

## 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シアル酸治療効果の 有効性を規定する要素～

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

**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。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 ( $\alpha$ 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。細胞への取り込みの高いシアル酸前駆体化合物、血液中を循環し、代謝されにくいシアル酸複合体化合物、徐放剤に加工したシアル酸化合物は、非常に高いシアル酸回復能が期待される。

#### A . 研究目的

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) は、主に遠位筋（前頸骨筋）が侵される、比較的高齢発症の遺伝性筋疾患である。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きた。一方、本邦では、数百人程度の患者が存

在すること、確立された治療法がないこと、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、希少疾患であることから、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、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。

2009 年に、我々は発症前の DMRV マウスで、シアル酸やその前駆体を発症期まで投与し続けることにより、このマウスのミオパチー発症を完全に予防することを、報告した (Nat Med 2009)。しかしながら、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標とした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 ( $\alpha$ 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: Ac<sub>4</sub>ManNAc の投与を報告してきた。Ac<sub>4</sub>ManNAc 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。

## B. 研究方法

DMRV のモデルマウス (*GNE*<sup>-/-</sup>・hGNETg) およびコントロールマウス

(*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。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。

(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・承認を得て行なっている。

### 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。

### 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 と同様の細胞シアリル化の回復を示し、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、Ac<sub>4</sub>ManNAc 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。

### 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。

### 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

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  $\alpha$ -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 4<sup>th</sup> Oriental Congress of

Neurology, Shanghai, China, (Shanghai International Convention Center), 3.27, 2015(3.25-3.28)

Nishino I: Treatment of GNE myopathy. 14<sup>th</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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

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. 19<sup>th</sup> 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. 13<sup>th</sup> 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. 13<sup>th</sup> 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

## 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