Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

CDP-ribitol prodrug treatment ameliorates ISPD-deficient muscular dystrophy mouse model

徳岡, 秀紀

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2022-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第8400号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477826

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

CDP-ribitol prodrug treatment ameliorates *ISPD*-deficient muscular dystrophy mouse model

CDP-リビトールプロドラッグ治療は *ISPD* 欠損筋ジストロフィーマウスモデルを改善する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
脳神経内科学
（指導教員：松本理器教授）

徳岡　秀紀

＜序論＞

筋ジストロフィーは骨格筋線維が壊死再生を繰り返し、筋力低下や筋萎縮が進行する遺伝性疾患群である。筋ジストロフィーの一部は、ジストロフィン糖タンパク複合体と呼ばれる細胞膜と細胞骨格を連結する構造体に関わる遺伝子の異常が原因で発症することが知られている。中でもジストログリカン（DG）異常症は、ジストロフィン糖タンパク複合体の中心に位置する DG の糖鎖異常によって生じる筋ジストロフィーの総称で、*fukutin* を原因遺伝子とする福山型先天性筋ジストロフィーが代表的であるが、いずれも有効な治療薬が開発されていない。

DG 糖鎖にはリビトールリン酸と呼ばれる特異的な修飾構造が含まれており、リビトールリン酸が欠失すると、DG 糖鎖が最後まで伸長できず、DG と基底膜間の結合力が低下して筋細胞が脆弱化することで DG 異常症の原因になると考えられている。DG 糖鎖のリビトールリン酸修飾に関わる遺伝子として、現在までに *fukutin*、*FKRP* (*fukutin-related protein*)、*ISPD* (*Isoprenoid synthase domain-containing protein*) の 3 種類が同定されており、ISPD はシチジン三リン酸とリビトール 5 リン酸からシチジン二リン酸-リビトール（CDP-Rbo）を生合成する酵素、fukutin や FKRP は CDP-Rbo を基質として DG 糖鎖にリビトールリン酸を付加する酵素であることが試験管内で示されている。また、欧米を中心に *ISPD* 遺伝子の常染色体潜性変異によって Walker-Warburg 症候群や muscle-eye-brain 病といった中枢神経異常を伴う筋ジストロフィーや肢帯型筋ジストロフィーを発症することが報告されているが、生体筋組織において IPSD の異常が筋ジストロフィー発症に直結する DG 糖鎖異常を引き起こすという証拠はない。*ISPD* 欠損に伴う筋ジストロフィーモデルマウスを確立すること、およびその疾患モデルを用いて *ISPD* 遺伝子異常に伴う筋ジストロフィーに対する有効な治療薬候補を開発することを本研究の目的とした。

＜方法＞

ISPD 欠損を伴う疾患モデルを確立するため、Myf5-Cre を用いた筋特異的 *Ispd* 欠損マウス（コンディショナルノックアウトマウス）を作出した。以下、*Ispd*$^{flox/flox}$: *Myf5-Cre*^{ki}(-)を WT、*Ispd*$^{flox/+}$: *Myf5-Cre*^{ki}(+)を Het、*Ispd*$^{flox/flox}$: *Myf5-Cre*^{ki}(+)を cKO と表記する。cKO について体重や握力、血清クレアチニンキナーゼ（CK）値の解析を行った。12 週齢までのマウスについて液体クロマトグラフィー質量分析を用いた筋肉中 CDP-Rbo 濃度測定、ウェスタンブロットを用いた骨格筋 DG 糖鎖の生化学的解析、免疫染色や HE 染色を用いた病理学的解析を行い、それぞれ WT や Het と比較した。4 週齢の cKO に対して、ヒト *ISPD* 遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを 2.0×10^{12} vector genome 静脈注射し、体重、握力、筋肉中 CDP-Rbo 濃度、DG 糖鎖及び筋ジストロフィー病理の改善について評価した。

次に膜透過性や安定性向上を目的とした CDP-Rbo のプロドラッグ化合物を複数作製し、*ISPD* 欠損 HEK293 細胞にて糖鎖回復活性を評価するとともに、cKO に対して筋肉注射

(0.1M tibialis anterior 40 µl, calf 60 µl) を行い糖鎖回復活性および毒性を評価した。明らかな毒性を認めず、糖鎖回復活性が高かったテトラアセチル体（TetA）および CDP-Rbo を 4 週齢の cKO に 3 週間繰り返し筋肉注射し、長期局所投与による病態改善効果を生理食塩水（生食）注射群と比較した。最後に *ISPD* 変異を持つ 2 人の患者由来の皮膚線維芽細胞に対して、200µM の TetA および CDP-Rbo を添加し、糖鎖回復活性を比較した。いずれも GraphPad Prism v.8.20 を用いて統計解析を行った。

＜結果＞

cKO は WT、Het と比較して 4 週齢より握力が低く、体重も低下しており、有意な CK 値上昇を認めた。また、20 週齢までに約 8 割の個体が死亡した。筋肉中 CDP-Rbo 濃度は WT、Het、cKO の順に低下した。cKO は骨格筋 DG 糖鎖の伸長不全と基底膜ラミニンとの結合活性低下を認め、筋病理では壊死再生や中心核線維の増加、筋線維の大小不同、結合組織の増加などの典型的な筋ジストロフィー病理を示した。

AAV を投与した遺伝子治療群では、cKO と比較して 12 週齢で体重および握力の増加と CK 値の低下を認めた。筋肉中 CDP-Rbo 濃度は増加し、DG 糖鎖の回復および筋ジストロフィー病理の改善を認め、発症後の cKO であっても遺伝子治療により筋ジストロフィー症状が改善することが示された。

次に *ISPD* 欠損 HEK 細胞を用いて 10 種類の CDP-Rbo プロドラッグの活性を評価したところ、TetA を含むいくつかのアシル化化合物およびピロリン酸保護化合物では、CDP-Rbo より高い糖鎖回復活性を認めた。しかし、マウスへの筋肉注射では TetA 以外の化合物では毒性を認めたため、長期局所投与実験には TetA を用いることにした。プロドラッグの長期局所投与実験では、生食を注射した群と比べて、CDP-Rbo 群、TetA 群ともに壊死線維の減少を認めたが、再生線維およびマクロファージ浸潤は TetA 群のみ有意な低下を認め、結合組織浸潤は CDP-Rbo 群と比較して TetA 群で有意な改善を認めた。

最後に *ISPD* 変異を伴う患者由来ヒト線維芽細胞に対するプロドラッグ添加実験では、CDP-Rbo と比較して TetA では有意な糖鎖回復を認めた。

＜考察＞

本研究によって、ISPD の機能不全により筋肉中 CDP-Rbo 濃度が低下することが示され、哺乳類の骨格筋細胞において ISPD が CDP-Rbo 合成の主体を担っていることが示唆された。また骨格筋における ISPD の機能不全によって、DG 糖鎖の伸長不全が生じ、重度の筋ジストロフィー症状が生じることを示した。

AAV ベクターを用いた遺伝子治療は、機能喪失変異を伴う単一遺伝性疾患に対する有望な新規モダリティである。本研究では AAV を用いた遺伝子治療により、モデルマウスの筋ジストロフィー症状が発症後でも改善することを示した。しかし、AAV ベクターには高用量投与による肝障害や成人における中和抗体の存在など問題点も数多く残されている。

今回我々は ISPD が CDP-Rbo 合成を担っている酵素であることに着目し、ISPD 機能不全の病態に対して、低分子治療薬である CDP-Rbo 補充療法の有効性を証明することを試みた。しかし、CDP-Rbo は多くの水酸基並びにピロリン酸を有し、生体内安定性および骨格筋細胞内へのデリバリー効率が低いと予想されたため、プロドラッグの開発を行った。特に TetA は長期局所投与にて、同濃度の CDP-Rbo よりも筋ジストロフィー病態により優れた治療効果を認めており、これは主に水酸基の修飾によって TetA の膜透過性が向上した効果によると考えられる。

CDP-Rbo 補充療法は ISPD 機能不全の病態に対して有効であることが示唆されたが、この補充療法を効率的かつ安全に行うことができれば、*ISPD* 遺伝子異常のみならず、福山型先天性筋ジストロフィーなどの CDP-Rbo を基質とする酵素の機能低下に伴う疾患の治療にも応用できる可能性があり、今後更なるドラッグデリバリーシステム（DDS）の向上が必要と考えられる。

＜結語＞

本研究では *ISPD* 欠損に伴う筋ジストロフィーの疾患モデルマウスを確立し、マウスに対する AAV を用いた遺伝子治療および CDP-Rbo プロドラッグによる低分子治療が有効であることを示した。CDP-Rbo 補充療法の実用化に向けて、さらに DDS を向上させていく必要がある。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第3191号	氏　名	徳岡 秀紀
論文題目 Title of Dissertation	CDP-ribitol prodrug treatment ameliorates *ISPD*-deficient muscular dystrophy mouse model CDP-リビトールプロドラッグ治療は *ISPD* 欠損筋ジストロフィーマウスモデルを改善する		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	野津寛大 小川渉 古屋敷智之	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

＜序論＞

ジストログリカン（DG）異常症は、ジストロフィン糖タンパク複合体の中心に位置する DG の糖鎖異常によって生じる筋ジストロフィーの総称で、有効な治療薬がない。DG 糖鎖にはリビトールリン酸と呼ばれる特異的な修飾構造が含まれており、リビトールリン酸修飾異常では DG 糖鎖の伸長が不完全となり、DG 異常症の原因になる。DG 糖鎖のリビトールリン酸修飾には 3 つの酵素が関わっており、ISPD は fukutin や FKRP が DG 糖鎖にリビトールリン酸を付加する際に、基質となる CDP-リビトール（CDP-Rbo）を生合成する酵素であることが *in vitro* で示されている。また、*ISPD* 遺伝子の常染色体潜性変異によって Walker-Warburg 症候群などの重症先天性筋ジストロフィーを発症することが報告されている。*ISPD* 欠損に伴う筋ジストロフィーモデルマウスを確立すること、およびその疾患モデルを用いて *ISPD* 遺伝子異常に伴う筋ジストロフィーに対する有効な治療薬を開発することを目的とした。

＜方法・結果＞

ISPD 欠損を伴う疾患モデルを確立するため、Myf5-Cre を用いた筋特異的 *Ispd* 欠損マウス（コンディショナルノックアウトマウス）を作出した。以下、$Ispd^{lox/lox}$: $Myf5\text{-}Cre^{KI}$(-)を WT、$Ispd^{lox/+}$: $Myf5\text{-}Cre^{KI}$(+)を Het、$Ispd^{lox/lox}$: $Myf5\text{-}Cre^{KI}$(+)を cKO と表記する。cKO は WT、Het と比較して 4 週齢より握力や体重が低く、血清クレアチニンキナーゼ（CK）値上昇を認めた。また、20 週齢までに約 8 割の個体が死亡した。液体クロマトグラフィー質量分析を用いた筋肉中 CDP-Rbo 濃度測定では WT、Het、cKO の順に濃度が低下した。ウェスタンブロットを用いた骨格筋 DG 糖鎖の生化学的解析では、cKO は糖鎖の伸長不全および基底膜ラミニンとの結合活性低下を認め、病理学的解析では壊死再生など典型的な筋ジストロフィー病理を示した。以上から cKO は ISPD 欠損に伴う筋ジストロフィーモデルマウスとなると考えた。

次に 4 週齢の cKO に対して、ヒト *ISPD* 遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを 2.0×10^{12} vector genome 静脈注射し、AAV による遺伝子治療を試みた。遺伝子治療群では、cKO と比較して 12 週齢で体重および握力の増加と CK 値の低下を認めた。DG 糖鎖の回復および筋ジストロフィー病理の改善を認め、発症後の cKO であっても遺伝子治療により筋ジストロフィー症状が改善することが示された。

さらに低分子化合物による治療を試みるため、 CDP-Rbo のプロドラッグ化合物を 10 種類作製し、*ISPD* 欠損 HEK293 細胞にて糖鎖回復活性を評価するとともに、cKO に対して筋肉注射を行い糖鎖回復活性および毒性を評価した。明らかな毒性を認めず、糖鎖回復活性が高かったテトラアセチル体（TetA）および CDP-Rbo を 4 週齢の cKO に繰り返し筋肉注射し、長期局所投与による病態改善効果を比較したところ、生食群と比べて、CDP-Rbo 群、TetA 群ともに壊死線維の減少を認めたが、再生線維は TetA 群のみ有意な低下を認め、結合組織浸潤は CDP-Rbo 群と比較して TetA 群で有意な改善を認めた。

最後に *ISPD* 変異を持つ 2 人の患者由来の皮膚線維芽細胞に対して、200μM の TetA および CDP-Rbo を添加し、糖鎖回復活性を比較したところ、CDP-Rbo と比較して TetA では有意な糖鎖回復を認めた。

＜考察＞

本研究では ISPD の機能不全により筋肉中 CDP-Rbo 濃度が低下し、骨格筋 DG 糖鎖の伸長不全によって重度の筋ジストロフィー症状が生じることが示唆された。また、AAV を用いた遺伝子治療により、モデルマウスの筋ジストロフィー症状が改善することを示した。さらに ISPD が CDP-Rbo 合成を担っている酵素であることに着目し、ISPD 機能不全の病態に対して、CDP-Rbo プロドラッグによる局所補充療法が有効であることを示した。この補充療法を効率的かつ安全に行うことができれば、*ISPD* 遺伝子異常に伴う DG 異常症のみならず、福山型先天性筋ジストロフィーなどの CDP-Rbo を基質とする酵素の機能低下に伴う疾患の治療にも応用できる可能性があり、今後更なるドラッグデリバリーシステムの向上が必要と考えられる。

＜結語＞

CDP-Rbo プロドラッグ治療は *ISPD* 欠損筋ジストロフィーマウスモデルの病態を改善し、*IPSD* 遺伝子異常に伴う DG 異常症の治療薬となる可能性がある。

本研究は、従来治療薬のなかった *ISPD* 欠損筋ジストロフィーに対して、遺伝子治療や低分子化合物による治療の可能性に言及する世界で初めての研究成果である。学術的かつ臨床的にも非常に意義のある研究成果と言える。
よって、本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があると認める。