

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390227

研究課題名(和文)核膜関連筋疾患の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文)To elucidate pathomechanisms of myopathies associated with nuclear envelopathy

研究代表者

林 由起子 (Hayashi, Yukiko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：50238135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：核膜病の原因遺伝子産物、A型ラミンならびにエメリンに変異を有する複数のモデルマウスを用いて、骨格筋・心筋の病理変化、遺伝子発現変化、筋再生能などの解析を行い、病態の解明を進めた。筋ジストロフィーを顕著に示すマウス、ならびに核膜関連筋疾患に特異的リン酸化ラミンを発現するマウスを作製した。リン酸化ラミン発現マウスは極軽微な変化を示すのみであり、これはリン酸化ラミンが十分に発現していないことによるものと推測された。心遺伝子の網羅的発現解析の結果、各マウスに特徴的な変化が認められた。ヒト核膜関連筋疾患の解析では、新たに先天性ミオパチー(筋線維不均等症)と鑑別困難な場合がある事を明らかにし、報告した。

研究成果の概要(英文)：Nucleus of the cell is surrounded by nuclear membrane and many nuclear membrane proteins are identified. Nuclear membrane is lined by nuclear lamina, and lamins are major components of the nuclear lamina. Nuclear envelopathy is a group of disorders caused by mutations in the genes encoding nuclear lamina or nuclear membrane proteins, and their clinical symptoms are quite variable. In this study, we used several model mice with the gene mutations in LMNA and/or EMD, and examined their skeletal and cardiac muscles using histopathological, gene expression analyses and obtained some results to understand their pathomechanisms. We produced a good animal model for muscular dystrophy related nuclear envelopathy. We examined several animal models and found that different gene expression patterns in emerin knockout, LMNA knock-in, and double mutant mice. We also reported that LMNA mutation can cause clinicopathological features mimicking to congenital fiber type disproportion.

研究分野：神経内科学

キーワード：核膜病 病態解析

1. 研究開始当初の背景

核膜病とは、細胞核の膜関連タンパク質の異常によって生じる疾患の総称であり、このなかには筋疾患、心疾患、神経疾患、代謝異常、発育・発達異常や早老症候群など様々な疾患が含まれる。このうちエメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー(EDMD)は、幼児期に発症する筋ジストロフィー、早期からの肘、足、後頸部の関節拘縮、思春期以降に発症する心伝導障害を伴う心筋症を臨床的な3主徴とする希な遺伝性疾患である。原因遺伝子として *EMD*、*LMNA*、*SINE1*、*SINE2*、*FHL1*、そして我々の同定した *TMEM43* が知られている。

(1) 我々は EDMD のモデル動物としてエメリン欠損マウス(ED)を作製し解析したが、ヒトと異なり極軽度の運動能の低下と、高齢になってからの軽度の心伝導障害を示すのみであり、筋ジストロフィー変化、関節の変化は認められなかった(ref.1)。一方、フランスのグループによって作製された *Lmna* KI (H222P) マウスは強い心不全症状を示すも骨格筋症状は軽度であった(ref.2)。従って、核膜病における骨格筋の病態解明に適したモデル動物が必要であった。

(2) 一方、我々はこれまでに *LMNA* 変異による筋疾患(筋ラミノパチー)患者特異的に発現するリン酸化ラミン A を見いだした(ref.3)が、リン酸化ラミン A の具体的な病態への関与は明らかでなかった。

(3) 核膜関連筋疾患は、臨床的にも筋病理医学的にもきわめて多彩であることが相次いで報告されてきている。

2. 研究の目的

本研究は、核膜病による筋変性の機序を明らかにするために、

(1) 筋ジストロフィーの変化の明らかな EDMD のモデルマウスを作製する事、

(2) 各モデルマウスの解析により EDMD 原因タンパク質の相互作用を明らかにし、核膜関連筋疾患の病態を明らかにすることを目的とした。また

(3) 核膜病を疑われた症例の遺伝学的解析を行い、その臨床・病理学的特徴を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

筋ラミノパチー特異的リン酸化ラミン A の病態への関与を明らかにする事を目的として、

(1) ヒトリン酸化ラミン A を発現するトランスジェニックマウスを作製し、解析を行った。(2) また、明らかな筋ジストロフィー変化を示す EDMD モデルマウスを作成するためにエメリン欠損マウス(ED)と *LMNA* KI マウス(H222P)を掛け合わせた二重変異マウス(EH)を作製し解析した。

(3) 各モデルマウスの解析方法としては、発育・発達の経過観察、寿命、臨床症状、心

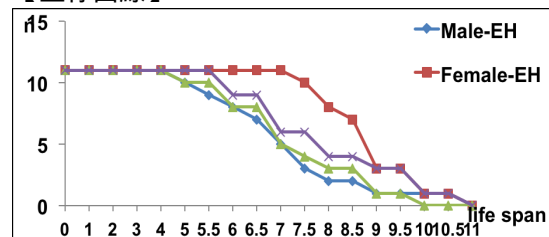
電図、筋病理変化、網羅的遺伝子発現解析、実験的筋壊死再生モデルの解析などを行った。

(4) ミオパチー患者のうち、核膜病と関連すると考えられた症例について、既知原因遺伝子の変異スクリーニングを行い、臨床症状、筋病理変化について詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) H222P マウスは心拡大・胸水貯留などの重症心不全症状を示し、生後10ヶ月以内に死亡する。一方、明らかな筋力低下はなく、筋病理変化もごく軽度しか認められなかった。一方、興味深いことに二重変異マウス(EH)の寿命は生後11ヶ月以内と H222P よりも若干長くなった。また、死亡時に心不全症状はあきらかでなく、むしろ徐々に衰弱する様子が観察された。また骨格筋の病理変化は H222P よりも明らかに強く、筋ジストロフィー変化を示した。ED の寿命は野生型と変わらず、筋病理変化も認められなかった。

【生存曲線】



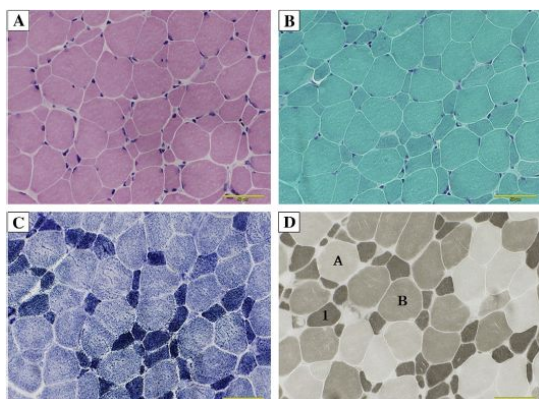
(2) ED, H222P, EH の各モデルマウスにおける心臓を明らかにするために心房を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、ED、H222P では野生型と比較して、心筋症に関する遺伝子の発現上昇が認められたが、その変化が乏しかった。一方、ストレス関連遺伝子の発現は EH でも ED、H222P 同様に発現上昇が認められた。これら結果は定量 PCR 法によっても確認された。この結果に基づき、本疾患の特徴の1つである心伝導障害や心筋症の具体的な病態については、さらに検討が必要である。

(3) 変異マウス骨格筋に薬剤性筋壊死を誘導し、筋の再生過程を検討した。その結果、単回の投与では筋再生障害やジストロフィー変化の増悪は認められなかった。今後、実験的筋壊死を繰り返すことにより、ヒト疾患筋に似た変化が生じるかどうかを検討する必要がある。

(4) リン酸化ラミン A 発現マウスは、ややサイズが小さいながらも正常に発育し、継代も可能であった。このマウス骨格筋におけるリン酸化ラミン A タンパク質はほとんど検出されなかった。そこでリン酸化ラミン A 発現マウスと A 型ラミノ欠損マウスを交配したところ、若干の寿命の延長が認められたのみであり、リン酸化ラミン A の発現増加や明らかな症状の改善は認められなかった。そこでこのマウス新生仔から作製した線維芽細胞におけるリン酸化ラミン A の発現を検討した結果、

培養直後の細胞ではリン酸化ラミン A は核膜に一致して発現が認められたが、細胞が分裂するにつれて経時的に減少することを見いだした。現在、リン酸化ラミン A の減少と細胞周期、細胞増殖に関する検討を進めているところである。

(5) ミオパチー患者のうち、核膜病が疑われた症例について、既知の原因遺伝子に対するスクリーニングを行っている。そのなかで、病初期に筋病理学的に先天性筋線維不均等症 (CFTD) と診断された先天性ミオパチー例が、後に関節拘縮、心症状が明らかとなり LMNA に変異をみいだした例を経験した。そこで臨床・病理学的に CFTD と診断された 80 例について LMNA 変異スクリーニングを実施し、2 例に LMNA 変異を見いだした。一方、23 例のすでに LMNA 変異が同定されている症例について筋病理学的に再検討した結果、4 例で筋病理学的に筋線維の不均等を示す事が明らかとなった。しかも通常の CFTD ではタイプ I 線維が小さいのに対し、LMNA 変異例ではタイプ II 線維が肥大傾向にある事も明らかにした。以上の結果をまとめ、LMNA 変異による新たな臨床病型として報告した (発表論文)



先天性筋線維不均等症と診断されたのち、LMNA 変異を有することの明らかとなった症例の筋病理所見。タイプ I 線維はタイプ II 線維と比べて小さい。筋ジストロフィー変化はみられない。

参考文献

- 1) Ozawa R, et al. Emerin-lacking mice show minimal motor and cardiac dysfunctions with nuclear-associated vacuoles, *Am J Pathol* 168(3):907-917,2006
- 2) Arimura T, et al. Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet.* 2005
- 3) Mitsuhashi H, et al. Specific phosphorylation of Ser458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy

patients, *J Cell Sci* 123(22):3893-3900, 2010.

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)

Kajino S, Ishihara K, Goto K, Ishigaki K, Noguchi S, Nonaka I, Osawa M, Nishino I, Hayashi YK. Congenital fiber type disproportion myopathy caused by LMNA mutations. *J Neurol Sci* 340(1-2):94-98, 2014 DOI: 10.1016/j.jns.2014.02.036 (査読有り)

Goto M, Okada M, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK. Marinesco-Sjögren syndrome in Japan. *Orphanet J Rare Diseases* 9(1):58, 2014 DOI: 10.1186/1750-1172-9-58 (査読有り)

Murakami N, Hayashi YK, Oto Y, Shiraishi M, Itabashi H, Kudo K, Nishino I, Nonaka I, Nagai T: Congenital generalized lipodystrophy type 4 with muscular dystrophy: Clinical and pathological manifestations in early childhood. *Neuromuscul Disord.* 23(5): 441-444,2013 DOI: 10.1016/j.nmd.2013.02.005. (査読有り)

[学会発表](計11件)

Hayashi YK, Shalaby S, Nishino I: FHL1 Myopathies in Japan. 199th ENMC International Workshop, Naarden, The Netherlands (NH Naarden Hotel), 2013.6.8-9
Kajino S, Hayashi YK, Fiber type disproportion caused by LMNA mutations. The 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia 2012.10.9-13

林由起子. 核の変化と筋疾患. 第5回山陽 Neuromuscular Forum, 岡山, 2012.8.25

[図書](計4件)

林由起子: I. 筋ジストロフィーおよび膜イオンチャネル異常症 3. Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (1) X連鎖性 Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (X-EDMD). 別冊 日本臨床 新領域別症候群 3 2 骨格筋症候群(第2版) pp36-39, 2015

林由起子: G-2. 筋ジストロフィー. 図説分子病態学. Pp.262-266. (編:一瀬白帝, 鈴木宏治)(編著) 中外医学社, Pp. 262-266, 2014

林由起子: Emery Dreifuss 型筋ジストロフィー. 筋疾患診療ハンドブック. (監修:内野 誠, 編集:青木正志), 中外医学社, 東京,

pp160-164, 2013

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 由起子 (HAYASHI, Yukiko)

国立精神・神経医療研究センター・神経研
究所・疾病研究第一部・室長

（平成25年7月まで）

東京医科大学・医学部・教授

（平成25年8月より）

研究者番号：50238135

(2) 研究分担者

大久 敬 (OHISA Satoshi)

独立行政法人国立精神・神経医療研究セン
ター・神経研究所・疾病研究第一部・流動
研究員

研究者番号：90610840

（平成25年度まで）

松田 知栄 (MATSUDA, Chie)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：50344099

（平成25年11月～平成26年8月まで）