

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790232
 研究課題名（和文） 糖鎖異常を伴う先天性筋ジストロフィーの発症機序の理解と治療戦略

研究課題名（英文） Molecular pathogenesis and therapeutic strategy of congenital muscular dystrophies with glycosylation defects

研究代表者

金川 基（KANAGAWA MOTOI）
 大阪大学・医学系研究科・特任助教（常勤）
 研究者番号：00448044

研究成果の概要：

本研究目的は、福山型筋ジストロフィー（FCMD）の発症機序を理解し、治療戦略を構築することである。FCMDでは、ジストログリカンという糖タンパク質に糖鎖修飾異常が生じており、これが発症に関与すると考えられている。本研究では、独自に作出したFCMDモデルマウスの病態・生化学解析を行った。その結果、糖鎖異常を完全に回復させる必要はなく、部分的な回復のみで病態の軽減・抑制につながる、という新概念を提唱するに至った。更に、糖鎖異常の解消手段として、FCMD原因遺伝子のフクチン、あるいは、糖鎖増強作用を持つ LARGE を対象とした遺伝子治療が効果的であることも示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	0	2,700,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	180,000	3,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：糖鎖異常・筋ジストロフィー・糖鎖治療・ジストログリカン・フクチン

1. 研究開始当初の背景

福山型筋ジストロフィー（FCMD）は、我が国で多くみられる小児性筋ジストロフィーであり、筋のみならず脳や眼の異常を伴うきわめて重篤な疾患である。本疾患は、生後まもなく発症し、患者は青年期までの生涯

を全身臥床状態で過ごすため、24時間にわたる介護が必要であり患者家族の負担も大きい。しかしながら本疾患の治療方法は全く確立されていない。申請者が所属するグループは世界にさきがけて、FCMDの原因遺伝子を同定し、その遺伝子産物をフクチンと名付

けた。フクチンはアミノ酸配列から糖転移酵素と推定されているが、その実際の機能は明らかになっていない。F C M Dの大多数の患者は、フクチンの3'-UTRに、およそ3kbのレトロトランスポゾンが挿入されており、その結果、フクチン mRNA が減少していると考えられている。研究代表者らは、F C M D患者の筋において、基底膜成分ラミニンの受容体であるジストログリカン (D G) の糖鎖に異常がみられ、そのラミニン結合能が著減していることを報告した。つまり、フクチン依存的な D G の糖鎖修飾機序に異常が生じることで筋ジストロフィーに至ると考えられるが、その詳細も明らかではない。本課題以前、代表者のグループは、フクチン遺伝子にレトロトランスポゾンを挿入した遺伝子組み換えマウス (フクチン KI マウス) の創出に成功しており、F C M Dの病態解明や治療法の構築に有効なモデルであることが示唆されていた。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、糖鎖異常を伴う F C M D の発症機序を理解し、治療戦略を構築することにある。本研究課題では、F C M Dモデル動物を用いて、発症機序の理解と糖鎖治療の可能性を探求する。

3 . 研究の方法

F C M Dモデルマウスとして、挿入変異のホモ接合マウスと、挿入変異とフクチン欠損アレルとの複合ヘテロ接合マウスを用いた。対照群として、正常フクチンアレルをもつ同腹マウスを用いた。筋ジストロフィー病態は、骨格筋組織を H E 染色することで解析した。また、強制運動装置を用いた過剰運動負荷後の膜脆弱性や、カルジオトキシン注射による壊死後の筋再生状況について、組織染色解析

を行った。D Gの糖鎖修飾状況は、ウェスタンブロット解析によって、また、基底膜ラミニンへの結合は、オーバーレイ法とソリッドフェイズ法によって検討した。さらに、アデノウイルスベクターを用いて、モデルマウス骨格筋にフクチン遺伝子や LARGE 遺伝子を導入し、遺伝子発現後の D G 糖鎖状況を解析した。

4 . 研究成果

ホモ接合、複合ヘテロ接合、いずれのモデルマウスにおいても、筋ジストロフィー症状は認められなかった。運動負荷後の膜強度や、筋再生に関しても、対照群との差は検出されなかった。いずれのモデルマウスにおいても、D G 糖鎖に異常が生じていることが明らかになったが、一部、正常糖鎖型の D G 分子種の残存も検出された。複合ヘテロ接合モデルにおけるラミニン結合能は、50%程度残存していることが示された。更に、アデノウイルスベクターを用いたフクチン遺伝子の導入により、D G 糖鎖異常が *in vivo* で解消できることが明らかになった。

D G 糖鎖異常、ラミニン結合異常は、F C M Dとその類縁疾患に共通した病態と考えられている。F C M D類縁疾患のモデルで、顕著な病態を示す Large^{myd}マウスでは、糖鎖正常型 D G 分子種も、ラミニン結合能も、ほとんど検出されない。以上の結果は、正常糖鎖型 D G が少量でも残存していれば、筋ジストロフィーの発症や進行を抑制できる可能性を示唆している。よって、糖鎖異常を部分的にでも解消できれば、膜脆弱化や筋再生異常を抑制し、F C M Dを含む類縁疾患群の治療につながると考えられる。

研究代表者らは、LARGE 遺伝子が、*in vitro* で糖鎖異常を解消できる機能をもつことを報告していた。そこで、F C M D類縁疾患に

みられる D G 糖鎖異常を解消する手段として、LARGE 遺伝子の *in vivo* 導入を検討した。F C M D 類縁疾患のモデルとして、フクチン KI と POMGnT1 ノックアウトマウスを用いた。アデノウイルスベクターを用いた LARGE 遺伝子の導入によって、いずれのモデルにおいても、糖鎖異常の解消とラミニン結合能の回復が観察された。これらの結果から、D G 糖鎖異常を共通の発症要因とする F C M D 類縁疾患に対して、糖鎖増強作用を持つ LARGE 遺伝子を標的とした治療戦略が効果的であることが示された。

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2件)

(1) Kanagawa, M., Nishimoto, A., Chiyonobu, T., Takeda, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Wang, F., Fujikake, N., Taniguchi, M., Lu, Z., Tachikawa, M., Nagai, Y., Tashiro, F., Miyazaki, J., Tajima, Y., Takeda, S., Endo, T., Kobayashi, K., Campbell, K.P., Toda, T. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 621-631 (2009) 査読あり

(2) Wakayama, Y., Inoue, M., Kojima, H., Yamashita, S., Shibuya, S., Jimi, T., Hara, H., Matsuzaki, Y., Oniki, H., Kanagawa, M., Kobayashi, K., Toda, T. Reduced expression of sarcospan in muscles of Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Histol. Histopathol.* 23, 1425-1438 (2008) 査読あり

[学会発表](計4件)

(1) Kanagawa, M., Nishimoto, A., Chiyonobu, T., Takeda, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Wang, F., Taniguchi, M., Lu, Z., Tachikawa, M., Tajima, Y., Takeda, S., Endo, T., Kobayashi, K., Campbell, K.P., Toda, T. "Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy" Clinical and Translational Research on Cancer: Glycomics Applications and The 2nd Seminar on Functional Glycomics for Young Investigators (2009.3.24-27) 鳥羽

(2) 金川 基, 西本明美, 千代延友裕, 武田聖, 戸田達史 "ジストログリカンの糖鎖異常を示すモデルマウスを用いた先天性筋ジストロフィーの病態解析と治療戦略の構築" Biochemistry and Molecular Biology 2008 (2008.12.9) 神戸

(3) Kanagawa, M., Nishimoto, A., Chiyonobu, T., Toda, T. "Molecular Pathogenesis and Therapeutic Strategy for Congenital Muscular Dystrophies Caused by Abnormal Glycosylation of Dystroglycan" 28th Japanese Carbohydrate Symposium (2008.8.18-20) つくば

(4) Kanagawa, M., Nishimoto, A., Chiyonobu, T., Takeda, S., Toda, T. "Generation of a model mouse for Fukuyama congenital muscular dystrophy carrying a retrotransposal insertion in the 3' UTR in the *fukutin* gene" The Third New Directions in Skeletal Muscle Biology Meeting (2008.4.27-30), New Orleans

[図書](計1件)

(1) Kanagawa, M., and Toda, T. Fukutin and Fukuyama congenital muscular dystrophy.

in *Experimental Glycoscience* (Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Y., Narimatsu, H., Kawasaki, T., and Hase, S. eds.) p309-312, Springer, Tokyo (2008)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金川 基 (KANAGAWA MOTOI)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：00448044

(2)研究分担者

(3)連携研究者