201027062A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

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２２年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　戸田　達史

神戸大学大学院医学研究科神経内科学

平成２３（２０１１）年　5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
神戸大学大学院医学研究科神経内科　　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
神戸大学大学院医学研究科神経内科　　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---- 13
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所
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に対する骨髄移植による再生療法確立のための基盤研究 -- 17
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 -- 21
国立精神・神経医療研究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 -- 25

IV．研究成果の刊行物･別刷 -- 31

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
総括研究報告書

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　神戸大学大学院医学研究科神経内科　教授

研究要旨

福山型筋ジストロフィ（FCMD）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。①既報告のあるミスセンス変異フクチン 13 種類のうち、その細胞内局在の変化が FCMD 発症の原因と示唆される変異体 4 種類を確認した。本研究で創出することに成功した新しいモデルマウス（フクチン挿入変異ノックインマウスとジスフェルリン変異 SJL マウスの二重変異マウス、Myf5-fukutin cKO マウス、MCK-fukutin cKO マウス）は、FCMD 病態の理解や治療法開発に有効なツールとなることが強く期待できる。②POMT1 の loop1 は ScPmt1 と同様に酵素活性の発現に重要であることが明らかとなった。しかし、複合体形成のメカニズムはヒトと酵母では異なる可能性が示された。また、POMT1 と POMT2 の機能が異なる可能性が示された。③Large Tg を POMGnT1 KO と交配したが、胎生致死である POMGnT1 KO の表現形の改善は認められなかった。Large を HeLa 細胞に高発現させると HeLa 細胞は接着能の亢進とともに増殖能、遊走能の著明な減弱を示し、Large が癌治療へ応用可能であることが示唆された。治療実験に供する分泌型 Large 蛋白質の大量精製にはさらなる条件検討が必要である。④筋特異的転写因子である Myf5 及び MyoD を線維芽細胞に導入することによって *in vitro* でも *in vivo* でも筋細胞への direct reprogramming が可能であった。また MyoD 導入細胞は骨格筋線維で長期に維持されることが明らかとなった。今後は FCMD モデルマウスへの治療研究によって、この細胞を用いた FCMD 患者への再生治療法の確立を図る。⑤POMGnT1 変異マウスは MEB 病の眼病変を忠実に再現しており、良い動物モデルだと考えられた。α-DG の糖鎖修飾異常のために、アストロサイト、ミューラー細胞がラミニン等に結合できず、内境界膜の破綻と、網膜血管の異常を引き起こしていると考えられた。またα-DG がピカチュリンに結合できないことにより、OPL でのシナプスの形成が異常になると考えられた。眼症状の治療には、外来性に POMGnT1 遺伝子あるいは Large 遺伝子を AAV ベクター等でグリアへ導入して、α-DG の糖鎖修飾を回復させる方法が有効であると期待される。

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・神経医療研究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型であり、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殖治療、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）

フクチンのミスセンス変異体、A114T、G125S、M133T、A170E、H172R、R179T、H186R、R246G、C250G、W305C、R307Q、Q358P、Y371Cの13種類の発現コンストラクトを構築し、培養細胞C2C12へ導入して細胞内局在を観察した。多くの変異体は正常型フクチンと同様にゴルジ体に局在していたが、A170E、H172R、H186R、およびY371Cの4種類がゴルジ体からERへと局在が変化していた。ER－ゴルジ体間の順方向性の輸送をBrefeldin Aで、逆行性の輸送をNocodazoleで阻害したところ、Brefeldin A存在下で正常型フクチンの局在がゴルジ体からERへと変化したが、Nocodazole存在下でも上記4種類のミスセンス変異フクチンの局在はERから変化しなかったことから、これらの変異フクチンの局在変化は

ER からゴルジ体への輸送障害と考えられた。

輸送障害の原因はアミノ酸が変化したことによるフクチンの折りたたみ異常と考えられたので、これらのミスセンス変異フクチンを導入した C2C12 細胞を低温状況下で培養することによる折りたたみ補正をおこなった。折りたたみ補正を受けた上記のミスセンス変異フクチンのうち A170E、H172R、および Y371C の 3 種類は ER からゴルジ体へと局在を変化させた。これらのミスセンス変異フクチンと共発現させた糖転移酵素 POMGnT1 はゴルジ体から ER へ局在を変化させた。

フクチン挿入変異ノックインマウスとジスフェルリン変異 SJL マウスとを掛け合わせた二重変異マウス系統の病態解析の結果、フクチン挿入変異のみでは病態を示さず、ジスフェルリンの単独変異マウスでは軽度の筋ジストロフィー病変が認められた。二重変異マウスにおいては、15 週齢時点でジスフェルリン単独変異マウスよりも進行した組織病態像と中心核線維数の増加が観察され、その程度は 30 週齢でより顕著であった。

cKO マウスについては、筋前駆細胞・筋芽細胞でフクチンを欠損する Myf5-fukutin cKO マウスと、筋管・成熟筋で欠損する MCK-fukutin cKO マウスを作出した。Myf5-fukutin cKO マウスは出生時点で既にジストログリカンの糖鎖異常とラミニン結合能の損失がみとめられた。一方、MCK-fukutin ckO マウスでは、MCK の発現時期のピーク（生後２週齢）と一致するように、２週齢から徐々に糖鎖異常が生じ、８～１６週齢で完全に糖鎖異常がみとめられた。筋ジストロフィー病態に関して、Myf5-fukutin cKO マウスでは４週齢から壊死線維と再生筋が観察されはじめ、加齢に応じた進行性の病変が観察された。１６週時点で、結合組織や脂肪組織の侵潤も認められた。一方、MCK-fukutin cKO は、１６週齢から再生線維が観察されはじめたが、４０週齢にいたっても、その病態の程度に大きな差は観察されなかった。MCK-fukutin cKO では、結合組織や脂肪組織の侵潤はみとめられなかった。

②POMT1 および POMT2 酵素の構造と酵素活性の関連について（遠藤）

昨年度に、ヒト POMT の二次構造を解析し、ScPmt1 と同様の膜配向性をとることを明らかにした。また、ScPmt1 の Arg64、Glu78、Arg138 は POMT1（Arg30, Glu44, Arg105）と POMT2（Arg72, Glu86, Arg145）ですべて保存されていた。そこで、これらのアミノ酸の重要性について検討するため、ヒト POMT1 の Arg30、Glu44、Arg105 および POMT2 の Arg72, Glu86, Arg145 をそれぞれ Ala に置換した変異体（R30A、E44A、R105A、R72A、E86A、R145A）を HEK293T 細胞に発現させ、酵素活性と複合体形成への影響を調べた。発現ベクターへの変異の導入は site-directed mutagenesis 法により行った。ウェスタンブロットにより各タンパク質の発現量を定量し、発現量当たりの酵素活性を測定した。複合体形成は免疫沈降法により確認した。

POMT1 の各変異体（R30A、E44A、R105A）と野生型 POMT2 との共発現では酵素活性は著しく減少した。一方、野生型 POMT1 と POMT2 の各変異体（R72A、E86A、R145A）との共発現では酵素活性の減少は認められなかった。免疫沈降実験では、変異型 POMT1 と野生型 POMT2、野生型 POMT1 と変異型 POMT2 のすべての組み合わせにおいて共沈

が観察され、いずれの変異体も複合体を形成することが確認された。

③Large 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* の系で検討するために Large transgenic mouse (Large Tg) を作出した。同マウスを POMGnT1 knockout mouse (POMGnT1 KO) と交配し、表現形の改善効果を観察した。また Large を安定発現する HeLa 細胞株を樹立して、細胞生物学的な変化を検討した。一方、昨年度樹立した分泌型 Large を安定発現する HEK293 細胞の培養を高密度細胞培養装置を用いてスケールアップして、分泌型 Large 蛋白質の大量発現、精製を試みた。

Large Tg を POMGnT1 KO と交配したが、ほぼ胎生致死である POMGnT1 KO の表現形の改善は認められなかった。Large 高発現 HeLa 細胞はコントロールと比較して接着能が亢進し、増殖能、遊走能は有意に低下していた。

一方高密度細胞培養装置を用いた分泌型 Large 高発現 HEK293 細胞の培養では、時間の経過とともに細胞が基質からはがれて浮遊してしまい、Large の発現も急速に低下してしまうという問題が生じたため、未だ Large 蛋白質の大量精製には至っていない。

④福山型筋ジストロフィーに対する骨髄移植による再生療法確立のための基盤研究（砂田）

MyoD 導入及び Myf5 導入線維芽細胞の *in vitro* リプログラミング

MyoD 及び Myf5 導入によって GFP 高発現マウス由来の MEF は形態学的には 48 時間後、ないし 76 時間後から細胞融合を始め、筋管様の多核細胞となり、筋特異的中間系フィラメントであるデスミンが陽性となった。4-5 日後には筋管細胞様多核細胞は収縮を開始し、7-14 日後には筋組織様の収縮する細胞シートとなった。この *in vitro* の分化過程で、ジストロフィン及びジストロフィン糖タンパク複合体、メロシン及びカベオリン-3 などの骨格筋構造蛋白質が発現し、筋の最終分化マーカーである、マイオジェニンやクレアチンキナーゼの発現も確認された。MyoD 導入線維芽細胞と比較して Myf5 導入線維芽細胞は形態学的にも蛋白発現でも約 24 時間遅れて筋細胞へ分化した。

次いでこの *in vitro* 筋細胞分化に至る分子機構について解析を行った。筋分化関連転写因子解析からは、MyoD 導入線維芽細胞では MyoD 以降の筋分化を制御する MEF2B 及び MEF2C の発現誘導が認められた。一方、Myf5 導入細胞では Myf5 の発現後に MyoD が発現し、その後 MEF2B 及び MEF2C の発現誘導が認められた。Myf5 より早期の筋分化転写因子である Pax7 発現は認められず、更に多能性幹細胞マーカーである、Nanog, Oct4, Sox2 の発現もみられなかった。

この MyoD 及び Myf5 導入線維芽細胞を、筋衛星細胞マーカーで経時的に染色した。MyoD 導入細胞では M-cadherin は 12 時間、V-CAM は 48 時間以降、ＣＤ34 は 72 時間以降に発現を認め 14 日後まで持続した。一方、Myf5 導入細胞では M-cadherin は 24 時間、V-CAM は 72 時間以降、ＣＤ34 は 96 時間以降に発現を認め 14 日後まで持続した。

MyoD 導入及び Myf5 導入線維芽細胞の細胞移植効率

MyoD 及び Myf5 導入細胞を、導入後の時間を振って野生型Ｂ6 マウス前脛骨筋に移植し FK506 投与を行った。40 日後に骨格筋を採取して解析した。約 50-80％の筋線維

はGFP陽性であった。MyoD導入細胞では6-48時間で導入効率が高くピークは12時間、一方、MyoD導入細胞では12-48時間で導入効率が高く、ピークは24時間であった。

MyoD導入線維芽細胞移植骨格筋の長期観察

MyoD導入細胞を免疫不全NOGマウス前脛骨筋に細胞移植し、長期間骨格筋を観察した。1年後及び2年後でもGFP陽性筋線維が認められた。

⑤POMGnT1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）

1．12カ月齢までには81％のホモ個体で網膜剥離が見られた。眼底写真では網膜血管の肥厚を思わせる所見と分岐・蛇行等の走行異常が示唆された。組織学的解析では内境界膜（ILM）が不連続で随所で破綻しており、硝子体側にGFAP陽性細胞が異所性に認められた。

2. *POMGnT1*$^{-/-}$のERGではa波（視神経）およびb波（双極細胞）の両方で振幅の減弱が見られた。

3. *POMGnT1*$^{-/-}$では外網状層（OPL）が薄くなっており、α-DGの糖鎖およびピカチュリンの発現が消失していた。視細胞、双極細胞、アマクリン細胞には免疫染色上、異常は認められなかった。b-DGとジストロフィンの発現は低下していた。電顕ではシナプス内では1個のみ存在するシナプスリボンが複数存在していた。

4. 網膜ホールマウント染色では血管走行に蛇行等の異常と、GFAP発現の増強が認められ、アストロサイトの異常増殖(gliosis)が考えられた。またER-TR7抗体のシグナルが増強している事からfibrosisも伴っていると考えられた。

D. 考察

①福山型先天性筋ジストロフィー発症機序の解明

ミスセンス変異フクチン13種類のうちA170E、H172R、H186RおよびY371Cの4種類は、そのアミノ酸変化に起因する折りたたみ異常が原因となってERからゴルジ体へ輸送されなくなる。この際にフクチンのバインディングパートナーである糖転移酵素POMGnT1もERに留まる。

POMGnT1が正しくゴルジ体へ輸送されないことにより、αジストログリカン(DG)に付加される4糖からなる糖鎖、Siaα2,3-Gal β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1-*O*-Ser/Thrの2番目の糖であるGlcNAcが付加されずαDGはhypoglycosylatedとなり、FCMDを発症するのではないかと考えられる。

これらの変異を持つ患者については、変異フクチンの細胞内局在を是正することでFCMDの発症を抑える、もしくは症状を低減できる可能性が考えられた。

二重変異マウス系統の解析結果から、フクチンの挿入変異マウスでは、細胞膜は潜在的に脆弱化しているものの、ジスフェルリン依存の膜修復機構が保護的に作用しているため、発症まで至らないものと考えられる。二重変異マウスにすることではじめて、挿入変異をもつモデルマウスが病態を呈した。従って、この新しい二重変異マウスは、レトロトランスポゾン挿入変異型の福山型筋ジストロフィーの治療法開発に有効なモデルとなることが期待される。

Myf5-fukutin cKOでは、重篤な進行性の筋ジストロフィー病変が観察されたのに対し、MCK-fukutin cKOでは、非常に軽度な病変が観察された。この理由としては、MCK-fukutin cKOマウスの筋衛星細胞は、Cre-recombinationの標的になっておらず、

正常の筋再生能を維持しているためと考えられる。これら2種の異なるcKOマウス間の病態比較から、従来から提唱されている筋細胞膜の物理的強度の維持に関する役割に加え、筋形成・再生過程におけるフクチンの細胞生物学的・組織病態的な重要性を新たに示唆することに成功した。これらの新しいフクチンcKOモデルマウスは、FCMD病態の理解や治療法開発に有効なツールとなることが強く期待できる。

②POMT1およびPOMT2酵素の構造と酵素活性の関連について

ScPmt1の変異体R64A、E78Aでは酵素活性減少、R138Aでは複合体形成不全と活性減少が報告されている。ヒトPOMT1では今回解析したすべての変異体で酵素活性の著しい減少が確認され、酵母とほぼ同様の結果となった。しかし、いずれの変異体もPOMT2との複合体を形成した。この結果、ScPmt1と同様にPOMT1のloop1も酵素活性に必要であるが、複合体形成のメカニズムは酵母とヒトでは異なっており、そうした相違が基質特異性などに影響を及ぼしている可能性が示唆された。一方、ヒトPOMT2では、いずれの変異体においても酵素活性の減少は認められず、POMT1との複合体も形成していた。この結果は、POMT1とPOMT2のloop1の働きが異なることを示しており、POMT1とPOMT2が異なる機能を担っている可能性を示している。今後、複合体形成の意味やPOMT1とPOMT2の機能を解析することで、病態との関連性を明らかにしたい。

③Large蛋白質を用いた新規治療法の開発

POMGnT1 KOとの交配で胎生致死を改善させるまでには至らなかったが、元々の表現形があまりに重篤であった可能性が考えられる。より症状が軽いfukutin conditional KO mouseとの交配実験を現在行っている。同マウスは誕生後に筋ジストロフィーを発症するため、表現型の変化の有無を確実に検討することが可能である。一方でLarge高発現HeLa細胞は接着能の亢進とともに増殖能、遊走能の著明な減弱を示した。筋ジストロフィーに及ぼすこれらの影響は今後検討する必要があるが、元々癌細胞由来のHeLa細胞でこのような効果が見られたことから、Largeは癌治療へも応用できる可能性が高い。分泌型Largeの大量培養ではこれまでのところ細胞を長期間良好な状態に保つことが難しく、今後さらなる培養条件の検討が必要となる。

④福山型筋ジストロフィーに対する骨髄移植による再生療法確立のための基盤研究

筋分化のマスター遺伝子（Myogenic reulator factrors）には、代表であるMyoDの他、Myf5とMRF4とがあり、それぞれ胎児期の発現時期や発現分布に差異があること、筋分化機能が一部重複することが解っているが、その全容は未だ解明されていない。昨年度までにMyoD導入による線維芽細胞リプログラミングによって*in vitro*でも*in vivo*でも筋細胞への分化が可能であることを証明した。本年度の研究によってMyoDの上流でMyf5が筋細胞へのリプログラミングを制御していることが明らかとなった。またMyf及びMyoD導入線維芽細胞が*in vitro*で筋衛星細胞を長期間発現すること、MyoD導入線維芽細胞が最低2年間という長期にわたり筋線維に生着することを示した。従ってMyoD導入の他、Myf5導入体細胞リプログラミングによっても筋ジストロフィーの細胞治療ソースを供給することが可能と考えられる。更に現在、核発現LacZ

を搭載したレンチウイルスベクターをも導入することによって、これらのマスター遺伝子導入細胞が骨格筋で幹細胞・筋衛星細胞として機能しているか否かについて解析を行っている。

本研究ではマスター遺伝子導入による筋ジストロフィー細胞治療についてproof-of-concept が示された。現在、筋ジストロフィーの根治療法として、これらの iPS を含む幹細胞から筋細胞を分化させる、乃至は、骨格筋から筋前駆細胞を単離し、疾患モデルマウスに移植するという 2 つのアプローチで細胞治療が試みられている。しかしこれらの試みは、移植した細胞が非筋細胞や奇形種にも分化する可能性があること、細胞の採取及び培養について高度な技術を要することが問題となる。本研究から体細胞はリプログラミングによって容易に筋細胞となり得ることが明らかとなった。今後は適切な体細胞の選択、細胞の大量供給、レプログラミング細胞治療が実際にモデルマウスの筋力低下が改善に至るのか否かについて生理機能解析などの検討が課題となる。また患者への臨床応用を考えた場合、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 Myf5 及び MyoD レコンビナント蛋白質の導入によるリプログラミングへの取り組みも必要と考えられる。

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

POMGnT1 変異マウスの網膜の形態学的異常は、a-DG の発現部位（内境界膜, 血管周囲、外網状層）と一致しており、網膜においてa-DG以外に POMGnT1 によって糖鎖修飾を受けるタンパク質がある可能性は否定的である。MEB では多彩な眼の病変が報告されているが、その共通のメカニズムとして、血管周囲アストロサイトやミューラー細胞の突起上の a-DG が糖鎖修飾の異常のためにそのリガンドである基底膜のラミニンと結合できないことが考えられる。更に a-DG とピカチュリンとの結合が失われることが OPL でのシナプスの異常と深く関連していると考えられた。ERG の異常は増殖性網膜はく離とリボンシナプスでのシグナル伝達異常の両者により生じていると考えられた。

E.　結論

1、ジストログリカンの糖鎖を介する新規結合タンパク質ピカチュリンの同定や、FCMD はスプライシング異常症であることを明らかにしてきた。既報告のあるミスセンス変異フクチン 13 種類のうち、その細胞内局在の変化が FCMD 発症の原因と示唆される変異体 4 種類を確認した。本研究で創出することに成功した新しいモデルマウスは、FCMD 病態の理解や治療法開発に有効なツールとなることが強く期待できる。

2、POMT1 の loop1 は ScPmt1 と同様に酵素活性の発現に重要であることが明らかとなった。しかし、複合体形成のメカニズムはヒトと酵母では異なる可能性が示された。また、POMT1 と POMT2 の機能が異なる可能性が示された。

3、Large Tg を POMGnT1 KO と交配したが、胎生致死である POMGnT1 KO の表現形の改善は認められなかった。Large を HeLa 細胞に高発現させると HeLa 細胞は接着能の亢進とともに増殖能、遊走能の著明な減弱を示し、Large が癌治療へ応用可能であることが示唆された。治療実験に供する分泌型 Large 蛋白質の大量精製にはさらなる条件検討が必要である。

4、筋特異的転写因子である Myf5 及び MyoD を線維芽細胞に導入することによって *in vitro* でも *in vivo* でも筋細胞への direct reprogramming が可能であった。また MyoD 導入細胞は骨格筋線維で長期に維持されることが明らかとなった。今後は FCMD モデルマウスへの治療研究によって、この細胞を用いた FCMD 患者への再生治療法の確立を図る。

5、POMGnT1 変異マウスは MEB 病の眼病変を忠実に再現しており、良い動物モデルだと考えられた。α-DG の糖鎖修飾異常のために、アストロサイト、ミューラー細胞がラミニン等に結合できず、内境界膜の破綻と、網膜血管の異常を引き起こしていると考えられた。またα-DG がピカチュリンに結合できないことにより、OPL でのシナプスの形成が異常になると考えられた。眼症状の治療には、外来性に POMGnT1 遺伝子あるいは Large 遺伝子を AAV ベクター等でグリアへ導入して、α-DG の糖鎖修飾を回復させる方法が有効であると期待される。

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

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
分担研究報告書

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　神戸大学大学院医学研究科神経内科　教授
研究協力者　立川雅司、金川基、小林千浩

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、病態解析研究をおこなった。ジストログリカンの糖鎖を介する新規結合タンパク質ピカチュリンの同定や、FCMD はスプライシング異常症であることを明らかにしてきた。

既報告のあるミスセンス変異フクチン 13 種類のうち、その細胞内局在の変化が FCMD 発症の原因と示唆される変異体 4 種類を確認した。

本研究で創出することに成功した新しいモデルマウス（フクチン挿入変異ノックインマウスとジスフェルリン変異 SJL マウスの二重変異マウス、Myf5-fukutin cKO マウス、MCK-fukutin cKO マウス）は、FCMD 病態の理解や治療法開発に有効なツールとなることが強く期待できる。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）は先天性筋ジストロフィー、II 型滑脳症、及び眼奇形の 3 症状を示す常染色体劣性遺伝疾患である。日本で 2 番目に多い小児の筋疾患であり、10 代で死に至る重篤な疾患だが未だ治療法がない。

日本のほとんどの福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）患者は 3' 非翻訳領域にレトロトランスポゾン様配列が挿入されたアレルを持つ。このアレルと点突然変異の複合ヘテロでは、しばしば重症化する事が知られている。近年、国内・海外からフクチン遺伝子の新たな変異と臨床症状に関する報告がみられ、フクチン遺伝子の変異による臨床スペクトラムは従来考えられているよりも幅広く、肢帯型筋ジストロフィーから Walker-Warburg 症候群まで、症状は多岐に渡ることが分かってきた。

また、福山型筋ジストロフィーの分子病態の解明や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。しかし、全身性のフクチンノックアウトマウスは胎生致死であり、キメラマウスは病態を呈すものの、表現型の個体差や実験の煩雑性などが問題となる。レトロトランスポゾン挿入変異のノックインマウスは糖鎖異常を示すものの病態はみとめられなかった。

これまでジストログリカンの糖鎖を介する新規結合タンパク質ピカチュリンの同定や、FCMD はスプライシング異常症であることを明らかにしてきた。本年度は、我々はフクチン遺伝子の変異と病態の関連を調べる目的で、既報告のあるフクチンミスセンス

変異体 13 種類を作成し、その細胞内局在を検討した。また福山型筋ジストロフィーの新たなモデルマウスとして、ノックインマウスとジスフェルリン変異SJLマウスとの二重変異マウス、ならびに骨格筋特異的なフクチンコンディショナルノックアウト（cKO）マウスの作成を行った。

B．研究方法

既報告のあるフクチンのミスセンス変異体 13 種類について、inverse PCR を利用した部位特異的変異導入法をもちいて発現コンストラクトを構築した。作成したベクターを培養細胞 C2C12 細胞に導入し、蛍光抗体法によって変異フクチンの局在を観察した。ゴルジ体から小胞体（ER）へと局在が変化している変異体 4 種類に関し、Brefeldin A もしくは Nocodazole をもちいて ER－ゴルジ体間の輸送を阻害し、局在変化の原因が順方向性の輸送によるのか、逆行性の輸送によるのかを確認した。

輸送障害の原因としてアミノ酸が変化したことによる折りたたみ異常を考え、折りたたみを補正する手段として発現ベクターを導入した細胞を低温状況下で培養し、局在の変化について観察した。

フクチン挿入変異ノックインマウスとジスフェルリン変異SJLマウスの掛け合わせを行い、同一マウス系統から、正常、ジスフェルリン変異、フクチン挿入変異、二重変異の４種のジェノタイプをもつ仔が得た。筋ジストロフィー病態は、骨格筋組織のHE染色、マッソントリクローム染色、マクロファージの免疫染色、中心核線維数の定量化によって解析した。

cKO マウスの作出に必要な FLOX マウスは、フクチンの exon2 を挟むようにLOX配列を挿入することで作出した。組織選択的にCreを発現するマウスとしては、筋衛星細胞、前駆細胞に発現する Myf5、あるいは筋管に発現する MCK、それぞれのプロモーターの下流にCreをもつトランスジェニックマウスを用いた。それぞれ Myf5-fukutin cKO、MCK-fukutin cKO と呼ぶ。cKO マウスの組織病態は HE 染色により、糖鎖修飾状況はウェスタンブロット解析、基底膜ラミニンへの結合は、オーバーレイ法を用いて検討した。

C．研究結果

フクチンのミスセンス変異体、A114T、G125S、M133T、A170E、H172R、R179T、H186R、R246G、C250G、W305C、R307Q、Q358P、Y371C の 13 種類の発現コンストラクトを構築し、培養細胞 C2C12 へ導入して細胞内局在を観察した。多くの変異体は正常型フクチンと同様にゴルジ体に局在していたが、A170E、H172R、H186R、および Y371C の 4 種類がゴルジ体から ER へと局在が変化していた。ER－ゴルジ体間の順方向性の輸送を Brefeldin A で、逆行性の輸送を Nocodazole で阻害したところ、Brefeldin A 存在下で正常型フクチンの局在がゴルジ体から ER へと変化したが、Nocodazole 存在下でも上記 4 種類のミスセンス変異フクチンの局在は ER から変化しなかったことから、これらの変異フクチンの局在変化は ER からゴルジ体への輸送障害と考えられた。

輸送障害の原因はアミノ酸が変化したことによるフクチンの折りたた

み異常と考えられたので、これらのミスセンス変異フクチンを導入したC2C12細胞を低温状況下で培養することによる折りたたみ補正をおこなった。折りたたみ補正を受けた上記のミスセンス変異フクチンのうち A170E、H172R、および Y371C の 3 種類は ER からゴルジ体へと局在を変化させた。

これらのミスセンス変異フクチンと共発現させた糖転移酵素 POMGnT1 はゴルジ体から ER へ局在を変化させた。

フクチン挿入変異ノックインマウスとジスフェルリン変異SJLマウスとを掛け合わせた二重変異マウス系統の病態解析の結果、フクチン挿入変異のみでは病態を示さず、ジスフェルリンの単独変異マウスでは軽度の筋ジストロフィー病変が認められた。二重変異マウスにおいては、15 週齢時点でジスフェルリン単独変異マウスよりも進行した組織病態像と中心核線維数の増加が観察され、その程度は 30 週齢でより顕著であった。

cKO マウスについては、筋前駆細胞・筋芽細胞でフクチンを欠損する Myf5-fukutin cKO マウスと、筋管・成熟筋で欠損する MCK-fukutin cKO マウスを作出した。Myf5-fukutin cKO マウスは出生時点で既にジストログリカンの糖鎖異常とラミニン結合能の損失がみとめられた。一方、MCK-fukutin ckO マウスでは、MCK の発現時期のピーク（生後２週齢）と一致するように、２週齢から徐々に糖鎖異常が生じ、８～１６週齢で完全に糖鎖異常がみとめられた。筋ジストロフィー病態に関して、Myf5-fukutin cKO マウスでは４週齢から壊死線維と再生筋が観察されはじめ、加齢に応じた進行性の病変が観察された。１６週時点で、結合組織や脂肪組織の侵潤も認められた。一方、MCK-fukutin cKO は、１６週齢から再生線維が観察されはじめたが、４０週齢にいたっても、その病態の程度に大きな差は観察されなかった。MCK-fukutin cKO では、結合組織や脂肪組織の侵潤はみとめられなかった。

D．考察

ミスセンス変異フクチン 13 種類のうち A170E、H172R、H186R および Y371C の 4 種類は、そのアミノ酸変化に起因する折りたたみ異常が原因となって ER からゴルジ体へ輸送されなくなる。この際にフクチンのバインディングパートナーである糖転移酵素 POMGnT1 も ER に留まる。

POMGnT1 が正しくゴルジ体へ輸送されないことにより、αジストログリカン（DG）に付加される 4 糖からなる糖鎖、Siaα2,3-Galβ1,4-GlcNAcβ1,2-Manα1-*O*-Ser/Thr の 2 番目の糖である GlcNAc が付加されず αDG は hypoglycosylated となり、FCMD を発症するのではないかと考えられる。

これらの変異を持つ患者については、変異フクチンの細胞内局在を是正することで FCMD の発症を抑える、もしくは症状を低減できる可能性が考えられた。

二重変異マウス系統の解析結果から、フクチンの挿入変異マウスでは、細胞膜は潜在的に脆弱化しているものの、ジスフェルリン依存の膜修復機構が保護的に作用しているため、発症まで至らないものと考えられる。二重変異マウスにすることではじめて、挿入変異をもつモデルマウスが病態を

呈した。従って、この新しい二重変異マウスは、レトロトランスポゾン挿入変異型の福山型筋ジストロフィーの治療法開発に有効なモデルとなることが期待される。

Myf5-fukutin cKO では、重篤な進行性の筋ジストロフィー病変が観察されたのに対し、MCK-fukutin cKO では、非常に軽度な病変が観察された。この理由としては、MCK-fukutin cKO マウスの筋衛星細胞は、Cre-recombination の標的になっておらず、正常の筋再生能を維持しているためと考えられる。これら2種の異なる cKO マウス間の病態比較から、従来から提唱されている筋細胞膜の物理的強度の維持に関する役割に加え、筋形成・再生過程におけるフクチンの細胞生物学的・組織病態的な重要性を新たに示唆することに成功した。これらの新しいフクチン cKO モデルマウスは、FCMD 病態の理解や治療法開発に有効なツールとなることが強く期待できる。

E. 結論

ジストログリカンの糖鎖を介する新規結合タンパク質ピカチュリンの同定や、FCMD はスプライシング異常症であることを明らかにしてきた。

既報告のあるミスセンス変異フクチン 13 種類のうち、その細胞内局在の変化が FCMD 発症の原因と示唆される変異体 4 種類を確認した。

本研究で創出することに成功した新しいモデルマウスは、FCMD 病態の理解や治療法開発に有効なツールとなることが強く期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanagawa M, et al. Post-translational maturation of dystroglycan is necessary for pikachurin binding and ribbon synaptic localization. J Biol Chem 285: 31208-31216, 2010.

Kojima K, et al. Defective glycosylation of α-dystroglycan contributes to podocyte flattening. Kidney Int 79: 311-316, 2011

2. 学会発表

World Muscle Society 2010

日本分子生物学会・生化学会 2010

2nd International Workshop for Glycosylation Defects in Muscular Dystrophies 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

特になし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
分担研究報告書

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　地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所　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。我々は、Walker-Warburg syndrome の原因遺伝子産物 POMT1 と POMT2 が複合体を形成することで *O*-マンノース転移酵素として機能することを明らかにしている。酵母の POMT ホモログである ScPmt1 の解析から、酵素活性や複合体形成に loop1 のアミノ酸の重要性が示されている。そこで本年度は、POMT1 と POMT2 における loop1 の重要性について検討した。

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。

Walker-Warburg syndrome（WWS）の原因遺伝子産物である POMT1 と POMT2 はタンパク質の Ser および Thr にマンノースを転移する *O*-マンノース転移酵素である。我々は、WWS の原因となる POMT1 および POMT2 の新たな変異の発見や、遺伝子診断に代わる酵素活性測定による新たな診断法の開発を行ってきた。*O*-マンノース転移酵素は酵素活性の発現に POMT1-POMT2 複合体の形成が必要である。しかしながら、複合体形成のメカニズムや WWS 患者で見られるアミノ酸変異による酵素活性喪失のメカニズムはよく分かっていない。これまでの解析から、WWS にみられる POMT1 および POMT2 の変異は POMT 活性を失活させることが示されている。

出芽酵母（*S. cerevisiae*）における POMT ホモログである ScPmt1 は ScPmt2 と複合体を形成する。ScPmt1 は 7 回膜貫通型タンパク質であり小胞体内腔側に位置する loop5 が活性中心と予想されているが、loop1 に位置する Arg64、Glu78、Arg138 も酵素活性に重要であり、特に Arg138 は複合体形成に必須であることが報告されている。我々は昨年度に、ヒト POMT の二次構造を解析し、ScPmt1 と同様の膜配向性をとることを明らかにした。また、ScPmt1 の Arg64、Glu78、Arg138 は POMT1（Arg30, Glu44, Arg105）と POMT2（Arg72, Glu86, Arg145）ですべて保存されていた。そこで、これらのアミノ酸の重要性について検討した。

B.研究方法

ヒト POMT1 の Arg30、Glu44、Arg105 および POMT2 の Arg72, Glu86, Arg145 をそれぞれ Ala に置換した変異体（R30A、E44A、R105A、R72A、E86A、R145A）を HEK293T 細胞に発現させ、酵素活性と複合体形成への影響を調べた。発現ベクターへの変異の導入は site-directed mutagenesis 法により行った。ウェスタンブロットにより各タンパク質の発現量を定量し、発現量当たりの酵素活性を測定した。複合体形成は免疫沈降法により確認した。

(倫理面への配慮)

放射性同位元素の使用関しては「放射線障害防止法関連法令」および「所内規定」に基づき安全を確保した。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」に基づくとともに所内組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けた。

C.研究結果

POMT1の各変異体（R30A、E44A、R105A）と野生型POMT2との共発現では酵素活性は著しく減少した。一方、野生型POMT1とPOMT2の各変異体（R72A、E86A、R145A）との共発現では酵素活性の減少は認められなかった。免疫沈降実験では、変異型POMT1と野生型POMT2、野生型POMT1と変異型POMT2のすべての組み合わせにおいて共沈が観察され、いずれの変異体も複合体を形成することが確認された。

D.考察

ScPmt1の変異体R64A、E78Aでは酵素活性減少、R138Aでは複合体形成不全と活性減少が報告されている。ヒトPOMT1では今回解析したすべての変異体で酵素活性の著しい減少が確認され、酵母とほぼ同様の結果となった。しかし、いずれの変異体もPOMT2との複合体を形成した。この結果、ScPmt1と同様にPOMT1のloop1も酵素活性に必要であるが、複合体形成のメカニズムは酵母とヒトでは異なっており、そうした相違が基質特異性などに影響を及ぼしている可能性が示唆された。一方、ヒトPOMT2では、いずれの変異体においても酵素活性の減少は認められず、POMT1との複合体も形成していた。この結果は、POMT1とPOMT2のloop1の働きが異なることを示しており、POMT1とPOMT2が異なる機能を担っている可能性を示している。今後、複合体形成の意味やPOMT1とPOMT2の機能を解析することで、病態との関連性を明らかにしたい。

E.結論

POMT1のloop1はScPmt1と同様に酵素活性の発現に重要であることが明らかとなった。しかし、複合体形成のメカニズムはヒトと酵母では異なる可能性が示された。また、POMT1とPOMT2の機能が異なる可能性が示された。

F.研究発表

1. 論文発表

Clarke N.F., Maugenre S., Vandebrouck A., Urtizberea J.A., Willer T., Peat R., Gray F., Bouchet C., Manya H., Vuillaumier-Barrot S., Endo T., Chouery E., Campbell K.P., Mégarbané A., Guicheney P.: Congenital Muscular Dystrophy type 1D (MDC1D) due to a large intragenic insertion/deletion involving intron 10 of the *LARGE* gene. *Eur. J. Hum. Genet.*, 19(4), 452-457, 2011

Avşar-Ban E., Ishikawa H., Manya H., Watanabe M., Akiyama S., Miyake H., Endo T., Tamaru Y.: Protein *O*-mannosylation is necessary for normal embryonic development in zebrafish. *Glycobiology,* 20(9), 1089-1102, 2010

Endo T., Manya H., Seta N., Guicheney P.: POMGnT1, POMT1, and POMT2 Mutations in Congenital Muscular Dystrophies. (Ed. Fukuda, M.), *Methods Enzymol.* Elsevier, San Diego, 479, 343-352, 2010

Manya H., Endo T.: Enzyme assay of protein *O*-mannosylglycan glycosyltransferases., *Glycoscience Protocol Online Database* (GlycoPOD), http://jcggdb.jp/GlycoPOD/, 2010

2. 学会発表

Manya H., Akasaka-Manya K., Endo T.: Role of *N*-glycans on protein *O*-mannosyltransferases POMT1 and POMT2. XXV International Carbohydrate Symposium, Tokyo, 2010.8.1-6

Endo T., Avsar-Ban E., Manya H., Tamaru Y.: Investigation the role of protein *O*-mannosylation during development. Annual Conference of the Society for Glycobiology, St Pete Beach, FL, USA, 2010.11.7-10

赤阪啓子、萬谷博、水野真盛、稲津敏行、遠藤玉夫: POMGnT1の基質特異性の解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010.12.7-10

アヴシャル-坂恵利子、石川文啓、萬谷博、渡部正利喜、秋山真一、三宅英雄、遠藤玉夫、田丸浩: ゼブラフィッシュ初期発生過程において *O*-マンノース型糖鎖修飾が必要である. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010.12.7-10

G.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
   該当なし
2. 実用新案登録
   該当なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））

分担研究報告書

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　教授

研究要旨

本研究は福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）に対する Large を用いた新規治療法の開発を目指すものである。本年度は Large の過剰発現が生体に及ぼす影響を細胞生物学的に検討するとともに Large transgenic mouse（Large Tg）と POMGnT1 knockout mouse（POMGnT1 KO）との交配を行い POMGnT1 KO の表現形の変化を観察した。Large 過剰発現 HeLa 細胞は細胞接着能の亢進と、細胞増殖脳、遊走能の低下を示した。Large Tg と POMGnT1 KO の交配実験では KO の胎生致死という表現形の改善は認められなかった。一方で、蛋白質治療実験の実施に向けてラージスケールでの Large の発現、精製を試みた。

A.研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は 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* の系で検討するために Large transgenic mouse（Large Tg）を作出した。同マウスを POMGnT1 knockout mouse（POMGnT1 KO）と交配し、表現形の改善効果を観察した。また Large を安定発現する HeLa 細胞株を樹立して、細胞生物学的な変化を検討した。一方、昨年度樹立した分泌型 Large を安定発現する HEK293 細胞の培養を高密度細胞培養装置を用いてスケールアップして、分泌型 Large 蛋白質の大量発現、精製を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究は厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守して行った。また本研究は本学の遺伝子組み換え生物実験安全委員会の承認を得て行うとともに、動物実験に関しても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った。以上より倫理面の問題はないものと考える。

C.研究結果

Large Tg を POMGnT1 KO と交配したが、ほぼ胎生致死である POMGnT1 KO の表現形の改善は認められなかった。Large 高発現 HeLa 細胞はコントロールと比較して接着能が亢進し、増殖能、遊走能は有意に低下していた。一方高密度細胞培養装置を用いた分泌型 Large 高発現 HEK293 細胞の培養では、時間の経過とともに細胞が基質からはがれて浮遊してしまい、Large の発現も急速に低下してしまうという問題が生じたため、未だ Large 蛋白質の大量精製には至っていない。

D.考察

POMGnT1 KO との交配で胎生致死を改善させるまでには至らなかったが、元々の表現形があまりに重篤であった可能性が考えられる。より症状が軽い fukutin conditional KO mouse との交配実験を現在行っている。同マウスは誕生後に筋ジストロフィーを発症するため、表現型の変化の有無を確実に検討することが可能である。一方で Large 高発現 HeLa 細胞は接着能の亢進とともに増殖能、遊走能の著明な減弱を示した。筋ジストロフィーに及ぼすこれらの影響は今後検討する必要があるが、元々癌細胞由来の HeLa 細胞でこのような効果が見られたことから、Large は癌治療へも応用できる可能性が高い。分泌型 Large の大量培養ではこれまでのところ細胞を長期間良好な状態に保つことが難しく、今後さらなる培養条件の検討が必要となる。

E.結論

Large Tg を POMGnT1 KO と交配したが、胎生致死である POMGnT1 KO の表現形の改善は認められなかった。Large を HeLa 細胞に高発現させると HeLa 細胞は接着能の亢進とともに増殖能、遊走能の著明な減弱を示し、Large が癌治療へ応用可能であることが示唆された。治療実験に供する分泌型 Large 蛋白質の大量精製にはさらなる条件検討が必要である。

F.研究発表

1. 論文発表

1) Saito F, Matsumura K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and defective

glycosylation of α-dystroglycan. Skeletal Muscle 2011 (*in press*).
2) 斉藤史明、松村喜一郎. α-ジストログリカンの機能異常と筋ジストロフィー. 生体の科学 2011 (*in press*).

2. 学会発表

1) Saito F, Nakamura-Okuma A, Ikeda M, Hagiwara H, Shimizu T, Matsumura K. Characterization of Large transgenic mice – Overexpression of Large and functional up-regulation of α-dystroglycan *in vivo* –. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases. Naples, Italy. July 21, 2010.
2) 斉藤史明, 萩原宏毅, 中村文美, 池田美樹, 清水輝夫, 松村喜一郎. 遺伝子改変マウスを用いた Large による a-dystroglycan の機能修復に関する検討. 第51回日本神経学会総会. 東京. 2010.5.20
3) 萩原宏毅, 斉藤史明, 中村文美, 松村喜一郎, 清水輝夫. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の骨格筋由来培養細胞に対する効果の検討. 第51回日本神経学会総会. 東京. 2010.5.20

G.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