

change in emerin 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, Hayashi 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, Hayashi 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

厚生労働科学研究費補助金（こころの研究事業）
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
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
シグナル伝達に関与する糖脂質ラクトシルセラミド分子種の
ESI-Ion Trap 質量分析計による解析法の開発

分担研究者：村山季美枝 順天堂大学大学院医学研究科
生体分子研究部門
研究協力者：加賀直子 順天堂大学大学院医学研究科
生体分子研究部門助手

研究要旨： 細胞外からのシグナル伝達は細胞膜の脂質成分、特にリピッドラフトと呼ばれるマイクロドメインを介して細胞情報を制御している。分担研究者は本研究課題において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を成功させてきた。今年度は細胞外マトリックスによるシグナル制御のステップにおける脂質成分の重要性に注目した。そこでリピッドラフトの構成成分のひとつであるラクトシルセラミドに焦点をあて分子種解明を試みた。ラクトシルセラミドは構成する脂肪酸、スフィンゴイド塩基の構造の多様性から幅広い分子種の存在が示唆されている。そこでラクトシルセラミドを逆相 C8 カラムを用い 1mM ギ酸アンモニウムを含むメタノール系で分離、MSⁿ 解析によりその構造を同定した。市販の porcine blood cell 由来のラクトシルセラミドを用いて検討を行ったところ、これらは分子中のセラミド成分の炭素鎖の長さ、不飽和度、水酸化(2-OH)の有無により分離された。ラクトシルセラミドはプロトン付加イオンとして検出され、さらにこれをイオントラップ質量分析計内で多段階にわたり開裂をおこさせることにより生じたイオンから、構成される塩基、脂肪酸の構造を解析し、ラクトシルセラミドの分子種を同定した。その結果、porcine blood cell 由来のラクトシルセラミドからは一度の分析で 33 種の分子種を同定することができた。また、この方法を用い好中球系細胞に分化させた HL-60 細胞の細胞膜及び顆粒中のラクトシルセラミドの分子種を分析した結果、細胞膜上に好中球でみられた活性酸素産生機構に関与した長鎖脂肪酸をもつラクトシルセラミドの存在は見られなかった。即ち、シグナル伝達における長鎖脂肪酸の有用性が示唆された。以上、われわれは逆相 HPLC/ESI イオントラップ質量分析法を用いたより簡便なラクトシルセラミドの分子種同定法を確立した。これらの系は筋細胞を含むあらゆる細胞の系において有用な情報として疾患におけるシグナル伝達の異常の解明に寄与すると考えられた。

A. 研究目的

細胞外からのシグナル伝達は細胞膜の脂質成分、特にリピッドラフトと呼ばれるマイクロドメインを介して細胞情報を制御し

ている。マイクロドメイン構成成分には、さまざまな膜たんぱく質、リン脂質、スフィンゴ糖脂質、コレステロールなどが含まれている。スフィンゴ糖脂質は長鎖脂肪酸

を含むため疎水性で融点が高く、互いに会合し、スフィンゴミエリン、コレステロール、シグナル伝達物質とともに細胞膜上にリピッドラフトと呼ばれるマイクロドメインを形成し、細胞間相互作用、細胞認識、シグナル伝達、細胞分化などに深く関わっている。生体におけるこのような生理的システムは疾患において破綻していることが予測される。分担研究者は好中球におけるリピッドラフトの構成成分につきいくつかの予備知見を得ていたため、まず好中球を用いて実験を行った。

好中球は、造血幹細胞から、分化成熟する過程で、様々な分子を細胞膜表面に発現させる。中性スフィンゴ糖脂質であるラクトシルセラミドは CDw17 とも呼ばれる分化抗原であり、成熟好中球となって初めて細胞膜表面に発現し、コレステロール、スフィンゴミエリン、さらに N 末端がミリストール、パルミトイル化された Src ファミリーキナーゼである Lyn とともに細胞膜上にマイクロドメインを形成する。そしてこのラクトシルセラミドに富むマイクロドメインを介して好中球が菌体に結合し、活性酸素を産生することが報告されている。

前骨髄性白血病細胞株である HL-60 細胞は DMSO (ジメチルスルフォキシド) によって好中球系細胞に分化誘導される。HL-60 細胞の細胞膜表面には分化程度によらずほぼ好中球と同程度のラクトシルセラミドが発現されている。しかしながら、好中球にはラクトシルセラミドから Lyn を介した活性酸素を産生する経路が存在するが、HL-60 細胞にはそのような経路が存在しないことがわかった。

そこで高分解能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) でこれらのマイクロドメインの脂質分析をしたところラクトシルセラミドの展開パターンに相違が見られた。

従ってラクトシルセラミドが細胞のシグナル伝達に関与が想定されることから、機能解明に重要なその分子種同定を試みた。

ラクトシルセラミドは炭素数 16-20 の長鎖アミノアルコールであるスフィンゴイド塩基と脂肪酸鎖がアミド結合してできたセラミドにラクトースが結合した中性スフィンゴ糖脂質である。

構成成分であるスフィンゴイド塩基、脂肪

酸鎖の構造に多様性があるため (炭素鎖の長さ、飽和度、水酸基の有無など)、ラクトシルセラミドの分子種には高い heterogeneity が存在する。

これらの構造解析には加水分解し脂肪酸及び塩基を別々に同定する方法があるが、それぞれの組み合わせは明らかではない。

今回、市販されている porcine blood cell 由来のラクトシルセラミド標品を用い、各分子種由来の分子イオンを質量分析計で測定、更に、MSⁿ解析により、非破壊で分子内構造情報得ることを目的とし、液体クロマトグラフ (LC) -イオントラップ型質量分析計によるラクトシルセラミドの分子種同定法を確立した。

その方法を用いて分化 HL-60 細胞膜及び顆粒に含まれるラクトシルセラミドの分子種を同定した。

B. 研究方法

シグマ社製 porcine blood cell 由来のラクトシルセラミド 200ng を試料とした。

HPLC は MAGIC2002 (Michrom Bio Resource 社)、質量分析計は LCQ DECA XP イオントラップ質量分析計 (Thermo electron 社) を使用した。ラクトシルセラミドの分子種は CapcellPak C8 カラム (資生堂) を用い流速 50 μ l/min、1mM ギ酸アンモニウム/メタノール溶媒で分離した。質量分析はイオン化電圧 5 kV、イオン化温度 250°C、開裂エネルギー 80% で行った。

ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 の細胞膜マイクロドメインに存在するラクトシルセラミドの抽出; 1.3%DMSO により HL-60 細胞を分化させ、膜と顆粒を分画し、ラフト画分を調製した。その後脂質画分を抽出し HPTLC による脂質分画をおこなった。CHCl₃/MeOH/ H₂O (65 : 25 : 4) により展開し Primulin で発色させラクトシルセラミド画分をかきとり CHCl₃/MeOH (2 : 1) で抽出した後、その一部を LC-MSⁿ で分析した。

C. 研究結果

ラクトシルセラミドは構成する炭素鎖の長さに比例して溶出時間が増加し、同じ長さの場合ラクトシルセラミドは不飽和、2-ヒドロキシ、飽和脂肪酸を持つ分子種の順に溶出された。

MSⁿ解析では、多段階にわたり開裂をおこさせることにより、よりシンプルな開裂パターンが得られた。ラクトシルセラミドはまずラクトースがはずれその後セラミドの酸アミド結合が切断されることによりスフィンゴシン塩基由来のイオンが得られた。その結果、脂肪酸（セラミドースフィンゴシン塩基）を決定しラクトシルセラミドの分子種を同定した。

好中球系細胞に分化した HL-60 の細胞膜のマイクロドメインでは炭素数 16 の脂肪酸を持つラクトシルセラミドが主成分であり、炭素鎖 24 の分子種がわずかにみられた。一方、好中球膜では炭素数 16 の脂肪酸を持つラクトシルセラミドもみられたが、脂肪酸鎖の長い炭素鎖 24 のものが非常に強く検出された。顆粒においては両者の相同性は高かった。

D. 考察

分化 HL-60 は膜上に Lyn 及びラクトシルセラミドが存在するが、その分子種は C16 脂肪酸が主体であり C24 脂肪酸の存在は著しく少なく、これらを介する活性酸素産生機構は確認されなかった。即ち、好中球に存在するラクトシルセラミドの長鎖脂肪酸 (C24) は Lyn への情報伝達に必須であり、活性酸素産生機構の重要な役割を担っていることが明らかとなった。Lyn の N 末端 Gly, Cys を修飾している C14 及び C16 の脂肪酸鎖にシグナル伝達するために細胞膜上の長鎖脂肪酸鎖が必須であることが明らかになった。

これらの系は筋細胞を含むあらゆる細胞の系において有用な情報として疾患におけるシグナル伝達の異常の解明に寄与すると考えられた。

E. 結論

逆相 HPLC-イオントラップ質量分析法 (LC-MSn) を用いたラクトシルセラミドの簡便な分子種同定法を確立した。この手法では分子を非破壊で、一回のインジェクションにより 30 種以上の分子種を分離同定することが可能であった。これは複合糖脂質の分子種同定に有用な方法であると考え

られる。この手法を用いて細胞外マトリックスの異常による筋細胞のシグナルの変化を解明することが出来る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kaga N, Kazuno S, Taka H, Iwabuchi K, Murayama K. Isolation and mass spectrometry characterization of molecular species of lactosylceramides using liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry. *Anal Biochem* 337(2):316-324, 2005

Nomiyama T, Igarashi Y, Taka H, Mineki R, Uchida T, Ogihara T, Choi JB, Uchino H, Tanaka Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Murayama K, Kawamori R, Watada H. Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1. *Biochem Biophys Res Commun* 320(3):639-47, 2004.

Seko Y, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Murayama K, Nagai R: Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 317(1):162-8, 2004.

Yamakura F, Matsumoto T, Taka H, Fujimura T, Murayama K: 6-Nitrotryptophan: a specific reaction product of tryptophan residue in human Cu, Zn-SOD treated with peroxynitrite. *Adv Exp Med Biol* 527:745-9, 2003.

Ezaki J, Takeda-Ezaki M, Koike M, Ohsawa Y, Taka H, Mineki R, Murayama K, Uchiyama Y, Ueno T, Kominami K. Characterization of Cln3P, the gene product responsible

for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein. *J Neurochem.* 87(5): 1296-308, 2003

Yokono T, Mineki R, Taka H, Kotaniguchi H, Murayama K. Improvement of automatic in-gel digestion by in situ alkylation of proteins. *J Bimo Tech.* 14(3): 191-6, 2003

Hanaguchi A, Suzuki E, Murayama K, Fujimura T, Hikita T, Iwabuchi K, Handa K, Withers DA, Masters SC, Fu H, Hakomori S. A sphingosine-dependent protein kinase that specifically phosphorylates 14-3-3 (SDK1) is identified as the kinase domain of PKCdelta: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun.* 307(3): 589-94, 2003

Hanaguchi A, Suzuki E, Murayama K, Fujimura T, Hikita T, Iwabuchi K, Handa K, Withers DA, Masters SC, Fu H, Hakomori S. Sphingosine-dependent protein kinase-1, directed to 14-3-3 is identified as the kinase domain of protein kinase C delta. *J Biol Chem.* 278(42): 41557-65, 2003

Kagan N, Soma S, Fujimura T, Seyama K, Fukuchi Y, Murayama K. Quantification of elastin cross-linking amino acids, desmosine and isodesmosine, in hydrolysates of rat lung by ion-pair liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 318(1): 25-9, 2003

Amino H, Osanai A, Miyadera H, Shinjyo N, Tomitsuka E, Taka H, Mineki R, Murayama K, Takamiya S, Aoki T, Miyoshi H, Sakamoto K, Kojima S, Kita K. Isolation and characterization of the stage-specific cytochrome b small subunit (CybS) of *Ascaris suum* complex from the aerobic respiratory chain of larval mitochondria. *Mol Biochem Parasitol.* 128(2): 175-86, 2003

Takamiya S, Yamasaki H, Hashimoto M, Taka H, Murayama K, Tagaya M, Aoki T. Heterologous expression of *Ascaris suum* cytochrome b5 precursor protein: a histidine - tagged full-length presequence is correctly processed to transport the mature protein to the periplasma of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 413(2): 253-61, 2003

Miyadera H, Hiraishi A, Miyoshi H, Sakamoto K, Mineki R, Murayama K, Nagashima KV, Matsuura K, Kojima S, Kita K. Complex II from phototrophic purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* displays rhodoquinol-fumarate reductase activity. *Eur J Biochem.* 270(8): 1863-74, 2003

Kobayashi H, Kruger R, Markopoulou K, Wszolek Z, Chase B, Taka H, Mineki R, Murayama K, Riess O, Mizuno Y, Hattori N. Haploinsufficiency at the synuclein gene underlies phenotypic severity in familial Parkinson's disease. *Brain* 126 (Pt 1), 32-42, 2003

2. 学会発表

Kaga N, Kazuno S, Taka H, Iwabuchi K, Murayama K. Isolation of molecular species of lactosylceramide. Confirmation of the fatty acid moiety and long chain base using LC-ESI MS. 52nd ASMS (American Society for Mass Spectrometry) Annual Conference, Nashville USA, May 22-27, 2004.

Taka H, Mineki R, Yanagida M, Fujimura T, Matsumoto T, Fuwa M, Yamakura F, Murayama K. Determination of a whole amino acid sequence and modifications of a protein in the organism with unsequenced genome by use of mass spectrometry and amino acid

sequencing. 第77回日本生化学会大会
2004年10月13-16日、パシフィコ横浜.

Kazuno S, Yanagida M, Shindo N,
Murayama K. Determination of
glycosylflavonoids in Rooibos tea by
LC/MS/MS with neutral loss scan mode.
第77回日本生化学会大会2004年10月
13-16日、パシフィコ横浜.

Horigome T, Segawa M, Niino K, Mineki
R, Kaga N, Murayama K, Sugimoto K.
Proteome analysis of rat liver
nuclear insoluble fraction and
localization of a novel protein,
ICP36, to the interchromatin
compartment. 第77回日本生化学会大会
2004年10月13-16日、パシフィコ
横浜.

Taka H, Kaga N, Mineki R, Fujimura T,
Shindo N, Tanokura M, Murayama K.
Oxidation of cysteinyl residue in
PA-1(pI4.78) parvalbumin from Bullfrog
skeletal muscle *in vivo*. 51st
ASMS(American Society for Mass
Spectrometry) Annual Conference,
Montreal Canada, June 7-12, 2003.

Mineki R, Taka H, Fujimura T, Kikkawa M,
Shindo N, Murayama K. *In situ*
alkylation with acrylamide for
identification of cysteinyl residues in
proteins during one- and two-
dimensional sodium dodecyl sulphate-
polyacrylamide gel electrophoresis.
ABRF 2003 meeting "Translating Biology
Using Proteomics and Functional
Genomics", Denver February 10-13, 2003.

Yokono T, Mineki R, Taka H, Kotaniguchi

H, Murayama K. Improvement of the
automatic in gel digestion by *in situ*
alkylation proteins. ABRF 2003 meeting
"Translating Biology Using Proteomics
and Functional Genomics", Denver
February 10-13, 2003.

Kaga N, Kazuno S, Murayama K.
Isolation of various molecular
species of Lactosyl ceramide.
Conformation of the fatty acid moiety
and long chainbases using LC-MS.
第76回日本生化学会大会2003年10月
15-18日、パシフィコ横浜.

Nishitani T, Tanida I, Mineki R, Taka
H, Murayama K, Ueno T, Tomino Y,
Kominami E.

Identification of Gate-16
interacting proteins. 第76回日本生
化学会大会2003年10月15-18日、パ
シフィコ横浜.

Matsumoto T, Yamakura F, Ikeda K,
Fujimura T, Taka H, Kaga N, Murayama
K.

Reactivities of tyrosine and
tryptophan residues in lysozyme with
pydroxynitrite.

第76回日本生化学会大会2003年10月
15-18日、パシフィコ横浜.

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、ラミニン α 1鎖組織特異的欠損マウス作成と解析と
生体での機能解明に関する研究-第2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 脳神経内科
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	小川順子	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 (長寿財団リサーチレジデント)

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のがわかった。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。胚に分化する組織のみで Lama1 を欠損させる Cre-トランスジェニックマウスとの交配によるコンディショナルノックアウトマウスが出生したことより、ラミニン α 1鎖の胚外組織における重要性が示された

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ールカン、ラミニン、アグリ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。将来胚に分化する組織のみで Cre リコンビネースを発現する Mox2-Cre マウスとの交配によりコンディショナルノックアウトマウスを作成した。

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、胚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。将来胚に分化する組織のみでCreリコンビネースを発現するMox2-Creマウスとの交配によりコンディショナルノックアウトマウスを作成した。ところラミニン α 1鎖をほぼ欠損するマウスが得られた。

D. 考察、

Lamal 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なっていることがわかった。
- 3) 将来胚に分化する組織のみでCreリコンビネースを発現するMox2-Creマウスとの交配によりコンディショナルノックアウトマウスを作成した。ところラミニン α 1鎖をほぼ欠損するマウスが得られた。このことはラミニン α 1鎖の胚外組織における重要性を示すものと考えられた。

E. 結論

基底膜構築の最初のスキュフォールドであるラミニンのうち、ラミニン α 1鎖が発生の最初の基底膜であるライヘルト膜形成及び胚外組織の発達に重要であることが示された。また、ラミニン α 1鎖コンディショナルノックアウトマウスの作成に成功した。

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 IJ. 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. *J Biol Chem.* 279(11):10286-92. 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 (軟骨異栄養性筋強直症) 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 α 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, Arikawa-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 polyamins 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 $\alpha 4$ 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

- なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

総説	1	平澤恵理	Schwartz-Jampel症候群(軟骨異栄養症)とパールカン	Annual Review 神経2004	2004
原著	2	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. J Biol Chem. 2003	J Biol Chem. 19;279(12):11402-7.	2004
原著	3	Vikramadithyan RK, Kako Y, Chen G, Hu Y, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y, Goldberg IJ.	Atherosclerosis in perlecan heterozygous mice.	J Lipid Res Oct;45(10):1806-12.	2004
総説	4	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
総説	5	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 /Glycoforum(http://glycoforum.gr.jp/science/word/ne)	2004
総説	6	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
原著	7	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	2004
原著	8	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,	Neurology 62: 620-623,	2004
原著	9	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: 1009-1011,	2004
原著	10	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
原著	11	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

原著	12	Matsumoto H, Noguchi S, Sugie K, Ogawa M, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I	Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells.	J Biochem (Tokyo) 135 :709-712,	2004
原著	13	Kawabe K, Goto K, Nishino I, Angelini C, Hayashi 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
原著	14	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
総説	15	Hayashi, 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, p 197-240	2004
原著	16	Nomiyama T, Igarashi Y, Taka H, Mineki R, Uchida T, Ogihara T, Choi JB, Uchino H, Tanaka Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Murayama K, Kawamori R, Watada H	Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1.	Biochem Biophys Res Commun. 320(3):639-47,	2004
原著	17	Seko Y, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Murayama K, Nagai R	Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes.	Biochem Biophys Res Commun. 317(1):162-8,	2004
原著	18	Niki Y, Yamada H, Seki S, Kikuchi T, Takahashi H, Toyama Y, Fijikawa K, and Tada N:	contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1a transgenic mice.	J Immunol 172, 577-584,	2004
原著	19	Takahashi F, Takahashi K, Shimizu K, Cui R, Tada N, Takahashi H, Soma S, Yoshioka M, and Fukuchi Y:	Osteopontin is strongly expressed by alveolar macrophages in the lungs of acute respiratory distress syndrome.	Lung 182, 173-185,	2004
原著	20	Zhang D, Zhao J, Fujio K, Tada N, Sudo K, Tsurui H, Nakamura K, Yamamoto K, Nishimura H, Shirai T, and Hirose S	Dissection of the role of MHC class II A and E genes in autoimmune susceptibility in murine lupus models with intragenic recombination	Proc Natl Acad Sci USA 101, 13838-13843	2004
原著	21	Kaga N, Kazuno S, Taka H, Iwabuchi K, Murayama K.	Isolation and MSn characterization of molecular species of lactosylceramides using LC-ESI ion trap mass spectrometry.	Anal Biochem. 337(2):316-324,	2005
原著	22	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

IV. 研究成果の刊行物・別刷

2. Schwartz-Jampel 症候群 (軟骨異栄養性筋強直症) とパールカン

順天堂大学脳神経内科講師 平澤恵理

key words perlecan, acetylcholinesterase, neuromuscular junction, myotonia

動 向

Schwartz-Jampel 症候群 (SJS) は乳幼児期に発症し、ミオトニアと骨軟骨病変を併せもつ先天性疾患である。ミオトニアの性状が筋緊張性ジストロフィーや先天性ミオトニアなどと違い、Isaacs 症候群などに観察されるニューロミオトニア的要素があるとされその発症機序には異論が多い。低身長や骨格異常についてもミオトニアと一元的な症状か二次的なものかも不明であった。そのため、その病因について議論が多く、原因遺伝子の解明が期待されていた。Nicole ら¹⁾ と著者ら²⁾ は臨床的に SJS1 型と分類される患者において、基底膜型ヘ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を同定した。これにより、臨床症状の多様性、病型の不均質性に対する分子機構の解明の大きな飛躍が期待される。これまでの文献報告例には一部パールカン遺伝子異常に起因しないものが含まれている可能性もある。今後、個々の症例の遺伝子レベル、蛋白質レベルでの解析と臨床症状の検討により、いくつかの疑問に明確な答えが示されると思われる。ここではパールカン分子と SJS の臨床症状の関連性を考察する。

A. Schwartz-Jampel 症候群の臨床

1. 臨床症状

病型分類については後述するが、以下 1 型の臨床症状について記載する。生下時は、臨床的に異常を認めないが、次第に筋緊張亢進が明らかになり 3 歳位までに診断される。顔面筋の緊張のため眼裂は狭小となり、口を尖らせた仮面のような顔貌を呈する。下顎にミオキミア様の不随意収縮を認めることもある。その他の合併症として小眼症、白内障、斜視、眼振等の眼症状がある。高口蓋、低位耳介等の小奇形もしばしば合併する。精神遅滞を伴う報告もあるが一般に知能障害は認めない。本症候群は多彩な骨格異常を伴うことでも知られ、大関節の屈曲拘縮、脊椎の後彎が認められる。扁平椎体、骨端、骨幹端異形成がみられるが、骨端、骨幹端異形成は大関節に限られる。大腿骨頭の変化は比較的強く、内反股を認めることがある。低身長を認めることが多い。

2. 検査所見

筋電図所見は連続的な自発性活動電位を示し、筋の安静を保っても筋放電が終止せずに持続する。特に臨床所見の強い顔面、大腿部では筋電図所見も著明である。この自発性活動電位は低振幅

で漸減がなく長く持続するといった特徴をもつ。Taylorらは、この自発電位がクラレ curareにより減弱することから他のミオトニア症候群で観察されるミオトニア電位とは異なる可能性を示した³⁾。その後も、いくつかの症例報告でSJSのミオトニアについて神経原性か筋原性かの議論が残されている。神経原性といっても神経伝導速度は正常であることから末梢神経由来ではなく、神経筋接合部の異常等も考えられる。他のミオトニア症候群に観察されるミオトニアとは違った発症機序が想定され興味深い。筋病理所見は筋線維の大小不同、中心核増生等非特異的なミオパチー様所見をとる。径の大小不同は主にタイプ1線維に認められる。神経原性所見は一般に観察されない。興味深い所見としては、アセチルコリンエステラーゼ（AChE）染色が神経筋接合部に局在せず、大径の線維を中心に筋表面膜全体に認めるという特異的な所見を認めた症例報告がある⁴⁾。電子顕微鏡的所見としては、筋形質拡大、筋原線維束間の空胞、筋原線維およびZ板の断裂等が認められ、神経終板には大きな変化がなかったという報告がある。クレアチンカイネース（CK）値は正常あるいは、経過とともに軽度上昇する。

3. 臨床病型分類と連鎖解析

SJSの遺伝形式は、常染色体劣性遺伝様式をとるとされるが常染色体優性遺伝型を示した家系の報告もある⁵⁾。1962年にSchwartzらによって“Congenital blepharophimosis associated with a unique generalized myopathy”として報告されて以後、50例以上が文献的に報告されてきたが、臨床症状、発症様式の多様性を認め、その病因も不明であった。臨床的に出生時には明らかな異常を認めず、成長とともにミオトニアと骨格系の異常が出現するものを1A型、出生後まもなくから骨格の異常が明らかになるものを1B型とされる。さらに出生時より骨格異常が強く予後の悪い重症

型が新生児型、あるいは2型と分類されるが、連鎖解析の結果2型は染色体1番に連鎖しないことから、遺伝的病因は均一ではないと考えられている⁶⁾。現在のところSJS2型は神経筋疾患と骨軟骨異常を合併し、乳児期致死を呈するStuve-Wiedemann症候群と同一の疾患ととらえる方向にある⁷⁾。Schwartzらの原著症例は1型と考えられるが1歳時から症状が出現しており、1A型と1B型の分類は必ずしも容易ではないと思われる。我々が遺伝子検索した3症例のうち、最も軽症と考えられた症例1は骨格異常も比較的軽く1A型と考えられる⁸⁾。NicoleらはSJS遺伝子座を染色体1番1p36.1-1p34に局在することを示し⁹⁾、さらにこの領域をせばめることにより、1p36.1-p35にマップされていたパールカン遺伝子（perlecan: HSPG2）がSJS遺伝子座に含まれることをみいだした。さらに3家系のSJSでエクソンスキッピング、ミスセンス、ノンセンス変異の3種類のhomozygous mutationを報告した¹⁾。我々もこれとは独立に3症例5種類のパールカン遺伝子変異を報告した²⁾。

B. SJSの原因遺伝子パールカンの分子生物学

SJSの原因遺伝子としてミオトニアや骨病変の発症のメカニズムとの関連性に興味もたれているパールカンであるが、本来基底膜の主要構成成分として同定されたヘパラン硫酸プロテオグリカンで、多様な生物学的活性をもつ多機能細胞外マトリックスとして知られている。パールカンはラミニン、ナイドジェン、フィブロネクチン、IV型コラーゲン等の細胞外マトリックスと結合して基底膜を構成する構造蛋白質である一方、FGFをはじめとする成長因子やその細胞膜受容体とも結合して様々な細胞内シグナルを修飾、制御する機能分子としても働き、器官の形態形成過程にお

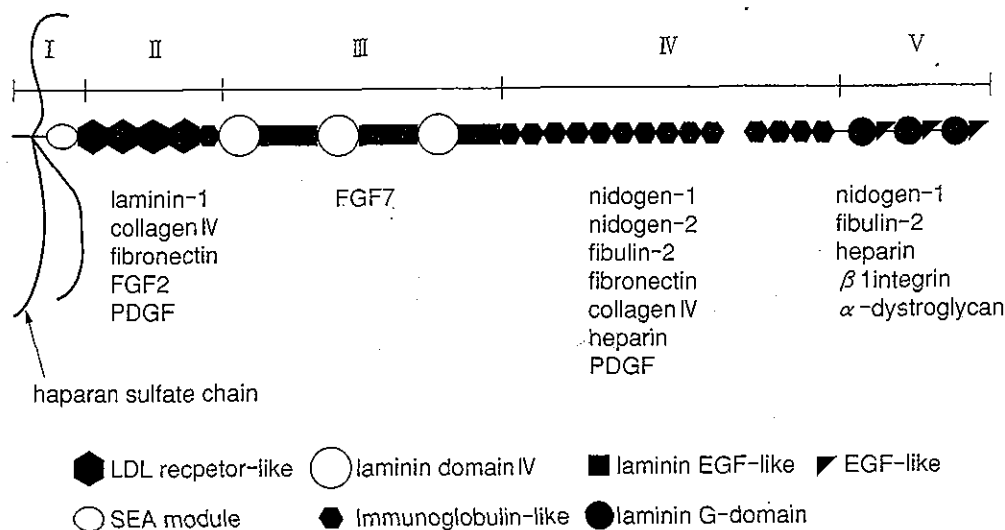


図1 パールカン分子の機能ドメインとその結合蛋白質 (文献11より一部改変)

ドメインI: 3カ所のヘパラン硫酸鎖の結合部位が存在する。ドメインII: LDL受容体のLDL結合部位の配列と相同性があり、4つのシステインに富むモチーフが存在する。ドメインIII: ラミニンの短鎖のN末端領域と高い相同性をもち、3つの球状のサブドメインとEGF様の繰り返し配列をもつ。ドメインIV: この領域の前半は他の基底膜蛋白質と結合性をもち、パールカンの細胞外マトリックスでの局在に重要である。ドメインV: ラミニン α 鎖のC末端球状Gドメインと相同性をもつ球状サブドメインと、EGF様繰り返し配列からなり、 α -ジストログリカンやインテグリン β 1との強い結合性から細胞接着等の機能が想定される。

ける上皮-間充織相互作用に重要であるとされている。また、血管新生、組織の修復、癌細胞の増殖、転移、浸潤等に関与していると考えられている。コア蛋白質は400kDa以上あり、5つの機能ドメインをもち、各ドメインの生物学的活性は*in vitro*の研究結果から図1のように報告されている¹⁰⁾。

C. マウスおよびヒトにおけるパールカン遺伝子の変異と病態

1. パールカンノックアウトマウスの作成とその表現型

我々はこの多様な機能をもつパールカンの*in vivo*での役割を明らかにし、その欠損が発生にどのような障害をもたらすか、また、どのような疾患を引き起こすのかを調べるため、パールカン遺伝子のノックアウトマウスを作成した。このマウスの一部は頭部形成異常のため胎生10.5日頃に

早期胎生期致死を呈するが、大部分のものは軟骨異形成症による周産期致死を呈することがわかった¹²⁾。ほぼ同時期にCostellらの作成したマウスからも同様の表現型が報告された¹³⁾。変異マウスは、内軟骨性骨化の障害により明らかな四肢短縮を呈するが、膜性骨化は障害されないため、四肢長管骨は横径が増し、太く短く発達する。脊椎の椎体部分の発生も内軟骨性骨化によるので、長管骨と同様の変化をとる。また胎生後期まで生存し、軟骨形成異常を呈したマウスの一部で脳ヘルニアも合併した。

2. パールカン機能完全欠損による遺伝性疾患の同定と遺伝子解析

ノックアウトマウスの解析結果から、これまで考えられてきた基底膜の主要構成成分としての役割のみならず、軟骨発生分化におけるパールカンの重要性が示された。基底膜をもたない軟骨組織において、致命的な形成異常を示したことは予想

外の結果であったが、その後ヒトでのパールカン欠損病をみいだす大きな鍵を与えた。我々は、パールカン欠損マウスの表現型から、ヒトでのパールカン欠損疾患が存在するものと考え、その探索を開始した。候補となる疾患の同定に際しては、ヒトでのパールカン欠損病でもノックアウトマウスと同じような表現型を呈する可能性から、ノックアウトマウスでの特徴的な骨X線所見、骨成長板の異常病理所見と合致する常染色体劣性遺伝形式軟骨異形成症を捜した。その結果、周産期致死性の軟骨異形成症 (Silverman-Handmaker型 dyssegmental dysplasia: DDSH) の表現型がパールカンノックアウトマウスのそれと大変類似していることがわかった¹⁴⁾。この疾患では患児は体幹、四肢とも著しく短縮し、四肢長管骨の彎曲、椎体骨の大小不等同ノックアウトマウスと非常に似た骨格異常を示すが、さらに一部の例で、脳ヘルニアを合併するとされる点もノックアウトマウスと共通し、非常に有力な候補と考えられた。この遺伝子は100kb以上の巨大遺伝子であるためその欠損病を捜すアプローチとして、1. 各ドメインに対する抗体を用いた免疫染色によりスクリーニングを行い、2. cDNAを用いたRT-PCRでmRNAレベルの異常を検出し、3. 染色体DNAレベルでの変異を同定するというアプローチを用いて、パールカン遺伝子変異を探索した。その結果3症例2種類の遺伝子変異を同定した。これらの変異は、おのおのフレームシフトを起こし変異の直後で転写を終了するアウトオブフレーム変異であった。我々はさらに、蛋白質レベルの解析を行い、遺伝子変異によりこの疾患ではパールカンが細胞外に分泌されず、細胞外マトリックスとして機能しないことがわかった。すなわち、パールカン機能完全欠損に起因する疾患と考えられた。

3. パールカン機能部分欠損による遺伝性疾患: SJSの同定と遺伝子解析

ところで、パールカン分子は、前述したように、複数のドメインからなる巨大な多機能分子であり、部分欠損などによるその他の表現型も考慮する必要がある。そこで、我々はパールカン遺伝子がマップされている染色体1p36に連鎖する疾患を探したところ、SJSが候補としてあげられた。詳細なマッピングを行ったところ、SJSの遺伝子座が、パールカン遺伝子座と450kb以内の距離にあることがわかった。SJSは、ミオトニア症状と軟骨異常を伴う遺伝性疾患でDDSHと異なり患者は生存する。骨格異常を伴うことから、パールカン異常による疾患である可能性が強く示唆された。また、ミオトニア症状に関しても、以下の理由からパールカン異常と関連する可能性が考えられた。パールカンは筋細胞をとりまく基底膜に局在し、特に神経筋結合部 (NMJ) には多く存在する (図2)。パールカン分子の生物学的機能の一つに、NMJ特異的な非対称型AChEのコラーゲン様ドメイン collagen-like tail (ColQ) と結合

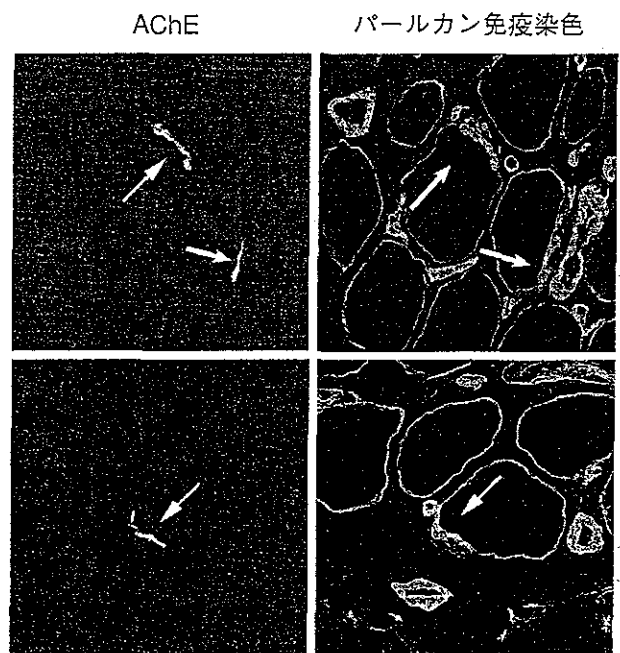


図2 神経筋接合部におけるパールカンとAChEの共局在

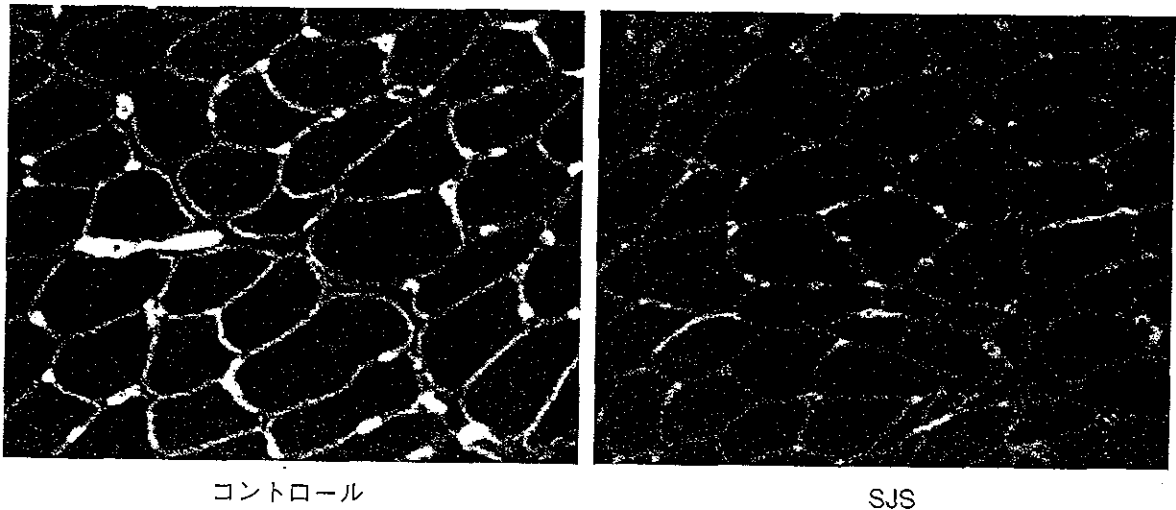


図3 生検筋のパールカン免疫染色 (文献2より改変)

することが知られている¹⁵⁾。ColQはAChEの構造のうち神経筋接合部基底膜に接着する尾部構造である¹⁶⁾。それゆえ、パールカンは神経筋接合部(NMJ)の基底膜にAChEを結合、集束させることにより、アセチルコリン(ACh)による神経筋の興奮とその解除を速やかに調整していると考えられ、その欠損は筋の収縮活動に異常をきたす可能性が充分考えられる。このように、遺伝子座の一致と臨床症状の特徴からSJSをパールカン異常による第二の疾患の有力な候補と考え、前述のアプローチを進め、前述のように遺伝子変異を確認した。さらに我々は、SJSでの蛋白質レベルの解析を行い、DDSHと違いSJSではパールカンが細胞外に分泌され、筋基底膜に局在しているということを確認した(図3)。すなわち、パールカン機能部分欠損による遺伝性疾患として同定した。これはDDSHがSJSと比べ、明らかに良好な経過をとる大きな理由と考えられた。

D. 先天性筋無力症候群とSJSにおけるAChE欠損と発症機構

先にSJSにおけるパールカン分子の欠損が、AChEの神経筋接合部(NMJ)基底膜への結合、

集束に影響し、神経筋の興奮とその解除に異常をきたす可能性について述べた。パールカン遺伝子異常が確認されているSJS患者生検筋に神経筋接合部が含まれていない場合、生検標本においてこれを確認することは困難である。我々は、パールカンノックアウトマウスにおける神経筋接合部の解析を行った。機能完全欠損であるノックアウトマウスは出生時まで死亡するが、神経筋接合部発生、形成を観察することができる。新生ノックアウトマウスの横隔膜、肋間筋、骨格筋等において末梢神経の支配、神経筋接合部へのアセチルコリン受容体、アグリン、ラプシン等の分子の集合などがみられほぼ正常な神経筋接合部が形成されているにもかかわらずAChEの局在のみが欠損していることを示した¹⁷⁾。筋全体の生化学的検討ではAChEの各アイソフォームは確認されたことから、生成されたAChEの基底膜への局在化の障害と考えられた。終板AChEの欠損する疾患として先天性終板AChE欠損症がある^{18,19)}。これは常染色体劣性のまれな疾患で、ColQ遺伝子の異常により終板におけるAChEの欠損を引き起こす。臨床的には乳児期または小児期に始まる。易疲労性と脱力を主症状とする先天性筋無力症候群で、躯幹筋の脱力と易疲労性のため、起立歩行

時に側彎, 前彎などの姿勢異常を示す。AChEの欠損症ではシナプス間隙に過剰のAChが存在する。このため, AChRの開口時間の延長による脱分極性ブロックやAChRの脱感作をきたし, 神経筋伝達が阻害され筋力低下の原因となる¹⁸⁻²⁰⁾。脱分極の程度が軽い場合はブロックではなく持続性の筋収縮をきたす可能性があり, SJSにおけるミオトニア発症機序として想定される。最近筆者らは, パールカンノックアウトマウスの軟骨異常をレスキューすることにより延命をはかり, パールカンの欠損による筋, 神経筋接合部の変化を形態的, 生理学的幅広く解析することを試みており, これによりSJSの発症機序の解明がさらに進むことが期待される。先天性終板AChE欠損症とSJSはともにAChEの欠損を示す病態としてその異同は非常に興味深く, 今後の研究発展がのぞまれるところである。

現在のところSJSに対する治療は対症療法にとどまるが, 今後, 蛋白質レベルでの異常と臨床症状の関連性等の解明により, 発症のメカニズムが明らかになり, 症状の軽減特にミオトニアのコントロールが効率的に行えることが望まれる。

文献

- 1) Nicole S, Davoine CS, Topaloglu H, et al. Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome(chondrodystrophic myotonia). *Nat Genet* 2000; 26: 480-3.
- 2) Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, et al. Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1368-75.
- 3) Taylor RG, Layzer RB, Davis HS, et al. Continuous muscle fiber activity in the Schwartz-Jampel syndrome. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 33: 497-509.
- 4) Fowler WM Jr, Layzer RB, Taylor RG, et al. The Schwartz-Jampel syndrome. Its clinical, physiological and histological expressions. *J Neurol Sci* 1974; 22: 127: 46.
- 5) Pascuzzi RM, Gratianna R, Azzarelli B, et al. Schwartz-Jampel syndrome with dominant inheritance. *Muscle Nerve* 1990; 13: 1152-63.
- 6) Brown KA, al-Gazali LI, Moynihan LM, et al. Genetic heterogeneity in Schwartz-Jampel syndrome: two families with neonatal Schwartz-Jampel syndrome do not map to human chromosome 1p34-p36.1. *J Med Genet* 1997; 34: 685-7.
- 7) Cormier-Daire V, Superti-Furga A, Munnich A, et al. Clinical homogeneity of the Stuve-Wiedemann syndrome and overlap with the Schwartz-Jampel syndrome type 2. *Am J Med Genet* 1998; 78: 146-9.
- 8) Ho NC, Sandusky S, Madike V, et al. Clinico-pathogenetic findings and management of chondrodystrophic myotonia (Schwartz-Jampel syndrome): a case report. *BMC Neurol* 2003; 3: 3.
- 9) Nicole S, Ben Hamida C, Beighton P, et al. Localization of the Schwartz-Jampel syndrome (SJS) locus to chromosome 1p34-p36.1 by homozygosity mapping. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1633-6.
- 10) Iozzo RV. Perlecan: a gem of a proteoglycan. *Matrix Biol* 1994; 14: 203-8.
- 11) Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y. [Roles of perlecan in development and disease: studies in knockout mice and human disorders]. *Seikagaku* 2001; 73: 1257-61.
- 12) Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, et al. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* 1999; 23: 354-8.
- 13) Costell M, Gustafsson E, Aszodi A, et al. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* 1999; 147: 1109-22.
- 14) Arikawa-Hirasawa E, Wilcox WR, Le AH, et al. Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of perlecan. *Nat Genet* 2001; 23: 354-8.
- 15) Steen MS, Froehner SC, PerleCan fix your muscle AChEs. *Trends Neurosci* 2003; 26: 241-2.
- 16) Krejci E, Thomine S, Boschetti N, et al. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J Biol Chem* 1997; 272: 22840-7.
- 17) Arikawa-Hirasawa ERS, Rotundo RL, Yamada Y. Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci* 2002; 5: 119-23.
- 18) Engel AG, Ohno K, Sine SM. Congenital myasthenic