

20000450

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明と
治療法の開発に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清水 輝夫

平成13(2001)年 3月

目次

I. 総括研究報告書

福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明と 治療法の開発に関する研究 清水 輝夫	1
---	---

II. 分担研究報告

1. 福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明と 治療法の開発に関する研究 戸田 達史	7
2. 福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明と 治療法の開発に関する研究 砂田 芳秀	9
3. 福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明と 治療法の開発に関する研究 松村 喜一郎	11
4. 福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明と 治療法の開発に関する研究 武田 聖	14

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発に関する研究

主任研究者 清水輝夫 帝京大学医学部 神経内科教授

研究要旨：脳・眼・骨格筋に障害をきたす福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）の原因遺伝子が第9染色体上に同定され、その遺伝子異常と表現型重症度との関係、その遺伝子産物フクチンの推定構造（461 アミノ酸、推定分子量 53.7kDa）が明らかにされ、N末端に分泌シグナルがある他は既知のモチーフやドメインがないことから筋細胞・神経細胞からの新規の分泌蛋白で細胞外基底層で何らかの生理機能を果たすとの推論が出されている段階で、当研究をスタートさせた。その初年度（平成12年度）は、①フクチン分子の生理機能の解明、②フクチン分子に直接機能連関する物質（p180 他）の機能解明、③FCMD の蛋白分子病態の解明、④FCMD 治療法の開発のためのモデル動物の確立、を主要目的とした。その結果、抗フクチン抗体が依然として確立できない中で、以下のような研究が行われている。(1)酵母・細菌などの細胞表面の糖鎖修飾酵素がフクチンファミリーであることから、フクチンのマンノースリン酸転移活性を調べたが活性は検出できなかった。しかし、FCMD 患者および正常コントロールのリンパ球の膜蛋白の糖鎖修飾状況をみたところ、FCMD で高分子量領域に糖鎖修飾が低下している分子がみつき、同分子の同定と他組織での病態の検討を開始した。(2)フクチン結合蛋白として細胞外基底膜蛋白 type IV collagen、fibronectin、merocin を含む laminin 3 種について検討したが、結合するものはない。(3)筋基底層からの抽出成分に対する抗体を検討する中で、M1 抗体は筋細胞膜に存在する分子量 180kDa 蛋白（p180）を認識するが、FCMD 患者の生検筋では p180 が選択的に欠損／著減していた。この現象は他の神経・筋疾患には観察されず、従って p180 はフクチンと何らかの機能連関する蛋白と推定される。(4)p180 は Ca 依存性の筋細胞外基底層蛋白であり、筋のみでなく神経系にも存在し、末梢神経髄鞘の最外層（基底膜）に局在し、Schwann 細胞から分泌される。中枢神経系・眼についてさらに検討を始めた。(5)他の筋ジストロフィー発症機序の検討から、細胞接着因子 α/β dystroglycan の破綻（DMD、BMD）や dystroglycan に直接連関する分子の破綻（sarcoglycanopathy、laminin 欠損症、Bethlem myopathy、caveolin 3 欠損）が筋細胞死の最も重要で重篤な機序であることが判明してきており、FCMD における α/β dystroglycan の病態の解明を開始した。現在までに、matrix metalloproteinase による β dystroglycan 43kDa \rightarrow N 端 13kDa+C 端 30kDa の分解経路が判明し、ガン細胞の転移過程・sarcoglycanopathy の筋細胞死過程に重要な役割を果たしていることが判明した。さらに FCMD での筋変性・脳奇形への関与の検討を開始した。(6)治療法開発のため FCMD モデルマウスの確立をおこなっている。フクチン遺伝子欠損マウスは胚致死で、胎生 8.5 日以前に死亡する。この胚は体軸の折れ曲がりや外一内胚葉の境不鮮明などの発生異常を呈するが、Reichert 膜・外一中胚葉間の基底層の collagen 染色には異常なく、フクチンは基底膜の形成・維持に必須の蛋白ではないことを示した。欠損マウスは FCMD モデルとはならず、別手法の開発が必要となった。(7)ヒト変異型エクソン置

換マウスの作成。マウス第 10 エクソン近傍に loxP 配列を knock-in した ES 細胞 6 株を単離でき、ヒト変異型エクソン置換マウス作成の第 1 段階が終了できた。(8)さらに、フクチンヘテロ欠損 ES 細胞株を再ターゲティングしホモ欠損 ES 細胞 2 株が樹立できた。(9)この 2 種の ES 細胞株は in vitro 分化系での解析に有用で、さらにキメラマウス作成の有力候補である。現在解析を進めている。

A. 研究目的

FCMD の原因遺伝子の解明から、その遺伝子産物フクチンの機能とその分子病態の解析、治療法開発が当研究の目標である。初年度(平成 12 年度)は、①フクチン分子の生理機能の解明、②フクチン分子に直接機能連関する物質の機能解明、③FCMD の蛋白分子病態の解明、④FCMD 治療法の開発のためのモデル動物の確立を目的とした。

B. 研究方法・結果

①フクチン分子の生理機能の解明：

- a. 抗フクチン抗体の確立は急務であるが、合成ペプチド、fusion protein からの抗血清、単クローン抗体は依然成功していない。
- b. 1999 年に酵母 *S.cerevisiae*、線虫およびいくつか種の細菌の細胞表面の糖鎖修飾酵素と相同性のあるドメイン G [TS] hhGhxxxxhxxaxxDxD が見い出され、フクチンファミリーの存在が示唆されたことから、糖鎖修飾に関する研究が行われている酵母の実験系をもちいて、フクチンのマンノースリン酸転移活性を調べたが活性は検出できなかった。
- c. しかし、FCMD 患者および正常コントロールのリンパ球の膜蛋白の糖鎖修飾状況を DIG グリカン検出法で調べたところ、FCMD で高分子量領域に反応の低下している分子がみつき、同分子の同定と他

組織での病態の検討を開始した。

②フクチン分子に直接機能連関する物質の機能解明：

- a. フクチンが結合する可能性のある細胞外基底膜蛋白 type IV collagen、fibronectin、merosin を含む laminin 3 種について、組み換えフクチンとの結合をオーバーレイ法にて検討したが、結合するものはみつからない。酵母 two hybrid 法を用いた結合蛋白の検索、baculovirus 発現系をもちい大量発現させたフクチンをつかった結合蛋白の検索を行っている。
- b. ウサギ骨格筋基底層からの抽出成分 (pH 12 抽出分画) に対するマウスモノクローン抗体をイムノプロット法および免疫組織学により検討する中で、M1 抗体はヒト筋細胞膜に存在する分子量 180kDa 蛋白 (p180) を認識するが、FCMD 患者 3 例の生検筋では p180 が選択的に欠損/著減していた。この現象は他の神経・筋疾患 (DMD、LGMD、FSH、WWS、merosin 欠損症、多発筋炎) には観察されず、従って p180 はフクチンと何らかの機能連関する蛋白で FCMD で著減すると推定される。ウサギ骨格筋で M1 抗体が認識するのは分子量 160 kDa 蛋白 (p160) であり、その分解産物のアミノ酸配列検索では 3 種類の配列があり、うち 2 つは sarcoplasmic reticulum histidine-rich binding protein とショウジョウバエの大

脳皮質の層構造形成の制御因子 disabled protein の homolog であった。さらに p160、p180 の蛋白同定を行っている。

- c. ヒト p180 は分子量からみてもフクチンそのものではないが、EDTA/EGTA 添加により、また triton X 存在下、アルカリ条件下で簡単に可溶化されることから、Ca 依存性の筋細胞外基底層蛋白であり、筋細胞から分泌される。さらに、筋のみでなく神経系にも存在し、特に末梢神経髄鞘の最外層（基底膜）には豊富に局在することが牛末梢神経の免疫組織で確認された。ウシ末梢神経 p180 は骨格筋同様に膜分画の triton X-100 存在下、pH 12 条件下で良好に可溶化でき、ラットの Schwann 細胞腫瘍株 RT4 細胞の培養液中に同定されることから Schwann 細胞から分泌される基底層蛋白であることが証明された。脳においては脳表面の glia limitans 最外層と基底層/血管の架橋構造に α/β dystroglycan と p180 との直接連関が存在しているとの仮定で中枢神経系・眼について confocal microscopy による免疫組織・イムノプロットで検討を始めている。

③FCMD の蛋白分子病態の解明：

他の筋ジストロフィー発症機序の検討から、細胞接着因子 α/β dystroglycan の破綻 (DMD、BMD) や dystroglycan に直接関連する分子の破綻 (sarcoglycanopathy、laminin 欠損症、Bethlem myopathy) が最も重要で重篤な機序であることが判明してきており、FCMD における α/β dystroglycan の分子病態の解明を開始した。牛の大脳・小脳・末梢神経・筋・肺・腎の全ホモジェネートからイムノプロットで α/β dystroglycan 複合体を調べる

と、

- a. α dystroglycan とともに 43kDa β dystroglycan (full size) と 30kDa β dystroglycan が存在している。
b. matrix metalloproteinase (MMP) 阻害薬存在下で実験を行うと、 α dystroglycan は存在するが、30kDa β dystroglycan は消失し、full size の 43kDa β dystroglycan のみが認められる。この MMP は細胞膜結合型が考えられる。
c. α dystroglycan は 43kDa β dystroglycan と 30kDa β dystroglycan の両者に結合する。

以上から、(43kDa β dystroglycan) \rightarrow (N 端 13kDa) + (C 端 30kDa) の分解経路が判明し、正常状態においてこの分解経路により α dystroglycan が細胞外に放出され、何らかの生命機能に関係することが予想される。また、ガン細胞には強く MMP が発現しており、ガン細胞と基底層との接着に dystroglycan 系が関与していること、sarcoglycanopathy でも 30kDa β dystroglycan が出現していることから、ガン細胞の転移過程と sarcoglycanopathy でこの分解経路が利用されていることが強く示唆される。従って、FCMD での筋変性・脳奇形にこの機序が関与するか検討を開始した。

平成 12 年度の厚生省筋ジストロフィー班会議で FCMD 筋での α dystroglycan 分子の免疫染色の低下が報告されており、また、FCMD 筋基底層の laminin 構成に異常があることは旧知であり、laminin、p180、dystroglycan 系の異常が FCMD での筋細胞死の key process と考え、本研究の中心テーマとなる。

④FCMD 治療法の開発のためのモデル動物の確立：

治療法開発のため FCMD モデルマウスの確立をおこなっている。

- a. ヘテロ間交配後得られたフクチン遺伝子欠損マウスは胚致死で、胎生 8.5 日以前に死亡する。6.5 日および 7.5 日胚を組織検索したところ、体軸の折れ曲がりと外一内胚葉の境界不鮮明、外胚葉でのアポトーシス増加が認められた。中胚葉形成は認められた。Reichert 膜の形成は正常で、type IV collagen の免疫組織染色から Reichert 膜・外一内胚葉間の基底膜構造は良く保たれていた。従って、フクチン自身は基底膜の形成・維持に必須の蛋白ではないことを示した。いずれにしても、欠損マウスは FCMD モデルとはならず、別手法の開発が必要となった。
- b. ヒト変異型エクソン置換マウスの作成：FCMD 患者にみられる 3' 非翻訳領域へのレトロポゾン挿入と同じ変異をもつマウスを作成し始めた。マウス第 10 エクソン上流と中流の 2 箇所に loxP 配列を knock-in したベクターが構築でき、マウス ES 細胞株へ導入したところ、ES 細胞 6 株が相同体と判定され、ヒト変異型エクソン置換マウス作成の第 1 段階が終了できた。
- c. ホモ欠損 ES 細胞株の樹立：マウスフクチン遺伝子の第 2 エクソンを puromycin 耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを作成して、フクチンヘテロ欠損 ES 細胞株を導入。そこから 2 株のホモ欠損 ES 細胞株が得られている。上記 b 及び c の ES 細胞株は in vitro 分化系での解析に有用で、さらにキメラマウス作成の有力候補である。現在解析を進めている。

C. 考察

FCMD は筋細胞膜基底層、脳表面基底層の形態的・免疫組織学的異常所見から、本研究においては細胞膜の接着因子 dystroglycan-laminin、筋細胞基底膜蛋白 p180 といった具体的蛋白分子の異常が本研究初年度で得られてきており、今後ともこの作業仮説に沿い、研究を進める。フクチン遺伝子欠損マウスの組織学的検索から、フクチン自身がなくとも基底層は形成されることから、フクチンが基底層形成の必須分子ではなく、基底層形成過程を modify する因子であることが推論される。基底層蛋白の modification により正常成熟した基底層を形成する調節因子として必要ではないかと考えられる。従って、フクチンファミリーの発見からえられた糖鎖修飾機能仮説は大いにありうることと予測される。平成 13 年度にはフクチン結合蛋白の同定、ヒト p180/ウサギ p160 の実体解明、フクチンの糖鎖修飾能、FCMD の dystroglycan 異常とその機序の解明に照準をあてる。

モデル動物として、フクチン遺伝子欠損マウスは胎生致死のためモデル動物としては使えない。代わって、ヒト変異型エクソン置換 ES 細胞あるいはホモ欠損 ES 細胞由来キメラマウスが有望であり、モデル動物確立に第 1 段階は達成できた。

D. 結論

初年度の結論として、

- ①フクチン生理機能として、基底膜蛋白の糖鎖修飾能を検討したところ、FCMD リンパ球の膜蛋白高分子量領域に糖鎖修飾の低下している分子がみつき、同分子の同定と他組織での病態の検討を開始した。
- ②FCMD 筋基底層で未知の 180kDa 蛋白 (p180) 欠損/著減が明かとなり、フク

チン関連蛋白として p180 蛋白の同定を行っている。

- ③p180 は神経系にも発現しており、末梢神経では Schwann 細胞から分泌され、髄鞘最外層の基底層に分布している。中枢神経における分布を検討はじめた。
- ④FCMD での筋細胞死の機序として接着因子 dystroglycan の異常を検討する中で、dystroglycan の分解過程として膜結合型の metalloproteinase が重要な役割を果たしていることが判明し、FCMD での病態について検討を始めた。
- ⑤モデル動物の確立：フクチン遺伝子欠損マウスは胎生致死のためモデル動物としては使えない。代わって、ヒト変異型エクソン置換 ES 細胞あるいはホモ欠損 ES 細胞由来キメラマウスが有望であり、モデル動物確立に第 1 段階が達成できた。

E. 研究発表

1. Jong YJ, Kobayashi K, Toda T, Kondo-lida E, Huang SC, Shen YZ, Nonaka I, Fukuyama Y. Genetic heterogeneity in three Chinese children with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 10:108-112, 2000
2. Toda T, Kobayashi K, Kondo-lida E, Sasaki J, Nakamura Y. The Fukuyama congenital muscular dystrophy story. *Neuromuscul Disord* 10:153-159, 2000
3. Toda T, Kobayashi K, Nonaka I. Congenital muscular dystrophies with special reference to the Fukuyama type. *Neurosci News* 3:39-45, 2000
4. Saito K, Osawa M, Wang Z-P, Ikeya K, Fukuyama Y, Kondo-lida E, Toda T, Ohashi H, Kurosawa K, Wakai S, Kaneko K. Haplotype-phenotype correlation in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 92:184-190, 2000
5. Chadani Y, Kondoh T, Kamimura N, Matsumoto T, Matsuzaka T, Kobayashi O, Kondo-lida E, Kobayashi K, Nonaka I, Toda T. Walker-Warburg syndrome is genetically distinct from Fukuyama type congenital muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 177:150-153, 2000
6. Villanova M, Mercuri E, Bertini E, Sabatelli P, Morandi L, Mora M, Sewry C, Brockington M, Brown SC, Ferreiro A, Maraldi NM, Toda T, Guicheney P, Merlini L, Muntoni F. Congenital muscular dystrophy associated with calf hypertrophy, microcephaly and severe mental retardation in three Italian families: evidence for a novel CMD syndrome. *Neuromuscul Disord* 10:541-547, 2000
7. Asano Y, Minagawa K, Okuda A, Matsui T, Ando K, Kondo-lida E, Kobayashi O, Toda T, Nonaka I, Tanizawa T. A case of Walker-Warburg syndrome. *Brain Dev* 22:454-457, 2000
8. Sasaki J, Ishikawa K, Kobayashi K, Kondo-lida E, Fukuyama M, Mizusawa H, Takashima S, Sakakihara Y, Nakamura Y,

- Toda T. Neuronal expression of the fukutin gene. *Hum Mol Genet* 9:3083-3090, 2000
9. Colombo R, Bignamini AA, Carobene A, Sasaki J, Tachikawa M, Kobayashi K, Toda T. Age and origin of the FCMD 3'-untranslated- region retrotransposal insertion mutation causing Fukuyama- type congenital muscular dystrophy in Japanese population. *Hum Genet* 107:559- 567, 2000
10. Kobayashi K, Sasaki J, Kondo- Iida E, Fukuda Y, Kinoshita M, Sunada Y, Nakamura Y, Toda T. Structural organization, complete genomic sequences, and mutational analyses of the Fukuyama- type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. *FEBS Lett* 489:192-196, 2001
11. Masaki, T., Matsumura, K., Saito, F., Sunada, Y., Shimizu, T., Yorifuji, H., Motoyoshi, K. and Kamakura, K. Expression of dystroglycan and laminin-2 in peripheral nerve under axonal degeneration and regeneration. *Acta Neuropathol.* 99: 289-295, 2000
12. Claudepierre, T., Dalloz, C., Mornet, D., Matsumura, K., Sahel, J. and Rendon, A. Characterization of the molecular architecture of the dystrophin associated glycoprotein complex in Muller glial cells. *J. Cell Sci.* 113: 3409-3417, 2000
13. Masaki, T., Matsumura, K., Hirata, A., Yamada, H., Hase, A., Shimizu, T., Yorifuji, H., Motoyoshi, K. and Kamakura, K. Expression of dystroglycan complex in satellite cells of dorsal root ganglia. *Acta Neuropathol.*, in press.
14. Sunada, Y., Ohi, H., Hase, A., Ohi, H., Hosono, T., Arata, S., Higuchi, S., Matsumura, K. and Shimizu, T. Transgenic mice expressing mutant caveolin-3 show severe myopathy associated with increased nNOS activity. *Hum. Molec. Genet.*, 10: 173-178, 2001

福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発に関する研究

分担研究者 戸田 達史 大阪大学医学系研究科臨床遺伝学・教授

研究要旨 fukutin の機能を知る試みとしていくつかの検討をおこなった。fukutin の細胞外基質に結合する可能性を調べるため、種々の細胞外基質タンパク質と、fukutin 組み換えタンパク質を用いてプロットオーバーレイ法により結合の有無をみたところ、fukutin はこれらのどの細胞外基質タンパク質とも結合しなかった。一方、アミノ酸配列から、fukutin タンパク質ファミリーは細胞表面の糖鎖修飾に関連があると推定されているが、DIG グリカン検出法により患者リンパ球では構成タンパク質の糖鎖修飾状態が異なっており、fukutin と糖鎖修飾との関係について検討を重ねる必要がある。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、重症の筋ジストロフィー病変に脳奇形を伴う常染色体劣性遺伝疾患であり、その原因遺伝子は第 9 染色体長腕 9q31 にマップされ、ポジショナルクローニングにより同定された。FCMD 遺伝子の翻訳産物は 461 アミノ酸残基からなる推定分子量 53.7 kDa のタンパク質であり、fukutin と命名された。

7 一次構造からの推定では、fukutin は N 末端に分泌シグナル配列を持ち、膜貫通ドメインや他のオルガネラへの移行シグナルを持たない。また既知のタンパク質との相同性は見られず、既知のモチーフやドメインも見られない、機能不明のタンパク質である。これまでの多くの試みにも関わらず特異的抗体が作製されていないので、組織内・細胞内での局在も調べられていない。

今回我々は、fukutin の機能を知る試みとしていくつかの検討をおこなった。

B. 研究方法・研究結果

(1) 組み換えタンパク質を用いた解析

fukutin のアミノ酸配列、FCMD 患者の脳・筋組織における病理像（基底膜の破れ、メロシンの染色性の低下）などから考えられる、fukutin の細胞外基質に結合する可能性を調べるため、タイプ IV コラーゲン、フィブロネクチン、メロシンを含むラミニン三種の各細胞外基質タンパク質と、fukutin の全長および部分配列を発現させた組み換えタンパク質を用いてプロットオーバーレイ法により結合の有無をみた。しかし、fukutin はこれらのどの細胞外基質タンパク質とも結合しなかった。

現在、酵母 two-hybrid 法を用いた結合タンパク

質の探索、および baculovirus 発現系を用い大量発現させた fukutin を使ったの生化学的手法による解析をおこなっている。

2) 糖鎖修飾に関する解析

1999 年、Aravind と Koonin が fukutin の配列に、出芽酵母 *S. cerevisiae*、線虫 *C. elegans*、およびいくつかの種のバクテリアに保存されたドメイン G[TS]hhGhxxxxhxxaxxDxD があり、これら一連のタンパク質 (fukutin タンパク質ファミリー) は細胞表面の糖鎖修飾に携わっていると考えられると報告した。

そこでこの保存されたドメインを持つ生物であり、糖鎖修飾に関する研究がおこなわれている酵母の実験系を用いて、fukutin のマンノースリン酸転移活性を測定したが、活性は検出されなかった。

しかし、患者および正常コントロールのリンパ球を用いて構成タンパク質の糖鎖修飾を DIG グリカン検出法を用いて調べたところ、Triton X-100 分画で高分子量側に患者で反応の薄くなっているバンドがみられた。

C. 考察

今回観察された、正常コントロールと FCMD 患者とで糖鎖修飾の異なっているタンパク質について、このタンパク質の同定や、脳・筋組織などでも同様の変化が観察されるのか等、さらに検討を重ねる必要がある。

D. 研究発表

1. Jong YJ, Kobayashi K, Toda T, Kondo-Iida E, Huang SC, Shen YZ, Nonaka I, Fukuyama Y. Genetic

- heterogeneity in three Chinese children with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 10:108-112, 2000
2. Toda T, Kobayashi K, Kondo-Iida E, Sasaki J, Nakamura Y. The Fukuyama congenital muscular dystrophy story. *Neuromuscul Disord* 10:153-159, 2000
 3. Toda T, Kobayashi K, Nonaka I. Congenital muscular dystrophies with special reference to the Fukuyama type. *Neurosci News* 3:39-45, 2000
 4. Saito K, Osawa M, Wang Z-P, Ikeya K, Fukuyama Y, Kondo-Iida E, Toda T, Ohashi H, Kurosawa K, Wakai S, Kaneko K. Haplotype-phenotype correlation in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 92:184-190, 2000
 5. Chadani Y, Kondoh T, Kamimura N, Matsumoto T, Matsuzaka T, Kobayashi O, Kondo-Iida E, Kobayashi K, Nonaka I, Toda T. Walker-Warburg syndrome is genetically distinct from Fukuyama type congenital muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 177:150-153, 2000
 6. Villanova M, Mercuri E, Bertini E, Sabatelli P, Morandi L, Mora M, Sewry C, Brockington M, Brown SC, Ferreiro A, Maraldi NM, Toda T, Guicheney P, Merlini L, Muntoni F. Congenital muscular dystrophy associated with calf hypertrophy, microcephaly and severe mental retardation in three Italian families: evidence for a novel CMD syndrome. *Neuromuscul Disord* 10:541-547, 2000
 7. Asano Y, Minagawa K, Okuda A, Matsui T, Ando K, Kondo-Iida E, Kobayashi O, Toda T, Nonaka I, Tanizawa T. A case of Walker-Warburg syndrome. *Brain Dev* 22:454-457, 2000
 8. Sasaki J, Ishikawa K, Kobayashi K, Kondo-Iida E, Fukayama M, Mizusawa H, Takashima S, Sakakihara Y, Nakamura Y, Toda T. Neuronal expression of the fukutin gene. *Hum Mol Genet* 9:3083-3090, 2000
 9. Colombo R, Bignamini AA, Carobene A, Sasaki J, Tachikawa M, Kobayashi K, Toda T. Age and origin of the FCMD 3'-untranslated-region retrotransposal insertion mutation causing Fukuyama-type congenital muscular dystrophy in Japanese population. *Hum Genet* 107:559-567, 2000
 10. Kobayashi K, Sasaki J, Kondo-Iida E, Fukuda Y, Kinoshita M, Sunada Y, Nakamura Y, Toda T. Structural organization, complete genomic sequences, and mutational analyses of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. *FEBS Lett* 489:192-196, 2001

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発に関する研究

分担研究者 砂田芳秀 川崎医科大学神経内科教授

研究要旨：福山型先天性筋ジストロフィーの病態に細胞外マトリックス蛋白の欠損が関与していると考え、免疫生化学的手法を用いて欠損蛋白の同定を試みた。強アルカリ条件で可溶化した骨格筋細胞外マトリックス成分に対する単クローン抗体を作製し、その中からFCMD骨格筋における欠損蛋白を認識するM1抗体を確立した。M1抗体はヒト骨格筋で分子量180 kDsの蛋白(p180)を認識し、FCMD骨格筋ではp180が欠損していた。p180の欠損はFCMDに特異的であり、その病態に関与することが示唆される。またM1抗体はウサギ骨格筋においてdisabled protein相同配列をもつ160 kDa蛋白(p160)を認識した。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィーにおける分子発症機構を解明する目的で、骨格筋における欠損蛋白の同定を行った。

B. 研究方法

単クローン抗体の作製：ウサギ骨格筋pH12抽出分画(細胞外マトリックス蛋白を含む)でbalb/cマウスを免疫し、その脾細胞をマウスミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを作製した。その中からsarcolemmaを免疫染色するクローンを選別し、FCMD欠損蛋白を認識する単クローン抗体M1を確立した。

免疫組織化学：ヒト生検骨格筋(FCMD3例、対照6例; DMD, LGMD, FSH, WWS, merosin欠損症, 多発筋炎)より凍結切片を作製し、FITC標識抗マウス二次抗体を用いて間接免疫蛍光染色を行った。

生検筋のウエスタンブロット解析：FCMD 2例、対照 2例について、凍結切片を20 vol.のBuffer Aでhomogenizeし、遠心後pelletの2% Triton-X100/Buffer Aの可溶化画分をウエスタンブロット解析した。

ウサギ骨格筋よりM1抗体結合蛋白の精製：精製したM1抗体をセファロースビーズに結合し、ウサギ骨格筋pH12抽出分画よりM1抗体に結合する蛋白の精製を行った。

M1結合蛋白のアミノ酸配列の解析：精製したM1結合蛋白をリジルエンドペプチダーゼ分解し、HPLC精製した分解断片のアミノ酸配列をEdman分解法により解析した。

C. 研究結果

得られた単クローン抗体の一つM1抗体を用いると対照ヒト骨格筋凍結切片ではsarcolemmaに一致した免疫染色がみられた。ところが3例のFCMD生検筋においては全例でsarcolemmaの免疫染色性が著減していた。

次いで、ヒト対照骨格筋よりpH12アルカリ抽出分画を調整し、M1抗体を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ分子量180kDaの蛋白(p180)が検出された。このp180は10mM EDTAあるいは2% Triton-X 100存在下でも可溶化された。一方、非還元状態で電気泳動を行った場合にはウエスタンブロット解析で、p180は検出されなかった。そこで、FCMD 2例の筋生検材料および2例の対照筋生検材料より2% Triton-X100可溶化分画を調整し、M1抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。FCMD 2例とも、対照に比べてp180の発現が著減していた。

ウサギ骨格筋よりM1抗体アフィニティーカラムを用いてp180の精製を試みたが、ウサギ骨格筋では分子量160kDaの蛋白(p160)がM1カラムに吸着された。p160を同定するためプロテアーゼ分解断片のアミノ酸配列を解析したところ3種類のアミノ酸配列が読まれた。このうち2つはsarcoplasmic reticulum histidine-rich binding proteinであり、1つはショウジョウバエのdisabled proteinのhomologであった。

D. 考察

われわれはFCMD骨格筋ではM1抗体で検出される180kDa蛋白(p180)が欠損していることをみいだした。p180は、界面活性剤だけでなく強アルカリ条件、およびEDTA存在下で可溶化されることから、Ca²⁺依存性細胞外マトリックス蛋白であると推測される。fukutinの推定分子量(53.6kDa)を考慮すると、p180がfukutin自体である可能性は低く、p180はfukutin結合蛋白でありFCMD筋で二次的に欠損しているのではないかと推察される。ウサギ骨格筋のウエスタンブロット解析ではM1抗体によりp180とともにp160が検出された。M1アフィニティーカラムではp160のみが吸着・精製された。そのアミノ酸配列の解析でショウジョウバエの脳皮質形成を制御するdisabled proteinのhomolog断片が検出されたことは興味

深い。ただし、ヒト骨格筋のウエスタンブロット解析ではp160が検出されないため、FCMD筋におけるp160の発現がどう変化しているのかは不明である。またp180とp160の相互作用についてもわからない。いずれもFCMD遺伝子産物であるfukutinと相互さようする可能性を持つ蛋白であり、今後fukutinの生理機能の解明、FCMDの病態の解明の上からもp160、p180の同定が必要であると思われる。

E. 結論

FCMD骨格筋では細胞外マトリックス蛋白と考えられる180kDa蛋白(p180)が欠損しており、発症の分子機構に関与すると思われる。またウサギ骨格筋ではp180以外のp160がM1抗体で認識・精製され、その断片には皮質神経細胞の層構造形成に関与するdisabled proteinのアミノ酸配列が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sunada Y. et al. Transgenic mice expressing mutant caveolin-3 show severe myopathy associated with increased nNOS activity. *Hum Mol Genet* 10: 173-178, 2000

Sunada Y. et al. Deficiency of a 180-kDa extracellular matrix protein in Fukuyama type congenital muscular dystrophy skeletal muscle. (投稿中)

2. 学会発表

砂田芳秀. FCMD骨格筋における欠損蛋白の生化学的解析. 厚生省精神・神経疾患研究委託費 筋ジス荒畑班 small group workshop 「福山型筋ジストロフィーの病態解明」平成12年11月20日（於東京）

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発に関する研究

分担研究者 松村喜一郎 帝京大学医学部 神経内科助教授

研究要旨 福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）において原因蛋白である fukutin と結合・相互作用する蛋白の異常が筋細胞死の発症に関与している可能性は高い。その中でも dystrophin 糖蛋白複合体の中核である dystroglycan 複合体の FCMD 筋における異常が近年注目されている。Dystroglycan 複合体は様々な細胞の表面膜に発現し、発生の初期には基底膜形成の中核となり、その後は基底膜と細胞内骨格をつなぎとめる強固な架橋構造として維持される。これを別の角度から見ると、生理的状态としての細胞の発生ならびに病的状態としての癌細胞の転移・侵潤などの過程にはこの架橋構造を特異的にしかも効率良く破壊するメカニズムが存在するはずである。本研究で、我々は① β -dystroglycan の細胞外ドメインがマトリックスメタロプロテアーゼによる分解を受けること、②これによって dystroglycan 複合体が崩壊し上記の架橋構造が破綻すること、③これが sarcoglycan 欠損症の筋細胞死を誘発する可能性があること、を見出した。これらのことはこれまでに報告された dystroglycan 複合体の異常が FCMD 筋における筋細胞死にも関与することを強く示唆している。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）において原因蛋白である fukutin と結合・相互作用する蛋白の異常が筋細胞死の発症に関与している可能性は高い。その中でも dystrophin 糖蛋白複合体の中核である dystroglycan 複合体の FCMD 筋における異常が近年注目されている。Dystroglycan 複合体は様々な細胞の膜表面に発現し、発生の初期には基底膜形成の中核となり、その後は基底膜と細胞内骨格をつなぎ強固な架橋構造として維持される。これを別の角度から見ると、生理的状态としての細胞の発生ならびに分化、および病的状態としての癌細胞の転移・侵潤などの過程にはこの架橋構造を特異的にしかも効率良く破壊するメカニズムが存在するはずである。我々は β -dystroglycan の細胞外ドメインがマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）によ

る分解を受けることが上記のメカニズムであるとの作業仮説を立て生化学的に検討した。

B. 研究方法

< β -dystroglycan 抽出パターン解析>

ウシ末梢神経の粗膜分画から、pH12, 2% TritonX100 0.5M NaCl, 2% TritonX100 0.15M NaCl, 5 mM EDTA の各種条件で蛋白を抽出した。ラット Schwannoma の cell line RT4 から、pH11 と 2% TritonX100 で蛋白を抽出した。

<単離 dystroglycan 複合体の構成成分解析>

ウシ末梢神経および RT4 細胞の膜分画から 1% Digitonin 可溶成分（出発物質）を抽出し、これを laminin アフィニティーカラムにかけ、Dystroglycan 複合体を単離した。また同じ出発物質を Wheat Germ Agglutinin (WGA) アフィニティーカラムにかけ、結合分画を単離、

さらに陰イオン交換カラムを用い 0-500 mM NaCl 濃度勾配で結合成分を分離溶出した。 <MMP 阻害剤による β - dystroglycan processing の抑制>

RT4 細胞の培養液中に様々な濃度で MMP 阻害剤を加え、 β - dystroglycan processing の変化を観察した。また、培養液中に MMP 阻害剤を加えた場合/加えない場合、細胞からの膜分画調製中に MMP 阻害剤を加えた場合/加えない場合と $2 \times 2 = 4$ つの異なる条件での β - dystroglycan processing を検討した。

C. 研究結果

ウシの骨格筋、末梢神経、大脳、小脳、肺、腎組織のホモジェネート中の β - dystroglycan をウェスタンブロットで検討したところ、骨格筋以外のいくつかの臓器で 43 kDa のバンドの外に、約 30 kDa のバンド (β -DG30) を認めた。 β -DG30 は RT4 細胞の膜分画中にも認められ、各種抽出条件で β -DG43 と挙動を共にした。Laminin アフィニティーカラムによる検討では、結合分画中に β -DG30 はなく、 β -DG43 のみを認めた。陰イオン交換カラムによるクロマトグラフィーでは β -DG43 と β -DG30 は分離され、 α -dystroglycan は β -DG43 とのみ結合していた。

MMP 阻害剤による検討では、 β -DG30 の出現は、MMP 阻害剤の濃度に依存して阻害された。培養中(M) および膜分画調製中(P) に MMP 阻害剤を加えると、 β -DG30 の出現量は阻害剤を加えた場合を+、加えない場合を- で表して M-P- > M+P- > M- P+ > M+P+ だった。

D. 考察

上記の結果は β - dystroglycan の細胞外ドメインが MMP によって切断され、細胞膜側に約 30 kDa のフラグメントが残り、これは α - dystroglycan とは結合しない。すなわち dystroglycan 複合体による架橋が断裂することを示している。なお、この MMP は細胞の生育中にも、膜分画に調製する段階でも作用する、すなわちこの MMP が膜結合型であることも示唆している。いくつかの MMP は癌細胞に強く発現することが知られているが、dystroglycan が基底膜を維持していることを考えると、この MMP による dystroglycan 複合体の断裂が癌の浸潤・転移の際に大きな役割を果たしている可能性が考えられる。また最近 sarcoglycan 欠損筋で β - dystroglycan の 30 kDa 分解産物が出現することが報告された。このことから、sarcoglycan 欠損筋では、いわば sarcoglycan という覆いが失われ、MMP cleavage site が露出している、すなわち sarcoglycan の機能の一つはこの MMP による dystroglycan の分解抑制であり、sarcoglycanopathy ではこの機能が失われて、前記の架橋構造が断裂するために筋細胞死が誘発されるという可能性が指摘できよう。

E. 結論

- ① β - dystroglycan の細胞外ドメインがマトリックスメタロプロテアーゼによる分解を受ける。
- ② これによって dystroglycan 複合体が崩壊し上記の架橋構造が破綻する。
- ③ これが sarcoglycan 欠損症の筋細胞死を誘発する可能性がある。
- ④ これらのことはこれまでに報告された dystroglycan 複合体の異常が FCMD 筋における筋細胞死にも関与することを強く示唆して

いる。

F. 研究 (論文) 発表

1. Masaki, T., Matsumura, K., Saito, F., Sunada, Y., Shimizu, T., Yorifuji, H., Motoyoshi, K. and Kamakura, K. (2000) Expression of dystroglycan and laminin-2 in peripheral nerve under axonal degeneration and regeneration. *Acta Neuropathol.* 99, 289-295.
2. Claudepierre, T., Dalloz, C., Mornet, D., Matsumura, K., Sahel, J. and Rendon, A. (2000) Characterization of the molecular architecture of the dystrophin associated glycoprotein complex in Muller glial cells. *J. Cell Sci.* 113, 3409-3417.
3. Masaki, T., Matsumura, K., Hirata, A., Yamada, H., Hase, A., Shimizu, T., Yorifuji, H., Motoyoshi, K. and Kamakura, K. (2001) Expression of dystroglycan complex in satellite cells of dorsal root ganglia. *Acta Neuropathol.*, in press.
4. Sunada, Y., Ohi, H., Hase, A., Ohi, H., Hosono, T., Arata, S., Higuchi, S., Matsumura, K. and Shimizu, T. (2001) Transgenic mice expressing mutant caveolin-3 show severe myopathy associated with increased nNOS activity. *Hum. Molec. Genet.*, in press.

福山型先天性筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発に関する研究

分担研究者 武田 聖 大塚GEN研究所 ゲノム機能解析室長

研究要旨 fukutin遺伝子欠損マウスは胎生8.5日以前に多くが死亡する。6.5および7.5日胚を解析したところ、ホモ欠損マウス胚では中胚葉は形成されるが、胚全体が折れ曲がる特異な形態を示した。IV型コラーゲン免疫染色では基底膜構造に異常は見られなかった。一方、マウス第10エクソン近傍にloxP配列を挿入したES細胞株を単離し、ヒト変異型エクソン置換マウス作製のための第1段階を終えた。また、fukutinヘテロ欠損ES細胞株への再ターゲティングにより、ホモ欠損ES細胞株を樹立した。これらの細胞株は *in vitro* 分化系およびキメラマウスを用いた解析を進めるうえで有用と思われる。

A. 研究目的

ジーンターゲティングにより福山型先天性筋ジストロフィーの疾患モデルマウスを作製し、筋ジストロフィー発症のメカニズムを *in vivo* にて精査するとともに、治療実験に役立てる。

B. 研究方法

(1) fukutin 遺伝子欠損マウスの解析

ヘテロ間交配後、6.5日および7.5日に胎子を回収して組織切片標本を作製する。標本の一部からDNAを採取して遺伝子型を判定する。残り標本はHE染色による形態観察、および抗IV型コラーゲン抗体を用いた免疫染色による基底膜構造の確認を行う。

(2) ヒト変異型エクソン置換マウスの作製

FCMD患者にみられる3'非翻訳領域へのレトロトランスポゾン挿入と同じ変異を持つマウスを作製するため、マウス第10エクソン上流および内部の2箇所にloxP配列を有するknock-inベクターを構築する。これをマウスES細胞へ導入し、相同組換え体細胞株を得る。ついで、ヒト変異型第10エクソンとloxP配列からなる置換ベクターをcre発現下で導入し、第10エクソンがヒト変異型に入れ替わったマウス個体を得る。

(3) ホモ欠損ES細胞株の樹立

マウスfukutin遺伝子第2エクソンをpuromycin 耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを作製し、fukutinヘテロ欠損ES細胞株へ導入する。puromycin耐性細胞を単離して遺伝子型を解析する。

(倫理面への配慮)

動物を用いる全ての実験は大塚製薬株式会社の定める「動物実験に関する指針」に従って実施する。

C. 研究結果

(1) fukutin 遺伝子欠損マウスの解析

6.5日では19例中5例、7.5日では29例中4例がホモ欠損マウス胚と判定された。これらの胚では、体軸の折れ曲がりと外-内胚葉の境界不明瞭、外胚葉でのアポトーシス増加などの異常が観察された。中胚葉の形成は認められた。卵黄膜腔への赤血球の漏出はなく、Reichert膜は正常に形成されているものと思われた。IV型コラーゲン免疫染色の結果、Reichert膜や胚外胚葉-内胚葉間の基底膜構造には異常は認められなかった。

(2) ヒト変異型エクソン置換マウスの作製

knock-inベクターをマウスES細胞株へ導入し、neomycin耐性細胞192株についてSouthern法により解析した結果、6株が相同組換え体と判定された。Sequencingにより、2つのloxP配列が正しく挿入されていることも確認した。

(3) ホモ欠損ES細胞株の樹立

すでに生殖系列キメラマウスが得られているfukutinヘテロ欠損ES細胞株(No.8)への再ターゲティングを行い、puromycin耐性細胞120株を単離した。このうち24株をSouthern法により解析し、ホモ欠損細胞2株を得た。

D. 考察

ホモ欠損マウス胚の解析により、fukutinは卵円筒期における体軸形成に関与することが示唆された。また、ほぼ同時期に死亡するDystroglycan 欠損マウスとは異なり、Reichert膜などに異常はみられなかったことから、fukutinは基底膜の形成・維持には必須ではないと考えられる。ホモ欠損マウスが胚致死であったので、疾患モデルマウス作製には別手法が求められる。ヒト変異型エクソン置換マウスあるいはホモ欠損ES細胞由来キメラマウスを用いた解析が有望であり、いずれについてもFCMDモデルマウス作製のための準備は整いつつあるといえる。

E. 結論

fukutinは卵円筒期における体軸形成に関与し、基底膜の形成・維持には必須ではない。一方、ヒト変異型エクソン置換マウスあるいはホモ欠損ES細胞由来キメラマウス作製のための準備が整いつつあり、疾患モデルマウスとしての応用が期待される。

F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響をおよぼすと考えられる内容は、本研究には含まれない。

G. 研究発表

1. 論文発表 (なし)
2. 学会発表

「新規ユビキチン結合酵素を欠損したマウスの解析」
武田 聖、近藤万里、金本尚秀、急式弘之、新美正史、古関教孝、奥山啓司、谷口吉弘、和田津貴史、嶋田良和、室井佐和子、西野直樹、谷上信. 第23回日本分子生物学会年会、講演要旨集660ページ (2000年)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 (なし)
2. 実用新案登録 (なし)
3. その他 (なし)