

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390236

研究課題名(和文) 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーにおける筋線維内アミロイド蓄積機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism for formation of protein aggregates in skeletal myofibers with distal myopathy with rimmed vacuoles

研究代表者

野口 悟 (Noguchi, Satoru)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第一部・室長

研究者番号：00370982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)は、筋線維内にタンパク質蓄積と自己貪色空胞が観察される。このタンパク質蓄積が、二次的に骨格筋の機能低下を引き起こすと考えられるが、そのメカニズムは不明である。本研究では、(1) DMRVモデルマウス骨格筋でタンパク質蓄積は、細胞骨格に沿って分布していること、(2) モデルマウス脳では蓄積はないこと、(3)骨格筋特異的オートファジー不全マウスでは、筋萎縮が亢進し、タンパク質の蓄積が見られた、(4)II型糖原病の骨格筋細胞質小体には、筋原線維タンパク質、代謝酵素、ポリユビキチンが蓄積していること、を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) is one of the protein aggregate myopathies in which numerous proteins and autophagic vacuoles were accumulated in the myofibers. The mechanism, in which the accumulation of these proteins secondarily leads to defects of muscle functions, has not been clarified. In this study, we clarified the following four results: (1) distribution of the accumulated proteins along cytoskeleton, especially microtubules in DMRV myofibers; (2) no protein accumulation in brain tissues of DMRV model mice; (3) numerous numbers of protein inclusions in atrophic muscles leading to a remarkable weakness in the mice with skeletal muscle-specific deficiency of autophagy as a model of the related disorder; (4) the accumulation of myofibril-regulating proteins, metabolic enzymes and polyubiquitin proteins in the cytoplasmic bodies formed in skeletal muscles in Pompe disease by proteome analysis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細胞・組織 蛋白質 糖 骨格筋 アミロイド

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 (DMRV) の骨格筋では、筋線維内にアミロイドなどのタンパク質の蓄積と自己貪食空胞の集積からなる、縁取り空胞と呼ばれる特徴的な構造が認められる。DMRV は、シアル酸合成に関わる律速酵素 UDP-GINAc 2-epimerase/ManNAc kinase をコードする *GNE* 遺伝子の変異により、引き起こされる。我々は変異 *GNE* のみを発現するモデルマウス (DMRV モデルマウス) を開発した (Hum Mol Genet 2007; Autophagy 2007)。このマウスは低シアル化を示し、筋力低下を示すとともに、DMRV 患者に見られるすべての症状を再現していた。このマウスの経時的観察から、自己貪食空胞形成に先立ち、筋線維内にベータアミロイド ($A\beta$)、ポリユビキチン、リン酸化タウタンパク質等のタンパク質の蓄積が観察され、それとともに、筋力の著しい低下が始まり、さらに、自己貪食空胞形成によって、筋力、筋サイズはさらに低下することがわかった。(Physiol Genomics 2008)。シアル酸投与により、すべての症状が予防されることから、第一に、シアル酸の低下によりアミロイドの蓄積が引き起こされ、発症すると考えられた (Nature Medicine 2009)。しかしながら、なぜ、シアル酸低下が $A\beta$ などのタンパク質蓄積につながるのかは依然として不明であり、また、このタンパク質蓄積と病態との直接的な関連も解析されていなかった。骨格筋内蓄積タンパク質として、ベータアミロイドの他に、ポリユビキチンや p62 が同定されていたこと、たくさんの自己貪食空胞の蓄積が認められることから、低シアル化によるタンパク質のミスフォールディングによる異常タンパク質蓄積と共に、細胞内の分解系 (プロテアソームおよびリソソーム) の低下などが考えられたが、結論には至っていない。一方、DMRV 骨格筋のタンパク質蓄積には、タンパク質蓄積を示す他の疾患といくつかの共通点が知られてきている。蓄積しているタンパク質の性質や細胞内分布、蓄積の結果、筋線維が示す病態などに共通点が多い。このため、他の疾患やモデル動物でのタンパク質蓄積を解析し、その共通点を探ることで、DMRV 骨格筋でのタンパク質蓄積の解析にも応用しようと試みた。

2. 研究の目的

DMRV および類縁疾患またはそのモデルマウスの骨格筋線維内で、タンパク質の蓄積がどのように起こるのか、また、骨格筋特異的な現象なのか、さらに、どのようなメカニズムで、二次的に骨格筋の機能低下、筋萎縮、筋線維変性を引き起こすのかを解析することを目的とした。本研究では、(1) DMRV でのアミロイド蓄積の機序とその下流現象の解明、(2) DMRV マウス脳におけるタンパク質の蓄積の解析、(3) 類縁疾患モデルマウスの骨格筋の生理学特性とタンパク質蓄積の解析、(4) 筋線維内でのタンパク質蓄積という共通点の多い II 型糖原病 (Pompe 病) について、骨格筋内に蓄積したタンパク質の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) DMRV でのアミロイド蓄積の機序とその下流現象の解明

DMRV モデルマウス (*GNE*^{-/-}·hGNETg) は、*GNE*-KO マウスと変異 *GNE* トランスジェニックマウスとの掛け合わせにより作製した。マウスは自由飲水、自由食餌摂取、12 時間の明暗環境で飼育した。

マウス骨格筋 (腓腹筋および前頸骨筋) はサンプリングした後、新鮮凍結し、凍結保存した。筋病理のため、凍結切片を作製した。また、マウス腓腹筋単線維の単離は、Rabener の方法に従って行った。透過型電子顕微鏡観察は定法に従って行った。

DMRV マウスの骨格筋の病理、免疫組織染色は、定法に基づいて行った。抗 P62 タンパク質抗体、抗ポリユビキチン抗体、抗デスミン抗体、抗 チュブリン抗体、抗 P62 タンパク質 Ser403 リン酸化抗体および抗 P62 タンパク質 Ser351 リン酸化抗体、HSP90 抗体、抗真核生物翻訳開始因子 2 (eIF2) Ser52 リン酸化抗体を用いた。二次抗体として対応する動物種 IgG に対する蛍光標識抗体、Q-dot 標識抗体を用いた。

(2) DMRV マウス脳におけるタンパク質の蓄積の解析

App Swedish 変異 Tg2576 マウスは、Taconic から購入した。40 週齢 DMRV モデルおよび Tg2576 マウスから、脳および脊髄を単離し、10%ホルマリンにて浸漬固定した。パラフィン封埋後、抗体染色に供した。

(3) 類縁疾患モデルマウスの骨格筋の生理学特性とタンパク質蓄積の解析

骨格筋特異的オートファジー欠損マウスは、*Atg7*flox マウスと *MucresA* Tg マウスを掛け合わせることで作製した。*Atg7*flox マウスは東

京都臨床研、MucresA Tg マウスは University of Otago の Dr. Koishi によって作製されたものを、理化学研究所バイオリソースセンターから譲り受けた。

In vitro での単離骨格筋の収縮力テストは、腓腹筋および前頸骨筋を腱から骨まで完全な状態で単離し、両端に糸を結びつけ、トランスデューサーと連結させた。生理検査溶液中で、最大単収縮長での単収縮力 (3ms) と 10-200Hz (300ms) での強縮力を測定した。骨格筋特異的オートファジー欠損マウスの骨格筋病理、免疫組織染色は、上記方法にもとづいて行った。

(4) II 型糖原病 (Pompe 病) 骨格筋内に蓄積したタンパク質のプロテオーム解析

ヒト Pompe 病骨格筋は、遺伝子解析の結果を含む情報を登録することについてのインフォームド・コンセントを同意書として得て行った。凍結切片を作製し、スライドガラス上で、Gomori トリクローム染色した。封入体をレーザーマイクロダイセクションにより切り出し、可溶化、トリプシン分解後、ショットガンシーケンスに供した。封入体を含む領域と含まない領域を解析し、得られたペプチドフラグメント数を比較して、封入体由来のタンパク質成分と考えた。

4. 研究成果

(1) DMRV でのアミロイド蓄積の機序とその下流現象の解明

高齢 (78 週齢) DMRV マウスの腓腹筋の蓄積タンパク質には、従来知られていたベータアミロイド、P62, ユビキチンタンパク質の他に、HSP90, リン酸化 eIF2 が局在していた。また、リン酸化 P62 抗体は、非特異的染色も低く、筋線維内のタンパク質蓄積物を染色した。このベータアミロイド、P62, ユビキチンタンパク質の他に、HSP90, リン酸化 eIF2 が蓄積していた。このことは、以下の二つのことを示唆していると考えられる。蓄積タンパク質が、コンフォメーション変化を来し、分解系へのクライアントタンパク質となっている可能性があること、その結果として、罹患筋において、タンパク質の翻訳活性が低下していることである。これらの結果は、DMRV 筋においても、筋線維内に蓄積したタンパク質に対して、細胞内応答が起こっていることを表しており、高齢マウスでは、タンパク質の蓄積が筋萎縮を引き起こす因子の一つであると考えられる。

DMRV マウスから調製した単線維の観察では、

蓄積タンパク質は自家蛍光を示し、微小管に沿って、存在していた。さらにこの領域の電子顕微鏡観察像では、無定型のタンパク質封入体を取り巻く、多数の自己貪食空胞および Multi-lamellar body の形成が見られた。また、それらは筋線維の中心部付近に存在したが、隣接する筋原線維の乱れなどは観察されなかった。このタンパク質蓄積物とそれを取り囲む自己貪食空胞の集合、さらに隣接した筋原線維が完全であり、破壊されていないという所見は、封入体筋炎や Pompe 病といった筋線維内にタンパク質の蓄積が二次的に起こっていると予測される疾患において、観察されているものである。重要なことは、このような疾患では、タンパク質の蓄積を予防することが出来れば、筋原線維自体は破壊されていないため、骨格筋の機能を取り戻せるであろうと考えられる。

細胞膜および膜小器官に対する染色を Q-dot 標識抗体を用いて行ったが、電子顕微鏡下の観察では、Q-dot 近傍の膜構造は破壊されており、観察に耐えなかった。

(2) DMRV マウス脳におけるタンパク質の蓄積の解析

30 匹以上の DMRV マウス脳の病理を観察したが、異常な所見は特に観察されなかった。同様に DMRV マウス中枢神経系でのベータアミロイドに対する免疫組織染色では、アミロイドの沈着を示す所見は全く得られなかった。同マウスにおいては、骨格筋でのアミロイド蓄積がすべてのマウスにおいて確認されている。アルツハイマーモデルの Tg2576 マウスの大脳皮質において、プラーク様のアミロイドの沈着が観察された。

DMRV は低シアル酸が原因で発症することが示されている。面白いことに、DMRV マウス脳においては、シアル酸レベルはほぼ正常に保たれていることを見いだしている。このことは脳組織には外来性のシアル酸の取り込み機構が存在する可能性を示唆している。また、このことに関連して、通常リソソーム膜に存在する、リソソームから細胞質への遊離シアル酸トランスポーターである sialin 分子が、神経細胞では細胞膜に局在する可能性が報告されている。一方、DMRV 骨格筋でのアミロイド蓄積のメカニズムとして、シアル酸の低下による、アミロイド分解酵素である Nepilysin の活性低下と膜での不安定化が提案されている。確かに、DMRV 骨格筋へのシアル酸補充により、Nepilysin の安定的発現と活性化が見いだされている。脳組織における、強いシアル酸取り込みは、Nepilysin の低シアル化を防ぎ、活性化を維持することで、アミロイドタンパ

ク質の代謝を維持しているものと考えられた。

(3) 骨格筋特異的オートファジー欠損マウスの骨格筋の生理学特性とタンパク質蓄積の解析

骨格筋特異的オートファジー欠損マウスの骨格筋の特性付けを行った。40週齢マウスの腓腹筋および前頸骨筋の単収縮力および強縮力は、DMRV マウスと同程度に低下しており、また、単位断面積あたりの比収縮力においても、両者はほぼ同様の値を示した。予備的解析において、骨格筋特異的オートファジー欠損マウスは、8-9ヶ月齢において拡張型心筋症の症状を呈し、突然死した。つまり、骨格筋特異的オートファジー欠損マウスでは、主に心筋症状により、重篤な症状が引き起こされると考えられていたが、今回の解析により、心筋ばかりでなく、骨格筋にも機能的に重度の症状が認められると考えている。しかしながら、この40週齢における骨格筋特異的オートファジー欠損マウスの筋力はDMRV マウスと同様であったが、この週齢においては、DMRV マウスでは、まだ、すべての骨格筋症状が出そっていないため、中間的な筋症状を示すことを報告しており、骨格筋特異的オートファジー欠損マウスのほうが、最終的な骨格筋症状は軽いものと思われる。

骨格筋特異的オートファジー欠損マウスの筋病理像は非常に興味深いものであった。骨格筋線維にたくさんのp62タンパク質の蓄積物が認められ、同時にポリユビキチンタンパク質の蓄積も観察されたが、筋線維へのタンパク質の蓄積の観点からは、DMRV マウスと比較にならない程、多数の筋線維において、p62タンパク質の蓄積が認められた。また、筋萎縮についても、DMRV マウスよりも激しい所見が認められた。

(4) II型糖原病(Pompe病)の骨格筋内に蓄積したタンパク質のプロテオーム解析

II型糖原病(Pompe病)では、グルコシダーゼ遺伝子の変異により、骨格筋リソソーム内にグリコーゲンが蓄積し、自己食空胞が蓄積し、二次的に細胞質にポリユビキチンタンパク質が蓄積する。我々は、Pompe病の骨格筋に、電子密度の高い楕円型の細胞内小体を見いだした。本研究では、この細胞内小体を構成するタンパク質の同定を試みた。レーザーマイクロダイセクションと、ショットガン質量分析により、細胞内小体とそれ以外の部位でのデファレンシャルディスプレイにより、細胞内小体に強く、蓄積しているタンパク質の同定を試みた。その結果、細胞内小体には、titin, filaminC, desmin, neburin, myomesin, troponin-T,

myosin binding protein C, myozenin-1, myomesin, myotilinなどの筋原線維の修飾タンパク質が有意に蓄積していることがわかった。また、解糖系及びミトコンドリアに存在する代謝酵素が多く含まれていた。さらに、ユビキチンや熱ショックタンパク質などが多く含まれていた。これらの結果は、リソソームの活性低下に伴う、二次的なタンパク質の細胞質蓄積には、ポリユビキチン修飾によるタンパク質分解シグナルが働いていること、また、タンパク質のミスフォールディング反応が起きていること、筋原線維の調節タンパク質と骨格筋に豊富な代謝酵素タンパク質が、細胞内小体の形成に関与すると考えられた。以上の結果から、タンパク質のturn-overが、細胞内小体の形成に関与することを示しているものと考えられた。

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 12件)

著者名: Malicdan MC, Noguchi S, Tokutomi T, Goto YI, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I.

論文課題: Peracetylated N-acetylmannosamine, a synthetic sugar molecule, effectively rescues muscle phenotype and biochemical defects in a mouse model of sialic acid deficient myopathy.

雑誌名: J Biol Chem.

査読: 有

巻: 287

発行年: 2012

頁: 2689-2705

DOI: [10.1074/jbc.M111.297051](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.297051)

著者名: Momma K, Noguchi S, Malicdan MC, Hayashi YK, Minami N, Kamakura K, Nonaka I, Nishino I.

論文課題: Rimmed vacuoles in Becker muscular dystrophy have similar features with inclusion myopathies.

雑誌名: PLoS One.

査読: 有

巻: 7

発行年: 2012

頁: e52002

DOI: [10.1371/journal.pone.0052002](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052002)

著者名: Cho A, Hayashi YK, Momma K, Oya Y,

Noguchi S, Nonaka I, Nishino I.
論文課題: Mutation profile of the GNE gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy).
雑誌名: J Neurol Neurosurg Psychiatry.
査読: 有
巻: 85
発行年: 2014
頁: 914-917
DOI: [10.1136/jnnp-2013-305587](https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-305587)

著者名: Anada RP, Wong KT, Malicdan MC, Goh KJ, Hayashi YK, Nishino I, Noguchi S.
論文課題: Absence of beta-amyloid deposition in the central nervous system of a transgenic mouse model of distal myopathy with rimmed vacuoles.
雑誌名: Amyloid.
査読: 有
巻: 21
発行年: 2014
頁: 138-139
DOI: [10.3109/13506129.2014.889675](https://doi.org/10.3109/13506129.2014.889675).

著者名: Yonekawa T, Malicdan MC, Cho A, Hayashi YK, Nonaka I, Mine T, Yamamoto T, Nishino I, Noguchi S.
論文課題: Sialylactose ameliorates myopathic phenotypes in symptomatic GNE myopathy model mice.
雑誌名: Brain
査読: 無
巻: 137
発行年: 2014
頁: 2670-2679
DOI: [10.1093/brain/awu210](https://doi.org/10.1093/brain/awu210)

〔学会発表〕(計 17件)

発表者名: 野口 悟, 他
発表課題: GNE ミオパチーの発症機序と治療戦略
学会名: 第 35 回日本分子生物学会年会 (招待講演)
発表年月日: 2012年12月11日 ~ 2012年12月14日
発表場所: 福岡、福岡国際会議場

発表者名: Noguchi S.
発表課題: GNE myopathy - Inclusion body myopathy (IBM2).
学会名: EUROPEAN NEURO MUSCULAR CENTRE (ENMC) WORKSHOP (招待講演)
発表年月日: 2013年11月01日 ~ 2013年11月03日
発表場所: The Netherlands (NH Jan Tabak Hotel)

発表者名: Uruha A, et al.
発表課題: High prevalence of hepatitis C virus infection in a Japanese inclusion body myositis cohort.
学会名: 18th International Congress of the World Muscle Society
発表年月日: 2013年10月01日 ~ 2013年10月05日
発表場所: USA (Asilomar Conference Grounds)

発表者名: Cho A, et al.
発表課題: Antioxidant capacity is impaired in hyposialylated myotubes of GNE myopathy.
発表年月日: 2013年10月01日 ~ 2013年10月05日
発表場所: USA (Asilomar Conference Grounds)

発表者名: Noguchi S.
発表課題: Sialylactose trial on GNE myopathy mouse model.
学会名: GNE myopathy Consortium Workshop, (招待講演)
発表年月日: 2014年10月12日
発表場所: Berlin, Germany (BEUTH HOCHSCHULE FUR TECHNIK BERLIN University of Applied Sciences)

〔図書〕(計 3件)

著者名: 野口悟, Malicdan MC, 西野一三
出版社名: 中山書店
書名: 疾患モデルマウス表現型解析指南
発行年: 2011
総ページ数: 477

著者名: Malicdan MC, Noguchi S, Nishino I
出版社名: Wiley-Blackwell
書名: Muscle aging, inclusion-body myositis and myopathies
発行年: 2012
総ページ数: 250

著者名: Cho A, Noguchi S.
出版社名: InTech
書名: Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death? (Ed. Yannick Bailly)
発行年: 2013
総ページ数: 522

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野口 悟 (NOGUCHI, Satoru)

研究機関：独立行政法人国立精神・神経医療
研究センター

部局：神経研究所 疾病研究第一部

職名：室長

研究者番号：00370982

(2)研究分担者

西村 洋昭 (NISHIMURA, Hiroaki)(H26)

研究機関：独立行政法人国立精神・神経医療
研究センター

部局：神経研究所 疾病研究第一部

職名：流動研究員

研究者番号：10399909

漆葉 章典 (URUHA, Akinori)(H24.25)

研究機関：独立行政法人国立精神・神経医療
研究センター

部局：トランスレーショナルメディカルセン
ター臨床開発部

職名：流動研究員

研究者番号：70635078