

シンボル	遺伝子座	遺伝形式	遺伝子	Lewy小体
PARK1、4	4q21	AD	<i>α-synuclein</i>	+
PARK2	6q25.2-q27	AR	<i>parkin</i>	-(+のこともあり)
PARK3	2p13	AD	?	+
PARK5	4p14	AD	<i>UCH-L1</i>	?
PARK6	1p35-p36	AR	<i>PINK1</i>	? (+のこともあり)
PARK7	1p36	AR	<i>DJ-1</i>	?
PARK8	12q12	AD	<i>LRRK2</i>	+/-
PARK9	1p36*	AR	<i>ATP13A2</i>	?
PARK11	2q36-37	AD	<i>GIGYF2</i>	?
PARK13	2p12	AD	<i>HtrA2/Omi</i>	?
PARK14	22q13.1	AR	<i>PLA2G6</i>	?
PARK15	22q12-q13	AR	<i>FBX07</i>	?
PARK17	16q11.2	AD	<i>VPS35</i>	+

表1 メンデル遺伝性PD(PARK遺伝子)

やすい点を除くと、孤発性PDに類似している。病理像は黒質の神経細胞脱落と、黒質、青斑核にLewy小体がみられ、皮質型Lewy小体も伴うことが多い。PARK1自体はまれな家系であるが、 α -シヌクレインがLewy小体の主要構成蛋白であることがわかって以来、PDの病因に大きく関与していることが推測されている。変異を起こした α -シヌクレインは異常リン酸化を認め、凝集傾向を亢進させ、Lewy小体形成を促進されることが推測されている。その凝集過程において毒性を発揮すると考えられている¹⁾。

PARK4は α -synucleinの重複(duplication, triplication)で発症する³⁾。triplicationは、発症年齢は若く、PD症状に加え認知機能障害を呈し、Lewy小体型認知症の特徴をもち、皮質型Lewy小体を認め、びまん性Lewy小体病の病理像を呈す。duplicationは孤発性PDに類似し、発症年齢はtriplicationよりも遅く、認知機能障害はある例とない例がある⁴⁾。 α -synucleinのgene dosageと重症度は相関することを示唆する。

PARK2/PARK6(*parkin*、*PINK1*)

*parkin*の変異により常染色体劣性遺伝形式で

若年発症するPDであり、わが国で臨床病型の報告と遺伝子単離がなされた⁵⁾。常染色体劣性遺伝性で若年発症であれば50%の症例で変異がみられ、わが国に比較的多い家族性PDである。臨床症状はパーキンソニズムに加え、下肢のジストニアがやや多く、日内変動や睡眠効果がみられる。少量のL-ドパにもよく反応する反面、L-ドパ誘発性ジスキネジアやwearing off現象が早期から出やすい。MIBG心筋シンチで取り込み低下がなく、病理学的にLewy小体はみられない。*parkin*はubiquitin ligase機能をもつことから、PDの原因にユビキチン-プロテアソーム系の異常が指摘されるようになった⁶⁾。

PARK6は*PINK1*の変異により常染色体劣性遺伝形式で若年発症し、PARK2と類似する⁷⁾。*PINK1*と*parkin*によるmitochondrial autophagy(ミトファジー)についての報告が注目されている。傷害されたミトコンドリアの外膜に、*PINK1*と*parkin*が細胞質から移行し、*PINK1*存在下で*parkin*はミトコンドリアにおいて何らかの蛋白質を基質としてユビキチン化する。そのユビキチン化蛋白質をp62蛋白質が認識し、オートファジーを誘導させ傷害ミトコンドリアを分解・除

去し、ミトコンドリアの品質を保つというメカニズムであり、この機構の破綻が孤発性PDの発症原因にも関与していることが考えられている^{8,9)}。

PARK8 (LRRK2)

常染色体優性PDの大家系が1978年にわが国から報告され、臨床症状は孤発性PDと類似している。この家系は第12染色体に連鎖し、PARK8として登録された。その後、2004年に原因遺伝子としてLRRK2遺伝子が同定された¹⁰⁾。その後、多種類の変異が報告されており、LRRK2遺伝子変異は優性遺伝性のPDのうち最も多く、5~15%に上ると推定されている。

LRRK2蛋白は2,527個のアミノ酸からなる巨大な蛋白質であり、配列の解析から多くの機能性ドメインをもつことが判明してきた。活性の中心となる部位はGTP-binding Ras of complex (ROC)ドメイン、carboxy-terminal of ROCドメインとキナーゼドメインなどが中心となる。R1441C、R1441G、R1441H、Y1699C変異はGTPaseの活性を減少させる。G2019S変異はキナーゼ活性が上がる事が判明している。それ以外の部位にはleucine-rich repeatsとWDドメインが存在し、別の蛋白質と結合することが推定されている。

マイクロRNA(miRNA)は細胞内に存在する20~25塩基ほどの1本鎖RNAであり、相補的なmRNAと結合し、その蛋白生成を制御する機能をもつ。変異性LRRK2はmiRNAの翻訳阻害が不能となり、E2F1/DPという蛋白の過剰産生を引き起こす。E2F1/DP蛋白は細胞周期などに関与しており、これらの蛋白の過剰発現が神経細胞死を起こす可能性があることが報告された¹¹⁾。

PARK17 (VPS35)

近年、優性遺伝性PD家系のエクソーム解析により、VPS35遺伝子変異が同定された¹²⁾。VPS35はエンドゾームからゴルジ体への逆行輸送を司るレトロマー複合体のサブユニットの1つである。この変異により、蛋白質の適切なりサイク

ルが行われず、過剰に溜まってしまうことによって、PDの一因となることが考えられる。

孤発性PDのリスク遺伝子

PDは多因子遺伝性疾患

症例的には大多数(95%)の孤発性PDの原因は現時点では不明であるが、環境因子と1つ1つは影響力の弱い遺伝因子(おそらく数10個)によって成り、その総和が、ある閾値を超えたとき発症するという多因子疾患であると考えられている。アイスランド国民を対象とした大規模な疫学的調査の結果が発表され、同胞再発危険率は6.7で、PD発症には遺伝因子が影響していることが示された¹³⁾。

PDのゲノムワイド関連解析(GWAS)

われわれは、PDの遺伝リスク因子を明らかにしようとし、大規模の患者対照集団と、56万個の一塩基多型(SNP)を搭載したイルミナHap550アレイを用いて、GWASと、2つの独立な再現研究を行い、全検体(PD 2,011検体、対照18,381検体)の解析にて、絶対的な有意水準 $p < 5 \times 10^{-8}$ をクリアする4つのPD感受性遺伝子座をみいだした¹⁴⁾。

まず2つの新しいPD感受性座を、1q32(PARK16と命名、 $p = 1.52 \times 10^{-12}$)と4p15($p = 3.94 \times 10^{-9}$)に発見した。PARK16領域は、3つの遺伝子(NUCKS1、RAB7L1、SLC41A1)を含む連鎖不平衡ブロックである。また、4p15領域は、BST1のみを含んでいた。さらに、常染色体優性遺伝性PDの原因遺伝子である、 α -synuclein(4q22、 $p = 7.35 \times 10^{-17}$)とLRRK2(12q12、 $p = 2.72 \times 10^{-8}$)の領域を同定した。うち α -synucleinは最もp値が低く、孤発性PDのSNPとしては最強である。常染色体優性遺伝性PDの原因遺伝子が片や変異により遺伝性PDを引き起こし、片やSNP多型により孤発性PDにきいてくるのは、興味深い¹⁴⁾。

遺伝子座	多型	位置 (hg18)	マイナーアレル頻度	アレル	n (データセット)	n (全症例)	オッズ比 (95%CI)	P	I ² (95%CI)
<i>GBA</i>	N370S	chr1:153451576	0.01	G vs. A	15	44,851	3.51 (2.55-4.83)	1.44×10 ⁻¹⁴	38 (0-66)
<i>SYT11/RAB25</i>		chr1:154105678 chr1:154105678	0.02	T vs. C	6	17,300	1.73 (1.48-2.02)	2.35×10 ⁻¹²	0 (0-52)
<i>PARK16</i>	rs947211	chr1:204019288	0.23	A vs. G	12	69,262	0.91 (0.88-0.94)	8.00×10 ⁻¹⁰	0 (0-66)
<i>STK39</i>	rs2390669	chr2:168800188	0.13	C vs. A	14	35,159	1.19 (1.12-1.25)	1.37×10 ⁻⁰⁹	18 (0-56)
<i>MCCC1/LAMP3</i>	rs11711441	chr3:184303969	0.14	A vs. G	25	46,502	0.86 (0.82-0.91)	9.20×10 ⁻¹⁰	18 (0-50)
<i>DGKQ</i>	rs11248060	chr4:954359	0.12	T vs. C	10	57,716	1.21 (1.15-1.27)	3.04×10 ⁻¹²	11 (0-52)
<i>BST1</i>	rs11724635	chr4:15346199	0.43	C vs. A	26	46,586	0.88 (0.84-0.91)	1.87×10 ⁻¹⁰	43 (10-64)
<i>SNCA</i>	rs356219	chr4:90856624	0.41	G vs. A	31	79,494	1.29 (1.25-1.33)	6.06×10 ⁻⁶⁵	16 (0-46)
<i>ITGA8</i>	rs7077361	chr10:15601549	0.12	C vs. T	11	61,036	0.88 (0.84-0.92)	1.51×10 ⁻⁰⁸	0 (0-55)
<i>LRRK2</i>	rs1491942	chr12:38907075	0.21	G vs. C	21	34,123	1.17 (1.13-1.22)	6.44×10 ⁻¹⁵	0 (0-38)
<i>CCDC62/HIP1R</i>	rs10847864	chr12:121892551	0.39	T vs. G	23	38,367	1.15 (1.11-1.18)	4.37×10 ⁻¹⁷	0 (0-35)
<i>MAPT/STH H1H2</i>		chr17:4213181841149582	0.20	H2 vs. H1	37	50,389	0.78 (0.75-0.80)	7.97×10 ⁻⁵²	0 (0-29)

表2 現在のところの最大規模のGWASのメタ解析によるPDリスク遺伝子のリスト(文献15より引用)

さらにLillらは、各国のGWASを集めてメタ解析(メタGWAS)を行い(計患者16,452名、対照48,810名)、新規に*ITGA8*(インテグリン $\alpha 8$ 遺伝子)を同定した。表2に示したものが計12個となり、現在のところのPDリスク遺伝子のリストといえよう(表2)¹⁵⁾。

リスクSNPと病態との関連性

これらの同定されたリスク遺伝子の病態との関連はまだほとんどわかっていない。まずなぜ α -synuclein の3'非翻訳領域のSNPが疾患の発症にかかわるのか？ われわれは転写因子YY1がSNPのアレル特異的にその領域に結合し、SNCA および逆向きに存在する noncoding RNAの量に関係することを示した¹⁶⁾。

*PARK16*領域には、先述した3つの遺伝子が存在するが、最近これら3つのうち低分子量GTPアーゼファミリーで空胞輸送に関係する*RAB7L1*が患者脳での発現が低下していること、LRRK2変異パーキンソンモデルの表現型をレスキューし、エンドゾームからゴルジ体への逆行輸送を司るレトロマーに関連すること、この異常は別のまれな家族性PDの病因遺伝子の産物であるレトロマー複合体のサブユニットの1つ、VPS35の発現により回復することが示された¹⁷⁾。

まれな多型(rare variant)とゴーシェ病遺伝子*GBA*

ゴーシェ病は、常染色体劣性遺伝性疾患で、リソソーム内酵素グルコセラブロシダーゼ(*GBA*)

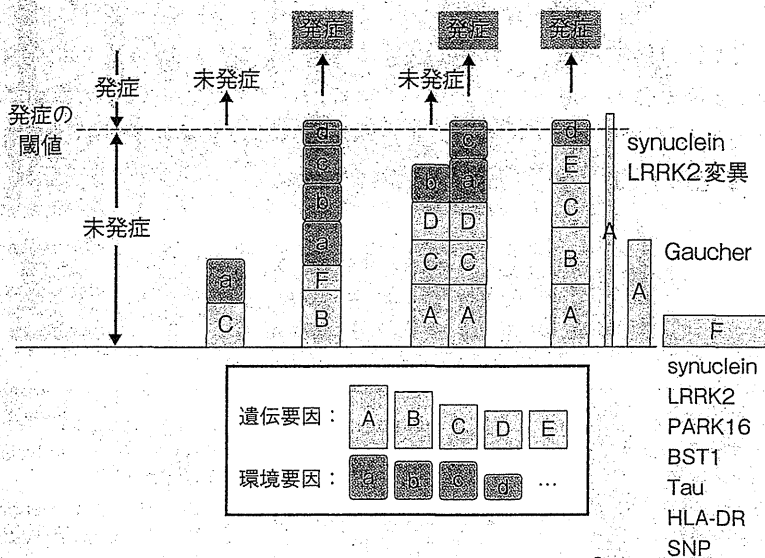


図1 孤発性PDは多遺伝子遺伝性疾患

PD、アルツハイマー病、または生活習慣病を含むほとんどの疾患は、複数の遺伝因子と複数の環境因子の積み木の総和がある閾値を超えたとき発症すると考えられている。メンデル遺伝性変異以外に、common variantとして α -シヌクレイン、PARK16、BST1、LRRK2、Tau、HLA-DRのSNPが、またrare variantとしてゴーシェ遺伝子が重要。

の変異による酵素活性低下により、グルコシルセラミドが体内に蓄積し、肝脾腫、貧血などを引き起こす脂質代謝異常症である。

1990年代後半からPD症状を合併するゴーシェ病患者の存在や、ゴーシェ病家系内にPD患者が多発するとの報告が散見されていた。ユダヤ人のPD患者について孤発性PD群では、*GBA* 変異のヘテロ保因者が対照群に比べ有意に多く、*GBA* が孤発性PDのリスク遺伝子であることが報告された¹⁸⁾。その後、この研究の再現研究が世界中で行われ、*GBA* 変異が日本人でもPD感受性をもつことが示され、*GBA* 遺伝子変異をヘテロでもつ保因者はPD患者534名中50名(9.4%)、対照544名中2名(0.37%)であり、PDと*GBA* 変異は強く関連していた($p = 6.9 \times 10^{-14}$ 、オッズ比28.0)¹⁹⁾。世界多施設共同研究で、計約10,000名の患者対照集団とのメタ解析により、原著のユダヤ人に限らず、どの人種でも*GBA* 遺伝子はリスクとなり、平均オッズ比は5であり、確実なPDリスク遺伝子であることが示された²⁰⁾。

*GBA*の基質であるグルコシルセラミドの蓄積により、神経毒性をもつとされる可溶性 α -シヌクレインオリゴマーが増加すること、可溶性 α -

シヌクレインオリゴマーの増加により*GBA*の小胞体-ゴルジ輸送が阻害されることによりさらに*GBA*活性が低下し、可溶性 α -シヌクレインオリゴマーのさらなる増加につながる、といったポジティブフィードバックの経路が報告された²¹⁾。さらに*GBA* 変異をもつPD患者だけでなく、もたない孤発性PD患者でも*GBA*活性が低下していることが示され興味深い²²⁾。

PDのゲノム背景

PD、アルツハイマー病、または生活習慣病を含むほとんどの疾患は、複数の遺伝因子と複数の環境因子の積み木の総和がある閾値を超えたとき発症すると考えられている。そのモデルを図1に示す。メンデル遺伝性PDを引き起こす α -synucleinや*LRRK2*の変異はそれ1つだけで閾値に到達し発症するが、対象患者はほとんど存在しないので積み木の幅はとても狭い(とてもまれ)。ゴーシェ病遺伝子*GBA*などのrare variantリスクは中等度の高さをもつが、10%以下の患者にしか当てはまらないため幅は狭い。一方、SNPはそれ自体のオッズ比は低いがほとんどの患者に当てはまるため、積み木の幅は広い。い

ずれも重要である(図1)。

GWASによって多数の疾患感受性遺伝子が同定されたものの、それらは遺伝要因全体の一部しか説明できないことから(失われた遺伝性、missing heritability)、ゴーシェ病遺伝子 *GBA* などの rare variant リスクが重要であると考えられ

ており、次世代シーケンサーを用いたアプローチが展開されている。今後のメタGWASやエクソーム解析からさらなる遺伝子の解明、そこから新たな疾患パスウェイとそこからの治療薬開発が期待される。

文献

- 1) Farrer MJ. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 306-18.
- 2) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-7.
- 3) Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841.
- 4) Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, et al. Clinical heterogeneity of α -synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 59: 298-309.
- 5) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605-8.
- 6) Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; 25: 302-5.
- 7) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304: 1158-60.
- 8) Matsuda N, Sato S, Shiba K, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 2010; 189: 211-21.
- 9) Okatsu K, Oka T, Iguchi M, et al. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun* 2012; 3: 1016.
- 10) Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44: 601-7.
- 11) Gehrke S, Imai Y, Sokol N, et al. Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* 2010; 466: 637-41.
- 12) Vilarino-Guell C, Wider C, Ross OA, et al. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 162-7.
- 13) Sveinbjornsdottir S, Hicks AA, Jonsson T, et al. Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 2000; 343: 1765-70.
- 14) Satake W, Nakayabashi Y, Mizuta I, et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 2009; 41: 1303-7.
- 15) Lill CM, Roehr JT, McQueen MB, et al. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002548.
- 16) Mizuta I, Takafuji K, Ando Y, et al. YY1 binds to α -synuclein 3'-flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression. *J Hum Genet* (in press).
- 17) MacLeod DA, Rhinn H, Kuwahara T, et al. RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk. *Neuron* 2013; 77: 425-39.
- 18) Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2004; 351: 1972-7.
- 19) Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, et al. Mutations for Gaucher disease confer a high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 2009; 66: 571-6.
- 20) Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 1651-61.
- 21) Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 2011; 146: 37-52.
- 22) Gegg ME, Burke D, Heales SJ, et al. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann Neurol* 2012; 72: 455-63.

福山型筋ジストロフィーの病的スプライシング異常とアンチセンス療法

谷口 (池田) 真理子, 小林千浩, 戸田達史

福山型筋ジストロフィー (FCMD) は日本に多い重症の神経・筋疾患であり治療法がない。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の挿入をもつが発症機序は不明であった。われわれはFCMDがSVA挿入に誘導されるスプライシング異常症であることを見出し、異常スプライシングを制御するアンチセンス核酸の投与により患者細胞およびモデルマウスでの治療に成功した。

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は日本特有の疾患であり先天性筋ジストロフィー、II型滑脳症、眼奇形の3症状を示す常染色体劣性の遺伝性疾患である¹⁾。日本で2番目に多い小児の筋疾患で10代のうちに死にいたる重篤な疾患だが根本的治療法がない。われわれのグループはFCMDの疾患責任遺伝子であるフクチン (fukutin) を1998年にポジショナルクローニング法により同定した²⁾。ほとんどの患者は、フクチンの3'非翻訳領域に、動く遺伝子である約3 kb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。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、現在日本人の88人に1人が保因者であり、約3万出生に1人発症する。また糖転移酵素POMGnT1が類縁疾患 muscle-eye-brain 病の原因であることを明らかにし³⁾、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質 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⁴⁾。フクチンタンパク質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である。またFCMDの発症機序も未解明のままであった。

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'非翻訳領域 (3'-UTR) をもつ。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によっては患者のフクチンmRNAは検出されなかった²⁾。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、

Pathogenic splicing and antisense therapy in Fukuyama muscular dystrophy

Mariko Taniguchi-Ikeda^{1) 2)} / Kazuhiro Kobayashi¹⁾ / Tatsushi Toda¹⁾ : Department of Neurology/Molecular Brain Science, Kobe University Graduate School of Medicine¹⁾ / Department of General Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine²⁾ (神戸大学大学院医学研究科神経内科学/分子脳科学¹⁾ / 神戸大学大学院医学研究科小児科こども急性疾患学²⁾)

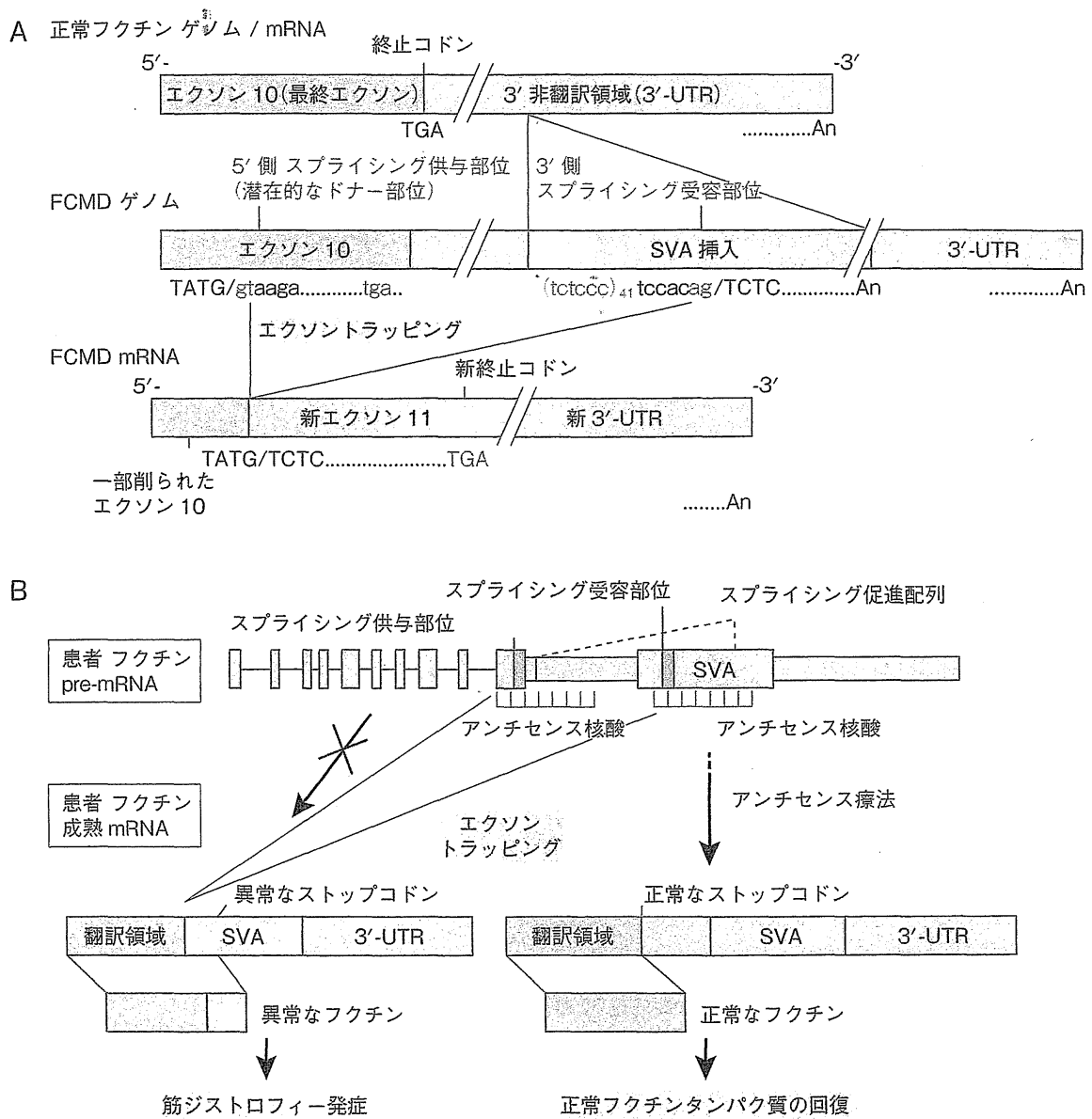


図1 FCMDのSVA型レトロトランスポゾン挿入によるエクソントラッピングがもたらすスプライシング異常とアンチセンス治療の構想

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ピング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

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、タンパク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1A)⁵⁾。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製し、HeLa細胞

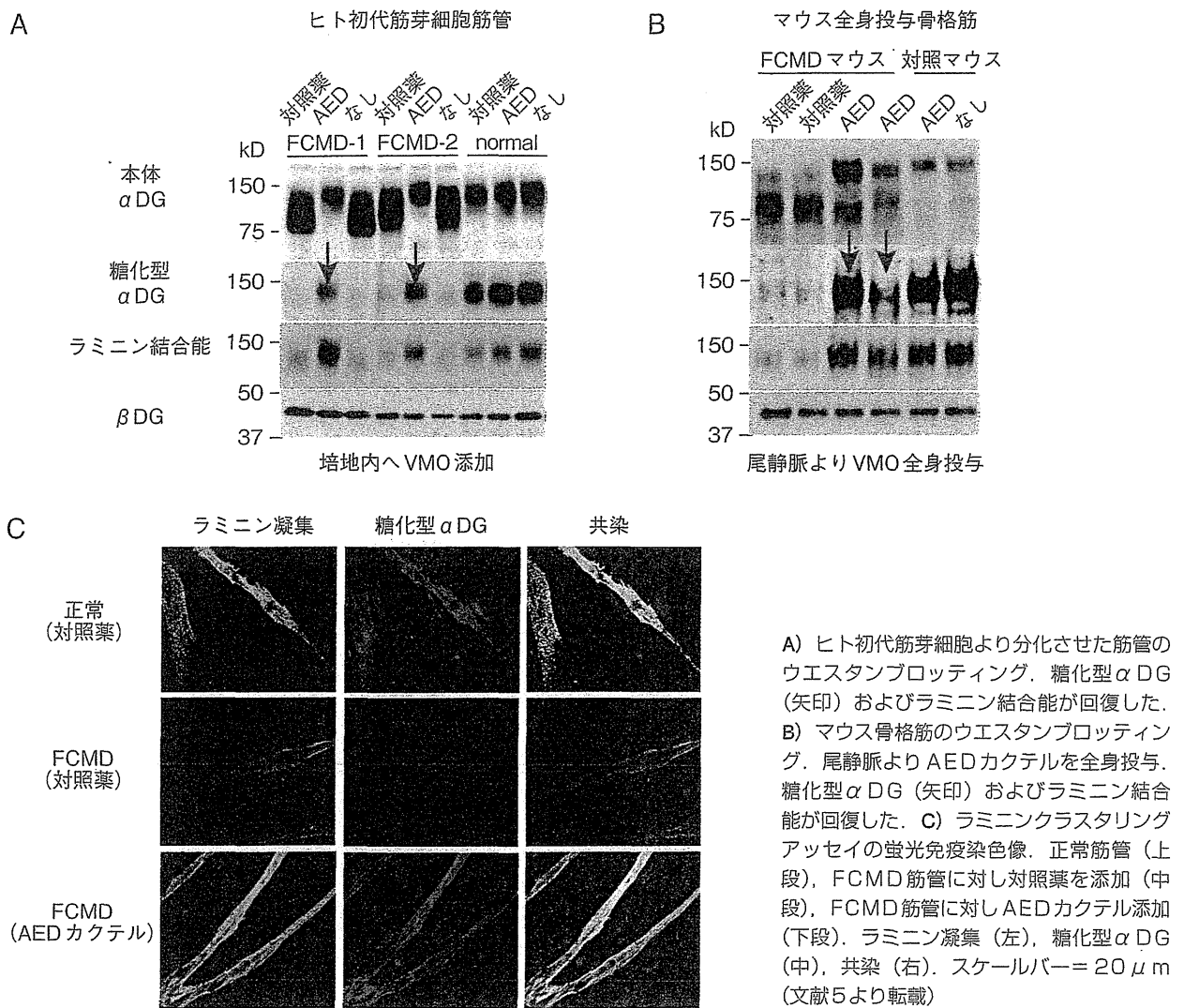


図2 FCMDに対するAEDカクテル療法によりヒト筋管およびマウス骨格筋において α DGの糖化およびラミニン結合能が回復した

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⁵⁾。

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挿入を認める他の2つの遺伝性疾患、1つは原因遺伝子*LDLRAP1*のイントロン1に約2.6 kb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1つは原因遺伝子*PNPLA2*のエクソン3内に約1.9 kb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いて同定した。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。そしてゲノムのなか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⁶⁾。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⁵⁾。

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 1 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、アンチセンス核酸のカクテル、AED (以降 AED カクテル) を選び出した。次にわれわれ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、非投与マウスに比較し、糖鎖の回復を示唆する糖化型 α DG の分子量の劇的な増加がみられた (図 2 A)⁵⁾。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 2 B)⁵⁾。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 (図 2 C)⁵⁾。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。

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、もっと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に対するエクソ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⁷⁾。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、今後医療応用の実現を目指したい⁵⁾。

おわりに

現時点では、このアンチセンス療法は脳や心筋組織への移行が困難である点、また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が、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 QOL の上昇につながればと考える。今後は臨床応用の実現にむけ、核酸化合物の至適化や毒性試験などを行う予定である。また SVA 挿入が同様の機序でひき起こす疾患や、この機序がヒトの進化、多様性、疾患を生み出すレトロトランスポゾンの機能解明に関しても興味深いデータが得られ、さらなる研究の発展につながることを期待したい。

文献

- 1) Fukuyama, Y. et al. : Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type - clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev.*, 3 : 1-29, 1981
- 2) Kobayashi, K. et al. : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*, 394 : 388-392, 1998
- 3) Yoshida, A. et al. : Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell*, 1 : 717-724, 2001
- 4) Michele, D. E. et al. : Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*, 418 : 417-422, 2002
- 5) Taniguchi-Ikeda, M. et al. : Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature*, 478 : 127-131, 2011
- 6) Cordaux, R. & Batzer, M. A. : The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Rev. Genet.*, 10 : 691-703, 2009
- 7) Goemans, N. M. et al. : Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. M.*, 364 : 1513-1522, 2011

● 筆頭著者プロフィール ●

谷口 (池田) 真理子 : 1997 年、高知大学医学部卒業。大阪大学医学部小児科入局、2001 年、小児科専門医。'05 年、日本人類遺伝学会認定臨床遺伝専門医。'06 年 3 月、大阪大学医学部博士課程修了 (戸田達史教授)。'06 年 4 月～大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学教室 (同教授) 特任研究員。'08 年 10 月～大阪大学大学院グローバル COE オルガネラネットワーク医学創成プログラム (同教授) 特任助教。'10 年 3 月～現在、神戸大学小児科子ども急性疾患学講座特命助教 (竹島泰弘教授)、神経内科学/分子脳科学 研究員兼任 (戸田達史教授)。

4 福山型筋ジストロフィー の分子標的治療

とだ たつし 1)
 戸田 達史
 たにぐち いけだ まりこ 1,2)
 谷口(池田) 真理子
 こばやし かずひろ 1)
 小林 千浩

1) 神戸大学大学院医学研究科 神経内科学/分子脳科学
 2) 神戸大学大学院医学研究科 こども急性疾患学



戸田 達史
 1985年 東京大学医学部卒業
 神経内科入局
 1994年 東京大学人類遺伝学助手
 1996年 東京大学医科学研究所助教授
 2000年 大阪大学臨床遺伝学教授
 2008年 神戸大学神経内科学/
 分子脳科学教授
 日本人類遺伝学会賞, 日本神経学会賞,
 朝日賞, 文部科学大臣表彰
 研究テーマ: 神経疾患の分子遺伝学・治療

Key words : 福山型筋ジストロフィー, エクソントラッピング,
 アンチセンス治療, ジストログリカノパチー

Abstract

福山型筋ジストロフィー (FCMD) は日本に多い重症の神経・筋疾患であり治療法がない。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の挿入を持つ発症機序は不明であった。我々はFCMDがSVA挿入に誘導されるスプライシング異常症であることを見出し、異常スプライシングを制御するアンチセンス核酸の投与により患者細胞及びモデルマウスでの治療に成功した。

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デュシャンヌ型の次に多く、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。

1. フクチン遺伝子と SVA型レトロトランスポゾン挿入

我々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。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)との複合へ

Molecular targeting therapy for Fukuyama muscular dystrophy :
 Tatsushi Toda¹⁾, Mariko Taniguchi-Ikeda^{1,2)}, Kazuhiro Kobayashi¹⁾,
 Divisions of Neurology/Molecular Brain Science¹⁾, General Pediatrics²⁾, Kobe University Graduate School of Medicine

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、糖鎖修飾に関係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 1C 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

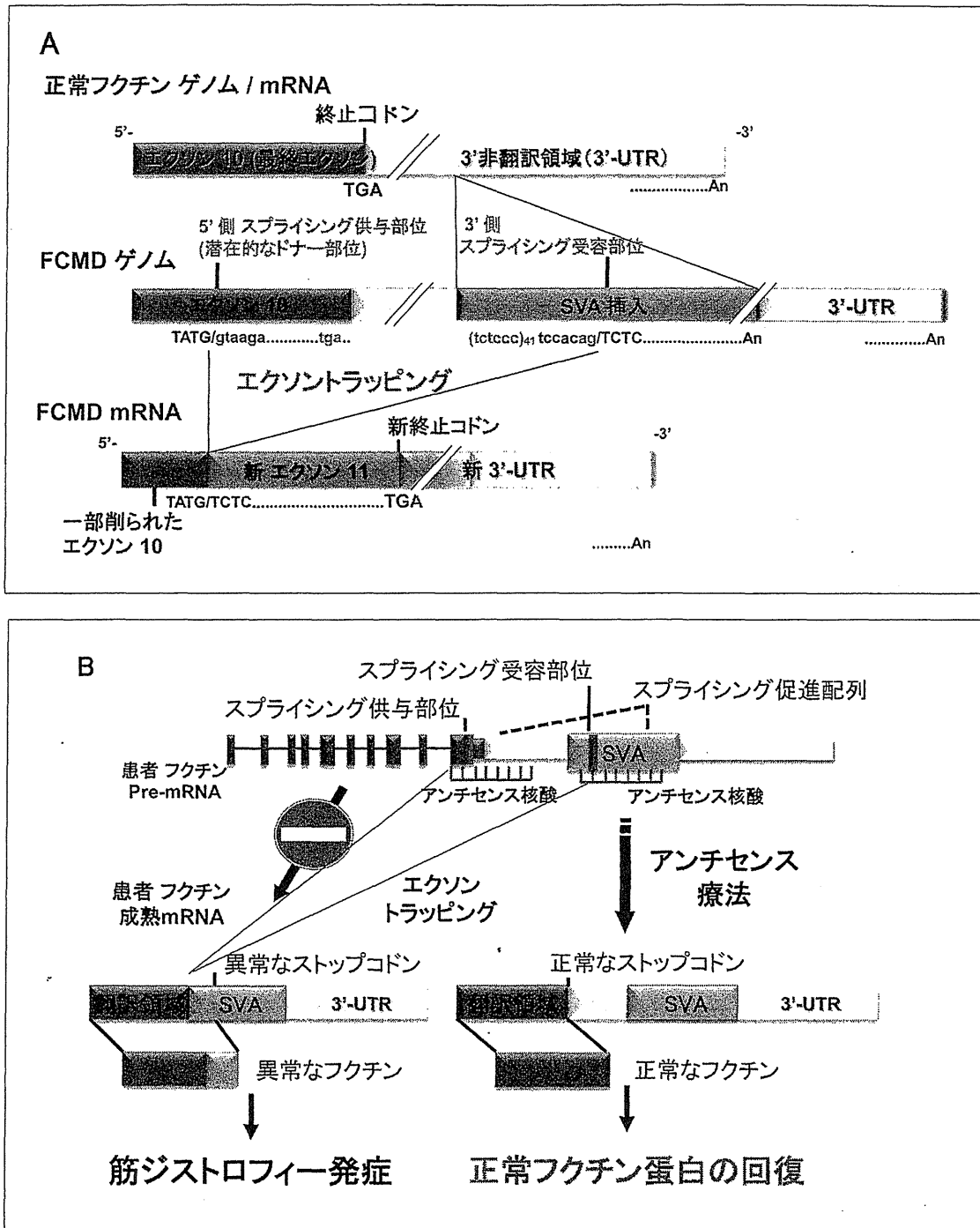


図 1 FCMD の SVA 型レトロトランスポゾン挿入によるエクソントラッピングがもたらすスプライシング異常とアンチセンス治療の構想

- 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

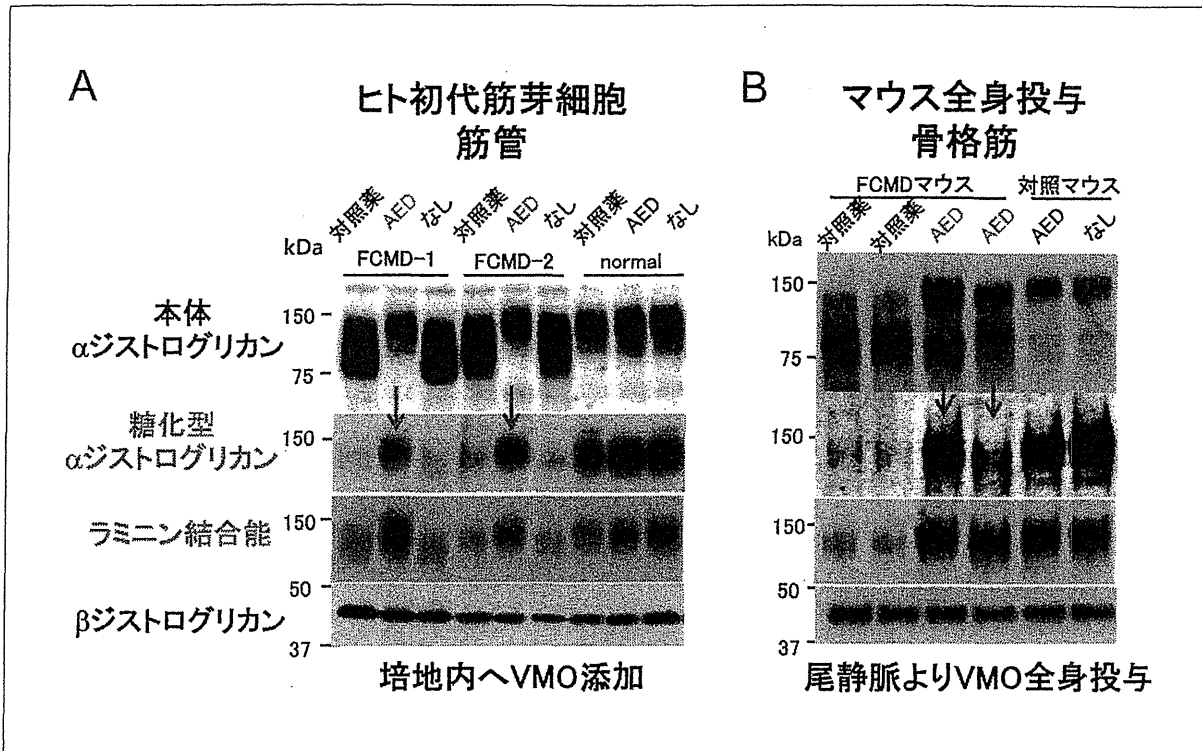


図2 FCMD に対する AED カクテル療法によりヒト筋管及びマウス骨格筋において α DG の糖化及びラミニン結合能が回復²⁾

- 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 aDG (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 aDG (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、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、糖鎖修飾に関係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.

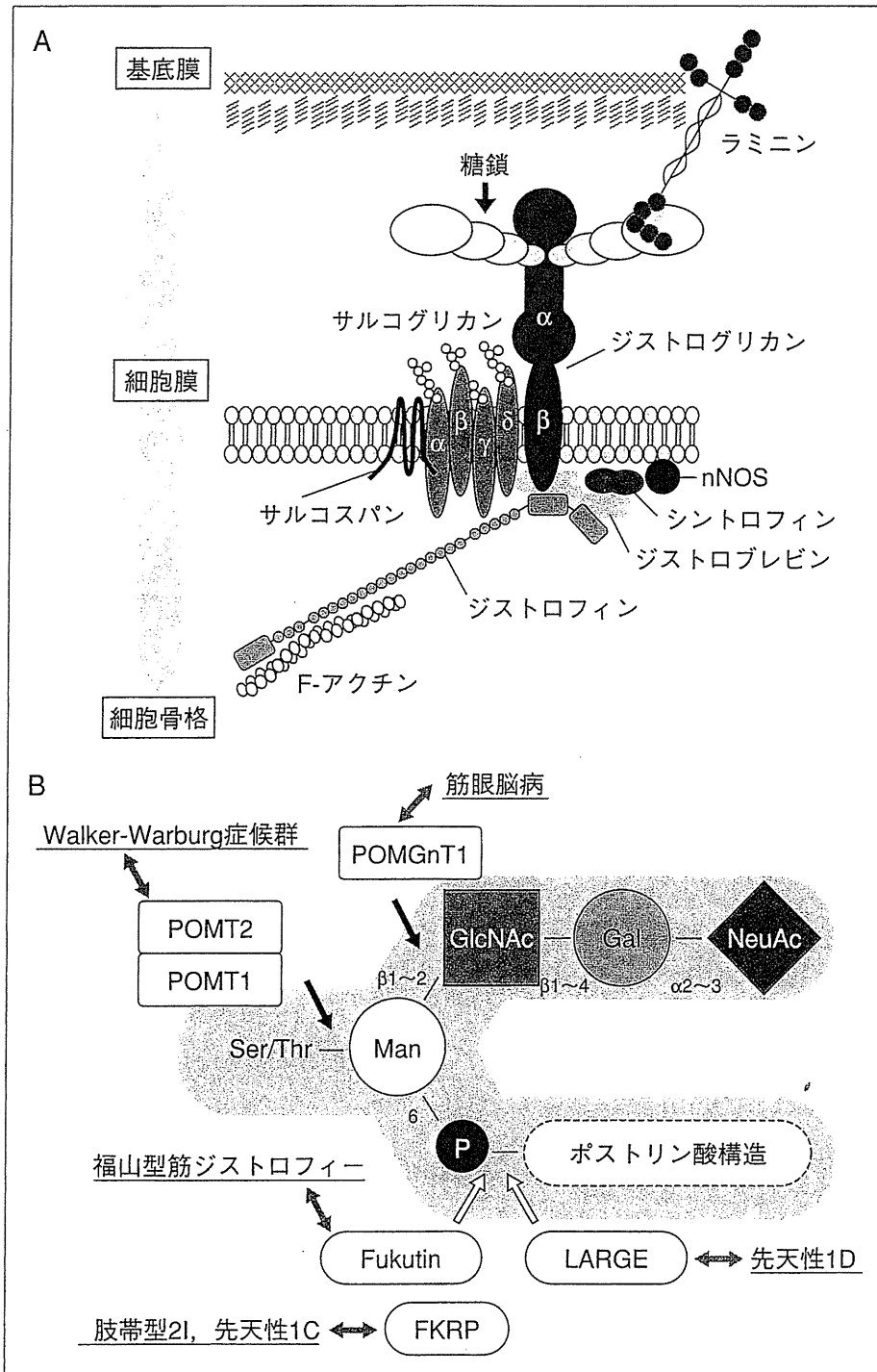


図1 筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体とαジストログリカンの糖鎖修飾異常を発症要因とする疾患群「αジストログリカノパチー」

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

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*in 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

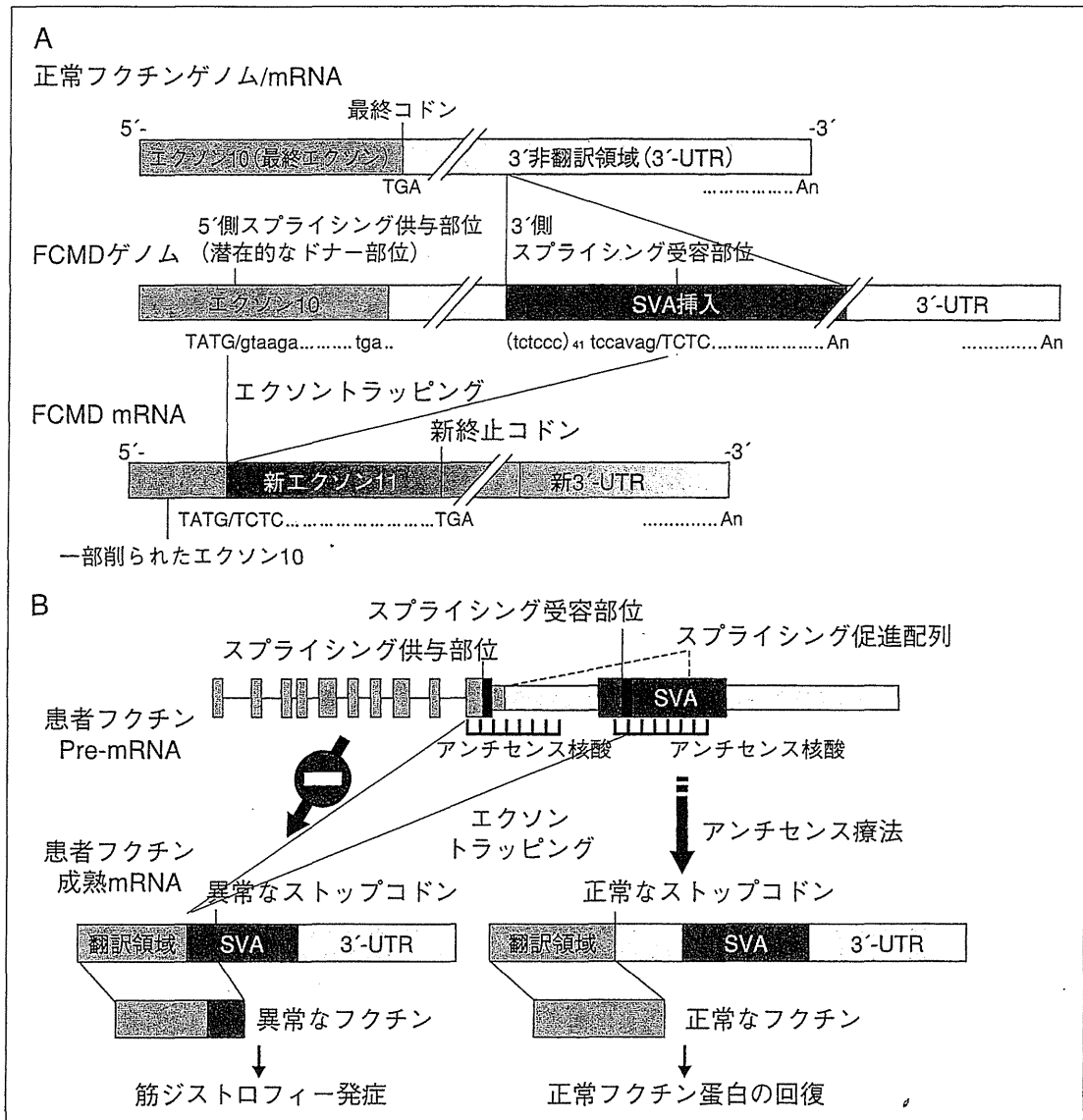


図2 福山型先天性筋ジストロフィーのSVA型レトロトランスポゾン挿入によるエクソントラッピングがもたらすスプライシング異常とアンチセンス治療の構想

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

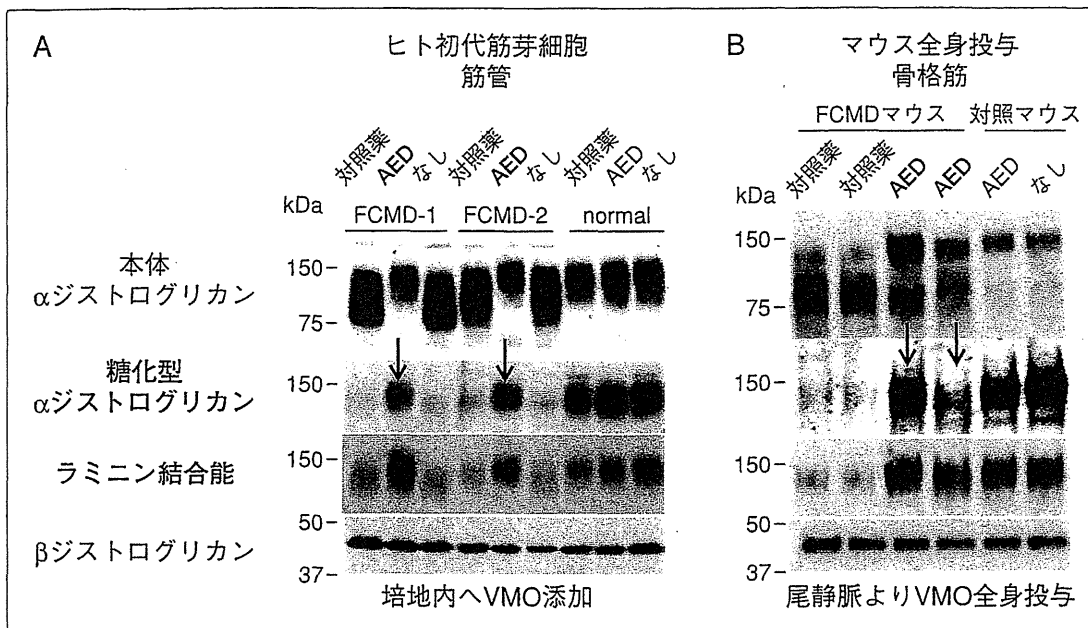


図3 福山型先天性筋ジストロフィーに対するAEDカクテル療法によりヒト筋管およびマウス骨格筋においてαDGの糖化およびラミニン結合能が回復

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αDG(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αDG(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、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、非投与マウスに比較し、糖鎖の回復を示唆する糖化型αDG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αDG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αDG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

ブ療法があげられる。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, Manya 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, Stalnaker 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.

* * *