

学位論文題名

Clinical, pathological, and genetic analysis of sporadic inclusion body myositis in Japanese people

(日本人の封入体筋炎における臨床症状、筋病理所見と遺伝学的背景に関する研究)

学位論文内容の要旨

【Background and Objectives】 Inclusion body myositis (IBM) is a common adult-onset, sporadic muscle disease with pathological findings of rimmed vacuoles, mononuclear cell invasion of non-necrotic fibers, and amyloid deposits or 15–18 nm filaments on electron microscopy. However, rimmed vacuoles are not specific to IBM and may be observed in inherited vacuolar myopathies such as hereditary inclusion body myopathy (hIBM) and myofibrillar myopathy (MFM). In general, clinical features of IBM may be diverse and show some overlap with other vacuolar myopathies. Molecular genetic studies have identified several genetic loci associated with some inherited vacuolar myopathies: 3 genes for hIBMs (*Desmin*, *GNE*, and *MYHC2A* genes), the *VCP* gene for inclusion body myopathy with early-onset Paget disease of the bone and frontotemporal dementia (IBMPFD), the *ZASP* gene for zaspopathy (one form of MFM) and the *DNAJB6* gene for limb-girdle muscular dystrophy 1D (LGMD1D). However, the extent to which these genes play a role in generating the phenotype of IBM is poorly understood. In order to explore the molecular basis of IBM and to investigate genotype-phenotype correlations, we performed a clinicopathological analysis of 23 IBM patients and screened for mutations in the above 6 candidate genes.

【Methods】 According to the Needham and Mastaglia criteria, 23 suspect IBM patients were recruited from a total of 692 cases with available muscle pathology from December 1993 to December 2011. Samples from all patients underwent a battery of conventional pathological studies, including hematoxylin-eosin (HE), modified Gomori trichrome (mGT), nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase (NADH-TR), adenosine triphosphatase (ATPase; pre-incubation at pH 4.2, 4.6, and 10.4), non-specific esterase, and alkaline phosphatase, as well as β -amyloid peptide precursor protein (β APP) immunostaining. Cytochrome c oxidase (COX) studies and immunostaining for CD8⁺ T cells and MHC-I expression could only be performed in 18 patients due to insufficient specimen samples. Double immunostaining for MYHC isoforms was performed in 3 patients with *MYHC* mutation. Immunohistochemical staining of Z-band associated proteins was performed in 2 patients with a *ZASP* mutation or variant. After extracting DNA from blood or frozen muscle, PCR was used to amplify all coding exons of the *Desmin*, *GNE*, *MYHC2A*, *VCP*, *ZASP*, and *DNAJB6* genes, as well as the flanking non-coding regions of the above. Direct sequencing of the *DNAJB6* gene was performed in 20 patients due to insufficient DNA, while sequencing of other 5 genes was performed in all patients.

【Results】 According to the Needham and Mastaglia criteria, 15 patients were diagnosed with definite IBM, 3 patients with probable IBM, and 5 patients with possible IBM. No cases showed missense mutations in the *Desmin*, *VCP*, or *DNAJB6* genes. Three patients with IBM carried the missense mutation p.V805A in the *MYHC2A* gene. The p.V805A variant was only present in 1 of 160 control chromosomes. The frequency of this allele was significantly higher in the IBM patients than in the controls (6.5% vs. 0.6%, respectively; $p < 0.05$). Further, the p.V805A variant in the *MYHC2A* gene was associated with a significantly increased risk of IBM (Odds Ratio = 11.1; 95% CI = 1.13-109.3). The immunohistochemical staining for MYHC isoforms in these 3 cases showed atrophy or loss of muscle fibers expressing MYHC IIa or IIx. One patient with IBM harbored the missense mutation p.V566M in the *ZASP* gene. The mutation was not present in 160 control chromosomes. Immunohistochemical studies of Z-band associated proteins revealed strong accumulation of desmin, dystrophin C-terminus, neural cell adhesion molecule (NCAM), and β APP in affected fibers, with mild to moderate immunoreactivity for cell division cycle 2 (CDC2), myotilin, α -B crystalline (α -BC), and ubiquitin at the vacuole margins. The immunohistochemical studies of Z-band associated proteins revealed typical Z-band abnormalities, indicating that the V566M mutation alters the functionally important ZASP protein. One patient with possible IBM was identified to carry both the *GNE* missense mutations and the *ZASP* variant: novel compound heterozygous missense mutations in the *GNE* gene (p.V421A and p.N635K) and a heterozygous variant in the *ZASP* gene (p.D673N). Both the *GNE* mutations were not observed in 160 control chromosomes while the *ZASP* p.D673N variant was identified in 2 of 160 control chromosomes. Immunohistochemical analysis of Z-band associated proteins showed mild to moderate immunoreactivity to β APP, NCAM, α -BC, and ubiquitin, and no immunoreactivity to desmin, CDC2, and myotilin, indicating atypical features of *ZASP* associated MFM. All of the mutations were located in highly evolutionarily conserved domains of their respective genes.

【Discussion】 Of the 6 genes screened in the 23 IBM patients, we identified 5 IBM patients carrying missense mutations. The 3 patients with *MYHC2A* p.V805A mutation displayed proximal dominance of limb weakness with involvement of the quadriceps femoris and finger flexors, and showed both clinical and pathological phenotypes resembling that of IBM. The diagnosis remained considerably indistinguishable between IBM and *MYHC2A* associated IBM3. However, the immunostaining results of MYHC isoforms revealed atrophy or loss of fibers expressing MYHC IIa in 3 patients, suggesting the p.V805A mutation alters MYHC IIa protein function and p.V805A mutation is pathogenic in 3 patients. The patient with *ZASP* V566M mutation displayed distal dominance of limb weakness with the tibialis anterior being more affected than the quadriceps femoris, indicating this patient did not show a classical IBM phenotype. The typical findings of the Z-band associated protein immunostaining were compatible with *ZASP* associated MFM. It appears that the V566M mutation was responsible for this patient, and the diagnosis was revised as zaspopathy from IBM. The patient with *GNE* mutations and *ZASP* variant presented with distal weakness sparing the quadriceps muscles, and showed atypical pathological findings of IBM lacking mononuclear cell invasion of non-necrotic fibers and upregulation of MHC class I expression. Moreover, the atypical findings of the Z-band associated protein immunostaining did not compatible with *ZASP* associated MFM. It seems that the *GNE* mutations are pathogenic and the diagnosis was revised as IBM2/DMRV from possible IBM.

【Conclusion】 Cumulatively, approximately 20% of the IBM patients in this study harbored missense mutations, and 3 genes (*MYHC2A*, *ZASP*, and *GNE*) appeared to play a role in generating the phenotype of IBM. These findings highlight the possibility of the non-familial cases carrying the mutations. Meanwhile, the immunohistochemical studies and causative gene screening would be further emphasized in the diagnostic procedure of IBM. Moreover, we suggest that typical clinical features and typical pathological findings, including CD8⁺ T cell invasion of non-necrotic fibers, are both required for accurately diagnosing IBM.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 口 昌 幸
副 査 教 授 佐々木 秀 直
副 査 教 授 松 野 吉 宏
副 査 教 授 佐 邊 壽 孝

学位論文題名

Clinical, pathological, and genetic analysis of sporadic inclusion body myositis in Japanese people

(日本人の封入体筋炎における臨床症状、筋病理所見と遺伝学的背景に関する研究)

孤発性封入体筋炎(IBM)は慢性進行性筋疾患であり、筋病理学的に炎症性変化に加えて筋線維内に縁取り空胞やアミロイド沈着を認めるという特徴がある。その病態機序は不明であり、有効な治療法はない。一方、遺伝性封入体筋症や縁取り空胞を伴う筋症においては、複数の原因遺伝子が同定されている。本研究では、IBMの遺伝学的背景を明らかにするために、IBM 23症例を対象に遺伝性封入体筋症や縁取り空胞を伴う筋症の原因遺伝子である*Desmin*, *GNE*, *MYHC2A*, *VCP*, *ZASP*, *DNAJB6*遺伝子について遺伝子解析を行うと伴に、臨床症状と筋病理学的所見を検討した。その結果、23例中*Desmin*, *VCP*, *DNAJB6*各遺伝子変化を認める症例は存在しなかったが、3例に*MYHC2A*遺伝子 p. V805Aを、1例に*ZASP*遺伝子 p. V566Mを、もう1例に*ZASP*遺伝子 p. D673Nと*GNE*遺伝子 p. V421Aと p. N635Kの複合ヘテロ接合を認めた。筋組織免疫染色の検討から、このうち*ZASP*遺伝子 p. D673Nのみが多型であり、その他は病的変異の可能性が高いことを報告した。また、臨床症状と筋病理所見の解析では、現在用いられている複数の国際IBM診断基準を用いると、診断基準によってはIBMと診断できない症例も存在することを報告した。

発表後、松野吉宏教授から1)免疫組織染色に用いた標本がホルマリン固定パラフィン包埋標本なのか、凍結標本なのかについて、2)ホルマリン固定標本であれば抗原性が失われている可能性について、3)IBMで認められるMHC-I発現の亢進を判断する基準について、4)ミスセンス変異は同定されなかったIBM症例の発症機序についての質問があった。回答として1)免疫組織染色に用いた標本はホルマリン固定パラフィン包埋標本であること、2)ホルマリン固定標本では抗原性が失活している可能性があること、3)MHC-I免疫染色時には、positive controlとnegative controlの検体を同時に染色し、positive controlと同様に染色される検体を発現亢進としたこと、4)今回の研究では80%のIBM症例において、遺伝子変異が同定されなかったこと、IBMの病態はまだ未知であり、環境因子、遺伝因子を含めた様々な仮説があること、今回解析していないが、 α B-crystallinやMyotilin遺伝子なども候補遺伝子であることを説明した。

この質疑に関して、審査終了後に申請者より、免疫組織染色に用いた試料は本来凍結筋組織であったにも関わらず、パラフィン包埋組織を用いたと学位申請論文に誤って記載し

ていたこと、それに伴い誤った回答をしてしまったことの申し出があった。該当箇所を訂正した学位申請論文を再提出することを指示した。

次に、佐々木秀直教授から1) 申請者の母国である中華人民共和国にけるIBMの報告は在るについて、2) 中華人民共和国のIBMにおける遺伝子変異が報告されているについて、3) 呈示した4つのIBM国際診断基準の中で最も実用的なものはどれかについて質問があった。回答として、1) 中華人民共和国においては、IBMの症例数が増加傾向にあること、特に、最近5年に、遺伝性封入体筋症に関する研究が進んでいること、2) 中華人民共和国のIBMにおいては、*GNE*と*Desmin*遺伝子変異が報告されており、*MYHC2A*遺伝子変異は報告されていないこと、3) Griggs診断基準がよく使われているが、電子顕微鏡所見が診断基準に含まれているため使用しにくいこと、Needham & Mastaglia診断基準では病理所見が重視されているが、臨床所見が軽視されていること、ENMC診断基準は臨床症状と病理所見に加えて、治療効果も含む13項目よりなる複雑な診断基準であること、印象としては2010年に作成されたrevised IBM診断基準が、病理学的所見と臨床所見を均等に扱っており最も使いやすい印象があること、今回の研究では診断基準の感度や特異度に関しては検討していないので、1つの診断基準を推奨することはできないことを説明した。

野口昌幸教授からは1) *MYHC2A*遺伝子 p. V805A を有した3症例の筋電図所見について、2) *MYHC2A*遺伝子 p. V805A変異を認めた症例が多いが、その変異の頻度について、3) 今回解析対象とした6遺伝子がIBM発症に関与する機序について、4) IBM診断基準の一部では発症年齢を30歳以上と規定しているが、その理由について、5) 今後のIBM研究計画についての質問があった。回答として1) *MYHC2A*遺伝子 p. V805A を有した1例では筋原性変化の筋電図所見を示したこと、残る2例では筋電図検査が行われなかったこと、2) *MYHC2A*遺伝子 p. V805A変異は新規変異であること、*MYHC2A*遺伝子解析については現時点で欧州からの報告のみであること、3) 筋原線維は筋節という最小単位で構成されており、筋節の構造は、Z-bandという膜で区切られていること、Z bandはactininとそれをらせん状に取り囲むdesmin、それにZASP, myotilin, α B-crystallinを含む複数の分子が支持的に結合する形態をとっていること、従って*Desmin*, *ZASP* 変異によるZ-band異常により筋原線維構造の変化や異常蓄積蛋白が認められること、*GNE*遺伝子については、*GNE*はシアル酸合成酵素なので、筋肉内蛋白のシアル化が低下することにより筋線維変性をきたすこと、*MYHC2A*遺伝子についてはmyosin heavy chain II aに翻訳されるので、それが主に存在するタイプ2A筋線維を中心に変性がおきること、*VCP*遺伝子については、*VCP*はAAA蛋白ファミリーに属し、小胞体関連分解、転写因子の活性化、アポトーシスなどの細胞機能に関与していること、*DNAJB6*遺伝子はwnt signal系に関与すること、4) IBMと遺伝性封入体筋症を臨床的に鑑別する目的で発症年齢を30歳以上と規定していること、5) 今後、遺伝子変化の無い群の詳細な病理学的解析と生化学的解析が重要と思われること、即ち遺伝子変化のあるIBMと無いIBMの異同を明らかにすることにより、より正確なIBM診断基準の作成に寄与できることを説明した。

この論文は、IBMの遺伝学的背景を明らかにした点と、現在の国際診断基準の問題点を明らかにした点で高く評価され、今後のIBMの発症機序を理解する一助になるのみならず、正確なIBM臨床診断のために重要な情報となる事が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども合わせて申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると評価した。