厚生労働省「精神・神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー及び関連疾患の臨床病態解明と治療法開発に関する研究

荒 畑 班／清 水 班

平成11～13年度研究報告書

平成14年3月（2002年）

研究報告書の作成にあたって

本報告書は，平成11～13年度にわたって行なわれた「筋ジストロフィー及び関連疾患の臨床病態解明と治療法開発に関する研究（11公－1)」の最終報告書である．

当班は，最初国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部部長荒畑喜一先生を班長とし，班員37名をもって，①未知遺伝子の単離と臨床表現型・遺伝子型の本態を解明する“診断研究”，②疾患の病態機序解明と筋細胞の分子生物学的研究を行なう“病態研究”，③科学的根拠に基づく有効な薬物治療と細胞治療を目指す“治療研究”，の3つを目標として始められた．ポストゲノムの時代を迎え functional genomics 機能解析遺伝学の観点から班構成を組み，研究促進を効率的にはかるため ENMC（ヨーロッパ神経筋連合）型の小グループによる実務的目標設定型研究分科会を年数回開きつつ全体会議による討論を行なう計画とした．

当研究班の前年までは石川春律群馬大学教授を班長とする「筋ジストロフィーの分子病態学的基礎研究（8指-1)」（所謂筋ジス1班）と高木昭夫虎の門病院神経科医長を班長とする「筋ジストロフィー及び関連疾患の臨床病態と治療法に関する研究（8指-2)」（所謂筋ジス2班）を発展的に合同・再構成して，公募班として出発したが，平成12年12月荒畑喜一班長が悪性腫瘍で急逝されたため，最終年度にあたる平成13年度に清水が引き継いだ次第である．日本の班研究の草分けである当班を高名な先達の活躍に優るべく支援し，筋ジス病態解明と治療開発の発信源とならんことを意図しつつ，平成11～13年度の3年間にわたる研究総括を報告する次第である．関係諸氏のご講評，ご批判をいただけると大変有り難く存じます．

締めるにあたり，永年にわたり研究促進に多大な努力をされている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国立精神・神経センター総長高橋清久先生，同神経研究所長高嶋幸男先生，同武蔵病院長埜中征哉先生，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，当班の運営幹事として見えざる努力をしていただいた栗原照幸東邦大学教授に感謝申し上げる次第である．

平成14年3月

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部　　帝京大学医学部神経内科
部長　荒　畑　喜　一　　教授　清　水　輝　夫

目　　次

平成 11～13 年度総括研究報告 …… 1

分担研究報告

Ⅰ. 肢帯型／遠位型（三好）筋ジストロフィー …… 13
Ⅱ. Dystrophin-Dystroglycan 関連 …… 43
Ⅲ. 福山型およびその他の筋ジストロフィー …… 63
Ⅳ. ミオトニー症候群 …… 87
Ⅴ. ミトコンドリア脳筋症 …… 99
Ⅵ. 筋発生・分化 …… 105
Ⅶ. 治療 …… 117

Small Group Workshop …… 129

Summary …… 151

平成 11～13 年度 班員名簿 …… 155

平成 11～13 年度

総 括 研 究 報 告

総 括 研 究 報 告

主任研究者　荒　畑　喜　一／清　水　輝　夫

本班は筋ジストロフィー及び関連疾患のI. 診断研究（未知遺伝子解析と診断法），II. 病態研究（疾患病態とその基盤解明），III. 治療法開発（薬物治療と細胞治療）を３本柱とし，基礎・臨床を含む実務者による小グループワークショップSGWにより研究を促進し以下の主要結果をえた.

I. 診断研究（未知遺伝子解析と診断法）

1. 肢帯型筋ジストロフィーLGMDs／遠位型筋ジストロフィーに大きな進展がみられた．概略LGMDsの約2%がcaveolin-3異常などのtype 1(常優)，他は常劣(type 2)で，約23%がtype 2A(calpain異常症)，16-30%がtype 2B(dysferlin異常症)であり，本邦ではこの2型が最も多く，types 2C-F(α,β,γ,δ-sarcoglycan異常症)は約10%であった.

1) **Calpain 異常症**；missense変異が半数以上の患者にみられ，calpain遺伝子の全領域に分布し，本邦ではG233V，R461C，D707G，1796insAが多く，諸外国と異なる．これにより，約70%の患者を遺伝子診断できる．イムノブロット／免疫組織法では約90%にcalpain蛋白の消失減少があり，最も有用な早期診断法といえる．しかし，これで発見できない患者が存在することも事実である．このため，より簡便で確実な“calpastatinを基質とするcalpain活性測定法”を開発し臨床診断に応用を試みる段階にきた.

2) **Dysferlin 異常症**；肢帯型と遠位型（三好）の2臨床型が主なもので，その変異はdysferlin遺伝子の全領域にわたり，約60%がG1310+1A，C1939G，G3370T，3746delG，4870delTの5変異であった．G3370Tは軽症型，C1939G，G3510Aは重症型であった．また，3746delGは遠位型であった．遺伝子診断は必ずしも高率でなく，生検筋の免疫染色／イムノブロット法の両者に異常がある場合に強く疑われる．遠位型の75%は免疫組織／イムノブロットの併用で同定できるが，25%は診断できない．今後，より信頼のおける診断法の開発が望まれる.

2. 福山型先天性筋ジストロフィーFCMD および類縁疾患；FCMD患者の9割は3'非翻訳領域にretrotransposon挿入をもち，fukutinは産生されない．良質な抗fukutin抗体がなく，末梢血の遺伝子診断により90%以上診断できる．FCMD類縁疾患であるmuscle-eye-brain症候群(MEB)の責任遺伝子として1p33-34に局在する糖鎖修飾酵素POMGnT1が同定された．これはUDP-N-acetylglucosamine: potein o-linked mannose β1,2-N-acetyl glucosaminyltranferaseで，筋・末梢神経・脳に限局するo-mannoseにGlcNAcを付加する新規の糖転移酵素であった．MEB 6症例の解析から，点変異ホモまたは複合ヘテロがみつかった.

II. 病態研究（疾患病態とその基盤研究）

1. 疾患病態とその基盤

1) **Duchenne/Becker型筋ジストロフィーDMD/BMD**；

Dystrophin/dystroglycan/laminin接着系の分子構築理解がすすみ，dystrophin C端での①syntrophin/dystrobrevin，②sarcoglycan(αβγδ)/sarcospan，③α,β-dystroglycanの結合があった．これに関連してcaveolin-3，MAGI-1/β-catenin/Tcf signal，dystrobrevin/desmuslin/plectinが確認された．また，膜型matrix metalloproteinaseがβ-dystroglycan分解に関与し，筋障害機序の1つが判明した.

2) **FCMDと類縁疾患**；

神経細胞の遊走異常／層構築障害や筋ジストロフィーは脳表面や筋細胞の基底膜異常に伴うもので，分子レベルでもlaminin subunits異常，未知の基底膜蛋白p180とα-dystroglycanの減少が判

明，dystroglycan 連関の破綻が示唆された．9p31 に局在する責任遺伝子産物 fukutin は，筋細胞，神経細胞，Cajal-Retius 細胞の Golgi 体から細胞外に分泌され，膜蛋白の糖鎖修飾を行なうと推定された．117 症例の分析から fukutin の非翻訳領域 exon 10 の transposon 挿入ホモが 90%で，重症型であり，その他の変異を持つ複合ヘテロは比較的軽症であった．類縁疾患 MEB 遺伝子産物は o-glycan 転位酵素であり，筋で完全酵素欠損し，α-dystroglycan が激減していた点から，α-dystroglycan が筋ジス発症の枢要な要素であり，酵素療法への展望を開いた．

3）Calpain 異常症；

ヌル型変異は重症で，ミスセンス型変異では G233V は calpain 完全欠損で重症型，D707G ホモと R461C ホモは calpain 減少で軽症型であった．Proteinase 活性だけを失活させた変異 calpain を発現する transgenic mouse の解析から，calpain の proteinase 活性不全が筋障害の根本原因であることが判明した．Calpain は筋 scaffold protein である connectin を主要ターゲットとし，connectin 崩壊→筋構造蛋白・筋膜（Tcap→K channel）・核（Murf1-3）に深甚な影響を及ぼす病態が考えられた．

4）Dysferlin 異常症；

肢帯型と遠位両型があり，その遺伝子変異と臨床型との関係が注目され，変異 3746delG が遠位型となることが判明しているが，今後の解明が必要である．Dysferlin には結合蛋白の存在が示唆され，caveolin-3 との機能連関が考えられた．Dysferlin 異常の筋障害機序は未解決であるが，dyrferlin-related ER stress apotosis がみつかり，今後の進展が期待された．

5）筋緊張性ジストロフィー（DM1，DM2）；

非翻訳領域にある CTG repeat 延長(DM1)，CCTG repeat 延長(DM2)によりその遺伝子産物（DM kinase，Zinc finger protein ZNT9）活性を低下させる．これらの mRNA に結合する CUG/CUGG 結合蛋白が 2 種(CUG-BP，EXP/MBNL)同定され，Repeat 延長した RNA との結合の促進，当該 RNA の細胞質内移行の阻害，他の RNA との結合欠乏，その結果多様な RNA 発現が障害されるとする RNA 仮説が提唱された．事実，DM1 遺伝子下流にある SIX5 遺伝子発現が抑制され白内障が生じたり，別の染色体上の遺伝子発現（tau 蛋白，β tubulin など）に障害がみられ，広範な臓器の多様な病変が説明できた．この変化は筋細胞のアポトーシスを促進するが，Apotosis 抑制薬で抑制できることが判明した．

2. モデル動物の作成

①fukutin ホモ欠損細胞をマウス胚に注入してキメラマウス(FCMD モデル)，②calpain の活性中心の Cys を Ser に変異させ，酵素活性だけを失活させた変異型を発現する transgenic mouse(LGMD 2A モデル)，③caveolin-3 の missense 変異 P104L をもつ transgenic mouse(LGMD1C モデル)，④caveolin-3 exon 2 欠失の caveolin-3 ホモ／ヘテロ欠損マウス，⑤poly(A)-binding protein 2 遺伝子の exon 1 の野生型 ATG(GCG)6(GCA)3GCG を，・・(GCG)9 ・・に変換した transgenic mouse(眼咽頭型筋ジスモデル)が得られ，病態解明と治療法開発に有力な武器ができつつある．

III. 治療法開発（薬物治療と細胞治療）

1. stop codon の読み越えをおこすアミノグリコシド系抗菌薬ネガマイシンを，mdx dystrophy mouse に投与し，約 10%の dystrophin を回復できた．今後 dystrophy dog，ヒト DMD/BMD の約 10%の患者に適用しうる，毒性の少ない治療法と期待できる．当法は類似の変異をもつ多数の疾患に応用できる点からも注目される．
2. pyruvate dehydrogenase kinase を阻害する乳酸降下薬 dichloroacetic acid(DCA)をミトコンドリア脳筋症 MELAS 患者 4 例に，4-6 年間投与された結果が発表され，乳酸／ピルビン酸値・脳硬塞様発作・頭痛・けいれん・易疲労性の改善がみられ，頭部 MRI 所見・脳波異常・難聴・知能は徐々に悪化，肝障害・末梢神経障害・低 Ca 血症などの副作用があった．なんらの治療薬がない現段階では比較的安定した長期効果が期待できる．
3. ピルビン酸 Na は MELAS,MERRF,CPEO などミトコンドリア脳筋症の高乳酸血症症状（吐き気，嘔吐，倦怠）の改善に緊急避難的に用いると有効であった．

4. taurine は，MELAS での，3243 と 3271 塩基に点変異をもつ変異 tRNA-Leu(UUR)や MERRF での，8344 塩基に点変異をもつ変異 tRNA-Lys の anticodon に結合できず，蛋白合成が停止することが判明．これらの変異 tRNA をもつサイブリド細胞を高濃度 taurine 存在下に培養すると，ミトコンドリアの形態が正常化し，機能も回復した．MELAS，MERRF に taurine 大量療法の期待が得られた．
5. **糖原病の第 1 次全国調査**を行ない，2292 施設のうち 62%から回答を得，過去 10 年間の診断症例数は 143 例であった．内訳は，II 型（acid maltase 欠損），III 型（debrancher enzyme 欠損），V 型（筋 phosphorylase 欠損＝McArdle 病）が主要 3 型で約 70%を占めた．このうち **V 型の生検筋では phosphorylase 結合性 vitamine B6 が 10%以下に減少，培養筋細胞に vitamine B6 投与すると phosphorylase 活性が回復できることが判明し，有力な治療法**である可能性が浮上した．
6. homeobox 遺伝子 Msx 1 cDNA をマウス骨格筋へ導入し，脱分化して分裂増殖可能な単核細胞がえられた．**幹細胞**類似の機能を有し，細胞治療への端緒を得た．
7. 筋緊張性ジストロフィーの myotonia 改善薬として dehydroepiandrosterone sulfate（DHEAS），**スーパーアポトーシス抑制因子 Bcl-xFNK** が開発できた．

主要筋疾患の遺伝子同定がおおむね出そろい，今後の展開として，dystrophin-dystroglycan と基底膜，dysferlin，calpain の異常症や FCMD について，①genotype phenotype 連関，②より簡便で確実な診断法の確立，③蛋白レベルの機能病態解析，④そこから得られる薬物治療／細胞治療の開発が急務である．基礎と臨床の協力による成果が大きく，すでに有力な方法が示唆されており実現可能な分野がある．また，主要筋ジスである FSHD, emerin/lamin 異常症について進展が得られず今後の重点領域と考える．上記結果は独創性が高く，emerin/lamin A/C 異常症以外は諸外国をリードしている内容である．

分 担 研 究 報 告

目　　次

I. 肢帯型／遠位型（三好）筋ジストロフィー

1) 骨格筋特異的カルパイン及びコネクチンが介する情報伝達系と肢帯型筋ジストロフィー症 2A 型の病態機序の解析 …… 15
東京大学大学院農学生命科学研究科　反　町　洋　之

2) 肢帯型筋ジストロフィー2A 型の分子医学的診断法の確立と病態解明 …… 19
国立精神・神経センター武蔵病院　南　　成　祐

3) 筋ジストロフィーの表現型・遺伝型の分子医学的研究 …… 22
国立精神・神経センター神経研究所　荒　畑　喜　一・林　　由起子

4) Dysferlinopathy（ジスフェルリン異常を原因とする筋ジストロフィー）における遺伝子変異と臨床型 …… 25
東北大学医学部神経内科　青　木　正　志

5) Dysferlin 遺伝子異常とその臨床像についての検討 …… 27
鹿児島大学医学部第三内科　樋　口　逸　郎

6) 筋ジストロフィーおよび関連疾患の臨床病態の解析 …… 30
愛知医科大学医学部神経内科　佐　橋　　功

7) サルコグリカン，サルコスパン，ジスフェルリンの正常骨格筋細胞での超微局在と存在様式の検討 …… 32
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

8) 筋細胞生存因子および細胞死抑制因子による筋ジストロフィー治療法の開発に関する研究 ―筋型，脳型ジスフェルリンの局在と ER ストレス細胞死― …… 35
国立精神・神経センター神経研究所　桃　井　　隆

9) 筋ジストロフィー発症機構の生化学・分子生物学的研究 …… 38
川崎医科大学神経内科　砂　田　芳　秀

10) 肢帯型筋ジストロフィーのモデルマウス“カベオリン－3 欠損マウス”の作成とその病態解析 …… 40
国立精神・神経センター神経研究所　萩　原　康　子

II. Dystrophin-Dystroglycan 関連

11) dystroglycan を分解する matrix metalloproteinase の解析 …… 45
帝京大学医学部神経内科　清　水　輝　夫

12）病態解明に向けたジストロフィン結合タンパク質の分子論的研究 …… 48
国立精神・神経センター神経研究所　吉　田　幹　晴

13）筋形質膜・細胞骨格間分子連関異常による筋ジストロフィー発症機構の細胞生物学的研究
—プレクチンと筋形質膜裏打ちタンパク質と構造・分子連関性の解析— …… 50
群馬大学医学部第二解剖　土　方　貴　雄

14）ジストロフィン欠損心筋におけるシグナル伝達異常の検討 …… 53
信州大学医学部附属病院遺伝子診療部　吉　田　邦　広

15）中枢神経系での dystroglycan および関連蛋白質の生理機能に関する研究 …… 55
鳥取大学医学部神経生物学　二　宮　治　明

16）中枢神経系における dystrophin の機能解析並びに新世代のアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療に関する研究 …… 57
熊本大学医学部附属病院神経内科　内　野　　誠

17）Mdx マウスの骨格筋浸潤細胞の flow cytometry …… 59
東邦大学医学部第四内科　栗　原　照　幸

18）ヒト染色体断片導入法による筋ジストロフィーモデルマウスの作出 …… 60
北里大学理学部分子発生学講座　花　岡　和　則

III．福山型およびその他の筋ジストロフィー

19）福山型先天性筋ジストロフィー遺伝子産物の機能解析と表現型・遺伝子型の研究 …… 65
大阪大学大学院医学系研究科　戸　田　達　史

20）筋ジストロフィーの分子遺伝学的研究と臨床への応用 …… 68
東京女子医科大学小児科　斎　藤　加代子

21）Ullrich 病の臨床病理学的検討 …… 70
国立精神・神経センター武蔵病院　南　　成　祐

22）眼咽頭筋ジストロフィー及び類縁疾患の遺伝子型／表現型の研究 …… 72
—抗 PABP2 抗体による免疫組織化学的検討を加えて—
熊本大学医学部附属病院神経内科　内　野　　誠

23）Rimmed vacuole 型遠位型ミオパチーの臨床・分子遺伝学的研究 …… 75
新潟大学脳研究所神経内科　田　中　恵　子

24）変異デスミン L385P と相互作用するタンパク質の検索 …… 77
新潟大学脳研究所神経内科　田　中　恵　子

25) リソソーム異常を伴う筋疾患の病態解明 …… 79
国立精神・神経センター神経研究所　西　野　一　三

26) エメリンに関する形態学的・細胞生物学的研究 …… 81
防衛医科大学校解剖学第二講座　依　藤　　宏

27) 筋型糖原病の遺伝子診断法の確立及び病態に即した治療法の開発 …… 84
浜松市発達医療総合センター小児神経科　杉　江　秀　夫

Ⅳ. ミオトニー症候群

28) 筋強直性ジストロフィー病態の分子論的解明と治療 …… 89
東京大学大学院総合文化研究科　石　浦　章　一

29) 筋緊張性ジストロフィー(DM1)の分子病態 —DMAHP/Six5 遺伝子の関与 …… 91
自治医科大学医学部生物学教室　川　上　　潔

30) 筋緊張性ジストロフィーに認められる CTG リピート延長が
遺伝子発現に及ぼす影響の検討 …… 94
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

31) 低分子量熱ショックタンパク質群による骨格筋ストレス耐性系の研究,
およびその筋ジストロフィー発症機構との関連 …… 96
横浜市立大学医学部第二生化学教室　鈴　木　　厚

Ⅴ. ミトコンドリア脳筋症

32) ミトコンドリア脳筋症（MELAS）の聴力障害に関する病理学的研究 …… 101
国立療養所犀潟病院神経内科　福　原　信　義

33) ミトコンドリア異常症における細胞死とその抑制系の検討 …… 103
自治医科大学小児科学　桃　井　真里子

Ⅵ. 筋発生・分化

34) 筋形成における細胞間相互作用とその制御機構 …… 107
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

35) 細胞成長因子に着目した筋肉再生メカニズムの解明 …… 109
徳島大学工学部生物工学科　野　地　澄　晴

36) 筋原線維形成制御因子の役割とその変異に起因する疾患の探索 …… 111
千葉大学理学部生物学科　大日方　　昂

37) 低分子量 G 蛋白質と Msx1 による筋細胞分化と脱分化の制御
：その筋再生への関与 …… 114
千葉大学理学部生物学教室　遠　藤　　剛

Ⅶ. 治　　療

38）未認可抗生物質ネガマイシンによるmdxマウスの治療 …… 119
東京大学大学院総合文化研究科　松　田　良　一

39）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 …… 122
神戸大学大学院医学系研究科　松　尾　雅　文

40）細胞死抑制の蛋白治療法の開発 …… 124
日本医科大学老人病研究所　太　田　成　男

41）Dehydroepiandrosterone sulfateのミオトニーに対する治療効果と作用機序 …… 126
東邦大学医学部第四内科　栗　原　照　幸

Ⅰ．肢帯型／遠位型（三好）筋ジストロフィー

骨格筋特異的カルパイン及びコネクチンが介する情報伝達系と肢帯型筋ジストロフィー2A型の病態機序の解析

反町洋之*

研究協力者 小野弥子** 秦勝志* 木村栄一*
中川和博* 勝井順子* 鳥居福代*
柿沼良美*,*** 鈴木紘一**** 阿部啓子*
南成祐***** 西野一三******

目的

肢帯型筋ジストロフィー2A型（LGMD2A）の責任遺伝子は1995年に*CAPN3*，即ち，骨格筋特異的カルパインp94(カルパイン3とも呼ばれる)の遺伝子であることが報告された．現在までに100以上の病原性変異が*CAPN3*遺伝子座に見出されており，その半分以上がミスセンス変異である（図1A参照）．

しかしながら，その発症機構については不明な点が多く，*CAPN3*遺伝子欠損が本質的に意味するところが不明であった．他の筋ジストロフィーでは構造蛋白質の構造的欠陥による膜構造不全が細胞外Ca^{2+}流入を増加し，μ-，m-カルパインの過剰活性化による筋蛋白質過剰切断が筋細胞崩壊のスキームとして広く受け入れられている．そのアナロジーでは，LGMD2Aにおいてもp94は実際には構造蛋白質として機能し，その構造破壊がLGMD2A発症の本質である，という可能性も考えられた．一方で，LGMD2Aはやはりプロテアーゼであるp94の酵素活性の欠損が原因である可能性もあり，まず，このどちらが正しいかを明確にすることがLGMD2Aの分子機構理解への第一歩であると考え，本研究の第一の目的はこの点を明確にすることにした．

我々は後述のようにプロテアーゼとしての機能が必須であることを明らかとした．そこで次に問題となるのは，p94のプロテアーゼ活性不全がどのように最終的に症状を引き起こすのか，という点である．これはLGMD2Aの分子機構を明らかにすることであり，他の筋ジストロフィーの発症機構との異動を明確にすることで，筋ジストロフィー共通の機構を解明することにつながると期待される．そのためには，広範な解析が必要であるが，我々は，p94の他にp94と特異的結合が確認されているコネクチン（タイチン）及び組織普遍的カルパインの3分子種に焦点を当て解析を行うことを第二の目的とした．

* 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻
** アリゾナ大学医学部
*** CREST, JST
**** 東京都老人総合研究所
***** 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

方法と結果

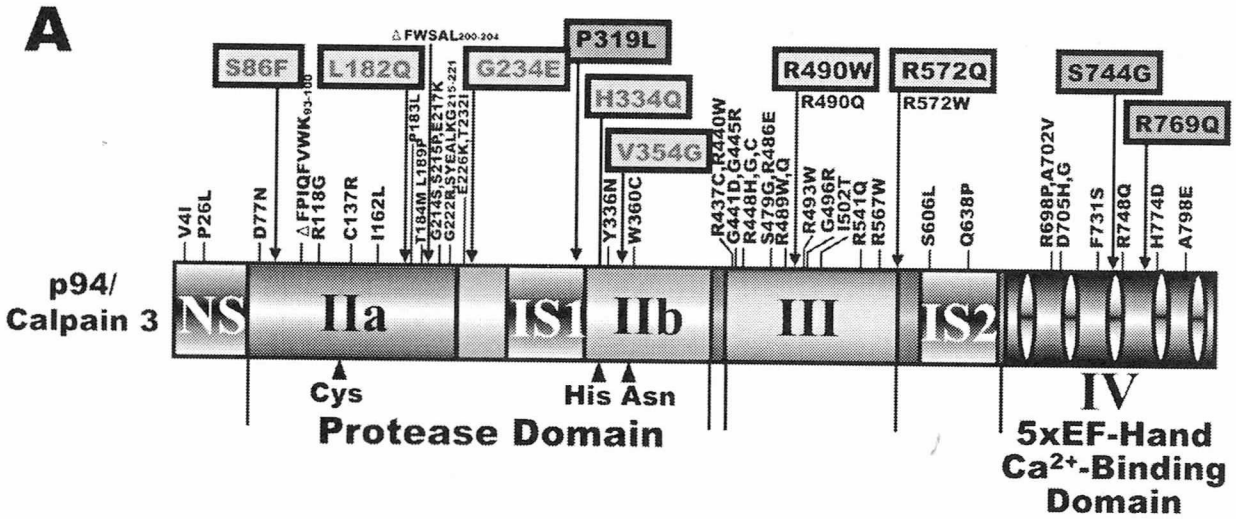
1）LGMD2Aはp94のプロテアーゼ活性不全により発症するか？:

この点を明らかにするために，LGMD2Aの病原性変異の中でミスセンス変異に注目し，10種類について変異p94を作成・発現し（図1A），その生化学的性質を解析した．その結果，全ての変異体に共通に基質のプロセシング活性消失が観察された．さらに，p94の活性中心のCysをSerに変異させ，プロテアーゼ活性だけを消失させた変異p94を発現するトランスジェニックマウスを作成して解析した結果，変異p94蛋白質の蓄積とLGMD2Aと類似のミオパチー症状が見出された．以上より，LGMD2Aの発症はp94のプロテアーゼ活性不全が根本原因となることを明らかとした．

2）コネクチンの部位特異的リガンドの同定:

コネクチンの各部位をドメインごとに区切り，ヒト骨格筋cDNAライブラリーを用いた酵母Two-Hybrid系でスクリーニングした．その結果，図2に示すように各部位特異的なリガンドが多数同定された．まず，N末端（Z線部位）に結合する分子としてT-cap（テレソニンとも呼ばれる）が得られた．T-capは，LGMD2Gの責任遺伝子産物であり，K^+-チャネルminKと特異的相互作用し，コネクチンキナーゼの基質となること，が報告され，極めて興味深い分子であといえる．

また，コネクチンキナーゼ領域（M線付近）には，MURF1（Muscle-specific RING-finger protein）の結合を同定した．さらに，MURF2，3というホモログが存在し，互いにホモ・ヘテロダイマーを形成すること，核移行して転写因子としても機能することを明らかとした．MURF1-3は，ユビキチン結合酵素（E2）であるUBC9やポリユビキチン鎖切断酵素であるISOT3とも結合すること，MURF1のノックアウトマウスは筋萎縮耐性を持つこと，等から，MURF1と骨格筋での蛋白分解との密接な関係が強く示唆されて，大変興味深い．他の知見も総合すると，コネクチンは筋原線維中で巨大な土台蛋白質（scaffold protein）としてシグナル伝達の交通整理を行っており，p94，T-capやMURF1などが必要に応じて解離し，細胞膜や核へとシグナルを伝達すると考えられた（図3）．



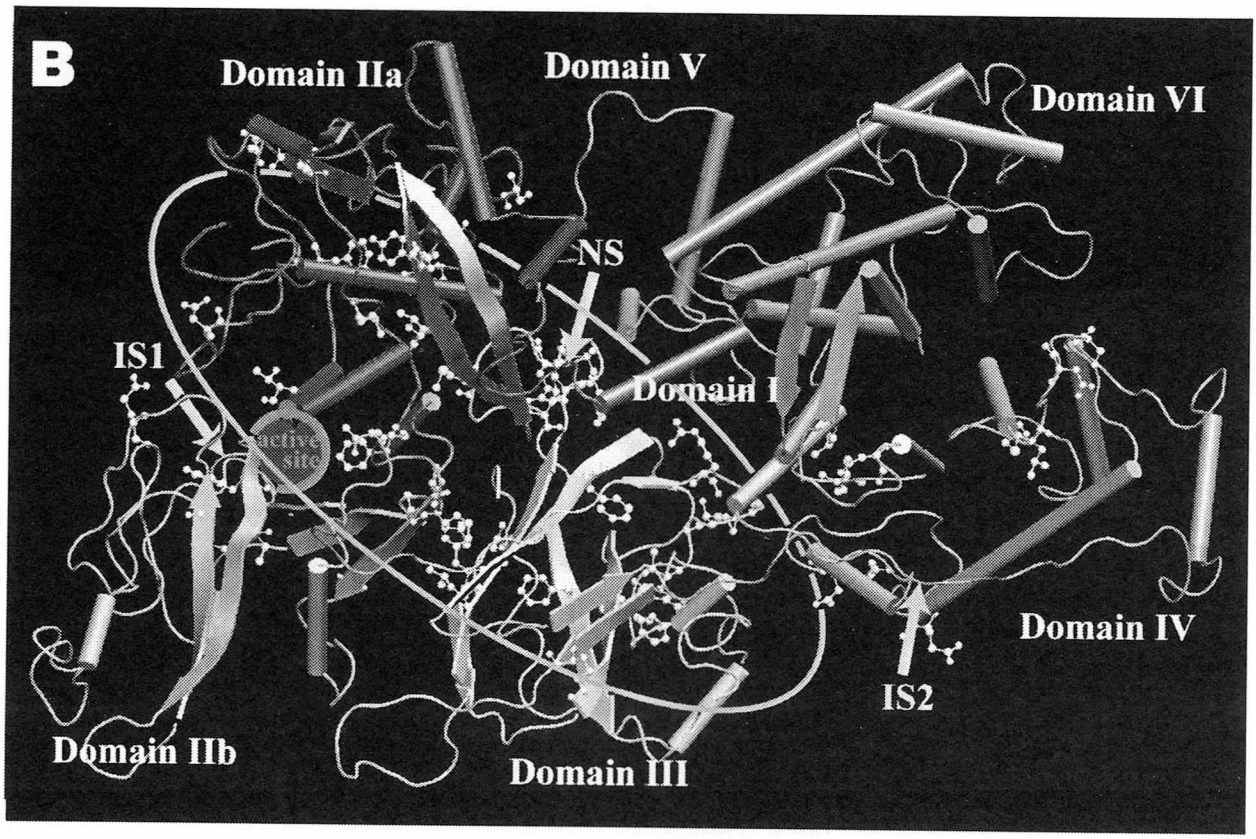


図1　カルパインの構造

A *p94（カルパイン3）の一次構造とLGMD2Aで見出された病原性ミスセンス変異:* 骨格筋に特異的に発現するp94は組織普遍的カルパインであるμ-, m-カルパインの活性サブユニットと高い相同性を持ち，4つのドメイン，プロ領域(I)，プロテアーゼ領域(IIa+IIb)，C2様Ca^{2+}-結合領域(III)，及び5xEF-ハンドCa^{2+}-結合領域(IV)，に分割できる．さらに，特異的なNS, IS1, IS2領域をそれぞれドメインI, IIb, IIIに持ち，この部分を欠失するp94Δは自己消化活性が弱まり安定化する．四角で囲んだ変異は本研究で作成し，解析したものである．

B *m-カルパインの立体構造とLGMD2Aの病原性ミスセンス変異の位置の投影:* 全体として薄い楕円円盤状の構造をしており，時計方向にドメインI, IIa, IIb, III, IV, IVと並び，分子内相互作用により閉じた構造を形成している．活性サブユニット（ドメインI～IV）の構造はp94と極めて高い相同性があるため，LMGD2Aで見出されているp94の変異をm-カルパイン活性サブユニットの構造に投影してみた．その結果，プロテアーゼ活性中心を中心として一つの同心円上に変異の集中が見られた．これは，LGMD2Aの発症がp94のプロテアーゼ活性と強くリンクしていることを示している．p94においてNS, IS1, IS2の挿入されている位置を矢印で示した．

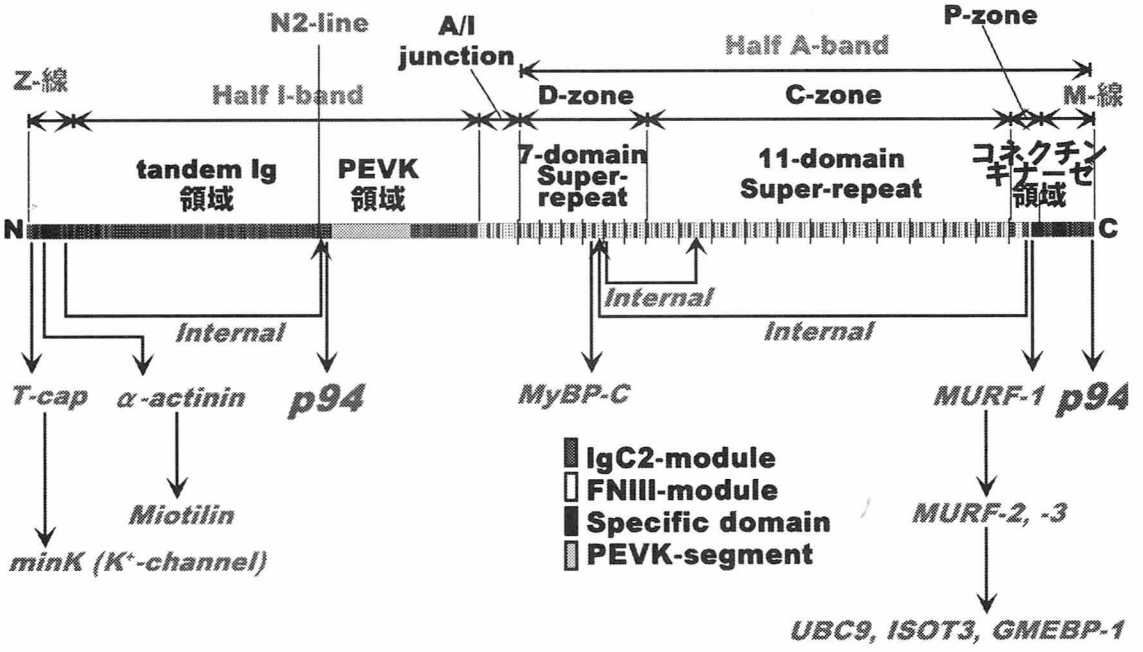


図2　コネクチンの構造と部位特異的リガンドの同定

コネクチンの90％以上は，免疫グロブリンC2ドメイン及びフィブロネクチンIII型ドメインの両接着モチーフの各々からなるが，いくつか興味深い構造が見られる．これらの領域に注目してそのリガンドをスクリーニングした結果，図に示した興味深い分子との特異的相互作用が見出され，さらにこれらの分子が他の分子とも相互作用することを明らかとした．これらの結果は図3に示す情報伝達システムの根拠となった．

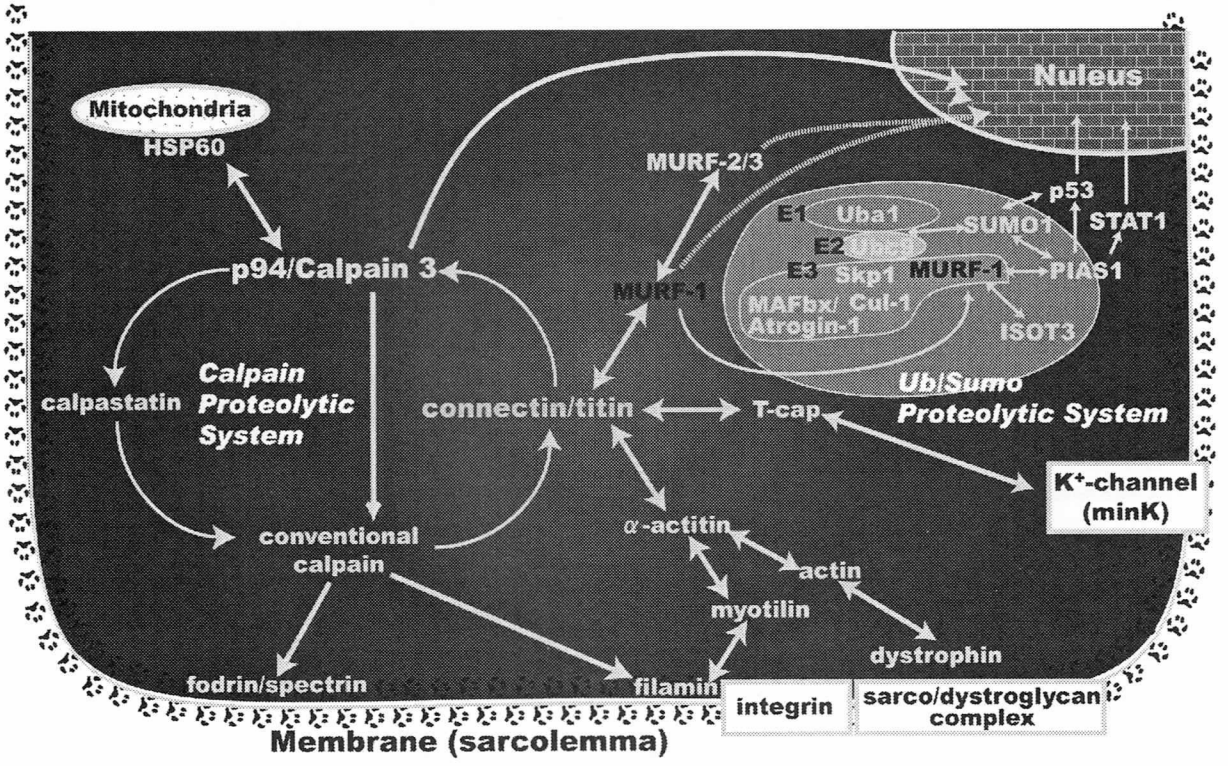


図3　コネクチンを土台タンパク質，p94／カルパインをモジュレーターとした筋細胞情報伝達系

p94，T-cap，MURF1などコネクチンに結合している分子は，サルコレンマからのシグナルを受容することで，コネクチンから解離して核へと情報を伝達する．また，同時にp94はカルパイン系を，MURF1は，ユビキチン－プロテアソーム系を制御して，骨格筋の蛋白質分解系をモジュレートする．LGMD2Aにおけるp94のプロテアーゼ活性不全はこのシステムの機能を不全にして，症状を引き起こすと考えられる．

3）カルパインの活性化機構の解析:

活性化機構を明らかにするには，カルパインの立体構造の解明が不可欠である．そこで，ヒトm-カルパイン発現系を確立し，X線結晶回折により立体構造を解明した（図1B）．その結果，

i）一次構造上で予想された4領域（プロ領域（I），プロテアーゼ領域（II），未知領域（III），カルモジュリン様Ca^{2+}結合領域（IV））は，立体構造上も保存されていた．

ii）プロテアーゼ領域はさらに2つのサブドメインに分割しており，Ca^{2+}非存在下では活性中心が形成されない．

iii）機能未知だが分子間で配列が保存されたドメインIIIはβ-サンドイッチ構造をとるC2ドメインに相同な領域であり活性に重要な役割を果たすCa^{2+}結合調節領域であることが判明した．LGMD2Aでこのドメインに最多の変異が存在する事実が説明された．

iv）ドメインIVは調節サブユニットの相同領域と会合しており，これはさらにN末端であるプロ領域と相互作用する．自己消化，サブユニット解離などカルパイン活性化機構が構造的に説明された．

こうして得られた立体構造情報を基に，カルパイン活性化機構を明確にするため，自己消化，サブユニット解離，Ca^{2+}依存性，などに注目し，様々な変異体を用いて解析した．その結果，プロテアーゼドメインに直接Ca^{2+}を結合するという驚くべき事実と，自己消化はサブユニット解離に必要であり解離・酸化・リン酸化などの翻訳後修飾はカルパインの基質特異性を変化させること，を明らかにした．

4）p94の酵素学的性質の解析:

p94はその強い自己消化活性（半減期10分）のために，活性のある蛋白質を得ることは不可能であった．興味深いことに，p94特異的に存在するIS1及びIS2領域（図1A参照）を欠失させると，この強力な自己消化活性は消失し安定化する．しかも，p94のalternative splicing産物の中にこのような分子種が存在する．そこで，この分子種（以下，p94Δと呼ぶ）を大量発現・精製して，その酵素学的性質を解析した．その結果，p94Δの様々なプロテアーゼ阻害剤に対する感受性は従来のカルパインと同様であるが，その内在性阻害蛋白質カルパスタチンはp94Δを阻害せず，しかも，これを非常によい基質とすることが判明した．カルパスタチンのp94による切断部位を解析した結果，阻害活性中心（TIPPxYR）の内部であることが明らかとなった．

5）p94の酵素学的性質のLGMD2A診断への応用:

カルパスタチンがp94の特異的基質であることを用いてp94のプロテアーゼ活性測定系を開発した．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蛋白質を適当な条件で用いるとp94の活性を蛍光で検出することが可能となった．今後は直接ヒト骨格筋におけるp94の活性を測定し，その活性の有無をLGMD2Aの診断の基準とできるように応用する．

考　察

LGMD2Aの発症はp94のプロテアーゼ活性不全が本質である．LGMD2Aの診断としては，現在までに主にWestern blotと免疫組織染色によるものの2種あるが，どちらもp94の不安定性により操作中に分解するfalse positiveや，LGMD2A変異によるp94の安定化に起因するfalse negativeの可能性が少なからず存在する．これに対して，p94の活性を直接測定できれば，LGMD2Aの診断を直接，正確かつ容易に行うことが可能となる．

今後の展望

現在のところ，p94の活性測定系を生検筋に適応することは困難である．その原因は，（1）検出感度，（2）MBSP（myofibril-bound serine protease）による活性妨害，である．前者は蛍光基質の改良，後者は阻害剤（PMSFなど）の使用により克服可能と考えており，近い将来に必ず実現する予定である．

文　献

1）Nakagawa K, Masumoto H, Sorimachi H, and Suzuki K: Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. J. Biochem. 130: 605-611, 2001.

2）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: 1583-1590, 2000.

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. Molec. Genet.,9: 1393-1402, 2000.

4）Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber R, Masumoto H, Nakagawa K, Irie A, Sorimachi H, Bourenkow G, Bartunik H, Suzuki K, and Bode W: The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97: 588-592. 2000.

5）Herasse M, Ono Y, Fougerousse F, Kimura E, Stockholm D, Beley C, Montarras D, Pinset C, Sorimachi H, Suzuki K, Beckmann J. S, and Richard I: Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and post-transcriptional events. Mol. Cell. Biol.,19: 4047-4055, 1999.

肢帯型筋ジストロフィー2A型の分子医学的診断法の確立と病態解明

南　成祐[*,**]

研究協力者　館澤　薫[**]　田川一彦[**,***]　小川　恵[**]
林　由起子[**]　西野一三[**]　埜中征哉[*]

目　的

肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）は主に肩甲帯，腰帯が侵される筋ジストロフィーである．近年，原因遺伝子が次々に明らかになり，多くの亜型に細分されるようになっている．1995年，LGMD2A型は骨格筋特異的な細胞内プロテアーゼであるカルパイン３の遺伝子（CAPN3）異常であることが明らかにされた．これにより遺伝子診断が可能になったが，変異のホットスポットがないことや対象となる患者がLGMD患者のほとんど全体となってしまうことなどの理由から，効率的に診断することは容易でなかった．一方，免疫組織化学診断は，カルパイン３がin-vitroで強い自己消化活性を示すことから困難であると予想されていた．

このような状況の中，我々は効率的な診断法の確立と病態の解明をめざして本研究を行ってきた．それらを総括して報告する．

方法と結果

1．カルパイン３遺伝子変異の解析

臨床および筋病理所見よりLGMDと診断した患者80名（常染色体優性のLGMDとLGMD2C～2F（サルコグリカン異常症）は除外した）を対象として，凍結生検筋より抽出したRNAを用いてRT-PCRを行い，ダイレクトシーケンス解析した．その結果，21名（26%）において13種類の変異を同定した（図1）．G233V，R461C，D707G，1796insAの4種の変異は頻度が高く，合わせて患者21名中15名（71%）に認められた．

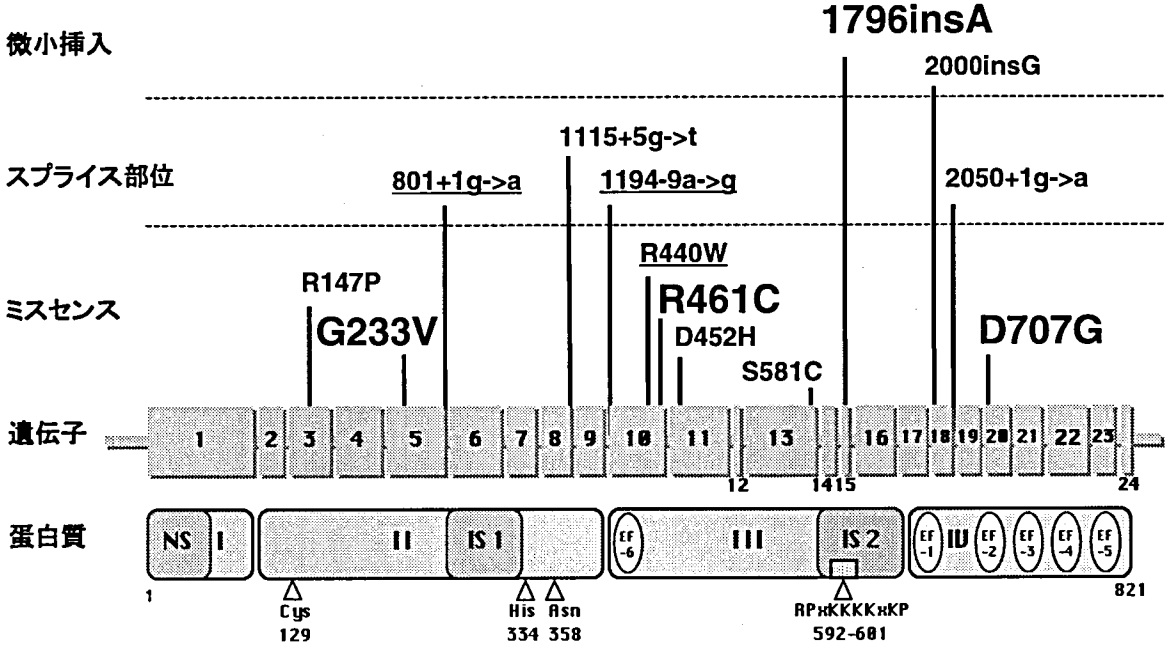


図1　カルパイン３遺伝子変異の分布

LGMD2A型患者21名に見いだされた13種類の変異について，遺伝子のエクソン構造に沿って示している．とくにホットスポットは認められない．下線を引いたものは海外での報告がある変異で，それ以外は本邦でのみ見つかっている．大きな文字で表した４つの変異は高頻度に見つかった変異である．下段はカルパイン３タンパク質の４ドメイン構造である．NS，IS1，IS2は他のカルパインファミリーには存在しないカルパイン3特有な配列．Cys，His，Asnの３つのアミノ酸はプロテアーゼ活性中心を成す．RPxKKKKxKPは核移行シグナル配列．EF-1～6はカルモジュリン様カルシウム結合モチーフである．

* 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
*** 東京都神経科学総合研究所

2. 臨床像ならびに表現型-遺伝子型相関の検討

下肢の機能障害度を指標として筋力低下の進行を調べたところ，ヌル型変異だけを持つ患者（3名）での発症年令が9-32（平均18）歳とやや早期なのに対し，ミスセンス変異だけを持つ患者（10名）では8-52（平均27）歳と幅広かった．しかし，個々のミスセンス変異に注目すると，G233Vホモ接合性患者（2名）が8～16歳と早期に発症しているのに対し，D707Gホモ接合性患者（2名）は30～35歳，R461Cのホモ接合性患者（2名）は35～52歳に発症していた（図2）．

3. 筋病理像の検討

HE染色，ATPase染色，NADH染色の光学顕微鏡観察と，電子顕微鏡観察を行った．病初期には小集団状に壊死線維が散見されたが，opaque線維は極めてまれであった（図3A）．病気が進行すると線維化が強い慢性的所見となった．特筆すべき点は14名（67%）に分葉線維が観察され（図3B），そのほとんどがタイプ１線維かつ萎縮していたことである．電顕上はZ-streamingや筋原線維の配列異常があり，進行例では筋原線維の大部分が消失して不定形物質やミトコンドリアで埋められていた．細胞核はHE染色で肥大して見え（図3C,D），電顕上もクロマチン凝集を伴う異常が観察された．

4. ミニマルチプレックスウエスタンブロット（MMW）法による解析

Andersonらが報告した方法を田川らが小スケールで行えるように改良した系で行った．凍結筋切片約10枚を用い，ジストロフィン，ジスフェルリン，カルパイン３，α－サルコグリカン，β－ジストログリカン，カベオリン－３に対する抗体を混合してイムノブロットした．LGMD2A型患者31名とその他のLGMD患者36名の凍結筋を対象とした．その結果，LGMD2A型患者のうち，カルパイン３の欠損～減少が28名，タンパク量が保たれていてその他のLGMDと区別できなかったのが3名（うち1名は分子量異常が認められた）であった（図4）．タンパ

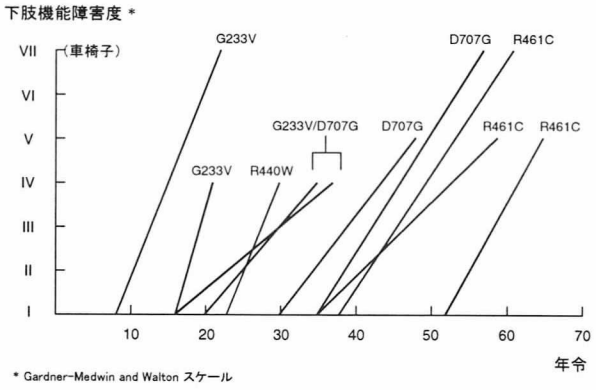


図2 ミスセンス変異だけを2つ持つ患者の下肢筋力低下の進行

下肢の機能障害度を指標として，ミスセンス変異を2つ持つ患者らの筋力低下の進行を調べ，直線でプロットした．各直線の先にその患者が持つ変異を示した．G233V/D707Gの複合ヘテロの患者以外はすべてホモ接合性の患者である．症例数が少ないものの，G233Vが早発型，D707GとR461Cが遅発型の，表現型－遺伝子型相関が示唆される．

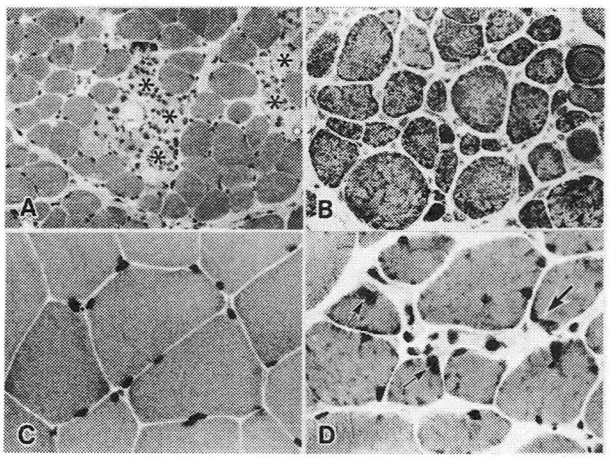


図3 骨格筋の病理変化

病初期の筋では壊死・再生線維が小集団状に認められる（A：星印）が，opaque線維はきわめてまれにしか見つからない．進行例では分葉線維が高率に認められるようになる（B）．分葉線維の核は正常な核（C）に比して肥大化して見える（D：矢印）．A，C，DはHE染色，BはNADH染色．

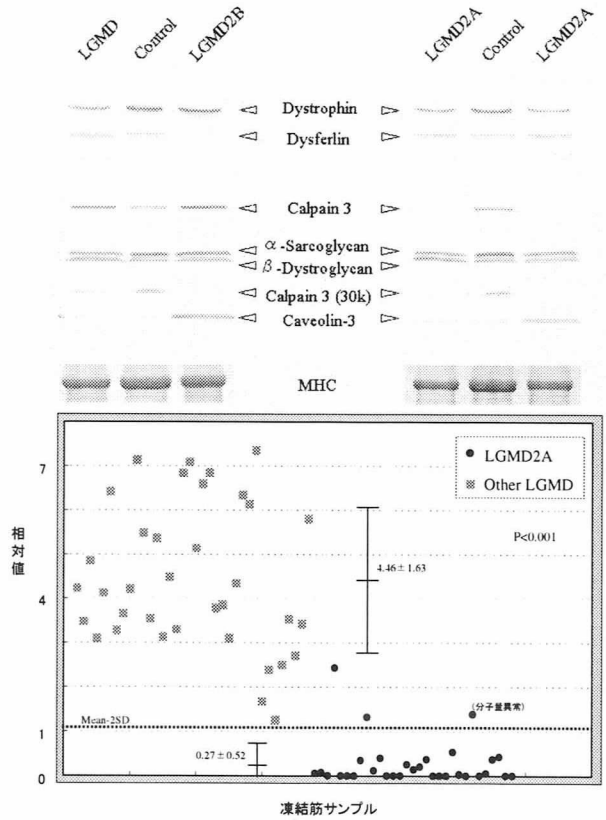


図4 マルチプレックスウエスタンブロット解析

上段右側にLGMD2Aの，左側にその他のLGMDのブロット像の例を示す．それぞれのブロット像の下にはミオシン重鎖の染色像を示す．LGMD2A型患者ではカルパイン３のバンドが消失している．カルパイン３遺伝子由来の30kDa断片は分解産物と考えられているが詳細は不明である．このブロットではLGMD2A型患者で30kDa断片が消失しているが，その他のLGMDで消失することも多い．下段はカルパイン３のバンドを定量したものである．その際，ミオシン重鎖の定量値で割ることにより筋タンパク量を標準化し，さらに各ブロットの同一コントロールサンプルに対する相対値として算出している．バーは平均値と標準偏差を表している．点線は，その他のLGMD群の平均値マイナス２倍標準偏差の境界線である．

ク量が保たれていた患者はR461C変異ないしS581C変異を持つ患者であった．分子量の変化（88.5kDaへの減少）として異常を検出できた患者は，cDNA上でエクソン16の欠失が認められている．凍結固定後の融解がカルパイン３の安定性に与える影響について調べるため，凍結切片を30℃で一定時間インキュベートすると，5分以内に検出が難しいレベルにまで分解された．また，ジストロフィンやα－サルコグリカンの検出量も低下した．

考　　察

1. 本邦のLGMDの約23％が2A型=カルパイン３異常症である

我々が検索した80名のLGMD患者のうち26％がLGMD2A型であった．検索の対象から除外した常染色体優性のLGMDとLGMD2C～2F型（サルコグリカン異常症）は，当センター生検筋バンクでは約2％と約10％と推定している．これらの値を入れて計算すると，LGMD2A型はLGMD全体の約23％となる．

2. 4種の変異のアレル頻度が約59％を占め，遺伝子診断に利用できる

本邦のカルパイン３遺伝子変異の特徴として，G233V，R461C，D707G，1796insAの4種の変異がアレル頻度として約59％を占める．これらの変異は海外では報告がない．おそらくは日本人の祖先に変異が生じて広まったものであろう．遺伝子診断に活用すると約71％の患者を見いだせると期待される．

3. ミスセンス変異における表現型-遺伝子型相関の発見

従来，ヌル型変異が比較的早期発症型であるとは言われていた．しかし，本研究の結果，G233Vミスセンス変異が早発型，D707GとR461Cが遅発型という新たな表現型－遺伝子型相関が示唆された．ミニマルチプレックスウエスタンブロット解析の結果，G233V変異ではカルパイン３は欠損を示し，R461Cは比較的保たれていた．D707Gは中間的な値を示した．したがって，ミスセンス変異と重症度の関係の大部分は残存するカルパイン３タンパク量から説明できるのではないかと考えられる．この点については今後の重要な検討課題である．

4. カルシウム流入による筋細胞壊死とは異なる病理発生機序を考えるべきである

病初期の筋では小集団状に壊死線維が散在するが，Duchenne型筋ジストロフィーなどによく見られるopaque線維はほとんどない．したがって，それらの発症機序として通説となっている，細胞膜損傷によるカルシウム流入が引き金となる筋細胞壊死とは異なるメカニズムを考えるべきである．一方，分葉線維は，筋原線維の局所的崩壊と配列異常に始まり，核の異常を伴って筋細胞全体の萎縮へと至る過程が示唆される．

5. MMW法による蛋白レベルでのスクリーニングが可能である

LGMD2A型患者31名のうち29例はカルパイン３の欠損～減少か分子量異常として正常群と区別できた．正常群の平均値マイナス2倍標準偏差以下を異常値とると，診断上の感度は約94％，特異性は事実上100％であった．一方，遺伝子診断に先立つスクリーニング目的として100％の感度が得られるように境界を設けても，ほとんどの正常群を除外することが可能である．ただし，サンプル調整時の不用意な融解はカルパイン３をきわめて不安定化することが明らかになったので，避けなければならない．

今後の展望

まず診断法の確立であるが，血液DNAからはG233V，R461C，D707G，1796insAについて検索し，異常がない場合は筋生検を行う．生検筋がある場合は，まずMMW法を行い，異常が期待された患者について RT-PCR-ダイレクトシーケンス解析を行う手順が効率的と考えられる．今後は，このような手順により，LGMD2A型＝カルパイン３異常症の患者の診断が進むことが期待される．

次に病態解明についてであるが，ミスセンス変異における表現型-遺伝子型相関を見いだした．この現象はカルパイン３タンパクの残存量の観点から説明されうることが示唆されたが，今後ミスセンス変異体の自己消化活性などの検討が必要である．

文　　献

1) Minami N, Nishino I, Kobayashi O, Ikezoe K, Goto Y, Nonaka I: Mutations of calpain 3 gene in patients with sporadic limb-girdle muscular dystrophy in Japan. J Neurol Sci 171:31-37, 1999.

2) Sorimachi H, Minami N, Ono Y, Suzuki K, Nonaka I: Limb-girdle muscular dystrophy with calpain 3 (p94) gene mutations (calpainopathy). NeuroScience news 3:20-27, 2000.

3) Chae J, Minami N, Jin Y, Nakagawa M, Murayama K, Igarashi F, Nonaka I: Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. 11:547-555, 2001.

筋ジストロフィーの表現型・遺伝型の分子医学的研究

荒畑喜一*（林　由起子*）

研究協力者　塚原俊文*　後藤加奈子*　小川　恵*
田川一彦*　松田知栄*　川辺清一*
松村　剛*　山中　岳*　野口　悟*
計良陽子*　平瀬正樹*　辻本敦美**
森下真一***　瀬々　潤***　青木正志****
Robert H. Brown, Jr.*****　石原傳幸******　村山久美子*
南　成祐*　西野一三*　埜中征哉*

目　的

筋ジストロフィーの臨床病理学的特徴と遺伝子変異ならびに責任遺伝子産物との関連について検討し，筋ジストロフィーの発症機序の解明に迫ることを目的とした．特に肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)，三好遠位型筋ジストロフィー(MM)，福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)を中心に研究を進めた．

方法と結果

生検骨格筋組織を用い，免疫組織化学法(IHC)およびイムノブロット法による筋ジストロフィー関連蛋白質の発現を検討し，また責任遺伝子の変異の有無を解析し，臨床・筋病理学的特徴とあわせ病態機序への関連を検討した．

1) ミニマルチウエスタンブロット(MMW)法の開発

これまでに多くの筋ジストロフィー原因遺伝子産物が同定されており，診断確定をするにあたってより簡便な方法が必要となった．そこで我々は，少量の試料で複数の原因蛋白質を同時に解析する簡便な方法としてMMW法を開発した．現在dystrophin, dysferlin, calpain 3 (p94), α-sarcoglycan, β-dystroglycanの発現を多検体同時に定量的に解析し，臨床診断へ応用している（図1).

2) LGMD/MM

LGMDは常染色体劣性あるいは優性の遺伝形式をとり，進行性に近位筋優位の筋力低下，筋萎縮を示すヘテロな疾患群である．これまでに多くの遺伝子座，責任遺伝子産物が同定されているが，まだ原因の明らかでないものも多い．一方，MMは下腿後面筋を中心に障害される遠位型の筋ジストロフィーである．臨床的に異なるLGMD2BとMMは，ともにdysferlin遺伝子の異常による疾患である．我々はLGMD/MM症例のdysferlinの存在様式と蛋白質量，さらには遺伝子変異の有無を検索した．その結果，dysferlinは正常骨格筋では筋細胞膜に存在するが，疾患筋において様々な免疫染色パターンをとりうること（図2)，dysferlinの局在異常が認められながらも生化学的には異常の認められない場合のあることを報告した．そしてIHC，MMWでともにdysferlinの発現異常が認められた症例群をdysferlinopathyであると考え，遺伝子異常の有無をPCR-SSCP法およびsequencingにて解析した．その結果，検索しえたほとんどの症例で遺伝子変異を確認した．このうち，G3370T変異の頻度が高く，dysferlinopathyの19.4%, LGMD2Bの50%に認められた．我々の検索ではLGMD 55例中2Bは18.2%を占めていた．一方，MMの25%には生化学的にdysferlinの明らかな異常が認められなかった．さらに，dysferlinと結合する蛋白質の同定を試みた結果，dysferlinとLGMD1Cの原因遺伝子産物caveolin-3が免疫沈降法で互いに共沈されることを明らかにした．また，LGMD1Cの骨格筋ではdysferlinの筋細胞膜における発現の低下が認められたことより，dysferlinとcaveolin-3が相互作用していることを報告した．

3) FCMD

FCMDは本邦に多く認められる中枢神経障害を伴った重症の先天性筋ジストロフィーである．Fukutin遺伝子の異常によるが，その発症機序は明らかでない．我々はこれまでに，FCMD骨格筋では，基底膜の構築異常があり，筋細胞膜内外の蛋白質相互連関の異常が病態に強く関わっている可能性を示唆してきた．今回我々は新たに，FCMD骨格筋ではα-dystroglycanが選択的に欠損していることを発見し報告した．β-dystroglycanの発現は保たれていることから翻訳後修飾，特に糖鎖修飾の異常による可能性を示唆した(図3).

* 国立精神・神経センター神経研究所
** DNAチップ研究所
*** 東京大学理学部情報科学科
**** 東北大学医学部神経内科
***** Massachusetts General Hospital-East, Harvard University Medical School, USA
****** 国療東埼玉病院

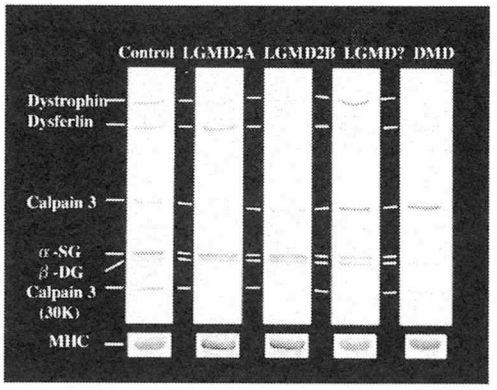


図1　MMW 法
MMW 法による解析．コントロール筋ではいずれの抗体に対するバンドも明瞭に認められる．LGMD2A では calpain 3 (p94)の，LGMD2B では dyferlin の，DMD では dystrophin のバンドが欠損している．

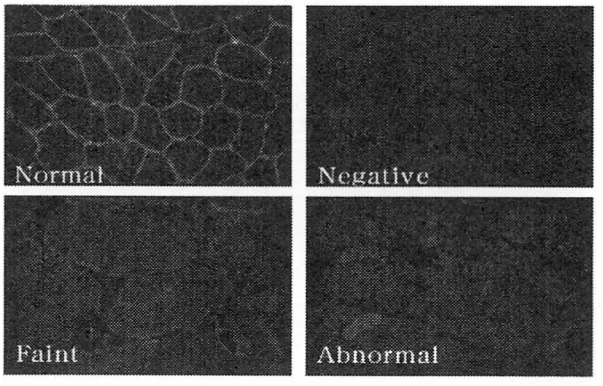


図2　Dysferlin の免疫染色パターン
Dysferlin は正常骨格筋では筋細胞膜に一致して認められる(Normal)が，疾患筋では完全に欠損しているもの(Negative),筋細胞膜に減弱した免疫反応の認められるもの(Faint)，筋線維ごとに染色パターンが異なったり，細胞質内に強い免疫反応陽性物質が認められるもの(Abnormal)など様々な染色パターンが認められる

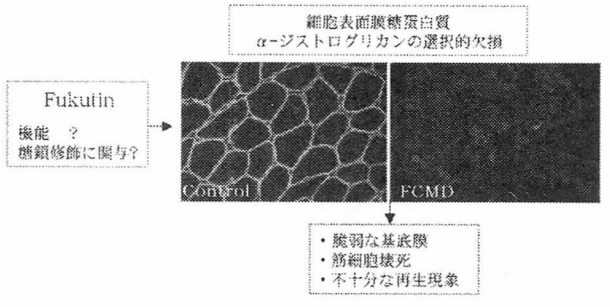


図3　FCMD の筋細胞障害過程

4) ヒト筋 cDNA マイクロアレイの作製

筋ジストロフィーの原因蛋白質は筋細胞膜，基底膜関連，核膜関連，ならびに細胞内酵素群などその局在や機能は様々である．このような蛋白質群の異常がどのようにして筋ジストロフィーという共通の病像を示すのかを知る一助として，現在ヒト筋 cDNA マイクロアレイを作製中である．

考　　察

1）Dysferlinopathy の診断には，免疫組織化学法，イムノブロット法の併用が重要であり，双方で異常の認められた症例は primary dysferlinopathy である可能性が高いと考えられた．

2）Dysferlin 遺伝子の G3370T 変異は本邦では頻度が高く，特に LGMD2B で多く認められる遺伝子変異であり，スクリーニングの際，有用であると考えられた．

3）臨床的に MM と診断されたにもかかわらず dysferlin に明らかな異常が認められない症例が 25%存在することから，遺伝的多様性も含め，今後検討してく必要があると考えられた．

4）FCMD の発症機序を考える上で，蛋白質の糖鎖修飾の異常が重要であると考えられた．

今後の展望

1）Dysferlin がどのような状況下で局在異常を示すのか，また caveolin-3 の他にどのような筋ジストロフィー関連蛋白質と関わっているのかを検討し，dysferlin の機能に迫ると同時に筋ジストロフィーの共通の病態の有無ならびにその機序について検討していきたいと考えている．

2）Fukutin がどのように蛋白質特に α-dystroglycan の糖鎖修飾に関与し，また中枢神経病変をも含めどのように病態と関連しているかを検討すると共に，筋ジストロフィー関連蛋白質それ自体のみならず糖鎖修飾を含めた分子の総合的な機能解析を進めていく必要があると考えている．

3）cDNA マイクロアレイによって骨格筋における遺伝子発現を網羅的にとらえ，疾患筋に共通の遺伝子発現パターンの有無を知ることが可能となり，今後の病態解明に重要な役割を果たしていくことが期待される．

参考文献

1）Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK, Ho MF, Arahata K, Brown RH Jr : Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. Neurology 53:1119-22, 1999.

2）Matsumura T, Aoki M., Nagano A, Hayashi YK, Asada C. Ogawa M, Yamanaka G, Goto K, Nakagawa M, Oka H, Sahashi K, Kouhara N, Saito Y, Brown RH.Jr, Nonaka I, Arahata K : Molecular genetic analysis of dysferlin in Japanese patients with Miyoshi myopathy. Proc Japan Acad 75 (Ser.B) : 207-212, 1999.

3）Tsukahara T, Tsujino S, Ogawa M, Nishiyama A, Fujita M, Kurokawa R, Hayashi YK, and Arahata K : Differential gene expression analysis in Emery-Dreifuss muscular dystrophy using cDNA microarrays. The American Journal of Human Genetics 67: 2227, 2000.

4) Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, Arahata K, Brown Jr RH : The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. Hum Mol Genet 10: 1761-1766, 2001.

5) Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, Noguchi S, Ishihara T, Nonaka I, Arahata K : Selective deficiency of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Neurology. 57:115-121, 2001.

Dysferlinopathy（ジスフェルリン異常を原因とする筋ジストロフィー）における遺伝子変異と臨床型

青木正志*

研究協力者 高橋俊明*,** 水野資子* 小野寺好明*
日沼雄二* 竪山真規* 近藤恵美**
中井博史** 鴻巣武** 斎藤博**
埜中征哉*** 荒畑喜一*** 糸山泰人*

三好型遠位型筋ジストロフィーはわが国の三好らの記載により臨床型が確立された疾患であり，常染色体劣性の遺伝形式を示す．1998 年に我々は，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するために，染色体 2p13 領域に 3Mb にわたる P1-derived artificial chromosome (PAC)による contig を作製することにより，その遺伝子の同定に成功した．原因遺伝子は 2,080 アミノ酸からなり，これまでに明らかにされているヒトを含めた哺乳類の遺伝子とは homology を示さず，線虫の fer-1 遺伝子のみに homology が認められた．このことから，dystrophy associated fer-1 like protein, の下線部をとり“dysferlin”と名づけた．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，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．

目　的

本邦 dysferlinopathy（三好型遠位型および肢帯型筋ジストロフィー 2B 型）患者での dysferlin 遺伝子変異と臨床的特徴の検討を行った．

対象と方法

患者における遺伝子解析を行うために，dysferlin 遺伝子の cDNA 上に設計したプライマーを用いて dysferlin 遺伝子を含む PAC を直接シークエンスすることにより，そのエクソン・イントロン構造を決定した．

遺伝子解析の対象となった症例は 59 家系の 66 人である．その内訳は三好型遠位型筋ジストロフィー患者が 34 家系 36 人，肢帯型筋ジストロフィー患者が 24 家系 27 人，高 CK 血症患者が 2 家系 2 人であった（1 家系は同一家系内に三好型遠位型筋ジストロフィー患者 1 人と肢帯型筋ジストロフィー患者 1 人及び distal anterior compartment myopathy 患者 1 人が存在）．インフォームドコンセントを得た患者末梢血リンパ球から DNA を抽出し，エクソンごとに PCR 法にて遺伝子を増幅した．PCR 産物を single strand conformation polymorphism (SSCP)法および直接塩基配列決定法にて確認した．

結果と考察

cDNA の情報に基づき PAC を直接シークエンスすることによりすべてのエクソン・イントロン構造を決定した．また，これにより得られたイントロンの塩基配列に基づき，各エクソンを増幅するプライマーを全てのエクソンにわたり設計した．

Dysferlin 遺伝子の解析により，三好型遠位型筋ジストロフィー 24 家系，肢帯型筋ジストロフィー 13 家系，高 CK 血症 1 家系で遺伝子型が確定した．これらの変異の多くは途中に終止コドンが出現する truncating mutation であった．外国例では C 末端の膜貫通部位の直前に変異が集積している傾向がみられたが，わが国の症例では遺伝子全体に分散して分布していた（図）．一方，G1310+1A 変異と C1939G 変異は 3 家系に，G3370T 変異は 8 家系に，3746delG 変異と 4870delT 変異は 6 家系に認められ，この 5 種類の変異は本研究で同定された変異の 59%を占め，日本人に比較的頻度の高い変異と考えられた．遺伝子変異が確認された dysferlinopathy の発症年齢は 13 歳から 43 歳までにわたり平均 23.9±8.0 歳であった．CK 値の平均は 5,008 ±3,678IU/l と高値を示した．長期間経過観察できた症例で CK 値は低下していく傾向にあった．また G3370T 変異をもつ症例の平均発症年齢は 33 歳と遅い一方，C1939G 変異を持つ症例は平均発症年齢が 16 歳，G3510A 変異をもつ症例は 13 歳と早かった．これらのことから G3370T 変異は軽症型，C1939G 変異と G3510A 変異は重症型と関連している可能性があると考えた．

今後の展望

3 年間の研究にて dysferlin 遺伝子解析の方法はほぼ確立できた．ジスフェルリン異常を原因とする筋ジストロフィー（Dysferlinopathy）の疾患概念も確立しつつある．今後さらに症例を積み重ね，生検骨格筋における dysferlin 蛋白発現と遺伝子変異の関係も検討する必要がある．

* 東北大学医学部神経内科
** 国立療養所西多賀病院
*** 国立精神・神経センター神経研究所

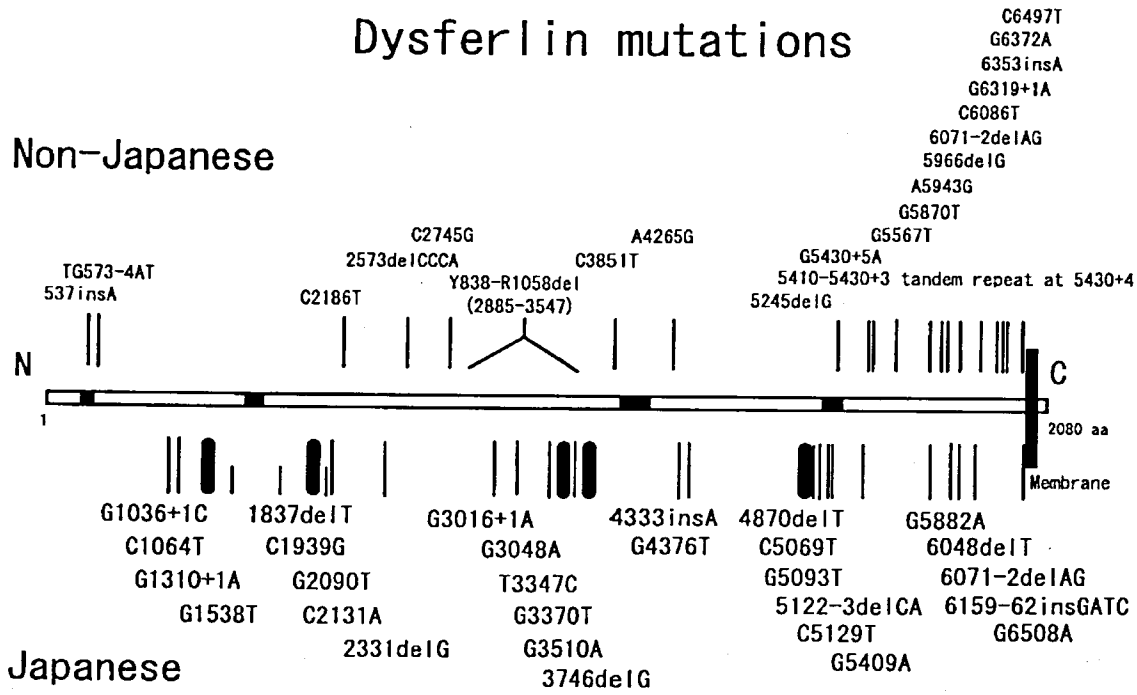


図 これまでに同定された dysferlin 遺伝子変異
中央は dysferlin 蛋白の構造を示し，C 末端部分に膜貫通部位を認める．外国例（上側）では C 末端の膜貫通部位の直前に変異が集積している傾向がみられたが，わが国の症例（下側）では遺伝子全体に分散して分布しており，太線で示した５つの変異（G1310+1A,C1939G,G3370T, 3746delG, 4870delT）の頻度が高かった．

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 Genet. 20, 31-36, 1998.

2) Matsumura T, Aoki M, Nagano A et al : Molecular genetic analysis of dysferlin in Japanese patients with Miyoshi myopathy. Proc. Japan Acad. 75, Ser. B, 207-212, 1999.

3) Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK et al : Dysferlin is a membrane-associated protein that is abcent in Miyoshi myopathy. Neurology 53, 1119-1122, 1999.

4) Aoki M, Liu J, Richard I et al : Genomic organization and novel mutations in dysferlin gene in Miyoshi myopathy and limb girdle dystrophy type 2B. Neurology, 57, 271-278, 2001.

5) Tateyama M, Aoki M, Nishino I et al : Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy. Neurology58, 323-325, 2002

Dysferlin 遺伝子異常とその臨床像についての検討

樋 口 逸 郎*

研究協力者　中 川 正 法*　斉 藤 明 子*　斉 藤 峰 輝*
平 田 圭 子*　末 原 雅 人**　黒 野 明日嗣**
青 木 正 志***　納 光 弘***

目　的

三好ミオパチーは，下腿屈筋群の障害を初発症状とする遠位部優位の筋萎縮・筋力低下を主症状とする常染色体劣性遺伝を示す疾患であり，Miyoshiらの報告により疾患単位として確立された[1]．Brownらにより原因遺伝子がクローニングされ，*dysferlin*と命名された[2]．また，Bashirらにより，*dysferlin*はLGMD2Bの原因遺伝子であることも同時に解明され，同一遺伝子の変異により三好ミオパチーとLGMD2Bの臨床型を示す家系が明らかとなった[3]．また，高CK血症のみを示す例も報告されている．このように，*dysferlin*異常症は臨床的に多様性であることが明らかとなった．今回，われわれは，*dysferlin*異常が認められた自験例9家系18名についての臨床的，遺伝子学的検討を行い，臨床症状の多様性と*dysferlin*異常との関連について検討したので報告する．

方法と結果

1）対　象　臨床症状，検査所見，筋生検所見等より*dysferlin*異常と診断された9家系18例（男性5例，女13例）について検討した（表1）．

2）方　法

生検筋の免疫組織学的検討：抗dysferlinモノクローナル抗体（Ham1/7B6，Novocastra社）を一次抗体，ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgG1抗体を二次抗体として免疫組織学的検討を行った．

ウエスタンブロット法：生検筋ホモジネートをポリアクリアミドゲル電気泳導後，PVDFフィルターに転写し，抗dysferlinモノクローナル抗体と反応させdysferlin蛋白の検出を行った．

***Dysferlin*解析**：同意を得た上で採血を行い，末梢血よりDNAを抽出した．*Dysferlin*をコードする55個のエクソンを増幅するPCRプライマーを作成し，PCRを行い，PCR産物をSSCP法にてスクリーニングした．異常バンドが認められたエクソンについて，シークエンスを行い遺伝子変異の有無を検討した．2家系については，三好ミオパチー遺伝子座領域（2p13）との連鎖解析を行った．

3）結　果

臨床症状：18例の検査時の平均年齢44.1±16.3歳，平均発症年齢22.6±11.8歳であった．初発症状は，つま先立ち不能9例，歩行障害7例，高CK血症のみが2例であった．歩行不能は6例で，平均歩行不能年齢は48.7±7.7歳であった．18例中13例は下腿屈筋群障害を中心に遠位部優位の筋障害を示したが，5例は肩甲下腿型筋萎縮を示し，1例は発症初期には近位筋優位の障害を示し，その後遠位部の障害が著明となっていた．

初発症状が高CK血症のみであった2例中，1例は初診後約2年後より下肢遠位部の筋力低下が出現した．他の1例は，25歳の現在でも筋力低下を認めていない（表2）．また，85歳に肺炎で死亡した例は，少なくと80歳前より高度の痴呆症状を示していた．63歳男性例に心拡大を（CTR64%）を認めた．平均血清CK値は，3732±3142 IU/Lであった（表1）．

生検筋の免疫組織学的検討：筋生検の検討を行った9例全例で，抗Dysferlin抗体による免疫染色で異常が認められた．そのうち，3例は全く染色性を示さず，2例はpathyに染色され，4例は全体的に若干の染色性を示した（図1A，B）．

ウエスタンブロット法：検討した8例全例でdysferlin蛋白は検出されなかった．

遺伝子連鎖解析：2p13領域のDNAマーカーとの2点連鎖解析を行った2家系では，D2S2113で最大lod score 4.00（θ=0.0)を得た．

***Dysferlin*異常**：遺伝子検索を行った13例中，exon19のG2090T (Glu573Stop) ホモ接合変異を1家系8名，exon6のG1036+1Cホモ接合変異を1家系2名，exon31のG3746delを1家系1名，exon10 G1310+1Aとexon18 C1939G（Tyr522Stop）のヘテロ接合を1家系1名に認めた．1例は，exon26 G3048Aヘテロ接合を認めたが，他のアレルには現在までのところ変異を認めていない（表1，2）．

考　察

遺伝子解析または免疫組織学的検討により*dysferlin*異常と診断された18例の臨床症状について検討した．

基本的には下肢遠位部屈筋群優位の筋力低下を主症状とし，三好ミオパチーと診断されたが，同一家系内に肢帯型筋ジストロフィー類似例と肩甲下腿型筋萎縮症類似

* 鹿児島大学医学部第三内科
** 国立療養所沖縄病院神経内科
*** 東北大学医学部神経内科

例が見られた[4]．1例では，筋力低下はなく高CK血症のみであった．

*Dysferlin*変異により，終止コドンを来していた例では，免疫組織染色にてまったく染色性を示さなかったが，他の変異では部分的に染色されていた．

*Dysferlin*異常症は，家系内，家系間で臨床的多様性を示すが，これは*dysferlin*の変異部位による違いだけでは説明できず，他の何らかの修飾因子が関与している可能性がある．

今後の展望および研究の意義

*Dysferlin*異常症は臨床症状が多様であり，同一症例でも進行のステージにより臨床症状が変化している．この臨床的多様性の原因として，*dysferlin*発現の経時的変化や*dysferlin*に関連する未知の遺伝子の発現様式の変化などが推定される．臨床的，分子疫学的研究を続け，*dysferlin*異常症におけるphenotype/genotype correlationを明らかにすることは，*dysferlin*異常症の病態解明と治療法の開発のために不可欠であると考える．

表2　臨床症状，検査所見，免疫組織染色，Western blot法，*dysferlin* 遺伝子解析の結果

1）検査時の平均年齢　44.1±16.3 歳、平均発症年齢　22.6±11.8 歳

2）初発症状：つま先立ち不能　9例、歩行障害　7例、高CK血症のみ　2例

3）平均歩行不能年齢：48.7±7.7 歳（6例）

4）臨床所見

下腿屈筋群障害中心の遠位部優位の障害	13例
肩甲下腿型筋萎縮	5例
発症初期に近位筋優位の障害，その後遠位部障害	1例
高度の痴呆症状を示し，85歳で死亡した例	1例
心拡大（CTR64%）を示した63歳男性例	1例

5）平均血清CK値：3752±3126 IU/L（332—10535）

6）生検筋の抗 dysferlin 抗体による免疫組織学的検討
　3例：染色性なし　2例：pathy 染色　4例：全体的に若干の染色性

7）ウエスタンブロット法：検討した8例全例で dysferlin 蛋白は検出されず．

8）遺伝子連鎖解析：D2S2113 で最大 lod score 4.00（θ=0.0）

9）Dysferlin 遺伝子異常（18 例中 13 例の検討，5 例は検討中）

Exon19/G2090T (Glu573Stop)	1家系8名
Exon6/G1036+1C	1家系2名
Exon31/G3746del	1家系1名
Exon10/G1310+1A と ex18/C1939G (Tyr522Stop)	1家系1名
Exon26/G3048A（ヘテロ接合のみ）	1家系1名

表1　*Dysferlin*異常症の臨床所見および検査所見

Patient No.	Family No.	Age*/ Sex	Age at onset	Age at inability to walk	Distribution of muscle weakness				Initial symptoms	Serum CK level	免疫組織染色	Western blot	遺伝子解析	Remarks
					Upper arm	Fore-arm	Thigh	Lower leg						
1	1	32/F	20		+	±	++	++	IST	7,860			Exon19/G2090T (E>stop)	Waddling and steppage gait
2	1	30/M	17		+	+	++	+++	IST	2,462	(−)	(−)	〃	Waddling gait
3	1	25/M	18		+	+	++	+++	IST	8,310	(−)	(−)	〃	Waddling gait
4	1	33/F	21		+++	++	++	+++	GD	10,535			〃	Steppage gait
5	1	57/F	31		++	++	+++	+++	IST	640			〃	Waddling gait with help
6	1	55/F	37		+	+	++	++	GD	1,320			〃	Waddling gait
7	1	56/F	20		+++	++	+++	+++	GD	1,385			〃	Waddling and steppage gait with help
8	1	83/F	59	59	+++	+++	+++	+++	GD	332			〃	Bed-riddened, dementia, joint contracture, died at 85
9	2	45/F	14	40	+++	++	++	+++	GD	4,049	(±) patchy	(−)	Linked to 2p13	Waddling and steppage gait
10	2	59/M	15	40	+++	++	++	+++	GD	3,569			〃	Wheelchair-bound
11	3	48/F	13	48	+++	++	++	+++	IST	1,289	(±) patchy	(−)	Exon6/G1036+1C	Wheelchair-bound
12	3	53/F	13	50	+++	++	++	+++	IST	1,076			〃	Wheelchair-bound
13	4	63/M	30	55	++	+++	++	+++	IST	1,817	(−)	(−)	exon31/G3746del	DM (HbA1c 6.0), CTR 64%, ECG: II, III, aVfでQ, Wheelchair-bound
14	5	25/F	23		−	−	−	−	Hyper-CK-emia	7,156	(±) 全体に低下	(−)	Exon10/G1310+1A,	Calf muscle hypertrophy
15	6	34/F	30		−	+	+	++	IST	3,499			Exon26/G3048A 変異（ヘテロ接合）	Calf muscle hypertrophy
16	7	34/F	16		+	++	++	+++	IST	6,860	(±) 全体に低下	(−)	unknown	
17	8	28/F	13		−	−	+	++	Hyper-CK-emia	3,980	(±) 全体に低下	(−)	unknown	自律神経障害
18	9	34/M	17		±	+	+	++	GD	1,400	(±) 全体に低下		unknown	

−, ±, +, ++, +++: grade of muscle weakness in this order.
Age*: age at examination
IST: inability to stand on toes; GD: gait disturbance

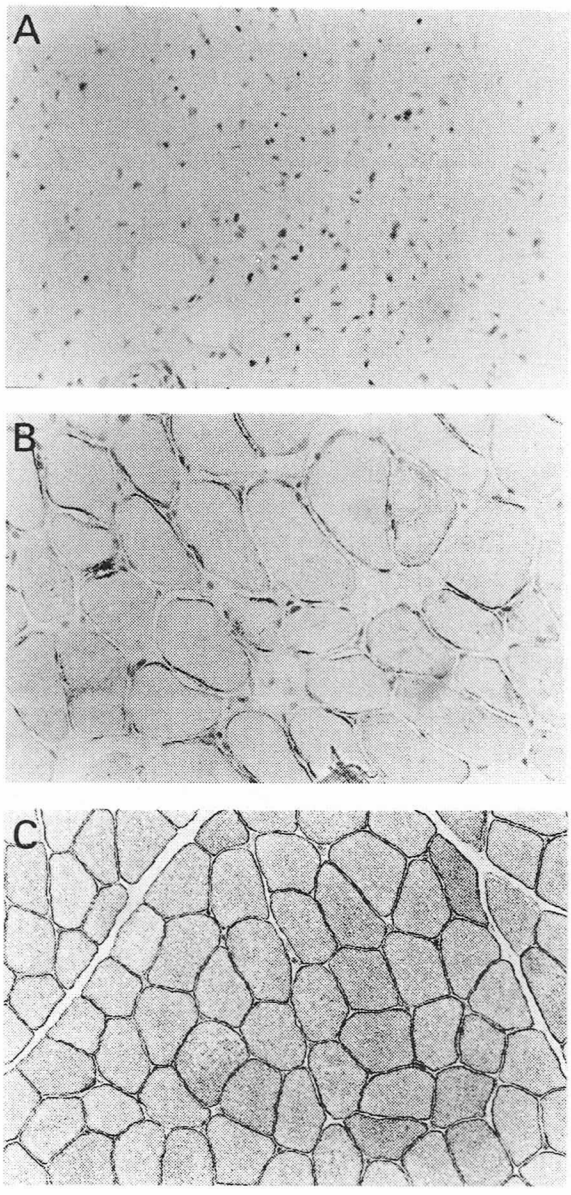


図1　生検筋の抗dysferlin抗体による免疫組織染色
A：Patient 13（G3746del）．筋線維周囲は全く染色されない．
B：Patient 11（G1036+1C）．筋線維周囲が部分的に染色されること。
C：正常対照．筋線維周囲が連続的に染色される．（×200）

文　献

1）Miyoshi K, Kawai H, Isawa M, et al: Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy: seventeen cases in eight families including an autopsied case. Brain **109**: 31-54, 1986.

2）Liu J, Aoki M, Illa I, et al: Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. Nat Genet **20**: 31-36, 1998.

3）Weiler T, Bashir R, Anderson LV, et al: Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). Hum Mol Genet **8**: 871-877, 1999.

4）Nakagawa M, Matsuzaki T, Suehara M, et al: Phenotypic variation in a large Japanese family with Miyoshi myopathy with nonsense mutation in exon 19 of Dysferlin gene. J Neurol Sci **184**: 15-19, 2001.

筋ジストロフィーおよび関連疾患の臨床病態の解析

佐橋　功*

研究協力者　衣斐　達*　田中雅嗣**　青木正志***
高橋俊明***　南　成祐****　荒畑喜一****
丸山和佳子*****　直井　信******　加藤陽二*******
Georgine Faulkner ********

本研究班の「筋ジストロフィーおよび関連疾患の臨床病態の解析」を目的とし，3 年間にわたり以下の A)ーD）の研究結果をえた．

A) 常染色体劣性肢帯型筋ジストロフィーの病態解析

全筋ジストロフィー(PMD)生検筋において calpain3, dysferlin, telethonin の免疫染色をし，とくに過去 17 年間に診断された自験骨格筋生検 915 例中での LGMD 48 例を中心に検討をした．そして病因遺伝子蛋白である calpain 3，dysferlin の免疫染色の有用性を calpainopathy (LGMD2A)[1] および dysferlinopathy (LGMD 2 B，三好型 [2])について確認し，臨床像・筋病理像・遺伝子解析結果を比較した．そして免疫染色の結果を下に，LGMD2A：4 例と 2B：8 例，三好型：4 例を診断した．そして罹患筋の選択性，免疫染色の態度等つき分析し，これら疾患について本邦における臨床データの基礎を供給した．骨格筋 CT による分析では LGMD2A[3]にて大腿屈筋群の選択的障害が明らかにされた．また LGMD2B では自覚筋症状のない症例から筋病変が確認され，初期病変として下肢屈筋優位の深部筋と傍脊柱筋の異常が明らかになり，特異例として大腿四頭筋の選択的障害例が 1 例があった（図 1）．一般筋病理所見では各タイプに特異的所見を得ることができなかった．しかし免疫染色で calpain 3 は対照筋の筋形質が染色されるのに対し，LGMD2A 患者では陰性であった．Dysferlin は筋形質膜が濃く，筋形質が薄く染まったが，LGMD2B 全例と三好型 2 例で陰性，三好型 1 例でごく微弱に筋形質膜が陽性であった(図 2)．これらのうち遺伝子解析を行った症例は全例 dysferlin 遺伝子異常が確認され，免疫染色が簡便な診断法の一助となると考えた．

* 愛知医科大学医学部神経内科
** 岐阜県国際バイオ研究所
*** 東北大学神経内科
**** 国立精神・神経センター
***** 国療中部病院長寿医療研究センター
****** 応用生化学研究所
******* 姫路工業大学環境人間学部
******** Paduva University, United Nations Centre, Italy

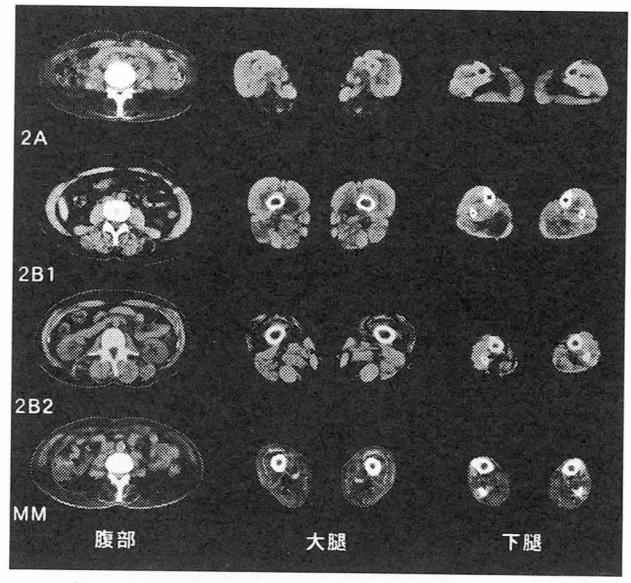


図 1　LGMD2A および 2B における骨格筋 CT 所見
LGMD2A では大腿屈筋群の脂肪化が特異的であり，傍脊柱筋および下腿ヒラメ筋の脂肪化がみられる（2A)，LGMD2B では初期例から大腿および，下腿後面の深部と傍脊柱筋外側の脂肪化が見られ(2B1)，特殊例では大腿四頭筋の萎縮が高度であった(2B2)．三好型では各筋の脂肪化が高度であった(MM).

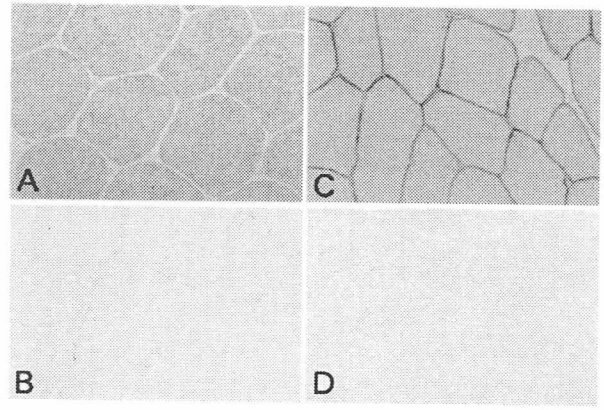


図 2　calpainopathy, dysferllinopathy における免疫染色
ABC 法による calpain 3 染色では対照筋では筋形質が染まるのに対し（A），LGMD2A 筋では筋形質は染まらない．Dysferlin 染色では対照筋では筋形質膜が強く，筋形質が薄く染まるが(C)，LGMD 2 B よび三好型では全く染色されなかった(D)．(×160)

B) PMD の治療

DMD ・ BMD の生検筋内に組織の線維化を促すキマーゼ陽性肥満細胞の遊出があることより，キマーゼの抑制を目的に降圧薬でもあるロサルタン; AII-R1 拮抗作用を BMD 例に対し了解をえて経口投与した．一部の BMD で臨床的な有効性が確認され，長期的な観察の必要性を考えた．副作用はフワフワ感であった．

C) ミトコンドリア病の治療

1) ミトコンドリア病 [4]の経口薬物治療として，生化学的な理論的な背景と基礎実験よりピルビン酸ナトリウム（15 g/日）を患者へ了解を得て投与し，とくに MELAS 患者において臨床検査上及び臨床症状の完全を確認し，副作用は少なく今後の希望ある治療と考えた．

2) 治療の基礎研究として，NARP 病では Mt8993T-G, ATP 合成酵素のアミノ酸置換 Leu156Arg があり同変異は Leigh 脳症でも検出され，変異型 mtDNA レベルがある閾値を越えると疾患が顕在化する．mtDNA 変異を有する患者への有効な治療法はなく，制限酵素の遺伝子導入により変異型 mtDNA を選択的に破壊し，野生型 mtDNA だけを増殖させ治療する可能性を検討した．mtDNA 変異を持つミトコンドリアを導入した培養細胞にてその有用性を確認し，動物実験モデルでの今後の研究の展開が期待された．

D) ミトコンドリア病の基礎病態の研究

1) 酸化ストレスによる蛋白障害では，蛋白質の lysine 残基が，過酸化脂質である 13-hydroperoxy-octadecadienoic acid により N∈-(hexanonyl) lysine (HEL) へ変化する．この HEL への抗体を作成し，ミトコンドリア病と PMD の生検筋において観察し有用な結果を得た．とくにミトコンドリア病では HEL は MnSOD, HSP60, GRP75 などのストレス蛋白と同様に ragged red fibers に強く染色され酸化ストレスによる蛋白障害の局在を確認した．

2) ミトコンドリア筋症ではチトクローム *b*(Cyt*b*) 遺伝子の変異が報告されている．しかし Cyt*b* 遺伝子は多型性が高く，患者におけるアミノ酸置換が多型か病的変異かの判断は困難である．日本人における標準 Cyt*b* 多型を明らかにするために，百寿者 64 名，パーキンソン病患者 96 名，若年成人 96 名について Cyt*b* 遺伝子の塩基配列を決定し、そのアミノ酸置換を比較検討した．N260D は百寿者群に，G251S 置換は患者群に有意に多く，長寿との関連で貴重なデータを得た．

以上の３年間の結果より，筋ジストロフィーとミトコンドリア病における今後の病因的また治療的な発展を目指す．

文　献

1) 衣斐　達，井　玲他：臨床神経　40:1023, 2000.
2) Matsunaga T, Aoki M, et al : Proc Jap Acad 75:20,1999.
3) 衣斐　達，中尾直樹他:神経内科 53(Suppl2):156, 2000.
4) Sahashi K, Yoneda M, et al : J Med Genet 38:703, 2001.

サルコグリカン，サルコスパン，ジスフェルリンの正常骨格筋細胞での超微局在と存在様式の検討

若山吉弘*

研究協力者　渋谷誠二*　原一*　井上昌彦*
小嶋宏子*　村橋真*　自見隆弘*
鬼木弘明**　山下純正***　熊谷俊幸****
木南英紀*****　中島敏明******

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，最近三年間に本研究委託費の支援で実施した研究の主要なものの概要を報告する．

1）Sarcoglycan, sarcospan, dysferlinの正常骨格筋における局在の検討

目　的

Dystrophin associated glycoproteins（DAG）はdystroglycan complex, sarcoglycan complexとsarcospan及びsyntrophinやdystrobrevinなどのcytoplasmic complexから成っている．このうちβ-dystroglycanとα-，β-，γ-，δ-sarcoglycanそれぞれの局在と相互関係及びこれらのsarcoglycan分子とsarcospanなどとの相互関係を検討する．更にdysferlinの局在とそのdystrophin，β-spectrin，caveolin 3などとの相互関係を検討する．

方法と結果

組織化学的に正常なヒト生検筋組織や正常マウス筋組織を対象とした．抗体の多くはDAGの各成分の雑誌に発表されたアミノ酸配列から抗体産生に適した部位を合成し，ウサギや羊に免疫して得た．また一部の抗体は市販のマウスモノクロナル抗体を用いた．免疫電顕的には異なる粒子径のコロイド金粒子で標識する2重ないし3重標識免疫電顕法を用いた．その結果α-，β-，γ-，δ-sarcoglycan分子やsarcospan分子は筋細胞の基底膜ではなく筋細胞膜に沿って存在し，costamereに多い傾向がみられた．またこれらの分子は互いに近接して存在し（図1），dystrophin，β-dystroglycanやnitric oxide synthaseとも近接して存在することが示された[1) 2)]．一方dysferlinも筋細胞膜に沿って局在し，costamereに多い傾向がみられたが，dystrophin，β-dystroglycanやcaveolin 3とはcolocalizeしないと考えられる結果が得られた．

* 昭和大学藤が丘病院神経内科
** 同　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
***** 順天堂大学医学部第１生化学教室
****** 東京大学医学部循環器内科

考　察

DAGの筋細胞膜における局在と分子相互間の空間的配列関係の超微局在に関する研究は極めて少なく，この検討はdystrophinopathy, sarcoglycanopathyなどの疾患の病態解明には重要な課題である．本研究にて生化学的研究を基に想定されたDAGのモデルが基本的には正しいことが証明された．更にdysferlinの局在が筋細胞膜のcostamereに多いことは本研究により初めて証明された．Dysferlinと他の細胞膜成分との関係は現在ほとんど未知なので，本研究結果は有意義な示唆を与えるものと考えられる．

今後の展望

Dystrophinとその関連蛋白質に関してはsyntrophinがそのPDZ domainを介してaquaporin 4（AQP4）と結合していることが報告されている．実際Duchenne筋ジストロフィー症生検筋ではAQP4の著減していることを我々は発見した[3)]．骨格筋におけるAQP4の役割に関しては不明なことが多いが，この所見はmdxマウスでも認められているので，AQP4過剰発現変異マウスを作製し，mdxマウスとかけ合わせmdxマウスの運動能の変化を解析する予定である．

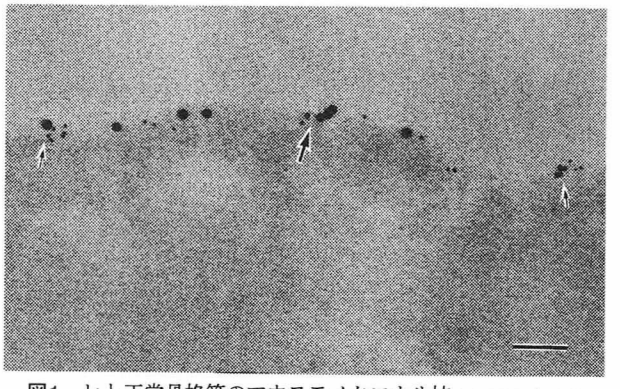


図1　ヒト正常骨格筋のマウスモノクロナル抗α-sarcoglycan (15nm gold)，ウサギ抗β-sarcoglycan (5nm gold)と羊抗γ-sarcoglycan (10nm gold)抗体によるコロイド金３重標識による免疫電顕所見．筋細胞表面に沿ってα-，β-sarcoglycan（小矢印），β-，γ-sarcoglycan（小矢印）やα-，β-，γ-sarcoglycan（大矢印）の信号がclusterを形成して存在している．　Bar=0.1μm

II）正常骨格筋におけるAQP4の局在とDuchenne筋ジストロフィー症における発現の減少の検討

目　　的

正常骨格筋におけるAQP4の局在に関しいわゆるcostamere領域に多いかどうかを共焦点レーザ顕微鏡で観察する．またAQP4がDuchenne筋ジストロフィー症(DMD)でどのように発現されているのかを蛋白レベル，RNAレベルで検討する．

方法と結果

組織化学的に正常なヒト生検筋とDMD生検筋の6例ずつを対象とした．AQP4抗体は既報のラットAQP4のアミノ酸配列に基づきウサギに免疫して作製した．共焦点レーザ顕微鏡ではAQP4はdystrophinとcolocalizeし筋細胞膜のcostamere領域に多かった[4]．次に免疫組織化学染色はウサギ抗AQP4抗体，ウサギ抗β-spectrin抗体，マウス抗dystrophinモノクロナル抗体（Novocastra DYS1）を使用し間接蛍光抗体法にて作製した．抗AQP4抗体ではDMD筋はほとんどの筋線維で染色性が陰性で，一部細胞膜がpatchyに染色される筋線維がみられた．抗β-spectrin抗体と抗DYS1抗体ではDMD筋線維はそれぞれ陽性染色所見と陰性染色所見を示した．イムノブロットでは抗AQP4抗体では正常筋の抽出物は31kDaの１本のbandを示すが，DMD筋の抽出物はこのbandの染色性が著減していた．更にRNAレベルでは6例ずつの正常筋とDMD筋から抽出したtotal RNAをβ-spectrinのgeneをhouse keeping geneとして半定量的に解析した所，AQP4のmRNAのDMD筋における有意の低下が認められた[3]．

考　　察

DMDでAQP4分子が減少していることは直接的には抗AQP4抗体でDMD生検筋を免疫染色した我々の研究[3]で明らかとなった．DMDではdystrophinが欠損し，これらの生検筋でAQP4分子が著減していることからAQP4とdystrophinとの関係が示唆されるが，最近Adamsらはdystrophinと結合するsyntrophinのPDZ domainがAQP4と結合することを報告（J Cell Biol 155:113-122, 2001）した．

今後の展望

プロジェクト I）と同様，AQP4過剰発現変異マウスを作製しmdxマウスとかけ合わせ，mdxマウスの1つの遺伝子治療を試みたい．

III）Fracture label法による骨格筋細胞膜のcaveolin 3の存在様式とmdxマウスにおける変化

目　　的

DMDやmdxマウス筋細胞膜でcaveolin 3発現増加が報告されており，病態への関与も推測されるのでfracture label法にて正常骨格筋細胞膜のcaveolin 3の存在様式とmdxマウスにおける変化を定量的に解析する．

方法と結果

正常骨格筋caveolin 3の局在とmdxマウスでの変化を，コラーゲナーゼ処理を加えたfracture label法により詳細に解析した．正常骨格筋細胞膜でcaveolin 3はcaveola様構造を取り囲むように存在し，その特異的配列構造はcaveola様構造のない細胞膜においてもみられた[5]（図2A）．一方，mdxマウスにおいては正常対照マウスよりもcaveolin 3が多く発現しており，その分子配列の乱れがみられた（図2B）．

考察と今後の展望

正常骨格筋においてcaveolin 3が細胞膜の局所に集合した後にcaveolaを形成することが推測され，mdxマウスではその動員は活発であるが乱れていた．今後caveolin 3と相互作用を示す細胞膜関連蛋白との関係や，caveolin 3に影響を及ぼす外的因子の刺激下での存在様式の変化について検討したい．

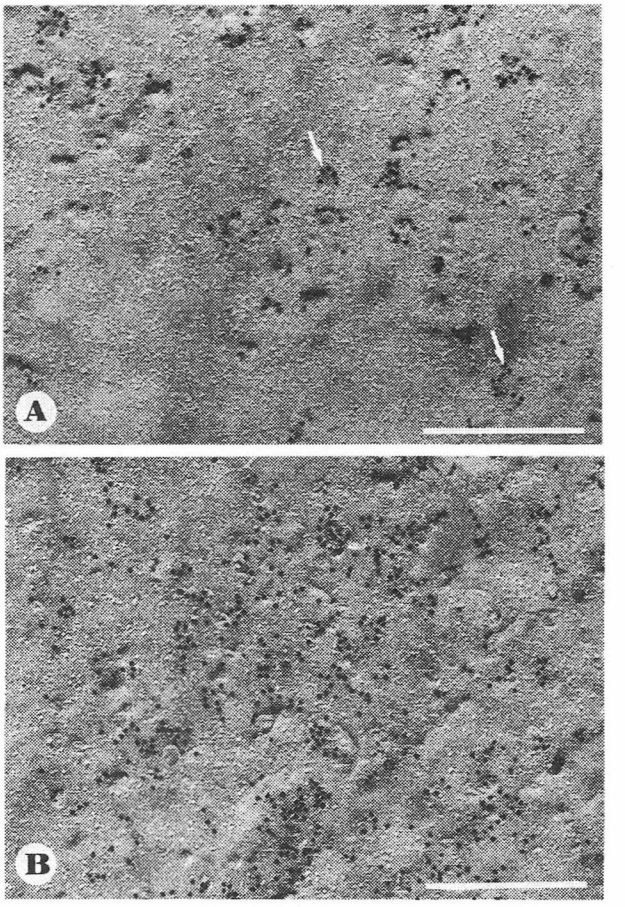


図2　マウス骨格筋細胞膜におけるcaveolin 3標識金コロイド粒子の分布．

正常マウス（図A）では，金コロイド粒子の多くはcaveola様構造物を取り囲む様に分布しており，しばしばcaveola様構造物とは無関係の領域にもサークル状の配列がみられた（白矢印）．一方mdxマウス（図B）では，金コロイド粒子が正常対照マウスよりも多数存在しており，その配列も乱れていた．　Bar=0.5μm

Ⅳ）アデノ随伴ウイルスベクターを用いたミオトニアのin-vivo遺伝子治療研究

目　　的

我々はアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を用い肉眼的な症状の改善を目標に，先天性ミオトニアのモデル動物であるADRマウスに遺伝子導入をおこなう．

方法と結果

CMV promoter，ClC-1，GFPを組み込んだAAV vectorを作成した．次にpatch clamp法にて導入遺伝子の正常なCl channel機能を確認した．2匹のADRマウスの下肢筋に対し，標準的濃度のベクターを筋注した．2週間後の針筋電図ではmyotonic dischargeに変化がなかった．組織学的にはGFP陽性筋線維の割合は数％であった．より効率よく遺伝子導入するため高濃度のベクターを対照マウスの下肢筋へ投与し2週間後に検討を行なったところ導入効率は約70％であった．

考察と今後の展望

初期実験では治療効果が得られず遺伝子導入効率の低さが問題であった．今後高濃度の実験でADRマウスでも治療効果が得られる可能性がある．

おわりに

以上の研究課題それぞれにつき今後更に研究を展開していきたい．

文　　献

1）Wakayama Y, Inoue M, Kojima H, et al: Ultrastructural localization of α-, β-, γ-sarcoglycan and their mutual relation, and their relation to dystrophin, β-dystroglycan and β-spectrin in normal skeletal myofiber. Acta Neuropathol 97: 288-296, 1999.

2）Wakayama Y, Inoue M, Kojima H, et al: Localization of sarcoglycan, neuronal nitric oxide synthase, β-dystroglycan, and dystrophin molecules in normal skeletal myofiber: triple immunogold labeling electron microscopy. Microsc Res Tech 55: 154-163, 2001.

3）Wakayama Y, Jimi T, Inoue M, et al: Reduced aquaporin 4 expression in the muscle plasma membrane of Duchenne muscular dystrophy. Arch Neurol (In press)

4) Wakayama Y, Kojima H, Inoue M, et al: Confocal laser and immunoelectron microscopic studies of aquaporin 4 localization in normal skeletal myofiber. Acta Myologica 20: 125-129, 2001.

5）Shibuya S, Wakayama Y, Inoue M, et al: Quantitative analysis of caveolin 3 molecular localization in the rat skeletal muscle using a modified fracture-label technique. Acta Myologica (In press)

筋細胞生存因子および細胞死抑制因子による筋ジストロフィー治療法の開発に関する研究

— 筋型，脳型ジスフェルリンの局在とERストレス細胞死 —

桃井　隆*

研究協力者　藤田恵理子*　高鹿依子*　林　由紀子**
荒畑喜一**　桃井真里子***

緒　言

本研究は筋ジストロフィーにみられる細胞死および生存に関与する情報伝達系の解析を通して，ネクローシスとアポトーシスの関係の分子機構を明らかにするとともに，その治療法の開発を目的としている．三好型遠位筋ジストロフィー（MDMD）の責任遺伝子であるジスフェルリン（Dysf）は 55 個のエクソンより構成され，骨格筋（8.5kb mRNA）などに選択的に発現し（以下 Mdysf），6243 塩基（2080 アミノ酸）からなる翻訳領域を有し，C 末端に膜貫通領域をもち，4 箇所のカルシウム結合部位である C2 ドメインを有する．MDysf は線虫の fer-遺伝子や先天性難聴の DFNB9 の原因遺伝子 Otoferlin や FER1L3 と高い相同性をもち fer-1 ファミリーを形成している．しかし，その機能に関しては膜融合に関与する可能性が示唆されているものの，未だ不明である．一方，脳では 3.8kb の mRNA からなる Dysf(Bdysf)の発現が示唆されている．われわれは Dysf の機能および疾患との関連を明らかにする目的で，脳に発現する BDysf および骨格筋に発現する MDysf を分離し，細胞内での局在を調べた．

方法と結果

MDysf，BDysf はヒト骨格筋，および脳の cDNA ライブラリーより分離した．BDysf は膜貫通領域を有し，2 つの C2 ドメインをもち，少なくとも 2 つの異なったスプライシング産物から構成されており，脳に特異的に発現していた(図 1)．分離したヒト MDysf，BDysf を EFGP-N1 ベクターに in frame つなげ，COS 細胞にトランスフェクトし，発現させた．細胞内発現を明らかにするため，EGFP(緑)と ER（小胞体）のマーカーであるオリゴ糖転移酵素βサブユニット抗体，KDEL 抗体，ゴルジマーカーである GM130，ミトコンドリアのマーカーである F0ATPase 抗体，ジスフェルリン抗体（テキサスレッド標識赤）との二重染色で局在を検討した．COS 細胞に発現した BDysf，MDysf は細胞膜よりむしろ Golgi，ER に局在が観察され，時間が経つにつれ，B，MDysf は凝集し，細胞は細胞縮小，などアポトーシスに典型的な像を示し，細胞死をおこすことが明らかとなった（図 2）．神経芽細胞腫である Neuro2A，筋芽細胞である C2C12 細胞に発現させても同様な局在と凝集をしめし，細胞死を誘導した．

小胞体（ER）で折り畳み不全や糖鎖不全の蛋白が蓄積すると，ER ストレスシグナル(JNK)を活性化し，過度の ER ストレスは細胞死を誘導することが知られている．この ER ストレスによる細胞死は ER に局在するカスパーゼ 12 の活性化が関与している．カスパーゼの活性化がプロセッシングにより活性化することから，切断点に特異的な抗体を作成することによりカスパーゼ 12 の活性型に特異的な抗体を作成した．この抗体を用いて，Dysf の強発現がカスパーゼ 12 の活性化をひきおこすかどうかを検討した．その結果，BDysf，MDysf は凝集するにつれ，JNK の活性化，カスパーゼ 12 の活性化を誘導することが明らかとなった (図 3)．また，Dysf のどの領域が凝集，カスパーゼ 12 の活性化，細胞死を誘導するかを検討した結果，細胞膜領域を含む C 末端部分で引き起こしていることが明かとなった．

この領域にはカベオリンが結合する scaffold binding domain が存在することが最近 Matuda らによって報告された．そこで，カベオリンの結合による凝集が細胞死を誘導するか否かを調べた結果，カベオリンは B，Mdysf とともにゴルジに局在するものの，Dysf が凝集すると，ゴルジから離脱するものの，カベオリンはゴルジにとどまることが明らかとなり，カベオリンによって，Dysf が凝集するのではないことが明らかとなった．

* 国立精神神経センター神経研究所疾病第五部
** 国立精神神経センター神経研究所疾病第一部
*** 自治医科大学小児科

Structure of Muscle and Brain type of Dysferlin

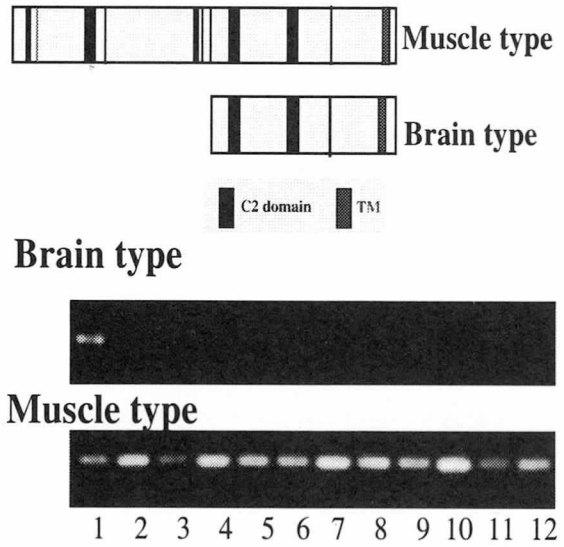


図1　BDysfの構造と発現

BDysfはMdysfのC端側に相当し，膜貫通領域と二つのC2ドメインをもつ．BdysfはMdysfと異なり，脳に特異的に発現する．

lane1: 脳，　lane2: 心臓，　lane3: 腎臓，　lane4: 脾臓，
lane5: 肝臓，
lane6: 小腸，　lane7: 筋肉，　lane8: 肺，　lane9: 胎盤，
lane10: 精巣，
lane11: 胃，　lane12: 大腸．

Brain-type Dysferlin

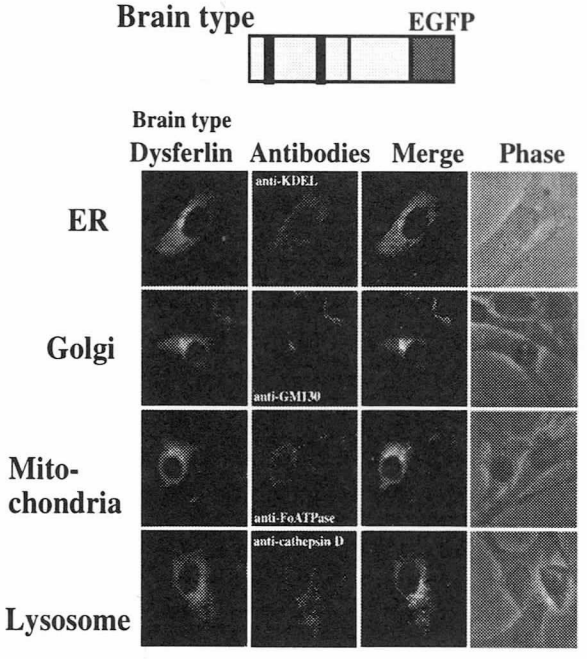


図2　BDysfの細胞内局在

C末端にEGFP標識（緑）したBDysfをCOS細胞に発現させたところ，ERとゴルジに局在が観察された．また，Mdysfも同様にER，ゴルジに局在が観察された．

The Region of Dysferlin Inducing Cell Death

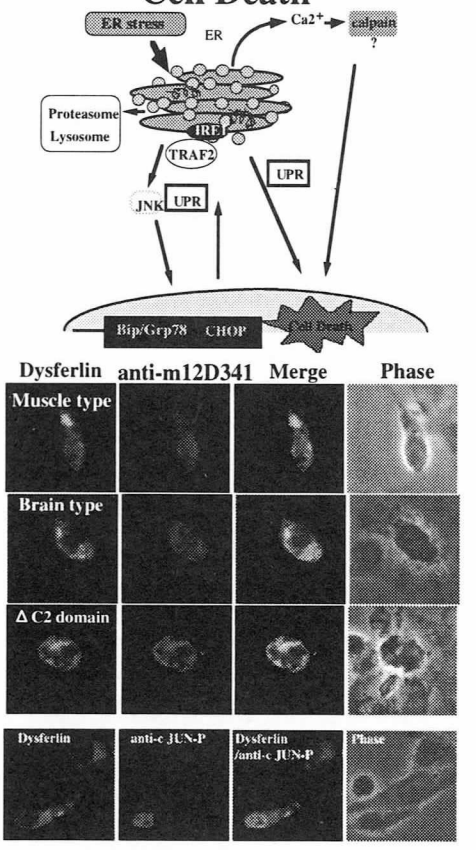


図3　DysfによるERストレスシグナルの活性化とカスパーゼ12，細胞死を誘導するDysfの領域

ERストレスによる細胞死ではストレスシグナルであるJNKERに局在するカスパーゼ12が活性化される．Mdysf，Bdysf，だけでなく，膜貫通領域とC端だけのDysf（_C2ドメイン）だけでもJNKの活性化とカスパーゼ12の活性化をもたらした．

考　　察

MDysf は筋組織では細胞膜に局在することが知られている．もし Dysf が fer-1 ファミリーとしての構造から推定されるようにカルシウム依存性の膜融合の機構に関与していると考えると，細胞間での融合，すなわち，筋芽細胞が筋管細胞へと融合する過程で関与する可能性が示唆される．しかし，われわれの結果は BDysf，Mdysf も細胞膜より，むしろ ER-ゴルジにその局在がみられることから，ER 輸送やゴルジ，細胞膜，エンドゾームとの融合，membrane recycle に関与している可能性が示唆された．

こうしたゴルジ膜蛋白の過剰発現は ER への逆輸送をもたらし，ER ストレスを引き起こしたものと考えることができる．

最近，Matuda らは，カベオリンが Dysf と結合している可能性を示唆する報告をしているが，カベオリンは細胞膜だけでなく，ゴルジにも存在し，細胞膜への輸送や membrane recycle に関係しているとの多数の報告がある．

なぜ，筋組織では Dysf やカベオリンは細胞膜にしか局在しないのかについての説明は，今後の課題であるが，一つはアセトン固定により，コレステロール除去され，ラフト，カベオラに存在する Dysf が抗体と反応できるようになった可能性も考えられる．また，筋細胞分化の段階では膜輸送が低下し，membrane recycle が定常状態になって，細胞膜に局在するのかもしれない．

しかし，注意しなければならないのは，Dysf はシグナルペプチドをもたない TypeII の膜蛋白であることである．すなわち，N 端は細胞質側にある可能性が高い．そうとすれば，分泌顆粒だけでなく，細胞膜に存在したとしても C2 ドメインは細胞質側にあり，細胞内での膜融合に関与していることが考えられる．ジストログリカンなどとは反対方向で機能していることになる．Dysf が他の筋ジストロフィーの原因蛋白に対し，相互作用するのか，どこで接点をもつのか，あるいは独立した疾患なのかは今後大いに論議の対象となるものと思われる．

研究の意義，今後の課題

Dysf は ER ゴルジに存在し，カルシウム存在下での膜輸送，membrane recycle での膜融合に関与していることが考えられ，Dysf の機能や MDMD の原因，治療をを考える上で十分注意を払わなくてはならないことと思われる．

今後，この仮説を証明すべく，膜融合過程での Dysf の機能について研究をすすめいき，他のジストロフィーの原因蛋白との接点をさがすことが重要と思われる．

参考文献

1) Inada H, Izawa I, Nishizawa M, Fujita E, Kiyono T, Takahashi T, Momoi T, Inagaki M : Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. J Cell Biol. 155(3): 415-426, 2001.
2) Fujita E, Egashira J, Urase K, Kuida K and Momoi T : Caspase-9 processing via feedback amplification loop in vivo. Cell Death and Differentiation 8, 335-344, 2001.
3) Zheng, Kuida K, Momoi T, Nicholson, Y Lezbek, Fravell : Deficiency of caspase-9 or caspase-3 induces the compensation of caspase. Nature Medicine 6, 1241-1247, 2000.
4) Fujita E, Soyama A, Kawabata H and Momoi T : BMP-4 and RA synergistically induce activation of caspase-9 and cause apoptosis of P19 EC cells cultured as monolayer. Cell Death and Differ. 6, 1109-1116, 1999.
5) Mukasa T, Momoi T and Momoi M : K. Activation of caspase-3 apoptotic pathways in skeletal muscle fibers in laminin 2-deficient mice. Biochem. Biophys Res. Commun. 260, 139-142 , 1999.

筋ジストロフィー発症機構の生化学・分子生物学的研究

砂田芳秀*

研究協力者　長谷麻子**　大井博子**　松村喜一郎**
清水輝夫**　大井浩明***　荒田　悟****
大沢　裕*　市川弥生子*　村上龍文*
森本和恵*

目　的

この10年で次々と筋ジス病因遺伝子が単離され，その病因の多様性が示されてきた．しかし，その遺伝子異常や原因蛋白欠損がどのような分子機構で筋細胞死を引き起こすのか解明されてはいない．遺伝子治療や幹細胞を用いた再生医療などを臨床応用して行くには，分子病態機序の解明が重要である．われわれは筋細胞変性死の分子機構を解明するために，caveolin-3という分子に着目して研究を進めてきた．caveolinは細胞膜の特殊陥入部caveolaを構成する膜蛋白であり，caveolin-3は主として骨格筋に発現している．caveolinはG-protein, NOS, c-Src, H-Ras, protein kinase Cなど種々のシグナル分子と結合し，シグナル伝達を調節する．またcaveolin-3がジストロフィン糖蛋白複合体とも結合することが示され，筋ジストロフィーの病態への関与が推測されていたが，1998年，caveolin-3遺伝子異常による常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー（LGMD1C）の家系が報告された．そこで筋ジストロフィーの発症機構におけるcaveolin-3の役割を解明する目的で，ヒトcaveolin-3遺伝子変異を導入したトランスジェニック（Tg）マウスを作製し，その病態を解析した．

方法と結果

変異caveolin-3 Tgマウスの作出：LGMD1C患者で同定されたP104Lミスセンス変異をマウスcaveolin-3 cDNAに導入し，上流にマウスmuscle creatine kinase（MCK）の発現調節エレメントを，下流にSV40 polyadenylation 配列を接続したtransgenic constructを作製した．これをC3Hマウス受精卵にmicroinjectionし，ICRマウスの卵管に移植し，Tgマウスを作出した．Tgマウスは出生後の体重増加不良，全般的な骨格筋の萎縮，後肢の麻痺が観察された．骨格筋病理像は筋線維の大小不同が顕著であり著明に萎縮した筋線維がみられ，中心核線維が増加していた（図1）．間質は軽度増加していた．壊死再生像は見られなかった．電子顕微鏡を用いてfreeze fracture法により筋細胞膜におけるceveola密度の解析をおこなったところ，Tgマウスではcaveolaの数が著減しており，野生型に比しその密度は有意に減少していた．

Caveolinおよび関連蛋白発現の解析：ノーザンブロット法によりTgマウス骨格筋では内因性の正常caveolin-3 mRNA発現に加えて変異caveolin-3 mRNAの過剰発現が確認された．一方，免疫組織染色では，筋形質膜に局在するcaveolin-3がほとんどの線維で欠損していた（図1）．ウエスタンブロットでもcaveolin-3の欠損が確認されたが，caveolin-3欠損に伴うcaveolin-1の代償性発現はみられなかった．ジストロフィン，メロシン，サルコグリカンなどのジストロフィン結合蛋白の発現は正常であった．またcaveolin-3に結合するシグナル分子のうち，H-Ras, c-Srk, EGF受容体のmRNA発現量は正常であった．一方，nNOS蛋白量はコントロールとの間に差を認めなかったが，NDP染色ではTgマウス骨格筋でnNOS活性が有意に増加していた（図2）．

DNA arrayによる遺伝子発現プロファイル解析：4週齢と24週齢の野生型マウス及びTgマウス骨格筋についてAtlas Mouse1.2 DNA Array（Clonetech）メンブレンを用いて発現に差異のある病態関連候補遺伝子群を同定した．Tgマウスでの発現上昇遺伝子として，c-Jun, ubiquitin conjugate E2β, G-protein-coupled receptor 25, laminin β2, defender against apoptotic cell death（*dad-1*）など8種類，発現低下遺伝子として，Glucocorticoid receptor form A, TNF receptor 1など4種類を同定した．

考　察

変異caveolin-3 Tgマウスは病理組織学的にも明らかなミオパチー症状を発症しており，モデルマウスとして有用である．Tgマウスがcaveolin-3欠損を生じたことからcaveolin-3遺伝子変異がdominant negative効果を持つことが確認された．caveolin-3は homo-oligomerを形成して機能するが，変異caveolin-3存在下では正常なhomo-oligomerが形成されないためと考えられる（図3）．筋変性の分子機構に関連して最も興味深いのは，caveolin-3欠損筋においてnNOS活性が上昇したことである．これまで筋ジストロフィー変化とnNOS欠損すなわちnNOS活性低下の関連が議論されてきたが，われわれのデータはむしろnNOS

* 川崎医科大学神経内科
** 帝京大学医学部神経内科
*** 昭和大学薬学部薬剤学
**** 昭和大学薬学部組換えDNA実験施設

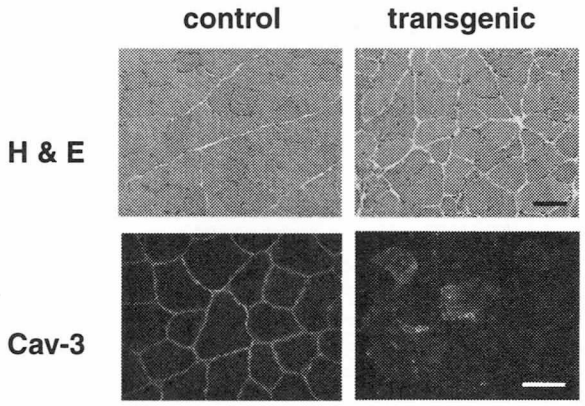


図1　野生型（control）およびTgマウス（transgenic）骨格筋凍結切片のヘマトキシリン・エオジン染色（H&E）による筋病理像（上段）と抗caveolin-3抗体による免疫蛍光染色像（下段）．バーは各々50 μmを示す．

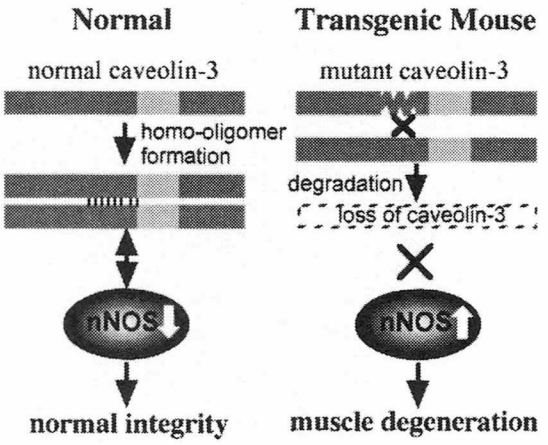


図3　caveolin-3欠損筋における筋変性の病態機序（仮説）．

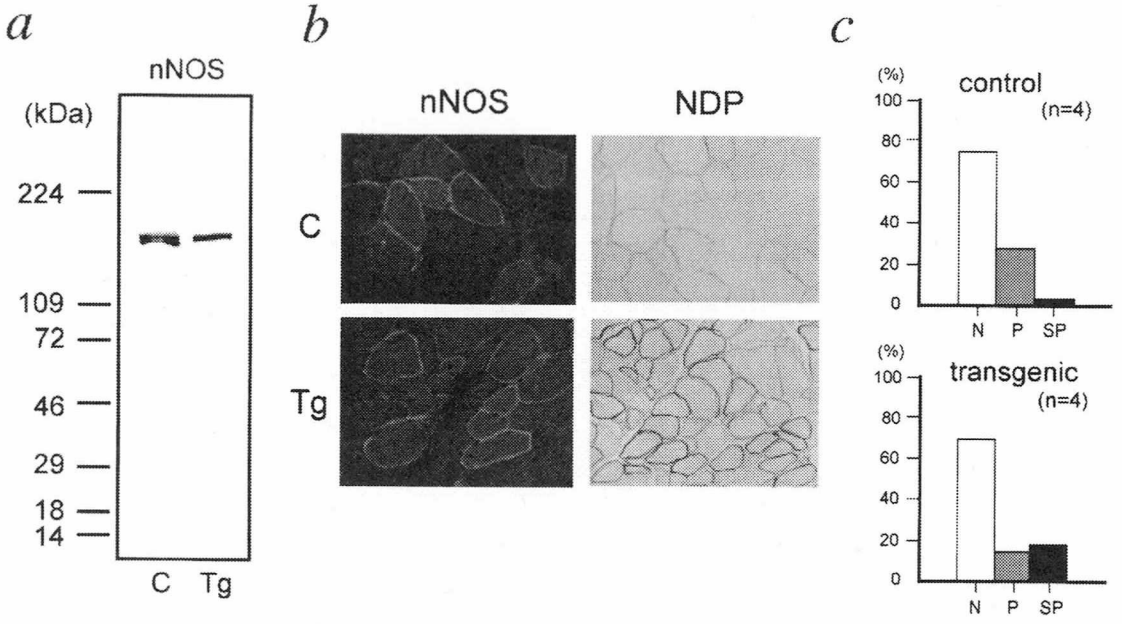


図2　野生型（C）およびTgマウス（Tg）骨格筋における　a．nNOSのウエスタンブロット解析，b．nNOS免疫蛍光染色（nNOS）とNDP染色（NDP），c．NDP染色によるnNOS活性陰性線維（N; negative），陽性線維（P; positive），強陽性線維（SP; strongly positive）の割合．

活性の上昇が筋細胞変性に関与する可能性を示唆しており（図3），今後さらに検討して行きたい．さらに，DNA array解析によりアポトーシス抑制遺伝子である*dad-1*の発現増加を認め，今後抗アポトーシス治療への応用の可能性が考えられる．

今後の展望

caveolin-3は細胞内シグナル伝達を調整するkey moleculeの１つであり，その異常が筋ジストロフィー発症に深く関与することが明らかになりつつある．さらにdysferlinがcaveolin結合蛋白であることからもdysferlinopathyのpathogenesisにもかかわる可能性が考えられる．今後，われわれのモデルマウスを用いてその病態生理を解析することにより，より普遍的な筋変性におけるシグナル伝達異常を解明し，新たな治療法を確立する手掛かりが得られると期待される．

文　献

1）Sunada Y, Ohi H, Hase A, Ohi H, Hosono T, Arata S, Higuchi S, Matsumura K, and Shimizu T: Transgenic mice expressing mutant caveolin-3 show severe myopathy associated with increased nNOS activity. Hum Mol Genet 10（3）: 173-178, 2001.

2）Sunada Y, Saito F, Higuchi I, Matsumura K, Shimizu T: Deficiency of a 180-kDa extracellular matrix protein in Fukuyama type congenital muscular dystrophy skeletal muscle. Neuromusc Disord （in press）

3）Sunada Y, Ohsawa Y, Murakami T, Matsumura K, Shimizu T: Caveolin-3 and muscular dystrophy. Acta Myologica（in press）

肢帯型筋ジストロフィーのモデルマウス "カベオリン-3 欠損マウス" の作成とその病態解析

萩 原 康 子*

研究協力者 笹 岡 俊 邦* 新 石 健 二* 今 村 道 博*
依 藤 宏** 埜 中 征 哉* 小 澤 鉄二郎*
菊 池 建 機*

目　的

カベオリン-3 遺伝子異常による肢帯型筋ジストロフィー(LGMD1C or caveolinopathy)の 2 家系が 1998 年に Minetti らによって報告されて以来，カベオリン-3 遺伝子変異の症例が報告されてきているが，その病態解明および発症に至る機構はまだ不明である．カベオリンは，カベオラと呼ばれる細胞膜の陥入部の主要なタンパク質で，カベオリン-3 は分化した横紋筋細胞にほぼ特異的に発現している．カベオリンは，シグナル分子をはじめ種々のタンパク質や脂質と結合することから，様々な細胞現象に関与していることが示唆されているが，筋ジストロフィー発症に関わる機構はまだ解明されていない．

本研究においては，caveolinopathy のモデルマウスとしてのカベオリン-3 欠損マウスを作成しその病態を解析して，caveolinopathy の発症機序および治療法に関する手掛かりを得ることを目的とする．さらに，カベオリン-3 とジストロフィンの二重欠損マウスを作成しその解析によって，筋ジストロフィー病態におけるカベオリン-3 の関与を検討したい．

方　法

1. カベオリン-3 欠損マウスの作成と解析

マウスのカベオリン-3 遺伝子をクローニングし，重要な機能領域をコードしているエクソン 2 領域（Minetti らの LGMD1C の変異はこの領域内に存在）を Neo カセット置換によって欠失させるターゲティングベクターを作成した．129 系統マウス胚幹(ES)細胞にターゲティングベクター DNA を導入し，相同組み換え ES 細胞 3 クローンを得た．C57BL/6J(B6)系統マウス胚盤胞への顕微注入法により，キメラマウスを作成し，キメラマウスと B6 マウスとの交配でヘテロ変異マウスを得た．ヘテロ変異マウス間の交配により，ホモ変異マウスを得た．同腹マウス骨格筋でのカベオリン-3 mRNA およびタンパク質の発現をノーザンブロット，イムノブロット法および免疫組織化学で解析した．骨格筋細胞膜のカベオラ数を freeze-fracture 法で調べた．筋病理組織所見は，HE 染色および Evans blue dye (EBD)による生体染色で観察した．

2. カベオリン－3 とジストロフィンの二重欠損マウスの作成

mdx マウス ♀とカベオリン－ 3 ホモ変異マウス♂との交配で得た F1 同士をさらに交配した F2 で二重欠損マウスが得られた．しかし，F2 では二重欠損および比較する同腹の *mdx* マウスともに♀，♂それぞれの 1/8 という低頻度でしか得られない．カベオリン－ 3 ヘテロ変異の *mdx* マウス F2 同士を交配した F3 では 1/4 の頻度で得られるので，今後は F3 での解析を予定している．今回は F2 でのパイロット実験で解析した．カベオリン-3 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．

結　果

1. カベオリン-3 欠損マウス

遺伝子型をサザンブロットおよび PCR 解析により調べた結果，ヘテロ変異マウス間の交配により誕生した仔マウスの割合は，メンデルの分離比にほぼ一致していた．ヘテロおよびホモ変異マウスは共に 30 週令まで発育および繁殖に異常はなく，正常型マウスとほぼ同様に体重が増加した．ホモ変異マウスはノーザンブロット，イムノブロット解析で カベオリン－ 3 の mRNA，タンパク質共に検出されなかった．ヘテロ変異マウスでは正常サイズの mRNA，タンパク質共に検出されたが，その量は約半分であった（図 1）．骨格筋細胞膜のカベオラ密度はカベオリン－ 3 発現量の減少に伴って減少していた（図 2）．ホモ変異マウスの横隔膜では EBD 染色性の筋線維がみられたが，ヘテロ変異マウスでは正常型マウスとほぼ同様にみられなかった．下肢筋組織の HE 染色像では，8 週令のホモ変異マウスヒラメ筋で壊死・再生像がみられ，12 週令では中心核筋線維がみられた（図 3）が，ジストロフィンやサルコグリカンの欠損マウスに比べ軽度であった．ヘテロ変異マウスでは，筋組織に顕著な病理像がみられなかった．ヘテロおよびホモ変異マウスでのカベオ

* 国立精神・神経センター神経研究所
** 防衛医科大学校解剖学第二

リン－1の代償性発現は認められず，また nNOS およびジストロフィン－DAP 複合体の筋細胞膜への発現は正常型との差がみられなかった．

2. カベオリン－3とジストロフィンの二重欠損マウス

イムノブロットおよび免疫組織化学による予備的な解析において，二重欠損マウスの骨格筋には，ジストロフィンおよびカベオリン－3は発現していなかった．また HE 染色では，壊死・再生像，中心核筋線維がみられた．

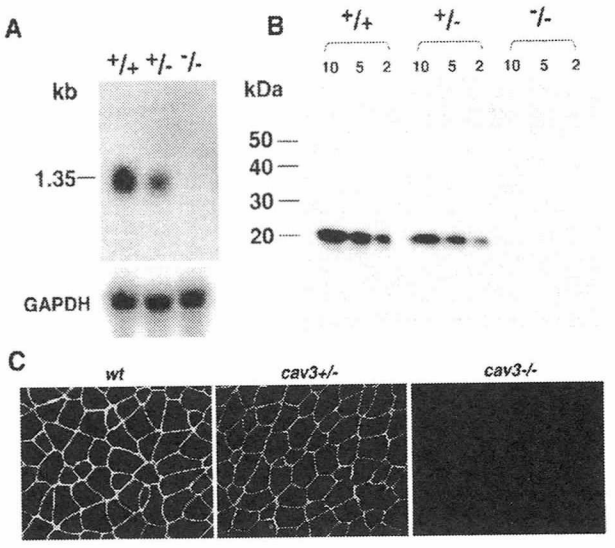


図1　マウス骨格筋におけるカベオリン-3mRNA および タンパク質の解析結果
A：ノーザンブロット解析において，ホモ変異型 (-/-)では mRNA の発現が認められず，ヘテロ変異型 (+/-)では，正常型 (+/+) と同サイズの mRNA が約半量発現していた．ホモおよびヘテロ変異型では，サイズの異なる変異 mRNA の発現は検出されなかった．
B：イムノブロット解析において，ホモ変異型 (-/-)では～20kDa のタンパク質が認められず，ヘテロ変異型 (+/-)では，正常型 (+/+) と同サイズのタンパク質が約半量認められた．
C：免疫組織染色像における筋細胞膜の染色性は，ヘテロ変異 (cav3+/-)で正常型 (wt)に比べて弱く,ホモ変異型 (cav3-/-)では染まらなかった．

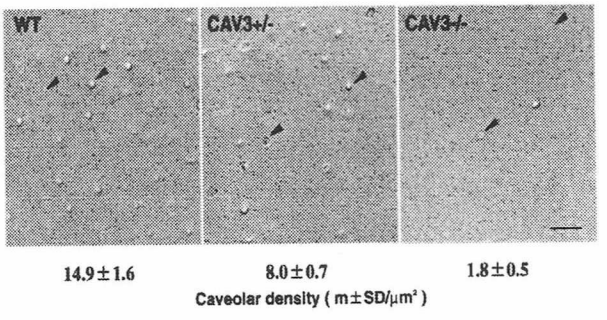


図2 マウスヒラメ筋のフリーズフラクチャー像とカベオラ数
カベオラ数が，ヘテロ変異型(CAV3+/-)で正常型 (WT)の約半分に減少し，ホモ変異型(CAV3-/-)で激減している．スケール：200 nm

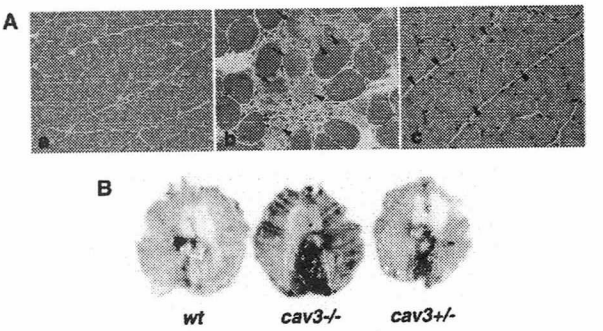


図3　カベオリン-3 欠損マウスの筋病理像
A：ホモ変異マウス 6 週令(a)，8 週令(b)，12 週令(c) のヒラメ筋 HE 染色像
8 週令では，壊死（矢印）再生（矢頭）像がみられ，12 週令では中心核線維（矢頭）がみられる．
B：横隔膜のエバンスブルー生体染色像　ホモ変異型 (cav3-/-)ではエバンスブルー陽性筋線維の束が認められるが，ヘテロ変異型 (cav3+/-)，正常型 (wt)では染まっていない．

考　　察

本分担研究課題のカベオリン-3 欠損マウス作成と第一段階としての解析を達成することができたので，結果を発表した [1]．われわれの発表に続いて，2001 年に報告された Galbiati らの欠損マウスでもこれらの結果は，定性的には同様であった．

われわれのマウスの作成と解析からは，1）遺伝子異常によるカベオリン-3 欠損がミオパチーを引き起こす．2）遺伝子変異のサイズによっては dominant negative 効果が起こらない．3）カベオリン-3 がカベオラ形成に直接関与している．ことを，実験的に個体レベルで明らかにした．

LGMD1C が autosomal dominant に対し，このマウスでは recessive である．それは，Minetti らの変異が 1 塩基置換のミスセンス変異と 9bp の短い欠失であり，培養細胞での彼らの実験および Sunada らのトランスジェニック（Tg）マウスに基づくと，domainant negative 効果により筋細胞膜に正常カベオリン－3 が殆ど発現しない．

われわれのマウスは，787 bp の大きい欠失であり，変異 mRNA およびタンパク質は発現していない．ホモ変異マウスでは筋細胞膜にカベオリン－3 が発現せずに筋変性が起こる．ヘテロ変異マウスでは，正常な mRNA およびタンパク質が 50 %発現して正常形態が保たれる．正常カベオリン－3 が筋細胞膜に 50 %発現していると発症しないことが明らかになった．

カベオリン-3 とジストロフィンは密接に関係している．Galbiati らは，正常カベオリン-3 を過剰発現させた Tg マウスで，カベオリン-3 およびカベオラ数の増加と，ジストロフィンの筋細胞膜への発現減少および DMD 様の筋病理像を報告している．一方，ジストロフィンの欠損している *mdx* マウスでは，カベオリン-3 およびカベオラ数の増加が報告されている．筋ジストロフィー病態機構へのカベオリン-3 の関与を調べる二重欠損マウスの解析が必要である．

今後の展望

今回の解析で，問題点として次の事項が明らかになった．1）骨格筋細胞膜のカベオラ密度が，カベオリン-3発現量の減少に伴って減少していたがホモ変異マウスで0ではなかった結果は，筋細胞の分化におけるカベオリンアイソフォーム（1から3へ）の変換とカベオラ形成の問題を含むので，発生期の解析が必要である．2）T-tubules形態形成の問題も骨格筋の分化および成長に関連した解析が必要である．3）筋変性の分子機構に関連するであろうnNOSおよびシグナル伝達関連分子の重要な問題が残されている．しかしながら，これらの実験解析の為には，遺伝的背景が統一されたマウスが必要である．　われわれのマウスは129系統とB6系統の混合系なので，B6系統への戻し交配を実施し，現在，第9世代目を得ている．一般的には第10世代（戻り理論値99.9%）で承認され，本年度中には第10世代が得られる．遺伝的背景が統一されると詳細な解析が可能になるので，遺伝検査の後に繁殖させ，解析に用いる予定である．また，筋ジストロフィー病態でのカベオリン－3とジストロフィンの相互作用を明らかにするために，作成した二重欠損マウスの解析を予定している．

発表文献

1) Hagiwara Y, Sasaoka T, Araishi K, Imamura M, Yorifuji H, Nonaka I, Ozawa E and Kikuchi T : Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice. Hum. Mol. Genet., 9: 3047-3054, 2000.
2) 萩原康子：骨格筋細胞のカベオリン．生体の科学，52巻4号：314－320，2001.
3) Hagiwara Y, Nishina Y, Yorifuji H and Kikuchi T: Immunolocalization of caveolin-1 and caveolin-3 in monkey skeletal, cardiac and smooth muscles. 投稿中

Ⅱ. Dystrophin－Dystroglycan 関連

dystroglycan を分解する matrix metalloproteinase の解析

清　水　輝　夫*

研究協力者　山　田　広　樹*　鐘　鏑*　大　井　博　子*
長　谷　麻　子*　新　井　謙*　松　村　喜一郎*

目　的

dystroglycanはα-dystroglycanとβ-dystroglycanから成る細胞膜蛋白複合体である．α-dystroglycanは細胞膜外表面に発現するperipheral membrane glycoproteinであり，基底膜の構成成分である，laminin, perlecan, agrinに結合する．β-dystroglycanは細胞膜貫通性の糖蛋白であり，その細胞外ドメインはα-dystroglycanを細胞膜につなぎとめ，細胞内ドメインは，dystrophin，utrophinを介して細胞膜下細胞骨格のF-actinと結合する．このようにdystroglycanは細胞膜内外で，細胞外マトリックスと細胞骨格を架橋すると同時に，β-dystroglycanが，caveolin-3, Grb-2, c-Srcなどと結合することにより信号伝達系にも何らかの役割を有していると考えられている．

一方このように強固な架橋構造は，細胞が基底膜上を，あるいは基底膜を通って移動する状況，すなわち，発生，分化や，病的状態ではガン細胞の浸潤，転移などの過程で効率良くこわされねばならない．従って生体はこのような架橋構造をこわす機構を自らそなえているはずである．

我々は，以上の仮説をもとに研究を行い，β-dystroglycanの細胞外ドメインを特異的に切断するmatrix metalloproteinase（MMP）の活性を見いだした．

以下，このMMP活性について報告する．また，この活性が，sarcoglycanopathyの発病機序に果たす役割について考察する．

方法と結果

ウシ臓器（主に末梢神経）および，ラットSchwannoma由来の細胞株RT4を材料とし，生化学的分析を行った．

図1aにウシの各種臓器のtotal homogenateをSDS-PAGE後，PVDF膜に転写し，抗β-dystroglycanモノクローナル抗体8D5でimmunoblotを行ったものを示す．末梢神経，腎，肺などの組織では，43 kDaのβ-dystroglycanのバンド（β-DG_{full}）以外に，約30 kDaのバンド（β-DG_{30}）が出現したが，骨格筋では認めなかった．

次に，β-DG_{30}の生化学的性質を明らかにするため，ウシ末梢神経から各種条件で抽出を行った．β-DG_{30}はβ-DG_{full}と全く同じ挙動を示し，detergentでよく抽出されたが，高アルカリでは全く抽出されなかった（図1b）．

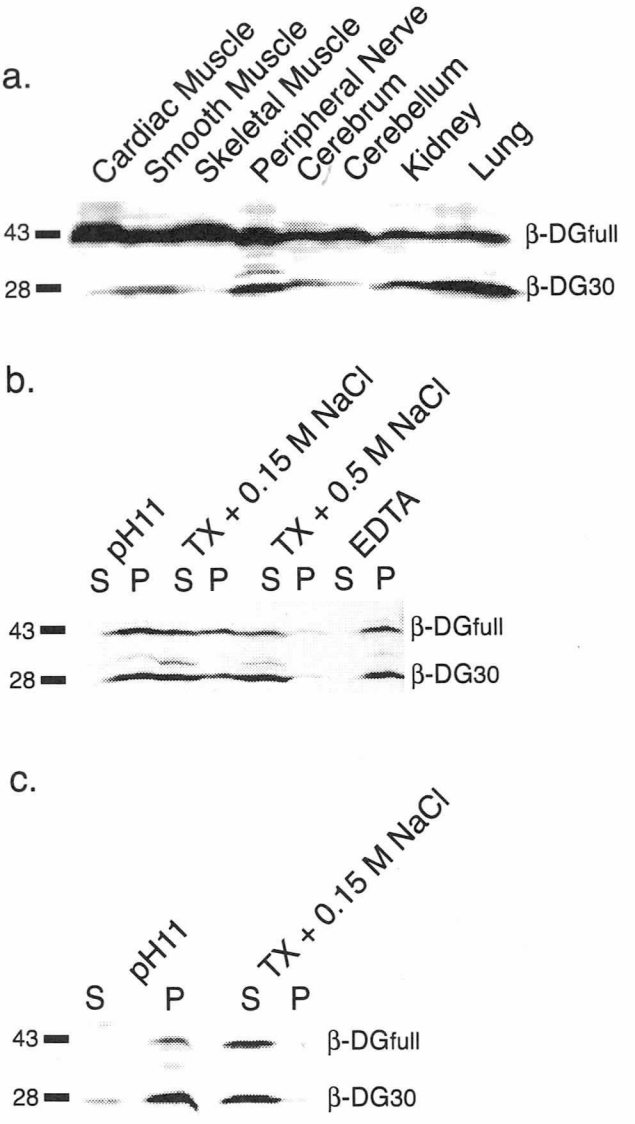


図1　β-DG_{30}の組織分布と抽出実験

a. 同重量のウシの各種組織を粉砕懸濁し，抗β-dystroglycan モノクローナル抗体8D5/43DAGでimmunoblotを行った．

b. ウシ末梢神経の粗膜分画を，pH 11, 2% Triton X100 150 mM NaCl (TX + 0.15 M NaCl), 2% Triton X100 500 mM NaCl (TX + 0.5 M NaCl)，および10 mM EDTA (EDTA)の条件で抽出した．遠心の後，沈殿 (P) および上清 (S) を8D5/43DAGによるimmunoblotで分析した．

c. ラットschwannoma由来の株細胞RT4の粗膜分画から，pH 11, 2%Triton X100 150 mM NaCl (TX + 0.15 M NaCl)の条件で抽出し，同様に分析した．

* 帝京大学医学部神経内科

このことから，β-DG_{30}はβ-dystroglycanの細胞膜貫通部を保持していることが分かる．検出に用いた8D5が，β-dystroglycanの最もC末端すなわち細胞内ドメインの末端に対する抗体であることを考え合わせると，β-DG_{30}は細胞外ドメインで切断されたβ-dystroglycanの細胞膜側の断片であると推測される．

以下の実験にRT4細胞を用いるため，培養RT4細胞の粗膜分画中のβ-dystroglycanの組成および生化学的性質を検討した．RT4細胞の粗膜分画中にも約30kDaのβ-dystroglycan断片と考えられるバンドが存在し，抽出実験での挙動もウシ末梢神経の場合と同様であった（図1c）．

ウシ組織の場合も，RT4細胞の場合も，何らかのプロテアーゼ活性がβ-dystroglycanを分解するものと考え，次の実験を行った．すなわちRT4細胞のtotal homogenateを室温でインキュベートすると，時間の経過と共にβ-DG_{full}が減少し，β-DG_{30}が増加した．total homogenateから粗膜分画を調製し同様にインキュベートすると，この分解はより迅速に進行した．このことはこのプロテアーゼ活性が膜分画中に濃縮されることを示唆する．

一方，RT4膜分画のdigitonin抽出物から，laminin affinity chromatographyないし，WGA affinity chromatographyからanion exchange chromatographyと2段階のクロマトグラフィーによってdystroglycan complexを分離すると，complex中にはいずれも，β-DG_{30}は含まれず，α-dystroglycanとはβ-DG_{full}のみが共分離した（図2b）．またRT4の膜分画のTriton X100抽出物からは，一段階のWGA affinity chromatographyによって，α-dystroglycanとβ-DG_{30}が解離した（図3b）．これらの結果は，このプロテアーゼ活性によって，dystroglycan 複合体が断裂し，α-dystroglycanがβ-dystroglycanの膜貫通部分および細胞内ドメインから分離することを示している．

次にこの活性の阻害実験を行った．この活性は，RT4培養上清中に，MMPの特異的阻害剤であるBPHAを加えることによって抑制された（図3a）．この阻害は濃度依存性であり，また他のMMP 阻害剤である，SI-27, phenanthrolineでも同様の結果であったが，阻害活性のスペクトラムの狭いMMI-16では抑制されなかった（実験結果は示さず）．

一方，BPHAによる阻害実験で用いた，RT4のtotal homogenateから粗膜分画を調製し，その際に生じた遠心上清と共に分析すると．BPHAを加えないcontrolでは遠心上清中にα-dystroglycan を検出したが，このα-dystroglycanの出現はBPHAにより完全に抑制された（図3a）．またRT4 細胞の粗膜分画を生理的条件で再懸濁した後，室温でインキュベートし，再度遠心して，膜分画と上清に分けると，時間経過と共にβ-dystroglycanが分解されると同時に膜分画中ではα-dystroglycanが減少し，上清中に出現した．BPHAを加えて同じ実験を行うと，β-dystroglycanの分解が抑制されると同時に，上清中のα-dystroglycanの出現も抑制された．これらの実験は，この活性がMMP活性であることだけでなく，このプロセシングによって α-dystroglycanがβ-dystroglycanからだけでなく，細胞膜から遊離することを示している．

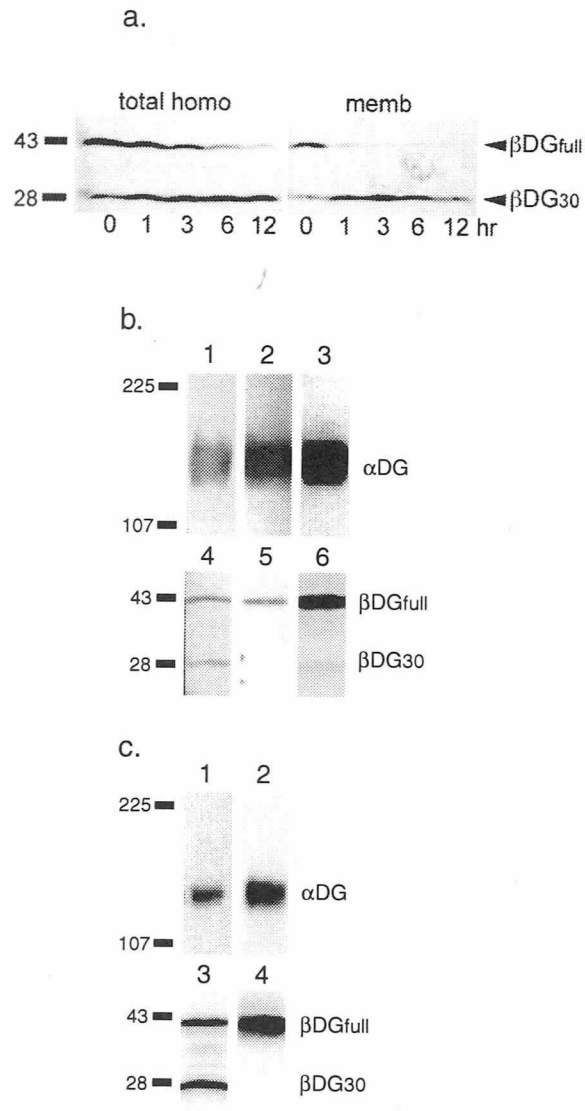


図2　β-dystroglycan プロセシングの時間経過および，dystroglycan 複合体

a. RT4細胞を収穫後，total homogenateを37℃で0, 1, 3, 6, 12時間インキュベートし，8D5/43DAGによるimmunoblotにより分析した（total homo）．同様にRT4細胞を収穫後，粗膜分画を調製し，それを再懸濁したものをやはり，0, 1, 3, 6, 12時間インキュベートし同様に分析した（memb）．

b. RT4細胞の粗膜分画の1%digitonin抽出物（lane 1および4）を出発材料として，laminin affinity chromatographyにより単離したdystroglycan complex（lane 2および5），WGA affinity chromatography の結合分画をanion exchange chromatographyにかけ，0.35 M NaClにより溶出した分画（lane 3 および 6)を示す．α-dystroglycan（α-DG）はモノクローナル抗体IIH6により検出した．

c. RT4細胞の粗膜分画の2% Triton X 100抽出物（lane 1および3）および，それをWGA affinity chromatographyにかけた，結合分画（lane 2および4)を示す．

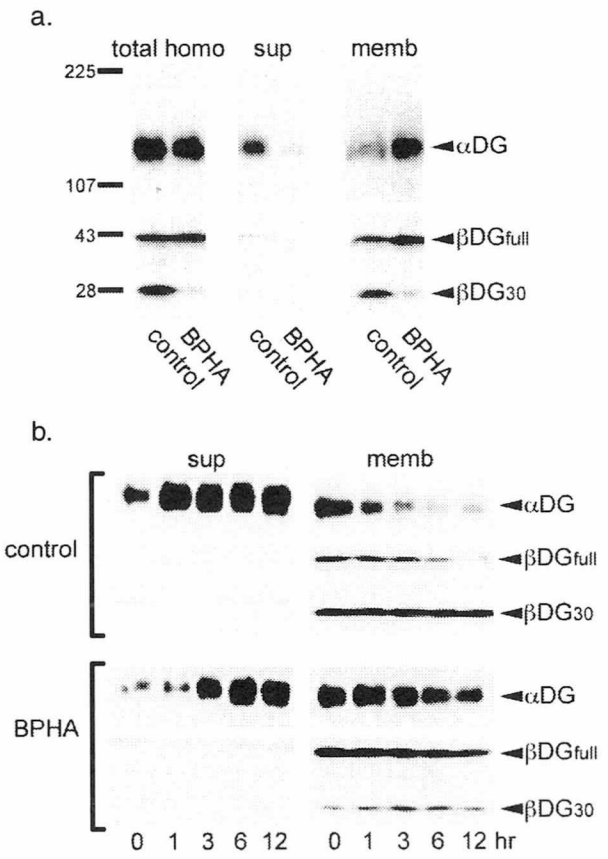


図3 β-dystroglycanプロセシングによるα-dystroglycanの膜分画からの遊離

a. RT4細胞をmatrix metalloproteinase の特異的阻害剤であるBPHAの存在下(BPHA) および非存在下 (control) で培養し，収穫後一部をtotal homogenate (total homo)とし，残りを遠心し上清 (sup) と粗膜分画 (memb) に分けて分析した.

b. 再懸濁したRT4粗膜分画をBPHAの存在下 (BPHA) および非存在下 (control) で，0, 1, 3, 6, 12時間インキュベートし，遠心して上清（sup）と，再沈殿した粗膜分画 (memb) に分けて分析した.

考　　察

上記の結果は以下を示唆する，

- 末梢神経，肺，腎臓などの臓器にはβ-dystroglycanの約30 kDaの断片が発現する.
- この断片は，β-dystroglycanの細胞外ドメインがmatrix metalloproteinaseによって切断されることにより生じる.
- このMMP活性は膜分画中に濃縮されている.
- この切断により，dystroglycan複合体は断裂し，α-dystroglycanは単にβ-dystroglycanの30 kDa断片から離れるだけではなく細胞膜から遊離する.

前述したようにdystroglycan 複合体の機能が，今日多くの疾患の発病機構に関与していることが明らかになりつつあるが，今回我々の見いだしたMMPによるβ-dystroglycanのプロセシングは，以下のような病態に関与している可能性があるものと思われる，

1. ガンの浸潤，転移：各種の培養細胞株で悪性度の高いものほど，β-dystroglycanの30 kDa断片が多く見られたとの報告がある.
2. 感染防御：α-dystroglycanはライ菌の，またラッサ熱ウイルスを含む一部のアレナウイルスが感染する際に細胞側のレセプターとして作用することが明らかになっている．また，MMP-7が腸粘膜への感染の際に発現亢進することから，感染防御的に働いているのではないかと考えられている.
3. Sarcoglycanopathy.

以下，3.について考察する．Sarcoglycanopathyでは，sarcoglycanの欠損がどのようにして筋細胞死につながるのかが不明であった．一方，ヒトのsarcoglycan欠損症の症例で，β-dystroglycanが保たれているにもかかわらず，α-dystroglycanが減少している例が報告されていること，δ-sarcoglycanの欠損動物モデルであるBIO14.6ハムスターでは，α-dystroglycanとβ-dystroglycanが解離しており，膜分画にα-dystroglycanが回収されないこと，が報告されていた．さらに最近，多数の筋疾患例生検筋のmultiple western blotの報告でsarcoglycanopathy例でのみ30 kDa β-dystroglycanの出現が報告されている．我々の結果でも，β-DG_{30}はα-sarcoglycanを含むsarcoglycanの組成を持つ骨格筋では見られず，他の臓器に見られている.

これらの結果をもとに，我々は，骨格筋のsarcoglycan複合体は，β-dystroglycanのプロセシングを抑制する方向にMMP活性を調節する機能を有しており，この機能の異常が，sarcoglycanopathyにおけるdystroglycan複合体の破綻，筋細胞死にながる，という仮説を提唱した.

今後の展望

今後，上記の仮説を元に関与するMMPの同定，sarcoglycanが活性を調節する機構を明らかにしていくことを目標とする．これらが明らかになれば，sarcoglycanopathyの治療法の開発につながる可能性がある.

文　　献

1) Yamada H, et al.: J. Biol. Chem. 271: 23418-23423, 1996.
2) Chiba A, et al.: J. Biol. Chem. 272: 2156-2162, 1997.
3) Matsumura K, et al.: J. Biol. Chem. 272: 13904-13910, 1997.
4) Saito F, et al.: J. Biol. Chem. 274: 8240-8246, 1999.
5) Yamada H, et al.: Hum. Molec. Genet. 10: 1563-1569, 2001.

病態解明に向けたジストロフィン結合タンパク質の分子論的研究

吉 田 幹 晴*,**

研究協力者　小 澤 鉄二郎** 武 田 伸 一*

緒　言

我々はこれまでジストロフィン（dys）と dys 結合タンパク質（DAP）からなる大きな複合体（dys 複合体）の構造について詳細な検討を行い，その分子構築を明らかにしてきた．その結果として「細胞膜は dys 複合体が基底膜と細胞膜骨格を連結することにより保護されている」ことが理解されるようになった．Dys の変異によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）やサルコグリカン（SG）複合体の発現異常によって発症するサルコグリカノパチー（SGP）は結果的に dys 複合体の構造が崩れるために保護機能が失われ，細胞膜が脆弱化した結果と考えることができる．こうした機械的な発症機構とは別に dys 複合体を経由するシグナル伝達が絶たれ発症を促すとの考え方もされているが，具体的な証拠はない．我々は dys 複合体においてシントロフィン（syn）/α-ジストロブレビン（DB）が SG 複合体と結合していることを明らかにしたが [1]，こうした背景からその結合状態をより詳細に示したいと考えた．syn がシグナル伝達分子 nNOS と結合することが知られているからである．その結果を前半で述べる．

今日まで様々な筋ジストロフィーの原因遺伝子が明らかになっているが，ジスフェルリン（dysF）もその一つである．dysF は三好型ミオパチー及び肢体型筋ジストロフィー 2B 型の責任遺伝子であり，同一遺伝子の変異によって症状の異なる二つの筋ジストロフィーが発症する点で興味深い分子である [2]．その機能は不明であるが，最近 DMD 患者の一部や SGP 患者の約半分で減少していることが報告され，dys 複合体との相互作用が示唆された [3]．広い意味で DAP となるかもしれない分子である．我々はその真偽を判定すると共に，dysF 欠損症の病態解明のため dysF の機能を明らかにしたいと思い dysF 結合タンパク質の存在についても検討した．その結果を後半で述べる．

方法と材料

Dys 複合体はウサギ骨格筋細胞膜より調製した．カルパイン消化及び小麦胚芽レクチン（WGA）ゲルクロマトグラフィーと消化物 WGA 結合画分の熱処理は文献 [4] に記載した．DysF のイムノブロットによる解析は細胞膜のジギトニン抽出液より得られた試料について行った．

* 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旧機能研究部

結果と考察

1．DB の N 末端は SG 複合体と結合している

精製した dys 複合体のカルパイン消化物を様々な抗体を用いて解析した．カルパインにより dys は断片化したが，DB を除く DAP の方は殆ど変化が認められなかった．DB は C 末端側が分解され，N 末端側 38 kDa 程の断片になることが見出された．消化物を WGA ゲルで分画すると DB 断片は糖鎖がないにもかかわらず結合画分に検出されたが，syn の方は殆どが非結合分画にあった．DB 断片は dys 結合部位を，また結合画分中の dys 断片は DB 結合部位を喪失している．従って DB 断片はジストログリカン（DG）複合体/SG 複合体に結合してゲルに保持されているものと考えられた．次に DB 断片が SG 複合体と結合しているかどうかをみるため，消化物の WGA 結合画分を高塩濃度下 37 ℃で熱処理した．この処理は 以前我々が Dys 複合体から DB と syn が結合した SG 複合体を得た時のものである [1]．処理後 SG 複合体を分離して DB を解析したところ，それが検出された．syn は WGA 分画で既に失われていることから，SG 複合体と結合しているのは DB であり，その N 末端側が結合に関与していると結論した [4]．

筋における DB は選択的スプライシングにより共通の N 末を持つ 3 種（DB-1, -2, -3）が発現している（図 1）．今回の結果からその何れもが SG 複合体と結合しているはずである．DB-3 を除く DB は C 末端側に syn 及び dys 結合部位を持っており，従って dys と SG 複合体を連結し，その間で syn と結合していることになる（図 2）．α-syn は nNOS と結合することが知られており，従って SG 複合体と nNOS が DB と syn を挟んでつながっていると考えられる．

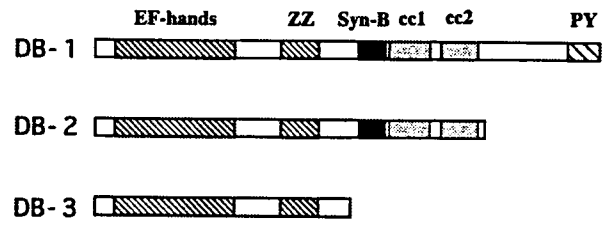


図 1　骨格筋において発現しているα-ジストロブレビン 3 つの分子種
WW: WW ドメイン，EF-hands: 2 つの EF-hand モチーフを含むドメイン，ZZ: Zn フィンガードメイン，Syn-B: syn 結合領域，cc1/cc2: coiled-coil 結合領域，PY: チロシンリン酸化酵素の基質となる配列を含む領域

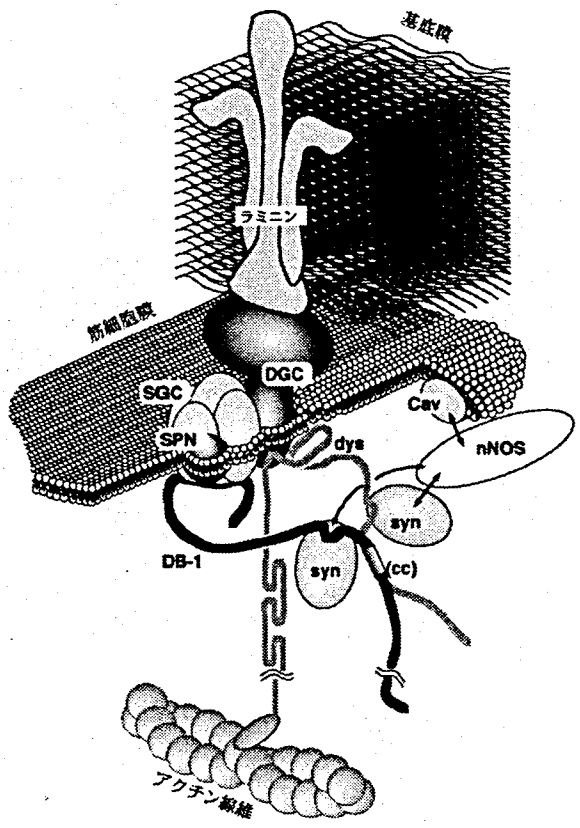


図2　骨格筋表面膜上に存在するジストロフィン複合体の様子
文献[4]の図を少し改変したものである．DGC: DG 複合体，SGC: SG 複合体，SPN: サルコスパン，Cav: カベオリン-3

2．dysF 結合タンパク質の存在

予想された dys 複合体と dysF の結合を調べるために，それを Ca2+存在下で検討したが，結合する様子は認められなかった．一方 dysF はその一部が WGA ゲルと結合することが認められた．この場合 Ca2+を必要とし，従って結合した dysF は N-アセチルグルコサミンを使わず，EGTA で溶出された．このことから dysF は WGA 結合性の糖タンパク質と Ca2+依存的に結合することが示唆された．

今後の展望

SG 複合体が DB-syn をとおして nNOS と結合していることがわかった．SG 複合体がレセプターであり，何らかのリガンドがこれに結合して nNOS の活性を制御遮断すると仮定してみよう．この場合 SG 複合体が失われると持続する収縮において NO 量が過剰となりうる．NO はその作用に二面性を持ち，過剰では細胞障害が予想され，筋ジストロフィーの発症を促す可能性がある．この仮説を試すには収縮に伴う NO 量の測定が必要と思われる．一方 DB-3 は syn 及び dys 結合部位を持たず，従って nNOS との結合も成立しない．この様な分子種が存在することも DB の機能を考える上で逆に興味深いと思われる．

dysF は分子内に C2 ドメインを複数持ち，従ってこの分子の Ca2+存在下での挙動が注目されていた．今回の研究で dysF が WGA 結合性の糖タンパク質と Ca2+依存的に結合することが示唆されたことは興味深い．dysF は fer-1 ファミリーの一員であり，fer-1 は線虫で発見された受精不能変異体の原因遺伝子として発見されたものである．fer-1 変異は MO と呼ばれる細胞内小胞と精子細胞膜の融合不全を起こす．一方同じく C2 ドメインを持つシナプトタグミンは fer-1 ファミリーとは少し異なる分子であるがシナプス小胞に存在し，神経伝達物質放出の際の Ca2+センサーとして機能すると言われている．こうしたことを考慮すれば dysF は筋細胞中に存在するある種の小胞が細胞膜と融合する際の Ca2+センサーとして働くのではと想定される．その際今回示唆された糖タンパク質との結合がキーポイントである可能性も考えられる．WGA ゲルで二分されるような dysF が存在することはこの分子の動的挙動を反映するものかもしれない．

文　献

1) 吉田幹晴：ジストロフィンとその結合タンパク質の分子論的研究．厚生省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーの分子病態学的基礎研究」総括研究報告書（平成8年度～10年度）7-11，1999.

2) 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 Genet 20: 31-36, 1998.

3) Piccolo F, Moore SA, Gwendolyn C et al : Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb--girdle muscular dystrophies. Ann Neurol: 48: 902-912, 2000.

4) Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M et al : Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. Hum Mol Genet 9: 1033-1040, 2000.

筋形質膜－細胞骨格間分子連関異常による筋ジストロフィー発症機構の細胞生物学的研究

― プレクチンと筋形質膜裏打ちタンパク質との構造・分子連関性の解析

土 方 貴 雄*

研究協力者 磯 川 桂太郎** 瀬 嶋 仁 美**
中 村 彰 男*** 村 上 徹*

目　的

皮膚疾患を伴う筋ジストロフィー（Epidermolysis Bullosa Simplex-Muscular Dystrophy）の原因がプレクチン欠損によることが 1996 年に明らかになり，骨格筋におけるプレクチンの役割が注目されるようになった．その後主に骨格筋内でのプレクチンの局在様式から以下の役割が提唱された．1）プレクチンはデスミン中間径フィラメントネットワークとともに隣接する筋原線維を Z 盤で連結し並列する筋原線維の同調収縮を保障している(Hijikata et al., 1999)．2）ミトコンドリアの細胞内適所での保持をデスミンネットワークとともに担い，in situ での呼吸活性に関与している．3）筋形質膜の支持や構造保持．これら役割の内，「筋形質膜の支持や保持」という説はプレクチンが筋形質膜下に局在するという観察からジストロフィンと同じであろうという類推に基づくもので，実質的なプレクチンと筋形質膜との構造的あるいは分子レベルでの結合関係は未だ不明である．そこで本研究ではプレクチンと筋形質膜との関係を筋形質膜裏打ちタンパク質であるジストロフィンやビンキュリンとの関係を中心に解析した．

方法と結果

ラット骨格筋において筋形質膜裏打ちタンパク質のジストロフィンやビンキュリンとプレクチンの相対的局在関係を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した．その結果，プレクチンは Z 線レベルと縦ストランドからなる格子状の領域の筋形質膜下にジストロフィンとビンキュリンとともに共存した（図 1）．一方，ジストロフィンとビンキュリンは M 線領域に相当する筋形質膜下にも局在したが，プレクチンは存在しなかった．

電子顕微鏡により Z 線レベルの筋形質膜下のプレクチン局在領域を精査した結果，ヘミデスモゾーム様の構造が見い出された．この部位では基底膜をともなう筋形質膜の直下に膜裏打ち dense plaques がみられ，これに数本の中間径フィラメントが平行に近接する．そこで次にプレクチンの局在をスキンドファイバーを用いた免疫電顕により調べた．その結果プレクチン抗体でゴールドラベルされた細いストランドがデスミン中間径フィラメントと dense plaques の間を連結しているのが観察された (図 2).

共焦点レーザー顕微鏡の観察により Z 線延長上の筋形質膜下のプレクチン存在領域にはジストロフィンとビンキュリンも局在していることが明らかなので，電顕レベルでのジストロフィンやビンキュリンとプレクチンの相対的局在関係を免疫電顕により観察した．その結果，ジストロフィン，ビンキュリンは共にプレクチン・ストランドが結合している dense plaques 内に存在していた (図 3A).

微細形態学的に観察されたプレクチンとジストロフィン・ビンキュリンとの連関性を生化学的に確かめるために，筋形質膜を含む軽いマイクロゾーム分画を可溶化しプレクチン抗体で免疫沈降した．その結果，確かにジストロフィン，ビンキュリンはともにプレクチンと共沈した (図 3B)．興味深いことに，軽いマイクロゾーム分画にはビンキュリンとメタビンキュリンが等量比で混在しているのに対し，プレクチン免疫沈降物内にはメタビンキュリンがより多く含まれていた．このことはプレクチンは主としてメタビンキュリンと連関していることを示唆している．

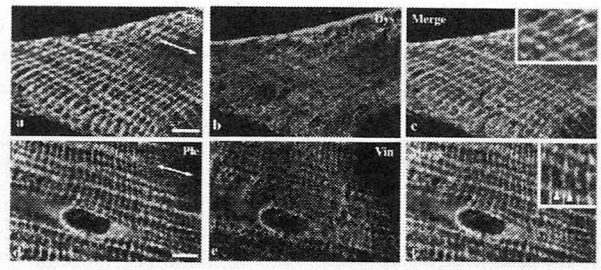


図 1　プレクチン，ジストロフィンおよびビンキュリンの筋形質膜下での二次元的局在様式と相対的な局在関係．プレクチン(a, d)は Z 線延長上領域と縦のストランドからなる目の粗い格子状の領域に分布するが，ジストロフィン(b)やビンキュリン(e)は上記領域に M 線延長上領域を加えた目の細かい格子状の領域に分布する．両方向矢印(a, d)は筋線維の長軸を示す．重ね合わせ像(d, f)の一部拡大 (insets)で矢印はプレクチンとジストロフィン・ビンキュリンが共局在する Z 線延長上領域を示し，矢尻はジストロフィン・ビンキュリンのみが局在する M 線延長上領域を示す．Bars 5 μm

* 群馬大学医学部第二解剖
** 日本大学歯学部第二解剖
*** 群馬大学医学部薬理学

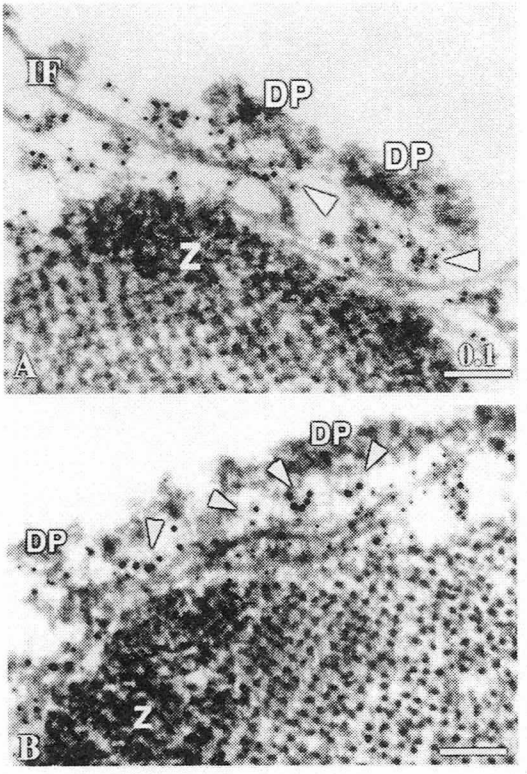


図 2　プレクチンはデスミン中間径フィラメントと膜裏打ち dense plaques をリンクする．A プレクチンを示す 5nm ゴールドは中間径フィラメント(IF)と膜裏打ち(DP)の間や中間径フィラメントと Z 盤の間にみられる．矢尻はプレクチンラベルされた細いストランドを示している．B プレクチン(10nm ゴールド)はデスミンラベル(5nm ゴールド)された中間径フィラメントと膜裏打ち(DP)の間に介在している（矢尻参照）．Bars 0.1 μm

プレクチン，ジストロフィン，ビンキュリンはいずれもアクチン結合ドメインをもつ．また，プレクチン免疫沈降実験によりアクチンも共沈することが確かめられた．これらのことから，アクチンがプレクチンとジストロフィンおよびビンキュリンの間を直接あるいは間接的に繋いでいることが考えられる．そこでこの可能性を検討するためにプレクチン免疫沈降物をゲルゾリンで処理してみた．この結果，プレクチン免疫沈降物内に含まれるジストロフィンおよびビンキュリンの量は 1/2-2/3 に減少した．このことはアクチンが部分的にはプレクチンとジストロフィンおよびビンキュリンとの連関性を担っていることを示唆している．

一方，ゲルゾリンにより完全にジストロフィンがプレクチン免疫沈降物から除去できないことからアクチンを介さないプレクチンとジストロフィンとの分子連関性も考えられる．そこでどのような分子がプレクチンに結合するかプレクチン N 末のリコンビナントタンパク質を用いたオーバーレイアッセイによりスクリーニングをおこなった．その結果，分子量約 150kDa のタンパク質がプレクチン N 末リコンビナントタンパク質に結合することが明らかになった(土方 2001)．このタンパク質は粗中間径フィラメントタンパク質分画に多く含まれていることから中間径フィラメント関連タンパク質であると考えられた．

つぎにこの分子量約 150kDa のプレクチン結合タンパク質の部分アミノ酸配列を決定した．ブラストサーチの結果，この部分アミノ酸配列は KIAA0353 およびデスマスリンのそれに一致していた．デスマスリンは最近ジストロブレビン結合タンパク質として明らかにされた新規タンパク質で，シネミンやパラネミンと同じタイプ 6 の中間径フィラメントタンパク質である．我々が同定したプレクチン結合タンパク質がデスマスリンであるならば，プレクチンはデスマスリン／ジストロブレビンを介しジストロフィンと結合する可能性があり，アクチンを介さないプレクチンとジストロフィンのもう一つの連関軸と考えられる．現在このデスマスリンと思われる 150kDa のプレクチン結合タンパク質のクローニングを行っているところである．

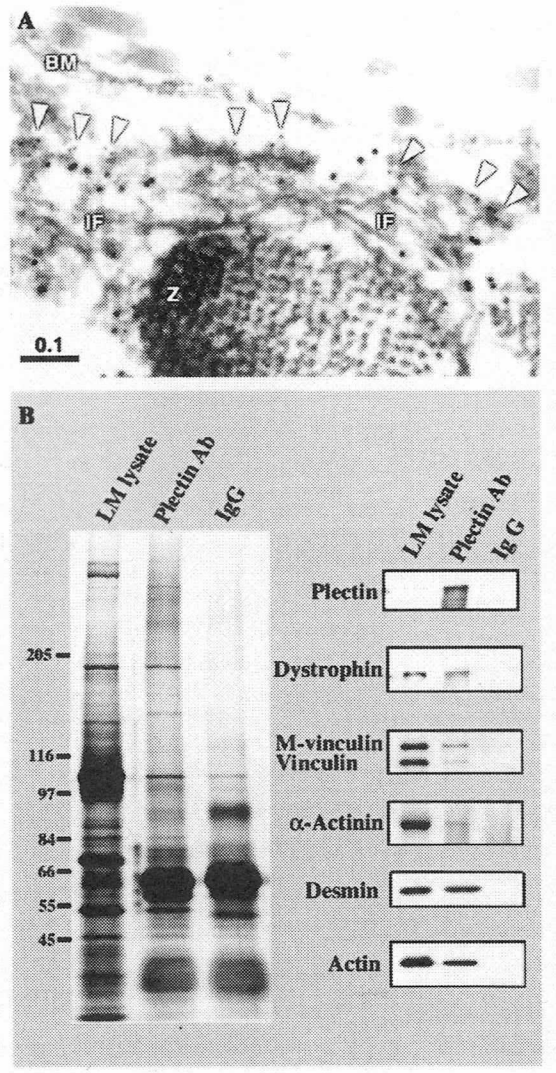


図 3　A プレクチン(10 nm ゴールド)がアソシエイトする膜裏打ちはジストロフィン(5 nm ゴールド)を含む（矢尻参照）．Bar 0.1 μm　B ジストロフィン・メタビンキュリンはプレクチン抗体で免疫沈降する．左:銀染色 右:イムノブロット

考　　察

本研究により，以下のことが明らかになった．

1）プレクチンはデスミン中間径フィラメントを Z 線の延長領域の筋形質膜裏打ち dense plaques に繋いでいる．全体としてヘミデスモゾームの相似構造を呈している．

2）プレクチンはジストロフィンや（メタ）ビンキュリンに部位特異的にアソシエイトする．プレクチンは Z 線の延長領域の筋形質膜下の dense plaques 内のジストロフィンやビンキュリンにはアソシエイトするが，その他の M 線延長上領域のジストロフィンやビンキュリンにはアソシエイトしない．

3）アクチンがプレクチンとジストロフィン・ビンキュリンのアソシエイトに直接的あるいは間接的に関与していることが示唆された．

4）プレクチンとジストロフィンのアソシエイトには別の連関軸の存在も示唆された．プレクチンはジストロブレビン結合タンパク質であるデスマスリンに結合し，その結果ジストロフィンにアソシエイトする連関軸である．これについては今後詳細に検討していく．

筋形質膜と中間径フィラメントネットワークとのプレクチンを介した連関構造は上皮でみられるヘミデスモゾームに構造的に相似であり，機能的にも相似と推察される．すなわち，筋形質膜は筋収縮により機械的ストレスを絶えず隣接する筋線維から被るが，ヘミデスモゾーム様構造はそのストレスを緩衝するストレス吸収の役割をしているのではないかと考えられた．

今後の展望

中間径フィラメントネットワークとジストロフィンを含む筋形質膜裏打ちとの構造・分子連関性が明らかになりつつある．このことは一方ではこれまで知られている筋ジストロフィーあるいはミオパチーの責任タンパク質が相互に連関していることを意味する．この連関構造の研究の延長上には，これまで責任タンパク質の不明な筋疾患の原因タンパク質が見出されていく可能性も大きい．また，治療の面においても連関構造の解明によりバイパス・キメラ分子などの設計が可能となり，代替分子を用いた遺伝子治療の基盤となっていくことを期待している．

文　　献

1) 土方　貴雄 :骨格筋における中間径フィラメントネットワークの分子構築　－発生過程における再編成の分子機構，機能的意義そして筋疾患との関連性 生体の科学, 52(4):287-293, 2001.

2) Hijikata T, Murakami T, Imamura M, Fujimaki N, Ishikawa H : Plectin is a linker of intermediate filaments to Z-discs in skeletal muscle fibers. J Cell Sci. 112:867-76, 1999.

ジストロフィン欠損心筋におけるシグナル伝達異常の検討

吉田邦広*

研究協力者　中村昭則** 池田修一** 武田伸一***
Harrod GV, Davies KE****

目　的

拡張型心筋症に基づくうっ血性心不全は呼吸不全と並んでジストロフィン異常症患者の重要な死因である．骨格筋障害の軽症なBecker型筋ジストロフィーでは心筋障害を呈する頻度が高いことが報告されているが，この理由として従来から運動負荷による心負荷の増大が要因と推測されてきた．これまでにジストロフィン欠損骨格筋・心筋では運動などの機械的ストレスにより障害され易いこと，また機械的ストレスにより心筋細胞内のstress activated protein kinase（SAPK）の活性化やCa濃度の上昇を来すことや一部の肥大型および拡張型心筋症モデルマウスにおいて心筋細胞内のSAPKやCa依存性のprotein phosophataseであるcalcineurinなどのシグナル伝達分子異常が明らかにされていることから，ジストロフィン欠損による心筋障害の発症機序においても同様のシグナル伝達異常が関与している可能性が考えられる．そこで我々はジストロフィン異常症における心筋障害の発症機序，病態生理を明らかにするためにジストロフィン欠損モデルマウスの心筋においてSAPKやp38 mitogen activated protein kinase（MAPK），calcineurinの異常の有無について検討し，さらに*mdx*マウスに運動負荷を掛けてその心筋病理変化と同シグナル伝達分子の発現について検討した．

方法と結果

1）6，12，24週のC57BL/10，*mdx*マウスおよび6，12週のutrophin-dystrophin欠損（dko）マウスの心筋を用いてcalcineurinとSAPK（JNK1）/p38 MAPKの上流に位置するangiotensin II receptor 1a（AT1a），さらに両分子の下流に位置するbrain type natriuretic peptide（BNP）のmRNAレベルを比較・検討した．またwestern blot法を用いてcalcineurin，活性化型および非活性化型のJNK1，p38 MAPKの蛋白レベルの比較・検討を行った．結果はcalcineurin，AT1a，BNPのmRNAレベルは12週以降の*mdx*および6週以降のdkoではC57BL/10に比べ有意に増加していたが，*mdx*ではcalcineurinおよびBNP値は増加しているものの値にばらつきがみられた．12週のマウスにおいてcalcineurinの蛋白レベルは*mdx*，dkoでC57BL/10の約2倍と増加し，個々のマウスにおいてそのmRNAのレベルを反映していた．活性化型（リン酸化型）JNK1は*mdx*で有意な上昇はみられなかったが，dkoではC57BL/10の約7倍に増加していた．また活性化型（リン酸化型）p38 MAPKは12週の*mdx*でwild typeの約6倍，dkoで約9倍に増加していた．以上からdko心筋においてcalcineurinとそれぞれ活性化型JNK1，p38 MAPKの発現が増加していること，*mdx*心筋においては個体差がみられるもののcalcineurinおよび活性化型p38 MAPKの発現が増加していることが明らかになった．

2）次にC57BL/10および*mdx*に運動負荷をかけて，心筋病理の変化と心筋におけるシグナル伝達分子p38 MAPK，JNK1，extra-cellular signal regulated kinase1/2 (ERK1/2)およびcalcineurinの発現を比較検討した．6週のC57BL/10および*mdx*をそれぞれ運動負荷群，非運動負荷群（各6匹ずつ）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．経時的な体重測定と終了後の心体重比を求め，心筋組織を用いて一般病理学的検討を行った．またcalcineurinとそれぞれ活性化型JNK1，p38 MAPK，ERK1/2の発現をwestern blot法と免疫組織化学を用いて比較検討した．結果はC57BL/10および*mdx*の運動負荷群，非運動負荷群のそれぞれの間に体重の有意差はなかったが，負荷終了時の心体重比は*mdx*運動負荷群で有意に大きかった．一般病理では*mdx*運動負荷群は非運動負荷群に比して心筋細胞の壊死，結合織増加，細胞浸潤の程度が強い傾向を認めた．またcalcineurinとそれぞれ活性化型p38 MAPK，ERK1/2の発現はC57BL/10および*mdx*ともに運動負荷群で増加していたが，*mdx*運動負荷群でより増加していた．また*mdx*での活性型JNK1の発現増加は見られなかった．免疫組織化学ではcalcineurinとそれぞれ活性化型p38 MAPK，ERK1/2は*mdx*心筋の変性・壊死線維に強く染色され，またその程度は運動負荷群で強い傾向を示した．

考　察

Dko心筋ではcalcineurinとJNK1およびp38 MAPKのpathwayが活性化しており，これらのpathwayが心筋障害の病態に関与している可能性が示唆された．また*mdx*心筋でもcalcineurinおよびp38 MAPKのpathwayが活性化さ

* 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
*** 国立精神・神経センター神経研究所
**** Department of Human Anatomy and Genetics, University of Oxford

れていたが，その程度は個々のマウスによって異なっていた．この可能性の一つとして個々のマウスにおいて運動量の差異による心筋障害への関与が考えられるため運動負荷実験を行ったところ，*mdx*運動負荷群の心筋では非運動負荷群より強いジストロフィー変化を呈し，活性化型p38 MAPK, ERK1/2およびcalcineurinの発現がさらに増加していた．以上からジストロフィン欠損心筋では運動負荷により細胞内のシグナル伝達分子がより強く活性化され，心筋症の進展に関与している可能性が考えられた．

今後の展望

上記のシグナル伝達分子が運動負荷に伴う心筋病変の進展に関与している可能性を証明するためには，それぞれのシグナル伝達分子に対する拮抗剤の投与による病態の変化を確認する必要があると考えられる．このことは拮抗剤を用いた治療の可能性を検討する上でも重要な知見が得られると思われる．またジストロフィン欠損骨格筋においても同シグナル伝達分子の発現について検討を行う予定である．

文　献

1) Nakamura A, Harrod GV, Davies KE: Activation of calcineurin and SAPK/p38-MAPK in heart of Duchenne muscular dystrophy mice. Neuromusc Disord 11:251-259, 2001.

2) Tasaki N, Yoshida K, Haruta S, et al: A case of X-linked dilated cardiomyopathy with a hot-spot deletion in the dystrophin gene. Intern Med 40: 1215-1221, 2001.

中枢神経系での dystroglycan および関連蛋白質の生理機能に関する研究

二 宮 治 明*

研究協力者 細 川 浩**

目 的

一般に非筋細胞においてdystroglycan（DG）はutrophinと結合すると考えられているが，いくつかの細胞種において，DGとutrophinの細胞内局在が異なっており，utrophin以外の蛋白質がDGの細胞内ドメインに結合していることが予想された．そこで，dystrophin/utrophin以外のDG-binding proteinを同定し，その生理的意義を明らかにする事を目的とした．

方法と結果

1. MAGI-1はそのWW domainを介してβDGに結合する．

DG cDNAの細胞内ドメイン（ΔβDG）をprey，ヒト骨格筋cDNA libraryをbaitとして，yeast two hybrid screeningを行った．得られたcloneに，MAGUK（membrane-associated guanylate kinase）familyに属する蛋白質MAGI-1（membrane-associated guanylate kinase with an inverted arrangement of protein-protein interaction domains）の部分cDNAが含まれていた．MAGI-1は，N端側から，guanylate kinase domain，2つのWW domain, polyQ repeat, 5つのPDZ domainを持ち，異なる蛋白質を架橋することが予想されたが，その生理機能は全く不明だった．MAGI-1のWW domainに対応する6xHis標識蛋白質と，GST融合ΔβDG蛋白質を作製し，in vitro でのMAGI-1とΔβDGの結合を確認した．さらに，MAGI-1がマウス，ヒト骨格筋形質膜に存在すること(抗MAGI-1免疫染色)，ラット網膜においてβDGとその発現部位が一致すること(抗βDG/抗MAGI-1二重染色)を確認し，マウス骨格筋抽出物を用いた免疫沈降実験において，抗βDGでMAGI-1を，逆に抗MAGI-1でβDGを共免沈することができた．これらの結果は，MAGI-1がin vivoでβDGと結合することを強く示唆する．

2. MAGI-1はそのPDZdomainを介してβ-cateninに結合し，β-cateninのstabilityを調節する．

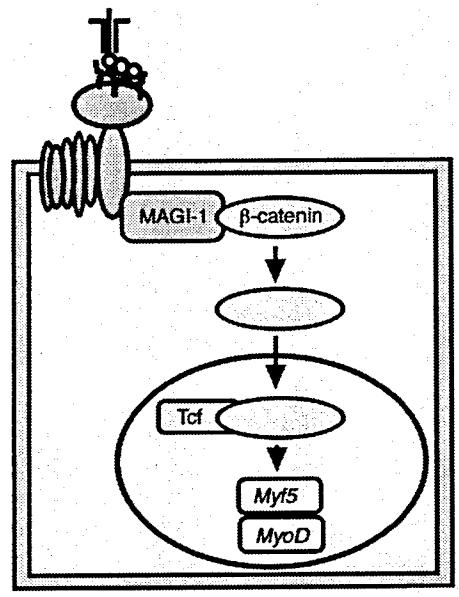
MAGI-1の機能を明らかにする目的で，そのPDZ domainに結合する蛋白質をyeast two-hybridにより検索し，候補蛋白質としてβ-cateninを同定した．In vitroでの結合実験において，β-cateninはそのC末端のPDZ-binding motifにより，MAGI-1の5番目のPDZ domainに結合した．β-cateninはマウス，ヒト骨格筋形質膜に存在し（抗β-catenin免疫染色），マウス骨格筋抽出物から抗βDG/抗MAGI-1のいずれによっても共免沈された．培養細胞での発現系において，MAGI-1はβ-cateninのstabilityを増強し，T cell factor (Tcf) reporter gene活性を誘導した．これらの結果は，βDGからMAGI-1/β-cateninを経てTcfに至るシグナル伝達系が存在することを示唆する．

3. 再生骨格筋の形質膜ではMAGI-1/β-cateninの発現が増強している．

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．これらの結果は，MAGI-1/β-cateninを経てTcfに至るシグナル伝達系が骨格筋の再生過程において活性化されていることを示唆する．

4. MAGI-1ノックアウトマウスの作製

MAGI-1ノックアウトマウスの作製を試み，F1ヘテロマウスの樹立に成功した段階である．これまでのF1ヘテロマウスのmatingにおいてホモマウスが得られていないが，これが単に出生数が少ないためか，embryonic lethalであるためか検討中である．



Dystrophin欠損骨格筋でのMAGI-1の機能に関するわれわれの仮説

MAGI-1はβDGとβ-cateninをリンクし、β-cateninを安定化することによりβ-catenin/Tcf複合体による転写活性を亢進させる。このシグナル伝達がdystrophin欠損骨格筋の再生/分化に必要である。Dystrophin欠損骨格筋においてMAGI-1/β-cateninの発現が亢進している理由は不明だが、utrophinの発現を亢進させているのと同じようなメカニズムが働いているのかもしれない。

* 鳥取大学医学部・神経生物学
** Center for Cardiovascular Research, University of Rochester

考　　察

上記1-3の結果から「βDG/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．胎生期の骨格筋発生においてWint1の刺激によりβ-catenin/Tcfシグナル伝達系が活性化され，Myf5などの筋特異的転写因子を誘導する事が知られているが，われわれの仮説は同様のシグナル伝達がmdxマウス/ヒトDMD再生骨格筋において働いている事を提唱するものである．

今後の展望

この仮説を直接的に証明するためにはmdxマウスにおいてMAGI-1遺伝子をノックアウトし，筋再生に異常をきたすか否かを確かめればよい．もし，MAGI-1ノックアウトマウスがembryonic lethalであった場合この目的には使えないので，Cre-loxPシステムを用いた筋特異的ノックアウトのような新たな手段による検証が必要となる．一方，神経筋接合部においてmuscle-specific protein kinase（MuSK）と共存する蛋白質としてMAGI-1c（MAGI-1のalternative splice form a，b，cのひとつでC末端が異なる）が同定され（Strochlic et al.，JCB，28，1127，2001），MAGI-1が神経筋接合部の形成に関与する事が示唆された．われわれのノックアウトマウスを用いて，MAGI-1が胎生期の神経筋接合部形成に関与する可能性の検証も行う予定である．

文　　献

1）Shimizu H, Hosokawa H, Ninomiya H, Miner J.H. and Masaki T: Adhesion of cultured bovine aortic endothelial cells to laminin-1 mediated by dystroglycan. J Biol Chem 274: 11995-12000, 1999.

2）Hosokawa H, Ninomiya H, Kitamura Y, Fujiwara K. and Masaki T: Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis. J. Cell Sci. in press

3）Hosokawa H, Ninomiya H, Imamura M, Kaidoh T, Fujiwara K. and Masaki T: Role of MAGI-1 as a link between β-dystroglycan and β-catenin in the skeletal muscle. 投稿中

中枢神経系における dystrophin の機能解析並びに新世代のアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療に関する研究

内野　誠*

研究協力者　有馬寿之*　木村　円*　前田　寧*
内田友二*　日野洋健*　宇山英一郎*
箕田修治*

目　的

dystrophin は骨格筋，心筋，平滑筋のみならず中枢神経においても大脳および小脳皮質に豊富に存在し，しかもシナプス後膜に局在している．中枢神経では dystrophin は筋組織とは違う promoter により制御されており中枢神経においては筋組織と異なる役割を担っている可能性があるが，現在のところその役割は不明である．また，DMD 患者の約 30%に mental retardation が認められるが dystrophin との関連については現在のところ明らかではない．我々は Adenovirus vector を使い mini-dystrophin を中枢神経で発現させ組織学的検討と Dystrophin の中枢神経における役割について解析を行った．

方法と結果

1. mini-dystrophin cDNA および C 末端からの欠失変異体の cDNA (N 末端のみの cDNA，N 末端と rod のみの cDNA) (図 1 A) を導入した Adenovirus vector 作製した．
2. 作製したウイルスを培養細胞に感染させ目的のウイルスであることを免疫染色および western blotting (図 1 B) を行い確認した．
3. 作製したウイルスを Mdx mouse の前脛骨筋に感染させそれぞれの局在を検討した．
4. 作製したウイルスを Mdx mouse の海馬に感染させそれぞれの局在を検討し
(図 2)，PSD-95 の抗体と二重染色を行った．
5. dystrophin がシナプス後膜においてどのような蛋白と結合しているか調べるため dystrophin の抗体を用いて免疫沈降を行った．(図 3)

骨格筋においては，mini-dystrophin は主に細胞膜に局在し，また N 末端のみの変異体は細胞質，N 末端と rod のみの変異体では細胞膜と細胞質両方に局在が認められた．

中枢神経 (海馬)においては mini-dystrophin のみが細胞膜に沿って dot 状に発現し，N 末端のみおよび N 末端と rod のみの変異体では神経細胞の細胞質に均一に発現が認められた．mini-dystrophin で認められた細胞膜に沿った dot 状の発現領域がシナプス後膜と一致するか PSD-95 と二重染色を施行した結果，発現領域がほぼ一致することが確できた．

さらに dystrophin の抗体を用いた免疫沈降を行った結果，β-dystroglycan，syntrophin とともにシナプス後膜に存在する PSD-95 や学習や長期記憶と関連する glutamate receptor (NMDAR1，GluR2)が沈降することを確認した．

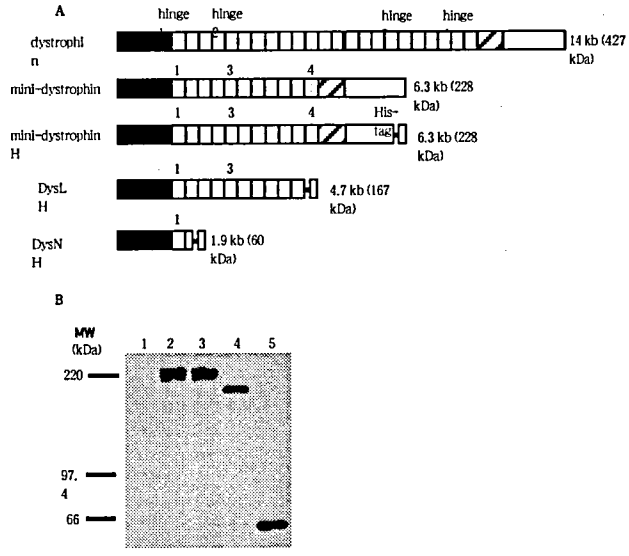


図 1

A: full-length dystrophin , mini-dystrophin および今回作製した deletion mutant cDNA の構造
mini-dystrophin H : mini-dystrophin の C 末端領域に Histidine tag を導入した cDNA, DysLH : C 末端領域と D domain を欠損させた cDNA, DysNH : rod domain 以下を欠損させた cDNA
black box : N 末端領域, open box : rod domain, dotted box : hinge segment , the dashed line: D domain の一部, large open box : C 末端領域

B: Western blotting による発現確認
Lane 1 :control, lane 2 : mini-dystrophin, lane 3 : mini-dystrophin H, lane 4 : DysLH, lane 5 : DysNH
各々が予想された分子量の蛋白を発現していることを確認した。

* 熊本大学医学部附属病院神経内科

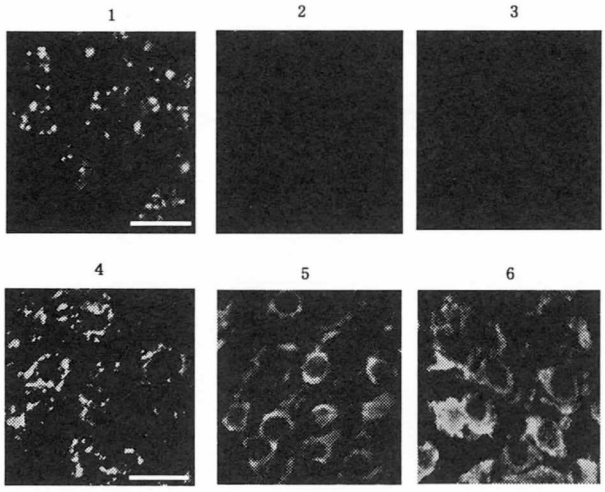


図2
control mouse および作製した adenovirus vector を感染させた mdx mouse の海馬における蛍光免疫染色
1: control mouse, 2: control mouse 一次抗体 (-), 3 : mdx mouse, 4 : mini-dystrophin, 5 : DysLH, 6 : DysNH Bar : 20 μm control mouse と mini-dystrophin を発現させた場合のみ細胞膜に沿った dot 状の染色像が認められた。

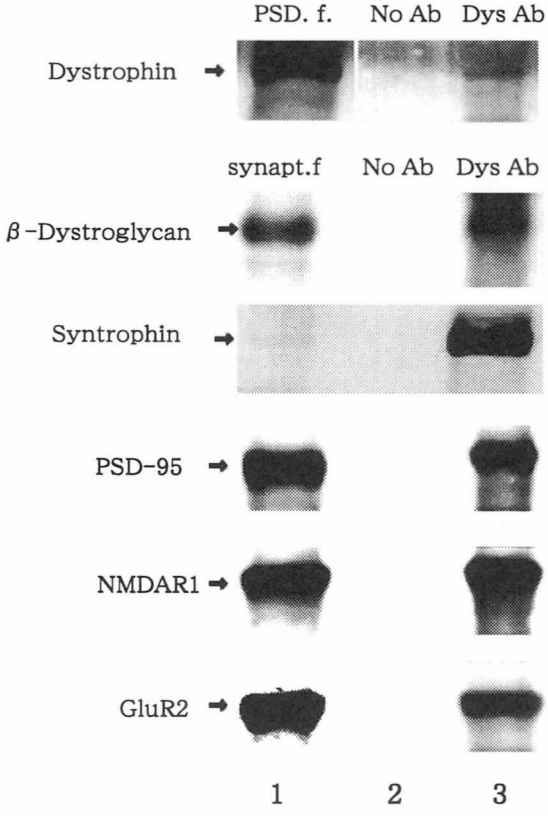


図3 dystrophin 抗体を用いた免疫沈降
lane 1: synaptosome fraction, lane 2 : 一次抗体（-）, lane 3 : 一 次抗体（+）

考　察

dystrophin は，骨格筋以外に中枢神経のシナプス後膜にも豊富に存在することが分かっているがその機能はまだ不明である．我々は，まず dystrophin のシナプス後膜への局在に dystrophin の N 末端領域，rod 領域，C 末端領域のどの領域が最も重要な役割を担っているか検討するため mini-dystrophin cDNA の C 末端から deletion させた cDNA を Adenovirus vector に導入し Mdx mouse の中枢神経（海馬）に発現させ発現部位の比較検討を行った．その結果，C 末端領域を欠損させた欠失変異体ではシナプス後膜へ限局した発現を呈することなく細胞質に均一に発現することを確認した．最近，dystrophin の遠位部（C 末端領域）が DMD 患者の mental retardation と特に関連しているとの報告がある 1)2)3)．今回，我々の実験結果は，dystrophin の遠位部の重要性を組織学的に示したものである．さらに，dystrophin の抗体を用いた免疫沈降を行った結果，PSD-95 や glutamate receptor が共沈することを確認した．この知見は，dystrophin が学習や長期記憶と何らかの関連性を有することを示唆するものである．

今後の展望

今後はさらに PSD-95 や glutamate receptor (NMDAR1, GluR2)の抗体を用いて dystrophin がこれらの蛋白と結合しているか確認する必要がある．また，培養細胞(COS7, PC12 等）に今回作製した 4 種類 Adenovirus vector と PSD-95 および glutamate receptor を共発現させそれぞれの組織学的検討と免疫沈降を施行することにより中枢神経において dystrophin がどの蛋白と結合しているか詳細に検討する予定である．併せて，Mdx mouse brain の slice culture に今回作製した 4 種類 Adenovirus vector を感染させ電気生理学的検討（LTP, LTD）を行う予定である．

文　献

1) Sylvie Tuffery, Uwe lenk, Roland G. Robert, Christine Coubes, Jacques Demaille, and Mireille Claustres : Protein Truncation Test: Analysis of Two Novel Point Mutations at the Carboxy-Terminus of the Human Dystrophin Gene Associated With Mental Retardation Human Mutation 6: 126-135 , 1995.
2) Uwe Lenk, komrad Oexle, Thomas voit, Ulrike Ancker, Karl-Anton Hellner, Astrid speer and Christoph Hubner : A cystein 3340 substitution in the dystroglycan-binding domain of dystrophin associated with Duchenne muscular dystrophy,mental retardation and absence of ERG b-wave. Hum Mol Gen 5(7): 973-975, 1996.
3) N Felisari, G Martinelli Boneschi, F Bardoni, A Sironi, M Comi, GP Robotti, M Turconi, AC Lai, M Corrao, G Bresolin : Loss of Dp140 dystrophin isoform and intellectual impairment in Duchenne dystrophy. Neurology 55(4): 559-64, 2000.

Mdx マウスの骨格筋浸潤細胞の flow cytometry

栗 原 照 幸*

研究協力者 藤 岡 俊 樹* 岸 雅 彦* 根 本 博*

目 的

Dystrophin 欠損から骨格筋崩壊に至る過程は未だ不明確である．Mdx マウス [1,2]骨格筋内にみられる浸潤細胞の種類を，flow cytometry (FACS)を応用して分析した．

方 法

生後 4 週の mdx マウスの骨格筋から，濃度勾配法により単核細胞分画を分離し，FACSCalibur（3 カラー）で解析した．同時に採取した末梢血と脾を対照とした．

結 果

骨格筋内からは，他の部分とは異なった細胞群が分離された．その内容は，CD11b-CD3-CD25+, CD3+CD25+, CD3+CD4-CD45RB+, TCR β-CD3+CD25+等であった．CD25 は活性化した T および B リンパ球に発現するとされ，また CD45RB は B リンパ球や細胞障害性リンパ球，ヘルパー T 細胞の一部などに発現していると考えられている．したがって，mdx マウス骨格筋内には活性化した B リンパ球が特異的にみられる可能性がある．さらに，γδT 細胞の比率が多く，その多くが CD25 陽性であり免疫学的に活性化していると考えられた．

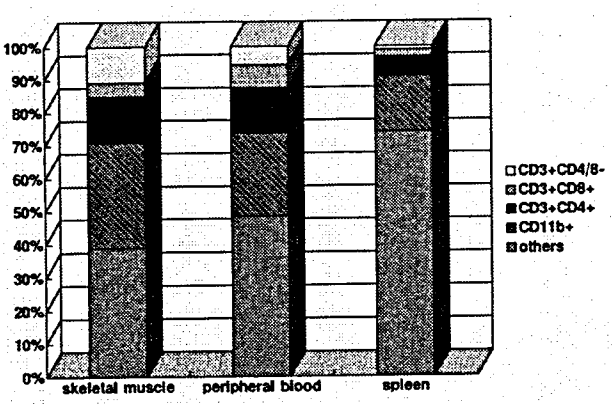


図 1 骨格筋から分離した単核細胞分画内での CD3 陽性細胞と CD11b 陽性細胞の割合．

濃度勾配法で分離した細胞の中で，CD45 (leukocyte common antigen; LCA)が陽性な細胞について，CD3 と CD11b の発現を flow cytometry にて検討した．更に，CD3 陽性細胞群のなかで CD4 と CD8 陽性細胞，CD4CD8 双方が陰性の細胞が占める割り合いについて検討した結果とあわせて示す．CD11b 陽性細胞が占める割合は骨格筋内において，他の組織よりも高い．骨格筋内の CD4CD8 double negative な T 細胞が多いのも目立つ．

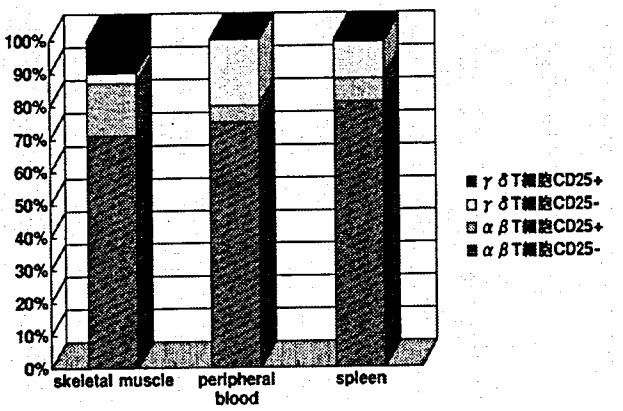


図 2 骨格筋内の T 細胞の分類．

リンパ球の形態的特徴を有する細胞のなかで CD 3 が陽性である細胞を選び，T 細胞受容体β鎖と CD25 の発現について解析した．CD3+TCRβ-細胞をγδT 細胞とみなした．骨格筋内では活性化マーカー CD25 が陽性の T 細胞が他の組織内よりも多い傾向があり，活性化したγδT 細胞も多い傾向がある．

考 察

これらの結果から，mdx マウスの骨格筋障害の過程に免疫学的な機序が関与していることが明らかになった．また，分離した骨格筋内浸潤細胞に対する FACS 分析は有用であった．

研究の意義

本研究で、dystrophin の欠損している mdx マウスでは、活性化したγδT 細胞が特異的に見られるので、骨格筋障害の機序に免疫が関与していると考えられ、筋ジストロフィーにおいても今後の展望として骨格筋内浸潤細胞の免疫学的検索及びその結果に基づく治療開発が必要と考える。

参考文献

1) Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, et al:X-chromosome-linked muscular dystrophy(mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA, 81:1189-1192, 1984.

2) Kurihara T, Kishi M, Saito M, et al : Electrical myotonia and cataract in X-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. J Neurol Sci 99: 83-92, 1990.

* 東邦大学医学部第四内科

ヒト染色体断片導入法による筋ジストロフィーモデルマウスの作出

花 岡 和 則*

研究協力者　富 塚 一 磨** 黒 岩 義 己** 押 村 光 雄***

目　的

Duchenne 型(DMD)および Becker 型筋ジストロフィー(BMD)の原因遺伝子が X 染色体短腕にあるジストロフィンとよばれる遺伝子であることが明らかにされてから筋ジストロフィーの研究は飛躍的に進展した．しかし，ジストロフィンの生理機能や筋ジストロフィーの発症期序には依然不明な点が多く，有効な治療法も全く開発されていないのが現状である．

ジストロフィン遺伝子は全長 2.3MB にも及ぶ巨大な遺伝子であり，このような巨大な遺伝子を通常の遺伝子操作により細胞内に導入することは.ベクターに組み込む遺伝子サイズの制約によりきわめて困難である．本研究は，ミクロセル融合法を用いてヒト染色体の断片を細胞に直接導入するという新しい遺伝子導入法を応用して，筋ジストロフィーモデル動物の作成や遺伝子治療のための基本技術の確立を目標とするものである．

方法と結果

1) ヒト染色体断片のマウス ES 細胞への移入およびキメラマウスの作成

ネオマイシン耐性遺伝子を transfect したヒト由来培養細胞株 HFL-1 をマウス A9 細胞と融合した後，コルセミドおよびサイトカラシン B 処理によりミクロセル化し，マウス A9 細胞に移入した．これらの細胞約 300 株を PCR でスクリーニングし，ヒト X 染色体断片を含む細胞株 F17 を得た．この細胞株を再度ミクロセル化し，マウス ES 細胞株 TT2-F に移入し，通常の方法でキメラマウスを作成した（図 1).

未分化な ES 細胞では，ジストロフィン遺伝子を含むヒト X 染色体断片が安定に保持されていることが確認できたが，キメラマウスでは，これらの染色体は著しく不安定であり発生の過程で多くは消失することが判明した．その原因は不明であるが，X 染色体不活性化と関連していることが示唆された．

2) ジストロフィン遺伝子領域のヒト人工染色体 HAC SC20 への転座

上記の結果に基づき，ジストロフィン遺伝子領域だけを，ヒトおよびマウスの細胞で安定性が確認されているヒト人工染色体 HAC SC20 に転座させ，それを ES 細胞に導入することを計画した．方法の概要を図 2 に示す．インターネット上で公開されている塩基配列をもとに，二つのベクターを作成した．一つはジストロフィン遺伝子座（DMD)より約 2Mb の位置にあると報告されている GK 遺伝子座からテロメア側を相同組み換えにより切断するためのベクター（Telomere truncation vector)であり，もう一つは DMD 近傍セントロメア側にある TCTE1L 遺伝子座で切断して HAC SC20 に転座させるために，TCTE1L 遺伝子座に LoxP 配列を挿入するためのベクターである．相同組み換えの効率を高めるために，ミクロセル法でヒト X 染色体断片を移入したトリ DT40 細胞株を作成し，これらの細胞にベクターを作用させた．現在までに得られた結果は以下の通り．

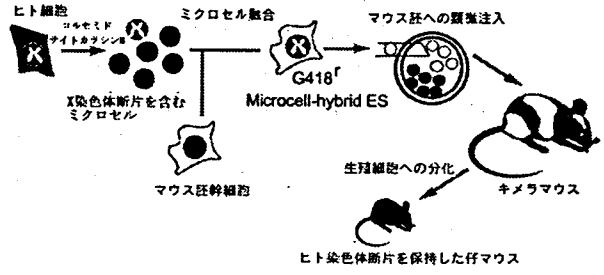


図 1　ミクロセル融合法によるヒト X 染色体断片のマウスへの導入

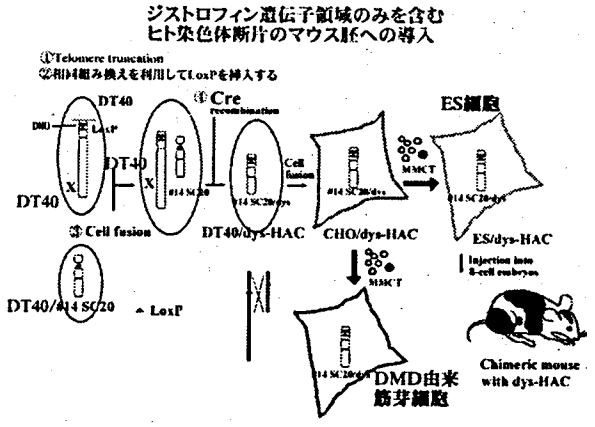


図 2　ジストロフィン遺伝子領域が転座した人工染色体の作成およびその応用

a) Telomere truncation

Telomere truncation ベクターを導入した DT40 細胞株からピューロマイシン選択により約 200 株をクローニン

* 北里大学理学部分子発生学講座
** キリンビール医薬探索研
*** 鳥取大学医学部

グした．うち 100 株について PCR でスクリーニングし，11 株で相同組み換えが生じていることを確認した．さらに FISH 解析により実際にテロメア側が切断されていることを染色体レベルで確認した（図 3）．

b) LoxP 配列の挿入

次いで，TCTE1L 遺伝子座に LoxP 配列を挿入するためのベクターを導入した．ピューロマイシン選択で得た 100 株の細胞株について PCR でスクリーニングし，30 株で相同組み換えが生じていることを確認した．FISH 解析で loxP 配列が挿入されていることを染色体レベルで確認した（図 3）．

c) HAC SC20 を保持した DT40 細胞株との細胞融合

b)で得られた，DMD 遺伝子テロメア側で truncate されセントロメア側に LoxP 配列が挿入された X 染色体を保持した DT40 細胞株と HAC SC20 を保持した DT40 細胞株を PEG を用いて融合した．選択培養で得られたクローン 100 株を PCR でスクリーニングし，19 株で両者の染色体が存在していることを確認した．現在，ジストロフィン遺伝子領域のみを転座した HAC SC20 をもつ細胞株を得るために Cre recombinase 遺伝子を作用させている段階である．

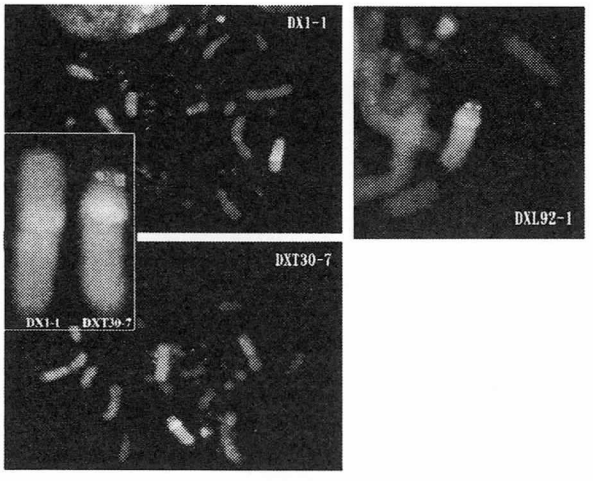


図 3　染色体操作過程の FISH による解析
DX1-1　ミクロセル融合法によりヒト由来 HFL-1 細胞株から分離した X 染色体断片　DXT30-7　Telomere truncation により DMD 遺伝子座よりテロメア側を切断した X 染色体断片（末端のシグナルはピューロマイシン遺伝子の存在を示す）
DXL92-1　さらに LoxP 配列を相同組み換えにより挿入した X 染色体断片（シグナルは LoxP 配列の存在を示す）

考　　察

現在までの研究により，ヒト X 染色体断片より DMD 領域だけを安定なヒト人工染色体 HAC SC20 に転座させる実験がほぼ完成した．今後，この染色体を ES 細胞に導入し，キメラマウスを作成する予定である．HAC SC20 は，生殖系列への伝達も確認されているので mdx マウスと交配することによりジストロフィン遺伝子領域だけがヒト化されたマウスを作成することが可能になる．同様な操作を DMD 患者由来の X 染色体を用いて行うことにより究極的な疾患モデル系を構築できると期待される．

ヒトジストロフィン遺伝子が転座した HAC SC20 は，DMD の遺伝子治療のための染色体ベクターにもなり得る．現在，DMD 患者由来筋細胞に導入してその発現を解析するための準備を進めている．本研究で用いられた手法は，導入する遺伝子サイズに制限がなくゲノム自体を導入することができる点に特徴があり，今後，この方向の研究をさらに進めていきたいと考えている．

研究の意義

本研究は，最近の遺伝子操作技術，胚操作技術の発展やゲノムプロジェクトの進展を背景に，ヒト染色体を直接操作して DMD の疾患モデルマウス作成や遺伝子治療ベクターの開発に発展させる試みであり，その意義は大きいと考える．

文　　献

Tomizuka K, et al: Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice.Nat Genet 16 :133-143, 1997.

Ⅲ. 福山型およびその他の筋ジストロフィー

福山型先天性筋ジストロフィー遺伝子産物の機能解析と表現型・遺伝子型の研究

戸田達史*

研究協力者 小林千浩* 佐々木淳子* 立川雅司*
鹿野博亀* 谷口妃代美* 堀江正人**
近藤万里** 武田聖** 石川欽也***
仲山賢一**** Thomas Voit***** Haluk Topaloglu******
今村道博******* 不二門尚******** 美崎佳寿代*********
寺島俊雄********* 吉田有人********** 萬谷博**********
遠藤玉夫**********

緒言

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は，重症の筋ジストロフィー病変に小多脳回を基本とする脳奇形および眼病変を伴う常染色体劣性遺伝疾患であり，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．

FCMD 遺伝子の翻訳産物は 461 アミノ酸残基からなる推定分子量 53.7 kDa のタンパク質であり，fukutin と命名された．大部分の FCMD 患者では fukutin 遺伝子の 3' 非翻訳領域にレトロトランスポゾン挿入変異が認められ，それ以外の変異を両アレルに持つ症例は知られておらず，この場合は胚致死となることが考えられる．

一方，muscle-eye-brain 病(サンタヴオリ病，MEB)，Walker-Warburg 症候群は，先天性筋ジストロフィーに II 型滑脳症と，眼奇形を伴う常染色体劣性疾患であり，福山型もあわせてこれら 3 疾患は病変部位，症状とも非常に似ており類縁疾患とされており，同じメカニズムにより発症すると考えられている．また O-mannose 型糖鎖は哺乳類においては，脳，神経，骨格筋の限られた糖タンパク質でのみ認められており，その 1 つとして α-dystroglycan があり，その糖鎖により基底膜の laminina2 と結合していることがわかっている．

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．

* 大阪大学院医ゲノム機能分野
** 大塚製薬大塚 GEN 研究所
*** 東京医科歯科大学神経内科
**** 産業技術総合研究所
***** Univ. of Essen
****** Hacettepe Children's Hospital
******* 国立精神・神経センター神経研究所
******** 大阪大学院医眼科・感覚機能形成学
********* 神戸大学院医第一解剖
********** キリンビール基盤技術研究所
********** 東京都老人総合研究所糖鎖生物学部門

結果と考察

(1) fukutin 遺伝子の脳における発現の検討

脳病変への関与を検討するために FCMD 遺伝子の脳における発現を解析した．ノーザン解析においては，胎児組織，成人脳各部位で，同程度 FCMD 遺伝子の発現が確認された．RT-PCR でも，胎生早期から成人まで発現に大きな差は認められず，FCMD 患者において発現の著明な低下が認められた．

in situ hybridization では，胎児脳で神経前駆細胞を含む発生過程の全ての神経細胞と Cajal-Retzius 細胞に発現が見られ，成人脳でも神経細胞に発現が継続して認められた．小脳のプルキンエ細胞，顆粒細胞にも発現していた．glia limitans-基底膜複合体には発現を認めず，分子層，白質のグリア細胞にも発現を認めなかった． FCMD 胎児脳では，正常部では弱く発現する細胞を比較的連続的に認め，病変部では著明に発現が低下していた．

FCMD 胎児，成人の病理所見の検討により，病変部で glia limitans-基底膜に破れがあり，この破れが病変の遠因であり，fukutin はアストロサイトが主な役割を担う基底膜に関与するのではないかと考えられている．しかしながら，今回のデータは発生過程から成人まで，神経細胞に発現が認められた．すなわち基底膜と接していないニューロンで発現が見られており，フクチン蛋白質が神経細胞の遊走自体に関与する可能性や，ニューロンで産生され分泌され基底膜の形成に関与する可能性もある．

(2) マウス FCMD 遺伝子の単離とノックアウトマウスの解析

マウス Fcmd 遺伝子は，翻訳領域において核酸レベルで 87.5%，また，アミノ酸レベルでは 89.6%と，ヒト FCMD 遺伝子に高い相同性を示した．

ジーンターゲッティングにより作製された Fcmd 遺伝子の F1 ヘテロ欠損マウスは，見かけ上は正常であり，また，繁殖可能であった．この F1 ヘテロ欠損マウス間の交配により得られる F2 離乳マウスの genotyping を行ったところ，ワイルドタイプマウス：ヘテロ欠損マウス：ホモ

欠損マウス＝35：62：0 であり，ホモ変異マウスが胎生致死であることが明らかとなった．さらに，F2 マウス胚の genotype を調べた結果，8.5 日胚，9.5 日胚，10.5 日胚，13.5 日胚で，ワイルドタイプマウス胚：ヘテロ欠損マウス胚：ホモ欠損マウス胚が，それぞれ 8：13：2，24：34：2，2：7：0，14：27：0 であった．

Fcmd 遺伝子のホモ欠損マウス（null allele）は胎生 8.5 以前に死亡することが明らかとなり，Fcmd 遺伝子がマウスの胚発生に必須であることが示唆された．これらの事実は，ヒト FCMD 遺伝子にノンセンス点変異をホモで持つ患者が，これまでのところ見つかっていない疫学的事実と合致するものである．

（3）fukutin の機能についての検討

fukutin のアミノ酸配列，FCMD 患者の脳・筋組織における病理像（基底膜の破れ，メロシンの染色性の低下）などから考えられる，fukutin の細胞外基質に結合する可能性を調べるため，タイプ IV コラーゲン，フィブロネクチン，メロシンを含むラミニン三種の各細胞外基質タンパク質と，fukutin の全長および部分配列を発現させた組み換えタンパク質を用いてブロットオーバーレイ法により結合の有無をみたが，fukutin はこれらのどの細胞外基質タンパク質とも結合しなかった．

Aravind らは，fukutin の配列に出芽酵母，線虫，およびいくつかの種のバクテリアに保存されたドメイン G[TS]hhGhhxxxxhhxaxxDxD があり，これら一連のタンパク質（fukutin タンパク質ファミリー）は細胞表面の糖鎖修飾に携わっていると考えられると報告した．患者および正常コントロールのリンパ球を用いて構成タンパク質の糖鎖修飾を DIG グリカン検出法を用いて調べたところ，Triton X-100 分画で高分子量側に患者で反応の薄くなっているバンドがみられた．正常コントロールと FCMD 患者とで糖鎖修飾の異なっているタンパク質があることが示唆された．

（4）fukutin 欠損細胞キメラマウスの病態解析

成体における fukutin の機能解明，ならびに FCMD 病態モデルとしての利用を目的として，fukutin ホモ欠損型 ES 細胞に由来するキメラマウスを作製した．

fukutin 欠損細胞の占める割合が高いことが毛色から予想されるキメラマウスでは，出生後の体重増加が小さく，一部の個体は離乳後に死亡した．生存したキメラマウスは筋力低下，運動失調様行動を呈した．骨格筋では筋線維の大小不同，間質の増大，壊死および再生像が観察され，免疫組織染色により α-dystroglycan 発現低下が認められた．大脳では左右半球の癒合，大脳皮質および海馬の構造異常が見られ，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していた（**図 1**）．小脳では小葉間ならびに小葉-下丘間の癒合，顆粒層の構築異常が認められた．脳表ラミニンの assembly も異常であった．眼では眼球の奇形的形成，角膜の混濁および水晶体との癒合，網膜剥離と層構造異常が認められ，網膜電位は消失していた．毛色によるキメラ率と各組織のキメラ率は測定できた範囲では比較的よく一致していた．

fukutin は骨格筋の機能維持や脳，眼の正常な発生に不可欠であることが示唆された．これらのキメラマウスは，中枢神経系，眼および骨格筋の異常を併発する疾患(FCMD，muscle-eye-brain 病，Walker-Warburg 症候群)の発症機構を解明し，さらには治療法を開発するためのモデルとして有用であると思われる．

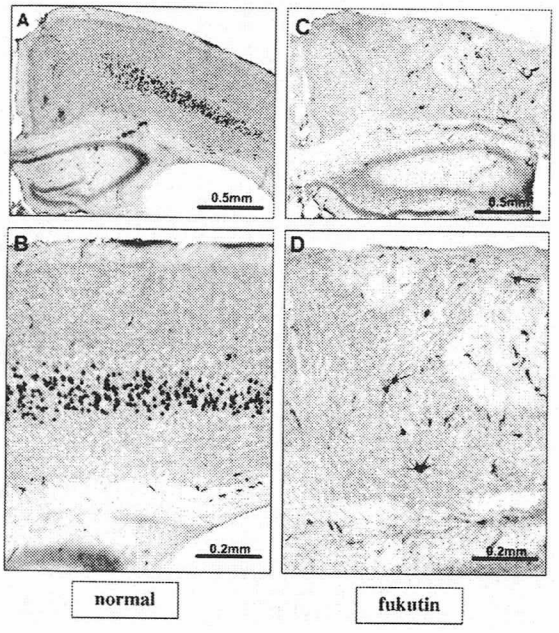


図 1　fukutin 欠損細胞キメラマウスの大脳皮質第 V 層ニューロンの HRP による逆行性標識．
層構造が乱れ第 V 層ニューロンも正常の位置に存在しない．大脳半球の癒合も認められる．

（5）MEB 病原因遺伝子の同定とその意義

O-mannose に GlcNAc を付加する新規の糖転移酵素，UDP-N-acetylglucosamine: protein O-linked mannose β1,2-N-acetylglucosaminyltransferase(POMGnT1) の遺伝子をクローニングし，本遺伝子が MEB 病の原因遺伝子であることを同定した．

POMGnT1 は 660 アミノ酸からなるⅡ型の膜タンパク質で，N-型糖鎖の生合成に関わる糖転移酵素 β-3-D-mannoside β-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I(GnT-I) と 23.2%相同であった．POMGnT1 を HEK293T 細胞に発現させると POMGnT 活性は約 100 倍増大し，一方 GnT-I 活性は検出されなかった．本遺伝子は 1p33-34 にマップされ，MEB 病原因遺伝子の存在領域 1cM の中に存在した．そこで MEB 病患者において本遺伝子を解析したところ 6 例の症例で 6 種の変異を見出した．

3 例の splicing donor site 変異のホモ(2 例: IVS17+1G>T, 1 例: IVS17+1G>A)，1 例のミスセンス変異のホモ(1743G>A, Ser550Asn)，1 例の 1 塩基欠失によるフレームシフト変異のホモ(1813delC)，1 例のミスセンス変異(1572C>G, Pro493Arg)と 1 塩基欠失(1970delG)によるフレームシフト変異の複合ヘテロであった（**図 2**）．変異

遺伝子産物の酵素活性は最も多く見られた変異を調べたところ著しく低下していた．α-dystroglycan はその O-mannose 型糖鎖により，基底膜のラミニンα2 鎖と結合していることがわかっているが，本酵素の target として MEB 骨格筋ではα-dystroglycan が選択的に欠損していた（図３）．以上より POMGnT1 糖転移酵素遺伝子は MEB 病の原因遺伝子であり，哺乳類の O-mannose 型糖鎖が筋および神経で重要な働きを果たしていることが考えられる．また本遺伝子では FCMD の原因の fukutin 遺伝子の 3'UTR の挿入変異のような特殊な変異ではなく単純な点突然変異が見られたことから，フィンランドに限らず日本を含む世界各国にも MEB 患者がいるはずであると考えられる．筋ジストロフィーの原因遺伝子として糖鎖転移酵素が同定され，実際に患者で変異が確認されたのは初めてのことになる．

MEB 病の他に，最近 myodystrophy mouse の原因が Large という putative な糖転移酵素であることが報告された．さらに FCMD の原因である fukutin も糖鎖修飾に関わる酵素と推測されており，またごく最近，ある型の先天性筋ジストロフィーの原因が fukutin と相同性のある FKRP という糖鎖修飾酵素と考えられるタンパク質であることが報告された．これらすべての疾患においてα-dystroglycan になんらかの異常が見られている．以上より，筋ジスや neuronal migration disorder の 1 つの発症メカニズムとして「糖鎖修飾の異常」を提唱した．酵素であるのでジストロフィンなどの純粋な構造蛋白と違って治療的アプローチも行いやすいのではないか，と考えられる．

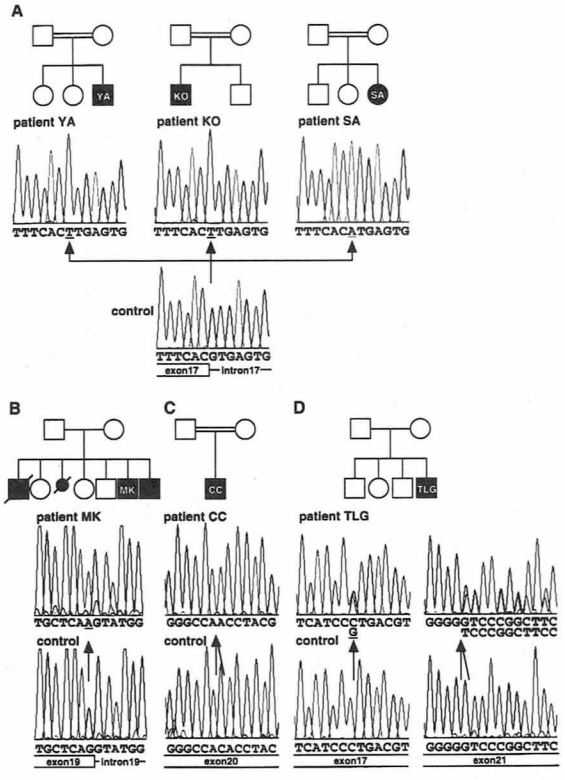


図２　MEB 病患者における UDP-N-acetylglucosamine: protein O-linked mannose β1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1)遺伝子の６種類の変異．

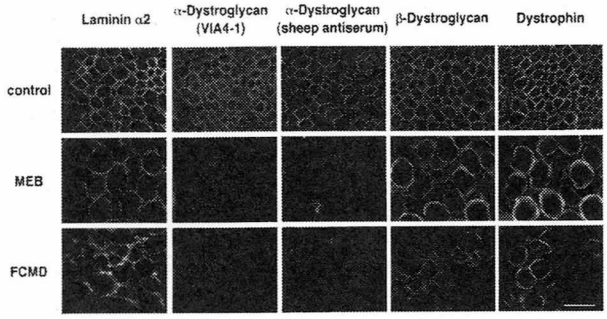


図３　MEB 骨格筋におけるα-dystroglycan の選択的欠損．FCMD と同様の所見．本酵素の糖鎖修飾の target の１つとしてα-dystroglycan が考えられる．

文　献

1) Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, Sasaki J, Kumagai T, Koide H, Saito K, Osawa M, Nakamura Y, Toda T : Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). Hum Mol Genet 8:2303-2309, 1999

2) Sasaki J, Ishikawa K, Kobayashi K, Kondo-Iida E, Fukayama M, Mizusawa H, Takashima S, Sakakihara Y, Nakamura Y, Toda T : Neuronal expression of the fukutin gene. Hum Mol Genet 9:3083-3090, 2000

3) Colombo R, Bignamini AA, Carobene A, Sasaki J, Tachikawa M, Kobayashi K, Toda T : Age and origin of the FCMD 3 -untranslated-region retrotransposal insertion mutation causing Fukuyama-type congenital muscular dystrophy in Japanese population. Hum Genet 107:559-567, 2000

4) Kobayashi K, Sasaki J, Kondo-Iida E, Fukuda Y, Kinoshita M, Sunada Y, Nakamura Y, Toda T : Structural organization, complete genomic sequences, and mutational analyses of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. FEBS Lett 489:192-196, 2001

5) Yoshida A, Kobayashi K, Manya 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 : Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a novel glycosyltransferase, POMGnT1. Dev Cell 1:717-724, 2001

筋ジストロフィーの分子遺伝学的研究と臨床への応用
(1)福山型筋ジストロフィーの臨床と遺伝子変異の関連の検討
(2)福山型筋ジストロフィーの中枢神経系病変の形成機序—神経病理学的検討

斎藤 加代子*

(1)研究協力者 近藤 恵里* 池谷 紀代子* 河北 有規子*
大澤 真木子*
(2)研究協力者 山本 智子** 小林 槙雄**

目的

福山型筋ジストロフィー(FCMD)の臨床病態の解明のために，その臨床型と遺伝子型の関連の解析，剖検例における神経病理学的検討を行った．

(1) 福山型筋ジストロフィーの臨床と遺伝子変異の関連の検討

方法

遺伝子検査を受けた FCMD 患者のうち東京女子医科大学小児科にて診察または主治医へのアンケート調査に回答があった 117 例において，以下の検討を行った．(1) FCMD 遺伝子検査：対象家系の DNA にてハプロタイプ解析を行い，創始者変異のヘテロ接合を確認した例について，FCMD 遺伝子の翻訳領域を直接塩基配列決定法にて解析した．(2)遺伝子変異を認めた例において，①運動機能獲得および喪失年齢，②死亡年齢，③creatine kinase (CK)値の経年的推移，④津守式発達検査，⑤眼所見，⑥けいれん，⑦MRI 所見について検討した．

結果

(1)創始者変異（F 群）は 94 例，exon3 における C250T/Arg47Stop の nonsense 変異（N 群）は 14 例，exon 5 における A626G/His172Arg の missense 変異（M5 群）は 1 例，exon 6 における T859G/Cys250Gly の missense 変異（M6 群）は 2 例に認めた．6 例では翻訳領域に変異を見いだせなかった．

(2)運動機能獲得年齢は，F 群では定頚獲得なし（レベル 0）が 94 例中 2 例（2%）であったが，N 群では 14 例中 8 例（57%），M6 群では 2 例中 1 例であった．座位獲得（レベル 2）年齢は N 群で 2y10m±1y5m であり，F 群 1y1m±7m より有意に遅かった($p<0.0001$)．M5 群の 1 例では 1y0m，M6 群の 1 例で 1y3m であった．N 群ではレベル 3 以上を獲得した例はなかった．独歩可能例は 16 例であり，全例 F 群であった．座位喪失年齢は F 群（16 例）12y7m±3y8m，N 群（1 例）7y0m，定頚喪失年齢は F 群 14y8m±4y5m，N 群（1 例）11y3m であった．②死亡年齢は F 群（6 例）15y5m±9y2m，N 群（2 例）1y4m±2m，M6 群（1 例）2y11m であった．③運動機能障害の進展に並行して CK 値は推移しているが，変異との関係は見いだせなかった．④発達テストでは F 群では N 群より DQ，探索・操作，社会性，生活・習慣，言語面において有意に高い結果であった($p<0.0001$)．⑤眼所見は F 群では N 群より軽く，Walker-Warburg 症候群や Muscle-eye-brain 病類似の所見は N 群や M6 群で認められた．⑥有熱性または無熱性けいれんは F 群の 45 例中 29 例 (64%)，N 群の 7 例中 5 例 (71%)に見られ 2 群間の有意差はなかった．⑦MRI 所見では N 群で厚脳回などの皮質形成障害の程度が重度であった．

考察

FCMD において，創始者ハプロタイプをホモ接合性に示す例の臨床像は軽症または典型的であり，創始者ハプロタイプを一方の染色体だけに示す例は重症であることを報告した [1]．本研究においては，FCMD 症例の遺伝子変異と臨床の関連の解析を行った．F 群は N 群より臨床的に軽症であり，M5 群はその中間的な臨床像であった．M6 群は N 群と同レベルの重症度であった．M6 群は missense 変異ではあるが，システインは S-S 結合をもつ重要なアミノ酸であること，N 群では fukutin 蛋白が量的に少ないことが症状の重症化の理由として考えられる．従って，これら FCMD の臨床像と遺伝子変異の関連の解析の結果，fukutin 蛋白の欠損の程度が FCMD 患児の臨床像と予後を決める可能性を示唆した．

(2) 福山型筋ジストロフィーの中枢神経系病変の形成機序—神経病理学的検討

FCMD の中枢神経系病変として，胎児例では glia limitans (GL) の部分的な欠損が観察される．検索した症例においては，胎齢 17-18 週までの大脳の構築はほぼ正常で，一部に微小な GL の欠損がみられるにとどまり，神経細胞の遊走そのものは大きくは障害されていない可能性が考えられる [2]．小児，成人例では大脳，小脳の小多脳回を主体とした病変がみられるが，胎児～成人例いずれの時期においても，脳病変は表層部分に優位で，深

* 東京女子医科大学小児科
** 東京女子医科大学第一病理

部構造は比較的よく保たれている．脊髄病変は通常軽微であるが，重症例では GL の欠損を伴う場合がある．これらの所見から，GL の破綻が FCMD 中枢神経系病変の形成に大きく関与していると考えられる．

FCMD 胎児～成人例の GL では，電子顕微鏡的に基底膜やアストロサイト足突起の細胞膜の構造異常が認められ [3]，免疫組織化学的に基底膜関連蛋白の merosin やβ-dystroglycan の二次的な発現の低下が観察された [4]．同様の異常は骨格筋においても認められている．また，小児，成人例のアストロサイトには GFAP 染色で細胞突起に形態変化がみられることが多く，酸化ストレス終末産物の carboxymethyl lysine の蓄積等も認められた．また，GFAP と fukutin 蛋白の二重染色でアストロサイトでの fukutin の発現が確認された．これらの所見から基底膜の異常が GL の破綻の原因となり，その背景にアストロサイトの関与が考えられる．Fukutin 蛋白は基底膜構成に関連した機能を有していると思われるが，未熟な神経細胞等での発現からは，他の機能を有する可能性も考えられる．

FCMD 脳病変は，分布や程度に症例内でも差異がみられる等，多様である．この多様性の少なくとも一部は fukutin の発現との関連で説明可能と思われる．例として，FCMD 小児，成人例の大脳では表面に強い gliosis を伴うが，コントロール小児，成人例の大脳では GL を形成する I 層のアストロサイトに fukutin の発現がみられることから，発現低下を補うための代償性の gliosis と考えられる．一方，コントロール小児，成人の小脳では GL を形成する Bergmann glia に fukutin の発現はなく，FCMD 例でも小脳においては小児，成人期には十分な GL が形成されると考えられる．しかしながら，単純には説明のつかない病変もみられ，脳病変の解明には発達過程での種々の要因も考慮する必要があると考えられる．

今後の展望

FCMD において遺伝子変異と臨床像の検討の結果，fukutin 蛋白の量が臨床像を決める可能性が考えられた．分子遺伝学，生化学レベルにおける解析によって治療への応用の可能性が開かれると考えられる．一方，FCMD の中枢神経病変の形成機序として，Fukutin 蛋白の生合成障害が，アストロサイトの変化をどのように引き起こすのか解析を発展させることが必要である．

文　献

1) Saito K, Osawa M, Wang Zhi-ping, Ikeya K, Fukuyama Y, Kondo-Iida E, Toda T, Ohashi H, Kurosawa K, Wakai S, Kaneko K : Haplotype-phenotype correlation in Fukuyama congenital muscular dystrophy. Am J Med Genet 92: 184-190, 2000.

2) Yamamoto T, Toyoda C, Kobayashi M, Kondo E, Saito K, Osawa M : Pial-glial barrier abnormalities in fetuses with Fukuyama congenital muscular dystrophy. Brain Dev 19:35-42, 1997

3) Yamamoto T, Shibata N, Kanazawa M, Kobayashi M, Komori T, Kondo E, Saito K, Osawa M : Early ultrastructural changes in the central nervous system in Fukuyama congenital muscular dystrophy. Ultrastruct Pathol 21:355-360, 1997

4) Yamamoto T, Shibata N, Kanazawa M, Kobayashi M, Komori T, Ikeya K, Kondo E, Saito K, Osawa M : Localization of laminin subunits in the central nervous system in Fukuyama congenital muscular dystrophy: an immunohistochemical investigation. Acta Neuropathol 94:173-179, 1997

Ullrich病の臨床病理学的検討

南　　成　祐[*,**]

研究協力者　石川晴美[**]　村山恵子[***]　館澤　薫[**]
杉江和馬[**]　西野一三[**]　埜中征哉[*,**]

目　的

Ullrich病は，生下時からの，近位関節の拘縮と遠位関節の過伸展を主徴とする疾患である．しかし，その疾患概念を疑う研究者も存在した．最近，その原因がcollagen VI遺伝子の劣性変異であることが報告された[1,2]．そこで，当施設でUllrich病と診断されていた9症例を対象として，collagen VIの免疫組織学的検討および遺伝子変異解析を行うとともに，臨床症状および筋病理所見の検討を行った．

方法と結果

1．免疫組織化学および電子顕微鏡観察

抗collagen VIモノクローナル抗体を用いて発色法による染色を行った．その結果，正常には筋鞘膜と間質にcollagen VIが存在していた．Ullrich病の9症例のうち，1例でcollagen VIの完全欠損，8例に筋鞘膜における染色性の低下（部分欠損）を認めた（図1）．また，基底膜コラーゲンであるcollagen IVのポリクローナル抗体との蛍光二重染色を行ったところ，正常には筋鞘膜にcollagen IVとVIが共局在するのに対し，Ullrich病の部分欠損例では，collagen IVは筋鞘膜に存在するものの，collagen VIは筋鞘膜に局在せず，むしろ間質にぼろ状の染色性を認めた．電子顕微鏡による観察では基底膜そのものには異常を認めなかった．

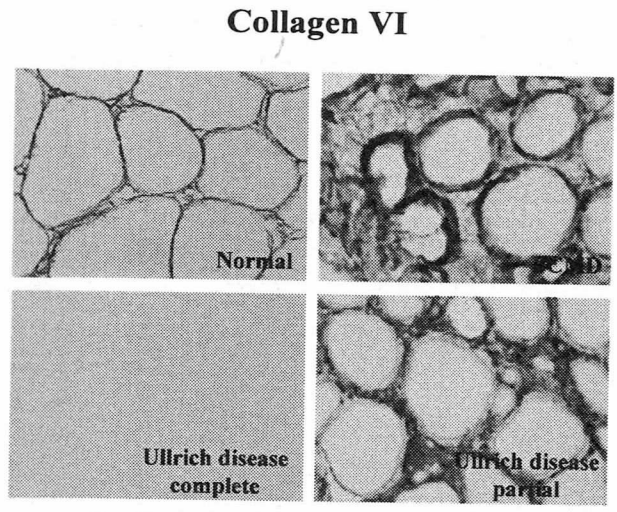


図1　抗collagen VI抗体による免疫組織化学染色
正常筋（左上）では筋鞘膜と間質に繊維状の染色性を認める．Ullrich病の完全欠損例（左下）では全く染色性が認められない．部分欠損例（右下）では筋鞘膜での染色性が低下し，むしろ間質にぼろ状の染色性が認められる．福山型先天性筋ジストロフィー（右上）ではUllrich病と同様に筋線維の円形化が認められるが，collagen VIの染色性は筋鞘膜，間質とも保たれており，非常に対照的である．

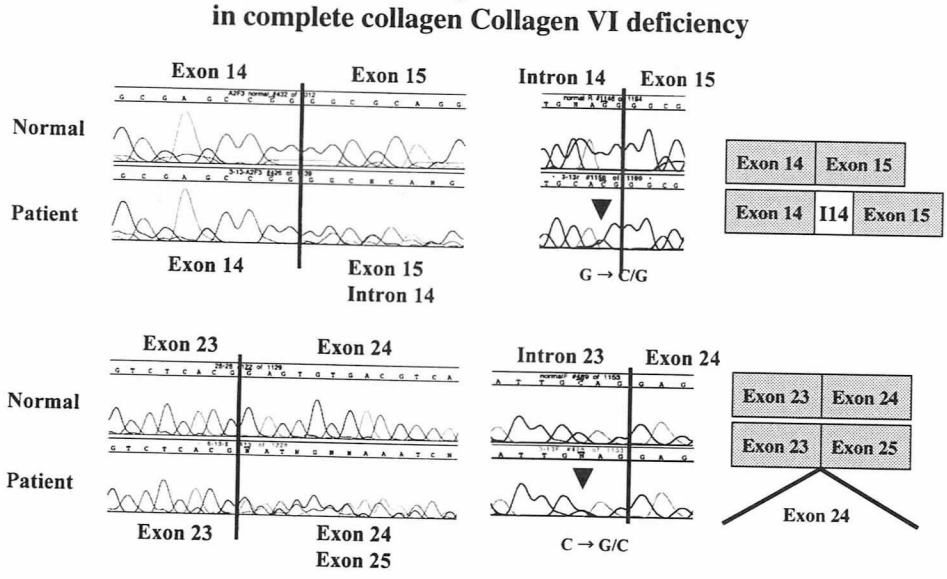


図2　完全欠損例におけるCOL6A2遺伝子変異

* 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
*** 心身障害児総合医療療育センター

2. 遺伝子変異解析

Collagen VI分子は3つのサブユニットからなるヘテロトリマーで，COL6A1，COL6A2，COL6A3によりコードされている．このうち，これまでに遺伝子変異が報告されているCOL6A2についてRT-PCR増幅し，direct sequence解析を行った．異常を認めた場合，ゲノムDNAの解析も行った．その結果，完全欠損例で，2箇所のスプライシング異常（intron 14の挿入と，exon 24のスキップ）を認めた（図2）．部分欠損例については，今のところ変異と断定できる変化は見つかっていない．

3. 臨床症状および筋病理

全症例に生下時からの障害を認め，近位関節の拘縮と遠位関節の過伸展を認めた．知能は正常で，高率に踵骨の突出，高口蓋，斜頚を認めた．CK値は正常～軽微上昇であった．

筋病理学的には，大小不同と線維化を全ての症例に認め，壊死・再生線維を認める筋ジストロフィー様変化を7例に，残る2例には再生線維のみを伴うミオパチー様変化を認めた．また，type 1 fiber predominanceを5例に，fiber typeの分布異常を3例に認めた．しかし，疾患特異的な所見は存在しなかった．

考　　察

文献的にも，また我々の完全欠損例においても，collagen VIの遺伝子異常が見つかったことから，Ullrich病という疾患単位が存在することは確実である．本研究の最も重要な成果は，完全欠損以外に，部分欠損（基底膜への局在異常？）が存在し，むしろ症例数が多いことを明らかにしたことである．両者の間で，臨床症状や筋病理所見に目立った違いを認めるわけではなかった．部分欠損例についてはまだ確実に病因といえる遺伝子変異は見つかっていないが，残るCOL6A1とCOL6A3の検索をさらに進める必要がある．

今後の展望

Collagen VIは多くの組織の間質に存在する太さ3 nmの微細線維の本体であると言われている．骨格筋組織における機能は明らかではない．しかし，collagen IVとの二重染色より，筋基底膜と間質を結合する重要な因子であることが示唆され，今後この視点から研究を進めることでUllrich病の特異な病態の発生機序が，解明されるものと期待される．

文　　献

1) Camacho Vanegas O, Bertini E, Zhang RZ, Petrini S, Minosse C, Sabatelli P, Giusti B, Chu ML, Pepe G: Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. Proc Natl Acad Sci USA 98: 7516-21, 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: 261-5, 2001.

眼咽頭筋ジストロフィー及び類縁疾患の遺伝子型/表現型の研究

― 抗 PABP2 抗体による免疫組織化学的検討を加えて ―

内野　誠*

研究協力者　宇山英一郎*　日野洋健*　前田寧*
後藤加奈子**　荒畑喜一**

目　的

眼咽頭筋ジストロフィー(oculopharyngeal muscular dystrophy: OPMD)は, (1)40 歳以降の発症, (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), (4)poly(A)- binding protein 2 (PABP2)を原因遺伝子とする常染色体優性の遺伝性筋疾患である[1]. 発病者の遺伝子型は, (GCG)6/(GCG)8-13 であり, French-Canadian と Bukhara Jews では(GCG)9 の創始者効果を認める. 私共はこれまでに,本邦にも OPMD の確実な家系が複数存在し,欧米白人家系と異なり創始者効果は認めないことを報告した[2].また,常染色体劣性遺伝性の眼咽頭遠位型ミオパチー(autosomal recessive oculopharyngodistal myopathy : AR-OPDM)では電顕的に ITFI は陰性であることを初めて証明し, OPMD とは病因が異なる可能性を指摘した[3].

今回は, OPMD の病理指標である ITFI と変異 PABP2 との関連性を明らかにするため, まず抗 PABP2 抗体を作製し,OPMD 及び類縁疾患の免疫組織化学的診断への有用性を検討した. さらにその抗体を用い, OPMD 確定例だけでなく, 知見が極めて乏しい類縁疾患の病態・成因解明のため, OPMD に類似した表現型の家系例と孤発例, および新たな AR-OPDM 家系例の表現型/遺伝子型についても検討した.

方法と結果

[1] 抗 PABP2 抗体の作製と免疫組織化学的検討：

上記診断基準(1)-(3)を満たし, PABP2 exon1 の(GCG)n リピートの異常伸長を同定した日本人 OPMD 患者 5 例, 封入体筋炎, 筋緊張性ジストロフィーなどの OPMD 以外の神経筋疾患 14 例, 及び正常対照 3 例の凍結筋切片を用いた. ヒト PABP2 cDNA をもとに正常 C 端部近傍の 22 アミノ酸(TNYNSSRSRFYSGFNSRPRGR)よりなるペプチドを合成し, そのポリクローナル抗体を New Zealand white rabbit を用いて作成した. PABP2 融合蛋白作成には, GST 発現ベクター pGEX-6P を用いた. また, コントロールとして抗 emerin 抗体を用いた二重染色を施行し, 骨格筋を対象にイムノブロット法についても検討した[4].

その結果, 1) 眼咽頭筋ジストロフィー患者では, 用いた抗 PABP2 抗体に対して, 5 例 7 カ所のすべての骨格筋筋鞘核内に, 平均 2%の頻度で陽性に染色される蓄積物を認めた(図 1). モノクローナル抗 emerin 抗体に対しては, 抗 PABP2 陽性の筋線維核を含め, 正常な染色性を呈した. 核以外の細胞質, 筋膜, 血管内皮細胞, 結合組織など筋鞘核以外はすべて陰性であった. 2) 予想に反して, 正常対照 3 例および疾患対照 14 例の筋組織では, 全例筋鞘核内・核外ともにすべて抗 PABP2 抗体に対し, 陰性であった. 3) 骨格筋を対象にイムノブロットを施行したが眼咽頭筋ジストロフィー患者, 疾患対照, 正常対照のいずれにおいても, 陰性であった(表 1)[4].

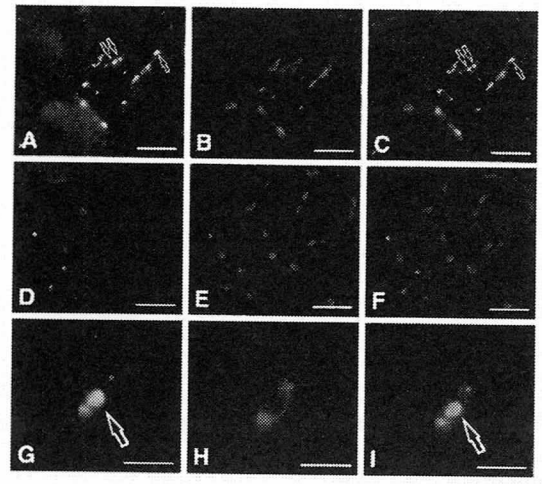


図 1

Cryosections were double immunoreacted for anti-PABP2 rabbit antiserum (green FITC) and anti-emerin monoclonal antibody (red rhodamin). Emerin was used as a specific marker for the inner nuclear membrane (B, E, H). Note the clearly positive green immunostaining of intranuclear aggregates (arrows) in the myonuclei of patients with genetically confirmed OPMD (A, C, G.I). (C) and (I) are double exposures of (A, B) and (G, H), respectively. In contrast, there was no immunostaining of myonuclei for PABP2 in IBM (D, F) or other neuromuscular diseases. (F) is a double exposure of (D) and (E). Coarse yellowish granules in A, D and G are autofluorescent materials in muscle. Pre-absorption of the primary antiserum with synthetic peptide or fusion protein for PABP2 abolished the immunoreaction, and preimmune rabbit serum showed negative staining (data not shown).
Bar=40nm (A-F), 10 μm (G-I).

* 熊本大学医学部附属病院神経内科
** 国立精神・神経センター神経研究所

表 1　眼咽頭筋ジストロフィーと他の神経筋疾患における抗 PABP2 抗体による免疫組織化学的検討

Clinical diagnosis	Age	Sex	Mode of inheritance	Mutation in *PABP2**	Muscle	PABP2 expression
OPMD (Patient 1)	62	F	AD	$(GCG)_{11}$	deltoid	+++
					sternohyoid	+++
					cricopharyngeal	+
OPMD (Patient 2)	47	F	AD	$(GCG)_{11}$	biceps	+
OPMD (Patient 3)	61	F	AD	$(GCG)_{11}$	gastrocnemius	++
OPMD (Patient 4)	81	M	AD	$(GCG)_{9}$	biceps	+++
OPMD (Patient 5)	63	M	Sporadic	$(GCG)_{9}$	gastrocnemius	+++
Distal myopathy with RV	35	M	AR		biceps	-
AR-OPDM	48	M	AR		biceps	-
Duchenne MD	10	M	XR		biceps	-
Becker MD	33	M	XR		quadriceps	-
Facioscapulohumeral MD	18	M	AD		biceps	-
Emery-Dreifuss MD	41	M	XR		quadriceps	-
Myotonic dystrophy	25	M	AD		biceps	-
MELAS	17	M			biceps	-
Nemaline myopahy	20	F	AD		biceps	-
Kennedy-Alter-Sung	45	M	XR		biceps	-
DRPLA	62	M	AD		biceps	-
Polymyositis	76	F			biceps	-
IBM	65	M			gastrocnemius	-
Hyothyroidism	44	F			biceps	-
Normal controls	19	F			deltoideus	-
	66	M			gastrocnemius	-
	61	F			biceps	-

Nuclear immunoreactivity in muscle fibers; positive with frequency with +++: 2.5-1.5%; ++, 1.5-0.5%; +, <0.5%: -, negative. OPMD: oculopharyngeal muscular dystrophy, AD: autosomal dominant, AR: autosomal recessive, XR: X-linked recessive, RV: rimmed vacuole, OPDM: oculopharyngodistal myopathy, MD: muscular dystrophy, MELAS: mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes.

*50 Japanese control individuals had $(GCG)_{9}/(GCG)_{9}$

[2]　眼咽頭筋ジストロフィー及び類縁疾患の表現型/遺伝子型の検討：

上記診断基準(1)-(3)を満たし，(GCG)n の異常伸長を同定した OPMD 確定 7 家系 45 例，(1)(2)を満たす OPMD 疑い 5 家系 7 例，及び常染色体劣性の AR-OPDM 2 家系 4 例について家系調査，診察，採血，筋電図，筋生検，筋 CT，流体力学的検査，VTR 咽頭食道造影，誤嚥シンチ，PABP2 解析，及び抗 PABP2 抗体の免疫組織化学染色を可能な限り施行した．

その結果，

1) OPMD の(GCG)n は，n=8: 1 家系，n=9: 2 家系，n=10: 1 家系，n= 11: 3 家系で，うち n=9 の 1 家系は孤発例であった．リピート数と重症度との相関は，n=9-11 間では明らかではなかった．全例外眼筋麻痺は軽微で，遠位筋優位の筋力低下は認めなかった．

2) OPMD 疑い 7 例中 N 家系 2 同胞例は，臨床的には OPMD に酷似していたが，PABP2 変異はなく，抗 PABP2 抗体の染色性も陰性で，電顕上 ITFI も認めなかった．その他の 5 例はいずれも PABP2 変異/抗 PABP2 抗体染色は陰性であり，全例孤発例であった．

3) 常染色体劣性の AR-OPDM の 2 家系はいずれも抗 PABP2 抗体染色は陰性で，うち 1 家系は PABP2 変異も陰性であった．

4) 筋生検上，全例ミトコンドリア病を示唆する所見は認めなかった (表 2).

表 2　日本における眼咽頭筋ジストロフィーの表現型／遺伝型の検討

遺伝子型	本籍	年齢	性	眼瞼下垂	嚥下障害	筋力低下	CK	抗PABP2染色
A. 眼咽頭筋ジストロフィー								
(GCG)8	東京	81	男	++ (76)	++ (70)	四肢近位	65	+
(GCG)9	大分	63	男	+++ (60)	+++ (48)	四肢近位	908	+
(GCG)9	宮城	58	女	++ (55)	+ (57)	四肢近位	104	+
(GCG)10	静岡	51	女	++ (48)	++ (40)	四肢近位	215	未検
		49	男	++ (45)	+++ (40)	四肢近位	805	未検
(GCG)11	熊本	62	女	+++ (52)	++ (59)	上肢近位	69	+
		66	女	+++ (48)	++(55)	上肢近位	80	未検
	熊本	61	女	+++ (40)	++(42)	四肢近位	408	+
	大分	55	女	+++ (44)	++ (47)	上肢近位	35	未検
B. 眼咽頭筋ジストロフィー疑い例								
家系例(両親は非血縁)								
(GCG)6	熊本	68	男	+++(45)*	+++(55)	近位4-5	104	-
(GCG)6	熊本	65	女	+++(48)*	++(60)	近位4-5	110	未検
孤発例(両親は非血縁)								
(GCG)6	熊本	70	男	++ (45)*	+ (65)	正常	54	-
(GCG)6	熊本	51	女	++(44)	+ (49)	近位4-5	115	-
(GCG)6	熊本	60	女	++(55)*	++(58)	近位3-4	114	-
(GCG)6	長崎	44	男	± (44)	++(41)	近位4-5	997	-
(GCG)6	東京	74	女	+++(44)*	++(63)	近位4-5	135	未検

*眼瞼下垂に加えて明らかな外眼筋麻痺を認めた例

考　　察

OPMD の原因遺伝子である PABP2 は，mRNA 前駆体 3'端修飾反応に関わる核内因子の 1 つであり，遊離 3'-OH 末端の poly(A)付加反応を刺激し，Poly(A)尾部を伸長させることで mRNA の安定性に関与すると推定されている．各組織にユビキタスに発現しているが，mRNA は骨格筋において特に豊富である．ヒト PABP2 は 6002 bp で，7 つの exon から構成され，306 アミノ酸からなる蛋白をコードしている．正常なアリルでは，N 端側 1285 番～1292 番目に GCG の 3 塩基配列(アラニンをコード)が 6 回連続しているが，OPMD 患者では，全例これがヘテロに 8～13 回伸長している．すなわち，発病者の遺伝子型は(GCG)6/(GCG)8～13 となるが，これまで表現型/遺伝子型の検討は不十分であった．

今回私共が検討した OPMD の 7 家系の結果に，他の施設で検討された 3 家系を加えて表現型/遺伝型を検討すると，日本人 10 家系のうち，(GCG)リピート数が 8 回では晩発・軽症例であり，13 回では四肢遠位筋まで侵される重症例であったが，9～11 回ではリピート数と重症度の相関は明らかではなかった．本邦で最初に同定された熊本と静岡の家系では，初発症状と血清 CK の相違から異なる遺伝子型を想定したが，実際各々 11 回と 10 回であり，ハプロタイプも全く異なっていた．しかし，他の家系では必ずしも同様ではなく，(GCG)リピートが 9～11 回の家系間で初発症状と血清 CK の相違から遺伝子型を想定するのは困難と思われる．今回検討した OPMD の 7 家系 45 例には，明らかな外眼筋麻痺を呈した例はなかったのに対し，OPMD 様の表現型を呈するも PABP2 変異がなかった 7 例では，5 例に中等度～高度の

外眼筋麻痺を認めたことから，眼瞼下垂が高度な割に外眼筋麻痺は目立たない点が,OPMD の臨床診断の鑑別点になると思われた.

また，孤発例では PABP2 変異は認めなかった．今回の検討で特に注目されるのは， OPMD に表現型が酷似した同胞例である．遺伝形式は，常染色体劣性の可能性が高いが，常染色体優性も完全には否定できない．この家系例のように，OPMD と表現型が酷似するも，PABP2 変異と外径 8.5nm の骨格筋筋鞘核内封入体を欠く家系例が存在することが初めて立証された．また，AR-OPDM の 2 家系では，PABP2 変異や抗 PABP2 抗体に染色される核はないことが初めて証明された．このことから,AR-OPDM は OPMD と異なる病因を有する別の疾患であることが示唆された.

さらに今回，私共は OPMD に特異的な核内封入体と変異 PABP2 の関連性を想定し，メチル化を受けるアルギニンが集中する PABP2 の C 端側 271 番～291 番目のアミノ酸から合成したペプチドに対する抗 PABP2 ポリクローナル抗体を作製し，免疫組織化学的検討を試みた．その結果，OPMD 患者の骨格筋筋線維核内のみに強陽性を示す異常蓄積物質が約 2%存在することが明らかになった．他の研究グループも別の抗体を用いて，核内封入体が構成蛋白として PABP2 を含有していることを証明した [5]．これで，OPMD に特異的な核内封入体(ITFI)は変異 PABP2 が構成蛋白の 1 つであり，これが筋細胞死に深く関与していることが示唆される．ただ，今回作製した抗 PABP2 抗体は，融合蛋白の吸収試験でもその特異性は確実であり，骨格筋の核内に染色性陽性の正常な PABP2 蛋白が局在していると推定されたが，結果は陰性であった．その理由としては，1) 正常筋核内 PABP2 蛋白の濃度が極めて低いか，代謝回転が非常に早く，(GCG)n リピートの延長にコードされる変異蛋白では，正常型の蛋白の量が増えている可能性，2) 今回偶然にも，変異 PABP2 蛋白のみを認識する特異抗体ができてしまった可能性，3) 正常 PABP2 蛋白の立体構造上，親水性の部分が 蛋白の folding によって通常内側に包まれた形になっている(推定)のが，変異蛋白の場合は，それがくずれるので染色性がでてくるという可能性などが想定される．しかし，恐らく今回の合成ペプチドが偶然にも，メチル化を受けるアルギニンが集中する PABP2 の C 端側のものであったことが主要な原因と思われる．本抗体はその分，OPMD の診断に有用性を十分発揮している.

今後の展望

次年度以降は，OPMD のモデル動物を作製し，本症の発症機序に係わる PABP2 以外の修飾遺伝子を検索すると同時に，筋細胞死の機序と障害筋の選択性の原因を解明し，有効な治療法の開発を目指したい.

文　献

1) Brais B, Bouchard J-P, Xie Y-G, et al : Short expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. Nature Genet 18: 164-167, 1998.
2) Uyama E, Nohira O, Chateau D, Tokunaga M, Uchino M, Okabe T, Ando M, Tome FMS : Oculopharyngeal muscular dystrophy in two unrelated Japanese families. Neurology 46: 773-778, 1996.
3) Uyama E, Uchino M, Chateau D, Tome FMS : Autosomal recessive oculopharyngodistal myopathy in light of distal myopathy with rimmed vacuoles and occulopharyngeal muscular dystrophy. Neuromusc Disord 8:119-125, 1998.
4) Uyama E, Tsukahara T, Goto K, et al : Nuclear accumulation of expanded PABP2 gene product in oculopharyngeal muscular dystrophy. Muscle Nerve 2000; 23:1549-1554.
5) Calado A, Tome FMS, Brais B, et al : Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. Hum Mol Genet 9;2321-2328, 2000.

Rimmed vacuole 型遠位型ミオパチーの臨床・分子遺伝学的研究

田 中 恵 子*

研究協力者 新 井 亜 希* 五十嵐 修 一* 小 林 央*
池 内 健* 辻 省 次*

目 的

rimmed vacuole型遠位型ミオパチー（DMRV）は常染色体劣性遺伝性疾患で，筋細胞での多数のrimmed vacuole形成と，特異な筋障害分布を特徴とする原因不明の疾患である．本症の診断法の確立およびrimmed vacuole形成を介する筋変性機序を解明し，その治療法を確立するため，最初のステップとして病因遺伝子を同定することを目的とし，これまでに私達はDMRVと診断した家系の連鎖解析の結果から，原因遺伝子の候補領域はD9S1868からD9S1787の12.3cMに存在することを報告してきた[1]．更に候補領域の絞り込みを行うため連鎖不均衡マッピングを行うとともに，候補領域内に存在する遺伝子について原因遺伝子である可能性を検討してきた[2]．本年になり，allelic diseaseと考えられるhereditary inclusion body myopathy（HIBM）の原因遺伝子として，UDP-N acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase（GNE）geneが同定されたことから本邦DMRV症例のGNE gene における変異についても検索し，原因遺伝子としての可能性を検討した．これによりDMRVとHIBMの臨床遺伝学的特徴について考察し，創始者効果についても検討した．

方法と結果

本症7家系を用い，GNE geneの翻訳領域の直接塩基配列決定を行った．その結果，今回解析した家系ではHIBMで報告された変異は見られず，全ての家系においてGNE gene exon10でvalineからleucineへ置換する新たな変異（V572L）を認めた．連鎖不平衡について検討するため，GNE gene周辺に新たなmicrosatellite markerを作製し，ハプロタイプ解析を行ったところ，共通するハプロタイプを認め，強い創始者効果を認めた．（図1，表）

考 察

今回，近親婚を有す，日本人家系のDMRVではkinase domainに共通する，新たなmissense mutation（V572L）を見出した．一方，HIBM症例では原著の症例に代表されるMiddle Eastern JewsではkinasedomainにhomozygousなmissensemutationがMutationが報告されているが，異なるethnic groupsに由来すると思われる症例では，copound heterozygoteの形で異なるmutationが報告されている．

Phenotype-genotype correlationについては今後の検討が必要だが，typical DMRVとMiddle Eastern JewsのtypicalHIBMでは臨床経過がやや異なっている可能性が指摘できる．DMRV症例の発症年齢は15-40才（平均26才）で，前脛骨筋の筋力低下で気付かれる例が多く，発症からnon-ambulantになるまでが平均12年であると報告されているが，Middle Eastern Jewsのtypical HIBMでは，non-ambulantになるまで経過がDMRVよりもやや緩徐であるとされている．Indiaのnon-Jewsに由来する症例ではmutationの部位もvariableであるとともにtypical HIBMと比べるとかなり筋障害分布も広範であり，quadricepsにも軽度のinvolvementがあると報告されている．こういった臨床像の差異を今後genotypeを検索することによって更に検討していく必要があると思われる．

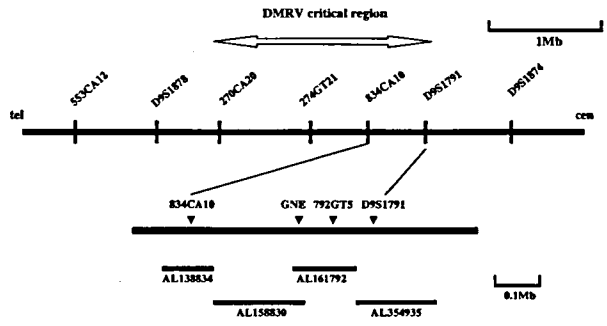


図1 DMRVlocusのphysical map

表 ハプロタイプ解析．ワク内はDMRV遺伝子とcosegregateするハプロタイプ．

Pedigree	553CA12	D9S1878	270CA20	274GT21	834CA10	792GT15	D9S1791	D9S1874
262	4 4	3 12	3 7	5 3	4 4	3 3	11 8	7 4
484	1	13	7	2	4	3	9	4
544	4	13	7	2	4	3		2
753	4	3	7	2	4	3	9	4
1548	1	11	7	2	4	3	9	4
2180	4 4	3 13	5 5	4 4	4 4	9 9	12 12	4 8
2181	4 4	12 3	7 2	4 4	4 4	3 3	9 9	2 2

Haplotypes cosegregating with DMRV are boxed.

* 新潟大学脳研究所神経内科

今後の展望

今後，より多数の家系についてGNE geneの解析を行い，本遺伝子変異が本症に共通な特異的なものであるかを確認する必要がある．さらに，本遺伝子の臓器発現パターンや細胞内局在を検討し，本遺伝子のノックアウト操作や変異遺伝子の培養細胞導入などにより，本遺伝子がコードする分子の細胞内機能を明らかにし，変異遺伝子が細胞に及ぼす影響を検討する．これによりDMRVの発症機序およびrimmed vacuole 形成を介する筋細胞傷害機序を明らかにしたい．

発表論文

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) Asaka T, Ikeuchi K, Okino S et al: Homozygosity and linkage disequilibrium mapping of atosomal recessive distal myoapthy (Nonaka distal myopathy). J Hum Genet; in press

変異デスミンL385Pと相互作用するタンパク質の検索

田 中 恵 子*

研究協力者 大 川 聡** 菅 原 正 伯** 豊 島 至**

目 的

中間径フィラメントに属するデスミンの異常蓄積の見られるミオパチー（desmin-related myopathy）のうちデスミンの遺伝子変異によって生じるものをデスミンミオパチーと呼ぶ（図1）．現在までエクソン3の欠失，ロッド1Bの7アミノ酸欠失，9種のミスセンス変異が知られており，ミスセンス変異はロッドドメインのC端側に集中していることがわかっている．

私たちはデスミン遺伝子のde novo変異（L385P）によるデスミンミオパチー患者を報告し，このデスミン変異による筋細胞傷害のメカニズムを明らかにすることを目的とした．そしてL385P変異デスミンは細胞内に凝集体を形成し細胞死を引き起こすか否か，細胞死にアポトーシスが関与しているのか，デスミン凝集体を形成するにはデスミンのどの部分が重要か，凝集体が結合してその機能を阻害する可能性のある関連タンパクは何かなどを検討した．

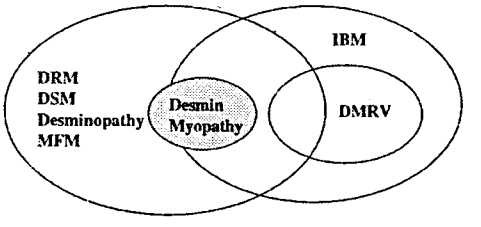
方法と結果

1）22歳時下肢遠位筋の筋力低下，筋萎縮で発症し，23歳時，完全房室ブロックでペースメーカー移植術を受けた患者生検筋の筋蛋白2次元電気泳動を行い，デスミンの著しい増加を認めた．生検筋からDNAを抽出し，デスミン遺伝子を増幅し，直接塩基配列決定法で遺伝子変異を検索した．デスミン遺伝子のExon 6にTからCへのmissense変異（L385P）を見出した．L385P変異は両親には認められず，血液型，血清型，DNA型を用いた親子鑑定の結果にもとづきde novo変異と考えられた．

2）COS-7細胞にgreen florescein protein（GFP）ラベルした部分デスミンを発現させると，正常型では細胞質にびまん性に発現がみられたのに対して，変異型では細胞質に凝集体が形成され，核酸の濃縮，断片化を伴う細胞死が引き起こされた．（図2）

3）長さの異なる正常と変異デスミンコンストラクト（全長，ヘッドからロッド2，ロッド1からテール，ロッド2からテール，ロッド2のみ）を得，GFPとの融合蛋白を，ウズラの心筋初代培養細胞に発現させ，細胞内分布を検討した．正常型デスミン，変異型デスミンとも全長を発現させたときには凝集体形成，細胞死は認められなかった．デスミンは細胞質にびまん性に発現し，その中に線維状の構造がわずかながら認められた．また，核内にも蛍光が認められた．正常型，変異型とも部分デスミンは筋線維の長軸方向に線維状の構造を形成し，一部の細胞ではZ板に集まり，横紋を呈した．変異部分デスミンは細胞質に凝集体を生じ，細胞死を引き起こした．テールドメインの有無は凝集体形成，凝集体の細胞内分布に影響を与えなかった．より短い部分変異デスミンで凝集体を形成した．

4）凝集体形成に関連するデスミン以外のタンパクをYeast-two hybrid法を用いて検索した．ベイトベクターにはデスミンのロッド2後半部のみとロッド2後半部から尾部の変異型，正常型を組み込み，ヒト骨格筋ライブラリーをスクリーニングした．ロッド2のみの変異型で22個，正常型で19個，ロッド2から尾部の変異型で30個，正常型で28個の陽性クローンを得た．まだすべてのクローンの同定は終えていないが，ロッド2変異型に特異的なのはtoroponin T3，carbonic anhydrase，FH1/FH2 domain proteinであった．ロッド2正常型，変異型に共通して，actin α，myomegalin類似タンパク，myosin-binding protein Cが同定された．ロッド2から尾部の変異型で同定を終えたタンパクの中で，正常型でも相互作用が確認されたものはいまのところない．ロッド2から尾部の正常型では，crystallin αBや最近デスミンとの相互作用が証明されたdesmuslinも同定された．変異デスミンは様々な筋タンパクと相互作用することが見いだされた．RFPラベル変異型デスミンロッド2から尾部とGFPラベルmyosin-binding protein CはCOS-7細胞内でco-localization を示した．（図3）



MFM:myofibrillar myopathy, A. Engel, NEJM 1999
DRM:desmin related myopathy, DSM:desmin storage myopathy, Desminopathy, Goebel, Curr Opin Neurol 1997
Desmin myopathy, Dalakas et al., NEJM 2000
IBM:inclusion body myositis/myopathies, DMRV:distal myopathy with rimmed Vacuole, Askanas et al., Inclusion body myositis and myopathies 1998

図1 デスミンミオパチーの関連疾患の中での位置づけ

* 新潟大学脳研究所神経内科
** 秋田大学医学部第一内科

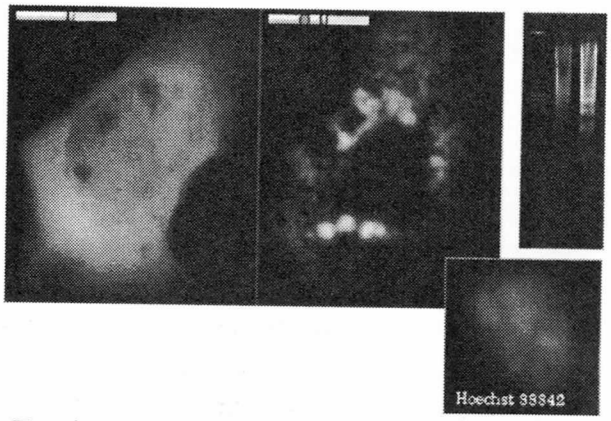


図2　変異型デスミンによって引き起こされるCOS-7の細胞死

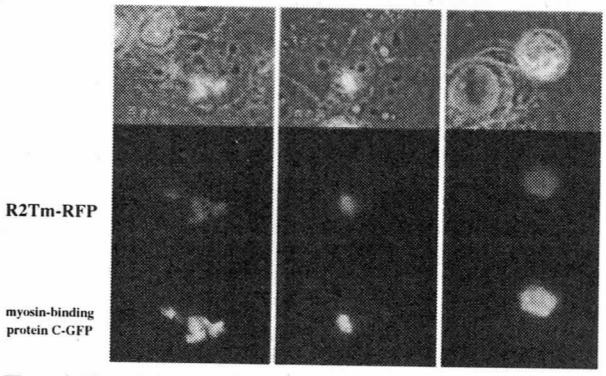


図3　変異型デスミンとミオシン結合プロテインCの二重発現

考　　察

デスミンミオパチーは優性遺伝性疾患で，20から30歳代に発症し，骨格筋傷害は下肢遠位に始まり大腿四頭筋も傷害される．心筋傷害はほぼ必発で，伝導ブロックによる突然死をきたし，後期では心筋症による心不全をきたす．筋生検像はGomori染色で青色細胞質内封入体（cytoplasmic, sarcoplasmic, or spheroid bodies）とrimmed vacuole を特徴とし，電顕ではelectron denseでamorphousな凝集体がみられる．デスミンミオパチーの報告は本例が本邦で最初である．その後も，心筋症の原因としてスクリーニングはされているが，骨格筋傷害での報告はない．

変異デスミンを強制発現させると，非筋細胞においてもアポトーシスを来す点から，デスミンミオパチーはアッセンブリー障害が主因ではなく，変異デスミン凝集体が細胞毒性を示し，細胞死を引き起こす凝集体病と考えられた．

変異型デスミンも筋細胞内で線維状の構造を示し，横紋の形成が認められた．ヘッドドメインを欠く変異デスミンは凝集体を形成し，細胞死を生じたのに対して，ヘッドドメインを有する変異デスミンでは凝集体形成が起こらなかった．中間径フィラメントがどのような分解過程をとるのか不明だが，断片化した変異デスミンが蓄積して形成される凝集体が，細胞毒性を示す可能性が示唆された．

今後の展望または研究の意義

現在，デスミンのプロセッシングに関する検討，4）で得られた関連タンパクの機能解析をすすめている．変異タンパクの蓄積・凝集に伴うアポトーシスは，ポリグルタミン病，アルツハイマー病，パーキンソン病などのコンホメーション病に共通する発症メカニズムの存在を示唆している．筋疾患におけるコンホメーション病としてデスミンミオパチーをとらえて検討することにより，他のコンホメーション病の病態解明，また治療法開発にも寄与することが期待される．

文　　献

Sugawara, M. et al: A novel de novo mutation in the desmin gene causes desmin myopathy with toxic aggregates. Neurology 55: 986-990, 2000.

リソソーム異常を伴う筋疾患の病態解明

西野一三*

研究協力者　山本彩香*　杉江和馬*　石川晴美*
大橋裕子*　南　成祐*　村山久美子*
植松富美枝*　埜中征哉*

目　的

1. Danonらにより「酸性マルターゼが正常なリソソーム性糖原病」として報告された，肥大型心筋症，ミオパチー，精神遅滞を臨床的特徴とするDanon病の原因遺伝子とその分子病態を明らかにする．

2. Danon病と確定した例について，臨床・病理学的特徴を明らかにする．

3. Danon病と同じ病名で報告されている2例の乳児型「酸性マルターゼが正常なリソソーム性糖原病」がDanon病と同じ疾患であるかどうかを検討する．

方法と結果

1. Danon病は，従来よりX連鎖性遺伝が疑われているので，原著例を含む10家系を用いX染色体上のマーカーについて連鎖解析を行った．その候補領域の中で，lysosome-associated membrane protein-2（LAMP-2）に注目し，全オープンリーディングフレームのシークエンスを行った．その結果，全ての発端者でLAMP-2遺伝子上に変異を見い出した（表1）．エクソン6のエクソンスッキピング変異の一例を除いて，すべてナンセンス変異またはフレームシフト変異であった．これらの例では，リソソーム膜貫通ドメインのコード配列を失っていた．興味深いことに，1例で変異はエクソン9bに存在していた．骨格筋のウェスタンブロットおよび免疫染色では，エクソンスッキピング変異の一例を含めて，LAMP-2はほぼ完全に欠損していた．エクソン9bに変異があった例では，ウェスタンブロットにて，LAMP-2aアイソフォームを反映すると思われる極めて薄いバンドを認めた．心筋を調べ得た一例においても，LAMP-2は完全に欠損していた．

2. Danon病と確定した13家系38人の患者（男性20人，女性18人）が対象．発端者は全例で筋生検が施行された．全患者における筋病理学的所見，臨床症状，臨床検査所見について検討を行った（表2）．Danon病の発端者は全例男性で，肥大型心筋症，ミオパチー，知的遅滞が臨床症状の3主徴であった．血清クレアチニンキナーゼ値は全例で上昇していた（平均1570 IU/l）．知的遅滞は約70%に認めたのみが，あっても軽微であった．発端者の母親の大部分が心筋症を示した．発症年齢は，男性患者の多く

表1　見出されたLAMP-2遺伝子変異

患者	人種	エクソン・イントロン	変異	mRNAへの影響
1	日本人	E9b	2塩基欠失*	フレーム・シフト
2	日本人	I6	g5c	E6スキッピング
3	日本人	E4	T440A	ナンセンス変異
4	イタリア人	E8	T974AA	フレーム・シフト
5	アフリカ系アメリカ人	E8	C813G	ナンセンス変異
6	日本人	I5	gla	6塩基挿入
7	アフリカ系アメリカ人	I5	gla	6塩基挿入†
8	アングロ・サクソン	I5	gla	6塩基挿入†
9	日本人	I5/E6境界	10塩基欠失‡	10塩基欠失§
10	ギリシャ系オーストラリア人	E1	G14欠失	フレーム・シフト

エクソン内の変異は大文字，イントロン内の変異は小文字で記した．エクソンの変異は，LAMP-2b cDNA内のヌクレオチドの位置で表している．イントロンの変異は，それぞれのイントロン内でのヌクレオチドの位置を表している．患者7は，Danonらが最初に報告した例．
E：エクソン．I：イントロン．
*第1097番目と1098番目のAAの欠失．
‡I5の3'端における4塩基欠失とE6の5'端における6塩基欠失．
§E6の5'端の10塩基に相当する配列の欠失．
†患者6においてのみ確認．

表2　遺伝学的に診断が確定したDanon病患者の臨床的特徴

	男	女
患者数	20人	18人
診断時年齢（歳）	17±7（20人）	38±12（14人）
発症時期		
乳児期	4人	
幼時期	11人	
10代	5人	
死亡時年齢（歳）	19±6（7人）	40±7（6人）
死因		
心不全	7/7 (100%)	6/6 (100%)
ミオパチー	18/20 (90%)	6/18 (33%)
筋力低下	16/20 (80%)	6/18 (33%)
易疲労性のみ	2/20 (10%)	0/18 (0%)
心筋症	20/20 (100%)	18/18 (100%)
肥大型	16/19 (84%)	2/7 (29%)
拡張型	2/19 (11%)	5/7 (71%)
混合型	1/19 (5%)	
知的遅滞	14/20 (70%)	1/18 (6%)
発達遅滞	3/8 (38%)	
肝腫大	5/14 (36%)	
脾腫大	1/13 (8%)	
足変形	3/8 (38%)	
高CK血症	18/18 (100%)	5/8 (63%)
血清CK値（IU/l）	1574±790（n=18）	
心電図異常	17/17 (100%)	10/10 (100%)
筋電図：筋原性変化	9/9 (100%)	
脳波異常	2/7 (29%)	
母親の発症	14/20 (70%)	6/18 (33%)

* 国立精神・神経センター神経研究所

が10代であるのに対し女性患者では成人期であった．死亡患者の死因は全例心不全であった．肥大型心筋症に対する最も効果的な治療方法は心臓移植であった．筋病理学的には，筋線維内に多数の好塩基性小空胞を認め酸性フォスファターゼ活性が亢進し，空胞壁はアセチルコリンエステラーゼや非特異的エステラーゼの組織化学で陽性に染まり，またジストロフィン，メロシン，サルコグリカンなど筋鞘膜特異的蛋白が存在していた．これらの空胞は電顕的には細胞質崩壊産物やグリコーゲンを含み自己貪食空胞であった．LAMP-2b欠損のみの1家系ではDanon病は発症するものの臨床症状はいずれも軽症であった．

3.【患者1】男児．生直後よりfloppy infantで発達遅滞を認めた．軽度の心肥大．2ヶ月時に筋生検を施行．2歳3ヶ月時，肺炎にて死亡．骨格筋の酸性マルターゼ活性は正常であった．【患者2】男児．新生児期より筋緊張低下．進行性の肥大型心筋症により，生後41日目に死亡．心，骨格筋，肝におけるグリコーゲンは増加していたが，酸性マルターゼ活性は正常であった．光顕ではH&Eで患者1，2ともに空胞を伴う筋線維を多数認めた．免疫染色を行ったところ，患者1，2ともにLAMP-2は欠損していなかった．LAMP-2遺伝子解析では，両例ともに変異は認めなかった．また，患者1では，筋線維の周囲に補体C5b-9の沈着を認めた．電顕では，患者1でX-linked myopathy with excessive autophagy (XMEA)で報告されているのと同様の基底膜の層状化が見られた．

考　　察

1．全例において，null変異またはそれと同等と思われる変異が見いだされ，蛋白レベルにおいてもLAMP-2の欠損が見いだされたことは，原発性のLAMP-2欠損症によりDanon病を発症することを強く示唆している．同時期に，ドイツ・ゲッティンゲン大学のSaftigらのグループにより，LAMP-2ノックアウトマウスが作製され，心筋の肥大に加えて，骨格筋・心筋を含む組織に多数の自己貪食空胞を認めることが報告された．我々の結果とSaftigらの結果を併せて，原発性LAMP-2欠損症がDanon病の原因であると結論づけた．

2．Danon病は，X連鎖性優性遺伝形式をとる疾患で，主に骨格筋・心筋障害を呈する以外に肝臓，血小板，中枢神経障害を伴う全身性疾患であることが再確認された．特に女性患者においても，致死性の心筋症を来す点には，注意が必要である．

3．乳児型「酸性マルターゼが正常なリソソーム性糖原病」はLAMP-2蛋白が存在すること，またLAMP-2遺伝子変異が見いだされなかったことから，Danon病とは異なる疾患であると結論付けた．従って「酸性マルターゼが正常なリソソーム性糖原病」ではなく，乳児型自己貪食空胞性ミオパチー（infantile autophagic vacuolar myopathy）と呼ばれるべきである．特に患者1では補体C5b-9の沈着，基底膜の層状化がみられることからDanon病よりもむしろXMEAに近いことが示唆された．

今後の展望

乳児型のように，Danon病類似の自己貪食空胞を有しながらDanon病ではない例が，今後さらに見いだされると考えられる．今後は，自己貪食空胞性ミオパチー（autophagic vacuolar myopathy）という疾患概念でDanon病，XMEA，乳児型自己貪食空胞性ミオパチーなどの疾患が整理されていくものと思われる（表3）．

表3　自己貪食空胞性ミオパチー

疾患	遺伝形式*	原因遺伝子産物
糖原病II型	AR	Acid maltase
Danon病	XD	LAMP-2
過剰自己貪食を伴うX連鎖性ミオパチー	XR	不明
乳児型自己貪食空胞性ミオパチー	AR?	不明
その他	不明	不明

*AR: 常染色体劣性、XD: X染色体優性、XR: X染色体劣性

研究の意義

従来原因不明であったDanon病が，リソソーム膜タンパクLAMP-2の原発性欠損で起こることを明らかにし，遺伝学的にDanon病との診断が確定した例における臨床・病理学的特徴を明らかにした．また，Danon病の原著で用いられたのと同じ病名で報告されてきた乳児例が，Danon病とは別の疾患であることを明らかにした．一連の我々の研究結果から，自己貪食空胞の出現を主徴とする一連の遺伝性筋疾患が存在することが明らかとなり，自己貪食空胞ミオパチーという疾患概念を初めて提唱した．

文　　献

1）Nishino I, et al: Primary LAMP-2 deficiency causes X-lined vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). Nature 406: 906-910, 2000.

2）Yamamoto A, et al: Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. Neurology 57: 903-905, 2001.

3）Sugie K, et al: Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. Neurology, in press

エメリンに関する形態学的・細胞生物学的研究

依藤　宏*

研究協力者　鹿島　晃*　仁科裕史*
只野　豊*　中田隆博*

目　的

Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーはX染色体性の遺伝形式によるものが核膜内膜の蛋白であるエメリンの変異により，常染色体性のものが核ラミナの構成蛋白であるラミン A/C の変異により起きることが知られているが，これらの蛋白の変異がどうして筋の萎縮，関節の拘縮，心筋の伝導障害につながるのかは明かではない．我々はこの発症機序の手がかりを得るため，①エメリンの全身の種々の器官における細胞レベルの発現量の比較，②哺乳類細胞における核ラミナの構築，③細胞分裂時のエメリンとラミン A，B の挙動の 3 点につき検索を行った．

方法と結果

①エメリンの細胞レベルの発現量の比較

材料としては成熟ラットを用い種々の器官を摘出・細切後，凍結切片を作製した．切片は抗エメリンモノクローン抗体，抗ラミン A/C ヤギポリクローン抗体で二重染色を施し，共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った．

エメリンは皮膚，食道粘膜などの重層扁平上皮や平滑筋，腱細胞などの核に最も強い蛍光を示し，それに次ぐ強度を示したのは骨格筋，膀胱の移行上皮，膵外分泌部導管上皮，口腔の小唾液腺粘液分泌細胞などであった (表 1)．全体としては機械的刺激を受けやすい部位に強い発現を示す傾向があり，このことは間質の線維芽細胞と考えられる細胞についても皮膚，膀胱などでは強い染色を示すのに対し，肝臓や腎臓の間質の細胞はほとんど染まらないことからも支持された．

ラミン A/C との二重染色では，多くの部位でエメリンの蛍光強度はラミン A/C の強度と平行関係を示したが，Raji cell ではエメリン（＋），ラミン A/C（－），血管内皮ではエメリン（±），ラミン A/C（+++）であり，両者の解離が見られた．また染色陽性の同種の細胞でもその二重染色の際の色調は細胞毎に異なり，また 1 つの細胞の核をとっても部位による色調の差も認められるのでエメリンとラミン A/C が厳密に 1：1 の対応関係を示すのではないようである．

表 1　NCL-抗エメリン抗体によるエメリンのラット体内における分布（蛍光抗体法）

＋＋＋～＋＋	重層扁平上皮（皮膚・口腔粘膜・食道粘膜・膣粘膜）及びその下層の結合組織の中の線維芽細胞 平滑筋（血管壁・消化管壁・膀胱壁・気管・子宮・卵管壁） 腱細胞
＋	骨格筋 膀胱移行上皮，膵外分泌部導管上皮，口腔底の小唾液腺粘液分泌細胞
＋～±	下垂体前葉
－	消化管単層円柱上皮（膵外分泌導管上皮を除く），気道多列上皮，甲状腺，副腎，精巣，卵巣，腎臓，中枢神経，肝臓，肺，顎下腺，膵外分泌細胞，汗腺，皮脂腺

蛍光抗体法による各種の器官のエメリン発現量の相対比較．
エメリンは力学的ストレスを受けやすい部位に多く発現している傾向が認められる．ラミン A/C は基本的にはエメリン陽性(＋以上)の部位では陽性．但し，細胞株の Raji cell (Burkitt lymphoma 由来）ではラミン A/C：－，エメリン：＋．血管内皮はエメリン（±），ラミン A/C（+++）；二重染色の際の細胞ごとの色調（平滑筋），1 つの核での部位による色調（腱細胞）も一定しておらず，ラミン A/C とエメリンの量比は細胞種に応じて一定している訳ではない．

②哺乳類細胞における核ラミナの構築

材料には 3T3，3Y1 などの培養細胞及びラット肝臓を用いホモジェナイズ後，粗核分画とし，DNaseI，RNaseA，TritonX-100，高塩濃度処理による抽出を行い低角度回転蒸着法，急速凍結ディープエッチ法，超薄切片法，ネガティブ染色法などにより観察した．一部のサンプルでは抗ラミン A/C ヤギポリクローン抗体，抗ラミン B2 抗体などによる免疫染色を施して観察した．

粗核分画を得るにあたり，Polytron によるホモジェナイズを用いると核膜と核ラミナの間で解離し，核膜孔核膜複合体を観察することはできなかったが，核ラミナは電子顕微鏡的には保たれており，ウエスタンブロッティングでもラミン A/C，B のほかエメリンの一部も核ラミナ分画に検出された．TritonX-100 処理後の核ラミナには 10nm 径のフィラメントは観察されず，急速ディープエッチ法のレプリカ上では約 5nm 径のフィラメントが網工を形成していた．この同じ分画にグリセリンを添加し低角度回転蒸着法で観察すると，核ラミナは約 3～5nm 径の多数の線維に径約 10nm の粒状物が付着した構造を示していた（図 1)．この線維は断片化した核ラミナの辺縁部においては，そのサブユニットと考えられる短い線維に分散していることもあり，この短い線維には Abei らがラミン A/C，B の単分子構造として報告して

* 防衛医科大学校解剖学第二講座

いるものと形，ディメンジョンとも一致するものも認められた．また 場所によってはこれらの短い線維が縦につながったものを見ることができ，in vitro で示されているラミンの head to tail polymer に一致する所見と考えられた．この分画を抗ラミン A/C，抗ラミン B2 で二重染色すると，両者のラベルは互いに混在し，また 10nm 以下の距離でラベルが近接している場所も観察された．

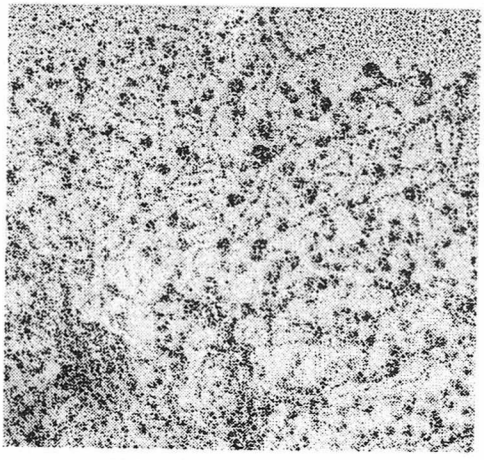


図1 核ラミナ分画の低角度回転蒸着像
核ラミナは 3～5nm 径の細いフィラメントの網工と径約 10nm の球状物からなっている．

③細胞分裂時のエメリンとラミン A，B の挙動に関して

過剰チミジンで同調した HeLa 細胞において抗エメリン，抗ラミン A，B 抗体による免疫ラベルを行った．細胞分裂時前期に核膜が崩壊するとエメリン，ラミン A，ラミン B の染色は細胞質に移行し，その状態は分裂後期になるまで維持される．分裂終期に入り核膜の再構築の頃になると，クロマチンの周囲に染色の凝集が見られ，この際強く染色される輝点も出現するが，これらの部位にはエメリン，ラミン A，ラミン B の 3 者がともに共存し，その強度もほぼ平行することが認められた．(図 2)

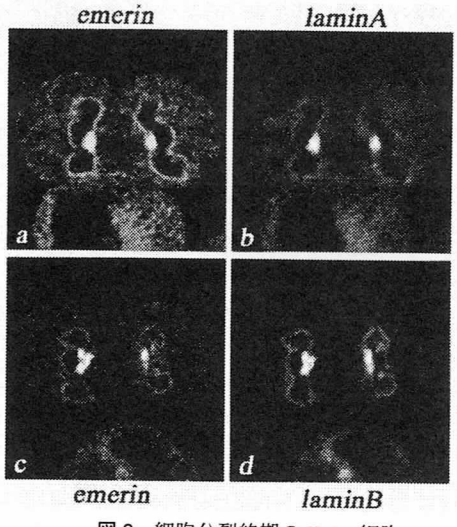


図2 細胞分裂終期の HeLa 細胞
エメリン(a)，ラミン A(b)の二重染色とエメリン(c)，ラミン B(d)の二重染色の共焦点レーザー顕微鏡の写真．エメリン，ラミン A, B の染色はそれぞれ核膜再構築部位において完全に重なる．

考　　察

①エメリンの細胞レベルの体内分布

エメリンは主としてノーザンブロッティングにより ubiquitous な蛋白と言われていたが，細胞レベルで蛋白の存在から見ると発現しているものとしていないものがあることが解った．蛍光抗体法によるエメリンの分布をその染色強度から見ると，機能的刺激を受けやすい部位に強く発現している傾向があり，また核ラミナを形成しているラミン A/C の蛍光強度ともおおよその平行関係が認められた．このことはエメリン，ラミン A/C が外力に対する核の維持に役立っているという仮説を支持するものと考えられる．また主として線維芽細胞からなる間質の細胞では，外力を受けやすい部位でエメリンの発現が強いことは外部環境によってエメリンの発現が調節されている可能性が示唆される．

②核ラミナの構築

核ラミナは核膜を内側から機械的に補強するとともにクロマチンの分布をも決定していることが考えられているが，その構造については Abei らが 1986 年の Nature 誌に発表した 10nm 径の線維が格子状に配列している仮説が広く受け入れられ，多くの細胞生物学の教科書にも引用されている．ところが，このデータは Xenopus 卵という特殊な細胞を材料として研究が行われたものであり，今回我々が哺乳類細胞において検索したのでは 10nm 径の線維は認められず，ラミン dimer を基本単位として細かい網目が形成されており，またラミン A/C とラミン B は互いに混在しながらこの網目を作っていることが示唆された．

③細胞分裂時のエメリンとラミン A，B の挙動

この 3 者の関係を調べたものとして GFP をつけたエメリン，ラミン B 受容体などを強制発現した細胞で観察した結果が提出されていた．それによると核膜内膜蛋白であるエメリンとラミン B 受容体は細胞分裂終期に異なる部位に集積することが示されており，両者を分離する機構を考えねばならなかった．ところが今回我々が強制発現等をおこなっていない細胞で観察するとエメリン，ラミン B（ラミン B 受容体と結合を保つと考えられている)，及びラミン A は細胞分裂の終期に同じ部位に同時期に集積してくることが明らかになり，②に示した両者が電子顕微鏡レベルでも共存することを支持するものと考えられた．

今後の展望

Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーは常染色体性のものは主として優性遺伝するが，このことは将来遺伝子治療を行う際問題になると考えられ，その解明は発症機構の究明とともに重要な課題である．これらの問題，すなわち変異ラミン A/C が正常ラミンに対して何故 dominant negative な作用を持つのか，また核の脆弱化の仮説に立てばエメリン，ラミン A/C の変異がどのよう

に核膜，核ラミナの破綻をもたらすのかを説明する上で，核ラミナの分子構築を明らかにし，in vitro の再構成系を作成することは肝要なことであると考えられる．

参考文献

1) Abei U, et al : The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. Nature 323:560-564, 1986.
2) Haraguchi T, et al : Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. J Cell Sci 113:779-794, 2000.
3) Narita S and Yorifuji H : Centrally nucleated fibers (CNFs) compensate the fragility of myofibers in mdx mouse. NeruoReport 10:3233-3235, 1999.
4) Nakata T, et al : Cytoplasmic γ Actin as a Z -Disc protein. Biochem Biophys Res Comm 286:156-163, 2001.

筋型糖原病の遺伝子診断法の確立及び病態に即した治療法の開発

杉 江 秀 夫[*,**]

研究協力者　伊 藤 政 孝[*,**]　福 田 冬季子[*,**]　杉 江 陽 子[**]

目　的

筋型糖原病（以下GSD）の多くは運動負荷等で容易に筋細胞崩壊を来たし，重症例では横紋筋融解症，腎不全などの合併症を呈する．従って正確な診断のもと医療面で生活指導を行う事は，重篤な合併症を予防する意味で重要である．本研究では日本人のGSDに関して主要な（頻度の多い）病型について遺伝子変異の検索を行い，本症の遺伝子診断法を確立する事を目的としている．またGSDの発症病態に即した有効な治療法を開発し，患者のQOLの改善に寄与する事も本研究の大きな目的である．このため（1）日本におけるGSDの病型頻度の調査（2）頻度の高いGSDの臨床症状，遺伝子変異の検討（3）GSD V型：McArdle病（以下M病）の病態生理に即した治療法の開発，の3点に重点をおき研究を行った．

方法と結果

1）日本におけるGSDの病型頻度の調査

浜松市発達医療総合センターで検索した日本人GSD 98例の病型について分析した．GSD II型（27例），III（29），IV（6），V（26），VII（2），VIII（2），IX（4），PGM（2）でII，III，V型の3病型で約84％を占めていた．この結果をふまえ日本全体での本症の頻度を確認するため，清水輝夫班長，斎藤加代子班員，西野一三班員の協力の元，平成13年10月にGSD 12種類の過去10年間における症例数について一次全国調査を行った．大学病院，国公立病院およびベッド数200床以上の小児科，神経内科を調査対象とした（2299件）．回収率は62％であった．症例数はGSD II型（47例），III（24），IV（5），V（28），VII（7），VIII（20），IX（6），X（2），XI（2），PGM欠損（2），総計143例であった．II，III，V型の3病型で約70％を占めた（図1）．

2）頻度の高いGSDの臨床症状，遺伝子変異の検討

i）GSD V型（M病）：分析可能な20例の症状は労作時筋痛，ミオグロビン尿症が13名，無症候性高CK血症4名，その他2名で，発症時期は小児期が12名，成人発症が1名であった．生検筋を用いた遺伝子変異の検索では708/709delTTCの変異が20例中（+/+）9例，（+/-）2例，すなわち40 allele中20 allele（50%）に認められ，日本人M病における好発遺伝子変異と考えられた．

ii）GSD III型（脱分枝酵素欠損症）：29例のうち筋症状を示す例は11例で，小児期より筋力低下が認められた．進行性の経過を持つものは7例で，筋力低下の進行は全例成人期からであった．循環器症状を合併した例は6例で，肥大型心筋症，左室肥大，伝導障害などであった．突然死が1例認められた．①IVS5－2A>C，②4234delA，③IVS21+1G>A，④1117delAACTの遺伝子変異が4例で認められたが，日本人に好発の遺伝子変異は認めなかった．

3）M病の病態生理に即した治療法の開発

筋組織にはVit.B6（pyridoxal phosphate：PP）のtotal body poolの約80％が分布し，筋phosphorylaseと結合している．M病の大部分では筋phosphorylase活性が10％以下であり筋組織のPP含量に影響を及ぼすことが類推される．

i）ヒト生検筋におけるPP含量：M病9例，GSDII型7例，III型5例，Duchenne型筋ジストロフィ症6例，正常筋8例において生検筋PP含量を測定した．PP含量はM病では正常の約20％以下に低下していたが，他のGSDでは減少していなかった（図2A）．

ii）PP添加によるL6細胞phosphorylase活性への影響：血清の1倍から10倍までの濃度でPPを添加し培養後phosphorylase活性を測定した．PPの添加によってphosphorylase活性は有意に増加していた（図2B）．

iii）ヒトでの応用：M病患者1例で同意のもと経口でPPを50mg/day投与した．投与後血清CKの低下が認められた．臨床的には幼児のため詳細は不明確であった．特に副作用は認めなかった．

iv）糖尿病を合併したM病患者で，糖尿病のコントロールが良好な時期に運動時の筋痛，筋硬直が出現し，コントロール不良な時期に筋症状が軽快した例が存在した．

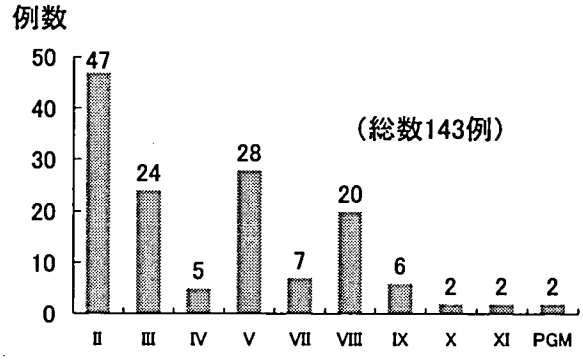
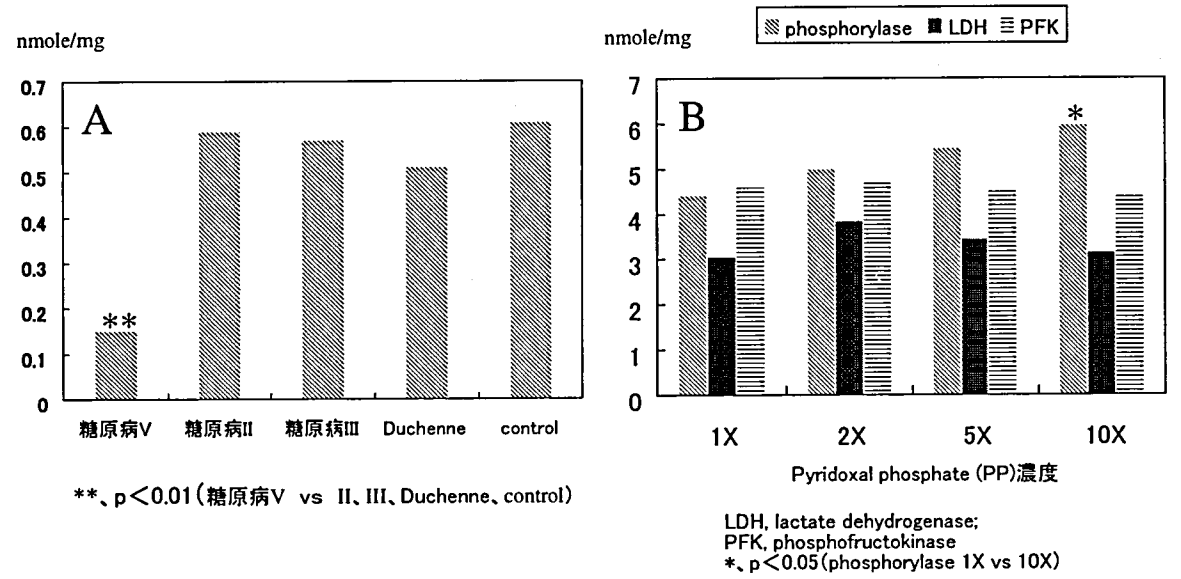


図1　筋型糖原病全国調査結果

* 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



A.生検筋におけるpyridoxal phosphate(PP)含量

B.L6細胞へのPP添加による解糖系酵素活性への影響

図2　McArdle病とpyridoxal phosphate

考　　察

GSDの病型頻度ではII, III, V型が主要なものである事が全国調査で判明した．また日本人M病の50%のalleleに708/709delTTCが認められる事から，日本人M病の半数は筋生検が必要なく，末梢血での遺伝子検索で診断できる事も明らかとなった．M病の病態として筋ではPPが2次的な欠乏状態にある事が証明できた．さらにL6細胞でPP添加によりphosphorylase活性の上昇が見られたことは，残存酵素活性が認められるM病において，PP投与を行うことで残存phosphorylaseをわずかでも活性化しうる可能性がある．さらに血糖が上昇しているM病で筋症状が改善した事は，グルコースが筋細胞内で嫌気性解糖に動員され利用されている可能性を示唆している．グルコースが利用できるG-6-Pより上流の第1段階の解糖系酵素異常に起因するGSD（V型，III型など）の治療の開発を考える上で重要である(図3).

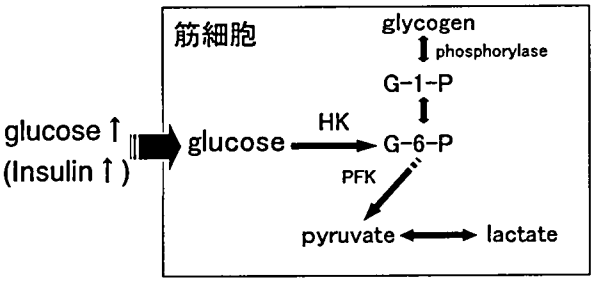


図3　グルコース代謝と嫌気性解糖系
(G−1−P, glucose-1-phosphate; G-6-P, glucose-6-Phosphate; HK, hexokinase; PFK, phosphofructokinase)

今後の展望

3 年間の研究の中で本邦において主要な GSD は II, III,V 型であることが判明し，診断，治療戦略を立てるにはまずこの 3 病型が重点対象であろう．診断については M 病では好発変異が判明したことから，酵素診断，遺伝子診断を利用すると主要病型（II, III, V 型）の 84%は末梢血で診断可能である．この事実を元に GSD の合理的な診断方法についてガイドラインを今後作成する事も可能である．治療面では M 病の生検筋で PP 欠乏状態が認められた事から，患者に Vit.B6 を投与して運動負荷に対する耐性の増加を期待する試みが考えられる．治療計画を策定し全国調査で同意を得た症例について多施設共同での治験を実施し，患者の QOL の向上が可能かどうか検討したいと考えている．さらに血中のグルコース利用を促進することで嫌気性解糖に利用できる可能性があり，Vit.B6+glucose derivative の combined therapy についても V 型，III 型への適応も含め今後検討する価値がある．

文　　献

1) Sugie H, Fukuda T, Ito M, Sugie Y, Kojoh T, Nonaka I: Novel exon 11 skipping mutation in anpatient with glycogen storage disease type IIId. J Inherit Metab Dis 24: 535-545, 2001.

2) Tsujino S, Huie M, Kanazawa N, Sugie H, Goto Y, Kawai M, Nonaka I, Hirschhorn R, Sakuragawa N. Frequent mutations in Japanese patients with acid maltase deficiency.Neuromuscul Disord 10: 599-603, 2000.

3) Fukuda T, Sugie H, Ito M: Novel mutations in two Japanese cases of glycogen storage disease type IIIa and a re-

view of the literature of the molecular basis of glycogen storage disease type III. J Inherit Metab Dis 23: 95-106, 2000.

4) Hamano T, Mutoh T, Sugie H, Koga H, Kuriyama M: Phosphoglycerate kinase deficiency: an adult myopathic form with a novel mutation. Neurology 54: 1188-1190, 2000.

5) Nishio T, Sunohara N, Nonaka I, Tsujino S, Sugie H: Myophosphorylase deficiency and limb-girdle muscular dystrophy in the same pedigree. Acta Neurol Scand 98: 364-367, 1998.

Ⅳ．ミオトニー症候群

筋強直性ジストロフィー病態の分子論的解明と治療

石浦章一*

研究協力者 笹川 昇* 紀 嘉浩*
高橋展弘* 竹下裕也*

目的

筋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，DM キナーゼ(DMPK)というセリン・スレオニンキナーゼであり，その 3' 非翻訳領域にある CTG トリプレットの伸長が原因と考えられている．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，これはジンクフィンガータンパク質である ZNT9 遺伝子中のイントロン 1 にある CCTG テトラヌクレオチドリピートの伸長であることが判明した．すなわち，DM という症状が塩基リピートの伸長に深く関係しており，2 つの DM の共通項としてリピート RNA 結合タンパク質が浮かび上がってきた．これら DM の原因を明らかにするとともに，DM の新しい治療法を開発するのが本研究の目的であった．

方法と結果

我々は，DM の原因は RNA の異常ではないかと考えた．そこで，DM1 のリピートが mRNA では CUG リピートに転写されること考慮して，CUG リピートに結合するタンパク質をスクリーニングすることから始めた．その結果，2 種類の RNA 結合タンパク質のクローニングと性質の解明に成功した．1 つは CUG-binding protein (CUG-BP)である．CUG-BP は全身臓器に発現している 50kDa のタンパク質である．CUG-BP と DMPK cDNA を COS 細胞に共発現させると，DMPK の CTG リピートが 30 から 130 と長くなるにつれて DMPK の翻訳量が減少することが判明した．これは，患者において骨格筋内の DMPK 量が減っていることに対応すると考えられた．次に，CUG-BP の基質特異性を酵母スリーハイブリッド法という RNA-タンパク質相互作用を測定するやり方で定量化したところ，CUG-BP は CUG リピートよりも UG ジヌクレオチドリピートの方に強く結合することがわかった．ここで CUG-BP の新しい生理機能も示唆された．CUG-BP と CCUG テトラヌクレオチドリピートとの結合についても同じスリーハイブリッド法で調べたが，結合能は CUG リピートと同じ程度であった．

我々は，CUG-BP の他に RNA リピートに結合するものはないかとスクリーニングし，新たに EXP/EMBL というタンパク質をクローニングすることに成功した．EXP/MBNL は 5 つのスプライシングアイソフォームを持っていたが，我々のスリーハイブリッドの系ではそう強い結合は認められなかった．しかし，GFP-EXP/MBNL 42 を細胞に発現させたところ，核に特異的に局在することを発見した．これは核と細胞質をシャトルする CUG-BP とは異なるところで，EXP/MBNL が mRNA を核に留めおく機能がある仮定すると，DM 発病の鍵がここにあると考えられる．

治療の見込みに関しても大幅の進歩があった．我々は DMPK の 3 非翻訳領域に CTG リピート 0，5，30，130，150，170，190 個を組み込んだ cDNA を作成し，そのうちのいくつかをマウス筋芽細胞 C2C12 に組み込んだ安定形質発現細胞を樹立した．リピート 130 の細胞はリピート 5 の細胞に比べて，血清除去後の筋分化が遅れることがわかったが，これは DM 患者の骨格筋が未分化な状態にあることに対応しているものと考えられた．またこれらの細胞を用いて，リピート伸長が細胞機能に及ぼす影響を検討したところ，リピートが伸びるに従って過酸化水素やメナジオンなどによる酸化ストレスに脆弱になることを発見した．この脆弱性はアポトーシスによるものであり，ビタミン E や N-アセチルシステインの投与で細胞死が抑えられることも発見した．

考察

DM2 の発見と，DM1 では CUG-BP による塩素チャネルのスプライシングによって筋強直を説明できることから，DM という疾患は長く伸びた RNA リピート(CUG または CCUG)が病気の本体である「RNA 病」であることが明らかになってきた．すなわち，リピートが伸びるとそこに CUG-BP や EXP/MBNL などのリピート RNA 結合タンパク質が結合して，本来それらが必要な場所で欠乏することがスプライシング異常や翻訳阻害を引き起こし，最終的に全身性疾患を生み出す可能性があることが，多くの研究で明らかにされてきた．我々の CUG-BP，EXP/MBNL の仕事は DM 研究の核心をついたものであり，平成 11 年から 13 年度の 3 年間の研究で，基質特異性を世界で初めて明らかにできたことは DM 研究の一助になったのではないかと考えている．

* 東京大学大学院総合文化研究科・生命環境科学系

また，長い CTG リピートを組み込んだモデル筋芽細胞が，筋分化の遅れという DM の症状を良く再現することが判明した．この細胞を用いた実験から，DM 筋は酸化ストレスに弱いことも明らかになった．これらの研究から，抗酸化剤の大量投与が遺伝性疾患である DM の症状を和らげる可能性があることを指摘しておきたい．

今後の展望

DM のいろいろな症状を 1 つの欠陥から説明することは不可能であると思われていたが，リピート RNA 結合タンパク質の発見で思わぬ展開になった．しかし，現在見つかっている CUG-BP や EXP//MBNL だけではリピートとの反応特異性が説明できず，この他にも CUG または CCUG リピートに結合するタンパク質が見つかる可能性がある．薬剤の標的としての役者が出そろうまでには，今すこし時間がかかりそうである．

最後に，研究が 3 年間で欧米に肩を並べるまでに進んだのも，本班会議からの研究補助のおかげである．厚生省清水班の方々，ならびに研究遂行のきっかけを与えていただき，折に触れて議論し励ましていただいた(故)荒畑喜一博士に深く感謝したい．

文　献

1) Takahashi N, Sasagawa N, Suzuki K and Ishiura S : Synthesis of long trinucleotide repeats in vitro. Neurosci.Lett. 262, 45-48, 1999.

2) Sasagawa N, Watanabe T, Usuki F, Saito N, Ito M, Koike H, Suzuki K and Ishiura S : A novel gene that is activated by myotonin protein kinase (MtPK). Biomed.Res. 20, 99-108, 1999.

3) Sasagawa N, Takahashi N, Suzuki K and Ishiura S : An expanded CTG trinucleotide repeat causes trans RNA interference: A new hypothesis for the pathogenesis of myotonic dystrophy. Biochem. Biophys. Res.Commun. 264, 76-80, 1999.

4) Takahashi N, Sasagawa N, Suzuki K and Ishiura S : The CUG-binding protein (CUG-BP) binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system. Biochem.Biophys.Res.Commun. 277, 518-523, 2000.

5) Takahashi N, Sasagawa N, Usuki F, Kino Y, Kawahara H, Sorimachi H, Maeda T, Suzuki K, Ishiura S : Coexpression of the CUG-Binding Protein Reduces DM Protein Kinase Expression in COS Cells. J.Biochem. 130, 581-587, 2001.

筋緊張性ジストロフィー(DM1)の分子病態 ーDMAHP/Six5 遺伝子の関与

川 上 潔*

研究協力者 佐 藤 滋* 中 村 美 和* Steve Tapscott**

目 的

DM1 は DMPK 遺伝子下流の CTG リピートの伸長によっておこる．リピート伸長が DM1 の病態に関与する機構については，CUG-RNA 転写産物によるドミナントネガティブ効果（CUG 結合タンパク質の異常によるスプライシング異常や RNA の核-細胞質の分布の異常が起こる）と CTG リピート周辺の遺伝子，DMWD，DMPK および SIX5 の発現低下による Loss of function の効果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（白内障や不妊）に関与していると示唆された．本研究は，転写因子 Six5 が制御する標的遺伝子群を同定し，それらの遺伝子群の発現異常による DM1 の諸症状発症の機構を明確にすることを目的とした．

方法と結果

Six5 タンパク質の標的遺伝子群をマイクロアレーを用いて同定する方法を開発した．強力な転写活性化能をもつ，ヘルペスウイルス VP16 タンパク質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）をアデノウイルスベクターに組み込み，胚性癌腫細胞 P19 と筋芽細胞株 C2C12 とに感染させ，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ーを用いてスクリーニングした．野生型と変異型とで 2 倍以上発現増加した遺伝子を標的遺伝子候補として表 1 にまとめた．

P19 細胞においては，中胚葉分化に伴って発現する転写因子やシグナル分子及びそのリセプター，また神経系で発現する転写因子やシグナル分子，さらに神経伝達物質の輸送体や受容体が同定された．C2C12 細胞においては，既知の標的遺伝子 myogenin および骨格筋の収縮に直接関与する遺伝子，アセチルコリン受容体などの遺伝子が同定された．これらのうち Igfbp5， Igf2 遺伝子については，マイクロアレーで観察された VP16-Six5 による誘導をノザン法にて確認した．さらに，Igfbp5 遺伝子プロモーターの VP16-Six5 タンパク質による転写活性化をレポーター遺伝子法にて検証した（図 1A）．VP16-Six5 の共発現によって，VP16-Six5W241R の共発現に比べて数十倍の転写活性化が観察された．その反応エレメントの位置をプロモーター領域の欠失変異を作成し，転写開始点上流-106～-70 の領域に同定した．反応エレメントには Six5 タンパク質が直接結合する事をゲルシフト法で明らかにした（図 1BC）．さらに，DNaseI フットプリント法，メチル化干渉法を用いてその結合部位を詳細に解析した．同定された結合部位は，ヒトおよびマウス，ラットの Igfbp5 プロモーターで完全に保存されており，既に知られていた Myogenin および Na,K-ATPase α1 サブユニット遺伝子の Six5 結合部位との比較からコンセンサス配列を提唱することができた．

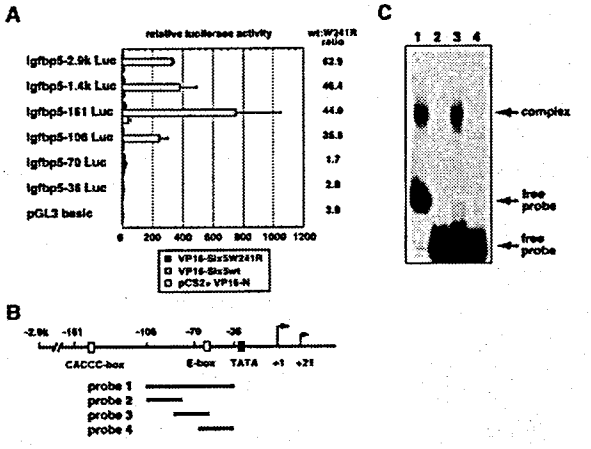


図 1 Igfbp5 遺伝子プロモーターの解析
A マウス Igfbp5 遺伝子プロモーターとルシフェラーゼレポーター遺伝子の融合遺伝子に対する，VP16-Six5 および VP16-Six5W241R の転写促進効果を測定した．B ゲルシフト法に用いたプローブ DNA の領域を示した．C 各プローブ DNA 断片を ^{32}P で標識し，GST-Six5 タンパク質との結合を観察した．

生体内で Igfbp5 および Igf2 が Six5 の標的遺伝子になっていることを確認するために，Six5 遺伝子欠損マウスから培養繊維芽細胞を樹立し，内在性 Six5 mRNA をノザン法で定量したところ，いずれも 2 分の 1 以上の低下がみられた．従って，生体内では Six5 タンパク質の働きによってこれらの遺伝子が正の調節を受けていることが確認された．

Igfbp5 遺伝子プロモーターの活性化機構を知るために，Six5，Six1 と Eya2，Eya3 を組み合わせて細胞に導入し，Igfbp5-ルシフェラーゼレポーター遺伝子の活性化を観察したところ，Six5 と Eya3 の組み合わせで最大の活性化が見られた．Six1 は単独では活性化が観察できなかったが，Eya2 を同時に加えると数倍の活性化が観察できた．

* 自治医科大学医学部生物学教室
** Fred Huchinson Cancer Research Center

表1　同定されたSix5の標的遺伝子候補．遺伝子と誘導倍率を主な発現部位とともに表示した．

P19細胞で2倍以上誘導された遺伝子	fold change (wt/W241R)	中胚葉系	神経系
転写因子			
Ebf2	27.68		○
Six2	16.63	○	
Dermo1	11.20	○	
Mesp2	> 9.00	○	
Sim1	6.89	○	
Six4	3.20	○	
Mdfi	2.74	○	
Foxd4	2.62		○
PurA	2.57		
シグナル分子と受容体			
Igfbp5	5.72	○	
Wnt4	3.85		○
Igf2	3.14	○	
Sarp1	2.95	○	
Fzd8	2.48	○	○
Ptn	2.02		○
神経伝達物質受容体と輸送体			
Gabt3	10.26		○
Htr3a	3.37		○
その他			
Col9a2	2.86		
Krt1-18	2.15		
Pltp	2.06		
St14	2.01		

C2C12細胞で2倍以上誘導された遺伝子	fold change (wt/W241R)	骨格筋特異的	神経系等で強く発現
転写因子			
Myog	8.08	○	
筋収縮			
Tnnt3	11.44	○	
Myh3	7.28	○	
Mlc2	6.98	○	
Tnni2	3.29	○	
Actn2 associated LIM protein	2.76	○	
神経伝達物質受容体			
Chrng	7.85	○	
細胞増殖と細胞周期			
Nf2 interacting protein	3.18		○
Cdkn1b	2.32		
Kras2	2.24		
その他			
Dcra	5.32		
P4ha1	2.67		
Arf1	2.67		
Mlp	2.28		
Brp44l	2.20		
Nxn	2.12		

DM1 患者細胞での IGFBP5 遺伝子の制御異常を検出する目的で，CTG リピートの数が 1000 以上の DM1 患者の繊維芽細胞と健常人からの繊維芽細胞を MyoD の強制発現によって骨格筋に分化させた時の IGFBP5 の発現様式を比較した．健常人では約 2 倍の発現増加が見られたのに対し，3 種類の DM1 患者由来細胞では IGFBP5 の発現増加はいずれも低下していた．IGFBP5 遺伝子の制御の様相が変化していることが確認された（図 2）．

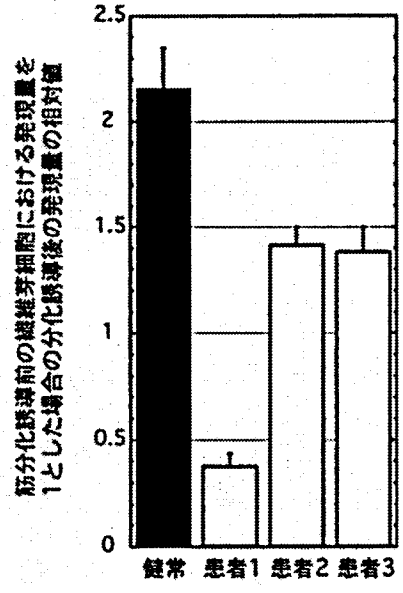


図 2　骨格筋分化に伴ったヒト IGFBP5 遺伝子の発現量の変化．健常人由来細胞と DM1 患者由来細胞を MyoD の強制発現によって筋分化させた．筋分化前後の IGFBP5 の発現をノザン法で検出し，相対比であらわした．

考　　察

1　本スクリーニング法の特徴

VP16-Six5 融合タンパク質をアデノウイルスベクターを用いて細胞に発現させ感染後短時間の誘導でスクリーニング行うので，二次的に誘導される遺伝子や形質転換株を選択したためにおこる影響を排除できる．VP16 に由来する強力な転写活性化ドメインを使用することで，Six5 の直接の標的遺伝子を効率よく検出できる．W241R 変異をコントロールの用いることで，アデノウイルスの感染や Six5 タンパク質および VP16 活性化ドメインの過剰発現による一般的な影響を最小限におさえることができる．

2　Igf2 の発現低下によって期待される成長不全，Igf2 および Igfbp5 の低下で期待される骨格筋その他の中胚葉組織の欠損などが Six5 遺伝子欠損マウスで観察されない理由として次の 3 つが考えられた．1）Six1，Six4 など他の Six 遺伝子メンバーによる機能補償．2）胚発生が正常に進むのに足る Igfbp5 遺伝子の発現レベルが，Igfbp5 遺伝子プロモーター内の Six5 結合部位以外の部位に結合する他の転写因子によって達成されている．3）Six5 遺伝子の働きは筋肉の再生や負荷をかけた場合にのみ観察できる．

3　インスリン抵抗性や白内障形成への関与の可能性

DM1 患者への IGF1 の投与によってインスリン抵抗性に改善がみられることから，IGF シグナルの構成要素である IGF2 や IGFBP5 の発現レベルがインスリン抵抗性に関与する可能性が考えられた．Igf2 と Igfbp5 の発現はレンズには見られないが，毛様体，角膜，網膜，強膜に見られるので IGF シグナリングの異常が引き起こされ白内障につながりうると考えられた．IGF-2 や IGFBP5 などの Six5 の標的遺伝子産物がレンズの周りの

組織から分泌されて DM1 患者及び Six5 遺伝子欠損マウスの白内障に関与する可能性がある.

4 P19 細胞で同定された 21 個の標的遺伝子のうち 10 個が発生中の体節や骨格筋で発現するので，SIX5 遺伝子の発現低下が myogenin に加えてこれらの遺伝子発現異常を介して筋の融合や成熟を遅らせることが先天性の DM1 においては考えられる.

今後の展望

レンズや生殖系列の細胞を用いて標的遺伝子群を同定し，白内障および生殖細胞の形成不全などの症状を引き起こす機構を明らかにしてゆきたい.

文　献

1) Ohto H, Kamada S, Tago K, Tominaga S, Ozaki H, Sato S and Kawakami K : Cooperation of Six and Eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya. Mol. Cell. Biol. 19:6815-6824, 1999.

2) Kawakami K, Sato S, Ozaki H and Ikeda K : Six family genes-Structure and function as transcription factors and their roles in development. BioEssays 22:616-626, 2000.

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, Watanabe Y, Ikeda K and Kawakami K : Impaired interactions between mouse Eya1 harboring mutations found in patients with branchio-oto-renal syndrome and Six, Dach and G proteins. J. Hum. Genet. in press, 2002.

5) 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. under revision, 2002.

筋緊張性ジストロフィーに認められるCTGリピート延長が遺伝子発現に及ぼす影響の検討

吉 良 潤 一*

研究協力者 古 谷 博 和* 菊 池 仁 志* 新 納 信 江*
山 田 猛* 田 代 康 介** 久 原 哲**

目 的

筋緊張性ジストロフィー（以下DM）では筋組織にミオトニア現象と筋力低下，筋萎縮が生じるが，それ以外に難治性糖尿病，甲状腺機能障害，良性・悪性腫瘍の合併，脂肪肝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2次性のtauopathyが生じる事が知られている．

DMは常染色体優性の遺伝性疾患であり，DMPK遺伝子の3'非翻訳領域に存在するCTGリピートが延長することによって発症するが，この際正常のDMPK遺伝子からは正常のDMPKが翻訳されているのに疾患が発症するという事実から，リピート延長が自分自身（この場合DYSTROPHIA MYOTONICA PROTEIN KINASE（以下DMPK）遺伝子）に影響を及ぼす*cis*-効果だけでは発症の機序や全身諸臓器に疾患を起こす機序を説明できず，DMPK遺伝子の下流にあるSIX5遺伝子，対立DMPK遺伝子，さらには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*-効果を考えなければならない．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，リピートがどの遺伝子にどのような機序で影響を及ぼすかについての詳細な検討は行われていない．

私どもはこれまでにリポーター遺伝子の3'非翻訳領域にCTGリピートを挿入したベクターを作成し，*in vitro*でリピートの遺伝子発現に及ぼす影響を調べるシステムを開発し，これを種々の培養細胞やアフリカツメガエル卵母細胞や受精卵に直接導入することで，(1) CTGリピートはCAGリピートよりも強力にその5'上流の遺伝子発現を抑制し，リピートのサイズが大きくなるほどその効果は強くなる．(2) この現象には種による違いや，培養細胞の種類による違いなどは認められず，普遍的な現象である．(3) この現象の発現には核膜が重要な働きをする等の事実を明らかにしてきた．そこでこのシステムを用いてCUGリピートの延長したmRNAが*cis*-，*trans*-に作用する機序を詳細に検討するとともに，中枢神経系に生じる2次性のtauopathyの機序についても解析を行うことにした．

* 九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科
** 九州大学大学院生物資源環境科学研究科

対象・方法・結果

1. アフリカツメガエル卵での検討

DM患者ゲノムDNAからPCR法で増幅したCTGリピート（136回繰り返し）をサブクローニングし，これらのCTG／CAGベクターから*in vitro* translation kit (ProMega)を用いてCAP構造を付着したmRNAを作成し，これとウミシイタケルシフェラーゼ(RL)mRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に直接インジェクションしてRL活性を測定した．この場合，RL活性はリピートの*trans*-効果を直接反映していると考えられる．

結果は図1に示すように，インジェクション2時間でCAGリピート（■）でもCTGリピート（●）でもコントロール（◆）に比べて発現の抑制が認められ，2時間ではCUGリピートの方がその抑制効果は強かった．しかしその後はCTG，CAGリピートの間で2時間目ほどの大きな差は認められなくなった．DNAで同じような実験を行った際には6時間目に同じような効果が認められたことから，mRNAをインジェクションした場合はその効果が2時間目に現れるものと考えられた．

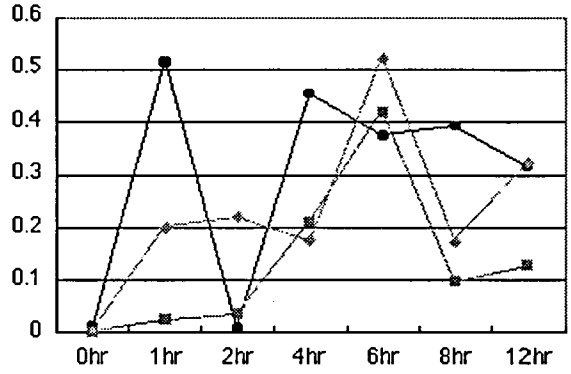


図1 リピートのtrans-効果とその経時的変化．アフリカツメガエル卵にCAG／CTGリピートのmRNAを直接打ち込み，同時に打ち込んだルシフェラーゼ活性を測定して，リピートの*trans*-効果を調べた．CAGリピート（■），CTGリピート（●），コントロール(Mock)（◆）の*trans*-効果を示す．トランスフェクション2時間後にCTGリピートの*trans*-効果が最も強く出ていることがわかる．

2. 神経系培養細胞での検討

次に，CTGリピートとtauopathyとの関連について調べるために，CTG136回リピートをルシフェラーゼ(LUC)発現ベクター(pGL3)に正・逆の方向にサブクローニングし

たプラスミドを作成した．それとウミシイタケルシフェラーゼ(RL)発現ベクター(pRL)を同時にPC12にlipofectamine plusを用いてトランスフェクションし，NGF (nerve growth factor)によるニューロンへの分化誘導を行い，培養24，36，48，60時間後にLUC，RLの活性測定と中枢神経系マーカー蛋白(MAP-2, caspase 3, ß-tubulin, tau)の免疫組織染色，ウェスタンブロッティングによる発現の定量，ß-tubulin, tauのmRNAレベルでの発現，RT-PCR法によるtau mRNAのalternative splicingの違いを検討した．この場合，LUC活性がリピートの*cis*-効果，RL活性が*trans*-効果を反映していると考えられる．

CAG／CTGリピートをトランスフェクションした場合，免疫組織染色でコントロールに比較して細胞数の減少およびtau蛋白の発現量低下が認められた．

一方ウェスタンブロッティングでは，トランスフェクション48時間後にCTGリピートで特異的にß-tubulinの有意な発現低下が認められた（図2）．しかし，tau蛋白のリン酸化のパターンにこれら3者の間で大きな差は検出されなかった．またLUCおよびRL活性では，RL活性の測定がトランスフェクション48時間後にCTGリピートで有意に低下することが明らかになるとともに，RT-PCRを用いた実験で，CTGをトランスフェクションしたPC12細胞ではエクソン2，3がスプライスアウトされたtauのmRNAがコントロールに比較して増加していることが判明した．これはDMの脳，DMのモデルマウスの脳でも認められる所見と一致していた．

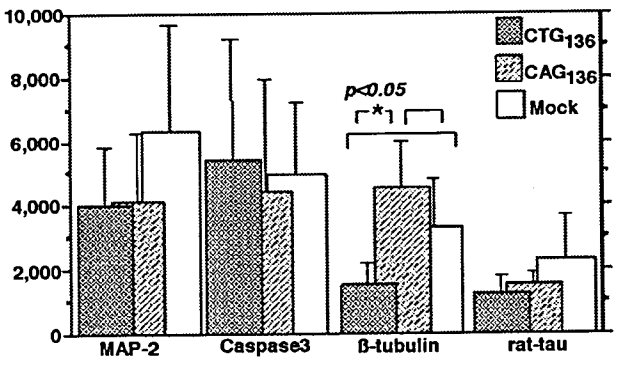


図2　リピートを含むリポート遺伝子をPC12細胞にトランスフェクションして48時間後にウェスタンブロッティングによって測定した脳のマーカー蛋白の発現．ß-tubulinの発現がCTGリピートで選択的に抑制されていることがわかる．

考　察

以上の結果から，CUGリピートの延長したmRNAが核内に存在すると*trans*-効果で，ある一定時間，比較的選択的に遺伝子の発現が抑制されたり，alternative splicingの異常が生じると考えられた（図3）．tau蛋白とß-tubulin蛋白は重合して管状構造物を構成しているが，PC12細胞では，プラスミドのトランスフェクションと同時にNGFによる分化誘導をかける．これにより樹状突起や軸索形成のために多量のtau蛋白やß-tubulin蛋白の発現誘導がかかるが，この時同時に核内にCUGリピートの延長したmRNAが多量に存在するために，tau蛋白に異常なalternative splicingが起こったり，核膜のところで他のmRNAの核・細胞質輸送に障害をきたし，そのために，必要な時期に必要な量のtau蛋白とß-tubulin蛋白をうまく生産出来ず，この時期のPC12細胞には形態異常が生じるものと考えられる．また，この時期，うまく重合できなかったtau蛋白に異常リン酸化が起こり，2次性のtauopathyを起こすのではないかと予想された．

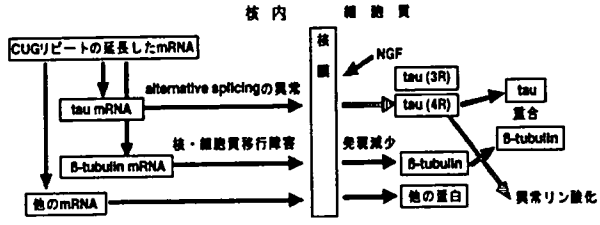


図3　PC12細胞で認められたtauopathyの機序

今後の展望

今後はこのシステムを用いてPC12細胞での異常リン酸化の有無やその機序をcDNAマイクロアレー法などを用いて解析してゆく予定である．PC12を用いたシステムは簡便である上に，DM患者脳やモデル動物の脳を用いる場合に比較して，他の要素の影響を受けにくく，純粋にtauopathyに関与する要因を解析することが出来る．

tau遺伝子自体に異常をきたした*in vitro*でのtauopathyの実験系は存在するものの，最も数多く存在する2次性tauopathyの良い*in vitro*でのモデルは存在しない．私どもの開発したこのシステムは，今後DMの疾患発症機序を解明してゆく上でも，またtauopathyの発症機序を解明してゆく上でも有用なものになると考えられる．

参考文献

1）Hirokazu Furuya, Naoshi Imai, Eri Kajita, Yukuto Yasuhiko, Sukehisa Nagano, Takeshi Yamada, Kenshi Hayashi, Jun-ichi Kira and Koichiro Shiokawa: Expression of reporter genes containing CTG and CAG repeats in 3'-untranslated region in mammalian cultured cells and *Xenopus* oocytes and embryos, *Zoological Science*, submitting

2）古谷博和: CTGリピート病と遺伝子発現．神経進歩 45(6), 927-933, 2001.

低分子量熱ショックタンパク質群による骨格筋ストレス耐性系の研究，およびその筋ジストロフィー発症機構との関連

鈴木　厚*

研究協力者　岸川　優*　山路　聡**　杉山由樹*
小井手裕一*　林　由紀子***　大野茂男*

1）MKBP結合タンパク質の検索

目　的

これまで我々は，筋強直性ジストロフィーの原因遺伝子産物，DMキナーゼの特異的結合タンパク質として新規低分子量熱ショックタンパク質（sHSP），MKBP，を同定し，それを契機として，筋肉細胞のストレス耐性，およびその複雑な筋原線維構造の構築・維持にsHSPが重要な役割を果たしていることを指摘してきた．本研究課題においては，MKBPの結合タンパク質を検索し，MKBPの分子レベルの作用機序を解明する手がかりを得ることを目指した．

方法と結果

Yeast two-hybrid screeningによりヒト心筋ｃDNAライブラリーからMKBP結合タンパク質を検索した結果，すでに「HSP70に結合し，その活性を制御するタンパク質」として報告されていたBAG-3が同定された．詳細な解析から，MKBPはBAG－3のN末端側，a.a.60－218の領域に結合することがわかった．HSP70はBAG－3のC末端側のBAGドメイン（444－490）に結合することがわかっているので，BAG－3に対するこれら2種のHSPの結合は独立であり，これらが同時に同じBAG－3分子に結合することが予想された（図1）．そして実際，ラット骨格筋抽出液からの免疫沈降実験によって，これら内在性タンパク質が3者複合体を形成していること，およびその結合は熱ショックによって増強されることが明らかとなった．一方，Northern Blot解析からはこのBAG－3が心筋・骨格筋に特異性高く発現していることが示された．

考　察

以上の結果より，BAG-3分子は筋肉細胞の2種のシャペロン系であるsHSP系とHSP70系を統合し，効率よいタンパク質管理を行なう筋細胞特異的なシステムを形成するスカフォールドタンパク質である可能性が強く示唆された．こうした異なるシャペロン系を統合するシステムという考え方は全く新しい概念であるとともに，今後の筋細胞ストレス耐性の解明に新たな視点を与えるものである．また，BAG－3はアポトーシス抑制タンパク質，Bcl－2に結合しその機能を助けることも報告されており，筋肉のストレス耐性系とアポトーシス系の相互関連についても新たな知見をもたらすことが予想される．

研究の意義

哺乳類sHSPの一種，αB-crystallin遺伝子における点変異が遺伝性のDesmin-related myopathyの原因の一つとなっていることが示されているが，MKBPはこのαB-crystallinよりもより筋肉に対する発現特異性が高い．従って，その筋細胞中での作用機構に手がかりを与えた今回のBAG-3との相互作用の発見は，筋肉特有のストレス耐性系，細胞死抑制系の解明につながることが期待できる．

文　献

Sugiyama et al. Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differenciation. *J. Biol. Chem.* 275: 1095-1104, 2000.

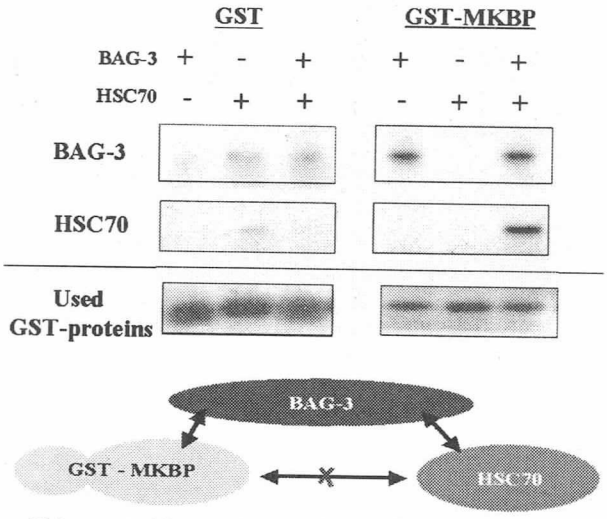


図１　BAG-3はMKBPとHSP70をつなぐscaffoldタンパク質として機能する．
精製BAG-3およびHSP70タンパク質とGST-MKBPを図に示したような組合せで混合し，それらの試験管内での結合の有無を検討した．グルタチオン樹脂によってGST-MKBPとともに沈降するタンパク質をwestern blot法によって検出した．Controlとしては精製GSTタンパク質を用いた（左側パネル）．

* 横浜市立大学医学部第二生化学教室
** 横浜市立大学医学部内科学第一教室
*** 国立精神神経センター，神経研究所，疾病研究第一部

2）ILK結合タンパク質の検索

目　　的

これまでの筋ジストロフィーの研究の中で，筋細胞と基底膜との結合に障害が生ずることが発症の大きな原因の一つであることが明らかとされてきている．Dystroglycan系とともにこの筋肉と基底膜をつなぐ主要な分子構造を形成するintegrin系の分子機構の解析を目指して，ILK（integrin-linked kinase）の結合タンパク質を検索した．

方法と結果

Yeast two-hybrid screeningによりヒト心筋c DNAライブラリーからMKBP結合タンパク質を検索した．その結果，spectrin，dystrophin，α-actininなどのN末端のactin結合ドメインに見られる2つのCalponin homology（CH）domainのみから構成されているという，これまで見られなかったユニークな構造を有した分子量約50kDaの新規タンパク質が同定された．そこでこれをaffixinと名づけて報告した．ILKはその後半のCH domainに結合し，その部位をリン酸化する．興味深いことに，RNA干渉法によりこのタンパク質の線虫ホモログの発現を線虫初期胚において抑制すると，体壁筋の基質との接着異常に起因するといわれる*pat* phenotypeと呼ばれる筋細胞発生の異常が現われた．このことから哺乳動物においてもこのaffixinがintegrinを介した基底膜と筋細胞の結合，およびそれを介したシグナル伝達に重要な役割りを果たしていることが予想された．実際，affixinは骨格筋・心筋に高い特異的発現を示すだけではなく，組織染色の結果，ILKとともに筋細胞形質膜に局在し，特にZ膜が細胞膜と連結している領域に濃縮していた（図2）．一方，CHO細胞を用いて細胞をseedする際に見られるcell spreading，およびそれに伴う細胞-基質接着形成過程におけるaffixinの役割を検討したところ，①affixinは ILKとともにcell spreadingの非常に初期に，vinculin，FAKなどよりも早く細胞と基質の接する細胞膜伸展領域に濃縮し，細胞がよく広がった後には接着斑（FA）に局在するようになる．②CH2 domainのみを有するaffixin変異体を高発現すると，cell spreading，およびそれに伴うFA形成が阻害されることがわかった．また，③細胞が十分spreadした後にCH 2 変異体を高発現してもFAの破壊が弱いながらも見られるが，そこにILKを共発現させた場合にその効果が顕著に増大することも明らかとなった．

考　　察

以上の結果は，affixinがintegrin-ILK signalingの下流で，細胞-基質接着の初期形成に必須な役割りを果たしており，哺乳動物骨格筋の形成，維持に積極的に働いている可能性を示唆している．

研究の意義

骨格筋のintegrin α subunitにおける変異がやはり先天性のmyopathyにつながることも知られている．従って，今回新たにこのintegrin系とアクチン系をつなぐ新しい分子機構，シグナル系を明らかとしたことは，dystroglycan系の障害に由来するものとは異なる筋ジストロフィーの病態解明に大きな手がかりを与えるものと考えられる．

文　　献

Yamaji, S. et al. A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. (2001) J.C.B.153: 1251-1264, 2001.

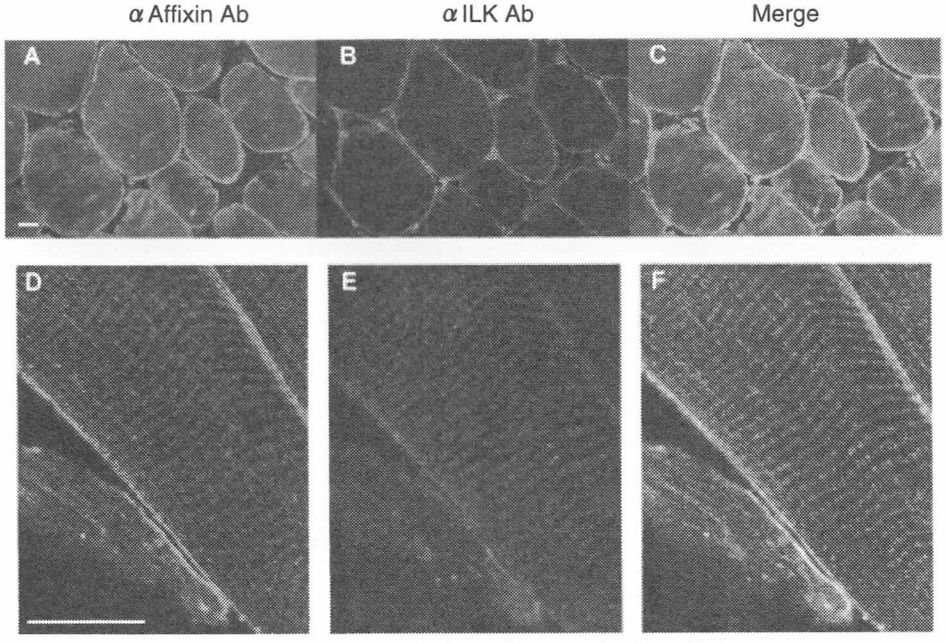


図2　AffixinはILKとともに，骨格筋形質膜とZ膜の連結部に濃縮している．

抗affixin，および抗ILK抗体を用いて正常ヒト骨格筋標品（同意を得て入手した剖検標品）における両タンパク質の局在を検討した．（A～C）横断面，（D～F）縦断面．Affixin，ILKともに形質膜に局在していることがわかる．縦断面において観察される縞状染色は，Z膜構造が形質膜に結合している領域に対応することが，α-actininとの共染色によって別途示唆された（data not shown）．

V．ミトコンドリア脳筋症

ミトコンドリア脳筋症(MELAS)の聴力障害に関する病理学的研究

福 原 信 義*

研究協力者 巻 渕 隆 夫** 中 島 孝* 石 田 千 穂*

目 的

ミトコンドリア脳筋症では，多彩な症状を示し，難聴を生じるものが少なくないが，特に Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS)では糖尿病と並んで難聴の合併頻度が高い．この MELAS の難聴については一般に，脳卒中様の神経症状が生じるよりもずっと前に難聴の症状が始まることが多く，感音性難聴と記載されているものの，その障害部位についての病理学的な報告はない．今回，MELAS の 2 剖検例で内耳について病理学的に検討したので報告する．

対象と方法

症例 1 41 歳（死亡時）女性．家族歴：母，母方伯父，母方いとこが類似疾患で死亡．

現病歴： 22 歳時，糖尿病と診断される．32 歳時，難聴，全身痙攣，びまん性筋萎縮， 次いで，右下 1/4 盲，小脳性運動失調などの症状を生じる．国立療養所犀潟病院に入院し，筋生検：RRF(+)，mtDNA の点変異(3243)が認められ，MELAS と診断される．その後も 41 歳時，拍動性頭痛，相貌失認，左片麻痺，失語，失行などを生じ，死亡した．

剖検所見： 大脳皮質の層性壊死があり，左頭頂葉，左側頭葉，両側後頭葉に新旧様々のものが認められる．この病変は特に脳回の頂部に強い．ほかに，小脳顆粒細胞の減少が認められた．一般臓器では，骨格筋の変性，萎縮，心筋のびまん性線維化，膵臓のびまん性線維化とランゲルハンス島の萎縮などの所見が認められた．

症例 2 52 歳（死亡時）男性．家族歴：母方叔父（2 人），母方叔母の子に糖尿病 ，母の白血球 mtDNA には 3243 変異(-)

現病歴： 37 歳時，糖尿病と診断される．40 歳時，難聴．42 歳時，糖尿病のコントロールが不良となる．49 歳，るい痩が著明で，言語障害，歩行障害，運動失調，痴呆が強くなり，国立療養所犀潟病院に紹介された．脳 CT ・ MRI 検査：びまん性脳萎縮で，白質には多発性ラクネ(+)，淡蒼球の石灰化(+)．筋生検：RRF(+) ，SSV(+) ，mtDNA3243 点変異(+)が認められ，MELAS と診断された．その後，精神的不穏，暴力行為，夜間徘徊があり，次第に構音障害，痴呆が増強するとともに，尿蛋白が高度となり，低蛋白血症，全身 浮腫，胸腹水が生じて 52 歳時に死亡した．

剖検所見：脳脊髄はび漫性に軽度萎縮があり，橋底部の小梗塞巣(+)，淡蒼球に中等度の仮性石灰沈着(+)であった．一般臓器では膵臓ランゲルハンス島の萎縮と糖尿病性腎症が認められた．

両例ともに，家族歴，臨床経過，検査所見，病理所見などが定型的な MELAS であり，生検材料，剖検材料で mtDNA の 3243 変異が認められている．生前の聴力検査で平均聴力は，症例 1 は 60～65dB，症例 2 は 80～100dB と高度の聴力低下が見られていた．ABR では波形が低く検査の信頼性が今ひとつであったが，各波形の潜時の遅れは認められなかった．

病理学的検査は，剖検時に側頭骨錐体部の内耳を含む部分を切り出し，脱灰した後に，通常の如く処理し，HE,KB,Bodian 染色を施し，光顕で観察した．

結 果

図 1 のように蝸牛神経，ラセン神経節の神経細胞の保持は良好であり，蝸牛神経には脱髄や軸索変性などの明らかな異常所見はみられなかった．蝸牛管の構造は保たれ，蝸牛の有毛細胞も保持されていた．わずかに血管条の組織が粗となっていた（図 2）が，MELAS の脳血管で報告されているような異常血管は認められなかった．

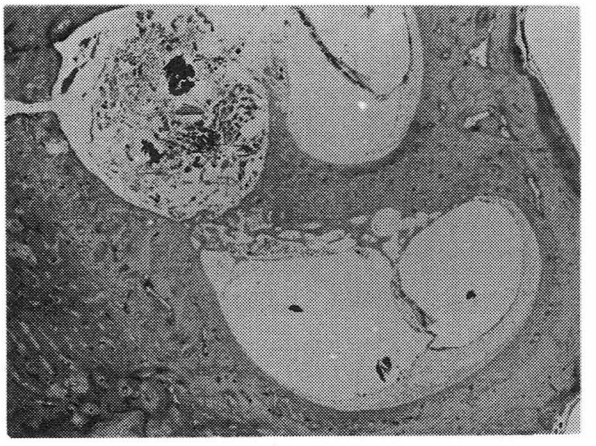


図 1

HE 染色，X14 血管条はやや粗であるが，蝸牛管の有毛細胞は保持されている．

* 国立療養所犀潟病院神経内科
** 国立療養所犀潟病院神経病理

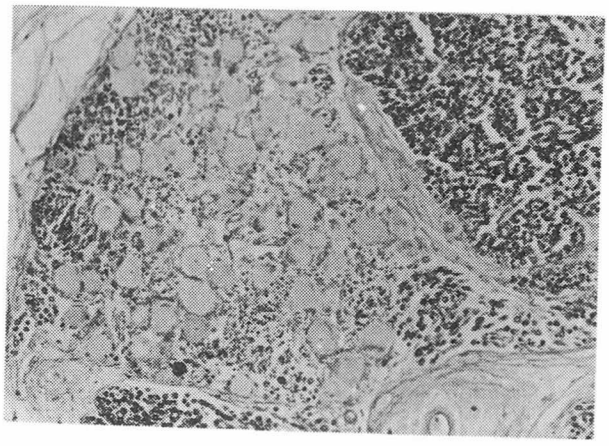


図2
KB 染色　X145　ラセン神経節と蝸牛神経．神経細胞と有髄神経はきちんと保持されている

考　　察

変異，欠失など種々の mtDNA の異常で聴力障害が報告されている．それらは，臨床的に感覚性難聴とされているものの，その障害部位，障害機序についてはほとんど報告されていない．因みに，mtDNA1555 の A→G 点変異は aminoglicoside 系抗生物質により内耳障害を生じるといわれ，mtDNA1555 点変異では蝸牛有毛細胞の脱落とそれによるラセン神経節の変性，脱落，が報告されている．また，老化には mtDNA の異常も関係しているとされるが，老人性難聴では蝸牛有毛細胞の脱落が生じるとされている．ミトコンドリア脳筋症では唯一，Kearns-Sayre 症候群の 1 例で内耳の変化が報告され，ラセン神経節細胞の大部分が変性脱落していた．今回，検索した症例ではこのような変化はみられず，また，MELAS の脳病変の原因とも推定されている血管変化もみられなかった．

結　　論

MELAS の内耳は光顕レベルでは異常が認められない．今後，電顕レベルの検討をする必要がある．

研究の意義

MELAS の発症病理機序については未だ明らかではないため，各臓器の変性機序について検討することが重要である．特に筋症状と聴力障害との関係を明らかにすることは筋障害の本質を追究するためにも重要である．

文　　献

1) Ohama E, Ohara S, Ikuta F, Tanaka K, Nishizawa M, Miyatake T : Mitochondrial angiopathy in cerebral blood vessels of mitochondrial encephalomyopathy (MELAS). Acta Neuropathol., 74: 226-233, 1987.
2) Hutchin T.P, Cortopassi,G.A. : Mitochondrial defects and hearing loss. CMLS,Cell.Mol.Life Sci., 57: 1927-1937, 2000.
3) Lindsay,J.R., Hinojosa,R. : Histopathologic features of the inner ear associated with Kearns-Sayre syndrome. Arch.Otolaryngol., 102: 747-752, 1976.

ミトコンドリア異常症における細胞死とその抑制系の検討

桃　井　真里子*

研究協力者　森　　雅　人*　永　井　真由美*　山　形　崇　倫*
諏　訪　清　隆*　野　崎　靖　之*　斉　藤　茂　子*

背景・目的

我々はこれまでMELASにおける遺伝子異常の解析[1]，MELAS患者におけるDCAの効果[2]などを報告してきた．近年，ミトコンドリアにはエネルギー産生の場としての機能の他にアポトーシスにおける関与が明らかとなった．多くの進行性の神経筋疾患において細胞死は基本的な細胞病態であり，細胞死の抑制は治療法開発のための重要な課題と思われる．そのミトコンドリア機能障害であるMELASにおいてもアポトーシスは病態の形成に大きく関与していると思われる．しかし，これまで3243A→G変異を持つMELASにおけるアポトーシスの検討は少なく，その関与は十分に証明されていない．ミトコンドリア異常症における細胞死の検討はその病態解明さらには治療法開発の重要なポイントと考えられる．MELAS筋細胞を用いて細胞死の存在，そのプロセスを証明し，その抑制の検討を行い，治療の可能性について検討した．また，ミトコンドリア異常症患者のDCA治療の効果について検討した．

1. MELAS筋細胞における細胞死の検討

方　　法

MELAS患者よりインフォームドコンセントのもとに採取した生検筋細胞をOri⁻SV40DNAにて不死化し，クローン化して用いた．細胞を通常培地による培養からグルコース欠乏培地に変更して細胞死を誘導した．細胞死はトリパンブルー分染にて生存率を計数し比較した．誘導された細胞死に対して経時的に抗活性型Caspase-3，8，9，12抗体による蛍光抗体染色とTUNEL法を用いてアポトーシスプロセスを検討した．また，DCAを培養液に濃度を変えて加え，生存率を計測し，DCAの細胞死に及ぼす効果を検討した．

結　　果

1.グルコース欠乏条件では細胞内の変異mtDNA量が約80%以上のクローンで24時間後の生存率が11%であった．その他のクローンは約80～90%であった（図1）．2.誘導された細胞死プロセスの検討では，6時間，12時間でTUNEL陽性のアポトーシス細胞が確認された．また，1.5時間でチトクロームCが細胞質に染色され，3時間で活性型Caspase-9が，4.5時間で活性型Caspase3が染色された．3.DCAを加えた検討では24時間後の生存率が無添加の11%から41%に用量依存的に増加していた（図2）．チトクロームCを加えた検討では加えない場合と変化はなかった（図3）．

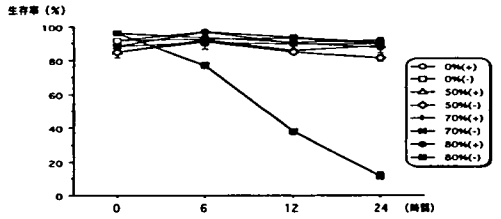


図1　各クローン毎の生存率の変化
縦軸に生存率，横軸に培養液変更後の時間を示した．変異mtDNAの含有量が80%の細胞でのみ細胞死が誘導され，12時間で約40%，24時間で約10%の生存率であった．
0%；変異mtDNA0%のクローン．50%；変異mtDNA50%のクローン．70%；変異mtDNA0%のクローン．80%；変異mtDNA80%のクローン．
(+)；グルコース含有培地．(－)；グルコース欠乏培地．

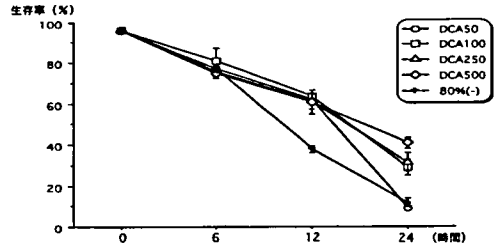


図2　DCA添加によるの生存率の変化
縦軸に生存率，横軸に培養液変更後の時間を示した．変異mtDNAの含有量が80%の細胞を用い，グルコース欠乏培地にDCAを加え，生存率の変化を観察した．12時間後の生存率が40%から60%に増加し，24時間では50μg/mlでは無添加の細胞と変わらなかったが，100μg/ml以上では30~40%に生存率が増加した．
培養液中のDCA濃度：DCA50 50μg/ml，DCA100 100μg/ml，DCA250 250μg/ml，DCA500 500μg/ml

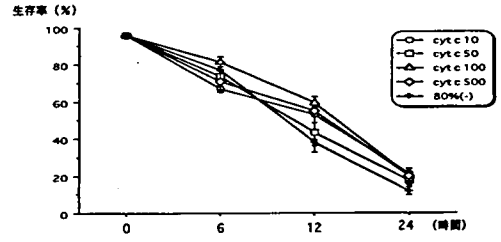


図3　チトクロームC（cytc）添加によるの生存率の変化
縦軸に生存率，横軸に培養液変更後の時間を示した．変異mtDNAの含有量が80%の細胞を用い，グルコース欠乏培地にcytcを加え，生存率の変化を観察した．
生存率の変化は無添加の細胞と比較して明らかではなかった．
培養液中のcytc10　10μg/ml，cytc50　50μg/ml，cytc100 100μg/ml，cytc500 500μg/ml

* 自治医科大学小児科学

考　　察

グルコース欠乏条件によりMELAS筋細胞において細胞内mtDNA変異量は約80％以上の細胞で選択的に細胞死は誘導された．この閾値効果はこれまでの臨床的な検討の報告ともよく合致していた．ミトコンドリア異常症における細胞障害プロセスには1.活性酸素による障害，2.ATP減少による障害，3.アポトーシス，4.代謝異常による増加物質による障害などが考えられるが，今回の細胞死のプロセスにはチトクロームC放出とそれに続く，Caspase-9，-3の活性化が伴っていた．また，DCAはこの細胞死を完全に抑制することはできないが，間接的に抑制している可能性が示唆された．ミトコンドリア異常症の細胞死の検討はミトコンドリアが細胞内ヘテロプラスミーであり，散発的な細胞死は同定しにくいなど*in vivo*では困難である．この実験系では，細胞内変異mtDNAの割合と細胞外条件を自由に設定でき，各種条件による細胞死閾値の変化や細胞死の抑制系を検討でき，MELAS病態の解明には有用な系であることが証明できた．

2. ミトコンドリア異常症におけるDCA治療の効果[4)]

症例・方法

4例のミトコンドリアDNA3243A→G変異をもつMELAS患者[2)]，1例の8993T→G変異を持つ重症Leigh脳症の4か月の男児[3)]にDCA治療を行った．DCAは徳島大学小児科方式に準じて，50mg/kg/回を12時間毎に内服し，半量に減量，以後，血中濃度，乳酸値を指標に維持量を決定した．症状の評価に加え，血液検査，知能検査，頭部画像所見，脳波，末梢神経伝導速度，聴力検査などを行い，効果の判定と副作用の検討を行った．

結　　果

MELAS4例では4年2か月から6年1か月の投与期間に4例とも臨床症状の改善と乳酸・ピルビン酸値の低下がみられた．2例において治療中に脳梗塞様発作がみられた．いずれの例も発作出現前に血中乳酸，ピルビン酸の増加があり，髄液中の乳酸，ピルビン酸値は高値であった．しかし，いずれの例においても頭部画像所見，脳波，難聴，知能検査には改善がみられず，徐々に悪化していた．DCAの副作用と考えられるものとして全例に軽度の肝機能障害と1例に末梢神経障害，3例に低カルシウム血症が認められた．重症Leigh脳症の乳児では治療前より肥大型心筋症を認め，循環動態が不良であり，人工呼吸管理のもと使用した．一時，意識状態が改善したが開始3日後に死亡した．

考　　察

DCAはMELASの治療薬として比較的長期的にも安定した効果があると思われた．しかし，慢性的な経過と思われる知能，難聴には改善はみられず，副作用と思われるものとして肝機能障害，末梢神経障害，低カルシウム血症が認められた．MELASの病態に対する作用機序は不明であるがMELASの急性進行性の臨床症状には明らかに有効であり，コントロールスタディが困難であり，さらに長期的な効果，副作用を検討していく必要があると思われた．また，状態の悪化した例では急激な状態の悪化を招く可能性があり，治療不応例，死亡例などの検討が必要と思われた．

研究の意義・今後の展望

MELAS筋細胞におけるグルコース欠乏条件での細胞死は，約80％以上の変異mtDNAを含むクローンにおいて誘導され，TUNEL陽性のミトコンドリアを介したアポトーシスの経路が存在することが証明された．MELAS病態解明における細胞死とその抑制系の検討は必要不可欠であり，今回我々の用いた筋細胞クローンの実験系はその解明に有用と思われた．さらにこの細胞死の抑制系の検討が治療の可能性を見いだすものと期待される．

また，MELAS患者へのDCA治療では6年間の長期にわたり脳卒中様発作，頭痛，けいれん，易疲労といった症状は著明に改善した．しかし，電気生理学的検査，難聴，知能といった慢性進行性の病変には効果は乏しいと思われた．DCAはMELAS患児において明らかにQOLを改善しており，早期から比較的安全に使用できる薬剤と考えられた．一方，状態の悪化したLeigh脳症の患児で死亡した例を経験し，DCA治療を効果的に行うために治療不応例，死亡例などの大規模な検討が必要と思われた．

文　　献

1) Kobayashi Y, Momoi YM, Tominaga K, Shimoizumi H, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S: Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes(MELAS). Am J Hum Genet 49: 590-9, 1991.

2) Saitoh S, Momoi YM, Yamagata T, Imai M: Effects of dichloroacetate in three patients with MELAS. Neurology 50: 531-4, 1998.

3) 斉藤茂子，桃井真里子，中村美樹，中島尚美，市橋 光，水口　雅: ミトコンドリアDNA塩基番号8993の一塩基置換の相違により異なる臨床経過を呈したと考えられたLeigh脳症の2例．日児誌104: 53-5, 2000.

4) Mori M, Nagai M, Yamagata T, Momoi YM: Long term effects of DCA therapy for patients with MELAS. Brain and Dev submitted.

VI. 筋発生・分化

筋形成における細胞間相互作用とその制御機構

瀬原淳子*

研究協力者 栗崎知浩* 黒原一人* 増田亜紀*
若月修二* 白壁恭子* 内田光子*

目　的

筋形成は，中胚葉由来の多能性幹細胞から筋芽細胞が生じ，それが互いに融合して筋管を形成する過程であり，この過程の分子機構を知ることは，筋ジストロフィーの解明，治療への分子生物学的基盤をなすものであろう．

近年，MyoD, myogenin をはじめとする 4 つの筋分化誘導因子の cDNA が相次いで単離され，これらの発現によって非筋細胞が筋芽細胞に質的に変化すること，さらに多くの筋特異的に発現する遺伝子の活性化にこれらの遺伝子産物が関与していることが示された．しかし，このような転写・翻訳の制御だけでは秩序だった筋形成や再生過程を説明することは出来ない．翻訳後制御，特に，タンパク質のリン酸化などの修飾とともに，タンパク質のプロセシングによる機能ドメインの活性化とその制御が，これらの過程に関わる多くの遺伝子の働くタイミングや細胞特異性の決定に重要な役割を果たしていることがわかってきている．

私達はそのような役割を担いうる遺伝子群のひとつ，ADAM(a Metalloprotease and Disintegrin)ファミリーに関する研究を行っている．ADAM ファミリーは，メタロプロテアーゼドメイン・ディスインテグリンドメインを有するユニークなタンパク質群で，このファミリーに属する可溶性分子ヘビ毒ディスインテグリンは血液凝固阻害活性を，膜タンパク質ファーティリンはディスインテグリンドメインを介して受精に関与することが知られる．一方，同じファミリーに属する TACE のメタロプロテアーゼは膜型 TNFα前駆体を可溶化型に変換し，ショウジョウバエの neurogenic gene クズバニアンは Notch あるいは Delta を切断活性化するとの報告がなされ，これらは，細胞間シグナリングをプロセシングという形で制御する新しいタイプの分化因子と見なすことができる．

私達は，筋形成機構の研究のなかで ADAM ファミリーに属する遺伝子群メルトリンα，β，γをクローニングし，形態形成におけるこれらの遺伝子の役割を探るとともに，これらの遺伝子産物のプロテアーゼとしての機能を解析した．

* 京都大学・再生医科学研究所・再生増殖制御学分野

方法および結果

1) メルトリンα遺伝子のマウス個体における役割

メルトリンαはマウス発生過程において筋，骨，血管，肺等様々な組織で一過的に発現し，これらの細胞の分化や形態形成に何らかの役割を果たしていることが予想された．メルトリンαに対する抗体を得て，この膜蛋白質が筋再生時にも誘導されることがわかった．また，メルトリンα遺伝子の個体における機能を探るためにそのノックアウトマウスを作製し，その解析をおこなった．まず，メルトリンα遺伝子のノックアウトマウスに関しては，褐色脂肪組織の減少がみられ，それらの組織に隣接する骨格筋の形成が低下していることが観察されることから，メルトリンαがそれらの組織構築に共通した過程を制御しているものと考えられた．さらにこれらの組織では，間葉細胞が組織形成部位に遊走したのち細胞凝集がおこるが，ノックアウトマウスでは，細胞凝集に先行する組織形成部位での細胞増殖が著しく減少することがわかった．これらのことから，メルトリンαが褐色脂肪組織およびその周辺の筋組織形成の際の細胞増殖の制御に関与していることが示唆された．

2) メルトリンβ遺伝子の機能と役割

メルトリンβは後根神経節など末梢神経の生ずる領域，及び分化後の胎仔・新生仔期の筋細胞で強い発現が見られ，メルトリンαとは異なる役割を果たしていると考えられた．そこでまず，個体におけるメルトリンβの役割を調べるため，メルトリンβ遺伝子を単離し，メルトリンβ遺伝子ノックアウトマウスを作成した．その結果，メルトリンβ遺伝子のノックアウトマウスは，新生仔の段階で 80～90％が死んでしまうことがわかった．その解析から，これらのマウスでは形態形成に異常がみられた．メルトリンα・βはいずれも細胞外にプロテアーゼドメインをもつ膜蛋白質であり，なんらかの基質の分解制御がこれらの形態形成に必須であることが考えられる．メルトリンβ遺伝子の場合，そのノックアウトマウスの表現型や発生過程における発現パターンの類似性から，心臓形成，神経筋接合部の形成や神経分化に関与することが知られる細胞膜貫通型増殖因子で ErbB リガンドのニューレギュリン（NRG）が，メルトリンβの基質となりうる可能性が考えられたので検討した．NRG のプロセシングが野生型メルトリンβを細胞内に共発現する事により増強し，プロテアーゼ活性を持たない変異型メ

ルトリンβを共発現すると抑制されること，神経特異的な NRGβを効率良く切断するのに対し NRGαの切断は効率が悪く，メルトリンβは基質特異性のあるプロテアーゼ活性がみられることがわかった．さらに細胞表面の NRG の発現が，野生型メルトリンβの共発現によって消失し，メルトリンプロテアーゼがいわゆる ectodomein shedding に関与しうることを示した．以上，メルトリンβが NRG あるいは類似リガンドのプロセシングを制御することによって組織形成にかかわることを示唆した．

考察・今後の展望

以上のように，メルトリンが発生後期の細胞増殖や組織形成を制御する因子であること，その際メルトリンβの場合は，そのプロテアーゼドメインの機能が重要であることを明らかにすることができた．

骨格筋では，メルトリンβが強く発現しているにも関わらず，そのノックアウトマウスでは表現型を見い出すことができなかった．また，メルトリンαの場合も，その表現型を示す部位は限局していた．これは，メルトリンαおよびβが重複していることによる可能性もある．今後メルトリンα・βのダブルノックアウトマウスを作成することにより，それを検証していきたいと考える．

文　献

1) Shirakabe K, Wakatsuki S, Kurisaki T, and Fujisawa-Sehara A : Role of Meltrin β in the processing of neuregulin. *J. Biol. Chem.*, 276., 9352-9358, 2001.

2) Eto K, Puzon-McLaughlin W, Sheppard D, Fujisawa-Sehara A, Zhang X-P, and Takada Y : The RGD-independent binding of integrin α9β1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J. Biol. Chem.*,275,34922-30, 2000.

3) Bornemann A, Kuschel R and Atsuko Fujisawa-Sehara: Analysis of transcript expression of meltrin α in normal, regenerating, and denervated rat muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil*,, 21,475-80, 2000.

4) Kurohara K, Matsuda Y, Nagabukuro A, Tsuji A, Amagasa T and Fujisawa-Sehara A : Chromosomal mapping of the meltrin β(ADAM19) gene, cloning and analysis of its regulatory region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 522-527, 2000.

細胞成長因子に着目した筋肉再生メカニズムの解明

野 地 澄 晴*

研究協力者 西 真寿美** 泰 江 章 博** 板 倉 光 夫***
山 岡 孝*** 森 山 啓 司** 西 松 伸一郎****
濃 野 勉****

目 的

通常の状態で形成される筋肉の量はある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．従って，筋肉の量を調節するメカニズムが存在することが示唆されている．しかし，そのメカニズムはまだほとんどに解明されていない．そこで，本分担研究では，筋肉の量を調節する因子として働くことが示唆されている細胞成長因子であるMyostatin（GDF8）に着目し，その機能を解明することを試みた．Myostatin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が，そのメカニズムはまだ解明されていない．そこで，発生にともなうMyostatin遺伝子発現を解析した．また，肉牛において発見された点突然変異によるMyostatinの作用を解明する目的で，同じ点突然変異を持つMyostatin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た．

方法と結果

Myostatinの発現をin situ hybridization法などにより調べた．ニワトリMyostatinの点突然変異タンパク質（C313Y）をコードするcDNAを作製し，CAGエンハンサー・プロモターにより発現するトランスジェニックマウスを作製した．得られたマウスについて，表現型を解析した．

Myostatin遺伝子の発現は，体節に観察され，肢芽の発生に応じて肢芽内に移動し，筋肉形成に関与することがわかった．肢芽においては筋芽細胞に発現しているが，総ての細胞ではなく，表皮に近い細胞に特異的に発現していることがわかった．発生の進行にともない，その傾向は顕著になった．

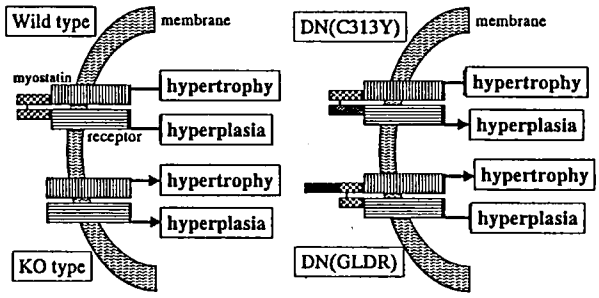
一方，トランスジェニックマウスは体重が約30~40％増加しており，その原因は筋肉量の増加であると予想された．筋肉切片を用いて解析した結果，筋肉量の増加は筋細胞の肥大化よりも筋線維の増加が原因であることが示唆された．

考 察

Myostatinは筋肉の形成を抑制する作用があることが示唆されていたが，発生の初期から発現し，筋肉形成にも関与していることが示唆された．しかも，筋肉細胞に総て発現していないことから，何らかの因子により発現が制御されている可能性が示唆された．従って，発生初期のMyostatinの役割は，筋肉の形成を一部抑制することにより筋肉の形を作ることに関与している可能性がある．

一方，MyostatinC313Y型突然変異トランスジェニックマウスの解析により，筋肉量が増加することから，この突然変異型はドミナントネガティティブ型として作用していることが示唆された．この点突然変異のタイプでは，筋繊維の数が増加し，筋細胞の大きさは変化なかった．このことは，肉牛においても観察されており，マウスの結果をサポートするものである．さらに興味ありことに，同じドミナントネガティティブ型であるプロセッシング異常Myostatinの場合は，筋細胞の肥大が生じており，今回のケースとは異なっていた．Myostatinノックアウトマウスでは，両方の現象が生じていることから，筋細胞肥大と筋繊維増加は別々にMyostatinにより調節されていることが示唆された．このような現象を説明するために，図1のようなモデルを考えた（図1）．最近の研究から，Myostatinの受容体は，activin type II receptor（Act RIIB）であり，follistatinが結合し，その作用を抑制することが報告された（Lee SJ and McPherron AC. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 98 : 9306-11 (2001)）．正常なMyostatinは，筋肉細胞（筋芽細胞）の受容体に結合し，筋細胞の肥大と筋線維の増加を抑制するシグナルを細胞内に伝達する．Myostatinが無い場合は，どちらのシグナル伝達も抑制されず，筋肉は増大する．点突然変異型のMyostatinは受容体には結合し，筋肉細胞肥大化を抑制するシグナルは細胞内へ伝達できるが，筋繊維増加を抑制するシグナルを細胞内へ伝達できないと考えられる．一方，プロセッシング異常型Myostatinの場合は，逆に筋肉細胞肥大化を抑制するシグナルは細胞内へ伝達できないが，筋繊維増加を抑制するシグナルを細胞内へ伝達できると考えられる．

* 徳島大学工学部生物工学科
** 徳島大学歯学部矯正学教室
*** 徳島大学ゲノム機能研究センター
**** 川崎医大学分子生物学教室



Myostatin receptor: Activin receptor type IIB, Alk5
Binding protein: follistatin

図1　筋肉形成におけるMyostatinの役割のモデル

Myostatinの受容体はactivin 受容体type IIBとAlk5であることが報告されていることおよびこれまで得られた情報を基に，受容体を介したMyostatinの作用機序についての単純なモデルを図示した．正常なMyostatinが受容体に結合した場合は，hypertrophyもhyperplasiaも抑制される．Myostatinがない場合(KO type)は，hypertrophyとhyperplasiaが促進される．点突然変異型ドミナントネガティブ型(DN(C313Y))が受容体に結合すると，hypertrophyは抑制され，hyperplasiaは促進される．一方，プロセッシング異常型ドミナントネガティブ型(DN(GLDR))が受容体に結合するとhypertrophyが促進され，hyperplasiaは抑制される．

今後の展望

Myostatin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．従って，ドミナントネガティブ型のMyostatinを用いて遺伝子治療を行なうことができる可能性がある．このことをまずモデルマウスを用いて検証することが必要である．そこで，筋ジストロフィーのモデルマウスを用いて，ドミナントネガティブ型のMyostatinの効果を調べる予定である．一方，筋量を調節するメカニズムを解明するためには，Myostatinにより調節されている遺伝子群を同定する必要がある．そこで，マウスDNAマイクロアレイなどを用いて，正常およびトランスジェニックマウスからmRNAを抽出し，両者に発現していない遺伝子について解析することにより，目的の遺伝子を同定できる可能性がある．

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.

筋原線維形成制御因子の役割とその変異に起因する疾患の探索

大日方　昂*

研究協力者　佐藤成樹*　毛利蔵人*　中島紀代子*
川上　勉*　中山彩子*　鈴木洋如*
花岡和則**　西野一三***　植松富美枝***
埜中征哉***

目　的

横紋筋筋原線維の形成と維持には，アクチン・ミオシン相互作用が重要で[文献 2)]アクチン結合蛋白質，ミオシン結合蛋白質が深く関わっている．これらはアクチンおよびミオシンの分子集合の制御，生じた繊維の横紋構造へ構築や維持に重要な役割を果たす．本研究では，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-蛋白質に着目した．

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と考えられる．近年，ヒト心筋型 C-蛋白質遺伝子の変異が家族性の肥大型心筋症の原因の一つであることが知られ，筋の機能維持での重要性が注目されている．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．一方，コフィリンは細胞内で活性制御を受けながらアクチンの集合およびアクチン繊維の動的な再編成を担う[文献 3)]最も重要なアクチン結合蛋白質として，近年，とりわけ注目されている．我々は，これまでヒトを含め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）の存在を見出している．MCF が筋原繊維の形成過程でのアクチン繊維形成の制御に重要な役割を果たすと考えている．

本研究では，特にこれらの蛋白質が筋原繊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繊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.　ミオシン結合蛋白質（C-蛋白質）の変異が筋原繊維形成に及ぼす影響について

ニワトリの骨格筋形成の初期過程では心筋型 C-蛋白質が主要な役割を果たすことを既に報告している．しかし，ほ乳類では心筋型 C-蛋白質は心筋でのみ寄与することを我々は明らかにした[文献 1)]．マウス心筋型 C-蛋白質の研究過程で，この蛋白質の C 端側のコネクチン結合に関わる領域（ドメイン IX ）に 10 アミノ酸の挿入配列を含む C-蛋白質変異体を発見した．この挿入配列以外は既知のマウス心筋 C-蛋白質と構造は完全に一致しており，この変異体は単一の心筋 C-蛋白質遺伝子から RNA の選択的スプライシングにより生ずるものと考えられる．挿入配列の前後，および挿入配列内をコードする塩基配列をプライマーにして，心筋から抽出した RNA に対して RT-PCR を行って発現を解析した結果，挿入配列を含む C-蛋白質は主に心房に発現し，加齢に従ってその発現量が増えることがわかった．また，C-蛋白質のＮ端側にＧＦＰをもつ融合蛋白質を発現するように設計された発現ベクターを培養心筋細胞にトランスフェクションして，細胞内で発現された蛍光 C-蛋白質の動態を解析の結果，挿入配列を含まない C-蛋白質は正常に横紋構造に組み込まれたが，挿入配列を含む C-蛋白質は細胞内に一様に拡散して観察され，横紋構造へは組み込まれにくいことがわかった．また，バキュロウイルス発現系を用いて，挿入配列を含まない C-蛋白質および挿入配列を含む C-蛋白質を作成してその機能を調べた結果，挿入配列を含む C-蛋白質は，ミオシンへの結合能が低いことが認められた．挿入配列を含む C-蛋白質の発現が起こる老齢期の心筋では機能的，構造的脆弱化がもたらされる可能性がある．

2.　筋原線維の形成と維持におけるコフィリンの役割とその変異に起因する障害

(1)　ほ乳類における筋型コフィリンの発現特性

マウス胎児での筋分化とコフィリンの発現の関係を in situ ハイブリダイゼーション法で解析した結果，筋分化が開始される筋節および肢芽の筋形成域に，筋分化因子（myogenin）や筋原線維蛋白質（トロポニン）と共に筋型コフィリン（MCF）が発現されることを見出した[文献 4)]．培養骨格筋細胞の免疫細胞化学的手法による解析の結果，増殖期にある筋芽細胞には非筋型コ

* 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
*** 国立精神・神経センター

フィリン（NMCF）しか発現しないが，筋分化した筋管で MCF の発現が開始されることが認められた．これらの観察は，筋分化に伴って起こる筋原線維形成に MCF が深く関与することを強く示唆している．骨格筋と心筋の発生過程での MCF と NMCF の発現特性をノーザンブロットで調べた結果，骨格筋では発生途上の幼若期には2種のコフィリンとが共存するものの，生後の成長過程で MCF のみに限定されることを確認した[文献 4)]．しかし，心筋では発生を通じて MCF, NMCF 両者が共存し続ける．このように，心筋と骨格筋とでは関与するコフィリンに違いがある．MCF の欠損や変異は成熟した骨格筋に特有の障害を導く可能性が想定された．

(2) 筋型，非筋型コフィリンとアクチンとの相互作用の比較

成熟筋で MCF のみが存在する生理的意義を推測するために，大腸菌発現系で作製した組み換え体コフィリン（MCF, NMCF）を用いて，それぞれの骨格筋アクチンとの相互作用の度合いについて共沈実験により定量的に解析した．F-アクチンに MCF, NMCF を単独で，あるいは両者を同時に加えて反応させた後，超遠心し，F-アクチンに結合して沈殿してくるコフィリンの量を調べると，沈殿に見られるコフィリン量は NMCF に比して，MCF の方が多く見られた（図1）．このことは，F-アクチンに対する結合能は MCF のほうが NMCF より高く，MCF がより強く，効率的にアクチンに作用すること，即ち機能的に重要であることが推測された[文献 5)]．

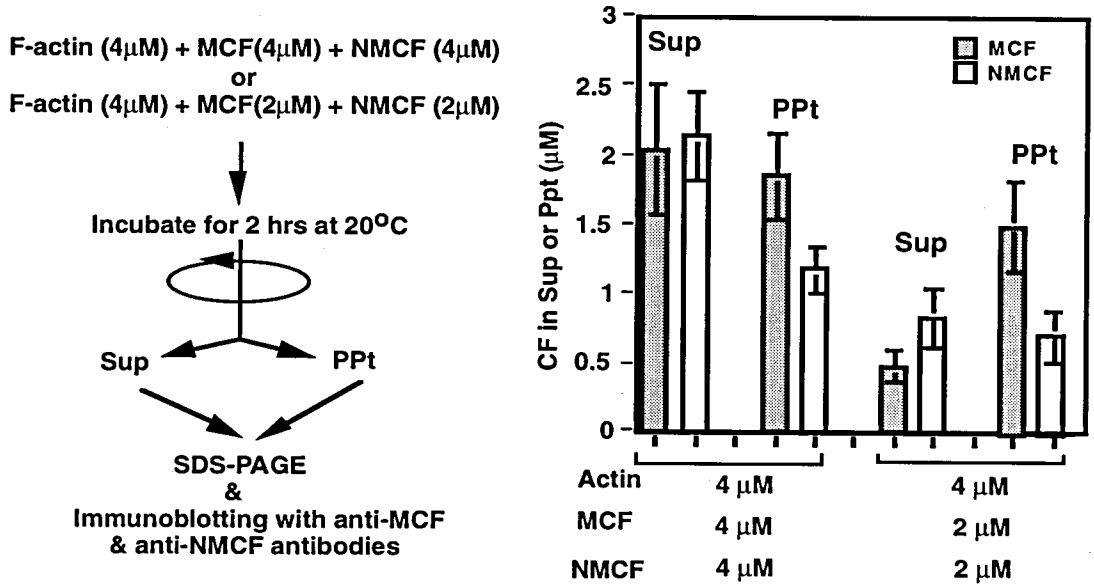


図1 共沈法による筋型，非筋型コフィリンとF-アクチンとの結合の解析
最終濃度 4μM の F-アクチン(骨格筋α-アクチン)に筋型コフィリン（MCF）と非筋型コフィリン（NMCF を 2μM ずつ（計 4μM）あるいは 4μM ずつ（計 8μM）を反応させた後，超遠心によりF-アクチンを沈殿させ，沈殿と上清にある MCF, NMCF を各コフィリン（CF）に特異的な抗体を用いて検量した結果を示す．MCF が優先的にアクチンに結合し，共沈されることがわかる．

(3) 筋型コフィリン（MCF）欠損が骨格筋にもたらす障害

MCF の働きをほ乳類の個体レベルで明らかにするために，MCF 遺伝子のコード域を相同組み替え法により LaCZ と neoR で置き換えて MCF 欠損 ES 細胞（MCF-/- 細胞）を作成した．この ES 細胞をマウス胚（胚盤胞）に注入して仮親で発生させ，MCF-/- 細胞をもつキメラマウスを作成した．MCF-/- 細胞に由来する骨格筋を X-gal 染色より顕在化し，その部位を組織学的に解析した．キメラマウス成体の骨格筋で MCF(-/-)に由来する細胞が集中する領域では，筋繊維の径の極端な大小不同や，単核細胞の増加，結合組織の増加など，筋ジストロフィー症筋に類似した顕著な筋繊維の壊死・再生が観察された（図2,右図）．新生時のマウスでは組織学的には大きな障害は見られなかった．また，MCF 遺伝子をヘテロに欠損する細胞(MCF(+/-))を持つキメラマウスの骨格筋では成体でもほとんどこの様な異常は観察されなかった（図2,左図）．電顕レベルの観察では，新生児期の骨格筋でもサルコメア形成の異常が所々観察され（図3A），生後数カ月を経た骨格筋では完全な筋原繊維をもつ筋細胞と，横紋筋原繊維をほとんど含まない大きなダメージを受けた筋細胞とがキメラ状に混在しているのが見られた（図3B）．MCF の欠損により，筋原繊維の形成や維持機構に異常をきたし，その結果，筋繊維に重篤な障害を与えるものと考えられる．新生児では MCF(-/-)細胞のキメラ率のかなり高い骨格筋においても筋原繊維の障害は軽微であった．従って，生後の骨格筋の成長過程に MCF が不可欠になってくると考えられる．また，これらの結果から，MCF が実際に骨格筋組織において重要な役割を担っていることが明らかとなった

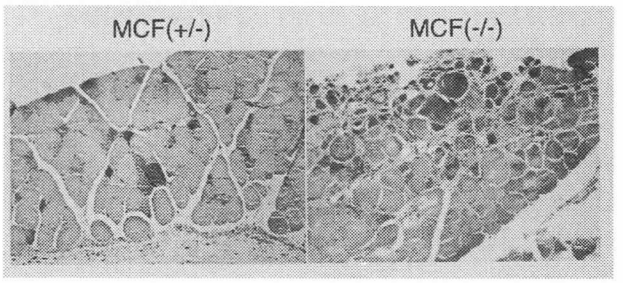


図２　キメラマウスの MCF(+/-) 細胞（左図）および MCF(-/-) 細胞（右図）が集中している領域の筋の横断組織像．MCF (-/-) 細胞由来の骨格筋では筋繊維の径の極端な大小不同や，単核細胞の増加など，筋ジストロフィー症に類似した筋繊維の壊死・再生像がみられる．

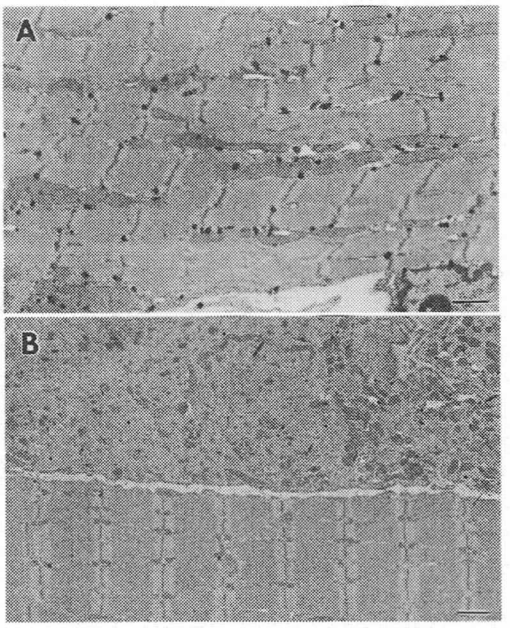


図３　MCF (-/-)細胞をもつキメラマウス骨格筋の電子顕微鏡像．Ａ図は生後１０日，Ｂ図は生後６月齢の骨格筋である．生後１０日では所々に横紋サルコメアが明確に形成されていない部位が見られる．生後６月齢では完全な横紋像をもつ筋細胞の隣に横紋筋原繊維を欠く筋細胞がみられる．筋原繊維の崩壊の程度は一律でなく，ミオフィラメントが並列している場合，横紋像が散在する場合も見られる．バーは４μmを示す．

考　　察

1) マウスでは単一の心筋 C-蛋白質遺伝子から，２つの C-蛋白質が作られること，その内の一方は，重要な機能部位に挿入配列を含み，コネクチンやミオシンとの反応性が弱いことを見出した．老齢マウスの心筋（特に心房）では，挿入配列を含む C-蛋白質の発現上昇するので，心筋の機能低下と形態的変化が生ずる可能性がある．老齢マウスやラット心筋では微細形態に変異が起こるという報告がある．このことと C-蛋白質の変化が関連するか興味深い．また，ヒトを含む他のほ乳類でどうかも関心事となる．

2) コフィリンが筋原繊維の形成と維持に極めて重要であることを明らかにした．非筋コフィリン(NMCF)を発現している新生児の骨格筋では，筋型コフィリン（MCF）を欠く骨格筋においても筋原繊維の障害が軽微なこと，MCF 欠損によるキメラマウスの筋の異常が，NMCF が存在しない成熟した骨格筋で特に顕著に現れるという結果は，NMCF が MCF の代替機能をある程度果たしていることを示唆する．しかし，MCF がより有効にアクチンフィラメントに作用するという結果を考えると，MCF の欠損や変異が筋に影響を及ぼす影響は大きいことが推測され，ヒトを含めてほ乳類では筋型コフィリン変異に起因する筋疾患が存在するる可能性を示唆している．成熟したマウスでは MCF 欠損骨格筋ではなぜ筋原繊維の著しい崩壊が起こるかその分子機構が興味深いところである．

今後の展望

1) マウスで観察された心筋 C-蛋白質変異体およびその発現特性に関する事実がヒトの心筋での問題に示唆を与えるかもしれない．今後の検討課題となろう．

2) ヒトにも筋型コフィリン，非筋型コフィリンが存在し，それらの発現パターンはマウスの場合に似ていることが報告されている．本研究で改めて筋の形成と維持におけるコフィリン（とりわけ筋型コフィリン）の重要性が明らかになった．筋の形成と維持におけるコフィリンの分子機作（活性制御も含め[文献 3)]）の解明が重要な課題となってきた．また，本研究はコフィリンにおける変異に起因する疾患の存在の可能性を示唆していると思われる．

文　　献

1) Kurasawa M, Sato N, Matsuda A, Koshida S, Totsuka T and Obinata T : Differential expression of C-protein isoforms in developing and degenerating mouse striataed muscles. Muscle & Nerve 22: 196-207, 1999.

2) Soeno Y, Shimada Y and Obinata T : BDM (2,3-Butanedione monoxime), an inhibitor for myosin-actin interaction, suppresses myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in culture. Cell Tiss. Res. 295:307-16, 1999.

3) Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Mizuno K, Narumiya S : Activation of LIM-kinase for cofilin phosphorylation by Rho-associated kinase in Rho-mediated actin reorganization. Science 285: 895-898, 1999.

4) Mohri K, Takano-Ohmuro H, Nakashima K, Hayakawa K, Endo T, Hanaoka K and Obinata T : Expression of cofilin isoforms during development of mouse striated muscles. J. Muscle Res Cell Motil. 21: 49-57, 2000.

5) 毛利　蔵人，中島紀代子，細田敦子，佐藤成樹，大日方　昂：筋型コフィリンの分子機能　生体の科学 52, 273-279, 2001.

低分子量 G 蛋白質と Msx1 による筋細胞分化と脱分化の制御：その筋再生への関与

遠藤　剛*

研究協力者　阿部智行*　徳田恵美*
大越有一*　鈴木暁子*

目　的

個体発生における筋形成の過程，および成体における筋再生の過程では，筋原細胞あるいは筋衛星細胞が分裂して数を増した後に，細胞分化が起こり多核筋管細胞が形成される．この発生や再生における筋細胞分化の過程では，低分子量 G 蛋白質が重要な働きをになっていると考えられるが，具体的にどの蛋白質がどのような働きをしているかはほとんど不明である．そこで本研究では，筋細胞に特異的に発現しているか，あるいは特定の時期に発現している低分子量 G 蛋白質を同定して，これらの蛋白質が筋細胞分化の過程でどのような働きをしているかを明らかにすることを目的とした．

一方，最終分化をした筋管細胞は不可逆的に分裂を停止していると考えられていた．しかし私たちはマウス骨格筋細胞に SV40 large T 抗原を発現させることにより，筋管細胞が再び細胞周期に入り細胞分裂をすること，すなわち脱分化をすることを明らかにしている．最近，ホメオドメイン蛋白質の Msx1 によっても large T 抗原と同様に骨格筋細胞に脱分化を誘導することが報告された．しかし骨格筋組織内の成熟筋細胞においても脱分化を誘導することができるかどうかは不明である．そこで成熟筋細胞の脱分化の可能性について検討した．

方法と結果

(1)　低分子量 G 蛋白質の筋細胞分化への関与

骨格筋細胞分化の過程でみられる細胞融合を始めとして，さまざまな細胞融合が起こる際には，細胞表層の融合する面に細胞突起が形成され，これらの突起が細胞融合に重要な役割を演じていると考えられている．Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質のうち Cdc42 サブファミリーの Cdc42 と Tc10 はアクチン再構成を介した細胞突起の形成を誘導することが知られている．そこで Tc10 とそれに相同性の高い新規の蛋白質の cDNA をマウス骨格筋細胞株 C2 筋管細胞 cDNA ライブラリーからクローニングし RhoT と名付けた．Cdc42, Tc10, RhoT の機能を知る目的で，さまざまな組織と C2 細胞分化の過程におけるこれらの発現をノーザンブロッティングで解析した (図 1)．Cdc42 はさまざまな組織に普遍的に発現しており，また C2 細胞の分化の過程でも恒常的に発現していた．一方，Tc10 は骨格筋と心臓に高く発現しており，C2 細胞の分化の過程で発現量が著しく増加した．RhoT は心臓と子宮にほぼ特異的に発現しており，C2 細胞の分化の過程では恒常的な発現がみられた．

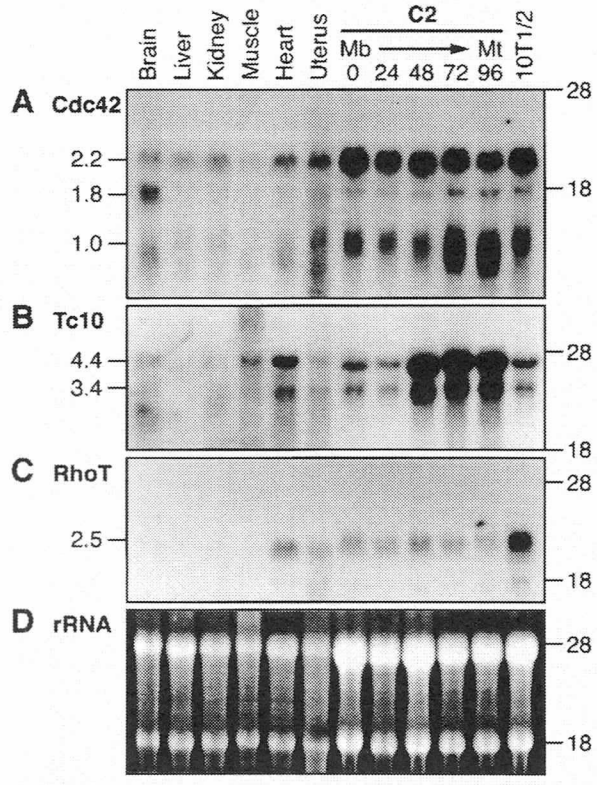


図 1　さまざまなマウス組織と C2 細胞の分化の過程および C3H10T1/2 細胞における Cdc42 サブファミリー蛋白質の発現．ノーザンブロッティングで Cdc42 (A), Tc10 (B), および RhoT (C) の発現のようすをみた．C2 筋芽細胞 (Mb) を分化培地に移して 24, 48, 72, 96 時間おいた．96 時間後までには最終分化をした筋管細胞 (Mt) が発達した．Tc10 は 48 時間後以降発現量が著しく増加した．(D) はエチジウムブロマイドの染色による 28S と 18S rRNA の位置を示す．左側の数値は mRNAs のサイズ (kb) を示す．

これらの蛋白質を線維芽細胞(C3H10T1/2 と Balb/3T3) にトランスフェクトしたところ，いずれも細胞表層にそれぞれ特徴的な突起を形成した(図 2A)．Cdc42 は 10 μm 程度のマイクロスパイク (フィロポディア) を形成したのに対し，Tc10 はより長い 10－20 μm の突起を形成した．また RhoT は先端が膨化した 20 μm 以上の長く太

* 千葉大学理学部生物学教室

い突起を形成した．これらの突起は長さや形態が異なっているものの，いずれもローダミンファロイジンで染色されることから，アクチンフィラメントを含んでいることが示された．一方，私たちが以前同定した RhoD も，10T1/2 細胞にアクチンフィラメントを含む突起を形成した．この突起は 20 μm 程度で，Cdc42 サブファミリー蛋白質が形成する突起とは異なり，細くしなやかであった(図 2B)．興味深いことに，RhoD によって形成される突起は細胞が隣接する面に形成された．したがってこの突起は細胞同士のコミュニケーションにかかわっていることが強く示唆される．さらにこれらの蛋白質の神経突起形成への関与を調べるために，N1E-115 神経芽細胞腫細胞と PC12 褐色細胞腫細胞にトランスフェクトした．いずれの細胞においても Cdc42 と RhoD は神経突起形成を誘導しなかったのに対し，Tc10 と RhoT は長い神経突起を形成した (図 2A)．

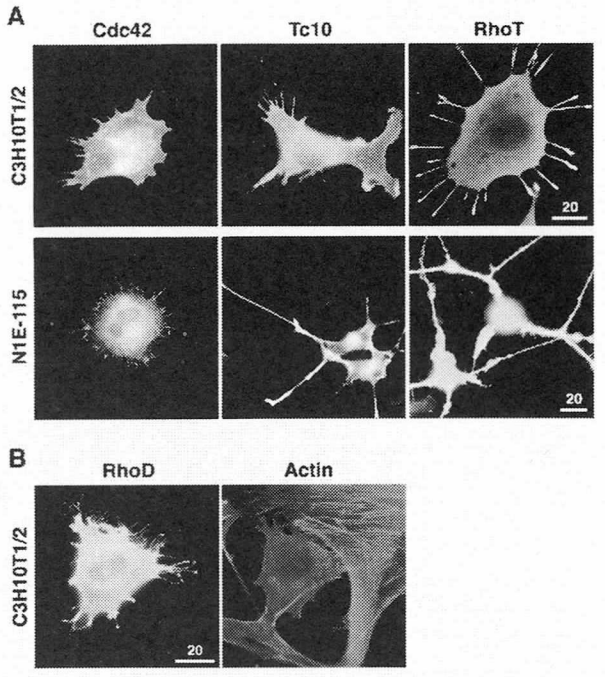


図 2　Cdc42 サブファミリー蛋白質と RhoD による細胞突起と神経突起の形成．
C3H10T1/2 線維芽細胞と N1E-115 神経芽細胞に Myc-tag を付加したそれぞれの cDNA をトランスフェクトした．48 時間後の突起形成のようすを，抗 Myc モノクローナル抗体 Myc1-9E10 による染色で示す．(A) Cdc42 サブファミリー．(B) RhoD．ローダミンファロイジンとの二重染色を示す．スケールバー，20 μm.

Cdc42 は標的蛋白質である N-WASP に結合して活性化状態にする．その結果，N-WASP に Arp2/3 複合体が結合し，迅速なアクチン重合が引き起こされる．こうしてマイクロスパイクが形成される．そこで Tc10 や RhoT によって誘導される突起形成が，N-WASP を介しているかどうかを調べた．GTP を結合して活性化状態にある Tc10 と RhoT は，Cdc42 と同様に N-WASP に結合することが，酵母の two-hybrid system とプルダウンアッセイにより示された (図 3)．一方，RhoD は N-WASP に結合しなかった．またドミナントネガティブ N-WASP を Tc10 や RhoT と共トランスフェクトしたところ，いずれの場合にも細胞突起形成と神経突起形成は抑制された．したがって Tc10 と RhoT は Cdc42 と同様に，N-WASP に結合して Arp2/3 複合体を介したアクチン重合を引き起こすことにより，これらの突起を形成することが明らかになった．しかし Tc10 や RhoT によって形成される突起は，Cdc42 によって形成されるマイクロスパイクとは明らかに形態が異なっている．このことは，Tc10 と RhoT の場合には N-WASP に加えてさらに別の蛋白質が突起形成にかかわっていることを示唆している．Par6 は Cdc42 の標的蛋白質として知られており，上皮細胞の細胞極性にかかわっている．そこで骨格筋に発現している Par6 アイソフォームを RT-PCR によりクローニングした．この Par6 は Tc10 と RhoT には結合するが，Cdc42 には結合しないことが two-hybrid system により示された．この Par6 アイソフォームが N-WASP とともに Tc10 や RhoT による独自の細胞突起形成にかかわっている可能性が考えられる．

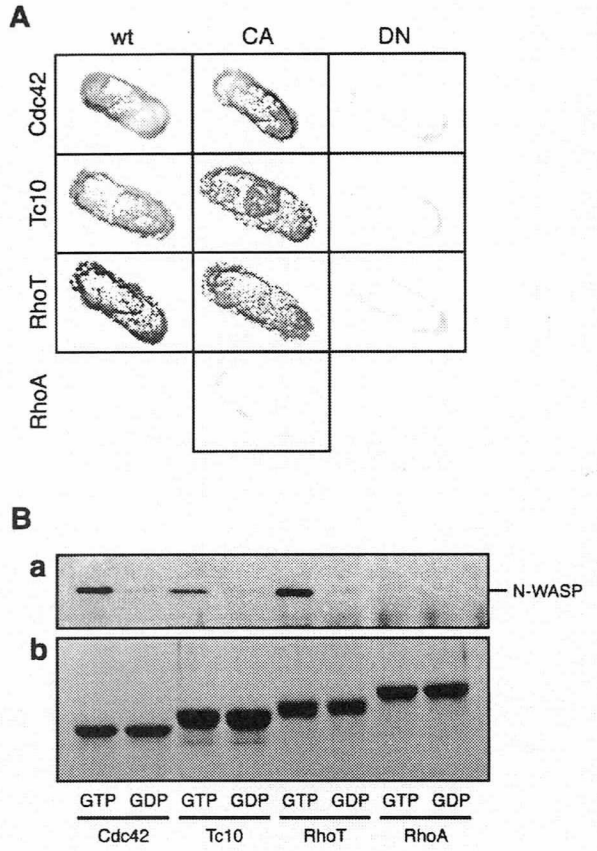


図 3　Cdc42 サブファミリーと N-WASP との結合．
(A) 酵母 two-hybrid system の β-ガラクトーシダーゼアッセイによる結合解析．Cdc42 サブファミリーと RhoA (コントロール) の野生型 (wt)，恒常的活性変異体 (CA)，およびドミナントネガティブ変異体 (DN) と N-WASP との結合を解析した．
(B) プルダウンアッセイによる結合解析．大腸菌に発現させた GST 標識低分子量 G 蛋白質に GTPγS または GDP を結合させ，細胞に発現させた HA-tag 付加 N-WASP との結合を解析した．

(2) Msx1 による成熟筋細胞の脱分化

RT-PCR によりクローニングした Msx1 cDNA に Myc-tag を付加し，AAV ベクターの系で成体マウス骨格筋に導入した．導入して 7 日ごとに，凍結切片を作製して筋組織の様子を観察した．導入 7 日後には，成熟筋細胞から分裂して Myc-Msx1 を発現している単核の細胞が見いだされた．28 日後には非常に多数の単核細胞が生じていた．ただしこの時期には単核の細胞でも Myc-Msx1 を発現しているものはほとんどみれらなくなった．これはエピソームの状態で存在している AAV ベクターが，細胞の分裂により希釈されたためであると考えられる．これらの単核の細胞はミオシン重鎖などの筋特異的蛋白質をもはや発現していなかった．これらの細胞はまた BrdU を取り込んだことから，細胞周期を回っていることが示された．以上の結果から，成熟筋細胞も Msx1 を過剰発現させることにより脱分化をすることが明らかになった．

考察と今後の展望

Tc10 は骨格筋と心臓に高く発現しており，C2 細胞の分化の過程で発現量が著しく増加した．このように筋細胞分化の過程で著しく誘導される低分子量 G 蛋白質はこれまでに知られていなかった．これらの結果から，Tc10 の骨格筋細胞分化における役割が強く示唆される．細胞融合においては細胞表層の突起が不可欠な役割を演じていると考えられている．したがって Tc10 はその突起形成を介して骨格筋細胞融合にかかわっている可能性が考えられる．このことを Tc10 のトランスフェクションにより検証するためには，低血清濃度の分化条件下でも骨格筋細胞へのトランスフェクションの効率が高くなければならない．そのために現在，Tc10 の恒常的活性変異体やドミナントネガティブ変異体を C2 細胞に効率よく導入する系を用いて解析を進めている．

一方，RhoT は心臓と子宮にほぼ特異的に発現していたことから，RhoT は心筋や平滑筋で特異的な機能をになっている可能性が考えられる．骨格筋細胞も含めてこれらの筋細胞には長軸方向と短軸方向の細胞極性が認められる．細胞極性はこれらの筋細胞が機能するうえで不可欠である．Tc10 と RhoT は骨格筋に発現している Par6 アイソフォームに結合したことから，何らかの細胞極性に関与していることは明らかである．現在，Tc10 が骨格筋細胞と心筋細胞の細胞極性の形成を，そして RhoT が心筋細胞と平滑筋細胞の細胞極性の形成を制御しているかどうかを解析中である．

RhoD は細くしなやかな細胞突起を形成した．しかもこれらの突起は細胞が隣接する面に形成された．したがってこの突起は細胞同士のコミュニケーションにかかわっていることが強く示唆される．この突起の形態は発生過程で胚の肢芽細胞にみられる突起に類似している．この肢芽細胞の突起がどのような働きをしているかまだ明らかではないが，RhoD がこの突起形成にかかわっているならば，RhoD が肢芽形成に重要な役割を果たしている可能性が考えられる．

Msx1 を骨格筋組織に導入したところ，成熟筋細胞が分裂することにより多数の単核細胞が生じた．これにより培養骨格筋細胞だけでなく，組織の成熟筋細胞にも脱分化がもたらされることが実証された．このようにして生じた単核細胞がやがて最終分化をして筋再生を引き起こすかどうかを，現在検討中である．筋再生が起こることが明らかになれば，筋ジストロフィー症の骨格筋に Msx1 を導入して生じた多数の単核細胞に正常な原因遺伝子を導入することにより，筋ジストロフィー症の治療に応用することが可能であろう．

文　献

1) Endo T and Nadal-Ginard, B : Reversal of myogenic terminal differentiation by SV40 large T antigen results in mitosis and apoptosis. J. Cell Sci. 111: 1081-1093, 1998.

2) Tsubakimoto K, Matsumoto K, Abe H, Ishii J, Amano M, Kaibuchi K and Endo T : Small GTPase RhoD suppresses cell migration and cytokinesis. Oncogene 18: 2431-2440, 1999.

3) Fukuoka M, Suetsugu S, Miki H, Fukami K, Endo T and Takenawa T : A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP)-binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. J. Cell Biol. 152: 471-482, 2001.

4) 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. 61-73, 2001.

5) Abe T, Miki H, Takenawa T and Endo T : Small GTPase Tc10 and its novel homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth. Submitted to J. Biol. Chem, 2002.

Ⅶ. 治　　療

未認可抗生物質ネガマイシンによるmdxマウスの治療

松田良一*

研究協力者　荒川正行*　川名正隆*　石浦章一*
笹川昇*　中山由紀**　原孝彦**
近藤信一***　浜田雅***　松尾雅文****
斎藤加代子*****　塩塚政孝******　武田伸一*******
加我君孝********

はじめに

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の患者の5～15%は遺伝子の途中にストップコドンが生じた，いわゆるナンセンス型突然変異によるものとされている．もし，点突然変異で生じたストップコドンを読み越えてmRNAを翻訳させることができれば，このナンセンス突然変異型DMDの治療が可能になる．ナンセンス突然変異型のCystic FibrosisやHurler syndromeにおいては，すでにアミノグリコシド系抗生物質ゲンタマイシンのもつストップコドン読み越え作用を応用して培養細胞レベルおよび患者の個体レベルでの治療研究が行われており，その薬効が証明されつつある．1999年，ペンシルバニア大のBarton-Davisらは同じゲンタマイシンをジストロフィン遺伝子にナンセンス突然変異を有するmdxマウスに投与し，ジストロフィンタンパク質の骨格筋内蓄積と筋症状の改善が起きたことを報告した．これらは，ナンセンス突然変異型遺伝子病の治療薬としてゲンタマイシンが有望であることを示している．しかし，感染症の場合と異なり，遺伝子病の治療薬として用いる場合には長期間投与が必須となる．その際，問題となるのが，ゲンタマイシンのもつ強い副作用（聴力障害，腎毒性など）である．さらに，耐性菌の問題も大きい．それでは，ゲンタマイシンと同様にストップコドンの読み越え作用があり，ゲンタマイシンより副作用が小さい別の抗生物質はないだろうか？

我々は文献検索の結果，1970年に（財）微生物化学研究会附属微生物化学研究所で発見されたジペプチド系抗生物質ネガマイシンがストップコドンの読み越え作用を持つと報告されていることを見出した．そこで，早速，同研究所からネガマイシンを入手し，mdxマウスへの投与実験を開始した．その結果，ネガマイシンを投与されたmdxマウスの骨格筋において1）蛍光抗体法とイムノブロット法によりジストロフィンタンパク質の蓄積，2）エバンスブルー陽性細胞数の減少を認めた．さらに，SV40-T遺伝子を導入したmdxマウス骨格筋細胞にネガマイシンを加えて培養したところ，ジストロフィンタンパク質の蓄積を認めた．

* 東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系
** (財)東京都臨床医学総合研究所
*** (財)微生物化学研究会微生物化学研究所菌学研究部
**** 神戸大学医学部小児科学教室
***** 東京女子医科大学医学部小児科学教室
****** 早稲田大学人間科学部基礎生物学
******* 国立精神・神経センター神経研究所遺伝子治療研究部
******** 東京大学医学部耳鼻咽喉科

材料と方法

ネガマイシン；微生物化学研究所に所蔵されているネガマイシン白色結晶（力価100%のもの）を用いた．溶液中での分解を避けるため，ネガマイシンは完全乾燥状態で低温保存し，投与直前にPBSに溶解，ろ過滅菌し使用した．用いたネガマイシンの濃度は$1.2X10^{-5}$あるいは$2.4X10^{-5}$mol/kg体重/day.

Mdxマウス；実験動物中央研究所および精神・神経センター神経研究所由来のmdxマウスを繁殖させ，その7～8週令のオスを用いた．

抗体；ジストロフィンC端40アミノ酸の合成ペプチドを抗原としてウサギに免疫して得たポリクロナル抗体およびノボカストラ社のモノクロナル抗体Dys2，Dys3を用いた．

蛍光抗体法；前頚骨筋(TA)を液体窒素中で粥状に冷却したイソペンタン内で急速凍結後，クリオスタットにて凍結切片を作成した．無固定あるいは低温アセトン固定した凍結切片に200倍希釈したポリクロナル抗体を室温1時間反応させ，洗浄後，200倍希釈した抗ウサギIgGヤギ抗体FITC標識抗体（Amersham）でさらに室温1時間反応させた．観察はツアイス・アキシオプランを用い，富士フィルムプロビア400を用いて写真撮影した．

イムノブロット；クリオスタットで薄切した20ミクロン厚の切片30枚を各種タンパク質分解酵素阻害剤(TPCK，TLCK，PMSF，EDTA)を含む抽出溶液(20mM Tris-HCl pH7.6，150m M NaCl，1%NP40，100μg/ml DNase I) 400μl中でホモジナイズし，その10,000rpm上清を採取し，そのタンパク質濃度を測定後，上清に対し3μlの抗ジストロフィン・ポリクロナル抗体を加え，室温で30分間反応させ，さらにプロテインA-Sepharose CL-4Bを加えて室温30分間反応させた．反応後，プロテインA-Sepharose CL-4Bを0.2%NP40を含むPBSで入念に洗浄し，SDSサンプル溶液にて沸騰水中で処理し，抗体添加前の溶液20μgタンパク

質分に相当するサンプルを5-10%SDSリニアグラジェント・ポリアクリルアミド・ゲル中で電気泳動した．泳動後，ニトロセルロース膜に転写し，5%スキムミルクPBS溶液にてブロッキングし，100倍希釈した抗ジストロフィン・モノクロナル抗体Dys2またはDys3にて室温1時間反応させ，入念な洗浄後，ECLキット(Amersham)に含まれる100倍希釈した抗マウスIgGパーオキシダーゼ標識抗体を室温1時間反応させ，洗浄後，マニュアルに従い発光基質を加え化学発光させX線フィルムに感光させた．

Mdxマウス骨格筋からの衛星細胞の採取とSV40-T遺伝子導入による準株化；2ヶ月令のオスmdxマウスの下腿筋を5%トリプシンin PBSで37度30分間処理し，ピペッティングにより細胞を遊離させ初代培養細胞を得た．その細胞に易熱分解性SV40-T遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入した．32度にて20%胎児牛血清in DMEM4000中で増殖培養し，38度にて10%馬血清in MEM（抗生物質不含）中で分化させた．分化条件で7日間培養し，筋管細胞が十分形成したことを確認後，ネガマイシンを加え，さらに7日間培養を続けた．その後，細胞を固定し蛍光抗体法あるいはイムノブロット法をおこなった．

ネガマイシンの毒性検査；mdxマウスに種々の量のネガマイシンあるいはゲンタマイシンを2週間にわたり皮下投与し，経日的に体重を測定した．また，7日間ネガマイシンあるいはゲンタマイシンを投与したmdxマウスの聴力試験をShapiroら（1984）の方法をもちいてauditory brain stem responseを測定した．

結　　果

mdxマウス骨格筋におけるジストロフィンタンパク質の蓄積；非投与mdxマウスのTA筋にはジストロフィン陽性線維は1%以下しか認められなかった．しかし，ネガマイシン処理されたmdxマウス由来のTA筋では5%以上のジストロフィン陽性線維が認められた．ジストロフィン陽性線維はクラスター状に存在した．エバンスブルー陽性線維は無処理mdxマウスでは18%存在したが，ネガマイシン処理マウスでは5%以下となり，変性筋ファイバー数の低下も認められた（図 1 A, B）．イムノブロット法を用い，ジストロフィンの存在および相対濃度を検討したところ，無処理mdxマウスTA筋では全くジストロフィンは検出されなかったが，ネガマイシン処理mdxマウスではジストロフィンが正常対照であるB10マウスのものと同じ分子量として検出できた．そのB10マウスTA筋のジストロフィンとの相対的比較をしたところ，ネガマイシン処理mdxマウスではB10のおよそ10%量のジストロフィンが蓄積しているものと思われた（図 2）．

培養mdx骨格筋細胞におけるジストロフィンタンパクの蓄積；易熱分解性SV40-T遺伝子の導入により準株化されたmdxマウス骨格筋細胞を用いてin vitroでのネガマイシンの効果を検討したところ，無処理細胞では認められないジストロフィンタンパク質の蓄積が蛍光抗体法およびイムノブロット法によって認められた．

ネガマイシンの毒性検査；mdxマウスに種々の量のネガマイシンを連日投与したところ，ジストロフィンの蓄積をもたらす量（1.2×10^{-5}mol/kg体重/day）の10倍量まではマウスの体重は増加を続けた．50，100倍量においては体重の減少が認められたが，死亡には至らなかった．しかし，100倍量のゲンタマイシンを投与されたmdxマウスは初回投与の4時間後には全員死亡した．したがって，ネガマイシンのLD50はゲンタマイシンのそれに比べはるかに高い，つまり，毒性が低いことが示唆された．聴力検査の結果，ゲンタマイシン投与マウスでは80dB以下の音に対する聴覚は明らかに喪失していたが，ネガマイシン投与マウスでは同様な聴力の喪失は認められなかった．

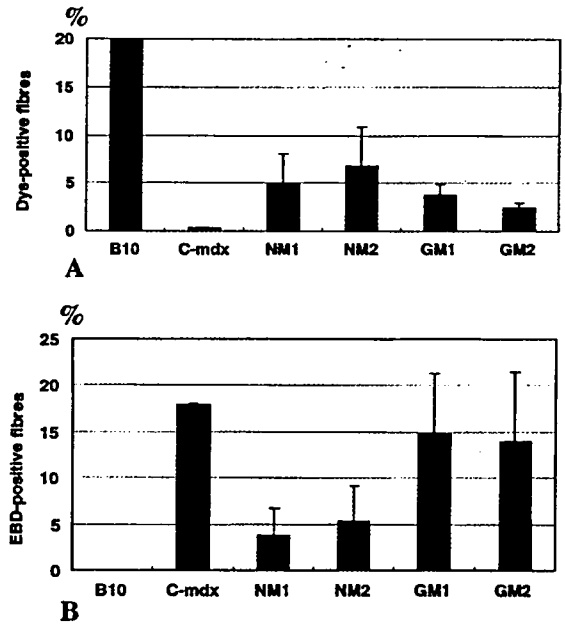


図1　A：Dystrophin expression in TA muscle fibers of antibiotic-treated mice. B：Evans Blue Dye-positive fibers in TA muscle fibers of antibiotic-treated mice. Mdx mice (7 weeks old, 3 mice each) were given a subcutaneous injection of NM or GM at doses of 2.4×10^{-5} mol/kg/day (NM1, GM1) or at 1.2×10^{-5} mol/kg/day (NM2, GM2) in PBS for two weeks. Control mdx mice (n=3) and C57BL/10 (B10)(n=3) mice were injected with PBS (0.1ml) only. After antibiotic treatment for two weeks, all animals were given an injection of Evans Blue Dye (EBD, 2% EBD in PBS, 0.1ml) intraperitoneally. About 350 to 550 muscle fibers were counted in each mouse (n=3). Bars indicate the means ± the standard deviations.

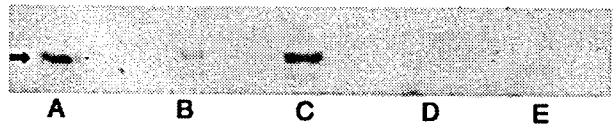


図2　Immunoblot of dystrophin protein (427kDa) in TA muscle. A, B10 control mouse; B, NM-treated mdx mouse; C, NM-treated mdx mouse (ten times the amount of protein B in slot was loaded); D, untreated mdx mouse; E, GM-treated mdx mouse. Dystrophin indicated by arrow was visualized by ECL, and only the dystrophin area of the gel is shown.

考察と今後の展望

グラムネガティブなカナマイシン耐性菌に効く抗生物質として30年以上も前に発見されたネガマイシンは，リジンのC端にヒドラジド酢酸が結合したジペプチド系抗生物質である．ネガマイシンは大腸菌由来の無細胞翻訳系においてストップコドンの読み越え作用を示すユニークな抗生物質であったが，毒性試験中に投与犬が1匹死亡したこと，構造上，ヒドラジド酢酸が遊離した場合に予想される毒性などのため，臨床試験プロセスの初期に治療薬としての開発を断念された経緯をもつ未認可抗生物質である．しかし，上に述べたとおり，その毒性は適切な保存法と溶液作成法を用いれば，認可抗生物質であるゲンタマイシンより，(少なくともマウスにおいては) はるかに毒性は低く，そのLD50の1%以下でmdxマウスの骨格筋にジストロフィンタンパク質の蓄積を起こさせる程の有効性をもっている．この点については今後，投与法，投与期間等について検討すると共に犬を用いた大規模な毒性試験を行う必要がある．

今回の一連の実験により，ネガマイシンを投与されたmdxマウスの骨格筋において，in vitroでもin vivoでもジストロフィンタンパク質の蓄積を認めたことから，この抗生物質は真核細胞においてもストップコドンの読み越え作用を有することが初めて証明された．さらに，投与されたマウスの体重変化，聴力検査などからゲンタマイシンより毒性がはるかに低く，ナンセンス突然変異型の遺伝子病に有効な抗生物質であることが示唆された．

微生物化学研究所ではネガマイシンを産生する放線菌はいくつか分離されており，その中にはネガマイシン本体以外にもいくつかの天然類縁体を産生するものがあることが知られている．これまで，ネガマイシンのスクリーニングはすべて抗菌活性をもとに行われてきたが，抗菌活性とともに真核細胞におけるストップコドン読み越え活性をスクリーニングに加えていけば，ネガマイシンの類縁体の中にさらに有望な抗生物質が見つかる可能性もある．これら類縁体の活性とその分子構造の比較から，さらに人為的化学修飾（ドラッグ・デザイン）を行うヒントが得られる可能性もある．今後は微生物化学研究所の協力を得て，ネガマイシンの大量生産，類縁体の生産を行い，それらの活性や毒性の検討を行いたい．

これまでジストロフィンタンパク質の蓄積をマーカーにmdxマウスや同マウス由来骨格筋細胞を用いて研究してきた．しかし，ジストロフィンの蓄積量はもともと低く，さらに分子量も通常のタンパク質より大きいため，実験の遂行にしばしば困難が伴った．そこで，今後の抗生物質のストップコドン読み越え活性の測定にはルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子にストップコドンを挿入した遺伝子をCOS細胞等に導入したものを用いる必要がある．さらに，そのストップコドンの種類や周辺の塩基配列がネガマイシンの作用にどのような影響を及ぼすかを検討する必要がある．

今回の実験では，mdx骨格筋衛星細胞由来の準株化細胞を作成し，その細胞を用いて，ネガマイシンの効果検定を行った．同様に，ヒトDMD患者の生検資料由来の衛星細胞を分化能をもったまま準株化することができれば，それを用いて個々の患者に最適な治療法の選定を行うことができる．つまりオーダーメードの遺伝子治療を行う上で，このような個々の患者由来の細胞株の作成は基本的手段となるものである．今後はナンセンス突然変異型のヒト筋ジストロフィー患者由来の筋細胞を易熱分解性SV40-T遺伝子を導入し，準株化した細胞を用いて，ネガマイシン等の抗生物質の作用をin vitroで調べ，個々の患者にとって副作用がより少ない，ストップコドン読み越え活性がより高い抗生物質の検索を行っていきたい．

発表論文等

1) Arakawa, M. et al: Negamycin can restore dystrophin in mdx skeletal muscle. Acta Myologica. XX; 154-158. 2001.

2) 荒川正行，松田良一: 筋ジストロフィーの分子病態と治療の可能性—
Duchenne型筋ジストロフィーを中心に
モレキュラー・メディシン38: 1284-1289, 2001.

3) 荒川正行，松田良一: ネガマイシンにより筋ジストロフィーの治療　難病と在宅ケア 7: 256-29, 2001.

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* Agus Surono*

目　的

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の責任遺伝子としてジストロフィン遺伝子がクローニングされて以来 10 年以上経過するが，未だ DMD の治療法は確立されていない．しかし，DMD に関する分子病態の解明は進み，多くでジストロフィン mRNA のアミノ酸読み取り枠にずれがあることが明らかとなってきた．私たちは，DMD の治療法として，このアミノ酸読み取り枠のずれを修正してジストロフィンの産生を回復させる方法について検討してきた．

これまでに私たちは，ジストロフィン遺伝子のエクソン 19 にはスプライシング促進配列があり [1]，この配列の機能を阻害す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が可能なことを明らかにした [2]．さらに，ジストロフィン遺伝子のエクソン 20 が欠失してmRNA のアミノ酸読み取り枠にずれを有する DMD 患者から筋細胞を分離し，その細胞にエクソン 19 のスプライシング促進配列の機能を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した．すると，エクソン 19 のスキッピングが誘導されて，アミノ酸読み取り枠のずれが修正されるとともに，この修正されたジストロフィン mRNA からジストロフィンが産生されることを確認した [3]．

これらの成果は，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を解明することにより，こうした治療法のさらなる展開が可能となることを示した．

本研究は，ジストロフィン遺伝子の各エクソンの配列が有するスプライシング促進配列を明らかにするものである．また，ジストロフィン遺伝子のエクソン 19 内のスプライシング促進配列の活性部について検討を加えた．

方　法

スプライシング促進能の解析

本研究では，ショウジョウバエの dsx 遺伝子のイントロン 3 のスプライシングがその下流にある配列に依存して進行することを利用した反応系を用いてスプライシング能を解析した．ショウジョウバエの dsx 遺伝子のエクソン 3，イントロン 3 及びエクソン 4 とアダプター配列からなるミニ遺伝子を作成する（図 1a）．このアダプター配列にジストロフィン遺伝子の各エクソン内のスプライシング促進配列の候補となる配列を挿入したキメラ遺伝子を構築した．このキメラ遺伝子から in vitro の転写反応により P^{32} でラベルした pre-mRNA を合成した．この合成 pre-mRNA を HeLa 細胞核抽出液と混じ in vitro のスプライシング反応を進行させた．そして，産生される成熟 mRNA 量を測定し，各配列のスプライシング促進能とした．

エクソン 19 内のスプライシング促進配列の解析

これまでに，ジストロフィン遺伝子のエクソン 19 の配列内の 31 塩基にスプライシング促進機能があることを報告してきた [1]．今回，その配列の活性部位を明らかにするため，エクソン 19 内に様々な欠失を人工的に加えたミニ遺伝子を作製し，その遺伝子産物のスプライシング反応を細胞内で実際に起こさせる系を用いて解析した．そのため，ジストロフィン遺伝子のエクソン 18，イントロン 18，エクソン 19，イントロン 19 とエクソン 20 からなるミニ遺伝子を作製した．このエクソン 19 の配列部位にジストロフィン神戸で欠失していた 52 塩基，スプライシング促進配列と考えられる 31 塩基，あるいはこの 31 塩基を 3 分割した配列のそれぞれを欠失させたものを用いた．そして，各種のエクソン 19 の配列を持ったミニ遺伝子を HeLa 細胞内に導入した．導入後にミニ遺伝子から転写されたジストロフィン mRNA を RT-PCR 法を用いて解析した．

結　果

ジストロフィン遺伝子のポリプリン配列のスプライシング促進能

ジストロフィン遺伝子の欠失のホットスポットに隣接するエクソン 43，46，53 から抽出したポリプリン配列を含む 31 塩基について，そのスプライシング促進能を解析した（図 1b）．各キメラ遺伝子の pre-mRNA からはイントロンが切り取られた成熟 mRNA が産生されたが，エクソン 43 から由来した配列を挿入したミニ遺伝子から最も多くの mRNA が産生され，この配列にスプライシング促進機能があることが判明した [4]．

* 神戸大学大学院医学系研究科遺伝病統御学

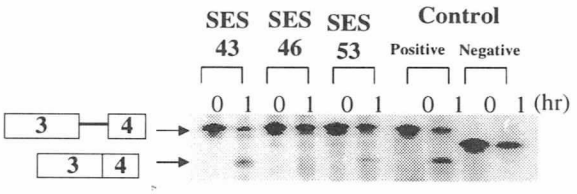


図1　スプライシング促進能の解析

a．キメラ遺伝子の構造
ジョウショウバエの dsx 遺伝子のエクソン 3・イントロン 3・エクソン 4 と黒枠で示すアダプター配列からなるキメラ遺伝子を作製した．

b．スプライシング反応産物解析
P^{32} でラベルしたキメラ遺伝子からの pre-mRNA を HeLa 細胞核抽出液と混じ，産生された mRNA 量を電気泳動で分離した．キメラ遺伝子の下流に何も入れない時にはスプライシング産生はみられず（Control），エクソン 43 由来の配列を挿入したものからは明らかな mRNA が検出されたが，エクソン 46 と 53 由来の配列を挿入したものからはあまり mRNA は産生されなかった．

エクソン 19 のスプライシング促進配列

様々なエクソン 19 の配列をもつミニ遺伝子のスプライシング産物を解析した．その結果，ジストロフィン神戸で欠失したのと同じ 52 塩基が欠失したものではエクソン 19 のスキッピングがすべての mRNA で生じた．一方，スプライシング促進配列と考えられた 31 塩基を欠失させたものでは，一部の mRNA でのみエクソンのスキッピングがみられた．また，31 塩基を 3 分割した配列のうち，中央部を欠失させた配列ではすべての mRNA からエクソン 19 が消失し，この領域が最も強いスプライシング促進能を有するものと考えられた．この領域は，特にプリンに富むわけでもなく，そのスプライシング促進能の由来については不明であった．

考　　察

ジストロフィン遺伝子はイントロンのサイズが極めて大きく，巨大なイントロンを切り取る際にはスプライシング促進配列の機能が特に重要な役割を果しているものと考えられるが，その詳細は未だ不明である．今回，遺伝子欠失のホットスポット周辺のエクソンではエクソン内のポリプリン配列が必ずしもスプライシング促進配列ではないことを示し，本遺伝子のスプライシング制御機序の複雑さを示した．

また，ジストロフィン遺伝子のエクソン 19 内のスプライシング促進配列についてはよりその機能部位が特定でき，今後の治療法の開発に重要な情報となった．

今後の展望

今回の研究において，ジストロフィン遺伝子の 1 部のエクソン配列内にスプライシングを促進する能力を有する配列があることが判明した．このことは，ジストロフィン遺伝子の欠失のホットスポットに遺伝子の欠失を有する DMD 例でもスプライシング促進配列の機能を阻害してエクソンのスキッピングを誘導する治療法が可能であることを示唆した．今後，この方面での研究がさらに進展し，多くの DMD 症例でも治療が可能となることを期待する．

研究業績

1) Takeshima Y, et al : Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe. J. Clin. Invest. **95**: 515-520, 1995.

2) Pramono Z.A, et al : Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. **226**: 445-449, 1996.

3) Takeshima Y, et al : Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient. Brain Dev. **23**: 788-790, 2001.

4) Ito T, et al : One of three examined purine-rich sequences selected from dystrophin exons exhibits splicing enhancer activity. Acta Myologica. **20**: 151-153, 2001.

細胞死抑制の蛋白治療法の開発

太田成男*

研究協力者　麻生定光**　山縣久美**　尾崎大也**
北澤梨々**　木村　恵**　大澤郁朗**
森　隆**　平出智晴***　桂　研一郎***
片山秦朗***

目　的

筋ジストロフィーやミトコンドリア脳筋症をはじめとする筋疾患では，細胞死が促進されて組織が萎縮する．細胞死には能動的なアポトーシス（細胞自滅）と事故的なネクローシス（壊死）があり，アポトーシスが実行される経路は明らかにされつつある．ミトコンドリア脳筋症患者組織でもアポトーシスを制御する因子発現の変動が観察され，アポトーシスによって細胞死が進行していることを予測させる．一時的にでも細胞死を抑制することが可能になれば，細胞死が促進されている筋疾患の病態を改善することも可能になるはずである．

そこで細胞死を強力に抑制するアポトーシス抑制因子を人為的に作成することが重要である．細胞内で発現させ細胞死を抑制することによって筋疾患の改善治療に適用することが考えられる．しかし，遺伝子導入法では，方法自身の開発状況，社会的状況より判断して，現時点では現実的とは思えない．HIVのもつTAT蛋白のPTDは蛋白質を膜通過させる能力を持つ．そこで，PTDと融合した蛋白を作成し，蛋白質を細胞外から細胞内へ導入できるかどうか検討した．さらに，実験動物を用いて細胞死を抑制する臨床的な応用が可能かどうかを検討した．

その結果，人為的に作成したPTD-Bcl-xFNKは実験動物において，様々な障害に対して細胞を良好に維持できることを示すことができた．

方法と結果

(1) スーパーアポトーシス抑制因子の作成

まず，強力に細胞死を抑制する因子の遺伝子を人為的に作成することを試みた．アポトーシを制御する因子にはBcl-2ファミリーとよばれる一群の因子があり，そのなかでもBcl-xLはアポトーシスを抑制する能力が強い．ラットBcl-xLは我々によって遺伝子がクローニングされ（1），精製蛋白が結晶化された．さらに，X線結晶解析によって，Bcl-xLの立体構造が決定された（2）．その基本構造は7本のα-ヘリックスから成り立ち，チャンネルを形成可能な構造をしていた．中央のチャンネル形成領域（α5とα6）は周囲のヘリックスからの9本の水素結合によって維持されている．このヘリックス間の水素結合を消失させるとさらにイオンチャンネルを形成されやすくなると考えた．水素結合を形成しているアミノ酸を同義アミノ酸に変化させることで，水素結合を消失させた．実際にはBcl-xの22番目のチロシンをフェニルアラニンに，26番目のグルタミンをアスパラギンに，165番目のアルギニンをリジンになるようにbcl-x遺伝子に変異を導入し，この蛋白をBcl-xFNKと命名した（3）．この遺伝子を導入したJurkat細胞はヒドロキシウレア（1 mM），カンプトテシン（1 mM），トリコスタチンA（1 mM），TN-16（10 mM），スタウロスポリン（20 nM），パラコート（1 mM），過酸化水素（0.1 mM）に対しBcl-xLを導入した細胞より耐性になった．さらに，加熱（45度C，10分）にも耐性になった．

さらに無血清培地でも細胞の増殖を可能にした．**図1**はbcl-xFNK遺伝子を導入したCHO細胞の無血清培地におけるコロニー形成の様子を示す．

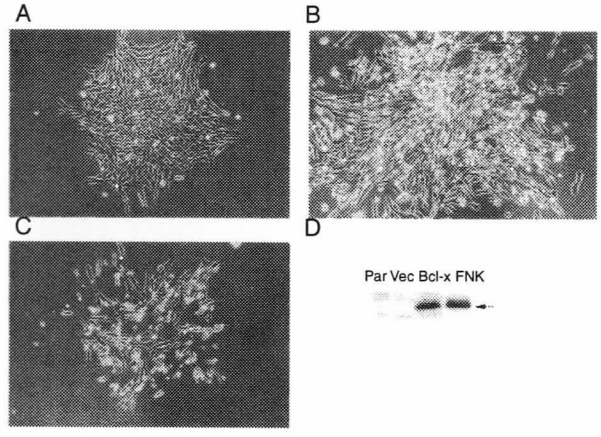


図1　Bcl-xFNKの強力な細胞死抑制効果．
CHOにBcl-xFNK，Bcl-xL，コントロールベクターを導入し，安定的に蛋白を発現する細胞クローンを分離した．HamF12/DMEM培地（血清無し）でコロニーを形成させた．A:Bcl-cFNK遺伝子導入細胞（コロニーを形成し，死細胞はほとんど見られない）．B：Bcl-xL遺伝子導入細胞（コロニーは形成するが死細胞が混在している）．C：コントリールベクター導入細胞．D：Western blotにより発現量が同じであることを確認している．

* 日本医科大学老人病研究所生化学部門
** 日本医大老研生化学
*** 日本医大・第二内科

(2) スーパーアポトーシス抑制因子の細胞内への導入

bcl-xL改良型遺伝子, bcl-xFNKのN末端側に, HIVのTAT蛋白質のPTDドメイン遺伝子を結合させ，大腸菌で誘導発現させた．不溶性のPTD-Bcl-xFNK蛋白質は，7M尿素で可溶化し，SDS電気泳動によって精製した．

培養細胞に添加するだけでPTD-Bcl-xFNKが細胞に取り込まれ，ミトコンドリア上へ移行することが免疫染色で確認され，細胞死を抑制することが確かめられた．

また，培養しにくい軟骨細胞をスライス培養し，培養液にPTD-Bcl-xFNKを加えて長期培養した．対照軟骨，PTD-Bcl-xLを導入した軟骨に比べ，培養後の細胞変性・死が明らかに抑制され，長期間の維持が可能になった．さらに，スライス培養中も軟骨組織の弾性を保ち自らの環境を形成する傾向がみられた．

(3) スーパーアポトーシス抑制因子の適用

マウスの腹腔投与で少なくとも肝臓，小腸，脾臓の各組織の細胞に取り込まれることを免疫組織染色で確認した．

放射線照射・薬剤処理された実験動物でその細胞死抑制効果や病態の改善を組織化学的検討した．致死量の4倍のX線照射したマウスにPTD-Bcl-xFNKを連日投与することで，照射後の生存時間が有意に延長され，脾臓細胞の変性と脾臓組織の萎縮が著しく抑制されていた．肝障害のモデルとして，マウスに四塩化炭素，デキサメタゾン，エタノールを投与した．**図2**は四塩化炭素，あるいはデキサメタゾン投与後の肝臓の組織である．PTD-Bcl-xFNKをあらかじめ投与したマウスでは脂質沈着などの肝臓細胞の障害がほとんど見られない．スナネズミの5分間前脳虚血モデルでは，PTD-Bcl-xFNK前投与することで海馬神経細胞の遅発性神経細胞死が顕著に抑制された．**図3**は，CA1領域の神経細胞が虚血によってほぼ死滅するのに対し, PTD-Bcl-xFNK投与スナネズミでは神経細胞は生存している．

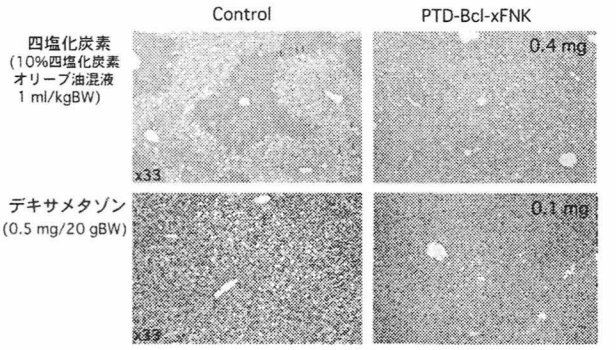


図2　PTD-Bcl-xFNK蛋白のマウス腹腔内投与の効果．
PTD-Bcl-xFNKをマウスに0.4 mg, 0.1mg投与し, 四塩化炭素あるいはデキサメタゾンを投与した．一日後に環流固定し，組織をヘマトキシリンエオジン染色した．

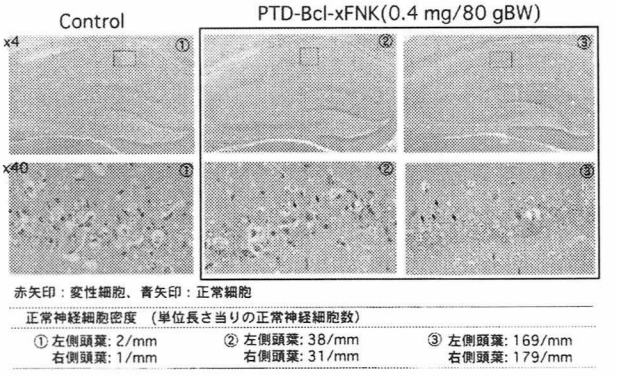


図3　脳虚血モデルのスナネズミの海馬への
PTD-Bcl-xFNK投与の効果．
PTD-Bcl-xFNK蛋白を腹腔投与後，前脳虚血5分処理をし，一週間後に脳組織をヘマトキシン　エオジン染色した．対照スナネズミのCA1領域の神経細胞はほぼ死滅したが，PTD-Bcl-xFNK投与スナネズミの神経は生き残った．

考察と今後の展望

以上の結果より，スーパーアポトーシス抑制因子PTD-Bcl-xFNKは広い範囲で細胞死を抑制することができる．動物実験によりPTD-Bcl-xFNKの適用がかなり現実的であることが示唆された．

培養のしにくい細胞の培養，無血清培地における培養，臓器移植の際の臓器の維持，火傷，肝臓疾患，心臓疾患，脳梗塞，放射線障害などの急性疾患に適用可能と思われる．

文　　献

1) Shiraiwa et al: J Biol Chem. **271**: 13258-13265. 1996.
2) Aritomi et al: J Biol Chem **272**: 27886-27892. 1997.
3) Asoh et al:. J Biol Chem **275**: 37240-37245. 2000.

Dehydroepiandrosterone sulfate のミオトニーに対する治療効果と作用機序

栗原照幸*

研究協力者 井本敬二** 森 誠之**
根本 博* 岸 雅彦*

目 的

杉野らは[1] 1998 年に筋強直性ジストロフィー(MD) 11 例の患者に dehydroepiandrosterone sulfate(DHEAS) 200mg を 8 週間連日静注したところ，治療開始 4 週後にミオトニーの軽減及び日常生活動作の改善がみられたことを報告した．その作用機序は不明である．そこで，DHEAS がミオトニーを抑制する効果の有無を筋細胞内記録で明らかにし，ミオトニーの成因から考えて[2,3] Na^+ channel をターゲットの候補として取り上げ，組換え Na^+ channel を発現した系を用いて DHEAS の効果を patch clamp 法で検討した．

方 法

1) 筋細胞記録では，C57BL/10Sc マウスの横隔膜標本を用いて，細胞内記録を行った．ミオトニーは Cl channel blocker である anthracene-9-carboxylic acid（A9C）を 10^{-4}M/L で Tyrode 液に加えて起こし，また Na channel 不活性化を阻止する anemone toxin を 0.02-0.04 μM/L の濃度で Tyrode 液に加えてもミオトニーを起こすことができる[4]．その他 Cl channel が発現していない SWR/J-Clcn1$^{adr\text{-}mto}$（mto mouse）の横隔膜標本についても，検討を加えた．

2) patch clamp については，ラット骨格筋 Na^+ channel の cDNA を HEK293 細胞に一過性に発現させ，Na+電流を whole cell モードの patch clamp 法で測定した．

結 果

1) 筋細胞内記録では，C57BL/Sc10 マウスの横隔膜標本で，Tyrode 液では RMP は-82.2–4.1mV から-88.2–3.5mV であるが，A9C を加えてミオトニーを起こすと，RMP は-74.2–7.1mV から-76.6–8.5mV に脱分極した．DHEAS を 160-320mg/L 加えると，RMP は夫々-81.0mV，-82.0mV に改善した．

微小電極刺入時の insertion myotonia は，A9C によって筋細胞 50 本中 76％にみられていたものが，DHEAS160mg/L を加えることによって，18%までに抑制された．Mto mouse についても，DHEAS は表 1 のようにミオトニーの抑制効果を示した．

表 1 mto マウスは stop codon によって筋細胞膜に Cl channel が発現していないミオトニーのモデルマウスである．mto マウスの横隔膜標本を Tyrode 溶液に浸して，95％O_2 と 5％CO_2 の混合ガスを通じて酸素化し，ガラス管微小電極をもちいて筋細胞内記録を行った．微小電極が筋細胞内に刺入されるとすべての筋線維で myotonic burst が起こった（表の最上段）．次に DHEAS 40mg/L から 320mg/L の濃度で加えると膜電位は次第に -89.8mv へと過分極した． ＊印は Tyrode 溶液中の膜電位-79.7mv に比べて優位に過分極している場合を示す．ミオトニーは濃度依存性に抑制され，DHEAS 320mg/L の高濃度では，insertion myotonia は完全に抑制された．

	RMP	S.D.	No.	% of insertion myotonia
Tyrode Solution	−79.7mv	5.5 mv	40	100 %
+DHEAS 40mg/L	−80.8	5.2	40	98
+DHEAS 80mg/L	−79.9	4.8	40	55
+DHEAS 120mg/L	−79.1	5.8	40	53
+DHEAS 160mg/L	−83.1 *	5.3	40	30
+DHEAS 200mg/L	−87.3 *	7.1	40	20
+DHEAS 320mg/L	−89.8 *	5.6	40	0

* statistically significant difference

Anemone toxin によって起こしたミオトニーでは，RMP の脱分極はなく，0.02 μM/L の anemone toxin では，69 本の筋細胞中 22 本(31.9%)に insertion myotonia を認め，0.04 μM/L の anemone toxin では 70 本の筋細胞中 61 本(87.1%)に insertion myotonia を認めた．DHEAS を加えると，insertion myotonia は筋細胞 90 本中 19 本(21.1%)まで抑制された．

2) patch clamp 法では，Na^+ channel を発現した HEK 細胞には，数 nA の電流が観察された．DHEAS を投与したところ電流は濃度依存的に減少したが，washout により電流の大きさは即座に回復した．また活性化と不活性化の速度に著変は観察されなかったが，不活性化の電位依存性がマイナスの方向に約 10 mV シフトしていた．

考 察

Cl channel の異常によるミオトニーと Na channel の不活性化障害によるミオトニーの両者に DHEAS はミオトニー軽減作用が認められた．Patch clamp 法による検索から，DHEAS は，Na^+channel に作用してミオトニーを軽減している．

* 東邦大学医学部第四内科
** 岡崎国立共同研究機構生理学研究所液性情報研究部門

研究の意義

筋細胞内記録によって DHEAS は，Na channel の異常によって起こるﾐｵﾄﾆｰと Cl channel の異常によって起こるﾐｵﾄﾆｰの両者にﾐｵﾄﾆｰ軽減効果のあることを示した [5]．またその作用機序は，Na channel に作用してﾐｵﾄﾆｰを軽減している事を明らかにした [6]．このような結果から，今後の展望としては，筋力を低下させずにﾐｵﾄﾆｰを抑制することのできる Na channel blocker の開発が重要で，経口投与可能な薬物開発が必要である．

参考文献

1) Sugino M, Ohsawa N, Ito T et al : A pilot study of dehydroepiandrosterone sulfate in myotonic dystrophy. Neurology **51**: 586-689, 1998.
2) Franke CH, Hatt H, Iaizzo PA et al : Characteristics of Na^+ channels and Cl^- conductance in resealed muscle fibre segments from patients with myotonic dystrophy. J Physiol **425**: 391-405, 1990.
3) Mounsey JP, Xu P, John III E et al : Modulation of skeletal muscle sodium channels by human myotonin protein kinase. J Clin Invest **95**: 2379-2384, 1995.
4) 栗原照幸：ミオトニーとチャネロパチー．臨床神経 **39**：1219-1221，1999.
5) Kurihara T, Kishi M, Nemoto H : The effect of dehydroepiandrosterone sulfate on myotonia: Intracellular study. Proceedings of the third International Myotonic Dystrophy Conference, Kyoto, Japan: 58, 2001.
6) Imoto K, Kurihara T, Mori M, Nemoto H : Suppressive effect of dehydroepiandrosterone sulfate on myotonia by interacting with Na channel. Proceedings of the third International Myotonic Dystrophy Conference, Kyoto, Japan: 58(Comments), 2001.

Small Group Workshop

1) 2000. 2. 9 Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) 131
東邦大学医学部第四内科 栗 原 照 幸

2) 2000. 2. 10 Calpainopathy (LGMD2A) 133
東京大学大学院農学生命科学研究科 反 町 洋 之

3) 2000. 8. 29 ミオトニー疾患の病態治療 139
東邦大学医学部第四内科 栗 原 照 幸

4) 2000. 11. 20 FCMD の病態解明 141
大阪大学大学院医学系研究科 戸 田 達 史

5) 2001. 3. 22 Perspectives to studies on myogenesis and therapeutics of muscular diseases in 21st century. 144
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

6) 2001. 12. 14 A Small Group Workshop on Dysferlinoparhy 146
東北大学医学部神経内科 青 木 正 志

7) 2002. 1. 17 Development of New Therapy for Muscular Dystrophy -Progress in Basic Research- (武田班との合同) 150

Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD)

(Moderator : Kiichi Arahata, Teruyuki Kurihara)

Time: February 9, 2000 (Wednesday) Official Language: English

Place: Conference Room 18 (B1 Floor of Zenkyoren Building)

10:00-10:05 Welcome address Kiichi Arahata

Key note lecture (Chairperson: Teruyuki Kurihara)

10:05-10:45 Clinical spectrum and pathogenesis of EDMD
(Prof. Emeritus Alan E.H. Emery)

///COFFEE BREAK///

Emerinopathy (X-EDMD)

11:00-11:15 Case presentation (Takafumi Hasegawa, Neurology, Tohoku U.)

11:15-11:30 Case presentation (Tatsuya Ishikawa, Pediatrics, Nagoya City U.)

11:30-11:45 Cardiac manifestations of EDMD (Yoshihito Hata, Cardiovascular Center, Iwate Medical College)

11:45-12:00 Discussion

///LUNCH///

Laminopathy (AD-EDMD)

13:00- 13:40 Clinical genetics (Gisele Bonne, Paris)

13:40- 14:00 Gene structure and expression of lamin A/C
(Noboru Nakajima, Biomolecular Engineering Institute, Osaka)

Structure and function of the nuclear envelope proteins

14:00- 14:15 Emerin (Yuichi Tsuchiya, Biochemitry, Toho University)

14:15- 14:25 Additional comments: Emerin-binding proteins
(Shoichi Ishiura, University of Tokyo)

14:25- 14:40 Morphological study on emerin
(Hiroshi Yorifuji, Anatomy, National Defense Medical College)

14:40- 15:00 Discussion

///COFFEE BREAK///

DNA microarray analysis

15:20-15:40 (Toshifumi Tsukahara, National Institute of Neuroscience, NCNP)

Gene therapy

15:40-16:55 (Seiichi Tsujino, National Institute of Neuroscience, NCNP)

General discussions and summary

15:55-16: 30

Emery-Dreifuss muscular dystrophy（EDMD）

栗 原 照 幸*

Emery-Dreifuss muscular dystrophyは，1966年にEmeryとDreifussによってUnusual type of benign X-linked muscular dystrophyとしてはじめて報告された．

このワークショップでは，Emery先生が出席され，本疾患をはじめて1疾患単位として確立するに至った家系調査，臨床徴候，疾患の原因としてemerinが骨格筋および心筋の核膜で欠損していること，突然死をすることのあるこの疾患では，心ペースメーカー植え込みが救命のために必要であることを話された．またフランスのBonne先生がLaminopathy（常染色体優性Emery-Dreifuss筋ジストロフィー）について講演されて，本疾患と臨床症状は同じであるが，遺伝形式が常染色体優性でemerinの欠損はなくlaminopathyである症例を分子遺伝学を中心に述べられた．

Emeryと Dreifussによりはじめに報告された疾患は，X染色体劣性遺伝の疾患で，3徴として1）早期発症の肘，アキレス腱，後頸部の拘縮，2）上腕，腓骨筋の萎縮と筋力低下，3）右心房優位の心筋症，心伝導障害を来たす．この疾患では筋細胞の核膜に存在するemerinという蛋白が欠損していることがあきらかにされ，emerin欠損を証明するには生検筋，生検皮膚，リンパ球，口腔粘膜を用いる．本疾患では心伝導障害による突然死の報告があり，心電図では，P波振幅低下や，胸写では右心房拡大がみられるが，臨床症状と照らして早期の心ペースメーカー植え込みが延命につながる．核膜の2重のlayerのうち，emerinは内側のinner nuclear membraneに付く蛋白質である．emerin欠損による筋ジストロフィーの発現機序は不明である．emerinは254個のアミノ酸からなり分子量が小さいので遺伝子治療，plasmidの導入がし易い可能性がある．

Bonne先生の講演では，Emery-Dreifuss muscular dystrophyと臨床症状が同じであるが，遺伝形式が常染色体優性遺伝を示し，内側の核膜の下にメッシュ状に存在するLamin A，Lamin Cの遺伝子変異によって起こるLaminopathyが見いだされている．やはり早期の心ペースメーカー植え込みが突然死予防の大切な治療である．

本邦にもこの疾患は存在し，東北大学の長谷川らにより，23歳の男性症例で，意識消失発作，心不整脈，足関節の拘縮を来した症例がこのワークショップでも発表された．名古屋市立医大の石川ら，および岩手医大の心血管センターのHataらにより本疾患の心機能について詳細に発表され，洞性徐脈，AV block，房室解離，右房の肥大，LVEFの低下などを来した症例の提示と，心ペースメーカー植え込みによって突然死を予防することの重要性を述べた．

今後の研究

1）筋および心筋の核膜に存在するemerinが欠損するとなぜ筋ジストロフィーが起こるかの病態生理は不明であり，今後明らかにしていく必要がある．
2）Emerinは，254個のアミノ酸からなり分子量が小さいので遺伝子治療，plasmidの導入がし易い可能性があるので治療的研究が必要である．
3）早期診断をして心ペースメーカー植え込みが延命につながるので，本疾患の存在と診断法の周知が必要である．

* 東邦大学第四内科

Calpainopathy (LGMD2A)

(Moderator: Drs. Hiroyuki Sorimachi, Ko Sahashi)

February 10, 2000 (Thursday)

Special invited lecture

(Chairperson: Dr. Teruyuki Kurihara)

10:00-11:00 Successful organization of the ENMC Workshops on neuromuscular diseases

Prof. Emeritus Alan E.H. Emery, ENMC

11:00-11:30 Discussions

11:30-13:00 ///// LUNCH /////

Small Group Workshop- 2

Calpainopathy (LGMD2A)

(Moderator: Drs. Hiroyuki Sorimachi, Ko Sahashi)

13:00-13:05 Welcome address Dr. Ko Sahashi

Key note lecture

(Chairperson: Dr. Hiroyuki Sorimachi)

13:05-14:00 History of finding calpains and current studies on calpains

Prof. Koichi Suzuki, University of Tokyo

Molecular biochemistry and pathology of calpains

14:00-14:30 Pathology of non-skeletal muscle calpains

Dr. Takaomi C. Saido, RIKEN Brain Science Institute

14:30-15:00 Muscle Pathology of calpain 3 deficiency

Dr. Ko Sahashi, Aichi Medical University

///// COFFEE BREAK /////

Update on clinical and molecular genetic studies-1

15:20-15:40 National Center Hospital for Mental, Nervous and Muscular Disorders, NCNP

Dr. Ikuya Nonaka

Update on clinical and molecular genetic studies-2

15:40-16:00 Takamatsu City Hospital

Dr. Hisaomi Kawai

Does apoptosis occur in calpainopathy?

16:00-16:20 Immunohistochemical investigation

Dr. Yukiko K. Hayashi, NCNP

Molecular biology of calpainopathy

16:20-16:40 Pathomechanism

Dr. Hiroyuki Sorimachi, University of Tokyo

16:40-17:00 General discussions and summary

17:00 Closing remarks

Report of the Small Group Workshop on Calpainopathy (LGMD2A)

H Sorimachi*, K Arahata**, T Ibi*** and K Sahashi***

1. Introduction

This small group workshop (SGW), which was the first in Japan to focus on calpainopathy (LGMD2A), was held in Tokyo on 10 February 2000. The aim of the workshop was to review various studies on calpainopathy from different perspectives, by sharing the knowledge of different kinds of researchers, leading to clarify molecular mechanism of calpainopathy, and finally to establish its diagnosis and therapy.

Dr Sahashi introduced the workshop, by stating that Walton and Nattrass first classified LGMD in 1954. LGMD is a progressive symmetrical atrophy and weakness of the proximal limb muscles with elevated serum enzymes from skeletal muscle with an estimated prevalence of 10^{-5}, and the onset of illness is usually during the first two decades of life, resulting in loss of walking ability 10 or 20 years after onset.

2. Update review of calpin3/p94 and conventional calpains

Dr Suzuki gave a keynote lecture on the history of discovering calpains and outlined current studies, followed by a lecture from Dr Saido on the pathology of conventional calpains. Calpain was first discovered in 1964, as a novel protease in the brain, and, also, as a novel factor that activates phosphorylase kinase. In 1978, Suzuki's group purified calpain for the first time, and the occurrence of an inhibitor of calpain, "calpastatin" was reported.

3. Conformational structure of calpains

Conventional calpain has two ubiquitous isozymes, μ- and m-calpain. Both have distinct large catalytic subunits of ca. 80 kDa (μCL and mCL), and common smaller regulatory subunit of ca. 30 kDa (30K). They are divided into 4 and 2 domains (I-IV and V-VI), respectively (Fig.1). The 3D structure of m-calpain has recently been described, as shown in Fig.1B [1,2]. Domain I penetrates into domain VI of 30K, contacting the 2nd and 5th EF-hand motifs. The protease domain is divided into two sub-domains, IIa and IIb, which contain C129, and H262/D286, respectively, resulting in no active site formed without Ca^{2+}, which accounts for the latency of calpain. Upon Ca^{2+}-binding, two sub-domains probably fuse into a papain-like catalytic domain.

The domain III has four anti-parallel β-strands, with a topology resembling the C2 domain, which, as in the case of protein kinase C, binds Ca^{2+} and plays important roles in translocation to the membrane. The two five-EF-hand domains of the large and small subunits interact with one another. The C-termini of both subunits are in close contact, and play an important role for hetero-dimerization.

As shown in Fig.1A, calpain3/p94 has three specific regions, in addition to the basic four-domain structure. The NS reregion locates at the N-terminus instead of domain I. Since calpain3/p94 does not associate with the 30K subunit, NS may occupy the space for 30K, displacing it. IS1 and IS2 are inserted into a loop of the sub-domain IIb, and the linker connecting domains III and IV, respectively. It is possible that, because of interactions among these 3 specific regions, the protease domain of calpain3/p94 is already fused in the absence of Ca^{2+}.

4. Pathological and molecular Genetic Studies

Dr Nonaka reported their analyses on 80 recessive sporadic Japanese LGMD2 patients, 21 of which harbored a mutation in the calpain3/p94 gene [3]. The average age of onset was 20.3 years. Among these, 3 missense point mutations, G233V, K461C, and D707G, and 1 insertion mutation, 1795-1796 ins A, which causes frame-shift at 631, account for more than 70 % of calpainopathy in Japan. He emphasized that abundant lobulated fiber were observed in type 1 fibers of 70 % of the patient with calpainopathy, which may be a hallmark of the disease, if not specific. Opaque fibers were almost negative in cases of calpainopathy. Those morphological findings could be useful for diagnosis of calpainopathy.

Drs Sahashi and Kawai reported on the clinico-pathological aspect of their own patients with calpainopathy. In muscle CT images, prominent proximal muscle wasting (pelvic >> shoulder girdle) was observed, and muscle bulks at the posterior parts in the neck, limb, and trunk were more severely involved than at the anterior (Fig.2). Muscle sections of a patient with a L189V mutation in calpain3/p94 was stained with four different antibodies, specific to distinct positions of calpain3/p94, as well as with an antibody against connectin/titin. Signals obtained by anti-N-term antibody were absent in the muscle fibres of the patient, and western blot analyses also showed no immunoreactivity by anti-pIS2 antibody in the patient (Fig.3). Dystrophin, sarcoglycan and

* Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
** National Institute of Neuroscience, NCNP
*** IVth Department of Internal Medicine, Aichi Medical University

laminin α2 were normally reactive, but one of the conventional calpains, μ-calpain, slightly increased in calpainopathy muscles as in the case of DMD. Another patient with W360C also showed negative staining with anti-pIS2 antibody. This is in accord with other reports that signals of calpain3/p94 are negative in most calpainopathy patients.

These observations are very intriguing and could be applied to diagnosis. However, this finding contradicts the biochemical data that eight out of 10 missense point mutants of calpain3/p94 lost their rapid autolytic activity, resulting in stable expression in cultured cells [4]. In other words, these missense mutant calpain3/p94s should be more stable in skeletal muscle than the wild-type forms. Why, then, did they disappear from the patients' muscle?

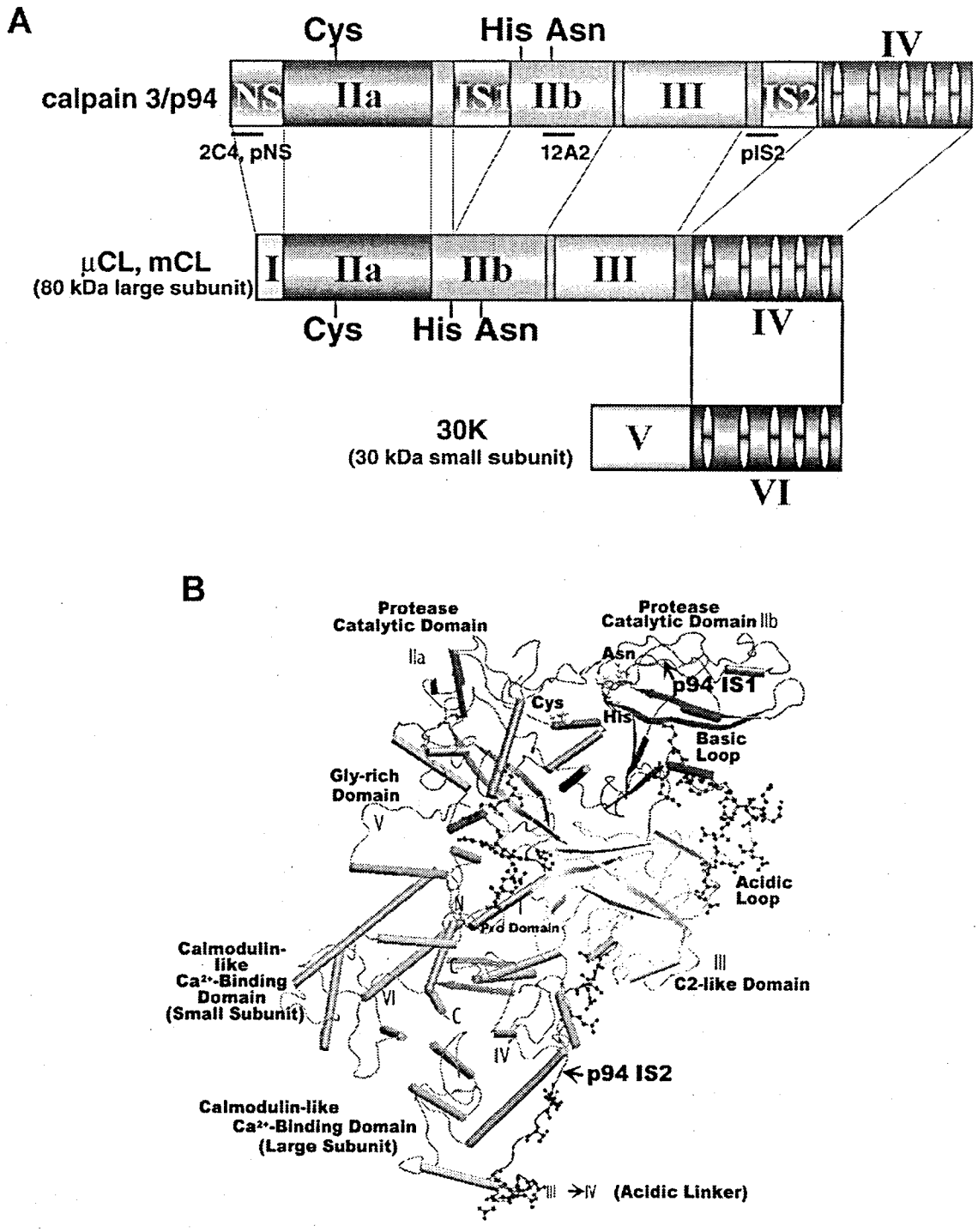


Fig. 1 Schematic structure of calpain3/p94 and conventional calpains

A. **Primary structure:** Each thin ellipse in Domains IV and VI represents one EF-hand motif. Thick lines under the calpain3/p94 structure indicate the location of the antigen peptides (2C4, MPTVI SPTVA PRTGA EPRS; pNS, PTVIS PTVAP RTGAE PRSC; 12A2, RLRNP WGQVE WNGSW S; pIS2, KRNTI SVDRP VKKKK NKPII FVC) used in this study.

B. **3D structure of human m-calpain:** See text for explanation.

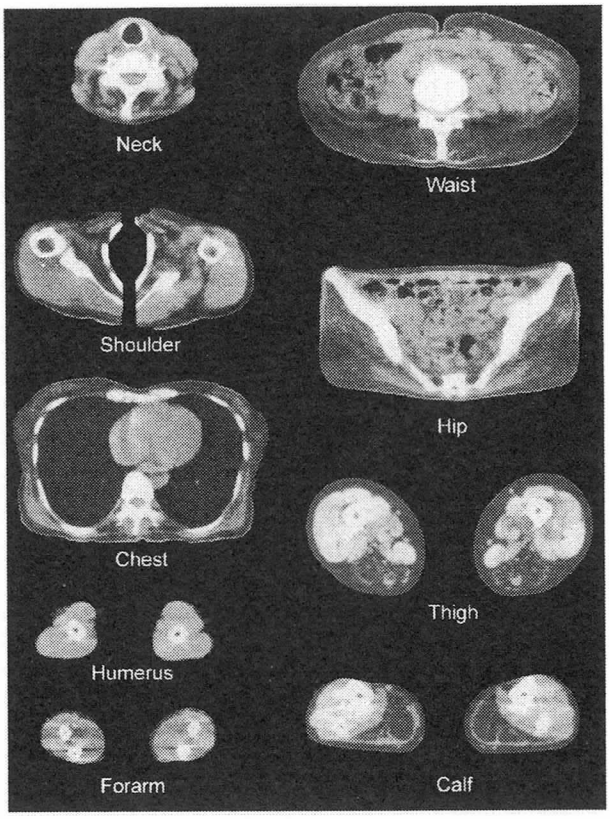


Fig. 2 Skeletal mucle CT on the chronic stage of LGMD2A
All pictures of the bottom part show the posterior face of four extremities and trunk, where marked invasion of fatty connective tissue element in skeletal muscle is noted.

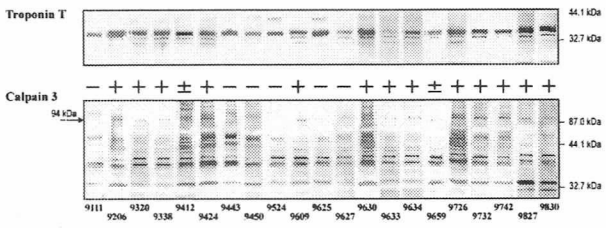


Fig. 3 Western Blot (W-B) Analysis on Calpain3
Twenty one patients with LGMD in the Aichi Medical University were analysed by using anti-pIS2 antibody. Six were negative, 2 false-positive, and 13 positive. Afterwards, one of 6 negative patients (#9625) was identified as LGMD2A by the genetic analysis of calpain3/p94 gene. When analysed, the very quick thawing stored frozen muscle samples were processed to the next few steps, because of prevention from rapid autolytic property of calpain3/p94.

5. Apoptosis and calpainopathy

Dr Hayashi reported apoptosis in calpainopathic muscle fibers. Recently, Baghdiguian et al. reported that calpainopathy is associated with myonuclear apoptosis [5]. The frequency of apoptotic cells is very low and there is no direct evidence that destruction of a few nuclei causes the final degeneration of whole muscle cells. It has been of interest whether muscular dystrophy is directly caused by necrosis or apoptosis. Dr Hayashi showed results of 15 calpainopathy cases examined by the TUNEL method, and anti-activated caspase 3 and 9 antibodies. The frequency is less than 0.01 % but not zero, which is much less than that reported by Baghdiguian et al. (0.1%–0.7%). Wild-type fibers also showed positive signals, although the frequency was extremely low. It seems that we will have to wait for successive studies on apoptosis of skeletal muscle cells before we know a clear answer.

6. Conclusions and perspective

From the data shown by various scientists in this SGW, the following important points have to be urgently investigated: (1) identification of *in vivo* substrates for calpain3/p94, (2) relationships between connectin/titin and calpain3/p94, and (3) relationships between calpain3/p94 and conventional calpains. (1) is important, because deficient proteolytic activity of calpain3/p94 is the cause of calpainopathy. (2) is essential, because connectin/titin probably regulates proteolytic activity of calpain3/p94. (3) is a novel viewpoint, because preliminary data suggested that calpain3/p94 inhibits connectin/titin proteolysis by those calpains. Pathologic alterations of calpain3/p94 substrates and connectin/titin as well as proteolytic activity of conventional calpains in calpainopathy muscles should be clearly elucidated. These would unveil the underlying signal transduction systems modulated by these molecules.

Another essential point is relationship between genotype and phenotype. Characteristics of several mutant calpain3/p94 have been examined so far, showing unique biochemical properties compared with the wild-type protein [4]. Differences in proteolytic activities between normal and calpainopathological states are likely to be very subtle. This should be closely related to the clinical fact that the time course in calpainopathic muscle fiber degeneration is slow as well as in the other types of muscular dystrophy. The experimental strategy regarding this point is very difficult. However, extensive joint-works from different viewpoints of clinical, biochemical, biological, genetic and pathological studies will ultimately clarify the molecular mechanism of calpainopathy.

7. Workshop participants

Dr. Kiichi Arahata (Tokyo, Japan); Dr. Gisele Bonne (Paris, France); Prof. Emeritus Alan E. H. Emery (Devon, UK); Dr. Yukiko K. Hayashi (Tokyo, Japan); Dr. Tohru Ibi (Aichi, Japan); Dr. Hisaomi Kawai (Takamatsu, Japan); Dr. Teruyuki Kurihara (Tokyo, Japan); Dr. Ikuya Nonaka (Tokyo, Japan); Prof. Eijiro Ozawa (Tokyo, Japan); Dr. Ko Sahashi (Aichi, Japan); Dr. Takaomi C. Saido (Saitama, Japan); Dr. Hiroyuki Sorimachi (Tokyo, Japan); Prof. Hideo Sugita (Tokyo, Japan); Prof. Koichi Suzuki (Tokyo, Japan) (Alphabetical order)

References

1. Hosfield CM, Elce JS, Davies PL, et al: Jia Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca^{2+}-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J* 1999; **18**: 6880-6889.
2. Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, et al: Huber R, Masumoto H, Nakagawa K, Irie A, Sorimachi H, Bourenkow G, Bartunik H, Suzuki K, Bode W. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 588-592.
3. Minami N, Nishino I, Kobayashi O, et al: Ikezoe K, Goto Y, Nonaka I. Mutations of calpain 3 gene in patients with sporadic limb-girdle muscular dystrophy in Japan. *J Neurol Sci* 1999; **171**: 31-37.
4. Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, et al: Richard I, Saido TC, Beckmann JS, Ishiura S, Suzuki K. Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J Biol Chem* 1998; **273**: 17073-17078.
5. Baghdiguian S, Martin M, Richard I, et al: Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Halaby G, Loiselet J, Anderson LV, Lopez de Munain A, Fardeau M, Mangeat P, Beckmann JS, Lefranc G. Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I•B α/NF-•B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* 1999; **5**: 503-511.

ミオトニー疾患の病態治療

(Moderator: 栗原照幸，石浦章一)

日時　平成12年8月29日（火）　10：00－16：30
場所　全共連ビル地下1階Room 18　東京都千代田区平河町2-7-9
電　話　03-3265-3111　　ＦＡＸ　03-3237-1370
班長　　荒畑喜一

10:00-10:05　開会挨拶，この会の目標　　栗原照幸
座長　栗原照幸
10:10-11:00　特別講演　骨格筋Na channelの生理学とミオトニーの病態
岡崎国立生理学研究所　液性情報部門　　井本敬二　教授
11:00-11:20　ミオトニーの病態治療　　東邦大学第四内科　栗原照幸
座長　内野　誠
11:20-11:35　Myotonic dystrophyのDHEAS治療経験　熊本大学神経内科　内野　誠
11:35-11:50　Myotonic dystrophyのDHEAS治療　[1]大阪医科大学第一内科，[2]藍野加齢医学研究所 [1]杉野正一，[1]石田志門，[1]伊藤巧，[1]花房俊昭，[2]大澤仲昭
11:50-12:05　DHEAS多施設臨床試験　　大阪医科大学第1内科　名誉教授　大澤仲昭
12:05-13:15　昼食
座長　石浦章一
13:15-13:35　Adr マウスを用いたmyotoniaの遺伝子治療　[1]昭和大学藤が丘病院神経内科，[2]東京大学循環器内科　　[1]原　一，[2]中島敏明，[1]若山吉弘
13:35-13:55　Myotonic dystrophyの分子遺伝学　埼玉医科大学第四内科　木下正信

13:55-14:15　CTG repeat延長と遺伝子発現　九州大学大学院医学系研究科脳神経研究施設内科部門　古谷博和，山田猛，吉良潤一
14:15-14:35　DMPK発現に影響するCUG結合蛋白　　東京大学・大学院総合文化研究科
石浦章一
14:35-14:55　CTG repeat下流のホメオボックス遺伝子の筋強直性ジストロフィー病態への関与　自治医科大学医学部生物学教室　佐藤　滋，川上　潔
14:55-15:25　コーヒーブレーク
座長　栗原照幸，石浦章一
15:25-16:25 全体討論　遺伝子異常—病態発現の機構—病態に基ずく治療の開発
1）　チャンネル異常とミオトニー　　2）　MDにおける筋力低下のメカニズム
16:25　　閉会挨拶

ミオトニー疾患の病態治療

栗 原 照 幸*

このワークショップでは，まず特別講演で国立生理学研究所の井本教授よりvoltage-gated Na channelの詳しい講義があり，現在使用されているミオトニーの薬剤はもともと心筋や中枢神経系のNa channel blockerとして開発されたものであり，心不整脈やてんかんの治療に使われて来たが，これを骨格筋にも流用しようとすると，筋力低下を来たしたりして都合のわるい事もある．そこで今後骨格筋用に適した薬剤を開発する必要があることを述べられた．

筋強直性ジストロフィーに対してdehydroepiandrosterone sulfate(DHEAS)用いると，ミオトニーを軽減し，日常生活動作もよくなり，また心不整脈も改善するということから，治療経験を熊本大学の内野教授，大阪医科大学の杉野講師らが発表し，東邦大学の栗原教授は，DHEASを用いると，筋細胞内記録により，微小電極を筋細胞内に刺入した時に起こるinsertion myotonia が抑制される事を示した．さらに井本教授のpatch clampによる研究で，DHEASの作用機序としてはNa channel を抑制することによってミオトニーを抑制することが明らかになった．DHEASは現在静脈内投与の薬物が市販されているが，経口薬は日本にはなく，杉野らが，経口的に投与してみてもミオトニーを抑制する効果がみられない点，また内野らの経験では，有効でない症例もあることなど，今後の更なる検討を要する．

先天性ミオトニーでは，病態としてはCl channelの異常により起こり，Thomsen病（AD）でも，autosomal recessive generalized myotonia(Becker type) でも筋力低下はないので，日常生活上必要なら，Na channel blockerを用いて治療すればよい．ParamyotoniaはNa channelの異常によっておこり，寒冷によりミオトニーが起こるが筋力低下はないので，秋から冬の寒冷時期だけメキシレチンのようなNa channel blockerを用いて治療すればよい．しかし，筋強直性ジストロフィーでは，ミオトニーのほかに筋力低下が進行性に見られるので，筋力を低下させないようなNa channel blockerを開発する必要がある．

昭和大学の原らは，stop codonのためにCl channelの発現していないmyotonic mouse(mto mouse) に対して，adenovirus を用いたgene therapyの試みを発表した．

筋強直性ジストロフィー分子遺伝学的研究では，本疾患ではDMPKの非翻訳領域にCTG repeat expansionがみられ，東京大学の石浦教授は，CTGはmRNAになるとCUGとなり，筋強直性ジストロフィーでは，CUG repeat expansionが起こって，BP_1(Binding Protein)と結合し細胞の核の中に大きな分子量の蛋白がたまり，細胞質に出ることが困難となる．DMPKの発現は低下する．自治医大の川上教授はCTG repeat expansionがおこると，DMPK下流のホメオボックス遺伝子であるSIX5に影響を及ぼして，その発現が低下し，白内障を来たすほか，SIX5のターゲット遺伝子であるIgfbp5,Igf2およびその他の遺伝子にも影響して筋の発達や分化に障害を来すと述べている．後者はtrans effectでDMPK以外の遺伝子にも障害を来していることを示す．

筋肉の疾患のみでなく，本疾患の全身症状である白内障，内分泌障害，中枢神経障害などの発症機序も次第に明らかになってくると考えられる．

今後の研究

筋力低下させないでミオトニーを抑制する薬の開発，進行性の筋萎縮と脱力を食い止める治療法を開発すること，および本疾患でみられるCTG repeat expansionを短縮する治療法の開発が望まれる．

* 東邦大学第四内科

FCMD の病態解明

(Moderator: 斎藤加代子，戸田達史)

日時　平成１２年１１月２０日（月）　9:30 -16:30

場所　全共連ビル１階 Room１０１

東京都千代田区平河町 2-7-9

電話　03-3265-3111　FAX　03-3237-1370

班長　荒畑喜一

司会	斎藤加代子	
9:30	斎藤加代子（東京女子医大小児科）	Small Group Workshop 開催にあたって FCMD の臨床
9:45	吉岡三恵子（神戸市総合療育センター）	FCMD の臨床スペクトラムと遺伝について
10:00	戸田達史（大阪大臨床遺伝）	FCMD の分子遺伝学
10:15	林　由紀子、荒畑喜一、埜中征哉 （国立精神神経センター）	FCMD の筋病理
10:35	松原四郎（東京都立神経病院）	筋細胞表面の形態的変化とその意味 —基底膜と形質膜を中心に
	10:55　ブレーク	
11:05	砂田芳秀（川崎医大神経内科）	FCMD 骨格筋における欠損蛋白の生化学的解析
11:25	寺嶋俊雄（神戸大第一解剖）	特別講演：大脳皮質形成異常を特徴とする ミュータント動物の神経回路
	12:25　昼食	
司会	戸田達史	
13:30	中野今治（自治医大神経内科）	FCMD の脳病理—Glia limitans-基底膜の破れが 脳奇型の原因か—
13:50	木村清次（横浜療育園）	Walker-Warburg 症候群と福山型先天性筋 ジストロフィーの比較検討
14:10	村山繁雄（東京都老人総合研究所）	福山型筋ジストロフィーにおける tauopathy
14:30	佐々木淳子、戸田達史（大阪大臨床遺伝）	フタチン遺伝子の脳における発現の検討
14:50	山本智子、小林槙雄（東京女子医大第一病理）	福山型先天性筋ジストロフィー: Fukutin mRNA の発現からみた皮質形成異常の病態 —in situ hybridization による解析—
15:10	斎藤義朗（東京女子医大小児科） 高嶋幸男（国立精神神経センター）	fukutin 蛋白のヒト脳における発現の発達的変化
15:30	日野なおみ（東京女子医大小児科）	福山型先天性筋ジストロフィーの眼病変の 病理学的検討
	15:40　ブレーク	
15:50	全体討論 :司会　斎藤加代子、戸田達史	FCMD 病態の working hypothesis

FCMDの病態解明

戸田達史*

FCMDのSGWのまとめ

FCMDにおいて，フクチン遺伝子変異によるフクチン蛋白合成障害が生じている．その結果，脳，骨格筋，眼に，それぞれ皮質形成障害，筋ジストロフィー，網膜形成障害による症状を発現している．神経病理学検討によって，神経細胞遊走障害はglia limitamsと基底膜に異常が起こっていることが明らかになっているが，フクチン蛋白と基底膜の異常との関係はブラックボックスにある．神経細胞の遊走障害，グリアの異常との関係も不明である．

「FCMDの病態解明」のワークショップでは，FCMDの臨床，病理，フクチン蛋白の機能，FCMDの病態メカニズムについて，発表と討議を行った．

1）FCMDの臨床

斎藤加代子（東京女子医大小児科）はFCMD120例の臨床と遺伝子解析について報告した．重症度によって分類すると，軽症31例25％，典型66例55％，重症23例20％という割合であり，軽症，典型の85％では創始者変異である3kb 挿入配列をホモ接合性に示し，重症例の74％がヘテロ接合性を示していた．

吉岡三恵子（神戸市総合医療センター小児科）は兄弟発症のFCMD例の臨床の比較，exon 3におけるnonsense変異を示す5例の臨床スペクトラムについて述べた．また，FCMDの臨床像を呈したが，遺伝子とmRNAに変異が見いだされなかった2例を呈示して，臨床的・遺伝子的異質性について呈示した．

2）FCMDにおける病理　基底膜の異常

松原四郎（都立神経病院）は電顕での定量的解析にて，FCMD骨格筋の基底膜の破れ，ならびに基底膜のない細胞膜での電子密度の低下を見い出した．

斎藤加代子（東京女子医大小児科）はFCMD胎児例の大脳表面のPAM染色において，14週，17週，20週と経時的に断裂部は数が増え，断裂の領域が拡大していることを指摘した．皮質形成異常の領域は在胎週数を経るに従い，その面積は広がり，程度も重度であった．

中野今治（自治医科大学神経内科）はglia limitans-基底膜複合体の破れが高度の領域と正常に形成されている領域が接している部分があることを述べ，前者ではcortical neuroblastの大部分が遊出しているのに対し，後者では皮質構造が正常に保たれていること，細胞遊出の部位の基底膜や軟膜のfibroblastの突起は反り返ることはないことを示した．さらに，脳表のglia limitansと基底膜に破れがあって，そこから飛び出した脳組織の基底膜の形成が不十分であり，このことが脳回癒合を促進している．本来のクモ膜血管をトラップして，その血管周囲腔にも脳組織が迷入している．基底膜は隣り合う脳回を分離する働きがある．Glia limitans-基底膜複合体が完全であることが，cortical neuroblastや脳組織が正常の位置に留まるためには必須であると述べた．

木村清次（横浜療育園）は，6例のWalker-Warburg症候群(WWS)について，FCMDと比較した結果を報告した．WWSは新生児期からの呼吸障害，嚥下障害，筋力低下，進行性水頭症，痙攣，白内障が臨床的特徴であり，2歳以内に死亡する．神経病理学的にはWWSにおいて重度の無脳回（滑脳症）を示し，FCMDでは大脳の層構造を認めるのに対し，WWSでは基本構築が乱れ，グリアや神経細胞が脳表に突出している像は認められないことを報告し，WWSとFCMDは遺伝子的にも異なった疾患であることを示した．

山本智子，小林槙雄（東京女子医大第一病理）はFCMD胎児，成人例のglia limitansでは，電子顕微鏡的に基底膜やアストロサイト足突起の細胞膜の構造異常が認められ，免疫組織化学的に基底膜関連蛋白の メロシンやβ-ジストログリカンの二次的な発現の低下が観察された．同様の異常は骨格筋においても認められていた．また，小児，成人例のアストロサイトにはGFAP染色で細胞突起に形態変化がみられることが多かった．In situ hybridizationによりアストロサイトでのフクチンの発現が確認された．これらの所見から基底膜の異常がglia limitansの破綻の原因となり，その背景にアストロサイトの関与が考えられる．

一方，佐々木淳子，戸田達史（大阪大ゲノム機能）はFCMD遺伝子は，脳では発生過程からCajal-Retzius細胞を含む遊走に関与する神経細胞に発現が認められ，基底膜と接しその形成に主要な役割を担うアストロサイトにはほとんど発現していない，とした．

斎藤義朗（東京女子医大小児科），高嶋幸男（国立精神神経センター）はフクチン蛋白の抗体によって，胎児期に大脳のCajal-Retzius細胞，軟膜下顆粒層，辺縁帯の神経線維，皮質板の神経細胞，脳室帯の神経上衣，小脳の外顆粒層，分子層，Purkinje細胞，内顆粒層の細胞に発現していたが，出生後のコントロールの脳と胎齢２３週のFCMD脳では発現していなかったことを報告した．

日野なおみ（東京女子医大小児科）はFCMDの眼病変について述べた．網膜においても基底膜の異常と層構造の異常が認められ，その成立機序には構造的，機能的に

* 大阪大学大学院医学系研究科

Cajal-Retzius細胞に類似する網膜ミューラー細胞の異常が関与していると考えられる.

3) フクチンの機能とFCMDの病態メカニズム

村山繁雄（都老人研神経病理）はFCMD脳では胎児期からtauの異常リン酸化が生じていることを報告し，病態への関与を示唆した.

砂田芳秀（川崎医大神経内科）は，骨格筋細胞外マトリックス成分からFCMDで特異的に欠損している蛋白p180を見い出し，分子量が異なるのでフクチンそのものではないが，フクチン結合蛋白ではないかと推察した.

寺島俊雄（神戸大第一解剖）は，「大脳皮質形成異常を特徴とするミュータント動物の神経回路」と題する特別講演を行い，FCMDでは，ニューロンがフクチンを分泌しないことより，フクチン・シグナル伝達系の活性が低下し，放射状細胞の形質が十分に誘導されない結果，軟膜直下のグリア性境界膜や基底膜の形成が不十分となる. また軟膜側の細胞膜表面のストップ・シグナルの提示がなく，移動中のニューロンは移動を停止できず，さらに表層に向かう. そして脆弱となった脳表面のバリアーを越えてニューロンが脳表面に湧き出す，とした.

フクチンは，アミノ酸相同性からフクチン蛋白ファミリーを形成し，細胞表面の糖蛋白ないしは糖脂質を修飾する酵素と推定される（Aravind). また林由起子（国立精神神経センター）は，FCMD筋では，ラミニン α2鎖，インテグリンよりも αジストログリカンが最も発現が低下しているとし，しかも使用した抗体は αジストログリカンの糖鎖部分を認識する抗体である. これらはフクチンが糖鎖修飾に関係があることを示している. FCMDでは糖鎖修飾がうまくいかないためこれらの蛋白が不安定になることが考えられる.

Perspectives to Studies on Myogenesis and Therapeutics of Muscular Diseases in 21st Century

Atsuko Sehara

日時：　平成１３年３月２２日（木）
場所：キャンパスプラザ京都（ＪＲ京都駅、京都中央郵便局西側）

9:30～Registration
10:00～10:10　Introduction
Atsuko Sehara　(Kyoto Univ.)

1)　Current Topics On Muscle Development And Regeneration
Chair Person: Atsuko Sehara (Kyoto Univ.)
10:10～10:30
Kazuki Kuroda (Kyoto Univ.)
Notch Signaling And Cell Fate Determination
10:30～10:50
Sumihare Noji (Tokushima Univ.)
Roles Of FGF10 And Myostatin In Muscle Formation
10:50～11:10
Yukiko K. Hayashi (NCNP)
Pathomechanism Of Fukuyama Type Congenital Muscular Dystrophy
11:10～11:30
Atsuko Sehara(Kyoto Univ.)
Roles Of ADAM Proteases In Myogenesis
11:30～12:10
Michael A. Rudnicki
(Program in Molecular Genetics, Ottawa Hospital Research Institute, Ottawa)
Pluripotent Stem Cells In Adult Skeletal Muscle

12:10～13:30　Lunch

2)　Current Topics On Myogenic Stem Cells
Chair Person: Shin'ichi Takeda(NCNP)

13:30～13:50
Shosei Yoshida (Kyoto Univ.)
Stem Cell Pool Maintenance And Transcription Factors: Learning From Skeletal Muscle
13:50～14:10
Jun Yamashita (Kyoto Univ.)
Stem Cells And Blood Vessel Formation
14:10～14:30
Keiichi Fukuda (Keio Univ.)
Stem Cells And Heart Formation
14:30～15:10
Margaret A. Goodell
(Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College Of Medicine, Houston)

Stem Cells And Muscle And Bone Marrow Regeneration

15:10～15:40 Coffee Break

3) Perspectives To Novel Diagnoses And Therapy Of Muscular Diseases
Chair Person: Ryoichi Matsuda (Univ.Tokyo)

15:40～16:00
Ryoichi Matsuda (Univ.Tokyo)
A Novel Type Of Chemotherapy
16:00～16:20
Masafumi Matsuo (Kobe Univ.)
A Novel Therapy Based On The Regulatory Mechanism Of Splicing
16:20～16:40
Steve Wilton
(Australian Neuromuscular Research Institute, QEII
Medical Centre, Western Australia)
Antisense Induced Dystrophin Expression in the Mdx
Mouse
16:40～17:00
Shin'ichi Takeda(NCNP)
New Therapeutic Approaches Of Muscular Dystrophy
17:00～17:20
Toshifumi Tsukahara (NCNP)
Development Of Human Muscle cDNA Microarray And Analysis Of Gene Expression Profile
17:20～18:00
Terry Partridge
(MRC Clinical Sciences Centre, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, London)
Stem Cells And Transplantation

18:00～18:10 Conclusion Remarks : Shin'ichi Takeda (NCNP)

18:30～19:40 Banquet

平成１３年度ワークショップ報告書

［概略］
２１世紀の幕開けとともに、幹細胞の分化能や組織再生能を利用した疾患治療への展望が開けてきた。そこで、「筋ジストロフィー及び関連疾患の臨床病態解明と治療法開発に関する研究」班（主任　荒畑喜一）では、武田伸一班と協力し、次のような国際ワークショップを開催した。そこにおいて、筋形成・再生に関する研究のトピックスから、筋疾患の分野での再生医学への展望を具体的に考察し、１５０人以上の参加者による活発な議論がかわされた。

A small group workshop on Dysferlinopathy

(Moderator: 青木正志)

2001年12月14日（金）東京・全共連ビル(地下1階R18) 10:00-16:30
December 14, 2001 (Friday) Official Language: English and Japanese
問い合わせ先　phone 022-717-7189（東北大学神経内科　青木正志)

PROGRAM

A Small Group Workshop on Dysferlinopathy

10:00-10:05 Opening Remarks

I) Clinical spectrum of dysferlinopathy (Chair: Masashi Aoki and Hiroshi Saito)

10:05-10:35 Masanori Nakagawa and Itsuro Higuchi (Kagoshima University)

Molecular epidemiology of Miyoshi myopathy in Southern part of Japan:

Clinical phenotypes and dysferlin mutations

10:35-11:05 Tohru Ibi and Ko Sahashi (Aichi Medical University)

Clinico-pathological aspect with dysferlinopathy

11:05-11:35 Yukiko K Hayashi (National Institute of Neuroscience, NCNP)

Clinical and protein analysis of dysferlinopathy

11:35-12:05 Masashi Aoki and Toshiaki Takahashi (Tohoku University and Nishitaga National Hospital)

Relatively prevalent mutations and genotype-phenotype correlation of dysferlinopathy in Japanese population

12:05-12:20 Discussion

(Lunch)

II) Special Lecture-1 (13:20-14:20) (Chair: Yukiko K Hayashi)

Robert H Brown Jr. (Massachusetts General Hospital, Boston)

Dysferlin: Recent Observations in Mice and Hematopoietic Cells

III) Special Lecture-2 (14:20-15:00) (Chair: Ko Sahashi)

Shin'ichiro Yasunaga (Department of Biochemistry, Saga Medical School)

The second member of FER-1 like gene family, OTOF (encoding otoferlin), causes a nonsyndromic deafness, DFNB9

IV) Update on dysferlin research (Chair: Ichizo Nishino)

15:20-15:35 Mikiharu Yoshida (National Institute of Neuroscience, NCNP)

Attempts to discover dysferlin-associated proteins

15:35-15:50 Takashi Momoi (National Institute of Neuroscience, NCNP)

Brain isoform of dysferlin and apoptosis

15: 50-16:20 Yoshihiro Wakayama (Showa University Fujigaoka Hospital)

Localization of dysferlin in normal skeletal myofibers: confocal lazer and electron microscopic studies

16:20-16:30 Conclusion Remarks

清水班　Dysferlinopathyに関するSmall Group Workshop報告書

青　木　正　志*

日時：平成13年12月14日10:00-16:30
場所：東京・全共連ビル　地下1階Rm18
班長：清水輝夫

発表者（発表順）：中川正法，樋口逸郎（鹿児島大学第3内科），衣斐　達，佐橋　功（愛知医大神経内科），林　由起子（国立精神神経センター神経研究所），高橋俊明，青木正志（東北大学神経内科，国療西多賀病院神経内科），Robert H Brown Jr. (Massachusetts General Hospital)，安永晋一郎（佐賀医大生化学），吉田幹晴（国立精神神経センター神経研究所），桃井　隆（国立精神神経センター神経研究所），若山吉弘（昭和大学藤が丘病院神経内科）
座長：（発表者，青木，林の他に）斉藤　博（国療西多賀病院），西野一三（国立精神神経センター神経研究所）

I. Dysferlinopathyの臨床型

鹿児島大学，愛知医大，国立精神神経センターおよび東北大学の4施設からの報告があり，その後に総合討論が行われた．鹿児島大学第3内科の中川らは，遺伝子解析または免疫組織学的検討によりdysferlin異常と診断された18例についてphenotype/genotype correlationを検討した．多くの症例は基本的には下肢遠位部屈筋群優位の筋力低下を主症状とし三好ミオパチーと診断されたが，同一家系内に肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)類似例と肩甲下腿型筋萎縮症類似例が見られた．愛知医大神経内科の衣斐らは愛知医科大学附属病院における過去16年間の筋生検916例の検討を行い，LGMDはsyndromeを含め48例でありそのうち，dysferlinの免疫染色で陰性でLGMD2Bと診断した症例は8例16.6%であったこと，三好遠位型ミオパチー(MM)は4例であったことを筋病理所見と共に報告した．また骨格筋CTでは筋症状のない症例でも大腿下腿の屈筋優位にまた傍脊柱筋外側部に脂肪化を認めたことを報告した．国立精神神経センターの林は生検筋におけるdysferlin蛋白の発現を免疫組織化学法(IHC)，イムノブロット法(Wb)を用いて検討し，LGMD 55例中2B型は18.2%を占めることを報告した．またIHC, Wbで共に異常が認められた症例群ではほとんどの症例で遺伝子変異を確認したことを報告した．その一方，MMのうち25%の症例では生化学的にdysferlinの明らかな異常が認められなかったことより，遺伝的多様性を含め今後検討していく必要性を報告した．東北大学の高橋らは59家系のdysferlin遺伝子解析の結果から，日本人に比較的頻度の高い5種類の変異を報告し，遺伝子変異の種類により臨床経過が大きく異なることを報告した．また国療西多賀病院入院中のLGMD症例15例のうち5例にdysferlin遺伝子異常が確認されたことを報告した．総合討論においては，dysferlinopathyは多彩な臨床像を示すことが再確認され，特にLGMD2A型との臨床的な鑑別の難しさが示された．発症年齢は13-51歳におよび，CK値は経過と共に低下がみられたが，発症時には最低でも1,000IU/l以上を呈することが明らかになった．また，筋病理学的な特徴ならびに診断にいたるための適切なスクリーニング方法を検討するためにはさらなる症例の蓄積および多施設共同による解析が必要であるという提案がなされた．

II. 特別講演

特別講演2題では，まず故荒畑喜一先生との共同により1998年にdysferlin遺伝子のクローニングに成功した米国Massachusetts General HospitalのDr. Brownが講演を行った．Dr. Brownはdysferlinopathyの位置づけ，dysferlinとcaveolin-3との関連，末梢血のうちCD14陽性のリンパ球を用いることによりdysferlin蛋白発現のスクリーニングが可能であること[1]，さらにはGene-chipによるdysferlin欠損マウス（SJLマウスなど）の遺伝子発現解析などを報告した．次にフランスPasteur研究所に留学中に遺伝性難聴の原因遺伝子としてotoferlinを同定した安永先生（現，佐賀医大生化学）が，同遺伝子同定までの経緯ならびにotoferlinは蝸牛では内有毛細胞・前庭部ではI型有毛細胞といった内耳でもシナプス活動の盛んな細胞に強く発現していること，さらには組織特異的な発現パターンを示す長さの大きく異なるsplice variantやalternative splicingが存在し，long formこそが聴覚障害の発生に重要であること[2]などの講演を行った．

III. Dysferlin基礎研究のupdate

このセッションでは3施設からの報告があった．国立精神神経センターの吉田からはdysferlin精製の試みが報告され，dysferlinはWGA結合性の糖タンパク質とCa2+依存的に結合することが示唆された．またdysferlinがエキソサイトーシスに関与する可能性が提案された．また同センターの桃井はdysferlinの機能を調べる目的で，脳に特異的に発現する脳型ジスフェルリン（Bdysf）と筋型ジスフェルリン（Mdysf）遺伝子を分離し，EGFP融合蛋白として，さまざまな細胞に発現させた．発現させたBdysfおよびMdysfは細胞膜よりむしろゴルジ，ERに局在が観察され，アポトーシスに典型的な像を示し細胞死をおこすことならびに，ERストレスの関与が報告された．昭和

* 東北大学医学部神経内科

大学藤が丘病院の若山からはdysferlinの正常骨格筋における局在の共焦点レーザー顕微鏡及び免疫電顕による検討が示され，dysferlinはcostamereに局在し，Hamletマウス単クローン抗体を用いた免疫電顕による検討ではdystrophin，β-dystroglycan，β-spectrinおよびcaveolin-3とは共存しないことが報告された.

文　献

1) Ho M et al: A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. Ann Neurol *in press*

2) Yasunaga S et al: *OTOF* encodes multiple long ans short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. Am J Hum Genet, 67:591-600, 2000

Development of New Therapy for Muscular Dystrophy
-Progress In Basic Research-

（武田班との合同）

17 January, 2002 (Thursday)
at Tokyo Sabou-kaikan (Schönbach Sabou)
Official language: English

I. Overview:
9:30-10:00
Shin'ichi Takeda, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry
"New therapeutic approaches for muscular dystrophy"

II. Gene therapy:
10:00-10:45
John Howell, Murdoch University
"The clinical trials for GRMD since the early 90s including plasmids, modified human adenovirus and AAV"

10:45-11:15
Keiya Ozawa, Shin-ichi Mochizuki, Lijun Wang, Yanyan Lu, Shin-ichi Muramatsu, Imaharu Nakano, Takashi Okada, Hiroaki Mizukami, Jichi Medical School
"Recent progress of AAV (adeno-associated virus) vector-mediated gene therapy"

11:15-11:45
Yasufumi Kaneda, Graduate School of Medicine, Osaka University
"Development of novel non-viral gene delivery systems"

12:00-13:30
lunch

III. Stem cell and skeletal muscle:
13:30-14:15
Giulio Cossu, University of Rome "La Sapienza"

14:15-14:45
Hiromitsu Nakauchi, Tsukuba University
"Isolation and differentiation potentials of hematopoietic and liver stem cells"

14:45-15:15
Keiichi Fukuda, Daihiko Hakuno, Yuichi Tomita, Institute for Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine
"Development of regenerated cardiomyocytes from mesenchymal stem cell for cardiovascular tissue engineering"

IV. Development of animal models:
15:30-16:00
Yo-ichi Nabeshima, Kyoto University
"Activation of calcium dependent proteolysis during aging"

16:00-16:30
Norio Nakatsuji, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

16:30
Closing remarks

Summary

Clinico-pathophysiological research and development of medical treatment for muscular dystrophy and the related disorders

Directed by Kiichi ARAHATA,M.D. and Teruo SHIMIZU,M.D.

The aims of the project are designed to achieve during 3 years, I.gene analysis and establishment of diagnostic procedures for muscular dystrophy and the related disorders, II.pathophysiological investigation;clinico-genotypic correlation,molecular analysis of muscle cell degeneration and death, III.development of medical and cell therapy.Small group workshop is held to promote a new break on special issues by young clinico-basic researchers.Major results are listed below.

I. Gene analysis and establishment of diagnostic procedures for muscular dystrophy and the related disorders;

limb-girdle muscular dystrophies (LGMDs) and a special form of distal muscular dystrophy (Miyoshi) are extensively analysed. Calpainothy (approximately 23%), dysferlinopthy (16-30%) and sarcoglycanopathies (around 10%) were major 3 forms in Japan.Western blot/immunohistochemistry and genetic diagnosis are found to be effectve in more than 70% of LGMD patients.Distal muscular dystrophy (Miyoshi) is found to be a special form of dysferlinopathy.Genes for Fukuyama type congenital muscular dystrophy FCMD and the related muscle-eye-brain disease MEB are found to be the fukutin gene on 9q31and the O-glycan tranferase POMGnT1 on 1p33-34,respectively.Transposon insertion at exon 10 is the major mutation for FCMD and nonsense mutations were detected in POMGnT1 for 6 MEB patients.Other mutaions were found in GNE for distal myopathy with rimmed vacuoles,collagen VI α subunit (Ullrich myopathy), PABP2 for Japanese families of oculopharyngeal muscular dystrophy.

II. Pathophysiological investigation;

clinico-genotypic correlation, molecular analysis of muscle cell degeneration and death. Molecular characterization of calpain suggests that loss of proteinase activity is essential for muscle damage of calpainopathy,which may cause derangements of a scaffold protein,connectin, followed by damages in myofibrils, sarcolemma and nucleus.This process is appeared to be different from apoptosis.

In contrast,the pathomechanism for dysferlinopathy is still undetermined.The first is the clinical variability of limb-girdle type,distal posterior type (Miyoshi), distal anterior type and quadriceps myopathy type.The second is the molecular pathophysiology of muscle degeneration in dysferlinopathy.

In congenital muscular dystrophy,the physiological activity of fukutin is the main issue. It is suggested to be a glycocyl transferase because of altered glyco-moiety of a peripheral lymphocyte membrane protein and reduction of α-dystroglycan of muscle. In MEB,the mutated o-glycan transferase resulted in the loss of α-dystroglycan immunoreactivity.

Taken together,a possible hypothesis is that the glycosylation defect(s) of α-dystroglycan disrupt the interaction of sarcolemma-basal matrix,which raises the feasibility of enzyme therapy for FCMD, WWS and MEB.

In myotonic dystrophy,tight binding of regulatory proteins (CUG-BP,EXP/MBNL) to elongated CUG/CUGG repeats of RNAs results in the derangements of other RNA expression and the resulting variable phenotypes such as SIX 5-cataract and tau/tubulin-neurofibrillary changes(RNA theory). These changes can be inhibited by anti-apoptotic chemicals.

III. Development of medical and cell therapy.

Negamycin,an unapproved aminoglycode,is shown to overcome the dystrophin stop codon of mdx mouse with up to10 % recovery of normal sized dystrophin in both in vivo and in cultured myotubes.Negamycin and the related chemicals are good candidates for ~ 10 % of DMD/BMD and other nonsense mutations, because it is not accompanied by serious side effects.Dehydroepiandrosterone sulfate DHEAS has turned out to be a Na channel blocker with no induction of muscle weakness and thus is a good candidate for myotonia of myotonic dystrophy.Dichloroacetic acid (DCA) and sodium pyruvate are tried to mitochondrial encepalomyopathy patients with promising results.Taurine is another better medical for MELAS and MERRF.Survey of glycogen storage disease patients for the recent 10 years demonstrated that types II, V, III and VIII are the 4 major forms (more than 83 %), and vitamine B6 will be tried in 28 patients of type V (McArdle).

A super-apoptosis protein factor, Bcl-xFNK,is developed for several muscle damages such as myotonic dystrophy,DMD/BMD and LGMDs.Stem cell-like mononuclear cells are prepared by induction of a homeodomain Msx 1 cDNA into a mouse skeletal muscle.

We like to further accelerate the researchs on clinico-genotypic correlation,pathophysiological analysis and establishment of realistic medical treatments for muscular dystrophies.

平成11～13年度 班員名簿

筋ジストロフィー及び関連疾患の臨床病態解明と治療法開発に関する研究

平成11～13年度　清水班　名簿

区分	氏名	所属施設名 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
主任	荒畑喜一 (平成12年12月逝去)	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	
〃	清水輝夫 (平成13年4月より)	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)
分担 (運営幹事)	栗原照幸	東邦大学医学部第四内科 〒153-8515 東京都目黒区大橋2-17-6	教授	03-3468-1251 (内2322)
〃 (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
〃 (幹事)	斎藤加代子	東京女子医科大学小児科 〒162-8666　東京都新宿区河田町8-1	教授	03-3353-8111 (内38211)
〃 (幹事)	佐橋功	愛知医科大学医学部神経内科学講座 〒480-1195　愛知県愛知郡長久手町岩作雁又21	教授	0561-62-3311 (内2380)
〃 (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
〃 (幹事)	戸田達史	大阪大学大学院医学系研究科ﾎﾟｽﾄｹﾞﾉﾑ疾患解析学講座 〒565-0871　大阪府吹田市山田丘2-2-B9	教授	06-6879-3380
〃 (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 (内5962)
〃	青木正志	東北大学医学部附属病院神経内科 〒980-8574　宮城県仙台市青葉区星陵町1-1	助手	022-717-7189
〃	遠藤剛	千葉大学理学部生物学教室 〒263-8522　千葉県千葉市稲毛区弥生町1-33	助教授	043-290-3911
〃	福原信義	国立療養所犀潟病院 〒949-3193　新潟県中頸城郡大潟町犀潟468-1	副院長	0255-34-3131 (内601)
〃	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)
〃	花岡和則	北里大学理学部生命科学科 〒228-8555　神奈川県相模原市北里1-15-1	教授	042-778-8864
〃	樋口逸郎	鹿児島大学医学部第三内科 〒890-8520　鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-35-1	講師	099-275-5332
〃	土方貴雄	群馬大学医学部第二解剖学講座 〒371-8511　群馬県前橋市昭和町3-39-22	助手	027-220-7912
〃	川上潔	自治医科大学医学部生物学教室 〒329-0498　栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1	教授	0285-58-7311
〃	吉良潤一	九州大学大学院医学研究院 〒812-8582　福岡県福岡市東区馬出3-1-1	教授	092-642-5337

区　分	氏　名	所属施設名 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
分　担	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
〃	松尾雅文	神戸大学医学部附属医学研究国際交流センター 〒650-0017　兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-1	教　授	078-382-5700
〃	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)
〃	桃井真里子	自治医科大学小児科 〒329-0498　栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1	教　授	0285-58-7365
〃	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)
〃	二宮治明	鳥取大学医学部生命科学科神経生物学 〒683-8503　鳥取県米子市西町 86	助教授	0859-34-8276
〃	西野一三 (平成 12 年 4 月より)	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	042-341-2711 (内 5111)
〃	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
〃	大日方　昂	千葉大学理学部生物学教室 〒263-8522　千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33	教　授	043-290-2804
〃	太田成男	日本医科大学老人病研究所 〒211-8533　神奈川県川崎市中原区小杉町 1-396	教　授	044-733-9267
〃	反町洋之	東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 〒113-8657　東京都文京区弥生 1-1-1	助教授	03-5841-8218
〃	杉江秀夫	浜松市発達医療総合センター 〒434-0023　静岡県浜北市高薗 775-1	所　長	053-586-8801 (内 100)
〃	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 6087)
〃	鈴木　厚	横浜市立大学医学部第 2 生化学教室 〒236-0004　神奈川県横浜市金沢区福浦 3-9	講　師	045-787-2597
〃	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
〃	内野　誠	熊本大学医学部附属病院神経内科 〒860-0811　熊本県熊本市本荘 1-1-1	教　授	096-373-5890
〃	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)
〃	依藤　宏	防衛医科大学校解剖学第二講座 〒359-8513　埼玉県所沢市並木 3-2	教　授	042-995-1478
〃	吉田邦広	信州大学医学部附属病院遺伝子診療部 〒390-8621　長野県松本市旭 3-1-1	助教授	0263-37-3215 (内 6881)
〃	林　由起子 (平成 13 年 4 月より)	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 5113)