

20010649

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

ライソゾーム性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究

平成 13 年度 総括研究報告書

主任研究者 西野 一三

平成 14 (2002) 年 3 月

# 目次

I. 総括研究報告書	
ライソゾーム性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究…………… 4	
西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
II. 分担研究報告	
1. Danon 病の臨床病理学的特徴に関する研究…………… 10	
西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
2. 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの原因遺伝子に関する研究 …… 12	
西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
3. 乳児型自己貪食空胞性ミオパチーに関する研究 …………… 14	
埜中 征哉 (国立精神・神経センター 武蔵病院)	
4. 骨格筋のオートファジーと筋萎縮に関する研究 …………… 16	
石浦 章一 (東京大学大学院 総合文化研究所)	
5. リソソーム膜蛋白質の機能解析 …………… 19	
田中 嘉孝 (九州大学大学院 薬学研究院)	
6. 異なる血清型の AAV ベクターによる acid maltase 遺伝子導入 の比較検討 …………… 22	
辻野 精一 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 25	
IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 27	

# I . 総括研究報告書

## ライソゾーム性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究

主任研究者 西野一三 国立精神・神経センター  
神経研究所 疾病研究第一部 部長

研究要旨：ライソゾーム性筋疾患は、自己食空胞性ミオパチー (autophagic vacuolar myopathy; AVM) と縁取り空胞性ミオパチー (rimmed vacuolar myopathy; RVM) とに分類できる。RVM は、二次的ライソゾーム性筋疾患、AVM は一次的ライソゾーム性筋疾患と考えられる。我々は、AVM の病態を解明して治療法開発を目指す目的で、Danon 病および類縁疾患である乳児型自己食空胞性ミオパチーの臨床病理学的検討を行うとともに、酸性マルターゼ (AM) 欠損症 (AMD) モデルマウスに対する AAV ベクターの効率について検討を行った。Danon 病は、男性例では、全例に心筋症とミオパチーが見られたが、精神遅滞は見られるのは 70% であった。女性例では、全例に心筋症を認めたが、ミオパチーは 33%、精神遅滞は 6% であった。また、Danon 病と同じ疾患名で報告されている乳児型例が 2 例あるが、両例とも LAMP-2 が欠損しておらず、Danon 病とは別の疾患であることが明らかとなった。AAV ベクターは従来用いられてきた 2 型よりも 5 型の効率が非常によいことが判明した。RVM については、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) が大半の例で HIBM の原因遺伝子である GNE 遺伝子変異と関連していることが明らかとなり、DMRV と HIBM が遺伝学的に同一の疾患である可能性が強く示唆された。

### 分担研究者

西野 一三：国立精神・神経センター  
神経研究所 疾病研究第一部 部長  
埜中 征哉：国立精神・神経センター  
武蔵病院 院長  
辻野 精一：国立精神・神経センター  
神経研究所 疾病研究第五部 室長  
田中 嘉孝：九州大学大学院薬学研究院  
細胞生物薬学分野 助手  
石浦 章一：東京大学大学院  
総合文化研究科 教授

### A. 研究目的

ライソゾーム性筋疾患の研究は立ち遅れており、「ライソゾーム性筋疾患」という言葉に対する定義すら定まっていない。我々は、ライソゾーム性筋疾患を、AVM と RVM に分類する。AVM の 1 つである Danon 病が、原発性 LAMP-2 欠損症であることが明らかとなったが、その臨床病理学的な詳細はまだ検討さ

れていない。そこで、遺伝学的に Danon 病が確定した患者の臨床病理学的特徴について検討した。これまで、女性患者についてはほとんど情報がなかったが、女性患者においても致死性の心筋症を来すことが明らかとなった。また、従来 Danon 病と同じ疾患名で報告されていた 2 例の乳児型例について検討し、両例とも Danon 病とは別の疾患であることを明らかにした。さらに、AVM の治療開発の一環として、AMD モデルマウスに対する AAV ベクターの遺伝子導入の効果について検討した。RVM については、DMRV 患者において GNE 遺伝子変異の有無を検討した。これは、臨床症状が酷似し同部位に遺伝子座が存在する HIBM が最近 UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase をコードする遺伝子 (GNE) の変異と関連していることが報告されたためである。

## B. 研究方法

1. Danon 病の臨床病理学的研究: 遺伝学的に Danon 病が確定している 13 家系 38 名 (男 20 名、女 18 名) を対象とし、臨床病理学的検討を行った。
2. 乳児型 AVM に関する研究: これまでに報告されている乳児型 2 例の骨格筋に対して、免疫染色および電顕的検討を行った。また、LAMP-2 遺伝子オープンリーディングフレームのシーケンスを決定した。
3. 異なる血清型の AAV ベクターによる AV 遺伝子導入の検討: ヒト培養線維芽細胞および AM 欠損マウスの線維芽細胞と個体に対して 3 種の血清型の AM 発現または LacZ 発現 AAV ベクター (AAV2, AAV3, AAV5) で遺伝子導入した後、染色および酵素活性測定を行った。
4. DMRV の原因遺伝子に関する研究: 互いに血縁関係がなく、臨床病理学的に DMRV と診断された 24 名の日本人患者を対象とし、GNE 遺伝子の全エクソンおよびエクソン・イントロン境界領域の塩基配列を決定した。

## C. 研究結果

1. Danon 病の臨床病理学的研究: 男性患者では、全例で心筋症とミオパチーが認められたが、精神遅滞は 70% の頻度であった。女性患者では、心筋症は全例に認められたが、ミオパチーは 33%、精神遅滞は 6% であった。また、血清 CK 値は男性患者では全例で上昇が見られたが、女性患者では 63% に上昇が見られるのみであった。死亡年齢は男性が  $19 \pm 6$  歳、女性が  $40 \pm 7$  歳で何れも死因は心不全であった。また、肝腫大を男性例の 36% に認めた。組織学的には、全例で LAMP-2 が欠損していた。筋線維内の空胞はその膜上にアセチルコリンエステラーゼ活性を有し、また、筋鞘膜蛋白が存在していた。
2. 乳児型 AVM に関する研究: 両例ともに骨格筋の免疫染色で LAMP-2 は欠損しておらず、また、LAMP-2 遺伝子変異も見いだされなかった。補体 C5b-9 は筋線維表面に沈着していた。電顕的観察では、筋線維内の自己食空胞を多数認めると共に、基底膜が重層化しその層間に exocytosis を受けた後と思われる自己食産物が多数認

められた。

3. 異なる血清型の AAV ベクターによる AV 遺伝子導入の検討: ヒト培養線維芽細胞では、3 種の AAV-AM はほぼ同様に AM 活性を発現したが、AM 欠損マウスの線維芽細胞と個体に対しては、AAV-5 の効率が著明に高かった。
4. DMRV の原因遺伝子に関する研究: 24 名のうち 18 名にホモ接合型または複合ヘテロ接合型の GNE 遺伝子変異を認めた。見出された変異は 7 種類で、epimerase ドメインに変異のあるものが 4 種類、kinase ドメインに変異のあるものが 3 種類であった。Epimerase ドメインの変異と kinase ドメインの変異の複合ヘテロ型変異は、5 例に認められた。何れの変異も HIBM において報告されているものとは異なっていた。

## D. 考察

1. Danon 病の臨床病理学的研究: これまで、Danon 病女性患者に関する検討は全くなかったが、今回の検討から、男性患者に比べて臨床症状は比較的軽度ではあるものの、全例で致死的心筋症を来すことが明らかとなった。加えて、男性患者とは異なり、ミオパチーを伴わない例があり、女性例では血清 CK 値の上昇を伴っていないことも Danon 病を否定できないことが明らかとなった。一定数の患者に肝腫大を認めたことは、LAMP-2 欠損は心筋・骨格筋・脳だけでなく、他の臓器にも何らかの影響を及ぼしていることを示唆している。組織学的には、筋線維内の空胞の膜が筋鞘膜の性質を示した。このことは、空胞が筋鞘膜の嵌入に由来することを示唆している。
2. 乳児型 AVM に関する研究: 両例とも、LAMP-2 が欠損していないことまた LAMP-2 遺伝子変異が見いだされないことから、Danon 病とは異なる疾患であることが明らかとなった。従って、Danon 病とは異なる病名が用いられるべきであり、乳児型 AVM と呼ばれるべきである。また、補体 C5b-9 筋線維表面への沈着及び電顕での基底膜重層化の所見は、Danon 病よりはむしろ過剰自己食食を伴う X 連鎖性ミオパチー (XMEA) で見られる所見であり、乳児型 AVM は XMEA に近い病態を持つことが示唆された。

3. 異なる血清型の AAV ベクターによる AV 遺伝子導入の検討: AM 欠損マウスに対して従来用いられてきた AAV2 よりも、AAV5 で遺伝子導入発現効率が格段に良く、AAV5-AM を用いた治療実験が期待される。
4. DMRV の原因遺伝子に関する研究: HIBM において報告されている変異とは異なっているが、臨床的に DMRV が HIBM に酷似していることに加えて DMRV 患者においても GNE 遺伝子変異が見出されたことは、DMRV と HIBM が allelic disease であることを強く示唆している。また、epimerase ドメインの変異と kinase ドメインの変異の複合ヘテロ型変異が認められる例があったことは、恐らく、一方のドメインの異常があれば2つの酵素の活性が共に影響を受けることを示唆している。また、GNE 遺伝子に変異を認めない DMRV 患者の存在については、イントロンなどシーケンスを決定していない部分に変異がある可能性とともに、DMRV 自体が遺伝学的に不均一である可能性を示唆している。

#### E. 結論

1. Danon 病は、男性患者では心筋症・ミオパチー・精神遅滞を3主徴とする疾患であるが、女性患者においては、多くの場合心筋症のみを発症する。
2. 乳児型自己食空胞性ミオパチーは Danon 病とは遺伝学的に異なる疾患である。
3. AAV5 は遺伝子導入発現効率が低い。
4. 18名の DMRV 患者において GNE 遺伝子変異を見出した。少なくとも大半の DMRV は遺伝学的に HIBM と同一である可能性が高い。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Murakami N, Hirano M, Nonaka I, Nishino I. Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. *Neurology*

57: 903-905, 2001.

・ Nishino I, Yamamoto A, Sugie K, Hirano M, Nonaka I. Danon disease and related disorders. *Acta Myologica* 20:120-124, 2001

・ Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Oh SJ, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Lamperti C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Nonaka I, Hirano M, Nishino I. Clinicopathological features of genetically-confirmed Danon disease. *Neurology*, in press.

・ Nishino I, Hirano M, DiMauro S. LAMP-2 deficiency: Structural and molecular basis of skeletal muscle diseases. *Karpati G ed. ISN Neuropath Press, Basel, Switzerland*. pp. 142-144, 2002.

・ Nonaka I, Minami N, Chae J, Murayama K, Igarashi F, Hayashi YK, Nishino I, Arahata K. Limb-girdle muscular dystrophy: research in Japan. *Acta Myologica* 20: 83-86, 2001.

・ Hirano M, Marti R, Ferreiro C, Vilà MR, Tadesse S, Nishino I, Vu TH. Defects of intergenomic communication: autosomal disorders causing multiple deletions and depletion of mitochondrial DNA. *Semin Cell Dev Biol* 12: 417-427, 2001.

・ Takahashi M, Yamamoto A, Takano K, Sudo A, Wada T, Goto Y, Nishino I, Saitoh S. Girmline mosaicism of a novel mutation in LAMP-2 deficiency (Danon disease). *Ann Neurol*, in press.

・ Ozawa E, Nishino I, Nonaka I. Sarcolemmopathy: muscular dystrophies with cell membrane defects. *Brain Pathol* 11: 218-230, 2001.

・ Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. MNGIE: from nuclear DNA to mitochondrial DNA. *Neuromuscul Disord*

11: 7-10, 2001.

・ Spinazzola A, Marti R, Nishino I, Andreu AL, Naini A, Tadesse S, Ivana P, Zammarchi E, Donati MA, Oliver JA, Hirano M. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem* 277: 4128-4133, 2002.

・ Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, Sekiguchi S, Shiga Y, Takahashi T, Onodera Y, Haginoya K, Kobayashi K, Iinuma K, Nonaka I, Arahata K, Itoyama Y. Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy. *Neurology* 58: 323-325, 2002.

・ Ikemoto-Tsuchiya K, Nishino I, Kawai M, Morimatsu M, Nonaka I. A new form of muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities. *Muscle Nerve* 24: 1710-1711, 2001.

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

・ Miyamoto T, Kanazawa N, Kato S, Kawakami M, Inoue Y, Kuhara T, Inoue T, Takeshita K, Tsujino S. Diagnosis of Japanese patients with HHH syndrome by molecular genetic analysis: a common mutation, R179X. *J Hum Genet* 46: 260-262, 2001.

・ Miyamoto T, Kanazawa N, Hayakawa C, Tsujino S. A novel mutation, P126R, in a Japanese patient with HHH syndrome. *Pediatr Neurol* 26: 65-67, 2002.

・ Shiroma N, Kanazawa N, Izami M, Sugai K, Fukumizu M, Sasaki M, Hamaoka S, Kaga M, Tsujino S. Diagnosis of Alexander disease in a Japanese patient by molecular genetic analysis. *J Hum Genet* 46: 579-582,

2001.

・ Umeda T, Kouchi Z, Kawahara H, Tomioka S, Sasagawa N, Maeda T, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Limited proteolysis of filamin is catalyzed by daspase-3 in U937 and Jurkat cells. *J Biochem* 130: 535-542, 2001.

・ Sakaki M, Takahashi N, Sasagawa N, Arahata K, Ishiura S. Interaction between emerin and nuclear lamins. *J Biochem* 120: 321-327, 2001.

・ 西野一三. 精神遅滞を伴う筋変性疾患ダノン病の解明. *Vita* 19: 42-45, 2002.

・ 西野一三. 過剰自己貪食を伴うX連鎖性ミオパチー. 骨格筋症候群. *日本臨床 別刷 領域別症候群シリーズ* 36: 230-232, 2001.

・ 西野一三. Danon 病. 骨格筋症候群. *日本臨床 別刷 領域別症候群シリーズ* 36: 225-229, 2001.

## 2. 学会発表

・ Nishino I, Yamamoto A, Tokonami F, Takahashi M, Chino F, Nonaka I. Two autopsy cases of Danon disease. 6th International Congress of World Muscle Society, Salt Lake City, UT, USA, 9/7/2001.

・ Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Hirano M, Nonaka I, Nishino I. Infantile autophagic vacuolar myopathy is genetically distinct from Danon disease (X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy). 6th International Congress of World Muscle Society, Salt Lake City, UT, USA, 9/7/2001.

・ Nishino I. GNE mutations in distal myopathy with rimmed vacuoles. 2nd European Neuromuscular Centre International Workshop for Distal Myopathies, Naarden, Holland, 3/9/2002.

・ Ishikawa H, Nishino I, Mizuno Y, Imamura M, Nonaka I.  
Negative results in a search for human  $\alpha$ -dystrobrevin deficiency.  
6th International Congress of World Muscle Society, Salt Lake City, UT, USA, 9/6/2001.

・ Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, Nonaka I, Arahata K, Brown Jr RH.  
The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle.  
6th International Congress of World Muscle Society, Salt Lake City, UT, USA, 9/6/2001.

・ Nishino I, Yamamoto A, Hirano M, Nonaka I.  
Danon disease and its related disorders - Are they glycogen storage diseases? .  
4th French-Japanese Symposium on Muscular Dystrophy, Paris, France, 6/15/2001.

・ 西野一三, 山本彩香, 桒中征哉, Michio Hirano, Salvatore DiMauro. Danon 病は原発性 LAMP-2 欠損症である. 第 42 回日本神経学会総会, 東京, 5/10/2001.

・ 山本彩香, 西野一三, 村上信行, 桒中征哉. 乳児型「酸性マルターゼが正常なリソソーム性糖原病」の筋病理学的検討. 第 43 回日本小児神経学会総会, 岡山, 6/9/2001.

・ 高橋真紀, 高野享子, 白石秀明, 和田敬仁, 久保田健夫, 後藤雄一, 山本彩香, 西野一三, 斎藤伸治. Danon 病 1 家系における臨床的, 筋病理学的, 分子遺伝学的検討. 第 43 回日本小児神経学会総会, 岡山, 6/8/2001.

・ 青木正志, 桒山真規, 糸山泰人, 萩野谷和裕, 飯沼一字, 林由起子, 荒畑喜一, 西野一三, 桒中征哉. 小児期に高 CK 血症で発見され, その後特異な筋萎縮分布を呈したカベオリン 3 異常による distal myopathy. 第 43 回日本小児神経学会総会, 岡山, 6/8/2001.

・ 西野一三, 山本彩香, 桒中征哉, Michio Hirano, Salvatore DiMauro. Danon 病は原発性 LAMP-2 欠損症である. 第 42 回日本神経学会総会, 東京, 5/10/2001.

・ 山本彩香, 西野一三, 桒中征哉, 森澤豊, Alain Verloes. 乳児型の「酸性マルターゼが正常なリソソーム性糖原病」は Danon 病ではない. 第 42 回日本神経学会総会, 東京, 5/9/2001.

・ 石川晴美, 西野一三, 桒中征哉, 今村道博, 水谷智彦.  $\alpha$ -dystrobrevin 欠損による筋ジストロフィーはあるか?. 第 42 回日本神経学会総会, 東京, 5/9/2001.

・ 斎藤陽子, 西野一三, 桒中征哉. Spheroid body myopathy は desmin-related myopathy なのか?. 第 42 回日本神経学会総会, 東京, 5/9/2001.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## Ⅱ. 分担研究報告書

ライソゾーム性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究  
Danon 病の臨床病理学的特徴に関する研究

分担研究者 西野一三 国立精神・神経センター  
神経研究所 疾病研究第一部 部長  
研究協力者 桒中征哉 国立精神・神経センター  
武蔵病院 院長

**研究要旨：**遺伝学的に Danon 病と診断が確定した 13 家系 38 名の患者の臨床病理学的特徴について検討した。男性患者では、全例で心筋症とミオパチーが認められたが、精神遅滞は 70% の頻度であった。女性患者では、心筋症は全例に認められたが、ミオパチーは 33%、精神遅滞は 6% であった。また、血清 CK 値は男性患者では全例で上昇が見られたが、女性患者では 63% に上昇が見られるのみであった。死亡年齢は男性が  $19 \pm 6$  歳、女性が  $40 \pm 7$  歳で何れも死因は心不全であった。女性患者では臨床症状は比較的軽度ではあるものの、致死的心筋症が必発である。ミオパチーを伴わない例があることに注意が必要である。

#### A. 研究目的

ライソゾーム性筋疾患を代表する Danon 病は心筋症・ミオパチー・精神遅滞を 3 主徴とする遺伝性疾患である。ライソゾーム膜タンパク LAMP-2 の原発性欠損が原因である。Danon 病はまれであること、また、当初「酸性マルターゼが正常なライソゾーム性糖原病」として報告されたことなどから、その疾患概念について混乱がある。そこで、全世界から遺伝学的に Danon 病と診断が確定した 13 家系 38 名の患者を集め、その臨床病理学的特徴について検討した。

#### B. 研究方法

Danon 病 13 家系 38 名（男 20 名、女 18 名）の患者が対象。発端者の LAMP-2 遺伝子オープンリーディングフレームの全シーケンスを決定した。また、発端者全員で筋生検が施行され、一連の組織化学染色に加えて、LAMP-2 を含む各種免疫染色を施行した。全患者の臨床情報につき検討した。

#### C. 研究結果

全発端者で LAMP-2 遺伝子変異を認め

た。1 例で in-frame 型のエクソン・スキッピング変異を認めたが、他の例は全て nonsense または frame-shift 型の変異であり、膜貫通部および細胞質領域の欠損を来す変異であった。エクソン・スキッピング変異は、ライソゾーム腔内ドメインのループ構造を消失させるため LAMP-2 蛋白の構造に重大な変化を与えるものと予想された。何れの発端者においても骨格筋の LAMP-2 は完全に欠損していた。臨床的には、男性患者では、全例で心筋症とミオパチーが認められたが、精神遅滞は 70% の頻度であった。女性患者では、心筋症は全例に認められたが、ミオパチーは 33%、精神遅滞は 6% であった。また、血清 CK 値は男性患者では全例で上昇が見られたが、女性患者では 63% に上昇が見られるのみであった。死亡年齢は男性が  $19 \pm 6$  歳、女性が  $40 \pm 7$  歳で何れも死因は心不全であった。また、肝腫大を男性例の 36% に認めた。組織学的には、筋線維内の空胞はその膜上にアセチルコリンエステラーゼ活性を有し、また、筋細胞膜蛋白が存在していた。

#### D. 考察

これまで、Danon 病女性患者に関する検討は全くなかったが、今回の検討から、男性患者に比べて臨床症状は比較的軽度ではあるものの、全例で致死的心筋症を来すことが明らかとなった。加えて、男性患者とは異なり、ミオパチーを伴わない例があり、女性例では血清CK値の上昇を伴っていないこともDanon病を否定できないことが明らかとなった。一定数の患者に肝腫大を認めたことは、LAMP-2欠損は心筋・骨格筋・脳だけでなく、他の臓器にも何らかの影響を及ぼしていることを示唆している。組織学的には、筋線維内の空胞の膜が筋鞘膜の性質を示した。このことは、空胞が筋鞘膜の嵌入に由来することを示唆している。

#### E. 結論

Danon 病は、男性患者では心筋症・ミオパチー・精神遅滞を3主徴とする疾患であるが、女性患者においては、多くの場合心筋症のみを発症する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Oh SJ, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Lamperti C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Nonaka I, Hirano M, Nishino I. Clinicopathological features of genetically-confirmed Danon disease. *Neurology*, in press.

・ Nishino I, Yamamoto A, Sugie K, Hirano M, Nonaka I. Danon disease and related disorders. *Acta Myologica* 20:120-124, 2001

・ Nishino I, Hirano M, DiMauro S. LAMP-2 deficiency. Structural and molecular basis of skeletal muscle diseases. *Karpati G ed. ISN Neuropath Press, Basel, Switzerland*, pp. 142-144, 2002.

##### 2. 学会発表

・ Nishino I, Yamamoto A, Tokonami F, Takahashi M, Chino F, Nonaka I. Two autopsy cases of Danon disease. 6th International Congress of World Muscle Society, Salt Lake City, UT, USA, 9/7/2001.

・ 西野一三, 山本彩香, 埜中征哉, Michio Hirano, Salvatore DiMauro. Danon 病は原発性 LAMP-2 欠損症である. 第 42 回日本神経学会総会, 東京, 5/10/2001.

・ 高橋真紀, 高野享子, 白石秀明, 和田敬仁, 久保田健夫, 後藤雄一, 山本彩香, 西野一三, 斎藤伸治. Danon 病 1 家系における臨床的, 筋病理学的, 分子遺伝学的検討. 第 43 回日本小児神経学会総会, 岡山, 6/8/2001.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

ライソゾーム性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究  
縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの原因遺伝子に関する研究

分担研究者 西野一三 国立精神・神経センター  
神経研究所 疾病研究第一部 部長  
研究協力者 梶中征哉 国立精神・神経センター  
武蔵病院 院長

研究要旨：ライソゾーム性筋疾患の1つである縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）の原因遺伝子は長らく不明であった。同一の疾患ではないかと考えられていた遺伝性封入体ミオパチー（HIBM）が最近、UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase と N-acetylmannosamine kinase の2つのシアル酸代謝酵素をコードする遺伝子（*GNE*）の変異と関連していることが報告されたことを受け調べたところ、互いに血縁関係のない18例のDMRV例において、ホモ接合型または複合ヘテロ接合型の変異を認めた。

#### A. 研究目的

ライソゾーム性筋疾患のうち、縁取り空胞性ミオパチーを代表する疾患であるDMRVの原因遺伝子は長らく不明であった。臨床症状が酷似し同部位に遺伝子座が存在するHIBMが最近、UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase をコードする遺伝子（*GNE*）の変異と関連していることが報告された。DMRVも*GNE* 遺伝子変異と関連しているかを調べた。

#### B. 研究方法

臨床病理学的にDMRVと診断された互いに血縁関係のない24名の日本人患者を対象とした。全例で筋生検が行われ、縁取り空胞が見られた。血液または骨格筋のDNAを抽出し、*GNE* 遺伝子の全エクソンおよびエクソン・イントロン境界領域の塩基配列を決定した。

#### C. 研究結果

24名の内18名にホモ接合型または複合ヘテロ接合型の*GNE* 遺伝子変異を認めた。見出された変異は7種類で、epimerase ドメインに変異のあるものが4種類、kinase ドメイ

ンに変異のあるものが3種類であった。Epimerase ドメインの変異と kinase ドメインの変異の複合ヘテロ型変異は、5例に認められた。何れの変異もHIBMにおいて報告されているものとは異なっていた。

#### D. 考察

HIBMにおいて報告されている変異とは異なっているが、臨床的にDMRVがHIBMに酷似していることに加えてDMRV患者においても*GNE* 遺伝子変異が見出されたことは、DMRVとHIBMがallelic diseaseであることを強く示唆している。また、epimerase ドメインの変異と kinase ドメインの変異の複合ヘテロ型変異が認められる例があったことは、恐らく、一方のドメインの異常があれば2つの酵素の活性が共に影響を受けることを示唆している。また、*GNE* 遺伝子に変異を認めないDMRV患者の存在については、イントロンなポリクエン素を決定していない部分に変異がある可能性とともに、DMRV自体が遺伝学的に不均一である可能性を示唆している。

#### E. 結論

18名のDMRV患者においてGNE遺伝子変異を見出した。少なくとも大半のDMRVは遺伝学的にHIBMと同一である可能性が高い。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

準備中

##### 2. 学会発表

・ Nishino I. GNE mutations in distal myopathy with rimmed vacuoles. 2nd European Neuromuscular Centre International Workshop for Distal Myopathies. Naarden, Holland, 3/9/2001.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

ライソゾーム性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究  
乳児型自己貪食空胞性ミオパチーに関する研究

分担研究者 梶中征哉 国立精神・神経センター  
武蔵病院 院長  
研究協力者 西野一三 国立精神・神経センター  
神経研究所 疾病研究第一部 部長

研究要旨：ライソゾーム性筋疾患を代表する Danon 病は当初「酸性マルターゼが正常なライソゾーム性糖原病」として報告された。これまでに報告されている患者の大半は、10代で発症し、30歳までに心不全で死亡している。一方、同じ「酸性マルターゼが正常なライソゾーム性糖原病」の病名で、2例の乳児例が報告されている。これら乳児型例の Danon 病との異同につき検討したところ、何れの例でも LAMP-2 は欠損しておらず、Danon 病とは別の疾患であることが明らかになった。さらに、微細構造の詳細な検討から、Danon 病よりは、むしろ、過剰自己貪食を伴う X 連鎖性ミオパチー（XMEA）に近い病態を有することが示唆された。これら3疾患は、共通の病理所見を示すことから、自己貪食空胞性ミオパチーという1つのカテゴリーを形成する疾患群であると考えられた。

#### A. 研究目的

原発性 LAMP-2 欠損症である Danon 病は当初「酸性マルターゼが正常なライソゾーム性糖原病」として報告された。これまでに報告されている患者の大半は、一様な臨床経過（10代で発症、30歳までに死亡）を示し、遺伝学的に均一な疾患であると考えられる。一方、同じ「酸性マルターゼが正常なライソゾーム性糖原病」の病名で、2例の乳児例が報告されており、Danon 病患者と比較すると極めて重篤な臨床経過をたどる。これらの例が Danon 病と同一の疾患であるのかどうかを検討した。

#### B. 研究方法

これまでに報告されている乳児型2例の骨格筋に対して、抗 LAMP-2 抗体と補体 C5b-9 に対する抗体を用いた免疫染色および電顕による骨格筋組織の超微形態の観察を行った。また、LAMP-2 遺伝子のオープンリーディングフレームのシーケンスも決定した。患

者は、共に男児で、生下時より筋緊張低下と筋力低下を、さらに遅れて心症状を来している。1例は2歳3カ月時に、もう1例は生後41日目に死亡している。前者では筋生検が2カ月時に施行され、後者では剖検時に骨格筋サンプルが採取された。

#### C. 研究結果

両例ともに骨格筋の免疫染色で LAMP-2 は欠損しておらず、また、LAMP-2 遺伝子変異も見いだされなかった。補体 C5b-9 は筋線維表面に沈着していた。電顕的観察では、筋線維内の自己貪食空胞を多数認めると共に、基底膜が重層化しその層間に exocytosis を受けた後と思われる自己貪食産物が多数認められた。

#### D. 考察

LAMP-2 が欠損していないことまた LAMP-2 遺伝子変異が見いだされないことから、乳児型例は Danon 病とは異なる疾患であ

ることが明らかとなった。従って、Danon 病とは異なる病名が用いられるべきであり、乳児型自己食空胞性ミオパチーと呼ばれるべきである。また、補体 C5b-9 筋線維表面への沈着及び電顕での基底膜重層化の所見は、Danon 病よりはむしろ XMEA で見られる所見であり、乳児型自己食空胞性ミオパチーは XMEA に近い病態を持つことが示唆された。

#### E. 結論

乳児型自己食空胞性ミオパチーは Danon 病とは遺伝学的に異なる疾患である。病理学的変化の特徴からは、Danon 病よりはむしろ XMEA に近い病態が示唆される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Murakami N, Hirano M, Nonaka I, Nishino I. Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. *Neurology* 57: 903-905, 2001.

・ Nishino I, Yamamoto A, Sugie K, Hirano M, Nonaka I. Danon disease and related disorders. *Acta Myologica* 20:120-124, 2001

##### 2. 学会発表

・ Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes, A, Hirano M, Nonaka I, Nishino I. Infantile autophagic vacuolar myopathy is genetically distinct from Danon disease (X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy). 6th International Congress of World Muscle Society, Salt Lake City, UT, USA, 9/7/2001.

・ 山本彩香, 西野一三, 桒中征哉, 森澤豊, Alain Verloes. 乳児型の「酸性マルターゼが正常なリソソーム性糖原病」は Danon 病ではない. 第 42 回日本神経学会総会, 東京, 5/9/2001.

・ 山本彩香, 西野一三, 桒中信行, 桒中征哉. 乳児型「酸性マルターゼが正常なリソソーム性糖原病」の筋病理学的検討. 第 43 回日本小児神経学会総会, 岡山, 6/9/2001.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

骨格筋のオートファジーと筋萎縮に関する研究

分担研究者 石浦章一 東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究要旨

リソソームタンパク質分解系が筋肉を萎縮に至らしめる過程を明らかにするため、リソソームへタンパク質を輸送しているオートファジー経路に着目した。そのため、酵母菌においてオートファジー経路を制御している Apg (Autophagy)群のホモログ、特に、オートファゴソーム膜に局在する LC3 について、培養細胞、病気のラットモデル、実際のヒト組織を用いて機能検討を行った。

た。

A. 研究目的

筋肉の萎縮の新しい形態であるオートファジーの分子機構を明らかにする目的で酵母オートファゴソーム膜のマーカーである apg8 の哺乳動物ホモログ LC3 について、研究を行った。実際には、空胞性ミオパチーにおける細胞内局在の検索、実験的空胞形成モデルであるラットクロロキンミオパチーを用いた解析、そして培養細胞系を用いた検索、の3つの実験を行った。

B. 研究方法

ヒト空胞性ミオパチー筋は、国立精神・神経センターの筋バンク（武蔵病院・埜中征哉院長）から御提供いただいた。クロロキンミオパチーは、ラット腹腔にクロロキン溶液(50mg/kg/day)を8週間注射する従来の方法で作成した。また実験に用いた抗 LC3 抗体は、基礎生物学研究所の大隅良典教授、吉森保助教授から御供与いただい

C. 研究結果

まず、クロロキン投与によるラットモデルを作製し、筋組織を光顕、電顕それぞれで観察した。クロロキン投与群では Type-1 線維優位な変性が確認され、縁取り空胞と高いリソソーム酵素活性が認められた。一方、Type-2 線維には殆ど変化が見られなかった。

次に、LC3 の cDNA を COS-7 細胞に導入し、クロロキンの存在下で培養した。その結果、細胞内の LC3-II 量が増加していることが示された。LC3-II は、翻訳後修飾によって LC3 がオートファゴソームに局在した際に生じる分子で、その量の上昇は細胞内のオートファゴソームが増加したことを示している。オートファゴソームは、本来リソソームによって分解されるが、クロロキンの投与でその分解が阻害されたと考えられた。



また、正常ラットならびにクロロキン投与ラットの筋肉において、オートファゴソームの局在を、LC3の免疫組織化学によって明らかにした。正常では、オートファゴソームがType・2線維にのみ観察され、リソソームがType・1線維に多いのとは対照的であった。一方、クロロキン投与群では、Type・2線維で変化が見られないのに対し、Type・1線維では、空胞変性の強い部位に不安定な形をしたオートファゴソーム様の構造体が確認された。線維タイプとオートファゴソームの関係は、NADH・TRによる線維タイプの視覚化によって、より明瞭に示された。

モデル系での結果を確認するため、実際のヒト眼咽頭型筋ジストロフィー上腕二頭筋におけるLC3免疫組織化学染色を実施した。リソソーム膜タンパク質LAMP・2との二重染色の結果、モデルと同様に、リソソームの多い線維ではオートファゴソームが少ないという結果が得られた。

また、ラット筋肉のLC3転写量をノーザン法により解析した。正常組織では、Type・1線維でむしろ多くのLC3が転写されていた。ラット坐骨神経の切断により、線維の脱分化を促すと、Type・1、Type・2どちらの筋肉でも、LC3転写量が増加した。増加は、脱神経の影響がより大きいとされるType・1線維で顕著に見られた。

#### D. 考察

本研究で得られた結果から、筋肉におけるオートファジーには線維タイプと密接な関わりがあることが示された。Type・1線維では、LC3の転写量多いものの、オートファゴソームは殆ど見られなかった。この

ことから、リソソームの多いType・1線維では、オートファゴソームの盛んな合成と素早い分解が行われている可能性が示唆された。一方、Type・2線維では、LC3の転写量は少ないものの、オートファゴソームは多く観察された。これは、リソソームの活性が低いため、オートファゴソームが分解されず安定的に存在しているためだと考えられた。

クロロキンによってリソソーム酵素を阻害したモデルでは、Type・2線維で目立った変化が見られなかったのに対し、Type・1線維では縁取り空胞が形成され、異常化したオートファゴソームが観察された。これは盛んに合成されるオートファゴソームが、リソソームで十分に分解できなくなったために生じたと考えられた。

#### E. 結論

このような凝集物が蓄積し、代償的にリソソームの異常な合成を招くことが、縁取り空胞型筋萎縮症の正体であると結論付けた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Umeda, T., Kouchi, Z., Kawahara, H., Tomioka, S., Sasagawa, N., Maeda, T., Sorimachi, H., Ishiura, S., Suzuki, K. Limited proteolysis of filamin is catalyzed by caspase-3 in U937 and Jurkat cells. *J.Biochem.* 130, 535-542. 2001.

Sakaki, M., Takahashi, N., Sasagawa, N., Arahata, K., Ishiura, S. Interaction between emerin and nuclear lamins. J.Biochem. 129, 321-327. 2001.

## 2. 学会発表

日本分子生物学会 2000 年度年会・一般演題 4PB-175「APG8 ホモログ LC3 のヒト骨格筋における細胞内局在」

鈴木貴士 1,2 中川雅裕 2 山本彩香 2 西野一三 2 石浦章一 1 吉森保 3 大隅良典 3 桒中征哉 2 ( 1 東大・院・総合・生命 2 国立精神・神経セ 3 国立基生研)

日本分子生物学会 2001 年度年会・一般演題 2P-698「オートファジーは筋変性に抵抗する？」

鈴木貴士 1,2 吉河歩 1 吉森保 3 大隅良典 3 西野一三 2 石浦章一 1 桒中征哉 2 ( 1 東大・院・総合・生命 2 国立精神・神経セ 3 国立基生研)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担 研究報告書

リソソーム膜蛋白質の機能解析

分担研究者 田中 嘉孝 九州大学大学院・薬学研究院・細胞生物薬学分野

研究要旨 主要なリソソーム膜蛋白質のひとつである LGP85 を COS 細胞に過剰発現させると、細胞内に巨大な空胞が形成された。空胞形成は他のリソソーム膜蛋白質である LGP107(LAMP-1)及び LGP96(LAMP-2)の過剰発現では起こらなかったことから、LGP85 に特異的であることが判明した。この空胞は初期及び後期エンドソーム由来であり、空胞形成に伴いエンドサイトーシス経路の輸送阻害が認められた。これらの結果から、リソソーム膜蛋白質である LGP85 自身がエンドソーム間あるいはエンドソームとリソソーム間の膜輸送に関与している可能性が示唆された。

研究目的

リソソームはエンドサイトーシスにより細胞外から取り込まれた蛋白質に加え、オートファジーとよばれる機構により取り込まれた細胞自身の蛋白質や細胞内小器官の分解を行う場である。蛋白質の合成と分解の絶妙なバランスの下に細胞の恒常性は維持されているため、このバランスが一旦崩れてしまうと、細胞及び生体にとって重篤な障害を引き起こすことになる。実際に、多くの神経及び筋疾患でオートファジーの異常に加えエンドソーム・リソソーム系の膜輸送の異常が報告されている。しかしながら、リソソーム膜を構成している蛋白質の機能、さらにリソソーム膜蛋白質自身がエンドソームとリソソーム間の膜輸送にどのように関わっているのかについては明らかにされていない。そこで、これらの問題を明らかにするため、リソソーム膜蛋白質を細胞内に過剰発現させ、エンドソーム・リソソーム系にどのような機能変化が引き起こされるかについて解析した。

研究方法

3 種類のラットリソソーム膜蛋白質、LGP107(LAMP-1)、LGP96(LAMP-2)及び LGP85(LIMP11)をサル腎臓由来の COS 細胞に一過性に過剰発現させ、リソソームの形態変化を共焦点レーザー顕微鏡および免疫電顕により解析した。

研究結果

LGP107 および LGP96 の過剰発現はリソソームの形態変化を引き起こさなかったが、LGP85 の過剰発現により細胞内に巨大な空胞が形成された。空胞のサイズは時間経過とともに増加したが、数は逆に減少した。この空胞は初期および後期エンドソームの性質を有しており、リソソームは空胞化した後期エンドソームのみと徐々に融合する傾向を示した。電子顕微鏡による観察から、これら空胞内には殆ど膜成分が含まれていないことが判明した。LGP85 の過剰発現によるエンドソーマル

コンパートメントの空胞化に伴い、これらコンパートメント間の膜輸送の阻害をも引き起こした。更に興味深いことに、これら空胞に遊離コレステロールの異常な蓄積が観察された。

#### 考察

これらの結果から、LGP85 の過剰発現によりエンドソーム・リソソーム膜からの内向き（エンドソーム・リソソーム内腔）及び外向き（他のコンパートメントへ向かう）の小胞形成が共に阻害された結果、巨大空胞が形成されることが判明した。このように、LGP85 はエンドソーム・リソソーム系のダイナミックな膜輸送を厳密に調節し、これらコンパートメントの形成・維持に深く関与していることが示唆された。

#### 結論

LGP85 は単なるリソソーム膜の構成蛋白質として存在しているのではなく、リソソームの形成・維持に重要な役割を演じていることが示唆された。

#### 研究発表

田中嘉孝、藤田英明 「リソソーム膜蛋白質の機能」蛋白質核酸酵素、Vol.46, No.15, 2133-2139, 2001

#### 学会発表

黒仁田敏雄、田中嘉孝、藤田英明、Eeva-Liisa Eskelinen、姫野勝 「ラットリソソーム膜タンパク質 LGP85 (LIMP2)の過剰発現による空

胞形成メカニズムの解析」日本細胞生物学会 (2001年5月)

A. Gamp, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, P. De Deyn, R. D'Hooze, K. von Figura, and P. Saftig "In vivo function of the lysosomal integral membrane protein type II (Limp II)" ESGLD meeting (2001年9月、Netherlands)

A.L. Illert, J. Blanz, E.-L. Eskelinen, Y. Tanaka, K. von Figura, and P. Saftig "Role of mannose 6-phosphate receptors in LAMP-2 deficient hepatocytes" ESGLD meeting (2001年9月、Netherlands)

P. Saftig, Y. Tanaka, A.L. Illert, D. Hartmann, and K. von Figura "Overlapping functions of LAMP-1 and LAMP-2 revealed by doubly deficient mice" ESGLD meeting (2001年9月、Netherlands)

黒仁田敏雄、田中嘉孝、藤田英明、Eeva-Liisa Eskelinen、姫野勝 「リソソーム膜蛋白質 LGP85 (LIMP2)はエンドソーム・リソソームの成熟に関与している」日本生化学会大会 (2001年10月)

波田野俊之、田中嘉孝、黒仁田敏雄、藤田英明、姫野勝 「リソソーム膜蛋白質 LGP85 の空胞形成に関与する領域の解析」日本分子生物学会 (2001年12月)

藤田英明、山中基子、今村加奈子、田中嘉孝、奈良篤樹、吉森保、姫野勝 「AAA型ATPase