

200833047A

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西野 一三

平成 21 (2009) 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 アミロイド抑制療法開発	12
	野口 悟 (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 骨髄移植によるモデルマウス治療の試み	16
	林 由起子 (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	19
IV.	研究成果の刊行物・別刷	20

# 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

研究代表者 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** 本研究では、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新規化合物 O-アセチル-N-アセチルマンノサミン (Ac<sub>4</sub>ManNAc) の投与、遺伝子治療用の GNE 発現アデノウイルスベクターの DMRV マウス細胞への投与試験、骨髄細胞移植実験を行うとともに、シャペロン分子 HSP90 に作用し蓄積タンパク質を分解に誘導する 17-AAG の発症後期の DMRV マウスへの投与試験を行った。Ac<sub>4</sub>ManNAc の投与により DMRV マウスの運動能力や骨格筋の収縮力において、シアル酸投与と同様に改善が見られ、血清シアル酸レベルは昨年度のシアル酸投与以上の効果が見られた。このことは Ac<sub>4</sub>ManNAc が治療薬として有望であることを示していた。GNE 遺伝子発現アデノウイルスベクターの DMRV 細胞への感染試験、骨髄細胞移植実験では、それぞれ細胞内、血清でのシアル酸レベルの上昇が観察された。また、17-AAG 投与では DMRV マウスの発症後期に見られた筋変性を抑え、骨格筋の収縮力の改善に効果があるものの、発症初期に見られる筋萎縮への改善効果がないことが示された。これらの結果は、シアル酸補充療法が非常に高い効果があること、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。

### 研究分担者

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

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

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

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

### 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

デルマウスの作製に成功した (Hum Mole Genet 2007, Physiol Genomics2008) 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。

このシアル酸を補充し、DMRV マウスの症状を改善することを目的に、前年度は、このDMRV マウスへの3種類のシアル酸関連化合物、遊離シアル酸 (NeuAc)、シアル酸誘導体であるシアリル乳酸 (Sialac)、前駆体であるN-アセチルマンノサミン (ManNAc) の投与による治療基礎研究を行なった。発症前からの自由飲水による投与により、DMRV マウスは高齢になっても、運動能力の低下、骨格筋筋力低下、筋萎縮、封入体や縁取り空胞形成など、特徴的な筋病理像を示さなかった。

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30週齢以降の収縮力の著明な低下を示すが、この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、つまり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、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。我々は、発症前のDMRV マウスに対して、シアル酸やその前駆体を投与することにより、このマウスの骨格筋症状が有意に改善されることを、

昨年度、報告した。シアル酸補充療法の他に、発症後、すでに変化をきたしている骨格筋組織を如何に回復させるかが、この疾患治療の問題であると考えられる。トリプレットリビート病のモデル動物を用いて、すでに発症している個体において蓄積した変異タンパク質の分解を促進することによる治療効果が報告されている。なかでも、17-AAG は、蓄積タンパク質に結合したシャペロン複合体、HSP90 複合体に作用し、安定型からプロテオソーム分解型に複合体構成を変化させるとともに、HSP70 の発現を上げることで、蓄積タンパク質を分解に働くと考えられている。この薬剤は、癌研究の分野では、臨床応用されつつあり、現在第2相試験が行なわれている。

そこで、本年度は、DMRV 細胞を用いた解析において低濃度範囲にて、最も効果の見出された新規シアル酸前駆体化合物 Ac<sub>4</sub>ManNAc を用いて、飲水投与による DMRV マウスへの治療・予防効果を解析した。さらに、骨髄細胞移植実験として、GFP-Tg マウスから、骨髄細胞を単離し、放射線照射により骨髄細胞を破壊した DMRV マウスへの移植実験を試みた。また、正常型 GNE 発現アデノウイルスベクターを作成し、DMRV 初代培養細胞に感染させ、シアル酸の回復を指標に治療効果を解析した。さらに、アミロイド蓄積に対する治療研究として、この DMRV マウスのアミロイドを含むタンパク質の蓄積を分解へと促進させることを目的とした治療基礎研究として、発症後期の DMRV マウスへの 17-AAG の投与試験を行った。

## 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。Ac<sub>4</sub>ManNAc は New Zealand Pharmaceuticals から購入した。投与量は 400 および 40mg/kg 体重/日にて、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15週から投与を開始し、54週目まで続けた。

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。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、腓腹筋および前頭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。17-AAG は 25mg/kg 体重の量を、週に 3 回、腹腔内へ投与した。プラセボ群としてアミロイド蓄積が考えられる生後 32-38 週から投与を開始し、53-59 週まで、21 週間投与を継続した。投与効果は、トレッドミルでの運動能力解析、in vitro での単離骨格筋収縮力測定により行なった。

GNE 発現アデノウイルスベクターは、前年度に作成した GNEpAxCAwtit2 に野生型 GNE をクローニングし、HEK273 細胞でクローニングとウイルスの増幅を行なったものを用い、上記 DMRV モデルマウスからの繊維芽細胞への感染実験を行った。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。

骨髄細胞ドナーマウス：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。3-5 週齢の GFP-Tg マウス (Tg homozygous) 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。実験により成熟 T 細胞は抗マウス CD90 (Thy-1.2 抗体) と磁気ビーズを用いて除去した。

骨髄移植を受けるレシピエントマウスには、15-30 週齢の DMRV および同腹仔を用いた。マウスには、移植 1 週間前から移植後 2 週間までアンピシリン水を与えた。放射線照射は日立 X 線照射装置 MBR-1520R-3 を用いて、9-12Grey の X 線 (12Grey の場合は 6Grey ずつ 2 分割、9Grey は単回照射) を照射した。骨髄移植は、 $1-2 \times 10^6$  ( $500\mu\text{l}$

培地) の骨髄細胞を尾静脈より注射した。血液細胞のキメラ率の測定は、ヘパリン採血した末梢血から赤血球を溶解したのち、白血球のみを蛍光顕微鏡下にカウントした。シアル酸の定量は、シアル酸を蛍光誘導体化して、HPLC にて定量化した。

#### (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

### シアル酸関連新規化合物投与試験

MRV 患者細胞およびモデルマウスからの筋細胞でのシアル酸化合物投与による細胞結合型シアル酸の回復実験では、Ac4ManNAc は 1-100  $\mu\text{M}$  の濃度において、他の化合物に比べ格段のシアル酸回復効果を示した。しかしながら、0.2mM 以上の濃度での暴露は細胞死を引き起こした。

Ac4ManNAc を投与された DMRV モデルマウスは、外見上、異常は見られなかった。Ac4ManNAc を投与群はプラセボ群に比べ、有意に生存率が改善した。さらに、トレッドミルでの測定では運動能力の回復を示したが、40 および 400 mg/kg 体重/日と投与量とともに回復度が増大し、容量依存性を示した。しかしながら、コントロールマウスの運動能力までは改善しなかった。また、Ac4ManNAc を投与されたコントロールマウスでは運動能力の低下が見られ、Ac4ManNAc による毒性の可能性を示唆した。単離した腓腹筋での収縮力も、同様に Ac4ManNAc を投与群はプラセボ群に比べ、有意にコントロールマウスレベルまでの改善が見ら

れ、容量依存性はなかった。Ac<sub>4</sub>ManNAcを投与されたコントロールマウスでは、収縮力の低下は見られなかった。血清シアル酸レベルは、容量依存的に著明な回復を示した。特に最大容量 400 mg/kg 体重/日では、前年度のシアル酸、シアリル乳糖、ManNAc に比べ、5 倍以上の増加を示し、コントロールの約 1/3 にまで増加していた。

#### 正常型 GNE 発現アデノウイルスベクターの DMRV マウスへの感染試験

GNE 発現アデノウイルスベクターを DMRV マウスからの初代繊維芽細胞へ感染させた。ウエスタンブロットの結果、発現 GNE は 75kDa の単一バンドを示した。細胞のシアル酸量を測定した結果、有意な上昇が見られた。

#### 骨髄移植実験

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約  $3 \times 10^6$  であり、CD90 抗体により、60%が素通り画分に、40%が磁気ビーズ吸着画分に回収された。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。12Grey の放射線を与えられたマウスに、未精製骨髄細胞を移植した。遺伝子型に関わらず、移植後 1 週間で約 90%のマウスが死亡した。また、生き残った個体にも、背側全体に白髪化と皮膚障害が見られた。そこで、9Grey の放射線照射と成熟 T 細胞を除去した骨髄細胞を移植することに条件を変えた。9Grey の照射では、移植後 1 週間で約 10%のマウスのみが死亡したが、生存マウスには際立った外観的な異常は見られなかった。

末梢血の白血球のキメラ率は、約 70-85% の GFP 陽性率であり、ほとんどがドナー由来の骨髄細胞で占められていたが、移植後の時間経過とともに若干低下傾向にあった。血清シアル酸レベルの測定では、最もシアル酸量が増加したマウスでは、移植後 11 週で 0.181nmol/l であり、昨年度シアル酸を投与したマウスに比べ、高値を示した。現在、マウスが発症期年齢になるまで継続飼育中である。

#### 17-AAG によるアミロイド等蓄積タンパク質分解誘導による治療実験

17-AAG 投与 (25mg/kg 体重、週 3 回) において、投与マウスは外見上、際立った障害的特徴を示さなかった。トレッドミルでの運動能力では、DMRV モデルマウスは野生型マウスに比べ、約 6 割の測定値を示す。17-AAG を 21 週間投与されたマウスは、野生型と DMRV モデルマウスのほぼ中間の成績を示し、治療効果を示した。プラセボ群は、改善効果が全く見られなかった。

骨格筋の重量および筋断面積は、17-AAG 治療群はプラセボ群と同様に、野生型に比べ低値を示し、回復効果を示さなかった。単離骨格筋の収縮力は、単収縮、強縮ともに、半分程度改善した。しかしながら、単離骨格筋の単位面積当たりの収縮力は 17-AAG 治療群は野生型程度まで回復し、顕著な治療効果を示した。

#### D. 考察

DMRV 患者およびモデルマウスからの筋細胞での結合型シアル酸の回復実験では、Ac<sub>4</sub>ManNAc は低濃度域において、他の化合物に比べ格段のシアル酸回復効果を示した。以前より、Ac<sub>4</sub>ManNAc は正常細胞において、過剰なシアリル化を誘導することが知られているが、今回の実験では、DMRV 細胞においても、Ac<sub>4</sub>ManNAc は低濃度で非常に高いシアリル化回復能を引き起こすことが確認された。

DMRV マウスへの Ac<sub>4</sub>ManNAc の飲水投与では、有意な治療効果が検出された。しかしながら、その効果は ManNAc の飲水投与と比べると、シアル酸の回復度は高く、マウスの運動能力、骨格筋の収縮力ともに、コントロールレベル程度まで回復した。また、Ac<sub>4</sub>ManNAc 投与は、正常コントロールマウスでは、逆に、運動能力を低下させ、副作用の可能性を示した。実際、細胞培養においては、0.2mM 以上の濃度での暴露は細胞死を引き起こす。投与群には、外見の異常と腎機能障害は見られなかったが、より詳細な解析が必要であると考えられた。また、Ac<sub>4</sub>ManNAc は胃内にて消化を受けて、ManNAc に変換されると考えられたが、予備的薬物動態解析では、大部分、尿中にそのまま排

出されているという結果が得られた。これは、Ac4ManNAcの分解よりも、消化管からの吸収が早いことが考えられた。来年度は、Ac4ManNAcの消化管を介さない投与を計画しており、正常コントロールマウスでのAc4ManNAcの効果の解析と合わせ、より効果的な治療法開発への研究を行いたいと考えている。

アデノウイルスベクターの感染実験では、シアル酸量のレベルは低いものの、改善傾向を確認することが出来た。回復度が低い要因として、感染後の無血清での培養時間が60時間と短かったためであるかもしれない。アデノウイルス導入後、無血清条件化での細胞死が多数観察された。さらなる、培養条件の最適化する、またはGNE発現アデノウイルスを高度に精製する必要がある。モデルマウス個体への導入への準備はほぼ準備出来たものと考えている。

GFP-Tgマウスから骨髄細胞の調製し、DMRVマウスへの移植実験を行った。同時に条件最適化の検討を行なった。腸管への障害を防ぐため、比較的弱い放射線を二度に分けて照射する方法を試したが、ほとんどのマウスが一週間後、死に至ってしまった。死亡マウスは、死亡時に際立った特徴を示さなかったが、生存マウスは毛色の白色化と皮膚障害という典型的な放射線障害像を示した。そこで、照射量を減少した単回照射に変更し、また、磁気ビーズ法により成熟T細胞を取り除いた後に骨髄細胞を移植する方法にした結果、マウスの生存率が格段に改善した。マウスの放射線に対する感受性はstrainによって異なり、129SVは比較的弱いという報告もある。現在、どの因子が重要であるのかを解析している。

骨髄移植によって血清のシアル酸含量は、DMRV非治療群に比べ、2倍以上増加した。今後は、移植白血球でのGNE活性の測定ともに、骨髄細胞のある幹細胞の各臓器への取り込みを調べる予定である。また、マウスの表現型の解析を開始していく予定である。

本研究では、DMRV骨格筋に蓄積しているタンパク質の分解を促進させることを目的に、HSP90シャペロン複合体を安定化型からプロテオソーム分解型に誘導し、複合体から活性化HSF1を遊離することで様々なシャペロン遺伝子の発現を誘導させる17-AAGを

用いた。DMRVマウスに17-AAGを週3回、21週間連続的に投与し、マウスの筋機能が改善できるかを調べることで、薬効を評価した。マウスの運動能力はほぼ半分程度改善した。また単離、骨格筋の重量および筋断面積はあまり改善が見られなかったが、単位面積あたりの筋収縮は野生型程度まで改善していた。また、骨格筋の収縮性能を示す、単収縮/強縮比は、コントロール並みの低値を示し、骨格筋自体の機能はほぼ完全に回復していると考えられた。つまり、治療後のDMRVマウス骨格筋は、筋萎縮のみの症状を示すDMRVマウス筋の発症初期の状態まで改善されたと考えられた。DMRVマウス骨格筋の変化は、発症初期と後期では、それぞれユニークな特徴を示すことがわかっている。前者が筋萎縮のみが主病態であるのに対し、後者は特有の病理変化を伴う。分子病態解析からは、これらは異なったメカニズムで引き起こされるものと考えられていた。今回の実験では、面白いことに、17-AAG投与により後期の症状のみが改善されたことを示し、異なった機構で骨格筋症状が形成されることを支持していた。

## E. 結論

DMRV 治療法開発に向けて、新規シアル酸関連化合物の投与は、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

Ohkuma A, Nonaka I, Malicdan MCV, Noguchi S, Nomura K, Sugie H, Havashi YK, Nishino I: Distal lipid storage myopathy due to PNPLA2 mutation. *Neuromuscul Disord* 18: 671-674, 2008



Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Muscle weakness correlates with muscle atrophy and precedes the development of inclusion body or rimmed vacuoles in the mouse model of DMRV/hIBM. *Physiol Genomics* 35: 106-115, 2008

Kawahara G, Ogawa M, Okada M, Malicdan MCV, Goto Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I: Diminished binding of mutated collagen VI to the extracellular matrix surrounding myocytes. *Muscle Nerve* 38: 1192-1195, 2008

Malicdan MCV, Noguchi S, Nonaka I, Saftig P, Nishino I: Lysosomal myopathies: An excessive build-up in autophagosomes is too much to handle. *Neuromuscul Disord* 18: 521-529, 2008

Malicdan MCV, Noguchi S, Nishino I: Recent advances in distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hIBM: treatment perspectives. *Curr Opin Neurol* 21: 596-600, 2008

Ohkuma A, Noguchi S, Sugie H, Malicdan MCV, Fukuda T, Shimazu K, López LC, Hirano M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. Clinical and genetic analysis of lipid storage myopathies. *Muscle Nerve* 39: 333-342, 2009

## 2. 学会発表

門間一成, 野口 悟, 林由起子, 南 成祐, 元吉和夫, 鎌倉恵子, 壺中征哉, 西野一三: Becker 型筋ジストロフィーにおける縁取り空胞の出現に関する臨床病理学的検討. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 5.16, 2008

野口 悟, Malicdan MCV, 林由起子, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーモデルマウスの生理学的解析. 第31回日本分子生物学会 第81回日本生化学会合同大会, 神戸, 12.12, 2008

西野一三: 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. 厚生労働科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業 (神経分野) 研究成果発表会, 東京, 2.3, 2009

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Amyloidogenesis in a mouse model of DMRV/hIBM. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Noguchi S, Malicdan MCV, Nishino I: Treatment of hyposialylation in human and murine DMRV/hIBM culture cells with various kinds of sialic acid derivatives and its precursors. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Nishino I, Oya Y, Monma K, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Cytoplasmic body with acid phosphatase activity—Hallmark of adult-onset Pompe disease on muscle pathology. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008

Monma K, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Clinico-pathological characteristics of the Becker muscle dystrophy with rimmed vacuole. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008

Nishino I, Malicdan MCV, Noguchi S: Sweetening the therapy for distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy. 50<sup>th</sup> Anniversary Symposium, Discovery of Serum Creatine Kinase as a Diagnostic Marker of Muscular Dystrophy, Tokyo, 1.10, 2009

Nishino I: GNE-opathy: spectrum of mutations and the hyposialylation defect. 3<sup>rd</sup> ENMC International Workshop on the Distal Myopathies, Naarden, the Netherlands, 2.7, 2009

Noguchi S: Animal models of DMRV. 3<sup>rd</sup> ENMC  
International Workshop on the Distal  
Myopathies, Naarden, the Netherlands,  
2.7, 2009

Malicdan MCV: Outcome of efforts to  
correct hyposialylation. 3<sup>rd</sup> ENMC In-  
ternational Workshop on the Distal  
Myopathies, Naarden, the Netherlands,  
2.7, 2009

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

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

研究分担者 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、新規なシアル酸前駆化合物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、前年度に行った3種類の化合物よりも、顕著な血清シアル酸の増加が認められた。また、3種類の化合物と同様に、運動能力、骨格筋収縮、病理学観察で、筋症状の顕著な改善が認められた。しかし、コントロールマウスには若干の運動能力の低下が観察された。

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発症すると数年という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、厚生労働行政による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回復できること（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。

前年度は、DMRVの治療法・予防法の開発を目的として、このDMRVマウスへの3種類のシアル酸関連化合物、遊離シアル酸（NeuAc）、シアル酸誘導体であるシアリル乳酸（Sialac）、前駆体であるN-アセチルマンノサミン（ManNAc）の投与による治療基礎研究を行なった。発症前からの自由飲水による投与により、DMRVマウスは高齢になっても、運動能力の低下、骨格筋筋力低下、筋萎縮、封入体や縁取り空胞形成など、特徴的な筋病理像を示さなかった。今年度は、DMRV細胞を用いた解析において低濃度範囲にて、最も効果の見出された新規シアル酸前駆化合物tetra-O-アセチル-ManNAc（Ac<sub>4</sub>ManNAc）を用いて、飲水投与による治療効果を調べた。

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。Ac<sub>4</sub>ManNAcはNew Zealand Pharmaceuticalsから購入した。投与量は400および40mg/kg体重/日にて、飲水中に加えることを行な

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15週から投与を開始し、54週目まで続けた。表現型の解析は、前年度と同様に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。

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

DMRV患者細胞およびモデルマウスからの筋細胞でのシアル酸化合物投与による細胞結合型シアル酸の回復実験では、 $Ac_4ManNAc$ は1-100  $\mu M$ の濃度において、他の化合物に比べ格段のシアル酸回復効果を示した。しかしながら、0.2mM以上の濃度での暴露は細胞死を引き起こした。 $Ac_4ManNAc$ を投与されたDMRVモデルマウスは、外見上、異常は見られなかった。 $Ac_4ManNAc$ を投与群はプラセボ群に比べ、有意に生存率が改善した。さらに、トレッドミルでの測定では運動能力の回復を示したが、40および400 mg/kg 体重/日と投与量とともに回復が増大し、容量依存性を示した。しかしながら、コントロールマウスの運動能力までは改善しなかった。また、 $Ac_4ManNAc$ を投与されたコントロールマウスでは運動能力の低下が見られ、 $Ac_4ManNAc$ による毒性の可能性を示唆した。単離した腓腹筋での収縮力も、同様に $Ac_4ManNAc$ を投与群はプラセボ群に比べ、有意にコントロールマウスレベルまでの改善が見られ、容量依存性はなかった。 $Ac_4ManNAc$ を投与されたコン

トロールマウスでは、収縮力の低下は見られなかった。

血清シアル酸レベルは、容量依存的に著明な回復を示した。特に最大容量400 mg/kg 体重/日では、前年度のシアル酸、シアリル乳糖、 $ManNAc$ に比べ、5倍以上の増加を示し、コントロールの約1/3にまで増加していた。

#### D. 考察

DMRV患者およびモデルマウスからの筋細胞での結合型シアル酸の回復実験では、 $Ac_4ManNAc$ は低濃度域において、他の化合物に比べ格段のシアル酸回復効果を示した。以前より、 $Ac_4ManNAc$ は正常細胞において、過剰なシアリル化を誘導することが知られているが、今回の実験では、DMRV細胞においても、 $Ac_4ManNAc$ は低濃度で非常に高いシアリル化回復能を引き起こすことが確認された。

DMRVマウスへの $Ac_4ManNAc$ の飲水投与では、有意な治療効果が検出された。しかしながら、その効果は $ManNAc$ の飲水投与と比べると、シアル酸の回復度は高く、マウスの運動能力、骨格筋の収縮力ともに、コントロールレベル程度まで回復した。また、 $Ac_4ManNAc$ 投与は、正常コントロールマウスでは、逆に、運動能力を低下させ、副作用の可能性を示した。実際、細胞培養においては、0.2mM以上の濃度での暴露は細胞死を引き起こす。投与群には、外見上の異常と腎機能障害は見られなかったが、より詳細な解析が必要であると考えられた。また、 $Ac_4ManNAc$ は胃内にて消化を受けて、 $ManNAc$ に変換されると考えられたが、予備的薬物動態解析では、大部分、尿中にそのまま排出されているという結果が得られた。これは、 $Ac_4ManNAc$ の分解よりも、消化管からの吸収が早いことが考えられた。来年度は、 $Ac_4ManNAc$ の消化管を介さない投与を計画しており、正常コントロールマウスでの $Ac_4ManNAc$ の効果の解析と合わせ、より効果的な治療法開発への研究を行いたいと考えている。

#### E. 結論

細胞実験により高い効果を示した $Ac_4ManNAc$ を用いて、飲水投与により、

DMRV マウスの骨格筋症状が、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

Ohkuma A, Nonaka I, Malicdan MCV, Noguchi S, Nomura K, Sugie H, Hayashi YK, Nishino I: Distal lipid storage myopathy due to PNPLA2 mutation. *Neuromuscul Disord* 18: 671-674, 2008

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Muscle weakness correlates with muscle atrophy and precedes the development of inclusion body or rimmed vacuoles in the mouse model of DMRV/hIBM. *Physiol Genomics* 35: 106-115, 2008

Kawahara G, Ogawa M, Okada M, Malicdan MCV, Goto Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I: Diminished binding of mutated collagen VI to the extracellular matrix surrounding myocytes. *Muscle Nerve* 38: 1192-1195, 2008

Malicdan MCV, Noguchi S, Nonaka I, Saftig P, Nishino I: Lysosomal myopathies: An excessive build-up in autophagosomes is too much to handle. *Neuromuscul Disord* 18: 521-529, 2008

Malicdan MCV, Noguchi S, Nishino I: Recent advances in distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hIBM: treatment perspectives. *Curr Opin Neurol* 21: 596-600, 2008

Ohkuma A, Noguchi S, Sugie H, Malicdan MCV, Fukuda T, Shimazu K, López LC, Hirano M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. Clinical and genetic analysis of lipid storage myopathies. *Muscle Nerve* 39: 333-342, 2009

## 2. 学会発表

門間一成, 野口 悟, 林由起子, 南 成祐, 元吉和夫, 鎌倉恵子, 埜中征哉, 西野一三: Becker 型筋ジストロフィーにおける縁取り空胞の出現に関する臨床病理学的検討. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 5.16, 2008

野口 悟, Malicdan MCV, 林由起子, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠錐型ミオパチーモデルマウスの生理学的解析. 第31回日本分子生物学会 第81回日本生化学会合同大会, 神戸, 12.12, 2008

西野一三: 縁取り空胞を伴う遠錐型ミオパチーの根本的治療法開発. 厚生労働科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業 (神経分野) 研究成果発表会, 東京, 2.3, 2009

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Amyloidogenesis in a mouse model of DMRV/hIBM. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Noguchi S, Malicdan MCV, Nishino I: Treatment of hyposialylation in human and murine DMRV/hIBM culture cells with various kinds of sialic acid derivatives and its precursors. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Nishino I, Oya Y, Monma K, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Cytoplasmic body with acid phosphatase activity-Hallmark of adult-onset Pompe disease on muscle pathology. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008

Monma K, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Clinico-pathological characteristics of the Becker muscle dystrophy with rimmed vacuole. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008

Nishino I, Malicdan MCV, Noguchi S:

Sweetening the therapy for distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy. 50<sup>th</sup> Anniversary Symposium, Discovery of Serum Creatine Kinase as a Diagnostic Marker of Muscular Dystrophy, Tokyo, 1.10, 2009

Nishino I: GNE-opathy: spectrum of mutations and the hyposialylation defect. 3<sup>rd</sup> ENMC International Workshop on the Distal Myopathies, Naarden, the Netherlands, 2.7, 2009

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  
アミロイド抑制療法開発

研究分担者 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、筋細胞内蓄積タンパク質の分解を促進する薬剤の投与による治療実験を試みた。この薬剤の投与は、このマウスで見られる高齢での症状を完全に抑制したが、早期に見られる筋萎縮には効果がなく、DMRVマウスにおける発症分子メカニズムを考える上で非常に重要な知見が得られた。また、遺伝子治療基礎実験のため、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DMRV培養細胞での発現、効果を調べた。

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)、患者骨格筋、血液ではシアル酸量が減少していること、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、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。我々は、発症前のDMRVマウスに対して、シアル酸やその前駆体を投与することにより、このマウスの骨格筋症状が有意に改善されることを、昨年度、報告した。シアル酸補充療法他に、発症後、すでに変化をきたしている骨格筋組織を如何に回復させるかが、この疾患治療の問題であると考えられる。トリプレットリピート病のモデル動物を用いて、すでに発症している個体において蓄積した変異タンパク質の分解を促進することによる治療効果が報告されている。なかでも、17-AAGは、蓄積タンパク質に結合したシャペロン複合体、HSP90複合体に作用し、安定型からプロテオソーム分解型に複合体構成を変化させるとともに、HSP70の発現を上げることで、蓄積タ



ンパク質を分解に働くと考えられている。この薬剤は、癌研究の分野では、臨床応用されつつあり、現在第2相試験が行なわれている。

今年度は、このDMRVマウスのアミロイドを含むタンパク質の蓄積を分解へと促進させることを目的とした治療基礎研究として、発症後期のDMRVマウスへの17-AAG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を開発し、DMRV初代培養細胞に感染させ、シアル酸の回復を指標に治療効果を解析した。

## 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。17-AAGは25mg/kg体重の量を、週に3回、腹腔内へ投与した。プラセボ群としてアミロイド蓄積が考えられる生後32-38週から投与を開始し、53-59週まで、21週間投与を継続した。投与効果は、トレッドミルでの運動能力解析、in vitroでの単離骨格筋収縮力測定により行なった。

GNE発現アデノウイルスベクターは、前年度に作成したGNEpAxCAwtit2に野生型GNEをクローニングし、HEK273細胞でクローン化とウイルスの増幅を行なったものを用い、上記DMRVモデルマウスからの繊維芽細胞への感染実験を行った。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。

### (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

17-AAG投与(25mg/kg体重、週3回)にお

いて、投与マウスは外見上、際立った障害的特徴を示さなかった。トレッドミルでの運動能力では、DMRVモデルマウスは野生型マウスに比べ、約6割の測定値を示す。17-AAGを21週間投与されたマウスは、野生型とDMRVモデルマウスのほぼ中間の成績を示し、治療効果を示した。プラセボ群は、改善効果が全く見られなかった。

骨格筋の重量および筋断面積は、17-AAG治療群はプラセボ群と同様に、野生型に比べ低値を示し、回復効果を示さなかった。単離骨格筋の収縮力は、単収縮、強縮ともに、半分程度改善した。しかしながら、単離骨格筋の単位面積当たりの収縮力は17-AAG治療群は野生型程度まで回復し、顕著な治療効果を示した。

GNE発現アデノウイルスベクターをDMRVマウスからの初代繊維芽細胞へ感染させた。ウエスタンブロットの結果、発現GNEは75kDaの単一バンドを示した。細胞のシアル酸量を測定した結果、有意な上昇が見られた。

## D. 考察

本研究では、DMRV骨格筋に蓄積しているタンパク質の分解を促進させることを目的に、HSP90シャペロン複合体を安定化型からプロテオソーム分解型に誘導し、複合体から活性化HSF1を遊離することで様々なシャペロン遺伝子の発現を誘導させる17-AAGを用いた。DMRVマウスに17-AAGを週3回、21週間連続的に投与し、マウスの筋機能が改善できるかを調べることで、薬効を評価した。マウスの運動能力はほぼ半分程度改善した。また単離、骨格筋の重量および筋断面積はあまり改善が見られなかったが、単位面積あたりの筋収縮は野生型程度まで改善していた。また、骨格筋の収縮性能を示す、単収縮/強縮比は、コントロール並みの低値を示し、骨格筋自体の機能はほぼ完全に回復していると考えられた。つまり、治療後のDMRVマウス骨格筋は、筋萎縮のみの症状を示すDMRVマウス筋の発症初期の状態まで改善されたと考えられた。DMRVマウス骨格筋の変化は、発症初期と後期では、それぞれユニークな特徴を示すことがわかっている。前者が筋萎縮のみが主病態であるのに対し、後者は特有の病理変化を伴う。分子病態解析からは、これらは異なったメカニ

ムで引き起こされるものと考えられていた。今回の実験では、面白いことに、17-AAG投与により後期の症状のみが改善されたことを示し、異なった機構で骨格筋症状が形成されることを支持していた。

アデノウイルスベクターの感染実験では、シアル酸量のレベルは低いものの、改善傾向を確認することが出来た。回復度が低い要因として、感染後の無血清での培養時間が60時間と短かったためであるかもしれない。アデノウイルス導入後、無血清条件化での細胞死が多数観察された。さらなる、培養条件の最適化する、またはGNE発現アデノウイルスを高度に精製する必要がある。モデルマウス個体への導入への準備はほぼ準備出来たものと考えている。

#### E. 結論

DMRV モデルマウスに対して、蓄積タンパク質の分解を促進する薬剤 17-AAG の投与を行なった。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 実験を進めた。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ohkuma A, Nonaka I, Malicdan MCV, Noguchi S, Nomura K, Sugie H, Hayashi YK, Nishino I: Distal lipid storage myopathy due to PNPLA2 mutation. *Neuromuscul Disord* 18: 671-674, 2008

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Muscle weakness correlates with muscle atrophy and precedes the development of inclusion body or rimmed vacuoles in the mouse model of DMRV/hIBM. *Physiol Genomics* 35: 106-115, 2008

Kawahara G, Ogawa M, Okada M, Malicdan MCV, Goto Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I: Diminished binding of mutated collagen VI

to the extracellular matrix surrounding myocytes. *Muscle Nerve* 38: 1192-1195, 2008

Malicdan MCV, Noguchi S, Nonaka I, Saftig P, Nishino I: Lysosomal myopathies: An excessive build-up in autophagosomes is too much to handle. *Neuromuscul Disord* 18: 521-529, 2008

Malicdan MCV, Noguchi S, Nishino I: Recent advances in distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hIBM: treatment perspectives. *Curr Opin Neurol* 21: 596-600, 2008

Ohkuma A, Noguchi S, Sugie H, Malicdan MCV, Fukuda T, Shimazu K, López LC, Hirano M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. Clinical and genetic analysis of lipid storage myopathies. *Muscle Nerve* 39: 333-342, 2009

#### 2. 学会発表

門間一成, 野口 悟, 林由起子, 南 成祐, 元吉和夫, 鎌倉恵子, 埜中征哉, 西野一三: Becker 型筋ジストロフィーにおける縁取り空胞の出現に関する臨床病理学的検討. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 5.16, 2008

野口 悟, Malicdan MCV, 林由起子, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠錐型ミオパチーモデルマウスの生理学的解析. 第31回日本分子生物学会 第81回日本生化学会合同大会, 神戸, 12.12, 2008

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Amyloidogenesis in a mouse model of DMRV/hIBM. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Noguchi S, Malicdan MCV, Nishino I: Treatment of hyposialylation in human and murine DMRV/hIBM culture cells with various kinds of sialic acid derivatives and its precursors. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Nishino I, Oya Y, Monma K, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Cytoplasmic body with acid phosphatase activity-Hallmark of adult-onset Pompe disease on muscle pathology. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008

Monma K, Noguchi S, Hayashi YK: Clinico-pathological characteristics of the Becker muscle dystrophy with rimmed vacuole. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008

Nishino I, Malicdan MCV, Noguchi S: Sweetening the therapy for distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy. 50<sup>th</sup> Anniversary Symposium, Discovery of Serum Creatine Kinase as a Diagnostic Marker of Muscular Dystrophy, Tokyo, 1.10, 2009

Noguchi S: Animal models of DMRV. 3<sup>rd</sup> ENMC International Workshop on the Distal Myopathies, Naarden, the Netherlands, 2.7, 2009

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  
骨髄移植によるモデルマウス治療の試み

研究分担者 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を開始した。GFP-Tg マウスからの骨髄細胞を、放射線処理したDMRVマウスに移植した。

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、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。

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 (本研究事業昨年度報告書) 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半減期数分と非常に短いことから、ヒト患者に応用する場合、いか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血流を循環し、末梢組織に供給されている。そのため、シアル酸産生細胞を局所的にでも導入出来れば、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。さらに、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中胚葉組織へと分化することが知られており、全身性にシアル酸を供給することが期待されるだけでなく、筋再生時に骨格筋に取り込まれることも期待される。

今年度は、骨髄細胞移植実験として、GFP-Tgマウスから、骨髄細胞を単離し、放射線照射により骨髄細胞を破壊したDMRVマウスへの移植実験を試みた。

B. 研究方法

骨髄細胞ドナーマウス：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。3-5 週齢の GFP-Tg マウス (Tg homozygous) から大腿骨および脛骨を