

図2. 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 (αDG) の糖鎖修飾異常を発症要因とする疾患群「αジストログリカナパチー」

A αジストログリカンはラミニンα2鎖とO型糖鎖を介して結合する。糖鎖修飾に異常をきたすと、ラミニンなどのリガンドとの結合能が低下し、αジストログリカナパチーを発症する。

B ラミニン結合に関して、O-マンノース型糖鎖 (Siaa2-3Galb1-4GlcNAcb1-2Man) とO-マンノシル糖鎖にリン酸基を介して修飾される側鎖構造が重要と考えられている。フクチンとLARGEはリン酸基より先の修飾に関与していると考えられる。

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。

さらに、近年*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<sup>11)</sup>。最近、ジストログリカン上のLARGEによるグリカン部分の伸長とその細胞外マトリックスリガンドに対する結合能の間に、直接的な相関関係があることが明らかにされた。LARGEグリカン反復配列が短いと、ジストロフィーの素因となる筋肉の機能不全などの様々な欠陥が生じる。さらに、臨床的な重症度の高い筋ジストロフィー患者ほど、LARGEグリカンの短縮の度合いが大きいことも明らかになった(図2B)<sup>12)</sup>。

ポストリン酸糖鎖の構造はいまだに不明であ

るが、さらに最近、O-マンノースにつく別の側鎖としてPOMGnT2/b3GalNT2/POMKによって厳密に制御される修飾が明らかにされている(図2B)<sup>13)</sup>。

2) FCMDはスプライシング異常症である

近年、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<sup>14)</sup>。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<sup>7)</sup>。そこで今回我々は、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

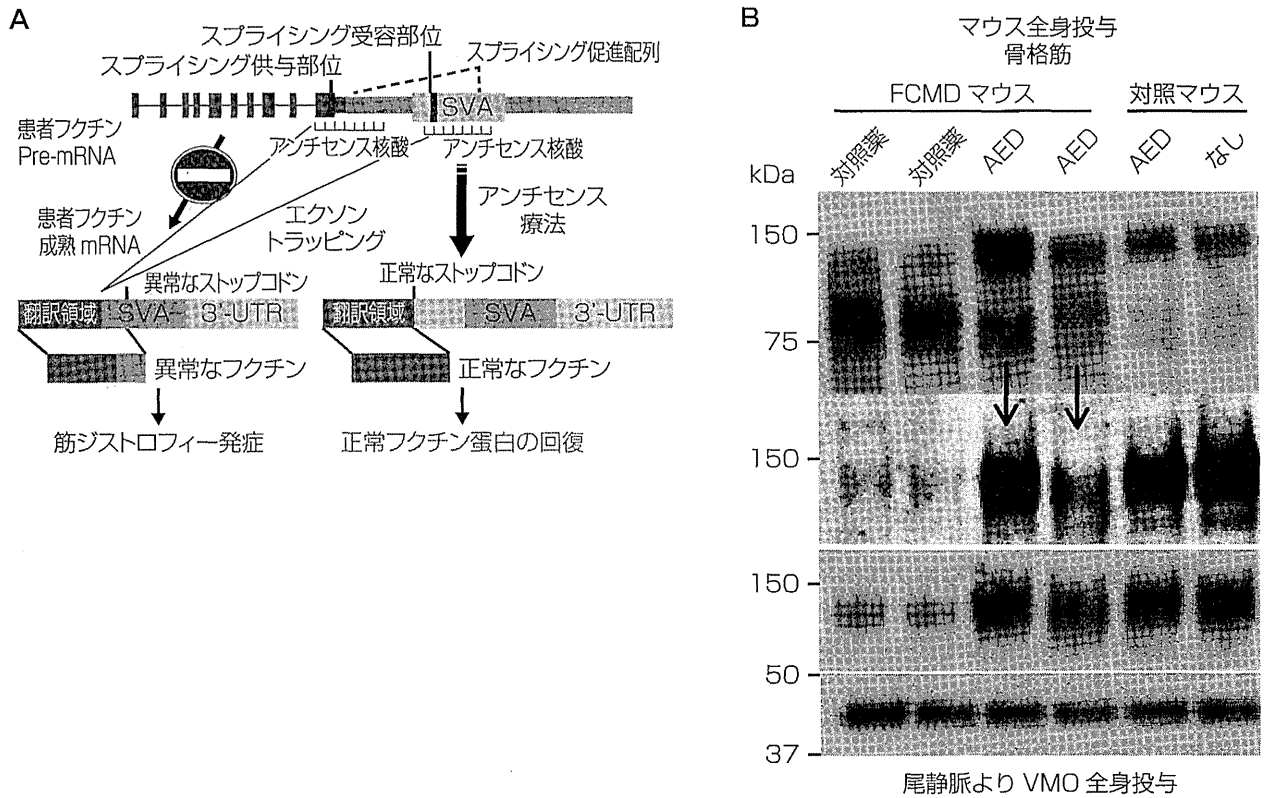


図 3. 福山型のアンチセンス治療

A 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

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。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。

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 $\alpha$ ジスとログリカン（矢印）およびラミニン結合能が回復した。

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、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（エクソントラッピング）が原因となっていた(図3A)<sup>14)</sup>。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<sup>14)</sup>。

### 3) FCMDに対するアンチセンス療法「エクソントラップ阻害療法」

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3A)。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、様々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、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、対照薬投与に比較し、糖鎖の回復を示唆する糖化型 $\alpha$ DGの劇的な増加がみられた<sup>14)</sup>。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3B)<sup>14)</sup>。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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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<sup>14)</sup>。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。

また、ポストリン酸糖鎖不全モデルとして2種類の組織時期特異的フクチン欠損コンディショナルノックアウトマウスを樹立し、筋幹細胞/筋再生におけるポストリン酸糖鎖の重要な役割や、静脈投与によるAAV遺伝子治療により筋病変が回復することを示した<sup>15)</sup>。

### おわりに

筋ジストロフィーはかつてのように不治の病ではなくなりつつある。今回、我々が開発した方法は「エクソントラップ阻害療法」とでも命名でき、本邦FCMDの根本的分子標的治療に道を拓くものである<sup>14)</sup>。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。国際治験中のDuchenne型エクソン52欠失は患者の10%であり、FCMD患者数をDuchenne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。今後、臨床試験の実現を目指したい。

福山型は我が国で初めて記載された疾患であり、患者数も多く、我が国の研究により、治療法開発を進めることは我々の責務であると考えられる。なお、我々が同定開発したフクチンの遺伝子検査は、2006年より健康保険適応となっていることを付記しておく。

著者のCOI(conflicts of interest)開示：戸田達史；研究費・助成金（大日本住友製薬）

### 文 献

- 1) Goemans NM, et al: Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 364: 1513-1522, 2011.

- 2) Cirak S, et al : Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment : an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* 378 : 595-605, 2011.
- 3) Barton-Davis ER, et al : Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 104 : 375-381, 1999.
- 4) Welch EM, et al : PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447 : 87-91, 2007.
- 5) Bogdanovich S, et al : Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420 : 418-421, 2002.
- 6) Lach-Trifilieff E, et al : An antibody blocking activin type II receptors induces strong skeletal muscle hypertrophy and protects from atrophy. *Mol Cell Biol* 34 : 606-618, 2014.
- 7) Malicdan MC, et al : Prophylactic treatment with sialic acid metabolites precludes the development of the myopathic phenotype in the DMRV-hIBM mouse model. *Nat Med* 15 : 690-705, 2009.
- 8) Kobayashi K, et al : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394 : 388-392, 1998.
- 9) Kanagawa M, et al : The genetic and molecular basis of muscular dystrophy : roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *J Hum Genet* 51 : 915-926, 2006.
- 10) Yoshida-Moriguchi T, et al : O-mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding. *Science* 327 : 88-92, 2010.
- 11) Inamori K, et al : Dystroglycan function requires xylosyl- and glucuronyltransferase activities of LARGE. *Science* 335 : 93-96, 2012.
- 12) Goddeeris MM, et al : LARGE glycans on dystroglycan function as a tunable matrix scaffold to prevent dystrophy. *Nature* 503 : 136-140, 2013.
- 13) Yoshida-Moriguchi T, et al : SGK196 is a glycosylation-specific O-mannose kinase required for dystroglycan function. *Science* 341 : 896-899, 2013.
- 14) Taniguchi-Ikeda M, et al : Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 478 : 127-131, 2011.
- 15) Kanagawa M, et al : Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. *Hum Mol Genet* 22 : 3003-3015, 2013.

福山型筋ジストロフィー 仕組みの解明 治療法開発

戸田達史

神戸大学大学院医学研究科 神経内科学/分子脳科学

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子としてジストロフィンが発見されて以来、この 20 年間で、40 種以上の筋ジス原因遺伝子が報告されている。我が国において、デュシェンヌ型に次いで多い小児期筋ジスである福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、先天性筋ジストロフィーに多小脳回などの脳奇形を伴う常染色体性劣性遺伝疾患であり、我々の 90 人に 1 人が保因者である。1960 年に福山幸夫博士によって発見され、その約 40 年後の 1998 年に、我々によって、原因遺伝子フクチンが同定された。

福山型は、muscle-eye-brain 病 (MEB) などと類似疾患とされる。我々は遠藤玉夫博士らとともに糖転移酵素 POMGnT1 の遺伝子が MEB 原因遺伝子であることを明らかにした。FCMD や MEB、Walker-Warburg (WWS) 症候群、肢帯型 2I 型などに共通した病態として、 $\alpha$  ジストログリカンの糖鎖修飾異常が発見され、 $\alpha$  ジストログリカナパチーという新しい疾患概念が確立された。糖転移酵素の欠損により  $\alpha$  ジストログリカンの糖鎖修飾が乱れ、ラミニンなどとの結合ができなくなり、脳奇形を伴う筋ジストロフィーが発症していると考えられている。

さらに近年、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。殆どの FCMD 患者は、フクチン遺伝子の 3' 非翻訳領域に約 3kb の SVA 型レトロトランスポゾンの挿入変異を持つ。我々は、FCMD が SVA の挿入により誘導される「スプライシング異常症」であることを見いだした。さらに異常スプライシングを阻止するため、スプライシング配列を標的とするアンチセンス核酸を設計し、患者由来細胞に導入、及び FCMD モデルマウスに筋注ならびに全身投与した結果、患者由来細胞において正常のフクチンが回復し、またモデルマウスにおいて正常フクチンの回復、 $\alpha$  ジストログリカンの糖鎖修飾及びラミニン結合能の回復が確認された。SVA のエクソントラッピング機能はヒトの疾患や進化に関与しており、FCMD に対しては初の根治療法実現の可能性が示唆される (エクソントラップ阻害療法)。

本講演では、福山型筋ジストロフィーの臨床、遺伝子、病態、分子標的治療などを概観する。



