

令和元年6月14日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06862

研究課題名(和文)ジストログリカノパチーに対するLARGE遺伝子治療

研究課題名(英文)Large gene therapy for dystroglycanopathies

研究代表者

大塚 喜久(Otsuka, Yoshihisa)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：20808860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ジストログリカンの糖鎖異常によって生じる筋ジストロフィーはジストログリカノパチーと総称される。本研究は、ある程度糖鎖が残存する非重症型ジストログリカノパチーモデルマウスに対してLarge遺伝子治療を行うことで、in vivoでのLarge遺伝子導入が原因遺伝子によらずジストログリカノパチーに共通して有効である可能性について検証することを目的とした。研究の結果、Large遺伝子治療により非重症型のジストログリカノパチーモデルマウスで骨格筋壊死の改善が認められた。Large遺伝子治療は非重症型のジストログリカノパチーに共通した治療になりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いずれの病型においても治療法が確立されていないジストログリカノパチーにおいて、新たな治療法の可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Regardless of the causative gene, muscular dystrophies characterized by abnormal glycosylation of dystroglycan are collectively referred to as dystroglycanopathy. We studied whether Large gene therapy is commonly effective to dystrocurinopathy regardless of the causative gene in vivo. We performed Large gene therapy to non-severe dystroglycanopathy model mice in which sugar chains remain a certain extent. As a result, improvement of skeletal muscle necrosis was detected in the non-severe type dystroglycanopathy model mice by Large gene therapy. We found that large gene therapy may be applied to non-severe forms of dystroglycanopathy regardless of causative gene.

研究分野：医学

キーワード：筋ジストロフィー ジストログリカノパチー 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

福山型筋ジストロフィー (FCMD) は福山博士によって見出された疾患で、日本ではデュシェンヌ型に次いで2番目に多い先天性筋ジストロフィーであり、戸田博士らが原因遺伝子 *fukutin* を発見した (Kobayashi et al. Nature 1998). 2001年にFCMD患者におけるジストログリカンの糖鎖修飾異常が報告され、それを契機に世界中からジストログリカンの糖鎖修飾異常を認める筋ジストロフィーが相次いで報告された。それら一群の筋ジストロフィーはジストログリカノパチーと総称されるようになった。

ジストログリカノパチーはジストログリカンの糖鎖修飾異常によりラミニンとの結合が障害され膜が脆弱となり細胞壊死を来すという共通病態をもち、FCMDの他に Muscle-Eye-Brain 病 (MEBD), Walker-Warburg syndrome (WWS) や肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 等の病型が存在するが、いずれの疾患も根治療法は存在しない。共通病態をもつジストログリカノパチーではあるが、中枢神経障害も伴う筋ジストロフィーである FCMD, MEBD, WWS の他に軽症の LGMD が報告されていることは興味深く、ジストログリカン糖鎖の残存量が症状に影響していると考えられている。

ジストログリカノパチーでは糖鎖修飾を司る遺伝子の変異が報告されている。原因遺伝子として FCMD における *fukutin* の他に、MEBD では *POMGnT1*, WWS では *POMT1* および *POMT2*, LGMD21, 先天性筋ジストロフィー (MDC) 1C では *FKRP*, MDC1D では *LARGE* が特定されている。*LARGE* はジストログリカンの O マンノシル型糖鎖のキシロース・グルクロン酸の繰り返し単位からなる多糖構造を形成し、この部分がラミニンとの結合に非常に重要である。*LARGE* は先天性筋ジストロフィー 1D 型の原因遺伝子であるが、*LARGE* の過剰発現により FCMD 患者の筋芽細胞および MEBD 患者・WWS 患者細胞においても糖鎖修飾が改善されることが報告されている (Barresi et al. Nat Med. 2004)。この結果は *LARGE* を利用した治療がジストログリカノパチーの共通病態に対して有用である可能性を示唆する。申請者はこの点に着目し、我々の研究室で作製した FCMD モデルマウスで筋特異的に *fukutin* をノックアウトした *Myf5-fukutin* cKO マウスに対し、アデノ随伴ウイルスベクターによる *LARGE* 遺伝子治療を検討した。その結果、有意な治療効果は得られなかったものの、*LARGE* が活性を発揮するには *fukutin* が必要であること、そして、*fukutin* は *LARGE* が修飾する糖鎖のさらに近位の糖鎖修飾に関わる分子である可能性を見出した (Ohtsuka et al. Sci Rep.)。その後、2016年に *fukutin* はジストログリカンの糖鎖構造においてリピトールリン酸を転移する酵素として機能していることが金川博士らにより報告された (Kanagawa et al. Cell Reports 2016)。

Myf5-fukutin cKO マウスは重症型モデルであり、骨格筋において正常糖鎖が残存していないが、前述のように FCMD 患者の筋管細胞では、ある程度糖鎖が残存しており、*LARGE* の発現により糖鎖修飾が改善されることが報告されており、ある程度の正常糖鎖が残存するジストログリカノパチーにおいて *LARGE* 遺伝子治療は効果がある可能性がある。出生後の治療介入であってもジストログリカンの機能を改善させることでジストログリカノパチーの症状改善が期待される。この可能性は、有効なモデルマウスが存在しなかったため、これまで検証されておらず、糖鎖治療のコンセプト樹立に遅れが生じていた。

2. 研究の目的

糖鎖が残存していない重症型ジストログリカノパチーモデルマウスに対しては明らかな効果が得られなかった *LARGE* 遺伝子治療であるが、ジストログリカン糖鎖がある程度残存していれば、治療効果を有する可能性がある。

本研究ではジストログリカン糖鎖がある程度残存する非重症型ジストログリカノパチーモデルマウスに対して骨格筋をターゲットとして *LARGE* 遺伝子治療を行うことで、*in vivo* での *LARGE* 遺伝子導入が原因遺伝子によらずジストログリカノパチーに共通して有効である可能性について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

申請者が以前 *Large* 遺伝子治療実験に用いた *fukutin* cK0 マウスは重症型のジストログリカノパチーモデルマウスであり、治療が奏功しなかったのは残存糖鎖が殆ど存在しなかったため *Large* の活性が得られなかったことが原因と考えている。2014年に我々の研究室で新たに作成した *dysferlin*^{sj1/sj1} : *fukutin*^{Hp/-} 二重変異マウスは、ある程度糖鎖の残存している非重症型のジストログリカノパチーモデルマウスであり (Kanagawa et al. Plos One 2014), これに対して骨格筋をターゲットに AAV-MCK-*Large* を用いた *Large* 遺伝子治療を行った。

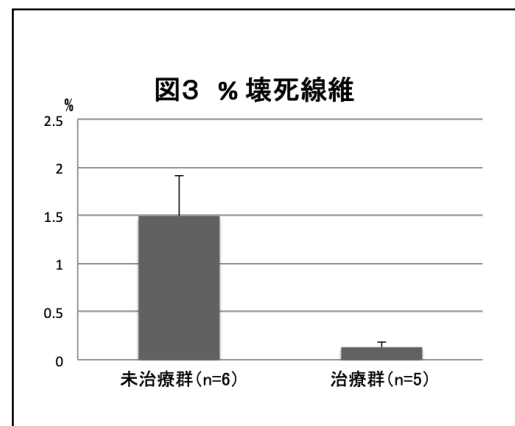
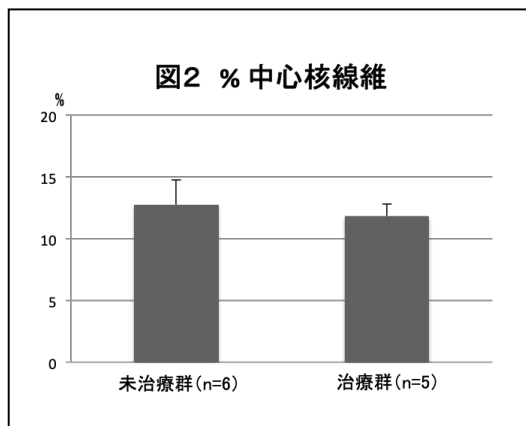
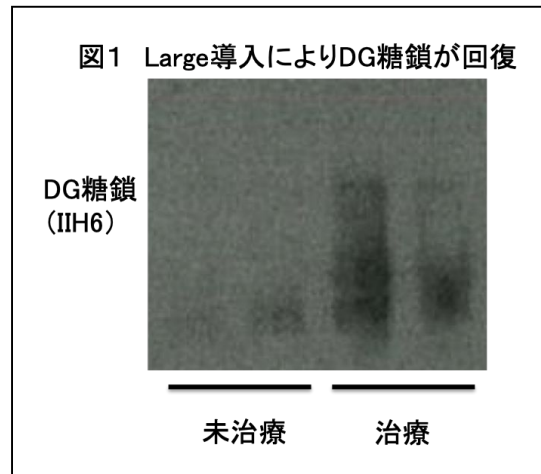
具体的には *dysferlin*^{sj1/sj1} : *fukutin*^{Hp/-} 二重変異マウスに対して AAV9-MCK-*Large* を静脈内投与し、骨格筋におけるジストログリカン糖鎖の発現を免疫染色およびウェスタンブロット法により確認するとともに、生化学的染色によって骨格筋を観察し、病理像の状態を定量的に解析した。

4. 研究成果

非重症型のジストログリカノパチーモデルマウスである *dysferlin* sj1/sj1 : *fukutin* Hp/- 二重変異マウスに対して骨格筋をターゲットに、MCK プロモーター下流に *Large* cDNA を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクター (AAV9-MCK-*Large*) を生後 4 週齢の時点で尾静脈より静脈内投与した。生後 15 週齢の時点で骨格筋サンプルを採取し、未治療群と比較した。

まず得られた骨格筋サンプルで *Large* 遺伝子治療によりジストログリカン (DG) 糖鎖が回復しているか否か評価した DG 糖鎖に対する抗体である H6 を用いたウェスタンブロット法を行ったところ AAV-MCK-*Large* を投与した群では骨格筋において DG 糖鎖が回復していることが確認できた (図 1)。前脛骨筋の筋病理組織を中心核数と壊死線維数を測定し、筋ジストロフィーによる病理学的変化を定量的に評価したところ、全線維数に対する中心核数の割合は未治療群 (n=6) が平均 12.7%であったのに対し *Large* 遺伝子治療群 (n=5) は 11.8%であり有意な差は認めず、骨格筋に対する *Large* 遺伝子治療による治療効果は明らかでない結果であった (図 2)。しかし全線維数に対する壊死線維数の割合は未治療群では平均 1.49%であったのに対して *Large* 遺伝子治療群では 0.13%と有意差をもって低下しており (p=0.02) (図 3)、ジストログリカノパチーにおける骨格筋の壊死が *Large* 遺伝子治療によって改善している可能性が示唆された。

我々は今回の研究により、出生後における治療介入であっても *Large* 遺伝子治療が原因遺伝子によらず非重症型ジストログリカノパチーに共通する治療法となり得る可能性を見出した。



5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

Yoshihisa Ohtsuka, Motoi Kanagawa, Tomoko Chiyo, Kazuhiro Kobayashi, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda & Tatsushi Toda. LARGE Gene Therapy for α -Dystroglycanopathies. 11th Japanese-French Workshop. 2018 Tokyo.

大塚喜久, 金川基, 千代智子, 小林千浩, 岡田尚巳, 武田伸一, 戸田達史. ジストログリカノパチーに対する LARGE 遺伝子治療. 第三回日本筋学会学術集会. 2017年. 東京.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/clgene/>

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 金川基, 戸田達史

ローマ字氏名: Kanagawa Motoi, Toda Tatsushi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。