

封入体筋炎におけるオートファジー初期過程の障害

研究協力者: 日下 博文¹⁾

共同研究者: 中野 智²⁾、隠岐 光彬¹⁾

1) 関西医科大学神経内科

2) 大阪市立総合医療センター 神経内科

研究要旨

【目的・背景】 封入体筋炎の生検筋病理において、空胞化筋線維を中心に、種々のオートファジー関連蛋白の異常沈着がみとめられ、筋障害にはオートファジーの異常が関係しているといわれている。蛋白凝集体に対する選択的オートファジーの過程では、ユビキチン化された蛋白凝集体が、ユビキチンを介して p62 と結合し、その後 p62 の LC3 結合部位に LC3 が結合、複合体はさらに脂質膜と結合し、蛋白凝集体は2重膜空胞のオートファゴソーム内に取り込まれる。オートファゴソームはリソソームと結合、最終的に蛋白凝集体がこの空胞内で分解される。一方、p62 の Ser403 がリン酸化されるとユビキチンとの結合が増すことが明らかにされている。蛋白凝集体のオートファジーにかかわるユビキチンは Lys63 ユビキチンが中心である。

今回、選択的オートファジーが封入体筋炎でどのように発現しているかを検討した。

【方法】

予備実験として、8 例の封入体筋炎患者の生検筋組織で、選択的オートファジーに関与する分子の抗体を免疫組織化学的に検討し、Lys63-linked ubiquitin、Ser403 がリン酸化された p62 (S403-pp62)が空胞化筋線維やその他形態学的に異常な筋線維に陽性凝集体として発現していることを明らかにした。

その後、16 例の封入体筋炎患者生検筋組織で、1) S403-pp62 、2) Lys63-linked ubiquitin 、3) LC3 の分布と p62 (aa120-440)の分布を蛍光二重染色にて検討した。

【結果および考察】

S403-pp62、Lys63-linked ubiquitin、LC3 は、p62 凝集体とそれぞれ $79.05\% \pm 13.64\%$ (mean \pm SD)、 $66.54\% \pm 19.91\%$ 、 $51.84\% \pm 14.1\%$ のレベルで共存していた(陽性部分が 75%以上重なっている線維の割合)。また、LC3 と p62 の共存率は、S403-pp62 と比べ有意に低下していた ($p < 0.001$)。S403-pp62 と Lys63-linked ubiquitin 陽性沈着物は常に p62 凝集体内にあつたのに対し、LC3 はしばしば p62 の分布と異なっていた。

これらの結果は、封入体筋炎において、p62、Lys63-linked ubiquitin、LC3 は、共同して蛋白質凝集体のオートファジーに関与していることを示している。一方、封入体筋炎では、凝集体の p62 と LC3 の結合が十分でないため、蛋白質凝集体の分解がオートファジーの初期で停止しまっていることが推定される。

【結論】

蛍光二重染色法で封入体筋炎における蛋白質凝集体のオートファジー初期過程にかかわる重要分子の異常発現を明らかにした。

蛍光二重染色法で封入体筋炎における蛋白質凝集体のオートファジー初期過程にかかわる重要分子の異常発現を明らかにした

A: 研究目的

封入体筋炎の筋障害には、オートファジーの異常が関係しているといわれている。それは、生検筋病理において、空胞化筋線維を中心に、種々のオートファジー関連蛋白の異常沈着がみとめられるためである。いくつかの報告によると、オートファジー関連蛋白のうち、p62/SQSTM1 や LC3 が封入体筋炎の診断において感度・特異度ともに優れていることが示されている。蛋白質凝集体に対する選択的オートファジーの過程では、ユビキチン化された蛋白質凝集体が、ユビキチンを介して p62 と結合し、その後 p62 の LC3 結合部位に LC3 が結合、複合体はさらに脂質膜と結合し、蛋白質凝集体は 2 重膜空胞のオートファゴゾーム内に取り込まれる。オートファゴゾームはリソゾームと結合、最終的に蛋白質凝集体がこの空胞内で分解される。

一方、p62 の Ser403 がリン酸化されるとユビキチンとの結合が増すことが明らかにされている。蛋白質凝集体のオートファジーにかかわるユビキチンは Lys63 ユビキチンが中心である。今回、選択的オートファジーが封入体筋炎でどのように発現しているかを検討した。

B: 研究方法

予備実験として、8 例の封入体筋炎患者の生検

筋組織で、選択的オートファジーに関与する分子の抗体を免疫組織化学的に検討し、Lys63-linked ubiquitin、Ser403 がリン酸化された p62 (S403-pp62) が空胞化筋線維やその他形態学的に異常な筋線維に陽性凝集体として発現していることを明らかにした。その後、16 例の封入体筋炎患者生検筋組織で、1) S403-pp62、2) Lys63-linked ubiquitin、3) LC3 の分布と p62 (aa120-440) の分布を蛍光二重染色にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は関西医科大学倫理委員会の指針に従った。また、本研究は大阪市立総合医療センターの倫理委員会の承認を得た。

C: 研究結果

S403-pp62、Lys63-linked ubiquitin、LC3 は、p62 凝集体とそれぞれ 79.05% + 13.64% (mean + SD)、66.54% + 19.91%、51.84% + 14.1% のレベルで共存していた(陽性部分が 75% 以上重なっている線維の割合)。また、LC3 と p62 の共存率は、S403-pp62 と比べ有意に低下していた($p < 0.001$)。S403-pp62 と Lys63-linked ubiquitin 陽性沈着物は常に p62 凝集体内にあつたのに対し、LC3 はしばしば p62 の分布と異なっていた。

D: 考察

封入体筋炎において、p62、Lys63-linked ubiquitin、LC3 は、共同して蛋白質凝集体のオートファジーに関与していることを示している。一方、封入体筋炎では、凝集体の p62 と LC3 の結合が十分でないため、蛋白質凝集体の分解がオートファジーの初期で停止しまっていることが推定される。

E: 結論

蛍光二重染色法で封入体筋炎における蛋白凝集体のオートファジー初期過程にかかわる重要分子の異常発現を明らかにした。

蛍光二重染色法で封入体筋炎における蛋白凝集体のオートファジー初期過程にかかわる重要分子の異常発現を明らかにした。

F: 健康危険情報

特になし。

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: Nakano S, Oki M, Kusaka H. The role of p62/SQSTM1 in sporadic inclusion body myositis. *Neuromuscul Disord.* 2017 Apr;27(4):363-369.

2: 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.* 2016 Nov 8;11(1):146.

3: M Oki, S Hori, S Asayama, R Wate, S Kaneko, H Kusaka. Early-onset

parkinson's disease associated with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Intern med.* 2016;55(3):303-305.

4: S Iida, M Nakamura, R Wate, S Kaneko, H Kusaka. Successful treatment of paroxysmal tonic spasms with topiramate in a patient with neuromyelitis optica. *Mult Scler Relat Disord.* 2015 Sep;4(5):457-459.

5: Ayaki T, Ito H, Fukushima H, Inoue T, Kondo T, Ikemoto A, Asano T, Shodai A, Fujita T, Fukui S, Morino H, Nakano S, Kusaka H, Yamashita H, Ihara M, Matsumoto R, Kawamata J, Urushitani M, Kawakami H, Takahashi R.

Immunoreactivity of valosin-containing protein in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in a case of its novel mutant. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Dec 10;2(1):172. [Epub ahead of print]

6: 辰野健太郎, 中村聖香, 朝山知子, 中野智. 筋症状のみを呈した慢性ミオパチー型筋サルコイドーシスの 1 例. *臨床神経* 2014;54(4):313-316.

2: 学会発表

1: S Nakano, M Matsumoto, R Kanki, H Morihata, M Oki, H Kusaka. Ser403-phosphorylated p62/SQSTM1 in sporadic inclusion body myositis.

第 56 回神経学会学術集会 2015.5 新潟

2: 隠岐光彬ら. 封入体筋炎における Glutathione peroxidase 1/2 陽性封入体
第 55 回神経学会学術集会 2014.5 福岡

3: 中野智ら. 封入体筋炎筋組織における p62/sequestosome1 の発現と核貪食

第 55 回神経学会学術集会 2014.5 福岡

4: 松本瑞樹ら, 抗ミトコンドリア抗体が陽性であった抗 SRP 抗体陽性壊死性筋症の一例 第

101 回 日本神経学会 近畿地方会 2014.12

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