

200632064A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

肢帯型筋ジストロフィー1B型の
社会医学的・分子細胞生物学的研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 由起子

平成19(2007)年4月

目 次

| | | |
|------|---|----|
| I. | 総括研究報告 | |
| | 肢帯型筋ジストロフィー 1 B 型の 社会医学的・分子細胞生物学的研究 林 由起子 (国立精神・神経センター 神経研究所) | 1 |
| II. | 分担研究報告 | |
| 1. | LGMD1B の社会医学的研究および治療研究 林 由起子 (国立精神・神経センター神経研究所) | 5 |
| 2. | LGMD1B の臨床医学的研究 西野 一三 (国立精神・神経センター神経研究所) | 9 |
| 3. | 核膜病における遺伝子発現解析 野口 悟 (国立精神・神経センター神経研究所) | 13 |
| 4. | 変異ラミン A/C の機能解析 松田 知栄 (独立行政法人 産業技術総合研究所) | 16 |
| III. | 研究成果の刊行に関する一覧表 | 18 |
| IV. | 研究成果の刊行物・別刷 | 19 |

I. 総括研究報告

肢帯型筋ジストロフィー 1 B 型の
社会医学的・分子細胞生物学的研究

主任研究者 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 肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)1B型はラミン A/C 遺伝子異常による核膜病の 1 つで、進行性の筋萎縮・筋力低下に加え、心障害による突然死を高率に合併する重篤な疾患である。われわれは今年度本研究において、ラミン A/C 遺伝子異常による LGMD1B が本邦における LGMD の中で 3 番目に多い頻度の高い疾患であることを明らかにした。その臨床的特徴は幼児期早期に発症し、下腿肥大を伴う筋ジストロフィーであり、Becker 型筋ジストロフィーとの鑑別診断が重要であることも明らかにした。また同じく核膜関連筋疾患の原因遺伝子であるエメリン遺伝子もまた、まれながら LGMD の原因となることを明らかにし LGMD 患者における核膜病診断の重要性を示した。

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

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

松田 知栄

独立行政法人産業技術総合研究所
脳神経情報研究部門
脳遺伝子研究グループ 主任研究員

病態を明らかにするとともに、治療法開発への手がかりを得ることを目的とする。

B. 研究方法

診断未確定の LGMD 患者において *LMNA* 変異のスクリーニングを行い、本邦における LGMD1B の頻度および臨床的特徴を明らかにする。また、*LMNA* 変異の違いと多彩な臨床症状との関連を知るために、ヒト変異ラミン A を COS-7 および C2C12 細胞に発現させ、その変化を検討した。モデル動物を用いた実験では、網羅的遺伝子発現解析を行い、その病態を明らかとするとともに、その結果に基づき治療実験を行った。

A. 研究目的

肢帯型筋ジストロフィー 1B 型(LGMD1B)は、核膜蛋白質ラミン A/C 遺伝子(*LMNA*)変異による疾患で、筋ジストロフィーに加え、心合併症によって高率に突然死をきたす臨床的に極めて重要な疾患であるが、本邦における頻度や臨床的特徴は明らかでない。またラミン A/C は、ゲノム情報の制御という生命現象で最も重要な役割を担うことが予測される反面、その具体的な機能は明らかでない。本研究は、ラミン A/C 遺伝子異常による LGMD1B に焦点を当て、*LMNA* 変異によって生じるゲノム情報の破綻を明らかにし、臨床社会医学的、分子細胞生物学的にその

(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 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た。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い、国立精神・神経センター神経研究所動物実験管理委員会の審査・承認を得ている。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。すべての組み換え DNA 実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、国立精神・神経センター神経研究所組み換え DNA 実験安全委員会の審査・承認を得ている。

C. 研究結果

診断未確定の LGMD 症例について、*LMNA* 変異解析をした結果、3%に変異を見いだし LGMD1B と診断した。この結果、LGMD1B は本邦で3番目に多い LGMD 亜型であることを明らかにした。LGMD1B の臨床的特徴として、幼児期早期に発症し、下腿肥大を伴い、Becker 型筋ジストロフィーとの鑑別診断が重要であること、心障害は骨格筋障害よりも後から出現することを明らかにした。また同じく核膜関連筋疾患の原因遺伝子 *EMD* 遺伝子変異も、LGMD の原因となることも明らかにした。

また、遺伝子変異の違いがどのようにして多彩な臨床病態を引き起こすのかを知ることが目的に、ヒト変異ラミン A を COS-7 および C2C12 細胞に発現させ、その局在、および細胞形態の変化を検討した。その結果、変異ラミン A の局在には変化は認められず、また導入細胞の形態にも明らかな異常は認められなかった。今後、変異導入細胞における各種変化を検討する予定である。

一方、モデルマウス骨格筋を用いた遺伝子発現解析の結果、ラミン A/C 欠損マウスおよびエメリン・ラミン A/C 二重欠損マウス骨格筋では筋萎縮関連遺伝子の発現亢進が認められ、筋萎縮を特徴とするこれらのマウス骨格筋病理像に合致する結果が得られた。この結果に基づき、筋萎縮阻害因子を実験的に投与したが、効果は得られなかった。

E. 結論

LGMD1B の確定診断は現在、遺伝子解析によらなければならない、本疾患は頻度が高いにもかかわらず見逃されている可能性が高い。しかしながら臨床医学的には若年者の突然死を高率にきたすことから、可能性のある患者については積極的に遺伝子診断を勧め、早期に確実に診断をつけること、心機能評価を定期的におこない、時期を逸することなく除細動装置付きのペースメーカー挿入を検討することが不可欠である。遺伝子変異に伴うゲノム情報の破綻についてはさらなる詳細な解析が必要である。

F. 健康危険情報

突然死予防の観点から、可及的速やかに核膜病の確定診断をおこない、定期的、慎重な心機能評価および経過観察が不可欠である。

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 α -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 muta-

tion 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.

Astejada Mina, 林由起子, 西野一三: エメリン欠損マウスの筋再生に関する研究. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5. 12, 2006.

後藤加奈子, 林由起子, 西野一三: 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の迅速診断法の開発. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5. 13, 2006.

浦茂久, 後藤加奈子, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: 肢帯型筋ジストロフィー1B型 (LGMD1B) 5例の臨床症状, 筋病理所見の検討. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5. 13, 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.

林由起子, 永野敦, 浦茂久, 後藤加奈子, 埜中征哉, 西野一三: 核膜関連筋疾患の臨床分子遺伝学的検討. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5. 13, 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.

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.

Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, Ogawa M, Suzuki A, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi YK: Dysferlin interacts with affixin(beta-parvin) at the sarcolemma. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 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.

Goto K, Nishino I, Hayashi YK, Reply to lemmers et Al. Neuromuscul Disord. 16: 617-8. 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.

Liang WC, You CY, Liu CY, Lee CS, Goto K, Hayashi YK, Jong YJ: Novel LMNA mutation in a Taiwanese family with autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. J Formos Med Assoc 106: 27-31, 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 re-

ducing body myopathy. Muscle Nerve 35:322-326, 2007.

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

LGMD1B の社会医学的研究および治療研究

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 LGMD1Bは、筋ジストロフィーに加え、心障害による突然死を高率に認める社会医学的に極めて重要な疾患である。本研究では*LMNA*遺伝子変異をスクリーニングすることによって、LGMD1Bが本邦LGMDの中で3番目に多い頻度の高い疾患であることを明らかにした。また同じ遺伝子変異であっても異なった表現型をとりうること、核内膜タンパク質であるエメリンの欠損もまた、LGMDの原因となりうることを明らかにした。一方、治療目的でおこなったモデルマウスへの筋肥大誘導因子投与実験では、むしろマウスの寿命の短縮を来す結果となり、今後その機序を含め解析をすすめていく必要がある。

A. 研究目的

LGMD1Bは、筋ジストロフィーに加え、心電導障害、心筋症を合併し、高率に突然死をきたす臨床的に極めて重要な疾患であるが、本邦における頻度や臨床的特徴は未だ明らかでない。本研究では*LMNA*変異のスクリーニングを行い、LGMD1Bの頻度を明らかにすることを目的とする。またモデルマウス骨格筋を用いた遺伝子解析結果に基づき、治療目的で筋肥大誘導因子をマウスに投与し、その効果判定を行う。

B. 研究方法

確定診断のついていないLGMD 204例について、直接シーケンス法を用いて*LMNA*遺伝子の全コーディング領域ならびにイントロン-エクソン境界領域の変異解析を行った。

また、モデル動物骨格筋を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果から、ラミンA/C欠損およびエメリン・ラミンA/C二重欠損マウスにおいて筋萎縮関連遺伝子の発現上昇が認められたことから、筋萎縮を改善する目的でマイオスタチン阻害分子FLRGを重複変異マウスに腹腔内投与し、筋肥大の誘導を試みた。

（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た。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い、国立精神・神経センター神経研究所動物実験管理委員会の審査・承認を得ている。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。すべての組み換えDNA実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、国立精神・神経センター神経研究所組み換えDNA実験安全

委員会の審査・承認を得ている。

C. 研究結果

LGMD 204例のうち6例(3%)に*LMNA*遺伝子変異を同定しLGMD1Bと診断した。この結果、LGMD1Bがジスフェルリン欠損によるLGMD2B、カルパイン3遺伝子異常によるLGMD2Aに次いで、本邦で3番目に多いLGMDであることが明らかとなった。遺伝子変異部位は様々であったが、このうちR453W変異は、同じ*LMNA*遺伝子の変異による筋疾患エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー患者ですでに多数報告されているものと同じであった。驚いたことにLGMDのスクリーニングの過程で、エメリン遺伝子異常もまたLGMDの原因となりうることを見だし、報告した。

一方、治療実験に関しては、筋萎縮を改善する目的でマイオスタチン阻害分子FLRGをエメリン・ラミンA/C二重欠損マウスに投与し、筋肥大の誘導を試みたが、筋肥大は認められず、かえって寿命を短縮する結果となった。

D. 考察

LGMD1Bは遺伝子変異のスクリーニングによって、頻度の高い疾患であることが明らかになった。また同じ遺伝子変異であっても、異なった臨床表現型をとりうるということが明らかとなり、今後その病態機序の解明を進めていく必要がある。

一方、エメリン遺伝子変異はこれまでエメリー・ドレイフス型筋ジストロフィーの原因となることのみが知られていたが、今回、LGMDの原因にもなることが明らかとなった。エメリン欠損症も*LMNA*変異と同様、突然死を高率に生じることから、LGMDにおけるエメリン欠損症のスクリーニングも不可欠である。

治療実験に関しては予想に反し、筋萎縮を抑制することなく、かえって寿命を短縮する結果となった。死因は不明であるが、今後FLRGの作用機序およびラミンA/Cの欠損との関連を詳細に解析していく必要がある。

E. 結論

LGMD1Bは本邦において3番目に多いLGMDで、頻度の高い疾患である。若年者の突戦

死を予防する上でも早期に確定診断を行い、十分な経過観察を行っていく必要がある。

F. 健康危険情報

突然死を高率に認めるLGMD1Bは頻度の高い疾患であることから、予後改善のためには早期に遺伝子診断を行い、十分に経過観察を行うことが重要である。またLGMD患者の中にエメリン遺伝子変異によるものが含まれることから、エメリン欠損症のスクリーニングもあわせて必要である。

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 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.

Astejada Mina, 林由起子, 西野一三: エメリン欠損マウスの筋再生に関する研究. 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.12, 2006.

後藤加奈子, 林由起子, 西野一三: 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の迅速診断法の開発. 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.13, 2006.

浦茂久, 後藤加奈子, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: 肢帯型筋ジストロフィー1B型 (LGMD1B) 5例の臨床症状, 筋病理所見の検討. 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.13, 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.

林由起子, 永野敦, 浦茂久, 後藤加奈子, 埜中征哉, 西野一三: 核膜関連筋疾患の臨床分子遺伝学的検討. 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, 松本浩, 埜中征哉, 林由起子, 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48回日本小児神経学会総会. 千葉, 6.1, 2006.

Astejada M, Hayasi 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.

Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, Ogawa M, Suzuki A, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi YK: Dysferlin interacts with affixin(beta-parvin) at the sarcolemma. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 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.

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.

Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, Ogawa M, Nonaka I, Tanabe Y, Ogino M, Takada F, Eriguchi M, Kotooka N, Campbell KP, Osawa M, Nishino I: Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. Ann Neurol 60: 597-602, 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

LGMD1B の臨床医学的研究

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 遺伝子変異スクリーニングによって*LMNA*変異の確定したLGMD1B患者について、臨床的特徴を検討した。その結果、LGMD1Bは幼児期早期に発症し、下腿肥大を伴うことから、ベッカー型筋ジストロフィーと鑑別が重要であることが明らかとなった。また、心機能障害は筋症状に遅れて明らかとなることから、慎重に経過観察を行うことが突然死を予防する上で不可欠であることを明らかにした。

A. 研究目的

突然死を高率に生じるLGMD1B患者では、その臨床的特徴を明らかにし、予後改善を図ることは社会医学的見地からきわめて重要なことである。本研究では臨床症状を詳細に分析し、本疾患患者への対応を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

あらたに診断の確定したLGMD1B 6例およびすでに診断のついていた2例、計8例について、主治医の協力のもとに集積した臨床情報をもとに、必要に応じて追加情報を依頼した上で詳細に臨床症状を解析した。

（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た。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

い、国立精神・神経センター神経研究所動物実験管理委員会の審査・承認を得ている。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。すべての組み換えDNA実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、国立精神・神経センター神経研究所組み換えDNA実験安全委員会の審査・承認を得ている。

C. 研究結果

LGMD1Bは、幼児期早期に発症する場合はほとんどで、高CK血症および進行性の近位筋優位の筋力低下・筋萎縮を特徴とする。関節拘縮は認めない。我々は新たに本疾患では病初期に、下腿肥大を高率に伴っていることを明らかにした。このような臨床的特徴はジストロフィン遺伝子異常によるBecker型筋ジストロフィーと極めて似ており、その鑑別診断が重要であることが明らかとなった。また、同じ*LMNA*変異によって生じる筋疾患Emery-Dreifuss型筋ジストロフィーは上腕下腿型の筋障害分布を示し、早期より関節拘縮を伴うという特徴がある。しかしながら、この両者の中間型を呈する場合、すなわち近位筋優位の筋障害と関節拘縮を伴うもの、上腕下腿型の筋障害分布をしめしながら関節拘縮のないものなども

あることが明らかとなった。

臨床的にきわめて重要な発見は、心電導障害・心筋症が全例において病初期にはみとめられず、思春期前後に発症することが多かったという点である。また A-V block を含む各種電導障害は進行性であり、検索例の中にすでに突然死を来してしまった症例も存在した。

D. 考察

LGMD1Bは若年者の突然死を高率にきたすことから、臨床社会医学的にきわめて重要な疾患である。本疾患の可能性のある患者については積極的に遺伝子診断を勧め、早期に確定診断をつけること、病初期には心合併症が認められないことに留意し、心機能評価を定期的におこない、時期を逸することなく除細動装置付きのペースメーカー挿入を検討することが不可欠である。

E. 結論

本邦における本疾患の社会的医学的重要性が再確認され、早期確定診断、および心機能を中心とした定期的な経過観察の重要性が明らかとなった。

F. 健康危険情報

突然死予防の観点から、可及的速やかに確実に確定診断し、定期的、慎重な心機能評価および経過観察および適切な処置が不可欠である。ペースメーカー挿入に当たっては、単にペースングを行うのみでは、心筋症による致死性不整脈を予防することができないため、除細動装置付きのものが必須である。

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 matu-

ration in α -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.

Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, Ogawa M, Nonaka I, Tanabe Y, Ogino M, Takada F, Eriguchi M, Kotooka N, Campbell KP, Osawa M, Nishino I: Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann Neurol* 60: 597-602, 2006

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.

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, Ni-

shino 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.

Astejada Mina, 林由起子, 西野一三: エメリン欠損マウスの筋再生に関する研究. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5. 12, 2006.

後藤加奈子, 林由起子, 西野一三: 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の迅速診断法の開発. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5. 13, 2006.

後藤加奈子, 林由起子, 西野一三: 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の迅速診断法の開発. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5. 13, 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.

林由起子, 永野敦, 浦茂久, 後藤加奈子, 埜中征哉, 西野一三: 核膜関連筋疾患の臨床分子遺伝学的検討. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5. 13, 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.

村上てるみ, 田辺雄三, 松本浩, 埜中征哉, 林由起子, 西野一三: 肢帯型筋ジストロフ

イー2L 型? FKTN 遺伝子異常の最軽症例. 第 48 回日本小児神経学会総会. 千葉, 6. 1, 2006.

Astejada M, Hayasi 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.

Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, Ogawa M, Suzuki A, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi YK: Dysferlin interacts with affixin(beta-parvin) at the sarcolemma. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 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.

Goto K, Nishino I, Hayashi YK, Reply to

lemmers et Al. Neuromuscul Disord. 16: 617-8. 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.

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

核膜病における遺伝子発現解析

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 核膜病は、核膜タンパク質の異常に伴う核膜の脆弱化および遺伝子発現変化がその本態であると考えられている。本研究ではLGMD1Bの病態を明らかにすることを目的に、核膜病モデルマウスを用いて遺伝子発現解析を行った。ラミンA/C欠損マウスおよびエメリン・ラミンA/C二重欠損マウス骨格筋を用いた網羅的遺伝子発現解析では、筋萎縮に関連する遺伝子群の発現上昇が認められ、筋萎縮を特徴とするこれらのマウス骨格筋病理像に合致する結果が得られた。

A. 研究目的

核膜病は、核膜タンパク質の異常に伴い機械的刺激に対する核膜の脆弱性が生じること、それに伴う核の構造変化あるいは原因タンパク質および関連分子の機能異常に伴う遺伝子発現変化がその本態であると考えられている。本研究では核膜病モデルマウスを用いて遺伝子発現解析を行うことによって、LGMD1Bの病態に迫ることを目的とする。

B. 研究方法

我々の作製したエメリン欠損マウス、米国より供与されたラミンA/C欠損マウス、およびそれらの二重欠損マウスの骨格筋を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、野生型と比較した。二重欠損マウスの寿命は3-5週ときわめて短いため、3週齢のマウス骨格筋を用いて解析した。

（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た。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い、国立精神・神経センター神経研究所動物実験管理委員会の審査・承認を得ている。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。すべての組み換え DNA 実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、国立精神・神経センター神経研究所組み換え DNA 実験安全委員会の審査・承認を得ている。

C. 研究結果

3週齢のラミン A/C 欠損および二重欠損マウス骨格筋ではアトロジンなど筋萎縮関連遺伝子の発現亢進が認められた。現在詳細にその機序について解析中である。

D. 考察

ラミン A/C 欠損および二重欠損マウス骨格筋は野生型およびエメリン欠損マウスと

比較し、筋細胞径が小さい、骨格筋の成長障害あるいは筋萎縮が考えられる。筋萎縮関連遺伝子発現亢進は、この病理変化に合致するものであり、今後、このようなシグナルがどのような機序で動いているのか、検討していく予定である。

E. 結論

各モデル動物で特徴的な遺伝子発現変化を見いだすことができた。今後ヒトの病態との関連についてさらに検討を進めていく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 α -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.

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.

Astejada M, Hayasi 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.

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.

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.

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

変異ラミン A/C の機能解析

分担研究者 松田 知栄 独立行政法人産業技術総合研究所主任研究員

研究要旨 ラミンA/C遺伝子変異による核膜病は、その変異の違いによって様々な臓器・組織が障害され、臨床的にもきわめて多様な症状を呈することが知られている。我々は同じアミノ酸部位の変異の違いによりLGMD1Bとなる場合と早老症候群を呈する場面があることを見いだした。このアミノ酸変異の違いがどのようにして多彩な臨床病態を引き起こすのかを知ることを目的に、ヒト変異ラミンAをCOS-7およびC2C12細胞に発現させ、その局在、および細胞形態の変化を検討した。その結果、変異ラミンAの局在には変化は認められず、また導入細胞の形態にも明らかな異常は認められなかった。今後、変異導入細胞における各種変化を検討する予定である。

A. 研究目的

ラミンA/C遺伝子変異による核膜病は、その変異の違いによって、様々な臓器・組織が障害され、臨床的にもきわめて多様な症状を呈することが知られている。アミノ酸変異の違いがどのようにして全く異なった臨床病態を引き起こすのかを知ることを目的に、ヒト変異ラミンAを有するコンストラクトを作製した。

我々は*LMNA*変異のうち、同じアミノ酸部位の変異の違いによりR471CはLGMD1Bの、R471Hは早老症の原因となることを見いだした。この2種類の変異ならびに他のLGMD1Bで見いだした変異(K311R)、そして野生型ラミンAをCOS-7およびC2C12細胞に導入し、変異ラミンAタンパク質の局在、および変異導入細胞における細胞生物学的変化を比較し、genotype-phenotype correlationについての詳細な知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

LGMD1B患者または早老症患者で見いだされた3種類の変異ラミンA (R471C, R471H, K311R) にFLAGを付加したコンス

トラクトを作製し、COS-7およびC2C12細胞に導入し、その局在、細胞形態を野生型ラミンA導入細胞と比較検討した。

C. 研究結果

FLAG付加した変異ラミンAの分子量およびタンパク質発現レベルは野生型のそれとほぼ同じであった。免疫組織化学法を用いて細胞内局在を調べた結果、C2C12細胞に導入した3種類の変異ラミンAはいずれも野生型ラミンA同様、核に明瞭に局在していた。変異ラミンAを導入したC2C12細胞の形態は導入していないコントロールの細胞と同様であった。

D. 考察

変異ラミンAの導入は、その局在、および細胞形態には明らかな変化を引き起こさなかった。今後、変異ラミンA導入による遺伝子発現変化について、細胞種による違いを含め、詳細に検討する予定である。

E. 結論

変異ラミンA導入によってラミンAの