

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

細胞外マトリックスの異常による遺伝性筋疾患
の病態解明と治療法に関する研究
(H14-こころ-015)

平成14年度-16年度

総括・分担報告書

(平成14年度分)

主任研究員 平澤恵理

分担研究員 村山季美枝

杉江和馬

平成14年3月31日

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

細胞外マトリックスの異常による遺伝性筋疾患
の病態解明と治療法に関する研究

(H14-こころ-015)

平成14年度-16年度

総括・分担報告書

(平成14年度分)

主任研究員 平澤恵理

分担研究員 村山季美枝

杉江和馬

平成14年3月31日

目次

I. 総括研究報告

細胞外マトリックスの異常による遺伝性筋疾患の病態解明と治療法に関する研究

平澤恵理 (順天堂大学医学部)

II. 分担研究報告

1. パールカンノックアウトマウスのレスキューによる筋病変の検討

平澤恵理 (順天堂大学医学部)

2. パールカン欠損筋における筋基底膜と神経筋接合部の超微細構造的解析

杉江和馬 (奈良県立医科大学)

3. パールカン欠損筋における外来性パールカン再構築実験

—分子治療への基礎実験—

杉江和馬 (奈良県立医科大学)

平澤恵理 (順天堂大学医学部)

4. 細胞外マトリックス異常症における遺伝子解析

杉江和馬 (奈良県立医科大学)

平澤恵理 (順天堂大学医学部)

5. プロテオミクスにおけるたんぱく質解析法の高精度・ハイスループット化への挑戦

村山季美江 (順天堂大学医学部)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

細胞外マトリックスの異常による遺伝性筋疾患の病態解明と治療法に関する研究

主任研究者 平澤恵理、順天堂大学医学部
老人性疾患病態治療研究センター
脳神経内科

研究要旨： 本研究は筋細胞を取り巻く細胞外マトリックスである基底膜とその関連分子の役割と機能の解明を行い、これらの分子の異常によって起こる筋疾患の発症分子機構を明らかにし、その治療法を目指すものである。基底膜成分のラミニン、パールカン、アグリンは各々が α ジストログリカン(α DG)結合部位を持ち、相互に競合、結合して機能することから筋疾患においても互いに深く関与している。これらの分子に注目し、広く臨床症状の解明から、基礎研究までを行っていく（平澤、杉江）。その結果をもとに患者やモデル動物に起こる筋障害の発症分子機構を明らかにし、その治療を目指している。蛋白質レベルでの分子機構解明は治療開発に重要と考えられ、疾患筋で起こるタンパク質レベルの変動をプロテオミクス解析により調べ、その変動に重要な働きをしているタンパク質の同定と機能の解析をすすめる（平澤、村山）。特に基底膜タンパク質の異常が細胞内シグナルにどのように影響を与えているかを翻訳後修飾（糖鎖修飾、リン酸化）に焦点をあてて解析を行うため、村山分担研究者によりプロテオミクス解析の高精度・ハイスループット化が試みられている。ここで得られる知見は筋疾患の治療に全く新しい分野を開くものと期待される。本年度は米国立研究所（NIH）山田吉彦博士の研究室との共同研究により、パールカン異常による Schwartz-Jampel 症候群（SJS）のモデルマウスの作成と解析が進んだ。また、村山分担研究者によるプロテオミクス解析法の高精度・ハイスループット化の技術確立が進んだ。

A. 研究目的

本研究の目的は細胞外マトリックスの異常に起因する遺伝性筋疾患の発症機序の解明とそれにより細胞外マトリックス/基底膜の筋発生、筋疾患における役割を明らかにしその知見を筋疾患一般の治療に役立てていくことである。

B. 研究方法

1.細胞外マトリックスの欠損による遺伝性筋疾患の発症機序の解明のため症例を蓄積し遺伝子異常を同定し、臨床症状との関連性を検討している。免疫組織化学によるスクリーニングや翻

訳領域に絞った変異検出などを併用した遺伝子異常の検出の効率を上げる。パールカン欠損疾患に関しては症例が少なくまた筋生検により神経筋接合部が得られないことが多いため、ミオトニアの発症機序解明への効率が悪い。そこで NIH との共同研究によりパールカンノックアウトマウスの軟骨症状を軟骨特異的プロモーター（II 型コラーゲン）下にパールカンを発現させるトランスジェニックマウスを交配することによりレスキューし延命をはかり SJS モデルマウスとする。このマウスの電気生理学的、筋病理学的、電顕を使用した超微細構造解析によりパ

ールカン欠損による筋障害の発症機構の解明を試みる。

2. 分子治療への基礎実験としてパールカンの5つの機能ドメインのうち筋や神経筋結合部基底膜への会合に必要なドメインはどこか、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) との結合ドメインはどこか、 α DG との結合ドメインの有無がどのように影響するか等を知る目的で *in vivo* での実験に先立ちパールカン欠損筋切片上での再構築実験を行う。

3. 細胞害マトリックスの異常によりどのような分子が変化し筋崩壊へいたるかをプロテオミクスの手法を用いて明らかにするための効率的な方法を検討している。そのひとつにシグナル伝達の場合としてのマイクロドメインに着目し、細胞外マトリックスによるシグナル分子の変化を明らかにする系をセットアップする。またこのためにプロテオミクス解析法の高精度・ハイスループット化の技術確立を行っている。具体的には分担研究者報告書参照。

B. 研究結果

1 細胞外マトリックスの欠損による遺伝性筋疾患としてパールカン欠損疾患 SJS と Burton 症候群、VI 型コラーゲン欠損疾患として Ullrich 病の遺伝子異常を解析した。VI 型コラーゲンの免疫染色では完全欠損 1 例と基底膜での発現量の低下を示した部分欠損例 8 例を見出した。完全欠損 1 例において COL6A2 に遺伝子異常を見出した。またパールカンノックアウトマウスのレスキューに成功した (P-/-Tg マウス)。P-/-Tg マウスは電気生理学的に確認される筋の持続収縮を認め SJS 患者に観察される眼裂の狭小化を認めた。このマウスの電気生理学的検討によりパールカン欠損によるミオトニアは筋原性ではなく、神経筋接合部の異常に起因することが示された。筋病理学的には筋肥大、壊死再生、筋線維内構築異常を認めた。筋細胞と血管内皮細胞における基底膜構造に関しては、パールカンノックアウトマウスでもコントロールマウスでも電顕的解析においては特に相違はなく異常所見は認めなかった。NMJ については、コントロールマウスでは薄切切片にて明瞭に

AChE 活性が確認でき、同部位を超薄切片で確認すると AChE 活性を有する *junctional fold* を豊富にもつ NMJ が散在してみられた。

一方、パールカンノックアウトマウスでは薄切切片では AChE 活性を確認できず NMJ での染色性の低下が示唆された。

2. 精製パールカン蛋白及びパールカン分子のリコンビナント蛋白投与による再構築実験の結果、精製パールカントタンパク質及びドメイン I-V 分子は筋細胞膜と神経筋接合部に再構築された。遺伝子治療への一つの知見が得られた。

3. 村山分担研究者によるプロテオミクス解析法の高精度・ハイスループット化のためアルキル化剤にアクリルアミドを用い、積極的に SDS ゲル電気泳動中でシステイン残基を効率よく PAM 化する方法を開発した (*in situ alkylation*)。

その結果、タンパク質同定の精度が上がり、蛋白染色後の還元・アルキル化のステップが省略され、さらに質量分析前の脱塩処理操作を省略するハイスループット化に成功した。

D. 考察

1 細胞外マトリックスの欠損による遺伝性筋疾患としてさらにパールカン欠損疾患、VI 型コラーゲン欠損疾患の症例を蓄積するとともに、新規の原因遺伝子の発見をしていく必要がある。基底膜タンパク質の免疫染色的部分欠損を示すミオパチー群などが検索対象になってくると思われる。P-/-Tg マウスのミオトニアの成因に関してはさらに MEPP の解析などを使い詳細に検討する必要がある。筋病理学的には筋肥大、壊死再生、筋線維内構築異常を認めたがその分子機構に関してさらに蛋白質レベルの解析を進める必要がある。電顕的解析においてはノックアウトマウスでの NMJ の微細構造についてより詳細に検討するためには、AChR に結合するバンガロトキシンを用いた免疫電顕などの手法も検討する必要がある。

2. I-V パールカン分子投与では、筋細胞膜と神経筋接合部で軽度ながらパールカン分子の再構成が認められたことから、分子治療への一つの知見が得られた。今後ドメイン IV をくわえての最小ドメインの検討など行い、さらに遺

伝子導入方法の検討等を行っていく。将来的にはリコンビナントを発現するトランスジェニックマウスの作成も考慮していく。

3. *In situ alkylation* の成功の結果、タンパク質同定の精度が上がり、蛋白染色後の還元・アルキル化のステップが省略され、さらに質量分析前の脱塩処理操作を省略するハイスループット化したのでこの系を用いて実際の筋疾患の解析を行っていく。

E. 結論

細胞外マトリックスの異常に起因する遺伝性筋疾患の発症機序の解明とそれにより細胞外マトリックス/基底膜の筋発生、筋疾患における役割を明らかにし、その知見を筋疾患一般の治療に役立てていくためのモデル動物作成やプロテオミクスのセットアップに成功した。さらに解析を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

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

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

細胞外マトリックスの異常による遺伝性筋疾患の病態解明と治療法に関する研究
パールカンノックアウトマウスのレスキューによる筋病変の検討

主任分担研究者	平澤恵理	順天堂大学 老人性疾患病態治療研究センター 脳神経内科
研究協力者	林明人 小崎慶介 山田吉彦	順天堂大学臨床病理 米国国立衛生研究所 米国国立衛生研究所

研究要旨： パールカンのノックアウトマウスは出生後数時間以内に死亡するため軟骨特異的プロモーター（II 型コラーゲン）下にパールカンを発現させるトランスジェニックマウスを交配することにより軟骨の異常をレスキューし延命をはかった。レスキューされたマウス（P-/Tg マウス）を用いて、電気生理学的、筋病理学的に検討し SJS の発症機序を検討した。P-/Tg マウスは電気生理学的に確認される筋の持続収縮を認め SJS 患者に観察される眼裂の狭小化を認めた。この持続収縮は安静時、全身麻酔時にも観察され、クラレの局所投与により Ach の伝達が阻害されたときに消失することから神経筋接合部由来と考えられた。筋病理学的には筋肥大、壊死再生、筋線維内構築異常を認めた。

A. 研究目的

主任研究者らは Schawartz-Jampel 症候群（SJS）のミオトニアの発症機序としてパールカン欠損によるアセチルコリンエステラーゼの集束の欠損を示したが、パールカンのノックアウトマウスは軟骨形成不全のために出生後数時間以内に死亡するためモデルマウスとして十分な解析が行えない。そこで周産期致死性をレスキューしたマウスを SJS モデルマウスとし、電気生理学的、筋病理学的に検討した。

B. 研究方法

パールカンノックアウトマウスは周産期に死亡するので軟骨特異的プロモーター（II 型コラーゲン）下にパールカンを発現させるトランスジェニックマウスを交配することにより軟骨の異常をレスキューし延命をはかった。レスキューされたノックアウトマウス（P-/Tg マウス）を生後 3 ヶ月、6 ヶ月の時点で電気生理学的、

筋病理学的に確認した。対象として同腹の同性、同年齢のマウスを検討した。電気生理学的にはシールドルームにてニューロパック 2 で記録し、MacLab システム（バイオリサーチセンター）を用いて解析した。筋病理学的には、HE 染色、Gomori-Trichrome 染色、NADH 染色、ATPase 染色、AChE 染色、非特異エステラーゼ染色を行った。

C. 研究結果

【レスキューマウス】レスキューマウス：P-/Tg マウスは免疫組織化学的に軟骨においてのみパールカンが発現していた。筋組織では全く染色性がなかった。生後 1 2 週以降コントロールに較べ体重が 20% 程度軽いが 8 ヶ月までの生存を確認している。運動機能に大きな問題はないが、生後 2 週頃より SJS 患者に類似した眼裂狭小化を認める。

【電気生理】針筋電図にてコントロールマウスでは刺入電位に続き随意運動による motor

unit,安静電位の記録が得られたが、P-/-Tg マウスでは刺入電位に続き myotonic discharge が持続し、急降下爆撃音が断続的に続いた。随意運動が認められなくても持続性電位が常に得られ、全身麻酔下でも消失しなかった。座骨神経刺激による single motor unit 確認後クラレを局所投与したところ、この持続電位の消失を見た。同時にクラレを局注していない上肢で確認したところ持続電位は確認された。

【筋病理】生後3ヶ月、6ヶ月のレスキューマウス：P-/-Tg マウスではいずれの筋でも筋肥大、壊死再生、筋線維内構築異常を認めた。AChE 染色では NMJ がわずかに染色されたが、非特異エステラーゼ染色でははっきりと NMJ が染色された。

D. 考察

軟骨でのパールカン発現により周産期致死がレスキューされたマウスは電気生理学的に確認される筋の持続収縮を認め SJS 患者に観察される眼裂の狭小化を認めた。この持続収縮は安静時、全身麻酔時にも観察され、クラレの局所投与により Ach の伝達が阻害されたときに消失することから神経筋接合部由来と考えられた。筋病理学的に壊死再生が認められたことは興味深い。筋緊張性ジストロフィーなどでは必ずしも壊死再生像は活発でなおことからミオトニア以外の要因の関与も示唆される。ノックアウトマウスの新生仔と異なり AChE の活性がわずかに認められることに関しては分泌された ColQ 型 AChE が NMJ の成熟とともに他のマトリックスに捉えられたり、膜型 AChE が他の分子を介して局在した等の可能性が考えられ、さらに検討が必要である。非特異エステラーゼ活性が AChE にくらべははっきりしていたことに関してはブチルコリンエステラーゼを含め他のエステラーゼの代償機構も考慮して検討する必要がある。

E. 結論

軟骨でのパールカン発現により周産期致死がレスキューされたマウスは電気生理学的に確認される筋の持続収縮を認め SJS 患者に観察され

る眼裂の狭小化を認めた。SJS モデルマウスとして今後 SJS の発症機序や治療開発に有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, and Yamada Y. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nature Genetics*, 23:354-358,1999
- Arikawa-Hirasawa E, Wilcox RL, Govindraj P, Hassell JR, Yamada Y: Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of perlecan. *Nature Genetics*, 27:431-434, 2001
- Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, and Yamada Y. Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nature Neuroscience*, 5:119-123, 2002
- Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA, Govindraj P, Hassell JR, Devaney JM, Spranger J, Stevenson RH, Iannaccone S, Dalakas MC, and Yamada Y. Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am. J. Hum. Gen.*, 70:1368-1375, 2002.
- Arikawa-Hirasawa E, Wilcox WR, and Yamada Y. Dyssegmental Dysplasia, Silverman-Handmaker Type: Unexpected role of perlecan in cartilage development. *Am. J. Med. Gen.*, 106:254-257, 2002.
- Arikawa-Hirasawa E and Yamada Y. Perlecan mutations in mice and humans: critical role of perlecan in skeletal development and disease. *Acta Myologica*, 2001, XX 2:134-137
- 平澤恵理、山田吉彦. 発生と疾患におけるパールカンの機能：遺伝子欠損マウスとヒ

1261,2001

- ・ 平澤恵理、山田吉彦: パールカンの骨格形成における役割とヒト 遺伝子疾患の解明細胞工学 8月号、2001

2. 学会発表

- ・ Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, Yamada Y. Perlecan is essential for localizing AChE to the neuromuscular junctions , Experimental Biology New Orleans, Louisiana.U.S.A . April 20 - 24, 2002
- ・ Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Sugie K, Rotundo RL, Yamada Y. Perlecan is essential for clustering of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- ・ 平澤恵理, Le A, Dalakas M, 西野一三, 埜中征哉, 水野美邦, 山田吉彦. Schwartzt-Jampel 症候群におけるパールカンの部分機能欠損 第43回日本神経学会総会、2002年5月札幌
- ・ Arikawa-Hirasawa, E. Kosaki, K., Morgan, G., Hayashi, A., Sugie, K. Yamada, Y. Role of perlecan in the neuromuscular junction activity 11th international symposium on basement membrane Kazusa Arc in Chiba, Japan. March 6th -7th,2003

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

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

細胞外マトリックスの異常による遺伝性筋疾患の病態解明と治療法に関する研究
パールカン欠損筋における筋基底膜と神経筋接合部の超微細構造的解析

分担研究者 杉江和馬 奈良県立医科大学神経内科
研究協力者 平澤恵理 順天堂大学
老人性疾患病態治療研究センター
脳神経内科

研究要旨： パールカンのノックアウトレスキューマウス(P-/TGmouse)を用いてパールカン欠損筋の超微細構造について病理学的に検討を行った。筋細胞と血管内皮細胞における基底膜構造に関しては、P-/TGmouse でもコントロールと大きな差異は認めなかった。神経筋接合部 (NMJ) については、P-/Tg マウスでは NMJ での AChE 活性の低下があり NMJ の同定が難しく現在超薄切片にて検討中である。

A. 研究目的

主任研究者らはパールカンのノックアウトマウスの神経筋接合部 (NMJ) におけるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の集束の欠損を示した。このことよりパールカン遺伝子の欠損に起因する Schawartz-Jampel 症候群 (SJS) のミオトニアの発症機序としてアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の集束の欠損の関与を示唆した。パールカンのノックアウトマウスは出生後数時間以内に死亡し、ミオトニアの発症機序を解明するにはその後の経過を検討する必要がある。そこで今回周産期致死性をレスキューしたマウス(P-/ Tg マウス：主任分担研究報告書参照)の筋を用いて、パールカン欠損に伴う筋細胞の基底膜構造や神経筋接合部 (NMJ) の超微細構造について病理学的に検討を行った。NMJ の同定を容易にすることと、AChE の微細局在を検討するため AChE ラベル後に電顕用試料とした。

B. 研究方法

P-/ Tg マウスとコントロールマウスから横隔膜、肋間筋、骨格筋を取り出し 3%グルタール

アルデヒドで固定後に AChE 染色を行った。そして 1%オスミウム酸液で固定後エタノール脱水してエポン包埋した。超薄切片作成後酢酸ウランとクエン酸鉛染色を行って透過型電子顕微鏡 (H7000, Hitachi) で鏡検を行った。

C. 研究結果

まず、筋細胞と血管内皮細胞における基底膜構造に関しては、パールカンノックアウトマウスでもコントロールマウスでも電顕的解析において大きな差異は認めなかった。NMJ については、コントロールマウスでは薄切切片にて明瞭に AchE 活性が確認でき、同部位を超薄切片で確認すると AchE 活性を有する junctional fold を豊富にもつ NMJ が散在してみられた。一方、パールカンノックアウトマウスでは薄切切片では AChE 活性を確認できず NMJ での染色性の低下が示唆された。NMJ の形態を確認するため、連続超薄切片作成を進めている。

D. 考察

今回の検討により筋細胞と血管内皮細胞の基底膜構造に関してはト P-/ TG マウスとコント

ロールマウスで明らかな差異は認めなかった。このことは、パールカン欠損筋で認めた壊死再生病変は基底膜の破綻によるものだけではない可能性を示唆している。また、コントロールマウスでは AChE 活性が NMJ にラベルされ、正常な NMJ の微細構造について明瞭に確認することが出来たが、マウスでは AChE 活性の低下し、NMJ の位置確認が困難であった。ノックアウトマウスでの NMJ を効率よく発見し微細構造についてより詳細に検討するためには、ACh 受容体を α ブンガラトキシンでラベルするなどの手法も検討する必要があると思われる。

E. 結論

筋細胞と血管内皮細胞における基底膜構造に関しては、パールカンノックアウトマウスで明らかな異常は認めなかった。一方、NMJ については、ノックアウトマウスでは NMJ での AChE 活性の低下を認めた。今後超薄切片での観察を行っていく予定である。

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*. 2002 Jun 25;58(12):1773-8.
- Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I. Ullrich disease: collagen VI deficiency: EM suggests a new basis for muscular weakness. *Neurology*. 2002 Sep 24;59(6):920-3.
- Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimiya J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology*. 2002 Dec 10;59(11):1689-93.

- 張 尚美、石川達也、埜中征哉、塚本東子、齋藤万里子、坂 京子、和田郁雄、杉江和馬、西野一三. 早期より整形外科的問題を呈したメロシン陽性型先天性筋ジストロフィー—Ullrich 病との関連を含めて—. *脳と発達* 2003 35(2):159-164

2. 学会発表

- Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Nonaka I, Nishino I, Oh SJ, Takahashi M, Saitoh S, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Byrne E, Lamperti C, DiMauro S, Hirano M. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I. Ullrich disease with collagen VI deficiency suggesting a new mechanism of muscular dystrophy. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- Kaneda D, Kato T, Yamamoto A, Sugie K, Nonaka I, Nishino I. A novel autophagic vacuolar myopathy –adult onset form-. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- Nishino I, Murayama K, Noguchi S, Sugie K, Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is associated with GNE gene mutations. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Sugie K, Rotundo RL, Yamada Y. Perlecan is essential for clustering of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- Yoshimura M, Itoh Y, Yuasa K, Sakamoto M, Sugie K, Nonaka I, Takeda S, Last J, Taylor A. Immunohistochemical analysis of skeletal muscles from canine X-linked muscular dystrophy. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.

- ・ 杉江和馬、山本彩香、埜中征哉、西野一三：
Danon 病の臨床病理学的特徴。第 43 回日
本神経学会総会、2002 年 5 月 札幌。
- ・ 石川晴美、杉江和馬、村山恵子、西野一三、
南 成祐、埜中征哉：Ullrich 病の臨床病理
学的検討。第 43 回日本神経学会総会、2002
年 5 月 札幌。
- ・ 杉江和馬、山本彩香、埜中征哉、西野一三：
Danon 病の女性患者の臨床的特徴。第 44
回日本小児神経学会総会、2002 年 5 月 仙
台。

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

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

細胞外マトリックスの異常による遺伝性筋疾患の病態解明と治療法に関する研究

パールカン欠損筋における外来性パールカン再構築実験
—分子治療への基礎実験—

分担研究者	杉江和馬	奈良県立医科大学神経内科
主任分担研究者	平澤恵理	順天堂大学 老人性疾患病態治療研究センター 脳神経内科
研究協力者	小崎慶介 山田吉彦	National Institute of the Health National Institute of the Health

研究要旨： 周産期致死性軟骨異形成症（DDSH）や Schawartz-Jampel 症候群（SJS）原因遺伝子であるパールカンのノックアウトマウスの筋組織を用いて、分子治療への基礎実験として、精製パールカン蛋白及びパールカン分子のリコンビナント蛋白投与による再構築実験を行った。精製パールカントタンパク質及びドメイン I-V 分子は筋細胞膜と神経筋接合部に再構築された。遺伝子治療への一つの知見が得られた。

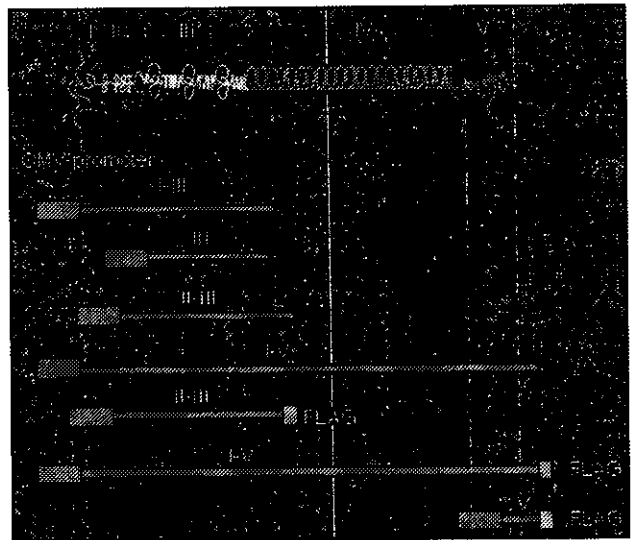
A. 研究目的

周産期致死性軟骨異形成症（DDSH）や Schawartz-Jampel 症候群（SJS）の原因遺伝子であるパールカンは5つの機能ドメインからなるヘパラン硫酸プロテオグリカンである（図）遺伝子治療を含む分子治療を目指して外来性のパールカンが基底膜に組み込まれるか、アセチルコリンエステラーゼと結合し、これを神経筋接合部に集束させる必須最小ドメインはどれかを検討するため *ex vivo* 再構築実験を行った。

B. 研究方法

パールカン分子のドメイン I から V のうち図 1 のような様々な組合せのリコンビナント蛋白を作成、精製した。パールカンノックアウトマウスとコントロールマウスの新鮮凍結筋に、high salt buffer (HSB) 処理後 1M NaCl 処理を行った後に、これらのリコンビナント蛋白あるいは、EHS 腫瘍由来の精製パールカンを反応させた。その後標本上でのパールカン蛋白質の局在確認するため、各ドメイン特有の一次抗体を

用いて免疫染色を行った。



C. 研究結果

EHS 腫瘍由来の精製パールカンは切片上で筋基底膜に再構築された。パールカン分子のドメイン I-II-III、ドメイン II-III-tag、ドメイン III、ドメイン V-tag のリコンビナント蛋白を投与したところ、ノックアウトマウスでのパールカン

分子の再構成は行われなかった。ドメイン I-V のパールカン分子投与では、免疫組織化学染色上、筋細胞膜で染色性が低いながらパールカン分子の再構成が認められた。また神経筋接合部でも局在が確認された。

D. 考察

今回作成したパールカン分子のリコンビナント蛋白投与での再構成による検討では、ドメイン I-V 全長のもの以外は、パールカン分子の再構築は確認できなかった。In vitro での結合実験で報告されているように、他のマトリックスタンパク質との結合にはドメイン IV の前半部分が必要である可能性が示唆された。I-V パールカン分子投与では、筋細胞膜と神経筋接合部で軽度ながらパールカン分子の再構成が認められたことから、分子治療への一つの知見が得られた。今後ドメイン IV をくわえての最小ドメインの検討など行い、さらに遺伝子導入方法の検討等を行っていく。

E. 結論

パールカンノックアウトマウスへのパールカン分子のリコンビナント蛋白質投与での再構築による検討で、全長パールカン分子投与では、筋細胞膜と神経筋接合部でパールカン分子の再構築が認められたことから、遺伝子治療への一つの知見が得られた。

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*. 2002 Jun 25;58(12):1773-8.
- Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I. Ullrich disease: collagen VI deficiency: EM suggests a new

basis for muscular weakness. *Neurology*. 2002 Sep 24;59(6):920-3.

- Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimiya J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology*. 2002 Dec 10;59(11):1689-93.
 - 張 尚美、石川達也、埜中征哉、塚本東子、斎藤万里子、坂 京子、和田郁雄、杉江和馬、西野一三. 早期より整形外科的問題を呈したメロシン陽性型先天性筋ジストロフィー—Ullrich 病との関連を含めて—。脳と発達 2003 35(2):159-164
- ##### 2. 学会発表
- Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Nonaka I, Nishino I, Oh SJ, Takahashi M, Saitoh S, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Byrne E, Lamperti C, DiMauro S, Hirano M. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
 - Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I. Ullrich disease with collagen VI deficiency suggesting a new mechanism of muscular dystrophy. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
 - Kaneda D, Kato T, Yamamoto A, Sugie K, Nonaka I, Nishino I. A novel autophagic vacuolar myopathy –adult onset form-. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
 - Nishino I, Murayama K, Noguchi S, Sugie K, Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is associated with GNE gene mutations. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
 - Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Sugie K, Rotundo RL, Yamada Y. Perlecan is essential for clustering of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. Xth International

Congress on Neuromuscular Diseases,
Vancouver July 7-12, 2002.

- Yoshimura M, Itoh Y, Yuasa K, Sakamoto M, Sugie K, Nonaka I, Takeda S, Last J, Taylor A. Immunohistochemical analysis of skeletal muscles from canine X-linked muscular dystrophy. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- 杉江和馬、山本彩香、埜中征哉、西野一三：Danon 病の臨床病理学的特徴。第 43 回日本神経学会総会、2002 年 5 月 札幌。
- 石川晴美、杉江和馬、村山恵子、西野一三、南 成祐、埜中征哉：Ullrich 病の臨床病理学的検討。第 43 回日本神経学会総会、2002

年 5 月 札幌。

- 杉江和馬、山本彩香、埜中征哉、西野一三：Danon 病の女性患者の臨床的特徴。第 44 回日本小児神経学会総会、2002 年 5 月 仙台。

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

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

細胞外マトリックスの異常による遺伝性筋疾患の病態解明と治療法に関する研究
細胞外マトリックス異常症における遺伝子解析

分担研究者	杉江和馬	奈良県立医科大学神経内科
主任分担研究者	平澤恵理	順天堂大学医学部 老人性疾患病態治療研究センター 脳神経内科
研究協力者	石川晴美 西野一三 埜中征哉	国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨： 細胞外マトリックス構成蛋白の遺伝子異常により、近年様々な疾患が起こることが明らかにされている。マトリックス分子はいずれも大きく、ゲノムレベルでは100 kb以上に及ぶこともあるので免疫組織化学によるスクリーニングや翻訳領域に絞った変異検出などを併用した遺伝子異常の検出のスタンダードの作成を試みた。対象分子としては最近新しく筋疾患の原因遺伝子として同定されたパールカンと VI 型コラーゲンを検討した。Schwartz-Jampel 症候群 (SJS) の原因遺伝子としてパールカン遺伝子が同定された。パールカンの遺伝子異常による臨床症状が軟骨形成や筋症状に多様なスペクトラムを持つ可能性が示唆されており、さらに症例の蓄積と蛋白レベルの詳細な解析が必要となっている。我々は臨床的に SJS と診断されている 2 症例とやはり SJS のスペクトラム Burton 症候群が示唆される症例について cDNA を用いて mRNA レベルでの解析と DHPLC での解析を行った。SJS 1 例と Burton 症候群 1 例では現在のところ明らかな異常は見出せておらず他の分子の関与も示唆される。一方先天性筋ジストロフィーの 1 型である Ullrich 病が VI 型コラーゲンの欠損を原因とすることが報告され、臨床的に Ullrich 病と診断されている例について免疫組織化学的検討を併用して遺伝子解析を行ったところ免疫染色での完全欠損例では VI 型コラーゲンの遺伝子異常が明らかになった。このことは VI 型コラーゲンの異常によってもジストロフィー変化を伴う筋障害を引き起こすことが明らかになり筋細胞膜でのシグナル伝達異常などの関与も示唆される。

A. 研究目的

細胞外マトリックス構成蛋白の異常を原因とする疾患として、近年様々な疾患が明らかにされつつある。マトリックス分子はいずれも大きく、ゲノムレベルでは100 kb以上に及ぶこともあるので免疫組織化学によるスクリーニングや翻訳領域に絞った変異検出等により効率よく遺伝子変異検索を進める。主任研究者らはハ

パラン硫酸プロテオグリカンであるパールカンの遺伝子変異により二つの重症度の違う疾患周産期致死性軟骨異形成症 (DDSH) と Schwartz-Jampel 症候群 (SJS) を来すことを報告した。さらに臨床的に SJS と診断された症例の遺伝子異常と臨床病型を蓄積することによってパールカン遺伝子異常による病型のスペクトラムの広がり解明しようとしている。また、最近細胞

外マトリックスの異常が明らかにされた筋疾患の一つに先天性筋ジストロフィーの1型である Ullrich 病がある。これは VI 型コラーゲンの欠損を原因とすることが報告された。われわれは臨床的に Ullrich 病と診断されている例について免疫組織化学的検討を併用して VI 型コラーゲン遺伝子の解析を行い臨床病型について検討した。

B. 研究方法

パールカン遺伝子については対象として臨床的に SJS と診断された患者 2 例と最近臨床経過の追跡と遺伝子連鎖解析の結果から SJS と同一疾患であることが示唆された Burton 症候群 1 例を用いた。生検筋あるいは線維芽細胞より RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて cDNA を合成、RT-PCR を行い翻訳領域での遺伝子異常顕出を試みた。PCR 産物の大きさの比較では確認できない短い遺伝子欠失や挿入、点変異検索については PCR 産物を用いた DHPLC による検出を試みた。一方、VI 型コラーゲン遺伝子については、臨床的に Ullrich 病と診断された 9 例について検討した。生検筋から RNA を抽出、cDNA を合成し、RT-PCR を行い VI 型コラーゲン遺伝子 COL6A1, A2, A3 の翻訳領域の全シークエンスを行った。いずれも生検筋あるいは培養線維芽細胞を用いた免疫組織化学的検討も行った。

C. 研究結果

免疫染色にてパールカンが正常であった SJS 1 例ではパールカン遺伝子の変異は検出できなかった。この症例は電気生理学的に筋原性のミオトニアが確認されており、興味深い結果であった。免疫染色と WB でパールカタンパク質の異常を認めた SJS 1 例において片側アレルのドメイン V にエクソン 9 2 のスプライシング異常を引き起こす点変異を検出したが、もう片側アレルでの異常は DHPLC で heterogeneity が疑われる波形を得たが直接シークエンス法で確認したがアミノ酸置換を伴わない点変異であることがわかり遺伝子異常は確認できていない。また免疫染色にてパールカン蛋白の異常を認めた

Burton 症候群の 1 例においてもパールカン遺伝子の異常は確認できていない。

一方、VI 型コラーゲン解析において、免疫染色では完全欠損 1 例と基底膜での発現量の低下を示した部分欠損例 8 例を見出した。そして完全欠損 1 例において COL6A2 に遺伝子異常を見出した。部分欠損 8 例については現在のところ解析中である。

D. 考察

今回の検討でパールカン遺伝子異常を見出せなかった症例においては他の手法を用いて遺伝子異常を検討する必要があると考えられた。またプロモーター領域の異常やあるいはパールカン以外の分子の異常によっても同様の病態が引き起こされることも考慮する必要がある。

一方、VI 型コラーゲンの遺伝子異常に関しては免疫染色での完全欠損例では遺伝子異常が明らかになった。このことはメロシンと同様細胞外マトリックス構成蛋白 VI 型コラーゲンの異常によってもジストロフィー変化を伴う筋障害を引き起こすことが明らかになり、その筋崩壊機序につきシグナル伝達異常なども含め今後検討が必要と思われた。

E. 結論

免疫染色で細胞外マトリックス構成蛋白である VI 型コラーゲンの完全欠損を示した Ullrich 病患者において VI 型コラーゲンの遺伝子異常を見出したことから、細胞外マトリックス構成蛋白異常によっても筋障害が引き起こされることを明らかにした。

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*. 2002 Jun 25;58(12):1773-8.

- Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I. Ullrich disease: collagen VI deficiency: EM suggests a new basis for muscular weakness. *Neurology*. 2002 Sep 24;59(6):920-3.
- Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA, Govindraj P, Hassell JR, Devaney JM, Spranger J, Stevenson RH, Iannaccone S, Dalakas MC, and Yamada Y. Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am. J. Hum. Gen.*, 70:1368-1375, 2002
- Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimiya J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology*. 2002 Dec 10;59(11):1689-93.
- 張 尚美, 石川達也, 埜中征哉, 塚本東子, 斎藤万里子, 坂 京子, 和田郁雄, 杉江和馬, 西野一三. 早期より整形外科的問題を呈したメロシン陽性型先天性筋ジストロフィーーUllrich病との関連を含めてー. *脳と発達* 2003 35(2):159-164

2. 学会発表

- Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Nonaka I, Nishino I, Oh SJ, Takahashi M, Saitoh S, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Byrne E, Lamperti C, DiMauro S, Hirano M. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I. Ullrich disease with collagen VI deficiency suggesting a new mechanism of muscular dystrophy. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- Kaneda D, Kato T, Yamamoto A, Sugie K, Nonaka I, Nishino I. A novel autophagic vacuolar myopathy –adult onset form-. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- Nishino I, Murayama K, Noguchi S, Sugie K, Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is associated with GNE gene mutations. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Sugie K, Rotundo RL, Yamada Y. Perlecan is essential for clustering of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- Yoshimura M, Itoh Y, Yuasa K, Sakamoto M, Sugie K, Nonaka I, Takeda S, Last J, Taylor A. Immunohistochemical analysis of skeletal muscles from canine X-linked muscular dystrophy. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- 杉江和馬, 山本彩香, 埜中征哉, 西野一三: Danon 病の臨床病理学的特徴. 第 43 回日本神経学会総会, 2002 年 5 月 札幌.
- 石川晴美, 杉江和馬, 村山恵子, 西野一三, 南 成祐, 埜中征哉: Ullrich 病の臨床病理学的検討. 第 43 回日本神経学会総会, 2002 年 5 月 札幌.
- 杉江和馬, 山本彩香, 埜中征哉, 西野一三: Danon 病の女性患者の臨床的特徴. 第 44 回日本小児神経学会総会, 2002 年 5 月 仙台.

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