

孤発性封入体筋炎における抗 NT5C1A 抗体の測定意義と 病態への関与に関する検討

研究協力者：山下 賢

共同研究者：俵 望、西上 朋、道鬼 つかさ、松尾 圭将、
前田 寧、安東 由喜雄

熊本大学大学院医学薬学研究部 神経内科学分野

A：研究目的

孤発性封入体筋炎（sIBM）は炎症性筋疾患に分類されているが、sIBM の骨格筋形質内にはアミロイド や TDP-43、タウなどアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症と共通する蛋白凝集がみられることや、多発性筋炎（PM）や皮膚筋炎（DM）と異なり免疫抑制剤による治療に対する治療反応性が非常に乏しく、筋萎縮が進行していくことなどから神経変性疾患と共通の病態を持つことが推察されている。しかし、炎症性疾患としての側面と変性疾患としての側面とのつながりを十分に説明しうる機序は未だ明らかにされていない。sIBM の炎症性筋疾患としての側面における新たな発見として、2013 年に Larman ら¹⁾、Pluk ら²⁾の 2 つの異なるグループより sIBM 患者血清において Cytosolic 5'-nucleotidase 1A（NT5C1A）に対する自己抗体が存在するとの報告がなされた。Larman らは Dot blot assay 法を用いた抗体測定を行い、カットオフ値を 10IU と定めた場合の sIBM 診断の感

度は 34%、特異度は 98%であると報告した。抗 NT5C1A 抗体測定はその特異性の高さから sIBM の診断に非常に有用である可能性がある。またこの抗体が標的とする NT5C1A が sIBM の骨格筋において核周囲に存在するという病理像などから、NT5C1A が sIBM の炎症性病態と変性病態とをつなぐ鍵になりうる分子として注目されている。しかしながら抗 NT5C1A 抗体や NT5C1A が sIBM の病態にいかんして関与しているかは十分な検討がなされていない。本研究では、sIBM 患者における抗 NT5C1A 抗体の測定意義とその病態への関与を解明することを目的とする。

B：研究方法

1) 抗 NT5C1A 抗体測定

sIBM 患者 13 例、炎症性筋疾患（PM もしくは DM）10 例、炎症性筋疾患以外の筋疾患 10 例、神経原性筋萎縮疾患 10 例、健常者 5 例の計 53 例の血清について、Cell-based assay 法を用いて抗 NT5C1A 抗体の定性的評価を行

い、sIBM の診断における感度、特異度の検討を行った。Cell based assay 法は Cos7 細胞に GFP 標識 NT5C1A 過剰発現ベクターを遺伝子導入後、一次抗体に患者および健常者血清、二次抗体に抗ヒト IgG 抗体を用い、蛍光顕微鏡観察にて評価した。

2) sIBM での NT5C1A の局在検討

sIBM11 例の凍結骨格筋生検組織標本について、抗 NT5C1A 抗体 (abcam 社) を用いて免疫組織化学染色を行い、NT5C1A の局在について検討した。また筋線維タイプ毎の局在を明らかにするためにタイプ 2 線維のマーカーである抗 Fast myosin heavy chain 抗体 (abcam 社) との二重蛍光免疫組織化学染色を行った。また蛋白分解経路との関連を検討するため、抗 p62 抗体 (MBL 社) との二重蛍光免疫組織化学染色を行った。

3) 抗 NT5C1A 抗体陽性例での臨床像および筋病理像

抗体陽性群と抗体陰性群について臨床像および筋病理像の比較を行った。

4) 活性型 AMP activated kinase の発現検討
また筋萎縮や蛋白分解経路と NT5C1A が関連する機序について、活性型 AMP activated kinase(P-AMPK)について抗体陽性、陰性群でウェスタンブロット法による蛋白発現量の比較を行った。

(倫理面への配慮)

検体採取時に研究試料に用いることについて患者からの同意を得ており、研究結果については匿名性に留意した。

C : 研究結果

1)抗 NT5C1A 抗体の sIBM 診断における感度、特異度

sIBM 患者血清 13 症例のうち 4 症例が抗 NT5C1A 抗体陽性 (Figure.1)を示し、その他 40 例は陰性であった。sIBM 診断における抗 NT5C1A 抗体測定感度は 30.8%、特異度は 100%であった。(Table.1)

Figure.1 抗 NT5C1A 抗体陽性、陰性代表例

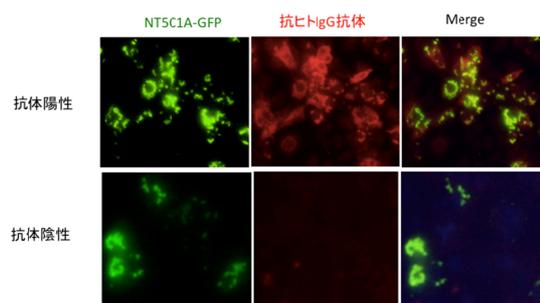


Table.1 抗 NT5C1A 抗体の疾患別陽性率

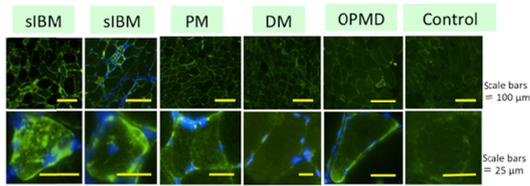
	sIBM	PM/ DM	その他の筋疾患	神経原性筋萎縮疾患	Control
抗NT5C1A抗体陽性	4/ 13	0/ 10	0/ 10	0/ 15	0/ 5
陽性率 (%)	30.8	0	0	0	0

2) sIBM での NT5C1A の局在

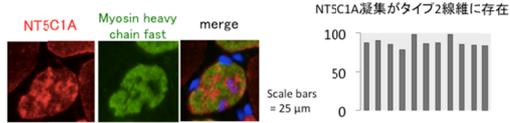
NT5C1A は sIBM 骨格筋 11 例全例で小径化した筋線維の筋形質および筋形質膜に凝集して発現していた (Figure. 2A)。sIBM では非特異的な所見であるがタイプ 2 線維萎縮が強いと報告されており³⁾、今回 NT5C1A 凝集を認めた線維がタイプ 2 線維である可能性を考え、抗 Fast myosin heavy chain 抗体との二重免疫染色を行った結果、NT5C1A 凝集がみられた線維は高率にタイプ 2 線維に一致した (Figure. 2B)。p62 は封入体筋炎の病理学的マーカーの一つであり、その筋形質内凝集は蛋白分解経路の障害を示唆すると考えられているが、NT5C1A が p62 と共局在をとるものが 5/ 11 例で認められた(Figure. 2C)。また核周囲に凝集を認めるものが 3/ 11 例で認められた(Figure. 2D)。

Figure.2 sIBM 筋における NT5C1A の局在

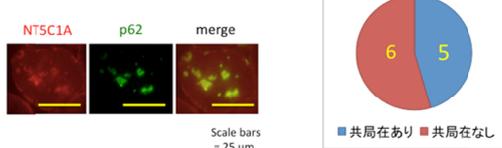
A. sIBM骨格筋でのNT5C1A局在



B. 抗Fast myosin heavy chain 抗体との二重免疫染色



C. sIBM骨格筋でのNT5C1A局在



D. sIBM骨格筋でのNT5C1A局在



3) 抗 NT5C1A 抗体陽性例での臨床像および筋病理像比較

発症年齢や診断までの罹病期間、男女比、諸初時自覚症状が上肢から始まった比率について差はみられなかった。有意な差ではなかったものの、抗体陽性 sIBM では嚥下障害の合併頻度が高い傾向と CK 値がより低値である傾向がみられた (Table. 2)。抗体陽性例の病理像においては縁取り空胞頻度や炎症細胞浸潤の程度、コンゴレッド染色陽性線維の有無には明らかな差は認められなかったが、有意にタイプ 2 線維の平均面積が小さかった。また NT5C1A が p62 との共局在をとるものや、核周囲に凝集するパターンは抗体陽性例で多い傾向がみられた (Table.3)。

4) 活性型 AMP activated kinase の発現検討

抗体陽性例で AMPK 発現は高い傾向があり、

NT5C1A 発現量は低い傾向にあった。(Figure.3)

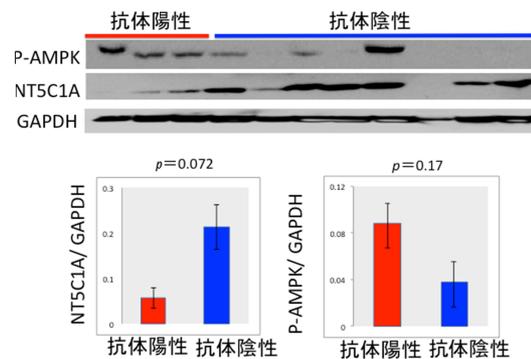
Table.2 抗 NT51A 抗体と臨床像の関連性

	抗体陽性 N=4	抗体陰性 N=9	p value
発症時年齢 (歳)	67.2 ± 5.3	64.8 ± 4.3	0.74
診断時年齢 (歳)	73.0 ± 3.2	72.3 ± 3.1	0.90
診断までの罹病期間 (年)	5.8 ± 2.8	7.5 ± 1.9	0.61
男性比率 (%)	75.0	66.7	0.79
初発症状上肢 (%)	25.0	33.3	0.78
嚥下障害 (%)	50.0	22.2	0.36
CK値 (IU/l)	379 ± 65.7	967.2 ± 241.3	0.14

Table.3 抗 NT51A 抗体と病理像の関連性

	抗体陽性 N=3	抗体陰性 N=8	p value
縁取り空胞頻度	6.1 ± 2.8	4.3 ± 3.9	0.56
炎症細胞浸潤程度 強	100.0	66.6	0.21
コンゴレッド染色陽性 (%)	0	22.2	0.35
NT5C1Aがp62と共局在 (%)	100	37.5	0.073
NT5C1Aが核周囲 (%)	66.7	12.5	0.085
タイプ2線維平均面積 (μm ²)	924.9 ± 184.2	2067.2 ± 326.7	0.049

Figure.3 抗体陽性陰性例での活性型 AMPK 発現比較



D : 考察

1.抗 NT5C1A の感度・特異度

今回の検討での抗 NT5C1A 抗体の sIBM 診断における感度、特異度はそれぞれ 30.8%、

100%となり、dot blot assay を用いた Larman ら¹⁾、免疫沈降法を用いた Pluk ら²⁾の既報告の感度、特異度と同程度の結果であった。今回少数規模での評価ではあるものの特異性の高い結果となり、診断に有用である可能性が示された。また Greenberg によれば sIBM 患者血清中には IgG 型抗 NT5C1A 抗体のみでなく、IgA、IgM 型抗体も存在しており、IgG、IgM、IgA 型の 3 つのサブタイプの抗 NT5C1A 抗体測定の併用により sIBM 診断感度を 76%まで高めることができると報告している⁴⁾。本検討ではこれまでの検討と異なり Cell based assay 法による評価を行った。抗 AQP4 抗体や抗体測定においては Cell based assay 法は ELISA 法に比べ感度が高いことが示されている⁵⁾。今後 sIBM の診断に抗 NT5C1A 抗体を用いるためには、各種検査法毎の感度・特異度の比較が重要と考えられる。今回抗 NT5C1A 抗体測定は定性的な評価のみであったため、今後血清希釈による半定量的な抗体価測定を予定している。また本邦 Nishimura らの ELISA 法を用いた検討では、PM 症例、抗 SRP 抗体陽性ミオパチーにおいて抗 NT5C1A 抗体陽性例を多く認めたと報告されており、その特異性についてはさらなる検討が必要であるとしている⁶⁾。Cell based assay 法においても同様の結果となるかどうかを検討するために、抗 SRP 抗体陽性ミオパチーを多く含む、より大規模での検討が必要と考えられる。

2. NT5C1A の局在からの病態推察

NT5C1A は sIBM 骨格筋の筋形質および筋形質膜で凝集するように存在しており、一部では核周囲での凝集や p62 との共局在がみられた。Larman らの報告においても核周囲での NT5C1A 凝集は確認されており、従来から推

察されている sIBM における核変性との関与⁷⁾を疑う所見であるとしている。また縁取り空胞部分の辺縁部分での凝集を認めたとも報告しており、今回明らかとなった p62 との共局在からも NT5C1A が蛋白分解経路に影響を及ぼしていることが推察され、今後より詳細な検討が必要である。NT5C1A 凝集および筋形質膜での高発現線維がタイプ 2 線維に高頻度に一致したという報告はこれまでにない。凝集蛋白は本来の機能を発揮していない可能性があり、NT5C1A 凝集はタイプ 2 線維での核酸代謝に影響を与える可能性があると考えられた。また Sugarman らによれば sIBM 筋線維でみられるアミロイド前駆蛋白凝集はタイプ 2 線維にみられると報告している⁸⁾。アミロイド前駆蛋白と NT5C1A の関連性についても今後の検討が必要である。

3. 抗 NT5C1A 抗体陽性 sIBM の臨床像および病理像

Larman らの報告では 47 例の抗 NT5C1A 抗体陽性 sIBM 患者の年齢、罹病期間、手指屈曲筋力、膝伸展筋力と抗体活動性は相関せず、抗核抗体陽性、抗 Ro 抗体、抗 La 抗体陽性とも関連しなかったとしている¹⁾。Goyal らによる sIBM 15 例(9 例抗 NT5C1A 抗体陽性)の検討では嚥下障害が有意に高頻度(抗体陽性例 6/9 vs 抗体陰性例 1/6, p 値<0.01)、発症年齢が若い傾向があることが示されており⁹⁾、嚥下障害についての結果は今回の我々の検討とも一致している。より多数例での解析が必要であるが、sIBM 剖検症例での罹患筋毎の抗原量の違い等を検討することが、sIBM の一つの特徴である罹患筋選択性の機序解明に必要であろう。抗体陽性と筋病理像との関連についてはこれまでに検討されていない。今回我々の検討では抗体陽性例でタイプ 2 線維

萎縮が強かった。タイプ 2 線維萎縮は sIBM 特異的な所見ではなく、加齢、ステロイドミオパチー、廃用性筋萎縮、悪液質などでもみられる所見である。しかし Parker らによれば PM、DM 症例と比較して sIBM ではタイプ 2 線維萎縮が強く、蛋白質量解析では Myosin heavy chain 1 などのタイプ 2 線維の構成蛋白質が減少していると報告している³⁾。このことから sIBM ではタイプ 2 線維萎縮をより増悪させる病態が存在することが推察される。NT5C1A および筋萎縮や蛋白分解経路の双方と関連が報告されている活性化型 AMP activated kinase (P-AMPK)の発現量を抗体陽性陰性例で比較したところ抗体陽性例で蛋白発現量が高い傾向がみられた。Kulkarni らは NT5C1A の発現抑制 AMPK を活性化させると報告しており¹⁰⁾、また P-AMPK は筋萎縮を誘導するマイオスタチンの発現を上昇させるとの報告もある¹¹⁾。また AMPK はオートファジーを負に制御する mTOR を抑制することが知られている。こういったことと NT5C1A の機能低下や発現量低下は P-AMPK を介して筋萎縮や蛋白分解経路に関連する可能性があると考えられる。また最近の報告では P-AMPK は筋萎縮性側索硬化症でみられる TDP-43 の異所性局在にも関連するとされており¹²⁾sIBM でもみられる筋形質内での TDP-43 凝集と NT5C1A との関連についても今後検討が必要である。

E : 結論

抗 NT5C1A 抗体は sIBM 診断において高い特異度を有し、診断に有用である可能性が示された。今後より大規模での検討が本邦でも必要と考えられる。抗 NT5C1A 抗体陽性 sIBM では AMPK の活性化を介して、筋萎縮や蛋白

分解経路の障害を生じていることが示唆された。

参考文献

- 1) Larman HB, Salajegheh M, Nazareno R, Lam T, Sauld J, Steen H, Kong SW, Pinkus JL, Amato AA, Elledge SJ, Greenberg SA. Cytosolic 5'-nucleotidase 1A autoimmunity in sporadic inclusion body myositis. *Ann Neurol.* 2013 Mar; 73(3): 408-18.
- 2) Pluk H, van Hoeve BJ, van Dooren SH, Stammen-Vogelzangs J, van der Heijden A, Schelhaas HJ, Verbeek MM, Badrising UA, Arnardottir S, Gheorghe K, Lundberg IE, Boelens WC, van Engelen BG, Pruijn GJ. Autoantibodies to cytosolic 5'-nucleotidase 1A in inclusion body myositis. *Ann Neurol.* 2013 Mar; 73(3): 397-407.
- 3) Parker KC, Kong SW, Walsh RJ, Bch, Salajegheh M, Moghadaszadeh B, Amato AA, Nazareno R, Lin YY, Krastins B, Sarracino DA, Beggs AH, Pinkus JL, Greenberg SA. Fast-twitch sarcomeric and glycolytic enzyme protein loss in inclusion body myositis. *Muscle Nerve.* 2009 Jun; 39(6): 739-53.
- 4) Greenberg SA. Cytoplasmic 5'-nucleotidase autoantibodies in inclusion body myositis: Isotypes and diagnostic utility. *Muscle Nerve.* 2014 Oct; 50(4): 488-92
- 5) Waters PJ, McKeon A, Leite MI, Rajasekharan S, Lennon VA, Villalobos A, Palace J, Mandrekar JN, Vincent A, Bar-Or A, Pittock SJ. Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG

assays. *Neurology*. 2012 Feb 28; 78(9): 665-71

6) Nishimura H, Suzuki S, Noguchi S, Uruha A, Mitsunashi S, Hayashi Y.K, Nonaka I, Nishino I. The utility of anti-cN1A autoantibody for the diagnosis of sporadic inclusion body myositis.

Neuromuscul Disord. Volume 24, Issues 9-10, October 2014, Pages 815-19th

International Congress of The World Muscle Society

7) Nishii M, Nakano S, Nakamura S, Wate R, Shinde A, Kaneko S, Kusaka H.

Myonuclear breakdown in sporadic inclusion body myositis is accompanied by DNA double strand breaks. *Neuromuscul Disord*. 2011 May; 21(5): 345-52

8) Sugarman MC, Kitazawa M, Baker M, Caiozzo VJ, Querfurth HW, LaFerla FM. Pathogenic accumulation of APP in fast twitch muscle of IBM patients and a transgenic model. *Neurobiol Aging*. 2006 Mar; 27(3): 423-32.

9) Goyal N, Pedouim F, Alam U, Enam S, Mozaffar F, Mozaffar T. Clinical patterns in NT5C1A antibody positive sporadic inclusion body myositis patients compared to seronegative patients. *Neurology* April 8, 2014 vol. 82 no. 10 Supplement S26.007

10) Kulkarni SS, Karlsson HK, Szekeres F, Chibalin AV, Krook A, Zierath JR.

Suppression of 5'-nucleotidase enzymes promotes AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation and metabolism in human and mouse skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2011 Oct 7; 286(40):34567-74.

11) Das AK, Yang QY, Fu X, Liang JF, Duarte MS, Zhu MJ, Trobridge GD, Du M. AMP-activated protein kinase stimulates myostatin expression in C2C12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Oct 12; 427(1): 36-40.

12) Liu YJ, Ju TC, Chen HM, Jang YS, Lee LM, Lai HL, Tai HC, Fang JM, Lin YL, Tu PH, Chern Y. Activation of AMP-activated protein kinase $\alpha 1$ mediates mislocalization of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2015 Feb 1; 24(3): 787-801.

F : 健康危険情報

なし

G : 研究発表

1 : 論文発表

1) Hori H, Yamashita S, Tawara N, Hirahara T, Kawakami K, Nishikami T, Maeda Y, Ando Y. Clinical features of Japanese patients with inclusion body myositis. *J Neurol Sci*. 2014 Nov 15; 346(1-2) 133-137

2) Yamashita S, Mori A, Nishida Y, Kurisaki R, Tawara N, Nishikami T, Misumi Y, Ueyama H, Imamura S, Higuchi Y, Hashiguchi A, Higuchi I, Morishita S, Yoshimura J, Uchino M, Takashima H, Tsuji S, Ando Y. Clinicopathological features of the first Asian family having vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy due to a MATR3 mutation. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014 Sep 4. [Epub ahead of print]

2 : 学会発表

- 1) Yamashita S, Kawakami K, Nishikami T, Tawara N, Y. Maeda Y. Ando Y. Analyses of the pathogenesis in muscle-specific wild-type TDP-43 transgenic mice. 19th International Congress of The World Muscle Society. Oct 8-11, 2014, Berlin, Germany.
- 2) Tawara N, Yamashita S, Nishikami T, Kawakami K, Tawara A, Hori H, Hirahara T, Maeda Y, Ando Y. World muscle society congress 2014 Cytoplasmic 5'-nucleotidase 1A are aggregated in type 2 fiber in sporadic inclusion body myositis. 19th International Congress of The World Muscle Society. Oct 8-11, 2014, Berlin, Germany.
- 3) Nishikami T, Yamashita S, Tawara N, Mori A, Hori H, Hirahara T, Maeda Y, Ando Y. The first Asian family having vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy due to a MATR3 mutation. 19th International Congress of The World Muscle Society. Oct 8-11, 2014, Berlin, Germany.
- 4) 山下賢、川上賢祐、西上朋、俵望、安東由喜雄 筋特異的な TDP-43 発現による IBM モデルマウス作製と病態解析 第 55 回日本神経学会学術大会 May 21-24,2014,福岡
- 5) 俵望, 山下賢, 西上朋, 川上賢祐, 前田寧, 安東由喜雄 孤発性封入体筋炎の自己抗原 NT5C1A はタイプ 2 線維に凝集している 第 55 回日本神経学会学術大会 May 21-24,2014,福岡
- 6) 西上朋、山下賢、俵望、森麗、西田泰斗、内野克尚、永利聡仁、栗崎玲一、中西俊人、

- 堀寛子、平原智雄、渡邊聖樹、上山秀嗣、山下太郎、前田寧、安東由喜雄 アジア初の声帯および咽頭麻痺を伴う遠位型ミオパチー (MPD2/VCPDM) の 1 家系 2 症例に関する多角的検討 第 55 回日本神経学会学術大会 May 21-24,2014,福岡
- 7) 山元雅典、俵望、山下賢、児玉美里、中村ひとみ、西上朋、川上賢祐、安東由喜雄封入体筋炎における Cyldromatosis 蛋白発現の検討 第 55 回日本神経学会学術大会 May 21-24,2014,福岡

H : 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1 : 特許取得

なし

2 : 実用新案登録

なし

3 : その他

なし