

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15年度分)

主任研究員 平澤 恵理

分担研究員 林 由起子

村山 季美枝

平成16年4月15日

目次

I. 統括研究報告

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. Schwartz-Jampel 症候群モデルマウスの作成と解析

平澤 恵理 (順天堂大学医学部)

2. 細胞外マトリックス異常症による先天性筋ジストロフィー

林 由起子 (国立精神・神経センター神経研究所)

3. 細胞外マトリックスラミニン活性ペプチドによる糖鎖超分子複合体と細胞内シグナルの修飾に関する研究

平澤 恵理 (順天堂大学医学部)

4. 細胞外マトリックス；ラミニン α 1 鎖欠損マウス作成と生体での機能解明に関する研究

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 (2)

村山季三枝 (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. 統括研究報告書

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、臨床症状の解明と基礎研究を行っている。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、その治療を目指す。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。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。

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

米国 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. 細胞外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脂質ミ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。

3. 細胞外マトリックスラミニンに関してはラミニン α 1鎖ノックアウトマウスの作成と解析、および創薬を視野に入れた活性ペプチドを使った実験を行う。

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、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。SJS に関しては臨床的に2例の新しい候補検体を得たが、パールカン免疫染色及び PCR スクリーニングによりパールカン遺伝子の変異は否定的であった。ミオトニアと骨格異常の組み合わせから SJS と診断されている患者群の中にヘテロな疾患群が存在することが示唆された。パールカンノックアウトマウスのレスキューマウス (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、神経筋接合部の異常に起因することが示唆された。今年度はさらに横隔筋を用いた微小電極による終板電位解析を加え、電気生理学的にも AChE の部分欠損を証明した。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. 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。

3. 代表的な基底膜構成分子ラミニンに関してはラミニン α 2鎖の異常による先天性筋ジストロフィーが有名であるが、主任研究員らはラミニン α 1鎖のノックアウトマウス作成を行いその機能解明を行った。ラミニン α 1鎖完全欠損マウスは胎生9.5日頃までに死亡する早期胎生致死であることがわかった。さらに筋におけるラミニン α 1鎖の機能を解明するため、遺伝子改変技術により、この胎生致死をレスキューしている。

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。VI型コラーゲン部分欠損疾患のグループでは新規原因分子の関与が考えられ、特にコラーゲン線維を束ねる small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) のグループの一つである Biglycan の関与も報告されたことから他の SLRPs も原因遺伝子の候補として検討していく必要がある。その他、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他の骨格筋の MEPP 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. 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。

3. ラミニン α 1 鎖完全欠損マウスは胎生 9.5 日頃までに死亡する早期胎生致死であるので、さらに筋におけるラミニン α 1 鎖の機能を解明するため、遺伝子改変技術により、この胎生致死をレスキューしている。これにより、神経、筋の発生、分化、維持に関するラミニン α 1 鎖の機能が解明されると期待される。

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）
主任分担研究報告書

Schwartz-Jampel 症候群モデルマウスの作成と解析

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 福留隆泰	順天堂大学脳神経内科 国立病院機構 長崎精神医療センター 神経内科
	小崎慶介	米国国立衛生研究所
	山田吉彦	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、神経筋接合部由来と考えられた。神経筋接合部の異常をさらに検討するため、横隔膜を用いて微小電極による終板電位を検討した結果、電気生理学的にも AChE の部分欠損が確認された。本マウスは SJS 患者の病態を再現しており、治療開発のモデルマウスとして有用と考えられた。

A. 研究目的

主任研究者らは Schwartz-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。生後 3 ヶ月の SJS マウス及びコントロールマウス（週令、性別を揃えた C57BL6）レスキューされたノックアウトマウス（P-/- Tg マウス）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。対象として同性、同年齢のマウスを検討した。電気生理学的検討としては、SJS マウスおよび control マウスから横隔膜神経筋標本を作成し、微小電極法にて、MEPP、EPP および静止膜電位を記録した。また MEPP 記録では、neostigmine 1.0 μ g/mL を灌流液に加えその作用を検討した。

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12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。

【筋病理】生後2週、3ヶ月、6ヶ月、54ヶ月のレスキューマウス:P-/-Tgマウスにおいて筋病理の経時的変化を観察した。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。54ヶ月を経過しても筋は再生能を有し、線維化は中等度に留まった。

【微小電極を用いた終板電位】

MEPP振幅はcontrolに比べて有意に増加していたが、EPP quantal contentおよび静止膜電位はcontrolと比べて有意差を認めなかった。MEPPのdecay time constant (τ)はcontrolに比べて延長していなかったが、EPPの τ は延長していた。controlマウスではNeostigmineにより、MEPP振幅は有意に増加し τ も延長したが、SJSマウスでは τ 延長したものの、MEPP振幅増加は有意ではなかった。これらの所見から神経筋微小電極を用いた終板電位の検討からも終板におけるアセチルコリンエステラーゼの部分欠損を示唆する所見が得られた。

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。このことを確認するため横隔膜筋サンプルを用いて微小電極終板電位を検討した。電気生理学的にもAChE部分欠損を認めたが、針筋電図でのミオトニア電位への直接的説明は不十分であ

った。他の骨格筋を用いた検討も必要であると思われた。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

軟骨以外でパールカンを欠損するマウスにおいて、SJSにおけるミオトニアと同様な筋電図所見が再現された。このマウスにおいて、形態学的、生理学的にアセチルコリンエステラーゼの部分欠損が確認され、神経筋接合部でのアセチルコリン伝達の異常の可能性が示唆された。今後、このマウスを用いてSJS患者に観察されるミオトニアと神経筋接合部の異常の関連についてさらに検討し、治療研究をすすめることが可能となった。

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ト疾患での機能骨格形成における役割とヒト遺伝子疾患の解明. *生化学*, 73:1257-1261, 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. 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
- SchwartzJampel 症候群モデルマウスにおけるミオトニア発症機序の解明 平澤恵理・小崎 圭介、西野一三、埜中征哉、水野美邦・山田吉彦 第44回日本神経学会総会、2003

年5月

- 科学研究費補助金特定領域研究 糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節 第一回夏季シンポジウム神経筋接合部における糖鎖複合体の研究 8月21-22日浜松、静岡
- 76回日本生化学会大会 (シンポジウム基底膜による細胞機能制御の分子機構) Perlecan is essential for cartilage development and neuromuscular junction function 10月15-18日 2003 横浜
- 「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」班 (清水班) Small group workshop 先天性筋ジストロフィー研究の進歩：翻訳後修飾異常と筋ジストロフィー、パールカンの神経筋発生及び疾患における役割 平成15年10月4日 全共連ビル 東京
- 平成15年度 厚生労働省 精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」Schwartz-Jampel 症候群におけるミオトニア発症機序の解明 清水班 班会議平成15年12月5日-6日 全共連ビル 東京
- 第10回プロテオグリカンフォーラム プロテオグリカンと疾患—最近の知見 神経筋の発生と疾患におけるパールカンの役割 平成16年1月24日 東京医科歯科大学、東京

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よる先天性筋ジストロフィー

分担研究者	林 由起子	国立精神・神経センター神経研究所
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 杉江和馬 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： 遺伝性筋疾患の中には細胞外マトリックス構成蛋白質自体の異常によるものの他、筋細胞膜内外をつなぐ分子の異常が原因となる場合も近年注目されている。我々は VI 型コラーゲンの異常による Ullrich 病とラミニン受容体である α -ジストログリカンの糖鎖修飾異常を原因とする筋ジストロフィー（ α -ジストログリカノパチー）を中心に検討した。臨床的に Ullrich 病と診断され、免疫組織化学的に VI 型コラーゲンの部分欠損を示す症例について、その局在ならびに遺伝子変異について検討した。その結果、部分欠損症例では VI 型コラーゲン遺伝子に異常を有しないものが多く、何らかの一次的原因により VI 型コラーゲンが基底膜に局在できないものと考えられた。一方、 α -ジストログリカノパチーのほとんどは、本邦に特異的にみられる福山型先天性筋ジストロフィーであるが、共通の臨床病態を示す Walker-Warburg 症候群、muscle-eye-brain 病なども少ないながら見いだされ、いずれの場合も基底膜の主成分であるラミニンとの結合能が消失していることを明らかにした。以上の結果から細胞外マトリックス蛋白質の局在異常や、筋細胞膜内外の蛋白質相互関連の障害が筋の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、筋細胞膜内外でのシグナル伝達の重要性も示唆される。

A. 研究目的

細胞外マトリックス構成蛋白質の異常は様々な疾患を引き起こすことが知られている。骨格筋においては、各筋細胞の周りに基底膜とよばれる特殊な細胞外マトリックスが存在し、これは筋細胞を保護するとともに筋の発生・分化、さらには再生などの重要な細胞生物学的機能を担っているものと考えられている。細胞外マトリックス構成蛋白質の異常による筋疾患としてこれまでに、基底膜の主成分ラミニン $\alpha 2$ 鎖遺

伝子異常によるメロシン欠損型ならびに VI 型コラーゲンの欠損による Ullrich/Bethlem 型が知られている。さらに、筋細胞膜と基底膜を結合する α -ジストログリカンの糖鎖の修飾異常が基底膜の脆弱性を伴った筋ジストロフィーを生じることが明らかとなり、 α -ジストログリカノパチーとして近年注目を集めている。

我々は昨年度に引き続き Ullrich 病に焦点を当て、特に VI 型コラーゲンの部分欠損症例について免疫組織化学的、分子遺伝学的解析を行

った。また、本邦に特異的に多い福山型先天性筋ジストロフィーをはじめとする α -ジストログリカノパチーについて臨床病理学的、分子生物学的に検討した。

B. 研究方法

臨床的に Ullrich 病と診断され、VI 型コラーゲンの部分欠損を認めた 8 例について生検筋を用いて免疫組織学的に関連分子の発現を検討した。また VI 型コラーゲン遺伝子 *COL6A1*, *A2*, *A3* 並びに結合蛋白質である decorin, biglycan 遺伝子の翻訳領域の全シーケンスを行った。 α -ジストログリカノパチーについては、原因遺伝子として同定されている *FUKUTIN*, *POMT1*, *POMGnT1*, *LARGE*, *FKRP* 各遺伝子について変異スクリーニングを行い、臨床病理学的に比較検討した。

C. 研究結果

Ullrich 病 8 例の部分欠損例について他の基底膜蛋白質、ならびに筋細胞膜蛋白質と VI 型コラーゲンとの局在を検討した。その結果、部分欠損症例では VI 型コラーゲンが間質には存在するものの、基底膜には局在していないことを明らかにした。遺伝子解析の結果、8 例中 1 例でのみ *COL6A2* に変異が見いだされたが、他の 7 例には明らかな変異は認められなかった。また、VI 型コラーゲン結合蛋白質である decorin, biglycan 遺伝子にも異常は見いだされなかった。

α -ジストログリカノパチー 80 例以上について *FUKUTIN* 遺伝子の解析を行った結果、そのほとんどに福山型の創始者変異である 3-kb 挿入が認められた。一方 *POMT1*, *POMGnT1* に変異を有する Walker-Warburg 症候群 1 例、muscle-eye-brain 病 2 例も見いだした。臨床的には福山型と比較して中枢神経ならびに眼病変が強く認められたが、筋病理学的にはきわめて似た症状を呈していた。またさらに肢帯型筋ジストロフィー 2I 型家系において新規 *FKRP* 変異を見いだした。これら α -ジストログリカノパチー症例の骨格筋では α -ジストログリカンの糖鎖修飾不全によりラミニン結合能が失わ

れていることを overlay assay で確認した。

D. 考察

VI 型コラーゲン部分欠損症例においては、一例でのみ *COL6A2* に異常が発見され、部分欠損型 Ullrich 病も *COL6* の異常による場合があると考えられた。一方、残る 7 症例については VI 型コラーゲンの局在異常は二次的なものであり、VI 型コラーゲンを基底膜に局在させる何らかの因子が欠損している可能性が示唆され、今後関連分子についての検討を進めていく予定である。

α -ジストログリカノパチーでは糖鎖修飾異常によりラミニン結合能が失われ、細胞膜内外の蛋白質相互連関が損なわれることが病因と考えられる。今後、 α -ジストログリカノパチーを引き起こす各々の原因遺伝子産物がどのように糖鎖修飾に関わっているかを検討していく予定である。

E. 結論

VI 型コラーゲンの部分欠損を示した Ullrich 病患者一例でのみしか *COL6* に変異が見出されなかったことから、部分欠損症例においては VI 型コラーゲンを基底膜に局在させる未知の因子が関与しているものと推定され、今後検索を進めていく。また、本邦において福山型以外にも稀ながら類縁疾患が存在することが明らかになった。今後発症機序についての検討を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Awaya A, Suzuki Y, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma. *Neurology* 62:620-623, 2004.
- Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Murakami N, Sakuta R, Mochizuki M, Michele DE,

- Campbell KP, Nonaka I, Nishino I. POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in alpha-DG. *Neurology* 62:1009-11, 2004.
- Goto K, Nishino I, Hayashi YK. Very low penetrance in 85 Japanese families with facioscapulohumeral muscular dystrophy 1 A. *J Med Genet* 41: E12. 2004.
 - Yamanaka G, Goto K, Ishihara T, Oya Y, Miyajima T, Hoshika A, Nishino I, Hayashi YK. FSHD-like patients without 4q35 deletion. *J Neurol Sci.* 219:89-93, 2004.
 - Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Imazawa M, Goto Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I : Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 279: 11402-11407, 2004
 - Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, Van Der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM. Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet.* 12: 2895-2907, 2003.
 - Schroder R, Reimann J, Salmikangas P, Clemen CS, Hayashi YK, Nonaka I, Arahata K, Carpen O. Beyond LGMD1A: myotilin is a component of central core lesions and nemaline rods. *Neuromuscul Disord* 13: 451-455, 2003.
 - Keira Y, Noguchi S, Minami N, Hayashi, YK, Nishino, I. Localization of calpain 3 in human skeletal muscle and its alteration in limb-girdle muscular dystrophy2A muscle. *J Biochem* 133, 659-664, 2003.
 - Driss A, Noguchi S, Amouri R, Kefi M, Sasaki T, Sugie K, Souilem S, Hayashi YK, Shimizu N, Minoshima S, Kudou J, Hentati F, Nishino I. Fukutin-related protein gene mutated in the original kindred limb-girdle MD 2I. *Neurology* 60: 1341-1344, 2003.
 - Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK. Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. *J Neurol Sci* 211: 23-28, 2003.
 - Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Many H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, Van Coster R, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, 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.
 - Hayashi YK. Membrane-repair machinery and muscular dystrophy. *Lancet* 362: 843-844, 2003
- ## 2. 学会発表
- Matsumoto H, Noguchi S, Ogawa M, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I: Subcellular localization of fukutin and FKRP in muscle cells. 8th International Congress of the World Muscle Society. Sep. 2003
 - Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Michele DE, Campbell KP, Nonaka I, Nishino I: Abnormal glycosylation and loss of laminin binding activity of alpha-dystroglycan is associated with POMT1 mutation causing Walker-Warburg syndrome. 8th International Congress of the World Muscle Society Sep. 2003
 - Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Diagnostic approaches to limb-girdle muscular dystrophy. The 20th annual conference on neuromuscular diseases in childhood, Aug. 2003

- Hayashi YK, Noguchi S, Matsumoto H, Ogawa M, Murayama K, Nonaka I, Nishino I: Molecular analysis of α -dystroglycanopathy. Vth Japanese-French workshop on muscular dystrophies -A challenge to knock out muscular dystrophies-. June, 2003
- Nishino I, Sugie K, Ishikawa H, Noguchi S, Ogawa M, Hayashi YK, Nonaka I: Collagen VI deficiency is the second leading cause of congenital muscular dystrophy in Japan. Vth Japanese-French workshop on muscular dystrophies -A challenge to knock out muscular dystrophies- Tokyo 6, 13, 2003
- 林 由起子. α -ジストログリカン関連筋ジストロフィーの遺伝子解析. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」班(清水班) Small group workshop: 先天性筋ジストロフィー研究の進歩: 翻訳後修飾異常と筋ジストロフィー. 2003年10月
- 林 由起子. ジスフェルリン関連蛋白質の発現. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」班(清水班) Small group workshop: 三好型筋ジストロフィー/LGMD2B; ジスフェルリンの機能とジストロフィー. 2003年10月
- 林 由起子, 野口 悟, 藤田雅子, 黒川留美, 後藤加奈子, 西野一三: エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー(EDMD)における遺伝子発現解析(II-PH-208) 第44回日本神経学会総会 2003年5月
- 松本 浩, 小川 恵, 金 大成, 野口 悟, 林 由起子, 西野一三: 臨床的に WWW/MEB と診断された6例における α -DG 発現の検討. 第44回 日本神経学会総会 横浜, 5, 16, 2003
- 松本 浩, 林 由起子, 西野一三, 埜中征哉: 福山型先天性筋ジストロフィー患者における遺伝子診断. 第45回 日本小児神経学会総

会 福岡, 5, 22, 2003

- 戸田達史, 斎藤加代子, 山内秀雄, 大沼 晃, 林 由起子, 西野一三: Muscle-eye-brain 病患者の世界各地における分布とその広い臨床スペクトラム. 第45回 日本小児神経学会総会 福岡, 5, 22, 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）
主任分担研究報告書

細胞外マトリックスラミニン活性ペプチドによる糖鎖超分子複合体と

細胞内シグナルの修飾に関する研究

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	市川直樹	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
	岩淵和久	順天堂大学 性差環境医学研究センター
	野水基義	東京薬科大学 薬学部、病態生化学教室

研究要旨：生体の分化、組織修復などにおける基底膜の重要性が解明されつつある。筋における基底膜分子の細胞内シグナルへの関与を検討するため、特に糖鎖超分子複合体形成への細胞外マトリックスの関与に着目し、神経筋結合部への分子クラスタリングをそのモデルとして解析を進めている。筋培養系における外来性のアグリニン、ラミニンの働きを検討する。さらに、ラミニン $\alpha 1$ 鎖の活性ペプチドのうち、細胞接着や神経突起伸長に強い活性を持つ AG73 につき C2C12 由来の筋細胞を用いて、創薬的視点からペプチドによる細胞内シグナルの制御の可能性を探った。

A. 研究目的

基底膜の生体の分化、組織修復などにおける重要性が解明されつつある。筋においても基底膜は筋収縮を機械的に支える支持組織としてのみならず、分化や維持機構における細胞内シグナルを制御する働きを担っておりその重要性がますます注目されている。筋培養系において外来性のアグリニン、ラミニンが各々独立に神経筋接合部分子の凝集を起こすことが報告されているが、その差異についての詳細は明らかではない。主任研究員らは、糖鎖超分子複合体形成への細胞外マトリックスの関与に着目し、神経筋結合部への分子クラスタリングをそのモデルとして解析を進める。ラミニンは全ての基底膜に存在する細胞外マトリックス糖蛋白質で神経突起伸長、血管新生、がん細胞の増殖、転移などの活性を持つ。その生物学的活性について最もよく研究されているラミニン $\alpha 1$ 鎖の活性ペプ

チドのうち、細胞接着や神経突起伸長に強い活性を持つ AG73 につき C2C12 由来の筋細胞を用いて、創薬的視点から細胞内シグナルの制御の可能性を探る。

B. 研究方法

細胞株 C2C12 を用いて筋管細胞に分化後、アグリニン、ラミニン、AG73 を培養液中に添加した。アセチルコリン受容体 (AChR) 分子を蛍光ラベル α B T、GM1 を蛍光ラベルコレラトキシン (CTx)、コレステロールをフィリピンでラベルし可視化、経時的に観察する。また、ビオチン化 AG73 によりペプチドと分子の共局在を観察する。脂質ドメインと神経筋分子の共局在の有無につき検討する。1% Triton X, sucrose gradient 処理により細胞の脂質ドメイン (rafts 分画) を採集し、2次元電気泳動によりタンパク質レベルの変動を検討する。GM1 の

リソ体により GM1 をブロックし、これによる変化を確認する。

C. 研究結果

アグリン、ラミニンの添加により各々違った形状、違った経時的変化をとる AChR 分子クラスターが蛍光ラベル α B T にて観察された。CTx, フィリピンによる脂質のラベルは AChR のラベルと必ずしも一致していなかった。ピオチン化 AG73 と α B T は部分的に共局在が観察された。GM1 のリソ体による GM1 のブロックにより、アグリン、ラミニンの添加による AChR 分子クラスターが阻害された。

D. 考察

外来性アグリン、ラミニンが各々異なる経路にて神経筋接合部分子をクラスタリングする可能性が示唆された。2次元電気泳動にてマイクロドメイン分画のスポットに違いが認められることよりタンパク質レベルでの変化が示唆され、今後質量分析なども含め、シグナル分子の変動などをタンパク質レベルで確認する必要があると考えられた。AG73 添加によっても AChR 分子のクラスターが観察されることより、このペプチドがなんらかの細胞内シグナルの変動を起こすことが示唆された。AG73 はヘパリン、ヘパラン硫酸鎖と結合することよりシンデカンなどのヘパラン硫酸プロテオグリカンなどを介して糖鎖超分子複合体を修飾する可能性が示唆された。

E. 結論

ラミニン α 1 鎖活性ペプチドによるシグナル分子が制御されうる可能が示唆された。ペプチドは人体への投与の可能性が高く、今後創薬的見地から、マウスモデルなどを使った *in vivo* の検討をすすめていく。

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ト疾患での機能骨格形成における役割とヒト遺伝子疾患の解明. *生化学*, 73:1257-1261,2001
- 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. 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

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

- Schwartz-Jampel 症候群モデルマウスにおけるミオトニア発症機序の解明 平澤恵理・小崎 圭介、西野一三、埜中征哉、水野美邦・山田吉彦 第44回日本神経学会総会、2003年5月
- 科学研究費補助金特定領域研究 糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節 第一回夏季シンポジウム神経筋接合部における糖鎖複合体の研究 8月21-22日浜松、静岡
- 76回日本生化学会大会 (シンポジウム基底膜による細胞機能制御の分子機構) Perlecan is essential for cartilage development and neuromuscular junction function 10月15-18日 2003 横浜
- 「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」班 (清水班) Small group workshop 先天性筋ジストロフィー研究の進歩: 翻訳後修飾異常と筋ジストロフィー、パルカンの神経筋発生及び疾患における役割 平成15年10月4日 全共連ビル 東京
- 平成15年度 厚生労働省 精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」Schwartz-Jampel 症候群におけるミオトニア発症機序の解明 清水班 班会議平成15年12月5日-6日 全共連ビル 東京
- 第10回プロテオグリカンフォーラム プロテオグリカンと疾患-最近の知見 神経筋の発生と疾患におけるパルカンの役割 平成16年1月24日 東京医科歯科大学、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
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；ラミニン α 1鎖欠損マウス作成と生体での機能解明に関する研究

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	小川順子	順天堂大学 老人性疾患病態治療研究センター

研究要旨： ラミニン α 1鎖の発生や疾患における働きを解明するためラミニン α 1鎖遺伝子（Lama1）欠損マウスを作成し、ホモ欠損胚を免疫組織、免疫電顕など形態的に解析した。新生仔の中にホモ欠損マウスは認められず、胎生致死が考えられた。ホモ欠損胚は正常な胚盤胞を形成し胚盤胞培養では野生型同様に栄養膜細胞と壁側内胚葉の分化、遊走が確認された。ホモ欠損胚は正常に着床するが、ライヘルト膜が形成されず、E6.5以後野生型に比較し胚の大きさが小さくなることがわかった。しかし胚盤葉上層と腹側内胚葉の境界にある基底膜は形成されており、胚盤葉上層の空洞化も観察されラミニン γ 1鎖欠損マウスとの差異が認められた。この基底膜には免疫組織学的にラミニン α 5鎖が発現しており α 1鎖との相補的働きが示唆された。発生に伴い野生胚では体腔が形成され胚盤葉上層は極性を持つが、ホモ欠損胚では胚盤葉上層は円筒状から変化せず、腹側内胚葉も極性を欠損し多層性に増殖する。また、胚体外組織の分化、増殖も観察されず、ホモ欠損胚は野生型に比べてはるかに小さくなっていた。PCR法による胚の遺伝子型解析の結果、ホモ欠損胚は胎生9.5日頃までに吸収され消滅することが示された。マウス初期発生においてラミニン α 1鎖はライヘルト膜の形成に必須の働きをもち、胚体組織形成や胚の極性の決定に重要な働きをしていることが示唆され、初期発生におけるラミニン α 5鎖との機能の違いが明らかになった。

A. 研究目的

細胞をとりまく細胞外マトリックスである基底膜は、筋収縮を機械的に支持する構造というだけでなく、筋の発生、分化、再生においてシグナル伝達のスキャフォールドとして重要な働きを有することが知られている。また、筋疾患においては α ジストログリカンを介する細胞外マトリックスと細胞内筋タンパク質の連合ということが非常に

重要であることがこれまでに示されてきた。主任研究員らは基底膜成分の中でも α ジストログリカンに強い結合性を示すパルカン、ラミニン、アグリンと筋疾患の関連性に注目して研究を進めている。ラミニンファミリーの分子は α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の3種類のサブユニットから構成されるヘテロ三量体分子で、基底膜に存在する細胞外マトリックスの主要成分となっている。サブユニット鎖

にはそれぞれに複数のホモログが存在し、現在までに $\alpha 1 \sim \alpha 5$ 、 $\beta 1 \sim \beta 3$ 、 $\gamma 1 \sim \gamma 3$ が同定され、また、それらの鎖の組み合わせは少なくとも 15 種類が確認され、ラミニン-1 からラミニン-15 と呼ばれている。ラミニンファミリーの分子はそれぞれに特徴的な機能ドメインを持ち、その発現も時間的・領域的に特異的である。基底膜成分の異常に起因する筋疾患の一つとして、ラミニン $\alpha 2$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖で構成されるラミニン-2 を欠損したラミニン-2 欠損型筋ジストロフィー（メロシン欠損型）が知られており、ラミニン $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (LAMA2) のノックアウトマウス (dy3K/dy3K マウス) でその筋変性機序の検討がなされている。同じ $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖とラミニン $\alpha 1$ 鎖から構成されるラミニン-1 は、古くからその精製が行われ、培養細胞を使った実験において細胞移動、接着、神経突起伸長などの強い活性が示され、ペプチドを用いた実験からも多くの活性ドメインを持つことで知られている。最近になってその発現領域は時期・部位的に非常に限局されていることが解り、生体における機能解明が待たれている。そこで我々は細胞外マトリックスの異常における筋崩壊のメカニズムを探る *in vitro*, *in vivo* の実験系を確立することを目的としてラミニン $\alpha 1$ 鎖遺伝子 (LAMA1) 欠損マウスを作成した。

B. 研究方法

将来的に多種の組織での機能解明を行うため、Cre-loxP システムを用いた遺伝子改変を計画した。これは Cre リコンビネースタンパク質発現トランスジェニックマウスとの交配により組織特異的、時期特異的に遺伝子を改変するようにデザインした。同時に ES 細胞の段階で Cre によって遺伝子を欠損させ作成された LAMA1 完全欠損マウスを作成しその解析を行った。

C. 研究結果

LAMA1 ヘテロ欠損マウスは外見上特に異常が認められず繁殖も可能であった。しかし、新生仔の中にホモ欠損マウスは認められなかった。発生の時期を追って調べると、ホモ欠損胚は胎生 3.5 日目には正常の形態をした胚盤胞を形成するが、胎生 9.5 日目には認められなくなっていた。致死の原因を明らかにするために着床後の発生段階を追って免疫組織学的に検索した。欠損マウスの確認は抗ラミニン $\alpha 1$ 鎖抗体を用い、胚構造の確認には腹側内胚葉のマーカーである DBA レクチンを使用

した。また基底膜構造を見るために基底膜成分であるパールカン、IV 型コラーゲンに対する抗体を用いて検索した。胎生 5.5 日の野生胚では遠位内胚葉の遊走とそれから分泌される細胞外マトリックスで形成される基底膜が観察され、ラミニン $\alpha 1$ 鎖、パールカン、IV 型コラーゲンの抗体に対し陽性であった。欠損マウス胚では栄養外胚葉層と、それに沿って遊走する壁側内胚葉は確認されるが、基底膜成分であるパールカン、IV 型コラーゲンの免疫反応は拡散し、基底膜様の構造が観察されなかった。しかし将来の胚体を生じる胚盤葉上層と、それをとりまく腹側内胚葉の構造は野生型とかわらず正常な発生をしているように観察され、大きさにも違いが見られなかった。胎生 6.5 日の野生胚では壁側内胚葉から分泌される基底膜成分によってライヘルト膜が形成され、胎盤の原基となる胚対外組織の分化が確認された。しかし、ホモ欠損マウス胚においてはライヘルト膜が形成されず、胚盤葉上層とそれをとりまく腹側内胚葉は確認されるが、胚体外組織の分化が観察されなかった。胚全体の大きさは野生型に比べて小さかった。胎生 7.5 日の野生胚では体腔が形成され胚盤葉上層は極性を持つが、LAMA1 遺伝子ホモ欠損胚は野生型に比べてはるかに小さく、胚盤葉上層は円筒状から変化せず、腹側内胚葉が異常な極性をもってその周囲をとりまいていた。胎生 8.5 日を解剖したところ吸収された胚が多く観察され、残った胚を PCR 法によって遺伝子型解析した結果からホモ欠損マウスが胎生 8.5 日前後に吸収され消滅することが示唆された。ラミニン $\alpha 1$ 鎖が欠損することで、初期胚の細胞にどのような変化が起きているのかを観察するために、胎生 3.5 日目の胚盤胞を回収してゼラチンコートした培養皿上で培養し観察を行った。野生胚および LAMA1 遺伝子ホモ欠損胚を培養すると、胚盤胞を構成する内部細胞塊および栄養外胚葉細胞がそれぞれ特徴的な形態を示して増殖した。培養 5 日目において、野生型胚の培養では胚盤胞から遊走した栄養外胚葉細胞上に、内部細胞塊が円筒状に増殖し、基底膜に覆われているのが観察された。いくつかの野生型胚においては腹側内胚葉様の細胞と層構造を形成し、細胞塊から遊走する壁側内胚葉様の細胞も観察された。ホモ欠損マウスの胚盤胞でも同様

に、増殖した栄養外胚葉細胞上に内部細胞塊が円筒状に増殖し腹側内胚葉様細胞も観察された。しかしその層構造は不明瞭で、基底膜によって覆われていなかった。

D. 考察、E. 結論

LAMA1 ホモ欠損マウスにおいて、*in vivo* と *in vitro* の実験により、

- 1) ライヘルト膜の形成がおこらず、胎生 8.5 日前後で致死となる。
- 2) 内部細胞塊からの腹側内胚葉、壁側内胚葉の分化、および胚葉上層形成は欠損マウス胚においても正常におこっていることがわかった。

このことから、LAMA1 遺伝子欠損マウス胚のライヘルト膜の形成を助けることで延命し、初期胚発生以降の更に分化した細胞でもラミニン α 1 鎖の機能が解析できるのではないかと考えられた。今後はこの結果をさらに発展させるとともに、組織、時期特異的に Cre タンパク質を発現するマウスとの交配によって得た時期特異的、領域特異的 LAMA1 欠損マウスの作成を進める予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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ト疾患での機能骨格形成における役割とヒト遺伝子疾患の解明. *生化学*, 73:1257-1261, 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

- The distinct role of laminin-1 in early mouse development J. Ogawa, H. Kurihara, N. Tada, T. Sasaki, K. , Y. Yamada, E. Arikawa-Hirasawa April 17-21 D.C.U.S.A
- 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
- SchwartzJampel 症候群モデルマウスにおけるミオトニア発症機序の解明 平澤恵理・小崎 圭介、西野一三、桝中征哉、水野美邦・山田吉彦 第 44 回日本神経学会総会、2003 年 5 月
- 科学研究費補助金特定領域研究 糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節 第一回夏季シンポジウム神経筋接合部における糖鎖複合体の研究 8月21-22日浜松、静岡
- 76回日本生化学会大会 (シンポジウム基底膜による細胞機能制御の分子機構) Perlecan is essential for cartilage development and neuromuscular junction function 10月15-18日 2003 横浜
- 「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」班 (清水班) Small group workshop 先天性筋ジストロフィー研究の進歩：翻訳後修飾異常と筋ジストロフィー、パールカンの神経筋発生及び疾患における役割 平成15年10月4日 全共連ビル 東京
- 平成15年度 厚生労働省 精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」 Schwartz-Jampel 症候群におけるミオトニア発症機序の解明 清水班 班会議平成15年12月5日-6日 全共連ビル 東京
- 第10回プロテオグリカンフォーラム プ