

称号及び氏名 博士(獣医学) 小林 欣滋

学位授与の日付 平成22年3月31日

論文名 Molecular Pathological Study on Interstrain Differences in the Skeletal Muscle Lesions between Dysferlin-deficient SJL and A/J Mice

(Dysferlin を欠損する SJL および A/J マウスにおける骨格筋病変の系統間差に関する分子病理学的研究)

論文審査委員
主査 山手 丈至
副査 松尾 三郎
副査 小森 雅之

論文要旨

はじめに

進行性筋ジストロフィーは、「骨格筋の変性・壊死・再生を主病変とし、臨床的には進行性の筋力低下と筋萎縮をみる遺伝性筋疾患の総称」である。現在、様々な治療法の開発が進められているが、未だ確立された方法はない。

本疾患群のうち、肢帯型筋ジストロフィー (LGMD: limb girdle muscular dystrophy) は筋力低下・筋萎縮が左右対称性に生じ、かつ四肢筋近位および四肢帯で緩徐に進行する疾患とされる。しかし、病的には均一な疾患単位ではないことから、近年、遺伝形式・遺伝子座位の違いで細分化されている。常染色体優性遺伝するものを LGMD1、常染色体劣性遺伝するものを LGMD2 と称し、遺伝子座位が明らかになった順に A, B, C, D... を付けて細分類している。LGMD のうち dysferlin を原因遺伝子とする疾患が LGMD2B であるが、その病理発生機序の全貌は未だ解明されていない。

本研究の第一章では、LGMD2B のモデル動物である SJL および A/J マウスの骨格筋病変の分布と病態について病理形態学的に詳細に解析し、両系統間でその違いを明らかにした。第二章では、筋肉病変と近年病変形成過程で注目されている小胞体ストレスとの関連について解析し、さらに、第三章では、両系統間で骨格筋における遺伝子発現

プロファイルの比較を行った。その結果、SJL マウスにおいて熱ショック蛋白およびヘムオキシゲナーゼ 1 の発現が増加し、脱共役蛋白が加齢に伴って変動すること、ならびに補体阻害因子の発現が常時低いことを明らかにした。

以上の研究成果は、SJL および A/J マウスに病態形成に係わる系統間差が存在することを明らかにし、LDMD2B の病期進展に係わる因子を探索する上での本マウスの有用性を示すものである。

第 1 章 SJL および A/J マウスの骨格筋における病理形態学的解析

骨格筋病変の分布

10 週齢時の病理組織学的所見：

SJL マウスでは、検査した多くの動物の大腿筋、上腕筋、腹筋、咬筋、腰部筋に、そして少数の動物の下腿筋、前腕筋、胸筋、横隔膜において極軽度～軽度の筋線維の硝子変性・壊死がみられた。一方、A/J マウスでは、正常対照として検査した BALB/c マウスと同様、いずれの筋線維にも病変は認められなかった。

35 週齢の病理組織学的所見：

SJL マウスでは、多くの動物の大腿筋、下腿筋、上腕筋、腹筋、胸筋、咬筋、腰部筋において極軽度～中等度の筋線維の硝子変性・壊死がみられた。さらに、より進行した病変として脂肪浸潤あるいは筋線維の萎縮が腰部筋（特に腰最長筋）や大腿筋（特に大腿直筋）で観察された。一方、A/J マウスでは、大腿筋や腰部筋、下腿筋、上腕筋、腹筋において筋線維の硝子変性・壊死が散見され、その程度は極軽度であった。

以上のことから、*dysferlin* を欠損する 2 つの *LGMD2B* モデルマウスの間で骨格筋病変の発症時期と程度が異なることに加え、病変の部位感受性の差を明らかにした。

浸潤細胞の免疫組織学的解析

SJL マウスは実験的自己免疫性脳脊髄炎の高感受性動物として知られており、本モデルの骨格筋病変の増強因子として自己免疫の関与が疑われた。しかし、マクロファージマーカーである抗 F4/80 抗体を用いた免疫染色では、SJL および A/J マウスともに殆どの浸潤細胞が、抗 F4/80 抗体陽性であった。一方、マクロファージ浸潤後に誘導される α -平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞の出現はなかった。以上のように、骨格筋病変内にリンパ球の浸潤を殆ど認めないことから、マクロファージは変性筋線維を処理するために浸潤したもので、SJL および A/J マウスの骨格筋傷害に自己免疫が介在する可能性はないと考えた。

骨格筋病変の筋線維型特異性の解析

35 週齢の SJL マウスの骨格筋に対して筋線維型の染め分けを行ったところ、病変の主体は fast-twitch fiber (II 型筋線維) で、当該筋では intermyofibrillar network が不明瞭になっていた。SJL マウスの骨格筋傷害には fast-twitch fiber (II 型筋線維) 優位に働く機序が存在することが示された。

第2章 SJL および A/J マウスにおける骨格筋病変と小胞体ストレスとの関連

SJL マウスでは in-frame 型の欠失による不完全な dysferlin 蛋白の形成が想定されることから、同マウスの骨格筋病変の増強因子として異常蛋白の負荷による小胞体ストレスの関与を疑った。そこで、35 週齢の雄の腰最長筋を用いて、小胞体ストレスの指標の一つである spliced XBP-1 mRNA の発現量を半定量的 RT-PCR によって解析した。その結果、SJL および A/J マウスの spliced XBP-1 mRNA 発現量はむしろ BALB/c マウスよりも低く、SJL マウスと A/J マウスとの間には発現量に明らかな差を認めなかった。Spliced XBP-1 mRNA の発現を調節する IRE1 は、他の小胞体ストレスセンサーである ATF6 および PERK と共通する BiP/Grp78 によってその機能が制御されていることから、他の 2 つの経路を介した小胞体ストレスの応答も生じている可能性は低いと考えた。

第3章. SJL および A/J マウスの骨格筋における TaqMan® プローブを用いた遺伝子発現解析

小胞体ストレスに関連する遺伝子の発現解析

小胞体ストレスマーカーに関しては、第2章の成績に加え、SJL および A/J マウスともに、BiP/Grp78, ATF6 あるいは Chop/Gadd153 の発現量に顕著な変化はみられなかったことから、骨格筋病変の発生機序に小胞体ストレスが関与する可能性はないと考えた。一方、糖蛋白質小胞体関連分解に関連する Edem1 および Erp57 の発現増加を認めたが、その後引き続き小胞体関連分解に係わる遺伝子に明らかな変動はなかった。

熱ショック蛋白および抗酸化因子の発現解析

ストレスマーカーである Hsp70 の発現量について比較したところ、BALB/c マウスでは 10 週齢と比較して 30 週齢時に発現量が 30~40 倍増加し、SJL マウスでは 10 および 30 週齢ともに 10~20 倍の発現量を維持しながら推移した。一方、A/J マウスでは 30 週齢時にその発現量が減少した。また、Hsp70 の補助因子である Hsp40 も同様の発現推移を示した。さらに、SJL マウスでは抗酸化因子のヘムオキシゲナーゼ 1 (Hmox1) の発現量が 30 週齢時に増加した。

脱共役蛋白の発現解析

SJL マウスでは *TBC1D1* 遺伝子の変異に関連して脂肪酸取り込みと β 酸化が亢進している。脂肪酸酸化の調節因子である PGC-1 α を骨格筋特異的に過剰発現させたマウスでは、ミトコンドリア増生に伴って β 酸化が亢進しているにも拘わらず、脱共役による ATP の著減に伴う II B 型筋線維優位な骨格筋萎縮を生じることから、脱共役蛋白 Ucp2 および Ucp3 の遺伝子発現量を解析したところ、PGC-1 α トランスジェニックマウス同様に、SJL マウスの骨格筋では、Ucp2 の発現が増加し、Ucp3 の発現が減少していることが明らかとなった。

補体阻害因子の発現解析

SJL マウスあるいは LGMD2B 罹患者の骨格筋では補体阻害因子の CD55 (Decay Accelerating Factor 1: Daf1) および Decay Accelerating Factor 2 (Daf2) の発現が低下していることが報告されており, dysferlin 欠損による骨格筋傷害における補体の関与が示唆されている。そこで, A/J マウスにおける CD55/Daf1 および Daf2 の発現量を解析したところ, A/J マウスでは両遺伝子の発現は低下していなかったことから, 補体が dysferlin 欠損に伴う筋ジストロフィーの病期を促進する可能性があること, また, dysferlin 欠損が CD55/Daf1 および Daf2 の発現低下の一次的要因ではないことが示された。

まとめ

LGMD2B のモデル動物として知られる SJL および A/J マウスの骨格筋病変の分布と病態について分子病理学的に比較したところ, 以下のような結果を得た。

- 1) SJL マウスと A/J マウスとの間に骨格筋病変の発現時期と部位感受性の差を見出した。
- 2) SJL および A/J マウスの腰最長筋での spliced XBP-1 mRNA の発現量は正常対照の BALB/c マウスよりもやや低く, 両マウスの間で差がないことを明らかにした。
- 3) SJL マウスにおける骨格筋病変は fast-twitch fiber (II 型筋線維) 優位であること, 病変部に浸潤マクロファージが出現することを明らかにした。
- 4) Hsp70 およびその補助因子である Hsp40 の BALB/c マウスでの加齢に伴う増加, SJL マウスでの加齢に依存しない持続的な高発現, A/J マウスでの加齢に伴う減少を明らかにした。加えて, SJL マウスでは加齢性に Hmox1 の発現量が増加することが分かった。さらに, SJL マウスでは, 脱共役蛋白である Ucp2 の発現量が増加し, Ucp3 の発現が減少することを明らかにした。また, SJL マウスでは CD55/Daf1 が加齢に関係なく減少していたが, A/J マウスでは変動はなかった。
- 5) 以上の研究成果は, SJL および A/J マウスの病態形成の過程に系統間差が存在することを証明するもので, LGMD2B 型の病期進展に係わる因子や治療法の探索においてこれらのモデル動物が有用であることを示す。

審査結果の要旨

進行性筋ジストロフィーは, 「骨格筋の変性・壊死・再生を主病変とし, 臨床的には進行性の筋力低下と筋萎縮をみる遺伝性筋疾患の総称」である。現在, 様々な治療法の開発が進められているが, 未だ確立された方法はない。

本疾患群のうち, 肢帯型筋ジストロフィー (LGMD: limb girdle muscular dystrophy) は筋力低下・筋萎縮が左右対称性に生じ, かつ四肢の近位および四肢帯部の筋で緩徐に進

行する疾患とされる。しかし、病因的には均一な疾患単位ではないことから、近年、遺伝形式・遺伝子座位の違いで細分化されている。常染色体優性遺伝するものを LGMD1、常染色体劣性遺伝するものを LGMD2 と称し、遺伝子座位が明らかになった順に A, B, C, D・・・を付けて細分類している。LGMD のうち dysferlin を原因遺伝子とする疾患が LGMD2B であるが、その病理発生機序の全貌は未だ解明されていない。本研究は、LGMD2B のモデル動物として知られる SJL および A/J マウスを用いて、骨格筋病変の分布と病態形成について分子病理学的に比較することで、系統間差を明らかにすることを目的として行われた。この研究成果は、LGMD2B 型の病期進展に係わる因子や治療法の探索において有用な情報を提供する。以下に成績の概要を記載する。

第 1 章では、LGMD2B のモデル動物である SJL および A/J マウスの骨格筋病変の分布と病態について病理形態学的に詳細に解析した。その結果、10 週齢時、SJL マウスでは検査した多くの動物の大腿筋、上腕筋、腹筋、咬筋、腰部筋に、そして少数の動物の下腿筋、前腕筋、胸筋、横隔膜において極軽度～軽度の筋線維の硝子変性・壊死がみられた。一方、A/J マウスでは、正常対照として検査した BALB/c マウスと同様、いずれの筋線維にも病変は認められなかった。35 週齢時、SJL マウスでは、多くの動物の大腿筋、下腿筋、上腕筋、腹筋、胸筋、咬筋、腰部筋において極軽度～中等度の筋線維の硝子変性・壊死がみられた。さらに、より進行した病変として脂肪浸潤あるいは筋線維の萎縮が、腰部筋（特に腰最長筋）や大腿筋（特に大腿直筋）で観察された。一方、A/J マウスでは、大腿筋や腰部筋、下腿筋、上腕筋、腹筋において、極軽度の筋線維の硝子変性・壊死が散見される程度であった。以上のことから、dysferlin を欠損する 2 つの LGMD2B モデルマウスの間で骨格筋病変の発症時期と程度が異なることに加え、病変の部位感受性の差を明らかにした。また、SJL マウスにおける骨格筋病変は fast-twitch fiber (II 型筋線維) 優位であること、ならびに病変部に浸潤マクロファージが出現することを明らかにした。

第 2 章では、筋肉病変と小胞体ストレスとの関連について、35 週齢の雄の腰最長筋を用いて、小胞体ストレスの指標の一つである spliced XBP-1 mRNA の発現量を半定量的 RT-PCR によって解析した。その結果、SJL および A/J マウスの spliced XBP-1 mRNA 発現量はむしろ BALB/c マウスよりも低く、SJL マウスと A/J マウスとの間には発現量に明らかな差を認めなかった。Spliced XBP-1 mRNA の発現を調節する IRE1 は、他の小胞体ストレスセンサーである ATF6 および PERK と共通する BiP/Grp78 によってその機能が制御されていることから、他の 2 つの経路を介した小胞体ストレスの応答も生じている可能性は低いと考えた。

第 3 章では、35 週齢の雄の腰最長筋・大腿直筋を用いて、定量的 RT-PCR によって両系統間の骨格筋における遺伝子発現プロファイルの比較を行った。その結果、Hsp70 およびその補助因子である Hsp40 の BALB/c マウスでの加齢に伴う増加、SJL マウスでの加齢に依存しない持続的な高発現、A/J マウスでの加齢に伴う減少を明らかにした。加

えて、SJL マウスでは加齢性に Hmox1 の発現量が増加することが分かった。さらに、SJL マウスでは、脱共役蛋白である Ucp2 の発現量が増加し、Ucp3 の発現が減少することを明らかにした。また、SJL マウスでは CD55/Daf1 が加齢に関係なく減少するが、A/J マウスでは変動しないことを見出した。

以上の研究成果は、LGMD2Bのモデル動物であるSJLおよびA/Jマウスに病態形成に係わる系統間差が存在することを明らかにし、LDMD2Bの病期進展に係わる因子を探索する上でこの本マウスが有用性を示すものである。この研究内容は、医学・獣医学の発展、とりわけ進行性筋ジストロフィーに関する研究の新たな展開に貢献するものである。従って、最終試験の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。