

20020887

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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14年度 総括研究報告書

主任研究者 西 野 一 三

平成15（2003）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.	筋鞘膜の性質を有する自己貧食空胞の疾患特異性と形成機序に関する研究	12
	西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
2.	縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの分子病態に関する研究	15
	西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
3.	成人発症型自己貧食空胞性ミオパチーに関する研究	18
	埜中 征哉 (国立精神・神経センター 武蔵病院)	
4.	筋萎縮時に発現する新規アダプター遺伝子の研究	20
	石浦 章一 (東京大学大学院 総合文化研究所)	
5.	リソゾーム膜蛋白質の機能解析	24
	田中 嘉孝 (九州大学大学院 薬学研究院)	
6.	5型 AAV ベクターによる acid maltase 遺伝子導入の長期効果の検討	27
	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	30
IV.	研究成果の刊行物・別刷	34

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

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、一連の自己食空胞性ミオパチーにおいて空胞形成のメカニズムを探るとともに、新たなAVMを同定しその臨床病理学的特徴について検討を行った。Danon病および一連のAVMでは、空胞壁に事実上全ての筋鞘膜タンパクを発現し、さらにアセチルコリンエステラーゼ活性及び非特異的エステラーゼ活性を有していた。アセチルコリンエステラーゼは発現していなかった。また電顕では、空胞壁に基底膜を認めた。これらの事実から、これらのAVMで認められる空胞膜は、神経筋接合部の筋鞘膜とも、通常の筋鞘膜とも性質が異なることが明らかとなった。また、特異な空胞は、年齢と共に増加することから、本来の自己食空胞に対して二次的に出現したものであることが示唆された。このような特異な膜の性質を持つ自己食空胞は、Danon病を初めとする一連の疾患が独自のグループを成す疾患群であることを示している。また、RVMに関しては、本邦に患者の多い縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）が遺伝性封入体ミオパチーと遺伝学的に同一の疾患であること、GNE遺伝子の機能喪失型変異により発症することを見出した。また、偶然に、ホモ接合型で全く無症状の例を見出した。このことは、GNE遺伝子以外にも発症規定因子があることを示している。患者細胞においては、シアリル化が減少していたが、これはGNE代謝産物投与で回復した。DMRVが治療可能となる可能性が示唆される。

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、依然としてこれらの疾患で認められる特異な空胞の疾患特異性と形成機序については十分明らかにされていない。そこで、病理学的にこれらの疾患における空胞について検討すると共に、これらの疾患と同様の特徴を

有する新たな疾患を探索した。RVM については、DMRV 患者において UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase をコードする GNE 遺伝子の変異の有無を検討した。さらに、生化学的および細胞生物学的実験により、分子病態を明らかにし、治療法開発への手掛かりを得ることを目指した。

B. 研究方法

1. 骨格筋以外にも網膜色素変性、不整脈、肝機能障害、腎機能障害など多数の臓器の機能異常が認められる 41 歳男性の上腕二頭筋より採取された筋生検検体に対して、各種組織化学染色、免疫染色、電顕観察を行った。LAMP-2 遺伝子オープンリーディングフレームのシークエンスを行った。
2. Danon 病、XMEA、乳児型 AVM、成人型 AVM の凍結骨格筋に対して、各種組織化学染色、免疫染色、電顕観察を行った。Danon 病筋に対しては、dystrophin と LIMP-I の二重免疫染色および免疫電顕を施行した。自己貪食空胞が出現する他の筋疾患 (DMRV、封入体筋炎 (SIBM)、酸性マルターゼ欠損症 (AMD)) の骨格筋においても同様の検討を行った。
3. 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの分子病態に関する研究：臨床病理学的に DMRV と診断された互いに血縁関係のない 34 名の患者で、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。患者白血球中の epimerase 活性を測定した。組換え蛋白を作製して酵素活性を測定した。また、患者細胞においてレクチン染色を行い、シアリル化の程度を評価すると共に、GNE 遺伝子がコードする UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase の代謝産物 ManNAc や NeuAc を培地に添加してシアリル化異常が回復されるかを検討した。

C. 研究結果

1. 筋線維大小不同に加えて、筋線維内に多数の小空胞を認めた。空胞の一部は空胞壁にアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性を有し

ていた。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。空胞壁は、各種の筋鞘膜蛋白を発現しており、筋鞘膜の性質を有することが明らかとなった。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。

2. 筋線維内に多数の自己貪食空胞の集塊を認めた。一部の自己貪食空胞塊は、筋鞘膜の性質を有する膜で囲まれていた。この空胞膜は、全ての筋鞘膜蛋白を発現し、さらに AChE 活性を有していた。アセチルコリン受容体は存在していなかった。この特異な空胞膜が形成する空間は、閉鎖腔を成しており、筋鞘膜との連続性は、高齢の患者でごく一部認められたのみであった。自己貪食空胞塊の数は、低年齢でも多数認められたが、筋鞘膜の性質を持つ空胞は、ほぼ年齢に比例して増加していた。筋鞘膜の性質を持つ空胞は、DMRV, SIBM, AMD においても認められたが、その頻度は遙かに低く、また、必ずしも全ての筋鞘膜蛋白を発現していなかった。さらに、AChE 活性を有する空胞膜は全く認められなかった。
3. 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの分子病態に関する研究：27 名にホモ接合又は複合ヘテロ接合型の変異を見出した。これらの患者の内 1 名は、HIBM 患者で報告されている変異と全く同じ変異を有していた。ホモ接合型で変異を有していながら症状を全く発現していない例を 1 例認めた。白血球中の epimerase 活性は全例で著減していた。見出された変異の組換え蛋白では、特に、epimerase domain の変異で epimerase 活性が著減していた。また、患者細胞を用いた実験では、シアリル化が著減していた。このシアリル化の著減は、UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase 代謝産物である ManNAc や NeuAc の培地への添加により回復した。

D. 考察

1. 本例は、筋病理学的特徴から Danon 病と同様

特異な空胞を有する AVM に分類される疾患である。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、本例は Danon 病とは異なる疾患であることが明らかとなった。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、本例は XMEA に近い病態を持つことが示唆された。

2. 特異な空胞膜形成は二次的に生じていると考えられる。従来このような空胞膜は、筋鞘膜の嵌入によると考えられていたが、ほぼ全ての空胞は閉鎖腔を形成していたことから、*de novo* でかつ *in situ* に形成されたものである可能性が強く示唆された。恐らく、機能不全状態にある自己貪食空胞塊を細胞外と同値の空間を新たに形成することで、細胞質から隔離しているものと考えられる。他の筋疾患においても、まれに筋鞘膜蛋白を発現する膜で囲まれた空胞が筋線維内に出現するが、Danon 病とその類縁疾患とは異なり、AChE を発現している空胞膜は全く認められなかった。従って、AChE を発現する空胞膜の出現は、極めて疾患特性が高い。
3. 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの分子病に関する研究：HIBM 例と全く同じ組み合わせの変異が見出されたことから、DMRV と HIBM は遺伝学的に同一疾患である。ホモ接合型で変異を有していながら無症状である例の存在は、GNE 遺伝子変異のみが症状発現の絶対的因子ではことを示している。このような因子を見出すことが出来れば、DMRV 治療法の開発に繋がることは言うまでもない。さらに、患者培養細胞において、ManNAc、NeuAc の添加によりシアリル化が回復したことは、これらの代謝産物の投与により DMRV を治療出来る可能性を強く示唆している。

E. 結論

1. 成人発症型自己貪食空胞性ミオパチーは Danon 病と同様の空胞を認め、特異な自己貪

食空胞を認める AVM 群の第 4 番目の疾患である。

2. 筋鞘膜の性質を有する膜で囲まれた自己貪食空胞は、極めて疾患特異性が高い。恐らく、筋鞘膜様構造が *de novo* でかつ *in situ* に形成されて、自己貪食空胞塊を細胞外と同値の空間に隔離しているものと考えられる。
3. DMRV は、GNE 遺伝子の機能喪失型変異により発症する。DMRV は遺伝学的に HIBM と同一である。DMRV では、回復可能なシアリル化異常が見られる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・Nishino I.

Lysosomal membrane disorders - LAMP-2 deficiency.

The molecular and genetic basis of neurological and psychiatric disease. 3rd ed. Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, Nestler EJ, ed. Butterworth-Heinemann, Boston, MA, USA, in press.

・Kaneda D, Sugie K, Yamamoto A, Matsumoto H, Kato T, Nonaka I, Nishino I.

A novel form of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multi-organ involvement. *Neurology*, in press

・Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12: 595-600, 2003.

・Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamauchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Many H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, Van Coster

- R, Nishino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T. Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 12: 527-534, 2003.
- Nishino I. Autophagic vacuolar myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3: 64-69, 2003.
 - Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J, Inturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Nonaka I, Hirano M, Nishino I. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 58: 1773-1778, 2002.
 - Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kellely RI, Somer H, Straub V, Mathews KD, Moore SA, Campbell KP. Posttranslational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418: 417-422, 2002.
 - Nishino I, Ozawa E. Muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 15: 539-544, 2002.
 - Takahashi M, Yamamoto A, Takano K, Sudo A, Wada T, Goto Y, Nishino I, Saitoh S. Germline mosaicism of a novel mutation in LAMP-2 deficiency (Danon disease). *Ann Neurol* 52: 122-125, 2002.
 - Suzuki T, Nakagawa M, Yoshikawa A, Sasagawa N, Yoshimori T, Ohsumi Y, Nishino I, Ishiura S, Nonaka I. The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy. *J Biochem* 131: 647-651, 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* 59: 1689-1693, 2002.
 - 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.
 - Sasagawa N, Ishiura S. Myotonic dystrophy protein kinase. *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* 5, 2203-2205, 2002
 - Kino Y, Oma Y, Takeshita Y, Takahashi N, Sasagawa N, Ishiura S. Direct evidence that EXP/muscleblind interacts with CCUG tetranucleotide repeats. *Basic Appl. Myol.* in press
 - Takeshita Y, Sasagawa N, Usuki F, Ishiura S. Decreased expression of alpha-B-crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats. *Basic Appl. Myol.* in press
 - Niwa K, Tanaka R, Murase H, Ishikawa T, Fujita H, Himeno M, Tanaka Y. Two lysosomal membrane proteins, LGP85 and LGP107, are delivered to late endosomes/lysosomes through different intracellular routes after exiting from the *trans*-Golgi network. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301: 833-840, 2003.
 - Gamp A.C, Tanaka Y, Lullmann-Rauch R, Wittke D, D'Hooge R, De Deyn P.P, Moser T, Maier T, Hartmann D, Reiss K, von Figura K,

- Saftig P.
LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice.
Hum Mol Genet 12: 631-646, 2003.
- Eskelinen E-L, Tanaka Y, Saftig P.
At the acidic edge: Emerging functions for lysosomal membrane proteins.
Trends Cell Biol 13: 137-145, 2003.
 - Fujita H, Yamanaka M, Imamura K, Tanaka Y, Nara A, Yoshimori T, Yokota S, Himeno M.
A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: Class E vps phenotype in mammalian cells.
J. Cell Sci. 116: 401-414, 2003.
 - Kuronita T, Eskelinen E-L, Fujita H, Saftig P, Himeno M, Tanaka Y.
A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J. Cell Sci.* 115: 4117-4131, 2002
 - Eskelinen E-L, Illert A-L, Tanaka Y, Schwarzmann G, Blanz J, von Figura K, Saftig P.
Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol. Biol. Cell* 13: 3355-3368, 2002.
 - Tsukahara T, Tsujino S, Arahata K.
cDNA microarray analysis of gene expression in fibroblasts of patients with X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy.
Muscle Nerve 25: 898-901, 2002.
 - Shiroma N, Kanazawa N, Kato Z, Shimozawa N, Imamura A, Ito M, Ohtani K, Oka K, Wakabayashi K, Iai M, Sugai K, Sasaki S, Kaga K, Ohta T, Tsujino S.
Molecular genetic study in Japanese patients with Alexander disease: a novel mutation, R79L.
Brain Dev 25: 116-121, 2003.
2. 学会発表
- Hentati F, Amouri R, Driss A, Zouari M, Murayama K, Nishino I, Ben Hamida M.
Allelic heterogeneity of autosomal recessive inclusion body myopathy in Tunisia. Xth International Congress of Neuromuscular Diseases, Vancouver, BC, Canada, 7.9, 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 of Neuromuscular Diseases, Vancouver, BC, Canada, 7.11, 2002.
 - Kaneda D, Kato T, Yamamoto A, Sugie K, Nonaka I, Nishino I. A novel autophagic vacuolar myopathy - Adult onset form. Xth International Congress of Neuromuscular Diseases, Vancouver, BC, Canada, 7.11, 2002.
 - Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Nonaka 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, Nishino I: Clinicopathological features of genetically-confirmed Danon disease. Xth International Congress of Neuromuscular Diseases, Vancouver, BC, Canada, 7.11, 2002.
 - Fujita H, Ishikawa D, Tanaka Y, Nara A, Yoshimori T, Yokota S, Ishido K, Himeno M. A Possible Involvement of an AAA-ATPase SKD1 in the Ubiquitin Dependent Endosomal Membrane Transport and Autophagy. American Society for Cell Biology "Nontraditional Functions of Ubiquitin and Ubiquitin-like Proteins" (August 2002, Colorado Springs, USA)
 - Kuronita T, Eskelinen E.L, Fujita H, Saftig P, Himeno M and Tanaka Y.
"A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of

III International Symposium on Autophagy
“Molecular Biology and Pathophysiology of
the Lysosomal/Vacuolar System” (September
2002 Osaka, Japan).

• Saftig P, Eskelinen E-L, Tanaka Y,
Illert A.L, von Figura K.

“Functions of lysosomal membrane proteins in
lysosomal biogenesis, autophagy and disease”

III International Symposium on Autophagy
“Molecular Biology and Pathophysiology of
the Lysosomal/Vacuolar System”
(September 2002 Osaka, Japan).

• Eskelinen E-L, Tanaka Y, Lüllmann-Rauch R,
von Figura K, Saftig P.

“Double deficiency reveals overlapping
functions for the lysosomal membrane proteins
LAMP-1 and LAMP-2” Transport Meeting
(November 2002, Goettingen, Germany).

• Tsujino S, Mizukami H, Muramatsu S, Ozawa K,
Plotz P, Raben N: Efficiency of different
serotypes of adeno-associated virus vector
for delivering the acid maltase (AM) gene into
AM knockout mice. Xth International Congress
of Neuromuscular Disease, Vancouver, Canada,
7. 10, 2002

• Korman SH, Kanazawa N, Abu-Libdeh BY, Gutman
A, Tsujino S.

Hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrul
linuria (HHH) with evidence of mitochondrial
dysfunction due to a novel ORNT1 mutation in
a Palestinian family.

40th Annual Symposium of Society for the Study
of Inborn Errors of Metabolism, Dublin,
Ireland, 9. 4, 2002

• 西野一三, 村山久美子, 野口悟, 埜中征哉.
縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの遺伝子解
析. 第43回日本神経学会総会, 札幌, 5. 30,
2002.

• 杉江和馬, 山本彩香, 埜中征哉, 西野一三.
遺伝学的に Danon 病と確定した 38 例の臨床病理
学的検討. 第43回日本神経学会総会, 札幌, 5. 30,
2002.

• 山本彩香, 埜中征哉, 西野一三, 茅野文利,
床並房雄, 高橋正明. Danon 病母子例の剖検組織
所見. 第43回日本神経学会総会, 札幌, 5. 31,
2002.

• 藤田英明, 石川大輔, 田中嘉孝, 奈良篤樹, 吉
森保, 横田貞記, 石堂一巳, 姫野勝 「AAA タン
パク質 SKD1 によるユビキチンシグナル依存性
膜輸送の制御」 第75回日本生化学会大会
(2002年10月 京都) 講演要旨集 p.891

• 広佐古香, 田中嘉孝, 藤田英明, 今里 泰,
姫野 勝 「3-Methyladenine (3MA) は mannose-6
-phosphate receptor (MPR) の early endosome か
ら TGN への輸送を選択的に阻害する」 第75
回日本生化学会大会 (2002年10月 京都)
講演要旨集 p.894

• 黒仁田敏雄, 田中嘉孝, 藤田英明, Eeva-Liisa
Eskelinen, Paul Saftig, 姫野 勝 「リソソ
ム膜蛋白質 LAMP1 の過剰発現による空胞形成機
構の解析」 日本薬学会 ファーマバイオフォー
ラム2002 (2002年11月 東京)

• 藤田英明, 石川大輔, 田中嘉孝, 奈良篤樹,
吉森保, 横田貞記, 石堂一巳, 姫野勝 「AAA タ
ンパク質 SKD1 によるユビキチンシグナル依存
性膜輸送の制御」 第75回日本生化学会大会
(2002年10月 京都) 講演要旨集 p.891

• 広佐古香, 田中嘉孝, 藤田英明, 今里 泰,
姫野 勝 「3-Methyladenine (3MA) は mannose-6
-phosphate receptor (MPR) の early endosome か
ら TGN への輸送を選択的に阻害する」 第75
回日本生化学会大会 (2002年10月 京都)
講演要旨集 p.894

• 黒仁田敏雄, 田中嘉孝, 藤田英明, 姫野 勝 「リ
ソソム膜蛋白質 LAMP1 はエンドソーム・リソソ

ームの形成機構に關与している」第 25 回日本分子生物学会年会 (2002 年 12 月 横浜)

・廣田有子, 増山菜緒子, 黒仁田敏雄, 藤田英明, 田中嘉孝, 姫野 勝「動物細胞における post-lysosome 様コンパートメントの解析」第 25 回日本分子生物学会年会 (2002 年 12 月 横浜)

・辻野精一, 水上浩明, 小澤敬也, 村松慎一, Nina Raben. 異なる serotype の AAV ベクターによる acid maltase 遺伝子導入の比較検討 第 43 回日本神経学会総会 平成 14 年 5 月 31 日 札幌

・城間 直秀, 金澤 直美, 須貝 研二, 中山治美, 西条 晴美, 伊藤雅之, 大谷恭一, 岡明, 辻野 精一. 日本人 Alexander 病および van der Knaap 病の遺伝子解析 第 43 回日本神経学会総会 平成 14 年 5 月 31 日 札幌

・城間直秀, 須貝研司, 佐々木征行, 加我牧子, 伊藤雅之, 大谷恭一, 岡明, 中山治美, 西条晴美, 加藤善一郎, 今村淳, 下澤伸行, 若林和代, 井合瑞江, 辻野精一. 白質疾患の遺伝子診断: Alexander 病と van der Knaap 病 第 44 回日本小児神経学会総会 平成 14 年 6 月 28 日 仙台

・西條晴美, 江添隆範, 荒木克仁, 曾根翠, 浜口弘, 鈴木文晴, 中山治美, 城間直秀, 辻野精一, 平山義人, 有馬正高. MLC1 遺伝子に変異を認め た Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (van der Knaap 病) の 1 例 第 44 回日本小児神経学会総会 平成 14 年 6 月 27 日 仙台

・若林和代, 井合瑞江, 増子香織, 山下純正, 山田美智子, 岩本弘子, 相田典子, 城間直秀, 金澤直美, 辻野精一. 遺伝子解析において診断を得た長期生存の Alexander 病の一例 第 44 回日本小児神経学会総会 平成 14 年 6 月 28 日 仙台

・金澤直美, 宮本健, 山田穰, 酒井規夫, 乾幸治, 萩原綱一, 川本未知, 幸原伸夫, 杉江秀秀, 坂井文彦, 辻野精一. 日本人若年型 acid maltase 欠損症の高頻度遺伝子変異 S619R 及び新規遺伝子変異 Q776X, M439K 第 45 回日本先天代謝異常学会 平成 14 年 11 月 8 日 神戸

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

1. 筋鞘膜の性質を有する自己貪食空胞の疾患特異性と形成機序に関する研究

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 埜中征哉 国立精神・神経センター
武蔵病院 院長

研究要旨 : Danon 病、過剰な自己貪食を伴う X 連鎖性ミオパチー (XMEA)、乳児型自己貪食性ミオパチー (AVM)、成人発症型で多臓器罹患を伴う AVM は何れも特異な自己貪食空胞を筋線維内に多数認めるが、その病理学的特徴及び形成機序については、十分に明らかにされているとは言えない。これらの疾患で認められる自己貪食空胞には組織学的には 2 種類あり、筋鞘膜の性質を持つ空胞膜で囲まれる自己貪食空胞の集まりと、このような膜構造を伴わない自己貪食空胞の集塊とがあった。前者は年齢と共に増加するのに対して、後者は、低年齢より多数存在し、むしろその数は減少していた。特異な空胞膜は、基底膜を有すると共に、ほぼ全種類の筋鞘膜蛋白とアセチルコリンエステラーゼ (AChE) を発現していたが、アセチルコリン受容体 (AChR) を発現しておらず、通常の筋鞘膜とも神経筋接合部筋鞘膜とも性質が異なっていた。このような空胞膜は、自己貪食産物の処理機構に不全に対して二次的に、*de novo* でかつ *in situ* に形成されたものである可能性が高く、疾患特異性が高い。

A. 研究目的

これまでに Danon 病、XMEA、乳児型 AVM は、特異な自己貪食空胞が筋線維内に出現することが知られている。さらに、我々は、成人発症型で多臓器罹患を伴う AVM においても同様の自己貪食空胞を認めることを本年見出した (分担研究者: 埜中征哉の報告書参照)。これらの疾患の内、遺伝学的原因が明らかになっているのは、Danon 病のみであるが、Danon 病においてさえも、その特異な空胞の形成機序については、十分に明らかにされているとは言えない。このような特異な空胞の特徴を十分に明らかにすることは、これらの疾患群の独自性を検証し、まだ遺伝学的原因の不明な XMEA、乳児型 AVM、成人型 AVM などの分子病態および原因遺伝子の解明に繋がるばかりでなく、治療法開発への手がかりを与えるものと期待される。

B. 研究方法

Danon 病、XMEA、乳児型 AVM、成人型 AVM の凍

結骨格筋に対して、ヘマトキシリン・エオジン染色、ゴモリトリクローム変法を含む各種組織化学染色を行った。また、ジストロフィンを含む各種筋鞘膜蛋白、LAMP-2 および LIMP-I を含むライソゾーム蛋白に対してそれぞれ免疫染色を施行した。電顕用検体が得られるものに関しては、電顕観察を行った。Danon 病筋に対しては、dystrophin と LIMP-I の二重免疫染色および免疫電顕を施行した。また、特異な空胞膜の疾患特異性を検証するために、自己貪食空胞が出現する他の筋疾患 (縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV)、封入体筋炎 (SIBM)、酸性マルターゼ欠損症 (AMD)) の骨格筋においても同様の空胞が出現するかを検討した。

C. 研究結果

骨格筋の組織化学染色では、筋線維大小不同に加えて、筋線維内に多数の好塩基性小顆粒を認めた。これらの顆粒は、LIMP-I 染色で強く染まり、電顕的には、自己貪食空胞の集塊であった。一方、

一部の好塩基性顆粒は、筋鞘膜の性質を有する膜で囲まれていた。免疫染色では、この空胞膜は、Agrinを除いて、調べた全ての筋鞘膜蛋白を発現していた。組織化学染色では、AChE 活性及び非特異的エステラーゼ活性を有していた。しかしながら、 α -bungarotoxin 染色は陰性で、AChR は存在していなかった。連続切片及び縦切での観察からは、この特異な空胞膜が形成する空間は、閉鎖腔を成しており、筋鞘膜との連続性は、高年齢の患者でごく一部認められたのみであった。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、一部の自己貪食空胞塊の周囲に基底膜を伴う膜が認められた。自己貪食空胞塊の数は、低年齢でも多数認められたが、筋鞘膜の性質を持つ空胞は、ほぼ年齢に比例して増加していた。筋鞘膜の性質を持つ空胞は、DMRV, SIBM, AMD においても認められたが、その頻度は遙かに低く、また、必ずしも全ての筋鞘膜蛋白を発現していなかった。さらに、AChE 活性を有する空胞膜は全く認められなかった。免疫電顕では、ジストロフィンを発現する膜構造内部に LIMP-I を発現する構造物が認められた。

D. 考察

免疫電顕の結果からは、特異な膜構造の内部に存在する構造物は、自己貪食空胞であることが示唆される。実際、電顕レベルでも光顕レベルでも筋鞘膜の性質を有する膜で囲まれた自己貪食空胞の集塊とそうでない自己貪食空胞塊が認められている。さらに、前者の空胞は年齢に比例して増加するのに対して、後者の自己貪食空胞塊は低年齢より認められ、このような特異な空胞膜形成が二次的に生じていることが強く示唆された。これは恐らく、Danon 病及び関連する疾患群では、自己貪食産物の完全な分解又は細胞外への放出といったプロセスに問題があり、自己貪食が最後まで完遂出来ていないためと考えられる。さらに、従来このような空胞膜は、筋鞘膜の嵌入によると考えられていたが、ほぼ全ての空胞は閉鎖腔を形成していたことから、*de novo* でかつ *in situ* に形成されたものである可能性が強く示唆された。恐らく、機能不全状態にある自己貪食空胞塊を細

胞外と同値の空間を新たに形成することで、細胞質から隔離しているものと考えられる。自己貪食空胞を認める他の筋疾患においては、まれに筋鞘膜蛋白を発現する膜で囲まれた空胞が筋線維内に出現するが、Danon 病とその類縁疾患に比べて、頻度は低く、また、筋鞘膜蛋白の発現も必ずしも完全ではなかった。また、AChE を発現している空胞膜は全く認められなかった。これらの事実から、AChE を発現し、完全な筋鞘膜蛋白の発現を認める空胞膜で囲まれる自己貪食空胞の出現は、極めて疾患特性が高いと考えられる。今後この疾患群に属する筋疾患がさらに見出されるものと期待される。

E. 結論

Danon 病および類縁疾患で認められる筋鞘膜の性質を有する膜で囲まれた自己貪食空胞は、極めて疾患特異性が高い。恐らく、自己貪食過程に問題があって自己貪食産物の分解が不十分であるために、筋鞘膜様構造が *de novo* でかつ *in situ* に形成されて、自己貪食空胞塊を細胞外と同値の空間に隔離しているものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Nishino I.

Lysosomal membrane disorders - LAMP-2 deficiency.

The molecular and genetic basis of neurological and psychiatric disease. 3rd ed. Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, Nestler EJ, ed. Butterworth-Heinemann, Boston, MA, USA, in press

・Kaneda D, Sugie K, Yamamoto A, Matsumoto H, Kato T, Nonaka I, Nishino I.

A novel form of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multi-organ involvement. *Neurology*, in press

• Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12: 595-600, 2003.

• Nishino I.
Autophagic vacuolar myopathies.
Curr Neurol Neurosci Rep 3: 64-69, 2003.

• Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J, Iturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Nonaka I, Hirano M, Nishino I.
Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease.
Neurology 58: 1773-1778, 2002.

• Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kellely RI, Somer H, Straub V, Mathews KD, Moore SA, Campbell KP.
Posttranslational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies.
Nature 418: 417-422, 2002.

• Nishino I, Ozawa E.
Muscular dystrophies.
Curr Opin Neurol 15: 539-544, 2002.

• Takahashi M, Yamamoto A, Takano K, Sudo A, Wada T, Goto Y, Nishino I, Saitoh S.
Germline mosaicism of a novel mutation in LAMP-2 deficiency (Danon disease).
Ann Neurol 52: 122-125, 2002.

• Suzuki T, Nakagawa M, Yoshikawa A, Sasagawa N, Yoshimori T, Ohsumi Y, Nishino I, Ishiura S, Nonaka I.
The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy.
J Biochem 131: 647-651, 2002.

• 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

• Kaneda D, Kato T, Yamamoto A, Sugie K, Nonaka I, Nishino I. A novel autophagic vacuolar myopathy - Adult onset form. Xth International Congress of Neuromuscular Diseases, Vancouver, BC, Canada, 7.11, 2002.

• Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Nonaka 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, Nishino I: Clinicopathological features of genetically -confirmed Danon disease. Xth International Congress of Neuromuscular Diseases, Vancouver, BC, Canada, 7.11, 2002.

• 杉江和馬, 山本彩香, 埜中征哉, 西野一三.
遺伝学的に Danon 病と確定した 38 例の臨床病理学的検討. 第 43 回日本神経学会総会, 札幌, 5.30, 2002.

• 山本彩香, 埜中征哉, 西野一三, 茅野文利, 床並房雄, 高橋正明.
Danon 病母子例の剖検組織所見. 第 43 回日本神経学会総会, 札幌, 5.31, 2002.

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

2. 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの分子病態に関する研究

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 埜中征哉 国立精神・神経センター
武蔵病院 院長

研究要旨：縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) は、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) の機能喪失型変異により生じる疾患であり、遺伝性封入体ミオパチー (HIBM) と同一疾患であることを明らかにした。患者培養細胞を用いた実験では、シアリル化が著減していたが、シアリル化異常は UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase / N-acetylmannosamine kinase の代謝産物投与により回復した。また、ホモ接合型で変異を有しながら無症状の例を見出した。これらの事実は、DMRV が治療可能である可能性を強く示唆する。

A. 研究目的

ライソゾーム性筋疾患の1つ縁取り空胞性ミオパチーにおいて UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase をコードする遺伝子 (GNE) の変異の有無を調べ、HIBM との異同を明らかにする。また、患者培養細胞におけるシアリル化異常の有無について検討する。

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34名の患者を対象として、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。また、白血球中の epimerase 活性を測定した。日本人に認められた上位4変異について、組換え蛋白を作製して酵素活性を測定した。また、患者細胞においてレクチン染色を行い、シアリル化の程度を評価すると共に、GNE 遺伝子がコードする UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase / N-acetylmannosamine kinase の代謝産物 ManNAc や NeuAc を培地に添加してシアリル化異常が回復されるかを検討した。

C. 研究結果

27名にホモ接合又は複合ヘテロ接合型の変異を見出した。これらの患者の内1名は、アイルランド・ドイツ系アメリカ人患者である。この患者は、HIBM 患者で報告されている変異と全く同じ変異を有しており、DMRV と HIBM が遺伝学的に同一疾患であることが強く示唆された。今回の調査の間に、偶然、発端者の父親で、ホモ接合型で変異を有していながら症状を全く発現していない例を発見した。白血球中の epimerase 活性は全例で著減していた。見出された変異の組換え蛋白では、特に、epimerase domain の変異で epimerase 活性が著減していた。また、患者細胞を用いた実験では、シアリル化が著減していた。このシアリル化の著減は、UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase / N-acetylmannosamine kinase 代謝産物である ManNAc や NeuAc の培地への添加により回復することが示された。

D. 考察

DMRV は、GNE 遺伝子の機能喪失型変異により発

症することが明らかとなった。HIBM 例と全く同じ組み合わせの変異が見出されたことから、DMRV と HIBM は遺伝学的に同一疾患であることが強く示唆された。ホモ接合型で変異を有していながら無症状である例の存在は、GNE 遺伝子変異のみが症状発現の絶対的因子ではなく、他にも発症に影響を及ぼしうる何らかの因子が存在することを示唆している。このような因子を見出すことが出来れば、DMRV 治療法の開発に繋がることは言うまでもない。さらに、患者培養細胞において、ManNAc、NeuAc の添加によりシアリル化が回復したことは、これらの代謝産物の投与により DMRV を治療出来る可能性を強く示唆している。

E. 結論

DMRV は、GNE 遺伝子の機能喪失型変異により発症する。DMRV は遺伝学的に HIBM と同一である。DMRV では、シアリル化異常が見られ、これは UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase の代謝産物投与により回復することから、将来的な治療法開発に繋がる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Kaneda D, Sugie K, Yamamoto A, Matsumoto H, Kato T, Nonaka I, Nishino I.

A novel form of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multi-organ involvement. *Neurology*, in press

・Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12: 595-600, 2003.

・Nishino I. Autophagic vacuolar myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3: 64-69, 2003.

・Nishino I, Ozawa E. Muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 15: 539-544, 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* 59: 1689-1693, 2002.

・Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kellely RI, Somer H, Straub V, Mathews KD, Moore SA, Campbell KP.

Posttranslational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418: 417-422, 2002.

・Takahashi M, Yamamoto A, Takano K, Sudo A, Wada T, Goto Y, Nishino I, Saitoh S. Germline mosaicism of a novel mutation in LAMP-2 deficiency (Danon disease). *Ann Neurol* 52: 122-125, 2002.

・Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J, Inturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Noanka I, Hirano M, Nishino I. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 58: 1773-1778, 2002.

2. 学会発表

Hentati F, Amouri R, Driss A, Zouari M, Murayama K, Nishino I, Ben Hamida M. Allelic heterogeneity of autosomal recessive inclusion body myopathy in Tunisia. Xth International Congress of Neuromuscular Diseases, Vancouver, BC, Canada, 7.9, 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 of Neuromuscular Diseases, Vancouver, BC, Canada, 7.11, 2002.

・西野一三, 村山久美子, 野口悟, 埜中征哉.
縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの遺伝子解析.
第43回日本神経学会総会, 札幌, 5.30, 2002.

・杉江和馬, 山本彩香, 埜中征哉, 西野一三
遺伝学的に Danon 病と確定した 38 例の臨床病理学的検討. 第43回日本神経学会総会, 札幌, 5.30, 2002.

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

3. 成人発症型自己貪食空胞性ミオパチーに関する研究

分担研究者 埜中征哉 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の内、Danon 病や過剰な自己貪食を伴う X 連鎖性ミオパチー (XMEA) は特異な自己貪食空胞の出現をその病理学的な特徴とする。これまでに同様の空胞を認める疾患として、他に乳児型自己貪食性ミオパチーの存在を明らかにしてきた。今回、同様の筋線維内空胞を認める成人発症型で多臓器罹患を伴う新たな自己貪食空胞性ミオパチーを見出した。Danon 病で欠損している LAMP-2 は欠損しておらず、Danon 病とは遺伝学的に異なる。臨床的には、XMEA や乳児型 AVM と異なることから、特異な空胞を来す AVM の第 4 番目の疾患であると考えられる。

A. 研究目的

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。我々が Danon 病は原発性 LAMP-2 欠損症であることを明らかにしてから、一見ライソゾーム性糖原病 (酸性マルターゼ欠損症) に似たミオパチー群が臨床病理学的に整理され始めた。これまでに我々は、類似した病理所見を呈する疾患群として、Danon 病、XMEA、乳児型 AVM があることを報告してきた。今回、新たにどの疾患とも臨床像をことにする同様の AVM を見出したため、第 4 の特異な空胞を伴う AVM として良いかどうかを検討した。

B. 研究方法

患者は 41 歳男性。23 歳時より血中クレアチンキナーゼ値の上昇を指摘されていた。34 歳時より労作性の筋痛と易疲労感が出現。骨格筋以外にも網膜色素変性、不整脈、肝機能障害、腎機能障害など多数の臓器の機能異常が認められる。上腕二頭筋より採取された筋生検検体に対して、凍結固定後、厚さ 10 μm の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、ゴモリトリクローム変法を含む各種組織化学染色を行った。また、ジストロフィンを含む各種筋鞘膜蛋白、LAMP-2、補

体 C5b-9 に対してそれぞれ免疫染色を施行した。検体の一部はグルタルアルデヒド溶液で固定し、電顕観察を行った。さらに、Danon 病との遺伝学的異同を明らかにするために、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行った。

C. 研究結果

骨格筋の組織化学染色では、筋線維大小不同に加えて、筋線維内に多数の小空胞を認めた。空胞の一部は空胞壁にアセチルコリンエステラーゼ活性及び非特異的エステラーゼ活性を有していた。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。空胞壁は、各種の筋鞘膜蛋白を発現しており、筋鞘膜の性質を有することが明らかとなった。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

本例は、筋病理学的特徴から Danon 病と同様特異な空胞を有する AVM に分類される疾患である。

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、本例はDanon病とは異なる疾患であることが明らかとなった。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、本例はXMEAに近い病態を持つことが示唆された。

E. 結論

成人発症型自己貪食空胞性ミオパチーはDanon病と同様の空胞を認め、特異な自己貪食空胞を認めるAVM群の第4番目の疾患である。詳細な病理学的検討の結果からは、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

・Nishino I.

Lysosomal membrane disorders - LAMP-2 deficiency.

The molecular and genetic basis of neurological and psychiatric disease. 3rd ed. Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, Nestler EJ, ed. Butterworth-Heinemann, Boston, MA, USA, in press.

・Kaneda D, Sugie K, Yamamoto A, Matsumoto H, Kato T, Nonaka I, Nishino I.

A novel form of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multi-organ involvement. *Neurology*, in press

・Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J, Iturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Nonaka I, Hirano M, Nishino I.

Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease.

Neurology 58: 1773-1778, 2002.

・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

・Kaneda D, Kato T, Yamamoto A, Sugie K, Nonaka I, Nishino I. A novel autophagic vacuolar myopathy - Adult onset form.

Xth International Congress of Neuromuscular Diseases, Vancouver, BC, Canada, 7.11, 2002.

・Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Nonaka 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, Nishino I. Clinicopathological features of genetically -confirmed Danon disease.

Xth International Congress of Neuromuscular Diseases, Vancouver, BC, Canada, 7.11, 2002.

・杉江和馬, 山本彩香, 埜中征哉, 西野一三. 遺伝学的にDanon病と確定した38例の臨床病理学的検討. 第43回日本神経学会総会, 札幌, 5.30, 2002.

・山本彩香, 埜中征哉, 西野一三, 茅野文利, 床並房雄, 高橋正明. Danon病母子例の剖検組織所見. 第43回日本神経学会総会, 札幌, 5.31, 2002.

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

4. 筋萎縮時に発現する新規アダプター遺伝子の研究

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：脱神経時に発現が変化する遺伝子を DNA マイクロアレイを用いてスクリーニングした。その結果、アセチルコリン受容体など、いくつかの遺伝子の発現が明らかになったが、中でも ARPP と名付けられた新規アダプター分子の挙動を明らかにした。

A. 研究目的

筋萎縮の原因には、筋肉を構成する蛋白質の遺伝子異常に起因するものだけでなく、免疫系の異常、脱神経、廃用性萎縮など様々なものが存在することが知られている。本研究では、ラットを用いて人工的に筋肉の張力を変化（尾部懸垂、廃用性萎縮、脱神経、張力加重）させ、筋細胞内蛋白分解の亢進とそれに伴う筋の萎縮のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。この研究の新しい点は、筋萎縮を、遺伝子発現という新しい指標を用いて、当該遺伝子の生理機能を定量的に、明らかにすることである。

筋萎縮に関わる分子についての研究は20年以上前から盛んに行われてきたが、プロテアーゼ遺伝子以外に、萎縮に関与するものは、そう多く発見されているわけではない。私たちは、DNA マイクロアレイ技術を用いて、新規遺伝子の探索を行い、新しく cAMP によって調節されるリン酸化タンパク質 (ARPP) が脱神経筋で発現上昇していることを見出した。この新しい標的の機能を明らかにすることで、これを用いて日本発の新しい治療法が見つかる可能性も期待される。

B. 研究方法

動物と脱神経

実験動物には、すべて8週令のオス Wistar 系ラット（約200～250g）を用いた。脱神経は、麻酔で眠らせた後、すぐに右後肢の坐骨神経を暴露し、約5mmにわたって神経を除去した。神経除去後、右後肢をひきずるようにして歩いていることを確認した後、それぞれの経過日数後に、長趾伸

筋 (EDL) とひらめ筋 (Soleus) をそれぞれ右後肢 (脱神経筋) と左後肢 (対照群) から摘出した。摘出後、筋湿重量を測定し、ただちに液体窒素で凍結させ、 -80°C にて保存した。

尾部懸垂

尾部懸垂は以下のように行った。まず、麻酔後、左肢の EDL と Soleus をそれぞれ摘出し、傷口をふさいだ。ラットの尻尾にフックを取り付け、約15cmの高さに360度回転出来るように引っ掛けて、後肢は宙に、前肢は地面に触れているようにした。2週間後に右後肢が地面についていないことを確認した後、EDL と Soleus をそれぞれ摘出した。脱神経の場合と同様に、筋湿重量を測定し、すぐに液体窒素にて凍結させ、 -80°C で保存した（国立精神・神経センター後藤雄一先生のご厚意による）。

ノーザンハイブリダイゼーション

RNA は、凍結筋サンプルから AGPC 法にしたがって total RNA を抽出した。Total RNA はホルムアルデヒドを含む1%変性アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロンメンブレン (Biodyne B, KPL) に吸引付着させ、0.05N NaOH によりメンブレンに共有結合させ固定した。メンブレンは、ハイブリダイゼーションバッファー (ULTRAhyb, Ambion) を用いて $[^{32}\text{P}]$ dCTP ラベルされた各遺伝子のプローブとハイブリダイゼーションを行った。プローブには、ヒト ARPP-19 遺伝子のコーディング領域全体とヒト GAPDH 遺伝子のコーディング領域の一部を用いた。各シグナルは BAS1000 (富士写真フィルム) で定量化し、GAPDH のシグ