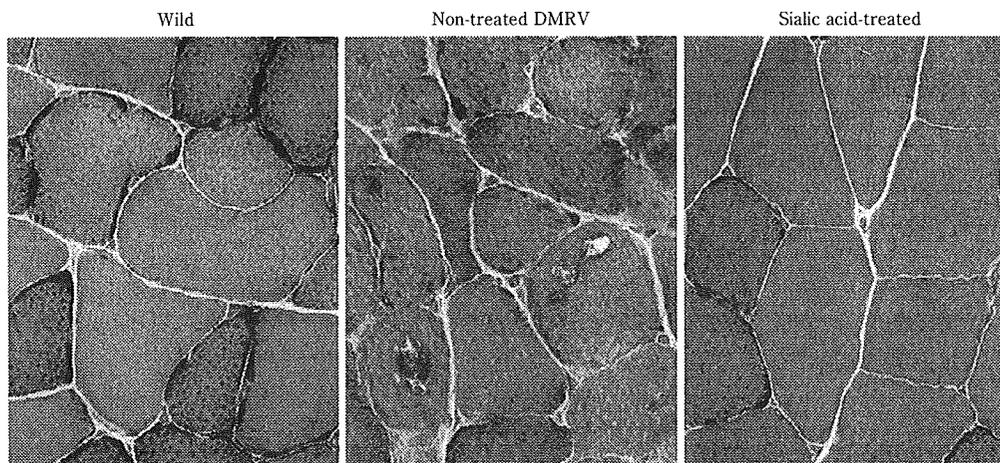


Fig. 2 Muscle pathology of DMRV model mice with or without sialic acid supplementation.

Without sialic acid treatment, DMRV mice show numerous rimmed vacuoles, in addition to marked variation in fiber size, at age 55 weeks. These features are essentially identical to those seen in human DRMV/HIBM patients. In contrast, with sialic acid treatment, DMRV mice show virtually no abnormality, clearly demonstrating that sialic acid can preclude DRMV/HIBM. ManNAc and sialyllactose also showed essentially the same efficacy. Modified Gomori trichrome stain. Gastrocnemius muscles.

タイプ・スプライシングにより、LAMP-2A, 2B, 2C の 3 つのアイソフォームが作られる。

一例の患者では、フレーム・シフト変異がエクソン 9B にあり、LAMP-2B アイソフォームのみ影響がある。この例の骨格筋をもちいたウエスタン・ブロットでは、極微量のバンドが検出された<sup>10)</sup>。このバンドは LAMP-2A アイソフォームを反映していると考えられる。以上の実験結果は、骨格筋や心筋で、LAMP-2B が主要なアイソフォームであるという事実と良く一致している。また、この患者は、明らかな精神遅滞はないものの、心筋症やミオパチーは他の患者と同程度と考えられることから、LAMP-2B 欠損のみでも Danon 病がおりうることを示している。近年オートファジーには様々な様態があることが知られてきており、この中で、ある種の蛋白質はシャペロンと LAMP-2A を介してライソゾーム内に直接取り込まれて分解されるとされている<sup>13)</sup>。この、シャペロン介在性オートファジー (chaperone-mediated autophagy : CMA) と呼ばれる機構は、LAMP-2 そのものを欠く Danon 病においてはまったく機能していないはずであり、Danon 病の病態の一端は CMA がおこらないことによるものだと仮説も成立しえる。しかし、LAMP-2B 欠損のみで Danon 病を発症する患者の存在は、少なくとも骨格筋や心筋においては、CMA は主要な役割を果たしていない可能性を示唆している。

LAMP-2 ノックアウトマウスの検討結果からは、LAMP-2 欠損により、一部のライソゾーム酵素のミスターゲティングにより、ライソゾームへと正しく運ばれないことが知られている<sup>14)</sup>。もしこのことが Danon 病の主要な病態であるならば、Danon 病も一部のライソゾーム酵素の部分欠損症との解

釈も成り立つ。また、最近では、LAMP-2 がオートファゴソームの成熟に関係しているとの報告もある<sup>15)</sup>。しかし、Danon 病の詳細な病態、とくに、なぜ AVSF が形成されるのかは、まったく不明であり、更なる検討が必要である。

## 2. その他の AVSF ミオパチー

### a) 過剰な自己食食をともなう X 連鎖性ミオパチー

過剰な自己食食をともなう X 連鎖性ミオパチー (X-linked myopathy with excessive autophagy : XEMA) は、当初フィンランドから報告された比較的軽症のミオパチーである<sup>16)</sup>。Danon 病とことなり、骨格筋のみが侵され、心筋や脳は侵されない。60 歳を過ぎても歩行可能な例が多く、Danon 病と比較して予後良好とされている。筋病理学的には、Danon 病と同様に AVSF を呈する。加えて、電顕上、基底膜が重層化し、同部位にカルシウムと補体 C5b-9 の沈着がみとめられる<sup>17)18)</sup>。最近、本疾患が、ライソゾーム腔内の酸性化に決定的な役割を有する vacuolar ATPase のアセンブリ因子をコードする VMA21 の変異によることが明らかとなった<sup>19)</sup>。XEMA 例では、実際にライソゾーム内の酸性度が低下していることが報告されている。Danon 病も XEMA もともにライソゾーム機能異常により発症する疾患であることは興味深い。これとは対照的に、後で述べる RVM は、基本的にライソゾーム外に根本的原因が存在する。

### b) 乳児型/先天型自己食空胞性ミオパチー

われわれは、これまでに、乳児重症型 AVM<sup>20)</sup> や X 連鎖性を示唆する家族歴を有し、生下時より先天性ミオパチー様の臨床症状を呈する兄弟例を報告している<sup>21)</sup>。この例は AVSF

を有しており、Danon 病や XMEA 等が鑑別診断として挙げられたが、発症年齢も重症度もことなることから、別の AVSF と捉えられる。筋病理学的には、AVSF をみとめるとともに (Fig. 1)、基底膜の重層化と補体 C5b-9 の筋鞘膜への沈着があり、どちらかという XMEA に近い病態が示唆される。

#### c) 成人型自己貪食空胞性ミオパチー

Nonaka I らは、成人で骨格筋内に多数の AVSF を呈し、脳、心、肝、肺、腎など多臓器が侵された例を報告しているが、その病因・病態はまったく不明である<sup>22)</sup>。今後さらに、AVSF を呈するミオパチーが新たにみだされていくものと思われる。

### 3. 縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチー

#### a) 臨床症状

RVM の代表として、縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles : DMRV) の研究を取り上げる。本疾患は、欧米では、遺伝性封入体ミオパチー (hereditary inclusion body myopathy : HIBM) と呼ばれている<sup>23)24)</sup>。常染色体劣性の筋疾患であり、男女ほぼ平等に侵されて、通常 15 歳~40 歳で発症する。前脛骨筋と大腿後面筋が侵されやすく、大腿四頭筋は病後期まで比較的良好に保たれる。前脛骨筋の障害を反映して、多くの患者で下垂足が初発症状である。平均的には発症後約 12 年程度で歩行不能となり、車椅子状態となるが、最近では、臨床的重症度や進行の速さにはかなりばらつきがあることが知られるようになってきている。

患者数は日本国内に 150 人から 400 人程度と予想され、超希少疾病である。

#### b) 筋病理

縁取り空胞と管状線維性封入体の出現が特徴である。免疫染色をおこなえば、 $\beta$ -アミロイド沈着やタウ蛋白質リン酸化といった神経変性疾患に似た変化もみとめられる<sup>23)24)</sup>。縁取り空胞は、電顕的には自己貪食空胞の集塊であり、DMRV は自己貪食空胞性ミオパチーとしての側面も有している<sup>3)</sup>。これに加えて、小角化線維様の萎縮線維をみとめる。われわれが作製した DMRV モデルマウスでの解析結果からは、萎縮線維がまず先行して出現し、次に  $\beta$ -アミロイドが沈着し、その後、縁取り空胞やリン酸化タウが出現してくることが明らかになっている<sup>25)26)</sup>。

#### c) 原因遺伝子

2001 年にイスラエルのグループにより HIBM の原因遺伝子がシアル酸合成経路酵素をコードする GNE であることが明らかにされた<sup>27)</sup>。本邦 DMRV 患者でも同様に GNE 変異がみだされることから、DMRV と HIBM は同一疾患であることが確定した<sup>28)</sup>。これまでに見つかった患者のアレルの 95% 以上がミスセンス変異であり、null 変異を両アレルに有する例はみだされていない。これは、Gne ノックアウトマウスは胎生致死である事実とよく合致している<sup>29)</sup>。本邦では p.V572L 変異が一番多く、p.D176V 変異が 2 番目に多い。

#### d) 分子病態とモデルマウス

患者の血液、筋組織、線維芽細胞、筋管細胞で、シアル酸量が低下し、とくに筋管細胞においては、細胞表面のシアリル化が低下している<sup>30)</sup>。さらに、培養線維芽細胞および筋管細胞において、GNE 代謝産物の N-アセチルマンノサミン (ManNAc) または主要なシアル酸であるノイラミン酸 (NeuAc) の投与により、これらが効率よく細胞内に取り込まれてシアリル化状態の回復がみとめられることを示した<sup>30)</sup>。これは、仮にシアリル化減少が DMRV の本態であるならば、*in vitro* ではすでに治療可能であることを示している。

われわれは Gne ノックアウトのヘテロ接合体マウスとヒト GNEp.D176V 変異体を発現するトランスジェニックマウスを作製して掛け合わせ、ヒト GNEp.D176V を GNE ノックアウトバックグラウンドで発現する Gne<sup>+/+</sup>hGNE D176V-Tg マウス (DMRV モデルマウス) を作製した<sup>25)</sup>。われわれのマウスは、生後 21 週以降より、体重減少と筋萎縮を、31 週より筋線維内のアミロイド沈着、41 週よりリン酸化タウ、管状線維性封入体、縁取り空胞の出現をみとめ、更に、全身臓器でのシアル酸量低下と軽度の血清 CK 値上昇をみとめた<sup>25)26)</sup>。これは、われわれのマウスが、ヒト DMRV を臨床的・病理学的・生化学的に再現する世界ではじめての DMRV/HIBM モデルマウスであることを示している。加えて、われわれのマウスにより、アミロイド沈着が縁取り空胞よりも時間的に先に形成されることがはじめて明らかとなり、病態の一端が解明された<sup>25)</sup>。

われわれのマウスでの解析により、DMRV/HIBM でみとめられる縁取り空胞形成はかなり下流の現象であることが明らかとなった。これは、相当幅広い疾患に縁取り空胞がみとめられる事実と良く合致している。この点は、AVSF を呈するミオパチーがライソゾーム機能異常を原因としていることと対照的であり、興味深い。

#### e) 治療法開発

NeuAc や ManNAc は静注すると約 2 分で尿中に排泄されてしまうことが良く知られている。そこで、正常マウスで腹腔内投与と経口投与を比較したところ、経口投与の方が尿中への排泄速度が遅く、さらに、投与 2 時間後の血中濃度も高かった。マウスは一日に約 12 回飲水をおこなうことから、自由飲水による経口投与をおこない、その治療効果を検討した<sup>31)</sup>。

まず、まだ症状を呈していない時期の 15 週前後の DMRV マウスに対して、3 つのことなる投与量 (20, 200, 2,000 mg/kg 体重/日) で ManNAc を与えたところ、いずれの用量においても、無治療であれば、ほぼすべての症状が出そろった 55 週の時点でも症状がみとめられなかった<sup>31)</sup>。そこで、この最小量をもちい、ManNAc に加えて、NeuAc、シアル酸結合物であるシアリル乳糖の投与を同様のスケジュールでおこなった。その結果、どの薬剤においても、ManNAc と同様に、55 週の時点でほぼ完全に DMRV 発症を抑制できた。病理学的にも、筋線維萎縮、 $\beta$ -アミロイド沈着、縁取り空胞形成などの変化はどれもみとめなかった (Fig. 2)。肝や腎などへの毒性もとくにみとめられなかった<sup>31)</sup>。これらの結果は、GNE 代謝産物が

DMRV に対して有効であることを明確に示すと同時に、確かに低シアル酸状態が DMRV の原因であることを明確に示した点でも意義が大きい。

これらの結果を踏まえると、当然、次はヒトでの検討、すなわち臨床試験ということになる。本邦でおこなわれる希少疾病薬開発の大半は、既存薬の適応拡大または欧米での既承認薬の国内承認を目的とするものである。われわれの知るかぎり、これまで、日本の研究室からの基礎研究成果に基づいて、DMRV のような「超」希少疾病に対する治療薬の開発が、原薬製造の段階から国内でおこなわれたことはない。DMRV の治療薬開発は、本邦における今後の希少疾病薬開発研究の試金石となると考えられる。

### まとめ

AVM は、その疾患概念が徐々に受け入れられつつあり、今後はさらにあらたな疾患がみいだされていくことになると考えられる。AVSF を呈するミオパチーは Danon 病と XMEA の原因遺伝子が明らかとなり、ともにライソゾーム機能異常を原因としている点で共通している。一方、DMRV などの RVM はライソゾーム外に根本的原因があり、その下流現象として自己貪食が惹起されている可能性が高い。いずれにせよ、今後さらに病態が解明されて治療法開発が進むことになるとであろうが、このような「超」希少疾病の治療薬開発に対して、本邦はどのようなスタンスで望んでいくのか、幅広い議論が必要であろう。

謝辞：AVM 研究を始めるきっかけをお与え下さるとともに、日頃から暖かいご指導を賜っております国立精神・神経センター病院名誉院長の埜中征哉先生、Danon 病研究でご指導を仰いだ米国コロンビア大学神経内科 Michio Hirano 先生ならびに Salvatore DiMauro 先生、そして、いつも一緒に研究を進めてくれている国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部の過去と現在の同僚、とくに昼夜を問わず実験を積み重ねて DMRV 治療開発につながる重要な成果を挙げた May Malicdan 医師と野口悟室長に感謝いたします。また、一連の研究にご協力下さった主治医の先生方、患者およびご家族の方々、遠位型ミオパチー患者会の方々に感謝いたします。

### 文 献

- Nishino I. Autophagic vacuolar myopathy. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:90-95.
- Nishino I. Autophagic vacuolar myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2003;3:64-69.
- Danon MJ, Oh SJ, DiMauro S, et al. Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* 1981;31:51-57.
- Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, et al. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 2002;58:1773-1778.
- Schorderet DF, Cottet S, Lobrinus JA, et al. Retinopathy in Danon disease. *Arch Ophthalmol* 2007;125:231-236.
- Prall FR, Drack A, Taylor M, et al. Ophthalmic manifestations of Danon disease. *Ophthalmology* 2006;113:1010-1013.
- Sugie K, Noguchi S, Kozuka Y, et al. Autophagic vacuoles with sarcolemmal features delineate Danon disease and related myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:513-522.
- Murakami N, Goto Y-I, Itoh M, et al. Sarcolemmal indentation in cardiomyopathy with mental retardation and vacuolar myopathy. *Neuromuscul Disord* 1995;5:149-155.
- Muntoni F, Catani G, Mateddu A, et al. Familial cardiomyopathy, mental retardation and myopathy associated with desmin-type intermediate filaments. *Neuromuscul Disord* 1994;4:233-241.
- Nishino I, Fu J, Tanji K, et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 2000;406:906-910.
- Tanaka Y, Guhde G, Suter A, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 2000;406:902-906.
- Fukuda M. Biogenesis of the lysosomal membrane. *Subcell Biochem* 1994;22:199-230.
- Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy. *Methods Mol Biol* 2008;445:227-244.
- Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell* 2002;13:3355-3368.
- Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy* 2008;4:510-512.
- Kalimo H, Savontaus M-L, Lang H, et al. X-linked myopathy with excessive autophagy: a new hereditary muscle disease. *Ann Neurol* 1988;23:258-265.
- Villanova M, Louboutin JP, Chateau D, et al. X-linked vacuolated myopathy: complement membrane attack complex on surface membranes of injured muscle fibers. *Ann Neurol* 1995;37:637-645.
- Louboutin JP, Villanova M, Lucas-Heron B, et al. X-linked vacuolated myopathy: membrane attack complex deposition on muscle fiber membranes with calcium accumulation on sarcolemma. *Ann Neurol* 1997;41:117-120.
- Ramachandran N, Munteanu I, Wang P, et al. VMA21 deficiency causes an autophagic myopathy by compromising V-ATPase activity and lysosomal acidification. *Cell* 2009;137:235-246.
- Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, et al. Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. *Neurology* 2001;57:903-905.
- Yan C, Tnaka M, Sugie K, et al. A new congenital form of