

**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

総合研究報告書

主任研究者 平澤恵理

平成17年(2005年)3月

目次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

（総合）研究報告書

研究課題名：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（課題番号 H14-こころ-015）

主任研究者：	平澤恵理	順天堂大学大学院医学研究科	講師
分担研究者	林由起子	国立精神・神経センター神経研究所	室長
分担研究者	村山季美枝	順天堂大学大学院医学研究科	助教授
分担研究者	多田昇弘	順天堂大学大学院医学研究科	講師
分担研究者	杉江和馬	奈良県立医科大学医学部	助手

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的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、リポミクスの高精度化、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解明を目的とする。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機能解明を行い、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。ラミニン α 2鎖欠損に関してはジストロフィン関連分子群の異常として解明が進んでいるので、最近遺伝子異常が解明されたパールカン、VI型コラーゲンを中心に検討する。筋疾患の発症機構解明と新しい治療法への新展開を目指してプロテオミクスの導入を試みた。

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の実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 α 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 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 α 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。

【倫理面への配慮】

各研究機関の定める倫理規定に従い研究を進める。患者から血液・組織などの提供を受ける際は、インフォームドコンセントを得て提供を受ける。動物実験に関わる部分は、苦痛の軽減を最大限に配慮した。

C. 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の要因として検討中する必要がある。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モデル動物作成につきパールカン、VI型コラーゲン、ラミニン $\alpha 1$ 鎖を中心に行った、本研究により、これら疾患の発症の分子機構が明らかになってきた。また疾患のマウスモデル作成とその解析により、遺伝子機能と疾患の関連が明らかになってきた。パールカン異常疾患における分子機序の実験系が確立されたことにより、治療法の研究開発への道筋が開かれた。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、機能をはたすと考えられ、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。今後、プロテオミクスでの細胞シグナル制御機構の分析により、細胞外マトリックス疾患の共通機序の解明を行い、これらの疾患の効果的な治療開発を目指したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. <2002年>

- 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..
- Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Oh SJ, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Lamperti C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Nonaka I, Hirano M, Nishino I. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology*. 2002 Jun 25;58(12):1773-8.
 - Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I. Ullrich disease: collagen VI deficiency: EM suggests a new basis for muscular weakness. *Neurology*. 2002 Sep 24;59(6):920-3.
 - Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimiya J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology*. 2002 Dec 10;59(11):1689-93.
 - 張 尚美、石川達也、埜中征哉、塚本東子、齋藤万里子、坂 京子、和田郁雄、杉江和馬、西野一三。早期より整形外科的問題を呈したメロシン陽性型先天性筋ジストロフィー—— Ullrich 病との関連を含めて——。 *脳と発達* 2003 35(2):159-164
 - 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. *Proteomics* 2 (12), 1672-1681, 2002.
 - Kato A, Kawamata N, Tamayose K, Egashira M, Miura R, Fujimura T, Murayama K, Oshimi K. Ancient ubiquitous protein 1 binds to the conserved membrane-proximal sequence of the cytoplasmic tail of the integrin subunits that plays a crucial role in the inside-out signaling of α_3 . *J Biol Chem* 277 (32), 28934-28941, 2002.
 - Takai T, Mineki R, Nakazawa T, Takaoka M, Yasueda H, Murayama K, Okumura K, Ogawa H. Maturation of the activities of recombinant mite allergens Der p1 and Der f1, and its implication in the blockade of proteolytic activity. *FEBS Letters* 531, 265-272, 2002.
 - Yamasaki H, Mineki R, Murayama K, Ito A, Aoki T. Characterization and expression of the *Fasciola gigantica* cathepsin L gene. *Int J Parasitol* 32(8), 1031-1042, 2002.
 - Sakurada S, Watanabe H, Hayashi T, Yuhki M, Fujimura T, Murayama K, Sakurada C, Sakurada T. Endomorphin analogues containing D-Pro(2) discriminate different mu-opioid receptor mediated antinociception in mice. *Br J Pharmacol* 137(8), 1143-1146, 2002.
 - Hung KC, Wu HE, Mizouchi H, Sakurada S, Okayama T, Fujimura T, Murayama K, Sakurada T, Fujimoto JM, Tseng LF. D-Pro(2)-endomorphin-1 and D-Pro(2)-endomorphin-2, respectively attenuate the antinociception induced by endomorphin-1 and endomorphin-2 given intrathecally in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 303(2) 874-879, 2002
 - Tada N: Effect of pre-incubation and centrifugation before and after freezing on the motility of mouse spermatozoa frozen by a new method for cryopreservation. *J Reprod Engineer*

5, 193-202, 2002

- Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusahara M, Moroi M, Tada N, and Ohsuzu F: Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circulation Res* 91, 77-82, 2002
- Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Kameda S, Iino N, Kazawa JJ, Takahashi N, Sugawa M, Hanawa H, Tada N, Miyazaki J, and Gejyo F: High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection. *J Gene Med* 4, 333-341, 2002

< 2 0 0 3 年 >

- 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
- Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, Van Der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM. Expression profiling of FHSD 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
- 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
 - Kaga 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
 - Isoda K, Kamezawa Y, Ayaori M, Shiigai M, Kusuhara M, Tada N, and Ohsuzu F: Osteopontin transgenic mice fed a high cholesterol diet develop early fatty-streak lesions. *Circulation* 107, 679-681, 2003
- < 2 0 0 4 年 >
- 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. 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/world/nervous/NS_J.html)
- Matsumoto H, Hayashi 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, Hayashi YK. Dysferlin interacts with affixin (b-parvin) at the sarcolemma. *J Exp Neurol* (in press).
- 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
- 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
- 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, 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
- 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.
- Aoki Y, Kogawa M, Ichimura S, Kikuchi T, Tada N and Fujikawa K: Overexpression of the human interleukin-1 alpha gene causes osteopenia in mice. *J Rheumatol*, in press

- 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
 - 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
 - 4. Niki Y, Yamada H, Kikuchi T, Toyama Y, Matsumoto H, Fujikawa K, and Tada N: Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1a transgenic mice. *J Immunol* 172, 571-584, 2004
- < 2 0 0 5 年 >
- 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
 - 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
3. 学会発表
- < 2 0 0 2 年 >
- Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, Yamada Y. Perlecan is essential for localizing AChE to the neuromuscular junctions , *Experimental Biology New Orleans, Louisiana.U.S.A . April 20 - 24, 2002*
 - Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Sugie K, Rotundo RL, Yamada Y. Perlecan is essential for clustering of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
 - 平澤恵理, Le A, Dalakas M, 西野一三, 桒中征哉, 水野美邦, 山田吉彦. Schwartz-Jampel 症候群におけるパールカンの部分機能欠損 第 43 回日本神経学会総会、2002 年 5 月札幌
 - Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Nonaka I, Nishino I, Oh SJ, Takahashi M, Saitoh S, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Byrne E, Lamperti C, DiMauro S, Hirano M. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
 - Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I. Ullrich disease with collagen VI deficiency suggesting a new mechanism of muscular dystrophy. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
 - Kaneda D, Kato T, Yamamoto A, Sugie K, Nonaka I, Nishino I. A novel autophagic vacuolar myopathy –adult onset form-. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
 - Nishino I, Murayama K, Noguchi S, Sugie K,

Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is associated with GNE gene mutations. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.

- Yoshimura M, Itoh Y, Yuasa K, Sakamoto M, Sugie K, Nonaka I, Takeda S, Last J, Taylor A. Immunohistochemical analysis of skeletal muscles from canine X-linked muscular dystrophy. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver July 7-12, 2002.
- 石川晴美、杉江和馬、村山恵子、西野一三、南 成祐、埜中征哉：Ullrich 病の臨床病理学的検討。第 43 回日本神経学会総会、2002 年 5 月 札幌。
- 杉江和馬、山本彩香、埜中征哉、西野一三：Danon 病の女性患者の臨床的特徴。第 44 回日本小児神経学会総会、2002 年 5 月 仙台。
- 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.
- 岩渕和久、Laura Mauri, Alessandro Prinetti, Sandro Sonnino, 小林俊秀、石井久美子、牧

野麻美、加賀直子、村山季美枝、長岡功：グリコシグナルドメインの情報伝達におけるスフィンゴ糖脂質・脂肪酸鎖の役割。第 75 回日本生化学会大会、2002 年 10 月 京都

- 加賀直子、相馬早苗、瀬山邦明、福地義之助、村山季美枝：ラット脳に含まれるエラスチン架橋物質デスマシン及びイソデスマシンの液体クロマトグラフィー質量分析計による定量法。第 75 回日本生化学会大会、2002 年 10 月 京都
- 西谷寛仁、谷田以誠、峯木礼子、高ひかり、村山季美枝、富野康日己、上野隆、木南英紀：GATE-16 に相互作用するタンパク質の解析。第 75 回日本生化学会大会、2002 年 10 月 京都
- 藤村務、進藤典子、峯木礼子、高ひかり、吉川美加、村山季美枝：マウス肝臓オルガネラたんぱく質の加齢変化- プロテオミクス解析における群別発現たんぱく質の有意差検定-。第 75 回日本生化学会大会、2002 年 10 月 京都
- 山倉文幸、松本孝、平岡行博、大森大二郎、内田桂吉、藤村務、高ひかり、村山季美枝：ミエロペルオキシダーゼ反応で生じる活性窒素酸化物によるヒト Cu,Zn-SOD の Trp32 のニトロ化。第 75 回日本生化学会大会、2002 年 10 月 京都

< 2 0 0 3 年 >

- 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、榎中征哉、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
- 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 alpha-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. alpha-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
 - 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, Takah, 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.
- < 2004年 >
- 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 α 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 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 Wasington 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
- 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, 桒中征哉, 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, 星加明徳, 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.
 - Hayashi 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, Hayashi 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, Hayashi 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, Hayashi YK, Kurokawa R, Ogawa M, Goto K, Noguchi S, Nishino I: No dystrophic 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 憲, 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
 - 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.

7. 知的所有権の出願・取得状況

特になし

II. 研究成果の刊行に関する一覧表