

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

糖鎖修飾異常による遺伝性筋疾患の病態解明と

治療法の開発に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 西 野 一 三

平成17(2005)年3月

目次

I.	総括研究報告	
	糖鎖修飾異常による遺伝性筋疾患の病態解明と治療法の 開発に関する研究	1
	西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
II.	分担研究報告	
1.	α -ジストログリカノパチー関連分子の機能解明に 関する研究	6
	西野 一三 (国立精神・神経センター神経研究所)	
2.	本邦における α -ジストログリカノパチーに関する研究	10
	林 由起子 (国立精神・神経センター神経研究所)	
3.	縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) の 病態解明に関する研究	13
	野口 悟 (国立精神・神経センター神経研究所)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	17
IV.	研究成果の刊行物・別刷	18

I. 総括研究報告書

糖鎖修飾異常による遺伝性筋疾患の病態解明と 治療法の開発に関する研究

主任研究者 西野 一三 国立精神・神経センター神経研究所部長

研究要旨 筋細胞膜タンパク質 α -ジストログリカン (α DG) の糖鎖修飾不全を原因とする α -ジストログリカノパチー (α DGP) とシアル酸合成酵素遺伝子の異常を原因とする縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) は、どちらも本邦に患者数の多い難病であり、一日も早い治療法の開発が望まれている。本プロジェクトにおいては、両疾患の病態解明と治療法開発を目指して、研究を進めてきた。

α DGP は生後早期に発症する先天性筋ジストロフィー (CMD) で症状の類似した疾患群である。福山型 CMD (FCMD)、Walker-Warburg 症候群 (WWS)、muscle-eye-brain 病 (MEB)、MDC1C、MDC1D 及び Large^{myd} マウスはそれぞれ、フクチン、POMT1、POMGnT1、FKRP、Large 遺伝子の変異により引き起こされる。これらの遺伝子産物 (α DGP 関連分子) のうち、POMT1 および POMGnT1 は糖転移活性が示されているが、他の 3 つについては糖転移酵素であろうと推測されているだけである。我々は、フクチン、LARGE および POMGnT1 が複合体として一つの機能単位であること、また、FKRP と POMT1 が同局在していることを見出した。

DMRV は、シアル酸合成酵素 UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE) 遺伝子の変異により起こること、変異蛋白質の酵素活性が減少していること、DMRV 骨格筋・培養細胞でシアル酸含量が減少していることを明らかにした。また、DMRV モデルマウスの作製を行い、現在交配によって、匹数を増加させている段階である。今後、行動及び病理解析を行っていく予定である。

分担研究者

西野 一三

国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 部長

林 由起子

国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 室長

野口 悟

国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 室長

本邦に患者数の多い難病であり、一日も早い治療法の開発が望まれている。本申請研究は両疾患の病態解明と治療法開発を目指すものである。

α DGP は生後早期に発症する CMD で症状の類似した疾患群である。FCMD、WWS、MEB、MDC1C、MDC1D 及び Large^{myd} マウスはそれぞれ、fukutin、POMT1、POMGnT1、FKRP、Large 遺伝子の変異により引き起こされる。これらの遺伝子産物 (α DGP 関連分子) のうち、POMGnT1 は糖転移活性が示されているが、他の 4 つについては糖転移酵素であろうと推測されているだけである。我々は、これらの α -DGP 関連分子の機能を明らかにし、 α -DGP の分子病態を明らかにすることを目的としている。

A. 研究目的

筋細胞膜タンパク質 α DG の糖鎖修飾不全を原因とする α DGP とシアル酸合成酵素遺伝子の異常を原因とする DMRV は、どちらも

一方、DMRV に関しては、2001 年、イスラエルの Eisenberg らが、遺伝子封入体ミオパチー (hereditary inclusion body myopathy: HIBM) 患者に GNE 遺伝子変異が認められることを報告したことを契機に、多数の DMRV/HIBM 患者において様々な GNE 変異が見出されてきている。この遺伝子は、シアル酸合成経路の律速段階を触媒する酵素 UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (UDP-GlcNAc 2-epimerase; GNE) と、その次の反応を触媒する酵素 N-acetylmannosamine kinase (ManNAc kinase; MNK) の 2 つの酵素活性を持つ蛋白質をコードしている。

興味深いことに、これまでに同定されているほぼ全ての変異がミスセンス変異である。このミスセンス変異が如何にして、DMRV/HIBM の病理学的変化を引き起こすかは依然として不明である。GNE 遺伝子産物の機能的異常を示さない限りは、依然として GNE 遺伝子を DMRV/HIBM の原因遺伝子と断定することはできない。さらには、治療法開発の目処も立たない。そこで、GNE 遺伝子産物機能を評価し、実際にその機能が障害されているかどうかを検討した。また、モデルマウスの作製を目指した。

B. 研究方法

α -DGP に関しては、 α -DGP 各責任遺伝子産物に対する抗体を作製し、その細胞内局在を検討した。また、fukutin, Large, POMGnT1 の組み換え蛋白質を作製して COS7 細胞および C2C12 筋管細胞に導入し、細胞内局在を検討するとともに、免疫沈降を行い、これら 3 分子の相互作用について検討した。また、FCMD 患者細胞において、 ^3H ラベルした GlcNAc の α -DG への取り込みを観察した。

一方、DMRV に関しては、これまでに、同定されているミスセンス変異を有する組み換え蛋白質を作製し、酵素活性の測定を行った。また、GNE/MNK がシアル酸合成経路の重要な酵素であるならば、DMRV/HIBM 患者においては、当然、シアリル化異常があることが予想される。我々は、患者培養細胞に対して、各種 lectin を用いることで、患者細胞におけるシアリル化状態を検討した。また、見出されたシアリル化異常が、GNE/MNK の代謝産物の添加により、回復可能

であるかどうかを検討した。さらに、患者筋組織において、lectin 染色を行い組織学的にシアリル化異常を評価するとともに、2次元電気泳動を行い、特に α -ジストグリカンとリソソーム膜蛋白質に糖鎖異常があるかどうか注目して検討した。

(倫理面への配慮)

本研究において使用する全てのヒト検体は、国立精神・神経センター倫理委員会承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究使用に対する検体の使用許可 (インフォームド Consent) を得たものである。検体を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用した。検体の保存ならびに匿名化したうえでの破棄は、患者および家族の意思を尊重している。遺伝子解析に関してはヒトゲノム解析研究に関する共通指針を遵守した。また、すべての動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従って行った。研究に使用する際には、必要最小限の動物を使用するとともに、動物に苦痛を与えないよう最大限の注意を払った。

C. 研究結果

fukutin, Large, POMGnT1 は、何れも cis-Golgi マーカーである GM130 と共局在していた。さらに、それぞれの分子の二重免疫染色でも共局在を確認した。また、cis-Golgi 変性剤である Brefeldin 処理により、これら分子の細胞内局在が変化することも確認した。免疫沈降では、fukutin と POMGnT1, fukutin と Large が共沈し、さらに、fukutin, Large, POMGnT1 の共沈も認められた。POMGnT1 抗体は、内在性分子も認識することが可能であった。骨格筋での発現パターンは cis-Golgi の分布として報告されているものに一致していた。 ^3H ラベルした GlcNAc の α -DG への取り込みは、コントロール細胞では正常に取り込みが認められたが、FCMD 患者由来の筋管細胞では、GlcNAc 取り込みが認められなかった。

GNE 組み換え蛋白質に対して、GNE と MNK それぞれの酵素活性の評価を行った。その結果、GNE ドメインの変異では GNE 活性が、MNK ドメインでの変異では MNK 活性がそれ

ぞれ特異的に阻害されていた。WGA, SBA を含む各種 lectin を用いた患者培養細胞の糖修飾の評価では、線維芽細胞・筋管細胞ともに、WGA でのシグナルが減少し、SBA のシグナルが上昇していた。WGA はシアル酸を、SBA は GalNAc を認識することから、DMRV 患者細胞においては、シアリル化が低下し、代わりに GalNAc が露出していることが明らかになった。さらに、GNE 代謝産物 ManNAc およびシアル酸そのものである NeuAc を培養液に加えると、シアリル化が回復した。また、患者筋組織において、lectin 染色を行ったところ、縁取り空胞を認める萎縮線維中心に染色異常を認めた。

患者筋組織では、縁取り空胞を伴う萎縮筋にのみ低シアリル化と SBA シグナルの上昇を認めた。このことは、ごく一部の筋線維にのみシアリル化異常が認められることを示している。患者筋組織を用いて 2 次元電気泳動を行い、 α -ジストログリカンおよびリソソーム膜蛋白質 LAMP-2 に注目した解析を行ったが、正常筋と比較して有意な差は認めなかった。

D. 考察

これらの結果は、fukutin, Large, POMGnT1 が cis-Golgi において複合体を形成していること、さらには、この複合体自体が α -DG に対する GlcNAc 転移能を有していることを示唆している。

DMRV/HIBM 患者の GNE 遺伝子変異が機能喪失型変異であること、この変異により細胞・組織の低シアリル化を来していること、そしてこの低シアリル化は GNE 代謝産物の投与によって回復可能であることを、明らかにした。このことは、少なくとも in vitro では、DMRV/HIBM が治療可能であることを示している。当然のことながら、このような代謝産物投与により in vivo においても、何らかの治療が出来る可能性を示唆している。現在、DMRV モデルマウスとして、GNE^{-/-}, Tg GNE c.1695G>C マウスを作製中であり、今後、治療法開発と詳細な病態解析を目指した研究に用いる予定である。

E. 結論

fukutin, Large, POMGnT1 は cis-Golgi において複合体を形成しており、この複合

体自体が α -DG に対する GlcNAc 転移能を有している。DMRV/HIBM は GNE 遺伝子の機能喪失型変異により、シアリル化の低下を来すことにより発症している。この低シアリル化は、GNE 代謝産物投与により回復可能であり、同様の手法による治療法を開発できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsumoto H, Hayashi YK, Kim DS, Ogawa M, Murakami T, Noguchi S, Nonaka I, Nakazawa T, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, Nishino I: Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of α -dystroglycan in Japan. *Neuromuscul Disord*, in press.

2) Goh KJ, Wong KT, Nishino I, Minami N, Nonaka I: Oculopharyngeal muscular dystrophy with PABPN1 mutation in a Chinese Malaysian woman. *Neuromuscul Disord* 15: 262-264, 2005.

3) Tsai TC, Horinouchi H, Noguchi S, Minami N, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I: Characterization of MTM1 mutations in 31 Japanese families with myotubular myopathy, including a patient carrying 240 kb deletion in Xq28 without male hypogenitalism. *Neuromuscul Disord* 15: 245-252, 2005.

4) Sugie K, Murayama K, Noguchi S, Murakami N, Mochizuki M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Two novel CAV3 gene mutations in Japanese LGMD1C patients. *Neuromuscul Disord* 14: 810-814, 2004.

5) Laing NG, Clarke NF, Dye DE, Walker KR, Kobayashi Y, Shimakawa S, Ogihara T, Ouvrier R, Sparrow JC, Nishino I, North KN, Nonaka I: Actin mutations are one cause of congenital fibre type

disproportion.

Ann Neurol 56: 689-694, 2004.

6) 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.

7) Yakushiji Y, Satoh J, Yukiwake M, Yamaguchi K, Nakamura I, Nishino I, Kuroda Y: Interferon β -responsive inclusion body myositis in a hepatitis C virus carrier. *Neurology* 63: 587-588, 2004.

8) Barresi R, Michele DE, Kanagawa M, Harper HA, Dovico SA, Satz JS, Moore SA, Zhang W, Schachter H, Dumanski JP, Cohn RD, Nishino I, Campbell KP: LARGE can functionally bypass α -dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med* 10: 696-703, 2004

9) 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* 135: 709-712, 2004.

10) Ohashi Y, Hasegawa Y, Murayama K, Ogawa M, Hasegawa T, Kawai M, Sakata N, Yoshida K, Yarita H, Imai K, Kumagai I, Murakami K, Hasegawa H, Noguchi S, Nonaka I, Yamaguchi S, Nishino I: A new diagnostic test for VLCAD deficiency using immunohistochemistry. *Neurology* 62: 2209-2213, 2004.

11) Yamanaka G, Goto K, Oya Y, Miyajima T, Hoshika A, Nishino I, Hayashi YK: FSHD-like patients without 4q35 deletion. *J Neurol Sci* 219: 89-93, 2004.

12) Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Murakami N, Sakuta R,

Mochizuki M, Michele DE, Campbell KP, Nonaka I, Nishino I: Abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan due to POMT1 gene mutation in a Japanese patient with Walker-Warburg syndrome. *Neurology* 62: 1009-1011, 2004.

13) Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Awaya A, Suzuki Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma. *Neurology* 62: 620-623, 2004. (selected for Highlight and Commentary)

14) 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.

15) Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Distal myopathy with rimmed vacuoles and hereditary inclusion body myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5: 61-65, 2005.

16) 吉岡三恵子, 杉江和馬, 西野一三, 戸田達史: 福山型と遺伝学的に異なる先天性筋ジストロフィーの免疫組織化学的検討. *脳と発達* 36: 55-59, 2004.

17) 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの原因遺伝子と分子病態. *ゲノム医学* 4: pp21-26, 2004.

18) 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの分子病態. *Annual Review 2005 神経*. 柳澤信夫, 篠原幸人, 岩田誠, 清水輝夫, 寺本明(編). 中外医学社. pp284-291, 2005.

2. 学会発表

1) Noguchi S, Nishino I: Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. BMB Annual Meeting and 8th IUBMB Conference, Boston,

USA, 6.13, 2004.

2) Hayashi YK, Ozawa R, Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Goto K, A Muchir, G Bonne, Nishino I: Microarray analysis of nuclear envelopathy. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.2, 2004.

3) Noguchi S, Fujita M, Uematsu F, Kurokawa R, Murayama K, Minami N, Nonaka I, Nishino I: Gene expression analyses of X-linked myotubular myopathy. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.4, 2004.

4) Nishino I, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Restoration of sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles/ hereditary inclusion body myopathy: a potential therapeutic strategy? 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.4, 2004.

5) 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.

6) Noguchi S, Matsumoto H, Sugie K, Ogawa M, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I: Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. Honolulu, Hawaii, 11.20, 2004.

7) 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.

8) 西野一三, 野口 悟, 村山久美子, 小川 恵, 計良陽子, 川原玄理, 大矢 寧, 埜中 征哉: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) における GNE 酵素活性とシアリル化異常. 第 45 回日本神経学会総会 東京 5.13, 2004.

9) 林 由起子, 松田知栄, 小川 恵, 後藤 加奈子, 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 5.14, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

II. 分担研究報告

α -ジストログリカノパチー関連分子の機能解明に関する研究

分担研究者 西野 一三 国立精神・神経センター神経研究所部長

研究要旨 α -ジストログリカノパチー（ α -DGP）関連分子である fukutin, POMGnT1, Largeがcis-Golgiにおいて共局在すること、これら3分子が実際に結合し複合体を形成していることを見出した。この複合体が α -ジストログリカン（ α -DG）へのGlcNAc転移を担っている可能性が示唆される。

A. 研究目的

α -DGの糖鎖修飾異常は、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（FCMD）をはじめ、Walker-Warburg症候群（WWS）、筋-眼-脳症候群（MEB）、MDC1D、MDC1C/LGMD2Iなど複数の重篤な筋ジストロフィーの病態と深く関わっている。これら疾患の責任遺伝子産物はいずれも α -DGの糖鎖修飾に関与していると考えられている。このうち、POMT1、POMGnT1は糖転移酵素であることが明らかとなっているが、それ以外はFCMDの原因遺伝子産物fukutinをはじめ、未だその機能は明らかでない。そこで、fukutin、Large、POMGnT1の細胞内局在と相互関係について検討した。

B. 研究方法

α -DGP各責任遺伝子産物に対する抗体を作製し、その局在を検討した。また、fukutin、Large、POMGnT1への組み換え蛋白質を作製し、COS7細胞およびC2C12筋管細胞に導入し、細胞内局在を検討するとともに、免疫沈降を行い、これら3分子の相互作用について検討した。また、FCMD患者細胞において、 ^3H ラベルしたGlcNAcの α -DGへの取り込みを観察した。

（倫理面への配慮）

本研究において使用する全てのヒト検体は、国立精神・神経センター倫理委員会で承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究使用に対する検体の使用許可（インフォームドコンセント）を得たものである。検体を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用した。検体の保存ならびに匿名化したうえでの破棄は、患者および家族の意思を尊重している。遺伝子解析に関してはヒトゲノム解析に関する共通指針を遵守した。また、すべての動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従って行った。研究に使用する際には、必要最小限度の動物を使用するとともに、動物に苦痛を与えないよう最大限の注意を払った。

C. 研究結果

fukutin、Large、POMGnT1は、何れもcis-GolgiマーカーであるGM130と共局在していた。さらに、それぞれの分子の二重免疫染色でも共局在を確認した。また、cis-Golgi変性剤であるBrefeldin処理により、これら分子の細胞内局在が

変化することも確認した。免疫沈降では、fukutinとPOMGnT1、fukutinとLargeが共沈し、さらに、fukutin、Large、POMGnT1の共沈も認められた。POMGnT1抗体は、内在性分子も認識することが可能であった。骨格筋での発現パターンはcis-Golgiの分布として報告されているものに一致していた。これらの結果は、fukutin、Large、POMGnT1がcis-Golgiにおいて複合体を形成していること、さらには、この複合体自体が α -DGに対するGlcNAc転移能を有している可能性が示唆される。そこで、FCMD患者細胞において、 ^3H ラベルしたGlcNAcの α -DGへの取り込みを観察した。もし、この複合体自体にGlcNAc転移能があるとするならば、GlcNAc転移酵素そのものであるPOMGnT1に異常のないFCMD患者においても、GlcNAc転移能が損なわれているはずだからである。その結果、コントロール細胞では正常にGlcNAc取り込みが認められたが、FCMD患者由来の筋管細胞では、 α -DGへのGlcNAc取り込みが認められなかった。

D. 考察

以上の結果より、 α -DGP 関連分子であるfukutin、Large、POMGnT1は、何れもcis-Golgi内で共局在しているだけでなく、複合体を形成して存在していることが強く示唆される。加えて、我々の行った取り込み実験の結果は、細胞内においては、この複合体自体にGlcNAc転移能があることが示唆された。今後、この結果の確認のためには、GlcNAc転移酵素活性を測定し定量化することが必要と考えられる。

E. 結論

α -DGP 関連分子である fukutin、Large、POMGnT1 は、cis-Golgi 内で複合体を形成して存在している。この複合体自体に α -DG への GlcNAc 転移能がある可能性が示唆される。今後さらに、 α -DGP の病態解明に向けて、詳細な活性測定を含めた研究を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsumoto H, Hayashi YK, Kim DS, Ogawa M, Murakami T, Noguchi S, Nonaka I, Nakazawa T, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, Nishino I: Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of α -dystroglycan in Japan. *Neuromuscul Disord*, in press.

2) Goh KJ, Wong KT, Nishino I, Minami N, Nonaka I: Oculopharyngeal muscular dystrophy with PABPN1 mutation in a Chinese Malaysian woman. *Neuromuscul Disord* 15: 262-264, 2005.

3) Tsai TC, Horinouchi H, Noguchi S, Minami N, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I: Characterization of MTM1 mutations in 31 Japanese families with myotubular myopathy, including a patient carrying 240 kb deletion in Xq28 without male hypogonadism. *Neuromuscul Disord* 15: 245-252, 2005.

4) Sugie K, Murayama K, Noguchi S, Murakami N, Mochizuki M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Two novel CAV3 gene mutations in Japanese LGMD1C patients. *Neuromuscul Disord* 14: 810-814, 2004.

5) Laing NG, Clarke NF, Dye DE, Walker KR, Kobayashi Y, Shimakawa S, Ogihara T, Ouvrier R, Sparrow JC, Nishino I, North KN, Nonaka I: Actin mutations are one cause of congenital fibre type disproportion. *Ann Neurol* 56: 689-694, 2004.

6) 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.
- 7) Yakushiji Y, Satoh J, Yukitake M, Yamaguchi K, Nakamura I, Nishino I, Kuroda Y : Interferon α -responsive inclusion body myositis in a hepatitis C virus carrier. *Neurology* 63: 587-588, 2004.
- 8) Barresi R, Michele DE, Kanagawa M, Harper HA, Dovico SA, Satz JS, Moore SA, Zhang W, Schachter H, Dumanski JP, Cohn RD, Nishino I, Campbell KP: LARGE can functionally bypass α -dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med* 10: 696-703, 2004
- 9) 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* 135: 709-712, 2004.
- 10) Ohashi Y, Hasegawa Y, Murayama K, Ogawa M, Hasegawa T, Kawai M, Sakata N, Yoshida K, Yarita H, Imai K, Kumagai I, Murakami K, Hasegawa H, Noguchi S, Nonaka I, Yamaguchi S, Nishino I: A new diagnostic test for VLCAD deficiency using immunohistochemistry. *Neurology* 62: 2209-2213, 2004.
- 11) Yamanaka G, Goto K, Oya Y, Miyajima T, Hoshika A, Nishino I, Hayashi YK: FSHD-like patients without 4q35 deletion. *J Neurol Sci* 219: 89-93, 2004.
- 12) Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Murakami N, Sakuta R, Mochizuki M, Michele DE, Campbell KP, Nonaka I, Nishino I : Abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan due to POMT1 gene mutation in a Japanese patient with Walker-Warburg syndrome. *Neurology* 62: 1009-1011, 2004.
- 13) Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Awaya A, Suzuki Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I : Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma. *Neurology* 62: 620-623, 2004. (selected for Highlight and Commentary)
- 14) 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.
- 15) Nonaka I, Noguchi S, Nishino I : Distal myopathy with rimmed vacuoles and hereditary inclusion body myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5: 61-65, 2005.
- 16) 吉岡三恵子, 杉江和馬, 西野一三, 戸田達史 : 福山型と遺伝学的に異なる先天性筋ジストロフィーの免疫組織化学的検討. *脳と発達* 36: 55-59, 2004.
- 17) 西野一三 : 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの原因遺伝子と分子病態. *ゲノム医学* 4: 21-26, 2004.
- 18) 西野一三 : 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの分子病態. *Annual Review 2005 神経*. 柳澤信夫, 篠原幸人, 岩田誠, 清水輝夫, 寺本明 (編). 中外医学社. pp. 284-291, 2005.

2. 学会発表

- 1) Nishino I, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Restoration of sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy: a potential therapeutic strategy? 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.4, 2004.
- 2) 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.

3) 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.

4) 西野一三, 野口 悟, 村山久美子, 小川 恵, 計良陽子, 川原玄理, 大矢 寧, 埜中 征哉: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) における GNE 酵素活性とシアリル化異常. 第 45 回日本神経学会総会 東京 5.13, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

本邦における α -ジストログリカノパチーに関する研究

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

研究要旨 α -ジストログリカン(α -DG)の糖鎖修飾異常を示す疾患群(α -ジストログリカノパチー; α -DGP)について臨床病理学的、分子細胞生物学的解析を行った。

A. 研究目的

α -DGの糖鎖修飾異常は、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(FCMD)をはじめ、Walker-Warburg症候群(WWS)、筋-眼-脳症候群(MEB)、MDC1D、MDC1C/LGMD2Iなど複数の重篤な筋ジストロフィーの病態と深く関わっている。これら疾患の責任遺伝子産物はいずれも α -DGの糖鎖修飾に関与していると考えられている。このうち、POMT1、POMGnT1は糖転移酵素であることが明らかとなっているが、それ以外はFCMDの原因遺伝子産物フクチンをはじめ、未だその機能は明らかでない。

我々は α -DGPの病態解明に向けた研究を進めている。

B. 研究方法

臨床筋病理学的に確定診断のついていない先天性筋ジストロフィー(CMD)患者125例の生検骨格筋について α -DG(VIA4-1)抗体を用いた α -DG糖鎖修飾異常のスクリーニングを行い、免疫反応で異常を認めた例についてフクチンならびに関連遺伝子の変異解析を行うとともに臨床病理学的解析をすすめた。また、各責任遺伝子産物に対する抗体を作製し、その局在を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究において使用する全てのヒト検体は、国立精神・神経センター倫理委員会で承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研

究使用に対する検体の使用許可(インフォームドコンセント)を得たものである。検体を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用した。検体の保存ならびに匿名化したうえでの破棄は、患者および家族の意思を尊重している。遺伝子解析に関してはヒトゲノム解析研究に関する共通指針を遵守した。また、すべての動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従って行った。研究に使用する際には、必要最小限度の動物を使用するとともに、動物に苦痛を与えないよう最大限の注意を払った。

C. 研究結果

α -DG(VIA4-1)の免疫反応は、125例中欠損73例、減弱23例、正常29例であった。欠損あるいは減弱を示した96例について、まずフクチン遺伝子の3-kb挿入変異を検索し、57例にホモ(43例)あるいはヘテロ(14例)で挿入変異を見出し、FCMDと診断した。またヘテロの患者についてはフクチン遺伝子の翻訳領域に新規変異を含む7つの変異を見出した。

次いでフクチン遺伝子に変異のない α -DG(VIA4-1)欠損例について α -DGP関連遺伝子の変異検索を行った。その結果、本邦で初めてPOMT1に新規変異を有するWWS患者1例を見出し報告した(Kim et al)。次いで本邦で初めてFKRP遺伝子に変異を有するMDC1C/LGMD2Iを1例見出し、MEB2例とともに報告した(Matsumoto et al)。MDC1C/LGMD2I

は、これまでにヨーロッパや中東では多数の報告があり、CMDの多くを占めているが、本邦では極めてまれであることが明らかとなった。また、FKRPに対する特異抗体を作製し、骨格筋ならびに培養筋線維においてFKRPがERに局在することを明らかにした(Matsumoto et al)。

また我々は α -DGP骨格筋において α -DGのコア部分を認識する抗体を用いたイムノブロット法ならびにラミニン結合能を検討した。その結果、原因遺伝子や変異様式、臨床的・筋病理学的重症度にかかわらず、 α -DGの分子量はほぼ同じ(~90 kDa)であり、ラミニン結合能も失われていることを明らかにした。

D. 考察

以上の結果より、本邦においては、FCMDが α -DGPのほとんどを占めているが、まれながらWWS、MEB、さらにはヨーロッパや中東で頻度の高いMDC1C/LGMD2Iも少数ながら存在する。 α -DGPの臨床症状、筋病理変化、原因遺伝子はきわめて多様であるが、 α -DGの変化には共通点が多い。 α -DGPの臨床的重症度の決定には α -DGの糖鎖修飾の異常に加え、なんらかの他の要因が関与している可能性があると考えられた。

E. 結論

現在、変異の見出されていない α -DGP患者についてさらなる遺伝子変異解析を行っている。また、 α -DGPの病態解明に向けて、関連蛋白質の機能や相互作用についての研究を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) H Matsumoto, YK Hayashi, D-S Kim, M Ogawa, T Murakami, S Noguchi, I Nonaka, T Nakazawa, T Matsuo, S Futagami, KP Campbell, I Nishino: Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of α -dystroglycan in Japan. *Neuromuscul Disord* (in press).

2) 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.

3) 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.

4) 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.

2. 学会発表

1) Hayashi YK, Ozawa R, Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Goto K, A Muchir, G Bonne, Nishino I: Microarray analysis of nuclear envelopathy. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.2, 2004.

2) Nishino I, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Restoration of sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy: a potential therapeutic strategy? 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.4, 2004.

3) 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.

4)Noguchi S, Matsumoto H, Sugie K, Ogawa M, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I: Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. Honolulu, Hawaii, 11.20, 2004.

5)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.

6)林 由起子, 松田知栄, 小川 恵, 後藤加奈子, 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 5.14, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（DMRV）の 病態解明に関する研究

分担研究者 野口 悟 国立精神・神経センター神経研究所室長

研究要旨 DMRVでは、GNE機能低下があり、線維芽細胞および筋管細胞では、シアリル化が低下しているがGNE代謝産物投与により回復可能である。

A. 研究目的

2001年、イスラエルの Eisenberg らが、遺伝子封入体ミオパチー (hereditary inclusion body myopathy: HIBM) 患者に GNE 遺伝子変異が認められることを報告したを契機に、多数の DMRV/HIBM 患者において様々な GNE 変異が見出されてきている。この遺伝子は、シアル酸生合成経路の律速段階を触媒する酵素 UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (UDP-GlcNAc 2-epimerase; GNE) と、その次の反応を触媒する酵素 N-acetylmannosamine kinase (ManNAc kinase; MNK) の2つの酵素活性を持つ蛋白質をコードしている。GNE ドメインは N 端側に、MNK ドメインは C 端側にコードされている。

興味深いことに、これまでに同定されているほぼ全ての変異がミスセンス変異であり、両アレルに null 変異を有する例は1例も報告されていない。また、変異は、オープンリーディングフレームのほぼ全長にわたって幅広く分布しており、GNE ドメインあるいは MNK ドメイン単独の障害であっても、両者の組み合わせの複合ヘテロ接合体の場合であっても DMRV/HIBM を発症しうる。しかしながら、GNE 遺伝子を見出しただけでは、DMRV/HIBM の病理学的変化、すなわち、縁取り空胞が出現して、筋線維が変性・萎縮してい

く機序を説明したことにはならない。言い換えるなら、GNE 遺伝子産物の機能的異常を示さない限りは、依然として GNE 遺伝子を DMRV/HIBM の原因遺伝子と断定することはできない。さらには、治療法開発の目処も立っていない。そこで、GNE 遺伝子産物機能を評価し、実際にその機能が障害されているかどうかを検討した。

B. 研究方法

これまでに、患者白血球における GNE 酵素活性測定を行い、患者では GNE 酵素活性が著減していることが明らかとなり、DMRV 患者における GNE 遺伝子変異は、機能喪失型変異であることが初めて示している。しかしこの酵素活性測定方法は、精度が高くないため、厳密に点変異の影響を評価することが出来ない。そこで、DMRV 患者で同定されている変異を有する組み換え蛋白質を作製し、酵素活性の測定を行った。

GNE/MNK がシアル酸生合成経路の重要な酵素であるならば、DMRV/HIBM 患者においては、当然、シアリル化異常があることが予想される。我々は、患者培養細胞に対して、各種 lectin を用いることで、患者細胞におけるシアリル化状態を検討した。また、見出されたシアリル化異常が、GNE/MNK の代謝産物の添加により、回

復可能であるかどうかを検討した。

また、患者筋組織において、lectin 染色を行い組織学的にシアリル化異常を評価するとともに、2次元電気泳動を行い、特に α -ジストログリカンとリソソーム膜蛋白質に糖鎖異常があるかどうか注目して検討した。

(倫理面への配慮)

本研究において使用する全てのヒト検体は、国立精神・神経センター倫理委員会承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究使用に対する検体の使用許可(インフォームドコンセント)を得たものである。検体を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用した。検体の保存ならびに匿名化したうえでの破棄は、患者および家族の意思を尊重している。遺伝子解析に関してはヒトゲノム解析に関する共通指針を遵守した。また、すべての動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従って行った。研究に使用する際には、必要最小限の動物を使用するとともに、動物に苦痛を与えないよう最大限の注意を払った。

C. 研究結果

作製した全ての組み換え蛋白質に対して、ウェスタンブロットを行ったところ、1例の片側アレルで認められた exon 4 の in-frame のスキッピングを有する組み換え体は不安定で、分解していた。このことは、この変異が病的であることを示している。他の変異体は全てミスセンス変異であったが、分解されることなく正常のサイズで検出された。これらミスセンス変異を有する組み換え蛋白質に対して、GNE と MNK それぞれの酵素活性の評価を行った。その結果、GNE ドメインの変異では GNE 活性が、MNK ドメインの変異では MNK 活性がそれぞれ特異的に阻害されていた。従来から、GNE 遺伝子産物におけるそれぞれの酵素活性はお互いに独立していることが提唱されており、我々の結果は、それを裏付けるものであった。

患者培養細胞の糖修飾の評価には、WGA、

SBA を含む各種 lectin を用いた。線維芽細胞・筋管細胞ともに、WGA でのシグナルが減少し、SBA のシグナルが上昇していた。WGA はシアル酸を、SBA は GalNAc を認識することから、DMRV 患者細胞においては、シアリル化が低下し、代わりに GalNAc が露出していることが明らかになった。さらに、GNE 代謝産物 ManNAc およびシアル酸そのものである NeuAc を培養液に加えると、シアリル化が回復した。また、患者筋組織において、lectin 染色を行ったところ、縁取り空胞を認める萎縮線維中心に染色異常を認めた。

患者筋組織では、縁取り空胞を伴う萎縮筋にのみ低シアリル化と SBA シグナルの上昇を認めた。このことは、ごく一部の筋線維にのみシアリル化異常が認められることを示している。患者筋組織を用いて2次元電気泳動を行い、 α -ジストログリカンおよびリソソーム膜蛋白質 LAMP-2 に注目した解析を行ったが、正常筋と比較して有意な差は認めなかった。

D. 考察

我々は、DMRV/HIBM 患者の GNE 遺伝子変異が機能喪失型変異であること、この変異により細胞・組織の低シアリル化を来していること、そしてこの低シアリル化は GNE 代謝産物の投与によって回復可能であることを、世界で初めて示した。このことは、少なくとも *in vitro* では、DMRV/HIBM が治療可能であることを示している。当然のことながら、このような代謝産物投与により *in vivo* においても、何らかの治療が出来る可能性を示唆している。

組み換え蛋白質での酵素活性測定では、GNE ドメインの変異では GNE 活性が、MNK ドメインの変異では MNK 活性がそれぞれ特異的に阻害されていた。ここで問題になるのは、GNE ドメインの変異と MNK ドメインの変異の組み合わせを複合ヘテロ接合体で持つ患者の存在である。もしも完全にそれぞれの酵素活性が独立して認められるのであれば、このような患者は、症状を出さないはずである。更に詳しく検討したところ、正常 GNE 蛋白質は 6 量体を形成しているのに対して、大半

の GNE ドメイン変異体は、6 量体を形成出来なかった。従って、生体内では GNE ドメインの変異体は、GNE 活性のみならず、実際には MNK 活性も失っている可能性が示唆される。同様に、何らかの理由により、MNK ドメインの変異でも、生体内では MNK 酵素活性が阻害されて、複合ヘテロ接合型の患者でも症状を呈するのかも知れない。

シアル酸は細胞表面の糖脂質および糖蛋白質上のオリゴ糖の末端に広範に存在しており、細胞表面の保護や細胞の相互認識など多彩かつ重要な役割を担っていると考えられている。実際、GNE ノックアウトマウスはシアル酸が合成できず、胎生致死であることが報告されており、器官形成の過程でシアル酸が必須であることが分かる。それならば、何故、このように生体にとって重要なシアル酸生合成経路の律速酵素の機能喪失変異で、骨格筋にしか異常が出ないのであろうか。言い換えるなら、何故、もっと広範な臓器障害を来さないのであろうか。しかも、我々が調べた限り、患者骨格筋内でもシアル化異常は一部の筋線維に局限している。この疑問に対する完全な答えはまだ見出されていないが、恐らく、ミスセンス変異では酵素活性が失われるもの、ごくわずかの活性は残存しており、他の臓器ではその少量の活性で臓器としての機能を損なわずに済むのであろうと考えられている。実際、患者血清および尿中のシアル酸濃度は正常人と変わらないので、肝臓などの臓器では必要量のシアル酸が合成できていると考えられる。骨格筋においては、GNE の発現がほとんどないことが知られており、恐らく、ごく僅かの GNE 活性が、すぐさま骨格筋機能の破綻に結びつかないものの、長期的には、骨格筋の機能維持にとって必須なのであろう。

GNE 遺伝子の機能喪失変異により、シアル酸合成が低下し、シアル化が減少することは確認された。しかし、それがどうして縁取り空胞や管状線維性封入体といった特徴的な病理変化を引き起こし、筋線維が萎縮していくのかは依然として不明である。シアル化の低下により

様々な糖蛋白質あるいは糖脂質の構造あるいは性質が変化し、その異常物質を処理する過程で、オートファジー/ライソゾーム系およびユビキチン・プロテアソーム系などが活性化されて、それが、筋病理学的に縁取り空胞として認められるというシナリオが、現時点では最も素直な仮説であると考えられる。しかし、それでも、管状線維性封入体がどのように形成されるかは依然として説得力のある仮説が無く、今後のさらなる検討が必要である。

現在、DMRV モデルマウスとして、*GNE*^{-/-}、*Tg GNE c. 1695G>C* マウスを作製中であり、今後、治療法開発と詳細な病態解析を目指した研究に用いる予定である。

E. 結論

DMRV/HIBM が *GNE* 遺伝子の機能喪失型変異により、シアル化の低下を来すことにより発症していることを明らかにした。この低シアル化は、GNE 代謝産物投与により回復可能であり、同様の手法による治療法開発の可能性を初めて示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Distal myopathy with rimmed vacuoles and hereditary inclusion body myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5: 61-65, 2005.

2. 学会発表

1) Noguchi S, Nishino I: Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase

activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. BMB Annual Meeting and 8th IUBMB Conference, Boston, USA, 6.13, 2004.

2) Hayashi YK, Ozawa R, Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Goto K, A Muchir, G Bonne, Nishino I: Microarray analysis of nuclear envelopathy. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.2, 2004.

3) Noguchi S, Fujita M, Uematsu F, Kurokawa R, Murayama K, Minami N, Nonaka I, Nishino I: Gene expression analyses of X-linked myotubular myopathy. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.4, 2004.

4) Nishino I, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Restoration of sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy: a potential therapeutic strategy? 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.4, 2004.

5) 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.

6) Noguchi S, Matsumoto H, Sugie K, Ogawa M, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I: Sub-cellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. Honolulu, Hawaii, 11.20, 2004.

7) 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.

8) 西野一三, 野口 悟, 村山久美子, 小川 恵, 計良陽子, 川原玄理, 大矢 寧, 埜中征哉: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)における GNE 酵素活性とシアリル化異常. 第 45 回日本神経学会総会 東京 5.13, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし