

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461541

研究課題名(和文) ポンペ病のエキソソーム機能の解明とmiRNA発現解析によるバイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Elucidation of function of exosomes and identification of biomarkers by miRNA expression analysis in Pompe disease

研究代表者

福田 冬季子 (Fukuda, Tokiko)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10458268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Pompe 病に対する更なる治療介入方法を模索するために、Pompe 病骨格筋におけるマイクロRNA解析を行った。3D-GENE Scanner 3000による網羅的解析では、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。Duchenne型筋ジストロフィーで報告されている発現とは異なるprofileであった。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の発現の低下が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to explore new therapeutic methods for Pompe disease, microRNA expression profile was analyzed in Pompe skeletal muscles. microRNAs expression analysis by using 3D-GENE Scanner 3000 revealed expression of miR-499a-5p, miR-206, miR-208b-3p decreased to approximately 40% in the Pompe disease skeletal muscle. This microRNAs expression profile was different from the expression which reported in Duchenne muscular dystrophy muscles. As to the expression of microRNA regarding as participating in controlling autophagy, The reduction of the expression of miR-30a-3p which restrained expression of BECN1 was suggested.

研究分野：小児科学

キーワード：ポンペ病 マイクロRNA

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するが、ミオパチー(筋症)や心筋症を主症状とする。

発症率は 1 人/40,000 人と希少疾病であるが、筋型糖原病の中では最も頻度が高い。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発され、Pompe 病は treatable myopathy となった。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ず、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、重大な課題の一つである。我々は、Pompe 病骨格筋に過剰に autophagy が蓄積することと、autophagy の機能不全の存在を報告した (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 の骨格筋への蓄積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以下の 3 つの研究が報告された。lysosome と autophagosome の biogenesis を制御する転写補助因子 PGC-1 のモデルマウスへの遺伝子導入では、lysosome と autophagosome の数の増加が見られたが、酵素補充療法前および後において glycogen の蓄積が増加し、治療効果の改善は得られなかった (Takikita S, PLoS One, 2010)。autophagosome の生成に不可欠な ATG7 発現抑制では、リソゾーム内のグリコーゲンの蓄積は改善したが、ユビキチン化されたタンパクのリソゾーム内への過剰な蓄積を認めた (Raben N, Autophagy 2010)。E-box 塩基配列に結合する転写因子 TFEB の過剰発現により、exocytosis が促進し、Pompe 病ヒト線維芽細胞でのグリコーゲンを減少させた (Medina DL Dev Cell, 2011)。

exocytosis による分泌と lysosome-autophagy による分解の関連が次第に明らかにされてきている。exocytosis では細胞内部で作られた exosome が細胞外環境へと放出される。神経変性疾患では exocytosis が蓄積物質の排除を促進する一方で、プリオン病では異常タンパクの伝播に参与すると報告されている (Schneider A,

2012)。Pompe 病において exosome 機能の障害が存在する可能性や、exosome の機能が病態に参与している可能性があるが、それらについての研究報告はない。

また、exosome から分泌される microRNA は悪性腫瘍や炎症反応などにおいて重要な役割を担っている。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 の発現に特徴的な変化がある可能性がある。病態解明の視点においてもまた、biomarker 探索の意味においても microRNA の発現解析の重要性が認識されている。Pompe 病では、尿中 glucose tetrasaccharide (Glc4) がグリコーゲンの蓄積を反映するため、biomarker として一定の評価を得ているが、グリコーゲン蓄積の分布を検出できないことや debranching 欠損症などの他の糖原病でも高値を示すなどの弱点があり、新たな biomarker の探索が求められている。

2. 研究の目的

Pompe 病の病態と治療効果における autophagy の機能不全の関与が考えられるため、autophagy への介入として、autophagosome による exocytosis への介入の可能性を探索する。exosome から分泌される microRNA は、内因性の silencer として働き、腫瘍の抑制や増殖を制御していることが知られている。また神経変性疾患においても特定の microRNA の発現が増減していることが知られている。Pompe 病の microRNA の発現の特徴を解明し、病態の解明や新たな治療の開発に貢献することを目的とする。また、microRNA の biomarker の検出により、Pompe 病患者の治療のモニタリングや、遅発型での治療開始時期の決定に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象: 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。この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、骨格筋の GAA 酵素活性測定を、人工基質 4-Methylumbelliferon (4MU) を用いた。

(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。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 時間で 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 Humam 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

(1) 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) 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、低料を認めたものは 19 種類であった。

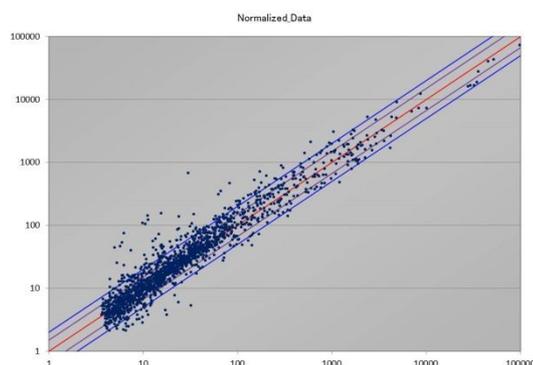
骨格筋特異的 miRNA (myomiRNA) に注目した解析では、Pompe 病骨格筋においては、miR-499a-5p、miR-206、miR-208b-3p の発現が約 40% に低下していた ($p < 0.05$)。miR-206 の発現が著しく亢進することが判明している Duchenne 型筋ジストロフィーとは異なる profile であった。miR-206 は、骨格筋の再生を促進すると考えられており、いわゆる dystrophic change が見られない Pompe 病では miR-206 の発現の更新は見られなかった。

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

autophagy に関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、autophagy/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 ($p = 0.04$)。

TFEB の過剰発現により、autophagy/lysosomal pathway の機能が改善する可能性が考えられるため、Pompe 病において microRNA-128 をターゲットにした治療の可能性が示される結果であった。



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 9 件)

- 1) Matsuoka T, Miwa Y, Tajika M, Sawada M, Fujimaki K, Soga T, Tomita H, Uemura S, Nishino I, Fukuda T, Sugie H, Kosuga M, Okuyama T, Umeda Y. Divergent clinical outcomes of alpha-glucosidase enzyme replacement therapy in two siblings with infantile-onset Pompe disease treated in the symptomatic or pre-symptomatic state. Mol Genet Metab Rep. 18; 98-105, 2016
- 2) Natsume J, Hamano SI, Iyoda K, Kanemura H, Kubota M, Mimaki M, Niiijima S, Tanabe T, Yoshinaga H, Kojimahara N, Komaki H, Sugai K, Fukuda T, Maegaki Y, Sugie H. New guidelines for management of febrile seizures in Japan. Brain Dev. 39:2-9, 2017
- 3) Ishigaki H, Hiraide T, Miyagi Y, Hayashi T, Matsubayashi T, Shimoda A, Kusunoki S, Fukuda T. Childhood-Onset Multifocal Motor Neuropathy With Immunoglobulin M Antibodies to Gangliosides GM1 and GM2: A Case Report and Review of the Literature. Pediatr Neurol. 62:51-72, 2016
- 4) 平野 恵子, 福田 冬季子 頭部 MRI arterial spin labeling (ASL) 画像で脳血流分布の異常を認めた有熱時けいれん重積の 3 例 脳と発達 48 213-217, 2016.
- 5) 平出 拓也, 松林 朋子, 石垣 英俊, 朝比奈 美輝, 坂口 公祥, 福田 冬季子 血管攣縮と血流低下が病態に関与し再燃した小児白血病に発症した posterior reversible encephalopathy syndrome の 1 例 脳と発達 47: 449-453, 2015.
- 6) Asahina M, Endoh Y, Matsubayashi T, Fukuda T, Ogata T. Novel RAB3GAP1 compound heterozygous mutations in

- Japanese siblings with Warburg Micro syndrome. Brain Dev. 38:337-40, 2016
- 7) 福田 冬季子 見逃してはならない治療法のある、あるいは今後期待できる小児神経疾患 診断と治療の最前線 Pompe 病の治療と autophagy 脳と発達 47: 122-124, 2015.
 - 8) 福田 冬季子, 杉江 秀夫 ポンペ病の酵素補充療法 長期的な治療効果と課題. Brain Nerve. 67:1091-8, 2015
 - 9) Shioya A, Takuma H, Yamaguchi S, Ishii A, Hiroki M, Fukuda T, Sugie H, Shigematsu Y, Tamaoka A. Amelioration of acylcarnitine profile using bezafibrate and riboflavin in a case of adult-onset glutaric acidemia type 2 with novel mutations of the electron transfer flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. J Neurol Sci. 15;346:350-2, 2014

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) 福田冬季子 乳児型・遅発型ポンペ病の確定診断例における診断のきっかけと特徴的症候 第 9 回日本ポンペ病研究会 2014
- 2) 福田 冬季子, 松林 朋子, 杉江 秀夫 筋型および肝型糖原病の診断支援の現状 日本小児科学会 日本小児科学会雑誌 121 :309, 2017.
- 3) 志村 優, 前田 朋子, 税所 純也, 鈴木 慎二, 西亦 繁雄, 笹井 英雄, 福田 冬季子, 杉江 秀夫, 深尾 敏幸, 河島 尚志 ケトン性低血糖症における PHKA2 G991A の意義 新生児期より繰り返すケトン性低血糖症の 2 男児例 日本先天代謝異常学会雑誌, 2016
- 4) 笹井 英雄, 大塚 博樹, 志村 優, 小林 弘典, 坂本 修, 但馬 剛, 沼倉 周彦, 福田 冬季子, 杉江 秀夫, 深尾 敏幸 ケトン性低血糖症における PHKA2G991A の意義 Overview 日本先天代謝異常学会雑誌, 32,147, 2016.)
- 5) 福田 冬季子, 大竹 明, 荻原 康子, 中富 明子, 濱田 悠介, 熊田 知浩, 藤井 達哉, 酒井 規夫, 深尾 敏幸, 杉江 秀夫 糖原病 III 型の心筋および骨格筋症状に対する治療法の検討 本先天代謝異常学会雑誌 32 147, 2016.
- 6) 小貫 孝則, 田屋 光将, 佐藤 大祐, 川島 英志, 松井 亨, 阿部 裕樹, 上原 由美子, 渡辺 徹, 阿部 時也, 佐藤 誠一, 杉江 秀夫, 福田 冬季子 肝機能障害、腹部膨満を主訴に診断に至った糖原病 IX 型の 1 例 日本小児科学会雑誌 120 号 1113-1114, 2016.
- 7) 坂中 亜衣, 高島 美和, 深山 侑祐, 廣佐古 裕子, 本郷 涼子, 花田 浩和, 中富 明子, 伊達木 澄人, 本村 秀樹, 松本 正, 森内 浩幸, 福田 冬季子, 杉江 秀夫, 世

- 羅 至子心筋症を合併した糖原病 3a 型患児において高たんぱく質・ケトン食が有効であった 1 症例 日本病態栄養学会誌 19 巻 Suppl. S-120, 2015
- 8) 石垣 景子, 小林 博司, 杉江 秀夫, 福田 冬季子, 成田 綾, 衛藤 薫, 永田 智, 大澤 真木子, 衛藤 義勝, 桒中 征哉 本邦の Pompe 病患者における骨格筋画像の特徴 脳と発達 47 巻 Suppl. S237, 2015.
 - 9) 小須賀 基通), 熊谷 淳之, 田鹿 牧子, 三輪 善之, 藤巻 孝一郎, 上村 茂, 福田 冬季子, 杉江 秀夫, 梅田 陽 乳児型ポンペ病に対する酵素補充療法 早期治療の重要性 日本先天代謝異常学会雑誌 30 180, 2014.
 - 10) 杉江 秀夫, 杉江 陽子, 福田 冬季子, 武関 美香 簡易血糖検査器を用いたベッドサイドでの Pompe 病スクリーニング脳と発達 46 Suppl. S409, 2014.

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 杉江秀夫, 福田冬季子 他、診断と治療社、代謝性ミオパチー 糖原病 II 型 2014、48

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 冬季子 (FUKUDA, Tokiko)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10458268

(2) 連携研究者

杉江 秀夫 (SUGIE, Hideo)
常葉大学・保健医療学部・教授
研究者番号: 60119980

(3) 研究協力者

松林 朋子 (MATSUBAYASHI, Tomoko)