

平成 21年 5月 31日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008 年
 課題番号：19591009
 研究課題名 (和文) カルシウム維持機構に着目した Schwartz-Jampel 症候群の病態研究
 研究課題名 (英文) Role of calcium homeostasis in Schwartz-Jampel syndrome.
 研究代表者
 平澤 恵理 (HIRASAWA ERI)
 順天堂大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：50245718

研究成果の概要：

細胞外マトリックスの1つである。パールカンの遺伝子欠損により Schwartz-Jampel 症候群 (SJS) を発症する。我々は本症候群における骨格筋の持続収縮、ミオトニア症状の発症機構についてモデルマウスを使って解明している。その過程でいくつかの複合要因が考えられ、その一つが筋の易収縮性である。また、本症候群に特徴的な眼輪筋や口輪筋の持続収縮、筋の肥大、type1 fiber predominancy 等の事象に関連して細胞内カルシウムの変動が重要な意味を持つと考えた。パールカン欠損と野生型マウス、及びその初代培養筋細胞の実験を行い、1) *in vivo* における筋線維タイプの存在比率や、筋横断面積の比較、2) *in vitro* における細胞内カルシウム濃度変動の差異からパールカンがカルシウム維持機構に何らかの関与をしている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：神経内科 細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：①ミオトニア ②カルシウム ③筋疾患 ④パールカン

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、Schwartz-Jampel 症候群 (SJS) 骨格筋の持続収縮、ミオト

ニア症状のメカニズムについてモデルマウスを使って解明している。これまでに SJS 患者においてミオトニアが発症する原因につ

き、シナプス前の原因として神経終末からのアセチルコリン放出のしやすさと神経筋接合部でのアセチルコリンの不活化障害を観察している。しかし、骨格筋の持続収縮には複合要因が考えられ、筋基底膜に存在するパールカンの役割を検討する必要が考えられ、筋の易収縮性に着目した。臨床的観点からは、SJS患者に特徴的な眼輪筋や口輪筋の持続収縮、筋の肥大、type1 fiber predominancy等の事象に関連して細胞内カルシウムの変動が興味深い。眼輪筋などは超速筋とも呼ばれる特殊に分化した筋であり、細胞内カルシウム濃度は低く維持され、その微量な変化に影響を受ける。一方カルシウム負荷は type1 fiber (遅筋群) の増加や筋の肥大シグナルに関与するとされる。

2. 研究の目的

以上の背景より、SJSの病態の解明と治療の確立において細胞内カルシウム維持機構とパールカンの関係に着目すること重要と考えた。研究期間内に *in vivo* における各筋線維タイプ存在比率と筋線維面積を検討する。*in vitro* においてカルシウムインジケータを用いて筋細胞内カルシウム濃度の変化を観察することとした。これにより、細胞外マトリックス、パールカンが直接的、あるいは間接的に筋のカルシウム維持機構に関わることを示し、SJSの病態の解明し、本疾患の薬物治療の基礎研究とすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Scwartz-Jampel 症候群 (SJS) モデルマウスの解析

軟骨以外でパールカンを欠損するマウス

(SJS モデルマウス) を使用し解析した。本マウスでは、既に筋病理、筋電図にて SJS の臨床症状を再現していることを確認している。15週齢雄 SJS マウスと対照マウス各3匹のヒラメ筋、前脛骨筋、腓腹筋、足底筋の筋線維タイプごとの筋線維面積と存在比率を検討した。

(2) パールカン欠損骨格筋におけるカルシウム動態変化の可視化

細胞外マトリックスであるパールカンの欠損と細胞内のカルシウムシグナルの変化を結ぶカスケードを知るため、生細胞においてカルシウム動態を観察した。カルシウムインジケータとしては筋細胞におけるカルシウム濃度に鋭敏な高親和性をもつ Fura2 を用いて、浜松フォトニクスも Aquacosmos ratio で解析した。刺激にはアセチルコリンを用いた。

4. 研究成果

パールカンを欠損する SJS モデルマウスにおける速筋 (type IIB, IIX) の肥大と遅筋 (type I) の存在比率の増大が観察された。パールカンを欠損する筋細胞ではアセチルコリン刺激による細胞内カルシウム濃度変化が著明に増大する細胞が有意に多く観察された。以上未発表データのため詳細の数値は省略した。これらの結果から、パールカンがカルシウム維持機構に何らかの関与をしている可能性が示唆された。カルシウム維持機構に関わる薬剤は多数存在し、臨床でも多くの選択肢がある。これらの薬物の投与を本疾患治療に応用するため、さらにカルシウム維持機構におけるパールカン分子の直接的な機序を証明することが重要と考えられた。

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 10 件)

原著論文

1. Binding of laminin-1 to GM1 ganglioside in lipid rafts is critical for neurite outgrowth. Ichikawa N, Iwabuchi K, Kurihara H, Ishii K, Kobayashi T, Sasaki T, Hattori N, Mizuno Y, Hozumi H, Yamada Y, and Arikawa-Hirasawa E *Journal of Cell Science* (査読有 IF 6.383) 9-September-2008 accepted
2. Mutational analysis of Fukutin gene in dilated cardiomyopathy and hypertrophic cardiomyopathy Arimura A, Hayashi YK, Murakami T, Oya Y, Funabe S, Arikawa-Hirasawa E, Hattori N, Nishino I and Kimura A *Circulation Journal* (査読有 IF 2.373) 21-Aug-2008 accepted
3. Long-term follow-up of laminin alpha2 (merosin)-deficient muscular dystrophy in a cat. Awamura Y, Uchida K, Arikawa-Hirasawa E. Long-term follow-up of laminin alpha2 (merosin)-deficient muscular dystrophy in a cat *J Feline Med Surg.* (査読有 IF 1.168) Jul;10(3):274-9. 2008
4. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. Kerever A, Schnack J, Vellinga D, Ichikawa N, Moon C, Arikawa-Hirasawa E, Efrid JT, Mercier F. *Stem Cells.* (査読有 IF 7.531) Sep;25(9):2146-57. 2007
5. 佐橋功、藤掛彰史、榎本由華、平澤恵理、衣斐達 Becker 型筋ジストロフィーに対す

る losartan の長期経口治療 *神経治療学* (査読有) 第 24 巻 第 6 号 2007 年

6. Murayama T, Oba, T., Hara, H., Wakebe, K., Ikemoto, N. and Ogawa, Y. (2007) Postulated role of interdomain interaction between regions 1 and 2 within type 1 ryanodine receptor in the pathogenesis of porcine malignant hyperthermia. *Biochem J* (査読有) **402**, 349-357
7. Kobayashi T, Morone N, Kashiya T, Oyamada H, Kurebayashi N, Murayama T: Engineering a novel multifunctional green fluorescent protein tag for a wide variety of protein research. *PLoS ONE* (査読有) 3: e3822, 2008
8. Rossi D, Murayama T, Manini I, Franci D, Ogawa Y and Sorrentino V: Expression and functional activity of ryanodine receptors (RyRs) during skeletal muscle development. *Cell Calcium* 41: 573-580, 2007

総説

1. 平澤恵理 神経筋接合部の機能におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割 生体の科学特集 細胞外基質—研究の新たな展開 (査読無し) 59(2)101-104 2008
2. 平澤恵理 発生や疾患を制御する多機能細胞外マトリックスパルカンの機能解明 医学研究の UP-TO-DATE 順天堂医学 (査読無し) (54) 25-28 2008

〔学会発表〕(計 4 件)

シンポジスト、招待講演

1. 第 40 回日本結合組織学会学術大会 シンポジウム [組織を支える基底膜分子の

機能解明と展望] 神経筋におけるパールカンの多様な役割 (シンポジスト) 平成 20 年 5 月 29 日 こまばエミネース、東京

順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 ; 10230012

2. Diverse roles of the heparan sulfate proteoglycan perlecan in organ development and homeostasis 日本細胞生物学会 第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会 合同大会ミニシンポジウム 2B 「細胞外マトリックスによる細胞運命制御」(オーガナイザー兼シンポジスト) 平成 19 年 5 月 29-30 日 福岡国際会議場

3. Role of perlecan in neuromuscular activity and Ca^{2+} influx in muscle 7th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (座長兼シンポジスト) Oct.28 -Nov 1 2007 Cairns Australia

学会発表

1. パールカンによるマイオスタチンシグナル伝達の制御 佐々木隆子, Dorthe Spillmann, Zhuo Xu, 平澤恵理
第 40 回日本結合組織学会学術大会、第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会
平成 20 年 5 月 29-31 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平澤 恵理 (HIRASAWA ERI)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号 ; 50245718

(2) 研究分担者

村山 尚 (MURAYAMA TAKASHI)