

機関番号：17501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591005

研究課題名 (和文) GNE 遺伝子異常に伴う遠位型ミオパチーの治療法の開発

研究課題名 (英文) Treatment of distal myopathy caused by GNE gene aberration

研究代表者

熊本 俊秀 (KUMAMOTO TOSHIHIDE)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：40134936

研究成果の概要 (和文)：異常 GNE 遺伝子導入細胞では GNE は主に細胞質に局在し、野生型 GNE と同様に形態変化を認めないが、ノックダウン細胞では、116 個遺伝子の発現量の増加を認めた。GNE は筋線維の再生に関与する。Rimmed vacuoles 筋の筋崩壊に autophagy-lysosome 系列に加え ubiquitin-proteasome 系列が関与し、IGF-1 は rimmed vacuoles の過剰形成を抑制する。

研究成果の概要 (英文)：GNE was exclusively present in the cytoplasm of mutant GNE gene-transfected cells, which showed normal appearance. Specific 116 genes were detected in GNE-knocked down cells by oligonucleotide microarray. GNE may play a certain role in muscle fiber regeneration. The ubiquitin-proteasome proteolysis pathway as well as lysosomal-proteolysis pathway may mediate the muscle fiber destruction in rimmed vacuolar myopathy such as distal myopathy with rimmed vacuoles and chloroquine-induced myopathy. IGF-1 treatment may suppress the overdevelopment of rimmed vacuoles in those myopathies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学系臨床医学・神経内科学

キーワード：遠位型ミオパチー、rimmed vacuoles、リソソーム、ユビキチン・プロテアゾーム、GNE、マイクロアレイ、nNOS、IGF-1

1. 研究開始当初の背景

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles ; DMRV) は、1970 年代後半に本邦で発見され、骨格筋に多数の縁取り空胞 (rimmed vacuoles) を認める遺伝性、または弧発性の筋疾患である (Nonaka ら、1981; Kumamoto ら、1982)。現在、国際的にも 1 疾患単位として確立されている。我々は本症の発見に係

わり合い、これまで本疾患の臨床概念の確立とともに病態解析を行い、rimmed vacuoles が lysosome 由来の autophagosome/autolysosome であり、その成因に autophagy-lysosome 系列、特に autolysosome の形成、または調節機構の異常が示唆されること、また、その筋崩壊には autophagy-lysosome 系列に加え、ubiquitin-proteasome 系列が関与することを明らかにしてきた (Fukuhara ら、1980; Kumamoto ら、

1982;1998;2000 ; 2004 ; 熊本ら、1982)。さらに予め脱神経処理した chloroquine 投与ラット筋が rimmed vacuoles の過剰形成とともにヒト DMRV と同様の病態を示し、実験モデルになることを明らかにした (Kumamoto ら、1993 ; Masuda ら、2005 ; Kimura ら、2007)。Preliminary study において本実験筋では、ubiquitin、proteasomes、筋特異 ubiquitin ligase である atrogin-1/MAFbx や muscle specific ring finger (MuRF-1) 遺伝子が増加し、ubiquitin-proteasome 系列が筋崩壊に関与し、それを抑制する insuline-like growth factor (IGF-1) 投与により rimmed vacuoles を有する線維が有意に減少することを認めている。2002 年に DMRV の遺伝子異常が UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase /N-acetylmannosamine kinases (GNE) であることが同定されたが (Arai ら、2002)、現在、GNE 遺伝子と DMRV の発症機構との関連は不明である。DMRV の病態にはこの他にアポトーシス、酸化ストレスの関与が示唆されているが、これまでの国内外の研究からは、rimmed vacuoles の過剰形成や病態に lysosome 系列が深く関与していることはほぼ確立されている。しかし、その病態や治療法の開発に関する研究は極めて少ない。

2. 研究の目的

変異 GNE 遺伝子導入細胞及び DMRV と同様に rimmed vacuoles を過剰形成する実験的 chloroquine ミオパチーの筋細胞の変性・崩壊プロセスと autophagy-lysosome 系列異常との関係を検討し、DMRV の発症機構を解明するとともに、ubiquitin-proteasome 系列の関与を明らかにし、IGF-1 による筋細胞の萎縮、変性・崩壊の抑制効果を検討し、DMRV の治療法の開発研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた GNE 機能解析:変異 GNE 遺伝子導入細胞及び GNE ノックダウン細胞の解析: 10%牛胎児血清 fetal bovine serum (FBS) を添加した Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM) で培養したマウス筋芽細胞由来 C2 細胞に、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて GNE に対する siRNA (QIAGEN) 及び陰性コントロールの siRNA (QIAGEN) を導入し、CO₂ インキュベータで培養した。siRNA 導入 48 時間後に細胞を採取し、

RNA を精製して、cDNA を合成した。RNA の質は吸光度測定及び Agilent Technologies 社のバイアナライザで確認した。定量的リアルタイム PCR 法で、GAPDH に対する GNE の遺伝子発現量を測定し、GNE 遺伝子発現の抑制を確認した。また、siRNA 導入 72 時間後に細胞を採取して可溶性蛋白質を精製し、抗 GNE 抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法で GNE 蛋白質量を確認した。Agilent Technologies 社のマイクロアレイシステムを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

(2) 生体筋における GNE の細胞内局在と機能解析と GNE 結合蛋白質の検索: Quickchange Mutagenesis kit II (Strata-gene) を用いて、V572L 変異 GNE 遺伝子を作製して GFP 融合蛋白質発現ベクターにサブクローニングし、リポフェクション法で C2 細胞に導入した。また、Takara LA PCR in vitro Mutagenesis kit (タカラバイオ) を用いて V572L+A82V ダブル変異 GNE 遺伝子を作製して GFP 融合蛋白質発現ベクターにサブクローニングし、リポフェクション法で NUGC3 細胞に導入した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP 融合 GNE 蛋白質の細胞内局在を観察した。

さらに培養細胞からクローニングしたヒト GNE 遺伝子を用いて、大腸菌発現系で各々 epimerase ドメインあるいは kinase ドメインを含む 2 個の GST 融合組換え蛋白質を作製した。それらをウサギに免疫し、得られた血清をアフィニティ精製して、抗 GNE ポリクローナル抗体 (抗 GNE-E 抗体、抗 GNE-K 抗体) を作製した。

また、C57BL/6 マウス (雄) の右腓腹筋に、cardiotoxin (CTX) を筋注後、1, 2, 4, 7 日後に腓腹筋を採取し、凍結組織標本及び 4% paraformaldehyde 固定・パラフィン包埋標本を作製し、免疫組織化学で GNE 蛋白質の発現と局在を調べた。また、Laser-capture microdissection (LCM) を用いて凍結組織切片から障害筋線維あるいは再生筋線維及び対照として同一切片の非障害筋線維を採取し、定量的 RT-PCR を行って GNE 遺伝子発現量を測定した。

(3) 実験的 chloroquine ミオパチーの筋崩壊機構における ubiquitin-proteasome の役割と insulin-like growth factor-1 (IGF-1) によるその抑制: 40 匹の Wistar 系雄ラットの左坐骨神経

を結紮し（脱神経処理）、そのうち 15 匹に chloroquine chloride (50 mg/kg 体重) を連日腹腔内に注射した。残りの 15 匹には同様に saline を注射した。これらのラットに IGF-1 (Somatomedin C) を 2 mg/kg (少量)、または 8 mg/kg (大量) を連日腹腔内に注射した。未投与群には同量の saline を投与した。IGF-1、生食水投与後 8 日目に全てのラットの右（神経支配）及び左（脱神経）ヒラメ筋を摘出した。摘出筋は直ちに液体窒素で冷却した isopentane で凍結した。

連続凍結標本作成後、ルーチンの組織学、組織化学、免疫組織化学的(20S proteasome, ubiquitin) 検索を行った。

Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) は、凍結切片より総 RNA を抽出し、cDNA を合成した。遺伝子特異 real-time PCR プライマーは、Takara Bio Inc. または Sigma-Aldrich Japan より購入した。すなわち、MuRF-1 mRNA (Accession No. NM133521)、ラット atrogen-1/MAFbx 32 mRNA (Accession No. NM133521)；ラット ubiquitin-C mRNA (Accession No. NM017314)；ラット MAPI-LC3 β mRNA (Accession No. RA019913)、ラット mTOR mRNA (Accession No. RA009998)、ラット Vps34 mRNA (Accession No. 16191) 及びラット GAPDH mRNA (Accession No. NM017008) である。定量的 real-time RT-PCR を行い、2%アガロースゲル電気泳動後、走査型濃度計を用いて mRNA の相対量を測定し、NIH image (version 1.61) で定量した。

(4) rimmed vacuole ミオパチーは筋線維における一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthetase ; NOS) の発現：研究 2 と同様に左側に脱神経処理したラット 30 匹の各 1 5 匹に chloroquine chloride、または saline を注射した。注射開始後 4, 7, 14 日目に両群ラットの左右のヒラメ筋を摘出した。さらに脱神経した chloroquine 投与ラットに nNOS inhibitor である 7-nitroindazole と同量の peanut oil を投与し、14 日目にヒラメ筋を摘出した。

連続凍結標本についてルーチンの組織学的、組織化学的検査を行った。NADPH diaphorase 染色は、Young ら (1997) の方法で行った。凍結切片を用い、nNOS, eNOS, iNOS の免疫染色を行った。nNOS, lamp-1、またはヒト dystrophin の蛍光抗体二重染色法を行い、走査型共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

ウェスタンブロッティングは、各筋をホモジナイズし、抽出液を 8%の SDS-ポリアクリルアミド・ゲルで電気泳動し、シートにトランスファー後、nNOS、 α -tubulin の免疫染色を行い、バンドの相対量は NIH Image J software で測定した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた GNE 機能解析:変異 GNE 遺伝子導入細胞及び GNE ノックダウン細胞の解析の研究:以下の結果が得られた。①GNE をノックダウンした C2 細胞では、GNE 遺伝子発現 (siRNA 導入 48 時間後) は約 40%に抑制され、GNE 蛋白質量 (siRNA 導入 72 時間後) は約 40%減少した。②顕微鏡的観察では、GNE の発現を抑制した細胞では形態的变化を認めなかった。③網羅的遺伝子発現解析を行ったところ (n=2)、陰性コントロール siRNA 導入細胞と比較して、GNE をノックダウンした細胞において発現量が 2 倍以上変化した遺伝子を 116 遺伝子認めた。GNE 遺伝子の発現は約 3 分の 1 に低下していたことから、定量的リアルタイム PCR 法との再現性が高いことが示された。

(2) 生体筋における GNE の細胞内局在と機能解析と GNE 結合蛋白質の検索:以下の研究成果が得られた。①抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティング法で GFP 融合 GNE 蛋白質 (野生型、V572L 変異) の発現を確認した。

②V572L 変異 GNE 及び V572L+A82V ダブル変異 GNE の細胞内局在は、主として細胞質内にびまん性に局在し、野生型 GNE と比較して変化を認めなかった (図 1)。

③作製した抗 GNE 抗体は両者とも invitro において GNE を特異的に認識し、マウス筋組織から抽出した蛋白質を用いたウェスタンブロッティングで約 79kDa の高さに GNE 蛋白質を検出した。免疫組織化学では、正常筋線維において GNE は主として細胞質に、また一部核に局在していた。細胞質では GNE は α -actinin と共局在しており、過去の報告に合致した。

④本抗体を用いて CTX 障害筋モデルにおける GNE の発現を調べた。免疫組織化学では、障害筋線維 (CTX 筋注 1~2 日後) 及び再生筋線維 (CTX 筋注 4~7 日後) において GNE が強陽性であった (図 2)。再生筋線維では GNE は細胞質と核に局在を認めた。免疫組織化学

における抗 GNE 抗体の反応は抗原吸収実験によって特異的反応であることを確認した(図2)。LCM を用いて採取した障害筋線維及び再生筋線維では GNE 遺伝子発現が亢進しており、障害筋線維及び再生筋線維において GNE が誘導されることを確認した。(本研究は、Pathobiology 2010;77(2):191-199 に発表した)

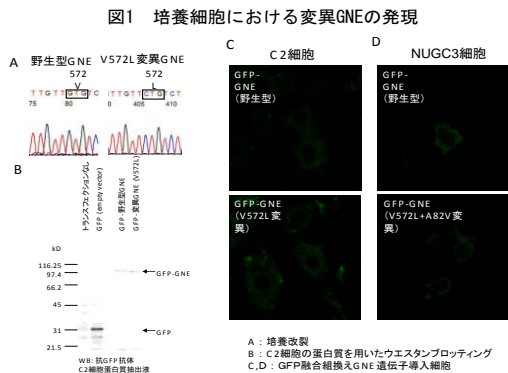
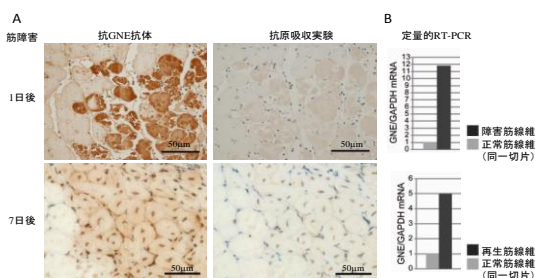


図2 障害筋線維と再生筋線維におけるGNEの発現誘導



(3) 実験的 chloroquine ミオパチーの筋崩壊機構における ubiquitin-proteasome の役割と (IGF-1) によるその抑制の研究: ①これまでの報告では、chloroquine 誘発ミオパチーの動物モデルの筋では、rimmed vacuoles、萎縮線維および lysosome cathepsin 活性の増加が認められ、この種のみオパチーにおける筋線維は、lysosome を介した蛋白分解経路で分解されることが示唆されている。しかし、rimmed vacuoles を有する筋線維では、ubiquitin, proteasomes の異常な発現がみられるという最近の知見から、実験的 chloroquine ミオパチーにおける筋線維の崩壊機構における ubiquitin-proteasome を介した蛋白分解経路の意義について研究を行った。

Saline、または chloroquine 投与ラットの神経支配筋及び脱神経筋について、ubiquitin, 26S proteasome 蛋白及び新規の

筋特異 ubiquitin ligase である MuRF-1, atrogin/FMAbx の発現を検討した。

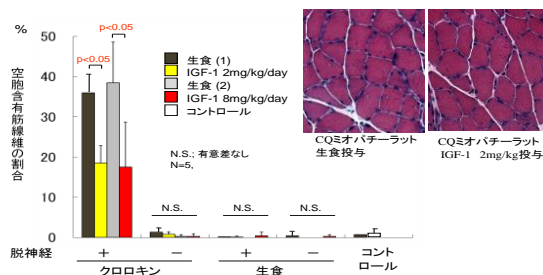
その結果、chloroquine 投与ラットの脱神経ヒラメ筋では、多数の rimmed vacuoles、dense granular bodies や small vacuoles が認められたが、saline 投与ラットの脱神経筋および saline や chloroquine 投与ラットの神経支配筋ではほとんどみられず、異常な rimmed vacuoles の集積は、chloroquine 投与した脱神経筋のみにみられた。免疫染色では、ubiquitin, 26S proteasomes は両ラット群の対側の神経支配筋に比べて、脱神経筋で有意に増加した。Ubiquitin 及び筋特異 ubiquitin ligases (MuRF-, atrogin-1/FAMbx) の mRNA レベルは、saline または chloroquine 投与ラットの神経支配筋に比べ、脱神経筋で有意に増加したが、saline 投与ラットの脱神経筋に比べ、chloroquine 投与群でより増加した。このことは rimmed vacuoles が多数みられる chloroquine 投与ラットの脱神経筋において ubiquitin, proteasomes が増加し、ubiquitin-proteasome 系列が筋原線維の崩壊に関与していることを示唆する。

以上のことから、chloroquine 投与により、筋線維の ubiquitin 及び筋特異 ubiquitin ligases、特に MuRF-1, atrogin-1/FMAbx が活性化され、それによって ubiquitin-proteasome を介した蛋白分解経路が増強され、その結果、筋線維の崩壊が起こるものと思われる。Ubiquitin-proteasome を介した蛋白分解経路は、lysosome による蛋白分解経路とともに実験的 chloroquine ミオパチーの筋線維の崩壊に関与する。(本研究は、Muscle Nerve 2009;39(4):521-528 に発表した)

②chloroquine 誘発ミオパチーの動物モデルでは、ubiquitin-proteasome 系列を介して筋線維が分解されることより、その治療法開発のために IGF-1 投与が saline 及び chloroquine 投与ラットの脱神経筋における筋萎縮を改善させ、chloroquine 投与した脱神経筋にみられる rimmed vacuoles の過剰形成を抑制するか否かを検討した。筋線維内の rimmed vacuoles や dense granular bodies は、chloroquine 投与した脱神経筋でのみ認められた。Chloroquine 投与ラットのヒラメ筋では、rimmed vacuoles を有する線維数は、少量の IGF-1 (2 mg/kg)、あるいは大量の IGF-1 (8 mg/kg) 投与により、IGF-1 非投与のラットに比べ有意に減少した(図3)。しかし、

両ラット群の脱神経筋の平均筋線維直径には変化を認めなかった。Proteasome と ubiquitin の免疫染色及び atrogin-1/ MAFbx, MuRF-1, autophagy 関連遺伝子 (LC3 α , LC3 β , mTOR, Vsp34) の mRNA レベルは、IGF-1 の 8 日間投与後の saline 及び chloroquine 投与ラットの脱神経筋で、対側の神経支配筋に比べ有意に増加した。しかし、両群ラットの脱神経筋における免疫染色及び mRNA レベルは IGF-1 の大量の投与でも変化はなかった。このことは IGF-1 は transcription レベルで作用していることが示唆された。以上より、IGF-1 は chloroquine 誘発ミオパチーの動物モデルにおける筋線維内の rimmed vacuoles の形成を抑制し、DMRV を含む rimmed vacuole ミオパチーの臨床症状を遅延させる薬剤となり得る可能性がある。(現在、本研究は投稿中である)

図3 IGF-1投与によるrimmed vacuoles/deuse granular bodies含有筋線維の頻度の変化



(4) rimmed vacuole ミオパチーは筋線維における NOS の発現 : 予め脱神経処理した chloroquine 投与ラットでは、異常な rimmed vacuoles の集簇と高度の筋萎縮がみられた。saline 投与ラットの非脱神経筋では、nNOS は筋形質膜に局在し、一方、chloroquine 投与ラットの脱神経筋では、細胞質及び筋形質膜に集簇した。ウェスタンブロッティング法では、nNOS は有意に saline 投与ラットの非脱神経筋に比べ、chloroquine 投与筋の脱神経筋で有意に増加した。Chloroquine 投与ラットの脱神経筋では、NADPH diaphorase (nNOS 活性のマーカー) の免疫染色は、有意に減少し、筋細胞質では陰性であった。Lysosome の指標である lamp-1 の陽性顆粒が筋細胞質にみられ、また、nNOS 陽性顆粒は、しばしば lamp-1-陽性空胞内にみられた。以上より、nNOS は、autophagy-lysosome 系列を介して nNOS 分解される。(本研究は、現在 Neuromuscul Disord に投稿中 (revised) である)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Nakamura K, Tsukamoto Y, Hijiya N, Higuchi Y, Yano S, Yokoyama S, Kumamoto T, Moriyama M, Induction of GNE in myofibers after muscle injury, Pathology、査読有、2010、77(4)、191-199.
- ② Ando M, Miyazaki E, Yamasue M, Sadamura Y, Ishii T, Takenaka R, Ito T, Nureki S, Kumamoto T, Successful treatment with tacrolimus of progressive interstitial pneumonia associated with amyopathic dermatomyositis refractory to cyclosporine, Clin Rheumatol、査読有、2010、29(4)、443-445.
- ③ 熊本俊秀、感染性筋炎、Clin Neurosci、査読無、2010、28(3)、340-342.
- ④ Korematsu S, Kosugi Y, Kumamoto T, Yamaguchi S, Izumi T, Novel mutation of early, perinatal-onset, myopathic-type very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, Pediatr Neurol、査読有、2009、41(2)、151-153.
- ⑤ Kimura N, Kumamoto T, Oniki T, Nomura M, Nakamura K, Abe Y, Hazama Y, Ueyama H, Role of ubiquitin-proteasome proteolysis in muscle fiber destruction in experimental chloroquine-induced myopathy, Muscle Nerve、査読有、2009、39(4)、521-528.
- ⑥ Tanabe F, Kasai H, He L, Kin T, Fujikado T, Kumamoto T, Hara T, Iwata T, Ito M, Improvement of deficient natural killer activity and delayed bactericidal activity by a thiol proteinase inhibitor, E-64-d, in leukocytes from Chediak-Higashi syndrome patients in vitro, Int Immunopharmacol、査読有、2009、9(3)、366-370.
- ⑦ 熊本俊秀、診断基準の評価と今後検討すべき課題：神経・筋サルコイドーシスの視点から、日サ会誌、査読無、2009、29(1)、81-82.
- ⑧ Obayashi K, Sato K, Shimazaki R, Ishikawa T, Goto K, Ueyama H, Mori T, Ando Y, Kumamoto T, Salivary chromogranin A: useful and quantitative biochemical marker of affective state in patients with amyotrophic lateral

sclerosis, Intern Med、査読有、2008、47(21)、1875-1879.

- ⑨ 熊本俊秀、筋肉サルコイドーシスの臨床と筋の崩壊機構、日サ会誌、査読有、2008、28、23-51.

[学会発表] (計7件)

- ① Kumamoto T, Kimura N, Oniki T, Nomura M, Nakamura K, Abe Y, Hazama Y, Ueyama H: Role of ubiquitin-proteasome proteolysis in muscle fiber destruction in experimental chloroquine-induced myopathy. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases, 2010. 7. 18, Naples.
- ② Aso Y, Sawada K, Masuda T, Hazama Y, Nakamura K, Kimura N, Kumamoto T: Expression of VCP in (muscle fibers of) experimental chloroquine-induced myopathy. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases, 2010. 7. 18, Naples.
- ③ Nakamura K, Kumamoto T, Moriyama M: Induction of GNE in myofibers after muscle injury. 15th International Congress of the World Muscle Society. 2010. 10. 13, Kumamoto.
- ④ 増田曜章、兒玉憲人、新川雄高、迫 祐介、中村憲一郎、木村成志、熊本俊秀：空胞形成ミオパチーの筋崩壊における一酸化窒素合成酵素と酸化ストレスの動態。第50回日本神経学会総会、2009. 5、仙台。
- ⑤ 中村憲一郎、熊本俊秀、守山正胤：正常マウス及びヒト組織における GNE 蛋白質の発現分布。第50回日本神経学会総会、2009. 5、仙台。
- ⑥ 木村成志、野村有希、増田曜章、岡崎敏郎、迫 祐介、花岡拓哉、中村憲一郎、荒川竜樹、熊本俊秀、ALS の脊髄前角運動ニューロンにおける pNF の蓄積および細胞変性へのユビキチン・プロテアゾーム系の関与、第50回日本神経病理学会学術研究会、2009. 6. 4、高松。
- ⑦ 迫 祐介、高柳義和、安部芳武、中村憲一郎、木村成志、熊本俊秀：IGF による rimmed vacuolar myopathy の治療の試み。第48回日本神経学会総会、2008. 5. 17、横浜。

[図書] (計5件)

- ① 熊本俊秀、糖尿病性筋萎縮症の概念・診断・管理、中山書店、糖尿病合併症—鑑別ポイントとベスト管理法(西川武志編)、2011、pp. 119-126.
- ② 熊本俊秀、側頭動脈炎、医学書院、今日の診断指針、第6版(金澤一郎、永井良三編)、2010、pp. 567-570.
- ③ 熊本俊秀、多発筋炎・皮膚筋炎、南江堂、神経疾患最新の治療 2009-2100(小林祥泰、水澤英洋編)、2009、pp. 290-293.
- ④ 熊本俊秀、多発筋炎と皮膚筋炎の治療、中外医学社、EBM 神経疾患の治療 2009-2010(岡本幸一、他編)、2009、pp556-561.
- ⑤ 熊本俊秀、先天性ミオパチー、金芳堂、最新神経病学(荒木淑郎編)、2008、pp522-536.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊本 俊秀 (KUMAMOTO TOSHIHIDE)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：40134936

(2) 研究分担者

木村 成志 (KIMURA NORIYUKI)
大分大学・医学部・講師
研究者番号：30433048

迫 祐介 (HAZAMA YUSUKE)
大分大学・医学部・助教
(H21：辞職)
研究者番号：80448547

岡崎 敏郎 (OKAZAKI TOSHIO)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：00464438

荒川 竜樹 (ARAKAWA RYUKI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：90363548
(H21→H22：研究分担者)

(3) 研究協力者

中村 憲一郎 (NAKAMURA KENICHIRO)
大分大学・医学部・大学院生