

201027062B

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

総合研究報告書
（平成20年度～平成22年度）

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. 総合 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. 総合 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----- 13
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----- 18
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 ----- 23
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----- 25
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 ----- 31
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 ----- 37

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 49

1. 総合 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 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ー (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い、以下のことを明らかにした。

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。この産物は、*fukutin* の最終エクソンの翻訳領域内にある潜在的スプライシング供与部位から、SVA 挿入変異内のスプライシング受容部位へ続く新生エクソンを有しており、患者細胞系より、異常スプライシング由来の異常 *fukutin* 蛋白が検出された。またこの異常 *fukutin* 蛋白は、局在が正常で見られるゴルジ体から小胞体へと変化していた。これらの結果より、FCMD はスプライシング異常症であり、*fukutin* 蛋白の機能喪失による FCMD の発症機構が明らかになった。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、およびジスフェルリン変異 SJL マウスとの二重変異マウス、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。

2、 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。POMT1 は 7 回、POMT2 は 9 回膜貫通型タンパク質であり、酵素活性の発現には両方の *N* 型糖鎖が必要であることが明らかとなった。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。酵素活性発現に必須な POMT1 と POMT2 とは、それぞれ果たす役割が異なる可能性が示された。

3、Large による α -DG の機能修復は *in vivo* においても生じる、Large の過剰発現は生体に重大な副作用をもたらさない、Large による α -DG の機能修復には Large の管腔内ドメインの全長が必要である、Large Tg と *fukutin* KO、POMGnT1 KO との交配で胎生致死という KO の表現形は変化しない、Large 遺伝子を HeLa 細胞に導入すると接着能が亢進し、増殖能、遊走能は著明に低下することから Large は癌治療に有用な可能性がある、分泌型 Large 蛋白質を HEK293 細胞の培養上清から精製した。

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 した。Myf5 は MyoD の上流から骨格筋分化制御転写因子群を経時的に誘導し、これによって筋衛星細胞マーカー、ジストロフィン及び速筋及び遅筋特異的ミオシン重鎖の

発現が生じる。この MyoD 導入細胞は NOG 免疫不全マウス骨格筋へ移植すると type I, IIA, 及び IIB 線維へ長期間生着した。メロシン欠損先天性筋ジストロフィーモデル (*dy*) およびカベオリン-3 欠損肢帯型筋ジストロフィー 1 C モデルマウスの筋線維にも生着し欠損蛋白質の発現が回復した。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。

5、*POMGnT1*^{-/-}マウスの骨格筋の表現型は軽微であるが、中枢神経系や眼の表現型は MEB と類似しており、良い疾患モデルである。*POMGnT1*^{-/-}筋衛星細胞では増殖能が低下していたことから、 α -DG の糖鎖修飾は筋衛星細胞の増殖能維持に重要であると考えられる。*POMGnT1* 変異マウスの網膜の解析から、*POMGnT1* による α -DG の糖鎖修飾がミュラーグリアとアストロサイトの機能に重要で、これらの機能不全が多様にみえる眼疾患のベースにあることが示唆された。 α -DG の糖鎖修飾は、外網状層 (OPL) のシナプス形成にも重要であった。

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)

福山型先天性筋ジストロフィーはスプライス異常症である

我々は、疾患の発症機序を明らかにするために、定量的 RT-PCR 法を用い *fukutin* 内各領域での遺伝子発現を調べたところ、患者初代線維芽細胞系において、SVA 挿入変異周辺で発現が激減している部分が見つかった。一方、挿入変異から離れた *fukutin* の 5' 側及び 3' 側部分では、患者と健常者で発現量の差が全く無い領域もあった。このことから、従来説とは異なり、FCMD の挿入変異がスプライシングパターンを変化させ、周辺領域が新たなスプライシングを受け脱落したのではないかとの仮説を立てた。

この仮説を検証するために、FCMD 患者由来初代線維芽細胞およびリンパ芽球の *fukutin* mRNA の塩基配列を調べたところ、異常スプライシング由来の産物が確認された。さらに患者細胞 polyA RNA を用いたノ

ザンハイブリダイゼーションにおいて、異常スプライシング由来のサイズのバンドが確認された。

この産物は、*fukutin* の最終エクソンの翻訳領域内にある潜在的スプライシング供与部位から、SVA 挿入変異内のスプライシング受容部位へ続く新生エクソンを有しており、患者細胞系より、異常スプライシング由来の異常 *fukutin* 蛋白が検出された。またこの異常 *fukutin* 蛋白は、局在が正常で見られるゴルジ体から小胞体へと変化していた。

フクチンのミスセンス変異の解析

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。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。

モデルマウスによる病態治療解析

FCMD のモデルとして我々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。

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 週時点では、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）

POMGnT1 活性測定法・末端糖鎖解析法の開発

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を行うと、GlcNAc は主に低分子量の分子種に取り込まれていた。

ゼブラフィッシュ POMT 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。また、POMT1 ノックダウン体では心膜の浮腫や尾部の形

成異常、POMT2 ノックダウン体では心膜の浮腫や尾部の形成異常、眼の色素異常がみられた。また、いずれの表現型においても α -ジストログリカンの *O*-Man 型糖鎖修飾の著しい減少が確認された。

ヒト POMT の機能解析

二次構造予測プログラムによる膜貫通領域の解析から、POMT1 は 7 回、POMT2 は 9 回膜貫通型と予測した。Asn を Gln に置換した変異体の解析から POMT1 では 3 ヶ所に、POMT2 では 5 ヶ所すべてにおいて *N* 型糖鎖が修飾されることが分かった。この結果は予測した膜配向性モデルを支持するものであった。また、POMT1 あるいは POMT2 の Asn を 1 ヶ所置換しても、POMT 活性には影響しなかった。しかし、POMT1 か POMT2 のどちらか一方の Asn をすべて置換し *N* 結合型糖鎖を欠失させたところ、POMT 活性は完全に消失した。また、糖鎖を欠失した POMT1-POMT2 複合体は不溶性になることが明らかとなった。同様に、*N* 型糖鎖修飾の阻害剤であるツニカマイシンで処理した細胞に発現させた POMT1 と POMT2 も不溶性となり POMT 活性は消失した。これらの結果から、POMT1 と POMT2 の *N* 型糖鎖は POMT 活性に必要であることが明らかとなった。また、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できることが確認された。

③ Large 蛋白質を用いた新規治療法の開発

(松村)

Large を ubiquitous に過剰発現する Large transgenic mouse (Large Tg) を作出し形態学的、生化学的な解析を行った。同マウスを fukutin knockout mouse (fukutin KO)、POMGnT1 knockout mouse (POMGnT1 KO) と交配し、表現形の変化を観察した。また Large の欠失コンストラクトを作製して α -DG の機能修復に必要なドメインを検討するとともに、Large を安定発現する HeLa 細胞株を樹立して接着能、増殖能、遊走能の変化を検討した。さらに分泌型の Large を安定発現する HEK293 細胞株を樹立し、Large 蛋白質の発現、精製を行った。

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は認められなかった。Large Tg の各臓器において Large の過剰発現を認め、 α -DG の高分子量化と IHH6 に対する反応性の著明な亢進を認めた。さらに同マウスの各臓器において α -DG の laminin 結合能、 agrin 結合能の著増を認めた。心筋、腎臓、肝臓などにおいては基底膜における laminin の発現も亢進していた。欠失コンストラクトを用いた検討では Large による α -DG の機能修復には Large 管腔内ドメインの全長が必要であることがわかった。Large Tg を fukutin KO、POMGnT1 KO と交配したが、胎生致死であるこれら KO の表現形の改善は認められなかった。また 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、分泌型の Large を安定して過剰発現する HEK293 細胞の培養上清からスモールスケールでの Large 蛋白質の精製を行った。

④MyoD 導入細胞の *in vitro* 解析、*in vivo* 解析と筋ジストロフィーモデルマウスへの細胞治療 (砂田)

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

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。Myf5 は MyoD 上流から MEF のリプログラミングを制御していると考えられた。

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-カドヘリンは 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-カドヘリンは 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。これらの導入細胞は *in vitro* で筋衛星細胞様の性格を有することが明らかとなった。

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 陽性であり、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、Myf5 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 GFP-MEF 細胞の *in vivo* 解析

MyoD 導入 GFP-MEF 細胞を NOG 免疫不全マウス前脛骨筋に移植し 40 日後に骨格筋を解析した。約 80% の筋線維は GFP 陽性であり、再生線維を中心に GFP 強陽性線維が認められた。更にこの GFP 陽性線維の筋線維タイピングを、特異モノクローナル抗体を用いて行ったところ、遅筋 type I, 速筋 IIB 線維、及び中間型の IIA 線維のいずれにも分化することが明らかとなった。

MyoD 導入線維芽細胞の筋ジストロフィーモデルマウスへの細胞治療

MyoD 導入 GFP-MEF 細胞を筋ジストロフィーモデルマウスに移植し翌日から免疫抑制剤 FK506 を投与し 40 日後に骨格筋を解析し筋ジストロフィー患者へのこの細胞による治療が可能かについて検討した。*dy* マウス及び CAV-3^{P104L}-Tg マウス骨格筋への移植によってもそれぞれ筋線維への導入が GFP 蛍光によって確認された。興味深いことに、導入筋線維だけでなく、その周囲の非導入筋線維においても欠損蛋白質であるメロシ

ン及びカベオリン-3の発現回復が認められた。

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。

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 (鈴木)

骨格筋及び筋衛星細胞

1. $POMGnT1^{-/-}$ では POMGnT1 の酵素活性が検出されず、 α -DG の糖鎖修飾が異常であったが、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るのみで、HE 染色では骨格筋の筋変性・壊死は目立たなかった。
2. $POMGnT1^{-/-}$ から FACS で純化した筋衛星細胞をの増殖能は著明に低下していた。筋管形成能 (分化能) の低下はなかった。
3. 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。

網膜

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示す所見と分岐・蛇行等の走行異常が示唆された。
2. 組織学的解析では内境界膜 (ILM) が不連続で頻繁に破綻しており、硝子体側にGFAP陽性細胞が異所性に認められた。
3. $POMGnT1^{-/-}$ 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。
4. $POMGnT1^{-/-}$ では外網状層 (OPL) の

厚さが減少しており、 α -DGの糖鎖およびピカチュリンの発現がほぼ消失していた。視細胞、双極細胞やアマクリン細胞には免疫染色上、数や形態に異常はなかった。b-DGとジストロフィンの発現は減少していた。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。

5. 網膜の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ことから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

福山型先天性筋ジストロフィーはスプライス異常症である

従来は FCMD の 3' 非翻訳領域への SVA 挿入変異が mRNA 不安定性などを引き起こし、mRNA が検出できない、と考えられていたが、スプライシング異常によって生じる新規 RNA は、ちょうどサイズが polyA RNA 精製でも大過剰に存在するリボゾーム RNA と重なるため、検出できなかったものと考えられる。今回、リボゾーム RNA を除く処理をして新規 RNA が検出された。

またスプライシング異常症であれば、異常スプライシングを起こさないようにする方法が治療的アプローチにつながると考えられる。

フクチンのミスセンス変異の解析

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、Sia α 2, 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 α DG 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。

モデルマウスによる病態治療解析

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。

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。

②POMT1 および POMT2 酵素の構造と酵素活性の関連について

POMGnT1 活性測定法・末端糖鎖解析法の開発

本研究で得られた結果は、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、新たに開発したこの方法は、酵素と糖供与体の組み合わせによって、様々な末端の糖鎖構造の検出に利用できることから、福山型先天性筋ジストロフィー以外の 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。

ゼブラフィッシュ POMT 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。zPOMT1 および zPOMT2 遺伝子のノックダウン体では、ヒトの WWS と同様に α -ジストログリカンの β -Man 型糖鎖異常と、筋（心臓、尾部）および眼の発生異常が観察された。この結果は、ゼブラフィッシュにおいても神経や筋の発生に β -Man 型糖鎖が重要であることを示しており、 α -ジストログリカノパチー病態モデルとしてゼブラフィッシュが有用であることを示している。

ヒト POMT の機能解析

POMT1 および POMT2 の触媒活性中心は、二次構造予測から小胞体の内腔側に大きな親水性領域として形成されることが示され、この領域に *N*型糖鎖修飾は集中していた。*N*型糖鎖の除去により不溶性となり活性が消失することから、*N*型糖鎖が触媒活性中心の親水性を保ち構造の維持に重要な役割を担っていることが考えられる。また、POMT1 あるいは POMT2 の片方の糖鎖の除去により POMT1 と POMT2 の両方が不溶性になってしまうことから、糖鎖は酵素活性に必要であるが、複合体形成には影響しないことが示された。

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。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両者で異なっており、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。

③ Large 蛋白質を用いた新規治療法の開発

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副作用の出現する可能性は低いものと考えられた。一方で、fukutin KO、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、元々の表現型があまりに重篤であった可能性が考えられる。より症状の軽い fukutin conditional KO mouse との交配実験を現在行っている。一方で Large を高発現する 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 の発現、精製についてはラージスケールにおける培養条件のさらなる検討が必要と考えられる。

④ MyoD 導入細胞の *in vitro* 解析、*in vivo* 解析と筋ジストロフィーモデルマウスへの細胞治療

Weintraub と Tapscott によって脱メチル化剤アザシチジン添加による培養細胞の多核筋管細胞分化を司る転写因子 MyoD が発見されて既に 20 年が経過した。ところがこの MyoD 導入細胞が筋線維となるのかにつ

いての *in vivo* の細胞運命については意外にも殆んど解析されていなかった。我々はこれまでに筋分化のマスター遺伝子 (Myogenic reulator factrors) として報告されている MyoD の他、Myf5 に興味を持ちこの転写因子導入による FCMD の細胞治療を目指した。

MyoD と Myf5 それぞれ胎児期の発現時期や発現分布に差異があり、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。そこで、アデノウイルスで MyoD と Myf5 を一過性大量導入したところ *in vitro* で単核筋芽細胞、多核筋管細胞となり、収縮する筋線維塊となった。この細胞塊は速筋及び遅筋 MyHC で染色され CK 発現も認められた。この機構として 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* で各種筋衛星細胞マーカー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から、導入細胞の一部は筋衛星細胞様の骨格筋幹細胞の性格を有する可能性がある。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。

これらマスター遺伝子導入細胞は免疫不全 NOG マウスの typeI, IIA, IIB 筋線維にそれぞれ生着した。また細胞移植によって *dy* マウス及び CAV-3^{P104L}-Tg マウス骨格筋への移植によってもそれぞれ筋線維への導入が GFP 蛍光によって確認された。興味深いことに、導入筋線維だけでなく、その周囲の非導入筋線維においても欠損蛋白質であるメロシン及びカベオリン-3 の発現回復が認められた。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・筋衛星細胞として筋ジストロフィーで長期間機能しているか否かについて解析をおこなっている。

多能性胚性幹 (iPS) 細胞が樹立されることが明らかとなり幹細胞治療による再生医学は新しい時代を迎えた。筋ジストロフィーの根治療法として、これらの多能性幹細胞や、骨格筋から単離した筋前駆細胞を疾患モデルマウスに移植する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 が示されたが、今後は、①リプログラミングに適切な体細胞の選択、②その細胞の大量供給、③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骨格筋握力及び筋張力などの生理機能解析の検討が必要である。

また 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レコンビナント蛋白などによるアプローチについても検討が必要と考えられる。

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^{-/-}マウスでは POMGnT1 の酵素活性が殆ど検出されないにも関わらず、骨格筋病変はヒト MEB のそれに比較して軽微であ

った。この原因は不明であるが、種間で糖鎖構造に違いがある可能性もある。POMGnT1^{-/-}由来の筋衛星細胞の増殖能の低下は α -DG と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。 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可能性がある。

網膜では α -DG の糖鎖異常によって網膜血管とこれを囲むアストロサイトの相互作用が阻害され、血管に何らかの障害が起こり網膜血管の走行が乱れたと考えられる。またミュラー細胞の end-feet によって構築される内境界膜の破綻により、増殖したアストロサイトが硝子体側に遊走して増殖することで牽引性の網膜剥離を起こした可能性が考えられた。 α -DG の糖鎖修飾は OPL のシナプス形成にも重要であることが分かった。 α -DG とピカチュリンの結合がシナプス形成と維持に重要であると思われる。

E. 結論

1、FCMD はスプライシング異常症であり、fukutin 蛋白の機能喪失による FCMD の発症機構が明らかになった。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、 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。POMT1 は 7 回、POMT2

は 9 回膜貫通型タンパク質であり、酵素活性の発現には両方の *N* 型糖鎖が必要であることが明らかとなった。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。酵素活性発現に必須な POMT1 と POMT2 とは、それぞれ果たす役割が異なる可能性が示された。

3、1) Large による α -DG の機能修復は *in vivo* においても生じる。2) Large の過剰発現は生体に重大な副作用をもたらさない。3) Large による α -DG の機能修復には Large の管腔内ドメインの全長が必要である。4) Large Tg と fukutin KO、POMGnT1 KO との交配で胎生致死という KO の表現形は変化しない。5) Large 遺伝子を HeLa 細胞に導入すると接着能が亢進し、増殖能、遊走能は著明に低下することから Large は癌治療に有用な可能性がある。6) 分泌型 Large 蛋白質を HEK293 細胞の培養上清から精製した。

4、1) 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 した。2) Myf5 は MyoD の上流から骨格筋分化制御転写因子群を経時的に誘導し、これによって筋衛星細胞マーカー、ジストロフィン及び速筋及び遅筋特異的ミオシン重鎖の発現が生じる。3) この MyoD 導入細胞は NOG 免疫不全マウス骨格筋へ移植すると type I, IIA, 及び IIB 線維へ長期間生着した。4) メロシン欠損先天性筋ジストロフィーモデル (*dy*) およびカベオリン-3 欠損肢帯型筋ジストロフィー 1 C モデルマウスの筋線維にも生着し欠損蛋白質の発現が回復した。5) 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。

5、1) *POMGnT1*^{-/-}マウスの骨格筋の表現型は軽微であるが、中枢神経系や眼の表現型は MEB と類似しており、良い疾患モデルであると言える。2) *POMGnT1*^{-/-}筋衛星細胞では増殖能が低下していたことから、 α -DG の糖鎖修飾は筋衛星細胞の増殖能維持に重要であると考えられる。3) *POMGnT1* 変異マウスの網膜の解析から、*POMGnT1* による α -DG の糖鎖修飾がミュラーグリアとアストロサイトの機能に重要で、これらの機能不全が多様にみえる眼疾患のベースにあることが示唆された。4) α -DG の糖鎖修飾は、外網状層 (OPL) のシナプス形成にも重要であった。

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. 総合 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 神戸大学大学院医学研究科神経内科 教授
研究協力者 谷口真理子、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 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。この産物は、*fukutin* の最終エクソンの翻訳領域内にある潜在的スプライシング供与部位から、SVA 挿入変異内のスプライシング受容部位へ続く新生エクソンを有しており、患者細胞系より、異常スプライシング由来の異常 *fukutin* 蛋白が検出された。またこの異常 *fukutin* 蛋白は、局在が正常で見られるゴルジ体から小胞体へと変化していた。これらの結果より、FCMD はスプライシング異常症であり、*fukutin* 蛋白の機能喪失による FCMD の発症機構が明らかになった。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、およびジスフェルリン変異 SJL マウスとの二重変異マウス、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、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 β -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はスプライス異常症である

我々は、疾患の発症機序を明らかにするために、定量的 RT-PCR 法を用い *fukutin* 内各領域での遺伝子発現を調

べたところ、患者初代線維芽細胞系において、SVA 挿入変異周辺で発現が激減している部分が見つかった。一方、挿入変異から離れた *fukutin* の 5' 側及び 3' 側部分では、患者と健常者で発現量の差が全く無い領域もあった。このことから、従来説とは異なり、FCMD の挿入変異がスプライシングパターンを変化させ、周辺領域が新たなスプライシングを受け脱落したのではないかとの仮説を立てた。

この仮説を検証するために、FCMD 患者由来初代線維芽細胞およびリンパ芽球の *fukutin* mRNA の塩基配列を調べたところ、異常スプライシング由来の産物が確認された。さらに患者細胞 polyA RNA を用いたノザンハイブリダイゼーションにおいて、異常スプライシング由来のサイズのバンドが確認された。

この産物は、*fukutin* の最終エクソンの翻訳領域内にある潜在的スプライシング供与部位から、SVA 挿入変異内のスプライシング受容部位へ続く新生エクソンを有しており、患者細胞系より、異常スプライシング由来の異常 *fukutin* 蛋白が検出された。またこの異常 *fukutin* 蛋白は、局在が正常で見られるゴルジ体から小胞体へと変化していた。

②フクチンのミスセンス変異の解析

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。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。

③モデルマウスによる病態治療解析

FCMD のモデルとして我々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。

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

①福山型先天性筋ジストロフィーはスプライス異常症である

従来はFCMDの3'非翻訳領域へのSVA挿入変異がmRNA不安定性などを引き起こし、mRNAが検出できない、と考えられていたが、スプライシング異常によって生じる新規RNAは、ちょうどサイズがpolyA RNA精製でも大過剰に存在するリボゾームRNAと重なるため、検出できなかったものと考えられる。今回、リボゾームRNAを除く処理をして新規RNAが検出された。

またスプライシング異常症であれば、異常スプライシングを起こさないようにする方法が治療的アプローチにつながると考えられる。

②フクチンのミスセンス変異の解析

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、Sia α 2,3-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 α DG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。

③モデルマウスによる病態治療解析

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。

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 はスプライシング異常症であり、fukutin 蛋白の機能喪失による FCMD の発症機構が明らかになった。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

Sato S, et al. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor 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

Xiong H, et al. Fukutin gene retrotransposal insertion in a non-Japanese Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) patient. *Am J Med Genet* 149A:2403-2408, 2009

Kanagawa M, et al. Post-translational