

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591012

研究課題名（和文）封入体筋炎における動的糖鎖付加の研究

研究課題名（英文）Dynamic O-GlcNAc modification in inclusion body myositis

研究代表者

日下 博文（KUSAKA HIROFUMI）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：70250066

研究成果の概要（和文）：人の骨格筋組織において、O-linked- $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) 修飾蛋白は、主に細胞膜と核に存在していることを初めて示した。様々な筋疾患の再生筋線維や萎縮筋線維の細胞質、封入体筋炎と DMRV で空胞を持つ筋線維の細胞質は O-GlcNAc 陽性であった。これらの細胞質での亢進は細胞ストレス反応と推定された。また、封入体筋炎と DMRV の縁どり空胞壁に O-GlcNAc 修飾蛋白強陽性反応がみられ、これについては核膜蛋白由来と推定された。今後 O-GlcNAc 修飾蛋白の解析・同定が必要である。

研究成果の概要（英文）：O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a ubiquitous posttranslational modification of nucleocytoplasmic proteins, which introduces the attachment of N-acetylglucosamine to serine or threonine residues of a protein. Unlike other protein glycosylation, this modification is highly reversible and like phosphorylation, it plays important roles in various cell signaling. Here, we immunolocalized O-GlcNAc-modified proteins in muscle biopsy specimens. In normal muscle fibers, O-GlcNAc was found along plasma membranes and in nuclei. Diffuse and increased cytoplasmic staining of O-GlcNAc was detected in: 1) regenerating muscle fibers in muscular dystrophy, myositis and rhabdomyolysis; 2) a proportion of atrophic fibers in myositis, such as those found in perifascicular regions in dermatomyositis; 3) vacuolated fibers in sporadic inclusion body myositis (s-IBM) and distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV). The increases of O-GlcNAc glycosylation could be associated with the stress response, as these lesions have been shown to be positive for several stress markers. Meanwhile, vacuolar rims in s-IBM and DMRV were sometimes sharply lined by O-GlcNAc-positive deposits, which reflects myonuclear breakdown in the diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脳神経疾患、病理学、ミオパチー、封入体筋炎、核細胞質間輸送

## 1. 研究開始当初の背景

封入体筋炎は炎症性ミオパチーの一種であるが、骨格筋の筋線維内に電顕で管状フィラメント状の封入体を認めることが特徴である。高齢発症の筋疾患では最も多数を占める。多発筋炎、皮膚筋炎と異なり、副腎皮質ステロイドなどの治療に抵抗する。このため、病態解明・治療法の開発が急務とされている。われわれは主に免疫組織学的に封入体筋炎の病理を検討し、以下の知見を得た。(1) 封入体筋炎の筋細胞質には異常なリン酸化蛋白質、リン酸化酵素が発現しており、細胞内シグナル伝達の乱れが示唆される (Nakano et al. Neurology, 1999, Neurology, 2001)。(2) 封入体筋炎の封入体形成は核内蛋白質が正常に核に移行しないことが関係しているのではないかと推定された (Nakano et al. Neurology, 2003)。(3) 細胞質にpoly(A)を持つRNAとその結合蛋白質である poly(A)-binding protein が異常凝集していることを明らかにし、原因として何らかの免疫異常によるmRNAの分解の障害の可能性を指摘した (Nakano et al. Neurology, 2005)。(4) Histone H1が核膜を超えて細胞質に遊離している像、また、封入体筋炎の病理学的特徴である縁取りのある空胞 (rimmed vacuole) を縁取りしている像がえられ、縁取り空胞は核由来と推定された (Nakano et al. Neuromuscul Disord, 2008)。(5) Histone H1が核外に遊離する原因として、電離放射線などによるDNA二本鎖切断がある。封入体筋炎でこの可能性を検討した。DNA二本鎖切断の

マーカーである $\gamma$ -H2AX (histone 2Aのvariantのリン酸化されたもの)が空胞壁のDNA上に認められた。DNA二本鎖切断修復因子も同様に空胞壁のDNA上に認められた ((Nishii et al. Neuromuscul Disord, 2011 [研究業績⑩]) )。

以上のように多岐にわたる異常は、(1)の蛋白質リン酸化が多種の系に影響を与える可能性があり、より上流と考えられる。

本研究の発端は、遺伝性の筋疾患である縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー

(distal myopathy with rimmed vacuole: DMRV)の変異がシアル酸合成の第一段階に関係する酵素UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine-kinase (GNE)であることが明らかにされたことである。このDMRVという疾患の筋病理は、炎症細胞浸潤は認めないが、そのほかの点では、rimmed vacuoleや管状フィラメントを有するなど、封入体筋炎と同じである。また、上記(1)のリン酸化の異常以下、(5)までの結果はDMRVでも同様である。GNE酵素の機能異常が推定されることから研究がなされ、DMRVでは細胞膜上の糖鎖含有蛋白質のシアル酸含有量の低下が認められるという報告がされているが、そのことと上記の(1) - (5)の知見を結び付ける仮説を立てることは困難である。そこでわれわれはGNEと基質を同じくするO-GlcNAc転移酵素(OGT)により触媒される蛋白質O-GlcNAc修飾の研究を始めるに至った。蛋白質のO-GlcNAc付加は、リン酸化同様、動的な反応で、リン酸化とは相互的あるいは拮抗的な作用を

する。たとえば、転写因子・Elf-1 はリン酸化と O-GlcNAc 化が同時に起こることによりはじめて核に移行する。また、核孔蛋白質を介する核内外の輸送は、核孔蛋白質リン酸化、O-GlcNAc 化の状態により調節されている。

以上のような背景により、本研究では蛋白質の O-GlcNAc 付加の封入体筋炎における異常を解析する。

## 2. 研究の目的

封入体筋炎筋細胞における蛋白質の動的糖鎖付加の異常を研究する。具体的には、OGT とその産物である O-GlcNAc 修飾蛋白質について、特異抗体を用いて組織化学的に分布を検討し、封入体筋炎における異常を明らかにする。次に筋ホモゲネートの免疫プロット・免疫沈降により、タンパク質全体あるいは特定の蛋白質の O-GlcNAc 修飾の変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

O-GlcNAc 修飾蛋白質について、特異抗体を用いて組織化学的に封入体筋炎やその他の筋疾患骨格筋で検討する。次に筋ホモゲネートの免疫プロット・免疫沈降により、蛋白質全体あるいは核孔蛋白質など特定の蛋白質の O-GlcNAc 修飾の変化を明らかにする。

## 4. 研究成果

診断目的で得られた 40 症例の生検筋の連続切片を作成し、O-GlcNAc に対する抗体を用いて免疫組織化学法にて評価した。正常対照筋線維では O-GlcNAc 修飾蛋白質は細胞膜と核に認められた。O-GlcNAc は筋ジストロフィー・筋炎・横紋筋融解症における再生筋、筋炎における萎縮筋の一部、封入体筋炎・縁取

り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) の空胞を持つ筋線維において細胞質にび漫性に染色された。神経原性筋萎縮の target formation は O-GlcNAc 陽性であった。封入体筋炎と DMRV では、空胞壁に強い線状の O-GlcNAc 陽性反応がみられ、蛍光染色においてこの O-GlcNAc と核膜蛋白 emerin との重なりを確認した。封入体筋炎と DMRV の縁どり空胞には核の崩壊産物が認められることにより、空胞は核の変性産物であると推定されている。核膜マーカーの emerin と重なってみえた O-GlcNAc 修飾蛋白質については核膜蛋白由来と推定される。

次に、筋ホモゲネートの電気泳動、免疫沈降により、O-GlcNAc 修飾蛋白質を分析した。筋組織における筋ホモゲネートの O-GlcNAc の免疫プロットでは、10 本程度の陽性バンドがみとめられ、疾患によりパターンに差を認めた。核孔蛋白質 nucleoporin p62 に対する抗体あるいはシグナル蛋白 Elk-1 に対する特異抗体を用いた筋ホモゲネートの免疫沈降により、筋組織では Nuc62、Elk-1 はリン酸化を受けていること、および O-GlcNAc 修飾されていることが分かった。また、筋ホモゲネートを細胞質と核分画に分けると核分画中の 75kD の蛋白質が、筋炎組織で強く発現していることをみいだした。核膜成分やシグナル分子のうち、この分子量をとるものをいくつか検討したが、それらの分子に対する特異抗体で生検筋のホモゲネートを免疫沈降した後、抗 O-GlcNAc 抗体を用いて免疫プロットを行ってもバンドは陽性反応を示さず、その候補分子が確かに目的の O-GlcNAc 修飾蛋白質であるという裏づけが今のところ得られていない。今後さらに質量分析法などの方法も加え、検討予定である。

## 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 10件 すべて査読あり)

① Nakamura S, Nakano S, Nishii M, Kaneko S, Kusaka H. Localization of O-GlcNAc-modified proteins in neuromuscular diseases. Medical Molecular Morphology, in press

② Nishii M, Nakano S, Nakamura S, Wate R, Shinde A, Kaneko S, Kusaka H. Myonuclear breakdown in sporadic inclusion body myositis is accompanied by DNA double strand breaks. Neuromuscul Disord. 2011;21:345-52.

③ Nakamura M, Ito H, Nakamura Y, Wate R, Kaneko S, Nakano S, Matsumoto S, Kusaka H. Smad ubiquitination regulatory factor-2 in progressive supranuclear palsy. Neuropathol Appl Neurobiol. 2011;37:307-14.

④ Kinoshita Y, Ito H, Hirano A, Fujita K, Wate R, Nakamura M, Kaneko S, Nakano S, Kusaka H. Nuclear contour irregularity and abnormal transporter protein distribution in anterior horn cells in amyotrophic lateral sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol. 2009;68:1184-92.

⑤ Ohnishi S, Ito H, Suzuki Y, Adachi Y, Wate R, Zhang J, Nakano S, Kusaka H, Ikehara S. Intra-bone marrow-bone marrow transplantation slows disease progression and prolongs survival in G93A mutant SOD1 transgenic mice, an animal model mouse for amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res. 2009;1296:216-24.

⑥ Shinde A, Kunieda T, Kinoshita Y, Wate R, Nakano S, Ito H, Yamada M, Kitamoto

T, Nakamura Y, Matsumoto S, Kusaka H. The first Japanese patient with variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). Neuropathology. 2009;29:713-9.

⑦ Fujita K, Ito H, Nakano S, Kinoshita Y, Wate R, Kusaka H. Immunohistochemical identification of messenger RNA-related proteins in basophilic inclusions of adult-onset atypical motor neuron disease. Acta Neuropathol. 2008;116:439-45.

⑧ Nakamura M, Ito H, Wate R, Nakano S, Hirano A, Kusaka H. Phosphorylated Smad2/3 immunoreactivity in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis and its mouse model. Acta Neuropathol. 2008;115:327-34.

⑨ Shinde A, Nakano S, Sugawara M, Toyoshima I, Ito H, Tanaka K, Kusaka H. Expression of caveolar components in primary desminopathy. Neuromuscul Disord. 2008;18:215-9.

⑩ Nakano S, Shinde A, Fujita K, Ito H, Kusaka H. Histone H1 is released from myonuclei and present in rimmed vacuoles with DNA in inclusion body myositis. Neuromuscul Disord. 2008;18:27-33.

[学会発表] (計 3件)

①中村聖香, 中野智, 日下博文, 他2名: "封入体筋炎組織の空胞における核膜とライソゾーム成分の比較" 第51回日本神経学会総会 (2010.5.20). 東京, 東京国際フォーラム

②中村聖香, 中野智, 日下博文, 他4名: "筋疾患筋組織におけるO-GlcNAc修飾蛋白の分布" 第50回日本神経学会総会. (2009.5.22). 仙台, 仙台国際センター

③西井誠, 中野智, 日下博文, 他 2 名 : “筋炎における DNA 二本鎖切断修復酵素の検討” 第 49 回日本神経学会総会. (2008. 5. 15). 横浜, パシフィコ横浜

[図書] (計 2 件)

①日下博文 全身性疾患に伴う神経疾患  
井村裕夫 編: “わかりやすい内科学(第 3 版)” 文光堂. 837-845 (2008)

②中野智 筋疾患: 筋ジストロフィー症 井村裕夫 編: “わかりやすい内科学(第 3 版)” 文光堂. 817-825 (2008)

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/neurolog/neurolog/gaiyou.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

・ 2008 年度-2009 年度

関西医科大学・医学部・准教授

中野智 (NAKANO SATOSHI)

研究者番号: 30333206

・ 2010 年度

関西医科大学・医学部・教授

日下博文 (KUSAKA HIROFUMI)

研究者番号: 70250066

### (2) 研究分担者

・ 2008 年度-2009 年度

関西医科大学・医学部・教授

日下博文 (KUSAKA HIROFUMI)

研究者番号: 70250066

・ 2008 年度

関西医科大学・医学部・准教授

伊東秀文 (ITO HIDEFUMI)

研究者番号: 20250061

関西医科大学・医学部・助教

新出明代 (SHINDE AKIYO)

研究者番号: 10368235

### (3) 連携研究者

なし