

福山型筋ジストロフィーの発見とその類縁疾患における病態

Pathomechanism of Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and related disorders

戸田達史

わが国で特異的にみられる福山型筋ジストロフィーや、そのほか muscle-eye-brain 病、Walker-Warburg 症候群は、先天性筋ジストロフィーに滑脳症と眼奇形をともなう類縁疾患である。筆者らは、福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子を同定し、原因蛋白質をフクチンと命名した。近年、これらの筋ジストロフィーに共通した病態として α ジストログリカンの糖鎖修飾異常が注目され、“ α ジストログリカノパチー”という新しい疾患概念が提唱されている。本稿では、福山型筋ジストロフィーの研究の歴史やその病態を中心に、 α ジストログリカノパチーについて解説する。

Key words ●福山型筋ジストロフィー ●フクチン ● α ジストログリカノパチー ●muscle-eye-brain 病 ●糖鎖

はじめに

筋ジストロフィーは、進行性の筋力低下と筋萎縮をともなう、筋線維の変性・壊死をおもな病理像とする遺伝性疾患の総称である。その種類は多く、発症頻度、遺伝形式、発症年齢、臨床症状はまったく異なっている。世界中で多くの患者が苦しんでおり、その救済のため、わが国を含め多くの国で、専門病院ばかりでなく筋ジストロフィー協会などの支援団体がつくられている。

福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama-type congenital muscular dystrophy; FCMD) は、1960年、福山らにより発見され、その後、臨床的に集大成された。先天性筋ジストロフィーに神経細胞の移動障害による脳奇形をともなう常染色体性劣性遺伝疾患であり、日本人に特異的な疾患である。筆者らは、“日本人の名前のついた病気は日本人の手でなんとかしたい”と思い、患者集めからはじめて、ポジショナルクローニング法により原因遺伝子を同定

し、原因蛋白質をフクチンと命名した¹⁾。さらに、遠藤王夫博士 (東京都老人総合研究所) らと共同で、福山型先天性筋ジストロフィーの類縁疾患である muscle-eye-brain 病の原因蛋白質が糖転移酵素 POMGnT1 であることを証明した²⁾。近年、筋ジストロフィーの原因が翻訳後の糖鎖修飾異常であるという、新たな発症メカニズムを示唆する研究があいついでいるが、福山型先天性筋ジストロフィーは糖鎖とのかかわりが示された最初の例である。本稿では、まず、福山型先天性筋ジストロフィーの発見から確立にいたる臨床的なことについて概説し、その後、遺伝子同定への道のりと最近のトピックス“糖鎖異常と筋ジストロフィー”を中心に述べる。ほとんど日本人にのみ発症し、日本人が発見・研究してきたこの疾患について、普段、親しみのない読者にもぜひ知っていただきたいと筆をとった。

1 福山型先天性筋ジストロフィーの発見と確立

福山型先天性筋ジストロフィーは、福山幸夫博士 (現 東京女子医大名誉教授) が東京大学医学部附属病院小児科に在籍していた1960年、“いわゆる脳性麻痺例から血清クレアチンキナーゼの高値例”を見だし、これを独立疾患として提唱したところからその歴史がはじまる。以後、福山ら

Tatsushi Toda

大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝学

E-mail: toda@clgene.med.osaka-u.ac.jp

URL: <http://www.clgene.med.osaka-u.ac.jp/www/menu.html>

を中心とした多数の症例報告や研究によって疾患としての確立がなされていった³⁾。この疾患は、わが国における小児期筋ジストロフィーのなかで、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのつぎに多くみられ、発症率は2.9/10万人であり、日本人の約90人に1人が保因者である計算になる。わが国には1000~2000人ほどの患者がいると推定されているが、海外からの診断確実例の報告は、この1~2年で増えたものの(後述)、当初は数例のみで、わが国に特異的にみられる疾患である。

福山型先天性筋ジストロフィーは、重度の筋ジストロフィー病変とともに多少脳回を基本とする高度の脳奇形を認め、さらに最近では、近視、白内障、視神経低形成、網膜剥離などの眼症状も注目されている。すなわち、遺伝子異常により骨格筋、眼、脳を中心に侵す一系統疾患である(図1)。患児は生後~乳児早期に筋緊張低下や筋力低下を発症し、運動障害は重症で、2歳前後で坐位まで獲得するものは多いが、歩行まで獲得するものはまれである。しかし、乳児期から筋力低下が認められるにもかかわらずその進行は緩徐であり、頭定または坐位保持の状態のまま維持する例が多い。また同時に、脳奇形による中枢神経症状にとま

た精神発達の遅延がみられ、その約半数に痙攣がみられる。6歳以降は運動機能の低下がみられ、筋力低下や全身の関節拘縮により10歳前後には完全臥床状態となる。平均寿命は17.6歳で、死亡原因としては肺炎がもっとも多く、ついで、心不全、呼吸不全の順である³⁾。

中枢神経病変は、病理学的に多小脳回あるいは厚回様多小脳回、無脳回などの脳回異常の混合が必発であり、特徴的である(図1)。組織学的には、大脳では層構造が失われ、皮質外層部における細胞移動障害により、有線線維を含むグリア間葉性膜組織が不規則に増殖している⁴⁾。

福山型先天性筋ジストロフィーは、1960年の発表後、わが国ではスムーズに認知されたものの、海外ではなかなか認知されなかった。その理由は、発表された雑誌がやや私的なものであったことと、海外に患者がいなかったことのためである。海外の雑誌に掲載された総説では、1979年に出版されたものでさえ、「先天性筋ジストロフィーという疾患自体、やがては分類から消えていくであろう」とあるくらいである。いわんや福山型をや、である。しかし、福山らの不断の活動やいくつかの影響力のある論文をとおして、福山型先天性筋ジストロフィーの知識は徐々に広がっていった。そして、1986年には、Mendelian Inheritance in Man(いわゆる、McKusickのカタログ)に登録された。しかし、国際疾病分類(神経)に独立した疾患として登場したのが1991年であることは、われわれ日本人からみればたいへん意外である。

II 福山型筋ジストロフィー原因遺伝子同定のヒントと幸運

日本人に多く発症し重度な疾患であるにもかかわらず、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに比べ、福山型筋ジストロフィーの本態はほとんどわかっていなかった。1989年、筆者は、筋ジストロフィー専門病院で臨床にたずさわっていた。当時、デュシェンヌ型筋ジストロフィーはその原因蛋白質であるジストロフィンが発見され病態が明らかになりつつあったが、福山型筋ジストロフィーに関しては常染色体性劣性遺伝疾患であるということ以外は遺伝子の位置も不明であり、確実なマーカー蛋白質となりうる物質もなく、分子医学的には何もわかっていなかった。

この原因不明の疾患の診療に取り組みながら、「日本人の名前のついた病気は日本人の手で何とかしたい」と思っていたのだが、それを始めるきっかけは、1990年に偶然に出

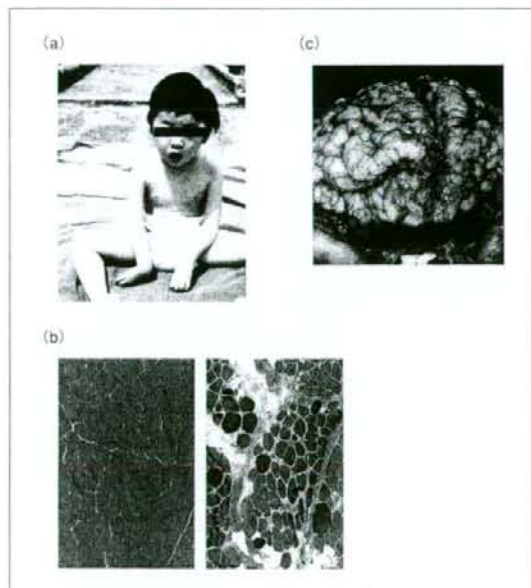


図1 福山型筋ジストロフィーの特徴

- (a) 患者の全身像。5歳。座位しかできない。ミオパチー様顔貌と関節拘縮。
 (b) 生検筋の組織像(ヘマトキシリン・エオジン染色)。左: 正常筋。右: 福山型筋ジストロフィー。
 (c) 多小脳回。小多脳回が集合して厚脳回様に見える。

かけたある班会議にあった。そこで三木哲郎博士(現愛媛大学)が、“近親婚の症例は多いのですか？近親婚の症例で10人くらいの患者さんがいれば、連鎖解析ができるのですが”と、筆者とはまったく無関係な演題において質問していたことによる。筆者はこの“ホモ接合性マッピング”⁵⁾の理論は知るはずもなく、休憩時間に三木博士に体当たりして聞いてみた。

その原理を、図2に示す。常染色体性劣性遺伝疾患の場合、いとこ婚の家系において、共通祖先の父親または母親のどちらかの染色体に福山型筋ジストロフィー変異があるとする(すなわち保因者。変異をfとし、正常を+とする)。その変異が子に伝わり、その変異がさらにその子に伝わり、変異をもついとこどうしの子においてはじめて、変異をホモにもち疾患を発症することが考えられる。言い換えれば、患者は共通祖先の1本の染色体のコピーを2つもつことになり、これを“同祖ホモ”という。この疾患原因遺伝子にごく近いDNA多型マーカーのアレルが仮に“1”である場合、遺伝子どうしの位置が近いと組換えは起こりにくいため、1はfとともに動き患者において同祖ホモになる。逆にいえば、近親婚により生まれた患者においてつねにホモとなるようなDNA多型を探せば、それは疾患原因遺伝子の近くに位置することが示唆されるわけである⁵⁾。

当時、常染色体性劣性遺伝疾患で通常連鎖解析をするのは不可能といわれており、ホモ接合性マッピングの理論を聞いてから、猛然と近親婚における症例の集積を開始した。“近親婚症例はいらっしゃいませんか？”と全国数百カ所の病院に手紙を書き、山中まで症例を集めに出かけた。もし、あの班会議に行っていなければ、このような研究は行なわなかったであろう。

また、その後、1991年、東京大学医学部附属病院神経内科医局における症例検討会で、福山型筋ジストロフィーと色素性乾皮症A群(常染色体性劣性遺伝疾患で、原因遺伝子XPAが同定された直後であった⁶⁾)を同時に発症した近親婚の症例が存在するとの情報を得て、この場合、2つの原因遺伝子は近くに存在しなければならないことに気づいた。その理由は、両親がともに2つの無関係な常染色体性劣性遺伝疾患の保因者である可能性は少なく、むしろ、患者の曾祖父または曾祖母が福山型筋ジストロフィーと色素性乾皮症A群の変異保因者であり、さらに、それら2つの原因遺伝子は近くに存在するため組換えが起こらず、ともに患者の父方と母方へと伝わり、患者で2つの変異ともホモとなって両者が合併した(図2)、という状況と考えたわ

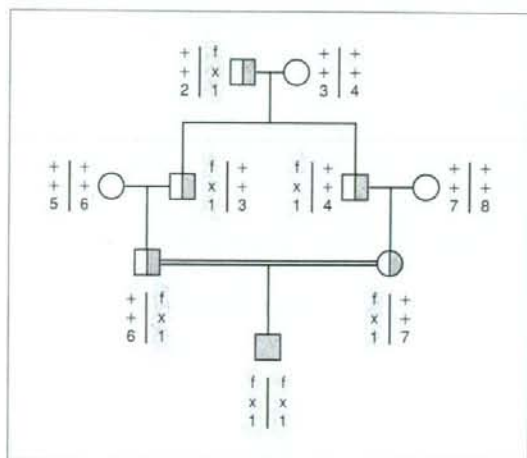


図2 ホモ接合性マッピングの原理

患者は曾祖父の1本の染色体断片のコピーを2つもつ“同祖ホモ”であり、福山型筋ジストロフィー原因遺伝子のごく近くにあるDNA多型もホモ(ここでは1, 1)になる。また、同様の理由で、色素性乾皮症A群の原因遺伝子XPAもホモになり、色素性乾皮症A群も発症する。

f: 福山型筋ジストロフィー遺伝子変異, x: XPA遺伝子変異。

けである⁵⁾。そして、まさにその周辺から連鎖解析を行ない、福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子が9q31-33領域に存在することを報告した⁷⁾。

III 福山型筋ジストロフィー原因遺伝子 フクチンとレトロトランスポゾン

その後も筆者らのグループは、福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子の存在範囲を狭める解析をつづけた。まず、組換え家系の解析により福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子の存在範囲を数cMに局限化したあと、その範囲のなかのひとつのマイクロサテライト多型に連鎖不平衡を見いだした。この多型の周辺のYACならびにコスミドの整理化クローンを作製し、独自にマイクロサテライト多型をクローニングして連鎖不平衡マッピングを行なうことで、原因遺伝子の存在範囲を100 kb以下と大幅に狭めた⁸⁾。そして、この領域の整理化コスミドの各クローンをプローブとしてサザンハイブリダイゼーション法で解析し、患者DNAのほとんどに約3 kbの挿入配列があることを見いだした。つぎに、挿入配列のまわりの断片を起点としてcDNAをスクリーニングしつづけて、1種類のcDNAを得た。こうして1998年、福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子をつきとめることに成功し、その遺伝子産物をフクチンと命名した¹⁾(図3)。

正常型フクチンのcDNAは約7kbで、骨格筋、心筋、脳で優位に発現している。ほとんどの患者DNAでみられた約3kbの挿入配列は、フクチン遺伝子の3'非翻訳領域にレトロトランスポゾンSVA型⁹⁾が挿入されていたものであった。この変異をもつ染色体ではフクチン遺伝子の発現が減少していることが観察された¹⁾。

フクチン遺伝子を挟んで存在する近傍の4つの多型マーカーを用いて多型解析を行なうと、レトロトランスポゾン挿入をもつ染色体はすべて同じハプロタイプを示す。これは、日本人の福山型筋ジストロフィー患者は共通した1人の祖先(保因者)に由来することを意味する。遺伝的に隔離された集団である日本人のなかで、レトロトランスポゾンが挿入された1本の染色体が全国に広がっていったものと考えられる。この「創始者」は約2500年前に存在したと考えられ¹⁰⁾、この時代はちょうど縄文時代から弥生時代へと移行するところである。古代から伝わったレトロトランスポゾンがヒトの遺伝性疾患の原因であることがわかったのは、世界ではじめてのことである¹⁾。

フクチンは461アミノ酸残基からなる53.7Kの蛋白質であり、N末端に膜貫通部位をもつ。抗フクチン抗体では発現量の少ない内在性フクチンを検出できないが、フクチンを細胞に強制発現させるとゴルジ体にその存在が認められる¹⁾。アミノ酸配列において相同性を示す既知の蛋白質やモチーフ検索から、フクチンはさまざまなゴルジ体糖転移酵素にみられるDXDモチーフとその周辺部分に酵母、線虫、細菌で保存されたドメインをもち、フクチン蛋白質ファミリーを形成していることが明らかとなった。また、それらの機能から、糖鎖修飾酵素あるいはその関連蛋白質である可能性が示唆されている¹¹⁾。

Ⅳ 福山型筋ジストロフィーの幅広い臨床スペクトラム

日本人における福山型筋ジストロフィー患者のほとんどは、レトロトランスポゾン挿入型染色体のホモ接合体、または、レトロトランスポゾン挿入型染色体とほかの変異をもった染色体との複合ヘテロ接合体である。また、複合ヘテロ接合体の患者は水頭症や小眼球などを併発し、ホモ接合体の患者よりも重症となる¹²⁾(表1)。これは、レトロトランスポゾン挿入型染色体からは微量ながらフクチン遺伝子が発現し、それは翻訳されて正常な蛋白質となるが、ほかの変異をもった染色体からは正常に機能する蛋白質が翻訳されないためと考えられる。この考えは、フクチンノックアウトマウスが胎生致死であることをうまく説明できる。すなわち、フクチンは正常な胚発生に必要な蛋白質であり、完全欠損した個体は生存しえないのであろう¹³⁾。つまり、海外では点変異をもつ染色体のホモ接合体となるため通常は胎生致死となり患者は存在しないが、わが国においては、めずらしいレトロトランスポゾンDNAの挿入が起こったためこの疾患が発生したといえる。この考えを裏づけるように、2003年にトルコにおいて出生後10日で死亡した男児は、フクチン遺伝子の一塩基挿入変異をホモ接合体でもっていたことを報告した¹⁴⁾。ほかにも、塩基置換によるナンセンス変異をホモ接合体でもち出生後4カ月半で死亡した例が報告されている(表1)。

しかしながら、2006年、わが国において、心筋症と軽度の筋力低下をみとめ知能正常の、臨床的には肢帯型筋ジストロフィーの例が成人で6例報告された¹⁵⁾。これは、レト

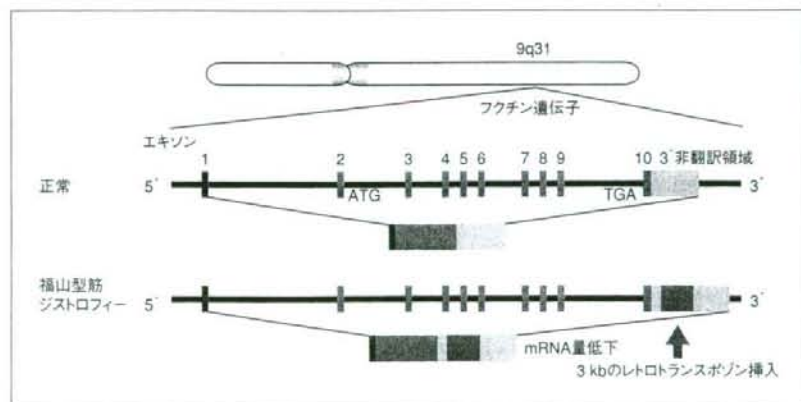


図3 フクチン遺伝子の模式図

フクチン遺伝子はゲノム上で約100 kbにわたり、10個のエキソンからなる。大部分の福山型筋ジストロフィー患者には3'非翻訳領域(水色)にレトロトランスポゾン(緑色)が挿入されている。遺伝子産物であるフクチンは、461個のアミノ酸残基からなる53.7Kの糖鎖修飾に関する新規蛋白質である。

表1 フクチン遺伝子の変異と表現型との関係

ハプロタイプ	変異の場所	DNA/アミノ酸レベルでの変異	効果	患者数	表現型
創始者ハプロタイプのホモ接合体					
138-192-147-183	3'非翻訳領域	3 kb レトロトランスポゾン挿入	mRNA 量低下	106	軽症/典型/重症/不明 (22:51:2:5)
創始者ハプロタイプと点変異の複合ヘテロ接合体					
130-201-157-183	エキソン3	C250T/Arg47 終止	ナンセンス変異	13	重症 (重度水頭症: 1)
138-195-143-191	エキソン4	298-299 欠失/Met63Val, 75 終止	フレームシフト	1	重症
不明	エキソン5	C718T/Arg203 終止	ナンセンス変異	1	重症
158-201-151-197	エキソン6	T859G/Cys250Gly	ミスセンス変異	1	重症
126-200-149-183	エキソン7	T1017A/Cys302 終止	ナンセンス変異	1	典型
128-196-159-183	イントロン7	1.2 kb L1 挿入, スプライス異常	エキソンスキップ	2	重症
不明	エキソン8	C1030T/Arg307 終止	ナンセンス変異	1	重症
不明	エキソン9	T1169A/Leu353 終止	ナンセンス変異	1	重症
不明	エキソン9	A1223G/Tyr371Cys	ミスセンス変異	1	重症
150-196-147-193	エキソン9	I279A 挿入/Phe390Ile, 403 終止	フレームシフト	1	重症 (小眼球)
点変異ホモ接合体					
不明	エキソン4	G6345 346CT/Gln116 終止	ナンセンス変異	1	最重症 (水頭症, 眼異常, 4 カ月半で死亡)
不明	エキソン5	504T 挿入/157 終止	フレームシフト	1	最重症 (小眼球, 重度水頭症, 10 日で死亡)

創始者レトロトランスポゾン変異と点変異との複合ヘテロ接合体の症例のほうが重症の傾向を示す
点変異をホモ接合体としてもつ患者は原則として胎生致死または超重症であるが、軽症例の報告もある

ロトランスポゾン挿入型染色体と点変異染色体の複合ヘテロ接合体であった。また同様に、ユダヤ人で肢帯型筋ジストロフィーの例が3例報告され、これは点変異染色体のホモ接合体であった¹⁶⁾。これらは、福山型筋ジストロフィーが先天型であるとの従来のイメージを変え、さらなる広い臨床スペクトラムを考えさせる。また、同様の報告もつづき、フクチン遺伝子の変異はさまざまな臨床型をひき起こすことが明らかになった¹⁷⁾。点変異の場合にも、変異が起こる位置によっては軽症型の変異が存在するものと思われる。

V 福山型筋ジストロフィーの病態と α ジストログリカン糖鎖異常

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因蛋白質であるジストロフィン、筋細胞膜において複数の糖蛋白質と結合してジストロフィン-糖蛋白質複合体を形成し、繊維状アクチンからなる細胞骨格とつながっている(図4)。ジストロフィン-糖蛋白質複合体の中心成分であるジストログリカン複合体は、単一の遺伝子にコードされた前駆体蛋白質が翻訳後に切断されて、 α と β の2つのサブユニットからなっている¹⁸⁾。 β ジストログリカンは膜貫通蛋白質で、細胞内でジストロフィンと、細胞外で α ジストログリカンと結合している。それに対し、 α ジストログリカンは細胞外に存在し、哺乳類にはめずらしいO-マンノース型糖鎖(Sia α 2-3Gal β 1-

4GlcNAc β 1-2Man-Ser/Thr)で高度に修飾され、この糖鎖を介して細胞外基底膜の構成成分であるラミニンと結合している¹⁹⁾。こうして、基底膜と細胞骨格はジストロフィン、 α ジストログリカン、 β ジストログリカンをつうじて結合しており、このつながりは骨格筋の収縮・弛緩による機械的な負荷に対して筋細胞膜を保護している。この構造に異常が生じると筋細胞膜の脆弱化や透過性の増大をきたし、細胞外からの Ca^{2+} の流入とそれによる筋蛋白質の分解、さらには、筋線維の崩壊をひき起こすと考えられている。

近年、フクチンが α ジストログリカンの糖鎖修飾にかかわっていることが示唆されている。福山型筋ジストロフィー患者の骨格筋では、 α ジストログリカンのO-マンノース型糖鎖を認識する抗体による免疫反応性が著減している²⁰⁾(図5)。後述するが、遠藤らと筆者らは、福山型筋ジストロフィー類縁疾患であるmuscle-eye-brain病が、 α ジストログリカンとラミニンの連結部であるO-マンノース型糖鎖にN-アセチルグルコサミンを付加する新規の糖転移酵素であるPOMGnT1の異常により発症する疾患であることを見いだした。筋ジストロフィーの原因遺伝子として糖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はじめてのことである²¹⁾。

また、 α ジストログリカン認識抗体による検討では、 α ジストログリカンは糖鎖修飾異常によっても筋細胞膜表面に残ってはいるが、分子量は小さくなっており、ラミニンな

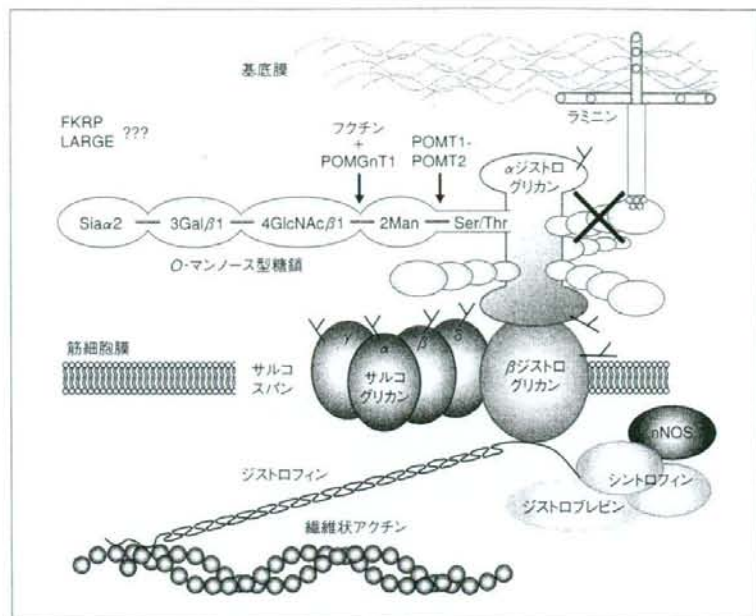


図4 ジストロフィン-糖蛋白質複合体と α ジストログリカナー

細胞外基底膜と細胞内骨格とをつなぐジストロフィン-糖蛋白質複合体における α ジストログリカンは、*O*-マンノース型糖鎖を介してラミニンと結合している。この糖鎖修飾に異常をきたすと、ラミニンなどのリガンドとの結合能が低下し α ジストログリカナーを発症すると考えられている。福山型筋ジストロフィー類縁疾患である muscle-eye-brain 病は POMGnT1、Walker-Warburg 症候群は POMT1 という、*O*-マンノース型糖鎖に *N*-アセチルグルコサミンを付加する糖転移酵素の異常により発症することがわかっている。フクチンは POMGnT1 と複合体を形成してその活性を修飾していると考えられている。

どのリガンドとの結合能が低下していた²¹⁾(図6a)。さらに、フクチン欠損キメラマウスにおいても同様に、 α ジストログリカン糖鎖認識抗体による免疫反応性が著減し、ラミニンとの結合能の低下を認めた²²⁾。つまり、福山型筋ジストロフィーではフクチンの欠損によって α ジストログリカンの糖鎖修飾に異常をきたし、ラミニンなどの細胞外基質との結合能が低下して基底膜と細胞骨格のつながりが破綻するため、筋ジストロフィーが発症すると考えられる(図4)。

多小脳回を基本とする脳病変の発生においても、 α ジストログリカンの糖鎖修飾異常が病態の中心であると考えられる。通常、大脳皮質の表面はグリア境界膜-基底膜複合体によって覆われており、神経組織が露出することはない。しかし、福山型筋ジストロフィーでは、 α ジストログリカンの糖鎖修飾異常により基底膜の構成成分であるラミニンなどのリガンドとの結合能が低下する。これによりグリア境界膜-基底膜複合体に破れが生じ、胎生期の神経細胞の移動を阻止できずに神経組織がくも膜下腔へと迷出して多小脳回が発生するものと考えられる。実際、福山型筋ジストロフィー胎児の脳組織ではグリア境界膜-基底膜複合体に亀裂がみられ⁴⁾、フクチン欠損キメラマウスの胎仔脳においても脳表基底膜が破綻する時期に一致して神経組織のくも膜下腔への迷出が認められた。なお、フクチン自体は神経細胞の移動には関与しない²³⁾。また、ジストログリカン脳特異

的ノックアウトマウスでも福山型筋ジストロフィーと同様の脳病変が認められ²⁴⁾、脳における α ジストログリカンの欠損あるいは糖鎖修飾異常のいずれによっても基底膜の破綻をきたし、神経細胞の移動異常にいたるものと考えられる。

VI 福山型筋ジストロフィー類縁疾患の原因遺伝子の発見と共通の発症機構

近年、福山型筋ジストロフィーにくわえ、 α ジストログリカンの糖鎖修飾異常が原因となる疾患の報告があいつぎ、これらは共通のメカニズムにより筋ジストロフィーを発症するものと考えられている(表2)。

先天性筋ジストロフィーにおいて、II型滑脳症と眼奇形をともなう muscle-eye-brain 病や Walker-Warburg 症候群は、その病変部位や症状の類似性から福山型筋ジストロフィーの類縁疾患とされており、Walker-Warburg 症候群> muscle-eye-brain 病=福山型筋ジストロフィーの順で重症である。筆者らは、遠藤らとの共同研究により、*O*-マンノース型糖鎖の GlcNAc β 1-2Man 結合に関与する糖転移酵素 POMGnT1 (protein *O*-mannose β -1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase 1) をコードする遺伝子の異常により、フィンランドで多くみられる muscle-eye-brain 病がひき起こされることを明らかにした²⁾、さらに、わが国を含む世界

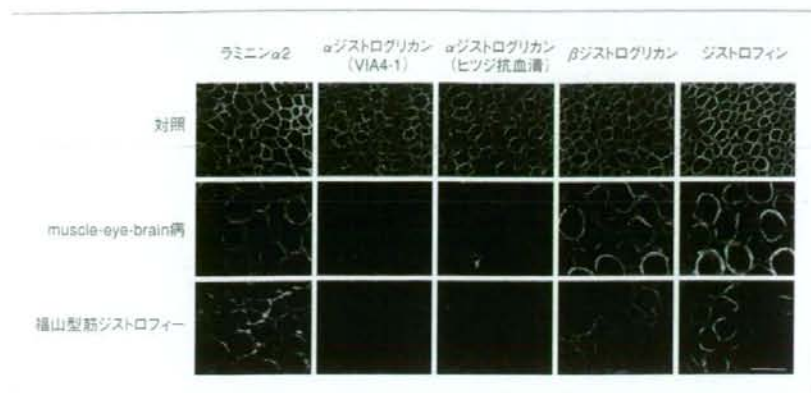


図5 福山型筋ジストロフィーと muscle-eye-brain 病の骨格筋における免疫組織染色

福山型筋ジストロフィーと muscle-eye-brain 病では、 α ジストログリカンの糖鎖認識抗体での反応性が下がっている [文献 26 より転載]

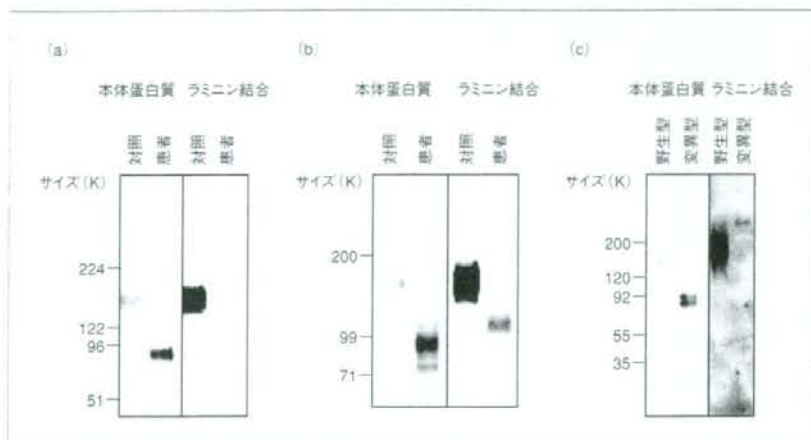


図6 α ジストログリカノパターにおける α ジストログリカンのラミニンとの結合能

(a) 福山型筋ジストロフィー、(b) muscle-eye-brain 病、(c) myodystrophy マウス。
(a)～(c)において、それぞれ、左側の2つのレーンでは α ジストログリカン本体蛋白質の存在、右側の2つのレーンではラミニンとの結合能を示す。福山型筋ジストロフィーや muscle-eye-brain 病において、 α ジストログリカンは残っているが、糖鎖修飾異常により分子量が小さくなっており、ラミニンとの結合能が低下している [文献 21 より転載、一部改変]

各国にも muscle-eye-brain 病患者が存在することを確認した²⁵。筋ジストロフィーの原因遺伝子として糖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この疾患がはじめてのことである。福山型筋ジストロフィーと同様、muscle-eye-brain 病患者の骨格筋では α ジストログリカンの糖鎖認識抗体による免疫反応性が著減した²⁶ (図5)。また、 α ジストログリカンの認識抗体による検討では、 α ジストログリカンは筋細胞膜表面に存在するが分子量が小さくなっており、リガンドとの結合能も低下していた²¹ (図6b)。

つづいて、一部の Walker-Warburg 症候群患者で、O-マンノース型糖鎖の合成にかかわる POMT1 (protein O-mannosyltransferase 1) をコードする遺伝子に変異が見いだされた。福山型筋ジストロフィーや muscle-eye-brain 病と同様、Walker-Warburg 症候群の患者における骨格筋でも α ジストログリカンの糖鎖認識抗体での免疫反応性が著

しく低下していた²⁷。POMT1はPOMT2と複合体を形成して協同的に作用し²⁸、POMT2変異による患者も発見された²⁹。

また、先天性筋ジストロフィー1C型患者においてFKRP (fukutin-related protein) 遺伝子に変異が見いだされた。FKRPはフクチンと高い相同性をもつ蛋白質で、同様の機能をもつことが推察される。先天性筋ジストロフィー1C型患者の骨格筋では、 α ジストログリカンの糖鎖認識抗体による免疫反応性が著減しており、やはり、糖鎖修飾異常が病態に関与しているものと考えられる³⁰。一方で、発症が遅く比較的軽症な肢帯型筋ジストロフィー2I型でもFKRP遺伝子に変異が見いだされた。これらの疾患は対立遺伝子疾患であり、幅広い重症度をもつものと考えられる。

自然発生の筋ジストロフィーモデル動物である myodystrophy (myd) マウスは、Large (like-acetylglucosaminyl

表2 α ジストログリカンに対する糖鎖修飾の異常によるとされている疾患群“ α ジストログリカノパチー”

疾患名	原因遺伝子産物	染色体座位
福山型先天性筋ジストロフィー	フクチン	9q31
muscle-eye-brain 病	POMGnT1	1p33-34
Walker-Warburg 症候群	POMT1	9q34.1
先天性筋ジストロフィー1C型	FKRP	19q13.3
肢帯型筋ジストロフィー2I型	FKRP	19q13.3
myodystrophy マウス	Large	8 (マウス)
先天性筋ジストロフィー1D型	LARGE	22q12.3

transferase) 蛋白質をコードする遺伝子内に大きな欠失をもっている³¹⁾。Largeの活性はまだまだ不明であるが、既知の糖転移酵素と高い相同性をもっている。mydマウスでは筋ジストロフィーにくわえて大脳皮質や小脳、海馬での神経細胞の移動に異常があり、脳表の基底膜が破壊されていることが報告されている。mydマウスでも、骨格筋や脳において α ジストログリカンの糖鎖修飾異常によってリガンドとの結合能が低下していた(図6c)。したがって、Largeも α ジストログリカンの糖鎖修飾に関与していると考えられる^{21,31)}。さらに、ヒトにおいてはLARGEをコードする遺伝子の異常により先天性筋ジストロフィー1D型が発症することが報告された³²⁾。

これらすべての疾患において、 α ジストログリカンのラミニン結合性が低下することが確認されている。福山型筋ジストロフィーと同様、これらの疾患においても細胞外の基底膜と筋細胞または脳表アストロサイトの足突起との結合

性が低下していることが発症の原因と考えられ、筆者らは、これら疾患群を総称して α ジストログリカノパチーという概念を提唱した³³⁾(図4, 表2)。また、その後も世界中から報告があいつぎ、現在、FKRP, POMT1, POMT2, POMGnT1, フクチン, LARGEをコードする遺伝子の変異は、Walker-Warburg 症候群, muscle-eye-brain 病, 福山型筋ジストロフィー, 肢帯型筋ジストロフィーなど、さまざまな臨床型筋ジストロフィーをひき起こすことが明らかになった¹⁷⁾。しかし、これらの遺伝子産物のなかでその酵素活性がわかっているのは、POMGnT1とPOMT1-POMT2だけである。筆者らは、フクチンには α ジストログリカンとラミニンとの結合にかかわる糖鎖に関して明らかな糖転位活性が検出されないこと、フクチンとPOMGnT1は両者ともゴルジ体に局在しフクチンの膜貫通領域をとおして結合していること、フクチン欠損細胞にPOMGnT1を発現してもPOMGnT1活性が検出されないこと、さらに、福山型筋ジストロフィーのモデルマウスではPOMGnT1活性が減少していること、を示した。フクチンはPOMGnT1と複合体を形成し、その活性に影響しているものと思われる³⁴⁾(図4)。

また、マイクロアレイによる発現解析、免疫組織学的解析、形態学的解析から、福山型筋ジストロフィーだけでなく α ジストログリカノパチーに神経筋接部の形態異常と α ジストログリカンの集積障害を見いだした。 α ジストログリカノパチーの主要病態として、筋ジストロフィー以外に、神経筋接部由来の筋分化シグナルが不完全となり筋繊維

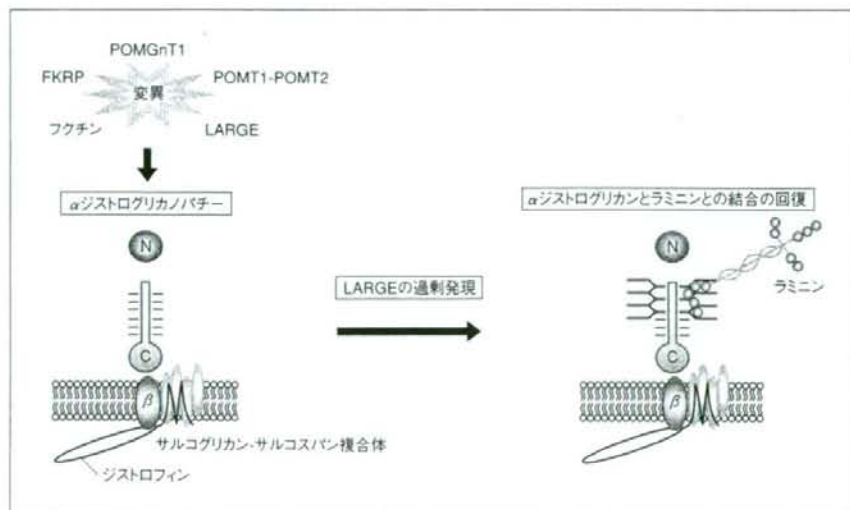


図7 LARGE 過剰発現による α ジストログリカン機能不全の解消モデル

糖鎖修飾経路の異常によって α ジストログリカンのラミニン結合能が著しく低下し、 α ジストログリカノパチーは発症する。LARGEを過剰発現させることによって、 α ジストログリカンとラミニンとの結合能が新たに形成もしくは増強される。

の成熟障害を起こすことが考えられる³⁵⁾。

Ⅳ 福山型筋ジストロフィーおよび α ジストログリカノパチーの治療へのヒント

多くの神経・筋変性疾患と同様、現在のところ、福山型筋ジストロフィーを含む α ジストログリカノパチーに治療法はないが、治療的アプローチにむけて研究が緒についたところである。

アデノウイルスベクターを用いて *myd* マウスの骨格筋に原因遺伝子である *LARGE* 遺伝子を発現させると、 α ジストログリカンの糖鎖修飾異常が回復し筋ジストロフィーが改善することが報告された。さらに興味深いことに、福山型筋ジストロフィー、*muscle-eye-brain* 病および Walker-Warburg 症候群の患者由来の細胞（筋芽細胞、線維芽細胞）においても、*LARGE* の過剰発現により α ジストログリカンの糖鎖修飾異常に改善を認められ、リガンドとの結合能が回復したという³⁶⁾。また、*LARGE* は α ジストログリカンの N 末端を認識・結合し、そのムチンドメインの糖鎖

付加に関与することが明らかになった³⁷⁾。さらに最近、FKRP は筋細胞膜に存在し、ジストロフィン-糖蛋白質複体のなかでジストログリカンの糖鎖状態に影響をあたえているという³⁸⁾。*LARGE* が付加する糖鎖が *muscle-eye-brain* 病などで欠損するラミニン結合 O-マンノース型糖鎖である保証はないが、遺伝的に異なるこれらの疾患群に対して、共通の病態である“ α ジストログリカンの糖鎖異常”を標的とした治療法の開発につながる可能性があり、たいへん興味深い（図 7）。

福山型筋ジストロフィーの病態解明および治療法の構築にはモデルマウスを用いた研究が不可欠であるが、フクチンノックアウトマウスは胎生致死であり¹³⁾、フクチン欠損キメラマウスは個体ごと、組織ごとにキメラ率が異なるため²²⁾、モデルとしては有効ではない。そこで筆者らは、レトロトランスポゾン挿入変異をもつノックインモデルマウスを作製し、その解析を行なった。しかし、レトロトランスポゾン挿入変異ホモ接合体、そして、より重症と思われる点変異との複合ヘテロ接合体のいずれにおいても、筋ジストロフィー症状は認められなかった。このモデルマウスにお

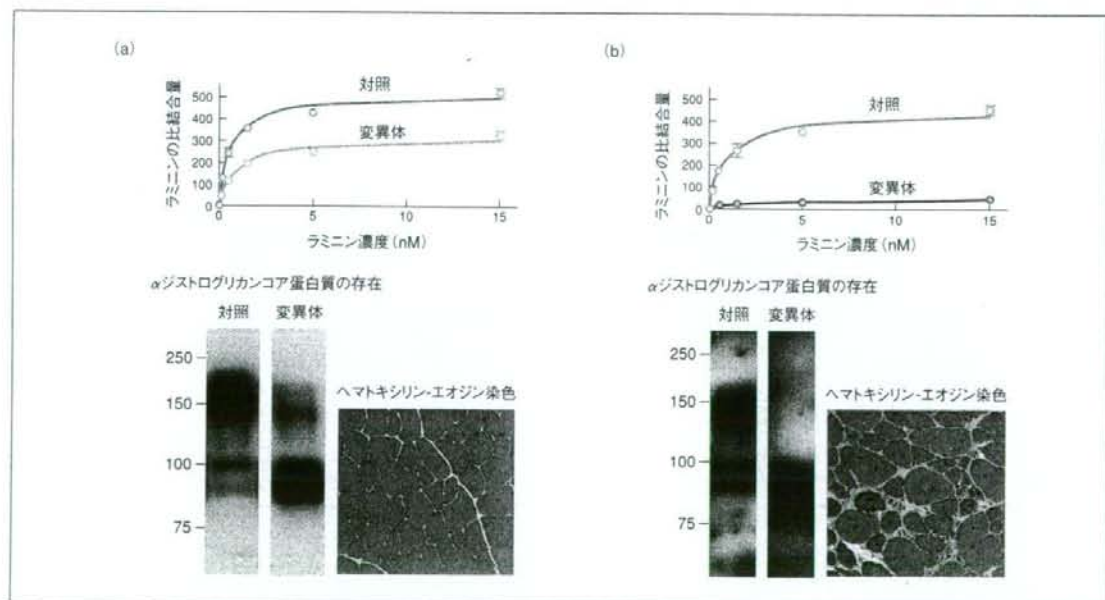


図 8 福山型筋ジストロフィーノックインマウスと *Large^{myd}* マウスとの比較

(a) 福山型筋ジストロフィーノックインマウス。

(b) *Large^{myd}* マウス。

福山型筋ジストロフィーノックインマウスでは、*Large^{myd}* マウスと異なり、正常な糖鎖型の α ジストログリカが残存しており筋ジストロフィー症状は認められない。ラミニン結合能も 50%程度が残存している。つまり、糖鎖異常を部分的にでも解消できれば筋ジストロフィー発症を抑制できる可能性がある。

いて α ジストログリカンの糖鎖に異常が生じていることは明らかになったが、一部、正常な糖鎖型をもつ α ジストログリカンの残存も検出された。複合ヘテロ接合体モデルマウスにおけるラミニン結合能は50%程度が残存していることが示された。さらに、アデノウイルスベクターを用いたフクチン遺伝子やLARGE遺伝子導入により、 α ジストログリカンの糖鎖修飾異常が*in vivo*で解消できることが明らかになった。一方、福山型筋ジストロフィー類縁疾患のモデルで顕著な病態を示すLarge^{myd}マウスでは、正常な糖鎖型をもつ α ジストログリカンもラミニン結合能もほとんど検出されない(金川ら:投稿中, 図8)。

福山型筋ジストロフィーノックインマウス、および、Large^{myd}マウスの結果から、正常な糖鎖型をもつ α ジストログリカンが少しでも残存していれば、筋ジストロフィーの発症を抑制できる可能性がある。つまり、糖鎖修飾異常を部分的にでも解消できれば、膜脆弱化や筋再生異常を抑制し、福山型筋ジストロフィーを含む類縁疾患群の治療につながると思われる。現在、 α ジストログリカンの糖鎖修飾異常の回復を指標に、低分子化合物のスクリーニングが行なわれている。

おわりに

21世紀になってから、筋ジストロフィーに α ジストログリカンの糖鎖異常という新しい病態メカニズムを提唱する報告があいつぎ、興味深い展開となっている。しかし、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。デュシェンヌ型筋ジストロフィーに関する治療研究は世界各国でさかんに行なわれている。一方で、福山型筋ジストロフィーやmuscle-eye-brain病の原因遺伝子の同定を契機に α ジストログリカノパチーの病態研究は大きく進展したが、治療としては報告がない。とくに、福山型筋ジストロフィーはわが国に特異的に多く、いまだ治療法がない悲惨な疾患であり、一刻も早い治療法の開発が望まれている。

福山型筋ジストロフィーはわが国ではじめて記載された疾患であり、患者数も多く、わが国の研究により治療法開発を進めることはわれわれの責務であると考えられる。なお、筆者らが同定・開発したフクチンの遺伝子検査は、2006年より健康保険適応となっていることを付記しておく。

文 献

- 1) Kobayashi, K. et al: *Nature*, 394, 388-392 (1998)
- 2) Yoshida, A. et al: *Dev. Cell*, 1, 717-724 (2001)

- 3) Fukuyama, Y., Osawa, M., Suzuki, H.: *Brain Dev.*, 3, 1-29 (1981)
- 4) Nakano, I., Funahashi, M., Takada, K., Toda, T.: *Acta Neuropathol.*, 91, 313-321 (1996)
- 5) Lander, E. S., Botstein, D.: *Science*, 236, 1567-1570 (1987)
- 6) Tanaka, K. et al: *Nature*, 348, 73-76 (1990)
- 7) Toda, T. et al: *Nature Genet.*, 5, 283-286 (1993)
- 8) Toda, T. et al: *Am. J. Hum. Genet.*, 59, 1313-1320 (1996)
- 9) Watanabe, M. et al: *Am. J. Med. Genet.*, 138, 344-348 (2005)
- 10) Colombo, R. et al: *Hum. Genet.*, 107, 559-567 (2000)
- 11) Aravind, L., Koonin, E. V.: *Curr. Biol.*, 9, R836-837 (1999)
- 12) Kondo-Iida, E. et al: *Hum. Mol. Genet.*, 8, 2303-2309 (1999)
- 13) Kurahashi, H. et al: *Neurobiol. Dis.*, 19, 208-217 (2005)
- 14) Silan, F. et al: *Ann. Neurol.*, 53, 392-396 (2003)
- 15) Murakami, T. et al: *Ann. Neurol.*, 60, 597-602 (2006)
- 16) Godfrey, C. et al: *Ann. Neurol.*, 60, 603-610 (2006)
- 17) Godfrey, C. et al: *Brain*, 130, 2725-2735 (2007)
- 18) Barresi, R., Campbell, K. P.: *J. Cell Sci.*, 119, 199-207 (2006)
- 19) Chiba, A. et al: *J. Biol. Chem.*, 272, 2156-2162 (1997)
- 20) Hayashi, Y. K. et al: *Neurology*, 57, 115-121 (2001)
- 21) Michele, D. E. et al: *Nature*, 418, 417-422 (2002)
- 22) Takeda, S. et al: *Hum. Mol. Genet.*, 12, 1449-1459 (2003)
- 23) Chiyonobu, T. et al: *Neuromuscul. Disord.*, 15, 416-426 (2005)
- 24) Moore, S. A. et al: *Nature*, 418, 422-425 (2002)
- 25) Taniguchi, K. et al: *Hum. Mol. Genet.*, 12, 527-534 (2003)
- 26) Kano, H. et al: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291, 1283-1286 (2002)
- 27) Beltrán-Valero de Bernabé, D. et al: *Am. J. Hum. Genet.*, 71, 1033-1043 (2002)
- 28) Many, H. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 500-505 (2004)
- 29) van Reeuwijk, J. et al: *J. Med. Genet.*, 42, 907-912 (2005)
- 30) Brockington, M. et al: *Am. J. Hum. Genet.*, 69, 1198-1209 (2001)
- 31) Grewal, P. K. et al: *Nature Genet.*, 28, 151-154 (2001)
- 32) Longman, C. et al: *Hum. Mol. Genet.*, 12, 2853-2861 (2003)
- 33) Toda, T. et al: *Congenit. Anom.*, 43, 97-104 (2003)
- 34) Xiong, H. et al: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 350, 935-941 (2006)
- 35) Taniguchi, M. et al: *Hum. Mol. Genet.*, 15, 1279-1289 (2006)
- 36) Barresi, R. et al: *Nature Med.*, 10, 696-703 (2004)
- 37) Kanagawa, M. et al: *Cell*, 117, 953-964 (2004)
- 38) Beedle, A. M., Nienaber, P. M., Campbell, K. P.: *J. Biol. Chem.*, 282, 16713-16717 (2007)

戸田達史

略歴: 1985年 東京大学医学部 卒業, 1987年 同 神経内科 医員, 1994年 同 大学院医学系研究科 人類遺伝学教室 助手, 1996年 同 医科学研究所ヒトゲノム解析センター 助教授を経て, 2000年より大阪大学大学院医学系研究科 教授, 2008年 朝日賞。

研究テーマ: 筋ジストロフィー, パーキンソン病, 高次脳機能の分子遺伝学, 治療。

抗マイオスタチン療法

Anti-myostatin therapy against muscular dystrophy



砂田 芳秀

Yoshihide SUNADA

川崎医科大学神経内科学教室

◎マイオスタチンは TGF- β ファミリーに属する骨格筋形成抑制因子で、個体の骨格筋量を負に調節している。この遺伝子に変異をもつ家畜やヒト、遺伝子ノックアウトマウスではこの抑制が解除されるため、骨格筋量が著明に増大する。筋ジストロフィーモデル *mdx* マウスに中和抗体を投与したところ、ジストロフィー病理変化と筋力が改善したことから、抗マイオスタチン療法は新規治療法として注目されてきた。欧米ではヒト化抗体 MYO-029 の第Ⅱ相試験が行われ、安全性が確認された。抗体療法以外にも阻害結合蛋白や可溶性受容体蛋白、受容体阻害薬、siRNA など多様な抗マイオスタチン療法の開発が進んでいる。筋ジストロフィー治療以外にも、ステロイドミオパチーや高齢者における骨格筋減少症 (sarcopenia) などに対して有効性が期待される。



Key word

筋ジストロフィー、マイオスタチン、TGF- β ファミリー、カベオリン

マイオスタチン： 骨格筋量の抑制性調節因子

マイオスタチン (myostatin) は骨格筋特異的に発現する TGF- β ファミリー分子で、1997年に Se-Jin Lee 博士らにより degenerative PCR を用いてクローニングされた¹⁾。当初 GDF-8 と命名された新規分子の機能はわかっていなかったが、作出されたノックアウトマウスでは骨格筋量が驚くほど増大したことから、骨格筋の増殖を強力に抑制する因子であることがわかった¹⁾。以前からヨーロッパでは筋肉量が増大した肉牛 (Belgian Blue, Piedmontese) やヒツジ (Texel) などの家畜が知られていたが、こうした家畜のマイオスタチン遺伝子を調べてみるといろいろな変異が発見された²⁻⁴⁾。さらに 2005 年には、マイオスタチン遺伝子変異をもつ男児も報告された⁵⁾。この男児は新生児のころから筋肉がよく発達していて、5歳にして 3kg のダンベルを水平挙上できたという。いまのところ、体脂肪の少ない筋肉質の体形であること以外には知能の発達や心臓機能にも問題はないようである。このようにマイオスタチンはヒトにおいても

骨格筋量を抑制的に調節していることが明らかになってきた。

マイオスタチンが骨格筋形成を抑制する作用機序はアポトーシスによるものではなく、G1 期→S 期への細胞周期のブロックによることが明らかにされている。すなわち、マイオスタチンは C2C12 筋芽細胞においてサイクリン依存性キナーゼ 2 (cdk2) の発現を抑制するとともに、その阻害因子 p21 の発現を誘導する⁶⁾。したがって、マイオスタチンノックアウトマウスの骨格筋過形成 (hyperplasia) は筋芽細胞の増殖規制が解除された結果と考えられる。一方、成獣においてもマイオスタチンを阻害すると筋線維が肥大するが、この場合の標的は筋衛星細胞であると考えられている⁷⁾。また、マイオスタチンは間葉系細胞の運命決定にも関与しており、筋芽細胞への分化を阻害し脂肪細胞への分化を促進する⁸⁾。

マイオスタチンの生合成と活性化、 細胞内シグナル伝達機構

マイオスタチンは骨格筋で産生され、分泌され

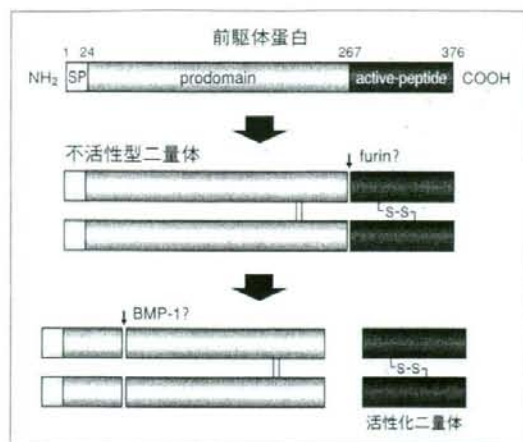


図1 マイオスタチンの生合成と活性化の分子機構
 プロドメインを含む前駆体蛋白として合成され、不活性化型二量体となるが、プロセッシングを受けて活性化二量体がリリースされる。

るが、多くの TGF- β ファミリー分子と同様に、いったん 50kDa の前駆体蛋白として合成された後、N 末端側 2/3 を占めるプロドメイン(プロペプチドともよばれる)が切り離されて、C 末端側 1/3 に相当する 26kDa の活性ペプチド二量体が形成される(図 1)。この活性化二量体は細胞膜受容体に結合してマイオスタチンシグナルが細胞内へと伝達される。一般に TGF- β 受容体はタイプ I 型とタイプ II 型からなるヘテロ二量体構造をとるが、マイオスタチン活性化二量体はまず II 型受容

体(ActR II B あるいは II A)に結合する。ついで I 型受容体(ALK4 あるいは ALK5)がリン酸化されると、これが細胞内エフェクター分子である Smad をリン酸化し、リン酸化された Smad は核内へ移行して標的遺伝子の転写調節領域に結合する。こうして種々の標的遺伝子の発現が制御された結果、骨格筋形成が抑制されると考えられている(図 2)。一方、ActR II B 活性化は MAPK 経路を介して、AKT や p21/Rb 経路の活性化や MyoD を含む muscle regulatory factors(MRFs)の抑制も引き起こすと考えられている。

マイオスタチンは骨格筋量およびエネルギー代謝のホメオスタシス維持にきわめて重要な Key 分子であり、その活性化やシグナル量は生体内で厳密に制御されているはずであるが、その制御機構の全貌はいまだに解明されていない。著者らは肢帯型筋ジストロフィーの原因蛋白であるカベオリン-3 が II 型受容体に結合すると、そのリン酸化を阻害してマイオスタチンシグナルの細胞内への伝達を抑制的に制御していることを明らかにした⁹⁾。したがって、カベオリン-3 が欠損する筋ジストロフィーではマイオスタチンシグナルが過剰になり、筋萎縮を生じる一因になっていると考えられる(図 3)。

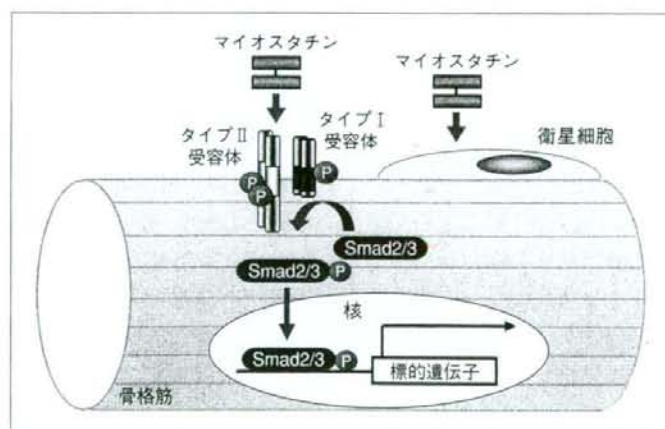


図2 マイオスタチン受容体と細胞内シグナル伝達
 活性化二量体が細胞膜受容体(II 型および I 型受容体のヘテロ二量体)に結合すると、リン酸化した受容体が細胞内エフェクター分子 Smad2/3 をリン酸化する。これが核内に移行し、標的遺伝子の転写を調節する。

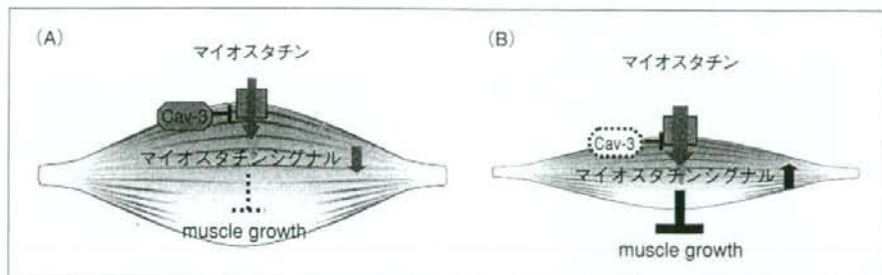


図3 カベオリン-3(Cav-3)によるマイオスタチンシグナルの制御機構

種々のシグナル分子の足場蛋白であるカベオリンは、マイオスタチン受容体に結合するとそのリン酸化を抑制することによりマイオスタチンシグナルをネガティブに制御している(A)。カベオリン-3欠損による肢帯型筋ジストロフィーでは、この制御機構の破綻により筋萎縮が生じると推測される(B)。

抗マイオスタチン抗体による筋ジストロフィー治療

WagnerらはDuchenne型筋ジストロフィーモデルである mdx マウスとマイオスタチンノックアウトマウスとの交配により、マイオスタチンを欠損させた mdx マウスをつくりだした¹⁰⁾。骨格筋重量・骨格筋収縮力とも有意に増加し、骨格筋病理像においてもジストロフィー変化に改善がみられたことを報告した。さらに2002年、Bogdanovichらはマイオスタチン中和抗体を mdx マウスに腹腔内投与することで、同様の治療効果が得られたことを報告した¹¹⁾。これを契機に抗マイオスタチン療法があらたな筋ジストロフィー治療法として世界的に注目されるようになった。

ジストロフィン欠損マウス以外にも、肢帯型筋ジストロフィーモデルである δ -サルコグリカン欠損マウスとメロシン欠損先天性筋ジストロフィーモデルである dy マウスに対しても、マイオスタチン中和抗体の投与が行われている。 δ -サルコグリカン欠損マウスにおいては、発症早期に投与した場合には有効であったが、発症後時間が経過した成獣では効果がみられなかった¹²⁾。一方、 dy マウスでは骨格筋量は増加したものの、脂肪量が過度に低下したため全身状態が悪化した¹³⁾。したがって、マイオスタチン阻害療法はすべてのタイプの筋ジストロフィーに効果があるわけではなく、将来の臨床応用に際してはどのような病態あるいは病型に適応となるかさらに検討する必要がある。

欧米ではWyeth社が開発したヒト型マイオスタチン阻害抗体(MYO-029)の臨床試験が行われた¹⁴⁾。Becker型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー患者、合計116例を対象として、プラセボと4段階の用量設定でI/II相試験が行われ、安全性には大きな問題がないことがわかった。全体としては徒手筋力テストや筋MRI検査では有意な改善はみられなかったが、なかには筋サイズが増加し、筋病理所見に改善がみられた患者もいたという。今後は小児のDuchenne型筋ジストロフィーにも適応を拡大した試験が開始される見込みである。

多様なマイオスタチン阻害戦略

マイオスタチンを阻害する方略としては中和抗体以外にもいろいろな戦略が考えられる。著者らの研究グループを含めて、世界中の研究室や製薬企業で開発競争にしのぎが削られている。

1. プロドメイン

マイオスタチン前駆蛋白のN末端側2/3を占めるプロドメイン部分は活性化二量体に結合し、受容体との結合を阻害することが知られている。徳島大学の野地らのグループはプロドメインだけを過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、骨格筋量が著明に増加することを確認している¹⁵⁾。また、精製されたプロドメインを正常マウスに投与すると筋量増大効果を呈し、さらに mdx マウスに投与しても中和抗体と同等以上のジストロフィー変化改善効果が報告されている¹⁶⁾。また、

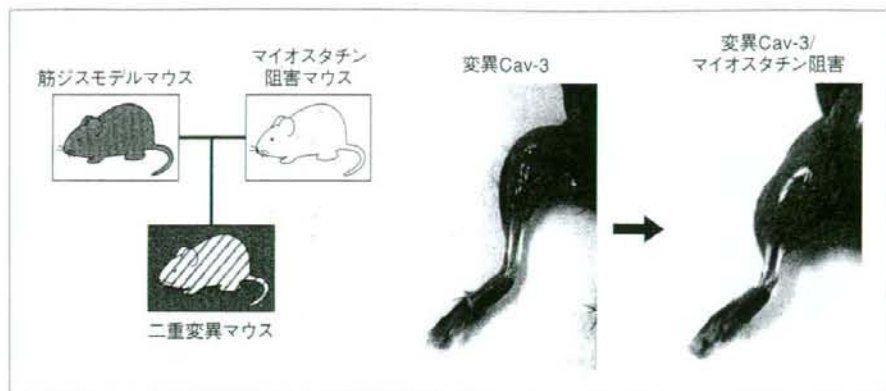


図4 マイオスタチン阻害による肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスの治療効果
カベオリン-3欠損マウス(肢帯型筋ジストロフィーモデル)とマイオスタチン阻害マウスを交配して作出した二重変異マウスにおいて、マイオスタチン阻害の顕著な治療効果がみられた。

肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスにウイルスベクターを用いてプロドメインを導入しても治療効果が報告されている¹⁷⁾。

著者らは変異カベオリン-3マウスに遺伝交配によりプロドメイン遺伝子を導入し、治療効果を検討したが、筋萎縮はほぼ野生型マウス同等に回復し、筋力や運動能力も著明に改善した(図4)⁶⁾。プロドメインが中和抗体を上まわる治療効果を発揮する機序のひとつとして、活性化マイオスタチン二量体以外にもマイオスタチン類似のTGF- β ファミリー分子(GDF-11など)にも結合して活性を阻害するためではないかと考えられている。

2. フォリスタチン改変体

フォリスタチンはマイオスタチンに直接結合してその作用を阻害する生体内分子である。LeeとMcPherronは骨格筋特異的にフォリスタチンを過剰発現するマウスを作製したが、驚くべきことに骨格筋量は3.27倍に増加し、マイオスタチン遺伝子をノックアウトした場合を上まわった¹⁸⁾。このことから、フォリスタチンはマイオスタチン以外の筋肉抑制因子の作用も阻害する可能性が示唆される。ところが、フォリスタチン過剰発現マウスではおそらくアクチビンも阻害されて生殖能が失われるため、フォリスタチン自体を治療に用いることはできない。

そこで、土田らはフォリスタチン分子を改変し、マイオスタチンを選択的に阻害する変異体を創製した¹⁹⁾。このフォリスタチン改変体分子FSI-Iを

過剰発現するマウスを作出したところ、顕著な骨格筋量の増加がみられた。骨格筋での遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイで解析すると、ミトコンドリアで脂肪酸代謝に関するカルニチンパルミトイル転移酵素-1(CPT-1)が顕著に上昇していた。ついで、このFSI-Iマウスを*mdx*マウスと交配して筋ジストロフィー治療効果を解析したところ、FSI-I/*mdx*マウスでは筋線維径が増大するとともに、*mdx*マウスでみられる筋線維径の大小不同の程度が改善していた。また、細胞浸潤や線維化にも明らかな改善傾向が観察され、機能的にはグリップ試験で正常マウスと同等の筋力の回復効果も確認されている¹⁶⁾。

3. 可溶化受容体

受容体レベルでマイオスタチンシグナルを抑制する方法のひとつに受容体の不活化が考えられる。LeeとMcPherronはII型受容体ActRIIBの細胞内kinase domainを欠かさせたドミナントネガティブ型受容体を設計してマウスで過剰発現させた。その結果、骨格筋量は有意に増加し、ドミナントネガティブ型受容体が治療応用できる可能性が示された¹⁵⁾。そこで、II型受容体分子のリガンド結合部位を有する細胞外ドメインだけからなる可溶化ドミナントネガティブ受容体を精製し、*mdx*マウスに腹腔内投与したところ、わずか5回の投与で有意に骨格筋量が増大した²⁰⁾。著者らも同じ可溶化受容体を変異カベオリン-3マウスに同じプロトコールで投与してみたが、やはり顕著

な改善がみられた⁹⁾。

4. 低分子阻害薬

低分子阻害薬で細胞膜受容体を不活化する戦略である。こうした分子標的療法はすでに白血病や肺癌の治療に臨床応用されている。ただし、現在臨床応用されているのはチロシンキナーゼ型受容体の阻害薬であるのに対して、マイオスタチン受容体はセリン・スレオニンキナーゼ型である。セリン・スレオニンキナーゼ型受容体阻害薬はすでに何種類かの低分子医薬品が開発されており、前立腺癌、肝硬変、尋常性乾癬などに対して臨床応用が検討されている。

著者らは HEK293 培養細胞でのルシフェラーゼ転写活性アッセイ系を用いて、入手可能であった 3 種類のセリン・スレオニンキナーゼ阻害薬のマイオスタチン阻害活性を調べた。そのなかでもっともマイオスタチン阻害活性の高い化合物は阻害特異性も高いことがわかり、これを 10 週間にわたって変異カベオリン-3 マウスに経口投与した。投与 6 週目から非投与群との間に体重増加に有意差が現れ、10 週後には骨格筋重量は 1.2~1.3 倍に増加した。血清中のマイオスタチン活性はほぼ完全に抑制されており、骨格筋においてはマイオスタチンの標的遺伝子である p21 の mRNA 発現が顕著に抑制されていることが確認された(論文投稿中)。長期投与によるめだつた副作用はみられなかったことから、臨床応用も可能ではないかと考えられる。

5. siRNA

最近、さまざまな疾患の治療法として、RNA 干渉法(RNAi)を用いた遺伝子サイレンシングが注目されている。Artaza らは、C3H10T(1/2)細胞で RNAi でマイオスタチン活性を抑制すると筋細胞へ分化誘導できることを示した⁸⁾。さらに、ニワトリの胎仔筋芽細胞初代培養系に siRNA を添加すると筋管細胞への分化が促進することが示された²¹⁾。C 末端 active peptide に相当する dsRNA をゼブラフィッシュに注射すると body mass が増加し、筋の過形成と肥大が生じることが報告された²²⁾。野地らはマイオスタチンの siRNA を設計し、それをアテロコラーゲンという担体と混和してマウス骨格筋に局所投与して骨格筋を肥大させ

ることに成功した²³⁾。肥大した筋ではマイオスタチンの蛋白発現が抑制されていることを確認した。さらに驚くべきことに、眼窩静脈からの全身投与によっても全身性の筋肥大が生じた²¹⁾。この結果は効率よく siRNA が筋細胞内に移行することを示唆しており、今後 siRNA の全身投与による筋ジストロフィー治療の可能性がでてきた。

● 今後の展望と問題点

上述したように、さまざまなアプローチによるマイオスタチン阻害薬の開発が進展しつつあるが、実際の臨床応用までにはいくつかの解決すべき問題点もある。

まず、筋ジストロフィーのどの病型に適応があるかを明らかにする必要がある。実験動物モデルを用いた研究では抗マイオスタチン療法が有効である病型が多く報告されているが、メロシン欠損先天性筋ジストロフィーモデルである *dy* マウスでは脂肪量減少のため生命予後の悪化が報告されている。また、どのタイミングで抗マイオスタチン療法を開始するのが適当なのか、よく検討する必要もある。サルコグリカノパチーモデルマウスでは進行期中に中和抗体を投与しても治療効果はなかったと報告されている。マイオスタチン活性を阻害すると筋基底膜直下に局在する筋衛星細胞が活性化し、筋再生が促進されると考えられているが、長期にわたって抗マイオスタチン療法を継続していると筋衛星細胞が枯渇し、結果的には病状が進行することも懸念される。マイオスタチン阻害によりたしかに筋線維は肥大するが、ジストロフィン欠損筋では太い筋線維ほど障害されやすいともいわれている。ジストロフィン欠損筋を肥大させることの是非についてはさらに詳細な検討が必要とされる。また、マイオスタチン変異をもった動物は筋肉量は増えるが、疲労しやすいともいわれている。これはマイオスタチンが主としてタイプ 2 線維(いわゆる速筋)に作用するためであると考えられている。また、マイオスタチン阻害により骨格筋のミトコンドリアが減少するという報告と増加するという報告があり、この点についてもさらに検討する必要がある。

いずれにせよ、抗マイオスタチン療法は筋ジス

トロフィーの遺伝子欠損に対する根本的治療法ではなく、共通したジストロフィー変化の分子病態に介入する“支持療法”と理解するべきである。したがって、遺伝子治療や幹細胞移植治療と併用すると相乗効果が期待される。

● その他の神経筋疾患への応用

筋ジストロフィー以外でのミオパチーの治療においても抗マイオスタチン療法の有効性が期待されている。ステロイドミオパチーにおいては骨格筋でマイオスタチンの発現が上昇しており、筋萎縮への関与が推定されることから²⁴⁾、抗マイオスタチン療法が有効であると思われる。また、マイオスタチン阻害は、脂肪酸のミトコンドリアへの輸送をつかさどるCPT-1の発現を増加させることから、脂肪酸輸送系や β 酸化酵素系障害によるミオパチーにも治療効果が期待される¹⁹⁾。

骨格筋はインスリンの標的臓器でもあり、肥満や糖尿病の病態生理にも重要な役割を果たしている。マイオスタチン阻害により骨格筋量が増加するとともに体脂肪量は低下する。レプチンの低下や脂肪分化に必須の転写因子C/EBP α やPPAR γ の発現低下が報告されている²⁵⁾。肥満・2型糖尿病マウスであるKKAyマウスやob/obマウスでマイオスタチンを欠損させると、脂肪が筋肉に置き換わった体型になり、肥満や糖代謝の改善がみられる²⁶⁾。

さらに、老化によって起こる筋量低下(sarcopenia)は、高齢者のADL低下とそれに伴う合併症や介護負担の増加と密接に関連している。抗マイオスタチン療法により高齢者のsarcopeniaが改善されれば、介護負担の軽減に大きな意義を有すると思われる。

文献

- 1) McPherron, A. C. et al. : *Nature*, **387** : 83-90, 1997.
- 2) Grobet, L. et al. : *Nat. Genet.*, **17** : 71-74, 1997.
- 3) Kambadur, R. et al. : *Genome Res.*, **7** : 910-916, 1997.
- 4) Clop, A. et al. : *Nat. Genet.*, **38** : 813-818, 2006.
- 5) Schuelke, M. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **350** : 2682-2688, 2004.
- 6) Thomas, M. et al. : *J. Biol. Chem.*, **275** : 40235-40243, 2000.
- 7) McCroskery, S. et al. : *J. Cell Biol.*, **162** : 1135-1147, 2003.
- 8) Artaza, J. N. et al. : *Endocrinology*, **146** : 3547-3557, 2005.
- 9) Ohsawa, Y. et al. : *J. Clin. Invest.*, **116** : 2924-2934, 2006.
- 10) Wagner, K. R. et al. : *Ann. Neurol.*, **52** : 832-836, 2002.
- 11) Bogdanovich, S. et al. : *Nature*, **420** : 418-421, 2002.
- 12) Parsons, S. A. et al. : *Am. J. Pathol.*, **168** : 1975-1985, 2006.
- 13) Li, Z. F. et al. : *Am. J. Pathol.*, **166** : 491-497, 2005.
- 14) Wagner, K. R. et al. : *Ann. Neurol.*, **63** : 543-545, 2008.
- 15) Nishi, M. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293** : 247-251, 2002.
- 16) Bogdanovich, S. et al. : *Faseb. J.*, **19** : 543-549, 2005.
- 17) Bartoli, M. et al. : *Gene Ther.*, **14** : 733-740, 2007.
- 18) Lee, S. J. and McPherron, A. C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** : 9306-9311, 2001.
- 19) Nakatani, M. et al. : *Faseb. J.*, **22** : 477-487, 2008.
- 20) Lee, S. J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** : 18117-18122, 2005.
- 21) Sato, F. et al. : *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291** : C538-C545, 2006.
- 22) Acosta, J. et al. : *J. Biotechnol.*, **119** : 324-331, 2005.
- 23) Kinouchi, N. et al. : *Gene Ther.*, 2008. (Epub ahead of print)
- 24) Schakman, O. et al. : *J. Endocrinol.*, **197** : 1-10, 2008.
- 25) Lin, J. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291** : 701-706, 2002.
- 26) McPherron, A. C. and Lee, S. J. : *J. Clin. Invest.*, **109** : 595-601, 2002.

* * *