

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19500375  
 研究課題名（和文） 筋ジストロフィー犬における刺激伝導系プルキンエ線維の選択的障害の機序の解明  
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of selective degeneration of Purkinje fibers in dystrophic dog  
 研究代表者  
 中村 昭則（NAKAMURA AKINORI）  
 国立精神・神経センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部・室長  
 研究者番号：10303471

## 研究成果の概要：

Duchenne 型筋ジストロフィーの動物モデルである筋ジストロフィー犬では、作業心筋に病変が見られない早期からプルキンエ線維に変性が生じ、月齢に伴いジストロフィン分子種 Dp71 の発現増加とジストロフィンのホモログであるユートロフィンの発現が低下していた。また、活性化された Ca 依存性プロテアーゼ $\mu$ カルパインにより基質である心筋型トロポニン-Iおよび-T、デスミンが分解およびユビキチン化を受けていた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：筋ジストロフィー，心筋障害，プルキンエ線維，カルパイン，ユビキチン

## 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは、筋線維の変性・壊死を主病変とする疾患群である。最も頻度が高くかつ重篤な経過を示す Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) はジストロフィン遺伝子の変異により引き起こされ、全身の骨格筋・心筋障害を引き起こす。20 歳前後で呼吸不全や心不全により死亡するが、人工呼吸器の進歩により、心不全や致死性不整脈による心臓死が問題となっている。心筋障害の特徴として、左室後壁より始まる線維化、心電図上の深く幅の狭い Q 波、PQ 間隔の短縮などがある。

致死性不整脈もみられ、心臓死の原因とし重要視されているが、心筋障害の検討においては、心筋生検が生命の危険を伴うこと、末期患者の高度に変性した組織を用いているため十分な情報が得られなかった。このために、モデル動物を用いた研究が重要となる。

DMD のモデル動物として広く用いられる *mdx* マウスは、骨格筋障害が軽度であり、心筋障害もほとんど呈さないために必ずしも適切なモデルではなかった。一方、ゴールデンレトリバー種に見出された筋ジストロフィー犬 (GRMD) は進行性の骨格筋・心筋

障害を呈することから DMD に最も類似したモデルと考えられているが、大型のため飼育・繁殖が容易でなかった。そこで、申請者らは GRMD の凍結精子を用いて飼育・繁殖が容易な中型犬ビーグル種を背景とした筋ジストロフィー犬（以下筋ジス犬）の作出に成功し、canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD<sub>J</sub>) と命名した (Shimatsu *et al.*, *Exp Anim*, 2004)。現在、当施設においてコロニーの維持が行なわれ、筋ジス犬に関する実験は、国立精神・神経センター 神経研究所 中型動物実験倫理問題検討委員会の承認を受けて実施されている。

筋ジス犬は生後 2-3 ヶ月齢頃から四肢や側頭筋の筋萎縮が出現し、歩行障害、脊柱後湾、関節拘縮が加わる。また、巨舌、舌下筋群の肥大、開口障害による流涎や嚥下障害も認める (Shimatsu *et al.*, *Acta Myologica*, 2005)。

心筋障害は、生後 2 週頃から心電図 II, III, aVF 誘導で異常 Q 波が出現し、6-7 ヶ月齢の全頭で認められた。一方、心筋の左室後壁の線維化は 5 ヶ月齢の 1 頭で認められた他は 12 ヶ月齢以降で見られた。左室後壁の線維化よりも異常 Q 波の出現が先行することを初めて見出し、異常 Q 波の成因として左室後壁の線維化による起電力の低下が原因との従来の仮説と異なる知見を報告した (Yugeta *et al.*, *BMC Cardiovasc Dis.*, 2006)。

## 2. 研究の目的

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィン遺伝子の変異により発症し、全身の骨格筋・心筋障害を引き起こす致死性疾患である。人工呼吸器の進歩により心不全や不整脈による心臓死が問題となっている。我々は、DMD に最も類似した症状を持つ筋ジストロフィー犬を用いて、1) 異常 Q 波の出現が左室後壁の線維化に先行すること、2) 作業心筋の病変出現以前にプルキンエ線維に著しい空胞変性を認めること、3) 作業心筋・プルキンエ線維の細胞膜に C 端型分子種 Dp71 の染色性を認めること、4) ウェスタンブロット上、プルキンエ線維で Dp71 と  $\mu$ -カルパインが過剰に発現していることを見出した。そこで、筋ジス犬のプルキンエ線維の変性の分子機構を心筋タンパク質であり、 $\mu$ -カルパインの基質となる心筋型トロポニン-I, -T および-C, デスミンの変性の有無、およびユビキチン化の関与の有無について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象およびサンプルの調整

筋ジス犬 7 頭およびコロニーを同じくする正常対照犬 7 頭 (それぞれ 2-24 ヶ月齢)、および保因犬 1 頭 (9 ヶ月齢) の血清と心筋を用いた。プルキンエ線維および作業心筋を 10

$\mu$ m 厚の心筋凍結切片を poly L lysin 塗布の 2.0  $\mu$ m 厚の PEN 付き膜スライド (Leica) を使い、アセトン中固定、水洗、0.05% トルイジンブルーによる染色を施した後、レーザーマイクロダイセクションシステム LMD6000 (Leica) を用いて採取した。

### (2) 免疫組織化学

6  $\mu$ m 厚の凍結切片を 4% パラホルムアルデヒド/0.1 M リン酸バッファー (pH 7.2) で固定し、一次抗体には抗ユビキチン抗体 (SC-8017, Santa cruz) および抗 MuRF1 抗体 (東京都臨床医学総合研究所 反町博士からの供与) を用いて行った。

### (3) ウェスタンブロット

血清を Aurum Serum Protein Mini Kit (Bio Rad) を用いてアルブミンおよび免疫グロブリン G を除去した後、サンプルバッファー (10% SDS, 70 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5% 2-メルカプトエタノール, 10 mM EDTA) で調整した。レーザーマイクロダイセクション法で採取した心筋 (作業心筋およびプルキンエ線維) は、同サンプルバッファーでタンパク質を抽出した。12.5% SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜 (Immobilon, Millipore) に転写した。抗心筋型トロポニン-I 抗体 (16A11, Fitzgerald), 抗心筋型トロポニン-T 抗体 (6G9, Hytest), 抗心筋型トロポニン-C 抗体 (sc-20642, Santa cruz), 抗デスミン抗体と反応させた後、HRP 標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体 (Amersham) またはロバ抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham) と ECL plus Western Blotting detection system (Amersham) を用いて検出した。

### (4) 免疫沈降

心内膜組織を lysis buffer {50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxy cholate, protease inhibitor (Complete, Roche)} を用いてタンパク質を抽出した。抗ユビキチン抗体 (Stressgen) で沈降した後、プロテイン A ビーズにより回収し、抗心筋型トロポニン-I, -T および-C, デスミン抗体を用いてウェスタンブロットを行った。また、同サンプルを用いて免疫沈降、ウェスタンブロットおよび免疫組織化学的に、心筋型トロポニン-I, -T, デスミンの分解産物の検出、ユビキチンおよびユビキチンライゲースである MuRF-1, atrogin の発現について検討した。

## 4. 研究成果

(1) 筋ジス犬のプルキンエ線維において、以下の結果を得た。ウェスタンブロット法により心筋型トロポニン-I, -T およびデスミンが  $\mu$ -カルパインによる分解を受けた場合に出現する断片産物が検出された。心筋型トロポニ

ン-I は筋ジス犬の血清サンプルにおいても同分子量の断片化産物が検出された。一方、心筋型トロポニン-C は分解を受けていなかった。

(2)免疫組織化学では、筋ジス犬のプルキンエ線維では正常対照犬に比べユビキチンおよび MuRF-1 の強い染色性を認め、心筋型トロポニン-I と共局在を示した。免疫沈降法により、ユビキチン化を受けた断片化心筋型トロポニン-I が検出された。

以上の結果より、筋ジス犬のプルキンエ線維では、細胞内カルシウムの増加により活性化された $\mu$ -カルパインにより心筋型トロポニン-I、-T およびデスミンが断片化を受けること、断片化された心筋型トロポニン-I が MuRF-1 によってユビキチン化されてユビキチン-プロテアソーム系によってタンパク質分解を受けた結果、変性が生じている可能性が考えられる。また、これらの結果から筋ジストロフィーの病態機構にも筋萎縮と同様のユビキチン化が関与している可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- ① Urasawa N, Machida N, Yuasa K, Wada M, Wakao Y, Yuasa S, Sano T, Nonaka I, Nakamura A, Takeda S. Dystrophin deficient cardiac Purkinje fibers revealed vacuolar degeneration despite preservation of dystrophin-associated proteins with over-expression of Dp71 in canine-X-linked muscular dystrophy. *Circulation* 117: 2437-2447, 2008, 査読有
- ② Nakamura A, Yoshida K, Fukushima K, Urasawa N, Ueda H, Koyama J, Yazaki Y, Takeda S, Ikeda S: Follow-up of three cases with a large in-frame deletion of exons 45-55 in the Duchenne muscular dystrophy (DMD) *Gene. J Clin Neuroscience* 15: 757-63, 2008, 査読有
- ③ Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S, Hijikata T. MicroRNA-206 is overexpressed in newly formed muscle fibers: Implication of potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct Funct* 33: 163-169, 2008, 査読有
- ④ Yuasa K, Nakamura A, Hijikata T, Takeda S. Fiber type composition of diaphragm is more greatly influenced by dystrophin-deficiency in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD<sub>J</sub>), than that of limb skeletal muscle *BMC Musculoskeletal*

*Disorders* 9: 1, 2008, 査読有

- ⑤ Matsumoto H, Maruse H, Inaba Y, Yoshizawa K, Sasazaki S, Fujiwara A, Nishinobori M, Nakamura A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H. The ubiquitin ligase gene (*WWP1*) is responsible for the chicken muscular dystrophy *FEBS Lett* 582: 2212-2218, 2008, 査読有
- ⑥ Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Ohshima S, Sato K, Mochizuki Y, Yugeta N, Howell JM, Nakamura A, Hijikata T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus into canine skeletal muscle evoked immune responses against products more susceptibility than that into murine muscles. *Gene Therapy* 14: 1249-1260, 2007, 査読有
- ⑦ Fukushima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S. Activation and localization of matrix metalloproteinase -2 and -9 in the skeletal muscle of muscular dystrophy dog (CXMD<sub>J</sub>) *BMC Musculoskeletal Disord* 8: 54, 2007, 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

2008年

国際学会

- ① Nakamura A, Takeda S. MRI imaging, Clinical trial endpoints discussions, Annual Meeting Muscular Dystrophy Programs, Washington DC, March, 2008
- ② Kobayashi M, Nakamura A, Hasegawa D, Orima H, Takeda S. Noninvasive evaluation of necrotic change in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) by fat-suppressed T2-weighted imaging. 13th International Congress of the World Muscle Society, Newcastle Gateshead, UK, 29 September-2 October, 2008
- ③ 八幡由美子, 北秀樹, 小林正典, 市川慎一, 中山隆幸, 大島幸子, 辛鎮洪, 齊藤崇, 弓削田直子, 岡田尚巳, 中村昭則, 武田伸一: 新生子筋ジストロフィー犬の呼吸筋障害の検討. 第55回日本実験動物学会総会、第42回日本実験動物技術者公開総会, 2008年5月15~17日, 仙台
- ④ 中村昭則, 小林正典, 武田伸一: MRIを用いた筋ジストロフィー犬の骨格筋障害の非侵襲的評価法の検討. 第49回日本神経学会総会, 2008年5月15~17日, 横浜
- ⑤ 福島和広, 宮崎大吾, 本橋紀夫, 吉田邦広, 中村昭則, 鈴木友子, 武田伸一, 池田修一: 骨格筋再生におけるmatrix metalloproteinase (MMP)-2, -9の役割の検

討. 第49回日本神経学会総会, 2008年5月15~17日, 横浜

- ⑥ 宮崎大吾, 福島和広, 中村昭則, 吉田邦広, 武田伸一, 池田修一: ジストロフィン遺伝子 (DMD) exon 45-55欠失例の臨床的、分子遺伝学的検討. 第49回日本神経学会総会, 2008年5月15~17日, 横浜
- ⑦ 横田俊文, Qi-long Lu, Terence Partridge, 小林正典, 浦澤延幸, 中村昭則, Ryszard Kole, Peter Sazani, Hong Moulton, Eric Hoffman, 武田伸一: アンチセンス・モルフォリノを用いた筋ジストロフィー犬治療の試み. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究」(主任研究者: 武田伸一) 平成20年度班会議, 2008年12月3~4日, 東京
- ⑧ 裏出良博, 有竹浩介, 林正裕, 鎌内慎也, エリザベス・コー・三田村, 永田奈々恵, 武田伸一, 中村昭則: 筋ジストロフィーの進行性軽減療法の開発-プロスタグランジンD 合成酵素をターゲットとした筋ジストロフィーの2次炎症軽減療法の開発-. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究」(主任研究者: 武田伸一) 平成20年度班会議, 2008年12月3~4日, 東京
- ⑨ 中村昭則, 高橋明男, 小林正典, 武田伸一: 筋ジストロフィー犬コロニーの確立・維持と病態解析-筋ジストロフィー犬新生子劇症型の病態機序に関する検討-. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究」(主任研究者: 武田伸一) 平成20年度班会議, 2008年12月3~4日, 東京

2007年

- ① Yoshimura M, Nakamura A, Kobayashi M, Takeda S: Deflazacort induced severe skeletal muscle wasting abd inguinal herniation in normal Beagle dogs. 12<sup>th</sup> International Congress of the World Muscle Society Giardini Naxos-aromina, Italy 17-20 October, 2007
- ② Partridge T, Yokota T, Lu Q, Hoffman E, Alter J, Takeda S, Kobayashi M, Nakamura A: Systemic delivery of morpholino oligonucleotide to skip mutations in the dystrophin gene of the mouse and dogs. 12<sup>th</sup> International Congress of the World Muscle Society, Giardini Naxos-Taromina, Italy 17-20 October, 2007
- ③ Yokota T, Lu Q, Partridge T, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E. Antisense morpholino injection restores extensive dystrophin expression to potentially

therapeutic levels in canine muscular dystrophy in vivo. Gordon Research Conference in Il Cicco, Italy May, 2007

- ④ 中村昭則, 武田伸一: 筋ジストロフィー1, 筋ジストロフィー犬を用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの心筋障害の発症機構の解明 第48回日本神経学会総会 名古屋, 5.16-17, 2007
- ⑤ プロスタグランジンD合成酵素をターゲットとした筋ジストロフィーの2次炎症軽減療法の開発 裏出良博, 有竹浩介, 林正裕, エリザベス・コー・三田村, 永田奈々恵, 武田伸一, 中村昭則, 北川茂, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究」(主任研究者: 武田伸一) 平成19年度班会議, 東京, 12.4, 2007
- ⑥ MRIを用いた筋ジストロフィー犬の骨格筋障害の非侵襲的評価. 高橋明男, 小林正典, 中村昭則, 武田伸一, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究」(主任研究者: 武田伸一) 平成19年度班会議, 東京, 12.4, 2007

〔図書〕(計1件)

- ① 中村昭則, 武田伸一: 心筋症 病態生理 筋ジストロフィーの最新知見. 治療学 ライフサイエンス出版 42: 42-46, 2008

〔その他〕

ホームページ:

[http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r\\_dna2/index.html](http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_dna2/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 昭則 (NAKAMURA AKINORI)  
国立精神・神経センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部・室長  
研究者番号: 10303471

### (2) 研究分担者

武田 伸一 (TAKEDA SHIN'ICHI)  
国立精神・神経センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部・部長  
研究者番号: 90171644