

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249049

研究課題名(和文) 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の分子標的治療と病態解明

研究課題名(英文) Molecular targeting therapy and pathomechanism for Fukuyama muscular dystrophy and related disorders

研究代表者

戸田 達史 (Tatsushi, Toda)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30262025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,900,000円、(間接経費) 11,070,000円

研究成果の概要(和文)：福山型筋ジストロフィー(FCMD)がスプライシング異常症であることを見出し、この異常スプライシングを制御するアンチセンス核酸を用い患者細胞及びモデルマウスでの治療に成功した。さらにアンチセンス核酸の指摘化を行い前臨床試験に用いる至適アンチセンスを決定した。今後臨床応用を目指したい。

ポストリン酸修飾構造は DG異常症モデルマウスで欠損しており、FCMDおよび類縁疾患の病態の中心といえる構造である。

フクチン欠損型ジストログリカノパチー2種作成し、筋再生障害を伴う筋ジストロフィーであり、またAAV遺伝子治療は、多くのタイプのジストログリカノパチーに対して有効な治療法であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Fukuyama muscular dystrophy (FCMD) is the first human disease found to result from ancestral insertion of a SINE-VNTR-Alu (SVA) retrotransposon into a causative gene. Here we show that aberrant mRNA splicing, induced by SVA exon-trapping, underlies the molecular pathogenesis of FCMD. Introduction of antisense oligonucleotides (AONs) targeting the splice acceptor, the predicted exonic splicing enhancer and the intronic splicing enhancer prevented pathogenic exon-trapping by SVA in cells of patients with FCMD and model mice, rescuing normal fukutin mRNA expression and protein production. AON treatment also restored fukutin functions, including O-glycosylation of α -DG and laminin binding by α -DG. Thus, we have discovered in human disease a role for SVA-mediated exon-trapping and demonstrated the promise of splicing modulation therapy as the first radical clinical treatment for FCMD and other SVA-mediated diseases.

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：福山型筋ジストロフィー レトロトランスポゾン ジストログリカノパチー アンチセンス治療 フクチン ポストリン酸構造

1. 研究開始当初の背景

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、福山によって報告・確立された先天性筋ジストロフィーの一型であり、重度の筋ジストロフィーに脳奇形を伴う常染色体劣性遺伝性神経筋疾患である。我が国の小児期筋ジストロフィーの中ではデュシャンヌ型に次いで多く我々の約 90 人に 1 人が保因者である。患児は生涯歩行不能であり、同時に精神発達遅延を伴い、多くは 20 歳以前に死亡する難病であり、muscle-eye-brain 病(MEB)などと類似疾患とされる。

研究代表者らのグループは日本に特異的に多い FCMD の原因遺伝子の同定に成功、遺伝子産物をフクチンと名付けた(Nature 1998)。また糖転移酵素 POMGnT1 の遺伝子が MEB 原因遺伝子であることを明らかにし、糖鎖異常が筋ジスの新たなメカニズムとした(Dev Cell 2001)。その後同様の原因が相次いで発見され、ジストログリカノパチーという新しい疾患概念が確立された。ジストログリカン(α -DG)の O-マンノース型糖鎖の異常により、基底膜中のラミニンとの結合能が低下し、筋組織では筋細胞膜が脆弱化、筋細胞が壊死・変性に陥り、筋ジストロフィーがおき、脳組織では、脳表基底膜が脆弱化、神経細胞過遊走、大脳皮質形成障害がおきる。

現在までにジストログリカノパチーの原因として 6 種類の遺伝子が同定されている(フクチン、POMGnT1、FKRP、LARGE、POMT1、POMT2)。申請者らのグループはうち POMT1 と POMT2 は複合体をつくって協同的に働くことをしめし(PNAS 2004)。また α -DG で O-マンノース型糖鎖修飾をうけるアミノ酸を決定した(JBC 2007)。POMT1-POMT2 複合体と POMGnT1 は、 α -DG の O-マンノース型糖鎖を直接合成する糖転移酵素として活性が同定されているが、他の分子には未だ糖転移酵素活性は見出されておらず、機能の詳細は未知である。我々

は、フクチンは糖鎖合成を直接担う酵素ではないが、POMGnT1 と結合する、O-マンノース型糖鎖の合成に不可欠な調節・制御因子であることを示した(BBRC 2006)。またジストログリカノパチーは筋以外に神経筋接合部異常による分化障害であることを示した(Hum Mol Genet 2006)。また網膜特異的分子ピカチュリンが α -DG のリガンドであること(Nat Neurosci 2008)。各種ジストログリカノパチーではその結合がラミンと同じ糖鎖依存的に低下しており網膜病変を説明できること(JBC 2010)を示した。またさらに予備実験では、フクチンは POMGnT1 以外にも、FKRP、LARGE、4GalT-II との相互作用を示唆する結果が得られている。そこで本研究では、これらの分子間の相互作用の詳細な検討を行って巨大複合体形成を確認し、またそれらと結合する他のタンパク質を探索して、O-マンノース型糖鎖修飾の分子機構の解明、ジストログリカノパチーのさらなる病態解析を行う。

しかしながら筋ジストロフィーとしてみた場合、重要なのは「治療」である。デュシャンヌ型に関する治療研究は世界各国で盛んに行われている。一方で、FCMD、MEB 原因遺伝子同定を契機にジストログリカノパチーの研究が大きく進展し、近年その病態が次第に明らかになり診断法が大幅に進歩したが、治療としては報告がない。特に FCMD は日本に特異的に多く未だ治療法がない悲惨な疾患であり、一刻も早い治療法開発が望まれている。申請者らは、fukutin 欠失細胞や RNAi による fukutin ノックダウン細胞などの FCMD モデル細胞系を確立し、さらに FCMD モデル動物として fukutin 欠損 ES 細胞由来のキメラマウス(Hum Mol Genet 2003)。大部分の FCMD 患者が持つ SVA レトロトランスポゾン挿入変異を導入したノックインマウスを作成して病態解析を行っており(Hum Mol Genet 2009)。また

fukutin コンディショナル KO マウスを作成し、糖鎖異常と病態を示すことを確認し、よりくわしく解析をしている。

そこで本研究では、むしろ治療研究を主眼とし、FCMD を中心とし、FCMD モデル細胞とモデル動物を用いて、アンチセンス・モルフォリノ治療、LARGE による糖鎖治療、AAV 遺伝子治療酵素補充治療、など(研究計画に詳述) さまざまなユニークな治療実験を行って、臨床応用可能な治療法を確立し、臨床試験への道筋を目指す。そして ジストログリカノパチー全体の治療へ応用する。

2. 研究の目的

研究代表者は、福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) および類縁疾患の原因遺伝子を同定し、糖鎖の異常であることを世界で初めて明らかにしてきた。本研究は、日本に特異的に多い FCMD をはじめとする ジストログリカノパチーの発症原因である O-マンノース型糖鎖の合成機構とその病態を解明することと、我が国の筋ジストロフィー研究における重要課題である FCMD の治療へ向けて、下記に記した有望な分子標的治療であるアンチセンス・モルフォリノ治療、LARGE による糖鎖治療、AAV 遺伝子治療など、さまざまなユニークな治療実験を行い、臨床応用可能な治療法を確立し、臨床試験への道筋を目指す。全く治療法のない不治の病にむかって、今はじめて分子標的治療ができつつあるのは、患者、家族、国民にとって福音である。

3. 研究の方法

(1) アンチセンス・モルフォリノ治療

FCMD モデルマウス (KI マウス) に対するアンチセンス化合物の全身投与による治療筋局所投与で有効性の確認されている AON を KI マウスの尾静脈経由または腹腔内に投与し骨格筋、各組織での治療効果を検討する。FCMD では DG の O-マンノース型糖鎖に異常

がみられ、そのリガンドである laminin との結合能が落ちる為その回復を機能的な治療効果の指標とする。筋病理組織及び臨床症状の改善を総合的に評価し、機能的治療効果判定を行う。

ヒト患者由来細胞系 (リンパ芽球、初代筋芽細胞) に対する治療

AON を用いた FCMD 患者由来リンパ球に対する治療では、vivo-Morpholino は濃度依存的に効果が上昇する。正常、FCMD 患者由来リンパ芽球の培地内に AON (800nM ~ 5 μM) を投与し、96 時間後に細胞を回収し、正常 fukutin 蛋白の回復を解析する。

AON を用いた FCMD 患者由来初代筋芽細胞に対する治療では、筋細胞の機能的回復をみるために、筋細胞膜上の DG の糖鎖の回復を検討する。また機能的な効果として、外来性の laminin を筋管に投与し、正常で見られる laminin の凝集 (クラスタリング) 能力が、治療群の患者由来の筋管において回復するかを検討する (ラミニンクラスタリングアッセイ)。

有効な AON の至適化

毒性が低く、効果の高い核酸配列を探索し標的配列の微調整を行う。2,3 塩基をずらすだけで効果が劇的に上がる配列もあるため、標的配列 (スプライシング受容部位、供与部位、スプライシングエンハンサー、サイレンサー等) を網羅的に検討する。また、核酸分子 (PMO, 2' O メチル, LNA, PNA, ENA, vMO 等) の配合や濃度も検討し配列の至適化を行う。更には論文に発表した 3 種配列混合でなく、2 種理想的には 1 種で可能な配列を見いだす。

(2) フクチン遺伝子治療

ジストログリカノパチーと総称される一群の筋ジストロフィーは、ジストログリカンの糖鎖異常によって発症する。本研究では、ジストログリカンに修飾される糖鎖の病態生理的意義の解明と、治療法の開発を目的に、ジストログリカノパチーとして最初に見出

された福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子フクチンの conditional knock-out (ck0) マウスを2種類作出した。

定法であるが欠損している fukutin 遺伝子を外来的に補う遺伝子治療が有効であると考えられる。骨格筋に対して感染性が高く、遺伝子導入効率の高い免疫応答を惹起せず長期の遺伝子発現が可能なアデノ随伴ウイルス(AAV) ベクターを用いて尾静脈、腹腔からの全身投与を行う。

4. 研究成果

「SVA レトロトランスポゾンによる病的エクソントラッピングと福山型筋ジストロフィーにおけるレスキュー」

福山型筋ジストロフィー (FCMD) は、重度の筋ジストロフィーに脳奇形を伴う常染色体劣性遺伝性神経筋疾患であり、日本に多く、未だ治療法がない。殆どの FCMD 患者は、フクチン遺伝子の3'非翻訳領域に約3kbのSVA型レトロトランスポゾンの挿入変異を持つ。この疾患の発症機序は、mRNAの不安定化や転写障害によるものと考えられていたが、詳細は不明であった。

今回我々は、FCMDがSVAの挿入により誘導されるスプライシング異常症であることを証明した。この異常スプライシングは、SVA挿入配列内に存在する強力なスプライシング受容部位の exon-trapping 機能により、最終エクソンのフクチンをコードする領域内の選択的スプライシング供与部位が活性化されて、引き起こされていた。そこで、異常スプライシングを阻止するアンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)を用いたスプライシング制御治療法が有効と考え、異常スプライシング部位、エクソン内スプライシング促進配列、及びイントロン内スプライシング促進配列を標的とするAONを設計した。患者由来細胞に導入、及びFCMDモデルマウスに筋注ならびに全身投与した結果、患者由来細胞において正常のフクチンが回復し、またモデル

マウスにおいて正常フクチンの回復、ジストログリカンの糖鎖修飾及びラミニン結合能の回復が確認された。さらにこのSVAの exon-trapping 機能による異常スプライシングが、SVA挿入変異をもつ他疾患(高コレステロール血症、中性脂肪蓄積症)においても引き起こされていることを証明し、またチンパンジーにはないヒト特異的なSVAの exon-trapping 由来の遺伝子産物を脳で同定した。以上より、SVAの exon-trapping 機能はヒトの疾患や進化に関与しており、FCMDに対しては初の根治療法実現の可能性が示唆された。

「フクチン関連タンパク(FKRP)はジストログリカンのポストリン酸修飾に關与する」

ジストログリカン(DG)は糖鎖修飾構造を介して細胞外マトリックス蛋白であるラミニンやアグリンと結合している。福山型筋ジストロフィー(FCMD)およびその類縁疾患はDGの糖鎖修飾異常を病態として共有することからDG異常症と総称される。近年ラミニンとの結合に重要なDG糖鎖修飾構造としてO-マンノースの6位炭素からリン酸ジエステル結合を介して分枝する未知の糖鎖修飾構造(ポストリン酸修飾構造)が注目されている。FCMD患者培養筋細胞やLarge変異マウス骨格筋ではDGのポストリン酸修飾構造が失われており、fukutinやLargeがこの構造の生合成に關与することが報告されている。

今回我々は複数のDG異常症モデルマウスを用いた生化学的解析によって、fukutin、Largeに加えてFKRPがポストリン酸修飾に關与することを確認した。また一方で、正常野生型マウスにおいても、肺と精巣で発現する

DGにはポストリン酸修飾構造がないこと、マウス精巣組織でfukutin、FKRP、LARGEの発現は正常であることを見出した。ポストリン酸修飾構造にはDG異常症における病的意義だけでなく、ラミニン結合能の組織特異

性を決定するという生理的意義があると考えられた。

「2種類のフクチン欠損マウスを用いた福山型筋ジストロフィーの病態解析と遺伝子治療」

筋線維選択的な MCK-fukutin-cKO マウスは、非常に軽症の筋ジストロフィー病変を示した。未発症の MCK-fukutin-cKO マウスを用いた強制運動負荷実験の結果から、細胞膜の脆弱化が発症の引き金になることが示された。一方、筋前駆細胞選択的な Myf5-fukutin-cKO マウスは、より重篤な病態を示した。単離した筋前駆細胞を用いた増殖・分化実験の結果から、フクチン依存のジストログリカン糖鎖修飾異常は、筋前駆細胞の増殖・分化活性、筋再生能を低下させることが明らかになった。これらの結果は、筋前駆細胞活性がジストログリカノパチー病態の重篤度に関連することを示唆している。更に、頻繁に繰り返される筋変性・再生の結果、筋前駆細胞数や活性の低下が生じることから、発症の引き金となる膜脆弱化の抑制が、筋前駆細胞異常を伴う疾患モデルにおいても、治療効果を生み出す可能性が考えられた。そこで、アデノ随伴ウイルスベクターを用い、Myf5-fukutin-cKO 筋線維限定的にフクチン発現を回復させ、その治療効果を検討したところ、発症後に遺伝子治療を開始した場合であっても、重篤な病態を軽減することに成功した。

「福山型先天性筋ジストロフィーのアンチセンス治療における至適薬剤の選択」

我々は初年度に、FCMD が SVA 配列内にある強力なスプライシング受容部位のエクソントラップ機能により、最終エクソンのフクチンをコードする領域内の選択的スプライシング供与部位が活性化されることで発症するスプライシング異常症であることを証明し、アンチセンス核酸を用いたエクソントラップ阻害による根治療法の可能性を示した

(Nature 2011)。しかしながらここでの検討では、毒性が危惧される膜透過型モルフォリノ核酸 (VMO) を使用していることと、3種類の配列のアンチセンス核酸 A3, E3, D5 の3種によるカクテル療法であるため、通常より多くの非臨床試験が必要となる可能性が存在した。

今回我々は、このエクソントラップ阻害剤の臨床応用に向けさらに至適薬剤の選択を行った。患者由来細胞を用いてスプライシング阻害活性測定系を再設定し、まず臨床応用が進んでいる 2-O メチル RNA を用い、エクソントラップを誘導するスプライシング受容部位・供与部位及びスプライシング促進配列に網羅的にアンチセンス核酸を設計した。スプライシング阻害活性を測定したところ、スプライシング調節部位に設計したアンチセンス核酸 1 種類で十分なエクソントラップ阻害効果を認めることが判明した。次にその核酸配列をモルフォリノ核酸を用いて合成し、最適化を行い複数の候補配列を見出した。これらの配列をモデルマウス及び患者由来細胞系に投与したところ、正常フクチン蛋白の回復及びジストログリカンの糖鎖修飾の改善が確認された。

安全性と有効性の観点から 1 種の配列を選択し、今後、臨床応用に向けて大型動物を用いて薬剤の副作用や投与用量、薬物動態 (吸収・組織分布・代謝・排泄) の検討など (いわゆる非 GLP 試験および GLP 試験) を行い、臨床治験を目指したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 54 件)

1. Kanagawa M, Yu CC, Ito C, Fukada SI, Hozoji-Inada M, Chiyo T, Kuga A, Matsuo M, Sato K, Yamaguchi M, Ito T, Ohtsuka Y, Katanosaka Y, Miyagoe-Suzuki Y, Naruse K, Kobayashi K, Okada T, Takeda S, Toda T. Impaired viability of muscle precursor cells

in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. *Hum Mol Genet* 22:3003-3015, 2013. 査読有
doi: 10.1093/hmg/ddt157.

2. Kuga A, Kanagawa M, Sudo A, Chan YM, Tajiri M, Manya H, Kikkawa Y, Nomizu M, Kobayashi K, Endo T, Lu QL, Wada Y, Toda T. Absence of post-phosphoryl modification in dystroglycanopathy mouse models and wild-type tissues expressing a non-laminin binding form of alpha-dystroglycan. *J Biol Chem* 287: 9560-9567, 2012. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M111.271767.
3. Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu CC, Mori K, Oda T, Kuga A, Kurahashi H, Akman HO, DiMauro S, Kaji R, Yokota T, Takeda S, Toda T. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 478:127-131, 2011. 査読有
doi: 10.1038/nature10456.

〔学会発表〕(計 31 件)

1. Tatsushi Toda. Alpha- dystroglycanopathy and molecular targeting therapy. Third International Workshop for Glycosylation Defects in Muscular Dystrophies. 2013 年 4 月 18 日 Omni Charlotte Hotel, Charlotte NC. U.S.A.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 福山型筋ジストロフィー治療用医薬組成物

発明者: 戸田 達史, 小林 千浩, 池田 真理子

権利者: 国立大学法人神戸大学

種類: 特許

番号: 特願 2012 86891

出願年月日: 平成 24 年 4 月 5 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

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

6. 研究組織

研究代表者:

戸田 達史 (TODA Tatsushi)

神戸大学大学院医学研究科・教授, 専門

分野: 神経内科学, 分子遺伝学, 役割分

担: 研究全般の実施とその統括

研究者番号: 30262025

連携研究者:

小林 千浩 (KOBAYASHI Kazuhiro)

神戸大学大学院医学研究科・准教授, 専

門分野: 分子生物学, 遺伝医学, 役割分

担: 遺伝子治療

研究者番号: 90324780

金川 基 (KANAGAWA Motoi)

神戸大学大学院医学研究科・助教, 専門

分野: 生化学, 分子生物学, 役割分

担: コンディショナルモデルマウスの作成

と解析、蛋白複合体の生化学

研究者番号: 00448044

池田 (谷口) 真理子 (IKEDA (TANIGUCHI) Mariko)

神戸大学大学院医学研究科・特命講師,

専門分野: 小児神経学, 遺伝医学, 分子

生物学, 分子遺伝学, 役割分

担: アンチセンス治療解析

研究者番号: 00410738