

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006 年度～2008 年度

課題番号：18390265

研究課題名（和文） エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィーの分子遺伝学的研究

研究課題名（英文） Clinical and molecular studies of Emery-Dreifuss muscular dystrophy

研究代表者

林 由起子 (HAYASHI YUKIKO)

国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第一部・室長

研究者番号：50238135

研究成果の概要：

核膜関連筋疾患であるエメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー（EDMD）について臨床・病理・分子細胞生物学的検討をおこない、本邦における EDMD の臨床・遺伝学的特徴を明らかにするとともに、EDMD 変異による新たな臨床病型の発見し、また新たな原因遺伝子を同定した。詳細な筋病理学的・細胞生物学的解析に基づき、核膜病に特徴的な核の変化と筋のジストロフィー変化との関連についても新たな知見を得た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
平成 19 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
平成 20 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	11,600,000	3,480,000	15,080,000

研究分野：医歯薬学

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：核膜、筋ジストロフィー、臨床、遺伝子、細胞・組織、病理、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

核内膜および核ラミナの蛋白質異常による遺伝病（核膜病）は、筋疾患、心疾患、代謝異常、発育・発達異常や老化を含め様々な疾患を引き起こすことが相次いで明らかになってきており、基礎医学的、臨床医学的に非常に注目を集めていた。本研

究のテーマであるエメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー（EDMD）は核膜病の発見の発端となった疾患である。EDMD は小児期早期より発症する筋ジストロフィー、肘、足関節および後頸部の拘縮、心伝導障害を伴う心筋症を 3 主徴とする遺伝性筋疾患で、若年者で高率に突然死をきたす社会医

学的に重要な疾患である。エメリン遺伝子 (EMD) の変異による X 染色体劣性型 (X-EDMD)、ラミン A/C 遺伝子 (LMNA) の変異による常染色体優性 (AD-EDMD) あるいは劣性型 (AR-EDMD) がある。エメリンは核内膜蛋白質、ラミン A/C は核ラミナ蛋白質であるが、EDMD は遺伝形式、原因遺伝子に関わらず、その臨床症状は酷似しており、臨床的に鑑別することはきわめて困難である。一方、驚くべきことに LMNA の異常は EDMD のみならず、肢帯型筋ジストロフィー 1B 型 (LGMD1B)、肥大型心筋症、脂肪異栄養症、Chrcot-Marie-Tooth 病 2B1 型 (CMT2B1)、早老症候群などといった遺伝形式も臨床症状も全く異なる様々な疾患を引き起こすことが相次いで明らかになってきている。同じ遺伝子の異常がどのようにして、このように多様な疾患を引き起こすかについてはまだ、明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究は核膜関連筋疾患の臨床病理学的解析、分子遺伝学的、細胞生物学的解析を通して、本邦における EDMD 患者について臨床・遺伝学的特徴を明らかにするとともに、EDMD の病理・病態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本邦 EDMD/LGMD1B の臨床・遺伝学的検討

国立精神・神経センターの骨格筋レポジトリを用いて、本邦 EDMD/LGMD 患者の変異スクリーニングを行い、原因遺伝子および変異部位と臨床症状との関連について検討した。

(2) EDMD の筋病理学的検討

遺伝子変異の確定した患者生検骨格筋を用い、一般病理染色、免疫組織染色、および電

顕観察により、EDMD の病理学的特徴について詳細に検討した。

(3) 培養細胞を用いた核膜関連タンパク質の局在変化についての検討

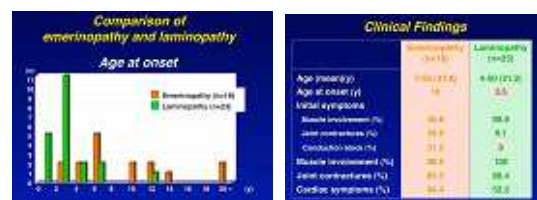
患者及びモデルマウスの培養細胞を用いて、免疫細胞染色により核膜関連タンパク質の局在変化について検討した。

(4) モデル動物を用いた EDMD の病態解析
EDMD の病態を明らかにすることを目的に、我々が作製した *Emd* KO マウスに加え、*Lmna* KO、*Lmna* KI マウスおよび新たに作製した *Emd* KO/*Lmna* KO、*Emd* KO/*Lmna* KI といった二重変異マウスを作製し、エメリン、ラミン A/C の機能を臨床病理学的、分子細胞生物学的比較検討した。具体的には、実験的筋壊死・再生モデルを用いた筋再生過程の解析、網羅的遺伝子発現解析、電気生理学的検査、病理学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 本邦 EDMD/LGMD1B 患者の臨床・遺伝学的検討

国立精神・神経センターの骨格筋レポジトリを用い、EDMD および LGMD 患者について *EMD*、*LMNA* の変異スクリーニングを行った。その結果、これまで本邦では X-EDMD がその大半を占めると考えられてきたが、AD-EDMD も同じ程度に存在すること、臨床的には X-EDMD は初発症状が様々であるのに対し、AD-EDMD はすべての症例で筋症状から発症し、心症状は遅れて発症するという特徴を見だし、臨床経過観察が予後改善のために不可欠であることを明らかにした。

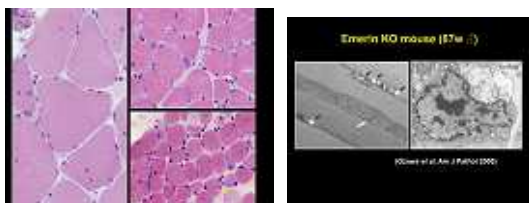


また、これまで *EMD* 変異による臨床病型は唯一 *EDMD* のみが知られていたが、関節症状のない肢帯型筋ジストロフィーもまた *EMD* 変異による場合があることを世界で初めて報告した。

一方、臨床的に *EDMD* と鑑別困難であるにもかかわらず遺伝子変異の見いだされない症例を多数見いだした。そこで詳細な臨床病理学的解析を行うとともに、疾患関連候補遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、*FHL1* 変異が *EDMD* 類縁疾患を引き起こすことを世界に先駆け発見し報告した。また *FHL1* 変異による疾患の臨床的多様性を明らかにし、第 2LIM ドメイン内システイン残基の重要性を明らかにし報告した。さらに新たな原因遺伝子として A 遺伝子変異を 2 例、B 遺伝子変異を 3 例に見いだした (A B: 仮名)。A、B 両遺伝子については、現在、疾患との関連を具体的に示すべく生化学的、細胞生物学的に検討中である。

(2) *EDMD* の筋病理学的検討

遺伝子変異解析で確定診断した核膜関連筋疾患患者の生検筋について、核の形態変化を中心とした病理学的解析を行った結果、病初期より強い核変化が認められる場合があること、筋核数の優位な増加、大小不同、鎖状核の存在といった核の変化が *EDMD* の筋病理学的特徴であることを明らかにした。



また、*EDMD* 患者骨格筋では筋細胞核のみならず骨格筋再生に重要な筋衛星細胞の核にも形態学的変化が生じ、筋衛星細胞数が増加しているものの、活性化されていないことを

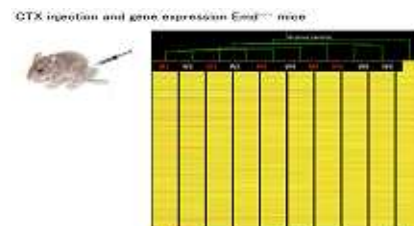
明らかにし、報告した。この結果は *EDMD* の筋ジストロフィー変化と深く関わるものであり、重要な知見である。

(3) 培養細胞を用いた核膜関連タンパク質の局在変化についての検討

患者およびモデルマウス培養線維芽細胞において、骨格筋で認められたものと同様の核の形態変化に加え、エメリン、ラミン A/C のみならず、種々の核膜関連タンパク質の凝集が認められた。この結果は、*EDMD* における核膜タンパク質群の局在の不安定性を明らかにしたものである。

(4) モデル動物を用いた *EDMD* の病態解析

実験的筋壊死・再生モデルを用いた解析の結果、これまでに報告されていた *Emd* KO マウス筋での *MyoD* 発現の遅延を確認するとともに、処置後 6-8 週における筋再生後期においても再生遅延が生じていることを明らかにした。現在、その詳細な機序について検討中である。



一方、*Emd* KO マウス心筋を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、MAPK のシグナルカスケードが亢進しており、心筋症発症との関連を見いだした。これは *Lmna* KI マウスでの結果と同様であり、エメリノパチーとラミノパチーの病態の類似性を証明したものである。

一方、*Emd* KO, *Lmna* KI, および *Emd* KO/*Lmna* KI 二重変異マウスにおける心筋障害について比較検討を行った結果、2 重変異マウスでは *Lmna* KI マウスで認められる明らかな心筋症変化が乏しいにもかかわらず寿命は同程

度に短縮していることを明らかとした。現在、シグナル伝達を含めその差異について詳細に検討中である。

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)

Park YE, Hayashi YK, Bonne, G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I. Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy*, 査読有り、5 巻、2009 年、in press

Murakami T, Hayashi YK, Ogawa M, Noguchi S, Campbell KP, Togawa M, Inoue T, Oka A, Ohno K, Nonaka I, Nishino I. A novel POMT2 mutation causes mild congenital muscular dystrophy with normal brain MRI. *Brain Dev*, 査読有り、31 巻、2009 年、465-468

Shalaby S, Hayashi YK, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I. Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy. *Neurology*, 査読有り、72 巻、2009 年、375-376

Park YE, Hayashi YK, Goto K, Komaki H, Hayashi Y, Inuzuka T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I. Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy/limb-girdle muscular dystrophy 1B. *Neuromuscul Disord*, 査読有り、19 巻、2009 年、29-36

Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I. Rigid spine syndrome caused by a novel mutation in four-and-a-half LIM domain 1 gene (FHL1). *Neuromuscul Disord*, 査読有り、18 巻、2008 年、959-961

Matsuda C, Kameyama K, Suzuki A, Mishima W, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi YK. Affixin activates Rac1 via bPIX in C2C12 myoblast. *FEBS Letters*, 査読有り、582 巻、2008 年、1189-1196

Astejada, MN, Goto K, Nagano A, Ura S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK. Emerinopathy and laminopathy clinical, pathological and molecular features of muscular dystrophy with nuclear envelopathy in Japan. *Acta Myol*, 査読無し、26 巻、2007 年、159-164

Muchir A, Pavlidis P, Bonne G, Hayashi YK, Worman HJ. Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 査読有り、16 巻、2007 年、1884-1895

Ura S, Hayashi YK, Goto K, Astejada MN, Murakami T, Nagato M, Ohta S, Daimon Y, Takekawa H, Hirata K, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I. Limb-girdle muscular dystrophy due to emerin gene mutations. *Archives of neurology*, 査読有り、64 巻、2007 年、1038-1041

Ozawa R, Hayashi YK, Ogawa M, Kurokawa R, Matsumoto H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I. Emerin-lacking mice show minimal motor and cardiac dysfunctions with nuclear-associated vacuoles. *Am J Pathol*, 査読有り、168 巻、2006 年、907-917

〔学会発表〕(計 5 件)

Park YE, 他. Nuclear changes in skeletal muscles of AD-EDMD/LGMD1B. The 13th International Congress of the World Muscle Society (WMS), 2008 年 9 月 30 日、

イギリス

Hayashi YK, 他、Muscular dystrophies associated with nuclear envelope proteins. 第 50 回日本小児神経学会総会、2008 年 5 月 30 日、東京

Park YE, 他、Electron microscopic analysis of myonuclei in EDMD2/LGMD1B. 第 50 回日本小児神経学会総会、2008 年 5 月 30 日、東京

Hayashi YK, 他、Nuclear Changes in Muscular Dystrophy Associated with Nuclear Envelopathy. The 12th International Congress of the World Muscle Society. 2007 年 10 月 17-20 日、イタリア
Hayashi YK. Nuclear abnormalities in nuclear envelopathy. 7th Japanese-French Workshop. 2007 年 6 月 8-9 日、神奈川

Hayashi YK. Clinical and molecular analyses of nuclear envelopathy. 第71回日本循環器学会総会・学術集会, 2007年3月16日、神戸

〔図書〕(計 2 件)

林 由起子、診断と治療社、小児筋疾患ハンドブック、2009 年、116-124

林 由起子、中外医学社、図説 分子病態学 4 版、2008 年、316-320

6 . 研究組織

(1)研究代表者

林 由起子 (HAYASHI YUKIKO)

国立精神・神経センター・神経研究所疾病研究第一部・室長

研究者番号 : 50238135

(2)研究分担者

西野 一三 (NISHINO ICHIZO)

国立精神・神経センター・神経研究所疾病研究第一部・部長

研究者番号 : 00332388

野口 悟 (NOGUCHI SATORU)

国立精神・神経センター・神経研究所疾病研究第一部・室長

研究者番号 : 00370982

埜中 征哉 (NONAKA IKUYA)

国立精神・神経センター・神経研究所・名誉所員

研究者番号 : 80040210