

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

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)患者骨格筋は筋線維内での縁取り空胞の形成とアミロイド等のタンパク質の蓄積を特徴とする。モデルマウスでは、この細胞内タンパク質の蓄積とその後の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。このことは、細胞の蓄積タンパク質に対する応答反応を示唆しており、アミロイド蓄積の病態への意義を考える上で興味深い。

A . 研究目的

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。縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)

患者骨格筋は筋線維内での縁取り空胞の形成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。

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 アミロイドなどの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、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。また、もし病態に関連する場合は、増悪因子であるのか、悪化防御因子であるのかが問題となる。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) 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。

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

DMRV モデルマウス(GNE^{-/-}・hGNETg)と APP^{-/-}マウスの掛け合わせを行った。現在は、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 $84.8 \pm 15.7 \text{mN/mm}^2$ (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 $142 \pm 31.2 \text{mN}$ (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 $15.8 \pm 5.2 \text{mN/mm}^2$ (正常コントロールマウスの 57%) であった。強縮力は $667 \pm 120 \text{mN}$ (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 $76.8 \pm 23.0 \text{mN/mm}^2$ (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 $64.0 \pm 15.7 \text{mN}$ (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 $12.6 \pm 2.7 \text{mN/mm}^2$ (正常コントロールマウスの 93%) であった。強縮力は $207 \pm 48 \text{mN}$ (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 $40.5 \pm 2.7 \text{mN/mm}^2$ (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 $34.6 \pm 14.3 \text{mN}$ 、単位断面積あたりの比単収縮力は $9.8 \pm 3.7 \text{mN/mm}^2$ であった。強縮力は $201 \pm 63.9 \text{mN}$ 、単位断面積あたりの比強縮力は $56.5 \pm 21.2 \text{mN/mm}^2$ 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

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。本系統マウスの DMRV マウスとの掛け合わせには全く問題がないと思われた。

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

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。筋線維内蓄積タンパク質のかいせきでは、蓄積タンパク質に対する細胞応答反応を示唆していた。

F . 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

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.

2. 学会発表

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)

その他（講演等）

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