

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461323

研究課題名(和文)自己貪食空胞性ミオパチーにおけるオートファジー分子機構の病態関与の解明

研究課題名(英文)Clinicopathological features and autophagic pathway of autophagic vacuolar myopathy and

研究代表者

杉江 和馬 (Sugie, Kazuma)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60347549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自己貪食空胞性ミオパチー(AVM)は、特異な自己貪食空胞を伴う筋疾患で、病態や発症機序は未解明である。全国調査でAVM患者41例を確認し、代表疾患Danon病28例では、男女とも致死性肥大型心筋症を示し、ミオパチーは男性のみであった。生検筋で筋鞘膜の性質を有する自己貪食空胞を認め、電顕的に二重膜である空胞壁を確認し、免疫組織学的にもオートファジー分子の発現を認めた。現状では根本的な治療はなく、ミオパチー症状は軽症である一方、Danon病の心筋症は予後決定因子でありその診断および治療は重要である。

研究成果の概要(英文)：Danon disease, an X-linked dominant vacuolar cardiomyopathy and skeletal myopathy, is caused by primary deficiency of lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2). The clinical features and the prevalences of Danon disease have not been well established. On a nationwide survey, we identified 28 Danon disease patients (16 men and 12 women). Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) was documented in most men, while dilated cardiomyopathy was more common among women. Pathologically, we found autophagic vacuoles with sarcolemmal features (AVSF) and LAMP-2 deficiency in muscle fibers. AVSF expressed virtually all sarcolemmal proteins on their vacuolar membranes. In addition, variable proteins associated with autophagic pathway were expressed in AVSF. In conclusion, Danon disease is a very rare muscular disorder and may be primarily caused by lysosomal dysfunctions. Cardiomyopathy is the most important prognostic factor and the main cause of death among Danon disease patients.

研究分野：神経内科

キーワード：自己貪食空胞性ミオパチー 自己貪食空胞 オートファジー Danon病 LAMP-2 ライソゾーム

1. 研究開始当初の背景

自己貪食空胞性ミオパチー (Autophagic vacuolar myopathy: AVM) の代表疾患である Danon 病は、2000 年にリソソーム膜蛋白である LAMP-2 (lysosome-associated membrane protein-2) の原発性欠損症であることが初めて明らかになったまれな疾患である (Nishino I et al. Nature, 2000)。研究代表者は、遺伝学的に確定した Danon 病の臨床病型について初めて報告し (Sugie K, et al. Neurology, 2002)、X 染色体優性遺伝であることを示した。続けて、女性患者における LAMP-2 haploinsufficiency についても明らかにした (Sugie K, et al. Neuromuscul Disord, 2003)。また、Danon 病を含めた AVM における空胞のきわめて特異な病理学的特徴について報告した (Sugie K, et al. J Neuropathol Exp Neurol, 2005)。これまで、研究代表者は、常にこの分野において先駆的研究を行ってきた。

Danon 病で認められる自己貪食空胞は、筋鞘膜の性質を有するきわめて特徴的な空胞膜を有した空胞 (AVSF: autophagic vacuoles with sarcolemmal features) である。この空胞は、縁取り空胞 (rimmed vacuole) や糖原病その他の疾患で認められる自己貪食空胞とは明らかに異なる。Danon 病と同様の空胞は、X-linked myopathy with excessive autophagy (XMEA)、infantile autophagic vacuolar myopathy、adult-onset autophagic vacuolar myopathy with multi-organ involvement (Kaneda D, Sugie K, et al. Neurology, 2003)、X-linked congenital autophagic vacuolar myopathy (Yan C, Sugie K, et al. Neurology, 2005) にみられる。XMEA 以外は、いずれも研究代表者のグループが疾患概念を提唱してきたものである。我々はオートファジー機構の異常を原因とするこれら疾患群を「自己貪食空胞性ミオパチー (AVM)」と提唱している。AVM の病態には、オートファジー機構の関与が疑われているが、依然原因不明で治療も未確立である。

2. 研究の目的

「自己貪食空胞性ミオパチー (AVM)」は病理学的に極めて特徴的な自己貪食空胞を有する稀少な筋疾患で、根治療法はなく身体的

障害度は重度である。生体防御の機構として飛躍的に注目されているオートファジー分子機構の関与が疑われるが、依然原因不明で治療も未確立である。本疾患の空胞には、1) 1 次性ライソゾーム異常による Danon 病を代表とする筋鞘膜の性質をもつ自己貪食空胞、2) 2 次性ライソゾーム異常による縁取り空胞 (RV) がある。オートファジーには未解明の部分が多く、特に筋組織での研究は進んでいない。病態解明の戦略として、確固たる疾患概念を確立させ、共通する臨床病態の解明を行う。

まず、AVM は、日本人により、原因が発見され臨床病型が明らかにされ、日本人で多く発見されている疾患であり、その先駆的研究を行ってきた我々のグループで本疾患の疾患概念を確立し、診断基準を作成することは大きな責務と考える。また、臨床病型により生命予後は大きく異なる。正確な診断や適切な治療を行うためにも、診断基準の確立は必要不可欠である。臨床病型の病態解明を行って根本治療の手掛かりを得ることを目指す。

また、AVM の疾患概念を確固たるものにしていくためには、共通する分子病態の解明が必要である。そのための戦略として、ヒトの AVM 患者の生検筋において、病理学的にリソソーム・エンドソーム経路およびオートファジー機構に關与する物質の局在・機能について検討を行うことで、筋組織でのオートファジーの詳細な機序解明を目指す。

3. 研究の方法

AVM の疾患概念の確立のためには、より詳細な臨床病型の把握が不可欠である。研究代表者が客員研究員を務める研究国立精神・神経医療研究センターは、世界で最多の AVM 患者の臨床情報を管理している。内訳は、Danon 病は全世界での報告例約 30 家系のうちの 19 家系が、XMEA は 3 家系、乳児型 4 家系、成人型 1 家系、X 連鎖性先天型 1 家系である。この貴重な情報に基づいて、診断基準確立のための臨床情報の整理および統計学的解析を行う。また、本疾患の確定診断に筋組織での特徴的な自己貪食空胞の病理所見は必要不可欠であるため、病理学的解析結果の整理も行う。そして、全国での疫学調査を行い、診断がつかずに埋もれている患者を見出し、臨

床経過や合併症、検査所見、筋病理学的所見、さらに、これまで施行された治療方法についても調査して、本疾患の実態を把握する。

また、AVM 患者の生検筋を用いて、自己貪食空胞の組織化学的・免疫組織化学的検討を行い筋病理学的に評価する。具体的には、ライソゾーム・エンドソーム経路およびオートファジーに關与する物質の局在・機能について筋病理学的検討を行う。さらに、オートファジーの場である自己貪食空胞の微細構造について形態学的に検討を行う。そして、筋鞘膜蛋白、ライソゾーム系蛋白の局在について観察、解析を行うことで、AVM の病態の全容解明として、骨格筋における蛋白分解システムとしてのライソゾーム・エンドソーム経路におけるオートファジー・カスケードの解明を行う。

4. 研究成果

全国の合計 2,617 施設のうち、1,409 施設から回答を得た（回収率 54%）。集計結果から、AVM 患者 40 例を確認した（Danon 病 12 家系 27 例、XMEA 1 家系 3 例、X 連鎖性先天性 AVN 1 家系 7 例、乳児型 AVN 2 例、成人型 AVN 1 例）。集計結果の詳細な解析から、Danon 病の発症年齢は男性 10 代、女性 30 代で、平均死亡年齢は男性 20 代、女性 40 代であった。ミオパチー、心筋症、知的遅滞が三主徴で、死因は心不全だった。心筋症の多くが肥大型心筋症であった。他の合併症として、網膜症や肝腫大、低身長、pes cavus を呈する患者がみられた。治療として、ブロッカーを中心とした投薬加療が多く、6 例でペースメーカー埋込がされ、根治療法である心臓移植は 0 例であった。

今回新たに見出した症例のうち、早期発症に肥大型心筋症に軽度精神遅滞を呈した女児例を認めた。女性患者での早期発症と精神遅滞はきわめて稀である。本患者を詳細に解析すると、網膜症の合併を認めるもミオパチー症状はほぼ見られなかった。生検筋では LAMP-2 発現の低下を認め、我々が過去に論文発表した女性例と同様に、LAMP-2 の haploinsufficiency を認めた。本人の遺伝子解析では、LAMP-2 に過去に報告の無い新たな変異を見出した。さらに、母の遺伝子解析では、LAMP-2 遺伝子変異は認めず、本例は de novo 症例であった。貴重な症例と考え、国際

雑誌に報告を行った（[Sugie K](#), et al. *Neuropathology* 2016, in press）。

一方、XMEA と先天性 AVN では臨床的にはミオパチーのみで、心筋障害はほぼ認めなかった。また、今回の検討では、両疾患ともに VMA21 遺伝子変異を認め、アレレル病であると考えられた。今後 XMEA を中心に、AVM の臨床分類の再検討も必要と考える。

病理学的検討として、自己貪食空胞の組織化学的および免疫組織学的解析より、オートファゴソームを筋鞘膜の性質を有する膜で囲んだ特異な自己貪食空胞を認めた。電顕的解析では、周囲の空胞壁に基底膜を見出した。空胞壁には、dystrophin や sarcoglycan など筋鞘膜蛋白が多数発現していた。組織化学染色では、空胞壁でコリンエステラーゼの発現も確認できた。さらに、ライソゾーム・エンドソーム経路およびオートファジー機構に關与する物質の局在について、筋組織では LAMP-2 欠損と、ライソゾーム膜蛋白：LAMP-1、LIMP-1、LIMP-2 の発現亢進を認めた。また、オートファゴソーム膜蛋白：LC3、ライソゾーム蛋白：cathepsin、エンドソーム膜蛋白：Rab5、VAMP-7、Transferrin receptor、LDL receptor も亢進していた。本結果から、Danon 病では、自己貪食空胞の筋線維内での蓄積に加えて、オートファジー/ライソゾーム系およびエンドソーム系の機能亢進を認めた。以上からも、AVM の診断に筋病理所見は必要不可欠である。我々が作成した診断基準においても、病理学的項目は重要所見として取り入れている。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1. [Sugie K](#), Yoshizawa H, Onoue K, Nakanishi Y, Eura N, Ogawa M, Nakano T, Sakaguchi Y, Hayashi YK, Kishimoto T, Shima M, Saito Y, [Nishino I](#), [Ueno S](#). Early onset of cardiomyopathy and intellectual disability in a girl with Danon disease associated with a de novo novel mutation of the LAMP2 gene. *Neuropathology*. 2016. [Epub ahead of print]

2. **Sugie K**, Sugie M, Taoka T, Tonomura Y, Kumazawa A, Izumi T, Kichikawa K, **Ueno S**. Characteristic MRI Findings of upper Limb Muscle Involvement in Myotonic Dystrophy Type 1. PLoS One. 2015. Apr 28;10(4):e0125051.
3. Izumi R, Niihori T, Takahashi T, Suzuki N, Tateyama M, Watanabe C, **Sugie K**, Nakanishi H, Sobue G, Kato M, Warita H, Aoki Y, Aoki M. Genetic profile for suspected dysferlinopathy identified by targeted next-generation sequencing. Neurol Genet. 2015. [Epub ahead of print]
4. **Sugie K**, Kumazawa A, **Ueno S**. Beevor's sign and protuberant abdomen in sIBM Intern Med. 2015;54(21):2793-2794.

〔学会発表〕(計 3件)

1. **Sugie K**, Sugie M, Taoka T, Tonomura Y, Kumazawa A, Izumi T, Kichikawa K, **Ueno S**. Characteristic MRI Findings of upper Limb Muscle Involvement in Myotonic Dystrophy Type 1. The 20th International Congress of the World Muscle Society (WMS 2015), Brighton, England, September 30th-October 4th, 2015.
2. **杉江和馬**、杉江美穂、田岡俊昭、殿村恭代、熊澤綾、泉哲石、吉川公彦、**上野聡** . 筋強直性ジストロフィー1型における上肢骨格筋障害の神経放射線学的検討 . 第1回日本筋学会総会、東京、2015年8月 .
3. **杉江和馬**、江浦信之、杉江美穂、岩佐直毅、小原啓弥、泉哲石、形岡博史、**上野聡** . Incidence and risk factors of stroke associated with myotonic dystrophy type 1 . 第56回日本神経学会学術集会、新潟、2015年5月 .

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：

番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉江 和馬 (SUGIE KAZUMA)
 奈良県立医科大学・神経内科・准教授
 研究者番号：60347549

(2) 研究分担者

西野 一三 (NISHINO ICHIZO)
 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・部長
 研究者番号：00332388

上野 聡 (UENO SATOSHI)
 奈良県立医科大学・神経内科・教授
 研究者番号：40184949

(3) 連携研究者

なし