

テロ接合体である。

フクチンは、461 アミノ酸からなる分子量 53.7kD の蛋白であり、N 末に膜貫通部位を持つ。抗フクチン抗体は発現量の少ない内在性フクチンを検出できないが、細胞に強制発現させるとフクチンはゴルジ体に認められる³⁾。相同性を示す既知の蛋白やモチーフ検索から、糖鎖修飾に関する蛋白である可能性が示唆されている。

2. ジストログリカンの糖鎖修飾異常 「 α ジストログリカノパチー」

ジストロフィン糖蛋白質複合体の中の α ジストログリカンは高度に糖鎖修飾を受け、基底膜成分のラミニンと O 型糖鎖を介して結合している。ラミニンとの結合に重要な糖鎖は、哺乳類では珍しい O-マンノース型糖鎖 (Sia \cdot 2-3Gal \cdot 1-4GlcNAc \cdot 1-2Man) である。 α ジストログリカンを介した基底膜と細胞骨格の一連のつながりは、骨格筋の収縮弛緩による機械的負荷に対して筋形質膜を保護している。

先天性筋ジストロフィーに、II 型滑脳症、眼奇形を伴う筋眼脳病 (Muscle-Eye-Brain disease; MEB 病) は、その病変部位、症状の類似性から FCMD と類縁疾患と考えられている。我々と東京都老人研の遠藤らは、MEB 病が α ジストログリカンの O-マンノースに GlcNAc を付加する新規の糖転移酵素 POMGnT1 の異常により発症する疾患であることを見出した⁴⁾。筋ジストロフィーの原因遺伝子として糖転移酵素が同定され、実際に患者で変異が確認されたのは初めてのことである。

その後、 α ジストログリカンの糖鎖異常をみとめる筋ジストロフィー (Walker-Warburg 症候群; WWS, 先天性 IC 型, 1D 型, 肢帯型 2I) と原因遺伝子 (POMT1, POMT2, FKR1P, LARGE) が相次いで報告され⁵⁾、これら疾患群を総称する「 α ジストログリカノパチー」という概念ができた。

FCMDをはじめ、これらの疾患群では、 α ジストログリカンの糖鎖修飾異常の結果、ラミニンなどの細胞外基質との結合能が低下し、基底膜と細胞骨格のつながりが破綻するために筋ジストロフィーが発症すると考えられる⁶⁾。

3. FCMD はスプライシング異常症である

今回我々は FCMD の根本的治療法につながる分子メカニズムと治療法を発見した²⁾。フクチンは 10 個のエクソンと長い 3' 非翻訳領域 (3' -UTR) をもつ。殆どの FCMD 患者は、原因遺伝子の 3' 非翻訳領域に SVA 型レトロトランスポゾン (以降 SVA) の挿入を持つ。過去のデータではノザンハイブリダイゼーション法では患者のフクチン mRNA は検出されなかった³⁾。そこで今回我々は、フクチン内の全エクソン, SVA 挿入配列, 及び 3' -UTR 領域の全域にわたる発現解析を再度検証し対照と比較した。その結果、フクチンの 5' 側の翻訳領域部分, 及び 3' -UTR のうち SVA 挿入配列 3' 側の遺伝子発現は対照と患者間で殆ど変化がない一方、その配列に挟まれる領域での遺伝子発現は患者でのみ激減していた。よって、患者の mRNA では翻訳領域及び SVA の挿入のあいだのどこかでスプライシングが起きているのではないかと考えられる。

そこで、発現の激減している配列をはさむ部分に PCR プライマーを設計し、患者及び対照の mRNA 由来の cDNA を鋳型に PCR を行ったところ患者特異的に対照よりも短い遺伝子産物を検出した。この遺伝子産物の塩基配列の解析より、やはり患者ではフクチン mRNA が異常なスプライシングを受けていたことがわかった (図 1A)。

この異常スプライシングは、SVA 挿入配列内に存在する強力なスプライシング受容部位が、蛋白質をコードする最終エクソン内の潜在的なスプ

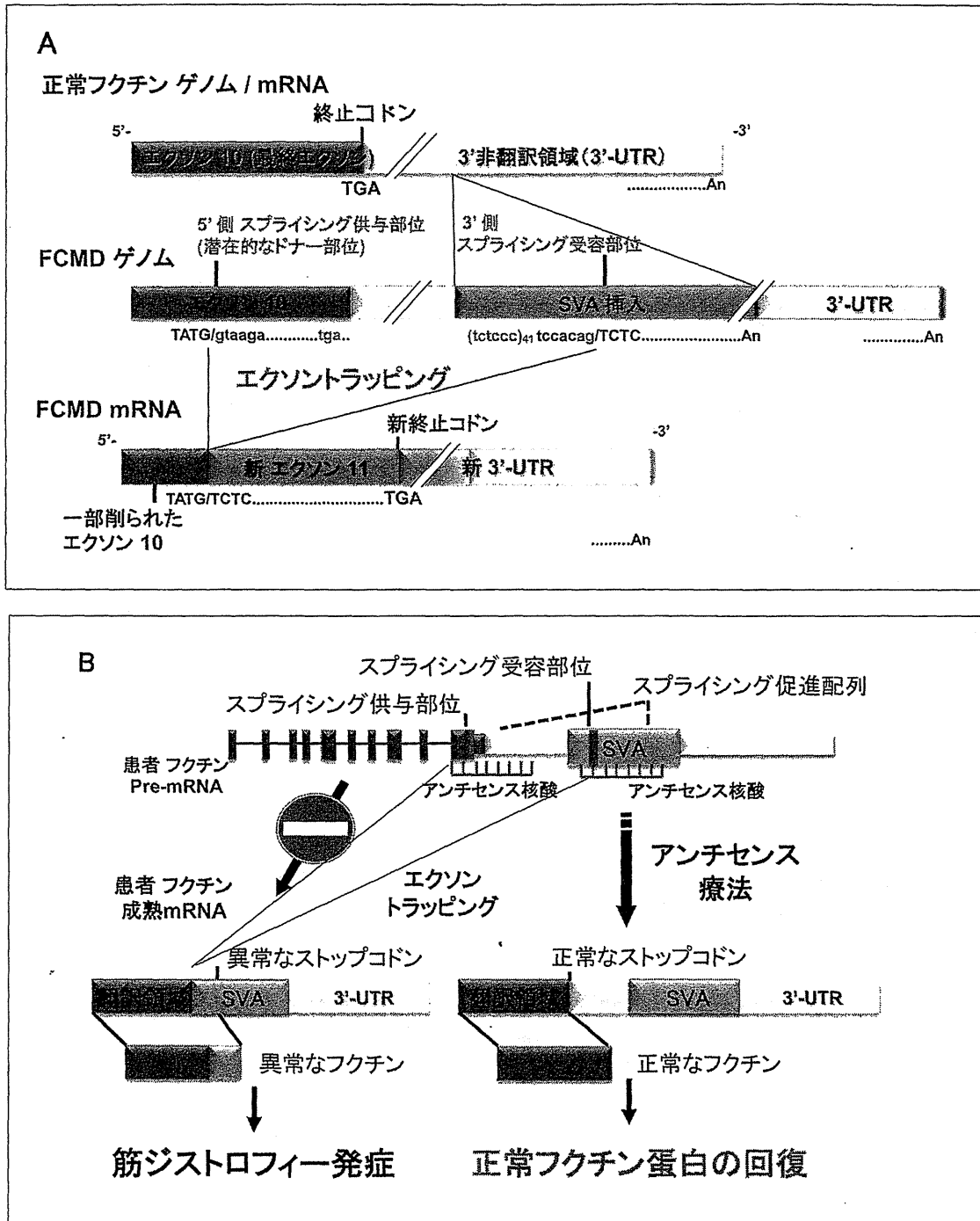


図1 FCMDのSVA型レトロトランスポゾン挿入によるエクソントラッピングがもたらすスプライシング異常とアンチセンス治療の構想

- A FCMDではSVA内の強力な3'側スプライシング受容部位により最終エクソン内の潜在的ドナー部位が強力に活性化されエクソントラップが起きスプライシング異常を引き起こす
- B 異常スプライシングを促進する配列に相補的なアンチセンス核酸を設計し、スプライシング配列をマスクすることにより異常スプライシングを阻止する

ライシング供与部位を新たに活性化すること（エクソントラッピング）が原因となっていた²⁾。新たにスプライシング供与部位となった配列は、もともとは最終エクソン内に存在するために使われることのなかった、いわば眠っていたスプライシング供与部位であったのだが、SVAのエクソントラッピング機能により揺り起こされ、遺伝子の「切り取り」が生じたのである。次にこの異常スプライシング由来の配列をもつコンストラクトを作成し、HeLa細胞へ導入し強制発現させたところ、スプライシング由来のフクチンの局在が、正常において見られるゴルジ体局在から小胞体へ変化していた。これらより、FCMDはSVAのエクソントラップ機能がもたらすスプライシング異常症であることが証明された（図1A）²⁾。

4, FCMD に対するアンチセンス療法

SVAが挿入された患者のフクチン遺伝子は、異常スプライシングさえ受けなければ、正常のフクチンをコードする正常なエクソン配列を体内に持っている。そこで、この異常スプライシングを阻止する目的で、異常スプライシングの標的配列に対し、アンチセンス核酸を pre-mRNA レベルで結合させ、正常なスプライシングに戻す、「アンチセンス療法」が有効ではないかと考えられる。そこで、これらの標的配列に対し有効なアンチセンス核酸を網羅的に設計し、さまざまな細胞系に投与しスプライシングの是正を検討し、3種のアンチセンス核酸のカクテル (acceptor, enhancer, donor にちなんで AED カクテルと命名) を選び出した (図1B)。

次に我々はビボモルフォリノ (Octa-Guanidine Morpholino: VMO) というアンチセンス核酸を用い、AED カクテルをモデル動物及び患者細胞に投与し治療効果を検討した。患者筋芽細胞に対し、

AED カクテルを投与したところ、非投与マウスと比較し、糖鎖の回復を示唆する糖化型 α DG の劇的な増加がみられた (図2A)²⁾。また尾静脈経由のモデルマウスへの AED カクテル全身投与においても、Oマンノース型糖鎖の劇的な回復がみられた (図2B)²⁾。最後に、患者由来筋芽細胞を使い AED カクテル投与によるラミニン凝集アッセイを行った。患者筋芽細胞では筋管での α DG の発現は激減している。しかし AED カクテル投与により、患者由来の筋管は α DG の糖鎖が正常レベルに回復し、正常と同程度の典型的なラミニンの凝集が観察された²⁾。これらの結果は AED カクテル投与により、筋管が機能的にも回復したことを示唆する。

5, エクソントラップ阻害療法

アンチセンス核酸を用いたスプライシング操作を標的とした治療法の一つに、もっとも頻度の高い筋ジストロフィーであるデュシャンヌ型筋ジストロフィーをベッカー型にするエクソンスキップ療法があげられる。この治療法は現在国際治験が進行しており最も実現可能な治療薬剤として注目されている (他項参照)⁷⁾。

今回我々が開発した方法はエクソンスキップ療法とは原理も異なり、「エクソントラップ阻害療法」とでも命名できよう。本邦 FCMD の根本的分子標的治療に道をひらくものである²⁾。また、デュシャンヌ型と異なり、患者のほとんどが同じ変異なので、FCMD に対するアンチセンス療法は、日本のすべての FCMD の患者を対象に同一の方法で行えるものであり有望である。国際治験中のデュシャンヌ型エクソン 52 欠失は患者の 10% であり、FCMD 患者数をデュシャンヌ型の 1/3 としても、日本での治療対象者は福山型の方が多い、と思われる

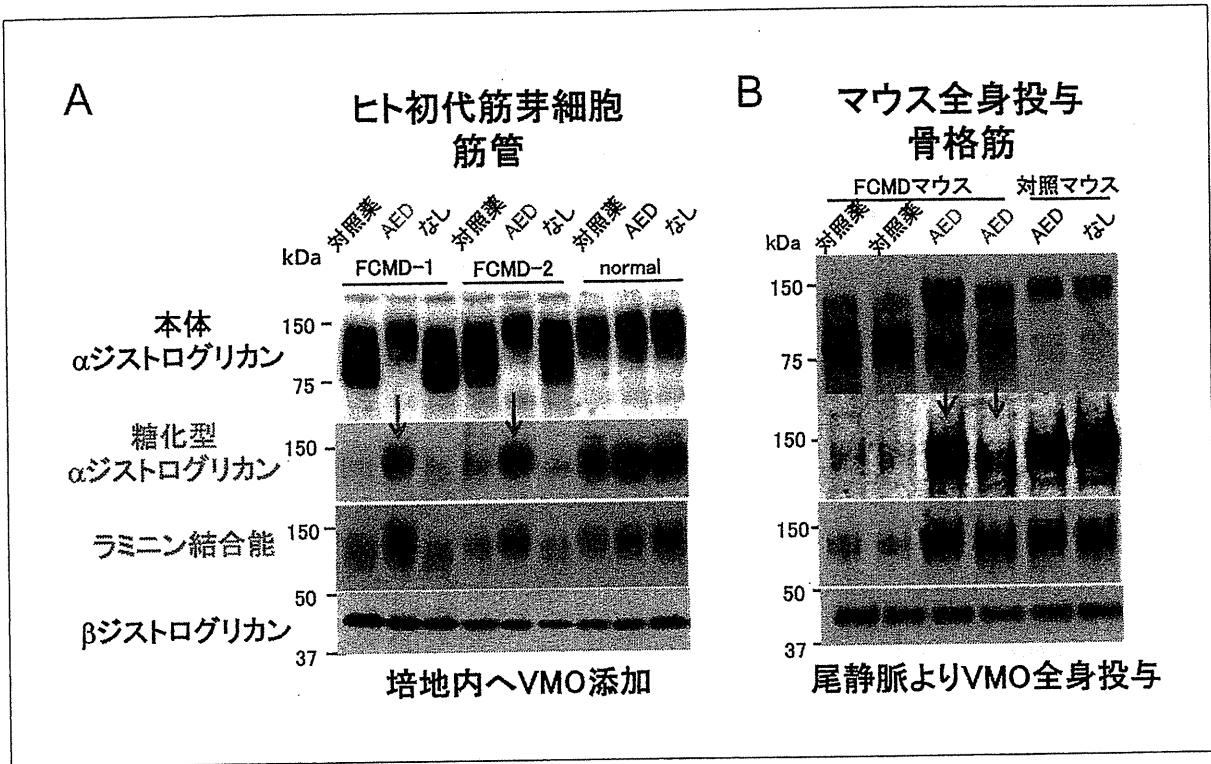


図2 FCMDに対するAEDカクテル療法によりヒト筋管及びマウス骨格筋において
α-DGの糖化及びラミニン結合能が回復²⁾

- A ヒト初代筋芽細胞より分化させた筋管のウエスタンブロットティング。糖化型α-DG (矢印) 及び laminin 結合能が回復した。
- B マウス骨格筋のウエスタンブロットティング。尾静脈よりAEDカクテルを全身投与。糖化型α-DG (矢印) 及び laminin 結合能が回復した。

る。至適配列や毒性の有無の問題など、まだ越えねばならぬ点はあるが、今後臨床試験の実現を目指したい。

文 献

- 1) Fukuyama Y, Osawa M, Suzuki H. Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type - clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev* 1981; 3: 1-29.
- 2) Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, *et al.*: Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 2011; 478: 127-31.
- 3) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, *et al.*: An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998; 394: 388-92.
- 4) Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, *et al.*: Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001; 1: 717-24.
- 5) Kanagawa M, Toda T: The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *J Hum Genet* 2006; 51: 915-26.
- 6) Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, *et al.*: Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 2002; 418: 417-21.
- 7) Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, *et al.*: Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2011; 364: 1513-22.

特 集 遺伝性筋疾患の新たな治療戦略

福山型筋ジストロフィーの 新たな病態とアンチセンス療法*

● 戸田達史** / 谷口-池田真理子**,** / 小林千浩**

Key Words : Fukuyama muscular dystrophy, dystroglycanopathy, exon trapping, antisense-therapy

フクチン遺伝子と福山型の
幅広い臨床スペクトラム

はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama congenital muscular dystrophy : FCMD) は1960年福山らにより発見された常染色体劣性遺伝疾患である。わが国の小児期筋ジストロフィー中ではDuchenne型の次に多く、日本人の約90人に1人が保因者とされる。日本に1,000~2,000人位の患者が存在すると推定され、日本人特有の疾患とされていたが、近年海外からの報告が相次いでいる。本症は重度の筋ジストロフィー病変とともに、多小脳回を基本とする高度の脳奇形(敷石(2型)滑脳症)が共存し、さらに最近では、近視、白内障、視神経低形成、網膜剥離などの眼症状も注目されている。すなわち、本症は遺伝子異常により骨格筋-眼-脳を中心に侵す一系統疾患である¹⁾。われわれは最近、福山型筋ジストロフィーの根本的治療法につながる分子メカニズムと治療法を発見した²⁾。本稿では、福山型の新たな分子病態、治療戦略を中心に解説する。

われわれはポジショナルクローニングにより原因遺伝子を同定し、遺伝子産物をフクチンと命名した³⁾。正常型のフクチンcDNAは約7kbで、骨格筋、心筋、脳で優位に発現している。ほとんどの患者ゲノムDNAでみられた約3kbの挿入配列は、この遺伝子の3'非翻訳領域に挿入されていた「利己的」な動く遺伝因子であるSVA型レトロトランスポゾンであった。古代から伝わったレトロトランスポゾンがヒトの遺伝性疾患の原因であることがわかったのは世界で初めてである。

フクチンは、461アミノ酸からなる分子量53.7kDの蛋白であり、N末に膜貫通部位を持つ。抗フクチン抗体は発現量の少ない内在性フクチンを検出できないが、細胞に強制発現させるとフクチンはGolgi体に認められる³⁾。相同性を示す既知の蛋白やモチーフ検索から、糖鎖修飾に関する蛋白である可能性が示唆されている。

日本人患者のほとんどすべては、レトロトランスポゾン挿入型染色体のホモ接合体、または挿入型染色体と他の変異(フレームシフト、ノンセンス、ミスセンスなど)との複合ヘテロ接合体である。挿入変異ホモ接合の患者と比べ、複合

* Pathogenic exon-trapping and antisense-therapy for Fukuyama muscular dystrophy.

** Tatsushi TODA, M.D., Ph.D., ***Mariko TANIGUCHI-IKEDA, M.D., Ph.D. & Kazuhiro KOBAYASHI, Ph.D.: 神戸大学大学院医学研究科神経内科学/分子脳科学, ***小児科こども急性疾患学(〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1); Departments of Neurology/Molecular Brain Science and ***General Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan.

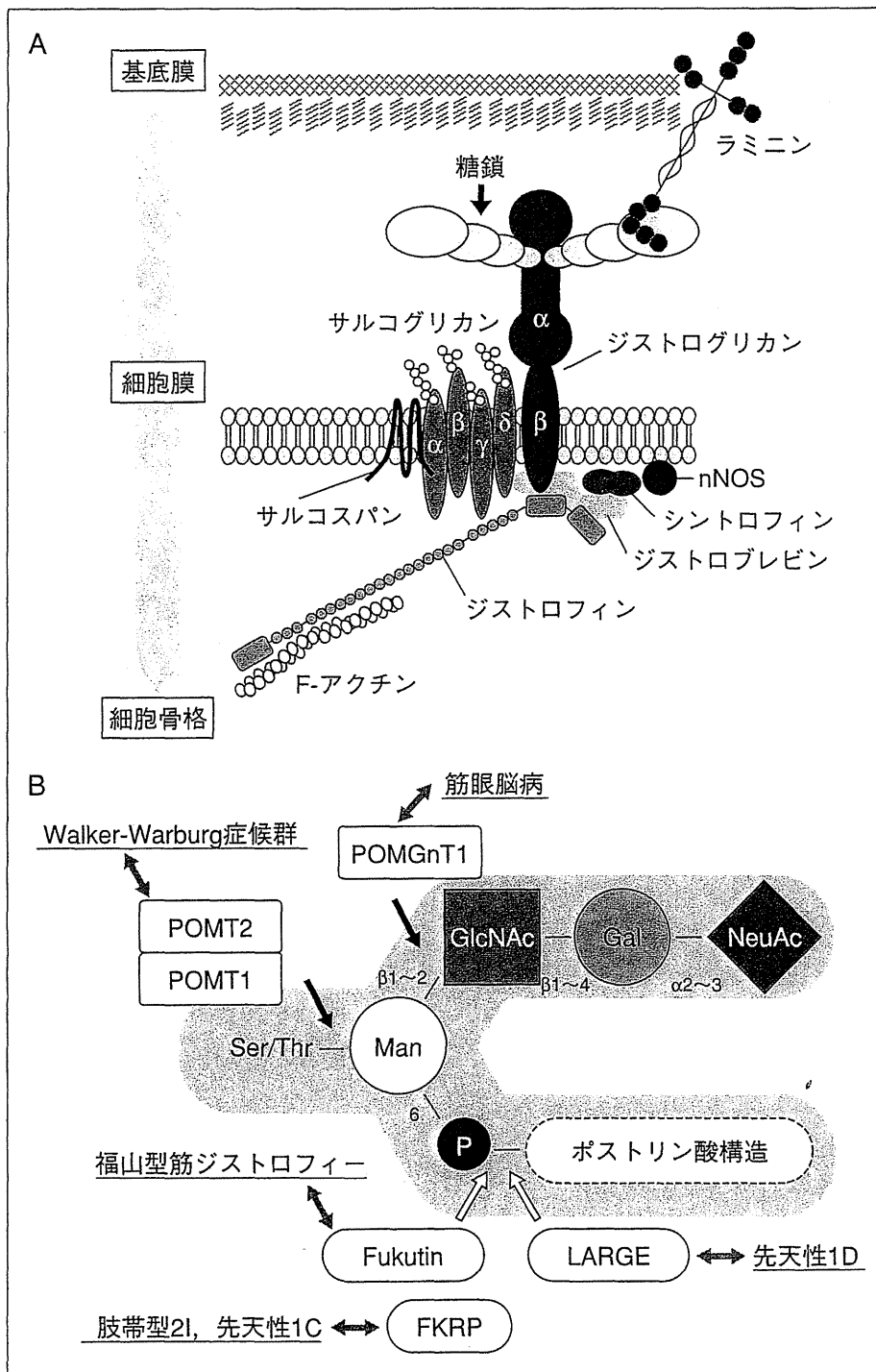


図1 筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体と α ジストログリカンの糖鎖修飾異常を発症要因とする疾患群「 α ジストログリカノパチー」

ヘテロ接合の患者は、水頭症、小眼球などを示す重症な場合⁴⁾と、心筋症と軽度筋力低下、知能正常の臨床的には肢帯型を示す例の報告もある⁵⁾。点変異を2個持つ症例は日本ではいまだ報告がないが、海外からはきわめて重度のWalker-Warburg症候群様の症状を呈す例や、軽度の肢帯型の例も報告されている⁶⁾。これらは従来の福山型の先天型のイメージを変え、福山型のさらなる広い臨床スペクトラムを考えさせる。

ジストログリカンの糖鎖修飾異常と最近の話題

ジストロフィン糖蛋白質複合体の中の α ジストログリカンは高度に糖鎖修飾を受け、基底膜成分のラミニンとO型糖鎖を介して結合している(図1-A)。ラミニンとの結合に重要な糖鎖は、哺乳類では珍しいO-マンノース型糖鎖(Sia₂-3Gal₁-4GlcNAc₁-2Man)である。 α ジストログ

リカンを介した基底膜と細胞骨格の一連のつながりは、骨格筋の収縮弛緩による機械的負荷に対して筋形質膜を保護している。

先天性筋ジストロフィーに、II型滑脳症、眼奇形を伴う筋眼脳病(muscle-eye-brain disease: MEB病)は、その病変部位、症状の類似性からFCMDと類縁疾患と考えられている。われわれと東京都老人研の遠藤らは、MEB病が α ジストログリカンのO-マンノースにGlcNAcを付加する新規の糖転移酵素POMGnT1の異常により発症する疾患であることを見出した⁷⁾。筋ジストロフィーの原因遺伝子として糖転移酵素が同定され、実際に患者で変異が確認されたのは初めてのことである。

その後、 α ジストログリカンの糖鎖異常を認める筋ジストロフィー(Walker-Warburg症候群: WWS, 先天性1C型, 1D型, 肢帯型2I)と原因遺伝子(*POMT1*, *POMT2*, *FKRP*, *LARGE*)が相次いで報告され⁸⁾、これら疾患群を総称する「 α ジストログリカノパチー」という概念ができた。FCMDをはじめこれらの疾患群では、 α ジストログリカンの糖鎖修飾異常の結果、ラミニンなどの細胞外基質との結合能が低下し、基底膜と細胞骨格のつながりが破綻するために筋ジストロフィーが発症すると考えられる⁹⁾。

ところで、ラミニン結合にかかわる糖鎖として、Sia₂₋₃Gal₁₋₄GlcNAc₁₋₂Manに加え、最近、O-マンノシル糖鎖にはリン酸基を介した側鎖構造があり、リン酸基より先の修飾もラミニン結合に必要であることが報告された(図1-B)¹⁰⁾。この構造の合成には*LARGE*が関与することが示されているが、興味深いことに、FCMD患者由来の細胞でもホスホジエステル結合を介した構造が欠如している。詳細な構造同定に加え、この修飾におけるフクチンの役割の解明が急がれる。また、われわれはfukutin-related protein (FKRP)モデルマウスでもこのホスホジエステル結合を介した構造が欠如していること、さらには正常の肺や精巣組織でも α ジストログリカンのリン酸基を介した側鎖構造が欠如しておりラミニン結合能がないことを示し、この構造が正常組織でもラミニン結合能の決定因子であることを示した¹¹⁾。さらに、最近*vitro*で*LARGE*の酵

素活性が明らかにされ、キシロースとグルクロン酸のリピートをつくる活性があることが示された。このキシロース-グルクロン酸リピートが天然の α ジストログリカンに存在するかは不明であるが、少なくともキシロースはラミニン結合活性に必要である¹²⁾。

FCMDはスプライシング異常症である

ところで、今回われわれはFCMDの根本的治療につながる分子メカニズムと治療法を発見した²⁾。フクチンは10個のエクソンと長い3'非翻訳領域(3'-UTR)を持つ。ほとんどのFCMD患者は、原因遺伝子の3'非翻訳領域にSVA型レトロトランスポゾン(以降、SVA)の挿入を持つ。過去のデータではノザンハイブリダイゼーション法では患者のフクチン mRNAは検出されなかった³⁾。そこで今回われわれは、フクチン内の全エクソン、SVA挿入配列および3'-UTR領域の全域にわたる発現解析を再度検証し対照と比較した。その結果、フクチンの5'側の翻訳領域部分および3'-UTRのうちSVA挿入配列3'側の遺伝子発現は対照と患者間でほとんど変化がない一方、その配列に挟まれる領域での遺伝子発現は患者でのみ激減していた。よって、患者のmRNAでは翻訳領域およびSVAの挿入の間のどこかでスプライシングが起きているのではないかと考えた。

そこで、発現の激減している配列をはさむ部分にPCRプライマーを設計し、患者および対照のmRNA由来のcDNAを鋳型にPCRを行ったところ患者特異的に対照よりも短い遺伝子産物を検出した。この遺伝子産物の塩基配列の解析より、やはり患者ではフクチンmRNAが異常なスプライシングを受けていたことがわかった。

この異常スプライシングは、SVA挿入配列内に存在する強力なスプライシング受容部位が、蛋白質をコードする最終エクソン内の潜在的なスプライシング供与部位を新たに活性化すること(エクソントラッピング)が原因となっていた(図2-A)²⁾。新たにスプライシング供与部位となった配列は、もともとは最終エクソン内に存在するために使われることのなかった、いわば眠っていたスプライシング供与部位であったのであるが、SVAのエクソントラッピング機能により揺り

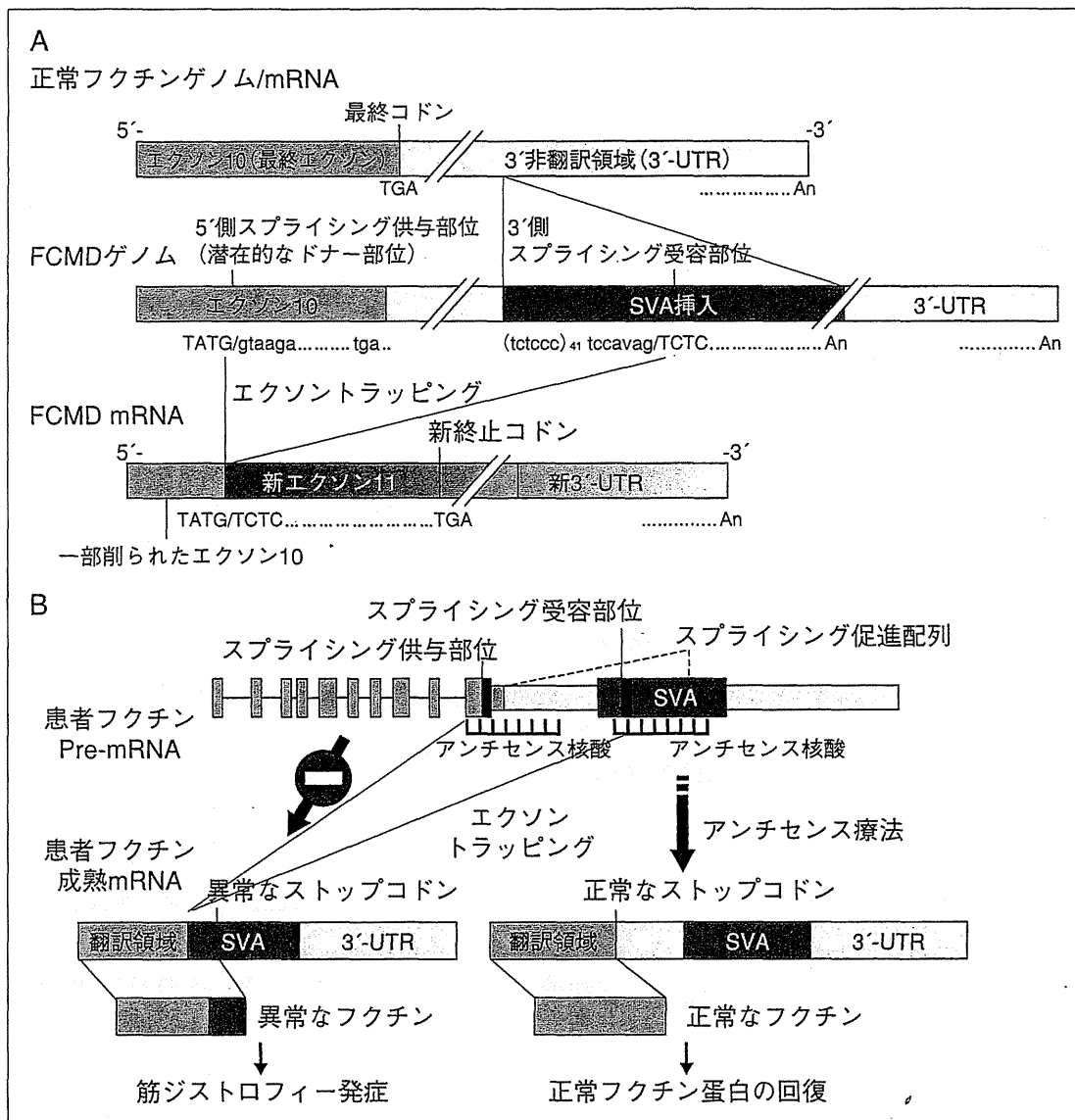


図2 福山型先天性筋ジストロフィーのSVA型レトロトランスポゾン挿入によるエクソントラッピングがもたらすスプライシング異常とアンチセンス治療の構想

A: FCMDではSVA内の強力な3'側スプライシング受容部位により最終エクソン内の潜在的ドナー部位が強力に活性化されエクソントラップが起きスプライシング異常をひき起こす。B: 異常スプライシングを促進する配列に相補的なアンチセンス核酸を設計し、スプライシング配列をマスクすることにより異常スプライシングを阻止する。

起こされ、遺伝子の「切り取り」が生じたのである。次にこの異常スプライシング由来の配列をもつコンストラクトを作成し、HeLa細胞へ導入し強制発現させたところ、スプライシング由来のフクチンの局在が、正常においてみられるGolgi体局在から小胞体へ変化していた。これらより、FCMDはSVAのエクソントラップ機能がもたらすスプライシング異常症であることが証明された²⁾。

SVAによるエクソントラッピングとヒトの進化、多様性、疾患

次にわれわれは、SVA挿入を認めるほかの二つ

の遺伝性疾患、一つは原因遺伝子*LDLRAP1*のイントロン1に約2.6kbのセンス鎖のSVA配列が挿入されている常染色体劣性遺伝性高コレステロール血症、もう一つは原因遺伝子*PNPLA2*のエクソン3内に約1.9kbのセンス鎖のSVA配列の挿入を認める中性脂肪蓄積ミオパチーにおいてFCMDと同様のエクソントラッピングを確認した。また、チンパンジーにはないヒト特異的なSVAのイントロンへの挿入を認める新規遺伝子(*AB627340*)により、エクソントラッピング由来のSVA配列をもつRNAをヒト脳において同定した。

SVAは進化的にもっとも新しいレトロトランス

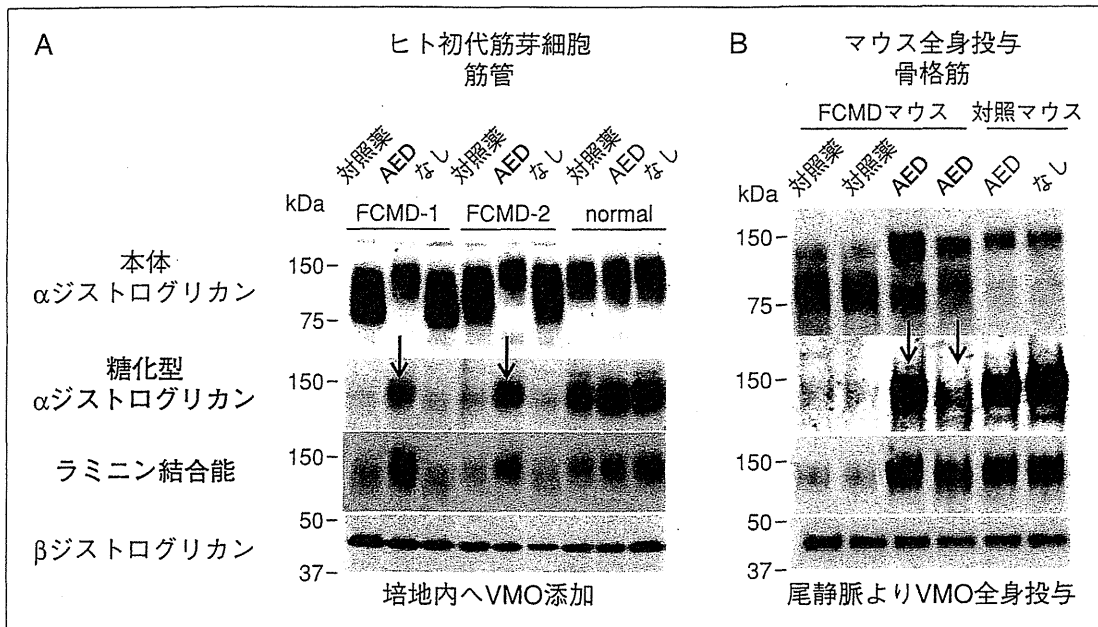


図3 福山型先天性筋ジストロフィーに対するAEDカクテル療法によりヒト筋管およびマウス骨格筋において α DGの糖化およびラミニン結合能が回復

A: ヒト初代筋芽細胞より分化させた筋管のウエスタンブロッティング. 糖化型 α DG(矢印)およびlaminin結合能が回復した. B: マウス骨格筋のウエスタンブロッティング. 尾静脈よりAEDカクテルを全身投与. 糖化型 α DG(矢印)およびlaminin結合能が回復した. (文献²⁾より引用)

ポゾンであり、霊長類に特異的である。そして、ゲノムの中で進化とともにその数が増し、ヒトには約2,700コピー存在するといわれている¹³⁾。SVAがエクソントラッピングにより、新たな機能をヒト脳において獲得し、進化や脳の高次脳機能獲得に関与しているかもしれない。よってエクソントラッピングはヒトの疾患だけでなく進化、多様性にも関与している可能性があり非常に興味深い結果であった²⁾。

FCMDに対するアンチセンス療法

SVAが挿入された患者のフクチンは、異常スプライシングさえ受けなければ、正常のフクチンをコードする正常なエクソン配列を体内に持っている。そこで、この異常スプライシングを阻止する目的で、異常スプライシングの標的配列に対しアンチセンス核酸をpre-mRNAレベルで結合させ、正常なスプライシングに戻す、「アンチセンス療法」が有効ではないかと考えた(図2-B)。そこで、これらの標的配列に対し有効なアンチセンス核酸を網羅的に設計し、さまざまな細胞系に投与しスプライシングの是正を検討し、3種のアンチセンス核酸のカクテル(AEDカクテルと命名)を選び出した。

次にわれわれは、ピボモルフォリノ(octa-guanidine morpholino: VMO)というアンチセンス核酸を用い、AEDカクテルをモデル動物および患者細胞に投与し治療効果を検討した。患者筋芽細胞に対し、AEDカクテルを投与したところ、非投与マウスと比較し、糖鎖の回復を示唆する糖化型 α DGの劇的な増加がみられた(図3-A)²⁾。また、尾静脈経由のモデルマウスへのAEDカクテル全身投与においても、O-マンノース型糖鎖の劇的な回復がみられた(図3-B)²⁾。最後に、患者由来筋芽細胞を使いAEDカクテル投与によるラミニン凝集アッセイを行った。患者筋芽細胞では筋管での α DGの発現は激減している。しかし、AEDカクテル投与により患者由来の筋管は α DGの糖鎖が正常レベルに回復し、正常と同程度の典型的なラミニンの凝集が観察された²⁾。これらの結果はAEDカクテル投与により、筋管が機能的にも回復したことを示唆する。

おわりに

アンチセンス核酸を用いたスプライシング操作を標的とした治療法の一つに、もっとも頻度の高い筋ジストロフィーであるDuchenne型筋ジストロフィーをBecker型にするエクソンスキッ

プ療法があげられる。この治療法は現在国際治療が進行しており、もっとも実現可能な治療薬剤として注目されている(他項参照)¹⁴⁾。今回われわれが開発した方法は、エクソンスキップ療法とは原理も異なり、本邦福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)の根本的分子標的治療に道を開くものである²⁾。また、Duchenne型と異なり、患者のほとんどが同じ変異なので、FCMDに対するアンチセンス療法は、日本のすべてのFCMDの患者を対象に同一の方法で行えるものであり、有望である。今後、医療応用の実現を目指したい。

文 献

- 1) Fukuyama Y, Osawa M, Suzuki H. Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type—clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev* 1981 ; 3 : 1-29.
- 2) Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, et al. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 2011 ; 478 : 127-31.
- 3) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998 ; 394 : 388-92.
- 4) Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, et al. Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy(FCMD). *Hum Mol Genet* 1999 ; 8 : 2303-9.
- 5) Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, et al. Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann Neurol* 2006 ; 60 : 597-602.
- 6) Godfrey C, Clement E, Mein R, et al. Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain* 2007 ; 130 : 2725-35.
- 7) Yoshida A, Kobayashi K, Many H, et al. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001 ; 1 : 717-24.
- 8) Kanagawa M, Toda T. The genetic and molecular basis of muscular dystrophy : roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *J Hum Genet* 2006 ; 51 : 915-26.
- 9) Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, et al. Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 2002 ; 418 : 417-21.
- 10) Yoshida-Moriguchi T, Yu L, Stalnakker SH, et al. O-mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding. *Science* 2010 ; 327 : 88-92.
- 11) Kuga A, Kanagawa M, Sudo A, et al. Absence of post-phosphoryl modification in dystroglycanopathy mouse models and wild-type tissues expressing a non-laminin binding form of alpha-dystroglycan. *J Biol Chem* 2012 (in press).
- 12) Inamori K, Yoshida-Moriguchi T, Hara Y, et al. Dystroglycan function requires xylosyl- and glucuronyltransferase activities of LARGE. *Science* 2012 ; 335 : 93-6.
- 13) Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Rev Genet* 2009 ; 10 : 691-703.
- 14) Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, et al. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2011 ; 364 : 1513-22.

* * *

福山型筋ジストロフィーのスプライシング異常に 対するアンチセンス治療

Abnormal splicing and antisense therapy for Fukuyama muscular dystrophy

神戸大学大学院医学研究科神経内科学／分子脳科学／
小児科こども急性疾患学特命助教

谷口(池田)真理子 *Mariko Taniguchi-Ikeda*

神戸大学大学院医学研究科神経内科学／分子脳科学准教授

小林 千浩 *Kazuhiro Kobayashi*

神戸大学大学院医学研究科神経内科学／分子脳科学教授

戸田 達史 *Tatsushi Toda*

Key words : 筋ジストロフィー, スプライシング異常, レトロトランスポゾン, アンチセンス療法, エクソントラッピング

▶ 歴 史 的 背 景 ◀

福山型先天性筋ジストロフィー(Fukuyama-type congenital muscular dystrophy; FCMD)は日本特有の疾患である。筋, 脳, 眼に特異的な症状をきたす常染色体劣性の遺伝性疾患であり, 乳幼児早期から発症する重度の先天性筋ジストロフィー, II型滑脳症や多小脳回などの脳奇形, 精神運動発達遅延やてんかんの合併, および網膜剥離や近視などの眼奇形がみられる。小児の筋疾患の中では日本で2番目に多く, 10代のうちに死に至る重篤な疾患であるがいまだに治療法がない。

われわれのグループは1998年に, FCMDの疾患責任遺伝子であるフクチン遺伝子(fukutin, 9q31)をポジショナルクローニング法により同定した¹⁾。ほとんどのFCMD患者は, フクチン遺伝子の末端側の, タンパク質をコードしない3'非翻訳領域に「動く遺伝子」である約3,000塩基長(3kb)のSVA(Sine-VNTR-*Alu*)型レトロトランスポゾンの挿入型変異を認める¹⁾。この変異は約100世代前, 日本人祖先の1人に生じたとされ, 日本人の88人に1人が保因者で約30,000出生に1人が発症すると考えられている。われわれは, さらに糖転移酵素の遺伝子POMGnT1がFCMDの類縁疾患であ

る muscle-eye-brain 病の原因遺伝子であることを明らかにした²⁾。これら患者の骨格筋では, 細胞膜と基底膜をつなぐ糖タンパク, α -ジストログリカン(α -DG)のO-マンノース型糖鎖修飾に欠損があり, この糖鎖を介する細胞膜-基底膜間の結合が破綻するために重度の筋ジストロフィーが発症することも明らかにされた³⁾。フクチンタンパクはゴルジ体に局在し, 既知の糖転移酵素とのアミノ酸配列相同性より α -DGの糖鎖修飾に関与する糖転移酵素ではないかと考えられているが, その機能を含め未知な点が多い。

▶ 仮 説 ◀

フクチン遺伝子は10個のエクソンと長い3'側非翻訳領域をもつ。過去のデータでは, ノーザンハイブリダイゼーション法では患者のフクチンmRNAは検出されなかった¹⁾。このことよりFCMDの発症機序は, ①SVAの挿入変異が3'非翻訳領域にあるため, フクチンのmRNAが不安定化し分解される, あるいは②レトロトランスポゾンの中のグアニン・シトシンの多い反復配列の影響でDNAがメチル化やヒストン脱アセチル化などの制御を受け, またフクチン遺伝子周辺がエピジェネティックな不活性化を受けるため発現抑制や転写伸長障

害が起こる、などと考えられてきた。しかし、SVA配列はグアニン、シトシンが豊富であるため解析が難しく疾患機序は未解明のままであった。今回、FCMDの病態を解析するため、フクチン遺伝子のそれぞれのエクソン、SVA型レトロトランスポゾンの挿入の周辺領域、および、3'側非翻訳領域の全域にわたり患者のリンパ球におけるフクチン遺伝子のmRNAの発現について定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)法による解析を行い、再度検証して健常人と比較した。その結果、フクチン遺伝子の5'側翻訳領域および3'側非翻訳領域のうち、SVA型レトロトランスポゾンの挿入より3'側の領域のmRNA量は健常人と患者とのあいだではほとんど違いのない一方、その配列に挟まれる領域におけるmRNA量は患者において激減していた。よって、患者のmRNAでは翻訳領域およびSVA型レトロトランスポゾン挿入配列のあいだのどこかでmRNAの「切り取り」である異常スプライシングが起こっているのではないかと考えた。

▶ 新知見の要点 ◀

1. FCMDはスプライシング異常症である

そこで、発現の激減している配列を挟む部分にPCRプライマーを設計し、患者および対照由来RNAよりcDNAを合成しlong-PCRを行った。このlong-PCRはSVA挿入配列がグアニンやシトシン、またリピートも多いため非常に難しく、さまざまな条件設定が必要であったが、予想どおり患者特異的に正常より短い遺伝子産物を検出した。この短い遺伝子産物は患者脳、骨格筋においても検出された。次に、この遺伝子産物を直接シーケンズ法により塩基配列を確認したところ、やはりFCMDで特異的にフクチンmRNAが異常なスプライシングを受けていることが確認された。この異常スプライシングは、SVA挿入配列内に存在する強力なスプライシング受容部位が、タンパク質をコードする最終エクソン内にある潜在的スプライシング供与部位を新たに活性化すること(エクソントラッピング)が原因となっていた

(図1A)。新たにスプライシング供与部位となった配列は、もともとは最終エクソン内に存在するために使われることのなかった、いわば眠っていたスプライシング供与部位であったのだが、SVAのエクソントラッピング機能により揺り起こされ、遺伝子の「切り取り」が生じたのである。以前、ノーザンハイブリダイゼーションを用いた実験でフクチンmRNAが検出できなかった理由として、①異常スプライシングを受けた患者型フクチンmRNAがGC-richなSVA由来の遺伝子産物を含むため高次構造が変化した、あるいは②異常スプライシング由来のフクチンmRNAの泳動度が、偶然にもmRNAの大部分を占めるリボゾームRNAのそれとほぼ一致するため、フクチンプロブのハイブリダイゼーションが阻害され検出されなくなった、などが考えられた。よって今回われわれはまず、フクチンプロブのハイブリダイズに競合する大量のリボゾームRNAをtotal RNAより除去し、RNA泳動時の変性条件を厳しく設定して実験を行った。これらの工夫が効を奏し、正常に比べ短い異常なフクチンmRNAを検出することができた。この異常な「切り取り」を受けたフクチンタンパクは、新生エクソン11となるSVA型レトロトランスポゾン由来の配列を含み、新生終止コドンまでを含めると約552アミノ酸となることが予想された。そこで免疫沈降およびウエスタンブロット法により患者のフクチンタンパクを調べたところ、予想どおり552アミノ酸の分子量に一致する、62.3 KDaの位置に異常スプライシング由来のフクチンタンパクが検出された。次にこの異常スプライシング由来の配列をもつコンストラクトを作成し、HeLa細胞へ導入し強制発現させたところ、スプライシング由来のフクチンの局在が、正常においてみられるゴルジ体局在から小胞体へ変化していた。これらの事実より、FCMDはSVA型レトロトランスポゾンのエクソントラップ機能がもたらすスプライシング異常症であることが証明された。

2. エクソントラッピングとヒトの進化, 選択, 多様性, 疾患の発生

次にわれわれは, SVA 挿入を認める他の遺伝性疾患においてもこの SVA のもつエクソントラッピング機能が疾患の発生に関与するかを検討した。常染色体劣性遺伝性高コレステロール血症において, 原因遺伝子 *LDLRAP1* のイントロン 1 内に約 2.6kb のセンス鎖の SVA 配列が挿入されている症例が報告され, また, 中性脂肪蓄積ミオパチー

においても, 原因遺伝子 *PNPLA2* のエクソン 3 内に約 1.9kb のセンス鎖の SVA 配列の挿入を認める症例が報告されていたが, これらの疾患の病態は未知のままであった。そこでこれら 2 つの疾患の患者由来の遺伝子産物を調べたところ, FCMD と同様の SVA によるエクソントラッピングが認められた。またチンパンジーにはないヒト特異的な SVA 挿入を認める新規遺伝子 *AB627340* のエクソントラッピング由来の遺伝子産物をヒト脳にお

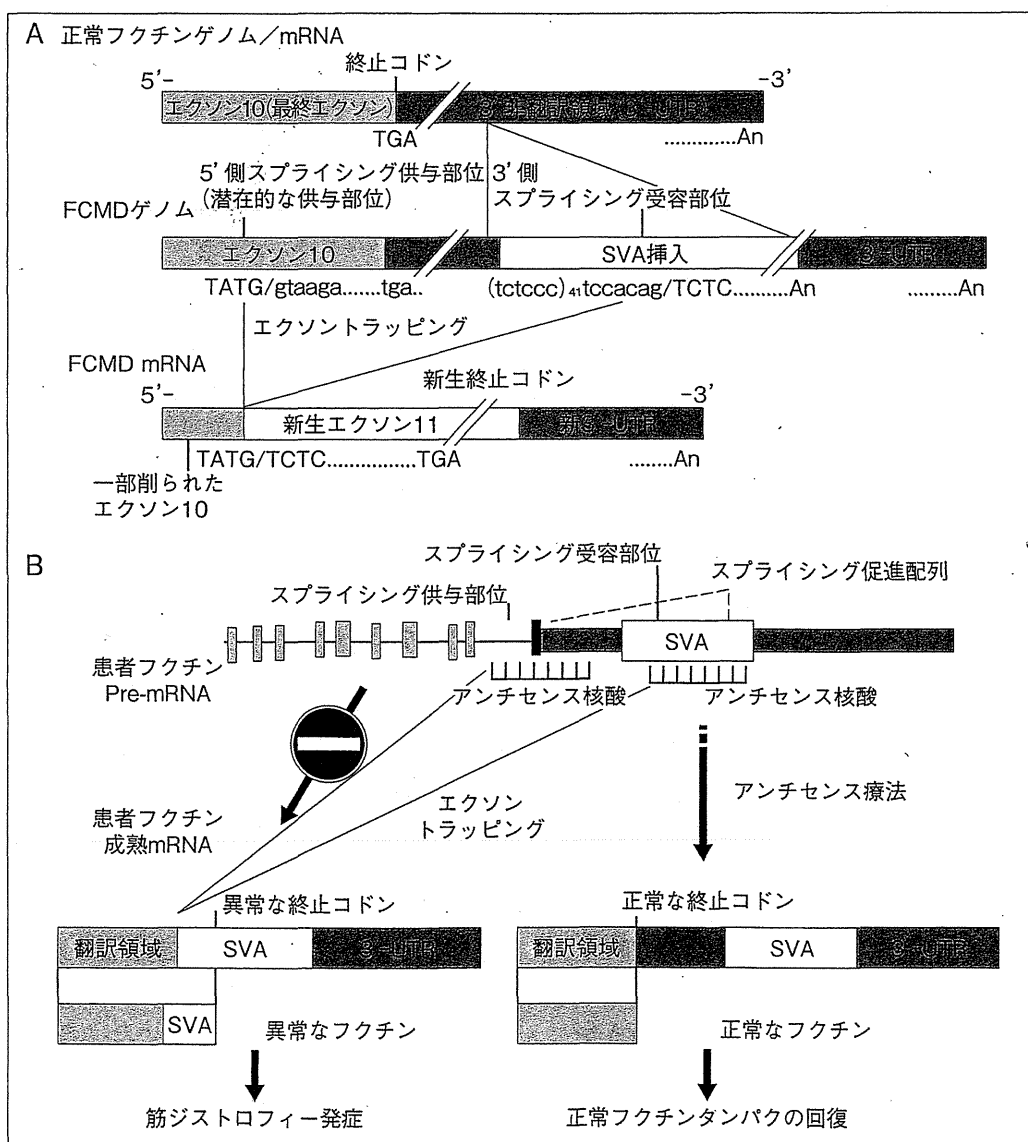


図1. FCMD のスプライシング異常とアンチセンス治療の構想

A: FCMD では SVA 内の強力な 3' 側スプライシング受容部位により最終エクソン内の潜在的供与部位が強力に活性化され, エクソントラップが起きスプライシング異常が引き起こされる。
 B: 異常スプライシングを促進する配列に対し相補的なアンチセンス核酸を設計し, スプライシングを促進する配列をマスクすることにより異常スプライシングを阻止し, 正常タンパクを回復させる。

いて同定した。これらの新規遺伝子由来の機能は未知であるがノンコーディングRNAで、なんらかの機能をもっているのではないかと考えてい

る。SVA型は進化的に最も新しいレトロトランスポゾンであり、霊長類に特異的である。そしてゲノムの中で進化とともにその数が増し、ヒトに

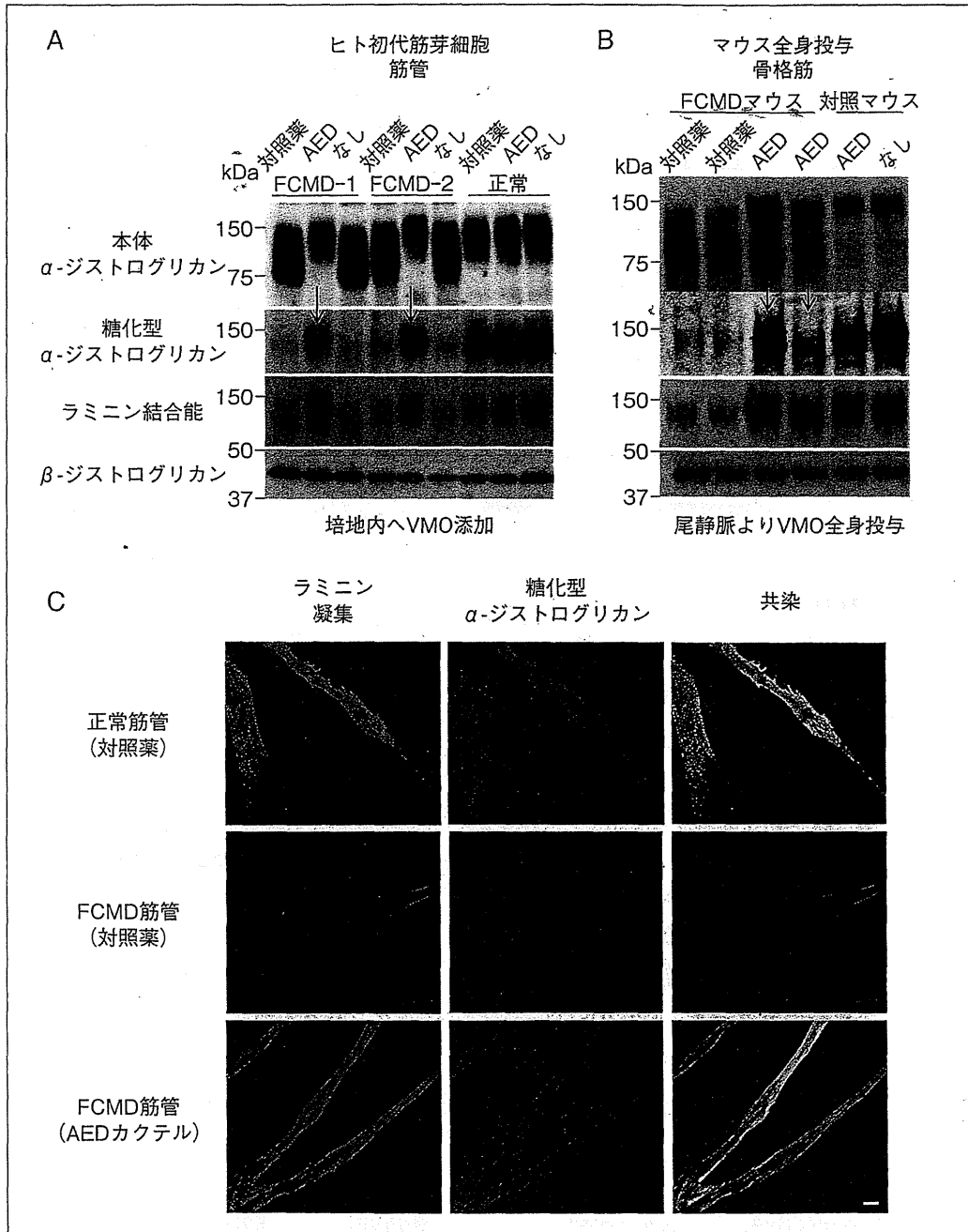


図2. FCMD に対する AED カクテル療法によりヒト筋管およびマウス骨格筋において α -ジストログリカン (α -DG) の糖化およびラミニン結合能が回復した

A: ヒト初代筋芽細胞より分化させた筋管のウエスタンブロッティング。糖化型 α -DG (矢印) およびラミニン結合能が回復した。B: マウス骨格筋のウエスタンブロッティング。尾静脈より AED カクテルを全身投与。糖化型 α -DG (矢印) およびラミニン結合能が回復した。C: ラミニンクラスタリングアッセイの蛍光免疫染色像。正常筋管 (上段), FCMD 筋管に対し対照薬を添加 (中段), FCMD 筋管に対し AED カクテル添加 (下段)。ラミニン凝集 (左), 糖化型 α -DG (中央), 共染 (右)。スケールバー = 20 μ m。

(巻頭グラビア p.12参照)

は約2,700コピー存在するといわれている。この機能がエクソントラッピングにより、さらに新たな機能をヒト脳において獲得し、進化や脳の高次脳機能獲得に関与しているかもしれない。よって、エクソントラッピングはヒトの進化、多様性、疾患に関与している可能性があると考えられる。

3. FCMDに対するアンチセンス療法

SVA型レトロトランスポゾンが挿入された患者のフクチン遺伝子は、異常スプライシングさえ受けなければ、正常のフクチンをコードする正常なエクソン配列を体内にもっている。そこで、この異常スプライシングを阻止する目的で、異常スプライシングを誘導する標的配列(スプライシング受容サイト、イントロン内/エクソン内スプライシング促進部位、スプライシング供与部位)に対し、アンチセンス核酸を pre-mRNA レベルにおいて結合させることで、正常なスプライシングパターンに戻す「アンチセンス療法」が有効ではないかと考えた(図1B)。そこで2'-OメチルRNAという種類のアンチセンス核酸を用い、標的配列の周辺に網羅的にアンチセンス核酸を設計し、さまざまな細胞系[FCMDモデルマウス由来胚性幹(embryonic stem; ES)細胞, 患者由来初代筋芽細胞系, 患者由来初代線維芽細胞, 患者由来リンパ芽球系]に投与し、異常スプライシングの抑制効果および正常フクチン mRNA の発現を検討した。これらの配列よりスプライシングを是正し、かつ正常なフクチン mRNA を最も効率よく回復させるアンチセンス核酸のカクテル, A3E3D5(以降 AED カクテル)を選び出した。この結果をもとに、次にわれわれはピボモルフォリノ(vivo-morpholino, octa-guanidine morpholino; VMO)という種類のアンチセンス核酸を用い、この AED カクテルを FCMD モデルマウスおよび患者細胞に投与し治療効果を検討した。まず FCMD マウスの前脛骨筋へ AED カクテルの局所注射を行ったところ、スプライシング異常が是正され、終止コドンまで達する正常なフクチン mRNA が約30%回復した。またウエスタンブロット法により、糖鎖の回復を示唆する O-マンノース型糖鎖分子量

の増加がみられた(図2A)。ヒト患者由来リンパ芽球に AED カクテルをエレクトロポレーション法により導入したところ、正常なフクチン mRNA が60%以上回復し、AED カクテル投与群において正常由来のフクチンタンパクが検出された。尾静脈経路に AED カクテルを全身投与したところ、局所注射同様に O-マンノース型糖鎖の劇的な回復がみられた(図2B)。最後に、患者由来の筋管で低下している基底膜成分であるラミニンの凝集(クラスタリング)能力が AED カクテル投与によって回復するかについて、ラミニンクラスタリングアッセイを行い検討した。患者由来の筋管における α -ジストログリカンの発現は激減しており、ラミニンクラスタリング能力もほとんどみられない(図2C中段)。しかし AED カクテル投与により、患者の筋管において正常レベルの α -DG の糖鎖が蛍光免疫染色にて検出されるようになり、ラミニンクラスタリング能力も正常と同程度に回復した(図2C下段)。これらの結果はアンチセンス療法によって、FCMD が機能的にも回復する可能性を示唆する。

▶将来の可能性、問題点◀

アンチセンス核酸を用いたスプライシング操作を標的とした治療法の1つに、世界で最も頻度の高い筋ジストロフィーであるデュシェンヌ型筋ジストロフィー(Duchenne muscular dystrophy; DMD)に対する「エクソンスキップ療法」が注目されている。DMDでは責任遺伝子である、筋の構造タンパクをコードするジストロフィン遺伝子に欠損を認める。エクソンスキップ療法とは、アンチセンス核酸を用いて患者において欠損のあるジストロフィン遺伝子内の一部のエクソンを人工的に取り去る治療法である。この治療の結果、ジストロフィンタンパクとしては不完全ながらも、いわゆる軽症型のベッカー型筋ジストロフィーで見られるようなジストロフィンタンパクの発現を誘導し、完治ではなく軽症化を目指す治療法である。この治療法は現在国際試験が進行しており最も実現可能な治療薬剤として注目されている⁶⁾。一方、われわれが目指す FCMD に対するアンチセ

ンス療法は、エクソスキッピング療法と違い、完全なフクチンタンパクの回復を目指す根治療法であり、しかも日本のすべてのFCMD患者を対象に同一の方法で行えるものである。フクチンの機能は未知であるが、糖転移酵素やその補酵素ではないかと考えられており、フクチンが酵素のような作用をもつのであれば、アンチセンス療法によりたとえ少量でも正常のフクチンタンパクが回復することで、十分な治療効果が得られる可能性

が期待できる。現時点では、このアンチセンス療法には脳や心筋組織への移行が困難である点、また先天性疾患であるため、脳の形成異常を治療するためには胎児治療が必要になる点など、解決すべき問題が多い。しかし、まずは筋力を回復する治療が実現され、患者およびその家族の生活の質 (quality of life ; QOL) の上昇につながればと考えている。今後は臨床応用の実現に向け、核酸化合物の至適化や毒性試験などを行っていきたい。

Summary

FCMD は日本に多い神経・筋疾患であり、ほとんどのFCMD患者は、原因遺伝子フクチンの3'非翻訳領域にSVA型レトロトランスポゾンの挿入を認めるが、疾患の発症機序は不明であった。われわれは今回、FCMDがスプライシング異常症であることを見出し、この異常スプライシング

を制御するアンチセンス核酸を用いて患者細胞およびモデルマウスでの治療に成功した。この治療法はすべてのFCMD患者に適応となる初の根治療法となる可能性があり、今後臨床応用を目指したい。

文 献

- 1) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake, M, et al : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998 ; 394 : 388-92.
- 2) Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, et al : Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001 ; 1 : 717-24.
- 3) Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, et al : Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 2002 ; 418 : 417-22.
- 4) Tanguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, et al : Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 2011 ; 478 : 127-31.
- 5) Cordaux R, Batzer MA : The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Rev Genet* 2009 ; 10 : 691-703.
- 6) Goemans NM, Tulinus M, van den Akker JT, et al : Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2011 ; 364 : 1513-22.

【福山型先天性筋ジストロフィーの発症機序と治療戦略】

Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy

谷口(池田)真理子^{1,2)}・戸田 達史¹⁾

Mariko I. Taniguti

Tatsushi Toda

Key words

福山型先天性筋ジストロフィー、スプライシング異常、
エクソントラップ、アンチセンス療法、
レトロトランスポゾン

要 約

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は日本に多い常染色体劣性遺伝性の神経・筋疾患であり、治療法はない。殆どの患者は疾患責任遺伝子であるフクチン遺伝子の3'非翻訳領域にSVA型レトロトランスポゾン(以降SVA)の挿入をもつが、その発症機序は不明であった。今回我々は、FCMDがSVAの挿入によりエクソントラップが誘導され発症する、スプライシング異常症であることを証明した。そこで、この異常スプライシングを制御するアンチセンス治療が有効と考え、アンチセンス核酸を設計し、患者由来細胞へ導入、また疾患モデルマウスに投与した。その結果、正常なフクチン蛋白の発現が回復し、 α ジストログリカンの糖鎖修飾とラミニン結合能の回復が確認された。さらに、同様のSVAの挿入変異をもつ2つの疾患においても同様の機序による異常スプライシングを観察し、さらにヒト特異的なSVAによるエクソントラップ由来のRNAを脳において同定した。以上、SVAのもつエクソントラップ機能はヒトの疾患や進化に関与している可能性があり、また、FCMDに対しては初の根治療法の可能性が示唆された。

はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy: FCMD) は1960年に福山らにより発見された常染色体劣性の遺伝性疾患である¹⁾。わが国でDuchenne型に次いで2番目に多

い小児期の筋ジストロフィーで、日本人の90人に一人が保因者であり、日本には1000~2000人位の患者が存在すると推定され、日本特有の疾患とされていたが、近年海外からの報告も相次いでいる。FCMDは重度の先天性筋ジストロフィー病変とともに、多小脳回、II型滑脳症など高度の脳奇形や、近視、白内障、視神経低形成、網膜剥離などの眼奇形の3症状を示す一系統疾患である。またFCMDは10代のうちに死にいたる重篤な疾患だがいまだ根本的治療法がない。われわれは最近、福山型筋ジストロフィーの根本的治療法につながる分子メカニズムと治療法を発見した²⁾。本稿ではFCMDの発症機序と治療戦略について解説する。

1. FCMDと α ジストログリカノパチー

われわれのグループはポジショナルクローニング法によりFCMDの疾患責任遺伝子であるフクチンを1998年に同定した³⁾。正常型のフクチンcDNAは約7kbで、骨格筋、心筋、脳で優位に発現している。ほとんどのFCMD患者は、この遺伝子の3'非翻訳領域(3'-UTR)に「利己的」な動く遺伝子である約3kbのSVA(SINE-VNTR-*Alu*)型レトロトランスポゾン(以降SVA)の挿入型変異を認める。この変異は約100世代前、日本人祖先の一人に生じたとされている。古代から伝わったレトロトランスポゾンがヒトの遺伝性疾患の原因であることがわかったのは世界で初めてである。

一方ジストログリカンは筋細胞膜上に存在し、ジ

神戸大学大学院医学研究科 1) 神経内科学/分子脳科学 2) 小児科 こども急性疾患学
Department of Neurology/Molecular Brain Science,¹⁾ Department of General Pediatrics,²⁾
Kobe University Graduate School of Medicine
〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町7丁目5-1 TEL: 078-382-5111
22 (598)

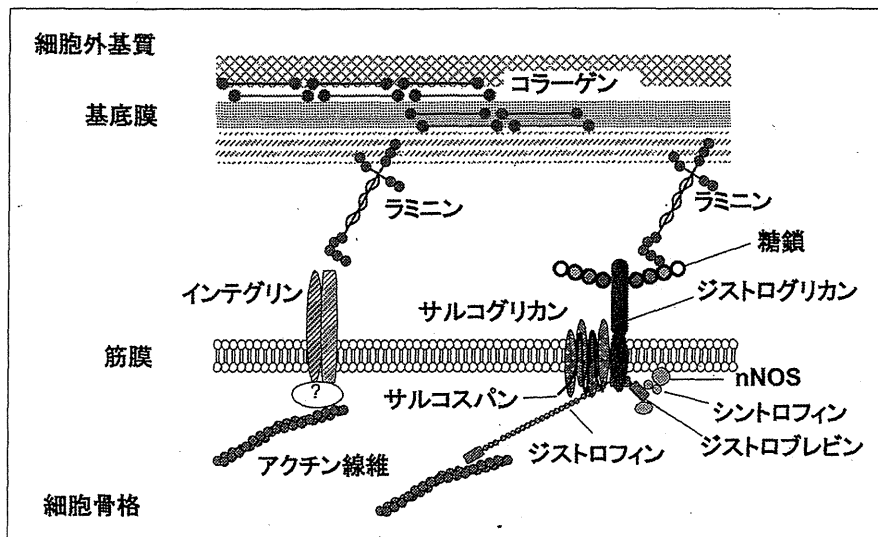


図1 筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体

ジストロフィン糖蛋白質複合体の中で高度に糖鎖修飾を受け、基底膜成分のラミニンとO型糖鎖を介して結合している(図1)。αジストログリカン(αDG)を介した基底膜と細胞骨格の一連のつながりは、骨格筋の収縮弛緩による機械的負荷に対して筋形質膜を保護している。われわれは、このαジストログリカンのO-マンノースにGlcNAcを付加する新規の糖転移酵素POMGnT1がFCMDの類縁疾患であるmuscle-eye-brain病の原因であることを明らかにした³⁾。その後、αDGの糖鎖異常を認める筋ジストロフィー(Walker-Warburg症候群、先天性筋ジストロフィー1C型、1D型、肢帯型2I)とその原因遺伝子が次々と報告され、これら疾患群を総称する「αジストログリカンパチー」という概念ができた⁴⁾。FCMDをはじめこれらの疾患群ではαDGの糖鎖修飾異常の結果、ラミニンなどの細胞外基質との結合能が低下し、基底膜と細胞骨格のつながりが破綻するために筋ジストロフィーが発症すると考えられる⁵⁾。フクチン蛋白はゴルジ体に局在し、既知の糖転移酵素とのアミノ酸配列相同性よりαDGの糖鎖修飾に関与する糖転移酵素ではないかと考えられているが、その機能を含め未知である。またFCMDの発症機序も未解明のままであった。

2. FCMDはスプライシング異常症である

フクチンは10個のエクソンと長い3'-UTRを持ち、殆どのFCMD患者はこの3'-UTR内にSVAが挿

入している。過去のデータでは、ノザンハイブリダイゼーション法では患者のフクチンmRNAは検出されなかった³⁾。そこで今回我々は、フクチン内の全エクソン、SVA挿入配列、及び3'-UTR領域の全域にわたる発現解析を再度検証し対照と比較した。その結果、フクチンの5'側の翻訳領域部分、及び3'-UTRのうちSVA挿入配列3'側の遺伝子発現は対照と患者間で殆ど変化がない一方、その配列に挟まれる領域での遺伝子発現は患者でのみ激減していた。よって、患者のmRNAでは翻訳領域及びSVAの挿入のあいだのどこかでスプライシングが起きているのではないかと考えた。そこで、発現の激減している配列をはさむ部分にPCRプライマーを設計し、患者及び対照のmRNA由来のcDNAを鋳型にPCRを行ったところ患者特異的に対照よりも短い遺伝子産物を検出した。この遺伝子産物の塩基配列の解析より、やはり患者ではフクチンmRNAが異常なスプライシングを受けていたことがわかった。この異常スプライシングは、SVA挿入配列内に存在する強力なスプライシング受容部位が、蛋白質をコードする最終エクソン内の潜在的なスプライシング供与部位を新たに活性化すること(エクソントラップ)が原因となっていた(図2-A)²⁾。新たにスプライシング供与部位となった配列は、もとは最終エクソン内に存在するために使われることのなかった、いわば眠っていたスプライシング供与部位であったのであるが、SVAのエクソントラップ機能により揺り起こされた結果、遺伝子の「切り取り」が生じたのである。次

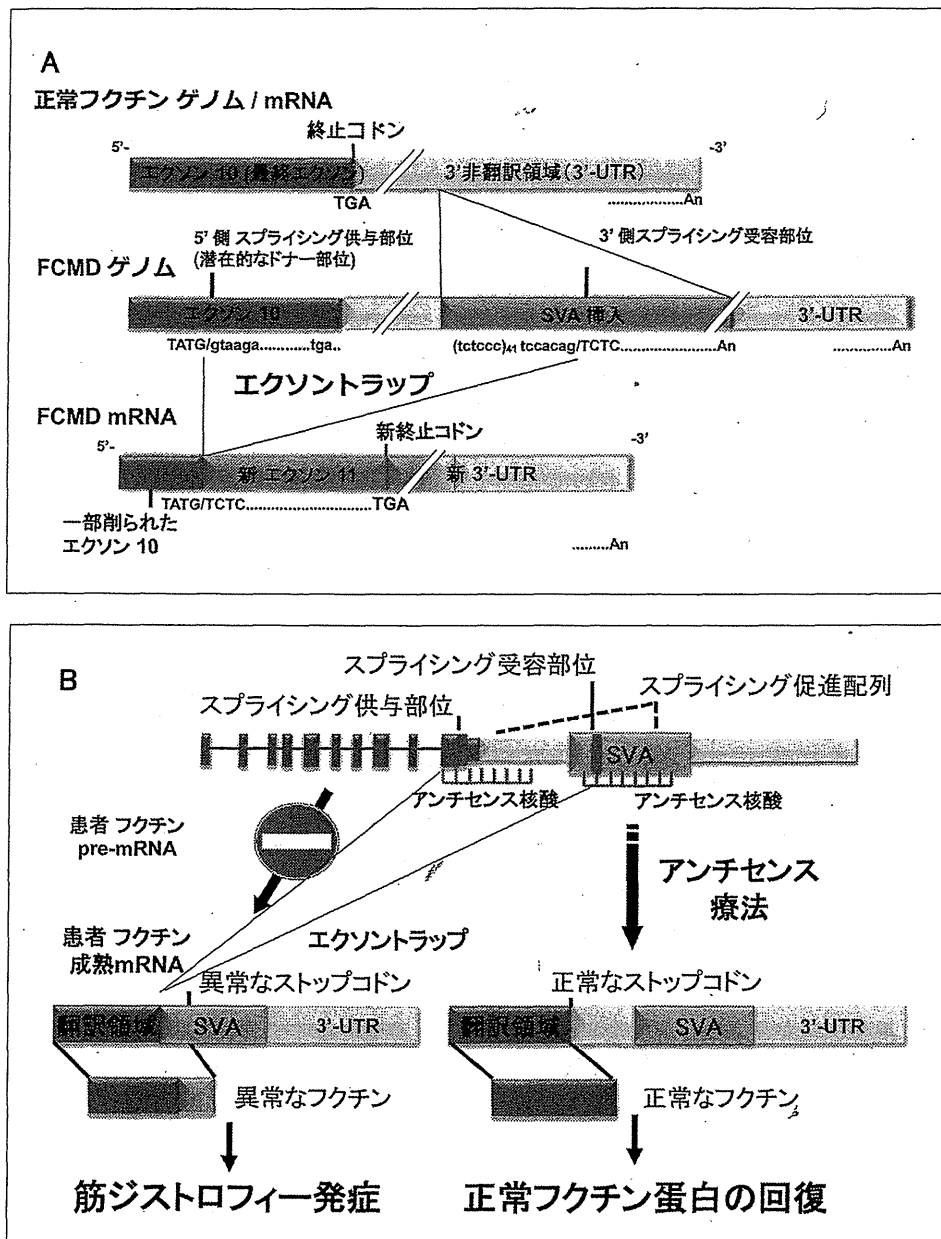


図2
 FCMDのSVA型レトロトランスポゾン挿入によるエクソントラップがもたらすスプライシング異常とアンチセンス治療の構想

A) FCMDではSVAのエクソントラップ機能により最終エクソン内の潜在的ドナー部位が活性化され、スプライシング異常が引き起こされる

B) 異常スプライシングを促進する配列に相補的なアンチセンス核酸を設計し、スプライシング配列をマスクすることにより異常スプライシングを阻止する

にこの異常スプライシング由来の配列をもつコンストラクトを作成し、HeLa細胞へ導入し強制発現させたところ、スプライシング由来のフクチンの局在が、正常において見られるゴルジ体局在から小胞体へ変化していた。これらより、FCMDはSVAのエクソントラップ機能がもたらすスプライシング異常症であることが証明された²⁾。

3. SVAによるエクソントラップとヒトの進化、多様性、疾患

次に我々は、SVA挿入を認める他の2つの遺伝性疾患、ひとつは原因遺伝子 *LDLRAP1* のイントロン1に

約2.6kbのセンス鎖のSVA配列が挿入されている常染色体劣性遺伝性高コレステロール血症、もうひとつは原因遺伝子 *PNPLA2* のエクソン3内に約1.9kbのセンス鎖のSVA配列の挿入を認める中性脂肪蓄積ミオパチーにおいてFCMDと同様のエクソントラップを確認した。またチンパンジーにはないヒト特異的なSVA挿入を認める新規遺伝子 (*AB627340*) のエクソントラップ由来の遺伝子産物をヒト脳において同定した。この遺伝子産物の機能は未知であるがノンコーディングRNAで、何らかの機能をもっているのではないかと考えている。

SVAは進化的に最も新しいレトロトランスポゾンであり、霊長類に特異的である。そしてゲノムの中で進

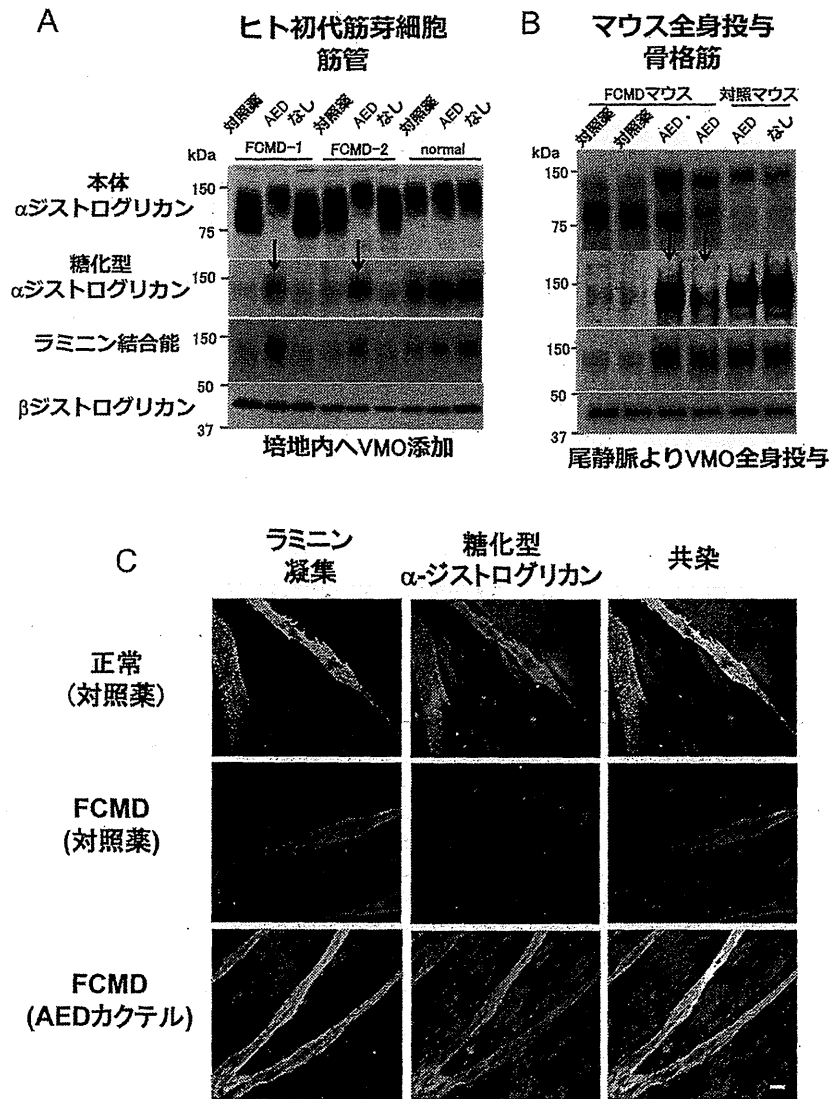


図3 FCMDに対するアンチセンス療法によりヒト筋管及びマウス骨格筋において α DG の糖化及びラミニン結合能が回復

- A) ヒト初代筋芽細胞より分化させた筋管のウエスタンブロッティング。糖化型 aDG (矢印) 及びラミニン結合能が回復した。
- B) マウス骨格筋のウエスタンブロッティング。尾静脈より AED カクテルを全身投与。糖化型 aDG (矢印) 及びラミニン結合能が回復した。
- C) ラミニンクラスターリングアッセイの蛍光免疫染色像。正常筋管 (上段), FCMD 筋管に対し対照薬を添加 (中段), FCMD 筋管に対し AED カクテル添加 (下段)。ラミニン凝集 (左), 糖化型 aDG (中), 共染 (右)。Scale bar = 20mm.

化とともにその数が増し、ヒトには約 2700 コピー存在すると言われている⁷⁾。SVA がエクソントラップにより、新たな機能をヒト脳において獲得し、進化や脳の高次脳機能獲得に関与しているかもしれない。よってエクソントラップはヒトの疾患だけでなく進化、多様性にも関与している可能性があり非常に興味深い結果であった²⁾。

3. FCMD に対するアンチセンス療法

SVA が挿入された患者のフクチンは、異常スプライシングさえ受けなければ、正常のフクチンをコードする正常なエクソン配列を体内に持っている。そこで、この異常スプライシングを阻止する目的で、異常