

課題番号：20 委-13

研究課題名：筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究

主任研究者：砂田 芳秀（川崎医科大学 神経内科学）

分担研究者：戸田 達史（神戸大学大学院）、斎藤 加代子（東京女子医科大学）、石浦 章一（東京大学大学院）、松村 喜一郎（帝京大学）、大野 欽司（名古屋大学大学院）、松田 良一（東京大学大学院）、林 由起子（国立精神・神経医療研究センター神経研究所）、青木 正志（東北大学）、土田 邦博（藤田保健衛生大学）、藤井 績（崇城大学）、根本 博（東邦大学）、太田 成男（日本医科大学大学院）、反町 洋之（東京都臨床医学総合研究所）、遠藤 玉夫（東京都健康長寿医療センター研究所）、遠藤 剛（千葉大学大学院）、杉江 秀夫（自治医科大学）、樋口 逸郎（鹿児島大学）、若山 吉弘（昭和大学）、依藤 宏（群馬大学大学院）、川上 潔（自治医科大学）、細川 浩（京都大学大学院）、鈴木 厚（横浜市立大学大学院）、吉良 潤一（九州大学大学院）、高橋 正紀（22 年度～；大阪大学大学院）、野地 澄晴（徳島大学大学院）、桃井 隆（国際医療福祉大学）、水澤 英洋（東京医科歯科大学大学院）、平澤 恵理（順天堂大学大学院）、林 良雄（21 年度～；東京薬科大学）、土方 貴雄（武蔵野大学）、古賀 靖敏（久留米大学）、中田 和人（筑波大学大学院）、田中 雅嗣（東京都健康長寿医療センター研究所）、竹島 浩（京都大学大学院）、濃野 勉（川崎医科大学）、衣斐 達（愛知医科大学）、吉田 幹晴（20 年度；国立精神・神経医療研究センター神経研究所）、木曾 良明（20 年度；京都薬科大学）、佐古田 三郎（20・21 年度；刀根山病院）、研究協力者（20・21 年度）：吉田 邦広（信州大学）、臼杵 扶佐子（水俣病総合研究センター）

1. 研究目的

筋ジストロフィーは未だに有効な治療法がない代表的な難病である。過去 20 年間で 30 以上の原因遺伝子が同定されたものの、肢帯型筋ジストロフィーの約 60%は未だに原因が不明な状況である。さらに治療法開発の基盤である分子病態に関しても依然不明な点が多い。本研究班においては、①多様な筋ジストロフィー病型において、治療法開発の基盤となる発症分子機構（ゲノム DNA レベル、mRNA レベル、タンパク質レベルにおける分子病態の研究と臨床表現型との関連）の解明、②原因が未解明の肢帯型筋ジストロフィー新規原因遺伝子の探索、③各種筋ジストロフィーおよび関連疾患の効率的で簡便な診断法、スクリーニング法の開発、④リードスルー薬や抗マイオスタチン薬などを中心とした、筋ジストロフィーに対する新規治療薬の開発を研究目標とした。

2. 研究方法

(1) 病態研究；①mRNA 及びタンパクレベルでの疾患責任分子病態の解析、②DNA array や proteome 解析を用いた疾患責任分子病態に伴う関連分子の発現／機能病態、③分子病態と臨床型との関連、(2) 診断研究；①未解明の肢帯型筋ジストロフィーの候補遺伝子アプローチ、②効率的かつ網羅的な遺伝子／蛋白質診断法の確立、(3) 治療開発；①薬物治療（リードスルー薬、抗アポトーシス薬、マイオスタチン阻害薬、抗サイトカイン薬、ミトコドリア脳筋症への L-arginine など）の開発と臨床応用への基盤整備、②福山型先天性筋ジストロフィーをターゲ

ットとした細胞治療、遺伝子治療の基盤研究、③筋強直性ジストロフィーに対する新規治療法の開発。なお、本班研究での倫理面の運用は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、国立精神・神経医療研究センター倫理規定を遵守し、各研究施設の定める倫理規定にもとづいた倫理委員会の承認を得て実施している。

3. 研究結果及び考察

分子病態の解明

- 1) 肢帯型筋ジストロフィーLGMD の原因候補分子として Ca^{2+} 非依存性に細胞膜修復に関与する新規タンパク質 MG53（ミツグミン）を発見した。MG53 欠損マウスは進行性筋ジストロフィー様の病態を示した。一方、培養細胞に対して組み換え MG53 タンパクを添加すると細胞膜損傷が抑制されることから、新たな治療標的分子としても注目される。
- 2) 福山型先天性筋ジストロフィーFCMD 患者の初代線維芽細胞から異常スプライシングに由来する転写産物が発見され、FCMD がスプライシング異常症であることが解明された。FCMD に対してもエクソンスキップ療法が応用可能であると思われる。
- 3) IGF-1 により nebulin と N-WASP の複合体が形成され、これがアクチン重合核となりアクチン線維が形成されるというメカニズムを解明した。

診断法の確立

- 1) 蛍光ビーズ多重解析システムを用いて 41 種類のミトコドリア遺伝子変異の迅速診断法を開発
- 2) 安定同位元素で標識した呼吸基質を投与し、患者の呼気を分析することにより、非侵襲的に全身の

ミトコンドリア機能を評価する検査法を開発した。
3) 微量生検筋から CE-TOFMS を用いたメタボローム解析による代謝性ミオパチーの診断法を開発した。

治療法の開発

- 1) 点変異による Duchenne 型の治療としてリードスルー薬の開発を進め、negamycin 誘導体、5 種類の低分子化合物を得るとともに、臨床使用薬アルベカシンにもリードスルー活性があることを見いだした。
- 2) マイオスタチン阻害薬として、活性化阻害ペプチド薬、受容体キナーゼ低分子阻害薬、ホリスタチン誘導体を開発するとともに、siRNA の担体としてコラーゲンナノ粒子を用いることにより RNA 干渉の治療効果を増強する方法を確立した。
- 3) 筋強直性ジストロフィーにおけるミオトニア現象の責任因子である C1 チャネルのスパライシング異常に対するアンチセンス核酸薬をモデルマウスに投与して、ミオトニア現象の消失を誘導することに成功した。
- 4) *mdx* マウスに創傷治癒促進形質 MRL を導入すると骨格筋における線維化が軽減され筋再生が促進されることを見いだした。

4. 結論

- 1) LGMD の原因候補分子として、新規膜修復分子 MG53 を見いだした。FCMD がスパライシング異常症であることを解明した。
- 2) ミトコンドリア病や代謝性ミオパチーの新規診断法を開発した
- 3) リードスルー薬やマイオスタチン阻害薬を開発しモデル動物での治療効果が確立した。

5. 研究発表

- 1) Takano et al. Nebulin and N-WASP cooperate to cause IGF-1-induced sarcomeric actin filament formation. *Science* 330: 1536, 2010
- 2) Uezumi et al. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12: 143, 2010
- 3) Ojima et al. Dynamic distribution of muscle-specific calpain in mice has a key role in physical-stress adaptation and is impaired in muscular dystrophy. *J Clin Invest* 120: 2672, 2010
- 4) Shiozuka et al. Transdermal delivery of a readthrough-inducing drug: a new approach of gentamicin administration for the

treatment of nonsense mutation-mediated disorders. *J Biochem* 147: 463, 2010

- 5) Kino et al. MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acid Res* 37 : 6477, 2009

6. 知的所有権の出願・取得状況

- 「筋強直性ジストロフィー治療薬」
 - 「リードスルー誘導剤、及びナンセンス変異型遺伝性疾患治療薬」
 - 「骨格筋検査用キット及び骨格筋検査方法」
 - 「リードスルー活性を有する化合物及び該化合物を含む医薬組成物」
 - 「水素分子を含む神経新生を促進する組成物」
 - 「水素分子を含む脂質代謝改善剤」
- の 6 件について特許取得・出願中である。

7. 自己評価

- 1) 達成度について
FCMD がスパライス異常症であるとの発見は、アンチセンス治療開発へ繋がるインパクトを持つ。また MG53 の発見も筋ジス病態解明に大きな意義がある。ミトコンドリア病や代謝性ミオパチーの簡易診断法開発は稀少疾患患者の医療にすぐに役立つ成果である。治療薬の開発は、安全性の評価など次の臨床開発ステップに進むことが求められる。
- 2) 学術的、国際的、社会的意義について
FCMD など α -ジストログリカノパチーの病態解明、ならびに MG53 の発見は高い学術的、国際的評価を受けている。筋ジストロフィー治療薬の開発は、この難治性疾患の克服が人類共通の課題であることから、大きな社会的な意義を有する。
- 3) 行政的意義について
DMD をはじめとする筋ジストロフィーやミトコンドリア病、代謝性ミオパチーは患者数の極めて少ない稀少疾患である。必ずしも製薬企業の積極的な参入が期待できない領域であるからこそ、科学先進国であるわが国が世界に先駆けて研究をリードすることに行政的意義があることを指摘したい。
- 4) その他特記すべき事項について
なし