

<シンポジウム 5—3>難治性筋疾患の病態機序—CK 発見から 50 年—治療の時代へ

福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の病態・治療戦略

戸田 達史

(臨床神経, 49 : 859—862, 2009)

Key words : 福山型筋ジストロフィー, フクチン, ジストログリカノパチー, LARGE, 糖鎖

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) の特徴

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は 1960 年福山らにより発見された常染色体性劣性遺伝である。わが国の小児期筋ジストロフィー中 Duchenne 型の次に多く、日本人の約 90 人に 1 人が保因者と計算され、日本に 1,000~2,000 人位の患者が存在すると推定され、日本人特有の疾患とされていたが、近年海外からの報告が相次いでいる(後述)。本症は重度の筋ジストロフィー病変とともに、多小脳回を基本とする高度の脳奇形(敷石(2型)滑脳症)が共存し、さらに最近では近視、白内障、視神経低形成、網膜剥離などの眼症状も注目されている。すなわち本症は遺伝子異常により骨格筋—眼—脳を中心に侵す一系統疾患である。

患児は生後~乳児早期に筋緊張低下、筋力低下で発症する。運動障害は重症で、2歳前後で坐位まで獲得するものは多いが、歩行まで獲得するものはまれである。また同時に脳奇形による中枢神経症状ともない、全例に精神発達遅延をみとめ、約半数にけいれんをみとめる。筋力低下、全身関節拘縮により、10歳前後に完全臥床状態となり、多くは20歳までに死亡する。

フクチン遺伝子の同定

私たちは、世界に先駆け、糖鎖異常をともなう筋ジストロフィーの原因遺伝子として、フクチン(福山型筋ジストロフィー)と POMGnT1(筋・眼・脳病)を同定した。

正常型のフクチン cDNA は約 7kb で、骨格筋、心筋、脳で優位に発現している。患者染色体のほぼ 90% には同一の変異がみられ、原因遺伝子の 3' 非翻訳領域内に約 3kb の DNA 挿入があり、mRNA の発現が検出できない。この挿入配列は、今から約 100 世代前の一人の祖先から今日の患者の大部分へと受け継がれたものと推定され、動く遺伝因子である「レトロトランスポゾン」である¹⁾。

正常遺伝子の産物蛋白質フクチンは、461 個のアミノ酸からなる分子量 53.7kD の蛋白質であり、細胞内ではゴルジ体に局

在し、相同性を示す既知の蛋白質やモチーフ検索から、糖鎖修飾に関係する蛋白質である可能性が示唆されている (Fig. 2)。

福山型の幅広い臨床スペクトラム —胎生致死から心筋症まで、超軽症 FCMD の存在—

日本人患者のほとんどすべては、約 3kb のレトロトランスポゾン挿入型染色体のホモ接合体、またはレトロトランスポゾン挿入型染色体と他の変異(フレームシフト、ノンセンスなど)の複合ヘテロ接合体である。複合ヘテロ接合の患者は挿入変異ホモ接合の患者よりも水頭症、小眼球などを示すなど重症である²⁾。点変異を 2 個持つ症例は日本には未だ報告がなく、海外の 2 報告例ではさらに重度の症状を呈し、それぞれ 10 日と 6 カ月で死亡している³⁾。点変異は表現型を重症化し、点変異 2 個の患者が見つからないのは、胎生致死と考えられた。西欧では点変異 2 個であり(したがって胎生致死)、これこそが本症が西欧に存在しにくい理由であり、これはフクチン遺伝子のノックアウトマウスが胎生致死であることとよく一致していた。

しかしながら 2006 年日本から心筋症と軽度筋力低下、知能正常の臨床的には肢帯型の成人 6 例が報告された⁴⁾。これはレトロトランスポゾン挿入型染色体とミスセンス変異の複合ヘテロ接合であった。また同様にユダヤ人で肢帯型例 3 例が報告され、点変異 2 個のホモ例であった。これらは従来の福山型の先天型のイメージを変え、福山型のさらなる広い臨床スペクトラムを考えさせる。また西洋から同様の報告が続き、フクチン遺伝子変異は、さまざまな臨床型をひきおこすことが明らかになった⁵⁾。点変異もその位置によっては、軽症型変異が存在すると思われる。

福山型筋ジストロフィーと α ジストログリカンの糖鎖修飾異常

ジストロフィン関連糖蛋白質複合体の中の α ジストログリカンは高度に糖鎖修飾を受け、全体が細胞外に存在し基底膜構成成分ラミニンと 0-mannose 型糖鎖 Sial2-3Galb1-

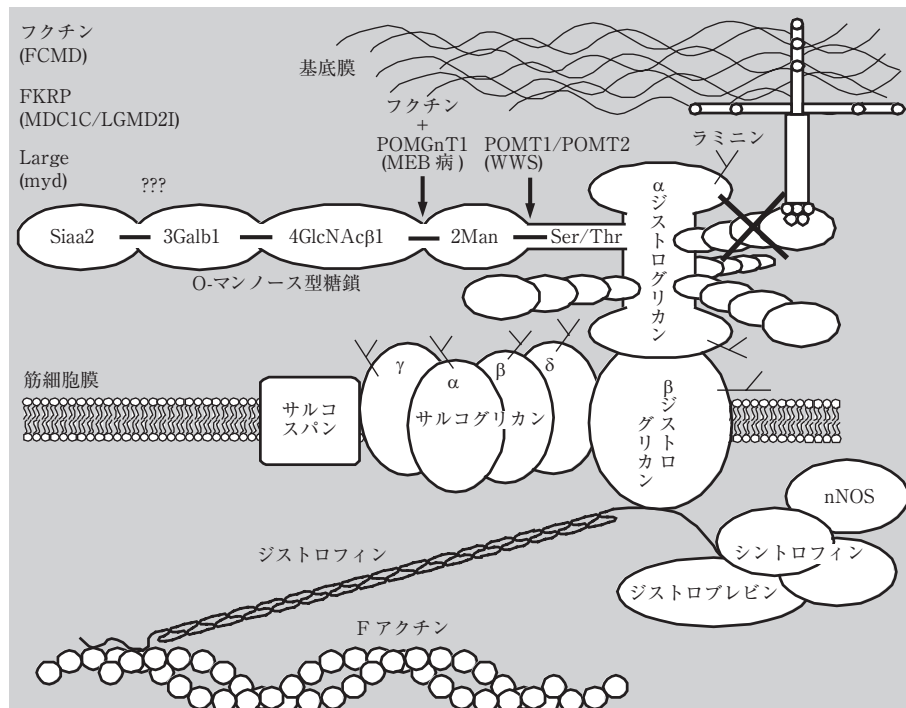


Fig. 1 筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体 DGC と α ジストログリカンに対する糖鎖修飾の異常によるとされている疾患群「 α ジストログリカノパチー」

細胞外基底膜から細胞内骨格につながる DGC 内の α ジストログリカンはラミニン $\alpha 2$ 鎖と O-マンノース型糖鎖で結合している。この糖鎖修飾に異常をきたすと、ラミニンなどのリガンド結合能が低下し、 α ジストログリカノパチーを発症すると考えられている。確実な活性が明らかなのは、POMGnT1 (MEB)、POMT1 (WWS) のみ。フクチンは POMGnT1 と複合体を形成し、その活性を修飾していると考えられている。

4GlcNAc β 1-2Man-Ser/Thr)で結合しており、一連のつながりは、骨格筋の収縮弛緩による機械的負荷に対して筋形質膜の保護をしている (Fig. 1)。

先天性筋ジストロフィーに、II 型滑脳症、眼奇形をともなう muscle-eye-brain (MEB) 病や Walker-Warburg 症候群 (WWS) は、その病変部位、症状の類似性から FCMD と類縁疾患と考えられている。遠藤らとわれわれは類縁疾患、MEB 病が、この α ジストログリカンとラミニンの連結部の O-mannose に GlcNAc を付加する新規の糖転移酵素 POMGnT1 の異常により発症する疾患であることを、みいだした。筋ジストロフィーの原因遺伝子として糖転移酵素が同定され、実際に患者で変異が確認されたのははじめてのことである⁶⁾。

続けて、一部の Walker-Warburg 症候群に O-mannose 転移酵素 POMT1 と POMT2 の変異が発見された。さらにフクチンもアミノ酸の相同性などから、糖鎖修飾に関わる酵素と推測されており、また先天性筋ジストロフィー 1C 型や肢帯型筋ジストロフィー 2I 型の原因がフクチンと相同性のある fukutin-related protein (FKRP) という糖鎖修飾酵素と考えられるタンパク質であることが報告された。他に、myodystrophy マウスや先天性筋ジストロフィー 1D 型の原因が Large という糖転移酵素と推定されているタンパク質の異常が原因

であることが報告された。これらすべての疾患において α ジストログリカンの糖鎖認識抗体による免疫組織染色性が低下する異常がみられている。

つまり Walker-Warburg 症候群、肢帯型 2I 型などもあわせ、糖転移酵素の欠損により α ジストログリカンの糖鎖修飾が乱れ、ラミニンなどとの結合ができなくなり、基底膜と細胞骨格のつながりが破綻するために筋ジストロフィー、脳表奇形が発症すると考えられ⁷⁾、これら疾患群を総称して「 α ジストログリカノパチー」という概念ができた (Fig. 1)。

その後も世界中から報告が続き、現在 FKRP, POMT1, POMT2, POMGnT1, フクチン, LARGE 遺伝子変異は、それぞれが WWS, MEB, FCMD, 肢帯型など、さまざまな臨床型をひきおこすことが明らかになっている⁸⁾。最近の私たちの研究から、フクチンと POMGnT1 は、細胞内で複合体を形成すること、また、フクチンの変異によって、POMGnT1 の細胞内局在異常や糖転移酵素活性の低下が引き起こされることが示された⁸⁾。

FCMD および α ジストログリカノパチーの治療へのヒント

多くの神経・筋変性疾患と同様、現在の所、福山型をふくむ

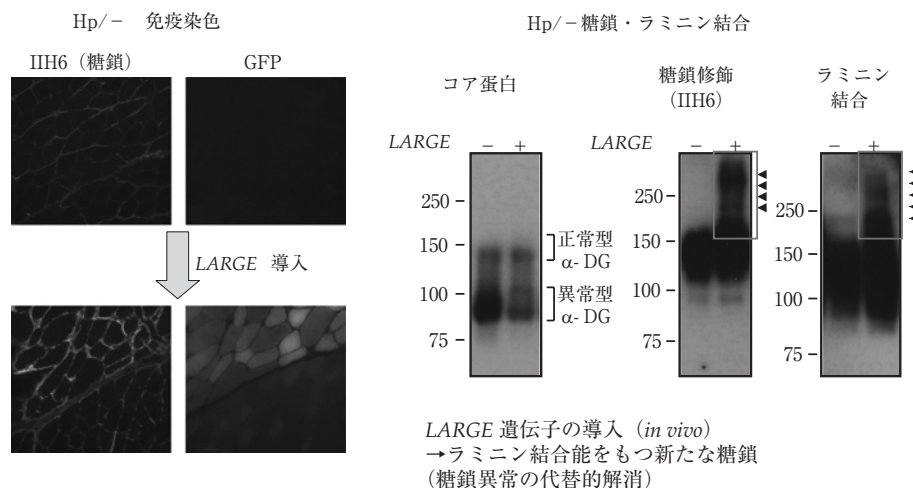


Fig. 2 FCMD モデルマウスへの *LARGE* 遺伝子導入

アデノウイルスベクターをもちいた *LARGE* 遺伝子導入により、FCMD ノックインマウスの α -DG の糖鎖異常が *in vivo* で解消できることが明らかになった。糖鎖抗体 IIIH6 の免疫染色やラミニン結合能も回復している。同様の所見は POMGnT1 ノックアウトマウスでもえられた。

α ジストログリカノパチーに治療法はないが、治療的アプローチにむけて研究が緒についたところである。

アデノウイルスベクターをもちいて *myd* マウスの骨格筋に原因遺伝子である *LARGE* 遺伝子を発現させると、 α ジストログリカンの糖鎖異常が回復し、筋ジストロフィーが改善することが報告された。さらに興味深いことに、FCMD、MEB 病および WWS 患者由来の細胞（筋芽細胞、線維芽細胞）においても、*LARGE* の過剰発現により α ジストログリカンの糖鎖異常に改善をみとめ、リガンドとの結合能が回復した⁹⁾。*LARGE* が付加する糖鎖が MEB 病などで欠損する通常のラミニン結合 O-マンノース型糖鎖である保証はないが、遺伝的にことなるこれらの疾患群に対して、共通の病態である「 α ジストログリカンの糖鎖異常」を標的とした治療法の開発につながる可能性があり、大変興味深い。

FCMD の病態解明、および治療法の構築には、モデルマウスをもちいた研究が不可欠であるが、フクチン欠損マウスは、胎生致死であり、フクチン欠損キメラマウスは個体ごとに組織ごとにキメラ率が異なり¹⁰⁾、モデルとしては有効ではない。そこで、われわれは、レトロトランスポゾン挿入変異をもつノックインモデルマウスを作成し、その解析を行った。レトロトランスポゾン挿入変異ホモ接合、より重症と思われる複合ヘテロ接合、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みとめられなかった。いずれのマウスにおいても、 α -DG 糖鎖に異常が生じていたが、正常糖鎖型の α -DG 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% 程度残存していた。一方 FCMD 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 α -DG 分子種も、ラミニン結合能も、ほとんど検出されない¹¹⁾。

FCMD ノックインマウス、*Large^{myd}* マウスの結果から、正常糖鎖型の α -DG が少し残存していれば、筋ジストロフィー

発症を抑制できる可能性がある。更に、アデノウイルスベクターを用いた *LARGE* 遺伝子導入により、FCMD ノックインマウス、POMGnT1 ノックアウトマウスの α -DG の糖鎖異常が *in vivo* で解消できることが明らかになった (Fig. 2)¹⁸⁾。つまり、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、FCMD をふくむ類縁疾患群の治療につながると考えられる。また一方現在米国で α -DG 糖鎖異常の回復を指標にして、低分子化合物のスクリーニングがおこなわれている。

おわりに

新世紀になってから、筋ジストロフィーに α ジストログリカンの糖鎖の異常という新しい病態メカニズムを提唱する報告が相次ぎ、興味深い展開となっている。しかし筋ジストロフィーとしてみたばあい、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おこなわれている。一方で、FCMD、MEB 原因遺伝子同定を契機に α ジストログリカノパチーの病態研究が大きく進展したが、治療としては報告がない。福山型は我が国ではじめて記載された疾患であり、患者数も多く、我が国の研究により、治療法開発をすすめることはわれわれの責務である、と考える。

なおわれわれが同定開発したフクチンの遺伝子検査は、2006 年より健康保険適応となっていることを、付記しておく。

文 献

- 1) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, et al: An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998; 394: 388—392
- 2) Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, et al: Novel mu-

- tation and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet* 1999; 8: 2303—2309
- 3) Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, et al: A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 2003; 53: 392—396
 - 4) Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, et al: Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann Neurol* 2006; 60: 597—602
 - 5) Godfrey C, Clement E, Mein R, et al: Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain* 2007; 130: 2725—2735
 - 6) Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, et al: Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001; 1: 717—724
 - 7) Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, et al: Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 2002; 418: 417—421
 - 8) Xiong H, Kobayashi K, Tachikawa M, et al: Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of α -dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 935—941
 - 9) Barresi R, Michele DE, Kanagawa M, et al: LARGE can functionally bypass α -dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med* 2004; 10: 696—703
 - 10) Takeda S, Kondo M, Sasaki J, et al: Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1449—1459
 - 11) Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, et al: Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 621—631

Abstract

Pathomechanism and therapeutic strategy of Fukuyama congenital muscular dystrophy and related disorders

Tatsushi Toda, M.D.

Division of Neurology, Kobe University Graduate School of Medicine

Hypoglycosylation and reduced laminin-binding activity of α -dystroglycan are common characteristics of dystroglycanopathy, which is a group of congenital and limb-girdle muscular dystrophies. We previously identified the genes for Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) and muscle-eye-brain disease (MEB). FCMD, caused by a mutation in the *fukutin* gene, is a severe form of dystroglycanopathy. Knock-in mice carrying the founder retrotransposal insertion exhibited hypoglycosylated α -dystroglycan; however, no signs of muscular dystrophy were observed. More sensitive methods detected minor levels of intact α -dystroglycan, and solid-phase assays determined laminin binding levels to be approximately 50% of normal. In contrast, intact α -dystroglycan is undetectable in the dystrophic Large mouse, and laminin-binding activity is markedly reduced. These data indicate that a small amount of intact α -dystroglycan is sufficient to maintain muscle cell integrity in knock-in mice, suggesting that the treatment of dystroglycanopathies might not require the full recovery of glycosylation. Transfer of fukutin into knock-in mice restored glycosylation of α -dystroglycan. Transfer of LARGE produced laminin-binding forms of α -dystroglycan in both knock-in mice and the POMGnT1 mutant mouse. These data suggest that even partial restoration of α -dystroglycan glycosylation and laminin-binding activity by replacing or augmenting glycosylation-related genes might effectively deter dystroglycanopathy progression and thus provide therapeutic benefits.

(*Clin Neurol*, 49: 859—862, 2009)

Key words: Fukuyama congenital muscular dystrophy, fukutin, dystroglycanopathy, LARGE, sugar chain