

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591010

研究課題名 (和文) 先天性筋ジストロフィーの分子病態解析と糖転移酵素を用いた治療法の開発に関する研究

研究課題名 (英文) Characterization of molecular pathogenesis of congenital muscular dystrophy and development of therapeutic strategy using glycosyltransferase.

研究代表者 齊藤 史明 (FUMIAKI SAITO)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：40286993

## 研究成果の概要：

1、 $\alpha$ -ジストログリカンのプロセッシングを解析するために N 末側および C 末側のコア蛋白質に対する特異的抗体を作製した。これらの抗体を用いて培養細胞における検討を行なったところ、 $\alpha$ -ジストログリカンの N 末端ドメインはプロプロテインコンバーターゼによって切断された後ただちに細胞外へ分泌されることを明らかにした。さらにヒトの血清や髄液中にもこの $\alpha$ -ジストログリカンの N 末端断片が存在することを示した。

2、悪性腫瘍由来の培養細胞には分子量 75kD 前後の低分子量の $\alpha$ -ジストログリカンが発現していた。これらの $\alpha$ -ジストログリカンはラミニン結合能を持たないことから異常な糖鎖修飾を受けた $\alpha$ -ジストログリカンと考えられた。培養細胞に対して Large 遺伝子のトランスフェクションを行なうと、 $\alpha$ -ジストログリカンの分子量は 200kD 前後にまで著明に増大するとともに、ラミニン結合能は著しく亢進した。このように培養細胞に Large を過剰発現させることにより $\alpha$ -ジストログリカンの機能修復が生じることを示した。

3、Large を過剰発現するトランスジェニックマウスを作出した。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。同マウスの各臓器において $\alpha$ -ジストログリカンの高分子量化と IIH6 に対する反応性の著明な亢進を認めた。同マウスは明らかな障害を示さないことから、将来的には Large の全身的投与による $\alpha$ -ジストログリカノパチーに対する治療への道が開かれたものと考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：(1)筋ジストロフィー (2) $\alpha$ -ジストログリカノパチー (3)ジストログリカン (4) Large (5)ラミニン (6)糖鎖修飾 (7)糖転移酵素 (8)福山型先天性筋ジストロフィー



さらに N 末端ドメインを欠損したノックインマウスを作製し、同マウスを用いて Large と  $\alpha$ -ジストログリカンの相互作用を検討する。すなわち *in vitro* においては Large が  $\alpha$ -ジストログリカンのラミニン結合能を亢進させるためには Large が  $\alpha$ -ジストログリカンの N 末端ドメインに結合することが必要であるが、この結合が *in vivo* でも生じているのかどうかを免疫沈降により確認する。また Large の  $\alpha$ -ジストログリカンの N 末端ドメインへの結合が必須であるならば、同マウスが  $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖修飾の異常から筋ジストロフィーを発症する可能性も十分にあり、プロットオーバーレイ法や固相結合法によるラミニン結合能の検討と共に骨格筋や脳の状態学的検討を行う。

## 2. Large を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製と解析

培養細胞同様に *in vivo* における Large の遺伝子導入が  $\alpha$ -ジストログリカンの機能を亢進させるかどうか、さらにこの機能亢進が先天性筋ジストロフィーの治療に応用可能か否かを検討するために、Large のトランスジェニックマウスを作製する。プロモーターには CAG を用いて、ユビキタスに Large を過剰発現させる。まず同マウスの発育や運動機能などの表現系を観察する。さらに、骨格筋をはじめとする各臓器を免疫蛍光抗体法やウエスタンブロット法を用いて検討し、 $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖に対する抗体である IIH6 との反応性や分子量の変化を見る。さらにプロットオーバーレイ法によりラミニン結合能を検討し、 $\alpha$ -ジストログリカンの機能の指標とする。そして同マウスを福山型先天性筋ジストロフィーや muscle-eye-brain 病のモデル動物である fukutin ノックアウトマウス、fukutin ノックインマウスや POMGnT1 ノックアウトマウスと交配し、ラミニン結合能や骨格筋病変の改善がみられるかどうかを検討する。治療効果は H-E 染色による筋病理所見に加えて、グリップテストやロータロッドテスト、血中 CK 値、 $\alpha$ -ジストログリカンのラミニン結合能などから総合的に判断する。Fukutin ノックアウトマウスの場合は胎生致死であるため、ヘテロ個体との交配を行いホモ個体が得られるようになるかどうかを検討する。

## 3. Large 蛋白質を用いた酵素補充療法の試み

Large 蛋白質の投与による先天性筋ジストロフィーの治療を試みるために、Large のリコンビナント蛋白質を作製する。蛋白質を大量に得るために分泌型の蛋白質として培地中に分泌されるようコンストラクトを作製する。Large 遺伝子を CHO 細胞にトランスフェクトして抗生剤によるセレクションの後安定発現細胞株を得る。ヒスチジンタグを

用いて培地から Large 蛋白質を精製する。これをまず培養細胞の上清に添加し、同細胞の  $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖修飾及びラミニン結合能が回復するかどうかをウエスタンブロット、プロットオーバーレイ法などを用いて検討する。さらに POMGnT1 ノックアウトマウスや fukutin ノックインマウスに投与して筋ジストロフィーに対する効果を判定する。効果判定は H-E 染色による筋病理所見、グリップテストやロータロッドテスト、血中 CK 値、 $\alpha$ -dystroglycan のラミニン結合能などから総合的に判断する。

## 4. 研究成果

$\alpha$ -ジストログリカンの N 末端プロセッシングを検討するために  $\alpha$ -ジストログリカンの N 末端と C 末端のコア蛋白質に対する抗体を作製した。これら抗体と、 $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖部分に対する抗体である IIH6 を用いて培養細胞におけるプロセッシングを検討した。この結果、 $\alpha$ -ジストログリカンの N 末端ドメインは切断されるとただちに培養上清に分泌されることを明らかにした。この分泌は CMK の培地への添加により抑制されることから、プロプロテインコンバーターによるものであることを確認した。さらに  $\alpha$ -ジストログリカンの N 末端断片はヒトの血清や髄液中にも分泌されていることを明らかにし、この N 末端断片は生体において何らかの機能を有している可能性を示した。一方で、 $\alpha$ -ジストログリカンの N 末端ドメインを欠損するノックインマウスは胎生致死であることが明らかとなった。したがってこの N 末端ドメインと Large との結合は生体の発生、成育において決定的な役割を担っていることが示された。

また各種培養細胞を用いた実験の結果、HeLa や MCF7 など悪性腫瘍由来の培養細胞には分子量 75kD 前後の低分子量の  $\alpha$ -ジストログリカンが発現していた。これらの  $\alpha$ -ジストログリカンは糖鎖部分に対する抗体である IIH6 と反応せず、ラミニン結合能を持たないことから異常な糖鎖修飾を受けた  $\alpha$ -ジストログリカンと考えられた。各種培養細胞に対してトランスフェクションによる Large 遺伝子の導入を行なったところ、 $\alpha$ -ジストログリカンの分子量は 200kD 前後にまで著明に増大するとともに、IIH6 との反応性、ラミニン結合能とも著しく亢進した。この効果は悪性腫瘍由来の培養細胞においても同様に明らかであった。これらのことから悪性腫瘍由来の培養細胞ではラミニン結合能を持たない低分子量の  $\alpha$ -ジストログリカンが発現しており、悪性腫瘍は生化学的に  $\alpha$ -ジストログリカノパチーとしての側面を有していることが明らかとなった。これら  $\alpha$ -ジストログリカノパチー培養細胞では糖転移酵素の異

6. 研究組織

(1) 研究代表者 齊藤史明 (FUMIAKI SAITO)  
帝京大学・医学部・講師  
研究者番号：40286993

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし