

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253057

研究課題名(和文) 福山型筋ジストロフィーおよびジストログリカノパチーの分子病態解明と治療薬開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathomechanism for Fukuyama muscular dystrophy and dystroglycanopathy and their drug developmen

研究代表者

戸田 達史 (Toda, Tatsusi)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：30262025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,900,000円

研究成果の概要(和文)：福山型筋ジストロフィー治療剤としてアンチセンス核酸の配列の最適化を実施し、ミックスカクテルでなく1本の核酸によって高活性を示す候補配列を見出した。LARGEのもつ糖鎖増強活性が得られるにはfukutinの存在が必要なことを示した。DGの糖鎖の中にリビトールリン酸が2つ連なった形で存在し、ISPDがCDP-リビトール合成酵素、フクチン、FKRPが、リビトールリン酸転移酵素であることを発見した。胎生期のモデルマウスの解析で、脳形成過程で放射状グリアに発現しているジストログリカン糖鎖の有無が、その後の脳病変の重篤度に寄与することを示した。

研究成果の概要(英文)：We re-designed AONs precisely around the splice sites and assessed the efficacy for exon trap inhibition of these AONs in Fukuyama CMD patient cells and model mice. We finally selected one best candidate AON. We demonstrated that fukutin is required for LARGE-dependent rescue of α -DG glycosylation. We further identified the previously unknown glycan unit ribitol 5-phosphate (Rbo5P), a phosphoric ester of pentose alcohol, as a tandem repeat that functions as a scaffold for the formation of the ligand-binding moiety of α -DG. We determined the enzyme activities of three major α -DGpathy-causing proteins to be involved in the synthesis of tandem Rbo5P. Isoprenoid synthase domain-containing (ISPD) is cytidine diphosphate ribitol (CDP-Rbo) synthase. Fukutin and fukutin-related protein are Rbo5P transferases that use CDP-Rbo. We also indicate that spatiotemporal persistence of functionally glycosylated dystroglycan may be crucial for brain development.

研究分野：医歯薬学

キーワード：福山型筋ジストロフィー ジストログリパノカチー リビトールリン酸 フクチン アンチセンス治療

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。

申請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 (-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 11 種類の遺伝子が同定されている (フクチン、POMGnT1、FKRP (fukutin-related protein)、LARGE、POMT1、POMT2、ISPD、B3GALNT2、TMEM5、DPM2、DPM3)。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 -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、-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 -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ニ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)、フクチンのミスセンス変異により本来のゴルジ体に到達せず ER にとどまり、シャペロン活性のあるクルクミンで異局在を戻せること (JBC 2012) を示した。また最近、O-マンノシル糖鎖にはリン酸基を介した側鎖構造があり、リン酸基より先の修飾もラミニン結合に必要であることが報告され、LARGE、FCMD 患者由来の細胞でこのホスホジエステル結合を介した構造が欠如している。FKRP でもこのホスホジエステル結合を介した構造 (ポストリン酸構造) が欠如していることを示した (JBC 2012)。

そこで本研究では、このポストリン酸構造の詳細な構造同定に加え、この修飾におけるフクチン、類縁疾患分子の役割の解明を行い、教科書的に「フクチンは を に修飾する酵素である」というような記述を行い、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見た場合、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、ポストリン酸糖鎖不全モデルとして 2 種類のフクチン欠損コンディショナル KO マウスを樹立し、筋幹細胞/筋再生におけるポストリン酸糖鎖の重要な役割や、静脈投与による AAV 遺伝子治療により筋病変が回復することを示した。(Hum Mol Genet 2013)。

またさらに FCMD は、患者 *fukutin* のレトロトランスポゾン挿入変異内に存在する潜在的スプライシング受容部位が、*fukutin* の exon 10 の翻訳領域内にある潜在的スプライシング供与部位を活性化するために、exon 10 の翻訳部領域が異常スプライシングを受け、異常フクチン蛋白が産生されることにより発症する、‘スプライシング異常症’であることを見出し、さらにアンチセンス薬剤モルフォリノをデザインし、モデルマウスやヒト患者細胞に投与すると、正常フクチンが回復し、DG の糖鎖異常が是正された。これにより、アンチセンス核酸による FCMD の根本治療への可能性を示した (Nature 2011)。

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、AAV 遺伝子治療、LARGE による糖鎖治療、など、さまざまなユニークな治療実験、前臨床試験を行って、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明らかにしてきた。さらに‘スプライシング異常症’であることを見出し、アンチセンス核酸による根本治療への可能性を示した (Nature 2011)。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、近年同定された O-マンノース型糖鎖のポストリン酸構造合成機構とその病態を解明すること、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

代表者は異常スプライシングを起きないようにするモルフォリノなどによるアンチセンス治療の有効性を確認した (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 種ミックスカクテル療法であるため、各成分ごと、混合ごとに、通常の 7 倍量の非臨床試験を必要とする問題点が存在する。

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 1 種の選択を行う。

1、網羅的に大量のスプライシング阻害を測定するため、患者由来細胞系を用いてスプライシング阻害活性測定系を再設定する。

2、有効な AON の至適化：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、毒性が低く、効果の高い核酸配列を探求し標的配列の調整を行う。安価でヒト臨床応用が進んでいる 2-O メチルアンチセンス核酸を用い、エクソ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 1 塩基ずつずらして網羅的に数 10 個の 2-O メチルアンチセンス核酸を設計し、上記測定系にて測定し、最終有効配列を決定する。

3、2-O メチルアンチセンス核酸による最終有効配列を実際に臨床試験に使用するであろう PMO モルフォリノに置き換え、同等の効果を確認する。

(2) フクチンなど ジストログリカノパチー関連分子の機能解析と病態解明 ～ポストリン酸糖鎖の構造同定

近年同定され ジストログリカノパチーに重要なポストリン酸糖鎖の構造解析は、ポストリン酸糖鎖が効率的に修飾された試料の獲得が困難であるため、世界的にも停滞している。申請者らはこの問題を解決し、ポストリン酸糖鎖が高度に修飾されたジストログリカン組換え体の大量調製と精製に成功している。この活性型標品の解析から、ポストリン酸糖鎖の一部に(Xyl-GlcA)繰り返し構造が含まれること、マンノシルリン酸 (Man-P) と繰り返し構造のリンカー部位には、予想がつかないユニークな構造が含まれる可能性を見出している。本項目では、独自の組み換え体をツールに、糖質化学的・糖鎖生物学的手法を駆使して、ポストリン酸糖鎖構造を同定する。

まず、活性型標品から、既に確立したプロトコールに従い、ポストリン酸糖鎖を含む糖ペプチドを調製する。(Xyl-GlcA)繰り返し構造が付加されない中間体や変異体、リン酸ジエステルを加水分解した試料を対照として用いる。これらを LC-MS/MALDI-TOF/ESI/MSⁿ など複数の分析を組み合わせ、ポストリン酸糖鎖の組成、配列、リンカー構造を決定する。

また、標品に含まれる中間体構造を精製し、糖転移酵素反応実験のアクセプター基質に供する。

(3) フクチン遺伝子治療と脳特異的フクチン KO マウスの作成と解析

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)ベクターを用いる。

さらにポストリン酸糖鎖不全モデルである nestin-Cte フクチン cKO を作成し、と LARGE 変異マウスの胎仔脳 (E12.5-18.5) を用い、基底膜や層構造に異常が発生する時期を決定する(免疫組織染色)。大脳皮質各層における細胞分布や、異所性の基底膜と放射状グリア/神経細胞の配置関係も観察する。以上より、ポストリン酸糖鎖が、大脳皮質層構造の形成に重要である、という生理的コンセプトと、その破綻による病態特徴を確立する。

4. 研究成果

「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」

福山型筋ジストロフィーは日本人特有の重篤な疾患であり、これまで治療薬は存在しない。本研究では福山型筋ジストロフィー新規治療剤としてアンチセンス核酸の開発を行った。FCMD モデル細胞とモデル動物を用いて既報告の A3, E3, D5 周辺の網羅的スクリーニングによって高活性配列の探索を実施した。さらにヒトへの投与試験が開始されており安全性の問題が無いと考えられるモルフォリノ核酸 (PMO) を用いてさらに配列の最適化を実施し、ミックスカクテルでなく 1 本のアンチセンス核酸によって高活性を示す候補配列を見出した。

「LARGE による糖鎖治療」

LARGEは先天性筋ジストロフィー1DおよびLarge^{myd}マウスの原因遺伝子であるが、FCMD、筋眼脳病、Walker-Warburg症候群の患者細胞にLARGEを過剰発現させることで糖鎖修飾が改善され、原因遺伝子によらずLARGEがジストログリカノパチーに共通した治療に活用できる可能性が示されている。Large^{myd}マウスとFCMDモデルのMyf5-fukutin cKOマウス⁽²⁾に対して、MCKプロモーター下流にLargeを組み込んだアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を投与し、筋線維特異的にLARGEを過剰発現させた。Large^{myd}マウスではAAV投与後に体重、握力、血清CK値の改善がみられ、糖鎖修飾、骨格筋病理的にも筋ジストロフィー病態の改善が得られた。しかし、Myf5-fukutin cKOマウスでは糖鎖修飾および筋ジストロフィー病態の改善は得られなかった。そこでfukutin欠損胚性幹細胞に対してLARGEを過剰発現させたが、糖鎖修飾の改善は認めなかった。fukutinが完全に欠損している状態ではLARGE依存性の糖鎖修飾が起こらないと考えられた。fukutinの活性は未知であるが、LARGEのもつ糖鎖増強活性が得られるにはfukutinの存在が必要と考えられる。

「フクチンなど ジストログリカノパチー関連分子の機能解析と病態解明 ～ポストリン酸糖鎖の構造同定」

我々は、Xyl-GlcAリピートが効率的に修飾される組み換えDGの発現・調製方法を世界で初めて開発し、糖タンパク質質量分析法、精密質量分析法、ガスクロマトグラフィー、二次元NMRなどの糖質化学的手法を駆使し、糖鎖の中に、リビトールリン酸という物質が2つ連なった形で存在することを見出した。このリビトールリン酸のタンデム構造がXyl-GlcAリピートとCoreM3と呼ばれるO-マンノース型糖鎖を結び、糖鎖がコアタンパク部分に連結する様式が初めて明らかになった。リビトールリン酸は、ペント

ース系の糖アルコールリン酸で、これまで哺乳類で存在が確認されておらず、我々が発見した新規翻訳後修飾体となる。次に我々は、タンデムリビトールリン酸の生合成系の解析を行った。リビトールリン酸は哺乳類で用いられている前例はなかったが、バクテリアの細胞壁成分として用いられている報告がある。バクテリアでは、CDP-リビトールという物質を供与体に糖鎖にリビトールリン酸が組み込まれる。興味深いことにバクテリアCDP-リビトール合成酵素TarIは、DG異常症遺伝子のひとつISPDと類似性があり、我々は実際にISPDがCDP-リビトールを合成するヒト酵素であることを証明した。更に、フクチン、そして、肢帯型筋ジストロフィー2I/先天型筋ジストロフィー1Cの原因遺伝子FKRPが、CDP-リビトールを供与体基質として、リビトールリン酸を糖鎖に順に組み込むリビトールリン酸転移酵素であることを発見した。また、CRISPR/Cas9システムにより、それぞれの遺伝子を欠損させた疾患モデル細胞を樹立し、リビトールリン酸修飾の不全が生じていることを示した。

「フクチン遺伝子治療と脳特異的フクチンKOマウスの作成と解析」

さらに胎生期のモデルマウスの解析で、脳形成過程で放射状グリアに発現しているジストログリカン糖鎖の有無が、その後の脳病変の重篤度に寄与する可能性が示唆された。これらの知見はジストログリカン異常症の患者の脳病変に見られる臨床的多様性を考える上で興味深く、胎児期のDG糖鎖修飾の制御がジストログリカン異常症の脳病変に対する新たな治療戦略になりうる可能性を示唆していた。

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 28 件)

Ohtsuka Y, Kanagawa M, Yu CC, Ito C, Chiyo T, Kobayashi K, Okada T, Takeda S'I, Toda T、 Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression.、 Sci Rep 査読有、 5、 2015、 8316、 doi:10.1038/srep08316

Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Many H, Kuga A, Yamaguchi Y, Akasaka-Manyu K, Furukawa JI, Mizuno M, Kawakami H, Shinohara Y, Wada Y, Endo T, Toda T、 Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy. 、 Cell Rep、 査読有、 14: 2016、 2209-2223、 doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.017. Epub 2016 Feb 25.

Kuwabara Naoyuki, Many Hiroshi, Yamada Takeyuki, Tateno Hiroaki, Kanagawa Motoi, Kobayashi Kazuhiro, Akasaka-Manyu Keiko, Hirose Yuriko, Mizuno Mamoru, Ikeguchi Mitsunori, Toda Tatsushi, Hirabayashi Jun, Senda Toshiya, Endo Tamao, Kato Ryuichi, Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α dystroglycan, Proceedings of the National Academy of Sciences、 査読有、 113、 2016、 pp. 9280-9285、 DOI : 10.1073/pnas.1525545113

〔学会発表〕(計 32 件)

Tatsushi Toda, Use of antisense oligonucleotides in FCMD mouse models. 、 212th ENMC International Workshop Animal models of Congenital Muscular Dystrophies. 、 2015 年 5 月 19 日、 Naarden, Netherlands

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤及び関連酵素測定法

発明者：戸田達史、小林千浩、金川基、遠藤玉夫、萬谷博、和田芳直、田尻道子

権利者：同上

種類：特許

番号：2016 160390

出願年月日：2017 年 8 月 18 日

国内外の別：国内

名称：筋ジストロフィー関連心筋症の治療又は予防剤

発明者：片野坂友紀、成瀬恵治、氏原嘉洋、戸田達史、金川基

権利者：同上

種類：特許

番号：2018 - 44752

出願年月日：2018 年 3 月 12 日

国内外の別：国内

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

研究者番号：30262025

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()