

## 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対する さらに高い効果の期待される治療薬の開発

### ～縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの克服に向けた新規治療薬 の探索～

研究代表者 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

3種類のシアル酸化合物により、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーのモデルマウス（DMRVマウス）の発症を完全に抑えることを、2009年に報告している。また、マウスへの連続的な長期シアル酸投与により、様々な組織でのシアル酸代謝とシアル酸生成経路が変化することを示した。今回の研究では、*GNE* 遺伝子にミスセンス変異をもつ細胞株を用いて、変異 *GNE* タンパク質の活性を上昇させる化合物の探索、また、*GNE* 遺伝子にナンセンス変異をもつ細胞株を用いて、少量のシアル酸を培地に添加した時に、著明に細胞シアル酸量を上昇させる化合物の探索を目論んだ。市販の薬物ライブラリー（1621化合物）を用い、細胞のシアリル化の回復を指標にスクリーニングを行った。変異 *GNE* タンパク質に直接作用し、活性を上昇させていると考えられるものが13化合物、シアル酸生成・代謝系に作用するものが9化合物、同定された。また、いくつかの化合物は共通の基本構造をもつ誘導体であった。

#### A. 研究目的

本邦に患者の多い縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）は、申請者が属する（独）国立精神・神経医療研究センターの塾中らにより、1981年に世界に先駆けて報告された筋難病であり、長年に亘り、本センターにおいて詳細な検討が行われてきた。欧米ではHIBMと名付けられ、イスラエル・米国・ドイツを中心に盛んに研究が行われている。

一方、本邦では、多数の患者が存在すること、全く治療法がないこと、発症すると数年という短い経過で急速に歩行不能となる進行性の難病であること、希少疾患であることから、厚生労働行政による早急な対応が望まれている。

我々はこれまでに、本疾患は、シアル酸生

合成過程の重要な酵素である

UDP-GlcNAc2-epimerase/ManNAc 6-kinase をコードする *GNE* 遺伝子の変異による疾患であり、HIBMと同一疾患であること（*Neurology* 2002）患者細胞で見られる低シアリル化はシアル酸の投与により回復できること（*J Biol Chem* 2004）を示してきた。さらに最近、世界で初めて本疾患のモデルマウスの作製に成功した（*Hum Mole Genet* 2007）が、このマウスでも骨格筋を含むほぼすべての臓器でシアル酸量が減少していることが示された。また、このマウスは20週齢より筋萎縮と筋力低下を、30週齢より骨格筋内にタンパク質の蓄積を、40週齢より骨格筋内に縁取り空胞の出現とより重篤な筋力低下を示す。

2009年にDMRVの治療法・予防法の開発を目的として、このDMRVマウスへの3種類のシアル酸関連化合物、遊離シアル酸(NeuAc)、シアル酸誘導体であるシアリル乳酸(Sialac)、前駆体であるN-アセチルマンノサミン(ManNAc)の投与による治療研究を行った。発症前からの自由飲水による投与により、DMRVマウスのみオパチー症状(運動能力の低下、骨格筋筋力低下、筋萎縮、封入体や縁取り空胞形成など、特徴的な筋病理像)が完全に予防されることを報告した。つまり、この疾患がシアル酸合成の不全により起こることを証明した。ここで重要なことは、DMRV患者は、*GNE* 遺伝子のいずれかに、必ずミスセンス変異をもつことである。In vitro の測定では、変異 *GNE* タンパク質は低下しているが、酵素活性を有していることが報告されている。つまり、酵素活性を保持している。また、*GNE* タンパク質はアロステリック部位をもち、その活性が、活性中心とは別の部位によっても調節されていることが知られている。

一方、長期間、シアル酸やその誘導体、前駆体を投与されたマウスでは、組織中のシアル酸取り込みに関わる遺伝子や生合成経路の遺伝子の発現低下とシアル酸代謝経路遺伝子の発現上昇を観察している。このシアル酸代謝経路を修飾出来れば、より効果的なシアル酸補充治療、また長期間に亘る有効な効果が期待される。そこで、本年度は、変異 *GNE* タンパク質自体に作用してシアル酸合成を上昇しうる化合物の探索と、シアル酸の生合成・代謝経路に作用して効率よくシアル酸合成を行える化合物を探索した。

## B. 研究方法

細胞への投与薬物として市販の薬物ライブラリー(1621化合物)を用いた。*GNE* 遺伝子のナンセンス変異とミスセンス変異をもつCHO細胞(Lec3.6F: p.E35stop、Lec3.4B: p.G135E)を、親CHO細胞と共に、無血清条件下にて培養した。Lec3.6Fに対しては、0.1mMシアル酸とともに100倍希釈にて薬物を投与した。Lec3.4Bに対しては薬物のみを100倍希釈にて投与した。3日間培養した後、細胞を固定し、シアル酸の合成はピオチン化MAM(シアリル化)及びPNAレクチン(非シアリル化)/蛍光標識アビジンでの

染色、細胞毒性、増殖に関しては蛍光標識フアロイジンで細胞を染色した。細胞の蛍光は、蛍光プレートリーダーにて測定した。

(倫理面への配慮)

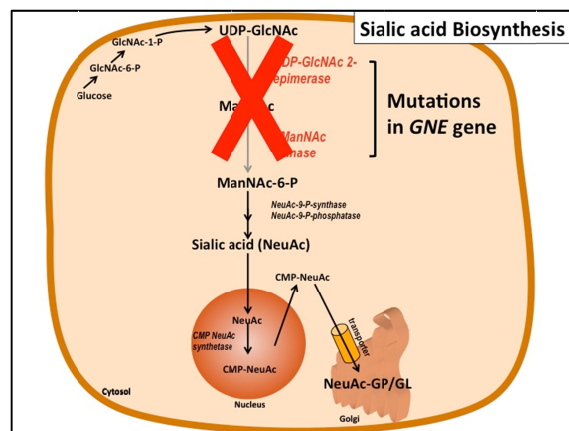
なし

## C. 研究結果

Lec3.6F細胞(p.E35stop)での一次スクリーニングにより、9種類の化合物が、低濃度シアル酸添加における細胞シアリル化の陽性を示した。また、Lec3.4B(p.G135E)での一次スクリーニングにより、シアル酸非添加において細胞シアリル化の陽性を示す17種類の化合物が同定された。このうち、4種の化合物は両方に含まれており、シアル酸の代謝経路の修飾を行っている可能性を考えている。つまり、変異 *GNE* タンパク質に直接作用しうるものが、13種、シアル酸生合成・代謝系に作用しうるものが9種類である。また、いくつかの化合物は類似の構造体または誘導体の関係にあった。

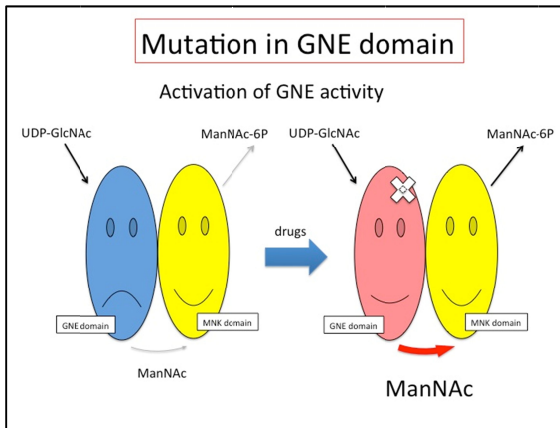
## D. 考察

DMRVでは、*GNE* 遺伝子に変異をもち、シアル酸生合成における律速段階である、最初のステップが進まないことが予想されている。



DMRV患者は *GNE* 遺伝子にミスセンスを持つが、このミスセンス変異は弱い活性を持つことが知られている。また、*GNE* タンパク質は、細胞内にシアル酸が充分存在し、シアル酸生合成が必要のない時には、その最終産物であるCMP-NeuAcによるネガティブフ

ードバックにより不活性化されることが知られている。この反応部位は GNE タンパク質の UDP-GlcNAc 2-エピメラーゼドメインに、活性中心から離れて存在する、つまり、このアロステリック効果により不活性化される。このことは、活性部位の修飾だけでなく、その周りの構造変化によっても、酵素活性を上昇しうる可能性を考えさせる。そこで、この研究では、下記の図の様にエピメラーゼドメインの活性化を考えた。



Lec3.4B 細胞で変異している Glycine135 は、活性中心にあり、変異により、エピメラーゼ活性が減少しているものと考えられた。この変異では、エピメラーゼ活性が消失しているとの報告もあるが、ヌル変異をもつ Lec3.6F に比べ、増殖能、接着性、細胞の形状は、親株である CHO 細胞に類似している。このことから、このミスセンス変異でも活性は残存しているものと思われる。今回のスクリーニングでは、13 種類の化合物が同定されたが、その中には、生理機能が同様と思われる共通の骨格構造を持つ化合物が複数含まれており、このスクリーニングがうまく進んでいることが伺われる。今後は、2 次スクリーニングを進めるとともに、ターゲット部位や作用機序の解明を目指して行きたい。

一方、GNE タンパク質以外のシアル酸合成を目論んだ Lec3.6F 細胞でのスクリーニングでは、9 種類の化合物が同定された。今後は、2 次スクリーニングを進めて、さらに絞りこみの作業を行う。また、絞り込まれた化合物で処理をした細胞での主な糖代謝物の解析により、標的カスケードを絞り込むことを考えている。いずれにせよ、活性がある化合物に関しては、モデルマウスでの前臨床研

究を視野に入れて解析を進めようと考えている。

また、今回の解析では、特定の GNE 変異をもつ細胞株を用いたが、ヌル変異をもつ Lec3.6F 細胞に変異 GNE を導入することで、DMRV 患者でみいだされている様々な GNE 変異への応用も可能である。

## E. 結論

市販の薬物ライブラリーから、GNE 遺伝子変異をもつ細胞のシアリル化の回復させる化合物が同定された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Mori-Yoshimura M, Oya Y, Yajima H, Yonemoto N, Kobayashi Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I, Murata M: GNE myopathy: A prospective natural history study of disease progression. *Neuromuscul Disord.* [Epub 2014 Feb]

Anada RP, Wong KT, Malicdan MC, Goh KJ, Hayashi YK, Nishino I, Noguchi S: Absence of beta-amyloid deposition in the central nervous system of a transgenic mouse model of distal myopathy with rimmed vacuoles. *Amyloid.* [Epub 2014 Mar]

Cho A, Hayashi YK, Monma K, Oya Y, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Mutation profile of the GNE gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* [Epub 2013 Sep]

Cho A, Noguchi S: Autophagy in GNE myopathy. *Autophagy – A Double-Edged Sword – Cell Survival or Death?* (Ed. Yanick Bailly), InTech, Croatia, pp141-161, 2013

## 2. 学会発表

Noguchi S, Ogawa M, Nishino I: Repeated cardiotoxin treatment progresses muscle phenotype in Collagen VI deficient mice. 2013 THE AMERICAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY (ASCB) Annual Meeting, New Orleans, USA (The New Orleans Ernest N. Morial Convention Center), 12.17, 2013 (12.14-12.18)

Noguchi S: GNE myopathy – Inclusion body myopathy (IBM2). EUROPEAN NEURO MUSCULAR CENTRE (ENMC) WORKSHOP, Bussum, The Netherlands (NH Jan Tabak Hotel), 11.2, 2013 (11.1-11.3)

Noguchi S: XMEA. EUROPEAN NEURO MUSCULAR CENTRE (ENMC) WORKSHOP, Bussum, The Netherlands (NH Jan Tabak Hotel), 11.1, 2013 (11.1-11.3)

Malicdan MC, Okada T, Takeda S, Funato F, Huizing M, Nonaka I, Hayashi YK, Argov Z, Nishino I, Mitrani-Rosenbaum S, Noguchi S: Expression of human GNE through adeno-associated virus mediated therapy delays progression of myopathy in the GNE myopathy mouse model. American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, Boston, USA (Boston Convention & Exhibition Center), 10.25, 2013 (10.22-10.26)

Cho A, Malicdan MC, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I, Noguchi S: Antioxidant capacity is impaired in hyposialylated myotubes of GNE myopathy. 18th International Congress of the World Muscle Society, Asilomar, USA (Asilomar Conference Grounds), 10.2, 2013 (10.1-10.5)

Noguchi S: ROS production in GM model mice and antioxidant therapy. The Third GNE myopathy (HIBM) consortium meeting, Burlingame, USA (San Francisco Marriott Airport Waterfront Hotel), 9.30,

2013 (9.29-9.30)

米川貴博, 野口 悟, Malicdan MC, 林由起子, 埜中征哉, 峯 利喜, 山本 岳, 西野一三: 6'-sialyllactose は, GNE ミオパチーを発症した高齢モデルマウスの筋症状を回復する. 平成 25 年度第 35 回国立精神・神経医療研究センター神経研究所発表会, 小平, 3.4, 2014 (3.4-3.5)

## 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