

- Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Quinlivan R, Sewry C, Mitsuhashi H, Goto K, Koksal B, Kale G, Ikeda K, Taguchi R, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H, Nishino I: A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. *Am J Hum Genet.* 88(6): 845-851, Jun, 2011.
- Komaki H, Hayashi YK, Tsuburaya R, Sugie K, Kato M, Nagai T, Imataka G, Suzuki S, Saitoh S, Asahina N, Honke K, Higuchi Y, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nonaka I, Nishino I: Inflammatory changes in infantile-onset *LMNA*-associated myopathy. *Neuromuscul Disord.* 21(8): 563-568, Aug, 2011.
- Mitsuhashi S, Hatakeyama H, Karahashi M, Koumura T, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S, Sher RB, Nakagawa Y, Manfredi G, Goto YI, Cox GA, Nishino I: Muscle choline kinase beta defect causes mitochondrial dysfunction and increased mitophagy. *Hum Mol Genet.* 20(19): 3841-3851, Oct, 2011.
- Fujita M, Mitsuhashi H, Isogai S, Nakata T, Kawakami A, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I, Kudo A: Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant *zacro*. *Dev Biol.* 361(1): 79-89, Jan, 2012.
- Sukigara S, Liang WC, Komaki H, Fukuda T, Miyamoto T, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Hayashi YK, Sugie H, Sasaki M, Nishino I: Muscle glycogen storage disease 0 presenting recurrent syncope with weakness and myalgia. *Neuromuscul Disord.* 22(2): 162-165, Feb, 2012.
- Shi Z, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Goto K, Kaneda D, Choi YC, Toyoda C, Hieda S, Kamiyama T, Sato H, Wada M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Characterization of the Asian myopathy patients with *VCP* mutations. *Eur J Neurol.* 19(3): 501-509, Mar, 2012.
- Furusawa Y, Mori-Yoshimura M, Yamamoto T, Sakamoto C, Wakita M, Kobayashi Y, Fukumoto Y, Oya Y, Fukuda T, Sugie H, Hayashi YK, Nishino I, Nonaka I, Murata M: Effects of enzyme replacement therapy on five patients with advanced late-onset glycogen

storage disease type II: a 2-year follow-up study. *J Inherit Metab Dis.* 35(2): 301-310, Mar, 2012.

Suzuki N, Aoki M, Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Increase in number of sporadic inclusion body myositis (sIBM) in Japan. *J Neurol.* 259(3): 554-556, Mar, 2012.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: *In Vivo* Characterization of Mutant Myotilins. *Am J Pathol.* Epub Feb 18, 2012.

圓谷理恵, 西野一三: 心筋症をきたす筋疾患. 病理と臨床 循環器病理 I 1. 心筋疾患 話題の心筋症. 29: 154-158, Apr, 2011.

佐藤孝俊, 西野一三: Dystrophin 解説編. 病理と臨床 臨時創刊号 病理診断に役立つ分子生物学. 29: 210-212, Apr. 2011.

西野一三: 筋病理の基本. 臨床神経学. 51(9): 669-676, Sep, 2011.

2. 学会発表

Cowling B, Amoasii L, Toussaint A, Koebel P, Ferry A, Davignon L, Nishino I, Mandel JL, Laporte J: Increased wild-type dynamin 2 expression or a

CNM mutant of dynamin 2 expressed in skeletal muscle of adult wild-type mice leads to structural defects and muscle weakness. 4th international congress of myology, Paris, France, 5.9-13, 2011.

Bartoli M, Nguyen K, Bernard R, Walrafen P, Attarian S, Hayashi YK, Pouget J, Nishino I, Krahn M, Helmbacher F, Levy N: Detection of genomic defects at the 4Q35 FSHD-associated locus by using multiple and large scale genomic tools. 4th international congress of myology, Paris, France, 5.12, 2011.

Liang WC, Er TK, Ohkuma A, Hayashi YK, Lopez LC, Hirano M, Nonaka I, Nishino I, Jong YJ: Patients with Riboflavin-Responsive Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Taiwan. 第53回日本小児神経学会総会, 横浜, 5.27, 2011.

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Takeshima H, Keduka E, Araki N, Nishino I, Hayashi YK: Real time analysis of sarcolemmal repair mediated by dysferlin and MG53. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.19, 2011.

Shi ZH, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Momma K, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Expanding clinicopathological findings observed in the Asian patients with VCP mutation. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.19, 2011.

Hayashi YK, Goto K, Kure Y, Ohnishi M, Sato T, Keduka E, Shalaby S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Characterization of Japanese patients with myofibrillar myopathy. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.20, 2011.

Quinlivan R, Nishino I, Mitsuhashi S, Aoyama C, Sewry C, Muntoni F, Cirak S, Robb S, Moore D, Abbs S, Bushby K, Straub V: Myopathy associated with mutations in CHKB in three UK patients. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.20, 2011.

Martinez Arroyo A, Naberhaus B, Liang WC, Nishino I, Alonso E, Jucgla A, Olive M: Novel mutation in PNPLA2 presenting with distal myopathy and lipodystrophy. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: In vivo characterization of mutant myotilins. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

Sato T, Hayashi YK, Keduka E, Noguchi S, Osawa M, Nonaka I, Nishino I: Novel BAG3 mutations in myofibrillar myopathy patients. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

Nishino I: PATHOLOGICAL FEATURES. 20th World Congress of Neurology, Marrakesh, Morocco, 11.13, 2011.

Nishino I: Distal myopathy: What's new? The Fourth Thai-Japanese Workshop on Muscle Diseases. Bangkok, 2.23, 2012.

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: 筋疾患の病態解明を目指したメダカの利用. 第32回国立精神・神経医療研究センター神経研究所研究発表会, 小平, 5.9, 2011.

三橋里美, 大熊 彩, Talim B, 唐橋美奈子, 幸村知子, 青山智英子, 栗原まな, Quinlivan R, Sewry C, 三橋弘明, 後藤加奈子, Koksai B, Kale G, 杉本博之, 中川靖一, Cox GA,

Topaloglu H, 西野一三: ホスファチジルコリン合成酵素 CHKB 変異により先天性筋ジストロフィーが引き起こされる. 第 32 回国立精神・神経医療研究センター神経研究所研究発表会, 小平, 5.9, 2011,

毛塚悦子, 林由起子, Shalaby S, 三橋弘明, 野口 悟, 西野一三: エレクトロポレーション法を用いた変異ミオティリンの解析. 第 32 回国立精神・神経医療研究センター神経研究所研究発表会, 小平, 5.10, 2011.

倉重毅志, 高橋哲也, 近藤啓太, 中村 毅, 山脇健盛, 圓谷理恵, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三, 松本昌泰: X-linked myopathy with excessive autophagyの一家系. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011.

林由起子, 後藤加奈子, 埜中征哉, 西野一三: 本邦における筋原線維性ミオパチーの臨床遺伝学的・筋病理学的特徴. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.19, 2011.

佐藤孝俊, 林由起子, 後藤加奈子, 高見真希, 鈴木茂文, 野口 悟, 西野一三: DNAJB6 ミオパチー. 平成23年度(第33回)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 研究発表会, 小平, 3.22, 2012.

毛塚悦子, 林由起子, Shalaby S, 三橋弘明, 野口 悟, 埜中征哉, 西野一三: 筋原線維性ミオパチーに関連する変異タンパク質の

解析. 平成23年度(第33回)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 研究発表会, 小平, 3.23, 2012.

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、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うる変異体と変化の認められない変異体が存在し、疾患との関連を明らかにするためには、他の手法も組み合わせた検討が必要であることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究では、筋原線維性ミオパチー患者における変異スクリーニングで見いだされた新規の遺伝子変化について、病態との関連を明らかにすることを目的に、候補遺伝子のクローニングをおこない、培養細胞を用いて発現させた変異タンパク質の解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

変異スクリーニングを行った新規疾患候補遺伝子を含む筋原線維性ミオパチー関連遺伝子について、ヒト正常骨格筋から抽出した cDNA ライブラリーを用いてクローニングし、あるいは市販品を購入し、本研究

により同定し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、および変異型遺伝子を、COS 細胞および C2 細胞へリポフェクタミンを用いて導入発現させ、凝集体の形成を中心に検討した。

（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・承認を得た。

C. 研究結果

これまでの報告にあるように、複数のデスミン変異体は効率よく細胞内凝集体を形成した。一方、BAG3 変異体は既報告の p.Pro209Leu 変異では細胞内凝集体の形成を再現し得たが、我々の見いだした5アミノ酸欠失変異体では、明らかな細胞内凝集体の形成は認められなかった。また、ミオティリン変異体2種類については、骨格筋で顕著な細胞内凝集体が認められるのにもかかわらず、いずれも培養細胞では凝集体の形成はみいだされなかった。また、新規疾患候補遺伝子について検討を行った結果、野生型の過剰発現細胞であってもその生存率が極めて低下し、タンパク質自体の過剰発現が細胞障害性であることが明らかとなった。

D. 考察

筋細胞内に凝集体を形成する筋原線維性ミオパチー関連分子の変異体は、必ずしも培養細胞で凝集体を再現しうるものではなく、遺伝子あるいは変異部位によって、その変化は異なることが明らかとなった。*In vitro* の変異導入による解析は比較的簡便な手法であるが、ヒト骨格筋で認められる変化を必ずしも再現できるわけではなく、他の手法をも加えた解析が必要となる。

E. 結果

培養細胞への変異体の発現導入は、解析

する遺伝子あるいは変異部位によって結果は様々であり、筋原線維性ミオパチーの病態解明に利用できる場合は限られることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.* 69(6): 1005-1013, Jun, 2011.

Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Quinlivan R, Sewry C, Mitsuhashi H, Goto K, Koksal B, Kale G, Ikeda K, Taguchi R, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H, Nishino I: A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. *Am J Hum Genet.* 88(6): 845-851, Jun, 2011.

Mitsuhashi S, Hatakeyama H, Karahashi M, Koumura T, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S, Sher RB, Nakagawa Y, Manfredi G, Goto YI, Cox GA, Nishino I: Muscle choline kinase beta defect causes

mitochondrial dysfunction and increased mitophagy. *Hum Mol Genet.* 20(19): 3841-3851, Oct, 2011.

Fujita M, Mitsunashi H, Isogai S, Nakata T, Kawakami A, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I, Kudo A: Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant *zacro*. *Dev Biol.* 361(1): 79-89, Jan, 2012.

Shi Z, Hayashi YK, Mitsunashi S, Goto K, Kaneda D, Choi YC, Toyoda C, Hieda S, Kamiyama T, Sato H, Wada M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Characterization of the Asian myopathy patients with *VCP* mutations. *Eur J Neurol.* 19(3): 501-509, Mar, 2012.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsunashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: *In Vivo* Characterization of Mutant Myotilins. *Am J Pathol.* Epub Feb 18, 2012.

2. 学会発表

Shi ZH, Hayashi YK, Mitsunashi S, Momma K, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Expanding clinicopathological findings observed in the Asian patients with *VCP* mutation. 16th International Congress of

the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.19, 2011.

Hayashi YK, Goto K, Kure Y, Ohnishi M, Sato T, Keduka E, Shalaby S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Characterization of Japanese patients with myofibrillar myopathy. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.20, 2011.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsunashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: In vivo characterization of mutant myotilins. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

Sato T, Hayashi YK, Keduka E, Noguchi S, Osawa M, Nonaka I, Nishino I: Novel BAG3 mutations in myofibrillar myopathy patients. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

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: 筋疾患の病態解明を目指したメダカの利用. 第32回国立精神・神経医療研究センター神経研究所研究発表会, 小平, 5.9, 2011.

毛塚悦子, 林由起子, Shalaby S, 三橋弘明,

野口 悟, 西野一三: エレクトロポレーション法を用いた変異ミオティリンの解析.
第32回国立精神・神経医療研究センター神経研究所研究発表会, 小平, 5.10, 2011.

佐藤孝俊, 林由起子, 後藤加奈子, 高見真希, 鈴木茂文, 野口 悟, 西野一三: DNAJB6 ミオパチー. 平成23年度(第33回)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 研究発表会, 小平, 3.22, 2012.

毛塚悦子, 林由起子, Shalaby S, 三橋弘明, 野口 悟, 埜中征哉, 西野一三: 筋原線維性ミオパチーに関連する変異タンパク質の解析. 平成23年度(第33回)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 研究発表会, 小平, 3.23, 2012.

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

in vivo 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原因遺伝子の迅速な同定法の確立を目的として、エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入法を検討した。原因遺伝子の一つであるミオティリン遺伝子(*MYOT*) やデスミン遺伝子(*DES*)の変異型タンパク質をエレクトロポレーション法によってマウス骨格筋に発現させ、*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。その結果、患者骨格筋の病理所見で見られるような多様な変化が短時間で再現されたことから、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方法の有用性が示された。

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)の原因遺伝子及び原因候補遺伝子における新規変異と疾患との関連を*in vivo*において証明するための迅速な方法を確立することを目的とする。

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ミオティリンやデスミンをマウス骨格筋に発現させた。遺伝子

導入後、7日目、14日目の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、および電子顕微鏡学的手法を用いて解析した。さらに患者骨格筋および遺伝子を導入したマウス骨格筋を用いて変異タンパク質の溶解度の解析をおこない、生化学的性質を調べた。

(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、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

in vivo エレクトロポレーション法を用いてマウス骨格筋に発現させた変異型ミオティリン(S60C, R405K)タンパク質は他の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おり、また経時的に凝集体の増加が認められた。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。タンパク質の溶解度解析の結果、変異ミオティリンは患者骨格筋同様、マウス骨格筋においても高い不溶性を示すことが明らかになり、生化学的な性質も再現されていることがわかった。

in vivo エレクトロポレーション法を用いてマウス骨格筋に発現させた変異型デスマンタンパク質は患者骨格筋の筋細胞辺縁に観察される特徴的な封入体と同様のタンパク質の凝集形成を示した。

D. 考察

in vivo 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および生化学的な性質を短時間で再現できた。

E. 結論

MFM患者の多くは原因遺伝子が明らかでなく、その同定が急がれている。またこれまでのMFM患者スクリーニングの結果多数の疾患との関連が疑われる新規遺伝子変異が見いだされている。*in vivo* 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、これら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, Mitsuhashi H, Keduka E,

Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 Mutations in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy. *Ann Neurol.* 69(6): 1005-1013, Jun, 2011.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: *In Vivo* Characterization of Mutant Myotilins. *Am J Pathol.* Epub Feb 18, 2012.

2. 学会発表

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Takeshima H, Keduka E, Araki N, Nishino I, Hayashi YK: Real time analysis of sarcolemmal repair mediated by dysferlin and MG53. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.19, 2011.

Hayashi YK, Goto K, Kure Y, Ohnishi M, Sato T, Keduka E, Shalaby S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Characterization of Japanese patients with myofibrillar myopathy. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.20, 2011.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: In vivo characterization of mutant myotilins. 16th International

Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

毛塚悦子, 林由起子, Shalaby S, 三橋弘明, 野口 悟, 西野一三: エレクトロポレーション法を用いた変異ミオティリンの解析. 第32回国立精神・神経医療研究センター神経研究所研究発表会, 小平, 5.10, 2011.

毛塚悦子, 林由起子, Shalaby S, 三橋弘明, 野口 悟, 埜中征哉, 西野一三: 筋原線維性ミオパチーに関連する変異タンパク質の解析. 平成23年度(第33回)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 研究発表会, 小平, 3.23, 2012.

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

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
病因・病態の解明と治療法の開発

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

メダカを用いた筋原線維性ミオパチーの病態解明

研究分担者 大久 敬（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

筋原線維の配列の乱れを主病変とする筋ジストロフィー患者群で認められた遺伝子変異が、実際に病因となっているかを、トランスジェニックメダカを用いて検討した。いくつかのトランスジェニックラインでは、筋原線維配列の乱れや細胞内凝集体の形成など、筋病理変化を伴う個体レベルでの表現型が認められた。トランスジェニックメダカの、変異の病原性の検討、およびそれに続く分子病態の解明、治療法の開発等についての有用性が示された。

A. 研究目的

筋原線維の配列の乱れを主病変とし、既存の診断基準に該当しない患者群の網羅的シーケンス解析から見出された患者特異的遺伝子変化について、その変異型遺伝子を発現するトランスジェニックメダカを作成した。得られたトランスジェニックメダカを用いて、その表現型や病理変化を解析し、患者特異的変異が実際に病因となっているかを検討するとともに、疾患モデルとして活用することによって、分子病態の解明、治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

骨格筋特異的に変異型遺伝子を発現するトランスジェニックメダカの作成にあたり、

メダカにおける骨格筋特異的遺伝子である α -actinのプロモーター領域をメダカゲノムから単離した。このプロモーターの制御下で、EGFP融合型の正常型、変異型それぞれの遺伝子を発現するコンストラクトを作成し、メダカ受精卵にマイクロインジェクションした。EGFPの蛍光を指標に、導入遺伝子陽性の個体をスクリーニングし、それぞれのトランスジェニックラインを確立した。その後、作成されたトランスジェニックラインにおいて、表現型の観察を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて導入タンパク質の生体内での挙動を調べるとともに、各種組織学的な解析を行った。

（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

現在6系統のトランスジェニックラインを作成、確立することに成功し、そのうちのいくつかの系統について、ヒトの病理変化に良く似た表現型が認められている。具体的には、筋線維の委縮を伴う径の大小不同、間質の著明な増加等、筋疾患と同等の組織学的変化が認められた。さらに、これらのメダカでは、体の屈曲、運動能の低下等、個体レベルでの表現型の変化が認められた。

D. 考察

本研究により得られた知見から我々は、いくつかの患者特異的遺伝子変化が、疾患の有力な原因候補であると考えているが、最終的な決断を下すには、トランスジェニ

ック個体の詳細な解析と、患者組織との比較検討が必要である。本研究で得られたトランスジェニックメダカは、分子レベルから個体レベルまでの総合的な疾患研究に資する有用なモデル生物となり得、今後はこれらを用いた分子病態の解明、治療法の開発等を視野に入れている。

E. 結論

筋原線維の配列の乱れを主病変とする筋ジストロフィー患者において見出された多彩な遺伝子の変化が、実際に病因となっているかを検討する上で、多産で、世代時間の短いメダカは、有用な脊椎動物モデルとなり得ることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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候補遺伝子 E について、免疫組織化学法、イムノブロット法、免疫沈降法を用い、疾患との具体的関連についての検討を行った。その結果、3種類の変異体では、いずれも E の結合タンパク質である α アクチニンとの相互作用に変化が認められ、病態との関連が示唆された。

A. 研究目的

筋原線維性ミオパチー (MFM) の原因遺伝子のコードするタンパク質の多くは Z 線関連タンパク質であり、その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解析し、病態との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

変異スクリーニングの結果、Z 線関連タンパク質をコードする新規の疾患原因候補遺伝子 E に変異のある 3 家系が見いだされ

た。この 3 家系の患者骨格筋について、免疫組織化学的、生化学的解析にタンパク質 E の発現を検討した。また、E と結合しうる分子として報告されている α アクチニンとの結合について、免疫沈降法を用いて検討を行った。

(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

新規疾患原因候補遺伝子 *E* のコードするタンパク質はコントロール筋でZ線へ局在することが免疫組織学的に確認された。一方、変異を有する患者骨格筋でもその局在は基本的に保たれていたが、細胞内の凝集体にも *E* の集積が認められた。また同時に *E* との結合が知られている α アクチニンも細胞内凝集体で共局在が認められたため、免疫沈降法を用いた解析を行った。その結果、3家系で見いだされたそれぞれの変異体はいずれも野生型と比較し、 α アクチニンとの結合が増強しているという結果が得られた。

D. 考察

新規疾患関連遺伝子 *E* の変異は、その局在自体には明らかな変化をきたさないが、その結合タンパク質である α アクチニンとの結合が増強している可能性が示唆された。

E. 結論

Z線関連分子 *E* の変異体と病態との関連についての検討を進めた。免疫沈降法で見いだされた変化と筋病理学的変化、さらには病態との関連については、さらなる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Takeshima H, Keduka E, Araki N, Nishino I, Hayashi YK: Real time analysis of sarcolemmal repair mediated by dysferlin and MG53. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.19, 2011.

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

Nebulinファミリーの異常を病因とした筋疾患の分子病理学的解析

研究分担者 高野 和儀 千葉大学大学院 融合科学研究科 助教

研究要旨 アクチン線維は横紋筋に含まれる収縮構造である筋原線維の形成に必要である。私たちは、N-WASP-nebulin 複合体による Z 線での新たなアクチン線維形成の機構を解明し、アクチン線維形成が骨格筋肥大に必要であることを明らかにした。一方、筋原線維構成タンパク質の変異は多くの筋疾患の原因であるが、生理的な筋原線維形成機構の破綻が筋疾患の病因となる可能性は検討の余地がある。そこで、nebulin が原因遺伝子の一つとして知られるネマリンミオパチーについてタンパク質発現解析を行ったところ、30 検体中 5 検体で nebulin の発現の低下が認められた。したがって、ネマリンミオパチーにおいて、筋原線維アクチンの形成にかかわる N-WASP-nebulin 複合体の機能異常が病因となる可能性が示唆された。また、拡張型心筋症の原因である nebulin ファミリーの nebulin も N-WASP と結合してアクチン重合を引き起こした。したがって、心筋においても筋原線維アクチン線維形成異常が病因となる可能性が考えられた。

A. 研究目的

Nebulin はヒトネマリンミオパチーの原因の一つとして知られている。ネマリンミオパチーでは、Z 線の形成不全からネマリン小体と呼ばれる凝集体が形成することから、Z 線の保持に関わるタンパク質の異常が病因と考えられる。私たちは骨格筋の Z 線において N-WASP と nebulin の C 末端領域が結合することを見出している (Takano, et al., *Science* (2010) 330, 1536–1540.) ため、nebulin 複合体が誘導するアクチン線維形成の異常がネマリンミオパチーの病態を誘導する可能性が考えられた。

そこで本研究では、ネマリンミオパチー

において nebulin の発現の低下や nebulin の C 末端領域に欠失の有無を検討することを目的とした。

一方、心臓特異的 nebulin ファミリーである nebulin は拡張型心筋症の原因として知られている。そこで、nebulin が nebulin と同様に N-WASP との結合や筋原線維アクチン線維形成に関与する可能性の検討を目的とした。

B. 研究方法

(1) 筋検体からのタンパク質抽出

ヒトネマリン筋疾患患者の骨格筋は（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所において凍結保存された筋検体を用いた。

クライオスタットにより 10- μ m 厚の筋検体凍結切片を作製し、凍結切片 5 枚当たり 30 μ l の SDS-sample buffer に溶解して即座に、95 $^{\circ}$ C、5 分間処理した。

(2) SDS-PAGE による nebulin の検出

溶出したタンパク質は、2%–6%のグラジエントゲルを用いて Leammli 法の SDS-PAGE により展開した。展開したタンパク質はゲルから PVDF 膜へ電気泳動により転写し、ウサギ抗 nebulin (C-terminus) ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットティングにより nebulin の C 末端領域を検出した。

(3) 免疫蛍光染色による N-WASP 局在解析

N-WASP は nebulin の C-末端領域に結合することで Z 線に局在する。そこで、(1) により作製した凍結切片について、ウサギ抗 N-WASP 抗体を用いた免疫蛍光染色により N-WASP タンパク質をラベルした。また、ネマリン小体はマウス抗 α -actinin 抗体により可視化した。免疫蛍光染色した凍結切片は蛍光顕微鏡により観察を行い、N-WASP の局在を調べた。

(4) Pull-down アッセイによる結合解析

GST-N-WASP(wt, Δ Pro, Pro) はバキュロウイルスにより Sf21 細胞に発現させた。COS-1 細胞に mOrange2-nebulette(wt, Δ SH3)をトランスフェクションにより発現させ、その細胞溶解物に対して、精製した GST-N-WASP を glutathione sepharose 4B と共に混和させた後に非特異的に結合したタンパク質を洗浄した。特異的結合により共沈した nebulette は SDS sample

buffer により GST-N-WASP とともに溶出した。溶出したタンパク質は SDS-PAGE により展開し、抗 DsRed 抗体を用いたウエスタンブロットティングにより、結合した nebulette を検出した。

(5) アクチン重合アッセイ

N-WASP, nebulette はバキュロウイルスにより Sf21 細胞に発現させ、精製した後に GST タグを切断した。精製したタンパク質はピレンラベルされたアクチンとともに重合バッファー (10 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM ATP, and 1 mM DTT) 中に混和し、蛍光分光光度計によりアクチン重合の速度をモニターすることによりアクチン重合活性を解析した。

(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、(独) 国立精神・神経医療研究センターの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

NebulinのC-末端領域を認識する抗体によるイムノプロットングにより、30例のネマリン筋疾患患者の筋検体において、nebulinのC末端領域が欠損している患者は存在しなかった。しかし、nebulinの発現量の低下が5例において確認された。

免疫蛍光染色の結果より、N-WASPはZ線に局在するものの、 α -actininの凝集体として観察されるネマリン小体への局在化はみられなかった。

また、Pull-downアッセイの結果により、N-WASP(wt, Pro)はnebuletteと結合したが、N-WASP(Δ Pro)は結合しなかった。一方、nebulette(Δ SH3)はN-WASPと結合しなかったことから、両者の結合様式はN-WASPとnebulinの結合と同様に、N-WASPのPro-rich領域とnebuletteのSH3ドメインの結合であった。

さらに、アクチン重合アッセイの結果より、nebuletteのアクチン重合活性をN-WASPが促進することが明らかになった。

D. 考察

これまで、nebulin遺伝子の変異によるネマリン筋疾患の例が多数明らかにされており、そのほとんどがC-末端領域の欠失を伴うことが明らかにされていた (Carina Wallgren-Pettersson, et al., *Brain* (2007)

130, 1465–1476.)。しかし、この解析に用いた検体はフィンランド家系のものであり、民族間の遺伝的背景が特定の遺伝子変異に関わる可能性は否定できない。実際に、本研究で用いたネマリンミオパチー検体では、nebulinタンパク質の多少の減少は確認されたものの、nebulinのC-末端領域に結合するN-WASPは正常組織と同様にZ線に局在した。したがって今回の解析により、少なくとも我が国においては、ネマリンミオパチーの病因としてC-末端が欠損するタイプのnebulin遺伝子変異頻度は低いことが考えられる。一方、フィンランド家系においては欠失を伴わないnebulin遺伝子変異も同様にネマリン筋疾患患者で見ついていることから、nebulinタンパク質の安定性が損なわれた可能性が考えられる。本研究では、ネマリン筋疾患の患者でnebulinの発現量が低下している例を見出したことから、部分的にN-WASP–nebulin複合体によるアクチン線維形成を攪乱しているのかもしれない。今後、ネマリンミオパチーの遺伝情報がゲノム規模で解明されることにより、我が国におけるネマリンミオパチー患者のnebulin遺伝子の変異やその頻度と発症機構とがリンクすると期待される。

さらに、拡張型心筋症の原因となっているnebuletteは、本研究によりN-WASPと結合して心筋のアクチン線維形成に関与していることが示された。この結果から、筋原線維形成におけるN-WASPとnebulinファミリータンパク質の普遍的な役割を推察

することができる。さらに本研究により、筋原線維アクチン線維の形成異常は骨格筋だけでなく、心筋においても筋疾患の病因となり得ると予想される。拡張型心筋症は収縮能の低下によりもたらされることから、筋原線維形成の異常が引き金になっている可能性は検討の余地がある。したがって、筋原線維アクチン線維形成の詳細な分子機構の解明や、その機構の異常と筋疾患との関係は今後も重要な検討課題であるといえる。

E. 結論

(a) 我が国におけるネマリンミオパチーの30症例において、nebulinのC-末端の欠損は検出されなかった。

(b) ネマリンミオパチー患者のうち、5例については、nebulinの発現が低下していたことから、nebulin-N-WASP複合体によるアクチン線維形成の異常がその病態に与える可能性が考えられた。

(c) N-WASPとnebulinが結合してアクチン重合に関わることから、拡張型心肥大は、筋原線維アクチン線維の形成異常が病因となる可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Senju Y, Itoh Y, Takano K, Hamada S, Suetsugu S: Essential roles of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *J. Cell Sci* 124: 2032–2040, 2011. DOI: 10.1242/jcs.08626

高野和儀, 渡邊-高野晴子, 遠藤剛: Nebulin と N-WASP の複合体が IGF-1 による筋原線維のアクチン線維形成を担う. 実験医学. 29: 1273–1276, 2011.

2. 学会発表

高野和儀, 竹縄忠臣, 遠藤剛: Nebulette と N-WASP は心筋筋原線維のアクチン線維形成にかかわっている. 第 63 回日本細胞生物学会大会, 北海道大学, 6.28, 2011.

遠藤剛, 高野和儀: 筋収縮と筋再生・筋肥大を担う筋原線維のアクチン線維形成機構. 第 84 回日本生化学会大会, 京都国際会館, 9.21, 2011.

高野和儀, 渡邊-高野晴子, 竹縄忠臣, 遠藤剛: 骨格筋と心筋におけるアクチン重合核形成と伸長の分子機構. 第 84 回日本生化学会大会, 京都国際会館, 9.23, 2011.

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