

200730071A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの

根本的治療法開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西野 一三

平成20(2008)年4月

目 次

I.	総括研究報告	
	縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの 根本的治療法開発	1
	西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
II.	分担研究報告	
1.	縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの シアル酸投与療法による前臨床試験	8
	西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
2.	縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対する治療法開発 骨髄移植実験並びに各種治療効果の組織学的評価	12
	林 由起子 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
3.	縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対する治療法開発 GNE 発現ウイルスベクター作成とアミロイド抑制療法開発	16
	野口 悟 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV.	研究成果の刊行物・別刷	21

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学事業）
総括研究報告書

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの根本的治療法開発

主任研究者 西野 一三 国立精神・神経センター神経研究所部長

研究要旨 ヒト GNE ミスセンス変異をノックアウトバックグラウンドで発現する縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) モデルマウスを用いて、前臨床試験を行なうことを目的としている。このマウスでは、シアル酸が顕著に低下し、また筋線維内にアミロイドの蓄積が観察され、これらが病態と密接に関連していると考えられている。今年度は、低シアル酸の回復を標的とした、シアル酸およびその化合物の投与、遺伝子治療用のアデノウイルスベクターの開発、骨髄細移植実験の基礎研究を行うとともに、アミロイド蓄積に対する *R*-fluobiprofen の投与試験を行った。シアル酸およびその化合物の投与により、DMRV マウスの運動能力、骨格筋の収縮力、生化学パラメーター、筋病理像などすべてにおいて、改善が見られた。この事は、シアル酸の回復が直接、症状の改善につながる事を示していた。遺伝子治療用の GNE 遺伝子発現アデノウイルスベクターの開発においては細胞レベルで、発現を確認出来た。骨髄細移植実験の基礎研究として、GFP-Tg マウスから骨髄細胞の単離調製法を確立出来た。また、*R*-fluobiprofen 投与は高頻度に致死に至ったが、dose と投与を変える事で、投与試験を続ける事が出来た。以上の結果は、DMRV の克服に向けて、シアル酸補充療法が非常に高い効果があることを示しており、他のアプローチと合わせ、根本的治療法が実現出来る可能性を強く示しているものと考えられた。

分担研究者

西野 一三

国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 部長

林 由起子

国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 室長

野口 悟

国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 室長

であり、長年に亘り、本センターにおいて詳細な検討が行われてきた。欧米では HIBM と名付けられ、イスラエル・米国・ドイツを中心に盛んに研究が行われている。一方、本邦では、①多数の患者が存在すること、②全く治療法がないこと、③発症すると数年の短い経過で急速に歩行不能となる進行性の難病であること、④希少疾患であることから、厚生労働行政的な観点からも早急な対応が望まれている。

我々はこれまでに、本疾患は、シアル酸合成過程の重要な酵素である UDP-GlcNAc2-epimerase/ManNAc 6-kinase をコードする *GNE* 遺伝子の変異による疾患であり、HIBM と同一疾患であること (Neurology 2002)、患者細胞で見られる低シアル化はシアル酸の投与により治療で

A. 研究目的

本邦に患者の多い縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) は、申請者らが属する国立精神・神経センターの枠中らにより、1981年に世界に先駆けて報告された筋難病

きること (J Biol Chem 2004) を示してきた。さらに最近、世界で初めて本疾患のモデルマウスの作製に成功した (Hum Mole Genet 2007) が、このマウスでも骨格筋を含むほぼすべての臓器でシアル酸量が減少していることが示された。

しかしながら、遊離シアル酸の血中での代謝時間は、数分と非常に短いことから、ヒト DMRV 患者に応用する場合、以下に服用するのかが問題となる。もし、持続的にシアル酸の供給が確保されれば、より高い治療効果が期待される。また、シアル酸またはその化合物は常に血流を循環している。そのため、シアル酸産生細胞を局所的にも導入出来れば、治療効果を発揮するはずである。骨髄移植はすでに確立されている治療法の一つである。移植された骨髄細胞は血液細胞または骨格筋細胞を含む非血液細胞へと分化することが知られており、循環することで全身性にシアル酸を供給することが期待される一方、筋再生時に骨格筋に取り込まれるという報告もある。さらに、DMRV 患者でのシアル酸回復を目的とする絶対的根治療法として、正常の遺伝子を導入する遺伝子治療も考えられる。

また、このマウスは 20 週齢以降に骨格筋の収縮力低下を示すが、この低下は、週齢と共に、顕著になることが示されている。30 週齢以降の収縮力の著明な低下は、筋病理学的に観察される筋線維内での封入体形成、特に、ベータアミロイドを含む様々なタンパク質の蓄積とその後に引き起こされる自己食色空胞の形成と関連していることが示唆された。そのため、先行する骨格筋線維内に蓄積するタンパク質の抑制が、治療の一つの標的になると考えられている。アルツハイマー病、またはそのモデルにおいて、ベータアミロイドの蓄積を抑制することを目的とした様々な試みの報告がなされている。中でもセクレターゼの切断生成物の特異性を A β 1-42 から A β 1-40 に変換する薬剤である非ステロイド性抗炎症剤 R-fluorbiprofen は、臨床応用されつつあり、現在第 3 相試験が行なわれている。

本研究事業では、モデルマウスを用いた DMRV の治療法開発を目的としているが、治療効果の判定方法として、マウスの運動能力、単離筋の収縮力、生化学パラメータ

一の測定と筋病理学的解析を用いている。その中で、筋病理解析は得られたサンプルの一部のみを用いて行なうこと、染色性や形状の変化など主観的な印象に負うところが大きいことなど、定量解析に乗せるのは極めて難しい。しかしながら、依然として、筋疾患研究において筋病理解析が果たす役割は大きい。

そこで、本年度は、低シアル酸の回復療法として、代謝速度が異なることが予想される 3 種類のシアル酸誘導体の投与試験を施行した。遊離シアル酸 (NeuAc)、シアル酸会合体であるシアリル乳酸 (SiaLac)、前駆体である ManNAc の、3 種の化合物の投与を発症前から行ない、DMRV マウスへの治療・予防効果を解析した。さらに、骨髄細胞移植実験の予備実験として、GFP-Tg マウスから骨髄細胞を単離・精製方法の確立とその特徴付けを行なった。一方、遺伝子治療実験用の正常型 GNE 発現アデノウイルスベクターを開発し、培養細胞での発現実験を行なった。また、アミロイド蓄積を抑制療法として R-fluorbiprofen の投与試験を行った。さらに、DMRV マウスの治療効果測定法の確立のため、病理学的解析を含めた骨格筋組織の評価法の確立を目指した。

B. 研究方法

DMRV のモデルマウス (DMRV-/-hGNETg) は、GNE-KO マウスと変異 GNE トランスジェニックマウスの掛け合わせにより作製した。NeuAc は半井化学、Sialac 及び ManNAc は Sigma から購入した。薬剤投与は 20mg/kg 体重/日の濃度で、飲水中に加えることで行なった (自由飲水)。薬液は、1 週間に 2 回の頻度で交換した。生後 8-15 週から投与を開始し、50 週目まで続けた。表現型の解析は、トレッドミルでの運動能力解析、in vitro での筋収縮力テスト、生化学測定、筋病理解析などにより行なった。

トレッドミルテストは、マウスを装置に馴化させるため、一週間軽い運動を与えた。その後、運動能力テストとして、初速度 20m/分から 1 分ごとに 10m/分増加させ、走行可能な最大速度を求めた。また、持久力テストは、速度 30m/分で 30 分間走行させ、その試験の間にマウスが受けた電撃ショックの

回数を測定した。

骨格筋の収縮力テストは、腓腹筋および前頸骨筋を腱から骨まで完全な状態で単離し、両端に糸を結びつけ、トランスデューサーと連結させた。生理検査溶液中で、最大単収縮長での単収縮力(3ms)と10-200Hz(300ms)での強縮力を測定した。その他、クレアチンキナーゼ測定、組織化学染色などは定法に基づいて行なった。

R-fluoribiprofenは25mg/kg体重の量を、毎日2回、経口ゾンデを用いて、胃内へ投与した。アミロイド蓄積が考えられる生後40週から投与を開始した。または、飼料に混ぜて投与した。この場合、10mg/kg体重/日(マウス一匹あたり、体重30gと、1日4gの飼料を食べるとして計算した)で、1週間ごとに餌料は交換した。

GNE発現アデノウイルスベクターは、ヒトGNEcDNAをMycタグに繋いで、5型アデノウイルスベクターであるpAxCawtit2にクローニングした。大腸菌でのコスミドコンストラクションの後、プラスミドに変換し、COS細胞で発現を確認した。コスミドは、完全長ゲノム導入法により、HEK273細胞へトランスフェクション、アデノウイルスに変換し、HEK273細胞でクローン化とウイルスの増幅を行なった。このベクターはCAGプロモーターにより、普遍的な遺伝子を発現することが出来る。ウイルスの培養細胞への感染は、セミコンフルエントな時期を用いた。

GFP-Tgマウス(C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-FM1310sb;大阪大学岡部勝教授により寄託された)は理研BRCより譲渡された。22週齢のGFP-Tgマウスから大腿骨および脛骨を採取した。培養液中に注射器で骨髓細胞を洗い出す。ナイロンメッシュを通した後、遠心、洗浄を繰り返し、骨髓細胞調製液を得た。

成熟T細胞は、抗マウスCD90(Thy-1.2抗体)と磁気ビーズを用いた方法で除去した。骨髓細胞の染色は、PE-CD90抗体を用いた。

各種治療効果の組織学的評価法確立のため、本研究では、DMRVマウスの腓腹筋を用いた。組織染色はヘマトキシリン-エオシン染色、アミロイド沈着用Congo-red染色により行なった。その他、ミオシン重鎖抗体により、筋線維型の測定を行なった。また、LAMP2、カテプシンD、ラミニン α 2、ア

ミロイド抗体によりウエスタンブロットを行なった。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従い行い、同研究所小型実験動物倫理問題検討委員会にて審査・承認を得ている。すべての組み換えDNA実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、国立精神・神経センター神経研究所組み換えDNA実験安全委員会の審査・承認を得て行なっている。

C. 研究結果

シアル酸及び化合物投与試験

トレッドミルテストにおいて、DMRVマウスは、運動能力テストおよび持久力テストともに、野生型マウスに比べ、低成績を示した。NeuAc、Sialac及びManNAcいずれの投与によっても、野生型マウスと同様のレベルまで、成績が回復した。

筋萎縮に対するシアル酸誘導体類の効果を評価した。体重測定ではDMRVマウスは野生型マウスに比べ、80%以下の体重を示したが、NeuAcおよびSialacの投与では約90%及びManNAcが野生型とほぼ同様レベルまで体重の改善を示した。腓腹筋および前頸骨筋の横断面積では、DMRVマウスは野生型比約70%だったが、ほぼ野生型並みに回復した。

単離腓腹筋での収縮力テストでは、いずれの薬剤投与においても、著明な回復傾向を示したが、特にNeuAc投与の単位面積あたりの比単収縮力はほぼ野生型と同じ成績を示した。

血清クレアチニン活性では、野生型約300IU/Lに対し、DMRVマウスは800IU/Lと高値を示し、筋変性の存在を示唆したが、NeuAc、Sialac及びManNAcいずれの投与によっても、野生型マウスと同様のレベルまで、成績が回復した。筋病理観察では、NeuAc、Sialac及びManNAcいずれの投与によっても、筋線維の大小不同は全く観察されなくなった。高

齡マウスで見られる筋線維内封入体や縁取り空胞も、まったく観察されなくなり、野生型マウスと同様の所見を与えた。正常型 GNE 発現アデノウイルスベクターの開発

GNE 発現アデノウイルスベクターを定法に従い、完全長ゲノム導入法にて作製した。増幅・精製したアデノウイルスは、生物学タイター 6×10^7 pfu/ml (物理化学タイター比: 8000) と極めて純度が低いものであった。このアデノウイルスを用いて、CHO 細胞への感染実験を行なった。ウエスタンブロットの結果、75kDa の単一バンドを示した。これは予測分子量と完全に一致するものであった。抗 Myc 抗体を用いた、免疫細胞染色では、核を除く細胞質全体に渡って、ほぼ均一な染色が見られた。以前に報告されたような核やゴルジ体への局在は見られなかった。培養筋管細胞でもほぼ同様の局在が確かめられた。また、これらの GNE 過剰発現細胞では際立った形態変化は観察されなかった。レクチン染色においても、シアル酸反応性レクチンの染色に際立った変化はなかった。

骨髄移植治療に向けた基礎研究

一匹の GFP-Tg マウスから単離した骨髄細胞液中の細胞数は 4.6×10^7 であった。約 50% が GFP 陽性であったが、残りの 50% は GFP 陰性であった。CD90 抗体により、85% が素通り画分に、15% が磁気ビーズ吸着画分に改修された。回収率は約 35% 程度であった。各画分に回収された細胞の染色では、素通り画分には CD90 陽性細胞は含まれていなかった。また、磁気ビーズ吸着画分には約 20% の CD90 陽性細胞が回収された。しかしながら、依然として、約 55% および 40% 弱の細胞が GFP 陰性の死細胞であった。

R-fluorbiprofen によるアミロイド抑制治療実験

経口ゾンデによる R-fluorbiprofen 投与 (mg/Kg 体重) において、投与マウスは、投与後 3 日目から、重篤な体重減少を示し、1-2 週間で、約 25% の個体が死に至った。他のマウスも体重減少が顕著に認められた。病理解剖の結果、消化管より多量の出血が認められた。また、一度に多量の R-fluorbiprofen を投与するには、その溶解度に問題があった。

そこで、R-fluorbiprofen 入りの飼料を用いた、自由摂取による投与を試みた。投与を開始した 5 個体のうちで、開始当初は顕著な体重の減少は認められなかったが、うち 1 個体で、投与 2 週後から体重の減少を認め、3 週目で死亡した。他のマウスには何ら目立った変化は無く、今も投与を続けている。

DMRV マウスの各種治療効果の組織学的評価法の検討

DMRV マウスおよび同腹仔のウエスタンブロットでは、用いた抗体すべてで明確な発現量の差を示す事は出来なかった

DMRV マウスの腓腹筋では、限られた筋束に高度に、封入体の形成、アミロイドの蓄積、縁取り空胞の形成が起こっていることが示された。逆に、この限られた領域に絞って観察すると、このような筋線維が高度に含まれている事がわかった。また、ミオシン染色の結果は、タイプ 2A 線維 (速筋, oxidative) のみで、このような変化が引き起こされていることが確認された。

D. 考察

治療基礎研究として、DMRV モデルマウスへのシアル酸投与試験を行なった。遊離シアル酸の代謝速度が非常に早いため、異なる代謝経路が期待される 3 種類の化合物を試した。NeuAc は、遊離シアル酸そのものでマクロピノサイトーシスにより細胞に取り込まれると考えられている。Sialac は、乳糖との縮合体であり、乳中にもこの形で存在するため、血中でも比較的安定に存在することが期待され、シアル酸同様にマクロピノサイトーシスにより細胞に取り込まれると考えられる。ManNAc は、マクロピノサイトーシスを介さず、全く異なる経路 (おそらく、細胞膜を通過する) により細胞に取り込まれるものと考えられる。驚いたことに、この 3 種類の化合物を投与された DMRV マウスは、機能的筋力測定、単離骨格筋の生理学的測定、ほぼ同様の回復結果を示した。即ち、コントロールマウスと同程度の筋力を示していた。また、筋病理学的、生化学的測定でも全く異常を示さなかった。このことは、投与したシアル酸が、有効に細胞内へ取り込まれ、充分効果を示してい

ることを示唆していた。また、マウスは教科書的には1日に11回以上水を飲むとされているが、飲水投与が不安定な物質の投与回数を増加させるために、有効であることを示している。現在シアル酸の定量については行なっているが、各組織でのシアル酸の回復が期待される。

シアル酸、シアリル乳糖は、天然に存在し、毒性も認められていないことから、DMRV患者の治療に向けて、最も適した化合物であると考えられた。今後は、最も有効な投与濃度、経路を探ると共に、もっと症状進行した高齢マウスでの治療を目的とした検討を行なっていくと考えている。また、もっと効果の期待される新しいシアル酸化合物を探索して行くつもりである。

アデノウイルスベクターの作製では、純度は低いものの、精製することが出来た。培養細胞に導入し、発現タンパク質を確認した。以前の報告と同様の分子量をもつタンパク質の発現を確認した。細胞内分布では、生化学的に示されたように、細胞質への分布が確認された。しかしながら、一部の報告にあるような細胞核やゴルジ体への局在は確認されなかった。なぜ、細胞内局在にこのような相違を生じるかはわからない。

骨髄移植への基礎実験として、GFP-Tgマウスからの骨髄細胞の調製法の検討を行なった。磁気ビーズ法により比較的短期間で、効率的に、骨髄細胞を調製出来る事を示した。しかしながら、約40-50%の細胞は死細胞であった。セルソーターなどでの分離も考えうるが、作業時間を考えると、そのまま、移植を進む方が適策であり、今後は調製過程での死細胞数をいかに減らせるかが課題となる。成熟T細胞に関しては、この精製法で充分除去出来ている事が示された。

DMRV骨格筋に蓄積しているベータアミロイドタンパク質の生成を抑える目的で、 γ シクレターゼの切断生成物の特異性をA β 1-42からA β 1-40に変換する薬剤である非ステロイド性抗炎症剤*R*-flurbiprofenが用いられている。非ステロイド性抗炎症剤としては、flurbiprofenのラセミ体が用いられてきたが、そのR体は細胞毒性が低く、 γ シクレターゼの特異性を変化させる特異的作用を持つことが知られている。ベータ

アミロイド高発現マウスにおいてなされた研究では、25mg/kg/日のdoseにて、*R*-flurbiprofenを3日間経口投与したところ、A β 1-42の産生を、特異的に60%程度抑えた。また、A β 1-40の産生に関しては、ほとんど阻害されなかったと報告している。しかしながら、その後の報告では、25mg/kg/日のdoseでの長期投与では、2週間で85%のマウスが死に至ったとある。我々が、最初に用いた25mg/kg/日というdoseは、その報告を再現したものであるかも知れない。また、10mg/kg/日のdoseでの14日間の投与では、なんら致死性は報告されていない。*R*-flurbiprofenを食餌にて、10mg/kg体重/日のdoseでの投与では、1個体のみが、1週間で致死に至った。この個体の解剖所見では消化管からの少量の出血は認めたと、元々のDMRVマウスの致死率を反映するものと考えられた。

DMRVマウスの組織学的検討では、統計解析の難しい病理解析に変わる方法として、比較的少量の骨格筋組織を用いたウエスタンブロットを試行した。免疫組織染色によって明瞭な違いを示す抗体を用いたが、正常筋線維での発現に隠れて、変性筋線維での発現を検出出来なかったと思われた。病理解析では限られた筋束に、変性筋線維が高頻度に観察された。この事は、この筋束に限って観察を行なえば、より統計的に変化を追う事が出来る可能性を示唆している。今後は、この解析の正当性を探る一方、治療効果のパラメーターとして、筋病理解析で観察される個々の現象の客観的な測定法を、探索していきたい。

E. 結論

DMRV 治療法開発に向けて、シアル酸及びその化合物の投与は、DMRV マウスの症状の改善に十分な効果が得られる事が判った。今後は、骨髄移植、遺伝子治療などの他のシアル酸補充療法やアミロイド抑制療法と組み合わせる事で、よりよい治療法の開発へとつなげていきたいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Malicdan MCV, Noguchi S, Nishino I: Autophagy in a Mouse Model of Distal Myopathy with Rimmed Vacuoles or Hereditary Inclusion Body Myopathy. *Autophagy* 3: 396-398, 2007

Okada M, Kawahara G, Noguchi S, Sugie K, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Primary collagen VI deficiency is the second most common congenital muscular dystrophy in Japan. *Neurology* 69: 1035-1042, 2007

Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra C, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease. *Neurology* 69: 1043-1049, 2007

Malicdan MCV, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: A *Gne* knockout mouse expressing human *GNE* D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 16: 2669-2682, 2007

Sato I, Wu S, Ibarra MCA, Hayashi YK, Fujita H, Tojo M, Oh SJ, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber and RYR1 mutation. *Neurology* 70: 114-122, 2008

2. 学会発表

西野一三: 先天性全タイプ1線維病の一部は RYR1 遺伝子変異による. 第 48 回 日本

神経学会総会 名古屋, 5.17, 2007

Nishino I: Ullrich Disease. 6th Asian and Oceanian Myology Centre (AOMC) and Neuroscience 2007, Penang, Malaysia, 6.21, 2007

Nishino I: Muscle disorders of lipid dysmetabolism. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.18, 2007

Malicdan MCV, Noguchi S, Kawahara G, Hayashi YK, Nishino I: Proteomic analysis of distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hereditary inclusion body myopathy (hIBM). 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Sugie K, Noguchi S, Ueno S, Nonaka I, Nishino I: Muscle pathological analysis for autophagic/lisosomal and endosomal pathways in Danon disease. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Ohkuma A, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Clinicopathological features of Japanese patients with PNPLA 2 gene mutation. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Okada M, Noguchi S, Nonaka I, Malicdan MCV, Fujita M, Ogawa M, Hayashi YK, Nishino I: Rimmed vacuoles in children: Highly specific indication for SIL1 mutation in

Marinesco-Sjögren syndrome. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Zaspopathy with multiminicores. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: A novel myotilin mutation in exon 9: The first LGMD1A identified in Japan. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Reduced force generation and atrophy impair overall physical performance of a mouse model for distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hereditary inclusion body myopathy (hIBM). 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学事業）
分担研究報告書

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーのシアル酸投与療法による
前臨床試験

分担研究者 西野 一三 国立精神・神経センター神経研究所部長

研究要旨 ヒト変異型GNEのみを発現する、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーマウスモデル（DMRVマウス）に対して、シアル酸またはその誘導体、前駆体を投与することによる治療基礎研究を行なった。その結果、用いた3種類の化合物の投与において、運動生理学的、筋生理学的、病理学的な表現型の顕著な改善が認められた。生化学測定の結果は、改善の兆候を支持した。

A. 研究目的

本邦に患者の多い縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）は、申請者らが属する国立精神・神経センターの塾中らにより、1981年に世界に先駆けて報告された筋難病であり、長年に亘り、本センターにおいて詳細な検討が行われてきた。欧米ではHIBMと名付けられ、イスラエル・米国・ドイツを中心に盛んに研究が行われている。一方、本邦では、①多数の患者が存在すること、②全く治療法がないこと、③発症すると数年の短い経過で急速に歩行不能となる進行性の難病であること、④希少疾患であることから、厚生労働行政的な観点からも早急な対応が望まれている。

我々はこれまでに、本疾患は、シアル酸生成過程の重要な酵素である

UDP-GlcNAc2-epimerase/ManNAc 6-kinaseをコードするGNE遺伝子の変異による疾患であり、HIBMと同一疾患であること（Neurology 2002）、患者細胞で見られる低シアリル化はシアル酸の投与により治療できること（J Biol Chem 2004）を示してきた。さらに最近、世界で初めて本疾患のモデルマウスの作製に成功した（Hum Mole Genet 2007）が、このマウスでも骨格筋を含むほぼすべての臓器でシアル酸量が減少していることが示された。そこで、本研究では、DMRVの治療法・予防法の開発と

して、このDMRVマウスのシアル酸状態の回復させることに焦点を絞った治療基礎研究を行なった。予備実験から遊離シアル酸の代謝速度が極めて早いことがわかったため、本研究では、代謝速度が異なることが予想される3種類のシアル酸誘導体を用いた。遊離シアル酸（NeuAc）、シアル酸会合体であるシアリル乳酸（Sialac）、前駆体であるManNAcである。この3種の化合物の発症前からの自由飲水投与を行ない、DMRVマウスへの治療・予防効果を解析した。

B. 研究方法

DMRVのモデルマウス（DMRV-/-hGNETg）は、GNE-KOマウスと変異GNEトランスジェニックマウスの掛け合わせにより作製した。NeuAcは半井化学、Sialac及びManNAcはSigmaから購入した。薬剤投与は20mg/kg体重/日の濃度で、飲水中に加えることで行なった（自由飲水）。薬液は、1週間に2回の頻度で交換した。生後8-15週から投与を開始し、50日目まで続けた。表現型の解析は、トレッドミルでの運動能力解析、in vitroでの筋収縮力テスト、生化学測定、筋病理解析などにより行なった。

トレッドミルテストは、マウスを装置に馴化

させるため、一週間軽い運動を与えた。その後、運動能力テストとして、初速度 20m/分から 1 分ごとに 10m/分増加させ、走行可能な最大速度を求めた。また、持久力テストは、速度 30m/分で 30 分間走行させ、その試験の間にマウスが受けた電撃ショックの回数を測定した。

骨格筋の収縮力テストは、腓腹筋および前頸骨筋を腱から骨まで完全な状態で単離し、両端に糸を結びつけ、トランスデューサーと連結させた。生理検査溶液中で、最大単収縮長での単収縮力 (3ms) と 10-200Hz (300ms) での強縮力を測定した。その他、クレアチンキナーゼ測定、組織化学染色などは定法に基づいて行なった。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従い行い、同研究所小型実験動物倫理問題検討委員会にて審査・承認を得ている。すべての組み換え DNA 実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、国立精神・神経センター神経研究所組み換え DNA 実験安全委員会の審査・承認を得て行なっている

C. 研究結果

トレッドミルテストにおいて、DMRV マウスは、運動能力テストおよび持久力テストともに、野生型マウスに比べ、低成績を示した。NeuAc、Sialac 及び ManNAc いずれの投与によっても、野生型マウスと同様のレベルまで、成績が回復した。

筋萎縮に対するシアル酸誘導体類の効果を評価した。体重測定では DMRV マウスは野生型マウスに比べ、80%以下の体重を示したが、NeuAc および Sialac の投与では約 90%及び ManNAc が野生型とほぼ同様レベルまで体重の改善を示した。腓腹筋および前頸骨筋の横断面積では、DMRV マウスは野生型比約 70%だったが、ほぼ野生型並みに回復した。

単離腓腹筋での収縮力テストでは、いずれの薬剤投与においても、著明な回復傾向を示

したが、特に NeuAc 投与の単位面積あたりの比単収縮力はほぼ野生型と同じ成績を示した。

血清クレアチニン活性では、野生型約 300IU/L に対し、DMRV マウスは 800IU/L と高値を示し、筋変性の存在を示唆したが、NeuAc、Sialac 及び ManNAc いずれの投与によっても、野生型マウスと同様のレベルまで、成績が回復した。

筋病理観察では、NeuAc、Sialac 及び ManNAc いずれの投与によっても、筋線維の大小不同は全く観察されなくなった。高齢マウスで見られる筋線維内封入体や縁取り空胞も、まったく観察されなくなり、野生型マウスと同様の所見を与えた。

D. 考察

治療基礎研究として、DMRVモデルマウスへのシアル酸投与試験を行なった。遊離シアル酸の代謝速度が非常に早いため、異なる代謝経路が期待される3種類の化合物を試した。NeuAcは、遊離シアル酸そのものでマクロピノサイトーシスにより細胞に取り込まれると考えられている。Sialacは、乳糖との縮合体であり、乳中にもこの形で存在するため、血中でも比較的安定に存在することが期待され、シアル酸同様にマクロピノサイトーシスにより細胞に取り込まれると考えられる。ManNAcは、マクロピノサイトーシスを介さず、全く異なる経路(おそらく、細胞膜を通過する)により細胞に取り込まれるものと考えられる。驚いたことに、この3種類の化合物を投与されたDMRVマウスは、機能的筋力測定、単離骨格筋の生理学的測定、ほぼ同様の回復結果を示した。即ち、コントロールマウスと同程度の筋力を示していた。また、筋病理学的、生化学的測定でも全く異常を示さなかった。このことは、投与したシアル酸が、有効に細胞内へ取り込まれ、充分効果を示していることを示唆していた。また、マウスは教科書的には1日に11回以上水を飲むとされているが、飲水投与が不安定な物質の投与回数を増加させるために、有効であることを示している。現在シアル酸の定量については行なっているが、各組織でのシアル酸の回復が期待される。

シアル酸、シアリル乳糖は、天然に存在し、毒性も認められていないことから、DMRV患者の治療に向けて、最も適した化合物であると

考えられた。今後は、最も有効な投与濃度、経路を探ると共に、もっと症状進行した高齢マウスでの治療を目的とした検討を行なって行きたいと考えている。また、もっと効果の期待される新しいシアル酸化合物を探索して行くつもりである。

E. 結論

飲水を用いたシアル酸、シアル酸化合物および前駆体の投与により、DMRV マウスの筋症状が、機能的、生理学的、病理学的に改善されることが示された。DMRV 患者の治療に向け、有効な手段であると考えられた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Malicdan MCV, Noguchi S, Nishino I: Autophagy in a Mouse Model of Distal Myopathy with Rimmed Vacuoles or Hereditary Inclusion Body Myopathy. *Autophagy* 3: 396-398, 2007

Okada M, Kawahara G, Noguchi S, Sugie K, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Primary collagen VI deficiency is the second most common congenital muscular dystrophy in Japan. *Neurology* 69: 1035-1042, 2007

Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra C, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease. *Neurology* 69: 1043-1049, 2007

Malicdan MCV, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: A *Gne* knockout

mouse expressing human *GNE* D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 16: 2669-2682, 2007

Sato I, Wu S, Ibarra MCA, Hayashi YK, Fujita H, Tojo M, Oh SJ, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber and RYR1 mutation. *Neurology* 70: 114-122, 2008

2. 学会発表

西野一三: 先天性全タイプ1線維病の一部は RYR1 遺伝子変異による. 第 48 回 日本神経学会総会 名古屋, 5.17, 2007

Nishino I: Ullrich Disease. 6th Asian and Oceanian Myology Centre (AOMC) and Neuroscience 2007, Penang, Malaysia, 6.21, 2007

Nishino I: Muscle disorders of lipid dysmetabolism. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.18, 2007

Malicdan MCV, Noguchi S, Kawahara G, Hayashi YK, Nishino I: Proteomic analysis of distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hereditary inclusion body myopathy (hIBM). 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Sugie K, Noguchi S, Ueno S, Nonaka I, Nishino I: Muscle pathological analysis for autophagic/lisosomal and endosomal pathways in Danon disease. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS),

Taormina, Italy, 10.19, 2007

Ohkuma A, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Clinicopathological features of Japanese patients with PNPLA 2 gene mutation. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Okada M, Noguchi S, Nonaka I, Malicdan MCV, Fujita M, Ogawa M, Hayashi YK, Nishino I: Rimmed vacuoles in children: Highly specific indication for SIL1 mutation in Marinesco-Sjögren syndrome. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Zaspopathy with multiminicores. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: A novel myotilin mutation in exon 9: The first LGMD1A identified in Japan. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Reduced force generation and atrophy impair overall physical performance of a mouse model for distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hereditary inclusion body myopathy (hIBM). 12th International Congress of the World Muscle Society

(WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対する治療法開発
骨髄移植実験並びに各種治療効果の組織学的評価

分担研究者 林 由起子 国立精神・神経センター神経研究所室長

研究要旨 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) の治療法開発のため、DMRVモデルマウスに対する骨髄移植実験の予備実験を開始した。GFP-Tgマウスから、骨髄細胞を単離し、分化T細胞を除去した。治療効果測定のため、骨格筋組織の評価法の検討を行った。

A. 研究目的

本邦に患者の多い縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) は、比較的高齢発症で、主に遠位筋が侵され、高度に筋萎縮を認める遺伝性の筋疾患である。筋病理学的には、筋線維の大小不同と特徴的な縁取り空胞の形成を認める。また、封入体と呼ばれる特異的な構造物の蓄積も認められる。

我々はこれまでに、本疾患は、シアル酸生合成過程の重要な酵素である UDP-GlcNAc2-epimerase/ManNAc 6-kinase をコードする *GNE* 遺伝子の変異による疾患であり、HIBM と同一疾患であること (Neurology 2002)、患者細胞で見られる低シアル化はシアル酸の投与により治療できること (J Biol Chem 2004) を示してきた。さらに最近、世界で初めて本疾患のモデルマウスの作製に成功した (Hum Mole Genet 2007)。この DMRV マウスは 20 週齢以降に骨格筋の収縮力低下を示すが、この低下はマウスの週齢と相関することが示されている。特に、30 週齢以降の収縮力の著明な低下は、筋病理学的に観察される筋線維内での封入体形成、特に、ベータアミロイドを含む様々なタンパク質の蓄積とその後引き起こされる自己貪食空胞の形成と関連していることが示唆された。シアル酸の直接投与は、患者細胞 (J Biol Chem 2004) および DMRV マウス (分担研究報告書: 西野の項

を参照) で、それぞれ、シアル酸の回復と筋力低下の改善の結果を得ている、しかしながら、遊離シアル酸の血中での代謝時間は、数分と非常に短いことから、ヒト DMRV 患者に応用する場合、以下に服用するのかが問題となる。もし、持続的にシアル酸の供給が確保されれば、より高い治療効果が期待される。また、シアル酸またはその化合物は常に血流を循環している。そのため、シアル酸産生細胞を局所的にも導入出来れば、治療効果を発揮するはずである。骨髄移植はすでに確立されている治療法の一つである。移植された骨髄細胞は血液細胞または骨格筋細胞を含む非血液細胞へと分化することが知られており、循環することで全身性にシアル酸を供給することが期待される一方、筋再生時に骨格筋に取り込まれるという報告もある。

また、本研究事業では、モデルマウスを用いた DMRV の治療法開発を目的としているが、治療効果の判定方法として、マウスの運動能力、単離筋の収縮力、生化学パラメーターの測定と筋病理学的解析を用いている。その中で、筋病理解析は得られたサンプルの一部分のみを用いて行なうこと、染色性や形状の変化など主観的な印象に負うところが大きいことなど、定量解析に乗せるのは極めて難しい。しかしながら、依然として、筋疾患研究において筋病理解析が果たす役割は大きい。

そこで、本研究では、骨髄細胞移植実験の予備実験として、GFP-Tg マウスから、骨髄細胞を単離し、精製方法の確立とその特徴付けを行なった。また、DMRV マウスの治療効果測定法の確立のため、病理学的解析を含めた骨格筋組織の評価法の確立を目指した。

B. 研究方法

GFP-Tg マウス (C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) C14-FM1310sb ; 大阪大学 岡部勝教授により寄託された) は理研 BRC より譲渡された。22 週齢の GFP-Tg マウスから大腿骨および脛骨を採取した。培養液中に注射器で骨髄細胞を洗い出す。ナイロンメッシュを通した後、遠心、洗浄を繰り返し、骨髄細胞調製液を得た。成熟 T 細胞は、抗マウス CD90 (Thy-1.2 抗体) と磁気ビーズを用いた方法で除去した。骨髄細胞の染色は、PE-CD90 抗体を用いた。

各種治療効果の組織学的評価法確立のため、本研究では、DMRV マウスの腓腹筋を用いた。組織染色はヘマトキシリン-エオシン染色、アミロイド沈着用 Congo-red 染色により行なった。その他、ミオシン重鎖抗体により、筋線維型の測定を行なった。また、LAMP2、カテプシン D、ラミニン・2、アミロイド抗体によりウエスタンブロットを行なった。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従い行い、同研究所小型実験動物倫理問題検討委員会にて審査・承認を得ている。すべての組み換え DNA 実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、国立精神・神経センター神経研究所組み換え DNA 実験安全委員会の審査・承認を得て行なっている

C. 研究結果

一匹の GFP-Tg マウスから単離した骨髄細胞液中の細胞数は 4.6×10^7 であった。約 50% が GFP 陽性であったが、残りの 50% は GFP 陰性であった。CD90 抗体により、85% が素通り画分に、15% が磁気ビーズ吸着画分に改修され

た。回収率は約 35% 程度であった。各画分に回収された細胞の染色では、素通り画分には CD90 陽性細胞は含まれていなかった。また、磁気ビーズ吸着画分には約 20% の CD90 陽性細胞が回収された。しかしながら、依然として、約 55% および 40% 弱の細胞が GFP 陰性の死細胞であった。

DMRV マウスおよび同腹仔のウエスタンブロットでは、用いた抗体すべてで明確な発現量の差を示す事は出来なかった

DMRV マウスの腓腹筋では、限られた筋束に高度に、封入体の形成、アミロイドの蓄積、縁取り空胞の形成が起こっていることが示された。逆に、この限られた領域に絞って観察すると、このような筋線維が高度に含まれている事がわかった。また、ミオシン染色の結果は、タイプ 2A 線維 (速筋、oxidative) のみで、このような変化が引き起こされていることが確認された。

D. 考察

骨髄移植への基礎実験として、GFP-Tg マウスからの骨髄細胞の調製法の検討を行なった。磁気ビーズ法により比較的短期間で、効率的に、骨髄細胞を調製出来る事を示した。しかしながら、約 40-50% の細胞は死細胞であった。セルソーターなどでの分離も考えうるが、作業時間を考えると、そのまま、移植を進む方が適策であり、今後は調製過程での死細胞数をいかに減らせるかが課題となる。

成熟 T 細胞に関しては、この精製法で充分除去出来ている事が示された。

DMRV マウスの組織学的検討では、統計解析の難しい病理解析に変わる方法として、比較的多量の骨格筋組織を用いたウエスタンブロットを試行した。免疫組織染色によって明瞭な違いを示す抗体を用いたが、正常筋線維での発現に隠れて、変性筋線維での発現を検出出来なかったと思われた。

病理解析では限られた筋束に、変性筋線維が高頻度に観察された。この事は、この線維に限って観察を行えば、より統計的に変化を追う事が出来る可能性を示唆している。今後は、この解析の正当性を探る一方、治療効果のパラメーターとして、筋病理解析で観察される個々の現象の客観的な測定法を、探索していきたい。

E. 結論

DMRV モデルマウスに対する骨髄移植治療実験のため、GFP-Tg マウスからの骨髄細胞調製法を確立した。治療効果測定のため、骨格筋組織の評価法の検討を行った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Okada M, Kawahara G, Noguchi S, Sugie K, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Primary collagen VI deficiency is the second most common congenital muscular dystrophy in Japan. *Neurology* 69: 1035-1042, 2007

Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra C, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease. *Neurology* 69: 1043-1049, 2007

Malicdan MCV, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: A *Gne* knockout mouse expressing human *GNE* D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 16: 2669-2682, 2007

Sato I, Wu S, Ibarra MCA, Hayashi YK, Fujita H, Tojo M, Oh SJ, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber and RYR1 mutation. *Neurology* 70: 114-122, 2008

2. 学会発表

Malicdan MCV, Noguchi S, Kawahara G,

Hayashi YK, Nishino I: Proteomic analysis of distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hereditary inclusion body myopathy (hIBM). 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Ohkuma A, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Clinicopathological features of Japanese patients with PNPLA 2 gene mutation. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Okada M, Noguchi S, Nonaka I, Malicdan MCV, Fujita M, Ogawa M, Hayashi YK, Nishino I: Rimmed vacuoles in children: Highly specific indication for SIL1 mutation in Marinco-Sjögren syndrome. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Zaspopathy with multiminicores. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: A novel myotilin mutation in exon 9: The first LGMD1A identified in Japan. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Reduced force generation

and atrophy impair overall physical performance of a mouse model for distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hereditary inclusion body myopathy (hIBM). 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.19, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対する治療法開発
GNE発現ウイルスベクター作成とアミロイド抑制療法開発

分担研究者 野口 悟 国立精神・神経センター神経研究所室長

研究要旨 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) の治療法開発のため、DMRVモデルマウスに対して、ベータアミロイドの蓄積を抑制する薬剤の投与を試みた。また、遺伝子治療基礎実験を行なうため、ヒトGNEを高発現するアデノウイルスベクターを開発し、その培養細胞での発現を調べた。

A. 研究目的

本邦に患者の多い縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) は、比較的高齢発症で、主に遠位筋が侵される遺伝性の筋疾患である。欧米ではHIBMと名付けられ、イスラエル・米国・ドイツを中心に盛んに研究が行われている。一方、本邦では、①多数の患者が存在すること、②全く治療法がないこと、③発症すると数年の短い経過で急速に歩行不能となる進行性の難病であること、④希少疾患であることから、厚生労働行政的な観点からも早急な対応が望まれている。

我々はこれまでに、本疾患は、シアル酸生合成過程の重要な酵素である

UDP-GlcNAc2-epimerase/ManNAc 6-kinaseをコードするGNE遺伝子の変異による疾患であり、HIBMと同一疾患であること (Neurology 2002)、患者細胞で見られる低シアル化はシアル酸の投与により治療できること (J Biol Chem 2004)を示してきた。さらに最近、世界で初めて本疾患のモデルマウスの作製に成功した (Hum Mole Genet 2007)。このマウスは20週齢以降に骨格筋の収縮力低下を示すが、この低下は、週齢と共に、顕著になることが示されている。30週齢以降の収縮力の著明な低下は、筋病理学的に観察される筋線維内の封入体形成、特に、ベータアミロイドを含

む様々なタンパク質の蓄積とその後に引き起こされる自己貪食空胞の形成と関連していることが示唆された。そのため、先行する骨格筋線維内に蓄積するタンパク質の抑制が、治療の一つの標的になると考えられている。アルツハイマー病、またはそのモデルにおいて、ベータアミロイドの蓄積を抑制することを目的とした様々な試みの報告がなされている。中でも γ セクレターゼの切断生成物の特異性をA β 1-42からA β 1-40に変換する薬剤である非ステロイド性抗炎症剤*R*-flurbiprofenは、臨床応用されつつあり、現在第3相試験が行なわれている。また、このマウスでは骨格筋を含むほぼすべての臓器でシアル酸量が減少していることが示されている。シアル酸補充療法他に、DMRV患者でのシアル酸回復を目的とする絶対的根治療法として、正常の遺伝子を導入する遺伝子治療が考えられる。そこで、本研究では、DMRVの治療法・予防法の開発として、このDMRVマウスのアミロイド産生の減少に焦点を絞った治療基礎研究として、*R*-flurbiprofenの投与試験を行った。また、正常型GNE発現アデノウイルスベクターの開発し、培養細胞での発現実験を行なった。