

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、骨格筋に直接という以外での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。

今年度の研究では、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。

B. 研究方法

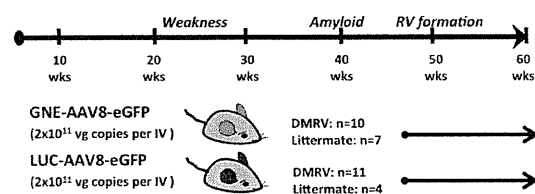
アデノウイルス (AdV) ベクターは、完全長ゲノム導入法にて作成した。コスミド pAxCawtit2 の SwaI サイトに、mouse GNE(mGNE) cDNA をクローニングした。

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。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 10¹¹ 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。投与後、60 週齢でトレッドミルでの運動能力試験、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。

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。



単離骨格筋の収縮力は以前に用いた方法にて行った。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。さらに、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。

また、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。

(倫理面への配慮)

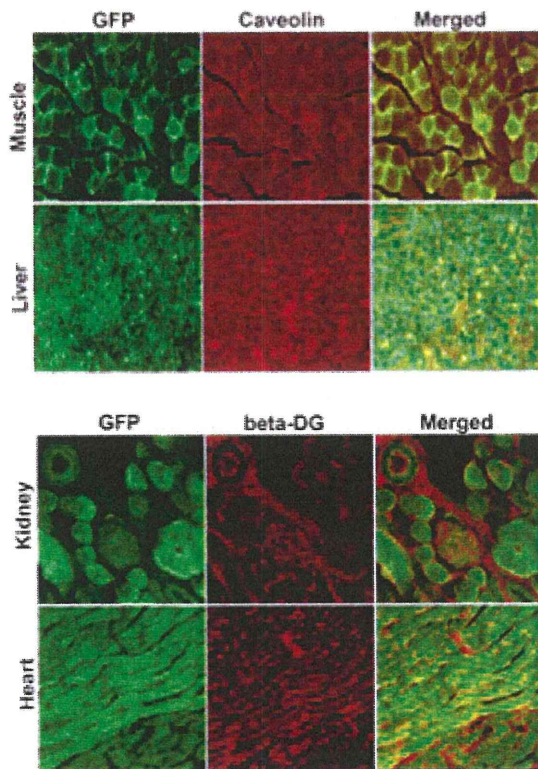
すべての動物実験は、(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従い行い、同研究所小型実験動物倫理問題検討委員会にて審査・承認を得ている。すべての組み換え DNA 実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所組み換え DNA 実験安全委員会の審査・承認を得て行っている。

C. 研究結果

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。

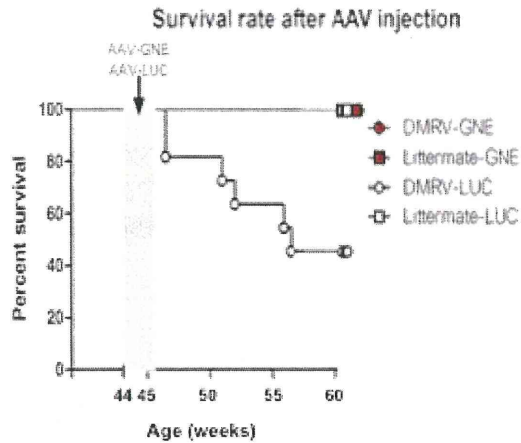
発症後、骨格筋にアミロイドが観察され、中程度の筋力低下を示す 44-45 週齢において、GNE-eGFP-AAV8 ベクターを尾静脈より導入し、全身性に感染させた。感染後にマウス

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。心臓はほぼ均一に 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。



D. 考察

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。

E. 結論

DMRV マウスへの 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。

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.

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.

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.

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

～活性酸素種のDMRV病態への関与および抗酸化薬による治療研究～

研究分担者 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

研究要旨

DMRV モデルマウス骨格筋における ROS 量を *in vivo* で測定した。ヒドロキシラジカルの量は、モデルマウス骨格筋で加齢とともに増加し、症状の進行との関係を示唆した。また、DMRV マウス骨格筋では加齢に伴い、アトロフィー関連遺伝子の発現上昇が認められた。少数のモデルマウスでの抗酸化薬投与により、骨格筋の表現型は部分的に回復することが出来た。

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 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。また、30 週齢以降のさらなる筋力の著明な低下は、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 NFκB 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うものである。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 α 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、下流のカスケードを活性化する可能性はある。

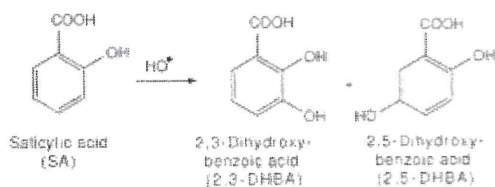
本年度の研究では、DMRV モデルマウスでの ROS 産生を *in vivo* で測定した。また、ROS 下流遺伝子の活性化を測定するとともに、小規模での抗酸化薬での治療研究を開始した。

B. 研究方法

DMRV のモデルマウス

(GNE-/-hGNETg)は、GNE-KO マウスと変異 GNE 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、自由食餌摂取、12 時間の明暗環境で飼育した。

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。



下流遺伝子の発現は TaqMan プローブを用いた Q-RTPCR 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 α 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。 α 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、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、骨格筋病理観察により行った。*in vitro* での単離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

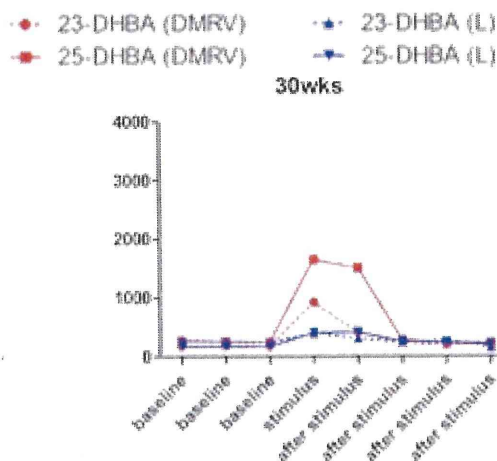
離し、両端に糸を結びつけ、トランスデューサーと連結させた。生理検査溶液中で、最大単収縮長での単収縮力 (3ms) と 10-200Hz (300ms) での強縮力を測定した。

(倫理面への配慮)

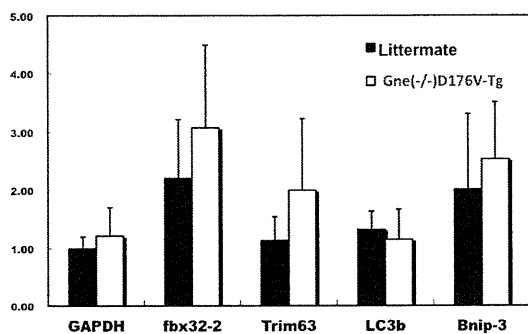
すべての動物実験は、(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従い行い、同研究所小型実験動物倫理問題検討委員会にて審査・承認を得ている。すべての組み換え DNA 実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所組み換え DNA 実験安全委員会の審査・承認を得て行っている。

C. 研究結果

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 マウスのユビキチンリガーゼ Atrogin1 (Fbx32-2) と Murf1 (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。



下記表に、N-アセチルシステインおよびαトコフェロール酢酸投与の結果を示す。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、α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。

Drug	N-Acetylcysteine	α-tocopherol
Group	18 mice 3 groups (High/Low/placebo)	18 mice 2 groups (treatment/placebo)
Duration	From 22 to 57 wk	From 16 to 26 wk
Weight Change	Not decreased in all groups	No change
Treadmill Test	Placebo>Low>High	ND
Contractile Force	Placebo>Low>High	Treatment>Placebo
Fibers diameter	Minimal difference (High>Placebo>Low)	Placebo>Treatment
RVs & Amyloids	Placebo>Low>High	ND

D. 考察

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H₂DCFDAなどのH₂O₂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。

E. 結論

DMRV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。少数のモデルマウスでの抗酸化薬投与により、骨格筋の表現型は部分的に回復した。

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.

2. 学会発表

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.

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.

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.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

～三好型遠位型ミオパチーの自然経過に関する研究～

研究分担者 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

研究要旨 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を行う。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アレル見つかったり、dysferlin タンパクの免疫染色が陰性なのは dysferlinopathy の可能性が高いと思われる。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。

A. 研究目的

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

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 poloxamer 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）

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。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

筋障害の分布が三好型のものの免疫染色は 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アレル見つかるものは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

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アレル見つかるものや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atrogin-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-atrogin-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

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. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki N, Akiyama T, Takahashi T, Komuro H, Warita H, Tateyama M, Itoyama 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.

Suzuki N, Takahashi T, Suzuki Y, Narikawa K, Kudo S, Suzuki H, Tateyama M, Aoki M: An Autopsy case of a dysferlinopathy patient with cardiac involvement. *Muscle Nerve* 45(2): 298-299, Feb, 2012.

2. 学会発表

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, Almancil, Algarve, Portugal, 10.18-22, 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.

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, 豎山真規, 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 回日本神経学会総会, 名古屋, 5. 18-20, 2011.

高橋俊明, 鈴木直輝, 井泉瑠美子, 豎山真規, 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. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

～自然歴作成・病態研究～

研究分担者 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

研究要旨

本疾患の自然歴を明らかにする目的で、長期間観察してきた患者の臨床経過を解析するとともに、発症 41 年後に亡くなった患者の剖検時に採取した組織を用いて、病気の広がりや病態について解析した。神経系については脊髄前角細胞の減少はなく、形態的な変化も認めなかった。多くの骨格筋では筋線維の大小不同は認めるが、縁取り空胞はほとんど認められなかった。しかし、臨床的に異常が強い筋においては、筋膜下に AB が沈着しており、同じ骨格筋でも症状に乏しい咬筋や舌では AB の沈着を殆ど認めなかった。AB 沈着は DMRV の病態に強く関係していると思われた。

A. 研究目的

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）は原因遺伝子が同定されてモデルマウスが作製された。そのマウスを用い治療法が検討され、ヒトへの応用が始まろうとしている。治療の効果判定には自然歴が確立していることが大切である。昨年度から長期間観察している患者の臨床症状を評価することで自然歴の確立を目指してきた。今回は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。

B. 研究方法

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 AB 抗体による免疫組織化学を行った。

（倫理面への配慮）

遺伝子診断については説明後、文書にて承諾を得たのちに診断を行っていた。また患者死亡後、ご家族に病理解剖と、その検体の研究への利用について説明を行い、文書にて承諾を得た。

C. 研究結果

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 Aβ 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 Aβ 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 Aβ の沈着を認めた。

D. 考察

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 抗体での染色で空胞周囲や筋線維内にドット状の沈着物を認めた。自己貪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 Aβ 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 Aβ の沈着を認め、それは全ての筋線維において染色された。自己貪食、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た。

E. 結論

DMRV の病態解明目的で、長期観察例の剖検組織を用いて検討を行った。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 Aβ の沈着を認め、病態を考えていく上で重要と思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

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 (DMRV/hIBM)-natural history study TREAT-NMD Conference 2011, Geneva, Switzerland, 11.8, 2012.

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.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

GNEミオパチー（縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー:DMRV）の 呼吸障害に関する研究

研究分担者 森 まどか
（独）国立精神・神経医療研究センター病院 医師

研究要旨

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）患者38人の後ろ向きカルテ調査を行い、呼吸機能障害の存在を明らかにした。

A. 研究目的

GNE ミオパチー（縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV））は本邦に多く集積するミオパチーであるが、*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を行った。

B. 研究方法

当院の 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, χ^2 検定および回帰分析を用いた。

（倫理面への配慮）

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。

C. 研究結果

【患者概要】38名、43.0±11.3歳(24-68歳)、男性 13人、女性 25人、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±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。

D. 考察

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。

E. 結論

GNE ミオパチー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 GNE ミオパチー患者では呼吸機能低下に注意する必要がある。MNK/MNK 変異は重症型である可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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.

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.

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自然歴研. 2011年日本神経学会総会, 名古屋, 5.17, 2011.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名： 論文タイトル名. 発表誌名 巻号： ページ, 出版年
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. <i>J Biol Chem.</i> 287(4): 2689-2705, Jan, 2012.
Suzuki N, Akiyama T, Takahashi T, Komuro H, Warita H, Tateyama M, Itoyama Y, <u>Aoki M</u> : Continuous administration of poloxamer 188 reduces overload-induced muscular atrophy in dysferlin-deficient SJL mice. <i>Neurosci Res</i> 72(2): 181-186, Feb, 2012.

IV 研究成果の刊行物・別刷

Peracetylated *N*-Acetylmannosamine, a Synthetic Sugar Molecule, Efficiently Rescues Muscle Phenotype and Biochemical Defects in Mouse Model of Sialic Acid-deficient Myopathy^{*[5]}

Received for publication, August 24, 2011, and in revised form, November 29, 2011. Published: JBC Papers in Press, December 8, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.297051

May Christine V. Malicdan^{*1}, Satoru Noguchi^{*2}, Tomoharu Tokutomi^{*3,6}, Yu-ichi Goto⁴, Ikuya Nonaka³, Yukiko K. Hayashi³, and Ichizo Nishino[†]

From the Departments of[†]Neuromuscular Research and[§]Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo 187-8502, Japan and[§]Department of Pathology and Laboratory Medicine, National Defense Medical College, Saitama 359-8513, Japan

Background: Distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy (DMRV)/hIBM is a sialic acid-deficient myopathy.

Results: Tissue sialylation in DMRV/hIBM mice is efficiently increased by Ac₄ManNAc, a synthetic compound.

Conclusion: Ac₄ManNAc rescued muscle phenotype in DMRV/hIBM more efficiently than natural compounds.

Significance: Application of this compound includes its potential use in therapy and in understanding the molecular basis of sialic acid deficiency in disease.

Distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy (DMRV/hIBM), characterized by progressive muscle atrophy, weakness, and degeneration, is due to mutations in *GNE*, a gene encoding a bifunctional enzyme critical in sialic acid biosynthesis. In the DMRV/hIBM mouse model, which exhibits hyposialylation in various tissues in addition to muscle atrophy, weakness, and degeneration, we recently have demonstrated that the myopathic phenotype was prevented by oral administration of *N*-acetylneuraminic acid, *N*-acetylmannosamine, and sialyllactose, underscoring the crucial role of hyposialylation in the disease pathomechanism. The choice for the preferred molecule, however, was limited probably by the complex pharmacokinetics of sialic acids and the lack of biomarkers that could clearly show dose response. To address these issues, we screened several synthetic sugar compounds that could increase sialylation more remarkably and allow demonstration of measurable effects in the DMRV/hIBM mice. In this study, we found that tetra-*O*-acetylated *N*-acetylmannosamine increased cell sialylation most efficiently, and *in vivo* evaluation in DMRV/hIBM mice revealed a more dramatic, measurable effect and improvement in muscle phenotype, enabling us to

establish analysis of protein biomarkers that can be used for assessing response to treatment. Our results provide a proof of concept in sialic acid-related molecular therapy with synthetic monosaccharides.

Distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV)³/hereditary inclusion body myopathy (hIBM) is a gradually progressive autosomal recessive disorder that predominantly affects distal muscles at the initial stages but also involves proximal muscles during the progression of the disease (1, 2). DMRV/hIBM has been reported as quadriceps-sparing myopathy because the quadriceps muscles are relatively spared even during the late stage of the disease (3). Skeletal muscle pathology is characterized by rimmed vacuoles in some fibers, scattered atrophic fibers, and intracellular congophilic deposits that are immunoreactive to amyloid, hyperphosphorylated tau, and various proteins (4, 5).

DMRV/hIBM is due to mutations in the UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase (*GNE*) gene (6–8) that encodes the bifunctional enzyme catalyzing the two critical steps in sialic acid synthesis (9). Sialic acids are monosaccharides found at the terminal ends of and confer negative charge to glycoproteins and glycolipids and are associated with several biological functions (10–15). Because mutations in the *GNE* gene lead to significant reduction in one of the two enzymatic activities of the gene product (16, 17), it was hypoth-

* This work was supported in part by Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health from the Japanese Health Sciences Foundation; the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation; Intramural Research Grants 22-5, 20B-12, and 20B-13 for Neurological and Psychiatric Disorders of the National Center of Neurology and Psychiatry; and the Kato Memorial Trust for Nambyo Research.

[5] This article contains supplemental Figs. 1–5.

¹ Supported in part by the Neuromuscular Disease Foundation and Association Française contre les Myopathies. Present address: Medical Genetics Branch, National Human Genome Research Institute, NIH, Bethesda, MD 20892.

² To whom correspondence should be addressed: Dept. of Neuromuscular Research, National Inst. of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawahigashi-cho, Kodaira-shi, Tokyo 187-8502, Japan. Tel.: 81-42-341-2711; Fax: 81-42-346-1742; E-mail: noguchi@ncnp.go.jp.

³ The abbreviations used are: DMRV, distal myopathy with rimmed vacuoles; hIBM, hereditary inclusion body myopathy; *GNE*, UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase; ManNAc, *N*-acetylmannosamine; Ac₄ManNAc, tetra-*O*-acetylated *N*-acetylmannosamine; Ac₅NeuAc, penta-*O*-acetyl-*N*-acetylneuraminic acid; Ac₅NeuAc-Me, penta-*O*-acetyl-*N*-acetylneuraminic acid methyl ester; Ab, antibody; BW, body weight; CSA, cross-sectional area; NEP, neprilysin; SG, sarcoglycan; βDG, β-dystroglycan; Aβ, amyloid β; Lamp2, lysosome-associated membrane protein 2.

Ac₄ManNAc Rescues Muscle Phenotype in DMRV/hIBM Mice

esized that the sialic acid level in DMRV/hIBM is altered, and this was later demonstrated by the reduced sialic acid levels in muscle, serum, and cultured cells from patients (16). This was further supported by findings in the existing mouse model that resembles the phenotype in humans, the *Gne*^{-/-}-GNED176V-Tg mouse, hereafter referred to as “DMRV/hIBM mouse,” which showed hyposialylation of serum and other tissues from birth and exhibited late onset progressive muscle weakness and atrophy that is accompanied by mild serum creatine kinase elevation from 21 weeks of age (18). In muscle pathology, intracytoplasmic deposits comprising predominantly amyloid β were observed from 31 weeks of age in addition to fiber size variation. From 41 weeks onward, rimmed vacuoles were seen in scattered fibers.

We have recently reported the prophylactic effect of sialic acid-related natural molecules, *N*-acetylneuraminic acid (NeuAc) and its glycosyl conjugate sialyllactose as well as its precursor *N*-acetylmannosamine (ManNAc), on DMRV/hIBM mice (19). By oral administration of these naturally occurring molecules, the DMRV/hIBM mice showed favorable improvement in survival rate, motor performance, muscle force, muscle atrophy, and muscle degeneration, suggesting that hyposialylation is an important factor in the pathogenesis of DMRV/hIBM. More importantly, these results implied that DMRV/hIBM might be rescued by extrinsic administration of sialic acid-related molecules. However, we could not clearly define the dose effect with ManNAc, which should be expected in establishing therapeutic protocols. As related to this finding, we have shown that the sialic acid levels in plasma and the organs were not fully recovered, giving rise to some speculations that these results may reflect a limitation in the incorporation of such compounds into mouse tissues because of the rapid excretion of sialic acid metabolites or the absence of definitive markers that could show dose response. Consequently, this concept would require the use of more effective compounds for the enhancement of cellular sialylation and the search for more sensitive and specific molecular markers in establishing the proof of concept of sialic acid-related molecular therapy for DMRV/hIBM. In this study, we identified a synthetic sugar compound with a profound effect in recovering cellular sialylation in DMRV/hIBM myocytes. When applied *in vivo* to DMRV/hIBM mice, this compound can prevent the myopathic phenotype in a dose-dependent fashion, providing evidence that synthetic sugar compounds may be a good option to consider in designing therapeutic trials pending complete toxicology studies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice—The DMRV/hIBM mice were generated as reported previously (18). Mice were maintained in a barrier-free, specific pathogen-free grade facility on a 12-h light, 12-h dark cycle and had free access to normal chow and water. All animal experiments conducted in this study were approved by and carried out within the rules and regulations of the Ethical Review Committee on the Care and Use of Rodents in the National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry. These policies are based on the “Guideline for Animal Experimentation” as sanctioned by the Council of the Japanese Association of Laboratory Animal Science.

Sialic Acid Precursors—Sialic acid (NeuAc) and the physiological precursor ManNAc, peracetylated ManNAc (tetra-*O*-acetyl-*N*-acetylmannosamine (Ac₄ManNAc)), and peracetylated NeuAc (penta-*O*-acetyl-*N*-acetylneuraminic acid (Ac₅-NeuAc) and penta-*O*-acetyl-*N*-acetylneuraminic acid methyl ester (Ac₅NeuAc-Me)) were purchased from Japan Food and Liquor Alliance (Kyoto, Japan), New Zealand Pharmaceuticals Ltd. (Palmerston North, New Zealand), and Nagara Science Co., Ltd. (Gifu, Japan), respectively. *N*-Acetylglucosamine (GlcNAc) (Sigma) was used as negative control.

Cell Culture and Analysis of Cellular Sialylation and Cytotoxicity—Cultured myoblasts from DMRV/hIBM patients, diagnosed based on clinical features, muscle pathology, and the presence of mutations (heterozygous for IVS4 + 4A→G and c.1714G→C) (16) in the *GNE* gene, were obtained with informed consent approved by the Ethical Review Board at the National Center of Neurology and Psychiatry. Primary myoblasts from DMRV/hIBM patients and DMRV/hIBM mice were prepared following standard protocols (20). Myoblasts were cultured in 10% FBS, DMEM/Ham’s F-12 (Sigma) in a humidified chamber with 5% CO₂ at 37 °C. Myogenic differentiation was induced at confluence stage by switching the medium to 5% horse serum in DMEM/Ham’s F-12. Forty-eight hours before lectin staining or sialic acid determination, the medium was replaced with serum-free DMEM/F-12 with or without GlcNAc, ManNAc, NeuAc, Ac₄ManNAc, Ac₅NeuAc, or Ac₅NeuAc-Me and maintained in the humidified chamber for 48 h. Cells were fixed and permeabilized as described previously (16). Biotin-labeled soybean agglutinin (Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan), wheat germ agglutinin (Seikagaku Kogyo), and a mAb against desmin (69-181, MP Biomedicals, Solon, OH) were used for staining the cells followed either with Alexa Fluor 468-labeled (Invitrogen) Ab or TRITC-streptavidin.

For analysis of cytotoxicity, the myoblasts were cultured in 10% FBS, DMEM/Ham’s F-12 with or without Ac₄ManNAc or Ac₅NeuAc-Me for 3 days. After removing dead cells by washing with PBS, the remaining myoblasts attached on the dish were harvested with trypsin and counted.

Sialic Acid Measurement—Total and bound sialic acids from the plasma, membrane-bound fractions collected from cultured cells, and pieces of different tissues were released using 25 mM sulfuric acid hydrolysis for 1 h at 80 °C. Released sialic acids were then derivatized with 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene and analyzed with reversed-phase HPLC with fluorescence detection as described previously (18, 21). Total protein was measured using the Bio-Rad Protein Assay according to the manufacturer’s protocol.

Ac₄ManNAc Pharmacokinetics—For this experiment, wild type mice were used ($n = 2$ each group). After collection of blood from the tail vein and urine for base-line data, Ac₄ManNAc (31 μ mol) was given as a single dose via an intraperitoneal, subcutaneous, intravenous, or intragastric route. Urine and blood were then serially collected after 5, 10, 30, 60, 120, 240, and 480 min. At the end of the experiment, the mice were sacrificed by CO₂ asphyxiation. Urine and prepared plasma were frozen and kept at -20 °C until processing. To quantify Ac₄ManNAc, samples were hydrolyzed with 4 M trifluoroacetic acid for 3 h at 100 °C to release the *O*-acetyl groups.