

201122049A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの  
治療効果最大化のための研究

総括・分担研究報告書

平成 23 年度

研究代表者 西野一三

平成 24 (2012) 年 5 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治療効果最大化のための研究.....	1
西野 一三（（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）	

## II. 分担研究報告

1. シアル酸投与療法による投与組織におけるシアル酸代謝の変化に関する研究.....	11
西野 一三（（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）	
2. ～高齢マウスでの骨格筋生理学測定法の確立～.....	17
野口 悟（（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）	
3. 骨髄移植による DMRV マウスの治療研究.....	23
林 由起子（（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）	
4. 三好型遠位型ミオパチーの自然経過に関する研究.....	27
青木 正志（（国立大学法人 東北大学大学院医学系研究科）	
5. 自然歴作成・病態研究.....	31
富満 弘之（国立大学法人 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学）	
6. 臨床評価指標作成・自然歴作成.....	33
森 まどか（（独）国立精神・神経医療研究センター病院）	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	35
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	36
----------------------	----

# I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
総括研究報告書

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの治療効果最大化のための研究

研究代表者 西野 一三

（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部 部長

研究要旨

発症後筋力低下した縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）患者に対する治療効果の最大化のための基礎研究を行った。①発症した DMRV モデルマウスへのシアル酸投与試験—シアリルラクトース投与により、運動量の増加の他、腓腹筋の機能、サイズの改善が認められ、遊離シアル酸よりも高い治療効果が認められた。②恒常的シアル酸投与—AAV8 ベクターによる遺伝子治療では、各組織のシアル酸レベルに回復が見られ、骨格筋の機能や病理は顕著に改善した。③病態解明とそれを利用した治療法の開発—モデルマウスの筋萎縮と骨格筋での ROS 産生の関連が示唆された。少数のマウスでの抗酸化薬投与では、骨格筋の表現型は部分的に回復した。

DMRV 患者の自然歴把握では、呼吸機能に関する研究と長期観察症例での解析を行った。DMRV 患者は時に呼吸不全を生じることがある。発症年齢が早く、罹患期間が長く、MNK/MNK 変異を持つ患者では呼吸機能低下に注意する必要がある。長期観察例の脊髄前角細胞には異常を認めず、障害の強い筋群では筋鞘膜下に AB の沈着を認め、病態を考えていく上で重要と思われた

三好型を中心とした他の遠位型ミオパチーの実態に関する解析—dysferlinopathy が疑われるものの遺伝子変異の確定しなかった患者の検討を行った。

研究分担者

野口 悟 （独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部 室長  
林 由起子 （独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部 室長  
青木 正志 国立大学法人 東北大学大学院 医学系研究科 教授  
富満 弘之 国立大学法人 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学 助教  
森 まどか 独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター病院 医師

A. 研究目的

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（前頸骨筋）が侵される遺伝性の筋疾患である。欧米では遺伝性封入体ミオパチー（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)。

このマウスは、20 週齢以降に骨格筋の収縮力低下を示し、30 週齢以降に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を示し、40 週齢以降には封入体形成後に引き起こされる自己貪食空胞の形成と関連して、骨格筋の収縮力に著明な低下を示す。我々は、発症前の DMRV マウスで、シアル酸やその前駆体を発症期まで投与し続けることにより、このマウスのミオパチー発症を完全に予防することを、2009 年に報告した。

しかしながら、DMRV は劣性遺伝病であるため、患者の早期診断は不可能であり、高齢発症に対して比較的短い経過で急速に歩行不能となる疾患であるため、症状の重篤な日本人患者の場合は、診断時には車椅子使用である。つまり、DMRV 患者への治療を考えると、発症の予防ではなく、ミオパチー症状を如何に、回復させるのが重要である。

また、上記のとおり、DMRV マウス (Nat Med 2009) に対するシアル酸の直接投与により、シアル酸の回復と筋力低下の改善という良好な結果を得ている、しかしながら、遊離シアル酸の血中での代謝時間が非常に短いことから、ヒト患者に応用する場合、いかにシアル酸を服用するのが問題となる。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。このような恒常性のシアル酸供給として、昨年は、骨髄移植を報告している。

さらに、DMRV モデルマウスは発症初期から筋力低下を示すが、この筋力低下は主に筋萎縮を原因とすることがわかっている。遺伝性筋疾患での罹患筋の筋萎縮モデルとして、活性酸素種 (ROS) の関与が考えられている。血管、筋細胞膜、ミトコンドリアで発生した ROS が、FOXO シグナル、または NF $\kappa$ B シグナルを活性化して、タンパク質合成を抑制、分解経路を活性化することにより筋萎縮に至

るといものである。また、アルツハイマー病では蓄積するベータアミロイドペプチド自体が ROS を産生するとの報告もある。さらに、in vitro のデータではあるが、シアル酸を含む  $\alpha$  ケト酸が、ROS を除去するという報告がある。シアル酸の低下した DMRV において、発生した ROS を除去出来ないために、下流のカスケードが活性化されている可能性はある。このような筋萎縮に対する治療のように、シアル酸投与の治療効果を最大限に引き出すためには、併行して患者の症状や病態に根ざした治療を行うことが必須である。本年度の研究では、DMRV モデルマウスでの ROS 産生を in vivo で測定した。また、ROS 下流遺伝子の活性化を測定するとともに、小規模での抗酸化薬での治療研究を開始した。

シアル酸投与による治療法開発のため、我々は以前、すでに発症した DMRV マウスへのシアル酸投与を試みた。シアル酸投与による一定のミオパチー抑制効果は得られたものの、トレッドミルを含む生理学的測定の繰り返しが高齢マウスへダメージを与えたため、同腹仔コントロールマウスにおいても運動能力の低下が認められてしまった。昨年度は高齢マウスに運動能力の低下を与えない生理学的測定方法を確立した。そこで、本年度の研究では、すでに予防効果を示した化合物のうち、遊離型シアル酸 (N-アセチルノイラミン酸: NeuAc) と結合型シアル酸 ( $\alpha$ 2-6 シアリルラクトース: 6'-SL) の投与による、発症マウスのミオパチー症状の改善を解析した。一方で、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。昨年までのシアル酸代謝経路の解析で、肝臓と腎臓は、外部からシアル酸を多く取り込む組織であることが示された。特に、肝臓はシアル酸を取り込み、シアリル化複合糖質を合成して、全身に分泌・供給しているものと考えられた。ここで、骨格筋を直接標的と考えた場合とは別に、全身性でのシアル酸の補充治療を考えた場合、肝臓がシアル酸を合成させるべき器官、つまり細胞治療や遺伝子治療の標的器官の一つと考えられた。

恒常的シアル酸供給での治療法開発研究では骨格筋などで幅広い組織への感染性を示す 8 型アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、広い臓器発現性を示す cytomegalovirus プロモーターにて、DMRV

の原因遺伝子である GNEcDNA を全身性に発現させることで、DMRV マウスの表現型の回復を解析した。

一方、DMRV に対するシアル酸補充治療の第 I 相の治験が既に開始されている。しかしながら、*GNE* 遺伝子変異が確定された患者の自然歴に関する統括的な研究が充分なされていない。DMRV 患者治験・臨床研究の試験計画作成および実施のためには自然歴把握が必要である。定量的データである呼吸機能検査により病状および治療効果測定が可能であるかを検討するため、当院の *GNE* ミオパチー患者カルテの後ろ向き調査及び長期観察症例の剖検筋を用いて、病変の広がりや病態について検討した。

さらに、*Dysferlin* は 1998 年三好型遠位型ミオパチーの原因遺伝子としてクローニングされた。肢帯型筋ジストロフィー 2B 型の原因であることも判明し、*dysferlinopathy* という概念が確立した。我々は日本人三好型遠位型ミオパチーおよび肢帯型筋ジストロフィーにおいて同遺伝子異常のスクリーニングを行い、三好型遠位型ミオパチー 46 家系、肢帯型 36 家系で遺伝子変異を確定した。*dysferlinopathy* が疑われるものの遺伝子変異の確定しなかった患者の検討を行った。また *dysferlinopathy* の分子病態解明のため動物モデルでの実験も行った。

## B. 研究方法

DMRV モデルマウス (*GNE*-/*-hGNETg*) は、*GNE*-KO マウスと変異ヒト *GNEcDNA* トランスジェニックマウスとの掛け合わせにより作製した。マウスは自由飲水、食餌摂取、12 時間の明暗時間で飼育した。

6'-SL の薬物動態は、6'-SL (30mg) を腹腔内および経口投与した後、5、10、30、60、120、240 分に鼻鏡脈採血と採尿を行った。6'-SL は蛍光標識後に、HPLC にて測定した。投与試験は、55 週齢のモデルマウスと同腹仔コントロールを用いて、飲水にて投与した。用量は、6'-SL : 100mg (低用量群) 及び 1000mg (高用量群) /kg 体重/日、*NeuAc* : 1000mg/kg 体重/日を用いた。プラセボコントロールとして水を与えた。80 週齢まで投与した。

アデノウイルス (AdV) ベクターは、完全長ゲノム導入法にて作成した。コス

ミド pAxCAwtit2 の *SwaI* サイトに、mouse *GNE*(*mGNE*) cDNA をクローニングした。PacI にて切断後、Lipofectoamine Plus にて、293 細胞に導入し、ウイルス粒子を作製させた。定法に従い増殖させた後、生物学的タイターを測定後、実験に用いた。

AAV8 発現用の 4 種のプラスミド pZAC2.1-*mGNE*-IRES-eGFP、pZAC2.1-LUC-IRES-eGFP、pAAV2/8 および pHelper は Hadassah Hebrew 大学 Medical Center の Mitrani-Rosenbaum より供与された。AAV ベクターの調製は、岡田らの方法に従って行った。ウイルスの精製は、CsCl 密度勾配遠心後、イオン交換膜にて行った。

AAV8 を投与するマウスは、44-45 週齢の発症中期の DMRV マウス (*GNE*-/*-hGNETg*) および同腹仔コントロール (*GNE*+/*-hGNETg*) を用いた。2 X 10<sup>11</sup> ウイルスゲノム (vg) コピーの *GNE*-eGFP-AAV8 および LUC-eGFP-AAV8 を尾静脈より投与した。

各組織中の AAV8 の感染コピー数は、ゲノム DNA から、GFP の領域を Q-PCR にて増幅することによって、見積もった。また、各臓器での GFP 細胞の分布状況は、ホルマリン固定組織を OCT コンパウンド中で凍結後、凍結切片を作製した。カベオリンまたはジストログリカン免疫染色とともに、GFP の分布を調べた。

肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋から細胞質画分を調製し、*GNE* 活性をラジオ HPLC 法にて測定した。各種臓器でのシアル酸の定量は、シアル酸を蛍光誘導体化して、HPLC にて定量化した。

マウス骨格筋のヒドロキシラジカルは、サリチル酸トラップ法にて測定した。5mM サリチル酸ナトリウム/リンゲル液を還流液として、腓腹筋をマイクロダイアリシスした。得られた還流液はそのまま、電気検出器を備えた逆相 HPLC にアプライした。ヒドロキシラジカルとサリチル酸との反応産物であるジヒドロキシ安息香酸 (DHBA) を分別定量した。骨格筋収縮に関連したヒドロキシラジカルの測定では、腓腹筋を電気刺激し、収縮させた。

ROS 下流遺伝子の発現は TaqMan プローブを用いた Q-RT-PCR によって測定した。

抗酸化薬投与試験は、N-アセチルシステインと $\alpha$ トコフェロール酢酸を用いた。N-アセチルシステインは、1.0%及び0.1%の濃度にて飲水投与した。投与期間は22週齢から57週齢まで行った。 $\alpha$ トコフェロール酢酸は、20IU/日/マウスの用量にて食餌に混ぜて与えた。16週齢から26週齢まで与えた。

治療効果の評価は、生理学試験の項目として、回転ケージでの自発運動量測定（メルクエスト）を用いた。55、65、72および80週齢で経時的に測定（一日あたりの回転数にて評価）した。80週齢にて、トレッドミルにて走行能力を評価した。Plethismographyによる呼吸筋測定を行うとともに、血中CK値を測定した。

Ex vivoでの単離腓腸筋の収縮力は、定法に従い測定した。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。骨格筋での病理像(ミオパチー)の改善について縁取り空胞とアミロイドの蓄積について調べた。

自然歴把握のための定量的データである呼吸機能検査結果を検討するため、(独)国立精神・神経医療研究センター病院のGNE ミオパチー患者の呼吸機能検査をretrospectiveに観察し、運動障害や検査データ、変異ドメインの位置(GNE/GNE, GNE/MNK, MNK/MNK)との関連、経時変化を観察した。検定にはstudent t,  $\chi^2$ 検定および回帰分析を用いた。

長期観察症例の剖検筋を用いての解析は、対象は発症41年経過後に肺炎で死亡した男性で、GNE変異はA631Vのホモ接合体であった。ご家族の承諾を得た上で病理解剖を行い、脊髄のほか、骨格筋として大腿四頭筋、ハムストリング、腸腰筋、肋間筋、胸鎖乳突筋、咬筋および舌、また心筋を採取して病理学的検討を行った。

脊髄はパラフィン標本HE染色、抗GNE抗体を用いた免疫組織化学、筋においては凍結標本でHE染色、抗LC3抗体、抗A $\beta$ 抗体による免疫組織化学を行った。

Dysferlin遺伝子解析は、ゲノムDNAを各エクソンにpolymerase chain reaction

(PCR)-Single strand conformation polymorphism (SSCP)法にて変異を検出し直接塩基配列決定法で同定した。この方法でdysferlin遺伝子変異の確定しなかったもののdysferlinopathyが疑われる患者を対象とし、血清CK値を遺伝子変異が確定した78人の血清CK値と罹病期間を考慮し(10年で1,000IU/l, 27年で800IU/l, 37年で427IU/lを下限)比較した。対象の内訳は筋障害の分布が三好型のものが17人、他の遠位型が4人、遠位型以外が15人だった。

またdysferlin欠損が見られるSJLマウスで膜修復に関与するpoxamer 188を浸透圧ポンプで持続投与し筋萎縮の経路の各分子について分子生物学的に検討した。遺伝子発現の変化についてはマイクロアレイと半定量的PCRを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、(独)国立精神・神経医療研究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、(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所組み換えDNA実験安全委員会の審査・承認を得て行っている。

DMRV患者を対象とした研究では、遺伝子解析の結果を含む情報を登録することについてのインフォームド・コンセントを同意書として得ることを必須とするとともに、研究対象者となる者が研究対象者となることを拒否できるよう十分に配慮した。取り扱う情報は、遺伝子解析の結果を含む個人情報であり個人情報管理については十分な配慮を行った。本研究は厚生労働省・文部科学省「疫学研究に関する倫理指針」を準拠し、行政機関の保有する個人情報の保護に関する法律を遵守した。

三好型を中心として他の遠位型ミオパチーの実態に関する情報収集では、遺伝子解析はインフォームド・コンセントを行い、書面で同意を得て、検体を匿名化し行った。(国)東北大学および共同研究施設である国立病院機構西多賀病院の倫

理委員会で承諾を受けた。

### C. 研究結果

6'-SL の薬物動態では腹腔内投与では、投与5分後に血中での上昇が見られ10分後をピークとし、ゆっくりと下がり始め、240分までの間、下がり続ける。一方、経口投与では投与5分後に血中での上昇は腹腔内投与の1/100程度であり、ピークを示さずに240分まで低レベルを維持した。尿中への移行では、腹腔内投与では60分をピークにゆっくりと下降したが、経口投与では240分まで増え続けた。

生存率はプラセボコントロールに比べ、6'-SL投与群、NeuAc投与群ともに改善が見られた。回転ケージでの自発運動量測定では、同腹仔コントロールの55、65、72週齢での回転数の変化はなかった。DMRVマウス（プラセボコントロール）は55週齢での回転数は同腹仔の半分程度であり、加齢に伴い回転数は減少した。NeuAc投与群は、55週齢から72週齢まで回転数は維持されていた。6'-SLの高用量群では投与に伴い、回転数の増加が観察された。トレッドミルでの走行試験では、6'-SL投与群、NeuAc投与群ともに改善は認められなかった。6'-SL投与群マウスから単離した腓腹筋は、重量、断面積ともに、用量依存的な回復を示した。Ex vivoでの収縮力でも、用量依存的に有意な回復傾向が見られた。一方、NeuAc投与群では筋萎縮に著明な改善が見られず、収縮力の改善も限定的であった。

GNE発現AdVベクターは、DMRVマウス由来繊維芽細胞に強く感染し、低シアル酸を改善した。同様に、GNE-eGFP-AAV8は、DMRVマウス由来の最終分化をした筋管細胞に強く感染し、同細胞でのシアル酸合成を改善した。発症後、骨格筋にアミロイドが観察され、中程度の筋力低下を示す44-45週齢において、GNE-eGFP-AAV8ベクターを尾静脈より導入し、全身性に感染させた。感染後にマウスの外観に異常は認められなかった。また、血液中のサイトカインの上昇を認めなかった。Q-PCRによる各種組織におけるAAV8ベクターの感染は肝臓、腎臓、心臓で強く、骨格筋でも比較的高い感染が見られた。光学顕微鏡下でのGFP陽性細胞（感染細胞）の分布

は、肝臓では肝実質と血管（内皮細胞）で強い蛍光が観察された。腎臓では腎髄質、内皮細胞で強く、糸球体ではむしろ弱かった。心筋はほぼ均一にGFPの強い発現が見られた。一方、骨格筋では、いくつかの筋線維で強いGFPの発現が認められた。陽性線維が壊死を起こしている像や陽性線維の周囲に免疫細胞の浸潤は認められなかった。どのような筋線維がGFP陽性となっているかは解析中である。

AAVベクターの投与により、生存率が上昇し、60週齢までに致死に至る個体はなかった。血清CK値はコントロールレベルまで減少した。60週齢でのDMRVマウスの運動能力は、同腹仔コントロール（ヘテロ接合体マウス：正常個体と同様の成績）程度まで、改善が見られた。また、腓腹筋の重量、断面積、収縮力には顕著な回復が見られた。調べた限りの組織におけるGNE活性は顕著に回復しており、回復シアル酸レベルと強い相関性が見られた。縁取り空胞の形成は顕著に低下し、アミロイドの蓄積もほとんど見られなかった。

DMRVマウス骨格筋において、収縮に関連したヒドロキシラジカル産生が観察された。ヒドロキシラジカルは加齢に伴い、増加した。コントロールマウスに対して、DMRVマウス骨格筋でのヒドロキシラジカル産生は高値を示した。

筋萎縮に関わるatrogene遺伝子の解析を行った。45週齢のDMRVマウスのコピキチンリガーゼAtrogin1 (Fbx32-2) とMurfl (Trim63) の発現は、2倍程度コントロールよりも高かった。また、Foxo3の脱リン酸化と核移行も観察された。

N-アセチルシステイン投与群では、筋線維径と筋病理に用量依存的な改善が見られたが、運動能力や筋収縮力には改善が見られなかった。一方、 $\alpha$ トコフェロール酢酸投与群では、筋収縮力に改善が見られたが、筋萎縮には効果が見られなかった。

呼吸機能検査データの解析では、患者数38名、43.0 $\pm$ 11.3歳（24-68歳）、男性13名、女性25名、車椅子使用なし12名、部分使用8名、一日中使用18名（杖・装具で介助歩行可能6名）であった。％機能的残気量（％FVC）は93.4 $\pm$ 25.2%（16.4-128.5）、人工呼吸器使用患者は1名（夜間NPPV）であった。夜間NPPV



の一名は肺炎を契機に重篤な呼吸不全となり呼吸器導入された。%FVC の回帰分析では発症年齢 ( $p=0.002$ )・罹患期間 ( $p=0.004$ )・歩行不能になった年齢 ( $r=0.462$ )・CK 値 ( $p=0.001$ ) が有意であった。遺伝子変異別では MNK/MNK のみの変異を持つ患者が、GNE/MNK や GNE/GNE 変異の患者より有意に呼吸機能障害が強く、発症年齢および歩行喪失時期が早かった。呼吸機能検査を 5-7 年前に行われている患者 9 名では、呼吸機能障害 (%FVC<80%) を持つ患者で有意に %FVC の低下が進行した。

長期観察症例では、筋電図にて神経原性変化が認められることで、脊髄(頸髄)パラフィン標本 HE 染色を検索した結果、前角細胞の減少や形態異常は認めなかった。骨格筋においては、全ての筋で筋線維の大小不同を認めたが、特徴的な縁取り空胞はほとんど認められなかった。抗 LC3 抗体での免疫染色は筋線維内にドット状の沈着物を認めたが、各筋間で明瞭な差を認めなかった。しかし抗 AB 抗体を用いた免疫組織化学の結果、臨床的に症状を示さない咬筋、舌は AB の沈着をあまり認めなかったが、症状が強い大腿四頭筋、ハムストリング、腸腰筋、胸鎖乳突筋では、筋鞘膜下に AB の沈着を認めた。

Dysferlinopathy の解析では、筋障害の分布が三好型であるが、免疫染色は 2 人で正常、3 人で陰性、1 人で弱い染色、他未施行。c.2675G>A 変異が 1 人、c.2997G>T 変異が 2 人、変異と断定できない変化が 3 人にみられた。5 人で血清 CK 値が低いと思われた。他の遠位型は免疫染色未施行。3 人で血清 CK 値が低いと思われた。遠位型以外は免疫染色が 10 人で陰性、4 人で弱い染色、1 人で未施行。c.2494C>T 変異が 1 人、変異と断定できない変化が 1 人にみられた。2 人で血清 CK 値が低いと思われた。遺伝子変異がみつからない検査方法上の可能性として SSCP の感度が低い、プロモーターやイントロンなど未検索の部位に変異、大きな欠失や重複の存在などが考えられる。変異が 1 アレル見ついているものは dysferlinopathy の可能性が高いと思われるが 1 人血清 CK 値が低かった。これは血清 CK 値の低くなる c.2997G>T 変異だったため判断が難しい。免疫染色が陰性のものに血清 CK 値が低いものはなかった。これ

も dysferlinopathy の可能性が高いと思われる。免疫染色が陰性ではない異常の 4 人中 3 人は血清 CK 値が低く dysferlinopathy とするには慎重さを要すると思われた。筋障害の分布が三好型のものでも免疫染色が正常や血清 CK 値の低いものがあった。

Poloxamer188 投与マウスでは筋重量の減少が有意に抑えられた。ケージ回転数の指標で運動量が増していることがわかった。リン酸化 p38 の増加が抑制され、核内での p38 存在量も低下が見られた。さらに atrogin-1 の発現上昇が抑制されていることもマイクロアレイおよび半定量的 PCR で確認することができた。これらのデータを Neurosci Res 誌に報告した。

#### D. 考察

6'-SL の薬物動態は、以前測定した NeuAc や N-アセチルマンノサミンとは全く異なる物であった。それらの単糖と比較すると、経口投与での血中への移行が極めて遅い反面、血中濃度保持時間は長かった。さらに、尿中への排出には 2 時間以上かかった。6'-SL も NeuAc も小腸にて吸収されている(データは示さず)と考えられるため、これらの代謝速度の違いは、吸収された後の血中への移行速度の違いにより、もたらされると思われる。事実、消化管を経ない腹腔内投与においても、6'-SL と NeuAc とは代謝速度が異なっており、これらの分子の血管内皮細胞間のタイトジャンクションの通過速度によるのかもしれない。

6'-SL の高用量群において、生存率、体重、自発運動量は改善を示した。特に、自発運動量は投与前に比較して増加しており、ミオパチー症状の進行抑制だけではなく、症状の改善を示すものと考えられた。

さらに腓腹筋の機能、サイズについても、治療効果が得られた。特に、サイズについては、NeuAc 投与以上の効果が得られた。6'-SL が単にシアル酸の供与というだけでなく、未だ明らかにされていない、特異的な生物活性があるのかもしれない。今後の解析が期待される。今後は、6'-SL 投与 DMRV マウスでの各組織でのシアル化の回復とともに、骨格筋の病理変化の改善について解析していく予定である。

AAV8ベクターを用いた遺伝子導入によって、全身性にAAV8ベクターの感染および導入遺伝子の発現が認められた。また、これらの組織では、組織内に多数のGFP陽性の細胞が認められた。特に、心臓では、ほぼすべての心筋細胞に強い発現が見られた。AAV8ベクター感染DMRVマウスでは、各組織のGNE酵素活性とシアル酸レベルは、肝臓、腎臓、脾臓、骨格筋では顕著に回復が見られた。このことは、肝臓、腎臓、骨格筋などに取り込まれたAAV8ベクターがGNEを産生してシアル酸レベルを上昇させた、または、AAV8ベクターが肝臓に感染することにより、肝臓でのシアリル化複合糖質の産生・分泌を上昇させ、全身性にシアル酸を供給した、の二つの可能性が考えられた。今後は、組織特異的プロモーターの使用やウイルスベクターの局所的投与により、その治療効果の機序の詳細が明らかになると考えられる。このことは、実際の遺伝子治療を考える上で重要なポイントとなるであろう。

AAVベクターの血清型で、1/6型、4型、5型は、シアル酸を受容体としていることが示されている。AAV8型は、ヘパリン硫酸への結合性はなく、37/67-kDa laminin receptor が受容体であるとされている。また、AAV9型は末端ガラクトース残基を認識しており、シアリダーゼ処理により感染効率の上昇が報告されている。今回のAAV8の実験では、感染効率においては、シアル酸が低下しているDMRVマウスと低下していないコントロールマウスとの間で差は見られなかった。つまり、AAV8型の感染には宿主のシアル酸は関係のないことが考えられ、感染性という視点ではDMRVの治療にAAV8を用いることに問題はないようである。

筋ジストロフィーモデルマウスやミオパチーモデルで、病態へのROSの関与が提案されている。しかしながら、それらの報告では、タンパク質や脂質のcarbonylation、またはH<sub>2</sub>DCFDAなどのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反応性蛍光試薬を用いて、筋ジストロフィー筋で浸潤細胞の染色がなされている。しかしながら、生体マウス骨格筋でのROSの直接測定は行われていない。我々は、マイクロダイアリシス法による生体脳でのヒドロキシラジカルの測定法を応用し、専用プローブによる骨格筋でのヒドロキシラジカル測定法を開発した。これに

より、罹患筋の筋収縮に伴うヒドロキシラジカルの量をリアルタイムで測定することが可能となった。DMRVマウスでは、加齢に伴い、筋収縮に伴うヒドロキシラジカルの量が増加していった。このことから、2つの可能性が考えられた。一つは、DMRVマウス骨格筋ではROSの生成量が増大しているというもの、もう一つはROSの除去能力が減少しているというものである。今後は、ROS量の増加と低シアル酸の関係、または筋病理変化との関係について解析する予定である。

DMRVマウス骨格筋では、筋萎縮に関わる遺伝子群の発現が増加していた。この結果はROSの産生により筋萎縮に至るプロセスを支持するものである。

少数のマウスを用いた、抗酸化薬の投与試験では、N-アセチルシステインは筋萎縮に対して効果を示したものの、筋力の回復はなかった。αトコフェロールは筋萎縮の改善はないものの、筋収縮力を改善した。このように、用いた2つの薬剤は、全く異なる結果を示した。解析個体数が少ないためである可能性もあるが、両者が骨格筋での作用機序や代謝速度が異なるせいであるかもしれない。今後は、より詳細に両薬剤の作用点、メカニズムを詳細に解析することで、これら2つの薬剤を使い分けることによって、筋萎縮の改善と筋力の回復をもたらす、より有効な治療効果が期待出来るかもしれない。

これまでGNEミオパチーの呼吸機能障害に関する具体的な記述はなされていなかったが、この研究により以下のことが明らかになった。1)GNEミオパチーは呼吸障害を呈するが程度は様々である。2)早期発症・筋萎縮や機能障害が強い患者に、より強い呼吸障害を認めた。3)遺伝子変異ドメインがMNK/MNKであるほうが呼吸障害の程度が大きく、GNME/MNKであるほうが軽症であった。4)%FVC<80%となると呼吸障害は進行性である。

DMRVは針筋電図で、いわゆる神経原性変化を認めることが特徴であるが、脊髄前角細胞数は減少していなかった。このことは前角細胞数の減少なく神経支配比が大きくなる現象を考えていく必要がある。

筋病理において、抗LC3抗体での染色で胞周囲や筋線維内にドット状の沈着物を認めた。自己食食が活発に行われている部位と考

えられたが、抗 LC3 抗体による染色は各筋間において明らかな差を認めなかった。一方、抗 AB 抗体による染色は、障害の強い筋と障害のほとんど認められない筋との間で差を認めた。障害の強い筋群では筋鞘膜下に AB の沈着を認め、それは全ての筋線維において染色された。自己食食、空胞形成のマーカーとして、LC3 だけでは不十分であり、更なる免疫組織化学やタンパク発現など検討する必要があるが、空胞形成とアミロイド沈着の機序は関連あるのか、これから検討する必要があると思われる。

三好型遠位型ミオパチーの特徴を明らかにするため、dysferlin 遺伝子変異の確定しなかった患者を解析した。変異が 1 アレル見つかったものや dysferlin タンパクの免疫染色が陰性のものは dysferlinopathy の可能性が高いと思われる。Dysferlinopathy である Miyoshi muscular dystrophy (MMD)1 以外に MMD2 や MMD3 も知られており他の原因遺伝子も考慮すべきである。

Poloxamer 188 はヒトに投与可能な薬剤であり米国食品医薬品局 (FDA) で認可されている。これまで vitro のモデルでは poloxamer 188 投与により p38 のリン酸化の抑制が示されている。また p38 は atrogen-1 の発現増加を通じて筋萎縮に関与するとされている。Poloxamer188 は p38-atrogen-1 の経路を修飾することで SJL マウスの骨格筋の表現型を修飾していると考えられる。

## E. 結論

発症した DMRV モデルマウスへの、6'-SL 投与により、運動量の増加の他、腓腹筋の機能、サイズの改善が認められた。遊離シアル酸よりも高い治療効果が認められた。AAV8 ベクターによる遺伝子治療では、各組織のシアル酸レベルに回復が見られ、骨格筋の機能や病理は顕著に改善した。モデルマウスの筋萎縮と骨格筋での ROS 産生の関連が示唆された。少数のマウスでの抗酸化薬投与では、骨格筋の表現型は部分的に回復した。

DMRV 患者は時に呼吸不全を生じる。発症年齢が早く、罹患期間が長く、MNK/MNK 変異を持つ患者では呼吸機能低下に注意する必要がある。長期観察例の脊髄前角細胞には異常を認めず、障害の強い筋群では筋鞘膜下に AB の沈着を認め、病態を考えていく上で

重要と思われた。

三好型を中心として他の遠位型ミオパチーの実態に関する解析を行った。本研究は将来 dysferlinopathy の治療研究がおこなわれる際の重要な基礎資料となると考える

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Malicdan MC, Noguchi S, Tokutomi T, Goto YI, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Peracetylated N-acetylmannosamine, a synthetic sugar molecule, effectively rescues muscle phenotype and biochemical defects in a mouse model of sialic acid deficient myopathy. *J Biol Chem.* 287(4): 2689-2705, Jan, 2012.

Suzuki N, Akiyama T, Takahashi T, Komuro H, Warita H, Tateyama M, Itoya Y, Aoki M: Continuous administration of poloxamer 188 reduces overload-induced muscular atrophy in dysferlin-deficient SJL mice. *Neurosci Res* 72(2): 181-186, Feb, 2012.

野口 悟, 西野一三: 遠位型ミオパチーの治療法開発. 生体の科学 特集 筋ジストロフィーの分子病態から治療へ. 62(2): 142-145, Apr. 2011.

西野一三, Malicdan MC, 野口 悟: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの病態と治療戦略. 神経内科 特集 神経・筋疾患の新規治療. 74(4): 347-351, Apr. 2011.

野口 悟: シアル酸の低下により引き起こされる骨格筋疾患. 生化学. 83(4): 316-320, Apr. 2011.

西野一三, 野口 悟: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーのシアル酸補充療法. BRAIN and NERVE 特集: アカデミアから新規治療の実現へ—トランスレーショナルリサーチの現状—. 64(3): 255-261, Mar, 2012.

## 2. 学会発表

Noguchi S, Malicdan MC, Nishino I: Prominent therapeutic potential of peracetylated N-acetylmannosamine, a synthetic sugar molecule, in DMRV/hIBM mice, Experimental Biology 2011, Washington, USA, 4.22, 2011.

Nishino I: Sialic acid supplementation therapy for DMRV/hIBM. 4th international congress of myology, Paris, France, 5.12, 2011.

Fahmy N, Abd El-Hady A, Abd El-Naser A, Ashour S, El-Etribi A, Nonaka I, Minami N, Suzuki N, Takahashi T, Aoki M: First dysferlinopathy patients in Egypt: clinical, pathological and genetic characteristics. 16th International Congress of the World Muscle Society, Alancil, Algarve, Portugal, 10.18-22, 2011.

Noguchi S, Malicdan MC, Funato F, Nishino I: Metabolic changes in sialic acid synthesis pathway in DMRV/hIBM model mice with long-term sialic acid treatment. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.19, 2011.

Malicdan MC, Okada T, Sela I, Takeda S, Funato F, Nonaka I, Hayashi YK, Yakovlev L, Argov Z, Nishino I, Mitrani-Rosaenbaum S, Noguchi S: Expression of human GNE through adeno-associated virus mediated therapy delays progression of myopathy in the DMRV/hIBM mouse model. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

Mori-Yoshimura M, Monma K, Suzuki N, Aoki M, Kumamoto T, Tanaka K, Tomimitsu H, Nakano N, Sonoo M, Shimizu J, Sugie K, Nakamura H, Oya Y, Hayashi YK, Malicdan MC, Noguchi S, Murata M, Nishino I: GNE myopathy (DMRV/hIBM)-natural history study

TREAT-NMD Conference 2011, Geneva, Switzerland, 11.8, 2011.

Nishino I, Malicdan MC, Noguchi S: Development of therapy for DMRV/hIBM. TREAT-NMD Conference 2011, Geneva, Switzerland, 11.9, 2011.

Mori-Yoshimura M, Momma K, Oya Y, Nakamura H, Hayashi YK, Malicdan MC, Noguchi S, Nishino I, Murata M: Distal myopathy with rimmed vacuoles-natural history study. TREAT-NMD Conference 2011, Geneva, Switzerland, 11.9, 2011.

Noguchi S, Malicdan MC, Nishino I: Metabolic changes in sialic acid synthesis pathway in DMRV/hIBM model mice with long-term sialic acid treatment. 2011 Annual meeting of American society of cell biology, Denver USA, 12. 4, 2011.

Malicdan MC, Noguchi S, Tokutomi T, Hayashi YK, Goto Y-I, Nishino I: peracetylated N-acetylmannosamine, a synthetic sugar molecule, unravels important biomarkers in a model of sialic acid deficient myopathy. Annual meeting of American society of cell biology, Denver USA, 12. 4, 2011.

Nishino I: Distal myopathy: What's new? The Fourth Thai-Japanese Workshop on Muscle Diseases. Bangkok, 2.23, 2012.

森まどか, 中村治雅, 山本敏之, 大矢 寧, 西野一三, 村田美穂: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)自然歴研究. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011.

富満弘之, Azat Mayra, 久保寺隆行, 小林正樹, 朴 文英, 横田隆徳, 水澤英洋: アデノ随伴ウイルス, RNA 干渉を用いた骨格筋での遺伝子発現抑制系の確立. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011.

鈴木直輝, 高橋俊明, 豎山真規, 割田仁, 安

藤里紗, 井泉瑠美子, 青木正志: poloxamer188  
の長期持続投与による SJL マウスの筋萎縮  
の抑制. 第 52 回日本神経学会総会, 名古屋,  
5.18-20, 2011.

高橋俊明, 青木正志, 鈴木直輝, 堅山真規,  
吉岡 勝, 今野秀彦, 小野寺宏, 西野一三,  
糸山泰人: 日本人三好型遠位型筋ジストロフ  
ィーの遺伝子変異の特徴と自然歴ー肢帯型筋  
ジストロフィー2B 型との比較ー. 第 52 回日  
本神経学会学術大会, 名古屋, 5.19, 2011.

大矢 寧, 森まどか, 西野一三: 埜中ミオパ  
チー (DMRV) の筋力低下の経過観察:  
clenbuterol 内服患者での経験. 第 52 回日本  
神経学会学術大会, 名古屋, 5.20, 2011.

高橋俊明, 鈴木直輝, 井泉瑠美子, 堅山真規,  
安藤里紗, 八木沼智香子, 佐藤仁美, 島倉奈  
緒子, 田中洋康, 吉岡勝, 今野秀彦, 小野寺  
宏, 西野一三, 青木正志: Dysferlinopathy が  
疑われるものの dysferlin 遺伝子変異の確定  
しなかった患者の検討. 日本人類遺伝学会第  
56 回大会, 千葉, 11. 20-22, 2011.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

特許申請中

GNE タンパク質の機能低下に起因す  
る疾患の治療用医薬剤、食品組成物、  
食品添加物

特願 2009-119272

国際特許 PTC/JP2010/58116

特許申請中

タンパク質蓄積性筋疾患を治療するた  
めの医薬

特願 2011-042435

### 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治療効果最大化のための研究  
～ミオパチーを発症した高齢 DMRV モデルマウスに対する  
シアル酸投与試験～

研究代表者 西野 一三  
(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部 部長

研究要旨

DMRV 患者への治療を考えると、発症の予防ではなく、ミオパチー症状を如何に、回復させるのが重要である。50 週齢を過ぎた発症した DMRV モデルマウスに対して、遊離型シアル酸 (N-アセチルノイラミン酸: NeuAc) と結合型シアル酸 ( $\alpha$ 2-6 シアリルラクトース: 6'-SL) を投与し、ミオパチー症状の改善を解析した。薬物動態の解析では、両者は異なる代謝速度を示した。6'-SL 投与はモデルマウスの自発運動量の改善に高い効果を示した。また、骨格筋の収縮力低下、筋萎縮に対しても効果が高かった。今後、DMRV 患者の治療を考える上で、重要な知見を与えると思われる。

A. 研究目的

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 (前頸骨筋) が侵される遺伝性の筋疾患である。欧米では遺伝性封入体ミオパチー (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)。

このマウスは、20 週齢以降に骨格筋の収縮力低下を示し、30 週齢以降に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を示し、40 週齢以降には封入体形成後に引き起こされる自己貪食空胞の形成と関連して、骨格筋の収縮力に著明な低下を示す。我々は、発症前の DMRV マウスで、シアル酸やその前駆体を発症期まで投与し続けることにより、このマウスのミオパチー発症を完全に予防することを、2009 年に報告した。しかしながら、DMRV は劣性遺伝病であるため、患者の早期診断は不可能であり、高齢発

症に対して比較的短い経過で急速に歩行不能となる疾患であるため、症状の重篤な日本人患者の場合は、診断時には車椅子使用である。つまり、DMRV 患者への治療を考えると、発症の予防ではなく、ミオパチー症状を如何に、回復させるのが重要である。その治療法開発のため、我々は以前、すでに発症した DMRV マウスへのシアル酸投与を試みた。シアル酸投与による一定のミオパチー抑制効果は得られたものの、トレッドミルを含む生理学的測定の繰り返しにより高齢マウスへダメージを与えたため、同腹仔コントロールマウスにおいても運動能力の低下が認められてしまった。そこで、昨年度は高齢マウスに運動能力の低下を与えない生理学的測定方法を確立した。そこで、本年度の研究は、すでに予防効果を示した化合物のうち、遊離型シアル酸 (N-アセチルノイラミン酸: NeuAc) と結合型シアル酸 ( $\alpha$ 2-6 シアリルラクトース: 6'-SL) の投与による、発症マウスのミオパチー症状の改善を解析した。

## B. 研究方法

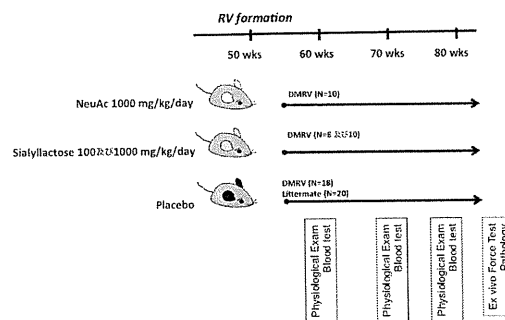
DMRV モデルマウス(GNE-/-hGNETg)は、GNE-KO マウスと変異ヒト GNEcDNA トランスジェニックマウスとの掛け合わせにより作製した。マウスは自由飲水、食餌摂取、12時間の明暗時間で飼育した。

6'-SL の薬物動態は、6'-SL(30mg)を腹腔内および経口投与した後、5、10、30、60、120、240分に鼻鏡脈採血と採尿を行った。6'-SLは蛍光標識後に、HPLCにて測定した。

投与試験は、55週齢のモデルマウスと同腹仔コントロールを用いて、飲水にて投与した。用量は、6'-SL:100mg(低用量群)及び1000mg(高用量群)/kg体重/日、NeuAc:1000mg/kg体重/日を用いた。プラセボコントロールとして水を与えた。80週齢まで投与した。

生理学試験の項目として、回転ケージでの自発運動量測定(メルクエスト)を用いた。55、65、72および80週齢で経時的に測定(一日あたりの回転数にて評価)した。80週齢にて、トレッドミルにて走行能力を評価した。

Ex vivoでの単離腓腸筋の収縮力は、定法に従い測定した。



(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、(独)国立精神・神経医療研究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、(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所組み換えDNA実験安全委員会の審査・承認を得て行っている。

## C. 研究結果

6'-SLの薬物動態では腹腔内投与では、投与5分後に血中での上昇が見られ10分後をピークとし、ゆっくりと下がり始め、240分までの間、下がり続ける。一方、経口投与では投与5分後に血中での上昇は腹腔内投与の1/100程度であり、ピークを示さずに240分まで低レベルを維持した。尿中への移行では、腹腔内投与では60分をピークにゆっくりと下降したが、経口投与では240分まで増え続けた。

生存率はプラセボコントロールに比べ、6'-SL投与群、NeuAc投与群ともに改善が見られた。

回転ケージでの自発運動量測定では、同腹仔コントロールの55、65、72週齢での回転数の変化はなかった。DMRVマウス(プラセボコントロール)は55週齢での回転数は同腹仔の半分程度であり、加齢に伴い回転数は減少した。NeuAc投与群は、55週齢から72週齢まで回転数は維持されていた。6'-SLの高用量群では投与に伴い、回転数の増加が観察された。トレッドミルでの走行試験では、



6'-SL 投与群、NeuAc 投与群ともに改善は認められなかった。

6'-SL 投与群マウスから単離した腓腹筋は、重量、断面積ともに、用量依存的な回復を示した。Ex vivo での収縮力でも、用量依存的に有意な回復傾向が見られた。一方、NeuAc 投与群では筋萎縮に著明な改善が見られず、収縮力の改善も限定的であった。

#### D. 考察

6'-SL の薬物動態は、以前測定した NeuAc や N-アセチルマンノサミンとは全く異なるものであった。それらの単糖と比較すると、経口投与での血中への移行が極めて遅い反面、血中濃度保持時間は長かった。さらに、尿中への排出には2時間以上かかった。6'-SL も NeuAc も小腸にて吸収されている（データは示さず）と考えられるため、これらの代謝速度の違いは、吸収された後の血中への移行速度の違いにより、もたらされると思われる。事実、消化管を経ない腹腔内投与においても、6'-SL と NeuAc とは代謝速度が異なっており、これらの分子の血管内皮細胞間のタイトジャンクションの通過速度によるのかもしれない。

6'-SL の高用量群において、生存率、体重、自発運動量は改善を示した。特に、自発運動量は投与前と比較して増加しており、ミオパチー症状の進行抑制だけではなく、症状の改善を示すものと考えられた。

さらに腓腹筋の機能、サイズについても、治療効果が得られた。特に、サイズについては、NeuAc 投与以上の効果が得られた。6'-SL が単にシアル酸の供与というだけでなく、未だ明らかにされていない、特異的な生物活性があるのかもしれない。今後の解析が期待される。今後は、6'-SL 投与 DMRV マウスでの各組織でのシアル化の回復とともに、骨格筋の病理変化の改善について解析していく予定である。

#### E. 結論

発症した DMRV モデルマウスへの、6'-SL 投与により、運動量の増加の他、腓腹筋の機能、サイズの改善が認められた。遊離シアル酸よりも高い治療効果が認められた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Malicdan MC, Noguchi S, Tokutomi T, Goto YI, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Peracetylated N-acetylmannosamine, a synthetic sugar molecule, effectively rescues muscle phenotype and biochemical defects in a mouse model of sialic acid deficient myopathy. *J Biol Chem.* 287(4): 2689-2705, Jan, 2012.

野口 悟, 西野一三: 遠位型ミオパチーの治療法開発. 生体の科学 特集 筋ジストロフィーの分子病態から治療へ. 62(2): 142-145, Apr. 2011.

西野一三, Malicdan MC, 野口 悟: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの病態と治療戦略. *神経内科 特集 神経・筋疾患の新規治療.* 74(4): 347-351, Apr. 2011.

西野一三, 野口 悟: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーのシアル酸補充療法. *BRAIN and NERVE 特集: アカデミアから新規治療の実現へトランスレーショナルリサーチの現状.* 64(3): 255-261, Mar, 2012.

##### 2. 学会発表

Noguchi S, Malicdan MC, Nishino I: Prominent therapeutic potential of peracetylated N-acetylmannosamine, a synthetic sugar molecule, in DMRV/hIBM mice, *Experimental Biology 2011, Washington, USA, 4.22, 2011.*

Nishino I: Sialic acid supplementation therapy for DMRV/HIBM. 4th international congress of myology, Paris, France, 5.12, 2011.

Noguchi S, Malicdan MC, Funato F, Nishino I: Metabolic changes in sialic acid synthesis pathway in DMRV/hIBM model mice with long-term sialic acid treatment. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.19, 2011.

Malicdan MC, Okada T, Sela I, Takeda S, Funato F, Nonaka I, Hayashi YK, Yakovlev L, Argov Z, Nishino I, Mitrani-Rosaenbaum S, Noguchi S: Expression of human GNE through adeno-associated virus mediated therapy delays progression of myopathy in the DMRV/hIBM mouse model. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

Mori-Yoshimura M, Monma K, Suzuki N, Aoki M, Kumamoto T, Tanaka K, Tomimitsu H, Nakano N, Sonoo M, Shimizu J, Sugie K, Nakamura H, Oya Y, Hayashi YK, Malicdan MC, Noguchi S, Murata M, Nishino I: GNE myopathy (DMRV/hIBM)-natural history study TREAT-NMD Conference 2011, Geneva, Switzerland, 11.8, 2012.

Nishino I, Malicdan MC, Noguchi S: Development of therapy for DMRV/hIBM. TREAT-NMD Conference 2011, Geneva, Switzerland, 11.9, 2011.

Mori-Yoshimura M, Momma K, Oya Y, Nakamura H, Hayashi YK, Malicdan MC, Noguchi S, Nishino I, Murata M: Distal myopathy with rimmed vacuoles-natural history study. TREAT-NMD Conference 2011, Geneva, Switzerland, 11.9, 2011.

Noguchi S, Malicdan MC, Nishino I: Metabolic changes in sialic acid synthesis pathway in DMRV/hIBM model mice with long-term sialic acid treatment. 2011 Annual meeting of American society of cell biology, Denver USA, 12. 4, 2011.

Malicdan MC, Noguchi S, Tokutomi T, Hayashi YK, Goto Y-I, Nishino I: peracetylated N-acetylmannosamine, a synthetic sugar molecule, unravels important biomarkers in a model of sialic acid deficient myopathy. Annual meeting of American

society of cell biology, Denver USA, 12. 4, 2011.

Nishino I: Distal myopathy: What's new? The Fourth Thai-Japanese Workshop on Muscle Diseases. Bangkok, 2.23, 2012.

森まどか, 中村治雅, 山本敏之, 大矢 寧, 西野一三, 村田美穂: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)自然歴研究. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011.

高橋俊明, 青木正志, 鈴木直輝, 堅山真規, 吉岡 勝, 今野秀彦, 小野寺宏, 西野一三, 糸山泰人: 日本人三好型遠位型筋ジストロフィーの遺伝子変異の特徴と自然歴-肢帯型筋ジストロフィー2B型との比較-. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.19, 2011.

大矢 寧, 森まどか, 西野一三: 埜中ミオパチー (DMRV) の筋力低下の経過観察: clenbuterol 内服患者での経験. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.20, 2011.

高橋俊明, 鈴木直輝, 井泉瑠美子, 堅山真規, 安藤里紗, 八木沼智香子, 佐藤仁美, 島倉奈緒子, 田中洋康, 吉岡勝, 今野秀彦, 小野寺宏, 西野一三, 青木正志: Dysferlinopathy が疑われるものの dysferlin 遺伝子変異の確定しなかった患者の検討. 日本人類遺伝学会第56回大会, 千葉, 11. 20-22, 2011.

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

特許申請中  
GNE タンパク質の機能低下に起因する疾患の治療用医薬剤、食品組成物、食品添加物  
特願 2009-119272  
国際特許 PTC/JP2010/58116

特許申請中  
タンパク質蓄積性筋疾患を治療するための医薬  
特願 2011-042435

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の治療効果最大化のための研究

### ～ 遺伝子治療によるDMRVマウスの治療研究～

研究分担者 野口 悟

(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部 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遺伝子治療研究を行った。44-45 週齢のマウスに対して、原因遺伝子である *GNE* cDNA を発現する AAV ベクターを尾静脈から、全身性に投与した。60 週齢で、骨格筋の運動測定を行うとともに、生化学的検査及び組織化学的解析を行った。遺伝子治療を受けたモデルマウスの運動能力には明らかな改善が認められた。モデルマウスに導入された遺伝子は、ほぼ全身に検出されたが、遺伝子発現は、肝臓、腎臓に高く、骨格筋でも検出された。各種臓器での AAV ベクター由来 GFP の発現には、特異的なパターンが観察され、細胞により感染効率が異なることが考えられた。各種組織での *GNE* 活性とシアル酸レベルの増加には相関性が確認された。組織染色では、筋線維萎縮の改善の他、DMRV 筋に特徴的な縁取り空胞またはアミロイド陽性筋線維の減少が認められた。以上のことより、遺伝子治療が DMRV に有効であることが示された。

#### 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、比較的高齢発症であり、遺伝性の筋疾患である。発症初期は主に遠位筋が侵され、発症後数年で高度に筋萎縮を認める。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タンパク質性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貪食空胞の形成と関連していることが示唆された。

DMRV マウス (Nat Med 2009) に対するシアル酸の直接投与により、シアル酸の回復と筋力低下の改善という良好な結果を得ている、しかしながら、遊離シアル酸の血中での代謝時間が非常に短いことから、ヒト患者に応用する場合、いかにシアル酸を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できれば、より高い治療効果が期待される。