

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012 年度

課題番号：22790826

研究課題名（和文）

自己貪食空胞性ミオパチーの臨床病態解析とオートファジー分子機構の解明

研究課題名（英文）

Study for the clinical features and the pathomechanism of autophagic systems in autophagic vacuolar myopathy

研究代表者

杉江 和馬（SUGIE KAZUMA）

奈良県立医科大学・神経内科・講師

研究者番号：60347549

研究成果の概要（和文）：

自己貪食空胞性ミオパチー(AVM)は、極めて特徴的な自己貪食空胞を有するまれな筋疾患で、根治療法はなく身体的障害度は重度である。AVMの疾患概念の確立を目指し、AVM患者の全国実態調査を行った。患者数や臨床実態、治療状況とともに、心筋症が致死性で予後決定因子であることを明らかにした。さらに、生検筋での病理学的検討で、筋細胞で特徴的な自己貪食空胞の蓄積とリソソーム・エンドソーム系の機能亢進を示した。筋変性との関連が示唆され、骨格筋でのオートファジーの解明に新しい知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

Autophagic vacuolar myopathy (AVM) is a very rare progressive muscle disease defined pathologically by the presence of unique autophagic vacuoles in muscle fibers. The etiology and the pathomechanism of AVM remain unestablished. To gain insights, we performed pathological study and performed a nationwide survey of AVM in Japan. We identified about 50 patients with AVM and elucidated the clinical features of AVM, characterized by lethal cardiomyopathy and skeletal myopathy. Our results indicated that in addition to autophagic/lysosomal pathway, endosomal pathway was also activated. Therefore, we considered that these both pathways may be associated with the degenerative process of muscle fibers in AVM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医師薬学

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：臨床神経形態学・筋病理学・臨床神経学

## 1. 研究開始当初の背景

自己食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食食空胞は、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食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「自己食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

「自己食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食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 次性リソソーム異常による Danon 病を代表とする筋鞘膜の性質をもつ自己食食空胞、2) 2 次性リソソ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関与する物質の局在・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

- (1) 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 連鎖性先天性 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、本疾患の事態を把握する。まず、疾患の啓蒙用文書と調査票の必要項目を作成する。そして、一次調査票を国内の日本神経学会専門医と同学会関連施設へ送付して、回答結果の解析を行う。本疾患の診療経験有りの施設には、二次調査票を送り、臨床経過や合併症、検査所見、筋病理学的所見など症例の詳細を収集する。さらに、これまで施行された治療方法についても調査する。二次調査票の集計結果より、本邦での患者数や有病率、臨床病型の多様性の把握に努める。

- (2) 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、リソソーム・エンドソーム経路およびオートファジーに関与する物質の局在・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、リソソ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リソソーム・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。さらに、本疾患群におけるリソソームを介したオートファジーの異常を解明し、本病態の改善に向けた治療へ結びつく分子病態の発見を目指していく。

#### 4. 研究成果

- (1) 全国 47 都道府県の合計 2,617 施設のうち、1,409 施設から第一次調査の回答を得た（回収率 54%）。AVM 患者を有する施設には第二次調査として患者の実態調査を行った。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 AVM 1 家系 7 例、乳児型 AVM 2 例、成人型 AVM 1 例）。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、β 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、4 例で根治療法である心臓移植が施行されていた。一方、XMEA と先天性 AVM 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。

集計結果では、他に、AVM 疑い例や既知の病型に該当しない AVM 例を 20 例以上見出した。現在、各患者の臨床病態につき、調査している段階である。今後、AVM の臨床分類の再検討も必要かもしれないと考える。

表 自己貪食空胞性ミオパチーの臨床的特徴

	Danon病		XMEA	乳児型 AVM	先天性 AVM	成人型 AVM
	男性	女性				
遺伝	XD	XD	XR	XR?	XR	ARorXR?
発症年齢	10代	30代	10代	新生児	乳幼児	40代
ミオパチー	+	-	+	+	+	+
心筋症	+	+	-	±	-	+
知的遅滞	+	-	-	+	+	+
合併症	時に肝障害 網膜症		-	-	-	多臓器障害
自己貪食空胞	+	+	+	+	+	+
空胞壁での AChE 発現	+	+	+	+	+	+
空胞壁での 筋鞘膜蛋白発現 (AVSF)	+	+	+	+	+	+
基底膜の 重層化	-	-	+	+	+	+
原因遺伝子	LAMP-2		VMA21	VMA21	VMA21	?

- (2) 自己貪食空胞の組織学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的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、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関する物質の局在について、筋組織では LAMP-2 欠損と、リソソーム膜蛋白：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、リソソーム蛋白：cathepsin、エンドソーム膜蛋白：Rab5、VAMP-7、Transferrin receptor、LDL receptor も亢進していた。一方、ユビキチン、19S および 20S プロテアソームの発現に明らかな亢進は認めなかった。今回の研究結果から、Danon 病では、自己食空胞の筋線維内での蓄積に加えて、オートファジー／リソソーム系およびエンドソーム系の機能亢進を明らかにできた。

AVM の診断に筋病理所見は必要不可欠である。診断基準項目への病理学的所見導入のため、生検筋での特徴的な自己食空胞：AVSF の組織化学的、免疫組織化学的、電顕的解析を行った。また、もう一つの重要な所見として、筋細胞膜の重層化が挙げられる。これは、Danon 病以外の臨床病型で認めることから、Danon 病と他の臨床病型を区別する所見と考えられる。病態機序については不明であるが、XMEA 類似疾患で多く認めることから、VMA21 の機能との関連やリソソーム腔内の pH の関与も示唆される。

## 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 6 件)

- ① **Sugie K**, Hayashi YK, Goto K, Nishino I, Ueno S.  
Unusual presentation: Unilateral arm and contralateral leg amyotrophy in

FSHD.

Neurology. 79(5): e46, 2012. 査読有.

- ② **Sugie K**, Tonomura Y, Ueno S.  
Characterization of dermatomyositis with coexistence of anti-Jo-1 and anti-SRP antibodies.  
Intern Med. 51(7): 799-802, 2012. 査読有.
- ③ **Sugie K**, Umehara F, Kataoka H, Kumazawa A, Ueno S.  
Chronic severe axonal polyneuropathy associated with hyperthyroidism and multivitamin deficiency.  
Neuro Endocrinol Lett. 33(8):757-760, 2012. 査読有.
- ④ Mori-Yoshimura M, Monma K, Suzuki N, Aoki M, Kumamoto T, Tanaka K, Tomimitsu H, Nakano S, Sonoo M, Shimizu J, **Sugie K**, Nakamura H, Oya Y, Hayashi YK, Malicdan MC, Noguchi S, Murata M, Nishino I.  
Heterozygous UDP-GlcNAc 2-epimerase and N-acetylmannosamine kinase domain mutations in the GNE gene result in a less severe GNE myopathy phenotype compared to homozygous N-acetylmannosamine kinase domain mutations.  
J Neurol Sci. 318(1-2): 100-105, 2012. 査読有.
- ⑤ Sato T, Hayashi YK, Oya Y, Kondo T, **Sugie K**, Kaneda D, Houzen H, Yabe I, Sasaki H, Noguchi S, Nonaka I, Osawa M, Nishino I.  
DNAJB6 myopathy in an Asian cohort and cytoplasmic/nuclear inclusions.  
Neuromuscul Disord. 23(3):269-276, 2013. 査読有.
- ⑥ **Sugie K**, Morikawa M, Taoka T, Hirano M, Ueno S.  
Serial neuroimaging in Tolosa-Hunt

syndrome with acute bilateral complete ophthalmoplegia. J Neuroimaging. 2011 Jan;21(1):79-82. 査読有.

[学会発表] (計 6件)

- ① **Sugie K**, Komaki H, Kaneda D, Kurashige T, Kimura A, Matsumoto M, Ueno S, Nishino I.  
A nationwide survey of autophagic vacuolar myopathies characterized by autophagic vacuoles with sarcolemmal features (AVSF) in Japan.  
The 17th International Congress of World Muscle Society, Perth, Australia, October 11-15, 2012.
- ② **Sugie K**, Hayashi YK, Goto K, Eura N, Nonaka I, Nishino I, Ueno S.  
A neuroimaging study of asymmetric skeletal muscle involvement in facioscapulohumeral muscular dystrophy.  
The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center, Kyoto, Japan, June 7-8, 2012.
- ③ Eura N, **Sugie K**, Kiriyama T, Kataoka H, Ueno S.  
Neuroradiological evaluation of dysphagia as a manifestation of dermatomyositis.  
The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center, Kyoto, Japan, June 7-8, 2012.
- ④ **Sugie K**, Kurashige T, Kaneda D, Kimura A, Komaki H, Matsumoto M, Ueno S, Nishino I.  
Clinicopathological and genetical features of autophagic vacuolar myopathies characterized by autophagic vacuoles with sarcolemmal features (AVSF).  
The 12th International Congress of

Human Genetics (ICHG), Montreal, Canada, October 11-15, 2011

- ⑤ **Sugie K**, Kimura A, Komaki H, Kaneda D, Nonaka I, Ueno S, Nishino I.  
Clinicopathological features of autophagic vacuolar myopathies characterized by autophagic vacuoles with sarcolemmal features (AVSF).  
The 17th International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, September 11-15, 2010.
- ⑥ **Sugie K**, Hayashi YK, Goto K, Nishino I, Ueno S.  
Asymmetry of skeletal muscle involvement in facioscapulohumeral muscular dystrophy: A neuroimaging study.  
The 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, October 12-16, 2010.

## 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・講師  
研究者番号: 60347549

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし