

機関番号：14501  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：21790318  
 研究課題名（和文） 筋形成・維持におけるフクチン依存ジストログリカン糖鎖の役割と筋ジストロフィー病態  
 研究課題名（英文） Role of fukutin-dependent glycosylation of dystroglycan on skeletal muscle development, maintenance, and muscular dystrophy pathogenesis  
 研究代表者  
 金川 基（KANAGAWA MOTOI）  
 神戸大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：00448044

研究成果の概要（和文）：福山型筋ジストロフィーは、フクチン遺伝子の変異によって生じる重篤な小児期筋ジストロフィーであるが、分子病態に不明な点は多く、治療法も存在しない。本研究では、骨格筋選択的にフクチン遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成した。本マウスは福山型筋ジストロフィー様の病態を呈し、分子病態の解明や遺伝子治療などの治療研究に有効なモデルとなる。

研究成果の概要（英文）：Fukuyama-type muscular dystrophy, which is caused by mutations in the fukutin gene, is a severe congenital form of muscular dystrophy. Pathogenesis of this disorder is poorly understood and currently no effective treatment is available. In this study, we generated conditional knock-out mice that lack fukutin selectively in the skeletal muscle. These mice showed pathology similar to Fukuyama-type muscular dystrophy, and thus would be a useful model for understanding molecular pathogenesis and establishing therapeutic strategy such as gene therapy.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：フクチン、ジストログリカン、福山型筋ジストロフィー、糖鎖異常、筋形成維持

## 1. 研究開始当初の背景

福山型筋ジストロフィー（FCMD）は、フクチンを責任遺伝子とする重篤な小児期筋ジス

トロフィーである。フクチンの変異によって、筋細胞膜タンパク質のジストログリカンに糖鎖異常が生じることから、ジストログリカ

ン糖鎖が病態に関与することは示唆されているが、糖鎖異常によって引き起こされる細胞・分子病態は、ほとんど明らかにされていない。また、ジストログリカン糖鎖の筋形成・維持における生理的役割も不明である。以前より福山型筋ジストロフィーのモデルマウスの必要性は強く認識されていたものの、フクチン遺伝子欠損マウスは胎生致死であることや、患者で多く見られる変異のノックインマウスは病態を示さないこと、などから、新しいモデルマウスの創出が必要とされていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、前項の問題を解決する新たなモデルとして、骨格筋選択的にフクチン遺伝子を欠損するコンディショナルマウスの創出と表現型解析を目的とした。骨格筋選択的フクチン欠損マウスの表現型や細胞・分子病態を解析することで、筋形成におけるフクチン依存ジストログリカン糖鎖の生理的意義を明らかにし、発症・病態に関わる分子を同定し、また、フクチン遺伝子治療の有効性の検討も検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) FCMD モデルマウスの樹立

骨格筋の形成や再生は、筋前駆細胞から筋芽細胞への分化、融合（筋管形成）の過程を経る。筋前駆細胞や筋芽細胞で Cre を発現する Myf5-Cre マウスや、筋管や成熟筋で Cre を発現する MCK-Cre マウスと、フクチン LOX マウスを掛け合わせることで、フクチンを欠損するタイミングが異なる、2 種の筋選択的フクチン KO マウスを創出する。

### (2) 病態比較

筋形成の初期段階からフクチンを欠損するモデル（Myf5-フクチン KO）と、筋管形成後にフクチンを欠損するモデル（MCK-フクチン KO）といった、2 種の新たな FCMD モデルマウスの表現型・病態を比較することで、筋形成過程や筋細胞維持におけるフクチン依存ジストログリカン糖鎖の役割や、病態発症への関わりを明らかにする。

### (3) 細胞生物学的比較

モデルマウス筋からフクチンが欠損した筋芽細胞を調整し、分化・成熟速度、筋管形態・細胞膜強度を解析することで、ジストログリカン糖鎖の細胞生物学的な意義を明らかにする。

### (4) シグナリング異常

フクチン欠損細胞を用いて、筋分化・成熟障害の原因となるシグナリング分子や接着タンパク質を同定することで、分子病態の理解に迫る。

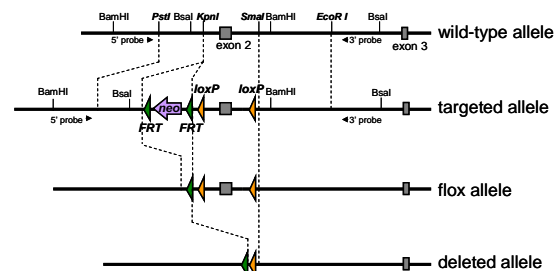
### (5) *in vivo* フクチン遺伝子導入

FCMD モデルである Myf5-フクチン KO の病

態が、フクチン遺伝子導入によって改善するか検討する。

## 4. 研究成果

cKO マウスの作出に必要な FLOX マウスは、フクチンの exon2 を挟むように LOX 配列を挿入することで作出した。組織選択的に Cre を発現するマウスとしては、筋衛星細胞、前駆細胞に発現する Myf5、あるいは筋管に発現する MCK、それぞれのプロモーターの下流に Cre をもつトランスジェニックマウスを用いた。それぞれ Myf5-fukutin cKO、MCK-fukutin cKO と命名した（図 1）。



Myf5-Cre x flox fukutin → Myf5-fukutin cKO (筋衛星細胞・前駆細胞)  
MCK-Cre x flox fukutin → MCK-fukutin cKO (筋管)

図 1 fukutin cKO マウスの作成概要

cKO マウスの糖鎖修飾状況をウェスタンブロット解析、基底膜ラミニンへの結合は、オーバーレイ法を用いて検討したところ、Myf5-fukutin cKO マウスは出生時点で既にジストログリカンの糖鎖異常とラミニン結合能の損失がみとめられた。一方、MCK-fukutin cKO マウスでは、MCK の発現時期のピーク（生後 2 週齢）と一致するように、2 週齢から徐々に糖鎖異常が生じ、8～16 週齢で完全に糖鎖異常がみとめられた（図 2）。

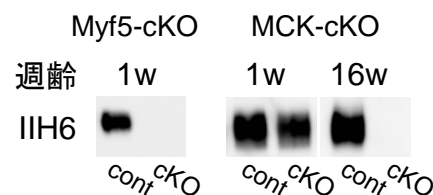


図 2 cKO マウスにおけるジストログリカンの糖鎖修飾状況

cKO マウスの筋ジストロフィー組織病態を HE 染色により検討したところ、Myf5-fukutin cKO マウスでは 4 週齢から壊死線維と再生筋が観察されはじめ、加齢に応じた進行性の病変が観察された。16 週時点で、結合組織や脂肪組織の侵潤も認められた。一方、MCK-fukutin cKO は、16 週齢から再生線維が観察されはじめたが、40 週齢にいたっても、その病態の程度に大きな差は観察されな

かった。MCK-fukutin cKO では、結合組織や脂肪組織の侵潤はみとめられなかった (図 3)。

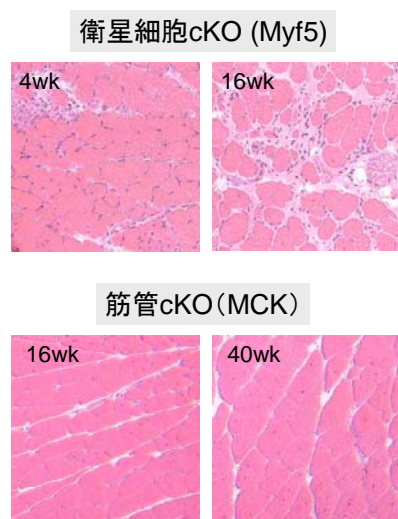


図 3 cKO マウスの組織病態解析

Myf5-fukutin cKO では、重篤な進行性の筋ジストロフィー病変が観察されたのに対し、MCK-fukutin cKO では、非常に軽度な病変が観察された。この理由としては、MCK-fukutin cKO マウスの筋衛星細胞は、Cre-recombination の標的になっておらず、正常の筋再生能を維持しているためと考えられる。これら 2 種の異なる cKO マウス間の病態比較から、従来から提唱されている筋細胞膜の物理的強度の維持に関する役割に加え、筋形成・再生過程におけるフクチンの細胞生物学的・組織病態的な重要性を新たに示唆することに成功した。

また、本研究期間中においては、単離筋衛星細胞を用いた筋細胞生物学的解析やアデノ随伴ウイルスベクターを用いたフクチン遺伝子治療の予備的検討も行っている。本研究で樹立することに成功した新しいフクチン cKO モデルマウスは、今後、福山型筋ジストロフィー病態の解明や治療法開発に有効なツールとなることが強く期待できる。

## 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 6 件)

(1)Kanagawa M, Omori Y, Sato S, Kobayashi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Furukawa T, Toda T. Post-translational maturation of dystroglycan is necessary for pikachurin binding and ribbon synaptic

localization. *J. Biol. Chem.* 285: 31208-31216, 2010. 査読有

(2)Lu Z, Kanagawa M, Toda T. Residual glycosylation of dystroglycan in model mice to Fukuyama-type congenital muscular dystrophy is sufficient to maintain voluntary exercise activity and skeletal muscle regeneration capability. *Medical Journal Osaka University* 53: 51-61, 2010. 査読有

(3)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 KP, 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. 査読有

(4)Han R, Kanagawa M, Yoshida-Moriguchi T, Rader EP, Ng RA, Michele DE, Muirhead DE, Kunz S, Moore SA, Iannaccone ST, Miyake K, McNeil PL, Mayer U, Oldstone MB, Faulkner JA, Campbell KP. Basal lamina strengthens cell membrane integrity via the laminin G domain-binding motif of alpha-dystroglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 12573-12579, 2009. 査読有

(5)Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, Funabiki K, Koyasu T, Kajimura N, Miyoshi T, Sawai H, Kobayashi K, Tani A, Toda T, Usukura J, Tano Y, Fujikado T, Furukawa T. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat. Neurosci.* 11: 923-931, 2008. 査読有

(6)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. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

(1)Kanagawa M, Molecular basis and physiological roles of dystroglycan glycosylation and its relevance to diseases. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 2010 年 12 月 10 日, 神戸.

(2)金川基, レトロトランスポゾン挿入変異をもつ福山型先天性筋ジストロフィーモデルマウスの創出と糖鎖遺伝子治療. 日本人類遺伝学会第55回大会. 2010年10月29日, さいたま.

(3)Kanagawa M, Disruption of dystroglycan-pikachurin interaction underlies the molecular pathogenesis of eye abnormalities in dystroglycanopathy. 15th International Congress of the World Muscle Society. Oct 13, 2010; Kumamoto, Japan.

(4)Kanagawa M, Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. 25th International Carbohydrate Symposium ICS2010. Aug 3, 2010; Makuhari, Japan.

(5)Kanagawa M, Disruption of dystroglycan-pikachurin interaction underlies the molecular pathogenesis of eye abnormalities in dystroglycanopathy. 第28回内藤コンファレンス Glycan Expression and Regulation [I]: Functions and Disease mechanisms (糖鎖の発現と制御 [I]-機能から病態まで). 2010年7月28日, 葉山.

(6)Kanagawa M, Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle. May 6, 2010; Ottawa, Canada.

(7)Sato K, Generation of a model mouse for Fukuyama-type Congenital Muscular Dystrophy. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月10日, 横浜.

(8)Kanagawa M, Essential role of dystroglycan in the maintenance of cell membrane. 第82回日本生化学会大会. 2009年10月24日, 神戸.

(9)Lu Z, Involvement of dysferlin-mediated membrane repair system in progression of glycosylation-defect muscular dystrophy. 第82回日本生化学会大会. 2009年10月24日, 神戸.

(10)Tachikawa M, Subcellular localization and POMGnT1-binding of fukutin missense mutants which are involved in the onset of

FCMD. 第82回日本生化学会大会. 2009年10月24日, 神戸.

(11)金川基, 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. 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会. 2008年12月9日, 神戸.

(12)金川基, ジストログリカンの糖鎖異常を伴う先天性筋ジストロフィーの病態と治療戦略. 第28回日本糖質科学会. 2008年8月18日, つくば.

(13)Kanagawa M, 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. Apr 29, 2008; New Orleans, U. S. A.

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金川 基 (KANAGAWA MOTOI)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 00448044

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者