

199800374A

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

（分担研究報告を含む）

エメリー・ドレイフス型 筋ジストロフィーの
病因・病態の解明と治療法の開発に関する研究

主任研究者：荒畑 喜一 国立精神・神経センター神経研究所部長

分担研究者：石浦章一 東京大学大学院生命認知科学科教授

依藤 宏 防衛医科大学校解剖学教授

埜中征哉 国立精神・神経センター武蔵病院長

厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）
（総括）研究報告書

エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィーの病因・病態の解明と
治療法の開発に関する研究

主任研究者 荒畑 喜一 国立精神・神経センター神経研究所第一部長

研究要旨　すでに私どもは X 染色体劣性 Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (X-EDMD) の原因遺伝子の変異の発見と、その遺伝子産物であるエメリン(emerin)の細胞局在（核二重膜の内膜の nucleoplasm 面）を明らかにし、Nature Genetics および Neurogenetics 誌上にそれらを発表して来た。今年度はさらに、病態機序の解明を目指す一端として、emerin の各種欠失変異体を作製し、GFP 法等を実施し、機能ドメインの特定等の研究を進めいくつかの重要な事実を得た。これらの結果は EJB 誌上に報告した。X-EDMD の責任遺伝子産物である emerin は、普遍的に発現する 34kDa の核内膜タンパク質であり、C 末端側にある単一の疎水性領域が膜貫通ドメインと推定されている。しかしながら機能を示唆するような一次構造上の特徴はなく、emerin の生理的役割、またその欠損がなぜ筋疾患を引き起こすのかについては不明である。我々は emerin の機能を解析するための第一歩として、核内膜への局在を決定する領域を細胞生物学的手法を用いて同定した。さらに臨床医学への貢献を目的とし、(1) 臨床データベースの充実、(2) エメリン遺伝子変異検出法の確立、(3) 心筋障害の臨床遺伝的検討、(4) 関節拘縮の臨床医学的検討、(6) エメリン結合タンパクの検出、(7) エメリン遺伝子の発現実験とノックアウトマウスの作製準備等を実施した。

分担研究者

石浦章一 東京大学生命認知科学科
教授

依藤 宏 防衛医科大学校解剖学
教授

埜中征哉 国立精神・神経センター
武蔵病院
病院長

A. 研究目的

本研究課題で取り上げたエメリー・ドレイフス型筋ジストロフィーは、(1)右房拡張型心筋症と重篤な心伝導障害、(2)早期発症の関節拘縮、(3)上腕-腓骨筋型の筋力低下と筋萎縮を3主徴とする筋疾患であり、突然死の頻度が高い(~50%)。従ってその解明が急務とされている。本症の拘縮は筋力低下が明らかとなる以前の早期から現れ、典型例では前腕は肘で半屈曲位を取り、頭前屈が障害される。また上腕二頭筋・三頭筋、腓骨筋萎縮が初期に見られ、後に肩甲-上腕-下肢帯-下腿型に至る。相前後して右房拡張型心筋症の存在が明らかとなることが多く、臨床的には徐脈として、心電図上ではPR間隔の延長として現れ進行してついには完全心房停止に至る。そのため失神や心不全症候を呈することがあり、さらに突然死の原因ともなる(~50%)ことから早急な対策が望まれている。筋生検では壊死・再生や結合織の増生など、筋ジストロフィーの変化がみられる。

我々はエメリー・ドレイフス型筋ジストロフィーに見る、高率の突然死を未然に防止すべく、(1)検出された遺伝子変異のデータを臨床に還元し、さらに(2)適切

な遺伝相談の資料提供を計り、一方、(3)臨床表現型-遺伝型の解析を行う。さらに、(4)筋細胞の核膜に局在するエメリンが心伝導障害、関節拘縮および筋線維壊死を惹起する機構を解明し、筋ジストロフィーの病態解明に新たな視点を拓く目的で、エメリンの細胞内動態と核内膜へのターゲティングの機能ドメインを同定する。また、有効な治療法の開発を計る手だての一環として、エメリン遺伝子の発現実験とノックアウトマウスの作製準備等を行う。

B. 研究方法

国立精神・神経センターの倫理・遺伝子検索ガイドラインに沿って、疾患の臨床調査を実施、症例の収集に努め、臨床データベースを作製する。ついでそれらの症例から末梢血液・筋肉・皮膚組織等を得て、組織細胞バンクを樹立する。DNA、mRNAは型通り抽出し、遺伝子変異の解析に供する。エメリンの超微局在は、金コロイド法による免疫電顕で定量的に明らかにする。エメリンの細胞内動態の解析にはHis-Tag乃至GFP-エメリン法を用いる。エメリン分子の細胞内動態に関しては各種欠失変異体を構築し、HeLa細胞、C2C12細胞等に過剰発現系を作り検討する。また必要に応じて共焦点レーザー顕微鏡・ビデオカメラ等にて検討する。とりわけ、細胞周期に伴う核膜の分離・再構築機転と細胞内 trafficking に最大の注意を払う。遺伝子治療を目指した基礎的研究としては、患者皮膚線維芽細胞の分子遺伝学的、免疫細胞学的分析と、今後用いていきた

いベクターについて検討する。さらに、エメリン結合タンパクの検出とノックアウトマウスの作製準備等を開始する。

C. 研究結果

今年度は日本人エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィーの臨床データベースを発展させた。特にエメリー・ドレイフス型筋ジストロフィーと臨床像が酷似する強直性脊椎症候群(RSS)を国立精神・神経センター組織細胞バンク 5,000 例を検索し、8 例中 1 例にエメリン遺伝子の変異とエメリンの欠損を発見した。このことから、RSS の中には X-EDMD オーバーラップが存在することが判明した。

次に X-EDMD におけるエメリン遺伝子変異検出法の確立と国際データベースの共有を行った。関係者の協力により、家族例・孤発例を含めこれまでに発見された STA 遺伝子異常はインターネット上で公開された (<http://www.path.cam.ac.uk/emd/mutation.html>)。

X-EDMD の心筋障害の臨床遺伝医学的検討から、本症が実は右房拡張型心筋症で、心臓の chamber-specific 遺伝子発現の異常のある可能性が示された。

ヒト emerin の全長型および様々な領域の欠失変異体を哺乳類細胞発現ベクターに組み込み、サル線維芽細胞 COS-7 およびマウス筋芽細胞 C₂ に導入した。なお emerin の N 末端へのタグの付加は細胞内局在に影響を与えないことから、内在性分子との識別のために c-Myc epitope または green fluorescent protein (GFP) を付加し、蛍光免疫染色および直

接蛍光観察によって細胞内局在を検討した。さらに GFP 融合 emerin 変異体については、C₂ にベクターを導入した後、薬剤選択により安定発現株を樹立し、増殖培地および分化培地において培養し比較検討した。全長型 emerin は、培養細胞における過剰発現系においても大部分は正しく核膜への局在を示したが、一部は細胞質膜へ移行した。N 末端約 100 残基を欠失した変異体も全長型と同様の局在を示したが、中間領域を欠失した変異体は大部分が細胞質膜へ分散した。疎水性領域を欠失した変異体は核内および細胞質に一樣に分散し、細胞内安定性は他の変異体に比べて有意に低下していた。この傾向は線維芽細胞と筋芽細胞ともに同様であり、融合した筋管細胞でも目立った差は見られなかった。なお変異体過剰発現状態の細胞と親株の間に表現形の顕著な差異は見られず、また細胞内プロテinkinase 活性やカルシウム濃度変化などに対する応答も変わらなかった。

すでに我々はエメリンの超微局在の研究結果から、エメリンは核の内膜（染色質面）の存在することを報告してきたが、今年度はエメリンの細胞内動態と核内膜へのターゲティングの機能ドメインを同定した。これは AD-EDMD の原因遺伝子の一つがエメリンと近接するラミン A/C であることが判明した事実と併せて極めて重要な事実であり、今後の病態研究の貢献するものである。

エメリン遺伝子の発現実験では、日本人 EDMD 患者 2 名の皮膚線維芽細胞を培養しそのエメリンの発現を抗エメリン抗体を用いた免疫細胞染色法と

Western blot により検討した。この 2 名の患者の遺伝子異常は患者 1 がスプライス接合部の変異によりイントロン 5 が mRNA に残るというもので、患者 2 では 1 塩基の欠失によりフレームシフトが起こり早くにストップコドンが生じるものであった。エメリンに対する抗体を用いて正常培養線維芽細胞を染めると、その核膜と僅かに細胞質が染まるが、患者 1 の線維芽細胞では全く染まらず、患者 2 も同様であった。線維芽細胞ではエメリンが別の機能を有し、その欠損が腱の拘縮に関与する可能性があるかもしれない。Western blot でも同様の結果を得た。

HeLa 細胞の細胞周期を同調させて、内因性ヒトエメリンを見ると、エメリンは静止期(interphase)で、主として核膜に認められたが、有糸分裂期(mitotic phase)に入ると細胞質に拡散し、終期(telophase)から細胞質分裂期(cytokinesis phase)の時期に染色体の周囲および中心体の一部に集合する、極めて特異な局在を示した。

EDMD には心伝導障害による突然死が報告されており現在有効な治療法はなく、将来的に遺伝子治療が期待される疾患の 1 つと考えられる。そこで我々は、ウイルスベクターを用いたエメリン遺伝子の導入実験を計画し、まずアデノウイルスベクターにヒトのエメリン cDNA と CMV プロモーターとポリ A を組み込んだ。

エメリン・ノックアウトマウスの作製を進めている。現在ライン 129 の BAC ライブラリーのスクリーニングを終えゲノム・コンストラクトの作成段階となっ

た。

D. 考察

EDMD では、3 主徴や遺伝形式が典型的であれば、その診断は難しくないが、実際は臨床表現型が多彩であり、たとえば従来、肩甲胛骨筋萎縮症、上腕胛骨筋症候群、RSS あるいはベッカー型筋ジストロフィー (BMD) などと診断されていた症例の中にも、本症の垂型と考えられる症例が少なからず存在すると考えられる。事実、本研究で我々は、それまで RSS、BMD と診断されていた EDMD 症例を発見した。これらの事実は、潜在的患者の指摘される RSS の積極的な分子遺伝学的診断と、適切な心ペースメーカーの装着の重要性を示唆するものである。EDMD の場合には遺伝子がさほど大きくないこと、またエメリン mRNA がリンパ球、皮膚にも発現していることから、末梢血や皮膚を材料として PCR 法を利用した診断が比較的容易かつ確実となった。リンパ球から得た RNA より RT-PCR を行えば ORF 全長を増幅することができ、またゲノム DNA を用いて STA 遺伝子全領域を網羅することも可能であるので、積極的に実施すべきである。なお、成熟した筋細胞の場合に比べて線維芽細胞で細胞質もやや染まることは、線維芽細胞ではエメリンが別の機能を有し、その欠損が関節の拘縮に関与する可能性も考えられた。

Emerin の膜への局在および安定性には C 末端の疎水性領域が必須であるが、核膜へのターゲティングは中間領域によって決定されていることが明らかにな

った。現在電子顕微鏡レベルでの詳細な解析を行っている。N 末端は核膜への局在には関与していないが、種間の一次構造の保存性が最も高い領域であり、別の機能を担っていることが推測される。また emerin には各種プロテインキナーゼのリン酸化コンセンサス配列が多く存在することからリン酸化を受けている可能性が高い。現在その意義や機能との関連について更なる検討を加えている。さらに emerin と細胞周期との関連、emerin 結合タンパクの解明も試みている。

アデノウイルスベクターを用いて、患者由来のエメリン欠損皮膚線維芽細胞にエメリンを発現し、免疫組織化学法とイムノプロット法で確認したが、今後この両者の細胞の Cell Biology が研究対象となった。また、筋組織への効率の良い遺伝子導入を可能とするべく新世代アデノウイルスベクターの開発など様々な工夫が試みる。力価の高いベクターを作るのが重要であろう。ウイルスベクターを用いたエメリン遺伝子の導入実験計画では、僅かに発現するウイルス蛋白の免疫原性が目的蛋白の発現持続期間を制限し再投与の効果が期待しがたいという問題点が知られているが、この問題を解決すべく新世代アデノウイルスベクターの開発など様々な工夫が試みられているところである。最近アデノ随伴ウイルスベクター（以下 AAV ベクター）が注目を集めつつある。我々はヒトのエメリン cDNA と CMV プロモーターとポリ A を AAV の ITR をもつプラスミドに組み込み AAV を作製している。

E. 結論

今年度の研究でエメリン分子の機能ドメインの解析が進展し、エメリン関連タンパクないしエメリン結合タンパクの発見への手掛かりも得られた。今後さらに ubiquitous 存在するエメリン欠損が、何故臓器特異的とも言える、臨床的 3 主徴：(1) 関節の早期拘縮、(2) 筋萎縮・筋力低下および(3) 重篤な伝導障害を伴う心筋症をもたらすのか、などの本質的な疑問に対する解答を探して行く事が急務となった。なおかつ遺伝子治療を含めた特異的治療法の開発を目指し、モデル動物の獲得が急がれる。

F. 研究発表

1. 1998 年度の論文発表 (List of Publications)

1) Hayashi Y.K, Chou F-L, Engvall E, Ogawa M, Matsuda C, Hirabayashi S, Yokochi K, Ziober BL, Kramer RL, Kaufman SJ, Ozawa E, Goto Y, Nonaka I, Tsukahara T, Wang J-Z, Hoffman EP and Kiichi Arahata: Mutations of integrin alpha 7 cause congenital myopathy. Nature Genet 19: 94-97, 1998

2) Shinichiro Kubo, Toshifumi Tsukahara, Masakazu Takemitsu, Kim Bong Yoon, Hiroya Utsumi, Ikuva Nonaka and Kiichi Arahata: Presence of emerinopathy in cases of rigid spine syndrome. Neuromusc Disord 8: 502-507, 1998

3) Jing Liu , Masashi Aoki, Isabel Illa, Chenyan Wu, Michel Fardeau, Corrado Angelini, Kiichi Arahata, Pieter J. de Jong and Robert H. Brown Jr.: Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. Nature Genet 20: 31-36, 1998

4) Daniela Toniolo, Silvia Bione and Kiichi Arahata.: Emery-Dreifuss muscular dystrophy. In Neuromuscular disorders: clinical and molecular genetics. ed by Alan EH Emery, 1998 John Wiley & Son's Ltd., Sussex, England, pp87-103.

5) Yuichi Tsuchiya, Asako Hase, Megumu Ogawa, Hiroshi Yorifuji and Kiichi Arahata: Distinct regions specify the nuclear membrane targeting of emerin, the responsible protein for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. European Journal of Biochemistry 259:859-865, 1999

2. 1998年度の学会発表

Kiichi Arahata
IX International Congress on Neuromuscular Diseases, Adelaide, Australia
SYMPOSIA S1m (August 31, 1998)
WHAT'S NEW IN DYSTROPHY?

Emery-Dreifuss muscular dystrophy

Kiichi Arahata
3rd Congress of the World Muscle Society (WMS), Naples, Italy
KEY NOTE LECTURE (May 29-30, 1998)
Cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy

Kiichi Arahata
XIVth Meeting on Neuromuscular Diseases, Marseilles, France
SYMPOSIA (March 20-22, 1998)
Contractures in Emery-Dreifuss Syndrome

