

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

日本小児神経学会 シンポジウム
2008

日本人類遺伝学会 教育講演 2008

World Muscle Society 2008

日本分子生物学会・生化学会 2008

CK50 symposium 2009

遺伝子治療シンポジウム 2009

台湾小児神経学会 特別講演 2009

日本神経学会総会 シンポジウム
2009

日仏筋ジストロフィー シンポジウム
2009

World Muscle Society 2009

日本分子生物学会・生化学会 2009

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））
（総合）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。福山型先天性筋ジストロフィーおよび類縁疾患の原因遺伝子は、これまで 6 種明らかにされており、我々はそのうち 3 種、POMGnT1 と POMT1、POMT2 が糖転移酵素であることを明らかにした。本研究では病態解明および画期的な診断・治療法を開発を目的として、(1) POMGnT1 を利用した fukutin の機能解析および末端糖鎖解析法の開発、(2) ゼブラフィッシュ POMT の解析と新たな筋ジストロフィーモデル動物の開発、(3) WWS の原因遺伝子産物 POMT1、POMT2 の機能解析を行った。

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を開発を目指している。福山型先天性筋ジストロフィーおよび類縁疾患の原因遺伝子は、これまで 6 種明らかにされており、我々はそのうち 3 種、POMGnT1 と POMT1、POMT2 が糖転移酵素であることを明らかにした。

福山型先天性筋ジストロフィー症の原因遺伝子産物である fukutin の機能は未解明である。我々は最近 fukutin が POMGnT1 と複合体を形成し、活性の制御に関わることを示した。そこで、POMGnT1 活性への fukutin の影響を高感度で検出する方法の開発を試みた。糖鎖構造の変化はその糖鎖を合成する糖転移酵素の異常を反映する。例えば、POMGnT1 活性の喪失は、*O*-マンノース (Man) 型糖鎖の GlcNAc β 1-2Man 構造の合成不全をおこし Man 以降の糖鎖伸長が停止する。その結果 α -ジストログリカンには Man を末端とする糖鎖が増加することが予想される。すなわち、 α -ジストログリカンの末端糖鎖構造を解析することで、異常が起きている糖転移酵素を特定できる可能性があり、新たな診断法開発への応用が期待できる。

近年、ゼブラフィッシュは、遺伝子操作が簡易である、繁殖しやすい、表現型を解析しやすい、

脊椎動物である、ことなどから、遺伝子の機能解析や疾患モデル動物として用いられている。特に薬剤を投与しやすく、化合物のスクリーニングなど治療法開発を目指す上での利用価値は高い。そこで、ゼブラフィッシュの *O*-Man 転移酵素 zPOMT1、zPOMT2 を解析し、筋ジストロフィー症モデルとしての可能性について検討した。

Walker-Warburg syndrome (WWS) の原因遺伝子産物 POMT1 と POMT2 は *O*-Man 転移酵素 (POMT) であり、酵素活性の発現には POMT1-POMT2 複合体の形成が必要である。WWS 患者における POMT1 および POMT2 の変異による活性消失のメカニズムとしてタンパク質の構造異常がひとつの要因として考えられる。しかし、POMT1 と POMT2 は構造解析が困難な複数回膜貫通型タンパク質であるため、その構造情報は未だ解明されていない。そこで、タンパク質の *N* 型糖鎖修飾の特性を利用して、膜配向性などの構造情報を解析し、複合体形成や活性発現機構、各変異による影響について検討した。また、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) の POMT ホモログ ScPmt1 と ScPmt2 は複合体を形成する。ScPmt1 は 7 回膜貫通型タンパク質であり小胞体内腔側の 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。これらのアミノ酸は POMT1

(Arg30, Glu44, Arg105) と POMT2 (Arg72, Glu86, Arg145) でもすべて保存されていたことから、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

POMGnT1 活性測定法・末端糖鎖解析法の開発

RNAi による fukutin ノックダウン細胞で発現させた α -ジストログリカンを用いて、リコンビナント POMGnT1 により転移される GlcNAc の量から、Man 末端糖鎖の量を定量し、POMGnT1 活性の変化を測定した。

ゼブラフィッシュ POMT の解析

ゼブラフィッシュ初期胚から *zPOMT1* および *zPOMT2* 遺伝子をクローニングし、HEK293T 細胞を用いて両タンパク質を単独あるいは同時に発現させて酵素活性を測定した。また、RT-PCR 法および whole-mount in situ hybridization (WISH) 法により両遺伝子の発現解析を行った。さらに、両遺伝子に対するアンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) を用いたノックダウン解析および免疫組織染色による解析を行った。

ヒト POMT の機能解析

タンパク質への *N* 型糖鎖修飾は小胞体の内腔側でしか起こらないことから、膜タンパク質の膜配向性の指標として利用できる。ヒト POMT1 と POMT2 には *N* 型糖鎖修飾のコンセンサス配列 (Asn-X-Ser/Thr) がそれぞれ 4 ヶ所と 5 ヶ所存在する。POMT1 と POMT2 の二次構造について 3 種のプログラム (SOSUI, HMMTOP, TMpred) により解析した。POMT1 および POMT2 の *N* 型糖鎖修飾される可能性のある Asn を Gln に置換し HEK293T 細胞に発現させた。ウェスタンブロットにより各変異体の分子量の変化を解析し、*N* 型糖鎖の修飾部位を決定した。さらに、Asn の置換およびツニカマイシンにより *N* 型糖鎖修飾を阻害した時の POMT 活性や複合体形成への影響を調べた。また、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。

(倫理面への配慮)

放射性同位元素の使用に関しては「放射線障害防止法関連法令」および「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

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 -ジストログリカンと比較して、GlcNAc の取り込み量が多く、Man を末端とする糖鎖の量が多いことが明らかとなった。この結果は、fukutin のノックダウンにより、POMGnT1 活性が低下することを示している。fukutin ノックダウン細胞で α -ジストログリカンを発現させると、糖鎖不全によると考えられる低分子量の分子種が一部検出される。オートラジオグラフィー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。

D. 考察

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 *O*-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 *O*-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。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

Miyagoe-Suzuki Y., Masubuchi N., Miyamoto K., Wada M.R., Yuasa S., Saito F., Matsumura K., Kanasaki H., Kudo A., Manya H., Endo T., Takeda S.: Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts *in vitro*. *Mech Dev.*, 126(3-4), 107-116, 2009

Yanagisawa A., Bouchet C., Quijano-Roy S., Vuillaumier-Barrot S., Clarke N., Odent S., Rodriguez D., Romero N.B., Osawa M., Endo T., Lia T.A., Seta N., Guicheney P.: *POMT2* intragenic deletions and splicing abnormalities causing congenital muscular dystrophy with mental retardation. *Eur J Med Genet.* 52(4), 201-206, 2009

Manya H., Akasaka-Manya K., Nakajima A., Kawakita M., Endo T.: Role of N-glycans in maintaining the activity of protein O-mannosyltransferases POMT1 and POMT2. *J. Biochem.*, 147(3), 337-344, 2010

Clarke N.F., Maugenre S., Vandebrouck A., Urtizbera J.A., Willer T., Peat R., Gray F., Bouchet C., Manya H., Vuillaumier-Barrot S., Endo T., Chouery E., Campbell K.P., M egarban e 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

Avsar-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://jcgdb.jp/GlycoPOD/>, 2010

2. 学会発表

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

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

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

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

, 2008.12.9-12

坂恵利子、萬谷博、遠藤玉夫、田丸浩: 培養細胞を用いたゼブラフィッシュ POMT 遺伝子の発現とその酵素活性の検討. 第 81 回日本生化学会大会, 神戸, 2008.12.9-12

Manya H., Akasaka-Manya K., Endo T.: Role of N-glycans on protein O-mannosyltransferases POMT1 and POMT2. Austria/Japan Seminar on Comparative Glycobiology and Developmental Biology, Hayama, Japan, 2009.9.21-22

遠藤玉夫、赤阪・萬谷啓子、萬谷博: 先天性筋ジストロフィーにおける糖鎖異常. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10.21-24

松本莉永、萬谷博、遠藤玉夫: 哺乳類 O-マンノース転移酵素の機能解析. 首都大バイオコンファレンス 2009, 東京, 2009.11.6

遠藤玉夫、萬谷博: O-マンノース型糖鎖修飾と病態. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.12.9-12

萬谷博、赤阪・萬谷啓子、遠藤玉夫: ヒト O-マンノース転移酵素における N 型糖鎖修飾の解析. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010.3.27-30

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

アヴシヤル・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
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

福山型先天性筋ジストロフィーに対する Large 蛋白質を用いた新規治療法の開発
研究分担者 松村喜一郎 帝京大学神経内科 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。Large の *in vivo* における機能を解析するために Large transgenic mouse (Large Tg) を作出した。Large Tg は正常に誕生、発育し交配も可能であり、各組織に形態学的な異常は認められなかった。各組織における α -DG の laminin 結合能、 agrin 結合能は著増し、一部の臓器では laminin の発現も増加していた。Large Tg を fukutin knockout mouse (fukutin KO), POMGnT1 knockout mouse (POMGnT1 KO) と交配したがこれら KO の胎生致死という表現形の改善は認めなかった。また 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ために HeLa 細胞に Large 遺伝子を導入したところ、HeLa 細胞は接着能の亢進と増殖能、遊走能の低下を示した。一方で Large 蛋白質による治療実験に供するための分泌型 Large を安定発現する HEK293 細胞株を樹立し、培養上清からリコンビナント蛋白質の精製を行った。

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 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。

(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無いものとする。

C.研究結果

Large transgenic mouse は正常に誕生、発育し交配も可能であった。各組織に形態学的異常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 I1H6 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。

D.考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito F, and Matsumura K. Dystroglycan and neuromuscular diseases: Its diverging role in muscle, nerve and brain. *Neurochemistry: Molecular aspects, cellular aspects and clinical applications*. Edited by Paços A and Nogueira S. NOVA Science Publishers, Inc. New York. 2009; chapter 8, 195-209.
- 2) Saito F, Matsumura K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and defective glycosylation of α -dystroglycan. *Skeletal Muscle* 2011 (*in press*).
- 3) 齊藤史明、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, Shimizu T, and Matsumura K. Glycosylation of α -dystroglycan in cultured cells and its restoration by glycosyltransferase. 13th International Congress of the World Muscle Society, September 30, 2008, Newcastle Gateshead, UK
- 2) 齊藤史明、新井祐子、清水輝夫、松村喜一郎. α -ジストログリカノパチーにおけるジストログリカンの機能修復に関する検討 第 49 回日本神経学会総

会、横浜、2008.5.17

- 3) 新井祐子、齊藤史明、清水輝夫、松村喜一郎. α -Dystroglycan の N 末端断片の脳脊髄液における発現 第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008.5.17
- 4) Saito F, Xin Z, Ikeda M, Hagiwara H, Shimizu T, and Matsumura K. Overexpression of LARGE strongly increases laminin binding of α -dystroglycan but does not exhibit toxic effects in mice. 14th International congress of the World Muscle Society. Geneva, Switzerland. Sep 10, 2009.
- 5) Matsumura K, Saito F, Saito-Arai Y, Ikeda M, Nakamura A, and Shimizu T. Secretion of N-terminal domain of α -dystroglycan in the human cerebrospinal fluid in physiological and pathological conditions. 14th International congress of the World Muscle Society. Geneva, Switzerland. Sep 10, 2009.
- 6) 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.
- 7) 齊藤史明、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 α -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
- 8) 萩原宏毅、齊藤史明、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。

研究要旨

我々は骨格筋マスター転写因子導入による体細胞直接リプログラミング戦略を用いて福山型筋ジストロフィー（FCMD）に対する細胞治療に取り組んでいる。アデノウイルスベクターでマスター転写遺伝子 MyoD 及び Myf5 を MEF へ一過性大量導入したところ、単核筋芽細胞から多核筋管細胞、筋線維様形態となり自発的収縮を開始した。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機構を明らかとした。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。さらに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。体細胞直接リプログラミング戦略による細胞治療の基盤が確立した。大量供給が可能な体細胞の選択、効率の良い欠損遺伝子フクチン導入治療との組み合わせについて研究を進める必要がある。

A. 研究目的

骨格筋再生には筋衛星細胞や血管周細胞など様々な前駆細胞が関与すると考えられているが、これら前駆細胞の単離と培養には複雑な手技が必要となる。またマウス胎児線維芽細胞(MEF)に 4 転写因子を導入して樹立された多能性胚性幹 (iPS) 細胞は、再生医療の細胞ソースとして期待されているが、骨格筋細胞への分化誘導は容易ではなく腫瘍化の問題は回避できない。一方、細胞特異的転写因子導入により膵腺房細胞を膵臓β細胞に分化させるといった、一旦分化した体細胞を別の体細胞に直接リプログラミングする戦略も再生医療の候補として注目を浴びている。

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、我が国で疾患概念が提唱され責任遺伝子 *fukutin* が同定された常染色体劣性遺伝形式を示す最も頻度の高い先天性筋ジストロフィーで治療法開発が急務となっている神経難病である。この疾患では、糖鎖修飾因子と推定されている *fukutin* 遺伝子が欠損することによって、まず筋細胞膜のジストロフィン糖タンパク複合体のメンバーであるアルファジストログリカン (α -DG) の糖鎖修飾に異常が生じ、その結果基

弱化して最終的に筋細胞の壊死・変性に至り筋ジストロフィーが発症するという疾患パラダイムが考えられている。我々はまず FCMD 同様に筋基底膜破綻が認められるメロシン欠損先天性筋ジストロフィーモデルマウス (*dy*) と筋基底膜破綻の認められないジストロフィン欠損 *mdx* マウスに対して GFP マウスからの骨髄移植を行い、細胞療法の可能性について検討した。その結果、*mdx* と比較して *dy* マウス横隔膜には GFP 陽性骨髄由来細胞が多数取り込まれ、筋線維と融合しメロシンが高発現する、有意に呼吸筋不全が改善し生存期間が延長することを報告した (Hagiwara H, et al. *FEBS Lett* 580, 2006)。この結果から筋基底膜破綻が認められる FCMD などの先天性筋ジストロフィーでは細胞治療が期待できると考えられた。しかし骨髄間葉系幹細胞は元々数が少なく、かつ骨格筋幹細胞へのトランスフォーム効率が低いことから、より簡便に供給が可能な再生医療の細胞ソースが必要と考えられた。

そこで我々は体細胞に骨格筋分化マスター転写因子を導入して直接リプログラミングによって簡便に筋細胞への分化を達成し、大量かつ効率の良い骨格筋再生細胞ソースの樹立を目標とする本研究を構想

した。そこで、GFP マウス胎児由来 MEF を単離培養し、この細胞にアデノウイルスベクターを用いて筋分化のマスター遺伝子である MyoD 及び Myf5 を大量かつ一過性に導入し *in vitro* での筋分化誘導が可能か検討した。次いでこのマスター遺伝子導入線維芽細胞を NOG 免疫不全マウス骨格筋に移植し生着が可能か否か解析した。更に免疫抑制剤を併用してメロシン欠損先天性筋ジストロフィー (MDC1A) モデルマウス及びカベオリン-3 欠損肢帯型筋ジストロフィー (LGMD1C) マウスの骨格筋へ移植し、筋線維への分化・生着と欠損蛋白質メロシン及びカベオリン-3 の発現回復について解析を進めた。加えて、この MyoD 及び Myf5 導入線維芽細胞が骨格筋幹・前駆細胞の性格を有するか否か、筋衛星細胞マーカーによる *in vitro* 解析や、骨格筋線維への長期生着の可否を検討した。これによって、体細胞直接リプログラミングによる FCMD 細胞治療法の基盤確立を目指した。

B. 研究方法

GFP-MEF 細胞の単離とアデノウイルスによる MyoD 及び Myf5 導入

胎生 14 日 GFP マウスから MEF を単離し DMEM/10%FBS 増殖培地で培養し CAG-GS プロモーター下で MyoD および Myf5 を発現するアデノウイルス (Adeno-CAG-MyoD, Adeno-CAG-Myf5) を力価 (MOI) 100, 30, 10, 3, 1 と条件を振って、それぞれ 60 分間感染させた。その後 48 時間増殖培地で培養した。

MyoD 及び Myf5 導入 MEF 細胞 *in vitro* 解析

感染 48 時間後に細胞が線維芽細胞から筋芽細胞様にトランスフォームした時点で DMEM/2%HS 低血清分化培地に交換した。以後、経時的に 21 日まで形態顕微鏡で細胞を観察し、骨格筋特異的転写遺伝子発現及び構造蛋白質発現について MyoD 導入及び Myf5 導入細胞について比較検討をおこなった。

MyoD 及び Myf5 導入細胞の細胞移植と *in vivo* 解析

Adeno-CAG-MyoD 及び Adeno-CAG-Myf5 を力

価 MOI 30 で GFP-MEF 細胞に 60 分間感染させた。感染後 2 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間と時間を振って、 1×10^6 個の細胞を回収した。これらの細胞を生理食塩水に懸濁し 10 週齢 NOG 免疫不全マウスないし野生型 B6 マウスの片側前脛骨筋へそれぞれ筋注した。その後 40 日後、1 年後、2 年後に、それぞれ移植筋を採取した。更に 10 週齢メロシン欠損先天性筋ジストロフィー (MDC1A) モデル (*dy*) マウス及びカベオリン-3 欠損肢帯型筋ジストロフィー (LGMD1C) マウス骨格筋にも同様に筋注によって細胞移植を行い、移植後免疫抑制剤 FK506 を 2mg/kg/day で連日皮下投与して 40 日後に骨格筋を採取した。H&E 染色で形態を観察し type I, IIA, IIB 特異的 MyHC によって筋線維タイピングを行った。移植細胞の生着率については GFP 免疫組織染色によって検討し、メロシン及びカベオリン-3 の免疫染色によって欠損蛋白質の発現回復の有無について検討した

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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、マイोज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、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 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。

D. 考察

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 factors) 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^{F104L}.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。

E. 結論

- 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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y. Caveolin-3 regulates myostatin signaling. *Acta Myol.* 27:19-24, 2008
- 2) Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanimoto Y, Moriyama K, Noji S. Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin -targeting siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene Ther.* 15(15):1126-30, 2008.
- 3) Tsuchida K, Nakatani M, Hitachi K, Uezumi A, Sunada Y, Ageta H, Inokuchi K. Activin

signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun. Signal.* 7(1),15, 2009

4) 砂田芳秀：筋ジストロフィーの分子病態. 神経治療学, Vol.27, No.6, PP781-784, 2010

5) Nakatani M, Kokubo M, Ohsawa Y, Sunada Y, Tsuchida K. Follistatin-derived peptide expression in muscle decreases adipose tissue mass and prevents hepatic steatosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 300 (3), E543-553, 2011

6) Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S. Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice. *Dev Growth Differ.* 53(1):48-54,2011

2. 学会発表

1) Ohsawa Y, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Murakami T, Sunada Y. A small-molecule inhibitor targeting transforming growth factor- β type receptor kinase ameliorate muscular atrophy in a mouse model of caveolin-3-deficient muscular dystrophy. 13th International Congress of World Muscle Society, Newcastle, UK, September 29-October 2(2008)

2) 久我敦、大澤裕、林紗織、村上龍文、砂田芳秀. cardiotoxin 筋再生モデルにおける caveolin-3 と dysferlin の動態. 第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15 日

3)大澤裕、岡田只士、林紗織、久我敦、村上龍文、若山吉弘、澁谷誠二、砂田芳秀. caveolin-3 欠損筋の dysferlin/myoferlin 細胞内局在異常. 第 49 回日本神経学会総会、2008 年 5 月 15 日

4) 久我敦、大澤裕、岡田只士、藤野雅広、林紗織、力丸満恵、村上龍文、砂田芳秀：変異 caveolin-3 トランスジェニックマウスにおける小胞体ストレスの解析, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成 20 年度「砂田班」班会議, 東京, 12.14, 2008

5) 大澤裕、藤野雅広、岡田只士、久我敦、林紗織、力丸満恵、村上龍文、西松伸一郎、濃野勉、土田邦博、野地澄晴、砂田芳秀：創傷治癒形質 MRL-MpJ 導入による mdx マウスの骨格筋解析, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成 20 年度「砂田班」班会議, 東京, 12.15, 2008

6) Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Rikimaru M, Sunada Y.: Introduction of wound-healing MRL-MpJ phenotype improves skeletal muscle pathology in mdx mouse. 14th International Congress of The World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

7) 大澤裕、久我敦、林紗織、力丸満恵、村上龍文、砂田芳秀：TGF- β タイプ I セリンスレオニンキナーゼ受容体阻害剤による筋ジストロフィー治療法の開発 (第 2 報), 第 27 回日本神経治療学会総会, 熊本, 6.11, 2009

8) 砂田芳秀、大澤裕、岡田只士、藤野雅広、力丸満恵、林紗織、村上龍文、藤井績：線維芽細胞の direct reprogramming による筋ジストロフィーの細胞治療, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成 21 年度「砂田班」班会議, 東京, 12.11, 2009

9) 砂田芳秀、大澤裕、岡田只士、藤野雅広、力丸満恵、林紗織、村上龍文、藤井績：線維芽細胞の direct reprogramming による筋ジストロフィーの細胞治療, 平成 21 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー総合班会議, 東京, 1.9, 2010

10) Sunada Y, Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Hayashi S, Rikimaru M, Murakami T, Nishimatsu S, Nohno T, Nagao M : Wound-healing MRL-MpJ phenotype improves outcome of dystrophin deficient mdx mice. XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 2010

11) 砂田芳秀：nNos は caveolin-3 欠損症の病態を抑制する. 第 51 回日本神経学会総会, 東京, 5.21.2010

12) 砂田芳秀：筋ジストロフィーの分子病態. 第 28 回日本神経治療学会総会, 横浜, 7.16.2010

13) 砂田芳秀、大澤 裕、岡田只士、西松伸一郎、石崎雅俊、菅 智宏、内野 誠、濃野 勉、野地澄晴、土田邦博：筋ジストロフィーに対する抗 myostatin 治療薬の開発, 厚生労働省精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成 22 年度「砂田班」班会議, 東京, 12.3.2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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））

（総合）分担研究報告書

「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」

研究分担者 鈴木 友子

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 室長

研究要旨

α -dystroglycan (α -DG) は、骨格筋膜上のジストロフィン・糖蛋白質複合体の主要な構成成分であり、*O*-マンノース型糖鎖を介して細胞外のラミニン、アグリン、パールカン、ピカチュリン等と結合している。POMGnT1 はマンノースに GlcNac を転移する酵素であり、その活性低下により、先天性筋ジストロフィーの一つ muscle-eye-brain 病 (MEB) が発症する。POMGnT1 変異マウスを作出し、筋衛星細胞の増殖能・分化能と眼の病変を調べた。POMGnT1^{-/-}では α -DG の糖鎖修飾が異常であったが、骨格筋の筋変性・壊死は軽微であった。筋衛星細胞の細胞増殖能は低下しており、筋衛星細胞に発現する α -DG と細胞外マトリックスのラミニンの結合が筋衛星細胞の増殖能の維持に重要であることが示唆された。MEB 患者では多様な眼の異常が報告されているが、POMGnT1 変異マウスはその表現型を良く再現していた。網膜の病変には血管周囲のアストロサイトと眼特異的グリアであるミュラー細胞の機能不全の他、 α -DG とピカチュリンの結合が失われることで引き起こされる外網状層におけるシナプス形成異常が深く関係すると考えられた。

A. 研究目的

POMGnT1 はマンノースに GlcNac を転移する酵素で、POMGnT1 遺伝子の異常により、先天性筋ジストロフィーの一つ muscle-eye-brain 病 (MEB) が発症する。MEB の分子病態を調べ、治療法を開発する目的で、POMGnT1 変異マウスを作出し、骨格筋とその再生能力、筋衛星細胞の増殖能、分化能を調べた。また、変異マウスの網膜の解析を行った。

B. 研究方法

筋損傷評価

血清 CK は DRI-CHEM3500 (FUJIFILM) を用いて計測した。骨格筋膜の損傷は、0.01% エバンスブルー/PBS をマウス腹腔内に (0.01ml/g BW) 投与し、24 時間後骨格筋切片を蛍光顕微鏡で観察した。

HE 染色・免疫染色

マウス眼球はスーパーフィックス (KURABO) で固定後、パラフィン包埋し、ミクロトームで薄切し、脱パラフィン処理後、HE 染色した。一部は液体窒素で凍結し、クライオスタットで 6 μ m に薄切し α -DG

の糖鎖に対する抗体 VIA4-1 (Upstate)、 β -DG 抗体 43DAG1/8D5 (Novocastra)、抗 dystrophin 抗体 (Dys2 ; Novocastra)、抗 PKC 抗体 (MCK; Sigma; 双極細胞)、抗 Syntaxin 抗体 (HPC-1, Sigma; アマクリン細胞)、抗 vimentin 抗体 (V9; Dako)、抗 GFAP 抗体 (Dako)、ER-TR7 (線維芽細胞)、抗 opsin 抗体 (RET-P1; Sigma; 視細胞)、抗ラミニン抗体 (Sigma) と反応させ、Alexa Fluor488 あるいは Alexa568 でラベルした二次抗体と反応させた。ピカチュリン抗体はアミノ酸 678-691 に相当するペプチドをウサギに免疫して作成されたものを用いた (日本医科大学眼科亀谷修平博士から供与)。画像の取得はライカ社共焦点顕微鏡 (TCSSP) を用いた。

網膜のホールマウント染色

麻酔をかけたマウスの心臓から 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を注入して灌流固定し、FITC-デキストランを注入した後に眼球を摘出して更に 4%PFA に一晩浸した。翌日眼球を切開して網膜を剥がし、スライドガラスに貼付けた後、抗 GFAP 抗体を反応させ

た後、ヤギ抗ウサギ IgG-Alexa Fluor 568 で染色した。

透過型電子顕微鏡像：

フィルジェンの電子顕微鏡撮影受託サービスを用いた。

筋衛星細胞の培養

マウス骨格筋を、0.2% collagenase type II で消化し、得られた単核の細胞を抗体染色した。SM/C-2.6 陽性、CD31 陰性、CD45 陰性、Sca-1 陰性分画（筋衛星細胞）を、FACS Vantage SE (BD) を用いて回収した。細胞は 37°C、CO₂ 湿潤下で、マトリゲル (BD) コートした dish 上で増殖培地 (20% ウシ胎児血清/DMEM + bFGF (2.5 ng/ml) + HGF (25 ng/ml) + heparin (5 µg/ml)) で培養した。筋分化誘導には 2% ウマ血清/DMEM を用いた。

レトロウイルス作成と細胞への感染

Plat-E 細胞を用いて GFP レトロウイルスベクター、POMGnT1-GFP レトロウイルスベクターを作成した。マトリゲルコートした 6 well dish に 4×10⁴ cells/well の密度で細胞を播種し、翌日レトロウイルス溶液を添加した。数日後 FACS を用いて GFP 陽性細胞（感染細胞）を分取した。細胞増殖は MTT assay を行った。

眼底カメラによる観察

麻酔した野生型及び POMGnT1 欠損マウスの眼底を GENESIS-D (興和) で観察した。

網膜電図測定

事前に暗室に移しておいたマウスに麻酔をかけ、眼球表面と後頭部に電極をセットして光刺激を加えて網膜電図を測定した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験では実験計画書を神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会へ提出し、承認を得（承認番号 2007040）、同研究所の定める小型実験動物倫理指針に従って実験を行った。

C. 研究結果

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。β-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事から fibrosis も伴っていると考えられた。

D. 考察

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おこり網膜血管の走行が乱れたと考えられる。またミューラー細胞の 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) *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 の糖鎖修飾がミュー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. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

原著

Nishiyama A, Ampong BN, Ohshima S, Shin JH, Nakai H, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Okada T, Takeda S. (2008) Recombinant Adeno-associated Virus Type 8-Mediated Extensive Therapeutic Gene Delivery into Skeletal Muscle of alpha-Sarcoglycan-Deficient Mice. *Hum Gene*

*Ther.*19:719-30.

Tanihata J, Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Imaizumi K, Takeda S. (2008) Downstream utrophin enhancer is required for expression of utrophin in skeletal muscle. *J Gene Med.* 10:702-13.

Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S (2008) Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am J Pathol.*173:781-91.

Segawa M, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H (2008) Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp. Cell Res.* 2008 Aug 22. [Epub ahead of print]

Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanesaki H, Kudo A, Many H, Endo T, Takeda S. (2009) Reduced proliferative activity of primary *POMGnT1*-null myoblasts in vitro. *Mech Dev.* 126, 107-116.

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

Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno

Y, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki YM, Takeda S, Heike T, Nakahata T. (2009) Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. **FASEB J.** 23:1907-19.

Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Takahito Ito, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H(2010) Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes **Am J Pathol.**176:2414-2424.

Yajima H, Motohashi N, Ono Y, Sato S, Ikeda K, Masuda S, Yada E, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Kawakami K (2010) Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. **Exp. Cell Res.** 316:2932-2944.

Kanagawa M, Omori Y, Sato S, Kobayashi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Furukawa T, Toda T (2010) Post-translational maturation of dystroglycan is necessary for pikachurin binding and ribbon synaptic localization. **J Biol Chem,** 285:31208-31216.

Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Chikao Morimoto C and Tanaka H (2011) Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle **Cell Metabolism** 13:170-182.

Takahashi H, Kanesaki H, Igarashi T, Kameya S, Yamaki K, Mizota A, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Takahashi H. Reactive gliosis of astrocytes and Muller glial cells in retina of

POMGnT1-deficient mice (2011) **Molecular and Cellular Neuroscience**, 印刷中

著書

鈴木 友子、武田 伸一

炎症再生医学事典 II. B. 体性幹細胞と組織修復
5. 骨格筋 松島綱治・西脇 徹編集、朝倉書店、
2009年、p453-456

鈴木友子、武田伸一：「マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック」秋山徹・奥平隆平・河府和義編 羊土社 第23章：筋ジストロフィーモデルマウス、p 378-393

鈴木友子、遠藤玉夫：第II部 生物機能モデルの作製と利用、第3章 糖鎖関連遺伝子ノックアウトマウス、第12節 POMGnT1：「生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール」エル・アイ・シー、p368-374.

Yuko Miyagoe-Suzuki, Akiyoshi Uezumi and Shin'ichi Takeda (2008) Side population (SP) cells and skeletal muscle differentiation, *Recent Advances of Skeletal muscle Differentiation*. Editors: Kunihiro Tsuchida and Shin'ichi Takeda, Research Signpost 378/661(2) Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India

総説

鈴木友子、武田伸一：ゲノムと再生医療「筋ジストロフィーに対する先端治療法の開発」(2009) *ゲノム医学* Vol. 3, No. 3, 47-50.

Yuko Miyagoe-Suzuki & Shin'ichi Takeda (2010) Gene therapy for muscle disease. Mini-review, **Exp. Cell Res.** 316:3087-3092.

鈴木友子、武田伸一：特集 再生医療—臨床応用へ

向けての現状と課題「筋ジストロフィー」(2011)
総合リハビリテーション Vol. 39, No. 1, 25-29.

2. 学会発表

国際学会

Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada RR, Endo T, Takeda S. Abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan results in poor proliferation and limited migration of muscle satellite cells. **6th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2008.** June 11-14, 2008. Philadelphia, USA

国内学会

増淵菜弥、宮本香織、和田倫子、花岡和則、遠藤 玉夫、鈴木友子、武田伸一

α -ジストログリカンの O-マンノース型糖鎖修飾は骨格筋幹細胞の増殖と移動に重要である 第6回幹細胞シンポジウム 平成20年5月16-17日、学術総合センター

鈴木友子 「遺伝性筋疾患への幹細胞移植治療の基盤研究」 第25回日本整形外科学会基礎学術集会シンポジウム6 臨床への橋渡し研究の現状-3 腱・靭帯・筋肉 2010年10月15日 京都

兼先宏典、高橋永幸、亀谷修平、高橋 浩、工藤明、鈴木友子、武田伸一「POMGnT1欠損型マウスではアストロサイトの増殖によって網膜剥離が生ずる」 第33回分子生物学会年会 神戸ポートアイランド 2010年12月10日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
無し

2. 実用新案登録
無し

3. その他
無し

III. 研究成果の刊行に関する一覧表