

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

研究代表者 野口 悟
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 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）に対して、分子病態機構の詳細を明らかにしつつ、治療の標的分子経路を具体的に設定することで、さらに効果的な治療薬の開発に取り組むことを目的とする。また、全く新たな治療法および治療薬開発にも挑む。本研究では 発症モデルマウスへのシアル酸化合物の投与による筋力低下からの回復、骨格筋内蓄積アミロイドの病原性の解析、オートファジーの病態形成への関与、筋萎縮に対する新規治療薬の開発、変異 GNE 酵素の活性化薬の探索、神経細胞におけるシアル酸取り込み機構の解析とその応用を目的とした。今年度は、発症モデルマウスへのシアル酸化合物の投与による筋力低下からの回復、骨格筋内蓄積アミロイドの病原性の解析に的を絞って報告する。

DMRV 患者への実際的な治療を考えると、診断時にはすでに発症しており、ミオパチー症状に至った骨格筋をいかに回復させるのが問題となる。我々は、以前、DMRV モデルマウスでのミオパチー発症の予防に、シアル酸補充（シアル酸および N-アセチルマンノサミン）が有効であること、さらに、過アセチル化 N-アセチルマンノサミンが非常に高い治療効果を示すことを報告した。また、50 週齢より高齢の発症した DMRV モデルマウスに対して結合型シアル酸（ α 2-6 シアリルラクトース：6'-SL）の投与が有効であることを示してきた。今回、6'-SL の薬物動態の再検討をおこない、この化合物は遊離シアル酸とは異なる代謝速度を示すばかりでなく、そこから遊離したシアル酸も体内を循環することを確認した。この結果をふまえ、シアル酸補充療法の有効性を示す化合物の性質について考察した。

さらに、モデルマウスでは縁取り空胞の形成にはタンパク質の蓄積とそれにより引き起こされるオートファジーが関与するものと考えられるが、アミロイドの蓄積がどのくらい、直接 DMRV 骨格筋の病態に寄与するのかは示されていない。本研究では、アミロイドの蓄積の DMRV の病態形成への寄与を解析することを目的に、遺伝的手法を用いて解析している。APP-/-マウスと DMRV モデルマウスとの掛け合わせを行っているが、今年度は APP-/-マウス骨格筋の収縮特性の解析を行った。その結果、正常コントロールと同様の収縮力を有していたが、前脛骨筋の強縮のみで低下が見られた。また、高齢（78 週齢）DMRV マウスの腓腹筋の蓄積タンパク質の解析も合わせておこなった。

研究分担者

西野 一三 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

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、申請者らが属する国立精神・神経医療研究センターの埜中らにより、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。

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 マウスのミオパチー症状 (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。

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。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 (α 2-6 シアリルラクトース : 6'-SL) の投与を行い、発症マウスのミオパチー症状の改善を認めるとともに、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てきた。一方、より有効性を示すシアル酸前駆体化合物として、過アセチル化 N-アセチルマンノサミン :

Ac₄ManNAc の投与を報告してきた。

Ac₄ManNAc は極めて高いミオパチーの予防効果とともに、組織シアル酸含量の上昇を示した。本研究では、6'-SL のコントロールマウスへの胃内投与後の血中および尿中の 6'-SL および代謝された遊離 NeuAc の量を測定し、6'-SL の薬物代謝動態を測定した。

一方、DMRV 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と縁取り空胞の形成が筋力低下に関与していると考えられている。縁取り空胞の形

成には、タンパク質の蓄積とそれにより引き起こされるオートファジーが関与するものと考えられるが、アミロイドの蓄積が直接 DMRV 骨格筋の病態に寄与するのか、アミロイドは単に他のタンパク質の蓄積の結果として二次的に蓄積されるのかはわかっていない。本研究では、アミロイド蓄積の病態への関与を解析する目的で、遺伝的にアミロイドタンパク質を欠損させた DMRV マウスを作製して、その表現型を解析することを目的とした。そこで、本年度はアミロイド前駆体タンパク質遺伝子欠損マウス (APP^{-/-}) マウスと DMRV モデルマウスとの掛け合わせを行った。また、APP^{-/-}欠損マウス骨格筋の生理学的特性づけも行った。さらに、DMRV マウス腓腹筋の蓄積タンパク質の解析も合わせて行った。

B . 研究方法

DMRV のモデルマウス(GNE^{-/-}・hGNETg) およびコントロールマウス (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。APP^{-/-}マウスは、Jackson laboratories より譲り受けた。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。

6'-SL の薬物動態は、6'-SL(47 micromole) を胃内投与した。投与後 5、10、30、60、120、240、480 分に尾静脈からの採血と採尿を行った。6'-SL 量は 4-aminobenzoic acid ethylester 化にて蛍光標識後に、HPLC にて測定した。また、遊離シアル酸は加水分解をせずに、結晶、尿を直接、1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene にて標識後、HPLC

にて定量した。

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。

DMRV マウスの骨格筋の病理は、定法に基づいて行った。抗 P62 タンパク質抗体の他、抗 P62 タンパク質 Ser403 リン酸化抗体および抗 P62 タンパク質 Ser351 リン酸化抗体、HSP90 抗体、抗真核生物翻訳開始因子 2 (eIF2^γ)Ser52 リン酸化抗体を用いた。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、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、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・承認を得ている。

C . 研究結果

6'-SLは胃内への投与の後、血中には5分以内に出現し、10分で最大値を示した。投与後、240分以内に、投与前のレベルに戻った。大多数の6'-SLは、投与後、60-120分で尿中に排泄されたが、投与前のレベルに戻るには、480分を要した。興味深いことに、6'-SLから代謝されたと考えられる遊離NeuAcは、血中およ

び尿中で、二峰性のピークを示し、血中では5分及び60分をピークとし、尿中では60-120分及び240-480分をピークとした。

DMRV モデルマウス(GNE^{-/-}・hGNETg)とAPP^{-/-}マウスの掛け合わせでは、現在、APP^{+/-}・GNE^{-/-}・hGNETgの掛け合わせを行って、産仔を集めているところである。離乳までの間に特に表現型に異常は見られていない。

APP^{-/-}マウスの骨格筋の特性付けを行った。54 週齢 APP^{-/-}マウスの腓腹筋の単収縮力は 290±49mN (正常コントロールマウスの 95%)、単位断面積あたりの比単収縮力は 28.7±2.4mN/mm² (正常コントロールマウスの 103%)であった。強縮力は 896±199mN (正常コントロールマウスの 87%)、単位断面積あたりの比強縮力は 84.8±15.7mN/mm² (正常コントロールマウスの 90%)、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 (正常コントロールマウスの 47%)、単位断面積あたりの比単収縮力は 15.8±5.2mN/mm² (正常コントロールマウスの 57%)であった。強縮力は 667±120mN (正常コントロールマウスの 65%)、単位断面積あたりの比強縮力は 76.8±23.0mN/mm² (正常コントロールマウスの 82%)であった。

54 週齢 APP^{-/-}マウスの前頸骨筋の単収縮力は 64.0±15.7mN (正常コントロールマウスの 95%)、単位断面積あたりの比単収縮力は 12.6±2.7mN/mm² (正常コントロールマウスの 93%)であった。強縮力は 207±48mN (正常コントロールマウスの 68%)、単位断面積あたりの比強縮力は 40.5±2.7mN/mm² (正常コントロールマウスの 66%)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/mm²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/mm²であった。

高齢 (78 週齢) DMRV マウスの腓腹筋の蓄積タンパク質には、アミロイド、P62、ユビキチンタンパク質の他に、HSP90、リン酸化 eIF2 が局在していた。また、リン酸化 P62 抗体は、非特異的染色も低く、特異的に細胞質タンパク質蓄積物を染色することがわかった。

D . 考察

以前の結果から、ヒト DMRV 患者において、6'-SL は遊離 NeuAc や ManNAc と同様の細胞シアル化の回復を示し、つまり、これらの化合物の細胞への取り込みは同程度であった。しかしながら、生体内代謝では、両者に違いが見られた。今回の研究では、血中の 6'-SL は投与後 240 分まで観察された。一方、NeuAc 投与では 120 分まで観察された。同様に、48-91%の 6'-SL は、60-480 分後に尿中に排泄されたが、NeuAc 投与ではその 75%が 60 分以内に排泄されていた。このことは、遊離シアル酸に比べ、シアル酸複合体が代謝されにくい化合物であることを示している。さらに驚いたことに、6'-SL の投与後、5 分及び 60 分をピークとして血中に観察された。前者のピークは、投与後すぐに分解されたものと考えられるが、後者は、一旦組織の取り込まれた後に分解され、遊離シアル酸として組織から放出されたものが 50 分遅れて、血中を巡回したものと考えられた。これらの結果と以前の治療効果の結果から、ゆっくりと代謝されるシアル酸化合物は、長い間、体内を循環し、組織に取り込まれる機会を延ばすことで、細胞への取り込み効率が同じで

あっても、高いシアル酸回復効果を生み出しているものと考えられた。

以上の知見を元に、シアル酸補充療法において、高い治療効果を示す化合物の性質やその投与方法として、Ac₄ManNAcのような、細胞への高い取り込み能を示すシアル酸前駆体化合物を用いること、

6'-SLのように、血液中を長時間循環し、代謝された後も遊離シアル酸を生成する複合化合物、徐放剤に加工した、ゆっくりと代謝されるシアル酸形剤が考えられた。このような化合物や投与方法を用いて、高い治療効果が期待される。

APP^{-/-}マウスとDMRVモデルマウスの掛け合わせは、産仔が得られない交配個体もあったものの、ほぼ滞りなく進んでいる。APP^{-/-}マウス系統は、個体産出、生下時の外見、離乳個体数などは、野生型と全く同様であった。DMRVマウスとの掛け合わせには全く問題がないと思われる。

40週齢におけるAPP^{-/-}マウスの筋力は、DMRVマウスと比較して非常に軽いものであった。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。面白いことに、APP^{-/-}マウスではむしろ、腓腹筋よりも前脛骨筋の筋力、特に強縮が低下していることが示された。DMRVマウスでは前脛骨筋の筋力の低下は筋萎縮によることがわかっているが、APP^{-/-}マウスでは、筋萎縮ではなく、筋力そのものが低下していた。

高齢(78週齢)DMRVマウス腓腹筋には、アミロイド、P62、ユビキチンタンパク質の他に、HSP90、リン酸化eIF2が蓄積していた。このことは、以下の二つのことを示唆

していると考えられる。蓄積タンパク質が、コンフォメーション変化を来し、分解系へのクライアントタンパク質となっている可能性があること、その結果として、罹患筋において、タンパク質の翻訳活性が低下していることである。これらの結果は、DMRV筋においても、筋線維内に蓄積したタンパク質に対して、細胞内応答が起こっていることを表しており、高齢マウスでは、タンパク質の蓄積が筋萎縮を引き起こす因子の一つであると考えられる。

E. 結論

DMRVに対するシアル酸治療について、有効性を規定する3つの条件を決定した。

遺伝学的手法を用いて、DMRVモデルマウスに、APP^{-/-}マウスを掛け合わせることで、DMRV骨格筋におけるアミロイドなどのタンパク質蓄積の意義の解明を目指した。APP^{-/-}マウスの骨格筋収縮力の解析では、筋力低下、筋萎縮ともに軽度であり、DMRVモデルマウスとの掛け合わせにおいて問題ないと思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Uruha A, Hayashi YK, Oya Y, Mori-Yoshimura M, Kanai M, Murata M, Kawamura M, Ogata K, Matsumura T, Suzuki S, Takahashi Y, Kondo T, Kawarabayashi T, Ishii Y, Kokubun N, Yokoi S, Yasuda R, Kira JI, Mitsuhashi S, Noguchi S, Nonaka

I, Nishino I: Necklace cytoplasmic bodies in hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. [Epub Sep 2014] ahead of print

Endo Y, Furuta A, Nishino I: Danon disease: a phenotypic expression of LAMP-2 deficiency. *Acta Neuropathol*. 129(3): 391-398, Mar, 2015 [Epub Jan 2015]

Tanboon J, Hayashi YK, Nishino I, Sangruchi T: Kyphoscoliosis and easy fatigability in a 14-year-old boy. *Neuropathology*. 35(1): 91-93, Feb 2015 [Epub Aug 2014]

Dong M, Noguchi S, Endo Y, Hayashi YK, Yoshida S, Nonaka I, Nishino I: *DAG1* mutations associated with asymptomatic hyperCKemia and hypoglycosylation of α -dystroglycan. *Neurology*. 84(3): 273-279, Jan, 2015 [Epub Dec 2014]

Yonekawa T, Malicdan MC, Cho A, Hayashi YK, Nonaka I, Mine T, Yamamoto T, Nishino I, Noguchi S: Sialyllactose ameliorates myopathic phenotypes in symptomatic GNE myopathy model mice. *Brain*. 137(10): 2670-2679, Oct, 2014 [Epub Jul 2014]

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*. 21(2): 138-139, Jun, 2014 [Epub Mar 2014]

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*. 85(8): 912-915, Aug, 2014

Kajino S, Ishihara K, Goto K, Ishigaki K, Noguchi S, Nonaka I, Osawa M, Nishino I, Hayashi YK: Congenital fiber type disproportion myopathy caused by LMNA mutations. *J Neurol Sci*. 340(1-2): 94-98, May, 2014 [Epub Mar 2014]

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*. 24(5): 380-386, May, 2014 [Epub Feb 2014]

Goto M, Okada M, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: A nationwide survey on marinesco-sjogren syndrome in Japan. *Orphanet J Rare Dis*. 9(1): 58, Apr, 2014.

米川貴博, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー. *Clinical Neuroscience 臨床神経科学*. 33(3): 348-349, Mar, 2015

2. 学会発表

Nishino I: Progress in therapy for GNE myopathy. The 4th Oriental Congress of Neurology, Shanghai, China, (Shanghai International Convention Center), 3.27, 2015(3.25-3.28)

Nishino I: Treatment of GNE myopathy. 14th AOMC ANNUAL SCIENTIFIC MEETING 2015 (AOMC), Bangkok, Thailand, (Shangri-La Hotel), 3.3, 2015(3.1-3.4)

Nishino I: GNE MYOPATHY – WILL IT BE TREATABLE? Brain Conference 2014 Joint Conference of the KSBNS (The Korean Society of Brain and Neural Science), CASN (The 3rd Congress of Asian Society of Neuropathology) and KSND (The Korean Society for Neurodegenerative Disease), Seoul, Korea, (Seoul National University), 11.6, 2014

Nishino I: Introduction to clinical features of GNE myopathy. GNE myopathy Consortium Workshop, Berlin, Germany, (BEUTH HOCHSCHULE FUR TECHNIK BERLIN University of Applied Sciences), 10.12, 2014

Noguchi S: Sialyllactose trial on GNE myopathy mouse model. GNE myopathy Consortium Workshop, Berlin, Germany, (BEUTH HOCHSCHULE FUR TECHNIK BERLIN University of Applied Sciences), 10.12, 2014

Nishimura H, Suzuki S, Uruha A, Noguchi S, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Nonaka I, Nishino I: Positivity for anti-cytosolic

5'-nucleotidase 1A autoantibody in inflammatory myopathies. 19th International Congress of the World Muscle Society, Berlin, Germany (Langenbeck-Virchow-Haus), 10.8, 2014 (10.7-10.11)

Nishino I: Therapeutic interventions in GNE-myopathy and possible targets in myofibrillar myopathies. 13th INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROMUSCULAR DISEASES, Nice, France (Nice Acropolis Convention Center), 7.7, 2014(7.5-7.10)

Nishino I: Therapy of DMRV/hIBM (GNE) myopathies. 13th INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROMUSCULAR DISEASES, Nice, France (Nice Acropolis Convention Center), 7.7, 2014(7.5-7.10)

その他（講演等）

西野一三：海外での治験．遠位型ミオパチー市民公開講座 - 治療法開発を目指して - , 小平市(国立精神・神経医療研究センター), 11.1, 2014, 主催：厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業)「希少難治性筋疾患に関する調査研究(H26-難治等(難)・一般-079)」班 研究代表者 青木正志(東北大学), 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)「遠位型ミオパチーにおける N-アセチルノイラミン酸の薬物動態の検討及び 2/3 相試験(H25-難治等(難)-一般-026)」班 研究代表者 青木正志, 厚生労働科学研究補助金 障害者対策総合研究事業(障害者対策総合研究開発事業(神

経・筋疾患分野))「縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対するさらに高い効果の期待される治療薬の開発(H25-神経・筋-一般-004)」班 研究代表者 野口 悟(国立精神・神経医療研究センター), NPO 法人 PADM 遠位型ミオパチー患者会

野口 悟:さらなる治療法開発・遠位型ミオパチー市民公開講座 - 治療法開発を目指して -, 小平市(国立精神・神経医療研究センター), 11.1, 2014, 主催:厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業)「希少難治性筋疾患に関する調査研究(H26-難治等(難)・一般-079)」班 研究代表者 青木正志(東北大学)厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)「遠位型ミオパチーにおけるN-アセチルノイラミン酸の薬物動態の検討及び2/3相試験(H25-難治等(難)-一般-026)」班 研究代表者 青木正志, 厚生労働科学研究補助金 障害者対策総合研究事業(障害者対策総合研究開発事業(神経・筋疾患分野))「縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーに対するさらに高い効果の期待される治療薬の開発(H25-神経・筋-一般-004)」班 研究代表者 野口 悟(国立精神・神経医療研究センター), NPO法人 PADM遠位型ミオパチー患者会

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許申請

発明の名称: 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:

公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願番号: 特願 2011-513374

登録番号: 第 5626734 号

登録日 : 平成 26(2014)年 10 月 10 日

発明の名称: 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
特許権者:

公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明者 :

野口 悟, Malicdan MC, 西野一三

国名: 中国 (PCT/JP2010/058116)

出願番号: 201080021386.4

基礎出願番号: 特願 2009-119272

登録番号: ZL201080021386.4

登録日 : 平成 27(2015)年 2 月 11 日

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし