

201224/0/A

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 24 年度

研究代表者 西野一三

平成 25 (2013) 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. 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－病理学的解析.....	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. DMRV モデルマウスへの抗酸化薬による治療研究と病態への活性酸素種の関与－細胞レベルでの解析.....	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. 三好型遠位型ミオパチーの自然経過に関する研究.....	21
青木 正志 (国立大学法人 東北大学大学院医学系研究科)	
4. GNEミオパチー（縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー：DMRV）の臨床評価指標についての研究.....	23
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.....	25
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	27
----------------------	----

# 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

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

1. 萎縮と筋力低下への ROS の関連が示唆された。ヒドロキシラジカル抗酸化薬投与試験を大規模にて行い、その効果を測定した。抗酸化薬 N-アセチルシステイン投与により、DMRV マウスの運動機能、腓腹筋の収縮力、筋病理に改善を認め、筋萎縮と筋力低下への ROS の関連が示唆された。また、DMRV マウス由来骨格筋細胞の解析から、ヒドロキシラジカルの除去能の低下が、病態と関連する可能性が示された。

2. 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が、腓腹筋の病理変化では、縁取り空胞の減少、アミロイドレベルの減少がみられた。特に、結合型シアル酸投与マウスでは筋線維径の著しい回復が認められた。また、両化合物の薬物動態の再検討をおこない、両者は異なる代謝速度を示すことを確認した。

3. 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）患者 27 人の自然歴研究を行い、進行に有用な指標を考察した。

4. 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った。三好型遠位型ミオパチーの特徴を明らかにするため、dysferlin 遺伝子変異の特徴を解析した。変異は遺伝子全体に広く分布し 4 種類の日本人に多い変異があった。三好型遠位型ミオパチーに特有の変異が存在した。

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  
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  
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 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、この若齢における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の封入体形成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 NF $\kappa$ B シグナルを活性化して、タンパク質合成抑制とタンパク質分解経路活性化により筋萎縮に至るといえるものである。また、アルツハイマー病では蓄積するアミロイドベータペプチド自体が ROS を産生するとの報告もある。

一方、遊離シアル酸を含む  $\alpha$  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 では、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。

昨年度、DMRV モデルマウスでのヒドロキシラジカル産生を *in vivo* で測定し、ROS 下流遺伝子の活性化を検出した。さらに、抗酸化薬によるミオパチー発症の抑制効果を小数のマウスで確認した。本年度は、これらの研究をすすめ、大規模でのモデルマウスへの治療研究をすすめるとともに、ROS の DMRV 骨格筋への作用を明らかにするため、細胞レベルの解析を行った。

我々は 2009 年に、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、報告した (Nat Med 2009)。しかしながら、DMRV は

劣性遺伝性の疾患かつ比較的高齢発症であるため、患者の発症前診断は不可能である。また、発症後、比較的短期間で急速に歩行不能となるため、症状の重篤な日本人患者の場合では、車椅子生活を余儀なくされてしまう。つまり、DMRV 患者への治療を考える時、発症の予防ばかりでなく、ミオパチー症状を如何に回復させるのかを目論んだ治療方法が必要となる。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進行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る高齢マウスへのダメージのため、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、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 シアルラクトース: 6'-SL) の投与を行い、発症マウスのミオパチー症状の改善を認めた。今年度は、投与マウスの筋病理検査、シアル酸解析を行い、ミオパチー症状の改善を評価した。また、両薬剤の薬物動態を再検討し、治療効果との関連を調べた。

さらに、DMRV は本邦で患者が多く見出されてい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おらず、評価指標は明らかでない。迫り来る治験に有用な項目選定のための横断・前向き観察研究を行った。

一方、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ってきた。Polymerase chain reaction (PCR)-Single strand conformation polymorphism (SSCP) 法により検出し得た日本人同遺伝子変異の特徴を解析した。

## 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。

抗酸化薬投与試験は、N-アセチルシステインを用いた。N-アセチルシステインは1.0% (n=13) 及び0.1% (n=13) の濃度にて飲水投与した。投与期間は25週齢から57週齢まで行った。プラセボコントロールとして、水を与えた (n=17)。シアル酸化合物投与試験は、55週齢のモデルマウスと同腹仔コントロール(n=15)を用いて、飲水にて投与した。用量は、6'-SL: 100mg (低用量群: n=10) 及び1000mg (高用量群: n=8) /kg 体重/日、NeuAc(n=10): 1000mg/kg 体重/日を用いた。プラセボコントロール(n=18)として水を与えた。80週齢まで投与した。

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なった。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。生理検査浴液中で、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。

骨格筋の病理変化は、新鮮凍結した腓腹筋の凍結切片を用いて行った。HE染色、ゴモリ染色での観察のほか、アミロイド(6E10)、LC3、LAMP2の免疫染色により評価した。また、カベオリン3抗体での免疫染色により、筋線維径を測定した。また、血漿、骨格筋中のアミロイド (Aβ1-40 および Aβ1-42) は、ELISAにて測定した。

血漿、骨格筋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。

6'-SLの薬物動態は、6'-SL(30mg)を経口投与した後、5、10、30、60、120、240、480分に尾静脈採血と採尿にて行った。6'-SL、シアルルラクトース、ラクトース量は蛍光標識後に、HPLCにて測定した。

DMRVマウスおよび同腹仔コントロール由来初代骨格筋細胞は定法により分化させた。分化培地に血清の有無、シアル酸 (NeuAc) またはN-アセチルシステインを添加し、72時間培養した。Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)を培地に加え、細胞内の蛍光によりROS産生を可視化した。さらに、様々な濃度のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及びMenadioneを加え、

誘導されるROS産生を測定した。

インフォームドコンセントの得られたNCNP病院神経内科通院中の成人患者を対象にした。17筋の徒手筋力テスト(合計MMT)、6分間歩行(6MWT)、大腿四頭筋筋力測定(hand held dynamometry, HHD)、粗大運動評価尺度(Gross motor function measurement, GMFM)、握力、ピンチ力、咬合力、lean body mass、skeletal muscle mass index (SMI)、CK、%FVC、心機能(EF, FS)、心電図およびホルター心電図、Barthel Index (BI)、modified Rankin Scale (mRS)、SF-36を用いた。歩行不能群を進行群と仮定した。

Dysferlin 遺伝子解析は、ゲノムDNAを55個のエクソンごとに近傍のイントロンを含めPCR-SSCP法にて遺伝子変異をスクリーニングし、直接塩基配列決定法にて確認した。c.1566C>G変異はPCR産物の*Mbo I*による切断を見て直接塩基配列を確認した。ナンセンス変異以外は正常100染色体に存在しないことを確認した。

(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・承認を得て行なっている。

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にて承諾を受けた。

### C. 研究結果

N-アセチルシステイン投与群ではトレッドミルでの運動能力及び持久力に用量依存的な改善が見られた。また、腓腹筋及び前脛骨筋の収縮力には有意な改善が見られた。筋線維径と筋病理に用量依存的な改善が見られた。

N-アセチルシステイン投与後の筋萎縮遺伝子と酸化ストレス関連遺伝子の発現では、ユビキチンリガーゼ Fbxo32 と Trim63 の発現は、プラセボ DMRV マウスに比較して、2 倍程度コントロール低値を示した。また、メタルチオネイン遺伝子 (MT1 及び MT2) の発現低下も観察された。

血清非添加の条件で、DMRV マウス由来細胞は同腹仔コントロール由来細胞に比較して、高い細胞内 ROS 濃度を示した。血清、NeuAc、N-アセチルシステインの添加により、ROS は低下した。DMRV マウス由来細胞において、高い細胞内 ROS 濃度は、ROS 産生が上昇しているのか、ROS に対する細胞内 capacity が低下しているのかを解析するため、2 種類の ROS 産生薬、O<sub>2</sub> ラジカル産生する Menadione とヒドロキシラジカル産生する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加え、培養した。Menadione 添加処理では、血清非添加の条件下において DMRV およびコントロールマウス由来細胞は高い細胞内 ROS 濃度を示したが、N-アセチルシステインの添加により細胞内 ROS 濃度は低下した。血清および NeuAc 添加により、Menadione による ROS 産生は抑制された。

一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による ROS 産生では、DMRV 由来細胞はコントロールマウス由来細胞よりも高かった。血清および NeuAc 添加により、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による ROS 産生は抑制されたが、高濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> には効果をしめさなかった。

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。一方、NeuAc 投与群では筋萎縮に著明な改善がみられなかった。筋線維径は、6'-SL

抗用量投与群でコントロールマウスと同様まで、回復が見られた。

骨格筋の縁取り空胞陽性線維数は、6'-SL および NeuAc、すべての投与マウスで低下していたが、特に 6'-SL 高用量投与群で著しい低下を認めた。また、アミロイド陽性線維数および骨格筋の AB1-40 は、同様に 6'-SL 抗用量投与群で著しい低下を認めた。しかしながら、面白いことに血漿中の AB1-40 および AB1-42 は、NeuAc 投与群マウスで最も低下を示し、6'-SL 高用量投与群よりも高い効果を示した。

6'-SL の経口投与の薬物動態を解析した。6'-SL の血中での上昇および尿中への移行は、血中濃度は 15-30 分をピークに、尿中濃度は 30-60 分をピークに 240 分まで、ゆっくりと下降した。血中および尿中での 6'-SL の分解はあまり観察されなかった。

DMRV の横断・前向き観察研究には、27 名、43.9±13.1 歳 (23-68)、男性 9 人、女性 18 人が参加した。初発症状出現は 28.0±11.9 (14-56) 歳、独歩 (6MWT) 可能 9 名、介助歩行可能 3 名、歩行不能 15 名であった。心筋障害・不整脈は認めなかった。歩行不能者では MMT、GMFM、HHD、握力、%FVC、lean body mass (%BW, leg)、SMI、CK、BI、mRS、SF-36 の PCS と MCS が有意に低かった。一年間の前向き研究には 19 名が参加し、6MWT (350.2±118.2→283.8±140.6m, p=0.036)、GMFM (42.7±38.0→40.1±37.7N, p=0.071)、握力 (7.0±6.7→5.6±5.9kg, p=0.073)、合計 MMT (17.9±9.9→16.1±9.9, p=0.016) が有意に低下した。合計 MMT、GMFM 低下は歩行不能群より可能群で大きい一方、歩行可能群で握力と 6MWT の低下が見られた。

Dysferlin 遺伝子解析は 91 家系に 42 種類の変異を見出した。その中で遺伝子変異が確定した 51 人が三好型遠位型ミオパチー、40 人が肢帯型筋ジストロフィー 2B 型、1 人が distal anterior compartment myopathy、7 人が高 CK 血症の表現型を呈していた。54 家系がホモ接合、31 家系が複合ヘテロ接合だった。6 家系の発端者では 1 アレルしか変異を見出せなかった。変異は遺伝子全体に広く分



布し、22種類のナンセンス変異、10種類のミスセンス変異、10種類のスプライス部位の変異だった。c.2997G>T (p.W999C) 変異が40アレル(22.7%)、c.1566C>G (p.Y522X) 変異が23アレル(13.1%)、c.4497delT 変異が15アレル(8.5%)、c.3373delG 変異が14アレル(8.0%)多い変異だった。c.3373delG 変異は肢帯型筋ジストロフィー2B型には1アレルしか認めなかった。一方c.2997G>T 変異は三好型遠位型ミオパチーより肢帯型筋ジストロフィー2B型に多く見られ、ホモ接合は三好型遠位型ミオパチーでは1人のみだった。

#### 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。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、また筋力も回復した。このことは、DMRVにおけるGNE遺伝子の変異にともなう低シアル酸が引き起こすミオパチーに関して、ROSが発症機序に重要な役割を示すこと、筋萎縮のみならず、筋力低下にも関わることが考えられた。

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することを昨年度報告した。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。今年度の解析では、DMRVマウスの初代骨格筋細胞において、ROSの除去能力が低下していることが示された。DMRVマウスで観察されるROSの除去の特異的減少は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるヒドロキシラジカルでは観察されたものの、MenadioneによるO<sub>2</sub>ラジカル産生に対しては観察されなかった。このことは、DMRVマウスでは、ヒドロキシラジカルに対する除去能力が特異的に低下していること、また、ヒドロキシラジカルがDMRVの病態形成に関わっている可能性が示された。マウスにおけるin vivoでのヒドロキシラジカルの上昇と関連しているものと思われる。面白いことに、シアル酸の添加およびN-アセチルシステインの添加で

は、細胞内のヒドロキシラジカルおよびO<sub>2</sub>ラジカル産生に対して、同様に除去効果を示した。

昨年度、6'-SLの高用量群において、生存率、体重、自発運動量の改善を報告した。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。また、腓腹筋の収縮、サイズについても、高い治療効果が得られた。特に、筋萎縮への効果はNeuAc投与以上であった。筋病理解析では、6'-SL投与によりDMRVマウスの筋病理に顕著な改善が見られた。NeuAc投与に比較して、筋萎縮(サイズ、重量)および筋変性(縁取り空胞、アミロイド蓄積)の両方に効果があった。また、6'-SLおよびNeuAc投与は、血中のシアリル化の回復をもたらしたが、特に骨格筋では6'-SLのシアリル化回復効果が高かった。細胞実験での各化合物の取り込みに顕著な差が見られなかったことを考え合わせると、シアリル化回復効果の違いは血中での化合物の代謝速度に関連すると考えられた。また、血液循環の間の各臓器への暴露と取り込み効率により、臓器間でのシアリル化回復効果に違いがあるものと思われる。また、このように、薬物の代謝速度が、シアル酸の回復と骨格筋症状の改善につながるものと考えられ、シアル酸化合物の服用法、徐放剤の使用は有効であると思われる。

DMRV自然歴研究に関して一歩の可否で進行する指標が異なることについては、病期により障害される部位が異なる可能性があり、評価を行う上では歩行可能者と歩行不能者は項目を分けて行う必要がある。一年間の変化はALSなどの検討と比べて緩徐であり、治験薬の治療効果判定などでは薬剤の運動能力維持効果を判定するためには前観察期間をおくことが必要と考えられる。

日本人のdysferlin遺伝子変異の特徴は遺伝子全体に広く分布し、4種類の多い変異でアレル単位では過半数をしめる。この変異は三好型遠位型ミオパチーに多く見られる。その一方でほとんど見られない遺伝子型も存在し、遺伝子型と表現型の関連が示唆される。遠位型ミオパチーの遺伝子型の効率的な確認方法はdysferlin遺伝子以外の原因遺伝子も含めて検討する必要がある。



## E. 結論

1. DMRV モデルマウスにおける筋萎縮と筋力低下への ROS の関連が示唆された。
2. ヒドロキシラジカルの除去効果の低下が、病態と関連する可能性が示された。
3. 発症した DMRV モデルマウスへの 6'-SL 投与では、運動量の増加の他、腓腹筋の機能、サイズの改善に加え、筋病理、シアリル化改善において、遊離シアル酸よりも高い治療効果が認められた。
4. 短期間で変化が見られる 6MWT、GMFM、握力、MMT は治験の評価項目の候補と考えた。歩行不能群で低下が見られる SMI、lean body mass、BI、mRS、SF-36 も評価指標として有用な可能性がある。
5. dysferlin 遺伝子変異の特徴を解析したが、変異は遺伝子全体に広く分布し 4 種類の日本人に多い変異があった。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Mori-Yoshimura M, Oya Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I, Murata M: Respiratory dysfunction in patients severely affected by GNE myopathy (distal myopathy with rimmed vacuoles). *Neuromuscul Disord.* 23(1): 84-88, Jan, 2013

Momma K, Noguchi S, Malicdan MC, Hayashi YK, Minami N, Kamakura K, Nonaka I, Nishino I: Rimmed vacuoles in Becker muscular dystrophy have similar features with inclusion myopathies. *PLoS One.* 7(12): e52002, Dec, 2012

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, Imamura T, Araki N, Nishino I, Hayashi YK: The C2A do-

main in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM 72). *PLoS Curr.* 4:e5035add8caff4. Nov, 2012

Mori-Yoshimura M, Monma K, Suzuki N, Aoki M, Kumamoto T, Tanaka K, Tomimitsu H, Nakano S, Sonoo M, Shimizu J, Sugie K, Nakamura H, Oya Y, Hayashi YK, Malicdan MC, Noguchi S, Murata M, Nishino I: Heterozygous UDP-GlcNAc 2-epimerase and N-acetylmannosamine kinase domain mutations in the GNE gene result in a less severe GNE myopathy phenotype compared to homozygous N-acetylmannosamine kinase domain mutations. *J Neurol Sci.* 318(1-2): 100-105, Jul, 2012

Mori-Yoshimura M, Okuma A, Oya Y, Fujimura-Kiyono C, Nakajima H, Matsuura K, Takemura A, Malicdan MC, Hayashi YK, Nonaka I, Murata M, Nishino I: Clinicopathological features of centronuclear myopathy in Japanese populations harboring mutations in dynamin 2. *Clin Neurol Neurosurg.* 114(6): 678-683. Jul, 2012

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: *In Vivo* Characterization of Mutant Myotilins. *Am J Pathol.* 180(4): 1570-1580, Apr, 2012

### 著書

森まどか, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー. 今日神経疾患治療指針 第2版 (編集: 水澤英洋, 鈴木則宏, 梶龍兒, 吉良潤一, 神田隆, 齊藤延人) 医学書院, 東京, pp784-786, Mar, 2012

### 総説

遠藤ゆかり, 西野一三: 心筋症をきたす筋疾患. *循環器内科.* 72(6): 599-609, Dec, 2012

西野一三, 野口 悟: 縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチー (GNEミオパチー) に対するシアル酸補充療法. *臨床神経.* 52(11): 1210-1212, Nov, 2012

米川貴博, 野口 悟: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対するシアル酸補充療法. トランスレーショナルリサーチを支援する遺伝子医学MOOK 最新疾患モデルと病態解明, 創薬応用研究, 細胞医薬創製研究の最前線 最新疾患モデル動物, ヒト化マウス, モデル細胞, ES・iPS細胞を利用した病態解明から創薬まで. 22: 179-184, Jul, 2012

米川貴博, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対する治療戦略. 神経内科 特集 遺伝性筋疾患の新たな治療戦略. 76(4): 372-378, June, 2012

## 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

Nishino I: GNE myopathy. Department of Neurology, Shandong University, Jinan, China, 10.23, 2012

Nishino I: The potential role of registries in therapeutic development for GNE myopathy. TREAT-NMD Agenda, Perth, Australia, 10.11, 2012

Cho A, Malicdan MC, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I, Noguchi S: Muscle atrophy in the GNE myopathy mouse model is associated with oxidative stress. 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10.9-10.13, 2012

Mori-Yoshimura M, Oya Y, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I, Murata M: Respiratory dysfunction in patients severely affected by GNE myopathy (distal

myopathy with rimmed vacuoles). 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10.9-10.13, 2012

Yonekawa T, Malicdan MC, Nonaka I, Hayashi YK, Mine T, Yamamoto T, Nishino I, Noguchi S: Sialyllactose reversed myopathic phenotype in symptomatic GNE myopathy model mice. 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10.9-10.13, 2012

Nishino I: Elucidation of pathomechanism and development of therapy for hereditary muscle disease. Joint Symposium Max Planck Institute (MPI) of Psychiatry and National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), Munchen, Germany, 10.3 – 10.5, 2012

Nishino I: GNE myopathy – facts and future. 49th Myological colloquium, Munchen, Germany, 10.2, 2012

Noguchi S, Nishino I: GNE myopathy – Pathogenesis and therapeutic strategies. 9th Japanese- French Symposium for ‘muscular dystrophy’ Tokyo, 9.7-9.8, 2012

Noguchi S, Malicdan MC, Funato F, Nishino I: Metabolic changes in sialic acid synthesis pathway in GNE-myopathy model mice with long-term sialic acid treatment. 2012 New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference. New Orleans, JSA, 6.17-6.21, 2012

Nishino I: GNE-Myopathies. Myology and Myopathology – state of the art Hans – Hilmar Goebel Symposium, Charite – Universitätsmedizin Berlin, Germany, 6.16, 2012

Mori-Yoshimura M, Oya Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I, Murata M: Respiratory dysfunction of GNE myopathy (Distal myopathy with rimmed vacuoles). The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

Cho A, Monma K, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Mutation Profile of the GNE gene in Japanese patients with GNE myopathy. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

Takahashi T, Suzuki N, Kato M, Tanaka H, Tateyama M, Yoshioka M, Konno H, Onodera H, Nishino I, Itoyama Y, Aoki M: Features of dysferlin mutations in Japan. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

Noguchi S, Malicdan MC, Funato F, Nishino I: Metabolic changes in sialic acid synthesis pathway in GNE-myopathy model mice with long-term sialic acid treatment. Experimental Biology 2012, San Diego, USA, 4.22, 2012

和田千鶴, 小原講二, 阿部エリカ, 小林道雄, 石原傳幸, 豊島至, 菅原正伯, 高橋俊明, 青木正志: 認知症を伴った肢帯型筋ジストロフィー2B型の1家系. 第91回日本神経学会東北地方会, 仙台, 3.16, 2013

野口 悟, 西野一三: GNE ミオパチーの発症機序と治療戦略. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡市, 12.11-12.14, 2012

高橋俊明, 鈴木直輝, 加藤昌昭, 井泉瑠美子, 堅山真規, 八木沼智香子, 佐藤仁美, 阿部恵美, 伊藤真理子, 菅原瞳, 早坂美保, 島倉奈緒子, 田中洋康, 吉岡勝, 今野秀彦, 小野寺

宏, 糸山泰人, 青木正志: PCR-SSCP 法による日本人 dysferlin 遺伝子変異のスクリーニング. 日本人類遺伝学会第57回大会, 新宿区, 10.24-27, 2012

西野一三, 野口 悟, Malicdan MC, 森まどか, 大矢 寧, 鈴木直輝, 青木正志: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対するシアル酸療法. 第53回日本神経学会学術大会, 千代田区, 5.25, 2012

森まどか, 大矢 寧, 西野一三, 村田美穂: 重症 GNE ミオパチーは呼吸機能低下を生ずる. 第53回日本神経学会学術大会, 千代田区, 5.22-5.25, 2012

高橋俊明, 鈴木直輝, 加藤昌昭, 出泉瑠美子, 堅山真規, 安藤理紗, 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 が疑われる患者の血清 CK 値. 第53回日本神経学会学術大会, 千代田区, 5.22-25, 2012

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許申請

特許の名称: 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

発明者名:

野口 悟, Malicdan MC, 西野一三

権利者名:

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

特許の種類: 特許

番号: 特願 2011-513374

出願日: 20090515

国内外別: 国際

特許の名称: タンパク質蓄積性筋疾患を治療するための医薬

発明者名:

野口 悟, Malicdan MC, 西野一三

権利者名：野口 悟  
特許の種類：特許  
番号：特願 2011-042435  
出願日：20110228  
国内外別：国内

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－病理学的解析～

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、発症の予防だけでなく、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、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が、腓腹筋の病理変化では、縁取り空胞の減少、アミロイドレベルの減少がみられた。特に、結合型シアル酸投与マウスでは筋線維径の著しい回復が認められた。また、両化合物の薬物動態の再検討をおこない、両者は異なる代謝速度を示すことを確認した。

#### A. 研究目的

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) は、主に遠位筋 (前頸骨筋) が侵される、比較的高齢発症の遺伝性筋疾患である。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数百人程度の患者が存在すること、②確立された治療法がないこと、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、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。2009 年に、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、このマウスのみオパチー発症を完全に予防することを、報告した (Nat Med 2009)。しかしながら、DMRV は劣性遺伝性の疾患かつ比較的高齢発症であるため、患者の発症前診断は不可能である。また、発症後、比較的短期間で急速に歩行不能となるため、症状の重篤な日本人患者の場合では、車椅子生活を余儀なくされてしまう。つまり、DMRV 患者への治療を考える時、発症の予防ばかりでなく、みオパチー症状を如何に回復させるのかを目論んだ治療方法が必要となる。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みオパチー進行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る高齢マウスへのダメージのため、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、一昨年度、高齢マウスでの運動機能の低下を与えない、非侵襲的な運動生理学的測定方法を確立した。また、昨年度は、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) の投与を行い、発症マウスのみオパチー症状の改善を認めた。今年度は、投与マウスの筋病理検査、シアル酸解析を行い、みオパチー症状の改善を評価した。また、両薬剤の薬物動態を再検討し、治療効果との関連を調べた。

## B. 研究方法

DMRV モデルマウス (GNE<sup>-/-</sup>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、自由食餌摂取、12 時間の明暗時間で飼育した。

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 (n=15) を用いて、飲水にて投与した。用量は、6'-SL: 100mg (低用量群: n=10) 及び 1000mg (高用量群: n=8) /kg 体重/日、NeuAc (n=10): 1000mg/kg 体重/日を用いた。プラセボコントロール (n=18) として水を与えた。80 週齢まで投与した。

骨格筋の病理変化は、新鮮凍結した腓腹筋の凍結切片を用いて行った。HE 染色、ゴモリ染色での観察のほか、アミロイド (6E10)、LC3、LAMP2 の免疫染色により評価した。

また、血漿、骨格筋中のアミロイド (A $\beta$ 1-40 および A $\beta$ 1-42) は、ELISA にて測定した。

血漿、骨格筋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。

6'-SL の薬物動態は、6'-SL (30mg) を経口投与した後、5、10、30、60、120、240、480 分に尾静脈採血と採尿にて行った。6'-SL、シアリルラクトース、ラクトース量は蛍光標識後に、HPLC にて測定した。

### (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・承認を得て行なっている。

## C. 研究結果

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。一方、NeuAc 投与群では筋萎縮に著明な改善がみられなかった。筋線維径は、6'-SL 抗用量投与群でコントロールマウスと同様まで、回復が見られた。

骨格筋の縁取り空胞陽性線維数は、6'-SL および NeuAc、すべての投与マウスで低下していたが、特に 6'-SL 高用量投与群で著しい低下を認めた。また、アミロイド陽性線維数および骨格筋の A $\beta$ 1-40 は、同様に 6'-SL 抗用量投与群で著しい低下を認めた。しかしながら、面白いことに血漿中の A $\beta$ 1-40 および A $\beta$ 1-42 は、NeuAc 投与群マウスで最も低下を示し、6'-SL 高用量投与群よりも高い効果を示した。

6'-SL の経口投与の薬物動態を解析した。6'-SL の血中での上昇および尿中への移行は、血中濃度は 15-30 分をピークに、尿中濃度は 30-60 をピークに 240 分まで、ゆっくりと下降した。血中および尿中での 6'-SL の分解はあまり観察されなかった。



#### D. 考察

昨年度、6'-SL の高用量群において、生存率、体重、自発運動量の改善を報告した。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。また、腓腹筋の収縮、サイズについても、高い治療効果が得られた。特に、筋萎縮への効果は NeuAc 投与以上であった。筋病理解析では、6'-SL 投与により DMRV マウスの筋病理に顕著な改善が見られた。NeuAc 投与に比較して、筋萎縮（サイズ、重量）および筋変性（縁取り空胞、アミロイド蓄積）の両方に効果があった。また、6'-SL および NeuAc 投与は、血中のシアリル化の回復をもたらしたが、特に骨格筋では 6'-SL のシアリル化回復効果が高かった。細胞実験での各化合物の取り込みに顕著な差が見られなかったことを考え合わせると、シアリル化回復効果の違いは血中での化合物の代謝速度に関連すると考えられた。また、血液循環の間の各臓器への暴露と取り込み効率により、臓器間でのシアリル化回復効果に違いがあるものと思われる。また、このように、薬物の代謝速度が、シアル酸の回復と骨格筋症状の改善につながるものと考えられ、シアル酸化合物の服用法、徐放剤の使用は有効であると思われる。

#### E. 結論

発症した DMRV モデルマウスへの 6'-SL 投与では、運動量の増加の他、腓腹筋の機能、サイズの改善に加え、筋病理、シアリル化改善において、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

Mori-Yoshimura M, Oya Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I, Murata M: Respiratory dysfunction in patients severely affected by GNE myopathy (distal myopathy with rimmed vacuoles). *Neuromuscul Disord.* 23(1): 84-88, Jan, 2013

Momma K, Noguchi S, Malicdan MC, Hayashi YK, Minami N, Kamakura K, Nonaka I, Nishino I: Rimmed vacuoles in Becker muscular dystrophy have similar features with inclusion myopathies. *PLoS One.* 7(12): e52002, Dec, 2012

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, Imamura T, Araki N, Nishino I, Hayashi YK: The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM 72). *PLoS Curr.* 4:e5035add8caff4. Nov, 2012

Mori-Yoshimura M, Monma K, Suzuki N, Aoki M, Kumamoto T, Tanaka K, Tomimitsu H, Nakano S, Sonoo M, Shimizu J, Sugie K, Nakamura H, Oya Y, Hayashi YK, Malicdan MC, Noguchi S, Murata M, Nishino I: Heterozygous UDP-GlcNAc 2-epimerase and N-acetylmannosamine kinase domain mutations in the GNE gene result in a less severe GNE myopathy phenotype compared to homozygous N-acetylmannosamine kinase domain mutations. *J Neurol Sci.* 318(1-2): 100-105, Jul, 2012

Mori-Yoshimura M, Okuma A, Oya Y, Fujimura-Kiyono C, Nakajima H, Matsuura K, Takemura A, Malicdan MC, Hayashi YK, Nonaka I, Murata M, Nishino I: Clinicopathological features of centronuclear myopathy in Japanese populations harboring mutations in dynamin 2. *Clin Neurol Neurosurg.* 114(6): 678-683, Jul, 2012

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: *In Vivo* Characterization of Mutant Myotilins. *Am J Pathol.* 180(4): 1570-1580, Apr, 2012

##### 著書

森まどか, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー. 今日の神経疾患治療指針 第2版 (編集: 水澤英洋, 鈴木則宏, 梶 龍兒, 吉良潤一, 神田 隆, 齊藤延人) 医学書院, 東京, pp784-786, Mar, 2012

## 総説

遠藤ゆかり, 西野一三: 心筋症をきたす筋疾患. 循環器内科. 72(6): 599-609, Dec, 2012

西野一三, 野口 悟: 縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチー (GNEミオパチー) に対するシアル酸補充療法. 臨床神経. 52(11): 1210-1212, Nov, 2012

米川貴博, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対する治療戦略. 神経内科 特集 遺伝性筋疾患の新たな治療戦略. 76(4): 372-378, June, 2012

## 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

Nishino I: GNE myopathy. Department of Neurology, Shandong University, Jinan, China, 10.23, 2012

Nishino I: The potential role of registries in therapeutic development for GNE myopathy. TREAT-NMD Agenda, Perth, Australia, 10.11, 2012

Mori-Yoshimura M, Oya Y, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I, Murata M: Respiratory dysfunction in patients severely affected by GNE myopathy (distal myopathy with rimmed vacuoles). 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10.9-10.13, 2012

Yonekawa T, Malicdan MC, Nonaka I, Hayashi YK, Mine T, Yamamoto T, Nishino I, Noguchi S: Sialyllactose reversed myo-

pathic phenotype in symptomatic GNE myopathy model mice. 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10.9-10.13, 2012

Nishino I: Elucidation of pathomechanism and development of therapy for hereditary muscle disease. Joint Symposium Max Planck Institute (MPI) of Psychiatry and National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), Munchen, Germany, 10.3 – 10.5, 2012

Nishino I: GNE myopathy – facts and future. 49th Myological colloquium, Munchen, Germany, 10.2, 2012

Nishino I: GNE-Myopathies. Myology and Myopathology – state of the art Hans – Hilmar Goebel Symposium, Charite – Universitätsmedizin Berlin, Germany, 6.16, 2012

Mori-Yoshimura M, Oya Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I, Murata M: Respiratory dysfunction of GNE myopathy (Distal myopathy with rimmed vacuoles). The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

西野一三, 野口 悟, Malicdan MC, 森まどか, 大矢 寧, 鈴木直輝, 青木正志: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対するシアル酸療法. 第53回日本神経学会学術大会, 千代田区, 5.25, 2012

森まどか, 大矢 寧, 西野一三, 村田美穂: 重症 GNE ミオパチーは呼吸機能低下を生ずる. 第53回日本神経学会学術大会, 千代田区, 5.22-5.25, 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)

1. 特許申請中

特許の名称：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

発明者名：

野口 悟, Malicdan MC, 西野一三

権利者名：

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

特許の種類：特許

番号：特願 2011-513374

出願日：20090515

国内外別：国際

特許の名称：タンパク質蓄積性筋疾患を治  
療するための医薬

発明者名：

野口 悟, Malicdan MC, 西野一三

権利者：野口 悟

特許の種類：特許

番号：特願 2011-042435

出願日：20110228

国内外別：国内

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

### ～DMRVモデルマウスへの抗酸化薬による治療研究と 病態への活性酸素種の関与—細胞レベルでの解析～

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

昨年度、DMRVモデルマウス骨格筋におけるROSのin vivo測定と筋萎縮関連遺伝子の発現上昇を見出し、少数のモデルマウスでの抗酸化薬投与試験を行った。本年度は、抗酸化薬投与試験を大規模にて行い、その効果を測定した。抗酸化薬N-アセチルシステイン投与により、DMRVマウスの運動機能、腓腹筋の収縮力、筋病理に改善を認め、筋萎縮と筋力低下へのROSの関連が示唆された。また、DMRVマウス由来骨格筋細胞の解析から、ヒドロキシラジカルの除去能の低下が、病態と関連する可能性が示された。

#### A. 研究目的

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー

(DMRV)は、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週齢以降に筋力低下を示すが、この若齢における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、タンパク質合成抑制とタンパク質分解経路活性化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アミロイドベータペプチド自体が ROS を産生するとの報告もある。

一方、遊離シアル酸を含む $\alpha$ 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 では、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。

昨年度、DMRV モデルマウスでのヒドロキシシラジカル産生を *in vivo* で測定し、ROS 下流遺伝子の活性化を検出した。さらに、抗酸化薬によるミオパチー発症の抑制効果を小数のマウスで確認した。本年度は、これらの研究をすすめる、大規模でのモデルマウスへの治療研究をすすめるとともに、ROS の DMRV 骨格筋への作用を明らかにするため、細胞レベルの解析を行った。

## 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。

抗酸化薬投与試験は、N-アセチルシステインを用いた。N-アセチルシステインは 1.0% (n=13) 及び 0.1% (n=13) の濃度にて飲水投与した。投与期間は 25 週齢から 57 週齢まで行った。プラセボコントロールとして、水を与えた (n=17)。

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なった。*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。

骨格筋の病理変化は、新鮮凍結した腓腹筋の凍結切片を用いて行った。HE 染色での観察のほか、カベオリン 3 抗体での免疫染色により、筋線維径を測定した。また、血漿、骨格筋中のアミロイド (A $\beta$ 1-40 および A $\beta$ 1-42) は、ELISA にて測定した。

DMRV マウスおよび同腹仔コントロール由来初代骨格筋細胞は定法により分化させた。

分化培地に血清の有無、シアル酸 (NeuAc) または N-アセチルシステインを添加し、72 時間培養した。Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) を培地に加え、細胞内の蛍光により ROS 産生を可視化した。さらに、様々な濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及び Menadione を加え、誘導される ROS 産生を測定した。

(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・承認を得て行なっている。

## C. 研究結果

N-アセチルシステイン投与群ではトレッドミルでの運動能力及び持久力に用量依存的な改善が見られた。また、腓腹筋及び前脛骨筋の収縮力には有意な改善が見られた。筋線維径と筋病理に用量依存的な改善が見られた。

N-アセチルシステイン投与後の筋萎縮遺伝子と酸化ストレス関連遺伝子の発現では、ユビキチンリガーゼ Fbxo32 と Trim63 の発現は、プラセボ DMRV マウスに比較して、2 倍程度コントロール低値を示した。また、メタルチオネイン遺伝子 (MT1 及び MT2) の発現低下も観察された。

血清非添加の条件で、DMRV マウス由来細胞は同腹仔コントロール由来細胞に比較して、高い細胞内 ROS 濃度を示した。血清、NeuAc、N-アセチルシステインの添加により、ROS は低下した。DMRV マウス由来細胞において、高い細胞内 ROS 濃度は、ROS 産生が上昇しているため、ROS に対する細胞内 capacity が低下しているためか考えられた。この可能性を検証するため、2 種類の ROS 産生薬、O<sub>2</sub> ラジカル産生する Menadione とヒドロキシシラジカル産生する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加え、培養した。Menadione 添加処理では、血清非添加の条件下において DMRV およびコントロールマウス由来細胞は高い細胞内 ROS 濃度を示した