

Gln128Arg マウスは胎生期に心拡大を伴う致死であり、Gly202Arg、Ala592Glu マウスは拡張型心筋症様の症状を呈した。このことから、これら4種の変異は拡張型心筋症の原因となると考えられた。

2) 心筋症病態発現における性差の検討：LMNA 変異 H222P ノックインマウスでは、心不全病態の発症時期、重症化、生存曲線に著明な性差が認められ、雄マウスが重症である。そこで LMNA マウスの雄マウスで去勢、雌マウスで卵巣摘出を行ったところ、図4に示すとおり、雄マウスでは生存曲線の著明な延長が認められた。また、雌マウスでも生存曲線のやや延長が認められたが有意な延長ではなかった。

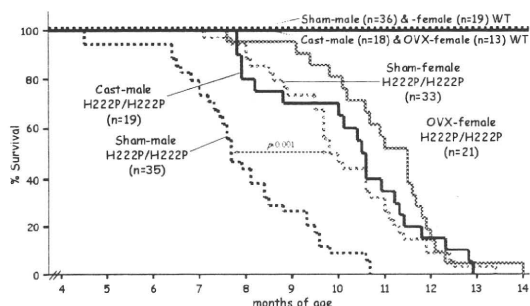


図4 LMNA マウスの生存曲線における去勢、卵摘の効果

また、雄マウスの拡張型心筋症様の病態（心拡大、心筋線維化）は去勢によって軽減するが、去勢後にテストステロンを投与すると再び悪化することから、拡張型心筋症病態の性差は男性ホルモンによるものと考えられた。

3) ミオシン脱リン酸化酵素によるカルシウム感受性制御機構の検討：プルダウン法による結合性解析の結果、ミオシン脱リン酸化酵素のsmallサブユニット（抑制サブユニット）M21は、largeサブユニット（活性化サブユニット）M110と結合することが判明した。また、M21とM110の結合にはM110の852Serが重要であった（図5）。

また、M110は細胞内で696Thrおよび853Thrがリン酸化されるが、M21が存在すると853Thrのリン酸化が阻害された。一方、キナーゼ阻害剤（図6）およびsiRNAを用いた阻害実験から、M110の696Thrリン酸化はROCKに依存するものと考えられた。

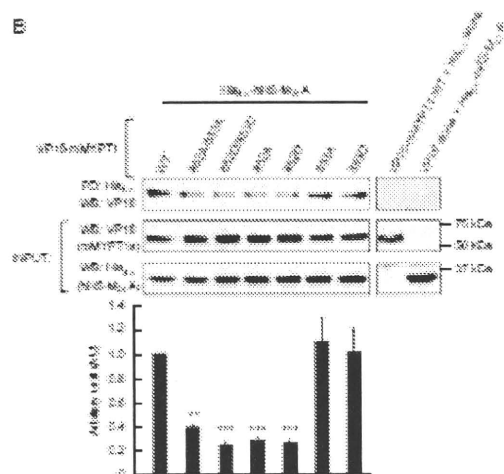


図5 M110の852Ser,853Thr位のアミノ酸によるM21-M110間の結合性の変化

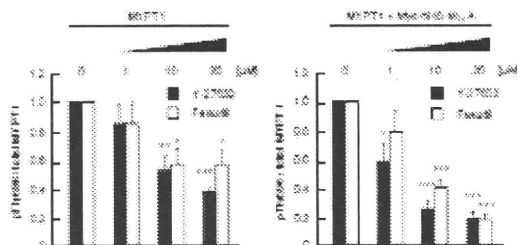


図6 ROCK 阻害剤はM21によるM110のリン酸化を抑制する

さらに、M21は細胞内でROCKと結合（図7）しており、ROCKを活性化することが示唆された（図8）。

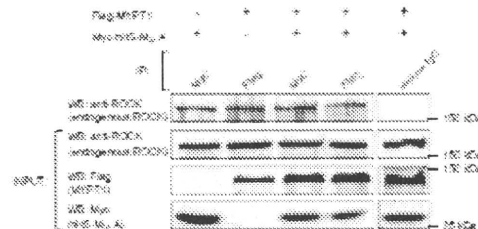


図7 プルダウン法によるM21とROCKの結合性解析

4) 骨格筋特異的構成要素の同定：我々は以前に心筋と骨格筋とのサブトラクションcDNAライブラリーを作製し、心筋特異的に発現する遺伝子として、上述のネブレットやM21を単離している。そこで、当該cDNAライブラリーのクローンをさらに検討したところ、心筋と骨格筋のみに発現するが、心筋での発現がより強い遺伝子（HS452）が

同定された。H452 はデスモコリンと一部相同性を有する新規の遺伝子であるが、その機能は未知である。そこで GFP との融合遺伝子を作製しラット心筋細胞に導入したところ、HS452 は Z 帯に分布した (図 9)。

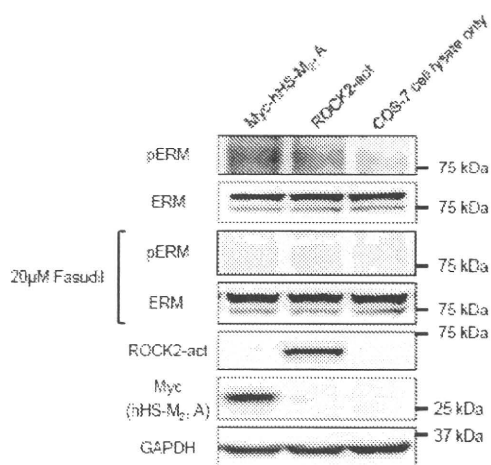


図 8 M21 は ROCK のターゲットである ERM のリン酸化を亢進する

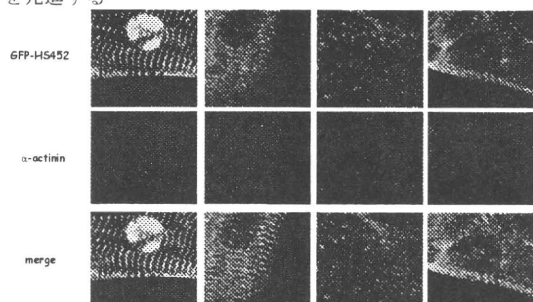


図 9 ラット心筋細胞に導入した GFP 標識 HS452 の分布

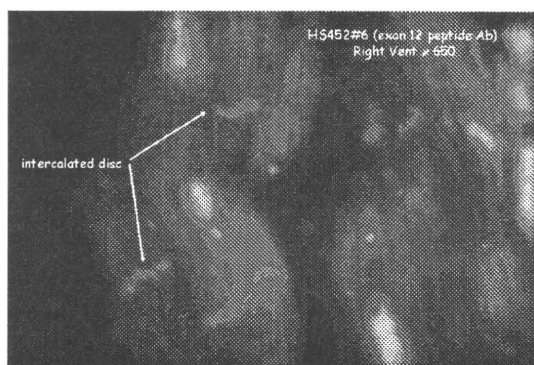


図 10 HS452 抗体を用いた心筋免疫組織染色

さらに HS452 ペプチドに対する抗体を作製し、これを用いてヒト心筋の免疫組織染色を行ったところ、H452 は Z 帯および介在板に分布するものと考えられた (図 10)。

また、肢帯型筋ジストロフィー患者にお

ける HS452 変異を検索したところ、1 例にミスセンス変異が検出された。この変異は健康日本人 200 名には存在しなかった。

D. 考察

- 1) 原因不明の心筋症における遺伝子異常の検索と機能異常の検討: 我々は以前にネブレット多型が拡張型心筋症のリスクファクターであることを報告しているが、本研究によってネブレットのミスセンス変異が拡張型心筋症の直接の病因となることを明らかにした。一方、ネブレットの C 末側の Z 帯結合ドメインを欠くフレームシフト変異のヘテロ接合が肥大型心筋症患者に見出されたが、家系解析からこの変異が肥大型心筋症の直接の病因とはならないことが示された。すなわち、ミスセンス変異はドミナントネガティブ効果によって心筋機能異常をもたらすが、機能欠失変異は心筋機能異常をもたらさないと考えられた。
- 2) 心筋症病態発現における性差の検討: 心筋症は一般に男性に多く、男性患者は早期に発症することが知られているが、本研究において LMNA マウスの心不全病態発現における性差は男性ホルモンによる心不全悪化であることが判明した。男性ホルモンがいかなる機序で心不全の悪化要因となるのかについては不明であるため、今後そのメカニズムを明らかにすることで、新たな心不全治療戦略が立てられるものと考えられる。
- 3) ミオシン脱リン酸化酵素によるカルシウム感受性制御機構の検討: M21 は心筋特異的に発現し、その高発現は心筋収縮のカルシウム感受性を亢進することを以前に報告しているが、本研究により M21 は ROCK と結合して M110 のリン酸化を亢進することでミオシンリン酸化酵素活性を抑制していることが判明した。ことに重要なことは、M21 が ROCK 活性を亢進することを発見したことにより、M21 の高発現マウスが肥大型心筋症様病態を呈する分子機構の解明にヒントを与えるものであった。
- 4) 骨格筋特異的構成要素の同定: 本研究により、新たな Z 帯および介在版要素として

HS452を同定した。また、Limb-Girdle型筋ジストロフィー患者1名にミスセンス変異が検出されたため、今後その臨床的意義の解明が必要である。

E. 結論

拡張型心筋症の一部はネブレット変異に起因する。また、心筋症・心不全の病態形成には男性ホルモンが関与する。一方、ミオシン脱リン酸化酵素スモールサブユニット M21 の機能発現は ROCK 活性化が関わる。さらに新規の Z 帯および介在板構成要素として HS452 を同定した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arimura T, Sato R, Machida N, Bando H, Zhang DY, Morimoto S, Tanaka R, Yamane Y, Bonne G, Kimura A: Improvement of left ventricular dysfunction and of survival prognosis of dilated cardiomyopathy by administration of calcium sensitizer SCH00013 in a mouse model. *J Am Coll Cardiol* 55(14): 1503-1505, 2010.
- 2) Neelyl GG, Kuba K, Cammarato A, Isobe K, Amann S, Zhang L, Murata M, Elmen L, Gupta V, Arora S, Sarangi R, Dan D, Fujisawa S, Usami T, Xia CP, Keene AC, Alayari NA, Yamakawa H, Elling U, Berger C, Novatchkova M, Kogelgruber R, Fukuda K, Nishina H, Isobe M, Pospisilik JA, Imai Y, Pfeufer A, Hicks A, Pramstaller PP, Subramaniam S, Kimura A, Ocorr K, Bodmer R, Penninger JM: A global in vivo *Drosophila* RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell* 141(1): 142-153, 2010.
- 3) Choi JO, You CW, Nah JC, Park JR, Lee BS, Choi BY, Cho BY, Lee SC, Park SW, Kimura A, Park JE: Long-term outcome of four Korean families with hypertrophic

cardiomyopathy caused by four different mutations. *Clin Cardiol* 33(7): 430-438, 2010.

- 4) Hitomi N, Kubo T, Kitaoka H, Hirota T, Hamada T, Hoshikawa E, Hayato K, Okawa M, Kimura A, Doi YL: A frameshift deletion mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene was associated with dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Cardiol* 56(2): 189-196, 2010.
- 5) Purevjav E, Varela J, Morgado M, Kearney DL, Li H, Taylor MD, Arimura T, Moncman CL, McKenna W, Labeit S, Vatta M, Bowles NE, Kimura A, Boriek AM, Towbin JA: Nebulette mutations are associated with dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *J Am Coll Cardiol* 56(18): 1493-1502, 2010.
- 6) Shichi D, Arimura T, Ishikawa T, Kimura A: Heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase activates Rho-associated kinase and regulates phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1. *J Biol Chem* 285(44): 33680-33690, 2010.

2. 学会発表

- 1) 大塚春奈、有村卓朗、久保亨、土居義典、木村彰方: 家族性肥大型心筋症患者における原因遺伝子変異解析. 第55回日本人類遺伝学会, 大宮, 10月28日, 2010.
- 2) 有村卓朗、木村彰方: 新規カルシウム増感剤SCH00013による拡張型心筋症病態の治療効果の検討. 第55回日本人類遺伝学会, 大宮, 10月30日, 2010.

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

「自己貪食空胞性ミオパチーの診断基準確立に関する研究」

研究分担者 小牧宏文 国立精神・神経医療研究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確立するため、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。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。超希少疾病といえる本症の病態解析や今後の治験の実現を考えるためには、単施設のみでの検討では不十分であり、日本国内の連携のみならず、海外と連携した臨床遺伝学的検討とデータベース構築が必要である。

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。また神経筋疾患の国際共同研究グループである、TREAT-NMDの年次ミーティングに参加し、筋疾患の特に頻度の少ない本疾患の現状やレジストリー制度の可能性について検討した。

B. 研究方法

国立精神・神経医療研究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は、国立精神・神経医療研究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上で施行した。

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。

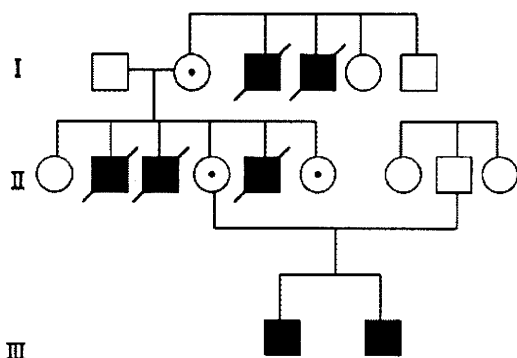
13歳視力低下が出現、ぶどう膜炎、左眼網膜剥離と診断された。ぶどう膜炎に対してステロイドの点眼と内服を行ったところ、眼症状の改善とともにCK値も400台まで低下したが、ステロイドを中止するとブドウ膜炎が再燃するという経過を繰り返した。

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 361IU/l、ALT 279IU/l、LD 971IU/l、CK 2015IU/l

(CK-MB1%, MM99%)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認めなかった。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、低吸収域も認めなかった。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族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遺伝子のコーディング領域のシーケンス解析を行ったところエクソン3に2塩基の欠失を認めた。この変異はフレームシフトを引き起こし、その結果終止コドンを生じるものと推測された。

症例2、3：XMEA(X-linked myopathy with excessive autophagy)の兄弟例、家族歴：血族結婚なし。父は米国人、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週間で死亡で母方の家族に濃厚な家族歴を認めており、家系図からはX連鎖性劣性遺伝形式が強く示唆された。



図：家系図、症例2、3はⅢにあたる。

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。出生直後より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 nmoI BCE/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/cm², 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SpO₂低下を繰り返し、頻回に吸引を要した。1歳3か月時にSpO₂低下があり、

肺高血圧の所見があり在宅酸素療法を開始した。以降つたい歩きが可能になり、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が出現した。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、慢性呼吸不全が顕在化し、夜間非侵襲的換気療法を導入した。側彎・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、物をとろうとしたときに左上腕を骨折した。

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、座位の時には股・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。筋力は近位筋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。BAP114IU/l、NTX80.0nmolBCE/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/cm²、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pH0.5-2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、endmysial 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。ジストロフィン染色：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、高acid phosphatase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(ライソソーム膜蛋白)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、カルシウムの沈着をみとめること、Danon病で認められる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。

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・膵・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、今後の検討が必要と考えられる。

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、膵臓、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彎曲が目立つが、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。

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。この変異は症例 2、3 の他、家系図での I-2、II-4、6 の母にヘテロに存在することが判明し、X連鎖性遺伝形式によるものが確定した。

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。希少疾病の中でも特に頻度の低い自己貪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。

TREAT-NMDの仕組みについて

本症のような希少疾病の中でも非常に頻度の低い疾患は患者情報の集積に困難を有する。今回我々は3例の検討を行ったが、もちろんそれだけでは診断基準の構築は不可能と考える。

TREAT-NMDはヨーロッパを中心とした、神経・筋疾患国際共同研究グループであり、我々は正式メンバーとして活動を行なっている。TREAT-NMDの主要な活動の一つとして、患者登録制度（レジストリー）があり、現在のところ、デュシェンヌ型筋ジストロフ

イー、ベッカー型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィーを対象とし患者レジストリーを行っている。これらレジストリーの目的は第一に治験対象患者のリクルートであり、また自然歴の調査も可能である。本疾患のような超希少疾病の場合にはこのようなシステムを利用して患者情報の集積を行うことは有用である可能性がある。Danon病はリソゾーム病の一つでもあり、近年リソゾーム病のいくつかのタイプで酵素補充療法が行われるようになってきている。そのような状況を考慮すると治験実現への基盤整備を行っておくべき状況ではないかと考える。

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) Ikeda C, Honda R, Komaki H, Sasaki M, Munteanu I, Ramachandran N, Minassian BA, Tsuburaya R, Hayashi YK, Nishino I. Congenital form of X-linked myopathy with excessive autophagy associated with VMA21 mutation. 15th International Congress of the World Muscle Society. October 12-16, 2010, Kumamoto, Japan.

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

「成人型自己貪食性ミオパチー症例における臨床病理学的研究」

研究分担者 金田大太 大阪赤十字病院神経内科 医員
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・神経医療研究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。臨床的な心筋症、ミオパチー、網膜色素変性に加え、全身病理検索から、病変として最も強いのは心筋、骨格筋、胸膜から肝被膜・脾被膜にかけた強い繊維性肥厚、限局性気管支拡張症を認めた。中枢神経では、中脳黒質ドーパミン細胞の著明な脱色素所見を認め、メラニン含有細胞に限局したLC3抗体に対する染色性の低下を認めた。髄液中のカテコラミン代謝物質の減少を認めた。

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空胞性ミオパチー症例 (Neurology, 2003 Jul 8;61(1):128-31) とした。臨床的解析に加えて、死後の病理解剖にて得られた、網膜を除く各臓器について、病理学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

剖検ならび、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

網膜色素変性症、心筋症、気管支拡張症、肝被膜肥厚を合併した成人型自己貪食空胞性ミオパチーの臨床学的・病理学的検討を進めた。

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。鏡検上黒質では zona compacta の neuropil の粗鬆化と反応性 astrocytosis が見られ、GFAP の免疫染色では、赤核や大脳脚も含めて、中脳全体にびまん性に中等度の astrocytosis を認めた。神経メラニン含有細胞は、脱落はごく軽度と思われるが、個々の神経細胞のメラニン含有量は明らかに正常に比較して減少していた。

黒質の残存神経細胞核には、肝性脳症などでも増加すると言われる Marinesco 小体が数多く出現しており、一部はユビキチン染色陽性であった。黒質と比較して、青斑

核のメラニン含有量の減少は軽度にとどまっていた。

黒質の変化が発症前のパーキンソン病に準ずるような共通した病態であるかどうかについて、synucleinopathy においてより早期に罹患するとされる延髄迷走神経背側核、嗅球、扁桃核につき synucleinopathy の存在がないかを検討した。結果、嗅球に反応性の astrocytosis がやや目立つ所見ながら、いずれの部位にも病的な α -synuclein の蓄積は認められなかった。

同様の病理所見として黒質の脱色素を呈する疾患として、瀬川病・Rett 症候群があげられる。臨床上これらの疾患に見られる錐体外路徴候は認められなかったが、生前に凍結保存した髄液において、カテコラミン代謝産物である HVA, VMA, 5-HIAA を測定した。結果は

VMA 1.0ng/ml 以下(正常: 0.86~1.09)

HVA 17.0 ng/ml (正常: 27.0~44.2)

5-HIAA 6.9 ng/ml (正常: 12.8~29.8)

と、一般的に低値を示し、中枢神経内でのカテコラミン代謝の異常を示唆する所見であった。

次に、神経メラニンの減少が、オートファジーの機能低下と関連しているか否かを調べるために、LC3 染色による検討を行った。大脳皮質(側頭葉内側)、基底核、脊髄のいずれの部位でも神経細胞体内にびまん性の LC3 のびまん性の染色性が確認された。一方で、黒質を含む中脳切片においては、同スライス上の reticular formation に位置する神経細胞は前記部位同様の良好な染色性を示したのに対し、黒質のメラニン含有神経細胞に限局して細胞体の LC3 に対する染色性が著明に低下していた。

脊髄では、前角細胞の有意な減少とグリオーシスを認めたが、大型神経細胞内にユビキチン陽性封入体は認めなかった。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 enthorrenal cortex には、ごく少数のユビキチン染色陽性の細胞内封入体が観察された。

下オリブ核にも 軽度の神経細胞脱落

があり、残存神経細胞には lipofuscin 沈着が強い。対して小脳歯状核には全体に細胞質内 lipofuscin 沈着が強く認められ軽度の astrocytosis を認めたが、細胞の脱落は認められなかった。

その他全身所見について列記する。

心臓: 心筋細胞には骨格筋同様の空胞変性が著明であり、間質は全体にレース状の間質性線維化が明らかである。心室中隔の中心部領域に心筋繊維の錯綜配列が間質線維化を伴って軽度認められた。

肺: 著明な線維性肥厚を示す胸膜が肝被膜・脾被膜まで連続して胸壁に強い癒着を示した。肺実質については、胸膜下領域において部分的に肺胞壁の断裂、気腫状変化、肺胞壁の線維性肥厚が見られた。左中肺野を中心に、一部限局した強い気管支拡張症の所見が認められ、検索を続けている。

肝臓: うっ血性心不全の2次性変化と考えられる小葉中心帯域の核の萎縮と細胞質の強い萎縮、菲薄化を伴った中心帯域類洞の拡張と鬱血を認める以外に著変を認めなかった。

膵臓: 外分泌腺房細胞のzymogen下流は全体によく保たれており、ランゲルハンス島に著変を認めなかった。

腎臓: LAMP2異常とANCA関連糸球体腎炎との関係が示唆されている。当症例においては、部分的に糸球体の一部にmesangium細胞の増殖とmesangium基質の増加を軽度認めたものの、全体として著変を認めなかった。尿細管は全体に上皮細胞の萎縮・菲薄化を示しているが、間質に著変を認めず非特異的な変化にとどまっていた。

精巣: 年齢に比して老人性変化がやや強く、精細管全体が硝子化に陥る像も散見され、Leydig細胞は著明に減少していた。

D. 考察

胸膜・肺病変に関しては、他の AVSF を伴う自己貪食ミオパチーにおいて報告がなく、同様の症例の蓄積が重要と考えられる。また、中枢病理所見の検討は現在まで報告がなく、特に Danon 病のように精神遅滞が様々な程度に見られる疾患との関連も興味を持たれた。黒質変性に関しては、病的な

α -synuclein の蓄積は認められなかったことから、synucleinopathy としての病態とは異なる機序が推定された。しかしながら、LC3 染色でのメラニン含有細胞に限局した染色性の低下は、全身性のオートファジー異常がドーパミン神経において影響が顕著である可能性を示唆する結果であり、髄液中のカテコラミン代謝マーカーの低下に関しては、Danon 病など精神遅滞を呈しているその他の病型での測定を検討すべき所見かと考える。

E. 結論

成人発症型自己貪食性空胞ミオパチーにおいて、全身臓器の検索を進めた。臨床的な心筋症、ミオパチー、網膜色素変性に加え、全身病理検索から、病変として最も強いのは心筋、骨格筋、胸膜から肝被膜・脾皮膜にかけた強い繊維性肥厚と癒着、限局性気管支拡張症、中脳の黒質変性が認められた。中枢神経病変につき、臨床的な錐体外路症状の欠如と病理学的検討での synucleinopathy の欠如からは、パーキンソン病と共通する病態は想定できなかったが、髄液マーカーからの検討から、カテコラミン代謝の障害が存在する可能性を示唆した。

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
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

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 α 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
- ・他の原因の確定している心筋症

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 α 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 22 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診断基準確立と治療法開発に関する研究班
(H22-難治-一般-119)

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・神経医療研究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・神経医療研究センター病院 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	岡 眞啓	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(研究分担者名にはアンダーライン): 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
Malicdan MC, <u>Nishino I</u> . Central Core Disease. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K Gene Reviews, University of Washington, Seattle, 2010, in press.

雑誌

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
<u>Sugie K</u> , <u>Kimura A</u> , <u>Komaki H</u> , <u>Kaneda D</u> , Nonaka I, Ueno S, <u>Nishino I</u> . Clinicopathological features of autophagic vacuolar myopathies characterized by autophagic vacuoles with sarcolemmal features (AVSF). Brain Pathology 20(9) S1: 93, 2010.
<u>Sugie K</u> , Hayashi YK, Goto K, <u>Nishino I</u> , Ueno S. Asymmetry of skeletal muscle involvement in facioscapulohumeral muscular dystrophy: A neuroimaging study. Neuromuscul Disord 20(9-10): 665, 2010.
Yamazaki Y, Kamei Y, Sugita S, Akaike F, Kanai S, Miura S, Hirata Y, Troen BR, Kitamura T, <u>Nishino I</u> , Sukanami T, Ezaki O, Ogawa Y. The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle. Biochem J 427: 171-178, 2010.
Kim H, Cho A, Lim BC, Kim MJ, Kim KJ, <u>Nishino I</u> , Hwang YS, Chae JH. A 13-year-old girl with proximal weakness and hypertrophic cardiomyopathy with danon disease. Muscle Nerve 41: 879-882, 2010.
Crotzer VL, Glosson N, Zhou D, <u>Nishino I</u> , Blum JS. LAMP-2-deficient human B cells exhibit altered MHC class II presentation of exogenous antigens. Immunology 131: 318-330, 2010.

Arimura T, Sato R, Machida N, Bando H, Zhang DY, Morimoto S, Tanaka R, Yamane Y, Bonne G, Kimura A.

Improvement of left ventricular dysfunction and of survival prognosis of dilated cardiomyopathy by administration of calcium sensitizer SCH00013 in a mouse model. J Am Coll Cardiol 55(14): 1503-1505, 2010.

Neely1 GG, Kuba K, Cammarato A, Isobe K, Amann S, Zhang L, Murata M, Elmen L, Gupta V, Arora S, Sarangi R, Dan D, Fujisawa S, Usami T, Xia CP, Keene AC, Alayari NA, Yamakawa H, Elling U, Berger C, Novatchkova M, Koglgruber R, Fukuda K, Nishina H, Isobe M, Pospisilik JA, Imai Y, Pfeufer A, Hicks A, Pramstaller PP, Subramaniam S, Kimura A, Ocorr K, Bodmer R, Penninger JM.

A global in vivo Drosophila RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function.

Cell 141(1): 142-153, 2010.

Choi JO, You CW, Nah JC, Park JR, Lee BS, Choi BY, Cho BY, Lee SC, Park SW, Kimura A, Park JE.

Long-term outcome of four Korean families with hypertrophic cardiomyopathy caused by four different mutations.

Clin Cardiol 33(7): 430-438, 2010.

Hitomi N, Kubo T, Kitaoka H, Hirota T, Hamada T, Hoshikawa E, Hayato K, Okawa M, Kimura A, Doi YL.

A frameshift deletion mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene was associated with dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy.

J Cardiol 56(2): 189-196, 2010.

Purevjav E, Varela J, Morgado M, Kearney DL, Li H, Taylor MD, Arimura T, Moncman CL, McKenna W, Labeit S, Vatta M, Bowles NE, Kimura A, Boriak AM, Towbin JA.

Nebulette mutations are associated with dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis.

J Am Coll Cardiol 56(18): 1493-1502, 2010.

Shichi D, Arimura T, Ishikawa T, Kimura A.

Heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase activates Rho-associated kinase and regulates phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1.

J Biol Chem 285(44): 33680-33690, 2010.

門間一成、西野一三。神経・筋 ミオパチー。

内科 105: 1387-1390, 2010.

本田真也、西野一三。筋疾患とオートファジー。

BIO Clinica 25: 42-46, 2010.