

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591099

研究課題名（和文） ジストログリカンの機能修復による筋ジストロフィーに対する治療戦略

研究課題名（英文） Therapeutic strategy for muscular dystrophy by restoring the function of dystroglycan

研究代表者

松村 喜一郎 (MATSUMURA KIICHIRO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：50260922

研究成果の概要（和文）：糖転移酵素 LARGE を過剰発現する遺伝子改変マウスを作出した。同マウスは正常に誕生、発育し、その骨格筋ではジストログリカンのラミニン結合能が著明に亢進していた。このマウスを先天性筋ジストロフィーのモデルマウスである *dy^{2J}* マウスと交配して、LARGE によるモデルマウスの治療実験を試みた。誕生したマウスにおいて筋ジストロフィーの改善は認められず、筋線維の変性はむしろ増強傾向を示した。

研究成果の概要（英文）：We generated transgenic mice overexpressing a glycosyltransferase, LARGE. The mice were born and grew normally, and laminin binding activity of dystroglycan was greatly increased in the skeletal muscle. We crossed the transgenic mice with *dy^{2J}* mice, a mouse model of congenital muscular dystrophy, to examine therapeutic effect of LARGE overexpression. The dystrophic change of *dy^{2J}* mice overexpressing LARGE, however, was not improved and the degeneration of myofibers was rather deteriorated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学・筋ジストロフィー・ジストログリカン・ラミニン・LARGE・糖鎖修飾

1. 研究開始当初の背景

近年、先天性筋ジストロフィーおよび肢帯型筋ジストロフィーの一部において、糖転移酵素と推定される遺伝子変異が相次いで明らかにされた。その代表的な疾患である福山型先天性筋ジストロフィーは *fukutin* の変異により発症し、我が国において特異的に頻度

の高い疾患である。このほか筋-眼-脳病においては *POMGnT1* の、Walker-Warburg 症候群では *POMT1* と *POMT2* の、先天性筋ジストロフィー1C型と肢帯型筋ジストロフィー2I型では *FKRP* の、さらに先天性筋ジストロフィー1D型では *LARGE* の遺伝子変異が見いだされている。これらの疾患ではその遺伝子産物の機能異常の結果 α -

ジストログリカンの糖鎖修飾に異常が生じ、このため基底膜中のラミニンに対する結合能が著減する。この結果、ジストログリカン-ラミニン間の相互作用が断たれることが筋細胞の変性壊死の原因と考えられている。一方で、先天性筋ジストロフィー1A型はラミニンの遺伝子変異により発症するが、同様にジストログリカン-ラミニン間の相互作用の欠如がその病態に深く関わっている。最近、糖転移酵素であるLARGEに関して興味深い報告がなされた。これはLARGE遺伝子の過剰発現により、ジストログリカンのラミニン結合能が著明に亢進するというものである。従って、LARGEの過剰発現によりジストログリカンの糖鎖修飾を増強してジストログリカン-ラミニン間の相互作用を亢進させる事が、これら筋ジストロフィーの治療戦略を考える上で大きな分子標的と考えられるようになってきた。

2. 研究の目的

上述したように各種の筋ジストロフィーはジストログリカン-ラミニン間の相互作用の減弱ないし欠如という共通の特徴を有しており、この結果筋細胞膜が脆弱になるとともに細胞内外のシグナルトランスダクションに破綻が生じ、筋細胞の変性壊死が生じると考えられている。従ってこれら疾患に対する治療戦略を構築する際には、ジストログリカン-ラミニン間相互作用を増強する事が格好の分子標的となる。本研究はLARGEを用いたジストログリカンのラミニン結合能増強作用を利用して、この分子標的に対する介入を試みるものである。具体的には、これまでLARGEによるジストログリカンのラミニン結合能の亢進作用は *in vitro* の系において報告されたものであることから、(1) マウスを用いた *in vivo* の系で同様の作用が観察されるのかを確認すること、そして将来的なヒトの筋ジストロフィー治療への応用を見据えて、(2) 筋ジストロフィーのモデルマウスを用いたLARGEによる治療実験を行うことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) LARGEトランスジェニックマウスの表現形の解析

研究代表者らはCAGプロモーターの制御下にLARGEを過剰発現するトランスジェニックマウス (LARGE Tgマウス) を作出していた。本研究では同マウスの骨格筋や心筋におけるジストログリカンのラミニン結合能についてプロットオーバーレイ法を用いて検討を行った。また骨格筋や心筋をはじめとする各組織の異常の有無を形態学的、免疫組織化

学的に検討した。さらに、同マウスの成長、行動、寿命などが野生型と比較して変化していないかどうかを観察した。

(2) 筋ジストロフィーモデルマウスに対するLARGEによる治療効果の検討

dy^{2J} マウスは先天性筋ジストロフィー1A型のモデルマウスで、ラミニン $\alpha 2$ 鎖の点変異によるラミニンの機能障害からジストログリカン-ラミニン間の相互作用の減弱が生じていると考えられる。このマウスをLARGE Tgマウスと交配し、その結果得られたLARGEを過剰発現している dy^{2J} マウス (dy^{2J} /LARGEマウス) の筋ジストロフィーを中心とした表現型を観察し、 dy^{2J} マウスとの比較、検討を行った。治療効果は①マウスの体重、②握力、③寿命、④骨格筋の病理組織像などを検討して総合的に判定した。骨格筋の病理組織像に関しては、H-E染色や免疫蛍光抗体法を用いて筋線維径、線維化、中心核保有線維を定量化して統計学的検討を加えた。

(3) LARGE Tgマウス骨格筋の遺伝子発現解析

LARGE Tgマウスと野生型マウスの腓腹筋からRNAを抽出して、DNAマイクロアレイ解析を行い遺伝子発現の変動を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) LARGE Tgマウスの解析の結果骨格筋を含む各種臓器においてLARGEの過剰発現を認めた。またプロットオーバーレイ法の結果から、同マウスの骨格筋ではジストログリカンのラミニン結合能が著明に亢進していることが明らかとなった。一方、同マウスは正常に誕生、発育し、交配も可能であり、外観上明らかな行動異常を示さなかった。さらに各組織を光学顕微鏡で観察したところ明らかな形態学的異常は認められなかった。これらのことからLARGEは *in vivo* においても確かにジストログリカンのラミニン結合能を亢進させるが示されると共に、LARGEの過剰発現は明らかな有害事象を引き起こさないことから治療への応用に際しても副作用等の問題が生じる可能性が低いことが示唆された。

(2) dy^{2J} マウスとLARGE Tgマウスとの交配の結果誕生した dy^{2J} /LARGEマウスではジストログリカンのラミニン結合能の著明な亢進が認められた。しかし予想に反して dy^{2J} /LARGEマウスは dy^{2J} マウスよりも有意に体重が小さく、短寿命であった。さらにH-E染色における筋線維の変性壊死像の改善は認められず、定量的解析の結果むしろ筋線維は dy^{2J} マウスよりも小径化し、結合織の浸潤

も増加していた。一方で中心核は dy^{2J} マウスよりも有意に減少していた。これらのことから dy^{2J} /LARGE マウスでは、筋線維の再生過程に何らかの障害が生じている可能性が示唆された。

(3) DNA マイクロアレイ解析の結果、LARGE の過剰発現により筋再生や結合織生成に関与する遺伝子の発現変動が観察された。このことから LARGE の過剰発現によってジストログリカン-ラミニン間の相互作用が増強されただけではなく、何らかの細胞内シグナルの変化が惹起された可能性が考えられた。そしてこれにより dy^{2J} /LARGE マウスでは dy^{2J} マウスより筋ジストロフィーが悪化したものと推測される。今後この LARGE により惹起される細胞内シグナルの変化が同定されれば、筋細胞の変性、再生の分子機序のさらなる解明と共に新たな治療の分子標的の発見につながる可能性がある。

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 11 件)

- 1) Hagiwara H, Saito F, Masaki T, Ikeda M, Nakamura-Ohkuma A, Shimizu T, Matsumura K. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A enhances myogenesis by coordinating muscle regulatory factors and myogenic repressors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 414: 826-831. 査読有.
- 2) Saito F, Saito-Arai Y, Nakamura-Okuma A, Ikeda M, Hagiwara H, Masaki T, Shimizu T, Matsumura K. Secretion of N-terminal domain of α -dystroglycan in cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 411: 365-369. 査読有.
- 3) Saito F, Matsumura K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and defective glycosylation of α -dystroglycan. *Skeletal Muscle* 2011; 1: 22. 査読有.
- 4) 斉藤史明, 松村喜一郎. α -ジストログリカンの機能異常と筋ジストロフィー. *生体の科学* 2011; 62: 88-90. 査読無.
- 5) Hagiwara H, Matsumura K. Dystroglycan, a multifunctional adaptor protein for signal transduction and a potential therapeutic target. *Current Signal Transduction Therapy*. 2011; 6: 71-81. 査読有.
- 6) 萩原宏毅, 松村喜一郎. 筋ジストロフィー治療薬としてのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤—臨床応用への展望. *帝京医学雑誌* 2011; 34: 303-313. 査読無.

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 斉藤史明, 他. Dystroglycan の機能亢進を用いた癌細胞抑制に関する検討. 第 84 回日本生化学会大会. 京都. 2011. 9. 22
- 2) 斉藤史明. シンポジウム 筋ジストロフィー新規治療法開発の最前線. Large による α -ジストログリカノパチーに対する治療法の開発. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5. 19
- 3) 斉藤史明, 他. Large による α -dystroglycan の機能修復と疾患治療への応用. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5. 19
- 4) 萩原宏毅, 他. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は筋原性制御因子に作用して骨格筋分化を促進する. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5. 18
- 5) Saito F. et al. Characterization of Large transgenic mice - Overexpression of Large and functional up-regulation of α -dystroglycan *in vivo* -. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases. Naples, Italy. July 21, 2010.
- 6) 斉藤史明, 他. 遺伝子改変マウスを用いた Large による α -dystroglycan の機能修復に関する検討. 第 51 回日本神経学会総会. 東京. 2010. 5. 20
- 7) 萩原宏毅, 他. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の骨格筋由来培養細胞に対する効果の検討. 第 51 回日本神経学会総会. 東京. 2010. 5. 20
- 8) 斉藤史明, 他. Large による α -dystroglycan の機能修復に関する検討. 第 82 回日本生化学会大会. 神戸. 2009.10.24.
- 9) Saito F. et al. Overexpression of LARGE strongly increases laminin binding of α -dystroglycan but does not exhibit toxic effects in mice. 14th International congress of the World Muscle Society. Geneva, Switzerland. Sep 10, 2009.
- 10) Matsumura K. et al. Secretion of N-terminal domain of α -dystroglycan in the human cerebrospinal fluid in physiological and pathological conditions. 14th International congress of the World Muscle Society. Geneva, Switzerland. Sep 10, 2009.

[図書] (計 3 件)

- 1) 斉藤史明, 清水輝夫. 筋強直性ジストロフィー. In: 神経疾患最新の治療 2012-2014 (小林祥泰, 水澤英洋編集). 南江堂. 334-336. 2012
- 2) 萩原宏毅, 松村喜一郎. 筋強直性ジストロフィー. In: 神経疾患最新の治療 2009-2011 (小林祥泰, 水澤英洋編集), 南江

堂, 306-308. 2009

3) Saito F, Matsumura K. Dystroglycan and neuromuscular diseases: Its diverging role in muscle, nerve and brain. In: Neurochemistry; Molecular aspects, cellular aspects and clinical applications. Edited by Paços A and Nogueira S. NOVA Science Publishers, Inc. New York. chapter 8, 195-209. 2009.

[その他]

医学情報紙 Medical tribune より取材を受け、同紙 2011 年 8 月 11 日号 (vol14, No32) に研究内容が紹介された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 喜一郎 (MATSUMURA KIICHIRO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号 : 50260922

(2) 連携研究者

斉藤 史明 (SAITO FUMIAKI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号 : 40286993

萩原 宏毅 (HAGIWARA HIROKI)

帝京大学・医学部・客員准教授

研究者番号 : 80276732

清水輝夫 (SHIMIZU TERUO)

帝京大学・医療技術学部・教授

研究者番号 : 00107666