

200632017A

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西野 一三

平成19(2007)年4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.	$\alpha$ -ジストログリカノパチー関連分子複合体の 酵素特性に関する研究	8
	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 $\alpha$ -ジストログリカノパチーに関する研究	13
	林 由起子 (国立精神・神経センター神経研究所)	
3.	$\alpha$ -ジストログリカノパチー候補タンパク質の評価方法の確立	17
	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	22
IV.	研究成果の刊行物・別刷	23

# 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

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 $\alpha$ -ジストログリカン ( $\alpha$ DG) の糖鎖修飾不全を原因とする $\alpha$ -ジストログリカノパチー ( $\alpha$ DGP) や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)などは、糖修飾異常をその病態とする疾患である。本邦に患者数が多く、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、これらの筋疾患の病態解明と治療法開発を目指して、研究を進めている。極軽度の肢体型筋ジストロフィーと拡張型心筋症を呈する新しい fukutin 変異の臨床型を4家系6例の患者に見だし、LGMD 2L と名付けた。また、先天性筋ジストロフィー患者の中で、POMT2 遺伝子変異を有する例を初めて見出した。Fukutin-LARGE-POMGnT1 複合体の酵素化学的特性付けを進め、この複合体酵素反応によって生じる産物を解析から、転移位置が異なる1-3残基のGlcNAcを転移していることを明らかにした。また、同定されたPOMT2遺伝子変異では活性が著しく減少していた。培養筋管細胞を用いて $\alpha$ -ジストログリカン依存的なアセチルコリン受容体の集合を指標に、新規な原因タンパク質の評価法の開発を試みた。ジストログリカン siRNA やFukutin siRNA では集合体の形成が阻害されており、この方法が、新規責任候補遺伝子の評価に適応出来る可能性が示唆された。ヒト GNE ミスセンス変異をノックアウトバックグラウンドで発現する DMRV モデルマウスの作製に成功した。このマウスは、臨床的・病理学的・生化学的に DMRV を再現する世界初の DMRV モデルマウスであることを示すことを明らかにした。このマウスの開発により、初めて前臨床試験の施行が可能となった。

### 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

### A. 研究目的

筋細胞膜タンパク質 $\alpha$ -DG の糖鎖修飾不全を原因とする $\alpha$ -DGP やシアル酸合成酵素遺伝子の異常を原因とする DMRV は、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。本申請研究はこれら糖修飾異常を病態とする疾患の病態解明と治療法開発を目指すものである。

$\alpha$ 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<sup>myd</sup> 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 ( $\alpha$ -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  $\alpha$ -DGP 関連分子の機能を明らかにし、 $\alpha$ -DGP の分子病態を明らかにすることを目的としている。また、 $\alpha$ -DGP 症例での原因遺伝子の同定を進めるとともに、簡便な  $\alpha$ -DGP 原因遺伝子候補のスクリーニング法の確立を目指した。

## B. 研究方法

フクチン、POMGnT1、LARGE cDNA を Myc タグまたは FLAG タグ融合タンパク質発現用ベクターにクローン化し、発現用コンストラクトを作成した。これらのベクターを、各々、または組み合わせで C2C12 骨格筋株化細胞で発現させ、POMGnT1 活性測定用の試料を作製した。POMGnT1 活性は O-マンノシル化  $\alpha$ -DG ペプチドに対して GlcNAc を転移させ、産物をアビジンビーズで部分精製後、アミド樹脂を用いた HPLC により分離した。反応産物の質量分析は、MALDI-TOF mass (Perseptive Voyager) によって解析した。

昨年度、同定した変異を POMT2 cDNA に site directed mutagenesis で導入した。POMT1 及び POMT2 は FLAG タグ融合タンパク質として、HEK293 細胞で発現した。定法に従って、POMT1/POMT2 活性を測定した。

国立精神・神経センターの生検骨格筋レポジトリーの中で臨床筋病理学的に確定診断のついていないジストロフィー骨格筋について  $\alpha$ -DG (VIA4-1) 抗体を用いた  $\alpha$ -DG の糖鎖修飾異常のスクリーニングを行い、免疫染色で異常を認めた例についてフクチン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。ウエスタンブロット及びラミネンオーバーレイは定法に従って行なった。

培養細胞はマウス C2C12 細胞を用いた。培養基質として、ポリオルニチン添加ラミネンコートを用いた。筋管細胞への分化は定法に従い、血清を除去することで分化を誘導した。DG 及びフクチン

siRNA は Invitrogen から購入した。遺伝子ノックダウン効果は DG の発現レベルとフクチンの mRNA 量により測定した。培養筋細胞への導入には Lipofectamine RNAiMAX 試薬 (Invitrogen) を用いた。アセチルコリン受容体の検出には TRITC ラベル  $\alpha$ -ブングアロトキシンを用いた。クラスタリングの計測は、オリンパス Fluoview 共焦点レーザー顕微鏡により行い、定量した。

DMRV のモデルマウスは、GNE-KO マウスと変異 GNE トランスジェニックマウスの掛け合わせにより作製した。表現型の解析は行動解析、病理解析、生化学解析により行なった。

### (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い行なった。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

昨年度報告したように、POMGnT1、フクチン、LARGE が複合体を形成し、O-マンノースへの GlcNAc 転移活性を有していることを示した。今年度は、ラジオアイソトープを用いない方法を試みて、順相クロマトグラフィーにより、良好に酵素産物を、反応物から分離出来ることがわかった。酵素産物は、4つのピークを与えた。質量分析の結果から、それぞれ、GlcNAc が 1、2 および 2 残基転移されたペプチドであることがわかった。ま

た、最後に溶出されたピークは、少量のため質量分析は出来なかったが、その溶出位置から3残基のGlcNAcが転移されたペプチドであると考えられた。酵素としてPOMGnT1を用いて、異なる基質濃度に対する反応産物の生成速度を調べた。GlcNAc 1残基をもつ生成物を産生する反応をMichaelis反応に近似させた。この場合、 $K_m = 0.1$  nM程度であった。

HEK293細胞で発現した、変異を導入したPOMT2/POMT1複合体の酵素活性は、POMT1単独での酵素活性とほぼ同様に減少していた。

$\alpha$ -DGの糖鎖部分を認識する抗体(VIA4-1)を用いた免疫組織化学法で、国立精神・神経センターの生検骨格筋レポジトリのうち、臨床病理学的に肢帯型筋ジストロフィーに分類された症例から $\alpha$ -DGPをスクリーニングした。さらに、VIA4-1の免疫反応に異常が認められた症例に対しフクチン遺伝子変異解析を行った結果、4家系6例に変異が認められた。いずれの症例も福山型先天性筋ジストロフィー患者で認められる3'非翻訳領域の3 kb挿入変異と翻訳領域のミスセンス変異の複合ヘテロ接合型変異を認めた。何れの患者も知能は全く正常で、筋力低下も軽度であったが、拡張型心筋症を伴っていた。ウェスタンブロット解析では、いずれの症例でも、 $\alpha$ -DGの糖鎖に対する抗体では、非常に弱い抗体反応を示し、タンパク質のサイズも減少した。また、ペプチド鎖に対する抗体でも弱く、ブロードなバンドを与えた。ラミニンオーバーレイでは、患者の $\alpha$ -DGは弱いラミニン反応性を示した。この患者群を、LGMD 2Lと名付けた

DGおよびフクチンmRNAに対するそれぞれ2および3種のsiRNAを試した。2種のDGsiRNA処理下での $\beta$ DG発現レベルは、未処理のコントロールに比べ、72及び11%の発現抑制が見られた。培養筋管細胞は、基質に1型コラーゲンを用いた場合、長さが数 $\mu$ m程度の線状のアセチルコリン受容体の集合体を形成したが、配向したラミニンを用いて培養した場合、直径10 $\mu$ m程度の楕円状の”Pretzel”と呼ばれる集合体(クラスタリング構造)を形成した。このPretzel構造は、DGおよびフクチンsiRNA処理によって、その数、面積ともに、明

らかに減少した。未処理の筋管細胞では、単位面積あたり、45個のPretzelが観察されたが、DGsiRNA処理では、13-23個、フクチンsiRNA処理では、14-35個に減少していた。ひとつのPretzel構造の面積は、コントロールでは $95 \pm 123 \mu\text{m}^2$ であるのに対し、最も効果のあったDGsiRNA処理により $40 \pm 23 \mu\text{m}^2$ であった。また、最も効果のあった1種のフクチンsiRNA処理では $74 \pm 101 \mu\text{m}^2$ と減少を示した。他の2種ではPretzel数に減少がみられたものの、面積には変化が見られなかった。

GNE-KOマウスと変異GNEトランスジェニックマウスの掛け合わせにより作製したDMRVのモデルマウスは、30週齢以降、顕著な骨格筋の筋力低下を示し、病理学的にも、人のDMRVのそれを再現していた。シアル酸量は骨格筋をはじめとする各種臓器で減少していた。

#### D. 考察

ラジオアイソトープを用いない方法で、0-マンノースへのGlcNAc転移活性を測定することが出来た。現在、合成基質などを用いた系が試されているが、特異的なマンノースペプチドを用いているため、より特異的に測れていると考えている。しかし、ラジオアイソトープを用いないため、感度が悪く、蛍光基質の利用など、今後は改善していかなければいけない点もある。POMGnT1、フクチン、LARGE複合体は酵素反応により、GlcNAcが1、2および3残基転移されたペプチドを生成した。POMGnT1のみの場合にも、ほぼ同様の比で産物が生成されたことを考えると、複合体形成は基質特異性を変えているわけではなく、むしろ反応速度を変化させている可能性が考えられた。しかしながら、大量の酵素複合体を生成させることが難しかったため、この複合体での反応パラメーターの測定にはいたらなかった。POMGnT1のみでは非常に小さい $K_m$ が測定され、基質が酵素に取り込まれやすいことを示した。

昨年度同定したPOMT2の変異では、POMT2/POMT1複合体の酵素活性は検出されなかった。これまでに、見いだされているPOMT2またはPOMT1の変異では酵素

活性はほぼ消失していることが報告されており、ほぼ同様の結果が得られたと考えられた。

今回見いだされた患者の臨床像は福山型先天性筋ジストロフィーのそれとは、完全に異なっていた。何れの患者も知能は全く正常で、筋力低下も極軽度であったが、拡張型心筋症を伴っていた。筋病理所見も最も軽いジストロフィー変化を示した。患者筋からの $\alpha$ -DGは、福山型先天性筋ジストロフィー患者のものよりも明らかに大きな分子量を示し、FKRPの変異で引き起こされる肢帯型筋ジストロフィーLGMD2I型で見られるものと同様であった。これらの結果は骨格筋でのフクチンの機能が部分的に保たれていることを示していると考えられた。

心症状はこれらの患者の最も顕著な発見であった。すべての患者は拡張型心筋症を示し、うち2例では非常に重い進行性の症状であった。しかしながら、軽い骨格筋の症状に比べると心筋症状は重く、また、このような心筋症状は他の $\alpha$ -DGPではほとんど報告は無い。その理由として、軽い骨格筋の症状をもつ患者は健常人と同様に生活したり、運動したりしているが、このような運動が心臓に負担をかけ、症状を重くしていると考えられた。今回認められた患者を含め、フクチン遺伝子の変異により引き起こされる疾患は、非常に幅広いスペクトラルを示すことがわかった。この知見をふまえて、家族性の拡張型心筋症の診断にフクチン遺伝子の変異を含めることが重要であると考えられた。

今までの $\alpha$ -DGP患者の検索では、約20%の患者で、同定されている既知の原因遺伝子に変異が見られなかった。このことは、新たな原因遺伝子の可能性を示唆していた。さらに、我々は、昨年報告したフクチンを含む複合体への結合タンパク質を同定しているが、これが原因遺伝子である可能性を簡便に解析するシステムが必要であった。今回の方法ではっきりと、DG遺伝子のノックダウン効果、またはDG修飾タンパク質遺伝子のノックダウン効果を、筋管細胞でのアセチルコリン受容体のクラスタリングによって評価出来ることが出来た。この方法を用いれば、DNAの配列解析の前段

階として、候補遺伝子をDGの機能解析を通して、絞り込むことが可能になると考えている。

GNE-KOマウスと変異GNEトランスジェニックマウスの掛け合わせにより作製したモデルマウスは、生理学的、病理学的に、生化学的に、ヒトのDMRVの症状を再現しており、この疾患のモデルマウスと考えられた。このマウスは、今後、病態解析や治療法の開発に大いに役立つものと考えている。

## E. 結論

世界で初めて、fukutin 変異による肢帯型筋ジストロフィー患者を見いだした。Fukutin-LARGE-POMGnT1 複合体の酵素化学的性質を解析した。新規な $\alpha$ -DGP原因タンパク質の評価法の開発を試みた。DMRVモデルマウスの作製に成功した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Goto K, Nishino I, Hayashi YK: Rapid and accurate diagnosis of facioscapulo-humeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 16:256-261. 2006.

Taniguchi M, Kurahashi H, Noguchi S, Fukudome T, Okinaga T, Tsukahara T, Tajima Y, Ozono K, Nishino I, Nonaka I, Toda T: Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in  $\alpha$ -dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet* 15:1279-1289. 2006.

Wu S, Ibarra MCA, Malicdan MCV, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. *Brain* 129: 1470-1480, 2006.

Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi,

YK, Nishino I: A Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 16: 115-128, 2007.

Osawa M, Liewluck T, Ogata K, Iizuka T, Hayashi YK, Nonaka I, Sasaki M, Nishino I: Familial reducing body myopathy. *Brain Dev* 29: 112-116, 2007.

Liewluck T, Hayashi YK, Osawa M, Kurokawa R, Fujita M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Unfolded protein response and aggressive formation in hereditary reducing body myopathy. *Muscle Nerve* 35:322-326, 2007.

Keira Y, Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Minami N, Hayashi YK, Kato T, Nishino I: Characterization of lobulated fibers in limb girdle muscular dystrophy type 2A by gene expression profiling. *Neurosci Res* 57:513-521, 2007.

## 2. 学会発表

村上てるみ, 田辺雄三, 松本浩, 小川恵, 埜中征哉, 野口悟, 林由起子, 西野一三: フクチン遺伝子 (FKTN) 変異による多様な臨床病態. 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006.

西野一三, Wu Shiwen, Ibarra Carlos, Malicdan May, 村山久美子, 埜中征哉, 野口悟, 林由起子: セントラルコア病の大半は RYR1 変異による. 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006.

Malicdan May, 野口悟, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) のモデルマウス作製. 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.12, 2006.

高橋俊明, 青木正志, 小野寺好明, 鈴木直輝, 豎山真規, 今野秀彦, 林由起子, 西野一三, 埜中征哉, 木村格, 糸山泰人:

Dysferlin 遺伝子変異の確定した肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 2B 型の筋障害の分布. 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.13, 2006.

村上てるみ, 田辺雄三, 埜中征哉, 小川恵, 野口悟, 林由起子, 大澤真木子, 西野一三: 肢帯型筋ジストロフィー2L型? FKTN 遺伝子異常の最軽症例. 第23回小児神経筋疾患懇話会. 東京, 8.19, 2006.

Nishino I, Wu S, Ibarra C, Malicdan M, Murayama K, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Central Core Disease Is Due to RYR1 Mutations in More Than 90% of Patients. 58th Annual Meeting of American Academy of Neurology. San Diego, CA, USA. 4.5, 2006.

Nishino I: The Muscle Dystrophies. 5th Asian and Oceanian Myology Center Meeting and 12th Philippine Neurological Association Midyear convention. Cebu, Philippines, 5.25, 2006.

Noguchi S, Ogawa M, Murayama K, Matsumoto H, Imamura M, Hayashi YK, Nishino I: Fukutin and LARGE Cooperatively work with POMGnT1 on N-acetylglucosamine transfer in O-mannosylglycan synthesis of alpha-dystroglycan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Astejada M, Hayashi YK, Fujita M, Uematsu F, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Disruption of the in vivo regeneration process in cardiotoxin-injected Emdy<sup>-</sup>Mice. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Keira Y, Kurokawa R, Fujita M, Minami N, Hayashi YK, Noguchi S, Kato T, Nishino I: Gene expression of Limb girdle muscular dystrophy type 2A. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.



Murakami T, Tanabe Y, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Fukutin (FKTN) mutations can cause cardiomyopathy. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Hayashi YK, Goto K, Nagano A, Ura S, Kawahara G, Astejada M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Emerinopathy and laminopathy in Japan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra MCA, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: A heterozygous COL6A1 glycine substitution that influences cell attachment in fibroblasts causes sarcolemma-specific collagen VI deficiency (SSCD). XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Okada M, Kawahara G, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Collagen VI deficiency is the second leading cause of congenital muscular dystrophy in Japan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Kasahata N, Hayashi YK, Laing NG, Uematsu F, Nonaka I, Nishino I: Clinical, pathological and immunohistochemical findings of nemaline myopathy, comparing adult-onset and congenital patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Nishino I: Myopathies with autophagy. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: A GNE knockout mouse

expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV). XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Sato I, Ibarra MCA, Wu S, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: RYR1 mutation in congenital neuromuscular disease with uniform type I fiber. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Ohkuma A, Murayama K, Ogawa M, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: The genetic cause of lipid storage myopathy is unknown in more than 80% of the cases. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Sugie K, Yamamoto KA, Murayama K, Malicdan MCV, Ueno S, Nonaka I, Nishino I: Clinicopathological features of cardiac involvement in genetically-confirmed Danon disease patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Ibarra MCA, Malicdan MCV, Wu S, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Pathological findings in muscle from malignant hyperthermia-susceptible patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 6 July 2006.

Arahata H, Fujita M, Murayama K, Ogawa M, Noguchi S, Hayashi YK, Raheem O, Udd B, Nishino I: The identification of non-DM1, non-DM2 Patient in clinical DM patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 6 July 2006.

Nishino I: Molecular pathomechanism of muscular dystrophy. Special Seminar. Bhumibol Adulyadej Hospital, Bangkok,

Thailand, 9.15, 2006

Noguchi S, Fujita M, Sasaoka T, Nishino I: The therapeutic effect of myostatin-blockade on muscular dystrophic mice and gene expression analysis of the treated muscles. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 6 October 2006.

Hayashi YK, Astejada MN, Ozawa R, Fujita M, Noguchi S, Nonaka I, Stewart CL, Nishino I: Three kinds of model mice for nuclear envelopathy. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 5 October 2006.

Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: A GNE knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to Nonaka myopathy or distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV). 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 4 October 2006.

Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Campbell KP, Osawa M, Nishino I: Fukutin gene mutations can cause familial dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness and normal intelligence. The 9th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology. Cebu Philippine, 24 Jan 2007.

#### 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複合体の酵素特性に関する研究

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** Fukutin-LARGE-POMGnT1複合体の酵素化学的特性付けを進め、この複合体の酵素反応によって生じる産物の解析から、転移位置が異なる1-3残基のGlcNAcが転移されていることが明らかとなった。また昨年同定されたPOMT2遺伝子変異ではその活性が著しく減少していた。DMRVのモデルマウスとして、ヒト変異型GNEのみを発現する遺伝子組み換えマウスを作製した。

### A. 研究目的

α-DGの糖鎖修飾異常は、本邦に特異的に見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)、先天性筋ジストロフィー(MDC) 1D、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の糖鎖修飾に関与すると考えられている。このうち、POMT1、POMT2、POMGnT1は糖修飾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、いまだ明らかでない。POMGnT1、フクチン、LARGEがゴルジ体シス領域に存在し、複合体を形成していること、FCMD患者細胞でGlcNAcのα-DGへの取り込みが起こらないことを示し、フクチン、LARGEのPOMGnT1機能への関与を示唆した。昨年度は、直接にこれらのタンパク質複合体の機能を評価することを試み、*in vitro*でのラジオアイソトープを用いた酵素活性の測定法を確立した。今年度は、酵素活性測定法を、ラジオアイソトープを用いない方法へと改良した。その過程で、産物をいくつか認めため、質量分析を行ない、すべての産物を同定するとともに、酵素反応の特性について解析した。また、昨年度見

だしたPOMT2変異をもつ組み換えタンパク質を培養細胞で発現し、POMT1/POMT2活性を測定した。

また、DMRVのモデルマウスを作製し、表現型の解析を進めた。

### B. 研究方法

フクチン、POMGnT1、LARGE cDNAをMycタグまたはFLAGタグ融合タンパク質発現用ベクターにクローン化し、発現用コンストラクトを作成した。これらのベクターを、各々、または組み合わせてC2C12骨格筋株化細胞で発現させ、POMGnT1活性測定用の試料を作製した。POMGnT1活性はO-マンノシル化α-DGペプチドに対してGlcNAcを転移させ、産物をアビジンビーズで部分精製後、アミド樹脂を用いたHPLCにより分離した。反応産物の質量分析は、MALDI-TOF mass (Perseptive Voyager)によって解析した。

昨年度、同定した変異をPOMT2 cDNAにsite directed mutagenesisで導入した。POMT1及びPOMT2はFLAGタグ融合タンパク質として、HEK293細胞で発現した。定法に従って、POMT1/POMT2活性を測定した。

DMRVのモデルマウスは、GNE-KOマウスと変異GNEトランスジェニックマウスの掛け合

わせにより作製した。表現型の解析は行動解析、病理解析、生化学解析により行なった。

#### (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い行った。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

昨年度報告したように、POMGnT1、フクチン、LARGE が複合体を形成し、0-マンノースへのGlcNAc転移活性を有していることを示した。今年度は、ラジオアイソトープを用いない方法を試みて、順相クロマトグラフィーにより、良好に酵素産物を、反応物から分離出来ることがわかった。酵素産物は、4つのピークを与えた。質量分析の結果から、それぞれ、GlcNAcが1、2および2残基転移されたペプチドであることがわかった。また、最後に溶出されたピークは、少量のため質量分析は出来なかったが、その溶出位置から3残基のGlcNAcが転移されたペプチドであると考えられた。酵素としてPOMGnT1を用いて、異なる基質濃度に対する反応産物の生成速度を調べた。GlcNAc 1残基をもつ生成物を産生する反応をMichaelis反応に近似させた。この場合、 $K_m = 0.1$  nM程度であった。

HEK293細胞で発現した、変異を導入したPOMT2/POMT1複合体の酵素活性は、POMT1単独での酵素活性とほぼ同様に減

少していた。

GNE-KOマウスと変異GNEトランスジェニックマウスの掛け合わせにより作製したDMRVのモデルマウスは、30週齢以降、顕著な骨格筋の筋力低下を示し、病理学的にも、人のDMRVのそれを再現していた。シアル酸量は骨格筋をはじめとする各種臓器で減少していた。

### D. 考察

ラジオアイソトープを用いない方法で、0-マンノースへのGlcNAc転移活性を測定することが出来た。現在、合成基質などを用いた系が試されているが、特異的なマンノースペプチドを用いているため、より特異的に測れていると考えている。しかし、ラジオアイソトープを用いないため、感度が悪く、蛍光基質の利用など、今後は改善していかなければいけない点もある。POMGnT1、フクチン、LARGE複合体は酵素反応により、GlcNAcが1、2および3残基転移されたペプチドを生成した。POMGnT1のみの場合にも、ほぼ同様の比で産物が生成されたことを考えると、複合体形成は基質特異性を変えているわけではなく、むしろ反応速度を変化させている可能性が考えられた。しかしながら、大量の酵素複合体を生成させることが難しかったため、この複合体での反応パラメーターの測定にはいたらなかった。POMGnT1のみでは非常に小さい $K_m$ が測定され、基質が酵素に取り込まれやすいことを示した。

昨年度同定したPOMT2の変異では、POMT2/POMT1複合体の酵素活性は検出されなかった。これまでに、見いだされているPOMT2またはPOMT1の変異では酵素活性はほぼ消失していることが報告されており、ほぼ同様の結果が得られたと考えられた。

GNE-KOマウスと変異GNEトランスジェニックマウスの掛け合わせにより作製したモデルマウスは、生理学的、病理学的に、生化学的に、ヒトのDMRVの症状を再現しており、この疾患のモデルマウスと考えられた。このマウスは、今後、病態解析や治療法の開発に大いに役立つものと考えている。

## E. 結論

Fukutin-LARGE-POMGnT1 複合体の酵素化学的性質を解析した。新規な  $\alpha$ -DGP 原因タンパク質の評価法の開発を試みた。DMRV モデルマウスの作製に成功した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Goto K, Nishino I, Hayashi YK: Rapid and accurate diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 16:256-261. 2006.

Taniguchi M, Kurahashi H, Noguchi S, Fukudome T, Okinaga T, Tsukahara T, Tajima Y, Ozono K, Nishino I, Nonaka I, Toda T: Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in  $\alpha$ -dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet* 15:1279-1289. 2006.

Wu S, Ibarra MCA, Malicdan MCV, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. *Brain* 129: 1470-1480, 2006.

Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: A Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 16: 115-128, 2007.

Osawa M, Liewluck T, Ogata K, Iizuka T, Hayashi YK, Nonaka I, Sasaki M, Nishino I: Familial reducing body myopathy. *Brain Dev* 29: 112-116, 2007.

Liewluck T, Hayashi YK, Osawa M, Kurokawa

R, Fujita M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Unfolded protein response and aggresome formation in hereditary reducing body myopathy. *Muscle Nerve* 35:322-326, 2007.

Keira Y, Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Minami N, Hayashi YK, Kato T, Nishino I: Characterization of lobulated fibers in limb girdle muscular dystrophy type 2A by gene expression profiling. *Neurosci Res* 57:513-521, 2007.

### 2. 学会発表

村上てるみ, 田辺雄三, 松本浩, 小川恵, 埜中征哉, 野口悟, 林由起子, 西野一三: フクチン遺伝子 (FKTN) 変異による多様な臨床病態. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006.

西野一三, Wu Shiwen, Ibarra Carlos, Malicdan May, 村山久美子, 埜中征哉, 野口悟, 林由起子: セントラルコア病の大半は RYR1 変異による. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006.

Malicdan May, 野口悟, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) のモデルマウス作製. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.12, 2006.

高橋俊明, 青木正志, 小野寺好明, 鈴木直輝, 堅山真規, 今野秀彦, 林由起子, 西野一三, 埜中征哉, 木村格, 糸山泰人: Dysferlin 遺伝子変異の確定した肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 2B 型の筋障害の分布. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.13, 2006.

村上てるみ, 田辺雄三, 埜中征哉, 小川恵, 野口悟, 林由起子, 大澤真木子, 西野一三: 肢帯型筋ジストロフィー 2L 型? FKTN 遺伝子異常の最軽症例. 第 23 回小児神経筋疾患懇話会. 東京, 8.19, 2006.

Nishino I, Wu S, Ibarra C, Malicdan M, Murayama K, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Central Core Disease Is Due to RYR1 Mutations in More Than 90% of Patients.

58th Annual Meeting of American Academy of Neurology. San Diego, CA, USA. 4.5, 2006.

Nishino I: The Muscle Dystrophies. 5th Asian and Oceanian Myology Center Meeting and 12th Philippine Neurological Association Midyear convention. Cebu, Philippines, 5.25, 2006.

Noguchi S, Ogawa M, Murayama K, Matsumoto H, Imamura M, Hayashi YK, Nishino I: Fukutin and LARGE Cooperatively work with POMGnT1 on N-acetylglucosamine transfer in O-mannosylglycan synthesis of alpha-dystroglycan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Astejada M, Hayashi YK, Fujita M, Uematsu F, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Disruption of the in vivo regeneration process in cardiotoxin-injected Emdy/-Mice. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Keira Y, Kurokawa R, Fujita M, Minami N, Hayashi YK, Noguchi S, Kato T, Nishino I: Gene expression of Limb girdle muscular dystrophy type 2A. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Murakami T, Tanabe Y, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Fukutin (FKTN) mutations can cause cardiomyopathy. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Hayashi YK, Goto K, Nagano A, Ura S, Kawahara G, Astejada M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Emerinopathy and laminopathy in Japan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra MCA, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino

I: A heterozygous COL6A1 glycine substitution that influences cell attachment in fibroblasts causes sarcolemma-specific collagen VI deficiency (SSCD). XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Okada M, Kawahara G, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Collagen VI deficiency is the second leading cause of congenital muscular dystrophy in Japan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Kasahata N, Hayashi YK, Laing NG, Uematsu F, Nonaka I, Nishino I: Clinical, pathological and immunohistochemical findings of nemaline myopathy, comparing adult-onset and congenital patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Nishino I: Myopathies with autophagy. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: A GNE knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV). XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Sato I, Ibarra MCA, Wu S, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: RYR1 mutation in congenital neuromuscular disease with uniform type I fiber. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Ohkuma A, Murayama K, Ogawa M, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: The genetic cause of lipid storage myopathy is unknown in more than 80% of the cases. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Sugie K, Yamamoto KA, Murayama K, Malicdan MCV, Ueno S, Nonaka I, Nishino I: Clinicopathological features of cardiac involvement in genetically-confirmed Danon disease patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Ibarra MCA, Malicdan MCV, Wu S, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Pathological findings in muscle from malignant hyperthermia-susceptible patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 6 July 2006.

Arahata H, Fujita M, Murayama K, Ogawa M, Noguchi S, Hayashi YK, Raheem O, Udd B, Nishino I: The identification of non-DM1, non-DM2 Patient in clinical DM patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 6 July 2006.

Nishino I: Molecular pathomechanism of muscular dystrophy. Special Seminar. Bhumibol Adulyadej Hospital, Bangkok, Thailand, 9.15, 2006

Noguchi S, Fujita M, Sasaoka T, Nishino I: The therapeutic effect of myostatin-blockade on muscular dystrophic mice and gene expression analysis of the treated muscles. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 6 October 2006.

Hayashi YK, Astejada MN, Ozawa R, Fujita M, Noguchi S, Nonaka I, Stewart CL, Nishino I: Three kinds of model mice for nuclear envelopathy. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 5 October 2006.

Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: A GNE knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to Nonaka myopathy or

distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV). 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 4 October 2006.

Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Campbell KP, Osawa M, Nishino I: Fukutin gene mutations can cause familial dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness and normal intelligence. The 9th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology. Cebu Philippines, 24 Jan 2007.

#### 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 $\alpha$ -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 臨床診断で肢帯型筋ジストロフィーとされ、 $\alpha$ -ジストログリカノパチーの糖鎖修飾異常を示す疾患群： $\alpha$ -ジストログリカノパチー症例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

$\alpha$ -ジストログリカン(DG)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をはじめ、Walker-Warburg症候群(WWS)、筋-眼-脳症候群(MEB)、MDC1D、MDC1C/LGMD2I、LGMD2K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 $\alpha$ -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、POMT2、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。

我々は昨年度に引き続き $\alpha$ -ジストログリカノパチー(DGP)の病態解明に向けた研究を進めている。

### B. 研究方法

国立精神・神経センターの生検骨格筋レポジトリーの中で臨床筋病理学的に確定診断のついていないジストロフィー骨格筋について $\alpha$ -DG(VIA4-1)抗体を用いた $\alpha$ -DGの糖鎖修飾異常のスクリーニングを行い、免疫染色で異常を認めた例についてフクチン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。ウエスタンブロット及びラミネンオーバーレイは定法に従って行なった。

(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。

### C. 研究結果

$\alpha$ -DGの糖鎖部分を認識する抗体(VIA4-1)を用いた免疫組織化学法で、国立精神・神経センターの生検骨格筋レポジトリーのうち、臨床病理学的に肢帯型筋ジストロフィーに分類された症例から $\alpha$ -DGPを、スクリーニングした。さらに、VIA4-1の免疫反応に異常が認められた症例に対しフクチン遺伝子変異解析を行った結果、4家系6例に変異が認められた。いずれの症例も福山型先天性筋ジストロフィー患者で認められる3'非翻訳領域の3 kb挿入変異と翻訳領域のミスセンス変異の複合ヘテロ接合型変異を認めた。何れの患者も知能は全く正常で、筋力低下も極軽度であったが、拡張型心筋症を伴っていた。ウエスタンブロット解析では、いずれの症例でも、 $\alpha$ -DGの糖鎖に対する抗体では、非常に弱い抗体反応を示し、タンパク質のサイズも減少した。また、ペプチド鎖に対する抗体でも弱く、ブロードなバンドを与えた。ラミネンオーバーレイでは、患

者の $\alpha$ -DGは弱いラミニン反応性を示した。この患者群を、LGMD 2Lと名付けた

#### D. 考察

今回見いだされた患者の臨床像は福山型先天性筋ジストロフィーのそれとは、完全に異なっていた。何れの患者も知能は全く正常で、筋力低下も極軽度であったが、拡張型心筋症を伴っていた。筋病理所見も最も軽いジストロフィー変化を示した。

患者筋からの $\alpha$ -DGは、福山型先天性筋ジストロフィー患者のものよりも明らかに大きな分子量を示し、FKRPの変異で引き起こされる肢帯型筋ジストロフィーLGMD2I型で見られるものと同様であった。これらの結果は骨格筋でのフクチンの機能が部分的に保たれていることを示していると考えられた。心症状はこれらの患者の最も顕著な発見であった。すべての患者は拡張型心筋症を示し、うち2例では非常に重い進行性の症状であった。しかしながら、軽い骨格筋の症状に比べると心筋症状は重く、また、このような心筋症状は他の $\alpha$ -DGPではほとんど報告は無い。その理由として、軽い骨格筋の症状をもつ患者は健常人と同様に生活したり、運動したりしているが、このような運動が心臓に負担をかけ、症状を重くしていると考えられた。

今回認められた患者を含め、フクチン遺伝子の変異により引き起こされる疾患は、非常に幅広いスペクトラルを示すことがわかった。この知見をふまえて、家族性の拡張型心筋症の診断にフクチン遺伝子の変異を含めることが重要であると考えられた。

#### E. 結論

極軽度の肢体型筋ジストロフィーと拡張型心筋症を呈する新しい fukutin 変異の臨床型を4家系6例の患者に見だし、LGMD 2Lと名付けた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Goto K, Nishino I, Hayashi YK: Rapid and

accurate diagnosis of facioscapulo-humeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 16:256-261. 2006.

Wu S, Ibarra MCA, Malicdan MCV, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. *Brain* 129: 1470-1480, 2006.

Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: A Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 16: 115-128, 2007.

Osawa M, Liewluck T, Ogata K, Iizuka T, Hayashi YK, Nonaka I, Sasaki M, Nishino I: Familial reducing body myopathy. *Brain Dev* 29: 112-116, 2007.

Liewluck T, Hayashi YK, Osawa M, Kurokawa R, Fujita M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Unfolded protein response and aggregates formation in hereditary reducing body myopathy. *Muscle Nerve* 35:322-326, 2007.

Keira Y, Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Minami N, Hayashi YK, Kato T, Nishino I: Characterization of lobulated fibers in limb girdle muscular dystrophy type 2A by gene expression profiling. *Neurosci Res* 57:513-521, 2007.

##### 2. 学会発表

村上てるみ, 田辺雄三, 松本浩, 小川恵, 埜中征哉, 野口悟, 林由起子, 西野一三: フクチン遺伝子 (FKTN) 変異による多様な臨床病態. 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006.

西野一三, Wu Shiwen, Ibarra Carlos, Malicdan May, 村山久美子, 埜中征哉, 野

口悟, 林由起子: セントラルコア病の大半は RYR1 変異による. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006.

Malicdan M, 野口悟, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) のモデルマウス作製. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.12, 2006.

高橋俊明, 青木正志, 小野寺好明, 鈴木直輝, 豎山真規, 今野秀彦, 林由起子, 西野一三, 埜中征哉, 木村格, 糸山泰人: Dysferlin 遺伝子変異の確定した肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 2B 型の筋障害の分布. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.13, 2006.

村上てるみ, 田辺雄三, 埜中征哉, 小川 恵, 野口 悟, 林由起子, 大澤真木子, 西野一三: 肢帯型筋ジストロフィー 2L 型? FKTN 遺伝子異常の最軽症例. 第 23 回小児神経筋疾患懇話会. 東京, 8.19, 2006.

Nishino I, Wu S, Ibarra C, Malicdan M, Murayama K, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Central Core Disease Is Due to RYR1 Mutations in More Than 90% of Patients. 58th Annual Meeting of American Academy of Neurology. San Diego, CA, USA. 4.5, 2006.

Noguchi S, Ogawa M, Murayama K, Matsumoto H, Imamura M, Hayashi YK, Nishino I: Fukutin and LARGE Cooperatively work with POMGnT1 on N-acetylglucosamine transfer in O-mannosylglycan synthesis of alpha-dystroglycan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Astejada M, Hayashi YK, Fujita M, Uematsu F, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Disruption of the in vivo regeneration process in cardiotoxin-injected Emdy/-Mice. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Keira Y, Kurokawa R, Fujita M, Minami N, Hayashi YK, Noguchi S, Kato T, Nishino I: Gene expression of Limb girdle muscular dystrophy type 2A. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Murakami T, Tanabe Y, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Fukutin (FKTN) mutations can cause cardiomyopathy. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Hayashi YK, Goto K, Nagano A, Ura S, Kawahara G, Astejada M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Emerinopathy and laminopathy in Japan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra MCA, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: A heterozygous COL6A1 glycine substitution that influences cell attachment in fibroblasts causes sarcolemma-specific collagen VI deficiency (SSCD). XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Okada M, Kawahara G, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Collagen VI deficiency is the second leading cause of congenital muscular dystrophy in Japan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Kasahata N, Hayashi YK, Laing NG, Uematsu F, Nonaka I, Nishino I: Clinical, pathological and immunohistochemical findings of nemaline myopathy, comparing adult-onset and congenital patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006.

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: A GNE knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles(DMRV). XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Sato I, Ibarra MCA, Wu S, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: RYR1 mutation in congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Ohkuma A, Murayama K, Ogawa M, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: The genetic cause of lipid storage myopathy is unknown in more than 80% of the cases. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006.

Ibarra MCA, Malicdan MCV, Wu S, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Pathological findings in muscle from malignant hyperthermiasusceptible patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 6 July 2006.

Arahata H, Fujita M, Murayama K, Ogawa M, Noguchi S, Hayashi YK, Raheem O, Udd B, Nishino I: The identification of non-DM1, non-DM2 Patient in clinical DM patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 6 July 2006.

Hayashi YK, Astejada MN, Ozawa R, Fujita M, Noguchi S, Nonaka I, Stewart CL, Nishino I: Three kinds of model mice for nuclear envelopathy. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 5 October 2006.

Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: A GNE knockout mouse

expressing human V572L mutation develops features similar to Nonaka myopathy or distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV). 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 4 October 2006.

Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Campbell KP, Osawa M, Nishino I: Fukutin gene mutations can cause familial dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness and normal intelligence. The 9th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology. Cebu Philippine, 24 Jan 2007.

#### 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