

2009J5060A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの
病因・病態の解明と治療法の開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 由起子

平成 22 (2010) 年 3 月

目次

I.	総括研究報告	
	サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの 病因・病態の解明と治療法の開発.....	1
	林 由起子 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
II.	分担研究報告	
1.	サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィー患者の 遺伝子変異スクリーニングに関する研究.....	7
	林 由起子 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
2.	サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの 筋病理学的解析に関する研究.....	11
	西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
3.	サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーで 見出された変異遺伝子の機能解析法の確立に関する研究.....	16
	野口 悟 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
4.	サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの 細胞生物学的解析に関する研究.....	19
	松田 知栄 (独立行政法人 産業技術総合研究所)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表.....	21
IV.	研究成果の刊行物・別刷.....	22

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの病因・病態の解明と治療法の開発

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 サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーについて、本邦における本疾患の臨床病理学的特徴をあきらかにする目的で、既知の遺伝子変異スクリーニングを行った。また、疾患モデルメダカの解析も開始した。実験動物を用いて、見いだした変異の病態への関与を検証する方法の確立を目指し、エレクトロポレーション法の有用性を示した。

研究分担者

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

A. 研究目的

サルコメアは横紋筋の基本収縮構造単位である。近年、サルコメアの配列の乱れを主病変とし、細胞内異常タンパク質の蓄積を伴う筋疾患として筋原線維性ミオパチー (myofibrillar myopathy: MFM) が注目を集めている。MFM の発症年齢や臨床症状はき

わめて多彩で、肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) や遠位型ミオパチーなどと診断されることが多い。しばしば嚥下、呼吸、心、末梢神経障害も合併する。本研究では、MFM の病因・病態解明を進めることを目的に研究を進めた。

B. 研究方法

国立精神・神経センターの保管する骨格筋レポジトリーを活用し、サルコメア配列の異常を主病理変化とする本邦 88 家系を抽出し、MFM の既知原因遺伝子 *DES*、*CRYAB*、*MYOT*、*ZASP*、*FLNC*、*BAG3*、*FHL1* の変異スクリーニングを行った。変異の見いだされた症例については詳細な臨床病理学的解析を行った。また、モデル動物を用いた効果的な変異遺伝子の機能解析法の確立を目指し、マウスを用いたエレクトロポレーション法を用いた方法の確立を図った。一方、メダカは、骨格筋病理の解析方法や筋病理所見

などの基礎データがないことから、正常メダカを用いて実験条件を検討するとともに、MFMの一関連遺伝子に変異を有するメダカの発生・発育、病理解析も開始した。

(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。

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

サルコメア配列の異常を主病理変化とする日本人患者88家系について、既知の7遺伝子の変異スクリーニングを継続中である。これまでに、新規*MYOT*変異による日本人初のLGMD1A家系を見いだし報告した(JNEN, 2009)。また4例の*ZASP*変異例を見いだし臨床筋病理学的多様性を明らかにした(論文投稿準備中)。一方、*FHL1*変異がMFMと極めてよく似た筋病理像をとりうること(論文投稿準備中)や臨床的に顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーと鑑別困難な症状を取り得ること(論文投稿準備中)などを明らかにした。

一方モデル動物を用いた病態機序の解明では、エレクトロポレーション法を用いて野生型及び変異型タンパク質をマウス骨格筋に導入・解析する基礎実験を行い、ヒト骨格筋で認められるものと同様の筋病理変化を再現できることを見いだしている。また、メダカを用いて筋原線維構造を観察する実験系を確立すべく検討中であると同時に、MFM原因遺伝子の1つに変異のあるメダカについて、筋病理学的解析を行っている。

D. 考察

これまでのヒト MFM 患者変異スクリーニングの結果では、各遺伝子変異の頻度はこれまで報告されている米国のそれとは頻度が異なる可能性がある。今後、スクリーニングを進め、本邦における変異頻度を明らかにしていく。

エレクトロポレーション法を用いた変異遺伝子導入法は MFM の病因のスクリーニングのみならず、発症機序の解明にも非常に有用な手段であることが示唆された。

E. 結論

MFMは近年増加傾向にある疾患であり、発症年齢や臨床症状も多彩であることから、本邦における本疾患の特徴を明らかにすることは重要である。モデル動物を利用し、今後もMFMの病態を明らかにすべく、研究を進めてく。

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。別冊・医学のあゆみ ミオパチー—臨床と治療研究の最前線（編集：埜中征哉），医歯薬出版株式会社，東京，pp99-103，2009

林由起子：肢帯型筋ジストロフィーの筋病理。神経内科 特集 筋病理—最近の進歩— 71: 345-353, 2009

西野一三：筋病理。小児筋疾患診療ハンドブック（監修：埜中征哉 編集：小牧宏文）診断と治療社，東京，pp18-22，2009

川井 充，徳富智明，圓谷理恵，西野一三：IBM(inclusion body myositis)は筋炎であるか否か。Clinical Neuroscience. 28: 228-229, 2010

Shalaby S, Mitsunashi H, Matsuda C, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: Defective Myotilin Homodimerization Caused by a Novel Mutation in MYOT Exon 9 in the First Japanese Limb Girdle Muscular Dystrophy 1A Patient. J Neuropathol Exp Neurol. 68: 701-707, 2009

Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. Autophagy. 5: 795-804, 2009

Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsunashi S, Park YE, Nonaka I, Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Sugano H, Nishino I: Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. J Clin Invest. 119: 2623-2633, 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.* 31: 465-468, 2009

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology. *Acta Neuropathol.* 119: 481-486, 2010

2. 学会発表

林由起子, 三橋里美, 朴 英恩, 埜中征哉, 西野一三: 二次性カベオリン欠損症の新規原因遺伝子同定とその臨床病態についての検討. 第50回日本神経学会総会, 仙台, 5. 21, 2009

三橋里美, Shalaby S, 後藤加奈子, 埜中征哉, 野口 悟, 林由起子, 西野一三: 本邦 zaspopathy 症例における臨床筋病理学的検討. 第50回日本神経学会総会, 仙台, 5. 21, 2009

林由起子, 菅野 尚, 萩野谷和裕, 福興なおみ, 埜中征哉, 西野一三: 二次性カベオリン欠損症の新規原因遺伝子同定とその臨床病態についての検討. 日本人類遺伝学会

第54回大会, 港区, 9. 26, 2009

三橋弘明, Shalaby S, 松田知栄, 南 成祐, 野口 悟, 埜中征哉, 林由起子, 西野一三: 肢帯型筋ジストロフィー1A型患者に見出された myotilin のホモダイマー形成異常. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 10. 24, 2009

富永佳代, 西野一三, 埜中征哉: 出生時より呼吸不全と著明な低緊張を認める2歳男児. 第69回 Neuro Muscular Conference (NMC), 東京, 12.19, 2009

Nishino I: Approach to Congenital Myopathies. 8th Asian and Oceanian Myology Centre (AOMC) Scientific Meeting, Mumbai, India, 5.24, 2009

Hayashi YK: Identification of a novel gene for muscular dystrophy with secondary caveolin deficiency. The 8th French-Japanese Workshop for Muscular Dystrophy, Paris, 7.3, 2009

Hayashi YK, Goto K, Noguchi S, Nishino I: Screening the FHL1 mutation in Japanese patients with non-4q35 FSHD. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.10, 2009

Matsuda C, Kameyama K, Nishino I, Hayashi YK: The association of dysferlin

and affixin is regulated by calcium concentration. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.10, 2009

Shalaby S, Hayashi YK, Mitsuhashi H, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: New variant of myofibrillar myopathy with CNS involvement. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

Arai A, Nonaka I, Saito Y, Komaki F, Sakuma H, Sugai K, Sasaki M, Robertson SP, Nishimura G, Nishino I: Actin myopathy with myofibrillar dysgenesis and abnormal ossification. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy in patients diagnosed as congenital fiber type disproportion. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic degradation of nuclear

component in nuclear envelopathy. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

Hayashi YK, Park YE, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. The 5th International Symposium on Autophagy: Molecular Mechanism, Cellular and Physiological Functions and Diseases, Ots, 9.28, 2009

Nishino I: Congenital muscular dystrophies. 19th World Congress of Neurology, Education Program: Neuromuscular Disorders, Bangkok, Thailand, 10.25, 2009

Nishino I: Muscle pathology. 19th World Congress of Neurology, Workshop: Diagnostic Approaches in Neuromuscular Diseases, Bangkok, Thailand, 10.25, 2009

Nishino I: Myopathy: update in diagnosis and treatment. 19th World Congress of Neurology, Symposium: Child Neurology 1, Bangkok, Thailand, 10.27, 2009

Hayashi YK: A Novel Muscular Dystrophy Associated with Secondary Deficiency of Caveolin. The 9th Annual

Asian and Oceanian Myology Center
(AOMC) Scientific Meeting, Seoul, Korea,
3.25, 2010

Hayashi YK: A Novel Muscular
Dystrophy Associated with Secondary
Deficiency of Caveolin. 14th
International Congress of Endocrinology
Official Satellite Symposium, Kyoto,
Japan, 3.30, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィー患者の遺伝子変異スクリーニング
に関する研究

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 筋病理学的にサルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィー88 家系について、既知の7 疾患関連遺伝子 (*DES*、*CRYAB*、*MYOT*、*ZASP*、*FLNC*、*BAG3*、*FHL1*) の変異スクリーニングを行った。現在その 60%の変異解析が終了し、変異の認められた患者についての臨床・病理学的情報を収集している。

A. 研究目的

サルコメアの配列の乱れを主病変とし、細胞内異常タンパク質の蓄積を伴う筋ジストロフィー (myofibrillar myopathy: MFM) 88 例について、既知の疾患関連遺伝子の変異スクリーニングを行い、本邦における分子遺伝学的特徴を明らかにする。

B. 研究方法

MFM の既知原因遺伝子 *DES*、*CRYAB*、*MYOT*、*ZASP*、*FLNC*、*BAG3*、*FHL1* について、末梢血あるいは骨格筋ガラ抽出したゲノム DNA を用いた変異スクリーニングを行った。各遺伝子の全コーディングエクソンならびにエクソン-イントロン境界領域について直接シーケンス法を用いて変異解析を行った。未知の変異が見いだされた症例については、正常コントロール 50 人の DNA を用いたコントロール実験を行った。

(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

今年度は、既知疾患関連遺伝子の変異解析の約60%を終了し、複数の変異を見いだ

している。このうち、これまでに報告のないMYOT Ex9に新たな変異を見だし、日本人初のLGMD1A家系として報告した (JNEN, 2009)。また4例のZASPE既知変異例を見だし、臨床筋病理学的多様性を明らかにした (論文投稿準備中)。一方、FHL1に変異を有する患者の筋病理所見がMFМと極めてよく似ていることを見だし、論文投稿準備中であるとともに、臨床的に顔面肩甲骨型筋ジストロフィーと鑑別困難な症状を取る患者にFHL1変異例が存在することを明らかにし、論文投稿準備中である。

D. 考察

我々のMFМ患者変異スクリーニングの結果では、各遺伝子変異の頻度はこれまで報告されている米国のそれとは異なる印象である。今後、スクリーニングを進め、本邦における各遺伝子の変異頻度、およびその臨床病理学的特徴を明らかにしていく。

E. 結論

MFМは近年増加傾向にある疾患であり、発症年齢や臨床症状も多彩であることから、本邦における本疾患の特徴を明らかにすることは重要である。

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。別冊・医学のあゆみ ミオパチー—臨床と治療研究の最前線 (編集：埜中征哉), 医歯薬出版株式会社, 東京, pp99-103, 2009

林由起子：肢帯型筋ジストロフィーの筋病理。神経内科 特集 筋病理—最近の進歩 — 71: 345-353, 2009

Shalaby S, Mitsuhashi H, Matsuda C, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: Defective Myotilin Homodimerization Caused by a Novel Mutation in MYOT Exon 9 in the First Japanese Limb Girdle Muscular Dystrophy 1A Patient. J Neuropathol Exp Neurol. 68: 701-707, 2009

Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. Autophagy. 5: 795-804, 2009

Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, Park YE, Nonaka I, Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Sugano H, Nishino I: Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. J Clin Invest. 119: 2623-2633, 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.* 31: 465-468, 2009

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology. *Acta Neuropathol.* 119: 481-486, 2010

2. 学会発表

林由起子, 三橋里美, 朴 英恩, 埜中征哉, 西野一三: 二次性カベオリン欠損症の新規原因遺伝子同定とその臨床病態についての検討. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5. 21, 2009

三橋里美, Shalaby S, 後藤加奈子, 埜中征哉, 野口 悟, 林由起子, 西野一三: 本邦 zaspopathy 症例における臨床筋病理学的検討. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5. 21, 2009

林由起子, 菅野 尚, 萩野谷和裕, 福興なおみ, 埜中征哉, 西野一三: 二次性カベオリン欠損症の新規原因遺伝子同定とその臨床病態についての検討. 日本人類遺伝学会 第 54 回大会, 港区, 9. 26, 2009

三橋弘明, Shalaby S, 松田知栄, 南 成祐, 野口 悟, 埜中征哉, 林由起子, 西野一三: 肢帯型筋ジストロフィー1A型患者に見出された myotilin のホモダイマー形成異常. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 10. 24, 2009

Hayashi YK: Identification of a novel gene for muscular dystrophy with secondary caveolin deficiency. The 8th French-Japanese Workshop for Muscular Dystrophy, Paris, 7.3, 2009

Hayashi YK, Goto K, Noguchi S, Nishino I: Screening the FHL1 mutation in Japanese patients with non-4q35 FSHD. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.10, 2009

Shalaby S, Hayashi YK, Mitsuhashi H, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: New variant of myofibrillar myopathy with CNS involvement. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy in patients diagnosed as congenital fiber type disproportion. 14th International Congress of the World Muscle Society

(WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I:
Autophagic degradation of nuclear component in nuclear envelopathy. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

Hayashi YK, Park YE, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I:
Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. The 5th International Symposium on Autophagy: Molecular Mechanism, Cellular and Physiological Functions and Diseases, Ots, 9.28, 2009

Hayashi YK: A Novel Muscular Dystrophy Associated with Secondary Deficiency of Caveolin. The 9th Annual Asian and Oceanian Myology Center (AOMC) Scientific Meeting, Seoul, Korea, 3.25, 2010

Hayashi YK: A Novel Muscular Dystrophy Associated with Secondary Deficiency of Caveolin. 14th International Congress of Endocrinology Official Satellite Symposium, Kyoto, Japan, 3.30, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの筋病理学的解析に関する研究

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 サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーについて、本邦における本疾患の臨床病理学的特徴をあきらかにする目的で、国立精神・神経センターヒト骨格筋レポジトリの中から、本疾患の病理学的特徴を有する 88 家系を抽出し、筋病理学的解析を行った。

A. 研究目的

筋原線維性ミオパチー患者の筋病理学的特徴を明らかにする。また、正常メダカ骨格筋の組織学的解析方法の確立ならびに基礎データの集積を行う。

B. 研究方法

国立精神・神経センターで保管されている 1 万検体以上の、ヒト骨格筋レポジトリから、筋原線維性ミオパチーの可能性のあるものを抽出し、一般組織化学法、免疫組織化学法、イムノブロット法を用いて組織学的解析を行った。

また、メダカの骨格筋について組織学的解析を行い、基礎データの集積を行った。

（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。

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

サルコメア配列の異常を主病理変化とする日本人患者88家系を抽出し、一般組織染色をおこない、その結果を集積している。新たに変異を見いだした骨格筋組織については、免疫組織化学法を用いて、蓄積タンパク質の解析を行った。

その結果MYOT変異LGMD1Aでは、ミオティリンの他、デスミン、 α Bクリスタリン、ZASPなど他のMFMD関連分子の凝集を認めた。また、ZASP変異例では小さい縁取り空胞が集積する特徴的な筋病理所見を呈することを明らかにした。

一方、メダカ骨格筋で使用できる一般下顎染色法や免疫染色に使用できる抗体の検討を進めている。メダカ骨格筋はヒトと異なり、速筋と遅筋の分布に特徴があり、またヒトで用いている組織染色の中でも情報のえられないものが存在することが明らかになった。

D. 考察

MFMD患者骨格筋では、変異遺伝子の違いにより特徴的な筋病理所見を呈する可能性がある。今後、遺伝子解析の結果をもとに、

変異遺伝子による筋病理学的特徴を明らかにしていく必要がある。

E. 結論

MFMD患者骨格筋の変異遺伝子の違いによる筋病理学的特徴の一端を明らかにした。またメダカ骨格筋の組織学的解析に必要な基礎データを集積した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

西野一三: 筋病理. 小児筋疾患診療ハンドブック (監修: 埜中征哉 編集: 小牧宏文) 診断と治療社, 東京, pp18-22, 2009

川井 充, 徳富智明, 圓谷理恵, 西野一三: IBM(inclusion body myositis)は筋炎であるか否か. Clinical Neuroscience. 28: 228-229, 2010

Shalaby S, Mitsuhashi H, Matsuda C, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: Defective Myotilin Homodimerization Caused by a Novel Mutation in MYOT Exon 9 in the First Japanese Limb Girdle Muscular Dystrophy 1A Patient. J Neuropathol Exp Neurol. 68: 701-707, 2009

Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura

T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy*. 5: 795-804, 2009

Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, Park YE, Nonaka I, Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Sugano H, Nishino I: Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest*. 119: 2623-2633, 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*. 31: 465-468, 2009

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology. *Acta Neuropathol*. 119: 481-486, 2010

2. 学会発表

三橋里美, Shalaby S, 後藤加奈子、埜中征哉, 野口 悟, 林由起子, 西野一三: 本邦

zaspopathy 症例における臨床筋病理学的検討. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5. 21, 2009

林由起子, 菅野 尚, 萩野谷和裕, 福興なおみ, 埜中征哉, 西野一三: 二次性カベオリン欠損症の新規原因遺伝子同定とその臨床病態についての検討. 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 港区, 9. 26, 2009

三橋弘明, Shalaby S, 松田知栄, 南 成祐, 野口 悟, 埜中征哉, 林由起子, 西野一三: 肢帯型筋ジストロフィー1A型患者に見出された myotilin のホモダイマー形成異常. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 10. 24, 2009

富永佳代, 西野一三, 埜中征哉: 出生時より呼吸不全と著明な低緊張を認める 2 歳男児. 第 69 回 Neuro Muscular Conference (NMC), 東京, 12. 19, 2009

Nishino I: Approach to Congenital Myopathies. 8th Asian and Oceanian Myology Centre (AOMC) Scientific Meeting, Mumbai, India, 5.24, 2009

Hayashi YK, Goto K, Noguchi S, Nishino I: Screening the FHL1 mutation in Japanese patients with non-4q35 FSHD. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.10, 2009

Matsuda C, Kameyama K, Nishino I, Hayashi YK: The association of dysferlin and affixin is regulated by calcium concentration. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.10, 2009

Shalaby S, Hayashi YK, Mitsuhashi H, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: New variant of myofibrillar myopathy with CNS involvement. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy in patients diagnosed as congenital fiber type disproportion. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic degradation of nuclear component in nuclear envelopathy. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

Arai A, Nonaka I, Saito Y, Komaki F, Sakuma H, Sugai K, Sasaki M, Robertson

SP, Nishimura G, Nishino I: Actin myopathy with myofibrillar dysgenesis and abnormal ossification. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009

Hayashi YK, Park YE, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. The 5th International Symposium on Autophagy: Molecular Mechanism, Cellular and Physiological Functions and Diseases, Ots, 9.28, 2009

Nishino I: Congenital muscular dystrophies. 19th World Congress of Neurology, Education Program: Neuromuscular Disorders, Bangkok, Thailand, 10.25, 2009

Nishino I: Muscle pathology. 19th World Congress of Neurology, Workshop: Diagnostic Approaches in Neuromuscular Diseases, Bangkok, Thailand, 10.25, 2009

Nishino I: Myopathy: update in diagnosis and treatment. 19th World Congress of Neurology, Symposium: Child Neurology 1, Bangkok, Thailand, 10.27, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーで見いだされた
変異遺伝子の機能解析法の確立に関する研究

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 サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィー患者で見いだされた遺伝子変異と病態との関連を検証する方法として、マウスを用い *in vivo* エレクトロポレーション法の有用性を示した。

A. 研究目的

本研究では、モデル動物を用いた効果的な変異遺伝子の機能解析法の確立を目指し、エレクトロポレーション法の有用性を検討した。

B. 研究方法

マウス前頸骨筋に野生型および変異型遺伝子をエレクトロポレーション法を用いて導入し、適宜筋病理変化を観察した。

(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

エレクトロポレーションによる遺伝子導入後、7-10日で筋組織凍結サンプルを作製することで良好に筋病理解析できることが明らかになった。変異遺伝子は約20%の筋繊維に導入が認められた。我々の見いだしたMYOTあるいはDESの変異遺伝子を導入した場合、ヒト骨格筋で認められるものと同様の筋原線維の乱れおよび筋細胞内異常タンパク質の蓄積を再現することができた。

D. 考察

エレクトロポレーション法を用いた変異遺伝子導入法は MFM 患者で見いだされた新規遺伝子変異の病態との関連をあきらかに