

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58年度研究報告書

昭和59年3月

## 目 次

総 括 報 告 .....	3
	江 橋 節 郎

## I 移植その他

1. 筋ジスー小人症(dy-dw)重複症疾患マウスとdy筋病変 .....	9
	戸 塚 武
2. ジストロフィーおよび正常チキンにおける 長橈側手根伸筋の神経支配 .....	17
	大 塚 正 徳
3. ジストロフィーハムスターと正常ハムスター間の筋の交換移植 についての研究(第2報)および再生筋の再移植について .....	20
	寺 尾 寿 夫

## II 細胞培養および細胞生物学

4. 外来性トランスフェリンの体内代謝について .....	29
	小 沢 鏝二郎
5. 筋芽細胞の成長を促進するラット脳由来酸性蛋白の性質 .....	35
	畑 山 一 郎
6. サテライト細胞の in vivo および in vitro における再生能 .....	41
	香 川 務
7. アフリカツメガエル初期胚の単一割球由来細胞群の選択的分離法 .....	47
	江 橋 節 郎

8. 鳥類胸腺筋様細胞の起源について .....	52
	仲村春和
9. 高分子注入法の新しい試み .....	57
	岡田善雄
10. 哺乳動物の初期胚形成に影響する単クローン抗体.....	59
	岡田節人

### III 生理学

11. 筋細胞における膜興奮機能の発生 .....	65
	高橋国太郎
12. 培養骨格筋における膜興奮性の変化 .....	70
	加濃正明
13. 幼生アフリカツメガエル腸骨筋の収縮系と筋小胞体 .....	74
	遠藤実
14. 筋収縮能の発現過程 — 培養による正常と ジストロフィーチキン胸筋の比較 .....	80
	堀田健
15. 哺乳動物骨格筋の損傷後の Healing-over .....	85
	栗山熙

### IV アセチルコリンレセプター

16. 骨格筋アセチルコリン受容体の生合成と細胞内前駆体 .....	91
	杉山博之

17. アセチルコリンレセプター分布に対する神経の作用 ..... 95  
萩原 彌四郎

## V 微細形態

18. 細胞骨格の分化発達—筋腱連結部の細胞骨格 ..... 103  
石川 春 律
19. ラット骨格筋の凍結切断像 ..... 107  
岩崎 祐 三
20. ジストロフィー鶏胸筋での異常蛋白質の発現について ..... 110  
野々村 禎 昭

## VI 生 化 学

21. 筋ジスおよび正常鶏における筋細胞内 poly-ADP-ribose  
含量と poly-ADP-ribose 合成酵素活性の相異  
(筋発達過程におけるその変化) ..... 117  
真崎 知 生
22. コネクチンとミオシン, アクトミオシンとの相互作用 ..... 122  
丸山 工 作
23. 筋発生・分化におけるアクチン結合蛋白質の発現様式 ..... 125  
小林 良 二
24. 除神経筋にみられる筋蛋白質分子種の変化 ..... 133  
大日方 昂

25.	ニワトリ胸筋および足筋におけるトロポニンTの発生, モノクローナル抗体を用いた研究 .....	138
	嶋田 裕	
26.	ウサギ胎仔骨格筋収縮蛋白活性に対する抗トロポニン抗体の影響 .....	144
	大槻 磐男	
27.	疾患筋筋小胞体膜の機能分類に関する一考察 .....	152
	酒井 敏夫	

## Ⅶ プロテアーゼ

28.	サル骨格筋カテプシンBの精製と性質 .....	159
	高橋 健治	
29.	内在性チオールプロテアーゼインヒビターの構造と 活性発現機構 .....	164
	勝沼 信彦	
30.	ブピバカイン(マーカイン)による急性筋崩壊の機序 .....	169
	杉田 秀夫	
31.	m-CANPと天然型 $\mu$ -CANPとの比較研究 .....	173
	今堀 和友	
32.	筋ジストロフィーのマウスおよびハムスターモデル における酵素網の比較 .....	177
	青柳 高明	
33.	幾つかの筋神経系異常マウスに於ける アルカリプロテアーゼ活性の変化 .....	182
	松下 宏	



# 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かなりな年月が経つが、その重要性は益々大きくなって来ている。例えば 1983 年アメリカの Muscular Dystrophy Association (MDA) のコロキウムにも遺伝子発現と成長因子がとり上げられている。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、本疾患では発症時は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。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。これらの制御も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害が存在する。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

上記総論に述べた基本的な理解の上に立った研究が本年も引き続き行われた。

総論の第一点に関与して、発生の各ステップがどのように行われるかを探ることを目的として研究が行われた。これは一つは遺伝子発現の問題であり、もう一つは細胞オーダーの発生生物学の立場からのアプローチである。第一の問題についての最も簡単な手段の一つは、遺伝子の発現の結果合成されるタンパク質について正しい記載をすることであり、まず正常動物のそれが行われた。これは前年度の進歩に引続いて行われたもので、嶋田はモノクロナル抗体を用いてニワトリ胸筋およ

び足筋におけるトロポニンTの発生の過程を追った。小林はアクチン結合蛋白の発現について報告した。大日方の研究は病的過程に進み、蛋白の発現は大まかに胚型、新生児型から親型へと進むが、除神経やジストロフィーでは親型から新生児型へと逆戻りすることを示した。また杉山はアセチルコリンレセプターの生合成について報告した。同じ線上にある研究としては丸山及び大槻の研究がある。また酒井は筋ジストロフィー症様患者由来の筋小胞体のCa-uptakeについて報告した。

一方直接の遺伝子の表現の問題とのかゝり合いはまだ不明だが真崎はpoly-ADP-riboseとその合成酵素活性が、筋ジスおよび正常鶏で大きく異なることを報告した。

このようにして発現された遺伝子を蛋白という形で合成する過程の形態学的裏づけを野々村が報告し、石川は筋腱連結部について、岩崎は凍結割断像について報告を行っている。同様にアセチルコリンレセプター形成の段階に於いて起る集合と分散について萩原が報告した。

この様にして形成される筋細胞がやがて膜興奮性を、また一方では収縮能を獲得するが、それらの基礎実験としてCaチャンネルについて高橋(国)と加濃が、また損傷後のhealing overについて栗山が、収縮系の分化について堀田と遠藤が報告を行った。また大塚は筋ジス筋では多神経支配という現象が正常よりも後々迄残ることを示した。

一方、畑山はラット脳に筋芽細胞の増殖を促す新しい物質の存在を示唆し、小沢はトランスフェリンのin vivo 実験を行うべく予備実験としてのその体内代謝の報告を行った。また胸腺の骨格筋が神経冠に由来するという証明を仲村が行った。

第二の点は筋の破壊効果及びおそらくそれに関与すると思われるプロテアーゼとそのインヒビターの問題である。マーカインは筋の急性破壊を惹起するが、このモデルを用いての研究が杉田によって報告された。勝沼は、リソゾーム・チオール・プロテアーゼの内在性インヒビターについて一次構造を報告し、それが普遍的に存在すること及び

肝型や皮膚型が存在すること等について述べた。今堀は、チオールプロテアーゼの mCANP 及び  $\mu$ CANP についての高次構造や、自己溶解などについて報告を行った。この他青柳、高橋(健)、松下らもそれぞれプロテアーゼに関する報告を行った。

第三の点に関しては、寺尾は筋ジスハムスターと正常ハムスターの交換移植を行い、筋の再生が環境によって大きな影響を受けることを示した。さらに再移植、再々移植が可能であることをも報告した。香川は筋ジスマウスの衛星細胞を用いて in vivo 及び in vitro での再生を調べ、クローン培養における衛星細胞の分化をクレアチンキナーゼをマーカーとして研究した。

これらの研究以外にも戸塚は筋ジスマウスの小人症変異種の筋ジス病変の発現が、野生種筋ジスマウスよりも少いことに注目し、筋と骨との成長の程度の違いが本症の修飾にかゝっているであろうと推論した。また、江橋、岡田(節)、岡田(善)が本症研究の基礎的手技についての報告を行った。

## 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わ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。

本年度は、三年に亘って行って来た「筋の発生と分化に関する基礎的研究」の最後の年に当る。この間に筋蛋白の分化について、特にその基本的なことがかなり明瞭になり、これらの結果から、さらにこれらがどのような過程により分化が修飾されるか、更にそれらが病的過程がどのように現われるかを調べるための準備が、完全とはいえないにしても、できて来たと思われる。また病的過程における種々のプロテアーゼの持つ役割に対する或る程度の見方ができ上ったようである。しかしまだ再生過程という筋ジストロフィー症の病態生理学において非常に重要な過程に対する理解はまだ不十分であるといわなければならない。

さらにこの数年間世界的に急速に普及しかつ著しいレベルの向上をみた遺伝子工学およびモノクロナル抗体法については、後者については一応のレベルを持つに至っているが、少なくとも筋発生分化はもちろん遺伝子疾患である筋ジストロフィー症研究のためには非常に強力な武器であるにもかかわらずまだ研究者の層が薄くこの面での研究者の養成が急ぎ望まれる。前述のMDAのコロキウムではこれらの手法を用いた研究が主流を占めている。

筋ジストロフィー症の研究の道は峻しい。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 移植その他

1. 筋ジスー小人症(dy-dw)重複症疾患マウスとdy筋病変 9
2. ジストロフィーおよび正常チキンにおける  
長橈側手根伸筋の神経支配 17
3. ジストロフィーハムスターと正常ハムスター間の  
交換移植についての研究(第2報)および再生筋  
の再移植について 20

# 1 筋ジストロフィー症 — 小人症 (dy-dw) 重複疾患マウスとdy筋病変

戸塚 武\*

研究協力者 渡辺 貴美\* 浦本 勲\*  
大平 敦彦\* 伊藤 均\*\*

マウスの筋ジストロフィー (dy) 症は、筋の成熟成長障害 (4, 6, 9, 12, 14) による疾患であり、成長の止った筋が成長し続ける骨により強制的に引き伸ばされることが発症の直接的原因であろう、と提唱してきた。その証拠として、筋は後肢筋同様異常 (1, 14) でありながら骨が低成長の前肢の症状が軽いこと (7)、骨を含む全身の成長も抑制された dy-dw (dw: 小人症) 重複疾患マウスで dy 症状が不顕化すること (*Proc. Japan Acad.*, 57B: 109-113), を報告した。同じ年 (1981), ヒトとニワトリでよく似た結果が発表された。ブラジルの Zatz らは dy (Duchenne 型) -dw (GH 欠乏による) 重複疾患児を発見し, dy 症状が著しく軽いこと (*Am. J. Med. Genet.*, 10: 301-304 & 305-307) を, アメリカの King らは, 抗甲状腺剤投与により一種の dw 症にした dy ニワトリの dy 症状がやはり著しく軽いこと (*Life Sci.*, 28: 577-585) を発表した。骨成長の抑制が一種の対症療法になるだろうと考えられる。

dy-dw マウスの筋に dy-specific な病変が見られるならば, それは前臨床期の dy 病変と考えられる。残念なことに, dy-dw マウスは外見上 dw マウスと区別できなかった。成長ホルモンとチロキシンを投与し dw 症の治療を行うと, dy-dw マウスは dy 症を発症する (後肢を引きずる) ようになることで

初めて同定が可能であった。最近になって我々は, 電気生理学的方法により dy-dw マウスを同定することに成功した (8, 10)。そこで本研究は, dy-dw マウスの前肢筋の組織学的分析を行った。また, dy 筋の結合織成分のプロテオグリカンの糖鎖グリコサミノグリカンの量の分析と, dy マウスが Ehrlich 腹水ガン接種に対してどのような反応を示すか, 検討した。

## 材料と方法

### 動物

dy マウス (C57BL/6J dy/dy), dw マウス (DW/J dw/dw), dy-dw マウス (前二者の雑種 BL-DW dy/dy dw/dw) とそれぞれに対応する正常マウスを用いた。

### dy-dw マウスの同定

ウレタン麻酔したマウスの坐骨神経を電気刺激し, Gastrocnemius からの誘発筋電位 (オシロスコープ上のパターン) を写真記録した。5 Hz 連続刺激による誘発筋電位の振幅の経時的变化を解析したところ, dy-dw マウスは dy マウスの特徴 (一種の疲労抵抗性: 別の観点からは未熟性) (11, 13, 15) を持っていることがわかった (8, 10)。すなわち, 正常マウスと dw マウスの誘発筋電位の振幅は 5 Hz 刺激開始後数分で, 数十%も減少したが, dy マウスと dy-dw と思われるマウスの誘発筋電位の振幅は, せいぜい十数%の変化を示しただけであった。

\* 愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所

\*\* 三重大学医学部

