

第11節 POMGnT1

1. はじめに

ジストロフィン・糖タンパク質複合体(dystrophin-glycoprotein complex : DGC)の主要分子の1つ、 α -dystroglycan (α -DG)の糖鎖修飾の異常で発症する、知能障害と眼の異常を伴う一連の筋ジストロフィーがあり、一括して α -dystroglycanopathyと呼ばれるようになった。 α -DGの糖鎖修飾の構造解析、糖鎖合成に関わる糖転移酵素の同定、そして各疾患の原因遺伝子の同定が進むにつれ、 α -dystroglycanopathyの発症メカニズムが明らかになるとともに、分子治療への応用が期待されるに至っている。

2. O-マンノース型糖鎖の発見

著者の1人である遠藤らはウシ末梢神経およびウサギ骨格筋に発現する α -DGの糖鎖修飾を解析し、その主要な糖鎖が哺乳類では新しいO-マンノース型タイプの糖鎖、Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Manであることを見いだした^{1), 2)}。そして、 α -DGはこの糖鎖を使ってラミニンに結合していることを示した。マンノースはSer/Thrの側鎖に結合している(図1)。中枢神経系に発現する α -DGも同様にO-マンノース型糖鎖修飾を受けている。哺乳類においてO-マンノース型糖鎖は、脳、神経、骨格筋の限られた糖タンパク質でのみ認められており、 α -DGはO-マンノース型糖鎖修飾を受ける主要なタンパク質である。

3. O-マンノース型糖鎖の生合成経路の解明

次に遠藤らはO-マンノース型糖鎖の生合成経路の解明に取り組み、タンパク質にマンノースを転移する酵素がprotein O-mannosyltransferase1 (POMT1)およびもう1つのホモログPOMT2であり、活性発現にPOMT1-POMT2複合体形成が必要であることを示した³⁾。さらにGlcNAc β 1-2Manを形成する酵素がprotein O-mannose : GlcNAc β 1-2transferase1 (POMGnT1)であることを明らかにした⁴⁾。POMGnT1は660個のアミノ酸からなる、ゴルジ体膜に局在するII型の膜タンパク質である。

4. α -DGの糖鎖のリガンド

α -DGと β -DGは、1つの遺伝子にコードされているが、翻訳後プロセッシングを受ける、骨格筋細胞膜上のDGCの主要な構成分子である(図2)。 β -DGは膜貫通ドメインを持ち、 α -DGと結合すると同時に、ジストロフィンと結合する。O-マンノース型糖鎖を受けた α -DGは細胞外マトリックスのラミニンのGドメインと結合する。このように α -DGと β -DGは基底膜-細胞膜-細胞骨格を機械的にリンクさせ、細胞膜の安定性に寄与している。ラミニンの他にもニューレキシン、ピカチュリン、アグリン、パールカンなどがGドメインを介して α -DGの糖鎖に結合すると報告されている。ピカチュリンは2008年、大阪バイオサイエンス研究所の古川貴久らの研究チームにより

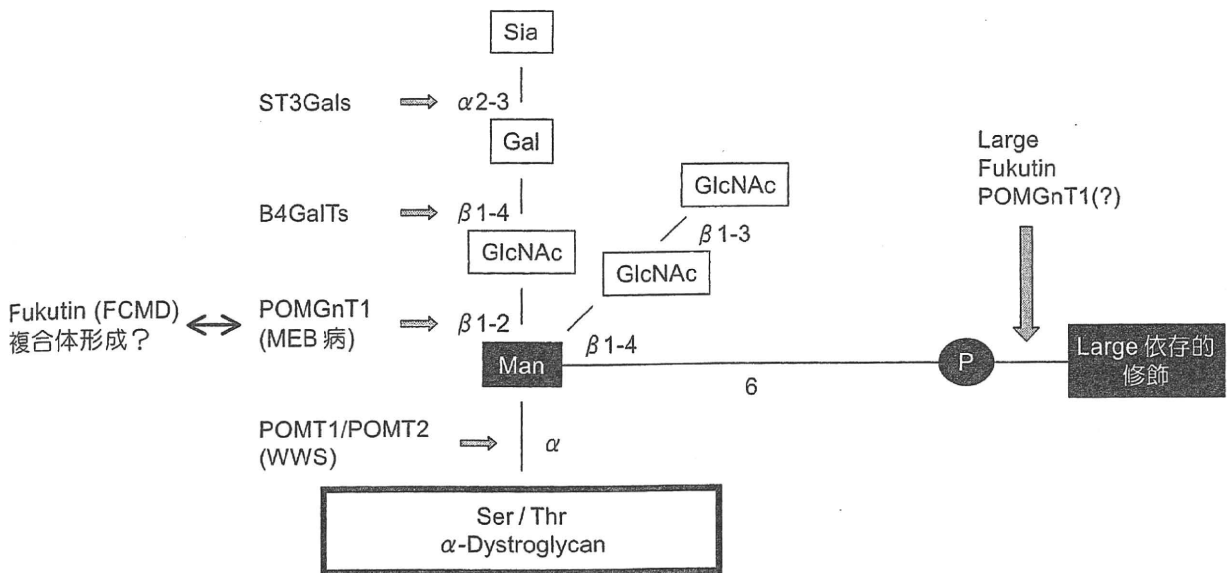


図1 α -DGのO-マンノース型糖鎖の構造と糖転移酵素

POMT1, POMT2 は Walker-Warburg 症候群 (WWS) の原因遺伝子で、複合体を形成して α -DG のセリン・スレオニンにマンノースを結合させる。POMGnT1 は muscle-eye-brain (MEB) 病の原因遺伝子で N-アセチルグルコサミンをマンノースに転移させる。福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) でも異常な糖鎖修飾とラミニン結合能の低下が認められる。原因分子であるフクチンの糖転移酵素活性は明らかではないが POMGnT1 と複合体を形成すると報告されている¹⁹⁾。Large および FKR (fukutin-related protein) の異常でも α -DG の糖鎖修飾異常を示す筋ジストロフィー、1C 型先天性筋ジストロフィー (MDC1C)、1D 型先天性筋ジストロフィー (MDC1D)、肢帯型筋ジストロフィー 2I 型 (LGMD2I) が発症する。最近 Campbell らは、マンノースがリン酸化された後に Large 依存的に形成される新しい α -DG の側鎖を報告し、それがラミニン結合に関係しているという新しいモデルを提唱している¹²⁾。

報告された⁵⁾。網膜の視細胞で受容された光刺激は電気信号に変換されて、リボンシナプスを形成している双極細胞および水平細胞に伝達される。ピカチュリンは細胞外マトリックスとしてこのリボンシナプス間隙に局在し、dystroglycan に結合していると考えられている。ピカチュリン欠損マウスでは、双極細胞の樹状突起の発達不良、信号伝達の遅延、動く物体への眼球の追従の遅れなどが認められている⁵⁾。

5. α -DG の糖鎖修飾異常と筋ジストロフィー

近年、中枢神経系と眼の異常を伴う先天性筋ジストロフィーである福山型先天性筋ジストロ

フィー (FCMD)、筋-眼-脳病 (muscle-eye-brain disease : MEB)、Walker-Warburg 症候群 (WWS) で、DGC の構成成分である α -DG の糖鎖修飾の異常 (分子量の低下、ラミニン結合能の低下、 α -DG 糖鎖抗体に対する反応性の低下) が明らかになった。これらの疾患では α -DG と基底膜のラミニンとの結合能が失われ、骨格筋膜が不安定になるために先天性筋ジストロフィーが発症すると考えられ、新しい疾患概念として α -dystroglycanopathy と総称されるようになった。WWS は *POMT1*⁶⁾ および *POMT2*⁷⁾ 遺伝子の異常で発症することが明らかになったが、3分の2の WWS 患者では *POMT1*、*POMT2* のいずれの異常も見つかっていない。MEB 病患者では *POMGnT1* 遺伝子の異常があり⁴⁾、FCMD では、アミノ酸配列上糖鎖修飾に関与すると推定される遺伝子が原因遺伝子であり、*Fukutin*

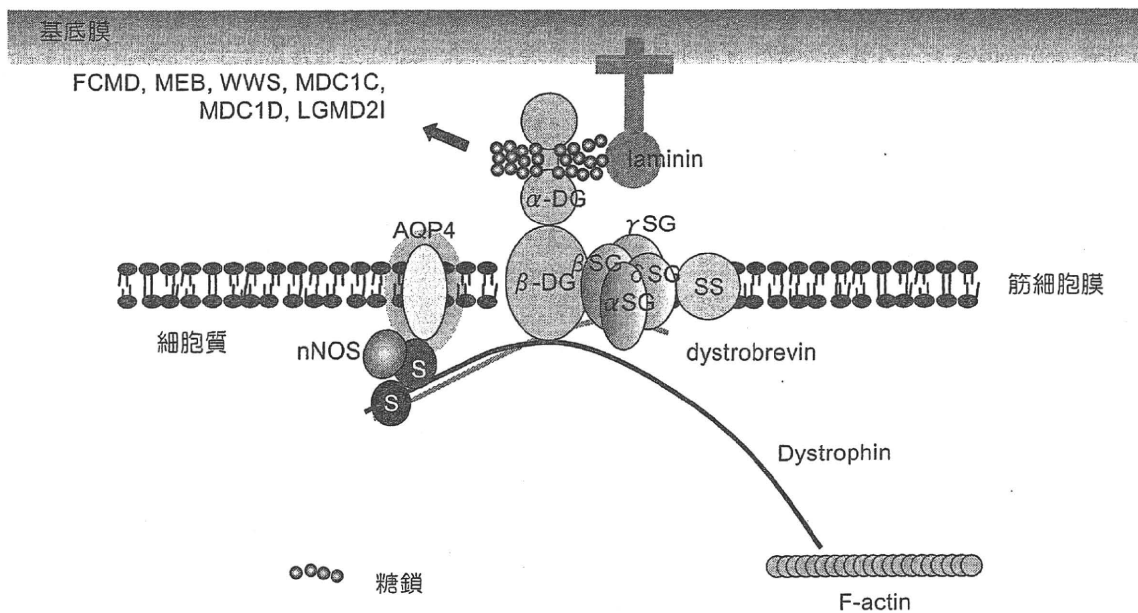


図2 dystroglycanはジストロフィン・糖タンパク質複合体 (DGC) の主要な構成成分で、基底膜と細胞骨格を結合させ、骨格筋膜を安定化させている

dystroglycan (DG) は α と β の 2 つの成分から構成され、細胞外タンパク質である α -DG は中央のムチン領域に集中している O-マンノース型糖鎖を介して基底膜のラミニンに結合する。膜貫通型タンパク質である β -DG は α -DG と結合する一方、ジストロフィンとも結合し、ジストロフィンは N 端で細胞質アクチン線維 (F-actin) と結合し、筋膜を安定化している。 α -DG の糖鎖修飾異常により、MEB, FCMD, WWS, MDC1C, MDC1D, LGMD2I が発症する。

nNOS : 神経型一酸化窒素合成酵素, S : シントロフィン, SS : サルコスパン, AQP4 : アクアポリン, SG : サルコグリカン

と命名された⁸⁾。また、*Large* の異常では 1D 型先天性筋ジストロフィー (MDC1D)⁹⁾ が、*FKRP* の異常では 1C 型先天性筋ジストロフィー (MDC1C)¹⁰⁾、肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 2I¹¹⁾ が発症する。いずれも α -DG の糖鎖修飾異常とラミニンへの結合能の低下が認められる。Fukutin, *Large*, *FKRP* いずれも α -DG の糖鎖修飾の過程に何らかの重要な役割を担っていることは確実であるが、糖転移活性は証明されていない。最近のトピックスとして Kevin P. Campbell らは、O 型結合をしたマンノースがゴルジ体内でリン酸化され、そのリン酸基が糖転移酵素様タンパク質 *Large* によって修飾されることで、ラミニン結合能を獲得すると報告した¹²⁾ (図 1)。 α -DG が受けている翻訳後修飾とラミニン結合能の関係は、今まで考えられていたより複雑である可能性がある。

6. POMGnT1 ノックアウト (KO) マウスの作製

MEB 病はフィンランドに患者が多い常染色体劣性遺伝性疾患で、先天性筋ジストロフィーに眼奇形、網膜異常、視神経萎縮、脳の形態形成異常 (II 型滑脳症) を伴う。これまで MEB 病患者で見いだされたすべての POMGnT1 変異は、調べた限り酵素活性を失っていた。我々は MEB 病の分子病態の解明と治療法の開発を企図して、エクソン 18 を含む配列をネオマイシン耐性遺伝子カセットと置換したベクターを ES 細胞に導入し、相同組み替えを起こした ES 細胞を C57BL/6 の胚盤胞に移植し、ジャームライントランスミッションを起こさせ、POMGnT1 欠損マウスを得た (図 3)¹³⁾。

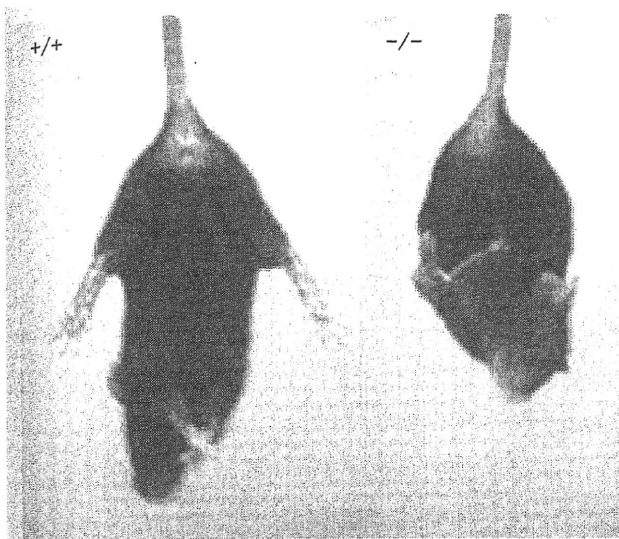


図3 POMGnT1 欠損マウス

ホモ個体は身体が小さく、歩行異常があり、*Large^{myd}* マウスと同様に、尾を持ち上げると四肢を折り曲げる行動(クラスピング)が認められる。

現在、国立精神・神経医療研究センター実験動物施設でヘテロ個体および凍結受精卵を維持しており、希望する研究者には供与可能である。我々とは別に、レトロウイルスベクターが第2エクソンに挿入されたことによって得られた POMGnT1 KO マウスも報告されており¹⁴⁾、こちらも入手可能である (<https://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoref.shtml>)。文献上の比較であるが、この2つのマウスの表現型はよく似ている。

KO マウスの表現型

(1) ライフスパン

KO マウスは野生型マウスと比較して体格が小さく、歩行異常がある。繁殖・維持には Heterozygote × Heterozygote の交配を行う。ホモ個体は生後 3 週間までに死亡しやすいので、実験に用いる場合は多めに交配しておく必要がある。

(2) 骨格筋組織

POMGnT1 KO マウスでは POMGnT1 の酵素活

性が検出されないため¹³⁾、MEB と同様に骨格筋組織に障害が出ることが予想されたが、骨格筋の変性・壊死像はほとんど認められず、筋再生の指標である中心核線維の割合の増加は認められなかった。また DGC 関連タンパク質(ジストロフィンや β -DG)の発現や基底膜の形成は正常に保たれていた。筋ジストロフィーで上昇する血清クレアチン・キナーゼ(CK)値は野生型マウスより高い傾向にあったが、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデル動物である mdx マウス程の上昇は認められなかった。一方、前脛骨筋の各筋線維の太さと総線維数は減少しており、また cardiotoxin の連続投与による重度の筋損傷後の再生筋では、野生型と比べて線維化や脂肪化が顕著に認められた。また、骨格筋特異的幹細胞である筋衛星細胞の増殖速度や移動速度の低下が認められている。MEB では非常に重症な筋変性・壊死が特徴的であるが、マウスにおいてそれが再現できなかった理由は不明である。

(3) 眼球

α -DGは網膜においては inner limiting membrane (ILM), 血管周囲, outer plexiform layer (OPL) に集中して発現している¹⁵⁾。ILM と血管周囲の発現は、ミュラー細胞と血管周囲のアストロサイトのエンドフィートへの局在をそれぞれ反映していると考えられる。OPL では α -DG は桿体および錐体のリボンシナプスで発現していると報告されており、ピカチュリンの局在と一致している。

POMGnT1 欠損マウスの眼球では 10 週齢程度から角膜や水晶体の混濁、網膜剥離、眼球の巨大化などが認められ、眼底カメラによる観察では網膜血管の周囲に白い増殖組織が認められる。また網膜電図測定により、網膜機能は低下しているものの失われてはいなかった。眼球の水平断切片の HE 染色像では部分的な網膜剥離や硝子体中の異所性細胞の存在なども認められ、MEB 病患者の眼奇形と同様に症状の幅が広い。またホルマ

ウント組織での観察により血管の走行異常が認められた。電子顕微鏡像では視細胞と双極細胞間のリボンシナプスの構造異常も認められた。一方、免疫組織化学では DGC 関連タンパク質の発現に異常は認められなかったが、血管周囲のアストログリアの異常増殖が確認され、血管の走行異常との関連性が示唆される(論文投稿中)。

(4) 大脳皮質

MEB では大脳皮質の層構造異常が認められ、大脳ニューロンの移動に異常があることが示唆されている。我々がマウスを用いて birth date analysis を行ったところ、POMGnT1 欠損マウスでは大脳皮質の新生ニューロンの移動が異常であることが分かった。さらに POMGnT1 を発現するプラスミドベクターを E12 あるいは E15 の POMGnT1 変異マウス胎仔の脳室内に投与し、エレクトロポレーション法で ventricular zone へ導入し、その後の細胞を調べるレスキュー実験を行ったが、POMGnT1 が導入されたニューロンの移動は改善しなかった。変異マウスではグリア境界膜 (glia limitans) の異常が認められ、また、リーリンの発現は変異マウスにおいて広汎に上昇していた。ニューロンの移動障害はニューロン自身の POMGnT1 の活性低下によるのではなく、ニューロン移動の足場となる放射性グリア構築の異常によることが示唆される。大脳でも広汎に反応性アストロサイトの増殖 (reactive gliosis) が認められる(論文投稿中)。

7. まとめ

POMGnT1 によって O-マンノース型糖鎖修飾を受ける主要なタンパク質は α -DG である。POMGnT1 の欠損による病変部位は、 α -DG の発現部位と一致している。また、 α -DG の脳¹⁶⁾ やグリア¹⁷⁾ でのコンディショナル KO の表現型は、POMGnT1 KO マウスのそれと酷似している。これらのことから、糖

鎖修飾が異常な α -DG が基底膜のラミニンと結合できなくなることが、MEB の骨格筋、眼、中枢神経系の異常に共通した発症メカニズムであると考えられる。POMGnT1 KO マウスに Large を過剰に発現させると、 α -DG のラミニン結合能が回復する¹⁸⁾。その機序はいまだ明らかではないが、最近の Campbell らの報告はラミニン結合部位と Large の役割に関して新しいモデルを提唱しており興味深い¹²⁾。

参考文献

- 1) Chiba A., Matsumura K., Yamada H., Inazu T., Shimizu T., Kusunoki S., Kanazawa I., Kobata A. and Endo T.: Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve α -dystroglycan: The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of α -dystroglycan with laminin. *J. Biol. Chem.*, 272: 2156-2162, 1997.
- 2) Endo T.: O-mannosyl glycans in mammals. *Biochim. Biophys. Acta*, 1473: 237-246, 1999.
- 3) Many H., Chiba A., Yoshida A., Wang X., Chiba Y., Jigami Y., Margolis R. U. and Endo T.: Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: Coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 500-505, 2004.
- 4) Yoshida A., Kobayashi K., Many H., Taniguchi K., Kano H., Mizuno M., Inazu T., Mitsuhashi H., Takahashi S., Takeuchi M., Herrmann R., Straub V., Talim B., Voit T., Topaloglu H., Toda T. and Endo T.: Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell*, 1: 717-724, 2001.
- 5) Sato S., Omori Y., Katoh K., Kondo M., Kanagawa M., Miyata K., Funabiki K., Koyasu T., Kajimura N., Miyoshi T., Sawai H., Kobayashi K., Tani A., Toda T., Usukura J., Tano Y., Fujikado T. and Furukawa T.: Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat. Neurosci.*, 11: 923-931, 2008.

- 6) Beltran-Valero de Bernabe D., Currier S., Steinbrecher A., Celli J., van Beusekom E., van der Zwaag B., Kayserili H., Merlini L., Chitayat D., Dobyns W. B., Cormand B., Lehesjoki A. E., Cruces J., Voit T., Walsh C. A., van Bokhoven H. and Brunner H. G. : Mutations in the *O*-mannosyltransferase gene *POMT1* give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 71 : 1033-1043, 2002.
- 7) van Reeuwijk J., Janssen M., van den Elzen C., Beltran-Valero de Bernabe D., Sabatelli P., Merlini L., Boon M., Scheffer H., Brockington M., Muntoni F., Huynen M. A., Verrips A., Walsh C. A., Barth P. G., Brunner H. G. and van Bokhoven H. : *POMT2* mutations cause α -dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J. Med. Genet.*, 42 : 907-912, 2005.
- 8) Kobayashi K., Nakahori Y., Miyake M., Matsumura K., Kondo-Iida E., Nomura Y., Segawa M., Yoshioka M., Saito K., Osawa M., Hamano K., Sakakihara Y., Nonaka I., Nakagome Y., Kanazawa I., Nakamura Y., Tokunaga K. and Toda T. : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*, 394 : 388-392, 1998.
- 9) Longman C., Brockington M., Torelli S., Jimenez-Mallebrera C., Kennedy C., Khalil N., Feng L., Saran R. K., Voit T., Merlini L., Sewry C. A., Brown S. C. and Muntoni F. : Mutations in the human *LARGE* gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. *Hum. Mol. Genet.*, 12 : 2853-2861, 2003.
- 10) Brockington M., Blake D. J., Prandini P., Brown S. C., Torelli S., Benson M. A., Ponting C. P., Estournet B., Romero N. B., Mercuri E., Voit T., Sewry C. A., Guicheney P. and Muntoni F. : Mutations in the fukutin-related protein gene (*FKRP*) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin $\alpha 2$ deficiency and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.*, 69 : 1198-1209, 2001.
- 11) Brockington M., Yuva Y., Prandini P., Brown S. C., Torelli S., Benson M. A., Herrmann R., Anderson L. V., Bashir R., Burgunder J. M., Fallet S., Romero N., Fardeau M., Straub V., Storey G., Pollitt C., Richard I., Sewry C. A., Bushby K., Voit T., Blake D. J. and Muntoni F. : Mutations in the fukutin-related protein gene (*FKRP*) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum. Mol. Genet.*, 10 : 2851-2859, 2001.
- 12) Yoshida-Moriguchi T., Yu L., Stalnakker S. H., Davis S., Kunz S., Madson M., Oldstone M. B., Schachter H., Wells L. and Campbell K. P. : *O*-mannosyl phosphorylation of α -dystroglycan is required for laminin binding. *Science*, 327 : 88-92, 2010.
- 13) Miyagoe-Suzuki Y., Masubuchi N., Miyamoto K., Wada M. R., Yuasa S., Saito F., Matsumura K., Kanesaki H., Kudo A., Manya H., Endo T. and Takeda S. : Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts *in vitro*. *Mech. Dev.*, 126 : 107-116, 2009.
- 14) Liu J., Ball S. L., Yang Y., Mei P., Zhang L., Shi H., Kaminski H. J., Lemmon V. P. and Hu H. : A genetic model for muscle-eye-brain disease in mice lacking protein *O*-mannose 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1). *Mech. Dev.*, 123 : 228-240, 2006.
- 15) Blake D. J. and Kroger S. : The neurobiology of duchenne muscular dystrophy : learning lessons from muscle? *Trends Neurosci.*, 23 : 92-99, 2000.
- 16) Moore S. A., Saito F., Chen J., Michele D. E., Henry M. D., Messing A., Cohn R. D., Ross-Barta S. E., Westra S., Williamson R. A., Hoshi T. and Campbell K. P. : Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature*, 418 : 422-425, 2002.
- 17) Satz J. S., Philp A. R., Nguyen H., Kusano H., Lee J., Turk R., Riker M. J., Hernandez J., Weiss R. M., Anderson M. G., Mullins R. F., Moore S. A., Stone E. M. and Campbell K. P. : Visual impairment in the absence of dystroglycan. *J. Neurosci.*, 29 : 13136-13146, 2009.
- 18) 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 K. P. and Toda T. : Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. Hum. Mol. Genet., 18 : 621-631, 2009.

19) Xiong H., Kobayashi K., Tachikawa M., Many H.,

Takeda S., Chiyonobu T., Fujikake N., Wang F., Nishimoto A., Morris G. E., Nagai Y., Kanagawa M., Endo T. and Toda T. : Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of α -dystroglycan. Biochem. Biophys. Res. Commun., 350 : 935-941, 2006.

(鈴木友子／遠藤玉夫)

23章

筋ジストロフィー
モデルマウス

鈴木友子, 武田伸一

筋ジストロフィーとは、筋線維の変性・壊死と再生を繰り返しながら、筋萎縮と筋力低下が進行していく遺伝性筋疾患の総称である。ジストロフィン (dystrophin) の異常で発症するX連鎖劣性のDuchenne型筋ジストロフィー症 (DMD) が最も頻度が高く、3,500人の男児に1人の頻度で発症する。

dystrophinは骨格筋細胞膜直下の細胞骨格タンパク質で、骨格筋膜上でdystrophin・糖タンパク質複合体を形成しており、その1つdystroglycanは糖鎖を介して基底膜成分のラミニンに結合している(概略図1)。dystrophinのN端は細胞骨格のアクチンと結合しており、細胞骨格と細胞膜をつなぐ役割を担っているため、dystrophinが発現しないと、膜が脆弱になり、筋の収縮・弛緩に伴う機械的ストレスによって骨格筋線維が壊れていくと考えられている。

dystrophinと複合体を構成する分子の異常によっても筋ジストロフィーが発症する。骨格筋に発現する4つのsarcoglycan (α , β , γ , δ) のいずれの遺伝子異常でも、sarcoglycanの四量体複合体が膜から消失し、筋ジストロフィーが発症する。ラミニン α 2重鎖に異常があると、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (CMD1A) を発症する。 α -dystroglycan (α -DG) の糖鎖修飾の異常では脳奇形や眼球異常を合併するWalker-Warburg症候群 (WWS), muscle-eye-brain (MEB) 病, 福山型筋ジストロフィー (FCMD) 等の先天性筋ジストロフィーを発症する(概略図2)。

DMDの代表的モデルマウスは*mdx*マウスであるが、筋再生が旺盛で、骨格筋はむしろ肥大しており、筋力低下も軽度であり、治療研究に用いる場合、評価に注意が必要である。*mdx*をdystrophinのautosomal homologue

である utrophin を欠損するマウス (*Utr^{-/-}*) と交配して、あるいは MyoD 欠損マウスと交配して重量化したマウスを用いて、薬剤や遺伝子治療、細胞移植治療の効果を検証する論文も多く発表されている。dystrophin を欠損する筋ジストロフィー犬は DMD 様の重篤な症状を呈しモデルとしては優れているが、症状の個体差が大きく、また維持費用が高額となる。

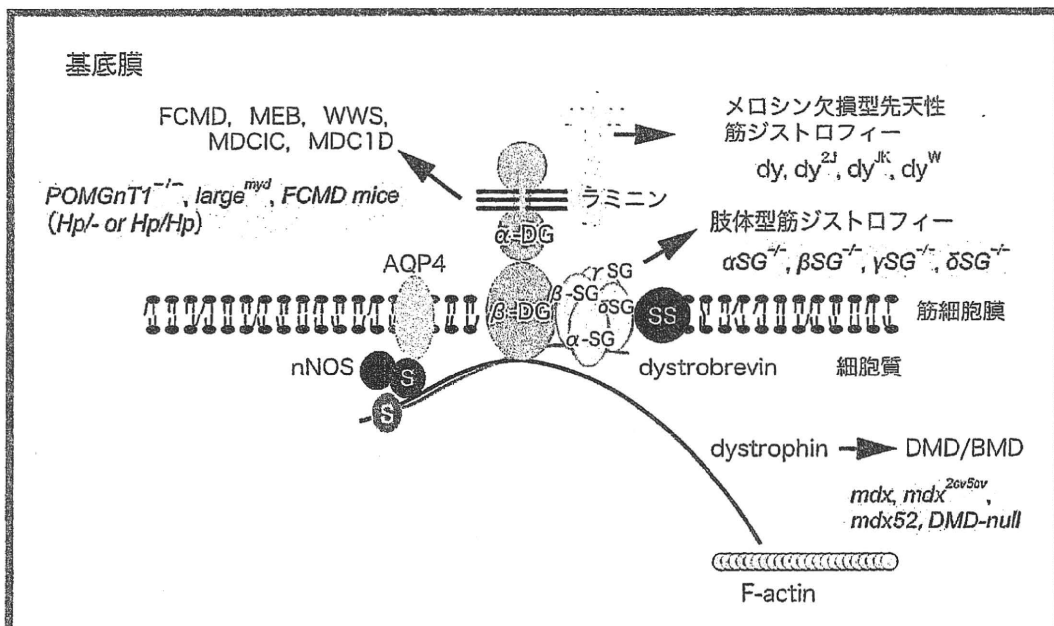
23

章

筋ジストロフィーモデルマウス

参考文献

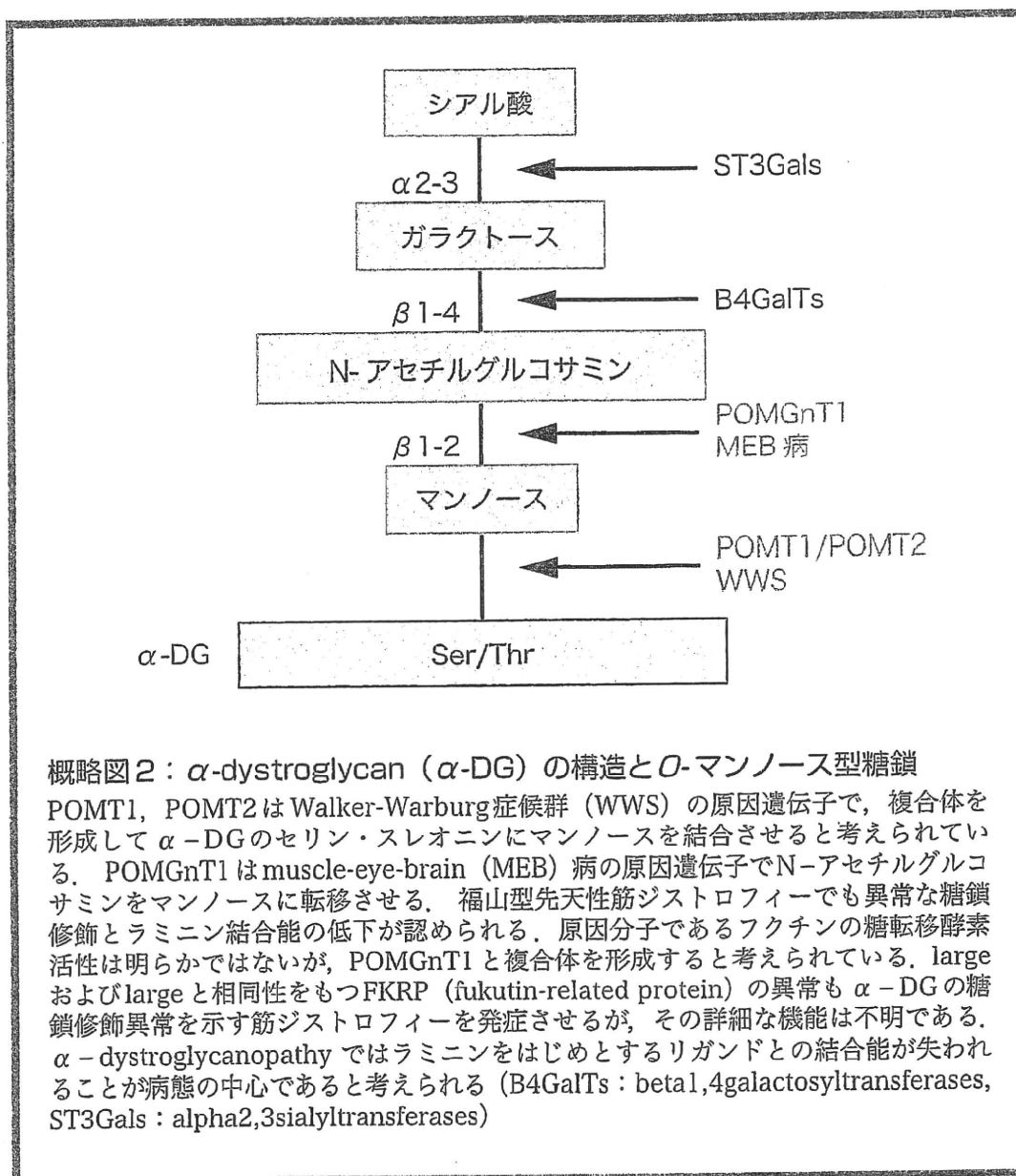
- 1) Willmann, R. et al. : Neuromuscul, Disord., 19 : 241-249, 2009
⇒ Duchenne 型筋ジストロフィーのモデル動物に関する概説
- 2) Vainzof, M. et al. : Mol Neurosci., 34 : 241-248, 2008
⇒ 遺伝性神経・筋疾患のモデル動物に関する概説



概略図 1 : dystrophin・糖タンパク質複合体と

関連する筋ジストロフィーおよびモデルマウス

dystrophin は N 端で細胞質アクチン線維 (F-actin) に、C 端で dystroglycan (DG) を介して筋細胞膜に結合し、筋膜を安定化している。α-DG は O-マンノース型糖鎖を介して基底膜のラミニンに結合する。複合体を構成する 4 つの sarcoglycan (α-, β-, γ-, δ-SG) の遺伝子異常も筋ジストロフィーを引き起こす。骨格筋特異的ラミニン重鎖 (laminin α2 heavy chain) の異常は重症な先天性筋ジストロフィーを発症する。MEB 病、FCMD、WWS 等の先天性筋ジストロフィーには共通して、α-DG の糖鎖修飾異常が見出され、α-dystroglycanopathy という疾患概念が提唱された。S : syntrophin, SS : sarcospan, AQP4 : aquaporin-4, BMD : Becker muscular dystrophy. FCMD マウスに関しては Kanagawa, M. et al. : Hum. Mol. Genet., 18 : 621-631, 2009 を参照されたい。



Mdx マウス

【系統名】 C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}/J

【背景系統】 C57BL/10J

【系統の分類】 コアイジェニック系統, ミュータント系, 自然発生変異

【繁殖・維持】 mdx 同士 の 自然 交配 (homozygote×hemizygote (female×male))

【作製の背景】 自然発生マウス

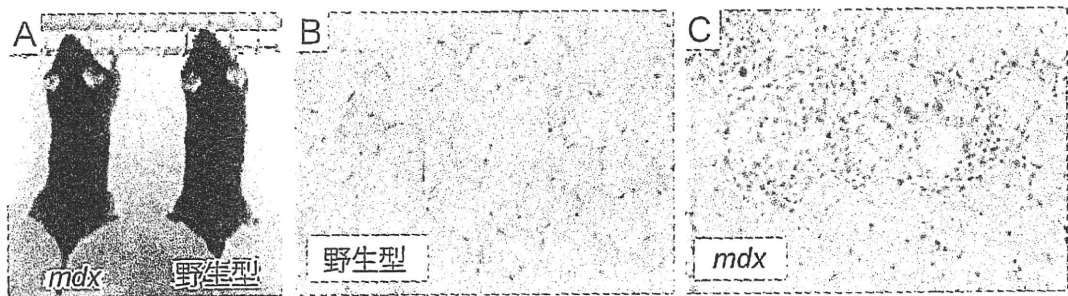
□ 特徴

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の代表的モデルマウス。DMD 遺伝子のエクソン23の3185番目のCが1塩基置換によりTに置き換わったために終止コドンとなり、全長dystrophinが欠損するが、エクソンスキップによってdystrophin発現が部分復帰したりパータントファイバーがわずかに出現する。生後2～3週から骨格筋の壊死・再生、炎症性細胞の浸潤がみられ、生後10週以降は壊死・変性と再生像が混在する病理像を示す(図)。しかし、DMD患者と異なり、*mdx*では再生能力がよく維持されており、骨格筋の線維化・脂肪化、筋張力の低下が軽度で、野生型マウスと生存期間が17～19%程度しか差がない。例外的に横隔膜の変性・壊死・線維化・脂肪化は進行性である。

N-エチルニトロソウレアによって誘導された変異マウス (*mdx*^{2Cv}-*mdx*^{5Cv}) やDMD遺伝子全体を欠損するマウス³⁾、51番目のエクソンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入してDMD遺伝子を破壊したマウス (*mdx52*)⁴⁾ も作出されている。これらのマウスの表現型は*mdx*と類似している。

□ 用途

- ・ dystrophin 欠損による筋ジストロフィーの病態研究。
 - ・ DMD に対する薬物治療法・遺伝子治療・細胞移植治療法の開発。
- 治療効果は、筋病理像の改善、血清CK値の低下、筋張力の回復等で検証する。



☆ mdx マウス

A) 8週齢の*mdx*マウスとC57BL/6マウス(♀)。外観では区別が付きにくく、旺盛な筋再生能力を反映して*mdx*の骨格筋は、むしろ肥大傾向にある。B)とC)は前脛骨筋H.E.染色。*mdx*では小径の筋線維(再生線維)、中心核線維(再生の指標)、細胞浸潤、壊死線維、筋径の大小不同が顕著。*mdx*マウスでは筋再生能が比較的よく保たれており、脂肪化・線維化はあっても軽度である

□ 入手方法

【入手先】実験動物中央研究所 (<http://www.ciea.or.jp/>), Jackson研究所 (<http://jaxmice.jax.org/strain/001801.html>; MGI: 1856328), あるいは日本チャールス・リバー社 (<http://www.crj.co.jp>) に注文できる。ライセンス等の制限等特にない。なお、笹岡俊邦氏(北里大学医学部実験動物学)が、*mdx*マウスをC57BL/6へ戻し交配して得たC57BL/6-*mdx*の凍結受精卵は国立精神・神経医療研究センター神経研究所実験動物管理室 (http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_ani/index.html) で維持されている(MTA要)。

参考文献

- 1) Spurney, C. F. et al. : Muscle. Nerve., 39 : 591-602, 2009
→ Mdxを用いた治療研究の評価方法に関する論文
- 2) Amalfitano, A. et al. : Muscle. Nerve., 19 : 1549-1553, 1996
→ ジェノタイプングPCRの条件が記載されている
- 3) Kudoh, H. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 328 : 507-516, 2005
- 4) Areaki, E. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 238 : 492-497, 1997

utrophin・dystrophin・ダブルノックアウト マウス：*mdx; utr^{-/-}*

【系統名】 *mdx; utr^{-/-}*

【背景系統】 C57BL/10

【系統の分類】 コンジェニック系統

【繁殖・維持】 *mdx* と utrophin ノックアウトマウスの交配

【作製の背景】 utrophin は dystrophin と相同性が高く、アクチンとの結合性、dystrophin 糖タンパク質複合体との結合能を有している。*mdx* マウスの筋線維膜では utrophin が発現増強していることから、*mdx* における dystrophin の欠損を utrophin が代償していると考えられていた。1997年、K. Davies 氏と J. R. Sanes 氏らの2グループが utrophin 欠損型マウスを作製したが、utrophin 欠損マウスは筋ジストロフィーの表現型を呈さなかった。しかし *mdx* マウスと utrophin 欠損型マウスを掛け合わせて *mdx; utr^{-/-}* マウスを作出すると、Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 患者の症状に似た重い表現型を示した。utrophin がある程度 dystrophin の機能を補っていることが証明された

□ 特徴

mdx; utr^{-/-} は生存期間が4～20週であり、重度の筋力低下、体重減少、関節拘縮、脊柱後弯症が著しい(図)。また生後6日頃から横隔膜において筋線維の壊死と線維化が認められる。2週齢から骨格筋において壊死再生がみられるが、4～5週齢までの筋病理は *mdx* マウスと変わらない。しかし、*mdx* と異なり、5週齢以降も壊死・再生が盛んであり、10週齢時には四肢筋において明らかな線維化が生じる。進行の早い、重い表現型は DMD 患者の病態をより反映したモデルマウスであり、治療研究に用いられる。

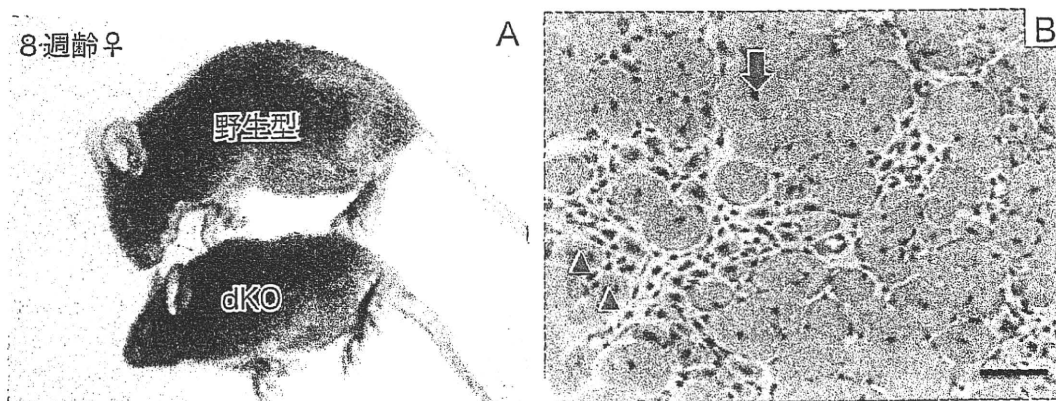
□ 用途

dystrophin 欠損による筋ジストロフィーの病態研究と DMD に対する薬物治療法・遺伝子治療・細胞移植治療法の開発。

2

章

筋ジストロフィーモデルマウス



✦ utrophin・dystrophin ダブルノックアウトマウス

A) utrophin・dystrophin ダブルノックアウトマウスと同腹の野生型マウス (8週齢, ♀).
 B) 前脛骨筋の横断切片のH.E.染色像 (×400). 矢印は中心核. マウスでは再生した筋線維の核は長い間, 筋線維の中心に位置する. 矢頭は小径の再生中の筋線維

□ 入手方法

【入手先】 実験動物中央研究所 (<http://www.ciea.or.jp/>) から入手できる.
 utrophin-null マウスはK. Davies 氏のラボで作出したものである

参考文献

1) Deconinck, A. E. et al. : Cell, 90 : 717-727, 1997

⇒モデルマウスとしての評価と, 交配の方法, ジェノタイピングPCRの条件が掲載されている

ラミニン $\alpha 2$ 重鎖欠損マウス (dy^{3K}/dy^{3K})

【系統名】 dy^{3K}/dy^{3K}

【背景系統】 C57BL/6

【系統の分類】 コンジェニック系統

【繁殖・維持】 ヘテロマウス同士の交配

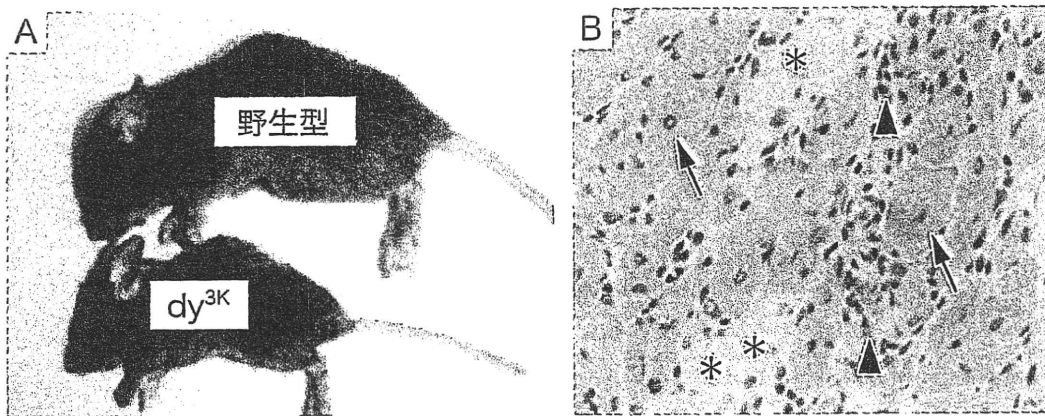
【作製の背景】 ジーンターゲット法によりラミニン $\alpha 2$ 重鎖遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を挿入して遺伝子を不活化. メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (CMD1A) のモデルマウス

□ 特徴

メロシン欠損ヒト先天性筋ジストロフィー (MDC1A) のモデルマウス。ラミニンは通常 α 鎖 (現在5種類のアイソフォームが知られている), β 鎖 (3種), γ 鎖 (3種) のトリマー構造をしており, 心筋・骨格筋線維・末梢神経の周りにはラミニン $\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 1$ で構成されるラミニン (laminin-211) が存在し, 神経筋接合部にはラミニン $\alpha 2$, $\beta 2$, $\gamma 1$ で構成されるラミニン (laminin-221) が存在する。ラミニン $\alpha 2$ 重鎖が完全に欠損する本モデルでは生後2週間以降, 骨格筋の変性・壊死が出現し, 進行が早く, 早期 (生後1~2カ月) に死亡する。従来使用されてきた自然発症の dy/dy マウスでは低レベルであるが, ラミニン $\alpha 2$ 重鎖の発現が認められ, やや筋ジストロフィーの進行が緩やかであるが, 本モデルには発現が全くない。やはり自然発症の dy^{2J}/dy^{2J} マウスではドメインVIを欠く短いラミニン $\alpha 2$ 重鎖が発現し, 軽症。

□ 用途

先天性筋ジストロフィーの病態研究, 薬物・遺伝子・細胞移植治療研究。他のラミニン重鎖の変異マウスや治療効果の期待される遺伝子の過剰発現トランスジェニックマウスとの交配等による機能の解析。



❖ dy^{3K}/dy^{3K} の外観と筋病理

A) 野生型と dy^{3K}/dy^{3K} (雄3週齢)。ホモ個体は小さく, 筋ジストロフィー症状が重く, 後弯が特徴的。B) 前脛骨筋の横断切片のHE染色像。壊死線維 (*), 中心核線維 (→), マクロファージ等の炎症性細胞浸潤 (矢頭)。ラミニン $\alpha 2$ 重鎖の異常による筋変性・壊死は激烈で, 急速に筋線維の減少と筋萎縮が進む

□ 補足

【注意点】 メロシンはE. Engvall博士が発見した骨格筋・心筋・シュワン細胞・胎盤・精巣等に特異的に発現するラミニン $\alpha 2$ 重鎖を含むラミニンである。ラミニン-2, M-ラミニンと呼ばれることもあるが、最近の命名法ではラミニン-211, ラミニン-221, ラミニン-213, ラミニン-212, ラミニン-222等に相当すると思われる。餌の与え方を工夫することで、寿命が多少伸びる

□ 入手方法

【入手先】 *dy/dy* マウスは実験動物中央研究所 (<http://www.ciea.or.jp/>) や Jackson 研究所 (MGI: 1856026) から入手可能。 *dy^{3k}/dy^{3k}* マウスは国立精神・神経医療研究センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部で凍結受精卵を維持している (要MTA) (http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_dna2/index.html)。

参考文献

- 1) Tomé, F. M. et al. : C. R. Acad. Sci. III., 317 : 351-357, 1994
 ⇒メロシン欠損による先天性筋ジストロフィーのはじめての報告
- 2) Miyagoe, Y. et al. : FEBS. Lett., 415 : 33-39, 1997
 ⇒ラミニン $\alpha 2$ 重鎖欠損マウスの作出とマウス表現型の解析

POMGnT1 欠損マウス

【系統名】 C57BL/6JJcl.129/SvJ-*pomgnt1* (POMGnT1 : protein O-linked mannanose beta1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase 欠損マウス (*Pomgnt1^{tm1Stk}*))

【背景系統】 C57BL/6JJcl (戻し交配による)

【系統の分類】 コンジェニック系統

【繁殖・維持】 heterozygote×heterozygote, ホモ個体は、生後3週間までに死亡しやすいので、多めに交配しておくことが必要である

【作製の背景】 ES細胞での相同組換えにより *pomgnt1* 遺伝子のエクソン18を含む配列を、ネオマイシン耐性遺伝子を含む配列に置換した

□ 特徴

POMGnT1 遺伝子の変異で先天性筋ジストロフィーと眼奇形、脳の形態形成異常（II型滑脳症）を特徴とする筋・眼・脳病（MEB：muscle-eye-brain disease）が発症する。当モデルではホモ個体は小さく、歩行障害があり、尾を持ち上げると四肢を折り曲げる行動（クラスピング）を示すなど、ホモ個体はすぐに識別できる。血清CK値の上昇や筋線維の壊死などは軽微である。眼球では網膜剥離の増発や網膜血管の走行の乱れ、角膜・水晶体の混濁などが確認されており、MEB病患者の眼奇形と同じく症状の幅が広い。MEB患者と同様に中枢神経系の異常（大脳層構造の乱れ等）があり、小脳では異所性の顆粒細胞が認められる。GFAP染色を行うと、変異マウスでその発現が広い範囲で上昇しており、glial limitans（グリア境界膜）の構造が失われている事が観察される。

□ 用途

MEB病および関連した α -DGの糖鎖異常を原因とする先天性筋ジストロフィーの病態および治療研究。

□ 補足

【注意点】 野性型と比較して体型が小さく、生後数週間までは死亡することが多く、飼育に注意が必要である。それ以降は安定している

□ 入手方法

【入手先】 国立精神・神経医療研究センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部 (http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_dna2/index.html)

【入手条件】 要MTA

参考文献

- 1) Miyagoe-Suzuki, Y. et al. : Mech. Dev., 126 : 107-116, 2009
→筋肉学の観点からPOMGnT1欠損マウスがどんな特徴をもつのか解析した論文
- 2) Liu, J. et al. : Mech. Dev., 123 : 228-240, 2006
→レトロウイルスベクターが第2エクソンに挿入されているPomgnt1ノックアウトマウスも作出されており、The Mouse Transgenics Core of the Consortium for Functional Glycomics から入手可能である (<https://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoref.shtml>)

Large^{myd}マウス

【系統名】 B6C3Fe a/a-Large^{myd}/J

【背景系統】 B6C3Fe-a/a

【系統の分類】 mutant stock

【繁殖・維持】 homozygous for Large^{myd}×B6C3Fe-a/a hybrid (female×male). 繁殖は、変異ホモとヘテロでも可能だが、ヘテロ同士の間掛け合わせに比べて、妊娠率は低下

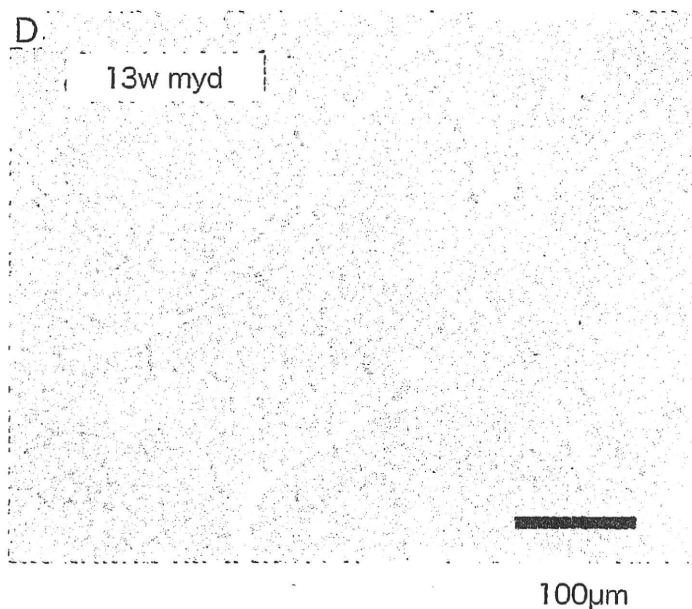
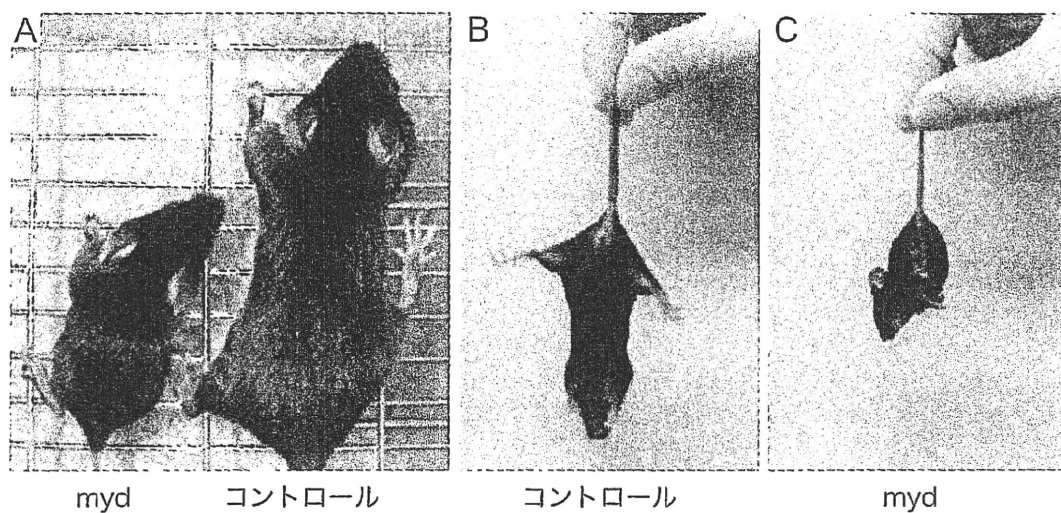
【作製の背景】 自然発症. *large* 遺伝子のエクソン5～7の欠失によるフレームシフト

□ 特徴

*myd*マウスは、重症の先天性筋ジストロフィータイプ1D (CMD1D) のモデルマウスであり、進行性の筋ジストロフィー、眼の異常、大脳皮質、小脳、海馬での神経細胞の遊走異常と基底膜の亀裂を特徴とする中枢神経系の異常を起こす. muscle-eye-brain病 (MEB病) や福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) 患者と同様に、骨格筋と脳で α -dystroglycan (α -DG) の糖鎖修飾低下が観察される. 野生型・ヘテロの同腹マウスよりも小さく、歩行異常やクラスピングも認められる (図). *large* を過剰発現させると、POMGnT1 や Fukutin が欠損する筋細胞でも α -DG の糖鎖修飾が回復し、マウスでは筋ジストロフィーの表現型が改善することが知られており、治療への応用が期待される.

□ 用途

α -DG の糖鎖修飾異常による先天性筋ジストロフィーの病態研究・治療研究.



❖ myd マウス

A～C) mydと同腹の野生型マウス (5週齢). C) mydは身体が小さく, 尻尾を持ち上げると, 四肢を抱え込むようなクランプがみられる. D) 13週齢mydマウスの骨格筋のHE染色. 筋壊死と再生像, 細胞浸潤, 筋線維の大小不同, 中心核線維等がみられる

□ 補足

【注意点】 *large* のコードするタンパク質はおそらく α -DG の糖鎖修飾に関与すると思われるが、その機能は明らかではない。他に、 α -DG の糖鎖修飾の異常をきたす疾患のモデルマウスとして、POMGnT1-null mice (MEB病のモデル) や、FCMD 患者の変異を導入したマウスが、作出されており、 α -DG の糖鎖修飾の異常による筋ジストロフィーの病態解明、治療法の開発に用いられる

□ 入手方法

【入手先】 Jackson 研究所 (<http://jaxmice.jax.org/strain/000226.html> ; MGI : 1856965), あるいは日本チャールス・リバー社 (<http://www.crj.co.jp/>) から入手可能。特にライセンス等の制限なし

参考文献

- 1) Grewal, P. K. et al. : Nat. Genet., 28 : 151-154, 2001
⇒ *myd* マウスの異常が *large* 遺伝子であることを報告
- 2) Holzfeind, P. J. et al. : Hum. Mol. Genet., 11 : 2673-2687, 2002
⇒ *Large^{myd}* の表現型と糖鎖異常の解析
- 3) Michele, D. E. et al. : Nature, 418 : 417-422, 2002
⇒ *Large^{myd}* の表現型と糖鎖異常の解析

β -sarcoglycan ノックアウトマウス (BSG-KO (C57BL/6J))

【系統名】 B6.129S4-Sgcb<tmlOza>, 理研BRC系統番号 #RBRC02268

【系統の分類】 戻し交配および戻し交配後の兄妹交配

【背景系統】 C57BL/6JJcl

【作製の背景】 129/SvJ 系統の J1 ES 細胞を用いて、標的遺伝子組換え法により欠損マウスを作製し、C57BL/6JJcl 系統に 10 世代以上戻し交配を行った