2001 0628

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清 水 輝 夫

平成14(2002)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 ―――――――――――― 12

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 ―――――――――――― 16

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　福山型先天性筋ジストロフィーFCMD の原因遺伝子産物 fukutin の生理機能について進展がえられ、❶患者リンパ球膜蛋白の高分子量域に glycan 染色されない成分があること、❷FCMD 類縁疾患である Muscle eye brain 病 MEB の遺伝子解析の結果、1p32-34 の POMGnT1 遺伝子を同定し Ser/Thr-mannose に GlcNAc を転嫁する glucosyl transferase であったこと、その変異として splice 異常、点変異があり短い mRNA が産生され、酵素活性が失活していた。❸FCMD および MEB において筋膜の最も枢要な接着因子 dystroglycan 系のうち、dystrophin、β-dystroglycan、laminin は筋膜に比較的よく保存されていたのに対し、α-dystroglycan の laminin 結合部位の糖鎖に対する抗体染色性が激減し laminin 結合能が失われていた。❹また、FCMD において筋・末梢神経 Schwann 細胞・脳表の基底層に存在する未知の蛋白 p180 の減少も明白であった。従って、fukutin は POMGnT1 同様にα-dystroglycan の laminin 結合部位に存在する糖鎖（O glycan）の生成過程に関する酵素であろうと推論できた。❺FCMD では、さらに、β-dystroglycan の細胞外ドメインが matrix metalloproteinase で分解されα-dystroglycan が遊離する機序も存在した。❻fukutin 遺伝子の構造として 10 exons 以外に 3A、3B、9'、9A の短い exon の存在が明らかにされ、筋・脳でそれぞれ 6 種の splice variants の存在が判明した。今後各 variant の機能解明が必要となった。❼動物モデルとして fukutin knockout mouse（胎生致死）と chimera mouse が確立され FCMD 類似病態が確認できた。今後、分子病態の開明を完遂し治療の開発に取りかかりたい。

分担研究者

戸田達史　大阪大学大学院医学系研究科分子生物学分子遺伝学教授

砂田芳秀　川崎医科大学神経内科教授

松村喜一郎　帝京大学医学部神経内科助教授

武田　聖　大塚製薬（株）大塚 GEN 研究所ゲノム機能解析室室長

A.　研究目的

日本で最も高頻度、最重症の常染色体性劣性疾患である福山型先天性筋ジストロフィーの分子病態を解明し、治療法の開発を行なう。

B.　研究方法

分担研究者として、戸田（fukutin 分子遺伝、fukutin 生理機能、fukutin 欠損動物モデルの分子病態、遺伝子治療）、砂田（fukutin 結合蛋白、fukutin 遺伝子、遺伝子治療）、松村（fukutin 蛋白／fukutin 結合蛋白の生理機能、FCMD 蛋白病態）、武田（fukutin 欠損動物モデル作製とその分子病態、遺伝子治療）の 4 名との共同研究で、年数回の全体討論をもち、主として分子生物学、蛋白免疫化学、糖鎖構造解析をもちいて遂行する。

（倫理面への配慮）

遺伝子診断は「3 省庁指針」に沿った倫理委員会にて条件付き承認されている。

C.　研究結果

❶fukutin 遺伝子；fukutin 遺伝子は 10 exon からなり、1-9 exon が翻訳されるが、intron 領域から新たに 3A、3B、9A の 3 種の短い exons が発見され、また、exon 9 は 31 塩基延長して exon 9' としても使われることが新らたに判明した。これにより、筋・脳のそれぞれに 6 種類の splice variants が発現していた。それぞれの variant transcipt の量比、蛋白生理機能は今後の課題である。

❷fukutin 生理機能；fukutin 遺伝子から主に分子量約 5 万の fukutin 蛋白が産生されると推定しているが、特異抗体が依然出来ておらず、fukutin の生理機能や分子病態は未解決である。しかし、コンピューター解析から酵母のマンノシルリン酸化酵素、肺炎球菌とインフルエンザ桿菌のホスホリルコリン転嫁酵素との相同性が認められたことから、糖鎖修飾酵素であろうとの想定をし、幾つかの組織膜成分の糖鎖染色をイムノブロット上で検討した結果、リンパ球膜成分の分子量 200 kDa 領域に glycan 染色不良な成分を確認できた。また、FCMD 類縁疾患である muscle eye brain 病（MEB）の遺伝子解析で、1p32-34 の POMGnT1 遺伝子を同定し Ser/Thr-mannose に GlcNAc を転嫁する glucosyl transferase であり Golgi 体で O glycan 生成転嫁を担う 2 型の Golgi 膜蛋白であったこと、その変異として splice 異常と点変異が認められ、短い mRNA が転写され、その結果失活した酵素が産生されていたことを明らかにした。これらから、fukutin は POMGnT1 同様に何らかの筋膜／脳表の蛋白の O glycan 生成転嫁を行なう酵素であろうとの強い傍証を得るにいたった。

❸FCMD 蛋白病態；筋基底層の未知の蛋白

p180がFCMDで欠損していることを指摘し、FCMDの基本病態として筋基底層の破綻を想定して来た。このp180は筋以外に末梢神経のSchwann細胞周囲の基底層や脳表glia limitans基底層にも存在すること、さらに同部位にはα, β-dystroglycansが共存していることを明らかにした。ただし、p180欠落はMEBにはないことも判明している。

筋膜蛋白dystroglycan連関をみると、FCMDとMEBに共通してみられるのは、laminin、β-dystroglycan、dystrophinが比較的よく保たれているのに対し、α-dystroglycanの糖鎖に対する抗体ではα-dystroglycanが認められない点である。これは両疾患でα-dystroglycanが全く欠損しているか、α-dystroglycanは存在してもその糖鎖（特にO glycan）が障害されていることを示している。従って、MEBの結果ともあわせ考えるとfukutinはPOMGnT1同様にα-dystroglycanのO glycan生成転嫁過程の酵素であり、その障害によりlaminin-α dystroglycan結合ができず、dystroglycan連関が破綻した病態であろうとの仮説がえられた。今後の証明されるべき点である。

また、FCMDではβ-dystroglycanがその細胞外ドメインでmatrix metalloproteinase（MMP）により分解される機序もあることが判明した。このMMPは過去の18種のMMPのいずれとも性質が異なり、新種のMMPである可能性がでている。この点も今後検討されるべき点である。

❹FCMD動物モデル；fukutinホモ欠損マウスは胎生致死であり、6.5日胚病理像では基底膜、中胚葉は正常だが、胚全体が折れ曲がり体軸形成の異常が示唆された。fukutinホモ欠損型ES細胞に由来するキメラマウスは屈曲姿勢で、歩容は足をひきずり、歩幅が短く、まっすぐ歩けない状態であった。回転するrodに乗せると落下が多く、金網にぶらさがれる時間も短かった。骨格筋HE染色では生後1ヶ月齢では著明な壊死再生像、間質の増大、7および9ヶ月齢では中心核、筋線維の大小不同がみられ部分的に壊死線維が散見された。免疫染色では筋膜での抗α-dystroglycan糖鎖抗体の染色性が特異的に激減していた。Laminin、β-dystroglycan、dystrophin、α-, β-sarcoglycans、utrophinは筋膜に比較的よく保存されていた。従って、このfukutinキメラマウスは骨格筋壊死は早い時期に生じ、その後再生が進むと考えられる。脳病変では大脳皮質分子層の消失、分子層の皮質深部での滞留など層構築障害が観察され、腰髄へのHRP注入による皮質錐体路の逆行性標識を行なうと、正常ではV層に整然としたHRP陽性細胞が並んでいるのに対し、fukutinキメラマウスでは皮質の全層にわたって散在しており皮質の層構築異常が明らかとなった。小脳では顆粒層の構築異常、小脳構の消失、小脳と下丘の癒合、が認められた。眼病変として、血管増生を伴う角膜混濁、眼球奇形、網膜剥離と層構造異常・水晶体との癒合、角膜の肥厚とレンズとの癒合などの奇形が観察され、FCMD類似の病態発症が確認され、fukutinが筋ジス発症と脳・眼発生に必須の要素であることが証明された。

❺キメラマウスでの遺伝子導入を検討して

おり、AAV をベクターとして fukutin 遺伝子を注入する方法に加え、fukutin 遺伝子を電気穿孔法にて直接導入する方法を始める方針である。

D. 考察

本年度、FCMD 類縁疾患である MEB の遺伝子解析に成功し、glucosyl transferase 活性消失が証明され、これによる α-dystroglycan の o glycan 生成転嫁が障害され laminin-α dystroglycan 結合不全、dystrophin 連関破綻が推測された。これにより、その病態類似性から fukutin の生理機能として α-dystroglycan の糖鎖修飾能、特に O glycan 形成転嫁酵素説が有力となった。モデルマウスがえられたことから、この仮説証明に邁進するとともに、二次的減少であろう基底層蛋白 p180 の解明を完遂し、治療法の開発に進みたい。

E. 結論

❶FCMD 類縁疾患である MEB の遺伝子解析結果および FCMD のリンパ球膜蛋白で glycan 染色不良の蛋白が存在したことから、fukutin の生理機能として筋形質膜・脳表 glia limitans に存在する α-dystroglycan の糖鎖修飾、特に O glycan 形成に携わる酵素であろうとの仮説がえられた。

❷fukutin の欠損により laminin-dystroglycan 連関の破綻と、脳表および筋の基底層蛋白 p180 の脱落とがおこり、脳での神経細胞遊走障害、筋のジストロフィーが発症すると推定する。

❸ fukutin 欠損キメラマウスでも FCMD/MEB と同じく laminin-dystroglycan-dystrophin 連関の破綻が認められた。

❹fukutin 遺伝子構造（10 exons）に新たに 3A、3B、9A がみつかり、exon 9 は 31 塩基延長した exon 9' としても用いられることが判明し、筋・脳それぞれ 6 種の splice variants が存在する。それぞれがどのような作用に関係するかが今後の問題である。

❺FCMD の β-dystroglycan は、その細胞外ドメインで matrix metalloproteinase による分解をうけ、laminin-α dystroglycan-β dystroglycan-dystrophin 連関を破綻させる機序も存在する。

F. 研究発表

1. Masaki, T., Matsumurak, 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. 101, 174-178, 2001

2. 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

3. Yamada, H., Saito, F., Fukuta-Ohi, H., Zhong, D., Hase, A., Arai, K., Okuyama, A., Maekawa, R., Shimizu, T. and Matsumura, K. Processing of β-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. Hum. Molec. Genet. 10, 1563-1569, 2001

4. Tachi, N., Chiba, S., Matsuo, M., Matsumura, K. and Saito, K. Fukuyama muscular dystrophy associated with lack of C-terminal domain of dyntrophin. Pediatr. Neurol. 24, 373-378, 2001

5. Kaminaga, T., Matsumura, K., Hatanaka, Y. and Shimizu, T. Abnormality of the myocardial sympathetic nervous system in a patient with Becker muscular dystrophy detected with Iodine-123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy. Clin. Nucl. Med. 26, 701-703.,2001

6. Sunada, Y., Ohsawa, Y., Murakami, T., Matsumura, K. and Shimizu, T. Caveolin-3 and muscular dystrophy. Acta Myologica 20, 162-167, 2001

7. 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

8. Togo M, Toda T, Nguyen LA, Kubota S, Tsukamoto K, Satoh H, Hara M, Iso-o N, Noto H, Kimura S, Nakahara K, Seyama Y, Hashimoto Y. Genetic analysis of phytosterolaemia. J Inherit Metab Dis 24:43-50, 2001

9. Trana TD, Kroepfla T, Saito M, Nagura M, Ichiseki H, Kubota M, Toda T, Sakakihara Y. The gene copy ratios of SMN1/SMN2 in Japanese carriers with type I spinal muscular atrophy. Brain Dev 23:321-326, 2001

10. Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsuhashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T, Endo T. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a novel glycosyltransferase, POMGnT1. Dev Cell 1:717-724, 2001

11. Toda T, Sasaki J, Tachikawa M, Kano H, Kobayashi K. Molecular genetics of

Fukuyama CMD and fukutin. Acta Myologica 20:92-95, 2001

12. Yoshioka M, Kuroki S, Sasaki H, Baba K, Toda T. A variant of congenital muscular dystrophy. Brain Dev 24:24-29, 2002

13. Momose Y, Murata M, Kobayashi K, Tachikawa M, Nakabayashi Y, Kanazawa I, Toda T. Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms. Ann Neurol 51:133-136, 2002

14. Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tachikawa M, Manya H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa H, Toda T. Deficiency of a-dystroglycan in muscle-eye-brain disease. Biochem Biophys Res Commun 291:1283-1286, 2002

15. Chiyonobu T, Fukushima Y, Yamamoto Y, Yoshihara T, Tsunamoto K, Nishimura Y, Toda T, Kasabuchi Y. Two sibling cases of Vici syndrome; a clinical entity defined by albinism and agenesis of the corpus callosum with profound psychomotor retardation. Am J Med Genet (in press)

16. Zanoteli E, Rocha JCC, Narumia LK, Fireman MAT, Moura LS, Oliveira ASB, Gabbai AA, Fukuda Y, Kinoshita M, Toda T. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). A case report in the Japanese population living in Brazil. Acta Neurol Scand (in press)

17. Tachikawa M, Nagai Y, Nakamura K, Kobayashi K, Fujiwara T, Han H-J, Nakabayashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Kanazawa I, Nakamura Y, Toda T. Identification of CAG repeat-containing genes expressed in human brain as candidate genes for autosomal dominant spinocerebellar ataxias and other neurodegenerative diseases. J Hum Genet (in press)

18. Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Kurahashi H, Tachikawa M, Kano H, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T. Chimeric mice deficient in fukutin develop neuronal migration disorder and ocular abnormality together with muscular dystrophy. Nature Genet (submitted)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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　戸田　達史　大阪大学医学系研究科ゲノム機能分野・教授

研究要旨　*O*-mannoseにGlcNAcを付加する新規の糖転移酵素、UDP-*N*-acetylglucosamine: protein *O*-linked mannose β1, 2-*N*-acetylglucosaminyltransferase(POMGnT1)の遺伝子をクローニングし、本遺伝子が福山型先天性筋ジストロフィー類縁疾患MEB病の原因遺伝子であることを同定した。α-dystroglycanはその*O*-mannose型糖鎖により、基底膜のラミニンα2鎖と結合していることがわかっているが、本酵素のtargetとしてMEB骨格筋ではα-dystroglycanが選択的に欠損していた。筋ジスやneuronal migration disorderの1つの発症メカニズムとして「糖鎖修飾の異常」「α-dystroglycanopathy」を提唱した。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)、muscle-eye-brain病(サンタヴオリ病、MEB)、Walker-Warburg症候群(WWS)は、重度の先天性の筋ジストロフィーに、神経細胞移動期の障害であるII型滑脳症と、眼奇形を伴う常染色体性劣性遺伝性の類縁疾患であり、これら3疾患は病変部位、症状とも非常に似ており類縁疾患とされており、同じメカニズムにより発症すると考えられている。MEB病は報告されている症例の多くがフィンランド人で、連鎖解析、ハプロタイプ解析などにより原因遺伝子は1p32-34の約1cMの領域にマップされている。

一方*O*-mannose型糖鎖は糖タンパク質のSer/Thrに結合している*O*型糖鎖の第1番目の糖がmannoseである糖鎖のことで、哺乳類においては、脳、神経、骨格筋の限られた糖タンパク質でのみ認められており、その意義は明らかでない。*O*-mannose型糖鎖を持つタンパク質の例としてα-dystroglycanがあり、その糖鎖により基底膜のlamininα2と結合していることがわかっている。

今回東京都老人総合研究所遠藤玉夫博士らと共同でその*O*-mannoseにGlcNAcを付加する新規の糖転移酵素、UDP-*N*-acetylglucosamine: protein *O*-linked mannose β1, 2-*N*-acetylglucosaminyltransferase(POMGnT1)の遺伝子をクローニングし、本遺伝子がMEB病の原因遺伝子であることを同定した。

B. 研究方法・研究結果

POMGnT1は660アミノ酸からなるII型の膜タンパク質で、N-型糖鎖の生合成に関わる糖転移酵素α-3-D-mannoside β-1, 2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I(GnT-I)と23.2%相同であった。POMGnT1をHEK293T細胞に発現させるとPOMGnT活性は約100倍増大し、一方GnT-I活性は検出されなかった。

本遺伝子は1p33-34にマップされ、MEB病原因遺伝子の存在領域1cMの中に存在した。そこでMEB病患者において本遺伝子を解析したところ6例の症例で6種の変異を見出した。3例のsplicing donor site変異のホモ(2例：IVS17+1G>T, 1例：IVS17+1G>A)、1例のミスセンス変異のホモ(1743G>A, Ser550Asn)、1例の1塩基欠失によるフレームシフト変異のホモ(1813delC)、1例のミスセンス変異(1572C>G, Pro493Arg)と1塩基欠失(1970delG)によるフレームシフト変異の複合ヘテロであった。変異遺伝子産物の酵素活性は最も多く見られた変異を調べたところ著しく低下していた。

α-dystroglycanはその*O*-mannose型糖鎖により、基底膜のラミニンα2鎖と結合していることがわかっているが、本酵素のtargetとしてMEB骨格筋ではα-dystroglycanが選択的に欠損していた。

C. 考察

以上よりPOMGnT1糖転移酵素遺伝子はMEB病の原因遺伝子であり、哺乳類の*O*-mannose型糖鎖が筋および神経で重要な働きを果たしていることが考えられる。また本遺伝子ではFCMDの原因のfukutin遺伝子の3'UTRの挿入変異のような特殊な変異ではなく単純な点突然変異が見られたことから、フィンランドに限らず日本を含む世界各国にもMEB患者がいるはずであると考えられる。筋ジストロフィーの原因遺伝子として糖鎖転移酵素が同定され、実際に患者で変異が確認されたのは初めてのことになる。

MEB病の他に、最近myodystrophy mouseの原因がLargeというputativeな糖転移酵素であることが報告された。さらにFCMDの原因であるfukutinも糖鎖修飾に関わる酵素と推測されており、またごく最近、ある型の先天性筋ジストロフィーの原因がfukutinと相同性のあるFKRPという糖鎖修飾酵素と考えられるタンパク質であることが報告された。これらすべての疾患においてα-dystroglycanになんらかの異常が見られている。

以上より、筋ジスやneuronal migration disorderの1つの発症メカニズムとして「糖鎖修飾の異常」「α-dystroglycanopathy」を提唱した。酵素であるのでジストロフィンなどの純粋な構造蛋白と違って治療的アプローチも行いやすいのではないか、と考えられる。

D. 研究発表

1. 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

2. Togo M, Toda T, Nguyen LA, Kubota S, Tsukamoto K, Satoh H, Hara M, Iso-o N, Noto H, Kimura S, Nakahara K, Seyama Y, Hashimoto Y. Genetic analysis of phytosterolaemia. J Inherit Metab Dis 24:43-50, 2001

3. Trana TD, Kroepfla T, Saito M, Nagura M, Ichiseki H, Kubota M, Toda T, Sakakihara Y. The gene copy ratios of SMN1/SMN2 in Japanese carriers with type I spinal muscular atrophy. Brain Dev 23:321-326, 2001

4. Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsuhashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T, Endo T. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a novel glycosyltransferase, POMGnT1. Dev Cell 1:717-724, 2001

5. Toda T, Sasaki J, Tachikawa M, Kano H, Kobayashi K. Molecular genetics of Fukuyama CMD and fukutin. Acta Myologica 20:92-95, 2001

6. Yoshioka M, Kuroki S, Sasaki H, Baba K, Toda T. A variant of congenital muscular dystrophy. Brain Dev 24:24-29, 2002

7. Momose Y, Murata M, Kobayashi K, Tachikawa M, Nakabayashi Y, Kanazawa I, Toda T. Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms. Ann Neurol 51:133-136, 2002

8. Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tachikawa M, Manya H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa H, Toda T. Deficiency of α-dystroglycan in muscle-eye-brain disease. Biochem Biophys Res Commun 291:1283-1286, 2002

9. Chiyonobu T, Fukushima Y, Yamamoto Y, Yoshihara T, Tsunamoto K, Nishimura Y, Toda T, Kasabuchi Y. Two sibling cases of Vici syndrome; a clinical entity defined by albinism and agenesis of the corpus callosum with profound psychomotor retardation. Am J Med Genet (in press)

10. Zanoteli E, Rocha JCC, Narumia LK, Fireman MAT, Moura LS, Oliveira ASB, Gabbai AA, Fukuda Y, Kinoshita M, Toda T. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). A case report in the Japanese population living in Brazil. Acta Neurol Scand (in press)

11. Tachikawa M, Nagai Y, Nakamura K, Kobayashi K, Fujiwara T, Han H-J, Nakabayashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Kanazawa I, Nakamura Y, Toda T. Identification of CAG repeat-containing genes expressed in human brain as candidate genes for autosomal dominant spinocerebellar ataxias and other neurodegenerative diseases. J Hum Genet (in press)

12. Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Kurahashi H, Tachikawa M, Kano H, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T. Chimeric mice deficient in fukutin develop neuronal migration disorder and ocular abnormality together with muscular dystrophy. Nature Genet (submitted)

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原因蛋白 fukutin の機能を解明することが病態機序の理解に必須である。近年アミノ酸配列の相同性解析からに fukutin が細胞膜表面の糖鎖修飾酵素である可能性が指摘されている。われわれは骨格筋および脳における fukutin 発現の差異を検討する目的で RT-PCR により mRNA 発現を解析した。その結果、骨格筋と脳において 9 種類の異なる fukutin 転写産物を同定し、これらが alternative splicing により生成していることを明らかにした。Fukutin の酵素活性部位の同定や、活性調節機構の解明に有用な知見であると考える。

A.　研究目的

第 9 染色体長腕上 9q31 にマップされていた福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)の原因遺伝子がクローニングされ、その蛋白産物は fukutin と命名された。FCMD 遺伝子は 10 個の exon から成り、mRNA レベルでは 1,383 bp のコード領域を持つことから、fukutin は 461 アミノ酸残基からなる推定分子量 53.7 kDa の蛋白であると予測された。当初は機能未知の新規蛋白とされていたが、近年アミノ酸配列の相同性解析から、fukutin は細胞膜表面の糖鎖を修飾する酵素ではないかと推測されている。FCMD に類似した先天性筋ジストロフィーであるサンタヴオリ病の原因遺伝子が糖転移酵素であったことからも、fukutin 糖転移酵素説の可能性がクローズアップされてきた。fukutin は northern blot 解析では 6.5 kb と 7.5 kb の fukutin 転写産物が主として骨格筋と脳に発現しているが、このサイズの違いは poly(A)の付加部位の違いによると考えられている。今回われわれはヒト骨格筋と脳における fukutin mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。

B. 研究方法

ヒト骨格筋と脳の poly(A)+RNA 分画から oligo(dT)プライマーを用いて逆転写を行い、fukutin cDNA の 5' UTR と 3' UTR に位置するプライマーで PCR を行った。しかし、fukutin 全長に相当するメッセージは増幅さ

れなかった。

そこで内部プライマーを用いてnested PCRを行ない、増幅されたPGR産物をTA vectorにsubcloningして、塩基配列を決定した。

C. 研究結果

骨格筋および脳のpoly(A)+RNA分画からNested RT-PCRを行ったところ予想されたサイズの単一のfragmentだけではなく複数のfragmentが増幅された。これらのPCR産物をTA vectorにsubcloningしたところ骨格筋と脳で各々6種類のサイズの異る断片が得られた。すべての断片をシークエンスしたところ骨格筋と脳において、少なくとも9種類の異なるfukutin転写産物が発現していることがわかった。exon skippingがみられるもの3種類、新規の塩基配列が挿入されたもの3種類、その両者が組合わさったもの2種類であった。挿入されていた塩基配列は全て従来intronと考えていた部分に存在し、その周辺の塩基配列はsplice部位としての特徴に合致したことから、これらはfukutin遺伝子転写産物が多様なalternative splicingを受けて生じたvariant transcriptと考えられた。

したがって、従来報告されていた10個のexon以外に新たなexon (exon 3A, exon 3B, exon 9A)が存在し、またexon 9はさらに31塩基延長してexon 9'としても使われることが判明した。

今回われわれが同定したvariant transcriptからは56～396アミノ酸残基に及ぶ6種類のサイズの異る蛋白の発現が予想され、このうち多くはframe shiftにより異ったN端部分を持つことが明らかとなった。

D. 考察

今回のわれわれの検討で、FCMD遺伝子転写産物は多様なalternative splicingを受けていることが、初めて示された。しかし、それぞれのvariant transcriptの生成される量比については今回の検討ではわからない。さらに蛋白レベルでもfukutinのアイソフォームが発現しているのか、今後の検討が必要である。

alternative splicingによりfukutinアイソフォームが存在する可能性は、FCMDの発症機構やgenotype-phenotype correlationを理解する上でも重要であると思われる。またfukutinが糖鎖転移酵素であるならば、種々のアイソフォームを用いた解析により酵素活性ドメインの同定や分子内活性調節機構の解明が可能になると思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Sunada Y. et al. Caveolin-3 and muscular dystrophy. Acta myologica 20 (2): 162-167, 2001

2. Sunada Y. et al. Deficiency of a 180-kDa extracellular matrix protein in Fukuyama type congenital muscular dystrophy skeletal muscle. Neuromusc Disord 12(2): 117-120, 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　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）の原因蛋白 fukutin は糖鎖修飾酵素と推定されている．FCMD では fukutin のターゲット蛋白の機能異常が筋細胞死の発症に関与していると考えられ，その同定が急務である．現在，ターゲット蛋白の候補として dystroglycan 複合体が注目されている．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，生理的状態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．昨年度，我々はこのメカニズムとしてマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）を同定，報告した．本年度はこの MMP 活性の特徴を解析した．結果：①β- dystroglycan の細胞外ドメインは MMP により特異的な分解を受けた，②この分解は組織特異的であった（末梢神経，肺，腎で高度，脳，骨格筋，心筋では軽微），③この MMP 活性は細胞膜分画に存在した，④この分解により dystroglycan 複合体を介する細胞内外の架橋が破綻した，⑤予想と異なりこの MMP 活性は MMP-2，１４ではなかった．以上の結果に基づき，この MMP 活性が重症の筋ジストロフィーの分子発症機序において作用する可能性について考察した．

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）の原因蛋白 fukutin は糖鎖修飾酵素と推定されている．FCMD では fukutin のターゲット蛋白の機能異常が筋細胞死の発症に関与していると考えられ，その同定が急務である．現在，ターゲット蛋白の候補として dystroglycan 複合体が注目されている．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ぐ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，生理的状態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 & C. 研究方法と結果

ウシ臓器（主に末梢神経）および、ラット Schwannoma 由来の細胞株 RT4 を材料とし，生化学的分析を行った．ウシの各種臓器の total homogenate を SDS-PAGE 後，PVDF 膜に転写し，抗β- dystroglycan モノクローナル抗体 8D5 で immunoblot を行った．末梢神経，腎，肺などの組織では 43 kDa のβ-dystroglycan のバンド（β-DG_{full}）以外に約 30 kDa のバンド（β-DG_{30}）が出現したが，骨格筋では認めなかった．β-DG_{30} の生化学的性質を明らかにするためウシ末梢神経から各

種条件で抽出を行った．β-DG_{30}はβ- DG_{full}と全く同じ挙動を示し，detergent でよく抽出されたが高アルカリでは全く抽出されなかった．このことからβ-DG_{30}はβ- dystroglycan の細胞膜貫通部を保持していることが分かる．検出に用いた 8D5 がβ- dystroglycan の最も C 末端すなわち細胞内ドメインの末端に対する抗体であることを考え合わせるとβ-DG_{30}は細胞外ドメインで切断されたβ- dystroglycan の細胞膜側の断片であると推測される．以下の実験に RT4 細胞を用いるため培養 RT4 細胞の粗膜分画中のβ- dystroglycan の組成および生化学的性質を検討した．RT4 細胞の粗膜分画中にも約 30 kDa の抗β- dystroglycan 断片と考えられるバンドが存在し抽出実験での挙動もウシ末梢神経の場合と同様であった．ウシ組織の場合も RT4 細胞の場合も何らかのプロテアーゼ活性がβ- dystroglycan を分解するものと考え次の実験を行った．すなわち RT4 細胞の total homogenate を室温でインキュベートすると時間の経過と共にβ- DG_{full}が減少しβ-DG_{30}が増加した．Total homogenate から粗膜分画を調製し同様にインキュベートするとこの分解はより迅速に進行した．このことはこのプロテアーゼ活性が膜分画中に濃縮されることを示唆する．一方，RT4 膜分画の digitonin 抽出物から laminin affinity chromatography ないし WGA affinity chromatography から anion exchange chromatography と 2 段階のクロマトグラフィーによって dystroglycan complex を分離すると complex 中にはいずれもβ-DG_{30}は含まれずα- dystroglycan とはβ- DG_{full}のみが共分離した．また RT4 の膜分画の Triton X100 抽出物からは一段階の WGA affinity chromatography によってα- dystroglycan とβ-DG_{30}が解離した．これらの結果はこのプロテアーゼ活性によって dystroglycan 複合体が断裂しα- dystroglycan がβ- dystroglycan の膜貫通部分および細胞内ドメインから分離することを示している．次にこの活性の阻害実験を行った．この活性は RT4 培養上清中に MMP の特異的阻害剤である BPHA を加えることによって抑制された．この阻害は濃度依存性でありまた他の MMP 阻害剤である SI-27, phenanthroline でも同様の結果であったが阻害活性のスペクトラムの狭い MMI-16 では抑制されなかった．一方，BPHA による阻害実験で用いた RT4 の total homogenate から粗膜分画を調製しその際に生じた遠心上清と共に分析すると BPHA を加えない control では遠心上清中にα- dystroglycan を検出したがこのα-dystroglycan の出現は BPHA により完全に抑制された．また RT4 細胞の粗膜分画を生理的条件で再懸濁した後，室温でインキュベートし再度遠心して，膜分画と上清に分けると時間経過と共にβ- dystroglycan が分解されると同時に膜分画中ではα- dystroglycan が減少し上清中に出現した．BPHA を加えて同じ実験を行うとβ- dystroglycan の分解が抑制されると同時に上清中のα- dystroglycan の出現も抑制された．これらの実験はこの活性が MMP 活性であることだけでなく，このプロセシングによってα- dystroglycan がβ- dystroglycan からだけでなく細胞膜から遊離することを示している．

D. 考察

上記の結果は以下を示唆する：①末梢神経、肺、腎臓などの臓器にはβ- dystroglycan の約 30 kDa の断片が発現する，②この断片は、β- dystroglycan の細胞外ドメインが Matrix

metalloproteinase によって切断されることにより生じる,③この MMP 活性は膜分画中に濃縮されている, ④この切断により dystroglycan 複合体は断列しα- dystroglycan は単にβ- dystroglycan の 30 kDa 断片から離れるだけではなく細胞膜から遊離する. 前述したように dystroglycan 複合体の機能が、今日多くの疾患の発病機構に関与していることが明らかになりつつあるが, 今回我々の見いだした MMP によるβ- dystroglycan のプロセシングは以下のような病態に関与している可能性があるものと思われる：①ガンの浸潤、転移：各種の培養細胞株で悪性度の高いものほど、β- dystroglycan の 30 kDa 断片が多く見られたとの報告がある, ②感染防御：α-dystroglycan はライ菌のまたラッサ熱ウイルスを含む一部のアレナウイルスが感染する際に細胞側のレセプターとして作用することが明らかになっている. また、MMP-7 が腸粘膜への感染の際に発現亢進することから感染防御的に働いているのではないかと考えられている, ③Sarcoglycanopathy. Sarcoglycanopathy では sarcoglycan の欠損がどのようにして筋細胞死につながるのかが不明であった. 一方ヒトの sarcoglycan 欠損症の症例で, β- dystroglycan が保たれているにもかかわらず, α- dystroglycan が減少している例が報告されていること, δ- sarcoglycan の欠損動物モデルである BIO14.6 ハムスターではα- dystroglycan とβ- dystroglycan が解離しており膜分画にα- dystroglycan が回収されないことが報告されていた. さらに最近、多数の筋疾患例生検筋の Multiple Western Blot の報告で sarcoglycanopathy 例でのみ 30 kDa β- dystroglycan の出現が報告されている. 我々の結果でもβ-DG_{30} はα- sarcoglycan を含む sarcoglycan の組成を持つ骨格筋では見られず、他の臓器に見られている. これらの結果をもとに我々は骨格筋の sarcoglycan 複合体はβ- dystroglycan のプロセシングを抑制する方向に MMP 活性を調節する機能を有しておりこの機能の異常が、sarcoglycanopathy における dystroglycan 複合体の破綻、筋細胞死にながるという仮説を提唱した.

E. 結語

①β- dystroglycan の細胞外ドメインは MMP により特異的な分解を受けた, ②この分解は組織特異的であった（末梢神経, 肺, 腎で高度, 脳, 骨格筋, 心筋では軽微）, ③この MMP 活性は細胞膜分画に存在した,④この分解により dystroglycan 複合体を介する細胞内外の架橋が破綻した, ⑤予想と異なりこの MMP 活性は MMP-2, 14 ではなかった. 以上の結果に基づき,この MMP 活性が重症の筋ジストロフィーの分子発症機序において作用する可能性について考察した.

F. 研究（論文）発表

1. Masaki, T., Matsumurak, 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. 101, 174-178.
2. 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. 10, 173-178.

3. Yamada, H., Saito, F., Fukuta-Ohi, H., Zhong, D., Hase, A, Arai, K., Okuyama, A., Maekawa, R., Shimizu, T. and Matsumura, K. (2001) Processing of β-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. Hum. Molec. Genet. 10, 1563-1569.

4. Tachi, N., Chiba, S., Matsuo, M., Matsumura, K. and Saito, K. (2001) Fukuyama muscular dystrophy associated with lack of C-terminal domain of dyntrophin. Pediatr. Neurol. 24, 373-378.

5. Kaminaga, T., Matsumura, K., Hatanaka, Y. and Shimizu, T. (2001) Abnormality of the myocardial sympathetic nervous system in a patient with Becker muscular dystrophy detected with Iodine-123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy. Clin. Nucl. Med. 26, 701-703.

6. Sunada, Y., Ohsawa, Y., Murakami, T., Matsumura, K. and Shimizu, T. (2001) Caveolin-3 and muscular dystrophy. Acta Myologica 20, 162-167.

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　武田　聖　大塚 GEN 研究所　ターゲット探索室　II　室長

研究要旨　　fukutin ホモ欠損型 ES 細胞に由来するキメラマウスを作製して表現型を解析した。その結果、筋ジストロフィー病変、脳皮質構造異常および眼形成障害が認められた。これらのキメラマウスは、FCMD および類縁疾患の発症機構を解明し、さらには治療法を開発するためのモデルとして有用であると思われる。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）は、神経細胞移動期の障害による脳奇形と重度の筋ジストロフィー病変を主徴とする劣性遺伝性疾患である。大部分の FCMD 患者では fukutin 遺伝子の 3' 非翻訳領域にレトロトランスポゾン挿入変異が認められる。それ以外の変異を両アレルに持つ症例は知られておらず、この場合は胚致死となることが考えられる。自然発症マウスは存在せず、また fukutin 欠損マウスが着床後の早い時期に死亡することはこの予想とよく一致し、fukutin は胚発生にとって必須であることが示唆される。我々は、成体における fukutin の機能解明、ならびに FCMD 病態モデルとしての利用を目的として、fukutin ホモ欠損型 ES 細胞に由来するキメラマウスを作製し、それらの表現型を解析した。

B. 研究方法

翻訳開始コドンを含む第 2 エクソンを異なる薬剤耐性マーカー遺伝子で置換した 2 種類の遺伝子破壊ベクターを作製する。これらをマウス ES 細胞へ順次導入して fukutin ホモ欠損型細胞を得る。この細胞を C57BL/6J マウス胚へ注入してキメラマウスを作製し、GPI assay によるキメラ率測定、行動試験、病理組織学的検索、大脳皮質第 V 層ニューロンの逆行性標識、網膜電位測定などの解析を行なう。

（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

すでに生殖系列キメラマウスが得られている fukutin ヘテロ欠損型 ES 細胞株への再ターゲティングを行い、fukutin ホモ欠損型細胞 2 株を得た。fukutin ホモ欠損型細胞を C57BL/6 マウス胚へ注入してキメラマウスを作製した。毛色によるキメラ率と各組織のキメラ率は測定できた範囲では比較的よく一致していた。Fukutin ホモ欠損型細胞の占める割合が高いことが毛色から予想されるキメラマウスは、出生後の体重増加が小さく、一部の個体は離乳後に死亡した。生存したキメラマウスは筋力低下、運動失調様行動を呈した。骨格筋では筋線維の大小不同、間質の増大、壊死および再生

像が観察され、免疫組織染色により alpha-dystroglycan 発現低下が認められた。大脳では左右半球の癒合、皮質および海馬の構造異常が見られ、第 V 層ニューロンは皮質深部から表層にかけて広く分布していた。小脳では小葉間ならびに小葉-下丘間の癒合、顆粒層の構築異常が認められた。脳表 laminin の assembly も異常であった。眼では眼球の奇形的形成、角膜の混濁および水晶体との癒合、網膜剥離と層構造異常が認められ、網膜電位は消失していた。

D. 考察

アミノ酸配列の相同性から、fukutin は糖鎖修飾酵素として機能することが推測されている。本研究において、fukutin 欠損キメラマウスの病変部位で alpha-dystroglycan や laminin の発現様式に変化が認められたことから、糖鎖修飾異常による dystroglycan 複合体の機能障害が FCMD の発症原因であると考えられる。

E. 結論

fukutin は骨格筋の機能維持や脳、眼の正常な発生に不可欠であることが示唆された。これらのキメラマウスは、FCMD、Muscle-eye-brain disease, Walker-Warburg 症候群などの骨格筋、中枢神経系、眼の異常を併発する疾患の発症機構を解明し、さらには治療法を開発するためのモデルとして有用であると思われる。

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

Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Kurahashi H, Tachikawa M, Kano H, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T. Chimeric mice deficient in fukutin develop neuronal migration disorder and ocular abnormality together with muscular dystrophy. Nature Genet (submitted)

2. 学会発表 (なし)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Masaki, T., Matsumurak, 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.	101	174-178	2001
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
Yamada, H., Saito, F., Fukuta-Ohi, H., Zhong, D., Hase, A., Arai, K., Okuyama, A., Maekawa, R., Shimizu, T. and Matsumura, K.	Processing of b-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex.	Hum. Molec. Genet.	10	1563-1569	2001
Tachi, N., Chiba, S., Matsuo, M., Matsumura, K. and Saito, K.	Fukuyama muscular dystrophy associated with lack of C-terminal domain of dyntrophin.	Pediatr. Neurol.	24	373-378	2001
Kaminaga, T., Matsumura, K., Hatanaka, Y. and Shimizu, T.	Abnormality of the myocardial sympathetic nervous system in a patient with Becker muscular dystrophy detected with Iodine-123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy.	Clin. Nucl. Med.	26	701-703	2001
Sunada, Y., Ohsawa, Y., Murakami, T., Matsumura, K. and Shimizu, T.	Caveolin-3 and muscular dystrophy.	Acta Myologica	20	162-167	2001
Sunada Y, Saito F, Higuchi I, Matsumura K, Shimizu T	Deficiency of a 180-kDa extracellular matrix protein in Fukuyama type congenital muscular dystrophy skeletal muscle.	Neuromusc. Disord.	12	117-120	2001
Kobayashi K, Sasaki J, Kondo-lida 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
Togo M, Toda T, Nguyen LA, Kubota S, Tsukamoto K, Satoh H, Hara M, Iso-o N, Noto H, Kimura S, Nakahara K, Seyama Y, Hashimoto Y	Genetic analysis of phytosterolaemia.	J Inherit Metab Dis	24	43-50	2001