

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 由起子

平成21(2009)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.	核膜病細胞の核変化とオートファジー 林 由起子 (国立精神・神経センター神経研究所)	5
2.	<i>LMNA</i> 変異による新規病態と新規疾病関連遺伝子の発見 西野 一三 (国立精神・神経センター神経研究所)	8
3.	抗リン酸化ラミン A/C 抗体の作製 野口 悟 (国立精神・神経センター神経研究所)	11
4.	ラミン A の変異による結合タンパク質 BAF に対する親和性の変化 松田 知栄 (独立行政法人 産業技術総合研究所)	13
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	16
IV.	研究成果の刊行物・別刷	17

I. 總括研究報告

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

研究代表者 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は核膜蛋白質ラミンA/C遺伝子(LMNA)変異による疾患である。今年度我々は、LMNA変異が乳児筋炎の原因となりうることを見いだすとともに、類縁疾患について新規疾患関連候補遺伝子を複数見いだすことに成功した。また、LGMD1Bの新規診断方法の開発としてリン酸化特異的ラミンA/C抗体を作製し、その有用性を示唆した。細胞生物学的には、BAFのLMNA変異による局在変化を示し、変異の違いによる臨床症状の多様性との関連を示唆した。さらにダメージを受けた核成分の処理機構として、オートファジーが関与していることを明らかにした。

研究分担者

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

B. 研究方法

LGMD1Bおよび類縁疾患患者について詳細な臨床病理学的解析を行うとともに、新規疾患関連遺伝子を含む幅広い変異スクリーニングを行った。また、ラミンA/Cのリン酸化特異抗体を作製し、新規診断システムの開発を目指した。抗BAF抗体も作製し、変異ラミンA存在下でのBAFの局在変化を細胞生物学的に検討した。さらに本疾患で特異的に認められる核近傍の空胞形成の機序を明らかにするために、電子顕微鏡観察とともに、モデルマウス培養細胞を用いた詳細な検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究において使用した全てのヒト検体から得られた情報は、いずれも疾患の確定診断のために病理学的、生化学的、免疫学的ならびに遺伝子レベルの解析が必要であり、かつ患者および家族もこれを希望し、患者および家族の了解を得た上で採取された組織（生検・剖検筋、皮膚、血球など）を用いて得られたものであり、かつ、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。遺伝子解析

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。本研究は、LGMD1B及びその関連疾患について、社会医学的、臨床病理学的、分子細胞生物学的にその病態を明らかにすることを目的とした。

に関しては「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」を遵守した上で、施行されたものである。これらの情報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。

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。

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・承認を得た。

C. 研究結果

LMNA の幅広い変異スクリーニングによって、乳児筋炎の一部が LMNA 変異によることを新たに発見するとともに、FHL1 ならびに複数の新規疾患関連候補遺伝子を見いだした。現在これらの変異についての機能解析を進めている。

また、LGMD1B の簡易診断方法の開発を目的として、抗リン酸化ラミン A/C 特異抗体を作製し、疾患筋における特異変化を解析中である。

一方、ラミン A/C およびクロマチン結合タンパク質 BAF に対する特異抗体を作製し、その局在が LMNA の変異の違いにより変化することを発見した。

さらに核膜病で共通に認められる核近傍の特異な空胞に注目し、その形成機構を明らかにした。すなわち脆弱な核膜によって細胞質内へ噴出した核成分が、オートファジーによって処理されうること、その際に巨大な空胞が形成されうることを明らかにした。これは特殊な自己貪食機構による核成分の分解現象を哺乳類細胞で初めて明らかにしたものである。

D. 考察

LMNA の変異が乳児筋炎の一原因であるこ

とが明らかになった点は、臨床経過の重篤性を考慮すると、厚生労働行政上、重要な結果である。LMNA 変異は様々な筋疾患を引き起こす可能性があり、常にその可能性を念頭に置く必要がある。抗リン酸化特異的ラミン A/C 抗体の作製は、多彩な臨床症状をとる LMNA 変異患者のスクリーニングに極めて有用なツールとなる可能性がある。また変異による関連タンパク質 BAF の局在の変化は、変異の違いによる臨床的多様性を示唆する結果である。一方、本研究で、特殊な自己貪食機構による核成分の分解現象を哺乳類細胞で初めて明らかにしたことは、特筆すべきである。

E. 結論

本研究成果によって、LGMD1B および類縁疾患の病因・病態の一部を明らかにすることができた。今回得られた結果を基に、さらなる病態の解明、そして治療法の開発へと研究を継続していきたいと考えている。

F. 健康危険情報

乳児筋炎患者では LMNA 変異スクリーニングを行う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

林由起子: 肢帯型筋ジストロフィーの心障害. 医学の歩み 226: 431-435, 2008

Astejada MN, Goto K, Nagano A, Ura S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: Emerinopathy and laminopathy clinical, pathological and molecular features of muscular dystrophy with nuclear envelopathy in Japan. *Acta Myol.* 26: 159-164, 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

Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Ogawa M,

Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Rigid spine syndrome caused by a novel mutation in four-and-a-half LIM domain 1 gene (FHL1). *Neuromuscul Disord*. 18: 959-961, 2008

Arimura T, Hayashi YK, Murakami T, Oya Y, Funabe S, Arikawa-Hirasawa E, Hattori N, Nishino I, Kimura A: Mutational Analysis of Fukutin Gene in Dilated Cardiomyopathy and Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ J*. 73: 158-161, 2009

Park YE, Hayashi YK, Goto K, Komaki H, Hayashi Y, Inuzuka T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy/limb-girdle muscular dystrophy 1B. *Neuromuscul Disord*. 19: 29-36, 2009

Shalaby S, Hayashi YK, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy. *Neurology*. 72: 375-376, 2009

Murakami T, Hayashi YK, Ogawa M, Noguchi S, Campbell KP, Togawa M, Inoue T, Oka A, Ohno K, Nonaka I, Nishino I: A novel POMT2 mutation causes mild congenital muscular dystrophy with normal brain MRI. *Brain Dev*. 18: [in press]

2. 学会発表

浦 茂久, 後藤加奈子, 林由起子, 西野一三: 高齢発症の limb girdle muscular dystrophy (LGMD) 2D 型. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 5.15, 2008

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) 患者の臨床データベースについて. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 5.15, 2008

林由起子, 後藤加奈子, 南 成祐, 埜中征哉, 西野一三: 本邦における肢帯型筋ジストロフィーの病型頻度とその特徴. 第 49 回

日本神経学会総会, 横浜, 5.17, 2008

小牧宏文, 林由起子, 加藤光広, 佐久間啓, 齊藤義郎, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 埜中征哉, 西野一三: 乳幼児筋炎は lamin A/C 遺伝子変異を伴った Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーを示唆する. 第 50 回日本小児神経学会総会, 東京, 5.29, 2008

Liang WC, Ohkuma A, Goto K, Hayashi YK, Jong YJ, Nishino I: Mutation analysis and response to riboflavin therapy in Taiwanese MADD patients. 第 50 回日本小児神経学会総会, 東京, 5.29, 2008

Hayashi YK, Park YE, Nonaka I, Nishino I: Muscular dystrophies associated with nuclear envelope proteins. 第 50 回日本小児神経学会総会, 東京, 5.30, 2008

Park YE, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Electron microscopic analysis of myonuclei in EDMD2/LGMD1B. 第 50 回日本小児神経学会総会, 東京, 5.30, 2008

Park YE, Hayashi YK, Goto K, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Nuclear changes in skeletal muscles of AD-EDMD/LGMD1B. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Liang WC, Ohkuma A, Hayashi YK, Lopez LC, Hirano M, Nonaka I, Noguchi S, Jong YJ, Nishino I: Novel ETFDH mutations and normal CoQ10 level in Taiwanese patients with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Hayashi YK, Goto K, Ohkuma A, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: D4Z4 repeat number and skeletal muscle changes in FSHD. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Matsuda C, Kameyama K, Nishino I, Hayashi YK: Altered interaction of mutant lamin A and barrier to autointegration factor (BAF). Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Shalaby S, Hayashi YK, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008

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

核膜病細胞の核変化とオートファジー

研究分担者 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 核膜タンパク質であるラミンA/Cの異常は、核膜の脆弱性に加え様々な核の形態異常を来す。我々は*Lmna* H222P変異導入マウスの培養線維芽細胞を用いて、核の形態変化を観察し、核近傍に存在する特異的空胞の形成機序についての検討を行った。その結果、マウス培養細胞でもLGMD1B患者骨格筋と同様に、著しい核の形態異常を認めた。また、脆弱な核膜が破綻することによって細胞質へ噴出した核成分が、オートファジーによって処理される、という新たな知見(nucleophagy)を見いだした。

A. 研究目的

LGMD1Bは、核膜の脆弱性が一主要病態と考えられる筋疾患である。本研究では、昨年、我々が報告した核の強い形態異常および核近傍の特異な空胞形成について、その具体的な機序を明らかにし、LGMD1Bの病態を明らかにすることを目的に研究を進めた。

B. 研究方法

ヒトLGMD1B患者で見いだされた*LMNA* H222P変異を導入した*Lmna* KIマウスの培養線維芽細胞を用いて、核の形態を電子顕微鏡下で詳細に観察した。また免疫細胞染色を用いて、核近傍に存在する特異な空胞の性状を検討した。さらに、GFP-LC3を発現するマウスと*Lmna* KIマウスを交配しGFP-LC3/*Lmna* KIマウスを作成し、その培養線維芽細胞を用いた検討も行った。

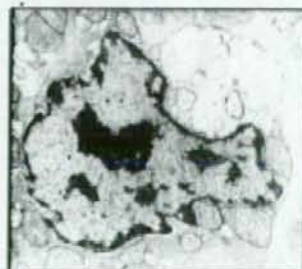
(倫理面への配慮)

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。

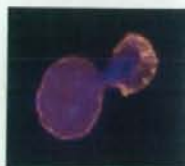
すべての組み換えDNA実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、国立精神・神経センター神経研究所組み換えDNA実験安全委員会の審査・承認を得た。

C. 研究結果

Lmna KIマウスから採取した培養線維芽細胞を電子顕微鏡下で観察を行った結果、LGMD1B患者骨格筋と同様に、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、核膜の肥厚・断裂といった様々な核の変化が認められた。また、核近傍には、核と同じ電子密度を有する構造や、種々の内容物を含む大小の空胞の集積が認められた。



空胞の形態から自己貪食空胞が示唆されたため、培養細胞を用いた免疫細胞染色を行い、オートファジーとの関連を検討した。その結果、核近傍の空胞は、各種オートファジーのマーカーで染色され、また自己貪食空胞の中にDAPI陽性の核成分が認められた。この空胞は大小様々であるが、時に核より大きいものも認められた。



D. 考察

ラミノパチーで認められる著しい核の形態変化は、Lmna KIマウス培養線維芽細胞でも確認され、核膜の脆弱性との関連が確認された。また、脆弱な核膜から細胞質へと噴出した核成分は、オートファジーによって処理される可能性があると考えられた。核膜病細胞で認められる核近傍の巨大空胞は、巨大自己貪食空胞であることが示唆された。

E. 結論

異常な核成分はオートファジーによって分解・処理される「nucleophagy」という現象を初めて明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

林由起子: 肢帯型筋ジストロフィーの心障害. 医学の歩み 226: 431-435, 2008

Astejada MN, Goto K, Nagano A, Ura S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: Emerinopathy and laminopathy clinical, pathological and molecular features of muscular dystrophy with nuclear

envelopathy in Japan. *Acta Myol.* 26: 159-164, 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

Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Rigid spine syndrome caused by a novel mutation in four-and-a-half LIM domain 1 gene (FHL1). *Neuromuscul Disord.* 18: 959-961, 2008

Arimura T, Hayashi YK, Murakami T, Oya Y, Funabe S, Arikawa-Hirasawa E, Hattori N, Nishino I, Kimura A: Mutational Analysis of Fukutin Gene in Dilated Cardiomyopathy and Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ J.* 73: 158-161, 2009

Park YE, Hayashi YK, Goto K, Komaki H, Hayashi Y, Inuzuka T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy/limb-girdle muscular dystrophy 1B. *Neuromuscul Disord.* 19: 29-36, 2009

Shalaby S, Hayashi YK, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy. *Neurology.* 72: 375-376, 2009

Murakami T, Hayashi YK, Ogawa M, Noguchi S, Campbell KP, Togawa M, Inoue T, Oka A, Ohno K, Nonaka I, Nishino I: A novel POMT2 mutation causes mild congenital muscular dystrophy with normal brain MRI. *Brain Dev.* 18: [in press]

2. 学会発表

浦 茂久, 後藤加奈子, 林由起子, 西野一三: 高齢発症の limb girdle muscular dystrophy (LGMD) 2D 型. 第 49 回日本神経学

会総会, 横浜, 5.15, 2008

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) 患者の臨床データベースについて. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 5.15, 2008

林由起子, 後藤加奈子, 南 成祐, 埜中征哉, 西野一三: 本邦における肢帯型筋ジストロフィーの病型頻度とその特徴. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 5.17, 2008

小牧宏文, 林由起子, 加藤光広, 佐久間啓, 斉藤義郎, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 埜中征哉, 西野一三: 乳幼児筋炎は lamin A/C 遺伝子変異を伴った Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーを示唆する. 第50回日本小児神経学会総会, 東京, 5.29, 2008

Liang WC, Ohkuma A, Goto K, Hayashi YK, Jong YJ, Nishino I: Mutation analysis and response to riboflavin therapy in Taiwanese MADD patients. 第50回日本小児神経学会総会, 東京, 5.29, 2008

Hayashi YK, Park YE, Nonaka I, Nishino I: Muscular dystrophies associated with nuclear envelope proteins. 第50回日本小児神経学会総会, 東京, 5.30, 2008

Park YE, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Electron microscopic analysis of myonuclei in EDMD2/LGMD1B. 第50回日本小児神経学会総会, 東京, 5.30, 2008

Park YE, Hayashi YK, Goto K, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Nuclear changes in skeletal muscles of AD-EDMD/LGMD1B. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Liang WC, Ohkuma A, Hayashi YK, Lopez LC, Hirano M, Nonaka I, Noguchi S, Jong YJ, Nishino I: Novel ETFDH mutations and normal CoQ10 level in Taiwanese patients with multiple acyl-CoA dehydrogenase

deficiency. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Hayashi YK, Goto K, Ohkuma A, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: D4Z4 repeat number and skeletal muscle changes in FSHD. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Matsuda C, Kameyama K, Nishino I, Hayashi YK: Altered interaction of mutant lamin A and barrier to autointegration factor (BAF). Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Shalaby S, Hayashi YK, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008

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

LMNA 変異による新規病態と新規疾患関連遺伝子の発見

研究分担者 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 LGMD1Bの原因遺伝子LMNAは、様々な疾患の原因となりうることが明らかとなっている。我々はLMNAの変異が乳児筋炎をひき起こしていることを新たに見いだした。また、LMNA変異のないLGMD1B類縁疾患患者にFHL1および新規疾患関連遺伝子の変異を見いだした。

A. 研究目的

我々はLGMD1Bの変異スクリーニングの過程で、乳児期に筋炎と診断され、その後LGMD1Bであることが明らかになった症例を経験した。そこで乳児筋炎とLMNA変異の関連を明らかにすることを目的とした。また臨床的にLGMD1Bが疑われたにもかかわらず、LMNAのスクリーニングで変異の認められない症例を多数見いだしたことから、他の疾患関連遺伝子の探索を進めた。

B. 研究方法

NCNP骨格筋レポジトリーで乳児筋炎と診断された症例についてLMNA変異スクリーニングを行った。また、LGMD1Bが疑われLMNAに変異が認められなかった例について、FHL1や他の疾患との関連が示唆される遺伝子、複数について変異スクリーニングを行った。

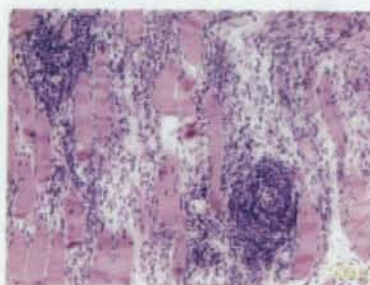
(倫理面への配慮)

本研究において使用した全てのヒト検体から得られた情報は、いずれも疾患の確定診断のために病理学的、生化学的、免疫学的ならびに遺伝子レベルの解析が必要であり、かつ患者および家族もこれを希望し、患者および家族の了解を得た上で採取された組織（生検・剖検筋、皮膚、血球など）を用いて得られたものであり、かつ、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。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」を遵守した上で、施行されたものである。これらの情報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。

C. 研究結果

乳児筋炎と診断されている症例のうち、4才以下の例でLMNA変異を複数見いだした。筋病理学的には細胞浸潤が著しく、いわゆる「筋炎」との鑑別は病理所見からは困難であった（図）。現在、頻度や詳細な臨床病理学的特徴についての解析を進めている。



一方、類縁疾患の原因遺伝子としてFHL1および2つの新規原因遺伝子候補を見いだした。現在、臨床症状との関連について、詳細な検討を進めている。

D. 考察

LGMD1Bの原因遺伝子は様々な臨床症状を呈することが知られているが、筋疾患の中でもLGMD1B、EDMDの他乳児筋炎の原因となりうることが示唆された。また、新たな疾患関連遺伝子の候補を複数同定することができた。

E. 結論

LMNA 変異は乳児筋炎の原因となりうる。また、類縁疾患の原因遺伝子はまた複数ある可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

乳児の筋炎患者では、LMNA 変異解析を行う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Arimura T, Hayashi YK, Murakami T, Oya Y, Funabe S, Arikawa-Hirasawa E, Hattori N, Nishino I, Kimura A: Mutational Analysis of Fukutin Gene in Dilated Cardiomyopathy and Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ J*. 73: 158-161, 2009

Park YE, Hayashi YK, Goto K, Komaki H, Hayashi Y, Inuzuka T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy/limb-girdle muscular dystrophy 1B. *Neuromuscul Disord*. 19: 29-36, 2009

Shalaby S, Hayashi YK, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy. *Neurology*. 72: 375-376, 2009

Murakami T, Hayashi YK, Ogawa M, Noguchi S, Campbell KP, Togawa M, Inoue T, Oka A, Ohno K, Nonaka I, Nishino I: A novel POMT2 mutation causes mild congenital muscular dystrophy with normal brain MRI. *Brain*

Dev. 18: [in press]

Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Rigid spine syndrome caused by a novel mutation in four-and-a-half LIM domain 1 gene (FHL1). *Neuromuscul Disord*. 18: 959-961, 2008

2. 学会発表

浦 茂久, 後藤加奈子, 林由起子, 西野一三: 高齢発症の limb girdle muscular dystrophy (LGMD) 2D型. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 5.15, 2008

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) 患者の臨床データベースについて. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 5.15, 2008

林由起子, 後藤加奈子, 南 成祐, 桒中征哉, 西野一三: 本邦における肢帯型筋ジストロフィーの病型頻度とその特徴. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 5.17, 2008

小牧宏文, 林由起子, 加藤光広, 佐久間啓, 斉藤義郎, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 桒中征哉, 西野一三: 乳幼児筋炎は lamin A/C 遺伝子変異を伴った Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーを示唆する. 第50回日本小児神経学会総会, 東京, 5.29, 2008

Liang WC, Ohkuma A, Goto K, Hayashi YK, Jong YJ, Nishino I: Mutation analysis and response to riboflavin therapy in Taiwanese MADD patients. 第50回日本小児神経学会総会, 東京, 5.29, 2008

Hayashi YK, Park YE, Nonaka I, Nishino I: Muscular dystrophies associated with nuclear envelope proteins. 第50回日本小児神経学会総会, 東京, 5.30, 2008

Park YE, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Electron microscopic analysis of myo-nuclei in EDMD2/LGMD1B. 第50回日本小児

神経学会総会, 東京, 5.30, 2008

Park YE, Hayashi YK, Goto K, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Nuclear changes in skeletal muscles of AD-EDMD/LGMD1B. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Liang WC, Ohkuma A, Hayashi YK, Lopez LC, Hirano M, Nonaka I, Noguchi S, Jong YJ, Nishino I: Novel ETFDH mutations and normal CoQ10 level in Taiwanese patients with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Hayashi YK, Goto K, Ohkuma A, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: D4Z4 repeat number and skeletal muscle changes in FSHD. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Matsuda C, Kameyama K, Nishino I, Hayashi YK: Altered interaction of mutant lamin A and barrier to autointegration factor (BAF). Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Shalaby S, Hayashi YK, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008

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

抗リン酸化ラミン A/C 抗体の作製

研究分担者 野口 悟 国立精神・神経センター神経研究所室長

研究要旨 *LMNA*変異によるLGMD1Bは重篤な心合併症を来すことから、早期に確定診断することが重要である。我々は簡便なLGMD1Bのスクリーニング法を開発することを目的に、リン酸化ラミンA/Cを特異的に認識する抗体を作製した。その結果、患者骨格筋でのみ免疫反応の認められる抗体を得ることができた。現在、診断への有用性について検討を進めている。

A. 研究目的

*LMNA*変異によるLGMD1Bは重篤な心合併症を来すことから、早期に確定診断することが重要である。しかしながら、優性遺伝形式をとるLGMD1Bの診断は、現在、遺伝子変異解析しか方法がない。さらに*LMNA*変異は様々な臨床病型を示すことも明らかとなっており、その上からも簡便なスクリーニング法の開発が急務である。本研究では、LGMD1Bの診断に使用できる抗体の作製を目的とした。

B. 研究方法

ラミンA/Cタンパク質には30カ所以上のリン酸化可能部位が報告されている。我々はLGMD1B患者筋で、ラミンA/Cのリン酸化修飾に変化が生じている可能性があると考えた。そこでラミンA/Cのリン酸化を特異的に認識するポリクローナル抗体4種類を作製し、正常筋と患者筋で染色性に差のあるものを探索した。

（倫理面への配慮）

本研究において使用した全てのヒト検体から得られた情報は、いずれも疾患の確定診断のために病理学的、生化学的、免疫学的ならびに遺伝子レベルの解析が必要であり、かつ患者および家族もこれを希望し、患者および家族の了解を得た上で採取され

た組織（生検・剖検筋、皮膚、血球など）を用いて得られたものであり、かつ、国立精神・神経センター倫理委員会にて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。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」を遵守した上で、施行されたものである。これらの情報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。

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

作製した4種類の抗リン酸化ラミンA/C抗体のうち、一つの抗体が*LMNA* R453W変異を有するLGMD1B患者骨格筋の細胞核のみを染色することを見いだした。現在、異なった遺伝子変異を有する患者筋を用いて、*LMNA*変異と染色性の関連を検討中である。今後診断への有用性を確認していく。また、このリン酸化修飾の細胞生物学的意義についても解析を進めていく予定である。

D. 考察

患者骨格筋では変異ラミンA/Cの存在によって、そのリン酸化に変化が生じている可能性が示唆された。抗リン酸化ラミンA/C抗体はLGMD1Bの早期診断に有用である可能性がある。

E. 結論

LGMD1Bの新たなスクリーニング法として、抗リン酸化ラミンA/C抗体を用いた方法が選択可能となるかもしれない。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Astejada MN, Goto K, Nagano A, Ura S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: Emerinopathy and laminopathy clinical, pathological and molecular features of muscular dystrophy with nuclear envelopathy in Japan. *Acta Myol.* 26: 159-164, 2007

Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Rigid spine syndrome caused by a novel mutation in four-and-a-half LIM domain 1 gene (FHL1). *Neuromuscul Disord.* 18: 959-961, 2008

Park YE, Hayashi YK, Goto K, Komaki H, Hayashi Y, Inuzuka T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy/limb-girdle muscular dystrophy 1B. *Neuromuscul Disord.* 19: 29-36, 2009

Shalaby S, Hayashi YK, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy. *Neurology.* 72: 375-376, 2009

Murakami T, Hayashi YK, Ogawa M, Noguchi S, Campbell KP, Togawa M, Inoue T, Oka A, Ohno K, Nonaka I, Nishino I: A novel POMT2 mutation causes mild congenital muscular dystrophy with normal brain MRI. *Brain Dev.* 18: [in press]

2. 学会発表

Park YE, Hayashi YK, Goto K, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Nuclear changes in skeletal muscles of AD-EDMD/LGMD1B. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Liang WC, Ohkuma A, Hayashi YK, Lopez LC, Hirano M, Nonaka I, Noguchi S, Jong YJ, Nishino I: Novel ETFDH mutations and normal CoQ10 level in Taiwanese patients with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Hayashi YK, Goto K, Ohkuma A, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: D4Z4 repeat number and skeletal muscle changes in FSHD. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008

Shalaby S, Hayashi YK, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008

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

ラミンAの変異による結合タンパク質 BAF に対する親和性の変化

研究分担者 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 野生型および変異ラミンAを細胞に発現させ、ラミンA結合タンパク質であるBAFの細胞内局在に及ぼす影響を免疫染色法にて検討し、BAFの核膜病の分子病態への関与を検討した。その結果、野生型ラミンAとBAFは核に濃縮され共局在していたが、変異ラミンAとBAFは核の周囲において部分的に共局在することが明らかになった。またラミンAの変異によりBAFとラミンAの共局在の程度には差が認められた。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報告した。昨年度はラミンAの変異によりBAFに対する親和性が変化することを見出した。そこでヒトBAFに対する抗体を作製し、変異型ラミンAを発現させた筋芽細胞の分子病理を調べた。

B. 研究方法

ヒトBAFのアミノ酸4-20を抗原とし、ウサギを用いてポリクローナル抗体を作製した。

ラミンAコンストラクトは野生型、LGMD1B患者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。変異型ラミンAコンストラクトをC2C12細胞(マウス筋芽細胞)に導入し、抗FLAG抗体、抗BAF抗体を用いて免疫染色を行った。試料の観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

すべての組み換えDNA実験は、カルタヘナ鑑定書に基づく「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

まず外来性ラミンAを導入していないC2C12細胞の内在性BAFの細胞内局在を調べるために、抗

BAF抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、C2C12細胞においてBAFの細胞内局在は細胞周期依存的に変化していることが明らかになった(図1)。



図1 C2C12細胞の抗BAF抗体による免疫染色

BAFはG₁期では主に核に、S/G₂期には主に細胞質に局在していた。

次に変異型ラミンAを導入したC2C12細胞における外来性のラミンA、内在性のBAFの細胞内局在を調べた。

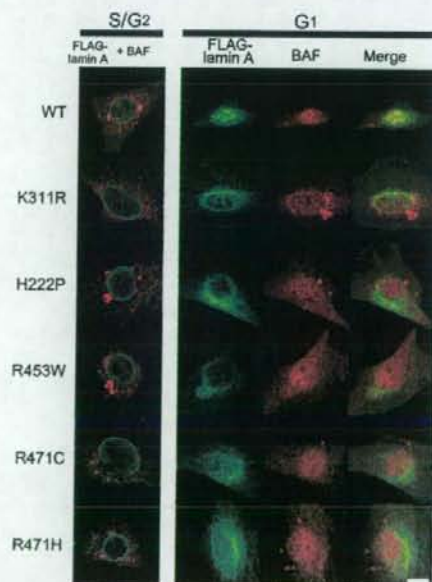


図2 変異型ラミンAを導入したC2C12細胞の抗FLAG抗体、抗BAF抗体による免疫染色

S/G₂期において野生型、いずれの変異型ラミンAも核膜に局在しており、主に細胞質に局在しているBAFとの共局在は観察されなかった。

G₁期では野生型ラミンAは核に濃縮されており、BAFとの共局在が確認された。一方、G₁期における変異型ラミンAは核に濃縮されず、核周囲において網目状に分布しており、部分的にBAFと共局在が認められた。また変異型ラミンAを発現させたC2C12細胞では、BAFの凝集が細胞質において認められた。

次にラミンA結合タンパク質であるエメリンの細胞内局在が変異型ラミンAの発現により影響を受ける可能性について免疫染色により検討した。

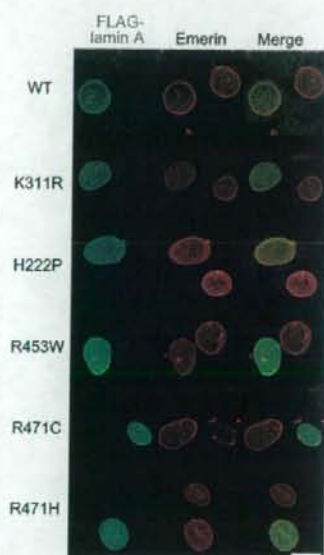


図3 変異型ラミンAを導入したC2C12細胞の抗FLAG抗体、抗エメリン抗体による免疫染色

野生型ラミンAは核膜においてエメリンと共局在しており、K311R、H222P、R453W、R471Hをそれぞれ導入した細胞においても同様であった。これに対しR471Cを導入した細胞ではBAFが部分的に核膜から欠落していた。

D. 考察

昨年度我々はCOS-7細胞に共発現した野生型ラミンAとBAFの相互作用を免疫沈降法により明らかにした。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。

本年度は変異型ラミンAを導入したC2C12細胞の分子病態を免疫染色で調べた。野生型、いずれの変異型ラミンAを導入した細胞においてBAFの細胞内局在は細胞周期により変化しており、BAFの新たな

生物学的機能が示唆される。G₁期において野生型ラミンAとBAFは核に共局在している。一方、変異型ラミンAとBAFは核の周囲で部分的に共局在しており、その程度はラミンAの変異により多様であった。この結果は昨年度の免疫沈降の結果と矛盾せず、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。

またLGMD1Bを引き起こすR471C変異型ラミンAを導入した細胞では、ラミンA結合タンパク質であるエメリンが核膜から部分的に欠落していた。一方、早老症を引き起こすR471H変異型ラミンAを導入した細胞ではエメリンの細胞内局在に異常は認められなかった。これらの知見はR471変異による臨床病態の多様性を説明する一端になるであろう。

E. 結論

マウス筋芽細胞 C2C12 において内在性の BAF の細胞内局在は細胞周期により制御されている可能性があり、BAF の新たな生物学的機能を示唆する。野生型ラミン A は核においてクロマチン結合タンパク質 BAF、エメリンと共局在する。LMNA 変異は BAF、エメリンの細胞内局在に影響を及ぼし、その結果ラミン A との共局在は部分的になる。またラミン A と BAF、エメリンの共局在の程度はラミン A の変異により異なっていた。この結果は変異の違いによる臨床病態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

Matsuda C, Kameyama K, Nishino I, Hayashi YK: Altered interaction of mutant lamin A and barrier to autointegration factor (BAF). Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9. 30, 2008

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