

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（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

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野口 悟

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I . 総括研究報告

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	1
野口 悟 ((独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所)	

II . 分担研究報告

1. 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	7
野口 悟 ((独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所)	
2. 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	11
西野一三 ((独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所)	

III . 研究成果の刊行に関する一覧表	15
----------------------------	----

IV . 研究成果の刊行物・別刷	16
------------------------	----

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

（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

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、シアル酸生合成・代謝系に作用しうるものが 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。

また、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 筋におけるオートファジー不全マウス（*GNE*^{-/-}・*hGNETg*・*Atg7 flox/flox*・*MucresATg*）の一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*・*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。

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

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（独）国立精神・神経医療研究センターの枠内により、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。

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。

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^{-/-}・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、Atg7floxマウスとMucreA Tgマウスを掛け合わせることで作製した。Atg7flox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。

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、シアル酸の合成はビオチン化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ァ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）

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

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。

DMRV モデルマウス(GNE^{-/-}・hGNETg)と骨格筋特異的オートファジー欠損マウス (Atg7flox/flox・MucresATg)の掛け合わせを行った。現在、GNE^{-/-}・hGNETg・Atg7flox/+ と GNE^{-/-}・Atg7flox/flox・MucresATg との掛け合わせを行っている。目的マウス

(GNE^{-/-}・hGNETg・Atg7flox/flox・MucresATg)は1/16の確立で、同腹仔コントロール(GNE^{-/-}・hGNETg・Atg7flox/+・MucresATg 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^{-/-}・hGNEdoubleTg・Atg7flox/flox 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 (Atg7flox/flox・MucresATg)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/mm²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/mm²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/mm²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/mm²であった。

骨格筋特異的オートファジー欠損マウス (Atg7flox/flox・MucresATg)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/mm²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/mm²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。

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ィ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、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。

DMRV 筋におけるオートファジー不全マウス作製のための掛け合わせに関しては、ほぼ問題なく進んでいる。予備的解析において、骨格筋特異的オートファジー欠損マウス (Atg7flox/flox·MucroATg) 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 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、Atg7flox/flox·MucroATg 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 骨格筋特異的オートファジー不全マウスを作製し、DMRV 筋におけるオートファジーの役割の解明を目指した。

市販の薬物ライブのスクリーニングでは、GNE 遺伝子変異をもつ細胞のシアル化の回復させる化合物が同定された

F. 健康危険情報

特になし

G. 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. Yannick 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)

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)

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)

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, 桒中征哉, 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)

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許申請

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
権利者名 : 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

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する化合物の探索と、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ァ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)

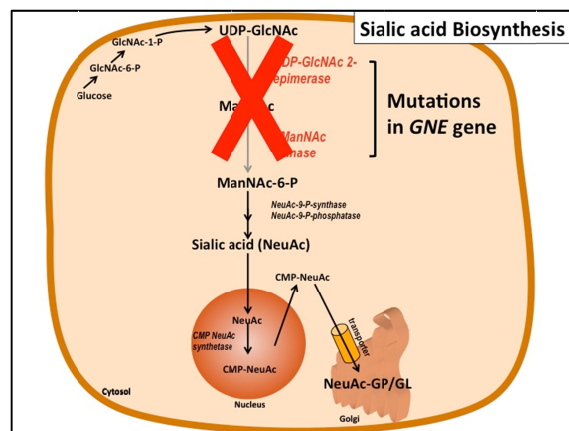
なし

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。

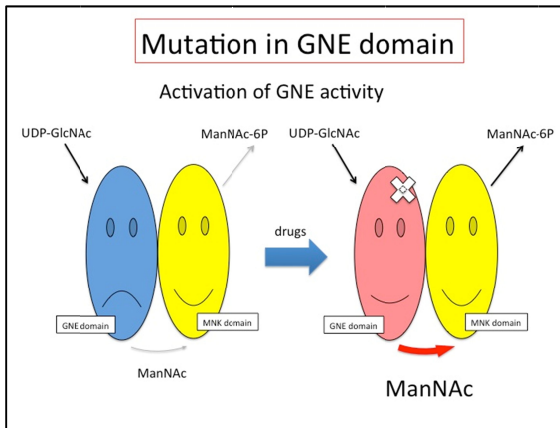
D. 考察

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

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^{-/-}・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^{-/-}・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^{flox} マウスと MucreA Tg マウスを掛け合わせることで作製した。Atg7^{flox} 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^{-/-}・hGNETg)と骨格筋特異的オートファジー欠損マウス(Atg7^{flox/flox}・MucreATg)の掛け合わせを行った。現在、GNE^{-/-}・hGNETg・Atg7^{flox/+}と GNE^{-/-}・Atg7^{flox/flox}・MucreATg との掛け合わせを行っている。目的マウス(GNE^{-/-}・hGNETg・Atg7^{flox/flox}・MucreATg)は 1/16 の確立で、同腹仔コントロール(GNE^{-/-}・hGNETg・Atg7^{flox/+}・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^{-/-}・hGNEdoubleTg・Atg7^{flox/flox} 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^{flox/flox}・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、単位断面あたり比単収縮力は 13.9±0.9mN/mm²であった。強縮力は 445±80.6mN、単位断面あたり比強縮力は 47.8±1.7mN/mm²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、単位断面あたり比単収縮力は 15.8±5.2mN/mm²であった。強縮力は 667±120mN、単位断面あたり比強縮力は 76.8±23.0mN/mm²であった。

骨格筋特異的オートファジー欠損マウス(Atg7^{flox/flox}・MucreATg)の前頸骨筋の単収縮力は 33.2±10.7mN、単位断面あたり比単収縮力は 9.3±2.1mN/mm²であった。強縮力は 161±16.3mN、単位断面あたり比強縮力は 46.0±9.2mN/mm²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、単位断面あたり比単収縮力は 9.8±3.7mN/mm²であった。強縮力は 201±63.9mN、単位断面あたり比強縮力は 56.5±21.2mN/mm²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^{flox/flox}・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^{flox/flox}・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・MucroATg) 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

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名：論文タイトル名．発表誌名 巻号：ページ，出版年
Anada RP, Wong KT, Malicdan MC, Goh KJ, Hayashi YK, <u>Nishino I</u> , <u>Noguchi S</u> : Absence of beta-amyloid deposition in the central nervous system of a transgenic mouse model of distal myopathy with rimmed vacuoles. <i>Amyloid</i> . [Epub 2014 Mar]
Mori-Yoshimura M, Oya Y, Yajima H, Yonemoto N, Kobayashi Y, Hayashi YK, <u>Noguchi S</u> , <u>Nishino I</u> , Murata M: GNE myopathy: A prospective natural history study of disease progression. <i>Neuromuscul Disord</i> . [Epub 2014 Feb]
Cho A, Hayashi YK, Monma K, Oya Y, <u>Noguchi S</u> , Nonaka I, <u>Nishino I</u> : Mutation profile of the <i>GNE</i> gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy). <i>J Neurol Neurosurg Psychiatry</i> . [Epub 2013 Sep]
Cho A, <u>Noguchi S</u> : Autophagy in GNE myopathy. <i>Autophagy – A Double-Edged Sword – Cell Survival or Death?</i> (Ed. Yannick Bailly), InTech, Croatia, pp141-161, 2013