

「筋強直性ジストロフィー新規治療法の開発」

分担研究者： 大野 欽司 名古屋大学大学院医学系研究科 神経遺伝情報学 教授

研究要旨：筋強直性ジストロフィーにおいては RNA 結合タンパク MBNL1 が *DMPK* 遺伝子 3' UTR の異常延長をした CUG 繰り返し配列に結合し MBNL1 の核内への異常蓄積ならびに機能低下が起きると同時に詳細な機構は不明であるが、RNA 結合タンパク CUGBP1 が過剰にリン酸化し CUGBP1 が安定化する。本研究では CUGBP1 と firefly luciferase cDNA の fusion gene を作成し、この fusion gene を不安定化させる薬剤を Prestwick Chemicals 社の 1200 種類の既認可薬パネルから同定を試みた。スクリーニングにて複数の有効な薬剤を同定し、現在、薬剤効果の濃度依存性を調べると同時に、内因性 CUGBP1 を不安定化させる効果の検証を行っている。さらに今後モデルマウスにおける効果を検証する。

A. 研究目的

本研究の目的は筋強直性ジストロフィーの新規治療薬の開発を行うことである。

筋強直性ジストロフィーは成人の筋ジストロフィーでは最も頻度が高い疾患であるが、生活習慣病やがんと比べると患者数が少なく、製薬メーカーが一製品1000億円と見積もられる投資を筋強直性ジストロフィーに対して行うことは期待をできない。別の疾患に広く用いられている薬剤を全く異なる病態の他の疾患に用いる手法(drug repositioning strategy)が2002年NINDSにより神経変性疾患治療薬を同定する手法として提唱をされ、2008年からは幅広い疾患を対象としたDrug Repositioning Summitが開催をされている。既存薬はヒトに対する至適投与量・代謝・副作用が判明しているために培養細胞・モデル動物を用いるベンチトップの研究の迅速な臨床応用が可能であることを特徴としており、利益を追求する必要がない大学研究室が希少疾患に対して新規治療薬を開発をすることを可能にしている。分担研究者は、骨格筋の異所性骨化により死に至る進行性骨化性繊維異形成症(fibrodysplasia ossificans progressiva)に対して高血圧治

療に用いられるカルシウムチャンネルブロッカー-perhexiline maleateが培養細胞ならびにモデルマウスに有効であることを見出し、患者からの要望に応じて、倫理ガイドラインに則り、探索的なオープンラベル治験を開始している。本研究も同様に筋強直性ジストロフィーに対して有効なオフラベル薬を同定し治療につなげることを目的とする。

B. 研究方法

筋強直性ジストロフィーにおいては RNA 結合タンパク MBNL1 が *DMPK* 遺伝子 3' UTR の異常延長をした CUG 繰り返し配列に結合し MBNL1 の核内への異常蓄積ならびに機能低下が起きる。詳細な機構は不明であるが同時に RNA 結合タンパク CUGBP1 の過剰なリン酸化により CUGBP1 が安定化する。一般に未分化な細胞においては CUGBP1 が機能をし、分化をした細胞では MBNL1 が機能をする。mRNA スプライシングにおいては MBNL1 と CUGBP1 は拮抗的に作用することが知られており、これら RNA 結合タンパクの標的 mRNA のスプライシングが未分化細胞のパターンになることが筋強

直性ジストロフィーの原因であることが知られてきた。さらに分担研究者は、RNA 結合タンパクの標的を網羅的に同定をする high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation (HITS-CLIP) 法を用いて MBNL1 と CUGBP1 の解析を行い、MBNL1 と CUGBP1 はスプライシング調節を行うのと同時に標的 mRNA の 3' UTR に結合し標的 mRNA を不安定化させていることを報告した(論文業績 1)。

本研究では、リン酸化をされ過剰に安定化をした CUGBP1 を不安定化する薬剤を Prestwick Chemicals 社の 1200 種類の既認可薬パネルから同定を試みた。Prestwick Chemicals 社のパネルは各種疾患に対して世界中で認可をされ臨床に用いられている薬剤から構成をされている。

(倫理面への配慮)

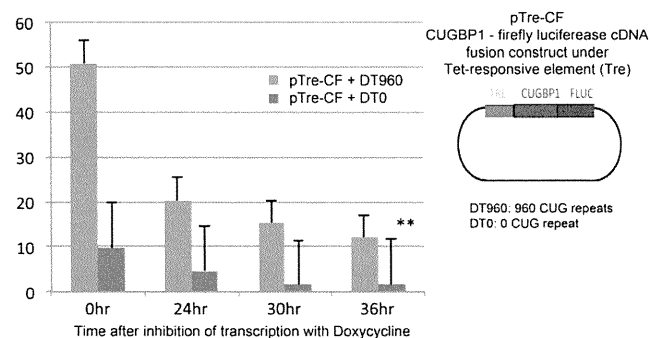
患者サンプルを用いる研究を行っていない。

C. 研究結果

Doxycycline 感受性因子 Tre 下流に CUGBP1 と firefly luciferase cDNA の fusion gene を挿入したプラスミド pTre-CF を作成した(図)。pTre-CF を、960 回 CUG 繰り返し配列を持つプラスミド DT960、または、DT960 から異常延長繰り返し配列を除去した DT0 と同時に未分化 C2C12 細胞に FuGene6 を用いて導入した。24 時間培養後 Doxycycline を付加し転写を止め CUGBP1 と firefly luciferase cDNA の fusion 遺伝子発現量を firefly luciferase の活性を測定することにより時系列を追って測定をした。その結果、DT960 は定常状態において fusion gene product の発現量を上昇させていた。さらに、Doxycycline にて転写を止めた後の時系列解析では、DT960 は CUGBP1 の安定化させていることが示された(図)。

現在、1200 種類の Prestwick Chemicals 社既認可薬パネルを用いて薬剤スクリーニングを開始し、CUGBP1 を不安定化させるいくつかの薬剤を同定しており、さらに薬剤濃度依存性

を調べるとともに内因性 CUGBP1 の薬剤濃度依存的な不安定化の可否を調べている。



D. 考察

CUGBP1 と firefly luciferase cDNA の fusion gene の予期せぬ不安定性のために実験系のセットアップに時間を費やしたが CUG 繰り返し配列の正常コントロールとして DT0 を導入することにより正確なアッセイ系を組むことが可能となった。スクリーニングにて同定をした薬剤の培養細胞に対する効果の検証を進めると同時に異常延長した CUG 繰り返し配列をもつトランスジェニックマウスに対する効果の検証を今後行いたい。

E. 結論

既認可薬は副作用・至適投与量が知られており、ベンチトップの成果の臨床応用に結びつけることが容易であることが期待をされ、筋強直性ジストロフィーの新規治療薬の臨床への導入に結び付けたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表:

Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K: CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. Scientific Reports in press.

- Yoshinaga H, Sakoda S, Good JM, Takahashi MP, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K, Kitamura T, Kobayashi K, Ohtsuka Y. A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J Neurol Sci* in press.
- Matsuura T, Minami N, Arahata H, Ohno K, Abe K, Hayashi YK, Nishino I. Myotonic dystrophy type 2 (DM2) is rare in the Japanese population. *J Hum Genet* in press.
- Selcen D, Juel VC, Hobson-Webb LD, Smith EC, Stickler DE, Bite AV, Ohno K, Engel AG.: Myasthenic syndrome caused by plectinopathy. *Neurology* 2011, 76: 327-336.
- Hirayama M, Nakamura T, Watanabe H, Uchida K, Hama T, Hara T, Niimi Y, Ito M, Ohno K, Sobue G.: Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine correlate with hallucinations rather than motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011, 17: 46-49.
- Fu Y, Masuda A, Ito M, Shinmi J, Ohno K.: AG-dependent 3'-splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon. *Nucleic Acids Research* 2011, 39: 4396-4404.
- Itoh T, Hamada N, Terazawa R, Ito M, Ohno K, Ichihara M, Nozawa Y, Ito M.: Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon gamma-induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 411:143-149.
- Ito M, Ibi T, Sahashi K, Ichihara M, Ito M, Ohno K.: Open-label trial and randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of hydrogen-enriched water for mitochondrial and inflammatory myopathies. *Medical Gas Research* 2011, 1:24.
- Kaneko H, Kitoh H, Matsuura T, Masuda A, Ito M, Mottes M, Rauch F, Ishiguro N, Ohno K.: Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in *GPATCH8*. *Hum Genet* 2011, 130:671-683.
- Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Nishida H, Mabuchi N, Engel AG, Ohno K.: Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 2011, 77:1819-1826.
- Engel AG, Shen X-M, Ohno K, and Sine SM. Congenital myasthenic syndromes. *Myasthenia gravis and myasthenic disorders* 2nd ed. Ed. by Engel AG. Oxford University Press, New York, in press.
- Ohno K, Ito M, and Engel AG.: Congenital Myasthenic Syndromes – Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction – Myopathy. InTech, Rijeka, in press.
- Ohno K, Masuda A.: RNA pathologies in neurological disorders. *Neurochemical Mechanisms in Disease, Advances in Neurobiology*. Ed by Abel Lajtha. Springer, New York, 2011, pp399-415.
- Ohta S, Nakao A, and Ohno K.: The 2011 Medical Molecular Hydrogen Symposium: An Inaugural Symposium of the Journal Medical Gas Research. *Medical Gas Research* 2011, 1:10.

Ohno K, Engel AG.: Chapter 8: Molecular defects of acetylcholine receptor subunits in congenital myasthenic syndromes. Pharmacology of Nicotinic Acetylcholine Receptors from the Basic and Therapeutic Perspectives. Ed. By Hugo R. Arias. Research Signpost, Kerala, 2011, pp175-186.

2. 学会発表：
一般演題

Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K. Protein-anchoring therapy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. 4th International Congress of Myology, Lille, France. May 9, 2011.

Masuda A, Ito M, Fujita Y, Ohno K. Genome-wide analysis of RNA-binding sites of HuR. 16th Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japan. Jun 14-18, 2011

Ishihara N, Azuma Y, Yanagihara K, Yokoi S, Nakata T, Aso K, Ohno K, Natsume J. Glut1 deficiency syndrome with a SLC2A1 splice site mutation and normal erythrocyte glucose uptake.

12th International congress of human genetics, Montreal, Canada. Oct 11-15, 2011.

Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Hishida H, Mabuchi N, Engel AG, Ohno K. Anti-MuSK antibodies in myasthenia gravis block binding of collagen Q to MuSK expressed at the neuromuscular junction. 41st Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC, USA. Nov 15, 2011.

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：

発明者：大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、三島健一、発明等の名称：「骨形成促進剤及びその用途」、特願 2011-185306 号)、出願年月日：2011年8月26日、出願人：国立大学法人名古屋大学、特許事務所番号：NU11005

2. 実用新案登録：

なし

3. その他：

なし

「イオンチャンネルと神経細胞のオートファジー制御機構」

分担研究者： 荒木 敏之（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 部長

研究要旨：イオンチャンネルの点変異などの遺伝変異に基づく機能異常が神経・筋細胞の機能不全や細胞死をきたすメカニズムは未だ十分に解明されていない。我々は、細胞膜・細胞内膜系に存在する Na/H 交換機構に着目し、このメカニズムが細胞のオートファジー活性化と細胞内異常蛋白蓄積の制御に関与する可能性を示した。神経系においてはオートファジー不全マウスが神経変性様症状を示すことがわかっており、このようなイオンチャンネルの機能変化と細胞機能とをつなぐメカニズムとして注目される。

A.研究目的

1) オートファジーとはユビキチン-プロテアソーム系と並ぶ細胞内大規模分解系であり、酵母から哺乳類まで広く保存された機構である。近年、分子生物学的手法により、多くの関連遺伝子群 (Atg 遺伝子群) が明らかにされている (Ohsumi, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2001; Xie and Klionsky, *Nat Cell Biol.*, 2007)。これらの遺伝子改変動物を用いた解析から Atg5、Atg7 はオートファジーの誘導過程に必須の遺伝子であることが報告されている (Kuma *et al.*, *Nature*, 2004; Komatsu *et al.*, *J Cell Biol.*, 2005)。特に、神経特異的なオートファジーの不全は神経変性疾患様の徴候を示すことから神経変性疾患治療の標的として注目を集めている (Hara *et al.*, *Nature*, 2006; Komatsu *et al.*, *Nature*, 2006; Rubinsztein *et al.*, *Nat Rev Drug Discov.*, 2007)。更に、オートファジー不全により起こるユビキチン陽性封入体形成に関与する p62/SQSTM1 との関連も徐々に明らかにされている (Bjørkøy *et al.*, *J Cell Biol.*, 2005; Komatsu *et al.*, *Cell*, 2007)。多くの神経変性疾患では神経細胞内に異常蛋白の凝集体が起こることが知られているが、神経毒性はこれらの凝集体ではなく、凝集する前段階のオリゴマー

が毒性を発揮すると考えられている (Taylor *et al.*, *Hum Mol Genet.*, 2003; Sánchez *et al.*, *Nature*, 2003)。細胞内凝集体の一種であるアグリソームの形成にはヒストン脱アセチル化酵素 HDAC6 が重要な役割を果たすことが報告されている (Kawaguchi *et al.*, *Cell*, 2003)。HDAC6 は酵素活性領域のほかにユビキチンおよび微小管のそれぞれと結合する領域を持ち、ユビキチン化蛋白を微小管形成中心に集める機能を有することから、こうして凝集した異常蛋白はオートファジーによって分解されることが示唆されていた。実際、ハンチントン舞踏病や脊髄球筋萎縮症といったポリグルタミン病モデルにおいて HDAC6 はオートファジーを増強して症状を改善しうることが示された (Iwata *et al.*, *J Biol Chem*, 2005; Pandey *et al.*, *Nature*, 2007)。また、オートファジーの調節因子の一つとして知られる mTOR を抑制することで誘導されるオートファジーがハンチントン舞踏病モデルにおいて凝集体の形成と細胞毒性を有意に低減することも報告されている (Ravikumar *et al.*, *Nat Genet.*, 2004)。しかし、神経系では飢餓状態においてもオートファゴソーム形成の指標である GFP-LC3 のドットは光学顕微鏡ではほとんど観察するこ

とができない(Mizushima *et al.*, *Mol Cell Biol.*, 2004)。これらのことから絶食などの飢餓状態によらないオートファジーの誘導機構を見出すことはこれらの細胞内異常蛋白凝集を特徴とする難治性の神経変性疾患に新たな治療法を開発の道を拓く可能性がある。

本研究では、我々は神経細胞様に形態分化する培養細胞を用い、培養環境の変化によるオートファジー誘導の網羅的検討により、オートファジー誘導のメカニズムに関する検討、並びにその生理的・病理的意義に関する検討をおこなった。また、さらに、オートファジー制御における重要な機能が推定されたNHE 5に関してKOマウスを用いた解析を行った。

2) 近年、ヒトにおいても人工多能性幹細胞(iPS細胞)を作成し、治療応用や病因・病態研究に利用する試みが行われている。培養下での幹細胞から骨格筋への効率的な誘導法は、ヒトにおいては必ずしも確立していないが、先天性疾患に関する研究手法としては、iPS細胞技術は特に有用である可能性がある。

本研究では、研究期間最終年度において、筋強直性ジストロフィー患者検体からのiPS細胞誘導ならびに筋分化を行う研究を開始した。

B.研究方法

1. 神経系でのNHEの役割を明らかにするため、マウス神経芽細胞腫由来Neuro-2a細胞に各NHEとポリグルタミン蛋白の一種HttEx1-Q97-mCherryを共発現させ、異常タンパク質の細胞内凝集がNHEの強制発現により抑制されるかどうかを確認した。

NHE5の遺伝子欠損マウスを導入(random insertion)によって得られたマウスを外部業者から導入)し、基本的なフェノタイプの解析を行うとともに、ポリグルタミン過剰発現モデルマウスとの交配を行い、脳組織中におけるNHE5機能欠損によるポリグルタミン凝集物蓄積に

対する影響の評価を行った。

2. iPS細胞技術を用いた筋チャンネル病研究を目的とし、ウイルスベクターを用いていわゆる山中4因子を患者検体由来培養線維芽細胞に導入することによって、iPS細胞誘導を行った。

(倫理面への配慮)

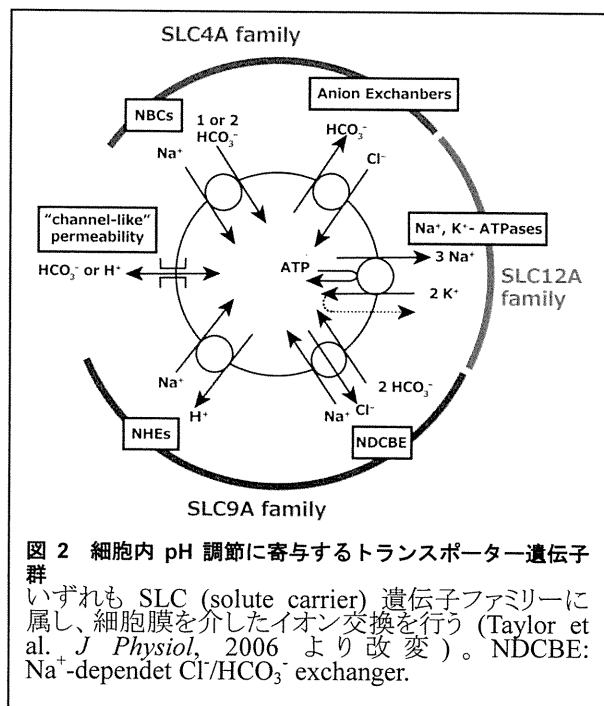
本研究で行う動物実験および遺伝子組み換え実験は関係法令および指針に基づき、実施場所である国立精神・神経医療研究センター神経研究所の定める「小型実験動物倫理指針」、「小型実験動物研究施設の運営に関する規則」および「組み換えDNA実験安全規則」、「組み換えDNA実験内部規則」に従って行った。

患者検体を用いる実験は、国立精神・神経医療研究センター、ならびに共同研究先研究機関の倫理委員会の承認の元に、提供者の許諾を得て行った。

C.研究結果

1. EGFP-LC3を安定に発現するNeuro2a細胞株(EGFP-LC3/N2a)では、単純な血清・アミノ酸除去ではオートファジーが誘導されなかった。そこで様々な細胞外液(Krebs-Ringer液、Hanks液、Earl液、PBS、電気生理学用細胞外液ほか)を比較したところ、Krebs-Ringer液で最も強くオートファジーが誘導されることを見出した。また、電気生理学等で用いられるイオン置換法を用いて検討したところ、この細胞ではオートファジーの誘導に細胞外 Na^+ と HCO_3^- および Ca^{2+} が存在することが非常に重要であること、細胞外 Ca^{2+} 濃度がオートファジーの度合いを調節していることを発見した。更に、細胞外pHの低下すなわち酸性化がオートファジーを抑制することを見出した。対照的に細胞外pHの上昇は血清を含有する培地中でもオートファゴソーム形成を誘導することが確認された。

哺乳動物において細胞内外の pH を調節する分子機構には大きく分けて Na^+/H^+ 交換担体(NHE)と、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送担体(NBC)が挙げられる(一部プロトンチャネルやプロトンポンプも関与している(図1))(Chesler, *Physiol Rev*, 2003; Taylor *et al.*, *J Physiol*, 2006)。EGFP-LC3 を安定発現する PS120 細胞 (NHE 欠損細胞株) を用



い、血清・アミノ酸除去及び細胞外 pH 依存的なオートファジー誘導条件で培養したところ、Neuro2A 細胞で観察されたオートファジー誘導は認められなかった。さらに、この細胞にの細胞に NHE1 または NHE5 をそれぞれ強制発現させると細胞外環境による刺激なしにオートファゴソームが形成されることが確認された。このことは、細胞外 pH 変化に伴うオートファジーの制御に NHE1 または NHE5 あるいはその両方が関与していることを示唆しているものと考えられた。

(図2) 実際、NHE1 は全身ほぼすべての細胞に発現し、主要な細胞内 pH の制御に関わると考えられているが、組織特異的に発現する他の NHE 分子と共在することも知られている (Masereel *et al.*, *Eur J Med Chem.*, 2003)。そこで、

NHE の属する SLC9A ファミリーの遺伝子発現を RT-PCR 法により検証したところ、EGFP-LC3/N2a 細胞には細胞膜に存在する分子としては NHE1 と NHE5 が発現することが確認された。

2. マウス神経芽細胞腫由来 Neuro-2a 細胞に各 NHE とポリグルタミン蛋白の一種 HttEx1-Q97-mCherry を共発現させ、異常タンパク質の細胞内凝集が NHE の強制発現により抑制されるかどうかを確認したところ、NHE の過剰発現によって培養細胞におけるポリグルタミン凝集阻害が観察された。中でも、細胞膜型 NHE である NHE1 および NHE5 はポリグルタミンの凝集を有意に抑制した。

NHE5 ノックアウトマウスは、発生・成長において明確な異常を認めなかった。ポリグルタミン蛋白過剰発現モデルマウスとの交配においては、このモデルマウスの大脳皮質、海馬において、通常ポリグルタミン蛋白凝集を認めない生後9週令においてポリグルタミン凝集を認め、オートファジー活性化も観察された。これらことから、培養細胞において観察された NHE5 の機能は生体内の機能を反映しているものであると考えられた。

3. 共同研究先研究機関で採取された筋強直性ジストロフィ患者由来の皮膚組織細胞検体(2例)を培養し、線維芽細胞を分離した。幹細胞誘導のための4因子(Sox2, Oct3/4, Klf4, Myc)は、センダイウイルスベクターによって線維芽細胞に導入した。導入後4週間の段階で、出現したコロニーをピックアップし、凍結保存するとともに、一部のコロニーについて多能性を検討した。(図2) TRA1-60, Nanog などの幹細胞マーカーの発現を確認することができた。今後、得られた細胞の多能性を検討し、筋分化を試みる予定である。

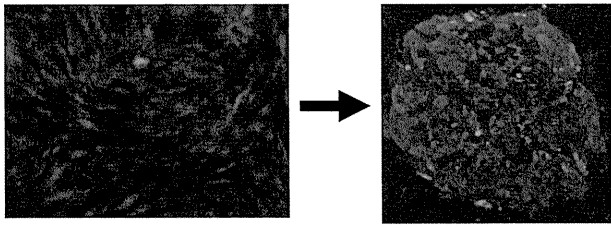


図2 線維芽細胞からiPS細胞へ

(左側) 患者検体から培養した線維芽細胞にセントラダイウイルスベクターを用いて4因子(Sox2, Oct3/4, Klf4, Myc)導入を行った際に、導入効率確認のためのコントロールとしてGFPを発現させた細胞。

(右側) 4因子導入から4週間後のコロニーにおけるTRA1-60(未分化細胞マーカー)の発現をImmunocytochemistryにより確認したもの。

D. 考察

これまでオートファジー研究の発展は電子顕微鏡を用いた形態学に始まり、分子生物学・生化学的手法を用いてその遺伝子群の同定及び機能の解明がなされてきた。また、オートファジーは飢餓状態で誘導されることから代謝・内分泌学的な見地からの考察が先行している。しかし、オートファジーに関与する多くの遺伝子群が明らかにされる中で、神経系や心筋といった興奮性細胞のその特徴たるイオン輸送およびこれに伴う細胞膜の興奮がオートファジーと関連するか否かについて吟味された研究はほとんどない。一部の研究では細胞外カルシウムイオンやナトリウムイオンの細胞内への生理的・病理的流入によるオートファジーの誘導を示唆する報告がなされ始めているものの細胞膜を介したイオン輸送の分子機構に踏み込んだ報告はほぼ皆無である。

オートファジーに関与する遺伝子群が明らかにされる以前、浸透圧や細胞内 Ca^{2+} といった生理学的な研究も一部行われたが(Margrete *et al.*, *Eur J Biochem.*, 1995)、それらが単離されたオートファジー関連分子とどのように関係するかは不明なままである。このような背景

にあつて、 Ca^{2+} を含む他のイオン輸送機構とオートファジーの関連は現在のところ明らかにされていない。神経細胞と非神経細胞におけるオートファジーの分子機構の違いを明らかにすることは、その生理的役割と多くの神経変性疾患に対する治療法開発の基盤の礎を構築するうえで非常に重要であると考えている。

Na^+/H^+ 交換機構の分子メカニズムは強制発現系を用いた解析から個々のトランスポーターとしての機能は解析されているものの、個体レベルにおける役割は不明な点が多い。特に、膵外分泌細胞や腸管などの消化器系や腎臓に優位に発現するNHEでは各種欠損動物が作成されその機能の解明が進んでいるものの、全身に分布するNHE1や中枢神経系に発現が制限されているNHE5に関してはほとんど明らかにされていない。今後、さらに、生体内における機能を中心に、NHEの機能に関する検討を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表:

Araki T, Nagano S, Tateno M, Kaido M, Ogata K, Arima K. Misfolded SOD1 forms high-density molecular complexes with synaptic molecules in mutant SOD1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis cases. *J Neurol Sci.* in press (2012)

2. 学会発表:

シンポジウム講演

荒木敏之

NAD代謝とミトコンドリアの機能改変による神経保護的疾患治療の可能性

2011年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ シナプス病態若手シンポジウム, 神戸,

8.23, 2011

荒木敏之, 徳永慎治

ミトコンドリアの機能改変による神経保護的疾患治療の可能性

第 84 回日本生化学会大会, 京都, 9.24, 2011

一般演題

長野清一, 荒木敏之, 舘野美成子, 階堂三砂子, 尾方克久, 有馬邦正

FALS 患者検体から示唆される変異型 SOD1 毒性:シナプス構造緻密化の可能性

第 56 回日本人類遺伝学会, 千葉, 11.10, 2011

齋藤文典, 荒木敏之

代謝型グルタミン酸受容体を介したシュワン細胞の増殖・分化制御機構,

第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.13, 2011

若月修二, 齋藤文典, 荒木敏之

神経系におけるユビキチンリガーゼ ZNRF1 の機能解析

第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.13, 2011

高田仁実, 荒木敏之

Overexpression of Sirt1 inhibits STZ-induced

skeletalmuscle atrophy.

第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.14, 2011

富樫和也, 荒木敏之

Na⁺/H⁺交換輸送体によるオートファジーの調節

第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.15, 2011

Tokunaga S, Araki T.

Wallerian degeneration slow mouse neurons are protected against cell death caused by mechanisms involving mitochondrial electron transport dysfunction.

第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.16, 2011

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

「筋強直性ジストロフィー簡易スクリーニング法作成に関する研究」

分担研究者：松村 剛（独）国立病院機構刀根山病院 神経内科医長

研究要旨：筋強直性ジストロフィーは多彩な合併症を有するため、最初に眼科、産婦人科、循環器科など様々な科を受診する場合がある。平成 21 年度のアンケート調査では周産期・周術期等のトラブルにより発見された事例もあり、非専門科が本症の存在に気づくための簡易スクリーニング法の開発が重要と考えられた。平成 22 年度、本症の特徴的症状に基づくスクリーニング法の素案を作成し、本年度は研修医にスクリーニング法を使用してもらい有用性の検討を行った。

A.研究目的

われわれは、昨年度神経内科・小児神経科以外での筋強直性ジストロフィーの診断能力を向上させるため、本症の特徴的症状・所見による簡易スクリーニング法を作成した。この有用性を評価するため、研修医に本スクリーニングを用いた診察・問診を行ってもらい、有用性を検討した。

B.研究方法

本症患者向けの講演会を実施し、参加した患者、関係者に本研究の主旨を説明し協力を依頼、同意を得た患者 7 名(男 3/女 4 名)、健常者 6 名(男 2 名/女 4 名)、他疾患患者(顔面肩甲上腕型)1 名(男)に対し、神経内科専門医 2 名、初期研修医 8 名が、スクリーニング法を用い理学所見項目(18 項目)の診察を行った。問診項目(13 項目)については、被検者によるセルフ記入とした。

C.研究結果

患者の平均年齢は 43.0±9.1 歳で、重症度は muscular disability rating scale in myotonic dystrophy で 1(筋障害無し)が 1 名、2(最小限の他覚症状)が 1 名、3(遠位筋筋力低下)が 3 名、4(軽度・中等度近位筋筋力低下)が 2 名であった。対

照者の平均年齢は 44.0±11.0 歳であった。

診察所見では、専門医では全 18 項目が特異度 0.9 以上であったが、感度も 0.7 以上の項目は「斧様顔貌」「鼻咽頭閉鎖不全」「手指筋力低下」「把握ミオトニア」「叩打ミオトニア」の 5 つであった。一方、研修医においては、特異度は全項目が 0.8 以上と高かったものの、感度は全て 0.7 未満であった。筋症状がない(重症度 1)の 1 例を除いても感度が 0.7 以上に達したのは「手指筋力低下」「把握ミオトニア」「下垂足」の 3 項目であった。専門医と研修医で感度に 0.25 以上の差が見られたものに「禿頭」「高口蓋」「鼻咽頭閉鎖不全」「頸部筋力低下」「叩打ミオトニア」「体幹筋力低下」の 6 項目があった。

問診項目では全 21 項目中特異度が 0.8 以上のものが 13 項目で、さらに感度が 0.7 以上あった項目は「口笛が吹けない」「強く力を入れると筋肉がこわばることがある」の 2 項目であった。

「口笛が吹けない」、「強く力を入れると筋肉がこわばる」、「つま先が上がりにくい、段差に躓きやすい」、「50 歳以下で白内障に罹患」、「筋肉の病気や運動能力に障害のある血縁者がいる」の 5 項目が 3 つ以上当てはまる場合の感度・特異度はそれぞれ 0.71 と 1.0 で、2 項目以上当てはまる場合の感度・特異度は 1.0 と 0.85 であった

(他疾患患者を除いた場合は感度・特異度共に1.0)。

D. 考察

今回調査に協力いただいた患者は、軽症例が多かった(1例は筋症状なし)ため、各項目の感度は問診・理学所見ともに全体に低かった。

本症を熟知した専門医では理学所見の特異度は高かったが、感度0.7以上の項目は5項目のみであった。研修医では特異度は比較的高かったものの、感度が0.7以上の項目は無く、日常診療の多忙さを考えても、スクリーニングとして理学所見を用いることは困難と思われた。

一方、問診所見は項目により感度・特異度にばらつきが見られたが、「口笛が吹けない」、「手を握ると開きにくい」の2項目は両者共に高値を示した。これに「つま先が上がりにくい、段差に躓きやすい」、「50歳以下で白内障に罹患」、「筋肉の病気や運動能力に障害のある血縁者がいる」を加えた場合、健常者には2項目該当者はなく、本症患者は全員2項目以上該当していた。

実用性を考慮すると、この5項目を基に事故記入式問診票を作成し、1項目以上該当者は診察・検査による確認、2項目以上該当者は専門医紹介を勧めることが望ましいと思われた。

今後、簡易問診票の有効性を多数例で評価する予定である。

E. 結論

本症の特徴的症状・所見による簡易スクリーニング法を作成し、研修医による問診・診察で有用性を検討した。

5項目程度のセルフチェック式問診票でスクリーニングが行える可能性が示された。今回の検討症例が少数であるため、症例数を増やして有効性を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

松村剛、木村卓、穀内洋介、久保田智哉、高橋正紀、佐古田三郎 大阪府下筋強直性ジストロフィー患者の受療動向調査 *臨床神経学* 51: 677-682, 2011

2. 学会発表：

なし

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

「筋強直性ジストロフィーにおける心電図異常」

分担研究者：尾方 克久 国立病院機構東埼玉病院 臨床研究部長

研究要旨：筋強直性ジストロフィー（MyD）の心電図異常所見の頻度を明らかにするため、病歴に保存された12誘導心電図の所見を後方視的に調査した。心ペースメーカを挿入されていないMyD患者57人の心電図記録321枚が得られた。記録のすべてが正常心電図であった患者は8人（14%）、伝導障害があった患者が27人（47%）、軸・移行帯異常の記録があった患者は35人（61%）であった。経時的な心電図所見の変化を今後検討する必要がある。

A.研究目的

筋強直性ジストロフィー（MyD）はミオトニア、筋萎縮、不整脈、白内障、糖尿病、禿頭といった多彩な症候を呈する遺伝性疾患である。

DMPK 遺伝子の3'UTRに存在するCTG反復配列が患者では異常に長く、様々な遺伝子の転写調節に異常をきたし多彩な症候を呈すると考えられている。

MyDでは12誘導心電図における異常所見を高率に認める。またMyDには突然死が多いとされ、不整脈等の心原性の要因が少なからぬ部分を占めると想定されている。

不整脈を検出するために、24時間ホルター心電図やヒス束心電図、心カテーテル検査による心臓電気生理学的検査等が実施されるが、患者侵襲が強かったり機器が高価であったりといった理由で、いずれも日常の病状評価のために定期的には実施するには困難が伴う。

外来診療でMyDの不整脈を評価するために一般に実施されるのは12誘導心電図検査である。これまでに記録されたMyD患者の12誘導心電図における異常所見の頻度と傾向を後方視

的に分析し、MyDの日常診療において留意すべき点を抽出した。

B.研究方法

国立病院機構東埼玉病院を平成22年1～12月に外来受診したMyD患者の病歴に保存された心電図を調査対象とし、当院内で診療録より臨床情報および心電図所見を抽出して集計し解析した。

（倫理面への配慮）

当研究は疫学研究に関する倫理指針を遵守し、国立病院機構東埼玉病院倫理委員会の承認（課題番号11-44）に基づき実施した。

C.研究結果

筋強直性ジストロフィー患者57人（男性36人、女性21人）の、321枚の心電図記録が得られた。心電図記録時における年齢は平均 41.4 ± 10.3 歳、罹病期間（初発症状の発症から当該心電図記録までの期間）は平均 18.0 ± 11.2 年であった。心ペースメーカを挿入された患者はいなかった。心電図が記録された期間に、心不全

ないし不整脈に対する治療を受けた患者はいなかった。

記録のすべてが正常心電図であった患者は 8 人 (14%)、逆にすべての記録に何らかの心電図所見があった患者が 25 人 (44%) であった。

何らかの伝導障害の記録があった患者は 27 人 (47%) であった。記録があった伝導障害の所見として、PR 延長 16 人、心室内ブロック 12 人、I 度房室ブロック 6 人、完全右脚ブロック 5 人、左脚前枝ブロック 5 人、完全左脚ブロック 2 人、Wenckebach 型 II 度房室ブロック 1 人、完全房室ブロック 1 人、洞房ブロック 1 人であった。

何らかの軸・移行帯異常の記録があった患者は 35 人 (61%) であった。記録があった軸・移行帯異常の所見として、反時計回転 18 人、時計回転 9 人、左軸偏位 12 人、右軸偏位 6 人であった。

他に、心室性期外収縮 8 人、異常 Q 波 2 人、ST-T 変化 2 人、上室性二段脈 1 人の記録があった。

Groh ら (2008) が重篤な心電図異常とした、PR 間隔 \geq 0.24 秒もしくは QRS 間隔 \geq 0.12 秒もしくは 2 度ないし完全房室ブロックのいずれかがあった患者は 28 人 (49%) であった。内訳は、QRS 間隔 \geq 0.12 秒のみ 17 人、PR 間隔 \geq 0.24 秒かつ QRS 間隔 \geq 0.12 秒 6 人、PR 間隔 \geq 0.24 秒のみ 3 人、PR 間隔 \geq 0.24 秒かつ Wenckebach 型 2 度房室ブロック 1 人、完全房室ブロックのみ 1 人であった。PR 間隔延長の 3 人と QRS 間隔延長の 3 人では、一旦延長した間隔が後年自然と基準未満に短縮した。2 度ないし完全房室ブロックの 2 人とも、自然とその所見が消失した。

D. 考察

今回の調査では、重篤な心合併症が生じた患者がなかったため、12 誘導心電図所見と心合併症との関連を論じることはできなかった。MyD 患者の約半数に伝導障害がみられることから、MyD 診療において心電図検査が有用であると思われるが、突然死予測における有用度については多数例の前方視的研究が必要である。

Groh ら (2008) が突然死の高リスク因子として報告した重篤な心電図異常を呈した症例が半数を占めた。しかし、その所見が自然と消失した症例があったことは、MyD の心伝導障害の機序と経過を検討する上で興味深い。心伝導障害の経時的変動に注目した検討が求められる。

E. 結論

MyD 患者の 47% に、12 誘導心電図で何らかの伝導障害が記録されていた。経時的な心電図所見の変化を今後検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 :

なし

2. 学会発表 :

能重歩, 高田真理子, 鈴木幹也, 谷田部可奈, 重山俊喜, 本間豊, 田中裕三, 田村拓久, 尾方克久, 川井充. 筋強直性ジストロフィーの初発症状および初診時主訴. 第 65 回国立病院総合医学会, 平成 23 年 10 月 7 日, 岡山

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

筋ジストロフィー症 講演会のお知らせ

成人の筋ジストロフィー症、特に筋強直性ジストロフィー症などを中心に、毎日の生活に役に立つわかりやすいお話しをしていただく予定です。またこの機会に、患者さんや御家族の交流を深めていただければと思います。お気軽に参加ください

平成23年10月2日(日)

13時30分

「口腔ケアとえんげ補助装置について」

大阪大学大学院歯学研究科 准教授 小野高裕先生

14時30分

**「筋ジストロフィー患者さんの普段の診療
平穩無事に過ごすために」**

国立病院機構 東埼玉病院 臨床研究部長 尾方克久先生

大阪大学医学部附属病院 14階 会議室
(スカイレストランの向かい側です)

参加費無料
事前申し込み不要

お問い合わせは
神経内科・脳卒中科 高橋まで

稀少筋疾患 シナプトパチー・チャネロパチーの 診断・病態から治療に向けて

厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業 奨励研究分野 3班合同ワークショップ

Schwartz-Jampel症候群のわが国における診断システム確立とモデルマウスによる病態解明と治療研究班
(代表：平澤 恵理)

先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究班
(代表：大野 欽司)

筋チャネル病および関連疾患の診断・治療指針作成および新規治療法開発に向けた基盤整備のための研究班
(代表：高橋 正紀)

日時 平成24年1月22日(日) 14:30~17:00

会場 千里ライフサイエンスセンター 8階 801号室
大阪府豊中市新千里東町1-4-2

『次世代シーケンサを用いたエクソーム解析の実際と悩み—43例の解析経験—』

名古屋大学大学院医学系研究科 神経遺伝情報 教授 大野 欽司

『福山型筋ジストロフィーの新たなメカニズムと分子標的治療』

神戸大学大学院医学系研究科 神経内科・分子脳科学 教授 戸田 達史

『心筋イオンチャネル病：疾患群としての概要と発症機序』

滋賀医科大学 呼吸循環器内科 教授 堀江 稔

【事務局】

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

「筋チャネル病および関連疾患の診断・治療指針作成および新規治療法
開発に向けた基盤整備のための研究班」 研究代表者 高橋正紀

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 D-4

大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学教室内

FAX 06-6879-3579

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Engel AG, Shen X-M, <u>Ohno K</u> , and Sine SM.	Congenital myasthenic syndromes.	Engel AG.	Myasthenia gravis and myasthenic disorders 2nd ed.	Oxford University Press	New York	印刷中	
<u>Ohno K</u> , Ito M, and Engel AG.	Congenital Myasthenic Syndromes – Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction –		Myopathy.	InTech	Rijeka	印刷中	
<u>Ohno K</u> , Engel AG	Molecular defects of acetylcholine receptor subunits in congenital myasthenic syndromes.	Hugo R. Arias	Pharmacology of Nicotinic Acetylcholine Receptors from the Basic and Therapeutic Perspectives.	Research Signpost	Kerala, India	2011	175-186

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hirano M, Kokunai Y, Nagai A, Nakamura Y, Saigoh K, Kusunoki S, <u>Takahashi MP</u> .	A novel mutation in the calcium channel gene in a family with hypokalemic periodic paralysis.	J Neurol Sci.	309	9-11	2011
Rau F, Freyermuth F, Fugier C, Villemin JP, Fischer MC, Jost B, Dembele D, Gourdon G, Nicole A, Duboc D, Wahbi K, Day JW, Fujimura H, <u>Takahashi MP</u> , Auboeuf D, Dreumont N, Furling D, Charlet-Berguerand N.	Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy.	Nat Struct Mol Biol.	18	540-845	2011
Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, Tosch V, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Kokunai Y, Tsuburaya R, de la Grange P, Dembele D, Francois V, Precigout G, Boulade-Ladame C, Hummel MC, de Munain AL, Sergeant N, Laquerrière A, Thibault C, Deryckere F, Auboeuf D, Garcia L, Zimmermann P, Udd B, Schoser B, <u>Takahashi MP</u> , Nishino I, Bassez G, Laporte J, Furling D, Charlet-Berguerand N.	Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy.	Nature Medicine	17	720-725	2011
Kubota T, Roca X, Kimura T, Kokunai Y, Nishino I, Sakoda S, Krainer AR, and <u>Takahashi MP</u> .	A mutation in a rare type of intron in a sodium-channel gene results in aberrant splicing and causes myotonia.	Human Mutation	32	773-782	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yata K, Oikawa S, <u>Sasaki R</u> , Shindo A, Yang R, Murata M, Kanamaru K, Tomimoto H	Astrocytic neuroprotection through induction of cytoprotective molecules; a proteomic analysis of mutant P301S tau-transgenic mouse	Brain Res	1410	12-23	2011
Tomiyama H, Yoshino H, Ogaki K, Li L, Yamashita C, Li Y, Funayama M, <u>Sasaki R</u> , Kokubo Y, Kuzuhara S, Hattori N	PLA2G6 variant in Parkinson's disease	J Hum Genet	56	401-403	2011
Yonemura Y, Futai E, Yagishita S, Suo S, Tomita T, Iwatsubo T. & <u>Ishiura S.</u>	Comparison of presenilin 1 and presenilin 2 gamma-secretase activities using a yeast reconstitution system.	J.Biol.Chem.	286	44569-75	2011
Sato K., Tanabe C, Yonemura Y, Watahiki H, Zhao Y, Yagishita S, Ebina M, Suo S, Futai E, Murata M, & <u>Ishiura S.</u>	Localization of mature neprilysin in lipid rafts.	J.Neurosci.Res.			印刷中
Ohsawa N, Koebis M, Suo S, Nishino I, <u>Ishiura S</u>	Alternative splicing of PDLIM3/ALP, for α-actinin-associated LIM protein 3, is aberrant in persons with myotonic dystrophy.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	409	64-69	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koebis M, Ohsawa N, Kino Y, Sasagawa N, Nishino I, <u>Ishiura S</u>	The alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1.	Genes to Cells	16	961-972	2011
Kanno K, <u>Ishiura S</u>	Differential effects of the HESR/HEY transcription factor family on dopamine transporter (<i>DAT1</i>) reporter gene expression via variable number of tandem repeats.	J. Neurosci. Res.	89	562-575	2011
Asai, M, Yagishita, S., Iwata, N., Saido, T.C., <u>Ishiura, S.</u> & Maruyama, K.	An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model.	FASEB J.	25	3720-3730	2011
Oguro, A., Kubota, H., <u>Ishiura, S.</u> , Shimizu, M. & Atomi, Y.	Protective role of the ubiquitin binding protein Tollip against the toxicity of polyglutamine-expansion proteins.	Neurosci.Lett.	503	234-239	2011
<u>Matsuura T</u> , Minami N, Arahata H, <u>Ohno K</u> , Abe K, Hayashi YK, Nishino I.	Myotonic dystrophy type 2 (DM2) is rare in the Japanese population.	J Hum Genet			印刷中