

封入体筋炎を中心とする炎症性筋疾患の調査研究と

炎症性筋疾患識別マーカーの開発

研究分担者:西野一三¹⁾²⁾

共同研究者:漆葉章典²⁾¹⁾

- 1) 国立研究開発法人 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
- 2) 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター メディカル・ゲノムセンター ゲノム診療開発部

研究要旨

2002年5月～2012年4月に国立精神・神経医療研究センター凍結生検筋レポジトリに登録された症例からIBMと診断された116例を抽出し、各主治医へのアンケート調査をもとにHCV抗体の有無を調査した。IBM患者の28.1%(32/114例)がHCV抗体陽性例であった。これは本邦一般人口のHCV抗体陽性率(60代:3.4%、2000年)および多発筋炎同齡患者のHCV抗体陽性率(4.5%、2/44例)より有意に高かった($P < 0.001$)。

抗cytosolic 5'-nucleotidase 1A(cN1A)抗体の診断マーカーとしての有用性を明らかにすることを目的とし、封入体筋炎患者34名、皮膚筋炎患者22名、抗SRP抗体陽性壊死性ミオパチー患者35名、GNEミオパチー患者15名の血漿でELISA法にて抗cN1A抗体を測定した。抗cN1A抗体は封入体筋炎では35%(12/34)で陽性であり、先行研究での陽性率と同等であった。皮膚筋炎、GNEミオパチーにおいて陽性例は見られなかったものの、抗SRP抗体陽性壊死性ミオパチーでは20%(7/35)で陽性であった。

臨床病理学的にGNEミオパチーが強く疑われるにも拘わらず、片側アレルにしか変異が見いだされない症例について、次世代シーケンサーを用いたcopy number variation(CNV)解析を行い、対側アレルの欠失や重複の有無を検討した。11家系13例で1つ以上のエクソンを含む欠失または重複を認めた。欠失側アレルのGNE遺伝子発現は認めなかった。

A: 研究目的

1. C型肝炎ウイルス(HCV)既感染の封入体筋炎患者の頻度および臨床・病理学的特徴を明らかにすること。

2. 近年、封入体筋炎患者で同定された抗 cytosolic 5'-nucleotidase 1A (cN1A) 抗体の診断マーカーとしての有用性を明らかにするとともに、炎症性筋疾患と非炎症性筋疾患を鑑別するマーカーを同定すること。

3. 片側アレルにしか変異が見いだされない GNE ミオパチー症例について対側アレルに大欠失や重複などの copy number variation (CNV)解析が存在する可能性を検討すること。

B: 研究方法

1. 2002年から2012年に国立精神・神経医療研究センター凍結筋レポジトリに登録された症例から、ENMC IBM Research Diagnostic Criteria 2011で clinicopathologically defined IBMに該当する症例116例を抽出し、主治医に回答を求める形でアンケート調査を行った。対照として同時期の多発筋炎(PM)同齡患者44例の主治医にも同様のアンケート調査を行った。

2. 封入体筋炎患者34名、皮膚筋炎患者22名、抗SRP抗体陽性壊死性ミオパチー患者35名、GNEミオパチー患者15名の血漿で、ELISA法を用いて抗cN1A抗体を測定した。先行研究にならい健常対照の平均値+3SDをカットオフ値とした。また、炎症性筋疾患患者100名(多発筋炎、皮膚筋炎、抗合成酵素症候群、免疫介在性壊死性ミオパチー、封入体筋炎)および遺伝性筋疾患患者50名(デュシェン

ヌ/ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、GNEミオパチー)の27種のサイトカイン血漿濃度を測定した。

3. 次世代シーケンサーを用いてGNE遺伝子領域を解析し、depth of coverage解析を施行した。欠失または重複が見いだされた例については、別途プライマーを設計し、断端部のシーケンス解析を行った。また、CNV変異が認められた例で凍結骨格筋が保存されている例については、mRNAの発現をRT-PCRによって確認した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いる全ての検体ならびに臨床情報は全例採取時に国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認された「診断と検体の研究使用に関する承諾書」をもとにインフォームド・コンセントされており、「神経・筋疾患の病態解明と治療法開発」を目的とした研究への使用が許可されている。

C: 研究結果

1. 114例中32例(28%)がHCV抗体陽性であった。対照のPM同齡患者は2/44例(4.5%)、2000年時点の日本人同齡一般人口(60代)は3.4%であった。HCV抗体陽性例・陰性例との臨床病理学的側面の比較では、いずれの指標でも有意差はなかった。HCV抗体陽性のIBM患者凍結筋では32例中19例(59%)でHCV-RNAが検出された。一方、IBM以外のHCV抗体陽性神経筋疾患患者の凍結筋でHCV-RNAが検出されたのは21例中20例(95%)でIBM患者群より高頻度であった(P=0.004)。

2. 抗 cN1A 抗体は封入体筋炎では 35% (34 名中 12 名) で陽性であった。これは先行研究での陽性率と同等であった。皮膚筋炎、GNE ミオパチーにおいて陽性例は見られなかったものの、抗 SRP 抗体陽性壊死性ミオパチーでは 20% (35 名中 7 名) で陽性であった。尚、健常対照の平均値 + 3SD というカットオフ値は、正診率の最高値を示した (78%)。封入体筋炎患者群あるいは抗 SRP 抗体陽性壊死性ミオパチー患者群の中で、抗 cN1A 抗体の有無は臨床病理学的特徴に影響しなかった。IP-10 と eotaxin は各炎症性筋疾患患者群において遺伝性筋疾患患者群より有意に高値を示した ($p < 0.01$)。

3. 11 家系 13 例で 1 つ以上のエクソンを含む欠失または重複を認めた。特にエクソン 2 が欠失している例が 7 家系 8 例を占めていた。凍結筋が保存されていた 6 例での RT-PCR 解析からは、何れの例でも欠失側アレルの GNE 遺伝子発現を認めなかった。また片側アレルに CNV を有していた日本人患者 8 家系のうち、6 家系が対側アレルに D207V 変異を有していた。

D: 考察

1. 封入体筋炎において HCV 感染が統計学的に有意に高頻度に合併していることが示された。また解析した限りにおいて、HCV 抗体陽性群と陰性群との間に、臨床的または病理学的な重症度に差は認められなかった。このことから HCV が IBM 病態における修飾因子として働くものではないことが示唆され、おそらく IBM の誘発因子として作用しているものと思われる。

2. 抗 cN1A 抗体は、アメリカおよびオランダの研究グループによって封入体筋炎患者において発見された自己抗体である。両グループの報告

でも診断応用の目的では感度の低さが問題となっていたが、特異度の高さが強調されていた。しかしその後、オランダの同じグループから封入体筋炎以外の自己免疫疾患患者 (シェーグレン症候群や全身性エリテマトーデス) で抗 cN1A 抗体が検出され、疾患特異性にも疑問が出始めてきた (Herbert, et al. *Ann Rheum Dis* 2015)。今回の我々の検討で、封入体筋炎以外の筋疾患においても、抗 cN1A 抗体が封入体筋炎と遜色ない頻度で検出されることが明らかとなった。抗 cN1A 抗体の診断目的での測定は、相当慎重に行うべきであると考えられる。

3. 11 家系中 7 家系でエクソン 2 欠失を認めた。更に、凍結筋が入手可能であった 6 例全例で欠失側アレルの GNE 遺伝子発現を認めなかった。このことは、このエクソン 2 の配列が hGNE1 トランスクリプトの発現に必須であることを強く示唆している。シアル酸補充療法の承認が現実的なものとなる可能性が高まっている現在、このような CNV 変異を見逃さず、正確な診断を下すことが極めて重要と考えられる。

E: 結論

IBM においては HCV 感染症の頻度が 28% と高く、何らかの形で IBM の病態形成に関与していると考えられる。抗 cN1A 抗体の封入体筋炎診断マーカーとしての有用性は低いと考えられる。一部の GNE ミオパチー患者は CNV 変異を片側アレルに有している。一見ヘテロ接合型に見えても対側アレルに CNV 変異を有していることがあり、注意が必要である。

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

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(1): 146, Nov, 2016 PMID: 27821140 DOI 10.1186/s13023-016-0524-x

Preethish-Kumar V, Pogoryelova O, Polavarapu K, Gayathri N, Seená V, Hudson J, Nishino I, Prasad C, Lochmuller H, Nalini A: Beevor's sign: a potential clinical marker for GNE myopathy. *Eur J Neurol.* 23(8): e46-8, Aug, 2016
doi: 10.1111/ene.13041. PMID: 27431025

Uruha A, Noguchi S, Sato W, Nishimura H, Mitsunashi S, Yamamura T, Nishino I. Plasma IP-10 level distinguishes inflammatory myopathy. *Neurology* 85: 293-294, 2015

Uruha A, Noguchi S, Hayashi YK, Tsuburaya RS, Yonekawa T, Nonaka I, Nishino I. Hepatitis C virus infection in inclusion body myositis: A case-control study. *Neurology* 86: 211-7, 2016

Furuta A, Kikuchi H, Fujita H, Yamada

D, Fujiwara Y, Kabuta T, Nishino I, Wada K, Uchiyama Y: Property of Lysosomal Storage Disease Associated with Midbrain Pathology in the Central Nervous System of *Lamp-2*-Deficient Mice. *Am J Pathol.* 185(6): 1713-1723, Jun, 2015

Suzuki S, Nishikawa A, Kuwana M, Nishimura H, Watanabe Y, Nakahara J, Hayashi YK, Suzuki N, Nishino I: Inflammatory myopathy with anti-signal recognition particle antibodies: case series of 100 patients. *Orphanet J Rare Dis.* 10(1): 61, May 2015 [Epub May 2015]

Nishino I, Carrillo-Carrasco N, Argov Z: GNE myopathy: current update and future therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 86(4): 385-392, Apr, 2015

Yonekawa T, Nishino I: Ullrich congenital muscular dystrophy: clinicopathological features, natural history and pathomechanism(s). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 86(3): 280-287, Mar 2015

Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Yonemoto N, Nakamura H, Murata M, Takeda SI, Nishino I, Kimura E: Nationwide patient registry for GNE myopathy in Japan. *Orphanet J Rare Dis.* 9(1): 150, 2014 [Online journal]

- Yonekawa T, Malicdan MC, Cho A, Hayashi YK, Nonaka I, Mine T, Yamamoto T, Nishino I, Noguchi S: Sialyllactose ameliorates myopathic phenotypes in symptomatic GNE myopathy model mice. *Brain*. 137(10): 2670-2679, 2014
- Cho A, Hayashi YK, Monma K, Oya Y, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Mutation profile of the *GNE* gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 85(8): 912-915, 2014
- Noguchi S, Ogawa M, Kawahara G, Malicdan MC, Nishino I: Allele-specific Gene Silencing of Mutant mRNA Restores Cellular Function in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts. *Mol Ther Nucleic Acids*. 3: e171, 2014
- Huizing M, Carrillo-Carrasco N, Malicdan MC, Noguchi S, Gahl WA, Mitrani-Rosenbaum S, Argov Z, Nishino I: GNE myopathy: New name and new mutation nomenclature. *Neuromuscul Disord*. 24(5): 387-389, 2014
- Mori-Yoshimura M, Oya Y, Yajima H, Yonemoto N, Kobayashi Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I, Murata M: GNE myopathy: A prospective natural history study of disease progression. *Neuromuscul Disord*. 24(5): 380-386, 2014
- Goto M, Okada M, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: A nationwide survey on marinesco-sjogren syndrome in Japan. *Orphanet J Rare Dis*. 9(1): 58, 2014
- 2:学会発表**
- Uruha A, Noguchi S, Sato W, Nishimura H, Mitsuhashi S, Yamamura T, Nishino I: Plasma IP-10 level distinguishes inflammatory myopathy. 20th International Congress of the World Muscle Society, Brighton, UK (Brighton Dome), 10.2, 2015 (9.30-10.4)
- 漆葉章典, 野口 悟, 三橋里美, 西村洋昭, 後藤加奈子, 西野一三: Plasma IP-10 level distinguishes inflammatory myopathy. 第7回筋炎ワークショップ, 新宿(京王プラザホテル), 9.12, 2015
- 漆葉章典, 野口 悟, 佐藤和貴郎, 西村洋昭, 三橋里美, 山村 隆, 西野一三: 血漿 IP-10 で炎症性筋疾患と非炎症性筋疾患を鑑別できる. 第一回日本筋学会学術集会, 小平(国立精神・神経医療研究センター), 8.8, 2015
- Uruha A, Noguchi S, Mitsuhashi S, Sato W, Yamamura T, Nishimura H, Nishino I: Plasma IP-10 level distinguishes inflammatory myopathy. 第56回日本神経学会学術大会, 新潟(朱鷺メッセ[新潟コンベンションセンター]), 5.22, 2015 (5.20-5.23)

Uruha A, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: High Prevalence of Hepatitis C Virus Infection in a Japanese Inclusion Body Myositis Cohort. 2014 American College of Rheumatology (ACR)/ Association of Rheumatology Health Professionals (ARHP) Annual Meeting, Boston, USA, Nov 2014.

漆葉章典, 野口悟, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: C 型肝炎ウイルス感染は封入体筋炎で高頻度である. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会・第 26 回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会, 金沢市, 9.4-9.6, 2014.

H: 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1: 特許取得

炎症性筋疾患鑑別マーカー及びそれを用いた炎症性筋疾患と非炎症性筋疾患の鑑別方法. (出願中. 特願 2015-031517)

2: 実用新案登録

なし

3: その他

なし