

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業))
希少難治性筋疾患に関する調査研究班 (総合)研究報告書

① H26 年度「骨格筋再生過程における Myostatin および関連蛋白 の検討」

研究協力者:村田顕也

共同研究者:高橋麻衣子、中山宜昭、森めぐみ、伊東秀文

和歌山県立医科大学 神経内科

② H27 年度「中條西村症候群と IBM の臨床像・筋病理像の比較」

研究協力者:村田顕也¹⁾

共同研究者:綾木孝²⁾、金澤伸雄³⁾、漆葉章典⁴⁾、西野一三⁴⁾、大村浩一郎⁵⁾、杉江和馬⁶⁾、
笠木伸平⁷⁾、上野聡⁶⁾、古川福実³⁾、伊東秀文¹⁾、漆谷真²⁾、高橋良輔²⁾

1)和歌山県立医科大学 神経内科、2)京都大学 神経内科、3)和歌山県立医科大学
皮膚科、4)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、
5)京都大学 膠原病内科、6)奈良県立医科大学 神経内科、7)神戸大学医学部附属
病院 検査部

③H28 年度「中條西村症候群の臨床病態の解析 –IBM との比較–」

研究協力者:村田顕也¹⁾

共同研究者:森めぐみ¹⁾、金澤伸雄²⁾、綾木孝³⁾、古川福実²⁾、伊東秀文¹⁾

1)和歌山県立医科大学 神経内科、2)和歌山県立医科大学 皮膚科
3)京都大学大学院 医学研究科臨床神経学

研究要旨

H26年度は、Cardiotoxin (CTX)による骨格筋損傷マウスモデルと炎症性ミオパチー (IBM、皮膚筋炎) の生検筋の筋再生過程におけるMSTNとActR IIBの発現を病理学的に検討した。マウスの検討においてCTX非投与の対照群では、MSTNとActR IIBは、Type 2の萎縮筋線維の筋細胞膜と筋細胞質に発現していた。CTX筋損傷モデルでは、MSTNとActR IIBは、再生過程にある筋線維の内在核と筋細胞質に発現していた。再生筋線維に占めるMSTN陽性線維の割合は損傷後の時期を問わず42-49%であった。また、ActR IIB陽性筋線維は、常にMSTN陽性であったが、MHC-d陽性の再生筋線維に占めるMSTN-ActR IIB共陽性線維の割合は、損傷1週後は8.4%、2週後は24.1%、3週後は18.3%と経時的に変化した。炎症性ミオパチーの検討において、MSTNとActRIIBは、MHC-d陽性の一部の再生筋線維とMHC-d陰性の高度に萎縮した萎縮筋線維で、共発現していた。MSTNとActR共陽性の再生筋線維の割合が筋線維萎縮の予測に重要であると結論づけられた。

H27年度、28年度は、IBMと中條西村症候群(NNS)について検討した。

H27年度は、プロテアソームサブユニットである $\beta 5i$ をコードするPSMB8遺伝子の変異により発症する中條西村症候群(NNS)とIBMを比較し、臨床像、筋病理像の点から検討した。NNSの症例の中には、IBMに類似した筋病理像を呈する症例が認められ、鑑別の点から重要と考えられた。

H28年度は、H27年に引き続き、NNSとIBMにおける臨床症状や画像所見、および、筋病理の特徴を比較検討した。

NNSとIBMはいずれも大腿四頭筋と深指屈筋に筋力低下、筋萎縮が強い点が共通していた。病理所見では、免疫染色で類似の染色性がみられた。NNSと臨床症状や病理所見における共通点が多数認められたことから、IBMにおいてもプロテアソーム機能異常の関与が推測された。

【H26年】

A: 研究目的

Myostatin (MSTN)は、骨格筋に特異的に発現するTGF β スーパーファミリーに属するサイトカインである。MSTNは、activin receptor IIB (ActR IIB)と結合後、Smad依存性/非依存性経路を活性化し、筋分化や筋肥大を誘導する遺伝子群の発現を抑制し、筋線維萎縮を促す。

今回、私たちは、Cardiotoxin (CTX)による骨格筋損傷マウスモデルと炎症性ミオパチーの生検筋の筋再生過程におけるMSTNとActR IIB

の発現を病理学的に検討し、その臨床的意義を解明した。

B: 研究方法

① 生後8-12週のC57BL/6マウスの大腿内転筋群にCTX (10 μ M)を投与し、筋損傷マウスモデルを作製した。CTX投与1,2,3週後にsacrificeし、損傷部の病理学的変化を、MSTN, ActRIIB, myosin-heavy chain slow (MHC-s), myosin-heavy chain developmental (MHC-d)抗体を用い検討した。CTXの代わりに生食を投与したマウスを対照群とし同様の検討を行った。

②炎症性ミオパチー(封入体筋炎、皮膚筋炎)の生検筋を用いて同様の病理学的検討を行った。

C: 研究結果

① 筋損傷モデル

CTX 非投与群: MSTN と ActR IIB は、Type 1 陰性の萎縮筋線維の筋細胞膜と筋細胞質に発現していた。(図 1)

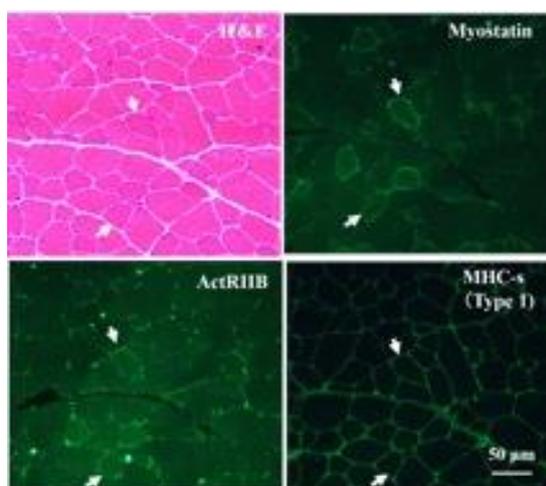


図 1. 正常対象の病理学的検討

CTX 投与群: CTX 損傷後 1 週間目には、MSTN と ActR IIB の発現は軽度であったが(図 2)、CTX 損傷後 3 週間目には、MSTN と ActR IIB は、MHC-d 陽性の再生過程の筋線維の内在核と筋細胞質に発現していた(図 3, 4)。

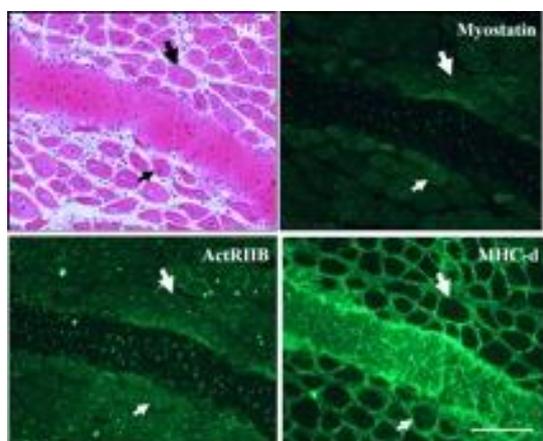


図 2 1week post CTX injury

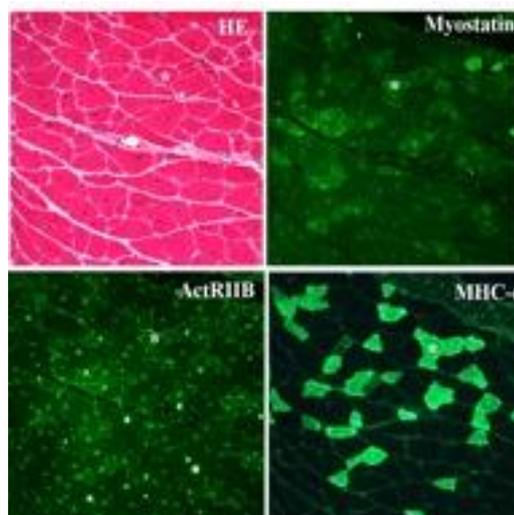


図 3 3week post CTX injury

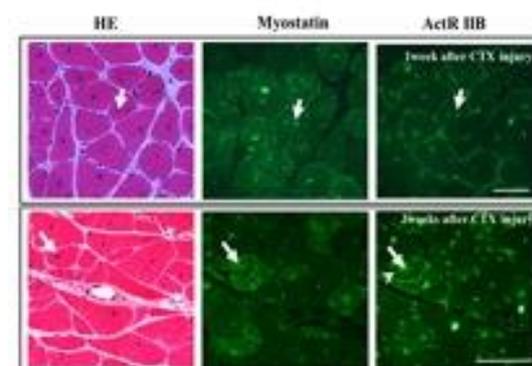


図4 Post CTX injury

再生筋線維に占める MSTN 陽性線維の割合は損傷後の時期を問わず 42-49%であった。

また、ActR IIB 陽性筋線維は、常に MSTN 陽性を呈したが、再生筋線維に占める MSTN-ActR IIB 共陽性線維の割合は、損傷 1 週後は 8.4%、2 週後は 24.1%、3 週後は 18.3%と経時的に変化した(表1)。

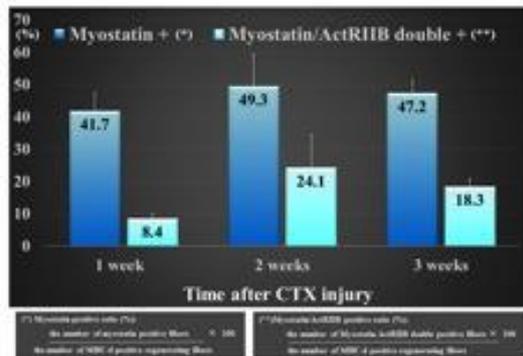


表1 Myostatin, Myostatin/ActRIIB 陽性線維の割合

② 生検筋

s-IBM: MSTN と ActRIIB は、MHC-d 陽性の再生筋線維で発現していたが Rimmed-vacuole を有する筋線維では発現していなかった(図 5)。MHC-d 陰性の高度に萎縮した筋線維でも MSTN と ActRIIB は共陽性を示した(図 6)。

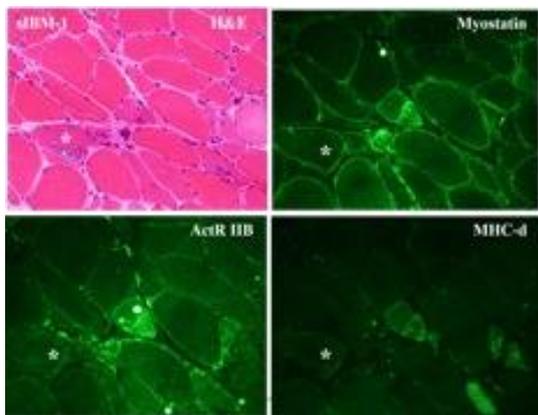


図 5 s-IBM

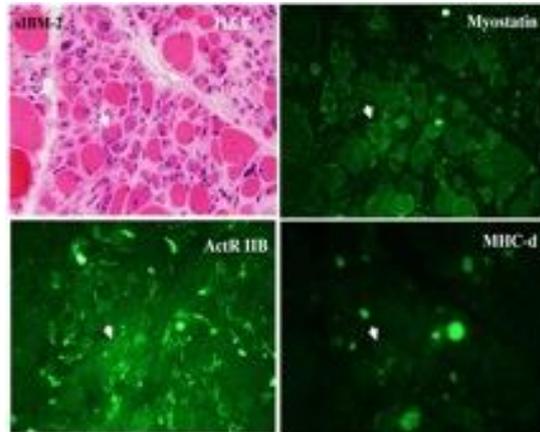


図 6 s-IBM (高度萎縮部分)

皮膚筋炎: perifascicular atrophy を来した筋線維のうち、MHC-d 陰性の萎縮筋線維において MSTN と ActRIIB は共陽性を示した(図 7)

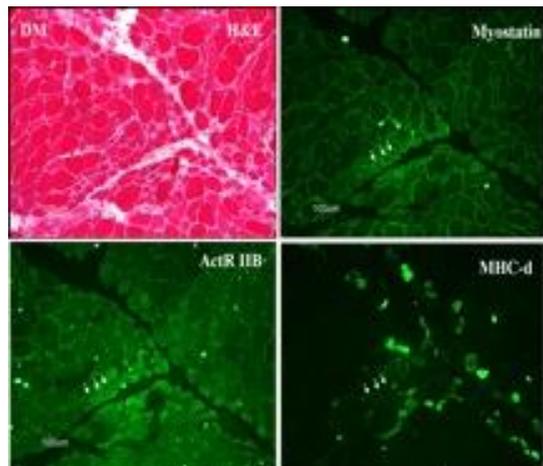


図 7 皮膚筋炎

【考察】

Myostatin (MSTN) は、骨格筋に特異的に発現する TGFβ スーパーファミリーに属するサイトカインで、activin receptor IIB (ActRIIB) と結合後、Smad 依存性/非依存性経路を活性化し、筋分化や筋肥大を誘導する遺伝子群の発現を抑制し筋萎縮を促す(図 8)。

MSTN は、Type 2 線維に発現するとの既報告はあるが、その受容体である ActRIIB の局在に

ついでに報告はなされていない。

今回の CTX の筋損傷モデルから、筋再生時の MSTN と ActRIIB の発現パターンは、経時的に変化し、MSTN と ActRIIB は必ずしも同一の筋線維に発現するとは限らず、double-positive 線維の割合が経時的に変化することが判明した。

また、生検筋の検討から、MHC-d 陽性再生筋線維は、MSTN 陽性と陰性群に大別され、MSTN 陽性群は更に ActR IIB 陽性と陰性群に大別された。一方、MHC-d 陰性線維は、筋萎縮を免れた MSTN 陽性・ActR IIB 陰性 Type 1 線維と MSTN 陽性・ActR IIB 陽性筋線維に大別できた。この MSTN ActR IIB double positive 線維は、皮膚筋炎の perifascicular atrophy や sIBM の高度の萎縮した筋線維で発現していた。(図 9)

以上のことから、筋傷害後、再生過程にある筋線維でまず、MSTN が発現し、その後 ActR IIB が発現した筋線維が最終的に萎縮に陥ることが推測された。

E: 結論

MSTN と ActR IIB は筋線維萎縮に関係しているが再生過程の筋線維における両者の発現は必ずしも一致していない。筋萎縮の進行の予測には共陽性再生筋線維の割合を検討することが重要である。

【H27 年】

A: 研究目的

中條-西村症候群はプロテアソームのサブユニッ

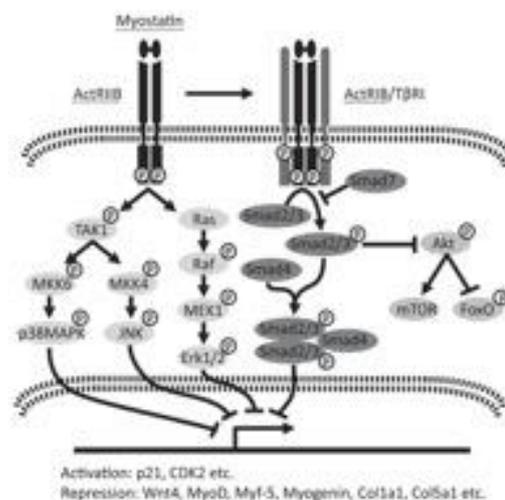


図 8 Myostatin と ActRIIB の作用機序

Myostatin および関連蛋白の発現パターン

	1	2	3	4
Myostatin	-	+	+	+~±
ActR IIB	-	-/+	-	+
MHC-d	+	+	-	-
	再生筋線維		萎縮を免れた Type 1筋線維	高度な萎縮筋線維 (perifascicular atrophy)

F: 健康危険情報

なし

G: 研究発表

論文発表

村田顕也, 伊東秀文: 封入体筋炎の病態と原因.

Brain and Nerve 66, 1385-1394, 2014

H: 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1: 特許取得 2: 実用新案登録

3: その他 なし

トである β -5i サブユニットをコードする PSMB8 遺伝比の変異によって発症し、封入体筋炎と類

似した病理像を呈する例が報告されている。これらの疾患の類似点と相違点を臨床像、筋病理像において比較検討を行った。

B: 研究方法

遺伝子検査によって PSMB8 遺伝子の変異が確認されている症例 1 例の筋凍結ブロックと、2 例のパラフィンブロック献体を用いて、HE 染色と免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

患者に対しては病理サンプル取得時に研究に用いられることを説明した上でサンプルを採取している。

C: 研究結果

中條-西村症候群の症例の中には、IBM に類似した筋病理像を呈する症例があり、鑑別の点から重要と考えた。また、タンパク沈着の程度は、炎症細胞や、空胞の程度と関連していた。一方で、炎症の程度や空胞の有無は今回の検討症例や、既報告でも、症例によって異なっていた。

D: 考察

プロテアソームの障害は IBM でも想定されており、中條-西村症候群はプロテアソーム障害によって、同等な病理像を呈し得ることは、炎症と変性の関係を知る上でも重要な所見と考えた。

E: 結論

これらの筋病理所見が、病態を反映したものなのか、二次的なものであるかや、IBM との病態の共有の有無については、さらに症例の蓄積が必要と考えた。

F: 健康危険情報

標本はいずれも、過去に既に採取されたもので

あり、本研究による患者への侵襲性はない。

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 Honjo Y, Ayaki T ら Increased GADD34 in oligodendrocytes in Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2015 Aug 18;602:50-5.
- ② Uchida T, Tamaki Y, Ayaki T ら CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. Sci Rep. 2016 Jan 11;6:19118

2: 学会発表

- ① 第 56 回日本神経学会, Takashi Ayaki, Hidefumi Ito, Osamu Komure ら Clinicopathologic study of autopsied familial ALS cases with optineurin mutation, 2015 (H27)/5/22, 新潟
- ② 第 56 回日本神経病理学会, 綾木孝, 伊東秀文, 小牟禮修ら, Optineurin 遺伝子にヘテロ接合 E478G 変異を認めた家族性 ALS の一剖検例 2015(H27)/6/4, 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

【H28 年】

A: 研究目的

中條-西村症候群(NNS)は、弛張熱や特徴

的な皮疹を伴い、顔面・上肢を中心とした上半身のやせと、拘縮を伴う長く節くれ立った指趾を呈する、常染色体劣性遺伝疾患である。免疫プロテアソーム $\beta 5i$ サブユニットをコードする遺伝子の変異により発症し、プロテアソーム機能不全のためにユビキチン化・酸化蛋白が異常蓄積することで種々の症状を呈すると考えられている。一方、封入体筋炎 (IBM) は大腿四頭筋と深指屈筋に強い筋力低下、筋萎縮を特徴とする炎症性筋疾患である。炎症、変性、異常蛋白の蓄積、オートファジーやプロテアソーム機能低下など様々な原因が提唱されているが、明確な発症機序はまだ不明である。両疾患における臨床的、病理学的特徴を比較検討した。

B: 研究方法

① 遺伝子検査によって PSMB8 遺伝子のホモ変異が確認されている 4 例の NNS 症例について、臨床所見 (筋力低下、筋 MRI、血液データなど) を IBM の臨床像と比較した。さらに NNS 症例 2 例と IBM 患者の筋組織を用いて、HE 染色および免疫染色を行い比較検討した。

② (倫理面への配慮)

各患者に対し、病理サンプル取得時に研究に用いられることを説明したうえサンプルを採取した。また、発表時には個人情報が入り込まない形で公開するよう配慮した。

C: 研究結果

① 臨床症状

NNS 患者 4 例はいずれも深指屈筋の筋力低下を認め、そのうち 3 例は大腿四頭筋の筋力低下もみられ、IBM の筋力低下の分布に類似していた。

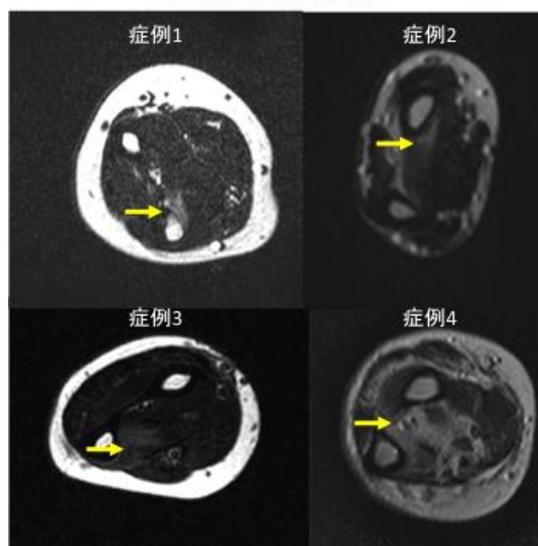
さらに嚥下造影所見では、嚥下障害が顕著

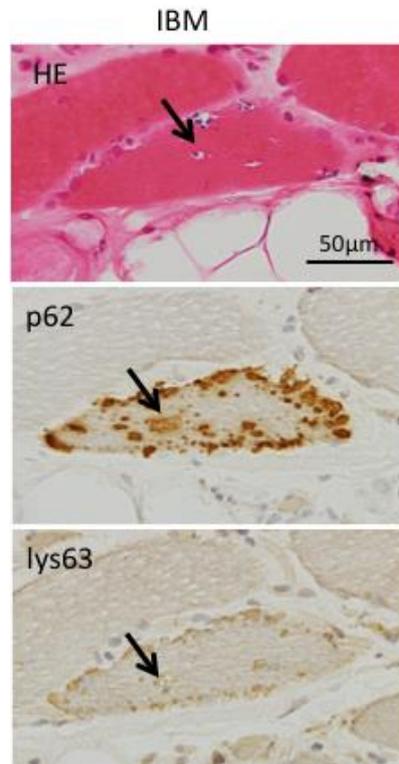
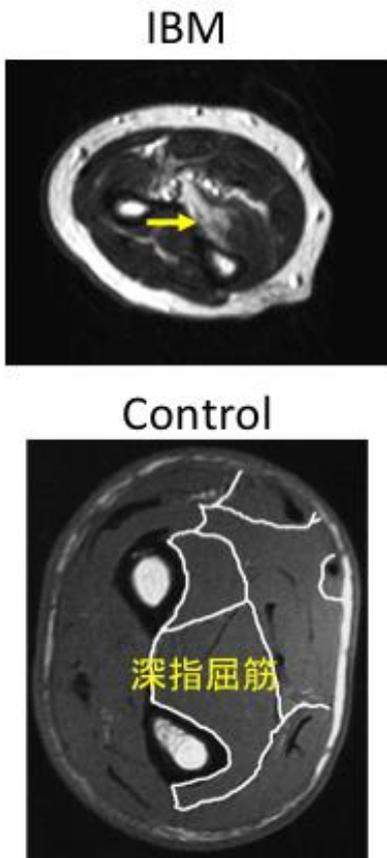
であった NNS1 例において、食道入口部開大障害が認められた。これは IBM における嚥下障害のパターンと同様であった。

② MRI 所見

前腕 MRI では、4 症例全てにおいて深指屈筋の高信号変化が認められ、IBM に類似した所見であった。

中條西村症候群

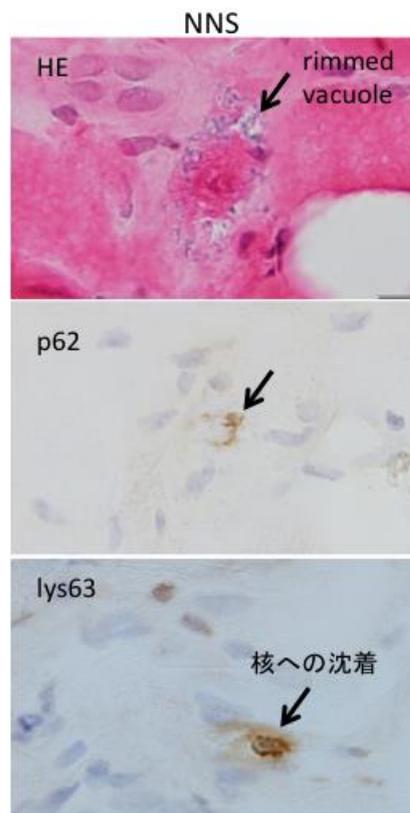




③ 病理所見

IBM、NNS のいずれでも縁取り空胞と、縁取り空胞内や空胞周囲細胞質への p62 沈着がみられた。IBM では、lys63-linked polyubiquitin による染色でも p62 とほぼ共通の染色性を認めた。

一方、NNS では lys63-linked polyubiquitin は細胞質には目立たず、核に淡い沈着を認めた。



D: 考察

IBM では p62 と lys63 polyubiquitin はいずれも縁取り空胞内や筋線維細胞膜下に沈着が目立った。選択的オートファジーにおいて p62 に LC3 が結合する際、p62 に k63 鎖ユビキチン化蛋白が結合して複合体を形成し、オートファゴソームへ取り込まれる。p62 と lys63 polyubiquitin の沈着部位が重複していたのは、これらの影響が推測された。

E: 結論

NNS と IBM には、多数の類似した臨床所見が確認された。

筋病理所見では、共通の特徴 (rimmed vacuole, p62, pTDP43 沈着) を有するが、ポリユビキチン鎖の染色性には相違点もみられた。NNS は遺伝子異常によりプロテアソーム機能不全をきたす稀な疾患である。NNS と臨床症状や病理所見における共通点が多数認められたことから、IBM においてもプロテアソーム機能異常の関与が推測された。今後症例数や免疫染色を追加してさらに検討する必要があると考えられた。

F: 健康危険情報

患者に実施した MRI や血液検査などの臨床検査は、いずれも通常診療の範囲で実施した。なお、標本はいずれも過去に既に採取されたものを用いており、本研究による患者への侵襲性はない。

G: 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

①Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan 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
Orphanet J Rare Dis. 2016 Nov 8;11(1):146

②Anti-U3 ribonucleoprotein antibody-positive inflammatory myopathy: a case report

Murata KY, Nakatani K, Yamaneki M, Nakanishi I, Ito H
J Med Case Rep. 2016 Jun 9;10:169.

③Fatigue-related differences in erector spinae between prepubertal children and young adults using surface

electromyographic power spectral analysis Tanina H, Nishimura Y, Tsuboi H, Sakata T, Nakamura T, Murata KY, Arakawa H, Umezu Y, Tajima F
J Back Musculoskelet Rehabil. 2017 vol. 30, no.1, pp.1-9

④A case of paraneoplastic anti-3-hydroxy-

3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies positive immune-mediated necrotizing myopathy with uterine cancer Mizuma A, Koheji M, Netsu S, Yutani S, Kitao R, Suzuki S, Murata K, Nagata E, Takizawa S

Internal Medicine. In press

2: 学会発表

村田顕也. ANCA 関連血管炎性ニューロパチーの臨床病理学的検討. 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016 年 5 月 19 日, 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