

において運動負荷後の筋血流量が顕著に増大することを示している⁹⁾。

正常な骨格筋でnNOS活性が低下しても、それだけでは筋ジストロフィーは発症しないが、ジストロフィン欠損というfirst hitの上にnNOS活性低下による筋血管拡張障害というsecond hitが加わることにより筋ジストロフィーが増悪するという、いわゆる“筋ジストロフィー発症のtwo-hit mechanism”が提唱されている。

V. RNA病としての筋ジストロフィー

スプライシングやエディティングなどのRNAプロセッシングの異常に起因する疾患はRNA病と呼ばれる。筋強直性ジストロフィーはいろいろな遺伝子のスプライシング異常によって多彩な症状を呈するRNA病であることが解明されてきた。この疾患(1型)では第19染色体のDMキナーゼ(DMPK)遺伝子の3'非翻訳領域にあるCTGリピートの異常伸長がみられるが⁹⁾、DMPK蛋白自体には異常がない。つまり原因蛋白レベルの異常で病気が発症するわけではない。異常伸長したCTGリピートはDMPK遺伝子のRNAへの転写段階でCUGリピートとなるが、異常伸長したCUGにはMBNL1-3やCELF1-6などのRNA結合蛋白が結合する。これらのRNA結合蛋白は様々な遺伝子のmRNAへの転写過程で、スプライシングを制御している。したがって、異常伸長したCUGリピートにスプライシングを調節するRNA結合蛋白質が結合してトラップされると、正常なスプライシングの制御に支障をきたすと考えられる。この病気の特徴であるミオトニアは塩素チャネルの機能異常で生じるが、患者の筋肉では塩素チャネルCLCN1遺伝子の異常スプライシングにより幼若型CLCN1が発現している¹⁰⁾。また、インスリン受容体においても、スプライシング異常により幼若型受容体が優位になっていて、おそらくインスリン耐性の原因と考えられている¹¹⁾。

VI. RNAレベルの分子病態から新たな治療戦略へ

従来のような蛋白レベルの分子病態の理解だけでなくRNAレベルにおける分子病態の理解が、新たな治療法開発へのアプローチに重要になると

思われる。DMDの場合DNAレベルでout-of-flame欠失を修正することは困難であるが、欠失に隣接するexonをRNAへの転写段階でスプライシングによりスキップさせることでin-flame欠失に変換して軽症化を試みる、いわゆるexon skippingという治療法が注目されている。今後はDMD以外の筋ジストロフィーに対しても、このようなRNAレベルを標的とした治療戦略の応用が考えられる。したがって、重症度など臨床表現型との相関を含め、RNAレベルでの分子病態の詳細な解析が重要になると思われる。

文 献

- 1) Yasuda S, Townsend D, Michele DE et al : Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature* 436 : 1025-1029, 2005
- 2) Iwata Y, Katanosaka Y, Arai Y et al : Dominant-negative inhibition of Ca²⁺ influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. *Hum Mol Genet* 18 : 824-834, 2009
- 3) Bansal D, Miyake K, Vogel SS et al : Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423 : 168-172, 2003
- 4) Cai C, Masumiya H, Weisleder N et al : MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol* 11 : 56-64, 2009
- 5) Miike T, Sugino S, Ohtani Y et al : Vascular endothelial cell injury and platelet embolism in Duchenne muscular dystrophy at the preclinical stage. *J Neurol Sci* 82 : 67-80, 1987
- 6) Brenman JE, Chao DS, Xia H et al : Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82 : 743-752, 1995
- 7) Asai A, Sahani N, Kaneki M et al : Primary role of functional ischemia, quantitative evidence for the two-hit mechanism, and phosphodiesterase-5 inhibitor therapy in mouse muscular dystrophy. *Plos One* 8 : 1-16, 2007
- 8) Kobayashi YM, Rader EP, Crawford RW et al : Sarcolemma-localized nNOS is required to maintain activity after mild exercise. *Nature* 456 : 511-515, 2008
- 9) Brook JD, Mila E, McCurrach HG et al : Molecular basis of myotonic dystrophy : expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68 : 799-808, 1992

10) Nezu Y, Kino Y, Sasagawa N et al : Expression of MBNL and CELF mRNA transcripts in muscles with myotonic dystrophy. *Neuromuscul Disord* 17 : 306-312, 2007

11) Savkur RS, Philips AV, Cooper TA : Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29 : 40-47, 2001

Molecular Pathogenesis of Muscular Dystrophies

Yoshihide SUNADA

Department of Neurology, Kawasaki Medical School

Muscular dystrophy is one of the most devastating diseases for which there is no effective therapy at present. In an attempt to develop effective therapeutics, a considerable number of causative genes for the numerous types of muscular dystrophy have been identified in the last twenty years. However, uncovering causative genes alone is not enough. It is crucial to comprehend molecular pathogenesis of muscular dystrophy, focusing on the causative proteins. It is further necessary to investigate the RNA processing defects.

Muscular dystrophies can be divided into five groups depending on the subcellular localization of the causative proteins as follows : (1) the extracellular matrix proteins such as laminin $\alpha 2$ or collagen VI, (2) the sarcolemmal proteins including dystrophin, sarcoglycans, and dysferlin, (3) the sarcomeric proteins like myotilin, titin, and FHL-1, (4) the nuclear membrane proteins like emerin and lamin A/C, and (5) other miscellaneous proteins such as calpain 3 and TRIM32.

Given the number of proteins attributed to muscular dystrophy, it can be said to be a heterogeneous and variable pathogenesis. However, recent research has revealed important molecular mechanisms leading to muscle degeneration. We discuss three major issues. First, in the patho-

genesis of dystrophinopathy, increased sarcolemmal fragility and increased Ca^{2+} influx have been observed. It is also revealed that TRPV2, a stretch-sensitive ion channel, plays a significant role in increasing Ca^{2+} influx. Second, dysferlin has been proved to be involved in the membrane repair system. In addition to the molecule dysferlin which works in a Ca^{2+} dependent manner, MG53 has been identified to play a significant role in membrane repair without Ca^{2+} . MG53 is also expected to be a novel therapeutic target molecule. Third, as a major underlying factor causing muscle damage in dystrophin-deficient skeletal muscle, decreased nNOS activity has been pointed. Dystrophin-deficient skeletal muscle is damaged as a consequence of disturbed vasodilation after muscle contraction. This is proved with *mdx* mice, where administration of a phosphodiesterase 5 inhibitor, a potent vasodilator, ameliorates muscle damage.

Although these findings at the protein level have great implications for the therapy of muscular dystrophy, clarifying the molecular mechanisms at the RNA level will be the key in developing novel therapeutic strategies. One of the new therapies for DMD could be the exon-skipping therapy where anti-sense agents are used to modify RNA splicing.

筋ジストロフィーに対する 先端治療法の開発

SUZUKI Yuko 鈴木友子

国立精神・神経センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部長

TAKEDA Shin'ichi 武田伸一

同 遺伝子疾患治療研究部長

国立精神・神経センタートランスレーショナル・メディカル・センター長

はじめに

Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)の原因が、骨格筋の細胞質膜の裏打ち蛋白質であるジストロフィンの欠損による膜の脆弱性によることが明らかになってから20年近くを経たが¹⁾、その根本的な治療法はいまだ確立されていない。ほかの遺伝子の異常による筋ジストロフィーに関してもおおむね同じ状況である。

本稿では、これまでの筋ジストロフィーに対する細胞移植治療研究を概説し、最近の人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells:iPS細胞)研究の目覚ましい発展が、どのように筋ジストロフィーに対する先端医療法へ結びついていくか、その可能性に関して述べてみたい。

筋ジストロフィーに対する 治療の現状

DMDの進行抑制効果があるとされている治療法には、プレドニゾンやdeflazacortのステロイド療法がある。その作用機序については諸説あり、よくわかっていない。次世代の治療法として期待されているものとして、ジストロフィン転写産物のスプライシングに重要な配列を標的としたアンチセンス・オリゴヌクレオチドを患者に投与して、ジストロフィン転写産物のスプライシングパターンを変え、premature stop codonの出現を回避するエクソン・スキッピング法がある。筆者らもアンチセンス・モルフォリーノの効果を筋ジストロフィー犬で検討しており、重篤な副作用なしに全身の骨格筋にジストロフィンの発現を回復

表1 2009年5月の段階で進行中の clinical trials の例(ClinicalTrials.gov)

種類	作用機序
PTC124 Gentamicin	Premature stop codon の read-through 効果.
AVI-4658(PMO)	アンチセンスモルフォリーノを用いたスプライシング段階でのエクソン51のスキッピング. リーディングフレームの回復.
rAAV vector expressing Mini-dystrophin with CMV promoter	AAV ベクターによる短縮型ジストロフィン遺伝子導入. AAV ベクターはホストの免疫を惹起することが少なく, 長期安定した発現が期待される.
MYO-029	組換えヒト抗 myostatin 抗体.

させることができた²⁾. しかし, モルフォリーノはやがて体外へ排出されるため, 繰り返し投与が必要であること, 骨格筋に比べて心筋に取り込まれる効率が低いこと, 患者によって遺伝子変異が異なり, 用いるアンチセンス配列が異なること, モルフォリーノ自体が高価であることなどが課題として残る. そのほかにも, 動物実験レベルでは有効であり, 現在臨床試験が進行中であるものがいくつかある(表1).

今までの幹細胞移植とその問題点

骨格筋は組織特異的幹細胞である筋衛星細胞(muscle satellite cells)を有し, 筋が傷害を受けると, この筋衛星細胞が分裂し, 融合して筋線維を再生する. 1990年代前半, 近親者から得た筋衛星細胞を培養後, DMD患者の骨格筋へ移植する筋芽細胞移植が行われたが, 筋力回復などの期待された治療効果は得られなかった. その原因と

して,

- ① 筋衛星細胞を *in vitro* で培養すると, 徐々に幹細胞としての能力を失うこと
- ② 移植直後に多くの筋芽細胞が死んでしまうこと
- ③ 移植後筋芽細胞が筋組織内をあまり移動しないことが挙げられている. さらに,
- ④ 免疫抑制が不十分であったことも筋芽細胞移植の失敗の原因のひとつであったと推察されている. 今後の発展のためには, この骨格筋幹細胞の自己複製, 増殖・分化の分子機構を解明していく必要がある.

新しい幹細胞の発見

一方, 骨格筋組織の間質や血管周囲にも, 多能性をもち, 筋細胞へ分化する細胞が報告されている. ヘキスト色素を排出する能力に富む side population(SP)細胞, 血管周囲に存在する

ペリサイト(pericyte), 同じく血管組織に由来する mesoangioblast, muscle-derived stem cells, myo-endothelial cells などである. これらの細胞の表面マーカーや分化能はよく似ており, その異同は興味をもたれる. 数量的には筋衛星細胞が筋線維再生に最も寄与していることは明らかであるが, 全身の筋変性疾患に対する移植治療という観点では, 局所にしか生着しない筋衛星細胞に対して, 経動脈的, あるいは経静脈的に移植可能であると報告されている多能性幹細胞の利用は多いに期待されることである. 特に mesoangioblasts は筋ジストロフィー犬への経動脈投与後, 全身の骨格筋でジストロフィンの発現を回復させ, 筋ジストロフィーの症状を顕著に改善させており, その臨床応用が待たれる³⁾.

iPS細胞の登場と筋ジストロフィーの細胞移植への応用

2006年, 4つの転写因子(*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*)を強制発現させることでマウスの胎児線維芽細胞から, 胚性幹細胞(embryonic stem cells; ES細胞)に類似した性質を示す人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells; iPS細胞)が樹立された⁴⁾. 2008年には6歳のDuchenne型筋ジストロフィー患者と38歳のBecker型筋ジストロフィーの患者の皮膚線維芽細胞からのiPS細胞の樹立が報告されている⁵⁾. その後はiPS細胞の再生医療への応用を視野に入れて, 低分子化合物やペプチドを用いてiPS細胞を誘導する方法や, ゲノムにinte-

筋ジストロフィーに対する先端治療法の開発

grate しないウイルスベクター(アデノウイルスベクターなど)やプラスミドベクターを用いた iPS 細胞の誘導が試みられている。さらに一度細胞のゲノムに導入した *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* の発現カセットを, Cre-lox, あるいは transposon のシステムを利用してホストのゲノムから切り出す方法で iPS 細胞を樹立する方法が報告されている。ウイルスの integration のない患者由来 iPS 細胞は, 次世代の DMD の治療法の tool として十分期待される。

■ iPS 細胞を移植治療に応用する際の利点, 想定される問題点(表 2)

成人に達したジストロフィー患者の線維芽細胞からも多能性幹細胞を確立できることは, iPS テクノロジーの優れた点である。樹立された iPS 細胞の増殖能は高く, 正常なジストロフィンを発現するように遺伝子を導入し, 筋分化を誘導し, 患者に移植する治療法も将来は可能になると考えられる(図 1)。しかし, 臨床応用には, 未分化な iPS 細胞が混在することによる腫瘍形成を回避する方法, すなわち, 目的とする細胞系譜へコミットした細胞を純化し, 分化誘導に抵抗性の未分化細胞を完全に除去する技術の確立が必要である。また, ヒト iPS 細胞から効率よく骨格筋への分化を誘導する方法を確立することも必要である。最近マウスの系で Pax3 を tet-on の系を用いて強制発現することで, 筋前駆細胞を誘導でき, ジストロフィン欠損マウスに移植すると, 効率よくジスト

表 2 ヒト筋衛星細胞とヒト iPS 細胞の比較

	ヒト筋衛星細胞	ヒト iPS 細胞
採取, 樹立	骨格筋組織から移植に十分な細胞数を調整することは難しい	成人の線維芽細胞からも樹立可能
増殖能	細胞老化に至る	無限
骨格筋への分化能・誘導方法	良好	有効な誘導方法がない Pax3 の強制発現が有効か? (文献 6)
移植における安全性	比較的安全	腫瘍形成の可能性
遺伝子導入, 遺伝子改変方法	レンチウイルスベクターなど	可能 ヒト人工染色体(HAC)、ベクターの応用など

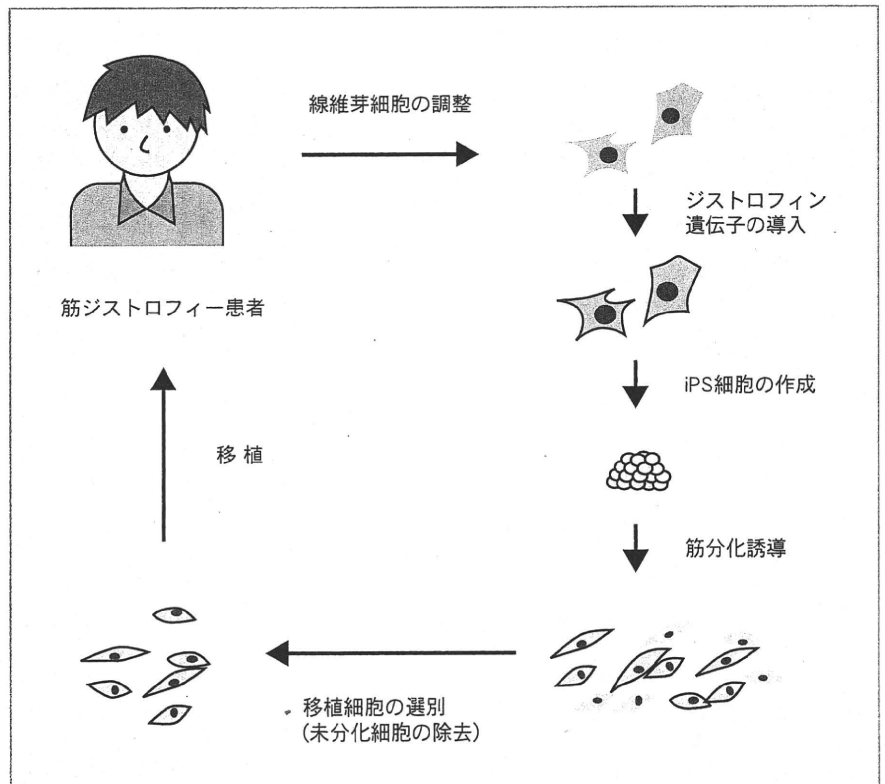


図 1 Duchenne 型筋ジストロフィーに対する iPS 細胞を用いた移植治療
患者由来の iPS 細胞に正常なジストロフィン遺伝子を導入後, iPS 細胞を樹立し, 筋分化誘導し, 患者へ移植する細胞治療法。効率よい筋分化誘導法と, 腫瘍形成能をもつ細胞の除去が課題である。

ロフィンの発現を回復させ、筋収縮力の改善を確認したという報告があり⁶⁾、ヒト iPS 細胞でも近い将来、効率よく筋分化誘導する方法が確立されると期待できる。

おわりに

iPS 細胞の筋ジストロフィーに対する臨床応用が期待されるが、その前に克服すべき問題がいくつかある。特に

ヒト iPS 細胞を骨格筋細胞系譜へ分化誘導する方法の開発には、まだまだ時を要すると思われる。骨格筋発生における Pax3, Pax7 の役割の解明、生後の筋成長や再生に中心的役割を果たす筋衛星細胞の維持、増殖・分化、自己複製の分子メカニズムの解明を進めることが大事であり、再生医療への早道なのかもしれない。

References

- 1) Hoffman EP et al : *Cell* 51 : 919-928, 1987
- 2) Yokota T et al : *Ann Neurol* 65 : 667-676, 2009
- 3) Sampaolesi M et al : *Nature* 444 : 574-579, 2006
- 4) Takahashi K, Yamanaka S : *Cell* 126 : 663-676, 2006
- 5) Park IH et al : *Cell* 134 : 877-886, 2008
- 6) Darabi R et al : *Nat Med* 14 : 134-143, 2008

筋ジストロフィー*

鈴木友子¹⁾ 武田伸一¹⁾

Key Words : 筋ジストロフィー, 筋衛星細胞, 骨格筋, iPS 細胞, 骨格筋再生, メソアンギオブラスト

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は, X 染色体上のジストロフィン遺伝子変異により, 骨格筋の細胞質膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンが欠損し, 膜が脆弱性になり, 骨格筋線維が変性・壊死する重症の X 連鎖性の筋疾患である. 幼児期から始まる筋力低下, 動揺性歩行, 登攀性歩行, 仮性肥大を特徴とする.

治療としては, プレドニゾロンやデフラザコートの糖質コルチコステロイド療法が, ある程度 DMD の進行を抑制する. 次世代の治療法としては, ジストロフィン転写産物のスプライシングに重要な配列を標的としたアンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いて, スプライシングパターンを変え, premature stop codon を回避するエクソン・スキッピング法が注目されており, 日本も, 欧米を中心に行われている国際共同試験に参加しようとしている. しかし, アンチセンス・オリゴヌクレオチドの効果は一過性であり, ジストロフィンの発現を維持するには繰り返し投与が必要である. また, 心筋に取り込まれる効率が低いこと, 患者によって用いるアンチセンス配列が異なること, 治療費が高額になることが懸念材料として残っている.

遺伝子治療研究は, 骨格筋での長期発現が可能

なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが主流であり, 骨格筋に親和性のある血清型や systemic delivery に威力を発揮する血清型が用いられてきた. しかし, ヒトでは AAV 抗体を有している人が多く, また, 一度投与すると中和抗体ができるため, 2 度目以降の投与は有効でない. さらに, ベクターに搭載できる外来遺伝子のサイズに制限があり, AAV 単独では DMD の治療法とはなりにくいと考えられる. 一方, 骨格筋は旺盛な再生能力を有しており, 最近の iPS 細胞の出現に刺激されて, 幹細胞を用いた再生医療は DMD の治療法として大いに期待されている.

組織幹細胞による骨格筋再生と筋ジストロフィー

1. 筋衛星細胞

骨格筋には組織特異的幹細胞である筋衛星細胞 (muscle satellite cells) が, 通常は骨格筋線維と共通の基底膜で挟まれて, dormant な状態で存在する. 一旦, 筋が傷害を受けると, 筋衛星細胞は活性化し, 分裂し, 筋芽細胞となり, お互い融合して, あるいは傷ついた筋線維と融合して筋線維を再生する (図 1). また, 生後の筋の成長や, 筋肥大や筋萎縮といった筋の可塑性にも関与している. 筋衛星細胞は, 旺盛な筋再生能を担う主役であるが, その分裂能は無限ではなく, 筋ジストロ

* Muscular dystrophy.

¹⁾ 独立行政法人国立精神・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: ☎187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1

Yuko Suzuki, MD, PhD, Shin'ichi Takeda, MD, PhD: Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

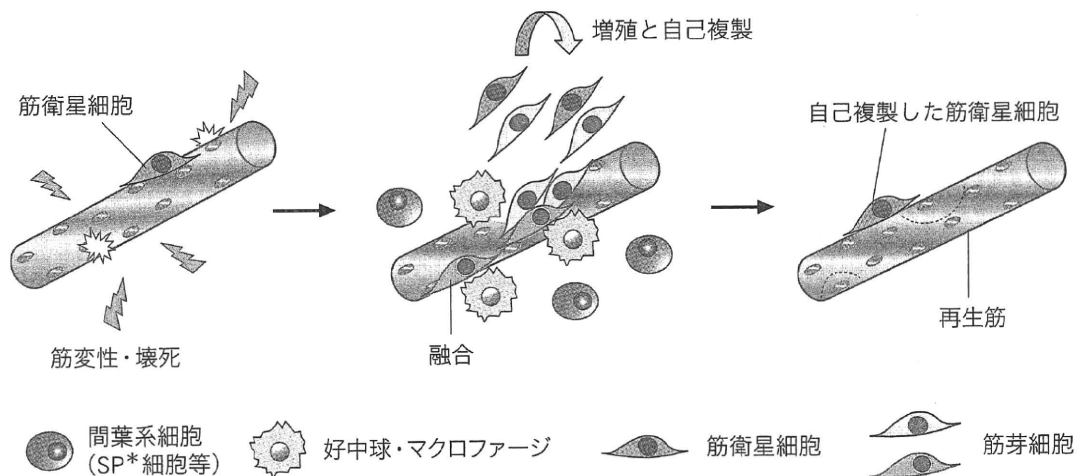


図 1 筋傷害時、活性化され、筋線維を再生する組織特異的幹細胞である筋衛星細胞

筋衛星細胞は通常は dormant な状態で筋線維と基底膜の間に存在するが、筋が傷害されると活性化され、増殖して筋芽細胞となり、傷害された筋線維と融合して、筋線維を再生する。一部は分化せずに筋衛星細胞となる（自己複製）。好中球やマクロファージは壊死線維の除去を行う。間葉系細胞は、筋衛星細胞の増殖や遊走の促進、細胞外マトリックスの再構成に寄与すると考えられる。筋線維再生がうまく進まない状況では、筋組織の線維化や脂肪化の原因になる。

*SP : side population

フィーなどで繰り返し筋衛星細胞が動員されると、徐々に分裂能、分化能を失い、筋再生が変性、壊死に追いつかなくなる。加齢に伴う筋萎縮（サルコペニア）でも、筋衛星細胞の増殖能の低下が一因になっていると考えられる。

2. 筋芽細胞移植

1990年代前半、近親者から得た筋衛星細胞を培養して増殖させた後、DMD患者の骨格筋へ移植する筋芽細胞移植が行われたが、患者の筋力回復は得られなかった。マウスを用いた実験から、その原因として、①培養した筋衛星細胞（筋芽細胞）では、増殖能、分化能が低下していること、②移植直後に多くの筋芽細胞が死んでしまうこと、③移植後筋芽細胞が筋組織内をあまり移動しないこと、などが推察されている。さらに④免疫抑制が不十分であったことも筋芽細胞移植の生着率の低下の原因の一つと推察されている¹⁾。一方、マウスの系では、筋衛星細胞の旺盛な筋再生能も示されており、酵素処理して骨格筋組織をばらばらにする従来の筋衛星細胞の調整法が、著しく再生能を損なっているのではないかという報告もなされている²⁾。筋衛星細胞を治療に応用するためには、さらに筋衛星細胞の調整法や、*in vitro*での培養条件を検討していく必要がある。

現在、筋芽細胞移植は、比較的侵されている筋が限局している眼咽頭型筋ジストロフィー（oculo-pharyngeal muscular dystrophy；OPMD）（<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00773227?term=OPMD%E3%80%81myoblasts&rank=1>）、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（fascio-scapulo-humeral muscular dystrophy；FSHD）などに対して行われており、機能が保たれている筋の生検組織から筋芽細胞を調整し、機能低下の著しい筋へ移植する自家細胞移植治療として応用されつつある。

3. メソアンギオブラスト（mesoangioblast）

近年、血中や骨格筋組織の間質、血管周囲にも、多能性をもち、筋細胞へ分化する幹細胞が数多くあることが報告されている。代表的なものが血管周囲に存在するペリサイト（pericyte；周皮細胞）やメソアンギオブラストである³⁻⁶⁾。筋衛星細胞の筋再生能は非常に高く、筋線維再生において他の細胞に比べて圧倒的に寄与していることは明らかである²⁾。内在性のメソアンギオブラストがどの程度、筋線維の再生に寄与しているかは定かではないが、筋ジストロフィーでは全身の筋が治療の対象であり、局所にしか生着しない筋衛星細胞に対して、経動脈的、経静脈的に骨格筋へ生着し筋線維へ分化すると報告されている幹細胞の利用は

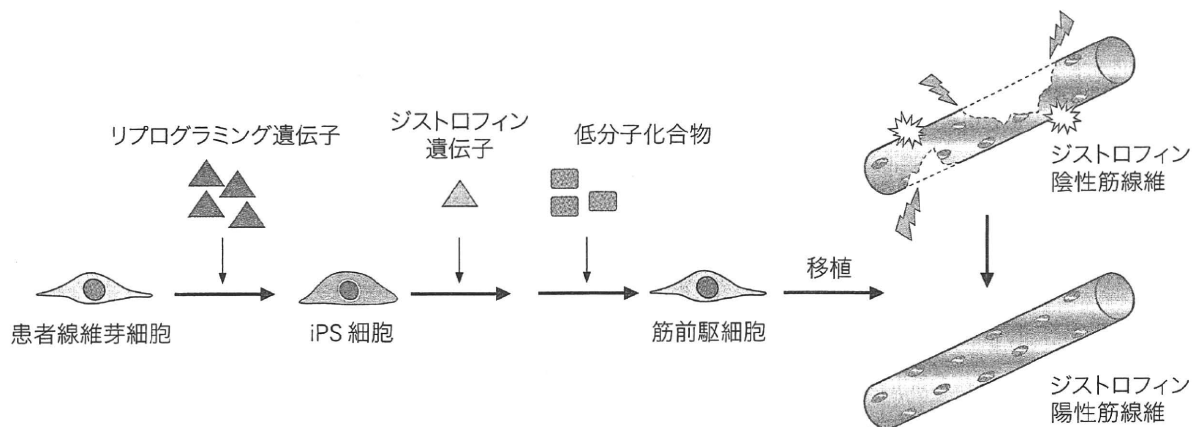


図 2 iPS 細胞を用いた DMD に対する幹細胞移植治療の概念図

患者の体細胞に初期化因子を導入することで iPS 細胞を誘導し、正常なジストロフィン遺伝子を導入後、筋分化を誘導し、患者へ移植する。効率のよい骨格筋系譜への筋分化誘導と、腫瘍形成能をもつ細胞の除去が課題である。

大いに期待される場所である。すでにメソアンギオブラストは、筋ジストロフィー犬への経動脈投与後、全身の骨格筋でジストロフィンの発現を回復させ、筋ジストロフィーの症状を顕著に改善させることが証明されており⁵⁾、成体からも調整可能で、イタリアで phase I の clinical trial の準備が行われている。

4. リプログラミング技術による骨格筋幹細胞の誘導—iPS 細胞の筋ジストロフィー治療への応用

2006 年、京都大学の山中らは、4 つの転写因子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を強制発現させることでマウスの胎児線維芽細胞から、胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES 細胞) に類似した性質をもつ人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) を樹立した⁷⁾。翌年にはヒト線維芽細胞から iPS 細胞が樹立され^{8,9)}、2008 年には 6 歳の DMD 患者と 38 歳の Becker 型筋ジストロフィー (DMD の allelic な疾患。軽症で、通常、小型のジストロフィンの発現がある) の患者の皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立が報告されている¹⁰⁾。患者由来 iPS 細胞は、ヒト人工染色体 (HAC) ベクターを利用した完全長ジストロフィン遺伝子の導入技術と組み合わせることで¹¹⁾、次世代の DMD の自家細胞を用いた細胞移植治療法の細胞源として、期待されている (図 2)。

骨格筋は ES 細胞から誘導されにくい組織の一

つであり、iPS 細胞を筋ジストロフィーの治療に用いる場合においても分化誘導技術の確立が急務である。舌、体幹・四肢の骨格筋の起源は、沿軸中胚葉からできる体節である (図 3)。体節の細胞はこの時期に周囲の組織や器官からさまざまなシグナルを受け取り、筋発生プログラムを進行させていく。最近、マウス ES 細胞では、*Pax3* を *tet-on* の系を用いて強制発現することで、筋前駆細胞を誘導でき、ジストロフィン欠損マウスに移植すると、効率よくジストロフィンの発現を回復させ、筋収縮力が改善したという報告がなされた¹²⁾。ヒト iPS 細胞での応用はまだ報告されていないが、将来、ヒト iPS 細胞でも効率よく筋分化誘導する方法が確立されると期待される。われわれは、*Pax3* に代わる低分子化合物を用いて筋細胞系譜への分化誘導を試みている。

MyoD によって線維芽細胞を筋細胞へ conversion する方法

MyoD などを用いて線維芽細胞を筋細胞へダイレクトにリプログラミングする方法も試みられている¹³⁾。MyoD は basic helix-loop-helix 構造をもつ骨格筋特異的転写因子で、非筋細胞に導入すると、強力に骨格筋への分化を誘導する。Kimura ら¹³⁾は、単離した筋ジストロフィーマウスの線維芽細胞にタモキシフェン制御下で MyoD を発現するカセットと骨格筋特異的なヒト skeletal α -

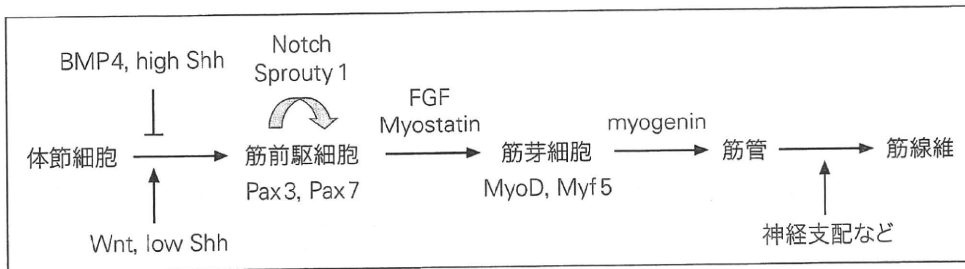
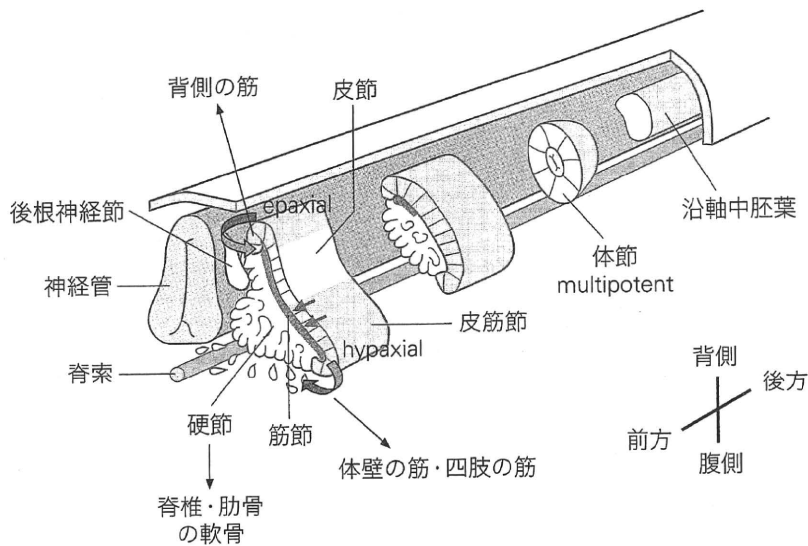


図3 体幹・四肢の骨格筋細胞の発生と分化(主にマウスを用いた研究から)(文献^{17,18}改変)
 上図: 体節 (somite) は、沿軸中胚葉 (paraxial mesoderm) に由来する中胚葉細胞の塊で、神経管・脊索、側板中胚葉、上皮から分泌される誘導因子 (Shh, Wnt, BMP4, NT3, FGF5 など) に応答している様々な細胞系譜へ分化する。最初 epaxial dermamyotome から細胞が移動してきて初期の筋節 (myotome) ができ、次に hypaxial dermamyotome から細胞が移動してきて筋芽細胞になる。最後に皮筋節 (dermamyotome) から矢印 (⇐) のように Pax3 陽性、Pax7 陽性の筋前駆細胞が移動してくると考えられている。四肢の筋は hypaxial myotome から細胞が移動していき、筋分化することで形成される。
 下図: 筋分化と主な制御因子

actin (HSA) のプロモーターの制御下でマイクロジストロフィン遺伝子を発現するカセットをレンチウイルスベクターで導入し、mdx4cv マウス骨格筋へ移植後、タモキシフェンを投与して fibroblast を筋細胞へ分化誘導すると、多くのジストロフィン陽性筋線維が出現することを示した。しかし、多くの移植細胞が間質で小径の筋管を形成していて、既存の筋線維と融合しておらず、融合する割合を高めることが今後の課題である。

骨格筋再生促進治療

骨格筋再生には、筋衛星細胞以外のいろいろな細胞の関与が必要である。たとえば、好中球・マクロファージの遊走能や貪食機能が低下すると、

正常な筋再生が起こらない¹⁴⁾。また、間質に存在する間葉系細胞も、筋再生時に活性化され、増殖し、いろいろなサイトカインや細胞外マトリックスを産生し、筋衛星細胞の増殖や遊走を促進し、細胞外マトリックスの再構築を行うなど、筋再生を促進する¹⁵⁾。一方、筋の変性・壊死が進行し、筋再生がそれに追いつかなくなり、筋線維が減少した状況では同じ細胞がコラーゲンなどを産生し、fibrosis や脂肪化を促進する¹⁶⁾。これらの間葉系の細胞の筋再生促進能力を最大限に高めるような薬剤の開発が骨格筋の再生医療の成功に必要である。

おわりに

多能性幹細胞の筋ジストロフィーに対する臨床応用が期待されるが、その前に明らかにしていくべき点が多く残されている。特に iPS 細胞を骨格筋細胞系譜へ分化誘導する方法の開発には、まだ時間を要すると思われる。生後の筋成長や筋肥大、筋再生に中心的役割を果たす筋衛星細胞の活性化、増殖・分化、自己複製の制御機構の解明を進めることが、再生医療への早道かもしれない。

文献

- 1) Mouly V, et al : Myoblast transfer therapy : is there any light at the end of the tunnel?. *Acta Myol* **24** : 128-133, 2005
- 2) Collins CA, et al : Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* **122** : 289-301, 2005
- 3) Minasi MG, et al : The meso-angioblast : a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* **129** : 2773-2783, 2002
- 4) Sampaolesi M, et al : Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* **301** (5632) : 487-492, 2003
- 5) Sampaolesi M, et al : Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* **444** (7119) : 574-579, 2006
- 6) Dellavalle A, et al : Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* **9** : 255-267, 2007
- 7) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** : 663-676, 2006
- 8) Takahashi K, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 861-872, 2007
- 9) Yu J, et al : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318** (5858) : 1917-1920, 2007
- 10) Park IH, et al : Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* **134** : 877-886, 2008
- 11) Hoshiya H, et al : A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4 Mb entire human dystrophin gene. *Mol Ther* **17** : 309-317, 2009
- 12) Darabi R, et al : Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* **14** : 134-143, 2008
- 13) Kimura E, et al : Cell-lineage regulated myogenesis for dystrophin replacement : a novel therapeutic approach for treatment of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **17** : 2507-2517, 2008
- 14) Segawa M, et al : Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res* **314** : 3232-3244, 2008
- 15) Motohashi N, et al : Muscle CD31 (-) CD45 (-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am J Pathol* **173** : 781-791, 2008
- 16) Uezumi A, et al : Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* **12** : 143-152, 2010
- 17) Buckingham M, Vincent SD : Distinct and dynamic myogenic populations in the vertebrate embryo. *Curr Opin Genet Dev* **19** : 444-453, 2009
- 18) Buckingham M, et al : The formation of skeletal muscle : from somite to limb. *J Anat* **202** : 59-68, 2003

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

<JUNスペシャル>

「治る力」を引き出す 実践! 臨床栄養

編集 東口高志

●AB判 頁312 2010年
定価3,780円(本体3,600円+税5%)
[ISBN978-4-260-01030-6]

「どの栄養素を?」「どれだけ?」「どこから?」「どのように?」はもちろん、栄養サポートの基本の「なぜ?」がこの1冊でわかる臨床栄養ガイドの決定版。アセスメントやモニタリングではとくに何をみたらいいの? 輸液・栄養剤投与を安全確実に実施するには? 合併症やトラブルの予防・対策は? などなど、NST活動のみならず、「毎日の栄養管理」にも役に立つ実践の書です。患者さんの「治る力」「生きる力」を引き出す仕組みをビジュアルに解説しました。

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

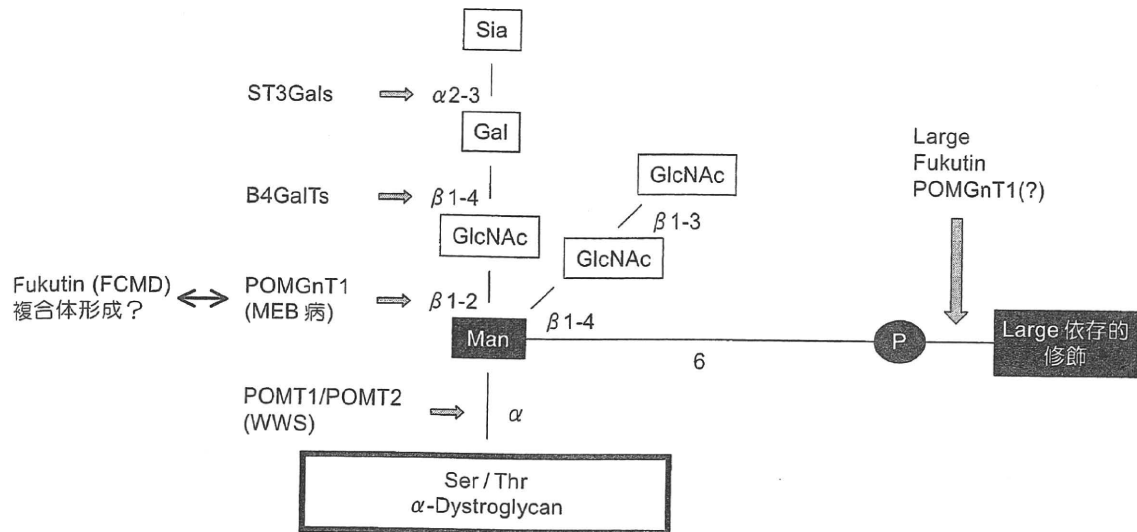


図1 α -DG の O-マンノース型糖鎖の構造と糖転移酵素

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 FKRP (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 POMT1⁶⁾ および POMT2⁷⁾ 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

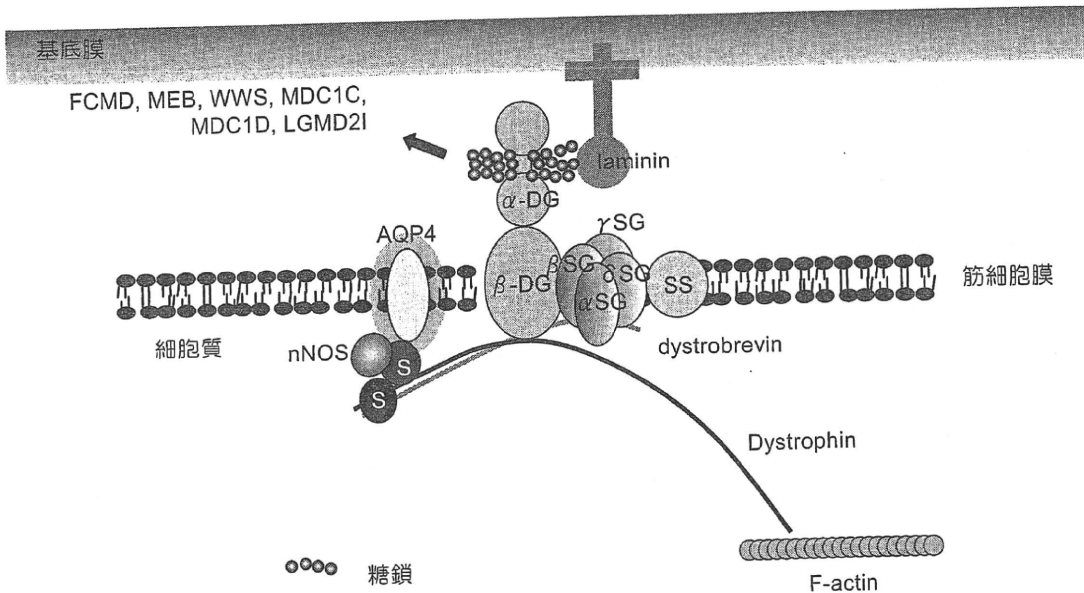


図2 dystroglycanはジストロフィン・糖タンパク質複合体 (DGC) の主要な構成成分で、基底膜と細胞骨格を結合させ、骨格筋膜を安定化させている

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⁾。

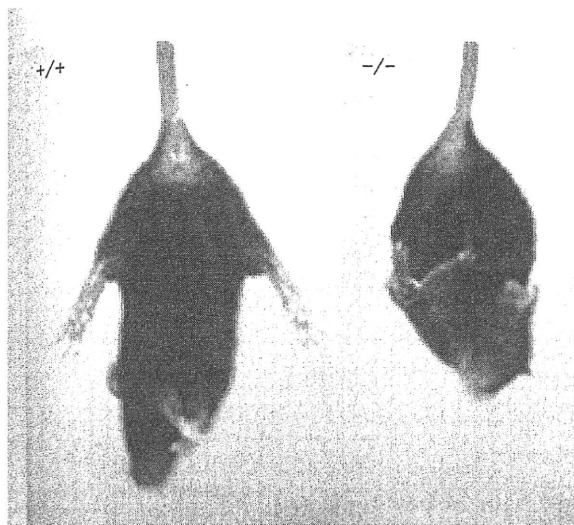


図3 POMGnT1 欠損マウス

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。我々とは別個に、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、大脳の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状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., Kanasaki H., Kudo A., Many 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., Manya 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)

