

<シンポジウム 5—1>難治性筋疾患の病態機序—CK 発見から 50 年—治療の時代へ

## 縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチーの治療法開発

西野 一三 May Christine V. Malicdan 野口 悟

(臨床神経, 49 : 852—855, 2009)

**Key words :** 遠位型ミオパチー, 遺伝性封入体ミオパチー, 縁取り空胞, シアル酸, GNE

縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles : DMRV) は、欧米では、遺伝性封入体ミオパチー (hereditary inclusion body myopathy : hIBM) と呼ばれる常染色体劣性の筋疾患である<sup>1)</sup>。発症年齢は、15 歳～40 歳で、男女ほぼ平等に侵される。臨床的には、前脛骨筋と大腿後面筋が侵されやすく、大腿四頭筋は病後期まで比較的良好に保たれる。前脛骨筋の障害を反映して、初発症状は、下垂足であることが多い。平均的には発症後約 12 年程度で歩行不能となり、車椅子となるが、最近、臨床的重症度や進行の速さにはかなり差があることが知られるようになってきてい

る。病理学的には、縁取り空胞と管状線維性封入体の出現が特徴であり、アミロイド沈着やタウ蛋白質リン酸化といった神経変性疾患に似た変化もみとめられる<sup>1)2)</sup>。縁取り空胞は、電顕的には自己貪食空胞の集塊であり、DMRV は自己貪食空胞性ミオパチーとしての側面も有している<sup>3)</sup>。

2001 年、hIBM の原因遺伝子がシアル酸合成経路律速酵素をコードする GNE であることが明らかにされた (Fig. 1)<sup>4)</sup>。本邦 DMRV 患者においても同様に GNE 変異がみいだされたことから、DMRV と hIBM は同一疾患であることが確定した<sup>5)</sup>。これまでのところ、アレルの 95% 以上がミスセン

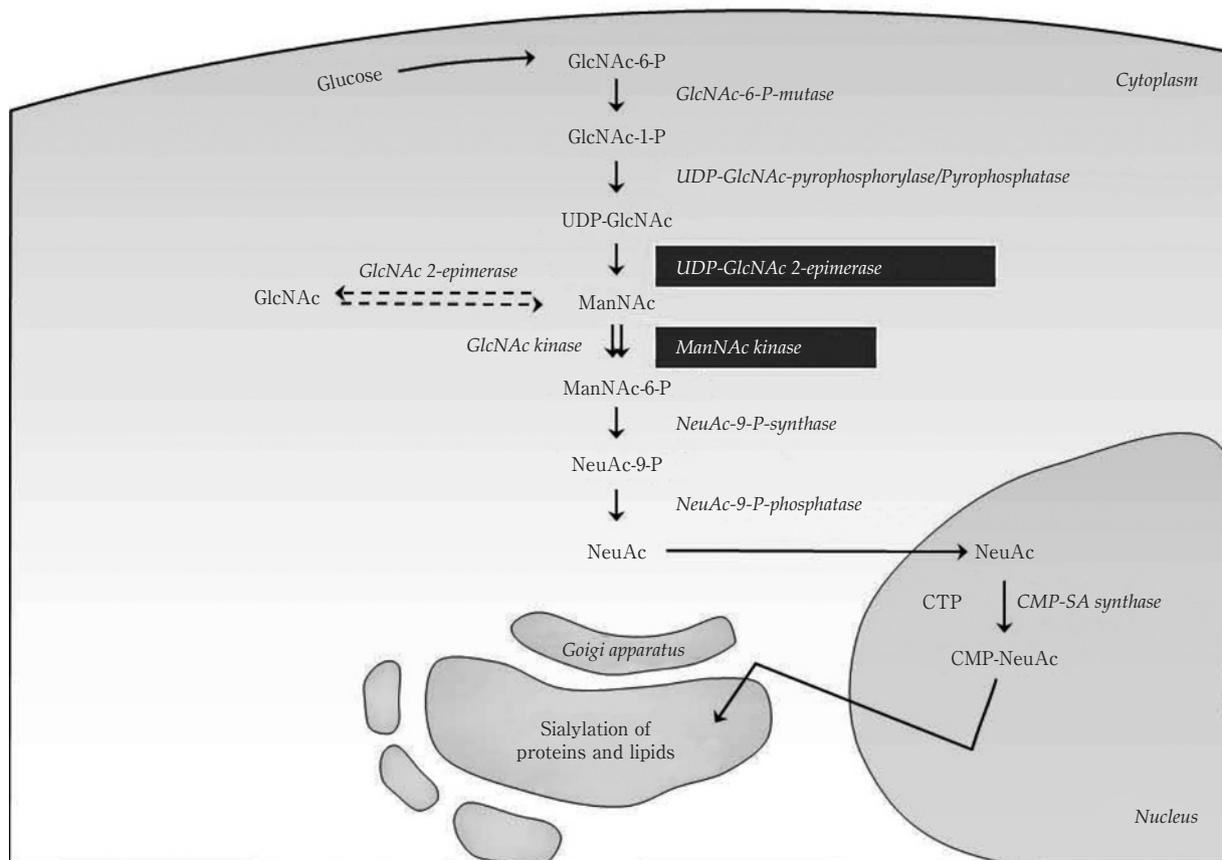


Fig. 1 Sialic acid biosynthetic pathway

GNE gene encodes a protein with two enzymatic activities: UDP-GlcNAc 2-epimerase and ManNAc kinase. The former catalyzes the rate-limiting step in sialic acid biosynthetic pathway.

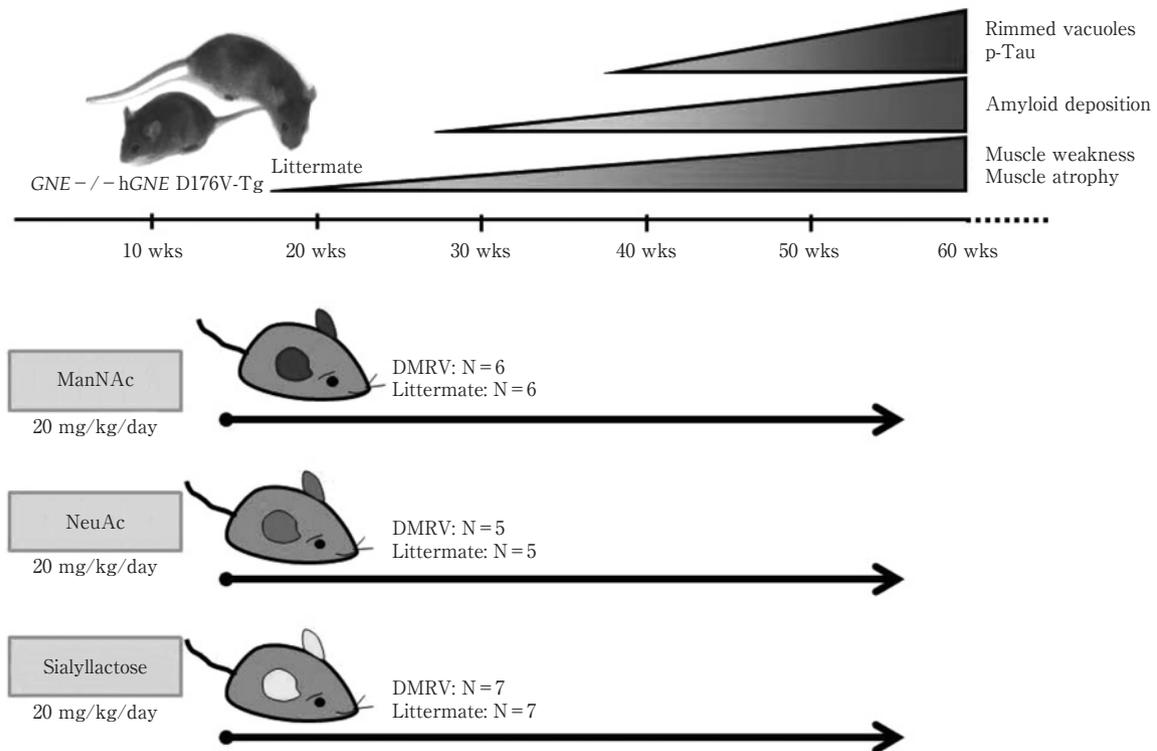


Fig. 2 Treatment schedule with low dose GNE metabolites

Three different GNE metabolites (ManNAc, NeuAc, and sialyllactose) were given orally from around 15 weeks of age until around 55 weeks of age. Without treatment, the DMRV model mice develop full-blown clinicopathological features of DMRV by 55 weeks.

ス変異であり、null 変異を両アレルに有する例はない。本邦では p.V572L 変異が一番多く、p.D176V 変異が2 番目に多い。われわれは *Gne* ノックアウトマウスの作製をおこなったが胎生致死であった。このことは、シアル酸合成が生体にとって必須であり、シアル酸をまったく合成できなければ生存しえないことを示している。これは、DMRV 患者が必ず少なくとも一つのアレルにミスセンス変異を持っていること、組み換えミスセンス変異タンパク質は少ないながらも活性を持っていることと良く一致している。おそらくヒトでも、null 変異は胎生致死となるものと思われる。

われわれのグループはこれまでに、患者の血液、筋組織、線維芽細胞、筋管細胞において、シアル酸が低下していることを報告してきた<sup>6)</sup>。さらに、培養細胞においては、GNE 代謝産物である ManNAc または主要なシアル酸である NeuAc を培地へ添加すると、これらの分子を細胞内に効率よく取り込んでシアル化基質を合成し、シアル化が回復することをみいだした<sup>6)</sup>。このことは、仮にシアル化減少が DMRV の本態であるならば、すでに *in vitro* で治療ができてことになる。当然、次のステップは、この治療効果を *in vivo* で、すなわちモデル動物で試すということになる。

米国グループは、イラン系ユダヤ人患者の共通変異 p.M712T を有するノックインマウスの作製をおこなった<sup>7)</sup>。ところが、このマウスは腎出血を呈してほぼ全例が生後 72

時間以内に死亡した。腎異常が、糸球体上皮細胞の podocalyxin のシアル低下によりひきおこされると考え、妊娠母体に ManNAc を与えたところ、腎異常が軽減して 12 匹のホモ接合型の個体が生まれた。このことから、ManNAc が腎発生の低シアル酸状態に対して効果があり、同様に、hIBM の治療にも効果がある可能性があると主張している<sup>7)</sup>。しかし、これらのマウスは筋症状をまったく呈しておらず、ManNAc がミオパチーに対して有効であるとの議論は科学的に無理がある。

われわれは *Gne* ノックアウトのヘテロ接合体マウスを有していたことから、このヘテロ接合体とヒト *GNE*p.D176V 変異体を発現するトランスジェニックマウスを作製して掛け合わせて、内在性の *Gne* 遺伝子は破壊される一方でヒト *GNE*p.D176V を高発現する *Gne*<sup>-/-</sup>hGNE D176V-Tg マウスを作製した<sup>8)</sup>。われわれのマウスは、生後 21 週以降より体重減少と筋萎縮を、31 週より筋線維内のアミロイド沈着、41 週よりリン酸化タウ、管状線維性封入体、縁取り空胞の出現を表し、更に、全身臓器でシアル酸量は低下し、血清 CK 値は軽度上昇していた<sup>8)9)</sup>。これは、われわれのマウスが、ヒト DMRV を臨床的・病理学的・生化学的に再現する世界ではじめての DMRV/hIBM モデルマウスであることを示している。加えて、われわれのマウスにより、はじめて、アミロイド沈着が縁取り空胞よりも時間的に先に形成されることが明らか

かとなり、病態の一端が解明された<sup>8)</sup>。

われわれは *in vivo* でのシアル酸代謝物の効果をしらべるべく、まず、投与方法の検討をおこなった<sup>10)</sup>。NeuAc や ManNAc は静注すると約2分で尿中に排泄されてしまうことが報告されている。そこで、正常マウスで腹腔内投与と経口投与での血中代謝動態および尿中への排泄速度を比較したところ、経口投与の方が尿中への排泄速度が遅く、さらに、投与2時間後の血中濃度も高かった。このことから、一日投与量を、少量ずつに分けてなるべくこまめに経口投与することがもっとも効果的であると考えられた。マウスは一日に約5mlの水を約12回にわけて摂取することが知られていることから、自由飲水により経口投与をおこなうことにした。

DMRV モデルマウス (*Gne*<sup>-/-</sup>hGNE D176V-Tg) に対して、発症前の15週齢前後から3つのことなる投与量 (20, 200, 2,000mg/kg 体重/日) で ManNAc を与えた。その結果、どの用量においても、55週齢の時点ではほぼ完全に DMRV 発症が抑制されていた<sup>10)</sup>。55週齢のモデルマウスでは、無治療のばあい、筋力低下・筋萎縮に加えて、軽度のCK上昇、アミロイド沈着、縁取り空胞形成、タウ蛋白質リン酸化といった一連の臨床病理学的所見がみとめられる。このことは、最小用量の20mg/kg 体重/日で十分に発症予防効果があることを示している。そこで、次に、この最小量で、ManNAc に加えて、NeuAc、シアル酸化合物であるシアリル乳糖の投与を同様のスケジュールでおこなった (Fig. 2)。その結果、NeuAc やシアリル乳糖においても、ManNAc と同様の効果がみとめられた<sup>10)</sup>。その他、生存率、運動能力、単離骨格筋の収縮力および骨格筋シアル酸レベルについても顕著な改善がみられた。しらべた範囲では、腎や肝への毒性はみとめられなかった<sup>10)</sup>。

われわれのモデルマウスでの結果は、単に DMRV に対する GNE 代謝産物の有効性を示すだけでなく、これまで議論の絶えなかった、「低シアル酸がミオパチーの原因なのか」という疑問に答えを与えるものである<sup>2)</sup>。低シアリル酸状態を回復させることで、ミオパチーを抑制できたことから、一連の臨床病理学的変化は、確かに低シアル酸状態を原因としていると考えられる。今後は、ヒトでもマウス同様の効果がみとめられるかどうかを検討すべく、臨床試験をおこなう必要がある。

## 文 献

1) Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Distal myopathy with

rimmed vacuoles and hereditary inclusion body myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2005; 5: 61—65

- 2) Malicdan MC, Noguchi S, Nishino I: Recent advances in distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hIBM: treatment perspectives. *Curr Opin Neurol* 2008; 21: 596—600
- 3) Nishino I: Autophagic vacuolar myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2003; 3: 64—69
- 4) Eisenberg I, Avidan N, Potikha T, et al: The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* 2001; 29: 83—87
- 5) Nishino I, Noguchi S, Murayama K, et al: Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 2002; 59: 1689—1693
- 6) Noguchi S, Keira Y, Murayama K, et al: Reduction of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 2004; 279: 11402—11407
- 7) Galeano B, Klootwijk R, Manoli I, et al: Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine. *J Clin Invest* 2007; 117: 1585—1194
- 8) Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, et al: A *Gne* knockout mouse expressing human GNE D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 2669—2682
- 9) Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, et al: Muscle weakness correlates with muscle atrophy and precedes the development of inclusion body or rimmed vacuoles in the mouse model of DMRV/hIBM. *Physiol Genomics* 2008; 35: 106—115
- 10) Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, et al: Prophylactic treatment with sialic acid metabolites precludes the development of the myopathic phenotype in the DMRV-hIBM mouse model. *Nat Med* 2009; 15: 690—695

**Abstract****Development of therapy for distal myopathy with rimmed vacuoles**

Ichizo Nishino, M.D., Ph.D., May Christine V. Malicdan, M.D. and Satoru Noguchi, Ph.D.

Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

Distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV), also called hereditary inclusion body myopathy, is an autosomal recessive disorder caused by homozygous or compound heterozygous missense mutations in *GNE* which encodes a protein with two enzymatic activities in sialic acid biosynthesis: UDP-GlcNAc 2-epimerase and ManNAc kinase. The disease starts from 15-40 years and is slowly progressive. DMRV preferentially affects tibialis anterior and hamstrings muscles, and has characteristic findings in muscle pathology which include rimmed vacuoles, tubulofilamentous inclusions, deposition of amyloid, and phosphorylated tau. We generated DMRV mice (*Gne*<sup>-/-</sup> h*GNE* D176V-Tg) by crossmating *Gne* knock-out heterozygous mouse and human *GNE* p.D176V transgenic mouse. This model mouse recapitulates DMRV clinically, pathologically, and biochemically by developing muscle weakness and atrophy from 21 weeks, amyloid deposition from 31 weeks, and rimmed vacuoles and phosphorylated tau from 41 weeks while having lifelong hyposialylation. We gave three types of *GNE* metabolites, ManNAc, NeuAc and sialyllactose, to DMRV mice orally from 15 weeks until 55 weeks of age. Sialic acid supplementation almost completely precluded the disease and virtually no sign of DMRV was seen even at 55 weeks of age, indicating that decreased sialic acid is the cause of myopathic phenotype and sialic acid supplementation can prevent the disease process.

(Clin Neurol, 49: 852—855, 2009)

**Key words:** distal myopathy, hereditary inclusion body myopathy: hIBM, rimmed vacuole, sialic acid, *GNE*

---