

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：37407

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591251

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病態解析と治療法の開発

研究課題名(英文) distal myopathy with abnormal GNE gene

研究代表者

熊本 俊秀 (Kumamoto, Toshihide)

九州看護福祉大学・看護福祉学部・教授

研究者番号：40134936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：変異GNE遺伝子導入細胞及びGNEノックダウン細胞では、rimmed vacuoleの過剰形成はみられず、オートファジー・リソソーム系関連構造物にも形態的变化はなかったが、mTORのリン酸化がみられ、GNEがmTORを介してオートファジー・リソソーム系を調節している可能性が推察された。Rimmed vacuolesの過剰形成にVCP/p97-Nfd1-Npl4複合体も関与するが、IGF-1、サルブリナールは各々mTOR及びeIF2の活性化(リン酸化)によって過剰形成を抑制する。

研究成果の概要(英文)：In mutant GNE gene-transfected cells and GNE-knockdown cells, the excessive formation of rimmed vacuole and the morphological change of an autophagy-lysosome system structures were not observed, but the level of mTOR phosphorylation increased, suggesting that GNE play a certain role in regulation of an autophagy-lysosome system through mTOR. The VCP/p97-Nfd1-Npl4 complex is suspected to participate in the overdevelopment formation of rimmed vacuoles. IGF-1 or salubrinal treatment may suppress the overdevelopment of rimmed vacuoles due to activation (phosphorylation) of mTOR and/or eIF2.

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：神経分子病態学 遠位型ミオパチー 縁取り空胞 GNE オートファジー リソソーム プロテアソーム 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles; DMRV) (Nonaka ら、1981; Kumamoto ら、1982) の発見当時から臨床概念の確立とともに病態解明と治療法の開発を目指して研究を行ってきた。本症の指標である筋線維内の縁取り空胞 (rimmed vacuole) がリソソーム由来のオートファゴソーム/オートリソソームであることを明らかにし、さらにヒト DMRV 筋及びクロロキン投与ラットの脱神経筋にみられる rimmed vacuoles の過剰形成と筋崩壊にオートファジー・リソソーム系列、ユビキチン・プロテアソーム系列が深く関与していることを分子レベルで明らかにしてきた (Kumamoto ら、1993; Masuda ら、2005; Kimura ら、2007; 2009)。DMRV 筋ではシアル酸合成酵素である UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) 遺伝子異常のためシアル酸が減少し、筋障害が起ると推測されている (Malicdan ら、2008)。研究者らは、GNE 遺伝子組換え蛋白を作成し、GNE が筋細胞を含む種々の細胞の細胞質、核に局在し、筋細胞の再生にも関与することを明らかにした (Pathobiology, 2010)。しかし、GNE の機能障害がオートファジー・リソソーム系列やユビキチン・プロテアソーム系列を介した rimmed vacuole の過剰形成や筋崩壊をいかに起こすかは依然不明である。

最近、DMRV と同様に rimmed vacuole を過剰形成する遺伝性封入体筋炎の一部にバロシン含有タンパク質 (VCP/p97) 遺伝子異常があることが報告された (Watts ら、2004)。VCP/p97 は Ufd1, Np14, ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC6) などの分子の作用によりユビキチン・プロテアソーム やオートファジー・リソソーム系列を活性化することが明らかにされている (Ju ら、2010)。これらの活性化には、さらに上流の NF- κ B などの転写因子を含む小胞体ストレスの関与が推定さ

れる。小胞体ストレス-オートファジー系列に関する研究は、最近、注目されつつあるが、筋疾患での十分な検討はない。Rimmed vacuole 過剰形成機序とそれに伴う筋崩壊機構の病態を明らかにし、さらにインスリン様成長因子 (IGF-1)、サルプリナル、ボルテゾミブ、スペラトールなどによる筋の障害抑制効果を検討し、DMRV の治療法の開発研究を推進する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DMRV 患者の筋細胞、その原因遺伝子である変異 GNE 遺伝子導入細胞、GNE ノックダウン細胞、または rimmed vacuole 過剰形成モデルラット筋を用い、rimmed vacuole の過剰形成から萎縮、細胞死に至る変性プロセスを担うオートファジー・リソソーム系列とユビキチン・プロテアソーム系列の亢進につながる VCP/p97 系列及び遺伝子異常に伴う小胞体ストレスにより活性化されるオートファジーシグナルの関与を明らかにし、これらのシステムを制御する IGF-1、サルプリナルなどによる筋の障害抑制効果を検討し、DMRV の病態解明と新しい治療法の開発を行うことにある。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞における変異 GNE の細胞内局在及びリソソームの観察: Quickchange Mutagenesis kit (Stratagene) を用いて日本人患者に多い V572L 変異 GNE 遺伝子を作成してリポフェクション法で C2 細胞 (マウス筋芽細胞由来) に一過性に過剰発現させた。また、V572L+A82V ダブル変異 GNE 遺伝子を作製し、GFP 融合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 NUGC 細胞 (胃癌細胞由来) に一過性に過剰発現させた。トランスフェクション 48 時間後に細胞を固定し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて野生型と変異 GFP 融合 GNE 蛋白質の細胞内局在を観察した。また、野生型及び V572L+A82V 変異 GNE 遺伝子導入細胞における LysoTracker (Cell

Signaling Technology, USA) で標識された酸性細胞内小器官 (リソソーム) 及び siRNA 法で GNE の発現を一過性に抑制した C2 細胞における LysoTracker で標識されたリソソームの動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(2) GNE 発現抑制細胞における哺乳類ラバマイシン標的タンパク質 (mTOR) の活性化: シアル酸合成酵素である GNE 遺伝子の変異が DMRV の原因であることが報告されたが、GNE 遺伝子変異によって DMRV が発症する分子生物学的機序は未だ不明である。Rimmed vacuole は自己貪食胞であり、その形成にオートファジー・ライソソーム系列の関与が示唆されていることから、オートファジー系を抑制的に調節する蛋白質の一つである mTOR に注目し、GNE がその活性化に与える影響を検討した。すなわち 10%牛胎児血清を添加した Dulbecco 変法イーグル培地で培養した C2 細胞に、リポフェクション法を用いて、GNE に対する siRNA (QIAGEN) 及び陰性コントロールの siRNA を導入し、CO₂ インキュベータで培養した。siRNA 導入 72 時間後に細胞を採取し、可溶性蛋白質を精製した。抗リン酸化 mTOR 抗体、抗 mTOR 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体、抗 Akt 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いてウエスタンブロッティングを行い、デンシトメトリーで mTOR のリン酸化の割合を測定した。

(3) 実験的 rimmed vacuole 過剰形成ミオパチー筋における VCP/p97 及び関連蛋白の発現: モデル動物は、既報の通り (Kumamoto ら、1993)、予め一側の坐骨神経を結紮したラット (30 匹) に 50mg/kg/日の塩酸クロロキン (15 匹) または生食水 (15 匹) を 1 日 2 回、連日腹腔内に投与した。投与開始後 4、7、14 日目に両側ヒラメ筋を摘出し、凍結標本作成後、定量的組織学的、組織化学的、免疫組織

化学的検討を行った。免疫組織化学的検討では、VCP/p97 及び関連蛋白 (Np14, p47, エラシン/UBXD2, GRP78/Bip, SVIP, Ufd1, α -チューブリン) の筋線維内局在と動態を観察するとともに陽性線維数を算出した。各抗体は、ウエスタンブロット法で、いずれもラット骨格筋に対して有意なバンドを認めた。また、培養溶液中にクロロキンを添加し、LysoSensor (Life Technologies, USA) を用い、HEK293 細胞のリソソーム内 pH を測定した。

(4) 実験的 rimmed vacuole 過剰形成ミオパチーにおける IGF-1 及びサルプリナールの抑制効果: 研究 (3) と同様に一側の坐骨神経を結紮したラットにクロロキン、または生食水を投与し、同時に半数に IGF-1 (8 mg/kg/日)、残りに生食水を腹腔内に連日 7 日間投与した。各ラットの両側ヒラメ筋を摘出し、定量的組織学的検討 (筋線維断面積、rimmed vacuole 含有筋線維数) とともに抗 mTOR 抗体、抗リン酸化 mTOR 抗体を用いてウエスタンブロット法を行い、リン酸化 mTOR/非リン酸化 mTOR 比を算出し、mTOR のリン酸化を測定した。

また、過去の予備実験からクロロキン投与筋では、eIF2 α のリン酸化及び ATF4 が減少していることが示唆されたことから (未発表データ) eIF2 α の脱リン酸化を選択的に抑制するサルプリナールの影響を検討した。ちなみに細胞にアミノ酸欠乏、小胞体ストレス、ウイルス感染などのストレスが加わると eIF2 α リン酸化酵素が活性化し、eIF2 α のリン酸化が亢進し、ATF4 は増加する。一方、リン酸化 eIF2 α は脱リン酸化酵素によって脱リン酸化されるが、サルプリナールは eIF2 α の脱リン酸化酵素を選択的に阻害することが知られている。前述の方法で作成した実験モデルラットにサルプリナール (1 mg/kg)、また対照としてジメチルスルホキシド (DMSO) を隔日 1 回、腹腔内に投与した。7 日目に左右ヒラメ

筋を摘出後、各実験筋について定量的組学的検討とともにウエスタンブロット法で抗リン酸化 eIF2 α 、eIF2 α 抗体を用い eIF2 のリン酸化を測定した。

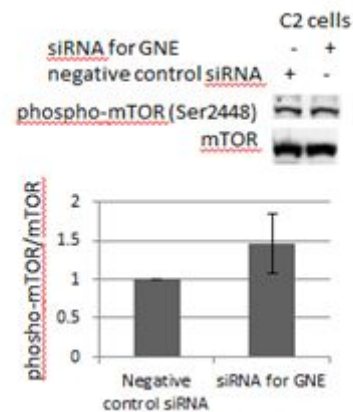
4. 研究成果

(1) 培養細胞における変異 GNE の細胞内局在及びリソソームの観察：野生型 GNE 導入細胞では、GFP 融合 GNE は主として細胞質にびまん性に局在した。GFP 融合 V572L 変異及び V572L+A82V ダブル変異のヒト GNE 遺伝子の細胞内局在は GFP 融合野生型 GNE と同様に細胞質にびまん性に局在した。また、LysoTracker で標識したリソソームは、V572L+A82V 変異 GNE 過剰発現細胞や GNE 発現抑制細胞において局在、数や形態に有意な変化を認めなかった。すなわち野生型及び変異 GNE を一過性に過剰発現させた培養細胞、または GNE の発現を一過性に抑制した細胞においては、内因性 GNE のみの細胞や野生型導入細胞に比べ、リソソームの形態には有意な変化はなかった。DMRV モデルマウスでは 42 週齢になって筋線維内に rimmed vacuole が出現することから、ライソゾーム・オートリソソームの変化を観察するには、長期の変化をみる実験系が必要かもしれない。また、D176V 変異 GNE トランスジェニックマウスの表現型は正常マウスと変わらないことから、内因性の正常 GNE の影響も考えられる (Malicdan ら、2007)。培養細胞での観察は、さらに適切な実験系を構築する必要があると思われる。

(2) GNE 発現抑制細胞における mTOR の活性化：Rimmed vacuole 形成にオートファジー・ライソソーム系の関与が示唆されていることから、GNE 発現抑制細胞におけるオートファジー系を抑制的に調節する蛋白質の一つである mTOR の活性化の変化について検討した。その結果、陰性コントロール siRNA を導入した細胞 (野生型) と比較して、GNE をノックダウンした細胞では、リン酸化 mTOR のリ

ン酸化は 1.46 ± 0.38 倍増加する傾向を示した。Akt のリン酸化は変わらなかった (各々 0.94 倍, 1.17 倍)。C2 細胞において GNE の発現抑制によって mTOR が活性化する可能性が示唆された。一方、GNE による mTOR のリン酸化は Akt 経路を介していない可能性が示唆され、GNE は mTOR を介してオートファジー・リソソーム系を調節している可能性が推察された (図 1)。

図1



(3) 実験的 rimmed vacuole 過剰形成ミオパチー筋における VCP/p97 及び関連蛋白質の発現：クロロキン、または生食水投与ラットの脱神経及び非脱神経筋を用いて検討したが、クロロキン投与ラットの脱神経筋のみで rimmed vacuole の過剰形成を認めた。生食水投与ラットの非脱神経筋 (対照) では、VCP/p97 陽性顆粒は、主に筋線維の細胞質、核や核周辺部に局在した。一方、クロロキン投与ラットの脱神経筋では、VCP/p97 は細胞質で増加したが、核には認められなかった。クロロキン投与ラットの脱神経筋における VCP/p97、Ufd1、Np14 陽性線維数は、対照筋及び他の実験筋に比べ有意に増加した。一方、小胞体ストレスによって活性化される SVIP, erodin/UBXD2、GRP78 蛋白質の増加は認められなかった。また、クロロキン添加後の HRK293 細胞のリソソーム内 pH は非添加細胞に比べ有意に上昇した。以上の結果から、rimmed vacuole を過剰形成するクロロキンミオパチーの筋線維では、筋線維内のリソソ

ム内 pH の異常によりオートファジー・リソソーム分解系列の代謝回転が低下し rimmed vacuole の過剰形成が起こり、さらに小胞体ストレスによらない VCP/p97-Nfd1-Np14 複合体の増加が誘導されることが示唆された。VCP/p97-Nfd1-Np14 複合体は、小胞体関連蛋白のみならず細胞内蛋白分解におけるユビキチン化蛋白のリソソーム・オートファジー分解系、またはプロテアソーム分解系に関与すると思われる。クロロキン投与ラットの脱神経筋では、ユビキチン、プロテアソーム、筋特異ユビキチンリガーゼ (アトロジン-1/MAFbx, MuRF-1) が増加しているが (Kimura ら, 2007)、VCP/p97-Nfd1-Np14 複合体はユビキチン・プロテアソーム系の亢進に関与している可能性が示唆される。

(4) 実験的 rimmed vacuole 過剰形成ミオパチー筋における IGF-1 及びサルプリナールの抑制効果: Rimmed vacuole を過剰に形成するクロロキン投与ラットの脱神経筋では、IGF-1、またはサルプリナール投与により、いずれも各非投与ラット筋に比べ平均筋線維面積に有意差はなかったが、rimmed vacuole を有する線維数は有意に減少した。

mTOR のリン酸化の検討では、リン酸化 mTOR (p-mTOR) と非リン酸化 mTOR (mTOR) 比は、脱神経筋で有意に低下し、IGF-1 投与によりクロロキン投与ラットの脱神経筋で有意に増加した。mTOR のリン酸化はオートファジーを抑制することから、IGF-1 は PI3K, Akt を介して rimmed vacuole の形成を抑制するものと思われた。

一方、eIF2 α のリン酸化は、生食水投与ラットの非脱神経筋 (対照) とクロロキン投与ラットの脱神経筋では、サルプリナール投与により有意に増加した。以上の結果から、本モデル筋において eIF2 α の経路がオートファゴソームやオートリソソームの集合体である rimmed vacuole の形成に関与している可

能性が示唆された。これまで eIF2 α の経路で調節される蛋白質にオートファジーの調節に関連する tribbles homologue 3 や ATG12 などが知られているが、サルプリナールが rimmed vacuole 過剰形成ミオパチーの治療薬となり得るか否かも合わせて、現在、解析中である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

Kimura N, Kumamoto T, Takahashi Y, Brain perfusion SPECT in limbic encephalitis associated with autoantibody against the glutamate receptor epsilon 2, Clin Neurol Neurosurg, 査読有、2014、118、44-48

doi: 10.1016/j.clineuro.2013.12.006.

Mori-Yoshimura M, Monma K, Suzuki N, Aoki M, Kumamoto T, Tanaka K, Tomimitsu H, Nakano S, Sonoo M, Shimizu J, Sugie K, Nakamura H, Oya Y, Hayashi YK, Malicdan MC, Noguchi S, Murata M, Nishino I, Heterozygous UDP-GlcNAc 2-epimerase and N-acetylmannosamine kinase domain mutations in the GNE gene result in a less severe GNE myopathy phenotype compared to homozygous N-acetylmannosamine kinase domain mutations, J Neurol Sci, 査読有、2012、318(1-2)、100-105

DOI:10.1016/j.jns.2012.03.016.

熊本俊秀, サルコイ筋炎, Clin Neurosci, 査読無、2012、30、332-334.

<http://www.chugaiigaku.jp>

熊本俊秀, 竹丸 誠, 姫野隆洋, 慢性ミオパチー型筋サルコイドーシス, 日サ会誌, 査読有、2012、32(1)、33-37.

<http://www.jssog.com/www/journal>

〔学会発表〕(計 7 件)

熊本俊秀、慢性ミオパチー型筋サルコイドーシス、第 31 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会、2011.10.22、名古屋

中村憲一郎、熊本俊秀：GNE ノックダウン細胞における網羅的遺伝子発現解析、第 52 回日本神経学会学術大会、2011.5.18、名古屋

中村憲一郎、熊本俊秀、竹丸 誠、麻生泰弘、培養細胞における変異 GNE の細胞内局在及びライソゾームの観察、第 53 回日本神経学会学術大会、2012.5.24、東京

竹丸 誠、麻生泰弘、中村憲一郎、熊本俊秀、クロロキンミオパチーモデルラットにおける小胞体ストレスの検討、第 53 回日本神経学会学術大会、2012.5.25、東京

中村憲一郎、竹丸 誠、麻生泰弘、木村成志、平野照之、熊本俊秀、GNE 結合蛋白の検索、第 54 回日本神経学会学術大会、2013.5.30、東京

熊本俊秀、竹丸 誠、藪内健一、麻生泰弘、鶴田和仁、早稲田 真、筋サルコイドーシスの臨床病理学的再検討、第 54 回日本神経学会学術大会、2013.6.1、東京

竹丸 誠、麻生泰弘、中村憲一郎、平野照之、熊本俊秀、クロロキンミオパチーモデルラット筋における VCP 関連蛋白質の発現と局在の解析、第 54 回日本神経学会学術大会、2013.6.1、東京

〔図書〕(計 5 件)

熊本俊秀 他、中山書店、糖尿病合併症鑑別ポイントとベスト管理法、2011、119-125

熊本俊秀 他、最新医学社、新しい診断と治療の ABC3 サルコイドーシス、2012、241-248

熊本俊秀 他、中山書店、肉芽腫性皮膚疾患：サルコイドーシス・他の肉芽腫、2012、114-120

熊本俊秀 他、南江堂、免疫性神経疾患ハンドブック、2013、261-270

熊本俊秀 他、中外医学社、筋疾患診療ハンドブック、2013、39-50

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kyushu-ns.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊本 俊秀 (KUMAMOTO, Toshihide)

九州看護福祉大学・看護福祉学部・教授

研究者番号：4 0 1 3 4 9 3 6

(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：3 0 4 3 3 0 4 8

中村 憲一郎 (NAKAMURA kenichiro)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：7 0 6 0 8 3 7 2

増田 曜章 (MASUDA teruaki)

大分大学・医学部・助教

(H23：辞職)

研究者番号：5 0 4 6 4 4 5 9

岡崎 敏郎 (Okazaki toshio)

大分大学・医学部・助教

(H25：辞職)

研究者番号：0 0 4 6 4 3 8