

20020915

厚生労働科学研究費補助金  
こころの健康科学研究事業

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清水輝夫

平成15(2003)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	10
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
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	18

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

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さらに進展がえられた。①fukutin の合成ペプチド、fusion protein から抗 fukutin 抗体(抗血清、単クローン抗体)がえられ、内在性 fukutin は微量の免疫組織・western blot で認識されないが、強制発現培養細胞系で Golgi body に局在することが判明し、当初考えられた分泌蛋白ではなく、Golgi で作用し protein modification に関与すると推量した、②平成13年度解明できた FCMD 類縁疾患 Muscle-eye-brain 病 MEB(POMGnT1 欠損症)で観察された筋形質膜蛋白  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$  DG)の抗糖鎖抗体の染色性低下/消失→抗蛋白抗体の染色性低下 ( $\alpha$  DG 消失)、 $\beta$  DG 残存が、FCMD 筋、fukutin 欠損細胞キメラマウス骨格筋の組織レベル、western blot レベルでも確認でき、western blot 上  $\alpha$  DG の laminin 結合能は消失していた。③キメラマウス骨格筋に fukutin 発現 construct を電気穿孔法で導入すると、少数線維ではあるが fukutin 発現細胞がえられ  $\alpha$  DG 糖鎖認識抗体の反応性が回復できた。従って、fukutin は POGnT1 に類似して、 $\alpha$  DG の o-mannose glycan 合成に関与する蛋白(酵素またはそのモデュレーター)ではないかと考えられる。FCMD と MEB には o-mannose glycan 合成障害→ $\alpha$  DG/laminin 結合不全→筋細胞死/神経細胞過遊走という共通する分子病態 (o-mannose glycanopathy of  $\alpha$  DG) が存在する。④筋膜上の  $\alpha$  DG・ $\beta$  DG 複合体の分解機構として新しい膜結合型 matrix metalloproteinase MMP とその特異的阻害薬 BPHA の存在について各種筋ジストロフィーで検討し、sarcoglycan 欠損症(肢帯型筋ジス)とその動物モデル BIO-14.6 と TO-2 心筋症ハムスターの骨格筋、心筋、平滑筋で  $\beta$  DG(43 kD)→30 kD(細胞内)+13 kD(細胞外)の分解機構の存在を確認し、BPHA で阻止できた。しかし、脳表 glia limitans では同分解機構は存在しなかった。フクチン欠損キメラマウス筋にも同分解機構が存在するようであり、今後 FCMD、MEB 筋障害進展の阻止薬として開発したい。⑤MEB でみつかった糖鎖転移酵素 POMGnT1 変異について、今回対象を広げ、日本・韓国をふくめ世界各国から fukutin 遺伝子異常のない30名(臨床診断はFCMD、MEB、WWS)の遺伝子解析した結果を踏まえ、Finland のみでなく全世界に存在すること、従来考えられているよりも広い MEB 臨床スペクトラムであること、5'末端変異例は水頭症を合併し重症であるが3'末端変異例は比較的軽症であることがわかった。

以上、fukutin は Golgi で作用する糖転移酵素ないしはそのモデュレーターと考えられること、FCMD および類縁疾患 MEB (POMGnT1 欠損症)はともに  $\alpha$ -dystroglycan の o-mannose glycanopathy を共通病態とすることが判明し、その病態進行阻止薬候補 MMP inhibitor と fukutin 欠損キメラマウスができたことにより、治療法開発の基盤が提供できた。

分担研究者

松村喜一郎 帝京大学医学部神経内科助教授

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

武田 聖 大塚製薬(株)大塚 GEN 研究所ゲノム  
機能解析室室長

砂田芳秀 川崎医科大学神経内科教授

## A. 研究目的

日本独特で、Duchenne 型について高頻度（90 人に 1 人の保因者）、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FCMD 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（p180 と 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

①fukutin 生理機能；9q31 に局在する fukutin 遺伝子（100 kb）から 9 種類以上の splice variants ができるが、その大部分は 7 kb message であり、分子量約 5 万の fukutin 蛋白が産生されると推定している。特異抗体の作成に成功した。fukutin 合成ペプチド、fusion protein から抗 fukutin 抗体（抗血清、単クローン抗体）を調製、内在性 fukutin は微量の為免疫組織・western blot で認識できなかった。しかし、強制発現培養細胞系（7A2、1B5、3C7、RY213）で Golgi body に局在することが判明し、当初考えられた分泌蛋白ではなく、Golgi で作用し protein modification に関与すると推量し

た。この状況は、Golgi 膜 II 型蛋白の糖鎖転移酵素 GnT1（n-glycan transferase）などと類似であり、fukutin に特異的なことではない。正常筋でも検出できない fukutin 染色は、FCMD 筋ではさらに発現低下していると考えられるので、FCMD 筋での fukutin 免疫染色でも有意な染色がえられなかったことは、充分了解出来る結果となった。

②平成 13 年度 FCMD 類縁疾患である muscle eye brain 病（MEB, Finland）の遺伝子解析に成功し、遺伝子局在 1p32-34、POMGnT1 遺伝子を同定し Ser/Thr-mannose に GlcNAc を添加する glucosyl transferase であり Golgi 体で O glycan 生成転移を担う 2 型の Golgi 膜蛋白であったこと、その変異 6 種の point mutation を認め、exon skip/read through のため産物が産生されないか失活酵素が産生されていることを明らかにした。また、末梢神経 Schwann 細胞膜に発現し基底層蛋白 laminin と結合する  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ DG) には laminin 結合を担う o-mannose glycan(Ser/Thr-mannose-GlcNAc-Gal-Sial) 構造があることを解明していたので、POMGnT1 基質は o-mannose glycan of  $\alpha$ DG であろうとの考えから、MEB 筋の免疫染色/western blot をしたところ、抗糖鎖抗体の染色性低下/消失→抗蛋白抗体の染色性低下 ( $\alpha$ DG 消失)、 $\beta$ DG 残存、laminin 結合能消失が判明した。この DG 変化/laminin 結合能消失は、今年度 FCMD 筋、fukutin 欠損細胞キメラマウス骨格筋でも確認できた。

③また、pCAG vector の EcoRI 部位に myc-tag をつけた mouse fukutin cDNA を挿入して形質転換した vector を、キメラマウス骨格筋（キメラ率 80-90 %）に電気穿孔法で導入すると、少数線維ではあるが fukutin 発現細胞がえられ  $\alpha$ DG 糖鎖認識抗体の反応性が回復で

きた。

従って、fukutin は POGnT1 に類似して、 $\alpha$ DG の o-mannose glycan 合成に関与する蛋白（酵素またはそのモジュレーター）ではないかと考えるに至った。この結果、FCMD と MEB には o-mannose glycan 合成障害  $\rightarrow$   $\alpha$ DG/laminin 結合不全  $\rightarrow$   $\alpha$ DG 消失 /  $\beta$ DG 残存  $\rightarrow$  筋細胞死 / 神経細胞過遊走（脳奇形）という共通する分子病態（o-mannose glycanopathy of  $\alpha$ DG）が存在すると考える。

④基底層接着因子 laminin のリガンドである筋膜上の  $\alpha$ DG  $\cdot$   $\beta$ DG 複合体の分解機構として新しい膜結合型 matrix metalloproteinase MMP が存在し、これにより  $\beta$ DG(43 kD)  $\rightarrow$  30 kD(細胞内) + 13 kD(細胞外)をへて、 $\alpha$ DG の分泌 / 消失がおこることを明らかにしてきたが、各種筋ジストロフィーで検討したところ、sarcoglycan 欠損症（肢帯型筋ジストロフィー）とその動物モデル BIO-14.6 と TO-2 心筋症ハムスターの骨格筋、心筋、平滑筋で同分解機構の存在を確認できた。この分解は特異的阻害薬 BPHA で阻止できた。しかし、脳表 glia limitans では同分解機構は存在しないことも判明した。フクチン欠損キメラマウス筋にも同分解機構が存在するようであり、今後 FCMD、MEB 筋障害進展の阻止薬として開発したい。

⑤平成13年度トルコ人・フランス人6名の MEB 患者から、o-mannose に GlcNAc を付加する糖鎖転移酵素 POMGnT1 の point mutation 6種類を発見したが、今回対象を広げ、日本・韓国をふくめ世界各国から fukutin 遺伝子に異常のない30名（臨床診断は FCMD、MEB、WWS）の POMGnT1 遺伝子解析した結果、新たに7種類の point mutation をみつけた。従って MEB は Finland のみでなく全世界に存在し、臨床診断は FCMD、MEB、

WWS であることがわかった。昨年度臨床診断 MEB での6種類の変異とあわせ、全部で13変異が判明、すべて simple point mutation で、変異は同遺伝子の全長に分散していた。1例を除き12例は生存しており、従来考えられているよりも広い臨床スペクトラムであることが判明した。死亡した1例は splice out し mRNA の産生されてない症例で、12例は少量の small size の message を産生していた。また、5'末端変異例は水頭症を合併し重症であるが3'末端変異例は比較的軽症であることもわかり、遺伝子変異と臨床重症度に、ある程度の correlation が判明した。

⑥FCMD 筋基底層で発現低下をみつけた新規蛋白 p180 は筋のみでなく末梢神経 Schwann 細胞基底層、脳表 glia limitans 基底層でも  $\alpha$  /  $\beta$ DG と共局在することが判明し、MEB、WWS では発現減弱してないことがわかった。この p180 は膜蛋白ではなく、基底層蛋白であり、最終結論には至ってないが laminin  $\beta$ 2 鎖の可能性が高く、2次的変化と推量する。しかし、FCMD、MEB、WWS での変化は一様ではなく、今後の検討課題である。

⑦⑧に述べたように、fukutin 欠損キメラマウスに mouse fukutin 遺伝子の導入をはじめたが、inject した周囲の少数例の筋線維にしかはならず、効率は悪いといわざるをえない。今後、遺伝子治療にむけおおいに検討すべき課題である。

以上、fukutin は Golgi で作用する糖転移酵素ないしはそのモジュレーターと考えられ、FCMD および類縁疾患 MEB（POMGnT1 欠損症）はともに、o-mannose glycan of  $\alpha$ -dystroglycan 形成障害により  $\alpha$ DG-laminin 結合不全状態であり、何らかの機序（MMP？）によ

りβDG 細胞外ドメインが分解され、αDG が細胞外に放出／分解され、その後何らかの機序で筋細胞死にいたる、ないしは脳表 Glia limitans-laminin 結合不全により神経細胞の過遊走（脳奇形）が生じると推論できる段階まで到達した。治療的には 上記病態進行阻止薬候補 MMP inhibitor BPHA と fukutin 欠損キメラマウスができ、治療法開発の基盤が提供できた段階である。

#### D. 考察

本年度、fukutin 抗体の調製に成功し、fukutin が分泌蛋白であろうとの当初予想を覆し、Golgi 体で作用する protein modifier と推測した。昨年度遺伝子解析した FCMD 類縁疾患 MEB が O-mannose に GlcNAc を転移する糖鎖転移酵素であったこと、基底層蛋白 laminin のリガンドである α dystroglycan 糖鎖が o-mannose-GlcNAc-Gal-Sial であるという我々の過去の実績から推論できたように MEB 筋で α dystroglycan 糖鎖異常、laminin 結合の消失が判明した。この変化は FCMD 筋、fukutin 欠損キメラマウス筋でも確認でき、両疾患で o-mannose glycanopathy of α dystroglycan を実証できた。'02 年度、オランダから発表された約 20% の WWS にみられた POMT1 (o-mannose 転移酵素) 異常／αDG 減少とあわせ、FCMD および MEB、約 20% の WWS の類縁 3 疾患は o-mannose glycanopathy of α -dystroglycan であるとの考えを提唱できた。

また、MEB の遺伝子解析を進めた結果、同遺伝子全長にわたる point mutation が判明、MEB は Finland 偏在ではなく全世界に存在する、臨床的に従来より広い臨床スペクトラムが存在する、5'末端変異で重症化する、などを指摘できた。今後、fukutin の糖転移酵素活性の最終同定、FCMD とその類縁 3 疾患の分子病態特に o-glycan の合成障害の詳細、治療法の開発、とともに、fukutin related protein FKRП の生理機能とその欠

損病態、約 80% の WWS など未解明類似疾患の遺伝子／病態解析、治療法開発が待たれる。

#### E. 結論

①抗 fukutin 抗体の調製に成功した。同抗体では内在性 fukutin は検出されず、強制発現系で Golgi 体に明瞭な局在がみとめられた。Fukutin は微量のため、免疫組織、western blot で検出できない。当初予想した分泌蛋白ではなく、Golgi 体で作用する protein modifier(酵素?)であろうと推測した。

②昨年度 FCMD 類縁疾患である MEB の遺伝子解析に成功し、o-mannose に GlcNAc を合成添加する糖転移酵素 POMGnT1 の 6 種の変異を報告したが、本年度、日本・東南アジアを含む世界各国から FCMD 遺伝子異常のない患者 30 名（臨床診断は FCMD、MEB、WWS）について POMGnT1 遺伝子解析を行い、新たに 7 種の点突然変異を認めた。この結果、MEB は Finland に偏在すると考えられていたが、世界のどの地域／民族にも存在すること、今までに確認できた変異はすべて点変異で遺伝子の全長に分散しており、1 例は splice out をおこして蛋白欠損を起こし死亡していること、他の 12 例は蛋白減少し存命中であり、今まで考えられていた以上に臨床スペクトラムは広いこと、5'末端異常例は水頭症を起こし重症、3'末端変異例は水頭症合併がなく比較的軽症であること、が判明した。

③MEB 筋形質膜で、筋基底層接着因子 laminin のリガンドである α -dystroglycan(α DG)の抗糖鎖抗体の染色性が失われ、laminin 結合能が欠損していた (western blot)。この結果 α DG の糖鎖異常が明らかとなり、我々が 98 年に報告していた laminin 結合糖鎖 o-mannose-GlcNAc-Gal-Sial of α DG の形成障害が強く示唆されるに至った。同じ現象は、本年度 FCMD 筋、fukutin

欠損細胞キメラマウス筋でも確認され、fukutin 欠損キメラマウス筋に fukutin 遺伝子導入した筋線維で  $\alpha$ DG の回復が確認できた。従って fukutin(FCMD) は POMGnT1(MEB)と同じく Golji 膜で  $\alpha$ DG の o-mannose glycan の転移酵素（またはその modulator）であろうと考えられ、両疾患は o-mannose glycanopathy  $\rightarrow$  laminin-dystroglycan 結合不全  $\rightarrow$   $\alpha$ DG 消失/ $\beta$ DG 残存  $\rightarrow$  筋細胞死を共通基盤とする類縁疾患であろうとの考えを提出した。脳や眼にもあてはまるか、FKRP 欠損症や未解明 WWS など類縁 3 疾患以外の類似疾患でも起こりうるか、今後の課題である。

④FCMD で発見した筋基底層新規蛋白 p180 の消失に関して、同成分は末梢神経 Schwann 細胞基底層と脳表 Glia limitans 基底層にも  $\alpha/\beta$ -DG と共局在していること、FCMD 類縁疾患である MEB/WWS 筋ではよく保たれていること、最終決着はついていないが laminin  $\beta$ 2 鎖である可能性が高く、fukutin 欠損に伴う 2 次的現象と推量した。

⑤FCMD 筋崩壊機序として sarcoglycanopathy で発見された  $\beta$ dystroglycan の MMP 分解機序 (43 kD  $\rightarrow$  30 kD (細胞内ドメイン)  $\rightarrow$  13 kD (細胞外ドメイン)) が FCMD、MEB、WWS 筋に存在している可能性があり、今後その特異的阻害薬候補 BPHA による治療薬開発を行いたい。この機序は脳・末梢神経・眼で存在しているか今後の課題である。

⑥遺伝子治療では fukutin 欠損キメラマウス筋に電気穿孔法で mouse fukutin の遺伝子導入をはじめたが、効率がわるく、今後の課題である。

## F. 研究発表

1. Sunada, Y., Saito, F., Higuchi, I., Matsumura, K. and Shimizu, T. Deficiency of a 180-kDa extracellular matrix protein in Fukuyama type

congenital muscular dystrophy skeletal muscle. *Neuromusc. Disord.* 12, 117-120, 2002

2. Masaki, T., Matsumura, K., Hirata, A., Yamada, H., Hase, A., Arai, K., Shimizu, T., Yorifuji, H., Motoyoshi, K. and Kamakura, K. Expression of dystroglycan and the laminin- $\alpha$ 2 chain in the rat peripheral nerve during development. *Exp. Neurol.* 174, 109-117, 2002

3. Hase A, Yamada H, Arai K, Sunada Y, Shimizu T, Matsumura K. Characterization of parkin in bovine peripheral nerve. *Brain Res* 930: 143-149, 2002

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

5. 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

6. Chiyonobu T, Yoshihara T, Fukushima Y, Yamamoto Y, Tsunamoto K, Nishimura Y, Ishida H, Toda T, Kasabuchi Y. Sister and brother with Vici syndrome: agenesis of the corpus callosum, albinism, and recurrent infections. *Am J Med Genet* 109:61-66, 2002

7. 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  $\alpha$ -dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 291:1283-1286, 2002

8. 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* 47:275-278, 2002
9. Zanoteli E, Rocha JC, Narumia LK, Fireman MA, Moura LS, Oliveira AS, Gabbai AA, Fukuda Y, Kinoshita M, Toda T. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: a case report in the Japanese population living in Brazil. *Acta Neurol Scand* 106:117-121, 2002
10. Horie M, Kobayashi K, Takeda S, Nakamura Y, Lyons GE, Toda T. Isolation and characterization of the murine homologue of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. *Genomics* 80:482-486, 2002
11. Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, Simsek E, Tunc M, Alper M, Cam M, Guven A, Fukuda Y, Kinoshita M, Kocabay K, Toda T. A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient with very severe and fatal abnormalities of the eye and brain as well as muscular dystrophy. *Ann Neurol* (in press)
12. Li M, Ishikawa K, Toru S, Tomomotsu H, Takashima M, Goto J, Takiyama Y, Sasaki H, Imoto I, Inazawa J, Toda T, Kanazawa I, Mizusawa H. Physical map and haplotype analysis of 16q-linked autosomal dominant ataxia (ADCA) type III in Japan. *J Hum Genet* (in press)
13. Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T, Emanuel BS. The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT rich repeats. *Am J Hum Genet* (in press)
14. Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamauchi H, Ohnuma A, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, van Coster R, Topaloglu H, Voit T, Many H, Endo T, Toda T. A worldwide distribution and a broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* (in press)
15. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med.* (7):731-7, 2002.
16. Mori A, Okuyama K, Horie M, Taniguchi Y, Wadatsu T, Nishino N, Shimada Y, Miyazawa N, Takeda S, Niimi M, Kyushiki H, Kondo M, Mitsumoto Y. Alteration of methamphetamine-induced striatal dopamine release in mint-1 knockout mice. *Neurosci Res.* 43(3):251-7, 2002.
17. 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. (submitted)
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

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  
フクチンのゴルジ体局在と $\alpha$ ジストログリカンへの関与と muscle-eye-brain 病患者の世界各地における  
分布とその広い臨床スペクトラム

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** 抗フクチン抗体を作成し、ゴルジ体への局在をみた。フクチン欠損キメラマウスの骨格筋、  
大脳において $\alpha$ ジストログリカン糖鎖認識抗体反応性が著しく低下しており、ラミニン結合能も低下してい  
た。またキメラマウス骨格筋にフクチン発現コンストラクトを導入すると、フクチンを発現するようにな  
った筋細胞において $\alpha$ ジストログリカン糖鎖認識抗体の反応性の回復をみた。O-mannose に GlcNAc を付加  
する新規の糖転移酵素、日本・韓国を含む世界各国の MEB, WWS, FCMD 患者 6 人より、7 種類の POMGnT1  
遺伝子変異を新たに見出し、MEB は決してフィンランドの疾患ではなく、幅広い表現型を持つことを提唱  
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 (MEB) 病、Walker-Warburg 症候  
群 (WWS) は、重度の先天性筋ジストロフィーに、  
胎生期の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劣性遺伝性神経筋疾患である。  
これら 3 疾患は類縁疾患とされ、同じメカニズム  
により発症すると考えられている。

我々は以前 FCMD の原因遺伝子を同定、また原  
因蛋白質フクチンはアミノ酸配列により、細胞表面  
の糖蛋白質または糖脂質の糖鎖を修飾する酵素では  
ないかと推測されている。実際我々は患者リンパ球  
での糖鎖修飾状態の変化を観察している。

一方 MEB 病は常染色体劣性遺伝疾患で、先天  
性筋ジストロフィーに強度の近視・網膜異常・視神  
経萎縮などの眼障害、さらに神経細胞移動期の障害  
による II 型滑脳症を伴い、眼・筋・脳が侵される疾  
患である。多くはフィンランドで報告され、今まで  
に我が国における MEB 病の報告はない。その症状  
は、FCMD や WWS と類似し、臨床症状で区別する  
のは困難な時もある。

MEB 病の原因遺伝子が protein O-linked  
mannose  $\beta$ 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase  
1 (POMGnT1) 糖転移酵素遺伝子である事を、我々  
は昨年報告した。その遺伝子産物は O 型マンノー  
スに特異的に GlcNAc を転移する糖転移酵素であ  
る。この O マンノース型糖鎖は哺乳類において脳・  
末梢神経・骨格筋の限られた糖蛋白質にのみ見られ

る。O マンノース型糖鎖をもつ蛋白質の例として、  
筋細胞膜の $\alpha$ ジストログリカンがあり、この糖鎖を  
介して基底膜の laminin  $\alpha$ 2 鎖と結合している。ま  
た MEB 患者において $\alpha$ ジストログリカンの染色性  
が著しく減少しており、現在、MEB では POMGnT1  
の変異によりこの糖鎖が異常になってしまう為、  
laminin-ligand 結合異常により筋ジスが発症するの  
ではないかと考えられている。

B. 研究方法・研究結果

これまでフクチン特異抗体の作成に多くの試みが  
なされてきたが、今回抗フクチン抗体を得ることが  
できた。本抗体は内在性フクチンを認識せず、強制  
発現系においてフクチンを認識する。この抗体を用  
いた骨格筋での観察は不可能であったが、フクチン  
を強制発現させ細胞内局在を調べたところ、フクチ  
ンはゴルジ体に局在することが分かった。

FCMD 骨格筋で $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖認識抗  
体による免疫染色性が著しく低下していることが報  
告されているが、我々も同様の結果を得た。さらに  
我々の作成したフクチン欠損キメラマウスの骨格筋  
においても $\alpha$ ジストログリカン糖鎖認識抗体反応性  
が著しく低下しており、ラミニン結合能も低下して  
いた。

またキメラマウス骨格筋にフクチン発現コンスト  
ラクトを導入すると、フクチンを発現するようにな  
った筋細胞において $\alpha$ ジストログリカン糖鎖認識抗  
体の反応性の回復がみられた。一方で、フクチンを

強制発現させた細胞の $\alpha$ ジストログリカンを用いたウエスタンで調べたところ、見かけ上の分子量が小さくなっていた。

昨年我々は、トルコ・フランス人計 6 人の患者から 6 種類の遺伝子変異を見出したが、これらは FCMD の *fukutin* 遺伝子に見られるような特殊な 3 kb insertion 変異とは異なり、全てシンプルな point mutation であった。そこで私達は「フィンランドの外でも広く MEB 患者は存在するのでは？」と考え、それを確かめる為、今回 FCMD 原因遺伝子である *fukutin* 遺伝子に変異が認められなかった患者を中心に、日本・韓国などアジア地域を含めた世界各国の WWS、重症型の FCMD、MEB が疑われる患者計 30 人において *POMGnT1* 遺伝子異常のスクリーニングを行った。

その結果、日本・韓国を含む世界各国の患者 6 人より、7 種類の変異を新たに見出した。これらの変異も全て point mutation であり、また今まで見出したものと合わせた 13 変異は、*POMGnT1* 遺伝子全体に散在していた。その変異位置と臨床症状との間に対して genotype-phenotype correlation があるかどうかを評価する為、私達は眼・筋・脳に関して計 12 人の MEB 患者の臨床症状を調べた。診断名については様々であったが、通常 1 年以内で死亡してしまう WWS とは異なり 12 人全員の MEB 患者は生存していた。比較的、多様な臨床症状が認められ、MEB 病には従来考えられていたよりも広い臨床スペクトラムが存在する事が分かった。また *POMGnT1* 遺伝子の 5'末端側に変異のある患者には水頭症があり、比較的重症な phenotype であるのに対して、3'末端側に変異のある患者には水頭症がなく比較的軽症な phenotype であるという correlation が認められた。

#### C. 考察

実際に FCMD 骨格筋で $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖認識抗体による免疫染色性が著しく低下していることが報告されている。また我々は FCMD 類縁疾患である MEB 病の原因が *POMGnT1* 糖転移酵素遺伝子の異常であることを報告したが、*POMGnT1* もゴルジ体に存在する糖転移酵素で、 $\alpha$ ジストログリカンの糖転移に関与していると考えられていることも考慮すると、フクチンも $\alpha$ ジストログリカンの糖

鎖修飾に関係するゴルジ体局在の糖鎖修飾酵素ではないかと考えられる。また発現量が微量で内在性のものを抗体で認識できないことも、他の糖転移酵素と共通している。

また *POMGnT1* 遺伝子の 5'末端側に変異のある患者には水頭症が見られるのに対して、3'末端側に変異のある患者には水頭症が見られないという correlation は認められたが、MEB には従来考えられていたよりも広い臨床スペクトラムが存在した。従って今後は、WWS・重症型の FCMD・もしくは MEB を疑う患者において、遺伝子レベルの診断が必要かつ有用だと考えられる。

#### D. 研究発表

1. Yoshioka M, Kuroki S, Sasaki H, Baba K, Toda T. A variant of congenital muscular dystrophy. *Brain Dev* 24:24-29, 2002
2. 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
3. Chiyonobu T, Yoshihara T, Fukushima Y, Yamamoto Y, Tsunamoto K, Nishimura Y, Ishida H, Toda T, Kasabuchi Y. Sister and brother with Vici syndrome: agenesis of the corpus callosum, albinism, and recurrent infections. *Am J Med Genet* 109:61-66, 2002
4. Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tachikawa M, Many H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa H, Toda T. Deficiency of  $\alpha$ -dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 291:1283-1286, 2002
5. 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* 47:275-278, 2002

6. Zanoteli E, Rocha JC, Narumia LK, Fireman MA, Moura LS, Oliveira AS, Gabbai AA, Fukuda Y, Kinoshita M, Toda T. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: a case report in the Japanese population living in Brazil. *Acta Neurol Scand* 106:117-121, 2002

7. Horie M, Kobayashi K, Takeda S, Nakamura Y, Lyons GE, Toda T. Isolation and characterization of the murine homologue of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. *Genomics* 80:482-486, 2002

8. Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, Simsek E, Tunc M, Alper M, Cam M, Guven A, Fukuda Y, Kinoshita M, Kocabay K, Toda T. A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient with very severe and fatal abnormalities of the eye and brain as well as muscular dystrophy.

*Ann Neurol* (in press)

9. Li M, Ishikawa K, Toru S, Tomomotsu H, Takashima M, Goto J, Takiyama Y, Sasaki H, Imoto I, Inazawa J, Toda T, Kanazawa I, Mizusawa H. Physical map and haplotype analysis of 16q-linked autosomal dominant ataxia (ADCA) type III in Japan. *J Hum Genet* (in press)

10. Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T, Emanuel BS. The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT rich repeats. *Am J Hum Genet* (in press)

11. Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamauchi H, Ohnuma A, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, van Coster R, Topaloglu H, Voit T, Manya H, Endo T, Toda T. A worldwide distribution and a broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* (in press)

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
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：FCMD筋においては $\alpha$ -dystroglycanの糖鎖認識抗体による免疫染色性が欠損していることが報告され、福山型先天性筋ジストロフィーの原因タンパクfukutinは糖鎖転移酵素である可能性が示唆されている。そこでわれわれはfukutin欠損キメラマウスを用いて、その骨格筋にmyc-fukutin遺伝子をelectroporationにより導入し、 $\alpha$ -dystroglycan糖鎖修飾が正常に回復するか免疫組織染色による検討を行った。遺伝子が導入された筋線維を抗myc抗体と抗neo抗体で同定し、糖鎖認識抗体VIA41で免疫染色したところ陽性に染まり糖鎖修飾が正常化していることが示された。

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。fukutinは461アミノ酸残基からなる推定分子量53.7 kDaの蛋白であり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、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、fukutin糖転移酵素説の可能性がクローズアップされ、最近、FCMD筋では $\alpha$ -dystroglycanの糖鎖修飾に異常があることが示されている。そこで本研究ではfukutinの糖鎖転移活性を検証する目的でfukutin欠損キメラマウス骨格筋にfukutin遺伝子を導入し、 $\alpha$ -dystroglycan糖鎖修飾が正常に回復するか検討した。

B. 研究方法

pCAG vectorのEco RI部位にmyc-tagを付けたマウスfukutin cDNAを挿入して形質転換vectorを作成し、fukutin欠損キメラマウス（1年齢、キメラ率80-90%）の前脛骨筋に50 mgを注入した。さらにこれをelectroporation法（75V, duration 50msec, 3Hz X 2回）により遺伝子導入した。一方、対側前脛骨筋にはコントロールとしてlac Z遺伝子を組み込んだpCAG vectorを導入した。遺伝子導入後2週間で前脛骨筋を摘出し凍結切片を作成、抗myc抗体、 $\alpha$ -dystroglycanの糖鎖認識抗体を用いて免疫組織染色による解析を行った。

C. 研究結果

plasmid vectorをelectroporationした部位において少数の抗myc抗体染色陽性の筋線維の存在が確認された。これらの筋線維は抗neomycine抗体染色陽性であり、fukutin欠損筋線維に遺伝子導入されたものであることが確認された。

次に連続切片を用いて $\alpha$ -dystroglycanの糖鎖認識抗体VIA41による免疫染色を行った。fukutin欠損筋線維はVIA41抗体陰性であるのに対して、抗myc抗体陽性、抗neomycine抗体陽性の筋線維はIH6抗体での免疫染色性が陽性化していることが確認された。

D. 考察

今回fukutin欠損キメラマウスを用いたわれわれの検討で、fukutin遺伝子が導入された筋線維ではVIA41抗体で認識される $\alpha$ -dystroglycanの糖鎖発現が回復することが示された。fukutinが糖鎖転移酵素である可能性を考慮すると、われわれのデータは $\alpha$ -dystroglycanがfukutinの基質であることを強く示唆している。今回の検討では遺伝子導入効率が低く、また高齢のキメラマウスを用いたため検討できなかったが、fukutin遺伝子導入による $\alpha$ -dystroglycanの糖鎖発現の回復が筋のジストロフィー病理を改善するのか今後の大きな課題であると考えている。

E. 結論

fukutin欠損キメラマウス骨格筋にfukutin遺伝子を導入することにより、 $\alpha$ -dystroglycanの糖鎖修飾が正常化することが示された。

F. 健康危機情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sunada Y, saito F, Higuchi I, Matsumura K, Shimizu T. Deficiency of a 180-kDa extracellular matrix protein in Fukuyama type congenital muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 12: 117-120, 2002

2) Hase A, Yamada H, Arai K, Sunada Y, Shimizu T, Matsumura K. Characterization of parkin in bovine peripheral nerve. *Brain Res* 930: 143-149, 2002

2. 学会発表

1) Sunada Y, Osawa Y, Ichikawa Y, Yamada H, Morimoto K, Murakami T, Hase A, Ohi H, Matsumura K, Shimizu T. molecular pathogenesis of caveolin-3 deficiency: analyses of caveolin-3 mutant mice. *J Neurolo Sci* 199 (suppl): S57, 2002

2) Sunada Y, Ohsawa Y, Ichikawa Y, Miyazaki Y, Yamada H, Murakami T. Abberant signal transduction in the pathogenesis of caveolin-3 deficiency. *Neuromusc Disord* 12 (7-8): 719, 2002

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
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 glycosyltransferase である可能性が高い。我々は「dystrophin 糖蛋白複合体の中核である dystroglycan 複合体の機能異常こそが各種の重症型筋ジストロフィーに共通する筋変性発症機序である」との仮説を立て研究を展開して来た。その成果の1つとして $\alpha$ -dystroglycan のムチンドメインの特異な糖鎖構造が基底膜の laminin との結合に重要な役割を果たすことを明らかにした。近年の研究により FCMD では fukutin の欠損により $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖修飾に異常を来し laminin との結合が障害されることが報告され、我々の仮説が正しかったことが確認されつつある。さて 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。そのようなメカニズムとして我々は $\beta$ -dystroglycan の細胞外ドメインを切断するマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）を同定し、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を報告した。今回はこの MMP が筋ジストロフィーの分子発症機序にどのような役割を果たしているか心筋症ハムスターを用いて検討した。①MMP による $\beta$ -dystroglycan 細胞外ドメインの分解は BIO-14.6 ならびに TO-2 心筋症ハムスターの骨格筋、心筋、平滑筋で特異的に亢進していた。BIO-14.6 ならびに TO-2 心筋症ハムスターの骨格筋、心筋抽出成分中の $\alpha$ -dystroglycan,  $\beta$ -dystroglycan, laminin  $\alpha 2$  鎖はすべて WGA column に完全に吸着されたが、 $\beta$ -dystroglycan の MMP 分解産物は吸着しなかった。つまり MMP による $\beta$ -dystroglycan 細胞外ドメインの分解によって心筋症ハムスター筋では dystroglycan 複合体を介する細胞内外の架橋が部分的に破綻していた。② $\beta$ -dystroglycan の細胞外ドメインが MMP により切断されることにより $\alpha$ -dystroglycan は細胞膜から切り離された。つまり基底膜と細胞膜の架橋構造が破綻した。心筋症ハムスターでは dystroglycan 複合体が崩壊し $\alpha$ -dystroglycan と $\beta$ -dystroglycan が分離していることが知られており、今回の結果は $\beta$ -dystroglycan の細胞外ドメインを分解する MMP がこの現象に関与していることを示唆した。これはこの MMP 活性を抑制する薬剤が筋ジストロフィーの治療法として有効である可能性を示すものである。

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 glycosyltransferase であ

る可能性が高い。我々は「dystrophin 糖蛋白複合体の中核である dystroglycan 複合体の機能異常こそが各種の重症型筋ジストロフィー

に共通する筋変性発症機序である」との仮説を立て研究を展開して来た。その成果の1つとして $\alpha$ -dystroglycan のムチンドメインの特異な糖鎖構造が基底膜の laminin との結合に重要な役割を果たすことを明らかにした。近年の研究により FCMD では fukutin の欠損により $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖修飾に異常を来し laminin との結合が障害されることが報告され、我々の仮説が正しかったことが確認されつつある。

さて 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。そのようなメカニズムとして我々は $\beta$ -dystroglycan の細胞外ドメインを切断するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を同定し、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を報告した。本研究ではこの MMP が筋ジストロフィーの分子発症機序にどのような役割を果たしているか心筋症ハムスターを用いて検討した。

## B. 研究方法

①sarcoglycan 欠損症のモデル動物である BIO-14.6 ならびに TO-2 心筋症ハムスターの骨格筋、心筋、平滑筋、大脳を摘出、その SDS 抽出液を SDS-PAGE にて分離、PVDF 膜に転写、 $\beta$ -dystroglycan のカルボキシル末端を認識する抗体を用いたイムノブロット法で解析した。骨格筋、心筋の粗膜分画を調整、

その Triton X-100 抽出成分を wheat germ agglutinin (WGA) affinity column chromatography にかき dystroglycan 複合体を部分精製、組成を解析した。なお正常対照として F1B ハムスターを用いた。

②RT4 細胞を MMP 阻害剤である BPHA の存在下または非存在下で培養、培養細胞を回収後、遠心して可溶性分画と細胞膜分画に分離した。 $\alpha$ -dystroglycan と $\beta$ -dystroglycan がどちらの分画に回収されるか SDS-PAGE にて分離、PVDF 膜に転写、 $\beta$ -dystroglycan のカルボキシル末端を認識する抗体を用いたイムノブロット法で解析した。

## C. 研究結果

①MMP による $\beta$ -dystroglycan 細胞外ドメインの分解は BIO-14.6 ならびに TO-2 心筋症ハムスターの骨格筋、心筋、平滑筋で特異的に亢進していた。一方、脳では認めなかった。正常ハムスター、BIO-14.6 ならびに TO-2 心筋症ハムスターすべてにおいて、骨格筋、心筋抽出成分中の $\alpha$ -dystroglycan、 $\beta$ -dystroglycan、laminin  $\alpha 2$  鎖はすべて WGA column に完全に吸着された。しかし BIO-14.6 ならびに TO-2 心筋症ハムスターで認める $\beta$ -dystroglycan の 30 kDa の MMP 分解産物は全く吸着しなかった。つまり MMP による $\beta$ -dystroglycan 細胞外ドメインの分解によって心筋症ハムスター筋では dystroglycan 複合体を介する細胞内外の架橋が部分的に破綻していた。

②この MMP 活性が細胞膜の安定性にどのような影響を与えるか培養細胞を用いて検証した。BPHA の存在下では $\beta$ -dystroglycan の分解は完全に抑制され、 $\alpha$ -dystroglycan と $\beta$ -dystroglycan はともに細胞膜分画に回収さ

れた。一方、非存在下ではかなりの割合の  $\beta$ -dystroglycan が分解し 30 kDa の分解産物が出現した。また  $\alpha$ -dystroglycan のかなりの部分が細胞膜には回収されず、可溶性分画に遊離していた。つまり  $\beta$ -dystroglycan の細胞外ドメインが MMP により切断されることにより  $\alpha$ -dystroglycan は細胞膜から切り離された。

#### D. 考察

我々はこれまで「dystroglycan 複合体の機能異常こそが各種の重症型筋ジストロフィーに共通する筋変性発症機序である」との仮説を立て研究を展開して来た。その中で  $\alpha$ -dystroglycan のムチンドメインの特異な糖鎖構造が基底膜の laminin との結合に重要な役割を果たすことを明らかにした。近年の研究により FCMD では fukutin の欠損により  $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖異常が起こり laminin との結合が障害されることが報告され、我々の仮説が正しかったことが確認されつつある。

さて心筋症ハムスターでは dystroglycan 複合体が崩壊し  $\alpha$ -dystroglycan と  $\beta$ -dystroglycan が分離していることが報告されている。今回の結果は  $\beta$ -dystroglycan の細胞外ドメインを分解する MMP がこの現象に関与していることを示唆している。その原因として例えば心筋症ハムスターでは sarocoglycan という覆いが失なわれ  $\beta$ -dystroglycan の細胞外ドメインの MMP 切断部位が露出している可能性が考えられる。さらに  $\beta$ -dystroglycan の細胞外ドメインが MMP により切断されることにより  $\alpha$ -dystroglycan が細胞膜から切り離されることは基底膜と細胞膜の架橋構造が破綻することを意味しており筋細胞膜の安定性に与える影

響は甚大と想像される。

以上のことより dystroglycan 複合体を介する細胞外基底膜と細胞膜の架橋構造の破綻を来す病態として  $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖異常の他に  $\beta$ -dystroglycan の細胞外ドメインを切断する MMP が重要と考えられる。

#### E. 結論

①MMP による  $\beta$ -dystroglycan 細胞外ドメインの分解は BIO-14.6 ならびに TO-2 心筋症ハムスターの骨格筋、心筋、平滑筋で特異的に亢進していた。BIO-14.6 ならびに TO-2 心筋症ハムスターにおいて、骨格筋、心筋抽出成分中の  $\alpha$ -dystroglycan,  $\beta$ -dystroglycan, laminin  $\alpha$ 2 鎖は WGA column に完全に吸着されたが、 $\beta$ -dystroglycan の MMP 分解産物は吸着しなかった。これらのことは MMP による  $\beta$ -dystroglycan 細胞外ドメインの分解によって心筋症ハムスター筋では dystroglycan 複合体を介する細胞内外の架橋が部分的に破綻していることを意味した。

② $\beta$ -dystroglycan の細胞外ドメインが MMP により切断されることにより  $\alpha$ -dystroglycan は細胞膜から切り離された。これは基底膜と細胞膜の架橋構造の破綻を意味した。

#### F. 研究(論文)発表

1. Sunada, Y., Saito, F., Higuchi, I., Matsumura, K. and Shimizu, T. (2002) Deficiency of a 180-kDa extracellular matrix protein in Fukuyama type congenital muscular dystrophy skeletal muscle. *Neuromusc. Disord.* 12, 117-120.
2. Masaki, T., Matsumura, K., Hirata, A., Yamada, H., Hase, A., Arai, K., Shimizu, T.,

Yorifuji, H., Motoyoshi, K. and Kamakura, K.  
(2002) Expression of dystroglycan and the  
laminin- $\alpha$ 2 chain in the rat peripheral nerve  
during development. *Exp. Neurol.* 174,  
109-117.

厚生労働科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業)  
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 研究員

研究要旨 マウス脳 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変異を有するマウスを作製するために、cre-loxP system によりマウス fukutin 遺伝子第 10 エクソンがヒト変異型第 10 エクソンで置換された ES 細胞の作製を試みた。

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常染色体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。この疾患に関する自然発症マウスは存在しない。本研究では、fukutin 遺伝子異常マウスを作製し、成体における fukutin 遺伝子の機能を解明すること、および FCMD の治療方法の開発に役立つことを目的とする。

B. 研究方法

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変異を有するマウスを作製するために、マウス fukutin 遺伝子第 10 エクソン近傍に loxP 配列を挿入した ES 細胞株を作製した。次いでヒト変異型第 10 エクソンと loxP 配列からなる置換ベクターを cre 発現下で導入して、第 10 エクソンがヒト患者型エクソンで置換された ES 細胞の作製を試みた。

(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」に従って実施した。

C. 研究結果

マウス fukutin 遺伝子第 10 エクソン近傍に 2 つの loxP 配列が挿入された ES 細胞を 6 株樹立し、うち 1 株 (B-60) を用いてキメラマウスを作製した。また、B-60 細胞株にヒト変異型第 10 エクソンと loxP 配列からなる置換ベクターを cre 組換え酵素発現下で導入したが、これまでのところ第 10 エクソンがヒト患者型エクソンで置換された ES 細胞は得られていない。

D. 考察

fukutin 欠損細胞キメラマウスでは FCMD の病態がよく再現され、骨格筋への fukutin 遺伝子導入により筋再生が認められたことから本疾患に対する治療の可能性が示された。ただし、このマウスを疾患モデル動物として利用する際には、fukutin 欠損細胞の寄与率は個体毎に異なること、およびマウスとして継代できないことが問題となる。これらを解決するために、ヒト変異型エクソン置換マウスの作製を試みたが、これまでのところ目的の ES 細胞は樹立できていない。このため、組換え細胞を効率的に選別するための工夫が必要と思われる。また、loxP 配列

が挿入された ES 細胞に由来するキメラマウスが作製できたので、この変異アレルが生殖系列に伝達されれば受精卵での knock-in 反応を検討することも可能となる。

#### E. 結論

マウス fukutin 遺伝子第 10 エクソン近傍に loxP 配列が挿入された ES 細胞株を作製したが、FCMD 患者型遺伝子による置換反応は認められず、今後の検討が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30.

Nat Med. (7):731-7, 2002.

Mori A, Okuyama K, Horie M, Taniguchi Y, Wadatsu T, Nishino N, Shimada Y, Miyazawa N, Takeda S, Niimi M, Kyushiki H, Kondo M, Mitsumoto Y. Alteration of methamphetamine-induced striatal dopamine release in mint-1 knockout mice. Neurosci Res. 43(3):251-7, 2002.

Horie M, Kobayashi K, Takeda S, Nakamura Y, Lyons GE, Toda T. Isolation and characterization of the mouse ortholog of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene. Genomics. 80(5):482-6, 2002.

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. (submitted)

##### 2. 学会発表

武田聖, 近藤万里, 佐々木淳子, 新井謙, 美崎佳寿代, 今村道弘, 清水輝夫, 松村喜一郎, 村上龍文, 砂田芳秀, 不二門尚, 寺島俊雄, 戸田達史. Fukutin 欠損細胞キメラマウスの病態解析. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)

Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Arai K, Imamura M, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T. Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis, and normal eye development. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of American Society of Human Genetics. (2002, Baltimore, MD)

##### 7. 知的所有権の出願・取得状況 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
Sunada, Y., Saito, F., Higuchi, I., Matsumura, K. and Shimizu, T.	Deficiency of a 180-kDa extracellular matrix protein in Fukuyama type congenital muscular dystrophy skeletal muscle.	Neuromusc. Disord.	12	117-120	2002
Masaki, T., Matsumura, K., Hirata, A., Yamada, H., Hase, A., Arai, K., Shimizu, T., Yorifuji, H., Motoyoshi, K. and Kamakura, K.	Expression of dystroglycan and the laminin- $\alpha$ 2 chain in the rat peripheral nerve during development.	Exp. Neurol.	174	109-117	2002
Hase, A., Yamada, H., Arai, K., Sunada, Y., Shimizu, T. and Matsumura, K.	Characterization of parkin in bovine peripheral nerve.	Brain Res.	930	143-149	2002
Matsumura, K., Yamada, H., Saito, F., Arai, K., Zhong, D., Fukuta-Ohi, H. and Shimizu, T.	Characterization of the matrix metalloproteinase that severs the link between the extracellular matrix and cell membrane by disrupting the dystroglycan complex.	J. Neurol. Sci.	199 (Suppl.1)	S36	2002
Matsumura, K., Yamada, H., Fukuta-Ohi, H., Arai, K. and Shimizu, T.	The role of dystroglycan in the molecular pathogenesis of neuromuscular diseases.	Current Topics in Neurochemistry		in press	
Yoshioka M, Kuroki S, Sasaki H, Baba K, Toda T.	A variant of congenital muscular dystrophy.	Brain Dev.	24	24-29	2002
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
Chiyonobu T, Yoshihara T, Fukushima Y, Yamamoto Y, Tsunamoto K, Nishimura Y, Ishida H, Toda T, Kasabuchi Y.	Sister and brother with Vici syndrome: agenesis of the corpus callosum, albinism, and recurrent infections.	Am. J. Med. Genet.	109	61-66	2002
Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tachikawa M, Many H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa H, Toda T.	Deficiency of $\alpha$ -dystroglycan in muscle-eye-brain disease.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	291	1283-1286	2002
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.	47	275-278	2002
Zanotelli E, Rocha JC, Narumia LK, Fireman MA, Moura LS, Oliveira AS, Gabbai AA, Fukuda Y, Kinoshita M, Toda T.	Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: a case report in the Japanese population living in Brazil.	Acta Neurol. Scand.	106	117-121	2002
Horie M, Kobayashi K, Takeda S, Nakamura Y, Lyons GE, Toda T.	Isolation and characterization of the murine homologue of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin.	Genomics	80	482-486	2002