

200833066A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発と病態解明

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 戸田 達史

大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発と病態解明-----	1
大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学	戸田 達史
II. 分担研究報告	
1. 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発と病態解明-----	9
大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学	戸田 達史
2. 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発と病態解明-----	12
財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団	
東京都老人総合研究所	遠藤 玉夫
3. 福山型先天性筋ジストロフィーに対する Large 蛋白質を用いた新規治療法の 開発 -----	15
帝京大学医学部神経内科	松村 喜一郎
4. 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発と病態解明-----	16
川崎医科大学医学部神経内科	砂田 芳秀
5. POMGnT1 欠損マウスを用いた α -dystroglycan の中枢神経系及び骨格筋での 機能解析、及び AAV 遺伝子治療 -----	19
国立精神・神経センター神経研究所	鈴木 友子
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	27

1. 総括研究報告

福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発と病態 解明

研究代表者 戸田達史 大阪大学院臨床遺伝学 教授

研究要旨

福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発をめざして、さまざまな病態解析と治療開発の研究をおこなった。①FCMDの発症機序は当初推定されていた mRNA 不安定化でなく、実はスプライシング異常であることを明らかにした。②内在性 fukutin を検出する抗体を作成でき、SVA 型レトロトランスポゾン挿入による異常スプライシングに由来する異常 fukutin をはじめて検出した。③レトロトランスポゾン挿入変異をもつ fukutin ノックインマウスを作成し、POMGnT1 ノックアウトマウスとともに、 α -DG の糖鎖異常を認めた。LARGE 遺伝子導入により、 α -DG の糖鎖とラミニン結合能の増強が観察された。Cre-lox システムを利用した fukutin コンディショナル KO マウスを作成し、糖鎖異常と病態を示すことを確認した。④ α -ジストログリカンにおける Man 末端糖鎖の定量法を確立し、 α -ジストログリカンの糖鎖変化の簡易解析法の可能性を示した。⑤ゼブラフィッシュの O-Man 転移酵素 zPOMT1、zPOMT2 を同定し、複合体形成による活性発現機構が種を越えて保存されていることを明らかにした。⑥Large transgenic mouse を作成し、Large により α -DG の機能修復が *in vivo* においても安全かつ確実に生じることを示した。⑦マウス胎生線維芽細胞に骨格筋特異的転写因子である MyoD をアデノウイルスベクターによって導入し *in vitro* でも *in vivo* でも筋細胞に分化させた。⑧POMGnT1 KO マウスを作成し、POMGnT1^{-/-}では α -DG の糖鎖修飾が異常であったが、筋変性・壊死は目立たず、POMGnT1^{-/-}筋衛星細胞では細胞増殖能が低下していた。レトロウイルスベクターで POMGnT1 発現を回復させても筋衛星細胞の *in vitro* での増殖能が回復せず、 α -DG-ラミニンの結合は niche での筋衛星細胞の維持に重要である。

研究分担者

遠藤玉夫 財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所・研究部長

松村喜一郎 帝京大学医学部神経内科・准教授

砂田芳秀 川崎医科大学医学部神経内科・教授

鈴木友子 国立精神・神経センター神経研究所・室長

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、福山によって報告・確立された先天性筋ジストロフィーの一種であり、重度の筋ジストロフィーに脳奇形を伴う常染色体劣性遺伝性神経筋疾患である。我が国の小児期筋ジ

ストロフィーの中ではデュシャンヌ型に次いで多く我々の約 90 人に 1 人が保因者である。患児は生涯歩行不能であり、同時に精神発達遅延を伴い、多くは 20 歳以前に死亡する難病であり、muscle-eye-brain 病 (MEB) などと類似疾患とされる。

研究代表者らのグループは日本に特異的に多い FCMD の原因遺伝子の同定に成功、遺伝子産物をフクチンと名付けた (Nature 1998)。また糖転移酵素 POMGnT1 の遺伝子が MEB 原因遺伝子であることを明らかにし、糖鎖異常が筋ジスの新たなメカニズムとした (Dev Cell 2001)。その後同様の原因が相次いで発見され、 α ジストログリカノパチーという新しい疾患概念が確立された。 α -DG の O-マンノース型糖鎖の異常により、基底膜中のラミニンとの結合能が低下し、筋組織では、筋細胞膜が脆弱化、筋細胞が壊死・変性に陥り、筋ジストロフィーが起こるとされ、6 種類の遺伝子が同定されている。うち POMT1 と POMT2 は複合体をつくって協同的に働くことをしめし (PNAS 2004)、また α -DG で O-マンノース型糖鎖修飾をうけるアミノ酸を決定した (JBC 2007)。さらに fukutin は、POMGnT1 と相互作用を示した (BBRC 2006)。よって O-マンノース型糖鎖修飾の分子機構の解明、 α ジストログリカノパチーのさらなる病態解析を行う。

しかしながら筋ジストロフィーとしてみた場合、重要なのは「治療」である。デュシャンヌ型に関する治療研究は世界各国で盛んに行われている。一方で、FCMD、MEB 原因遺伝子同定を契機に α ジストログリカノパチーの

病態研究が大きく進展したが、治療としては報告がない。特に FCMD は日本に特異的に多く未だ治療法がない悲惨な疾患であり、一刻も早い治療法開発が望まれている。研究代表者らは、fukutin 欠失細胞や RNAi による fukutin ノックダウン細胞などの FCMD モデル細胞系を確立し、さらに FCMD モデル動物として fukutin 欠損 ES 細胞由来のキメラマウス (Hum Mol Genet 2003)、大部分の FCMD 患者が持つ SVA レトロトランスポゾン挿入変異を導入したノックインマウスを作成して病態解析を行っており、またコンディショナルノックアウトマウスの完成も近い。

そこで本研究では、むしろ治療研究を主眼とし、FCMD を中心とし、FCMD モデル細胞とモデル動物を用いて、ゴルジ装置へ運搬させるコレラトキシン+LARGE による酵素補充治療、基底膜異常に着目した細胞移植治療、AAV 遺伝子治療など、さまざまなユニークな治療実験を行って、臨床応用可能な治療法を確立し、臨床試験への道筋を目指す。

B. 研究方法, C. 研究結果

①福山型先天性筋ジストロフィー発症機序の解明 (戸田)

FCMD の発症機序は当初推定されていた mRNA 不安定化でなく、実はスプライシング異常であることを明らかにした。最終エクソンにおいて、正常な翻訳領域中に存在する潜在的スプライシング供与部位が SVA により活性化され、SVA 中の潜在的スプライシング受容部位との間がスプライシングされて脱落し、fukutin タンパク質の

C末端が変化してしまうために発症するのである。

②抗フクチン抗体を用いた解析(戸田)

fukutin タンパク質は、多くの糖転移酵素と同様に細胞内には微量しか存在せず、通常のWestern解析等では検出できない。戸田らが今回新たに作成したヤギ抗体 106G2 は、免疫沈降が可能であることがわかり、この抗体を用いて内在性 fukutin を濃縮、別の抗体を用いて検出することができた。

この免疫沈降の系により、FCMD モデルのマウス、マウス細胞、ヒト患者細胞から fukutin を濃縮したところ、正常 fukutin タンパク質よりも分子量の大きな異常 fukutin タンパク質を検出した。この異常 fukutin は、SVA 型レトロトランスポゾン挿入による異常スプライシングに由来するものであると考えられる。

③福山型筋ジストロフィーと類縁疾患モデルマウスにおける糖鎖異常(戸田)

FCMD のモデルとして戸田らが創出したレトロトランスポゾン挿入変異をもつ fukutin KI マウスと、FCMD 類縁疾患 muscle-eye-brain 病モデルの POMGnT1 KO マウスにおいて、 α -DG の糖鎖異常が認められた。これらのマウスに LARGE 遺伝子を導入すると、 α -DG の糖鎖とラミニン結合能の増強が観察された。

また、fukutin 機能解析のため、Cre-lox システムを利用した fukutin コンディショナル KO マウスを作成し、糖鎖異常と病態を示すことを確認した。

④POMGnT1 活性変化の検出方法の

開発(遠藤)

POMGnT1 活性の低下は、O-Man 型糖鎖の GlcNAc 転移不全により Man 以降の糖鎖伸長を制限する。そのため、 α -ジストログリカンには Man を末端とする糖鎖が増加することが予想される。そこで、RNAi による fukutin ノックダウン細胞で発現させた α -ジストログリカンを用いて、リコンビナント POMGnT1 により転移される GlcNAc の量から、Man 末端糖鎖の量を定量し、POMGnT1 活性の変化を測定する方法を検討した。

RNAi により fukutin をノックダウンした細胞に発現させた α -ジストログリカンは、コントロール細胞で発現させた α -ジストログリカンに比較して、GlcNAc の取り込み量が多く、Man を末端とする糖鎖の量が多いことが明らかとなった。この結果は、fukutin のノックダウンにより、POMGnT1 活性が低下することを示している。fukutin ノックダウン細胞で α -ジストログリカンを発現させると、糖鎖不全によると考えられる低分子量の分子種が一部検出される。オートラジオグラフィによる分析から、GlcNAc の取り込みは主に低分子量の分子種に見られた。

⑤ゼブラフィッシュ O-Man 転移酵素の解析(遠藤)

ゼブラフィッシュ初期胚から zPOMT1 および zPOMT2 遺伝子をクローニングし、HEK293 細胞を用いて両タンパク質を単独あるいは同時に発現させて酵素活性を測定した。また、RT-PCR 法および whole-mount in situ hybridization (WISH) 法により両遺伝子の発現解析を行った。

zPOMT1 および zPOMT2 はそれぞれ 720 アミノ酸および 756 アミノ酸をコードしていた。活性測定を行った結果、両タンパク質を共発現させた場合に高い POMT 活性が検出された。RT-PCR 法および WISH 法の結果から、両遺伝子は受精直後より発現しており、初期発生過程を通してほぼ全身で発現していることが確認された。

⑥ Large 蛋白質を用いた新規治療法の開発 (松村)

Large による α -DG の機能修復作用を *in vivo* の系で確認するために Large transgenic mouse を作製した。また欠失コンストラクトを用いて α -DG の機能修復に必要な Large のドメインを決定した。

Large transgenic mouse は正常に誕生、発育し交配も可能であった。各組織に形態学的異常も認められなかった。同マウスの α -DG の laminin 結合能は著明に亢進していた。Large による α -DG の機能修復には管腔内ドメインの全長が必要であった。

⑦ Adeno-MyoD-GFP-MEF 細胞のジストロフィン陽性筋細胞への *in vitro* 分化 (砂田)

ヒト線維芽細胞同様にマウス胎児線維芽細胞が MyoD 導入によって筋細胞に分化するか否かについて解析した。Adeno-CAG-MyoD ウイルスベクター導入後 2 日目から紡錘状の線維芽細胞の形態が変化し円形化を始め筋芽細胞様に変化した。その後次第にこの細胞同士が融合を始め 4-5 日には筋管細胞様の形態を呈し筋細胞への分化が考えられた。

アデノウイルス感染についてはタ

イターが高すぎると増殖抑制が強すぎ死滅すること、低すぎると分化傾向が抑制される、MOI 30 程度が至適であることが明らかとなった。ウエスタンブロット解析では MyoD 発現は分化 4 日まで持続した後に消失して、MyoD の一過性の発現と宿主ゲノムへのインテグレートはしないことが証明された。その後分化 5 日で筋細胞特異的中間径フィラメントであるデスミンが発現し、分化 14 日にはジストロフィンが発現が確認された。MyoD によってマウス胎児由来線維芽細胞が *in vitro* では筋細胞に分化することが確認された。

⑧ MyoD 導入 GFP-MEF 細胞の筋線維への *in vivo* 分化 (砂田)

MyoD 導入 GFP-MEF 細胞を野生型マウス前脛骨筋に移植し 4 週間後に解析した。約 80% の筋線維は GFP 陽性であり、このうち再生線維を中心に GFP 強陽性線維が認められた。MyoD 導入によって線維芽細胞が筋線維に分化し筋再生に参加することが *in vivo* で明らかとなった。これらの GFP 陽性線維のうち、弱陽性線維は内因性筋線維への MyoD 導入 GFP-MEF 細胞の融合、強陽性線維は MyoD 導入 GFP-MEF 細胞からの筋線維の分化が予想される。今後は雄 GFP-MEF 細胞から雌野生型マウスへの細移植をおこない、Y 染色体染色による筋核の同定による検討を予定している。

⑨ POMGnT1 欠損マウスを用いた α -dystroglycan の中枢神経系及び骨格筋での機能解析 (鈴木)

POMGnT1^{-/-} では α -DG の糖鎖修飾が異常であったが、組織切片上では骨格筋

の筋変性・壊死は目立たなかった。筋壊死の指標である血中 CK 値及びエバンスブルーの筋線維内への取り込みは軽度上昇していた。野生型及び *POMGnT1*^{-/-} から筋衛星細胞分画を FACS で分取し、20%FCS と 2.5 ng/ml bFGF を添加した DMEM 培地で培養し、MTT アッセイを行なった結果、*POMGnT1*^{-/-} 筋衛星細胞の増殖能の著明な低下が認められた。

2%ウマ血清を含む培地で筋衛星細胞に分化を誘導したところ、野生型と *POMGnT1*^{-/-} の間には筋管形成能に有意差はなかった。レトロウイルスによる *POMGnT1* 発現回復により α -DG の糖鎖修飾は完全に回復したが、増殖能は回復しなかった。

D. 考察

FCMD の発症機序がスプライシング異常であることが示された。この発症機構を治療標的に、アンチセンス化合物を用いてスプライシングの是正を行い、正常なフクチン蛋白を誘導することで、FCMD の根治治療への可能性が示唆された。

タンパク質レベルの解析においても、異常スプライシングが起こっていることが示された。ヤギ抗体 106G2 は今後のタンパク質レベルでの検討、機能解析等に有用である。

LARGE 遺伝子は、fukutin や *POMGnT1* に変異が生じていても、 α -DG の糖鎖異常を *in vivo* において代替的に解消できることから、 α -ジストログリカノパチーに対する LARGE 遺伝子治療の有効性が示された。fukutin コンディショナル KO マウスは、fukutin 機能解析のみならず、病態機序や治療研究に有

効なツールとなることが予想される。

今回の結果は、変異 *fukutin* ノックインマウスの脳で、一部の α -ジストログリカンにおいて分子量の低下が観察され、*POMGnT1* 活性が低下する、という以前の解析結果に一致していた。これは *fukutin* による *POMGnT1* 活性の制御機構の存在を強く示している。また、この方法は、酵素と糖供与体の組み合わせによって、末端の糖鎖構造の検出に利用できることから、福山型以外の α -ジストログリカノパチーにおける糖鎖異常の簡易解析への応用が可能である。

POMT 活性の検出に *zPOMT1* と *zPOMT2* を共発現する必要があることから、酵素活性の発現に *zPOMT1*-*zPOMT2* 複合体の形成が必要であるという、哺乳類の POMT と同様のメカニズムがあることが明らかとなった。さらに、 α -ジストログリカノパチー病態モデルとしてのゼブラフィッシュの有用性を示し、治療薬のスクリーニングなどへの応用を目指すため、現在、アンチセンスモルフォリノによる *zPOMT1* および *zPOMT2* 遺伝子のノックダウン解析を行っている。

Large transgenic mouse において α -DG の laminin 結合能が著明に亢進しているにもかかわらず同マウスの表現型に異常が認められないことから、Large 蛋白質の全身投与に際しても副作用の出現する可能性は高くはないものと推測された。また Large は膜貫通ドメインや細胞質ドメインを欠いても α -DG の機能修復作用を保持していた。これにより Large を分泌型蛋白質として哺乳類培養細胞により大量産生する道が開けた。

4 種類の遺伝子発現によって線維芽細胞が胚性多能性幹 (iPS 細胞) になるという山中らの報告によって成熟体細胞から多能性幹細胞への“初期化”が証明され、再生療法は新たな時代を迎えている。MyoD は骨格筋分化への最も重要な転写因子と考えられ藤井らはヒト皮膚生検組織からの線維芽細胞へのこの転写因子導入によって *in vitro* では骨格筋への分化に成功した。

今回の検討により MyoD を導入したマウス胎児線維芽細胞も *in vitro* で骨格筋へ分化し、更にこの細胞の移植によって *in vivo* でも筋線維に高率に分化することを示した。本研究では MyoD 導入に際して アデノウイルスベクターを用いたが、MyoD の発現は一過性であり宿主ゲノムへのウイルスインテグレーションはないものと考えられた。しかしながらこの細胞移植戦略を FCMD 患者への臨床応用を考えた場合には、ウイルスベクターの使用が安全性、倫理性において問題となると予想される。従って今後は MyoD 導入についてアデノウイルスベクター以外のアプローチについての検討が必要と考えられる。また MyoD 導入マウス胎児線維芽細胞の分化過程での α -DG の糖鎖修飾についての詳細な検討が必須となる。

POMGnT1^{-/-}では、 α -DG とラミニンとの結合能が顕著に低下していることから、*POMGnT1*^{-/-}由来の筋衛星細胞の増殖能の低下は α -DG-ラミニンの結合能の低下によると考えられたが、*POMGnT1* 発現回復により増殖能が回復しなかった。その原因については今後検討が必要である。

E. 結論

1、FCMDの発症機序は当初推定されていたmRNA不安定化でなく、実はスプライシング異常であることを明らかにした。

2、内在性fukutinを検出する抗体を作成でき、SVA型レトロトランスポゾン挿入による異常スプライシングに由来する異常fukutinをはじめ検出した。

3、レトロトランスポゾン挿入変異をもつfukutin KIマウスを作成し、*POMGnT1* KOマウスとともに、 α -DGの糖鎖異常を認めた。LARGE遺伝子導入により、 α -DGの糖鎖とラミニン結合能の増強が観察された。Cre-loxシステムを利用したfukutinコンディショナルKOマウスを作成し、糖鎖異常と病態を示すことを確認した。

4、 α -ジストログリカンにおけるMan末端糖鎖の定量法を確立し、 α -ジストログリカンの糖鎖変化の簡易解析法の可能性を示した。ゼブラフィッシュのO-Man転移酵素zPOMT1、zPOMT2を同定し、複合体形成による活性発現機構が種を越えて保存されていることを明らかにした。

5、Largeにより α -DGの機能修復が*in vivo*においても安全かつ確実に生じることを示した。今後はLarge transgenic mouseをfukutin knockout mouseと交配し表現型が改善するかどうか観察するとともに、Large蛋白質を大量産生し蛋白質治療に向けた予備実験を開始する予定である。

6、マウス胎生線維芽細胞に骨格筋特異的転写因子であるMyoDをアデノウイルスベクターによって導入すると*in vitro*でも*in vivo*でも筋細胞

に分化することが明らかとなった。この細胞を用いたFCMD患者への再生治療法を目指しFCMDモデルマウスへの治療研究を行う予定である。

7、*POMGnT1*^{-/-}ではa-DGの糖鎖修飾が異常であったが、組織切片上では骨格筋の筋変性・壊死は目立たなかった。*POMGnT1*^{-/-}筋衛星細胞では細胞増殖能が低下していた。レトロウイルスベクターで*POMGnT1*発現を回復させても筋衛星細胞の*in vitro*での増殖能が回復しなかったことから、a-DG-ラミニンの結合はnicheでの筋衛星細胞の維持に重要である可能性がある。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
1. 論文発表
(研究分担者の項参照)

2. 学会発表
(研究分担者の項参照)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
特になし

II. 分担研究報告

福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発と病態解明

研究代表者 戸田達史 大阪大学院臨床遺伝学 教授
研究協力者 谷口真理子、金川基、小林千浩

研究要旨

FCMDの発症機序は当初推定されていたmRNA不安定化でなく、実はスプライシング異常であることを明らかにした。内在性fukutinを検出する抗体を作成でき、SVA型レトロトランスポゾン挿入による異常スプライシングに由来する異常fukutinをはじめ検出した。レトロトランスポゾン挿入変異をもつfukutinノックインマウスを作出し、PO MGnT1 KOマウスとともに、 α -DGの糖鎖異常を認めた。LARGE遺伝子導入により、 α -DGの糖鎖とラミニン結合能の増強が観察された。Cre-loxシステムを利用したfukutinコンディショナルKOマウスを作出し、糖鎖異常と病態を示すことを確認した。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は、大脳皮質形成異常、眼症状を伴い、fukutinの機能喪失変異により発症する。ほとんどの患者では、fukutinの3'非翻訳領域へのSVAレトロトランスポゾン挿入変異が、ホモ接合、または他の変異との複合ヘテロ接合で認められる。FCMDでは、基底膜と細胞骨格を結ぶ α -ジストログリカン(α -DG)に糖鎖異常が生じているため、fukutinタンパク質は、 α -DGの糖鎖修飾に関わっていると考えられている。

本研究は、日本に特異的に多いFCMDをはじめとする、 α -ジストログリカノパチーの発症原因であるO-マンノース型糖鎖の合成機構とその病態を解明することと、我が国の筋ジストロフィー研究における重要課題であるFCMDの治療へ向けて、さまざまなユニークな治療実験を行い、臨床応用可能な治療法を確立し、臨床試験への道筋を目指す。

B. 研究方法、C. 研究結果

①福山型先天性筋ジストロフィー発症機序の解明

FCMDの発症機序は当初推定されていたmRNA不安定化でなく、実はスプライシング異常であることを明らかにした。最終エクソンにおいて、正常な翻訳領域中に存在する潜在的スプライシング供与部位がSVAにより活性化され、SVA中の潜在的スプライシング受容部位との間がスプライシングされて脱落し、fukutinタンパク質のC末端が変化してしまうために発症するのである。

②抗フクチン抗体を用いた解析

fukutinタンパク質は、多くの糖転移酵素と同様に細胞内には微量しか存在せず、通常のWestern解析等では検出できない。今回新たに作成したヤギ抗体106G2は、免疫沈降が可能であることがわかり、この抗体を用いて内在性fukutinを濃縮、別の抗体を用いて検出することができた。

この免疫沈降の系により、FCMDモデルのマウス、マウス細胞、ヒト患者細胞からfukutinを濃縮したところ、正常fukutinタンパク質よりも分子量の大きな異常fukutinタンパク質を検出した。この異常fukutinは、SVA型レトロトラン

スポゾン挿入による異常スプライシングに由来するものであると考えられる。

③福山型筋ジストロフィーと類縁疾患モデルマウスにおける糖鎖異常

FCMDのモデルとして我々が創出したレトロトランススポゾン挿入変異をもつ fukutin KI マウスと、FCMD 類縁疾患 muscle-eye-brain 病モデルの POMGnT1 KO マウスにおいて、 α -DG の糖鎖異常が認められた。これらのマウスに LARGE 遺伝子を導入すると、 α -DG の糖鎖とラミニン結合能の増強が観察された。

また、fukutin 機能解析のため、Cre-lox システムを利用した fukutin コンディショナル KO マウスを作成し、糖鎖異常と病態を示すことを確認した。

D. 考察

FCMD の発症機序がスプライシング異常であることが示された。この発症機構を治療標的に、アンチセンス化合物を用いてスプライシングの是正を行い、正常なフクチン蛋白を誘導することで、FCMD の根治治療への可能性が示唆された。

タンパク質レベルの解析においても、異常スプライシングが起こっていることが示された。ヤギ抗体 106G2 は今後のタンパク質レベルでの検討、機能解析等に有用である。

LARGE 遺伝子は、fukutin や POMGnT1 に変異が生じていても、 α -DG の糖鎖異常を *in vivo* において代替的に解消できることから、 α ジストログリカノパチーに対する LARGE 遺伝子治療の有効性が示された。fukutin コンディショナル KO マウスは、fukutin 機能解析のみならず、病態機序や治療研究に有効なツールとなることが予想される。

E. 結論

FCMD の発症機序は当初推定されていた mR NA 不安定化でなく、実はスプライシング異常であることを明らかにした。

内在性 fukutin を検出する抗体を作成でき、SVA 型レトロトランススポゾン挿入による異常スプライシングに由来する異常 fukutin をはじめて検出した。

レトロトランススポゾン挿入変異をもつ fukutin KI マウスを作成し、POMGnT1 KO マウスとともに、 α -DG の糖鎖異常を認めた。LARGE 遺伝子導入により、 α -DG の糖鎖とラミニン結合能の増強が観察された。Cre-lox システムを利用した fukutin コンディショナル KO マウスを作成し、糖鎖異常と病態を示すことを確認した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato S, et al. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photo receptor ribbon synapse formation. *Nature Neurosci* 11:923-931, 2008

Wakayama Y, et al. Reduced expression of sarcospan in muscles of Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Histol Histopathol* 23:1425-1438, 2008

Kanagawa M, et al. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet* 18:621-631, 2009

2. 学会発表

日本小児神経学会 シンポジウム 2008
日本人類遺伝学会 教育講演 2008

World Muscle Society 2008
日本分子生物学会・生化学会 2008
CK50 symposium 2009
遺伝子治療シンポジウム 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

特になし

福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発と病態解明

研究分担者 遠藤玉夫 財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所 研究部長

福山型先天性筋ジストロフィーおよび類縁疾患は糖鎖異常を原因とする。本研究では糖鎖異常のメカニズムを理解することで、病態解明および画期的な診断・治療法の開発を目指している。本年度は fukutin と POMGnT1 活性との関係を詳細に検討する目的で、 α -ジストログリカンにおけるマンノース末端糖鎖の定量法を確立し、 α -ジストログリカンの糖鎖変化を簡便に解析できる可能性を示した。また、筋ジストロフィーモデルとしてのゼブラフィッシュの可能性を検討するため、O-Man 転移酵素 zPOMT1、zPOMT2 を同定し、ヒトと同様に複合体形成による活性発現機構を明らかにした。

A. 研究目的

我々は福山型先天性筋ジストロフィーおよび類縁疾患の原因が糖鎖の異常であることを世界で初めて明らかにしており、病態解明から画期的な早期診断法や治療法の開発を目指している。福山型先天性筋ジストロフィーおよび類縁疾患の原因遺伝子は、これまで6種明らかにされている。我々はそのうち3種、POMGnT1 と POMT1 と POMT2、は糖転移酵素であることを明らかにしたが、fukutin, FKRP, LARGE の機能は不明である。我々は最近 fukutin が POMGnT1 と複合体を形成し、活性の制御に関わることを示した。しかし、この活性制御機構には不明な点が多い。そこで、本年度は、POMGnT1 活性への fukutin の影響を高感度で検出する方法の開発を試みた。また、近年、ゼブラフィッシュは、遺伝子操作が簡易である、繁殖しやすい、表現型を解析しやすい、脊椎動物である、ことなどから、遺伝子解析や疾患モデル動物として用いられている。特に薬剤を投与しやすく化合物のスクリーニングなど治療法開発を目指す上での利用価値は高い。そこで、ゼブラフィッシュの O-マンノース (Man) 転移酵素 zPOMT1、zPOMT2 を解析し、筋ジストロフィー症モデルとしての可能性について検討した。

B. 研究方法

(1) POMGnT1 活性変化の検出方法の開発

POMGnT1 活性の低下は、O-Man 型糖鎖の GlcNAc 転移不全により Man 以降の糖鎖伸長を制限する。そのため、 α -ジストログリカンには Man を末端とする糖鎖が増加することが予想される。そこで、RNAi による fukutin ノックダウン細胞で発現させた α -ジストログリカンを用いて、リコンビナント POMGnT1 により転移される GlcNAc の量から、Man 末端糖鎖の量を定量し、POMGnT1 活性の変化を測定する方法を検討した。

(2) ゼブラフィッシュ O-Man 転移酵素の解析

ゼブラフィッシュ初期胚から zPOMT1 および zPOMT2 遺伝子をクローニングし、HEK293 細胞を用いて両タンパク質を単独あるいは同時に発現させて酵素活性を測定した。また、RT-PCR 法および whole-mount in situ hybridization (WISH) 法により両遺伝子の発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

放射性同位元素の使用に関しては「放射線障害防止法関連法令」および「東京都老人総合研究所規定」に従った。組換え DNA 実験に関しては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」および「東京都老人総合研究所規定」に従った。

C. 研究結果

(1) POMGnT1 活性変化の検出方法の開発

RNAiにより *fukutin* をノックダウンした細胞に発現させた α -ジストログリカン、コントロール細胞で発現させた α -ジストログリカンと比較して、GlcNAc の取り込み量が多く、Man を末端とする糖鎖の量が多いことが明らかとなった。この結果は、*fukutin* のノックダウンにより、POMGnT1 活性が低下することを示している。*fukutin* ノックダウン細胞で α -ジストログリカンを発現させると、糖鎖不全によると考えられる低分子量の分子種が一部検出される。オートラジオグラフィによる分析から、GlcNAc の取り込みは主に低分子量の分子種に見られた。

(2) ゼブラフィッシュ O-Man 転移酵素の解析

zPOMT1 および *zPOMT2* はそれぞれ 720 アミノ酸および 756 アミノ酸をコードしており、活性測定を行った結果、両タンパク質を共発現させた場合に高い POMT 活性が検出された。RT-PCR 法および WISH 法の結果から、両遺伝子は受精直後より発現しており、初期発生過程を通してほぼ全身で発現していることが確認された。

D. 考察

(1) POMGnT1 活性変化の検出方法の開発

今回の結果は、変異 *fukutin* ノックインマウスの脳で、一部の α -ジストログリカンにおいて分子量の低下が観察され、POMGnT1 活性が低下する、という以前の解析結果に一致していた。これは *fukutin* による POMGnT1 活性の制御機構の存在を強く示している。また、この方法は、酵素と糖供与体の組み合わせによって、末端の糖鎖構造の検出に利用できることから、福山型以外の α -ジストログリカノパチーにおける糖鎖異常の簡易解析への応用が可能である。

(2) ゼブラフィッシュ O-Man 転移酵素の解析

POMT 活性の検出に *zPOMT1* と *zPOMT2* を共発現する必要があることから、酵素活性の発現に *zPOMT1*-*zPOMT2* 複合体の形成が必要であるという哺乳類の POMT と同様のメカニズムがあることが明らかとなった。さらに、 α -ジストログリカ

ノパチー病態モデルとしてのゼブラフィッシュの有用性を示し、治療薬のスクリーニングなどへの応用を目指すため、現在、アンチセンスモルフォリンによる *zPOMT1* および *zPOMT2* 遺伝子のノックダウン解析を行っている。

E. 結論

α -ジストログリカンにおける Man 末端糖鎖の定量法を確立し、 α -ジストログリカンの糖鎖変化の簡易解析法の可能性を示した。ゼブラフィッシュの O-Man 転移酵素 *zPOMT1*、*zPOMT2* を同定し、複合体形成による活性発現機構が種を越えて保存されていることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Wang F, Fujikake N, Taniguchi M, Lu Z, Tachikawa M, Nagai Y, Tashiro F, Miyazaki J, Tajima Y, Takeda S, Endo T, Kobayashi K, Campbell KP, Toda T.: Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet.*, 18(4), 621-31, 2009

Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanesaki H, Kudo A, Many H, Endo T, Takeda S. Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts *in vitro*. *Mech Develop.*, in press

Yanagisawa A, Bouchet C, Quijano-Roy S, Vuillaumier-Barrot S, Clarke N, Odent S, Rodriguez D, Romero NB, Osawa M, Endo T, Lia TA, Seta N, Guicheney P.: *POMT2* intragenic deletions and splicing abnormalities causing congenital muscular dystrophy with mental retardation. *Eur J Med Genet.* in press

2. 学会発表

遠藤玉夫、萬谷博、赤阪-萬谷啓子: 神経移動障害を伴う先天性筋ジストロフィー。第31回日本神経科学大会、東京、2008.7.9-11

萬谷博、赤阪-萬谷啓子、遠藤玉夫: O-マンノース転移酵素における N 型糖鎖の役割。第28回日本糖質学会年会、つくば、2008.8.18-20

萬谷博、赤阪-萬谷啓子、遠藤玉夫: *O*-マンノース転移酵素における *N*型糖鎖の役割. 第81回日本生化学会大会, 神戸, 2008.12.9-12

遠藤玉夫、萬谷博: ジストログリカンの糖鎖修飾と筋ジストロフィー. 第81回日本生化学会大会, 神戸, 2008.12.9-12

坂恵利子、萬谷博、遠藤玉夫、田丸浩: 培養細胞を用いたゼブラフィッシュPOMT遺伝子の発現とその

酵素活性の検討. 第81回日本生化学会大会, 神戸, 2008.12.9-12

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

福山型先天性筋ジストロフィーに対する Large 蛋白質を用いた新規治療法の開発

研究分担者 松村喜一郎 帝京大学神経内科

研究要旨

Large 蛋白質を用いた福山型先天性筋ジストロフィーに対する新規治療法の開発を目指すにあたり、本年度は Large transgenic mouse の解析を行なった。同マウスは正常に誕生、発育し交配も可能であり、各組織に形態学的異常も認められなかった。各組織における α -DG の laminin 結合能は著明に充進していた。今後は Large transgenic mouse を fukutin knockout mouse と交配しその表現型が改善するかどうか観察するとともに、Large 蛋白質を大量産生し蛋白質治療に向けた予備実験を開始する予定である。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は α -dystroglycan (α -DG) の機能低下が原因と考えられている。一方で Large には α -DG の機能修復作用が知られている。本研究の目的は Large 蛋白質を用いた FCMD の新規治療法を開発することである。

B. 研究方法

Large による α -DG の機能修復作用を *in vivo* の系で確認するために Large transgenic mouse を作製した。また欠失コンストラクトを用いて α -DG の機能修復に必要な Large のドメインを決定した。

(倫理面への配慮)

実験動物に関して本学の動物実験倫理委員会にて承認を受け、苦痛軽減のため安楽死を行うなど動物愛護に十分配慮しながら行う。ヒトのサンプルを用いた実験やヒトへの薬剤投与は計画していない。

C. 研究結果

Large transgenic mouse は正常に誕生、発育し交配も可能であった。各組織に形態学的異常も認められなかった。同マウスの α -DG の laminin 結合能は著明に充進していた。Large による α -DG の機能修復には管腔内ドメインの全長が必要であった。

D. 考察

Large transgenic mouse において α -DG の laminin 結合能が著明に充進しているにもかかわらず同マウスの表現型に異常が認められないことから、Large 蛋白質の全身投与に際しても副作用の出現する可能性は高くはないものと推測された。また Large は膜貫通ドメインや細胞質ドメインを欠いても α -DG の機能修復作用を保持していた。これによ

り Large を分泌型蛋白質として哺乳類培養細胞により大量産生する道が開けた。

E. 結論

Large により α -DG の機能修復が *in vivo* においても安全かつ確実に生じることを示した。今後は Large transgenic mouse を fukutin knockout mouse と交配し表現型が改善するかどうか観察するとともに、Large 蛋白質を大量産生し蛋白質治療に向けた予備実験を開始する予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
なし
2. 学会発表

Saito F, Shimizu T, and Matsumura K.
Glycosylation of α -dystroglycan in cultured cells and its restoration by glycosyltransferase. 13th International Congress of the World Muscle Society, September 30, 2008, Newcastle Gateshead, UK

齊藤史明、新井祐子、清水輝夫、松村喜一郎、 α -ジストログリカノパチーにおけるジストログリカンの機能修復に関する検討 第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008.5.17

新井祐子、齊藤史明、清水輝夫、松村喜一郎、 α -Dystroglycan の N 末端断片の脳脊髄液における発現 第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008.5.17

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

福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発と病態解明

研究分担者 砂田 芳秀 川崎医科大学内科学（神経） 教授

研究要旨

筋ジストロフィー治療研究の世界的な潮流として骨格筋前駆細胞を用いた再生療法が注目されている。我々が報告したラミニン欠損マウスを用いた骨髄移植の検討からは基底膜が破綻するタイプの筋ジストロフィーである福山型筋ジストロフィー（FCMD）は骨格筋前駆細胞治療の効率が良いと予想される。本研究では、①骨格筋前駆細胞（幹細胞）のソースとして大量に入手の出来る線維芽細胞を用い、骨格筋特異的転写因子 MyoD をアデノウイルスベクターで一過性に導入し *in vitro* での筋細胞分化を証明した、②この分化過程の細胞を野生型マウス前脛骨筋に移植することにより高率に筋細胞に分化することを示した。今後はこの細胞を FCMD モデルマウスに移植し FCMD の細胞治療法の開発を目指しに研究を進める。

A. 研究目的

福山型筋ジストロフィー（FCMD）は我が国で疾患概念が提唱され責任遺伝子 *fukutin* が同定された常染色体劣性遺伝形式を示す先天性筋ジストロフィーで現在その治療法の確立が急務の神経難病である。その病態研究からは糖鎖修飾酵素と推定されている *fukutin* 遺伝子の欠損によりアルファジストログリカン（ α -DG）の O-マンノース型糖鎖修飾が異常によって基底膜中のラミニンとの結合能が低下し、筋細胞膜が脆弱化し筋細胞壊死・変性に陥り、筋ジストロフィーが起こると考えられている。従ってこの疾患の治療戦略として α -DG の糖鎖修飾を修復するという戦略が考えられ最近、*Fukutin* の機能を代替する糖鎖修飾酵素 *Large* を発現させるという治療戦略が報告され注目を浴びている。我々は FCMD における基底膜破壊に着目して、この障害を積極的に利用した骨格筋前駆細胞による再生医療を構想し研究を進めてきた。

まず FCMD と同様に筋基底膜破綻が認められるラミニン欠損先天性ジストロフィーのモデルマウス（*dy*）に GFP マウス骨髄細胞を移植した。その結果、① *dy* マウス横隔膜には GFP 陽性骨髄由来細胞が高率に取り込まれ、筋線維と融合する、②この GFP 陽性筋線維では筋線維周囲にラミニンが高発現する、③移植群 *dy* マウスは、非移植群と比較

して有意に呼吸筋不全が改善し生存期間が延長する、④一方、筋基底膜が破綻しないジストロフィン欠損筋ジストロフィー（DMD）モデル（*mdx*）マウスに対する GFP 骨髄移植は GFP 陽性骨髄由来細胞が殆ど取り込まれない、という結果を得ている（Hagiwara H, et al., FEBS lett 580, 2006）。このことから、「筋基底膜は骨髄由来幹細胞治療の生理的バリアーである」と考えられ、筋基底膜破綻の認められる FCMD は骨格筋系幹細胞治療によって高い治療効果が期待できると考えられる。

そこで我々は、骨髄細胞より移植効率が高く、かつ細胞が大量に入手が出来る骨格筋系幹細胞のソースとして、マウス胎児線維芽細胞（MEF）に着目した。MEF に *cMyc* を含む 4 種類の遺伝子を導入することによって多能性幹（ES）細胞類似の胚性幹（iPS）細胞が樹立できることが最近京都大学山中らによって報告され、胎児線維芽細胞は幹細胞へのプライミングが可能な細胞と考えられている。一方、崇城大学薬学部藤井 績博士らはヒト DMD 患者の皮膚生検組織から採取した線維芽細胞に骨格筋特異的転写因子である *MyoD* を *Adeno* ウイルスベクターで発現することによって *in vitro* ではジストロフィン発現筋細胞に分化が可能であることを報告した。これらの結果から

我々は胎児線維芽細胞に MyoD を発現することによって骨格筋幹細胞を樹立できるのではないかと考えた。そこで本研究では、まず GFP マウス胎児から MEF 細胞を採取培養して、MyoD をアデノウイルスベクターで発現し、*in vitro* で筋細胞に分化するか否かについて観察を行った。次いでこの細胞を野生型マウス骨格筋に移植して筋細胞として正着するか否かについて検討を行った。この研究を基礎にして最終的には FCMD 患者に対する線維芽細胞由来骨格筋系幹細胞移植法の開発を目指し研究を進めている。

B. 研究方法

GFP-MEF 細胞の単離と培養

胎生 12 日の GFP マウスを母体より無菌条件下で摘出し PBS 溶液に浸す。次いでこのマウスの脳神経系及び内臓を剥離し、残りの皮膚及び皮下組織をハサミで細切して 0.25 % Trypsin, 0.5mMEDTA 溶液に浸し 5% インキュベーターで 37°C、20 分間インキュベートした。次いで皮膚及び皮下組織をピペッティングして機械的に分解した。もう一回同様の Trypsin 処理を繰り返した後、DMEM/10%FBS 培地を加え攪拌し単一細胞を得た。この細胞をペトリディッシュに播種し、DMEM/10%FBS 培地で培養し継代していった。

Adeno-CAG-MyoD ウイルスベクターによる感染

感染前日に 2 継代 GFP マウス由来 MEF 細胞を 1×10^5 /well で 6 ウェルプレートに播種した。感染日にはまず DMEM/10%FBS 培地を吸引して DMEM/5%FBS 培地に交換する。次いで Adeno-CAG-MyoD ウイルスベクターを MOI 100, 30, 10, 3, 1 と条件を振って培養上清に添加する。その後プレートを 5% インキュベーターで 37°C、15 分間振盪インキュベートし、60 分後培地を完全に吸引する。DMEM/5%FBS 培地で細胞を洗浄し、DMEM/10%FBS 培地に交換する。培養開始後経時的に蛍光顕微鏡で観察し、細胞染色及びウエスタンブロット解析を行った。

Adeno-MyoD-GFP-MEF 細胞の野生型マウスへの移植

感染細胞が線維芽細胞から筋芽細胞様にトランスフォームした時点で Trypsin 処理を行い、筋芽細胞様細胞を回収した。この細胞を生理食塩水に懸濁して 1×10^6 個の細胞を 10 週齢野生型マウス (C57B/L6) 前脛骨筋に筋注した。

Adeno-MyoD-GFP-MEF 細胞移植筋の解析

移植後 4 週間のマウス前脛骨筋を採取し O.C.T.Compound を用いて凍結包埋した。これをスライドガラス上に厚さ 10 μ m の切片とし、-80°C で保存した作製した切片について H&E 染色、抗 GFP 抗体染色を行い移植効率について検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、川崎医科大学の実験動物に関するガイドラインに従って行った。また、遺伝子組み換え実験については、川崎医科大学の規定に従い、許可を得て行った。

C. 研究結果

Adeno-MyoD-GFP-MEF 細胞のジストロフィン陽性筋細胞への *in vitro* 分化

まずヒト線維芽細胞同様にマウス胎児線維芽細胞が MyoD 導入によって筋細胞に分化するか否かについて解析した。Adeno-CAG-MyoD ウイルスベクター導入後 2 日目から紡錘状の線維芽細胞の形態が変化し円形化を始め筋芽細胞様に変化した。その後次第にこの細胞同士が融合を始め 4-5 日には筋管細胞様の形態を呈し筋細胞への分化が考えられた。アデノウイルス感染についてはタイターが高すぎると増殖抑制が強すぎ死滅すること、低すぎると分化傾向が抑制される、MOI 30 程度が至適であることが明らかとなった。ウエスタンブロット解析では MyoD 発現は分化 4 日まで持続した後に消失して、MyoD の一過性の発現と宿主ゲノムへのインテグレーションはしないことが証明された。その後分化 5 日で筋細胞特異的中間径フィラメントであるデスミンが発現し、分化