

## 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病態におけるオートファ ジーの役割～

研究分担者 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)の罹患筋は筋線維内の縁取り空胞とアミロイド等のタンパク質の蓄積を特徴とする。縁取り空胞の形成にはオートファジーが関与するものと考えられるが、オートファジーがどのように関与しているかは、解明されていない。本研究では、発生工学的手法を用いて、DMRVモデルマウスに、骨格筋特異的オートファジー欠損マウスを掛け合わせることで、DMRV筋におけるオートファジーの役割の解明を目指した。現在、目的とするDMRV筋オートファジー不全マウス(GNE<sup>-/-</sup>・hGNETg・Atg7 flox/flox・MucreATg)の一世代前までの掛け合わせが終了している。また、骨格筋特異的オートファジー欠損マウス(Atg7 flox/flox・MucreATg)の骨格筋の解析では、DMRVモデルマウスとほぼ同様に筋力低下、筋萎縮が見られた。

#### A. 研究目的

我々はこれまでに、本疾患は、シアル酸合成過程の重要な酵素であるUDP-GlcNAc2-epimerase/ManNAc 6-kinaseをコードするGNE遺伝子の変異による疾患であり、HIBMと同一疾患であること(Neurology 2002)、患者細胞で見られる低シアル化はシアル酸の投与により回復できること(J Biol Chem 2004)を示してきた。DMRVの罹患筋は筋線維内の縁取り空胞とアミロイド等のタンパク質の蓄積を特徴とする。我々は、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進行性の筋力低下を示す。つまり、この細胞内タンパク質の蓄積が筋力低下に関与していると考えられ、その後縁取り空胞の形成に至り、さらに、重篤化するわけである。縁取り空胞の形成にはオートファジーが関与するものと考えられるが、このオートファジー応答と自己貪食空胞形成がDMRV骨格筋の病態に対して、関連するのか、もし、関連する場合は増悪因子であるのか、防御因子であるのかが問題となる。さらに、どちらの場合であっても、オートファジーを操作することで、罹患筋の回復・治療につながると考えている。そこで、本年度は骨格筋特異的オートファジー欠損マウスとDMRVモデルマウスとの掛け合わせを行った。また、骨格筋特異的オートファジー欠損マウスの骨格筋の生理学的

特性づけも行った。

## B. 研究方法

DMRV のモデルマウス(GNE<sup>-/-</sup>・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。骨格筋特異的オートファジー欠損マウスは、Atg7<sup>flox</sup> マウスと MucreA Tg マウスを掛け合わせることで作製した。Atg7<sup>flox</sup> マウスは東京都臨床研の小松博士と MucreA Tg マウスは University of Otago の Dr.Koishi によって作製されたものを、理化学研究所バイオリソースセンターから譲り受けた。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。

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・承認を得て行なっている。

## C. 研究結果

DMRV モデルマウス(GNE<sup>-/-</sup>・hGNETg)と骨格筋特異的オートファジー欠損マウス(Atg7<sup>flox/flox</sup>・MucreATg)の掛け合わせを行った。現在、GNE<sup>-/-</sup>・hGNETg・Atg7<sup>flox/+</sup>と GNE<sup>-/-</sup>・Atg7<sup>flox/flox</sup>・MucreATg との掛け合わせを行っている。目的マウス(GNE<sup>-/-</sup>・hGNETg・Atg7<sup>flox/flox</sup>・MucreATg)は 1/16 の確立で、同腹仔コントロール(GNE<sup>-/-</sup>・hGNETg・Atg7<sup>flox/+</sup>・MucreATg 他)は 3/16 の確率で産生

されるはずである。

さらに産出量の増加を目論み、GNE<sup>-/-</sup>・hGNEdoubleTg・Atg7<sup>flox/flox</sup> の作製を行っている。このマウスが得られれば、1/4 の確率で目的マウスが産出されるはずである。

骨格筋特異的オートファジー欠損マウス(Atg7<sup>flox/flox</sup>・MucreATg)の骨格筋の特性付けを行った。40 週齢マウスの腓腹筋の単収縮力は 130±28.9mN、単位断面積あたりの比単収縮力は 13.9±0.9mN/mm<sup>2</sup>であった。強縮力は 445±80.6mN、単位断面積あたりの比強縮力は 47.8±1.7mN/mm<sup>2</sup>であった。一方、ほぼ同週齢における DMRV モデルマウスは、腓腹筋の単収縮力は 142±31.2mN、単位断面積あたりの比単収縮力は 15.8±5.2mN/mm<sup>2</sup>であった。強縮力は 667±120mN、単位断面積あたりの比強縮力は 76.8±23.0mN/mm<sup>2</sup>であった。

骨格筋特異的オートファジー欠損マウス(Atg7<sup>flox/flox</sup>・MucreATg)の前頸骨筋の単収縮力は 33.2±10.7mN、単位断面積あたりの比単収縮力は 9.3±2.1mN/mm<sup>2</sup>であった。強縮力は 161±16.3mN、単位断面積あたりの比強縮力は 46.0±9.2mN/mm<sup>2</sup>であった。一方、同週齢における DMRV モデルマウスの前頸骨筋の単収縮力は 34.6±14.3mN、単位断面積あたりの比単収縮力は 9.8±3.7mN/mm<sup>2</sup>であった。強縮力は 201±63.9mN、単位断面積あたりの比強縮力は 56.5±21.2mN/mm<sup>2</sup>であった。

## D. 考察

掛け合わせに関しては、ほぼ問題なく進んでいる。予備実験において、骨格筋特異的オートファジー欠損マウス(Atg7<sup>flox/flox</sup>・MucreATg)は、8-9 ヶ月齢において拡張型心筋症の症状を呈し、突然死した。これは、用いている骨格筋 α アクチンプロモーターで制御される cre recombinase 遺伝子が心筋でも発現したためだと思われる。掛け合わせにより、8-9 ヶ月齢より高齢での解析に問題があると思われたが、その後、Atg7<sup>flox/flox</sup>・MucreATg を野生型マウスとのバッククロスを行った後は、8-9 ヶ月齢において死亡個体や重度の心筋症マウスは見られなくなった。

40 週齢における骨格筋特異的オートファジー欠損マウスの筋力は、DMRV マウスと同様か、少し弱い程度であった。この週齢では DMRV マウスのすべての骨格筋症状が出そろっていないこと、また、それに関連して、DMRV マウスの筋収縮力に個体差が大きいことが観察されている。両者の骨格筋の症状がほぼ同様であるため、掛け合わせにより作製するマウスの表現型の解析にも問題は無いものと考えている。

## E. 結論

発生工学的手法を用いて、DMRV モデルマウスに、骨格筋特異的オートファジー欠損マウスを掛け合わせることで、DMRV 筋におけるオートファジーの役割の解明を目指した。骨格筋特異的オートファジー欠損マウス (Atg7 flox/flox・MucresATg) の骨格筋の解析では、DMRV モデルマウスとほぼ同様に筋力低下、筋萎縮が見られた。

## 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]

### 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)

[Nishino I](#): Natural history studies and therapy development in GNE myopathy. TREAT-NMD Alliance Meeting, Newcastle, UK (Newcastle University), 10.31, 2013 (10.30-11.1)

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)

[Nishino I](#): The Japanese large cohort. The Third GNE myopathy (HIBM) consortium meeting, Burlingame, USA (San Francisco Marriott Airport Waterfront Hotel), 9.30, 2013 (9.29-9.30)

[Nishino I](#): Therapy For GNE Myopathy.

The 12th Annual Asian and Oceanian Myology Center (AOMC) Scientific Meeting, Xi'an, China (Sofitel Xian on Renmin Square), 6.8, 2013 (6.6-6.8)

Nishino I: GNE myopathy and autophagy. 13th National Congress of the Italian Association of Myology, Stresa, Italy (Hotel Regina Palace), 5.16, 2013 (5.16-5.18)

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)

西野一三: GNE ミオパチーの病態解明と治療法開発. 第32回日本糖質学会年会, 大阪市(大阪国際交流センター), 8.6, 2013 (8.5-8.7)

西野一三: 遺伝性筋疾患診断の網羅的遺伝子解析. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島市 (広島市文化交流会館), 4.20, 2013 (4.19-4.21)

## 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