

201224101B

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

総合研究報告書

平成 22 年度～平成 24 年度

研究代表者 西野一三

平成 25 (2013) 年 5 月

目次

I. 総合研究報告

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 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.....	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. 研究成果の刊行に関する一覧表.....21

III. 研究成果の刊行物・別刷.....23

I 総合研究報告

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
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

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

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）モデルマウスに対するシアル酸療法での長期投与における影響および発症マウスに対する治療効果を測定した。シアリル乳糖の効果が明らかになった。発症した高齢マウスへの治療効果の確立により、予防研究から治療研究へと進むことが可能になった。また、恒常的なシアル酸補充方法として、骨髄移植及びアデノ随伴ウイルスによる GNE 遺伝子治療が、高いミオパチー抑制効果を示すことが示された。さらに、DMRV 病態形成に、活性酸素種が関与することが示された。抗酸化剤により、ミオパチー発症が抑制された。DMRV 患者への応用が期待される。

DMRV 患者の自然歴に関する研究では、長期経過例での生命予後に関する重要な知見が得られた。また、比較的大きな規模での調査により、簡便な筋力測定により、粗大運動評価尺度評価を代用しうることも、また、DMFS は臨床スケールとして臨床研究での利用が期待される。

一方、三好型遠位型ミオパチーの自然経過調査で得られた結果は、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。

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

1. 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、DMRV マウスに対して、シアル酸やその前駆体を、発症前から発症期まで長期に投与し続けることにより、ミオパチー発症を完全に予防しうることを 2009 年に報告した。

しかしながら、DMRV は劣性遺伝病であり、患者はほぼ孤発例のため、早期診断は不可能である。さらに、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り、罹患筋の分子病態の理解とそれを基盤とした治療法の開発が必要である。また、シアル酸投与の治療効果を最大限に引き出すためにも、シアル酸投与に併行して、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。これまでに、DMRV モデルマウスにおいて、筋線維に蓄積したアミロイドなどのタンパク質の分解を目的とした、シャペロン誘導剤の DMRV マウスへの投与を行い、発症後期における筋力低下に対して、高い効果を示すことを見出している。しかしながら、発症前期から見られる筋萎縮に対する治療は試みられていない。

また、上記のとおり、DMRV マウス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 (Nat Med 2009)。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。

そこで、本研究では、DMRV マウスを用いた治療法開発の基盤研究として、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

- ① 長期シアル酸またはその前駆体投与がもたらす、DMRV マウスのシアル酸生合成経路への影響の解析
- ② 恒常的シアル酸補充療法—骨髄細胞移植の評価
- ③ 恒常的シアル酸補充療法—AAV ベクターによる *GNE* 遺伝子発現の有効性の検証
- ④ 分子病態に基づく薬物治療—発症後の高齢 DMRV マウスに対するシアル酸補充療法
- ⑤ 骨格筋変性をもたらす機構の解明—骨格筋萎縮をもたらす機構の解明—ROS の役割とそれに対する治療

DMRV に対するシアル酸補充療法の第 I 相の治療が既に開始されている。DMRV の治療法の効果判定には自然歴が確立していることが重要であるが、*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充分なされていない。DMRV 患者治療・臨床研究の試験計画作成、実施のためには自然歴把握とともに有効性を適切に評価できる臨床評価項目の確立が必要である。そのため、本研究では以下の点を明らかにすることを目的とした。

- ① 理学所見・生理機能検査・放射線学検査により患者自然歴を経年的に観察すること。
- ② これまでに作成した遠位型ミオパチー機能評価スケールの妥当性について、理学所見と対比により評価すること。
- ③ 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こと。
- ④ *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すること。

2. 三好型遠位型ミオパチー

一方、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。

- ① 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51家系、肢帯型40家系で遺伝子変異を確定すること
- ② dysferlinopathyが疑われるものの遺伝子変異の確定しなかった患者での血清クレアチンキナーゼ (CK) 測定値の検討を行うことを目的とした。また動物モデルでのdysferlinopathyの分子病態解明を目的とした。

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。マウスの繁殖はオリエンタル酵母にて行った。すべてのマウスは自由飲水、自由食餌摂取、12 時間の明暗時間で飼育した。

DMRV マウスでのシアル酸投与による細胞シアル酸代謝経路の変化は、15 週齢から 56 週齢まで、およそ 300 日間以上、NeuAc、Sialac、ManNAc を 20mg/kg/day 投与し続けたマウスの組織 (肝臓、腎臓、骨格筋) を解析に用いた。

メタボローム解析は、ヒューマンメタボロームテクノロジーにて行った。遺伝子発現解析では、分解酵素である Renbp、Npl、シアル酸取り込みに関するトランスポーター Slc17a5、シアル酸生合成に関わる NANS、CMAS、Slc35a1、シアル酸の修飾に関わる CMAH の遺伝子を解析した。組織の発現解析では市販の野生マウスの組織 cDNA パネル (Clontech) を用いた。TaqMan プローブを用いて、リアルタイム PCR にて測定した。Penta-O-acetyl-N-acetylglucosaminol の合成は、既報の方法を用いて行い、EMI-MS 及び H-NMR にて構造を確認した。患者細胞およびコントロール細胞に 5mM NeuAc または ManNAc とともに添加し、細胞シアル化の回復と CMP-NeuAc の細胞内濃度を測定した。CMP-NeuAc は既報を参考にして HPLC にて分離・定量した。

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、呼吸筋測定、非拘束非侵襲的心電図測定を用いた。呼吸筋測定はバクスコ社の温湿度補正付きの plethysmography

装置を用いた。55 週齢以降のモデルマウスと同腹仔コントロールを、反復的に測定することにより、結果の再現性、マウスに与える負荷を含めた方法の可否を評価した。

6'-sialylactose (6'-SL) の薬物動態測定では、6'-SL (30mg) を腹腔内および経口投与した後、5、10、30、60、120、240 分に尾静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(n=15)を用いて、飲水にて投与した。用量は、6'-SL : 100mg (低用量群: DMRV n=10) 及び 1000mg (高用量群: DMRV n=8) /kg 体重/日、NeuAc (DMRV n=10) : 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(DMRV n=18)。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 SmaI 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 教授より供与された。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 投与には、44-45 週齢の発症中期の DMRV マウスおよび同腹仔コントロール (GNE^{+/+}-hGNETg) を用いた。2X10¹¹ ウイルスゲノムコピー (vg) の GNE-eGFP-AAV8 (DMRV n=10, littermate n=7) 及び LUC-eGFP-AAV8 (DMRV n=11, littermate n=4) 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 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% (DMRV n=13, littermate n=7) 及び 0.1% (DMRV n=13, littermate n=7) の濃度にて飲水投与した。プラセボとして水を与えた (DMRV n=17, littermate n=6) 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。

治療効果の評価では、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 週齢にて 3 日間連続で測定し、一日あたりの平均回転数にて評価した。80 週齢にて、トレッドミル上の走行能力を評価した。Plethysmography 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 での単離腓腹筋の収縮力は、定法にしたがい測定した。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、カバオリン 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 β 1-40 および A β 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。

自然歴調査は、遺伝子診断されている DMRV 患者を対象とし、参加希望者には対面で趣旨・研究の詳細と参加意思を確認し、承諾書を手した。全員に詳細な病歴聴取を行い、出生発達歴・発症年齢・初発症状を聴取した。ADL については問診および distal myopathy functional scale (DMFS, 2010 Mori-Yoshimura et al.) にて集計、歩行については歩行の可否、歩行不能群については歩行不能になった年齢、車椅子使用開始時期を聴取した。診察所見として、17筋の徒手筋力テスト (manual muscle testing, MMT)、四肢周径測定、握力、ピンチ力、大腿筋力測定、装具なしで歩行可能な患者については 6 分間歩行、入院可能な患者について粗大運動機能尺度 (Gross motor function measurement, GMFM) を施行した。生理機能検査として呼吸機能検査・神経伝導速度検査による複合運動活動電位 (CMAP)、画像検査として骨格筋 CT、体組成測定を行った。血液・尿検査で CK, AST, ALT, LDH を採取した。QOL については SF-36 と MD-QOL を用いた。

最終年度は、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。

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, χ^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 AB 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 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。

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）

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で承諾を受けた。

C. 研究結果

1.DMRV マウスを用いた治療法開発の基盤研究

①長期シアル酸またはその前駆体投与がもたらす、DMRV マウスのシアル酸生合成経路への影響の解析

野生型マウスでの、メタボローム解析で、基質の解析を行った。骨格筋で GlcNAc-1p, UDP-GlcNAc, CMP-NeuAc 以外の代謝産物を同定することは出来なかった。これは、測定感度と他の代謝基質に対して測定系が確立されていなかったためである。

基質解析は不可能であったため、酵素発現解析を行った。野生型マウスでの、各種遺伝子の発現により、腎臓と肝臓では共に、シアル酸の取り込みに働くトランスporter 遺伝子の発現は高かったが、腎臓では主にシアル酸を分解する酵素遺

伝子の発現が高いのに対し、肝臓は取り込んだシアル酸を糖ヌクレオチドにと合成していく酵素の遺伝子の発現が高かった。骨格筋は、トランスポーター遺伝子の発現、分解、生合成どちらの酵素遺伝子の発現も低かった。

次に、コントロールマウスでのシアル酸投与の影響について調べた。腎臓、肝臓、骨格筋のすべてで、投与物質によらず、トランスポーター遺伝子の発現上昇が見られた。さらに、腎臓は分解酵素遺伝子の活性化が顕著であったが、骨格筋では低下していた。腎臓および肝臓ではシアル酸合成酵素の発現上昇が見られた。

DMRV マウスでは、コントロールマウスとは異なるパターンが観察された。すべての物質の投与でほとんどの遺伝子が発現低下していた。なかでも、Sialac 投与群の骨格筋において、Nans(1/30)と Cmas(1/10)の発現が緒減していた。腎臓および肝臓では、分解酵素の発現低下が見られたが、骨格筋において Renbp の発現低下は見られなかった。

②恒常的シアル酸補充療法としての骨髄細胞移植の評価

9Grey の放射線を与えられたマウスに、精製骨髄細胞を移植した。BMT 群は、プラセボ群に比べ、高い生存率を示し、BMT 1ヶ月後以降の死亡例はなかった。血球細胞のキメラ率は GFP 細胞が 85%であった。シアル化血漿中のシアル酸含量は、2 倍程度上昇が見られ、以前行ったシアル酸投与マウスと同様の回復度であった。キメラ率と血球細胞のシアル化の回復は相関していた。56 週齢での運動能力は、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。各種組織における GFP 細胞の分布では、肝臓では肝実質と血管（内皮細胞）で GFP の蛍光が観察された。骨格筋では、GFP 細胞が多数の筋線維に取り込まれ、GFP 陽性線維となっている像が観察された。各組織での GNE 活性は、顕著に増加していることが観察され、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。

③恒常的シアル酸補充療法として、AAV ベクターによる GNE 遺伝子発現の有効性の検証

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。

④分子病態に基づく薬物治療—発症後の高齢 DMRV マウスに対するシアル酸補充療法

自発的運動量測定では、運動量はマウスのサーカディアンリズムに従うこと、暗時間帯に運動量が増加し、明時間帯はほとんど運動していないこと、が観察された。そのため、測定は、明暗時間帯、3 日間連続して測定す

ることが有効であることが分かった。コントロールマウスでさえ、個体間で運動量に差があることが観察されたが、同一個体の連続3日間の測定では、一日毎の運動量にほぼ差が無いことが示された。加齢に伴い、マウスの運動量が低下することが観察された。呼吸筋測定は、200ミリ秒ごとの測定により、マウスの呼吸は、装置に移動後・安静時・睡眠時等で変化することが示された。そこで、10分間のバックグラウンド測定（安静への待ち時間）の後、30分間の本測定を行った。短期的には、マウスの状態で変化するため、2分間毎に積算した値を用いて評価することを試みた。30分間の測定のうち、開始15分で、各パラメーターは初期値から下降し、安定することがわかった。また、DMRVモデルマウスでは、tidal volume と呼気・吸気速度がコントロールマウスと差異を示すことが分かった。

非拘束非侵襲的心電図測定は、一匹のマウスがおおよそ、10分程で測定可能であることが分かった。非拘束でも良好な波形が得られることが分かった。また、測定数が少ないが、現在のところ、モデルマウスとコントロールの間での明瞭なパラメーターの違いは得られていない。

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分後をピークとして、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。

発症したDMRVマウスに対する6'-SLの長期投与では、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、80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、加齢に伴い回転数は減少し、80週齢での低下は顕著だった。NeuAc投与群は、55週齢から72週齢まで回転数は維持されており、80週齢で低下した。6'-SLの高用量群では投与に伴い、すべての週齢で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。しかしながら、シアル酸の回復効果は、6'-SLがNeuAcよりも優れていた。

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高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Aβ1-40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Aβ1-40およびAβ1-42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。

⑤骨格筋変性をもたらす機構の解明—骨格筋萎縮をもたらす機構の解明—ROSの役割とそれに対する治療

マウス骨格筋において収縮に伴うヒドロキシシラジカル産生が観察された。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シラジカル産生は高値を示した。DMRVマウスでは、ヒドロキシシラジカル産生は加齢に伴い、増加した。

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、メタルチオネイン 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、O₂ ラジカル産生する Menadione とヒドロキシラジカル産生する H₂O₂ 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、H₂O₂ 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、H₂O₂ による ROS 産生は抑制されたが、高濃度の H₂O₂ には効果をめしなかった。

2. DMRV 患者の自然歴把握と臨床評価項目の確立

①理学所見・生理機能検査・放射線学検査により患者自然歴調査

DMRV 患者の自然歴調査では 16 名の DMRV 患者をエントリーした。1 名については当研究を契機に遺伝子診断により確定診断を得た。12 名は当研究のために当院に新たに受診あるいは再診し、4 名は定期通院中の患者であった。平均年齢 45.6±15.2 歳 (23~68)、男性 8 人、女性 8 人、初発症状出現は 25.9±9.7 (14~56, 46) 歳。うち、14 名について入院での詳細評価が可能であった。

初回評価結果の概要について。独歩可能 1 名、杖・装具での介助歩行可能 4 名、歩行不能 9 名であった。遺伝子変異別では、4 名がホモ接合 (すべて V572L)、10 名が複合ヘテロ接合、2 名がヘテロ接合であった。主要筋の徒手筋力テストによる測定では、肘関節屈

曲 2.5±1.6 (0~5, 3) [mean±SD, (最小値~最大値, 中央値)。以下同じ]、膝関節伸展 2.6±2.2 (0~5, 1)、足関節背屈 0.5±1.1 (0~4, 0)、握力 4.9±6.3kg (0~19.6, 1.9)、ピンチ力 25.8±21.8N (0.6~64.5, 19.0)、筋疾患の全身筋力評価指標の一つである GMFM は 44.3±37.2% であった。6 分間歩行試験が施行可能であったのは 5 名で、298±120.8 m (197~442, 226) だった。運動機能測定では、6 分間歩行>握力>大腿四頭筋筋力測定>ピンチ力の順に測定不能者が少なく、ピンチ力では全員が参加できた。呼吸機能検査では %VC は重症患者で軽度低下傾向 (96±21.1%, 60~124, 104)、正中神経の CMAP は 9.5±5.1mV (0.7~22.4, 8.3) であった。CK 値は 283±271 IU/L, CK 上昇は 7 人に見られた。クレアチン・クレアチニン比は 48.5±26.1% で正常 (10%以下) より上昇していた。

②遠位型ミオパチー機能評価スケールと理学所見との対比

全身の運動機能を示す GMFM と他データとの相関を検討した。その結果、DMFS、握力・ピンチ力・大腿四頭筋力測定・CK, LDH、MMT では肘関節屈曲伸展・股関節屈曲・手首の掌屈・膝関節屈曲伸展・足関節屈曲伸展内反外反・母趾屈曲伸展が有意相関を示した (P<0.05)。CMAP は脛骨神経・尺骨神経は左右で有意か否かが異なっており、正中神経では有意相関は見られなかった。6 分間歩行については GMFM と有意相関は見られなかった。DMFS については GMFM、握力・ピンチ力・大腿四頭筋力測定・CK, LDH、MMT では頸部屈曲・足関節外反以外の全ての筋 (肘関節屈曲伸展・手首の掌屈・股関節屈曲・膝関節屈曲伸展・足関節屈曲伸展内反・母趾屈曲伸展) と有意相関した。

③DMRV の横断・前向き観察研究のまとめ

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。

④呼吸機能検査による病状および治療効果測定の検討。

呼吸機能検査データの解析では、患者数 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。

⑤GNE 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検討

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 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。

3. 三好型遠位型ミオパチー

①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ける遺伝子変異

Dysferlin 遺伝子の変異は、c.1566C>G 変異、c.2997G>T 変異、c.3373delG 変異、c.4497delT 変異が多かった。肢帯型筋ジストロフィー 2B 型と比べ c.2997G>T 変異は少なく、c.3373delG 変異は多かった。

発症年齢は平均 21.8±7.5 歳で、c.2997G>T 変異をもつと 28.8±9.0 歳、もたないと 21.0±7.0 歳で有意差がみられた。

初発症状はつま先立ち困難 17、下腿筋委縮 6、階段困難 5、走り困難 5、下肢筋力低下 5、歩行困難 4、転倒 1、踵歩き困難 1、足がひっかかる 1、膝が上がらない 1、握力低下 1 人ずつだった。

平均経過はつま先立ち困難 0±0 年、走り困難 1±2 年、階段昇り困難 3±3 年、しゃがみ立ち困難 6±4 年、つまずきやすい 7±6 年、手の脱力 9±9 年、上肢近位脱力 11±11 年、杖使用 16±8 年、車椅子使用 21±9 年、電動車椅子使用 30±13 年だった。血清 CK 値については初期は非常に高値で、罹病期間とともに減少していた。

②dysferlinopathy が疑われるものの遺伝子変異の確定しなかった患者での血清クレアチンキナーゼ (CK) 測定値の検討

Dysferlinopathy の解析では、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アレル見つかったものは 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。

③三好型遠位型ミオパチー遺伝子検査のまとめ

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。

④三好型遠位型ミオパチーおよび肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスでの治療実験

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 atrogen-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。

D. 考察

発症前からのDMRVマウスへのシアル酸 (NeuAc)の飲水投与は顕著な予防効果を示した。シアル酸レベル、マウスの運動能力、骨格筋の収縮力、筋病理所見ともに、コントロールレベル程度まで予防した。遺伝子変異から引き起こされるシアル酸の低下がこの疾患の原因であると考えられるが、シアル酸の補充療法ではシアル酸を蓄積することは出来ないため、常にシアル酸を外から補充する必要がある。また、シアル酸を投与するためには、シアル酸の血中半減期が短いため、組織は頻繁に高いシアル酸溶液に曝されることになる。新生児ラットの結果から、高濃度のシアル酸の補充では細胞内のシアル酸合成に影響を及ぼす可能性が考えられた。このことは、たとえば、GNEのステップを回避するように代謝基質を与えたとしても、他のステップでシアル酸生合成が下がること(または、分解経路が活性化すること)により、全体としてシアル酸合成が進まないことが考えられた。

本研究では、シアル酸の細胞内分解、合成、取り込みに関わる7種類の遺伝子の発現変化を解析した。結果から、腎臓は外来シアル酸を分解する臓器であること、肝臓は外来シアル酸を利用できる形に変え、シアリル複合糖質を生産する臓器であること、骨格筋がどちらにも属さず、低いシアル酸合成能をもつであろうことが明らかとなった。シアル酸生合成の正常であろうコントロールマウスの腎臓においては、外来シアル酸への長期間の暴露がシアル酸の取り込みを上昇させ、かつ取り込んだシアル酸を合成や分解へと進めていることが考えられた。最も大きな変化は、腎臓・肝臓でのシアル酸合成酵素遺伝子群の発現上昇と骨格筋でのこれらの生合成遺伝子群が活性化しないことと、分解酵素遺伝子の発現低下であった。しかしながら、長期シアル酸投与でのDMRVマウスにおいては、全く異なる変化を示し、すべての組織での生合成遺伝子群の発現低下が見られた。面白いことに、NeuAc、ManNAcまたはSialac投与群では、これらの遺伝子群の発現変化は異なっていた。

今後は、シアル酸分解経路を操作することや、投与物質を経時的に取り換えることで、内在性のシアル酸合成能をコントロールしながらの治療法の確立を試みたいと考えている。

DMRVマウス骨格筋は、発症初期と進行した後期とではそれぞれ特徴的な筋力低下を示すことがわかっている。特に、筋力低下が著しい。以前からトレッドミルを用いた運動量測定を行ってきた。この方法は、再現性もよく、マウスの運動能力を直接評価する方法としては優れていた。しかしながら、進行した発症後期、特に高齢マウスでの連続的な測定では、測定自体の負荷が大きいため、骨格筋にダメージを与え、また、致死に至るマウスが顕著に増加した。今回の実験では、高齢マウスでも使用に耐えうる骨格筋の生理学的測定方法の確立を目指した。いくつかの方法を試したうち、我々の施設で測定可能であるような3種類の手法、自発運動量測定、呼吸筋測定、心電図を行った。すべての方法は、非侵襲的に測定するもので、マウスには全く負荷がかかっていないものと観察からも確認された。前者2種類の手法では、測定法の詳細が確認されるとともに、測定の有効性が確認された。今後は、マウスの測定数を増やすことで、より信頼できる測定として確立することを目指したい。また、シアル酸投与マウスにアプライすることにより、高齢発症マウスでの症状の改善を測定する方法としての有用性を示したいと考えている。

骨髄移植によって各組織のシアル酸レベルは、肝臓、腎臓、脾臓、骨格筋では顕著に回復が見られた。また、肝臓および骨格筋では、組織内に多数のGFP陽性の細胞が存在していた。このことは、骨格筋に直接細胞が取り込まれることにより、GNEが供給され、シアル酸レベルが回復している可能性が考えられたが、実際のGNE活性測定では、コントロールマウスレベルまで、酵素活性が回復していた。しかしながら、DMRVモデルマウスの骨格筋では筋壊死、筋再生はほとんど見られないため、これらの細胞の筋線維内への取り込み機構は不明であり、この取り込み機序を明らかにすることで、より一層の治療効果が期待されるものと思われる。また、血球細胞のシアリル化は、ほぼ、移植細胞のキメラ率を相関しており、さらに、例数は少ないが、キメラ率やシアリル化率の低い移植マウスでは

筋病理での完全の程度が低かった。このことは、骨髄移植後の血球細胞の測定により、治療効果を予測しうる可能性が考えられた。今後は、移植マウス間での、血球細胞のシアリル化と移植細胞のキメラ率の違いが何に起因するのかを調べることで、再現性のある移植法の確立を目指したい。

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、尿中への移行には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。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投与と比較して、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。

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 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。

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すとともに、筋力を回復させた。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。α-トコフェロール投与は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。

大規模な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、H₂O₂ 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 O₂ 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た。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 O₂ ラジカル産生に対して、同様に除去効果を示した。

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 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る。

三好型遠位型ミオパチーは、肢帯型筋ジストロフィー2B型と経過を比較すると発症年齢が早かったが、c.2997G>T 変異を除いて比較すると差がなく、肢帯型にこの変異が多いためと考えられた。つま先立ち困難と手の脱力は、生存曲線での比較で有意に肢帯型より早く障害された。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。

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 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 投与では、遊離シアル酸よりも高い治療効果が認められた。骨髄移植と 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。抗酸化薬投与は有効な治療法であると考えられた。

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。

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

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 Dis-*

ord.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, Arai 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

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

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

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, 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

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

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, 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

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：遠位型ミオパチーの治療法開発. 難病と在宅ケア 各種難病の最新治療情報 16: 50-53, Jul, 2010

野口 悟, Malicdan MC, 西野一三：縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーのモデルマウスと糖化合物による治療. BRAIN and NERVE 62: 601-607, Jun, 2010

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, Aus-

tralia, 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

Nishino I: Distal myopathy: What's new?

The Fourth Thai–Japanese Workshop on Muscle Diseases. Bangkok, 2.23, 2012

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, 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

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

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

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

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

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

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

Mori-Yoshimura M, Ohkuma A, Tominaga K, Oya Y, Fujimura-Kiyono C, Nakajima H, Matsumura K, Takamura A, Hashimoto K, Malicdan MC, Hayashi YK, Nonaka I, Murata M, Nishino I: Clinicopathological features of Japanese centronuclear myopathy harboring Dynamin 2 mutation. NCNP International Symposium CONGENITAL MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23, 2010

Mori-Yoshimura M: Natural course of DMRV. THE SECOND HIBM CONSORTIUM WORKSHOP, Kumamoto, Japan, 10.17, 2010

Nakamura H, Nishino I, Komaki H, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Motoyoshi Y, Matsumura T, Takeda S, Kawai M: REMUDY –DMD/BMD patient registry in Japan –. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.15, 2010

Nishino I: Sweetening the therapy for distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010

Malicdan MC, Noguchi S, Momma K, Funato F, Hayashi YK, Nishino I: Novel approach to sialic acid therapy in DMRV/hIBM mouse model. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010

Tokutomi T, Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Treatment of hyposialylation in mouse model of DMRV/hIBM with novel synthetic sugar compounds. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010

Takahashi T, Aoki M, Suzuki N, Yaginuma C, Sato H, Hayasaka M, Sugawara H, Abe E, Ito M, Tateyama M, Yoshioka M, Konno H, Onodera H, Itoyama Y: Clinical features of limb-girdle muscular dystrophy type 2B with the c.2997G>T mutation. 15th International Congress of the World Muscle Society(WMS), Kumamoto, Japan, 10.12-16, 2010