

Kurihara M, Mitsuhashi H, Goto K, Koksal B, Kale G, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H, Nishino I: A novel congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010.

Nishino I: RYR1 gene mutation in congenital myopathies. NCNP International Symposium CONGENITAL MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23, 2010.

Hayashi YK, Shalaby S, Xiao X, Goto K, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: FHL1 gene mutation in congenital myopathies. NCNP International Symposium CONGENITAL MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23, 2010.

Tominaga K, Tsuburaya R, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Congenital myopathy with extreme muscle immaturity. NCNP International Symposium CONGENITAL MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND

MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23, 2010.

Mitsuhashi H, Fujita M, Yasuta H, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Noguchi S, Nonaka I, Kawakami A, Kudo A, Nishino I: Filamin C is required for the maintenance of sarcomere structure in medaka. NCNP International Symposium CONGENITAL MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23, 2010.

Mitsuhashi S, Hatakeyama H, Nonaka I, Sher R, Cox G, Goto Y, Nishino I: Mitochondrial dysfunction and mitophagy in muscle choline kinase beta defect. The 7th conference of Asian society for mitochondrial research and medicine (ASMRM) And The 10th conference of Japanese society of mitochondrial research and medicine (J-mit). Fukuoka, Japan, 12.18, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

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（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
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 （独）国立精神・神経医療研究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、原因及び候補遺伝子のクローニングを進めている。また、それを用いた培養細胞への発現系を用いた解析を行った。その結果、ヒト骨格筋で認められる変化を再現し、病態との関連を明らかにするためには、発現導入する遺伝子産物の特性を十分に考慮したベクターを作製する必要があることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究では、培養細胞へ野生型あるいは変異型遺伝子を発現させることによって、本疾患患者で新たに同定しえた変異と病態との関連を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

本疾患関連遺伝子について、ヒト cDNA を骨格筋から抽出した cDNA ライブラリーからクローニング、あるいは市販品を購入し、本研究により同定しえた各遺伝子変異を有する変異体を作製した。これらの野生型、および変異型を、COS 細胞および C2 細胞へ導入し、凝集体の形成能を検討した。

(倫理面への配慮)

すべての組み換えDNA実験は、カルタへ

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、(独)国立精神・神経医療研究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

既知原因遺伝子産物、新規に変異を見出した疾患関連遺伝子候補、およびそれらの変異体に関しては、順次、クローニングをおこなっている。このうち、デスミンに関しては既報告と同様の細胞内凝集体の形成が変異体導入細胞で確認された。一方、新たな疾患関連候補遺伝子として変異を見出した遺伝子産物に関しては、野生型を導入した場合でも容易に強く凝集体を形成して

しまい、凝集体のユビキチン化を含め、変異型との差異を十分にとらえることができなかった。今後、ターゲットとする遺伝子産物によっては、プロモーターの変更、標識の変更を考慮する他、Tet-on systemなどの発現誘導系を用いて、発現の時期ならびに量をコントロールする必要がある。

D. 考察

培養背細胞への遺伝子導入には、発現タンパク質の特性を考慮したベクター作製が必要である。

E. 結論

In vitro, in vivo 導入へむけた、既知、および新規の疾患関連遺伝子およびその変異体についてのクローニングをすすめた。培養細胞系を用いた実験系では、原因遺伝子産物により、発現条件を考慮する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

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, Apr, 2010.

Mitsuhashi H, Hayashi YK, Matsuda C, Noguchi S, Nishino I: Specific

phosphorylation on Ser 458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. *J Cell Sci* 123: 3893-3900, Nov, 2010.

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 Mutations in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy. *Ann Neurol*, 2011 (Epub ahead of print).

2. 学会発表

三橋里美, 島山英之, 唐橋美奈子, 幸村知子, 野口 悟, 林由起子, 埜中征哉, 中川靖一, 後藤雄一, 西野一三: rmd マウスにおけるミトコンドリア巨大化機構の解明. 第51回日本神経学会総会, 東京, 5.20, 2010.

三橋弘明, 藤田深里, 安田裕隆, 林由起子, 野口 悟, 埜中征哉, 川上厚志, 工藤 明, 西野一三: 心筋・骨格筋に異常を示すメダカ変異体 *zacro* の解析. 第16回小型魚類研究会, 埼玉, 9.18, 2010.

三橋弘明, 林由起子, 松田知栄, 野口 悟, 若月修二, 荒木敏之, 西野一三: 筋ジストロフィー患者に特異的なA型ラミンSer458のリン酸化. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12.7, 2010.

Shalaby S, Quinzii CM, Hayashi YK, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Hirano M, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy, rigid spine and myofibrillar myopathy. 20th Meeting of the European Neurological Society, Berlin, Germany, 6.19-23, 2010.

Liang WC, Hayashi YK, Park YE, Mitsuhashi H, Arimura T, Bonne G, Noguchi S, Nishino I: Characterization of *Emd^{-/-}/Lmna^{H222P/H222P}* mice: focus on the heart. World Federation of Neurology, XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.19, 2010.

Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Noguchi S, Nishino I: Expression of cavin family members in skeletal muscle. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: In vivo electroporation is an effective method to reproduce pathological changes in myofibrillar myopathy. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Mitsuhashi H, Fujita M, Yasuta H, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Kawakami A, Kudo A, Nishino I: Filamin C is required for the maintenance of sarcomere structure in medaka. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Genetic, clinical, and pathological features of congenital fiber type disproportion in Japan. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy-like patients cause dysfunctions of a nuclear membrane protein, LUMA. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010.

Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Mitsuhashi H, Goto K, Koksal B, Kale G, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H,

Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H,
Nishino I: A novel congenital muscular
dystrophy with mitochondrial structural
abnormalities caused by defective de novo
phosphatidylcholine biosynthesis. 15th
International Congress of the World
Muscle Society (WMS), Kumamoto,
Japan, 10.14, 2010.

Hayashi YK, Shalaby S, Xiao X, Goto K,
Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: FHL1
gene mutation in congenital myopathies.
NCNP International Symposium
CONGENITAL MYOPATHIES:
PATHOGENESIS AND MANAGEMENT,
Kodaira, Japan, 10.23, 2010.

Mitsuhashi H, Fujita M, Yasuta H,
Hayashi YK, Mitsuhashi S, Noguchi S,
Nonaka I, Kawakami A, Kudo A, Nishino
I: Filamin C is required for the
maintenance of sarcomere structure in
medaka. NCNP International
Symposium CONGENITAL
MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND
MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23,
2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

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（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
分担研究報告書

メダカをモデルとした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関する研究

研究分担者 三橋 弘明（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 流動研究員

研究要旨 筋ジストロフィーの新たなモデル動物としてメダカの確立を試みた。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原因遺伝子の1つである *FLNC* に変異を持つメダカが進行性の筋変性と心筋症を呈することが明らかとなり、メダカの疾患モデルとしての有用性が確認された。

A. 研究目的

サルコメアの配列の乱れを主病変とする筋ジストロフィー (myofibrillar myopathy: MFM) の原因遺伝子の1つである *FLNC* に変異を持つメダカの解析をおこない、メダカの疾患モデル動物としての有用性を検討する。

B. 研究方法

FLNC 変異を持つメダカ変異体、*zac* の受精後 2~9 日胚を用い、実体顕微鏡観察、電子顕微鏡観察、免疫組織化学染色を用いて心筋・骨格筋の形態と機能を解析した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、(独) 国立精神・神経医療研究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、(独) 国立精

神・神経医療研究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、(独) 国立精神・神経医療研究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

メダカにおける *FLNC* の局在を調べた結果、ヒト骨格筋と同様に、Z線、細胞膜、筋腱接合部に局在していることが明らかになった。*FLNC* を欠損している *zac* 変異体では受精後4日目からこれらの構造が壊れ始め、

日を追うごとにサルコメアの配列異常が進行することを明らかにし、国内外の学会で発表した。さらに、変性初期に麻酔によって運動負荷を軽減させると、筋変性の進行が抑えられることがわかったため、FLNCが機械的なストレスからサルコメア構造を守っていることが示唆された。FLNCは心筋細胞の接着部にも発現しており、*zac* 変異体では拍出量の低下が認められ、うっ血性の心不全を起こすことが明らかとなった。現在、論文投稿準備中である。

D. 考察

メダカ FLNC タンパク質の局在はヒト FLNC と同様であり、FLNC 欠損によってメダカでサルコメア配列異常が見られたことから、メダカは筋ジストロフィーの有用なモデル動物であると言える。さらに FLNC が心臓においても重要な役割をもつことが示唆された。

E. 結論

FLNCの局在はヒト-メダカ間で保存されており、メダカ変異体は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モデル動物として有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mitsuhashi H, Hayashi YK, Matsuda C, Noguchi S, Wakatsuki S, Araki T, Nishino I: Specific phosphorylation of Ser458 of A-type lamins in

LMNA-associated myopathy patients. *J Cell Sci.* 123: 3893-3900, 2010.

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy and related myopathy. *Ann Neurol* (in press).

2. 学会発表

三橋弘明, 藤田深里, 安田裕隆, 林由起子, 野口悟, 埜中征哉, 川上厚志, 工藤明, 西野一三: 心筋・骨格筋に異常を示すメダカ変異体*zacro*の解析. 第16回小型魚類研究会, 埼玉, 9.18, 2010.

三橋弘明, 林由起子, 松田知栄, 野口悟, 若月修二, 荒木敏之, 西野一三: 筋ジストロフィー患者に特異的なA型ラミンSer458のリン酸化. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12.8, 2010.

Liang WC, Hayashi YK, Park YE, Mitsuhashi H, Arimura T, Bonne G, Noguchi S, Nishino I: Characterization of EMD-/-/LMNAH222P/H222P mice. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research & 51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, 4.17, 2010.

Mitsuhashi H, Fujita M, Yasuta H,

Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Kawakami A, Kudo A, Nishino I: Filamin C is required for the maintenance of sarcomere structure in medaka. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: In vivo electroporation is an effective method to reproduce pathological changes in myofibrillar myopathy. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy-like patients cause dysfunctions of a nuclear membrane protein, LUMA. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010.

Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Mitsuhashi H, Goto K, Koksal B, Kale G, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H,

Nishino I: A novel congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

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（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
分担研究報告書

エレクトロポレーション法を用いたサルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィー
に関する研究

研究分担者 毛塚 悦子（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 流動研究員

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の分子病態の解明を目的として、原因遺伝子の一つであるミオティリン遺伝子(*MYOT*) に着目し、エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入によって、*in vivo* における変異タンパク質の筋原線維形成・維持への影響を解析した。変異型 *MYOT* タンパク質をマウス骨格筋に発現させると、疾患の病理所見で見られるような筋線維内の異常タンパク質の凝集や Z 線の異常が観察されたことから、生体レベルで、変異型 *MYOT* が疾患と関連していることが示された。

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) の原因遺伝子の一つである、*MYOT* の変異体 (図1) が引き起こす病理変化の *in vivo* における解析を行い、分子病態を解明する。

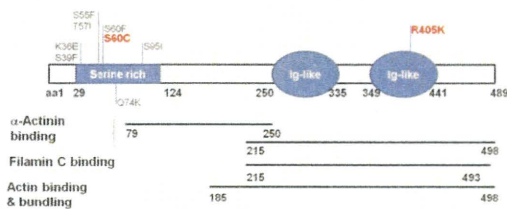


図1 ミオティリンの構造と疾患の原因となるアミノ酸変異

B. 研究方法

in vivo エレクトロポレーション法を用いて野生型及び変異型 *MYOT* (S60C, R405K) を遺伝子導入したマウス前脛骨筋の病理変

化を組織化学的、免疫組織化学的、また電子顕微鏡学的手法を用いて解析した (図2)。

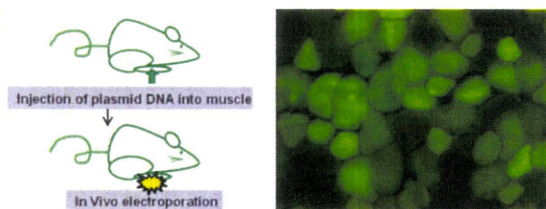


図2 *In vivo* エレクトロポレーション法(左)によって、マウス骨格筋へ導入したGFP遺伝子の発現(右)

(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、患者および家族の了解を得た上で採取された組織であり、かつ、(独)国立精神・神経医療研究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研究使用に対するインフォームドコンセントを得たものである。検体はプライバシーを尊重し、匿名化した上で

使用し、得られた結果は公開する。全ての動物実験は、(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従って行い、(独)国立精神・神経医療研究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。全ての組み換え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、(独)国立精神・神経医療研究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

変異型*MYOT* タンパク質は、マウス骨格筋に発現させると、他のZ線のタンパク質や、ユビキチンとともに筋線維内に凝集を起こしていた。これらの凝集タンパク質は、患者骨格筋で観察される凝集タンパク質と一致していた。さらに電子顕微鏡を用いて、変異型*MYOT* を導入した筋線維の微細構造を解析したところ、患者骨格筋で観察されるような封入体やフィラメント様の凝集体、Z線の乱れが観察された。よって生体レベルで、変異型*MYOT* が疾患と関連していることが明らかになった。現在、論文投稿準備中である。

D. 考察

エレクトロポレーション法を用いて変異タンパク質をマウス骨格筋に発現させることで、患者骨格筋で観察されるような筋病理変化を短時間で再現できた。

E. 結論

MFPM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。しかし、疾患の70%は原因が明らかでない。

エレクトロポレーション法を用いた変異タンパク質の解析は、新規の疾患原因候補遺伝子のスクリーニングに応用でき、原因遺伝子の迅速な特定のために非常に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Liang WC, Mitsunashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 Mutations in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy. *Ann Neurol* 2011 (Epub ahead of print).

2. 学会発表

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsunashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: In vivo electroporation is an effective method to reproduce pathological changes in myofibrillar myopathy. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan,

10.13, 2010.

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E,
Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi
YK: TMEM43 mutations in
Emery-Dreifuss muscular dystrophy-like
patients cause dysfunctions of a nuclear
membrane protein, LUMA. 15th
International Congress of the World
Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan,
10.14, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

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（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
分担研究報告書

サルコミ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

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 筋原線維性ミオパチー患者で見いだされた新規疾患関連遺伝子候補の変異について、免疫組織化学法、イースト2ハイブリット法を用い、病態との関連についての検討を行った。変異タンパク質において、アクチニンとの結合能の増加が示唆された。今後、更なる解析を行って、病態との関連を明らかにしていく予定である。

A. 研究目的

筋原線維性ミオパチー（MFM）の原因遺伝子タンパク質の多くはZ線関連タンパク質であり、そのタンパク質相互連関が病態と深く関わっていると考えられる。そこで本研究では変異を同定し得たMFM患者骨格筋におけるZ線関連タンパク質の変化を検討した。

B. 研究方法

変異スクリーニングの結果、変異の見いだされた患者骨格筋について、免疫組織化学的、生化学的解析を行った。

（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、（独）国立精神・神経医療研究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

MFMの新規原因遺伝子候補分子Sについては、これまでの変異スクリーニングの結果、4家系4つの変異を見出している。このうち2つの変異について、免疫組織化学法、およびイースト2ハイブリット法を用いてZ線タンパク質との結合についての解

析を行った。その結果、患者骨格筋ではSタンパク質の細胞内集積とデスミン、フィラミンCなどの他、アクチンの集積も認められた。また1つの変異では α アクチニンとの結合が増強しているという結果を得た。

D. 考察

新規疾患関連候補遺伝子 S に 4 家系で変異を見出したが、家系内発症者がいないこと、各 1 例であることなどから、病態との関連を詳細に示す必要がある。イースト 2 ハイブリット法では異常が示唆されたが、病態を明らかにする上では、今後更なる解析が必要である。

E. 結論

新規疾患関連候補遺伝子で同定した変異についての解析を進めている。病因として確定するには、複数の in vivo, in vitro の解析が必要であり、今後、免疫沈降や細胞生物学的解析実験を進めていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mitsuhashi H, Hayashi YK, Matsuda C, Noguchi S, Nishino I: Specific phosphorylation on Ser 458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. *J Cell Sci* 123: 3893-3900, Nov, 2010.

2. 学会発表

三橋弘明, 林由起子, 松田知栄, 野口 悟, 若月修二, 荒木敏之, 西野一三: 筋ジストロフィー患者に特異的な A 型ラミン Ser458 のリン酸化. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12.7, 2010.

Matsuda C, Kameyama K, Takeshima H, Nishino I, Hayashi YK: Dysferlin C2A domain is important for association with MG53 (TRIM72). World Federation of Neurology, XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.18, 2010.

Hayashi YK, Matsuda C, Nonaka I, Nishino I: Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. World Federation of Neurology, XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.18, 2010.

Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Noguchi S, Nishino I: Expression of cavin family members in skeletal muscle. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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
Tominaga K, <u>Hayashi YK</u> , Goto K, Minami N, <u>Noguchi S</u> , Nonaka I, Miki T, <u>Nishino I</u> : Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology. <i>Acta Neuropathol</i> 119: 481-486, Apr, 2010.
Yamazaki Y, Kamei Y, Sugita S, Akaike F, Kanai S, Miura S, Hirata Y, Troen BR, Kitamura T, <u>Nishino I</u> , Sukanami T, Ezaki O, Ogawa Y: The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle. <i>Biochem J</i> 427: 171-178, Apr, 2010.
<u>Mitsubishi H</u> , <u>Hayashi YK</u> , <u>Matsuda C</u> , <u>Noguchi S</u> , <u>Nishino I</u> : Specific phosphorylation on Ser 458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. <i>J Cell Sci</i> 123: 3893-3900, Nov, 2010.
Liang WC, <u>Nishino I</u> : Lipid Storage Myopathy. <i>Curr Neurol Neurosci Rep</i> 11: 97-103, Feb, 2011.
Liang WC, <u>Mitsubishi H</u> , <u>Keduka E</u> , Nonaka I, <u>Noguchi S</u> , <u>Nishino I</u> , <u>Hayashi YK</u> : TMEM43 Mutations in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy. <i>Ann Neurol</i> , 2011 (Epub ahead of print)

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology

Kayo Tominaga · Yukiko K. Hayashi · Kanako Goto ·
Narihito Minami · Satoru Noguchi · Ikuya Nonaka ·
Tetsuro Miki · Ichizo Nishino

Received: 19 November 2009 / Revised: 15 February 2010 / Accepted: 15 February 2010 / Published online: 24 February 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Congenital myotonic dystrophy (CDM) is associated with markedly expanded CTG repeats in *DMPK*. The presence of numerous immature fibers with peripheral halo is a characteristic feature of CDM muscles together with hypotrophy of type 1 fibers. Smaller type 1 fibers with no structural abnormality are a definitive criterion of congenital fiber type disproportion (CFTD). Nonetheless, we recently came across a patient who was genetically confirmed as CDM, but had been earlier diagnosed as CFTD when he was an infant. In this study, we performed clinical, pathological, and genetic analyses in infantile patients pathologically diagnosed as CFTD to evaluate CDM patients indistinguishable from CFTD. We examined CTG repeat expansion in *DMPK* in 28 infantile patients pathologically diagnosed as CFTD. Mutation screening of *ACTA1* and *TPM3* was performed, and we compared clinical and pathological findings of 20 CDM patients with those of the other cohorts. We identified four (14%) patients with CTG expansion in *DMPK*. *ACTA1* mutation was

identified in four (14%), and *TPM3* mutation was found in two (7%) patients. Fiber size disproportion was more prominent in patients with *ACTA1* or *TPM3* mutations as compared to CFTD patients with CTG expansion. A further three patients among 20 CDM patients showed pathological findings similar to CFTD. From our results, CDM should be excluded in CFTD patients.

Keywords Congenital myotonic dystrophy (CDM) · Congenital fiber type disproportion (CFTD) · *DMPK* · CTG expansion · *ACTA1* · *TPM3*

Introduction

Congenital myotonic dystrophy (CDM; OMIM 160900) is caused by marked expansion of trinucleotide (CTG) repeat in the 3' untranslated region of the dystrophin myotonia protein kinase gene (*DMPK*; OMIM 605377) on chromosome 19q [1, 5, 9]. The CTG repeat in normal individuals varies from 5 to 35, whereas it expands to more than 1,000 repeats in CDM [7]. Typically, the mothers of CDM patients show clinical features of myotonic dystrophy which makes the diagnosis of CDM easier. Clinically, CDM patients show hypotrophy at birth, tented upper lip, facial muscle weakness, and neonatal respiratory insufficiency. Mental retardation becomes evident in later life. On muscle pathology, the presence of numerous immature fibers with peripheral halo is a characteristic feature together with increased number of fibers with centrally placed nuclei and hypotrophy of type 1 fibers, mimicking myotubular myopathy [6].

Smaller sized type 1 fibers as compared to type 2 fibers are a characteristic pathological feature of congenital fiber type disproportion (CFTD; OMIM 255310). CFTD is a

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00401-010-0660-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. Tominaga · Y. K. Hayashi · K. Goto · N. Minami ·
S. Noguchi · I. Nonaka · I. Nishino (✉)
Department of Neuromuscular Research, National Institute
of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry,
4-1-1 Ogawa-higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan
e-mail: nishino@ncnp.go.jp

T. Miki
Proteo-Medicine Research Center, Ehime University,
Toon, Ehime 791-0295, Japan

K. Tominaga · T. Miki
Department of Geriatric Medicine, Ehime University Graduate
School of Medicine, Toon, Ehime 791-0295, Japan

congenital myopathy defined by type 1 fiber hypotrophy of 12% or more than type 2 fibers, and with the absence of structural abnormalities within myofibers [2]. Type 1 fiber predominance is also commonly seen. Clinically, CFTD patients show hypotonia, facial muscle weakness, and severe respiratory insufficiency at birth. Long face, high-arched palate, and joint contractures are often seen. CFTD is a genetically heterogeneous disorder and mutations in the genes for tropomyosin 3 (*TPM3*; OMIM 191030), α -skeletal muscle actin 1 (*ACTA1*; OMIM 102610), and selenoprotein N1 (*SEPN1*; OMIM 606210) have been identified [3, 4, 8]. Reportedly *TPM3* mutations are the most common ones and observed approximately in 20–25% of the CFTD patients [4]. *ACTA1* mutations were identified in 6% of CFTD [8], and only one family was reported having an *SEPN1* mutation [3].

Although the muscle pathology features of CDM seem to be well defined, our experience with one CDM patient who was previously diagnosed as CFTD made us hypothesize that CDM may have features other than the presently defined ones, both in terms of muscle pathology and clinical characteristics. In this study, we looked for CDM patients among patients who presented with CFTD. We also performed clinical and pathological analysis to find out whether patients with CDM can be distinguished from CFTD.

Materials and methods

Patients

All clinical materials used in this study were obtained for diagnostic purposes and with informed consent. This work was approved by the Ethical Committee of National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP). In this study, we chose muscle specimens from patients younger than 1 year of age. From the muscle repository of NCNP, there were 28 unrelated patients who were pathologically diagnosed as CFTD. Twenty CDM patients, who had symptomatic family members and whose diagnosis was genetically confirmed, were also used for comparison.

Histochemistry

Biopsied skeletal muscles were frozen with isopentane cooled in liquid nitrogen. Serial frozen sections of 10 μ m thickness were stained with hematoxylin and eosin (H & E), modified Gomori-trichrome (mGT), NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR), and ATPases (pH 10.6, pH 4.6 and pH 4.3). For each muscle specimen, the mean fiber diameter was determined by obtaining the shortest anteroposterior diameter of 100 each of type 1 and type 2 (A + B) fibers

using ATPase stains. The myofiber diameter was used to calculate the fiber size disproportion (FSD). FSD was computed as: difference of type 2 fiber diameter (mean) and type 1 fiber diameter (mean) divided by type 2 fiber diameter (mean) \times 100%.

Genetic analyses

Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes or frozen muscle specimens using standard protocol. To examine CTG repeat expansion in *DMPK*, triplet repeat primed PCR was performed as described previously [12]. The presence of the expanded CTG repeats was examined by Gene Mapper using ABI PRISM 310 automated sequencer (Applied Biosystems Japan Co., Ltd, Japan). To know the approximate number of triplet repeats, we performed Southern blotting analysis using PCR-amplified CTG repeats because of the limited amounts of muscle specimens [10]. The primer sequences used in this study are F: 5'-CGAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGC CG-3', and R: 5'-TCTTTCTTTACCAGACTAGGG-3'.

The PCR products were electrophoresed with 1% of Seakem HGT agarose gel (Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME, USA), transferred to Hybond-XL (GE Healthcare, UK) for overnight, hybridized with 32 P-labeled probes of (CTG)₁₀ oligonucleotide at 65°C for overnight, and detected using BAS2500 (Fuji Film, Japan). By using genomic DNA from a CDM patient with known CTG repeat number, we confirmed that this PCR-based method can detect the corresponding size of the CTG repeats using genomic DNA. For mutation screening of *ACTA1* and *TPM3*, all exons and their flanking intronic regions were amplified by PCR and directly sequenced by an ABI PRISM 3100 automated sequencer (Applied Biosystems). Primer sequences are listed in the Supplemental Table.

Statistical analyses

All data are presented as means \pm SD. Comparisons among groups were done by using Student's *t* test and analysis of variance (ANOVA) as appropriate. Statistical significance was considered when *p* value was less than 0.05.

Results

Genetic analyses

By using triplet repeat primed PCR, expanded CTG repeats in *DMPK* were detected in 4 of 28 (14%) unrelated patients who were pathologically diagnosed as CFTD (Figs. 1, 2a). This diagnosis of CDM was further confirmed by Southern

blotting analysis, wherein all four patients had more than 1,000 CTG repeats (Fig. 2b). We also identified three heterozygous *ACTA1* mutations (p.Gly48Cys, p.Leu221-Pro, and p.Pro332Ser) in four unrelated CFTD patients. Two mutations of p.Leu221Pro and p.Pro332Ser have already been reported [8], whereas the p.Gly48Cys mutation observed in two patients was a novel one. The Gly48 is a highly conserved amino acid among several species. Two unrelated CFTD patients had the same heterozygous mutation p.Arg168Cys in *TPM3*, which was previously reported in CFTD patients [4].

Clinical findings

We compared the clinical findings among 4 CFTD patients with CTG expansion and 6 CFTD patients with *ACTA1* or *TPM3* mutations, and compared the clinical features with 20 patients genetically confirmed as CDM (Table 1). In terms of family history, none of the four CFTD patients with CTG expansion had a positive family history. This is in stark contrast with the typical picture in CDM patients, as all of them had at least one symptomatic family member. Hydramnios and premature delivery were seen in more than 50% of the CFTD patients with CTG expansion and

CDM, but none of CFTD patients with *ACTA1* or *TPM3* mutations. Hypotonia and respiratory insufficiency at birth were seen in all groups except for two patients with *TPM3* mutation.

Muscle pathological findings

As muscle pathology can have drastic changes according to the gestational age of infantile patients, we adjusted the age by setting the full-term day (37 weeks of gestation) as putative birthday. After adjustment, the age at biopsy of the CDM patients ranged from -7 to 43 weeks, and those of the four CFTD patients with CTG expansion were from 21 to 42 weeks.

Congenital fiber type disproportion is defined as a congenital myopathy wherein FSD is higher than 12%, but with no associated structural abnormalities within the myofibers [2]. In this study, FSD in CDM, CFTD with CTG expansion, CFTD with *ACTA1* mutation, and CFTD with *TPM3* mutation was calculated to be $7.2 \pm 6.8\%$ (mean \pm SD), 23.0 ± 5.0 , 47.5 ± 4.0 , and $52.0 \pm 9.9\%$, respectively (Fig. 3). FSD was significantly ($p < 0.05$) higher in CFTD with *ACTA1* or *TPM3* mutations as compared to the CFTD patients with CTG expansion and CDM.

Fig. 1 Muscle pathology of a 42-week-old CFTD patient with CTG expansion. **a** Hematoxylin and eosin, **b** modified Gomori trichrome, **c** NADH-TR, and **d** ATPase (pH 4.4) stain. Type 1 fiber atrophy (FSD [(mean type 2 fiber diameter) - (mean type 1 fiber diameter)/mean type 2 fiber diameter \times 100] = 26%), type 1 fiber predominance (65%), and only 1% of type 2C fibers with no peripheral halo is seen. Bar 50 μ m

