

## 孤発性封入体筋炎の病態における抗 NT5C1A 抗体の意義

研究協力者:山下 賢<sup>1)</sup>

共同研究者:俵 望<sup>1)</sup>、張 霄<sup>1)</sup>、張 子微<sup>1)</sup>、道鬼 つかさ<sup>1)</sup>、松尾 圭将<sup>1)</sup>、  
中根 俊成<sup>1)</sup>、前田 寧<sup>1)</sup>、安東 由喜雄<sup>1)</sup>

1)熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学

### 研究要旨

【目的】孤発性封入体筋炎 (sIBM) は難治性筋疾患であり、その病態には蛋白分解機構の破綻や異常な免疫反応の関与が想定されている。近年、一部の sIBM 患者血清および血漿中に cytosolic 5'-nucleotidase 1A (NT5C1A) に対する自己抗体の検出が報告された。本研究の目的は、sIBM の病態における本抗体の病因論的意義を解明することである。

【方法】我々は本抗体を検出可能な cell-based assay (CBA) 系を作成し、sIBM を含む神経筋疾患患者血清を用いて、sIBM 診断に対する感度および特異度を ELISA 法と比較した。また in vitro および in vivo 受動免疫モデルにおいて、本抗体の病態に及ぼす影響を検討した。

【結果および考察】同一 45 例の解析では CBA 法の感度 45%、特異度 96%であった一方、ELISA 法での感度は 45%、特異度は 88%であった。in vitro モデルでは、本抗体陽性の sIBM 患者 IgG を添加した細胞で p62 の発現が増加し、p62 陽性の凝集を有する細胞が増加した。in vivo モデルでは、本抗体陽性の sIBM 患者 IgG を接種されたマウス筋線維内に p62 陽性の凝集を認め、マクロファージの浸潤を伴った。

【結論】CBA 法は、ELISA 法と同等の感度を有し、sIBM 診断に有用と考えられた。本抗体は筋線維内の蛋白分解機構に影響する可能性が示された。

### A:研究目的

封入体筋炎(sIBM)は高齢者に頻発する進行性筋疾患であるが、今日まで有効な治療法はなく、15年程度で車椅子生活になる難治性疾患である。特異的な診断方法はなく、臨床症状や筋病理所見、電気生理検査所見より総合的に診断されるため、確定診断の時点で既に進行期に達していることも少なくない。したがって、早期診断

に有用なバイオマーカーの開発が不可欠と考えられる。

sIBM のバイオマーカーに関する新たな発見として、2013年に Larman ら、Pluk らの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。一方で、本抗体は sIBM のみならず、筋疾患を有さない全身性エリテマトーデス (SLE) やシェーグレン症候群 (SjS) の患者においても検出されることが報告された。すなわち、本抗体が病原性を有するか否かは未解明である。

本研究の目的は、我々が新たに開発した cell-based assay (CBA) 法の有用性を検証することと、in vitro および in vivo 受動免疫モデルを用いて本抗体の病因的意義を解明することである。

## B: 研究方法

### 1) 抗 NT5C1A 抗体測定における CBA 法と ELISA 法の比較.

CBA 法は COS7 細胞に GFP 標識 NT5C1A 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 Alexa594 標識抗ヒト IgG 抗体を用い、蛍光顕微鏡観察にて定性的に評価した。ELISA 法は、抗 NT5C1A 測定 ELISA キット (Cat. No. EA1675-4801G, EUROIMMUN AG, Lübeck, Germany) を用いた。同一検体 45 症例 (sIBM 患者 20 例、多発筋炎 11 例、皮膚筋炎 7 例、非炎症性筋疾患性のミオパチー 6 例、健常者 1 例) について、CBA 法および ELISA 法両者で本抗体を検出し、それぞれの sIBM 診断の感度および特異度を算出した。

### 2) 抗 NT5C1A 抗体の in vitro 受動免疫モデルの評価.

抗 NT5C1A 抗体陽性および陰性患者、健常者各 3 例より IgG を抽出し、ヒト横紋筋肉腫細胞である RD 細胞の培地中にそれぞれ

7 mg/ml の濃度で添加し、i) MTS アッセイによる細胞生存性、ii) 抗原である NT5C1A 蛋白と、LC3 および p62 などのオートファジー関連蛋白の発現を免疫染色およびウェスタンブロットにて比較した。

### 3) 抗 NT5C1A 抗体の in vivo 受動免疫モデルの評価.

抗 NT5C1A 抗体陽性および陰性患者、健常者各 3 例より抽出した IgG (10 mg) を、それぞれ 3 匹ずつの C57BL/6J マウスに腹腔内投与し、経時的に体重推移、ロータロッドテストおよびメッシュハンギングテストによる運動機能評価を行った。また投与後 4 週の段階で筋病理学的評価を行い、p62 および IgG、CD68 の発現を比較した。

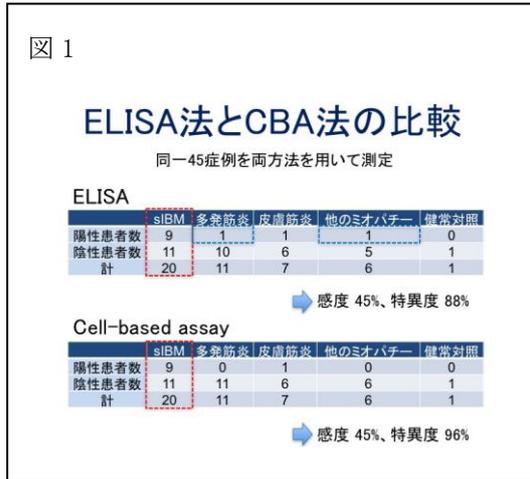
(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、熊本大学大学院生命科学研究部等疫学・一般研究倫理委員会で審査を受け、承認された (倫理第 937、1124 号)。

## C: 研究結果

### 1) 抗 NT5C1A 抗体測定における CBA 法と ELISA 法の比較.

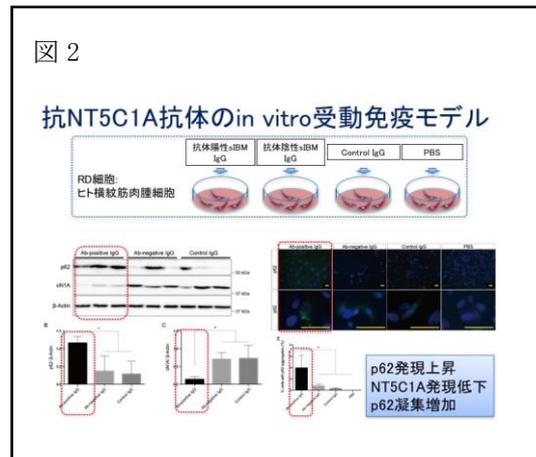
ランダムに選択した 45 例の解析では CBA 法の感度 45%、特異度 96%であった一方、ELISA 法での感度は 45%、特異度は 88%であった(図 1)。



### 2) 抗 NT5C1A 抗体の in vitro 受動免疫モデルの評価.

本抗体陽性および陰性 sIBM 患者、健常者より抽出した IgG を添加後 24 時間および 48 時間後に、MTS アッセイを用いて細胞生存性を評価したが、明らかな細胞毒性は見出されなかった。しかし、本抗体陽性患者 IgG 添加細胞では p62 の発現が増加し、NT5C1A の発現が低下していた。p62 抗体による免疫染色では、抗体陽性患者 IgG 添加細胞では p62 のドット状の凝集が見られた(図 2)。

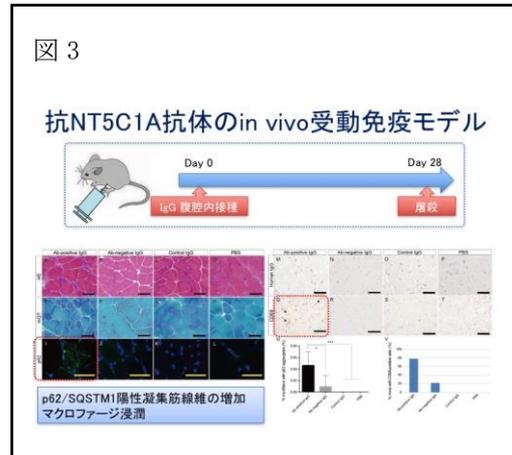
図 2



### 3) 抗 NT5C1A 抗体の in vivo 受動免疫モデルの評価.

本抗体陽性患者および陰性患者、健常者由来 IgG を投与されたマウスにおいて、体重推移、ロータロッドテストおよびメッシュハンギングテストによる運動機能に有意差はみられなかった。しかし、本抗体陽性患者 IgG 接種マウスでは、p62 陽性凝集筋線維が有意に増加し、CD68 陽性のマクロファージ浸潤を伴っていた(図 3)。

図 3



## D: 考察

### 1) 抗 NT5C1A 抗体測定の感度・特異度

我々が新たに開発した CBA 法は、従来のスタンダードと考えられる ELISA 法と同等の感度を有する一方、ELISA 法よりもさらに高

い特異度を有する可能性が示された。本研究での抗 NT5C1A 抗体測定 of sIBM 診断における感度、特異度は、dot blot assay を用いた Larman ら、免疫沈降法を用いた Pluk らの既報告の感度、特異度とほぼ同程度であり、診断に有用と考えられる。一方、Greenberg らは sIBM 患者血清中には IgG 型抗体のみでなく、IgA、IgM 型抗体も存在すること、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ことを報告している。今後 sIBM の診断精度向上に対する抗 NT5C1A 抗体測定の有用性を確立するために、IgG、IgM、IgA 各クラスの測定を含め、抗体測定の標準化が不可欠と考える。

## 2) 抗 NT5C1A 抗体の病原性

我々の *in vitro* および *in vivo* 受動免疫モデルでは、抗 NT5C1A 抗体陽性 IgG が p62 の筋線維内凝集を誘導する可能性が示された。また同抗体陽性患者骨格筋において NT5C1A 抗原の発現が低下していたことは、本抗体が筋変性に影響することを示唆している。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型 AMP activated kinase (p-AMPK) の発現量を抗体陽性と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 の発現抑制が AMPK を活性化させると報告しており、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。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。すなわち 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

考えられる。

## E: 結論

CBA 法は、ELISA 法より高い特異度を有し、sIBM 確定診断に有用と考えられた。本抗体は筋線維内の蛋白分解機構に影響する可能性が示された。

## F: 健康危険情報

なし

## G: 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

### 1: 論文発表

- 1) Tawara N., Yamashita S., Zhang X., Korogi M., Zhang Z., Doki T., Matsuo Y., Nakane S., Maeda S., Sugie K., Suzuki N., Aoki M., Ando Y. Pathomechanisms of anti-cN1A autoantibodies in sporadic inclusion body myositis. *Ann. Neurol.*, in press (2017).
- 2) Ishizaki M., Kedoin C., Ueyama H., Maeda Y., Yamashita S., Ando Y. Utility of skinfold thickness measurement in non-ambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.*, 27, 24-28 (2017).
- 3) Mori Y., Yamashita S., Kato M., Masuda T., Takamatsu K., Kumamoto T., Sasaki R., Ando Y. Thomsen disease with ptosis and abnormal MR findings. *Neuromuscul. Disord.*, 26, 805-808 (2016).

- 4) Suzuki, N., Mori-Yoshimura, M., Yamashita S., Nakano S., Murata KY., Inamori Y., Matsui N., Kimura E., Kusaka H., Kondo T., Higuchi I., Kaji R., Tateyama M., Izumi R., Ono H., Kato M., Warita H., Takahashi T., Nishino I., Aoki M. Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan. *Orphanet J. Rare Dis.*, 11, 146 (2016).
- 5) Okumura K., Yamashita T., Masuda T., Misumi Y., Ueda A., Ueda M., Obayashi K., Jono H., Yamashita S., Inomata Y., Ando Y. Long-term outcome of patients with hereditary transthyretin V30M amyloidosis with polyneuropathy after liver transplantation. *Amyloid*, 23, 39-45 (2016).
- 6) Azuma M., Hirai T., Yamada K., Yamashita S., Ando Y., Tateishi M., Iryo Y., Yoneda T., Kitajima M., Wang Y., Yamashita Y. Lateral asymmetry and spatial difference of iron deposition in the substantia nigra of Parkinson's disease patients measured with quantitative susceptibility mapping. *AJNR Am J Neuroradiol.*, 37, 782-788 (2016).
- 7) Mori A., Yamashita S., Nakajima M., Hori H., Tawara A., Matsuo Y., Misumi Y., Ando Y. CMAP decrement as a potential diagnostic marker for ALS. *Acta Neurol. Scand.*, 134, 49-53 (2016).
- 8) Yamashita T., Ueda M., Saga N., Nanto K., Tasaki M., Masuda T., Misumi Y., Oda S., Fujimoto A., Amano T., Takamatsu K., Yamashita S., Obayashi K., Matsui H., Ando Y. Hereditary amyloidosis with cardiomyopathy caused by the novel variant transthyretin A36D. *Amyloid*, 23, 207-208 (2016).
- 9) 山下 賢, 安東 由喜雄. 眼咽頭遠位型ミオパチー. *Clinical Neuroscience*, 34, 332-333 (2016).

## 2:学会発表

- 1) Yamashita S., et al. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of a murine model and patients of inclusion body myositis. 21st International Congress of the World Muscle Society, Oct 6, 2016, Congress Palace, Granada, Spain.
- 2) Tawara N., Yamashita S., et al. Effect of anti-Cytosolic 5'-nucleotidase 1A (NT5C1A) antibody on cultured muscle cells and muscle fibers of mice. 21st International Congress of the World Muscle Society, Oct 6, 2016, Congress Palace, Granada, Spain.
- 3) Doki T., Yamashita S., et al. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of oculopharyngeal muscular dystrophy. 21st International Congress of the World Muscle Society, Oct 5, 2016, Congress Palace, Granada, Spain.
- 4) Zhang X., Yamashita S., et al. Establishment of a murine model of vocal cord and pharyngeal weakness

- with distal myopathy. 21st International Congress of the World Muscle Society, Oct 6, 2016, Congress Palace, Granada, Spain.
- 5) Yamashita S., et al. Endoplasmic reticulum stress in murine model and patients with inclusion body myositis. 第 57 回日本神経学会総会, May 20, 2016, 神戸.
  - 6) 山下 賢. 運動ニューロン疾患の診断と鑑別疾患 第 57 回日本神経学会総会, May 21, 2016, 神戸.
  - 7) 張 霄、山下 賢他. VCPDM モデルマウスの作成および筋病理学的解析. 第 57 回日本神経学会総会, May 18, 2016, 神戸.
  - 8) 中原圭一、中根俊成、高松孝太郎、中島誠、山下 賢他. 重症筋無力症の抗 AChR 抗体価と胸腺病理所見、胸腺摘出術の有効性との関連. 第 57 回日本神経学会総会, May 18, 2016, 神戸.
  - 9) 道鬼つかさ、山下 賢他. 眼咽頭筋ジストロフィーにおけるミトコンドリア障害の解析. 第 57 回日本神経学会総会, May 18, 2016, 神戸.
  - 10) 俵 望、山下 賢他. 孤発性封入体筋炎における抗 NT5C1A 抗体の病態におよぼす影響. 第 57 回日本神経学会総会, May 20, 2016, 神戸.
  - 11) 興梶 舞、俵 望、山下 賢他. 抗 NT5C1A 抗体の筋毒性. 第 57 回日本神経学会総会, May 20, 2016, 神戸.
  - 12) 原健太朗、山下 賢他. 入院時歩行不能状態にあった HTLV-I 関連脊髄症の臨床的検討. 第 57 回日本神経学会総会, May 20, 2016, 神戸.
  - 13) 松尾淳一、山下 賢他. 声帯および咽頭麻痺を伴う遠位型ミオパチー (VCPDM) の筋病理学的解析. 第 57 回日本神経学会総会, May 18, 2016, 神戸.
  - 14) 長尾麻子、石崎雅俊、山下哲司、奥村幸祐、岡崎敏郎、前田 寧、上山秀嗣、川田康誠、山下 賢、安東由喜雄. 呼吸不全をきたした ALS におけるより安全な胃瘻造設術の検討. 第 57 回日本神経学会総会, May 21, 2016, 神戸.
  - 15) 天野朋子、山下 賢他. 筋萎縮性側索硬化症患者の医療処置法の選択に影響を及ぼす要因についての検討. 第 57 回日本神経学会総会, May 21, 2016, 神戸.

## 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