

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16年度分)

主任研究者 平澤恵理

分担研究者 林由起子

村山季美枝

多田昇弘

平成17年4月15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16年度分)

主任研究者 平澤恵理

分担研究者 林由起子

村山季美枝

多田昇弘

平成17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 (順天堂大学大学院医学研究科)

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-第3報

平澤 恵理 (順天堂大学大学院医学研究科)

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 その2

林 由起子 (国立精神・神経センター神経研究所)

3. シグナル伝達に関与する質量分析法の高精度・ハイスループット化の試み

村山 季三枝 (順天堂大学大学院医学研究科)

4. 細胞外マトリックス；ラミニン $\alpha 1$ 鎖欠損マウス作成と生体での機能解明に関する研究—第2報

平澤 恵理 (順天堂大学大学院医学研究科)

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

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 順天堂大学大学院医学研究科
老人性疾患病態治療研究センター
順天堂大学医学部 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、その治療への応用を目指した。最近、細胞外マトリックスの欠損により発症することが解明された遺伝性筋疾患として、パールカン欠損による Schwartz-Jampel 症候群 (SJS)、VI 型コラーゲン欠損による Ullrich 病の遺伝子異常を解析した。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。また、臨床的に Ullrich 病と診断された中に VI 型コラーゲンの部分欠損例が多数存在し、VI 型コラーゲン関連分子の遺伝子異常が示唆された。SJS に関してはモデルマウスの作成と解析により、遺伝子機能と疾患の関連が明らかになってきた。モデルマウスでは、SJS における臨床症状、筋病理変化、電気生理学的所見が良く再現されており、既存の薬物を使った治療実験も可能となった。細胞外マトリックスの主要な活性をになうラミニンのうち、特に生物活性の強いラミニン $\alpha 1$ 鎖につき遺伝子欠損モデルを作成した。完全欠損マウスでの胎生期致死性の解明と生体におけるラミニンの機能解明のためのコンディショナルノックアウトマウスの作成を行った。また、新しい治療開発には、蛋白質レベルでの分子機構解明が重要と考えられる。細胞外マトリックスは他の分子と共同して組織の構築、維持機能を果たすと考えられ、細胞膜との相互作用、シグナル伝達の制御などにおける共通の機能が考えられる。これらをプロテオミクスの手法を用いて解明するため、効率的な方法としてシグナル伝達の場合であるマイクロドメイン（脂質ラフト）に着目した。プロテオミクス、リピドミクスの高精度化、ハイスループット化を試み、細胞内シグナル制御機構の分析を目指した。これらの手法を用いて細胞外マトリックス疾患における共通機序の解明を行い、疾患に対する効果的な治療を開発する道筋を開いた。

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

【細胞外マトリックス異常症における遺伝子解析及び Schwartz-Jampel 症候群 (SJS) モデルマ

ウス作成とその解析】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、遺伝子異常と臨床症状との関連性を検討した。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た。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軟骨病変をレスキューし延命をはかり、Schwartz-Jampel 症候群 (SJS) モデルマウスとした。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た。

【プロテオミクス解析】細胞外マトリックスの異常による筋崩壊をプロテオミクスの手法を用いて解明するため、効率的な方法を検討した。そのひとつとしてシグナル伝達の場合としてのマイクロドメイン (脂質ラフト) 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解明する系をセットアップする。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を確立した。脂質ラフトではシグナル伝達を受容体蛋白質とともに多様な糖脂質が存在しており、これらの分子と細胞外マトリックスの糖鎖成分との相互作用の解析も重要と考えられるので、リポドミクスの手法も取り入れ、脂質ラフトに存在する糖脂質の構成もラクトシルセラミドを中心に解析した。

【ラミニン $\alpha 1$ 鎖の機能解析】細胞外マトリックス、ラミニンに関してはラミニン $\alpha 1$ 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った。ノックアウトマウスの作成に際しては、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。また、細胞外マトリックスのシグナル制御機構を解明するため、ラミニン $\alpha 1$ 鎖の活性ペプチドを用いて、細胞外マトリックスの脂質ラフトの形成機構などを検討した。

B. 研究結果

【細胞外マトリックス異常症における遺伝子解析及び Schwartz-Jampel 症候群 (SJS) モデルマウス作成とその解析】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。SJS に関しては臨床的 SJS と診断された患者 3 例を新たに解析した。2 例は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。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。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。

パールカンノックアウトマウスの軟骨疾患由来の致死性のレスキューに成功した (P-/-Tg マウス)。P-/-Tg マウスは軟骨には正常組み換えパールカンが発現して軟骨異常が矯正されるが、筋等軟骨以外の組織ではパールカンは発現せず、異常が予測された。実際、P-/-Tg マウスは電気生理学的に筋の持続収縮を認め、眼裂の狭小化を認めた。これらの異常は SJS 患者に特徴的なものであり、SJS の発症機序、治療薬剤の開発に有効な動物モデルと考えられる。P-/-Tg マウス (以後 SJS マウス) では筋肥大、壊死再生、

筋線維内構築異常を認めた。また、パールカンノックアウトマウス同様、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) の欠損を認めた。このマウスの電気生理学的検討では、針筋電図により SJS 患者と類似した持続性自発性電位が確認された。P-/Tg マウスのミオトニアの成因に関して微小電極を用いた終板電位を検討した。MEPP、EPP quantal content および静止膜電位を検討した結果、筋の膜電位の異常は検出されず、パールカン欠損によるミオトニアは NMJ より上流の異常に起因する可能性が示された。また、終板における AChE の部分欠損を示唆する所見が得られた。40Hz の高頻度連続神経刺激 SJS マウスでは神経終末からアセチルコリンが刺激に対して放出されやすいことが示唆された。

【プロテオミクス解析】 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。この手法を用いて、脂質ラフトの 2 次元電気泳動解析とスポット採取からの質量分析の系を確立した。また、脂質ラフトの構成分子うち脂質成分の解析のためのリピドミクスについてもラクトシルセラミドを中心に検討し、微量サンプルから良い結果を得た。

【ラミニン α 1 鎖の機能解析】 ラミニンに関してはラミニン 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 8.5 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。さらに神経、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、胚外組織のラミニンを残し胚のラミニンを欠損させたまま出生させることに成功した。さらに、ラミニン α 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 や PC12 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制御の可能性を検討した。ラミニン α 1、及びその G ドメイン由来の活性ペプチド AG73 が脂質ラフトの主要構成成分である GM1 と結合し、シグナルを増強する可能性が示唆された。

D. 考察

ヒトにおけるパールカンの遺伝子異常は 2000 年にフランスで初めて報告されたが、その後蛋白レベルでの解析を含む分子機構解明が主任研究者のグループを中心に進められた。SJS ではパールカンが細胞外に分泌され、部分的に機能すること、このためパールカン完全欠損による周産期致死性疾患 (DDSH) と異なり予後が良好であることを報告してきた。さらに本研究期間中に SJS モデル動物の作成と評価が達成された。このモデル動物において SJS における筋症状が再現されていることを確認し、治療研究に有用なモデル系を確立した。*In vivo* での薬物治療検討が可能になったことは大きな成果である。このマウスの解析により、パールカン欠損による筋の収縮異常には神経終末からの ACh の遊離の亢進、AChE 欠損による ACh 分解の低下が原因していることが示されたが、さらに筋そのものの易収縮性を第 3 の要因として検討する必要がある。これには微細構造上の変化や、カルシウムシグナルの変化などが関与する可能性がある。これまで細胞外マトリックスの異常による筋疾患発症機構は基底膜から筋収縮タンパク質を連携するジストロフィン関連分子群の異常と一義的に考えられてきた。しかし、本研究によりパールカン、VI 型コラーゲンによる新たな機能が解明され、ジストロフィン関連分子異常性疾患とは異なる新たな筋疾患の分子機構が示唆され、重要な成果であった。細胞外マトリックスは基底膜のような支持組織としての重要性が注目されてきたが、細胞の運命を左右するシグナル制御に関わることが示唆される。このことをさらに検討するために必要なプロテオミクスの効率的な方法が検討された。患者筋での応用を考え高精度・ハイスループット化の技術開発を検討した。シグナルの場である脂質ラフト、マイクロドメインの採取とそのプロテオ

ミクス（2次元電気泳動により得られたスポットの質量分析）の系を確立した。今後モデル動物、患者サンプルにおける異常分子の同定が可能となる。臨床検体のプロテオミクス解析は遺伝子解析異常同様に難しい点があるが、病因解明には必須と考えられ、筋疾患研究の分野でもさらに取り組んでいく必要があると思われる。

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

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
Schwartz-Jampel 症候群モデルマウスの作成と解析- 第3報

主任分担研究者	平澤恵理	順天堂大学大学院医学研究科 老人性疾患病態治療研究センター
分担研究者	多田昇弘	順天堂大学大学院医学研究科 アトピーセンター
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。今年度はさらに、反復刺激時の神経終末からの ACh 遊離の亢進が確認された。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。さらに、EPP 記録と 40Hz の高頻度連続神経刺激 (EPP 40Hz run-down 法) を行い、アセチルコリン遊離のパラメーターである m (quantal content)、 n (the store of neurotransmitter quanta immediately available for release)、および p (the probability of release by a nerve impulse) を求めた。

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。40Hz の高頻度連続神経刺激 SJS マウスではコントロールに比べて m と n が減少していたが有意ではなかった。しかし、 p は有意に増加し、アセチルコリンが刺激に対

して放出されやすいことを示唆した。

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。アセチルコリン遊離のパラメーターには $m = n \times p$ の相互関係がある。Col-Q 欠損による先天性終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症では n は有意に減少するが p が増加せず、結果として m が有意に低下している。これはシナプス間隙でのアセチルコリン増加を抑制する代償機序と考えられている。パールカン欠損では、 n の減少が有意でないにもかかわらず p が有意に増加している。これは、アセチルコリンが刺激に対して放出されやすいことを示すと考えられる。 p の増加は n の減少を補う二次的な変化のみではなく、パールカン欠損による直接的な機序である可能性が考えられた。これは SJS 患者の顔面筋の持続収縮に対しアセチルコリン放出を抑制するボツリヌス毒治療などの有用性を示唆すると結果と考えられた。また、大動脈などの平滑筋を使った収縮試験も検討中である。アセチルコリン放出が亢進している機序につき電顕レベルでの神経終末の形態変化観察も必要と思われた。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いことからミオトニア以外の要因の関与も示唆される。筋の肥大所見も興味深いと思われる。

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

ス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

- Vikramadithyan RK, Kako Y, Chen G, Hu Y, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y, Goldberg JJ. Atherosclerosis in perlecan heterozygous mice J Lipid Res 45:1806-12,2004
- Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, Saito K, Harada H, Arikawa-Hirasawa E, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Okamoto K, Kato Y, Fujiwara T. Laminin alpha2 essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression. 279(11):10286-92. J Biol Chem. 2004
- 平澤恵理: 遺伝子改変マウスの解析から解明されるパールカンの神経筋機能への関与。『蛋白質 核酸 酵素』増刊号 神経糖鎖生物学 49:2425-2430, 2004.
- 平澤恵理 Schwartz-Jampel 症候群 (軟骨異常性筋強直症) とパールカン。Annual Review 神経 2004 分担執筆 p286-292.
- 平澤恵理 パールカンの多様な機能の解明をめざして Functional Glycomics No, 4 20-23 2004
- 平澤恵理 神経筋接合部におけるパールカンの役割 Glycoward NS-A03 2004 /Glycoforum(http://glycoforum.gr.jp/science/word/nervous/NS_J.html)
- Ichikawa N, Kasai S, Suzuki N, Nishi N, Oishi S, Fujii N, Kadoya Y, Hatori, K Mizuno Y,

Nomizu M, and Arikawa-Hirasawa E
Identification of neurite outgrowth active sites on the laminin alpha4 chain G domain. Biochemistry. 2005 in press

2. 学会発表

- 第10回プロテオグライカンフォーラム プロテオグライカンと疾患- 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
- 第36回日本結合組織学会学術大会 シンポジウム 基底膜マウス初期胚におけるラミニン $\alpha 1$ 鎖の機能と重要性平成16年6月3日 九州大学 福岡
- Naoki Ichikawa, Kazuhisa Iwabuchi, Mitsuaki Yanagida, Kimie Murayama, Nobuharu Suzuki, Motoyoshi Nomizu, Eri Arikawa-Hirasawa The laminin 1 ag73 peptide promotes neurite outgrowth of pc12 cells through binding to gm1. Sapporo Sphingolipid Symposium. July 2004
- Ikeguchi, Y. Nakatani S, Arikaa-Hirasawa E, Ishijima M, Pegg AE, Wada M, Hiroshi M, Shirahata A Effect of polyamines on differentiation of murine chondrogenic cell line ATDC5 2004 International conference on polyamines Kazusa Arc, Chiba, Japan Nov. 28 - Dec. 2 2004
- Ogawa J, Kurihara H, Tada N, Sasaki T, Ichimura K, Sakai T, Morgan G, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E The distinct role of laminin-1 in early mouse development MINISYMPOSIUM, Experimental Biology 2004 Washington D.C., April 17-21, 2004.
- Ichikawa N, Iwabuchi K, Yanagida M, Murayama K, Suzuki N, Nomizu M, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E; Laminin-1 G domain synthetic peptide promotes neurite outgrowth in PC12 cell by modulation of GM1 localization and syndecan signaling. ASCB meeting. 2004 Dec. 3-8 Washington D.C.
- モデルマウスによる Schwartz-Jampel 症候群の筋収縮機構の研究 平成16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」総合班会議 2004年12月4日

- ・ パールカン欠損モデルマウス解析による
Schwartz-Jampel 症候群におけるミオトニア
発症機序の考察平成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」
総合班会議 2004年1月16日
- ・ Seronegative MG (SNMG) の骨格筋萎縮に関す
る検討中尾直樹、衣斐達、佐橋功、平澤恵理、
本村政勝、大野欽司第45回日本神経学会総会、
2004年5月 東京
- ・ ラミニン α 4鎖Gドメインにおける神経特記伸
長活性部位の同定 市川直樹、鈴木善晴、野水
基義、水野美邦、平澤恵理第45回日本神経学
会総会、2004年5月 東京
- ・ パールカン欠損モデルマウスを用いた
SchwartzJampel 症候群発症機序の研究
平澤恵理・福留隆泰、林明人、山田吉
彦、水野美邦 第45回日本神経学会総
会、2004年5月 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--その2

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	国立精神・神経センター神経研究所
	杉江和馬	同上
	西野一三	同上
	埜中征哉	同上

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 (α -DGP) 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; α -DGP) を中心に研究を進めた。Ullrich 病の臨床スペクトラムを知ることが目的に、確定診断のついていない先天性筋ジストロフィーについて、免疫組織化学的に VI 型コラーゲンの発現を検討し、異常の認められた患者について臨床・筋病理学的解析並びに遺伝子変異の検索をおこなった。その結果、高率に骨格筋における VI 型コラーゲンの発現異常が見出された。臨床的には Ullrich 病として典型的なものから軽度の筋症状を呈するのみのもので幅広く認められた。現在これらの患者について VI 型コラーゲン遺伝子を含めた遺伝子解析を施行中である。また、本邦における α -DGP について、詳細に臨床・筋病理学的解析および遺伝子変異解析を行い、福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) が α -DGP の 87% を占めることを報告するとともに、アジアで初めて FKRP 遺伝子変異を有する MDC1C 症例を発見、報告した。MDC1C は、他の α -DGP と異なり、中枢神経障害を合併することはまれであるが、本患児は小脳に多数の小嚢胞を有しており、また FCMD、Walker-Warburg 症候群、muscle-eye-brain 病同様に、 α -DG の糖鎖異常、およびラミニンとの結合能の消失を明らかにした。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 -DG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 -DGPとして近年注目を集めている。

今年度は先天性筋ジストロフィーにおけるVI型コラーゲンの発現異常を検索、詳細な臨床筋病理学的解析を進めた。また、本邦における α -DGPについて臨床病理学的、分子生物学的に詳細に検討した。

B. 研究方法

原因の確定していない先天性筋ジストロフィーについて、免疫組織化学的にVI型コラーゲンの発現を検討し、異常の認められた症例について臨床・筋病理学的に詳細に検討するとともにVI型コラーゲン遺伝子COL6A1, A2, A3の変異解析を行った。 α -DGPについては、免疫組織学的に α -DGの発現をスクリーニングし、欠損・減弱のみられた症例について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

原因の確定していない先天性筋ジストロフィーの中にはVI型コラーゲンの発現異常を示すものが高率に存在した。そのほとんどは基底膜特異的な欠損パターンを呈していた。これらの症例は、Ullrich病として典型的なものから軽度の筋症状を呈するのみのものまで幅広い臨床症状が認められた。一方VI型コラーゲンの発現の程度と臨床症状との間には明らかな関係は見出されなかった。現在これらの患者についてCOL6A1, A2, A3について変異解析を施行中である。

免疫組織学的スクリーニングにより抽出した α -DGP 62例について、関連遺伝子の変異解析を行った結果、福山型の創始者変異である3-kb挿入変異がホモで42例、ヘテロで12例認められた。また、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。さらにFKRP遺伝子異常に

より生じるヨーロッパで多く報告されているMDC1Cをアジアで初めて見いだした。FKRPの遺伝子変異による疾患は中枢神経障害を認めないことが多いが、本患者では知能障害はないものの、小脳に複数の小嚢胞が認められた。FCMD, MEB, WWS, MDC1C骨格筋では、原因遺伝子が異なっても、 α -DGの分子量はほぼ同程度に低下しており、また糖鎖修飾不全によると考えられるラミニン結合能が失われている点も共通していた。一方で、 α -DGの変化や原因となる遺伝子が同じであっても、臨床筋病理学的重症度には個体差があり、他の病態修飾要因も考慮する必要があると考えられた。

D. 考察

VI型コラーゲン欠損例は先天性筋ジストロフィー患者の中で、比較的頻度が高く、今後原因遺伝子の解明が必須である。VI型コラーゲンの発現量や発現部位と臨床的重症度とには、明らかな相関がないことより、たとえ蛋白質が発現していても機能不全であると考えられた。

α -DGP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、各々の原因遺伝子産物がどのように α -DGの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型コラーゲン欠損症は、比較的頻度の高い疾患であり、原因遺伝子の解明は重要である。基底膜特異的な欠損例ではVI型コラーゲンが基底膜に局在できないことが原因と考えられ、今後結合蛋白質の検索を含めた解析を進めていく。また、 α -DGPの中にはFCMDのみならず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

- Matsumoto H, Havashi YK, Kim D-S, Ogawa M, Murakami T, Noguchi S, Nonaka I, Nakazawa Y, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, and Nishino I. Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of α -dystroglycan in Japan. *Neuromuscul Disord* (in press).
- Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, Ogawa M, Suzuki A, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Havashi YK. Dysferlin interacts with affixin (β -parvin) at the sarcolemma. *J Exp Neurol* (in press).
- Kawabe K, Goto K, Nishino I, Angelini C, Havashi YK. Dysferlin mutation analysis in a group of Italian patients with limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy. *Eur J Neurol* 11: 657-661, 2004
- Sugie K, Murayama K, Noguchi S, Murakami N, Mochizuki M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. Two novel CAV3 gene mutations in Japanese families. *Neuromuscul Disord*. 14: 810-814, 2004
- 保住 功、高橋俊明、青木正志、林 由起子、鈴木直輝、松山善次郎、犬塚 貴、埜中征哉。Dysferlin 遺伝子に変異を認めず、dysferlin 蛋白の筋線維内局在異常を認めた遠位型筋ジストロフィーの一例。臨床神経 44: 699-702, 2004
- Havashi YK. Unusual clinical features associated with FSHD. In FSHD (Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy) ~Clinical Medicine and Molecular Cell Biology~ (Eds) Upadhyaya M, Cooper DN. BIOSIS Scientific Publishers, London and New York, 2004, pp197-210
- 林 由起子. クレアチン. 内科 <特集> 検査値の読み 93: 1077, 2004
- 埜中征哉, 林 由起子. 筋炎の診断 筋組織学的所見. *Clinical Neuroscience* 22: 1158-1160, 2004
- 林 由起子, 黒川 留美, 藤田 雅子, 後藤 加奈子, 野口 悟, 西野 一三. Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー(EDMD)の遺伝子発現解析. 「脳を守る」終了シンポジウム, 東京, 1月22日, 2004
- 林 由起子, 松田知栄, 小川恵, 西野一三. ジスフェルリン関連蛋白質の解析. 第45回日本神経学会総会, 東京, 5月11-14日, 2004
- 小澤律子, 林 由起子, 黒川留美, 小川 恵, 後藤加奈子, 野口 悟, 西野一三: エメリン欠損マウスの解析. 第45回日本神経学会総会 東京 5.12, 2004
- 松本 浩, 林 由起子, 西野一三, 埜中征哉, 松尾多希子, 中澤友幸: 本邦初の先天性筋ジストロフィー1C(MDC1C)の一例. 第46回日本小児神経学会, 東京, 7.16, 2004.
- 山中 岳, 林 由起子, 宮島 祐, 星加明德, 西野一三: FSHD の臨床像を呈したにも関わらず、4q35 領域の遺伝子欠失を有しない40症例の臨床的および分子遺伝学的検討. 第46回日本小児神経学会, 東京, 7.16, 2004.
- Havashi YK, Ozawa R, Noguchi S, Kurikawa R, Fujita M, Goto K, Muchir A, Bonne G, Nishino I. Microarray analysis of nuclear envelopathy. The 9th International Congress of The World Muscle Society. Goteborg, Sweden, Sept 1-4, 2004
- Matsuda C, Havashi YK, Kameyama K, Okamoto H, Nishino I, RH Brown:
- Identification of a novel dysferlin-associated protein. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, Sept 1-4, 2004.
- Matsumoto H, Havashi YK, Matsuo T, Nakazawa T, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: The first case with congenital muscular dystrophy 1C in Japan. 9th International Congress of the World Muscle Society. Goteborg, Sweden, Sept 1-4, 2004.
- Ozawa R, Havashi YK, Kurokawa R, Ogawa M, Goto K, Noguchi S, Nishino I: No dystrophic

2. 学会発表 他

change in emerlin deficient mice. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, Sept 1-4, 2004.

- Nishino I, Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Havashi YK, Nonaka I: Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. Honolulu, Hawaii, 11.20, 2004.
- Nishino I, Noguchi S, Havashi YK, Nonaka I: Restoration of sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy. 11th Asian Oceanic Congress of Neurology, Singapore, 11.28, 2004.
- 林 由起子, 村上てるみ, 松本 浩, 小川 恵, 後藤加奈子, 野口 悟, 埜中征哉, 西野一三: 日本における MDC1C/LGMD21. 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 平成16年度班会議, 東京, 12.3, 2004.
- 林 由起子. 学術講演, 筋疾患 最近の話題. 和歌山県立医大神経内科セミナー, 和歌山, 9.9, 2004

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—その2

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	国立精神・神経センター神経研究所
	杉江和馬	同上
	西野一三	同上
	埜中征哉	同上

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 (α -DGP) 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; α -DGP) を中心に研究を進めた。Ullrich 病の臨床スペクトラムを知ることを目的に、確定診断のついていない先天性筋ジストロフィーについて、免疫組織化学的に VI 型コラーゲンの発現を検討し、異常の認められた患者について臨床・筋病理学的解析並びに遺伝子変異の検索をおこなった。その結果、高率に骨格筋における VI 型コラーゲンの発現異常が見出された。臨床的には Ullrich 病として典型的なものから軽度の筋症状を呈するのものまで幅広く認められた。現在これらの患者について VI 型コラーゲン遺伝子を含めた遺伝子解析を施行中である。また、本邦における α -DGP について、詳細に臨床・筋病理学的解析および遺伝子変異解析を行い、福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) が α -DGP の 87% を占めることを報告するとともに、アジアで初めて FKRP 遺伝子変異を有する MDC1C 症例を発見、報告した。MDC1C は、他の α -DGP と異なり、中枢神経障害を合併することはまれであるが、本患児は小脳に多数の小嚢胞を有しており、また FCMD、Walker-Warburg 症候群、muscle-eye-brain 病同様に、 α -DG の糖鎖異常、およびラミニンとの結合能の消失を明らかにした。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 α 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 -DG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 -DGPとして近年注目を集めている。

今年度は先天性筋ジストロフィーにおけるVI型コラーゲンの発現異常を検索、詳細な臨床筋病理学的解析を進めた。また、本邦における α -DGPについて臨床病理学的、分子生物学的に詳細に検討した。

B. 研究方法

原因の確定していない先天性筋ジストロフィーについて、免疫組織化学的にVI型コラーゲンの発現を検討し、異常の認められた症例について臨床・筋病理学的に詳細に検討するとともにVI型コラーゲン遺伝子COL6A1, A2, A3の変異解析を行った。 α -DGPについては、免疫組織学的に α -DGの発現をスクリーニングし、欠損・減弱のみられた症例について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

原因の確定していない先天性筋ジストロフィーの中にはVI型コラーゲンの発現異常を示すものが高率に存在した。そのほとんどは基底膜特異的な欠損パターンを呈していた。これらの症例は、Ullrich病として典型的なものから軽度の筋症状を呈するのみのものまで幅広い臨床症状が認められた。一方VI型コラーゲンの発現の程度と臨床症状との間には明らかな関係は見出されなかった。現在これらの患者についてCOL6A1, A2, A3について変異解析を施行中である。

免疫組織学的スクリーニングにより抽出した α -DGP 62例について、関連遺伝子の変異解析を行った結果、福山型の創始者変異である3-kb挿入変異がホモで42例、ヘテロで12例認められた。また、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。さらにFKRP遺伝子異常に

より生じるヨーロッパで多く報告されているMDC1Cをアジアで初めて見いだした。FKRPの遺伝子変異による疾患は中枢神経障害を認めないことが多いが、本患者では知能障害はないものの、小脳に複数の小嚢胞が認められた。FCMD, MEB, WWS, MDC1C骨格筋では、原因遺伝子が異なっても、 α -DGの分子量はほぼ同程度に低下しており、また糖鎖修飾不全によると考えられるラミニン結合能が失われている点も共通していた。一方で、 α -DGの変化や原因となる遺伝子が同じであっても、臨床筋病理学的重症度には個体差があり、他の病態修飾要因も考慮する必要があると考えられた。

D. 考察

VI型コラーゲン欠損例は先天性筋ジストロフィー患者の中で、比較的頻度が高く、今後原因遺伝子の解明が必須である。VI型コラーゲンの発現量や発現部位と臨床の重症度とには、明らかな相関がないことより、たとえ蛋白質が発現していても機能不全であると考えられた。

α -DGP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、各々の原因遺伝子産物がどのように α -DGの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型コラーゲン欠損症は、比較的頻度の高い疾患であり、原因遺伝子の解明は重要である。基底膜特異的な欠損例ではVI型コラーゲンが基底膜に局在できないことが原因と考えられ、今後結合蛋白質の検索を含めた解析を進めていく。また、 α -DGPの中にはFCMDのみならず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

- Matsumoto H, Havashi YK, Kim D-S, Ogawa M, Murakami T, Noguchi S, Nonaka I, Nakazawa Y, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, and Nishino I. Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of α -dystroglycan in Japan. *Neuromuscul Disord* (in press).
- Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, Ogawa M, Suzuki A, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Havashi YK. Dysferlin interacts with affixin (β -parvin) at the sarcolemma. *J Exp Neurol* (in press).
- Kawabe K, Goto K, Nishino I, Angelini C, Havashi YK. Dysferlin mutation analysis in a group of Italian patients with limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy. *Eur J Neurol* 11: 657-661, 2004
- Sugie K, Murayama K, Noguchi S, Murakami N, Mochizuki M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. Two novel CAV3 gene mutations in Japanese families. *Neuromuscul Disord*. 14: 810-814, 2004
- 保住 功、高橋俊明、青木正志、林 由起子、鈴木直輝、松山善次郎、犬塚 貴、埜中征哉。Dysferlin 遺伝子に変異を認めず、dysferlin 蛋白の筋線維内局在異常を認めた遠位型筋ジストロフィーの一例。臨床神経 44: 699-702, 2004
- Havashi YK. Unusual clinical features associated with FSHD. In FSHD (Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy) ~Clinical Medicine and Molecular Cell Biology~ (Eds) Upadhyaya M, Cooper DN. BIOSIS Scientific Publishers, London and New York, 2004, pp197-210
- 林 由起子. クレアチン. 内科 <特集> 検査値の読む 93: 1077, 2004
- 埜中征哉, 林 由起子. 筋炎の診断 筋組織学的所見. *Clinical Neuroscience* 22: 1158-1160, 2004
- 2. 学会発表 他
- 林 由起子, 黒川 留美, 藤田 雅子, 後藤 加奈子, 野口 悟, 西野 一三. Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (EDMD) の遺伝子発現解析. 「脳を守る」終了シンポジウム, 東京, 1月22日, 2004
- 林 由起子, 松田知栄, 小川恵, 西野一三. ジスフェルリン関連蛋白質の解析. 第45回日本神経学会総会, 東京, 5月11~14日, 2004
- 小澤律子, 林 由起子, 黒川留美, 小川 恵, 後藤加奈子, 野口 悟, 西野一三: エメリン欠損マウスの解析. 第45回日本神経学会総会 東京 5.12, 2004
- 松本 浩, 林 由起子, 西野一三, 埜中征哉, 松尾多希子, 中澤友幸: 本邦初の先天性筋ジストロフィー1C (MDC1C) の一例. 第46回日本小児神経学会, 東京, 7.16, 2004.
- 山中 岳, 林 由起子, 宮島 祐, 星加明德, 西野一三: FSHD の臨床像を呈したにも関わらず、4q35 領域の遺伝子欠失を有しない40症例の臨床的および分子遺伝学的検討. 第46回日本小児神経学会, 東京, 7.16, 2004.
- Havashi YK, Ozawa R, Noguchi S, Kurikawa R, Fujita M, Goto K, Muchir A, Bonne G, Nishino I. Microarray analysis of nuclear envelopathy. The 9th International Congress of The World Muscle Society. Goteborg, Sweden, Sept 1-4, 2004
- Matsuda C, Havashi YK, Kameyama K, Okamoto H, Nishino I, RH Brown:
- Identification of a novel dysferlin-associated protein. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, Sept 1-4, 2004.
- Matsumoto H, Havashi YK, Matsuo T, Nakazawa T, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: The first case with congenital muscular dystrophy 1C in Japan. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, Sept 1-4, 2004.
- Ozawa R, Havashi YK, Kurokawa R, Ogawa M, Goto K, Noguchi S, Nishino I: No dystrophic