

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02685

研究課題名（和文）新規リビトールリン酸修飾の分子基盤の解明と筋ジストロフィー治療法開発への展開

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular basis of novel ribitol phosphate modifications and their application to the development of treatments for muscular dystrophy

研究代表者

金川 基（Kanagawa, Motoi）

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00448044

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：新規の翻訳後修飾体であるリビトールリン酸は、筋や神経組織で重要な生理的役割を担っており、その異常は筋ジストロフィーや滑脳症などの原因になる。リビトールリン酸修飾に必要な前駆体であるCDP-リビトールの合成経路や修飾メカニズムは不明であり、また、リビトールリン酸異常症の有効な治療法も存在しない。本研究では、CDP-リビトールの生合成機序を明らかにし、発症メカニズムに基づく代謝物補充療法を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リビトールリン酸修飾の分子機構に不明な点は多く、また、リビトールリン酸異常症に有効な治療法は存在しない。本研究では、リビトールリン酸修飾に重要なCDP-リビトールの合成経路が明らかになり、発症メカニズムに基づいた治療戦略の提唱にも至った。これらの成果は、疾患機序の解明や治療法の開発につながり、学術的・社会的にも大きな貢献を果たした。

研究成果の概要（英文）：Ribitol phosphate, a novel post-translational moiety, plays important roles in skeletal muscle and nerve tissues, and its abnormalities lead to muscular dystrophy and lissencephaly. The biosynthetic pathway of CDP-ribitol, a precursor required for ribitol phosphate modification, and the detailed mechanism of ribitol phosphate modification are unknown, and there is no effective treatment for ribitol phosphate-defective diseases. In this study, we elucidated the biosynthetic mechanism of CDP-ribitol and proposed an enzyme product supplementation therapy based on the pathogenesis.

研究分野：医化学

キーワード：筋ジストロフィー 糖鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸、タンパク質に次ぐ第3の生命鎖とよばれる糖鎖は、脂質やタンパク質に修飾された形で存在し、多様な生理的役割を担う翻訳後修飾体である。一方で、その複雑な構造と修飾機序がネックになり、研究の進展が遅れている感は否めない。しかし、逆にいえば、糖鎖がコードする生物学的情報を読み解くことで、今まで明らかにされなかった生命現象や病態機序が解明できると考えられ、その可能性に期待がもたれている。

我々は糖鎖の異常が筋ジストロフィーの原因になることを見出し、糖鎖と疾患の関係を明確なものにしてきた (Nature 2002-参考文献1)。糖鎖異常はジストログリカンという基底膜ラミニンの受容体に生じるため、ジストログリカン異常症 (DG 異常症) とも呼ばれている。DG 異常症は筋ジストロフィーに加え、滑脳症や精神発達遅滞などの中枢神経障害を伴う。発症に直結する糖鎖の構造や修飾酵素は長年の間論争的であったが、我々は世界に先駆けて糖鎖構造の全容解明に成功し、哺乳類では存在が知られていなかったリビトールリン酸という新型の修飾体が存在することを発見した (Cell Rep 2016-参考文献2)。リビトールリン酸はラミニン結合性糖鎖の足場となり、その欠損はラミニン結合能の消失につながる。我々は更に、機能未知だった DG 異常症の原因遺伝子のうち、フクチン、FKRP、TMEM5、ISPD の4つの遺伝子機能を明らかにし、これらがリビトールリン酸修飾に関わる酵素であることを報告した (Cell Rep 2016-参考文献2; JBC 2016-参考文献3)。この結果、DG 異常症の大半がリビトールリン酸異常症であることも明らかになった。

ISPD はリビトールリン酸の前駆体 (供与基質) である CDP-リビトール (CDP-Rbo) の合成酵素で、フクチンと FKRP は CDP-Rbo を基質として用いるリビトールリン酸転移酵素、TMEM5 はラミニン結合糖鎖とリビトールリン酸を結ぶ酵素である。我々はフクチン欠損マウスを用いて、リビトールリン酸修飾が筋再生、脳皮質形成、心機能維持に重要な役割を担っており、その破綻が筋ジストロフィー、滑脳症、心不全の原因になることも明らかにしてきた。一方で、リビトールリン酸の前駆体である CDP-Rbo の生合成経路や、リビトールリン酸修飾の詳細なメカニズムなどに不明な点は多く、リビトールリン酸不全症に対する有効な治療法も存在しない。リビトールリン酸という新型の翻訳後修飾メカニズムと、その不全によって発症する疾患を完全に理解するためにも、これら学術的問題の解決が強く望まれる。

2. 研究の目的

リビトールリン酸修飾の分子基盤を包括的に明らかにし、リビトールリン酸異常症の治療戦略を構築することを目的とする。具体的には、CDP-Rbo 生合成経路を明らかにし、リビトールリン酸修飾の分子基盤を応用した治療法を開発することを目指した。

3. 研究の方法

CDP-Rbo 生合成経路の解明

組織や細胞内における CDP-Rbo および CDP-Rbo 合成酵素 ISPD の基質であるリビトール5リン酸 (Rbo5P) の高感度・高精度定量測定法を用いて、RboP 産生経路に関わる分子の探索を行った。

リビトールリン酸修飾の分子基盤を応用した治療法の開発

DG 異常症モデルマウスとして骨格筋選択的な ISPD 欠損マウス (Myf5-Ispd cK0) を用いて、ISPD 酵素産物である CDP-Rbo 補充療法の有効性を検証した。

4. 研究成果

CDP-Rbo 生合成経路の解明

糖アルコールは一般的に糖のアルデヒド基あるいはケト基が還元されて生じることから、Rbo5P 産生に関わる代謝経路として、リボース・リブロースの還元で生じた Rbo がリン酸化されて Rbo5P となる経路と、リボースリン酸・リブロースリン酸が還元されて Rbo5P となる経路が想定された。また、ISPD 欠損細胞のトランスクリプトーム解析を実施し、これらの経路に関わる分子が Rbo5P 産生に関わることも示唆された。リボースはリボキナーゼ、Rbo とリブロースは FGGY にそれぞれリン酸化されることが報告されている。そこで、アルデヒド基とケト基の還元に関連する酵素群 Aldo-keto reductase (AKR) family のうち、糖の還元に関わることが報告されている AKR1A1、AKR1B1、AKR1C1 の組換えタンパク質を作製し Rbo5P 産生との関連を調べた。HEK293T 細胞を用いた解析から内在性の糖還元活性はリボースに対する比活性が最も高く、その活性は主に AKR1B1 に由来していた。また、AKR1B1 の強制発現細胞では CDP-Rbo の産生量が増加したことから、AKR1B1 によりリボースから還元された Rbo が FGGY にリン酸化されて Rbo5P となる経路が CDP-Rbo の産生に関与することが明らかになった。以上の結果より、CDP-Rbo 生合成経路の全容が解明された。(J Biochem 2024)

リビトールリン酸修飾の分子基盤を応用した治療法の開発

Myf5-Ispd cK0 マウスは健常コントロール群と比較して握力が弱く、体重や筋重量も減少しており、筋病変マーカーである血清クレアチンキナーゼ値は上昇していた。また、20 週齢までに約 8 割の個体が死亡した。Myf5-Ispd cK0 マウスの骨格筋組織においては、CDP-Rbo 濃度が著減しており、結果として、DG の糖鎖不全と基底膜ラミニン結合活性も低下していた。組織病理解析の結果から、壊死・再生筋の増加、筋線維の大小不同、結合組織の増加などの典型的な筋ジストロフィー所見を示した。以上から、Myf5-Ispd cK0 マウスは DG 異常症の病変を再現する有効なモデルと考えられた。

治療法としてまず、本疾患が発症後においても治療可能であることを確認するため、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療を検討した。正常 ISPD 遺伝性を搭載したベクターを作出し (AAV-ISPD)、発症後 (4 週齢) の時点で経尾静脈で AAV-ISPD を投与し、12 週齢の時点で治療効果を検証した。遺伝子治療群では、体重および握力の増加と CK 値の低下を認めた。骨格筋内の CDP-Rbo 濃度は増加し、DG 糖鎖の回復および筋ジストロフィー病変の改善を認めた。以上から、発症後の介入であっても遺伝子治療により筋ジストロフィー症状が改善することが示された。また、この結果は CDP-Rbo 補充療法が有効であることも示唆している。

そこで、CDP-Rbo を効率的に筋細胞内に送達するために、プロドラッグ化 CDP-Rbo を 10 種類合成し、ISPD 欠損 HEK 細胞と Myf5-Ispd cK0 マウスを用いて、in vitro と in vivo の両方でプロドラッグ活性および毒性を評価した。その結果、10 種のプロドラッグ化合物のうち、テトラアセチル型 (TetA) が長期的試験に最適であることが明らかになった。TetA を 4 週間にわたる長期局所投与したところ、未治療対照群 (生理的食塩水投与群) と比べて、CDP-Rbo 投与群、TetA 投与群ともに壊死線維の減少を認めたが、再生線維およびマクロファージ浸潤は TetA 群のみ有

意な低下を認め、結合組織浸潤は CDP-Rbo 群と比較して TetA 群で有意な改善を認めた。更に ISPD 変異型患者由来のヒト線維芽細胞を TetA 処理したところ、CDP-Rbo 処理群と比較して有意な糖鎖回復を認めた。以上の結果から、ISPD 変異型 DG 異常症に対しては、プロドラッグ化 CDP-リピトール補充療法が有効であることが示唆された。(Nature Commun 2022)

<引用文献>

1. Nature 2002, 418:417-422.
2. Cell Rep. 2016, 14:2209-2223.
3. J. Biol. Chem. 2016, 291:24618-24627.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hoshino Shunsuke, Manya Hiroshi, Imae Rieko, Kobayashi Kazuhiro, Kanagawa Motoi, Endo Tamao	4. 巻 175
2. 論文標題 Endogenous reductase activities for the generation of ribitol-phosphate, a CDP-ribitol precursor, in mammals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 418 ~ 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsunuma Masumi, Kan Ryuji, Yamada Yuji, Hamada Keisuke, Kanagawa Motoi, Nomizu Motoyoshi, Kikkawa Yamato	4. 巻 13
2. 論文標題 Chain-specificity of laminin 1-5 LG45 modules in the recognition of carbohydrate-linked receptors and intramolecular binding	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-37533-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kikkawa Yamato, Matsunuma Masumi, Kan Ryuji, Yamada Yuji, Hamada Keisuke, Nomizu Motoyoshi, Negishi Yoichi, Nagamori Shushi, Toda Tatsushi, Tanaka Minoru, Kanagawa Motoi	4. 巻 15
2. 論文標題 Laminin 5_CD239_Spectrin is a candidate association that compensates the linkage between the basement membrane and cytoskeleton in skeletal muscle fibers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Matrix Biology Plus	6. 最初と最後の頁 100118 ~ 100118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mplus.2022.100118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tokuoka Hideki, Imae Rieko, Nakashima Hitomi, Manya Hiroshi, Masuda Chiaki, Hoshino Shunsuke, Kobayashi Kazuhiro, Lefebvre Dirk J., Matsumoto Riki, Okada Takashi, Endo Tamao, Kanagawa Motoi, Toda Tatsushi	4. 巻 13
2. 論文標題 CDP-ribitol prodrug treatment ameliorates ISPD-deficient muscular dystrophy mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1847-1847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29473-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 金川 基
2. 発表標題 Ribitol-phosphate modification and muscular dystrophy
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motoi Kanagawa
2. 発表標題 CDP-ribitol supplementation therapy and pathomechanism of dystroglycanopathy-related cardiomyopathy
3. 学会等名 7th International Workshop for Glycosylation Defects in Muscular Dystrophies（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motoi Kanagawa
2. 発表標題 Pathogenesis and therapeutic strategy for dystroglycanopathy
3. 学会等名 1st Symposium on Skeletal muscle cells in Growth and Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金川 基
2. 発表標題 糖鎖異常型筋ジストロフィーの発症機序にもとづいたCDP-リビトール補充療法の開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金川 基
2. 発表標題 リピトールリン酸という新規糖鎖ユニットの発見と疾患
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金川 基
2. 発表標題 糖鎖異常型筋ジストロフィーの発症機序にもとづいたCDP-リピトール補充療法の開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金川 基
2. 発表標題 リピトールリン酸という新規糖鎖ユニットの発見と疾患
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>愛媛大学大学院医学系研究科医化学・細胞生物学講座 https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem1/ 愛媛大学大学院医学系研究科医化学・細胞生物学講座 https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem1/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	萬谷 博 (Manya Hiroshi) (20321870)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長 (82674)	
研究分担者	永森 收志 (Nagamori Shushi) (90467572)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授 (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関