

厚生省  
神経疾患研究委託費

筋の発生と分化に関する  
基礎的研究

江橋班

昭和57年度研究報告書

昭和58年3月

# 目 次

筋の発生と分化に関する基礎的研究班・総括報告 .....	3
江橋節郎	

## I 筋移植と成長

1. ジストロフィーハムスターと正常ハムスター の筋の交換移植についての研究 .....	9
寺尾寿夫	
2. ジストロフィーおよび正常チキンにおける長橈側手根伸筋の交換移植 ——組織学的変化—— .....	15
大塚正徳	
3. 筋ジストロフィー症マウスと小人症マウスの骨格筋の未熟度 .....	19
戸塚武	

## II 微細形態

4. 骨格筋の小窩について .....	31
岩崎祐三	
5. 細胞骨格の分化発達——中間径フィラメントの存在様式 .....	35
石川春律	

## III 細胞培養

6. サテライト細胞の培養 .....	41
香川務	
7. ニワトリ胚抽出物中の筋芽細胞増殖促進因子 .....	47
小沢鎧二郎	

8. 培養骨格筋における活動電位の発達に關与する神経性因子 ..... 52  
加 濃 正 明

#### IV 生 理 学

9. 骨格筋の発達過程の機能的, 形態的追跡  
— 鶏胸筋の正常とジストロフィー筋の比較 — ..... 59  
堀 田 健
10. 筋細胞膜における膜興奮機能の発生 ..... 65  
高 橋 国太郎
11. 除神経による活動電位の誘発 ..... 73  
栗 山 熙
12. ジストロフィーハムスターの心臓機能と骨格筋々小胞体  
のCaの取り込み能に関する研究 ..... 76  
酒 井 敏 夫
13. 両生類骨格筋の遅筋と速筋: 筋小胞体の性質と比較 ..... 80  
遠 藤 実

#### V 生 化 学

14. 培養筋細胞のアセチルコリンレセプターの代謝 ..... 91  
萩 原 彌四郎
15. アセチルコリン受容体に対するモノクローナル抗体 ..... 94  
杉 山 博 之
16. 筋発生に伴うミオシン分子 isoform の変化 ..... 98  
江 橋 節 郎
17. 鶏ジストロフィー筋におけるC-蛋白質分子種の変化 ..... 102  
大日方 昂

18. 培養骨格筋および心筋細胞におけるトロポニンの分化 .....	109
嶋田 裕	
19. 筋ジストロフィー症鶏浅胸筋の筋線維構成蛋白 —筋ジス遺伝子の白レグ鶏への導入— .....	114
野々村 禎 昭	
20. ジストロフィー鶏および正常鶏の発生過程におけるEF2 およびNAD含量の変化 .....	122
真崎 知 生	
21. 可溶性コネクチン .....	127
丸山 工 作	
22. 骨格筋細いフィラメント上のトロポニンの局在及びハイブリッド トロポニンの性質の検討 .....	131
大槻 磐 男	

## VI プロテアーゼ

23. 筋発生分化におけるプロテアーゼの役割 .....	137
今堀 和 友	
24. サル心筋Ca依存性中性プロテアーゼの性状と阻害物質の影響 .....	141
高橋 健 治	
25. 筋ジストロフィー・ハムスターにおけるリソゾームプロテアーゼ 活性調節の異常 .....	145
勝 沼 信 彦	
26. 培養筋細胞における筋蛋白代謝 .....	149
杉田 秀 夫	
27. 筋ジストロフィー患者の血性酵素にみられる2種類の動態 .....	153
青柳 高 明	

28. 筋ジストロフィー症マウスに対する微生物プロテアーゼ・ ..... 157  
インヒビター投与の影響 松 下 宏

#### Ⅶ 関 連 領 域

29. 高分子物質の細胞内注入法の工夫 ..... 167  
岡 田 善 雄
30. 細胞接着分子と細胞収縮 ..... 168  
岡 田 節 人
31. 体幹部神経堤細胞からの間葉組織の分化 ..... 170  
仲 村 春 和



## 筋の発生と分化に関する基礎的研究班 総括報告

班長 江橋節郎

### 総論

本研究班では、筋ジストロフィー症という疾患名を表面的には班の名称としては唱っていない。しかし我々の目的は、筋ジストロフィー症の病因を現代の基礎医学、生物学の基盤において解明することを当面の目標としつつも、終局的には本疾患の根本的治療法確立と根絶を期するものである。

筋ジストロフィー症の研究の基礎として筋の発生と分化の問題が重要であることは、世界的に広く認められて既になかなか年月が経つが、その重要性は益々大きくなって来ている。この趨勢は、1982年秋に開かれた第5回筋神経疾患学会のシンポジウム、一般演題さらには教育講演などからも明瞭に読みとることができる。それでは何故に本疾患の研究のために筋の発生や分化の問題が重要なのであろうか。大きくいって三つの点があげられると思われる。

第一点は、本疾患では既に筋の発生期からはかなりの年月を経ているにも拘らず罹患筋に筋の発生期に見られるような種々の現象がみられることである。このことは想像の翼を伸ばすと筋の分化が充分でないことに病因を求め得るかもしれないという期待を持たせし、またそれを示唆する報告も行われても来た。しかしながら我々の班員は、全く新しい事実を過去において観察している。すなわちジストロフィー筋では分化の停滞があるというよりは、一度正常のように分化するにもかかわらず何らかの原因によって分化した状態を保ち得ず、再び幼若時代に類似した状態に戻るのであ

る。こゝに於いて我々は本疾患の研究に於いて如何にして分化が行われるかという発生生物学の基本問題として広くとり組まれている問題の他に、分化した状態が如何にして保たれているかという問題が重要なものとして認識することになる。

第二点は、分化した状態の崩壊に対する別の面からの見方である。上述の分化の「若返り現象」が遺伝子発現の質的な制御の乱れであるならば、この場合は割り切った言い方をすれば量的な乱れである。健康な筋細胞がその正常な姿を保ち機能を発揮するためには、一定量の蛋白質が常に合成されると共に分解されていくことが必要である。すなわち蛋白質の代謝が嚴重なバランスのもとに遂行されていることが要求される。これらの制御は究極に於いては遺伝子の発現の問題であろうが、筋ジストロフィー症罹患筋に於いては筋蛋白質代謝の乱れが存在する。すなわち罹患筋に於ては、蛋白質の合成が促進されているにも拘らず、分解がそれを上まわっているという事実が知られている。このことは常識的には蛋白分解酵素作用の亢進状態があつて、それが分化の安定性を乱す要因の一つとなっていることが考えられる。病的な機転をこのような立場からみる時、逆に正常な筋は如何にして量的にも分化した状態を保つかを探ることが、本疾患研究への一つのアプローチになるであろう。

第三点は筋の再生の問題である。本疾患の過程に於て再生がみられることは周知の事実である。いうまでもなく再生は筋の衛星細胞が活性化され

て増殖し、新に筋線維を形成するか、既存の筋線維にとり込まれて行く過程である。多くの考えでは、衛星細胞は、発生時期の筋芽細胞が活動を停止して筋線維に接触して存在するものである。これが再生の時に如何にして活性化されるかは、発生生物学の根本問題の一つである。もしこの活性化の本態が分かれば、不幸にして再生が停止あるいは相対的に低下する本疾患の進行期の問題を解明するのに大きな力を示すであろう。

第二点で述べた分化を保つために必要な要因、また第三点で述べた再生を促すための要因を物質の形で把握できるならば、それは終局の目的である治療法の確立に何等かの光を与えることになるであろう。

以上に述べたことは到達するには誠に困難な事柄であるが、我々は此の難病の解決のアプローチとして筋の発生と分化の問題を取り上げることの必要性についての一端を披瀝した。

実験のないところに科学は存在しない。本疾患の場合には通常の臨床実験のもつ困難さを遥かに超えた障碍が存在する。この困難さを回避するためには、できるだけ人間の筋ジストロフィー症に似た動物モデルを用いなければならない。本疾患とモデル動物の疾患が異った面を多く持っているであろうことは十分に認識しつつも、我々はモデル動物を重要な研究材料として、その病態の解明を上記述べた視点を踏まえて行ってきた。

#### 本年度の研究の概要

本年度の研究も前年度に引き続いて上記の原則に基いて遂行された。

遺伝子発現の状況を調べるために最も単純な手段は一種のタンパク質に着目しその経時的な変化を詳細に記載することから始めることである。正常動物に於ける遺伝子発現の記載の比較が必要であるが、その際にまず正常動物の正確な記載が重要である。此の線上にあるものとして、ミオシン分子のアイソフォームの変化（江橋）トロポニン分子の分化（嶋田）がある。大日方は筋ジストロ

フィーニワトリの胸筋を用いてC蛋白の動態を検討した。C蛋白にも遅筋型と速筋型とがあり、幼若細胞は両型のC蛋白を持つが、成長と共に遅筋型は消失する。これに対して筋ジス細胞では一旦は消えた遅筋型が再び多く作られることを示した。これはかつて野々村らがトロポミオシンで示したのと同じ現象で、筋ジス細胞が幼若期に於ける遺伝子発現を再現している可能性を示唆するものである。

野々村は、野村班菊池によって開発された白レグ筋ジス鶏が劣性遺伝であることをふまえて、ヘテロに筋ジス遺伝子をもつニワトリでは、上記の遺伝子発現の幼若化が起りにくいことを示し、筋ジス発症と幼若化との間の因果関係を示唆した。

また丸山、杉山、大概らはこの様な線上の研究を発展させる足がかりを与える研究を行った。

この様にして出来上がった蛋白も分解され、新しい蛋白が合成されるのは、遺伝子発現の基礎であると共に、またそれ故に筋ジストロフィー症の病態の成立の理解に重要であり、更に蛋白の代謝過程のコントロールが可能になれば本症の治療に役立つことが考えられる。

杉田と萩原は、それぞれ筋蛋白とアセチルコリンレセプターの代謝について研究し、諸種の薬物の代謝過程に及ぼす影響について検討した。蛋白の分解過程には蛋白分解酵素が関与するが、それらの分子機構については、Ca依存性中性プロテアーゼについて今堀と高橋(健)がそれぞれの見地から研究を進め、カテプシンとその内源性インヒビター(TPI)について勝沼が研究を行った。勝沼は筋ジストロフィーハムスターを行い、骨格筋、心筋に於いてカテプシンとTPIがほぼ平行して増加していることを認めた。

また青柳は筋ジストロフィー症患者血清中の血清動態を調べ、松下は筋ジストロフィー症マウスにベスタチン投与によって症状が改善すると報告した。これ等の他に、正常及び筋ジス動物を用いて、諸種の機能の変化が堀田、高橋(国)、酒井、遠藤、岩崎、石川、香川、仲村らによって研究さ



れた。またそれらの研究のための基礎的手段について岡田(善)、岡田(節)から報告があった。

以上のような蛋白、酵素蛋白その他諸機能の変動がどのようにして調節されるかを知らうとする試みが行われて来ている。このことは疾患を理解しその解決法を求める上に重要であることはいふ迄もない。筋の分化に関しては古くから神経因子の関与が考えられており本研究班でも主として生理学的な立場から、除神経筋の分化状態の変動(栗山)や、筋の興奮性の発現に及ぼす神経由来の物質(加濃)の研究が行われた。特に加濃はこの物質が高分子であり、おそらく蛋白質であることを報告している。

筋ジストロフィー症においては、上述のようにある時期に筋の再生現象がみられる。その際には衛星細胞の著しい増殖がみられる。衛星細胞の増殖およびその後の変化を追うには色々な手法が考えられるが、大塚と寺尾はそれぞれニワトリ及びハムスターを用いて正常及びジストロフィー動物間での筋の交換移植を行い、筋の正常な発育には環境因子が重要であることを報告した。環境因子には当然神経及び他の因子の関与が考えられるがまだそれに関する知見は得られていない。小沢は筋芽細胞の増殖を促進する分画を、ニワトリ胚抽出物から得たが、まだ精製は充分には進んでいない。筋芽細胞と衛星細胞とどこまで等価かという問題はあるにしても、再生が行われるには十分な増殖が必要であることに留意したい。

筋ジストロフィー症モデル動物を用いて発症の原因についての研究が行われた。戸塚は骨と筋の

発達のアンバランスに注目し、真崎は細胞内NA Dレベルの変化が発症の原因として深くかかわっている可能性を指摘した。

## 結 語

個々の研究の進展の度合や、筋ジストロフィー症そのものとの直接のかゝり合いの度合などにはいろいろな違いがみられる。しかし研究班全体としては、世界の筋ジストロフィー症研究に比して勝るとも劣らないレベルを保ちながら、着実に前進しているといえる。そしてこれらの研究の間に、協同研究者として加わった若い研究者が、筋ジストロフィー症研究に深い関心を持つようになり、また既に出来上がった研究室間にもお互いの連帯の気運が盛り上って来たことは、喜ばしいことである。

また特に本年度の行事の一つとして、本研究班の業績を本格的な英文のモノグラフとして刊行した。過去において本班は毎年英文報告集として小冊子を刊行して来た。幸い内外の研究者から歓迎されて来たが、何分にも小冊子であって十分に意をつくすことはできず文献として後々迄残ることは期待できなかった。今回各班員に各自の問題を自分の業績を中心とした総説を書くことを依頼し、一書となして、本研究班の研究成果を世に問うこととした。

筋ジストロフィー症研究の道は峻しい。しかし我々は一步一步地道な努力を重ねてゆかなければならない。

## I 筋移植と成長

1. ジストロフィーハムスターと正常ハムスターの筋の  
交換移植についての研究 9
2. ジストロフィーおよび正常チキンにおける  
長橈側手根伸筋の交換移植 15  
——組織学的変化——
3. 筋ジストロフィー症マウスと小人症マウスの骨格筋の未熟度 19

# 1 ジストロフィーハムスターと正常ハムスターの筋の交換移植についての研究

寺 尾 寿 夫<sup>\*</sup>  
研究協力者 増 野 和 子<sup>\*</sup>  
大 沢 伸 昭<sup>\*\*</sup>

## はじめに

ジストロフィー筋肉を正常の動物に移植した場合に、移植筋が如何なる再生をきたすかを明らかにすることはジストロフィーの成因を知る上に一つの手掛りを与えるものとして注目されている。そのために古くよりジストロフィー筋の正常動物への移植実験が行われてきた。<sup>1-4)</sup>

Homburger<sup>5)</sup>らが導入したジストロフィーハムスターがヒトのジストロフィー症のすぐれたModel動物であることはよく知られている。<sup>6)</sup>我々はこの動物と正常コントロール動物との間に筋の交換移植を行い、それぞれのgraftが新しいhost中で起す再生現象を比較したので報告する。

また、ジストロフィーハムスターの血中、尿中、骨格筋中のアミノ酸測定も併せ行なった。

## 方 法

### 1) アミノ酸測定

血漿中アミノ酸についてはハムスターを絶食させた後ヘパリン加採血し、血漿分離後ズルフォサリチル酸で除蛋白し、アミノ酸自動分析機にて各アミノ酸の濃度を測定した。

尿については、ラット用蓄尿ケージにて24時間蓄尿したものをを用いた。ハムスター尿は蛋白を含むため、ズルフォサリチル酸にて除蛋白し、その中の遊離アミノ酸を測定した。骨格筋は大腿四頭

筋、腓腹筋、ヒラメ筋などを脱血後採取し、homogenize後、過塩素酸にて除蛋白したものをを用いた。

### 2) 交換移植

これにはジストロフィーハムスターとコントロールハムスターの長指伸筋(EDL)を使用した。交換移植後、種々の時間を経てこれを取り出し、再生の状態を検討した。再生の指標には種々の方法が考えられるが、この研究では、再生筋線維の数と直径を目標にした。移植後2ヶ月目の再生筋を上中下の3部分にわけ、その各々につきクリオスタットにより薄切後、種々の染色標本を作り、その各部分ごとに2~3枚の標本(主としてH・E染色標本を使用)につき再生筋線維の数を数え、その平均値を求めてその筋の再生筋線維の数とした。また、各部分のcross section標本の中央部に含まれる筋線維の直径を上中下3部分より同数ずつ総計が1,000本になるまで測定し、その分布を調べた。染色にはH・Eの他Trichrome, ATPase, DPNHを行った。

## 結 果

### 1. ジストロフィーハムスターのアミノ酸代謝異常

#### a) 血中アミノ酸

ハムスターの血漿中にはグルタミン酸濃度がもっとも高く、次いでアラニン、グリシン、バリン、リジン、タウリン、プロリンなどが高濃度に含ま

\* 帝京大学医学部第1内科

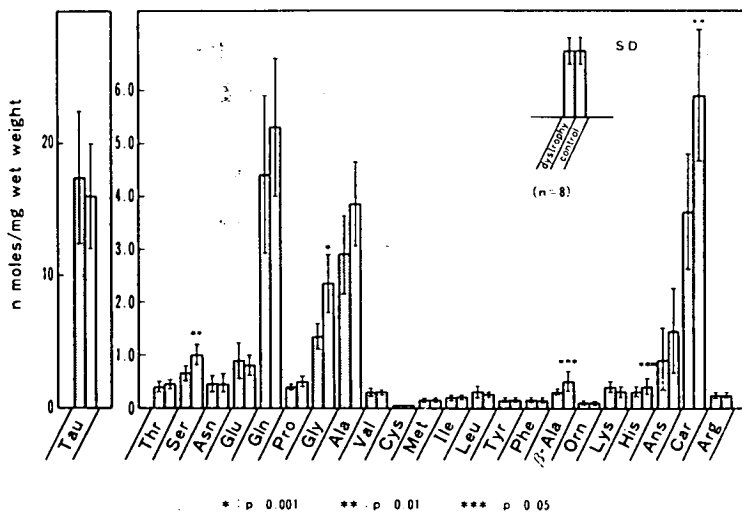
\*\* 東京大学医学部第3内科

れる。これら血漿中遊離アミノ酸をジストロフィーハムスターとコントロールにつき比較したものが第1図である (n = 8)。これに示す様に、ジストロフィーハムスターの血漿中にはコントロールに比し、濃度の低いアミノ酸が多いが、とくにシスチン、トリプトファンは有意に低値を示していた (P < 0.05)。これに反し、タウリンは有意に高かった (P < 0.01)。

b) 尿中遊離アミノ酸

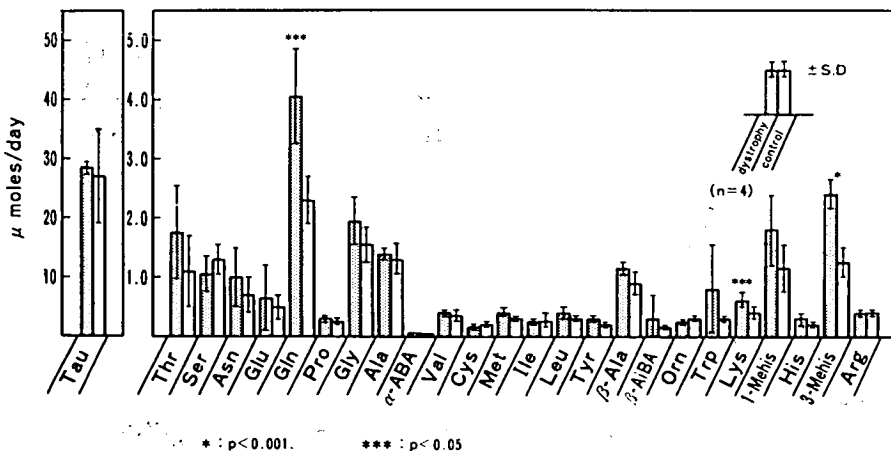
ハムスターの尿中に排泄される遊離アミノ酸はタウリンが著しく多く、次にグルタミン、グリシン、1-および3-メチルヒスチジン、スレオニン、アラニン、β-アラニンが多い。両者の比較を第2図 (n = 4) に示した。ジストロフィーハムスターではコントロールより排泄値の高いアミノ酸が多い。とくに3-メチルヒスチジン (P <

Free amino acid levels in Quadriceps of dystrophic hamster.



第1図

Urinary free amino acid levels of dystrophic hamster.



第2図

0.001), グルタミン, リシン ( $P < 0.05$ ) は有意に高かった。

c) 骨格筋の遊離アミノ酸

骨格筋の中の遊離アミノ酸はタウリンが極めて多く、次いでグルタミン, カルノシンが多い。またアラニン, アンセリンも比較的高濃度に含まれる。大腿四頭筋についてジストロフィーハムスターとコントロールの骨格筋の遊離アミノ酸を比較したのが第3図 ( $n = 8$ ) である。これに示す様にジストロフィーハムスターの大腿四頭筋中には遊離アミノ酸が低値を示すものが多い。とくにグリシン ( $P < 0.001$ ), セリン, カルノシン ( $P < 0.01$ ),  $\beta$ -アラニン, アンセリン ( $P < 0.05$ ) が有意に低値を示した。タウリンは逆に高い傾向を示した。また腓腹筋, ヒラメ筋でも同様な傾向がみられた。

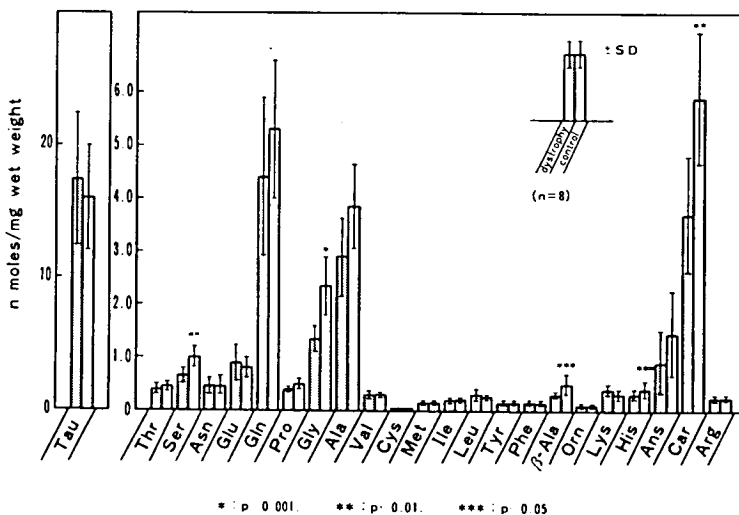
2. ジストロフィーハムスターとコントロールハムスター間のEDLの交換移植

ハムスターのEDLを交換移植した場合も, 昨年まで報告したマウスやラットの場合と同じく, graftの周辺から筋の再生が進む。

ジストロフィーハムスターのEDLをコントロールハムスターに移植し (以下dys  $\rightarrow$  cont と示す)

2ヶ月を経た再生筋の1例を第4図に, またこれと対をなし, コントロールハムスターのEDLをジストロフィーハムスターに移植した場合 (cont  $\rightarrow$  dys) の再生筋を同倍率で第5図に示した。これで見ると後者に細い筋線維が多い。このような交換移植筋を8組作り, 2ヶ月後それらの各々につき再生筋線維の数を示したものが第6図である。また, その直径の分布を第7図に示した。これに示す如くジストロフィーのEDLをコントロール動物に移植した場合は再生筋線維は20~40  $\mu$ mの直径のものがもっとも多いが, 逆の移植では20  $\mu$ mのものが圧倒的に多く, 明らかな差を示した。第7図はこれらをまとめたものである。上段は再生筋線維の数と直径を交換移植した再生筋の各群で比較したものである ( $n = 8$ )。再生筋線維の数はdys  $\rightarrow$  contの方がcont  $\rightarrow$  dysに比しやや多かったが, 有意の差はなかった。しかし直径では前者が有意 ( $P \leq 0.001$ ) に大きかった。図の下段は交換移植した8対につき, 各々のペアの再生筋線維の数と直径の比 (dys  $\rightarrow$  cont / cont  $\rightarrow$  dys) を求め, その平均とS. D. を示したものである。数の比は1.3, 直径の比は1.7である。

Free amino acid levels in Quadriceps of dystrophic hamster.



第3図

