

先天性筋無力症候群における分子病態の解明と 新規治療法の開発



名古屋大学大学院医学系研究科 特任講師 伊藤 美佳子

背景

先天性筋無力症候群は非常に稀な疾患ですが、生れながらの分子欠損により筋力低下や易疲労性を呈し、軽度から重度の呼吸困難、嚥下困難がある病気です。しかし根本的な治療法は確立していません。運動神経終末と筋肉組織の接着部である神経筋接合部ではシナプスが形成され、筋収縮を引き起こす神経伝達が行われます。ここにはアセチルコリンレセプター AChR、Collagen Q、ChAT、Rapsyn、MuSK、LRP4、GFPT1、DOK7、Agrin 等の分子が集合しており、それらの分子に欠損があると、先天性筋無力症候群が引き起こされることが報告されています。本邦での先天性筋無力症候群の確定診断例は極めて少なく、未診断例・誤診断例が数多く存在することが予想され、遺伝子変異を同定できない場合も多く存在します。本研究では糖化酵素の遺伝子である GFPT1 に注目しました。GFPT1 の変異を持つ患者ではなぜ病気が引き起こされるのかを解明し、新規治療法の開発に取り組むことを目的に研究を行いました。

方法

タンパクや脂質の糖化酵素である GFPT1 (Glutamine : Fructose-6-Phosphate Transaminase 1) 遺伝子の変異を有する患者さんの症状は、肢帯型の筋力低下が特徴です。GFPT1 は体の広範囲で発現するタンパクであるにも関わらず、なぜ神経筋接合部に限定して症状を起こすのかは分かっていません。GFPT1 は2つのタンパク質の isoform があります。全身で発現する GFPT1-S タンパクと、骨格筋ではスプライシングされる exon 9 の54塩基が含まれる GFPT1-L タンパクです。GFPT1-L は酵素活性が減少しますが、骨格筋でこの GFPT1-L タンパクが高発現であるかは分かっていません。GFPT1 の exon 9 近傍に変異を持つ患者さんでは、骨格筋において GFPT1-L が作られません。本研究では GFPT1-L の骨格筋での役割を明らかにするため、患者さんと同じように exon 9 をスキップさせたモデルマウス GFPT1-L^{-/-} を作製し、運動試験等の表現型解析を行いました。

また、別の患者さんの変異では、exon 9 中に1塩基の挿入があるため、exon 10 内に終止コドンが出現し、不完全な短いタンパクが出来てしまいます。この治療法の開発として、患者由来 iPS 細胞を用いて核酸医薬であるアンチセンスオリゴの効果を検討しました。

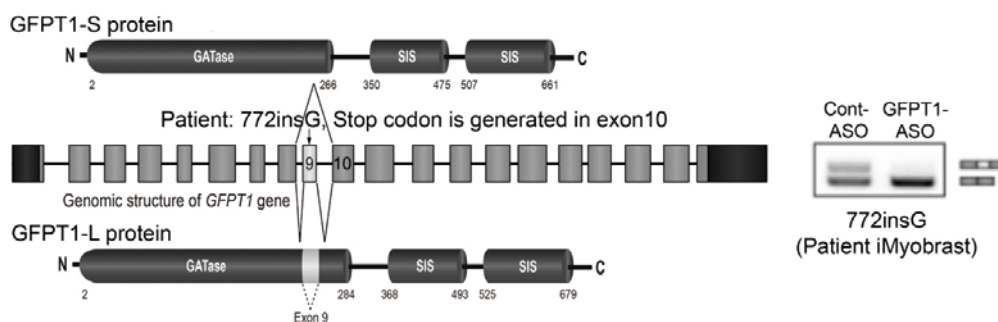


図 1. GFPT1 は long, short isoform を形成する。患者 iMyoblast にアンチセンスオリゴ (ASO) を用いて exon 9 を skipping することができた。

結果

当機関の実験動物施設においてGFPT1のエクソン9を削除したホモのGFPT1-L^{-/-}マウスを作成しました。GFPT1-L^{-/-}マウスは成長の過程において、対照マウスと体重の差は観察されませんでした。運動能力と持久力を評価するために、ランニングホイールテストとロタロッドテストを実施しました。しかし、GFPT1-L^{-/-}と対照マウスの間に違いはありませんでした。次に骨格筋でexon 9をスキップすると、GFPT1変異を持つ先天性筋無力症患者と同じように、筋肉内のタンパク質のグリコシル化レベルが低下するかどうかを調べましたが、GFPT1-L^{-/-}に減少は見られませんでした。患者さんでは手足のMuscle atrophyが報告されているため、GFPT1-L^{-/-}マウスのコンピューター断層撮影 (CT) スキャンを行いました。CTスキャン画像解析では、GFPT1-L^{-/-}の皮下および内臓脂肪組織の減少を示したが、有意な筋萎縮は観察されませんでした。一方、GFPT1-L^{-/-}骨格筋でのミトコンドリア代謝を示すタンパク量は減少を示し、脂質の利用の低下によるミトコンドリア代謝の減少が示唆されました。

また、exon 9に1塩基挿入のある患者iPS細胞から筋細胞に分化させた細胞に、exon 9のアンチセンスオリゴを処理すると、exon 9がスキップし、GFPT1-Sタンパクを作ることができました。これにより、不完全なGFPT1タンパクができることを回避できる治療法の可能性が示唆されました。

今後の方針

GFPT1-L^{-/-}マウスの表現型が変わらないのは、マウスにはGfpt2が代償機構として働いている可能性があります。そのため、Gfpt2^{-/-}、GFPT1-L^{-/-}ダブルノックアウトマウスを作成して、Gfpt2^{-/-}との比較を行うため、現在そのマウスを作製中です。また培養実験においては、この患者由来のiPS細胞を使用し、病気の分子メカニズムの解明を試みます。この患者GFPT1変異の表現型を解析するため、神経筋接合部で発現する細胞外と細胞膜結合タンパクの糖化レベルを解析します。また、筋分化させた患者iMyoblastにおいて神経筋接合部の形成度を検出し、治療戦略として、この変異の表現型を回復させる薬剤の選別や、アンチセンスオリゴを用いた治療法についても検討する予定です。

さらに、exon 9に1塩基挿入のある患者と同じ変異を持つモデルマウスを、現在作成中であり、培養実験でスキッピング効果のあったアンチセンスオリゴをモデルマウスに投与し、回復や副作用の有無を検証していきます。

謝辞

本研究を行うにあたり多大なご支援をいただきました公益財団法人難病医学研究財団の皆様には厚く御礼を申し上げます。