

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700443

研究課題名(和文) 骨格筋細胞外分子欠損症における、組織標的シグナルを利用した汎用治療法の開発研究

研究課題名(英文) Protein anchoring-therapy in defect of extra cellular matrix at skeletal muscle.

研究代表者

伊藤 美佳子 (Mikako Ito)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60444402

研究成果の概要(和文)：

先天性筋(AChE)無力症候群の1つであるCollagen Q (ColQ)変異による終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症に対するタンパク係留療法の開発を試みた。Adeno-associated virusを介してCOLQ遺伝子をColq^{-/-}マウスに導入したところ、顕著な運動機能の回復が見られ、神経筋接合部にColQが集積しAChE活性があることが確認できた。さらにAChE-ColQ複合体タンパクをマウスの臀筋に注入した場合も、四肢の骨格筋において神経筋接合部での集積が認められ、ColQ自身が全身の筋組織に伝達・補充されることを証明した。

研究成果の概要(英文)：

Congenital defects of ColQ cause endplate AChE deficiency and myasthenic syndrome. The intravenous administration of adeno-associated virus -COLQ to Colq^{-/-} mice recovers motor functions, synaptic transmission, as well as the morphology of the NMJ. ColQ-tailed AChE is specifically anchored to NMJ. Furthermore, the *in vivo* injection of recombinant ColQ-tailed AChE protein complex into the gluteus maximus muscle of Colq^{-/-} mice led to accumulation of AChE in non-injected forelimbs. We demonstrated for the first time *in vivo* that the ColQ protein contains a tissue-targeting signal that is sufficient for anchoring itself to the NMJ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学 神経・筋肉生理学

キーワード：先天性筋無力症 遺伝子治療 collagen Q アセチルコリンエステラーゼ欠損症 分子欠損症

1. 研究開始当初の背景

先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndromes) は、神経筋接合部の先天的分子欠損症により神経筋伝達障害が起こる疾患群である。先天性筋無力症候群において欠損・変異をする分子には、(1) 骨格筋ニコチン作動性アセチルコリンレセプター (AChR)、(2) アセチルコリンエステラーゼをシナプス基底膜に係留する collagen Q (Co1Q)、(3) 神経終末のコリン・アセチルトランスフェラーゼ (ChAT)、(4) AChR を endplate に集積させる rapsyn、(5) 骨格筋電位依存性ナトリウムチャンネル、(6) 神経終末より放出される agrin のレセプター MuSK、(7) MuSK 信号伝達系の下流に位置する Dok-7 がある (図 1)。これら分子欠損症の多くでそれぞれの分子病態に応じた治療法が存在するが、Co1Q 欠損症による終板 AChE 欠損症に対する治療法は全く存在せず、致死的な経過を辿ることが多い。

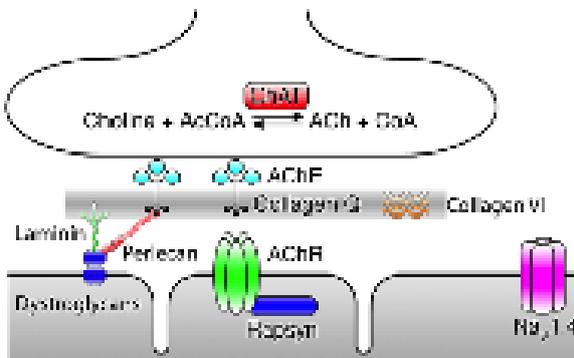


図1 神経筋接合部の分子構築

2. 研究の目的

遺伝性筋疾患研究の目指すところは治療法開発による疾患の完全な克服であり、世界各地で盛んに研究が行われている。本研究は、神経筋接合部の細胞外マトリックス分子欠損症 (図 1) に対する遺伝子治療法の開発を行う。細胞外分子は細胞内分子と異なり、一部の細胞が細胞外分子を発現し放出すれば、細胞外分子自身の組織親和性シグナルによ

り標的組織に集積をすると期待をされる。本研究では Co1Q 分子のシナプス基底膜親和性を利用したタンパク標的療法の開発を行い、細胞外マトリックス分子欠損症に対する汎用の遺伝子治療方法の開発を目指す。

3. 研究の方法

AAV ベクターは、神経・筋・肝細胞等の非分裂細胞に対し 1 回の導入で長期的な遺伝子発現が得られ、また安全性の点でも非病原性・低免疫原性など他のウイルスベクターに比べ利点が多い。ここでは全身の筋肉組織への親和性が高い serotype8 を選び用いた。AAV ベクターは、骨格筋において高活性を示す CMV promoter の下流に COLQ をつないだコンストラクトを作製し、AAV8-helper ベクターと共にリン酸カルシウム法により HEK293 細胞にトランスフェクションした。得られた rAAV を精製しマウスに静注、筋注した。3 週間後にその効果を、運動試験、組織細胞化学実験、電気生理実験により検証した。

また、Co1Q タンパク自身が全身の神経筋接合部に係留することを証明する為、局所感染効率の高い AAV serotype1 を用い、COLQ-IRES-EGFP を運ぶ AAV1 をマウスの筋肉に注射した。そして、非注入部位において COLQ-ACHE 複合体の発現が見られるかを検証した。さらに、HEK に plasmid を transfection して発現させた Co1Q タンパクを筋肉注射し、非注入部での発現を確認した。

4. 研究成果

AAV ベクターは AAV8 型 capsid をコードする AAV8-Co1Q 組換え AAV を作製した。強イオン膜を用いて精製した後、Co1Q^{-/-}マウスの尾静脈より全身投与 (～2x10¹² genome copies) を行った。

投与2週間後から、ロタロッドでの運動テストに改善効果が見られ、4週間後には、運動テストと疲労テストで正常マウスと同成績まで回復し、それは44週後も持続した(図2)。

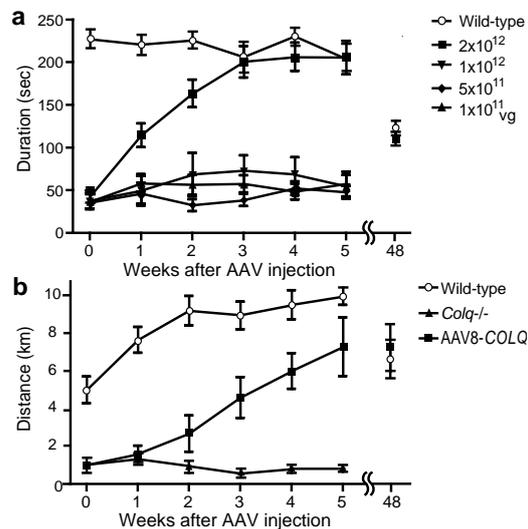


図2 AAV8-COLQ注入マウスのロタロッドテスト (a)、1日の運動距離 (b)。

治療マウスの骨格筋の組織切片を作成し、AChE染色を行うと、 α バンガロトキシンで染まるAChR部位に、活性染色が見られた。また、Col1Q抗体による免疫染色においても、同じ部位でシグナルが検出され、神経筋接合部においてCol1Qが集積していることが確認できた(図3)。

また、シヨ糖勾配遠心法により、治療マウスの骨格筋中のAChE-formを検出したところ、未治療群では見られなかったA₄、A₈、A₁₂ forms AChE-Col1Qが検出された(図4)。以上の結果から、AAV8を介してCOL1Qの遺伝子導入により、発現したCol1QがAChEと複合体を形成し神経筋接合部に係留すること、また治療マウスは、運動機能テストから筋無力症状が正常値まで回復したことが明らかになった。Col1Qは基底膜に係留シグナルを持つ細胞外タンパクであるため、生体内で遺伝子導入された細胞の割合が低くても、自らの細胞外集積に

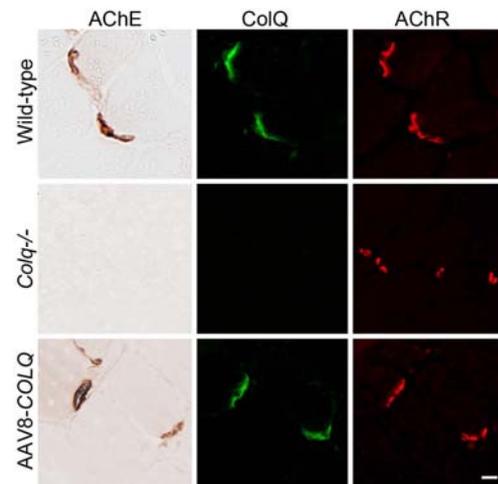


図3 マウスの筋切片においてAChE活性染色、Col1Q抗体染色、 α バンガロトキシンを用いたAChR検出を行った。治療マウスでは筋組織の神経筋接合部でのCol1QとAChEの集積が観察された。

より、十分量を獲得できたと考えられる。

さらに、遺伝子導入を行なったColq^{-/-}マウスを用い、微小板電位、終板電位、複合筋活動電位などの生理学的検査と電子顕微鏡を用いた神経筋接合部のシナプス部位の観察を行った結果、正常化傾向が見られた。組換えA₁₂-AChEの肝臓への異所性集積を調べる為、治療マウスの肝臓より抽出したタンパクを、シヨ糖勾配遠心法により分画した。しかし肝臓からはAChE-Col1Q複合体は検出されなかった。その理由としてAChEの発現が肝臓では少ないこと、Col1Qが結合するMuSK、

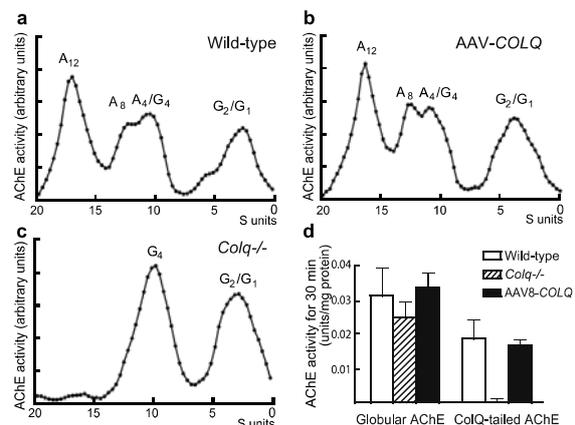


図4 シヨ糖勾配遠心法によるA₄、A₈、A₁₂ formsの分離。治療マウスではColq^{-/-}では存在しないA₄、A₈、A₁₂ formsが出現した。また、筋組織中のAChE活性はWTの80%まで上昇した。

Perlecan が肝臓で発現していないためと考えられる。

次に、Col1Q, AChE plasmid を transfection した HEK 細胞より抽出したタンパクを、ヘパリンカラムにより粗精製し、Col1Q-AChE 複合体タンパクを作製した。これを *Col1q*^{-/-}マウスの臀筋に注入した。このマウスの下肢の骨格筋の神経筋接合部において、Col1Q の蓄積と AChE 活性が認められた(図 5)。このマウスは 1 週間後にはわずかではあるが運動能が上昇した。

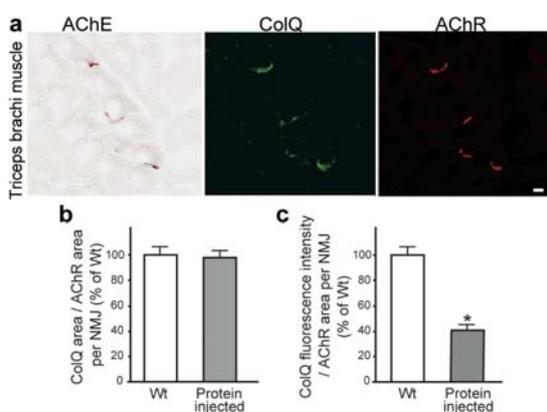


図 5 Col1Q-AChE タンパクを臀筋部に注入した *Col1q*^{-/-}マウスの上肢の骨格筋(非注入部)において、Col1Q と AChE の蓄積が認められた。

以上の結果から、AChE-Col1Q 複合体が発現部位より全身に運搬され、Col1Q 自らの細胞外集積により、神経筋接合部において十分量を獲得でき、正常化に至ったと考えられる。本研究にて開発した遺伝子治療法は、細胞外分子欠損症に対するタンパク分子の補充に非常に有効であると思われるため、collagen Q 欠損症だけでなく、perlecan 欠損症、laminin α_2 欠損症、 α -dystroglycanopathy をなどの細胞外マトリックス・タンパク欠損症への効果も期待できる。今後、これらの分子欠損症の治療研究を行い、汎用の治療法として確立が期待される。

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 8 件)

- ① Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Molecular Therapy* 査読有(印刷中)
- ② Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay, *Scientific Reports* 査読有(印刷中)
- ③ Hirayama M, Nakamura T, Watanabe H, Uchida K, Hama T, Hara T, Niimi Y, Ito M, Ohno K, Sobue G. (2011) Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine correlate with hallucinations rather than motor symptoms in Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat Disord* 査読有 17: 46-49
- ④ Ito M, Ibi T, Sahashi K, Ichihara M, Ito M, Ohno K (2011) Open-label trial and randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of hydrogen-enriched water for mitochondrial and inflammatory myopathies. *Medical Gas Research* 査読有 1:24.
- ⑤ Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Nishida H, Mabuchi N, Engel A.G, Ohno K (2011) Anti-MuSK

autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 査読有 77(20):1819-1826

- ⑥ Kaneko H, Kitoh H, Matsuura T, Masuda A, Ito M, Mottes M, Rauch F, Ishiguro N, Ohno K, (2011) Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in *GPATCH8*. *Human Genetics* 査読有 130(5):671-683
- ⑦ Itoh T, Hamada N, Terazawa R, Ito M, Ohno K, Ichihara M, Nozawa Y, Ito M (2011) Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon c-induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 411:143-149
- ⑧ Fu Y, Masuda A, Ito M, Shinmi J, Ohno K. (2011) AG-dependent 3'-splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon. *Nucleic Acids Res.* 査読有 39: 4396-4404

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K
PROTEIN-ANCHORING THERAPY FOR DELIVERING ACETYLCHOLINESTERASE TO THE NEUROMUSCULAR JUNCTION 日本遺伝子治療学会

ポスター 2011年7月16日 九州大学 (福岡)

- ② 伊藤 美佳子, 付 源、衣斐 達、大野 欽司 分子状水素はパーキンソン病モデルラットの発症を抑制し、ヒト筋疾患の各種マーカーを改善する
日本分子生物学会 ワークショップ
2010年12月10日 神戸国際会議場 (兵庫)
- ③ Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno
rAAV8-Mediated Protein-anchoring therapy for targeting collagen Q-tailed acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. 2010 米国遺伝子細胞治療学会 2010年5月21日 ワシントンD.C. 口頭

[図書] (計 1 件)

1. Kinji Ohno, Mikako Ito, Andrew G. Engel (2012) *Myopathy*, InTech Congenital Myasthenic Syndromes – Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction – (印刷中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 美佳子 (Mikako Ito)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60444402

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：