

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08472

研究課題名(和文)オートファジ を制御するmicroRNAを用いたポンペ病骨格筋の治療戦略

研究課題名(英文)Autophagy-regulating microRNAs in Pompe disease and their therapeutic strategy

研究代表者

福田 冬季子 (Fukuda, Tokiko)

浜松医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：10458268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトPompe病骨格筋のmicroRNA発現解析結果と他の筋型糖原病と比較した。報告者らはPompe病ではautophagyが障害され、進行を左右する病態を形成することを既に報告した。Pompe病ではmiR-499a-5p、miR-206、miR-208b-3pの発現が約40%に低下した。miR-206は、Duchenne型筋ジストロフィーと異なり糖原病V型でも亢進はなかった。TFEB発現やautophagy機能を低下させるmicroRNA-128は、microRNA-128-3pがPompe病骨格筋で40%に低下したが、糖原病V型では低下せず、autophagyへの異なる影響が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

autophagyに関与する遺伝子を制御するmiR-128、miR-30aなどのmicroRNAのPompe病骨格筋における役割を明らかにすること。microRNAの調節による病態の改善および治療効果の改善の可能性を明らかにすることである。実臨床において、酵素補充療法や基質合成阻害薬、遺伝子治療の開発が行われており、Pompe病におけるmicroRNAの変化を明らかにすることによりautophagyの治療による改善の評価方法を見いだす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The results of microRNA expression analysis of human Pompe disease skeletal muscle were compared with other muscle glycogen storage disease. The authors have previously reported that autophagy is impaired in Pompe disease, forming a pathology that influences disease progression. miR-499a-5p, miR-206 and miR-208b-3p expression was reduced to approximately 40% in Pompe disease. miR-206 expression is increased, but miR-206 was not increased in glycogen storage disease type V as in Pompe disease.

MicroRNA-128, which reduces TFEB expression and autophagy function, was reduced by microRNA-128-3p to 40% in skeletal muscle in Pompe disease but not in glycogen storage disease type V, suggesting a different effect on autophagy.

研究分野：小児科学

キーワード：Pompe病 マイクロRNA AUTOPHAGY

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Pompe 病は GAA 遺伝子変異によりリソゾーム酵素 acid alpha glucosidase (GAA) が欠損する疾患である。全身のリソゾームにグリコーゲンが蓄積し、ミオパチー(筋症)や心筋症を主症状とする。筋型糖原病の中では最も頻度が高いとされるが、発症率は 1 人/40,000 人の希少疾病であるが、リソゾーム病の中では骨格筋を侵す唯一の疾病であり、筋力低下、筋萎縮などの骨格筋症状発現メカニズムの解明や治療方法の開発が必要とされている。

recombinant GAA による酵素補充療法が開始され、Pompe 病の疾患修飾が実現した。酵素補充療法は、GAA が完全欠損する乳児型 Pompe 病では生命予後を著しく改善し、部分酵素欠損症である遅発型 Pompe 病では筋症状の進行を抑制する効果が得られているが、筋症状の消失には至らないこと、一旦改善した機能が再び低下することがあるなど課題が残されている。酵素補充療法では治療酵素に対する抗体産生が治療効果を妨げる一因であり、重大な課題の 1 つであり、免疫抑制療法が提唱され、また、CI-MPR を介した治療酵素の細胞内への取り込みの改善を目的に、酵素に付加するビス-マンノース-6-リン酸 (bis-M6P) を増加させた第 2 世代の治療酵素が開発され、さらに国際的には基質合成阻害薬と治療酵素との併用の治験も進んでいる。

我々は、Pompe 病骨格筋に過剰に autophagy が蓄積すること、autophagy の機能不全が存在することを報告した(Fukuda T, et al. Autophagy, 2006.)。ポリユビキチン化された分解されない大量のタンパクが蓄積し、autophagy 機能が障害された autophagic vacuole が骨格筋へ蓄積することにより筋組織の破壊が進行することから、autophagy の機能不全への介入が重要な課題であると考えられる。

Pompe 病において autophagic vacuole の過剰な蓄積をもたらす autophagy の機能不全に対するいくつかの研究が報告された。Pompe 病の骨格筋において、autophagy は lysosome にリクルートされた mTORC1 が GTP 結合 Rheb によって活性化され、ULK1 複合体と転写因子 TFEB/TFE3 のリン酸化依存的阻害を介して抑制される。また、AMPK が ULK1 をリン酸化し、autophagy を促進する。AMPK はまた、TSC2 をリン酸化し mTORC1 の活性を阻害し、autophagy を促進する。

lysosome-autophagy による分解と exocytosis を連動して制御する転写因子 TFEB の過剰発現では、TFEB は exocytosis をも促進し、モデルマウスや患者 iPS 由来の myotube でグリコーゲンを減少させた (Spampanato C EMBO Mol Med, 2013, Ohashi T Mol Ther Methods Clin Dev, 2016)。

autophagy 関連遺伝子への治療的介入の可能性や、autophagy の評価が治療効果を反映することが示唆されている。

Pompe 病と同様に、autophagy の異常が病態に関与する疾患には、ガン、Alzheimer 病や Parkinson 病などがある。ガンや Alzheimer 病の領域では、microRNA による autophagy の制御を治療に応用するための研究が報告されている。miR-30a は autophagy 膜の核形成と autolysosome の融合に関与する BECN1 (Beclin1) を標的とするが、miR-30a の乳がん、肺がん、神経膠芽腫における発現の低下や miR-30a の autophagy の抑制効果および治療効果への関与 (Yu Y, Leukemia, 2012, Zou Z, J Biol Chem, 2012) が報告されている。

miR-128 は転写因子 TFEB を標的とするが、Alzheimer 病患者の単球において、miR-128 の発現が亢進し TFEB の発現が抑制されていることや、miR-128 の抑制がアミロイド の分解を改善したことが報告された (Tiribuzi R, Neurobiol Aging, 2014)。

筋疾患では、Duchenne 型筋ジストロフィーにおいて、筋特異性 microRNA 発現の増加が報告された (Mizuno H, PLoS One, 2011)。Pompe 病においても、microRNA の autophagy の病態への関与が想定される。

2. 研究の目的

autophagy に関与する遺伝子を制御する miR-128、miR-30a などの microRNA の Pompe 病骨格筋における役割を明らかにすること。microRNA の調節による病態の改善および治療効果の改善の可能性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 対象：先行研究 (2016 基盤研究 C) で得られた解析と他の筋型糖原病との比較を実施した。Pompe 病の診断および病態解明研究への同意が得られ、Pompe 病と酵素診断した症例 5 例。糖原病 V 型と診断した症例 2 例。本研究は浜松医科大学倫理委員会の承認を得て行った。

(2) 酵素活性測定と臨床症状の解析：Pompe 病と酵素診断した症例の病型分類、臨床症状を集計した。酵素診断は、Pompe 病においては骨格筋の GAA 酵素活性測定を、人工基質 4-Methylumbelliferon (4 MU) を用い行い、糖原病 V 型においては、骨格筋の phosphorylase 活性をグリコーゲンを基質とする測定系により測定した。

(3) miRNA の発現解析：5 症例の凍結骨格筋を用い、miRNA の発現解析を行った。高 CK 血症を示さない 5 症例の骨格筋を対照とした。疾患対照として糖原病 V 型と診断した症例 2 例の発

現解析を実施した。骨格筋約5mgからmicroRNAを含むtotal RNAを分離し、2100 BioanalyzerによるRIN解析後、3D-GENE miRNA labeling kitを用い、アルカリフォスファターゼ(AP)処理後、total RNA 250ngを用いて標識を行い、32で12時間ハイブリダイゼーションを行った。miRNA Oligo chipは、2,565のprobeを有するHuman miRNA (Ver.21, 東レ)を用いた。3D-GENE Scanner 3000を用いてScanを行い、数値化したdataを解析した。生データからバックグラウンド値を減産したのち、グローバルノーマライズにより正規化した。

(4)統計: Fisher検定による分散の検定およびt検定を用いて行った。

4. 研究成果

ヒトPompe病骨格筋のmicroRNA発現解析において、特に筋が罹患する他の代表的な糖原病との比較を行った。

(1)Pompe病の症例は遅発型4例および乳児型1例。遅発型の年齢は11歳から44歳。骨格筋組織化学では、筋線維の大小不同 空胞を持つ筋線維、空胞内の酸ホスファターゼ活性上昇の所見が見られていた。

生検筋を用いたGAA酵素活性測定では、acid alpha glucosidase 0.5-1.9 nmoles 4MU/mg/30min (正常 14.6+/-4.8)、neutral glucosidase 15.4-19.4 nmoles 4MU/mg/30min ((正常 15.6+/-4.6)であった。遅発型の4例の臨床症状と経過は、近位筋優位の進行性筋ジストロフィー類似であり、いずれも心筋の異常を認めなかった。

(2)ボンベ病骨格筋のmiRNAの発現解析では、1.5倍以上の発現の変化を示し、t検定で $p < 0.05$ の有意差を認めたmicroRNAはPompe病の骨格筋で発現の上昇を認めたものは44種類、低値を認めたものは19種類であった。((2016 基盤研究C)

骨格筋特異的miRNA(myomiRNA)に注目した解析では、Pompe病骨格筋においては、miR-499a-5p、miR-206、miR-208b-3pの発現が約40%に低下していた($p < 0.05$)。

autophagyに關与する遺伝子の発現を制御すると考えられているmiRNAの発現の解析では、BECN1の発現を抑制するmiR-30a-3pが有意に低下しており、発現の低下が示唆された。

TFEBの発現レベルの低下をもたらし、autophagosomal-lysosomal pathwayの機能を低下させると報告されているmicroRNA-128の発現は、microRNA-128-3pがPompe病骨格筋では40%に低下していた($p=0.04$)。

(3)糖原病V型の症例は、成人例の2例。骨格筋組織化学では2例において、筋線維の大小不同、PAS染色陽性物質の増加、ホスホリラーゼ染色陰性の所見が得られていた。

生検筋を用いたin vitroで、glycogenとglucose-1-phosphateを基質とした乳酸生成測定では、glycogenを基質として測定した乳酸は検出されず、glycogenを基質として測定したphosphorylase活性はそれぞれ正常の10%以下に低下していた。

(4)ヒトPompe病骨格筋のmicroRNA発現と他疾患および、糖原病V型におけるmicroRNA発現

miR-206の発現は、Duchenne型筋ジストロフィーでは著しく亢進することが判明している。一方ボンベ病骨格筋では、約40%に低下していた($p < 0.05$)。miR-206は、骨格筋の再生を促進すると考えられており、いわゆるdystrophic changeが見られないPompe病ではmiR-206の発現の亢進は見られず、Duchenne型筋ジストロフィーとは異なるprofileであった。Pompe病骨格筋と同様に糖原病V型においてもmiR-206の発現の亢進は見られなかった。

miR-29は、fibrosisを促進し、Duchenne型筋ジストロフィーで発現が亢進する。Pompe病骨格筋においてmiR-29の発現には有意差のある変化は認めなかった。

microRNA-128はTFEBの発現レベルの低下をもたらし、autophagy-lysosomal pathwayの機能を低下させると報告されており、microRNA-128-3pがPompe病骨格筋では40%に低下していた($p=0.04$)が、糖原病V型では低下が見られず、autophagy-lysosomal pathwayへの異なる影響が示唆された。

参考文献

- 1) Fukuda T, et al. Mol Ther 2006, 14:831-9
- 2) Fukuda T, et al. Ann Neurol 2006, 59:700-8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------