

Large による α -ジストログリカノパチーに対する治療法の開発

齊藤 史明

(臨床神経 2011;51:918-921)

Key words : 筋ジストロフィー, α -ジストログリカノパチー, ジストログリカン, 糖転移酵素, ラージ

はじめに

先天性筋ジストロフィーや肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) において遺伝子変異が相次いで明らかにされている。福山型先天性筋ジストロフィーは fukutin 遺伝子の変異により発症することが明らかにされた¹⁾。また筋一眼一脳病では POMGnT1 の, Walker-Warburg 症候群では POMT1 と POMT2 の, 先天性筋ジストロフィー 1C 型 (MDC1C) と LGMD2I 型では FKRП の, さらに MDC1D では Large の遺伝子変異がみいだされた。これら疾患の遺伝子産物のうち POMGnT1, POMT1, POMT2 は糖転移酵素としての活性が明らかにされたが, fukutin, FKRП, Large についてもアミノ酸配列のホモロジーから蛋白質の翻訳後修飾にかかわる酵素であると推測されている²⁾。そしてこれら遺伝子産物の機能異常により α -ジストログリカン (α -DG) の翻訳後修飾に異常が生じる結果, α -ジストログリカンの機能低下が惹起され筋細胞の変性, 壊死がひきおこされるものと考えられるようになった³⁾。したがってこれら疾患は α -ジストログリカノパチーと総称される (Fig.1)。

近年, Large が α -ジストログリカンの翻訳後修飾を改変することで α -ジストログリカンの機能を著明に亢進させることが明らかとなった。しかもこの作用は fukutin や POMGnT1 の欠損下においてもみられることからこれら, 他の α -ジストログリカノパチー遺伝子産物の機能をバイパスしてひきおこされるものであることがわかった⁴⁾。これらのことから Large による α -ジストログリカンの機能亢進は広く α -ジストログリカノパチーの治療を包括的に模索する上で重要な分子標的となるものと考えられる。本研究でわれわれは Large による α -ジストログリカノパチー治療の可能性を *in vitro*, *in vivo* の系をもちいて検討し, その実現へ向けての考察をおこなった。

実験材料・方法

RT4, HEK293, C2C12, HeLa, COS7, MCF7 の各株化培養細胞を既定の方法により培養した。ヒトの Large cDNA は OriGene より購入し, pcDNA3 (Invitrogen) ヘクローニングし

た後 FuGene HD (Roche) をもちいて各培養細胞へ一過性の遺伝子導入をおこなった。Large の欠失コンストラクトは KOD-plus-Mutagenesis kit (TOYOBO) をもちいてマニュアルの方法にしたがい作製した。またヒト Large 管腔内ドメインの全長を pSecTag/FRT/V5-His TOPO (Invitrogen) ヘクローニングした後 Flp-In 293 細胞 (Invitrogen) へ遺伝子導入をおこない, 分泌型 Large の安定発現株をえた。培養上清中の分泌型 Large 蛋白質は TALON metal affinity resin (Clontech) をもちいて精製した。

既定の方法をもちいて Large を過剰発現するトランスジェニックマウスを作出した。Large の発現調節には CAG プロモーターをもちいた。マウスの骨格筋, 心臓, 脳, 坐骨神経, 肝臓, 腎臓, 肺を急速凍結し厚さ 8 μ m の凍結切片スライドを作製した。これをもちいて H-E 染色による形態学的観察をおこなった。また Large や α -ジストログリカン, laminin などの発現を免疫蛍光抗体法やウエスタンブロット法により検討した。さらに α -ジストログリカンのラミニン結合能をブロットオーバーレイ法により解析した。

結 果

α -ジストログリカンの糖鎖に対する抗体をもちいたウエスタンブロットの結果, 悪性腫瘍由来の細胞株である HeLa や MCF7 では α -ジストログリカンの糖鎖修飾がいちじるしく減弱していた。しかしこれらの細胞でも Large の遺伝子導入により α -ジストログリカンの糖鎖修飾は著明に亢進し, また laminin 結合能も大幅に増強した。Large の欠失コンストラクトをもちいた実験では, α -ジストログリカンの機能亢進は Large の管腔内ドメインのいずれの部分も欠いても発揮されないことから, 管腔内ドメイン全長が必要であることが明らかとなった。

一方, Large トランスジェニックマウスは正常に誕生, 発育し, 交配も可能であった。また外観上明らかな行動異常を示さなかった。各臓器の H-E 染色による観察の結果, 明らかな形態学的異常はみとめられなかった。同マウスの各臓器では Large の過剰発現をみとめ, これにともない α -ジストログリカンの高分子量と laminin に対する結合能の著明な亢進, すなわち α -ジストログリカンの機能亢進をみとめた (Fig.

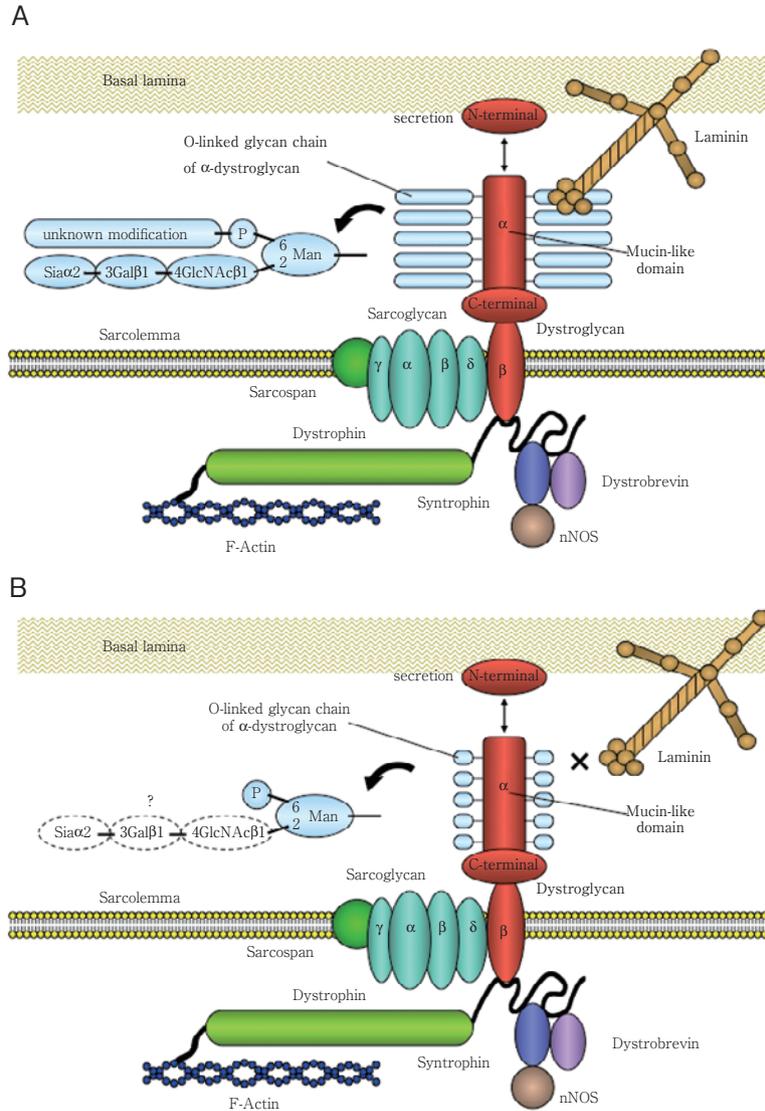


Fig. 1 Dysfunction of α -dystroglycan in Fukuyama type congenital muscular dystrophy (FCMD). (A) Normal dystrophin-glycoprotein complex in skeletal muscle. α -Dystroglycan binds to laminin via the O-linked glycan chain moiety, including Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man and a phosphoryl glycan attached to the mannose. N-terminal domain of α -dystroglycan is cleaved by furin and secreted. (B) The mutation of fukutin causes defects in postphosphoryl modification of the O-linked glycan. This results in disruption of the linkage between α -dystroglycan and laminin, leading to destabilization of the sarcolemma. The modification of O-linked mannose by Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β remains to be elucidated in FCMD.

2). また一部の臓器ではラミニンの発現の増加をみとめた。

Large 蛋白質による治療を考える際には大量の Large 蛋白質を比較的簡便にえる方法を確立することが望まれる。そこで Large を元来の膜蛋白質ではなく分泌型のリコンビナント蛋白質として培養細胞をもちいて産生することを試みた。シグナルペプチド配列をもつ pSecTag ベクターをもちいて Large の管腔内ドメイン全長を分泌発現する Flp-In 293 細胞の安定発現株を作製した。本発現株は培養上清中に分泌型 Large 蛋白質を効率よく発現した。さらに His タグをもちい

て分泌型 Large を精製した。

考 察

Large トランスジェニックマウスをもちいた実験の結果から、 α -ジストログリカンの機能亢進は *in vivo* においても主要な臓器で生じること、また Large の過剰発現は生体に重大な有害事象をもたらさないことが示された。これらのことから Large による α -ジストログリカンの機能亢進は α -ジストロ

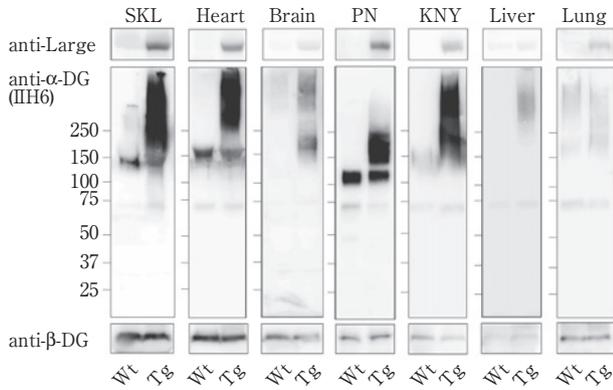


Fig. 2 Several tissues of Large transgenic mice were examined by Western blotting. Overexpression of Large was confirmed in these tissues. Intense bands of α -dystroglycan with broader appearance and higher molecular mass were detected with anti- α -DG (IIIH6) in transgenic mice. Expression of β -dystroglycan was not altered. SKL, skeletal muscle; PN, peripheral nerve; KNY, kidney.

グリコノパチーに対する分子標的治療として有用である可能性が強く示唆された。現在 Large を生体に導入する方法として遺伝子レベルでの導入に加えて、Large 蛋白質を投与する酵素補充療法、Large 遺伝子を安定導入した幹細胞による細胞治療など、様々な可能性について多面的に検討をおこなっている。

中でも Large 蛋白質の投与による酵素補充療法は、ライソゾーム酵素欠損病に対する同治療法がすでに臨床応用され成果を上げていることから今後有望な治療法となる可能性がある。しかし最大の問題点は、生体外から投与した Large

蛋白質をどのようにしてその作用を発揮する場であるゴルジ装置まで到達させるかという点であろう。この点に関してわれわれはコレラトキシン B サブユニット (CTB) に注目している。CTB には毒性はまったくなく細胞外から取り込まれ容易にゴルジ装置まで運搬される性質を有している⁵⁾。そこで CTB と分泌型 Large 蛋白質の融合蛋白質を作製し酵素補充療法に供することを検討している。今後さらなる研究が必要であろう。

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) Yoshida A, Kobayashi K, Many H, et al. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001;1:717-724.
- 3) Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, et al. Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 2002;418:417-422.
- 4) 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.
- 5) Chinnapen DJ, Chinnapen H, Saslowsky D, et al. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol Lett* 2007;266:129-137.

Abstract**Emerging novel therapeutic strategy for α -dystroglycanopathy by Large**

Fumiaki Saito, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Teikyo University School of Medicine

The past decade of researches have revealed mutations of known or putative glycosyltransferases in several types of muscular dystrophy, including Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. In these disorders, the function of α -dystroglycan is severely decreased, therefore they are called α -dystroglycanopathy. Recently, putative glycosyltransferase Large was shown to restore the defective function of α -dystroglycan, thus, it is an intriguing idea to apply this effect to the therapy of α -dystroglycanopathy. In the present study, we sought to test this possibility. Using several cultured cell lines, we confirmed that the overexpression of Large results in hyperglycosylation and marked enhancement of the function of α -dystroglycan. For this effect, the whole luminal domain of Large was shown to be necessary using several deletion constructs. We further generated transgenic mice overexpressing Large ubiquitously. In each tissue of the mice, the glycosylation of α -dystroglycan and its laminin binding activity was remarkably increased. Moreover, the morphological analyses on each tissue stained by H-E revealed no significant abnormality in the transgenic mice, suggesting no serious side effects by the overexpression of Large. Taken together, these results indicate that the restoration of the function of α -dystroglycan by Large should be an important molecular target to develop therapeutic strategies for α -dystroglycanopathy.

(Clin Neurol 2011;51:918-921)

Key words: muscular dystrophy, α -dystroglycanopathy, dystroglycan, glycosyltransferase, Large
