

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591020

研究課題名（和文） 神経筋疾患における筋組織内のアкваポリン発現性変化の病態機序に関する検討

研究課題名（英文） Analysis of the aquaporin expression in skeletal muscles with neuromuscular diseases.

研究代表者

清水 潤 (SHIMIZU JUN)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40260492

研究成果の概要（和文）：神経筋疾患の骨格筋線維における aquaporin 4 (AQP4) の発現変化を検討し、再生線維、脱神経線維、炎症性筋で非壊死筋線維上の発現が低下することを明らかにした。炎症性筋の AQP4 の発現低下は補体の組織沈着度と逆相関しており、補体活性化が AQP4 の発現低下をおこしていた。補体系の関与した筋炎では AQP4 の発現変化により筋細胞の水バランス調整障害が生じ筋線維機能障害が生じるという、従来未知の障害機序が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Aquaporin 4 (AQP4) is known to be important not only in controlling water balance of many cell types but also serve as an autoimmune target of neuromyelitis optica. In this project, we studied AQP4 expression of skeletal muscle fibers in various neuromuscular diseases including inflammatory myopathies. In immunohistochemistry, in addition to regenerating muscle fibers and denervated muscle fibers irrespective of disease, many non necrotic fibers in inflammatory myopathies showed the decrease of AQP4 expression. In the analysis of the factors which correlates to the decrease of AQP4 expression, the deposit of membrane attack complex (C5b9) in muscle tissues was clearly correlated. Our findings indicated that the activation of complement cascade decreases the AQP4 expression in skeletal muscle fibers in inflammatory myopathies, and causes functional defect of skeletal muscle fibers in inflammatory myopathies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経筋疾患、aquaporin 4

1. 研究開始当初の背景

細胞膜蛋白である aquaporin (AQP) は、ジストロフィン関連蛋白や細胞骨格蛋白と密接に関連し細胞の構造や浸透圧バランス維持、

細胞接着、血管内皮細胞の細胞遊走、細胞の信号伝達に関与する。一方、Neuromyelitis Optica (NMO) においては、血清中に抗 aquaporin4 (AQP4) 抗体が疾患特異的に出現

し病態に関与する。

臓器ごとに発現するアクアポリンは異なり、機能に関しては、十分に明らかにされていない。骨格筋におけるアクアポリンについては過去に少数の検討がされており、先行研究では、AQP4 の発現は Duchenne 型筋ジストロフィーや福山型筋ジストロフィーなどのジストロフィンおよび関連蛋白の発現に異常を認める筋疾患において、発現が高度に低下し、筋細胞の障害性に関係していることが推定されている。その他、再生線維、神経原性筋線維において筋線維上の染色性が低下することが知られるが、その生理的な意義は不明である。

2. 研究の目的

(1) 本検討では、aquaporin(AQP)の中の AQP4 の神経筋疾患の筋組織での病的意義を解明するために各種の神経筋疾患の生検骨格筋において、発現変化を免疫組織学的に検討することを目的とした。

(2) AQP4 発現が高度に低下していた例を抽出し、その臨床病態背景を臨床像との対比で検討することで AQP4 発現を作用する因子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 筋組織における AQP4 の発現

対象疾患は、コントロール筋 3 例、Dystrophinopathy 7 例、Dysferlinopathy 6 例、神経原性筋 6 例、縁取り空包を伴う遠位型ミオパチー群 3 例、Inflammatory myopathy 42 例。生検筋を用い、抗アクアポリ 4 抗体 (rabbit anti-AQP4 antibody Chemicon International AB3594×1500) を用いて免疫組織染色をおこなった。連続切片をルーチ酵素組織化学染色、免疫染色 [筋疾患マーカー：(抗 α , β)-dystroglycan, 抗

dys1, dys2, dys3, 抗 dysferlin、抗 Ubiquitin, 抗 emerin、抗 laminin, 抗 SMI31 抗体, 抗 $(\alpha, \beta, \gamma, \delta)$ -sarcoglycan 抗体、炎症性マーカー：抗 HLA-ABC, 抗 HLA-DR, 抗 CD8, 抗 CD4, 抗 C5b9(membrane attack complex), 抗 CD68 抗体、抗 LCA 抗体、抗 IgG 抗体、抗 IgM 抗体] にて同時に染色し、筋線維上の AQP4 の発現に関して疾患、筋線維病理変化ごとに比較検討した。

Inflammatory myopathy に関しては、連続切片を用いて、AQP4 の筋細胞膜上の発現と以下の指標と①炎症細胞浸潤の程度、②壊死・再生線維の頻度、③補体複合体 C5b9 抗体の沈着、の関連を半定量的に検討した。

(2) AQP4 発現高度低下例の臨床病態検討

平成 20 年度 4 月～平成 22 年度 12 月までに当科で経験し生検筋の検討をした連続症例に対して、抗アクアポリ 4 抗体を用いて免疫組織染色を施行し AQP4 発現の高度低下例を抽出。

4. 研究成果

(1) 神経筋疾患における AQP4 発現

コントロール筋群：全ての筋線維細胞膜に発現していた。疾患群：疾患にかかわらず再生線維は陰性。神経原性群：神経再支配線維の一部における陰性化を認めた。群集萎縮を示す脱神経筋では筋線維細胞膜 AQP4 の染色性は消失していた。神経原性の小角化線維には、染色性が陰性のものと陽性のものが存在し筋線維のタイプにも一致しなかった。Dystrophinopathy 群・Dysferlinopathy 群：筋組織の変化に伴い染色性が低下する筋線維数は増加した。慢性で高度組織変化を示す症例では、陽性線維は散見程度であった。再生線維の染色性が低下する一方、比較的正常に見える筋線維の染色性も低下を見せるも

のが存在した。縁取り空包を伴う遠位型ミオパチー群：筋組織の変化に伴い染色性が低下する筋線維数は増加した。慢性で高度組織変化を示す症例では陽性線維は散見程度であった。縁どり空包を持つ筋線維の染色性が低下する一方、比較的正常に見える筋線維の染色性も低下を見せるものが存在した。(表1)

表1. 骨格筋におけるAQP4の発現

	症例数	筋細胞膜上のAQP4の発現			
		Normal	↓	↓↓	↓↓↓
Control	5	5	0	0	0
Dystrophinopathy	7	1	2	2	1
Dysferlinopathy	6	0	4	1	2
Neuropathic	6	0	3	1	2
IBM	6	0	4	1	1
縁取り空包を伴うミオパチー	3	0	1	0	2
Inflammatory myopathy	42	11	15	10	5

AQP4: N (5%以内)、↓:5~1/3、↓↓:1/3~2/3、↓↓↓:2/3以上

(2) 炎症性筋疾患筋のAQP4の発現

封入体筋炎群：rimmed vacuoleを示す筋線維、炎症細胞浸潤を受ける筋線維、および筋内鞘の炎症の近傍の非壊死筋線維において、染色性が低下を認めた。

Inflammatory myopathy群：壊死線維、再生線維で染色性は低下～消失していた。過収縮線維、空胞変性線維、perifascicular atrophy 部位の線維の染色性は正常。非壊死筋線維で陰性化線維が増加していた。高度

表2. 筋炎におけるAQP4発現の補体沈着の関連
C5b9の筋細胞膜沈着

筋細胞膜上のAQP4の発現	症例数	C5b9の筋細胞膜沈着			
		-	±	+	+++
Normal	11	11	0	0	0
↓	15	9	1	5	0
↓↓	10	2	1	5	2
↓↓↓	5	0	0	3	2

筋線維膜C5b9: -, +: ~1/3, ++: 1/3~2/3, +++: 2/3以上

のAQP4低下を示す2症例(SLE + Sjögren症候群)が存在した。

非壊死AQP4陰性化線維の増加の程度を①炎症細胞浸潤の程度、②壊死再生線維の頻度、③筋線維に対する補体沈着の程度と比較し

た結果では、AQP4の発現は補体(C5b9)の筋組織沈着の程度と逆相関していた。(表2)

(3) AQP4発現高度低下例の臨床病態検討

AQP4発現の高度低下例として、SLE + Sjögren症候群を合併した筋炎症例2例とアルコール過飲に脊柱管狭窄を合併し高CK血症を認めた神経原性筋の2症例が抽出された。

SLE + Sjögren症候群を合併した筋炎症例1例では血清中の抗アクアポリン4抗体は陰性であった。1例では血清が得られず、抗アクアポリン4抗体の有無は不明であった。

神経原性筋の2症例は、60歳と68歳の男性で、いずれもアルコール過飲歴があり、腰部脊柱管狭窄によるS1神経根障害を合併しており、安静と禁酒で軽快する可逆性の血清CK上昇を認めていた。増悪期の骨格筋MRI画像ではS1支配筋に骨格筋MRIのDWIで高信号を認め、同時期の生検骨格筋ではAQP4の高度発現低下に加えて慢性神経原性と慢性筋原性の混在像を認めたが間質浮腫はとぼしかった。

抗AQP4抗体の神経筋疾患の筋組織における発現に関して、骨格筋におけるAQP4の発現は、1)再生線維、2)脱神経線維に加えて、新たに3)補体系活性化の病態で高度の低下を見せることが明らかになった。また、本検討ではじめて、炎症性筋疾患では非壊死筋線維上のAQP4発現が低下することが明らかになった。さらに、炎症性筋疾患の骨格筋でのAQP4の発現は、C5b9の組織沈着の程度と逆相関しており、補体沈着の程度の増加により筋線維のAQP4発現が低下することが示された。

筋線維に関わらず、細胞膜上のAQP4の発現を作用する要因に関しての研究は乏しい。AQP4の中樞病巣での発現低下がNMOの指標および直接的な病態機序として注目されてい

るが、補体系活性化が筋線維細胞膜上の AQP4 の発現を低下させるという今回の結論は、筋線維に関わらず、神経細胞や組織細胞の AQP4 発現に補体系活性化が影響を及ぼす可能性を示唆し、AQP4 の病態機序への関与を考える上で重要な知見であろう。また、膠原病や自己免疫性神経疾患における補体を介した細胞機能低下に関して AQP4 発現変化という観点から検討していく必要示唆された。

炎症性筋疾患の筋力低下は必ずしも壊死・再生線維の割合には比例せず、筋力低下の真の病態機序に関しては不明な点が多い。今回、補体の関連した筋炎の組織において非壊死筋線維で広範に AQP4 発現が低下していたことは、inflammatory myopathy における炎症病巣で筋線維の機能障害が従来の指標である壊死再生より広範であることを示す。炎症性筋疾患の病巣における筋細胞の機能障害を捉えたともいえる。治療を念頭においた上で、補体による筋線維機能障害の機序解明の必要がある。

SLE + Sjögren 症候群を伴う筋炎では抗アクアポリン 4 抗体は関係していなかった。神経筋疾患における抗アクアポリン 4 抗体関連症候群の存在を引き続き検索していく必要がある。神経原性筋の 2 症例の筋では DWI で高信号を認めており、アルコール、神経原性、運動などによる筋線維の機械的負荷が筋線維上の AQP4 発現高度低下に関連していることが示された。

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 3 件 すべて査読あり)

1. Shimizu J, Hatanaka Y, Hasegawa M, Iwata A, Sugimoto I, Date H, Goto J, Shimizu T, Takatsu M, Sakurai Y,

Nakase H, Uesaka Y, Hashida H, Hashimoto K, Komiya T, Tsuji S. IFN β -1b may severely exacerbate Japanese optic-spinal MS in neuromyelitis optica spectrum. *Neurology*. 2010 Sep 8. 75:1423-142

2. Shirota Y, et al. Shimizu J (6 番目).

A case of atypical amyloid polyneuropathy with predominant upper-limb involvement with the diagnosis unexpectedly found at lung operation. *Intern Med*. 2010; 49 (15): 1627-31.

3. Takada K, Shimizu J, Kusunoki S. Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy. *Exp Neurol*. 209: 279-83, 2008

[学会発表] (計 2 件)

1. Immunohistochemical and electron microscopy study of myositis with rheumatoid arthritis. Shimizu J, Hashimoto M, Kadoya M, Koide Y, Kubota A, Tsuji S XII ICNMD, 2010 July 20, Naples, Italy.
2. 神経筋疾患における筋組織内のアクアポリン発現性変化に関する検討 清水潤、橋本明子、辻 省次 第 50 回日本神経学会総会 2009 年 5 月 22 日 仙台

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 潤 (SHIMIZU JUN)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40260492

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし