

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
（総合）研究報告書

==== 1997~1999 ====

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

（分担研究報告を含む）

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

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

平成11年度

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 筋ジストロフィーの一次的原因が、細胞の核膜関連タンパク（エメリン、ラミン A/C）に見いだされたのは、Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (EDMD) がはじめてである。EDMD には X 染色体性劣性の X-EDMD (MIM:310300) と常染色体性優性の AD-EDMD (MIM:181350) および劣性の AR-EDMD があり、遺伝的に heterogeneous な疾患であると考えられる (X-EDMD の遺伝子座は Xq28 に、AD-EDMD の遺伝子座は 1q21.2-q21.3 の存在する)。AR-EDMD の遺伝子座は未だ不明である。我々は X-EDMD 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、機能ドメインの特定等の研究を進めた。さらに核内膜のエメリンの臓器別染色分布をラットで見、エメリンの発現が腱、筋、皮膚など力学的な力を受けやすい部位に一致する傾向を示した。また AD-EDMD の原因タンパク質のラミン A が、実はエメリン結合タンパク質である可能性を示した。これらの事実は EDMD の病態を考える上で非常に重要である。EDMD には現在有効な治療法はなく遺伝子治療が期待される本症に対し、我々はアデノウイルスベクターを用いてエメリン遺伝子の導入に成功した。今後アデノ随伴ウイルスベクター、(AAV ベクター) 使用を検討する。さらに、将来の治療法の開発を視野に、エメリン遺伝子・ラミン A 遺伝子のノックアウトマウスの作製・解析に着手した。

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

我々は EDMD 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とその染色質面に位置するラミン A/C 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、これら分子群の細胞内動態と核膜へのターゲティング機構を知る。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、ラミン A 遺伝子の導入実験とノックアウトマウスの解析を行う。

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。核内膜のエメリンの臓器別染色分布はラットで検索する。またエメリン、ラミン A/C 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。さらにエメリンの結合タンパ

ク質を生化学的に明らかにする目的で、エメリンの発現及び精製・核膜サンプルの調製・核膜を混ぜ各々の抗体による免疫沈降を行う（発色は抗エメリン抗体）。遺伝子治療への試みとして、我々はアデノウイルスベクターを用いてエメリン遺伝子の導入を行う。またアデノ随伴ウイルスベクター、(AAV ベクター) 使用を検討する。さらに、エメリン遺伝子・ラミン A 遺伝子のノックアウトマウスの作製・解析に着手する。一方、21世紀の機能解析遺伝学 (Functional Genomics) の主要な方法論の一つである DNA チップの筋疾病研究分野への導入を図る。特に筋ジストロフィーに共通の病態像を特徴づける遺伝子発現プロフィールを明らかにすべく、筋蛋白関連遺伝子と筋ジストロフィー関連遺伝子群のデータベースを構築し、筋 DNA チップを作製する。筋発現遺伝子クローン、STACK-DB (SANBI)、TIGR-DB 等を用い、DNA チップの大規模化を図る。

C. 研究結果

今年度も日本人エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィーの臨床データベースを更に発展させた。とりわけ AD-EDMD の3家系が明らかになった。またエメリー・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) 例にエメリン遺伝子の変異とエメリンの欠損をさらに発見した。一方、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さらに進めた。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。

我々は前年度に 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を示したが、心房内心電図の結果はこれを裏付けた。

昨年度の研究から、全長型エメリンは、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、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ことで、疎水性領域の重要性を指摘したが、今年度はエメリンの機能を明らかにすべく、エメリン結合タンパク質を検索した。その手順として；（１）エメリンの発現及び精製を行った。これは、膜貫通部位を削ったヒスタグ付きコンストラクトを精製、大腸菌では不溶性画分（発現画分）を得、まず尿素で変成させた後、ニッケルカラムで精製、続いて段階的に尿素を透析で抜き、最終的に溶け残ったサンプルを巻き戻しがうまく行ったと判断し、次の実験に用いた。（２）尿素による変性条件下で、ヒスタグ付き組換えエメリンは 100mM イミダゾールで溶出した。ヒスタグはきちんと機能し、精製に成功した。（３）エメリンと相互作用させるための核膜サンプルを調製（ショ糖を使った遠心分画法）た。最終精製サンプルを確認するためにラミンや LAP1 の抗体でウエスタンし、実験がうまくいっている事を確認した。（４）1. で作ったエメリンと 3. で作った核膜を混ぜ、各々の抗体で免沈した。ウエスタンプロットの発色は抗エメリン抗体で行い、抗ラミン A での免沈サンプルにおいて、抗エメリン抗体による発色が確認された。以上の事からラミン A とエメリンは結合するという結論を得た。

エメリン及びラミン遺伝子の発現実験では、DNA チップの解析から、エメリン欠損におけるラミンの upregulation と、遺伝子導入後の normalization を確認した。

EDMD 患者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 による検討では、エメリン、ラミン抗体を用いて正常培養線維芽細胞を染めると、その核膜が染まるが、患者の線維芽細胞では全く染まらず、Western blot でも同様の結果を得た。なお、核内膜のエメリンの臓器別染色分布をラットで見たとこ、エメリンの発現が腱、筋、皮膚など力学的な力を受けやすい部位に一致する傾向を示した。しかし lamin A/C との相関は不明であった。

遺伝子治療を目指した基礎的研究としては、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行った。アデノウイルスベクターにはヒトのエメリン cDNA と CMV プロモーターとポリ A を組み込んだ。また将来的に遺伝子治療の基礎実験を行う目的で、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、ゲノム・コンストラクトの作製段階を終え、キメラマウス作製に入っている。

D. 考察

この一年間の我々および他の研究グループの結果から、EDMD の原因として、エメリンに加えラミン A/C 変異が加わった。とりわけラミン A/C 遺伝子変異によって、いわゆる EDMD (X-EDMD, AD-EDMD, AR-EDMD) に加え、さらに拡張型心筋症 (CMD1A) と Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD) の臨床表現型が報告された意義は大きく、今後これらの分子異常の関与する EDMD の病態を解明する手掛かりとなる。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、肩甲腓骨

筋萎縮症、上腕腓骨筋症候群、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、本症の亜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。本研究で我々はそれまで RSS, BMD と診断されていた EDMD 症例を発見している。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。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。

Emerin の膜への局在および安定性には C 末端の疎水性領域の存在が必須であるが、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。一方、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。今回エメリンとラミン A の結合が示唆されたことは、今後核膜病変による疾病の発生を考える上で大きな手掛かりとなる。問題は内在性のエメリンがあるか否かであるが、ラットの肝臓を用いた今回の実験では、ネイティブなものは確認できなかったもので、内在性のエメリンは存在量が非常に少ないと判断し、核膜サンプルに組換えエメリンを更に加えてから免沈実験を行った。いずれにしても、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、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るが、今回ラミン A とエメリンが結合するという結論を得た意味は大きい。

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、今回両者の細胞の Cell Biology が研究対象となった。DNA チップによる研究の推進は今後結果が期待される。また、筋組織への効率の良い遺伝子導入を可能と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ているが、当面アデノウイルスベクターを用いたエメリン遺伝子の導入が成功した事で、エメリン・ラミン A 欠損状態のレスキューとそれによる細胞レベルの応答などが検討できることになった。

Ubiquitous に存在するエメリン欠損が、何故臨床的 3 主徴をもたらすのかななどの本質的な疑問に対する解答を探して行く必要がある。なおかつ将来の治療法の開発を視野に、エメリン遺伝子及びラミン A 遺伝子のノックアウトマウスの作製・解析が急がれる。

E. 結論

Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (EDMD) は遺伝性の筋疾患であり、①若年発症の肘・Achilles 腱・後頸部の拘縮、②緩徐に進行する肩甲-上腕-腓骨筋型の筋萎縮と筋力低下、③重篤な伝導障害を伴う心筋症を 3 主徴とする。今年度の研究ではエメリン結合タンパクの一つが実は AD-EDMD の原因遺伝子の転写-翻訳産物ラミン A である可能性が示された。また核内膜のエメリンの臓器別染色分布では、エメリンの発現が腱、筋、

皮膚など力学的な力を受けやすい部位に一致する傾向を示した。さらにDNAチップの解析から、エメリン欠損における

ラミンの upregulation が確認され、遺伝子導入による restoration を見た。

F. 研究発表

1. 1999年度の論文発表 (List of Publications)

1) 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) Masanori Funakoshi, Yuichi Tsuchiya and Kiichi Arahata: Emerin and cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 9: 108-111, 1999

3) Shinnji Fujimoto, Tatsuya Ishikawa, Kiichi Arahata and Ikuya Nonaka: Early onset of X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy in a boy with emerin gene deletion. *Neuropediatrics* 30: 161-163, 1999

4) Seiichi Tsujino and Kiichi Arahata: Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *NeuroScience News* 3:34-38, 2000

5) Kiichi Arahata: Emery-Dreifuss muscular dystrophy. In *Disorders of Voluntary Muscle* (7th ed)(In Press)

6) 荒畑喜一 エメリー・ドレーフス型筋ジストロフィー

生体の科学 50: 344-346, 1999

7) 永野 敦, 荒畑喜一 Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー

Clinical Neurosciences 17: 1134-1137, 1999

2. 1999年度の学会発表

1) Kiichi Arahata, Atsushi Nagano, Noboru Sasagawa, Yuichi Tsuchiya¹, Megumu Ogawa, Kanako Goto, Yukiko K. Havashi, Hiroshi Yorifuji, Takafumi Hasegawa, Tatsuya Ishikawa, Eiichiro Uyama, Yoshihito Hata, Seiichi Tsujino, Toshifumi Tsukahara and Shoichi Ishiura

COE Symposium 2000 - Muscular Dystrophy - molecular and cellular mechanisms and gene therapy, March 14-16, 2000, Tokyo - Japan
Molecular pathology of Emery-Dreifuss muscular dystrophy.

2) Kiichi Arahata

AFM Sponsored International Congress on Myologie 2000, March 27-31, Nice - France
Nuclear envelopeopathy/Emery-Dreifuss muscular dystrophy.

3) 荒畑喜一

第25回日本医学会総会講演

平成11年4月2日、東京
筋ジストロフィー研究の進歩

4) 荒畑喜一

日本医学会シンポジウム
平成11年12月2日、東京
神経難病の update, 筋ジストロフィー