

厚生労働省「精神・神経疾患研究委託費」

# 筋ジストロフィーに関連する疾患の 病態解明と治療法の開発に関する研究

清水班

平成14～16年度研究報告書

平成17年3月（2005年）

## 研究報告書の作成にあたって

本報告書は、平成 14～16 年度に行われた「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究（14 公—4）」の最終報告である。

当研究は、基礎医学・臨床医学関係の 38 名の分担研究者（公募）とともに行われ、筋ジストロフィー関連疾患の克服のため functional genomics を重視した以下の 3 側面から推進した。①診断研究；未解明筋疾患責任遺伝子／蛋白の機能解明と遺伝子／蛋白診断法、②病態研究；疾患に関連する遺伝子／message／蛋白の病態と表現型との関連、疾患責任遺伝子異常に併発する他分子の発現／機能の変化と臨床病態との関連、③治療の開発；薬物治療の開発と遺伝子／細胞治療への基盤研究。これらを定例班会議に加え、実務者による目標設定型 small group workshop を企画し重点研究の促進を図った。

その結果、診断・病態解明分野で、DMD/BMD に関連して  $\beta$ -dystroglycan の細胞内ドメインに結合する情報伝達系 MAGI-1/ $\beta$ -catenin/Tcf の細胞死への関与、肢帯型に関連し日本人 41 家系 dysferlinopathy の遺伝子異常・表現型の集計、遠位型に関連し日本人 44 名の DMRV の遺伝子(GNE)異常と表現型の集計、先天性筋ジストロフィーに関連して日本人独特の福山型筋ジストロフィー、muscle-eye-brain 病、Walker-Warburg 症候群の責任遺伝子と O-mannose glycan 生合成障害機序の解明、筋緊張性ジストロフィーの RNA 仮説（CUG/CCUG 結合蛋白の発見と RNA 発現機能障害）の提唱、その他 collagenopathy・selenoprotein-N(SEPN) related myopathy・Schwarz-Jampel 症候群などの分子病態解明が行われた。特に、先天性筋ジストロフィーの分子病態解明に長足の進歩があった。

治療面では、DMD に関連して gentamicin の代替 read-through 薬（negamycin）、小欠失エクソン部分のスプライシング促進オリゴヌクレオチド薬（AS-oligo, ENA/RNA chimera）、成熟筋からの安全で容易な幹細胞誘導薬（Msx-1 cDNA）が、肢帯型に関連して sarcoglycanopathy（LGMDs 2C-F）での  $\beta$ -dystroglycan 分解阻止薬 BPHA, caveolinopathy(LGMD 1A)での myostatin 阻害薬(myostatin prodomain)、collagenopathy での RNA decay 阻害薬などが開発され、検討段階にきた。特に、AS-oligo では exon 20 を欠失した一名の DMA 患者でのトライアルが始まった。慎重な検討を加え臨床応用への道を強く促進する時が来ている。

反省として、FSH 型、肢帯型の約 1/3、ミトコンドリア脳筋症の病態研究が進んでいない点があげられる。また、近い将来到達すべき点として、福山型の責任蛋白 fukutin の機能の最終決着、筋緊張性ジストロフィーの RNA 仮説の検証、DMD/BMD の細胞死に関する分子病態機序（ $\beta$ -dystroglycan 関連情報伝達系）の解明があげられる。

最後に、永年にわたり研究の促進に甚大な努力をされている日本筋ジストロフィー協会理事長河端静子氏、様々なご助言をいただきました前国立精神・神経センター武蔵病院長埜中征哉先生、国立精神・神経センター名誉総長・筋ジストロフィー総合班班長杉田秀夫先生に深謝するとともに、当班の幹事として努力された栗原照幸東邦大学教授および石浦章一東京大学教授、斉藤加代子東京女子医大教授、佐橋功愛知医科大学教授、瀬原淳子京都大学教授、戸田達志大阪大学教授、西野一三国立神経研究所部長、松田良一東京大学助教授、吉田幹晴国立神経研究所室長に感謝申し上げる次第である。

平成 17 年 3 月

主任研究者 帝京大学医学部神経内科

主任教授 清水輝夫

# 目 次

平成 14～16 年度総括研究報告 .....	1
分担研究報告	
I. LGDM(肢帯型筋ジストロフィー) .....	15
II. FCMD(福山型先天性筋ジストロフィー) .....	49
III. OPMD(眼咽頭筋ジストロフィー)およびミオパチー .....	61
IV. 遠位型筋ジストロフィー, Emery-Dreifuss 症候群, DMRV など .....	79
V. DMD/BMD、およびジストロフィンその他 .....	91
VI. 先天性ミオトニー、筋強直性ジストロフィー、治療法の開発 .....	117
VII. 骨格筋形成、壊死、アポトーシス .....	135
VIII. ミトコンドリア異常症と治療 .....	155
IX. 筋ジストロフィー骨格筋の酸化ストレス、耐性系、遺伝子治療など .....	169
Small Group Workshop .....	175
Summary .....	195
平成 14～16 年度 班員名簿 .....	201

平成 14～16 年度

# 総 括 研 究 報 告

# 総括研究報告

主任研究者 清水輝夫

筋ジストロフィー関連疾患の診断／病態研究と治療法の開発について、診断研究（筋疾患関連遺伝子／蛋白の解明と診断法の確立）、病態研究（病態関連遺伝子／産物の分子病態と表現型との関わり）、治療法開発（薬物治療と遺伝子／細胞治療への基盤研究）の3側面からアプローチした。

1. DMD/BMD 関連；治療面で、1) 小欠失の exon 内に存在するスプライシング促進配列に相補的な antisense oligonucleotide(AS-oligo)の導入により、欠失 exon をスキップした in frame truncated dystrophin mRNA を発現させられることが示された。3 種の変異症例の培養骨格筋細胞への投与で dystrophin 発現が確認でき、一例の DMD 患者で臨床応用へと進んだ。Exon 20 の欠失例で、exon 19 の splicing 促進配列に相補的に結合する AS-oligo を、週 1 回、0.5 mg/kg、2 時間点滴静注で 4 回投与した結果、3 週目から末梢血リンパ球に dystrophin mRNA の発現が観察され、血清 CK 値や筋力には変化がなかったものの、5 週目の筋生検で dystrophin の発現がわずかに観察された。副作用もなく今後の検討が必要だが、有望な治療法の可能性がある。2) 細胞治療への基盤研究として、胎児、肝・骨髄・臍帯血からよりも簡便、安全、容易にえられる幹細胞を探求した結果、マウス成熟筋にホメオボックスの一つ Msx-1 cDNA の導入により効率良く、骨細胞・脂肪細胞・骨格筋に再分化可能な幹細胞が得られた。コントロールマウスの前脛骨筋に Msx-1 cDNA を直接注入すると、1-2 週間で豊富な幹細胞がえられ、筋ジストロフィー動物 mdx マウス前脛骨筋に移植すると、3 ヶ月にわたって dystrophin 発現移植細胞が筋線維を形成・生存していた。拒絶反応は乏しく、適切な drug delivery system にのせると有用な治療法の可能性がある。3) 点変異の下流にできた stop codon の読みとばし薬として、欧米で試みられるアミノグリコシド系抗菌薬（gentamicin, ampicillin）には副作用の点で難点があるため、その代替薬物を探した。その結果、日本独自に開発された古い dipeptide 系抗菌薬 negamycin が培養細胞系、mdx マウスへの投与にて、副作用が少なく、約 10 %の dystrophin 発現がえられることが判明した。Negamycin は開発の段階で中断され実際には市場にでなかった経緯から、その供給に不安定要素があり、現在その類似体を含め検討を継続している。米国では gentamicin 類似物質から PTC124 を見いだし、その経口摂取による治験が開始される動きがある。いずれにしても、上記 3 者 1),2),3)はいずれも臨床応用への可能性が高いと考えられる。

病態面では、DMD/BMD の重症化に筋細胞死の進行があげられ、従来、膜直下の細胞骨格成分 dystrophin の先天性欠損で膜の脆弱性がある上に、筋収縮などストレスにより膜が断裂して細胞外 Ca イオンが流入して細胞死が生じると考えられてきた（Ca 説）。この過程で何らかの機序により筋形質膜の内外（細胞骨格とラミニン）を連結する架橋構造の中心  $\alpha$ ,  $\beta$ -dystroglycan の崩壊が起きていることがわかっていた。今回、膜貫通成分である  $\beta$ -dystroglycan の細胞内ドメインに MAGI-1/ $\beta$ -catenin/Tcf signal transduction 系が結合しており、その欠損により細胞死をきたすことが判明した。筋ジストロフィーでの筋細胞死の具体的分子機構の解明の糸口が見いだせた点で大きな進歩と考える。

## 2. LGMDs 関連

1) dysferlinopathy(LGMD 2B)関連；①2B 型の原因蛋白 dysferlin の機能には筋形質膜に存在する Ca 結合蛋白質であるという以外に、細胞内小胞体系（LAMP-1 陽性小胞＝リソソーム、後期エンドソーム、ゴルジ体、小胞体）に存在して形質膜との融合や筋 T 管系にも局在して EC カップリングに関係する機能があることが指摘された。これに関して、dysferlin が syntaxin や SNA 25 と結合し、Ca 依存性に AAATPase である VCP と複合体を形成、形質膜修復やゴルジ体の膜融合・膜輸送への関与が示唆された。②遠位型と肢帯型の両型をしめす dysferlin 異常症の日本人 41 家系 44 人（遠位型）と 23 家系 26 人（肢帯型）の遺伝子解析結果と臨床的特徴の集計が出され、遠位型で 28 種、肢帯型で 12 種（うち 5 種は共通）が見い出され、遠位型では C1939G, G3370T, 3746delG, 4870delT が多く、特に 3746delG は肢帯型にはみられなかった。他方肢帯型では G3370T, 4870delT が多く、両者

とも G3370T 変異で発症年齢が遅い傾向があった。しかし、変異型と臨床的重症度の間で強い相関はなかった。Dysferlin 異常症（遠位型、肢帯型）の臨床像についてまとめ、診断指針を作成する方針である。③dysferlinopathy 筋変性機序として SR stress 仮説（dysferlin 欠損→SR stress→JNK/caspase 12 の活性化→筋細胞死）が提唱された。④炎症性筋疾患モデル SJL/J mouse が dysferlin 欠損症であることが示され、type I fiber atrophy, 中心核, 細胞浸潤, 筋内運動神経の脱髄（神経原性変化）, が経時的に出現すること, 浸潤細胞は macrophage が 60-70 %, CD4 陽性 T 細胞が 15-25 %, CD8 陽性 T 細胞が 10 % であり, ヒトの dysferlinopathy との形態的相違が明かされた。

2) sarcoglycanopathy(LGMD2C~2F)関連; 特異的病態として  $\beta$ -dystroglycan 43 kDa が膜外ドメインで膜型 matrix metalloproteinase の分解を受け, 膜貫通ドメイン・膜内ドメイン 30 kDa と断端 13 kDa に分解を受けることが判明し, in vivo では, その阻害薬 BPHA によってこの分解過程が抑えられることから治療の可能性が提唱された。この筋崩壊機序は Duchenne/Becker 型でも存在するが, sarcoglycan complex が二次的に崩壊されてから生じると考えられる。それ以外の筋疾患には福山型を含め存在しない。従って, sarcoglycanopathy の進行予防薬として有用である可能性がある。

3) caveolinopathy(LGMD1C)関連; myostatin(45 kDa)活性抑制薬が筋増大をきたすため治療薬として米国では抗 myostatin 抗体の点滴静注による筋ジストロフィー群の治験が開始される動きがある。しかし, 抗体を打ち続けるには難点があるため, 別の myostatin inhibitor の検索をしてきた。その結果, follistatin および follistatin-related gene(FLRG)の 2 種の蛋白質および myostatin prodomain(30 kDa)が myostatin receptor と結合して強力な機能抑制効果があることが判明した。今回, LGMD1C の原因蛋白質 caveolin-3 の変異型(P104L)の transgenic mouse に myostatin prodomain 過剰発現マウスを交配して得られた double tg mouse で検討してみたところ, 変異 caveolin mRNA と prodomain mRNA の発現が強くみられたが変異 caveolin-3 の筋内発現はなかった (dominant negative)。それにも関わらず, ミオパチー変化の改善, 骨格筋線維数の増大, 軽度肥大化がえられ, トレッドミル試験でコントロールマウス同様の走力改善がみられ, LCMD 1C 型の有力な治療法の可能性がえられた。

4) collagen VI 異常症; collagen VI は筋基底膜の外周, collagen IV のさらに外側に存在する成分であるが, この  $\alpha$  subunit の遺伝子異常により 2 つの病型; Bethlem myopathy (常優, 遠位関節の拘縮を伴う緩徐進行性) と Ullrich myopathy (常劣, 近位関節の拘縮と遠位関節の過伸展を伴う緩徐進行性) をきたすことが判明した。その遺伝子異常と発現型との関係は未解明である。26 塩基のホモの欠失があり, フレームシフトが起こって下流に premature termination codon が出現している Ullrich myopathy 患者の線維芽細胞を用いて, カフェイン, wortmannin, siRNA により nonsense-mediated mRNA decay を抑制したところ, 変異 collagen  $\alpha$  を含む collagen 3 量体が細胞外へ分泌され細胞外マトリックスへ取り込まれ, 一部の機能回復 (fibronectin receptor の増加や細胞遊離性の亢進) がみられた。従って, stop codon を有する遺伝疾患一般の治療法として有望と考えられた。

### 3. 先天性最重症型筋ジストロフィー関連

1) Muscle-eye-brain 病 (MEB) の原因遺伝子/蛋白質 POMGnT1 (Ser/Thr-mannose に GlcNAc 添加する酵素) が解明され, Finland のみでなく日本を含む全世界に分布する 13 種の点突然変異が報告された。いずれも酵素活性は完全消失 (loss of function) していた。

2) 最も重症な先天性筋ジスである Walker-Warburg syndrome (WWS) の原因遺伝子が下等動物で見つかった *pmt* (Ser/Thr に mannose を添加する酵素) の相同遺伝子 POMT(protein O-mannosyl transferase)であることがオランダで報告されたが, ヒトを含む高等動物での研究がなく実態が不明であった。ヒトを始めとする哺乳類での検討を行った結果, POMT1 と POMT2 の 2 成分の存在が必要で, 臨床的 WWS の約 10 % が POMT1 の遺伝子異常 (点変異) によることを確認した。その糖添加酵素活性のアッセイ系を確立し完全消失(loss of function)であった。MEB と WWS について遺伝子診断, 生化学的酵素測定での診断が可能となった。なお, 約 9 割の臨床的 WWS については未解明である。

3) 遺伝子異常が解明された MEB と WWS については, いずれも  $\alpha$ -dystroglycan DG の糖鎖異常が存在しラミンニンとの結合不全が明らかとなり, 両者は  $\alpha$  DG の O-mannosyl glycan(Sia-Gal-GlcNAc-Mann-ser/thr)の合成障害→laminin- $\alpha$  DG 結合不全→筋細胞死が支持された。福山型についても同一の  $\alpha$  DG 糖鎖異常・laminin- $\alpha$  DG 結合不全が確認されているので, これら 3 疾患は  $\alpha$ -dystroglycanopathy である。

4) 日本に独特の福山型先天性筋ジストロフィーFCMDの責任蛋白質 fukutin の生理機能について、fukutin はその N 末でゴルジ体膜に存在する成分で、糖添加活性はなく、MEB の責任蛋白質である POMGnT1 に結合する成分であることが判明した。N 末を欠失するとゴルジ体ではなく小胞体に移行する。Fukutin 機能の最終決着が必要である。

5) FCMD, MEB, WWS の類縁 3 疾患は確実な遺伝子診断が可能となったので、確実症例の集計を行い臨床診断指針を作成する必要がある。

6) FKRП 遺伝子異常を有し、精神発達正常な先天性筋ジストロフィーの日本人女児一名がイギリス、チュニジア、トルコ以外の日本で始めて発見された。大脳異常はないが小脳に多発小嚢胞をみとめ、福山型に準ずる臨床症状で、 $\alpha$ DG 糖鎖異常を伴っていた。

7) 古くから知られる dystrophy chicken の  $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖が検討され O-glycan のシアール酸付加に障害が確認され、福山型、MEB と類似の病態を有すると判断され、福山型関連疾患の自然発症動物モデルが見つかった。欧米で検討されている WWS, FKRП 異常症, LARGE 異常症とともに当班で行われた福山型, MEB, WWS, dystrophy chicken は、いずれも  $\alpha$ -dystroglycan の O-mannose glycan の合成障害  $\rightarrow$  laminin と  $\alpha$ DG の結合不全を共通の病態としてもち、 $\alpha$ -dystroglycanopathy を呈する疾患群ができつつある。

#### 4. Distal myopathy with rimmed vacuoles(DMRV)

諸外国の遺伝性封入体ミオパチーHIBM の原因遺伝子 GNE (UDP-GlcNAc 2 epimerase/ManNAc kinase ; シアール酸合成関連酵素) の異常であることが判明し、その日本人 66 名 (4 施設) の臨床病型が集計された。その結果、25 種の変異 (missense 変異 23, nonsense 変異 2) が、分子全領域に生じ、特別の hot spot は存在しない、V572L 変異が最も多く、31 名はこのホモ接合体であり、次いで D176V 変異が多かった。発症の平均年齢は 25.4 歳、ほとんど下肢遠位部前脛骨筋からの発症で、近位部もかなり早期からおかされるが大腿四頭筋は保たれる。平均歩行可能期間は 9.4 年、重篤な心機能障害例が 4 例存在した。血清 CK 値は 91% で上昇し、20% は 1,000 IU/L 以上の高値であった。本疾患の診断指針を作成予定である。筋糖蛋白質のシアール酸異常など分子病態について一部でシアール酸低下が報告されるも今後の課題である。

#### 5. ミオトニア症候群関連

1) 筋緊張性ジストロフィーDM (DM1=DMPK の CTG リピート病, DM2=ZFF 9 の CCTG リピート病) の骨格筋では、インスリン受容体, NMDA 受容体, Cl チャンネル, six 5, リアノジン受容体, 筋小胞体 Ca-ATPase(Serca 1), タウ蛋白, amyloid precursor protein, 心筋トロポニン T, myotubularin-related protein 1 など多数の蛋白質が幼弱型であり、これらの発現レベルでスプライシング異常をきたし様々な臨床症状に関与することが判明した。その機序として、DM1, DM2 の遺伝子にみられる非翻訳領域での CTG, CCTG リピートの異常伸長の結果できる mRNA の異常伸長部に強固に結合する蛋白 CUG-BP, MBNL1, 2, 3 が同定され、これらが本来もっている RNA splicing 機能が異常伸長部にトラップされるため多数の RNA splicing に影響を及ぼす結果、多くの mRNA が幼弱型を発現させる機序が解明された (RNA 機能障害仮説)。異常伸長リピートがどの遺伝子に存在するかは疾患発症とは無関係であると推測された。

2) Schwartz-Jampel 症候群が、筋基底層蛋白 perlecan の遺伝子異常による部分欠損症であることが判明し、神経筋接合部での  $\alpha$ DG-perlecan-AchE 機能が低下することが示された。

#### 6. ミトコンドリア脳筋症

ミトコンドリア異常症 ; MELAS, MERRF の主要 mt DNA 変異である 3243 変異, 3271 変異, 8377 変異から複製される変異 tRNA には taurine が結合していないことから、高濃度 taurine 療法の開発をすすめており、変異 tRNA をもつサイブリッド細胞培養を数 mM taurine 存在下で膜電位、ミトコンドリア形態、呼吸機能のみでなく蛋白合成能にも明白な改善がみられ、MELAS, MERRF の治療薬として有用である。

## 7. その他

1) 筋接着因子 laminin-integrin に結合する細胞内シグナル伝達系として ILK-リン酸化 affn-Rac 1/Cdc 42 が同定され、筋原線維の actin filament の形成、fibroblast 接着、血小板病集に関与することが解明された。

2) PTD FNK ; 筋細胞死の一つの有力機序として apoptosis が考えられ、その抑制薬候補として Bcl2 の改造蛋白 PTD FNK が開発され、スタウロスポリン、グルタミン酸、虚血による細胞死をいずれも効率良く低濃度 (pM) で抑制できた。各種細胞死予防薬として有力である。

3) 筋発生の negative regulator である myostatin の抑制薬として抗 myostatin 抗体が米国で開発されつつあるが、本研究班では 高分子蛋白質である follistatin や follistatin-related gene (FLRG), ペプチドである myostatin prodomain が開発され、種々の筋疾患への効果判定を動物実験できる段階に来ている。

4) 先天性ミオパチーに属する SEPN(selenoprotein N)-related myopathy, すなわち rigid spine syndrome, multiminicore disease, desmin-related myopathy が筋小胞体蛋白質 selenoprotein 1 の遺伝子異常で発症すること、悪性高熱/central core disease が筋小胞体蛋白質 ryanodine receptor の遺伝子異常で発症すること、X-linked myotubular myopathy が脱リン酸化活性をもつ myotubularin (MTM1) の遺伝子異常で発症することなど新たな筋疾患責任遺伝子が日本人家系で報告された。

## 8. 問題点と今後の研究

1) FSH 型について遺伝子診断まではできるがその分子病態解明・治療開発は滞っている。先天性筋ジストロフィーについては、MEB, 約 10 %の WWS, FCMD の遺伝子異常, 分子病態解明に大きな進歩がえられ、fukutin がゴルジ体膜で GlcNAc 添加酵素 POMGnT1 に結合して作用する非酵素であることまでは解明したがその最終的生理機能の解明には至っていない。また、 $\alpha$ DG 糖鎖合成の第 3, 4 段階の酵素 Gal-T, Sia-T や Large, FKR, ジストロフィー鶏の実態解明と筋ジストロフィー発症との関連、先天性筋ジストロフィーでの脳奇形、眼奇形発症機序の解明が必要である。

2) DMD/BMD, LGMDs の 2/3, 筋緊張性ジストロフィーの原因遺伝子の解明がなされ、遺伝子診断・蛋白質診断が正確に可能となったが、治療薬開発の観点から筋障害の分子病態の解明に一層の努力が必要である。

3) negamycin, AS-oligo, myostatin inhibitors(抗体, follistatin, follistatin-related gene, myostatin prodomain), Msx-1 誘導幹細胞, taurine など有望な治療薬候補が出されており、今後その臨床治験への具体的方策を探る。

4) ミトコンドリア脳筋症の分野にみるべき成果がなく、特に核由来遺伝子異常症の解明に遅れが出ている。

5) 遺伝子診断で確定できるいくつかの筋ジス病型 (dysferlinopathy, distal myopathy with rimmed vacuoles, FCMD/MEB/WWS) の診断指針を作成、社会に公表する必要がある。

## 9. 倫理面の運用

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済省告示第 1 号)」, 国立精神・神経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るものとしている。

# 分 担 研 究 報 告

# 目 次

## I. LGMD (肢帯型筋ジストロフィー)

- 1) 血清抗 giantin 抗体陽性の肢帯型ミオパチー ..... 17  
愛知医科大学医学部神経内科 佐 橋 功
- 2) 筋特異的カルパイン・コネクチンを中心とするネットワークと  
肢帯型筋ジストロフィー症の病態機序 ..... 19  
東京都臨床医学総合研究所酵素機能制御研究部門 反 町 洋 之
- 3) 筋ジストロフィーモデルマウスにおけるマトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子発現の  
検討 ..... 23  
川崎医科大学神経内科 砂 田 芳 秀
- 4) 変異 caveolin-3 トランスジェニックマウスにおける肥大型心筋症の発現 ..... 25  
川崎医科大学神経内科 砂 田 芳 秀
- 5) Myostatin prodomain による変異 caveolin-3 トランスジェニックマウス表現型の改善 ..... 27  
川崎医科大学神経内科 砂 田 芳 秀
- 6) 筋ジストロフィーの分子発病機序としての matrix metalloproteinase による  
dystroglycan 複合体の崩壊に関する研究 ..... 29  
帝京大学医学部神経内科 清 水 輝 夫
- 7) 遺伝子二重変異筋ジストロフィーマウスの作成と解析による病態の解明 ..... 31  
国立精神・神経センター神経研究所モデル動物開発部 荻 原 康 子
- 8) Calpain3 の筋線維内局在 ..... 33  
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部 西 野 一 三
- 9) 新しいサルコグリカン分子の組織発現と機能に関する研究 ..... 34  
国立精神・神経センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部 今 村 道 博
- 10) サルコグリカン異常症：日本人における原因サブユニット，遺伝子変異，  
及び免疫組織化学染色パターンの再検討 ..... 36  
国立精神・神経センター武蔵病院 南 成 祐
- 11) 日本人 dysferlinopathy における遺伝子変異と臨床型の特徴 ..... 38  
東北大学医学部神経内科 青 木 正 志
- 12) SJL マウス骨格筋における遺伝子発現解析 ..... 40  
東北大学医学部神経内科 青 木 正 志

13) 筋ジストロフィー発症機構の理解をめざす関連タンパク質の分子論的研究 .....	42
国立精神・神経センター神経研究所 吉田 幹 晴	
14) 三好型筋ジストロフィー(LGMD2B)責任遺伝子産物ジスフェルリンと (ER)ストレス発生の機構 .....	44
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第五部 桃井 隆	
15) SJL/J マウス骨格筋における炎症性細胞と NF kappa B 発現の経時的検討 .....	46
東邦大学大橋病院神経内科 栗原 照 幸	
<b>II. FCMD (福山型先天性筋ジストロフィー)</b>	
16) 福山型先天性筋ジストロフィーにみられるてんかんと遺伝子異常との関連 .....	51
神戸市総合療育センター小児神経科 吉岡 三恵子	
17) 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の遺伝子異常と蛋白質/ 細胞病態および治療に関する研究 .....	53
大阪大学院医ゲノム機能分野 戸田 達 史	
18) 筋ジストロフィーにおける糖鎖異常と病態機序の解明 .....	55
東京都老人総合研究所 遠藤 玉 夫	
19) 筋形質膜蛋白質に起因しない筋ジストロフィーの病態解明についての研究 .....	57
国立精神・神経センター神経研究所 林 由起子	
20) 新たなモデル動物を用いた $\alpha$ -dystroglycanopathy の発症機序に関する研究 .....	59
帝京大学医学部神経内科 清水 輝 夫	
<b>III. OPMD (眼咽頭筋ジストロフィー)およびミオパチー</b>	
21) Agrin/MuSK 系障害における限局性骨格筋障害の臨床と病因的考察 .....	63
愛知医科大学神経内科 佐橋 功	
22) 筋型糖原病の生化学・遺伝子診断法の確立および病態に即した治療法の開発 .....	65
浜松市発達医療総合センター小児神経科 杉江 秀 夫	
23) コラーゲン VI 異常による筋疾患(Ullrich 病, Bethlem myopathy)の臨床的, 病理学的 および遺伝子学的研究 .....	67
鹿児島大学神経内科・老年病学 樋口 逸 郎	
24) 眼咽頭筋ジストロフィーモデルマウスの作製 .....	69
熊本大学大学院医学薬学研究部先端生命医療科学部門 脳・神経科学講座・神経内科学分野 内野 誠	
25) 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素(VLCAD)欠損症の 免疫組織化学染色によるスクリーニング .....	71
国立精神・神経センター武蔵病院 DNA 診断・治療室 南 成 祐	

26) 悪性高熱症およびセントラルコア病：リアノジン受容体 RYR1 の遺伝子変異検索 ……	72
国立精神・神経センター武蔵病院 DNA 診断・治療室 南 成 祐	
27) X-linked ミオチューブラーミオパチー：日本人患者の遺伝子変異スペクトラム及び 臨床・筋病理学的検討 ……	74
国立精神・神経センター武蔵病院 DNA 診断・治療室 南 成 祐	
28) デスミンミオパチー細胞傷害機構の検討 ……	76
秋田大学医学部神経内科 豊 島 至	
29) 家族性還元小体ミオパチー — ER ストレス関連疾患？ — ……	78
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部 西 野 一 三	
<b>IV. 遠位型筋ジストロフィー, Emery-Dreifuss 症候群, DMRV など</b>	
30) DMRV における分子生物学的検討および遺伝子変異型と 臨床症状の関連についての検討 ……	81
東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 水 澤 英 洋	
31) Rimmed vacuole 型遠位型ミオパチーの筋変性機序に関する研究 ……	83
新潟大学脳研究所神経内科 田 中 恵 子	
32) Rimmed vacuole を伴うミオパチーにおける免疫染色 —レクチンを中心に— ……	85
愛知医科大学神経内科 佐 橋 功	
33) アセチルコリン受容体 $\alpha$ サブユニット遺伝子の機能を有さないエクソン P3A 上の ミスセンス変異は mRNA スプライシング異常を誘発する ……	87
愛知医科大学神経内科 佐 橋 功	
34) Rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチーの骨格筋における 糖蛋白のシアル酸負荷に関する研究 ……	88
帝京大学医学部神経内科 清 水 輝 夫	
35) 縁取り空砲を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)におけるシアリル化異常 ……	90
国立精神・神経センター神経研究所 西 野 一 三	
<b>V. DMD/BMD, およびジストロフィンその他</b>	
36) 新しい中間径フィラメントである $\beta$ -synemin の分化に関する研究 ……	93
群馬大学大学院脳神経内科学 水 野 裕 司	
37) ジストロフィン欠損骨格筋における MAPK および matrix metalloproteinase-2,9 の検討 ……	95
信州大学医学部第三内科 池 田 修 一	
38) 筋原線維から筋形質膜への分子連関構築と筋ジストロフィー発症機序の相関解析 ……	98
武蔵野大学薬学部機能形態学 土 方 貴 雄	
群馬大学大学院医学系研究科器官機能構築学 依 藤 宏	

39) Duchenne 型筋ジストロフィー筋における浸潤細胞の解析 .....	100
新潟大学脳研究所神経内科 田中 恵子	
40) mdx マウスに対する同系筋前駆細胞移植によるジストロフィン導入 .....	102
熊本大学医学部発達小児科 三池 輝久	
41) Syntrophin, aquaporin の骨格筋における発現と局在の研究 .....	104
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山 吉弘	
42) Aquaporin4 過剰発現トランスジェニックマウスの作製と mdx マウスの治療 .....	106
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山 吉弘	
43) ジストロフィン遺伝子のスプライシング制御機序の解明とその治療への応用 .....	108
神戸大学大学院医学系研究科小児科 松尾 雅文	
44) ヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクターによる骨格筋への ジストロフィン遺伝子導入効率と治療効果 .....	110
熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学分野 内野 誠	
45) Read-Through 活性物質を検索するためのダブル・レポーター遺伝子 を導入したトランスジェニックマウスの開発 .....	112
東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系(生物学) 松田 良一	
46) 筋ジストロフィー治療法の開発 — 培養骨格筋細胞におけるステロイドおよびゲンタマイシンの影響 — .....	114
東京女子医科大学遺伝子医療センター 斎藤 加代子	
<b>VI. 先天性ミオトニー, 筋強直性ジストロフィー, 治療法の開発</b>	
47) 筋強直性ジストロフィー骨格筋における mRNA スプライシングの異常 .....	119
大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学(神経内科) 佐古田 三郎	
48) クラス Ic 抗不整脈薬の骨格筋型ナトリウムチャンネルに対する作用 — ミオトニー治療薬としての検討 — .....	121
大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学(神経内科) 佐古田 三郎	
49) ミオトニーの筋活動電位反復発火の減衰に関する研究 .....	123
東邦大学大橋病院神経内科 栗原 照幸	
50) 筋強直性ジストロフィーの分子病態と治療 .....	125
東京大学大学院総合文化研究科 石浦 章一	
51) RNA 結合因子としての SIX5 と筋強直性ジストロフィーの関わり .....	127
自治医科大学分子病態治療研究センター細胞生物研究部 川上 潔	

52) Nonsense-mediated mRNA decay(NMD)抑制による神経筋疾患の 病態と治療に関する研究 .....	128
国立水俣病総合研究センター 白 杵 扶佐子	
53) PC12 細胞を用いた筋強直性ジストロフィーモデル細胞の作成： 薬剤スクリーニングシステムの確立を目指して .....	130
九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科 吉 良 潤 一	
54) Schwartz-Jampel 症候群におけるミオトニア発症機序の解明 .....	132
順天堂大学脳神経内科 平 澤 恵 理	
<b>VII. 骨格筋形成, 壊死, アポトーシス</b>	
55) 骨格筋の脱分化と再生：筋ジストロフィーの再生治療にむけて .....	137
千葉大学理学部生物学教室 遠 藤 剛	
56) ミオフィラメント動態制御因子の変異に起因する筋異常に関する研究 — コフィリンおよびC-蛋白質に焦点をおいて .....	140
千葉大学理学部生物学科 大日方 昂	
57) 筋肉形成におけるマイオスタチンの役割 .....	143
徳島大学工学部生物工学科 野 地 澄 晴	
58) 筋細胞特異的に必須な役割を果たしているインテグリン-ILK-affixin 系 シグナル伝達の研究 .....	145
横浜市立大学大学院医学研究科分子細胞生物学教室 鈴 木 厚	
59) 筋分化・筋形成と Six 遺伝子とのかかわり .....	147
自治医科大学分子病態治療研究センター細胞生物研究部 川 上 潔	
60) SIX5 の標的分子と筋緊張性ジストロフィーの関わり .....	148
自治医科大学分子病態治療研究センター細胞生物研究部 川 上 潔	
61) Dystroglycan 結合蛋白質 MAGI-1 の生理機能の研究 .....	150
鳥取大学医学部神経生物学 二 宮 治 明	
62) 細胞死抑制の蛋白質細胞内導入治療法の開発 .....	152
日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野 太 田 成 男	
<b>VIII. ミトコンドリア異常症と治療</b>	
63) ミトコンドリア脳筋症のタウリン療法 —培養細胞を用いての効果検定 .....	157
日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野 太 田 成 男	
64) ミトコンドリア ALDH2 欠損によるミトコンドリア病病態モデルマウスの作製と その病態改善法 —ビタミンE の効果 .....	160
日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野 太 田 成 男	

65) MELAS 筋芽細胞における細胞死とその抑制 .....	162
自治医科大学小児科学 桃井真里子	
66) ミトコンドリアゲノム多型データベースを用いた病的変異と多型の鑑別 .....	164
東京老人総合研究所健康長寿ゲノム探索 田中雅嗣	
67) 筋形成に関わる細胞間相互作用の解明 .....	166
京都大学再生医科学研究所再生増殖制御学分野 瀬原淳子	
<b>IX. 筋ジストロフィー骨格筋の酸化ストレス, 耐性系, 遺伝子治療など</b>	
68) 筋ジストロフィーに対するゲンタマシン治療対象患者のスクリーニング及び ハイブリット型リボソームを用いた治療法の開発 .....	171
熊本大学医学薬学研究部発達小児科 三池輝久	
69) 筋疾患と小胞体ストレスの関連 .....	173
九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科 吉良潤一	

# I. LGMD(肢帯型筋ジストロフィー)

# 血清抗 giantin 抗体陽性の肢帯型ミオパチー

佐橋 功\*

研究協力者 衣斐 達\* 近藤久雄\*\* 大野欽司\*\*\*

## はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー (F-CMD), Walker-Warburg 症候群 (WWS), muscle-eye-brain disease (MEB 病), 肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 2I 等は,  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) の欠陥によりグリコシル化と laminin  $\alpha$ 2, neuregulin, agrin 連関への二次的異常も来す遺伝性  $\alpha$ -dystroglycanopathy ( $\alpha$ -DGpathy) である<sup>1,2)</sup>。しかし, 現在まで後天性・二次性  $\alpha$ -DGpathy に伴う筋疾患の報告はない。

Giantin は, 372kDa のゴルジ体膜タンパク質であり, 輸送小胞 (transport vesicle) とゴルジ膜間の架橋をなす<sup>3,4)</sup>。

我々は血清抗ゴルジ (giantin) 抗体を有する成人発症で  $\alpha$ -DG 染色が特異的に減弱した進行性 LGMD 様ミオパチーの世界初報告をする。

## 症例報告

患者; 59 歳, 女性, 既往歴・家族歴; 2 人弟に不整脈, 虚血性心疾患, 子供 3 名は健康。

44 歳時に, 立ち上がり困難を自覚し, 進行性。47 歳の筋生検で慢性炎症性筋疾患の診断。48 歳に愛知医大初診。第 2 回目の筋生検→パルス療法, 48 歳以降はプレソニゾン (PSL) 経口療法を受けたが, 進行性。当時の身体・神経所見; 意識・知能正常, 150.5 cm, 51.0 kg, 134/70 mmHg, 36.3°C, 球結膜は浮腫様, 紅斑性皮膚変化, リンパ節症, レイノー現象, 関節症はない。流涙正常, シルマー試験陰性。顔面・球筋は正常, 頸部屈筋/伸筋・体幹筋・骨盤周囲筋・大腿筋は高度障害。歩行は高度動揺性, ガワーズ徴候陽性, 運動不耐性。四肢遠位筋は良く保持 (握力正常)。筋痛, 筋緊張, 筋浮腫, 仮性肥大, 線維束性筋れん縮なし。深部腱反射は減弱, Babinski 徴候陰性。

## 主要検査

血清 CK 値は常に正常。蛍光 Hepana 試験 (MBL, 名古屋, 日本) を使用した血清中の抗核抗体 ( $\times 160$ ) のスクリーニングで, 細胞質内のまだら蛍光が観察され, 抗ゴルジ抗体を示唆。自己抗体と SSA (Ro) 陽性 (ELISA  $\times 31.4$ )。15 年間以上にわたる悪性腫瘍に関する可能な限りの検討は陰性。心電図 ST-T 異常, 針 EMG 筋原性, 骨格筋 CT は近位筋優位の高度の四肢筋肉の脂肪置換を

伴う筋萎縮。生検筋より抽出した DNA 変異検索, LGMD2A, 2B, 2I 遺伝子異常はなかった。

## 病理学的検討

上腕二頭筋生検筋の光顕所見は, 1) 酸化還元酵素 (NADH-TR, cytochrome c oxidase 等) 異常を示す散在性・集簇性の小径壊死線維, 2) 間質結合組織の中等度増加, 3) cytoplasmic body と空胞変性, 4) 結合組織中の散在性 AcPase 陽性小円形細胞浸潤, 5) type 2 線維萎縮, 6) dystrophin, utrophin, emerin, caveolin 3, sarcoglycan 複合体, calpain 3, dysferlin, telethonin, merosin の免疫染色正常, 7)  $\alpha$ -DG 免疫染色 (VIA4-1 抗体使用) の減弱。電子顕微鏡所見は, 筋原線維の走行障害, 細胞内の細胞小器官の変性, 核近辺の小水疱変化, 運動終板は正常。

## 免疫学的検討

抗ゴルジ抗体陽性患者血清は, Hep-2 細胞の核周囲構造と免疫反応し, Hela 細胞抽出物で 300 kDa 以上の分子と同定された (図 1A, 1B)。Giantin がゴルジ体において 300 kDa の分子量を上回る唯一の既知の分子であり, 患者血清と giantin との反応の検索をしたところ, giantin と抗 giantin 抗体は良く反応した (図 1C)。そして患者血清と免疫沈降した蛋白は, 抗 giantin 抗体で染色された (図 1D)。

## 考 察

本症例は LGMD 2A, 2B 等の劣性疾患に似ていたが除外された。Giantin は, Sjogren 症候群<sup>6)</sup>, 強皮症<sup>6)</sup> と RA<sup>5,7)</sup> 患者より分離され, これら症例では高力価の抗 giantin 自己抗体を有したが筋疾患はなかった。血清抗 giantin 抗体のスクリーニングで自己免疫疾患や筋疾患はなかったが, 64 人の健康対照者は陰性であったが, HIV 陽性患者の 164 人中の 18 人に低力価で抗 giantin 抗体が検出されたという<sup>6)</sup>。

Giantin は輸送小胞とゴルジ膜間の架橋をなし, 抗 giantin 抗体は筋ゴルジ体において蛋白輸送に潜在的な影響を与えらると思われる<sup>3,5)</sup>。

F-CMD, WWS, MEB, LGMD 2I 等は,  $\alpha$ -DG 欠陥とさらに二次性 laminin-2, neurexin, agrin 2) のグリコシル化欠陥を伴う遺伝性疾患である。 $\alpha$ -DG 染色性の減弱は, laminin-2 の免疫染色は正常であったが, 遺伝性  $\alpha$ -DGpathy 類似の病態への関与が想定された。また患者血清 CK 値

\* 愛知医科大学神経内科

\*\* ケンブリッジ大学

\*\*\* 名古屋大学神経疾患腫瘍センター神経遺伝情報学

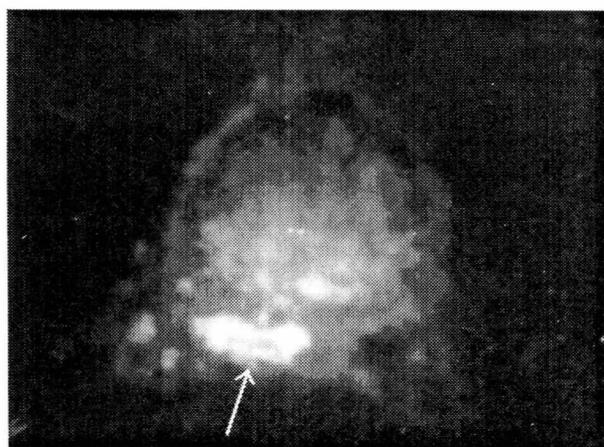


図 1

Patient's serum diluted to 1:20 is applied to cultured Hep-2 cells derived from human laryngeal cancer. Application of FITC-labeled anti-human serum antibody (1:100) detects aggregated granules (arrow).

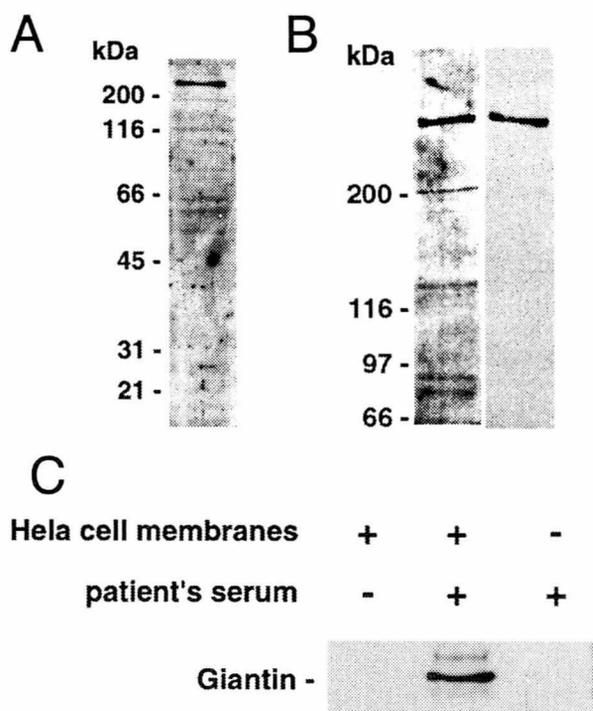


図 2

(A) Patient's serum diluted to 1:20 is applied to cultured Hep-2 cells derived from human laryngeal cancer. Application of FITC-labeled anti-human serum antibody (1:100) detects aggregated granules (arrow). (B) Immunostaining of HeLa cell extracts probed with the patient's serum reveals a >300 kDa band (arrowhead). (C) A molecule in the Golgi membrane proteins immunostained by the patient's serum has a similar molecular weight as giantin detected by a rabbit polyclonal anti-human giantin antibody (arrowhead). The antibody was a gift from Dr. Yoshio Misumi, Fukuoka University, Japan. (D) Denatured immunoprecipitation reveals that a molecule immunoprecipitated with the patient's serum is immunostained with an anti-giantin antibody.

の正常は、筋線維の極緩徐変性による可能性が高いが、ゴルジ体での不完全な CK 合成による可能性もある。

本患者と遺伝性  $\alpha$ -DG pathy との類似性は、自己抗体が進行性ミオパチーを引き起こすことを示唆している。しかし PSL 反応性と細胞浸潤の乏しさ、細胞内分子である抗体の標的は、この炎症性の可能性を否定している。

### 結 語

血清中の抗ゴルジ抗体 (giantin) を有し、四肢筋生検で  $\alpha$ -DG への免疫染色性の低下を示す女性例を報告し、遺伝性  $\alpha$ -DGpathy との病因的類似性につき考察した。

### 引用文献

- 1) Muntoni F, Brockington M, Blake DJ, et al. : Defective glycosylation in muscular dystrophy. *Lancet* , 360: 1419-1421, 2002.
- 2) Grewal PK, Hewitt JE. Glycosylation defects: a new mechanism for muscular dystrophy? : *Hum Mol Genet* 12: Suppl 2:R259-264, 2003.
- 3) Lesa GM, Seemann J, Shorter J, et al. The amino-terminal domain of the golgi protein giantin interacts directly with the vesicle-tethering protein p115. *J Biol Chem* 2000, 275:2831-2836
- 4) Sohda M, Misumi Y, Yamamoto A, et al.: Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin. *J Biol Chem* 276:45298-45306, 2001.
- 5) Sohda M, Misumi Y, Fujiwara T, et al.: Molecular cloning and sequence analysis of a human 372-kDa protein localized in the Golgi complex. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1399-1408, 1994.
- 6) Seelig HP, Schranz P, Schroter H, et al.: Macrogolgin--a new 376 kD Golgi complex outer membrane protein as target of antibodies in patients with rheumatic diseases and HIV infections. *J Autoimmun* 7:67-91, 1994.
- 7) Toki C, Fujiwara T, Sohda M, et al.: Identification and characterization of rat 364-kDa Golgi-associated protein recognized by autoantibodies from a patient with rheumatoid arthritis. *Cell Struct Funct* 22:565-577, 1997.

# 筋特異的カルパイン・コネクチンを中心とするネットワークと 肢帯型筋ジストロフィー症の病態機序

反 町 洋 之<sup>\*\*\*\*\*\*</sup>

研究協力者	小 野 弥 子 <sup>*</sup>	尾 嶋 孝 一 <sup>*,*****</sup>	土 井 菜穂子 <sup>*,*****</sup>
	秦 勝 志 <sup>*</sup>	小 山 傑 <sup>*,†</sup>	川 畑 順 子 <sup>††</sup>
	鳥 居 福 代 <sup>†</sup>	柿 沼 良 美 <sup>*****</sup>	川 原 裕 之 <sup>†††</sup>
	千 葉 智 樹 <sup>**</sup>	田 中 啓 二 <sup>***</sup>	多 屋 長 治 <sup>****</sup>
	米 川 博 通 <sup>****</sup>	反 町 典 子 <sup>††††</sup>	Christian Witt <sup>††††</sup>
	Stephanie Witt <sup>†††††</sup>	Abigail S. McElhinny <sup>※</sup>	Carol C. Gregorio <sup>※</sup>
	Siegfried Labeit <sup>†††††</sup>	中 尾 晴 美 <sup>※※</sup>	饗 場 篤 <sup>※※</sup>
	鈴 木 紘 一 <sup>※※※</sup>	阿 部 啓 子 <sup>†</sup>	

## 目 的

本研究は、骨格筋特異的に発現するカルパインホモログ p94 (カルパイン 3) 及びコネクチンの骨格筋における機能を解析し、特に両者が中心となる情報伝達系の作用機序を明らかとして、p94 遺伝子 (*CAPN3*) 欠損で発症する肢帯型筋ジストロフィー 2A 型 (LGMD2A)<sup>1)</sup> の分子メカニズムの解明とその臨床的応用を目的とする。昨年までに我々は、LGMD2A が p94 のプロテアーゼ活性の機能不全により生じることを、様々な解析<sup>2-4)</sup> から明らかにした。本研究期間では、次の 3 つの方向から研究を進めた。即ち、①不活性型 p94:C129S ノックインマウス (以下、p94CS マウス) の作成と解析、②p94 活性測定系の開発と診断への応用、③p94 の分子生物学・生化学的解析、である。p94CS マウスは、活性中心の Cys が Ser に変異したプロテアーゼ不活性型 p94 を野生型の代わりに発現する遺伝子改変マウスであり、立体構造を保持したままプロテアーゼ活性のみを欠失するため、活性に焦点を当てた、極めて興味深い解析と応用が可能となり、②、③のプロジェクトにももちろん適用した。

## 方法と結果

(1) p94:C129S ノックインマウスの作成：マウス 129Sv ゲノミックライブラリーより得た p94 遺伝子 (*Capn3*) DNA を用いて、エキソン 3 にコードされる活性中心の

Cys129 を Ser に変異させたターゲティングベクターを作成し、これによって相同組換えを起こした遺伝子改変マウスのホモ体を得た (図 1 参照)。これを Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと交配し、バッククロスを行うことにより、選択マーカーが切除されたほぼ intact に近いノックインマウスを作出した。このマウスを解析した結果、中心核などのミオパチー症状は見られたが、ノックアウトの表現型に比べると非常に軽いものであった<sup>5)</sup>。

(2) カルパスタチン及び蛍光タンパク質を用いた p94 の活性測定系の改良：一昨年開発した、カルパスタチンの両端にシアン及び黄色蛍光蛋白質を融合させた p94 特異的蛍光基質タンパク質について、カルパスタチン部分を短くすることで、基質の安定化を図った。また、測定条件にセリンプロテアーゼを含有することで、バックグラウンドの活性をほぼゼロにすることに成功した。この系を用いて、野生型全長 p94、不活性型 p94、 $\mu$ -カルパイン、などを発現させた COS 細胞のエキストラクトを用いて、直接その活性を測定した。その結果、実際に p94 の活性がクルードな状態で測定可能であることが判明した。計算では、10  $\mu$ m 切片数枚で十分測定可能であると考えられ、正確かつ簡便な診断法の確立に一步近づくことができた<sup>6)</sup>。

(3) 新規 p94 バリエーションの発見とその解析：新規 p94 バリエーションは、マウス erythroleukemia 細胞 (MEL) 及びヒト脾臓の cDNA を用いてクローニングし、配列を決定した。その発現解析は半定量的 RT-PCR を用いて行った。得られた新規 p94 バリエーションは、興味深いことに従来の骨格筋特異的プロモーターの約 10 kb 上流に存在する新規のプロモーターから転写されており、新規のエキソンを有していた (図 2 参照)。その 5'-端は上流に存在するグルコシダーゼ遺伝子とオーバーラップしていることが判明した。さらに、この新規 p94 バリエーションは組織普遍的に発現しており、血球系細胞の維持、分化に機能して

\* 東京都臨床医学総合研究所酵素機能制御研究部門  
 \*\* 東京都臨床医学総合研究所独立研究部門  
 \*\*\* 東京都臨床医学総合研究所分子腫瘍研究部門  
 \*\*\*\* 東京都臨床医学総合研究所実験動物研究部門  
 \*\*\*\*\* CREST, JST  
 † 東京大学大学院農学生命科学研究科  
 †† 福山大学生命工学部  
 ††† 北海道大学大学院薬学研究科  
 †††† 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部門  
 ††††† マンハイム大学医学部  
 ※ アリゾナ大学医学部  
 ※※ 神戸大学大学院医学研究科  
 ※※※ 東レ・先端融合研究所

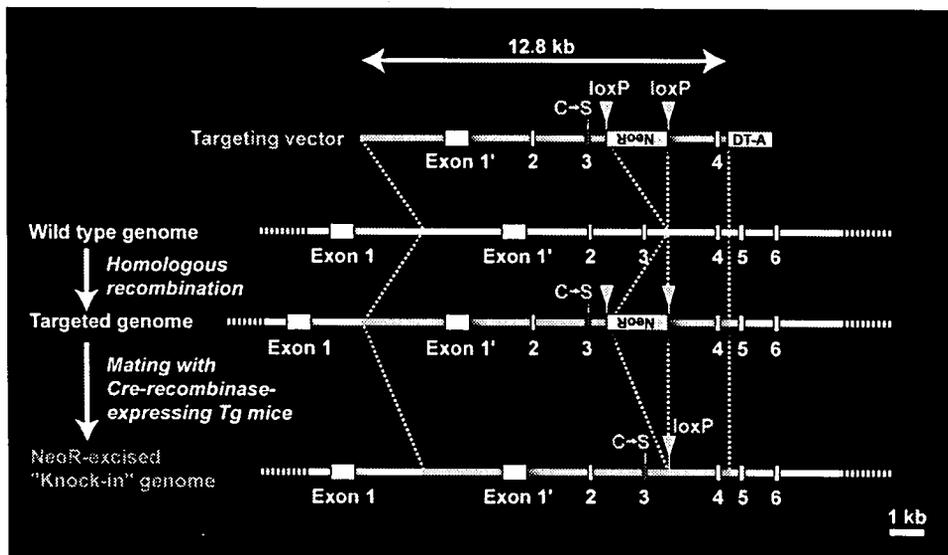


図1 p94:C129S ノックインマウス作出のストラテジー  
最終的に得られた遺伝子改変マウスのゲノムには変異 C129S 及び loxP 配列のみが存在する。

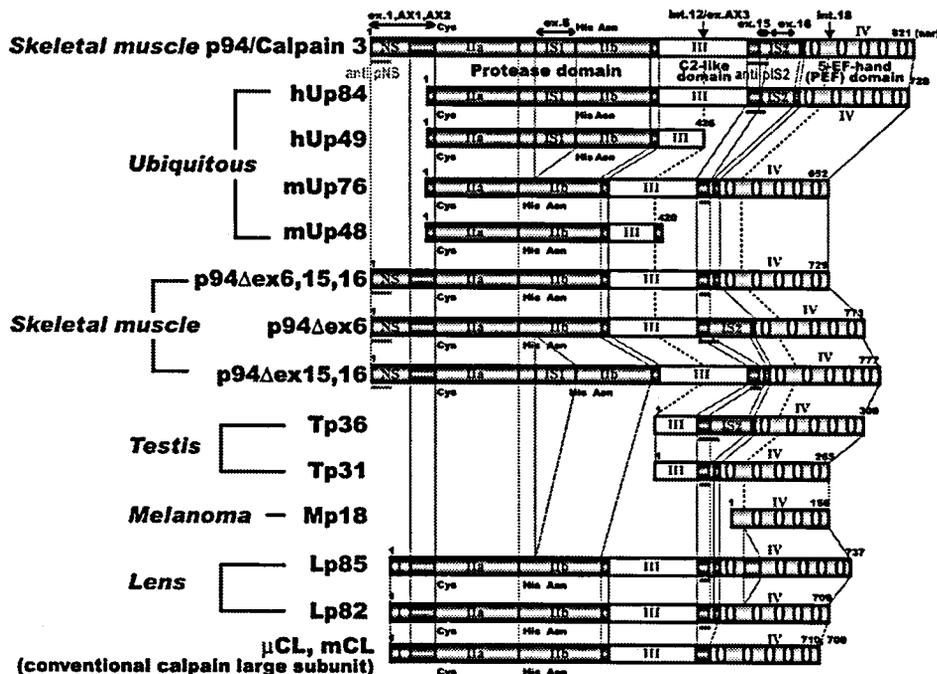


図2 様々な組織に発現する p94 のバリエント  
組織普遍的に発現する hUp84 などは、組織普遍のプロモーターを用いる。

いることが示唆された<sup>7)</sup>。

(4) p94 の Na<sup>+</sup>-依存性の発見：p94 の活性中心を形成する Asn386 を Asp に変異した蛋白質は、活性が 1/100 程度になっており、野生型では不可能であった *in vitro* の生化学的解析が可能となった。そこで、p94:N386D 蛋白質をバキュロウイルス系で発現・精製し、その生化学的性質を解析した結果、興味深いことに p94 は Ca<sup>2+</sup> と Na<sup>+</sup> の両方に感受性を示すことが見出された。さらに、免疫組織染色の結果、p94 が SR にも存在していることが示された。

## 考 察

LGMD2A の分子メカニズムを考える上で極めて重要な p94CS のマウスを得ることに成功した。これらは、治療・診断をはじめ様々な解析に応用可能となる。その表現型から、正常な骨格筋機能に p94 のプロテアーゼ活性が必須である事が証明されたと同時に、症状が極めて軽いことから、p94 には構造タンパク質としての機能も存在することが示された。また、p94 の *in vitro* 活性測定系の開発に成功したが、その実用性は今後 p94CS マウスを用いて評価が可能と考えられる。

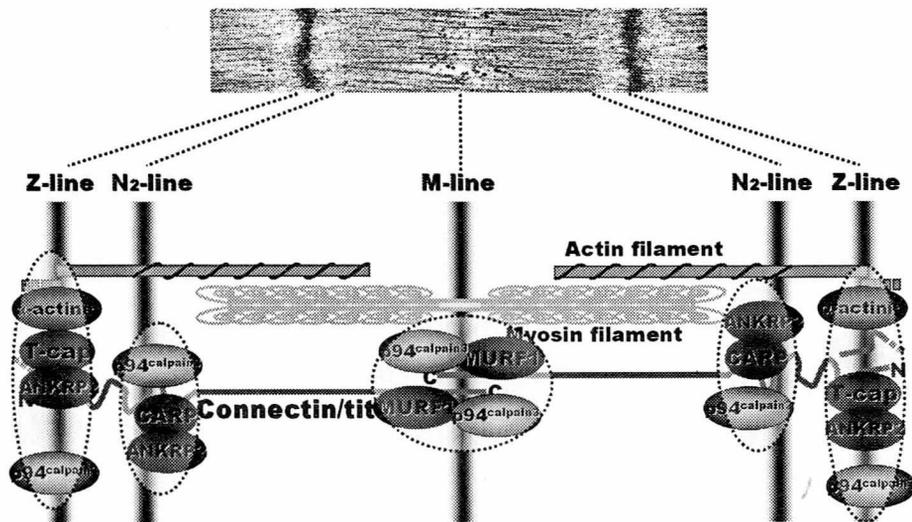


図3 筋原線維の構造と「シグナル複合体」

Z, N2, 及びM線は、それぞれ、コネクチンのN末端, N末端から1/3の部分, C末端に相当する。それぞれの部位にp94, T-cap, CARP, ANKRD2, MURF1などの興味深い分子が複合体を形成している。p94を含めて、その多くは核に移行し、核に情報を伝える。

一方、p94の分子生物学・生化学的解析から、p94の新しい性質、即ち、組織普遍的バリエーションの存在とNa<sup>+</sup>依存性、が見出された。前者は、p94がサイクリンAやC/EBPβなどのプロセッシングに関与するという結果<sup>8)</sup>を支持するもので、今後の発展が期待される。また、後者は、p94がSRにも存在することを考え合わせると、p94の全く新しい骨格筋での機能が示唆された(図3参照)。

#### 研究の意義

p94CSマウスは、我々の研究のみならず、LGMD2Aの治療・診断・予防の有効性の検討に重要なモデルマウスとなりうる。p94活性測定系も同マウスを用いて検証可能である。p94結合タンパク質であるコネクチンの変異で筋ジストロフィーを生じるmdmマウスの解析結果<sup>9)</sup>と合わせることで、さらに筋ジストロフィーへの理解は深まるであろう。一方で、p94:C129Sが軽度の筋ジストロフィー症状しか呈しなかった事から、野生型p94(これはプロテアーゼ活性が強く危険)ではなく、p94:C129Sタンパク質を重度LGMD2Aの遺伝子治療に用いることは極めて有望であろう。Na<sup>+</sup>依存性などの新しく見出されたp94の生理的意義を明らかにしていくことで、さらに有効性の高い治療法への道を拓くことであろう。さらに、他の筋ジストロフィーの発症機序への関与の可能性もある。今後さらに詳細な解析を行っていくつもりである。

#### 文 献

- 1) Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., and Sorimachi, H.: Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 53: S 12-18. 2004.
- 2) Ono, Y., Shimada, H., Sorimachi, H., Richard, I., Saido, T. C., Beckmann, J. S., Ishiura, S., and Suzuki, K. :

Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A). *J. Biol. Chem.* 273: 17073-78. 1998.

- 3) Tagawa, K., Taya, C., Hayashi, Y. K., Nakagawa, M., Ono, Y., Fukuda, R., Karasuyama, H., Toyama-Sorimachi, N., Katsui, Y., Hata, S., Ishiura, S., Nonaka, I., Seyama, Y., Arahata, K., Yonekawa, H., Sorimachi, H., and Suzuki, K. : Myopathy phenotype of transgenic mice expressing active site-mutated, inactive p94, skeletal muscle-specific calpain, the gene product responsible for limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Hum. Mol. Genet.*, 9: 1393-1402., 2000.
- 4) Spencer, M. J., Guyon, J. R., Sorimachi, H., Potts, A., Richard, I., Herasse, M., Chamberlain, J., Dalkilic, I., Kunkel, L. M., and Beckmann, J. S. : Stable expression of calpain 3 from a muscle transgene in vivo: Immature muscle in transgenic mice suggests a role for calpain 3 in muscle maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 8874-79. 2002.
- 5) Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdiguian, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H., Lefranc, G., Fardeau, M., Sébille, A., and Beckmann, J. S. : Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated IκBα/Nuclear Factor κB pathway perturbation in mince. *J. Cell Biol.* 151: 1583-90, 2000.
- 6) Ono, Y., Kakinuma, K., Torii, F., Irie, A., Nakagawa, K., Labeit, S., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. : Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *J. Biol.*

*Chem.* 279:2761-71, 2004.

- 7) Kawabata, Y., Hata, S., Ono, Y., Ito, Y., Suzuki, K., Abe, K., and Sorimachi, H. : Newly identified exons encoding novel variants of p94/calpain3 are expressed ubiquitously and overlap the  $\alpha$ -glucosidase C gene. *FEBS Lett.* 555 : 623-30, 2003.
- 8) Welm, A. L., Timchenko, N. A., Ono, Y., Sorimachi, H., Radomska, H. S., Tenen, D. G., Lekstrom-Himes, J., and Darlington, G. J. : C/EBP $\alpha$  is required for proteolytic cleavage of cyclin A by calpain 3 in myeloid precursor cells. *J. Biol. Chem.* 277:33848-56, 2002.
- 9) Ono, Y., Witt, C. C., Puschmann, E., McNabb, M., Wu, Y., Gotthardt, M., Witt, S. H., Haak, M., Labeit, D., Gregorio, C. C., Sorimachi, H., Granzier, H., and Labeit, S. : Induction and myofibrillar targeting of CARP, and suppression of the Nkx2.5 pathway in the MDM mouse with impaired titin-based signaling. *J. Mol. Biol.* 336: 145-54, 2004.

# 筋ジストロフィーモデルマウスにおけるマトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子発現の検討

砂田 芳秀\*

研究協力者 市川 弥生子\* 大澤 裕\* 萩原 宏毅\* 村上 龍文\*  
笹岡 俊邦\*\* 新石 健二\*\*\* 今村 道博\*\*\*\*

## 目 的

Dystroglycan 複合体 (DG) は  $\alpha$ -DG と  $\beta$ -DG から構成され、基底膜と細胞内骨格を結び付け、強固な架橋構造を形成している。近年、細胞外マトリックス分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: MMP) が  $\beta$ -DG の細胞外ドメイン部分を分解し、その結果、この架橋構造が崩れ、筋変性が生じる可能性が示唆されている。しかし、20 数種類ある MMP のうち、どの MMP が特異的に  $\beta$ -DG のプロセッシングに関与しているかは明らかにされていない。我々は、筋ジストロフィーのモデルマウスにおいて発現量が多い MMP 遺伝子を見出し、その MMP 遺伝子が  $\beta$ -DG のプロセッシングに関与している可能性について検討した。

## 方法と結果

**DNA array による遺伝子発現プロファイル解析:** 我々が作製したヒト caveolin-3 遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウス (Tg), mdx マウス, 野生型マウスについて DNA array を用いた遺伝子発現プロファイル解析を行い、これらの筋ジストロフィーモデルマウスにおいて遺伝子発現が上昇している MMP 遺伝子を検索した。その結果、Tg マウス, mdx マウスにおいて membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) 遺伝子の発現が上昇していた。

**MMP 遺伝子発現の解析:** モデルマウスにおいて発現が上昇していた MT1-MMP 遺伝子について Tg マウス, mdx マウス,  $\beta$  および  $\gamma$  サルコグリカンノックアウトマウス ( $\beta$  SGK/O,  $\gamma$  SGK/O), 野生型マウスの骨格筋における発現量をノザンプロット解析にて確認した。その結果、上記すべての筋ジストロフィーモデルマウスの骨格筋において MT1-MMP 遺伝子の発現量が野生型マウスに比べて増加していた (図 1)。

**$\beta$ -DG プロセッシング産物 ( $\beta$  DG30) の発現の解析:**  $\beta$ -DG は MMP によるプロセッシングを受けると、細胞外ドメインと C 末側 30kD の大きさのプロセッシング産物 ( $\beta$  DG30) に分解されることが報告されている。

上記 4 種類の筋ジストロフィーモデルマウスおよび野生型マウスの骨格筋から抽出した蛋白について、 $\beta$ -DG の C 末端を認識する抗体を用いてウエスタンブロット解析を行い  $\beta$  DG30 の発現を検討した。また見出した MMP 遺伝子を DG 複合体が発現している COS 7 細胞に導入し、その遺伝子の存在下で  $\beta$  DG30 が増加するかどうかをウエスタンブロット解析にて検討した。その結果

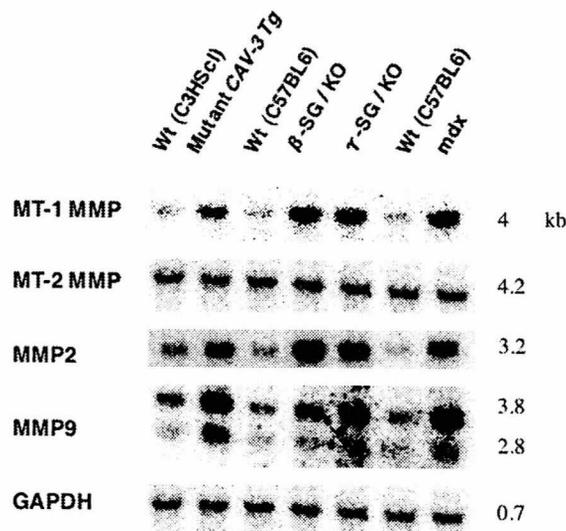


図 1 caveolin-3Tg マウス,  $\beta$  および  $\gamma$  サルコグリカンノックアウトマウス ( $\beta$  SGK/O,  $\gamma$  SGK/O), 野生型マウス, mdx マウスの骨格筋における MMP のノザンプロット解析。各レーン 10 $\mu$ g total RNA をアプライした。

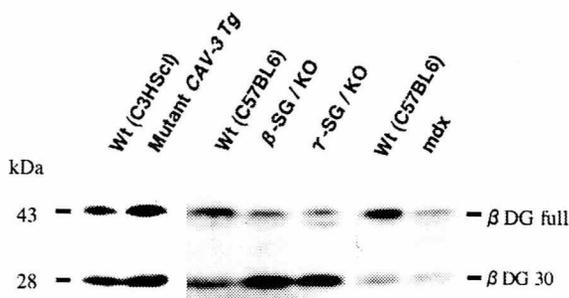


図 2 caveolin-3Tg マウス,  $\beta$  および  $\gamma$  サルコグリカンノックアウトマウス ( $\beta$  SGK/O,  $\gamma$  SGK/O), 野生型マウス, mdx マウスの骨格筋における  $\beta$ -DG プロセッシング産物 ( $\beta$  DG30) のウエスタンブロット解析。上のバンドは分解されない  $\beta$ -DG, 下のバンドは  $\beta$  DG30 を示す。

\* 川崎医科大学神経内科  
\*\* 岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所  
\*\*\* 神戸大学大学院医学系研究科  
\*\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

$\beta$  DG30 の発現量はサルコグリカンノックアウトマウス ( $\beta$ SGK/O,  $\gamma$ SGK/O) においてのみ野生型に比べ増加していた (図2)。さらにヒト MT1-MMP 遺伝子を COS 7 細胞に導入すると、発現ベクターのみを導入した時と比べて、 $\beta$  DG30 の発現量は増加していた。

#### 考 察

LGMDIC のモデルマウスである変異 caveolin-3Tg マウス骨格筋において発現が亢進していた MT1-MMP 遺伝子は、検討した筋ジストロフィーモデルマウスすべてで同様に発現が上昇していた。MT1-MMP を COS 細胞に発現させると、 $\beta$  DG30 の生成が有意に増加したことから、MT1-MMP 遺伝子が  $\beta$  DG のプロセッシングに関与することが示唆された。MT1-MMP 遺伝子はサルコグリカノパチーだけでなく、他のタイプの筋ジストロフィーモデルマウス骨格筋においても、発現が上昇していたが、 $\beta$  DG30 の生成はサルコグリカンノックアウトマウス ( $\beta$ SGK/O,  $\gamma$ SGK/O) のみで増加していた。このことから MMP による  $\beta$  DG のプロセッシングはサルコグリカン欠損状態で促進されることが示唆され、正常筋ではサルコグリカンの存在が MMP による  $\beta$  DG のプロセッシングを阻止している可能性が考えられた。

#### 研究の意義

筋ジストロフィー発症機構において、 $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖異常によるラミニン結合能の喪失と細胞外マトリックスと細胞骨格の架橋構造の脆弱性が問題になっている。サルコグリカノパチーにおいてはマトリックスメタロプロテアーゼによる  $\beta$ -dystroglycan ( $\beta$  DG) の切断が、この架橋構造の破綻をもたらすことが提唱されている。我々は 20 種以上存在する MMP のうち、MT1-MMP が  $\beta$  DG のプロセッシングに関与し、今回検討した筋ジ

ストロフィーモデルマウスすべてにおいてその発現が上昇していることを示した。次にこれを培養細胞に導入すると  $\beta$  DG のプロセッシングが増加することを見いだした。さらに生体内ではサルコグリカン欠損筋でのみ、 $\beta$  DG のプロセッシングが亢進していることを明らかにした。このことから正常なサルコグリカン複合体の存在はこのプロセッシングを阻止する可能性が示唆され、筋ジストロフィーの発症のメカニズムを知る上で重要な意義をもつと考える。

#### 文 献

- 1) Ohsawa Y, Toko H, Katsura M, Morimoto K, Yamada H, Ichikawa Y, Murakami T, Ohkuma S, Komuro I, Sunada Y. Overexpression of P104L mutant caveolin-3 in mice develops hypertrophic cardiomyopathy with enhanced contractility association with endothelial oxide synthase activity. *Hum Mol Genet* 13 (2) : 151-7, 2004.
- 2) Ohsawa Y, Toko H, Katsura M, Morimoto K, Yamada H, Ichikawa Y, Murakami T, Ohkuma S, Komuro I, Sunada Y. Non-transcriptional activation of nitric oxide synthase induces hypertrophic cardiomyopathy with enhanced contractility in the P104L mutant Caveolin-3 transgenic mice. *Neuromusc Disord* 13 (7-8) 622-3, 2003 (8th International Congress of the World Muscle Society)
- 3) 砂田芳秀, 市川弥生子, 大澤裕, 萩原宏毅, 村上龍文, 笹岡俊邦, 新石健二, 今村道博. 筋ジストロフィーモデルマウスにおけるマトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子発現の検討. 平成 15 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」清水班班会議 東京 12 月 5 日, 2003.

# 変異caveolin-3トランスジェニックマウスにおける肥大型心筋症の発現

砂田 芳秀\*

研究協力者 大澤 裕\* 東口 治弘\*\* 桂 昌司\*\*\*  
村上 龍文\* 大熊 誠太郎\*\*\* 小室 一成\*\*

## 目 的

caveolin-3 は骨格筋と心筋に特異的に発現している caveolae 構成蛋白質 caveolin の isoform で、骨格筋では nNOS、心筋では、eNOS と結合しその活性を強力に阻害することが知られている。caveolin-3 遺伝子変異による常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー1C(LGMD1C)のモデルとして、我々は、muscle creatine kinase promotor 調節下に P104L ミスセンス変異 Caveolin-3 過剰発現トランスジェニック(Tg)マウスを作成した<sup>1)</sup>。このマウスの骨格筋では、著明な筋萎縮を特徴とするミオパチーを呈し、caveolin-3 の著明な減少と、骨格筋 nNOS 活性の亢進が認められた。一方、心筋の肥大シグナル<sup>2)</sup>及び心筋収縮のメカニズム<sup>3)</sup>において、各 NOS アイソフォーム(eNOS, nNOS, iNOS)が極めて重要な役割を果たしていることが、最近次々と明らかとなってきた。我々は caveolin-3 遺伝子変異が、心筋においても NOS アイソフォームの活性に変化をおこし、その形態および機能に影響を与えると考え、変異 caveolin-3 Tg マウスの心筋に関して病理形態解析、生理機能解析、NOS 活性をふくめた生化学的解析を行った。

## 方法と結果

**病理形態解析:** 野生型マウスと比較すると、変異 caveolin-3 Tg マウスでは、4 週、12 週、24 週、36 週齢における心重量の増加を認め、心臓重量/体重比は、有意に増加していた(図 1)。心臓横断面では左室壁と心室中隔の肥厚が著明で、左室内腔は狭小化し(図 2A)、心筋線維径は有意に増大していた(図 2B)、心肥大マーカー遺伝子 ANP、BNP の upregulation が認められた。

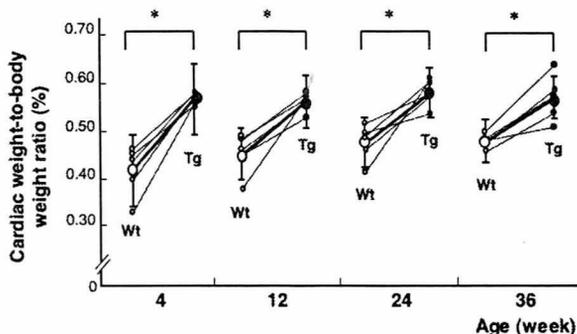


図 1 野生型 Wt (○), および Tg (●) の心重量・体重比  
\* $P < 0.05$  (Weich's t-test)

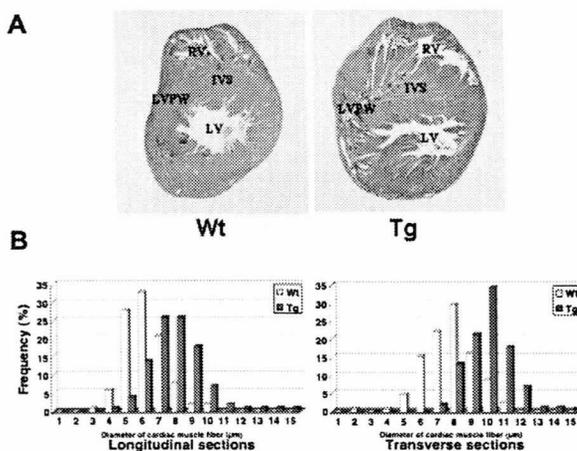


図 2 6 週齢 Wt, Tg マウスの心横断面 (A), 心筋線維径ヒストグラム (B)

表 1 24 週齢マウスの経胸壁心エコー検査

Group	Interventricular septal thickness (mm)	Left ventricular posterior wall thickness (mm)	Left ventricular end diastolic diameter (mm)	Left ventricular end systolic diameter (mm)	Left ventricular fractional shortening (mm)
Wt	0.83 ± 0.11	0.78 ± 0.08	3.94 ± 0.28	2.14 ± 0.23	45.60 ± 4.00
Tg	1.04 ± 0.12*	1.07 ± 0.11*	3.00 ± 0.30*	1.15 ± 0.18*	61.20 ± 4.70*

\* $p < 0.01$ . Wt(n=7); Tg(n=7)

\* 川崎医科大学神経内科学  
\*\* 千葉大学大学院循環病態医学科  
\*\*\* 川崎医科大学薬理学

## 考 察

生理機能解析：経胸壁心エコーによる心機能解析では、心筋壁の肥厚、心筋拡張不全が認められ、心筋収縮力亢進を伴う肥大型心筋症と考えられた（表 1）。

生化学的解析：心筋組織の caveolin-3 mRNA は著増していたが（図 3A）、蛋白は著減し（図 3B）、一部、細胞質に mislocalization していた（図 3C）。Northern blot 解析、Immunoblot 解析では心筋組織の各 NOS アイソフォームの発現に差はなく、eNOS の組織染色でも蛋白発現に著変は認められなかった。新鮮心筋組織の nNOS および iNOS 活性も野生型と差は認められなかったが、eNOS 活性は中等度亢進していた（図 4）。

変異 caveolin-3 Tg マウスでは、心筋収縮力亢進を伴う肥大型心筋症が発症し、心筋では、caveolin-3 蛋白の著明な減少と、caveolin-3 結合蛋白質である eNOS の中等度活性亢進が認められた。骨格筋では caveolin-3 欠損により nNOS 活性が亢進し、顕著な萎縮を認めるが、これとは対照的に心筋においては eNOS 活性亢進が、心筋肥大シグナルに関与している可能性が示唆された。我々の報告とほぼ同時に、caveolin-3 遺伝子変異によるヒトの肥大型心筋症が報告されており<sup>4)</sup>、肥大型心筋症は、caveolinopathy の新たな表現型として注目される。

## 文 献

- 1) Sunada Y, Ohi H, Hase A, Ohi H, Hosono T, Arata S, Shigesada H, Matsumura K, Shimizu T. Transgenic mice overexpressing mutant caveolin-3 show severe myopathy associated with increased nNOS activity. *Hum Mol Genet* 10(3):173-178,2001
- 2) Barouch LA, Harrison RW, Skaf M et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416:337-341, 2002
- 3) Vila-Petroff MG, Kim SH, Pepe S et al. Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol* 3:867-873,2001
- 4) Ohsawa Y, Toko H, Katsura M, Morimoto K, Yamada H, Ichikawa Y, Murakami T, Ohkuma S, Komuro I, and Sunada Y. Overexpression of P104L mutant caveolin-3 in mice develops hypertrophic cardiomyopathy with enhanced contractility in association with increased endothelial nitric oxide synthase activity. *Hum Mol Genet* 13(2):151-157,2004
- 5) Hayashi T, Arimura T, Ueda K et al. Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *BBRC* 313:178-184,2004

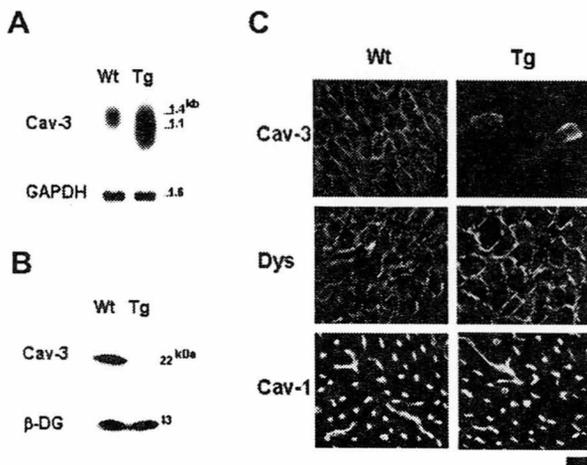


図 3 6 週齢 Wt, Tg マウス心筋組織の caveolin-3 のノザンブロット解析 (A)、ウエスタンブロット解析 (B)、免疫組織染色 (C)

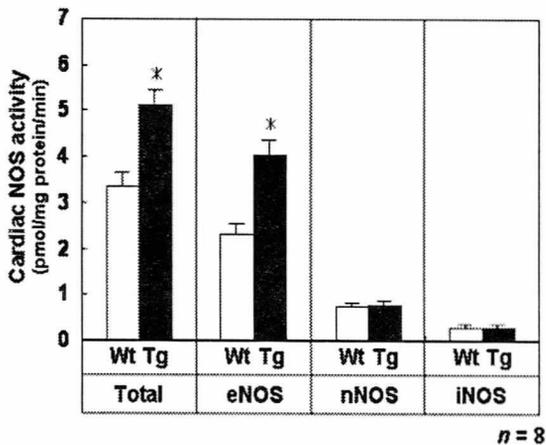


図 4 6 週齢 Wt, Tg マウス心筋組織の L-[<sup>3</sup>H]アルギニン- L-[<sup>3</sup>H]シトルリン変換法による NOS 活性測定  
\*P < 0.05 (Weich's t-test)

# Myostatin prodomain による変異 caveolin-3 トランスジェニック マウス表現型の改善

砂田 芳秀\*

研究協力者 大澤 裕\* 萩原 宏毅\* 土田 邦博\*\* 野地 澄晴\*\*\*  
武田 伸一\*\*\*\* 篠野 静香\* 森 弥生\* 村上 龍文\*

## はじめに

変異 caveolin-3 トランスジェニック (Tg) マウスは、我々が作出した常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー LGMD1C のモデルマウスで、骨格筋 caveolin-3 の著減と、著明な筋萎縮を特徴とするミオパチーを表現型としている<sup>1)</sup>。一方、myostatin は、骨格筋特異的 Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily であり、その機能抑制により、筋線維の数とサイズの増加による骨格筋量の著増を来すことから、骨格筋量の negative regulator と考えられている<sup>2)</sup>。最近 Caveolin-1 が TGF- $\beta$ 1 の細胞膜受容体に結合しその下流のシグナルを強力に抑制することが報告され<sup>3)</sup>、caveolin と、TGF- $\beta$  superfamily の signal crosstalk が注目されている<sup>3,4,5)</sup>。

## 目的

変異 caveolin-3 トランスジェニック (Tg) マウスの筋萎縮に至る病態機序のひとつとして、caveolin-3 欠損によって、TGF- $\beta$  superfamily である myostatin シグナルの脱抑制が引き起こされるのではないかと考えた。この仮説の検証のため、変異 caveolin-3 Tg マウスのミオパチーが、myostatin の生理的活性阻害蛋白質<sup>6)</sup>である myostatin prodomain により改善するか否か検討した。

## 方法と結果

myostatin prodomain を過剰発現させた Tg マウスと変異 caveolin-3 Tg マウスを交配して、二重トランスジェニック (double Tg) マウスを作出し、その表現型、生化学的及び生理学的機能を解析した。

交配により誕生した、double Tg と、変異 caveolin-3 Tg、myostatin prodomain Tg、野生型の計 4 種類のマウスについて検討した。double Tg では、変異 caveolin-3 Tg で認められた筋萎縮が、ほぼ野生型まで改善していた (図 1)。体重は、8 週齢から、ほぼ野生型のレベルまで回復していた (図 2)。次いで、この double Tg に認められた骨格筋量回復の原因について、それぞれのマウスの下腿筋線維数及び筋線維断面積から比較検討した。平均筋線維数

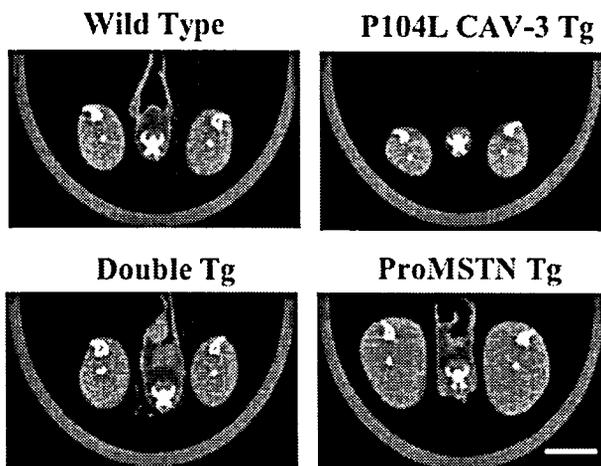


図 1 交配により誕生した 4 種類のマウスの下腿中央部横断 CT 所見、10 週齢 Bar=5 mm

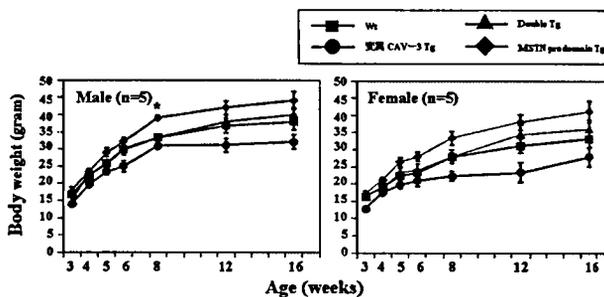


図 2 体重増加曲線

(n=4) は、野生型 (TA 1685, EDL 717) 変異 caveolin-3 Tg (1226, 458), double Tg (2286, 1485), myostatin prodomain Tg (3340, 1692) であった。TA 筋線維断面積 (n=4: 各 1000 本) の検討では、変異 caveolin-3 Tg では、筋線維ヒストグラムの左方偏倚が認められたが、double Tg では回復していた (図 3)。TA 平均筋線維断面積は、野生型 ( $1610 \mu^2$ ) 変異 caveolin-3 Tg ( $1092.8 \mu^2$ ), double Tg ( $1586.3 \mu^2$ ), myostatin prodomain Tg ( $1649.1 \mu^2$ ) であった。従って double Tg では、著明な筋線維数の増加 (hyperplasia) が主体となり、軽度の筋線維サイズの増加 (hypertrophy) を伴い、骨格筋量が回復することが明らかとなった。また変異 caveolin-3 Tg の筋萎縮には、筋線維数の減少 (hypoplasia) と、筋線維サイズの減少 (hypotrophy) の双方が関与することも示された。double Tg 骨格筋では、caveolin-3 蛋白

\* 川崎医科大学神経内科学  
\*\* 徳島大学分子酵素研究センター  
\*\*\* 徳島大学工学部  
\*\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

の著明な減少と myostatin prodomain 蛋白の過剰発現が確

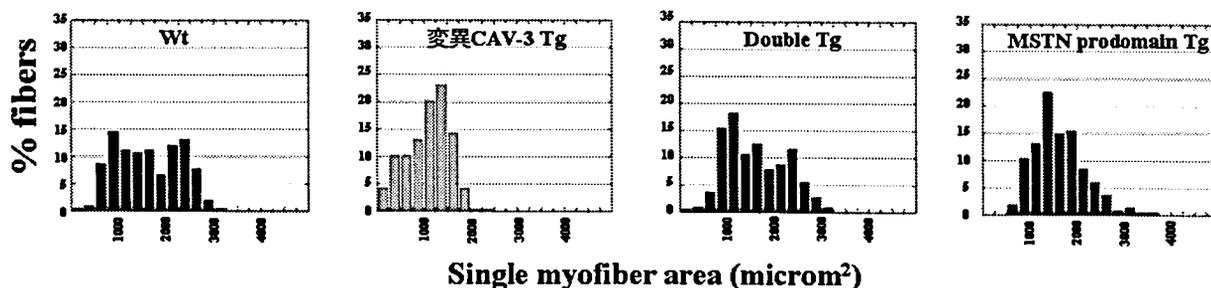


図3 10週齢マウスの前脛骨筋(TA)の単筋線維断面面積ヒストグラム n=4, 各1000本

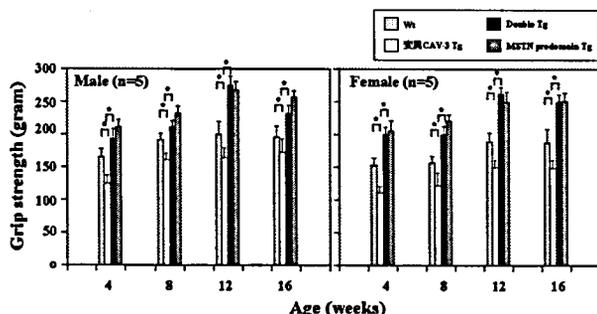


図4 マウスの握力検査 \* Bonferroni's test after 1-way ANOVA, P<0.05

認された。機能的には, double Tg では, 生後4週齢から, 握力は野生型を上回るまで著明に改善し(図4), トレッドミル運動検査上, 走力も完全に回復していた。

#### 考 察

交配により導入した myostatin prodomain による myostatin 活性阻害により, caveolin-3 欠損マウスの筋萎縮および筋力低下はほぼ正常に回復した。今回の検討で変異 caveolin-3 Tg マウスにおける筋萎縮には筋線維の萎縮だけではなく筋線維数の減少(hypoplasia)も関与することを明らかにした。さらに骨格筋発生の早期から Myostatin を阻害すると, 筋線維数が増加(kyperplasia)するという興味深い知見も得られた。この結果から myostatin 阻害は caveolin-3 欠損による筋萎縮には有効な治療法であることが示された。今後, caveolin-3 と myostatin シグナル伝達系との関連をより下流の smad リン酸化経路の解析によりに検討するとともに, myostatin prodomain 投与による筋ジストロフィー治療法の開発を目指したい。

#### 文 献

- 1) Sunada Y, Ohi H, Hase A, Ohi H, Hosono T, Arata S, Shigesada H, Matsumura K, Shimizu T: Transgenic mice overexpressing mutant caveolin-3 show severe myopathy associated with increased nNOS activity. *Hum Mol Genet* 10(3):173-178, 2001.
- 2) McPherron AC, Lowler AM, Lee S-J: Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* 387: 83-90, 1997.
- 3) Razani B, Zhang L, Bitzer M, Gerdorff G, Boettinger EP, Lisanti MP: Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)- $\beta$ /SMAD signaling through an interaction with the TGF- $\beta$  type I receptor. *JBC* 276:6729-6738, 2001.
- 4) Nohe A, Keating E, Loh C, Underhill MT, Petersen NO: Caveolin-1 isoform recognition studied by image correlation spectroscopy. *Faraday Discuss* 126:185-195, 2004.
- 5) Di Guglielmo GM, Roy CL, Goodfello AF, Wrana JL.: Distinct endocytic pathway regulate TGF- $\beta$  receptor signaling and turnover. *Nat Cell Biol*: 410-420, 2003.
- 6) Thies RS, Chen T, Davies MV et al.: GDF-8 propeptide binds and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* 18: 251-259, 2001.

# 筋ジストロフィーの分子発病機序としてのmatrix metalloproteinaseによるdystroglycan複合体の崩壊に関する研究

清水 輝夫\*

研究協力者 松村 喜一郎\* 鐘 鏞\* 新井 謙\*  
大井 博子\* 西野 一三\*\* 斉藤 史明\*

## 目 的

dystroglycan 複合体は様々な細胞の表面膜に発現し発生の初期には基底膜形成の中核となりその後は基底膜と細胞内骨格をつなぎとめる強固な架橋構造として維持される。これを別の角度から見ると生理的状态としての細胞の発生・分化、ならびに病的状態としての癌細胞の転移・浸潤などの過程にはこの架橋構造を特異的にしかも効率良く破壊するメカニズムが存在するはずである。このようなメカニズムとして我々は $\beta$ dystroglycanの細胞外ドメインを特異的に分解するmatrix metalloproteinase活性を報告して来た。このMMP活性は筋ジストロフィーの分子発病機序においてどのような役割を果たしているのだろうか？我々はsarcoglycan欠損症ではdystroglycan複合体が崩壊し $\alpha$ dystroglycanと $\beta$ dystroglycanが分離しているという事実に注目し、まずsarcoglycan欠損症のモデル動物であるBIO-14.6ならびにTO-2心筋症ハムスターの筋変性にこのMMP活性がこの現象に関与しているか解析した。次にsarcoglycan欠損症、Duchenne型筋ジストロフィー、福山型先天性筋ジストロフィー、炎症性筋疾患など各種の筋疾患の生検筋を同様に解析した。

## 方 法

- (1) sarcoglycan欠損症のモデル動物であるBIO-14.6ならびにTO-2心筋症ハムスターの各種臓器を $\beta$ dystroglycanのカルボキシル末端を認識する抗体を用いたイムノプロット法で解析した
- (2) BIO-14.6ならびにTO-2心筋症ハムスターならびに正常ハムスターの筋の抽出成分をwheat germ agglutinin (WGA) affinity column chromatography にかけてdystroglycan複合体の組成、安定性を解析した。なお正常対照としてF1Bハムスターを用いた。
- (3) sarcoglycan欠損症、Duchenne型筋ジストロフィー、福山型先天性筋ジストロフィー、炎症性筋疾患など各種筋疾患の生検筋を $\beta$ dystroglycanのカルボキシル末端を認識する抗体を用いたイムノプロット法で解析した。

## 結 果

- (1) MMPによる $\beta$ dystroglycan細胞外ドメインの分解はBIO-14.6ならびにTO-2心筋症ハムスターの骨格筋、心筋、平滑筋で特異的に亢進していた。一方、脳では認めなかった。
- (2) 正常ハムスター、BIO-14.6ならびにTO-2心筋症ハムスターすべてにおいて、骨格筋、心筋抽出成分中の $\alpha$ dystroglycan,  $\beta$ dystroglycan, laminin  $\alpha$ 2 鎖はすべてWGA columnに完全に吸着された。しかしBIO-14.6ならびにTO-2心筋症ハムスターで認める $\beta$ dystroglycanのMMP分解産物は全く吸着しなかった。つまりmatrix metalloproteinaseによる $\beta$ dystroglycan細胞外ドメインの分解によって心筋症ハムスター筋ではdystroglycan複合体が一部崩壊していた。
- (3) MMPによる $\beta$ dystroglycan細胞外ドメインの分解はsarcoglycan欠損症とDuchenne型筋ジストロフィーで著明に亢進していたが、その他の疾患では正常と差を認めなかった。

## 考 察

我々はこれまでに $\beta$ dystroglycanの細胞外ドメインを特異的に分解するmatrix metalloproteinase活性について研究して来た。本研究で我々は心筋症ハムスターの骨格筋と心筋ではこのmatrix metalloproteinaseによってdystroglycan複合体が崩壊し細胞膜と基底膜の間の架橋が破綻することを明らかにした。ヒトsarcoglycan欠損症でも心筋症ハムスターと同様にmatrix metalloproteinaseによる $\beta$ dystroglycan細胞外ドメインの分解が亢進していた。またdystrophinの一次的な欠損のために二次的にsarcoglycanを欠損するDuchenne型筋ジストロフィーでも同様の現象を認めた。これらの結果は一次的、二次的を問わずsarcoglycanを欠損する筋ではこのmatrix metalloproteinase活性が亢進し、その結果として起こるdystroglycan複合体の崩壊が筋細胞変性に関与していることを示唆した。

## 研究の意義

sarcoglycan欠損症とDuchenne型筋ジストロフィーでは $\beta$ dystroglycanの細胞外ドメインを分解するmatrix metallo-

\* 帝京大学医学部神経内科

\*\* 国立精神神経センター神経研究所

proteinase によって筋変性が進行する可能性を示した。これはこの matrix metalloproteinase 活性を阻害する薬物がこれらの疾患の治療法として有用である可能性を示唆している。今後、これらの疾患の動物モデルへの投薬実験を行い、その実用性を検討して行きたい。

## 文 献

- 1) Matsumura, K., et al. FEBS Lett. 334:281-285, 1993.
- 2) Yamada, H., et al. FEBS Lett. 352:49-53, 1994.
- 3) Yamada, H., et al. J. Neurochem. 66:1518-1524, 1996.
- 4) Yamada, H., et al. J. Biol. Chem. 271:23418-23423, 1996.
- 5) Chiba, A., et al. J. Biol. Chem. 272:2156-2162, 1997.
- 6) Matsumura, K., et al. J. Biol. Chem. 272:13904-13910, 1997.
- 7) Matsumura, K., et al. Histol. Histopathol. 12:195-203, 1997.
- 8) Matsumura, K., et al. Neuromusc. Disord. 7:7-12, 1997.
- 9) Saito, F., et al. J. Biol. Chem. 272:26708-26713, 1997.
- 10) Sasaki, T., et al. Biochim. Biophys. Acta 1425:599-606, 1998.
- 11) Saito, F., et al. J. Biol. Chem. 1999;274:8240-8246.
- 12) Shimoji, Y., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:9857-9862, 1999.
- 13) Matsumura, K., et al. Cell. Molec. Biol. 45:751-762, 1999.
- 14) Masaki, T., et al. Acta Neuropathol. 99:289-295, 2000.
- 15) Claudepierre, T., et al. J. Cell Sci. 113:3409-3417, 2000.
- 16) Masaki, T., et al. Acta Neuropathol. 2001;101:174-178.
- 17) Yamada, H., et al. Hum. Molec. Genet. 10:1563-1569, 2001.
- 18) Masaki, T., et al. Exp. Neurol. 174:109-117, 2002.
- 19) Matsumura, K., et al. Current Topics in Neurochemistry 3:131-140, 2002.
- 20) Matsumura, K., et al. Neuromusc. Disord. 213:796-803, 2001
- 21) Matsumura, K., et al. Basic and Applied Myology 13:299-304, 2003.

# 遺伝子二重変異筋ジストロフィーマウスの作成と解析による病態の解明

萩原 康子\*

研究協力者 笹岡 俊邦\*\* 今村 道博\*\*\* 藤田 雅子\*\*\*\*  
野口 悟\*\*\*\* 依藤 宏\*\*\*\*\*

## 目 的

カベオリン-3 (Cav3) 遺伝子異常による筋ジストロフィーは、Minetti らによって報告された肢帯型筋ジストロフィー(LGMD1C)<sup>1)</sup>をはじめ、異なる筋疾患でも報告されてきている。われわれは、Cav3 ノックアウト(Cav3 KO)マウスを作成し、このマウスが軽度の筋ジストロフィー phenotype を示すことを報告した<sup>2)</sup>。また、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から、Cav3 KO マウス骨格筋では野生型(wt)マウス骨格筋に比べてオステオポンチン(OPN)遺伝子発現が低下していることを見出した。DMD および mdx マウスの骨格筋では、高い OPN 遺伝子発現が報告されている<sup>3, 4)</sup>が、その理由はまだ十分に解析されていない。本研究では、Cav3 とジストロフィンの遺伝子二重変異筋ジストロフィー (double mutant) マウスを用いて解析し、OPN 遺伝子発現への Cav3 遺伝子発現の効果をより明瞭にすることを試みた。

## 方法と結果

mdx マウスと Cav3 KO マウスを 3-4 世代交配することにより、double mutant マウスを作成した。Cav3 およびジストロフィンの遺伝子変異は、PCR 法により同定した。double mutant マウス骨格筋の H&E 染色像では、2.5 週齢でわずかに浸潤細胞が観察され、壊死・再生像が 1 ヶ月齢で観察されたが、mdx マウス骨格筋での病理像と比較して特別な差はみられなかった。さらに、マウス腹腔内に PBS で稀釈したエバンスブルー色素(EBD)を注入して骨格筋線維への EBD の取込みを凍結切片標本で観察した結果においても、double mutant マウスと mdx マウス間の特別な差はみられなかった。

6 週齢の Cav3 KO マウス骨格筋から単離した RNA を用いて、CodeLink オリゴマイクロアレイで約 8,000 種類の遺伝子の発現プロファイル解析を行った(図 1)。Cav3 KO マウスで wt マウスの 2 倍以上に発現が上昇していた遺伝子は約 200 種類、1/2 以下に発現が減少していた遺伝子は約 60 種類あった。Cav3 遺伝子は激減していた

が、カベオリン-1, 2 は wt との差がなく、また NOS 遺伝子の発現も n, e, i の 3 種類共に wt との発現に差がみられなかった。OPN 遺伝子発現がノックアウトした Cav3 遺伝子と同程度に減少していた。2 週、1, 3, 6 および 8 ヶ月齢の double mutant, mdx, Cav3 KO および wt マウスの前脛骨筋から RNA を単離して、OPN 遺伝子発現を SYBR Green を用いたリアルタイム RT-PCR で測定し比較した(図 2)。内部コントロールの G3PDH mRNA 量で補正した OPN mRNA 量は、mdx マウスでは報告されているように wt より高かった<sup>4)</sup>。しかし、Cav3 遺伝子発現が (-) であることは、OPN mRNA 量を低下させる効果があった。即ち、double mutant マウスでは mdx マウスの半分以下であり、Cav3 KO マウスでは wt マウスより減少していた。月齢を追った解析では、mdx マウスでは殆ど筋変性のない 2 週齢でも既に wt の約 3 倍であり、筋変性の盛んな 1 ヶ月齢では約 55 倍であった。3, 6, 8 ヶ月齢と低下するが、8 ヶ月齢でも wt の約 30 倍の高値であった。一方、double mutant マウスでは調べた月齢間でそれ程大きな変化は見られずに、1 ヶ月齢でも wt と比べた値は約 8 倍で、mdx マウスの約 1/7 の値であった。OPN 抗体を用いた免疫組織染色像では、浸潤したマクロファージの周辺が濃く染まり筋線維は殆ど染まらなかったが、マクロファージが入込んだ筋線維は弱く染色された。一方、Cav3 抗体では、マクロファージは染まらなかった。

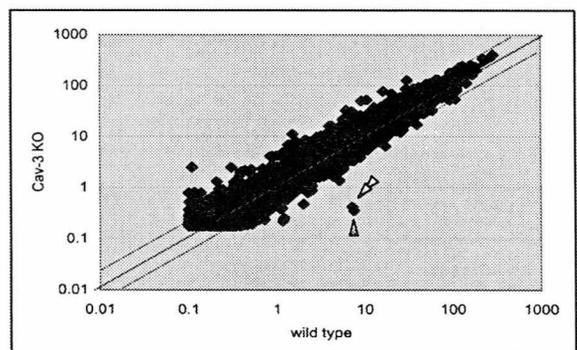


図 1 マウス骨格筋の遺伝子発現プロファイル

Cav3 遺伝子変異ホモマウスを縦軸に、野生型マウスを横軸にとり、解析した約 8,000 種類遺伝子についての発現プロファイルの結果をスカッタープロットした。カベオリン-3 遺伝子変異ホモマウスにおいて、野生型マウスの 2 倍以上に発現が上昇していた遺伝子(上の線より上の部分)が約 200 種類、1/2 以下に減少していた遺伝子(下の線より下の部分)が約 60 種類あった。矢印はカベオリン-3 遺伝子、二重矢印はオステオポンチン遺伝子。

\* 国立精神・神経センター神経研究所モデル動物開発部  
\*\* 自然科学研究機構基礎生物学研究所神経生化学研究室  
\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部  
\*\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部  
\*\*\*\*\* 群馬大学大学院医学系研究科器官機能構築学

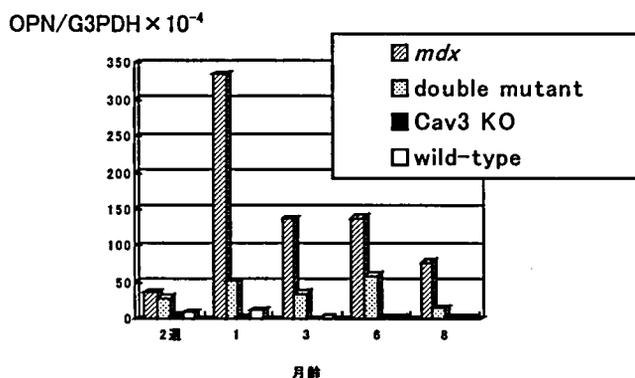


図2 マウス骨格筋におけるオステオポンチン遺伝子発現  
2週齢および1, 3, 6, 8ヶ月齢マウス前脛骨格の mRNA から合成した cDNA を用いて、オステオポンチン遺伝子に対するリアルタイム PCR を行った。内部コントロール G3PDH 遺伝子の発現量に対するオステオポンチン遺伝子の相対発現量を縦軸にとり表記した。mdx マウスおよび遺伝子二重変異マウスでは野生型よりオステオポンチン遺伝子の発現量が高かった。

### 考 察

Cav3 遺伝子発現を(-)にすることによって OPNmRNA の発現が低く保たれた。Cav3 は骨格筋に特異的でありマクロファージには発現していない。一方、OPN タンパク質はマクロファージで発現しているが筋線維には殆ど発現していない。このことから、OPNmRNA 発現に関してのマクロファージと筋線維との相互作用の存在が示唆された。これがどのような機構で行われるかは不明である。

OPNmRNA 発現量は、mdx マウスでは筋変性・壊死の盛んな時期と並行して、マクロファージの浸潤によると考えられる。しかしながら、double mutant マウスでは、マクロファージが多く浸潤して変性の盛んな1ヶ月齢でも OPNmRNA 量が mdx マウスより低く抑えられていたので、おそらくこの時期は Cav3 遺伝子発現が(-)であることの効果がより強く作用していると思われる。

### 今後の展望

筋ジストロフィーにおける OPN 遺伝子発現の上昇は明らかであるが、その意味付けはまだ解明されていない。OPN 遺伝子発現への Cav3 の役割をさらに明らかにすることは、筋ジストロフィー病態解明および治療法開発への手掛かりになると思われる。

### 参考文献

- 1) Minetti C, Sotgia F, Bruno C et al, Nat Genet 18: 365-368, 1998
- 2) Hagiwara Y, Sasaoka T, Araishi K et al, Hum Mol Genet 9: 3047-3054, 2000
- 3) Haslett JN, Sanoudou D, Kho AT et al, Proc Natl Acad Sci USA, 99: 15000-15005, 2002
- 4) Porter JD, Sangeeta K, Kaminski HJ et al, Hum Mol Genet 11: 263-272, 2002

# Calpain 3 の筋線維内局在

西野 一三\*

研究協力者 計良陽子\* 野口 悟\* 南 成祐\* 林 由起子\*

## 緒 言

骨格筋型カルパイン Calpain 3 は、肢帯型筋ジストロフィー(LGMD) 2A 型の原因遺伝子産物である。反町らによる Yeast 2-hybrid での解析から、Calpain 3 がタイチン(コネクチン)に結合して筋原線維上に局在していることが予想されている。しかし、Calpain 3 が激しい自己分解活性を有するため、これまで骨格筋試料上での局在に関する直接的な証明はなされて来なかった。この問題を解決すべく、今回、我々は新たに Calpain 3 に対するポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用い、正常及び LGMD2A 筋における Calpain 3 の局在を検討した。

## 方 法

Calpain 3 の特異的な配列である N 末 100 残基と GST を融合させた組み換え蛋白質を大腸菌に発現させた後精製し、抗原としてウサギに免疫した。免疫染色にはヒト凍結骨格筋及びグリセリン筋、ウエスタンブロットにはヒト及びマウス凍結骨格筋を用いた。ヒト骨格筋検体は、国立精神・神経センター倫理委員会で承認された承諾書を用いて、検体の研究使用に対するインフォームドコンセントを得ているものを使用した。

## 結果と考察

ヒト正常骨格筋の免疫染色では、筋細胞核とともに、筋原線維がユニークな二重線パターンで染色された。マーカー抗体 ( $\alpha$ -アクチニン、タイチン T11) との二重共焦点染色では、 $\alpha$ -アクチニンの両側に、またタイチン T11 よりも Z-line 側に Calpain 3 のシグナルを認めたことから、Calpain 3 はタイチン分子の N2 領域に存在することが確認された。この結果は Yeast 2-hybrid のデータを

初めて組織学的に確認するものである。一方、M-line 上に Calpain 3 のシグナルは観察されなかった。筋線維タイプによる発現量の違いは認められなかった。

筋細胞核への局在を確認するために、さらに、筋細胞核画分を精製してウエスタンブロットを行った。その結果、確かに核画分に Calpain 3 が存在することを確認した。

LGMD2A 患者筋を用いた解析では、ウエスタンブロットで Calpain 3 が一部検出される患者と完全に欠損している患者が見い出された。Calpain 3 が一部残存している患者筋では、Calpain 3 は核及び N2 領域ともに局在していたが、サルコメアの染色パターンは不規則であった。このことは、Calpain 3 が核及び N2 領域に局在するだけでなく、その部位で正常な機能を有していないと筋ジストロフィーを発症してしまうことを示している。また、Calpain 3 が検出できなかった患者筋では、筋原線維は染色されないのに対し、核には弱い染色が見られた。この抗体を用いることによって calpain 3 の変異による局在の差異を検出できる可能性が示唆された。

## 結 論

独自に作製した抗 Calpain 3 抗体により Calpain 3 が N2 領域と核内に存在することを、はじめて組織学的に確認した。

## 参 考 文 献

- 1) Baghdiguian, S., et al.: Nat. Med. 5: 503-511, 1999.
- 2) Sorimachi, H., et al.: J. Biol. Chem. 270:31158-31162, 1995.
- 3) Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougerousse, F., Chiannikulchai, N., et al.: Cell 8:27-40, 1995.
- 4) Anderson, LV., et al.: Am J Pathol. 153(4):1169-79, 1998.

\* 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部

# 新しいサルコグリカン分子の組織発現と機能に関する研究

今村道博\*

研究協力者 西山章代\* 志賀和雄\* 吉岡弘樹\*  
遠藤剛\*\* 武田伸一\*

## 目 的

ジストロフィン結合タンパク質複合体の主要構成単位であるサルコグリカン複合体 (SGC) は $\alpha$ から $\delta$ までの4つのサルコグリカン分子 (SG) から構成されており、このうちいずれかに変異が起こると SGC 全体の消失を生じてサルコグリカノパチー (LGMD2C, 2D, 2E, 2F) となる。SGC の機能については、細胞膜の安定性を保つための機械的補強装置であるという理解がなされているが、他にも、情報伝達系の制御因子としての可能性が論じられている。これらは SGC が横紋筋特異的な構造であることを前提に議論されてきたが、近年になり第5 ( $\epsilon$ -SG)、第6 ( $\zeta$ -SG) の新しい SG メンバーが発見されてからは、SGC は横紋筋のみならず生体内の様々な領域で機能する可能性が示唆されている<sup>1-3)</sup>。我々はこれらの新しい SG の存在様式と機能について解析することが横紋筋型 SGC の機能を解明する上でも重要になると考えており、得られた結果をもとにサルコグリカノパチーの新しい治療法開発の可能性についても検討を行なっている。

このように、本研究はサルコグリカノパチーの治療法開発に結びつくような SG 分子の特性を探索するという目的の下に行なわれた。

## 方法と結果

中枢神経系における  $\epsilon$ -SG の発現と局在： $\epsilon$ -SG 遺伝子の変異が筋ジストロフィーではなくミオクロヌス-ジストニア症候群 (M-D) の原因となることから<sup>4)</sup>、 $\epsilon$ -SG は中枢神経系において重要な機能を担っているものと考えられる。我々はマウスの脳を材料とした RT-PCR により翻訳領域全長を含む  $\epsilon$ -SG cDNA をクローニングしたところ、オルタナティブスプライシングによりユニークな C 末端構造が付加された新しい  $\epsilon$ -SG 分子種 ( $\epsilon$ -SG2) を発見した<sup>5)</sup>。mRNA 及びタンパク質の両レベルの解析からは  $\epsilon$ -SG2 が脳特異的に発現していることが明らかになった。また、中枢神経系に於いては、既に報告されているもう一方の  $\epsilon$ -SG 分子種 ( $\epsilon$ -SG1) の発現も認められたが、免疫組織化学的解析からは両分子種が共に脳の神経細胞に広く分布していること、そして、生化学的膜分画法からは両者がシナプス関連構造に局在している

ことが示された。しかし、この分画を用いた解析からは  $\epsilon$ -SG が脳内で SGC を形成している証拠は得られなかった。

$\zeta$ -SG の複合体形成能と組織発現： $\zeta$ -SG は  $\delta$ -SG 及び  $\gamma$ -SG に高い相同性を有する分子として発見されたが<sup>3)</sup>、その存在様式と発現部位については明らかでない。我々は Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いた発現実験系により  $\zeta$ -SG の複合体形成における役割を解析すると共に、RT-PCR を用いた組織発現解析を行なった。CHO 細胞に  $\alpha$  から  $\zeta$  までの 6 種類の SG を発現させ、形質膜上に現れた SGC を単離してその構成分子を同定したところ、 $\zeta$ -SG と  $\gamma$ -SG は同一の複合体内には共存し得ないこと、すなわち、SGC 形成における両者の機能は同等であることが明らかになった。 $\zeta$ -SG の発現は横紋筋や平滑筋などの筋細胞よりも中枢神経系に多く認められるため、脳での機能が注目される。

## 考 察

SG 分子は複合体を形成して初めて安定化し、機能的であると考えられているが、脳においては  $\epsilon$ -SG 以外の SG タンパク質は検出されていない。これは  $\epsilon$ -SG が単独で存在するか、或いは SG 以外のタンパク質と相互作用をする可能性を示唆している。但し、ジストロフィンに加えてジストログリカン、ジストロプレビン、シントロフィンなど、SG 以外のジストロフィン結合タンパク質は脳に広く分布しているため、これらの分子との関連を解析する必要がある。さらに  $\zeta$ -SG が脳に発現していることが示されたため、これとの相互作用を検証しなければならない。しかしながら現時点ではタンパク質としての  $\zeta$ -SG 検出に困難があるため、より良い特異抗体の作成が課題となった。

SGC 形成では  $\zeta$ -SG が  $\gamma$ -SG と同等の機能を有することを示した。また、組織発現の解析からはこれが横紋筋でも微量ながら発現していることが示されている。このことは  $\gamma$ -SG を欠損しても内在性  $\zeta$ -SG の発現を増強させることが出来れば  $\gamma$ -SG の機能代償が行なわれる可能性を示唆していた。

## 今後の展望

SG は筋組織だけでなく中枢神経系においても重要な機能を果たしているものと考えられる。今後、M-D など、

\* 国立精神・神経センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部

\*\* 千葉大学大学院自然科学研究科

運動異常に関連した疾患の解析から SG の機能に関する新しい知見が得られる可能性がある。また、 $\zeta$ -SG は  $\gamma$ -SG の、 $\varepsilon$ -SG は  $\alpha$ -SG の代用分子として機能すると考えられるため、これらの発現制御の問題に取り組むことで LGMD2C, 2D の治療法への応用が期待される<sup>6)</sup>。

#### 文 献

- 1) Straub, V. *et al.*:  $\varepsilon$ -Sarcoglycan replaces  $\alpha$ -sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.*, 274 :27989-27996, 1999.
- 2) Imamura, M. *et al.*: A sarcoglycan-dystroglycan complex system, *Hum. Mol. Genet.*, 9:3091-3100, 2000.
- 3) Wheeler, M. *et al.*:  $\zeta$ -Sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.*, 11:2147-2154, 2002.
- 4) Zimprich, A. *et al.*: Mutations in the gene encoding  $\varepsilon$ -sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome, *Nat. Genet.*, 29: 66-69, 2001.
- 5) Nishiyama, A. *et al.*: Identification and characterization of  $\varepsilon$ -sarcoglycan in the central nervous system, *Mol. Brain Res.*, 125:1-12, 2004.
- 6) Imamura, M. *et al.*:  $\varepsilon$ -Sarcoglycan compensates for lack of  $\alpha$ -sarcoglycan in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.*, 14:775-783, 2005.

# サルコグリカン異常症：日本人における原因サブユニット， 遺伝子変異，及び免疫組織化学染色パターンの再検討

南 成 祐\*

研究協力者 金 大成\*\* 杉 江 和 馬\*\* 村 山 久美子\*\* 西 野 一 三\*\*

## 目 的

ジストロフィン結合蛋白であるサルコグリカン (SG) 複合体の異常は早期発症型の肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) を引き起こす。これまでに、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -SG サブユニットの遺伝子異常を原因とする亜型が明らかとなっているが、本邦では SG 異常症全体の頻度が少なく、亜型間の割合は必ずしも明らかにされていない。例えば、 $\beta$ -SG 異常症は 1 例しか報告がなく、 $\delta$ -SG 異常症は LGMD としては 1 例も報告がない。また、全サブユニット遺伝子の網羅的な変異検索が行われたことがない点も問題である。

そこで、今回、国立精神・神経センターで筋病理検索された患者について各 SG 遺伝子変異を系統的に検討するとともに、免疫組織化学染色による各 SG サブユニットの染色性の違いについても再検討した。さらに、最近になって骨格筋などでの SG 複合体の要素であることが示された  $\zeta$ -SG の遺伝子異常が含まれないか検討した。

## 方法と結果

### 1. $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -SG 遺伝子変異解析

対象は、臨床・筋病理学的所見と、少なくとも抗ジストロフィン抗体と抗  $\alpha$ -SG 抗体などを用いた免疫組織化学的検索の結果から SG 異常症が疑われた患者 11 名である。患者らの凍結筋から RNA を抽出し、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -SG 遺伝子の転写産物を RT-PCR 増幅して direct sequence 解析した。そして、ゲノム DNA で遺伝子変異を確認した。その結果、表 1 に示したように、9 名については SG 遺伝子異常を認めた。その内訳は、 $\alpha$ -SG 遺伝子変異が 4 名、 $\beta$ -SG が 4 名、 $\gamma$ -SG が 1 名で、 $\delta$ -SG 変異は見つからなかった。

### 2. $\zeta$ -SG 遺伝子変異解析

$\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -SG 遺伝子変異解析で変異が認められなかった 2 名 (患者 10 と 11) については  $\zeta$ -SG 遺伝子異常の可能性があると考え、その検索を行った。 $\zeta$ -SG 遺伝子の変異検索についてはゲノム DNA から PCR 増幅し direct sequence 解析を行った。その結果、 $\zeta$ -SG 遺伝子変異を発見することはできなかった。

### 3. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色による各 SG サブユニットの染色性を検討するため、今回あらためて対象患者の凍結筋切片を作製し、一連の抗体を用いて同一条件下で免疫染色を行い比較した。その結果、各サブユニットの染色性は表 2 に示したようになった。 $\beta$ -SG 異常症の患者では全サブユニットの染色性が消失したのに対し、 $\alpha$ -および  $\gamma$ -SG 異常症では各サブユニットの染色性が減弱するものの筋細胞膜への局在が残存する傾向を示した。とくに、 $\gamma$ -SG 異常症では  $\delta$ -サブユニットがほぼ正常に保たれていた。

表 1 遺伝子変異解析

遺伝子	患者	アレル 1	アレル 2
$\alpha$ -SG	1	229C>T (R77C)	229C>T (R77C)
	2	229C>T (R77C)	229C>T (R77C)
	3	229C>T (R77C)	229C>T (R77C)
	4	220C>T (R74W)	220C>T (R74W)
$\beta$ -SG	5	325C>T (R109X)	325C>T (R109X)
	6	325C>T (R109X)	325C>T (R109X)
	7	325C>T (R109X)	214_221del
	8	499G>A (G167S)	IVS5+5G>A
$\gamma$ -SG	9	EX6del	EX1_EX8del
$\delta$ -SG	なし		

表 2 免疫組織化学

患者	各サブユニットの染色性			
	$\alpha$ -SG	$\beta$ -SG	$\gamma$ -SG	$\delta$ -SG
1	+/-	+/-	+/-	+
2	+/-	+/-	+/-	+/-
3	+/-	-	-	+/-
4	+/-	+	+/-	+/-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	+	+/-	+/-	++
10	-	-	-	-
11	++	+	+	+

\* 国立精神・神経センター武蔵病院

\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

+++ : normal, ++ : slightly faint, + : faint, +/- : extremely faint, - : negative.

## 考 察

本邦で過去に遺伝子解析が行われた報告では、少なくとも、 $\alpha$ -SG 異常が9家系、 $\beta$ -SG 異常は1家系、 $\gamma$ -SG が4家系あり、 $\delta$ -SG 異常症はLGMDとしてはない。しかし今回、遺伝子異常を特定できた9名中4名までが $\beta$ -SG 異常であったことから、日本人のSG 異常症の原因サブユニットとして、 $\beta$ -SG もまた主要な割合を占めるものと考えられる。

$\alpha$ -SG 遺伝子変異はいずれもミスセンス型で、R77C 変異が8アレル中6アレル(75%)を占めた。この変異は国内外のこれまでの報告で $\alpha$ -SG 異常症の common mutation であることが示されている。一方、 $\beta$ -SG 遺伝子変異はナンセンス変異やスプライシング異常による null mutation がほとんどであったが、海外からの報告ではミスセンス変異の方が多く、むしろ今回の検索ではR109X 変異が8アレル中5アレル(62.5%)を占めたことが null mutation の比率を高めた要因であると思われる。 $\beta$ -SG 遺伝子では海外において特定の common mutation の存在は報告されていない。しかし、R109X 変異が本研究で初めて見いだされた変異であることを考えると、この $\beta$ -SG 変異は日本人に特有な common mutation である可能性がある。ただし、今後の患者数の積み上げが必要である。

免疫組織化学染色の結果、遺伝子異常と各サブユニットの染色性の傾向は従来の報告とよく一致しており、 $\beta$ -サブユニットが核となってSG 複合体を形成するという培養細胞での発現実験から考えられているモデルを支持している。また、各サブユニットの染色性から、ある程度、遺伝子変異のあるサブユニットを推定しうることを示している。

さて、免疫組織化学的にSG 蛋白の欠損を認めながら $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -SG 遺伝子の全てに異常を認めることのできない患者が2名存在したことは予想外であった。 $\gamma$ -SG 遺伝子についても残念ながら異常を発見できなかった。今回用いた遺伝子変異検索法で見逃される変異を持っている可能性も完全には否定できないが、SG 複合体の二次性の欠損を引き起こす新たな疾患である可能性もある。

## 研究の意義・今後の展望

本研究において、日本人では $\alpha$ -、 $\beta$ -SG 異常が患者のほとんどを占め、 $\gamma$ -、 $\delta$ -SG 異常は稀であることが示唆された。また、免疫組織化学染色による各サブユニットの染色性から遺伝子異常が存在するサブユニットをある程度推定できると考えられた。以上のことは遺伝子検査への応用を考える上でも重要な知見である。患者の筋生検が可能な場合には、免疫組織化学染色の結果によって遺伝子解析を行うサブユニットの第一選択が決まって来るし、筋生検ができないような場合には、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -SG 遺伝子の順に変異検索を行う手順が良いであろう。また、 $\alpha$ -と $\beta$ -SG 遺伝子については common mutation の検索も可能であると思われる。

最後に、遺伝子変異が特定できなかった患者2名については、二次性のSG 複合体欠損を引き起こす新たな疾患である可能性も考えられ、候補遺伝子について今後も検討していきたいと考えている。

# 日本人 dysferlinopathy における遺伝子変異と臨床型の特徴

青木正志\*

研究協力者 高橋俊明\*\* 小野寺好明\* 鈴木直輝\* 館山真規\*  
 近藤恵美\*\* 伊藤真理子\*\* 相場瞳\*\* 三浦優子\*\*  
 今野秀彦\*\* 林由起子\*\*\* 西野一三\*\*\* 埜中征哉\*\*\*  
 齋藤博\*\*\*\* 木村格\*\* 糸山泰人\*

我々は1998年三好型遠位型筋ジストロフィーの原因遺伝子をクローニングし dysferlin と名づけた<sup>1)</sup>。同遺伝子はエクソン55個から構成され2,080アミノ酸からなり<sup>2)</sup>、肢帯型筋ジストロフィー-2B型の原因であることも判明した。日本人三好型遠位型筋ジストロフィーでの遺伝子変異の特徴としては、C1939G, G3370T, 3746delG および 4870delT の4種の変異が多く認められる。さらには G3370T 変異を伴う症例は発症年齢が遅く G3510A 変異は発症年齢が早いことを既に報告している<sup>3)</sup>。

## 目 的

本邦 dysferlinopathy (dysferlin 遺伝子異常に伴う筋ジストロフィー) 患者の dysferlin 遺伝子変異と臨床的特徴を明らかにする。

特に肢帯型を呈する筋ジストロフィーの表現型を呈す dysferlinopathy の臨床的特徴を明らかにする。

## 方法と結果

41家系44人の三好型遠位型筋ジストロフィーと23家系26人の肢帯型筋ジストロフィーの表現型を示した日本人 dysferlinopathy 患者を対象とした。遺伝子型はインフォームドコンセントを得た患者ゲノムDNAから55個のエクソンごとにPCR-SSCP法にて遺伝子変異をスクリーニングし、直接塩基配列決定法にて確認した。

遺伝子変異は三好型遠位型で28種類、肢帯型で12種類(5種類は共通)が見いだされた。過去に論文報告されている外国人での変異と共通するものは1種類のみであった。日本人では外国人での変異の分布と異なり遺伝子全体に広く分布していた。三好型遠位型ではC1939G変異、G3370T変異、3746delG変異、4870delT変異が多くみられ48%をしめた。肢帯型でもG3370T変異と4870delT変異が多くみられ52%をしめたが3746delG変異はみられなかった。(図1)平均発症年齢は三好型遠位型では22±9歳(12~48歳)、肢帯型では26±10歳(11~43歳)であった。三好型遠位型ではG3510A変異では13±0歳、

C4968T変異では12±0歳と早く、G3370T変異を持つ症例は33±6歳と遅かった。肢帯型でもG3370T変異を持つ症例は発症年齢が35±10歳と遅かった。三好型遠位型では平均33歳(発症後平均14年)、肢帯型では平均39歳(発症後平均15年)で独歩が不可能になる。三好型遠位型では平均41歳(発症後平均21年)、肢帯型では平均45歳(発症後平均21年)で杖歩行が不可能となった<sup>4)</sup>。(図2)

現在、肢帯型筋ジストロフィーの表現型を呈する dysferlinopathy 患者の臨床型の詳細な検討を行っている。これまでに13人の臨床データを解析できた。対象患者は現在23歳から75歳であり、平均年齢は53±15歳であった。そのうち5人にはG3370T変異が存在した。平均発症年齢は25±7歳、平均罹病期間は27±15年であった(G3370T変異を保有する患者の平均発症年齢は32±6歳、保有しない患者は21±3歳)。ほとんどの患者で下肢の筋力低下が初発症状であった。発症18±14年後に現在の医療機関を初診となっている。Functional grade scaleによる進行経過は上肢では約30年の経過でgrade 5(手を口に持っていけないが、ペンを握れるか、テーブルのコインを拾える)、下肢では約25年の経過でgrade 9(車椅子)に至るまで罹病期間とともにほぼ直線状に進行し、その後の進行はゆるやかであった。G3370T変異を有する患者の経過もほぼ同様であった。病初期に下腿屈筋の仮性肥大を思わせる症状を呈した患者(4例)も存在した。顔面筋や外眼筋の障害、嚥下困難、翼状肩甲、前後

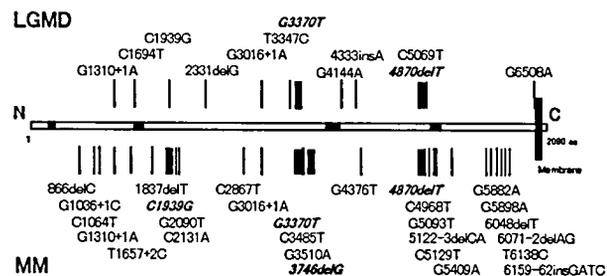


図1 dysferlinopathy 患者で見出された遺伝子変異。Dysferlin タンパク上変異の位置をしめす。タンパクより上に肢帯型患者。下に三好型遠位型患者の変異をしめす。変異の位置の太線(イタリック体)はそれぞれの表現型で多く見られた変異。3746delG 変異は三好型遠位型でしか見つからない。

\* 東北大学医学部神経内科

\*\* 国立病院機構西多賀病院

\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

\*\*\*\* 国立病院機構宮城病院

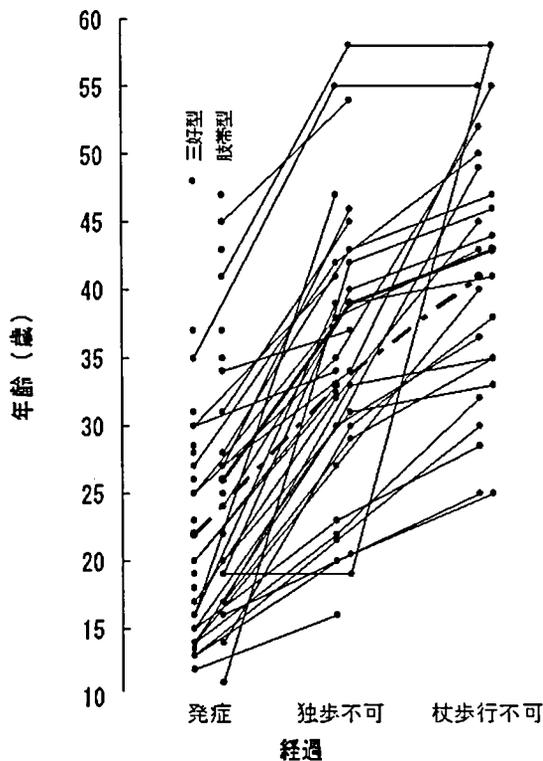


図2 三好型遠位型と肢帯型患者の経過。各経過になった年齢を左側に三好型遠位型、右側に肢帯型をプロットし、同一患者を結んだ。太い実線は肢帯型の太い破線は三好型遠位型の平均。

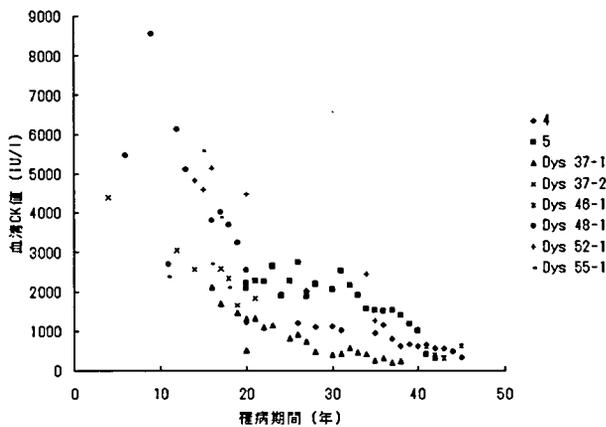


図3 同一患者内での血清CK値の推移

側彎を呈した患者はみられなかった。筋電図では筋原性の所見であるが fibrillation がみられることもあった。筋生検所見はジストロフィー様で細胞浸潤を呈することもあった。血清CK値は、病初期は非常に高値であるが罹病期間とともに低下していき正常域まで低下する症例もあった(図3)。心胸郭比は罹病期間とともに拡大するが、心エコーによる左室駆出率ははっきりした変化はない。

しかし拡張型心筋症を呈した患者(1例)も存在した。%肺活量は罹病期間とともに低下し非侵襲的人工呼吸を施行した患者(2例)も存在した。今後は、筋CT画像を含めてさらに多くに患者の臨床型を解析する予定である。

### 考 察

遺伝子型の特徴として肢帯型では三好型遠位型で多くみられる 3746delG 変異はみられていない。発症後の進行度で両者に有意な差はみられなかった。G3370T 変異を有する患者は、発症年齢は遅いものの罹病期間でみた進行速度は他の変異をもつ患者と大差はなかった。

肢帯型筋ジストロフィーの表現型をしめす dysferlinopathy の臨床的特徴は現時点までの解析では以下のようにまとめることができる。下肢の筋力低下で発症することが多く、初期には仮性肥大を思わせることもある。進行しても手の機能は比較的長期間保たれ、車椅子乗車可能期間も保たれている。血清CK値は病初期では高値であるが経過に伴って低下していき、正常域まで低下する症例もあった。心機能は比較的保たれるが、呼吸機能は経過とともに徐々に低下していく。

### 研究の意義

本研究の成果により dysferlinopathy の臨床的特徴および発症後の経過が明らかになった。これらは臨床診断や経過観察の留意点の明確化に寄与する。将来 dysferlinopathy に対する治療研究を行う際には対照としての自然経過の重要な資料となりうる。

### 文 献

- 1) Liu J, Aoki M, Illa I, et al.: Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics*. 20:31-36, 1998.
- 2) Aoki M, Liu J, Richard I, et al.: Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology* 57: 271-278, 2001.
- 3) Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, et al.: Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy. *Neurology* 60: 1799-1804, 2003.
- 4) Aoki M: Dysferlinopathy. In: *GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]*. Copyright, University of Washington, Seattle, 1997-2004. Available at <http://www.genetests.org>.
- 5) 青木正志, 高橋俊: Dysferlinopathy (Dysferlin 異常症), *Annual Review 神経* 2005, 中外医学社, pp277-283.

# SJL マウス骨格筋における遺伝子発現解析

青木正志\*

研究協力者 鈴木直輝\* 日沼雄二\*\* 高橋俊明\*\*\*  
小野寺好明\* 豎山真規\* 糸山泰人\*

Dysferlin は三好型遠位型筋ジストロフィーの原因遺伝子として 1998 年にクローニングされ、肢帯型筋ジストロフィー-2B 型の原因でもあることが明らかになった<sup>1)</sup>。dysferlin 変異を伴う筋ジストロフィーに対して dysferlinopathy という疾患概念が提唱されている。Dysferlin は筋細胞膜に存在し、膜修復に際し重要な働きをもつと考えられているが<sup>2)</sup>、dysferlinopathy の病態の全体像は未知の部分が多い。一方 SJL マウスでは自然発生的に筋に炎症の出現が知られていたが、dysferlin 遺伝子の異常が報告され、dysferlinopathy のモデルと考えられている。本研究では SJL マウスを用いて dysferlinopathy の病態に関与すると思われる遺伝子群の発現変化について網羅的に解析した。

## 目 的

dysferlinopathy のモデル動物である SJL マウスの解析を通じてその病態を明らかにし、治療への糸口とする。

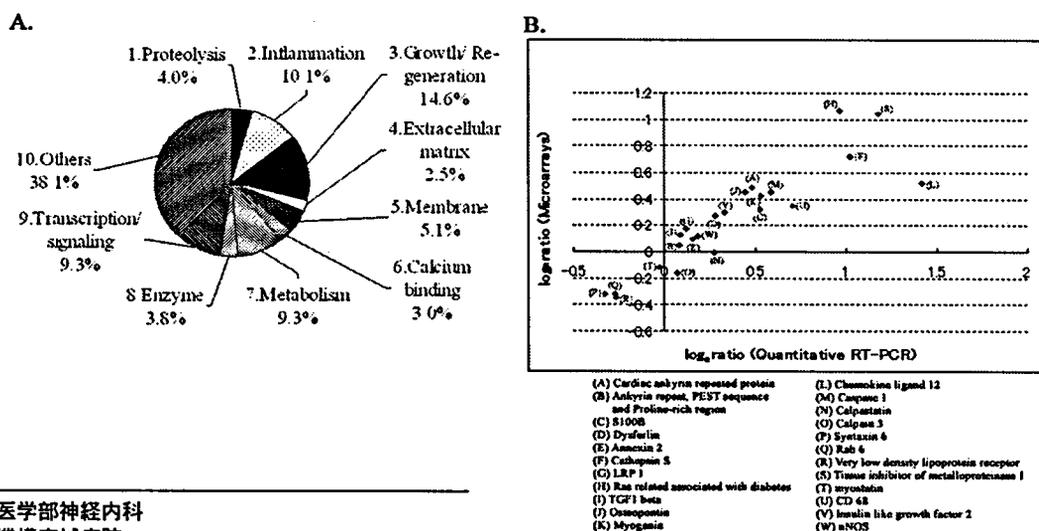
## 方法と結果

筋の変性が軽度な 2 ヶ月齢および進行した 9 ヶ月齢の SJL マウスの大腿四頭筋から RNA を単離しハイブリダイゼーションを行い、対照と比較した。GenBank を基本データベースとしたマウス cDNA からのオリゴアレイ (CodeLink<sup>TM</sup>) を用いて約 10,000 遺伝子の発現プロファイルを調べた。また遺伝子発現を LightCycler (Roche Diagnostics)

を用いた半定量的 RT-PCR を用いて確認した。さらに免疫組織染色およびウエスタンブロット法にて蛋白発現についても検討した。

SJL マウスでは対照と比べて 213 の遺伝子で 2 倍以上の発現の増減を認めた。annotation 毎に分類すると inflammation, growth/ regeneration に関わる遺伝子が多く見られた (図 1A)。具体的には 1) Proteolysis に関わる Cathepsin S および *Tissue inhibitor of metalloproteinase 4*; 2) Inflammation に関わる Small inducible cytokine A 2 (Scya 2) および Scya 12; 3) Growth/ Regeneration に関わる CARP (Cardiac ankyrin repeat protein), Caspase 1, Fos, Jun, myogenin, Myosin light chain, Ras-related associated with diabetes; 4) Extracellular matrix の osteopontin; 5) Membrane event に関わる *syntaxin 6*, Rab6; 6) Calcium binding の機能を持つ S100a4, S100b などの発現変化を認めた (斜字は SJL マウスで発現低下)。半定量的 RT-PCR の結果はマイクロアレイで 2 倍以上の変動を示した遺伝子に関して高い相関を示した。(図 1B)

さらに蛋白レベルでは caveolin-3, dystrophin および utrophin の発現は対照と SJL マウスで差異は認められなかったが、nNOS の発現は SJL マウスにおいて低下していた。一方、 $\alpha$ -sarcoglycan の発現は 2 カ月齢では差異がなかったが、6 カ月齢および 10 カ月齢の SJL マウスで有意に増加していた。myostatin は mRNA と逆に SJL マウスで増加を示した。



\* 東北大学医学部神経内科  
\*\* 国立病院機構宮城病院  
\*\*\* 国立病院機構西多賀病院

図 1

## 考 察

ヒト dysferlinopathy 患者の筋におけるマイクロアレイによる検討を行った Campanaro らの報告<sup>3)</sup>や SJL マウスで検討した Lennon らの報告<sup>4)</sup>とある程度対応した結果が得られた。Dysferlin との相関が報告され膜修復に関与することが想定されている Annexin 2 は両方の論文で発現増強が見られたが (対照に比べ約2.2倍と3.7倍), 我々の解析では約 1.3 倍の上昇を認めたのみだった。2 倍以上の変動が見られた遺伝子で, Calcium 結合能を持つものや小胞輸送に関わるものは, C2 domain を有し膜修復に関与するとされる dysferlin と相互作用をする候補遺伝子と考えられる。また CARP に関しては, myogenin や osteopontin など同様に病期の進行に伴い発現が高まっており, DMD 患者や脱神経モデルラットで報告されたように障害筋の再生に関与している可能性がある。nNOS や myostatin に関しても dysferlinopathy 病態への関与が示唆された。

## 研究の意義

本研究の成果により dysferlinopathy の病態の一部が明らかになった。これらは今後 dysferlinopathy に対する治療のターゲットを模索する上で基本的な情報であると考ええる。

## 文 献

- 1) Liu J et al.: Nature Genet. 20: 31-36, 1998.
- 2) Bansal D et al.: Nature 423: 168-172, 2003.
- 3) Campanaro S et al.: Genet 26: 3283-3298, 2002.
- 4) Lennon NJ et al.: J Biol Chem 278: 50466-50473, 2003.

# 筋ジストロフィー発症機構の理解をめざす関連タンパク質の分子論的研究

吉田 幹 晴\*

研究協力者 Beryl N. Ampong\*\*\* 今村道博\* 武田伸一\*

## 目 的

ジストロブレピン(DB)-1 はジストロフィン (dys) 結合タンパク質 (DAP) の一つで、同遺伝子ノックアウトマウスは筋ジストロフィー症状を示す<sup>1)</sup>。DB-1 は分子前半部においてサルコグリカン複合体 (SGC)<sup>2)</sup>と、後半部でシントロフィン (syn) そして dys と結合する。筋では DB-1 の他、C 末端側の長さが異なる DB-2 と DB-3 が発現しており、その中最短の分子 DB-3 は唯一 syn 及び dys 結合部位を持っていないことから、我々はその局在や機能に関心を持ち、研究を進めた。その結果を前半で述べる。

ジスフェルリン (dysF) は三好型ミオパチー及び肢帯型筋ジストロフィー2B の原因遺伝子産物として発見された。一昨年その遺伝子ノックアウトマウスが作成され、その骨格筋では筋形質膜障害時に Ca<sup>2+</sup>要求性の膜修復システムが機能しないことが示された<sup>3)</sup>。しかしこのシステムにおいて dysF がいかに関与するかその機構は不明である。我々は dysF の機能を明らかにしようとする過程でそれが筋形質膜だけでなく、細胞内にも存在する証拠を幾つか得たのでそのことを後半で述べる。

## 方法と材料

抗 DB-3 は同分子 C 末端部の短い特異配列を利用して作成した。抗 dysF は dysF の配列<sup>4)</sup>の中からミオフェルリン<sup>5)</sup>に存在しない配列 (aa#1281-1299) を抗原にして作成した。この抗体が dysF と特異的に反応することをイムノブロットにより確認した。骨格筋の免疫組織染色ではアフィニティ精製したものを使用した。dys-DAP 複合体はウサギ骨格筋より調製した。

## 結果と考察

### 1. dys 複合体における syn 結合の必要条件

抗 DB-3 は dys-DAP 複合体に結合する DB 分子中 40 kDa のものと特異的に反応し、DB-3 は同複合体の構成成分であることがわかった。DB-3 は構造上 dys と直接結合できないが、SGC に結合することで<sup>2)</sup>間接的に同複合体の構成成分になっていると考えられる。抗 DB-3 はラット骨格筋の細胞膜を染めた。また同抗体及び抗 DB-1 抗体を用いた dys-DAP 複合体の免疫沈降において、前者は

DB-3 を、後者は DB-1 を含む複合体を沈降させることが確認された。この時 DB-3 を含む複合体中に syn の含量の著しく少ないことが見出された。この結果を確かめるため抗 syn を用いた免疫沈降を行った。その結果沈降物中に DB-1 が検出される一方 DB-3 は検出されず、上記の結果を補完する結果を得た。また同じ沈降物中に DB-2 も存在することがわかり、syn と DB-2 を結合する複合体も存在していることが推察された。図 1 に同定された 3 種の dys-DAP 複合体を記す。dys 並びに DB 分子種中、DB-3 だけが syn 結合部位を持たないことから「syn が dys-DAP 複合体中に正しく結合するためには、dys 及び DB 双方の syn 結合部位が対になって存在する必要がある」と考えている。近年の結果から dys 複合体は DB そして  $\beta$ -synemin を介して筋原線維の Z 線と結合していると考えられているが、DB-3 だけはその結合が構造上無理と考えられ、従って DB-3 を含む dys 複合体の筋形質膜上での分布は微視的に他の複合体と少し異なる可能性もある。

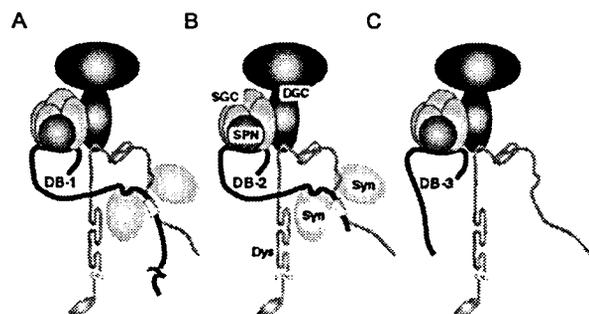


図 1 骨格筋において見出された 3 つの dys-DAP 複合体。各複合体は異なる DB 分子種を 1 分子結合している。DB-3 を結合した複合体だけは dys 上に結合部位が存在するにもかかわらず syn を結合できない。

### 2. dysF は筋原線維内にも存在する

我々が作成した抗 dysF はマウス骨格筋筋形質膜だけでなく線維によっては内部も横紋様に染めた。有染線維と線維型の相関は認められなかった。この線維内染色は伸びた筋では二重線様に観察された。横紋マーカー (市販の抗体) と比較したところ、dysF の染色は I 帯上にあり、Z 線を挟むようにして位置していることがわかった。類似の染色パターンは市販のモノクローナル抗体 (NCL-hamlet) を使っても、またラット筋でも認められた。

\* 国立精神・神経センター神経研究所

\*\* 東京医科大学薬理

次に我々は dysF の筋線維内分布について生化学的側面から解析した。マウス骨格筋をホモジェナイズし、低速遠心した場合 NaK-ATPase の様な筋形質膜成分はほぼ上清に回収されたが、dysF の場合は半分程度であり残りは沈殿画分より LiBr によって抽出された膜成分、その比較的重い方に検出された。これとは別に筋ホモジネートより筋原線維を調製し、その中に留まる dysF を筋ホモジネート中のものと比較した。前述結果と一致して半分程の dysF が筋原線維中に残存していることが示された。dysF は小胞膜に包まれて筋原線維内に存在すると思われるが、前述の実験で dysF と同様 LiBr で抽出される DHP レセプター (DHPR) やリアノジンレセプターなどと比べると、強く結合しているようであった。

次に dys-DAP 複合体の各精製段階の中間試料を使って dysF を検索したところ dysF の一部分画が WGA と結合することを見出した。この結果は WGA 結合性のタンパク質と結合している dysF の存在を示唆する。結合タンパク質を探るために我々は筋形質膜タンパク質の WGA 結合画分より dysF 抗体による免沈物を調製し、その中に WGA と反応するものを探した。2つのタンパク質を認め、そのうち 140 kDa についてはその分画のされ方も考慮して DHPR の $\alpha 2$  サブユニットではないかと予想した。抗 DHPR を用いたイムノプロット解析によりこれが確認され、また抗 DHPR を用いた免沈物の中に dysF が確認されたことから DHPR が dysF の結合タンパク質の1つであると結論した。この結果から我々は dysF が失われた場合、DHPR の発現がどうなるかに関心を持ち、dysF の

著減が知られている SJL マウス筋でその発現量を調べたが、対象として用いた BALB/c に比べ有意差は認められなかった。

#### 今後の展望

我々は DHPR が EC カップリングの一翼を担うタンパク質であることから SJL マウスの筋収縮特性に関心を持ち、それを調べた。しかしこの種の実験では対照の選択が難しくこのマウスを利用することの限界を感じた。遺伝子 KO マウスの利用が理想であるが、次善策として最近報告された dysF 欠損 A/J マウスの併用も検討する必要がある。

この研究では dysF が筋形質膜だけでなく、筋原線維内にも相当量存在することが示された。報告された筋形質膜修復における dysF の役割を知る、もしくは dysF の未知の機能を探る上で後者の dysF 分画の研究は欠かせないであろう。dysF がそこに留まったまま機能するのか、それとも Ca 等の刺激によって離れ筋形質膜の dysF と行き交うのかなど興味深い問題である。こうした研究に筋原線維は有効な出発物質になると期待している。

#### 文 献

- 1) Grady RM et al.: Nature Cell Biol 1: 215-220, 1999.
- 2) Yoshida M et al. : Hum Mol Genet 9:1033-1040, 2000.
- 3) Bansal D et al. : Nature 423:168-172, 2003.
- 4) Liu J et al : Nat Genet 20:31-36, 1998.
- 5) Davis DB et al : Hum Mol Genet 9:217-226, 2000.

# 三好型筋ジストロフィー (LGMD2B) 責任遺伝子産物 ジスフェルリンと (ER) ストレス発生の機構

桃井 隆\*

研究協力者 藤田 恵理子\* 高鹿 依子\*

## 目 的

ジスフェルリンは肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2B) および三好型遠位型筋ジストロフィーの責任遺伝子であり、線虫 *Caenorhabditis elegans* の *fer-1*, ミオフェルリンや先天性難聴疾患の原因遺伝子であるオトフェルリンと高い相同性を持ちフェリンファミリーを形成している。フェリンファミリーはリン脂質に結合する C2 ドメインを複数持つことから、Ca 依存性の膜融合に関与する可能性が考えられる。また FER-1 との相同性から、精細胞での細胞膜への小胞融合に関与する可能性が示唆されている。細胞内における膜融合は、主に神経シナプスのエクソサイトーシスの機構で知られており、vesicle(v)-SNARE であるシナプトタグミンはカルシウム依存性の C2 領域を介して、膜融合に関与し、v-SNARE である VAMP と t-SNARE であるシンタキシン 1, SNAP25 が複合体を形成する。融合後には NSF,  $\alpha$ -SNAP と結合し、ATP から ADP に移行する際、それぞれの膜融合複合体を解離するという機能を果たしている。一方、ジスフェルリンはカルシウム依存的に LAMP-1 陽性の小胞との膜融合に関与することが報告され、筋細胞膜修復機構への関与が示唆されている。しかしながら、ジスフェルリンの機能に関しては依然として不明な点が多い。

一方、小胞体 (ER) には、unfolded protein response (UPR) と endoplasmic reticulum associated degradation という品質管理機構が存在している。UPR は IRE などのストレスセンサーを介しシャペロン蛋白の発現を誘導することで異常タンパク質の折りたたみの正常化、ストレスの回避を図ると共に、新たなタンパク質の合成を抑制して小胞体の負担を軽減させる応答である。しかし、UPR で異常タンパク質が除去できず過度に変異蛋白の蓄積した場合、ER に直結したユビキチン/プロテアソーム系の分解システムにより分解される。それでも異常タンパク質が除去できない場合には、細胞はアポトーシス様の形態変化を示す。その細胞死には、ストレスセンサーである IRE1 が関与する ASK/JNK の活性化や小胞体に局在する caspase-12 の活性化が関与していることが示されている。

これまで我々は細胞にジスフェルリンを導入し、細胞内局在を各種細胞小器官のマーカーを用いた免疫染色法により、細胞膜より主にゴルジ体、小胞体に局在が観察

されること、また過剰発現させることによって ER ストレス細胞死を誘導することを明らかにしてきた。

本研究では、ジスフェルリンの局在と様々な膜融合における機能の解析を通して、三好型筋ジストロフィーの治療法を探索することを目的とした。

## 方法と結果

ジスフェルリンの細胞内局在は細胞膜より主にゴルジ体(anti-GM130)、小胞体 (anti-KDEL, anti-Bap31) に局在が観察された。この結果から、我々はジスフェルリンが小胞体やゴルジ体の小胞輸送の関与しているものと考えた。

小胞体やゴルジ体の小胞輸送には、小胞体からの順行性または逆行性が存在し、この輸送には、シナプト小胞の膜融合で知られるシンタキシン 1 のかわりにゴルジ体および小胞体に局在しているシンタキシン 5 が関与している。シンタキシン 5 は、NSF,  $\alpha$ -SNAP と結合する機構と P97(VCP), P47 と結合する機構との両方が存在し、両者は拮抗的に作用することが報告されている。前者の NSF,  $\alpha$ -SNAP は VAMP やシナプトタグミンと関与することが知られているが、P97 (VCP), P47 については明らかにされていない。

これらを踏まえ、ジスフェルリンとシンタキシン 5 の結合について検討した。細胞に両遺伝子を共発現させ、細胞免疫染色にて観察したところ、ジスフェルリンとシンタキシン 5 は小胞体/ゴルジ体で共局在していた。免疫

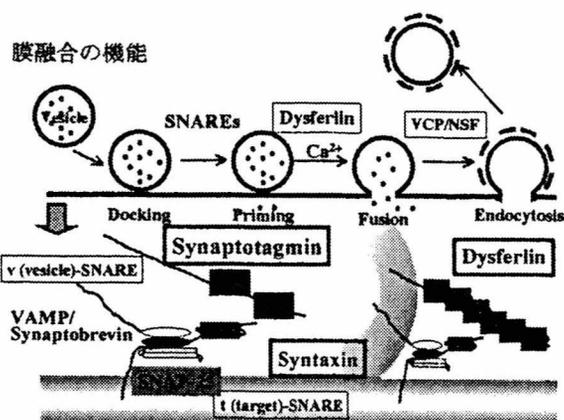


図1 膜融合の機能  
ジスフェルリンはシナプトタグミンと同様 C2 領域を介して、小胞のドッキングおよびプライミングに関与し、シンタキシン、SNAP25 と複合体を形成する。

\* 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第五部

沈降法においても両者は結合し複合体を形成していることが明らかとなった。またこの結合はカルシウム存在下において増大した。

次にジスフェルリンと P97 (VCP) P47 との免疫沈降法による結合実験では、ジスフェルリンはシタキシンの他に P47 を介して P97(VCP)と結合することが明らかとなった。また複合体には SNAP25 が含まれていたが、 $\alpha$ -SNAP, NSF などは含まれなかった。

また、青木博士らの研究により以前から示唆されていた脳型ジスフェルリンの機能を明らかにするために、ヒト脳の cDNA ライブラリーからクローニングした結果、筋組織を含む多くの組織に発現するものと異なり、脳に特異的に発現する短いもの（脳型ジスフェルリン）が得られた。また、市販のヒト胎児発達過程および成人脳から得られた cDNA を用い RT-PCR 法により解析したところ、脳型は、胎児で PCR 断片が検出されず、成人脳において断片が見られた。このことから脳に脳型ジスフェルリンが存在し、脳発達過程で変動し、神経細胞に発現すると考えられた。ラット神経細胞に脳型ジスフェルリンとシタキシン 1 を共に導入したところ、細胞質とともにアクソン、デンドライトで共局在している像が観察された。

一方、正常人、三好型遠位筋ジストロフィー患者を含む筋疾患患者の筋切片をジスフェルリン抗体、Bap31 抗体について組織染色を行いスクリーニングを行った。正常ではジスフェルリンは細胞膜に局在しているものの、三好病では染色されず Bap31 抗体陽性領域と一致した像は

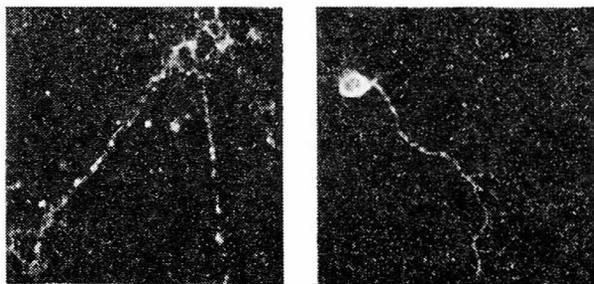


図 2 神経細胞におけるジスフェルリンの局在  
神経細胞をジスフェルリン抗体で染色したもの（左：内在性）とジスフェルリン-EGFP 遺伝子を導入したもの（右）。

得られなかった。しかしながら、一部の患者の筋組織について小胞体マーカーである Bap31 抗体の染色像とほぼ同様にジスフェルリン抗体陽性の像が見い出された。

C2C12 細胞に過剰発現させたジスフェルリンは、時間経過に従って小胞体とゴルジ体の一部に凝集体として局在したのち、細胞は細胞縮小などアポトーシスに典型的な像を示し、小胞体とゴルジ体に局在する凝集体はユビキチン化されていた。こうした凝集体は小胞体ストレスを引き起こし、JNK の活性化、小胞体に局在するカスパーゼ 12 を活性化し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

## 考 察

脳型ジスフェルリンは、神経系ではシナプス小胞とシナプス膜への融合に関与している可能性が考えられる。筋組織においてもジスフェルリンは小胞の融合に関与し、筋細胞膜の修復機構に関与していると考えられる。これらのことから、ジスフェルリンは様々なシタキシンと結合し、細胞内の様々な膜融合過程に関与していると考えられる。

一方、一部の筋ジストロフィー患者の筋組織において、ジスフェルリン抗体陽性の像が小胞体に見出されたことから、ジスフェルリンの小胞体局在による ER ストレスと筋ジストロフィーとの関係が示唆された。

## 今後の展望または研究の意義

ジスフェルリンは細胞内膜輸送、膜融合に関わる蛋白と結合することから、多くの細胞で膜融合に関与していることが明らかとなった。筋組織ではジスフェルリンが細胞膜修復の過程に重要な働きをしており、LAMP-1 陽性の小胞との融合に関与していることが Bansal や Lenon らによって相次いで報告されたが、未だにジスフェルリンが関与する膜融合の機構についての詳細は明らかにされていない。筋組織での膜融合機構についてさらなる検討が必要であろう。

細胞内膜輸送の異常と筋ジストロフィーが発症する機構との関係は今後の課題である。

# SJL/J マウス骨格筋における炎症性細胞と NF kappa B 発現の経時的検討

栗原 照幸\*

研究協力者名 根本 博\* 三浦 浩子\* 中空 浩志\*

## 目 的

SJL/J マウスは dysferlin の欠損が報告され、人の肢帯型筋ジストロフィー症 (LGMB2B), Miyoshi myopathy のモデルマウスと考えられている。一方加齢により B cell lymphoma の出現が見られ、免疫機能の障害が推定されている。加齢に伴う SJL/J マウスの骨格筋での炎症性細胞浸潤の報告<sup>1,2)</sup>がなされているが、筋の部位による炎症性細胞浸潤・変性の差や炎症性細胞の phenotype についての詳細な検討は行われていない。転写因子である NF kappa B はサイトカイン、ケモカイン、炎症性プロセス、アポトーシスなどに関与しており、Inhibitor kappa B が I kappa B kinase により活性化され核内で作用する。各種の筋疾患 (多発性筋炎<sup>3)</sup>, Duchenne 型筋ジストロフィー症<sup>3)</sup>, 肢帯型筋ジストロフィー症 (LGMB2A)) での upregulation が報告され、mdx マウスにおいても炎症性細胞浸潤が生じる以前の 15 日齢より NF kappa B p65, p50 の出現が報告<sup>4)</sup>されている。SJL/J マウスの筋の炎症性変化、変性の過程を経時的および部位ごとに検討し、その分布と肢帯型筋ジストロフィー症 (LGMB2B), Miyoshi myopathy の関連を検討すること。また SJL/J マウスでの筋の炎症性変化が dysferlin の欠損に伴う変性の過程と免疫機能の障害のいずれに起因するかを筋病理学的変化と NF kappa B の signal の変化を通して検討することを目的とした。

## 方法と結果

メスの SJL/J マウス (各 n=5) を 30, 60, 120, 240, 360 日齢で屠殺し、上腕二頭筋・大腿四頭筋・腓腹筋・ヒラメ筋・前脛骨筋を採取し、凍結切片を作成した。筋組織の染色は Hematoxylin-Eosin 染色, NADH 染色を行い、また免疫組織染色として CD4, CD8, CD19, Mac-1, Mac-3, ICAM-1, NF kappa B p65 を施行した。同時に血清を採取し Creatine kinase の活性を測定した。

HE 染色: 炎症性細胞浸潤は 30 日齢ではほぼ認められないが、60 日齢では endomysium 内に少数出現が認められた。120 日齢で endomysium 内の細胞数の増加が見られ、240 日齢では perimysium 内にも炎症性細胞が出現し、360 日齢では perimysium の炎症性細胞浸潤が増強し、一部では epimysium にも炎症性細胞が見られた。間質の結合織

の増加・脂肪変性は 360 日齢のみ認められた。中心核線維は 60 日齢までは少数であるが、120 日齢以降増加が見られ加齢と共に増加した。その変化は大腿四頭筋が最も強く、ついで上腕二頭筋に強く見られ、腓腹筋・ヒラメ筋では軽度であった。

NADH 染色: type I 線維は 120 日齢より type II 線維に比べ萎縮傾向があり、240・360 日齢ではさらに萎縮の進行が見られた。120 日齢以降 intracellular network の乱れ・target fiber が出現し、360 日齢では約半数に fiber type grouping と small angulated fiber を認めた。

免疫組織染色: 炎症細胞浸潤 (図 1); 浸潤細胞数は加齢と共に増加し 360 日齢で最も多かった。その構成比率は macrophage(Mac-1, Mac-3)が全体の 60-70%を占めていた。リンパ球 subset では CD4 が 25-30%, CD8 が 10-15%, CD19 が 2%前後であり CD4/CD8 比は 2.0-3.0 であった。

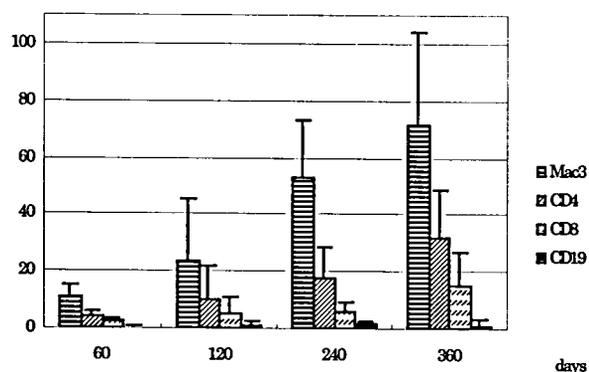


図 1 大腿四頭筋における炎症性浸潤細胞数 (×200 / field)

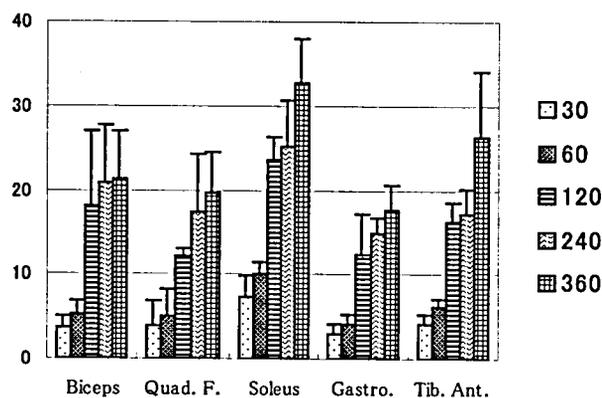


図 2 NF kappa B 陽性細胞の比率  
Quad. F = Quadriceps femoris, Gastro = Gastrocnemius, Tib. Ant. = Tibialis anterior

\*東邦大学大橋病院神経内科

この比率は各日齢において大きな変動はなく、主体をなすものは macrophage であった。また ICAM-1 は炎症性細胞浸潤の認められる以外に、再生線維の多く見られる部位に陽性細胞が見られた。NF kappa B (図 2); NF kappa B 陽性線維は炎症性細胞浸潤が出現する以前の 30 日齢から陽性細胞が少数認められた。中心核線維の増加の認められる 120 日齢より陽性細胞の比率が増加した。240, 360 日齢ではさらに陽性線維が増加していた。陽性線維は腓腹筋に最も多く、ヒラメ筋が最も少なかった。血清 CK 値: 血清 CK は 30 日齢で  $378 \pm 151$  IU, 60 日齢で  $552 \pm 219$  IU, 120 日齢で  $1571 \pm 1470$  IU, 240 日齢で  $4345 \pm 3720$  IU, 360 日齢で  $5479 \pm 4377$  IU と加齢に伴い上昇が認められた。

### 考 察

筋の炎症性変化・変性は加齢と共に増強が認められ、血清 CK 値もそれに平行して増加した。筋の部位別には大腿四頭筋・上腕二頭筋で下肢の屈筋・伸筋群より変化が強く、人の LGMB2B に類似した障害の pattern が認められた。Miyoshi myopathy で障害される下腿の屈筋群の変化は最も軽かった。また一部には神経原性の変化を示唆する所見も認められた。炎症性細胞は全経過を通じて macrophage が主体をなしていた。T cell subset では CD4 が優位であり、B cell はごく少数のみであった。Macrophage 優位なことから筋の変性による二次性の変化が推定された。しかし SJL/J マウスにおける実験的自己免疫性筋炎の炎症性細胞の比率とこの変化はほぼ同等であり今後検討が必要と考えられる。

また転写因子である NF kappa B p65 は生後 30 日齢より活性化が見られ、120 日齢で中心核線維の出現する時点において出現頻度は増加した。炎症性細胞浸潤は軽度

であることから当初は変性に起因した signal の誘導が生じているものと推定された。しかし 360 日齢では最も陽性細胞が多いことから、変性の要素に加えて炎症の機序も NF kappa B の活性化に関与していると考えられた。

### 今後の展望

SJL/J マウスにおける炎症性細胞浸潤は変性の二次的結果と考えられる。SJL/J マウスの NF kappa B の抑制による筋の変性の改善の有無を確認する。NF kappa B の活性化因子として TNF  $\alpha$  があげられていることから、TNF  $\alpha$ 、NF kappa B p50・p65 の遺伝子レベルでの発現を検討する。また SJL/J マウスでの dysferlin 欠損にともなう dystrophin の発現の増加が認められるかを検討する。

### 文 献

- 1) Kostek CA, Dominov JA, Miller JB. : Up-regulation of MHC class I expression accompanies but is not required for spontaneous myopathy in dysferlin-deficient SJL/J mice. *Am J Pathol* 160: 833-839, 2002.
- 2) Weller AH, Magliato SA, Bell KP et al. : Spontaneous myopathy in the SJL/J mouse. *Pathology and strength loss. Muscle Nerve* 20: 72-82, 1997.
- 3) Monici MC, Aguenouz M, Mazzeo A et al. : Activation of nuclear factor- $\kappa$ B in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 60: 993-997, 2003.
- 4) Kumar A, Boriek AM. : Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J* 17: 386-396, 2003

## II. FCMD(福山型先天性筋ジストロフィー)

# 福山型先天性筋ジストロフィーにみられるてんかんと遺伝子異常との関連

吉岡 三恵子<sup>\* \*\*</sup>

共同研究者 松本 貴子<sup>\* \*\*</sup> 樋口 嘉久<sup>\*\*\*</sup> 愛波 秀男<sup>\*\*\*\*</sup>  
藤井 達哉<sup>\*\*\*\*\*</sup> 池田 浩子<sup>\*\*</sup> 戸田 達史<sup>\*\*\*\*\*</sup>

## 目 的

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) はフクチン遺伝子の異常により胎生期の神経細胞遊走障害が引き起こされ、丸石様滑脳症という特徴的な皮質形成異常を持つ<sup>1)</sup>。我が国の FCMD 患者はすべてフクチン遺伝子に 3kb の挿入変異を持ち、多くがこの変異のホモ、残りはヘテロ接合体であり、一般に後者が重症と報告されている<sup>2)</sup>。今回、FCMD にみられるてんかんと遺伝子異常との関連を調べ、てんかんの予後や治療方針の決定に役立たないか検討した。

## 対象および方法

フクチン遺伝子に挿入変異を認め、FCMD と診断された 34 例。挿入変異をホモで持つか、ヘテロで持つかにより、前者をホモ群、後者をヘテロ群とした。両群とも 17 例で、共に男 8 例、女 9 例。経過観察期間 (平均) はホモ群 16 年、ヘテロ群 10 年。けいれんについては、有熱時のみのものを有熱性、有熱時に始まり無熱性となったもの及び当初から無熱性のものを無熱性とした。病歴と脳波所見より発作型を診断した。又、全例 CT/MRI により脳奇形を調べると共に、最高運動能力、言語能力や眼科的異常も調査した。更に、ヘテロ群についてはハプロタイプの分析だけでなく、一部の症例において 3kb の挿入変異を持つ染色体以外の、他の染色体に見られる変異について、シーケンスを行って詳細に調べた。

## 結 果

けいれんはホモ群 11/17 例 (65%)、ヘテロ群 12/17 例 (71%) に出現。内訳では有熱性はホモ群 3、ヘテロ群 4 名に、無熱性はホモ群 8、ヘテロ群 8 名に見られた。初発年齢 (平均) は有熱性ではホモ群 3 歳 4 カ月、ヘテロ群 2 歳 3 カ月、無熱性はホモ群 9 歳 2 ヶ月、ヘテロ群 6 歳 2 ヶ月。生涯に 1 回だけ熱性けいれんを認めた例もホモ群に見られたが、一般に両群とも大部分の症例は幼少期に熱性けいれんではじまり、数年の経過で無熱性け

いれんに移行していた。脳波で突発波を認めたのはホモ群 7、ヘテロ群 10 例。突発波の部位は両群とも前頭、頭頂、側頭又は後頭部など種々の部分にみられたが、前頭部と側頭部に多かった。発作型は両群とも有熱性では全身性强直間代けいれん、無熱性では複雑部分、二次性全般化発作であったが、ヘテロ群ではこの他にミオクロニー及び強直発作が認められた。抗てんかん薬はホモ群 8、ヘテロ群 10 例に投与。使用薬剤としては、熱性けいれんで始まることが多いことを受けて、両群ともバルプロ酸が最も多く、ついでフェノバルビタール、カルバマゼピン、クロナゼパム、ゾニサミドであった。2~3 種類の抗てんかん薬を最大限まで用いても尚、抑制困難な発作を持つ難治例はヘテロ群の 4 例に見られた。CT/MRI ではホモ群に比べ、ヘテロ群に高度の脳奇形を認めた。運動・言語能力については、予定の見られない症例がホモ群 2/17 例に対し、ヘテロ群では 7/17 例と多く、座位可能な症例はホモ群 14/17 例、ヘテロ群 4/17 例で、一般にヘテロ群で重度の運動障害が認められた。言語についても意味語を話せない症例はホモ群では 2/17 例に対し、ヘテロ群では 11/17 例と多かった。眼科的な異常では特に両群に差が顕著であり、ヘテロ群では網膜変性を 7 例に、網膜剥離を 5 例に認めたのに対し、ホモ群には網膜病変を持つ例はなかった。

ヘテロ群において、3kb 挿入以外の変異は、エクソン 3 にノンセンス変異 (C250T/Arg47Stop) を 4 例に、エクソン 8 にノンセンス変異 (C1030T/Arg307Stop) を 1 例に、エクソン 5 にミスセンス変異 (T509C/Met133Thr) を 1 例に認めた。これらの症例はいずれも重度の脳奇形を示したが、難治例は 2 例のみで、他は早期に死亡又はけいれんを認めなかった。

## 考 察

FCMD を疑うと最近では先ず遺伝子解析を行うので、遺伝子異常の種類によって早期に発作の予後が予測されると治療方針が立てやすい。今回の検討ではけいれんの発症率にはホモ群とヘテロ群の間に大きな差は見られなかったが、ヘテロ群では無熱性けいれんを来たした例の半数は難治性であった。又、けいれんの発症年齢はヘテロ群で低く、この群では重度の障害のため、早期に死亡する例が多く、けいれんの発症を見ないことも多かった。

\* 神戸市総合療育センター小児神経科

\*\* 神戸市立中央市民病院小児科

\*\*\* 国立病院機構宇多野病院小児科

\*\*\*\* 静岡県立こども病院小児神経科

\*\*\*\*\* 滋賀県立小児保健医療センター小児科

\*\*\*\*\* 大阪大学大学院医学系研究科ポストゲノム解析分野

遺伝子診断においてヘテロ群に属する症例では, 早期からてんかんの治療について十分な配慮が必要と考えられた.

#### 文 献

1) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, et al.: An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital

muscular dystrophy. *Nature* 394:388-392, 1998.

Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, et al.: Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet* 8:2303-2309, 1999.

# 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の遺伝子異常と蛋白質／細胞病態および治療に関する研究

戸田 達 史\*

研究協力者 小林 千 浩\* 谷 口 真理子\* 熊 暉\* 立 川 雅 司\*  
谷 口 妃代美\* 倉 橋 浩 樹\*\* 沖 永 剛 史\*\*\* 野 口 悟\*\*\*\*  
西 野 一 三\*\*\*\* 埜 中 征 哉\*\*\*\* 萬 谷 博\*\*\*\*\* 遠 藤 玉 夫\*\*\*\*\*

## 緒 言

福山型先天性筋ジストロフィー症 (FCMD) は II 型滑脳症及び眼奇形を伴う、日本で二番目に多い小児期の常染色体劣性遺伝性筋疾患である。我々はその原因遺伝子を 9q31 にマップし、ポジショナルクローニングにより同定してきた。責任遺伝子である *fukutin* は筋細胞膜上の  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) の O-マンノース型糖鎖修飾に関与すると推定されている。また、さらに平成 13 年に、muscle-eye-brain (MEB) 病の原因遺伝子が protein O-linked mannose  $\beta$ 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (POMGnT1) 糖転移酵素遺伝子である事を、報告した。その遺伝子産物は O 型マンノースに特異的に GlucNAc を転移する糖転移酵素である。この一連の糖転移酵素に変異をもつ muscle-eye-brain (MEB) 病や、Walker-Warburg 症候群 (WWS) においても、FCMD 同様、 $\alpha$ -DG と筋基底膜間の結合性の低下をきたし、重度の先天性筋ジストロフィーを呈する。これらは類縁疾患とされ、 $\alpha$ -ジストロクリカノパシー ( $\alpha$ -dystroglycanopathy) と総称される。

我々は、今回の 3 年間でこの班として以下のことを明らかにした。

## 結果と考察

### (1) FCMD, MEB 病患者の世界各地における分布とその広い臨床スペクトラム

当初は、トルコ・フランス人計 6 人の患者から 6 種類の遺伝子変異を見出したが、これらは FCMD の *fukutin* 遺伝子に見られるような特殊な 3kb insertion 変異とは異なり、全てシンプルな point mutation であった。今回 FCMD 原因遺伝子である *fukutin* 遺伝子に変異が認められなかった患者を中心に、日本・韓国などアジア地域を含めた世界各国の WWS, 重症型の FCMD, MEB が疑われる患者計 30 人において *POMGnT1* 遺伝子異常のスクリーニングを行った。その結果、日本・韓国を含む世界各国の患者 6 人より、7 種類の変異を新たに見出した。これらの変異も全て point mutation であり、また今まで

見出したものと合わせた 13 変異は、*POMGnT1* 遺伝子全体に散在していた。MEB はフィンランドの疾患ではなくアジア人も含め世界中に分布することを見出した。

その変異位置と臨床症状との間に対して、眼・筋・脳に関して計 12 人の MEB 患者の臨床症状を調べたところ、比較的、多様な臨床症状が認められ、MEB 病には従来考えられていたよりも広い臨床スペクトラムが存在する事が分かった。また *POMGnT1* 遺伝子の 5'末端側に変異のある患者には水頭症があり、比較的重症な phenotype であるのに対して、3'末端側に変異のある患者には水頭症がなく比較的軽症な phenotype であった。

また FCMD では、西洋では点変異 2 個のため通常胎生致死になり患者が存在しないが、日本においては、珍しいレトロトランズポゾン DNA の挿入が起こったため、この疾患が発生した、としてきたが、この考えを裏付けるように、2003 年にトルコにおいて出生後 10 日で死亡した男児が、フクチン遺伝子の一塩基挿入変異をホモで持っていたことを報告した。海外の診断例ではもう一例、塩基置換によるノンセンス変異をホモで持ち、出生後 4 ヶ月半で死亡した例が報告されている (計 2 例)。

### (2) フクチンの構造と機能の解析と MEB 病原因糖転移酵素 POMGnT1 との連関に関する検討

フクチンの糖転移酵素活性を調べるために、フクチン強制発現細胞、あるいは FCMD 患者と健常人の線維芽細胞を用いて、Man 転移、GlcNAc 転移、Gal 転移、Sia 転移活性それぞれを測定したところ、現在のところ、フクチンには明らかな糖転位活性は、認められていない。

動物細胞での強制発現系においてフクチンの細胞内局在を観察したところ、フクチンはゴルジ体に局在し、フクチンの膜貫通領域にゴルジ体局在シグナルの存在が示唆された。一方 FCMD 患者で見られた Y371C ミスセンス変異体は小胞体に局在した。

POMGnT1 も同様にゴルジ体に局在した。さらに POMGnT1 とフクチンを共発現させると両者は共にゴルジ体に局在するが、正常型フクチンの代わりに Y371C 変異フクチンと共発現させると、POMGnT1 の局在も小胞体へと変化した。フクチンや POMGnT1 と同様に、 $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖修飾に関わっているとされる Large では、Y371C ミスセンス変異フクチンを共発現させて

\* 大阪大学院医ゲノム機能分野

\*\* 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

\*\*\* 大阪大学院医小児科

\*\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

\*\*\*\*\* 東京都老人総合研究所

も局在の変化は観察されなかった。また免疫沈降法による実験では、フクチンとPOMGnT1は共沈した。この結合はtwo-hybrid法でも確かめられた。フクチンの膜貫通領域のみをGFPと融合させた蛋白質を用いた実験でも、POMGnT1の共沈が観察された。これらの結果から、フクチンとPOMGnT1は細胞内において、膜貫通領域を通して結合していると考えられた。

$\alpha$ -dystroglycanの糖鎖修飾に異常をきたす各 $\alpha$ -ジストログリカノパチーにおいて、コア蛋白質に対する抗体でみた $\alpha$ -dystroglycanはいずれも同程度の分子量を示し、またフクチンには $\alpha$ -dystroglycanとlamininの結合に関わる糖鎖に関して明らかな糖転位活性が検出されないことから、フクチンはPOMGnT1と複合体を形成し、何らかの機能的連関を示すと思われる。

### (3) $\alpha$ -ジストログリカノパチーの神経筋接合部異常と筋分化遅延について

FCMD患者の骨格筋をNCNPで独自に開発されたcDNAマイクロアレイにより発現解析を行い、また、 $\alpha$ -dystroglycanopathyの一疾患であるLARGE変異モデルマウス(*myd*マウス)を用い、 $\alpha$ -dystroglycanopathyにおける発現解析及び病態解析を行った。

FCMD及び*myd*の筋線維では筋分化過程後期に発現する転写因子である*myf6*や*myosin heavy chain2, 7*の発現低下をきたし、また電顕的観察において、筋細胞の核及び筋線維の成熟障害を呈した。また神経筋接合部では免疫染色および電顕的観察において、著しい異常像を認め、 $\alpha$ -dystroglycanのクラスタリングも不良であった。これらのことより、神経筋接合部由来の筋分化シグナルが基底膜障害により不完全となり、筋線維の成熟障害を起こすことが、 $\alpha$ -dystroglycanopathyの筋ジストロフィー以外の主要な病態生理である可能性が示唆された。

### 今後の展望

$\alpha$ -dystroglycanopathyの一連の原因遺伝子の中で、その活性がわかっているのは、POMGnT1とPOMT1だけである。フクチンには $\alpha$ -dystroglycanとlamininの結合に関わる糖鎖に関して明らかな糖転位活性が検出されないことから、その働きは通常の酵素ではなく、モデュレーターのようなものが考えられるが、日本人に多い疾患のため、一刻も早く詐称を見い出さなければいけない。また今後は治療的アプローチが展開していくことが期待される。

### 文 献

- 1) Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tachikawa M, Many H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa H, Toda T: Deficiency of  $\alpha$ -dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 291:1283-1286, 2002.
- 2) Zanoteli E, Rocha JC, Narumia LK, Fireman MA, Moura LS, Oliveira AS, Gabbai AA, Fukuda Y, Kinoshita M, Toda T: Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: a case report in the Japanese population living in Brazil. *Acta Neurol Scand* 106:117-121, 2002.
- 3) Horie M, Kobayashi K, Takeda S, Nakamura Y, Lyons GE, Toda T: Isolation and characterization of the murine homologue of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, *fukutin*. *Genomics* 80:482-486, 2002.
- 4) Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Many H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, van Coster R, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, Nishino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T: Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 12:527-534, 2003.
- 5) Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, Simsek E, Tunc M, Alper M, Cam M, Guven A, Fukuda Y, Kinoshita M, Kocabay K, Toda T: A new mutation of the *fukutin* gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 53:392-396, 2003.
- 6) Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Tachikawa M, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Murakami T, Sunada Y, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T: Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 12:1449-1459, 2003.
- 7) Toda T, Kobayashi K, Takeda S, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Tachikawa M, Wang F, Nagai Y, Taniguchi K, Taniguchi M, Sunada Y, Terashima T, Endo T, Matsumura K: Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) and  $\alpha$ -dystroglycanopathy. *Congenit Anom* 43:97-104, 2003.
- 8) Toda T, Kobayashi K, Takeda S, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Tachikawa M, Wang F, Nagai Y, Taniguchi K, Taniguchi M, Sunada Y, Terashima T, Endo T, Matsumura K: Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and abnormal glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan. *Basic Appl Myol* 13:287-292, 2003.
- 9) Kurahashi H, Taniguchi M, Meno C, Taniguchi Y, Takeda S, Horie M, Otani H, Toda T: Basement membrane fragility underlies embryonic lethality in *fukutin*-null mice. *Neurobiol Dis* 10:208-217, 2005.

# 筋ジストロフィーにおける糖鎖異常と病態機序の解明

遠藤玉夫\*

研究協力者 萬谷博\* 赤阪啓子\* 千葉厚郎\*\* 吉田有人\*\*\*  
小林千浩\*\*\*\* 地神芳文\*\*\*\*\* 西原祥子\*\*\*\*\* 戸田達史\*\*\*\*\*

## 目 的

我々はこれまでに $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖解析により、マンノース(Man)を介してタンパク質に結合する新しいタイプの糖鎖、O-Man型糖鎖(Sia $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man)を発見した。さらに、O-Man型糖鎖の合成に関わるprotein O-mannose  $\beta$ 1,2 N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1)の遺伝子が、先天性の筋ジストロフィーに眼奇形、神経細胞移動障害を伴う常染色体劣性遺伝病であるmuscle-eye-brain (MEB)病の原因遺伝子であることを明らかにした<sup>1)</sup>。この原因遺伝子の特定により臨床症状が複雑多様であるMEBの遺伝子レベルでの確定診断が可能になり、その結果この疾患は欧州に限らず日本人を含め世界中に患者が分布していることが判明した<sup>2)</sup>。

一方、Walker-Warburg症候群(WWS)は、乳幼児期に死亡することが多くMEBより重篤な疾患である。オランダのグループによって酵母のO-Man型糖鎖合成の開始酵素であるO-Man転移酵素(protein O-mannosyltransferase: pmt)のヒトホモログ、POMT1遺伝子にWWS患者の20%で変異が起こっていることが報告され、POMT1がWWSの原因遺伝子であることが示された<sup>3)</sup>。哺乳類のpmtホモログとしてこれまでPOMT1とPOMT2が報告されているが、これらの酵素活性については全く明らかにされていなかった。

このように、 $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖異常、特にO-Man型糖鎖の修飾不全が筋ジストロフィーの発症原因となることが示唆されていることから、O-Man型糖鎖の生合成経路を解明し、筋ジストロフィーの発症メカニズムを生化学的に明らかにする必要がある。

## 方法と結果

我々は、MEB患者の遺伝子解析からPOMGnT1遺伝子に13種類の変異を見いだした。これらの変異遺伝子産物が酵素活性を有するかどうか調べるため、各変異を導入した変異型POMGnT1 cDNAを構築しHEK293T細胞に発現させ、酵素活性を測定した。その結果、すべての変異体で酵素活性が消失していたことから、MEBは

POMGnT1の機能喪失による疾患であると結論した<sup>4)</sup>。さらに、各変異が酵素活性に及ぼす影響を詳細に検討するため、N末端及びC末端側からアミノ酸を削ったPOMGnT1を作製し触媒活性領域を決定した<sup>5)</sup>。MEBで検出された変異のうち2例は、触媒領域ではない幹領域の1アミノ酸置換であったが、この解析から、これらの変異が幹領域を含めた全体の立体構造を変化させることによって酵素活性を阻害することが示唆された。また、MEB骨格筋での $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖異常を確認し、 $\alpha$ ジストログリカンが本酵素の標的分子の一つであることを示した<sup>6)</sup>。

O-Man転移酵素について、基質特異性や界面活性剤の要求性など反応条件を検討し、哺乳類におけるO-Man転移酵素活性の測定法を世界で初めて確立した<sup>7)</sup>。そこで、WWSの原因遺伝子産物、POMT1がO-Man転移酵素であるのか検討した。ヒトPOMT1及びPOMT2をHEK293T細胞に発現させ酵素活性を調べた。その結果、POMT1とPOMT2を共発現させた細胞でO-Man転移活性は顕著に上昇し、POMT1あるいはPOMT2の単独発現では活性の上昇は全く見られなかった。このことから、POMT1とPOMT2はO-Man転移酵素であることが明らかとなり、活性発現にPOMT1-POMT2複合体形成の必要性が示唆された<sup>7)</sup>。さらに、WWS患者の遺伝子解析から検出された、POMT1遺伝子の変異が酵素活性に及ぼす影響を調べた。これまでに7種の変異が見つかるが、このうち2種は酵素タンパク質の大部分が欠失するため活性はないと考えられることから、残り5種について各変異を導入した変異型POMT1 cDNAを作製し、HEK293T細胞にPOMT2と共発現させた。その結果、いずれの変異体も酵素活性を消失していたことから、WWSはPOMT1の機能喪失による疾患であると結論した<sup>8)</sup>。また、WWS骨格筋でもMEBと同じように $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖異常が起こっており、 $\alpha$ ジストログリカンが本酵素の標的分子の一つと考えられた<sup>3)</sup>。

ショウジョウバエにも2つのPOMTホモログがある。これらの解析から、ヒトと同様にPOMT活性発現には両ホモログの共存が必要であることを示した。また、RNAiによりそれぞれの発現を抑制すると筋形成がうまくできず体がねじれてしまうことを明らかにした。これらの結果は、脊椎動物と無脊椎動物を問わず筋形成におけるO-Man型糖鎖の重要性を示している<sup>9)</sup>。

\* 東京都老人総合研究所  
\*\* 杏林大学医学部  
\*\*\* キリンビール基盤技術研究所  
\*\*\*\* 大阪大学大学院医学系研究科  
\*\*\*\*\* 産業技術総合研究所糖鎖工学研究センター  
\*\*\*\*\* 創価大学工学部

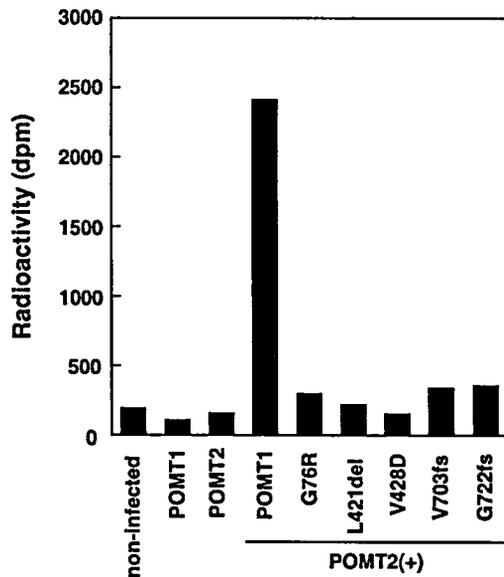


図1 ヒト POMT1 と POMT2 の O-Man 転移活性と WWS 患者より検出された POMT1 の変異による酵素活性への影響。POMT1 あるいは変異 POMT1 と POMT2 を単独あるいは共発現させ、O-Man 転移活性を測定した。POMT1 と POMT2 の共発現でのみ活性が顕著に上昇した。変異 POMT1 と POMT2 の共発現では活性の上昇は観察されなかった。G76R:Gly76Arg ミスセンス, L421del: Leu421 欠失, V428D: Val428Asp ミスセンス, V703fs: Val703 フレームシフト 729 停止, G722fs: Gly722 フレームシフト 729 停止。

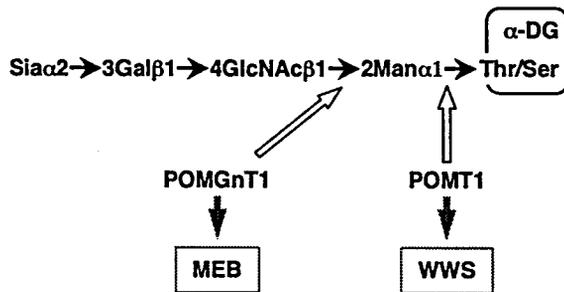


図2 O-Man 型糖鎖の生合成と筋ジストロフィー。POMT1 および POMGnT1 の変異により O-Man 型糖鎖不全となり、それぞれ WWS と MEB が発症する。α-DG: αジストログリカン, Sia: シアル酸, Gal: ガラクトース, GlcNAc: N-アセチルグルコサミン, Man: マンノース

### 考 察

本研究により、MEB と WWS の原因が O-Man 型糖鎖不全であることが明らかとなり、神経細胞移動障害を伴う筋ジストロフィーの発症機序に O-Man 型糖鎖が深く関与することが示された。POMT の変異は、O-Man 型糖鎖合成経路で POMGnT1 より初期に働く酵素の変異であり、MEB と比べて WWS では全く O-Man 型糖鎖ができないためにより重篤な症状を呈するのではないかと考えられる。

### 研究の意義

これらの成果は、生体における O-Man 型糖鎖の重要性を明白に示すものであり、さらに筋ジストロフィーの病態解明に向けて大きく貢献するものと期待される。最近

の研究により、MEB 病と類似の病態を呈する福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)、先天性筋ジストロフィー 1 C 型(MDC1C)、先天性筋ジストロフィー 1 D 型(MDC1D) など他の筋ジストロフィーでも、いずれも αジストログリカンの糖鎖修飾異常が認められ、神経細胞移動障害を伴う筋ジストロフィーの発症機序に糖鎖が深く関与すると考えられる<sup>10,11)</sup>。これらの異常を具体的に明らかにすることは、筋ジストロフィーの糖鎖病理機序の解明の新たな道を拓くことが期待される。

### 文 献

- 1) Yoshida A., Kobayashi, K., Many, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsuhashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., Herrmann, R., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Toda, T., Endo, T.: Dev. Cell 1: 717-24, 2001.
- 2) Taniguchi K., Kobayashi, K., Saito, K., Yamanouchi, H., Ohnuma, A., Hayashi, Y. K., Many, H., Jin, D. K., Lee, M., Parano, E., Falsaperla, R., Pavone, P., Van Coster, R., Talim, B., Steinbrecher, A., Straub, V., Nishino, I., Topaloglu, H., Voit, T., Endo, T., Toda, T.: Hum. Mol. Genet. 12: 527-34, 2003.
- 3) Beltran-Valero De Bernabe D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., Van Beusekom, E., Van Der Zwaag, B., Kayserili, H., Merlini, L., Chitayat, D., Dobyns, W. B., Cormand, B., Lehesjoki, A. E., Cruces, J., Voit, T., Walsh, C. A., Van Bokhoven, H., Brunner, H. G.: Am. J. Hum. Genet. 71: 1033-43, 2002.
- 4) Many H., Sakai, K., Kobayashi, K., Taniguchi, K., Kawakita, M., Toda, T., Endo, T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 306: 93-7, 2003.
- 5) Akasaka-Many, K., Many, H., Kobayashi, K., Toda, T., Endo, T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 320: 39-44, 2004.
- 6) Kano H., Kobayashi, K., Herrmann, R., Tachikawa, M., Many, H., Nishino, I., Nonaka, I., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Endo, T., Yoshikawa, H., Toda, T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 291: 1283-6, 2002.
- 7) Many H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis, R. U., Endo, T.: Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101: 500-5, 2004.
- 8) Akasaka-Many, K., Many, H., Endo, T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 325: 75-9, 2004.
- 9) Ichimiya T., Many, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Takahashi, K., Ueda, R., Endo, T., Nishihara, S.: J. Biol. Chem. 279: 42638-47, 2004.
- 10) Endo T., Toda, T.: Biol. Pharm. Bull. 26: 1641-7, 2003.
- 11) Endo T.: Glycoconjugate J. 21: 3-7, 2004.

# 筋形質膜蛋白質に起因しない筋ジストロフィーの病態解明についての研究

林 由起子\*

研究協力者 小澤律子\* 村上てるみ\* 松本浩\*  
黒川留美\* 小川恵\* 後藤加奈子\*  
野口悟\* 埜中征哉\* 西野一三\*

平成15年度は Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (EDMD) の原因遺伝子産物エメリンを欠損するモデルマウスについて報告した。また平成16年度は本邦で初めて MDC1C/LGMD2I 患者を見出したので報告した。本報告書では各年度の結果をそれぞれ記す。

## 平成15年度：エメリン欠損マウスの解析

### 目 的

EDMDは遺伝性の筋疾患で、1) 病初期から出現する関節拘縮、2) 緩徐進行性の筋力低下・筋萎縮、3) 心伝導障害を伴う心筋症を3主徴とする。核内膜に局在するエメリンの欠損によるX染色体劣性型、核ラミナの構成蛋白質であるラミンA/Cの欠損による常染色体優性・劣性型があるが、臨床的に明らかな違いはみいだせない。

モデル動物としてはこれまでにラミン A/C 遺伝子の knock-in と knock-out のマウスが報告されている。これらのマウスは生下時には明らかな異常は認めないが、ホモの変異マウスは出生 4~6 日齢で成長率の著明な低下を認め、6~8 週齢までに死亡する。筋病理像は心筋・骨格筋ともに筋線維の発達が見られず低形成で、週齢を追うごとに筋線維の萎縮もみられるようになる。一方、ヘテロマウスに明らかな異常は認めない。今回我々は X 染色体劣性型 EDMD の病態解明を目的にエメリン欠損マウスを作製し、解析したので報告した。

### 方法と結果

エメリン欠損マウスを作製し、遺伝子型、成長率、筋力低下・筋萎縮の有無、心筋・骨格筋病理所見、心電図変化について解析した。

81 週齢まで観察したところエメリン欠損マウスはヘテロや野生型と同様の成長曲線を示した。明らかな筋力低下や筋萎縮はみられず、繁殖も可能であった。骨格筋の病理所見でもジストロフィー変化、筋線維の低形成などはみられなかった。免疫染色ではエメリンは欠損していたがラミン A, C, B2, および LAP2 に明らかな異常は認められなかった。これはエメリンが欠損していても

ラミン A/C は核膜に局在できることを示唆している。心電図解析を行ったところエメリン欠損のマウスで房室伝導時間が有意に延長していた。PR 間隔は RR 間隔と正の相関を示すため PR/RR 比で検討したところ、エメリン欠損マウスで PR/RR 比  $0.40 \pm 0.05$  ( $n=32$ )、ヘテロ  $0.37 \pm 0.06$  ( $n=14$ )、野生型  $0.36 \pm 0.05$  ( $n=7$ ) であった。心伝導障害が明らかであるにもかかわらず心筋の線維化などの異常は認められなかった。

### 考察・今後の展望

エメリン欠損マウスは光顕レベルでは骨格筋・心筋ともに病理学的に明らかな異常はみられなかったが、心伝導系の細胞に何らかの異常を生じうるものと考えられた。今後心伝導型を中心に電顕レベルでの詳細な解析を進めていく予定である。

## 平成16年度：本邦におけるMDC1C/LGMD2I

### 目 的

$\alpha$ -ジストログリカン ( $\alpha$ -DG) の糖鎖修飾異常は、福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) をはじめ、複数の重症な筋ジストロフィーの病態と深く関わっている。MDC1C/LGMD2I の原因遺伝子産物、フクチン関連蛋白質 (FKRP) はフクチン同様  $\alpha$ -ジストログリカン ( $\alpha$ -DG) の糖鎖修飾に関与していると考えられている。MDC1C/LGMD2I は、これまでにヨーロッパや中東では多数の報告があるが、本邦からの報告例はない。

MDC1C は乳児期より筋緊張低下、運動発達遅滞を示し、歩行獲得に至らない重症の筋ジストロフィーである。FCMD と異なり、ほとんどの例では脳形成異常は認められず、精神発達も正常であるが、小脳嚢胞、滑脳症など脳奇形や重度の精神発達遅滞の合併例もある。一方、LGMD2I の発症は乳児期以降成人までと幅広く、独歩可能で精神発達は正常である。脳奇形も伴わない。これまでに報告されている90%以上の患者には共通の遺伝子変異(L276I)が認められる。MDC1C/LGMD2I ともに  $\alpha$ -DG の糖鎖を認識する抗体(VIA4-1)で  $\alpha$ -DG の異常が検出される。

我々は  $\alpha$ -DG の糖鎖修飾異常を示す患者の中に2例の MDC1C/LGMD2I を見出したので報告した。

\* 国立精神・神経センター神経研究所

## 方法と結果

臨床筋病理学的に非福山型先天性筋ジストロフィー (nonFCMD) と診断された患者 63 例について  $\alpha$ -DG (VIA4-1) 抗体を用いたスクリーニングを行い、免疫反応で異常を認めた例についてFKRPならびにフクチンの遺伝子解析を行った。

VIA4-1の免疫反応が減弱 (23例) あるいは欠損 (11例) していた計34例について遺伝子変異検索を行った結果、フクチン遺伝子の3-kb挿入変異を3例、FKRP変異を2例見出した。FKRP変異例の臨床症状を下記に記す。

<患者1> 6歳日本人女兒。出生時より筋緊張低下、運動発達遅滞を認め、独歩はできず現在車椅子。精神発達は正常で小学校普通学級に通学中である。顔面筋罹患はなく、先天性の内斜視を認めるものの、眼底異常なし。四肢筋力低下と下腿の肥大を認めた。血清CK値は6,429IU/lと高値。頭部MRI上脳回の形成異常はないが、小脳に複数の嚢胞を認めた。筋病理像はFCMDと酷似していた。

<患者2> 9歳台湾在住中国人女兒。周生期は吸綴力の

弱さ以外には異常は認めない。運動発達歴は定額3ヶ月、独座7ヶ月、独り立ち1歳2ヶ月、独歩2歳とやや遅れを認め、1歳7ヶ月時よりGower's signを認める。精神発達は正常で頭部MRIも正常。顔面筋罹患なし。眼所見正常。現在も独歩可能。腓腹筋肥大あり。血清CK値は4,924IU/lと高値。筋病理変化は症例1に比べ軽度。

2例とも骨格筋におけるVIA4-1の免疫反応は欠損していた。 $\alpha$ -DGのコア抗体(GT20ADG)では、FCMDとほぼ同じ分子量の $\alpha$ -DGが検出されたが、ラミニンとの結合はみられなかった。FKRP遺伝子検索の結果、患者1に266C>G (P89A)と1169\_1170delGC、患者2に823C>T (A275C)と987delCといった、いずれも新規の変異が見出された。

## 考察・今後の展望

本邦にもMDC1C/LGMD2I例が存在する。これまでの報告例と考え合わせると、FKRP遺伝子変異による臨床症状、 $\alpha$ -DGの変化はきわめて多様である。今後、より臨床症状の軽い例にも検索範囲を広げていく予定である。

# 新たなモデル動物を用いた $\alpha$ -dystroglycanopathyの 発症機序に関する研究

清水 輝 夫\*

研究協力者 斉藤 史明\* 新井 謙\* 水谷 誠\*\* 松村 喜一郎\*

## 目 的

福山型筋ジストロフィー, muscle-eye-brain 病, Walker-Warburg 症候群, MDC1C, MDC1D などの先天性筋ジストロフィーの発症には, 糖転移酵素と推測される蛋白をコードする遺伝子群の変異により引き起こされる $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖異常と, その結果生じる laminin 結合能の低下が関与しているものと考えられている。これらの疾患は $\alpha$ -dystroglycanopathy と総称されているが, 最近我々は以前から筋ジストロフィーのモデル動物として知られていた筋ジストロフィー鶏が $\alpha$ -dystroglycanopathy のモデル動物として有用であることを見いだした。本研究の目的はこの新たなモデル動物の解析を通して $\alpha$ -dystroglycanopathy の発症機序を解明することである。

## 方 法

$\alpha$ -dystroglycan および dystrophin 糖蛋白複合体の各構成蛋白に対する抗体を用いて免疫蛍光抗体法, ウェスタンブロット法により筋ジストロフィー鶏の骨格筋における各蛋白の発現を検討した。Trifluoromethanesulfonic acid (TFMS) による化学的脱糖鎖を行い,  $\alpha$ -dystroglycan の分子量の変化をウェスタンブロット法にて観察した。また,  $\alpha$ -dystroglycan の laminin 結合能をプロットオーバーレイアッセイ, ソリッドフェーズアッセイにより検討した。さらに, レクチンを用いて同鶏の $\alpha$ -dystroglycan における糖鎖の変化を観察した。

## 結 果

$\alpha$ -dystroglycan の糖鎖部分に対する抗体 (IIH6) を用いた免疫蛍光抗体法の結果,  $\alpha$ -dystroglycan の免疫反応性は減少していたが, 他の dystrophin 糖蛋白複合体構成蛋白の発現は正常であった。IIH6 を用いたウェスタンブロットでは $\alpha$ -dystroglycan の分子量の低下と免疫反応性の減弱を認めたが, core protein に対する抗体では $\alpha$ -dystroglycan の分子量の低下のみを認め免疫反応性は保たれていた。TFMS による脱糖鎖後にウェスタンブロットを行うとコントロールとの分子量の差はなくなることから, この $\alpha$ -dystroglycan の分子量の低下は糖鎖修飾の異常に起因するものと考えられた。プロットオーバーレイアッセイ, ソリッドフェーズアッセイの結果,

$\alpha$ -dystroglycan の laminin 結合能は減少していた。レクチンを用いた糖鎖解析の結果, 同鶏の $\alpha$ -dystroglycan にはコントロールと比較して Gal $\beta$ 1-3GalNAc が多く, 逆にシアル酸が少ないことが明らかとなった。

## 考 察

上記結果より筋ジストロフィー鶏における筋線維の変性, 壊死には $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖異常と laminin 結合能の減少が関与していると考えられ, 同鶏は $\alpha$ -dystroglycanopathy のモデル動物として有用であることが明らかとなった。我々はこれまでに $\alpha$ -dystroglycan の laminin との結合には $\alpha$ -dystroglycan のシアル酸が重要な役割を果たしていることを報告しており, 同鶏における $\alpha$ -dystroglycan の laminin 結合能の減少の一因は $\alpha$ -dystroglycan のシアル酸含量の減少にある可能性が考えられた。

## 研究の意義

筋ジストロフィー鶏が $\alpha$ -dystroglycanopathy のモデル動物として有用であることを明らかにした。筋ジストロフィー鶏は $\alpha$ -dystroglycanopathy の分子発症機序を解析し, 治療法を開発する際に有用である。

## 文 献

- 1) Matsumura, K., et al. FEBS Lett. 334:281-285, 1993.
- 2) Yamada, H., et al. FEBS Lett. 352:49-53, 1994.
- 3) Yamada, H., et al. J. Neurochem. 66:1518-1524, 1996.
- 4) Yamada, H., et al. J. Biol. Chem. 271:23418-23423, 1996.
- 5) Chiba, A., et al. J. Biol. Chem. 272:2156-2162, 1997.
- 6) Matsumura, K., et al. J. Biol. Chem. 272:13904-13910, 1997.
- 7) Matsumura, K., et al. Histol. Histopathol. 12:195-203, 1997.
- 8) Matsumura, K., et al. Neuromusc. Disord. 7:7-12, 1997.
- 9) Saito, F., et al. J. Biol. Chem. 272:26708-26713, 1997.
- 10) Sasaki, T., et al. Biochim. Biophys. Acta 1425:599-606, 1998.
- 11) Saito, F., et al. J. Biol. Chem. 274:8240-8246, 1999.
- 12) Shimoji, Y., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:9857-9862, 1999.

\* 帝京大学医学部神経内科

\*\* 日本生物科学研究所

- 13) Matsumura, K., et al. *Cell. Molec. Biol.* 45:751-762, 1999.
- 14) Masaki, T., et al. *Acta Neuropathol.* 99:289-295, 2000.
- 15) Claudepierre, T., et al. *J. Cell Sci.* 113:3409-3417, 2000.
- 16) Masaki, T., et al. *Acta Neuropathol.* 101:174-178, 2001.
- 17) Yamada, H., et al. *Hum. Molec. Genet.* 10:1563-1569, 2001.
- 18) Masaki, T., et al. *Exp. Neurol.* 174:109-117, 2002.
- 19) Matsumura, K., et al. *Current Topics in Neurochemistry* 3: 131-140, 2002.]
- 20) Matsumura, K., et al. *Neuromusc. Disord.* 13:796-803, 2001.
- 21) Matsumura, K., et al. *Basic and Applied Myology* 13: 299-304, 2003.

### III. OPMD(眼咽頭筋ジストロフィー) およびミオパチー

# Agrin/MuSK 系障害における限局性骨格筋障害の臨床と病因的考察

佐橋 功\*

研究協力者 衣斐 達\* 中尾直樹\* 木全弘治\*\* 平澤恵里\*\*\*  
本村政勝\*\*\*\* 田中雅嗣\*\*\*\* 大野欽司\*\*\*\*\*

## はじめに

筋ジストロフィー (PMD) の骨格筋障害には、疾患特異的な筋障害の分布があり、それは神経細胞、骨格筋細胞の自体の機能等との関連が示唆されている。さて神経筋接合部疾患である重症筋無力症 (MG) では、約 80% が抗 AChR 抗体陽性の seropositive MG; SPMG, 10% が抗 AChR 抗体陰性で neural agrin (n-agrin) のシグナル伝達受容体である muscle specific receptor tyrosine kinase (MuSK: MW 110 kDa のシグナル伝達受容体) に対する IgG 抗体陽性の seronegative MG (SNMG) があり、多くの SNMG の慢性期には特徴的な顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) 様の治療抵抗性・進行性の顔面・咽頭、上肢近位筋萎縮が来る<sup>1)2)3)</sup>。

すなわち SNMG は神経筋接合部の後シナプス領域の基底膜上でシグナル蛋白としての laminin  $\alpha 4$  等と結合した neural agrin (n-agrin) 誘導性の AChR clustering<sup>4)5)</sup> の減少を生ずる agrin>MuSK 系の障害である。すなわち n-agrin  $\rightarrow$  MuSK 異常 (欠乏?) は筋萎縮という病態との関連性が示唆され、慢性期 SNMG 症例の提示と病態・病因に関し検討を加えた。

## 症 例

患者: 43 歳, 女性, 23 歳時に軽度の眼症状で発症し, 次第に顔面筋・球麻痺, 肩甲帯筋の脱力や軽度の筋萎縮が進行したが, 日内変動は乏しかった。以降, 胸腺摘出術を受け数回のクリーゼも経験したが, 一過性に有効な免疫吸着療法以外に治療抵抗性であった。1994 年 7 月 AG Engel 教授の診察にて SNMG と診断され, 以降は ADL は維持されたため 41 歳以降は全薬物治療を中止した。しかし FSHD 類似の顔面筋・球筋・肩一腕の萎縮・筋力低下は緩徐進行し ADL 上の障害も明らかであるが, 外眼筋, 腹部以下の体幹筋・下肢筋は略正常である。主な臨床検査では抗核・抗 cryoglobulin 抗体陽性, 筋電図は筋原性, waning 陽性, 顔面筋の SFEMG で伝導ブロックが明らかであった。四肢骨格筋 MRI では上腕の伸筋優位の筋萎縮を認める。各種抗 AChR 抗体や抗 LEMS 抗体は

陰性, 抗 MuSk 抗体; 5.7 nMol/l ( $n < 0.05$ ) 陽性, 血漿 TNF  $\alpha$  は 74.5 pg/ml (陽性)。病初期の上腕三頭筋生検では生化学所見を含み特異な所見はなく, 進行期の外肋間筋生検では軽度の筋原性所見を呈した。なお  $\alpha$ -dystroglycan (DG), perlecan, laminin  $\alpha$ , agrin 免疫染色に異常なかった。胸腺病理は正常であった。

## SNMG 骨格筋萎縮の成因

Agrin は heparan sulfate proteoglycan (chromosome 1 にコード) で, 3' 端の相違で LN と SN isoform があり, LN isoform の 3' 端近辺には X, Y, Z の 3 つの alternative exons が存在し, Z は Z1 と Z2 の 2 exons から構成され Z+ isoform は強力な AChR clustering 活性を持つ n-agrin で Z- isoform は m-agrin である。n-agrin は laminin  $\alpha 4$  や AChR anchoring のため  $\alpha$ -DG と結合し, m-agrin は laminin  $\alpha 2$ ,  $\alpha$ -DG,  $\alpha 7$  integrin と結合した基底膜構築蛋白である。

SNMG の筋萎縮発現の機序として, 第一に AChR clustering に至る経路以外に骨格筋量の維持効果を示す未知の MuSK 経路が抗 MuSK 抗体で障害された可能性が考えられ, 実験的に MuSK knock-out mice には筋萎縮が出現し, agrin > MuSK 系は myotrophic effect を有する可能性が示されている。ゆえに未知の本経路の解明には, MyoD, myogenin 等の myogenic determination factors の筋線維内発現量を SNMG と SPMG で比較し, とくに myogenin と Myf6 の減少の確認が必要であるが, 両者間でこれら transcription factors の発現量の差がないと検出は困難で, かつ SNMG 症例数が必要となる。

第二の SNMG 筋萎縮の機序として, (A) m-agrin 量の変動に伴う可能性がある。すなわち n-agrin を代償的に増やすため agrin pre-mRNA が専ら n-agrin を作るのに使われ, m-agrin が減少  $\rightarrow$  m-agrin 結合分子である laminin  $\alpha 2$ ,  $\alpha$ -DG,  $\alpha 7$  integrin が減少する; (B) n-agrin の代償的な増加  $\rightarrow$  agrin transcript 総量が増加し, その副次効果として m-agrin が増加  $\rightarrow$  m-agrin 結合分子である laminin  $\alpha 2$ ,  $\alpha$ -DG,  $\alpha 7$  integrin の細胞表面分布が変わる等で骨格筋病態を来すというものである。そのために m-agrin 発現の増減を mRNA の transcript 量を定量し, さらに n-/m-agrin タンパク量をみる必要がある。mRNA の transcript 定量のためには, LN isoform について, n-と m-型の Z+ と Z- isoforms の mRNA の比較定量を要する。我々は 2 つのプライマーのデザイン: (1) Exon Z1, Z2 を挟む exon 内にプライマー

\* 愛知医科大学神経内科  
\*\* 愛知医科大学分子医学研究所  
\*\*\* 順天堂大学脳神経内科  
\*\*\*\* 長崎大学医歯薬学総合研究科病態解析・制御学  
\*\*\*\*\* 岐阜県国際バイオ研究所 遺伝子治療研究部  
\*\*\*\*\* 名古屋大学神経疾患腫瘍センター神経遺伝情報学

を設定する方法, (2) イントロンをまたぐ形にプライマーを設定し分析中である。

最後に agrin と筋ジストロフィー治療との関連につき, Taniguchi ら<sup>6)</sup>は FCMD ではおそらく agrin の mRNA 量が対照筋に比し増加していると報告した。これは FCMD の筋萎縮を代償するため agrin が骨格筋を増加させる重要な膜成分であることを示唆している。また, 非シナプス領域の agrin 発現量は正常マウスにおいて各骨格筋毎に大きく異なっており, 骨格筋の筋線維の筋線維タイプや選択的な罹患筋部位の決定には, agrin の発現が重要な役割を果たしている可能性があり, また筋ジス・マウスなどでその発現量は変化していると報告されている<sup>7)</sup>。

#### 結 語

SNMG における agrin/MuSK 系統の障害による特異な筋病態の検討より, ミオパチーにおける骨格筋萎縮や萎縮の分布には agrin (n-/m-) の関連が考えられ, また骨格筋における agrin 系の賦活等が筋萎縮に対する治療システムに繋がることが示唆された。

#### 文 献

1) Evoli A, Tonali PA, Padua L, et al.: Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain* 26:2304-2311, 2003.

- 2) Sanders DB, El-Salem K, Massey JM, et al.: Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. *Neurology* 60:1978-1980, 2003.
- 3) Vincent A, Bowen J, Newsom-Davis J, et al.: Seronegative generalised myasthenia gravis: clinical features, antibodies, and their targets. *Lancet Neurol* 2:99-106, 2003.
- 4) Willmann R, Fuhrer C.: Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptors revisited. *Cell Mol Life Sci.* 59:1296-1316, 2002.
- 5) DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, et al.: The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85: 501-512, 1996.
- 6) Taniguchi M, et al.: *Am J Hum Gen* 73:576 2003 (abstract).
- 7) Moll J, Barzaghi P, Lin S, et al. : An agrin minigene rescues dystrophic symptoms in a mouse model for congenital muscular dystrophy. *Nature* 413:302-307, 2001.
- 8) Eusebio A, Oliveri F, Barzaghi P, et al. : Expression of mouse agrin in normal, denervated and dystrophic muscle. *Neuromusc Disord* 13 :408-415, 2003.

# 筋型糖原病の生化学・遺伝子診断法の確立および病態に即した治療法の開発

杉江秀夫\*

研究協力者 福田 冬季子\* 鈴木 輝彦\* 大澤 純子\*  
杉江 陽子\*\* 平野 浩一\*\* 宮本 健\*\*  
西野 一三\*\*\* 斉藤 加代子\*\*\*\* 清水 輝夫\*\*\*\*\*

## 目 的

筋型糖原病は嫌気性解糖における先天的な酵素欠損の為、筋収縮時にエネルギー供給不全を引き起こし筋痛、筋硬直、横紋筋融解症、筋力低下などを来す疾患である。本疾患の診断には生検筋、血球などを用いた酵素診断が必要だが、一部の疾患ではDNA診断が可能である。早期に診断し、適切な生活指導、治療を行うことにより合併症の予防が可能である。本研究では(1)筋型糖原病のわが国における実態を明らかにする、(2)診断法の開発および診断ガイドラインの作成、(3)治療法の開発、を研究課題とした。治療については遺伝子治療が根本治療として位置づけられるが、過渡的な方法として本疾患の病態を考慮し、残存酵素の賦活化及び正常に機能している他の代謝経路を利用した基質の補充などにより、新たな治療法の開発を検討する。

## 方法と結果

### (1) 筋型糖原病のわが国における実態

平成14年度に質問紙法で全国調査を行った。その結果II型(Pompe病: acid maltase 欠損症)、III型(Cori病: debranching enzyme 欠損症)、V型(McArdle病: myophosphorylase 欠損症)で全体の75%を占めた<sup>1)</sup>。

### (2) 診断法の開発および診断ガイドラインの作成

頻度の多いII、III、V型のスクリーニングとしてポリクロナール抗体を作成し、western blotにより検討した。少量の筋組織でスクリーニングが可能であった。従来の阻血下(嫌気性)前腕運動負荷試験に対して、Hogrelらの好気性前腕運動負荷試験(non-ischemic forearm exercise test (NIFET))が報告された<sup>2)</sup>。正常対象5例、PGK欠損症1例で検討しその有用性について分析した。正常対象では好気条件でも乳酸の上昇は前値の2.5倍以上であり、糖原病では乳酸の上昇を認めなかった。本方法は従来の阻血下と同様な診断価値があり、患者に対する負荷、危険性が少ないと考えられた。遺伝子診断法では日本人

のV型で約50%に好発遺伝子変異があり、診断に有用である<sup>3)</sup>。

### (3) 治療法の開発

V型の病態として筋内Vit.B6含量が低下している事、Vit.B6は内因性のphosphorylase活性を増加させる事、糖分の補給が症状を改善させる事を基礎に、Vit.B6投与とコーンスターチ併用療法を考案し実施した<sup>4)</sup>。対象は本治療について本人または保護者から文書による同意を得たV型患者5人(女1人、男4人、年齢3歳~82歳)。Open trialによる治療デザインとして2つの投与群を設定した。A群: Vit.B6単独から開始その後Vit.B6+コーンスターチ併用、B群: Vit.B6+コーンスターチ併用から開始その後Vit.B6単独の2群である。Vit.B6の投与量は15歳以下60mg、15歳以上120mg/day、分2、コーンスターチ1g/kg、分2。最初の2ヶ月観察期を置き、2ヶ月の投与期、2カ月半のwash-outさらに2ヶ月治療、その後2ヶ月観察を行った。MMTによる評価、副作用の評価および患者による各尺度の記入(1)Fatigue Severity Scale (FSS)、(2)Short Form-36 Health Survey (SF-36)、item 3、(3)Severity Scale of Exercise-Induced Muscle Pain in Working Muscles、(4)Frequency Scale of Exercise-Induced Muscle Pain in Working Muscles、(5)Clinical Global Impression Scale<sup>5)</sup>。血液検査として一般採血、特殊採血(血清pyridoxal phosphate)を行った。Vit.B6とコーンスターチの服用について副作用は無く安全に終了した。症状の分析では有意な改善は認めなかった。しかしながらCKの値がVit.B6+コーンスターチ、Vit.B6服用にともない有意に低下した(P<0.05)。

## 考 察

今までの研究成果を元に、筋型糖原病の診断のためのフローチャートを作成し提案した(図1)<sup>6)</sup>。このフローチャートに従って検索すれば、筋型糖原病の70%は血球での診断が可能である。V型の症状は運動時の筋症状、特に筋痛、筋硬直をしめすが高齢になるに従い、一部の例で進行性の筋力の低下が見られる例がある。これは日常に少しずつ起こっている筋細胞障害の蓄積によることも推測されている。今回見られたように、Vit.B6投与で

\* 浜松市発達医療総合センター小児神経科

\*\* 浜松医科大学小児科

\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

\*\*\*\* 東京女子医科大学遺伝子医療センター

\*\*\*\*\* 帝京大学医学部神経内科

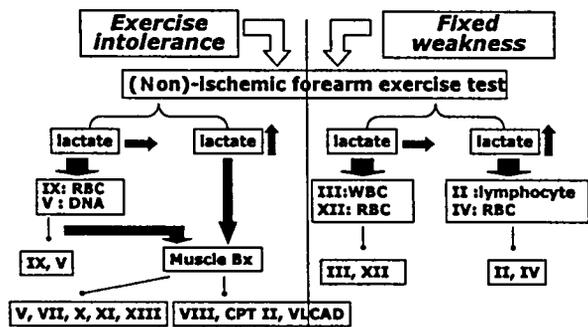


図1 筋型糖原病診断フローチャート(臨床症状から見た) ver.1  
 【精神神経疾患研究委託費(清水判): 浜松市発達医療総合センター小児神経科 杉江】  
 (RBC, 赤血球; WBC, 白血球; CPT, carnitine palmitoyl transferase; VLCAD, very long chain acyl CoA dehydrogenase)

表1 McArdle病(糖原病V型)に対するビタミンB6, コーンスターチ療法

Recommendation

- ・ビタミンB6は筋細胞の障害を軽減する可能性が示唆されるので, 将来的な筋細胞の障害蓄積を緩和することを期待して一日25-50mgを服用する. ただし血中濃度の上昇には個人差があるため, PALで50-100ng/mlとなるように服用量を調節する.
- ・コーンスターチあるいは糖分は特に運動が予想される前に1-2g/kg 摂取する事で効果が期待できる.
- ・運動をするにあたって急激な運動は避け, 準備運動を穏やかに行った後に運動する事が望ましい.
- ・ビタミンB6の長期服用にあたっては定期的な副作用チェックおよび診察を行う事が必要である.

有意に CK が低下した事は本治療により今後筋の障害の蓄積を少しでも抑制できるのではないかと期待される. 近年本症の患者において朝糖분을補給して運動を行った結果が報告され<sup>7)</sup>糖分摂取があきらかに良い効果を示しているため, 理論的にはコーンスターチは効果があると考えられる. 今回コーンスターチの服用があまり効果として現れなかった点については今後さらに検討する余地がある. 以上 CK の値の変化は subclinical であるものの有意であり, 筋細胞障害に何らかの抑制を期待できる可能性があるため今後は Vit.B6 療法の長期予後についての検討が必要である. 最終的に今回の結果から V 型の治療方針として表 1 に示す recommendation を提案した.

今後の展望

本研究の重要課題は治療法の開発である. 3 年間での研究成果として V 型に対する治療ガイドライン及び筋型糖原病の診断フローチャートを提案できた. 今後は他の糖原病特に予後が不良な II 型, III 型について治療法を開発すること, V 型では Vit.B6 療法の長期予後について検討を進めたいと考えている.

文 献

- 1) 福田冬季子, 杉江秀夫, 伊藤政孝, 杉江陽子, 斉藤加代子, 西野一三, 清水輝夫. 筋型糖原病の全国調査および浜松市発達医療総合センターにおける筋型糖原病診断症例の比較検討. 臨牀神経 43: 243-8, 2003.
- 2) Hogrel JY, Laforet P, Yaou B, et al. A non-ischemic forearm exercise test for the screening of patients with exercise intolerance. Neurology Jun 26;56(12):1733-8, 2001.
- 3) Sugie H, Sugie Y, Ito M, Fukuda T, Nonaka I, Igarashi Y: Genetic analysis of Japanese patients with myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): single-codon deletion in exon 17 is the predominant mutation. Clin Chim Acta Apr 30;236(1):81-6, 1995.
- 4) Phoenix J, Hopkins P, Bartram C, et al. Effect of vitamin B6 supplementation in McArdle's disease: a strategic case study. Neuromusc Disord 8:210-212, 1998.
- 5) Vorgerd M, Zange J, Kley R, Grehl T, Husing A, Jager M, Muller K, Schroder R, Mortier W, Fabian K, Malin JP, Luttmann A.. Effect of high-dose creatine therapy on symptoms of exercise intolerance in McArdle disease: double-blind, placebo-controlled crossover study. Arch Neurol Jan 59(1):97-101, 2002.
- 6) Sugie H, Sugie Y: Muscle Glycogen Storage Diseases (MGSDs): Overview and Diagnostic Approach. Invited Lecture, 3<sup>rd</sup> Asia-Oceanic Myology Center (AOMC) Annual Scientific Meeting. Singapore 2004
- 7) Vissing J, Haller RG. The effect of oral sucrose on exercise tolerance in patients with McArdle's disease. N Engl J Med 349(26):2503-9, 2003.

# コラーゲン VI 異常による筋疾患 (Ullrich 病, Bethlem myopathy) の臨床的, 病理学のおよび遺伝子学的研究

樋口逸郎\*

研究協力者 新山尚仁\* 内田裕一\*\* 東 桂子\* 白石匡史\*  
 平野隆城\* 岡本裕嗣\* 迫田俊一\* 斉藤明子\*  
 堀切尚\* 胡静\* 高嶋博\* 末原雅人\*\*\*  
 有村公良\* 納光弘\*

## 目 的

Ullrich 型先天性筋ジストロフィー(Ullrich 病)は 1930 年に Ullrich により初めて記載された疾患であり, 生下時・幼少時から筋力低下, 筋萎縮を認め, 近位関節の拘縮と遠位関節の過進展を特徴とする疾患である。進行性の経過を示し, 遺伝形式は常染色体劣性遺伝と考えられる。我々は本症の病因である collagen VI 蛋白欠損をはじめて明らかにし遺伝子異常を報告したが<sup>1)2)</sup>, 本症の病態を明らかにするため本症の生検筋, 生検皮膚, および培養線維芽細胞を用いて病理学的に検索した。

また, Bethlem myopathy は関節拘縮を合併する常染色体優性遺伝の良性ミオパチーである。Bethlem myopathy も細胞外マトリックスを構成する collagen VI の三本鎖を形成する各遺伝子 (COL6A1, A2, A3) の変異に起因することが知られているが, 同じ遺伝子に変異を有する Ullrich 病とはその臨床像, 筋病理像に大きな違いがみられる。Bethlem myopathy の国内における報告は少なく, 我々が経験した 1 家系 (図 1) について遺伝子異常を確定し Ullrich 病との筋病理学的相違点について検討し, 両疾患における筋病変の発生機序を解明する。

## 方法と結果

遺伝子検索は Ullrich 病 2 症例と Bethlem myopathy 4 症例中 3 症例の末梢血から DNA を単離し, COL6A1, A2, A3

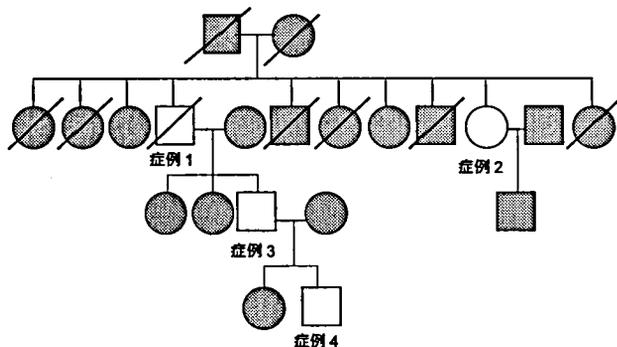


図 1 Bethlem myopathy の家系図

遺伝子の exon 領域とその splice site を PCR 増幅後に dye-terminator 法により塩基配列決定した。その結果 Ullrich 病の 2 症例においては, COL6A2 遺伝子の triple helical domain (exon 18) に 26 塩基の欠失を伴うホモのフレームシフト変異が認められた。また Bethlem myopathy の患者では COL6A1 遺伝子の intron 14 の splice donor site +1 position に G→A のヘテロの塩基置換変異が確認された。

筋病理学的検討には Ullrich 病の生検筋, 生検皮膚および培養皮膚線維芽細胞と Bethlem myopathy の生検筋を用い, 組織化学染色ならび免疫組織染色を施行した。免疫染色は細胞外マトリックス蛋白, 筋膜蛋白および筋再生関連蛋白に対するモノクローナル抗体を使用した。Ullrich 病においては collagen VI が欠損していたが, Bethlem myopathy では collagen VI の染色性は保たれていた。Bethlem myopathy では筋基底膜部分での laminin  $\beta 1$  の染色性低下が認められたが, Ullrich 病では保たれていた。NG2 proteoglycan は Ullrich 病の筋膜で発現が低下していたが, Bethlem myopathy では正常に発現していた。また Ullrich 病の皮膚および培養線維芽細胞において fibronectin receptor の発現が著明に低下していた<sup>4)</sup>。さらに Ullrich 病においては小径線維に再生線維のマーカーとされている desmin や NCAM は強く発現していたが, developmental myosin heavy chain の発現は弱く neonatal myosin heavy chain は他疾患に比べてより小径の線維のみに発現が局限していた<sup>5)</sup>。

Ullrich 病の電顕的観察では筋形質膜は過伸展し, 嚢状に変化している部位が存在し, 基底膜の肥厚, 増殖が認められた<sup>3)</sup>。骨格筋内毛細血管の観察では, 血管内腔の狭窄, pinocytotic vesicle の増加, 内皮細胞質の高電子密度, 毛細血管基底膜の層状変化, 有窓毛細血管を認めた<sup>2)</sup>。

Ullrich 病 2 症例については皮膚線維芽細胞を用いたウェスタンブロッティングを行ない, 症例間の collagen VI 残余蛋白量を比較した。同じ遺伝子異常を有する 2 症例の間で collagen VI の各 chain の残余蛋白量は異っており, 残余蛋白量を指標にして変異を有する chain を推定することは困難であった。

\* 鹿児島大学神経内科・老年病学  
 \*\* 国立病院機構南九州病院神経内科  
 \*\*\* 国立病院機構沖縄病院神経内科

表1 Ullrich病とBethlem myopathyの比較

	Bethlem myopathy	Ullrich's disease
Inheritance	Autosomal dominant	Autosomal recessive
Mutated genes	COL6A1, A2, A3	COL6A2, A3, (A1)
Pathogenesis	Dominant negative ?	Loss of function
Collagen VI staining	Normal	Deficient
Laminin $\beta$ 1 staining	Decreased	Normal
Onset	Birth to adult	Birth to infant
Distal laxity	Rare	All
Proximal contracture	Frequent	Frequent
Weakness	Mild	Severe
Respiratory failure	Rare	Frequent

### 考 察

Duchenne型筋ジストロフィーのような筋膜の欠損に伴う筋線維の壊死のみではUllrich病骨格筋のdystrophicな変化は説明困難と思われ、接着分子やその受容体異常による筋成熟障害、あるいは筋再生障害が病態に関与する可能性がある。常染色体優性のBethlem myopathyで報告されているcollagen VI遺伝子のヘテロ変異によるミオパチーはdominant negativeの機序によるとされており、collagen VI蛋白の完全欠損を呈した報告はみられない。Ullrich病では著明なcollagen VI蛋白の低下があり、loss-of-functionの機序が考えられ、ヘテロの両親は発症しない。しかしUllrich病においてもcollagen VI  $\alpha$  3遺伝子のホモ変異で軽症例の報告もあり、今後Ullrich病患者における臨床病型、collagen VI蛋白異常および遺伝子異常の比較検討が必要である。Ullrich病とBethlem myopathyの相違点を表1に示す。

我が国におけるBethlem myopathy家系の遺伝子異常の確定は今回が最初である。本家系ではCOL6A1遺伝子に異常が確認された。このsplice donor siteでの遺伝子異常はpre-mRNA splicing決定に障害を生じexon 14のskippingを来した結果、アミノ酸の欠失を生じているものと推定される。症例間におけるlaminin  $\beta$  1発現の差異は、不完全なcollagen VIが引き起こす二次的laminin  $\beta$  1の変化と加齢的要素が修飾を加えた現象と考えられる。laminin  $\beta$  1の低下はUllrich病には見られずcollagen VI異常のみによる現象としては説明できない。Ullrich病とBethlem myopathyはともにcollagen VIの遺伝子異常を病

因とするが、collagen VIと関連する他の細胞外マトリックス分子に質的に異なる変化を来しており、それぞれの特徴的病態形成に関与する可能性がある。

### 今後の展望

今後Ullrich病とBethlem myopathyの接着分子の発現異常、骨格筋の分化、再生異常についてのより詳細な検討が必要である。最近重症例のBethlem myopathyや比較的軽症例のUllrich病の報告もあり、collagen VIの遺伝子異常を伴う筋疾患の病態を明らかにするためより多くのUllrich病およびBethlem myopathy患者における臨床病型、collagen VI蛋白異常および遺伝子異常の比較検討が必要である。

### 文 献

- 1) Higuchi I, Suehara M, Iwaki H, Nakagawa M, Arimura K, Osame M.:Collagen VI deficiency in Ullrich's disease. *Ann Neurol.* 49:544, 2001.
- 2) Higuchi I, Shiraishi T, Hashiguchi T, Suehara M, Niiyama T, Nakagawa M, Arimura K, Maruyama I, Osame M.:Frameshift mutation in the collagen VI gene causes Ullrich's disease. *Ann Neurol.* 50:261-265, 2001.
- 3) Niiyama T, Higuchi I, Suehara M, Hashiguchi T, Shiraishi T, Nakagawa M, Arimura K, Maruyama I, Osame M.:Electron microscopic abnormalities of skeletal muscle in patients with collagen VI deficiency in Ullrich's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 104:67-71, 2002.
- 4) Hu J, Higuchi I, Shiraishi T, Suehara M, Niiyama T, Horikiri T, Uchida Y, Saito A, Osame M.:Fibronectin receptor reduction in skin and fibroblasts of patients with Ullrich's disease. *Muscle Nerve.* 26:696-701, 2002.
- 5) Niiyama T, Higuchi I, Hashiguchi T, Suehara M, Uchida Y, Horikiri T, Shiraishi T, Saito A, Hu J, Nakagawa M, Arimura K, Osame M.:Capillary changes in skeletal muscle of patients with Ullrich's disease with collagen VI deficiency. *Acta Neuropathol (Berl).* 106:137-42, 2003.
- 6) Higuchi I, Horikiri T, Niiyama T, Suehara M, Shiraishi T, Hu J, Uchida Y, Saito A, Nakagawa M, Arimura K, Osame M.:Pathological characteristics of skeletal muscle in Ullrich's disease with collagen VI deficiency. *Neuromuscul Disord.* 13:310-316, 2003.

# 眼咽頭筋ジストロフィーモデルマウスの作製

内野 誠\*

研究協力者 日野 洋健\* 宇山 英一郎\* 前田 寧\* 三池 浩一郎\*\*  
竹屋 元裕\*\*\* 荒木 喜美\*\* 山村 研一\*\*

## 目的

眼咽頭筋ジストロフィー (oculopharyngeal muscular dystrophy : OPMD)は、(1)40歳以降に発症、(2)主症状は眼瞼下垂と嚥下障害、(3)外径8.5nmの骨格筋筋鞘核内封入体(ITFI)を特徴とし、poly(A)-binding protein, nuclear (PABPN1)を原因遺伝子とする常染色体優性疾患である<sup>1)</sup>。PABP2はpolyadenylationに際しpoly(A)の付加反応を刺激し、poly(A)-tailの伸長と安定性に関与するとされている<sup>2)</sup>。PABP2のexon1はATG(GCG)<sub>6</sub>(GCA)<sub>3</sub>GCGという塩基配列を持つが、OPMD患者ではATG(GCG)<sub>8-13</sub>(GCA)<sub>3</sub>GCGとGCGのshort expansionを認めることが明らかにされている<sup>1)</sup>。しかしながら、PABPN1のGCGのshort expansionが生体内でのPABPN1の働きにどのような影響を与え、その結果いかにして眼咽頭筋ジストロフィーという特異的な疾患像を呈するのかが未だ不明な点が多い。そこで、今回我々は、眼咽頭筋ジストロフィーのトランスジェニックマウスを作製し、その発生機序の解明と治療法開発を進めることを目的とした。

## 方法と結果

正常PABPN1 cDNAと(GCG)<sub>9</sub>を持つ変異PABPN1 cDNAをそれぞれ心筋、骨格筋で強く発現するpCAGGSベクターにクローニングし、直鎖状にしたトランスジーンをマウス受精卵にマイクロインジェクションにて導入した。得られたマウスはPCR、サザンブロット解析にて導入遺伝子の有無を確認、その後F1以降のノザンブロット解析にて導入遺伝子の発現解析を行い、ウエスタンブロット法にて蛋白の発現を確認し、トランスジェニックマウスラインを樹立した。正常PABPN1 cDNAを発現しているトランスジェニックマウスを2ライン(N lineで2line; N33, N35)、変異PABP2 cDNAを発現しているトランスジェニックマウスを3ライン(M lineで3line; M38, M41, M43)得た。各ラインは外観上の変化は特に認めなかった。しかしながら、金網捕まりテストにおける落下するまでの時間は、M43 miceでは6.3 ± 2.1min

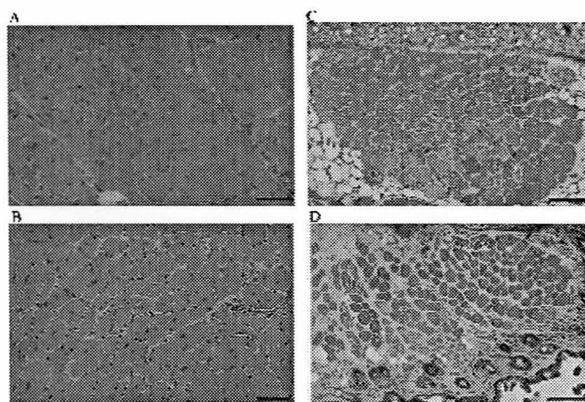


図1 M43mic, 6ヶ月齢(A), 18ヶ月齢(B)のひらめ筋。筋繊維は代償不動で中心角が増加, 中心角の頻度は華麗とともに著しい増加を示した。M43mic, 6ヶ月齢の輪状咽頭筋(C), 上眼筋(D)においても dystrophic changes を認めた。

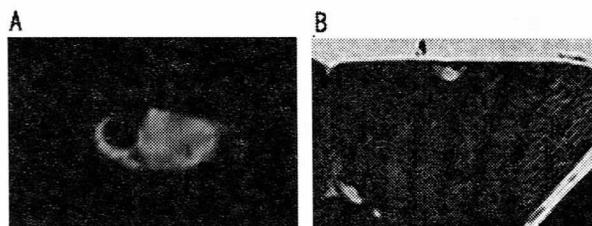


図2 A) 6ヶ月齢のM43 mice. 抗PABPN1抗体による免疫染色にてひらめ筋の筋繊維核内にPABPN1が凝集して染色されている。B) 6ヶ月齢のM43 mice. ひらめ筋トルイジンブルー染色。M43 miceの筋繊維核は (arrow) 「large inclusion body」に占められている。

であったが normal littermate では 16.4 ± 5.8min で、有意にM43 miceが落下するまでの時間は低くM lineでは筋力低下が示唆された。組織学的検討として、ひらめ筋、輪状咽頭筋、上眼筋のH.E.染色を行ったところ、N lineでは異常認めなかったが、M line dystrophic changeを認めた(図1)。また、M lineの筋組織について抗PABPN1抗体にて免疫染色を行ったところ、PABPN1が核内に集積しているのが確認され、同部位はトルイジンブルー染色において特異的な組織像を呈し(図2)、電子顕微鏡にてintranuclear inclusionの像を呈した(図3)。

## 考察

今回我々は、OPMD患者に認めるヒト変異PABPN1を発現した transgenic mice を作製した。このマウスはこの

\* 熊本大学大学院医学薬学研究部先端生命医療科学部門  
脳・神経科学講座・神経内科学分野

\*\* 熊本大学発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成分野

\*\*\* 熊本大学大学院医学薬学研究部・総合医薬科学部門・生体機能病態学講座細胞病理学分野

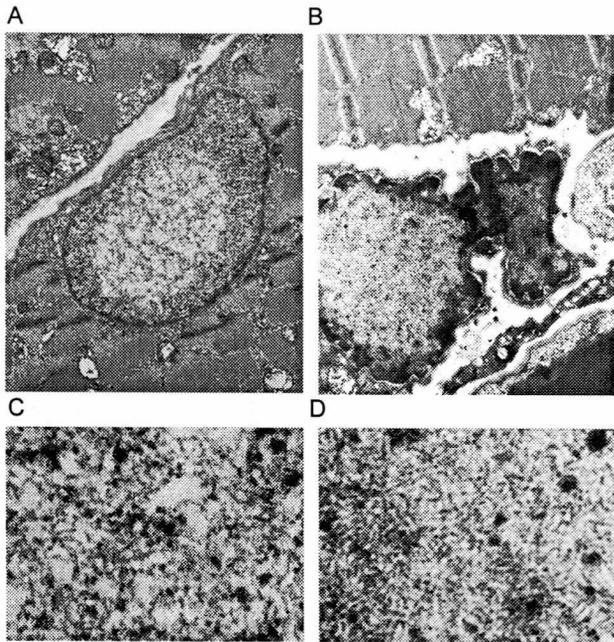


図3 6ヶ月齢のM43 mice, ひらめ筋筋繊維(A, C) とOPMD患者三角筋筋繊維核 (B, D) の電子顕微鏡。

M43 mice の筋繊維核において認められた核内の明るく抜けた部位 (A, C) は電子顕微鏡において観察すると、低倍率ではヒトOPMDで認める intranuclear inclusion と類似している。高倍率で観察すると intranuclear inclusion は tubular filament から校正されていることが明らかとなった。ヒトOPMDと比較すると、tubular filament の集積はやや疎である印象を受ける。

A and B ×5000 magnification and C and D ×75000 magnification

intranuclear inclusions は transgene である PABPN1 が全身の諸臓器に発現しているにもかかわらず、eyelid muscles や pharynx muscles を含めた、骨格筋の核内にのみ形成された。興味深いことに、筋肉の変性の程度は加齢とともに

進行しており、この点においても OPMD と矛盾しない。また、生後 18 ヶ月の mice の筋肉は明らかに重度の myopathic changes を呈しており、OPMD 患者と比較して、より重度の筋病変を来たしていると考えられた。

今回我々は2種類の transgenic mice を作製したが、正常の PABPN1 を導入した N33 mice においては、その蛋白発現量が M41 や M43 mice と同等であるにもかかわらず、いかなる筋変性もきたさず、intranuclear inclusions も形成しなかった。よって、OPMD の発症にはある程度の変異 PABPN1 の発現が必要であると考えられた。M43 mice での変異 PABPN1 の発現量はマウス内在性 PABPN1 より強く発現しているが、この発現量はヒト OPMD での変異 PABPN1 の発現量よりも高いと考えられる。ヒトの OPMD において、inclusion body を認める頻度は、筋組織標本において一切片あたり 3-6.6% 程度といわれている<sup>3</sup>。今回作製した M43 mice においては、図 3 に示したように、非常に高頻度に inclusion body を認め、この結果ヒト OPMD と比較してより重度の筋病変を認めたと考えられた。

#### 研究の意義

今回、眼咽頭筋ジストロフィーモデルマウスの作成に成功したことで、今後本疾患の発症機序や治療法の確立のための研究において、本マウスが有用であろう。

#### 参考文献

- 1) Brais B, et al. Nature Genet, 164-167, 1998.
- 2) Keller W, et al. Cell, 829-832, 1995.
- 3) 宇山 英一郎, 眼咽頭筋ジストロフィー. 神経進歩, 44: 212-221, 2000.

# 極長鎖アシルCoA脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症の 免疫組織化学染色によるスクリーニング

南 成 祐\*

研究協力者 大橋 裕子\*\* 長谷川 有紀\*\*\* 山口 清次\*\*\*  
埜 中 征 哉\* 西 野 一 三\*\*

## 目 的

運動や感染などに起因する筋痛や筋硬直は、糖原病やカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(CPT)欠損症、脂肪酸代謝異常の可能性があるが、実際に診断に至る例は多くはなく、中でもβ酸化異常症の報告は少ない。その理由の1つとして、β酸化系、解糖系、CPTの酵素活性測定はそれぞれの測定系が異なるため、1回の筋生検で得られた検体量ですべての生化学的スクリーニングを行うことが事実上不可能であり、有効なスクリーニングがなされていない可能性が考えられる。そこで我々は、β酸化の最初のステップを触媒する極長鎖アシル CoA 脱水素酵素(VLCAD)に着目し、極少量の検体で検査のできる免疫組織化学染色によるスクリーニングを試みた。

VLCAD 欠損症は、重症型、中間型、骨格筋型の3つの臨床病型があり、1993年の最初の報告後、海外では60例以上、日本では10数例が報告されている。

## 方法と結果

1978年から2001年までに筋生検を施行された約8000例のうち、高CK血症、ミオグロビン尿症、筋症状、SIDS、Reye症候群様などの症状を呈し、確定診断のされていない345例を対象とした。

生検凍結筋から厚さ7μmのスライスを作製し、抗VLCADポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色(間接法)を行った。そして、染色性の消失あるいは減弱を認めた患者のアシル CoA 脱水素酵素活性の測定とイムノプロット、遺伝子解析、筋病理所見、臨床像の検討を行った。

免疫組織化学染色の結果、14例に染色性の消失(9例)あるいは減弱(5例)を認めた。全例、パルミトイル CoA(C16) / オクタノイル CoA(C8)比の有意な活性の低下を認め、イムノプロットでは蛋白量の低下を認めたことより、VLCAD欠損症と診断した。

筋病理所見では、ほとんどの患者に筋線維の大小不同

を認め、約半数の患者に type1 fiber の大小不同を認めたが、脂肪滴の蓄積などは見られなかった。

臨床像は、男性6名、女性8名で、発症年齢は3~29歳、平均13歳であった。誘因は運動が11例で最も多く、感染と寒冷が2例ずつ、誘因のないものが2例あった。主症状は何らかの筋症状(筋痛、筋硬直、筋力低下、筋肉の腫脹)を全例に認め、ミオグロビン尿も高率(71%)に見られた。今回の患者は、全例、VLCAD欠損症の臨床病型として骨格筋型であった。

遺伝子変異は多様であったが、クローニングや発現実験が必要な患者も存在し、検討中である。

## 考 察

抗VLCAD抗体による免疫組織化学染色でのスクリーニングは有用であると考えられた。骨格筋型のVLCAD欠損症では、ミオグロビン尿が高率に認められる。筋病理所見では特徴的な所見に乏しく、また今回見つかった患者はこれまでの報告と比べて発症年齢が高い傾向があり、まだ診断されていないVLCAD欠損症の患者が多く存在している可能性があると考えられた。

## 研究の意義

抗VLCAD抗体を用いての免疫染色による新しいスクリーニングを試み、14例のVLCAD欠損症の患者を見出すとともに、この方法の有効性を確認した。

## 文 献

- 1) Ohashi Y, Hasegawa Y, Murayama K, Ogawa M, Hasegawa T, Kawai M, Sakata N, Yoshida K, Yarita H, Imai K, Kumagai I, Murakami K, Hasegawa H, Noguchi S, Nonaka I, Yamaguchi S, Nishino I: A new diagnostic test for VLCAD deficiency using immunohistochemistry. *Neurology* 62: 2209-2213, 2004.

\* 国立精神・神経センター武蔵病院 DNA 診断・治療室  
\*\* 国立神経・神経センター神経研究所疾病研究第一部  
\*\*\* 島根医科大学小児科

# 悪性高熱症およびセントラルコア病： リアノジン受容体RYR1の遺伝子変異検索

南 成 祐\*

研究協力者 Carlos Ibarra\*\*\*\* 吳 士 文\*\* 市 原 靖 子\*\*\*\*  
菊 地 博 達\*\*\*\*\* 落 合 亮 一\*\*\*\*\* 西 野 一 三\*\*

## 緒 言

悪性高熱症 (MH) はハロセンなどの吸引麻酔によって数万回に一回の頻度で起きる重篤な副作用である。遺伝学的背景をもとに薬物が引き金となって発症する薬剤遺伝病の一種である。悪性高熱症の感受性 (MHS) は、常染色体優性の遺伝形式で遺伝し、これまでに MHS1 から MHS6 までの遺伝子座が知られている。このうち MHS1 と MHS5 では責任遺伝子が判明しており、それぞれ、骨格筋の筋小胞体膜上の Ca イオン (Ca<sup>2+</sup>) 遊離チャンネルであるリアノジン受容体 (RYR1) と T 管膜上の膜電位検知分子であるジヒドロピリジン受容体 (DHPR) をコードしている。両者は隣接して存在し、興奮収縮連関において中心的な役割を担っている。一方、セントラルコア病 (CCD) は先天性ミオパチーに分類される筋疾患で、酸化酵素染色で筋線維の中心部が染色されないという特徴的な筋病理所見を示す。この CCD も大部分が常染色体優性の遺伝形式を示し、責任遺伝子として RYR1 が同定されている。

## 目 的

MHS 素因者のうち、RYR1 遺伝子変異による MHS1 は 50-70% を占めると推測されている。しかしながら、RYR1 遺伝子が 106 エクソンを有する大きな遺伝子であることが遺伝子変異検索を困難にしており、真の頻度は明らかになっていない。従来、RYR1 蛋白のアミノ酸配列上の N-末端、中央部、C-末端の 3 カ所に遺伝子変異のクラスターがあり、ホットスポットであるとされている。しかしながら、このホットスポット以外の領域について大規模な変異検索が行われたことがないため、真にホットスポットであるという根拠も十分とは言いがたい。

本研究では、上記の問題点に答えるため、MHS および CCD の RYR1 遺伝子変異の全容を明らかにすることを目標とし、十分な数の患者を対象として全エクソンの直接シーケンシングによる大規模な変異検索を計画した。

現在までに全エクソンの約 40% を解析し、ホットスポット領域の変異検索結果を報告する。

## 方法と結果

Ca<sup>2+</sup>誘発性 Ca<sup>2+</sup>遊離 (CICR) 速度の亢進によって確定診断された 59 名の MHS 素因者、および組織病理学的に診断された 28 名の CCD 患者を、対象とした。患者らのゲノム DNA から各エクソンとその隣接するイントロン配列を単位として PCR 増幅し、直接シーケンシングによって変異を決定した。

表 1 シークエンス解析を終えたエクソン数

	N 末端	中央部	C 末端	合計/全エクソン数
MHS	10	12	21	43/106 (41%)
CCD	10	7	20	37/106 (35%)

表 2 MHS 素因者より見いだされた RYR1 変異

exon	遺伝子変異	蛋白への影響	患者数	新規 a
6	593c>a	Gln154I.vs	1	*
6	617c>t	Arg163Cys	1	
6	627a>g	Asp166Gly	1	*
10	1077g>t	Arg316Leu	1	*
11	1152g>c	Gly341Arg	1	
15	1728g>a	Arg533His	1	
39	6618g>a	Arg2163His	1	
45	7434g>a	Arg2435His	2	
46	7485g>a	Arg2452Gln	1	*
46	7503g>a	Arg2458His	1	
51	8318g>c	Asp2730His	1	*
95	14070g>a	Arg4647Gln	2	*
102	14816g>a	Ala4896Thr	1	*
104	15015t>a	Phe4962Tyr	1	*

患者数合計 16 (27%)

破線： N 末端領域、中央部、C 末端領域の境界

a： 過去に報告されていない変異

\* 国立精神・神経センター武蔵病院 DNA 診断・治療室  
\*\* 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部  
\*\*\* 東邦大学大学院医学研究科  
\*\*\*\* 東京臨界病院麻酔科  
\*\*\*\*\* 埼玉医科大学麻酔科  
\*\*\*\*\* 東邦大学医学部麻酔科

表3 CCD患者より見いだされたRYR1変異

exon	遺伝子変異	蛋白への影響	患者数	新規 <sup>a</sup>
39	6447t>a	Val2049Glu	1	
95	13900g>a	Glu4634Lys	1	
95	13912g>a	Gly4638Ser	1	*
101	14572a>g	Asn4858Glu	1	*
101	14581c>t	Arg4861Cys	4	
101	14582g>a	Arg4861His	1	
102	14678g>c	Arg4893Pro	1	*
102	14693t>c	Ile4898Thr	1	
102	14696g>a	Gly4899Glu	1	
102	14751_14752tt>ac	Phe4919Thr	1	
102	14752t>c	Phe4919Ser	1	
102	14791c>a	Thr4920Asn	1	*
患者数合計			15	

破線： 中央部とC末端領域の境界

a： 過去に報告されていない変異

シーケンス解析の進捗状況は表1に示したようになっており、ホットスポットに該当するエクソンの解析をほぼ終えた。とくに、過去に変異が見つかったことのあるエクソンに関してはすべて解析を完了した。

その解析結果を表2と表3に示した。MHS素因者からは16名(27%)において14種類のミスセンス変異が発見された。このうち8種類は過去に報告例がない変異であった。分布は、N-末端領域が6種類、中央部が5種類、C-末端領域が3種類である。一方、CCD患者からは15名(54%)で12種類のミスセンス変異が見つかり、うち3種類が報告例のないものであった。分布は、1種類以外はすべてC-末端領域に位置していた。

## 考 察

1) ホットスポットの解析結果は、従来言われているように、MHS素因者の25~30%、CCDの50%以上にRYR1変異が認められた。海外の様々な地域と同様に、この頻度については我が国においても大差ないことが明らかになった。

2) MHSに関連する変異が、3カ所のホットスポットのうち、N-末端と中央部に多く、CCDに関係するものほとんどはC-末端から見いだされた。この結果についても従来の報告と一致している。

3) 過去の検索で報告されたことのない変異が多数見いだされた。今回の検索において、MHSでは変異の57%

が、CCDでは25%が、そのようなはじめて発見された変異であった。なお、報告例がない変異については、今回の検索だけで、病的変異であると結論づけられるものではない。変化しているアミノ酸の進化上の保存性や、側鎖の性質の変化などから、ポリモルフィズムである可能性のある変異はごく少数であると現在予想している。とは言え、今後、2世代以上のco-segregationのような遺伝学的特徴づけとともに、変異RYR1を導入した培養細胞を用いた機能的特徴づけが必要である。

4) 変異の種類と頻度に民族や地域による違いがあることは従来から指摘されていることではあるが、日本人集団においてもそれが確認された。例を挙げると、欧州のMHSに多いGly341Arg(6~10%)は我々の検索では1名(1.7%)にしか認められず、ドイツや北米に多いArg614Cys(9%, 4%)は全く認められなかった。逆に、今回のMHSの検索で複数の患者に認められたArg2435His(3.4%)は北米での124名の検索では認められておらず、Arg4647Gln(3.4%)は初めての報告となる。なお、今回のCCD患者の検索で4名に認められたArg4861Cys(14%)は欧州での検索でも同等の頻度で報告されている。

## 研究の意義・今後の展望

本研究は、私たちの知る限り、MHSとCCDの日本人患者を対象とした初めての大規模な変異解析であり、ホットスポットに関する限り、日本人集団においても従来の知見が当てはまることを明らかにした。

欧州や米国ではホットスポットの15-20種類の代表的な変異パネルによる遺伝子検査が行われている。それは、予防的見地からMHS患者の家族が強いられる、CICR試験などのための筋生検を少しでも回避するためである。私たちは、現在進行中の全エクソンの変異検索の完了後、真のRYR1変異分布の解明によって、日本人患者を対象としたより優れた変異検索パネルを確立できると考えている。

また、全エクソンの変異決定の意義は、単に遺伝子変異の集積ということではない。MHSとCCDにおいてRYR1変異が原因となっている割合を初めて十分な根拠をもって提示できるであろう。さらに、新しいホットスポット領域の発見につながる可能性や、表現型との関係の検討、さらにはCaチャンネルの構造と機能という興味深い問題を研究する上で従来不足していた完全な変異分布マップを提供することになる。

# X-linkedミオチューブラーミオパチー：日本人患者の遺伝子変異スペクトラム及び臨床・筋病理学的検討

南 成 祐\*

研究協力者 堀之内 英雄<sup>\*\*\*</sup> 蔡 宗 璋<sup>\*\*</sup> 村 山 久美子<sup>\*\*</sup>  
甲 藤 美 幸<sup>\*</sup> 黒 川 留 美<sup>\*\*</sup> 西 野 一 三<sup>\*\*</sup>

## 緒 言

ミオチューブラーミオパチーは先天性ミオパチーの中でセントラルコア病に次いで多い疾患である。病名の由来にもなっているように、患者の骨格筋線維（筋細胞）は細く、胎児筋での筋管細胞（myotube）のように一見幼若に見えることが特徴である。良性先天型と乳児重症型とに大別されるが、乳児重症型の大半がX連鎖ミオチューブラーミオパチー（XLMTM）であることが明らかにされ、その責任遺伝子 MTM1 はミオチューブラリンと呼ばれるタンパク質をコードしている。

XLMTM は、出生時からの著明な筋緊張低下（hypotonia）、筋力低下、呼吸障害をきたし、人工呼吸管理を必要とする。先に述べたような骨格筋病理像から、病態機序として筋分化・成熟の遅滞が提唱されてきたが、最近作られたノックアウトマウスの解析からは、筋分化の本質的な障害は疑問視されるようになっている。ミオチューブラリンは組織普遍的に発現しており、phosphatidylinositol 3-phosphateなどを脱リン酸化する活性を有し、エンドソーム調節との関連性が有力視されているが、生体におけるその役割には不明な部分が多い。

## 目 的

MTM1 遺伝子変異は欧米を中心に約 200 種類（約 300 家系）が報告されているが、本邦からの報告は散発的でまとまった症例数の報告はない。

今回我々は、本邦の 31 家系について MTM1 変異を同定した。そして、その遺伝子変異スペクトラム、臨床像、筋病理像を検討した。とくに筋病理の検討では、筋病理像の酷似する先天性筋強直性ジストロフィー（CDM）との鑑別という観点からも検討した。

## 方法と結果

まず、臨床所見と筋病理所見からミオチューブラーミオパチーが疑われた男性患者を対象として MTM1 遺伝子の塩基配列解析をおこない、31 家系（32 名）について遺伝子変異を確定した。これらの患者を対象に、変異の

種類や頻度、臨床像および重症度と変異の関連性について検討した。また、生後の成長に伴う病理変化を明らかにするため、患者らの骨格筋標本を生検時年齢別に比較した。さらに、筋病理像が酷似する先天性筋強直性ジストロフィー（CDM）との比較をし、筋病理学的な鑑別を検討した。

### 1) MTM1 遺伝子変異

31 家系において 26 種類の異なる変異を見出した（図 1）。ミスセンス変異が 8 種類（9 家系）、ナンセンス変異が 6 種類（8 家系）、スプライス部位変異が 5 種類（7 家系）、微小な欠失・挿入が 5 種類（5 家系）、大欠失が 2 種類（2 家系）であった。これら 26 種類の変異のうち、14 種類が報告のない新規の変異で、そのほとんどはミスセンス変異と微小な欠失/挿入であった。これは、ナンセンス変異やスプライシング部位変異の起きる位置が限られているためであろう。すでに 200 種類あまりの変異が報告されているにもかかわらず、これほど多くの変異が新規に見出されることは、MTM1 の変異の多様性をあらためて示している。また、複数の家系に認められた変異が 4 種類あったが、それらの家系をすべて合わせても 9 家系（29%）であり、突出して高頻度な変異は日本人には存在しないことを示唆している。

### 2) 臨床像

患者全体では、羊水過多などの周産期異常が高率にみられ、ほとんどの患者が floppy infant で出生し、出生時より人工呼吸管理を受けていた。しかしながら、胎生期、新生児期異常ともになく、発達歴も正常で、4 歳頃より易転倒性が出現した患者が存在した。XLMTM の自然経過としては、大半の患者が呼吸不全により 1 歳半までに死亡するとされるが、本症例はきわめて軽症である。このような顕著な軽症例は過去数例しか報告されていない。その 12 歳時の生検筋には筋線維の大小不同があり、ごく少数の小径線維に peripheral halo が認められた。明らかな軽症例はこの 1 名だけであったが、生検時の病歴書をもとに人工呼吸管理の有無を指標にして検討したところ、人工呼吸管理をおこなっていない（おそらくやや軽症と推測される）患者は、先述の軽症例を含め、ミスセンス変異やインフレーム型変異による患者にのみ存在した（4 名）。

\* 国立精神・神経センター武蔵病院 DNA 診断・治療室  
\*\* 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部  
\*\*\* 大分大学医学部免疫アレルギー統御講座（第 3 内科）

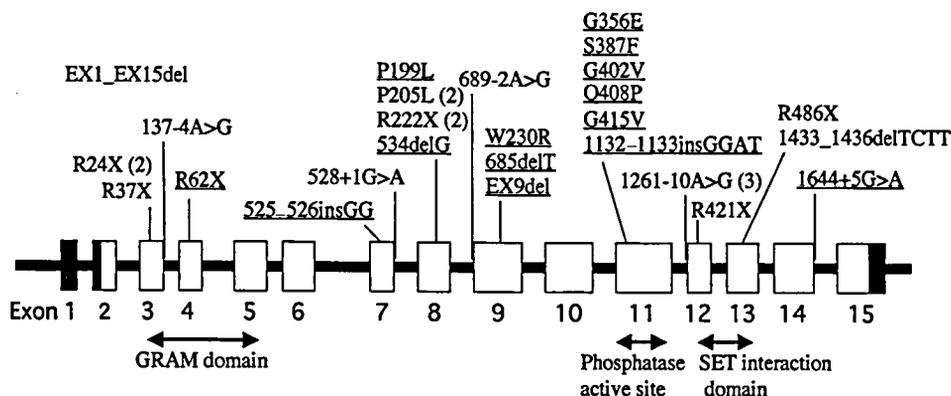


図1 見出された遺伝子変異  
 ミオチューブラリン遺伝子のエクソン構造に沿って、今回見出された変異を示している。欠失，挿入，スプライス部位変異については塩基の変化によって，ミスセンス変異とナンセンス変異については蛋白への影響によって記載している。下線は，過去に報告例がなく，本邦の今回の検索で初めて見つけた変異である。括弧内の数値は，今回の検索で複数の家系に認められた場合のその家系数。下部にはミオチューブラリン蛋白の機能部位との対応関係を示している。

### 3) 筋病理像，とくにCDMとの比較において

XLMTMは，中心核や peripheral halo (以下，halo) を呈する筋線維を特徴とする。しかし，生検時年齢を追って比較検討したところ，生後1ヶ月では，中心核は目立たず，haloは大多数の線維に認めるものの明瞭ではない。しかし，2ヶ月以後，中心核が増加し，haloについても，筋線維中央部の NADH 活性の濃染と周辺部の抜けが明瞭な，より典型的なものになる傾向が強かった。一方，CDMでは，生後1ヶ月ではXLMTMのそれと同様の所見が認められ，鑑別は困難であったが，2ヶ月以後ではhaloが不明瞭になるという点でXLMTMとの違いが現われ，1歳以上ではhaloと呼べる線維をほとんどの症例で認めなかった。また，ATPase染色で筋線維タイプ分布を見ると，XLMTMでは生後1ヶ月からタイプ1線維優位 (>50%) があって2ヶ月以降さらに顕著になる一方，CDMでは生後1ヶ月ではタイプ1線維優位はなく，2ヶ月以後の約半数の患者には認めたが，その程度はXLMTMよりも軽かった。また，タイプ2C線維の増加が生後1~2ヶ月のCDMにおいて顕著で，それらすべてで30%以上であったが，XLMTMでは30%を超える症例はなく，その後も減少傾向にあった。これらの違いは有意な差としてみられた。

### 考 察

MTM1 遺伝子変異は多種多様で，本邦においても高頻度な変異はない。ミスセンス変異やインフレーム型変異の患者の中に，軽症例が一部存在する。しかし，遺伝子変異から臨床的重症度を予測することは困難である。筋病理では，XLMTMに特徴的な中心核の増加や peripheral halo は生後1ヶ月よりも2ヶ月以降の方が明瞭になり，CDMとの鑑別では，筋線維タイプ分布も参考になると考えられる。

### 研究の意義・今後の展望

筋病理像では，XLMTMとCDMの形態学的違いは生後2ヶ月以後に現れてくることを明らかにした。筋線維タイプ分布も鑑別上の参考になる。診断に迷う場合はXLMTMもCDMも遺伝子診断が可能である。その際，XLMTMでは，既知変異検索法では不十分で，塩基配列決定が必要であると考えられた。

また，今回の検索で遺伝子変異が見つからなかった症例もまた存在する。それらについてはミオチューブラリンと何らかの機能的関連性のある遺伝子に異常がある可能性が高いと思われるが，今後どのように原因遺伝子に迫れるのが課題である。

# デスミンミオパチー細胞傷害機構の検討

豊島 至\*

研究協力者 大川 聡\* 菅原 正伯\* 小林 道雄\*  
武田 伸一\*\*

## 目 的

デスミンミオパチーは、デスミンタンパクの変異による常染色体優性遺伝の心筋・骨格筋・平滑筋傷害である<sup>1</sup>。患者筋組織では、デスミンが過剰発現し凝集体を形成、細胞死を引き起こす。我々は過去に L385Pde novo 変異によるデスミンミオパチー患者を報告した<sup>2</sup>。デスミンミオパチーの報告者の多くは、変異デスミンが正常デスミンとアッセンブリーし、Z 板構築を崩壊させることが筋傷害の原因と考えている。しかし、我々の検討では、デスミンを持たない COS7、CHO 細胞でも変異ヒトデスミンが凝集体を形成し細胞死をもたらした<sup>2</sup>。この事実より、デスミンミオパチーは、変異タンパク凝集体が毒性を獲得し細胞死を引き起こす凝集体病のひとつであると考えに至った。さらに、この筋傷害の治療法として、凝集体形成を非特異的に抑制するシャペロン活性を持つタンパク、変異デスミンにより特異的に活性の低下したタンパクを見出しこれらによる補充療法を考えた。正常型より変異型デスミンに強く結合するものが補充の候補になると考え、酵母 two-hybrid 法にて変異デスミン結合骨格筋タンパクを 22 種同定した(平成 13 年度本会議で報告)。今回は、これらを変異デスミンと COS7 細胞に共発現させ、結合性を再確認した。また、治療効果判定にはモデル動物も必要と考えられ作製を試みた。これまでにロッド 1B の 7 アミノ酸欠失 (R173-E179) にてトランスジェニックマウス(TgM)の報告があるが、これは心筋特異性にデスミンを発現させている<sup>3</sup>。今回我々は、骨格筋でも発現がみられるヒトデスミン TgM を作製し解析した。ヒトデスミンが内在性マウスデスミンにアッセンブリー出来ない可能性を考えマウスデスミン TgM も作製するが、今回はその前段階としてコンストラクトの構築と培養細胞で変異デスミン凝集体形成と性状の確認を行った。

## 方法と結果

### 1) 共発現実験による変異デスミン結合タンパクの同定

正常/変異部分デスミンを赤蛍光タンパク(DsRed)ラベル、結合候補タンパクを緑蛍光タンパク(GFP)ラベルし COS7 細胞に共発現 96 時間後まで細胞内分布を観察し

た。変異デスミンとのみ共存を示したものは  $\alpha$ -actin (部分)、myosin binding protein C (部分)、heat shock transcription factor 4 (全長)、KIAA0454 (全長)であった。KIAA0454 は単独では核周囲に存在し一部ゴルジ体に分布したが、変異デスミンが存在するとゴルジ体から出て共凝集した。同様の傾向はラベルのない変異全長デスミンでも見られた(図 1)。RT-PCR では人各種臓器間で骨格筋、心臓など筋組織に強い発現を示した。

### 1. ヒトデスミン過剰発現 TgM の作製と解析

mouse muscle creatine kinase promoter/enhancer(MCK promoter)を用い、導入遺伝子をヒトデスミン正常型と L385P 変異型とし、cDNA 全長 5' 側に GFP を組みこんだ。TgM は変異型で 2 系統、正常型で 4 系統選抜され、サザンプロットでは正常型は最大約 50 copy、変異型は 1 copy だった。ノザンプロット、ウエスタンプロットにて変異型では発現量が少なく、正常型と約 20 倍の差が見られ、正常型でも発現量は内在マウスデスミンの約 10%であった。正常型マウス骨格筋心筋では GFP を筋鞘膜下に強く認めたが Z 帯には一致しなかった。変異型では F1 世代で明らかな表現型が得られず F2 世代でホモマウスを作製したところ、一部が約 40 週齢で歩行不能となった。骨格筋では、血管周囲性に炎症細胞浸潤が見られ、GFP 発現と一致した青色細胞質封入体が確認された。電顕では Z 板を断裂する形で、直径約 10nm のフィラメントが付着した不定形凝集体が確認できた(図 2)。患者筋組織と同様の病理所見であった。

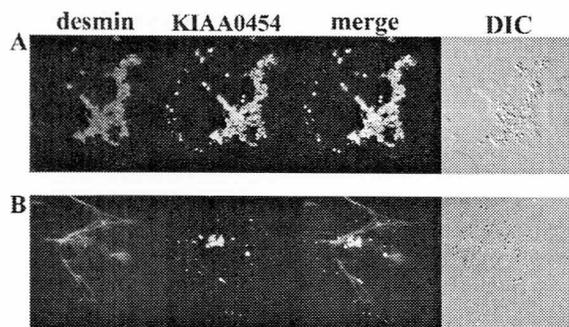


図 1 デスミン全長と KIAA0454 の COS7 細胞への co-transfection デスミン全長と N 端に GFP を融合させた KIAA0454 を COS7 細胞に共発現させ 48 時間後に固定。抗デスミン抗体による免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。A 段が変異型、B 段が正常型。KIAA0454 は変異デスミンと共存を示した。

\* 秋田大学医学部神経内科

\*\* 国立精神神経センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部

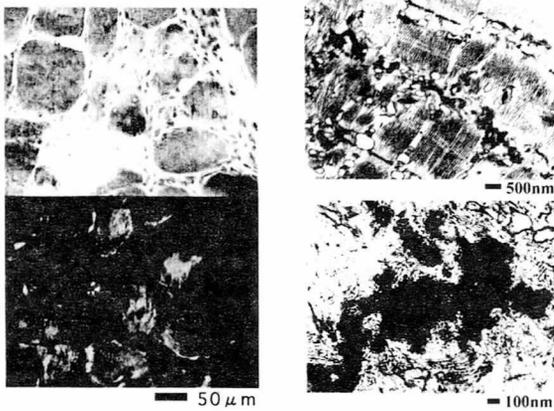


図2 FP/ヒト変異デスミントランスジェニックマウスの病理像  
ゴモリ・トリクローム染色にてみられた青色細胞質封入体はGFPの発現とほぼ一致した。電顕ではZ板を断裂する形で不定形凝集体がみられ、凝集体には直径約10nmのフィラメントが多数付着している。

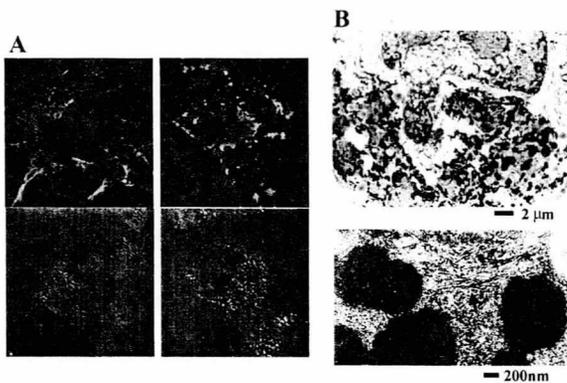


図3 マウス変異デスミン全長のCOS7細胞へのtransfection  
A:抗デスミン抗体による免疫染色。上段が蛍光観察像、下段が微分干渉像。変異デスミンは左列のように線維状構造を形成するものや、右列のように凝集体を形成するものがみられた。個々の凝集体にはフィラメントが付着しており核近傍に集合する傾向が見られた。  
B:電子顕微鏡像。上の弱拡大では、免疫染色と同様に、核近傍で小さな凝集体の集合がみられる。下の強拡大では、矢印が示すように凝集体に付着した直径約10nmのフィラメントがみられる。

## 2. 変異マウスデスミン TgM コンストラクト構築と凝集体形成の確認

ヒトデスミン TgM から筋傷害が変異デスミン発現量に依存する傾向が見られ、TgM コンストラクトの promoter をチキンβアクチン(CAG)に変更した。ヒトL385Pに相当するL384P変異マウスデスミン cDNA をクローニングし、変異型正常型全長、ロッド1—尾部、ロッド2—尾部の6種のコンストラクトを作製した。これらをCOS7細胞に遺伝子導入し48時間後に固定。尾部を認識するデスミン抗体による免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡、また、電子顕微鏡にて凝集体の有無と性状を確認した。全長では線維状構造を構築する細胞が多かったが、変異型では核近傍に小さな凝集体の集合を持つ細胞もみられた。ロッド1—尾部は内部が抗体で認識されない大きな凝集体を形成し、変異型は核近傍に、正常

型は細胞膜下に分布した。ロッド2—尾部では小さな凝集体が細胞質内にびまん性に分布した。電顕での凝集体の性状はロッド1—尾部は細かい粒子状物質の集合で、全長変異型では加えて直径10nmくらいのフィラメントが凝集体に付着していた(図3)。

## 考 察

変異デスミンと共存を示した結合タンパクのうち、KIAA0454は筋組織に強く発現することが示され筋特異的なシャペロン活性が期待される。この結合性を免疫共沈降などのin vitro実験系でも確認する必要がある。

ヒトデスミン正常型 TgM では導入ヒトデスミンが内在性マウスデスミンにアッセムブリできなかった。GFPでラベルしたヒトデスミンである事、筋細胞分化後に発現させるMCK promoterの性質も原因と考えられる<sup>4</sup>。発症した変異型 TgM ではアッセムブリできない導入デスミンが筋傷害を引き起こす機序が示唆され、これは変異デスミンのアッセムブリ障害説に反する。CAG promoter 下にラベルのないマウスデスミンを導入する事でより安定した表現型が得られ、デスミンアッセムブリ障害説のさらなる検討が期待できる。

COS7細胞内で全長変異型マウスデスミンは患者、TgMと同様の凝集体を形成したが、部分デスミンの方がより凝集する傾向にあった。凝集体形成におけるデスミンのプロセッシングを検討するためにtail以外のデスミンドメイン抗体の作製が急務である。

## 今後の展望、研究の意義

CAG promoter/マウスデスミンの TgM を確立させたい。変異型 Tg マウス初代骨格筋培養細胞に変異デスミン結合タンパクを導入することで、細胞死抑制効果が確認できる。抑制効果が見られたものは最終的に Tg マウス生体内に導入し、表現型の改善を確認する。凝集体形成阻害薬の候補として short interfering RNA (siRNA) の導入も考えている。以上の研究成果はデスミンミオパシーの治療法開発につながると期待される。

## 文 献

- 1) Dalakas, M.C. et al. Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *N Engl J Med* 342:770-780, 2000.
- 2) Sugawara, M. et al. A novel de novo mutation in the desmin gene causes desmin myopathy with toxic aggregates. *Neurology* 55:986-990, 2000.
- 3) Xuejun Wan. et al. Mouse model of desmin related cardiomyopathy. *Circulation* 103:2402-2407, 2001.
- 4) Johnson, J.E. et al. Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 9(8):3393-3399, 1989.

# 家族性還元小体ミオパチー — ER ストレス関連疾患? —

西野 一三\*\*

研究協力者 Teerin Liewluck\* 大澤 麻記\*\* 尾方 克久\*\*  
野口 悟\* 林 由起子\* 埜中 征哉\*\*\*

## 背景

還元小体ミオパチー(reducing body myopathy)は、病理学的に、Menadione-linked  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase (MAG)染色において、基質である $\alpha$ -glycerophosphate を抜いても nitroblue tetrazolium (NBT)が還元されて染色性を示す筋細胞質内封入体(還元小体)の出現を特徴とするミオパチーである。これまでに全世界で18例しか報告のない希な疾患であり、その病態は依然として不明である。この内、12例は孤発例であり、その大部分は後天性疾患と考えられているが、残りの6例(3家系)には家系内発症者がおり、遺伝性還元小体ミオパチーも希にあることが知られている。臨床経過も多彩で、病因論的には、不均一な疾患群であると考えられる。

我々は、最近、11歳男児とその母親(35歳)の両者に還元小体を認め、常染色体優生遺伝と考えられる還元小体ミオパチー例を見出した。

## 目的

還元小体の成因を明らかにし、遺伝性還元小体ミオパチーの病因・病態を明らかにする。

## 患者と方法

発端者には、10歳時より近位筋優位の筋力低下と rigid spine が出現し、11歳時に筋生検施行。母親は、29歳より非対称性の全般性筋力低下を来し、31歳時に他院で筋生検施行。現在35歳で、車椅子使用。

患者生検筋に対して、電顕による超微細構造の観察、および各種蛋白質に対する免疫染色を行った。また、患者皮膚線維芽細胞を用いて、ER ストレス応答の観察、およびプロテアソーム活性の測定を行った。

## 結果

還元小体は、筋鞘膜蛋白質、emerin、LIMP-1、GM130 など、多様な膜蛋白質とともに各種の ER シャペロンとポリユビキチンに対する抗体で染色された。さらに、還元小体の中心に $\gamma$ -tubulin が局在し、さらに、還元小体は desmin により囲まれていた。また、tunicamycin を加えて培養した患者線維芽細胞での定量的 PCR 及びプロテア

ソーム活性測定においては、ATF6 などの ER ストレスのセンサー蛋白質群の発現がコントロールと同程度に保たれていたにもかかわらず、ER シャペロンの転写増強が認められなかった。一方、プロテアソーム活性はコントロールよりも寧ろ亢進していた。また、カスパーゼ 12 の発現が認められた。

## 考察

還元小体に各種の膜蛋白質が蓄積していることを報告したのは初めてである。各種 ER シャペロンが共局在していたことから、ER ストレスが生じていることが示唆された。さらに、 $\gamma$ -tubulin が共局在し、desmin による cage が形成されていたことから、aggrosome 様構造物が形成されていることが明らかとなった。ER ストレスのセンサー分子の発現はコントロールと差がないにも関わらず、ER シャペロンの発現誘導が乏しかったことから、unfolded protein response (UPR)に何らかの異常がある可能性が示唆された。さらには、これら ER ストレスの結果として、アポトーシスも誘導されていると考えられた。

## 結論

世界で第4番目の家系となる、家族制還元小体ミオパチー例を報告した。本母子例での還元小体には、多種類の膜蛋白質の蓄積が、ER シャペロン蛋白質と共局在しており、ER での蛋白質の quality control システムの破綻による aggrosome 様構造物形成が、本母子例における還元小体形成機構であると考えられた。

## 参考文献

- 1) Kiyomoto BH, et al.: Fatal reducing body myopathy. Ultrastructural and immunohistochemical observations. *J Neurol Sci* 128: 58-65, 1995.
- 2) Goebel HH, et al.: Reducing body myopathy with cytoplasmic bodies and rigid spine syndrome: a mixed congenital myopathy. *Neuropediatrics* 32: 196-205, 2001
- 3) 西野一三: Myopathy, reducing body. 日本臨牀別刷 領域別症候群シリーズ 34:255-256, 2001.
- 4) 石川晴美, et al.:還元小体ミオパチー. 日本臨牀別刷 領域別症候群シリーズ 35:424-426, 2001.

\* 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部

\*\* 国立精神・神経センター武蔵病院

#### IV. 遠位型筋ジストロフィー, Emery - Dreifuss 症候群、DMRV など

# DMRV における分子生物学的検討および遺伝子変異型と臨床症状の関連についての検討

水澤英洋\*

研究協力者 富満弘之\* 清水潤\*\* 石川欽也\*  
藤ヶ崎浩人\* 斉藤史明\*\*\* 大越教夫\*\*\*\*  
松村喜一郎\*\*\* 垣塚彰\*\*\*\*\* 金澤一郎\*\*\*\*\*  
新井亜季† 青木正志†† 田中恵子†  
西野一三\*\*\*\*\*

## 緒言

平成 14 年度から 16 年度の 3 年間で、我々は distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) は GNE 遺伝子変異で発症することを報告し、その病態解明に向けて分子生物学的検討を行った。また並行して遺伝子変異を認めた DMRV の臨床症状についても解析を行ってきたのでここに報告する。

## 目的と方法および対象

### 1 分子生物学的検討

2001 年に DMRV と類似の疾患と考えられてきた hereditary inclusion body myopathy (HIBM) が UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) 遺伝子変異にて発症することが報告された。そこで筋生検にて rimmed vacuole を認め、明らかな炎症細胞浸潤を伴わない症例について、informed consent をとった後、患者ゲノムを用いて直接シーケンス法で遺伝子解析を行った。次に DMRV は常染色体劣性遺伝性疾患であり、原因遺伝子の発現低下や機能喪失が発症に大きく関与することが考えられるため、GNE 遺伝子の発現について RNA レベルおよびタンパクレベルで検討した。さらに本疾患は筋線維内に空胞を生じる疾患であり、空胞形成に関係する valosin-containing protein (VCP) について DMRV および IBM の病態への関与について検討した。

### 2 遺伝子変異型と臨床症状の関連についての検討

当教室では GNE 遺伝子変異をもつ症例について臨床症状に関する調査用紙を作成して解析を行ってきた。さらに本研究班で症例を集積して解析することになり、東北大学、新潟大学、国立精神・神経センターの症例

も合わせて、66 症例の遺伝子変異型と臨床症状の関連について検討した。

## 結果・考察

### 1 分子生物学的検討

DMRV と診断されていた患者の 95% で GNE 遺伝子変異を認めた。患者生検筋より RNA を抽出し逆転写して cDNA を作製した。PCR 法にて GNE 遺伝子全長をクローニングした結果、既知の全長 mRNA の他に、エクソン 4 をスキップした splice variant の存在が明らかとなった。これは正常筋でも認められ alternative splice form と考えた。組織間での発現を検討した結果、この variant は既知の splice variant の中で、唯一骨格筋に多く発現しているものであった。しかしこの 2 つの mRNA の発現について対照群および DMRV 群で検討した結果、明らかな差を認めなかった。

タンパクレベルでの発現を調べるため、GNE を特異的に認識する抗体を作製した。これを用いて骨格筋の免疫組織化学的検討を行った。筋線維は他の疾患コントロールと比較して、染色性に明らかな差を認めず、DMRV において、GNE はタンパクレベルでも発現している可能性が示唆された。GNE の局在については、筋線維だけでなく、筋線維内および間質の細胞の核にも GNE が存在すると考えられた。DMRV では空胞も染色されたため、空胞形成に GNE が関与して空胞に沈着したものと考えられた。つぎに VCP 抗体を用いて免疫組織学的検討を行った結果、DMRV および IBM では変性が進んだ筋線維で強い染色性を示し、rimmed vacuole に関しては内容物、辺縁共に染色された。しかしイムノプロットの結果からは正常 VCP と考えられる単一のバンドのみ認められた。

以上のことから DMRV において、GNE がタンパクレベルで発現していることを確認すると共に、GNE および VCP の rimmed vacuole 形成および筋線維変性への関与が示唆された。

### 2 遺伝子変異型と臨床症状の関連についての検討

4 施設で集積された情報を解析した結果、発症初期に

\* 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学  
\*\* 東京大学大学院神経内科学  
\*\*\* 帝京大学医学部神経内科学  
\*\*\*\* 筑波大学臨床医学系神経内科学  
\*\*\*\*\* 京都大学大学院高次生体統御学  
\*\*\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所  
† 新潟大学脳研究所神経内科  
†† 東北大学大学院神経内科学

近位筋優位の障害を呈する症例も5%存在したが、臨床的にDMRVと診断できる症例が95%を占めた。すなわち、GNE 遺伝子変異をもつミオパチーの臨床症状は、これまで報告されたDMRVの臨床症状とほぼ一致していた。しかしながら今回の検討で、血清CK値が1000IU/Lを越える症例が約20%存在すること、遠位筋だけでなく大腿内転筋群や傍脊柱筋という近位筋も発症早期から障害されること、重篤な心筋障害を伴う症例も存在することが分かり、今後の診療上注意が必要と思われた。また遺伝子変異型と臨床症状との関連については、31名の同一変異(V572L変異のホモ接合体)患者間で検討しても、5名が上肢からの発症例であるなど筋障害分布が完全には一様でなく、遺伝子変異型と臨床像の特異的な関連は見出せなかった。

#### 今後の展望

病態の解明を進めるとともに治療法の開発が大切である。そこで我々は、原因とされるGNEの病態への関連を解明するため抗GNE抗体を作製した。この抗体を

用いてGNEの病態への関与についてさらに詳細に検討していく。それとともに疾患モデルを培養細胞レベル、実験動物レベルで作成することを目指す。

#### 文 献

- 1) Tomimitsu H, Ishikawa K, Shimizu J, Ohkoshi N, Kanazawa I, Mizusawa H. Distal myopathy with rimmed vacuoles: novel mutations in the GNE gene. *Neurology* 59: 451-454, 2002.
- 2) Saito F, Tomimitsu H, Arai K, Nakai S, Kanda T, Shimizu T, Mizusawa H, Matsumura K. A Japanese patient with distal myopathy with rimmed vacuoles: Missense mutations in the epimerase domain of the UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene accompanied by hyposialylation of skeletal muscle glycoproteins. *Neuromuscul Disord* 14: 158-61, 2004.
- 3) Tomimitsu H, Shimizu J, Ishikawa K, Ohkoshi N, Kanazawa I, Mizusawa H. Distal myopathy with rimmed vacuoles: New mutations and splice variant. *Neurology* 62: 1607-1610, 2004.

# Rimmed vacuole 型遠位型ミオパチーの筋変性機序に関する研究

田中 恵子\*

研究協力者 新井 亜希\* 五十嵐 修一\* 小林 央\*  
辻 省次\*\* 池内 健\* 西澤 正豊\*

## 目 的

Rimmed vacuole 型遠位型ミオパチー (DMRV) の原因遺伝子である UDP-N acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) がコードする蛋白は独立した 2 種類の酵素活性(epimerase 活性と kinase 活性)を有する bifunctional enzyme であり, シアル酸の生合成に関与することから, 様々な蛋白の糖鎖修飾に重要な役割を果たしているものと考えられている。我々はこれまで連鎖解析を行ってきた多数の本症家系で GNE の遺伝子解析を行い, kinase domain に位置する V572L という common mutation の存在を報告した。さらに臨床的・筋病理学的に DMRV と診断した症例を追加して GNE 遺伝子上の変異部位を明らかにし, 臨床型・遺伝子型の対応について検討した。

DMRV ではいずれの domain にも変異が認められるため, 本酵素の変異が DMRV の発症にどのように関与するかは不明である。我々は本症の遺伝子変異が培養細胞系に及ぼす影響を解析し, 本遺伝子変異の病因への関与を明らかにする目的で以下の研究を行った。

また, 本症の免疫組織学的診断法を確立するため, 変異遺伝子産物を検出するための抗体の作成を試みた。

## 方法と結果

1. 臨床的, 筋病理組織学的に DMRV と診断した 19 症例 (家族発症例 6 家系 13 症例, 孤発例 6 症例) につき, 遺伝子解析の同意を得た上で採血を行い, genomic DNA を抽出した。それらにつき GNE の coding exons (exon 2 から 12) における変異の有無を direct sequence 法を用いて検索した。

家族発症例 6 家系 13 症例のうち, 3 家系 7 症例において既報の common mutation である V572L をホモ接合で認めた。その他の 3 家系においては各々, 新たな変異をヘテロ接合に認めた(家系 756; D176V/N635K, 家系 2219; G295D/A631V, 家系 2377; D176V/Y675C)。孤発例については 4 症例において common mutation である V572L をホモ接合で認め, そのうち 1 症例は両親に近親婚を有する例である。その他の孤発例の 2 症例については各々新たな変異をヘテロ接合に認めた (症例 3868; D176V/L603F, 症例 4219; A148S/V421A)。common mutation (V572L) を

有する症例においては平均発症年齢 24.8 歳 (18~30 歳), 車椅子使用に至るまでの平均経過年数 9.7 年 (3~15 年) であった。Common mutation 以外の部位に変異を有する compound heterozygote の症例においてはその変異の位置に関わらず比較的高齢発症で, 緩徐な経過をとる傾向が認められた(平均発症年齢 30.6 歳; 22~50 歳)。

2. ヒト骨格筋 cDNA library から DMRV の原因遺伝子である GNE gene の全長をクローニングし, 野生型及び V572L 変異型 (日本人 DMRV 症例における common mutation) を発現ベクターに組み入れた。これらを HEK293 細胞, ヒト骨格筋筋芽細胞に強制発現させ, 経時的に形態変化を解析した。HEK293 細胞, ヒト骨格筋筋芽細胞のいずれにおいても野生型では細胞質にびまん性に均一な GNE の発現を認めた。V572L 変異型ではいずれの細胞においても細胞質での発現がやや凝集傾向を有する不均一なパターンで染色された。培養筋芽細胞への変異遺伝子導入により, 細胞内に凝集体や空胞が形成されることを見出した。

GNE 遺伝子の各エクソンについて合成ペプチドを合成し, それぞれに対するペプチド抗体を作成し, マウスおよびラットの全身諸臓器を抗原としたウェスタンブロットにて臓器間での GNE 発現パターンを検討した。

今回作成した GNE に対するペプチド抗体は, マウスおよびラットの全身諸臓器を抗原としたウェスタンブロットで骨格筋を強く認識した。

さらに本症患者 6 例の生検筋組織および対照筋組織 (筋病変の軽微な筋炎, 先天性ミオパチー, 肢帯型筋ジストロフィー, 筋障害のない剖検筋) について免疫組織化学的に検討を行った。本症患者生検筋および対照筋を用いた免疫組織化学染色では, いずれの筋でも type I fiber に強い染色性を認めたが, rimmed vacuole を有す筋線維においては type I fiber でも染色性が低下していた。

## 考 察

common mutation である V572L を有する症例については, その多くが 20 代半ばで下肢筋力低下 (特に前脛骨筋の筋力低下) にて発症, 発症数年を経て上肢の筋力低下も自覚するようになった時点で医療機関を受診, その後約 10 年を経て車椅子を必要とする状態に至るが, その時点でも大腿四頭筋の筋力が比較的保たれる傾向に有るといった比較的均一な臨床像を呈していた。しかし 10 代で

\* 新潟大学脳研究所神経内科

\*\* 東京大学大学院医科系研究科神経内科

発症する若年症例や、数年で歩行不能に至る経過の早い症例といった予後不良の症例が見られる一方で、発症後7年を経て通常の出産が可能である経過が緩徐な症例も認められた。common mutation 以外の症例については変異の種類に関わらず発症年齢が高く、下肢筋力低下は進行性の経過ではあるものの、比較的長期間歩行能力を維持することができる症例が多く見られた。また初診時には上肢の筋力低下が認められない症例が多く見られた。

現時点では解析例が少なく、臨床型・遺伝子型の対応については今後さらに多くの症例の蓄積と臨床経過の詳細な検討が必要である。

一方、GNE の筋における生理的意義は未だ不明であり、病態の解明においては筋における GNE の機能解明が重要であると考えられる。今回我々は日本人 DMRV の common mutation である V572L 変異型の培養細胞における影響を検討した。HEK293 細胞、ヒト骨格筋筋芽細胞のいずれにおいても、変異型では細胞質における GNE の発現が凝集傾向を有する不均一なパターンとして認められ、機能的にも何らかの障害を生じているものと推察された。免疫組織化学染色の結果を併せて考察すると、GNE の異常により変性した筋線維に rimmed vacuole が形成されてくる可能性が考えられた。

GNE はシアル酸合成の最初の 2 つのステップを触媒する bifunctional enzyme で、N 末に epimerase 活性、C 末側に kinase 活性があり、独立に機能している。DMRV のように GNE の全長にわたって mutation が散在するような場合は酵素機能そのものの傷害を生じていると考えられる。しかしながら RV の形成機序およびその病因的意義はいまだはっきりせず、異常な筋蛋白の細胞内集積が autophagosome の形成を促進して lysosomal system を活性化するのか、これらの fusion 過程に障害があるのか、またはカテプシンなどのリソソーム酵素活性そのものが一義的に亢進している可能性、non-lysosomal system (ATP-ubiquitin-proteasome proteolytic pathway) の活性化が関与するなどの可能性も指摘されており、今後の課題である。

## 今後の展望/研究の意義

DMRV では GNE 遺伝子の異常により、比較的一定の筋障害分布を有するミオパチーを発症し、筋組織内には多数の rimmed vacuole を認めること、シアル酸の合成系との何らかの関わりが想定され、筋細胞内の各種構成蛋白の分解に何らかの障害を生じている可能性が考えられるなど、いくつかの研究の方向性を示唆する疾患である。本症は進行性で、多くの罹患者が治療法の開発を待ち望んでいるため、本症の病態を解明することは極めて意義がある。

## 文 献

- 1) Ikeuchi T, Asaka T, Saito M et al. Gene locus for autosomal recessive distal myopathy with rimmed vacuoles maps to chromosome 9. *Ann Neurol* 41:432-437, 1997.
- 2) Eisenberg I, Avidan N, Potikha T et al. The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* 29:83-87, 2001.
- 3) Arai A, Tanaka K, Ikeuchi T, et al.: A novel mutation in the UDP-N acetylglucosamine 2- epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene and a strong linkage disequilibrium in Japanese pedigrees with distal myopathy with rimmed vacuoles (Nonaka distal myopathy) *Ann Neurol* 52:516-519, 2002.
- 4) Nishino I, Noguchi S, Murayama K, et al.: Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 59:1689-1693, 2002.
- 5) Klionsky DJ, Emr SD.: Autophagy as a regulated pathway of cellular degeneration. *Science* 290:1717-1721, 2000.
- 6) Kumamoto T, Ito T, Horinouchi H et al. Increased lysosome-related proteins in the skeletal muscles of distal myopathy with rimmed vacuoles. *Muscle Nerve* 23:1686-1693, 2000.

# Rimmed vacuole を伴うミオパチーにおける免疫染色 — レクチンを中心に —

佐 橋 功\*

研究協力者 衣 斐 達\*

## 目 的

Rimmed vacuole (RV)を伴う筋疾患の3病態には、distal myopathy with rimmed vacuole (DMRV), 封入体 (IBM), 眼咽頭型筋ジストロフィー (OPM) 等がある。そして、DMRV は UDP-GlcNAc 2 epimerase/ManNAc kinase (GNE) 遺伝子<sup>1)</sup>, OPM は polyA binding protein nuclear 1 遺伝子<sup>2)</sup>の異常によるという。DMRV では GNE 異常によりシアル酸合成障害が起き、糖タンパクの糖鎖のシアル酸等の異常が推察される。レクチンを用い骨格筋のシアル酸を含めた糖タンパクの糖鎖異常につき組織学的に検討し考察した。

## 対象・方法

対象：DMRV 5例, OPD 4例, IBM 5例。

方法：四肢生検筋につき新鮮凍結切片を作成し、24種類のピオチン化レクチン(下に別途記載)を用いてABC法で免疫染色。

## 結 果 (図1, 表1)

シアル酸を認識するレクチン：WGA (図1A-C), EBL, MALII, Jacalin では筋細胞膜, 血管, 間質結合織が3疾患で同様に染色された。Rimmed vacuole (RV) については, WGA, EBL, MALII は DMRV で他の2疾患より染色性が低下していた。

GlcNAc を認識するレクチン DSL (図1D-F), LEL, STL は筋細胞膜, 血管, 間質結合織が3疾患で同様に染色されたが, RV については DMRV で他疾患より染色性が増加していた。SWGA は3疾患で血管が強く染まり, 筋細胞膜, 間質結合織がごく薄く染まったが, RV は染まらなかった。GSLII では筋細胞膜がびまん性に染色され, 3疾患での差はなかった。

GlcNAc を認識するレクチン：RCAI, SBA は血管が最も強く染まり, 筋細胞膜, 間質結合織が3疾患で同様に染色されたが, RV については DMRV で強かった。VVL では3疾患で同様に血管, 筋細胞膜が染まり, 間質結合織がごく薄く染まり, RV は各疾患で陰性であった。GSLI は各疾患で血管が染色されたが, RV については DMRV でそまるものがあつた。DBA は血管のみ染色され, 疾患での差は見られなかった。

Galactose を認識するレクチン：PNA と ECL は3疾患

ともに筋細胞膜, 血管, 間質結合織で陽性であったが, RV では DMRV に染まった。SJ あは血管のみ染まり, 疾患差がなかった。

Fucose を認識するレクチン：UEAI (図1G-I) は, 各疾患とも血管が染まっていたが, DMRV では多くの筋細胞膜が染まり, 他疾患では陰性であった。また DMRV では細胞膜陽性の筋線維は RV も染色されたが, 細胞膜陰性では RV も陰性であった。LTL は各疾患で細胞質がびまん性に染まった。

Mannose を認識するレクチン：LCA, PSA は, 3疾患とも筋細胞膜, 血管, 間質結合織が陽性であったが, RV については DMRV で強く染まった。ConA は各疾患で, 細胞質と間質がびまん性に陽性を示した。

その他：PHA-A と PHA-L は筋細胞膜, 血管, 間質結合織が陽性であり, PHA-E では RV は3疾患とも同様に染まり, PHA-L では RV における DMRV で強陽性であった。

## 考 察

DMRV では GNE 遺伝子異常により, シアル酸合成経路の UDP-GlcNAc 2 epimerase/ManNAc kinase の活性が障害され, シアル酸合成が低下すると考えられている<sup>3)</sup>。シアル酸の減少は糖タンパクの糖鎖末端のシアル化が障害され, より近位の糖が露出するため, レクチン染色ではシアル酸を認識するレクチンの染色性が低下し, その他のレクチンの染色性が増強したものと考えた。この傾向は, 筋組織の中では RV において強く見られたため, シアル酸修飾がなされない不完全な糖鎖を持った蛋白がライソゾームへ運ばれるようになったものと推察される。なお筋細胞膜や間質, 血管においては DMRV と他疾患での差が見られなかったことは, 染色法の感度の問題も考慮される。また, fucose を認識する UEAI において, DMRV でのみ筋細胞膜が染まったことは, 糖鎖末端のシアル酸が fucose に置換した可能性も示唆され, RV を呈する他疾患との鑑別に有用であると考えた。

## 結 語

DMRV は, GNE の障害により糖蛋白の糖鎖シアル化が障害され, シアル酸より近位の糖が露出し, レクチンで認識された可能性が示唆された。また, DMRV の RV や微小空胞での強い染色性は, シアル化障害の糖蛋白はリソゾーム内へ移送され易いことを推察した。

\* 愛知医科大学神経内科

略 語

WGA: Wheat Germ Agglutinin, EBL: Elderberry Balk Lectin, Jacalin: Brazil Lakfruit, MAL II: Maackia amurensis Lectin II, LEL: Lycopersicon esculentum Lectin, STL: Solanum tuberosum Lectin, DSL: Datura stramonium Lectin, SWGA: Succinylated Wheat Germ Agglutinin, GSL II: Griffonia simplicifolia Lectin II. SBA: Soybean Agglutinin, GSLI: Griffonia simplicifolia Lectin I. RCA I: Ricinus communis Agglutinin I, VVL: Vicia villosa Lectin, DBA: Dolichos biflorus Agglutinin, PNA: Arachis hypogaea Agglutinin, Ecl: Erythrina cristagalli Lectin, SJA: Sophora japonica Agglutinin, UEA I: Ulex europaeus I, LTL: Lotus tetragonolobus Lectin, LCA: Lens culinaris Agglutinin, PSA: Pisum sativum Agglutinin, ConA: Concanavalin A, PHA-E: Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin, PHA-L: Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin

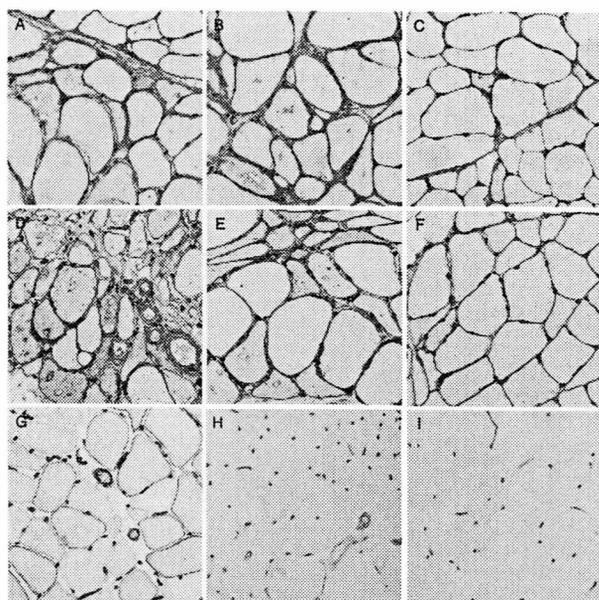


図1 WGA, DSL, UEAI での DMRV, IBM, OPD における染色。WGA では DMRV で RV の染色性が低下, DSL では増加しており, UEAI では筋細胞膜の染色される線維が見られる。(×100)

表1 各レクチンによる生検筋における DMRV と IBM, OPD と比較した染色結果。  
RV\*: DMRV での IBM, OPD と比較した RV の染色性

lectin	Specificity	筋細胞膜	筋形質	RV	RV*	血管	間質
WGA	Sialic Acid. (GlcNAc)n	+	-	+	↓	+	+
EBL	Sialyl-Gal, Sialyl-GalNAc	+	-	+	↓	+	+
jacalin	Sialyl-Gal β1-3GalNAc-O-	+	-	-		+	+
MAL-II	Sialyl α2-3	+	-	+	↓	+	+
RCA-I	GalNAc, Gal	+	-	+-	↑	+	+
SBA	GalNAc	+-	-	-	↑	+	+-
VVL	GalNAc	+	-	-		+	+-
DBA	GalNAc α, Gal α	-	-	-		+	-
GSL-I	GalNAc α	-	-	+	↑	+	-
SJA	Gal β, GalNAc β	-	-	-		+	-
PNA	Gal β1-3 GalNAc	+	-	-	↑	+	+
ECL	Gal β1-3 GalNAc, Gal	+	-	-	↑	+	+
DSL	(GlcNAc)n, Gal β1-3 GlcNAc	+	-	+	↑	+	+
LEL	(GlcNAc)n	+	-	+	↑	+	+
STL	(GlcNAc)n	+	-	+	↑	+	+
S-WGA	(GlcNAc)n	+	-	-		+	+
GSL-II	GlcNAc α, GlcNAc β,	-	+	-		+	+
Con A	Man α, Glc α	-	+	-		-	-
LCA	Man α	+	-	+	↑	+	+
PSA	Man α	+	-	+	↑	+	+
UEA-I	Fuc α	-	-	-	↑	+	-
LTL	Fuc α	-	+	-		-	-
PHA-E		+	-	+		+	+
PHA-L		+	-	+	↑	+	+

文 献

- 1) Kayashima T, Matsuo H, Satoh A, et al: Nonaka myopathy is caused by mutations in the UDP-N-acetylglucosamin-2-epimerase/N-acethylmannosamine kinase gene (*GNE*). *J Hum Genet* 47: 77-79, 2002.
- 2) Brais B, Bouchard JP, Xie YG, et al.: Short GCG expansuins in The PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature Genet* 18: 164-167, 1998.
- 3) Saito F, Tomimitsu H, Arai K, et al.: A Japanese patient with distal myopathy with rimmed vacuoles: missense mutations in the epimerase domain of the UDP-N-acetylglucosamine2-epimerase/N-acethylmannosamine kinase (*GNE*) gene accompanied by hyposialylation of skeletal muscle glycoproteins. *Neuromusc Disord* 14: 158-161. 2004.

# アセチルコリン受容体 $\alpha$ サブユニット遺伝子の機能を有さないエクソン P3A 上のミスセンス変異は mRNA スプライシング異常を誘発する

佐橋 功\*

研究協力者 大野 欽 司\*\* Andrew G. Engel\*\*\*

## 目 的

先天性筋無力症候群は、神経筋接合部の先天的な分子欠損により神経筋接合部の信号伝達が障害される疾患群であり、i) 骨格筋ニコチン作動性アセチルコリンレセプター (AChR), ii) AChR を終板に集積させる rapsyn, iii) 骨格筋電位依存性ナトリウムチャンネル, iv) アセチルコリンエステラーゼをシナプス基底膜に係留する collagen Q, v) 神経終末においてアセチルコリンを再合成するコリンアセチルトランスフェラーゼの 5 分子の欠損が知られている。成人型 AChR は、 $\alpha, \beta, \delta, \epsilon$  の 4 つのサブユニットからなる 5 量体である。  $\alpha$  サブユニット遺伝子 (*CHRM1*) の 75 塩基からなるエクソン P3A は、alternative splicing を受け、P3A を有する P3A(+)mRNA と、P3A をスキップした P3A(-)mRNA は骨格筋において 1:1 で生成される。P3A(-)mRNA は正常  $\alpha$  サブユニットをコードする。一方、P3A(+)mRNA によってコードされる  $\alpha$  サブユニットは AChR を構成できず、その存在意義は不明である。エクソン P3A の alternative splicing 調節の分子機構は明らかにされていない。

## 方 法

HEK 細胞に発現をさせた組み換え AChR の  $\alpha$  バンガロトキシン結合アッセイを行った。骨格筋 mRNA、及び、

COS 細胞に導入したミニ遺伝子由来の mRNA の real time RT-PCR 解析を行った。さらに、エクソン特異的 siRNA をミニ遺伝子と同時に COS 細胞に導入し、治療オプションの可能性を検討した。

## 結 果

先天性筋無力症候群の 1 例において認められたエクソン P3A 上のミスセンス変異によりエクソン P3A が常に mRNA に取り込まれ、P3A(+)mRNA のみが作られることを患者骨格筋 mRNA の RT-PCR 解析により見出した。COS 細胞に導入したミニ遺伝子の解析でも同様な結果が得られた。ミニ遺伝子に対する scanning mutagenesis により、この変異は exonic splicing silencer を破断していることが判明した。P3A(-)mRNA 量は 5 倍に増加したが、P3A(-)mRNA が全 mRNA の 1.8% を占めるまでしか増加させることができなかった。

## 考 察

Alternative splicing を受ける機能を有さないエクソン上の一塩基置換はサイレントとは限らない。あらゆるエクソン上の変異は、mRNA 前駆体スプライシングへの影響を常に考慮に入れる必要がある。

\* 愛知医科大学神経内科

\*\* 名古屋大学神経疾患腫瘍センター神経遺伝情報学

\*\*\* Mayo Clinic, Department of Neurology

# Rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチーの骨格筋における糖蛋白のシアル酸負荷に関する研究

清水 輝夫\*

研究協力者 斉藤 史明\* 新井 謙\* 富満 弘之\*\*  
水澤 英洋\*\* 松村 喜一郎\*

## 目 的

Rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチー (Distal myopathy with rimmed vacuole: DMRV) は UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) 遺伝子の変異で生じることが知られている。GNE はシアル酸合成に必須の酵素であり、その機能異常では糖蛋白のシアル酸付加に異常を生じる可能性が推測されているものの、本症の発症機序は不明のままである。本研究では DMRV 患者の骨格筋における糖蛋白のシアル酸負荷の異常の有無を検討した。

## 方 法

病理学的に診断された日本人 DMRV 患者7名の生検骨格筋より蛋白を抽出し、電気泳動、転写の後に、レクチンブロットを行いシアル酸の変化を検討した。また、免疫染色、ウエスタンブロットにより同患者骨格筋における $\alpha$ -dystroglycan の発現を検討するとともに、ブロットオーバーレイアッセイにより $\alpha$ -dystroglycan のラミニン結合能を検討した。

## 結 果

7名中1名の DMRV 患者においてシアル酸認識レクチンである wheat germ agglutinin (WGA), sambucus nigra agglutinin (SNA), maaackia amurensis lectin (MAM) の反応性の著明な低下を認め、シアリダーゼ処理後にはこれらコントロールとの差異は消失したことから、同骨格筋における糖蛋白のシアル酸負荷の減少が明らかとなった。遺伝子解析の結果、本患者は GNE の epimerase domain に Cys13Ser, Asp176Val という稀な点変異を有することがわかった。一方、7名全ての DMRV 患者において $\alpha$ -dystroglycan の発現は正常であり、明らかなラミニン結合能の低下も認められなかった。

## 考 察

両アリアル共に epimerase domain に変異を有する DMRV 患者において骨格筋蛋白のシアル酸負荷の減少を認めたが、kinase domain に変異を持つ他の DMRV 患者ではレクチンブロットに明らかな変化は認められなかった。GNE と同様の kinase 活性をもつ酵素 GlcNAc

kinase の存在が知られており、kinase domain に変異を持つ患者では同酵素により GNE の活性低下が代償されている可能性が推測された。近年、 $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖異常の結果 $\alpha$ -dystroglycan の laminin 結合能が减弱することが先天性筋ジストロフィーの発症機序として注目されている。しかし DMRV においては $\alpha$ -DG の laminin 結合能は正常であり、 $\alpha$ -dystroglycan 以外の蛋白の機能異常が本疾患の発症に関わっているものと考えられる。

## 今後の展望

SG は筋組織だけでなく中枢神経系においても重要な機能を果たしているものと考えられる。今後、M-D など、運動異常に関連した疾患の解析から SG の機能に関する新しい知見が得られる可能性がある。また、 $\zeta$ -SG は $\gamma$ -SG の、 $\epsilon$ -SG は $\alpha$ -SG の代用分子として機能すると考えられるため、これらの発現制御の問題に取り組むことで LGMD2C, 2D の治療法への応用が期待される。

## 研究意義

DMRV 患者7名のうち1名において骨格筋糖蛋白のシアル酸負荷が著減していることを見いだした。同患者は GNE 遺伝子の epimerase domain に稀な点変異を有していた。7名の患者全てにおいて $\alpha$ -dystroglycan の laminin 結合能は正常であった。これらのことは DMRV の一部の患者では骨格筋糖蛋白のシアル酸の減少が筋細胞変性に関与する可能性を示唆しており、その分子発症機序の解明に重要な発見である。

## 文 献

- 1) Matsumura, K., et al. FEBS Lett. 334:281-285, 1993.
- 2) Yamada, H., et al. FEBS Lett. 352:49-53, 1994.
- 3) Yamada, H., et al. J. Neurochem. 66:1518-1524, 1996.
- 4) Yamada, H., et al. J. Biol. Chem. 271:23418-23423, 1996.
- 5) Chiba, A., et al. J. Biol. Chem. 272:2156-2162, 1997.
- 6) Matsumura, K., et al. J. Biol. Chem. 272:13904-13910, 1997.
- 7) Matsumura, K., et al. Histol. Histopathol. 12:195-203, 1997.
- 8) Matsumura, K., et al. Neuromusc. Disord. 7:7-12, 1997.

\* 帝京医科大学神経内科

\*\* 東京医科歯科大学脳神経機能病態学

- 9) Saito, F., et al. *J. Biol. Chem.* 272:26708-26713, 1997.
- 10) Sasaki, T., et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1425:599-606, 1998.
- 11) Saito, F., et al. *J. Biol. Chem.* 274:8240-8246, 1999.
- 12) Shimoji, Y., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 9857-9862, 1999.
- 13) Matsumura, K., et al. *Cell. Molec. Biol.* 45:751-762, 1999.
- 14) Masaki, T., et al. *Acta Neuropathol.* 299:289-295, 2000.
- 15) Claudepierre, T., et al. *J. Cell Sci.* 113:3409-3417, 2000.
- 16) Masaki, T., et al. *Acta Neuropathol.* 101:174-178, 2001.
- 17) Yamada, H., et al. *Hum. Molec. Genet.* 10: 1563-1569, 2001.
- 18) Masaki, T., et al. *Exp. Neurol.* 174:109-117, 2002.
- 19) Matsumura, K., et al. *Current Topics in Neurochemistry* 3:131-140, 2002.
- 20) Matsumura, K., et al. *Neuromusc. Disord.* 13:796-803, 2001.
- 21) Matsumura, K., et al. *Basic and Applied Myology* 13: 299-304. 2003.

# 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)におけるシアル化異常

西野 一三\*

研究研究者 野口 悟\* 計良 陽子\* 村山 久美子\* 小川 恵\*  
藤田 雅子\* 川原 玄理\* 林 由起子\* 後藤 雄一\*  
埜 中 征 哉\*

## 緒 言

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)は本邦で初めて報告され、前頸骨筋が好んで侵される疾患である。我々は DMRV が海外に多い遺伝性封入体ミオパチー(HIBM)のアレル病であり、シアル酸生合成の律速段階酵素 UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE)遺伝子の機能喪失型変異による疾患であることを明らかにした。これまでに国内外で遺伝子変異の報告があるが、その詳細な病態機序は不明のままである。本研究では、組み換え変異 GNE 蛋白質の酵素活性とオリゴマー形成を測定し、DMRV における変異 GNE 酵素の生化学的な特性付けをするとともに、DMRV 筋・培養細胞におけるシアル化について解析をした。

## 方 法

site-directed mutagenesis により、変異 GNE 蛋白質発現ベクターを作成し、COS 細胞にて組み換え変異 GNE 蛋白質を強制発現させた。標識基質を用いて、酵素活性を測定した。オリゴマー形成は、化学架橋剤を用いて、組み換え変異 GNE 蛋白質を架橋・精製後、電気泳動で調べた。DMRV 患者筋・細胞のシアル酸含量はチオバルビツール酸法で測定した。レクチン及び抗体染色、ラミネンオーバーレイは常法に従って行った。GNE-/-マウスは、常法に従い、exon3 を NEO 遺伝子に置き換えて作成した。

## 結 果

少しの例外を除き、UDP-GlcNAc 2-epimerase ドメインに変異のある GNE 蛋白質は UDP-GlcNAc 2-epimerase 活性が減少し、ManNAc kinase 活性は保たれていた。一方、ManNAc kinase ドメインに変異のある GNE 蛋白質はその逆の傾向を示した。正常型 GNE 蛋白質は 6 量体を形成していたが、UDP-GlcNAc 2-epimerase 活性減少変異体は単量体または 3 量体であった。このことは、オリゴマー形成が UDP-GlcNAc 2-epimerase に関連があることを示していた。患者血清のシアル酸含量はほぼ正常レベルであったが、

患者筋では約 25%減少していた。レクチン染色では縁取り空胞をもつ筋線維または高度に萎縮した筋線維で、シアル酸の減少を示す染色が観察された。しかしながら、患者筋全体から調製したサンプルでは、ほとんど有意なシアル酸減少を示す糖蛋白質は見られなかった。また、DMRV 培養細胞では、シアル酸は血清を加えない時のみ、約 35% 低下していた。この低下は、培地に血清や GNE 代謝産物である ManNAc・NeuAc の添加により正常レベルに回復した。これらの結果はレクチン染色でも確かめられた。GNE+/-マウスには異常が見られなかったが、GNE-/-マウスは産出されなかった。胎児期 9.5 日齢以降に胎生致死性を示した。

## 考察・結論

①UDP-GlcNAc 2-epimerase 活性または ManNAc kinase 活性を完全に失っている GNE 変異はなかった。②オリゴマー形成は UDP-GlcNAc 2-epimerase 活性に必須だと考えられた。③DMRV 患者筋の一部に見られる萎縮筋においてシアル化の減少が観察された。全体では、約 25%のシアル酸の減少を示した。なぜ、一部の筋線維のみで減少するのが解明されなければならない。④DMRV でのシアル化の減少は GNE 代謝産物である ManNAc・NeuAc の添加により正常レベルに回復したが、特に NeuAc のほうが効果が高かった。これらの物質による治療効果が期待された。⑤GNE-/-マウスは胎生致死性を示した。つまり、UDP-GlcNAc 2-epimerase 活性または ManNAc kinase 活性を完全に失うと致死に至る。シアル酸減少から DMRV 発症に至る分子病態解明にはモデルマウスが必要であり、変異 GNE トランスジェニックマウスとの交配にて得る予定でいる。

## 参考文献

- 1) Nishino, I. et al. Neurology 59:1689-1693, 2002.
- 2) Hiderlich, S. et al. Neurology 61: 145, 2003.
- 3) Noguchi, S. et al. J Biol Chem, 279:11402, 2004.

\* 国立精神・神経センター神経研究所

## V. DMD/BMD、およびジストロフィンその他

# 新しい中間径フィラメントである $\beta$ -synemin の分化に関する研究

水野裕司\*

研究協力者 水島和幸\*  
Louis M. Kunkel\*\*

岡本幸市\* Jeffrey R. Guyon\*\*  
Simon C. Watkins\*\*\*

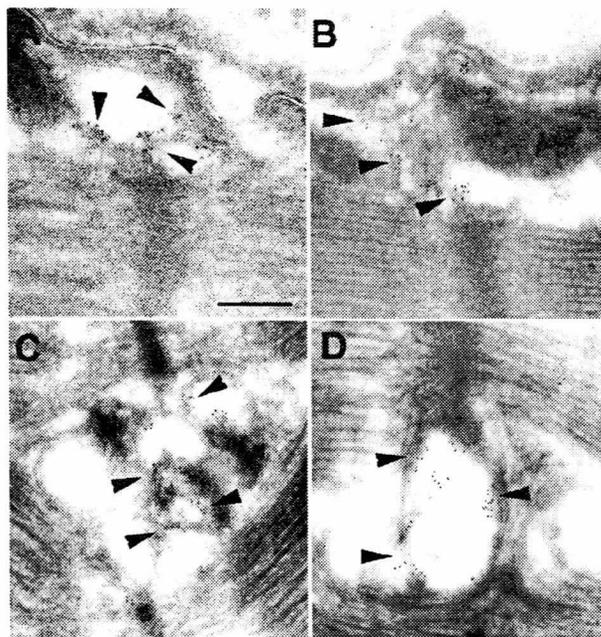
## 目 的

5 個のエクソンから翻訳される  $\beta$ -synemin<sup>1)2)3)</sup> (当初は desmuslin<sup>1)</sup> と命名された) は、ジストロフィン結合タンパク質のひとつである  $\alpha$ -dystrobrevin-1 (エクソン 1~21A で構成) と  $\alpha$ -dystrobrevin-2 (エクソン 1~17B で構成) に共通な配列 (エクソン 1~16 に相当) をおとりタンパク質として獲得した中間径フィラメントである。  $\beta$ -synemin は N 端側が 10 個、Rod 部分 (1A-1B-2A-2B で構成) が 312 個、C 端側が 931 個のアミノ酸より構成される分子量約 170kDa のタンパク質で、中間径フィラメントのタイプ 6 に類似の構造をしている。免疫沈降実験の結果、両タンパク質が結合するためには、  $\beta$ -synemin は N 末端から Rod の 1A-1B-2A までが、  $\alpha$ -dystrobrevin はエクソン 8~16 が必要であった。また、  $\beta$ -synemin は desmin にも結合したので、このタンパク質はジストロフィン結合タンパク質と細胞骨格系タンパク質の両者を結ぶ役割をしていることが推定された。  $\beta$ -synemin の局在に関しては、光学顕微鏡レベルや電子顕微鏡レベルでの解析により、Z 線に沿って存在していることを明らかにした (図)<sup>1)</sup>。本研究では  $\beta$ -synemin に特異的な抗体を用いて、(1)  $\beta$ -synemin の骨格筋における詳細な局在、(2)  $\beta$ -synemin の発現時期及び他のタンパク質との比較、(3) コントロールマウスと mdx マウスの骨格筋における  $\beta$ -synemin の変動の有無について検討した。

## 方法と結果

(1) 共焦点レーザー顕微鏡レベルで  $\beta$ -synemin の局在を検討した。  $\beta$ -synemin は Z 線に沿って存在するが、特に costamere に強いシグナルを認めた<sup>3)</sup>。

(2) ラット Br/Han:WIST (GALAS) の胎生 16 日、18 日、20 日、生後 1 日、3 日、5 日、7 日、13 週の下腿筋を使用した。イムノプロット法を用いて、  $\beta$ -synemin の他に  $\alpha$ -dystrobrevin-1、  $\alpha$ -dystrobrevin-2、 dystrophin、 vimentin の発現時期を検討した。  $\beta$ -synemin は生後 5 日よりバンドとして見えるようになり、徐々に発現量が増加していった。  $\alpha$ -dystrobrevin-1 は  $\beta$ -synemin と同じく生後 5 日よりバンドとして認識できた。一方、  $\alpha$ -徐々にシグナルが強くなっていった。 Dystrophin は生後



$\beta$ -synemin の電子顕微鏡レベルでの局在について  
 $\beta$ -synemin は Z 線が筋細胞膜に接する箇所 (costamere に相当) に多く存在している (A、B)。また、筋細胞内では Z 線に沿って存在している (C、D)。

dystrobrevin-2 は胎生 20 日よりバンドとして認識でき、1 日から発現を認め、生後 5 日、7 日と急速に増加したが、その時期においても  $\beta$ -synemin の発現量の急激な増加はなかった。同じ中間径フィラメントの vimentin は胎生 16 日にすでに発現し、生後 7 日まで明らかなバンドを認めたが、13 週になるとバンドは見られなかった。以上の結果より、抗体の力価の違いはあるが、  $\beta$ -synemin は  $\alpha$ -dystrobrevin-2 よりも  $\alpha$ -dystrobrevin-1 に発現パターンが類似しており、両タンパク質の親和性を示唆していると考えた。また、ラット下肢筋を免疫組織学的に検討すると、胎生 20 日に細胞内にドット状のシグナルが検出できた。生後 3 日から細胞膜周囲及び細胞内にも発現が明らかになってきた。

(3) コントロールマウスと mdx マウスの大腿四頭筋のホモジネートを電気泳動し、イムノプロット法により  $\beta$ -synemin の発現状況を比較した。両マウスで差がないとされる  $\alpha$ -dystrobrevin-1 をマーカーとした。Utrophin、  $\alpha$ -dystrobrevin-1、  $\alpha$ -dystrobrevin-2、  $\beta$ -synemin のバンドを NIH Image を使用して数値化した。Mdx/コントロール比は  $\alpha$ -dystrobrevin-1 が 0.99 であり、両方のタンパ

\* 群馬大学大学院 脳神経内科学  
\*\* Harvard 大学 ポストン小児病院  
\*\*\* Pittsburgh 大学 Center for Biologic Imaging

ク質がほぼ同量泳動されているものと解釈した。その際 utrophin が 5.72 と mdx で増加し、 $\alpha$ -dystrobrevin-2 が 0.57 と mdx で低下していた。一方、 $\beta$ -synemin に関しては 1.00 と差がなかった<sup>3)</sup>。この結果から推測できることは、 $\beta$ -synemin の発現量が両マウスで変動がなかったことより、 $\beta$ -synemin は  $\alpha$ -dystrobrevin-1 に親和性があるのではないかとということであった。

#### 考 察

(1) ラットの下腿筋を用いてイムノプロット実験を行った結果、 $\beta$ -synemin と  $\alpha$ -dystrobrevin-1 の発現を認識できたのがともに生後 5 日であったこと、コントロールマウスと mdx マウスの大腿四頭筋における  $\beta$ -synemin の発現量が、 $\alpha$ -dystrobrevin-1 と同様に差がなかったことより、 $\beta$ -synemin は  $\alpha$ -dystrobrevin-2 よりも  $\alpha$ -dystrobrevin-1 に対して強い親和性があると考えた。

(2)  $\beta$ -synemin の発現パターンを経時的に検討するためにラットの骨格筋にマーカインあるいはカルジオトキシンを注射して、人工的に再生を起こさせ、観察する必要があると考えた。

#### 今後の展望

$\beta$ -synemin は  $\alpha$ -dystrobrevin-1 と  $\alpha$ -dystrobrevin-2 の両者、あるいはどちらかに優位に結合している可能性のあるタンパク質である。どちらとより強く結合するかを解明することは、 $\beta$ -synemin の局在及び機能を考える上でとても重要である。神経筋接合部において、 $\beta$ -synemin が crest に存在しているか、それとも deep portion に存在しているかを検討することは意義がある。なぜなら  $\alpha$ -dystrobrevin-1 は crest に多く、 $\alpha$ -dystrobrevin-2 が deep portion に優位に存在していること、desmin が acetylcholine receptor の豊富な crest に接して存在していることが報告されているからである。

以前我々が報告した  $\beta$ -synemin のアミノ酸置換を伴う 12 個の変異とアミノ酸置換を伴わない 9 個の変異の計 21 種類の single-nucleotide polymorphisms (SNPs) は、

157 例のコントロール群と 71 例の疾患群 (Nemaline myopathy 50 例, Muticore/minicore disease 6 例, Myotubular myopathy 2 例, Spheroid body myopathy 1 例, Limb-Girdle muscular dystrophy 4 例, Undefined 8 例) の両方に認めたことより、検索し得た 71 例の疾患群の原因となるべき変異ではないと判断した<sup>2)</sup>。最も興味深かったことは、 $\beta$ -synemin のエクソン 1 に存在した SNP である。これは核酸番号 598 が C→T (C598T) に置換しており、CAG→TAG となり、グルタミンが停止コドンに変化しているものであった。この患者はヘテロ変異で、患者の健康な両親を検索したところ、父親にも同様のヘテロ変異を認めた。さらに 157 例のコントロール群を調べたところ、同じヘテロ変異の人が 1 人見つかった。計算上、ヘテロ変異の確率は  $2/456 \{ (71 + 157) \times 2 \} = 0.44 \%$ 、ホモ変異になる確率は  $0.44 \times 0.44 = 0.002 \%$  になった。C598T のホモ変異の患者は見つかっていないので、 $\beta$ -synemin のノックアウトマウスを作製して、筋力低下などの症状を呈するか否かを検討することが必要と考える。 $\beta$ -synemin のノックアウトマウスの研究が、 $\beta$ -synemin の筋組織における機能を探るうえでとても大切であると考えられる。

#### 文 献

- 1) Mizuno Y, Thompson TG, Guyon JR, Lidov HGW, Brosius M, Imamura M, Ozawa E, Watkins SC, Kunkel LM: Desmuslin, a novel intermediate filament protein that interacts with alpha-dystrobrevin and desmin. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 98: 6156-6161, 2001.
- 2) Mizuno Y, Puca AA, O'Brien KF, Beggs AH, Kunkel LM: Genomic organization and single-nucleotide polymorphism map of desmuslin, a novel intermediate filament protein on chromosome 15q26.3. BMC Genetics 2: 8, 2001.
- 3) Mizuno Y, Guyon JR, Watkins SC, Mizushima K, Sasaoka T, Imamura M, Kunkel LM, Okamoto K:  $\beta$ -synemin localizes to regions of high stress in human skeletal myofibers. Muscle Nerve 30: 337-346, 2004.

# ジストロフィン欠損骨格筋における MAPK および matrix metalloproteinase-2, -9 の検討

池田 修一\*\*

研究協力者 吉田 邦広\*† 中村 昭則\*\* 福島 和広\*\*  
飯島 尚子\*\* 植田 秀穂\*\*\* 武田 伸一\*\*\*\*

## 目的

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) は機械的刺激などの様々なストレスにより活性化される細胞内伝達シグナル伝達分子であり、細胞の分化、増殖、アポトーシスなど多彩な機能を有している。MAPKs は主に p38 MAPK, ERK1/2, JNK に分類され、各々の発現・活性化は組織やストレスの種類により異なっている。ジストロフィン欠損筋では正常筋に比べ機械的ストレスをより受けやすいことから、MAPKs の発現異常が起こっている可能性を考えた。我々は以前に運動負荷により mdx マウスの心筋では p38 MAPK の活性化が強く起こることを報告した<sup>1)</sup>。そこで、この3年間に(1)運動負荷による mdx 骨格筋の MAPKs の発現の検討、(2)ヒトジストロフィン異常症の骨格筋における p38 MAPK, ERK1/2 の発現・局在の検討、(3) MAPK の下流の分子である matrix metalloproteinase -2, -9 (それぞれ gelatinase A, B) のジストロフィン欠損筋での活性・局在の検討、を行った。

## 方法と結果

### ①骨格筋における運動負荷による MAPKs の発現

6週齢の対照および mdx マウスそれぞれ5匹ずつを運動負荷群、非運動負荷群の計4群に分け、運動負荷群にはトレッドミルを用いて傾斜7度、15 m/min (5週) 続いて 23m/min (5週) を1時間、週2回の計10週間の運動負荷を行った。各マウスの後肢筋を用いて、各々活性化型である p-ERK1/2, p-p38 MAPK, p-JNK の蛋白量について比較・検討した。

p-ERK1/2, p-p38MAPK, p-JNK2 の発現は運動負荷群の対照および mdx マウスの骨格筋で増加していたが、特に mdx 運動負荷群でより増加していた。p-JNK1 はどの群においても発現は極めて少なく、運動負荷との関連はみられなかった(図1)。MAPK pathway の下流に位置する p90RSK や matrix metalloproteinase-9 の発現も検討したが、同様に mdx 運動負荷群で強かった。<sup>2)</sup>

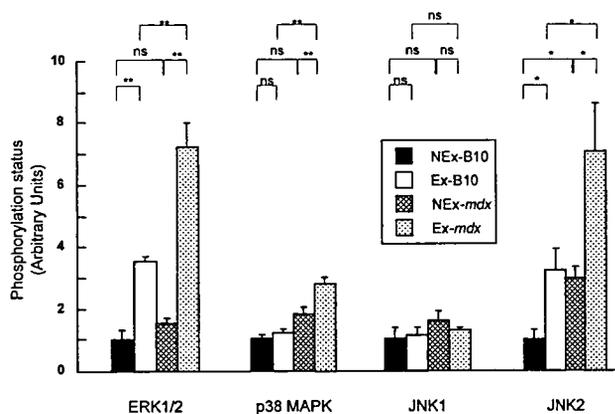


図1 運動負荷群 (Ex), 非運動負荷群 (NEx) の mdx および C57BL/10 (B10) マウス骨格筋における ERK1/2, p38 MAPK, JNK1, JNK2 の活性化の比較。各群とも n = 5, Bar: mean ± S.E.M, \*p<0.05, \*\*p<0.01, ns: not significant.

### ②ヒトジストロフィン異常症の骨格筋における p38 MAPK, ERK1/2 の発現・局在

ジストロフィン異常症11名、対照として自己免疫性筋炎11名、神経原性筋萎縮症5名、正常者2名の骨格筋について、p-p38 MAPK および p-ERK1/2 の発現を比較した。また両分子の局在を免疫組織化学的に検討した。

ジストロフィン異常症では p-p38 MAPK は炎症性ミオパチーおよび神経原性筋萎縮症の2.5倍と有意 (p<0.01) に増加していた(図2A)。また、p-ERK1/2 は自己免疫性筋炎との間に有意差 (p > 0.05) はなかったが、神経原性筋萎縮症に対しては2.5倍と有意 (p<0.05) に増加していた(図2B)。ジストロフィン異常症では p-p38 MAPK は壊死線維の38%、再生線維の35%に陽性、p-ERK1/2 は壊死線維の25%、再生線維の52%で陽性であった。一方、自己免疫性筋炎では p-p38 MAPK は壊死線維の50%、再生線維の33%に陽性、p-ERK1/2 は壊死線維の50%、再生線維の75%で陽性であった(図2C)。神経原性筋萎縮症では萎縮線維の核・細胞質に両分子の弱い染色性を認め、正常ではいずれの染色性も極めて弱かった。<sup>3)</sup>

\* 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部

\*\* 信州大学医学部第三内科

\*\*\* 信州大学医学部保健学科解剖学

\*\*\*\* 国立精神・神経センター神経研究所

† 平成16年度

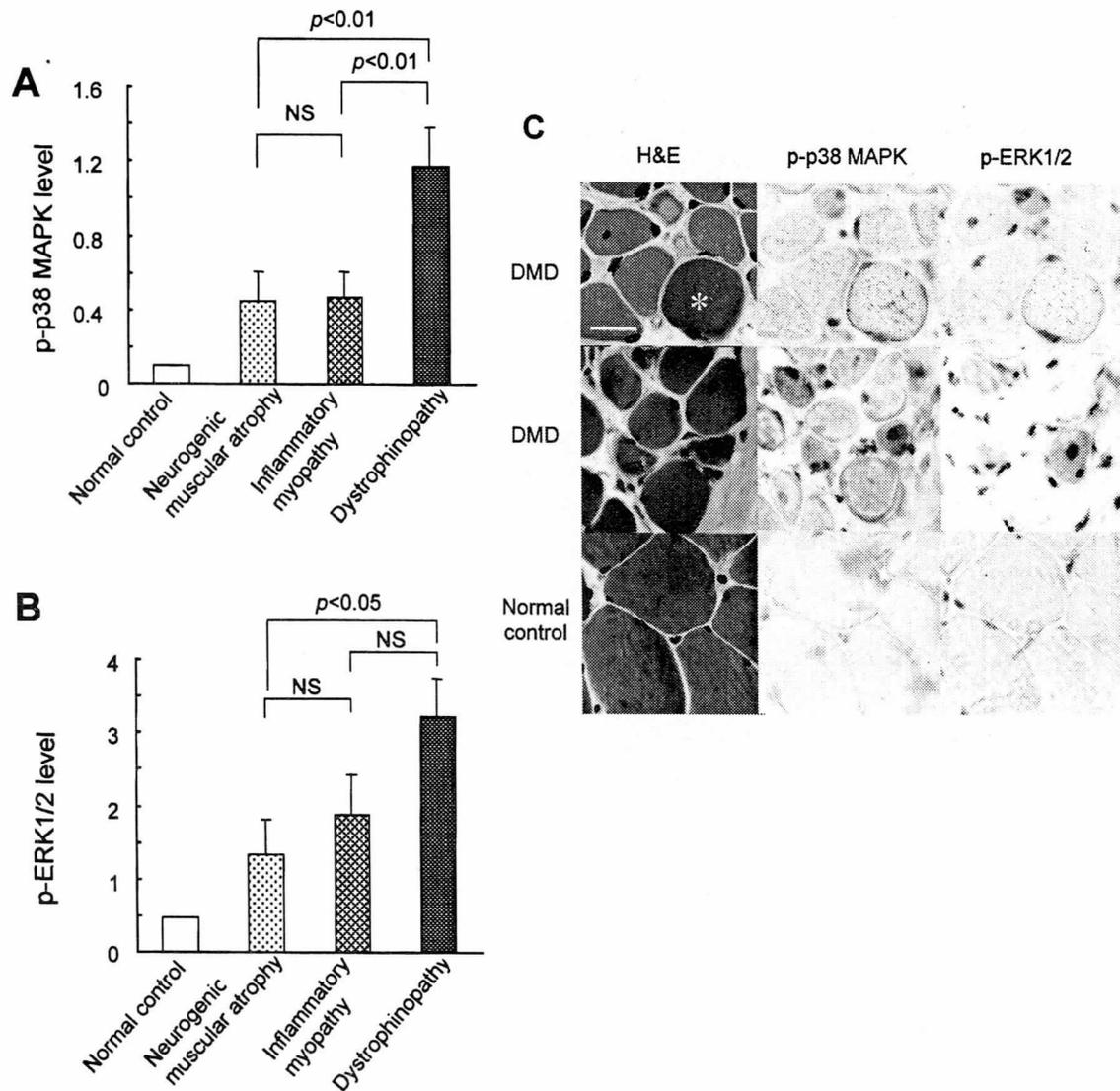


図 2

A : 正常者, 神経原性筋萎縮症, 自己免疫性筋炎およびジストロフィン異常症患者の骨格筋における p-p38 MAPK の発現量. Bar: mean ± SEM, NS: not significant  
 B : 正常者, 神経原性筋萎縮症, 自己免疫性筋炎およびジストロフィン異常症患者の骨格筋における p-ERK1/2 の発現量. Bar: mean ± SEM, NS: not significant  
 C : DMD 患者, 正常者の骨格筋における H&E 染色, p-p38 MAPK および p-ERK1/2 の免疫組織化学 \*Opaque fiber, Bar: 50 μm.

### ③筋ジストロフィー犬 (CXMDj) の骨格筋における MMP-2, -9 の活性・局在

正常犬およびCXMDjそれぞれ9匹 (1, 4, 5, 6, 11, 11, 12, 14, 28ヶ月齢) の前脛骨筋を用いてgelatin zymographyを行い, MMP-2, -9の活性について検討した. また, 4ヶ月齢の正常犬およびCXMDjの前脛骨筋を用いてfilm in situ zymographyを行い, gelatinaseの活性の局在部位を検討した. さらに, 4ヶ月齢の正常犬およびCXMDjの前脛骨筋でMMP-2, -9, CD11b, laminin B2およびMHCdの局在を免疫組織化学的に検討した. proMMP-2, MMP-2, proMMP-9の活性は正常犬と比較し

CXMDjで有意に増加し, 月齢に関わらず高値が持続していた. 正常犬ではproMMP-2の活性は月齢との有意な負の相関を認め, 低月齢において増加していた. また, 4ヶ月齢のCXMDjでは壊死・再生部位に強いgelatinase活性を認めた. MMP-2およびMHCdは再生線維に共局在を認め, MMP-2陽性筋線維はMHCd陽性筋線維よりも少数であり, 再生早期の筋線維に局限していた (図3A). MMP-9は炎症細胞の侵入した壊死線維やその周囲間質に局在を認め, CD11bと共局在を示した. また, 細胞浸潤を認めるMMP-9陽性の壊死線維ではLaminin B2の染色性が不均一に低下していた (図3B).<sup>4)</sup>

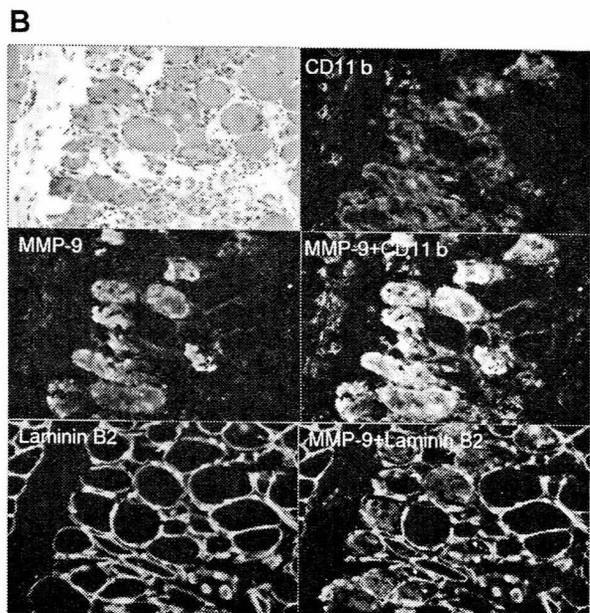
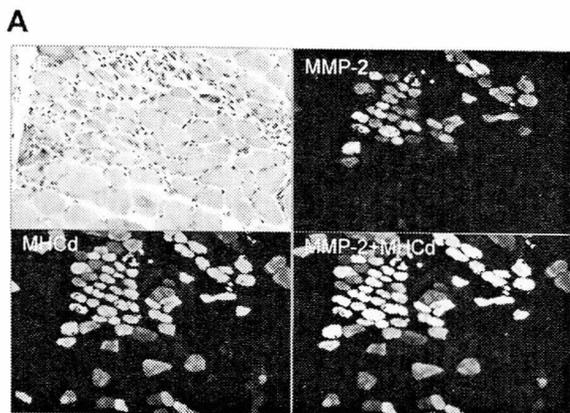


図 3

A : 4ヶ月齢のCXMDjの前脛骨筋におけるMMP-2, MHCdの免疫組織化学  
 B : 4ヶ月齢のCXMDjの前脛骨筋におけるMMP-9, CD11b, laminin B2の免疫組織化学

### 考 察

Mdxの運動負荷群の骨格筋では対照の運動負荷群に比して、p-ERK1/2, p-p38MAPK, p-JNK2の発現が増加していたことから、これらの分子が機械的ストレスに伴うジストロフィン欠損骨格筋の病態に関与している可能性がある。ジストロフィン異常症ではp-p38 MAPKの発現が他の対照疾患に比べて有意に増加し、より壊死線維に染色性がみられた。p38 MAPKは死のシグナルと考えられ、p38 MAPKがジストロフィン欠損筋の変性に促進的に働いている可能性がある。一方、p-ERK1/2はより再生線維に染色性がみられ、ERK1/2が生のシグナルと考えられていることから、筋再生への関与もしくは変性に対して抑制的に働いている可能性がある。最近、heregulinがERK pathwayを介してユートロフィンの発現を増強 (Gyrd-Hansen et al, J Neruo Sci 2002;197:27) し、またheregulinが utrophinの発現を増強して、mdxマウスのジストロフィー変化を改善 (Krag et al, PNAS 2004;101:13856) することが報告された。ジストロフィー変化の機序にMAPKsの果たす役割は重要と考えられる。

MMP-2, -9の活性はCXMDjでは月齢に関わらず高値を持続していたが、proMMP-2は低月齢の正常犬で有意に高く、生理的な筋組織の成長発達に関与している可能性がある。MMP-2はMHCd陽性線維の一部に共局在を認め、筋の再生の早期に関与していることが示唆された。MMP-9は壊死線維と炎症細胞に局在しており、壊死線維の除去による筋再生への促進的な役割を果たしている可能性や過度な発現が組織障害性に働き、筋壊死に対して促進的に働いている可能性が考えられる。

### 今後の展望

- ①ジストロフィン異常症において、p38 MAPK が壊死や変性に関与している可能性があることから、p38 MAPKの抑制剤を mdx マウスに投与し、病態変化の有無について検討する予定である。
- ②MMP-2, -9については、さらにジストロフィン異常症の病態との関連を深めるために、(1) 衛星細胞との関連、(2) 実験的筋壊死・再生モデルおよび mdx マウス筋における発現様式について検討する予定である。

### 参考文献

- 1) Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N, Ikeda S. Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of mdx mice. FEBS Letters 520: 18-24, 2002.
- 2) Nakamura A, Yoshida K, Ueda H, Takeda S, Ikeda S. Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise. BBA Mol Basis Dis. In press.
- 3) Iijima-Dohi N, Nakamura A, Ueda H, Yoshida K, Takeda S, Nishino I, Ikeda S. Alteration of p38 mitogen activated protein kinase and extracellular signal regulated kinase1/2 in skeletal muscle from patients with dystrophinopathy and autoimmune inflammatory myopathy. In submission
- 4) Fukusima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Takeda S, Ikeda S. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of in dystrophic dog (cxmdj). In preparation

# 筋原線維から筋形質膜への分子連関構築と筋ジストロフィー発症機序の相関解析

土方 貴雄<sup>\*†</sup> 依藤 宏<sup>\*,†,††</sup>

研究協力者 依藤 宏<sup>\*†</sup> 土方 貴雄<sup>\*,†,††,†††</sup>  
村上 徹<sup>\*</sup>

## 目 的

骨格筋では細胞内の細胞骨格を細胞外の基底膜につなぎ止めるものに、ジストロフィン-ジストログリカン軸およびインテグリン軸の二つのものが存在する。ところで、筋原線維は中間径フィラメント-プレクチン系により、相互に束ねられ、全体としては筋形質膜のジストロフィン-ジストログリカン軸につなぎ止められている<sup>1)</sup>が、後者の分子連関は明確にはなっていない。本研究ではこの点の解明を目的として、(1)中間径フィラメント・プレクチン系がどのような分子を介して細胞膜のジストロフィン-ジストログリカン軸と連関するのか。(2)(1)の研究過程でジストロフィン-ジストログリカン軸はピンキュリンあるいはアクチンを介してインテグリン軸とも分子連関を持つ可能性が出てきた。この可能性の有無の検証を目的として、両軸の関係を電顕レベルの免疫組織化学により検討することにした。(3)不明な点の多いインテグリン軸について、ユートロフィンとの分子連関の有無を調べるため、神経筋接合部におけるインテグリン及びそれと相互作用を持つ蛋白の局在を検討した。

## 方法と結果

(1) 中間径フィラメント-プレクチン系とジストロフィン-ジストログリカン軸の分子連関 プレクチンの N 末のリコンビナントタンパク質を用いたプロットオーバーレイアッセイによりβ-シネミン(デスマスリン)がプレクチンと結合することが明らかになった。また、ラットの骨格筋切片の抗β-シネミン抗体と抗ジストロブレピン抗体での二重染色によりβ-シネミンは Z 線延長上の筋形質膜においてジストロブレピンと共局在を示した。これらの結果ならびに水野らのβ-シネミン(デスマスリン)はジストロブレピン結合タンパク質であるという報告<sup>2)</sup>から、プレクチンは筋形質膜直下でβ-シネミン、ジストロブレピンを介してジストロフィンに分子連関性を示すものと考えられた。そこで、次にプレクチンとβ-

シネミンのドメイン相互作用をプルダウンアッセイにより検討した。その結果、プレクチン N 末はβ-シネミンのロッドドメイン C 末、テールドメイン N 末にかけての領域に結合し、反対にβ-シネミンはプレクチンのエクソン 1 ドメイン、カルボニンホモロジドメイン、N 末最初のスペクトリンリピートドメインに結合することが明らかになった。カルボニンホモロジドメインはアクチン結合部位でよく知られているので、このドメインに F-アクチンが結合しβ-シネミンとの結合が阻害されるかどうか F-アクチン、β-シネミン、プレクチンを用いた競合的沈降実験を行った結果、プレクチンと F-アクチンとの結合はプレクチンとβ-シネミンとの結合を阻害するものでないことが明らかになった。さらに、β-シネミンのテールドメインは弱いながらも F-アクチンへの結合能をもつことも明らかになった。

(2) ジストロフィン-ジストログリカン軸とインテグリン軸の分子連関の可能性 抗インテグリンβ1D抗体および抗ジストロフィンあるいは抗ジストログリカン抗体の二重染色を電子顕微鏡レベルでおこなうことにより、両軸の分子連関の可能性を検討した。抗ジストロフィン抗体との染色にはクリオスタット切片上で免疫染色をおこない再包埋、薄切した試料を用い、Triton X-100 で処理したものとしていないものの 2 種類を試みた。抗ジストログリカンとの組み合わせでは chemically skinned fiber<sup>1)</sup>に免疫染色を施した。前者の方法では 2 つのラベルが近接して存在する場合が認められ、その際は二つのラベル間の距離のヒストグラムを描くと Triton 処理(+)で 20~30nm に、Triton 処理(+)で 30~40nm にピークが認められた。ジストログリカンとの二重染色では細胞膜を挟んで二種類のラベルが相対する像が認められた(図 1)。

(3) 神経筋接合部におけるインテグリンβ1D の局在 モルモット長趾伸筋においてシナプス後膜のヒダの山の部分か谷の部分に局在するかを共焦点レーザー顕微鏡により他の裏打ち蛋白の局在とともに検討した。インテグリンβ1D、ジストロフィン、ターリン、ピンキュリン、パキシリン、focal adhesion kinase、スペクトリンはすべて谷の部分に局在し、山と谷の両方に分布するβ-ジストログリカン、山の部分に局在するユートロフィンとは分布が異なることが明らかになった(図 2)。

\* 群馬大学大学院医学系研究科器官機能構築学

\*\* 武蔵野大学薬学部機能形態学

† 平成 14 年度

†† 平成 15 年度

††† 平成 16 年度

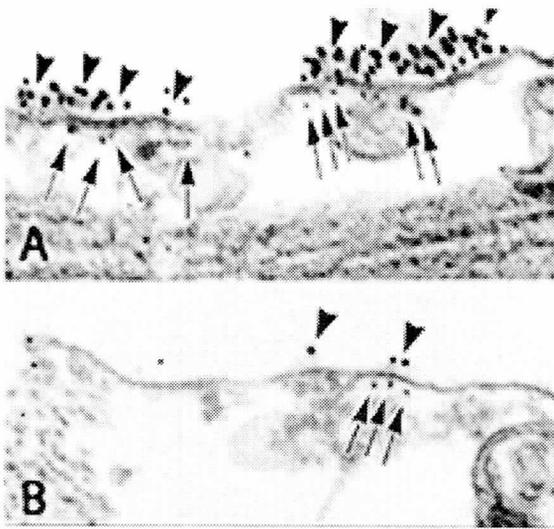


図 1 抗インテグリンβ1Dと抗ジストログリカンの二重染色の電子顕微鏡像。5nm コロイド金(矢印)はインテグリンβ1Dの、10nm コロイド金はジストログリカンの局在を示す。両者が細胞膜を隔てて相対する像が観察される。A: 縦断切片, B: 横断切片

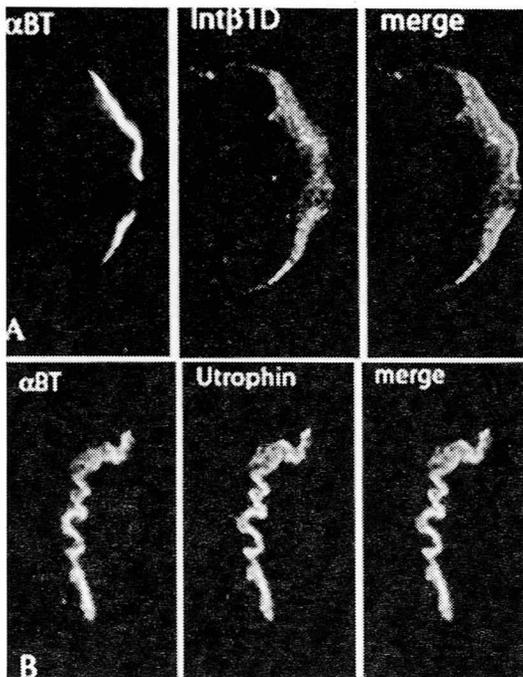


図 2 神経筋接合部の共焦点レーザー顕微鏡像。A: α-ブングアロトキシン(αBT)インテグリンβ1D(Intβ1D)の二重染色。B: α-ブングアロトキシンとユートロフィンの二重染色。α-ブングアロトキシンとユートロフィンは局在が完全に一致し、シナプス後膜の山の部分に存在するが、インテグリンはα-ブングアロトキシンより細胞質側に染色がみられ、後膜の谷の部分に局在することが分かる。

### 考 察

(1) 中間径フィラメントとジストログリカン軸の分子連関を上記の結果からまとめると、図3のような分子構築モデルが提唱できる。プレクチン分子は筋形質膜下でそのN末でβ-シネミンのテールならびにF-アクチンに結合し、反対のC末端でデスミン中間径フィラメントに結合する。プレクチンに結合しているβ-シネミンのテールとF-アクチン間にも弱いながらも結合能がみられる。

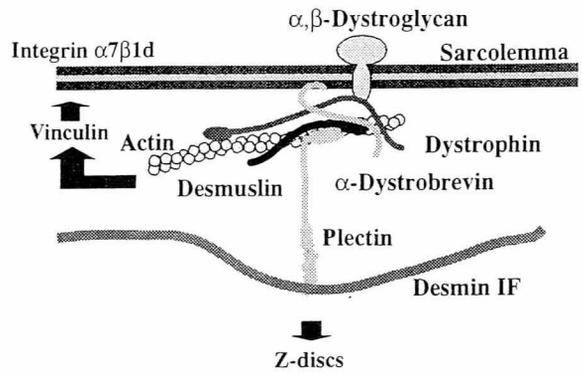


図 3 ジストロフィン筋形質膜裏打ちからデスミン中間径フィラメントへの分子連関モデル。デスミン中間径フィラメントはプレクチン-β-シネミン-ジストロブレイン-ジストロフィンを介して筋形質膜にアンカーしている。

プレクチンやアクチンに結合したβ-シネミンはそのN末のロッドドメインでα-ジストロブレインに結合し、さらにα-ジストロブレインがジストロフィンに結合していると考えられる。(2)ジストログリカン軸とインテグリン軸の連関の可能性については抗体の分子サイズ、介在する可能性のあるピンキュリンのサイズなどを考慮すると、両者は相互に分子連関を持っていても矛盾はしない。(3)神経筋接合部のシナプス後膜の免疫染色からインテグリンはユートロフィンとは分子連関を持つ可能性は少ないと考えられた。

### 今後の展望

(1) 上記の中間径フィラメント-ジストログリカン軸の分子構築モデルをもとにデスミン欠損、ジストロフィン欠損、α-ジストロブレイン欠損マウスでの、それぞれ連関する分子の存在有無や局在異常の解析を行うことでモデルの検討、さらに欠損による筋疾患の表現形との対応関係をはかり、分子構築の機能的役割と生理学的意義の検討を行うつもりである。(2)ジストログリカン軸とインテグリン軸の連関については形態学的証拠は得られたので、今後免疫沈降実験、プロットオーバーレイ法などを用い、生化学的に両軸の分子連関を検討するとともに、今は全くデータの無い in vivo の成熟骨格筋におけるインテグリンと細胞内細胞骨格との連関を明らかにし、インテグリン軸の骨格筋において果たす役割を明らかにしてゆく予定である。

### 参考文献

- Hijikata T, Murakami T, Ishikawa H, Yorifuji H: Plectin tethers desmin intermediate filaments onto subsarcolemmal dense plaques containing dystrophin and vinculin. *Histochem Cell Biol* 119:109-23, 2003.
- Mizuno Y, Thompson TG, Guyon JR, Lidov HG, Brosius M, Imamura M, Ozawa E, Watkins SC, Kunkel LM: Desmuslin, an intermediate filament protein that interact with alpha-dystrobrevin and desmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6156-61, 2001.

# Duchenne 型筋ジストロフィー筋における浸潤細胞の解析

田中 恵子\*

研究協力者 河内 泉\* 西澤 正豊\*

## 目 的

Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) では、生検筋組織に多数の炎症細胞浸潤が見られる。時に非壊死線維の周囲にもCD8+T細胞を認め、また一部の筋線維にMHC class Iの発現を認めるなど、炎症所見という側面では多発筋炎 (PM) との区別は困難である。一方、DMDにおいて、副腎皮質ホルモン療法が筋力低下の進行を遅らせることが知られている。顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーや dysferlinopathy, その他の筋ジストロフィーでも、筋組織にリンパ球浸潤が見られ、これらの細胞の筋線維傷害過程への関与も考えられる。筋細胞膜異常に伴い通常提示されない筋抗原が免疫応答を生じる可能性も指摘されている。このような異常な筋線維に由来する一定の抗原を認識する免疫反応であるならば、細胞障害性T細胞を抑制する治療が一時的にでも筋力低下の進行を遅らせることができる可能性がある。そこで我々はDMDの病態の一部に筋組織の傷害を早める自己免疫的機序が存在する可能性を考え、浸潤T細胞のT細胞受容体 (TCR) のレパトア解析を行った。共通のアミノ酸構造を有するT細胞受容体 (TCR) がoligoclonalに浸潤している場合は、一定の抗原を認識する自己免疫機序が存在することを示唆するため、DMDの病態に筋組織を積極的傷害する自己免疫的機序が存在する可能性がある。

## 方法と結果

対象：HLA class I型が同一のDMD 1例、PM 3例、皮膚筋炎 (DM) 2例の生検筋凍結標本を用いた。

方法：リンパ球表面マーカー等に対するモノクローナル抗体 (CD4, CD8, B, Macrophage, HLA class I, class II, granzyme, perforin) を用いて、それぞれのクリオスタット切片をABC法にて免疫組織化学染色を行った。

また、各筋組織からISOGENにてRNAを抽出しRT-PCRで作成したcDNAについて、TCR V $\beta$ 鎖のプライマーを用いてTCR V $\beta$  CDR3領域PCR産物を得た。クローナルに出現していると考えられたTCR V $\beta$  13.1 PCR産物をサブクローン化し、インサートを含むコロニーをランダムに選択して塩基配列を決定し、その出現頻度を算出することで浸潤T細胞のクローナリテーを検討した。

結果：DMD および PM ではいずれの筋組織でも浸潤細

胞は CD8+T 細胞が優位であり、いずれも非壊死線維周囲への浸潤が観察された。また両者とも HLA class I が陽性の筋線維が散在性に認められた。DM では CD4+T, B, Macrophage の浸潤が多数を占め、筋線維での class I の発現は認めなかった。

PM では 3 例すべてで V $\beta$  13.1 鎖を有する T 細胞の CDR3 領域に優位に出現するクローンが得られ、その中に特定のモチーフ構造が認められた。一方、DMD および DM では特定の優位なクローンは得られなかった。

## 考 察

PM では浸潤リンパ球が CD8+T 細胞優位であり、筋細胞に HLA class I の発現が見られることから、その傷害機序として細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が関与していると推察される。また浸潤細胞が特定クローナリテーを有し、その TCR CDR3 領域に特定のモチーフ構造を有することは、PM 筋が、比較的一定の抗原を呈示しており、それに対して antigen-driven に T 細胞が浸潤して CTL による筋傷害が生じていることが推察される。DMD では免疫組織化学的には PM との区別が困難で、本症の筋傷害の一部に自己免疫機序が関与している可能性が示唆されたが、浸潤細胞の TCR 解析では特定の抗原を認識する T 細胞がクローナルに浸潤している証拠は得られなかった。今回は一例のみの解析であり、普遍化するにはさらなる検討が必要と考えられるが、DMD に見られる T 細胞浸潤の機構は PM とは異なる可能性が示唆された。

## 研究の意義

DMD では、筋組織に多数のリンパ球浸潤が見られ、非壊死線維の周囲にも浸潤していること、筋線維に HLA class I 分子の発現がみられることから、筋傷害の一部に多発筋炎と同様の細胞傷害性 T 細胞が関与している可能性が考えられてきた。今回の浸潤T細胞のTCRの解析では、浸潤 T 細胞が特定の抗原を認識して浸潤しているとの証拠は得られなかった。しかしながら多数のリンパ球が浸潤して筋線維を包圍して見える所見はリンパ球が筋線維崩壊に積極的に関与している可能性が否定できず、細胞浸潤の意義を解明することは、DMDの筋障害を少しでも遅延させるための治療法を考える上で重要な意義を有する。

\* 新潟大学脳研究所神経内科

文 献

- 1) Dalakas MC. Muscle biopsy findings in inflammatory myopathies. *Rheum Dis Clin North Am* 28:779-798, 2002.
- 2) Confalonieri P, Oliva L, Andreetta F, et al. Muscle inflammation and MHC class I up-regulation in muscular dystrophy with lack dysferlin: an immunopathological study. *J Neuroimmunol* 142:130-136, 2003.

# mdx マウスに対する同系筋前駆細胞移植によるジストロフィン導入

三池輝久\*

研究協力者 池澤 誠\* 木村重美\*  
Baohong Cao\*\* Johnny Huard\*\*

## 目 的

これまで Duchenne 型筋ジストロフィー(以下, DMD) の治療として, 遺伝子導入, 細胞移植, 薬物治療などが試みられてきた. ウィルスベクターを用いる遺伝子導入にはそれぞれのウィルスにより, アデノウィルスベクターでは免疫応答があり, レトロウィルスベクターでは感染効率が悪い. また, アデノ随伴ベクターでは導入できる遺伝子サイズが短いなど, それぞれ問題を抱えている. 一方, 筋芽移植も十分な効果を上げておらず, 効率のよい細胞が求められている. そのひとつとして preplate 法を用いて得られる LP 細胞は筋前駆細胞として移植効率が改善することが知られている(文献 1).

われわれは今回, mdx マウスより preplate 法により筋前駆細胞(LP cell)を単離し, 約 4Kb に短縮したジストロフィン遺伝子をレトロウィルスベクターによって導入し, 同系筋前駆細胞移植をこころみた(文献 2).

## 方法と結果

われわれは CMV-IE プロモーター下に 3999bp に短縮したヒトミニジストロフィン遺伝子を挿入し, 選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を持ったレトロウィルスベクター(RetroDys3999)を作成した. また, DMD モデルマウスである mdx マウス筋肉より preplate 法を用いて筋前駆細胞(mdx LP)を単離し, mdx LP 培養細胞に RetroDys3999 を用いてヒトミニジストロフィン遺伝子を安定導入した(mdx LP/Dys3999). レトロウィルスによるヒトミニジストロフィン遺伝子導入後も mdx LP/Dys3999 は幹細胞のマーカーである CD34, Sca-1 を発現し, また筋細胞のマーカーである desmin も発現していることが, 免疫細胞染色にて確認された.(図 1)

mdx LP/Dys3999 を mdx マウスのヒラメ筋に筋注し, 筋注後 2, 4, 8, 12, 24 週のヒラメ筋を組織化学的に検討した. 免疫染色にて確認されたジストロフィン陽性線維数は筋注後 2 週目より 24 週目までほぼ安定していた.(図 2)

しかし, その陽性線維数は 100 本程度と低く, また筋注後 2, 4 週目の骨格筋において CD4, CD8 陽性リンパ球の浸潤を認めた. また, 一度目の移植後 2 週目に対側のヒラメ筋に 2 度目の移植を行うと, その効率は著明に低下していた. 次に移植に用いた mdx LP/Dys3999 よりサブクローニングを行い, 得られたサブクローンのうち 8 クローン(MD3903-MD3927)を同様に mdx マウスヒラメ筋に筋注し, 2 週後に免疫組織染色を行った.(図 3)

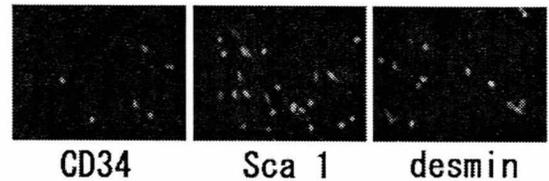


図 1

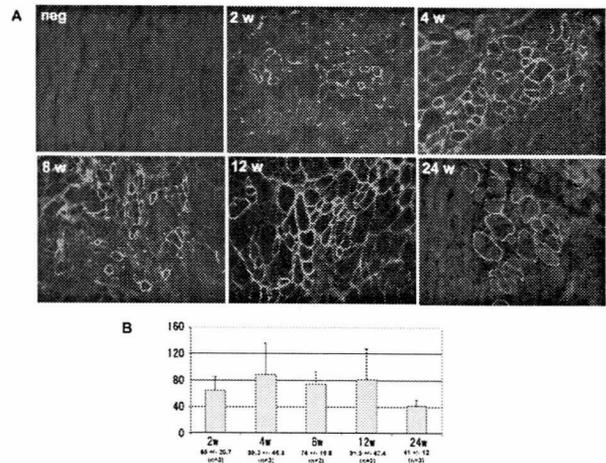


図 2 ジストロフィン染色, B 陽性線維数

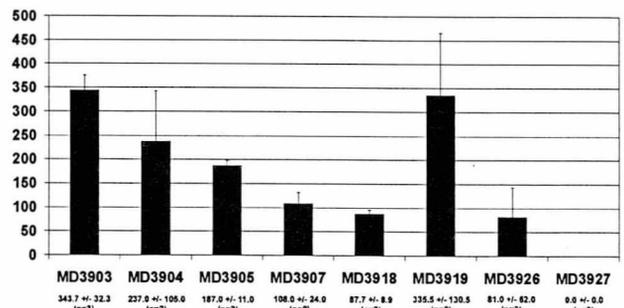


図 3

\* 熊本大学医学部発達小児科

\*\* Children's Hospital of Pittsburgh

ジストロフィン陽性線維数は 347 +/- 32.3 から 0 まで、各クローン間で移植効率に著明な差が見られた。サブクローンのうちのひとつ (MD3927) では、in vitro ではジストロフィン遺伝子の発現と、筋管細胞への分化が確認されたにもかかわらず、移植部位には未分化な筋線維が多数見られ、これらはジストロフィン染色陰性であった。

#### 考 察

今回われわれが用いた mdx LP/Dys3999 細胞は、mdx マウス由来でありながら、ジストロフィンを発現するばかりでなく、幹細胞マーカーを発現し筋肉に分化する筋前駆細胞と呼べるものであった。この細胞を用いることにより安定した遺伝子導入がみられたが、その効率は期待されたよりも低く、充分ではなかった。その原因として、免疫応答と、移植細胞の効率が考えられた。今回の実験では、本来ウイルス蛋白を発現せず、免疫原性を持たないレトロウイルスベクターをもちい、かつ同系細胞移植を行ったにもかかわらず、CD4、CD8 陽性リンパ球の浸潤が見られ、かつ反復移植にて効率の減少が見られた。免疫反応の原因については今後更なる検討が必要であるが、ジストロフィン蛋白そのものが候補として考えられる。

また、サブクローン間の検討において、移植効率がクローンによって差があることが明らかになった。今後の細胞移植のためにはさらに移植効率のよい細胞の確立が必要であると思われた。特異な表現形を示したサブクロー

ン(MD3927)については、レトロウイルスベクターの遺伝子導入のポジション効果によるとおもわれるが、詳細については更なる検討が必要である。

#### 今後の展望

今回の実験で十分な効率が得られなかった原因として考えられる免疫応答、細胞移植の効率についてそれぞれに検討を加えたい。免疫応答についてはジストロフィン蛋白を筋芽細胞の段階でなく、充分分化した後に発現するよう例えば MCK プロモーターなど、筋特異的に発現するプロモーターを用いることによって拒絶反応を回避できる可能性がある。一方、さらに移植効率のよい細胞を得るためには今回得られたサブクローンをそれぞれ検討することによって、より効率のよい細胞のマーカーとなるものが見つかる可能性がある。また、筋肉から得られる幹細胞だけでなく、embryonic stem cell を用いることも検討したい。

#### 文 献

- 1) Qu, Z., et al Development of approach to improve cell survival in myoblast transfer therapy. J Cell Biol 142. 1257-1267, 1998.
- 2) Ikezawa M et.al. Dystrophin delivery in dystrophin-efficient DMDmdx skeletal muscle by isogenic muscle-derived stem cell transplantation. Hum Gene Ther 16. 1535-46, 2003.

# Syntrophin, aquaporin の骨格筋における発現と局在の研究

若山吉弘\*

研究協力者 澁谷誠二\* 井上昌彦\* 小嶋宏子\*  
自見隆弘\* 原一\* 鬼木弘明\*\*  
山下純正\*\*\* 熊谷俊幸\*\*\*\*

## はじめに

我々は骨格筋細胞膜異常による筋疾患を中心に研究しているが、平成14年から16年に本研究委託費の支援で実施した主要な研究の概要を報告する。

1) Syntrophin の正常骨格筋における発現と局在の検討と Duchenne 型、福山型筋ジストロフィー症生検筋における発現の変化

## 目 的

Syntrophin は dystrophin associated glycoprotein の細胞内成分の一つで筋細胞膜の内面に存在する。この syntrophin には今までのところ  $\alpha 1$ -,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -,  $\gamma 1$ -,  $\gamma 2$ -の isoform が同定されている。このうち  $\gamma 1$ -は中枢神経系に分布し、残りは骨格筋細胞膜に発現しているとされている。本研究では  $\gamma 2$ -syntrophin ( $\gamma 2$ -SYT) の超微局在と、 $\alpha 1$ -syntrophin ( $\alpha 1$ -SYT) の Duchenne 筋ジストロフィー症(DMD)と福山型筋ジストロフィー症(FCMD)での発現の変化につき検討した。

## 方法と結果

【抗体】抗  $\alpha 1$ -SYT 抗体、抗  $\gamma 2$ -SYT 抗体、抗  $\beta$ -spectrin ( $\beta$ -SPC) 抗体ともに我々の教室で作製した。抗  $\alpha 1$ -SYT 抗体は既報1)のように作製した。抗  $\gamma 2$ -SYT 抗体は Nigro ら2)の報告した  $\gamma 2$ -SYT のアミノ酸配列から C 端のアミノ酸 14 残基 MDSQSLARKYMYSS を合成しこのペプチドの N 端に cysteine をハプテンとして付加し抗原とし、ウサギに免疫して作製した。イムノプロットは正常骨格筋の抽出液を対象にウサギ抗  $\gamma 2$ -SYT 抗体について実施した。【筋組織】 $\gamma 2$ -SYT の超微局在の研究には組織化学的に正常な生検筋6例を用いた。 $\alpha 1$ -SYT の DMD, FCMD 筋における発現の検討には DMD 5 例, FCMD 5 例, 疾患対照として筋緊張型ジストロフィー症3例と顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症2例の合計5例, 正常対照5例の大腿四頭筋生検筋を用いた。【抗体標識方法】免疫光顕標本は間接蛍光抗体法, 免疫電顕標本はイムノゴールド法にて標識した。【結果】抗  $\gamma 2$ -SYT 抗体は正常骨格筋の

表面を連続的に染色した。超微局在としては  $\gamma 2$ -SYT の信号は骨格筋細胞膜の内面に沿って局在していた。抗  $\gamma 2$ -SYT 抗体を用いた正常骨格筋抽出液のイムノプロットでは約 60kDa の分子量の蛋白を一本のバンドで認識した。抗  $\beta$ -SPC 抗体は正常骨格筋線維の表面膜を連続的に染色したが、DMD, FCMD 筋では部分染色、陰性染色の筋線維が散在し、抗  $\alpha 1$ -SYT 抗体ではこれら疾患筋では抗  $\beta$ -SPC 抗体より更に多くの部分染色線維や、陰性染色線維がみられた。DMD 筋では  $\alpha 1$ -SYT 陽性線維が部分発現線維を含め 55%あり、FCMD 筋では  $\alpha 1$ -SYT 陰性線維が 46%みられた。

## 考察と今後の展望

$\gamma 2$ -SYT の正常骨格筋での発現と局在に関する研究は少なく、 $\gamma 2$ -SYT についてはその発現を確認出来なかった報告もあり、正常・病的筋での発現の更なる検討を要する。DMD 筋, FCMD 筋における抗  $\beta$ -SPC 抗体染色陰性筋線維では何らかの原因により筋細胞膜が欠損していることが考えられる。しかし抗  $\beta$ -SPC 抗体染色陽性かつ抗  $\alpha 1$ -SYT 抗体染色陰性筋線維では筋細胞膜での  $\alpha 1$ -SYT の発現が陰性と考えられる。 $\alpha 1$ -SYT の発現に関しては DMD 筋で半数以上の筋線維で発現していたのは予想外であり、dystrophin が欠損しているにもかかわらず  $\alpha 1$ -SYT が発現しているということはこの  $\alpha 1$ -SYT 分子がどのような筋細胞膜分子と結合しているのか不明である。今後この点を解明するとともに、FCMD 筋では dystrophin が陽性であるにもかかわらず約半数の筋線維で  $\alpha 1$ -SYT の発現が陰性であった原因は何かを研究したい。更に  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -,  $\gamma 2$ -SYT の筋ジストロフィー症での発現の解析も今後の課題である。

2) Aquaporin (AQP) の正常骨格筋における発現と局在、AQP4 の FCMD 筋における発現の検討

## 目 的

AQP 分子は現在 10 個以上が同定されている。このうち骨格筋には AQP4 が発現していることは確立されているので FCMD 筋 (DMD 筋は検討済み) での発現を検討した。更に他の AQP 分子の発現が正常骨格筋にあるかどうか、あればその局在を検討した。

\* 昭和大学藤が丘病院神経内科

\*\* 昭和大学藤が丘病院電顕室

\*\*\* 神奈川こども医療センター神経内科

\*\*\*\* 愛知県コロニー中央病院小児神経科

## 方法と結果

【方法】組織化学的に正常な6例のヒト生検筋を対象にAQP分子の検索を実施した。またFCMD6例と正常対照6例の大腿四頭筋を対象にFCMD筋のAQP4分子の発現をRNAレベル(競合的RT-PCR法)、蛋白レベル(イムノブロット、免疫組織化学)で検討した。【結果】骨格筋におけるAQPの発現は現在までにAQP1, 3, 4, 7で認められた。新しく発現があることが発見されたAQP3<sup>3)</sup>, 7<sup>4)</sup>の局在は両者とも筋線維表面であり、AQP3はtype1線維、AQP7はtype2線維により強く発現していた(図1)。FCMD筋ではAQP4のmRNAは著減し、蛋白レベルでも発現は減少、免疫組織化学的にも多くの筋線維で部分発現や発現がみられなかった(図2)。

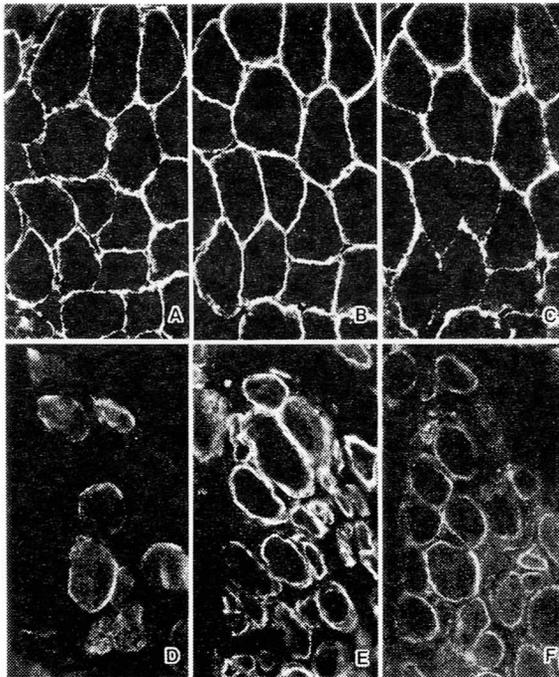


図1 正常骨格筋(A-C)と福山型先天性筋ジストロフィー症(FCMD)(D-F)の免疫組織化学所見。A, Dは抗aquaporin(AQP4)抗体, B, Eは抗 $\beta$ -dystrophin抗体, C, Fは抗 $\beta$ -spectrin抗体染色所見。正常筋組織ではこれら抗体で筋線維表面に連続性の免疫反応がみられる。FCMD筋では抗dystrophin抗体(E)と抗 $\beta$ -spectrin抗体(F)染色では各筋線維表面に陽性染色所見が認められるが、抗AQP4抗体染色では著明な染色性の低下がみられ、かなりの筋線維表面が陰性染色で残りの筋線維表面もpatchyな染色性を示す。(A-F:  $\times 350$ )

## 考察と今後の展望

水分子は生体活動において必須の分子であり、骨格筋は生体では最大の臓器であることを考えるとAQP分子は骨格筋において重要な役割を果たしていると考えられる。特にAQP4分子は水特異的チャネルであり、水分子の通過が非常に速いといわれているので骨格筋細胞内外への水分子の急速な移動に対応しているものと考えられる。AQP分子はAQP1, AQP4など水特異的チャネルと水分子以外グリセロール、尿素など非イオン性小分子を通すAQP3, AQP7, AQP9などの水グリセリンチャネル

とがあり、筋疾患以外でも生活習慣病や脂質代謝にもAQPは関与しているので、今後まず筋疾患を手始めにそのAQPの関与がどのようなものであるのかにつき研究を進めていきたい。

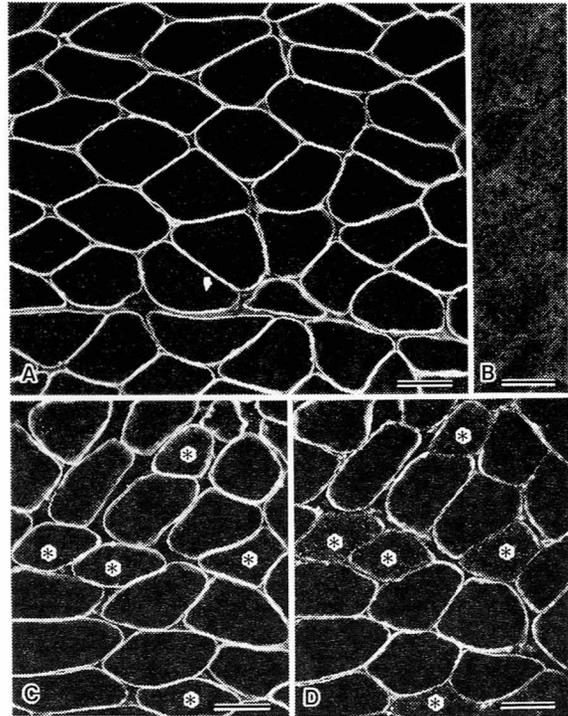


図2 ヒト正常骨格筋の抗aquaporin(AQP)7抗体の免疫染色所見。(A)各々の筋線維の表面が免疫染色され、筋線維の内部には免疫反応は見られない。(B)AQP7の合成ペプチドの過剰量とあらかじめ反応させた抗AQP7抗体液では免疫反応はみられない。(D)抗AQP4抗体での免疫染色標本はタイプ1線維は\*印の線維のように筋線維の表面が淡く染色されるが、(C)の抗AQP7抗体による連続切片的染色では\*印のタイプ1筋線維もその他のタイプ2筋線維と同様に筋線維表面が濃く染色される。(A-D:  $\times 330$ ; scale bars at A-D=50  $\mu$ m)

## 文 献

- 1) Wakayama Y, Inoue M, Murahashi M, Shibuya S, Jimi T, Kojima H, Oniki H: Ultrastructural localization of  $\alpha$ 1-syntrophin and neuronal nitric oxide synthase in normal skeletal myofiber, and their relation to each other and to dystrophin. *Acta Neuropathol* 94: 455-464, 1997.
- 2) Wakayama Y, Jimi T, Inoue M, Kojima H, Yamashita S, Kumagai T, Murahashi M, Hara H, Shibuya S: Altered aquaporin 4 expression in muscles of Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Virchows Arch* 443: 761-767, 2003.
- 3) Wakayama Y, Jimi T, Inoue M, Kojima H, Shibuya S, Murahashi M, Hara H, Oniki H: Expression of aquaporin 3 and its localization in normal skeletal myofibres. *Histochem J* 34: 331-337, 2002.
- 4) Wakayama Y, Inoue M, Kojima H, Jimi T, Shibuya S, Hara H, Oniki H: Expression and localization of aquaporin 7 in normal skeletal myofiber. *Cell Tissue Res* 316: 123-129, 2004.

# Aquaporin 4 過剰発現トランスジェニックマウスの作製と mdx マウスの治療

若山 吉弘\*

研究協力者 澁谷 誠二\* 高橋 丈二\* 小嶋 宏子\*  
井上 昌彦\* 自見 隆弘\* 原 一\*  
鬼木 弘明\*\* 荒田 悟\*\*\* 塩田 清二\*\*\*\*  
砂田 芳秀\*\*\*\*\* 大井 博子\*\*\*\*\* 清水 輝夫\*\*\*\*\*

## 目 的

我々は Duchenne 型筋ジストロフィー症(DMD)やその動物モデルである mdx マウス骨格筋細胞膜の Freeze-Fracture (F-F)レプリカ電顕標本の解析において, orthogonal array (OA)という非常に明瞭な膜内粒子の集合体が著減していることを以前に見出している<sup>1,2)</sup>. 近年, この微細構造物は水チャネルの 1 つである aquaporin 4 (AQP4)からなることが判明している<sup>3)</sup>. 筋症状の軽い mdx マウスに比べて, 臨床症状の重い DMD の筋細胞膜中の OA の方がより顕著に減少している事実や, より若いマウスでは OA が非常に多いということからも, OA は骨格筋において重要な役割をしていると考えられる.

今回, AQP4 遺伝子を mdx マウスに導入して治療の試みをするという目標の前段階として, AQP4 を過剰発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを作製したので, 現在までに得られているこの Tg マウスの特性について報告する.

## 方法と結果

【方法】 Caveolin 3/MCK gene cassette (川崎医科大学砂田教授, 帝京大学医学部大井博士・清水教授より供与) を back bone として利用し, その MCK promotor および caveolin 3 を digest した上で, 903 bp マウス AQP4 cDNA (Verkman 教授より供与) と MCK promotor を ligation することで AQP4/MCK gene cassette を作製した. この gene cassette を遺伝子導入法により正常マウス(C57BL/6J)胚細胞へ導入し, 正常マウス子宮へ移植することにより AQP4 過剰発現 Tg マウスを作製した.

RNA レベルでの解析のため, 各々 5 匹ずつの AQP4 過剰発現 Tg マウスおよび wild マウスの soleus 筋を摘出し, total RNA を抽出後, real time RT-PCR を施行した. 得られた AQP4 mRNA 量は, 同時に施行した house keeping gene として G3PDH gene の mRNA を定量し, その copy 数で補正した上で両群マウスで比較検討した.

## 結 果

蛋白レベルの解析のため, イムノブロット法, 免疫組織化学法および F-F レプリカ法で検討した. イムノブロット法では Tg マウスと wild マウスの soleus 筋からの抽出液を抗 AQP4 抗体で染色した. また免疫組織学的には抗 AQP4 抗体と抗 slow myosin 抗体を用いて, AQP4 過剰発現 Tg マウスと wild マウスの soleus 筋の連続凍結切片による免疫組織標本を作製し検討した. また F-F レプリカ法では各々 5 匹ずつの AQP4 過剰発現 Tg マウスと wild マウスの soleus 筋を摘出し, 2.5%グルタルアルデヒドリン酸緩衝液で固定した後, F-F 法で筋細胞膜レプリカ電顕標本を作製した. 筋細胞膜電顕写真を無作為に撮影し, 1 匹のマウスにつき, 異なる 20 本の筋線維の最終倍率 16 万倍の筋細胞膜電顕写真 (10 P 面および 10 E 面) 中にみられる OA 密度を single blind 法で算出し, 両群マウスで統計的 (T-検定) に比較検討した.

(1)ヘテロ同士を交配させ, 繁殖し生まれた AQP4 過剰発現 Tg マウスの外観は wild マウスと大きく変わらず, 行動, 活発性も現在までの限られた匹数の観察では大きな差がないようにみえた. (2)real time RT-PCR 法において, house keeping gene G3PDH の mRNA の copy 数で補正した soleus 筋 AQP4 mRNA 量は, wild マウス群(n=5)で  $0.133 \pm 0.076$  (Mean  $\pm$  SD)で, AQP4 過剰発現 Tg マウス群(n=5)では  $1.560 \pm 0.978$  であり, AQP4 Tg マウス群で著明に増加していた ( $p < 0.02$ , T 検定) (図 1). (3)抗 AQP4 抗体と抗 slow myosin 抗体による soleus 筋の連続切片の免疫染色標本では, AQP4 過剰発現 Tg マウスにおいて, 通常 AQP4 発現の乏しいタイプ 1 筋線維にも AQP4 の過剰発現がみられた. (4)F-F 法において, wild マウス群(n=5)の soleus 筋 OA 密度 ( $/\mu\text{m}^2$ ) は Median 値 1.07 (25%~75% Midrange 値 0~2.69) に対して, AQP4 過剰発現 Tg マウス群(n=5)では 8.17 (1.60~20.36) であり, AQP4 過剰発現 Tg マウス群で OA 密度は明らかに増加していた ( $p < 0.0001$ , ノンパラメトリック検定) (図 2).

\* 昭和大学藤が丘病院神経内科

\*\* 昭和大学藤が丘病院電顕室

\*\*\* 昭和大学組換え DNA 実験室

\*\*\*\* 昭和大学第 1 解剖学教室

\*\*\*\*\* 川崎医科大学神経内科

\*\*\*\*\* 帝京大学神経内科

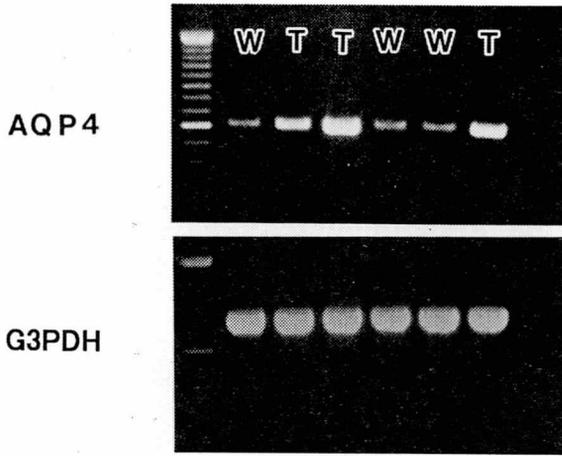


図1 Real time RT-PCR 法による aquaporin (AQP) 4 トランスジェニックマウス(T)と wild マウス(W)の soleus 筋の AQP4 mRNA 量. 上段は AQP4 mRNA の RT-PCR 所見で, 下段は house keeping gene である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) gene の mRNA の RT-PCR 所見である. Wild マウスに比べて AQP4 トランスジェニック (AQP4Tg)マウスの mRNA 量が明らかに多い. また AQP4Tg マウスでは AQP4 のバンドの濃さにかなりの個体によるばらつきがみられる.

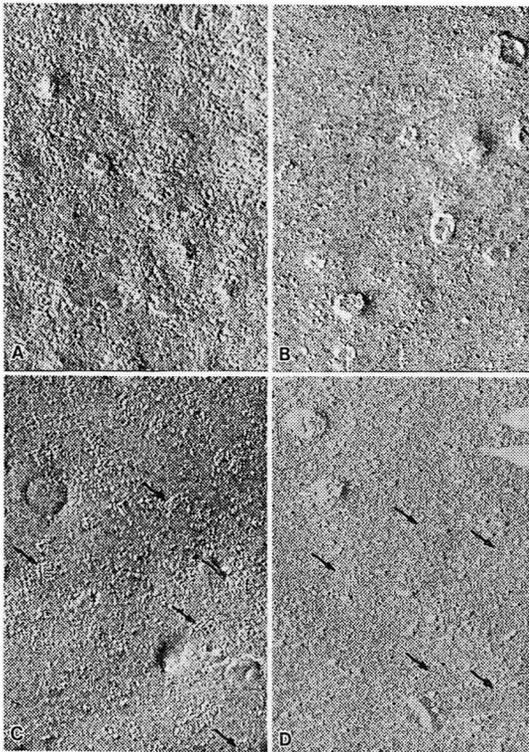


図2 Freeze-Fracture 法により作製した soleus 筋の筋細胞膜 P 面(A, C)および E 面(B, D)レプリカ電顕写真で A, B は wild マウス, C, D は AQP4Tg マウスのものである. AQP4Tg マウスでは著明な orthogonal arrays およびその pits の増加がみられる (矢印). (A-D:  $\times 160,000$ )

### 考察と今後の展望

AQP4 過剰発現 Tg マウスの作製を試み, 従来, wild マウスでは OA の発現の少ない soleus 筋で AQP4 mRNA の合成亢進と蛋白量の増加, 筋表面膜における AQP4 の過剰発現, 分子レベルでの OA 密度増加を確認できた. Soleus 筋は多数の type 1 線維から構成され, OA を多く含む type 2 線維が主体の EDL 筋とは生理的な働きを異にする. 今後 soleus 筋だけでなく, EDL 筋や心筋などでも同様な検討をしていきたい. 一般臨床像では wild マウスと比較して明らかな違いはみられなかったが, 同様に一見運動能に差が見られない mdx マウスと正常対照マウスの間でも computerized wheel を使えば明瞭な運動能の差が見られる<sup>4)</sup>ことからこの方法を用いて Tg マウスと wild マウスとの運動能の差を今後検討していきたい. また real time RT-PCR 法で行った AQP4 mRNA 量の検討において, AQP4 過剰発現 Tg マウスでその copy 数はほとんどの Tg マウスで wild マウスより増加していたが, Tg マウス間で AQP4 mRNA 量に大きなばらつきが見られたことから, 今後 Tg マウスの AQP4 mRNA copy 数と臨床症状の相関を考えながら, より定量的に Tg マウスの活動能力を computerized wheel などを使って詳細に調べていきたい. 最終的に OA が著減している mdx マウス骨格筋に AQP4 遺伝子を導入してその活動能力の変化等を検討していきたい.

### 文 献

- 1) Wakayama Y, Okayasu H, Shibuya S, Kumagai T: Duchenne dystrophy: Reduced density of orthogonal array subunit particles in the muscle plasma membrane. *Neurology (Cleveland)* 34: 1313-1317, 1984.
- 2) Shibuya S, Wakayama Y: Freeze-fracture studies of myofiber plasma membrane in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mice. *Acta Neuropathol (Berl)* 76: 179-184, 1988.
- 3) Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S: Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11981-11986, 1998.
- 4) Hara H, Nolan PM, Scott MO, Bucan M, Wakayama Y, Fischbeck K: Running endurance abnormality in mdx mice. *Muscle Nerve* 25: 207-211, 2002.

# ジストロフィン遺伝子のスプライシング制御機序の解明とその治療への応用

松尾 雅文\*

研究協力者 竹島 泰弘\* 八木 麻理子\*

## 目 的

ジストロフィン遺伝子のエクソンのスキッピングを誘導する Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)の治療が注目されている。私達は、ジストロフィン遺伝子のエクソン 19 のスプライシング促進配列を解明し、スプライシング促進配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることによりエクソン 19 のスキッピングを誘導することに世界で初めて成功した。これまで、このエクソン 19 のスキッピングを誘導する方法の臨床応用もはかってきた。

一方ジストロフィン遺伝子には 79 ものエクソンがあり、また DMD 患者の有するエクソンの欠失形式も多様である。そのため、それぞれのエクソンの欠失異常に対応したエクソンのスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドの同定が必要となっている。

本研究では、ジストロフィン遺伝子のエクソン内のスプライシング促進配列の解明、スプライシング促進配列のスプライシング制御に関与する核タンパクの役割、エクソンスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発等を実施してきた。ここでは、エクソン 41 のスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドの同定と、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた DMD 患者由来筋細胞でのジストロフィン発現について検討し、ジストロフィンの発現に成功した結果を報告する。

## 方法と結果

### スプライシング促進配列の解明

DMD 患者の 1 例でジストロフィン遺伝子のエクソン 41 内の 1 塩基の置換のためにナンセンス変異となった症例を見出した。この症例のジストロフィン mRNA を解析したところ、エクソン 41 のスキップした mRNA が産生されていることが判明した。

この結果は、この 1 塩基置換により、スプライシング促進配列の機能が破綻したことを示唆し、この領域がスプライシング促進配列である可能性を強く示唆した。

### アンチセンスオリゴヌクレオチドの作成

エクソン 41 の 1 塩基置換が発見された領域がスプライシング促進配列と考えられたので、この領域を標的とし

たアンチセンスオリゴヌクレオチドの RNA/ENA キメラを合成した。RNA/ENA キメラは、お互いにオーバーラップする 3 種のを合成した。そして、それぞれの RNA/ENA キメラを筋細胞に導入し、ジストロフィン mRNA の解析を RT-PCR 法を用いて行い、エクソン 41 スキッピング誘導能について解析した。

### ジストロフィン発現誘導能の解析

エクソン 41 にナンセンス変異を持つ患者から筋細胞株を樹立した。この例では、エクソン 41 のスキッピングを誘導することにより、ジストロフィン mRNA からナンセンス変異が消失し、183 塩基の欠失した新しいインフレームのジストロフィン mRNA が産生される。そして、この新たな mRNA からジストロフィンの産生が期待される。このことを検証するため、合成した RNA/ENA キメラを樹立した培養筋細胞に導入した。ジストロフィン mRNA を RT-PCR 法で解析するとともに、ジストロフィンの発現の有無を培養細胞をジストロフィン染色することにより検討した。

## 結 果

ジストロフィン遺伝子のエクソン 41 のスプライシング促進配列に相補的な RNA/ENA キメラを 3 種合成し、それぞれを筋細胞に導入した。導入した筋細胞でジストロフィン mRNA を解析したところ、エクソン 41 のスキッピングは RNA/ENA キメラの C を導入した筋細胞で最も強く誘導された。この結果は、この領域が予想通りスプライシング促進配列であることを示すとともに、RNA/ENA キメラ C が強力なエクソンとスキッピング誘導能を有するものと確認した。

そこでジストロフィン遺伝子のエクソン 41 にナンセンス変異を有する患者由来の筋細胞に RNA/ENA キメラ C を導入した。導入した筋細胞においてジストロフィン mRNA を解析したところエクソン 41 の配列が消失している mRNA が一部で産生されていることが確認され、患者筋細胞でもエクソン 41 のスキッピングを誘導することに成功した。この結果は RNA/ENA キメラ導入細胞でジストロフィンが発現することを強く示した。そこで、導入細胞のジストロフィン染色を行うと、ジストロフィン陽性細胞が 90%近くで認められた。

\* 神戸大学大学院医学系研究科小児科

## 考 察

ジストロフィン遺伝子のエクソン 41 にナンセンス変異をもつ DMD 患者由来筋細胞でのジストロフィン発現に成功した。この結果は、mRNA のアミノ酸読み取り枠を修正する治療法が有効なことを改めて示すものである。

今後さらに他のエクソンを対象として強力にエクソンスキッピングを誘導する RNA/ENA キメラの同定を推進し、すべての欠失変異を有する DMD 患者の治療が可能となる様にする予定である。

## 文 献

- 1) Suminaga, R, Takeshima, T, Adachi, K, Yagi, M, Nakamura, H, Matsuo, M. A novel cryptic exon in intron 3 of the dystrophin gene was incorporated into dystrophin mRNA with a single nucleotide deletion in exon 5. *J Hum Genet.* 47; 196-201, 2002.
- 2) Saito-Ohara F, Hukuda Y, Ito M, Agarwala KL, Hayashi M, Matsuo M, Imoto I, Yamakawa K, Inazawa J. The Xp22 inversion breakpoint interrupted a novel ras-like GTPase gene in a DMD patient in profound mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 71; 637-645, 2002.
- 3) Lai P-S, Takeshima Y, Adachi K, van Tran K, Nugyen H, T Low P-S, Matsuo M. Comparative study on deletions of the dystrophin gene in three Asian populations. *J. Hum. Genet.* 47;552-555, 2002.
- 4) Yagi M, Takeshima Y, Wada H, Nakamura H, Matsuo M. Two alternative exons can result from activation of the cryptic splice acceptor site deep within intron 2 of the dystrophin gene in a patient with as yet asymptomatic dystrophinopathy. *Hum. Genet.* 112;164-170, 2003.
- 5) Ito T, Takeshima Y, Yagi M, Kamei S, Wada H, Matsuo M, Analysis of dystrophin mRNA from skeletal muscle but not from lymphocytes led to identification of a novel nonsense mutation in a carrier of Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol.* 250; 581-587, 2003.
- 6) Adachi K, Takeshima Y, Wada H, Yagi Y, Nakamura H, Matsuo M. Heterogous dystrophin mRNAs produced by a novel splice acceptor site mutation in intermediate dystrophinopathy. *Ped. Res.* 53; 1-7, 2003.
- 7) Rohman MS, Emoto N, Takeshima Y, Yokoyama M, Matsuo M. Decreased mAKAP, ryanodine receptor, and SERCA2a gene expression in mdx hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 310; 228-235, 2003.
- 8) Nakayama Y, Nara N, Kawakita Y, Takeshima Y, Arakawa M, Katoh M, Morita S, Iwatsuki K, Tanaka K, Okamoto S, Kitamura T, Seki N, Matsuda R, Matsuo M, Saito K, Hara T. Cloning of cDNA Encoding a Regeneration-associated Muscle Protease Whose Expression is Attenuated in Cell Lines Derived from Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *American Journal of Pathology.* 164; 1773-1782, 2004.
- 9) Yagi M, Takeshima Y, S Agus, Takagi M, Koizumi M, Matsuo M. Chimeric RNA and 2'-O, 4'-C-ethylene-bridged nucleic acids have stronger activity than phosphorothioate oligodeoxynucleotides in induction of exon-19 skipping in dystrophin mRNA. *Oligonucleotides.* 14; 33-40, 2004.
- 10) Surono A, Khanh TV, Takeshima Y, Wada H, Yagi M, Takagi M, Koizumi M, Matsuo M, Chimeric RNA/ethylene bridged nucleic acids promote dystrophin expression in myocytes of Duchenne muscular dystrophy by inducing skipping of the nonsense-mutation-encoding exon. *Hum Gene Ther.* 15; 749-757, 2004.
- 11) Suminaga R, Takeshima Y, Wada H, Yagi M, Matsuo M, C-terminal Truncated Dystrophin Identified in Skeletal Muscle of an Asymptomatic Boy with a Novel Nonsense Mutation of the Dystrophin Gene. *Pediatric Research.* 56; 739-743, 2004.
- 12) Takagi M, Yagi M, Ishibashi K, Takeshima Y, Surono A, Matsuo M, Koizumi M, Design of 2'-O-Me RNA/ENA™ chimera oligonucleotides to induce exon skipping in dystrophin pre-mRNA. *Nucleic Acids Symposium Series.* 48; 297-298, 2004.

# ヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクターによる骨格筋へのジストロフィン遺伝子導入効率と治療効果

内野 誠\*

研究協力者 内田友二\* 前田 寧\* 阪本 徹郎\*  
杉本亮子\* 小出 達也\* 有馬 寿之\*  
木村 円\*

## 目 的

Duchenne 型筋ジストロフィー(以下 DMD) は、全身の骨格筋および心筋に生じる進行性の壊死、変性を特徴とし、dystrophin 遺伝子の異常に起因する X 染色体劣性の遺伝性筋疾患である。現在、臨床応用されている有効な治療法はなく、その開発が待たれている。ヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクター(以下 HDAd) は免疫原性が低く、クローニングキャパシティーが十分にあり、全長 dystrophin cDNA が導入可能であるという利点を持つものの、成熟骨格筋での dystrophin の高率かつ長期にわたる発現はこれまで困難とされてきた。その主因のひとつは、アデノウイルス(以下 Ad) の感染に重要な役割を果たしているアタッチメントレセプターである coxsackievirus and adenovirus reseptor (以下 CAR) の発現が成熟骨格筋においては著しく低いことにある。我々は DMD の根本的治療法の開発を目指し、骨格筋での dystrophin の発現を長期間維持し、それにより治療効果をもたらすことを目的として以下のような研究を行った。

## 方法と結果

我々は、HDAd のクローニングキャパシティーの大きさを活用し、全長 dystrophin 発現カセットおよび HDAd の増幅時にマーカーとして使用する LacZ 発現カセットをもつ HDAdLacZ-dys と、全長 dystrophin 発現カセットと CAR 発現カセットをもつ HDAdCAR-dys の 2 種類の HDAd を作製した。この二つの HDAd を用いて mdx マウスの前脛骨筋に dystrophin を導入し、その導入効率や発現期間、病理変化の改善度などを検討した。さらに HDAd を成熟筋に繰り返し注入して、繰り返し注入時の dystrophin 遺伝子の導入効率およびこれまで不可能とされてきたアデノウイルスベクター(以下 Adv) の反復投与の有効性についても検討した。

はじめに、HDAdLacZ-dys を幼若期に注入した筋において、dystrophin が正常骨格筋と同様に筋線維膜に一致して高率に発現することを確認した。ほとんど全ての dystrophin 陽性筋線維では、正常の筋線維で見られるパターンと同じように核は辺縁に位置していた。それに対

して、dystrophin が導入されていない筋線維の中には、ジストロフィー筋線維で見られるパターンと同じように中心核を持つ筋線維が多く存在していた。さらには dystrophin 陽性筋線維がほとんど含まれていない領域では壊死、再生、炎症細胞浸潤などの明らかなジストロフィー変化を示していたのに対して、dystrophin 陽性筋線維が多く含まれる領域ではそのような変化は認められなかった。

さらに、HDAdCAR-dys を成熟期に繰り返し注入した筋で、一回注入した筋に比べて、dystrophin 陽性の筋線維数が 9 倍増加し、24 週齢時点で前脛骨筋全体の 19% の筋線維に dystrophin の発現が認められた。また、それに伴い dystrophin 結合蛋白の発現も回復していた。

HDAdLacZ-dys を反復注入した筋では、このような増加はみられず、HDAdCAR-dys と HDAdLacZ-dys が注入された筋で惹起された細胞性免疫には明らかな違いは認められなかった。

## 考 察

上述のように HDAd を用いて導入された dystrophin の発現が持続することによって mdx マウスの筋病理所見が改善することが確認された。これは、導入された dystrophin によって筋が壊死—再生のサイクルに入ることが効果的に妨げられ、それによって炎症細胞浸潤などの二次的な変化も抑えられたものと考えられた。さらに成熟筋においては、HDAdCAR-dys を注入された筋のみで反復注入後の dystrophin 陽性筋線維数が明らかに増加しており、HDAdCAR-dys 繰り返し注入時の HDAd の感染効率については dystrophin 遺伝子の導入効率が改善したものと考えられた。またこの結果から、ある特定のアデノウイルスの血清型に対して既に感作されている宿主に対しても、それと同型由来の Adv の投与が可能であることが示唆された。以上の結果は、DMD に対する新しい遺伝子治療法を提示しており、他の遺伝性筋疾患に対する遺伝子治療にも応用できる可能性があると考えられた。

## 研究の意義

HDAd を用いた全長 dystrophin 遺伝子導入により、mdx マウスの筋病理所見に改善効果が認められた。さ

\* 熊本大学大学院 医学薬学研究部 神経内科学分野

らにアデノウイルスノのレセプターである CAR を利用することで成熟骨格筋への HDAd の反復投与が可能となり、効率的な dystrophin 遺伝子導入が達成された。これらの結果は DMD の根本的治療の実現に寄与すると考えられる。

## 文 献

- 1) En Kimura, Yasushi Maeda, Toshiyuki Arima, et al. Efficient repetitive gene delivery to skeletal muscle using recombinant adenovirus vector containing the Coxsackievirus and adenovirus receptor cDNA. *Gene Ther* 8: 20-27, 2001.
- 2) Yasushi Maeda, En Kimura, Yuji Uchida, et al. Cre/loxP-mediated adenovirus type 5 packaging signal excision demonstrates that core element VI is sufficient for virus packaging. *Virology* 309: 330-338, 2003.
- 3) Yuji Uchida, Yasushi Maeda, En Kimura, et al. Effective repetitive dystrophin gene transfer into skeletal muscle of adult mdx mice using a helper-dependent adenovirus vector expressing the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) and dystrophin. *The Journal of Gene Medicine*, in press

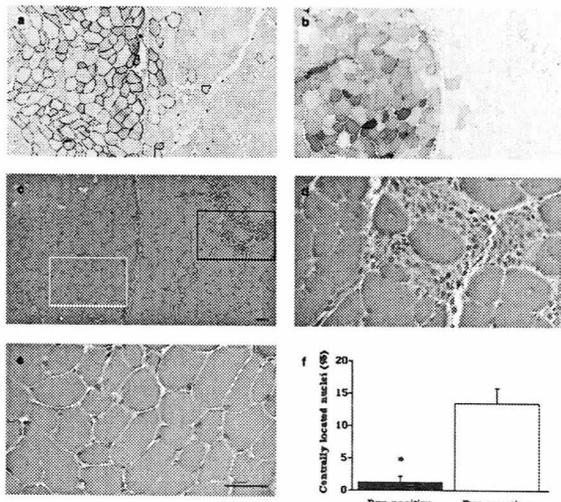


図1 dystrophin 導入による筋病理所見の改善  
HDAdLacZ-dys を幼若期に注入して 8 週後の筋の連続凍結切片の dystrophin 免疫染色(a), X-gal 染色(b), H&E 染色(c). (c) の black box と white box の領域を拡大し、それぞれ(d)と(e)に示した。スケールバー、50  $\mu$ m. (f)dystrophin 陽性筋線維と dystrophin 陰性筋線維での中心核線維の割合を検討した。\*は dystrophin 陰性筋線維でのデータと比較して著明な差があることを示した。

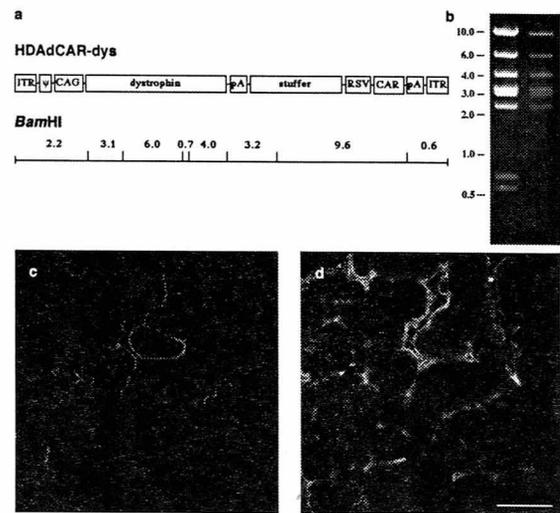


図2 HDAdCAR-dys の構造と dystrophin および CAR の発現  
(a)ITR, アデノウイルスの inverted terminal repeat;  $\psi$ , パッケージング・シグナル; PA, SV40 polyadenylation signal; dystrophin, マウス全長 dystrophin cDNA; CAG, CAG プロモータ; stuffer, マウス Emx2 遺伝子の一部 (SwaI-SpeI フラグメント (10kb)); RSV, RSV プロモーター; CAR, ヒト coxsackievirus and adenovirus receptor cDNA. HDAdCAR-dys の構造図の下に BamHI で切断される部位と切断による DNA フラグメントのサイズを示した。  
(b)HDAdCAR-dys の構造解析。プラスミド pPN10-CAR-mFLdys (左側のレーン) と精製後のウイルス HDAdCAR-dys (右側のレーン) から回収した DNA を BamHI で切断し、アガロースゲルに泳動することで分離した。フラグメントは(a)に示された期待されたフラグメントと一致した。DNA のサイズ (kb) はゲルの左側に示した。dystrophin の免疫染色と X-gal 染色をそれぞれ(c)と(d)に示した。dystrophin(c)と CAR(d)の発現が HDAdCAR-dys を成熟期に注入して 2 週後の筋の筋線維に認められた。スケールバー、50  $\mu$ m.

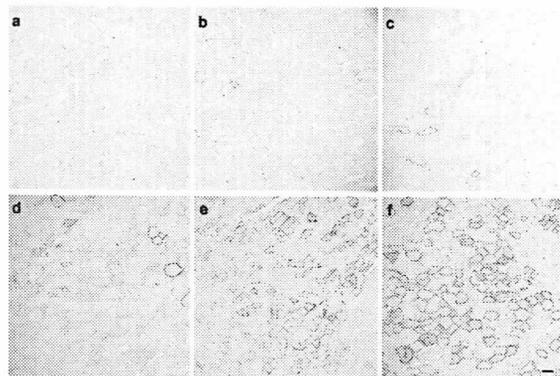


図3 HDAd 反復注入後の dystrophin 免疫染色  
反復注入実験では 18 匹の mdx マウスを使用した。それぞれのマウスの前脛骨筋に HDAd LacZ-dys(a, b, c)もしくは HDAdCAR-dys(d, e, f)を注入した。一回注入群は 8 週齢時に(a, d), 二回注入群は 8 週齢時および 12 週齢時に(b, e), 三回注入群は 8 週齢時, 12 週齢時および 16 週齢時に(c, f)それぞれの HDAd を注入した。いずれの群のマウス数も 3 匹であり、最終注入から 8 週後に評価した。スケールバー、50  $\mu$ m.

# Read-Through 活性物質を検索するためのダブル・レポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの開発

松田 良一\*

研究協力者 嶋田 健一\* 塩塚 政孝\* アレックス マッケレル\*\*

## はじめに

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)発症例の5-15%はジストロフィン遺伝子上に起きたナンセンス突然変異によるものといわれている。もし、生じた premature termination codon (PTC)を薬剤等で読み越え(read-through)させ、ジストロフィン全長たんぱく質を合成させることができれば治療手段として有効である。この戦略は、米国ではユダヤ系人種に多いナンセンス型の嚢胞性繊維症の治療方法として有望視され、アミノグリコシド系抗生物質、特にゲンタマイシンを用いて研究が進み、今や臨床への応用が試みられている。さらに、ゲンタマイシンの毒性を回避するため、様々な化学物質から read-through 活性をもつ物質の検索が進んでいる。

我々は、ゲンタマイシンと同様に read-through 活性を有し、ゲンタマイシンとは全く構造を異にするジペプチド系抗生物質ネガマイシンに注目し、mdx マウスへの投与効果を検討してきた。その結果、投与された mdx マウスの骨格筋と心筋においてジストロフィンの発現を認めた。しかし、その read-through 効果の検定に微量筋たんぱく質であるジストロフィンを指標にすることは、検出感度等の問題から容易ではない。そこで、read-through 活性を検出する新たな検出系の構築を目的として研究をおこなった。さらに、ネガマイシン分子の立体構造に類似した分子をメリーランド大学薬学部 A. マッケレル教授グループが開発した立体構造データベース中からコンピュータ検索した。

## 材料と方法

$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を繋ぎ、その2遺伝子の連結部位に mdx マウス由来の PTC 周辺配列に TAA, TGA, TAG の3種類を別々に含む配列を挿入し、 $\beta$ -アクリンプロモーターで制御されるように設計したコンストラクト(dual-reporter gene)を作った。これを C2C12 細胞とマウス受精卵に導入し、in vitro と in vivo での検出系の構築を試みた。トランスジェニックマウスにおけるトランス遺伝子の有無は尾端より DNA を採取し PCR にて確認した。さらに、各種臓器の凍結切片およびホモジェネートにおける  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測

定し、局在を活性染色にて検討した。トランス遺伝子を有する C2C12 細胞は蛍光基質を用い、蛍光セルソーターにて分取後、クローニングをおこない、これを2回繰り返して導入細胞を増殖させた。

また、トランスジェニックマウスの骨格筋細胞を初代培養するため、大腿筋にマーケインを注射し、その3日後に筋細胞を採取、20%胎児牛血清、4%ウルトローザー(和光)を含むダルベッコ改変イーグル MEM 培養液を用い、セラチンコート培養皿にて培養した。その培養液中にゲンタマイシン、ネガマイシン、アミカシン、ストレプトマイシンを最終濃度 300ug/ml 加えて、細胞をさらに2日間培養し、細胞ホモジェネートの  $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびルシフェラーゼ活性を測定し、その活性の相対比をもって read-through 活性とした。さらに、ネガマイシン分子の立体構造に類似した分子をメリーランド大学薬学部 A. マッケレル教授グループが開発した立体構造データベースに登録された 105 万分子種の中からコンピュータ検索した。

## 結果と考察

### 1) トランスジェニックマウスの作出

TGA をもつ dual-reporter gene を発現するトランスジェニックマウスの作出に成功した。トランスジェニックマウス体内では、脳、心臓、骨格筋、膵臓、肝臓、腎臓、小腸、脾臓について凍結切片および組織ホモジェネートにおける  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を検討したところ、骨格筋、心筋および大脳において高い活性が検出された。このトランスジェニックマウスの骨格筋初代培養細胞においても  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現が確認された。TAA トランスジェニックマウスでは、生体組織における  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現は認められなかった。TAG マウスについては現在、検討中である。read-through 物質のアッセイ系として今回作出できた TGA マウスを活用していきたい。

### 2) 細胞培養系における read-through 活性の測定

TGA トランスジェニックマウスの骨格筋から分離した初代培養細胞における種々の抗生物質の read-through 活性を検討した所、特定バッチのゲンタマイシンのみルシフェラーゼ活性の上昇を認めた。この細胞においてはネガマイシンによる read-through は認められなかった。

\* 東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系(生物学)

\*\* メリーランド大学薬学部薬物科学教室

また、TAA を含むトランス遺伝子を組み込んだリコンビナント C2C12 細胞の作出にも成功した。

### 3) ネガマイシン類似構造体のコンピュータ検索

ネガマイシン分子の立体構造に類似した分子をメリーランド大学薬学部 A. マッケレル教授グループが開発し

た立体構造データベースに登録された 105 万分子種の中からコンピュータ検索した所、27 分子種が検出された。

今後、TGA トランスジェニックマウス及び、TAA リコンビナント C2C12 細胞を用い、read-through 物質の検索をおこなう。

# 筋ジストロフィー治療法の開発

## — 培養骨格筋細胞におけるステロイドおよびゲンタマイシンの影響 —

齋藤 加代子\*

研究協力者 近藤 恵里\*\* 河北 有規子\* 木村 一郎\*\*\*

### 目 的

筋ジストロフィーに対する根本治療の実現に向け、培養骨格筋細胞における分子生物学的検討を行い、疾患の病態を明らかにするとともに、培養系における治療効果判定の指標とすることを目的とした。

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)において副腎皮質ステロイド剤は、現時点で臨床的有効性が唯一証明されている薬物である。また近年あらたな分子治療の概念として研究がすすむ「premature stop mutationの抑制に作用する薬物」の一つであるゲンタマイシン(GM)は、ナンセンス変異に起因する DMD 症例の治療薬として期待されている。しかし GM の臨床応用にあたっては、GM の有する聴神経障害、腎障害の回避が必要である。

我々は種々の筋ジストロフィー患者由来の筋衛星細胞の培養系を確立し、筋特異的蛋白および mRNA の発現状況を確認した。これを用い、まずは DMD において有効性が示される副腎皮質ステロイド剤と GM の効果、相互作用についての検討を開始した。

### 対象と方法

インフォームド Consent のもと、生検筋組織から筋衛星細胞の初代培養を得た。対象はナンセンス変異 DMD 患者筋(G4003A: TGG to TGA) 1 例と正常コントロール筋 1 例。培地中に  $\alpha$ -Methylprednisolone (MEPD: 1  $\mu$ M) 存在下、GM (300, 200, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml) 存在下、さらに両者の存在下で、培養における増殖・分化の形態学的観察とともに、筋細胞の分化レベルの指標として細胞内 CK 値の推移を測定した。ジストロフィン (dys) 蛋白の発現量の評価は、主としてイムノブロット法にて行った。

### 結 果

形態学的所見： 増殖期では DMD 筋、正常筋とも有意な差はなかった。分化期においては DMD 筋、正常筋とも、MEPD 存在下の方が myotube への分化がやや阻害されていた。GM 存在下では濃度依存的な分化阻害がみられ、GM 100  $\mu$ g/ml 以上+ MEPD 添加では myotube の形態変化が起こり、全体として管状ではなく塊状の細胞が

観察された。各 CK 値の推移は分化阻害の程度をよく繁栄していた。

dys イムノブロット： 正常筋では、MEPD の添加で dys の発現が増強した。DMD 筋でも MEPD の添加によりごくわずかな dys 発現が見られた。また、GM 添加でわずかな発現、GM+MEPD 添加ではそれよりも強い発現が見られた。培地中の GM 濃度は、25~50  $\mu$ g/ml 時が最も強い発現が見られ、200~300  $\mu$ g/ml ではむしろ阻害された。

### 考 察

MEPD は、正常筋においても dys 発現量を増加させると考えられた。DMD 筋ではリパーセント細胞の dys 発現をも増強させている可能性もある。

DMD 筋における GM は、GM 単独では極めて弱い効果であるが、GM と MEPD の両者を併用することにより dys の発現量を単独投与時よりもかなり高めることができた。GM での readthrough が起こり dys 全長蛋白が発現、さらに MEPD の作用が加わって dys 産生量が増えるものと示唆された。MEPD 併用時における GM の至適濃度は 25~50  $\mu$ g/ml と判断された。これは mdx マウスでの報告 (300  $\mu$ g/ml) よりも低く、臨床応用の際には、MEPD と GM を併用することで GM の投与量を減らし、GM の副作用を軽減できる可能性が示唆された。

### 今後の展望

患者生検筋由来の培養細胞を用いた治療効果の検定というのは、いわばその個人の in vitro システムにおけるパイロットスタディーとなる。効果の認められた症例において、その治療法を臨床にフィードバックすることができる。これは薬物療法のみならず、筋再生および移植治療、遺伝子治療においても同様の活用が期待できる。いわゆるオーダーメイドの治療を目指していく上では、個々の患者由来の細胞株の作成を基本的手段とし、治療研究に生かしていくことが可能と思われる。

さらに我々は、痛みを伴わない非侵襲的なドラッグデリバリーシステムとして、MEPD と GM の経皮投与法の検討を開始した。「イオントフォoresis 法」とは、電場を利用したイオン性薬物を皮膚透過させる方法である。バイポーラー電極により溶媒中のイオン化された薬物が、カチオン性イオン(GM)はプラス極から、アニオン性イオン(MEPD)はマイナス極から、2剤同時に経皮吸収させら

\* 東京女子医科大学遺伝子医療センター

\*\* 東京女子医科大学小児科

\*\*\* 早稲田大学人間科学部

れる仕組みである。現在、イオントフォレシス法による薬剤吸収能の確認を、前述の培養細胞実験で得られたGM, MEPDそれぞれの至適濃度を参考にすすめている。

#### 文 献

- 1) Sklar RM, Brown RH Jr.: Methylprednisolone increases dystrophin levels by inhibiting myotube death during myogenesis of normal human muscle in vitro. *J Neurol Sci* 101: 73-81, 1991.
- 2) Hardiman O, Sklar RM, Brown RH Jr.: Methylprednisolone selectively affects dystrophin expression in human muscle cultures. *Neurology* 43:342-345, 1993.
- 3) Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL: Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 104:375-381, 1999.

## VI. 先天性ミオトニー、筋強直性ジストロフィー、 治療法の開発

# 筋強直性ジストロフィー骨格筋における mRNA スプライシングの異常

佐古田 三 郎\*

研究協力者 中 森 雅 之\* 木 村 卓\*\* 青 池 太 志\*  
高 橋 正 紀\*

## 目 的

筋強直性ジストロフィー症(DM)の病態に pre-mRNA のスプライシング異常が関与することが近年示されてきている(図 1)。われわれは Thornton ら(Univ. Rochester NY)と共同で本症のモデルマウス(HSA-LR)を解析し、骨格筋型クロライドチャンネルの異常なスプライシングによりクロライドコンダクタンスが低下し、筋の興奮性が亢進していることを見出した(文献 1)。また、トロポニンT、インスリン受容体などのスプライシング異常が他のグループにより示され、不整脈、耐糖能異常の原因である可能性が示されている。しかし、本症の最も重要な症状である筋萎縮・変性のメカニズムについてはまだ明らかにされていない。以前より本症の骨格筋で細胞内カルシウム動態が異常であるとの報告があること、上述のスプライシング変異は全て正常の筋分化の過程で見られる、いわゆる”幼若型”の増加であることから、われわれは筋成熟の過程でスプライシングパターンが変化することが知られており、しかも細胞内カルシウム制御に重要な 2 つの遺伝子、リアノジン受容体(RyR)および筋小胞体カルシウムポンプ (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase, Serca)に注目し、それらのスプライシング異常を患者生検筋および先述のモデルマウス筋において検討した。

## 方法と結果

ヒト生検筋 23 例(DM 5 例, 多発性筋炎 5 例), 筋萎縮性側索硬化症 5 例, 肢帯型筋ジストロフィー症 2 例, 正常コントロール 6 例), 手術時に採取した筋 5 例(すべて DM), 生検筋より培養した筋管細胞 2 例 (DM 1 例, 正常コントロール 1 例), 胎児筋 1 例(先天性 DM)。上述のモデルマウス(HSA-LR)は、ヒト骨格筋アクチン遺伝子(HSA)の 3' 末に 250 回 CTG リpeat が伸長した transgene を発現しており、筋強直現象に加え、中心核増加・間質増生などの筋病理所見が存在する。

患者筋あるいはマウス大腿筋から mRNA を抽出、cDNA に逆転写。各種プライマーにて cDNA を PCR 法で増幅、アクリルアミドゲルあるいはアガロースゲルに

\* 大阪大学大学院医学系研究科 神経機能医学(神経内科)

\*\* オーストラリア国立大学

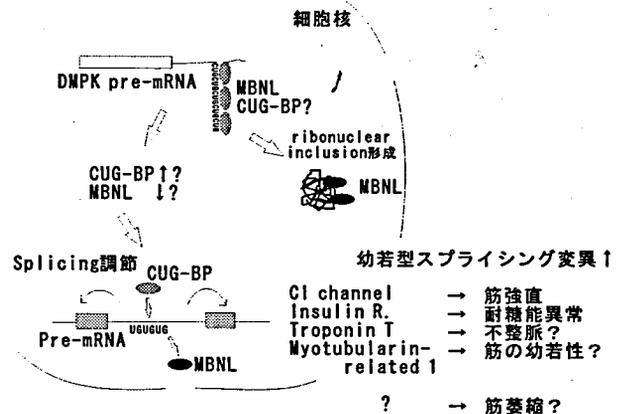


図 1 筋強直性ジストロフィーの病態仮説

リピートの伸長した mRNA は核内に凝集体を形成する。異常な CUG リpeat の存在の結果、MBNL や CUG-BP といった mRNA 結合タンパクの量的異常が生じ、それらタンパクが制御している Cl チャンネル、インスリン受容体などの mRNA スプライシング機構に異常をきたし、筋強直、耐糖能異常など種々の症状を呈すると考えられている。

て電気泳動した後にエチジウムブロマイドにて染色、イメージアナライザーで定量しスプライシングアイソフォームの比を求めた。また、Ryr1(骨格筋型), Ryr3(心筋型), Serca1(速筋型), Serca2(遅筋そのほか型)の総 mRNA 発現量についても検討した。

Ryr1 には、筋分化の過程で選択的スプライシングが起こる 2 つのエクソン(ASI, ASII)がある。幼若なタイプ ASI(-), ASII(-)から成熟タイプ ASI(+), ASII(+への変換は、ASII のほうが ASI に比して分化の早い段階で生じることも知られている。幼若なスプライスアイソフォーム ASI(-)の ASI(+に対する割合が DM 患者および HSA-LR マウスで有意に増加していたが、ASII のスプライシングについてはコントロールと差を認めなかった。

Serca も分化段階によってスプライシングパターンが変化し、成人型の Serca 1a と幼若型の Serca 1b が存在する。本症患者および HSA-LR マウスの筋では幼若型の Serca 1b の割合が有意に増加していた。一方 Serca2 は臓器特異的なスプライシングを示し、遅筋には Serca2a, 他の多臓器では Serca2b が発現する。Serca2a, Serca2b のスプライシングは DM 患者筋で特に変化を認めなかったが、イントロン 19 を含んだ未報告のスプライス変異体が本症患者筋で減少していることが判明した。

なお, Ryr1, Ryr3, Serca1, Serca2 mRNA の総発現量については有意な変化は認めなかった。

#### 考 察

患者筋に加えモデルマウスでもスプライシング異常が認められたことから, CUG の延長した mRNA が, スプライシング機構の異常に重要であることが示された。さらに, Ryr1 では 2 箇所のうち 1 箇所でのみスプライシング異常が生じていたことから, スプライシングはランダムなものではなく, 筋分化の過程に関与することが示唆された。リアノジン受容体, 筋小胞体カルシウムポンプはともに筋小胞体に存在し, 筋興奮に伴う一過性のカルシウムの遊離, その後の回収に必須

である。以前より本症における細胞内カルシウム異常の報告があり, 今回見出したリアノジン受容体, 筋小胞体カルシウムポンプのスプライシング異常が原因である可能性がある。さらに, Ryr1 および Serca1 はセントラルコア病, Brody 病といった筋疾患の原因遺伝子でもあることなどから, 本症の未解決な病態である筋変性への関与が示唆される。

#### 文 献

- 1) A. Mankodi, M. P. Takahashi, et al. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Molecular Cell* 10: 35-44, 2002.

# クラス Ic 抗不整脈薬の骨格筋型ナトリウムチャンネルに対する作用 — ミオトニー治療薬としての検討 —

佐古田 三 郎\*

研究協力者 青 池 太 志\* 高 橋 正 紀\*

## 目 的

筋強直（ミオトニー）の症状緩和にナトリウムチャンネルを主に抑制する抗不整脈薬が経験的に使用されるが、有効性の検討は必ずしも十分であるとはいえない。ミオトニーの定量化、症状の個人差などの問題から臨床的評価には困難がある。一方、基礎薬理学研究も十分であるとはいえない。多くの薬物については心筋型 Na チャンネルでは比較的詳細な研究がされているが、その結果をそのまま骨格筋型 Na チャンネルに適用することは危険である。例えば、骨格筋型は速い不活性化過程の時定数(時間経過)ひとつをとっても、心筋型に比して 1 オーダー小さい(速い)ように、チャンネルの性質に違いがある。骨格筋型チャンネルでの研究もいくつかあるが、チャンネルに対する親和性など薬理学的パラメーターの計測に主眼が置かれ、-150mV といった過分極状態に膜電位を固定したり、数 100ms といった長い脱分極刺激を用いたりしており、実際の骨格筋での静止膜電位(-90mV)や活動電位の幅(~3ms)と、乖離した条件下での実験である(文献 1)。

ナトリウムチャンネルを主に抑制する抗不整脈薬は Vaughan-Williams 分類で class I に分類され、心電図変化など電気生理学的性質からさらに A, B, C に再分される。これまで、ミオトニーの治療にはメキシレチンに代表されるチャンネルからの解離の速い class I B 薬剤が良く用いられてきた。いっぽう、class I C 群の薬剤はチャンネルからの解離が遅いという特徴があり、心筋型ナトリウムチャンネルの遺伝子異常により引き起こされる Long QT 症候群に対し有効である可能性が示されている。しかし、骨格筋に対する作用を薬理学的に検討した報告はほとんどなく、ミオトニーに効果があったという症例報告も 1 例のみである。そこでメキシレチンおよびフレカイニドの骨格筋型 Na チャンネルに対する作用について、in vitro のチャンネル発現系を用い臨床条件を模した刺激を与えた際の Na 電流に対する効果を計測し検討した。

## 方法と結果

Human embryonic kidney(HEK) 293 細胞にヒト骨格筋型 Na チャンネル  $\alpha$  サブユニットおよび  $\beta 1$  サブユニットの発現ベクターをリン酸カルシウム法により transfection した。同時に CD8 発現ベクターを少量 transfection し、

抗 CD8 抗体固着ビーズの細胞への付着をチャンネル発現細胞の手がかりとした。Transfection の 48-72 時間後、CD8 陽性細胞に対しパッチ電極によるホールセルクランプ法を適用し、電位固定下でナトリウム電流を記録した。メキシレチンあるいはフレカイニドを細胞外液に投与し、ミオトニーを模した刺激条件下(膜電位を-90mV に固定し、+10mV, 3msec, 50Hz の高頻度脱分極刺激)でナトリウム電流に対する影響を検討した。

ミオトニーを模した刺激を与えた時には、骨格筋型 Na チャンネルは薬物の存在しない場合でもチャンネルの不活化により 10%程度の漸減を認める。-90mV に膜電位を固定した時には-120mV といった過分極時とは異なり、治療域濃度のメキシレチン(10  $\mu$ M)、フレカイニド(1  $\mu$ M)が、チャンネルを 30%程度に抑制した(図 1)。フレカイニドによるブロックからのチャンネルの回復の時定数は-90mV の膜電位では 10s 程度と、メキシレチンの数 100ms~数 s に比し遅延しており、チャンネルからの解離が遅いというクラス I C の性質を反映しチャンネルブロックの持続がみられた。さらに脱分極性の麻痺を模した 300ms の長い脱分極刺激時にはメキシレチンとは異なり、フレカイニドによるチャンネルの抑制はほとんど認められず、オープンチャンネルブロッカーとしての性質によると考えられた。

## 考 察

従来より臨床で使用されてきたメキシレチンに加えフレカイニドも治療域濃度での抗ミオトニー効果を有する可能性が in vitro のチャンネル発現系を用いた系で示された。フレカイニドのチャンネルからの解離の遅さも考え合わせると、難治性ミオトニーに対し非常に有効である可能性が示された。さらに、高カリウム性周期性四肢麻痺などでは、ミオトニーに加え麻痺症状(脱分極性)も存在する。フレカイニドは高頻度発火にのみ有効で、長い脱分極刺激にはその作用を示さないことから、ミオトニーにのみ作用する可能性が示唆された。脱分極性麻痺に対する、抗不整脈薬の効果・安全性が確立されていない現状では、麻痺発作を有する患者では Class IC 薬剤の使用も考慮されるべきかもしれない。

## 今後の展望

骨格筋には独自のチャンネルの発現が多く、骨格筋タイプのチャンネルに対する薬剤作用の検討は不十分であるこ

\* 大阪大学大学院医学系研究科 神経機能医学(神経内科)

とが多い。本研究のように *in vitro* チャネル発現システムを用いて骨格筋タイプのチャネルに対する候補薬剤の薬理学的基礎データを収集する必要がある。一方で、これらの実験データが実際の臨床効果を反映しているかを検証しなければならない。また、骨格筋細胞生理機能の *in silico* モデルを利用し、候補薬剤の治療効果のシミュレーションシステムをも目指し、治療応用の促進に結び

付けることも目指すべきである。

## 文 献

- 1) M.P. Takahashi & S.C. Cannon Mexiletine block of disease-associated mutations in S6 segments of the human skeletal muscle Na<sup>(+)</sup> channel. *J. Physiol.* 537:701-714, 2001.

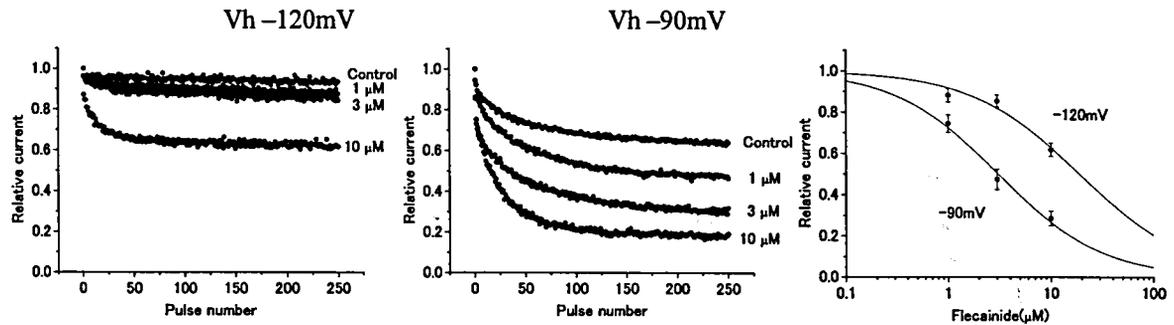


図1 高頻度脱分極時のフレカイニドの作用

+10mV, 3msec, 50Hz, 250回の高頻度脱分極刺激時のフレカイニドのナトリウム電流に対する作用をホールセルクランプ法にて計測した。左のように膜電位が-120mVの時には、治療域濃度の1µMではほとんど電流を抑制しないが、中央のように膜電位が-90mVの時には、有意に電流を抑制する。なお、薬物の存在しないcontrolでも電流の減少が見られるのは-90mVではチャネルが不活化しやすいためである。右は濃度依存性を示したものである。膜電位が-90mVのときのIC50は3.1µMである。

# ミオトニーの筋活動電位反復発火の減衰に関する研究

栗原 照幸\*

研究協力者 中空 浩志\* 岸 雅彦\* 根本 博\*

## 目 的

Thomsen 病及び myotonic dystrophy(DM1)では、神経反復刺激によって誘発筋電位が漸減することが Brown<sup>1)</sup>により報告されているが、その詳細な病態生理が不明である。10Hz 以下の神経刺激でも、刺激後 3-5 分の安静をしてから神経刺激をすると誘発筋電位が平均 58%まで漸減する。演者らは、Cl conductance の低下によるミオトニー標本で膜電位、epp, mepp を含めて検討を加えたので報告する。

## 方法と結果

Wistar 系ラットの横隔膜一神経標本を用いて、細胞内記録を行なった。ミオトニーは Cl conductance を低下させるために anthracene-9-carboxylic acid を用いた。ガラス管微小電極を用いて筋細胞内記録を行なった。Epp の記録を行なうためには  $\mu$ -conotoxin GIIIA<sup>2, 3)</sup> を用いて、骨格筋の Na channel を選択的に block して記録した。ミオトニーの連続記録のためには、筋収縮を阻止するため t-tubular system を選択的に disrupt して筋収縮を止めて筋細胞内記録をした。

骨格筋の Na channel を選択的に阻止する  $\mu$ -conotoxin GIIIA を用いることによって哺乳動物骨格筋の epp を実測することができた。コントロールの筋標本では epp は、31.1—40.0 mV(平均 33.3±2.9 mV)、ミオトニー標本では、epp は、24.4—44.4mV(平均 34.56.5 mV)で両者に統計学的有意差は認めなかった。30Hz の神経反復刺激を 12 回すると、epp はコントロールの筋標本では、平均 20.1±3.5 mV まで漸減し、ミオトニー標本では、epp は、平均 22.6±4.7 mV まで漸減した。神経刺激ごとの epp の漸減の仕方は両者で有意差はなかった。30Hz の神経反復刺激を 300msec, 10sec, 20sec 行なった前後の mepp の素量は減少がないので、上記の刺激回数 12 回の短時間に起こった epp 漸減は、epp quantal content(素量の数)が減少したものである。コントロール筋標本の epp 実測値より、哺乳動物の骨格筋における素量数は平均 94.6 個と計算できた。E-C uncoupling をして記録した myotonic burst の筋細胞内記録では、初め-78.6mV の膜電位が、98 個の活動電位が出たあと-50.0mV まで脱分極し、筋活動電位も 85.7mV から、最後は 7.14mV にまで低下している。

## 考 察

筋細胞膜の Cl conductance 低下によるミオトニー標本では、膜電位は活動電位の出るごとに脱分極して行き、活動電位も膜電位の脱分極に伴って漸減することが観察された。また t-system を disrupt しておいても myotonic burst が起こることを実験的に示した。コントロールの筋標本で  $\mu$ -conotoxin GIIIA を用いることによって、epp を実測することができ、epp は 31.1—40.0 mV と高く、epp から筋活動電位の出現する閾値<sup>4)</sup> (16.2 mV)を安全に越えるものであることを示した。表 1 に示すように、30Hz の高頻度神経反復刺激に伴う epp の漸減は、ミオトニー標本でも、コントロール筋標本と変わらないことと、20 秒間程度の短時間の神経刺激では、神経筋疲労が起こらないことから、ミオトニーにおける筋活動電位の漸減は神経筋接合部における疲労現象ではなく、筋細胞膜の異常による脱分極が関係していると考えられた。

表 1 神経反復刺激と epp の漸減

コントロールとミオトニーの神経筋標本で 30Hz の神経刺激をしたときの終板電位の減衰の仕方を比較した。11 箇所の神経筋接合部において記録した epp の平均値と 1 S.D.を示す。両者に統計的な有意差はなかった。

神経刺激 の回数	control		Myotonia	
	epp	S.D.	epp	S.D.
1 <sup>st</sup> stim.	33.3 mV	2.8	35.9 mV	5.9
2nd	33.1	3.2	34.0	6.3
3rd	30.9	2.7	32.8	6.3
4th	29.6	3.2	31.6	6.1
5th	27.6	3.2	31.6	6.1
6th	25.3	4.2	29.6	5.2
7th	24.5	2.7	28.2	4.6
8th	23.1	3.7	26.1	4.7
9th	22.2	3.7	26.2	4.6
10th	20.3	4.1	24.7	4.9
11th	20.3	4.3	23.7	4.5
12th	20.1	3.5	22.6	4.7

## 今後の展望

ミオトニー疾患の中で特に DM1 及び DM2 では、ミオトニー以外に筋力低下があり、後者は日常生活に支障を来たす要因となっている。その主たる原因はジストロ

\* 東邦大学大橋病院神経内科

フィーによる筋の変性，萎縮によるが，チャネロパチーのために反復発火時の脱分極により，筋活動電位の低下が見られるので，これも筋力低下の一因となる．今後更に筋力低下の病態生理を明らかにすることが重要である．

#### 研究の意義

ミオトニーにおける筋活動電位の漸減は神経筋接合部における疲労現象ではなく，筋細胞膜の異常によるものである．Cl conductance が低下していると，筋活動電位が反復して出現するごとに，脱分極が起こり，それと共に筋活動電位が漸減する． $\mu$ -conotoxin GIIIA を用いることによって哺乳動物骨格筋の epp (平均 33.3mV) を実測することができたことは意義深い．

#### 文 献

- 1) Brown JC: Muscle weakness after rest in myotonic disorders: an electrophysiological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 37: 1336-1342, 1974.
- 2) Sosa MA, Zengel JE: Use of  $\mu$ -conotoxin GIIIA for the study of synaptic transmission at the frog neuromuscular junction. *Neurosci Lett* 157:235-238, 1993.
- 3) Michelle M, van Lunteren E: Effect of phasic activation on endplate potential in rat diaphragm. *J Neurophysiol* 82: 3030-3040, 1999.
- 4) Kurihara T, Brooks JE: The mechanism of neuromuscular fatigue. A study of mammalian muscle using excitation-contraction uncoupling. *Arch Neurol* 32: 168-174, 1975.

# 筋強直性ジストロフィーの分子病態と治療

石 浦 章 一\*

研究協力者 笹 川 昇\* 紀 嘉 浩\*  
竹 下 裕 也\* 森 大 輔\*

## 目 的

強直性ジストロフィー1型 (DM1)は、筋強直、精巣萎縮、白内障、耐糖能異常などを特徴とする全身性疾患である。責任遺伝子は、第19染色体にあるDMキナーゼ (DMPK)という小胞体結合型セリン・スレオニンキナーゼであり、その3'非翻訳領域にあるCTGリピートの伸長が病気の直接の原因である。また最近、筋強直性ジストロフィー2型(DM2)も発見されたが、これは第3染色体にあるジンクフィンガータンパク質 ZNF9 遺伝子中のイントロン1にあるCCTGリピートの伸長であることが判明した。すなわちDMという症状が、責任遺伝子の機能異常ではなく、3または4塩基リピートの伸長に深く関係していることが明らかになってきた。また、伸長したリピートだけを骨格筋に発現させたマウスでも同じミオトニア(筋強直)症状が見られることも、この説が有力になる証拠の1つとされている。しかしながら、同様の症状が、なぜ異なる遺伝子中の異なる塩基リピート伸長で起こるのかについては、その理由は明らかではなかった。

私たちの研究室では、塩基リピート結合タンパク質の研究を2000年より開始し、2つの異なる型のRNAリピートに結合するタンパク質MBNL1/EXPの同定に世界で初めて成功した(*Basic Appl. Myol.* 2003; *Human Mol. Genet.* 2004)。このタンパク質は、リピートDNAにも結合はするものの、CUGやCCUGなどのリピートRNAの方に強く結合することが酵母 three hybrid の系と gel retardation analysis によって明らかになった。また最近、MBNL1のノックアウトマウスが作成され、これにDM症状が見られることから、RNA機能異常説は強く信じられるようになっていく。

本研究の目的は、筋強直性ジストロフィー発症に関わるRNA結合タンパク質を同定し、その遺伝子の機能を解析することで、本症の分子的基盤の理解を進めることである。

## 方法と結果

本研究では、このRNA機能異常を調べるため、リピートRNA結合タンパク質9種(MBNL1, MBNL2, MBNL3, CUG-BP, CUG-BP2, PKR, CELF3, PTB, FOX1)をクロー

ニングし、結合するRNA配列の特異性を酵母 three hybrid 法で調べた。その結果、CUGとCCUGリピートに結合するのは、今まで知られていたCUG-BPではなく、MBNL1であることが明らかになった。また、そのオソログであるMBNL2、筋特異的に発現しているMBNL3もMBNL1と同様の基質特異性を持つことがわかった。またこれらRNA結合タンパク質同士も結合することが酵母 two hybrid 法で明らかになった。これらのRNA結合タンパク質は、スプライシングにも関わることが示唆されている。そこで、塩素チャネルや $\alpha$ アクチニンなどの*in vitro*スプライシング系を用いて、これらRNA結合タンパク質がスプライシングに関係するかを調べたところ、確かにMBNL1の発現の有無によってスプライシングパターンが変化することが明らかになった。

一方これらと共に3年間の研究で、基礎的なことでは、DMPKタンパク質の精製と小胞体局在の同定、トリプレット・リピートを人工的に伸長させる新しいPCR法の開発などを行った。従来、リピートを含む遺伝子のクローニングが難しかったが、我々が開発した手法によってリピートが簡単にクローニングできるようになった。また、RNAとタンパク質の結合に関しては、酵母 three hybrid 法という手法を駆使して、定量的に結合を解析する手段を確立した。同時に、表面プラズモンバイオセンサを用いてRNA結合タンパク質の1つであるCUG-BPやMBNL1とRNAとの結合を直接的に解析することにも成功した。

また、これら基礎研究の一環として、DMPKの生理機能を調べる実験を酵母を用いて行った。酵母にはDMPKホモログが存在するが、この遺伝子を欠損させた株が形態異常を示すことを発見した。遺伝子導入でレスキューできること、ATP結合部位を変異させると機能を欠失することから、活性が形態維持に必要なことがわかった。この研究によって、DMPKは細胞骨格の機能維持に働いている可能性も示唆された。

また、本症の発症に関わる新規因子の同定をCTGリピート増加筋細胞株を使ったDNAチップ解析によって行った。リピート伸長に関連する新規発現(抑制)遺伝子の探索を行っている。CTG160伸長細胞では、SCAMP3遺伝子の発現が上昇し、反対にendosulfine遺伝子の発現が低下することがわかった。また、ノーザンブロット解析によって、Cu-SOD, Mn-SOD, GPx, catalaseなどの酸

\* 東京大学・大学院総合文化研究所

化ストレス関連酵素の遺伝子発現が変化することも明らかになった。リピート伸長によって $\alpha$ Bクリスタリンの発現低下を発見した。

#### 考 察

筋強直性ジストロフィーの多岐にわたる症状は、原因遺伝子そのものではなく、リピート自身が引き起こしている。そこで、伸長リピートに結合する因子を探したところ、CUG-BP や MBNL1 などいくつかの RNA 結合タンパク質が候補に挙がってきた。つまり、本症は RNA 結合タンパク質がリピート RNA に捕捉され、正常機能が果たせなくなるために起こる可能性があることが、本研究によって明らかになった。これは、MBNL1 が CUG と CCUG リピートに結合すること、MBNL1 が症状に関係する遺伝子のスプライシングに関わること、などの証拠から推測できることである。また同時に、リピート伸長細胞には酸化ストレスの影響があり、これによって種々の遺伝子が動いていることも明らかになった。

#### 今後の展望

本研究によって、筋強直性ジストロフィーが RNA 結合タンパク質の機能異常で発病する可能性が高くなった。今後は、これら RNA 結合タンパク質を標的にした治療法の開発が期待できる。

#### 文 献

- 1) Kino Y., Oma Y., Sasagawa N. and Ishiura S.: Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Human Mol.Genet.* 13:495-507, 2004.
- 2) Watanabe T., Takagi A., Sasagawa N., Ishiura S. and Nakase H.: Altered expression of CUG binding protein 1 mRNA in myotonic dystrophy 1: possible RNA-RNA interaction. *Neurosci.Res.* 49:47-54, 2004.
- 3) Takeshita Y., Sasagawa N., Usuki F. and Ishiura S.: Decreased expression of alpha-B-crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats. *Basic Appl.Myol.* 13:305-308, 2003.
- 4) Sasagawa N., Kino Y., Takeshita Y., Oma Y. and Ishiura S.: Overexpression of human myotonic dystrophy protein kinase in *Saccharomyces Pombe* induces abnormal polarized and swollen cell morphology. *J.Biochem.* 134: 537-542. 2003.
- 5) Kino Y., Oma Y., Takeshita Y., Takahashi N., Sasagawa N. and Ishiura S.: Direct evidence that EXP/muscleblind interacts with CCUG tetranucleotide repeats. *Basic Appl. Myol.* 13:293-298, 2003.
- 6) Sasagawa N. and Ishiura S.: Myotonic dystrophy protein kinase. *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* 5: 2203-2205, 2002.
- 7) Usuki F., Yasutake A., Umehara F., Tokunaga H., Matsumoto M., Eto K, Ishiura S. and Higuchi I.: In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci. Lett.* 304:199-203, 2001.
- 8) Takahashi N, Sasagawa N, Usuki F, Kino Y, Kawahara H, Sorimachi H, Maeda T, Suzuki K and Ishiura S.: Coexpression of the CUG-binding protein reduces DM protein kinase expression in COS cells. *J.Biochem.* 130: 581-587, 2001.

# RNA 結合因子としての SIX5 と筋強直性ジストロフィーの関わり

川 上 潔\*

研究協力者 佐 藤 滋\*

## 緒 言

筋強直性ジストロフィー1型 (DM1) は CTG リピートの伸長を原因とする神経筋疾患である。リピート伸長は、1) CUG リピートを含む異常 RNA の蓄積とそれに伴う RNA 結合タンパク質の量と分布の変化、2) DMPK の発現量低下、3) 下流に位置する *SIX5* 遺伝子の転写抑制、を同時に引き起こす。そして、1)・3) の異常を個別に有するモデルマウスは、それぞれ DM1 症状を部分的に再現することが報告されている。*SIX5* は水晶体、骨格筋、脳、生殖腺で発現する転写因子をコードしており、*Six5* 欠損マウスは白内障と性腺機能低下症を発症する。私たちは、「CUG リピートを含む異常 RNA が引き起こす *SIX5* の機能低下が、DM1、*Six5* 欠損マウス及び CCTG リピート伸長による DM2 に共通して観察される症状の発症機序の可能性はある」という新たな仮説をたて、研究を行った。

## 方 法

*Six* 型ホメオドメイン (HD) タンパク質である *Six5* の配列・構造上の特徴を明らかにするために全 HD タンパク質とアミノ酸配列の比較を行った。4 種類の GST-*Six5* 融合タンパク質 (野生型, W48R, K50Q, Q54A) を精製し、ゲルシフト法により種々の DNA 及び RNA プロープに対する結合活性を調べた。強力な ROSA26 プロモーター下で CUG リピート (5 個または 200 個) を含む DMPK mRNA 3'-UTR を過剰発現するプラスミド (Amack and Mahadevan, 2001) を HEK293 と COS7 細胞にトランスフェクトし、CUG リピートが VP16-*Six5* の機能 (*myogenin* 及び *Igfbp5* プロモーターを活性化する能力) を変化させるか否かについて調べた。

## 結 果

*Six5* は HD の 50 番目にリジン (K50) を持つユニークなタイプの HD タンパク質であることがわかった。その 1 つであるショウジョウバエ *bicoid* (*bcd*) は、*caudal* (*cad*) mRNA 3'-UTR に結合し、翻訳を阻害することが知られている。また、*bcd* と *cad*-RNA との特異的な結合には K50 が必須であることも明らかとなっている。

そこで、DM における RNA の重要性を考慮し、*Six5* の RNA 結合活性を解析するために、GST-*Six5* 融合タンパク質と *bcd* の標的である *cad*-RNA プロープを用いてゲ

ルシフト実験を行った。その結果、野生型 *Six5* も HD 中のアミノ酸を置換した 4 種類の変異型分子も *cad*-RNA プロープに結合することがわかった。次に DM1 で核内に異常蓄積する CUG リピートと GST-*Six5* の結合を CUG<sub>8</sub>-RNA プロープによって調べたが、シフトしたバンドは検出されなかった。興味深いことに、CCUG<sub>8</sub>-RNA プロープでは弱いながらシフトしたバンドが検出された。

トランスフェクション実験では過剰発現させた CUG リピートの VP16-*Six5* に対する特異的な影響は観察されなかった。

## 考 察

*SIX5* は RNA 結合能を持っていることがわかった。*SIX5* の CCUG<sub>8</sub>-RNA プロープへの結合は、*SIX5* が DM1 だけでなく DM2 の発症過程にも関与するという可能性をはじめて示唆する結果であった。私たちは種々の細胞種における *Six5* 標的遺伝子をすでに同定しているが (Sato et al., 2002)、DM では *Six5* が CUG あるいは CCUG リピートに結合してしまい、標的遺伝子の転写活性化という正常な機能を果たせなくなっている可能性が考えられる。*Six5* と CUG 及び CCUG リピートとの *in vitro* での結合は、長い RNA プロープを作製して再度確認する必要がある。また、細胞内で CUG リピートが *Six5* に及ぼす影響の解析は、リピート発現細胞株の使用が有効だと思われる。

## 結 論

*Six5* は *bcd* の標的である *cad*-RNA と CCUG リピートに *in vitro* で結合した。*SIX5* は RNA 結合能を持つ転写因子であることが示唆された。*SIX5* が DM1 と DM2 の両者において共通な症状である白内障と性腺機能低下症の発症過程に関与する可能性が考えられる。

## 参考文献

- 1) Amack JD, Mahadevan MS. The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum Mol Genet* 10:1879-1887, 2001.
- 2) Sato, S., Nakamura, M., Cho, D. H., Tapscott, S. J., Ozaki, H. and Kawakami, K. Identification of transcriptional targets for *Six5*: Implication for the pathogenesis of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Molec. Genet* 11:1045-1058, 2002.

\* 自治医科大学分子病態治療研究センター細胞生物研究部

# Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)抑制による神経筋疾患の病態と治療に関する研究

白 杵 扶佐子\*

研究協力者 山下 暁 朗\*\*\*\* 樋口 逸 郎\*\*\* 大野 茂 男\*\*

## 目 的

Premature translation termination codon (PTC)をもたらすフレームシフト変異あるいはナンセンス変異は、遺伝性疾患の主な原因である。PTCを有する変異 mRNA は nonsense-mediated mRNA decay (NMD)の標的となり分解されるため、その変異蛋白質は作られないことが多い。NMDは、PTCを有する変異 mRNA を排除する mRNA 監視機構である。しかしながら、変異蛋白質の中には正常な蛋白質の機能を代償するものもあり、このような例では NMD はその病態に負に作用することになる。常染色体劣性遺伝を示す Ullrich 病を対象に、NMD の抑制が病態に及ぼす影響と NMD を標的とした治療の可能性について検討した。

## 対象と方法

collagen VI  $\alpha 2$  鎖(COL $\alpha 2$  (VI))の triple helical domain をコードする exon に 26 塩基のホモの欠失があり、フレームシフト変異がおこって PTC が出現した Ullrich 病の患者繊維芽細胞を対象とした。collagen VI の三鎖構造を認識する抗 collagen VI 抗体を用いた免疫染色で、collagen VI 蛋白質の完全欠損を認めた。ヒト NMD における mRNA helicase である hUPF1 のリン酸化を薬理的にあるいは RNA interference を用いて抑制し、COL $\alpha 2$  (VI) mRNA, collagen VI 蛋白質の発現変化と細胞機能に及ぼす影響について検討した。

## 結果および考察

hUPF1 protein kinase である hSMG-1 を wortmannin, caffeine で抑制すると COL  $\alpha 2$  (VI) mRNA は未添加時の 2.8-3.4 倍に増加した (図 1)。抗 collagen VI 抗体を用いた免疫染色では、欠損していた細胞内および細胞外マトリックスにおける collagen VI の三鎖構造が wortmannin, caffeine 添加後認められた (図 2)。<sup>35</sup>S-メチオニンラベル後の培養液を用いた抗 collagen VI 抗体による免疫沈降後電気泳動にて、変異 collagen VI の細胞外への分泌が確認された。即ち、変異 COL  $\alpha 2$ (VI) mRNA の増加により合成された変異 COL $\alpha 2$ (VI) 鎖は、正常に合成された

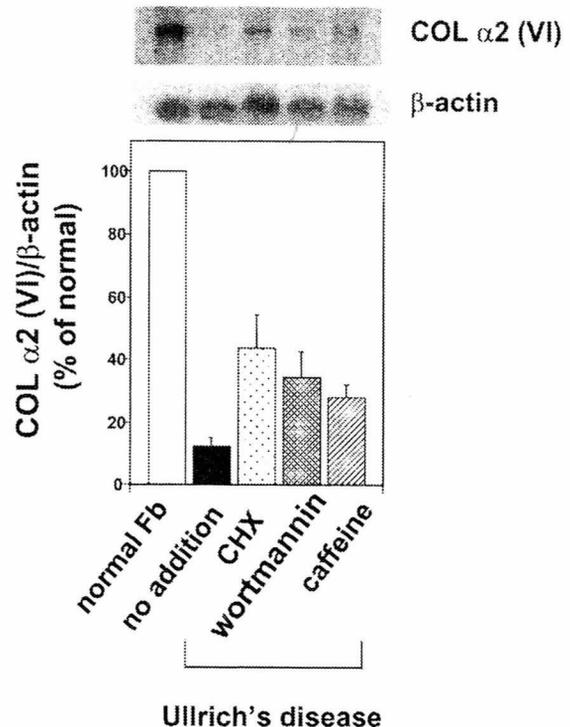


図 1 Northern blot 解析. CHX (100  $\mu$ g/ml), wortmannin (10  $\mu$ M), caffeine (7.5 mM) をそれぞれ 6 時間投与後、total RNA を抽出して Northern blot を行い、デンストメトリーで解析した (n=4)。

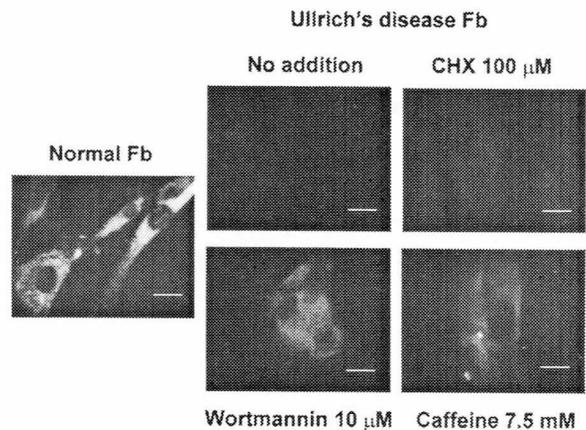


図 2 collagen VI 三鎖構造を認識する抗体を用いた免疫染色。CHX, wortmannin, caffeine をそれぞれ 6 時間投与後、細胞を固定し免疫染色を行った。欠損していた細胞内 collagen VI の三鎖構造が wortmannin, caffeine 添加後認められた。Bar=20  $\mu$ m。

\* 国立水俣病総合研究センター

\*\* 横浜市立大学大学院医学研究科分子細胞生物学

\*\*\* 鹿児島大学医学部老年、神経内科、

\*\*\*\* Dep. Biochem. & Mol. Biol., Univ. Texas

COL $\alpha$ 1 (VI)鎖, COL $\alpha$ 3 (VI) 鎖と細胞内で collagen VI 三鎖構造を作り細胞外へ分泌され, さらに細胞外マトリックスへとりこまれることが明らかになった. 患者線維芽細胞では, fibronectin receptor の減少と細胞易遊離性が認められたが, wortmannin, caffeine による collagen VI の回復はこれらの細胞機能を部分的に回復した.

hMG-1 は, phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase (PIKK) family に属する. wortmannin, caffeine は, 患者線維芽細胞における hUPF1 リン酸化を抑制したが, NMD 以外の他の分子への作用も知られている. Collagen VI 蛋白質の増加が NMD を特異的に抑制した結果であることを確認するために, hUPF1 とそのリン酸化酵素である hSMG-1 を標的とした RNA interference を用いて検討した. 患者線維芽細胞内に siRNA を発現させ, si-hSMG-1 の発現による hSMG-1 の knockdown および si-hUPF1 の発現による hUPF1 の knockdown を Western Blot により確認した. hSMG-1, hUPF1 いずれの knockdown 細胞でも hUPF1 のリン酸化低下が認められ, NMD は特異的に抑制された. 抗 collagen VI 抗体を用いた免疫染色では, hSMG-1, hUPF1 いずれの knockdown 細胞においても empty vector あるいは non-silencing siRNA 導入の control 細胞では認めなかった細胞内および細胞外マトリックスにおける collagen VI の三鎖構造が認められた. この collagen VI の回復は fibronectin receptor の発現増加と細胞易遊離性の改善をもたらした.

以上, NMD の特異的な抑制により, collagen VI が欠

損した Ullrich 病患者線維芽細胞において, 変異蛋白質の増加とそれによる細胞機能の部分回復が明らかになった.

#### 今後の展望

NMD は, PTC を有し NMD が負に作用している Ullrich 病など劣性遺伝病の治療標的となる可能性が考えられる. 今後, 表現型を改善する最適な NMD の抑制法についてさらに検討していく必要がある.

#### 文 献

- 1) Usuki F, Yamashita A, Higuchi I, Ohnishi T, Shiraishi T, Osame M, Ohno S: Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the mutant phenotype in collagen VI-deficient Ullrich's disease. *Ann Neurol* 55:740-744, 2004.
- 2) Yamashita A, Ohnishi T, Kashima I, Taya Y, Ohno S: Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Dev* 15: 2215-2228, 2001.
- 3) Ohnishi T, Yamashita A, Kashima I, Schell T, Anders KR, Grimson A, Hachiya T, Hentze MW, Anderson P, Ohno S: Phosphorylation of hUpf1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol. Cell* 12:1187-1200, 2003.

# PC12細胞を用いた筋強直性ジストロフィーモデル細胞の作成： 薬剤スクリーニングシステムの確立を目指して

吉 良 潤 一\*

協力研究者 古 谷 博 和\* 池 添 浩 二\*  
大八木 保 政\* 林 利 光\*\*

## 目 的

筋緊張性ジストロフィー（以下DM1）はミオトニア等の筋症状が目立つが、難治性糖尿病、甲状腺機能障害、良性・悪性腫瘍の合併などの全身症状を認め、中枢神経系では異常リン酸化したタウ蛋白が沈着する tauopathy が生じる。DM1は dystrophin myotonic protein kinase（以下DMPK）遺伝子の3'非翻訳領域に存在するCTGリピートの延長によって発症するが、最近では、リピートの延長した mRNA が核内に存在することで alternative splicing の異常等の toxicity が出現するという、RNA toxicity 説が有力視されている。この場合、リピート延長がDMPK遺伝子自身の発現に影響を及ぼす cis-効果のみならず、同時に発現する他の遺伝子の発現に影響を及ぼすという trans-効果も起こすと考えられる。しかし、このことをきちんと証明できる in vitro のシステムはなく、リピートがどのような機序で他の遺伝子発現に影響を及ぼすかについての詳細な検討は行われていなかった。

私どもはこれまでにリポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）の3'非翻訳領域に250繰り返しのCTGリピートを含む mRNA を恒常的に発現する PC12 細胞の stable cell line を作成し、分化誘導によって細胞死が起こることを示してきたが、今回、この細胞での tau 遺伝子の発現を調べるとともに、cis-効果を軽減する bioflavonoid(BF)のスクリーニングを行った。その結果、このシステムは薬剤スクリーニングシステムとして有用であることが判明した。

## 方 法

250繰り返しのCTGリピートをルシフェラーゼ(luc)遺伝子の下流に挿入し、それを pCAGGSneo ベクターに組み込み、PC12細胞の stable 細胞を作成した(CTG-250)。この細胞を nerve growth factor (NGF)存在下で分化誘導を行った後、まず Northern blotting で luc 遺伝子の転写量を測定した。次に RT-PCR 法で tau 遺伝子の発現と alternative splicing の違いを検出した。これらの細胞を nerve growth factor (NGF)存在下で1週間培養して分化誘導を行った後、新しいプレートにまき直してさらに1週間 NGF(+)もしくは NGF(-)でほぼ6日間培養し、この間の luc 活性(cis-

効果)と、LDH Cytotoxicity Detection Kit(Takara)を用いて CTG リピートを含む mRNA が神経細胞に及ぼす細胞毒性を調べた。さらに、これらの効果を減弱する薬剤を見つけるために、分化誘導後に235種類の bioflavonoid を加えて培養し、cis-効果や細胞毒性を軽減する薬剤のスクリーニングを行った。

## 結 果

最初から NGF(-)で培養した場合、コントロールと比較して CTG-250 に有意な cis-効果と細胞死は起こらなかったが、いったん CTG-250 を分化誘導した後は、CTG-250 に有意な細胞死が起こり、luc の発現も減少した。この時、caspase-3 の活性型が増加していることより、結果として apoptosis が生じていると考えられた。また、Northern blotting では、コントロールと CTG-250 で、mRNA の発現量に差は認められず、luc 活性の低下は、転写後に生じるものと考えられた。

RT-PCR 法で調べた tau 遺伝子の発現は、exon3 と exon10 の splice-out された tau isoform の発現が増えており、tauopathy の所見に一致していた。これらの cis-効果や細胞死は、flavone (toringin), isoflavone (ononin と formononetin), flavanone (isosakuranetin), xanthylatin および DHEA-S (dehydroepiandrosterone sulfate)などで有意に抑制された。

## 考 察

PC12細胞は NGF が培地に加えられれば分裂を繰り返す。核膜が一定の周期で消失する。NGF が加えられると分裂を停止し、軸索や樹状突起の形成を開始する。CTG-250 では、延長した CTG(CUG)を含む mRNA が核内で toxic に働き、cis-効果と細胞死を起こすと考えられる。四種類の bioflavonoid は、これを改善するものと考えられた。

これまでに DM1 で、ミオトニアや脱力の改善に多少効果があるとされている DHEA-S がこのシステムでも有効であったことから、この細胞は DM1 治療薬のスクリーニングのために有用な系であると考えられた。

## 研究の意義

今後の DM1 治療薬の開発に不可欠の細胞系を樹立し、かつその候補薬剤を発見した。

\* 九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科

\*\* 富山医科薬科大学薬学部

#### 参考文献

- 1) 古谷博和. 神経進歩 45: 927-933, 2001.
- 2) Tapscott SJ. et al. Science 293: 816-7, 2001.
- 3) Sergeant N, et al. Hum Mol Genet 10 :2143-55, 2001.
- 4) Seznec H, et al. Hum Mol Genet 10 :2717-26, 2001.
- 5) Furuya H, et al. Biochem Pharmacol, in press

# Schwartz-Jampel 症候群におけるミオトニア発症機序の解明

平澤 恵理\*

## 緒 言

Schwartz Jampel 症候群 (SJS) はパールカン機能の部分欠損による疾患であることが解ったが、本疾患におけるミオトニアの発症機構は解明されていない。パールカンを欠損させたマウスモデルを用い、神経筋の形態学的、電気生理学的検討を行うことにより、SJS におけるミオトニアの発症機序の解明を試みた。

## 方 法

パールカン欠損マウスに、II 型 collagen プロモーターにより軟骨特異的にパールカンを発現させたトランスジェニックマウスを交配し、軟骨病変をレスキューしたマウス (SJS マウス) を作成し、病理、電気生理学的検討を加えた。電気生理学的検討としては、針筋電図に加え、横隔膜神経筋標本を用いた微小電極法にて、MEPP、EPP および静止膜電位を記録した。また MEPP 記録では、neostigmine 1.0  $\mu$ g/mL を灌流液に加えその作用を検討した。さらに、EPP 記録と 40Hz の高頻度連続神経刺激 (EPP 40Hz run-down 法) を行い、アセチルコリン遊離のパラメーターである  $m$  (quantal content),  $n$  (the store of neurotransmitter quanta immediately available for release), および  $p$  (the probability of release by a nerve impulse) を求めた。

## 結 果

SJS マウスでは、筋病理学的に壊死再生、中心核、結合組織の増勢を認めた。電頭的には、筋基底膜の異常は認められなかった。全身麻酔下針筋電図にて自発性持続性放電を認めた。この持続電位はクラレ局所投与にて消失した。SJS マウスではほぼ正常な神経筋接合部が形成されたが、神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体とアセチルコリンエステラーズの共局在に欠損がみられた。微小電極記録では、MEPP 振幅は control に比べて有意に増加していたが、EPP quantal content および静止膜電位は control と比べて有意差を認めなかった。MEPP の decay time constant ( $\tau$ ) は control に比べて延長してはなかったが、EPP の  $\tau$  は延長していた。control マウスでは Neostigmine により、MEPP 振幅は有意に増加し  $\tau$  も延長したが、SJS マウスでは  $\tau$  延長したものの、MEPP 振幅増加は有意ではなかった。これらの所見から神経筋微小電極を用いた終板電位の検討からも終板におけるアセチルコリンエステラーズの部分欠損を示唆する所見が得られた。40Hz の高頻度連続神経刺激 SJS マウスではコントロールに比べて  $m$  と  $n$  が減少していたが有意ではなかった。

しかし、 $p$  は有意に増加し、アセチルコリンが刺激に対して放出されやすいことを示唆した。

## 考察および結論

軟骨以外でパールカンを欠損するマウスにおいて、SJS におけるミオトニアと同様な筋電図所見が再現された。このマウスにおいて、形態学的、生理学的にアセチルコリンエステラーズの部分欠損が確認され、神経筋接合部でのアセチルコリン伝達の異常の可能性が示唆された。今後、このマウスを用いて SJS 患者に観察されるミオトニアと神経筋接合部の異常の関連についてさらに検討し、治療研究をすすめることが可能となった。アセチルコリン遊離のパラメーターには  $m = n \times p$  の相互関係がある。Col-Q 欠損による先天性終板アセチルコリンエステラーズ欠損症では  $n$  は有意に減少するが  $p$  が増加せず、結果として  $m$  が有意に低下している。これはシナプス間隙でのアセチルコリン増加を抑制する代償機序と考えられている。パールカン欠損では、 $n$  の減少が有意でないにもかかわらず  $p$  が有意に増加している。これは、アセチルコリンが刺激に対して放出されやすいことを示すと考えられる。 $p$  の増加は  $n$  の減少を補う二次的な変化のみではなく、パールカン欠損による直接的な機序である可能性が考えられた。これは SJS 患者の顔面筋の持続収縮に対しアセチルコリン放出を抑制するボツリヌス毒治療などの有用性を示唆すると結果と考えられた。また、大動脈などの平滑筋を使った収縮試験も検討中である。アセチルコリン放出が亢進している機序につき電頭レベルでの神経終末の形態変化観察も必要と思われた。

## 文 献

- 1) Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y: Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* 23:354-358, 1999.
- 2) Costell M, Gustafsson E, Aszodi A, Morgelin M, Bloch W, Hunziker E, Addicks K, Timpl R, Fassler R: Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* 147:1109-1122, 1999.
- 3) Nicole, S., Davoine, C.S., Topaloglu, H. et al.: Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nature Genetics* 26:480-483 2000.
- 4) Arikawa-Hirasawa, E., Le, A.H., Nishino, I. et al.: Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and

\* 順天堂大学脳神経内科

chondrodysplasia. *Am J Hum Genet* 70:1368-1375, 2002.

- 5) Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, Yamada Y. Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci.* 5:119-23, 2002

## VII. 骨格筋形成、壊死、アポトーシス

# 骨格筋の脱分化と再生：筋ジストロフィーの再生治療にむけて

遠藤 剛\*

研究協力者 高野和儀\* 大越有一\* 河村和広\*  
渡邊晴子\* 栗田宗一\* 黒瀬隆史\*  
山田敬子\* 木村澄子\* 水上浩明\*\*  
久米晃啓\*\* 小澤敬也\*\* 末次志郎\*\*\*  
竹縄忠臣\*\*\*

## 目 的

筋ジストロフィーの細胞治療には、筋衛星細胞や成体の筋幹細胞が有用であると考えられている。しかしこれらの細胞は数が限られており単離も容易ではない。そこで細胞治療を行うためには、衛星細胞や成体幹細胞に代わり十分な数が得られる細胞を利用することが望まれる。私たちはホメオボックス遺伝子 *Msx1* をマウス骨格筋に形質導入すると、脱分化により分化の多能性をもった単核細胞が多数生ずることを明らかにした。この脱分化細胞を *mdx* マウスに移植することにより、脱分化細胞が筋ジストロフィーの細胞治療に有用である可能性が示された。

筋再生の過程では、衛星細胞は走化性により損傷部に向かって遊走して行く。衛星細胞は損傷部で増殖した後、分化、成熟して筋線維を形成する。さらに再生筋線維は運動などの刺激により肥大する。衛星細胞の遊走には、損傷部から放出された肝細胞増殖因子 (HGF) が走化性因子として働いている。一方、成熟や肥大はインスリン様増殖因子 I (IGF-I) によってもたらされる。IGF-I には *mdx* マウスの筋細胞死や線維化を抑制する作用もある。しかし HGF がどのような分子機構で細胞遊走を引き起こすのかは明らかになっていない。また IGF-I による成熟・肥大の機構も不明な点が多い。そこで筋ジストロフィーにおいて筋再生を促すことによる治療を行うための手がかりを得るために、これらの分子機構の解明に取り組んだ。

## 方法と結果

### (1) 骨格筋の脱分化と幹細胞化

ICR マウスの前脛骨筋 (TA 筋) に Myc-tag を付加した *Msx1* cDNA を AAV ベクターを用いて形質導入した。5 日後には筋線維の脱分化により、Myc-*Msx1* を発現している単核細胞が検出された。単核細胞の数は 14

日目あたりまで著しく増加していった。AAV ベクターは染色体に組込まれずにエピソームの状態で存在するために、細胞が分裂することにより希釈されて、*Msx1* の発現が低下する。その結果、14 日目以降は脱分化細胞の再分化・成熟による筋再生が進行した。28 日目までには筋再生はほぼ完了した。

*Msx1* の発現がみられる筋線維の核や脱分化によって生じた単核細胞の核には、BrdU の取り込みがみられた。また筋線維から分裂している細胞には紡錘体の形成がみられた。これらの結果は、細胞がそれぞれ細胞周期の S 期と M 期にいることを示している。さらに、*Msx1* を発現している単核細胞にはミオシン重鎖や dystrophin が残存しているのがみられた。以上の結果から、単核細胞は筋線維から細胞分裂し脱分化することによって生じたものであることが実証された。

脱分化細胞を単離して FACS で解析した。脱分化細胞は cardiotoxin 注射により生じた衛星細胞や浸潤細胞の集団と比べて、幹細胞マーカーである Sca-1 を顕著に発現していた。このことは脱分化細胞が衛星細胞とは異なる細胞であること、そして脱分化細胞が幹細胞様の状態になっていることを示している。単離した脱分化細胞を適切な分化条件下におくと、筋管細胞に再分化するだけでなく、脂肪細胞や骨細胞に分化転換をした。このことも脱分化細胞が幹細胞状態になっており、分化の多能性をもっていることを示している。以上の結果を図 1 に示す。

EGFP トランスジェニック C57BL/6 マウス (グリーンマウス) の TA 筋に Myc-*Msx1* を形質導入して生じた脱分化細胞を単離して、*mdx* マウスの TA 筋に移植した。14 日後までには EGFP の蛍光を発する筋線維が効率よく再生した。これらの筋線維は dystrophin を発現していた。したがってこの脱分化-再生の系は、筋ジストロフィーなど変性をともなう筋疾患の細胞治療への応用が期待できる。

\* 千葉大学理学部生物学教室

\*\* 自治医科大学分子病態治療研究センター

\*\*\* 東京大学医科学研究所腫瘍分子医学分野

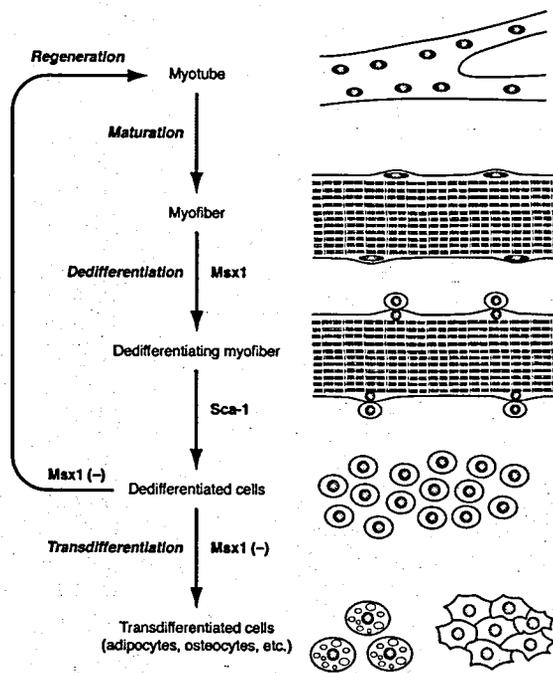


図 1 Mx1 による筋線維の脱分化と脱分化細胞の分化転換および筋再生。成熟筋線維に Mx1 を発現させると、脱分化が起きて単核の脱分化細胞が多数生じる。これらの脱分化細胞は幹細胞マーカーの Sca-1 を発現しており、多能性幹細胞の状態になっている。そのため Mx1 の発現が消失した後に、筋管細胞に再分化するだけでなく、脂肪細胞や骨細胞に分化転換する。生体内では筋管細胞はさらに成熟して筋線維を形成し、筋再生に至る。

## (2) 骨格筋細胞の遊走の分子機構

筋再生過程における HGF に対する衛星細胞の走化性の分子機構を解明するために、衛星細胞由来のマウス C2C12 細胞を用いて解析した。C2C12 細胞を HGF で刺激すると、アクチン細胞骨格の再構成が起こり葉状仮足が形成された。さらに 3次元遊走チャンバーアッセイで、HGF に対する著しい走化性が示された。そこで細胞内で Arp2/3 複合体を介した迅速なアクチン重合を引き起こし葉状仮足の形成にかかわっている N-WASP や、同様にして葉状仮足の形成にかかわっている WAVE2 の関与を調べた。N-WASP と WAVE2 はいずれも HGF によって形成される葉状仮足にアクチンと共存していた。ドミナントネガティブ変異体 N-WASP と WAVE2 を発現させると、いずれも HGF による葉状仮足形成と HGF に対する走化性を阻害した。また RNAi によって N-WASP と WAVE2 の発現をノックダウンすると、いずれの場合にも HGF による葉状仮足形成と HGF に対する走化性が阻害された。さらに HGF によって活性化されることが知られているホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) の阻害剤 LY294002 を作用させた場合にも、HGF による葉状仮足形成と HGF に対する走化性は著しく阻害された。したがって、HGF に対する C2C12 細胞の走化性には PI3K の下流で働く N-WASP と WAVE2 の両者が不可欠であることが明らかになった。このシグナル伝達経路を図 2 に示す。HGF に対する衛星細胞の走化性にも同様の機構が働いていると考えられる。

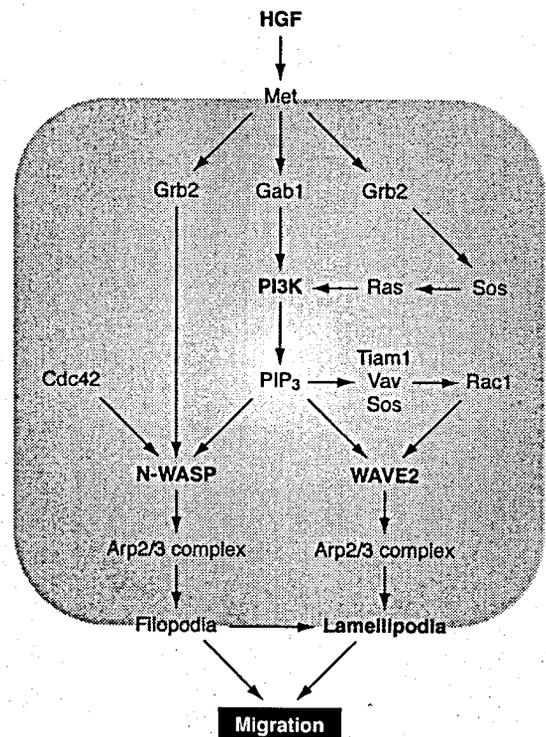


図 2 HGF による C2C12 細胞の遊走のシグナル伝達経路。HGF により PI3K が活性化され、その下流で N-WASP と WAVE2 が活性化される。これらは Arp2/3 複合体を活性化してアクチン重合を引き起こし、葉状仮足の形成を誘導する。これにより HGF に対する走化性がもたらされる。

## (3) 再生・筋肥大における筋原線維のアクチン線維形成の分子機構

N-WASP は単離した筋原線維において Z 帯に局在していることが免疫蛍光染色により示された。また筋再生の過程で、早期に細胞質に分散していた N-WASP は Z 帯が形成されるにつれて Z 帯に局在するようになった。この Z 帯への N-WASP の局在化は、N-WASP のプロリンに富む部位が Z 帯に入り込んでいる nebulin の C 末端の SH3 部位に結合することにより起こることが示された。また N-WASP による Arp2/3 複合体を介したアクチン重合は、nebulin の SH3 部位を含む断片により著しく促進された。

N-WASP と nebulin の *in vitro* および *in vivo* での結合は、IGF-I 刺激により誘導されることが pull-down アッセイと免疫共沈アッセイにより示された。IGF-I 刺激によって活性化される PI3K のシグナリングにより Akt/PKB が活性化される。Akt は GSK-3 $\beta$  をリン酸化して不活性化する。Nebulin の C 末端側には、GSK-3 $\beta$  によりリン酸化されるコンセンサス配列が存在しており、この配列に含まれるアミノ酸が実際に GSK-3 $\beta$  によりリン酸化された。これらのアミノ酸を非リン酸化アミノ酸に置換することにより、N-WASP の nebulin への結合は *in vitro* および *in vivo* で促進された。さらに筋再生過程および IGF による筋肥大の過程で、N-WASP ドミナントネガティブ変異体を発現させた筋線維は、

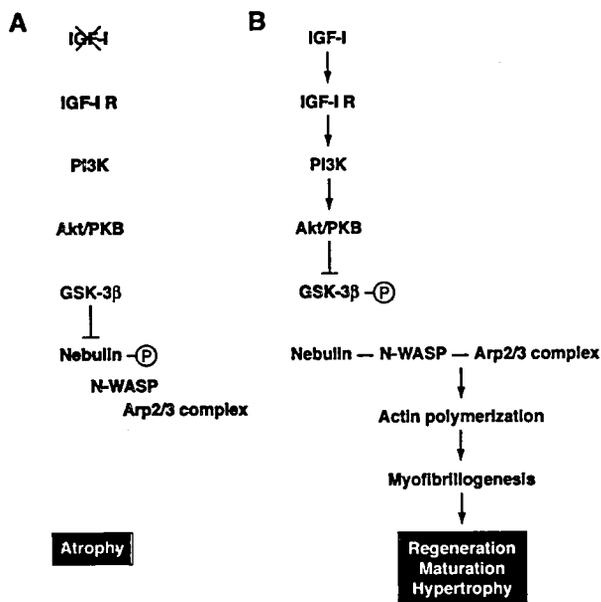


図3 IGF-Iによる筋再生、筋成熟、筋肥大における筋原線維形成のシグナル伝達経路。(A) IGF-Iがないと、GSK-3 $\beta$ がリン酸化されずに活性状態でいて、nebulinのC末端側をリン酸化する。リン酸化nebulinにはN-WASPは結合できず、N-WASPは活性化されない。そのためアクチン重合に基づく筋原線維形成は起こらず、骨格筋は萎縮する。(B) IGF-Iがあると、PI3Kが活性化される。PI3KシグナリングはAktを活性化し、さらにAktはGSK-3 $\beta$ をリン酸化して不活性化する。そのためnebulinのC末端側はリン酸化されず、N-WASPが結合して活性化される。N-WASPはArp2/3複合体を介してアクチン重合を引き起こし、筋再生、筋成熟、筋肥大における筋原線維形成を誘導する。

断面積が小さく成熟や肥大が抑制されていた。以上の結果から、IGF-Iによって誘導されるPI3Kシグナリングを介して、nebulinのC末端側のリン酸化が阻害されることにより、N-WASPはnebulinに結合して活性化され、筋原線維のアクチン線維形成がもたらされると考えられる。筋成熟や筋肥大には、このアクチン線維形成に基づく筋原線維形成が不可欠である(図3)。

#### 研究の意義

Msx1による脱分化細胞を移植することにより、筋ジストロフィーをはじめとした筋疾患の細胞治療への応

用が期待できる。実際に治療に用いる場合には、患者の骨格筋の一部にMsx1を導入し脱分化を起こす。その脱分化細胞を単離して、ジストロフィンなどの原因遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入し、安定に発現する細胞株を得る。これらの細胞を患者の骨格筋に移植することにより、細胞治療を行う。また脱分化細胞にIGF-I遺伝子を導入し、安定に発現する細胞株を得る。これらの細胞はドラッグデリバリーシステムとして患者に移植することにより、筋ジストロフィーやその他の筋萎縮を伴う疾患の再生治療に広く利用できる可能性が考えられる。

#### 文 献

- 1) Endo, T.: Reversal of terminally differentiated state in skeletal myocytes by SV40 large T antigen. In *Reactivation of the Cell Cycle in Terminally Differentiated Cells* (Crescenzi, M., ed.) Landes Bioscience, Georgetown, Texas pp. 63-75, 2002.
- 2) Abe, T., Kato, M., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T.: Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth. *J. Cell Sci* 116: 155-168, 2003.
- 3) Sun, P., Yamamoto, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T.: Small GTPase Rah/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation. *J. Biol. Chem* 278: 4063-4071, 2003.
- 4) Abe, T., Takano, K., Suzuki, A., Shimada, Y., Inagaki, M., Sato, N., Obinata, T., and Endo, T.: Myocyte differentiation generates nuclear invaginations traversed by myofibrils associating with sarcomeric protein mRNAs. *J. Cell Sci* 117: 6523-6534, 2004.
- 5) Kawamura, K., Takano, K., Suetsugu, S., Kurisu, S., Yamazaki, D., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T.: N-WASP and WAVE2 acting downstream of phosphatidylinositol 3-kinase are required for myogenic cell migration induced by hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem* 279: 54862-54871, 2004.

# ミオフィラメント動態制御因子の変異に起因する筋異常に関する研究 —コフィリンおよびC-蛋白質に焦点をおいて

大日方 昂\*

研究協力者 佐藤成樹\* 鈴木加奈子\*\* 宮内沙映子\*\*  
田中健太郎\*\* 花岡和則\*\*

## 目 的

ミオフィラメントの動態制御因子、即ち、筋原線維のアクチン線維やミオシン線維に結合してそれらの維持や動的変化に関わる因子は筋収縮装置の形成と維持に重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、主として、アクチン結合蛋白質であるコフィリン、ミオシン結合蛋白質であるC-蛋白質に着目して研究した。コフィリンはリン酸化・脱リン酸化やPIP<sub>2</sub>の結合などによる活性制御を受けながら、様々な細胞でアクチンの集合およびアクチン線維の動的な再編成を担うアクチン結合蛋白質である。例えば、精子形成でも重要な役割をもつ<sup>1)</sup>。我々は、これまで哺乳類には非筋組織に広く分布する非筋型コフィリンに加え、筋で顕著に発現する筋型コフィリン（以下MCFと略す）の存在を見出し、コフィリンの過剰が培養筋細胞のアクチンフィラメントの集合状態を異常にすること、コフィリン遺伝子欠損ES細胞を導入したキメラマウスに生ずるコフィリンを欠く筋組織に局所的な崩壊・再生状態が生じ、筋原線維を損傷した筋細胞が出現することを報告した。一方、C-蛋白質は横紋筋に特異的なミオシン結合蛋白質で、ミオシンのフィラメント形成に関わるが、コネクチンやアクチンとも結合し、ミオシンフィラメントをサルコメア内で正しく配置させる上でも重要な役割を果たす。しかし、C-蛋白質の分子の機能ドメイン、分子機能はまだ未解明の点が多い。

本研究では、特にこれらの蛋白質が筋原線維の形成と維持にどう関わるか、その分子機構を明らかにしつつ、これらの変異や欠失が筋原線維にどのような障害をもたらすかを探り、これらの変異に起因する筋疾患の可能性を探求することを目的とした。

## 方法と結果

### 1. コフィリンの欠損が筋原線維形成に及ぼす影響について

1) マウスのMCF欠損筋における筋収縮構造の変化の解析：既報告のように、MCF遺伝子の蛋白質コード域をLacZで置き換えたMCF欠損ES細胞(MCF<sup>-/-</sup>細胞)をマウス胚(胚盤胞)に注入して発生させ、MCF<sup>-/-</sup>筋

細胞をもつキメラマウスを作成した。肢部の筋の凍結横断および長軸切片を作成、MCF<sup>-/-</sup>細胞に由来しMCFの発現量が減少した骨格筋をLacZの産物であるβガラクトシダーゼ(以下β-gal)に対する抗体で染色して個別細胞レベルでMCFの欠損あるいはMCFの発現量低下を顕在化し、その細胞の形態変化、特に長軸切片組織像においてその細胞におけるサルコメア蛋白質の局在パターンの変動を観察した。ミオシンを指標とした観察で、β-galが強く発現している細胞(MCFが大きく減少している細胞)では横紋不全が顕著にみられ、筋収縮装置に大きなダメージが生じていることが見られた。β-galが弱く発現している細胞では横紋構造がみられた。コフィリン欠損は、まずアクチン線維系の変化を導くと思われるが、生体内では長い時間を経るとサルコメア全体に影響がおよぶと考えられる。

2) コフィリンとADFのリン酸化型、脱リン酸化型の定量解析：幼若筋にはコフィリン類似蛋白質であるADFが存在するので、この蛋白質の関与も検討する必要がある。そこで培養筋細胞から抽出した蛋白質を2次元電気泳動で展開して、抗コフィリン抗体および抗ADF抗体によりそれぞれの脱リン酸化型、脱リン酸化型を検出、デンストメトリーにより、それらの量的なバランスおよび脱リン酸化型(活性型)とリン酸化型(不活性型)としてどの程度に存在するかを調べた。その結果、培養初期にはADFが主であるが、筋管細胞の発達とともにコフィリンの発現が上昇し、また活性のある脱リン酸化コフィ

ミスセンスオリゴ導入

アンチセンスオリゴ導入

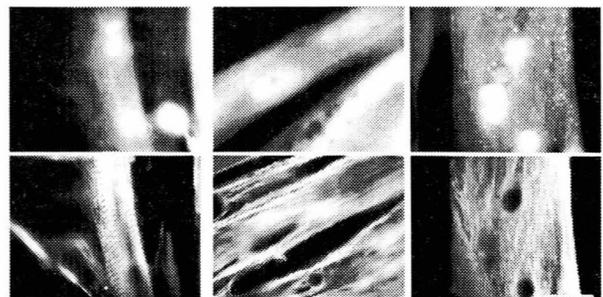


図1 アンチセンスオリゴヌクレオチドによるコフィリンの発現抑制による筋原線維形成の抑制。培養3日目の筋管細胞にアンチセンスオリゴまたはミスセンスオリゴ(対照)を導入し、更に培養3日後にアクチンの筋原線維への集合状態を抗アクチン抗体で検出した。

\* 千葉大学理学部生物学科

\*\* 北里大学理学部分子発生学講座

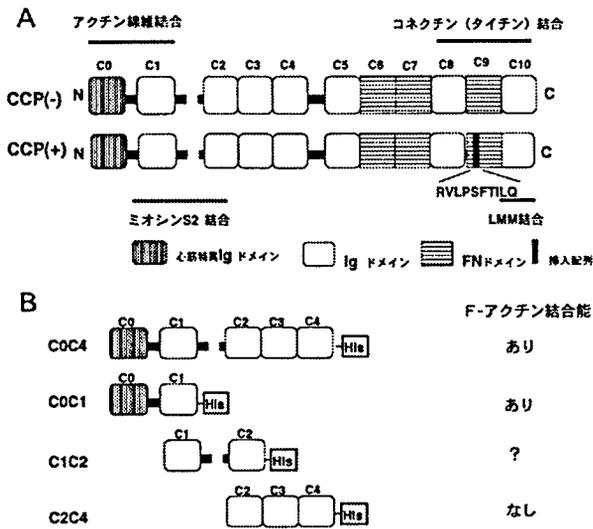


図2 A: マウス心筋C-蛋白質の分子構造と機能ドメイン。C端に10アミノ酸の挿入あり、なしの2つの変異体(CCP(-), CCP(+))があり、いずれもC端にアクチン結合部位がある。B: 大腸菌発現系で作成した組み替えタンパク質断片のF-アクチンとの結合能

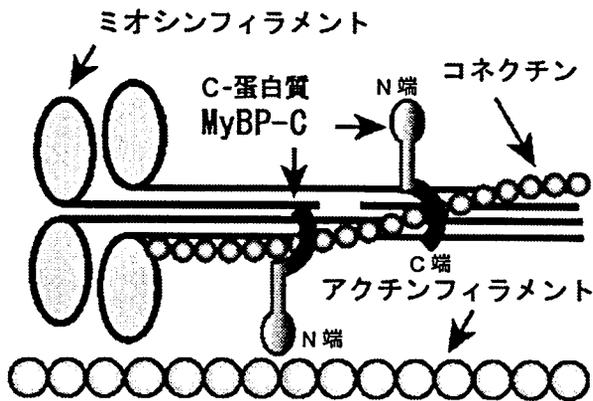


図3 C-蛋白質 (MyBP-C) の分子構造と筋原線維における局在のイメージ。N端でアクチン線維に結合し、C端でミオシン、コネクチンに結合する。

リンが主要となることが認められた。次に、筋細胞においてはどちらがより優位にアクチン線維に作用するかを比較検定するために、精製された組み替え体コフィリンおよび ADF を培養骨格筋細胞にそれぞれの内在蛋白質の約 10 倍程度まで注入し、アクチン線維に与える影響を比較検討した。コフィリン注入の場合には、速やかなアクチン線維の崩壊、アクチン・コフィリンロッドの形成、およびアクチン線維からのトロポミオシンの離脱が見られたが、ADF 注入の場合にはそのようなアクチン線維系のダメージは顕著には生じなかった。従って、筋細胞ではコフィリンがより強くアクチン動態に関与し、ADF が存在してもその役割は少ないと結論された。

3) アンチセンス法によるコフィリンの発現抑制と筋原線維への影響: コフィリンの筋原線維形成への影響をより明確に調べるために、ニワトリ初代培養骨格筋細胞で、アンチセンス法によりコフィリンの発現抑制を試みた。

コフィリンの翻訳開始領域から 25 塩基に対するアンチセンスモリフォルノオリゴヌクレオチド (以下アンチセンスオリゴ) および対照としてミスセンスモリフォルノオリゴ (開始コドン及び第 3, 6, 8 コドンに変異) を 1 mM の濃度でニワトリ初代培養骨格筋細胞 (培養 3 日目) にマイクロインジェクションにより投与した。細胞内の、アクチン集合は横紋筋アクチン特異抗体 SkA-06 を用いて解析した。アンチセンスオリゴを投与された培養骨格筋細胞について、投与後 2 日, 3 日目に、抗コフィリン抗体 (MAB-22) で間接蛍光抗体染色し、コフィリンの発現の量的な変化を蛍光測定により解析したところ、コフィリン量が有意に減少する事が認められた。細胞が DMSO 処理されるとコフィリンは核内に移行して特徴的なロッド構造を作ることを利用すると、高感度でコフィリンが検出される。アンチセンスオリゴを導入された培養筋細胞では DMSO 処理による核内ロッドが見られず、コフィリン量の顕著な減少が導かれたことが確認された。また、蛋白質合成阻害剤を投与されたコフィリンの消長から、コフィリンの代謝回転はかなり速いことが確認されており、コフィリンの発現を阻害された筋細胞においては、コフィリンが迅速に量を減少するとみなされる。アンチセンスオリゴ導入後、1 日, 2 日, 3 日後の時点で、アクチンの線維形成、横紋構造への構築の状況を調べたところ、無処理あるいはミスセンスオリゴ導入の培養筋細胞ではアクチンが明瞭な横紋構造に組み込まれるのに対して、アンチセンスオリゴ導入でコフィリン量が減少した筋細胞の多くはアクチンが不規則な集合物や太い線維状構造を形成し、横紋への構築はほとんど見られず、筋原線維形成が異常な状態となるのが観察された。アクチン線維を生細胞で可視化できるプローブ (蛍光標識したモエシンの C 端断片) を細胞に導入して、ミスセンスオリゴ導入後のアクチン集合の経過を同一細胞で数日間追跡し、不規則なアクチン線維の束化形成を確認した。このようにコフィリンの筋原線維形成における不可欠の重要性が実証された。しかし、ミオシンの集合に大きな影響は認められなかった。コフィリン欠損は、初期にはアクチンの集合に大きな影響を与えるものの、短期的には筋原線維におけるミオシンの局在までその影響が及ぶわけではないと考えられる。

## 2. C-蛋白質の分子構造及びその変異が及ぼす影響について

マウス心筋では単一遺伝子由来で C-端側のミオシン結合・コネクチン結合に関わる領域に 10 アミノ酸の挿入の有無で異なり、機能的に違いのある 2 つの C-蛋白質変異体が生じ、挿入をもつ機能的に脆弱なタイプが心筋の老化に伴い発現上昇することを明らかにした<sup>2)</sup>。一方、C-蛋白質のアクチンへの結合も筋原線維の構造、機能の制御に関わることが想定されているが、詳細は不明であり、また C-蛋白質分子におけるアクチン結合部位も十分明らかになっていない。そこで、トリ心筋 C-蛋白質

cDNA の操作により、C-蛋白質の断片蛋白質を大腸菌発現系で作成して、アクチンとの結合をF-アクチンとの共沈法で、およびアクチン・ミオシン相互作用への効果をアクトミオシン ATP アーゼ測定により解析した。その結果、N-端側の4つの Ig ドメインを含むドメイン C0-C4 フラグメント (MW 約 95 kDa) がアクチン線維への結合能をもつこと、その結合はアクチン線維がトロポニン・トロポミオシンをもつ、もたないにより大きな影響をうけないこと、この C0-C4 フラグメントはアクチン・ミオシン相互作用に抑制的に作用すること、しかしトロポニン・トロポミオシンの存在により抑制が解除されることなどを見いだした。さらに小断片の組み替え蛋白質を作成して検討の結果、C-蛋白質の主要アクチン結合部位はN-端に近い C0-C1 に存在することを確かめた。

### 考 察

コフィリンはアクチン線維の筋原線維への構築と維持に極めて重要であることが明らかになった。その欠損(機能不全)は当初、アクチン線維のに大きな影響を与え、時間を経て筋原線維全体の障害を導くと推測される。分化途上の筋にはコフィリンの類似蛋白質 ADF が存在するが、コフィリンが主たる役割をもつと考えられる。一方、分子量約 14 万の C-蛋白質はC-端側でミオシン線維、コネクチン線維に結合しつつ、N-端側でアクチン線維と相互作用して、筋原線維構造の支持や収縮運動調節に関与することが想定される。C-蛋白質分子のN-端側における変異もまた筋原線維の構造と機能に変化をもたらし、疾患の一因となる可能性を秘めている。なお、本

研究期間内に筋原線維 Z 線に局在するアクチン結合タンパク質 CapZ ( $\beta$  アクチニン) に結合して機能抑制する蛋白質を明らかにしたことを付記する<sup>3)</sup>。更に検討されるべき蛋白質と考えられる。

### 今後の展望

本研究では、コフィリンおよびC-蛋白質に焦点をおいて、分子機能および筋原線維の構築と維持における重要性を明らかにした。これらミオフィラメント動態制御因子の変異は、骨格筋異常の一因となることが推定される。本研究の範囲では、筋疾患との関わりまで具体的に検討するに至らなかったが、本研究の成果が基盤的情報として寄与できることを願っている。

### 文 献

- 1) Guttman JA, Obinata T, Shima J, Griswold M and Vogl AW : Non-muscle cofilin is a component of tubulobulbar complexes in the testis. *Biol Reprod* 70: 805-812, 2004.
- 2) Sato N, Kawakami T, Nakayama A, Suzuki H, Kasahara H and Obinata T. : A novel variant of cardiac myosin-binding protein-C (MyBP-C/C-protein) that is unable to assemble into sarcomeres is expressed in the aged mouse atrium. *Mol Biol Cell* 14(8): 3180-3191, 2003.
- 3) Taoka M, Ichimura T, Wakamiya-Tsuruta A, Kubota Y, Araki T, Obinata T and Isobe T : V-1, a protein expressed transiently during murine cerebellar development, regulates actin polymerization via interaction with capping protein. *J Biol Chem* 278: 5864-5870, 2003.

# 筋肉形成におけるマイオスタチンの役割

野地 澄 晴\*

研究協力者 西 真 寿 美\*\* 泰 江 章 博\*\* 森 山 啓 司\*\*  
板 倉 光 夫\*\*\* 土 田 邦 博\*\*\*\* 中 谷 直 史\*\*\*\*  
杉 野 弘\*\*\*\* 西 松 伸 一 郎\*\*\*\*\* 濃 野 勉\*\*\*\*\*

## 目 的

ヒトの筋肉の量は通常一定に保たれているが、刺激などによりその量は増減するので、筋肉の量を調節するメカニズムが存在する。これまでの研究から、IGF (insulin-like growth factor) が筋肉の量を正に調節する増殖因子として働き、一方、マイオスタチン (GDF8) が負に調節する因子であることが知られており、マイオスタチンのノックアウトマウスにおいては、筋肉の形成が促進されることが報告されている<sup>1)</sup>。そこで、分担者らは筋ジストロフィーなどの疾患の治療に、マイオスタチンの誘導体を使用できるかどうかを検討した。まず、肉牛において発見された点突然変異マイオスタチンに着目し、同じ突然変異を持つマイオスタチンを発現するトランスジェニックマウスを作製し、筋肉の変化を解析してきた。その結果、骨格筋量が野生型同腹仔に比べ約2倍増加し、その原因は筋線維数の増加であることがわかった<sup>2)</sup>。本分担研究においては、マイオスタチンのレセプターとシグナルカスケードについて解析を行い、さらにマイオスタチンがアクチビンに近縁の TGF- $\beta$ ファミリー細胞増殖因子であることに着目し、マイオスタチンの天然由来の阻害タンパク質の探索および人工タンパク質の開発を行い、マイオスタチンを利用した治療法を検討した。

## 方法と結果

マイオスタチンのシグナルカスケードの解析を行なった。TGF- $\beta$ ファミリーのシグナル伝達にはI型、II型レセプターの両者が必要である。マイオスタチンのII型レセプターとして activin type II receptor (ActR II B) がすでに報告されているので、I型レセプターに着目し研究を行った。また、マイオスタチンによる筋分化に対する制御を、Muscle Creatin Kinase (MCK)プロモーターの活性化を指標として解析した。細胞膜上に Act R II B を発現する 293 細胞に、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に CAGA プロモーターと TGF- $\beta$  I 型レセプ

ターである ALK (activin receptor-like kinase) 1 $\cdot$ 7 のそれぞれを連結したプラスミドを導入し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーターの転写活性を比較した。その結果 ALK5 存在下でマイオスタチンにより活性が上昇した。しかし、突然変異体の場合は、活性化が阻害された。解析の結果、マイオスタチンはまず ActR II B に結合し、さらにそこに ALK5 が結合することによって ALK5 が Act R II B によってリン酸化を受け、その結果、細胞内のシグナル分子である Smad3 を活性化させ、シグナルを伝達させていることが分かった。活性化された Smad3 は骨格筋細胞の分化因子である MyoD の作用を阻害することにより、骨格筋の分化を抑制することがわかった。マイオスタチン突然変異体は、ドミナントネガティブ型のリガンドとして働き、正常なシグナルが細胞内に伝達されることを阻害することがわかった。次に、マイオスタチン結合タンパク質について調べた。ヒトおよびマウスの血清において、フォリスタチン・ファミリー (フォリスタチンおよび FLRG) の主要な血清中の結合分子はマイオスタチンであることを明らかにした。また、DMD, BMD, FSHD などの種々の筋ジストロフィー患者の血清を、マイオスタチン抗体で免疫沈降し共沈する FLRG を western blotting で検出した。さらに、フォリスタチンをシースとした探索研究を行い、アクチビンへの親和性が低下し、マイオスタチンにより特異的なタンパク質分子 (FS1-1) の構築にも成功した。そこで、この分子の機能解析のために、MLC (ミオシン軽鎖) プロモーターの下流に cDNA を組み込み、骨格筋特異的トランスジェニックマウスを作製した。得られた数系統のラインにおいて、組織学的な解析から、骨格筋は正常な形態を保ったまま、2倍程度肥大した。フォリスタチン・ファミリーおよび独自に開発したタンパク分子が生体内でマイオスタチンの阻害タンパク質として作用することがわかった。マウス胚における FLRG とマイオスタチンの mRNA の局在を解析した。また、FLRG に対するモノクローナル抗体を用いて抗体染色を行なった。胚では FLRG は骨格筋の遅筋に特異的に発現し、マイオスタチンと局在を共にしていることがわかった。

\* 徳島大学工学部生物工学科

\*\* 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

\*\*\* 徳島大学ゲノム機能研究センター

\*\*\*\* 徳島大学分子酵素センター

\*\*\*\*\* 川崎医科大学分子生物学教室

### 今後の展望

マイオスタチンに突然変異をもつヒトについての報告があり、そのヒトは筋肉が増大している以外は健康であることが報告されている<sup>3)</sup>。従って、われわれの研究から、ドミナントネガティブ型のマイオスタチンやホリスタチン誘導蛋白質を用いて、筋ジストロフィーなどの疾患の治療を行なえる可能性が示唆された(図1)。

### 文 献

- 1) 泰江章博, 西松伸一郎, 濃野 勉, 森山啓司, 野地澄晴, 骨格筋形成におけるマイオスタチンの役割, 生体の科学, 52:256-260, 2001.
- 2) Nishi M, Noji S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 293:247-51, 2002.
- 3) Schuelke M, et al.: N. Engl. J. Med. 350:2682-2688, 2004.

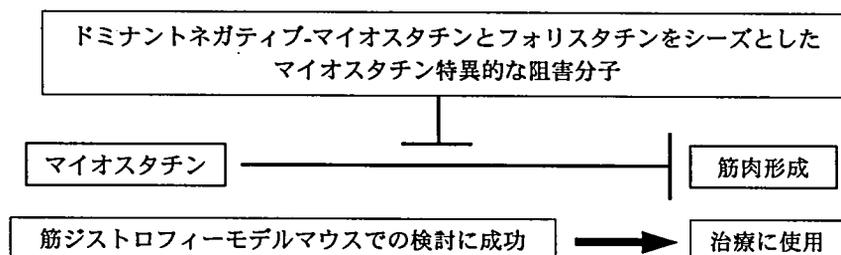


図1 ドミナントネガティブ-マイオスタチンとフォリスタチンをシースとしたマイオスタチン特異的な阻害分子による筋肉形成の促進

# 筋細胞特異的に必須な役割を果たしているインテグリン-ILK-affixin 系シグナル伝達の研究

鈴木 厚\*

研究協力者 山路 聡\*\* 三島 渉\*\*  
松田 知栄\*\*\* 林 由起子\*\*\*\*

## 目 的

筋細胞の筋原線維と基底膜を連結する分子装置としては Integrin 系、および Dystroglycan 系が知られており、これらいずれの欠損も筋ジストロフィーの発症に結びつくことがこれまでに明らかとされてきている。本研究では、integrin-ILK-affixin からなる新規の integrin シグナル伝達系の基礎的解明を、まず非筋細胞で、そして最終的には筋肉細胞で進めることにより筋ジストロフィー発症機構に関する基礎的研究の推進をめざした。

## 方法と結果

① 我々はすでに ILK-affixin 系を介した integrin シグナルが非筋細胞の伸展初期に決定的に重要な役割を果たしていることを明らかとさせてきている (Yamaji et al. J.C.B. 153: 1251-1264, 2001)。このシグナル系の実態を明らかとするために、活性型 affixin 変異体 (N 末端断片: 以下, RP1) の細胞伸展活性への影響を培養上皮細胞 (MDCK 細胞) を用いて詳細に解析した。RP1 を高発現した MDCK 細胞は上皮様のコンパクトな形態を消失し、葉状突起をいくつも伸ばした線維芽細胞様の形態となるが、その変化は, Rac1 および、その活性化因子の一つ,  $\alpha$ Pix それぞれの優性抑制変異体の発現によって顕著に抑制された。 $\alpha$ Pix は affixin の RP-1 領域に結合すること、また、RP1 高発現細胞においては Rac1, Cdc42 が活性化 (Rho は変化なし) ことも示された。以上の結果から、affixin の下流では  $\alpha$ Pix を通じて Rac1/Cdc42 の活性化が起こり、そのことによって actin の重合、葉状突起の形成が進むと考えられた<sup>(1)</sup>。実際の細胞内では Integrin からの刺激を受けて活性化した ILK<sup>(2)</sup>が affixin の RP2 領域をリン酸化し、そのことによって RP1 が開放され以下にシグナルが伝わるとされる (図 1)。

② 一方、affixin を bait としてさらに結合タンパク質を検索したところ  $\alpha$ -actinin が同定され、さらに内在性にもこれらが基質接着依存的に結合することがわかった。したがって、affixin は integrin 刺激に応じて  $\alpha$ Pix とともに  $\alpha$ -actinin とともに結合し、これら両者との結合を介して相乗的にアクチン重合を促進するものと思われる (図 1)。

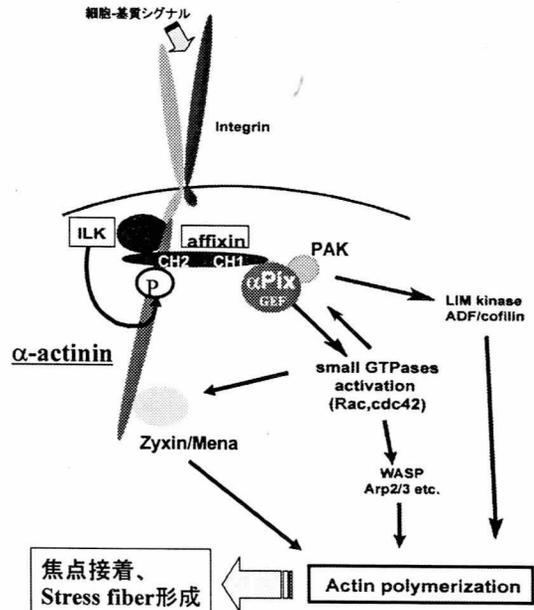


図 1 本研究によって明らかとなった、非筋細胞における integrin-ILK-affixin シグナル系の分子機構 (詳細は本文参照)

③ 一方、RNAi 法を利用して affixin をヒト線維芽細胞においてノックダウンすることに成功しこれまで優性抑制変異体を使って示してきた基質接着における affixin の重要性をさらに確認した。また、筋肉における integrin-ILK-affixin 系の役割を研究する第一歩として、培養筋芽細胞, C2C12 においても affixin ノックダウンの効果を検討し、affixin の発現低下が sarcomeric myosinII, myogenin などの筋分化マーカーの発現誘導の遅れを引き起こすことを明らかとすることができた (図 2)。Affixin は、分化した筋管細胞に見られる発達した焦点接着様の構造において強く ILK と共局在していることも明らかとなり (図 3)、こうした構造において筋原線維構造の発達に寄与している可能性が強く示唆された。

## 考 察

ILK, affixin はヒト骨格筋において筋質膜、特に Z 膜と接するコストメアに濃縮していることをすでに我々は明らかとしている。線虫, ショウジョウバエの affixin, ILK のホモログは、integrin とともに筋原線維の発達、筋細胞

\* 横浜市立大学大学院医学研究科 分子細胞生物学教室  
\*\* 同 病態免疫制御内科学教室  
\*\*\* 独立行政法人, 産業技術総合研究所, 神経情報研究部門  
\*\*\*\* 国立精神神経センター, 神経研究所, 疾病研究第一部

## 研究の意義

本研究は、筋ジストロフィーの病態やその発症メカニズム、さらには治療を直接の対象として正面からその解明を目指すものではない。しかし、それらの研究のために必要な土台を築くという意味で意義がある。実際、本研究班を通じた林、松田両博士との共同研究により、affixin が肢帯性筋ジストロフィーの一種、LGMD2B や三好型筋ジストロフィーの原因遺伝子産物、dysferlin と形質膜で結合し、かつ患者筋においては dysferlin とともに強くその局在が乱されていることが明らかとなった。本研究は、これら筋疾患の研究に直接深く関わる可能性もあり、その点でも今後なお一層研究を進める意義があると考えられる。

## 文 献

- 1) Mishima W, **A. Suzuki**, S. Yamaji, R. Yoshimi, A. Ueda, T. Kaneko, J. Tanaka, Y. Miwa, S. Ohno, and Y. Ishigatsubo. The first CH domain of affixin activates Cdc42 and Rac1 through  $\alpha$  PIX, a Cdc42/Rac1-specific guanine nucleotide exchanging factor. *Genes to Cells* 9 : 193-204, 2004.
- 2) Yamaji, S., **A. Suzuki**, H. Kanamori, W. Mishima, M. Takabayashi, K. Fujimaki, N. Tomita, S. Fujisawa, S. Ohno, and Y. Ishigatsubo. Possible role of ILK-affixin complex in integrin-cytoskeleton linkage during platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 1324-1331, 2002.
- 3) Yamaji, S. **A. Suzuki**, H. Kanamori, W. Mishima, R. Yoshimi, H. Takasaki, M. Takabayashi, K. Fujimaki, S. Fujisawa, S. Ohno, Y. Ishigatsubo. Affixin interacts with a-actinin and mediates integrin signaling for reorganization of F-actin induced by initial cell-substrate interaction. *J. Cell. Biol* 165: 539-551, 2004.

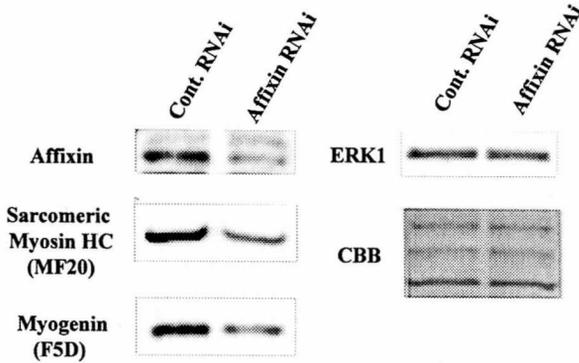


図2 affixin ノックダウンによる C2C12 筋芽細胞の分化抑制。図は ITS による分化誘導 3 日目の結果を示している。

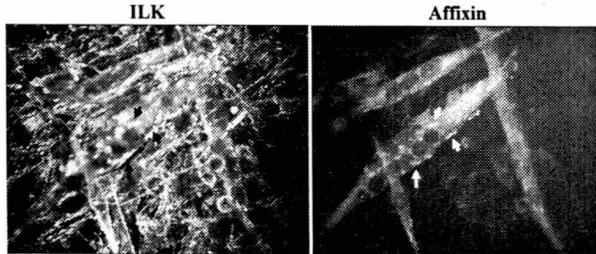


図3 分化誘導 3 日目の C2C12 における ILK(左), および affixin (右) の細胞内局在。Affixin は、分化した筋管細胞で見られる発達した焦点接着様構造においてのみ ILK と共局在していることがわかる (矢印)。

の成熟に必要な役割を果たしていることが遺伝的にわかっている。これらの結果は、本シグナル系がヒト骨格筋の発生においても必要な役割を果たしている可能性を強く示している。非筋細胞を用いて詳細に進めてきた解析結果は、今後筋細胞におけるこの基質接着系の働きを明らかとしていく上で重要な基礎となるはずである。筋細胞における解析はまだ緒についたばかりであるが、培養筋芽細胞を用いた予備的実験では、予想通り affixin が骨格筋の発生、成熟に必須である可能性を強く示唆する結果が得られた。この三年間の成果を基礎に研究をさらに展開することによって、ヒト骨格筋の形成、維持の基礎的メカニズムに迫れるものと確信している。

# 筋分化・筋形成と Six 遺伝子とのかかわり

川上 潔\*

研究協力者 尾崎 秀徳\* 池田 啓子\*

## 緒言

Six 遺伝子群は保存領域として Six ドメインとホメオドメインを有するホメオボックス遺伝子ファミリーでありヒト及びマウスでは *Six1* から *Six6* の 6 種類が存在する。*SIX5* は筋緊張性ジストロフィーの病態の一部、白内障や性腺異常をにやうことが遺伝子欠損マウスの解析から明らかとなっている。ショウジョウバエや、線虫においては *SIX5* ホモログである *D-Six4* や *Ceh-35* 遺伝子の変異体 (Kirby et al, 2001, Yanowitz et al, 2004) で、骨格筋融合や、筋細胞の分化に異常が見られ、*SIX5* ホモログの骨格筋形成への関与がしめされてきた。一方マウスでは、*Six1*、*Six4* および *Six5* は体節や筋芽細胞、骨格筋細胞に発現し、骨格筋の分化・増殖の制御を行うと考えられてきたが、生体内での実証はなされていなかった。私たちは、*Six4* 遺伝子欠損マウスの作成解析を行ったが、骨格筋細胞の分化や増殖には影響が見られなかった (Ozaki et al, 2001)。また、*Six4* 欠損マウスにおいても骨格筋細胞の分化や増殖には異常がみられず、*Six1* との機能重複が示唆されていた。私たちは *Six1* 遺伝子欠損マウス及び *Six1/Six4* 遺伝子欠損マウスを作成することで、両遺伝子が骨格筋の形成に重要な役割を果たすことを見いだした。

## 方法

*Six1* タンパク質のコード領域に EGFP 遺伝子を挿入することで *Six1* 遺伝子欠損 ES 細胞を作成し、キメラマウスを経て *Six1* 欠損マウスを作成した (Ozaki et al. 2004)。また、*Six1/Six4* 二重欠損マウスは *Six4* 遺伝子欠損 ES 細胞 (Ozaki et al. 2001) に *Six1* を標的遺伝子組み換えすることで作成した。*Six1* 遺伝子の欠損は PCR、サザン法にて確認し、*Six1* 遺伝子の発現についてはノザン法および、in situ ハイブリダイゼーションによって欠損マウスでの消失を確認した。

## 結果

*Six1* 欠損マウスでは野生型に比べ、胴部の脊椎周囲の骨格筋の低形成がみられ、体壁の骨格筋層も薄くなっていた。*Six1/Six4* 二重欠損マウスでは、胴・頸部ともに脊椎の周囲の骨格筋が低形成となり、体壁の骨格筋は著しく減少していた。また、四肢の骨格筋は全く観察されなかった。脊椎周囲の筋肉の筋繊維密度は約半分くらいに

低下し、筋繊維の太さはやや増加し本数が減少傾向がみられたが、有意な差があるとは認められなかった。

筋肉量の低下の原因を探るために、*Myogenin* 遺伝子の発現を 10.5 日胚で調べたところ、*Six1* 欠損マウスでは、その発現パターンがほとんど変化していないのに対し、*Six1/Six4* 二重変異においては、*Myogenin* の発現は大きく低下しており、このことが筋分化の異常の原因の一つであると考えられた。

## 考察

*Six* 遺伝子群は、構造上の類縁関係から *Six1/2*、*Six3/6*、*Six4/5* の 3 つのサブファミリーからなる。ショウジョウバエや線虫では *Six4/5* サブファミリーが骨格筋の分化や形成に必須であるが、この機能はマウスでは主に *Six1* と *Six4* によって担われている。

## 結論

マウスの発生過程において体節での発現が見られた *Six1* 及び *Six4* は骨格筋の分化と形成に重要な機能をはたしており、少なくとも *Myogenin* の発現を生体内で調節していることがその機能の一つである。

## 参考文献

- 1) Kirby, R. J., Hamilton, G. M., Finnegan, D. J., Johnson, K. J. and Jarman, A. P. Drosophila homolog of the myotonic dystrophy-associated gene, SIX5, is required for muscle and gonad development. *Curr. Biol* 11: 1044-1049, 2001.
- 2) Yanowitz, J. L., Shakir, M. A., Hedgecock, E., Hutter, H., Fire, A. Z. and Lundquist, E. A UNC-39, the *C. elegans* homolog of the human myotonic dystrophy-associated homeodomain protein Six5, regulates cell motility and differentiation. *Dev. Biol* 272: 389-402, 2004.
- 3) Ozaki, H., Watanabe, Y., Takahashi, K., Kitamura, K., Tanaka, A., Urase, K., Momoi, T., Sudo, K., Sakagami, J., Asano, M., Iwakura, Y. and Kawakami, K. Six4, a putative myogenin gene regulator, is not essential for mouse embryonal development. *Mol. Cell. Biol* 21: 3343-3350, 2001.
- 4) Ozaki, H., Nakamura, K., Funahashi, J., Ikeda, K., Yamada, G., Tokano, H., Okamura, H., Kitamura, K., Muto, S., Kotaki, H., Horai, T., Sudo, K., Iwakura, Y., and Kawakami, K. Six1 controls patterning of the mouse otic vesicle. *Development* 131: 551-562, 2004.

\* 自治医科大学分子病態治療研究センター細胞生物研究部

# SIX5 の標的分子と筋緊張性ジストロフィーの関わり

川 上 潔\*

研究協力者 佐 藤 滋\*

## 緒 言

DM1はDMPK遺伝子下流のCTGリピートの伸長が原因で起こる全身性疾患である。リピート伸長がDM1の病態に関与する機構は、伸長したCUGを含むRNAの核内への蓄積によるドミナントネガティブ効果とCTGリピート周辺の遺伝子、DMWD、DMPK及びSIX5の発現低下によるLoss of functionの効果の両方が原因と考えられている。Six5遺伝子欠損マウスの表現型からはSIX5遺伝子の発現低下がDM1の一部の症状（白内障や性腺機能低下症）に関与していると示唆された。本研究ではDM1の性腺機能低下症の発症におけるSIX5遺伝子の関与を明確にすることを目的に、ヒト顆粒膜細胞でのSIX5タンパク質の標的遺伝子の同定を試みた。

## 方 法

Six5 タンパク質の標的遺伝子群を同定する方法を開発した (Sato et al., 2002)。VP16 タンパク質の強力な転写活性化ドメインを融合させた野生型 Six5 タンパク質 (VP16-Six5)、及び特異的 DNA 結合能を欠く変異型 Six5 タンパク質 (VP16-Six5W241R) をウイルスベクターに組み込み、顆粒膜細胞株に感染させ、野生型融合タンパク質で特異的に誘導され、変異型タンパク質では誘導されない遺伝子群をマイクロアレイを用いてスクリーニングした。用いた細胞株は子宮癌 (顆粒膜細胞腫) より樹立されたヒト顆粒膜細胞株 KGN (Nishi et al., 2001) である。用いたアレイは Agilent 社製 Human 1 マイクロアレイ (12,814 クローン, 97%がマップされたヒト遺伝子に対応) である。アデノウイルスベクターを KGN 細胞に感染させ、24 時間後に RNA を抽出、Cy3 と Cy5 標識の cDNA プローブを合成した。マイクロアレイに対する競合ハイブリダイゼーションを行い、野生型と変異型とで 2 倍以上発現レベルが異なる遺伝子を標的候補として同定した。

## 結 果

アレイ上にスポットされた12,814遺伝子の内の2.4%, 310遺伝子が標的候補として同定できた。不妊症や遺伝子欠損マウスの表現型から卵胞の形成や機能に関与することが強く示唆される以下の5遺伝子が含まれていた。

1) *CYP19A1*: アロマトラーゼ。遺伝子欠損マウスのメスは卵胞形成不全のため不妊, オスも進行性の精子形成不全。

2) *ESR1*: エストロゲン受容体  $\alpha$  (*ER $\alpha$* )。遺伝子欠損マウスは両性ともに不妊。

3) *NR1P1*: *ER $\alpha$*  のコリプレッサー。遺伝子欠損マウスのメスは排卵異常, さらに妊娠を維持できないため不妊。

4) *GATA4*: 転写因子。Gata4<sup>ki</sup> マウスでは性腺形成が初期段階でブロックされる。

5) *BDNF*: ニューロトロフィン。BDNF 阻害抗体は卵原細胞の生存率を低下させ, 受容体の TrkB 欠損マウスは卵胞を形成しない。

また, ジスフェルリンやジストロブレビン, 白内障の原因遺伝子 ( $\alpha$ B クリスタリン, キヌレニン・モノオキシゲナーゼ) も標的候補として同定された。

## 考 察

スクリーニングの結果, 性腺機能低下症と関連があると考えられる遺伝子 (標的候補) が複数同定された。性腺の形成や機能にはステロイドホルモンが深く関わっているが, 今回 SIX5 の標的候補として, その代謝や作用を制御する複数の遺伝子が同定された。さらに性腺の発生に重要な役割を果たす転写因子やシグナル分子の遺伝子も含まれていた。Six5 の卵巣周辺での主要な発現部位は顆粒膜細胞であり, そこでの Six5 の発現低下がこうした遺伝子の発現レベルを局所的に変動させ, 卵胞の形成や機能を低下させるという機序が示唆され, 非常に興味深い。今後, Six5 遺伝子欠損マウスでこれらの標的遺伝子群が発現異常を起こしているかどうかを検証し, 性腺機能低下症との関連を明確にする必要があると考える。

## 結 論

顆粒膜細胞において, SIX5 タンパク質によって制御される遺伝子群の候補を 310 同定した。これらの中には, 性腺機能低下症や不妊との因果関係が示されている遺伝子が含まれており, それ以外にも性腺の形成や機能に関係する可能性の高い遺伝子群が多く含まれていた。

## 参考文献

- 1) Sato, S., Nakamura, M., Cho, D. H., Tapscott, S. J., Ozaki, H. and Kawakami, K. Identification of transcriptional targets for Six5: Implication for the pathogenesis of myotonic dystrophy type 1. Hum. Molec. Genet 11: 1045-1058, 2002.

\* 自治医科大学分子病態治療研究センター細胞生物研究部

2) Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M, Nawata H. Establishment and

characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 142: 437-45, 2001.

# Dystroglycan 結合蛋白質 MAGI-1 の生理機能の研究

二宮 治明\*

研究協力者 細川 浩\*

## 緒言

MAGI-1 (MAGUK with an inverted arrangement of protein-protein interaction domains-1) はその WW domain を介してβ-DG に結合する。培養細胞での発現系において、MAGI-1 はその PDZ domain を介してβ-catenin と結合し、TCF/LEF-1 を活性化させた、また、mdx マウス、ヒト DMD 骨格筋の形質膜では、抗 MAGI-1/抗β-catenin のいずれの染色性も増強しており、その増強は再生線維で特に顕著だった。これらの結果から「β-DG/MAGI-1/β-catenin /Tcf シグナル伝達系が骨格筋の再生に必要である」という仮説を提唱した(図 1)。われわれの目的は、マウスモデルを用いてこの仮説を検証することである。

## 方法

- ① MAGI-1 ノックアウトマウスを作製し、mdx マウスと交配して筋再生に対する効果を検討する。
- ② MAGI-1 に対する dominant-negative construct を発現する transgenic mouse を作製し、これと mdx マウスと交配して、筋再生に対する効果を検討する。

## 結果

### ① MAGI-1 ノックアウトマウスの表現型

MAGI-1 ノックアウトマウスは胎生致死であり、遅くとも E10 までに死亡した。E12 ヘテロ胎児の whole mount X-gal 染色 (LacZ が MAGI-1 promoter でドライブされている) では全身の皮膚での発現を認めた。組織切片の X-gal 染色、抗 MAGI-1 染色の結果、MAGI-1 は心筋、脳脊髄の他、皮膚、舌の表皮および消化管上皮に強

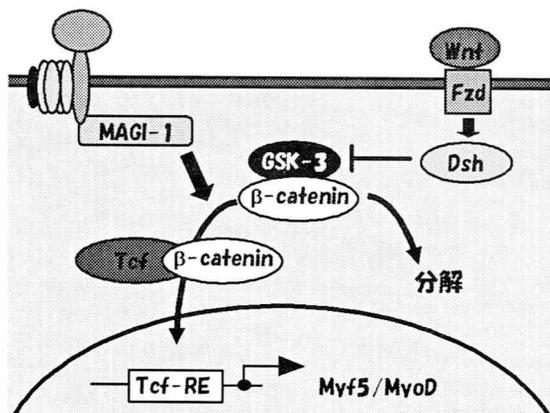


図 1 筋再生における MAGI-1 の役割についての作業仮説

く発現していた。これらの上皮系組織ではβ-DG も発現していたが、MAGI-1 は上皮細胞同士の junction および基底膜側面に広く分布したのに対し、β-DG は基底膜側に比較的局在していた。皮膚切片の染色の結果、毛乳頭周囲および毛髄鞘の表皮細胞に MAGI-1 の発現を認めた(図 2)。

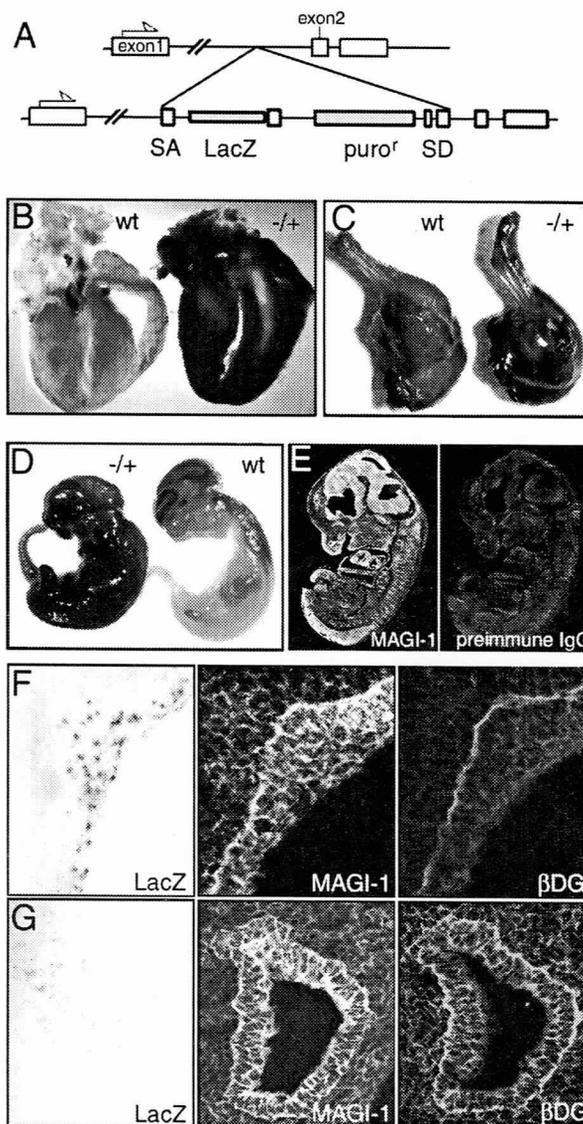


図 2 MAGI-1 KO ヘテロマウスでの MAGI-1 およびβ-DG の発現。

- A: gene trap construct の insertion の位置。  
 B: アダルト心筋、LacZ 染色  
 C: アダルト骨格筋、LacZ 染色。  
 D: E12 胎児、whole mount LacZ。  
 E: E12 胎児切片、抗 MAGI-1 免疫染色。  
 F: E12 胎児舌上皮切片、LacZ & 免疫染色。  
 G: E12 胎児小腸上皮切片、LacZ & 免疫染色。

\* 鳥取大学医学部神経生物学

\*\* 京都大学大学院情報学研究所

MAGI-1 ノックアウトマウスは胎生致死であり当初の目的であった mdx マウスとの交配には使えない。PDZ ファミリータンパク質のいくつかについて、その PDZ domain のみを発現させると、dominant negative form として働くことがわかっている。そこで、MAGI-1 の5つの PDZ domain の各々を単独で発現するコンストラクトを作製し、培養細胞での発現系でその効果を検討した。

### ② MAGI-1/PDZ5 の dominant-negative 効果

(1)COS 細胞でのβ-catenin の pulse chase – 全長の MAGI-1 の発現により、β-catenin の half-life は延長する。PDZ5 の発現は全長 MAGI-1 の効果を阻害するのにに対して、PDZ1-4 にはそのような効果はなかった。

(2)HEK293 細胞での Tcf-luc reporter gene assay – 全長の MAGI-1 の発現により、β-catenin による Tcf-luc 発現誘導効果は増強される。PDZ5 の発現は全長 MAGI-1 の効果を阻害するのにに対して、PDZ1-4 にはそのような効果はなかった。

(3)DG 発現量を低下させた C2 細胞の分化誘導での細胞死 – 全長の MAGI-1 の発現により、細胞死は抑制される。PDZ5 の発現は全長 MAGI-1 の効果を阻害するのにに対して、PDZ1-4 にはそのような効果はなかった(図 3)。この系では、PDZ5 単独の発現でも細胞死が増加した。

### 考 察

MAGI-1 ノックアウトマウスの胎生致死の原因は不明であるが、上記の発現パターンから胎児期での上皮系器官の形成に MAGI-1 が必要であると推察される。また、心筋で強い発現が認められたことは筋発生・再生における MAGI-1 の役割というわれわれの仮説を支持する。毛根基底細胞の増殖分化には β-catenin /Tcf シグナル伝達が重要な働きをすることが知られている。毛根基底細胞に MAGI-1 の強い発現が認められることは、その増殖分化における MAGI-1 の役割を示唆している。

一方、少なくとも培養細胞系では、PDZ5 が MAGI-1 によるβ-catenin 安定化効果に対して dominant negative form として働く。

### 研究の意義

MAGI-1 ノックアウトマウスを作製し、MAGI-1 は胎生期においておそらく上皮系組織の器官形成に必要であることを示唆した。また、胎生期の心筋で強い発現が認められたことは筋発生における MAGI-1 の役割を示唆した。しかし、これまでの結果では、筋再生における MAGI-1 の役割を証明できていない。ノックアウトマウスを使わない方法として、MAGI-1 に対する dominant negative form の発現を試み、これまでに PDZ5 が MAGI-1 によるβ-catenin 安定化効果に対して dominant negative form として働くことを明らかにした。このコンストラクトの組織特異的発現により、MAGI-1 の筋肉での機能を解析することが可能であると期待している。

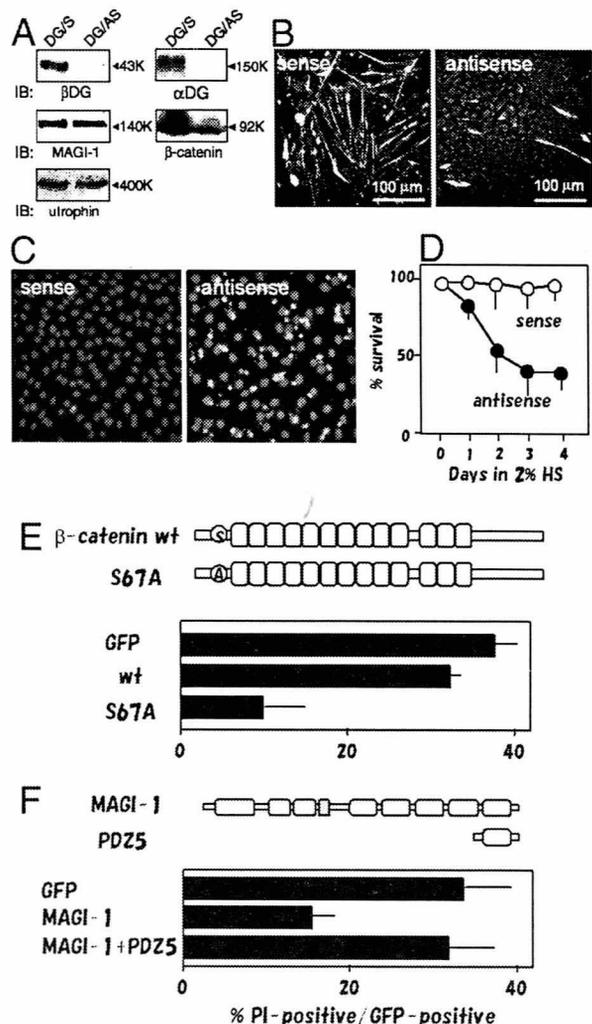


図3 MAGI-1 PDZ5 の dominant negative 効果 (DG antisense DNA を発現する C2 細胞の分化培地での細胞死)  
 A: Antisense DNA の発現による DG の発現抑制。  
 B: 分化培地での MHC の発現, 抗 MHC 免疫染色。  
 C: 分化培地での細胞死, PI の取り込み。  
 D: 分化培地での細胞死, MTT アッセイ。  
 E: β-catenin (wild-type および S26A constitutive active form) による細胞死の抑制。  
 F: MAGI-1 による細胞死の抑制と、PDZ5 の dominant negative 効果。

### 参考文献

- 1) Dobrosotskaya, I. *et al.*: MAGI-1, a membrane-associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein-protein interaction domains. *J. Biol. Chem.* 272: 31589-31597, 1997.
- 2) Cossu, G. and Borello, U.: Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J.* 18: 6867-6872, 1999.
- 3) Laura RP *et al.*: MAGI-1: a widely expressed, alternatively spliced tight junction protein. *Exp. Cell Res.* 275:155-170, 2002.

# 細胞死抑制の蛋白質細胞内導入治療法の開発

太田 成 男\*

研究協力者 麻生 定光\* 大澤 郁朗\* 山縣 久美\* 尾崎 大也\*  
 荒川 正行\* 渡辺 めぐみ\* 永井 信也\* 森 隆\*  
 平出 智晴\*\* 桂 研一郎\*\* 片山 泰朗\*\*

## 背景と目的

私たちは、アポトーシス抑制因子 Bcl-xL 蛋白質の立体構造を決定し、その構造を基に強力にアポトーシスを抑制する蛋白質をデザインした。Bcl-xL 遺伝子を3箇所変え、3個のアミノ酸残基を置換することによって、アポトーシス抑制活性が飛躍的に上昇したスーパーアポトーシス抑制因子を人為的に作成することに成功した(1)。その蛋白質を変異させた3アミノ酸 FNK をもじって FNK と命名した。FNK 遺伝子を導入し、FNK を発現させた細胞は、種々の細胞死誘導刺激(カルシウムイオンホア、酸化ストレス、スタウロスポリン、血清除去、anti-Fas、温熱処理、TN-16、カンプトテシン、トリコスタチン A、ヒドロキシウレア)に対し Bcl-xL よりも細胞死を強く抑制した<sup>1)</sup>。

本研究の目的は、このアポトーシス抑制因子を用いて細胞死を抑制して治療に実際に用いるために、HIV の Tat 蛋白質の蛋白質導入領域(PTD: protein transduction domain, 11 アミノ酸残基)を FNK に結合させ、蛋白質を細胞の外から細胞内へ導入させ、細胞死を抑制する治療法を開発することである。

## 方法と結果

FNK 遺伝子に Tat/HIV 蛋白質由来の 11 アミノ酸ペプチド (PTD) 遺伝子を結合した遺伝子を結合し、PTD-FNK 遺伝子を作成した。同様に、PTD-Bcl-xL 遺伝子と、PTD と FNK の間に myc ペプチドを挿入した遺伝子も作成した。これらの遺伝子を実験室に導入し蛋白質を合成させ、PTD-FNK 蛋白質、PTD-Bcl-xL 蛋白質、PTD-myc-FNK 蛋白質を精製した。これらの蛋白質を培養細胞に添加して、その影響を調べた。

(1) 培養細胞への導入： PTD-FNK 蛋白質を神経芽細胞の培養液に添加すると、PTD-FNK は速やかに細胞内にはいり、ミトコンドリアへ達した。60分で定常状態に達した(図1)。逆の培養液から PTD-FNK を除去すると半減期2時間で減少した(図1)<sup>2)</sup>。

(2) 軟骨スライス培養細胞への導入：軟骨基質はコンドロイチン硫酸などの酸性基に富む。PTD は塩基性アミ

ノ酸に富むので、軟骨基質を通過して軟骨細胞へ到達するのは困難と思われたが、PTD-FNK は軟骨基質を通過して、軟骨細胞内へ導入され細胞死を抑制できることがわかった<sup>3)</sup>。

(3) アポトーシスの抑制： PTD-FNK は pM レベルでスタウロスポリンによって誘導されたアポトーシスを抑制した。また、初代培養神経細胞のグルタミン酸による細胞死も pM オーダーで抑制した<sup>2)</sup>(図2)。これらの効果は PTD-Bcl-xL よりも明らかに強かった。グルタミン酸による神経細胞死を PTD-FNK が抑制した場合に、細胞質内カルシウムの挙動が変化した。グルタミン酸

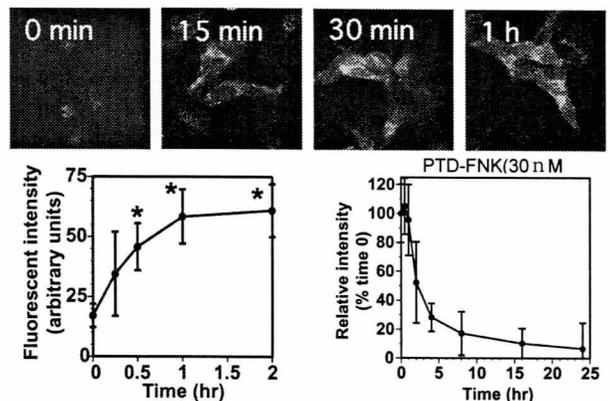


図1 PTD-FNK タンパク質の培養細胞内への導入。PTD-FNK を添加して各時間毎に免疫染色をした(上図)。経時的に取り込まれ(左図)、除去することによって速やかに細胞内から除去できた(右図)。

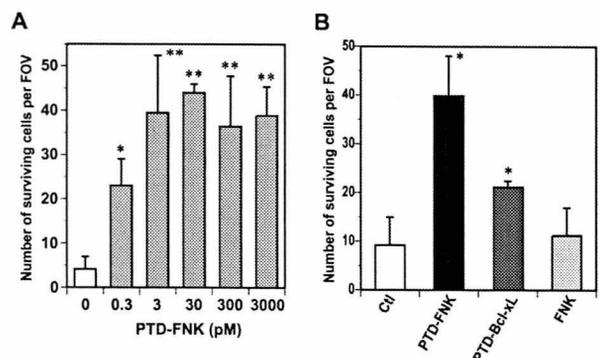


図2 初代神経培養細胞の細胞死の抑制。各濃度の PTD-FNK で処理後グルタミン酸により細胞死を誘導した。A: PTD-FNK は pM レベルの低濃度でも細胞死を抑制した。B: PTD-FNK の効果は少なく、PTD を結合しない、FNK 蛋白質だけでは効果がなかった。

\* 日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野  
 \*\* 日本医科大学第二内科

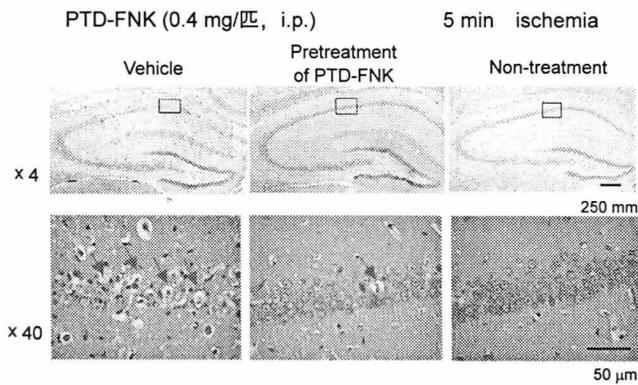


図3 前脳虚血による神経細胞死の抑制。PTD-FNK 投与後、頸動脈を梗塞し、5分間の虚血状態にした後、血流を再開した。遅延性神経細胞死への効果を見た。対照スナネズミではCA1神経細胞がほぼ全滅している(左図)のに対し、PTD-FNKは神経細胞死を抑制している(中央図)。

による細胞死はネクローシスと考えられているのでPTD-FNKはアポトーシスのみならずネクローシスも抑制できることが示唆された。

(4) PTD-FNKのネクローシス抑制: 四塩化炭素は典型的ネクローシスをおこすことが知られている。PTD-FNKは四塩化炭素処理した細胞をアポトーシス経路へ変換して、細胞死を抑制することが明らかとなった<sup>4)</sup>。すなわち、PTD-FNKはアポトーシスだけでなく、ネクローシスも有効に抑制できるので、治療としてもちいるのは広い範囲で有効であることが期待できる。

(5) PTD-FNKの動物組織への導入: 実験動物(マウスとスナネズミ)の腹腔、静脈、皮下にPTD-FNKへ注入した。PTD-FNKの動態については、抗Bcl-xモノクローナル抗体と抗myc抗体を用いた免疫染色によって定量した。ミトコンドリアの細胞内局在場所を明らかにするために、蛍光色素MitoTrackerRedで染色した。腹腔や静脈にPTD-myc-FNKを注入すると脳神経細胞にも抗myc抗体で染色される細胞が出現した。皮下注射によって、少なくとも肝細胞へPTD-FNKは導入された。

(6) PTD-FNKの治療への応用: スナネズミの5分間全脳虚血による海馬CA1領域の神経細胞死は、PTD-FNKを腹腔投与することによって抑制された<sup>2)</sup>(図3)。四塩化炭素はステロイド、アルコールによる肝障害にも効果的であることがわかった<sup>4)</sup>。

## 考 察

PTD-FNKを用いた細胞死抑制の特徴として、PTD-を結合させた蛋白は核に移行することが一般的であるが、PTD-FNKはミトコンドリアへ到達した。培養細胞レベルでは、pMレベルで細胞死を抑制できるので極めて微量で効果を発揮する。PTD-FNK蛋白は軟骨基質を通過して軟骨細胞内へ導入され、脳血管閥門を通過して神経細胞へも到達できた。また、PTD-FNKはアポトーシスのみならずネクローシスも抑制できるので、広い範囲の治療法に応用可能であると期待される。

## 今後の展望

人工的に細胞死抑制効果を強くしたスーパー細胞死抑制因子FNKはPTDと結合することによって、効率良く細胞内へ導入され、微量で細胞死を抑制したので、一般的に細胞死を抑制し、広い範囲で細胞死を抑制する治療法に適用しうることが示された。様々な疾患モデル動物を用いて適用範囲を拡大することを進行中である。

## 文 献

- 1) Asoh, S., Ohtsu, T., and Ohta, S.: The Super Anti-apoptotic Factor Bcl-xFNK Constructed by Disturbing Intramolecular Polar Interactions in Rat Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 275: 37240-37245, 2000.
- 2) Asoh, S., Ohsawa, I., Mori, T., Katsura, K., Hiraide, T., Katayama, Y., Kimura, M., Ozaki, D., Yamagata, K. and Ohta, S.: Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 17107-17112, 2002.
- 3) Ozaki, D., Sudo, K., Asoh, S., Yamagata, K., Ito, H., Ohta, S.: Transduction of anti-apoptotic proteins into chondrocytes in cartilage slice culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 522-527, 2004.
- 4) Asoh, S., Mori, T., Nagai, S., Yamagata, K., Nishimaki, K., Miyato, Y., Shidara, Y., Ohta, S.: Zonal necrosis prevented by transduction of the artificial anti-death FNK protein. *Cell death & differentiation*, 2005 (in press)

## VIII. ミトコンドリア異常症と治療

# ミトコンドリア脳筋症のタウリン療法 — 培養細胞を用いての効果検定

太田 成 男\*

研究協力者 石井 徳 恵\* 西 楨 貴代美\* 山 縣 久 美\* 大 澤 郁 朗\*  
安 川 武 宏\*\* 桐 野 洋 平\*\* 鈴 木 勉\*\*

## 背景と目的

ミトコンドリア脳筋症の MELAS と MERRF の原因はミトコンドリア tRNA の点変異であることが 1990 年に同定された。MELAS は tRNA-Leu(UUR) 遺伝子, MERRF は tRNA-Lys 遺伝子の点変異 (それぞれ, 塩基番号 3243, 3271 と 8344 など) によって発症する。長年の私たちのグループの研究により変異 tRNA に関して以下のことが明らかになった。

変異 tRNA を精製して構造を決定すると MELAS の 3243 変異 tRNA と 3271 変異 tRNA でいずれも変異 tRNA のアンチコドンの塩基で本来修飾されるべき塩基が共通に修飾されていなかった (図 1) <sup>1)</sup>。さらに MERRF の 8344 変異をもつ tRNA-Lys においてもアンチコドンの塩基修飾が欠損していた <sup>2)</sup>。さらに解析をすすめるとアンチコドンが修飾されていない変異 tRNA は mRNA に結合できなくなり蛋白合成を停止させることが判明した <sup>3)</sup>。この結果は, MELAS と MERRF の変異 tRNA ではアンチコドンの塩基修飾が欠損しているために, tRNA 機能が不完全となり蛋白合成が途中で停止し, 不完全な蛋白を合成することを示唆している。さらに, この修飾塩基の構造を決定すると正常 tRNA-Leu(UUR) と tRNA-Lys のアンチコドンにはタウリン基が結合して修飾していた <sup>4)</sup>。すなわち, MELAS, MERRF の原因である mtDNA 点変異によって, それぞれ変異 tRNA-Leu(UUR), 変異 tRNA-Lys のアンチコドンへのタウリン修飾が欠損し, 蛋白合成が途中で停止すると考えられた。

本研究の目的は, 分子整形法を用いてタウリン欠損によるタンパク質合成停止の分子機構をさらに詳細に解析し, 変異 tRNA におけるタウリン修飾の役割を明確にすることである。次に, MELAS と MERRF の変異 mtDNA をもつサイブリッド培養細胞を用いて, タウリンがミトコンドリア脳筋症の改善に効果があるかどうかを判定し, 病態改善の方法を開発することが目的である。

## 方法と結果

ヒトミトコンドリア tRNA をヒト胎盤より大量に精製して, 変異点の塩基は正常であるがタウリン修飾のみが欠損した tRNA を分子整形法によって人工的に作製した

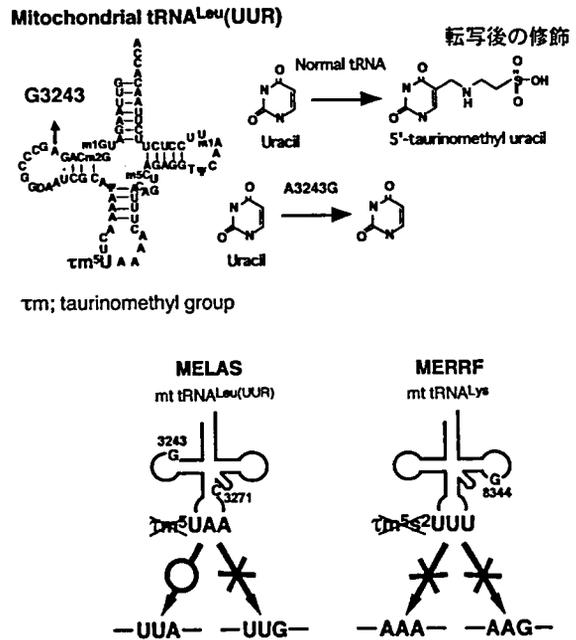


図 1 MELAS, MERRF の原因遺伝子変異による tRNA のアンチコドン部のタウリン修飾欠損。(上図) 正常 tRNA-Leu(UUR) のアンチコドンには転写後タウリン修飾されるが, 変異 tRNA では修飾されない。(下図) 分子整形法によって, 変異点に対応する塩基は正常でタウリン修飾だけが欠損している tRNA を人工的に作製した。すると, tRNA-Leu(UUR) では UUA のみを認識し, UUG ではタンパク質合成を停止すること, tRNA-Lys ではタウリン修飾の欠損によって AAA と AAG のコドンも双方とも識別できずタンパク質合成が停止することがわかった(4, 5)。

(図 1)。この結果, 変異 tRNA の機能不全は変異塩基にあるのではなく, アンチコドンのタウリン修飾の欠損が原因であることが明確になった。さらに tRNA-Leu(UUR) にタウリン修飾が欠損した場合には UUA コドンを読み取ることができるが, UUG コドンは読みとることができないこと, tRNA-Lys のタウリン修飾を欠損させた場合は AAA と AAG を読みとることができないことが明らかとなった <sup>5)</sup>。

培養液に高濃度タウリンを加えると tRNA 機能が回復するのではないかという考えのもと, 3243 変異, 3271 変異, 8344 変異をもつサイブリッド細胞(核は HeLa 細胞でそれぞれの変異 mtDNA をもつように作製した人口細胞)に 10mM~60mM のタウリンを加えて 1~4 日間培養して, ミトコンドリアの機能が回復するかどうかを調べた。

\* 日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野  
\*\* 東京大学大学院新領域創成科学

ミトコンドリア膜電位は MitotrackerRed の蛍光染色の強度をフローサイトメーターで調べた (図2). 酸素消費速度は酸素電極により測定し, ミトコンドリアの形態は共焦点顕微鏡により観察した. ミトコンドリア内タンパク質合成はエメチン存在下でアイソトープメチオニンを取り込ませ, ミトコンドリアを分画後電気泳動によって合成タンパク質を測定した. すると, 高濃度タウリン存在下で, MELAS, MERRF の点変異 mtDNA をもつサイブリド細胞では, 膜電位, 酸素消費速度, 形態, ミトコンドリア蛋白合成速度, いずれも改善した. 40mM のタウ

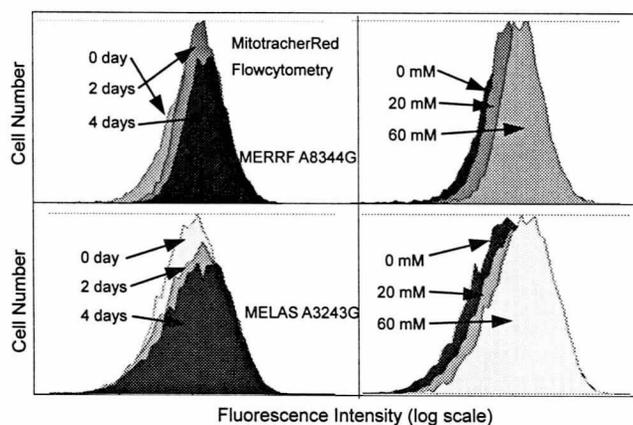


図2 高濃度タウリンによる変異 mtDNA をもつサイブリド細胞のミトコンドリア膜電位の改善. 8344 変異(上図), あるいは 3243 変異 (下図) をもつサイブリドに 40mM タウリンを加えて培養し, フローサイトメーターでミトコンドリア膜電位を測定すると経時的に増加した (左図). また, 濃度依存的にタウリンの効果が見られた (処理4日後) (右図). タウリンによって, ミトコンドリア膜電位が改善されたことが明瞭である.

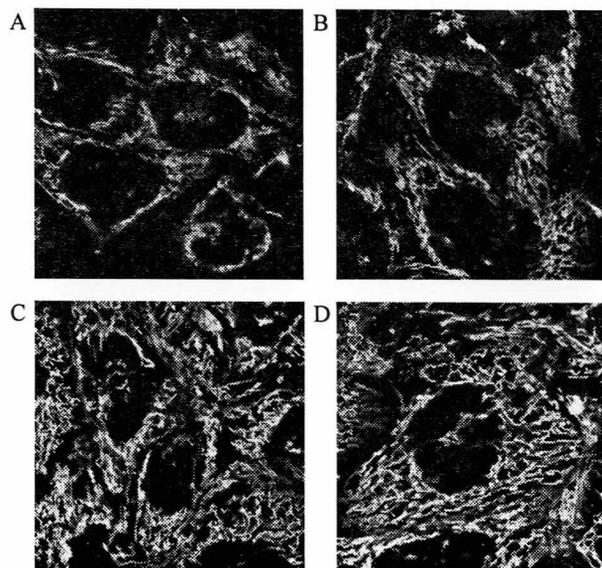


図3 低濃度のタウリンの効果. タウリン合成の材料であるメチオニンとシステインの濃度を必要最小限まで下げ 8344 変異をもつサイブリドを培養し, 低濃度のタウリン (0.1~1mM) の効果を調べた. A: 0mM, B: 0.1mM, C: 0.3mM, D: 1mM タウリンで4日間培養した細胞を MitoTracker で染色した. タウリンにより MitotrackerRed の蛍光が強くなり, ミトコンドリア膜電位が上昇したことが明らかである. また, 形態も糸状になりミトコンドリア機能が回復したことが示唆された.

リン存在下で4日間培養すると, 30%程度酸素消費速度が回復した. タウリン添加によって分子量の大きい蛋白の合成が改善させたので, tRNA の機能が回復したことを示唆する.

しかし, 以上の結果は, タウリンが 10mM 濃度以上の高濃度で効果が見られたので, 現実的にタウリンを飲用した時の効果を示すものではない. そこで, 細胞内のタウリン合成を抑制するためにタウリン合成の材料であるメチオニンとシステインを必要最小限の濃度として, 4日間培養し, その後 0.1mM・1mM の低濃度のタウリンの効果を調べた. すると, 特に 8344 変異を持つサイブリド細胞では, MitoTracker の蛍光強度が濃度依存的に増加し, 形態も糸状になりミトコンドリア機能が回復したことが示唆された (図3).

## 考 察

MELAS3243 変異 tRNA と MERRF8344 変異 tRNA ではアンチコドンの塩基のタウリン修飾が欠損することによってミトコンドリア内のタンパク質合成が途中で停止することが確定された. また, タウリン添加によって分子量の大きい蛋白の合成が改善させていることは, 変異 tRNA の機能を改善していることを示唆している. タウリン合成を抑制した場合には 0.3mM 程度の低濃度のタウリンでも十分効果があるので, 飲用によってミトコンドリア脳筋症の病態改善に有効である可能性がある.

## 研究の意義

MELAS, MERRF の tRNA 遺伝子変異によって tRNA のタウリン修飾が欠損するという基礎的研究を背景に, タウリンが少なくとも培養細胞ではミトコンドリア脳筋症患者由来の変異 mtDNA をもつミトコンドリアの機能改善することを明らかにした. タウリンは副作用が認められないので, 積極的に病態改善に利用すべきであると結論した.

## 文 献

- 1) Yasukawa T., Suzuki T., Suzuki Ta., Ueda T., Ohta S. and Watanabe K.: Modification Defect at Anticodon Wobble Nucleotide of Mitochondrial tRNAs LEU(UUR) with Pathogenic mutations of Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes. *J.Biol.Chem.* 275:4251-4257, 2000..
- 2) Yasukawa T., Suzuki T., Ishii N., Ueda T., Ohta S. and Watanabe K.: Defect in Modification at the Anticodon Wobble Nucleotide of Mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup> with the MERRF Encephalomyopathy Pathogenic Mutation. *FEBS Letters.* 467:175-178, 2000.
- 3) Yasukawa T., Suzuki T., Ishii N., Ohta S. and Watanabe K.: Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease.

- EMBO J. 20: 4794-4802, 2001.
- 4) Suzuki T, Suzuki T, Wada T, Saigo K, Watanabe K.: Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. EMBO J. 21:6581-6589, 2002.
- 5) Kirino Y, Yasukawa T, Ohta S, Akira S, Ishihara K, Watanabe K, Suzuki T.: Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 101:15070-15075, 2004.

# ミトコンドリア ALDH2 欠損によるミトコンドリア病病態モデルマウスの作製とその病態改善法ービタミン E の効果

太田 成男\*

研究協力者 大澤 郁朗\* 西 槇 貴代美\* 小平 恵理\* 鈴木 吉彦\*

## 背景と目的

ミトコンドリア脳筋症の治療あるいは病態改善にはモデルマウスの作製が不可欠である。ミトコンドリア ALDH2 酵素活性を低下させることによってミトコンドリア脳筋症の特徴である筋萎縮、ミトコンドリアの増加を示す赤色ぼろ繊維の出現を指標としたモデルマウスの作製を試みた。

ミトコンドリアのマトリクスに局在するアルデヒド脱水素酵素 ALDH2 は、エタノール代謝においてアセトアルデヒドから酢酸への反応を触媒する。その一塩基置換の遺伝子多型である *ALDH2\*2* はドミナント・ネガティブに ALDH2 活性を抑制する。私たちは、*ALDH2\*2* が晩期発症型アルツハイマー病(AD)の危険因子であり<sup>1)</sup>、*ALDH2\*2* をもつ健康人集団の血清には、過酸化脂質濃度が有意に高いことを示した<sup>2)</sup>。過酸化脂質は、毒性の強いアルデヒド類である 4-ヒドロキシ-2-ノネナール(4-HNE)に自然に分解されることから、4-HNE が ALDH2 の標的基質であり、ALDH2 酵素活性が低下すると 4-HNE が蓄積し、毒性を発揮すると想定した。マウス型 *ALDH2\*2* 遺伝子をラット PC12 細胞に導入し、ALDH2 活性を低下させ、活性酸素を発生させると、4-HNE が蓄積し、細胞死が促進されたので、ALDH2 は酸化ストレスへの防御機構として働いていることが示唆された<sup>3)</sup>。

本研究の目的は、ALDH2 酵素欠損マウスを作製してミトコンドリアと骨格筋への影響を調べ、ミトコンドリア脳筋症のモデルとなりうるかを検証することである。さらに、骨格筋の萎縮と酸化ストレスを食餌によって改善できるかどうかを調べた。

## 方法と結果

マウス *ALDH2* 遺伝子を改変し、欠損型遺伝子 *ALDH2\*2* を作製した。アクチン・プロモーターと EF-1  $\alpha$  プロモーター下にそれぞれマウスの *ALDH2\*2* を挿入し、トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、DAL マウス (Dominant Negative ALDH2 deficient mice) と命名した。トランスジェニックマウスの DNA を PCR と Southern blot により確認し、*ALDH2\*2* の導入を確認した。*ALDH2\*2* 蛋白の確認は Western blot により行った。

ALDH2 酵素活性は、骨格筋からミトコンドリアを分

離して測定した。酸化ストレスの蓄積は、過酸化脂質の分解物であるマロンジアルデヒドと 4-ヒドロキシアルケナールを定量した。赤色ぼろ繊維はゴモリトリクロム染色変化法を用いて染色し、ミトコンドリアの蓄積の指標として、は、Mitotracker Green も併用した。電子顕微鏡によってミトコンドリア形態異常を観察した。

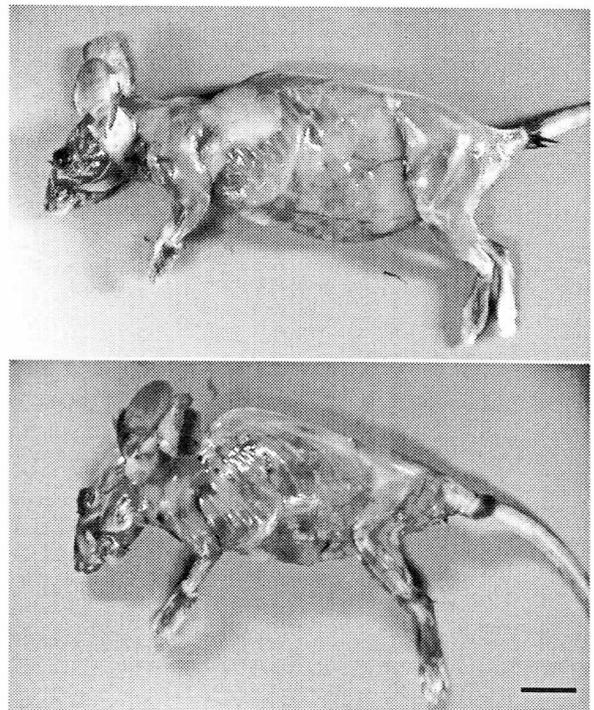


図1 ALDH2 酵素活性欠損 DAL マウスにおける骨格筋の萎縮皮をはいだ DAL マウス (下写真) と同腹同胞の対照マウス (上写真)。

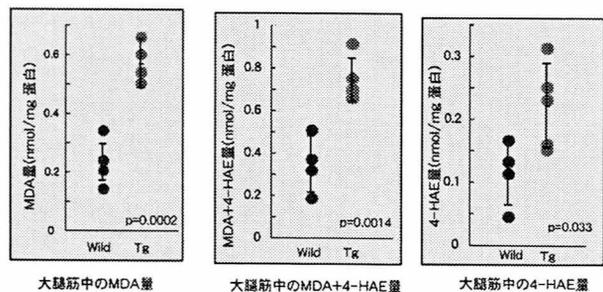


図2 DAL マウスにおける酸化ストレスの上昇。大腿筋中における過酸化脂質の蓄積。過酸化脂質の分解物であるアロンアルデヒド(MDA)と 4-ヒドロキシアルケナール(4-HAE)の定量結果。左の Tg が DAL マウスの結果である。

\* 日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野

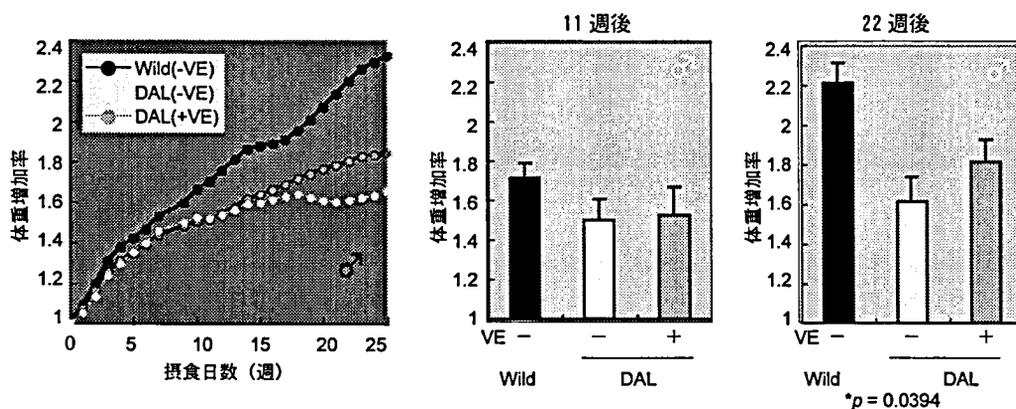


図3 DALマウスにビタミンEを食餌に与えることで筋萎縮の改善。7週齢のマウスを群分けした後にビタミンE(VE)添加食を与えた。VE摂取量 90mg/day/mouse.

DALマウスをVE投与群とコントロール群に分け、VE投与群にはVE添加食( $\alpha$ -トコフェロール 3g/100g 飼料)を与えた。それとは別に、異なる時期に生まれたDALマウスをカテキン投与群とコントロール群に分け、カテキン投与群にはカテキン添加食(カテキン混合物、緑茶由来 100mg/100g 飼料)を与えた。これらのマウスの体重を定期的に計測した。

VE投与群とコントロール群に関しては、大腿筋に蓄積した過酸化脂質の分解物の量をマロンジアルデヒド(MDA)と4-ヒドロキシアルケナール(4-HAE)の量として測定した。また、下肢筋肉を病理学的に観察した。

3系統のTgマウスについて解析したところ、筋肉でALDH2\*2が高発現しており、ALDH2酵素活性が低下していた。体重が低下しており、著しい筋萎縮を認めた。筋繊維数が少ないのではなく、筋繊維自体が細かった。骨格筋において、過酸化脂質の分解物であるマロンジアルデヒドと4-ヒドロキシアルケナールが蓄積していた。筋繊維は生後直後正常であるが、1ヶ月後には筋繊維が正常マウスと比較して著明に萎縮した。

さらに、ALDH2欠損筋繊維では、正常マウスと同じ筋の場所を比較するとミトコンドリア脳筋症の指標である赤色ぼろ繊維とミトコンドリアの蓄積が認められた。ミトコンドリアの蓄積は出生直後には見られず1ヶ月後に出現した。

さらに神経伝導速度の低下、骨密度の低下、白髪の増加など老化の指標も認められた。

雄のVE投与群ではコントロール群に比較して体重が増加し、発育不良が改善した。この時、後肢断面積が増加しており、筋萎縮が抑制されていた。また、大腿筋に蓄積したMDAと4-HNEもVE投与群では減少傾向にあった。雌ではVE投与群がコントロール群に比較して体重増加することはなかったが、大腿筋に蓄積したMDAと4-HNEは雌においてもVE投与群で減少傾向にあった。

#### 考 察

ALDH2欠損DALマウスでは、欠損型であるALDH2\*2の導入によりALDH2活性が抑制され、酸化ストレスに

よって生じるアルデヒド類の解毒能が低下した結果として筋萎縮が生じたものと考えられる<sup>4)</sup>。ミトコンドリア脳筋症の指標である筋萎縮と赤色ぼろ繊維、ミトコンドリアの蓄積とミトコンドリア形態異常が観察されたことから、ミトコンドリア脳筋症のモデル動物となる可能性がある。

また、ビタミンEが酸化ストレスを減少させ、筋萎縮を改善したことから、ミトコンドリア脳筋症の改善にはビタミンEが有効であることが示唆された。

#### 研究の意義

本研究から、DALマウスが酸化ストレス防御法を検討する上での有効なモデル動物であることが示された。ミトコンドリア脳筋症の病態改善のための治療薬の開発に重要な役割を果たす事が期待できる。筋萎縮の軽減、赤色ぼろ繊維の減少を指標に、ミトコンドリア脳筋症の病態改善薬、治療薬をスクリーニングが可能になった。ビタミンE以上の改善薬の開発が期待できる。

#### 参考文献

- 1) Kamino, K., Nagasaka, K., Imagawa, M., Yamamoto, H., Yoneda, H., Ueki, A., Kitamura, S., Namekata, K., Miki, T., and Ohta, S.: Deficiency in Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Increases the Risk for Late-Onset Alzheimer's Disease in the Japanese Population. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 192-196, 2000.
- 2) Ohsawa, I., Kamino, K., Nagasaka, K., Ando, F., Niino, N., Shimokata, H., Ohta, S.: Genetic deficiency of a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases serum lipid peroxides in community-dwelling females. *J. Hum. Genet.* 48: 404-409, 2003.
- 3) Ohsawa, I., Nishimaki, K., Yasuda, C., Kamino, K., Ohta, S.: Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells. *J. Neurochem.* 84(5):1110-1117, 2003.
- 4) Ohta, S., Ohsawa, I., Kamino, K., Ando, F., Shimokata, H.: Mitochondrial ALDH2 Deficiency as an Oxidative Stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1011: 36-44, 2004.

# MELAS 筋芽細胞における細胞死とその抑制

桃井 真里子\*

研究協力者 森 雅人\* 山形 崇倫\* 後藤 珠子\*

## 目 的

MELAS では感染、過労などのストレスを誘因としてけいれん、脳梗塞様発作などの episodic な症状を繰り返す、部分改善をしながら次第に進行していく。また、episodic な病態とは別に難聴、知的障害などの慢性進行性の病態もあり、現在の治療では病気の進行を完全に抑制するのは困難である。我々はこのような MELAS の病態にどのような細胞内機構が関与するかを検討し、有効な治療法を開発する目的で培養筋芽細胞を用いて細胞死プロセスを検討してきた。

## 材料・方法

MELAS 患者よりインフォームド Consent のもと採取した生検筋細胞を初代培養後、ori-SV40 DNA にて不死化し、クローン化して使用した。3243A/G 変異を 80% 有する細胞株(80%株)と対照として 0% 有する細胞株(0%株)を使用した。通常培地で培養した後、グルコース欠乏培地に変更し培養を続けることにより、80%株は細胞死が誘導される。①この細胞死過程へのアポトーシスの関与を検討するため、以下の抗体による蛍光抗体染色、同時に TUNEL 法、Hoechst 染色を行った。：抗チトクローム c 抗体、活性型 caspase-3,-8,-9 抗体、ER ストレス細胞死の特異蛋白である活性型ヒト caspase-4 抗体 (国立精神神経センター、桃井隆博士より供与)。②各クローンの細胞特性と細胞死誘導、抑制の検討のため、細胞内 ATP 量、caspase3/7 活性をキット (Promega, USA) を用いて検討した。上記 2 クローンを使用し、通常培養後、通常培地 (血清を含む)、無血清培地に変更し、経時的に細胞内 ATP 量、caspase3/7 活性を測定した。また、MELAS 治療薬である DCA を加え、同様の検討を行った。

## 結 果

①アポトーシス過程の検討：細胞死が誘導される 80% 株ではチトクローム c 放出、カスパーゼ-9、-3 の活性化、TUNEL 陽性となるミトコンドリア(mt)を介するカスパーゼ依存性の apoptosis の経路が作動していた。また、活性型 caspase-4 抗体にても 80%株では細胞質に瀰漫性

の染色が確認された。②細胞内 ATP 量、カスパーゼ活性の検討：通常培養下での細胞内 ATP 量は 80%変異株でも対照と差がなかったが、80%株では対照の 0%株の培養条件をグルコース欠乏や、血清除去培養条件下と同様の ATP 変化を示していた。(図 1) また、80%株では caspase3/7 活性が確認された。この caspase3/7 活性は血清除去により更に増加した。(図 2) DCA を添加した検討では、80%変異株にのみ ATP 量の有意な増加が見られた。(図 3)

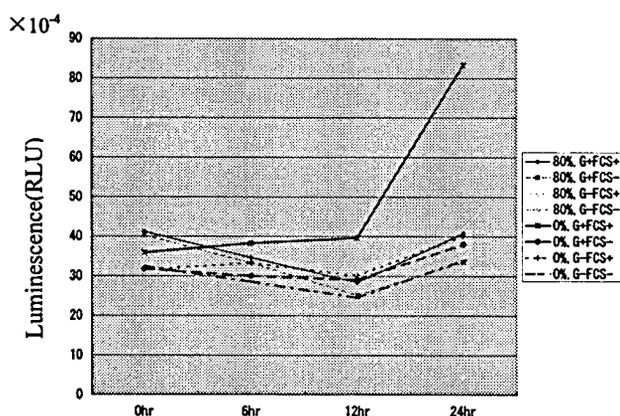


図 1 細胞内 ATP 量の変化：それぞれを通常培養(G+,FCS+), グルコース欠損(G-,FCS+), 血清欠損(G+,FCS-), グルコース・血清欠損(G-,FCS-)の条件で培養し、経時的に ATP 量を測定した。

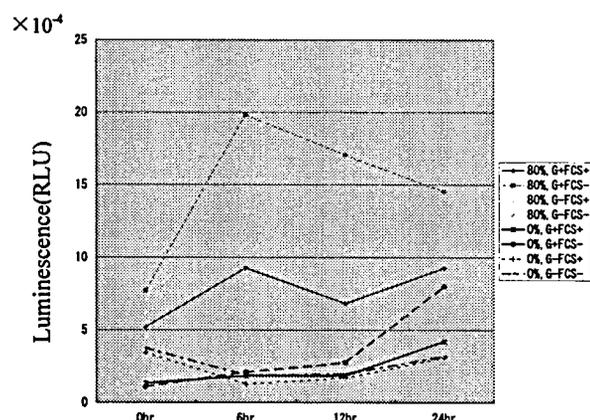


図 2 Caspase3/7 活性の変化：図 1 と同じ条件で caspase3/7 活性を測定した。80%株は刺激がなくても軽度の caspase3/7 の活性が確認された。

\* 自治医科大学小児科学

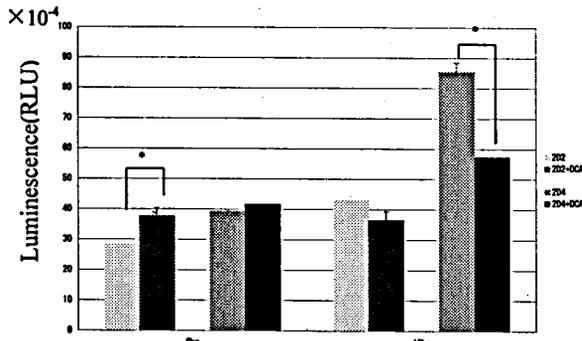


図3 DCA 添加による ATP 量の変化: 0%株, 80%株に通常培養条件下において DCA を 250 $\mu$ g/ml で添加し, ATP 量を測定した。80%株では添加 6 時間後に有意な ATP 量の増加が確認された。一方, 0%株では 12 時間後に DCA を添加した細胞で有意な ATP 量の低下がみられた。

### 考 察

MELAS 培養筋芽細胞の細胞死には mt を介した cytochrome c 放出, caspase-9, -3 活性化を経る apoptosis の経路が作動していることを確認し 1), さらに近年, 神経変性疾患などの病態への関与が報告されている ER ストレスによる apoptosis の経路も活性化されていることが確認された。このように MELAS 筋芽細胞ではグルコース欠乏というストレスにより ER ストレスに惹起される caspase-4 の活性化による経路, mt からの cytochrome c 放出, caspase9/3 活性化による経路の 2 つがメカニズムとして存在していることが確認された。ER ストレスにより caspase-12 のみならず, cytochrome c の放出も誘発されるという報告 2) もあり, 今回確認されたこの 2 つの経路が ER ストレスによって誘導されたものか, 別々の刺激により誘導されたものかは今後の検討が必要と思われた。また, 細胞内 ATP 量の検討では, 通常培養下での細胞内 ATP 量は 80%変異株でも対照と差がなかったが, 培地の変更により容易に ATP 量は低下した。これまでに患者線維芽細胞を用い, 通常状態での細胞内 ATP 量は異常細胞も正常と変わらず 3), ATP 合成刺激を与えたときの刺激に対する反応が 2-20 倍程度低下しているという報告があり 4), 筋芽細胞でも同様の結果であった。このように 80%変異を持つ細胞でも通常状態での ATP 量には問題がなかったが, 増殖が悪く, caspase3/7 依存性のアポトーシスが常に活性化されていることが確認され, この caspase3/7 活性は血清除去により著明に増加した。このことは MELAS の慢性進行性の病態を反映している可能性もあると考えられた。MELAS 治療薬の検討では DCA は 80%株でのみ DCA 添加によって有意な ATP 量の増加が見られたが, 効果は 12 時間では消失していた。

臨床的に DCA は短期的には episodic な症状を軽快させる 5) が, 長期的には慢性的の病態は抑制は困難であり 6), DCA を補充することで改善できるか, 長期の効果が得られるのか検討が必要と思われた。

### 今後の展望

MELAS3243A/G変異を80%持つ筋芽細胞はATP産生低下により, cytochrome c放出によるcaspase9/3系とERストレスによる caspase-4 系の双方が活性化されていた。Cytochrome c 放出系もATP産生低下によるERストレス過程によるものである可能性もあり, ERストレスの制御が治療的戦略になりうると考えられ今後の検討が必要と思われた。更に, この系を用いて通常培養条件下でもみられているアポトーシスの制御検討を行い, 容易に細胞死へと傾く細胞を制御できる薬物の検討を行うとともに, 他の変異や病型においてこの系が in vitro での治療薬の効果判定に利用できる可能性があると思われ, 適応症例の選別が困難である治療薬の検討を行い, 有効症例の選別が行えるかどうか検討したいと考えている。

### 参考文献

- 1) Mori M, Momoi YM. Caspase-9 and -3 were activated in MELAS myogenic cell death. Submitted.
- 2) Jimbo A, Fujita E, Kouroku Y, Ohnishi J, Inohara N, Kuida K, Sakamaki K, Yonehara S, Momoi T. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp Cell Res.* 2003 Feb 15; 283(2):156-66.
- 3) Moudy AM, Handran SD, Goldberg MP, Ruffin N, Karl I, Kranz-Eble P, DeVivo DC, Rothman SM. Abnormal calcium homeostasis and mitochondrial polarization in a human encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jan 31;92(3):729-33.
- 4) James AM, Sheard PW, Wei YH, Murphy MP. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. *Eur J Biochem.* 1999 Jan;259(1-2):462-9.
- 5) Saitoh S, Momoi MY, Yamagata T, Mori Y, Imai M. Effects of dichloroacetate in three patients with MELAS. *Neurology.* 1998 Feb;50(2):531-4.
- 6) Mori M, Yamagata T, Goto T, Saito S, Momoi MY. Dichloroacetate treatment for mitochondrial cytopathy: long-term effects in MELAS. *Brain Dev.* 2004 Oct;26(7):453-8.

# ミトコンドリアゲノム多型データベースを用いた病的変異と多型の鑑別

田 中 雅 嗣\*

研究協力者 武 安 岳 史\* 福 典 之\* 藤 田 泰 典\*\*  
伊 藤 雅 史\*\* 衣 斐 達\*\*\* 佐 橋 功\*\*\*

## 目 的

ミトコンドリア DNA (mtDNA)の塩基配列は多様性が高いため、ミトコンドリア脳筋症などの疾患の病因となる変異を同定する場合に、一般集団における多型と疾患の直接的病因となる変異とを鑑別することが重要な作業である。我々は日本人 672 名の mtDNA 全塩基配列の分子進化系統樹を解析し、110 種類の subhaplogroup に分類した(文献 1)。これらの mtDNA 全塩基配列データを基礎として、ミトコンドリアゲノムに分布する多型をデータベース化し、多型の相互連鎖、疾患との関連、多型の機能的相違に関する総合的情報の提供を開始した。ここでは、ミトコンドリアゲノムにおける多型とミトコンドリア脳筋症の病因となる変異を鑑別できるかどうかを検証した。

## 方 法

百寿者、パーキンソン病患者、アルツハイマー病患者、血管病変を伴う糖尿病患者、一般糖尿病患者(文献 2)、若年肥満者、若年非肥満者、計 7 群、各 96 名の血液細胞あるいは口腔粘膜細胞から DNA を単離し、mtDNA の全塩基配列を決定した(16,569 塩基対×672 例 = 11,134,368 塩基対)。これに基づいてミトコンドリアゲノム一塩基多型データベース (mtSNPdb, [http://www.giib.or.jp/mtsnp/index\\_e.html/](http://www.giib.or.jp/mtsnp/index_e.html/)) を構築した。MITOMAP に登録されている既報の mtDNA 変異と日本人で観察された多型 (mtSNP) を比較した。

## 結果と考察

672 人についてミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定した結果、1,294 か所に多型が見出された。非翻訳領域の hypervariable region (変異発生頻度の高い領域)における塩基置換・挿入・欠失はデータベースの別表に記載している([http://www.giib.or.jp/mtsnp/search\\_LengthPolymorphisms\\_e.html](http://www.giib.or.jp/mtsnp/search_LengthPolymorphisms_e.html))。16,620bp (重複領域の 51bp を含む) の中から 1,294 か所という頻度は約 13 塩基に 1 個の割合で多型が検出されることを意味する。核ゲノムにおける多型頻度は 1,000 塩基に 1 個であるとさ

れているので、ミトコンドリアゲノムの多型頻度はきわめて高い。領域ごとに見ると、ミトコンドリアゲノムの非翻訳領域における変異率は 21.5%と最も高かった。タンパク質コード領域には 870 か所の多型があり、変異率は 7.7%であった。2 種の rRNA 遺伝子および 22 種の tRNA 遺伝子における変異率は、それぞれ 3.6%および 4.6%であり、タンパク質コード領域の変異率より低かった。

一方、MITOMAP (<http://www.mitomap.org/>) において、蛋白質コード領域および発現制御領域では 88 ヶ所に 92 種類、rRNA および tRNA 遺伝子領域では 105 ヶ所に 107 種類の変異が登録されていた。蛋白質コード領域および発現制御領域の 88 ヶ所変異のうち 16 ヶ所の変異が mtSNPdb において検出された。

(a) MITOMAP において疾患病態への関与が確認されたと分類されていた変異 18 ヶ所のうち 2 ヶ所が mtSNPdb で検出された。Leber 病の病因変異として確認されていた 4216T>C (ND1:Y304H)はアルツハイマー病患者 1 名と血管病変を伴う糖尿病患者 1 名において検出された。同じく Leber 病の病因変異とされていた 14484T>C (ND6:M64V)は血管病変を伴う糖尿病患者 1 名において検出された。

(b) MITOMAP において暫定的に病的変異と分類されていた変異 64 ヶ所のうち 6 変異が mtSNPdb で検出された。アルツハイマー病とパーキンソン病で報告されている 3397A>G (ND1:M31V)はパーキンソン病患者の 1 名で検出された。Leber 病への関与が示唆されている 4136A>G (ND1:Y277C)はアルツハイマー病の 1 名で検出された。これらの変異は百寿者では検出されなかったため有害変異と推定され、加齢に伴う神経変性疾患のみならず特発性心筋症にも関与している可能性が考えられた。

(c) 9804G>A, 11696G>A, 12026A>G は Leber 病あるいは糖尿病への関与が示唆されていたが、百寿者において検出されたので病的意義はないと判断された。

(d)非翻訳領域の多型 16198T>C は Poulton らにより、拡張型心筋症のリスクファクターであると報告されていたが、百寿者 96 人中 37 人で検出されたので、病態への関与は小さいと推定された。

\* 東京都老人総合研究所健康長寿ゲノム探索

\*\* 岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部

\*\*\* 愛知医科大学神経内科

(e) 感音性難聴の病因であることが確定している 1555A>G (12S rRNA)変異がアルツハイマー病患者1名において検出された。

(f) 感音性難聴の病因であると推定されている 961T>C (12S rRNA)置換は百寿者でも検出された。

(g) maternally inherited cardiomyopathy (MICM) の病因変異として 12192G>A (tRNA-His)が MITOMAP に登録されていたが、百寿者において検出されたので多型であると判断された。

### 研究の意義

MITOMAP と mtSNP の両データベースを比較することによって、mtDNA の病的変異と多型を鑑別することが可能であることが確認された。mtSNP database には日本人において見いだされる多型がほぼ網羅されてい

るので、mtSNP に登録されていない変異が脳筋症の患者で mtDNA が heteroplasmy の状態にあるか、変異 mtDNA の割合が臨床的重症度と関連するかどうかなどの確認作業が必要となる。さらにサイブリードを用いたミトコンドリア機能の解析が必要である。

### 文 献

- 1) Tanaka M, Cabrera VM, Gonzalez AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, et al. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Res* 14: 1832-1850, 2004.
- 2) Guo L-J, Oshida Y, Fuku N, Takeyasu T, Fujita Y, Kurata M, Sato Y, Ito M, and Tanaka M. Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity. *Mitochondrion* in press, 2004.

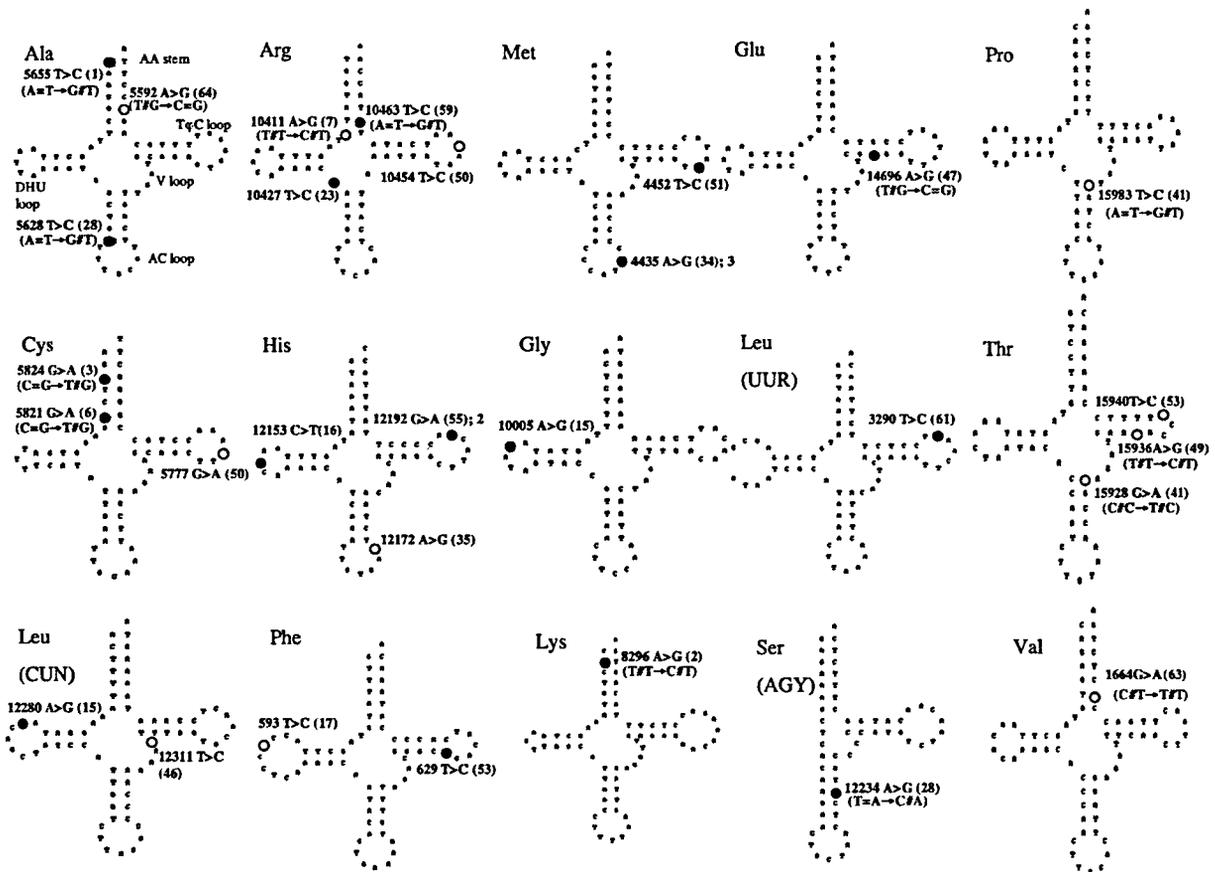


図 1 肥満者あるいは糖尿病患者において検出された tRNA 遺伝子の多型。それぞれの置換の位置をミトコンドリア tRNA の二次構造上に示した。白丸は若年肥満者のみに見いだされた塩基置換の位置を示し、黒丸は糖尿病患者のみに検出された塩基置換の位置を示す。

# 筋形成に関わる細胞間相互作用の解明

瀬原 淳子\*

研究協力者 栗崎 知浩\* 若月 修二\* 黒原 一人\*  
増田 亜紀\* 湯本 法弘\* 小松 紘司\*  
正木 めぐみ\*

## 目 的

私達は、骨格筋形成の分子機構の解明を目指している。運命決定を受けた筋芽細胞から骨格筋が形成される過程は、さまざまな要因に規定される。(1) 細胞基質間接着に依存したプロセス、(2) 細胞間の直接的な接着に依存したプロセス、(3) 細胞融合、(4) 腱・神経など異種組織との構造的・機能的な結合などがそれである。これらのプロセス一つ一つに不明なことが多いばかりか、(5) プロセス同士の共役も未解明である。筋形成を理解するためには、これら個々のプロセスにかかわる分子群を見つけ、それらを有機的に結びつけていく作業が必要である。本研究は、主に細胞間細胞基質間相互作用の視点から筋形成に関わる分子の検索とその機能の解明をおこなうことを目的とした。

## 方 法

まず、これまでにすでに筋形成にかかわることを明らかにした2つのADAM(メタロプロテアーゼ/ディスインテグリン)分子メルトリン $\alpha$ ・ $\beta$ に関して、間葉組織形成におけるそれらの機能をさらに追求し、筋形成過程における位置づけを明らかにする。そのために、これまでに作成したメルトリン $\alpha$ ・メルトリン $\beta$ ノックアウトマウスの形態形成における役割や生理的役割についての検討をおこなう。

これと並行して、筋形成にかかわるあらたな分子の同定とその機能に関して、未知遺伝子を中心に、研究のあまり進んでいない細胞間・細胞基質間相互作用にかかわりうる遺伝子を見つけ出し、cDNAの単離、siRNAによる筋形成における役割、機能の解析を行う。

## 結 果

これまでにノックアウトマウスの作成と分子・細胞生物学的アプローチにより、ADAMプロテアーゼ・ディスインテグリンファミリーに属するメルトリン $\alpha$ ・メルトリン $\beta$ 遺伝子の役割と機能を探り、メルトリン $\alpha$ は骨格筋形成ばかりでなく脂肪組織の形成にも関わること(Kurisasi et al. Mol. Cell.Biol.,2003)、メルトリン $\beta$ は心臓形成・骨格筋形成・神経形成にかかわること(Kurohara

et al., Developmental Biol, 2004)などを明らかにした。メルトリン $\beta$ に関しては、心室中隔欠損・房室弁大動脈弁形成不全で、生まれてまもなくほとんどのホモ個体が死んでしまうが、生き残ったものは拡張型の心肥大を起こすこと、その症状は人のTetralogy of Fallot様であることがわかった。そして、メルトリン $\beta$ の心臓における表現型を細胞生物学的あるいは生化学的な手法で調べ、心室中隔・弁など心臓の内膜組織を形成する心クッション間葉細胞の分化に異常があることを明らかにした。

またその分子機能を調べたところ、膜型プロテアーゼとして膜型ErbBリガンドの切断活性化を担うことを明らかにし、確かにノックアウトマウスの解析からも、メルトリン $\alpha$ はErbBリガンドのひとつHB-EGFの膜型から可溶性増殖因子としてのprotein kinase Cに依存した変換に、メルトリン $\beta$ は心臓形成に関与するErbBリガンドニューレグリンの活性化に関与することを示した。これらのErbBリガンドがなんらかのプロテアーゼ制御を受けることは知られていたが、ノックアウトマウス作成によりADAMプロテアーゼがそのプロセスに関与することを示すことができたのは初めてであり、その意義はきわめて大きい。形態形成におけるメルトリンの役割や機能を探る中で、発生過程における増殖因子の放出とレセプターの活性化が、複数のプロテアーゼによって制御される、予想以上に複雑な制御によって行われていることもわかってきた。

メルトリン $\beta$ が、心臓のみならず胎児神経や骨格筋でも発現していることから、それらの組織や機能に関しても、野生型と欠損マウスで比較検討してきた。その結果、大部分の欠損マウスは生後1週間以内に死んでしまうものの、生き延びたマウスをみると、骨格筋に中心核繊維が顕著に多いこと、胎児型のアセチルコリンレセプターの発現が一部の筋繊維に残ること、などの異常がみられることがわかってきた。メルトリン $\beta$ は、神経直下におけるアセチルコリンレセプター遺伝子を活性化させるニューレグリンと、神経における発現部位や発現時期が一致すること、そして上記のようにノックアウトマウス胎児由来繊維芽細胞では膜型ニューレグリンの切断制御に異常が見られることなどから、メルトリン $\beta$ は、ニューレグリンあるいは類似の膜型増殖因子の制御を介して神経筋接合部の形成や筋形成とその維持を制御していることが考えられる。

\* 京都大学 再生医科学研究所 再生増殖制御学分野

さらに、筋系列で発現が活性化される新規 ADAM プロテアーゼとして、メルトリン $\epsilon$ /ADAM35 のクローニングに成功した。これは、体節から筋系列の細胞が生じる段階で、筋節特異的に発現の活性化が見られる。その発現は、デスミン発現細胞で見られることから、この遺伝子は筋芽細胞で活性化され、骨格筋になったあとも発現する遺伝子であることがわかった。メルトリン $\epsilon$  の発現はきわめて限局しているが、興味深いことに、それらは、未分化なレンズ上皮、耳砲上皮、小腸上皮など、未分化な上皮組織に限局されていることがわかった。現在、それらが筋形成にどのような役割を果たしているか、あるいはどのような機能を担っているか検討中である (Watabe-Uchida et al., *Developmental Dynamics*, 2004)。

#### 研究の展望・意義

メルトリン $\alpha$ 、 $\beta$  が、細胞増殖制御因子の制御を介して筋形成その他の形態形成に関わることを明らかにすることができた。これらのプロテアーゼの活性化が筋形成に必要であることがわかったことから、それらの活性化機構を検討することによって、筋ジストロフィーやミオパチーの病態の改善への応用を検討していきたい。

#### 文 献

1) Watabe-Uchida M, Masuda A, Shimada N, Endo M,

Shimamura K, Yasuda K, and Sehara-Fujisawa A. A Novel Metalloprotease–Disintegrin, Meltrin  $\epsilon$  (ADAM35), Expressed in Epithelial Tissues during Chick Embryogenesis. *Dev. Dynamics* 230: 557-568, 2004.

- 2) Wakatsuki S., Kurisaki T., and Sehara-Fujisawa A. Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated Meltrin  $\beta$ /ADAM19. *J. Neurochemistry* 89(1): 119-23, 2004.
- 3) Kurohara, K., Komatsu K., Kurisaki, T., Masuda, A., Irie N., Asano, M., Sudo, K., Nabeshima, Y., Iwakura, Y., and Sehara-Fujisawa A. Essential Roles of Meltrin  $\beta$  / ADAM19 in Heart Development. *Developmental Biol* 267: 14-28, 2004.
- 4) Kurisaki T, Masuda A, Sudo K, Sakagami J, Higashiyama S, Matsuda Y, Nagabukuro A, Tsuji A, Nabeshima Y, Asano M, Iwakura Y, Sehara-Fujisawa A. Phenotypic analysis of Meltrin alpha (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin alpha in adipogenesis and myogenesis. *Mol Cell Biol* 23(1): 55-61, 2003.
- 5) Kurisaki T, Wakatsuki S, Sehara-Fujisawa A. Meltrin beta mini, a new ADAM19 isoform lacking metalloprotease and disintegrin domains, induces morphological changes in neuronal cells. *FEBS Lett* 532(3): 419-22, 2002.

## IX. 筋ジストロフィー骨格筋の酸化ストレス、 耐性系、遺伝子治療など

# 筋ジストロフィーに対するゲンタマシン治療対象患者のスクリーニング及びハイブリット型リポソームを用いた治療法の開発

三池輝久\*

研究協力者 木村重美\* 伊藤 薫\* 河野弘恵\* 池澤 誠\*  
小篠史郎\* 松倉 誠\* 増田聖子\*\* 松尾雅文\*\*\*  
竹島泰弘\*\*\* 上岡 龍一\*\*\*\* 松本陽子\*\*\*\*

## 緒言

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)の治療を目的に Sweeney ら<sup>1)</sup>はゲンタマイシンをDMDのモデルマウスである mdx マウスに投与したところ、ほぼ正常なジストロフィン(dy)が発現していることを報告している。ゲンタマイシンが、mdx マウスが持つ dy 遺伝子の点突然変異(終止コドン)を翻訳段階で読み飛ばし(リードスルー)、ほぼ正常 dy を発現させたためである。一方、点突然変異により終止コドンが生じたことにより DMD となった患者は DMD 患者の 5~15%といわれている。dy 遺伝子内の点突然変異を見つけるには、dy の cDNA が 14kb と長く、多くの時間と複雑なテクニックを必要とする。また、終止コドンの種類によりリードスルーする効率が違うという報告もある<sup>2)</sup>。そこでゲンタマイシン治療対象患者をスクリーニングする方法を確立する。また、DMD に対するゲンタマイシン治療法の問題点はゲンタマイシンの半減期が短く、腎毒性、聴神経毒性などの副作用である。そのため、リードスルーするための十分な投与量を患者に投与できないことにある。このことを解決するため、ハイブリット型リポソームをもちいて骨格筋へ効率よくゲンタマイシンを運ぶ方法 [DDS (Drug Deliverly System)]を開発をする。

## 方法と結果

### 1. ゲンタマイシン患者スクリーニング法

インフォームドコンセントを行い同意を得た DMD 患者より線維芽細胞を分離培養し、MyoD を発現させることのできるアデノウイルスベクター (AdMyoD) を感染させた。その後、ゲンタマイシン存在下でマイオチューブに分化誘導し、dy 染色とウエスタンブロット解析を行った。今回は点突然変異が既に分かっている下記の患者の線維芽細胞を用いた。

患者 1; エクソン 48・50 欠損, 患者 2; C2510T: CGA to TGA G, 患者 3; G562A: TGG to TGA C, 患者 4; C6491T: CGA to TGA C, 患者 5; C932T: CAA to TAA G,

患者 6; G2444T: GAA to TAA T, 患者 7: C6107T: CGA to TGA A, 患者 8: C4937T: CGA to TGA A, 患者 9: C6631A; TAC to TAAA, 患者 10; G4965A: TGG to TAG C

以上のジストロフィンの発現を解析した結果、TGA を持つ患者のみ dy の発現を dy 染色及びウエスタンブロット解析で認めた。しかし、TGA を持つにもかかわらず、dy の発現を認めない線維芽細胞(患者 8)も存在した。

### 2. ハイブリット型リポソームを用いたゲンタマイシン投与方法

蛍光物質をつけたハイブリット型リポソームをマウスの腹腔内注射し筋組織への移行するか検討した結果、投与後 2 時間がピークを示し、6 時間後まで蛍光物質を認めた。

マウスは 8~12 週齢の mdx マウスを使用し、ゲンタマシン (GM) の 34mg/kg を 1 倍量とし決めた。その濃度の何倍かで投与量を設定し、以下の投与量で実際に腹腔内に投与した。GM を封入したハイブリット型リポソームは、作製時に存在する水溶液中に存在するゲンタマシンをゲル濾過法で取り除き GM の封入率が 100%であるハイブリット型リポソーム (GM-Lip) を作製した。その GM-Lip と GM のみとハイブリット型リポソーム (Lip) のみを、それぞれ 1, 5, 10 倍量を 14 日間連日、腹腔内投与に投与した。投与 2 週間後、ABR (聴性脳幹反応)、Cre 値、CK 値、dy 陽性線維の出現率を測定した。CK の平均値は GM-Lip 投与群の 1 倍, 5 倍, 10 倍がそれぞれ、685.3±242.4, 758.5±171.8, 610 IU/l であり、GM の 1 倍, 10 倍が 1521.3±731.5, 1236.66±716.99, Lip の 1 倍, 5 倍は 2114±745.1, 2145±1350.5 であった(図 1)。なかでも、10 倍量の GM-Lip 投与群がもっとも小さい値を示した。

dy 陽性線維は腓腹筋よりとり出した筋組織を dy 染色し、無作為に組織の写真をとり、1 匹につき 3 視野を選びその平均を算出した。dy の陽性線維の平均値は GM-Lip 投与群の 1 倍, 5 倍, 10 倍はそれぞれ、3.87±1.65, 5.57±3.2, 7.73±6.95% であり、GM の 1 倍, 10 倍が 3.23±1.75, 4.62±3.76% であり、Lip の 1 倍, 5 倍は 2.44±2.04, 1.738±1.10% であった(図 2)。dy 陽性線維の出現する割合は GM-Lip の 10 倍が一番高く(図 3)、次に GM のみが高値を示した(図 2) GM-Lip を投与されたマウスの腓腹筋のウエスタンブロット解析でも dy の発現が確認された。

\* 熊本大学医学薬学研究部発達小児科

\*\* 熊本大学・耳鼻咽喉科

\*\*\* 神戸大学大学院医学系研究科・小児科学

\*\*\*\* 崇城大学応用生命科学科

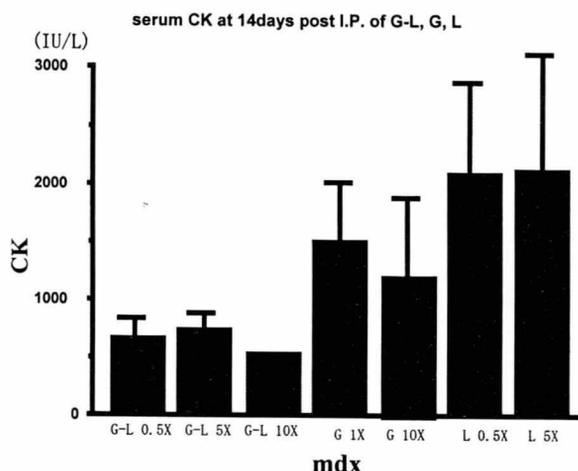


図1 GM-Lip, G, Lip を2週間投与して, CK を測定した. GM-Lip 投与群がG より低い傾向を示した.

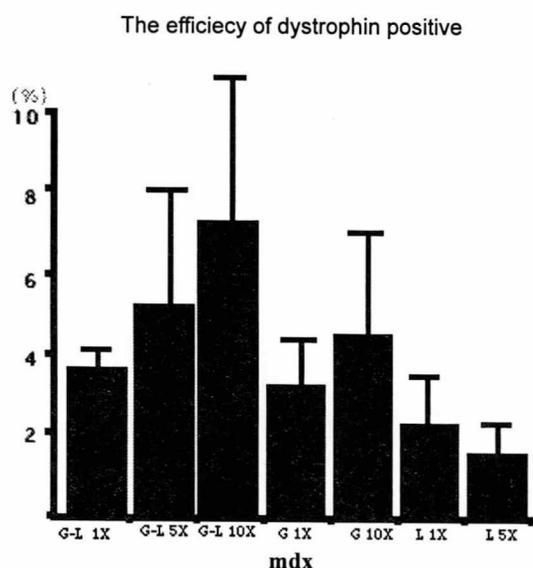


図2 GM-Lip, G, Lip を2週間投与して, dy の陽性率を算出した. dy 陽性繊維の出現率は GM-Lip 投与群の方が高い傾向を示した.

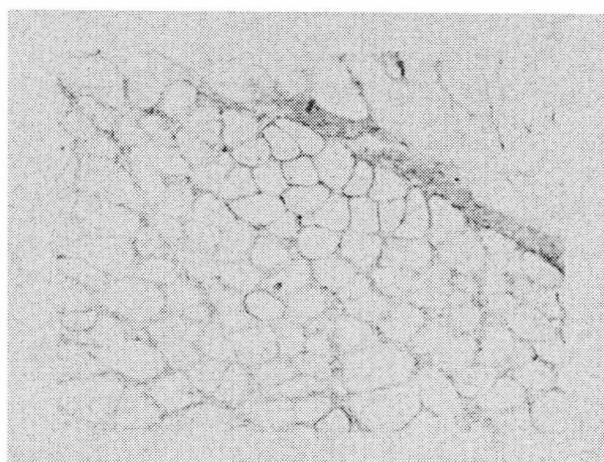


図3 ジストロフィン陽性線維がクラスターをなして出現した.

GM の副作用である聴毒性は GM-Lip 投与群ではすべての ABR において聴毒性は認めなかったが, 10 倍量の GM 投与群では 65dB において V 波は確認できず, 聴毒性を示した. 腎毒性はすべてのマウスについて Cre の上昇は認めなかった. 10 倍の GM のみの投与群ではすべてのマウスで体重減少を示したが, 10 倍の GM-Lip は増加していた.

## 考 察

DMD におけるゲンタマシン治療対象患者のスクリーニング法を確立した. TGA の点突然変異を持つ患者の線維芽細胞に dy の発現を認めたことにより, TGA を持つ患者がゲンタマイシン治療が一番有効ではないかと考える. しかし, TGA にもかかわらず, dy の発現を認めない患者 (患者 8) が存在し, 単にナンセンス変異の種類だけの問題ではないことを示唆している. この様な現象があるため実際に患者の細胞を用いて治療対象患者であるかどうかを in vitro で調べることは有意義である.

GM-Lip を使用することにより聴毒性が軽減できた. また, DMD における 10 倍の GM を投与されたマウスで体重の減少を示し, 副作用を示した. それは, ハイブリット型リポソームを使用することで回避された. また, CK は GM-Lip を使用した場合が一番低値を示し, dy の陽性線維の率は GM-Lip 投与群が高値を示した. このことはゲンタマシンが筋細胞内でリードスルーを引き起こし, ジストロフィンの発現を誘発したと考える. 以上より, ハイブリット型リポソームで封入してゲンタマイシンを投与する治療法は有効であること示した.

## 今後の展望

今後, GM-Lip の投与する個体の数を増やし, 有効性の検討を確認する. また, 反復投与による有効性も検討する. 有効性が確認出来れば, ヒトへの投与を前提として, 大型動物で本当に副作用を示さないか解析する.

## 文 献

- 1). Barton-Davis ER, et al. : J Clin Invest 104: 375-381, 1999.
- 2). Howard MT, et al. : Ann Neurol 48: 164-169, 2000.

# 筋疾患と小胞体ストレスの関連

吉 良 潤 一\*

研究協力者 池 添 浩 二\* 西 野 一 三\*\*  
埜 中 征 哉\*\* 古 谷 博 和\*

## 目 的

近年小胞体ストレスの概念が確立され、種々の神経変性疾患においてその関与が指摘されている。小胞体ストレスは様々な原因で惹起されるが、細胞内  $Ca^{2+}$  ホメオスタシスの乱れもその一因である。骨格筋細胞では収縮・弛緩時に  $Ca^{2+}$  が中心的な役割を果たすため、興奮収縮連関の異常は筋細胞内  $Ca^{2+}$  ホメオスタシスの乱れを引き起こすことが予想され、その結果として筋疾患でも小胞体ストレスが惹起されている可能性がある。そこで、興奮収縮連関が障害される筋疾患として、周期性四肢麻痺 (PP) と筋強直性ジストロフィー (DM1) に着目し、小胞体ストレスの関与を検索した。

## 対象と方法

Tubular aggregates (TAs) を有するヒト生検筋 12 例 (周期性四肢麻痺 11 例, myalgia/cramps syndrome 1 例) に対し、unfolded protein response のひとつとしてその発現が増加する GRP78 および GRP94 の局在および発現量を免疫組織化学的に、およびウエスタンブロット法を用いて解析した。

また遺伝子検索により診断が確定している DM1 生検筋 6 例に対し、GRP78, GRP94, XBP-1, リン酸化 eIF-2 $\alpha$ , calnexin, calreticulin に対する抗体を用いて免疫組織学的検索を行った。

## 結 果

PP 生検筋では GRP78 および GRP94 が TAs に強く発現しており、ウエスタンブロット法でも正常筋に比べ有意にその発現は増加していた。また全症例において dysferlin が TAs に強く発現していた。しかし dystrophin,  $\alpha$ - および  $\beta$ -sarcoglycan,  $\beta$ -dystroglycan, caveolin-3, laminin-2 は TAs には陰性であり、dysferlin のみが特異的に TAs に発現することもわかった。

一方 DM1 生検筋では特徴的な病理所見である sarcoplasmic mass および pyknotic nuclear clump を有する筋線維において GRP78, GRP94, XBP-1, リン酸化 eIF-2 $\alpha$ , calnexin, calreticulin の発現が認められ、一部筋核は TUNEL 陽性であった。これらの蛋白の発現は DMPK 遺伝子の CTG リピート延長と正の相関を示す傾向にあっ

た。また、同じく pyknotic nuclear clump を有する脊髄性筋萎縮症 III 型の生検筋で検索したところ、やはり pyknotic nuclear clump に GRP78, GRP94, XBP-1, リン酸化 eIF-2 $\alpha$ , calnexin, calreticulin の発現を認め、一部筋核は TUNEL 陽性であった。

## 考 察

PP では TAs の出現を特徴とする。TAs は筋小胞体 (SR) 由来の構造である。その形成機序は判明していないが、SR が筋細胞内での  $Ca^{2+}$  濃度を調節することと、TAs にも  $Ca^{2+}$  貯蔵能があることより、筋細胞内での  $Ca^{2+}$  ホメオスタシスの維持や  $Ca^{2+}$  を介するシグナル伝達に何らかの関与をしていると思われる。また Dysferlin は TAs に発現することがわかった。これは少なくとも病的状態下では dysferlin は筋細胞膜のみならず SR にも発現することを示唆する。また dysferlin の TAs における発現、および TAs の生成は小胞体ストレスに対する反応である可能性が考えられる。

一方 DM1 骨格筋でも小胞体ストレスが存在していることが判明した。それは sarcoplasmic mass および pyknotic nuclear clump を有する筋線維にほぼ限られているものの、DM1 における骨格筋障害に何らかの関与をしているものと思われる。加えて脊髄性筋萎縮症 III 型で出現する pyknotic nuclear clump でも小胞体ストレスが存在した。したがって、骨格筋萎縮の終末状態においては小胞体ストレスが疾患にかかわらず惹起されている可能性がある。

## 研究の意義

PP および DM1 における小胞体ストレスの関与を示した。また従来成熟筋細胞においては細胞膜にしか局在しないとされていた dysferlin が筋小胞体にも局在しうることを示した。

## 参考文献

- 1) Anderson LVB *et al.* Hum Mol Genet 8:855-861, 1999.
- 2) Martin JE *et al.* Muscle Nerve 14:291-225, 1991.
- 3) Reske-Nielsen E *et al.* J Biol Chem 273:15879-15882, 1998.
- 4) Salviati G *et al.* Muscle Nerve 8:299-306, 1985.
- 5) Ikezoe k *et al.* Acta Neuropathol 105: 603-609, 2003.

\* 九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科

\*\* 国立精神神経センター

# Small Group Workshop

- 1) 2002. 11. 16 縁取り空砲を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) ..... 177  
国立精神・神経センター神経研究所 西野 一三
- 2) 2002. 11. 26-27 Molecular Therapy for Muscular Dystrophy ..... 179  
東京大学大学院総合文化研究科 松田 良一
- 3) 2003. 7. 26 薬剤による遺伝子発現調整 ..... 182  
東京大学大学院総合文化研究科 石浦 章一
- 4) 2003. 10. 4 先天性筋ジストロフィー研究の進歩：  
翻訳後修飾異常と筋ジストロフィー ..... 184  
東京都老人総合研究所 遠藤 玉夫
- 5) 2003. 10. 24 三好型筋ジストロフィー/LGMD2B;ジスフェリンの機能と筋ジストロフィー  
..... 187  
国立精神・神経センター神経研究所 桃井 隆
- 6) 2004. 9. 25 リソソーム再訪 ..... 189  
東京大学大学院総合文化研究科 石浦 章一
- 7) 2004. 11. 12-13 Molecular Therapy of Muscular Dystrophy, Part II ..... 191  
東京大学大学院総合文化研究科 松田 良一

## Small group workshop

### 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV)

2002年11月16日(土)  
全共連ビル地下1階 No. 19

#### プログラム

清水輝夫班長挨拶

9:55 - 10:00

GNE 遺伝子解析 (座長: 田中恵子) 10:00 - 11:20 (15分発表、討論5分)

新井亜希 (新潟大学脳研究所神経内科)

水澤英洋 (東京医科歯科大学神経内科)

永田哲也 (国立療養所岩手病院神経内科)

西野一三 (国立精神・神経センター神経研究所)

#### 休憩

教育講演(1) (座長: 水澤英洋) 11:30 - 12:20 (40分発表、討論10分)

シアル酸合成経路

遠藤玉夫 (東京都老人総合研究所)

#### 昼食

教育講演(2) (座長: 青木正志) 13:30 - 14:20 (40分発表、討論10分)

オートファジーと筋疾患

水島 昇 (基礎生物学研究所)

#### 休憩

DMRVの病態解析 (座長: 西野一三) 14:30 - 16:10 (15分発表、討論5分)

オートファジー

熊本俊秀 (大分医科大学第三内科)

タウ、アミロイド等

中野 智 (関西医科大学神経内科)

杉江和馬 (国立精神・神経センター神経研究所)

アポトーシス

埜中征哉 (国立精神・神経センター武蔵病院)

生化学

野口 悟 (国立精神・神経センター神経研究所)

#### 休憩

総合討論 (司会: 西野一三)

16:20 - 16:40

# 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー

## distal myopathy with rimmed vacuoles: DMRV

文責 西野 一三

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部

### SGW 開催の背景と目的

DMRV は、臨床的には、15 歳から 40 歳に発症して、主に前脛骨筋、大腿後面筋群を中心に筋力低下と筋萎縮を呈する、常染色体劣性遺伝病である。筋病理学的には、多数の縁取り空胞の出現と径 20 nm 前後の tubulofilamentous inclusion の出現により特徴づけられる。これまでに、本邦においては、新潟大学グループが連鎖解析を行い、第 9 染色体上に遺伝子座があることが明らかとなっていた。

一方、欧米では、1984 年に Argov らにより、quadriceps-sparing myopathy として報告され、現在では、hereditary inclusion body myopathy (HIBM) として広く知られる疾患がある。この疾患では、しばしば前脛骨筋が強く侵されること、筋病理学的変化は、事実上同一であることから、DMRV との異同が問題となっていた。事実、イスラエルのグループは、DMRV の報告に先駆けて、HIBM 遺伝子座が第 9 染色体上にマップされることを報告していた。このような状況の下、2001 年にイスラエルグループは、HIBM 患者では、UDP-GlcNAc 2-epimerase (GNE) /ManNAc kinase (MNK) の二つの酵素活性を有する分子をコードする GNE 遺伝子に変異があることを報告した。

この結果を受けて、本邦の新潟大学、東京医科歯科大学、東北大学、国立精神・神経センターの 4 グループを中心にそれぞれ GNE 遺伝子変異検索を行い、DMRV 患者においても GNE 遺伝子変異が認められることを確認した。本 SGW は、この 4 施設のデータを持ち寄り、本邦 DMRV 患者の遺伝子型と表現型の全容を把握すること、GNE 遺伝子変異を踏まえて、DMRV の分子病態を捉え直すこと、本邦での DMRV 共同研究を推進することを目的として開催された。

### 演者と講演内容

**GNE 遺伝子解析 (新井亜希, 水澤英洋, 永田哲也, 西野一三):** 4 施設での変異結果を報告した。イスラエルの報告と同様に、大部分がミスセンス変異であり、GNE 領域にも、MNK 領域にも変異が認められた。変異の組み合

わせは様々で、GNE 領域同士、MNK 領域同士、GNE 領域・MNK 領域の組合せの何れのパターンも認められた。本邦では、V572L 変異が最も高頻度で、D176V が次に多かった。V572L 変異には創始者効果が認められた。遺伝子変異が確認された例の大部分は典型例であったが、心筋障害を認めた兄弟例 (東北大学) や無症状ホモ接合体例 (国立精神・神経センター) などの特異な例の報告もあった。また、従来考えられていたよりも発症年齢は幅広く、また、症状の進行速度や程度にもかなり幅があることが明らかとなった。

**教育講演 (1) シアル酸生成経路 (遠藤玉夫):** GNE がシアル酸生成経路の律速酵素、MNK はその次のステップを触媒する酵素であることから、シアル酸生成経路の概要について、講演を頂いた。

**教育講演 (2) オートファジーと筋疾患 (水島昇):** DMRV の筋病理を特徴づける縁取り空胞は、電顕的には自己食空胞の集塊であることから、オートファジーの亢進あるいは何らかの異常が示唆される。そこで、近年相次いで明らかにされたオートファジーの分子機構について、筋疾患の病態との関連から講演を頂いた。

**DMRV の病態解析 (熊本俊秀, 中野智, 杉江和馬, 桢中征哉, 野口悟):** 現時点で考え得る DMRV の病態について、オートファジー、アミロイド、アポトーシス、シアル化異常の観点から、各種データと病態に対する仮説の検討を行った。

### まとめ

東京医科歯科大学神経内科で使用している臨床調査票に改変を加えたものを共通に用いることで、4 施設を中心に、本邦における DMRV 患者の大規模調査を行うこととなった。GNE 遺伝子変異同定後も、依然として DMRV の分子病態の全容は明らかではないが、GNE 変異により、低シアル化を来し、その下流現象として、オートファジー、アミロイド形成、タウ異常リン酸化、ユビキチン・プロテアソーム系活性化、アポトーシスなどの様々な現象が生じ、それが、病理学的には縁取り空胞や封入体の形成として捉えられるものと考えられた。

# International Symposium of "Molecular Therapy for Muscular Dystrophy"

Organized by Teruo Shimizu and Ryoichi Matsuda

Sponsored by Muscular Dystrophy Group, The Ministry of Health,  
Labour and Welfare, Japan

Date: November 26 (Tue) through November 27 (Wed), 2002.

Place: Gakushi-Kaikan

3-28 Kanda Nishiki-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8459, Japan

Phone# +81-3-3292-5936

<http://www.gakushikai.or.jp/facilities/index.html>

## November 26 (Tue), 2002

Chairpersons: Drs. Teruo Shimizu and Ryoichi Matsuda

9:30 Teruo Shimizu P.5  
(Department of Neurology and Neuroscience, Teikyo University School of Medicine, Tokyo 173-8605, Japan)  
Opening remarks

9:45 Richard C. Strohman P.6  
(Department of Molecular and Cell Biology, Univ. of California, Berkley, CA 94720-3206, USA)  
Modern biology & medicine in crisis: Difficulties in, and new solutions to, understanding the origins of disease phenotype

10:30 H. Lee Sweeney P.7  
(Department of Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA19104, USA)  
Stop codon suppression for treatment of a subset of dystrophin mutations

11:30 Ryoichi Matsuda P.8  
(Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 153-8902, Japan)  
Negamycin can restore dystrophin in mdx muscles

12:15 Lunch

Chairpersons: Drs. Paul L. McNeil and Shigeo Ohta

14:00 Valerie Allamand P.9  
(INSERM U523, Institut de Myologie-Batiment Joseph Babinski, Groupe Hospitalier Pitie-Salpetriere, 75651 Paris Cedex 13, France)  
Ex vivo treatment of laminin alpha 2 chain-deficient myotubes with antibiotics forcing readthrough of premature stop codons

14:45 Elisabeth Barton P.10  
(Department of Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA)  
Systemic administration of L-arginine benefits skeletal muscle function in mdx mice

15:30 Coffee break

Chairpersons: Drs. Terrence Partridge and Shoichi Ishiura

16:00 Yoshihiro Kashiwaya P.11  
(Unit of Metabolic Control Laboratory of Membrane biology and biophysics/National Institutes of Alcohol abuse and Alcoholism /National Institutes of Health/Department of Health and Human Services, Rockville, MD.20852, USA)  
D-b-hydroxybutyrate reverses heart failure and insulin resistance in perfused hearts from MDX mice.

16:45 Shigeo Ohta P.12  
(Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Gerontology, Nippon Medical School, Kanagawa, Japan)  
Protein therapeutics by using the super anti-apoptosis factor FNK

17:30 Paul L. McNeil P.13  
(Department of Anatomy and Cellular Biology and Institute for Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Augusta, GA 30912-2000, USA)  
How cells repair plasma membrane disruptions

18:30 Social hour

## November 27 (Wed), 2002

Chairpersons: Drs. H. Lee Sweeney and Masafumi Matsuo

9:30 Ugo Carraro P.14  
(C.N.R. Institute of Neuroscience, Unit for Muscle Biology and Physiopathology, c/o Department of Biomedical Sciences, Padua Medical School, University of Padova, Padova, Italy)  
Basics to gene therapy: Quantify and stage regenerative myogenesis in muscular dystrophies

10:15 Naohiro Hashimoto P.15  
(Stem Cell Research Unit, Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, Tokyo 194-8511, Japan)  
Plasticity of muscle stem cells

11:00 Shin'ichi Takeda P.16  
(Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo 187-8502, Japan)  
New therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy:  
Over-expression of endogenous utrophin

11:45 Lunch

Chairpersons: Drs. Ugo Carraro and Kiichiro Matsumura

13:00 Terence Partridge P.17  
(Muscle Cell Biology Group, MRC Clinical Sciences Centre, Hammersmith Hospital, London, W12 0NN, UK)  
Behavior of satellite cells in regenerating muscle And Correction of the mutated dystrophin gene by casual and deliberate exon skipping

14:00 Masafumi Matsuo P.18  
(Division of Molecular Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine, Hyogo, 650-0017, Japan)  
Treatment of Duchenne muscular dystrophy with oligonucleotides against an exonic splicing enhancer sequence

14:45 Tatsushi Toda P.19  
(Division of Functional Genomics, Department Post-Genomics and Diseases, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871, Japan)  
Recent advances in Fukuyama CMD and muscle-eye-brain disease

15:30 Coffee break

Chairpersons: Drs. Elisabeth Barton and Shin'ichi Takeba

16:00 Shoichi Ishiura P.20  
(Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 153-8902, Japan)  
Direct evidence that RNA-binding proteins interact with CUG tri- and CCUG tetra-nucleotide repeats in myotonic dystrophy: its therapeutic implications

16:45 Kiichiro Matsumura P.21  
(Department of Neurology and Neuroscience, Teikyo University School of Medicine, Tokyo 173-8605, Japan)  
Disruption of dystroglycan axis by matrix metalloproteinase in cardiomyopathic hamster muscle

17:30 Ryoichi Matsuda  
(Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 153-8902, Japan)  
Closing remark

## 清水班ワークショップ「薬剤による遺伝子発現調整」

日時：平成 15 年 7 月 26 日（土）13 時－17 時

会場：全共連ビル地下 1 階 No.14

あいさつ 清水輝夫（帝京大学医学部）

- 1 大野茂男（横浜私立大学医学部）  
Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)について（総論）  
13 時－14 時
  - 2 白杵扶佐子（国立水俣病研究センター）  
NMD の応用例  
14 時－14 時 30 分
  - 3 松田良一（東京大学）  
抗生物質による stop codon 読み飛ばし  
14 時 30 分－15 時
  - 4 松尾雅文（神戸大学医学部）  
エキソンスキッピング（総論）  
15 時－16 時
  - 5 木村重美（熊本大学医学部）  
ゲンタマイシンによる治療実験  
16 時－16 時 30 分
- 総合討論 石浦章一（東京大学），清水輝夫（帝京大学医学部）  
16 時 30 分－17 時

## 薬剤による遺伝子発現調節

文責 石浦 章一  
東京大学大学院総合文化研究科

厚生労働省委託研究：筋ジストロフィー清水班 Small group workshop「薬剤による遺伝子発現調節」は、平成15年7月26日、全共連ビルで行われた（オーガナイザー、石浦章一、東大・院・総合文化）。これは、NMDやエキソスキップ、停止コドン読みとばし、など遺伝子疾患の薬剤治療を目指したものである。

班長の挨拶のあと、大野茂男博士（横浜市立大学）がNMD(nonsense-mediated mRNA decay)について1時間、総論を述べた。これは、停止コドンが入ったmRNAが、選択的に分解されてしまう機構で、数多くの因子の参加によって行われている。大野は、線虫とヒトを対比して、NMDの基本メカニズムは種に関わらず保存されていることを示した。特に、hSMG1という大きなキナーゼが関与していて、このキナーゼの阻害剤によってNMDが抑制されることを示した。

白杵扶佐子博士（国立水俣病研究センター）は、大野と共同研究を行っているが、臨床材料を用いてNMD阻害を行い、遺伝性疾患が治る可能性を示した。材料はUllrich病で、コラーゲンVIが欠損している細胞に、hSMG1の阻害剤であるウォルトマニンやカフェインを培養外液に添加すると、NMDが阻害され、異常mRNAの

分解が抑制されるので、停止コドンが入ったmRNAが安定化し、短いタンパク質が作られて細胞膜に取り込まれることを示した。

松田良一博士（東京大学）は、停止コドンの入ったmRNAを読み飛ばすネガマイシンという抗生物質の機能について議論した。ジストロフィン遺伝子に停止コドンが入ったmdxマウスにネガマイシン投与すると、ジストロフィンの蛍光染色が回復することを示した。欧米ではゲンタマイシンですでに同様の結果が報告されており、今後は、効率の良い抗生物質の開発が望まれる。

松尾雅文博士（神戸大学）は、以前から行っているジストロフィン欠損患者をエキソスキッピングという方法で治す試みについて講演した。この方法は、すべての患者で使えるわけではないが、症例によっては強力な武器になるものと思われた。

木村重美博士（熊本大学）は、ゲンタマイシンによる治療実験について述べた。ゲンタマイシンも、前述のネガマイシンも、難聴や肝毒性など種々の副作用が出ることが予想される。今後は、副作用のない治療薬の開発や、NMDとの併用によって不安定なmRNAを保存して、翻訳時に抗生物質を使って停止コドン読み飛ばすことによって、機能を保持したタンパク質をつくる試みもすべきだろう。

## Small group workshop

先天性筋ジストロフィー研究の進歩：翻訳後修飾異常と筋ジストロフィー

平成 15 年 10 月 4 日

全共連ビル地下一階 No.19

### プログラム

9 時 55 分（開始）（座長：遠藤玉夫）

清水輝夫班長 挨拶（5 分）

糖鎖とは 遠藤玉夫（東京都老人総合研究所）（5 分）

動物レクチンと糖鎖認識 平林 淳（産業技術総合研究所糖鎖工学研究センター）（35 分）

休憩（10 分）

（座長：戸田達史）

糖タンパク質の品質管理とユビキチン・プロテアソーム系 田井 直（東京都臨床医学総合研究所）（35 分）

細胞内糖修飾 O-GlcNAc の生理学的意義 亀村和生（理化学研究所）（35 分）

昼食（12 時 00 分・13 時 10 分）

（座長：西野一三）

神経細胞移動と脳の構築異常 寺島俊雄（神戸大学）（35 分）

福山型先天性筋ジストロフィーと類縁疾患(MEB と WWS) 戸田達史（大阪大学）（30 分）

Dystroglycan conditional KO mice の解析 斎藤史明（帝京大学）（30 分）

マトリックスメタロプロテアーゼ：ジストログリカンによる細胞内外の架橋構造を破壊する

別のメカニズム 松村喜一郎（帝京大学）（10 分）

休憩（10 分）

（座長：松村喜一郎）

パルカンの神経筋発生及び疾患における役割 平澤恵理（順天堂大学）（30 分）

FCMD における網膜病変の病理学的検討 福與なおみ 大澤真木子 斎藤加代子

小林慎雄（東京女子医科大学）（25 分）

$\alpha$ ジストログリカン関連筋ジストロフィーの遺伝子解析 林由起子（国立精神・神経センター神経研究所）（20 分）

DMRV 研究：最近の進歩 西野一三（国立精神・神経センター神経研究所）（20 分）

総合討論（座長：遠藤玉夫）（10 分）

16 時 50 分（終了）

# 先天性筋ジストロフィー研究の進歩： 翻訳後修飾異常と筋ジストロフィー

遠藤 玉夫\*

複合糖質の糖鎖が、多細胞生物で営まれているさまざまな生命現象（発生、分化、炎症、免疫、感染症、がん、細胞接着、老化など）において重要な役割を果たしていることが分かってきた。もし、それらの糖鎖の欠損あるいは構造異常が生じるとさまざまな病態が生じることは想像に難くない。動物細胞で合成されるタンパク質の50%以上は糖鎖が付加されていると推定されている。 $\alpha$ ジストログリカンにマンノース (Man) を介して結合する新しいタイプの糖鎖、O-Man 型糖鎖 (Sia $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man) が発見された。O-Man 型糖鎖は、脳、神経、あるいは骨格筋など限られた糖タンパク質に存在する。O-Man 型糖鎖の合成に関わる protein O-mannose  $\beta$ 1,2 N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1) の遺伝子が先天性の筋ジストロフィーに眼奇形、神経細胞移動障害を伴う常染色体劣性遺伝病である muscle-eye-brain (MEB) 病の原因遺伝子であることが明らかになった。さらに最近の研究により、MEB 病と類似の病態を呈する福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD)、Walker-Warburg 症候群 (WWS)、先天性筋ジストロフィー1C 型 (MDC1C)、先天性筋ジストロフィー1D 型 (MDC1D) など他の筋ジストロフィーでも、いずれも  $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖修飾異常が認められ、神経細胞移動障害を伴う筋ジストロフィーの発症機序に糖鎖が深く関わると考えられるようになった。これらの異常を具体的に明らかにすることは、筋ジストロフィーの糖鎖病理機序の解明の新たな道を拓くことが期待される。

糖鎖というのは多様性があり取扱いが難しく、余り馴染みのない生体高分子であるというイメージがある。そこで今回の「先天性筋ジストロフィー研究の進歩：翻訳後修飾異常と筋ジストロフィー」のワークショップを開催した。まず、前半で糖鎖研究の第一線で活躍されておられる先生方に糖鎖について分かりやすく解説して頂いた。さらに後半で糖鎖異常とされる筋ジストロフィーについて最新のデータを発表して頂き討議した。

## 1) 糖鎖についての教育講演

最初に「糖鎖とは」と題して私が簡単なイントロダクションを行なった。引き続き講演に入り、平林 淳 (産業技術総合研究所糖鎖工学研究センター) は、生体における糖鎖の役割について糖鎖と結合する動物レクチンの立場から解説した。田井 直 (東京都臨床医学総合研究所) は、細胞内における糖鎖の役割について糖鎖を認識しユビキ

チン化するシステム、つまり糖鎖を介したタンパク質の品質管理機構について解説した。亀村和生 (理化学研究所) は、やはり細胞内における糖鎖の役割として、タンパク質の O-GlcNAc 修飾について解説した。O-GlcNAc の生理学的意義は細胞内情報伝達で重要な役割を果たしているリン酸化を調節している可能性を示唆した。これら二つの講演は、従来糖鎖は細胞の表面あるいは細胞の外で機能していると考えられていたが、実は細胞内でも大変重要な役割を果たしていることを明らかにしたものである。

## 2) 糖鎖異常とされる筋ジストロフィーについて最新の知見

寺島俊雄 (神戸大学) は、神経細胞移動障害と脳の構築異常を示すさまざまなミュータントマウスを取り上げ、解剖学的所見について報告した。リーラーマウスは従来層構造異常と単純に説明されていたが、詳細に形態を解析すると従来言われているような第一層がなく層構造が逆転という単純な異常ではなく diffusible な障害、fukutin は基底膜グリア性境界異常、CDK5 と p35 は post-plate 異常、Reelin, DAB1, VLDLR, APOER2 は皮質ニューロンが pre-plate に侵入できず outside-in 配列になる異常、などについて解析結果を報告した。また、ヒトで REELIN 変異患者がみつかったことも報告した。この講演は出席者の注目を浴び、年度末の班会議の席上改めて、より多くの班員の前でお話頂くことにした。

戸田達史 (大阪大学) は、FCMD と類縁疾患 (MEB と WWS) について概説した。次に fukutin 欠損マウスは胎生致死であることを報告した。そこで fukutin 欠損細胞キメラマウスを作製し、その様々な病態について報告した。筋力低下、運動失調様行動を呈すること、骨格筋では筋線維の大小不同、間質の増大、壊死および再生像を呈すること、抗糖鎖  $\alpha$ ジストログリカン抗体により  $\alpha$ ジストログリカンの発現低下が認められること、大脳では左右半球の癒合、皮質および海馬の構造異常、第 V 層ニューロンは皮質深部から表層にかけて広く分布すること、眼では眼球の奇形や角膜の混濁などを報告した。さらに fukutin はゴルジに局在しており、患者から見つかった点変異の fukutin はゴルジに到達できないことを示した。さらに fukutin は N 型糖鎖の修飾を受けていることを明らかにした。

齊藤史明 (帝京大学) は、ジストログリカン組織特異的欠損マウス (脳、骨格筋、末梢神経それぞれ) の解析について報告した。脳でのみ特異的にジストログリカンを欠くと、大脳皮質層構造の欠如、異常脳回、グリア性境界膜-基底膜の破壊などの脳奇形、筋でのみ特異的にジストログ

\* 東京都老人総合研究所

リカンを欠くと、DGCの構成成分の消失、緩和な筋ジストロフィー、末梢神経でのみ特異的にジストログリカンを欠くと、ミエリンと絞輪の形成不全、ランヴェエ絞輪でのナトリウムチャンネルの減少、などが観察され、改めてジストログリカンの重要性が認識された。これらの異常にジストログリカンの糖鎖がどの位関与するか興味もたれる。

松村喜一郎（帝京大学）は、ジストログリカンの糖鎖異常だけでなく別の翻訳語修飾であるタンパク質分解、マトリックスメタロプロテアーゼによってジストログリカンを介した細胞内外の架橋構造が破壊される可能性に言及した。癌細胞で特に顕著にジストログリカンは分解を受けていること、心筋症ハムスター（LGMDのモデル）でも認められること、さらにサルコグリカン欠損LGMD2Eでも認められることを報告した。

平澤恵理（順天堂大学）は、パールカン（ヘパラン硫酸プロテオグリカン）のノックアウトマウスを作製し、パールカンの機能完全欠損はノックアウトマウスの症状とよく似た周産期致死性のSilverman-Handmaker型軟骨異形成症(DDSH)を発症することを示した。このマウスは、神経筋接合部アセチルコリンエステラーゼが特異的に消失していた。さらに、このマウスに対して軟骨特異的にパールカンを発現させたマウス作製に成功した。この機能部分欠損マウスは、軟骨病変と筋持続収縮（ミオトニア）を併せ持つSchwartz-Jampel症候群(SJS)を発症すること、ミオトニアのメカニズムを研究するのに良いモデルであることを示した。

福與なおみ、大澤真木子、斎藤加代子、小林慎雄（東京女子医科大学）は、FCMDにおける網膜病変の病変について報告し、網膜においても基底膜異常が認められるが、これはグリア様細胞である網膜ミュラー細胞の関与と、FCMD脳での形態形成異常、すなわちグリア性境界膜の断裂と共通する糖鎖異常で説明できるのではないかとした。

林由起子（国立精神・神経センター神経研究所）は、日本における $\alpha$ ジストログリカン関連筋ジストロフィーの遺伝子解析(FCMD, FKR, WWS, MEB)について詳細な報告をした。また、WWSで三つの連続した塩基の脱離が起こりこれは421番目のロイシンの脱離となる変異について報告した。これらすべてジストログリカンのコアタンパク質は検出されることから、すべて糖鎖異常であろう、とした。

西野一三（国立精神・神経センター神経研究所）は、シアル酸供与体の中間体の合成に関与する遺伝子(UDP-GlcNAc-2-epimerase, ManNAc kinase)変異が原因(GNEの変異)である、DMRV研究について最近の進歩をまとめて報告した。骨格筋でシアル化されている糖鎖が少なくGalNAcがむき出しになっていることや培養細胞レベルでは、ManNAc, NeuNAcを培地に加えることによりシアル化が回復することを示した。遺伝子変異があっても発病しない例を報告し、シアル酸の複雑な代謝系(サルベージ回路)によりシアル酸が補償されている可能性を示唆し、DMRVの複雑な病態の奥深さを示唆した。

三好型筋ジストロフィー／LGMD2B；  
ジスフェルリンの機能と筋ジストロフィー

(Moderator: 桃井 隆)

日時：平成 15 年 10 月 24 日 (金)  
午後 1 時 00 分・午後 5 時 20 分  
場所：全共連ビル地下 1 階 No.19  
問い合わせ先：Tel: 042-341-2711(内線 5273)

プログラム

午後 1 時 00 分 (開始) (座長：桃井 隆)  
清水輝夫班長 挨拶 (5 分)

(座長：青木正志)  
常染色体劣性遠位型筋ジストロフィー (三好) の臨床と原著論文症例のジスフェルリン遺伝子異常  
川井尚臣 (高松市民病院 名誉院長) (30 分)

細胞膜修復とリソソーム  
木南 英紀 (順天堂大学医学部生化学教室) (15 分)

三好型筋ジストロフィーの病理  
埜中征哉 (国立精神・神経センター武蔵病院長) (30 分)

日本人 dysferlinopathy における遺伝子変異と臨床型  
青木正志, 高橋俊明 (東北大学神経内科) (30 分)

2:50—3:05 (休憩) (15 分)

(座長：桃井 隆)  
メンブレントラフィック・分子機構から高次機能への展開・  
吉森 保 (国立遺伝学研究所) (40 分)

カルシウム結合ドメインの構造と機能  
反町洋之 (東京大学大学院農学生命科学研究科) (30 分)

ジスフェルリンの膜融合機能について  
藤田恵理子, 桃井 隆 (国立精神・神経センター神経研究所疾病 5 部) (20 分)

ジスフェルリン結合タンパク質の発現  
林 由起子 (国立精神・神経センター神経研究所疾病 1 部) (30 分)

総合討論 (座長：桃井 隆) (20 分)  
5:25 (終了)

# 三好型筋ジストロフィー/LGMD2B ; ジスフェルリンの機能とジストロフィー

桃 井 隆\*

三好型/LGMD2B 筋ジストロフィーの原因遺伝子として、ジスフェルリンが見い出され、その塩基配列からジスフェルリンはカルシウムが結合する C2 ドメインをもち、膜融合に関係する蛋白であると推定されてきたが、実際の機能や筋ジストロフィーを誘導する機構、また他の筋ジストロフィーの原因蛋白との関係など依然不明な点が多く残されている。

本ワークショップでは、常染色体劣性遠位性筋ジストロフィー（三好）と LGMD2B の臨床症例、ジスフェルリン遺伝子の変異、および筋細胞膜の修復とジスフェルリンとの関係、ジスフェルリンの機能欠損と三好型/LGMD2B 筋ジストロフィーの発症との関係を考える機会とした。

川井尚臣先生（高松市民病院 名誉院長）は三好型筋ジストロフィーの臨床的特徴について、1967年の発表以来の原著症例（Miyoshi ら, Brain, 1986 を含む）を中心に述べた。原著論文症例の 3 家系 4 症例のジスフェルリン遺伝子解析で、C4968T (Thr1532Met), C1939G (Try522stop), 6048delT (stop codon) の変異が検出され dysferlinopathy であることが確認された。

青木正志先生（東北大学神経内科）は日本人

dysferlinopathy における遺伝子変異と臨床型について報告し、特に神経症状を示す症例を報告し、注目を集めた。

埜中征哉先生（国立精神・神経センター武蔵病院院長）は dysferlinopathy の筋組織の細胞膜は不連続の断片化がおきており、明らかにジストロフィン欠損の筋ジストロフィーとは異なることを、美しい電顕写真で示した。

反町洋之先生（東京大学大学院農学生命科学研究科）はジスフェルリンのカルシウム結合領域である C2 ドメインの立体構造を紹介した。

木南 英紀先生（順天堂大学医学部生化学教室）は細胞膜修復におけるリソゾームの関与について、現在考えられている分子機構を説明した。

吉森 保先生（国立遺伝学研究所）はエンドゾーム融合と膜輸送の分子機構、オートファジーからリソゾームの生成の機構について紹介した。

藤田恵理子/桃井隆先生（国立精神・神経センター神経研究所疾病 5 部）は膜融合過程におけるジスフェリン分子の結合蛋白とその分子機構を示した。

林 由起子先生（国立精神・神経センター神経研究所疾病 1 部）は新たなジスフェルリン結合タンパク質の存在を示唆するデータを紹介し、注目を浴びた。

---

\* 国立精神・神経センター神経研究所疾病 5 部

## ワークショップ：「リソソーム再訪」

場所：全共連ビル地下 No.18 室

日時：平成 16 年 9 月 25 日（土）午後 1 時から午後 4 時半

演者：

- 1) 13:00 あいさつ
- 2) 13:05-14:00 Boris Turk (Jozef Stefan Inst., Slovenia)  
Lysosomal Cathepsins
- 3) 14:00-14:45 木南英紀 (順天堂大学医学部)  
リソソームとオートファジー
- 4) 14:45-15:30 山本健二 (九州大学歯学部)  
Medical Aspects of Endolysosomal Aspartic Proteinases
- 5) 15:30-16:15 桃井 隆 (国立精神・神経センター)  
変異蛋白凝集と小胞体ストレス --- 細胞死とオートファジー
- 6) 16:15- ディスカッション

オーガナイザー：石浦章一 (東大・大学院総合文化研究科)

班長：清水輝夫 (帝京大神経内科)

## リソソーム再訪

文責 石 浦 章 一  
東京大学大学院総合文化研究科

厚生労働省委託研究：筋ジストロフィー清水班（14B-4）の Small group workshop 「リソソーム再訪」は、石浦章一（東大・大学院総合文化研究科）をオーガナイザーとして、平成 16 年 9 月 25 日（土）午後 1 時から午後 4 時半、全共連ビル地下 No.18 室で行われた。

主演者は、スロベニア国の Jozef Stefan 研究所の Boris Turk 博士で、「Lysosomal Cathepsins」と題してリソソームタンパク分解酵素についてのオーバービューを行った。Turk 博士は、世界プロテオリシス会議のヨーロッパカウンシルメンバーであり、カテプシンの世界的権威である。講演では、11 種類のカテプシンの機能、構造の差異、筋肉疾患での活性化など、最新の知見を紹介した。

次に講演した木南英紀博士（順天堂大学医学部）は、「リソソームとオートファジー」と題して、オートファジーの最新の知見を述べた。空胞変性とオートファジーとの関係、オートファジーに関わる十数種類の因子の同定、ノックアウトマウス、など筋変性とオートファジーがどのように関わるかについてまとめた。

山本健二博士（九州大学歯学部）は、リソソーム酵素、特にアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン D やカテプシン E の権威である。講演は、「Medical Aspects of Endolysosomal Aspartic Proteinases」と題して行われ、山本研究室で初めて行われたカテプシン E ノックアウトマウスの表現型について詳しく解析した。

桃井隆博士（国立精神・神経センター）は「変異蛋白凝集と小胞体ストレス --- 細胞死とオートファジー」という題で、主に小胞体ストレスについてまとめた。このあたりは、本年度のノーベル化学賞のテーマである細胞内タンパク質分解とも重なり合うところがあり、興味深い議論がなされた。

神経筋疾患にタンパク分解が関与していることは周知の事実だが、かつてリソソームと細胞質分解に分けて議論してきた時代から、個々の機能を分子生物学的に明らかにする時代がきている。この Small group workshop 「リソソーム再訪」は、もう一度、リソソームの機能を見直そう、という目的で行われ、最新のオートファジーや小胞体ストレスがリソソーム機能に関係していることが明らかになった。

# SGW (Molecular Therapy of Muscular Dystrophy, Part II)報告

松田 良一

東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系 (生物学)

平成16年11月12(金), 13(土)の2日間, 東京大学教養学部キャンパス内の駒場ファカルティハウスにおいて, 国際シンポジウム“Molecular Therapy of Muscular Dystrophy, Part II (筋ジストロフィーの分子治療/パート2)”を開催した。公用言語は英語。2日間の合計参加者数は80名を越えた。外国からの発表者はD. Bedwell (アラバマ大学医学部教授), H.Lee Sweeney (ペンシルヴェニア大学医学部教授), Jean-Pierre Rousset (南パリ大学分子生物学教授)の3名。筋ジストロフィー研究およびストップコドンの読み越し(read-through)によるナンセンス突然変異の薬物治療研究の最前線について発表と活発な質疑がおこなわれた。

## プログラム

**An International Symposium Organized by Japanese  
Muscular Dystrophy Research Group**

***Molecular Therapy of Muscular Dystrophy / Part II***  
**November 12 (Fri)-13(Sat), 2004**

**At Komaba Faculty House, University of Tokyo, Japan**  
**Location,**

<http://www.c.u-tokyo.ac.jp/eng/kyoyo/map.html#a>

**November 12 (Fri) 2004**

**Chairpersons, Ryoichi Matsuda & H. Lee Sweeney**

**13:00-13:10**

**Opening remarks**

**Teruo Shimizu**

Department of Neurology and Neuroscience, Teikyo University

[tshimizu@med.teikyo-u.ac.jp](mailto:tshimizu@med.teikyo-u.ac.jp)

**13:10-13:35**

**Fukutin and dystroglycanopathy**

Xiong Hui<sup>1</sup>, Kazuhiro Kobayashi<sup>1</sup>, Masaji Tachikawa<sup>1</sup>, Nobuhiro Fujikake<sup>1</sup>, Yoshitaka Nagai<sup>1</sup>, Hiroshi Many<sup>2</sup>, Tamao Endo<sup>2</sup>, Tatsushi Toda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Functional Genomics, Department of Post-Genomics and Diseases, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan <sup>2</sup>Glycobiology Research

Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, Japan

[toda@clgene.med.osaka-u.ac.jp](mailto:toda@clgene.med.osaka-u.ac.jp)

**13:35-14:00**

**Restoration of a myopathic phenotype of mutant caveolin-3 transgenic mice by crossing with mutant myostatin transgenic mice**

Yoshihide Sunada<sup>1</sup>, Yutaka Ohsawa<sup>1</sup>, Hiroki Hagiwara<sup>1</sup>, Shizuka Sasano<sup>1</sup>, Yayoi Mori<sup>1</sup>, Masumi Nishi<sup>2</sup>, Akihiro Yasue<sup>2</sup>, Tatsufumi Murakami<sup>1</sup>, and Sumihare Noji<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Kawasaki Medical School, Okayama, Japan

<sup>2</sup>Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, and <sup>3</sup>Department of Biological Science and Technology, Faculty of Engineering, The University of Tokushima, Tokushima, Japan  
[ysunada@med.kawasaki-m.ac.jp](mailto:ysunada@med.kawasaki-m.ac.jp)

**14:00-14:25**

**Characterization of follistatin and FLRG as myostatin inhibiting proteins and novel therapeutic tools for treatment of muscular dystrophy**

Kunihiro Tsuchida,

Institute for Enzyme Research, University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto, Tokushima 770-8503, Japan

[tsuchida@ier.tokushima-u.ac.jp](mailto:tsuchida@ier.tokushima-u.ac.jp)

**Chairpersons, Tatsushi Toda & Jean-Pierre Rousset**

**14:25-14:50**

**Induction of dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy by creating in-frame mRNA with antisense oligonucleotides**

Masafumi Matsuo<sup>1</sup>, Mariko Yagi<sup>1</sup>, Makoto Koizumi<sup>2</sup>, Kazuto Ishibashi<sup>1</sup>, Atsushi Nishiyama<sup>1</sup>, Yasuhiro Takeshima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine, 2: Sankyo Co., Ltd.

[matsuo@kobe-u.ac.jp](mailto:matsuo@kobe-u.ac.jp)

**14:50-15:15**

**RNA-binding protein MBNL1 is involved in the pathogenesis of myotonic dystrophy**

Yoshihiro Kino, Noboru Sasagawa, Shoichi Ishiura

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

[cishiura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:cishiura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

**15:15-15:45 Coffee Break**

**15:45-16:10**

**Identification of a novel muscle gene which is up-regulated in *mdx* mice and down-regulated in cell lines derived from Duchenne muscular dystrophy patients**

Yuki Nakayama<sup>1</sup>, Noriko Nara<sup>1</sup>, Yukiko Kawakita<sup>2</sup>, Yasuhiro Takeshima<sup>3</sup>, Masayuki Arakawa<sup>4</sup>, Ryoichi Matsuda<sup>4</sup>, Masafumi Matsuo<sup>3</sup>, Kayoko Saito<sup>2</sup>, and Takahiko Hara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Tumor Biochemistry, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University, <sup>3</sup>Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine, <sup>4</sup>Department of Life Sciences, The University of Tokyo  
[thara@rinshoken.or.jp](mailto:thara@rinshoken.or.jp)

**Chairpersons, Kayoko Saito & Masafumi Matsuo**

**16:10-16:35**

**Defining dystroglycan function necessary to prevent muscle cell degeneration**

Fumiaki Saito<sup>1</sup>, Teruo Shimizu<sup>1</sup>, Kevin P. Campbell<sup>2</sup>, Kiichiro Matsumura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology and Neuroscience, Teikyo University, <sup>2</sup>Department of Physiology and Biophysics, University of Iowa  
[f-saito@med.teikyo-u.ac.jp](mailto:f-saito@med.teikyo-u.ac.jp)

**16:35-17:00**

**Muscle stem cells as a tool for cell therapy of muscular dystrophy**

Yuko Miyagoe-Suzuki, Shin'ichi Takeda

Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan  
[miyagoe@ncnp.go.jp](mailto:miyagoe@ncnp.go.jp)

**17:00-17:25**

**Cofilin in myofibril formation and maintenance**

Takashi Obinata and Naruki Sato:

Department of Biology, Chiba University, Japan  
[tobinata@bio.s.chiba-u.ac.jp](mailto:tobinata@bio.s.chiba-u.ac.jp)

**Chairperson, Shin'ichi Takeda**

**17:25-18:15**

**Stop codon context and response to readthrough-inducing drugs.**

Laure Bidou (1), Valérie Allamand (2), Isabelle Hatin (1) and

Jean-Pierre Rousset (1)

(1) Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

[jproussel@serv1.igmors.u-psud.fr](mailto:jproussel@serv1.igmors.u-psud.fr)

(2) INSERM U582 - Institut de Myologie, IFR14, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France

**18:15-18:40**

**Current situation of Negamycin research**

Ryoichi Matsuda, Masataka Shiozuka and Kenichi Shimada

Department of Life Sciences, University of Tokyo, 3-8-1Komaba, Tokyo153-8902, Japan

[Ryoichi@matsuda.c.u-tokyo.ac.jp](mailto:Ryoichi@matsuda.c.u-tokyo.ac.jp)

**November 13 (Sat), 2004**

**Chairpersons, Shoichi Ishiura & David Bedwell**

**9:00-9:50**

**Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) : Molecular mechanisms and potential applications.**

Shigeo Ohno

Department of Molecular Biology, Yokohama City University School of Medicine

[ohnos@mail.yokohama-cu.ac.jp](mailto:ohnos@mail.yokohama-cu.ac.jp)

**9:50-10:00**

**Structure and function relationship of hSMG-1, a member of the PIKK family protein kinases, that plays an essential role in nonsense-mediated mRNA decay**

Tomoko Morita, <sup>2</sup>Isao Kashima, <sup>2</sup>Natsuko Izumi, <sup>1</sup>Shoichi Ishiura, <sup>2</sup>Shigeo Ohno

<sup>1</sup>Univ. of Tokyo, Grad. Sch. of Arts & Sci., Dept. of Life Sci.,

<sup>2</sup>Yokohama City Univ., Grad. Sch. Med., Dept. Mol. Biol.

[cishiura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:cishiura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

**10:00-10:25**

**Effect of the inhibition of nonsense-mediated mRNA decay on the mutant phenotype in Ullrich's disease**

Fusako Usuki<sup>1</sup>, Akio Yamashita<sup>2,4</sup>, Itsuro Higuchi<sup>3</sup>, Shigeo Ohno<sup>2</sup>

1. Department of Clinical Medicine, National Institute for Minamata Disease [usuki@nimd.go.jp](mailto:usuki@nimd.go.jp)

2. Department of Molecular Biology, Yokohama City University School of Medicine,

Department of Neurology and Geriatrics, Kagoshima

University Graduate School of Medical and Dental Science,  
3. Department of Biochemistry and Molecular Biology,  
University of Texas

**Chairpersons, Ichizo Nishino & Teruyuki Kurihara**

**10:25-11:15**

**Suppression of premature stop mutations that cause genetic diseases**

M. Du\*, E. Welch#, J. Zhuo#, S. Peltz#, S. Hwang#, G. Chen#, J. Takasugi#, L. Miller#, S. Yeh#, and D. Bedwell\*.

\*Department of Microbiology and Cystic Fibrosis Research Center, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294; and #PTC Therapeutics, South Plainfield, NJ 07080.

[dbedwell@uab.edu](mailto:dbedwell@uab.edu)

**11:15-12:05**

**Suppression of premature stop codons as a potential therapy for a subset of patients with Duchenne muscular dystrophy**

H. Lee Sweeney

Department of Physiology, University of Pennsylvania, School of Medicine, 3700 Hamilton Walk, B400 Richards Building, Philadelphia, PA 19104-6085

[lsweeney@mail.med.upenn.edu](mailto:lsweeney@mail.med.upenn.edu)

**12:05-13:30 Lunch**

**1, 050yen / person**

**Chairpersons, Teruo Shimizu & Ryoichi Matsuda**

**13:30-13:55**

**A novel approach of the gentamicin therapy for Duchenne muscular dystrophy using hybrid liposome and establishment of a system to identify the patients eligible for the treatment.**

Shigemi Kimura<sup>a\*</sup>, Kaori Ito<sup>a</sup>, Hiroe Kawano<sup>a</sup>, Takashi Hiranuma<sup>a</sup>, Kowasi Yoshioka<sup>a</sup>, Shiro Ozasa<sup>a</sup>, Makoto Matsukura<sup>a</sup>, Makoto Ikezawa<sup>a</sup>, Masafumi Matsuo<sup>b</sup>, Yasuhiro Takeshima<sup>b</sup>, Ryuichi Ueoka<sup>c</sup>, Yoko Matsumoto<sup>c</sup>, Teruhisa Miike<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Child Development, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto, Japan, <sup>b</sup>Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan, <sup>c</sup>Department of applied life science, Sojo University, Kumamoto, Japan

[kimusige@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp](mailto:kimusige@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp)

**13:55-14:20**

**The effect of corticosteroid and gentamicin administration to cultured muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient**

Kayoko Saito, Eri Kondo-Iida, Yukiko Kawakita, Kiyoko Ikeya, Hiroko Hosaka

Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University, Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University

[ksaito@ped.twmu.ac.jp](mailto:ksaito@ped.twmu.ac.jp)

**14:20-14:30**

**Closing remarks**

Teruyuki Kurihara

Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Toho University Ohashi Hospital, 2-17-6 Ohashi, Meguro, Tokyo 153-8515, Japan

[kurihara@oha.toho-u.ac.jp](mailto:kurihara@oha.toho-u.ac.jp)

# Summary

# Clinico-pathophysiological research and development of medical treatment for muscular dystrophy and related disorders

*Teruo Shimizu*

The project, started in April 2002, is aimed to (1) analyze the molecular mechanism of muscular dystrophies and related myopathies and the relationship between the molecular events and clinical phenotypes, (2) establish diagnostic procedures of these diseases, and (3) develop gene and cellular therapies and chemicals which can rescue and/or prevent clinical deterioration of muscular dystrophy patients. The following results are obtained in the research years, April 2002-March 2005.

## 1. DMD and BMD.

In the aspect of therapeutics, (1) the effect of negamycin on read-through of the causative point mutation of dystrophin gene is assessed and found to express dystrophin at the level of 10 % to control in both cultured myotubes and tibialis anterior muscles of mdx mouse with no toxicity. Negamycin will be an promising alternative candidate instead of biologically toxic gentamicin. An improved method is essential to get enough dystrophin expression to test the recovery of muscle strength in the dystrophy dog. (2) As a chemical to cause the skipping of a mutated-exon of the dystrophin gene, anti-sense oligonucleotide (AS-oligo) against the splicing-enhancer sequence of exon 19 and ENA (2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acid)/DNA chimera is synthesized and found to be effective to express the in-frame dystrophin missing the exon 19 in cultured myocytes from controls and exon 20-deficient DMD patients. ENA/DNA chimera is more effective than AS-oligo in the culture system from both human and mouse controls and mdx mouse than AS-oligo. In vivo trial using DNA/ENA chimera demonstrated hopeful results in mouse. The AS-oligo is now tried to an exon-20 deficient DMD boy by intravenous injections once a week for 4 weeks. At the time of 5<sup>th</sup> week, no improving effects are observed in the level of serum CK and clinical muscle strength. However, no side effects are apparent and the dystrophin expression is definite in both peripheral lymphocytes and biopsied skeletal muscle by immunofluorescent microscopy and immunoblotting. This is promising. (3) Msx 1-induced stem cells from mature mouse muscles is successively found to develop to mature myotubes, adipose cells or bone cells in the individual conditions, respectively. They were effectively transplanted to the mdx tibialis muscles and shown to develop dystrophin-positive myotube/myofibers. Msx-1 is an excellent candidate to induce stem cells and a hopeful cell therapy for muscular dystrophy.

In the aspects of pathophysiology, (1) it is generally believed that dystrophin-deficient dystrophic myofibers are fragile to mechanical and hypertrophic stress because of the defective membranous skeleton, which causes a localized destruction of sarcolemma (delta region), Ca<sup>2+</sup>-influx from outside of the cells, and muscle cell damage(s) of proteolysis (Ca<sup>2+</sup> theory). During this process,  $\alpha$  /  $\beta$  -dystroglycan (DG) is somehow destroyed and dystrophic muscles undergo to deteriorate. It turns out that a membrane-bound matrix metalloproteinase 1 (MMP 1) cleaves the extracellular domain (13 kDa) of  $\beta$  -DG (43 kDa) in vitro and in vivo (human dystrophic muscles) experiments. Particularly, the cleavage increases in the clinical progress of DMD/BMD. The MMP inhibitor, BPHA, is a candidate for the prevention of clinical progression of DMD/BMD. (2) It is found that the intracellular domain of  $\beta$  DG binds to another signal transduction system of MAGI-1/-catenin/Tcf in addition to the already-known Grb 2 system, the defect of which causes myocyte death. The molecular pathomechanism of dystrophic muscles is still unclear.

## 2. LGMDs.

(1) There are several progresses on the dysferlin function, the causative protein of LGMD2B. In addition to the sarcolemmal localization and a putative Ca<sup>2+</sup>-binding property, dysferlin is found to localize on the cytoplasmic membranes (lysosome, endstage-endosome, Golgi body, and ER) and to play a role on the fusion of the cytoplasmic membrane to the plasma membrane by binding to syntaxin and SNAP 25 and by

forming a Ca-dependent complex with AAATPase(VCP). This is an essential process in the repair of the damaged plasma membrane, membrano-fusion and -transport in the Golgi body.

A clinico-genetic relationship of dysferlinopathy is demonstrated in Japanese families. 41 unrelated Japanese families(44 patients) show both distal and LGMD types, and 23 unrelated Japanese families (26 patients) show the LGMD type. Genetically,28 mutations are found in the distal type, 12 mutations in the LGMD type,and 5 mutations in both types.Mutations of C1939G, G3370T, 3746delG and 4870delT are frequent in the distal type,especially the 3746delG mutation is not found in the LGMD type.On the other hand,mutations of G3370T and 4870delT are popular in the LGMD type.The mutants of G3370T are clinically benign.

An animal model for an inflammatory myopathy,SJL/J mouse, is found to be defective in the dysferlin gene,and to show a sequential myopathology of type 1 fiber atrophy,central nuclei,cell infiltration, and demyelination of intramuscular motor nerves,which suggests a pathological difference from human dysferlinopathy.

(2) As regards to the pathogenesis and therapy of sarcoglycanopathy(LGMDs 2C,2D,2E and 2F), the activation of a membrane-type matrix metalloproteinase 1(MMP-1) is specifically shown to cleave the extracellular domain of  $\beta$ -dystroglycan with the resultant disruption of the dystroglycan linkage between the subsarcolemmal cytoskeleton and basal lamina,which is identical to DMD/BMD. This raises a therapeutic possibility for sarcoglycanopathy by a specific inhibitor BPHA of membrane- type matrix metalloproteinase I(MMP-1).

(3) Trial of a myostatin inhibitor,myostatin prodomain,for transgenic caveolinopathy(LGMD 1C) mouse.Myostatin inhibition is reported from USA to cause the increase of the muscle volume with the enlargement of both number and diameter of myofibers,and anti-myostatin antibody is expected to be a possible medication for various myopathies.However,we believe that the repeat injection of the antibody has a high possibility of an allergic reaction,and we explore other candidates of myostatin inhibition such as follistatin,follistatin-related gene FLRG,and myostatin prodomain.Double transgenic mouse of mutated caveolin and myostatin prodomain is found to remarkably improve the muscle volume and strength in spite of unchanged myopathology and poor expression of mutated caveolin.Myostatin prodomain is a good candidate for therapy of muscular dystrophies.

(4) In Ullrich disease, which is caused by genetic defects of collagen VI  $\alpha$ -subunit, the inhibition of the nonsense-mutated mRNA decay by either wortmannin or caffeine is demonstrated to restore the expression of in-frame truncated collagen VI  $\alpha$ -subunit and the formation of collagen fibrils in the cytoplasm and extracellular matrix of cultured fibroblasts from a patient with an in-frame small deletion in the exon 26,and to promote a functional recovery of fibronectin receptor expression.This result presents another possibility for the therapy of nonsense-mutations such as DMD/BMD by the combination with negamycin.

### 3. Congenital muscular dystrophies.

Fukuyama type congenital muscular dystrophy FCMD and the related disorders,Muscle-eye-brain disease MEB and Walker-Warburg syndrome WWS are known to have anomalies of eye and brain (overmigration of nerve cells through the glia limitans of brain surface,lissencephaly II) as well as severe muscular dystrophy.In the common muscle pathogenesis, it is already demonstrated to be defective in the bindings of both the anti-sugar moiety antibody to  $\alpha$ -dystroglycan and the extracellular laminin to  $\alpha$ -dystroglycan in spite of the presence of  $\alpha$ -dystroglycan core protein,suggesting defective formations of O-mannosyl glycan, ser/thr-mannose2-  $\beta$  1GlcNAc4-  $\beta$  1Gal3-2Sia of  $\alpha$ -dystroglycan( $\alpha$ -dystroglycanopathy).

In addition to the above-mentioned three disorders,genetic defects of fukutin-related protein FKR causes human muscular dystrophies,congenital type MDC1C and LGMD type 2I,and myodystrophy mouse(myd,Large) and its human homologous congenital dystrophy MDC1D are reported to be  $\alpha$ -dystroglycanopathy.

(1) In this research group,another  $\alpha$ -dystroglycanopathy is found,chicken dystrophy of autosomal dominant trait.Further details is under the study.

(2) A progress is made in the physiology of fukutin,a defective protein in FCMD.①A Golgi body-binding

domain is demonstrated in the N-terminal membrane-binding domain,6-27aa.②A N-glycosylation site is found at the 92th Asn.③Fukutin has no apparent glycosylation activities for the biosynthesis of O-mannosyl glycan of  $\alpha$  DG.④Fukutin can bind to POMGnT1 at the N-terminal transmembrane domain.It is strongly suggested that fukutin is not a glycosylation enzyme itself but a kind of modulator for POMGnT1 or a component of the multicomplex POMGnT1 activity.

Until now,FCMD is found exclusively in Japan where the unique mutation of the 3kb retrotransposon is inserted onto the exon 10 of fukutin gene.A turkey boy,however,is determined in 2003 to be affected with "WWS", severe mental retardation and severe congenital muscular dystrophy,and he is homozygous for the fukutin mutation of Gln116stop. The clinical feature is consistent with WWS. This observation suggests us that the 3kb retrotransposon mutation in the exon 10 causes a relatively mild form(typical FCMD) in comparison to the severe form(WWS) of point mutants in the translation exons of fukutin gene.

Myopathogenesis of FCMD is also analyzed by DNA microarray and indicated that ①fetal components of extracellular matrix, neuromuscular junction and contractile proteins are continuously upregulated during fetal and child stages,and ②growth factors in the final myogenesis such as MYH7 and MRF4 are always down-regulated.The results indicates that the development of FCMD muscles ceases at the stage of the neuromuscular junction formation.

In 2003,the causative gene of MEB is found to express a GlcNAc transferase POMGnT1 and, so far,13 point mutations are found. The biochemical assay system is established and confirmed that the thirteen mutants loses the enzyme activity completely(loss of function).Now, we can make the definite biochemical diagnosis of MEB from biopsied muscles.

Beltran-Valero de Bernabe et al demonstrated that 10 % of WWS patients had mutations of O-mannosyl transferase POMT1.However,the transferase is not known to have the real activity in mammals.In 2004,it is clarified by the establishment of a biochemical assay system for the POMT activity and molecular biological techniques that ①the protein O-mannosyl transferase(pmt) homologues in humans or mammals are POMT1 and POMT2, ②either POMT1 itself or POMT2 itself does not have the activity,but when both POMT1 and POMT2 are co-expressed, the activity is fully observed, ③coexpression of a reported POMT1 mutant of WWS(7 mutants) and the wild POMT2 demonstrates no the mannose transferase activity,④transgenic flies of the knock-down of either POMT1 or POMT2 gene shows a prominent deformity of the trunk and the muscle maldevelopment, and ⑤POMT2 mutation is not found in the other WWS patients. The results reveal that the POMT1 mutation causes the loss of O-mannosyl transferase activity and develops the WWS phenotype(loss of function),which explains about 10 % of WWS. The next problem is the molecular mechanism of the rest of WWS.

A Japanese female child is reported to be defective in the FKR gene. She is affected with congenital muscular dystrophy which mimics to FCMD, but her intelligence is well-developed in spite of multiple cysts in the cerebellum. It is suggested that the muscle  $\alpha$  DG glycosylation is defective.

FCMD,MEB,WWS, FKR mutations(MDC1C and LGMD2I),and Large mutations(MDC1D and myodystrophy mouse) have a common characteristics( $\alpha$ -dystroglycanopathy) such as the decrease of binding of laminin with  $\alpha$ -dystroglycan, the decrease of binding of anti-sugar moieties of  $\alpha$  DG antibody to  $\alpha$  DG. In addition, dystrophy chicken is found to be a new type of  $\alpha$ -dystroglycanopathy. The chicken myopathology demonstrates atypical dystrophic change with vacuoles of T-tubules,no obvious anomaly of brain. The gene mutation remains to be clarified.

#### 4. Distal myopathy with rimmed vacuoles DMRV.

DMRV in Japan is confirmed to be caused by the mutations of the same GNE gene as HIBM. GNE is found to be a cytoplasmic enzyme and DMRV muscles contained a decreased amount of sialic acid. However, the molecular pathomechanism is unclear in the majority.

Japanese 66 patients from 4 institutes are analysed and demonstrated 25 mutations(missense 23,nonsense 2) in the whole region of the gene.No hot spots are found.V572L is most frequent, and 31 patients are the homozygote.The next frequent is D176V.The average onset is 25.4 years old. The initial involvement starts at the bilateral tibialis anterior muscles, and proximal leg muscles except the quadriceps femoris muscles are

also involved in the early stage of the majority patients. They are able to walk in 9.4 years of average after the onset. Cardiac involvement is observed in 4 patients. Serum CK is raised in 90 % of the patients, and 20 % have more than 1.000 IU/l. We will publish a guideline for the diagnosis of DMRV on the basis of the 66 Japanese, gene-confirmed patients.

## 5. Myotonia syndromes.

① Myotonic dystrophy is known to be caused by either elongated CTG repeats in the 3'-region of the DMPK gene or elongated CCTG repeats in the first intron of ZFF9. The skeletal muscles of the myotonic dystrophy is found to express embryonic forms of many genes such as insulin receptor, NMDA receptor, Cl channel, ryanodine receptor, SR Ca-ATPase (Serca 1), six 5, tau protein, amyloid precursor protein, cardiac troponin I, and myotubularin-related protein 1. The result suggests the presence of a common splicing abnormality in many gene expressions. In order to explain this hypothesis, a CUG/CUGG-binding protein(s) is found and they are named as CUG-binding protein, MBNL 1, 2, and 3. They are found to have various expression effects at the splicing process. These proteins strongly binds to the elongation part of mutated RNA with the result of deficiency of the protein(s). Further study is necessary to confirm this hypothesis in the next step.

② Schwartz-Jampel syndrome is found to be a partial deficiency of perlecan, an ECM protein, and it is clarified that the abnormal function of the  $\alpha$  DG-perlecan-AchE linkage causes myotonia.

## 6. Mitochondrial encephalomyopathy.

Mutations at 3243, 3271 and 8377 of mtDNA, which are main gene abnormalities in MELAS and MERRF, are found to cause the defective binding of the tRNA for taurine with resultant defects in the mitochondrial functions such as membrane potentials, respiration and ATP synthesis. It is also demonstrated that millimolar levels of taurine rescue the mitochondrial dysfunction. Taurine is an excellent candidate for the therapy of MELAS and MERRF.

## 7. In others.

A prominent progress is made in ① ILK-phosphorylated affinitive Rac 1/Cdc 42 as the intracytoplasmic signal transduction system under the laminin-integrin complex, ② an new anti-apoptosis protein, PTD FNK a Bcl 2 homologue, for ischemic, glutamine-induced, and staurosporine-induced cell deaths, and ③ gene analyses in Japanese patients of a SR protein selenoprotein 1 in SEP (selenoprotein N)-related myopathy (congenital myopathy such as rigid spine syndrome, multiminicore disease and desmin-related myopathy), ryanodine receptor in malignant hyperthermia/central core disease, and myotubularin (MTM1) in X-linked myotubular myopathy.

## 8. Problems to be studied.

① No progress is made in FSHD. The gene mutation is already analysed and the gene diagnosis is possible. However, the molecular pathomechanism is totally unclear and therapeutic approach is not made.

② Molecular events in the process of DMD/BMD cell death is still not satisfied. Ca influx and MMP proteolysis of  $\beta$ DG are definite but the intracellular deterioration is still unclear, particularly  $\beta$ DG signal transduction system(s) should be studied.

③ Possible therapeutic agents such as negamycin, AS-oligo, myostatin inhibitors (antibody, follistatin, follistatin-related gene FLRG, myostatin prodomain), taurine, PTD FNK, Msx-1 induced stem cells are needed to approach to clinical trials.

④ Poor progress is made in mitochondrial encephalomyopathy. Member should be changed.

⑤ In FCMD and the related congenital dystrophy, a remarkable progress is made in the point of molecular mechanism. Final analysis of the fukutin function, Gal T, and Sia T, and FKR is necessary. A new animal model, dystrophy chicken, must be clarified.

⑥ Since the molecular-clinical relationship is clarified in Japanese patients, a diagnostic guideline will be published in dysferlinopathy, DMRV, and FCMD/MEB/WWS.

# 平成14～16年度 班員名簿

# 筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と 治療法の開発に関する研究

## 平成 14～16 年度 清水班 名簿

区 分	氏 名	所 属 施 設 名 所 在 地	所属施設に おける地位	連絡の際の電話番号 E-mail ｱﾄﾞﾙｽﾞ
主 任	清 水 輝 夫	帝京大学医学部神経内科 〒173-8605 東京都板橋区加賀 2-11-1	教 授	03-3964-1211 (内 1910) tshimizu@med.teikyo-u.ac.jp
分 担 (運営幹事)	栗 原 照 幸	東邦大学大橋病院神経内科 〒153-8515 東京都目黒区大橋 2-17-6	教 授	03-3468-1251 (内 2322) kurihara@oha.toho-u.ac.jp
" (監 事)	石 浦 章 一	東京大学大学院総合文化研究科 〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1	教 授	03-5454-6739 cishiura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
" (幹 事)	斎 藤 加 代 子	東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 〒162-0054 東京都新宿区河田町 10-22	教 授	03-3353-8111 (内 38211) saito@img.twmu.ac.jp
" (幹 事)	佐 橋 功	愛知医科大学内科学講座神経内科 〒480-1195 愛知県愛知郡長久手町岩作雁又 21	教 授	0561-62-3311 (内 2830) sahashi@aichi-med-u.ac.jp
" (幹 事)	瀬 原 淳 子	京都大学再生医科学研究所 〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院 川原町 53	教 授	075-751-3826 asehara@frontier.kyoto-u.ac.jp
" (幹 事)	戸 田 達 史	大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2-B9	教 授	06-6879-3380 toda@clgene.med.osaka-u.ac.jp
" (幹 事)	吉 田 幹 晴	国立精神・神経センター神経研究所 〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1	室 長	042-346-1720 yoshida@ncnp.go.jp
" (幹 事)	松 田 良 一	東京大学大学院総合文化研究科 〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1	助教授	03-5454-6637 ryoichi@matsuda.c.u-tokyo.ac.jp
" (幹 事)	西 野 一 三	国立精神・神経センター神経研究所 〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1	部 長	042-346-1712 nishino@ncnp.go.jp
"	青 木 正 志	東北大学病院神経内科 〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1	助 手	022-717-7189 aokim@mail.tains.tohoku.ac.jp
"	太 田 成 男	日本医科大学大学院医学研究科加齢科学 〒211-8533 神奈川県川崎市中原区小杉町 1-396	教 授	044-733-9267 ohta@nms.ac.jp

分 担	反 町 洋 之	(旧)東京大学大学院農学生命科学研究科 (現) 東京都臨床医学総合研究所酵素機能 制御研究部門 〒113-8613 東京都文京区本駒込 3-18-22	助教授 室 長	(現) 03-3823-2181 sorimach@rinshoken.or.jp
"	遠 藤 玉 夫	財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所 〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2	研究部長	03-3964-3241 (内 3080) endo@tmig.or.jp
"	遠 藤 剛	千葉大学理学部 〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33	助教授	043-290-3911 t.endo@faculty.chiba-u.jp
"	大日方 昂	千葉大学理学部 〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33	教 授	043-290-2804 tobinata@faculty.chiba-u.ac.jp
"	杉 江 秀 夫	浜松市発達医療総合センター 〒434-0023 静岡県浜北市高菌 775-1	所 長	053-586-8800 (内 100) h-sugie@umin.ac.jp
"	松 尾 雅 文	神戸大学大学院医学系研究科 〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-1	教 授	078-382-6080 matsuo@kobe-u.ac.jp
"	樋 口 逸 郎	鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 〒890-8520 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1	講 師	099-275-5332 ihiguchi@m2.kufm.kagoshima-u.ac.jp
"	若 山 吉 弘	昭和大学藤が丘病院神経内科 〒227-8501 神奈川県横浜市青葉区藤が丘 1-30	教 授	045-971-1151 (内 6269) wakayama@showa-university-fujigaoka.gr.jp
"	吉 田 邦 広 14-15 年度	信州大学医学部附属病院遺伝子診療部	助教授	
"	池 田 修 一 16 年度	信州大学医学部第三内科 〒390-0861 長野県松本市旭 3-1-1	教 授	0263-37-3216 ikedasi@hsp.md.shinshu-u.ac.jp
"	土 方 貴 雄 14 年度	群馬大学大学院医学系研究科器官機能構築学 〒371-8511 群馬県前橋市昭和町 3-39-22	講 師	027-220-7910, 7912
"	依 藤 宏 15-16 年度		教 授	
"	川 上 潔	自治医科大学細胞生物学 〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1	教 授	0285-58-7311 kkawakam@jichi.ac.jp
"	二 宮 治 明	鳥取大学医学部生命科学科神経生物学 〒683-0826 鳥取県米子市西町 86 番地	助教授	0859-34-8276 ninomiya@grape.med.tottori-u.ac.jp
"	田 中 恵 子	新潟大学脳研究所神経内科 〒951-8585 新潟県新潟市旭町通一番町 757	助教授	025-227-0664 keiko@bri.niigata-u.ac.jp

"	砂田 芳秀	川崎医科大学神経内科 〒701-0192 岡山県倉敷市松島 577	教 授	086-462-1111 (内 86087) ysunada@med.kawasaki-m.ac.jp
"	鈴木 厚	横浜市立大学・大学院医学研究科 〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦 3-9	講 師	045-787-2598 abell@med.yokohama-cu.ac.jp
"	吉良 潤一	九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設 神経内科 〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1	教 授	092-642-5340 kira@neuro.med.kyushu-u.ac.jp
"	佐古田 三郎	大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2	教 授	06-6879-3571 sakoda@neuro.med.osaka-u.ac.jp
"	桃井 真理子	自治医科大学小児科学 〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1	教 授	0285-58-7366 mymomoi@jichi.ac.jp
"	野地 澄晴	徳島大学工学部生物工学科 〒770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1	教 授	088-656-7528 noji@bio.tokushima-u.ac.jp
"	内野 誠	熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学分野 〒860-0811 熊本県熊本市本荘 1-1-1	教 授	096-373-5893 uchino96@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp
"	桃井 隆	国立精神・神経センター神経研究所 〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1	室 長	042-341-2711 (内 5273) momoi@ncnp.go.jp
"	水澤 英洋	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 脳神経機能病態学 〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45	教 授	03-5803-5233 h-mizusawa.nuro@tmd.ac.jp
"	南 成祐	国立精神・神経センター武蔵病院 〒187-8551 東京都小平市小川東町 4-1-1	医療技 術職員	042-341-2711 (内 3590) minami@ncnp.go.jp
"	萩原 康子	国立精神・神経センター神経研究所 〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1	室 長	042-341-2711 (内 5155) hagiwara@ncnp.go.jp
"	水野 裕司	群馬大学大学院医学系研究科脳神経内科学 〒371-8511 群馬県前橋市昭和町 3-39-22	講 師	027-220- 8064, 8061 mizunoy@med.gunma-u.ac.jp
"	三池 輝久	熊本大学大学院医学薬学研究部 〒860-8556 熊本県熊本市本荘 1-1-1	教 授	096-373-5197 miketeru@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp

研究協力者

今村道博	国立精神・神経センター神経研究所 〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1	室長	042-346-1720 imamura@ncnp.go.jp
白杵扶佐子	環境省国立水俣病総合研究センター臨床部理学診療科 〒867-0008 熊本県水俣市浜 4058-18	室長	0966-63-3111 usuki@nimd.go.jp
田中雅嗣	東京都老人総合研究所健康長寿ゲノム探索 〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2	参事 研究員	03-3964-3241 (内 3095) mtanaka@tmig.or.jp
豊島至	秋田大学医学部内科 〒010-8543 秋田県秋田市本道 1-1-1	講師	018-884-6104 toyoshim@med.akita-u.ac.jp
林由起子	国立精神・神経センター神経研究所 〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1	室長	042-346-1712 hayasi_y@ncnp.go.jp
土方貴雄	武蔵野大学薬学部機能形態学講座 〒202-8585 東京都西東京市新町 1-1-20	教授	0424-68-9290 hijikata@musashino-u.ac.jp
平澤恵理	順天堂大学医学部神経学講座 〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1	講師	03-3813-3111 ehirasaw@med.juntendo.ac.jp
吉岡三恵子	神戸市総合療育センター 〒653-0875 兵庫県神戸市長田区丸山町 2-3-50	所長	078-646-5291 mieko@mte.biglobe.ne.jp