

200730036A

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 由起子

平成20(2008)年4月

目 次

I.	総括研究報告	
	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 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.	核膜病骨格筋における核変化を中心とする病理学的検討 林 由起子 (国立精神・神経センター神経研究所)	4
2.	核膜病細胞における関連タンパク質の局在変化 西野 一三 (国立精神・神経センター神経研究所)	7
3.	核膜病骨格筋における染色体不安定性の検討 野口 悟 (国立精神・神経センター神経研究所)	10
4.	変異ラミンAと結合タンパク質の親和性の変化 松田 知栄 (独立行政法人 産業技術総合研究所)	12
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	14
IV.	研究成果の刊行物・別刷	15

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。われわれは今年度の本研究において、ラミン A/C 遺伝子異常による LGMD1B/AD-EDMD 患者およびモデルマウス骨格筋における病理変化および分子細胞生物学的研究により、核形態およびクロマチンの著しい異常と筋のジストロフィー変化との関連を明らかにした。また、細胞生物学的検討により、クロマチンの不安定性、変異ラミン A/C およびその結合タンパク質の局在・親和性の異常および核内凝集を見いだした。

分担研究者

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

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

ロフィーであることを明らかにした。ラミン A/C は、核の維持、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、*LMNA* 変異によって生じる核の変化および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

LGMD1B/EDMD 患者およびモデルマウス骨格筋において核の微細構造を含めた詳細な病理変化を光顕、電顕を用いて検討するとともに、マウス骨格筋における gene dose の変化を array CGH 法を用いて網羅的に解析した。培養細胞を用いた実験では、核の形態及び関連タンパク質の局在変化を免疫細胞染色で検討し、またヒト変異ラミン A とラミン A/C 結合核膜タンパク質 BAF との親和性の差を COS-7 細胞への共発現・免疫沈降法を用いて解析した。

(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

A. 研究目的

肢帯型筋ジストロフィー 1B 型(LGMD1B)は、常染色体性 Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー(AD-EDMD)とともに、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。昨年度本研究によって、LGMD1B は本邦の LGMD の中で 3 番目に多い疾患であること、臨床的に小児期早期に発症し、下腿肥大を高頻度に認める筋ジスト

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/AD-EDMD 患者骨格筋の筋病理所見を検討した結果、一筋線維あたりの核数の増加、核の大小不同・形態異常を見いだした。さらに電顕を用いて詳細に観察したところ、大小不同の鎖状核、核の変形、クロマチンの変化、核内・核近傍の空胞形成を認めた。筋原線維の構築は変化の強い核周辺に比較的限局しており、本疾患の筋変性における核の変化の重要性を明らかにした。さらに筋再生の鍵となる筋衛星細胞も筋核同様の強いクロマチン異常を呈しており、筋再生能の低下を示唆する結果となった。

また、同様の核の異常は患者およびモデルマウスの培養皮膚線維芽細胞においても見いだされた。マウス細胞では核形態の著しい異常とともに、核質の核外への噴出が認められた。また、これらの結果を裏付けるように array CGH 法を用いた解析ではモデルマウス骨格筋でのクロマチンの全般的不安定性が明らかとなった。

さらに培養細胞ではラミン A/C 結合タンパク質である BAF の局在に異常が見いださ

れた。そこで変異ラミン A/C と BAF との親和性の変化による可能性を考慮し、タグをつけたヒト変異ラミン A および BAF を COS-7 および C2C12 細胞に共発現させ、BAF との結合能を検討した。その結果、ラミン A の変異の違いにより BAF との結合能に差のあることが明らかとなった。

D. 考察

LGMD1B における筋のジストロフィー変化として、Duchenne 型筋ジストロフィーに代表されるような筋細胞膜関連のタンパク質異常に伴う筋ジストロフィーとは異なった発症機序が示唆された。すなわち、核膜の脆弱性に伴う核および筋衛星細胞の形態異常、クロマチンの変化、ならびに関連タンパク質の局在異常や親和性の変化が生じ、それが筋原繊維変性、筋細胞死、そして筋再生能の低下を引き起こすことが示唆された。

E. 結論

核の変化を中心とした筋変性機序を明らかにした。

今後、患者同様の筋のジストロフィー変化を生じる新たなモデルマウス (*Emd KO/Lmna KI*) を用いて筋変性の具体的な分子メカニズムを明らかにする予定である。

F. 健康危険情報

LGMD1B は決して頻度の低い疾患ではなく、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

Ura S, Hayashi YK, Goto K, Astejada MN, Murakami T, Nagato M, Ohta S, Daimon Y, Takekawa H, Hirata K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Limb-Girdle Muscular Dystrophy Due

to Emerin Gene Mutations. Arch Neurol 64: 1038-1041, 2007

Muchir A, Pavlidis P, Bonne G, Hayashi YK, Worman HJ: Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Hum. Mol. Genet 16: 1884-1895, 2007

Matsuda C, Kameyama K, Suzuki A, Mishima W, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi YK: Affixin activates Rac1 via β PIX in C2C12 myoblast. FEBS Lett 582: 1189-1196, 2008

2. 学会発表

林由起子, アステハーダ ミーナ, 後藤加奈子, 埜中征哉, 西野一三: PZ-207核膜関連筋疾患における核の異常についての検討. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 5. 17, 2007

浦 茂久, 後藤加奈子, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: エメリン遺伝子異常による肢帯型筋ジストロフィー. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 5. 17, 2007

岡田麻里, 遠藤雄策, 小牧宏文, 松坂哲鷹, 埜中征哉, 林由起子, 西野一三: SIL1変異による本邦Marinesco-Sjögren症候群14例の臨床病理学的特徴. 第49回日本小児神経学会総会, 大阪, 7. 5, 2007

林由起子: 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. 厚生労働科学研究 こころの健康科学(神経分野)研究成果発表会, 東京, 2. 5, 2008

Hayashi YK: Nuclear abnormalities in nuclear envelopathy. 7th Japanese-French Worksop, Hayama, Kanagawa, 6. 8, 2007

Hayashi YK: Alpha-dystroglycanopathy. 6th Asian and Oceanian Myology Centre (AOMC) and Neuroscience 2007, Penang, Malaysia, 6. 21, 2007

Hayashi YK, Astejada M, Park Y, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Nuclear changes in muscular dystrophy associated with nuclear envelopathy. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10. 18, 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

核膜病骨格筋における核変化を中心とする病理学的検討

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*遺伝子変異を有するLGMD1B/EDMD患者およびモデルマウス骨格筋における病理変化を詳細に検討し、筋細胞障害の病態機序を明らかにすることを目的とした。その結果、LGMD1B/EDMD骨格筋ではDuchenne型筋ジストロフィー(DMD)と比べ、筋の壊死・再生像は比較的乏しく、一方、核の数および形態、クロマチンに著しい異常を見いだした。また著しく変性した核近傍の筋原線維間網に配列の乱れが認められた。さらに筋衛星細胞も筋核と同様の変化を呈することを明らかにした。以上の結果より、ラミノパチーでは筋核の障害の結果筋細胞死が生じ、また筋再生も障害されている可能性を示唆した。

A. 研究目的

LGMD1Bは、筋ジストロフィーに加え、心伝導障害、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、その具体的発症機序は明らかでない。本研究では、患者およびモデルマウス骨格筋の病理変化を詳細に検討し、筋細胞死の発症機序を探ることを目的とした。

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。

B. 研究方法

診断の確定したLGMD1Bおよび同じ*LMNA*遺伝子変異による筋ジストロフィー、常染色体優性Emery-Dreifuss型筋ジストロフィー(AD-EDMD) 12例、および同じく核膜病であるX染色体性EDMD (X-EDMD) 11例の骨格筋組織について、20種類の一般組織染色結果を検討した。また4例(小児例3例、成人例1例)については詳細な電顕的観察も行った。

(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

C. 研究結果

*LMNA*遺伝子変異によるallelic disease、LGMD1BとAD-EDMD、*EMD*遺伝子変異によるX-EDMDの筋病理変化に明らかな違いは認められなかった。興味深いことに、いずれの疾患群でも筋線維の大小不同、軽度の壊死再生像、間質結合組織の増大といった筋のジストロフィーに共通な非特異的変化に加え、核の形態に強い異常が認められた。また、筋線維1本あたりの筋核数が疾患対照群と比べ有意に増加していた。より詳細な核形態の変化を検討する目的でLGMD1B/EDMD 4例の骨格筋について電子顕微鏡下で観察を行った。その結果、大小不同の核が一行に連なった鎖状核、核の著し

い形態変化、ヘテロクロマチンの減少、ユークロマチン領域の電子密度の低下、クロマチンの濃縮、核膜の肥厚・断裂、核近傍および核内の空胞形成といった様々な核の変化が認められた。また、筋原線維間網の乱れは、核の著しく変性した領域近傍に多く認められ、クロマチンの濃縮、核内空胞を認める核を有する筋線維では、筋原線維は著しく断裂していた。これらの変化は患者の年齢、臨床的重症度、筋病理変化の強さとは明らかな相関は認められなかった。さらに重要な所見として、骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞の核にも筋核同様の強いクロマチンの変化が見いだされた。コントロールとして検討したDMD筋では同様の核の変化はほとんど認められなかった。

D. 考察

LGMD1B/AD-EDMDの骨格筋では、変異ラミンA/Cの存在により核膜の脆弱性が生じ、その結果、収縮・弛緩といった機械的刺激を常に繰り返している骨格筋では形態異常およびクロマチンの変化といった様々な筋細胞核の変化が惹起される。異常な筋核の近傍領域では筋原線維の構築も障害され、最終的に筋細胞死が引き起こされると考えられた。

一方、筋衛星細胞の核変化は重要な知見である。筋衛星細胞のクロマチン変化は、筋再生能の低下を強く示唆する所見と考えられる。今後、モデル動物を用いて筋再生能の変化を詳細に検討する予定である。また、この所見は病初期から多様な核の障害が生じていることを示唆している。この結果は、核変化が年齢、臨床・筋病理変化の重症度と相関しない結果とも矛盾しない。

E. 結論

LGMD1B/AD-EDMDの詳細な筋病理観察から核膜病における筋細胞障害の発症機序をあきらかにした。

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

Ura S, Hayashi YK, Goto K, Astejada MN, Murakami T, Nagato M, Ohta S, Daimon Y, Takekawa H, Hirata K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Limb-Girdle Muscular Dystrophy Due to Emerin Gene Mutations. Arch Neurol 64: 1038-1041, 2007

Muchir A, Pavlidis P, Bonne G, Hayashi YK, Worman HJ: Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Hum. Mol. Genet 16: 1884-1895, 2007

Matsuda C, Kameyama K, Suzuki A, Mishima W, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi YK: Affixin activates Racl via β PIX in C2C12 myoblast. FEBS Lett 582: 1189-1196, 2008

2. 学会発表

林由起子, アステハーダ ミーナ, 後藤加奈子, 埜中征哉, 西野一三: PZ-207核膜関連筋疾患における核の異常についての検討. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 5.17, 2007

浦 茂久, 後藤加奈子, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: エメリン遺伝子異常による肢帯型筋ジストロフィー. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 5.17, 2007

岡田麻里, 遠藤雄策, 小牧宏文, 松坂哲鷹,

埜中征哉, 林由起子, 西野一三: SIL1変異による本邦Marinesco-Sjögren症候群14例の臨床病理学的特徴. 第49回日本小児神経学会総会, 大阪, 7. 5, 2007

林由起子: 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. 厚生労働科学研究 こころの健康科学(神経分野) 研究成果発表会, 東京, 2. 5, 2008

Hayashi YK: Nuclear abnormalities in nuclear envelopathy. 7th Japanese-French Worksyp, Hayama, Kanagawa, 6. 8, 2007

Hayashi YK: Alpha-dystroglycanopathy. 6th Asian and Oceanian Myology Centre (AOMC) and Neuroscience 2007, Penang, Malaysia, 6. 21, 2007

Hayashi YK, Astejada M, Park Y, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Nuclear changes in muscular dystrophy associated with nuclear envelopathy. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10. 18, 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

核膜病細胞における関連タンパク質の局在変化

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 核膜病は、核膜タンパク質の異常に伴う核膜の脆弱化、核機能の変化が発症に深く関わっていることが示唆されている。本研究では培養線維芽細胞を用いて、核の形態及び関連タンパク質の局在変化を検討した。LGMD1B/EDMD患者培養皮膚細胞では、ラミンA/Cおよびその結合タンパク質の核内凝集が認められた。またモデルマウス細胞では核の形態が著しく変化しており、患者細胞同様のラミンA結合タンパク質の凝集も認められた。核膜病における関連タンパク質の局在異常および凝集はそのタンパク質機能の障害をも示唆し、病態と深く関わっていると考えられた。

A. 研究目的

LMNAおよびEMDの変異による核膜病は、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病態と深く関わっていると考えられている。本研究では培養細胞を用いて核の形態、および関連タンパク質の局在を詳細に検討した。

B. 研究方法

LGMD1B/EDMD患者4例の皮膚線維芽細胞および我々の作製したエメリン欠損マウス (*Emd KO*)、米国より供与されたラミンA/C欠損マウス (*Lmna KO*)、その二重欠損マウス (*Emd/Lmna DKO*)、フランスより供与されたラミン変異導入マウス (*Lmna KI*) の線維芽細胞を用いて、核の形態、ラミンA/C、ラミンA/C結合タンパク質であるエメリン、LAP2、BAF、ネスプリンの局在を免疫細胞染色法を用いて検討した。

(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た。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

ヒト LGMD1B/EDMD 患者細胞では核の形態

は円形で比較的保たれているものが多かったが、小さい核 bleb はコントロール細胞に比べ高頻度に認められた。またラミンC、エメリン、LAP2 などラミン結合タンパク質の核内小凝集も散見された。一方、ラミンA/C完全欠損患者細胞では強い核の形態異常が認められ、また細胞の増殖能も著しく低下していた。マウス *Lmna KO*、*Emd/Lmna DKO*、*Lmna KI* 細胞でも顕著な核の形態異常を認め、核質の一部が核外へ漏出している細胞が散見された。また、エメリン、LAP2、BAFの核内凝集も認められた。ラミン欠損マウス細胞の増殖能もヒト欠損細胞同様著しく低下していた。一方 *Emd KO* 細胞では明らかな異常は認められなかった。

D. 考察

ラミンA/Cの完全欠損症例は新生児期に死亡するきわめて重篤な経過を示す。また *Lmna KO* マウスも強い発育障害、早期死亡を認める。これに合致するように、ラミンA/C完全欠損細胞は著しい核の形態異常を示すとともに、増殖能の低下を示した。この結果はラミンA/Cタンパク質の核の形態維持といった生存に不可欠な機能を反映しているものと考えられる。

また核質の核外への漏出は核膜の脆弱性を具体的に裏付ける結果であり、また骨格筋の核の電顕所見で認められたヘテロクロマチンの減少との関連も強く示唆される。

一方、ラミンA/Cおよびその結合タンパク質の核内凝集は、これらのタンパク質の機能障害を強く示唆するものと考えられる。今後、これらのタンパク質の機能と疾患との具体的関連について詳細な検討を行う必要がある。同時に上記変化が骨格筋細胞においても再現されるか否かを検討する必要がある。

E. 結論

核膜病患者およびモデルマウス培養線維芽細胞における核の形態および結合タンパク質の異常を明らかにした。このような変化が病態とどのように関わっているのかの具体的関連について検討を進める。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ura S, Hayashi YK, Goto K, Astejada MN, Murakami T, Nagato M, Ohta S, Daimon Y, Takekawa H, Hirata K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Limb-Girdle Muscular Dystrophy Due to Emerin Gene Mutations. Arch Neurol 64: 1038-1041, 2007

Matsuda C, Kameyama K, Suzuki A, Mishima W, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi YK: Affixin activates Rac1 via β PIX in C2C12 myoblast. FEBS Lett 582: 1189-1196, 2008

2. 学会発表

林由起子, アステハーダ ミーナ, 後藤加奈子, 埜中征哉, 西野一三: PZ-207核膜関連筋疾患における核の異常についての検討. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 5. 17, 2007

浦 茂久, 後藤加奈子, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: エメリン遺伝子異常による肢帯型筋ジストロフィー. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 5. 17, 2007

岡田麻里, 遠藤雄策, 小牧宏文, 松坂哲鷹, 埜中征哉, 林由起子, 西野一三: SIL1変異による本邦Marinesco-Sjögren症候群14例の臨床病理学的特徴. 第49回日本小児神経学会総会, 大阪, 7. 5, 2007

Hayashi YK, Astejada M, Park Y, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Nuclear changes in muscular dystrophy associated with nuclear envelopathy. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10. 18, 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

核膜病骨格筋における染色体不安定性の検討

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 核膜病における核膜の脆弱性は、核形態およびクロマチンの変化ひきおこし、その結果、染色体の構造に変化が生じる可能性が示唆されている。我々はarray CGH(comparative genome hybridization)法を用いてラミンA/C欠損モデルマウス骨格筋におけるクロマチンの変化を網羅的に検討し、その不安定性を明らかにした。

A. 研究目的

ラミンA/C欠損マウス(*Lmna KO*)は著しい成長障害、早老症状を示し、生後6-8週で死亡する。また我々の作製したエメリン欠損マウス(*Emd KO*)との二重欠損マウス(*Lmna/Emd DKO*)はさらにその症状が促進され、生後4-5週齢で死亡する。いずれのマウスも骨格筋の発達は著しく障害されている。我々は前年度、これらモデルマウス骨格筋で筋萎縮関連遺伝子の発現が亢進していることを見いだした。今年度はラミンA/Cの欠損が骨格筋に与える影響を染色体レベルで明らかにするため、gene doseの変化を網羅的に解析した。また変異ラミンAを正常マウス骨格筋へ導入し、筋変性の具体的発症機序の検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

生後4週齢の野生型、*Emd KO*、*Lmna KO*、*Lmna/Emd DKO*マウス各2匹の骨格筋からゲノムDNAを抽出し、array CGHを用いてgene doseを野生型のものと比較した。また野生型マウス前頸骨筋に遺伝子導入を行う前実験として、GFP発現ベクターをエレクトロポレーション法を用いて導入を試みた。

(倫理面への配慮)

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

array CGH法を用いgene doseを網羅的に解析した結果、*Lmna KO*、*Lmna/Emd DKO*ではwild-typeと比較し、小欠失、小重複を示す領域が有意に高いことが明らかになった。これらの変化は特定の染色体、あるいはその領域に限局したものではなく、特異的遺伝子に変化を認めるものでもなかった。一方、その変化領域は比較的遺伝子コード領域から外れている場合が多い傾向にあった。*Lmna KO*と*Lmna/Emd DKO*では、明らかな差は見いだされなかったが、*Emd KO*マウス骨格筋では、ラミンA/C欠損マウスに比べ変化は乏しかった。

一方、エレクトロポレーション法を用いて変異ラミンAの導入を図る前実験としてGFP発現ベクターの導入を試みた。しかしながら発現効率は約10-30%程度と低く、一方、多数の壊死線維が認められた。今後、電流

の強さ、通電時間、電極の位置や種類、実験的筋壊死誘導等の導入前処置の検討など技術的な改善が必要であると考えている。

D. 考察

ラミンA/C欠損モデルマウス骨格筋における染色体のランダムな不安定性は、核の脆弱性をよく反映しているものと考えられる。遺伝子非コード領域に変化が強いという結果は、骨格筋電顕像で認められた核のヘテロクロマチンの減少と合致する所見であるかもしれない。一方、*Emd KO*ではgene dose変化が目立たないという結果が得られたが、これは*Emd KO*マウスが骨格筋症状を示さないという結果と一致している。今後、array CGHで得られたデータをさらに詳細に解析し、疾患特異的に変化の生じやすい染色体、領域、遺伝子などの有無を探索し、病態との関連を明らかにしたいと考えている。

エレクトロポレーション法による遺伝子導入は技術的改良点を克服し、今後、変異ラミンAの効率よい導入を図り、経時的な病理変化を検討したいと考えている。

E. 結論

ラミン A/C 欠損マウス骨格筋における染色体不安定性を見いだした。今後、筋の発達障害、萎縮との関連を具体的に検討する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ura S, Hayashi YK, Goto K, Astejada MN, Murakami T, Nagato M, Ohta S, Daimon Y, Takekawa H, Hirata K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Limb-Girdle Muscular Dystrophy Due to Emerin Gene Mutations. Arch Neurol 64: 1038-1041, 2007

2. 学会発表

Hayashi YK, Astejada M, Park Y, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Nuclear changes in muscular dystrophy associated with nuclear envelopathy. 12th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Taormina, Italy, 10.18, 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 と結合タンパク質の親和性の変化

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 核膜タンパク質BAF (Barrier-to-autointegration factor) と野生型および変異ラミンAを細胞へ共発現し、その結合能を免疫沈降法を用いて検討し、BAFの核膜病の分子病態への関与を検討した。その結果、発現したBAF とラミンAは相互作用しており、変異によりその親和性に差が認められた。この結果は変異の違いにより多様な臨床症状を示す核膜病の病態の一端を示すものとする。

A. 研究目的

BAFはラミンA、エメリン、2本鎖DNA等と結合する核膜タンパク質であり、クロマチンのremodeling・organizationに関与する。最近ではBAFが線虫の筋肉のintegrityに関与することが報告されている (J Cell Biol. 2007;178:661-73)。我々はラミンA/C遺伝子変異による核膜病の患者細胞においてBAFの細胞内局在が異常であることを見出した。そこでBAFがラミンA/C遺伝子変異による核膜病の分子病態に関与している可能性について検討した。

B. 研究方法

ヒト BAF cDNA に T7 タグを付加し培養動物細胞用発現ベクターにサブクローニングした。この T7・BAF コンストラクトと昨年度作製したラミン A コンストラクトを COS-7 細胞に一過的に共発現させた。ラミン A コンストラクトは野生型、LGMD1B で見いだされた変異である H222P、K311R、R471C、日本人 LGMD1B において最も頻度の高い変異である R453W、早老症を引き起こす R471H の 6 種類の cDNA に FLAG タグを付加したものである。導入した細胞からライセートを調製し、タグの抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降・共沈されたタンパク質をタグの抗体を用いた

ウエスタンブロット法で解析した。

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および産業技術総合研究所の組み換え DNA 実験安全委員会の審査・承認を得ている。

C. 研究結果

野生型ラミンAとBAFを導入した細胞において抗FLAG抗体はBAFを共沈し、抗T7抗体はラミンAを共沈した。共沈されるタンパク質の量を野生型ラミンAと比較するとH222P、R453Wでは明らかな差は認められなかった。K311Rでは共沈されるラミンA、BAFは野生型ラミンAと比較するとやや少なく、R471C、R471Hでは著減していた。現在ラミンAとBAFをC2C12細胞に一過的発現させこれらの細胞内局在を解析中である。

また、FLAGを付加した野生型ラミンA、R453W、R471C、R471Hをそれぞれ安定型発現するC2C12細胞株を確立した。導入したラミンAの発現を抗FLAG抗体を用いた免疫組織化学法で調べたところ、野生型・変異型共に核膜と核質に局在していた。

細胞株からライセートを調製し抗FLAG抗体を用いてウエスタンブロット法を行ったところ74kDaのバンドが確認された。これは予想されるラミンAの分子量と一致する。これらのラミンAの導入はその局在、およびC2C12細胞の形態に明らかな変化はもたらさなかった。

D. 考察

COS-7細胞に共発現した野生型ラミンAとBAFの相互作用が示唆された。変異型ラミンAのBAFに対するaffinityは、野生型と同等のものから著減しているものまで変異によって差が認められ、変異の違いによる臨床病態の多様性に結合タンパク質との親和性の差も関与している可能性を示唆した。

変異ラミンAのC2C12細胞への導入は、その局在、および細胞形態に明らかな変化を引き起こさなかった。現在ラミンAとBAFを一過性に発現させ、これらの細胞内局在を解析中である。また線維芽細胞でも同様の実験を行い、骨格筋由来のC2C12細胞のラミンA、BAFの細胞内局在を比較する予定である。

E. 結論

LMNA 変異の違いによるクロマチン結合タンパク質 BAF との親和性の違いを見いだした。この結果は変異の違いによる臨床病型の多様性を理解する上で、極めて重要な知見であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsuda C, Kameyama K, Suzuki A, Mishima W, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi YK: Affixin activates Rac1 via β PIX in C2C12 myoblast. FEBS Lett 582: 1189-1196, 2008

2. 学会発表 特になし

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名： 論文タイトル名. 発表誌名 巻号： ページ, 出版年
Ura S, <u>Hayashi YK</u> , Goto K, Atejada MN, Murakami T, Nagato M, Ohta S, Daimon Y, Takekawa H, Hirata K, Nonaka I, <u>Noguchi S</u> , <u>Nishino I</u> : Limb-Girdle Muscular Dystrophy Due to Emerin Gene Mutations. <i>Arch Neurol</i> 64: 1038-1041, 2007
Muchir A, Pavlidis P, Bonne G, <u>Hayashi YK</u> , Worman HJ: Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. <i>Hum. Mol. Genet</i> 16: 1884-1895, 2007
<u>Matsuda C</u> , Kameyama K, Suzuki A, Mishima W, Yamaji S, Okamoto H, <u>Nishino I</u> , <u>Hayashi YK</u> : Affixin activates Rac1 via β PIX in C2C12 myoblast. <i>FEBS Lett</i> 582: 1189-1196, 2008

IV. 研究成果の刊行物・別刷