

氏名	なかだちさと 中田知里
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	甲第36号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Cardiac-Restricted Ankyrin-Repeated Protein Is Differentially Induced in Duchenne and Congenital Muscular Dystrophy (心筋特異的アンキリンリピート蛋白質はデュシェンヌ型筋ジストロフィーと先天性筋ジストロフィーにおいて異なって誘導される)
学位論文審査委員	(主査) 大野 耕 策 (副査) 林 真 一 佐藤 建 三

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

CARP 蛋白質は、心発生過程で心室形成に重要な遺伝子 MLC-2v（心室型ミオシン軽鎖タイプ 2）の転写調節因子として単離された。また、成人心臓においても圧負荷によって CARP 発現が上昇することから心肥大マーカーと考えられており、CARP は肥大心に特異的な機能を果たしていると推測されている。これまで、CARP の発現は心臓に限局し、骨格筋ではほとんど検出されないと考えられていた。しかし我々はヒト胎児骨格筋で CARP が高発現していること、除神経された骨格筋で一過性に CARP が誘導されることを発見し、CARP は骨格筋において特異的な状況下で誘導される可能性があると考えた。

本研究では、筋再生過程が筋発生の過程と類似していることに注目し、骨格筋再生モデルにおける CARP の発現を検討した。CARP は筋再生の過程で一過性に誘導された。さらに、筋の壊死・再生が繰り返される疾患である筋ジストロフィーにおける CARP の発現を調べたところ、14 例中 13 例で CARP の発現が認められ、特にデュシェンヌ型では CARP は小径の再生筋線維に発現することを明らかにした。

材料と方法

筋再生モデル：ラットのヒフク筋に筋毒性を持つ局所麻酔剤ピバカインを注射すると筋壊死について筋再生が起こる。注射後 1、2、3、5、7、14、28 日後にヒフク筋を切除し、蛋白質を抽出してウェスタンブロット解析を行った。あるいはホルマリンで固定後、免疫組織化学に供した。

筋ジストロフィー患者の筋組織：診断のために採取された未固定の筋凍結組織 14 例（デュシェンヌ型 6 例、ベッカー型 1 例、肢帯型 2 例、顔面肩甲上腕型 1 例、先天型 4 例）を免疫組織化学に用いた。

抗体：CARP 検出には、以前に我々の研究室で作成した抗マウス CARP 抗体、抗ヒト CARP 抗体をウェスタンブロット解析あるいは免疫組織化学に用いた。また、筋線維の分化マーカーとして抗マイ

オジェニン抗体、抗胎児型 MHC(ミオシン重鎖)抗体、抗遅筋型 MHC 抗体、抗速筋型 MHC 抗体を蛍光二重染色法に用いた。

結 果

骨格筋再生モデルにおいて、ブピバカイン注射後 1 日目には CARP が発現誘導され、3 日後にピークに達した。その後次第に CARP 発現は低下し、14 日後には痕跡程度、28 日後には発現が消失した。注射 3 日後では中心核を持つ小径の再生筋線維が強く CARP を発現しているのが観察された。CARP 陽性筋線維はマイオジェニン、胎児型 MHC を共発現していたことから、CARP は筋分化の初期に特異的に誘導されることが明らかになった。また、3 日後から 5 日後にかけて CARP の筋線維内局在がびまん性から横紋様に変化した。

筋ジストロフィーにおける CARP の発現を調べたところ、14 例中 13 例で CARP の発現が認められた。特にデュシェンヌ型において CARP 陽性筋線維は小径であり、胎児型 MHC を共発現していたことから、CARP 陽性線維は再生筋線維に一致していると考えられた。一方、先天型は、他のサブタイプに比較して CARP 陽性線維の割合が著しく高かった。先天型において、CARP 陽性線維には、成熟した筋線維で発現される遅筋型 MHC、速筋型 MHC を共発現している筋線維が多くあり、CARP 陽性線維は再生筋線維と必ずしも一致していないと考えられた。

考 察

骨格筋において、CARP は筋分化の初期に特異的に誘導されることが明らかになった。ブピバカイン注射 3 日後に CARP 発現がピークに達したが、この頃は筋芽細胞がさかんに融合し、サルコメア構造を構築する時期であり、再生筋線維内における CARP 局在も横紋様に変化した。また最近、CARP がサルコメア構造の維持に関与している可能性が報告された。CARP は筋再生過程において、サルコメアの新規構築や、構築されたサルコメアの構造維持に関与しているかもしれない。

筋ジストロフィーにおいて、デュシェンヌ型では CARP 陽性線維は再生筋線維に一致していた。しかし、先天型では CARP 陽性線維の割合が著しく高く、CARP 陽性線維は再生筋線維と必ずしも一致していなかった。この CARP の構成的な発現には、患者の筋線維の壊れ易さや、誕生時にすでに筋が変性していることが関係しているかもしれない。あるいは、CARP 陽性線維の分化段階がデュシェンヌ型と先天型で異なっている可能性がある。

結 論

骨格筋において CARP は筋分化の初期に特異的に誘導された。このことより CARP は新しい筋分化マーカーになりうるかもしれない。また、デュシェンヌ型筋ジストロフィーにおいて再生をモニターするのに有用かもしれない。先天性筋ジストロフィーではデュシェンヌ型に比較して CARP 陽性線維の割合が著しく高かった。また、CARP は正常骨格筋ではほとんど検出されない。以上の結果より、先天型における CARP の構成的発現は、先天性筋ジストロフィーの病理学的診断に役立つかもしれない。今後更なる検討が必要である。

論文審査の結果の要旨

本研究は、心筋特異的アンキリンリピート蛋白質 CARP の骨格筋再生過程における発現、さらに筋の壊死・再生が繰り返される筋ジストロフィーの筋組織における CARP の発現を検討したものである。その結果、成人骨格筋では発現していないと考えられていた CARP が筋分化の初期に一過性に誘導されることを発見した。さらに筋ジストロフィーの様々なサブタイプにおいて CARP が著しく誘導されていること、サブタイプによって CARP の発現が異なっていることを明らかにした。デュシェンヌ型筋ジストロフィーでは CARP 陽性線維は再生筋線維に一致しており、デュシェンヌ型において、CARP は筋再生をモニターするマーカーになりうると考えられた。一方、先天型では CARP は再生筋線維だけでなく、それ以外の筋線維にも発現していた。以上の知見は、CARP が心筋だけでなく骨格筋においても機能することを示唆し、その発現の差異は筋ジストロフィーという多様な疾患を解析、分類する手がかりと考えられ、明らかに学術的水準を高めたものと認められる。