

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32643
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26461281
 研究課題名(和文) -ジストログリカノパチーによる筋ジストロフィーに対する糖転移酵素補充療法の開発

研究課題名(英文) Development of glycosyltransferase replacement therapy for muscular dystrophy caused by alpha-dystroglycanopathy

研究代表者
 斉藤 史明 (Saito, Fumiaki)
 帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：40286993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：-ジストログリカン(-DG)は糖鎖を介して細胞外のラミニンと結合することで細胞膜を安定化している。-DGの糖鎖修飾に関わる糖転移酵素の遺伝子異常は筋ジストロフィー、脳奇形、眼球異常など多彩な症状を呈しこれらは-ジストログリカノパチーと呼ばれる。本研究ではこの原因となる糖転移酵素の投与により-DGの糖鎖修飾を回復させて疾患治療を目指す糖転移酵素補充療法の開発に向けての基礎的な研究を行った。そしてCRISPR/Cas9のゲノム編集技術により培養細胞を用いた糖転移酵素補充療法のアッセイ系を確立するとともに、糖転移酵素を小胞体へ運搬するための担体としてリシンBサブユニットの利用を提唱した。

研究成果の概要(英文)：-Dystroglycan (-DG) stabilizes plasma membrane by binding with laminin via its glycan chain.

Mutations of glycosyltransferases involved in the glycosylation of -DG lead to multi-organ disorders including muscular dystrophy, brain anomaly and eye abnormality, which is called -dystroglycanopathy. In this study, we conducted basic research to develop glycosyltransferase replacement therapy for -dystroglycanopathy, which aims to treat the patients by correcting abnormal glycan structure of -DG with glycosyltransferases protein. Further, using CRISPR/Cas9 genome editing technology, we established cell culture assay system for the glycosyltransferase replacement therapy, and advocated to use ricin-B subunit as a trafficking tag to the endoplasmic reticulum.

研究分野：医歯薬学

キーワード：筋ジストロフィー -ジストログリカノパチー 福山型先天性筋ジストロフィー 糖転移酵素 酵素補充療法

1. 研究開始当初の背景

-ジストログリカン(-DG)はジストロフィン糖蛋白複合体の構成蛋白質であり、糖鎖を介して細胞外のラミニンと結合することで細胞膜を安定化している。近年 -DG の糖鎖修飾の異常により筋ジストロフィー、脳奇形、心筋症など多彩な疾患が発症することが明らかとなりこれらは -ジストログリカノパチーと総称されている。本邦においては福山型先天性筋ジストロフィーが最も発症頻度が高く、高く代表的な疾患である。本疾患群では糖転移酵素をコードする遺伝子の変異により -DG の糖鎖修飾が未熟な状態にとどまり、この結果 -DG とラミニンとの結合が断たれることが原因と考えられている。本研究は -ジストログリカノパチーの原因となっている糖転移酵素を体外から投与することにより -DG とラミニンとの結合性を回復させて疾患の治療を目指す、すなわち糖転移酵素補充療法の実現に向けての基礎的な研究を行うことを目的としている。

2. 研究の目的

近年 Gaucher 病や Pompe 病などライソゾーム酵素欠損病において酵素補充療法が実用化され大きな成果を挙げている。これらライソゾーム酵素欠損病で欠損しているのはライソゾームに局在する糖や脂質の分解酵素である。一方 α -ジストログリカノパチーで欠損しているのは主としてゴルジ体に局在している糖転移酵素である。我々はこのゴルジ体酵素欠損病として位置づけられる α -ジストログリカノパチーに対しても酵素補充療法が試みられるべきであると考え本研究を開始した。

糖転移酵素補充療法の成否に最も影響する要因の一つは、体外から投与された酵素が細胞内へ取り込まれてその機能を発揮すべきゴルジ体まで輸送される際の運搬効率にあると考えられる。そこで本研究では細胞外からゴルジ体への輸送を担う運搬体としてコレラトキシンあるいはリシンを利用することを検討した。現在細胞外からゴルジ体へと輸送されることが知られている物質はこれら数種類の蛋白質のみである。いずれも A サブユニットと B サブユニットから構成され A サブユニットは毒素であるが、B サブユニットは A サブユニットの運搬体としてのみ機能しており毒性は全くない。そこで本研究ではこれら B サブユニットと糖転移酵素との融合蛋白質を作製することで将来的な酵素補充療法の可能性を検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 糖転移酵素補充療法のアッセイ系

糖転移酵素補充療法を検討するにあたって、その効率などを判定するためのアッセイ系を確立する必要がある。このために HEK293 細胞に対して CRISPR/Cas9 を用いて福山型先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子であるフクチンの機能が欠損する細胞を作製した。

具体的にはフクチン遺伝子のエクソン 5 に guide RNA を設計し、Cas9 とともに HEK293 細胞へトランスフェクションを行った。その後遺伝子導入細胞を薬剤耐性により選別し変異導入株のクローニングを行った。フクチン遺伝子の変異はシーケンスにより確認した。

(2) フクチン-リシン B 融合蛋白質

フクチン遺伝子とリシン B サブユニットを発現プラスミド pEF4 ならびに pCMV6 にクローニングした。この際融合蛋白質を可溶性画分に回収するためにフクチンの膜貫通ドメインは欠損させた。これらプラスミドを上述のフクチン欠損 HEK293 細胞へトランスフェクションを行った。目的とする融合蛋白質の発現はウエスタンブロット法により確認した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた糖転移酵素補充療法のアッセイ系の確率

本研究では -ジストログリカノパチーのなかでも特に本邦において発症率の高い福山型先天性筋ジストロフィーに標的を絞り研究を行った。始めに本症で欠損しているフクチンと、小胞体への運搬体として利用するコレラトキシン B サブユニットあるいはリシン B サブユニットとの融合蛋白質のコンストラクトを作製した。そしてこれらを細胞に遺伝子同導入して -DG の糖鎖修飾が正常化するかどうかをフクチン欠損マウス ES 細胞を用いて検討した。しかしリポフェクション法、エレクトロポレーション法などを試みたものの遺伝子導入効率が低く、十分な量の蛋白質の発現が得られなかった。そこで細胞の系を遺伝子導入効率の高い HEK293 に変更して、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いてフクチンノックアウト細胞株の作製を試みた。そしてフクチン遺伝子のエクソン 5 に 1 塩基が挿入される結果その下流においてフレームシフトおよび終止コドンが生じ、不完全なフクチンを産生する細胞株 (indel 1 と命名)を得た。

この細胞株をウエスタンブロットで確認すると、-DG のラミニン結合能を反映する糖鎖修飾に対する抗体である 11H6 に対する反応性は消失する一方、-DG のコア蛋白に対する抗体では通常よりも分子量の小さい -DG の発現を認めた (図 1)。このことから indel 1 株はフクチンが機能不全に陥り -DG の糖鎖修飾が不完全となっている、すなわち福山型先天性筋ジストロフィーのモデル細胞と見なすことができる。これに pEF4 や pCMV6 などのフクチン発現プラスミドをトランスフェクションするとフクチンの機能が回復して -DG の糖鎖修飾が正常化した (図 1)。以上より HEK293 細胞、indel 1 株はフクチンの糖転移酵素補充療法を開発するにあたってのアッセイ系として有用であることが明らかとなった。

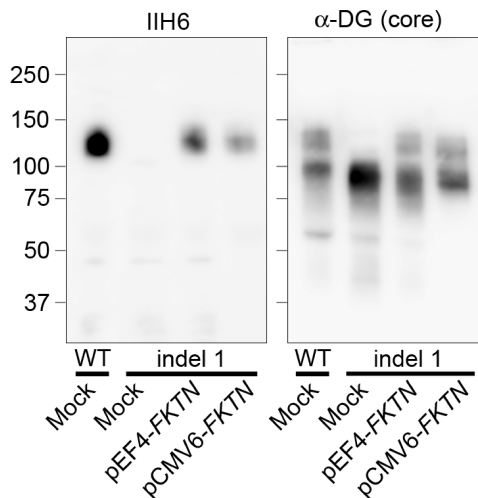


図 1 CRISPR/Cas9 によりフクチンの機能が欠損した HEK293 細胞株 (indel 1) を作製した。

(2) フクチン-リシン B 融合蛋白質の作製

前述の通り糖転移酵素補充療法は生体外から糖転移酵素を投与することを想定している。そこで投与した酵素はその機能を発揮する場である、ゴルジ体まで運搬されなくてはならない。そこで本研究では細胞外から取り込まれ、効率よくゴルジ体まで運搬される事が知られているコレラトキシン B サブユニットとリシン B サブユニットに着目した。両者とも A サブユニットは毒素であるが、B サブユニットには毒性はない。

ここでコレラトキシン B サブユニットは 5 量体を形成しなければ運搬体としての機能が発揮できないのに対して、リシン B サブユニットは単量体で機能する。そこでリシン B サブユニットとフクチンの融合蛋白質を先程の HEK293 細胞、indel 1 株を用いて発現した。ここではフクチンを可溶性画分に回収する目的で膜貫通ドメインを欠損させている (図 2.A)。その結果フクチンとリシン B サブユニットは indel 1 株に発現し、発現細胞においては -DG のラミニン結合能が回復した。しかしフクチンの膜貫通ドメインを欠損させたにもかかわらず多くの融合蛋白質は不溶性画分に回収されてしまった (図 2.B)。今後可溶性を増すために更なる検討が必要となる。

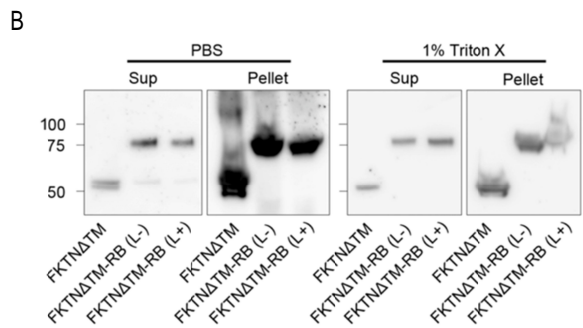
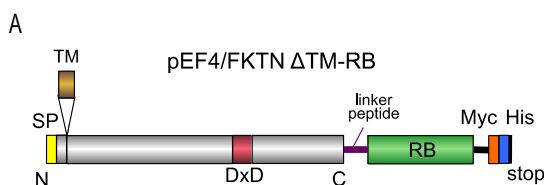


図 2 フクチンとリシン B サブユニット融合蛋白質のコンストラクト (A) と HEK293 細胞 indel 1 株での融合蛋白質の発現 (B)。TM: 膜貫通ドメイン欠損体、L: リンカーペプチド。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Rader EP, Turk R, Willer T, Beltrán D, Inamori K, Peterson TA, Engle J, Prouty S, Matsumura K, Saito F, Anderson ME, Campbell KP. Role of dystroglycan in limiting contraction-induced injury to the sarcomeric cytoskeleton of mature skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci U S A. (査読有) 2016;113:10992-10997. doi: 10.1073/pnas.1605265113.

Okuma H, Saito F, Mitsui J, Hara Y, Hatanaka Y, Ikeda M, Shimizu T, Matsumura K, Shimizu J, Tsuji S, Sonoo M. Tubular aggregate myopathy caused by a novel mutation in the cytoplasmic domain of STIM1. Neurol Genet. (査読有) 2016;2:e50. doi: 10.1212/NXG.0000000000000050.

Saito F, Kanagawa M, Ikeda M, Hagiwara H, Masaki T, Ohkuma H, Katanosaka Y, Shimizu T, Sonoo M, Toda T, Matsumura K. Overexpression of LARGE suppresses muscle regeneration via down-regulation of insulin-like growth factor 1 and aggravates muscular dystrophy in mice. Hum Mol Genet. (査読有) 2014;23:4543-5458. doi: 10.1093/hmg/ddu168.

[学会発表](計 14 件)

Saito F, Okuma H, Mitsui J, Hara Y, Hatanaka Y, Ikeda M, Shimizu T, Matsumura K, Shimizu J, Tsuji S, Sonoo M. Tubular aggregate myopathy caused by a novel mutation in the cytoplasmic domain of STIM1. 21th International congress of the World Muscle Society. Granada, Spain. Oct 6, 2016.

齊藤史明、原雄二、三井純、畑中裕己、萩原宏毅、真先敏弘、清水輝夫、清水潤、辻省次、松村喜一郎、園生雅弘. Novel mutation of STIM1 causes dysregulation of Ca²⁺

homeostasis in tubular aggregate myopathy.
第 5 7 回日本神経学会学術大会 . 神戸 .
2016.5.20

大熊秀彦、真先敏弘、齋藤史明、萩原宏毅、池田美樹、松村喜一郎、園生雅弘、Rambukkana Anura . Recapitulation of ML-induced reprogramming of Schwann cells by artificial methods. 第 5 7 回日本神経学会学術大会 . 神戸 . 2016.5.18

真先敏弘、大熊秀彦、齋藤史明、萩原宏毅、池田美樹、松村喜一郎、園生雅弘、Rambukkana Anura . Similarity of Schwann cell dedifferentiation in ML-induced reprogramming and Wallerian degeneration. 第 5 7 回日本神経学会学術大会 . 神戸 . 2016.5.18

萩原宏毅、相原正博、大熊秀彦、真先敏弘、松村喜一郎、園生雅弘、齋藤史明 . Dynamics of myokines in the process of muscle atrophy and reloading in the mouse disuse model. 第 5 7 回日本神経学会学術大会 . 神戸 . 2016.5.20

齋藤史明、大熊秀彦、池田美樹、萩原宏毅、真先敏弘、清水輝夫、松村喜一郎、園生雅弘 . α -dystroglycan N 末端ドメインの過剰発現がマウス骨格筋に及ぼす影響に関する検討 . BMB2015 (第 3 8 回日本分子生物学会年会、第 8 8 回日本生化学会大会合同大会) . 神戸 . 2015.12.2

大熊秀彦、三井純、原雄二、萩原宏毅、真先敏弘、池田美樹、畑中裕己、清水輝夫、松村喜一郎、清水潤、辻省次、園生雅弘、齋藤史明 . Tubular aggregate myopathy における STIM1 の新規変異と C2C12 筋芽細胞への影響 . 第 1 回日本筋学会学術集会 . 東京 . 2015.8.8

齋藤史明、大熊秀彦、萩原宏毅、真先敏弘、池田美樹、清水輝夫、園生雅弘、松村喜一郎 . Analysis of the functional role of α -dystroglycan N-terminal domain in vivo . 第 5 6 回日本神経学会学術大会 . 新潟 . 2015.5.20

大熊秀彦、三井純、大森亜希、肥田あゆみ、畑中裕己、松村喜一郎、清水潤、辻省次、園生雅弘、齋藤史明 . Tubular aggregate myopathy における新規 STIM1 変異と筋芽細胞に及ぼす影響 . 第 5 6 回日本神経学会学術大会 . 新潟 . 2015.5.20

齋藤史明、金川基、池田美樹、萩原宏毅、真先敏弘、大熊秀彦、片野坂友紀、清水輝夫、園生雅弘、戸田達史、松村喜一郎 . LARGE の過剰発現は IGF-1 の発現低下により筋再生を抑制してマウスの筋ジストロフィーを悪化させる . 第 8 7 回日本生化学会大会 . 京都 . 2014.10.18

齋藤史明、金川基、池田美樹、萩原宏毅、真先敏弘、大熊秀彦、片野坂友紀、清水輝夫、園生雅弘、戸田達史、松村喜一郎 . LARGE の過剰発現による筋ジストロフィーモデルマウスにおける筋再生の抑制 . 第 3 7 回日本神

経科学大会 . 横浜 . 2014.9.11

大熊秀彦、畑中裕己、三井純、齋藤史明、大森亜希、肥田あゆみ、松村喜一郎、清水潤、辻省次、園生雅弘 . STIM1 遺伝子に変異を認める Tubular aggregate を伴う筋疾患の 42 歳男性例の臨床病理像の検討 . 第 5 5 回日本神経病理学会総会学術研究会 . 東京 . 2014.6.7

齋藤史明、金川基、萩原宏毅、真先敏弘、池田美樹、清水輝夫、園生雅弘、戸田達史、松村喜一郎 . Fukutin ノックアウトマウスにおける LARGE の過剰発現 - 治療応用へ向けての課題 - . 第 5 5 回日本神経学会学術大会 . 福岡 . 2014.5.24

萩原宏毅、齋藤史明、真先敏弘、松村喜一郎、園生雅弘 . レスベラトロールは線維化を軽減し先天性筋ジストロフィーモデルの症状を改善する . 第 5 5 回日本神経学会学術大会 . 福岡 . 2014.5.24

〔 図書 〕 (計 2 件)

大熊秀彦、齋藤史明、松村喜一郎 . 骨格筋症候群 (第 2 版) - その他の神経筋疾患を含めて - [上] 筋ジストロフィーおよび膜イオンチャンネル異常症 肢帯型筋ジストロフィー 常染色体劣性型 LGMD, LGMD2G, 日本臨床 2015; 0047-1852 別冊骨格筋症候群 (上) : 122-123.

大熊秀彦、齋藤史明、松村喜一郎 . 骨格筋症候群 (第 2 版) - その他の神経筋疾患を含めて - [上] 筋ジストロフィーおよび膜イオンチャンネル異常症 肢帯型筋ジストロフィー 常染色体劣性型 LGMD, LGMD2H, 日本臨床 2015; 0047-1852 別冊骨格筋症候群 (上) : 124-125.

〔 産業財産権 〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔 その他 〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 史明 (Saito Fumiaki)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：40286993

(2) 研究分担者

真先 敏弘 (Masaki Toshihiro)

帝京科学大学・医療科学部・教授

研究者番号：00585028

萩原 宏毅 (Hagiwara Hiroki)

帝京科学大学・医療科学部・教授

研究者番号：80276732

(3) 連携研究者

松村 喜一郎 (Matsumura Kiichiro)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：50260922

(4) 研究協力者

()