

厚生省「精神・神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー及び類縁疾患の  
病態と治療法に関する研究

高木 班

平成7年度研究報告書

平成8年3月（1996年）

# 総括研究報告

主任研究者 高木昭夫

## 1. 研究目標とその成果

1) 研究目標 筋ジストロフィーや類縁疾患の病態解明と治療法の開発を目的として3年間の班研究活動をおこなった。筋ジストロフィーとしてはDuchenne/Becker型(DMD/BMD), 先天型(CMD), 肢帯型(LGMD), 顔面肩甲上腕型(FSH), 遠位型などを対象とした。類縁疾患としてはミトコンドリア脳筋症, 筋緊張性ジストロフィー, その他のミオパチーを対象とした。治療法開発としては, 遺伝子治療を第一に取り上げた。さらに病変進行にたいする緩和治療も考慮した。以下に各々の疾病につき報告する。

## 2) DMD/BMD

これらの疾病ではdystrophin分子の欠失ないし異常が病因であることは既に判明している。進行性筋変性の発症機序が未解決問題の1つである。筋細胞膜下においてdystrophin分子のN端はactinと結合し, 他端はdystroglycanと結合すると推定されている。さらにdystroglycanは細胞外マトリックスと結合して筋細胞の補強に関与すると仮定されている。金粒子を使用した免疫電顕によると, adhalin ( $\alpha$ -sarcoglycan) のcytoplasmic domainと $\beta$ -dystroglycanは細胞膜下でいずれもdystrophinと近接して存在した(若山)。ちなみに $\beta$ -dystroglycanはDMDで中等度に減少していた。またDMDではadhalinが二次的に著減している。Adhalinが遺伝的に欠損するAdhalin欠損症では臨床経過や筋病理はDMDに類似しているがやや軽症といわれた(川井)。脳型dystrophinは中枢神経の後シナプス部に発現している。しかしDMD脳でシナプス部に明瞭な超微構造の変化は指摘できなかった(内野)。通常はDMDの遺伝子診断は末梢血白血球を使用して行われる。骨格筋のdystrophin mRNAの分析結果は臨床像とよく相関していた(斉藤加)。Apoptosisに関連するFas抗原はDMDを含む数種の疾患筋に非特異的に発現した。しかし核変化を伴わないなど細胞死への直接関与は否定的であった(佐橋, 杉村)。重篤な心筋障害を合併したBMD28症例の遺伝子異常が分析された。exon1-13のN端側に異常を持つ症例では心症状が先行しより重症であった。C端側の異常では骨格筋症状が先行した(池田)。

**治療** 妊婦末梢血中の単一有核赤血球のDNAを増幅して, 胎児の性別やDMD保因の診断法が開発された(佐藤)。より非侵襲的診断法として完成が期待される。遺伝子治療に関して基礎実験が行われた。ex vivo遺伝子治療を考慮して培養細胞への遺伝子導入法が検討された。その結果ポリカチオン脂質法が効率が良いと判明した(庄司)。しかし本法は

効率の悪さと組織障害性のためin vivoでの応用は困難と考えられた。同様にHVJ-liposome法で全長のdystrophin cDNAをマウス培養筋芽細胞に導入できた(岡田)。しかしin vivo実験では安定した発現をみるに至っていない。DMDの治療法として筋芽細胞移植が成功しない一因は拒絶反応のためである。拒絶反応予防を目的としてIL-12に拮抗するIL-12p40遺伝子を筋芽細胞に導入する実験が行われた(佐藤)。予報段階であるがこの操作の有効性が確認された。mdxマウスを使用した実験的治療が継続されている。mdxの骨格筋はin vitroでは膜電位の低下とミオトニア放電をきたすことが知られる。idebenoneがこの現象を著明に抑制した(栗原)。プレドニン投与がDMD治療法として成果をあげている。プレドニン投与が筋壊死を抑制するか否かが検討された。Prednisolone (30mg/kg/day)はmdx骨格筋壊死の進行には影響しなかった(高木)。しかしrevertant fiberの分裂促進あるいは免疫的影響も示唆された。nifedipine (6 or 14mg/kg/day)が血清CKを低下させ、筋壊死を抑制する可能性が示された(吉田)。しかし溶媒の関与も考慮されている。BMD, FSH, LGMDの臨床例にdantrolene及びglycyrrhizineの効果が検討された(田代)。少数例であるが長期投与の有効性が示唆された。

### 3) 先天性筋ジストロフィー (CMD)

**福山型筋ジストロフィー (FCMD)** 本症の責任遺伝子の同定に関して大きな前進がみられている。まず近親婚による発症の家系におけるホモ接合マッピング法による連鎖解析から、遺伝子の局在は9q31-33と判明した(戸田)。さらにFCMD遺伝子はD9S127--CA246の5cMの間にしぼられた。marker mf220と強い連鎖不平衡をみとめた。その後より強い連鎖不平衡を示すJ12がクローン化された。FCMDはJ12を含む100kb以内に存在する。FCMD患者の88%に共通するハプロタイプが発見され、孤発例のFCMDの診断に応用可能となった(戸田)。FCMD同胞間で臨床像が著しく相違することがある。遺伝子解析の結果からは同一疾病であることが判明し、臨床症候の広がり確認された(齊藤加)。FCMD胎児脳の病理が研究され貴重な所見が報告された(戸田, 齊藤加)。前頭・頭頂葉の脳皮質は異常組織(neurogliomesenchymal tissue)で覆われていた。この部位ではglia limitansに亀裂がみとめられた。グリア基底膜に異常が推定され、小多脳回や脳回融合の原因と想定される。

**非福山型先天性筋ジストロフィー**この群には異種の疾病が含まれる。この中には基底膜蛋白ラミニンの垂分画であるmerosin(ラミニン $\alpha$ 2)M鎖を遺伝的に欠損する病型がある。欧米ではmerosin陽性と陰性の比は1:1であった。本邦ではこの比は25:1と著しく異なった(後藤)。また本邦のCMDのうちmerosin M鎖欠損は2.8%に認められた(荒畑)。merosin M鎖欠損では知能障害や中枢神経形態異常は合併しない。

#### 4) FSH

FSHの原因遺伝子は4q35-terに局在するとされている。しかし現時点で同定されていない。診断にはp13E-11ないしpFR-1をプローブとするサザン解析が行われている。すなわちEcoRI断片の28Kb以下の短縮がFSHの特徴とされた。本邦のFSH158症例の97%は本法で診断可能であった(荒畑)。別の報告では33例中の82%に異常を検出した(納)。

#### 5) LG

このグループは分子レベルでの研究が遅れていた分野であった。しかし近年欠失する蛋白が相次いで発見され、疾病の再分類が試みられている。本邦では $\alpha$ -sarcoglycan (50DAG, adhalin) 欠損の病型が確認された(荒畑, 清水, 川井, 納)。この病型は三好により悪性肢帯型として記載された筋ジストロフィーの一型である。Adhalin遺伝子は17q12-21に局在し、本症では点変異、挿入、欠失などが主として細胞外ドメインに認められた(川井)。臨床像はDMDに似るがやや軽症であった。心臓異常は比較的少なく、知能障害はみられない(川井)。

#### 6) 三好型遠位筋ジストロフィー

microsatellite polymorphismを応用して遺伝子座が決定された(水野)。2p12-14の15種の総てのマーカーと有意な連鎖を認めた。D2S292-D2S286の6cMの間に存在した。候補遺伝子としてTGFAとsyndecanを検討したが該当しなかった(水野)。

#### 7) 遠位型ミオパチー (DMRV)

常染色体劣性のDMRVは本邦に比較的多く、解明の待たれる疾病である。稀ではあるが、常染色体優性DMRVの家系が報告された(高木)。DMRV発症者がいずれもRh (-)であったことから、1pのmicrosatellite markerとの連鎖を調べた(高守)。また第20染色体のmarkerとの連鎖も分析された(辻)。しかしいずれの分析においても有意な連鎖は証明されていない。

#### 8) 筋緊張性ジストロフィー (MYD)

myotonin kinase遺伝子の異常による疾病と既に判明しているが、その病態解明は遅れている。合成ペプチドに対する抗体を使用して罹患組織における蛋白発現を調べた(荒畑)。本症の骨格筋や心筋では蛋白量の著明な減少を観察した。しかし蛋白の過剰発現との報告もあり、一致した結果を得てはいない。この遺伝子にみられる(CTG)nの反復配列は転写調節に関与するとの説が有力である。この遺伝子のcDNAをtransfectした筋芽細胞における筋関連蛋白の発現を分析した(寺尾)。myogenin, syntrophin-1, cardiac  $\alpha$ -actinの発現は対照より遅延した。すなわち分化抑制の起こる可能性を推定した。一方、

galactosylceramidaseに (CTG)<sub>150</sub>を組み込んだ遺伝子を発現させると、GALC活性は著増した (小林卓)。CTG反復が発現を増強させたと推論した。MYDにおいてCTG反復の伸展は臨床的にも重要であるが、その伸展機序は不明である。CTGの伸展はMYD遺伝子に特異的であると推定された。myotonin kinase C端の合成ペプチドに対する抗体を用いて酵素の局在を調べた (小林高)。酵素はI帯に存在し、特に小胞体終槽に多かった。

## 9) ミトコンドリア脳筋症

この分野では3年間にまた大きな前進をみた。筋組織化学検査ではsmooth red fiber (SRF) やSDH染色性の意義が検討された。SRFはragged red fiber とほぼ同等の診断意義を持っていた (田代)。SDH染色性の強弱は変異mtDNA量と相関していた (内野)。mtDNAを系統的に検査する方法が提唱された (後藤)。in situ hybridizationによりDNA欠失の解析法が考案された (水野)。新しいmtDNAの変異が追加された。MELAS/MERRF overlap症候群で新しい点変異が発見された (梶)。MERRFの変異に関して、lysine tRNA上の2種の点変異が追加された (宝来)。MELAS, MERRF, LHONの間でまた3243変異をともなう糖尿病におけるheteroplasmyと臓器障害の関係が検討された (桃井, 高木)。LHONではhomoplasmyのみの細胞が64%存在した。 $\rho_0$ 細胞 (cybrid) を使用して病態研究がおこなわれた (小沢, 太田)。

## 2. 未解決の問題点と解決の見通し

病因遺伝子の未同定の疾患がいくつかある。既に遺伝子局在の確定している病気としてはFSH, FCMD, 一部のLGなどである。遺伝子局在未定のものとしてはDMRVや一部のLGである。MYDについては遺伝子は同定されたが、多系統疾病としての病態は未解決である。これらの諸問題に関しては、既に方法論はほぼ確立しているため解決は近いと考えられる。類縁疾患を含めて筋ジストロフィーの治療の領域では未解決の問題が多い。DMDの根本治療はやはり遺伝子治療を待たねばならない。モデル動物レベルでdystrophin遺伝子導入による治療が十分に成功したとは言いがたい現状である。遺伝子導入の効率や安全性の研究が必要と考える。筋芽細胞移植は拒絶反応の問題が解決されれば展望がひらけると思われる。corticosteroids投与がDMDに有効との報告が散見される。その作用機序はまだ不明である。

## 目 次

### I. 臨床・分子病理学

- 1) Rigid spine syndromeの臨床・筋病理学的検討 ..... 15  
東京都立神経病院 田 邊 等
- 2) MDX マウス及び諸種神経筋疾患における Fibroblast growth factors,  
Heparan sulfate proteoglycanの免疫組織学的研究 ..... 18  
東京都立神経病院 田 邊 等
- 3) サイトカインと筋萎縮 ..... 21  
順天堂大学医学部生化学第一講座 木 南 英 紀
- 4) 共焦点レーザー顕微鏡を使用したヒト疾患培養筋細胞内の  
動的細胞内カルシウム濃度変化 ..... 24  
東京医科歯科大学医学部神経内科 小 林 高 義
- 5) 筋ジストロフィーおよびミトコンドリア病生検筋における  
熱ショック蛋白の免疫染色 ..... 28  
愛知医科大学第四内科 佐 橋 功
- 6) ミトコンドリア脳筋症の生検筋における superoxide dismutase (SOD) および  
nitric oxide synthase (NOS) の局在 ..... 31  
筑波大学臨床医学系神経内科 庄 司 進 一
- 7) 筋ジストロフィー生検筋における細胞死関連蛋白の免疫組織学的観察 ..... 34  
愛知医科大学第四内科 佐 橋 功
- 8) 筋細胞障害における Fas 抗原と Apoptosis ..... 38  
名古屋大学医療技術短期大学部 杉 村 公 也
- 9) 筋フォスホリラーゼ遺伝子コドン49のナンセンス変異を示した  
McArdle病の一例 ..... 41  
京都大学医学部神経内科 梶 龍 児
- 10) Gomori-Trichrome 変法における薄層赤染線維の意義について  
—慢性進行性外眼筋麻痺の母子例を中心に— ..... 44  
北海道大学医学部神経内科 田 代 邦 雄
- 11) ミトコンドリア脳筋症患者の ragged-red fiber における  
ミオグロビン量とその mRNA 量 ..... 48  
徳島大学医学部第一内科 川 井 尚 臣

### II. 臨床・分子遺伝学

- 12) リンパ芽球細胞の樹立とその解析 ..... 55  
東京医科歯科大学難治疾患研究所遺伝疾患研究部門(細胞遺伝) 斎 藤 深 美 子

13) 眼咽頭筋ジストロフィー：日本人2家系例の 臨床・筋病理・遺伝子連鎖解析の検討	58
熊本大学医学部附属病院神経内科 内野 誠	
14) Paramyotonia congenita 日本人1家系の遺伝子解析	62
九州大学医学部脳研神経内科 小林 卓郎	
15) Emery-Dreifuss型筋ジストロフィーの分子遺伝学的研究	64
国立精神・神経センター神経研究所 荒畑 喜一	
16) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の臨床的多様性と遺伝子診断	67
鹿児島大学医学部第三内科 納 光弘	
17) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の遺伝子領域の構造と遺伝子診断	70
国立精神・神経センター神経研究所 荒畑 喜一	
18) 脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断	73
東京女子医科大学小児科 斎藤 加代子	
III. 福山型先天性筋ジストロフィー	
19) 福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) 遺伝子のポジショナルクローニング	77
東京大学医学部人類遺伝学 戸田 達史	
20) 出生前診断が行われた福山型先天性筋ジストロフィー 胎児2症例の大脳皮質病変—神経病理学的考察—	80
東京女子医科大学小児科 斎藤 加代子	
21) 非典型的 (歩行可能) 福山型筋ジストロフィーの 第9染色体長腕31への局在の検討	82
東京女子医科大学小児科 斎藤 加代子	
22) 福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) : glia limitans-基底膜複合体の 破れが大脳micropolygyriaの遠因か? —FCMD胎児 (18週) 脳の免疫組織学的・電顕的検索から—	84
東京大学医学部人類遺伝学 戸田 達史	
IV. 遠位型ミオパチー	
23) Rimmed Vacuoleを伴う遠位型ミオパチーに対する homozygosity mappingを用いた分子遺伝学的研究	91
新潟大学脳研究所神経内科 辻 省次	
24) Rimmed-vacuole型遠位型ミオパチーの連鎖解析	95
金沢大学医学部神経内科 高守 正治	
25) 常染色体優性rimmed vacuolar myopathyの一家系	98
虎の門病院神経内科 高木 昭夫	

26) Rimmed vacuoleにおけるアミロイド蛋白関連物質の発現について .....	101
東京都立神経病院 田邊 等	
27) 三好型遠位型筋ジストロフィーの遺伝子解析 .....	104
順天堂大学医学部脳神経内科 水野美邦	
 V. 筋緊張性ジストロフィー, その他(1)	
28) ミオトニンプロテインキナーゼ (MtPK) cDNA 導入筋芽細胞 における筋関連蛋白遺伝子の発現解析 .....	109
帝京大学医学部神経内科 寺尾壽夫	
29) Myotonin Protein Kinase (MtPK) の <i>in vivo</i> 及び <i>in vitro</i> における局在 .....	112
東京医科歯科大学医学部神経内科 小林高義	
30) CTG リピートの遺伝子発現に及ぼす影響の解析 .....	115
九州大学医学部脳研神経内科 小林卓郎	
31) 三塩基対反復配列延長疾患の配列延長に関する解析 .....	119
自治医科大学小児科 桃井真里子	
 VI. 筋緊張性ジストロフィー, その他(2)	
32) 筋緊張性ジストロフィーにおける insulin receptor の糖鎖異常 .....	123
名古屋大学医療技術短期大学部 杉村公也	
33) 骨格筋組織にリソソーム由来と思われる空砲を認めた $\alpha$ -mannosidase 症例の $\alpha$ -D-mannosidase 遺伝子の解析 .....	125
徳島大学医学部第一内科 川井尚臣	
34) 筋型 AMP デアミナーゼ遺伝子 (AMPD1) の スプライシング調節: 甲状腺機能低下性ミオパチーにおける検討 .....	128
国家公務員等共済組合連合会大手前病院 垂井清一郎	
 VII. DMD/BMD	
35) 妊婦末梢血を用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの出生前遺伝子診断 .....	133
国立精神・神経センター国府台病院神経内科 佐藤 猛	
36) DMD/BMD 骨格筋のジストロフィン mRNA と臨床像 .....	136
東京女子医科大学小児科 斎藤加代子	
37) Duchenne 型筋ジストロフィー中枢神経におけるシナプス部の変化について .....	138
熊本大学医学部神経内科 内野 誠	
38) 重篤な心筋障害を呈する Becker 型筋ジストロフィーの全国調査結果 .....	141
信州大学医学部第三内科 池田修一	

## VIII. Adhalin欠損症

- 39) Adhalin欠損悪性肢帯型筋ジストロフィーにおける臨床像と  
adhalin遺伝子異常の特徴 ..... 147  
徳島大学医学部第一内科 川井尚臣
- 40) Adhalin欠損悪性肢帯型筋ジストロフィーの心所見 ..... 154  
—臨床像と剖検所見について  
徳島大学医学部第一内科 川井尚臣
- 41) 正常骨格筋線維における adhalinの超微局在と dystrophin,  
 $\beta$ -dystroglycan,  $\beta$ -spectrinとの相互関係について ..... 159  
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山吉弘
- 42) Adhalin欠損症の細胞接着分子に関する免疫組織化学的研究 ..... 163  
鹿児島大学医学部第三内科 納光弘
- 43) 末梢神経における dystrophin関連・結合蛋白の機能・構造解析 ..... 166  
帝京大学医学部神経内科 清水輝夫
- 44) dyマウス骨格筋細胞膜微細構造の解析—mdxマウスとの比較検討— ..... 171  
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山弘

## IX. ミトコンドリア脳筋症

- 45) ミトコンドリア脳筋症各病型の筋病理所見と変異mtDNAの比較検討 ..... 177  
熊本大学医学部神経内科 内野誠
- 46) ミトコンドリアミオパチーの成因に関する分子生物学的研究 ..... 180  
国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部 後藤雄一
- 47) MERRFにおける新たなミトコンドリアtRNA遺伝子上の変異 ..... 182  
国立遺伝学研究所 宝来聰
- 48) MERRFの心筋ミトコンドリア病変についての研究 ..... 185  
国立療養所犀潟病院神経内科 福原信義
- 49) 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いた in situ hybridizationによる  
4977bpの欠失を伴う変異ミトコンドリアDNAの検出 ..... 188  
順天堂大学医学部脳神経内科 水野美邦
- 50) ミトコンドリア遺伝子変異型と表現型 ..... 193  
名古屋大学医学部生化学第二講座 小澤高将
- 51) ミトコンドリア損傷によるアポトーシス誘導のシグナル  
—ミトコンドリア脳筋症の負の遺伝子治療をめざして ..... 198  
日本医科大学老人病研究所生化学部門 太田成男



# I . 臨床 · 分子病理学

# 1) Rigid spine syndromeの臨床・筋病理学的検討

田邊 等\*

研究協力者 磯崎英治\* 藤本陽子\* 川田明広\*  
宮本和人\* 松原四郎\*

## はじめに

Rigid spine syndrome (RSS) は、1965年にDubowitz<sup>1)</sup>が提唱した疾患であり、現在までに約60例の報告例がある。しかし、種々な合併症を有するRSSのvariantとしての報告も多く、例えば心筋症、著明な呼吸不全、高CK血症、あるいは筋萎縮の分布が四肢近位部でなく肩甲下腿型を示した例などであり、それ故RSSが一つの独立した疾患単位であるのか否かが問題となっている。こうした点をふまえ、我々は自験例の臨床・筋病理学的所見をsplittingでなく、むしろlumpingの立場から再検討し、さらに文献報告例との比較検討を行った。

## 対象および方法

対象は、当院にてRSSと診断された6例(表1)および記載の十分な文献報告49例である。自験例の症例6についてはすでに共同研究者の一人(Kawata<sup>2)</sup>)により報告されている。筋病理所見については半定量化のため、筋線維の大小不同およびendomysium～perimysiumの線維化の程度をそれぞれ軽度、中等度、高度に分け、文献報告例についても記載内容を参考に同様に分類した。

表1 自験RSS6例の臨床・筋病理所見

症例	1	2	3	4	5	6
年齢/性	57/M	32/M	21/M	42/M	21/F	20/F
発症年齢	10	4	3	2	4	6
歩行不能年齢	34	26	20	38	—	—
SCMの萎縮	+	+	+	+	+	+
心電図異常	—	—	—	—	—	—
%肺活量	気切	39%	↓	39%	75%	気切
筋病理						
大小不同	++	++	++	++	++	+
線維化	++	+	++	++	+	+
タイプ優位	—	—	—	タイプ1	タイプ1	—
構築異常	++	+	—	+	+	+
RV	+	+	—	—	—	+

SCM: 胸鎖乳突筋 RV:rimmed vacuoles

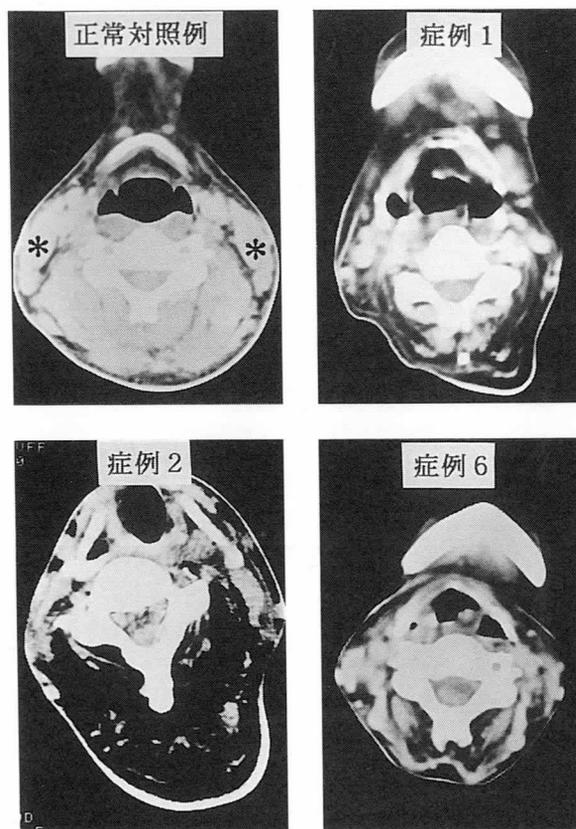


図1 頸部における骨格筋CT像

正常対照例における胸鎖乳突筋(SCM, \*で示す)に比し、RSS例ではいずれも中等度から高度の萎縮を認める。

## 結果

自験6例の検討: 全例で胸鎖乳突筋(SCM)の萎縮を肉眼的に認め、頸部の骨格筋CT像では同筋のvolumeの減少ないし消失を認めた他、傍脊柱筋を中心とする後頸部の筋群の低吸収域を認めた。症例6のようにまだ歩行可能な例においても上記の所見は明らかであった(図1)。呼吸機能については、全例で%肺活量(%VC)の低下を認め、特に症例1, 6においてはそのために気

\*東京都立神経病院神経内科

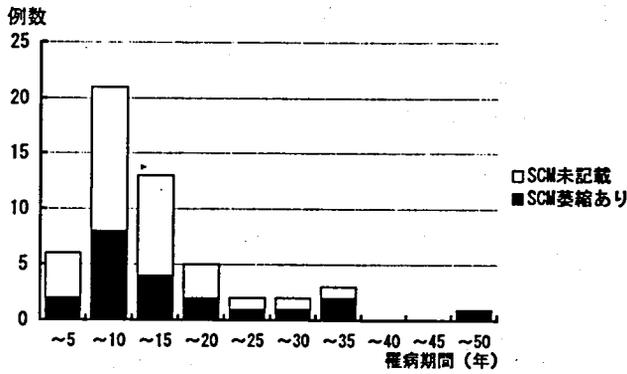


図2 胸鎖乳突筋(SCM)萎縮の出現頻度  
発症早期より、SCMの萎縮を認める。

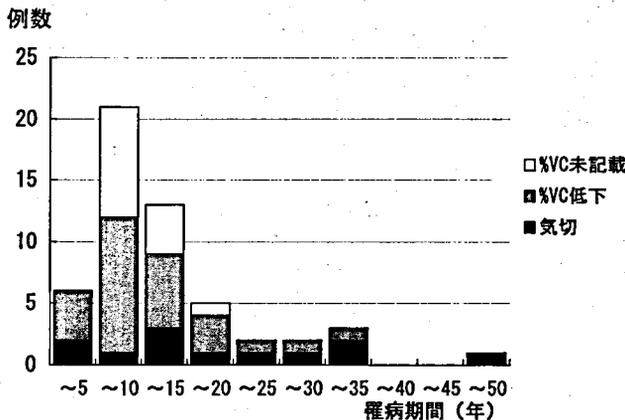


図3 拘束性換気障害の出現頻度  
発症早期より、気管切開術を必要とする重症例を含め、高率に拘束性換気障害を認める。

管切開術を必要としたが、嚥下機能はいずれの例もよく保たれていた。筋生検所見は、全例で種々な程度に筋線維の大小不同、線維化、中心核の増加などいわゆる筋原性変化を示し、症例5では神経原性変化も混在していた。さらに、症例1, 2, 6の3例ではrimmed vacuole (RV)を認めたが、その数は全視野で3から4個程度であった。

自験6例に文献報告49例をあわせた55例の検討：SCMの萎縮を認めた例は、22/55例(40%)、また拘束性換気障害(%VCの低下)を認めた例は、44/55例(80%)であり、何れも発症早期(罹病期間5年以内)から認められた(図2, 3)。筋生検所見上、延べ51検体中14検体(27%)でRVの出現をみた。RVを認めた筋(14検体)は、RVを認めない筋(37検体)に比し、筋線維の大小不同や線維化の程度が強く(図4)、lobulated fiberやmoth-eaten fiberなどの筋構築異常も高率に示し、また神経原性変化を加味する傾向にあった。一方、生検部位別にRVの出現率をみると、四肢筋では49例中13例(27%)であるのに対し、傍脊柱筋では11例中8例(73%)と高率であった。RSSをRVの有無で2群に分

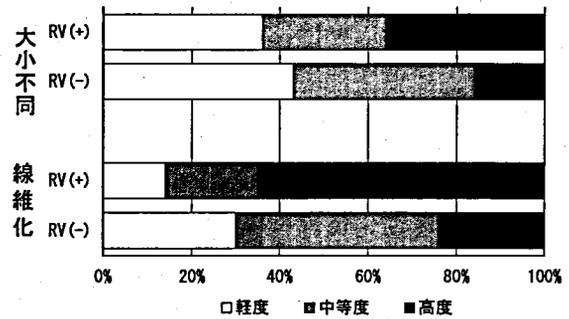


図4 Rimmed vacuoles (RV)と筋病変の程度

RVを有する筋(14検体)では、それを認めない筋(37検体)に比し、より高度の筋病理所見(大小不同、線維化)を呈する。

けると、RV陽性群(22例)では、RV陰性群(33例)に比し、拘束性換気障害やSCM萎縮の出現率がやや高い傾向にあったが、同時に罹病期間も有意に長かった。

### 考 察

1965年、Dubowitz<sup>1)</sup>が提唱したRSSの臨床的特徴は、「乳児期発症、頸椎から腰背部脊椎の前屈障害、肘・足関節の運動制限、四肢近位筋の筋力低下を主徴とする緩徐進行性ないし非進行性のミオパチーであり、側彎や関節拘縮は進行しうる」というものであった。しかし、その後、前述したような種々なvariantsの報告、不定の遺伝形式、病態名である「rigid spine」と疾患名である「rigid spine syndrome」との用語使用上の混同、筋生検所見の多様性などのため、現在でもなおRSSはheterogeneousな疾患であるとする傾向にある。我々は、自験例を含めた55例の臨床・筋病理学的検討の結果、上記のDubowitzの記載以外に、発症早期からのSCMの萎縮および進行性の拘束性換気障害もRSSの特徴であると考えた。後者についてはすでに指摘されており<sup>3)~6)</sup>、拘束性換気障害の原因は、呼吸筋の筋力低下およびrigid spineに起因する胸郭運動制限によると考えられている<sup>6)</sup>。SCMは頭部前屈作用の他に、呼吸補助筋としての作用(吸気時に胸郭の挙上開大を行う)も有することから、同筋の萎縮・筋力低下は換気障害の一因になりうる。SCMの萎縮をきたすミオパチーには筋緊張性ジストロフィーの他、RVを伴う遠位型ミオパチー、封入体筋炎、糖原病(Debrancher欠損症)などが知られているが、RSSもその一つと考えられる。

一方、RVは前述した様に筋線維の大小不同や線維化など筋原性変化のより強い筋で出現する傾向にあり、しかも自験例で見る限りRVの数は全視野で3~4個と少ないことより、筋の変性に伴って非特異的、二次的に出現したと考えた。一般にRSSでは四肢筋に比し、

傍脊柱筋においてより筋の変性所見が強いとされており、それ故にRVは変性所見の強い傍脊柱筋において、より高率に出現したと思われる。同一症例で、四肢筋と傍脊柱筋の両方を検索した上原ら<sup>7)</sup>も同様に考えている。RVの有無によりRSSが2群に分かれる可能性を指摘している報告もあるが<sup>8)</sup>、55例を対象とした我々の結果からは、呼吸機能上両群間で明らかな差はなく、また上述したようにRSSにおけるRVは二次的に出現したと考えられるので、RVの有無でRSSを2群に分けることは本質的ではないと思われる。ただし、Lotzら<sup>5)</sup>の報告は、筋病変の程度についての記載がなく、彼らのいうvacuolar typeのRSSにみられるRVが、二次的に出現したRVとみなせるか否かは不明である。Emery-Dreifuss型筋ジストロフィー(EDMD)は、RSSと最も鑑別を要する疾患であり、症候学的な特徴のみではしばしば鑑別が困難である。実際、RSSとして経過観察されていた例が、その後心伝導障害をきたし、またgenetic studyの結果からEDMDと診断された例もある<sup>9)</sup>。しかし、我々が調べた限りでは、少なくとも典型的なEDMDにおいては、重篤な呼吸障害もSCMの萎縮についても、またRVについても報告がなく、これらは心伝導障害とともにRSSとEDMDとの臨床的鑑別点になりうると思われる。

#### 文 献

- 1) Dubowitz V: Pseudo muscular dystrophy. In Reserch Committee of the Muscular Dystrophy Group of Great Britain: Proceedings of the Third Symposium. Pitman Medical, London, 1965, p57.
- 2) Kawata A, Suga M, Miyamoto K, et al: Rigid spine syndrome and nocturnal alveolar hypoventilation. *Internal Med* 32: 638-640, 1993.
- 3) Poewe W, Willeit H, Sluga E, et al: The rigid spine syndrome—a myopathy of uncertain nosological position. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48: 887-893, 1985.
- 4) Merlini L, Granata C, Ballestrazzi A, et al: Rigid spine syndrome and rigid spine sign in myopathies. *J Child Neurol* 4: 273-282, 1989.
- 5) Lotz BP and Stubgen JP: The rigid spine syndrome: A vacuolar variant. *Muscle and Nerve* 16: 530-536, 1993.
- 6) Ras GJ, Staden MV, Schultz C, et al: Respiratory manifestations of rigid spine syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 540-546, 1994.
- 7) 上原真理子, 原 朋邦, 上原 哲ほか: 強直性脊椎症候群(rigid spine syndrome)の1例—骨格筋の組織学的, 組織化学的所見を中心として—. *神経内科* 16: 50-56, 1982.
- 8) 小野寺 理, 山崎元義, 渥美哲至ほか: Rimmed vacuoleを認めたRigid spine syndromeの一例. *臨床神経* 30: 516-519, 1990.
- 9) Voit T, Krogmann O and Lenard HG: Emery-Dreifuss muscular dystrophy: Disease spectrum and differential diagnosis. *Neuropediatrics* 19: 62-71, 1988.

## 2) MDX マウス及び諸種神経筋疾患における Fibroblast growth factors, Heparan sulfate proteoglycanの免疫組織学的研究

田 邊 等\*

研究協力者 水野美彦\*\* 繁友律子\*\* 小森穂子\*\*

### はじめに

Fibroblast growth factor (FGF)は体内の多くの細胞に存在し、細胞の再生・分化に重要な役割を果たしている。FGFはacidic FGF(aFGF), basic FGF(bFGF)を初めとして7つのものが現在までに発見され、また、そのreceptor(FGFR)も4つが見ついている。ところでaFGF及びbFGFはheparin-binding growth factor familyに属する蛋白で<sup>1)</sup>、heparinあるいはheparansulfate proteoglycan(HSPG)と強く結合し<sup>2)</sup>、その作用の一つとして*in vitro*で筋細胞の発育・分化にも深く関わっていることが報告されている<sup>3)4)</sup>。

ところで、MDXマウスはBulfieldらによって最初に見出され、X-linked recessiveな遺伝を示し、dystrophin欠損を示すことより、DMDの動物モデルと考えられている。しかしながら、DMDが進行性を示すのに対して、MDXマウスは再生が活発で進行性を示さない。同じ遺伝子欠損を示しながら臨床症状が異なる原因については未だ説明されていない。OliverらはMDXマウスにおいてaFGFがcontrol mouseに比べて強く細胞外matrixに染色されることを免疫組織学的研究によって報告している<sup>5)</sup>。一方、DiMarioらもbFGFがMDXマウスの細胞外matrixに存在することを示している<sup>6)</sup>。これらFGFの存在は筋細胞の再生と密接な関係があると考えられており、MDXマウスにおけるsatellite cellの活性化及び変性後の活発な再生をもたらしていると考えられる。一方、ヒトの筋におけるFGFの局在については、文献的に調べた限り記載はない。D'Amoreら<sup>7)</sup>はDMD患者血清中にbFGFが増加していることを報告しているが、免疫組織学的には証明しておらず、それが筋由来のものか否かは断定できない。今回、我々はMDXマウス及び諸種神経筋疾患の筋組織におけるaFGF、bFGF及び

HSPGの局在について免疫組織学的に検討したので報告する。

### 対象・方法

MDXマウス、対照B-10マウス、Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)、福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)、皮膚筋炎(DM)、Werdnig-Hoffmann病(WH)、中枢性hypotonia(CH)症例、各2例の生検筋を使用した。凍結標本より8 $\mu$ の切片を作り、HISTOFINE Kitt(ニチレイ)を用い、免疫蛍光法により施行した。使用した抗体はaFGF、bFGFはpurified human recombinant aFGF及びbFGFを、HSPGについてはBovine originの各々モノクローナル抗体を使用した。抗体の希釈倍率はそれぞれaFGF(300 $\times$ )、bFGF(400 $\times$ )、HSPG(150 $\times$ )である。

### 結 果

まずMDX、B-10においてはaFGF、bFGF、HSPGとも細胞外matrix、及び変性筋線維内に存在し、bFGFはその他に再生期の筋鞘核、血管内皮細胞核、間質細胞核などの核膜に、そしてaFGF、HSPGは血管内皮細胞にも存在した(図1)。一方、ヒトの神経筋疾患ではbFGFが同様に一部の筋鞘核、血管内皮細胞核、間質細胞核の核膜に、aFGF、HSPGが血管内皮細胞に存在したのみで、細胞外matrixや変性線維内にはいずれも認められなかった(図2)。

### 考 察

aFGF、bFGFは体内の種々の細胞において再生・分化に影響を与えていると考えられている。骨格筋においても*in vitro*ではこれらFGFはmyoblastの増殖を促すことが知られている。FGFは細胞内で合成され、細胞の変性に際しては一旦細胞外に分泌され、extracellular matrixに存在するHSPGとlow affinity bindingを生じ活性化される。次にやはり細胞膜に存在するFGFRとhigh affinity bindingを生じ、

\*東京都立神経病院神経内科

\*\*東京都立神経病院神経小児科

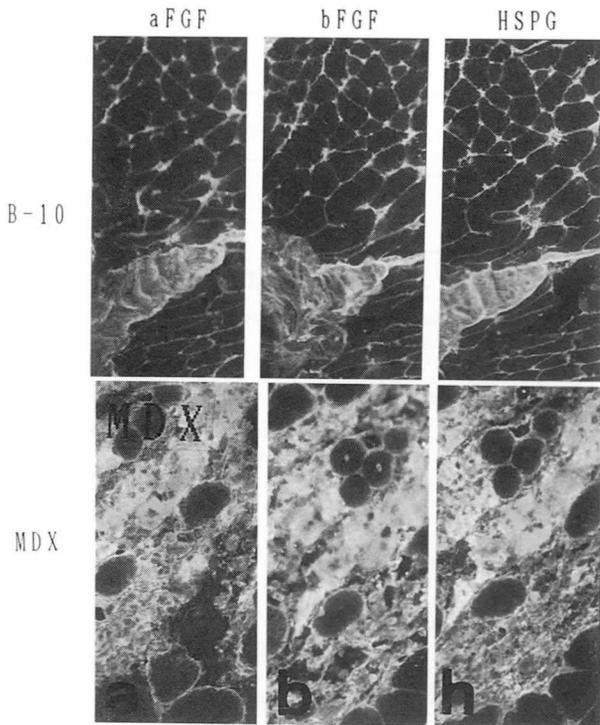


図1 B-10及びMDXマウスにおける, aFGF, bFGF, HSPGの免疫蛍光染色所見. MDXでは変性線維は細胞内に強く染色される.

細胞内に取り込まれ再生賦活作用を現すとされている<sup>8)</sup>. 今回の結果からMDXではaFGF, bFGF, HSPGとも主としてextracellular matrixに存在していることが示された. 変性筋線維内で強く染色されたことは, 上に述べた機序によって FGFが細胞内に入り活性を現していることが考えられた. これに対してヒトではこれらはいずれも extracellular matrixにも変性筋線維内にも存在していないことが明らかとなった. MDXにおける活発な再生がこれらFGFによってもたらされると仮定するならば, ヒトの筋ジストロフィーにおいては FGFあるいはHSPGの欠如が活発な再生を阻害していることが考えられ, 進行性を説明しているものと考えられた. 一方, bFGFは筋細胞からreleaseされDMD患者の血清中に増加していることが報告されているが, 例え分泌されてもHSPGの欠如により筋膜に結合しなければ, 血清中に吸収されることが考えられる. また, 一方では遊離した bFGFはfibroblastを刺激し, fibrosisを生ずることも考えられる. 以上の結果より, MDXマウス及びDMDにおける再生能力, すなわち進行性の違いはヒトにおけるこれらFGF,あるいはHSPGの欠如による可能性が示唆された.

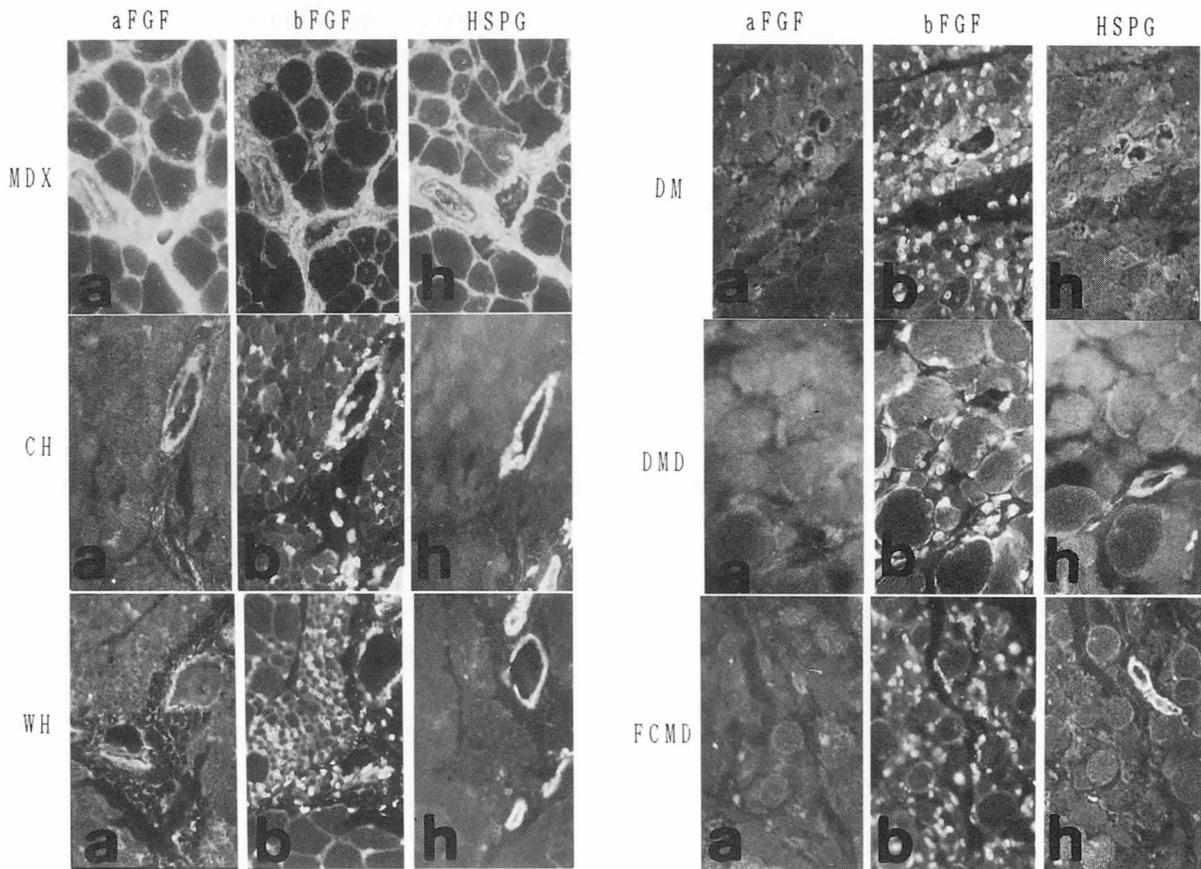


図2 MDXマウス及びヒト神経筋疾患におけるaFGF, bFGF, HSPGの免疫蛍光染色所見.

今後検討すべき問題として, human origin の HSPG での検討, TGF- $\beta$ , IGF 等, やはり myogenesis に関係しているといわれている他の FGF による検討, ヒト筋細胞膜に FGFR が存在するか否かの検討, 更に, ヒト筋からの aFGF, bFGF, HSPG などの bioassay が必要である. *In vitro* で HSPG が欠如している細胞において, 外から heparin を投与すると bFGF は FGFR と high affinity binding を生じ, その結果筋細胞の mitogenic reaction を起こし活発な再生が生じることが報告されており<sup>8)</sup>, 治療上からも重要な問題を含んでいる.

#### 結 語

1. MDX マウス, B-10 マウス及びヒト神経筋疾患における aFGF, bFGF, HSPG の局在を免疫蛍光法により検討した.
2. aFGF, bFGF, HSPG とも MDX マウス, B-10 マウスでは細胞外マトリックス, 変性筋線維内に存在したが, ヒトでは認められなかった.
3. MDX マウスとヒト筋ジストロフィーにおける再生能力の違いはこれら FGF あるいは HSPG の欠如による可能性が示唆された.

#### 文 献

- 1) Burgess WH and Maciag T: The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of protein. *Annu Rev Biochem* 58: 575-606, 1989.
- 2) Saksela O, Moscatelli D, Sommer A and Rifkin DB: Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 107: 743-51, 1988.
- 3) Oliver L, Raulais D and Vigny M: Acidic fibroblast growth factor (aFGF) in developing normal and dystrophic (mdx) mouse muscles. Distribution in degenerating and regenerating mdx myofibers. *Growth Factors* 7: 97-106, 1992.
- 4) Groux-Muscatelli B, Bassaglia Y, Barritault D, Caruelle JP and Gautron J: Proliferating satellite cells express acidic fibroblast growth factor during in vitro myogenesis. *Devel Biol* 142: 380-385, 1990.
- 5) Jose-Silverstain J, Consigli SA, Lyser KM and Pault CV: Basic fibroblast growth factor in the chick embryo: Immunolocalization to striated muscle cells and their precursors. *J Cell Biol* 108: 2459-2466, 1989.
- 6) DiMario J, Buffinger S, Yamada S and Strohman RC: Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science* 244: 688-690, 1989.
- 7) D'Amore PA, Brown, Jr. RH, Ku P-T, Hoffmann EP, Watanabe H, Arahata K, Ishihara T and Folkman J: Elevated basic fibroblast growth factor in the serum of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 35: 362-365, 1994;
- 8) Klagsberg M, Baird A: A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* 67: 229-231, 1991.

### 3) サイトカインと筋萎縮

木南英紀\*

研究協力者 辻 伸 利 政\*\* 戎 井 力\*\*  
藤 田 淳 也\*\* 門 田 守 人\*\*

#### はじめに

筋ジストロフィー症や急性筋壊死のモデルでは、筋細胞の変性・壊死の初期過程に自食作用の誘起とリソソーム内タンパク分解の亢進像がみられることを報告してきた<sup>1)</sup>。しかし、筋崩壊に伴うタンパクの分解のメディエーター、とくにサイトカインの関与については十分に検討されていない。IL-6は筋蛋白分解の誘導因子として一つの有力候補であり、実際筋萎縮が明らかかな癌の悪疫質では、筋蛋白分解を誘導することが報告されている<sup>2)</sup>。我々は2C12C筋管細胞を用いた実験で、IL-6が長寿命のタンパク質の半減期を短くし、それに対応してリソソームカテプシン群の活性増加をもたらすことを明らかにしてきた<sup>3)</sup>。今回はIL-6のトランスジェニックマウスを用いて、IL-6による筋蛋白分解の誘導・筋萎縮とリソソーム蛋白分解系の関連について解析した結果を報告する。

#### 材料と方法

トランスジェニックマウス：C57BL/6JLd-IL-6トランスジェニックマウスはすでに報告されている方法<sup>4)</sup>に従い、H-2Ldプロモーターと融合させたヒトIL-6cDNAを含む3.3キロ塩基対をマウス受精卵に注入して作成した。

活性測定：カテプシンBおよびLの活性はZ-Arg-Arg-MCA, Z-Phe-Arg-MCAをそれぞれ基質として測定した<sup>5)</sup>。

RNA解析：腓腹筋から全mRNAを抽出し、アイソトープ標識したラットカテプシンおよびLcDNAをプローブとしてノーザンブロッティングを行なった。

免疫組織化学的検査：腓腹筋の凍結切片を作成し、抗ラットカテプシン抗体を用い、ABC法で染色した。

#### 結 果

トランスジェニックマウスではコントロールマウスに比べ、体重が重いにもかかわらず、腓腹筋の重量は有意に低下していた(図1)。筋重量の減少に関連して

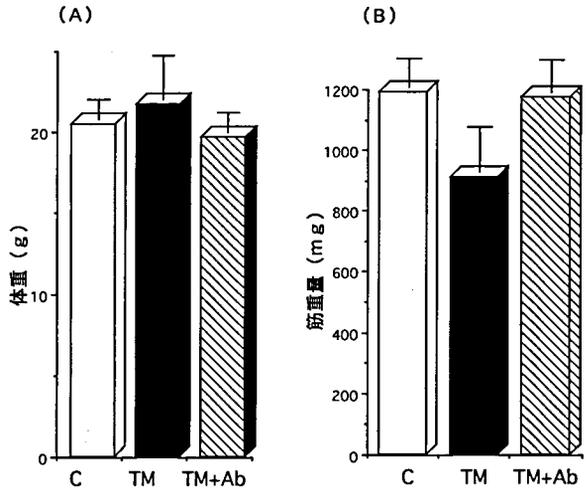


図1 コントロール(C), IL-6トランスジェニックマウス(TM)および抗-マウスIL-6受容体抗体処理IL-6トランスジェニックマウス(TM+Ab)における体重(A)および腓腹筋の重量(B)。

トランスジェニックマウスの筋カテプシンおよびL(B)活性が著明に上昇していた(図2)。この二つのカテプシン活性の増加はプロテアーゼ抗原およびmRNAの上昇を伴っており、生合成の増加によると考えられた。Duchenne型筋ジストロフィー症およびmdxマウスでの筋カテプシン活性の著明な増加は主として浸潤マクロファージに由来することを以前に報告した<sup>1)</sup>。そこで、IL-6トランスジェニックマウスでのカテプシン活性の増加がマクロファージ由来かどうか組織学的に調べたところ、筋線維の周辺に単球系およびプラズマ細胞が散在している所見は見られるが、筋線維内にはまったく浸潤細胞は見られなかった。免疫組織化学的手法では、図3に示すようにカテプシンBおよびL抗体に陽性の微細な顆粒状の染色像がトランスジェニックマウスの筋細胞内に観察できる。しかしコントロールマウスでは陽性反応はみられなかった。そこで、次にIL-6の受容体に対するモノクローナル抗体を投与して、IL-6によって誘起された筋タンパクの崩壊・萎

\*順天堂大学医学部生化学第一講座

\*\*大阪大学医学部第二外科

縮が抑制されるかどうかを検討した。生後5週目に大量の抗体(2mg/体重)を静脈注射し、6週目から14週目までは週2回0.1mg/体重を投与し、16週齢で投与の効果調べた。図1に示すように、受容体抗体の投与ではほぼ完全に、トランスジェニックマウスでみられる体重の増加と筋重量の低下が抑制されている。また、トランスジェニックマウスの腓腹筋で検出されたカテプシンBおよびLの活性並びにそれらのmRNAのレベルの著明な増加もほぼ完全に抑制されていた(図2)。腓腹筋線維にみられた自食作用亢進を示唆するカテプシンの免疫組織化学的パターンも正常化していた(図3)。

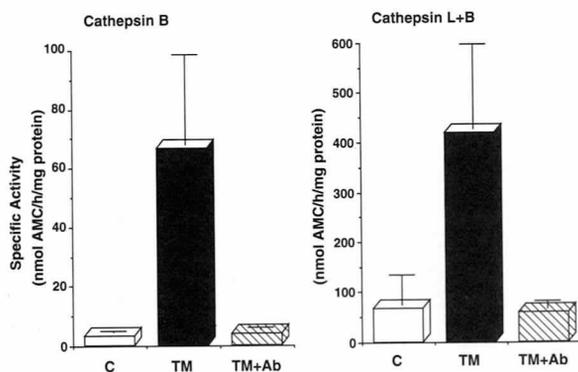


図2 コントロール(C), IL-6 トランスジェニックマウス(TM)および抗-マウスIL-6受容体抗体処理IL-6トランスジェニックマウス(TM+Ab)腓腹筋におけるカテプシンBおよびカテプシンL+B活性。

## 考 察

IL-6トランスジェニックマウスではリンパ節、脾臓、胸腺に著明な plasmacytosis と肺、肝、腎にプラズマ細胞の浸潤をきたす。肝脾の腫大のためコントロールマウスより体重の増加がみられるが、逆に筋肉は著明な萎縮をおこす。トランスジェニックマウスにおけるヒトIL-6の血清濃度は生後4~8週で200~400pg/ml、12週齢では600pg/mlに達する。今回の結果はIL-6の過剰産生が筋の萎縮をもたらすこと、また萎縮の進行に伴い、腓腹筋の著明なカテプシン活性およびmRNAの増加をひきおこすことを示した。IL-6トランスジェニックマウス筋におけるカテプシンの免疫組織化学的染色パターンは、プラスモシドーミオパチーの初期や幼弱mdxマウスでみられるまだマクロファージの浸潤が軽微な萎縮筋線維の染色パターンと酷似している。筋線維内のカテプシンの増加は活発なリソソーム蛋白分解系の働きを示すものであり、細胞内に蓄積した異常タンパクの除去と共に、障害を受けた筋細胞膜を積極的に除去・修復している像と理解できる。リソソーム分解系は細胞の容積のコントロールに大きな役割をもっており、障害細胞膜の持続的な処理の結果、筋の萎縮をもたらすと考えられる。

マウスIL-6受容体抗体の投与は上述したすべてのIL-6過剰発現によってもたらされた現象を阻止した。この実験結果は、ヒトIL-6がマウスIL-6受容体に結合してその後のIL-6の情報伝達を阻害したことを示唆する。IL-6によって誘導されるシグナリングの過程がカテプシンの増加やおそらくオートファゴゾームの形成と密接な関連があると考えられる。その詳しいメカニズムは今後の課題である。IL-6トランスジェニック

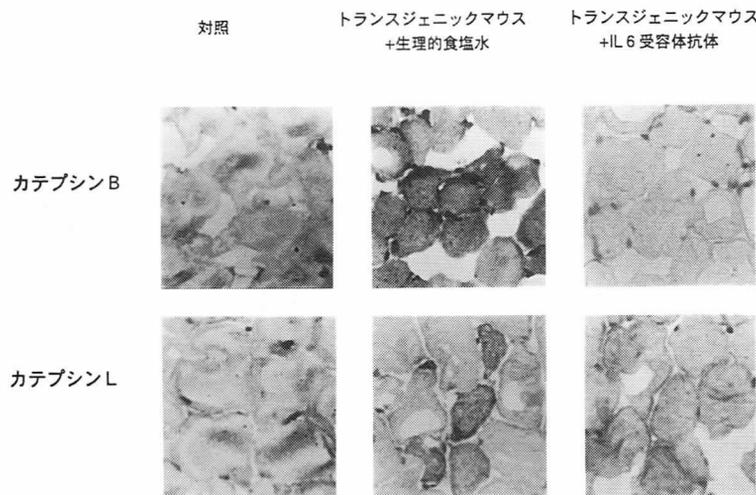


図3 コントロール(C), IL-6 トランスジェニックマウス(TM)および抗-マウスIL-6受容体抗体処理IL-6トランスジェニックマウス(TM+Ab)腓腹筋におけるカテプシンBおよびカテプシンLの免疫組織像。

マウス筋では、リソソーム蛋白分解系のみならず、ユビキチン-プロテアソーム蛋白分解系の活性化ももたらす<sup>7)</sup>。IL-6による筋萎縮はこれら細胞内の主要な蛋白分解系の活性化の結果によると思われる。IL-6受容体抗体は主要な蛋白分解系の発現の亢進をブロックするため、著明な効果が得られたのであろう。本研究は筋ジストロフィーを含む種々の筋消耗性疾患に対するIL-6受容体抗体の治療薬としての可能性を示すが、その効果は筋ジストロフィーの筋病像の形成にIL-6がどの程度関与しているかに依存すると考えられる。

#### 文 献

- 1) Kominami E, Ii K and Katunuma N: Activation of the intramyofibrillar autophagic lysosomal system in muscular dystrophy. *Amer J Pathol* 127: 21-26, 1987.
- 2) Strassmann G, Fong M, Kenney JS and Jacob CO: Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest* 89: 1681-1684, 1992.
- 3) Ebisui C, Tsujinaka T, Morimoto T, Kan K, Iijima S, Yano M, Kominami E, Tanaka K and Monden M: Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases cathepsins B and L, proteasome in C2C12 myotubes. *Clin Sci* 89: 431-439, 1995.
- 4) Yamamura K, Kikutani H, Takahashi N, Taga T, Akira S, Kawai K, Fukuchi K, Kumahara Y, Honjo T and Kishimoto T: Introduction of human  $\gamma$  1 immunoglobulin genes into fertilized mouse eggs. *J Biochem* 96: 357-363, 1984.
- 5) 木南英紀, 板東祥晃: チオールプロテアーゼ. “蛋白質分解酵素 I, 生物化学実験法 30” (鶴 大典, 船津 勝編) 学会出版センター, 1993, pp39-56.
- 6) Tsujinaka T, Ebisui C, Fujita J, Kishibuchi M, Morimoto T, Ogawa A, Kasume A, Ohsugi Y, Kominami E and Monden M: Muscle undergoes atrophy in association with increase of lysosomal cathepsin activity in interleukin-6 transgenic mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 168-174, 1995.
- 7) Tsujinaka T, Fujita J, Ebisui C, Yano M, Kominami E, Tanaka K, Katsume A, Ohsugi Y, Shiozaki H and Monden M: Interleukin-6-receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin-6 transgenic mice. *J Clin Invest*: in press.

## 4) 共焦点レーザー顕微鏡を使用したヒト疾患培養筋細胞内の動的細胞内カルシウム濃度変化

小林 高 義\*

研究協力者 田中 宏 明\* 山本 雅 彦\*

### 目 的

細胞内カルシウムは、細胞内の各種情報伝達系の中で重要な役割を果たし、一方その細胞内での異常は、細胞死の引き金になると考えられている。我々は、最近開発された共焦点レーザー顕微鏡を使用して、各種イオンの動的変化を同時に測定することにより、神経筋疾患の病態解明を行うためのシステムの開発を行っているが、今回は、蛍光カルシウム指示薬を使用して、ヒト培養筋細胞における脱分極刺激による細胞内カルシウムの変化及びカフェイン負荷による calcium induced calcium release (CICR) に関して検討を行ったので報告する。

### 対象及び方法

対象は、多発筋炎、運動ニューロン疾患など筋細胞自身に内因性の障害がないと考えられる筋組織4例を control筋として、低カリウム性周期性四肢麻痺1例、臨床的に筋萎縮・筋力低下を認めず、ジストロフィン染色を含む筋病理に特異的変化の認められない一過性高CK血症5例、筋緊張性ジストロフィー6例の生検筋の一部を培養に使用した。また、ヒト筋細胞との比較検討のために、ラット筋細胞の cell line (R615) 及び不死化ラット神経細胞 (CL8c4.7) を使用した。ヒト筋細胞の培養は、以前より報告している如く explant-reexplantation法により筋単層培養を作成した。ラット筋細胞及び神経細胞の cell line はトリプシンで分離培養して用いた。培養液は、DMEM 67%, medium 199 23%, FBS 10%, 25ng/ml FGF, 10ng/ml EGF, 10ug/ml insulin を添加した培養液を使用し、cell line に関しては10%FBS以外特に growth factor の添加していない培養液を使用した。細胞内カルシウム濃度の測定には、fluo-3を使用し、fluo-3/AM10uMを37度の incubator 内で30~120分 loading して使用した。共焦点顕微鏡は、LSM310 (Carl Zeiss 社) を使用し、アルゴンイオンレーザーを用い、波長488nmで励起し、

525nm付近で蛍光を測定した。灌流系には、ペリスタポンプを使用し、低速灌流し、4mMのカリウム濃度溶液を標準液として、脱分極刺激として、10, 20, 50mM カリウム濃度溶液及びカフェインによる CICR を測定するために、1, 2.5, 5, 10, 20mM のカフェイン標準液を作成し、測定を行った。

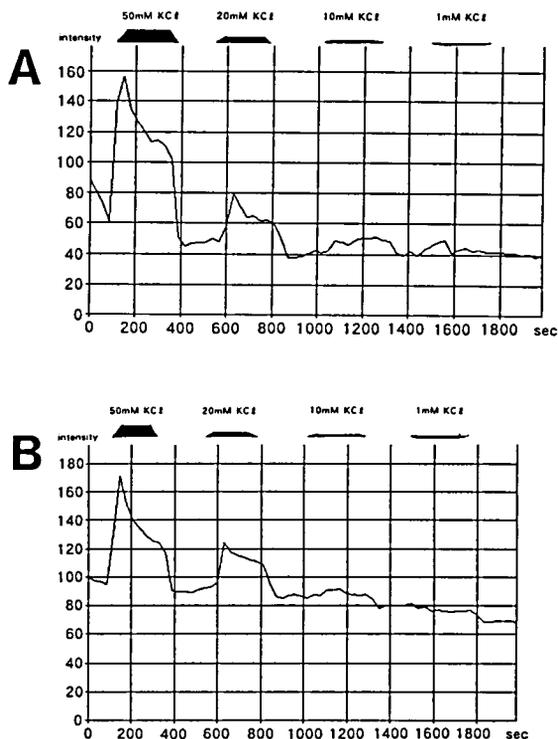


図1 脱分極刺激による  $[Ca]_i$  の変化

- A. Control (運動ニューロン疾患, 47歳, 女性) 培養26日目。  
B. 筋緊張性ジストロフィー (56歳, 男性) 培養25日目。

50mM, 20mM, 10mM の高カリウム溶液及び 1mM の低カリウム溶液を連続的に灌流した時の  $[Ca]_i$  の変化を示す。

\*東京医科歯科大学医学部神経内科

## 結 果

(1) 脱分極刺激による $[Ca]_i$ の変化: ヒト培養筋細胞では, control及びいずれの疾患筋においても, 10, 20, 50mMの脱分極刺激によって, 細胞内カルシウム濃度は一過性に上昇し, その後脱分極中であっても急速に低下した. その一過性上昇の程度は, 細胞外カリウム

濃度に比例した(図1). ラット培養筋細胞においても同様の傾向が認められた. 特に低カリウム性周期性四肢麻痺の培養筋細胞では, 50mMの脱分極液中では, 一過性の $[Ca]_i$ の上昇後急速に低下し元のレベルにもどり, その後の4mMカリウム中では, むしろ $[Ca]_i$ が低下する時期が認められた. 一方, ラット培養神経細胞では, 高カリウム液灌流中は, 細胞内のカルシウム濃度は, 高濃度のまま維持され, その後4mM灌流液に戻した後ゆっくりとカルシウム濃度は低下するが,

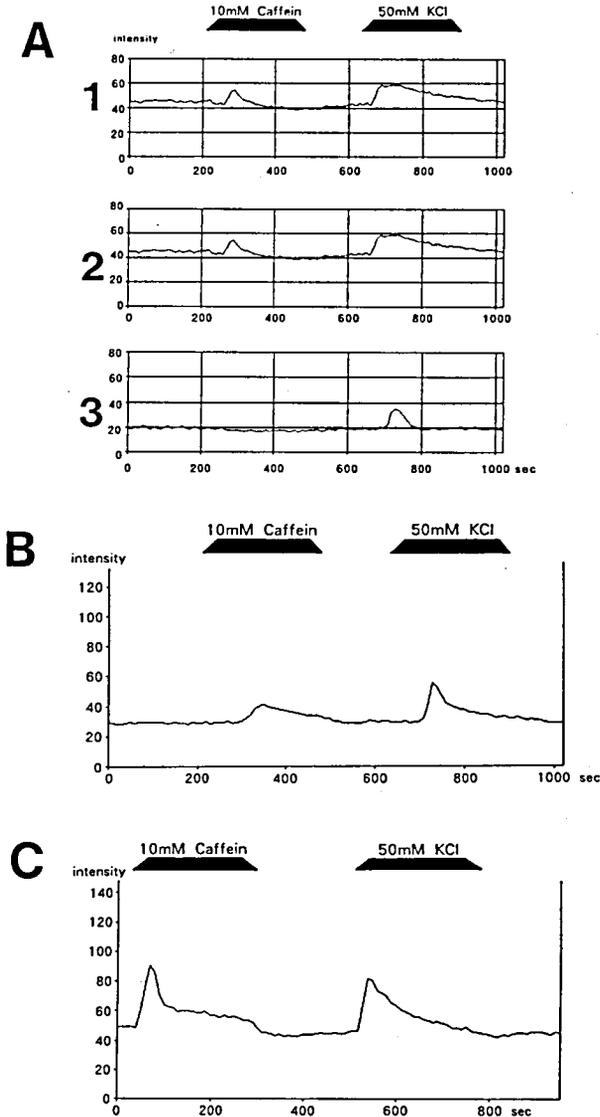


図2 カフェイン負荷及び脱分極刺激による $[Ca]_i$ の変化

- A. Control (皮膚筋炎, 30歳, 女性).  
培養30日目.
- B. 一過性高CK血症(34歳, 男性).  
培養29日目.
- C. 筋緊張性ジストロフィー(22歳, 男性).  
培養45日目.

10mMカフェイン溶液及び50mM高カリウム溶液を連続的に灌流した時の $[Ca]_i$ の変化を示す. A-1, 2, 3は異なる筋管細胞の反応を示す.

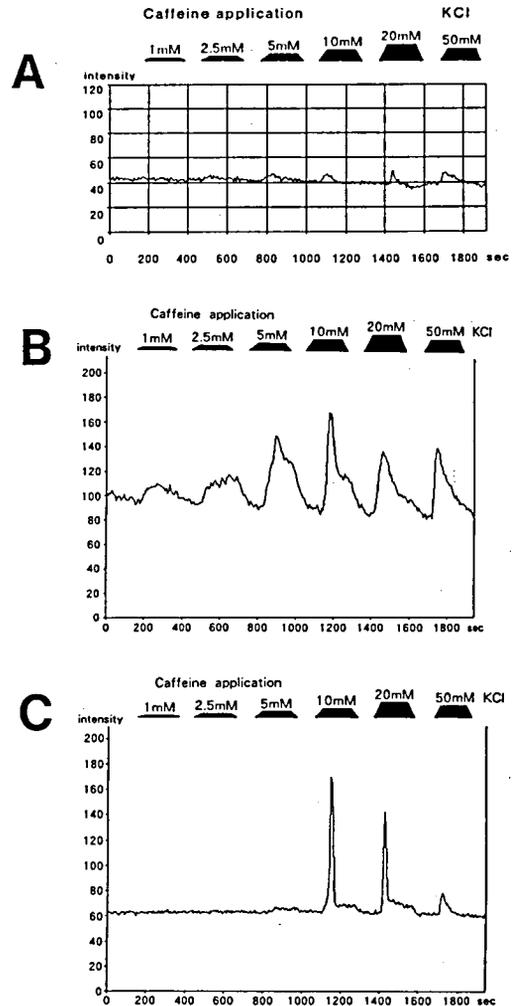


図3 異なる濃度の連続カフェイン負荷及び脱分極刺激による $[Ca]_i$ の変化

- A. Control (ポリニューロパチー, 25歳, 女性).  
培養97日目.
- B. 一過性高CK血症(34歳, 男性).  
培養29日目.
- C. 筋緊張性ジストロフィー(22歳, 男性).  
培養45日目.

1, 2, 5, 10, 20mMカフェイン溶液及び50mM高カリウム溶液を連続的に灌流した時の $[Ca]_i$ の変化を示す.

元のレベルにもどるには5~10数分以上の時間を必要とした。

(2) カフェイン負荷による細胞内[Ca]<sub>i</sub>の変化: ヒト筋管細胞に対して, 10mMカフェイン負荷及び50mMカリウム負荷による[Ca]<sub>i</sub>の上昇に関して検討を行ったが, control筋, 疾患筋共に50mMの脱分極刺激では, 急速な[Ca]<sub>i</sub>の上昇が一般的に観察されるのに対し, 10mMカフェイン負荷では, [Ca]<sub>i</sub>の立ち上がりは, 50mM脱分極刺激に比し急峻ではなく, その後プラトー成分が長く続く傾向があった(図2)。しかしながら, 筋緊張性ジストロフィーの6例中4例でカフェイン負荷によって[Ca]<sub>i</sub>の急峻な立ち上がりを認める筋管細胞が観察され(図2-C, 図3-C), MD培養筋の特徴と考えられるかどうか現在更に検討中である。図3に10mMカフェインに反応した筋細胞の低濃度カフェインに対する反応性を示す。図3-Aのcontrol筋は, 5mMから[Ca]<sub>i</sub>の上昇が認められ, Bの一過性高CK血症では, 1mMからはっきりとした[Ca]<sub>i</sub>の上昇が認められ, カフェイン負荷の時間的経過では, [Ca]<sub>i</sub>の上昇の状態がcontrol筋に比して遷延し, プラトー波が長く続く傾向が存在した。[Ca]<sub>i</sub>の上昇の程度は, カフェインの濃度が上がるにつれ上昇するが, 連続負荷では20mMでの反応はむしろ弱く, 10mMで最大になっていることがわかる。一方, Cの筋緊張性ジストロフィーの筋細胞では10mMカフェインから急速な

[Ca]<sub>i</sub>の上昇が認められた。表1に培養ヒト筋細胞におけるカフェイン負荷によって起こるCICRによる[Ca]<sub>i</sub>の変化を示す。control筋では, 10mMカフェインで[Ca]<sub>i</sub>の上昇が認められる筋管細胞が48.1%に認められ, 少数ではあるが, 2.5~5mMで, [Ca]<sub>i</sub>の一過性の上昇を認める筋管細胞が存在した。一方, 一過性高CK血症の5症例で79.8%の筋管細胞に10mMカフェインで[Ca]<sub>i</sub>の上昇が認められ, skinned fiberによるカフェイン拘縮試験の感受性が軽度亢進していた2例で1mMから明らかに反応する筋管細胞が存在した。筋緊張性ジストロフィーの6例では, 10mMカフェインで[Ca]<sub>i</sub>の上昇が認められる筋管細胞が63.3%に認められ, 2.5mMから反応する細胞が存在し, コントロールと一過性高CK血症との中間の値を示した。

### 考察及び結論

今まで培養ヒト筋細胞の細胞内カルシウム濃度の測定は, indo-1などを使用した静的状態での細胞内カルシウム濃度の検討の報告はあるが, 高濃度カリウム液の負荷による脱分極刺激あるいはカフェイン負荷によるCICRの検討は行われていない。今回の我々の検討では, ヒト培養筋細胞では, 脱分極刺激により細胞内カルシウム濃度が一過性に上昇し, 脱分極中であっても速やかに低下し, 一方培養神経細胞では, 脱分極中

表1 培養ヒト筋細胞におけるカフェイン負荷による[Ca]<sub>i</sub>の変化

	培養日数	10mMカフェイン		10mMカフェイン感受性細胞の低濃度カフェインに対する反応				skinned fiberによるカフェイン拘縮試験	
		培養日数	感受性細胞数 (%)	1	2.5	5	10	type1	type2
一過性高CK血症	1	22, 29	78.8 (n=33)	+	+	+	+	9.6±3.7	9.7±2.6
	2	33	60 (n=10)		±	+	+	7.5	9.7±2.0
	3	21, 28	92.3 (n=13)	+	+	+	+	10	9.8±3.4
	4	33	90 (n=10)					(20)	13.0±0.15
	5	14	77.7 (n=9)			±	+	(2.5-15)	12.1±1.9
mean		79.8±12.8							
筋緊張性ジストロフィー-1	1	76	75 (n=8)		±	+	+		
	2	45, 62	85.7 (n=14)		±	+	+		
	3	42	85.7 (n=7)		+	+	+		
	4	65	33.3 (n=6)						
	5	50	50 (n=2)	±	+	+	+		
	6	20	50 (n=4)						
mean		63.3±21.8							
コントロール	1	97	27.3 (n=11)			±	+		
	2	30	57.1 (n=7)		+	+	+		
	3	14	60 (n=5)		±	+	+		
	mean		48.1±18.1					10±3.7	12.4±1.8

細胞内カルシウム濃度はほぼプラトーの状態であった。このことは、培養筋細胞が神経細胞に比較して、細胞内でカルシウムを再取り込みをするSR系が発達しているためと考えられた。

今回の我々の実験で、ヒト培養筋細胞では、10mM前後のカフェイン負荷でCICRによる一過性の $[Ca]_i$ の上昇が認められた。特に一過性高CK血症の培養筋管細胞では、10mMカフェインに対し反応する筋管細胞が多く存在し、低濃度カフェインによるCICRが明らかに認められ、カフェイン感受性の亢進している筋管細胞が培養下でも存在していることが明らかにされた。筋緊張性ジストロフィーの筋管細胞では、カフェインによるCICRの反応はcontrol筋と一過性高CK血症の培養筋管細胞との中間の値を示したが、我々は

myotonin protein kinase (MtPK) が、SRのterminal cisternaeに強く局在していることを明らかにしており、筋緊張性ジストロフィーにおける、SRの機能異常の有無に関して更に検討をしていく予定である。

また今後筋細胞の各発達段階での、 $[Ca]_i$ の変化を、SRの発達とCICRの変化との関係でより詳細に検討すると同時に、今後、神経筋疾患の遺伝子レベルでの異常と、機能異常との関連、更に細胞死との関連の追究に本システムを活用していく予定である。

謝辞：Skinned fiberによるカフェイン拘縮試験を施行していただいた虎の門病院神経内科 高木昭夫先生に深謝いたします。

## 5) 筋ジストロフィーおよびミトコンドリア病生検筋における熱ショック蛋白の免疫染色

佐橋 功\*

研究協力者 衣斐 達\* 井 玲\* 丸井 公軌\*

### はじめに

Heat shock protein (HSP)は熱ショックを含む種々のストレスにより誘導され、変性蛋白と結合し、その凝集を妨げ、ストレスの防御反応に関与する。さらにHSPはストレス時だけではなく正常の細胞環境の中なかでも分子シャペロンとして機能し、蛋白の「折りたたみ」および「会合」に関与している。

HSPはいくつかのHSPファミリーからなり、それぞれの機能は異なり、細胞質・核・ミトコンドリア(mt)など様々に分布する。我々は筋ジストロフィー(PMD)とミトコンドリア病生検筋におけるそれぞれのHSPの局在を免疫染色にて観察し、その病態への関与について検討した。

### 対象および方法

対象はPMDはdystrophinopathyとしてDuchenne型(DMD)4, DMD保因者6, Becker型(BMD)12, その他のジストロフィーとして肢帯型(LG)15, 顔面肩甲上腕型(FSH)6, rimmed vacuole型遠位型(DMRV)4, 眼筋咽頭型(OPMD)4, 筋緊張性ジストロフィー(MyD)21, およびミトコンドリア病として慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)14, MELAS6, mtDNA多重欠失を伴う労作性ミオグロビン尿症2, Leber病2例である。生検筋は上腕二頭筋または大腿四頭筋より採取した。対照筋は病的所見を疑い筋病理学的異常を認めなかった10筋を用いた。

方法は新鮮凍結切片(8 $\mu$ m厚)を作成し、アセトン固定後ABC法(Vectastain ABC elite キット)による免疫組織化学を行った。一次抗体としては細胞質および核に存在するHSPとしてHSP70 (Sigma), HSP90, HSP27 (Stress Gene), ubiquitin (Chemicon), ミトコンドリアに存在するHSPとしてmtHSP70 (Stress Gene), およびHSP60 (Sigma), superoxide dismutaseとしてMnSOD (BMS), Cu/ZnSOD (Sigma)の単クローン抗体を用いた。さらに連続切片にてHE

染色, modified Gomori trichrome 染色およびコハク酸脱水素酵素(SDH), cytochrome c oxidase (CCO) 活性染色を行い比較した。

### 結 果

#### 1. 筋ジストロフィーにおけるHSP

1) HSP70: 病的筋において筋形質に限局性およびびまん性に染色された。すなわち限局性パターンを示したものはDMDのopaque fiber(図1A), BMDなどに顆粒状, MyDでのring fiberのring部(図1B)およ

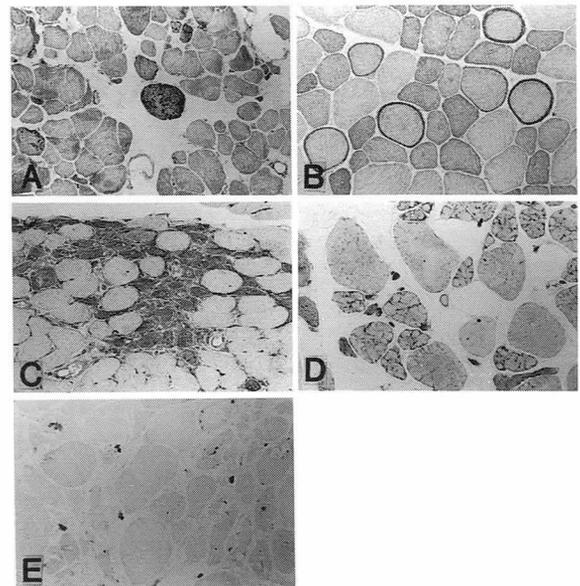


図1 筋ジストロフィーにおける各HSPの発現

A, B: HSP70, C: HSP90, D: HSP27, E: Ubiquitin( $\times 100$ )

HSP70はDMDでのopaque fiber(A)がHSP70で顆粒状に, MyDにおけるring fiberと萎縮type 1 fiberがHSP70で濃染した(B)。HSP90はBMDにおける再生線維が濃染した。HSP27はLGにおけるlobulated fiberが濃染した。UbiquitinはDMRVにおけるrimmed vacuoleが濃染した。

\*愛知医科大学第四内科

び sarcoplasmic mass, DMRV での rimmed vacuole, ミトコンドリアミオパチーなどでの cytoplasmic body が陽性であった。一方びまん性パターンを示したものは MyD での type 1 線維であり筋形質に一樣に染色された (図 1B)。

2) HSP90 : PMD を含む病的筋において、一般に再生線維の筋形質にびまん性に染まった (図 1C) が、MyD の sarcoplasmic mass, LG の lobulated fiber, DMRV での rimmed vacuole が軽度限局性に陽性であった。

3) HSP27 : 限局性には DMD, BMD, その他で細胞質が顆粒状に染まる線維が散見され、LG では lobulated fiber が顕著であり (図 1D), MyD での sarcoplasmic mass, DMRV の rimmed vacuole が陽性であった。

びまん性には BMD などの type 2 線維, 再生線維, DMRV の小径線維が筋形質が一樣に染色された。

5) Ubiquitin : DMRV や OPMD などでの rimmed vacuole が濃染した (図 1E)。

## 2. ミトコンドリア病

ミトコンドリア病では、ミトコンドリアに局在するストレス蛋白の発現がより特異的にみられた。

すなわち、mtHSP70 は ragged red fiber (RRF) および strongly SDH reactive vessel (SSV) に特異的に発現していた (図 2A, E)。HSP60 は RRF に特異的に発現していた (図 2C) が SSV では対照筋の血管との差異はみられなかった。mtHSP70 と HSP60 の RRF への発現様式は同じであり、CCO 陰性線維に比し、SDH 陽性線維により対応していた。その他の HSP は RRF で若干陽性であったがミトコンドリア HSP ほど明瞭ではなかった。SOD では MnSOD は RRF および SSV に特異的に発現し (図 2D, G) Cu/ZnSOD は非 RRF の細胞質にも発現していたが RRF でより増強していた。

## 考 察

PMD を含む病的筋では各 HSP が病的構造に対し様々に発現していた。すなわち HSP70 は opaque fiber やその他のジストロフィーにおける一部の筋線維, ring fiber, sarcoplasmic mass, rimmed vacuole, MyD の type 1 線維などに発現していた。HSP70 は細胞質に存在し分子シャペロンとして蛋白の折りたたみや会合を補助し、蛋白の合成, 膜透過, 分解に関与するとされている<sup>1)</sup>が、病的筋での変性した筋構成蛋白の修復・処理に関与して発現していることが今回の検討で明らかになった。MyD では萎縮した type 1 線維に HSP70 が陽性であったことは、ストレス状態のより強い反映であると思われる。

HSP90 は再生筋や lobulated fiber, sarcoplasmic mass などに発現していた。HSP90 は様々な機能蛋白

と複合体を形成しターゲット蛋白の機能と細胞内局在を制御するとされており<sup>1)</sup>、筋形質内での機能蛋白との結合が示唆された。

HSP27 は HSP70, HSP90 などに比し機能の解明が乏しいが、lobulated fiber, rimmed vacuole (RV), sarcoplasmic mass, 再生線維などで染まり、筋の変性や再生に関与して発現している。

Ubiquitin は標的蛋白に結合し蛋白質分解のシグナルとなる<sup>1)</sup>が、DMRV の RV を中心に局在し、RV での変性蛋白の処理に関与しているものと推察される。

次にミトコンドリア病での結果は RRF に mtHSP70 と HSP60 が、MELAS の SSV に mtHSP70 が強く発現していた。その発現機序は ; 1) ミトコンドリアの数的増加, 2) ミトコンドリア内での電子伝達系複合体

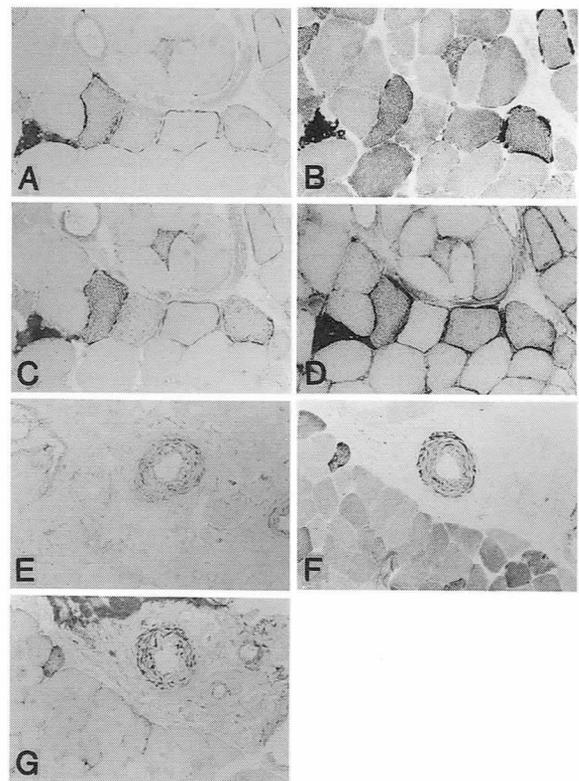


図2 ミトコンドリア病における ragged-red fiber (RRF), strongly SDH reactive vessels (SSV) における mtHSP70, HSP70 および MnSOD の局在

A, E : mtHSP70, C : HSP60,

D, G : MnSOD, B, F, : SDH (×100)

慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO : A-D) では RRF は SDH 高活性であり、mtHSP70, HSP60, MnSOD で濃染する。

MELAS (F, H) での SSV は mtHSP70, MnSOD で濃染するが、その他の疾患では CPEO (E, G) を含め血管は染まらない。

の会合障害, 3) フリーラジカルの増加によるストレス状態などを反映している可能性が考えられた。

すなわちミトコンドリア内にはHSP60とmtHSP70が存在し, mtHSP70は分子シャペロンとして核由来のミトコンドリア蛋白のミトコンドリア膜透過に関与し<sup>1)</sup>, HSP60はミトコンドリア内での折りたたみおよび会合に関与する<sup>1)</sup>。ミトコンドリア病では, とくにRRFおよびSSVにおいて, mtDNA異常に伴いmtDNA由来の電子伝達系蛋白の合成障害が推察される。故に核由来の蛋白の過剰状態となり, mtDNA由来の蛋白と会合できずにHSP60やmtHSP70が結合した状態で存在し, 蓄積するものと考えられる。他方mt内ではフリーラジカルが増加し<sup>2)</sup>, 酸化ストレスによるmt蛋白の障害も加味し, HSP60, mtHSP70がさらに増加する可能性が考えられる。すなわち今回のミトコンドリア病の生検筋におけるmt関連HSPの発現は, 上記の1)mtの増加に加え, 2)3)の可能性も十分に考えられた。またRRFにおいてはその他のHSPも軽度に染まるものがあったが, mt外の筋形質にも異常が一部波及していることが推察された。またSODもミトコンドリアに局在するMnSOD<sup>3)</sup>がRRF, SSVに濃染し, ミトコンドリアの増加およびsuperoxideの増加を反映しているものと推察された。

## ま と め

筋ジストロフィーおよびミトコンドリア(mt)病の生検筋において各熱ショック蛋白(HSP)の免疫染色を行った。

ジストロフィー筋では筋の変性・再生に関与し, 病的構造物に各HSPの異なった発現がみられた。ミトコンドリア病ではRRFおよびSSVにmtHSPやMnSODが発現しており, ミトコンドリア異常を反映していた。

以上, HSPは骨格筋の様々な病態と関連して, 各HSPが特徴をもって発現し, HSPの免疫染色は筋病理学的に病態把握の指標としての有用性が示唆された。

## 文 献

- 1) 伊藤維昭, 川崎泰生ほか: ストレス蛋白質の機能と構造. ストレス蛋白質—基礎と臨床(永田和宏編), 中外医学社, 東京, 1994, pp49-175.
- 2) 小川紀雄: フリーラジカルと神経細胞障害: 神経内科 42: 195-202, 1995.
- 3) Weisiger RA and Fridovich I: Superoxide dismutase, organelle specificity. J Biol Chem 248: 3582-3592, 1973.

## 6) ミトコンドリア脳筋症の生検筋における superoxide dismutase (SOD) および nitric oxide synthase (NOS) の局在

庄 司 進 一\*

研究協力者 大 越 教 夫\*

### はじめに

ミトコンドリア電子伝達系酵素では、ミトコンドリアの酸素消費とともに活性酸素の生成が行われ<sup>1)</sup>、細胞内で生成する活性酸素の約15%を生成するといわれている。その主な発生部位は複合体Iおよび複合体IIIとされている<sup>2)3)</sup>。Superoxide dismutase (以下SOD)は (superoxide, O<sub>2</sub><sup>-</sup>)を消去する酵素であり、フリーラジカルからの細胞保護作用を有する<sup>4)</sup>。SODの中でCu/Zn-SODは細胞質に存在するが、Mn-SODはミトコンドリアに分布する<sup>5)</sup>。異常ミトコンドリアの増加がみられるミトコンドリア脳筋症生検筋におけるMn-SODの分布の変化の有無を検討し、ミトコンドリア脳筋症の骨格筋と活性酸素との関連を考察する。

一方, nitric oxide (NO)は, nitric oxide synthase (NOS)によりL-アルギニンより生成され, 多彩な分布と生理作用を示すことで最近注目されている<sup>6)</sup>。骨格筋内にも neuronal-type NOS (nNOS)が存在し, おもにtype 2線維の筋鞘膜に分布し, 骨格筋の弛緩作用に関連すると報告されている<sup>7)</sup>。病的状態の骨格筋での局在を検討した報告は, わずかに Duchenne型筋ジストロフィー症にて dystro-phin と関連して sarcolemma における欠損が報告されているのみである<sup>8)</sup>。NOも superoxideと反応し, 細胞障害性を有する peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)を生じることから<sup>9)</sup>ミトコンドリア脳筋症の筋障害にNOが何らかに関連すると予想される。今回, ミトコンドリア脳筋症の筋病変とNOの関与を検討するため, ミトコンドリア脳筋症の生検筋におけるnNOSの分布をnNOS抗体を用いた免疫組織とNADPH-dia-phorase染色により酵素化学的に検討した。

### 対象および方法

#### 1. Mn-SODの分布

対象は, ミトコンドリア脳筋症7例 (MELAS 3例,

CPEO 4例)と, 対照として多発筋炎6例, 筋ジストロフィー4例, 軽微変化例4例の生検筋を用いた。

方法は, それぞれの10 $\mu$ m凍結切片を用い, 一次抗体として anti-Mn-SOD (polyclonal antibody; The Binding Site社, 1/400希釈, monoclonal antibody; Bender社, 1/50希釈)を反応後, ABC法, DAB反応にて発色し, SOD陽性筋線維の分布を観察した。また, 連続切片にて Gomori-trichrome変法を施行した。

#### 2. nNOSの分布

対象は, ミトコンドリア脳筋症4例 (MELAS 1例, CPEO 3例)と, 対照として多発筋炎7例, 筋緊張性ジストロフィー1例, ネマリンミオパチー1例, 進行性脊髄性筋萎縮症 (SPMA) 2例, 軽微変化例2例を用いた。

(1) NOS免疫染色: 生検筋凍結切片を用い, 一次抗体として抗nNOS抗体 (polyclonal anti-nNOS antibody; Transduction Labo)を反応後, ABC法, DAB染色にて免疫組織染色を施行した。

(2) NADPH-diaphorase 組織化学染色: 2% para-formaldehydeにて10分間反応後, 0.1mg/ml nitroblue tetrazolium, 1mg/ml NADPH, 0.3% Triton X-100, 37 $^{\circ}$ C, 1時間反応した。

### 結 果

#### 1. Mn-SODの分布

対照例の通常の筋線維では, Mn-SOD免疫組織化学染色にてほとんど染色性を有しないか, あるいはtype 1線維の筋鞘膜下や筋線維内にごく薄く染色されるのみであった。MELASおよびCPEOにおけるragged-red fiberでは, Mn-SODの免疫組織化学染色は筋鞘膜下に濃染し, 内部は網状, 顆粒状に染色され, 変性崩壊した筋線維ではびまん性に濃染した (図1)。Mn-SOD陽性線維は, ragged-red fiberとほぼ一致した分布および形態をとった (図2)。

#### 2. nNOSの分布

(1) NOS免疫染色: 対照例の通常の筋線維では, nNOS免疫組織化学染色はtype 2線維の筋鞘膜に強く,

\*筑波大学臨床医学系神経内科

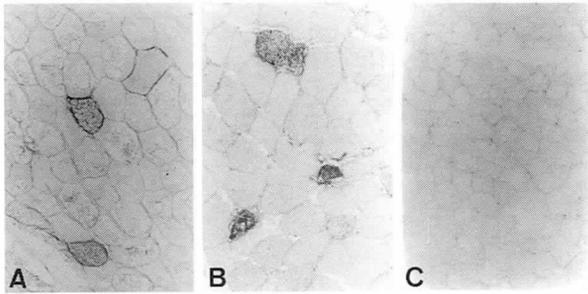


図1 Mn-SOD免疫染色

- A. ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) 生検筋では、筋鞘膜下周囲および筋線維内に網状に強陽性に染色される線維が散在する (×80)。  
 B. ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) 生検筋の中には、一個の筋線維全体にびまん性に陽性に染色される症例もある (×80)。  
 C. 対照例 (軽微変化例) では、Mn-SOD は筋鞘膜下および筋線維内にわずかに染色される程度である。

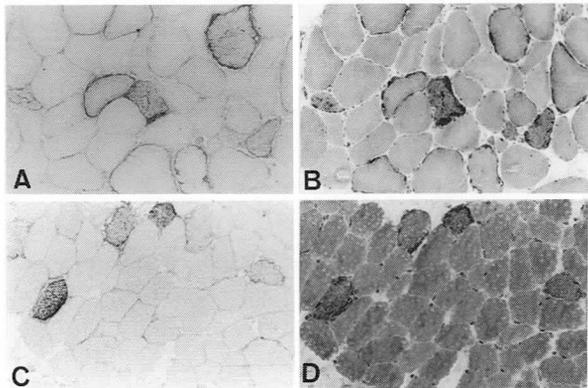


図2 ミトコンドリア脳筋症例の Mn-SOD 免疫染色と Gomori-trichrome 変法染色の関連

- A. CPEO 症例生検筋にて、ragged-red fiber に一致して筋鞘膜下、筋線維内に強陽性に染色される (×40)。  
 B. A の連続切片の Gomori-trichrome 変法染色 (×40)。  
 C. MELAS 症例生検筋にて、ragged-red fiber に一致して筋鞘膜下、筋線維内に強陽性に染色される (×80)。  
 D. C の連続切片の Gomori-trichrome 変法染色 (×80)。

type 1 線維で筋鞘膜に弱く染色された。CPEO および MELAS 例の ragged-red fiber では、通常線維に比し、筋鞘膜および筋鞘膜下に強い染色性を有し、一部の筋線維では筋線維内にびまん性に認められるパターンもみられ、ragged-red fiber の形態に一致した所見であった (図3)。

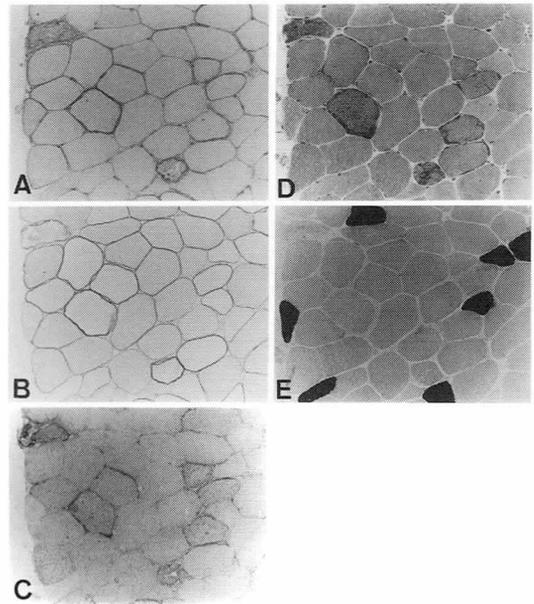


図3 ミトコンドリア脳筋症例 (CPEO) における各種染色間に関連

- A. nNOS 免疫染色：nNOS 免疫組織化学染色は通常筋線維では、type 2 線維の筋鞘膜に強く、type 1 線維の筋鞘膜に弱い染色性を有する。Ragged-red fiber では、通常線維に比し、筋鞘膜および筋鞘膜下に強い染色性を有し、一部の筋線維では筋線維内にびまん性に認められるパターンもみられ、ragged-red fiber の形態に一致した所見であった (×66)。  
 B. NADPH-diaphorase 組織化学染色：通常筋線維では、type 2 線維の筋鞘膜に濃染し、type 1 線維では筋鞘膜および筋線維内に網状に弱く染色された。Ragged-red fiber では、筋鞘膜に強い染色性を有した。Ragged-red fiber は type 1 線維にもかかわらず type 2 線維と同様あるいはより強い染色性が認められた。  
 C. Mn-SOD 免疫染色, D: Gomori-trichrome 変法染色, E: ATPase 染色 (pH 11.1)

(2) NADPH-diaphorase 組織化学染色：通常筋線維では、NADPH-diaphorase 組織化学染色にて type 2 線維の筋鞘膜に濃染し、type 1 線維では筋鞘膜および筋線維内に網状に弱く染色された。CPEO および MELAS 例の ragged-red fiber では、nNOS と同様に筋鞘膜のみならず筋鞘膜下にも染色性を有した。Ragged-red fiber は type 1 線維にもかかわらず type 2 線維と同様あるいはより強い染色性が認められた (図3)。

## 考 察

ミトコンドリア脳筋症生検筋では, ragged-red fiberにおいて Mn-SOD および nNOS 免疫染色, NADPH-diaphorase 染色ともに強陽性に染色され, ragged-red fiberにはほぼ一致した分布, 形態をとった。

Ragged-red fiberにおける Mn-SOD 陽性線維の意義として次の2つの可能性が考えられる。

(1) Mn-SODの分布はミトコンドリアの量的変化に左右され, ragged-red fiber内ではミトコンドリアが豊富に存在することより単なる量的な変化を反映している。

(2) ミトコンドリア脳筋症の ragged-red fiberでは, 異常なミトコンドリアが集簇していることより多量の活性酸素が生成されることが予想される。その結果, 活性酸素の消去のため Mn-SOD が多量に誘導され, Mn-SOD が強陽性に染色される。

いずれにせよ ragged-red fiberに Mn-SOD が多量に分布し, その作用として豊富なミトコンドリアにより産生される活性酸素の消去に役立っている可能性が考えられる。

本研究では, ragged-red fiberに NOS が豊富に存在することを示したが, NOSと骨格筋の関連は前述したようにこれまでの知見が十分でなく, ragged-red fiberにおける nNOS 陽性線維の意義は不明と言わざるを得ない。SuperoxideとNOの作用との関連に関し, 次のような二つの相反する機序が推定されている。一方はsuperoxideと結合することにより活性酸素を不活化することによる細胞保護的作用であり, 他方はsuperoxideと反応し, 強力な細胞障害性を有するperoxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)の産生による細胞障害的作用である<sup>9)</sup>。Ragged-red fiberに NOS および Mn-SOD が豊富に存在することは, superoxideとNOの反応が容易に起こることが推定され, これらの2つの作用のどちらかに関与している可能性がある。

## ま と め

1. ミトコンドリア脳筋症生検筋における SOD の免疫組織化学染色では, Mn-SOD は筋鞘膜下周囲に強く染色され, 筋線維内に網状, 顆粒状, びまん性, 斑状に染色された。Mn-SOD 陽性線維の分布は ragged-red fiberにはほぼ一致していた。また, 程度の軽い ragged-red fiberにも陽性に染色され, ミトコンドリア脳筋症の診断に有用であった。

2. 通常の筋線維では nNOS は, type 2 線維の筋鞘膜に存在することを免疫組織化学および NADPH-diaphorase 染色にて確認した。

3. Ragged-red fiber における nNOS 免疫組織化学染色は筋鞘膜および筋鞘膜下周囲に強い染色性を有し, NADPH-diaphorase 組織化学染色でも同様であった。

4. Ragged-red fiber 内で Mn-SOD, nNOS とともに強陽性に染色されることは, これらが豊富に存在することを示唆し, ragged-red fiber 内での異常なミトコンドリアで産生される活性酸素を消去する作用や NO 産生を示唆し, 何らかの酸化ストレスに関与している可能性が考えられる。

## 文 献

- 1) Boveris A and Chance B: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716, 1973.
- 2) Turrens JF, Alexander A and Lehninger AL: Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237: 408-414, 1985.
- 3) Beyer RE: An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem Cell Biol* 70: 390-403, 1992.
- 4) McCord JM and Fridovich I: Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055, 1969.
- 5) Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA and Crapo JD: Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab Invest* 55: 363-371, 1986.
- 6) Knowles RG and Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258, 1994.
- 7) Kobzik L, Reid MB, Bredt DS and Stamler JS: Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372: 546-548, 1994.
- 8) Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K and Bredt DS: Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82: 743-752, 1995.
- 9) Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HSV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ and Stamler JS: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632, 1993.

# 7) 筋ジストロフィー生検筋における細胞死関連蛋白の免疫組織学的観察

佐橋 功\*

研究協力者 衣斐 達\* 井 玲\* 荒畑 喜一\*\*

## はじめに

筋ジストロフィー (PMD)は核遺伝子異常により筋構築蛋白や細胞膜またその代謝, 修復, エネルギー産生, 情報伝達などが障害され, 筋の変性・壊死をきたす疾患群である. さて近年注目されている細胞死 (program cell death: apoptosis)は外的要因などによる壊死 (necrosis)とは異なり, 細胞核機能の破壊に伴う細胞・組織・個体の「生」を維持するための死とされる<sup>1)</sup>. 我々は各種のPMD生検筋において, 疾患の病態へ細胞死の機構が関与するかに関し, 免疫染色によるFas, Bcl-2などの細胞死関連蛋白の筋細胞への発現と筋細胞核の超微形態的検討を行なった.

## 対象および方法

対象のMDは dystrophinopathyとして Duchenne型 (DMD)4例, DMD保因者 (DMD-C)6例, Becker型 (BMD)10例, 他のPMDとして肢帯型 (LG)11例, 顔面・肩甲・上腕型 (FSH)7例, rimmed vacuole型遠位型 (DMRV)5例, 眼・咽頭・遠位型4例, 筋緊張型 (MyD)26例, ミオパチーはミトコンドリア病18例である. 対照筋としては病的所見を疑い筋病理上異常を認めなかった生検10筋を用いた. 生検部位は上腕二頭筋および一部は大腿四頭筋の外側頭を用い, その凍結連続切片にて以下の検討を行なった.

方法は細胞死関連蛋白に対する抗体として抗Fas (MBL; IgG<sub>1</sub>, UB2 clone), 抗Fas (MBL; IgM, CH11 clone) (MBL), 抗Bcl-2 (Dako; clone 124および Novocastra; clone Bcl-2/100/D5), 抗p53 (Dako; clone DO-7), 抗Ki-67 (Dako; 抗家兔 polyclonal抗体), 抗myotonin protein kinase (MtPK, 抗家兔 polyclonal抗体<sup>2)</sup>)を用い, ABC法にて免疫染色を行ない観察した. また連続切片にて Gomori trichrome変法染色などの一般染色に加え, NADH-TR, コハク酸脱水素酵素反応 (SDH) および routine ATPase 染色, 他に dystrophin (dys.; Novocastra), ミオシン重鎖 (MyHC) の neonatal,

developmentalの各 isoforms (Novocastra)を用いた免疫染色を行ない比較検討した.

また透過型電顕による形態観察および定量的解析は, オスミウム固定→酢酸鉛・オスミウム二重染色を行ない, 各PMD型につき30個以上の筋核につき倍率6000倍の写真をほぼランダムな核の中央部にて撮影し, イメージリーダーにてMacintoshに取り込みNIHイメージにより核質内の高電子密度領域の観察と量的な定量化を行なった.

## 結 果

### (A) 免疫染色結果

#### 1. Fas (IgG<sub>1</sub>)

正常対照筋では加齢筋を含めFas陽性線維はなかった. Dystrophinopathies (DMD, DMD-C, BMD)では陽性線維はtype 2b, 2c線維に対応し, とくにDMDでのopaque fibersやCa<sup>2+</sup>染色陽性線維と関連しなかった (図1A). またDMD-C筋ではdys. 陰性線維とよく対応した (図1B). 他のPMDではDMRVでは高頻度にtype 2小径線維が陽性で, 空胞内容は一部陽性であったが空胞壁は陰性であり, FSHではFas陽性線維の出現頻度が極少なく, MyDでは高頻度に陽性 (図1C)であり, 中心核を有するtype 2線維に多くみられた.

#### 2. Fas (IgM)

正常対照筋および病的筋ともtype 2線維の筋形質内にび漫性に染色された (図1D, E).

#### 3. Bcl-2

対照筋はATPase染色と比較して大部分のtype 2b>2aと極一部のtype 1線維の形質に淡くび漫性に染色された. また陽性線維の核膜はより強く染色されたが, 陰性線維の核はほぼ陰性であった (図2A). PMDではDMD (図2B)と一部LGでは筋線維での陽性率が低く, これらではATPase染色にて2b deficiency, 2c線維増加を認めた. DMD-Cではdys. 陰性線維はBcl-2陰性の2c線維 (再生線維)であった (図2C). DMRVでは空胞を有する小径線維, MyDではpyknotic nuclear clumpを示す極小径線維に陽性であり, 他の筋

\*愛知医科大学第四内科

\*\*国立精神・神経センター神経研究所

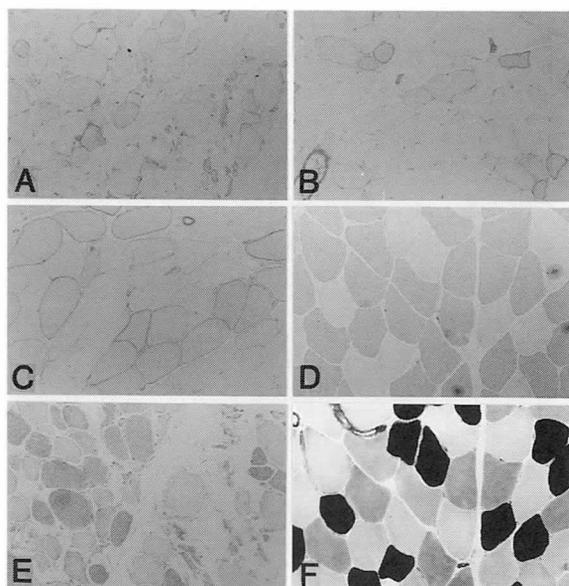


図1 筋ジストロフィー生検筋における Fas 抗原の免疫染色

A-C: 抗 Fas IgG<sub>1</sub> 抗体, D, E: 抗 Fas IgM 抗体, F: ATPase pH4.5 (×100)  
 抗 Fas IgG<sub>1</sub> 抗体では病的筋 (A: DMD, B: DMD-C, C: MyD) での type 2 線維に, 抗 Fas IgM 抗体では対照筋 (D) DMD 筋 (E) とも type 2 線維形質に陽性である。

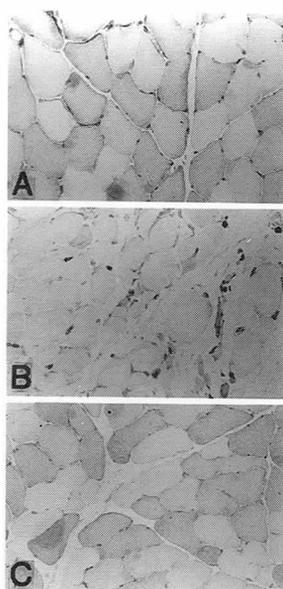


図2 筋ジストロフィー生検筋における Bcl-2 (×100)

Bcl-2 は対照筋では type 2b 線維優位に染まり (A), DMD 筋では陽性線維は少なく, DMD-C では dys. 陰性線維は Bcl-2 陰性であることが多い。

疾患でも小径繊維に陽性であった。しかし, MyHC dev, neo で染まる 2c (再生) 線維は濃染しなかった。その他 sarcoplasmic mass は陰性, opaque & ring fibers は濃染しなかった。またミトコンドリア筋症では type 2 線維の ragged red fibers のミトコンドリア蓄積部分が陽性であった。

#### 4. p53

正常筋および病的筋とも全て陰性であった。

#### 5. Ki-67

正常筋に発現はなく, 病的筋では再生筋に発現し, LG での lobulated fiber が染色された (図 3A-D)。

#### 6. MtPK

今回使用した抗体では細胞膜・筋小胞体膜がよく染色されたが, 核や形質内も一部染色された。また再生筋や DMD の opaque fiber の細胞質や ring fiber がより濃染されたが (図 3E, F), 疾患特異性はなかった。

### (B) 透過電顕による筋核の超微形態変化

#### 1. 核質の検討

正常筋ではほぼ核辺縁に比較的均一な幅で淡黒色のクロマチンが局在し, 核内部は微細顆粒状の所見を示し, 核小体は 2 種の RNA よりなる整然とした核小体糸

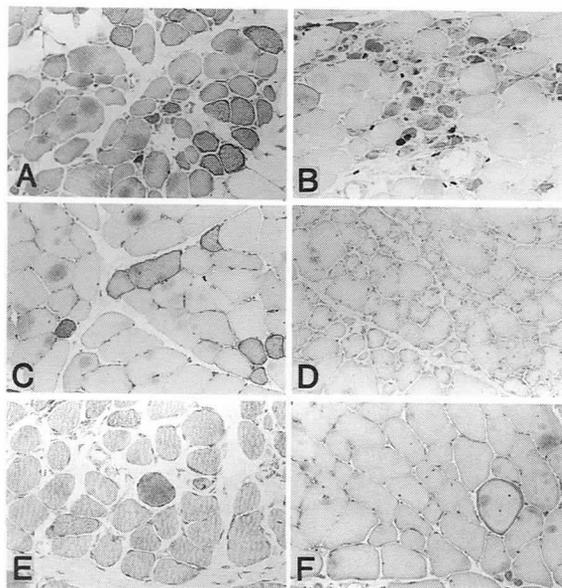


図3 筋ジストロフィー生検筋における Ki-67 と MtPK (×100)

A-D: (Ki-67), E, F: (MtPK)

Ki-67 はジストロフィー筋 (A: DMD, B: BMD, C: DMD-C) などでは再生筋に, LG では lobulated fiber に陽性であった (D)。MtPK は筋形質, 核などが染色されたが DMD の opaque fiber (E), MyD の ring fiber (F) などが強陽性であった。

が存在した。DMDやFSHはほぼ正常の核質であったが、DMDでは核サイズがやや大きくまたより淡明で vesicular nucleiの所見を示した。

DMRVでは一部の核膜は皺襞化し、また辺縁のクロマチンは濃縮・増加し、核膜に接したクロマチン内には小空胞変化がしばしば観察された。MyDでは核サイズが全体に小さく、クロマチンや核質は濃縮化・断片化・散在し、核膜はより皺襞化し、核小体糸もより黒く不整化しているものが多かった。以上の結果はDMRVやMyDでは細胞死に関連した筋核変化がより強い可能性が示唆された。

## 2. 核質内高電子密度領域の定量化(表)

現時点では各疾患でのカウント核数は不十分で有意な結果は見出せなかったが、DMRVとMyDなど3疾患は核60個以上での検討で信頼性がより高いと考えているものの、分散幅も大きく更に核数を増して結論を出すべきと考えている。

### 考察および結語

細胞死または関連抑制関連蛋白としては、前者では Fas 抗原が後者では Bcl(B cell lymphoma/leukemia)-2が注目されている。さて Fas 抗原は細胞膜に局在する TNF receptor family に属する糖蛋白であり、抗 Fas 抗体など Fas 抗原の刺激にて細胞死が誘導される<sup>3)</sup>。そして抗 Fas 抗体による細胞死誘導は IgG タイプではなく IgM タイプで観察されるという<sup>4)</sup>。今回はこれら2種の抗 Fas 単クローン抗体についての染色結果は異なっており、Fas IgG1 抗体は病的筋の type 2 線維の筋細胞膜を中心に発現し、IgM 抗体は対照筋も含む全 type 2 線維の筋形質に染まった。これは IgM 抗体が、より非特異的に Fas 関連抗原を認識する

表 筋核の透過電顕写真における定量解析  
核サイズおよびクロマチンを中心とした dark area の百分率および、50%以上の dark area を示す核の百分率を示した。

症例数	核のサイズ $\mu\text{m}^2$	%Dark Area	50%< Dark Area
Control*	4 9.12 $\pm$ 3.88	47.9 $\pm$ 9.6	37.1
DMD	1 29.43 $\pm$ 13.35	30.5 $\pm$ 12.4	0
BMD	1 10.40 $\pm$ 5.21	43.6 $\pm$ 13.1	44.4
LG	2 9.96 $\pm$ 4.06	47.3 $\pm$ 8.9	38.3
FSH	2 8.08 $\pm$ 3.31	46.9 $\pm$ 8.9	7.7
DMRV	3 12.76 $\pm$ 6.70	43.6 $\pm$ 8.2	22.0
MyD*	4 9.53 $\pm$ 4.77	43.0 $\pm$ 9.7	18.8
MyC	1 6.39 $\pm$ 2.11	32.0 $\pm$ 6.4	0
CPEO*	2 9.33 $\pm$ 5.25	47.0 $\pm$ 11.6	42.5
PM/DM	2 8.94 $\pm$ 3.93	53.1 $\pm$ 6.8	68.2
IBM	1 9.51 $\pm$ 4.29	45.0 $\pm$ 9.7	29.4
BSMA	1 12.8 $\pm$ 5.39	35.7 $\pm$ 12.5	10.5

\*核数>50, 写真倍率 x6000

一方、筋線維別の選択性の発現(陽性)は筋線維内の代謝の相違と密接に関連していることが示唆された。しかし Fas IgG1 抗体は、一部筋線維別陽性度の相違と同時に病的筋の PMD ではとくに MyD と DMRV にて type 2 線維に細胞膜優位に局在し、DMD-C の dys. 陰性線維で陽性でもあり、明らかに多彩な病態と関連していることは事実であろう。

次に Bcl-2 は細胞死抑制蛋白としてミトコンドリア内膜や核膜や小胞体中存在し、リンパ系および神経系組織での発現が顕著であるとされている<sup>5)</sup>。本研究では骨格筋には正常筋を含め Bcl-2 が陽性であり、とくに type 2b 線維優位に細胞質に発現し、type 1/2c 線維ではほとんど発現していなかったが、その意義は現時点では不明であった。

p53 は細胞死を誘導する癌抑制遺伝子であるが<sup>5)</sup>、骨格筋での p53 遺伝子産物は免疫染色では検出されなかった。また Ki-67 は細胞増殖に関する蛋白であり<sup>6)</sup>、本研究では再生線維に発現していることが示された。

MtPK は MyD 病因遺伝子解析にて発見された蛋白であり、機能は現在不明である。MyD では臨床的に早期老化徴候も見られ MtPK と細胞死との関連も推察されたが、本研究で使用した抗体での染色結果では主に細胞膜により強く陽性であったが、一般的に再生筋でより濃染していたものの MyD の特異的所見は観察されなかった。

最後に筋細胞核の超微形態変化については、光顕的に MyD でしばしば観察される虎斑様核は、かつては本疾患での神経原性変化を示唆する所見とも考えられたが、それに対応した核の濃縮、クロマチンの濃縮と偏在、核膜の凸凹分岐は MyD と DMRV により強かった。これは細胞死での初期変化所見とも共通し、これら2疾患では細胞死の機構が骨格筋の病態に関与していることが考えられた。

以上、各種病因に基づく筋ジストロフィー生検筋の一部においては、疾患別の定常性ある所見は必ずしも明らかにできなかったが、壊死とは別に一部の細胞死・抑制関連因子蛋白の発現(陽性所見)がある。しかしその発現が細胞死と関連して発現しているのか、または他の機能をもって発現しているのかは検討の余地があるものと考えた。

### 引用文献

- 1) 丸山征郎: アポトーシス「生」のための「死」. 最新医学 49: 1079, 1994.
- 2) Koga R, Nakao Y, et al: Decreased myotonic protein kinase in the skeletal and cardiac muscles in myotonic dystrophy. Biochem Biophys Res Comm 202: 577, 1994.

- 3) Yonehara S, Ishii A, et al: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169:1747, 1989.
- 4) 小林信之: アポトーシス誘導法. 生物学的因子. ウイルス, Fas 抗原. 最新アポトーシス実験法, (辻本賀英ほか)編, 羊土社, 東京, 1995, p112.
- 5) 奥山隆造, 高橋 玲ほか: アポトーシスと癌遺伝子. *最新医学* 49:1096, 1994.
- 6) Key G, Petersen JL, et al: New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections. *J Clin Pathol* 46:1080, 1993.

## 8) 筋細胞障害における Fas 抗原と Apoptosis

杉村 公也\*

研究協力者 犬飼 晃\*\* 小林 靖\*\* 伊藤 慶太\*\*\*  
道勇 学\*\* 高野 明美\*\* 本田 仁\*\*  
祖父江 元\*\*

### 目 的

近年, necrosis とは異なる細胞死の形態として apoptosis が提唱され, その筋細胞での存在も電顕的に観察されたとする報告がある. さらに apoptosis 関連抗原として膜結合蛋白である Fas 抗原が発見され, 筋細胞における発現も報告されている. 本抗原に関して多くの研究がなされているが, 筋組織における発現に関して詳細な検討はなされていない. 我々は, 種々の疾患筋での組織障害過程における apoptosis の関与をさぐるため, 筋組織における本抗原の発現および性状と機能について, 免疫組織化学法, 免疫沈降法, TUNEL 法, RT-PCR 法を用いて検討した.

### 対 象

- ①免疫組織化学法; 筋緊張性ジストロフィー 18 例, Duchenne 型筋ジストロフィー 4 例, Becker 型筋ジストロフィー 4 例, 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー 4 例, 多発筋炎 10 例, 筋萎縮性側索硬化症 4 例, 脊髄性筋萎縮症 4 例, 正常対照例 5 例の計 53 例.
- ②免疫沈降法; 健康成人男子 3 例 (31~36 歳) の末梢血から分離した有核血球成分. 52 歳, Myotonic dystrophy 男子剖検例の筋組織 3g.
- ③TUNEL 法; 免疫組織化学染色で筋細胞 Fas 抗原の発現頻度の高かった MyD 3 例, DMD 2 例, BMD 3 例, PM 4 例, ALS 1 例, SMA 2 例, 非神経筋疾患 2 例の生検筋.
- ④筋組織 RT-PCR; 健康成人男子 3 例 (31~36 歳) の末梢血から分離した有核血球成分. 各疾患筋組織と正常対照筋組織.

### 方 法

- ①免疫組織化学法; 生検筋組織を急速凍結し, クリオスタットで厚さ  $8\mu\text{m}$  の切片を作製. 抗 Fas-IgG 抗体 (UB2, MBL 社) を反応させ, ABC 法を用い (Vector

社), DAB で発色した.

- ②免疫沈降法; 分離有核血球成分を, IFN- $\gamma$  にて 24 時間培養後, 細胞膜成分に調整. 筋組織は, ホモジネート後, 細胞膜成分に調整. 両試料とも Triton-X に溶解後, 抗 Fas-IgG 抗体 (UB2), Protein A-agarose にて免疫沈降し, SDS-PAGE で分離後, ニトロセルロースペーパーにトランスファーし, 抗 Fas-IgG 抗体 (ZB4) にて免疫染色し, ECL にて発色した.

- ③TUNEL 法; 生検筋を急速凍結後, 厚さ  $8\mu\text{m}$  の切片を作製, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) を用いて digoxigenin (DIG)-nucleotide を反応させた後, peroxidase 標識の抗 DIG 抗体を用い, DAB で発色した. 陽性コントロールとして DNase I 処理した切片を同時に作製した. また, 各症例とも連続切片で, 抗 Fas 抗体 (UB2) を用いた免疫組織化学染色を行った.

- ④筋組織 RT-PCR; 分離有核血球成分は ConA, IL-2, PMA, ionomycin で培養後, 各筋組織と同様に TRIzol で total RNA を抽出し, Fas ligand,  $\beta$ -actin の primer を用いて RT-PCR を行った.

### 結 果

- ①免疫組織化学法; 正常対照例では, 筋細胞は抗 Fas 抗体で染色されなかった. 疾患筋では Fas 陽性の線維が, 萎縮線維にも, 肥大線維にも存在し, sarcolemma を中心に, 一部のものは胞体内も染色された (図 1). 陽性線維数の全筋線維数に占める割合 (%) は, MyD  $10.0 \pm 14.1$ , DMD  $17.0 \pm 12.6$ , BMD  $15.8 \pm 7.7$ , FSH  $1.4 \pm 1.2$ , PM  $10.4 \pm 13.6$ , ALS  $5.1 \pm 4.6$ , SMA  $12.4 \pm 12.1$  であり, 疾患間に有意差はなかった. H. E. 標本での筋障害の程度と筋細胞の Fas 陽性率 (%) との関連は, 軽度群 1.79, 中等度群 7.91, 重度群 17.58 であり, 筋障害の程度が強いほど, 筋細胞の Fas 陽性率は増した (図 2). Fas 陽性線維における type II fiber の割合 (%) は, 上記疾患順に  $88.3 \pm 26.1$ ,  $81.9 \pm 17.9$ ,  $96.2 \pm 4.0$ ,  $85.0 \pm 10.8$ ,  $96.0 \pm$

\* 名古屋大学医療技術短期大学部

\*\* 名古屋大学神経内科

\*\*\* 福井医科大学第二内科

8.0, 91.1±4.1, 96.2±3.9であり, 各疾患間ではほぼ一定であった.

③免疫沈降法; IFN- $\gamma$  存在下での培養有核血球成分からの試料, 筋組織試料ともに 45kDa の明瞭なバンドが得られた (図3).

④TUNEL 法; いずれの症例においても, 免疫組織化学染色にて Fas 抗原陽性の筋線維においても TUNEL 染色でその核は染色されなかった (図1).

⑤筋組織 RT-PCR; 正常対照筋組織, 各疾患筋組織いずれからも Fas ligand の mRNA は検出されなかった (図4).

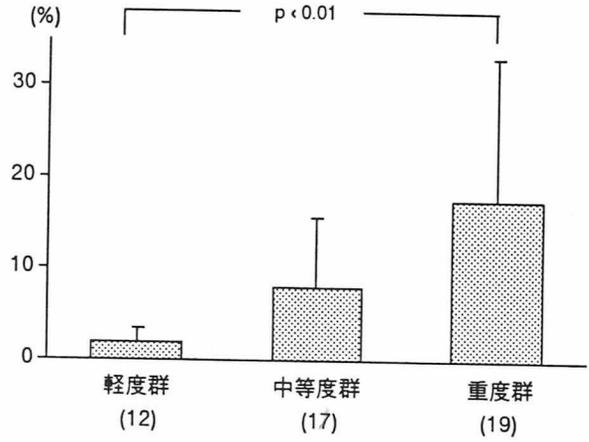


図2 組織障害度別, Fas 陽性線維頻度

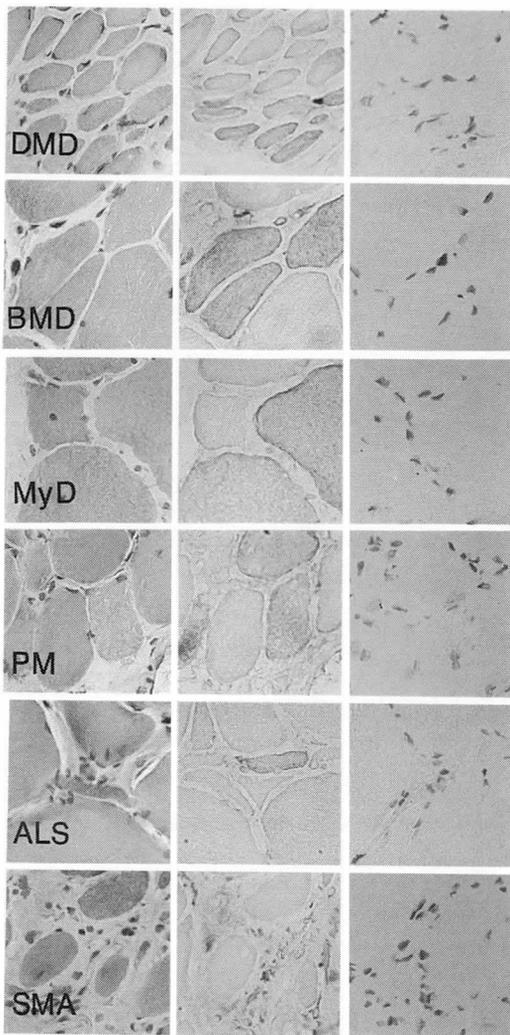


図1 生検筋 H. E. 染色, Fas 免疫染色, TUNEL 染色  
上段より, DMD, BMD, MyD, PM, ALS, SMA 症例  
左列; H. E. 染色 中列; Fas 染色  
右列; TUNEL 染色

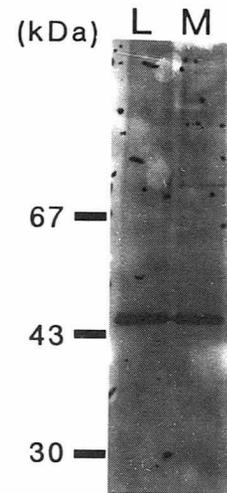


図3 Fas antigen immunoprecipitation  
左; IFN- $\gamma$ , 24時間培養有核血球  
右; MyD 剖検筋組織

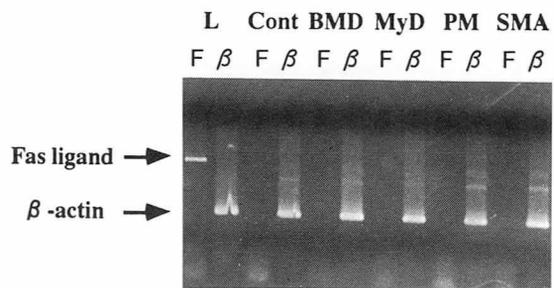


図4 Fas ligand RT-PCR  
左より, Con A, IL-2, PMA, ionomycin 培養有核血球, 正常筋組織, BMD, MyD, PM, SMA 症例筋組織  
F; Fas ligand の primer によるもの  
 $\beta$ ;  $\beta$ -actin の primer によるもの

## 考 察

疾患筋細胞においては apoptosis のシグナル伝達を  
になう 45kDa の Fas 抗原が発現していることが免疫沈  
降法にて確認された。その発現の状態は、正常筋細胞  
には発現せず、変性性疾患、炎症性疾患にはともに同  
程度に認められ、疾患特異性は明らかでなかった。し  
かし、正常筋では発現せず、筋障害度が増すほど、発  
現率が増していることから、Fas 抗原は組織障害の過  
程に何らかの関与をしているものと思われた。しかし  
TUNEL 染色の結果からは Fas 抗原が強く発現してい  
る筋細胞でさえ、該当する細胞の核の fragmentation  
は否定的であり、筋組織において Fas 抗原が  
apoptosis の signal transduction に直接関与してい  
る所見は得られなかった。また Fas 抗原の apoptosis  
の signal transduction の trigger となる Fas ligand  
も、その mRNA の検討から、疾患筋組織においても  
存在していなかった。これらの結果は、筋組織におい

て Fas 抗原は、従来報告されているような Fas ligand  
→Fas antigen→signal transduction→apoptosis と  
いう情報伝達には必ずしも働いてはいないことを示唆  
し、いまだ知られていない何らかの signal  
transduction に関与しているか、または組織障害の過  
程で何らかの cytokine に誘導された epiphenomenon  
である可能性が推察される。

## 結 論

筋組織における Fas 抗原は、①apoptosis の signal  
transduction の機能を持つとされる 45kDa の分子が発  
現し、②その発現状態は、正常筋細胞では発現せず、  
種々の疾患筋細胞で発現は認めるが疾患特異性は明ら  
かでなく、筋組織の障害度が増す程、発現は増してい  
るが、③筋細胞に apoptosis を誘導している事実はな  
く、④Fas 抗原に apoptosis の signal transduction  
を惹起する Fas ligand mRNA も存在しなかった。

# 9) 筋フォスフォリラーゼ遺伝子コドン49のナンセンス変異を示したMcArdle病の一例

梶 龍 児\*

研究協力者 中野 智\* 川嶋 信吾\* 里井 齊\*  
秋口 一郎\* 木村 淳\*

## 緒 言

遺伝性の酵素欠損症であるMcArdle病は、一般に小児期、若年期例が多いが、稀に高齢者において発症がみられることがある<sup>1)</sup>。我々は、70歳代で発症し、多年にわたるインスリン依存性糖尿病を合併していた症例を経験した。さらに遺伝子解析の結果、本例は、欧米では頻度が高いがわが国のMcArdle病では現在まで報告のない、コドン49におけるナンセンス変異を有していることが判明した。

## 症 例

患者：症例は72歳の女性で、歩行後の下腿筋を中心とした筋のクランプを主訴に当科を受診した。既往歴として、20年来のインスリン依存性の糖尿病がある。また、6年前に心房中隔欠損症の閉鎖手術を受けている。両親、同胞3人、子ども3人に筋疾患を疑わせる家族歴はない。また、糖尿病の家族歴もない。

現病歴は、約1年前より、特に長期間歩行後にgastrocnemiusを中心とした部位にクランプが生じるようになった。しばらく休憩すると回復する。かなり以前より両足指の痺れ、約半年前より、右下腿の筋力低下を自覚していた。現症として、四肢腱反射の低下、下肢振動覚の高度低下、下肢近位筋の軽度筋力低下を認めた。肝脾は触知されなかった。

末梢血CK値は317~5954 IU/mlの間を著明に変動していた。心電図ではIRBBB、上室性期外収縮が認められた。心胸比は56.9%であった。心エコーでは、心室壁の肥厚はなかった。阻血下運動負荷試験では、血中乳酸、ピルビン酸の上昇不良が認められた。

神経電気生理学的検査では、神経伝導速度の低下、電位の低下が認められ、糖尿病性のニューロパチーに一致する所見であった。EMGでは、myopathic patternを一部の筋に認めた。

## 筋生検組織所見

凍結切片では、筋線維の大小不同、中心核の増加を示した。多数の筋線維の筋鞘下に空胞を認め、電顕用のsemithin切片におけるPAS染色において筋鞘下に陽性物質の蓄積を示した。このPAS陽性物質は $\alpha$ -アミラーゼで消化されたためグリコーゲンと考えられた。筋線維内の酸性フォスファターゼ活性の上昇なし。フォスフォリラーゼ染色で筋線維における活性が認められず、筋フォスフォリラーゼ欠損症と診断した。

電顕では、筋鞘下、筋線維間に著しいグリコーゲン顆粒の貯留を認めた(図1)。また、長期にわたる糖尿病を反映して、筋内毛細血管の基底膜の肥厚、二重像が認められた(図2)。

## PCR-RFLP

方法：生検筋よりゲノムDNAを抽出し、myo-phosphorylase geneのエクソン1をPCRにて増幅、*NlaIII*で消化後、3%アガロースゲルで電気泳動、臭化エチジウムにて染色した<sup>2)</sup>。



図1 生検筋の電顕像(1)。筋鞘下に著明なグリコーゲン顆粒の蓄積が認められる。

\*京都大学医学部神経内科

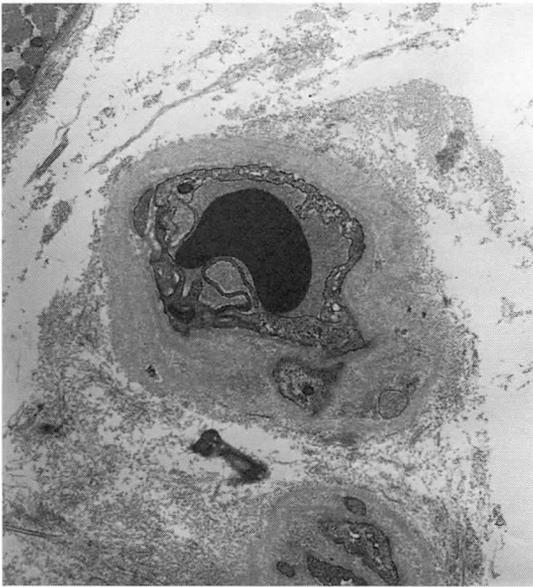


図2 電顕像(2). 筋内毛細血管基底膜の肥厚, 多層化, debrisが存在する.

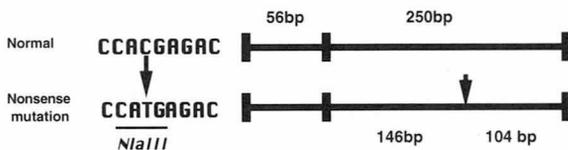


図3 Myophosphorylase gene コドン49におけるナンセンス変異の検出(PCR-RFLP法). 正常では306bpのPCR産物は, *NlaIII*により, 56bpと250bpの2つの断片に分かれるが, コドン49に図のようにC→T置換があるとその制限酵素の認識部位が新たに生じるため, 250bpの断片はさらに146bpと104bpに分かれる.

### 結果

PCRによって306bpのヌクレオチドが増幅される. 対照例では*NlaIII*によって, このPCR産物は250bpと56bpに切断される(図3). 本例では250bpのバンドは認められず, コドン49のC→T置換のために生じた*NlaIII*の新たな認識部位により, 146bpと104bpのバンドのみが認められ, コドン49におけるナンセンス変異のホモ接合体であることが判明した(図3, 図4).

### 考察

糖原病は, 低血糖を伴うことが一般的である. 糖原病と糖尿病の合併については, I型 von Gierke病での報告がある. しかしこれはI型に特異的で, 長期間にわたる低血糖症状の後にみられる. 糖原病性ミオパチーでは, 糖尿病を合併した報告は見当たらない. 本

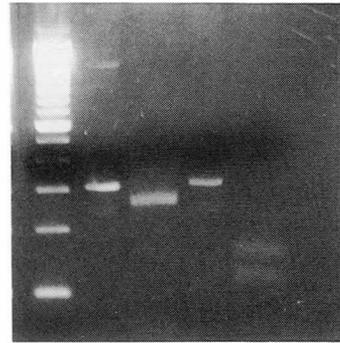


図4 本例におけるPCR-RFLPの結果. 左端のレーンより, 1: MWマーカー, 2: 対照例のPCR産物, 3: 対照例, *NlaIII*による消化後, 4: 患者のPCR産物, 5: 患者, *NlaIII*消化後. 患者では*NlaIII*消化後の250bpの断片は認められず, 146bpと104bpの2本のバンドのみが認められる.

例は糖尿病発症後20年を経過しており, 両者の合併は偶然であろう. しかし, 糖尿病を合併したことによって, 糖原病症状の発症が遅れた可能性は考えられる.

Tsujinoは, 米国人を中心に, 50例近くのMcArdle病の遺伝子型を解析している. それによると, 米国人40例のうち30例がコドン49のCGA(Arg)→TGAナンセンス変異を有し, そのうちの18例が本例のように, この変異のホモ接合体であった<sup>3)</sup>. また, 英国のBartramらは16例の患者を解析し, 全例でこのナンセンス変異が認められ, 10例はホモ接合体であったと報告している<sup>4)</sup>. このように, 欧米例ではコドン49のナンセンス変異が圧倒的に多いわけであるが, おもしろいことに, 日本人例の既報7例ではこの変異は認められていない. 日本人例では欧米にないタイプの, コドン708/709におけるTTCコドンの欠失が7例中4例に認められている<sup>3)</sup>. 本例は, 日本人例ではじめてコドン49のナンセンス変異が証明されたMcArdle病である. しかし, 日本では欧米と異なった変異が多数を占めるという事実には変わりはない.

### 文献

- 1) Pourmand, R, Sanders DB and Corwin HM: Late-onset McArdle's disease with unusual electromyographic findings. Arch Neurol 40: 374-377, 1983.
- 2) Tsujino S, Shanske S and DiMauro S: Molecular genetic heterogeneity of myophosphorylase deficiency. N Engl J Med 329: 241-245, 1993.

- 3) Tsujino S, Shanske S, Nonaka I and DiMauro S: The molecular genetic basis of myophosphorylase deficiency (McArdle Disease). *Muscle and Nerve*, Suppl 3: S23-27, 1995.
- 4) Bartram C, Dwards RH, Clague J and Beynon RJ: McArdle's disease: a nonsense mutation in exon 1 of the muscle glycogen phosphorylase gene explains some but not all cases. *Hum Mol Genet* 2: 1291-1293, 1993.

# 10) Gomori-Trichrome変法における薄層赤染線維の意義について

## —慢性進行性外眼筋麻痺の母子例を中心に—

田代邦雄\*

研究協力者 吉田一人\* 島功二\*\* 森若文雄\*

### はじめに

筋病理観察において、Gomori-Trichrome変法染色でみられる ragged red fiber (RRF) は<sup>1)</sup>、横隔膜では正常でも多数観察される<sup>2)</sup>。一般の骨格筋では多くの疾患で非特異的に少量が観察され<sup>3)</sup>、高齢者では非特異的に増加するとの報告もある<sup>4)</sup>。ミトコンドリア脳筋症ではある程度以上存在するのが特徴であり、電子顕微鏡の観察において大小不同ミトコンドリアの異常集積と、ミトコンドリア内パラクリスタリン封入体などのクリスタ異常を示す。

一方、われわれは、ミトコンドリア脳筋症と考えられる症例においても必ずしも RRF を認めず、Gomori-Trichrome変法染色で細胞膜下の薄層が均一に赤染され、内部が比較的保たれているものがしばしば出現することに注目した。しかし、これらの辺縁平滑薄層赤染線維 (smooth red fiber) は、RRF の前段階なのか、あるいはこれらと異なる出現機序を示すものなのか不明であり、病理学的意味は十分には解明できていない。そこで、1) smooth red fiber (SRF) と RRF との形態的相違、2) SRF と RRF の出現する筋疾患を検討し、SRF の出現機序を考察した。

### 材料・方法

北海道大学医学部附属病院神経内科において1980年1月から1994年10月までの14年10カ月間に得られたヒト筋生検の738例(男391, 女347例)、年齢は生後1週より78歳、平均39.4歳(男37.9, 女41.2歳)を用い以下の検索を行った。

#### 1. 組織学的検索

生検筋は大腿四頭筋から、また一部は上腕二頭筋から採取した。筋組織は、Gomori-Trichrome変法、H&E、NSE、ALP、NADH、ATPaseに対する組織化学染色し、光学顕微鏡で観察した。また、一部の試料は電子顕微鏡で観察した。

\*北海道大学医学部神経内科

\*\*国立療養所札幌南病院神経内科

光顕観察、Gomori-Trichrome変法染色で筋細胞膜下に平滑均一に赤染する薄層が存在し、筋線維内部が比較的保たれかつNADH染色で辺縁が濃染される筋線維を、「SRF」と定義した。またRRFは上記のようなEngelらの定義に従って観察した<sup>1)</sup>。

SRFあるいはRRFが疑われた症例では染色条件による所見の差異を避けるために、可能な限り同一条件、同時染色を行い、横断面に加え、縦断面でも観察した。対照と対比して観察し、陽性と認められた症例ではcytochrome c oxidase (CCO)、SDHに対する組織化学染色を加えた。これらの標本に対して組織学的に、SRFとRRFの形態および染色性の比較を行った。

#### 2. 臨床病型との関係

記録における臨床診断および筋病理診断とSRF、RRFが観察される症例との関係を検討した。

#### 3. 代表例における検索

SRFが観察された代表例を呈示した。

### 結 果

#### 1. 組織学的検索

##### 1) RRFの形態

RRFは、Gomori-Trichrome変法染色において筋細胞膜下に赤く均一に濃染する不整の縁取りを示す。この縁取りは必ずしも全周性ではなく、厚さも薄い部分から厚い部分まで様々であった。また、赤染部が筋線維内部にまで及ぶものもみられた。筋線維内部は空胞や亀裂を示した。NADH染色では筋細胞膜下が濃染され、筋線維内部の乱れが確認された。CCO染色では活性の低下、SDH染色では活性の上昇を認め、ミトコンドリアの異常があることを示した。電顕で観察すると、RRFでは筋細胞膜の乳頭状陥凹、細胞残渣の増加に加え、筋細胞膜下のミトコンドリアの肥大、異常集積を示すとともにミトコンドリア内部にパラクリスタリン封入体が高頻度に出現することを確認した(表1)。

表1 Pathological findings of RRF and SRF

	RRF	SRF
light microscopic finding		
frequency of RRF in fiber bundles	++	-
frequency of SRF in fiber bundles	-	++
margin of fiber	rough	smooth
derangement of sarcoplasmic reticulum	+++	+
electron microscopic finding		
mitochondria		
increase of number	+++	++
hypertrophy	++	++
abnormal cryste	+++	++
paracrystalline inclusion	+++	++
plasmic membrane		
papillary folding	++	++
cell debris	+	+

SRF:smooth red fiber, RRF:regged red fiber

+++ :much, ++ :moderate, + :mild,

+ - :litte increased, - :no observed

表2 Case with RRF in 738 cases of muscle biospies in neurology clinic on Hokkaido University

grade of occurrence of RRF numbers( %)	+	++
	64(8.7%)	31(4.2%)
diagnosis	numbers out of + cases	numbers out of ++ cases
mitochondrial myopathy	31	31
chronic denervation	9	0
polymyositis	7	0
progressive muscular dystrophy	3	0
dermatomyositis	2	0
congenital myopathy	2	0
myotonic dystrophy	1	0
collagen myopathy	1	0
oculopharyngeal muscular dystrophy	1	0
non specific myopathy	7	0

+and++ :more than 1 and 3 ragged red fibers are seen in a low power light microscopic fined

## 2) SRFの形態

Gomori-Trichrome変法染色で辺縁赤染部は平滑であったが、筋線維内部まで点状かつ散在性に染色される傾向を示した。NADH染色では筋細胞膜下が濃染され、筋線維内部の乱れは軽度であった。一部の線維ではCCO染色では活性の低下、SDH染色では活性の上昇を認め、電顕観察でも筋細胞膜の乳頭状陥凹、細胞残渣の増加に加え、ミトコンドリアの肥大と集積、および一部のミトコンドリア内部のパラクリスタリン異常封入体の蓄積を示した。光顕観察では、連続切片

で観察してもRRFへ移行することなく、RRFとは明らかに異なっていたが、電顕所見はRRFと近似した(表1)。

## 2. 臨床病型との関係

RRFは、光学顕微鏡40倍、1視野(径4mm)あたり1個以上認めるものを陽性とする、全症例の64症例(8.7%)が陽性であり、診断的価値はなかった。40倍、1視野に3個以上認めるものを陽性とする、31症例(4.2%)に限定され、全例がミトコンドリア脳筋症であった(表2)。

表3 Number of cases with RRF and SRF in mitochondrial myopathy

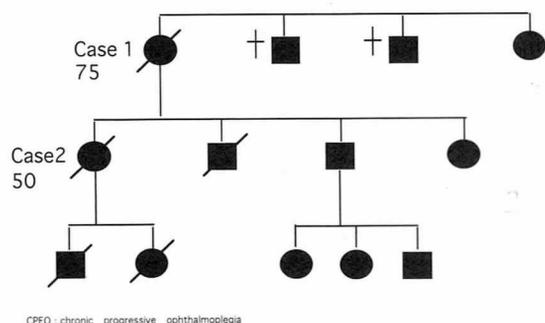
		cases with SRF	cases without SRF
numbers of cases	42	19	23
cases with RRF	31	10	21
cases without RRF	11	9	2

RRF:ragged red fiber, SRF:smooth red fiber

臨床的にミトコンドリア脳筋症と診断された42症例中19例(45.2%)にSRFが観察された(表3)。そのうち10例はRRFとSRFの両者を、9例はSRFのみを、21例はRRFのみを認めた。両者とも認めなかった2例はDNA検索にて診断された。

### 3. 代表的症例における検索

慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)の家族例で、母親は、RRFを、長女はSRFのみを認めた(図1)。



CPEO: chronic progressive ophthalmoplegia

図1 Pedigree of CPEO family

#### 1) Case 1. 75歳, 女性.

20歳代より、眼瞼下垂、外眼筋麻痺出現し、70歳台になり、四肢脱力が加わる。血清CK値の上昇、負荷試験での乳酸、ピルビン酸の持続的高値を認めた。筋病理で典型的なRRFを有し、電子顕微鏡観察でもパラクリスタリン封入体が確認された。

#### 2) Case 2. 50歳, 女性.

Case 1の長女。20歳代台より眼瞼下垂出現、40歳台後半より、上方視制限が加わる。血液検査は異常を認めなかった。筋線維にはGomori-Trichrome変法染色でRRFは観察されなかったが、一部の筋線維は筋膜下から内部にかけて点状、散在性に赤染するSRFであった(図2-a)。電顕で観察すると、赤染部の筋膜下および筋線維内部に著しい大小不同ミトコンドリアの著しい集積がみられた。これらのミトコンドリアは、パラクリスタリン封入体は示さなかった(図2-b)。

#### 3) Case 3. 35歳, 男性.

臨床経過15年の孤発性CPEOであり、眼瞼下垂、外

眼筋麻痺を示す。筋線維には、Gomori-Trichrome変法染色でRRFは認めず、筋膜下から内部にかけて点状、散在性に赤染するSRFが散見された(図2-c)。電顕で観察すると、大小不同ミトコンドリアの著明な集積、筋膜の乳頭状陥凹がみられた。これらミトコンドリア内部にはパラクリスタリン封入体、異常クリスタが認められた(図2-d)。

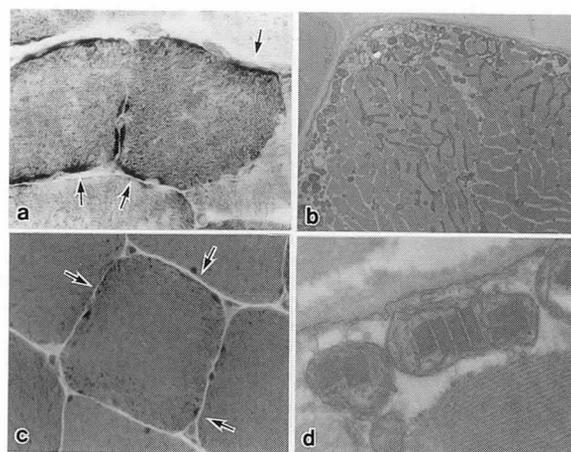


図2 a:Case 2 modified Gomori-Trichrome stain 264 ×  
b:Case 2 EM 8,000 ×  
c:Case 3 Case 2 modified Gomori-Trichrome stain 264 ×  
d:Case 3 EM 16,000 ×  
Arrows show smooth red layer

### 考 察

今回の結果でも明らかなように、Gomori-Trichrome変法染色は筋線維でミトコンドリアが集積する部分を赤染する。とくに、これまで、RRFがある程度以上の数が出現するときは、ミトコンドリア異常の指標として重要視されていた。今回の検討でも40倍、1視野に3個以上のRRFを認めた症例は、全てミトコンドリア脳筋症であり、RRFはミトコンドリア異常の特徴的所見であることが確認された。一方、今回、注目したSRFは、ミトコンドリア脳筋症と関連して出

現する。そこで、RRFとSRFの関連を考察し、筋病理の特徴を整理した。

SRFは組織学的に、光顕観察では、辺縁は平滑であり、赤染部は筋細胞膜下、および一部筋線維内部にまでおよび、筋線維構築の乱れは軽度であり、RRFとは異なるが、電顕観察では、パラクリスタリン封入体を高頻度に認め、RRFと近い存在である(表1)。

また臨床的にも、家族歴を有するCPEOの症例で、重症の母親(Case 1)では典型的なRRF および電子顕微鏡観察でパラクリスタリン封入体が見られたが、軽症状の娘(Case 2)ではRRFはみられず、SRFのみ認めた。また、SRFを持つ症例の一部では(Case 3)、電子顕微鏡観察でパラクリスタリン封入体のみみられた。さらにミトコンドリア脳筋症ではRRFとSRFが混在して認められる症例もあった。このように、SRFは、遺伝性の問題がみられ、ミトコンドリア自体に問題のあるミトコンドリア脳筋症と密接に関連している。以上のように、ミトコンドリア脳筋症で見られるSRFは、RRFと同様の機序により発現すると推測され、SRFは、ミトコンドリア脳筋症の進行に伴ってRRFへ移行していく前段階の線維であると考えられる。

なお、今回呈示した、CPEO母子例では遺伝子検索は未施行であり、今後検討が必要である。

## 文 献

- 1) Olson W, Engel WK, Walsh GO, Einaugler R: Oculocraniosomatic neuromuscular disease with "Ragged-Red" fibers. Histochemical and ultrastructural changes in limb muscles of a group of patients with idiopathic progressive external ophthalmoplegia. *Arch Neurol* 26: 193-211, 1972.
- 2) 磯崎英治, 宮本和人, 田邊 等, 小田雅也: ヒト横隔膜における多様性筋病変 (ragged red fiber, core/targetoid fiber, cytoplasmic body, ring fiber) の検討. *臨床神経* 29: 726-733, 1989.
- 3) 埜中征哉, 古賀靖敏, 山本雅彦: ミトコンドリア脳筋症の病理. 31: 624-633, 1987.
- 4) Ziad R, Stephen W, Cornelia K, Charles AT: Ragged red fiber in normal aging and inflammatory myopathy. *Ann Neurol* 37: 24-29, 1995.

# 11) ミトコンドリア脳筋症患者の ragged-red fiber におけるミオグロビン量とその mRNA 量

川井尚臣\*

研究協力者 国重誠\* 三ッ井貴夫\* 峯秀樹\*  
西田善彦\* 岡崎誠司\* 若松延昭\*  
齋藤史郎\*

## はじめに

ミトコンドリア脳筋症患者の骨格筋組織には異常ミトコンドリアの集積した ragged-red fiber (RRF) が通常認められ、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の異常が認められることも多い<sup>1)</sup>。本症患者のミトコンドリアには機能異常があり、ミトコンドリアにおける酸素の利用障害が生じていると考えられる<sup>1)2)</sup>。

一方、myoglobin (Mb) は筋細胞中で酸素の貯蔵や運搬を行うヘム蛋白質であり、ミトコンドリアへの酸素の供給に密接な関係がある。また、本蛋白質は筋組織中に発生する活性酸素である過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) と反応することにより、さらに組織障害性の強い活性酸素の一種である hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) を発生させることが知られている<sup>3)</sup>。

本研究ではミトコンドリア脳筋症患者の RRF 中の Mb とその mRNA の量を調べ Mb の生合成とその役割を検討し、あわせて活性酸素の消去酵素である manganese superoxide dismutase (Mn-SOD)、copper zinc (CuZn)-SOD および catalase (CAT) についてもその量を調べ、RRF における酸素の供給と活性酸素の消去機構との関係について検討した。

## 対象と方法

対象はミトコンドリア脳筋症患者 5 例で、その内訳は慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO) 4 例、Kearns-Sayre 症候群 (KSS) 1 例である。これらの患者の生検骨格筋および正常対照 2 例 (膝関節症患者) の骨格筋を用いて研究を行った。

方法は、これらの筋組織より新鮮凍結連続切片 ( $6 \mu m$ ) を作製し、その切片について modified Gomori trichrome 染色、ATPase 染色 (pH 4.4)、succinate dehydrogenase (SDH) 染色、cytochrome c oxidase (COX) 染色を行った。また、Mb、SOD、CAT は抗 Mb 抗体 (Dako)、抗 Mn-SOD 抗体 (日本油脂)、抗

CuZn-SOD 抗体 (Sigma)、抗 CAT 抗体 (Athens research) を用いて免疫組織化学的に染色した。また、MbmRNA はブタ Mb cDNA を Pst I で処理して得られた 209bp の断片をビオチン化したものをプローブとして用い、*in situ* hybridization により検出した。

Mb の定量には、Mb を染色した切片 1 枚につき 50 本の筋線維を無作為に選び、1 本の筋線維につき 1 カ所を選び、一定面積 ( $314 \mu m^2$ ) の 530nm の吸光度 (OD) を顕微分光測光装置 (Carl Zeiss, UMSP-I) で測定した。Mn-SOD、CuZn-SOD および CAT の定量には、連続切片上で Mb の定量を行った全ての筋線維について同一部位を測定し、MbmRNA の定量には染色した切片 1 枚につき 200 本の筋線維を無作為に選んで同様に測定した。それぞれの染色で得られた OD の平均値より陰性対照の OD 値を差し引き、それぞれの蛋白質、酵素、mRNA の含有量を表した。なお、本研究では筋線維の横断面の最大径が  $40 \mu m$  以上のものを非萎縮筋線維、それ未満のものを萎縮筋線維とした<sup>4)5)</sup>。

## 成績

### 1. 正常骨格筋の成績

Mb は筋線維全体が細顆粒状に染色され、染色性の強い線維と弱い線維がモザイク状に分布しており (図 1B)、前者は type 1 線維に、後者は type 2 線維に相当していた (図 1A, B)。MbmRNA は筋線維全体に顆粒状のシグナルとしてみられ (図 1C)、fiber type による差はみられなかった。Mn-SOD では微細網目状に筋細胞質が染色され、type 1 線維に強く染まるモザイク状のパターンがみられた (図 1D)。CuZn-SOD も同様の染色パターンを示し、fiber type による差がわずかにみられた (図 1E)。CAT は筋線維全体が均一に染色され、fiber type による差はみられなかった (図 1F)。

### 2. ミトコンドリア脳筋症患者の成績

Mb および MbmRNA の染色性は筋線維全体に顆粒状に認められ、非萎縮筋線維では、RRF は Mb、MbmRNA とともに非 RRF に比べて強く染色された (図

\*徳島大学医学部第一内科

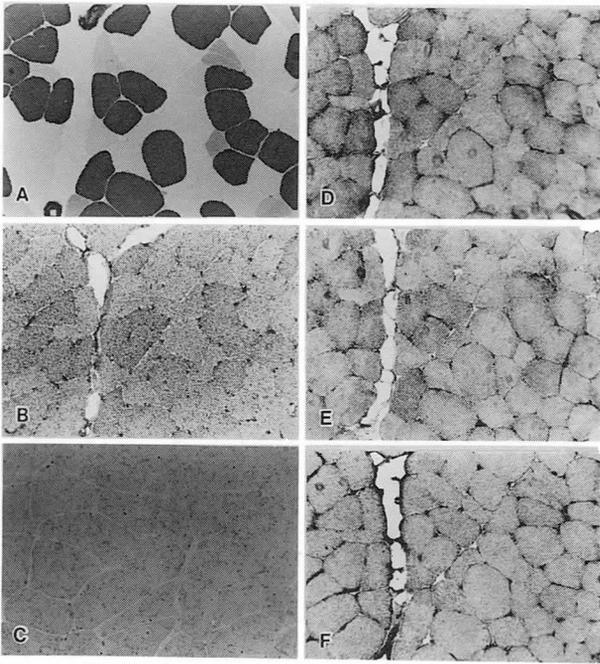


図1 正常骨格筋組織像

A-Eはそれぞれ下記の酵素、蛋白質あるいは mRNA の染色を示す。A: ATPase (pH4.4). B: Mb. C: MbmRNA. D: Mn-SOD. E: CuZn-SOD. F: CAT. (A-E x200).

2A-G, 矢印). 萎縮筋線維では, RRFは Mb, MbmRNAともに非RRFと同様の染色性を示した(図2A-G, 矢頭). Mn-SOD, CuZn-SODおよびCATは非萎縮, 萎縮筋線維ともにRRFは非RRFに比べて強く染色されたが, この所見は非萎縮筋で顕著であった(図2H-J).

### 3. MbおよびMbmRNAの量

正常骨格筋では, Mb量はtype 2線維(OD=0.350 ± 0.023, mean ± SD)に比べtype 1線維(OD=0.400 ± 0.022)では有意(p<0.001)に高値であったが(図3A), MbmRNA量は筋線維のtype別の有意差はなかった(図3B).

CPEO/KSS患者の骨格筋では, 非萎縮筋線維のうち, RRFではMb量(type 1: OD=0.538 ± 0.105, type 2: OD=0.531 ± 0.119)およびMbmRNA量(OD=0.085 ± 0.024)は, 非RRFのMb量(type 1: OD=0.403 ± 0.056, type 2: OD=0.370 ± 0.044)およびMbmRNA量(OD=0.067 ± 0.023)に比べ有意(それぞれp<0.001, p<0.005)に高値であったが, 萎縮筋線維ではRRFと非RRFとの間に有意差はなかった(図3A, B).

### 4. SODおよびCATの量

正常骨格筋のtype 1線維のMn-SOD量(OD=0.309 ± 0.026)およびCuZn-SOD量(OD=0.292 ± 0.027)はtype 2線維のMn-SOD量(OD=0.207 ± 0.033)および

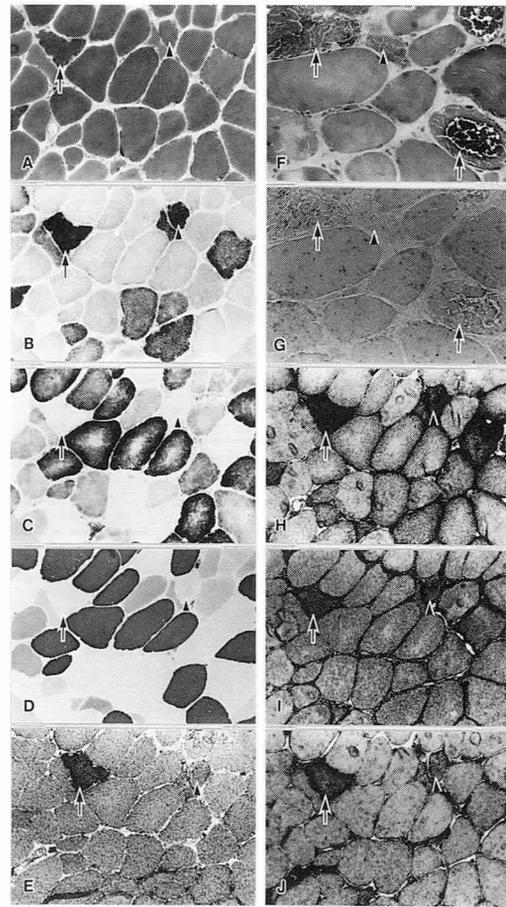


図2 ミトコンドリア脳筋症患者の組織像

A-Jはそれぞれ下記の酵素、蛋白質あるいは mRNA の染色を示す。A: Modified Gomori trichrome. B: SDH. C: COX. D: ATPase (pH4.4). E: Mb. F: Modified Gomori trichrome. G: MbmRNA. H: Mn-SOD. I: CuZn-SOD. J: CAT. (A-E, H-J x200, G, H x400).

CuZn-SOD量(OD=0.250 ± 0.030)に比べ有意(ともにp<0.001)に高値であったが(図4A, B), CAT量は筋線維のtype別の有意差はなかった(図4C).

CPEO/KSS患者の骨格筋では, 非萎縮, 萎縮筋線維ともに, RRFのMn-SOD量(type 1: OD=0.736 ± 0.264, type 2: OD=0.736 ± 0.284), CuZn-SOD量(type 1: OD=0.668 ± 0.260, type 2: OD=0.671 ± 0.289)およびCAT量(type 1: OD=0.715 ± 0.119, type 2: OD=0.701 ± 0.093)は, 非RRFのMn-SOD量(type 1: OD=0.408 ± 0.081, type 2: OD=0.359 ± 0.097), CuZn-SOD量(type 1: OD=0.434 ± 0.096, type 2: OD=0.401 ± 0.074)およびCAT量(type 1: OD=0.530 ± 0.085, type 2: OD=0.532 ± 0.079)に比べ有意(それぞれp<0.001, p<0.001, p<0.003)に高値を示した(図4A-C).

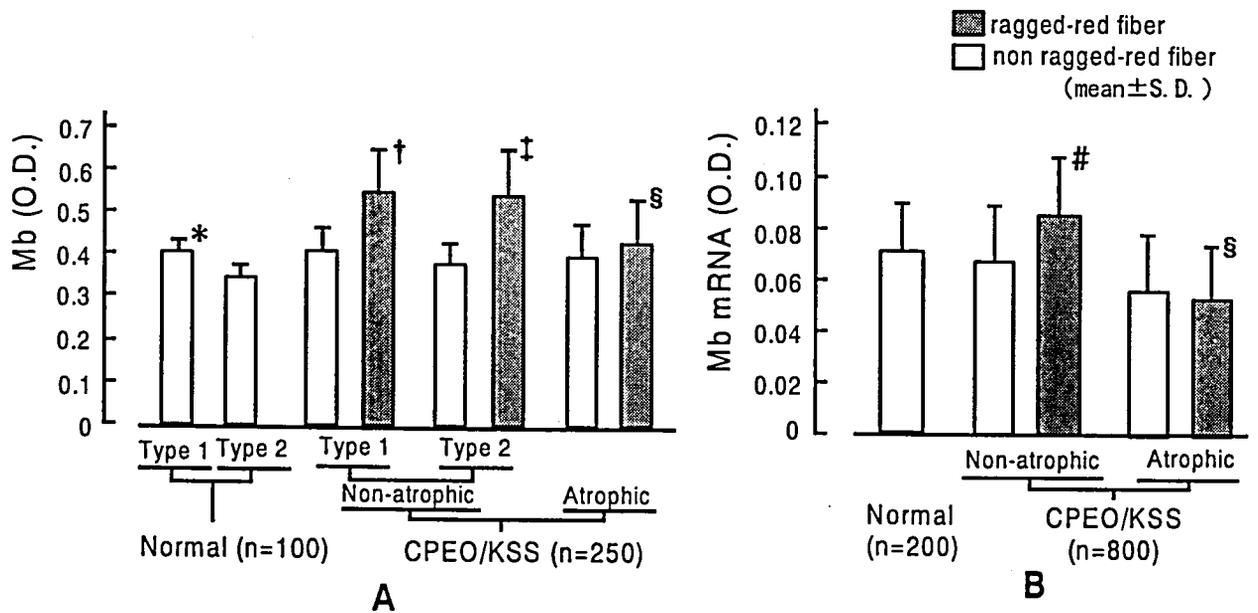


図3 MbおよびMbmRNAの量

A: Mb量. B: MbmRNA量. \*: 正常 type 2 線維に比べ有意 ( $p < 0.001$ ) に高値. †: 正常 type 1 線維および type 1 非 RRF に比べ有意 ( $p < 0.001$ ) に高値. ‡: 正常 type 2 線維および type 2 非 RRF に比べ有意 ( $p < 0.001$ ) に高値. §: 非 RRF に比べて有意差なし. #: 正常筋線維および非 RRF に比べて有意 ( $p < 0.005$ ) に高値.

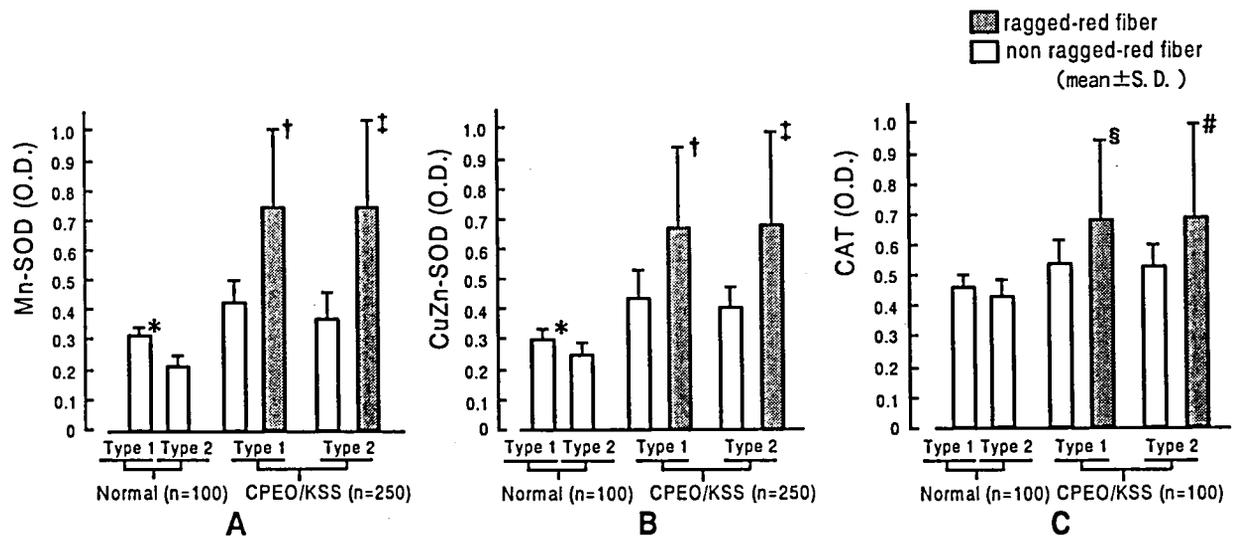


図4 SODおよびCATの量

A: Mn-SOD量. B: CuZnSOD量. C: CAT量. \*: 正常 type 2 線維に比べ有意 ( $p < 0.001$ ) に高値. †: 正常 type 1 線維および type 1 非 RRF に比べ有意 ( $p < 0.001$ ) に高値. ‡: 正常 type 2 線維および type 2 非 RRF に比べ有意 ( $p < 0.001$ ) に高値. §: 正常 type 1 線維および type 1 非 RRF に比べて有意 ( $p < 0.01$ ) に高値. #: 正常 type 2 線維および type 2 非 RRF に比べて有意 ( $p < 0.01$ ) に高値.

#### 5. Mb量とSOD量およびCAT量の関係

Mn-SOD量, CuZn-SOD量およびCAT量はMb量と有意(それぞれ  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ )に正の相関を示した(それぞれ  $r = 0.779$ ,  $r = 0.754$ ,  $r = 0.280$ ) (図5A-C).

#### 考 察

本研究ではミトコンドリア脳筋症患者の骨格筋の非萎縮のRRFでMbとそのmRNAの量が増加していることを示した。このことは、非萎縮のRRFではMbの生合成が増加していることを示すものであり、このよ

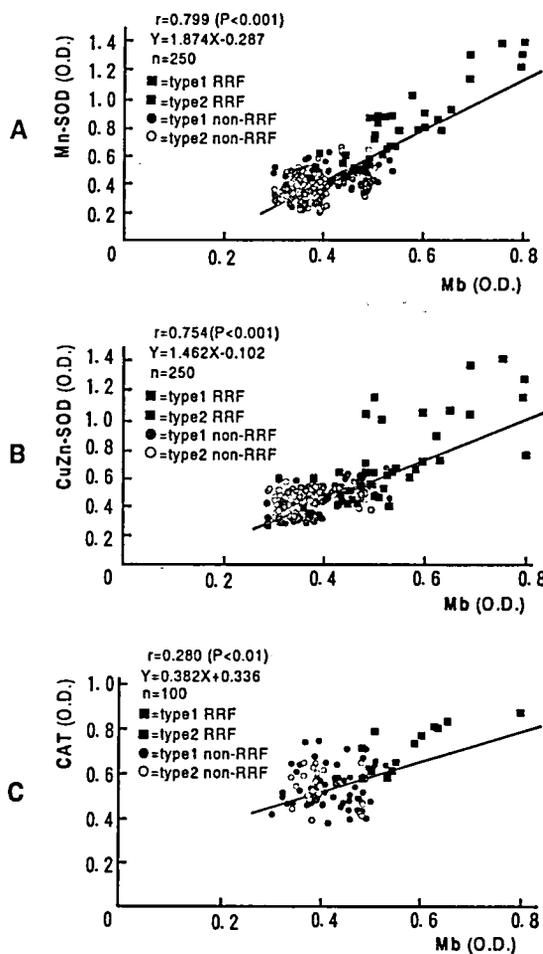


図5 ミトコンドリア脳筋症患者の骨格筋線維のMb量とSOD量およびCAT量の関係

A: Mb量とMn-SOD量, B: Mb量とCuZn-SOD量. C: Mb量とCAT量. Mn-SOD, CuZn-SOD量およびCAT量はそれぞれMb量と有意に正の相関がみられた.

うな筋細胞では酸素の供給が増加していることを示唆する。すなわち、異常ミトコンドリアでは低下したエネルギー産生を代償するためにMbを増加し酸素の供給を増加する機構が働いていると考えられる。文献的にも、患者の筋組織より単離したミトコンドリアあたりの酸素消費は低下しているが、患者の身体全体の酸素の取り込みは増加していることが報告されている<sup>1)</sup>。また、本症患者の骨格筋組織では、運動負荷時にoxyhemoglobinの増加があり、酸素の供給が増加しているとの報告もある<sup>2)</sup>。しかし、この酸素供給の増加は活性酸素を過剰に発生させる要因にもなり<sup>6)</sup>、ミトコンドリアの機能障害をさらに増強させる可能性がある。

ミトコンドリア脳筋症における活性酸素による組織の障害を示す所見として、血清過酸化脂質の増加があ

り<sup>7)</sup>、われわれも患者の筋組織においてDNA損傷の指標である8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG)が増加していることを報告した<sup>8)</sup>。一方、活性酸素を減少させる機構の存在については、患者の血漿および赤血球中の還元型glutathioneが減少していることや<sup>7)</sup>、RRFでMn-SODやCuZn-SODが増加していることが報告されている<sup>9)</sup>。本研究では、非萎縮ならびに萎縮のRRFではMn-SODやCuZn-SODのみならずH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を処理するCATも増加していることを見出した。さらに、非萎縮RRFでは、SODおよびCATの増加はMbの増加に対応していることを示した。

以上の成績より、非萎縮RRFでは、低下したエネルギー産生を代償するためMbの生合成が増加し、酸素の供給を増加させていると考えられる。その結果RRFでは活性酸素の発生が増加することになり、これにより細胞障害が増強するとともにミトコンドリアの機能障害も進行すると考えられる。Mbの増加に対応したSODおよびCATの増加は、RRFにおいては過剰に発生した活性酸素の処理機構が亢進していることを示唆するものであり、萎縮RRFではこのような代償機構は失われていると考えられる。

#### まとめ

ミトコンドリア脳筋症患者の非萎縮RRFでは、Mbの生合成の増加による酸素供給の増加が起こりミトコンドリアの機能障害を補っていると考えられるが、これにより活性酸素が増加するためその処理機構が亢進していることが示唆された。

#### 文献

- 1) Luft R: The development of mitochondrial medicine. Proc Natl Acad Sci USA 91: 8731-8738, 1994.
- 2) Ozawa T, Sahashi K, Nakase Y and Chance B: Extensive tissue oxygenation associated with mitochondrial DNA mutations. Biochem Biophys Res Comm 213: 432-438, 1995.
- 3) Puppato A and Halliwell B: Formation of hydroxyl radicals in biological systems. Does myoglobin stimulate hydroxyl radical formation from hydrogen peroxide? Free Rad Res Comms 4: 415-422, 1988.
- 4) Mitsui T, Kawai H, Naruo T, Nishino H and Saito S: In situ hybridization of myoglobin mRNA: results on the skeletal muscles of normal subjects and patients with neuromuscular diseases. Acta Neuropathol

86 : 313-318, 1993.

- 5) Kunishige M, Mitsui T, Akaike M, Shono M, Kawai H and Saito S : Localization and amount of myoglobin and myoglobin mRNA in ragged-red fiber of patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Muscle Nerve* (1996 in press).
- 6) Kinnula VL, Crapo JD and Raivio KO : Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest* 73 : 3-19, 1995.
- 7) Piccolo G, Banfi P, Azan G, Rizzuto R, Bisson R, Sandona D and Bellomo G : Biological markers of oxidative stress in mitochondrial myopathies with progressive external ophthalmoplegia. *J Neurol Sci* 105 : 57-60, 1991.
- 8) Mitsui T, Kawai H, Nagasawa M, Kunishige M, Akaike M, Kimura Y and Saito S : Oxidative damage to skeletal muscle DNA from patients with mitochondrial encephalomyopathies. *J Neurol Sci*, 1996, in press.
- 9) Ohkoshi N, Mizusawa H, Shiraiwa N, Shoji S, Harada K and Yoshizawa K : Superoxide dismutases of muscle in mitochondrial encephalomyopathies. *Muscle Nerve* 18 : 1265-1271, 1995.

## II. 臨床・分子遺伝学

## 12) リンパ芽球細胞の樹立とその解析

齋藤 深美子\*

EBウイルス (Epstein-Bar virus) はリンパ球 B cell に特異的に感染し、それを transform させる能力がある。こうして樹立した細胞株はリンパ芽球細胞株 (lymphoid cell line: LCL) と称されている。LCL は、その樹立の際に患者に苦痛を与えることもなく、また、細胞は半永久的に増殖し、染色体構成も安定で、その凍結保存や DNA 抽出も容易なことから、分子遺伝学的解析資料として大変有用とされている。実際、DMD をはじめ数多くの遺伝性疾患原因遺伝子のポジショナルクローニングの際に、必要不可欠の細胞資料として利用されてきた。

本研究は、筋ジストロフィーおよび類縁疾患の患者およびその家族の LCL の樹立・保存とその細胞遺伝学および分子細胞遺伝学的解析を目的とした。

### (1) 細胞株 (LCL) の樹立

患者およびその家族の静脈血から無菌的にヘパリン採血された、リンフォプレップ (比重=1.077) を用いてリンパ球を分離する。一部は凍結保存し、残りのリンパ球に調製した EBウイルス抽出液を混合して、37°C で1時間処理する。その後細胞を2回洗浄し、培養液 (牛胎児血清を含む) を加えた後、37°C の恒温槽で培養を開始する。細胞が樹立するまで、細胞の増殖の程度をチェックしながら培養液の交換をする。樹立した後は、-80°C ディープフリーザーまたは液体窒素で細胞株を凍結保存し、必要なときに解凍保存し、再培養を行う。

各細胞株は EBウイルス感染後、1~2週間で樹立した。現在までに、家族を含め58人分 (その内患者は40名) の LCL を樹立し、凍結保存している。その内訳を表1に示した。

### (2) 細胞遺伝学的検索

細胞遺伝学的検索に関しては、末梢血培養および樹立した LCL を用いて検索を行った。末梢血培養の場合は、PHA を添加した後、48~72時間培養して染色体標本作製する。LCL を使用する場合は、通常染色体標本作製法では、高精度分析の可能な細長い染色体標本作製法を得ることは困難なので、本研究者らが開発した同調培養およびエチジウムブロマイド併用法を

用いた<sup>1)</sup>。

染色体解析の結果、ALSでの t(7;13) 転座<sup>2)</sup> および DMDでの t(X;22) 転座の染色体構造異常の他に、重度の精神遅滞を伴う DMD の患者に X 染色体の逆位 (inv(X)) が見出された (図1)。

この症例は、DMD に合併した精神遅滞と染色体構造異常切断点との関連性を示唆する貴重な例と思われる。この患者の染色体構成は 46, Y, inv(X) (p21.2q22.2) で、この inv(X) は、軽い精神遅滞を伴う母親由来であることが判明した。患者および母親の臨床症状と染色体切断点との関連性を考慮すると、X 染色体の短腕側の切断により DMD を発症し、一方、長腕側の切断により中枢神経障害を発症した可能性が考えられ、X 染色体上に存在するといわれる幾つかの中枢神経障害関連疾患遺伝子の1つの候補領域として更に検討を重ねたい。

表1 樹立した細胞株 (LCL) のリスト

muscular dystrophy, late onset distal:	6 (4)
myotonic dystrophy (MD):	20 (6)
amyotrophic lateral sclerosis (ALS):	23 (23)
Duchenne muscular dystrophy (DMD):	4 (2)
Charcot-Marie-Tooth disease type 1 (CMT1):	4 (4)
hereditary neuropathy with liability to pressure-sensitive palsies (HNPP):	1 (1)

合計 58 (40)

[数字は人数、( ) 内は患者数を現わす]

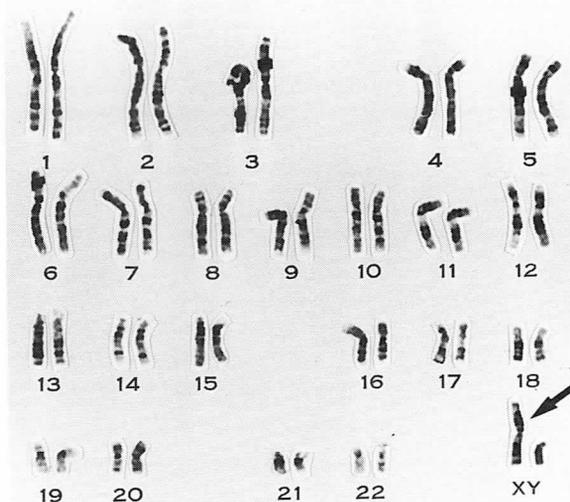


図1 G分染法による患者の染色体核型

\*東京医科歯科大学難治疾患研究所遺伝疾患研究部門 (細胞遺伝)

### (3) 分子細胞遺伝学的検索

Myotonic dystrophy (MD) の責任遺伝子は、19q13.3に座位する myotonin protein kinase (MTPK) をコードしており、この MTPK 遺伝子の 3' 側の非翻訳領域にある 3塩基 (CTG) 反復配列の異常拡大<sup>3)</sup>によって、疾患が発症すると言われているが、その本態はまだ不明である。また、この遺伝子の mRNA の発現量に関しては、正常細胞と比較して、増大<sup>4)</sup>あるいは減少<sup>5)</sup>という報告がなされており、未だ結論が出ていない。そこで今回は、3塩基反復配列のアンチセンスのオリゴプローブ (30base) による *in situ* hybridization (ISH) 法<sup>6)</sup>を用いて、患者及び健常人の MTPK 遺伝子の転写産物の細胞核内での局在を調べた。

### 資 料

MDの患者5例、および健常人4例の各々の LCL を検索の資料として用いた。

### 方 法

使用したオリゴヌクレオチドプローブは、アンチセンスプローブとしての CAG の 10回 repeat から成る CAG-30、およびセンスプローブとしての CTG の 10回 repeat から成る CTG-30で、前者は TR で標識するためそのシグナルは赤く観察され、また後者は FITC で標識されるため緑色に見える。

今回用いた *in situ* hybridization 法は図2に示した。

### 結 果

センスプローブ CTG-30 では、患者の細胞核内の一ヶ所に緑色のシグナルが検出された。一方、アンチセンスプローブ CAG-30 では、核内の数カ所に赤色のシグナルが存在し、その中の一ヶ所は、センスプローブの緑色のシグナルと重なって黄色のシグナルとして

観察された。つまりこの黄色の部分は、trinucleotide が expand している遺伝子部分を示し、他の赤い focus は、その転写産物を示していると考えられる。

患者と健常人の核で比較した結果を表2に示した。アンチセンスのシグナルが陽性の細胞 (CAG(+)) は、健常人ではほぼ0~1%であるが、患者の細胞では43~93%と明らかに高かった。またその割合は、hybridization の時間に依存して増加していることがわかった。

一方、パラフォルムアルデヒドで固定した細胞では、シグナルを定量化することが困難であったが、患者の細胞では、多くの bright な固まりが観察された。

以上のことから、アンチセンスプローブは患者の核では、MTPK 遺伝子とその転写産物の両方を示し、散在するシグナルの focus の1つのみ遺伝子 DNA と RNA を含み、センスプローブは post transcriptional な RNA を示し、それが核内に集積していると思われる。この転写産物の核内集積は MD の病態の1つの側

表2 患者および健常人の細胞 (LCL) における hybridization の時間と CAG-30(+) の割合と関係

Hybri time	Patient	CAG-30(+)	Normal	CAG-30(+)
3.5 hrs	DM2	45.3 %	DM7	0.5 %
	DM3	43.0		
	DM4	50.9		
	DM6	37.5		
6.5 hrs	DM1	93.4	DM7	0.8
			N1	0.2
			N2	0.3
			N3	0.4
17.0 hrs	DM2	88.2	DM7	1.3
	DM6	82.7	N1	1.4
			N3	1.0

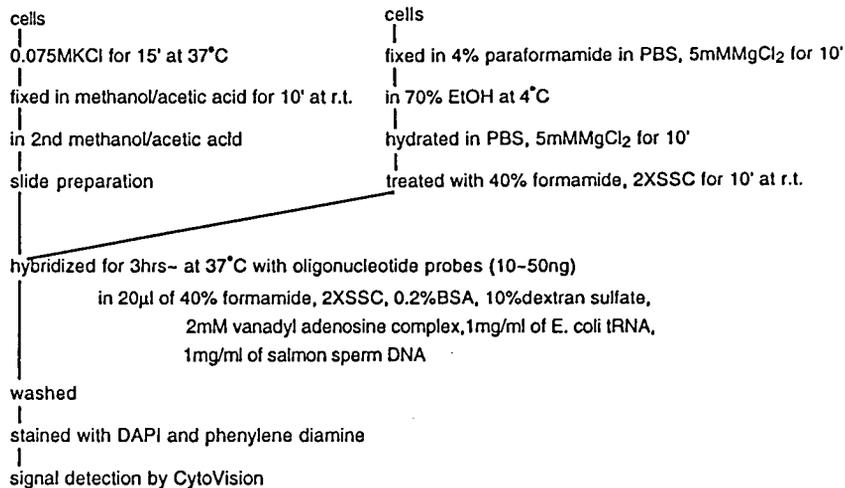


図2 *In situ* hybridization with oligonucleotide probes

面であるとも考えられるため、さらに解析例数を増やし、診断との応用等に関して検討していきたい。

最後に、御協力頂いた以下の先生方に、心より深謝いたします。(順不同、敬称略)

虎の門病院(神経内科)高木昭夫、中瀬浩史、竹内壮介；国立精神・神経センター(神経研)荒畑喜一、中村昭則；新潟大学(神経内科)辻省次、小野寺理、牧野邦比古；東京医科歯科大学(神経内科)金子清俊；東京大学(神経内科)後藤順；公立昭和病院(神経内科)佐野元規；都立墨東病院(小児科)伊藤昌弘；日本電子(株)植松善英

#### 参考文献

- 1) Ye MH, Saito-Ohara F and Ikeuchi T: High-resolution chromosome R-banding in lymphoblastoid cell lines by the combined use of cell synchronization and ethidium bromide treatment. *Jpn J Hum Genet*, in press.
- 2) Kaneko K, Saito F, Sunohara N and Ikeuchi T: Cytogenetic analysis of 23 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Genet* 47: 158-160, 1995.
- 3) Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG Jr, et al: An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255(5049): 1256-1258, 1992.
- 4) Sabouri LA, Mahadevan MS, Narang M, Lee DS, Surh LC and Korneluk RG: Effect of the myotonic dystrophy (DM) mutation on mRNA levels of the DM gene. *Nature Genet* 4(3): 233-238, 1993.
- 5) Fu YH, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, et al: Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 260(5150): 235-238, 1993.
- 6) Taneja KL, McCurrach M, Schalling M, Housman D and Singer RH: Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol* 128(6): 995-1002, 1995.

# 13) 眼咽頭筋ジストロフィー：日本人2家系の臨床・筋病理・遺伝子連鎖解析の検討

内野 誠\*

研究協力者 宇山 英一郎\* 徳永 誠\* 安藤 正幸\*\*  
野平 修\*\*\* 岡部 多加志\*\*\* D. Chateau\*\*\*\*  
F. M. S. Tomé\*\*\*\* B. Brais\*\*\*\*\* G. A. Rouleau\*\*\*\*\*

## はじめに

眼咽頭筋ジストロフィー (oculopharyngeal muscular dystrophy: MIM 164300)<sup>1)</sup> は 1915 年に Taylor<sup>2)</sup> が脳神経核の障害による疾患として最初に記載し、1962年に Victorら<sup>3)</sup> が筋原性の疾患として命名した、常染色体優性の遺伝性疾患である。一般に40歳以降に発症し、眼瞼下垂と嚥下障害を主徴とする。進行は非常に緩徐で、発症早期から外眼筋麻痺を伴うことは稀であり、生命予後は比較的良好である<sup>4)</sup>。従来 French Canadian を中心に多数の白人家系が報告されてきたが、他の人種には、筋病理学的に診断が確定した家系は見出されていなかった。最近、カナダの研究グループにより、本疾患の候補遺伝子は心臓の  $\alpha$  と  $\beta$  の myosin heavy chain が存在する染色体の 14q11.2-q13 に局在していることが明らかにされた<sup>5)</sup>。今回私共は、熊本と静岡に日本人の本症家系を見出し、欧米の白人家系と比較検討するため、臨床・筋病理・遺伝子連鎖解析を行ったので報告する。

## 対象および方法

熊本の家系(図1A; 発病者3世代5例、静岡の家系(図1B; 発病者4世代25例について臨床的比較検討を行い、両家系の詳細な家系調査を行った。

筋病理学的検討は、熊本の発端者では生検で得られた三角筋に加え、嚥下障害の治療のため施行した輪状咽頭筋切開術の際、同意のもとに得られた両側の輪状咽頭筋と胸骨舌骨筋、および静岡の発端者の生検で得られた上腕二頭筋を用いて行った。

遺伝子連鎖解析は、同意の得られた静岡の家系について、発病者而非発病者の計33例の末梢血20mlよりゲノムDNAを抽出し、14q11.2-q13のマイクロサテラ

イト多型 DNA マーカーの、D14S50, D14S283, Genethon 1, MYH 7.24, および MYH 7.1 を用いてハプロタイプを検討した。二点連鎖解析には LINK-AGE 5.1 package の MLINK program を用いた。

## 結果

本症の日本人2家系の発病者は30例(男性14例、女性16例)で発症年齢は40歳以降、平均年齢は58歳であった。熊本の家系は眼瞼下垂、静岡の家系は嚥下障害が初発症状であったが、発病後10年以上経過した症例の病状に有意な差は認めなかった。明らかな外眼筋麻痺や四肢遠位筋の萎縮をきたした例はなく、頸部屈筋と四肢近位筋に軽度の筋力低下を認めた。血清CKは熊本の家系例では正常で、静岡の家系例では軽度ないし中等度上昇していた。筋病理学的には、筋力低下が軽度であった三角筋と上腕二頭筋では、筋線維の軽度の大小不同に加え、少数の rimmed vacuole と小角化線維が散見されたが、両側の輪状咽頭筋では筋線維の基本構築の崩壊、著明な fibrosis、および間質の脂肪浸潤を認めた(表1)。壊死・再生線維はわずかに確認された程度であった。電顕では、本症患者の骨格筋筋線維核内にのみ見出されるとされている intranuclear tubulofilamentous inclusions (ITI) が三角筋で3.5%、胸骨舌骨筋で5%、輪状咽頭筋2%、上腕二頭筋で3%認められた(図3)。静岡の家系例における遺伝子連鎖解析では、用いた14番目の染色体長腕(14q11.2-q13)のマーカーすべてに対して組換え率  $\theta = 0.00, 0.01, 0.002$  で最大 lod score は3以上であり、日本人の本症家系の候補遺伝子も French Canadian の家系例と同様に14q11.2-q13上に存在することが明らかとなった。また、両家系間に共通祖先はなく、いずれも日本人以外の祖先との関連は調査した限りでは確認されなかった(表2)。また、ハプロタイプ解析では、発病者はすべて共通の本症遺伝子領域のハプロタイプをヘテロに有していた(図2)。

\*熊本大学医学部附属病院神経内科

\*\*熊本大学医学部第一内科

\*\*\*静岡赤十字病院神経内科

\*\*\*\*INSERM U. 153, France

\*\*\*\*\*McGill University & Montreal General Hospital, Canada

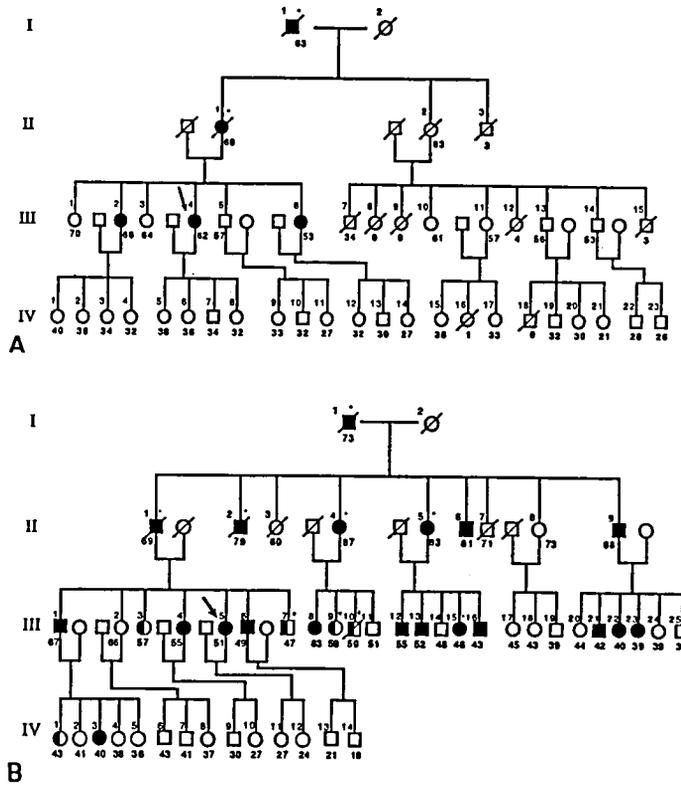


図1 熊本(A)と静岡(B)の家系図。矢印が発端者、黒塗印が発病者、斜線印が死亡者である。Anticipationは静岡の家系で軽度みられる。

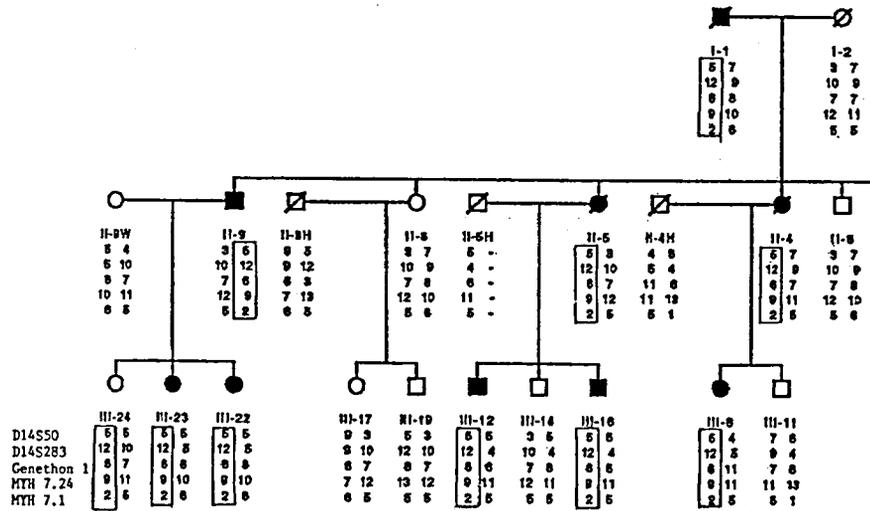


図2 静岡の家系のハプロタイプ解析(紙面の都合で一部を示す)。各マーカーのアレルを適宜数字で示し、眼咽頭筋ジストロフィー遺伝子領域のハプロタイプを枠で囲んである。一人の危険保因者(39歳)を除き、発病者はいずれも共通の本症遺伝子領域のハプロタイプをヘテロに保有している。

### 考 察

日本にも、French Canadianをはじめとする白人の眼咽頭筋ジストロフィーの家系例と酷似した臨床像を呈する家系例が存在することが明らかにされた。す

なわち、発症年齢は40歳以降で、高度の眼瞼下垂と嚥下障害を呈するも外眼筋麻痺は伴わず、四肢筋の障害も近位部に軽度認められる程度である点など、欧米家系例と共通した臨床症状の特徴を呈した。また、熊本

表1 日本人眼咽頭筋ジストロフィー患者の筋病理所見

筋病理	熊本の発端者			静岡の発端者		
	三角筋	胸骨舌骨筋		輪状咽頭筋		上腕二頭筋
	右	右	左	右	左	左
光顕所見						
Loss of fibers	+	+	+	+++	+++	+
Small angulated fibers	+	+	+	-	-	+
Rimmed vacuoles	+	+	+	++	++	+
Interstitial fibrosis	++	+	+	+++	+++	+
電顕所見						
ITI (%)	3.5	5	NE	2	NE	3

-: なし, +: 軽度, ++: 中等度, +++: 著明

ITI: intranuclear tubulofilamentous inclusions, NE: not examined

表2 14q11.2-q13マーカーとOPMD-静岡との二点連鎖解析

マーカー	組み替え率 (θ)									
	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.2	0.3	
D14S50	5.26	5.17	5.09	5.00	4.91	4.81	4.34	3.32	2.16	
D14S283	3.63	3.54	3.45	3.36	3.27	3.18	2.72	1.83	1.05	
Genethon1	3.23	3.15	3.07	2.99	2.91	2.83	2.43	1.70	1.06	
MYH7.24	5.04	4.96	4.87	4.78	4.70	4.61	4.15	3.17	2.08	
MYH7.1	4.87	4.79	4.70	4.61	4.52	4.43	3.96	2.95	1.84	

OPMD: oculopharyngeal muscular dystrophy

各マーカーは centromere 側から telomere 側の順に列記している

と静岡の各発端者の骨格筋に、欧米の白人家系例と同様の性状のITIを電顕的に証明し得たことから、本症の診断は確実である。ITIの出現頻度は3~6%と低く、構成蛋白の性状も不明だが<sup>4)</sup>、今回検索し得たすべての骨格筋の筋線維核内に確認できたことと、これまで本症以外の疾患や正常対照群では見出されていないことから、現時点では本症に特異的であり、診断には不可欠のものと思われる。これまで三角筋をはじめとする四肢筋、外眼筋、上眼瞼挙筋、および輪状咽頭筋で確認されていたが<sup>4)</sup>、今回新たに胸骨舌骨筋においても見出された。本症の発病者が両親である患者、すなわち本症のホモの発病者が最近2家系で3例見出されたが、いずれも発症が20歳ないし30歳代と早く、ITIが10%前後と約2倍高頻度に認められたこと<sup>6)7)</sup>はITIの意義を考える上で重要と思われる。

ITIが証明された本症確実例は、これまで12カ国の白人社会で確認されており、ITIが証明されていない本症疑い例が4カ国の白人社会と1黒人社会<sup>8)</sup>で報告されている。疫学的に注目される点は、本症の白人社会における有病率が地域により著しく異なっていることである。一般に、フランスでは20万人に1人<sup>9)</sup>、カナダのケベックのSaguenay-Lac-St-Jean地域では7500人に1人<sup>10)</sup>、ウズベキスタン共和国から移住してきたBukhara地域のイスラエル人では625人に1人<sup>7)</sup>とされている。今回我々が検討した日本人2家系例は、白

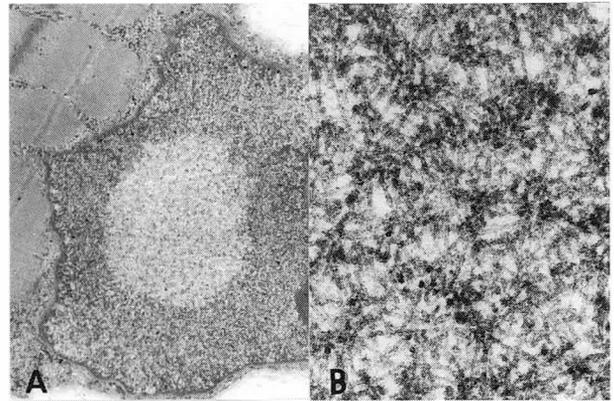


図3 熊本の家系(発端者)の骨格筋筋線維内 ITI.

A. ITIの電顕像(胸骨舌骨筋, ×15,500)

B. ITI(A)の高倍率電顕像(胸骨舌骨筋, ×110,000). 外径8.5nm, 内径3nm, 長径0.25μmまでの無数のフィラメントの集束像がみられ、しばしばtangleやpalisadeを形成している。

人以外の人種において、筋病理学的にも本症の診断が確定した最初の症例である。従来 French Canadianの本症家系例は、すべて1夫婦の共通祖先に由来すると推定されているが、我々の日本人2家系例との関連は、調査した範囲では認めなかった。しかし、遺伝子連鎖解析にて、日本人家系例においても本症の候補遺伝子が French Canadianと同じ14q11.2-q13に局在することが確認されたことから、今後さらに詳細なハプロタイプの分析を行い、白人家系例と共通の祖先を有するの否かを遺伝子レベルで解明する必要がある。

Braisら<sup>5)</sup>は、本症の候補遺伝子として、心臓のαとβのmyosin heavy chain遺伝子を最も有力視している。両蛋白は心臓で最も多く発現しているが、前者はラットの外眼筋とウサギの咬筋でも発現し、後者はヒトのslow twitch fiberにおいても発現している点では注目される。しかし、これらの遺伝子変異は、一般に神経筋症状を呈さない特発性肥大型心筋症で報告されているにすぎないし、眼咽頭筋ジストロフィーでは心筋は通常侵されない<sup>4)</sup>など矛盾するところもある。

いずれにしても本研究により、本症が白人以外の人種にも確実に存在することが明らかにされたことは疫学的、人類学的にも非常に重要な意義を有すると思われる。

## 文 献

- 1) McKusick VA, Francomano CA, Antonarakis SE and Pearson PL: Mendelian inheritance in man: a catalog of human genes and genetic disorders. (11th ed), Baltimore, The

- Johns Hopkins University Press, 1994, pp1040-1041.
- 2) Taylor EW : Progressive vagusglossopharyngeal paralysis with ptosis : a contribution to the group of family diseases. *J Nerv Ment Dis* 42 : 129-139, 1915.
  - 3) Victor M, Hayes R and Adams RD : Oculopharyngeal muscle dystrophy : a familial disease of late life characterized by dysphagia and progressive ptosis of the eyelids. *New Engl J Med* 267 : 1267-1272, 1962.
  - 4) Tomé MS and Fardeau M : Oculopharyngeal muscular dystrophy. In "Myology, 2nd ed" (Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds), New York, McGraw-Hill, 1994, pp1233-1245.
  - 5) Brais B, Xie Y-G, Sanson M, et al : The oculopharyngeal muscular dystrophy locus maps to the region of the cardiac  $\alpha$  and  $\beta$  myosin heavy chain genes on chromosome 14q11.2-q13. *Hum Mol Genet* 4 : 429-434, 1995.
  - 6) Brais B, Bouchard J-P, Xie Y-G, et al :  
A more severe form of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is documented in a genetically proven homozygous patient (abstract). *Neurology* 45(Suppl 4) : A243, 1995.
  - 7) Blumen SC : Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) among Bukhara Jews (abstract). Abstract of the 1st International Symposium on Oculopharyngeal Muscular Dystrophy 4, 1995.
  - 8) Rubin FH and Cross SA : Oculopharyngeal dystrophy (letter). *Arch Intern Med* 141 : 1103, 1981.
  - 9) Brunet G, Tomé FMS, Samson F, Robert JM and Fardeau M : Dystrophie musculaire oculopharyngée : recensement des familles françaises et étude genealogique. *Rev Neurol* 146 : 425-429, 1990.
  - 10) Tremblay-Tymczuk S, Mathieu J, Morgan K, et al : Étude genealogique de la dystrophie oculo-pharyngée au Saguenay-Lac-St-Jean, Quebec, Canada. *Rev Neurol* 148 : 601-604, 1992.

# 14) Paràmyotonia congenita 日本人1家系の遺伝子解析

小林 卓郎\*

研究協力者 越智 博文\* 山田 猛\*

## はじめに

最近, ion channel 遺伝子のクローニング, 連鎖解析に続く遺伝子変異の発見により, ion channel の機能異常によっておこる疾患群が ion channel 病として理解されるようになってきた. 骨格筋 Na<sup>+</sup> channel 遺伝子 (SCN4A) の異常に基づく疾患として, paramyotonia congenita (PMC), hyperkalemic periodic paralysis, myotonia fluctuans (potassium-aggravated myotonia) の3疾患が知られている. PMCは寒冷刺激や反復運動によって誘発, 増強される myotonia あるいは脱力を示す常染色体優性遺伝の疾患である. PMCの日本人一家系について, 遺伝子学的検索の結果を報告する.

## 症 例

発端者(症例1)は42歳女性で, 父親と第一子(症例2)に同様の症状を認めた(図1). 7歳頃より, 冬場になると四肢のこわばりが出現するようになり, 時には脱力を自覚することもあった. 寒さの厳しい時には, 眼が開きにくい, 喋りにくいということもあったが, いずれの症状も身体を暖めることで軽快した. 現症として顔面, 頸部に軽度の筋力低下を認めた. 両側眼輪筋に myotonia を認めたが, grip myotonia, percussion myotonia はいずれも陰性であった. その他神経学的には異常所見を認めなかった. 血液生化学検査はCK, Kを含めて異常を認めなかった. 電気生理学的検査では, 室温(皮膚温33°C)安静時にて, 短母指外転筋より myotonic discharge を認め, 反復運動, 寒冷刺激(皮膚温<20°C)による増強効果を認めた.

## 方法・結果

本家系についてSCN4A遺伝子の検索を行った. 従来PMCではexon 22, 24内の点変異が報告されているため<sup>1)~3)</sup>, 末梢血白血球より抽出したDNAを用い, Ptacekら<sup>2)</sup>の報告に従いexon 22, 23, 24の領域をPCR-SSCP(single strand conformation polymorphism)法により解析した. その結果, exon 22に正常

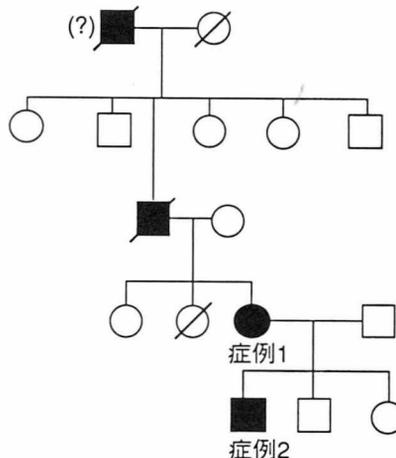


図1 家系図

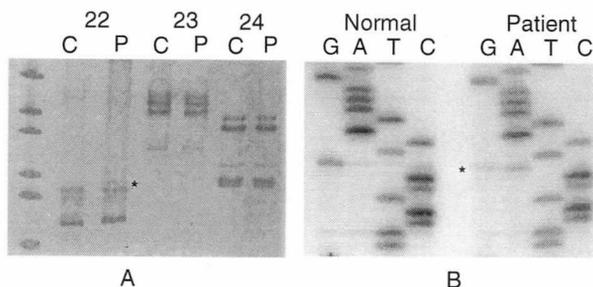


図2 PCR-SSCPによる解析. A: exon22に正常対照とは異なるバンドを認める(\*). C: 正常対照, P: 患者. B: exon 22の領域の塩基配列. 患者において3938番C→T(図では相補鎖のためG→A)変異を認める.

対照とは異なる band を認めたため(図2A), exon 22の領域の塩基配列を決定した. 3938番目にC→T(図2Bでは相補鎖のためG→A)への変異を認めた. 他の家族については, mismatched primerを用いたPCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism)法により解析を行った. Mismatched primer (N22-5' m: 5'AGGGGGGA-AAGACATCTTTACCA3') と primer (N22-3'-2: 5'AGGTCTGTACCTGGGGCCG3')

\*九州大学医学部脳研神経内科

を用いてPCRを行い、113bpのPCR産物を得た。得られたPCR産物においてC→Tへの変異がある場合 *Sty* I 認識部位を生じ、*Sty* I消化により92bpと21bpの断片が得られる(図3A)。家系解析の結果、症例1と2のみにヘテロの変異を認めた(図3B)。

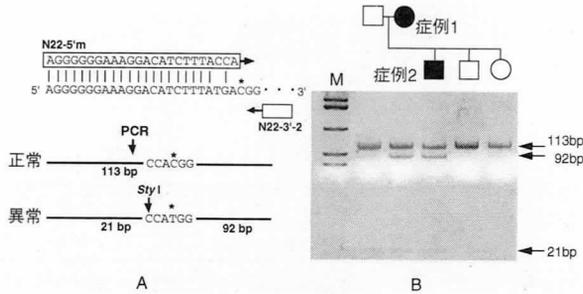


図3 Mismatched primerを用いたPCR-RFLPによる解析。A: C→T変異を認める場合、*Sty* I siteを生じ、増幅されたPCR産物(113bp)は92bpと21bpの断片に切断される。B: 症例1と2にヘテロの変異を認める。

### 考 察

PMCは骨格筋Na<sup>+</sup>channel遺伝子の異常に基づく疾患であり、これまでにGly1306Val, Thr1313Met, Leu1433Arg, Arg1448Cys, Arg1448Hisの5つの変異が報告されている。今回我々が検索した家系は、Thr1313Metの変異を有していた。この変異はフランス人家系において報告が多く<sup>4)</sup>、一方Arg1448Cys, Arg1448Hisはドイツ人家系において報告が多い<sup>5)</sup>。Thr1313Metの変異部位は、塩基配列では変異のhot spotとされているCG配列を構成しており、本変異は人種を越えて広く存在するものと考えられる。

### 文 献

- 1) McClatchey AI, Van den Bergh P, Pericak-Vance MA, et al: Temperature-sensitive mutations in the cytoplasmic loop region of the skeletal muscle sodium channel gene in paramyotonia congenita. *Cell* 68: 769-774, 1992.
- 2) Ptacek LJ, George AL, Barchi RL, et al: Mutations in an S4 segment of the adult skeletal muscle sodium channel cause paramyotonia congenita. *Neuron* 8: 891-897, 1992.
- 3) Ptacek LJ, Gouw L, Kwiecinski H, et al: Sodium channel mutations in paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis. *Ann Neurol* 33: 300-307, 1993.
- 4) Plassart E, Reboul J, Rime CS, et al: Mutations in the muscle sodium channel gene (SCN4A) in 13 French families with hyperkalemic periodic paralysis and paramyotonia congenita: phenotype to genotype correlations and demonstration of the predominance of two mutations. *Eur J Hum Genet* 2: 110-124, 1994.
- 5) Meyer-Kleine C, Otto M, Zoll B, et al: Molecular and genetic characterisation of German families with paramyotonia congenita and demonstration of founder effect in the Ravensberg families. *Hum Genet* 93: 707-710, 1994.

# 15) Emery-Dreifuss型筋ジストロフィーの分子遺伝学的研究

荒畑 喜一\*

研究協力者 永野 敦\*\* 塚原 俊文\* 小川 恵\*  
河田 純也\*\*\* 岡田 了三\*\*\*\*

## 目 的

Emery-Dreifuss型筋ジストロフィー (EDMD) は通常 X 染色体性劣性遺伝形式をとり、臨床的に (1) 病初期より認められる肘・アキレス腱・後頸部の拘縮, (2) scapulo-humero-peroneal 型の筋萎縮と筋力低下, (3) 重篤な伝導障害を伴う心筋症を 3 主徴とし, Becker 型とは明らかに異なる, 良性の経過を示す進行性筋ジストロフィーである。

1966年 Emery と Dreifuss が最初の 1 家系を報告し, 1979年 Rowland により疾患概念が確立されて以後, 多型解析によって本症の疾患遺伝子座は X 染色体短腕の遠位側 (Xq28) に存在することが知られていた。Bione らは 1994 年, *STA* gene に変異を来した EDMD 患者 5 例を報告し, 疾患遺伝子を明らかにすると同時に, この遺伝子産物を *emerin* と命名した。さらに 1995 年には *STA* 遺伝子の全ゲノム配列を報告した。

*STA* 遺伝子は Xq28 に存在し, 6 個の exon からなる 2147bp の遺伝子である。その mRNA の全長は 1218nts で, 762nts の open reading frame (ORF) を有している。遺伝子産物 *emerin* は serine-rich な 254 アミノ酸からなり, C 末端側に膜貫通 domain と想定される部分を持つ。これらのことから *emerin* は N 末端側を細胞質に向けた, 新しい anchor protein と考えられている。

今回我々は日本人 EDMD 2 家系 3 症例について *STA* 遺伝子を解析し, 共通の変異を見出したのでこれを報告する。

## 対象及び方法

対象は EDMD 症例 3 例を含む 2 家系 5 例と健常日本人 17 例の合計 22 例である。表に今回検索した EDMD 症例の臨床所見のまとめを示す。このうち家系 1 の症例 1 と 2 は兄弟であり, この家系では両親に対しても

表 EDMD 症例の臨床所見まとめ

症例	家系 1		家系 2
	1	2	3
年齢・性別	30・M	27・M	15・M
筋萎縮・筋力低下	+	+	+
関節拘縮	+	+	+
心筋症	+	+	+
心電図異常 (AVブロック)	+	+	+
筋生検	有	無	有
ペースメーカー挿入	無	有	有

検討が加えられた。

遺伝子解析は次のように行った。生検筋または末梢血液リンパ球を用い, AGPC 法により total RNA を抽出した。ORF を増幅するようにプライマーセットを設定して RT-PCR を行った。増幅産物をクローニング (TA クローニングキット, Invitrogen 社) の後, プラスミド DNA の精製 (Qiagen カラム) を行い, 塩基配列を決定した (Autoread sequencing kit, A. L. F. Autosequencer, Pharmacia 社)。

ゲノム DNA については全例末梢血リンパ球を用い, プライマーセットを exon 6 の一部 (354bp) を増幅するように設定し, 同様の方法で行った。さらにこの増幅産物を制限酵素 *Bfa* I で消化し変異の存在確認やポリモルフィズムの検討を行った。

## 結 果

RT-PCR: いずれの lane においても想定される大きさのバンド, すなわち *STA* gene region の 858bp,  $\beta$ -actin の 348bp, 筋特異的 creatine kinase の 414bp のバンドが認められた。しかし *STA* 遺伝子の大きな欠損や発現の異常は認められなかった (図 1)。

シーケンス結果: EDMD 症例 3 例ともにゲノムの塩基番号 1735 番塩基に G から A への点変異を認めた。

家系 1 の母親では変異を含む allele と正常な allele の両者が認められた (図 2)。

ゲノム DNA の検討: 症例及び健常コントロール全例で変異部分を含む 354bp が予想される大きさのバンドと

\*国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部  
\*\*東京医科大学内科学第三講座  
\*\*\*金沢医科大学神経内科  
\*\*\*\*順天堂大学医学部心臓血管病理学研究室

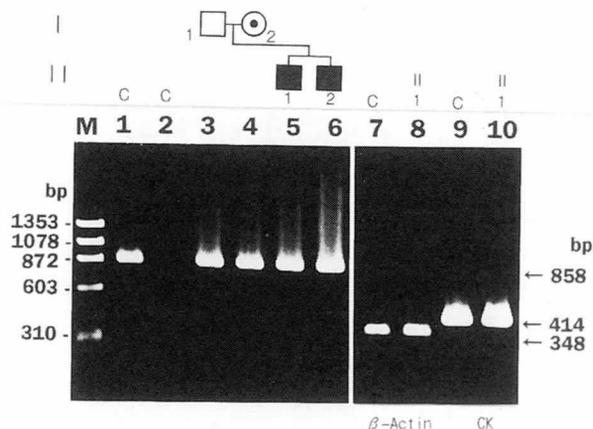


図1 Emerin,  $\beta$ -actin, creatine kinase の発現遺伝子(mRNA)のRT-PCR法による検討  
Emerin (lane 1, 6),  $\beta$ -actin (lane 7, 8), 筋特異的CK (9, 10) に対するRT-PCR. それぞれ858bp, 348bp, 414bpのバンドが増幅される. 健常対照 (lane 1, 2, 7, 9) と症例1 (lane 5, 8, 10) は生検筋を, これ以外は末梢血液リンパ球を用いた. 対照とした $\beta$ -actinと筋特異的CKがほぼ同じ程度に増幅され, またlane 2のreverse transcriptaseを除いたものではバンドを認めないことからDNAの混入が否定される.

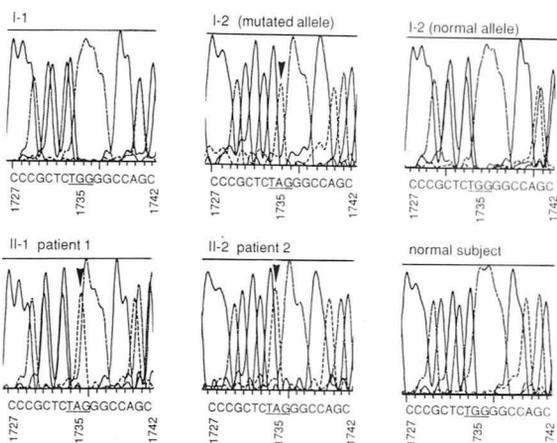


図2 家系1の変異部分周辺のSTA遺伝子のシーケンス

症例1(II-1)および2(II-2)の1735番塩基には同じGからAへの変異を認める. 母親(I-2)は変異alleleと正常alleleの両者を有するheterozygousなcarrierである. 父親(I-1)と健常対照では正常な配列のみを認める.

はcDNAのそれと完全に一致していた(結果省略).  
*Bfa* Iによる消化: 変異により新たに*Bfa* Iの制限酵素切断部位が生じ, 健常者にある278bpのフラグメントは症例では191bpと78bpに分かれることから変異の存在が検討された. 家系1の母親ではこれら3つのバンドが存在し, heterozygous asymptomatic carrierであることが確認できた. 健常コントロール17例ではこの短いバンドは存在しなかった(図3).

### 考 案

今回の症例ではSTA gene regionのRT-PCRで, 予想された858bpのフラグメントが同定されたことから, STA遺伝子に大きな欠失や重複は存在せず, 小さな欠損や挿入や点変異が存在する可能性が示唆された. そして, このPCR産物のシーケンスの結果, 我々は独立した2家系のEDMD症例3例に, STA遺伝子1735番塩基のGからAへのナンセンス突然変異を認めた. また家系1の母親では正常なalleleと, 変異を含むalleleの両方を認め, heterozygousな無症候性キャリアーの存在を明らかにした. さらに制限酵素*Bfa* Iによる消化実験から, 変異の存在確認やキャリアー診断

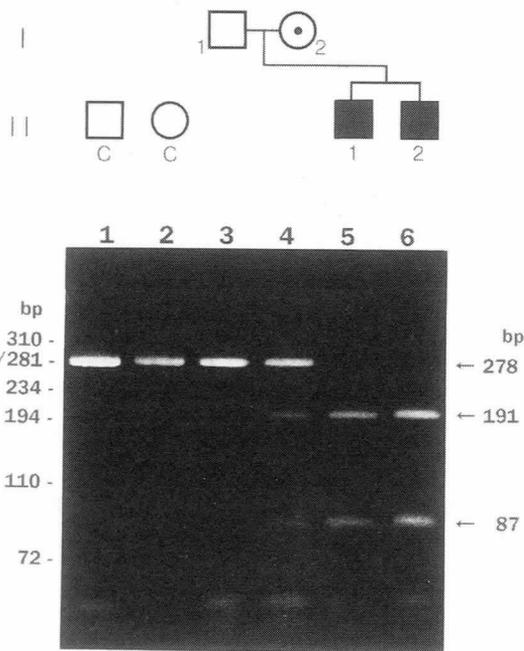


図3 *Bfa* I digestionによる検討

EDMD症例 (lane 5, 6) では変異により新たに*Bfa* Iの制限酵素部位が生じ, 191bpと987bpのフラグメントを, また父親 (lane 3) 及び健常対照 (男性: lane 1, 女性: lane 2) では278bpの正常フラグメントのみを有する. これに対し母親 (lane 4) では変異フラグメントと正常フラグメントの両者を有している.

を行い、さらにこの変異がポリモルフィズムによるものではない可能性も示した。このように日本人の EDMD 症例においても STA 遺伝子に変異が見出されたことは基礎及び臨床遺伝学的に重要であろう。

STA 遺伝子がコードするタンパク emerin は 254 アミノ酸からなり、その 226 番目のアミノ酸はトリプトファンである。しかし本症例では変異によってこのトリプトファンコドン (TGG) はナンセンスコドン (TAG) へと変化した。今回変異が認められた場所は emerin の膜貫通 domain の中の上流に位置することから、これらの症例では膜貫通 domain の大半を含む C 末端側の 29 アミノ酸を欠いたタンパクしか合成されず、このことが発症に深く関係していると考えられた。

#### 文 献

- 1) Emery AEH and Dreifuss FE: Unusual type of benign X-linked muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 29: 338-342, 1966.
- 2) Rowland LP, et al: Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Ann Neurol* 5: 111-117, 1979.
- 3) Emery AEH: Emery-Dreifuss syndrome. *J Med Genet* 26: 637-641, 1989.
- 4) Bione S, et al: Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 8: 323-327, 1994.
- 5) Cabane M, et al: Identification of novel mutations in three families with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 10: 1853-1857, 1995.
- 6) Bione S, et al: Identification of new mutations in the Emery-Dreifuss muscular dystrophy gene and evidence for genetic heterogeneity of the disease. *Hum Mol Genet* 10: 1859-1863, 1995.
- 7) Nagano A, et al: A novel nonsense mutation of the STA gene in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 57: A222, 1995.

# 16) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の臨床的多様性と遺伝子診断

納 光 弘\*

研究協力者 中川正法\* 樋口逸郎\* 吉留宏明\*\*  
 岩城宏之\*\* 福永秀敏\*\* 堀切尚\*\*\*  
 斉藤峰輝\*\*\* 松崎敏男\*\*\*

## はじめに

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) は、顔面、肩甲、上腕近位部の筋萎縮に始まり、徐々に下肢筋、腰帯筋群へと障害が広がる常染色体優性遺伝の筋疾患である。家系内または家系間でその臨床症状が多様性であることが特徴のひとつであり<sup>1-3)</sup>、家族性典型例の診断は容易であるが、非典型孤発例では診断が困難なことがある。FSHDの原因遺伝子は、いまだ不明であるが、第4染色体長腕末端部の遺伝子マーカーとの連鎖が報告されている<sup>4)</sup>。この3年間、FSHDの臨床的多様性と遺伝子異常の関連を明らかにするために第4染色体長腕の遺伝子マーカーを用いて、臨床症状と遺伝子異常の関連について検討してきた。第4染色体長腕の遺伝子異常と臨床症状に、一定の関連を認めただが、この遺伝子マーカーのみでは説明困難な点が多く、FSHD原因遺伝子の解明が待たれる。

## 方法および結果

対象は、FSHDが疑われた16家系23例、孤発例9例およびその家族21例の計53例である。罹患者32例(男14例、女18例)の平均発症年齢は19.0±16.9歳であり、歩行不能例の平均歩行不能年齢は28.7±10.9歳であった。32例中、若年発症例6例、難聴、眼底血管の走行異常の合併を2例、呼吸不全の合併を3例、肢帯型筋ジストロフィー類似の筋萎縮を5例に認めた(表1)。家系例について親子間での発症年齢、歩行不能年齢を比較検討したところ、子の発症年齢および歩行不能年齢が有意に若年化していた(表2)。

筋生検は21例に行い、19例に筋原性変化、2例に神経原性変化を認めた。筋原性変化を認めた19例中、血管周囲への細胞浸潤およびlobulated fiberをそれぞれ5例に認めた。

FSHD罹患者32例、その家族21例および健常成人

表1 今回検討したFSHDとその家族のサザンブロット分析の結果

対象	異常EcoRI断片を示す例/検討症例
FSHD	30/32例(93.8%)
家系例	22/23例(95.7%)
孤発例	8/9例(88.9%)
若年発症例	6/6例
難聴、眼底血管走行異常の合併	2/2例
呼吸不全の合併	3/3例
肢帯型筋ジストロフィー類似例	5/5例
FSHDの家族	3/21例
健常成人	0/30例

表2 FSHD家系例の発症年齢と歩行不能年齢の比較

親の発症年齢	32.0 ± 17.0 歳	} p=0.004
子の発症年齢	11.2 ± 4.5 歳	
親の歩行不能年齢	61.8 ± 15.2 歳以上	} p<0.001
子の歩行不能年齢	24.0 ± 11.5 歳	

30例より、同意を得た上で採血を行い、全血よりDNAを抽出した。抽出したDNAを制限酵素EcoRIにてdigestion後、0.5%アガロースゲルにて電気泳動し、ナイロン膜に転写した。そのナイロン膜をα-32P-dCTPにてラベルしたプローブp13E-11とハイブリダイゼーションし、洗浄後、-70℃にてオートラジオグラフィを行った。その結果、罹患者32例中30例で30kbより短いEcoRI断片が検出された(図1、表1)。罹患者の家族21例中、無症状の母親2名と無症状の娘1名の計3例に罹患者と同じサイズの異常バンドを認めた。また、若年発症重症例ほど、より短いEcoRI断片を示す傾向がみられたが(図2、表3)、家系内でのEcoRI断片のサイズに変化は認められなかった。30kb

\*鹿児島大学医学部第三内科

\*\*国立療養所南九州病院

\*\*\*国立療養所沖繩病院

表3 今回検討したFSHD32例の臨床的特徴と遺伝子分析のまとめ

EcoRI断片のサイズ(kb)	症例数	男女比	平均発症年齢	家族歴	網膜血管走行異常	難聴	歩行不能	筋生検所見 筋原性 神経原性	備考
<20	9	4:5	8.2歳	6/9	2/9	2/9	6/9	6/6 0/6	呼吸不全2例 肢帯型1例
20-22	12	3:9	26.2歳	10/12	0/12	0/12	2/12	7/7 0/7	肢帯型1例
23-25	7	4:3	21.1歳	5/7	0/7	1/7	1/7	4/4 0/4	呼吸不全1例 第9短腕欠損例1例 肢帯型3例
28-30	2	2:0	23.5歳	1/2	0/2	1/2	0/2	2/2 1/2	
>30	2	1:1	27.0歳	1/2	0/2	1/2	0/2	1/2 1/2	

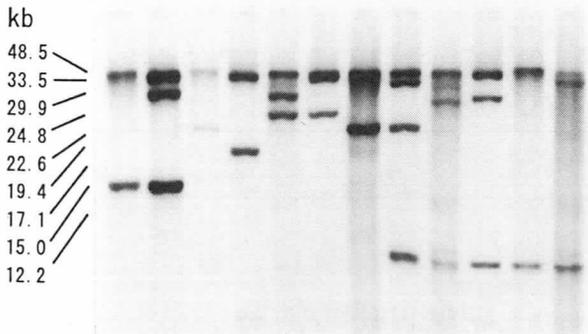


図1 プローブ p13E-11 を用いた FSHD の Southern blot 分析 (EcoRI digestion)

より短い EcoRI断片が検出されなかった2例中1例は、家族発症で筋生検にて神経原性変化を示した。他の1例は、血管周囲に軽度の細胞浸潤を示す孤発例であった。なお、健常成人30例には、30kbより短い EcoRI断片は検出されなかった(表3)。

### 考 察

今回の検討から、第4染色体長腕末端部のプローブ p13E-11にて異常 EcoRI断片が検出される FSHDの臨床病型は、進行性呼吸不全から、緩徐進行性の肢帯型筋萎縮症まであり、FSHDにおける家系内または家系間での臨床症状の多様性が確認された。また、EcoRI断片のサイズが小さい(欠失が大きい)ほど、臨床症状がより重症である傾向がみられたが、家系内の EcoRI断片のサイズは、臨床症状の重症度に関わらず一定であった。FSHDの家系内で、臨床症状の表現促進(anticipation)が存在するか否かは、論議のあるところであるが、少なくともわれわれの検討した例では、発症年齢および歩行不能年齢に表現促進が示唆された。FSHDの筋病理所見では、血管周囲の細胞浸潤例があることが知られているが、われわれの検討でも、炎症細胞の血管周囲への浸潤を24%に認めた。多発筋炎との鑑別が問題となる場合があり<sup>5)</sup>、鑑別診断に際してはFSHDの遺伝子異常の検討が必要であろう。一方、

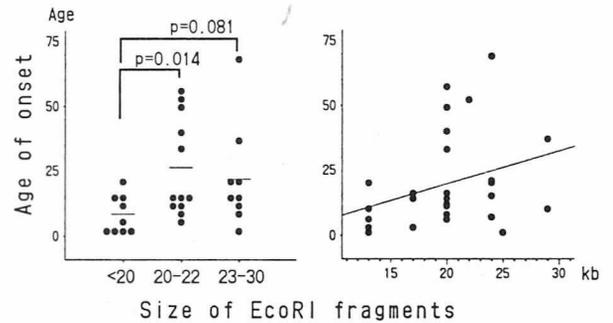


図2 EcoRI断片サイズと発症年齢の関連

第4染色体長腕遺伝子マーカーと連鎖しない FSHD 家系例もあり、FSHDが臨床的にも遺伝学的にも多様であることが示された。FSHDの病態は不明であるが、網膜血管病変や生検筋での血管周囲へのリンパ球浸潤が認められることより、本疾患の少なくとも一部の例では、炎症(血管炎?)に關与する異常が存在することが示唆されている<sup>6)</sup>。FSHDの臨床症状の多様性を、今回用いた第4染色体長腕の遺伝子マーカーにて示される EcoRI断片の欠失サイズのみで説明することは困難であり、今後の FSHD原因遺伝子の解明が望まれる。

謝 辞：プローブ p13E-11 を供与いただきました Leiden 大学 R. R. Frants 先生 (The Netherlands)、ならびに貴重な症例をご紹介いただきました大分医科大学第三内科：上山秀嗣先生、国立療養所徳島病院：乾俊夫先生、大分県立病院：有村仁志先生に深謝いたします。

### 文 献

- 1) Lunt PW and Harper PS: Genetic counselling in facioscapulohumeral muscular dystrophy. J Med Genet 28: 655-664, 1991.
- 2) Nakagawa M, Higuchi I, Yoshidome H, et al: Facioscapulohumeral muscular dystrophy: phenotypic diversity and genetic abnormality.

- mality. *Acta Neurol Scand* (in press)
- 3) Ueyama H, Kumamoto T, Mita S, et al: Facioscapulohumeral muscular dystrophy with chromosome 9p deletion. *Neurology* (in press).
  - 4) Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA, et al: Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nature Genet* 2: 26-30, 1992.
  - 5) Munsat TL, Piper D, Cancilla P and Mednick J: Inflammatory myopathy with facio-scapulohumeral distribution. *Neurology* 22: 335-347, 1972.
  - 6) Fitzsimons RB: Facioscapulohumeral dystrophy: the role of inflammation. *Lancet* 344: 902-903, 1994.

# 17) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の 遺伝子領域の構造と遺伝子診断

荒 畑 喜 一\*

研究協力者 宋 泯 東\* 後 藤 加奈子\*  
李 濟 賢\*\* 佐 橋 功\*\*\*

## 目 的

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) は、現在世界各国の FSHD 研究者グループが互いに協力して International Consortium を組織し、原因遺伝子の同定と病態機序の早急な解明を目指している。FSHD は、顔面と上肢帯～腕の筋肉が主として障害される常染色体性優性遺伝形式の進行性筋ジストロフィーで浸透度は高い (20歳までに95%)。進行すると筋病変が下肢帯～下肢にも及び、約20%の患者が40歳までに車椅子生活を余儀なくされる。また、高率に網膜症や神経性難聴を合併する。さらに、臨床的表現型の著しい差異が家族間のみならず、家族内においても認められたり、筋原性以外に神経原性変化を呈する症例も知られている。本研究課題では、このような医学的並びに社会的要請に応えるべく FSHD の遺伝子領域の構造解析と遺伝子診断法の確立を図ることを目的としている。

## 方 法

我々が独自に開発した pFR-1 (1.1kb) と Frants らにより供与された p13E-11 (0.8kb) プローブを用いて、ゲノムのサザンプロット解析 (SB) を実施し、ゲノムの *EcoRI* 断片長を測定する (図1)。また、現在まで検討されている *EcoRI* 以外に遺伝子クローン化に適当な制限酵素を *HindIII*, *KpnI* 等を用いたサザンプロット

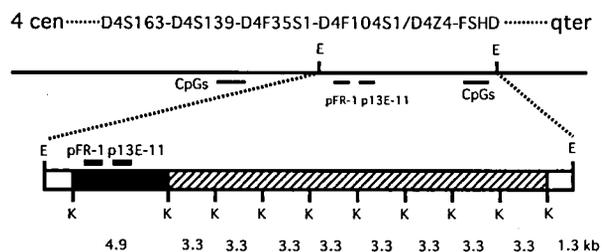


図1 Genomic map of the FSHD gene region (4q35-ter)

\* 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部  
\*\* Takara-Korea Biomedical Inc., Seoul  
\*\*\* 愛知医科大学第四内科

解析を検討する。FSHD 関連遺伝子のクローン化には、コスミド c51 と pSM1 および FSHD 患者由来の genomic DNA library からプローブ pFR-1, p13E-11 を用いてこれらをスクリーニングし、クローンを得る。FSHD 遺伝子領域の塩基配列を決定し、DNA の構造を明らかにする。FSHD の検索対象は 52 家族 (unrelated: 家族性 29, 孤発性 23) である。さらに、このうち 40 家族については *EcoRI* 断片内に存在する 3.3kb *KpnI* 反復配列部分内の反復ユニット数の定量を LA (Long and Accurate)-PCR 法にて実施する。まず反復配列部分の両端の非反復部分の塩基配列を決定し、LA-PCR 法に適当なプライマーを設計した。内部標準には  $\beta$  グロビンの 22.5kb を増幅するプライマーを用いた。増幅産物の同定には、SB 結果から予測されるサイズとの比較のほかに、反復ユニット内のホメオドメインを含む *StuI* 断片をプローブとした SB を実施した。

## 結 果

FSHD 52 家族のゲノム SB の結果は、これまでの報告を支持するものであった。すなわち、ヒト第 4 染色体長腕の最も遠位マーカーである p13E-11 と独自に開発した pFR-1 プローブによって、家族性 FSHD と孤発性 FSHD およびそれらの両親と同胞については、患者の 97% 以上に疾患と cosegregate する短い (<28kb) *EcoRI* 断片を検出し、これとは逆に正常者群の 94% で 28kb 以上の長い断片を検出した (図2)<sup>1)2)</sup>。そして、ゲノムの *EcoRI* 断片内に存在する 3.3kb 反復配列部分 (D4Z4) の反復ユニット (3.3kb *KpnI* 断片) に欠失が存在するものと考えられた。

臨床的には、表現促進 (anticipation) の存在する可能性も示唆された。FSHD の臨床的重症度は同一家族内でもきわめて多彩であることから、一般に anticipation は無いものと考えられて来た。しかし実際には *EcoRI* 断片のサイズの短い症例ほど、また親よりも子ほど、若年発症となる傾向が認められたし、さらに、これまで知られているうちで最も短い (欠失の最も大

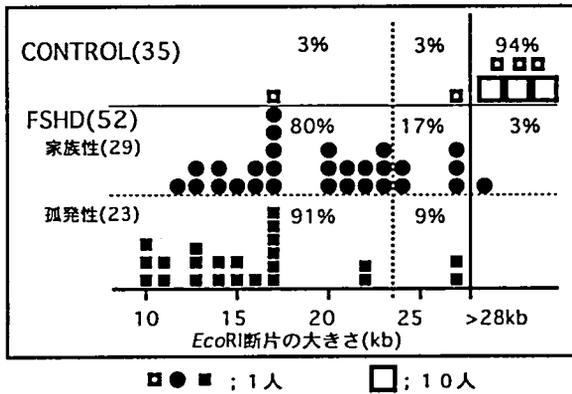


図2 pFR-1プローブで検出される *EcoRI* 断片

さい)10kbの *EcoRI*断片が検出された症例は、いずれも重症例であった<sup>2)~4)</sup>。これら事実は、FSHDにおける anticipationの存在を想起させる。なお、家族例よりも孤発例のほうが *EcoRI*断片のサイズは短い傾向にあった、重症例ほど子供をもうける機会が少ない可能性が考えられる。なお、10kbの *EcoRI*切断断片をもっていたFSHD症例(2例)では、FSHD遺伝子領域の構造は同一であった。

先に述べたFSHD遺伝子関連領域の反復ユニット数の定量的解析の結果、FSHD40家族のLA-PCR解析では、 $\beta$ グロビンがきちんと増幅されたものが31(77.5%)で、このうちGC含量の高い(73%)反復配列部分が特異的に増幅されたものが93.5%(29/31)であった。これは全体の72.5%(29/40)に相当した。なお、反復ユニット数では4リピートまで(ゲノムSBで20kbに相当;実測値では20~23kbの症例に相当)の増幅が可能であった。

#### 考察および結論

今回の研究からFSHDに伴う染色体の異常(DNA rearrangements)がp13E-11/pFR-1プローブによって検出されたことから、FSHDではこのプローブの近傍にゲノムDNAの異常が推定され、さらにFSHDに伴う染色体の異常は、*EcoRI*断片内に存在する3.3kb反復配列の反復ユニット(3.3kb *Kpn*I断片)の欠失に由来する事が判明した。すなわち通常の場合、正常者で7回以上みられる反復ユニットの繰り返し構造が、FSHD患者では1~6回に減少していた。このようなことから、FSHD発病のメカニズムとして、まず①Truncation deletionがあげられた。個々の3.3kb繰り返し構造の中には、ホメオボックス配列が2つずつ含まれるが、この中でも特に重要な部分が欠失することによって、dominant negative effectが生ずる可能性が考えられる。つぎに、②Position effectがある。FSHD関連遺伝子領域は、テロメアのヘテロクロマチンに極めて近接していることから、位置効果を容易に受けやすいものと考えられる。この場合、近傍に想定

されるFSHDの責任遺伝子が、染色体上で相対的位置関係を変えてしまい、結果として表現型を変え得るであろう。ただ、この場合、FSHDの責任遺伝子自体には突然変異は起こっていないので、遺伝子が元の位置に戻れば位置効果は解消する。その他、③Reciprocal translocationsも挙げられる。これはp13E-11/pFR-1プローブの認識する(ホモログスの)DNA配列が染色体4q35の他にYや10等にも存在する事実から推定されている。

次にFSHDの遺伝子診断にあたって留意すべき事柄がいくつか指摘された。このなかには、①遺伝的異質性(染色体4に連鎖しないFSHD家系)、②プローブの限界(p13E-11/pFR-1プローブは染色体4q35のみならず、これとホモロジーの高い染色体Y、10等のDNA断片をも認識してしまう)、③遺伝子組換えの存在、④突然変異(頻度は、従来10%程度とされてきたが、実際にはもっと高く、~30%以上であること)、⑤胚細胞モザイク(germinal mosaicism)の存在する可能性、⑥表現促進(anticipation)の問題等、遺伝相談にあたって解決すべき重要な検討課題が示された。なお、ゲノムDNAの抽出にあたり、FSHDの遺伝子診断のように大きなDNA断片を扱う場合には、DNAに機械的な損傷を与えてSBの結果に修飾(アーチファクト)をきたさぬよう、DNAの扱いには格別の注意を払わねばならないことは特に強調された。

最後に、今回の検索からFSHD関連遺伝子領域のLA-PCR法による増幅は(DNAの保存状態が良好な場合には)、ゲノムSBで検出される *EcoRI*断片長が23kbまでのFSHD家族で可能であることが判明した。これは、我々の診断し得たFSHD家族全体の84.6%に相当したことから、LA-PCR法は迅速なFSHDの遺伝子診断法となり得る方法であることが示された。

#### 文 献

- 1) 荒畑喜一, 古川哲雄, 佐橋 功他: 染色体4q35-qterマーカーp13E-11による顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの遺伝子診断. 医学のあゆみ 164: 865-866, 1993.
- 2) Goto K, Lee JH, Matsuda C, et al: DNA rearrangements in Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy patients: clinical correlations. Neuromusc Disord 5: 201-208, 1995.
- 3) Lee JH, Goto K, Matsuda C, et al: Characterization of a tandemly repeated 3.3kb *Kpn*I unit in the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) gene region on chromosome 4q35. Muscle Nerve Suppl 2: S6

-S13, 1995.

- 4) Lee JH, Goto K, Sahashi K, et al: Cloning and mapping of a very short(10-kb)EcoRI

fragment associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). Muscle Nerve Suppl 2 : S27-S31, 1995.

# 18) 脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断

斎藤 加代子\*

研究協力者 白岩 由美\* 河北 有規子\* 池田 穰 衛\*\*  
福山 幸夫\*\*\* 小出 博 義\*\*\* 森本 雄次\*\*\*\*  
大澤 真木子\*

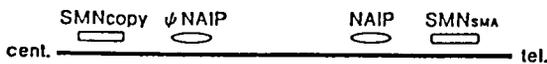
## 緒 言

脊髄性筋萎縮症(SMA)は脊髄の前角細胞の変性に起因する筋萎縮と筋力低下を特徴とする常染色体劣性遺伝病である。本疾患は発症年齢, 到達運動能力, 経過, 重症度によって, 3型に分類される。

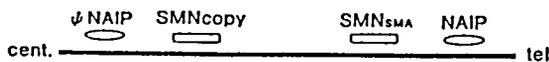
1990年, SMAの遺伝子座が5q11.2-13.3の領域に局在することが明らかになり, 異なる臨床経過を示す3つの型が同じ遺伝子座に位置することが判明した。各国でSMA遺伝子のクローニングを試みているが, いまだ, SMAの遺伝子そのものは得られていない。1995年, 5q13に局在するNAIP(neuronal apoptosis inhibitory protein)遺伝子とSMN(survival motor neuron)遺伝子の2つが候補遺伝子として報告され, 注目されている。RoyらはNAIP遺伝子のexon5, 6がSMA I型の45%, II型, III型の18%に欠失していることを報告した。彼等はNAIP遺伝子が欠失することによって, 神経細胞のアポトーシスが抑制されず, 本疾患が発症しているものと推測した。一方, LefebvreらはSMN遺伝子のexon7, 8がSMAの93%で欠失していたことを報告した。

私たちは, SMA患者16名について臨床的分類をし, NAIP遺伝子とSMN遺伝子における変異の検討をした。

### (A) Royら (Canada)



### (B) Lefebvreら (France)



NAIP: neuronal apoptosis inhibitory protein  
SMN: survival motor neuron

Cell, vol. 80 January 13, 1995

## 方 法

SMA患者16名を1990年のInternational SMA Collaborationの分類に基づいて分類した。

患者の末梢血のリンパ球より調製したDNAを用いて, NAIP遺伝子についてはPCR増幅をして, SMN遺伝子についてはPCR産物をDraIまたはDdeIで消化して, NAIP遺伝子のexon4, 5, 6, SMN遺伝子のexon7, 8の欠失の有無を確認した。

## 結 果

SMA16名を1990年のInternational SMA Collaborationの分類に基づいて分類した結果, I型が3例, II型が11例, III型が2例であった。

この症例16名のうちI型に分類された1名においてNAIP遺伝子のexon5のホモ接合性の欠失が認められた。この症例において同遺伝子のexon4, 6については欠失が認められなかった。

SMN遺伝子については16名中15名94%においてテロメア側のSMN遺伝子のexon7, 8の欠失が認められた。各々のセントロメア側のコピーについては全例バンドが検出された。欠失が認められなかった1例はI型に分類され, NAIP遺伝子にも欠失を認めなかった症例であった。

## 考 察

SMA患者16名について遺伝子診断を試みた。NAIP遺伝子, SMN遺伝子両者ともに欠失が認められた症例は生後まもなくよりfloppy infantを呈しており, 生後6カ月時に呼吸器感染後死亡するという重症の経過をとった典型的なSMA I型であった。また, NAIP遺伝子およびSMN遺伝子両者ともに欠失が認められなかった症例は生後4カ月時より呼吸器管理を施行しているSMA I型であった。この症例の遺伝子変異は点変異や極めて小さい欠失の可能性もあり, さらに詳細な検討が必要である。

遺伝子変異と臨床型の相関は, NAIP遺伝子については, 重症度が高くなるほど欠失頻度が高い傾向にあるが, その関係はいまだ明らかでない。

\*東京女子医科大学小児科

\*\*東海大学分子医学医療研究センター分子神経学部門

\*\*\*埼玉医科大学小児科

\*\*\*\*国立善通寺病院小児科

今後は、さらに SMA とその辺縁疾患の症例数を増やし、臨床型との関係の検討が必要である。

#### 参考文献

1) Roy N, et al : Cell 80 : 167-178, 1995.

2) Lefebvre S, et al : Cell 80 : 155-165, 1995.

3) Steege G, et al : Lancet 345(15) : 985-986, 1995.

4) Dubowitz V : Neuromuscul. Disord 1(2) : 81, 1995. 1995.

### III. 福山型先天性筋ジストロフィー

# 19) 福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) 遺伝子の ポジショナルクローニング

戸田 達史\*

研究協力者 三宅 正志\* 水野 邦彦\* 小林 千浩\*  
 松下 育美\* 平井 百樹\*\* 徳永 勝士\*  
 中堀 豊\*

## はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama-type Congenital Muscular Dystrophy; FCMD) は、重度の筋ジストロフィー病変とともに、小多脳回を基本とする高度の脳奇形を特徴とする常染色体性劣性遺伝病<sup>1)</sup>であり、わが国の筋ジストロフィー中 Duchenne 型筋ジストロフィーの次に多い。10万人に6.2~11.9人の発生率で認め<sup>2)</sup>、我々の約80人に1人が保因者である。さらには日本で最も多い常染色体性劣性遺伝病の一つである。FCMDの病態を分子的に追求するに際して、原因遺伝子の同定が非常に重要であるが、FCMDでは確実なマーカー蛋白となり得る物質がなかったため、我々はポジショナルクローニングによる方法を選択した。

そして我々は、主に近親婚を利用した解析法(ホモ接合性マッピング<sup>3)</sup>)を用いて連鎖解析を行い、FCMD遺伝子座を9q31-33に決定した<sup>4)5)</sup>(平成5年度)。さらに近親婚患者における同祖ホモ領域の同定や、組み換えマッピングにより、FCMD遺伝子座をD9S127とCA246の間の約5cMに絞り込むとともに、この領域内に存在する9q31のマーカー、mfd220との間に連鎖不平衡を見出し、この近傍100万塩基対以内に存在すると報告してきた(図1)<sup>6)~8)</sup>(平成6年度)。

## YAC, コスミドを用いた物理地図の作製

そこでこのmfd220を含む酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome; YAC) クローンをYACライブラリーより3-D PCR法にて単離し、周辺の領域をYACクローンで約3Mbコンティグ化し、rare cutting enzymeを用いて制限酵素地図を作製した(図2)。またYACをコスミドへサブクローニングし、コスミドコンティグの構築を進めた。後述する重要な領域のほとんどの部分を、コスミドでコンティグ化した<sup>9)</sup>。

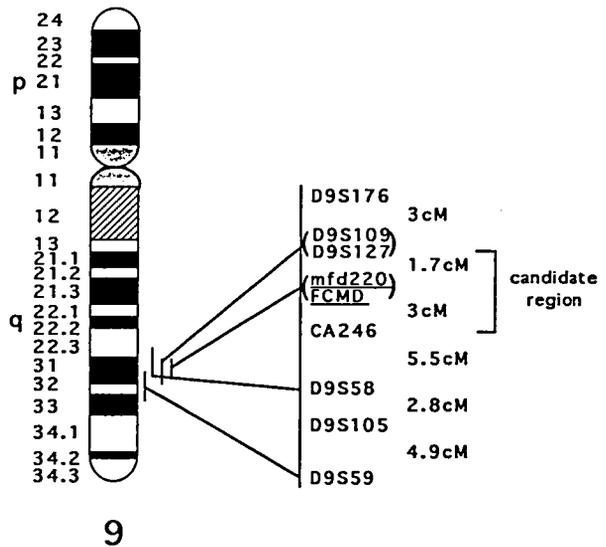


図1 連鎖を示したマーカーの第9番染色体長腕における物理的、遺伝学的位置。1 cMは約100万塩基対。FCMD遺伝子は、D9S127とCA246の間で、連鎖不平衡を示すmfd220(9q31)の約100万塩基対以内に存在する<sup>4)~8)</sup>。

## 新しいDNA多型マーカーの単離

さらに、FCMDは遺伝的孤立集団である日本人に特異的に頻度が高いことから病気の創始者、すなわち祖先は一人であり、それが全国にひろがっていったと考え、フィンランドでdiastrophic dysplasia<sup>10)</sup>やBatten病(NCLtype3)<sup>11)</sup>で行われたような連鎖不平衡マッピングを行った。

しかし連鎖不平衡を示す既知のマーカーはmfd220のみで、その両側は近くても1.7cMも離れており(図1のD9S127)、連鎖不平衡も存在しない。そこでYACコンティグよりコスミドライブラリーを作成し、CAリポートを持つクローンを単離し、そのリポートの両端の塩基配列を決定し、PCRプライマーをデザインして、新たなマイクロサテライトDNA多型マーカーを単離した。これらのマーカーのYAC上での位置を決

\*東京大学医学部人類遺伝学

\*\*東京大学大学院理学系研究科生物科学

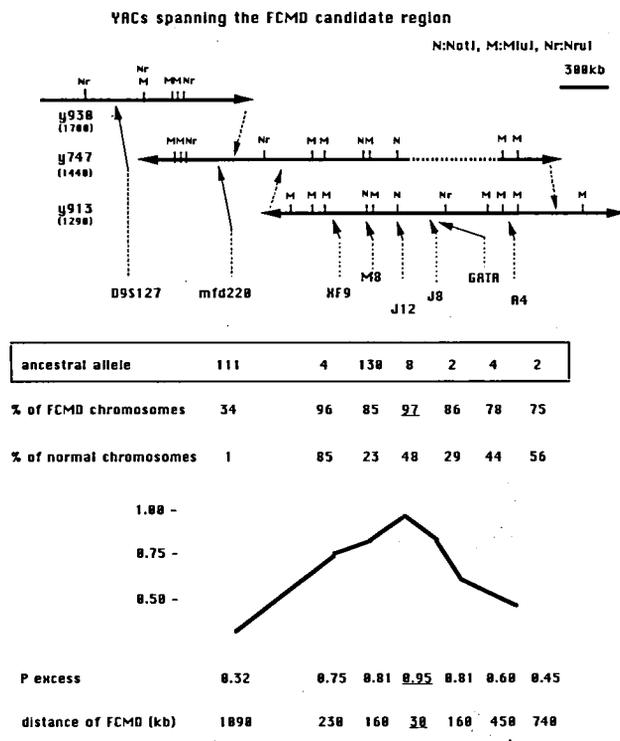


図2 FCMD遺伝子領域のYACコンティグと連鎖不平衡マッピング。新たに単離したマイクロサテライトDNA多型マーカーの位置を示す。mfd220はこの図の左方に存在する。連鎖不平衡の強度を示すPexcess値はJ12を極大にして、左右に行くに連れて小さくなる。FCMDと各マーカーとの推定距離を最下段に示した。FCMDはマーカーJ12を含んだ100kb以下の領域に存在すると考えられる<sup>9)12)</sup>。

定するとともに、これらのマーカーを用いて患者ならびに正常をアレタイプした<sup>12)</sup>。

連鎖不平衡マッピング

新たに単離したマイクロサテライトDNA多型マーカーのYAC上での位置を示す(図2)。各マーカーでのFCMDの祖先のアレルは、任意の数字で表わすとmfd220からテロメア側に向かって、111, 4, 130, 8, 2, 4, 2のようになり、マーカーJ12では患者の97%が祖先のアレルを持ち、それは正常の48%に認められた。同様にM8では患者の85%, 正常の23%, またJ8では患者の86%, 正常の29%が祖先のアレルを持っていた(図2)。しかしながら、仮にマーカーとFCMDが遠くて、組み換えにより祖先のアレルが失われても、正常染色体にも祖先のアレルの頻度が高ければ、祖先のアレルは保たれることになるため、それを補正するため連鎖不平衡の強度を表わすPexcessを求めた。

Pexcessは祖先のアレルの患者での割合 Paffected,

正常での割合 Pnormalから下記のように定義される。さらに突然変異率をμ, 祖先からの世代をg, FCMD遺伝子頻度をqとすれば、FCMDとマーカー間の距離(組み換え率)θが求められる<sup>13)</sup>。

$$P_{excess} = (P_{affected} - P_{normal}) / (1 - P_{normal}) = (1 - \mu g q^{-1}) (1 - \theta)^g$$

連鎖不平衡の強度を示すPexcess値はmfd220, XF9, M8, J12, J8, GATA, A4でそれぞれ0.32, 0.75, 0.81, 0.95, 0.81, 0.60, 0.45であり、J12を極大にして、左右に行くに連れて小さくなっている(図2)。FCMDと各マーカーとの距離はそれぞれ1Mb, 230kb, 160kb, 30kb, 160kb, 450kb, 740kbと推定された。この推定距離は各マーカーのYAC上での位置とよく一致していた(図2)。このようにFCMDはマーカーJ12を含んだ約100kb以下の領域に存在すると考えられ、FCMD遺伝子の単離に高度に焦点を絞ることが可能になった<sup>12)</sup>。

ハプロタイプによる診断の可能性

またPexcess値が極大を示すJ12とそのすぐ近傍のマーカーでハプロタイプを調べると、FCMD染色体の77%が祖先由来である一つのハプロタイプを示した。またFCMD患者の88%が祖先由来のハプロタイプのホモかヘテロであった。このハプロタイプは正常染色体には現在までに一つも見出されていない。このことはFCMDの祖先は一人という我々の仮説を支持するとともに、今まで原則的には不可能であった「ある一人の患者がFCMDか否か」の診断が、かなりの程度まで可能になったことを意味する<sup>12)</sup>。

明らかになってきたこと

これまでの過程で可能になってきたこと、明らかになってきたことを表わすと、

- 1) 9q31領域には既知の蛋白質は存在しない。FCMD遺伝子産物は未知の蛋白質と思われる。
- 2) 上述したように日本人のFCMDの祖先は一人である<sup>12)</sup>。
- 3) これらの連鎖しているマーカーを用いて、FCMD家系における出生前、保因者診断は可能であり、すでに応用されている<sup>14)~16)</sup>。
- 4) 上述したように連鎖不平衡マッピングの進展によりFCMDか否かの診断も可能になった<sup>12)</sup>。
- 5) FCMDには時に軽症例、非典型例とでも言うべき、歩行可能であった症例が存在し、CMDⅢ型、Ⅳ型といわれ、非典型的FCMDとされていた<sup>1)</sup>。歩行可能例のみの連鎖解析でも9q31のマーカーと連鎖し、これらの症例は、FCMDの一連のスペクトラムにはいること

が明らかになった<sup>17)</sup>(本報告書参照).

6) 重度の脳奇形, 眼奇形, 先天性筋ジストロフィーを示す西洋に多いWalker-Warburg症候群と福山型が, 遺伝的には一部, 同一である可能性が得られた<sup>18)</sup>.

7) 胎児剖検例の検討から, FCMDの脳奇形はglia limitans-基底膜複合体の亀裂が一因であることが明らかになった<sup>14)16)</sup>(本報告書参照).

#### おわりに

以上FCMD遺伝子は, 22対の全常染色体から9番染色体長腕の31-33バンドに局在化され, 組み換え解析等により約500万塩基対, 連鎖不平衡の同定により100万塩基対, 連鎖不平衡マッピングによりピンポイントに絞られようとしている. FCMD原因遺伝子が単離され, 蛋白レベルでの解析が進むことが期待される.

#### 文 献

- 1) Fukuyama Y, Osawa M and Suzuki H: Brain Dev 3: 1-30, 1981.
- 2) Fukuyama Y and Ohsawa M: Brain Dev 6: 373-390, 1984.
- 3) Lander ES and Botstein D: Science 236: 1567-1570, 1987.
- 4) Toda T, Segawa M, Nomura Y, et al: Nature Genet 5: 283-286, 1993.
- 5) Toda T, Segawa M, Nomura Y, et al: Muscle Nerve 18: 463-466, 1995.
- 6) Toda T, Ikegawa S, Okui K, et al: Am J Hum Genet 55: 946-950, 1994.
- 7) Toda T, Miyake M, Nakahori Y, et al: Brain Dev (in press).
- 8) Toda T, Ikegawa S, Miyake M, et al: Jpn J Hum Genet 40: 333-334, 1995.
- 9) Miyake M, Toda T, Mizuno K, et al: (submitted).
- 10) Hastbacka J, de la Chapelle A, Mahtani MM, et al: Cell 78: 1073-1087, 1994.
- 11) Mitchinson HM, O'Rawe AM, Taschner PEM, et al: Am J Hum Genet 56: 654-662, 1995.
- 12) Toda T, Miyake M, Kobayashi K, et al: (submitted).
- 13) Lehesjoki AE, Koskiniemi M, Norio R, et al: Hum Mol Genet 2: 1229-1234, 1993.
- 14) Nakano I, Funahashi M, Takada K, et al: Acta Neuropathol (in press).
- 15) Kondo E, Saito K, Toda T, et al: Am J Med Genet (in press).
- 16) Yamamoto T, Komori T, Shibata N, et al: (submitted).
- 17) 斎藤加代子, 近藤恵里, 戸田達史ほか: 厚生省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー及び類縁疾患の病態と治療法に関する研究」平成7年度班会議報告書.
- 18) Toda T, Yoshioka M, Nakahori Y, et al: Ann Neurol 37: 99-101, 1995.

## 20) 出生前診断が行われた福山型先天性筋ジストロフィー 胎児2症例の脳皮質病変 — 神経病理学的考察 —

斎藤 加代子\*

研究協力者 山本 智子\*\* 柴田 亮行\*\* 小林 慎雄\*\*  
近藤 恵里\* 河北 有規子\* 池谷 紀代子\*  
大澤 真木子\* 戸田 達史\*\*\*

### 緒 言

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) の脳病変の形成には神経細胞の遊走異常が想定されており、中でも脳表面の pial-glial barrier の破綻による神経細胞の over migration が注目されている。神経細胞の遊走は胎齢 7~10 週頃から 20~24 週頃にかけておこるとされており、FCMD 脳病変の形成過程を解明していく上でこの時期の脳病変の検討は重要と考えられる。今回、胎齢 20 週、18 週胎児において認められた脳病変に関して報告する。

### 症 例 1

同胞は、第 1 子は健康であるが、第 2 子は自然流産、第 3 子は FCMD である。胎齢 16 週の羊水穿刺による出生前遺伝子診断において、約 86% の確率で FCMD が疑われたため、両親の合意のもと胎齢 20 週で人工妊娠中絶が行われた。

剖検時脳重量は 41.6g で、週数相当と考えられた。肉眼的に脳表面は顆粒状を呈し、後頭葉の一部では軽度の隆起が認められた。組織学的には、基底核、皮質、germinal matrix 等、大脳の基本構築の形成は週数相当と考えられたが、脳表面には Takada らの<sup>1)</sup> 23 週の胎児例で報告されているように、type 1: 脳外表面への neuronal cluster の小突出、type 2: 脳外表病変内での neuroglial cluster の形成、type 3: さらに厚い脳外表面の病変の形成、の大きく 3 型に類別される病変が認められた。20 週の症例では、type 1 病変が前頭葉から側頭葉、後頭葉にかけて地図状に最も広く分布しており、type 2 は前頭葉、側頭葉、後頭葉の一部に、type 3 は後頭葉の一部に認められるのみであった。小脳、脳幹に関しては、一部のみ組織標本が作製されたが、観察した範囲内には明らかな病変は認められなかった。

\*東京女子医科大学小児科  
\*\*東京女子医科大学第一病理  
\*\*\*東京大学医学部人類遺伝学

### 症 例 2

胎齢 15 週の出生前遺伝子診断で第 1 子 (2 才 8 ヶ月の FCMD 児) と同様のハプロタイプが認められたため、両親の希望により胎齢 18 週で人工妊娠中絶が行われた。剖検時脳重量は 29.5g とほぼ週数相当であった。肉眼的に大脳表面は微細な顆粒状を呈していた。組織学的には大脳の基本構造はほぼ週数相当と考えられたが、脳表面には病変が認められた。18 週例では、type 2, 3 の病変は認められず、前頭葉を主体に type 1 病変が一部に認められるのみであったが、脳表面は全体に異常な間葉組織に覆われていた。本来の脳表面には PAM 染色陽性の線状に走る基底膜様構造が観察されるが、本症例においては、微細な欠損が多数認められ、欠損部から外側の間葉組織内に向かって脳実質の吹き出し状の病変が形成されていた。脳表面を覆う間葉組織内には軟膜直下の顆粒細胞と考えられる小型円形細胞が認められた。免疫組織化学的には病変内にグリア細胞と考えられる S-100 蛋白陽性細胞が散見され、また、synaptophysin もかなり広範囲に陽性を示した。

小脳においても、表面を覆う間葉組織内には外顆粒層の細胞や、グリア細胞を含む組織からなる小クラスターが散見された。歯状核には大きな異常はないと考えられた。

脳幹表面にも所々に表面の barrier の欠損と考えられる所見が認められた。脳幹の核に関しては大きな異常はないと考えられたが、錐体路には走行の異常が示唆された。

### 考 察

肉眼的、組織学的に観察された脳表面の病変の性状からは FCMD 脳病変の形成に pial-glial barrier の破綻が大きく関わっていることが示唆される。Pial-glial barrier は基底膜、glia limitans、分子層の神経突起から形成されると考えられている。FCMD 胎児例では脳組織全体の構成や成熟状態がほぼ週数相当であり、病変が脳表面に有意に認められること、また、

PAM 染色で基底膜と考えられる構造物に断裂が認められること等から、FCMD脳病変の形成には神経細胞自体の異常よりもむしろ基底膜ないしグリアの異常が前面にでているものと考えられる。

Takadaらの23週の報告例では<sup>1)</sup>、大脳のcortical dysplasiaはtype 2, 3が主体であるが、我々の20週の症例ではtype 1が主体で、type 2, 3はごく一部に認められるのみであり、18週の症例においてはtype 1がごく一部にしか観察されなかった。20週例の、特にtype 3病変部分では脳表面により大きな欠損が多発する傾向がみられたが、18週例では欠損は小さく、やや大きな欠損部にtype 1の病変が認められた。これらの所見からは、type 1~3の病変の形成には脳表面のbarrierの欠損の程度が反映されていると思われるが、18週例でより程度の軽い病変が認められたことを考慮

すると、type 1からtype 2, 3への経時的な移行の可能性も充分ありうると考えられる。

脳表面の病変は、神経細胞の遊走時期に一致して形成されることが考えられるが、18週の症例において、脳外表の病変内に大脳皮質軟膜直下の顆粒細胞や、小脳外顆粒層に由来すると考えられる細胞が認められた。いずれの細胞も胎齢12~13週頃形成が始まるとされており、少なくともこの頃から形態的に捉えうる病変の形成が始まるものと考えられた。

#### 文 献

- 1) Takada K, Nakamura H, et al: Cortical dysplasia in a 23-week fetus with Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD). *Acta Neuropathol* 74: 300-306, 1987

## 21) 非典型的(歩行可能)福山型筋ジストロフィーの第9染色体長腕31への局在の検討

斎藤 加代子\*

研究協力者 近藤 恵里\* 戸田 達史\*\* 田中 一\*\*\*  
大澤 真木子\* 福山 幸夫\*

### はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)では、臨床症状に軽症、重症の差を認め、非典型例がしばしば存在することが知られている。昨年我々は、典型的(歩行不能)と非典型的(歩行可能)なFCMDが混在する2同胞例において、第9染色体長腕31-33に存在するマイクロサテライトDNA多型マーカーを用いた多型解析を施行した結果、それぞれのハプロタイプは一致し、独立歩行を獲得する症例もFCMDのスペクトラムに入ることが示唆されたことを報告した。そこで、さらに今回は、非典型的(歩行可能)FCMDの家系を集め、9q31近傍のDNA多型マーカーを用いた連鎖解析を行い、このような非典型例の遺伝子座と、すでに報告のあるFCMDの遺伝子座9q31とを比較し、FCMDの臨床型と遺伝子型について検討したので報告する。

### 対象

非典型的(歩行可能)FCMD患者を有する10家系34名(患者11名、うち血族婚3家系)を対象とした。対象とする診断基準は、1981年福山ら<sup>1)</sup>が提唱したものに準じ、先天性筋ジストロフィーとしての必須条件[(1)性差のない罹患、(2)生後8ヵ月までの発症、(3)運動発達遅延、(4)全身対称性の筋力および筋緊張低下、(5)深部腱反射減弱または消失、(6)顔面筋罹患、(7)高CK血症、(8)筋組織のジストロフィー変化]を全て満たし、さらに追加条件として、(9)知能障害を認め、(10)独立歩行の獲得のあった(期間は問わず)患者を対象とした。なお、典型例(歩行不能)が混在する家系は除外した。

対象患者の補足臨床所見一覧を表1に示した。歩行可能期間は最短1年、最長9年で、うち2例は階段昇降も可能となっていたが、患者病歴不足により、歩行不能となった年齢が不明なものもあった。頭部画像診断または剖検が行われた5例では、それぞれにFCMDを

示唆する所見が得られていた。また、腓腹筋に仮性肥大が認められたものが5例あったが、他の6例では仮性肥大の記載はなかった。

### 方法

9q31近傍に存在する5種類のマイクロサテライトDNA多型マーカーD9S176、D9S109、D9S127、mfd220、CA246を用いて各人のアレルを決定し、コンピュータープログラムLINKAGEにて2点連鎖解析を施行した。

表1 補足臨床所見

患者No.	性別	最終観察年齢(y:m)	歩行可能年齢(y)	白質LD	皮質萎縮 or形成不全	厚脳回	DQ (y:m)	仮性肥大
1	M	10:11	6-7	○			13(10:11)	○
2	F	20:1	4-6		○		22(20:1)	○
3	M	27:7	2-6	○			44(7:11)	
4	F	23:6	4-7		ND			
5	F	17:3	4-5	○	○	○	52(2:7)	
6	B	20:10	3-10	○	○			○
7	M	21:0	2-8		ND			
8	F	21:0	4-7		ND			○
9	M	25:7	2-11		ND			
10-I	F	22:2	8-7		ND			
10-II	M	8:1	2-7		ND			○

ND: Not Done ○ 階段昇降 (+) ♂ 大脳皮質多小脳回(剖)

### 結果

5種のマーカーのうち、従来FCMDに最も近いとされるマーカーmfd220において3.09( $\theta=0.00$ )の最大ロッドスコアを獲得し、有意な連鎖を認めた。また、そのセントロメア側のマーカーD9S109、D9S127でも、2を超えるロッドスコアが得られた。

一方、mfd220の示す111bpのアレルとFCMDには連鎖不平衡が判明している<sup>2)</sup>。今回我々が解析した非典型的FCMDのグループにつき同様の検討を試みたところ、染色体19のうち5(26%)に111bpのアレルが認められ、このグループがFCMDに属することをサポートする結果となった。

\*東京女子医科大学小児科  
\*\*東京大学医学部人類遺伝学  
\*\*\*新潟大学脳研究所神経内科

表2 Pairwise lod scores of chromosome 9 markers with atypical FCMD

Locus	$\theta$ max	Zmax	$\theta$								
			0.00	0.01	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40	
D9S176	0.05	0.90	0.48	0.73	0.90	0.80	0.64	0.48	0.24	0.09	
D9S109	0.00	2.22	2.22	2.13	1.79	1.40	1.06	0.78	0.37	0.13	
D9S127	0.00	2.69	2.69	2.60	2.26	1.85	1.48	1.15	0.61	0.21	
mfd220	0.00	3.09	3.09	2.98	2.55	2.06	1.62	1.24	0.66	0.24	
CA246	0.07	0.58	-0.08	0.26	0.56	0.56	0.47	0.37	0.18	0.05	

## 結 論

独立歩行を獲得する非典型的FCMD家系における連鎖解析の結果、従来FCMD原因遺伝子に最も近いと報告されているマーカーmfd220において有意な連鎖が認められ、これらの非典型的グループは遺伝子型としては典型的FCMDと同一であることが判明した。昨年の我々の報告、および、今回の連鎖解析の結果より、独立歩行を獲得する症例もFCMDのスペクトラムに入るものと結論づけられた。

## 参 考 文 献

- 1) Fukuyama Y, et al: Brain Dev 3(1):1-29, 1981.
- 2) Toda T, et al: Am J Hum genet 55: 946-950, 1994.

## 22) 福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) : glia limitans-基底膜複合体の破れが大脳 micropolygyria の遠因か?— FCMD 胎児 (18週) 脳の免疫組織学的・電顕的検索から—

戸田 達史\*

研究協力者 中野 今治\* 高田 邦安\* 舟橋 満壽子\*

### はじめに

FCMDにおける脳病理の中核をなす大脳の小多脳回の形成機序に関してはほとんど知られていない。本症と考えられる在胎23週胎児の脳において、大脳皮質板神経細胞がglia limitans (GL)の破れから過剰遊走している像が見出され、これがFCMD脳でみられる小多脳回の原因であろうと推測された<sup>1)</sup>。しかし、この胎児では骨格筋のジストロフィー変化はなく、大脳皮質のGLの破れは他の疾患でも観察される<sup>2)</sup>ため、大脳の変化のみをもってFCMDとは断定しがたい。

ところが、最近、本症の遺伝子座が9番染色体長腕(9q31)にあることが分かって<sup>3)</sup>、胎児DNAの解析により非常に高い確率で本症の出生前診断が可能となり、その大脳病変の初期像が検索できるようになった。

本報告では、上記手法により出生前診断を行い、在胎18週にて人工流産したFCMDの胎児1例の大脳皮質病変について記載する。

### 症例と方法

同胞にFCMD患者1人を有する在胎18週の胎児。本胎児は、そのDNAのmicrosatellite polymorphism analysisにより、99%の確率でFCMDと診断され、人工流産された。脳重は約20gで、大脳表面には広範に細かいシワがみられ、小さなイボ状の突出が少数認められた。大脳のくも膜血管は不明瞭で、柔膜と脳とは強く連結していた。

10%中性ホルマリンで固定した左半球を、パラフィン包埋し、種々の染色を施した。また、抗GFAP抗体、抗collagen typeIV抗体で免疫染色を行った。前頭葉と後頭葉の一部を電顕用に2,5%glutaraldehyde+4%paraformaldehyde固定し、エボン包埋の後型の如く処理して電顕観察した。

正常対照として、神経疾患の無い在胎19週と23週

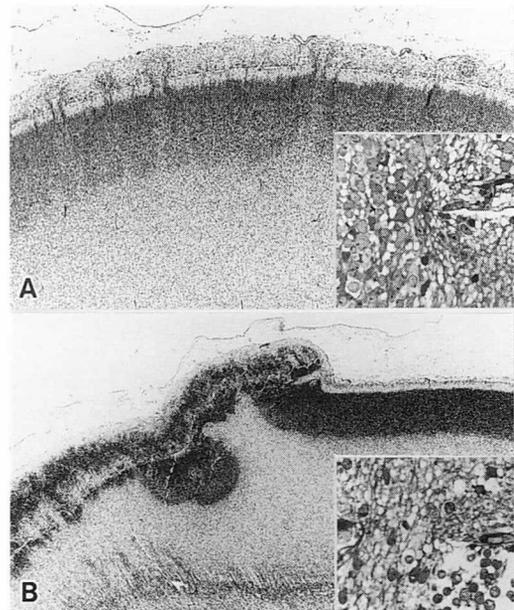


図1 A: 前頭葉皮質  
表面は、neurogliomesenchymal tissue (NGMT)で覆われており、皮質板神経細胞がglia limitansの破れからとび出している。HE,  $\times 10$ . 挿入図: glia limitansの破れ部分の拡大。  
B: 後頭葉皮質  
異形性の強い左半分と正常の右半分の境は明瞭。KB,  $\times 5$ . 挿入図: 異形性の強い部分のglia limitansと思われる部位の拡大。横に走る線は前頭葉に比して貧弱である。  
A, Bの挿入図: エボン包埋0.1 $\mu$ 切片, トリイデンブルー=フクシン染色,  $\times 100$ .

の胎児脳を使った。

### 結 果

#### 1. 光顕所見

大脳皮質は広範に異常な組織で覆われていた(図1)。

\*東京大学医学部人類遺伝学

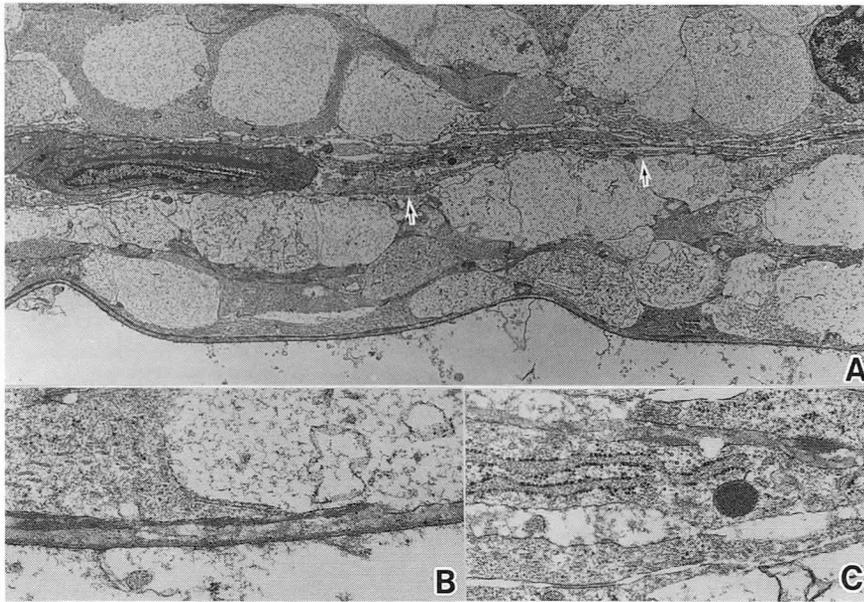


図2 A: 前頭葉の glia limitans とその上の NGMT.  
 下方の glia limitans に平行して pial fibroblast (矢印) が走っている.  $\times 6,000$ .  
 B: glia limitans 表面の拡大図.  
 glia limitans 側の基底膜は連続しているが, NGMT 側のは不連続である.  
 C: NGMT 無いの pial fibroblast とコラーゲン線維  
 B, C :  $\times 30,000$

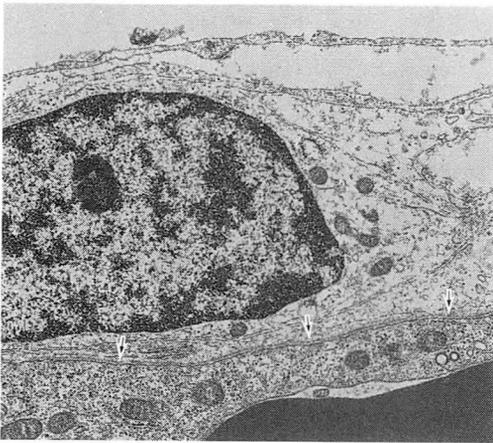


図3 NGMTの最表面  
 血管内皮には基底膜が形成されている (矢印) が, NGMT がくも膜下腔に露出する部分には形成されていない.  $\times 16,000$ .

これは, 神経細胞, グリア, 間葉系の組織を含んでいるので neurogliomesenchymal tissue (NGMT と略) と呼ぶ.

前頭葉では, GL に多数の破れが生じており, そこから皮質板の神経細胞が噴水のように過剰遊走していた (図1A). NGMT には, subpial granular layer の細胞や少数の Cajal-Retzius 細胞も認められた.

GL の破れと破れの間では, 皮質板神経細胞は GL の下に留まっていて, それを迂回して遊出している像はみられなかった.

GFAP 染色では, GL の表層が線状に陽性に染まり, 破れの部分ではこれが途切れていた. また, NGMT の中に GFAP 陽性の細胞が少数観察された. Collagen type IV 染色では, NGMT 表層や深部白質の血管壁は陽性に染まったが, GL や皮質板内の血管壁は陰性であり, コントロール脳でも同様の染色態度が認められた.

後頭葉では, 異形性の強い皮質とほぼ正常に見える皮質とが隣り合っている部分があった (図1B). 異形性の強い部分では GL の破れが大きくかつ多数で, GFAP 染色でも GL としての陽性像は認められず, 皮質板神経細胞の大半が, この破れを通して過剰遊走していた. この過剰遊走した神経細胞は, 概ね脳表面に垂直な柱状配列を示し, 脳表に平行に移動する傾向は呈していなかった. このことは, 異形性の強い部分と正常部分との明瞭な境界からも伺える.

後頭葉の正常皮質部分では, GL の部分に GFAP 陽性の連続した線状構造が認められ, その外表には NGMT は観察されなかった. ただし, この部分でも subpial granular layer の細胞は少なかった.

## II. 電子顕微鏡所見

前頭葉では, GL を形成している astrocyte の

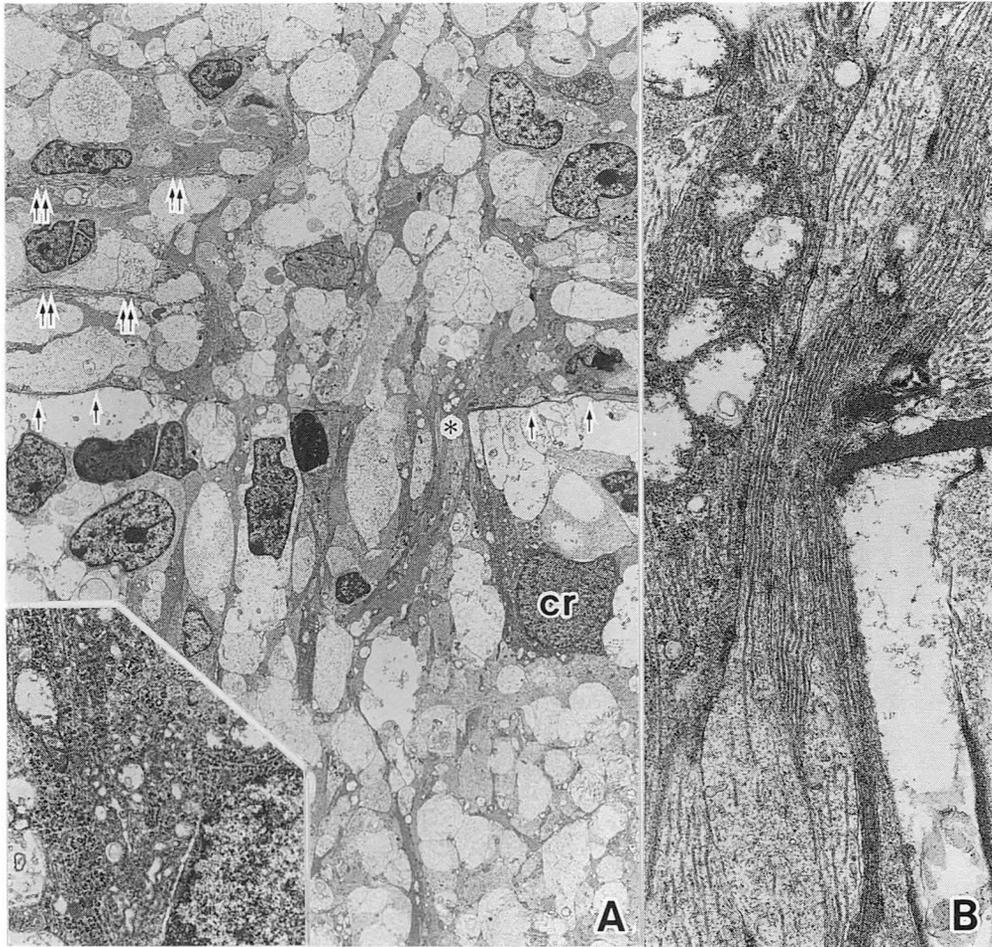


図4 A: 前頭葉

glia limitans (矢印)の破れから皮質板から突起がとび出している。破れの上では pial fibroblast (二重矢)の層も途切れている。cr: Cajal-Retzius 細胞。挿入図: A の cr の拡大。濃いクロマチン, 粗面小胞体のよく発達した暗い細胞質が特徴的。

A:  $\times 2,000$ . 挿入図と B:  $\times 20,000$ .

endfeetの最表面と、このendfeetに面するNGMT部分に基底膜(basal lamina: BL)が認められた(図2)。このBLは電子密度が均質に高く、lamina densaとlamina lucidaの区別はできなかった。両者のBLは通常癒合していたが、しばしばコラーゲン線維と思われる構造が介在していた。

GL側のBLは連続だったが、NGMT側のは不連続であった(図2A)。GL側、NGMT側を問わず、BLを有する細胞膜は滑らかな直線であるのに対し、NGMT側でBLを欠く細胞膜の走行は凸凹していた。

NGMTの深部には、pial fibroblastsの細い突起の層が2~3層、少数のコラーゲン線維を伴ってGLと平行に走っていた(図2B)。この突起に接するグリアにはBLは形成されていない。また、NGMTの最表面でも膜下腔に露出している部分にもBLは見られなかった(図3)。

GLの破れの部分では、GLのBLやpial fibroblastの層も断列して、皮質板神経細胞やradial gliaの突起と思われる突起が貫通していた(図4)。

後頭葉の異形性の強い皮質部分のGLに相当すると思われるところには、BLを有するendfeetはなく、表面に平行に走るpial fibroblastの細い突起が少数のコラーゲン線維を伴って走るのが観察されるのみであった(図5)。

#### 考 察

本例では、GLに破れの在る皮質でのみNGMTがみられ、この皮質でも正常に保たれたGL部分では皮質板神経細胞はGL下に留まっていた。また、異形性の強い皮質部分では、過剰遊走した皮質板神経細胞は表面に垂直に柱状配列をしており、正常皮質との境界部でもこの細胞は異常側に留まっており、脳表の接線方

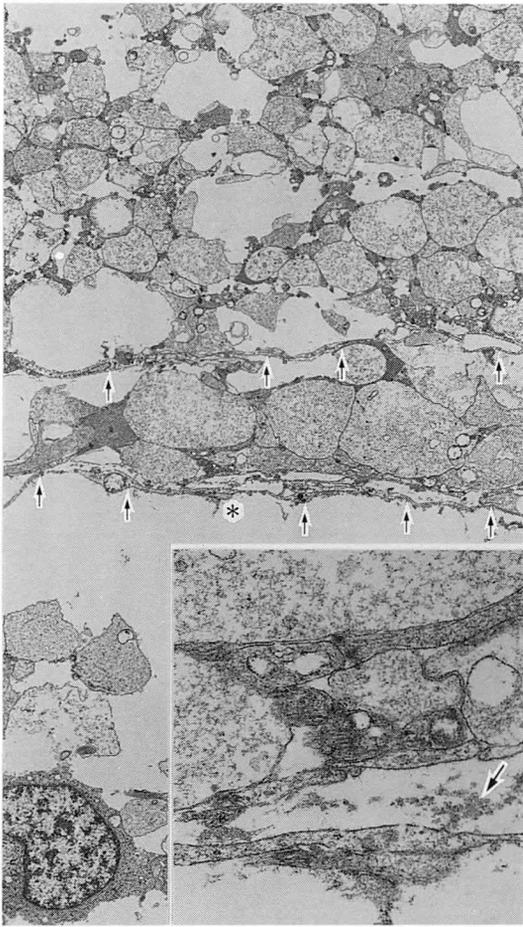


図5 後頭葉の異形性の強い皮質の深部  
表面に平行して走る突起(矢印)が認められる。  
×4,000. 挿入図:\*部分の拡大図. 基底膜を有  
する glia limitans はなく, 少数のコラーゲン線  
維(矢印)を伴う pial fibroblast の突起がみられ  
る. ×20,000.

向にはほとんど移動しないと考えられた。以上の所見は、NGMTの形成にはその場におけるGL-BLの破れが必要条件であり、ひいてはこの破れがFCMDで見

られる小多脳回の遠因である可能性を示すものである。異形性の強い皮質部分で完全なGLがほとんどみられなかった。ここでは元来GLの破れが大きく、過剰遊走した大量の神経組織に埋まってBLをもったGLが消失した可能性がある。

BLは実質組織を間質組織から隔離する働きがあり<sup>4)</sup>、脳においては脳回間を分離する作用がある<sup>5)</sup>。本例において、NGMT表面にBLが形成されていないことは、本症の生後例の脳にみられる脳回癒合を促進した可能性がある。

#### 文 献

- 1) Takada K, Nakamura H, Suzumori K, et al: Cortical dysplasia in a 23-week fetus with Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD). *Acta Neuropathol (Berl)* 74: 300-306, 1987.
- 2) Choi BH and Matthias SC: Cortical dysplasia associated with massive ectopia of neurons and glial cells within the subarachnoid space. *Acta Neuropathol (Berl)* 73: 105-109, 1987.
- 3) Toda T, Segawa M, Nomura Y, et al: Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. *Nature Genet* 5: 283-286, 1993.
- 4) Furthmayr H: Basement membranes. In: Clark RAF, Henson PM (eds), *The molecular and cellular biology of wound repair*. Plenum Press, New York, 1988, pp525-558.
- 5) Sievers J, Mangold U, Berry M, et al: Experimental studies on cerebellar foliation. I. A qualitative morphological analysis of cerebellar fissuration defects after neonatal treatment with 6-OHDA in the rat. *J Comp Neurol* 203: 751-769, 1981.

## IV. 遠位型ミオパチー

# 23) Rimmed Vacuoleを伴う遠位型ミオパチーに対する homozygosity mapping を用いた分子遺伝学的研究

辻 省 次\*

研究協力者 池 内 健\* 樋 口 砂 里\* 斎 藤 正 明\*  
 松 原 奈 絵\* 田 中 恵 子\* 田 中 一\*  
 浅 賀 知 也\*\* 新 田 永 俊\*\* 林 茂\*\*  
 佐 竹 良 三\*\* 高 守 正 治\*\* 斉 田 恭 子\*\*\*  
 奥 泉 薫\*\*\*\* 福 原 信 義\*\*\*\* 宇 山 英 一 郎\*\*\*\*  
 水 澤 英 洋<sup>§</sup>

## 目 的

Rimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチー distal myopathy with rimmed vacuole (以下 DMRV) は、下肢の遠位筋、特に前脛骨筋の筋力低下を示し、筋病理組織学的には rimmed vacuole を認める疾患である。DMRV の遺伝形式は常染色体劣性遺伝を呈する家系が多く報告されているが<sup>1)</sup>、孤発例や常染色体優性遺伝を呈する症例もある。DMRV の遺伝子座については、浅賀らにより 1p34-p32 に連鎖する可能性がある家系が報告されたが、複数家系における解析では、有意なロッド得点は得られていない<sup>2)</sup>。そこで我々は、系統的な genome search による連鎖解析が必要であると考え、ホモ接合性 homozygosity mapping を応用して DMRV の遺伝子座の解析を施行した。

## 方 法

対象は血族結婚がある10家系と同胞発症を認める2家系の計に家系の発症者18名を対象とした(図1)。効率よく genome search を行うために、1. 血族結婚のある家系の場合は発症者が DMRV 遺伝子座周辺でホモ接合を示す確率が高い、2. 血族結婚のない場合においても、発症者は DMRV 遺伝子座の周辺においては、同一の genotype を示す確率が高いと考え、解析対象を血族結婚のある10家系と同胞発症を認める2家系の計12家系の発症者18名にしぼり、%heterozygosity が70%を超えるような多型性に富むマーカーを用いて(図2)、迅速に解析するストラテジーを選択した。また、マイクロサテライト多型を自

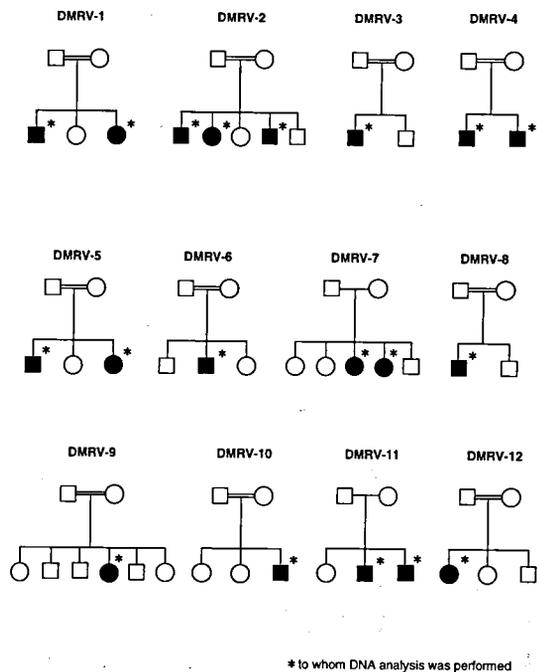


図1 DMRV家系図

動DNAシーケンサーを用いて解析する際の分析精度を高めるために、可能な限り trinucleotide repeat あるいは tetranucleotide repeat を用いるようにし、各染色体を15~20cMの間隔でカバーするように設計した。

多点連鎖解析によるロッド得点の算出には、Kruglyakらに報告された“MAPMARKER/HOMOZ”による algorithm を用いた<sup>3)</sup>。各マイクロサテライトマーカーにおける正常者のアレル頻度は、Genome Data Base (GDB) もしくは The Cooperative Human Linkage Center (CHLC) により公表されている値を用いた。

\*新潟大学脳研究所神経内科

\*\*金沢大学医学部神経内科

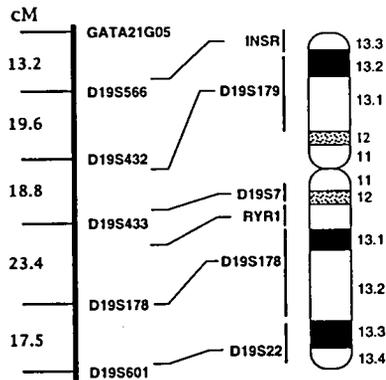
\*\*\*国立療養所宇多野病院神経内科

\*\*\*\*国立療養所厚瀧病院神経内科

\*\*\*\*\*熊本大学医学部第一内科

§筑波大学臨床医学系神経内科

### Chromosome 19



### Chromosome 20

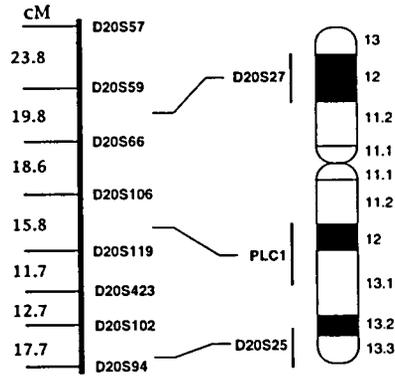
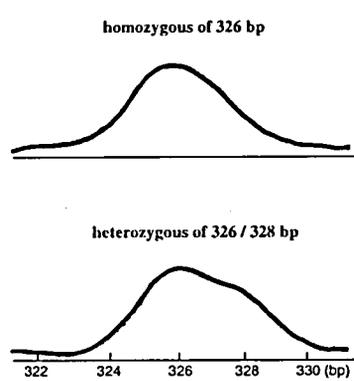


図2 第19, 20染色体上のマイクロサテライトマーカー

microsatellite marker with dinucleotide repeat



microsatellite marker with tetranucleotide repeat

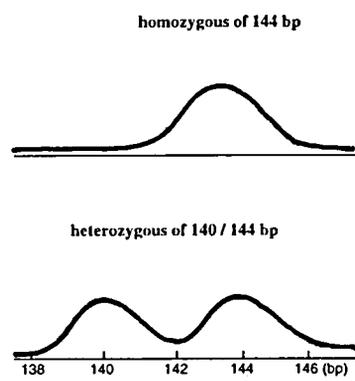


図3 Tetranucleotide repeat は dinucleotide repeat よりもホモ接合かヘテロ接合かの判別に優れている

### 結果

(1) Tetranucleotide repeat マーカーはホモ接合かヘテロ接合の判定に有用である

自動DNAシーケンサーを用いた解析では, dinucleotide repeat マーカーを用いた場合には, 1リピート差のヘテロ接合では2塩基違いのピークの分離が不完全となり, ホモ接合かヘテロ接合かの判別が困難な場合が少なくない. 一方, tetranucleotide repeat マーカーでは1リピート差が4塩基対の違いとなり, ピークの分離が良好で, 自動DNAシーケンサーによる解析精度が高まるものと思われた(図3).

(2) DMRV のホモ接合性マッピングにおいて MAPMARKER/HOMOZ は有用な algorithm である

今回解析した DMRV12 家系において, 第19番染色体上のマイクロサテライトを用い, すべてホモ結合を呈したと仮定して MAPMARKER/HOMOZ にて多点連鎖解析を行うと, 最高ロッド得点 16.02 を示した. このことは, DMRV 家系に genetic heterogeneity が無いとすれば, 現在の12家系を対象とした解析で,

DMRV 遺伝子座周辺では十分有意なロッド得点が見られると考えられた.

(3) 第19, 20番染色体では高いホモ接合率, 有意なロッド得点を呈する領域は認めない

第19番染色体の各マイクロサテライトマーカーにおけるホモ接合率とロッド得点を図4に示した. ホモ接合率は GATA21G05, D19S586, D19S178 において 50% を示した. 多点連鎖解析では GATA21G05 の telomere 側で最高ロッド得点 0.72 を呈した.

第20番染色体では, D20S66 において最高 50% のホモ接合率を呈し, 多点連鎖解析では D20S102 の telomere 側で最高ロッド得点 2.08 を呈した(図5).

### 考察

ホモ接合マッピングを用いた DMRV の分子遺伝学的研究を報告した. 現在までに解析した第19番ならびに第20番染色体では, 高いホモ接合率および有意なロッド得点を呈する領域は認められなかった. D20S102 の telomere 側にてロッド得点が 2.08 と比較

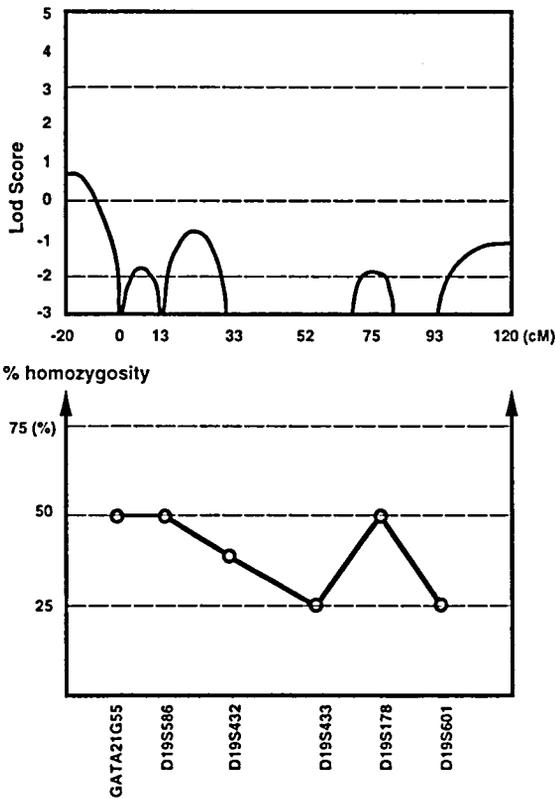


図4 第19番染色体の各マイクロサテライトマーカーにおけるロッド得点と%homozygosity

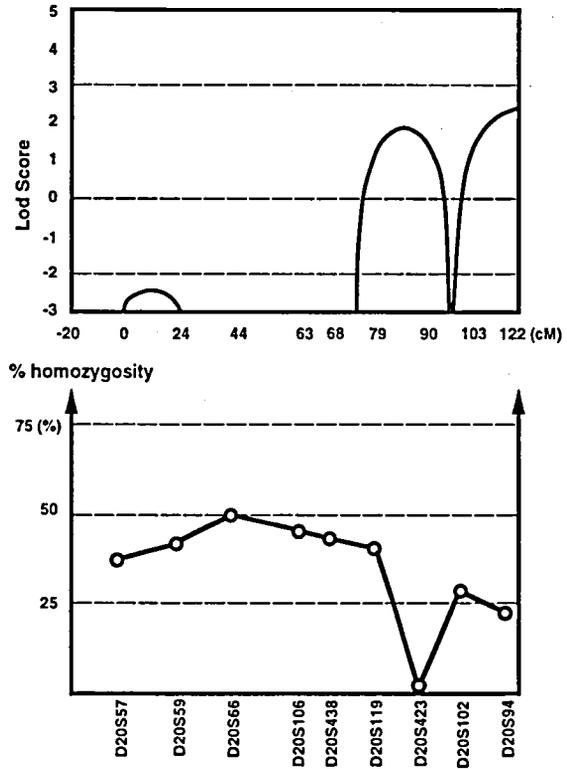


図5 第20番染色体の各マイクロサテライトマーカーにおけるロッド得点と%homozygosity

の高い値が認められたが、その領域のD20S94でのアレル頻度が明らかにさせていなかったため、見かけ上、ロッド得点が高くなっている可能性があると思われた。事実、D20S94でのホモ接合率は23%と低い値を示していた。

今回のDMRV遺伝子座の決定にむけて用いたホモ接合性マッピングは、常染色体劣性遺伝病の連鎖解析においては、非常に有力な戦略であることが知られている<sup>4)5)</sup>。ホモ接合性マッピングは、その利点として、血族結婚を認める場合には、小さな家系でも有意なロッド得点を得ることが可能なことがあげられる。我々は今回の解析で、ホモ接合性マッピングの解析対象を発症者のみに絞り込み、効率化をはかった。加えて、%heterozygosityが高いマイクロサテライトマーカーを選択し、tetranucleotide repeatを75%という高い割合で使用するにより、分析精度の向上をはかった。

多点連鎖解析によるロッド得点の計算は通常LathropらによるLINKAGEの中のLINKMAPプログラムが用いられているが、特に血族結婚を認める場合には、連鎖解析によるロッド得点の算出に多大な時間を要することが問題とされている<sup>6)</sup>。そこで我々は、短時間に効率的に連鎖解析を行うために、最近

ruglyakらにより発表されたMAPMARKER/HOMOZによるalgorithmを用いた。MAPMARKER/HOMOZは、発症者とその両親のgenotypeしか入力できない、アレル頻度がロッド得点に大きく影響するなどの欠点もあるが、今回のように各染色体を迅速に解析することを目的とする場合には、有力なalgorithmであると考えられた。

DMRVの遺伝子座の同定に向けて、このような戦略は非常に有効であると思われ、今後は他の染色体の解析を予定している。

## 文 献

- 1) Nonaka I, Sunohara N, et al: Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar(myeloid) body formation. *J Neurol Sci* 51: 141-155, 1981.
- 2) 浅賀知也, 樋口砂里ほか: Rimmed-vacuole型ミオパチーの連鎖解析. *神経内科* 43: 112-116, 1995.
- 3) Kruglyak L, Daly MJ, et al: Rapid multi-point linkage analysis of recessive traits in nuclear families, including homozygosity mapping. *Am J Hum Genet* 56: 519-527,

- 1995.
- 4) Lander ES and Botstein D: Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236: 1567-1570, 1987.
  - 5) Martin Farrall: Homozygosity mapping: familiarity#breeds debility. *Nature Genet* 5: 107-108, 1993.
  - 6) Lathrop GM, Lalouel JM, et al: Strategies for multilocus linkage analysis in human. *Proc Natl Acad USA* 81: 3443-3446, 1984.

## 24) Rimmed-vacuole型遠位型ミオパチーの連鎖解析

高 守 正 治\*

研究協力者	浅 賀 知 也*	新 田 永 俊*	林	茂*
	佐 竹 良 三*	樋 口 砂 里**	田 中	一**
	斉 藤 正 明**	松 原 奈 絵**	田 中	恵 子**
	辻 省 次**			

Rimmed-vacuoleを伴う遠位型ミオパチー (DMRV) は1978年水澤<sup>1)</sup>らにより Welander型や三好型遠位型ジストロフィーとは明らかに異なる疾患単位として提唱されて以来<sup>2)</sup>, 本邦を中心に病態の解明が行われてきた。典型的なDMRVは臨床的には以下のような特徴を有するものと考えられる。

- (1) 遺伝様式は常染色体劣性遺伝。
- (2) 病初期の筋力低下, 筋萎縮の分布はこの疾患群に極めて特徴的で, 下腿遠位部の伸筋群(前脛骨筋など)が侵される。更に比較的早期より大腿後面の屈筋群の筋力低下, 筋萎縮も認めることが多い。
- (3) 筋病理学的には筋線維内に rimmed-vacuoleを認める。

本研究ではDMRVの疾患の遺伝子座を決める目的で行われた。

### 対 象

- 1) ある家系の発症者2名のRh式血液型がRh(-)であるのに対し非発症者はRh(+)であったことから, RH式血液型遺伝子座のある1番染色体の短腕p34-32近傍を中心にマイクロサテライト多型DNAマーカーを用いて連鎖解析を行った。第1染色体短腕上のRH式血液型遺伝子座近傍については全国の施設よりお送りいただいたrimmed-vacuoleを伴う遠位型ミオパチー17家系(近親婚6家系)を対象とした。
- 2) 三好型遠位型ジストロフィーと思われる様な臨床症状で発症しながら, 筋病理学的にrimmed-vacuoleが認められる症例があることから, DMRVの独立性を明らかにする目的で三好型遠位型ジストロフィーの疾患遺伝子座の存在する第2染色体について検討した。対象として血族結婚が明らかなDMRV3家系, 血族結婚のないDMRV1家系および臨床的には三好型遠位型ジストロフィーと思われ, 筋病理学的にrimmed-

vacuoleを認めた1家系(両親は近親婚)を用いた。

### 方 法

- 1) 第1染色体短腕RH式血液型遺伝子座近傍のハプロタイプをマイクロサテライト多型DNAマーカーを用いて決定した。マーカーについてはセントロメア側よりD1S200, D1S193, D1S255, D1S496, D1S201, D1S241, D1S233, D1S513, D1S247を用いた。
- 2) 第2染色体については, 三好型遠位型ジストロフィーの疾患遺伝子座近傍のハプロタイプをマイクロサテライト多型DNAマーカーを用いて決定した。マーカーはテロメア側よりD2S134, D2S292, D2S291, D2S286, D2S329を用いた。

### 結 果

DMRVは通常常染色体劣性遺伝様式をとると考えられ両親が近親婚である場合, DMRVの疾患遺伝子の近傍のハプロタイプはホモ接合となることが予想される。

- 1) 本研究の発端となった家系について上記の各マーカーを用いPCR法で連鎖解析を行なうと, 発症者2名のハプロタイプはRh式血液型遺伝子座と考えられている1p34-32よりも, セントロメア側のマーカーD1S247からD1S255に対して共にホモ接合となっていた(図1)。しかし, 本研究で検討した近親婚が明らかなrimmed-vacuoleを伴う遠位型ミオパチー6家系の発症者全てにホモ接合となる領域はRH式血液型遺伝子座近傍には存在しなかった。
- 2) 第2染色体については(図2)マイクロサテライト多型DNAマーカー-D2S292に対して血族結婚のあるDMRV3家系ともにホモ接合となり, 血族結婚のないDMRV1家系についても発症者と非発症者が異なるハプロタイプを有していた。一方, 三好型遠位型ジストロフィーと思われ, 筋病理学的にrimmed-vacuoleを認めた1家系についてはD2S292に対してヘテロ接合となっており, 更に全ての三好型遠位型ジストロフィー

\*金沢大学医学部神経内科

\*\*新潟大学医研究所神経内科

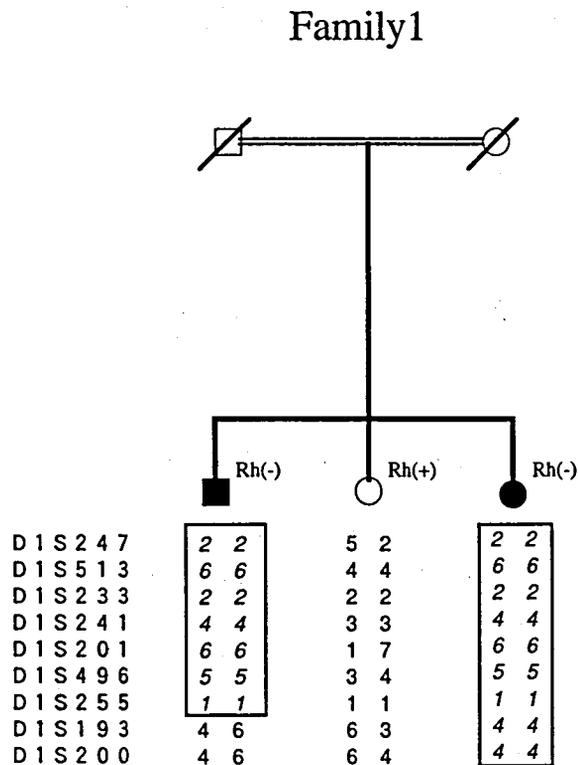


図1 発端者の家系図とハプロタイプ

が連鎖するとされていた D2S291 に対してもヘテロ接合となっていた。Rimmed-vacuoleを伴う遠位型ミオパチー全体では、第2染色体上の三好型遠位型ジストロフィーの疾患遺伝子座近傍に共通してホモ接合となる領域は認められなかった(図3)。

### 考 案

1) 現在までの連鎖解析の結果では比較的進行の遅い DMRV, 特に発症後長期間が経過しても下腿屈筋群, 大腿伸筋群の筋力が正常に保たれる DMRV の2家系について, D1S241 から D1S255 に対して発症者に共通してホモ接合となる領域が認められた。DMRV のうち大腿伸筋群の筋力は正常に保たれる一群の存在は 1984年 Argovら<sup>3)</sup>により既に報告されており, 少なくとも DMRV の中にこのようなユニークな筋障害の分布を保ったまま経過する一群が存在することは事実と思われる<sup>4)</sup>。しかし, rimmed-vacuoleを伴う遠位型ミオパチー全体の解析では, D1S241 から D1S255 に対して発症者と非発症者が同じハプロタイプを有する家系も認められることから, 更に家系を増やして検討していく必要があるものと考えられた。

2) 最近, 肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2B) と三好型遠位型ジストロフィーの疾患遺伝子座が共に第2染色体短腕に連鎖するという興味深い研究結果が提示さ

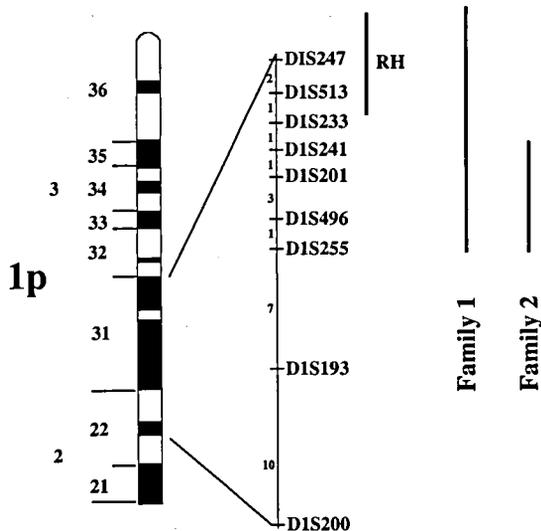


図2 第1染色体短腕のRH locus近傍の遺伝子地図  
マーカーはすべてマイクロサテライト多型DNAマーカー。右は各家系の DMRV 発症者のハプロタイプがホモ接合であった範囲を示す。

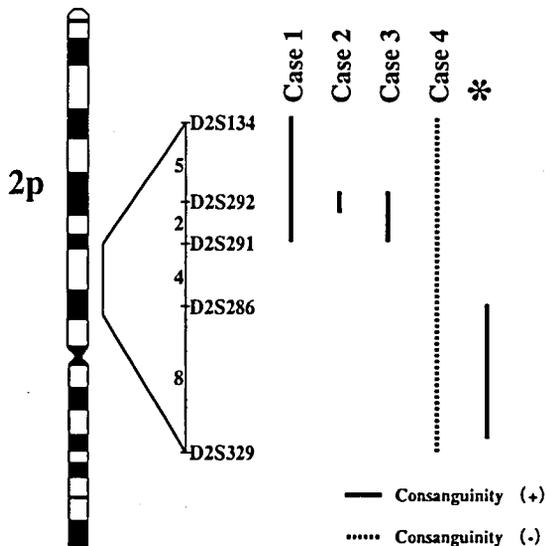


図3 第2染色体短腕の三好型遠位型ジストロフィーの疾患遺伝子座近傍の遺伝子地図  
マーカーはすべてマイクロサテライト多型DNAマーカー。実線は各家系の DMRV 発症者のハプロタイプがホモ接合であった範囲を示す。\*は初発症状が三好型遠位型ジストロフィー類似で病理学的に rimmed-vacuole を認めた家系。

れた。Rimmed-vacuole 型遠位型ミオパチー (DMRV) 自体は臨床的に明らかに独立した疾患単位と考えられるが, 症例によっては三好型遠位型ジストロフィーと思われる臨床症状で発症しながら, 筋病理学的に rimmed-vacuole が認められることもあり, 連鎖

解析のレベルでDMRVの独立性を確認することも意味があるものと思われる。本研究では三好型遠位型ジストロフィーの疾患遺伝子座近傍のマーカーD2S292に対して近親婚を有するDMRV3家系でホモ接合となり、今後症例を増やして検討を進める必要があるものと思われた。一方で三好型遠位型ジストロフィーと思われる臨床症状で発症しながら、筋病理学的にrimmed-vacuoleが認められた1家系では、全ての三好型遠位型ジストロフィーが連鎖するとされていたD2S291に対してヘテロ接合となっていたことは興味深く、D2S291とD2S286の間のマーカーについて検討を加えて行く必要があるものと思われた。

謝 辞：以上の研究をご協力戴きました厚生省筋ジストロフィー研究班の諸先生方、また貴重な検体をお送り戴きました下記の諸先生方に深謝致します。

新潟大学脳研究所神経内科 遠藤耕太郎、小宅琢郎、国立療養所犀潟病院神経内科 奥泉 薫、福原信義、筑波大学神経内科 石川欽也、水澤英洋、国立精神神経センター神経内科 春原経彦、北里大学東病院神経

内科 齊藤豊和、東京都立神経病院神経内科 松原四郎、国立療養所鈴鹿病院神経内科 小長谷正明、国立療養所宇多野病院神経内科 斎田恭子、国立療養所南岡山病院神経内科 難波玲子、高田裕、長崎大学医療短大 吉村俊朗、日赤長崎原爆病院 松尾秀徳

#### 文 献

- 1) 水澤英洋, 中野今治, 井上聖啓ほか: 筋線維に高度の空胞変性を伴ったdistal myopathyの一病型. 神経内科 12: 40, 1980.
- 2) 水澤英洋, 豊倉康夫: 遠位型ミオパシー. 神経内科 20: 555, 1984.
- 3) Argov, Z, Yarom, R: "Rimmed vacuole myopathy" sparing the Quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews. J Neurol Sci 64: 33, 1984.
- 4) Suohara N and Nonaka I: Distal myopathy with rimmed vacuole formation. A follow-up study. Brain 112: 65, 1989.

## 25) 常染色体優性rimmed vacuolar myopathyの一家系

高木 昭夫\*

研究協力者 北村 曜子\* 上坂 義和\* 井田 雅祥\*  
中道 健一\* 小島 進\*\*

Rimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチー(DMRV)は通常は孤発ないし常染色体劣性遺伝である。しかし常染色体優性の家系が本邦でも報告された<sup>1)</sup>。今回我々の経験した常染色体優性rimmed vacuolar myopathyの一家系を臨床的・筋理的に検討し既報の病型と比較した。

### 症 例

図1に家系図を示した。3世代に8名の発症者がみられる。近親婚は無く、常染色体優性遺伝と考えられた。発症者のうちIII-4, III-5, II-2につき診察や検索の機会があった。

**症例1**：30歳男性(III-5) 乳幼児期発育や既往歴に特記すべき異常はない。小学校では徒競走で1, 2番で、中学時代バスケットボール部活動で支障を感じなかった。高校生時代下腿の重さを感じ、走るのが困難になり始めた。1990年当科初診時(25歳), 股関節と膝関節周囲筋にMMT4+レベルの筋力低下を指摘された。上肢筋力はほぼ正常であり、爪先立ちや踵立ちは可能であった。この時点で血清CKは412IU/L(正常域 100以下)。以後徐々に下肢萎縮と脱力が進行した。1995年になり躰踞からの立ち上がりが困難となり、階段昇降に手すりを必要とするようになり、入院した。身体所見として、口蓋高位が認められた。脳神経系では閉眼力軽度低下とわずかな嚥下障害を時に認めた。下腿は著明に萎縮していた。Gowers徴候が陽性、爪先立ち・踵立ち不可能であった。握力は右20kg, 左24kg。頸部前屈は4-, 上腕肩甲部に4レベル、腰部部・大腿部に3~4レベル、足関節には底屈が2, 背屈が3レベルの筋力低下を認めた。深部腱反射はPTRとATRは低下していた。病的反射なし。感覚系、小脳系に異常を認めなかった。入院時の血液生化学検査ではCKが416 IU/lと上昇している他異常なく、胸部X線像や心電図12誘導は正常であった。神経伝導速度検査は正常。針筋電図検査では少量の安静時放電を伴う筋原性変化

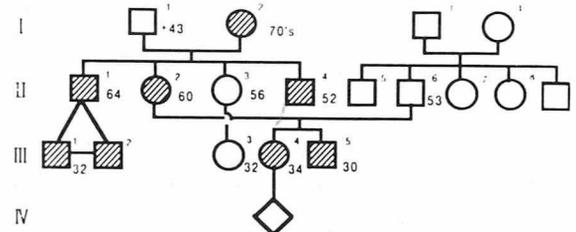


図1 家系図

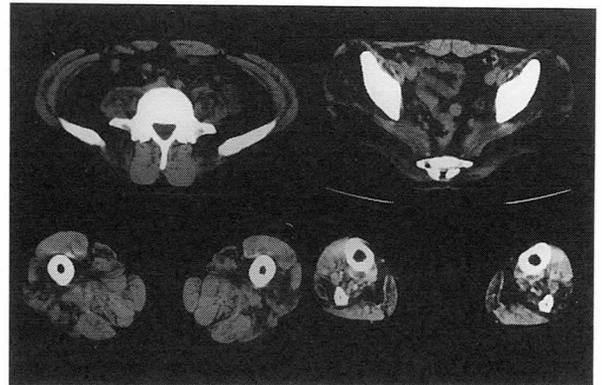


図2 症例1(III-5)の30歳時の筋肉CT像

を認めた。筋肉CT像(図2)では殿筋群、大腿四頭筋、下腿三頭筋に低吸収域を認めた。前脛骨筋の変化は比較的軽度であった。

**症例2**：34歳女性(III-4)。高校時代まで徒競走は遅い方だったが歩行異常はなかった。24歳時腰痛を自覚した。この頃、同僚から歩容異常を指摘された。25歳時、8cmのハイヒールから低いものに変えたところ歩きにくさを自覚した。爪先立ちの困難と階段の登りに手すりを要することに気づき、27歳時当科を受診した。初診時(27歳)現症では脳神経、感覚系、小脳系は正常。運動系では握力が右33kg, 左30kg。棘上筋に極軽度の筋力低下を認める他は上肢肩甲帯の筋力は正常。腰部部・大腿ではMMT4レベルの筋力低下。足関節背屈は正常、同底屈が4レベルの筋力低下を認めた。腱反射は正常。検査所見では血清LDH 278HU, CK 421 IU/Lの他一般血液検査に異常なし。心電図12誘導、胸部X線像に異常なし。神経伝導速度は正常。針筋電

\*虎の門病院神経内科

\*\*三宿病院神経内科

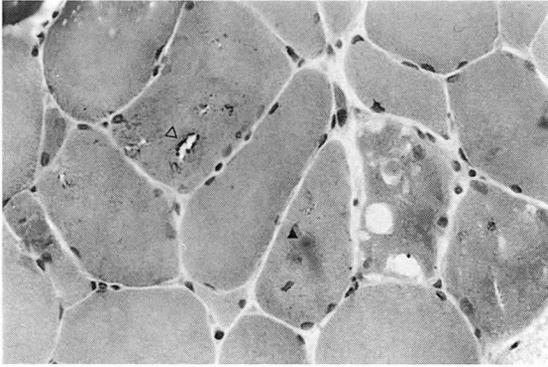


図3 症例1(III-5)の左大腿四頭筋組織像(HE染色, 200倍). 筋径の大小不同, 空胞, rimmed vacuole(△), cytoplasmic body(▲)などを認める.

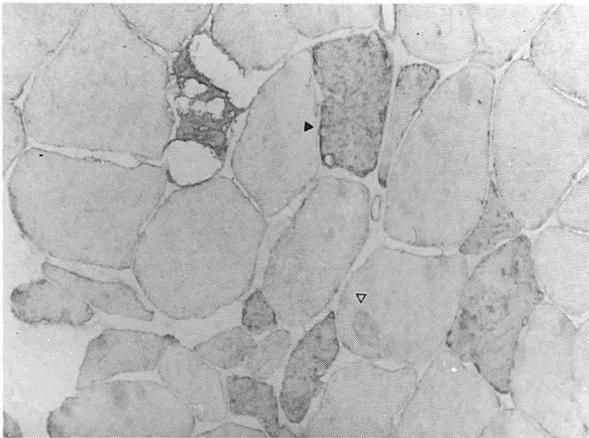


図4 抗desmin抗体による免疫組織化学染色(200倍). Cytoplasmic bodyが染色される筋線維(△)と一様に染色される筋線維(▲)がみられる.

図にて筋原性変化を認めた. 27歳時の筋肉CTでは, 下腿では下腿三頭筋変性が強い. 前脛骨筋は比較的保たれていた. 症例1に比して殿筋群の低吸収域は軽度であった.

症例3: 60歳女性(II-2) 20歳代までは登山をしていた. 30歳代後半に下肢のだるさにて発症. 49歳まで外出が可能であったが, 50歳より起立不能. 53歳時には上肢挙上不能となった. 現在車椅子介助レベルとなっている. 症候としては脳神経, 感覚系や小脳系には異常を認めない. 筋力は上下肢ともMMT2ないしそれ以下レベルだが, 腱反射は保持されている. 血清CKは263IU/L. 心電図12誘導と胸腹単純X線像は正常であった.

症例4: 52歳男性(II-4, 都立神経病院にて経過観察中) 30歳代後半より下肢筋力が次第に低下, 階段を上るのに手すりを必要とするようになった. 45歳時より杖歩行となっている. 48歳時の診察では脳神経, 感

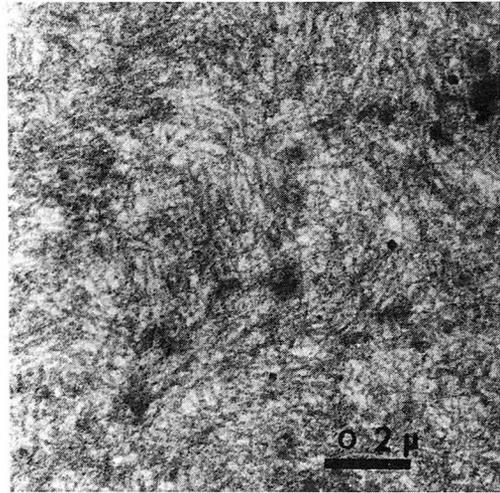


図5 Cytoplasmic bodyの電顕像. 電子密度の高い物質とfilamentよりなる. filament径は7~9nmであった.

覚系や小脳系は正常. 運動系では上肢はMMT4+レベル, 腰部部・大腿にMMT3+~4レベルの筋力低下を認めた. 足関節背屈はMMT4レベル, 同底屈はMMT2レベルであった. 腱反射は上腕二頭筋, 同三頭筋とPTRにて低下, ATRは消失. 検査所見ではCKは88U/L. 心電図12誘導と胸腹単純X線像は正常であった. 神経伝導速度検査は正常. 針筋電図にて安静時放電を伴う筋原性変化を認めた.

#### 筋病理学的所見

症例1, 2, 4にて筋生検が施行された(症例4は都立神経病院の資料). 症例1の左大腿四頭筋のHE染色標本(図3)では筋線維の大小不同, 小角化線維の散在, 空胞, rimmed vacuole, 好塩基性cytoplasmic bodyなどを認めた. また好塩基性subsarcolemmal bodyを認めた筋線維も存在した. rimmed vacuoleは全筋線維の約10%に認められた. 壊死再生の所見は僅かに認められた. 抗desminモノクローナル抗体, 抗vimentinモノクローナル抗体, 抗dystrophin抗体4-4C5及びA1Cを用いてABC法により免疫組織染色を行った. 図4に抗desmin抗体を用いた染色標本を示した. 一部の筋線維は均一にあるいはcytoplasmic bodyに一致して染色された. 抗vimentin抗体や抗dystrophin抗体を用いた検討でもほぼ同様の所見を認めた. 抗desmin抗体を用いたimmunoblotにより筋組織でのdesmin増加を証明した. 電顕所見ではgranulofilamentous inclusionやミエリン様構造物の貯留を観察した. 前者はZ帯様物質と7~9nmの中間径filamentからなっていた(図5). 症例2大腿外側広筋の組織像は症例1と同一の所見であった.

## 考 察

本家系の特徴をまとめると、1) 10歳代後半から30歳代後半の発症で世代間で発症促進の可能性がある。2) 経過中には上肢帯や腰帯筋群も障害されるが、初発は下腿脱力であり、前脛骨筋より下腿三頭筋がより強く障害される。顔面筋・咽頭筋のごく軽度の障害を示す症例も存在する。3) 生検筋では rimmed vacuole や cytoplasmic body を認める。cytoplasmic body の電顕所見では granulo-filamentous な構造を認め、filament の径は7~9nmであった。4) desmin, vimentin や dystrophin の抗体により染色される封入体を認めた。

従来報告されている病型とは以下の点で異なる。Markesbery のものは発症が40歳代以降の例が多く晩発型で、筋力低下の分布も前脛骨筋が下腿三頭筋より障害が強く、顔面筋も障害されない<sup>2)</sup>。Welander のものは初発が上肢遠位、特に手指筋が強く障害され、近位筋の障害は稀であるとされている<sup>3)</sup>。Finnish type は前脛骨筋の障害が強く初発症状となる<sup>4)</sup>。oculopharyngeal dystrophy については一例で極めて軽微な顔面筋の障害が疑われたのみで症状を異にする。Edstrom らが desmin storage type として報告している症例では手内筋と手関節背屈、呼吸筋、心筋障害が強く進行も急速であり本症と異なる<sup>5)</sup>。Helliwell らは desmin, vimentin, dystrophin の増加した遠位型ミオパチーの家系を報告した<sup>6)</sup>。この家系では血清CKは正常であり、前脛骨筋の障害が下腿三頭筋より強かった。また心障害を伴うことが多いなど臨床像は異なっている。desmin, vimentin, dystrophin の増加は筋変性過程の非特異的現象の可能性もあろう。本家系は従来の欧米の報告例とは厳密には一致しない。同一疾病における症候の多様性なのか別の疾病かは今

後の検討課題である。

謝 辞：症例4の資料をご提供いただきました都立神経病院神経内科 宮本和人先生に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 春原経彦, 岸林 潤, 斉藤陽子ほか: Autosomal dominant limb-girdle myopathy. “厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィーの臨床・疫学及び遺伝相談に関する研究”(高橋班)平成5年度研究報告書, 1994, p145.
- 2) Markesbery WR, Griggs RC, Leach RP, et al: Late onset hereditary distal myopathy. *Neurology* 24: 127, 1974.
- 3) Welander L: Myopathia distalis tarda hereditaria. *Acta Med Scand* 141(Suppl 265): 1, 1951.
- 4) Udd B, Partanen J, Halonen P, et al: Tibial muscular dystrophy: Late adult-onset distal myopathy in 66 Finnish patients. *Arch Neurol* 50: 604, 1993.
- 5) Edstrom L, Thornell L-E and Eriksson A: A new type of hereditary distal myopathy with characteristic sarcoplasmic bodies and intermediate (skeletal) filaments. *J Neurol Sci* 47: 171, 1980.
- 6) Helliwell TR, Green ART, Green A, et al: Hereditary distal myopathy with granulo-filamentous cytoplasmic inclusions containing desmin, dystrophin and vimentin. *J Neurol Sci* 124: 174, 1994.

## 26) Rimmed vacuoleにおけるアミロイド蛋白関連物質の発現について

田 邊 等\*

研究協力者 宮本和人\*\* 菅谷慶三\*\* 磯崎英治\*\*  
松原四郎\*\* 新井信隆\*\*\*

### はじめに

H6年度より, rimmed vacuole(以下RV)を伴う疾患の形成機序について検討を進めている. RVの疾患特異性や疾患分類について見解の違いがあり, 米国ではRVを認めた疾患の多くをinclusion body myositis(以下IBM)と診断することが多く, 本邦で言うRV型distal myopathy(以下RVDM)もIBMに分類されている. IBMの診断基準は, おもにRVの微細構築上の特徴として15~20nmの線維性封入体がmarkerとされてきた. 最近では, 蓄積物質を免疫染色にて同定し, Askansらはprion蛋白の, またChouらはamyloid- $\beta$ 蛋白とubiquitinの重要性を指摘し, amyloid- $\beta$ 蛋白とubiquitinが診断基準となりうるとしている. しかし, 筋肉内のRVにprion蛋白やamyloid- $\beta$ 蛋白が蓄積する機序について十分な説明がなされていないように思われた.

### 目 的

筋肉内のRVに, prion蛋白やamyloid- $\beta$ 蛋白の蓄積機序やアミロイド生成の機序を解明する. さらにはRVを呈する疾患についてその蓄積物質により臨床症状の差が見られないかをも検討し, 疾患の特異性について検討を進めたい.

### 対 象

新鮮凍結切片のGomori-Trichrome変法にてRVを認めた神経筋疾患10例, 内訳RV型遠位ミオパチー(以下RVDM)5例, 封入体筋炎(以下IBM)1例, 眼咽頭型ミオパチー(以下OPDM)2例, その他2例.

### 方 法

Prion蛋白に対する抗体は, prion蛋白のアミノ酸配列90番から102番に相当する合成peptideを作成し, 家兎に免疫し, polyclonal抗体を作成した. 生検筋を

ホルマリン固定後パラフィン封埋し, 6 $\mu$ 切片を切り出し, 脱パラ後リン酸緩衝液でよく洗い50%蟻酸3分, 0.3%加メタノール10分で処理した後, 1次抗体を4°C over night作用させ, biotin-abidine法にて2段階免疫染色を実施した. その他, 市販の抗ubiquitin polyclonal, 抗タウ(polyclonal), 抗amyloid-P component(polyclonal), 抗Amyloid- $\beta$  protein(monoclonal), cystatin-C(polyclonal)等の抗体を用いて連続切片を染色した.

一部の症例では, 中枢神経系で老人斑やneurofibrillary tangle(NFT)を染め出すときに用いるメセナミン銀染色, ガリアス染色を実施した.

また, アミロイド染色として小さなamyloid depositでも十分観察可能なthioflavin-T染色を実施した.

### 結 果

まず, 本研究を着手するきっかけになった症例を提示したい. 症例は, 8年以上前に経験されていたもので, 筋生検で認められたrimmed vacuoleの意義が解決されないままになっていた.

症例1: S. S. 66歳男性(NHS-1148).

主訴: 手足の運動障害, ものが見づらい, 手足の筋萎縮  
家族歴: 妹と長女に運動失調症

病歴: 47歳のときふらつき歩行で発症. 53歳, 言語障害. 55歳, 痴呆や自殺企図などの精神症状. 60歳, 眼球運動障害と下肢筋萎縮が明らかになった.

神経症状: 痴呆, 眼瞼下垂, 眼球運動障害, 眼振, 顔面筋萎縮, 仮性球麻痺, 断綴言語, 協調運動障害, 四肢筋萎縮, 腱反射は初期に亢進していたが, 後に低下. Babinski反射陽性, 尿便失禁がみられた.

検査: 頭部CTスキャン及びMRIにて小脳と脳幹の萎縮を認めた. 筋電図で運動単位電位は, 1 mV以下の低振幅のものと5mV程度のものが同一筋に混在しており, 干渉波は減少傾向が認められた. 安静時の自発放電は認められなかった. 筋生検で, 大小不同と小群集萎縮を認め, 萎縮線維を中心にRVを多数認めた.

\*東京都立神経病院

\*\*東京都立神経病院神経内科

\*\*\*東京都神経科学研究所臨床病理

症例：SS 65才 男(NHS-1148)  
 主訴：言語障害、運動失調、筋萎縮  
 家族歴：妹と長女Joseph 病の遺伝子異常  
 経過：47才歩行時ふらつき、53才言語障害  
 55才精神症状、60才眼球運動障害、  
 筋萎縮



眼瞼下垂、眼球運動障害  
 (逆風F症候群)  
 腱反射：初期亢進、  
 その後徐々に低下)  
 Babinski(+)、尿失禁、梗死索

図1 症例1, SSの概略

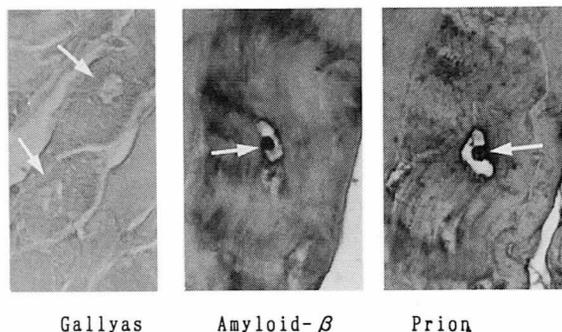


図3 症例1のRVの染色, 左から Gallyas, Amyloid-β蛋白, prion蛋白

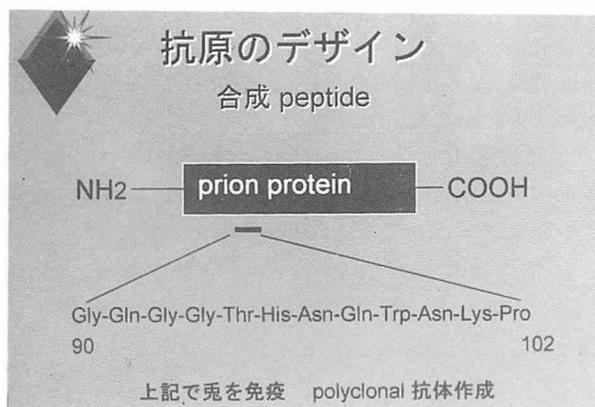


図2 抗prion抗体を作成した時の抗原のデザイン

経過：優性遺伝形式をとる小脳変成症で核上性の眼球運動障害を強く認める点から小脳変成症についてはJoseph病を考えていた。しかし、顔面筋萎縮がみられたこと、筋生検でRVが出現した点がJoseph病では報告がなく、他の神経筋疾患が合併した可能性を残していた。その後、Joseph病の遺伝子診断が確立した段階で、本人及び妹、長女がJoseph病の遺伝子異常を保有していることが明らかになった。

また、H6年度に痴呆を伴った家族性小脳変成症という観点から prion 遺伝子を4組の primer を用いた PCR 法にて検索したところ、5'近傍に遺伝子異常があることが示唆されたが、既知の遺伝子変異と一致しないものであった。

以上より、本例は Joseph 病の遺伝子異常と prion 蛋白の遺伝子異常が併存した例と考えた。RV について Askanas らは免疫染色にて prion 蛋白が証明されると報告していたので、本例の RV 形成と prion 蛋白の遺伝子異常との間に何らかの関連があるのではないかと考え、上記の合成 peptide を作成し、家兔にて抗体を得て骨格筋を免疫組織学的に検索した。その結果、RV の光顕的封入体と思われる部位に prion 蛋白の免疫活性を認めた。すなわち、異常な prion 蛋白遺伝子により異常な prion 蛋白が産生され、RV 内に沈着した可能性が示唆された。筋内の RV の形成は、Joseph 病とは独立したできごとと考えた。以上のことを H6 年度の班会議にて報告した。

H7 年度に入り、上記症例について ubiquitin や amyloid-β 蛋白の発現を免疫組織学的に検討したところ、いずれも発現していることが確かめられ、Askanas や Chou らの IBM における知見に一致することが分かった。そのことから、当施設で経験された

表 ND: 未試行

NHS	120	250	611	852	964	981	1148	1212	1706	2288
Diagn.	RVDM	RVDM	?	OPDM	OPDM	IBM	SCD+?	RVDM	RVDM	RVDM
Prion	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Ubiquitin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tau	+	+	+	ND	+	+	+	-	+	-
Amyloid-P	+	+	ND	+	+	-	+	-	+	-
Amyloid-β	-	+	ND	+	-	ND	+	-	-	-
Cystatin	+	-	+	ND	+	-	ND	-	ND	ND
メセナミン	-	-	ND	-	-	ND	-	-	-	-
ガリアス	-	-	ND	-	-	ND	-	-	-	-

10例のRVを有する疾患についても同様の免疫組織学的検討を加えた。結果は、次の表に示した。Prion蛋白の陽性例は10例中7例に及んだ。その臨床診断は、IBMのみならず、RVDMやOPDMに及んだ。Ubiquitinについては、RVを認めた全例で陽性であった。Amyloid- $\beta$ 蛋白も陽性例が多く、prion蛋白陽性例と一致する傾向があるようにも思えた。

Thioflavin-Tによるamyloid染色をNHS 120, 250, 852, 961, 981, 1148で実施して250, 981, 1148陽性であった。Amyloidの沈着がRVと一致しないものもみられた。

今回、免疫組織学的検討を進める過程で定量化は困難であるが、NHS-250などは、prion蛋白などの抗原性の発現が特に強かったので、この例を九州大学医学部脳検病理の北本先生に依頼し、prion蛋白遺伝子の変異を調べて頂いたところ、codon-129のMet-Valへの変異がホモ結合の状態が存在することが明らかになった。すなわち、RVを呈する例でprion蛋白の遺伝子異常が見つかった第2例となった。次にこの症例の概要を示す。

症例： MS 46y F (NHS-250) RVDM  
 経過： 16年前、下腿前面と手の脱力にて発症。  
 現在、下肢遠位部筋力0、近位3、上肢遠位3。  
 両親は従兄弟婚だが、家族に類症なく、精神症状を認めない。CPK 134IU。

Prion蛋白polymorphism  
 Codon129 Met-Val(Val/Val)ホモ

図4 症例2の概略，筋生検 Gomori-trichrome 変法とNADH-TR，筋電図にて上肢の第1背側骨間筋に筋原性変化をみる。

症例2： M. S. 46歳女性 (NHS-250)

主訴：四肢遠位部の筋萎縮

病歴：30歳頃、下腿前面と手の筋萎縮にて発症、緩徐に進行し最近では、近位筋にも脱力を生じ、車椅子生活となった。

現症：意識知能に問題なく、顔面筋や舌に萎縮を認めない。胸鎖乳突筋に萎縮を認めるが、僧帽筋や肩甲周囲筋には有意な萎縮は認められない。筋力は上肢近位部で3/5程度、遠位で3/5程度、下肢近位も3/5、下肢遠位は0/5であった。知覚障害や排尿排便障害・協調運動障害は認めなかった。

検査：CK値の上昇はなく、筋電図では遠位有意の筋

原性パターンであった。筋生検では、筋線維の大小不同が著明で萎縮線維にRVを多数認めたが、壊死・再生現象や炎症細胞浸潤はほとんど認めなかった。

経過：臨床症状と筋生検の結果よりRVDMと診断し、その後他院に転院となった。本例も10年以上前の症例であるが、今回の免疫組織学的検索で、prion蛋白とamyloid蛋白が光顕的封入体に強く染まるため、筋生検の凍結切片よりDNAを抽出し、九大に解析を依頼して上記の結果を得た。

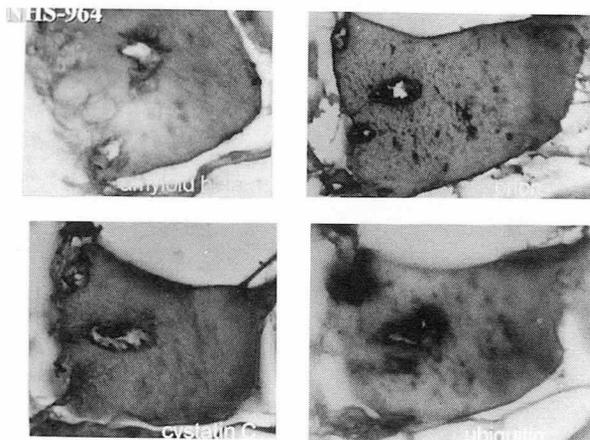


図5 別の例の染色結果，左上 amyloid- $\beta$ ，右上 prion蛋白，左下Cystatin-C，右下 ubiquitin いずれも陽性で，この例では cystatin-C と ubiquitin が光顕的封入体に染まる。

### まとめ

各抗体での陽性率は、Prion 7/10, Ubiquitin 10/10, tau 5/9, Amyloid-P 6/9, Amyloid- $\beta$  3/8, Cystatin 3/6であった。Thioflavin-Tによる amyloid 染色でRVは染まるが、さらにRVから離れた部位に蛍光が認められる場合があった。メセナミンとガリアスは陽性例がなかった。以上より、RVでの amyloid 蛋白関連物質では、prionの発現頻度が最も高く、tau蛋白と amyloid- $\beta$ 蛋白は多少低かった。Thioflavin-Tの結果から、一部のRVにのみ amyloid が蓄積しており、またこのような疾患においては、RV以外にも amyloid が蓄積していることが示唆された。老人班やNFTなどとは、アミロイド生成の機構に違いが示唆された。

### 参考文献

- 1) Chou SM: Inclusion body myositis. Baillieres Clin Neurol 2: 557-577, 1993.
- 2) Askanas V and Engel WK: New advances in inclusion body myositis. Crr Opin Rheumatol 5: 732-741, 1993.

## 27) 三好型遠位型筋ジストロフィーの遺伝子解析

水野美邦\*

研究協力者 平林久吾\*\* 荒畑喜一\*\* Brown, R. H. Jr. \*\*\*

### はじめに

三好型遠位型筋ジストロフィーすなわち Miyoshi distal muscular dystrophy (MDMD) は1967年三好らにより初めて家族例が報告され、その後1977年に一疾患単位として提唱された常染色体劣性遺伝疾患である。三好らの報告によれば、四国での推定される有病率は10万人に0.5人である。本症は日本のみならず、東アジア、欧米、北アフリカにも存在する。(MDMDの臨床特徴)発症年齢は12~35歳にわたるが、多くの例(80%)では15~20歳であり、常染色体劣性遺伝形式をとる。臨床的には早期より選択的に腓腹筋、ヒラメ筋の筋力低下と筋萎縮を認め、進行期には下肢近位筋や上肢筋も侵されることを特徴とする。中枢および末梢神経に異常は認めない。検査所見では血清CK値は正常の10~150倍と高値を示す。筋病理は、壊死、再生像を含む一般的な筋ジストロフィーの特徴を示す。

### 目 的

1. 平成6年本研究で、MDMDの原因遺伝子を解明する第一歩として、連鎖解析を行いその遺伝子座を明らかにしたため報告する。
2. 平成7年D2S291が2p13.1にmapされたことより、MDMDの原因遺伝子は第2染色体短腕13領域に存在することが判明した。このことより、平成7年本研究で我々はMDMDの原因遺伝子を同定するため、MDMDのcandidate geneとして2p13にmapされている遺伝子に焦点をあて、positional candidate approach (PCA)を試みたため報告する。

### 方 法

1. MDMDの連鎖解析：我々はMDMDの遺伝子座の決定を行うにあたり、マイクロサテライトDNA多形(dinucleotide-tetranucleotide repeat polymorphisms)を利用した連鎖解析を行った。その結果はVAX4500 computer/Lipin version 2.1 data management program及びLIPEDを用いて解析した。

今回の対象は近親婚のある家系、ないしは両親と複数の同胞のいる家系を選抜し、近親婚5家系を含む12家系(内訳は、日本人5家系、欧米人5家系、チュニジア人2家系)の総数88例で、うち患者は35例であった。検索可能なsimple repeat polymorphisms DNA多形マーカーを約20センチモルガン(cM)間隔で設定し、連鎖解析を全ての常染色体にわたって行った。

2. MDMDの遺伝子座が第2染色体短腕13領域にmapされたことより、第2染色体短腕13領域にmapされている遺伝子のうち筋細胞で発現しているものはMDMDの原因遺伝子として可能性を持つ。既に第2染色体短腕13領域にmapされている遺伝子群として、transforming growth factor alpha (TGFA), thyroid peroxidase, annexin4, early growth response 4, acta 3, hexikinase 2, orx 1, madが知られており、そして第2染色体短腕にmapされているが、明確な染色体上の位置が示されていない膜関連蛋白質として、syndecan, integrin alpha-3, integrin alpha-6, integrin beta-6, が判明している。今回我々は、MDMDのcandidate geneとして2p13にmapされている遺伝子に焦点をあてPCAを試みた。対象はマイクロサテライト多形マーカーD2S291にて連鎖することを確認した近親婚5家系を含む、MDMD12家系(内訳は、正常者4例、保因者28例、発症者22例)合計54例を用いた。第2染色体短腕13領域にmapされている遺伝子群のうち細胞発育に関連し、epidermic growth factor receptorに結合するTGFA、及びファイブロネクチンと結合し、fibroblast growth factorと複合体を形成する膜関連蛋白質syndecanについて遺伝子解析を行った。二つの遺伝子の各々のエクソンをはさむプライマーを設定し、PCR法にて増幅した。PCR産物のサイズはsequencing gelにて同定し、欠損や挿入を調べた。さらにSSCP法にて点変異を含む遺伝子異常の検索を行った。TGFAはintron-exon borderを含むプライマーを設定し、syndecanはexon内でプライマーを設定した。

### 結 果

MDMDの連鎖解析の結果：図1は連鎖解析の結果のま

\*順天堂大学医学部脳神経内科  
\*\*国立精神・神経センター神経研究所  
\*\*\*MGH, ハーバード大学医学部

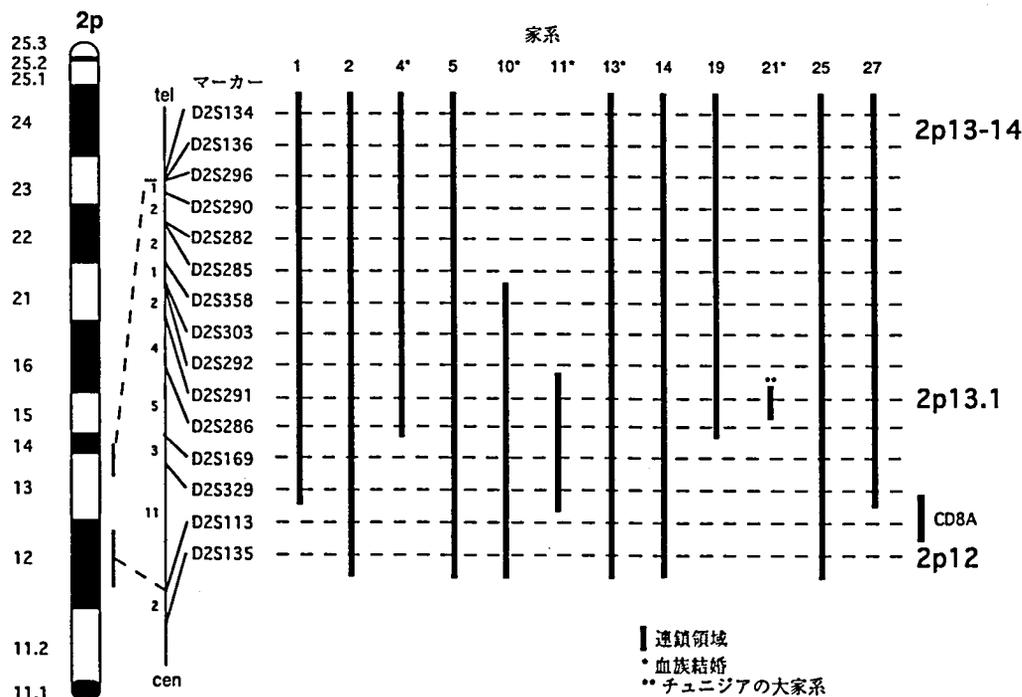


図 1

とめである。左側にマーカーの順位とそのマーカー間の genetic distance を示している。記載した 15 個のマーカーの順位は Genethon が発表したものを使用している。第 2 染色体短腕 12-14 に map された 15 種のマーカーはすべて MDMD と有意の連鎖を示し D2S291 ( $Z_{max}=15.3$ ,  $\theta=0$ ) で最大の lod score を得た。同じく D2S286 ( $Z_{max}=10.7$ ,  $\theta=0$ ), 及び D2S292 ( $Z_{max}=7.2$ ,  $\theta=0.5$ ) でそれぞれ高い lod score を得ている。縦のバーは各々の家族において連鎖の認められた領域を示している。例えば family 2 では、検索したマーカーに対して組み替えなしに連鎖を認めたが、family 11 では D2S291-D2S292 の間と D2S329-D2S113 の間でそれぞれ組み替えが起こった。マーカー D2S291 は全ての家系と linkage した。D2S291 の約 2 cM telomeric side の D2S286 は 2 家系と linkage がなく、D2S291 の約 4 cM centromeric side の D2S292 は family 21 で組み替えを認めた。つまり、MDMD の責任遺伝子は D2S292 と D2S286 の間、約 6cM の間に存在することが判明した。このことより MDMD の遺伝子座は 2p12~14 に map された。MDMD の PCA の結果：TGFA 及び syndecan の PCR により増幅された各エクソンサイズはゲノム DNA のものと一致しており、欠損は認められなかった。

SSCP 法による解析ではグリセロールの濃度を変えても mobility shift は認めず、点変異は除外された。

### 結 論

MDMD の原因遺伝子は第 2 染色体短腕 13 領域に存在する。しかしながら transforming growth factor alpha (TGFA) 及び, syndecan には MDMD 家系において、遺伝子変異は見いだせなかった。今後さらにその他の遺伝子についても検索していくつもりである。

### 文 献

- 1) Bejaoui K, et al: Neurology 45, 768, 1995.
- 2) Bashir R, et al: Hum Mol Genet 3, 455, 1994.
- 3) Miyoshi K, et al: Brain 109, 31, 1986.
- 4) Weissenbach J, et al: Nature 359, 794, 1992.
- 5) Gyapay G, et al: Nature Genet 7, 246, 1994.
- 6) Trofatter JA, et al: AM J Hum Genet 39, 147, 1986.
- 7) Ott J: Am J Hum Genet 26, 588, 1974.
- 8) 三好和夫ほか: 日本臨床 35, 3922, 1977.
- 9) 三好和夫ほか: 日人遺誌 12, 113, 1967.

## V. 筋緊張性ジストロフィー, その他(1)

## 28) ミオトニンプロテインキナーゼ (MtPK) cDNA 導入筋芽細胞における筋関連蛋白遺伝子の発現解析

寺尾 壽夫\*

研究協力者 白 杵 扶佐子\*<sup>\*\*\*</sup> 齊 藤 直 人\*\*  
笹 川 昇\*\* 石 浦 章 一\*\*

### はじめに

筋緊張性ジストロフィー (DM) の原因遺伝子は常染色体 19q13.3 に存在するミオトニンプロテインキナーゼ (MtPK) であることが 1992 年に同定された<sup>1-3)</sup>。MtPK はトリプレット CTG のリピートが 3' 非翻訳領域中にあり、そのリピート数と症状に比例関係があることが認められている。MtPK は、その塩基配列よりプロテインキナーゼと命名されたが、真にキナーゼであるのか、MtPK の生理作用に関しては未だ不明な部分が多く残されている。そこで今回、株化された筋芽細胞にヒト MtPK の cDNA を導入し stable に MtPK を発現させた筋芽細胞を用いて、MtPK 変異遺伝子が筋肉に及ぼす影響を検討した。

### 方 法

遺伝子導入の方法として、カチオン性リポソームである Lipofectin を用いてリポソーム核酸複合体を作らせ、cDNA を細胞に取り込ませる方法をとった。MtPK 変異遺伝子としては、これまでのところ CTG リピート数を人工的に増幅させることに成功した最大値である 46 個のものをを用いた<sup>4)</sup>。この変異ヒト MtPK cDNA の全長をプラスミド pSRD に構築したものと、neomycin 耐性遺伝子を組み込ませたプラスミド pSV2-neo を Lipofectin とともにマウス筋芽細胞株 C2C12 に co-transfection した。control としてはインサイトフリーの pSRD プラスミドと pSV2-neo を導入した筋芽細胞株 C2C12 を用いた。co-transfection 後 16hr culture した後増殖培地へ変換、48hr の培養後、G418 400  $\mu$ g/ml にて neomycin 耐性細胞の選択培養を行った。このようにして得られた G418 耐性細胞株を、抗 MtPK 抗体による immunoblot 及び CTG リピート部をはさむ primer にて行った RT-PCR にて MtPK 変異遺伝子の発現解析を行い、MtPK<sub>46</sub> 安定発

現細胞株を得た。

この MtPK<sub>46</sub> 安定発現細胞株における筋分化過程での MtPK 及び筋関連蛋白遺伝子 (cardiac  $\alpha$ -actin, myogenin, syntrophin-1) の発現を RT-PCR 法にて検討した。10cm シャーレに  $3 \times 10^5$  個の cell を plate して増殖培地で培養 1 日目の myoblastic stage (Mb), 融合培地へ変換 1 日目 (F1), 4 日目 (F4) の total RNA を抽出し、それぞれの primer にて RT-PCR を行った。MtPK の primer は kinase domain にて作成した。G3PDH は positive control として用いた。

また、筋芽細胞の融合度を細胞組織化学的に検討した。gelatin-coat のカバーガラスへ細胞を plate し、1 日後融合培地へ変換、変換 1 日目から 4 日目で各々細胞を固定し、toluidine blue O 染色後、random に 6 視野を選択、核数を評価した。すなわち、3 個以上の核をもつ細胞を融合したのものとして、これらの核数と total の核数の比を fusion index として表した。

### 結果及び考察

MtPK 変異遺伝子の発現解析にて、control である C2C12-neo は RT-PCR, immunoblot とも negative であった。変異遺伝子導入株 C2C12-MtPK<sub>46</sub> では RT-PCR において予想される 337bp のバンドを、immunoblot にて約 70kDa の MtPK 蛋白の発現を認めた。MtPK 蛋白は、分化培地へ変換 7 日目においても同様に約 70kDa の蛋白として認められた。

増殖曲線より得られた doubling time は MtPK<sub>46</sub> 導入株が 16.7hrs, control が 18hrs と MtPK<sub>46</sub> 導入株がやや早い増殖を示した。

このような MtPK<sub>46</sub> 導入株における筋分化過程における MtPK 及び筋関連蛋白遺伝子の発現を RT-PCR 法にて検討した。図 1 に結果を示す。MtPK は、control では negative, MtPK<sub>46</sub> 導入株では myoblast より発現を認め、融合培地へ変換 4 日目まで発現量には変化を認めなかった。cardiac  $\alpha$ -actin は control では分化とともに発現の増強がみられたが、MtPK<sub>46</sub> 導入株

\* 帝京大学医学部神経内科

\*\* 東京大学分子細胞生物学研究所

\*\*\* (現) 国立水俣病研究センター

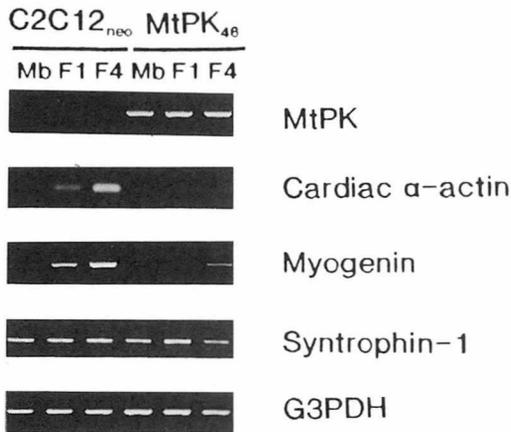


図1 RT-PCRを用いた筋分化過程における筋関連蛋白質遺伝子の発現  
Mb; myoblastic stage, F1; 融合培地へ変換1日目, F4; 融合培地へ変換4日目

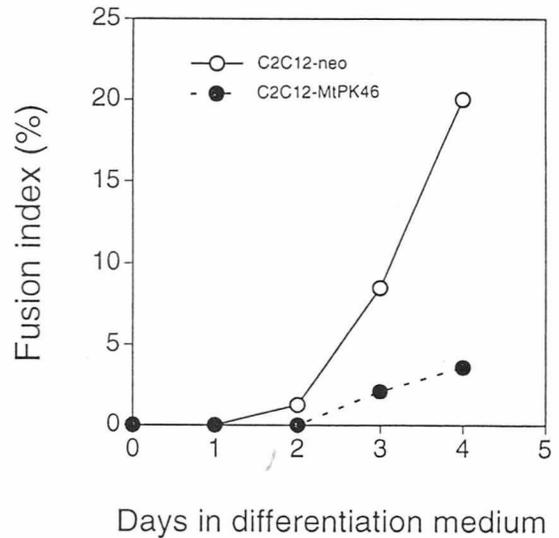


図3 分化培地へ変換後のfusion indexの変化

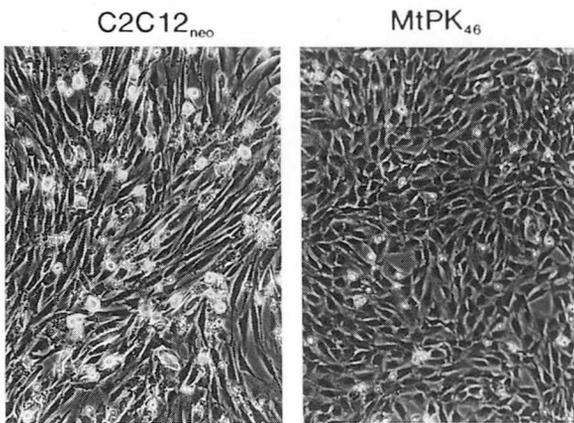


図2 分化培地へ変換4日目の位相差顕微鏡写真(×75)  
controlでは、多核の筋管細胞の形成がみられるが、MtPK<sub>46</sub>cDNA導入株では融合の遅れを認める。

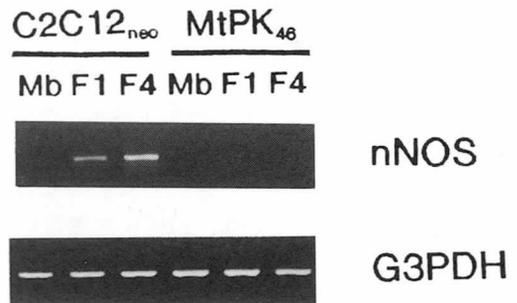


図4 分化過程における neuronal NO synthetase (nNOS) の発現  
Mb; myoblastic stage, F1; 融合培地へ変換1日目, F4; 融合培地へ変換4日目

では融合培地へ変換4日目までほとんど発現を認めなかった。分化マーカーである myogenin は control では分化とともに発現の増強を認めたが、MtPK<sub>46</sub>導入株では発現の遅れを認めた。syntrophin-1 は筋芽細胞より発現を認め、MtPK<sub>46</sub>導入株でも同様に発現が認められた。分化で影響をうけない G3PDH は control, MtPK<sub>46</sub>導入株でもすべてのレーンで同様に発現が認められた。

従って、導入筋芽細胞株 C2C12-MtPK<sub>46</sub>では、分化過程において筋関連蛋白質遺伝子の発現に遅れが認められることが明らかになった。

融合培地へ変換4日目の位相差顕微鏡写真を図2に示す。controlでは多核のmyotubeの形成が認められたが、MtPK<sub>46</sub>導入株ではmyotubeの形成は稀であ

た。この筋芽細胞の融合度を toluidine blue O 染色後、定量的に評価した結果を図3に示す。controlでは2日目より fusion index は増加したが、MtPK<sub>46</sub>導入株では、融合の遅れが明らかであった。

筋芽細胞の融合に関する factor として、最近 nitric oxide が報告されている<sup>5)</sup>。nitric oxide は NO synthetase (NOS) により合成されるが、筋芽細胞の融合の際に一過性に NOS が増加すること、また、筋肉組織に存在する NOS は neuronal type で type II fiber の sarcolemma に存在すること<sup>6)</sup>が報告され、筋肉における NO の作用が注目されている。そこで、neuronal type の NOS に関し primer を作成し、各々の cell line の分化過程における NOS mRNA の変化を検討した。図4に結果を示す。controlでは分化にともない NOS mRNA は増加を認めたが、MtPK<sub>46</sub>導入株では融合培地へ変換4日目までまったく negative であった。

以上より、導入株 C2C12-MtPK<sub>46</sub>では分化抑制がおこることが明らかになった。この結果は、myotonic

dystrophyにおける筋線維の未熟性という生検筋の組織化学的所見と一致すると思われる。分化抑制の原因に関しては、NOS mRNAの発現がみられなかったことと併せ、シグナル伝達系を含めたさらなる検討が必要である。

#### ま と め

CTGリピートを46個延長させたヒトMtPK変異遺伝子の全長を導入した筋芽細胞株C2C12-MtPK<sub>46</sub>では、分化過程において筋関連蛋白遺伝子の発現の遅れや形態学的に融合の遅れが認められるなど、分化抑制がおこっていることが明らかになった。

#### 文 献

- 1) Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, et al: Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68: 799-808, 1992.
- 2) Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG, et al: An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255: 1256-1258, 1992.
- 3) Jansen G, Mahadevan M, Amemiya, et al: Characterization of the myotonic dystrophy region predicts multiple protein isoform-encoding mRNAs. *Nature Genetics* 1: 261-266, 1992.
- 4) Sasagawa N, Sorimachi H, Maruyama K, et al: Expression of a novel human myotonin protein kinase (MtPK) cDNA clone which encodes a protein with a thymopoietin-like domain in COS cells. *FEBS Lett* 351: 22-26, 1994.
- 5) Lee KH, Baek MY, Moon KY, et al: Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion. *J Biol Chem* 269: 14371-14374, 1994.
- 6) Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, et al: Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372: 546-548, 1994.

## 29) Myotonin Protein Kinase (MtPK) の *in vivo* 及び *in vitro* における局在

小林 高 義\*

研究協力者 下川 雅 文\* 亀田 典 佳\* 山本 雅 彦\*  
大野 伸 一\*\* 植田 秀 穂\*\* 石浦 章 一\*\*  
笹川 昇\*\*\* 反町 洋 之\*\*\* 鈴木 紘 一\*\*\*

### 目 的

筋緊張性ジストロフィー (DM) の原因遺伝子は、19番染色体長腕に存在し、serine, threonine protein kinase と monology を有することから、myotonin protein kinase (MtPK) と名付けられているが、その機能、局在に関しては十分解明されていない。今回、我々は、MtPK の C 末端領域のポリクローナル抗体を作成し、*in vivo* 及び *in vitro* における局在を、共焦点レーザー顕微鏡による免疫組織化学的検討を行うと共に、DM 筋における MtPK の局在についても検討を行ったので報告する。

### 材料及び方法

#### (1) MtPK polyclonal antibody の作成

Sasagawa ら (1994)<sup>1)</sup> がクローニングを行った cDNA の配列を基にして C 末端の合成ペプチド (SGAAQEPPALPEP) を作成し、これを兔に免疫し、ポリクローナル抗体を作成し、affinity column に通し精製して使用した。

#### (2) Western blot による MtPK の生化学的同定

Cos-1 細胞に MtPK cDNA を導入し、full length の MtPK を得ると共に、ヒト筋肉を超遠心によって、膜及び可溶性分画に分けて Western blot で我々の作成した抗体の特異性に関する検討を行った。

#### (3) ヒト筋組織に対する免疫組織化学的検討及び免疫電顕的検討

材料として、神経筋疾患を有しない剖検時に取られた筋組織及び組織化学的に非特異的変化のみの生検筋及び DM 筋に関して検討を行った。

免疫組織化学は、一次抗体として、MtPK のポリクローナル抗体、ヒトミオシンに対するモノクローナル抗体、F-actin に対してはロダミンでラベルした phalloidin を使用し、更に神経筋接合部における

MtPK の局在の有無を検討するために  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -BGT) を使用した。2次抗体としては FITC 及び rhodamin を使用し、MtPK/ミオシン、MtPK/アクチン、MtPK/ $\alpha$ -BGT の 2重染色で MtPK の局在の検討を行った。

共焦点レーザー顕微鏡は Carl-Zeiss 社製 LSM310 を使用し、FITC ラベルの蛍光染色は 488nm 励起波長を用い、525nm の帯域で測定、rhodamin ラベルの蛍光染色は 543nm の励起波長で 590nm の帯域で測定を行い、単独、重ね合わせ像、微分干渉像をとり検討を行った。

免疫電顕的検討のために、光顕的観察で使用したものと同一の control 筋及び DM 筋を使用して、immunoperoxidase 法及び immunogold 法により免疫染色し、Hitachi H-600 及び H-8100 を使用して超微構造的検討を行った。

#### (4) 培養ヒト筋細胞に対する免疫組織化学的検討

内因性筋疾患を有しないと考えられた生検筋の一部を使用した。ヒト筋細胞の培養は以前より報告している如く、explant-replantation 法により筋単層培養を作成し、更に、ラット胎児脊髄片を併置して innervation culture を作成した。

免疫組織化学は、ヒト生検筋と同様に MtPK/ミオシン、MtPK/アクチン、MtPK/ $\alpha$ -BGT の 2重染色を行い、MtPK の局在の変化に関する検討を行った。

### 結 果

#### (1) Western blot による MtPK の同定 (図 1)

Western blot による検討では、我々の抗体はヒト筋組織の 70kDa の膜分画及び 55kDa の可溶性分画を認識した。同時にこの抗体は、COS 細胞に cDNA を transfect して得られた 69kDa の full length の合成 MtPK fusion protein と特異的に反応しており、ヒト筋組織の 70kDa の膜分画には full length の MtPK が存在していると考えられた。

#### (2) ヒト骨格筋組織における MtPK の局在

\* 東京医科歯科大学医学部神経内科

\*\* 山梨医科大学第 1 解剖

\*\*\* 東京大学分子生物学研究所生体超高分子分野

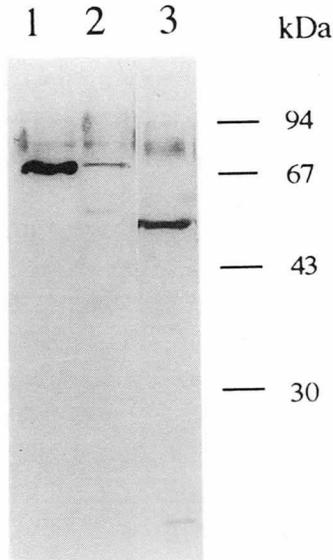


図1 Western blotによるMtPKの同定  
 lane 1: Cos-1 cellにMtPKのcDNAを導入して得られたMtPK  
 lane 2: ヒト骨格筋の膜分画  
 lane 3: ヒト骨格筋の可溶性分画

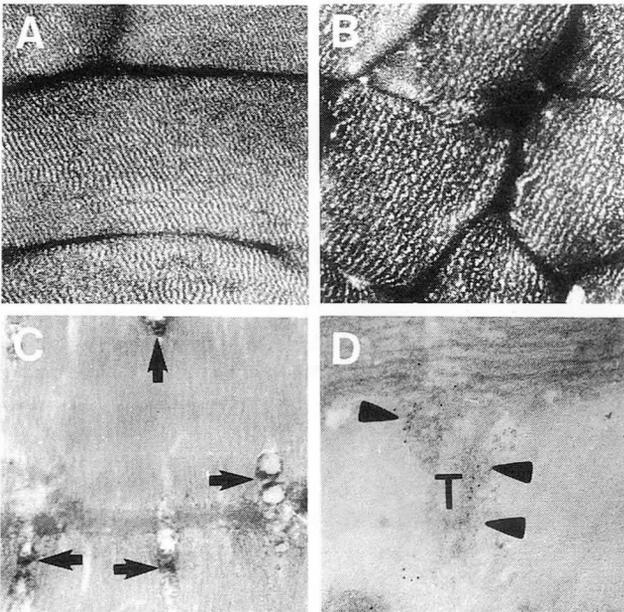


図2 正常筋組織におけるMtPKの局在  
 A, B: MtPKの免疫組織化学のヒト骨格筋縦断像(A)及び横断像(B)の光顕写真  
 C: MtPKのimmunoperoxidase法による電顕写真: Triadの部分のSRのterminal cisternaeに強い染色性(矢印)が認められる。  
 D: MtPKのimmunogold法による電顕写真: T管(T)の外側に5nmのgold particleの集積(矢印)が認められる。

MtPKの生検組織の単独染色では、縦断面ではband状に、横断面では顆粒状に染色され、細胞膜は染色されなかった(図2-A, B)。生検筋組織の2重染色による観察では、MtPKとミオシンでは、両者のbandの境界部分にcolocalizationがあり、Mtpkとアクチンでは、MtPKとアクチンのcolocalizationしているbandとアクチンのみのbandが交互に存在するのが観察された。この所見から、MtPKは、光顕的にはA帯とI帯の境界及びI帯にMtPKが強く局在していると考えられた。

更に免疫電顕によって、MtPKの超微構造的局在の検討を行ったが、MtPKはsarcoplasmic reticulum(SR)のterminal cisternaeに強く限局して存在した(図2-C, D)。

### (3) 培養ヒト筋細胞に対する免疫組織化学的検討

一方、培養下では、MtPKは未熟な筋管細胞では、核周辺あるいは細胞膜下に不規則に存在し、アクチン及びミオシンとの相互関係は明らかではないが、innervation後、横紋が形成された筋線維ではミオシンbandの間にMtPKは局在するようになり、アクチンbandとは2bandsがMtPK bandとcolocalizationがあり、次のbandがアクチンbandのみとなるtripletの配列となり、基本的にI帯に局在していくことが明らかとなった。

### (4) 組織及び培養下におけるMtPKの神経筋接合部における局在

ヒト骨格筋組織に対するMtPK/ $\alpha$ -BGTの二重染色による検討では、 $\alpha$ -BGTに一致したMtPKのcolocalizationの部位が認められ(図3)、また、innervation cultureにおいても位相差顕微鏡像の観察で神経終末と考えられる部位に一致して、MtPKと $\alpha$ -BGTがcolocalizationしている部位が観察された。

### (5) DM筋におけるMtPKの局在の変化

DM筋の光顕的観察では、MtPKの染色が正常組織において観察されるband状の染色がstreamingしている像が観察され(図4-A, B)、一部の筋線維ではMtPKの染色性の低下が認められた。免疫電顕による検討では、筋線維の構造がよく保たれている部位では、control筋と同様にtriadがよく保たれ、その部位のSRのterminal cisternaeにMtPKが強く限局していた(図3-C)が、筋線維の内部構造が乱れている部位では、膨化した膜系の集簇した像が観察され、その膨化した膜系の一部にMtPKの強い染色性が認められた(図4-D)。

### 考察及び結論

今まで報告されてきたMtPKの分子量は42~62kDaであり、MtPKのcDNAから推定される分子量より低

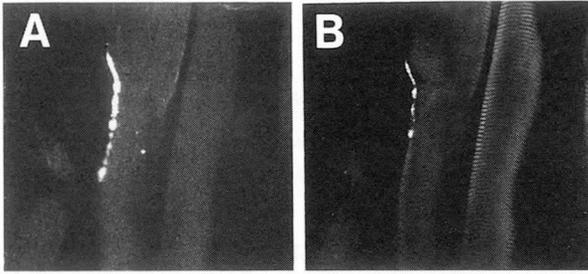


図3 正常筋組織における $\alpha$ -BGT (A), MtPK (B)の蛍光二重染色共焦点レーザー顕微鏡像

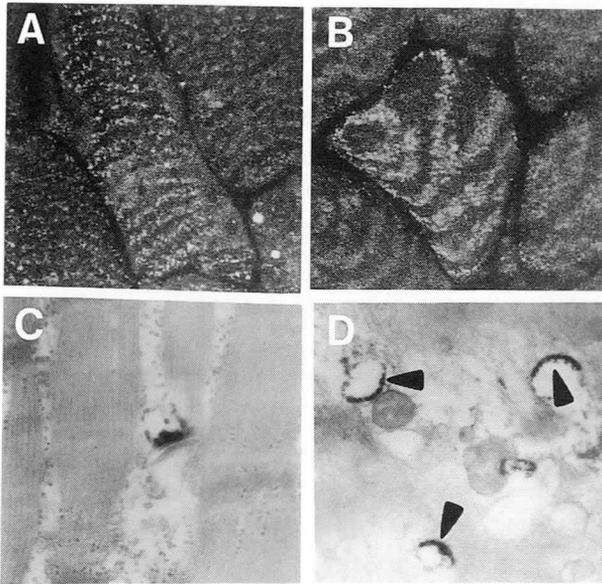


図4 筋緊張性ジストロフィー骨格筋組織におけるMtPKの局在  
A, B: MtPK免疫組織化学のDM筋縦断像(A)及び横断像(B)の光顕写真  
C, D: MtPKのimmunoperoxidase法による電顕写真

いものが多く報告されてきたが、最近 Whitingら<sup>2)</sup>, Maedaら<sup>3)</sup>は74, 82kDaあるいは71, 81kDaの分子量をもつMtPKが骨格筋、心筋にあることを報告している。今回我々が作成した抗体は、70kDaのfull lengthのMtPKを認識し、骨格筋組織の70kDaの膜分画の蛋白を認識する抗体である。いままで報告されている42~62kDaの蛋白及び我々の可溶性分画に存在スル55kDaの蛋白は、isoformあるいは分解産物である可能性が推測される。

今までに、MtPKの局在に関して共焦点レーザー顕微鏡及び電子顕微鏡による免疫組織化学的検討は行わ

れておらず、今回の我々の研究が初めての報告である。今回の我々の抗体による免疫組織化学的検討で特異的な点としては、この抗体では骨格筋の細胞膜は染色されず、光顕的にはMtPKはI帯及びA-I帯の境界に存在し、免疫電顕によってSRのterminal cisternaeに強く存在することが明らかにされたことである。更に、DM筋に関して同様に免疫組織化学的に検討を行ったが、DM筋においてもMtPKは、SRのterminal cisternaeに強く存在し、変性の強い筋線維では一部にMtPK染色陽性を示す膨化した膜系の集簇が観察された。SRは、細胞内のカルシウムの代謝調節、excitation-contraction couplingに重要な役割を果たしており、このようなDMでのSRの変化は、DMの筋変性及び、病態の発症機構を考える上で興味深い。

また、MtPKの局在に関しては、今まで骨格筋では神経筋接合部に存在するという報告がいくつかなされており、我々の抗体も神経筋接合部を認識していると考えられる。DM筋では、従来から形態学的に*in vivo*及び*in vitro*において神経筋接合部異常が報告されており<sup>4)</sup>、今後神経筋接合部におけるMtPKの機能と病態生理との関係を追究していくことが必要であると考えられる。

#### 文 献

- 1) Sasagawa N, Sorimachi H, Maruyama K, Arahata K, Ishiura S, et al: Expression of a novel human myotonic protein kinase (MtPK) cDNA clone which encodes a protein with a thymopoietin-like domain in COS cells. FEBS letters 351: 22-26, 1994.
- 2) Whiting EJ, Waring JD, Tamai K, Somerville MJ, Hincke M, et al: Characterization of myotonic dystrophy kinase (DMK) protein in human and rodent muscle and central nervous tissue. Human Mol Genet 4: 1063-1072, 1995.
- 3) Maeda M, Taft CS, Bush EW, Holder E, Bailey WM, et al: Identification, tissue-specific expression, and subcellular localization of the 30- and 71- kDa forms of myotonic dystrophy kinase protein. J Biol Chem 270: 20246-20249, 1995.
- 4) Kobayashi T, Askanas V, Saito K, Engel WK and Ishikawa K: Abnormalities of aneural and innervated cultured muscle fibers from patients with myotonic atrophy (dystrophy). Arch Neurol 47: 893-896, 1990.

## 30) CTG リピートの遺伝子発現に及ぼす影響の解析

小林 卓郎\*

研究協力者 古谷 博和\* 長野 祐久\*  
山田 猛\* 林 健志\*\*

### はじめに

筋緊張性ジストロフィー(以下MyDと略す)はCTGリピートの延長で発症する常染色体優性の遺伝性疾患であり、近年ではHuntington 舞踏病, DRPLA, Machado-Joseph 病, 脆弱X染色体症候群, SCA1, 球脊髄性筋萎縮症などとともにリピート病として分類されている。しかし、この中でMyDと脆弱X染色体症候群以外のリピート病はCAGリピートの延長であり、しかもこの領域はアミノ酸に翻訳されるのでポリグルタミン病というgain-of-functionの概念でとらえられている。それに対してMyDではCTGリピートがミオトニンカイネース遺伝子(以下MKと略す)の3'非翻訳領域にあり、しかもその延長の程度が激しい点などが他のリピート病と異なっている<sup>1)</sup>。

またMyDは常染色体優性の遺伝性疾患であるので、病因がgain-of-functionでないとすると、リピートの延長が疾患発症機序にどのようにしてかかわってくるか興味もたれる。

そこでまずCTGの延長が遺伝子発現に及ぼす影響を調べるために、allele別のMK遺伝子の発現をMyD患者の種々の組織で検討し、リピートの存在が変異型allele, 野生型alleleのMK遺伝子にどのような影響を及ぼすかを検討した。次に既知の遺伝子をリポーター遺伝子として用い、その3'非翻訳領域に人工的にCTGリピートを挿入したコンストラクトを作成し、リポーター遺伝子の発現を定量した。

### 対象・方法

#### 1) ゲノムDNAおよびtotal RNAの抽出

MK遺伝子ハプロタイプ解析の結果、MKcDNA内にBsrI RFLP<sup>2),3)</sup>をヘテロで有するMyD患者(2例)、先天性MyD(1例)の末梢血白血球と線維芽細胞よりゲノムDNAとtotal RNAを抽出した。次にBsrI RFLPをヘテロで有する凍結剖検脳(2例)よりtotal RNAを抽出した。ゲノムDNAはハプロタイプの解析及びCTGリピートのクローニングに、total RNAは

RT-PCRに用いた。2) RT-PCR法によるallele別mRNA発現量の解析

延長したCTGリピートのあるalleleとポリモルフィズムとの関連を調べるためにポリモルフィズムをヘテロで有するMyD患者のゲノムDNAを制限酵素Hind III, Xba Iで処理してサザンブロッティングを行い、同時にゲル電気泳動を行った同じサンプルから正常alleleを切り出し、ポリモルフィズム周辺(257bp)の領域を増幅した後にポリモルフィズムの有無を検出し、それがCTGリピートのある変異alleleか、野生型alleleにあるかを決定した。

次にcDNA合成キット(ファーマシア社)のランダムプライマーを用いてcDNAを合成した後、これをテンプレートとしてポリモルフィズム周辺(257bp)の領域を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ でアイソトープラベルしてPCRを行い、5サイクルごとに一部のサンプルを取り出して制限酵素Bsr Iで切断して10%アクリルアミドゲルで電気泳動後オートラジオグラフィを行い、バンドをスキナーで読み取った後、NIH imageをソフトウェアとして用いてその濃度を解析し、mRNA発現量のallele別のMK遺伝子発現量を比較した。なお、手技の詳細に関しては既に平成5年度研究報告書に報告している<sup>4)</sup>。

#### 3) CTGリピートを挿入した遺伝子発現系の作成

リポーター遺伝子としてはリソソーム酵素のgalactosylceramidase (GALC)を用いた<sup>5)~7)</sup>。まずリピート領域をサブクローニングするためにMyD患者のMK遺伝子3'側非翻訳領域をゲノムDNAをテンプレートとしてPCR法で増幅後制限酵素Msp Iで処理して、一旦pUC19のSal Iサイトにサブクローニングし、シーケンスにてリピートの数を確認した。その後、このCTGリピートをCMVプロモーターとSV40 Oriを有するpRC/CMV真核細胞発現ベクター(In Vitrogen社)のXba I, Apa Iサイトにサブクローニングして、さらにリピートの5'上流のXba Iサイトに野生型(作成したクローンをWT, Rep(+))で示す。以下同様)、およびGALC活性を全く有しない270Asp変異を有する変異型GALC cDNA(MT, Rep(+))を挿入挿入した。またこれとは別に野生型GALCcDNAの

\*九州大学医学部脳神経内科

\*\*九州大学遺伝情報研究施設・ゲノム解析部門

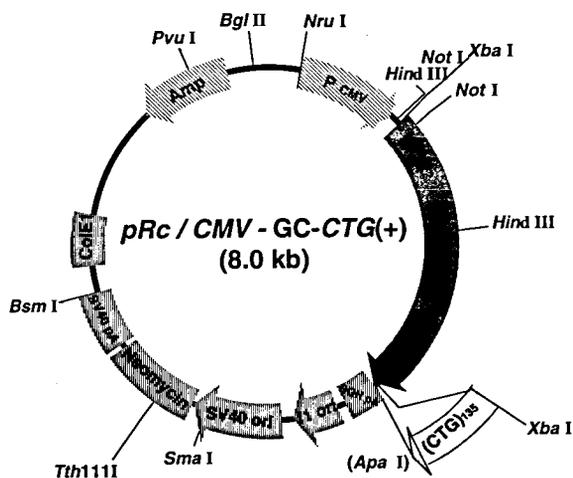


図1 CTGリピートをGALCcDNAの3'下流に挿入したpRc/CMV真核細胞発現ベクターの構造

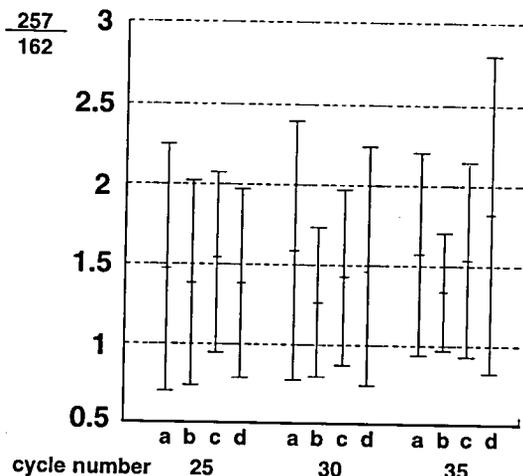
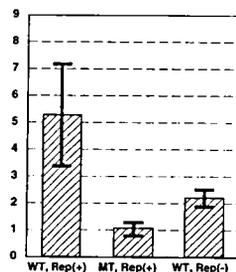


図2 MK遺伝子のallele別発現の検討

Bsr I RFLPをヘテロで有する2名のMyD患者(既にMKcDNA上のBsr I (+)のRFLPとCTGリピートの延長が同じallele上にあることが確認されている)の線維芽細胞(a, b)と末梢白血球(c, d)のmRNAをテンプレートとしてBsr I RFLP近傍(257bp)を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ でアイソトープラベルしたRT-PCRで増幅した。25, 30, 35サイクルで一部のサンプルを取り出してBsr Iで切断し、10%アクリルアミドゲルで電気泳動後、オートラジオグラフィーを行った。図には257bpのサイズのバンドの濃度を162bpのサイズのバンドで割った値をmean  $\pm$  SDで示している。実験はそれぞれ6回行った。

CTGリピートのあるalleleのMK遺伝子の発現量は162bpのサイズのバンドに反映され、リピートのないalleleのMK遺伝子の発現量は257bpのサイズのバンドに反映されている。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ はPCR断片にランダムに取り込まれるので、双方のalleleが同量発現している、理論上257/162( $\approx 1.58$ )の値をとるはずである。



	1	2	3	4
WT, Rep(+)	3.97	3.45	4.93	8.6
MT, Rep(+)	0.9	1.6	1.07	1.5
WT, Rep(-)	2.44	2.61	2.22	3.14

図3 CTGリピートの5'上流リポーター遺伝子(GALC)発現に及ぼす影響。(WT, Rep(+)), (MT, Rep(+)), (WT, Rep(-))のベクターのGALC活性のバックグラウンド(COS-I細胞のみの活性)に対する比を示した。測定は4回行い、表にはそのデータ、図にはmean  $\pm$  SDを示した。

みをpRc/CMVベクターに入れたもの(WT, Rep(-))も作成した(図1)。

これらのDNA 2  $\mu\text{g}$ を5  $\mu\text{l}$ のLipofectamin (BRL社)でCOS-I細胞にトランスフェクションし、3日後に回収してそのGALC活性を測定した。

## 結果

### 1) MK遺伝子のallele別発現の検討

CTGリピートとBsr I RFLPとの相関を検討した結果、5例のサンプルではこれまでの報告とおり二つの変異は同じalleleに存在することが判明し、CTGリピートのある変異alleleのハプロタイプが均一であることが確認された<sup>6)</sup>。

また、このRFLPを用いてallele別の発現を脳組織、末梢白血球、線維芽細胞の間で検討したが、変異alleleと野生型alleleとでMK mRNAの発現量に差は認められなかった(図2)。また、通常のMyDと先天性MyDの間にも差は認められなかった。

### 2) CTGリピートの5'上流遺伝子発現に及ぼす影響

サブクローニングしたCTGリピートをシーケンスした結果、リピートは135回の繰り返し配列であることがわかった。またトランスフェクションの結果は表に示すようにCTGリピートの入った野生型(WT, Rep(+))ではリピートのないもの(WT, Rep(-))に比べて2.5倍近く高いGALC活性が得られた。一般にGALC酵素活性は蛋白の発現量に比例している、リピートが入ったベクターではリポーター遺伝子の発現量が増加していると考えられた(図3)。

## 考察

CTG配列の延長がMK遺伝子の発現に及ぼす影響に

関してはこれまでmRNAの増加<sup>3)</sup>, 減少<sup>9)</sup>, MK蛋白発現量の減少<sup>10)</sup>など種々の報告があり, いまだに定説が得られていない。

mRNAの3' 翻訳領域はmRNAの安定性や蛋白の翻訳時の効率に関与するなどの説があり, この領域に非常に安定した高次構造を形成するCTGリピートが存在することは遺伝子の発現に関して大きな影響を及ぼすことが考えられる<sup>11)12)</sup>。

患者の組織別にMK遺伝子のallele別発現の検討を行った結果からはMK遺伝子の発現は対立遺伝子の間で差がないことを示している。MyDは常染色体優性の疾患であるので, 仮にmRNAやMK蛋白の発現量の増減があるにしても, CTGの存在がトランスに働き対立遺伝子の発現をコントロールする可能性が示唆された。

そこでこのことに関して基礎的な研究を行うため, リピートの影響を真核細胞で容易に検出できるシステムとして, CTGリピートをpRC/CMV真核細胞発現ベクターに挿入した系を作成したが, その結果からはリピートはリポーター遺伝子に対してシスに働き, その発現量を増やす可能性が考えられた。

最近MK遺伝子の周辺には筋肉, 心筋および脳で発現する別の遺伝子がオーバーラップして存在する可能性が示唆されており<sup>13)</sup>, CTGリピートがMK遺伝子のみならず, これらの遺伝子やさらに周辺の遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性も考えられ, これらの遺伝子でmRNAの発現や蛋白の発現がどのように変化するか興味のもたれるところである。

もちろん今回の結果はMKとは異なる遺伝子, 異なるプロモーターの下で得られたものであり, 今後さらにリポータージーンやプロモーターを変え, 同様の結果が得られるかどうか調べて行く必要があると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Wieringa B: Myotonic dystrophy reviewed: back to the future? Hum Mol Genet 3(1): 1-7, 1994.
- 2) Mahadevan MS, Amemiya C, Jansen G, Sabourin L, Baird S, Neville CE, Wormskamp N, Sefers B, Batzer M, Lamerdin J, Jong P, Wieringa B and Korneluk RG: Structure and genetic sequence of the myotonic dystrophy (DM kinase) gene. Hum Mol Genet 2: 299-304, 1993.
- 3) Sabouri LA, Mahadevan MS, Narang M, Lee DS, Surh LC and Korneluk RG: Effect of the myotonic dystrophy (DM) mutation on mRNA levels of the DM. Nat Genet 4: 233-238, 1993.
- 4) 古谷博和, 小林卓郎, 林 健志, 後藤幾生.: 筋緊張性ジストロフィー症関連遺伝子の脳内発現の検討. "厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー及び類縁疾患の病態と治療法に関する研究" (高木班) 平成5年度研究報告書, 1994, PP 68-70.
- 5) Luzi P, Rafi MA and Wenger DA: Structure and organization of the human galactocerebrosidase (GALC) gene. Genomics 26: 407-409, 1995.
- 6) Chen YQ, Rafi MA, de Gala G and Wenger DA: Cloning and expression of cDNA encoding human galactocerebrosidase, the enzyme deficient in globoid cell leukodystrophy. Hum Mol Genet 2: 1841-1845, 1993.
- 7) Sakai N, Inui K, Fujii N, Fukushima H, Nishimoto J, Yanagihara I, Isegawa Y, Iwamatsu A and Okada S: Krabbe disease: isolation and characterization of a full-length cDNA human galactocerebrosidase. Biochem Biophys Res Commun 198: 485-491, 1994.
- 8) Neville CE, Mahadevan MS, Barcelo JM and Korneluk RG: High resolution genetic analysis suggests one ancestral predisposing haplotype for the origin of the myotonic dystrophy mutation. Hum Mol Genet 3: 45-51, 1994.
- 9) Fu Y-H, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs RA, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman MB, Scarlato G, Fenwick RG Jr and Caskey CT: Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. Science 260: 235-238, 1993.
- 10) Carango P, Noble JE, Marks HG and Funanage VL: Absence of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) mRNA as a result of a triplet repeat expansion in myotonic dystrophy. Genomics 18: 304-348, 1993.
- 11) Yu A, Dill J, Wirth SS, Huang G, Lee VH, Haworth IS and Mitas M: The trinucleotide repeat sequence d(GTC)<sub>15</sub> adopts a hairpin

- conformation. Nucl Acids Res 23 : 2706-2714, 1995.
- 12) Mitas M, Yu A, Dill J, Kamp TJ, Chambers EJ and Haworth IS : Hairpin properties of single-stranded DNA containing a GC-rich triplet repeat: (CTG)<sub>15</sub>. Nucl Acids Res 23 : 1050-1059, 1995.
- 13) Boucher CA, King SK, Carey N, Krahe R, Winchester CL, Rahman S, Creavin T, Meghji P, Bailey MES, Chartier FL, Brown SD, Siciliano MJ and Johnson KJ : A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)<sub>n</sub> repeat. Hum Mol Genet 4 : 1919-1925, 1995.

# 31) 三塩基対反復配列延長疾患の配列延長に関する解析

桃井 真里子\*

研究協力者 津留智彦\* 山形崇倫\*  
桃井隆\*\* 斉藤茂子\*

## はじめに

筋強直性ジストロフィー症 (DM) は病因遺伝子 MT-PK の 3' 端近傍の (CTG)<sub>n</sub> 配列の異常延長と関連することが解明されたが、他の三塩基対反復配列延長疾患と同様、配列延長の機構は不明である。これらの疾患においては特定の遺伝子の三塩基対反復配列の異常延長程度と臨床的重症度と相関すること、linkage analysis の結果と配列延長遺伝子座位が一致することなどから、特定遺伝子の配列延長と病態が関連することは明らかであるが、配列を延長させる機構に関しては不明である。この配列延長機構の解析を目的として、ヒト脳から三塩基対反復配列保有遺伝子をクローニングし、その特性、機能などを解析すると同時に延長機構に関する解析を行った。塩基対反復配列の延長に関しては、テロメラーゼが知られており、6塩基対反復配列として延長する機構がヒトにも存在することが報告されている。テロメラーゼ活性はヒトでは生殖細胞に限定されており、反復配列自体を認識する機構である。(CAG/CTG)<sub>n</sub> 延長に関しても類似の機構が想定されるとすると、反復配列を認識する機構のため、該当遺伝子以外の反復配列保有遺伝子も延長する可能性がある。配列延長が該当遺伝子のみに行っているとすると、延長機構は該当遺伝子の固有の配列を認識する必要がある。以上を明らかにするために、三塩基対反復配列疾患の細胞において配列延長が固有遺伝子のみの現象であるかどうかを検討した。

## 方法

細胞：CTG 延長疾患として DM、CAG 延長疾患として DRPLA 患者の末梢リンパ球を EV ウイルスでトランスフォームしたものをを用いた。

(CAG/CTG)<sub>n</sub> 保有遺伝子のクローニング：ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーを (CAG)<sub>5</sub> を含むプライマーとファージベクター ( $\lambda$ gt10) のプライマーで PCR し、

産物をプローベとしてライブラリーをスクリーニングし、CAG/CTG 配列を有する遺伝子を検出。これらをプローベとして、ヒト胎児脳 cDNA ライブラリー、ヒト胎盤 genomic DNA ライブラリーをスクリーニングし、サブクローニング後、FISH を含む同定、解析を行った。

配列延長の解析：DM 細胞に関しては、MT-PK の延長配列を含むプローブである F102, R101<sup>1)</sup> と、ヒト脳に発現する CTG-B33<sup>2)</sup> の CTG 配列を含むプライマーを用いて、CTG 延長を解析した。TaKaRa LA-PCR システムを用い、35 サイクル増幅し、サザン解析した。プローブは各々の反復配列を含むフラグメントの PCR 産物を標識して用い、BAS200 で解析した。DRPLA 細胞においては CAG を含んでプライマー<sup>2)</sup>、Machado-Joseph 病の MJ52, MJ25 を用いて PCR し、同様にサザン解析した。

## 結果

ヒト胎児脳ライブラリーから CAG/CTG を有する遺伝子が多数クローニングされ、その一部は既に脳特異的発現の CTG 遺伝子として報告されている CTG-B33 が含まれていた。現在、これら CAG/CTG 遺伝子に関して機能の解析を行っている。DM 細胞における CTG 遺伝子の延長を図 1, 2 に示す。CTG-B33 は DM 細胞では CTG 延長は無く、この延長は CTG 配列以外の配列の認識が存在することを示唆した。同様に、DRPLA 細胞においても (図 3, 4) CAG の認識ではなく、DRPLA 遺伝子固有の機構が存在することを示唆した。

## 考察

脳においては CTG-B33 のように脳特異的発現を示す 9CAG/CTG)<sub>n</sub> 保有遺伝子が多数存在することが明らかになった。これら遺伝子の機能の解析は三塩基対反復配列延長疾患の病態解析、新たな疾患遺伝子の同定に挙げると考えられる。また、配列延長機構に関してはテロメラーゼ様の (CAG/CTG)<sub>n</sub> を認識する機構ではなく、遺伝子固有の配列を認識する機構が存在

\*自治医科大学小児科

\*\*国立精神・神経センター神経研究所

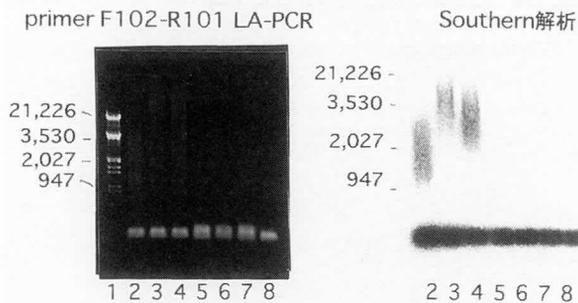


図1 筋強直性ジストロフィー症細胞における MT-PK 遺伝子のCTG 延長の解析  
2-4は先天性筋強直性ジストロフィー症細胞, 5-7はDRPLA細胞, 8は正常細胞.

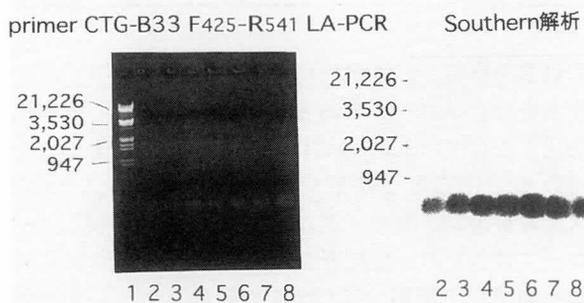


図2 筋強直性ジストロフィー症細胞における他の CTG 遺伝子の延長の解析  
2-8は図1と同様. プライマー, サザンのプローブはCTG-B33遺伝子のCTGを含む領域を使用. 延長を認めない.

することを示唆した. この機構は該当遺伝子に近接し該当遺伝子の固有配列を認識し, かつ減数分裂時に著明に発現し, 体細胞でも一定程度発現する機構が想定される.

#### 文 献

- 1) Brook JD, et al: Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a tran-

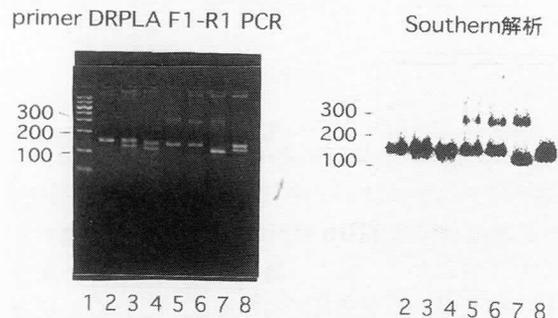


図3 DRPLA細胞におけるCAGB37の延長の解析  
2-8は図1と同様. 5-7に配列延長を求め.

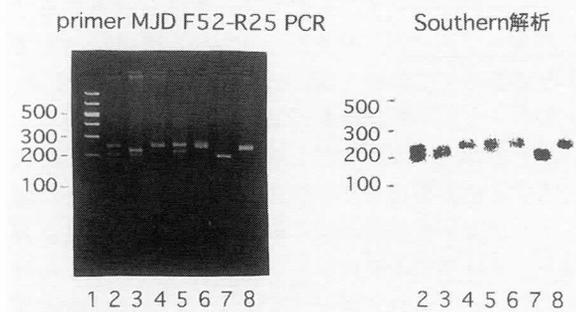


図4 DRPLA細胞における Machado-Joseph 病遺伝子の延長の解析  
2-8は図1と同様.

script encoding a protein kinase family member. *Cell* 68: 799-808, 1992.

- 2) Li-SH, et al: Novel triplet repeat containing genes in human brain: Cloning, expression and length polymorphisms. *Genomics* 16: 572-579, 1993.

## VI. 筋緊張性ジストロフィー, その他(2)

## 32) 筋緊張性ジストロフィーにおける insulin receptor の糖鎖異常

杉村 公也\*

研究協力者 高野 明美\*\* 伊藤 慶太\*\*,\*\* 小林 靖\*\*  
犬飼 晃\*\* 祖父江 元\*\* 本田 仁\*\*  
志井 光瑞\*\*\*\*

### 目 的

私達はこれまでに、筋緊張性ジストロフィー (MyD) 患者の免疫グロブリン G (IgG) の糖蛋白において糖鎖異常 (N-アセチルグルコサミンが非還元末端に露出する糖蛋白の増加) が見られることを指摘した<sup>1)</sup>。IgGにはFc portionに2本のアスパラギン結合型糖鎖があり、この糖鎖部分をHPLCで解析すると、MyD患者では正常群に比べ、糖鎖の先端がガラクトースで終わっている digalactosyl oligosaccharides が少なく、逆にガラクトースが付いていない、即ち、非還元末端にN-アセチルグルコサミンが露出する糖鎖、が増加していた。レクチンの中でS-WGAは、N-アセチルグルコサミンが非還元末端に露出する糖鎖と結合することが知られているが、このS-WGAを用いて生検筋の凍結切片をレクチン染色すると、正常の筋細胞膜はほとんど染色されないのに対し、MyDでは陽性に染色される多数の筋線維が見られた。MyDにおけるS-WGA陽性筋線維は特にtype I線維において多く認められた。患者末梢赤血球をFITC標識レクチンと反応させ、FACS解析を行うと、ガラクトースやN-アセチルガラクトサミンと結合するPNAやRCA-1ではMyD患者と正常群で差を認めなかったが、S-WGAでは筋組織と同様に患者赤血球では結合性が増加していた。即ち、MyD患者においてIgGと同様の糖鎖の変化、hypogalactosylation、はMyD患者の筋組織や赤血球膜においても存在することが確認された<sup>2)</sup>。

一方、MyD患者ではしばしば耐糖能異常が認められるが、その原因として膜における insulin 抵抗性が指摘されている。Insulin receptorは $\alpha_2\beta_2$ の形をとる糖蛋白質であり、 $\beta$ 鎖は細胞膜を貫通しており、細胞内部分に tyrosine 残基をもち、tyrosine kinase 活性を持っている。 $\alpha$ 鎖に insulin が結合すると、 $\beta$ 鎖

の tyrosine に磷酸化が起こり、tyrosine kinase が活性化される<sup>3)</sup>。

Insulin receptor を sialidase 処理、次いで  $\beta$ -galactosidase 処理をすると insulin 結合能が消失したり<sup>4)</sup>、 $\beta$ 鎖から糖鎖を除くと insulin 結合性は保たれているものの、tyrosine kinase の活性化が起こらない<sup>5)</sup>ことが報告されており、insulin receptor において糖鎖修飾が機能発現に重要であることが知られている。

そこで今回は、MyD 患者に見られる代表的な症候の一つである耐糖能異常につき、insulin receptor の糖鎖構造において、IgGや筋組織、赤血球膜と同様の変化、即ち hypogalactosylation が認められるか否か、また、糖鎖構造の変化が insulin receptor の機能異常に関与しているかについて検討した。

### 対象と方法

試料は、培養皮膚線維芽細胞および赤血球の white ghost を用いた。対象は成人型筋緊張性ジストロフィー患者3例、対照3例である。

Insulin receptor の糖鎖構造の hypogalactosylation を検出するために培養皮膚線維芽細胞および赤血球膜を用いサンドイッチ ELISA 法を行った。ELISA は志井らの報告した方法<sup>6)</sup>を一部改変して行った。培養皮膚線維芽細胞および赤血球膜を TNE buffer にて可溶化し、crude cell homogenate の蛋白定量は Lowry 法にて行った。ELISA プレートに insulin receptor の intracellular portion を認識する monoclonal 抗体 (4A1 あるいは 2H2) をコーティングした。次に、蛋白量を同一に調整した可溶化試料を serial dilution し、反応させた。2次抗体としてビオチン化S-WGAを用い o-phenylenediamine で発色させ、ELISA プレートリーダーで測定波長 492nm にて測定した。

次に insulin receptor の自己磷酸化反応について cell-free system において検討を行った。MyD と control の培養皮膚線維芽細胞および赤血球膜を用い、

\*名古屋大学医療技術短期大学部

\*\*名古屋大学医学部神経内科

\*\*\*現) 福井医科大学内科学第二講座

\*\*\*\*兵庫県立成人病臨床研究所

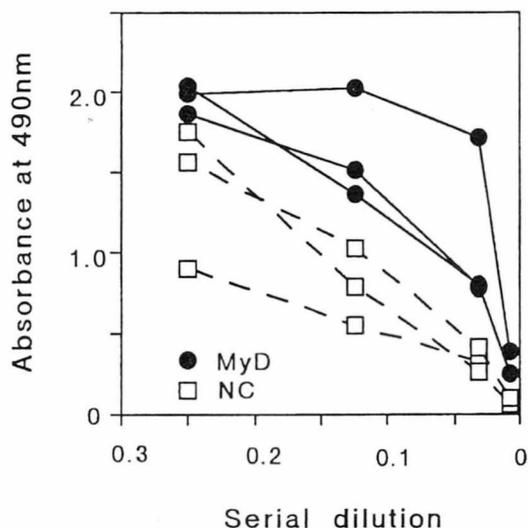


図1 赤血球膜のinsulin receptorに対するS-WGAの結合性(サンドイッチELISA法). Insulin receptorに対するS-WGAの結合性は正常対照に比しMyDにおいて増加している.

抗ヒトinsulin receptor抗体(4A1あるいは2H2)にて免疫沈降を行った. 免疫沈降産物に $1 \times 10^{-6}$ Mのinsulinを作用させた後, 120mM HEPES, 90mM ATP, 12mM  $MnCl_2$ , 24mM  $MgCl_2$ で自己リン酸化反応を行った. その後, SDS-PAGEに展開し, nitrocellulose膜に転写した後, ヒトinsulin receptorの $\alpha$ 鎖を認識するmonoclonal抗体(3B6),  $\beta$ 鎖を認識するmonoclonal抗体(2H2), 抗phosphotyrosine抗体(PT-66)で染色し, ECL法にて検出し, その染色性をcontrolとMyDとで比較検討した.

### 結 果

培養皮膚線維芽細胞を用いたELISA法で, insulin receptorのS-WGA反応性は対照に比べMyDで増加していた. 赤血球膜を用いたサンドイッチELISA法の結果でも, insulin receptorに対するS-WGAの結合性は, MyD患者では正常対照に比べ増加していた(図1). 免疫沈降を用いた培養皮膚線維芽細胞および赤血球膜のinsulin receptorのwestern blottingでは, MyD患者において対照と比べinsulin刺激後の抗phosphotyrosine抗体による染色性が95kDaの $\beta$ 鎖のバンドで低下していた(図2).

### 結 論

MyD患者の赤血球膜における1細胞あたりのinsulin receptorの数は正常対照と同じであると報告されている<sup>7)</sup>. MyD患者と正常対照の試料中の蛋白量を同

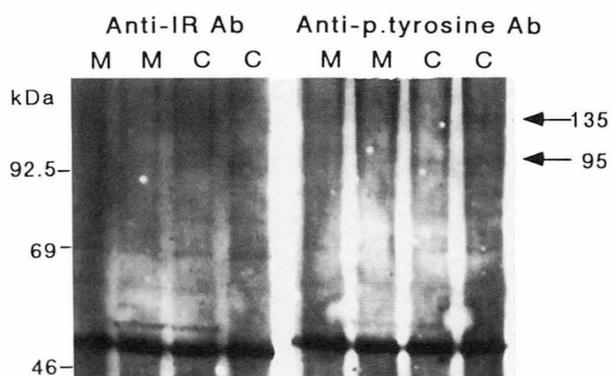


図2 皮膚線維芽細胞からのinsulin receptorの自己リン酸化.

MyD患者において抗phosphotyrosine抗体によるinsulin receptorの $\beta$ 鎖の染色性は低下している. M=MyD, C=正常対照.

じにした結果, insulin receptorのS-WGA反応性は正常対照に比べMyD患者で増加していた. したがってMyD患者のinsulin receptorの糖鎖部分にはIgG, 筋組織や赤血球膜と同様にN-アセチルグルコサミンが非還元末端に露出する糖蛋白の増加が存在し, また, insulin刺激による同受容体の自己リン酸化能が低下していることが示唆された. 今回の検討結果から, MyDではinsulin receptorの糖鎖構造の変化が耐糖能異常という膜受容体の機能異常に関与している可能性が推定された.

尚, これらの糖鎖構造の変化の程度とCTG repeat数との相関性については現在検討中である.

### 文 献

- 1) Ito K, Takahashi N, Hirayama M, Honda H and Takahashi A : J Clin Biochem Nutri 14 : 60-69, 1993.
- 2) 松岡幸彦ほか : 平成6年度精神・神経疾患研究筋ジス第3班報告書, 1995.
- 3) Kasuga M, Karisson FA and Kahn CR : Science 215 : 185-187, 1982.
- 4) Hayes GR and Lockwood DH : J Biol Chem 261 : 2791-2798, 1986.
- 5) Leconte I, Azuan C, Debantm A, Rossi A and Clauser E : J Biol Chem 267 : 17415-17423, 1992.
- 6) Hagino H, Shii K, Yokono K, et al : Diabetes 43 : 274-280, 1994.
- 7) Kakehi T, Kuzuya H, Kosaki A, et al : J Lab Clin Med 115 : 688-695, 1990.

# 33) 骨格筋組織にリソソーム由来と思われる空胞を認めた $\alpha$ -mannosidosis 患者の $\alpha$ -D-mannosidase 遺伝子の解析

川井尚臣\*

研究協力者 若松延昭\* 後藤田康夫\*  
西田善彦\* 齋藤史郎\*

## はじめに

$\alpha$ -マンノシドーシスは、リソソーム水解酵素の一種である  $\alpha$ -D-マンノシダーゼの欠損により、マンノースを含んだオリゴ糖が主として神経や肝細胞内のリソソームに蓄積し、精神運動発達遅延、難聴、粗な顔貌、肝腫大等の特異な症状を呈する常染色体劣性遺伝の代謝性疾患である。また本症は臨床経過より、乳児期に発症し予後不良な I 型と幼児期以後に発症し予後良好な II 型に分類されている。我々はさきに筋に多数のリソソーム由来の空胞を認めた II 型の家系を報告したが<sup>1)2)</sup>、本例の筋病変の原因を明らかにするため、 $\alpha$ -D-マンノシダーゼ遺伝子の構造を決定し、患者の同遺伝子の解析を試みたので報告する。

## 対象

対象は、自験の  $\alpha$ -マンノシドーシス患者 2 名と Coriell Cell Repositories より購入した 4 名の患者の皮膚線維芽細胞 (I 型-GM4518, II-GM654, GM2817, GM2051) および Erasme 病院 (ベルギー) より供与された I 型患者 (A2541) のゲノム DNA である。

## 自験例

症例 1 : 29 歳, 女性

主訴 : 精神発達遅延, 難聴, 歩行障害

家族歴 : 両親は近親婚である。

現病歴 : 乳児期より頻回に上気道炎, 中耳炎に罹患していた。生後の運動発達は正常だったが, 会話は 3 歳でようやく幼児語が可能となった。5 歳頃より階段の昇降に手すりが必要になった。その後, 歩行障害は徐々に進行し, 28 歳頃より痙性歩行となり, 起立が不能となったため当科を受診した。

現症 : 身長 145cm, 体重 35kg と体格は小柄であり, 粗な顔貌がみられた。IQ は 32 と低下し, 60dB の感音性難聴も認められた。肝脾腫はなかったが, 四肢の筋

力は低下しており下肢の深部腱反射は亢進し, 病的反射も陽性であった。

症例 2 : 36 歳, 女性

主訴 : 精神発達遅延, 難聴, 歩行障害

家族歴 : 妹 (症例 1) が同様の症状を示す。

現病歴 : 妹と同様に乳児期に感染症に頻回に罹患していた。2 歳時に難聴を指摘され, 8 歳時に聾学校に入学した。その後徐々に歩行障害が進行し 36 歳時に当科に入院した。

現症 : 身長 139cm, 体重 40kg と妹と同様に体格は小柄であり, 粗な顔貌がみられた。IQ は 19 と低下し, 70dB の感音性難聴が認められた。肝脾腫はみられず, 四肢の筋力低下, 失調性歩行, 四肢の協調運動障害などが認められた。生検骨格筋の光顕所見では, 筋線維は全体に細く軽度の大小不同が認められ, 電顕所見では, 筋鞘膜下に直径 1~10  $\mu$ m の空胞が多数認められた。これらの空胞は一層の膜で限界され, その中に電子密度の高い大小不同の顆粒や膜構造物を認めた。さらに, 一部の筋線維には空胞に加えてサルコメア配列の乱れ, Z 帯の乱れなどの変化がみられた<sup>1)2)</sup>。

$\alpha$ -D-マンノシダーゼ活性値 : 症例 1, 症例 2 ともに白血球の  $\alpha$ -D-マンノシダーゼ活性は 2nmol/h/mg 蛋白 (正常値 35~178nmol/h/mg 蛋白) と低下していた。両親の同酵素活性は正常値のほぼ 50% の活性を示した。しかし, 他の 7 種類のリソソーム酵素の活性は正常値を示した。

## 方法

### 1. 人 $\alpha$ -D-mannosidase 遺伝子のゲノム構造の決定

若松らは, マウスのヘキササミニダーゼ A 遺伝子を含むコクミドクロンを単離し, 遺伝子構造を決定しており<sup>3)</sup>, 本研究でも同様の方法を用いた。すなわち, 100 万個の人コスミドクロン (SuperCos, stratagene) をナイロンメンブレンに吸着させた後, [<sup>32</sup>P]ラベルした  $\alpha$ -D-mannosidase 遺伝子の cDNA

\*徳島大学医学部第一内科

をプローブに用いて同遺伝子を含むゲノム遺伝子を探し出し、スクリーニングした。

## 2. エクソン/イントロン接合部の決定

単離したコスミドクローンをEcoRIで切断し、同遺伝子の制限酵素地図を作成した後、エクソンを含むDNA断片をサザンブロットング法にて同定した。同定したDNAは、プラスミドにサブクローニングし、プロモーター領域、エクソン、およびエクソン/イントロン接合部の塩基配列を決定した。

## 3. SSCP-PCR法による $\alpha$ -マンノシドーシス患者の異常遺伝子の同定

決定したイントロンの塩基配列をもとにプライマーを作製し、自験例及び入手したマンノシドーシス患者(I型2名, II型4名)のDNAをテンプレートに用いて個々のエクソンをPCRで増幅した後、SSCP法により異常遺伝子の同定を試みた。

## 結 果

### 1. 人 $\alpha$ -D-mannosidase遺伝子のゲノム構造

人コスミドライブラリーより、 $\alpha$ -D-マンノシダーゼcDNAの5'側と3'側の両方のDNA断片にハイブリダイズするコスミドクローン(pCos5.4)を単離した。同クローンをEcoRIで切断し、全長のcDNAをプローブに用いてサザン解析を行った結果、13.5kb, 6.0kb, 2個の3.5kb, 1.6kb, 0.9kbのDNA断片にエクソンが含まれることが判明した。さらに、これらのDNAの塩基配列を決定した結果、本遺伝子は全長約23kbであり、24個のエクソンより構成されていた(図1)。プロモーター領域の塩基配列の解析では、上流200bp内にG, Cが76%認められ、GC boxも2箇所認められた。

### 2. マンノシダーゼ患者の異常遺伝子の同定

自験例の姉および海外より入手した6例のマンノシダーゼ患者のゲノムDNAを用いて、現在20個のエクソン(エクソン6, 14, 15, 21以外の全エクソン)のDNAをPCRで増幅しSSCPによる解析が終了した。その内エクソン8においては、I型患者(GM4518)に移動度の異なる異常なDNAバンドが認められ(図2)、ダイレクトシーケンシング法による解析では、C→Gのミスセンス変異が確認された。しかし、自験例では上記のエクソン内には異常はみられなかった。

## 考 察

本研究班で長年とりあげてきたdistal myopathy with rimmed vacuole<sup>4)</sup>では、筋細胞内にリソソーム酵素活性のある異常な空胞が認められ、その成因としてリソソーム酵素の関与も指摘されている。一方、 $\alpha$ -マンノシドーシスの自験例では四肢に筋力低下が

## Human $\alpha$ -D-mannosidase gene

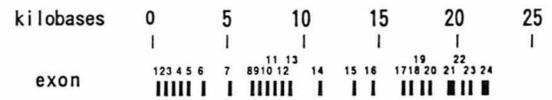


図1 人 $\alpha$ -D-mannosidase 遺伝子のゲノム構造を示す。24個のエクソンより構成されている。

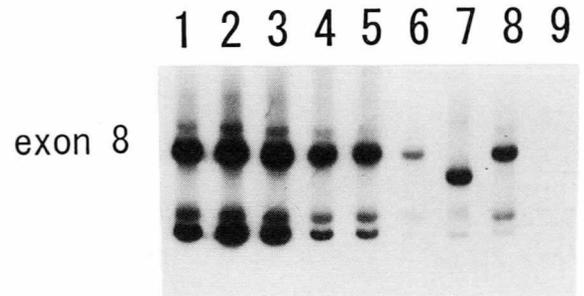


図2 エクソン8のSSCP-PCRの結果を示す。

レーン7(GM4518)に移動度の異なる異常なDNAを認める。レーン1. 自験例(姉), 2, 3. 正常対照, 4. GM654, 5. GM2051, 6. GM2817, 7. GM4518, 8. A2541, 9. blank

あり、骨格筋細胞内にリソソーム由来と考えられる多数の空胞がみられ、これらの両疾患の病因や病態にリソソーム異常という共通のものがあると推定される。

そこで我々は、リソソーム異常に伴う筋崩壊の機序ならびに病態解明のため、自験例の $\alpha$ -マンノシドーシス患者の遺伝子解析を行った。まず本研究において、我々は、初めて人 $\alpha$ -D-マンノシダーゼ遺伝子のゲノム構造を明らかにし、さらに患者の異常遺伝子を同定する方法を確立した。まだ全てのエクソンの解析が終了してはいないが、I型の患者のエクソン8内にミスセンス変異が認められたことより、2個以上の遺伝子異常が本症の病因に関与していることが示された。自験例には四肢の筋力低下があり、骨格筋内にリソソーム由来と考えられる空胞が認められた。これらの異常所見は、 $\alpha$ -マンノシダーゼの遺伝子異常に起因すると思われるが、我々の2例がII型であることを考えると、I型とは異なった特異な遺伝子異常が存在することが考えられる。今後引き続き、 $\alpha$ -マンノシドーシス患者の異常遺伝子の解析、さらには筋細胞内での発現実験を行い、リソソーム異常に伴う筋崩壊の過程を解明したいと考えている。本研究の成果は、 $\alpha$ -マンノシドーシスの病因解明のみならず、他の空胞形成を有するミオパチーの病因や病態の解明にも役立つことが期待できる。

### ま と め

1. 人  $\alpha$ -D-mannosidase 遺伝子を含むコスミドクローンを単離し, 同遺伝子のゲノム構造を決定した.
2. 骨格筋内にリソソーム由来の空胞を有する  $\alpha$ -マンノシドーシス症例を含め6例の同患者の遺伝子解析を行った.

### 文 献

- 1) 川井尚臣, 西田善彦, 西野 洋ほか : Mannosi-dosisの1家系2症例と筋病理所見. 日本内科学会雑誌 75 : 638-643, 1986.
- 2) Kawai H, Nishino H, Nishida Y, et al :

Skeletal muscle pathology of mannosidosis in two siblings with spastic paraplegia. *Acta Neuropathol* 68 : 201-204, 1985.

- 3) Wakamatsu N, Benoit G, Lamhonwah AM, et al : Structural organization, sequence, and expression of the mouse HEXA gene encoding the  $\alpha$  subunit of hexosaminidase A. *Genomics* 24 : 110-119, 1994.
- 4) Nonaka I, Sunohara N, Ishiura S, et al : Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation. *J Neurol Sci* 51 : 141-155, 1981.

# 34) 筋型 AMP デアミナーゼ遺伝子 (*AMPD1*) の スプライシング調節：甲状腺機能低下性ミオパチーに おける検討

垂井 清一郎\*

研究協力者 嶺尾 郁夫\* 西川 嘉郎\*

## はじめに

私どもは、グリコーゲン病 VII 型をはじめとする代謝性ミオパチーにおいて、運動筋のエネルギー危機に基づいて AMP デアミナーゼ (*AMPD*) 反応が亢進する結果、高尿酸血症が発現する病態 (筋原性高尿酸血症) を明らかにしてきた<sup>1)2)</sup>。*AMPD* はプリン分解系の key enzyme として 広く生体の各組織に存在するが、特に骨格筋で強い酵素活性が認められる。筋肉には同組織に特異的なアイソザイムが発現し、これをコードする遺伝子 *AMPD1* が単離されている<sup>3)</sup>。*AMPD1* は 15 個のエキソンより構成されるが、翻訳領域にある第 2 エキソンは 12 base より成るミニエキソンで、選択的スプライシング alternative splicing により mRNA に含まれる場合 (Type I mRNA) と除外される場合 (Type II mRNA) がある<sup>4)</sup>。Type I および Type II mRNA にコードされる酵素蛋白は、共に *AMPD* 活性を有することが示されている。ラットでは筋ファイバタイプにより両 mRNA の比率が異なる<sup>4)</sup>。また、欧米人に極めて多い筋 *AMPD* 欠損症の遺伝子変異は第 2 エキソン中にあるが、Type II mRNA が産生されて完全な酵素活性欠損から免れるためにミオパチーを示さない例のある可能性が示されている<sup>5)</sup>。そこで本研究では、代謝性ミオパチーにおける *AMPD1* の選択的スプライシングの意義を明らかにする目的で、甲状腺ホルモン低下性ミオパチーにおける *AMPD1* のスプライシング産物と酵素活性を分析した。これまで甲状腺ホルモンが欠乏すると解糖系やミトコンドリア機能の障害により運動筋における *AMPD* 反応が亢進することが示されているが<sup>6)</sup>、*AMPD* 酵素自身の変化について検討した成績はない。

## 方 法

実験動物：約 150g の SD 系雄性ラットを 2 群に分け、甲状腺ホルモン欠乏群には飲水として 0.05% プロピル

サイオウラシル (PTU) 溶液を、対照群には水道水を与え飼育した。8 週後に屠殺し、ヒラメ筋 (SOL) と長趾伸筋 (EDL) を採取、測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

RNA 分析：筋肉をグアニジン溶液でホモゲナイズし、セシウム超遠心法で total RNA を単離した。ラット *AMPD1* に相補的な cRNA プロブを合成し、RNase マッピング法にて Type I mRNA と Type II mRNA を検出した<sup>4)</sup>。オートラジオグラフィ後、両 mRNA の相対比率を島津モデル 5500 densitometer で測定した。

酵素活性：筋肉をリン酸緩衝液でホモゲナイズ後、遠心上清について *AMPD* 活性を分光光度法で測定した<sup>7)</sup>。

## 結 果

甲状腺ホルモン欠乏群ラットの屠殺時体重は、対照群ラットに比較して著しく軽く ( $285 \pm 10$  vs  $556 \pm 42\text{g}$ , mean  $\pm$  SE,  $n=5$ ,  $P<0.01$ )、PTU 溶液の投与によって甲状腺機能低下症に陥ったと判定される。SOL および EDL の筋重量も、甲状腺ホルモン欠乏群で有意に低値であった (SOL ;  $121 \pm 7$  vs  $189 \pm 13\text{mg}$ ,  $P<0.01$ , EDL ;  $142 \pm 5$  vs  $252 \pm 15\text{mg}$ ,  $P<0.01$ )。図 1 に単位筋重量あたりから抽出される total RNA 量を示した。EDL の total RNA 量は、対照群に比し甲状腺ホルモン欠乏群で有意に低値であった。ただし、その差違はそれ程大きいものではなかった。SOL の total RNA 量は、EDL の約 2 倍に及ぶが、対照群と甲状腺ホルモン欠乏群間で有意差を認めなかった。

RNase マッピング法によって得られるオートラジオグラフィの典型例を図 2 に示した。215nt と 170nt のバンドは、それぞれ Type I mRNA と Type II mRNA に由来する。これまでの報告通り<sup>4)</sup>、対照群ラットの SOL では Type I mRNA と Type II mRNA がほぼ等しく産生され、EDL ではもっぱら Type I mRNA が優位に産生される。一方、甲状腺ホルモン欠乏群ラットでは、SOL における Type II mRNA の産生が対照群に比し著しく減少していた。しかし、EDL にお

\* 国家公務員等共済組合連合会大手前病院

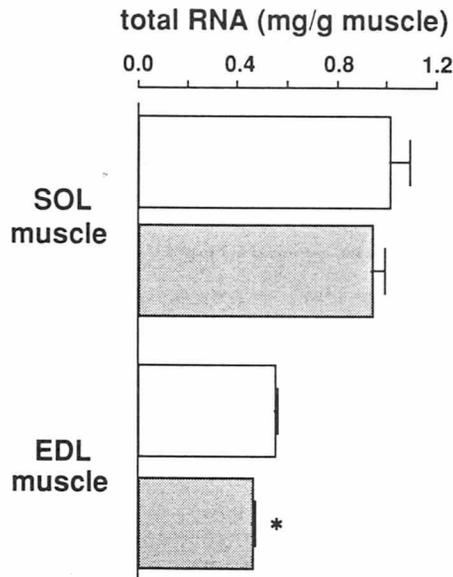


図1 ラット骨格筋における単位筋重量あたりの total RNA 量  
SOL:ヒラメ筋, EDL:長趾伸筋.  
▨: 甲状腺ホルモン欠乏群, □: 対照群,  
mean±SE, \* $P < 0.01$

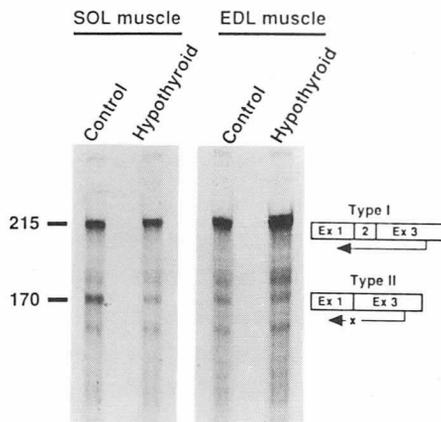


図2 ラット骨格筋における Type I と Type II mRNA の産生 (RNase マッピング法)

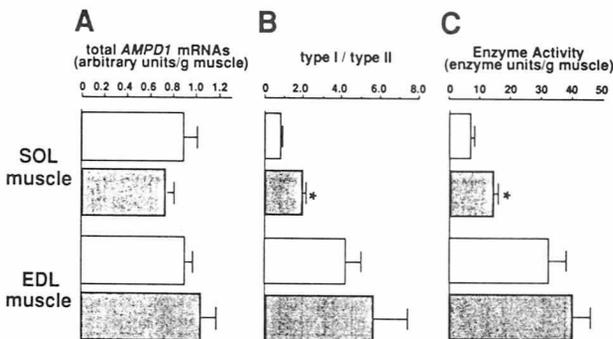


図3 AMPD1 mRNA と AMPD 酵素活性に対する甲状腺ホルモン欠乏の影響  
mean±SE, \* $P < 0.01$

ける選択的スプライシングには甲状腺ホルモンが欠乏する影響は認められなかった。

オートラジオグラフィから densitometry 法にて定量化した AMPD1 mRNA 量と酵素活性を図3に表わした。Type I と Type II を併せた総 AMPD1 mRNA 量は、SOL と EDL のいずれの筋肉においても、甲状腺ホルモン欠乏群と対照群で有意差を認めなかった(図3A)。ところが、Type I と Type II の比率は、SOL では甲状腺ホルモン欠乏群が対照群に比し有意に高値を示した。一方、EDL では両群間で有意差を認めなかった(図3B)。AMPD 活性についても、SOL では甲状腺ホルモン欠乏群が対照群に比し有意に高値を示したが、EDL では両群間で有意差を認めなかった(図3C)。

### 考 察

本研究では、甲状腺機能低下性ミオパチーにおいて AMPD1 遺伝子の Type I mRNA に対する Type II mRNA の相対産生量が減少することを明らかにした。このように選択的スプライシングの様式が甲状腺ホルモンの欠乏によって変化する例は、脳神経組織に発現する tau 遺伝子について報告されているだけである<sup>8)</sup>。甲状腺ホルモンは、ポリ(A)尾部の伸長に関わって転写物の安定性に影響することが知られている<sup>9)10)</sup>。一方、AMPD1 の選択的スプライシングの調節には、エキソン2に隣接するイントロンの除去効率とその後の核-細胞質移行が関係することが示されている<sup>11)</sup>。したがって、スプライシング過程と並行するポリ(A)尾部の伸長が、甲状腺ホルモンの欠乏によって増強するためにエキソン2のスキッピングが抑制される結果、Type II mRNA の産生が減少したのかも知れない。なお、AMPD1 の選択的スプライシングに対する甲状腺ホルモン欠乏の影響は、代表的な赤筋である SOL で観察されたが、白筋である EDL では認められなかった。筋肉に対する甲状腺ホルモンの影響が、これまでの多くの報告と同様に、筋ファイバータイプによって異なることを示す成績である。

AMPD 活性は、赤筋 (type I fiber) に比べ白筋 (type II fiber) で数倍高いことが知られている。AMPD1 mRNA について、SOL と EDL を比較すると、総 mRNA 量に大きな差はなく、Type I/Type II 比が異なることに気付かれる(図3)。甲状腺ホルモンの欠乏によって SOL では AMPD 活性が増加したが、この際 AMPD1 の総 mRNA 量に変化はなく、Type I/Type II 比の増加が観察された。以上のことから、AMPD1 の選択的スプライシングが筋 AMPD 酵素活性の変動に関与することが示唆される。大腸菌の発現システムを用いた検討では、Type I と Type II mRNA にコードされる蛋白に酵素活性上の差異は認められて

いないが<sup>5)</sup>, *in vivo*筋組織にあっては本酵素の活性化に関係するミオシンの結合性<sup>7)</sup>などに違いが存在する可能性も考えられる。

#### 結 語

*AMPD 1* のスプライシング調節には、筋ファイバータイプに特異的な様式で甲状腺ホルモンが関与し、これが筋 *AMPD* 活性の変動にも関係することが示唆された。

#### 参 考 文 献

- 1) Mineo I, Kono N, Hara N, Shimizu T, Yamada Y, Kawachi M, Kiyokawa H, Wang YL and Tarui S: Myogenic hyperuricemia: a common pathophysiologic feature of glycogenoses types III, V, and VII. *New Engl J Med* 317: 75-80, 1987.
- 2) Mineo I and Tarui S: Myogenic Hyperuricemia: what can we learn from metabolic myopathy? *Muscle Nerve (suppl)* 3: S75-81, 1995.
- 3) Sabina RL, Morisaki T, Clarke P, Eddy R, Shows TB, Morton CC and Holmes EW: Characterization of the human and rat myoadenylate deaminase genes. *J Biol Chem* 265: 9423-9433, 1990.
- 4) Mineo I, Clarke PRH, Sabina RL and Holmes EW: A novel pathway for alternative splicing: identification of an RNA intermediate that generates an alternative 5' splice donor site not present in the primary transcript of *AMPD 1*. *Mol Cell Biol* 10: 5271-5278, 1990.
- 5) Morisaki H, Morisaki T, Newby LK and Holmes EW: Alternative splicing: a mechanism for phenotypic rescue of a common inherited defect. *J Clin Invest* 91: 2275-2280, 1993.
- 6) Dudley GA, Tullson PC and Terjung RL: Influence of mitochondrial content on the sensitivity of respiratory control. *J Biol Chem* 262: 9109-9114, 1987.
- 7) Rundell KW, Tullson PC and Terjung RL: AMP deaminase binding in contracting rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 263 (Cell Physiol 32): C287-C293, 1992.
- 8) Aniello F, Couchie D, Bridoux AM, Grippois D and Nunez J: Splicing of juvenile and adult tau mRNA variants is regulated by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 4035-39, 1991.
- 9) Krane IM, Spindel ER and Chin WW: Thyroid hormone decreases the stability and the poly(A) tract length of rat thyrotropin  $\beta$ -subunit messenger RNA. *Mol Endocrinol* 5: 469-475, 1991.
- 10) Murphy D, Pardy K, Seah V and Carter D: Posttranscriptional regulation of rat growth hormone gene expression: increased message stability and nuclear polyadenylation accompany thyroid hormone depletion. *Mol Cell Biol* 12: 2624-2632, 1992.
- 11) Mineo I and Holmes EW: Exon recognition and nucleocytoplasmic partitioning determine *AMPD 1* alternative transcript production. *Mol Cell Biol* 11: 5356-5363, 1991.

## VII. D M D / B M D

# 35) 妊婦末梢血を用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの 出生前遺伝子診断

佐藤 猛\*

研究協力者 関 沢 明 彦\*\* 木 村 武 彦\*\*

## はじめに

現在、胎児遺伝性疾患の出生前診断は主に羊水穿刺、経腔的絨毛採取、臍帯穿刺などにより行われているが、母体細胞の混入による誤診や出血、感染などによる流産などの問題がある。そこで母体・胎児双方にとって理想的あるいはより安全な方法として妊婦末梢血中に混入してくるとされる胎児細胞が注目され、世界中で研究されている。

妊婦末梢血中に混入していることが知られている胎児由来細胞には絨毛細胞、リンパ球、赤血球などがある。絨毛細胞は出現頻度が著しく低いこと、リンパ球は母体由来の細胞との鑑別が困難なことや分娩後も数年にわたり母体血中に残存することなどから出生前診断への応用は困難である。しかし、有核赤血球は胎児血中には豊富に存在する反面、健常成人血中には存在しないことや母体血中で長期間存在し続けないことなどから胎児遺伝子診断の好適な標的として注目されている。

妊婦末梢血中に僅かに存在する有核赤血球の分離は、特異的な細胞表面抗原を認識するモノクローナル抗体を利用し、flow cytometry, magnetic sortingなどを用いて回収する方法で主に行われていた。しかし、現時点では胎児細胞に特異的な抗原は発見されておらず、母体細胞の混入が避けられないことから遺伝子分析には応用できなかった。しかし、パーコールを用いた比重遠沈法で有核赤血球を含む分画を分離し、形態的に直接有核赤血球を識別した後、それを micro-manipulator にて単一細胞レベルで回収する方法が高林ら<sup>1)</sup>により開発された。

さらに、近年の分子生物学領域における進歩はめざましく、その応用範囲は著しく拡大している。1992年、Zhangら<sup>2)</sup>が報告した primer extension pre-amplification (PEP) 法は、15塩基からなる random primer (4<sup>th</sup>種の塩基鎖の mix), Taq polymeraseなどを加え、PCR法で50cycle行い基となった DNA を 2<sup>50</sup>倍に増幅しようとする方法である。この方法により、単

一細胞中の DNA 塩基配列は 78%以上が増幅されるとされ、単一細胞を用いた遺伝子診断の可能性を著しく広げる方法である。

これらの成果をふまえ、妊婦末梢血中の有核赤血球を用いての胎児遺伝子診断法を昨年度の本研究班で報告した。本年度はその精度を含め報告する<sup>3)</sup>。

## 対象および方法

妊娠 9~30 週の妊婦 10 例より同意のもと末梢血を 7ml 採取し EDTA 処理した後、パーコール不連続密度勾配遠沈法を用い、顆粒球と有核赤血球を含む分画を分離し、塗沫、ギムザ染色した。さらにその標本より形態的に有核赤血球を識別し、micromanipulator を用いて単一の有核赤血球を回収した。その細胞を強アルカリ性の lysis solution (5 $\mu$ l) 中に入れ、65 $^{\circ}$ C にてインキュベーションした後、neutralization solution (5 $\mu$ l) にて中和し、10 $\mu$ l 中に DNA を抽出した。DNA は 15 mer の oligonucleotide からなる random primer, Taq polymerase などに加え、総量 60 $\mu$ l にて primer extension pre-amplification (PEP) 法にて全遺伝子増幅を行い、その PEP 産物を用いて各種遺伝子診断を行う。まず、性別診断は PEP 産物 2 $\mu$ l を用いて ZFX/ZFY locus を nested-PCR 法にて増幅した後、制限酵素 Hae-III にて消化し、2.5% アガロースゲルにて電気泳動し、男性では 300, 216, 84, 44 base pairs (bp) の 4 本の、女性では 300, 44 bp の 2 本のバンドが出現することで判定した。さらに、性別判定可能であった細胞について、Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子診断を同一細胞の PEP 産物 5 $\mu$ l ずつを用いて Chamberlain らの報告<sup>4)</sup>したジストロフィン遺伝子のエクソン 4, 8, 12, 45, 48, 50, 51 について hemi-nested PCR 法にて遺伝子増幅した後、2.5% アガロースゲルにて電気泳動し、遺伝子欠失の有無について検討した。また、コントロールとして Duchenne 型筋ジストロフィーでエクソン 50 の欠失がある患者から単一リンパ球を回収し同様に検討した。

\*国立精神・神経センター国府台病院神経内科

\*\*国立精神・神経センター国府台病院産婦人科

## 結 果

図1は妊娠9週の妊婦末梢血中をパーコール不連続密度勾配遠沈法にて分離後、塗沫、ギムザ染色した標本である。矢印は妊婦末梢血中に存在する有核赤血球である。この単一の有核赤血球をPEP法で全遺伝子増幅し、性別および筋ジストロフィーの各エクソンについて検討した結果を図2Aに示す。性別では同一標本から採取した単一のリンパ球は300, 44bpと女性型を示したが、有核赤血球は300, 216, 84, 44bpのバンドを認め男性由来の細胞であり、胎児由来であることがわかる。また、この有核赤血球はジストロフィン・エクソン 4, 8, 12, 45, 48, 50, 51 に欠失がないことが示されている。さらに、Duchenne型筋ジストロフィーで exon 50 の欠失が明かな患者末梢血中の単一リンパ球より検討した結果を図2Bに示す。この患者は遺伝子診断結果でも男性であり、また、エクソン 4, 8, 12, 45, 48, 51 についてはバンドが検出されたが、exon 50 についてはバンドは検出されず、ジストロフィン遺伝子のエクソン 50 の欠失が単一細胞でも診断できることが確認できた。

この妊娠9週の症例を含む正常妊婦10例についてこの方法でDuchenne型筋ジストロフィーが出生前遺伝子診断できるかどうか検討した結果を表1に示す。妊婦末梢血7mlから平均3.3個の有核赤血球が識別され、その有核赤血球33個中21個の細胞がmicromanipulatorを用いて回収し、そのうち13細胞で性別診断可能であった。性別診断できた細胞では92.3% (12/13)でDuchenne型筋ジストロフィーの出生前遺伝子診断が可能であった。对患者当たりの診断効率は60%であったが、診断結果は分娩後の検査結果と全例で一致した。

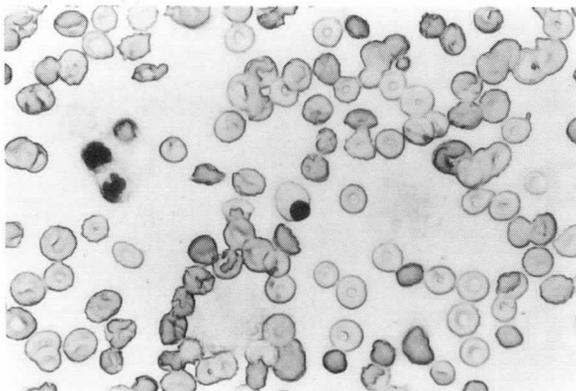


図1 妊婦(妊娠9週)末梢血中の胎児由来有核赤血球(矢印)(×360)。

## 考 察

妊婦血中より単一の有核赤血球を回収し、そのDNAを全遺伝子増幅したPEP産物の一部で性別判定を行い、その細胞が胎児由来であるかどうか確認した上で、さらに残りの一部で筋ジストロフィーなどの遺伝子診断を行うことが可能となった。

今回、出生前診断に用いた筋ジストロフィーの7種類のエクソンはChamberlainらの報告<sup>4)</sup>に準じて設定したものである。これらの組み合わせで筋ジストロフィーのすべてを診断できるわけではなく、あらかじめ保因者であることがわかっている妊婦の出生前診断において特に有用であると考えられた。

妊婦末梢血中の有核赤血球を用いたこの出生前診断法は、従来の絨毛や羊水細胞を用いた胎児診断で最も問題になっている母体細胞の混入を遺伝子レベルで否定した上で目的の遺伝子診断を同一細胞で行うことが可能である。さらに、この方法は母体・胎児に対し非侵襲的であること、妊娠6週と妊娠の極初期から遺伝子診断が可能なことなどの利点を有している。さらに、我々は、ここで示したDuchenne型筋ジストロフィー

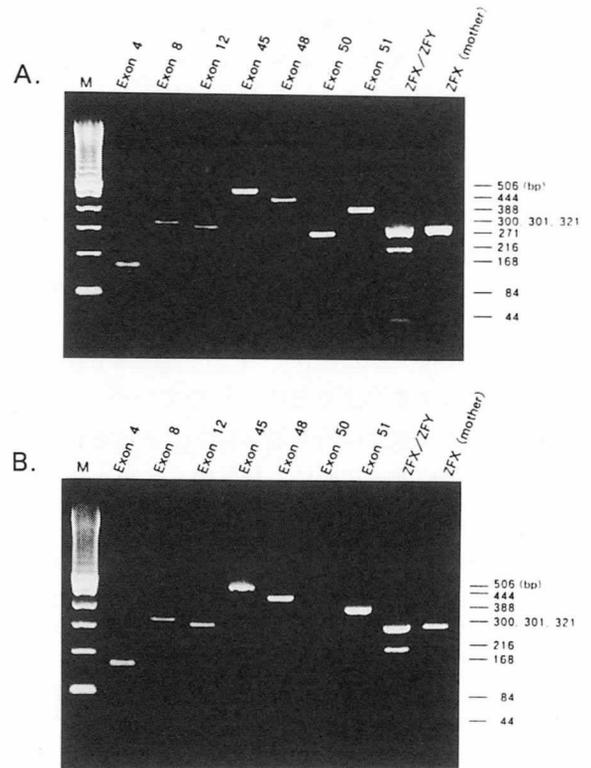


図2 A: 正常胎児のジストロフィン・エクソン4~51, およびZFX/ZFY locusにて男児であることを示す。  
B: Duchenne型筋ジストロフィー児の1個のリンパ球からジストロフィン・エクソン50の欠失とZFX/ZFY locusにて男児であることを示す。

表1 正常妊婦10例の末梢血中の胎児有核赤血球のPCR:ジストロフィン・エクソンと男児証明  
nucleated RBC in maternal blood newborn

case	weeks	detected	retrieved	ZFX/ZFY		Exons of DMD		sex	DMD deletions
				sex	sex detected /cell retrieved	deletions	DMD detected /sex confirmed		
1	9	3	3	male	3/3	-	3/3	male	-
2	12	3	2	★	0/2	※		female	-
3	14	7	4	female	3/4	-	3/3	female	-
4	15	2	2	male	2/2	-	2/2	male	-
5	15	1	1	★	0/1	※		female	-
6	18	2	2	male	1/2	-	1/1	male	-
7	20	0	0	★		※		male	-
8	28	1	1	★	0/1	※		female	-
9	29	9	4	female	3/4	-	2/3	female	-
10	30	3	2	female	1/2	-	1/1	female	-
Total		33	21		13/21		12/13		

★ not detected ※ not performed

子診断が可能なことなどの利点を有している。さらに、我々は、ここで示したDuchenne型筋ジストロフィーの出生前遺伝子診断の他に、同様の方法でRh陰性妊婦の胎児Rh式血液型の遺伝子診断が可能であることを報告している<sup>5)</sup>。本法はこの他にも、Fabry病、Tay-Sacks病、脆弱X症候群、ステロイドサルファターゼ欠損症、血友病A、B、ミトコンドリア脳筋症、Leber病など多量の現在DNA診断可能な遺伝性疾患の出生前診断ばかりではなく、風疹、サイトメガロウイルスなどの胎児感染症の診断にも広く応用可能な方法と考えられる。

これらのことより、本法は遺伝性疾患の非侵襲的な胎児遺伝子診断の実用化に広く道を開く方法であり、近い将来、現在の羊水穿刺や絨毛採取法などの侵襲的方法にとってかわる日がくると考える。

この検査法は現時点で有効な治療法のない遺伝性疾患を非侵襲的に診断可能であり、その胎児診断の結果が人工妊娠中絶のきっかけや前提になる可能性がある。本法は患者にとって極めて簡便であるために実地応用に際しては倫理的・社会的側面からさらに慎重な対応が必要と考えられる。

#### 文 献

1) Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K and Igarashi T: Development of non-invasive fetal DNA diag-

nosis from maternal blood. Prenat Diagn 15: 74-77, 1994.

- 2) Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W and Arnheim N: Whole genome amplification from a single cell: Implications for genetic analysis. Proc Natl Sci USA 87: 4580-4584, 1990.
- 3) Sekizawa A, Kimura T, Sasaki M, Nakamura S, Kobayashi R and Sato T: Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using a single nucleated erythrocyte in maternal blood. Neurology, 1996, in press.
- 4) Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE and Caskey CT: Detection of gene deletions using multiplex polymerase chain reaction. In "(Mathew C, ed). Method in molecular biology, IX: Protocol in human molecular genetics" Clifton NJ: The human Express, 1991, pp299-312.
- 5) Sekizawa A, Watanabe A, Kimura T, Saito H, Yanaihara T and Sato T: Prenatal diagnosis of the RhD blood type using a single nucleated erythrocyte in maternal blood. Obstet Gynecol, 1996, in press.

## 36) DMD/BMD骨格筋のジストロフィンmRNAと臨床像

斎藤 加代子\*

研究協力者 杜 娟\* 池谷 紀代子\* 河北 有規子\*  
宮川 桃香\* 大澤 真木子\*

### 緒言

Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) や Becker 型筋ジストロフィー (BMD) のジストロフィン遺伝子の部分欠失と臨床像は reading-frame theory によって主に説明できる。しかし、リンパ球における遺伝子欠失が臨床像やジストロフィン染色の結果と合致しない例や、遺伝子欠失が同一のエクソンでも臨床像に差を認める例を経験する。このような症例を含めて、骨格筋のジストロフィン mRNA を解析<sup>1)</sup>することによって、リンパ球における遺伝子欠失との整合性を調べ、ジストロフィンの発現、臨床像を合わせて分析した。本年は major hot spot に欠失が認められた例に関して施行した。

### 対象と方法

対象はエクソン44から52のいずれかの欠失を示す 2y2m から 15y7m の DMD11例 (厚生省ステージ分類ステージ I から VIII) と、2y7m から 14y0m の BMD4例 (ステージ I から II) である。全例骨格筋組織にてジストロフィン染色を施行した。運動機能障害進展過程は症例5は DMD としては緩徐である。症例11は運動機能獲得が遅れている。症例13は痙攣重積を合併、座位保持不能、先天型との異同が考えられた例、症例14は骨格筋原発の横紋筋肉腫により死亡した例<sup>2)</sup>である。

方法は骨格筋より AGPC法によって RNA を単離し、リンパ球における遺伝子欠失領域をはさむプライマーを設計し、10例ではエクソン43から51の、5例ではエクソン46から53の領域の RT-PCR を nested にて行った。症例1, 5, 14では PCR産物の direct sequencing を ALF DNA sequencer にて行った。

### 結果

- 1) DMD の RNA 量は、BMD より少ない傾向があった。
- 2) 骨格筋 mRNA の RT-PCR により、DMD9例、BMD4例に欠失をはさむ領域の転写産物を認めたが、DMDの2例では認めなかった (図1)。

case	age (y:m)	stage	diag	dystrophin	DNA deletion	mRNA calc: size
1	10:2	I	B	F	45-49	=
2	14:0	I	B	F	45-48	=
3	2:7	II	B	F	45-48	=
4	10:10	I	B	F	45-47	=
5	6:11	I	D	-	46-49	=
6	8:1	V	D	-	44	=
7	7:11	II	D	R	45	=
8	14:1	VII	D	R	45	=
9	7:8	II	D	-	49-50	=
10	9:3	III	D	-	50	-
11	2:2	II	D	-	51	=
12	6:2	II	D	-	48-52	=
13	12:9	VIII	D	-	48-52	=
14	15:7	VIII	D	-	48-52	<
15	8:9	III	D	-	52	-

B: BMD, D: DMD, F: faint, R: revertant

図1 結果

- 3) リンパ球 DNA にてエクソン48-52の欠失を示す DMD の3例のうち、症例14で mRNA は欠失から推定されるサイズより大きかった。この症例はリンパ球 DNA の Southern blot法にて、エクソン48のシグナルが認められなかったが、16kb の junction fragment が認められた。なお全例の PCR-Southern法によって、バンドは hybridization signal として確認された。
- 4) BMD の4例では mRNA は欠失から推定されるサイズと整合性があり、ジストロフィンの分子量も整合性があった。
- 5) ジストロフィン染色で revertant を示した DMD2例は、欠失と mRNA サイズに整合性があり、臨床像も DMD として軽症とはいえなかった。
- 6) PCR産物の direct sequencing の結果、症例1ではエクソン45-49の欠失により、エクソン44と50がスプライシングによって reading frame を保持して、つながっていることが確認された。
- 7) 症例5ではエクソン46-49の欠失によって、out-of frame にてエクソン45と50がつながっていた。
- 8) 症例14ではリンパ球 DNA にてエクソン48-52の欠失が認められたが、エクソン48が全て欠失しているわけではなかった。エクソン48の3'端の15塩基のエクソン内欠失に引き続き、エクソン49-52の欠失、7301-C の A への missense mutation を認めた (図2)。

\*東京女子医科大学小児科

## 結 論

遺伝子変異とジストロフィン蛋白の発現，臨床像の関係を明らかにしていくために，リンパ球における遺伝子欠失が臨床像やジストロフィン染色の結果と合致しない例や，遺伝子欠失が同一のエクソンでも臨床像に差を認める例において，骨格筋 mRNA を調べることは有用である．major hot spot に欠失を示す例以外に関しても検討したい。

## 参 考 文 献

- 1) Chelly J, Gilgenkrantz H, et al : Cell 63 : 1239-1248, 1990.
- 2) 小峯 聡, 斎藤加代子ほか : 東女医大 62 : 1208-1215, 1992.

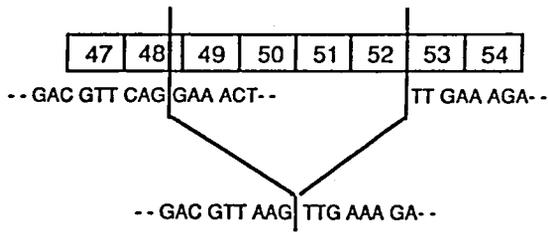


図2 Nucleotide sequence of E48-53 segment in case 14

# 37) Duchenne型筋ジストロフィー中枢神経におけるシナプス部の変化について

内野 誠\*

研究協力者 原 暁 生\* 徳 永 誠\* 平 野 照 之\*  
藤 木 通 弘\* 宇 山 英 一 郎\* 箕 田 修 治\*  
中 村 鉄 治\*\* 安 東 由 喜 雄\*\* 寺 本 仁 郎\*\*\*  
直 江 弘 昭\*\*\* 安 藤 正 幸\*\*

## 目 的

Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)の原因蛋白dystrophinが1987年Hoffmanらによりreverse geneticsの手法により発見されて以来, その局在や特性に関する数多くの知見が集積されてきた. しかしその生理機能はまだ完全には解明されておらず, Dyの欠如により骨格筋が変性, 壊死に陥る機序も今日なお不明である. またDMD児では高率に精神発達遅延やIQ異常が認められるが, その理由についても明らかではない. 我々はこれまでDyは骨格筋のみならず, ヒト中枢神経系のニューロン(postsynaptic region)にいわゆる脳型Dyとして局在し, 知能障害を認めるDMD脳ではDyを欠如することを世界に先がけて報告してきた<sup>1)2)</sup>. また詳細なIQ分析によりDMDではIQの下位テストでは特に記憶力, 記憶力, 計算力が低値で, 電気生理学的にも認知電位(P-300)に異常が認められることを明らかにしてきた<sup>3)</sup>. そこで今回Dyの局在が想定されている後シナプス部(postsynaptic region)の超微構造の変化について正常対照とDMD脳で比較検討した.

## 対象・方法

神経筋疾患以外で死亡した対照5例(42~68歳, 平均52.4歳)とDMD3例(17~26歳, 平均21.7歳)の大腦を剖検時に採取し, 電顕用に固定した頭頂葉(postcentral gyrus)の皮質第3層について, 単位面積( $100\mu\text{m}^2$ )あたりのシナプスの数, シナプス間隙内の变化, 後シナプス部の超微構造の変化を中心に検索した. なお各症例の頭頂葉(postcentral gyrus)の単位面積( $100\mu\text{m}^2$ )あたりのシナプス数は, 皮質第3層をニューロンの胞体はずして, 無作為に18箇所~60箇所(平均33箇所)を6,000倍の倍率で写真撮影

を行い, 一定倍率で引き伸ばしたのち, 印画紙中の $100\mu\text{m}^2$ 内に含まれるシナプス数を拡大鏡で確認することにより算定した. なお6,000倍で撮影した同じ部位をシナプスの観察に正確を期すために, 観察が容易な約20,000倍の倍率で分割撮影した. またシナプス間隙および後シナプス部の超微構造の変化は70,000~100,000倍の倍率で観察を行った.

## 結 果

対照例では単位面積( $100\mu\text{m}^2$ )あたりのシナプスの数は $8.027\pm 1.041$ (Mean $\pm$ SE)であり, 一方DMDでは $11.041\pm 0.949$ であった. DMDのほうが単位面積( $100\mu\text{m}^2$ )あたりのシナプスの数は多い傾向がみられた( $P<0.1$ ) (図1A, 1B).

また対照例のシナプス間隙についてはシナプス部分以外の細胞間隙にくらべて電子密度の高い物質で埋められており, 前後のシナプス膜をむすぶ線維状構造やときに前後のシナプス膜の中央に横線が認められた(図2A). DMDにおいては前後のシナプス膜をむすぶ線維状構造は対照と同様に比較的観察が容易であったが, 前後のシナプス膜の中央の横線は殆ど確認することが困難であった. 後シナプス膜の細胞質に向かう面は電子密度の高い物質(postsynaptic density: PSD)により裏打ちされており, その形態学的特徴からシナプスはType I(非対称型)とType II(対称型)に分類される. 今回検索したシナプスはすべてType Iに該当すると思われたが, 対照例ならびにDMD例ともPSDの形態に著しい差異はみられなかった. ただ対照例のPSDは境界が比較的鮮明であるのに対してDMDのPSDは全般的に境界がやや不鮮明なものが多く観察された(図2B).

## 考 案

ヒト骨格筋においてはdystrophin(Dy)はN端側でactinに結合し, cysteine-rich domainとC-terminal

\*熊本大学医学部神経内科

\*\*熊本大学医学部第一内科

\*\*\*国立療養所再春荘病院神経内科

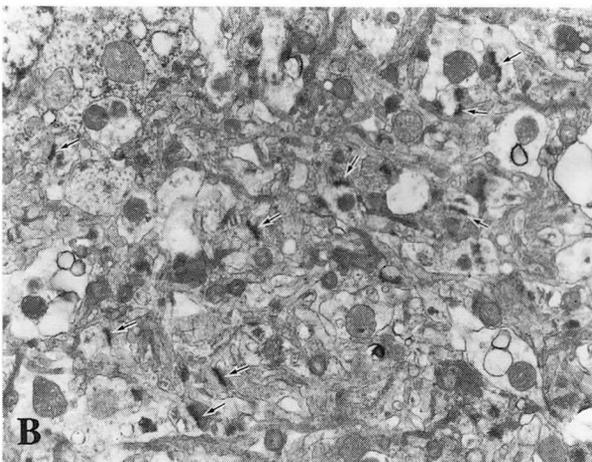
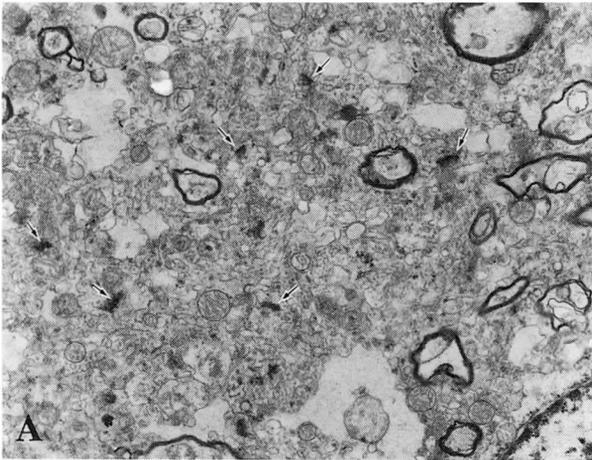


図1A 対照例の頭頂葉皮質第3層におけるシナプス(矢印)の分布.  $\times 6,000$ .  
 B DMDの頭頂葉皮質第3層におけるシナプス(矢印)の分布. 単位面積あたりのシナプス数が対照より増加しているように見える.  $\times 6,000$ .

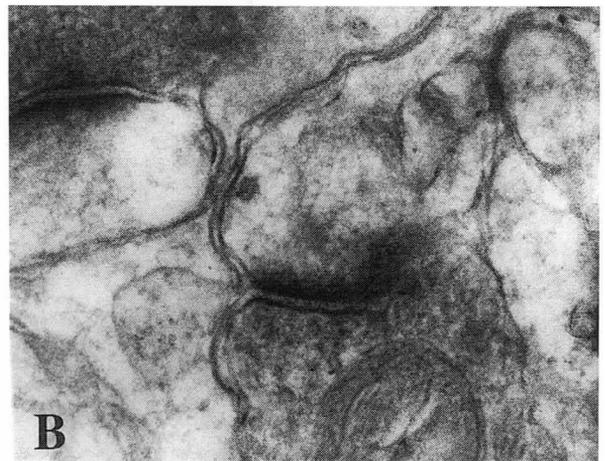
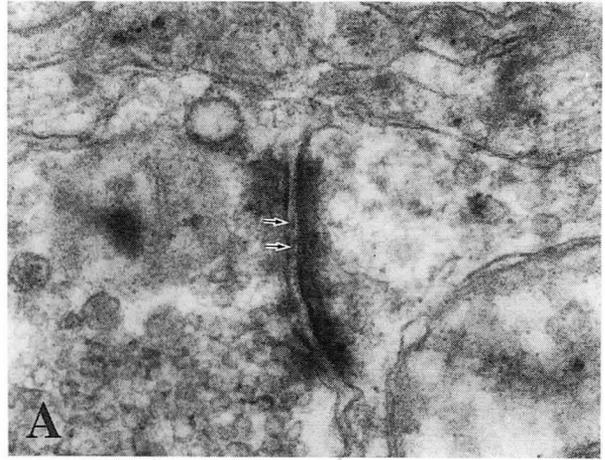


図2A 対照例のシナプスの拡大像. シナプス間隙の中央の横線(矢印)が観察され, postsynaptic density (PSD)の境界も比較的明瞭である.  $\times 70,000$ .  
 B DMDのシナプスの拡大像. シナプス間隙の中央の横線が不明瞭であり, PSDの境界も不鮮明である.  $\times 70,000$ .

domainの一部で細胞膜に存在する Dy-associated proteins (DAPs)と結合し, さらに基底膜の laminin と連結することが知られているが<sup>4)5)</sup>, ヒト脳においてはDyが postsynaptic regionに局在が想定されること以外は何ら明らかになっていない. DMD骨格筋では anchor proteinとしてのDyが欠如することで, 殆ど全てのDAPsが減少し, Dy-DAPs-lamininの連結が破綻して細胞死につながると推定されるのに対して, DMD脳ではDyは欠如していても細胞死は生じない. このことは同じくDyを欠如しながら, DMD骨格筋と脳でDyの欠如を通じて二次的に生じる病態の変化に何らかの違いがあることが予想される. 前回Dyが直接結合することが想定されるDAPsの一つの  $\beta$ -dystroglycanがヒト中枢神経内にも存在しており, DMDの骨格筋では  $\beta$ -dystroglycanは著減しているものの, 脳においては比較的よく保たれていることを

報告した<sup>6)</sup>. 現在骨格筋線維における基底膜に相当するものは脳では血管周囲に存在するほかは知られておらず, 後シナプス膜部に  $\beta$ -dystroglycanが局在しても筋線維のようにそれが連結する lamininのような基底膜成分が脳においては存在しないのか, あるいは類似の構造物が実際は存在しているのか解決が急がれる重要な問題と思われる. 超微構造上, 前後のシナプス膜を結ぶ線維状構造や前後のシナプス膜の中央に認められる暗線が前後のシナプスを機械的に結合する接着作用を有すると考えられており<sup>7)</sup>, これらの構造物がDyと  $\beta$ -dystroglycanの連結相手として働いている可能性もあり今後検討が必要である. 今回の検索ではDMD脳におけるDyの欠損によって惹起されたと思われる明瞭な超微構造上の変化は認めること

はできなかったが、DMDのPSDは全般的に境界がやや不鮮明であること、前後のシナプス膜の中央の暗線が殆ど確認が困難であること、単位面積(100 $\mu\text{m}^2$ )あたりのシナプスの数が対照より多い傾向がみられることなど若干の違いもみられたので今後さらに症例を増して検討することが大切と思われる。さらにシナプス部にはCa<sup>++</sup>/calmodulin(CAM)-dependent protein kinase, CAM kinase IIなどの調整酵素のほか tubulin, actin, fodrinなどの細胞骨格蛋白の存在が知られており<sup>8)</sup>, Dyがこれらの既知の蛋白といかなる関係をもってシナプス部の生理機構に係わっているのか、今後に残された重要な問題である。

### 結 論

Dyの局在が想定されている後、シナプス部(postsynaptic region)の超微構造の変化について正常対照とDMD脳で比較検討した。今回の検索ではDMD脳におけるDyの欠損によって惹起されたと思われる明瞭な超微構造上の変化は認めることはできなかったが、DMDのPSDは全般的に境界がやや不鮮明であること、前後のシナプス膜の中央の暗線が殆ど確認が困難であること、単位面積(100 $\text{mm}^2$ )あたりのシナプスの数が対照より多い傾向がみられることなど若干の違いもみられたので、今後さらに症例を増して検討することが大切と思われる。

### 文 献

- 1) Uchino M, Teramoto H, Naoe H, et al : Localization and characterization of dystrophin in the central nervous system of controls and patients with Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57 : 426-429, 1994.
- 2) Uchino M, Teramoto H, Naoe H, et al : Dystrophin and dystrophin-related protein in the central nervous system of normal controls and Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 87 : 129-134, 1994.
- 3) 池田晃章, 福島達臣, 内野 誠ほか : 筋ジストロフィー患者における聴覚および視覚刺激P300の検討。"厚生省「精神・神経疾患委託研究費」筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝相談及び疫学に関する研究班”(高橋班)平成5年度研究報告書, 1993.
- 4) Ibraghimov-Beskrovnyaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, et al : Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355 : 696-702, 1992.
- 5) Suzuki A, Yoshida M, Hayashi K, et al : Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. *Eur J Biochem* 220 : 283-292, 1994.
- 6) Uchino M, Hara A, Mizuno Y, et al : Distribution of dystrophin and dystrophin-associated protein 43DAG( $\beta$ -dystroglycan) in the central nervous system of normal controls and patients with Duchenne muscular dystrophy. *Internal Medicine*, 1996, in press.
- 7) Ichimura T and Hashimoto PH : Structural components in the synaptic cleft captured by freeze-substitution and deep etching of directly frozen cerebellar cortex. *J Neurocytol* 17 : 3-12, 1988.
- 8) Kennedy MB : The postsynaptic density. *Current Opinion in Neurobiology* 3 : 732-737, 1993.

# 38) 重篤な心筋障害を呈する Becker 型筋ジストロフィーの 全国調査結果

池田 修一\*

研究協力者 中村 昭則\* 矢崎 正英\*  
柳沢 信夫\* 武田 伸一\*\*

## はじめに

Becker 型筋ジストロフィー (BMD) は, Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) と同じく dystrophin 遺伝子異常により発症するが, 骨格筋症状が軽微であるのに対し心筋障害が強い例がみられるなど DMD に比べ表現型のスペクトラムが広いことで知られている. 我々は拡張型心筋症類似の病態を主徴とした BMD 症例に着目し, 遺伝子解析を行ってきた. 今年度は遺伝子異常と表現型の関連を検討するため, 重篤な心筋障害を合併した BMD について全国調査を行った.

## 方 法

神経内科・循環器科のある全国の大学附属病院, 国立病院, 国立療養所 124 施設を対象に, 各施設で過去 5 年間に経験された拡張型心筋症類似の病態を呈する BMD または, 高 CK 血症を伴う家族性拡張型心筋症 (以下 DCM) の症例について調査を依頼した.

調査項目は性別・年齢, 発症年齢, 診断, 骨格筋および心症状, 血清 CK 値, 骨格筋生検所見, 心電図・心エコー・心臓カテーテル検査を用いた心機能, ジストロフィン免疫組織化学, ジストロフィン遺伝子解析, 転帰の各項目について調査票の記入を依頼し, その結果をもとに遺伝子異常と表現型の関連について検討した.

## 結 果

全国 124 施設中 49 施設から返答があり, 16 施設 30 例の症例の報告があった. 性別は全て男性で調査時年齢は 13~65 歳, 発症年齢は 1~40 歳. 拡張型心筋症を示す BMD が 25 例, 高 CK 血症を伴う家族性 DCM が 3 例であった. 高 CK 血症を全例に認めた. また全例に心機能検査上異常を認め, 心不全症状を呈するものは 30 例中 17 例であった. Dystrophin 免疫組織化学は 9 例で施行され, BMD 7 例および DCM 1 例で faint and

patchy pattern を認めたが, 残りの DCM 1 例では正常パターンであった. この dystrophin が正常パターンを示した家族性 DCM 1 例は臨床的には大腿筋群の萎縮・筋力低下も認め, 骨格筋生検所見でも筋線維の大小不同, 壊死再生像, 間質結合織の増生を認めた. 転帰については 26 例が生存し, 4 例が既に死亡していた.

Dystrophin 遺伝子の解析は 30 例中 19 例で施行されており (表 1), exon 1 の欠失が 3 例, exon 2-7 の欠失が 1 例, exon 3・4 の欠失が 1 例, exon 13 の欠失及び一塩基置換が各 1 例, exon 45-48 内の欠失が 7 例だった. また PCR で欠失を認めなかったものが 2 例, 詳細不明が 3 例, 未施行が 11 例だった. 遺伝子検索が行われ, dystrophin 異常が明らかであった 14 例は, 13 例が BMD, 残りの 1 例が exon 2-7 の欠失による DCM であった. この 14 例について dystrophin 遺伝子異常と表現型の関連を詳細に検討した.

遺伝子異常と骨格筋症状の関連 (表 2) については, 全例に下腿の仮性肥大を認めたが, exon 1, exon 2-7 の欠失例では, 明らかな筋萎縮・筋力低下は認められなかった. その他の症例では, いずれも軽度ないし中等度の近位筋の筋力低下が認められた. Exon 45-48 内の欠失例は全て経過年数が長く, 四肢の筋萎縮・筋力

表 1 dystrophin 遺伝子解析結果

遺伝子異常	症例数	診断	診断方法
exon			
1 deletion	3	BMD	Southern blot + PCR
2-7 deletion	1	DCM	Southern blot + PCR
3, 4 deletion	1	BMD	PCR
13 deletion	1	BMD	Southern blot + PCR
13 point mutation	1	BMD	PCR + sequence
45-47 deletion	1	BMD	PCR
45-48 deletion	4	BMD	PCR
47 deletion	2	BMD	Southern blot + PCR
PCR で欠失を認めない例	2	DCM	PCR
詳細不明例	3	BMD	
未施行例	11	BMD	
計	30		

\*信州大学医学部第三内科

\*\*国立精神・神経センター神経研究所

低下が明らかであった。遺伝子異常と心症状・心機能の関連(表3)については、心不全症状を14例中11例に認め、左室壁運動障害を全例に認めた。また exon 1 から exon13までの異常例では経過年数に比し、左室駆出率の低下が顕著であった。

以上の結果から、心筋障害を呈する dystrophin 異常症は5' 端の異常を持つものと、hot spot 部の異常を持つものに大別されると仮定し、左室駆出率が示されていた症例について、5' 端の異常をもつ群と hot spot 部の異常を持つ群に分けて、経過年数と左室駆出率との関係を調べた(図1)。5' 端の異常のものは発症早期から駆出率の低下傾向を示すが、hot spot 部の異常例では緩徐に駆出率が低下してくると考えられた。

ただし、対象とした症例数が少ないこと、経過年数が正確でないこと、駆出率の計測が使用機種で異なるこ

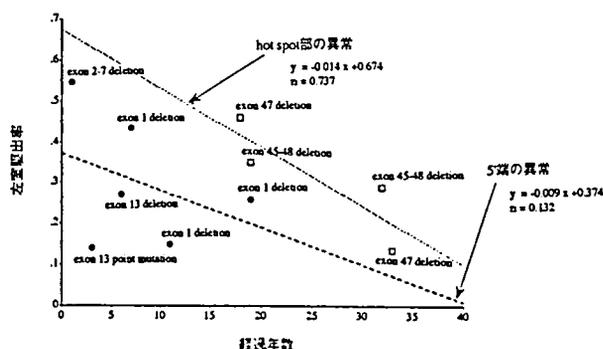


図1 経過年数と左室駆出率(ejection fraction)の関係

表2 dystrophin 遺伝子異常と骨格筋症状の関連

Case	Age (yr)	Diagnosis	Duration of illness (yr)	Dystrophin gene exon abnormality	Pseudohypertrophy	Muscle weakness	Muscle biopsy findings
1	24	BMD	19	1 deletion	+	none	not done
2	18	BMD	7	1 deletion	+	none	opaque fiber
3	14	BMD	11	1 deletion	+	none	not done
4	24	DCM	1	2-7 deletion	+	none	not done
5	19	BMD	4	3-4 deletion	+	mild	hypertrophic fiber necrotic fiber pyknotic nuclear clamp
6	43	BMD	13	13 deletion	+	moderate	not done
7	44	BMD	4	13 point mutation	+	mild	variation in fiber size necrotic fiber
8	47	BMD	25	45-48 deletion	+	moderate	variation in fiber size necrotic fiber fiber splitting
9	21	BMD	19	45-48 deletion	+	moderate	variation in fiber size
10	39	BMD	15	45-48 deletion	+	moderate	not done
11	27	BMD	32	45-47 deletion	+	moderate	not done
12	40	BMD	33	45-48 deletion	+	moderate	not done
13	27	BMD	18	47 deletion	+	moderate	variation in fiber size opaque fiber
14	34	BMD	33	47 deletion	+	moderate	necrotic fiber increased interstitial tissue

表3 dystrophin 遺伝子異常と心症状・心機能の関連

Case	Age (yr)	Diagnosis	Duration of illness (yr)	Dystrophin gene exon abnormality	Heart failure	ECG findings	UCG findings	Ejection fraction
1	24	BMD	19	1 deletion	-	abnormal Q in II, III, aVf	LV hypokinesis	0.26
2	18	BMD	7	1 deletion	+	abnormal Q in II, III, aVf tall R in V1-2	posterolateral hypokinesis	0.435
3	14	BMD	11	1 deletion	+	abnormal Q in I, aVL, V4-6 tall R in V1	LV dilatation	0.15
4	24	DCM	1	2-7 deletion	+	bradycardia, flat T	LV dilatation diffuse hypokinesis	0.547
5	19	BMD	4	3-4 deletion	+	bradycardia LVH with ST-T change	LV dilatation LV dysfunction	-
6	42	BMD	13	13 deletion	+	IRBBB, LA load	LV hypokinesis	0.27
7	44	BMD	4	13 point mutation	+	V1 R/S>1.0 ST ↓ in I, V4-6	LVDs 71mm LVDd 69mm	0.14
8	47	BMD	25	45-48 deletion	-	ST-T ↓ in I-aVI-V3-6	DCM pattern	-
9	21	BMD	19	45-48 deletion	+	within normal limit	LV hypokinesis	0.45
10	39	BMD	15	45-48 deletion	+	unknown	unknown	-
11	27	BMD	32	45-47 deletion	+	LA load, tachycardia	unknown	0.29
12	40	BMD	33	45-47 deletion	+	intraventricular conduction delay	unknown	0.29
13	27	BMD	18	47 deletion	-	deep Q in II, III, aVf tall R in V1-2	LV hypokinesis	0.46
14	34	BMD	33	47 deletion	+	LA+RA load ST ↓ in II, III, aVf, V5-6	LV dilatation LV hypokinesis	-

とが問題点としてあげられた。

## 考 察

心筋障害を呈するBMDは、dystrophin遺伝子の5'端の異常を持つものと、hot spot部の異常を持つものに大別されると考えられた。5'端の異常例では骨格筋症状に比べ心症状・心筋障害が先行しより重篤である症例が多かった。Hot spot部の異常例では骨格筋症状が先行し、進行期に至って心筋障害が出現してくると考えられた。Exon13に異常をもつ2例については、他の5'端の異常例と同様に骨格筋症状に比べ心症状の出現が早く、重篤であったが、近位筋の筋力低下が明らかであったことから、5'端の異常例の中でも表現型にheterogeneityがあると考えられた。

拡張型心筋症を呈した5'端のdystrophin異常症はBMDおよびX linked cardiomyopathy (XLCM)として報告されている。我が国においてはexon1の欠失<sup>1)</sup>、exon3, 4の欠失<sup>2)</sup>およびexon13のone point mutation<sup>3)</sup>により拡張型心筋症を主徴としたBMD例が報告されている。またイタリアのMuntoniら<sup>4)</sup>はXLCM家系でpromoter~exon1にかけての欠失を見出し、アメリカのTowbinら<sup>5)6)</sup>はexon8-10内のアミノ酸変異を伴った異常を見出したと報告した。さらに最近イタリアのBartoloniら<sup>7)</sup>はpromoter領域のpoint mutationで、心筋障害を主徴とし、骨格筋障害が軽度であったをBMD例を報告した。今回の調査でもexon1が欠失したBMD例およびexon2-7が欠失したDCM例は下腿の仮性肥大以外明らかな筋力低下はみられず、XLCM類似の病態と考えられた。しかし、5'端の異常の中でもexon3-4の欠失例やexon13の欠失例ではいずれも軽度ながら近位筋の筋力低下がみられたことから、5'端の中にも重篤な心筋障害を起こすlocusがいくつかあって、そのlocusにより骨格筋障害の程度が異なる可能性があると考えられた。一方exon45-48はBMDでdystrophinの欠失が生じるhot spotであり、以前からこの部位の異常を持つ一部の例で心筋障害を起こすことが報告されている。今回の調査結果からも5'端の異常例に比べ心筋障害の出現は遅く、従来の報告と同様の結果と考えられた。

5'端の異常を持つBMD症例が病初期から心筋障害の程度が強く、骨格筋症状が軽微であることが明らかにされたことで、このような異常を持つ患者の予後の改善・生活レベルの向上を図るため、将来的には心移植を含めた積極的な治療法を導入検討することが可能となる。従って5'端の異常を持つBMDにおいて遺伝子異常と心筋障害の発症機序をより詳細に明らかにすることは、心筋におけるdystrophinの機能ならびに治療方針を検討する上で重要と考えられた。

謝 辞：本研究にあたり、症例を呈示頂きました秋田大学医学部第二内科、筑波大学医学部神経内科、国立療養所東埼玉病院内科、千葉大学医学部神経内科、東京医科歯科大学神経内科、東京医科歯科大学第三内科、日本医科大学第一内科、東海大学医学部第四内科、国立精神・神経センター武蔵病院神経内科、松本共立病院、愛知医科大学第四内科、国立循環器病センター内科脳血管部門、大阪医科大学第一内科、近畿大学医学部第一内科、神戸大学医学部第一内科、岡山大学医学部神経内科、九州大学医学部神経内科の各施設および調査票をお送り頂きました施設に対して深謝します。

## 文 献

- 1) Yoshida K, Ikeda S, Nakamura A, et al: Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy gene in patients with dilated cardiomyopathy. *Muscle & Nerve* 16: 1161-1166, 1993.
- 2) Ohkoshi N, Yoshizawa T, Mizusawa H, et al: Malignant hyperthermia in a patient with Becker muscular dystrophy: dystrophin analysis and caffeine contracture study. *Neuromusc Disord* 5: 53-58, 1995.
- 3) Yu Y, Yamabe H, Fujita H, et al: Cardiac involvement in a family with Becker muscular dystrophy. *Internal Medicine* 34: 919-923, 1995.
- 4) Muntoni F, Cau M, Ganau A, et al: Deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 329: 921-925, 1993.
- 5) Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, et al: X-linked dilated cardiomyopathy; molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 87: 1854-1865, 1993.
- 6) Towbin JA, Ortiz-Lopez R, Bulman D, et al: A novel cardio-specific dystrophin mutation as a cause of X-linked dilated cardiomyopathy (XLCM). *Cardiology* 36(suppl): A203, 1995.
- 7) Bartoloni L, Fanin M, Freda MP, et al: Point mutations in muscle promoter region of dystrophin gene associated with cardiomyopathy and myoglobinemia. *Neurology* 45 (Suppl 4): A182-83P, 1995.

## VIII. Adhalin 欠損症

# 39) Adhalin欠損悪性肢帯型筋ジストロフィーにおける臨床像とadhalin遺伝子異常の特徴

川井尚臣\*

研究協力者 赤池雅史\* 遠藤武徳\* 柏木節子\*  
国重誠\* 足立克仁\*\* 藤原力\*\*\*  
奥野史郎\*\*\* 平井嘉勝\*\*\* Campbell KP\*\*\*\*  
清水輝夫\*\*\*\*\* 松村喜一郎\*\*\*\*\*

## はじめに

悪性肢帯型筋ジストロフィーは、1966年三好らにより提唱された筋ジストロフィーの遺伝・臨床型の一つで<sup>1)2)</sup>、臨床像はDuchenne型筋ジストロフィー(DMD)に類似しているが常染色体劣性の遺伝型を示す。Ben Hamidaら(1983年)<sup>3)</sup>により報告されたsevere childhood autosomal recessive muscular dystrophy (SCARMD)の臨床像は本症に類似しており、両者は同じものと考えられる。1992年、Matsumuraら<sup>4)</sup>によりSCARMD症例の骨格筋にadhalinの欠損が明らかにされたが、我々は悪性肢帯型症例の中にも同蛋白質の欠損例があることを見出し<sup>5)</sup>、それらの症例にadhalin遺伝子の異常を見出した<sup>6)</sup>。

本論文では自験の悪性肢帯型症例のadhalinの遺伝子解析の結果を述べ、併せて文献報告のadhalin欠損筋ジストロフィーの臨床像とadhalin遺伝子の異常についても述べる。

## 対象と方法

### 【対象】

自験の悪性肢帯型筋ジストロフィー (MLGMD) 3家系4症例と、現在までに報告された<sup>4)~18)25)</sup> adhalin欠損筋ジストロフィー52家系71症例である。

### 【方法】

#### 1. 臨床像の検討

- 1) MLGMD症例：自験の3家系4症例の臨床事項を要約して表1に示した。
- 2) 文献報告例：前記の文献例の臨床像と筋組織像を

検討した。

## 2. Adhalin遺伝子の解析と遺伝子異常の検討

1) 自験例のadhalin遺伝子の解析：症例1~3については生検筋によりRNAを抽出し、Roberdsら<sup>15)</sup>のadhalin遺伝子の塩基配列をもとに6対のプライマーを作成し<sup>6)</sup>、reversed transcription PCR (RT-PCR)を行った。症例4に関してはホルマリン固定の筋組織標本よりDNAを抽出し、ゲノムDNA解析用のプライマー対<sup>6)</sup>を用いてDNAを増幅した。得られたDNAの塩基配列は自動DNA sequencer (ALF, Pharmacia)により解析した。症例1~3はゲノムDNAの解析も行った。両親と、一部の家系員については白血球より抽出したゲノムDNAについて検索を行った。

2) 文献例のadhalin遺伝子異常：Adhalin遺伝子の異常が報告された症例あるいは家系<sup>6)14)17)18)25)</sup>の遺伝子異常をまとめた。

## 3. 変異adhalinのHydrophobicity/Hydrophilicity Plot

遺伝子異常から推定される変異adhalinの構成アミノ酸の疎水性、親水性<sup>26)</sup>の変化を調べ、正常adhalinのものと比較検討した。

成績の統計処理は二項検定にて行った。

## 結 果

### 1. 臨床像

1) 自験例：臨床事項の要約を表1に示した。Wa.家系とTa.家系では患者の両親は近親婚であるが、Ma.家系には近親婚はない。若年の症例1と4には血清CK活性値の著しい上昇がみられた。筋力低下は主として四肢近位部と体幹に認められ、大腿腓腹筋には末期の症例2を除き仮性肥大がみられた。症例1~3については骨格筋中のadhalinの欠損を免疫組織学的に確認した<sup>5)6)</sup>。

### 2) Adhalin欠損筋ジストロフィーの報告例の臨床像

Adhalin欠損例の文献報告例(自験例を含む)は52家系71症例である。このうち、adhalinの遺伝子異常を

\*徳島大学医学部第一内科

\*\*国立療養所徳島病院

\*\*\*大塚製薬Gen研究所

\*\*\*\*HIMIおよびIowa大学医学部

\*\*\*\*\*帝京大学医学部神経内科

表1 Adhalin 遺伝子に異常が認められた悪性肢帯型筋ジストロフィーの3家系. Adhalin 遺伝子の変異—報告例

	Wa. 家系	Ta. 家系		Ma. 家系
症例	1	2	3	4
年齢・性	23歳・女性	56歳・女性	31歳・女性	10歳・男性
発症年齢	3歳	5歳	5歳	2歳
家族歴				
主訴	歩行障害, 四肢の筋力低下	四肢, 体幹の筋力低下		起立困難
初発症状	歩行時よく転倒	駆走遅い, 転倒	駆走遅い, 転倒	動揺性歩行
歩行不能年齢	11歳	13歳	16歳	9歳
現知能	正常	正常 (全身性)	正常	正常
筋萎縮	四肢近位部, 軀幹 (+)	(±)	四肢近位部, 軀幹 (+)	四肢近位部, 軀幹 (+)
腓腹筋仮性肥大	(+)	(±)	(+)	(+)
起立・歩行	不能	不能	不能	不能
血清CK値 (IU/L)	6,550 (11歳)	400	680	6,264 (正常値 <200)

■●: 患者 (MLGM), 回○: 保因者, ㄗ: 発症者, †: 死亡, /: 検査済, ( )内はCK活性値 (正常値: <200 IU/L), □, ○内の数字は同胞数を表す

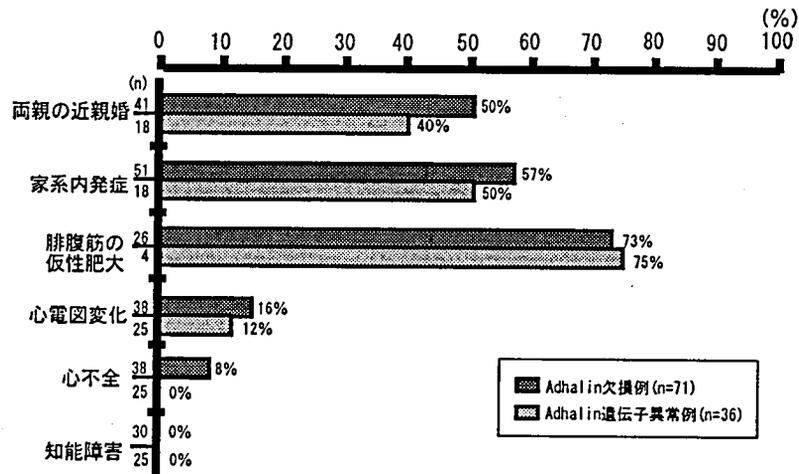


図1 Adhalin 欠損筋ジストロフィーの臨床像 (1). Adhalin は他の sarcoglycan ( $\beta$ ,  $\gamma$ ) の遺伝子の異常でも欠損するので adhlain 欠損例と adhalin 遺伝子異常例をわけて示した.

有する例は19家系36症例である。Adhalinの完全欠損例と不完全欠損例に分けると前者は27家系44症例<sup>4)~9)11)~14)17)~19)</sup>で、後者は23家系24症例<sup>7)10)15)~17)</sup>あった。臨床事項の概要を図1と図2に示した。

以下臨床事項について述べる。

男女比: 男性29例, 女性41例で, 男女比は(1:1.4)である。

発症年齢: 1歳~15歳と幅広く分布しており, 平均6.6±3.6歳であった。Adhalin完全欠損の28例は1歳~12歳に分布し, 平均6.0歳であった。不完全欠損

の13例は1歳~15歳に分布し, 平均7.6歳であった。これらはDMD(50例)の平均3.1±0.9歳に比べ高い(p<0.01)。

歩行不能年齢: 平均14.3±5.1歳であった。完全欠損例(18例)は9~21歳に分布し, 平均14.2歳で, 不完全欠損例の(4例)は10~21歳, 平均15.5歳であった。これはDMD(50例)の平均10.1±1.4歳に比べ遅い(p<0.05)。

両親の近親婚: 41例中21例(50%)にみられた。

家系内発症: 51家系中29家系(57%)に認められた。

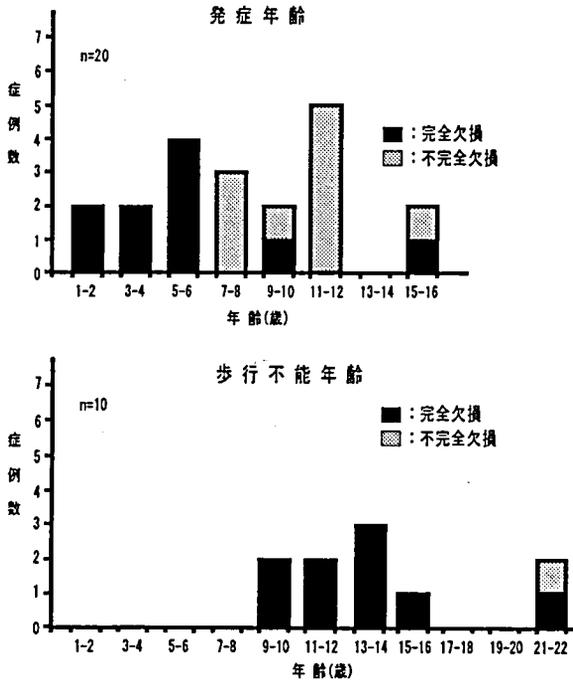


図2 Adhalin欠損筋ジストロフィーの発症年齢と歩行不能年齢(自験4例, Roberds SL, et al(3例), Piccolo F, et al(12例), Passos-Bueno MR, et al(1例)).

腓腹筋の仮性肥大: 26例中19例(73%)に認められた。

心障害: 心電図異常は38例中6例(16%)に認められ, 完全欠損例20例中4例(20%)に異常Q波があり, 不完全欠損例の15例中のうち2例(13%)に左室肥大所見が認められた。心不全症状を示したのは完全欠損例の3例(8%)のみであった。

知能障害: 30例に知能に関する記載があったが, 知能障害を有する例はなかった(図1)。

血清CK活性値: 10歳以下ではDMDに比べ低い, それ以上の年齢では高い傾向を示した。

下肢筋のCT: 腓腹筋, ヒラメ筋などの屈筋群に強い萎縮像が認められ, これはDMDと類似の所見であった(図略)。

図2はadhalin遺伝子に異常を有する症例のみの発症年齢, 歩行不能年齢の成績を示したが, adhalin欠損例の成績とほぼ同じであった。

### 3) 筋病理組織所見

筋線維の大小不同が著明で, 壊死, 変性, は少なく, opaque線維, 再生筋線維などの所見もDMDに比べ少なかったが, 多数の分葉線維が5例(12%)に認められた。免疫組織化学ではジストロフィンほぼ正常に認められたが, adhalin(50kDa DAG)の欠損が認められた。43k(β)と35k(γ)のsarcoglycanも同様に欠損していた。

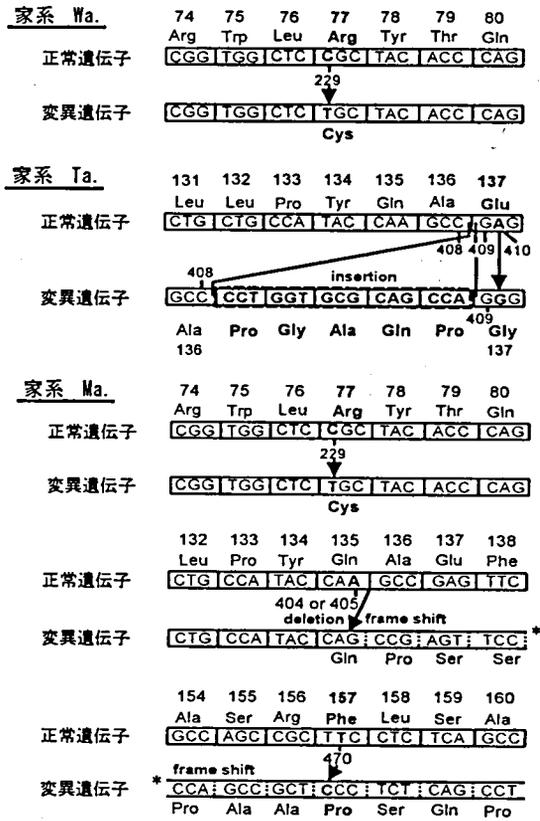


図3 自験3家系のadhalin遺伝子の異常。症例1(Wa. 家系)では, adhalin遺伝子のcDNAにC229Tの変異が見出され, ゲノムDNAでも同じ変異が確認された。症例2と症例3(Ta. 家)ではA410Gの変異が認められ, さらに塩基番号(nt.)408とnt.409の間に15塩基(-CCTGGTGCGCAGCCA-)の挿入が認められた。これらの変異によりWa. 家ではArg77Cysの置換が, Ta. 家ではGlu137Glyの置換とPro-Gly-Ala-Gln-Proの5つのアミノ酸の挿入が生じる<sup>6)</sup>。症例4では, 一方の対立遺伝子にnt.404あるいは405のadenine(A)の欠失とT470Cの変異が見出された。このAの欠失により3'側にはフレームシフトが生じ, コドン136よりC末端側は異なったアミノ酸配列となり, 下流のエクソン6にはナンセンス変異が生じていた。そしてもう一方の対立遺伝子には症例1と同じくC229Tの異常が認められた。なお, 正常人75例の白血球DNAで上記の変異を調べたが変異はみられなかった。

## 2 Adhalin遺伝子の異常

### 1) 自験例のadhalin遺伝子の解析

成績の要約は図3に示した。Wa. 家系とTa. 家系では患者にはホモ接合型の遺伝子異常が認められ, 両親には正常と変異型の両者が認められた。Ta. 家はcompound heterozygote(複合ヘテロ接合体)の変異が認

表2 Adhalinの遺伝子異常-報告例

家系	対象	塩基番号	塩基置換	エクソン	変異 (コドン番号)
1	7人	-1 exon7	G→A	7	スプライシング異常
2	モロコシ人		挿入 8bp	5	フレームシフト
3	日本人	404, 470 229	A→欠失, T→C C→T	5	フレームシフト, Phe157 Pro Arg77 Cys
4	フランス人	238 229	C→T C→T	3	ナンセンス (80) Arg77 Cys
5	ドイツ人	229	C→T	3	Arg77 Cys
6	日本人	229	C→T	3	Arg77 Cys
7	ブラジル人	229	C→T	3	Arg77 Cys
8	ブラジル人	229	C→T	3	Arg77 Cys
9	ブラジル人	229	C→T	3	Arg77 Cys
10	フランス人	184 725	T→C T→C	3	Tyr62 His Val247 Ala
11	イギリス人	101	G→A	2	Arg34 His
12	日本人	408-409 410	挿入 15bp A→G	5	Pro-Gly-Ala-Gln-Pro Glu137 Gly
13	フランス人	293 524	G→A T→C	3	Arg98 His Val175 Ala
14	フランス人	293 -1 exon8	G→A G→T	8	Arg98 His スプライシング異常
15	イギリス人	452 739	C→G G→A	5	ナンセンス (151) Val247 Met
16	フランス人	229 203	C→T G→A	3	Arg77 Cys Gly68 Gln
17	フランス人	739	G→A (もう一方不明)	6	Val247 Met
18	7人	293	(C→T)	3	Arg98 Cys
19	日本人	229	(G→A)	3	Arg98 His
19	日本人	229	C→T	3	Arg77 Cys

\*: Roberds, S.L., et al. (1994); ●: 著者らの家系(1994, 1995);  
 †: Passos-Bueno, M.R., et al. (1995); #: Ljunggren, A., et al.  
 (1995); その他は Piccolo, F., et al. (1995); 家系番号の C 印:  
 複合ヘテロ接合体; Δ: 徳島大学小児科例

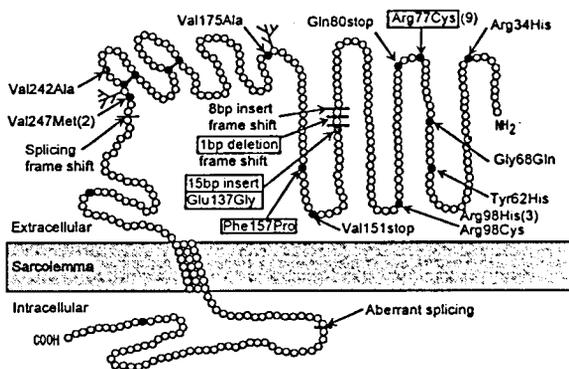


図4 Adhalin分子上のアミノ酸変異とその部位(自験例+文献例). (Piccolo, et al.<sup>10</sup>, 一部改変) Arg77Cysの変異が多く, この部位はhot spotである. 挿入や欠失はnt. 400~408の部分に多い. □は自験例, ( )内の数値は変異を有する家系数. ○印はアミノ酸1個を示す. ○は変異アミノ酸.

められた. 正常人75例について変異部位の塩基配列を調べたが, 異常はなかった.

## 2) 文献報告例の遺伝子異常

現時点までに報告された adhalin の遺伝子異常をまとめて表2に示した. 19家系の報告があるが変異は遺伝子の各部位に起こり, ミスセンス変異, 欠失, 挿入など各種の変異が認められた. 変異部位は nt. 229 の C→T の変異が全体の 47% と多い. 複合ヘテロ接合体が約半数にみられた.

変異は adhalin の筋漿膜外をコードする部分に多く (図4), 筋漿膜内には1箇所のみで, 膜貫通部分の報告はない.

## 3. 遺伝子異常による adhalin 分子の変化

変異 adhalin の親水性・疎水性表示の変化を調べた結果, 変異部位の近辺ではかなり大きい変化がみられた (図略).

## 4. Adhalin の欠損と臨床経過との関係

Adhalin の免疫組織化学あるいはウェスタンブロットの所見により adhalin の発現量を判断し, 発症年齢や歩行不能年齢との関係を見ると, adhalin の欠損の程度の強い例が発症年齢が早い傾向を示した (図2). 歩行不能年齢についても同様のことがいえる.

## 考 察

悪性肢帯型筋ジストロフィー (MLDMD) の診断基準<sup>1)2)</sup>は, 1) 両性に発症し, 2) 筋萎縮は腰帯, 四肢近位部に有意, 3) 1~5歳に発症, 以後急速に進行し, 多くは15歳までに歩行不能となり, 4) 血清CK活性値は中等度の上昇が認められるが, 両親の多くは血清CK活性値の上昇はない, 5) 知能障害はない. 加えて, 6) 臨床症状の程度には多少の幅が認められる, などである. 本論文の自験 MLDMD 症例は上記の特徴を有し, 悪性肢帯型と考えられる.

Adhalin 欠損筋ジストロフィーの臨床像は, Duchenne型に比べると症状はやや軽く, 経過が遅いものがあるなどの特徴を有する. その他に心障害が少ないことや, 知能障害がないなどの特徴があるが, 前者については adhalin の欠損を代償する機構が存在するか, あるいは心筋における adhalin の isoform の存在による可能性も考えられる<sup>28)</sup>. 後者については骨格筋型の adhalin の中枢神経系における発現がないことによると考えられる<sup>29)</sup>.

文献例の中には, 臨床症状や経過にかなりの幅があり, 筋組織の adhalin の発現程度をみると adhalin の完全欠損例<sup>4)~9)11)~14)18)19)</sup>と不完全欠損例<sup>7)10)15)~17)</sup>に分けることができる. 両者の臨床症状には基本的には差はなかったが, 前者は後者に比べ初発年齢が早く, 歩行不能年齢も若年であり, 症状はやや重症である.

また、最近  $\beta$ -sarcoglycan や  $\gamma$ -sarcoglycan (A3b) の遺伝子欠損例<sup>30)~32)</sup>の報告もあり、これらの例では adhalin も欠損するので、adhalin 欠損例と adhalin の遺伝子異常を有する例に分けて臨床像を検討したが、両者の間に明らかな差はなかった。

筋病理組織像では、基本的には DMD と同じであるが筋障害は比較的軽く、また分葉線維が多く、これらの変化は筋障害がより緩徐に生じたことを表していると思われる。

Adhalin 欠損例の adhalin 遺伝子については、Ben Othmane ら<sup>27)</sup>がチュニジアの SCARMD 家系で染色体 13q に連鎖していることを報告したが、Roberds ら<sup>14)</sup>は adhalin 遺伝子が 17 番染色体上 (17q12-q21.33) に存在し、フランス人の adhalin 欠損の 1 家系で同遺伝子の変異があることを報告した。本症 (MLGMD) あるいは SCARMD における adhalin の遺伝子異常は、はじめ米国 (1994 年)<sup>14)</sup>より報告があり、ついで我が国 (1994 年<sup>33)</sup>, 1995 年<sup>6)</sup>), フランス (1995 年)<sup>17)</sup>, ブラジル (1995 年)<sup>18)</sup>, 米国 (1995 年)<sup>25)</sup> などより続々と報告された。

我々は MLGMD の 3 家系に adhalin 遺伝子の点変異、塩基挿入および欠失を見出したが、Roberds ら<sup>14)</sup>が SCARMD で見出した変異は、一方の遺伝子に G293A の変異 (Arg98His に置換) があり、その対立遺伝子には T524C の変異 (Val175Ala に置換) がある複合ヘテロ接合体であった。従って、この変異を本症の原因とするには多少問題もあった。しかし我々の報告<sup>6)</sup>や、その後 Piccolo ら<sup>17)</sup>の家系にホモ接合型の変異が発見されたことにより、Roberds<sup>14)</sup>らによる adhalin の遺伝子異常が本症の原因であることがより明確になった。

遺伝子異常としては、nt. 229 の adenine から thymine への変異が最も多く、約半数を占め hot spot と考えられているが、その他に種々の部位に塩基の欠失、挿入、スプライシング異常を生じるものなど各種の変異がある。本症には半数の例に複合ヘテロ接合体が存在する。これも本症の遺伝子異常の特徴の一つであるが、報告例の多くが先進国の例で、近親婚率が低いことや、一般人の間の変異遺伝子頻度が高いことなどが考えられる。

Adhalin の遺伝子異常によるアミノ酸の変異や置換の大部分は adhalin の筋漿膜外の部分にあるので、これらの部分は本蛋白質の安定化や他の蛋白との結合に重要な役割をしていると考えられる。

遺伝子異常のうち Arg77Cys の変異例は adhalin の完全欠損があり、重症である。その他の変異では両者の関係は明らかでない。

Adhalin の遺伝子異常と adhalin 欠失との関係については、異常遺伝子により異常 adhalin 分子が生成さ

れ、その高次構造の変化や物理化学的な変化により、他の膜関連蛋白質との結合障害が生じ、その結果 adhalin の分解促進、筋細胞膜の機能異常、ついで筋漿膜の崩壊、そして最後に筋細胞の壊死が生じると考えられる。

#### おわりに

Adhalin 欠損 MLGMD あるいは SCARMD の臨床像と adhalin 遺伝子の異常について報告し、遺伝子異常と筋細胞の崩壊の機序について述べた。

#### 文 献

- 1) 三好和夫, 西条一夫, 栗生陽次郎ほか: 進行性ジストロフィー症の 1 病型 "Malignant Limb-girdle" type の提唱 (会). 臨床神経 6: 491, 1966.
- 2) Miyoshi K, Tada Y and Kawai H: Genetic-clinical types of progressive muscular dystrophy, with special reference to "malignant limb-girdle type". Jpn J Hum Genet 19: 39-42, 1974.
- 3) Ben Hamida M, Fardeau M and Attia N: Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia. Muscle Nerve 6: 469-480, 1983.
- 4) Matsumura K, Tomé FMS, Collin H, et al: Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. Nature 359: 320-322, 1992.
- 5) 川井尚臣, 乾 俊夫, 三ッ井貴夫ほか: 悪性肢帯型筋ジストロフィー (三好) の骨格筋における adhalin (50kDa dystrophin associated glycoprotein) の完全欠損. 臨床神経学 35: 184-189, 1995.
- 6) Kawai H, Akaike M, Endo T, et al: Adhalin gene mutations in patients with autosomal recessive childhood onset muscular dystrophy with adhalin deficiency. J Clin Invest 96: 1202-1207, 1995.
- 7) Fardeau M, Matsumura K, Tomé FMS, et al: Deficiency of the 50kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin) in severe autosomal recessive muscular dystrophies in children native from European countries. C R Acad Sci Paris 316: 799-804, 1993.
- 8) Passos-Bueno MR, Bakker E, Marie SKN, et al: Exclusion of the 15q locus as a candidate gene for severe childhood autosomal

- recessive Duchenne-like muscular dystrophy in Brazilian families. *Hum Mol Genet* 2 : 201–202, 1993.
- 9) Passos-Bueno MR, Richard I, Vainzof M, et al : Evidence of genetic heterogeneity in the autosomal recessive adult forms of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families. *J Med Genet* 30 : 385–387, 1993.
  - 10) Azibi K, Bachner L, Beckmann JS, et al : Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome 13q12. *Hum Mol Genet* 2 : 1423–1428, 1993.
  - 11) Zatz M, Matsumura K, Vainzof M, et al : Assessment of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein in Brazilian patients with severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 123 : 122–128, 1994.
  - 12) Romero NB, Tomé FMS, Leturcq F, et al : Genetic heterogeneity of severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with adhalin (50kDa dystrophin-associated glycoprotein) deficiency. *C R Acad Sci Paris* 317 : 70–76, 1994.
  - 13) Sewry CA, Sansome A, Matsumura K, et al : Deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein and abnormal expression of utrophin in two south asian cousins with variable expression of severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 4 : 121–129, 1994.
  - 14) Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, et al : Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78 : 625–633, 1994.
  - 15) Higuchi I, Yamada H, Fukunaga H, et al : Abnormal expression of laminin suggests disturbance of sarcolemma-extracellular matrix interaction in Japanese patients with autosomal recessive muscular dystrophy deficient in adhalin. *J Clin Invest* 94 : 601–606, 1994.
  - 16) Hayashi YK, Mizuno Y, Yoshida M, et al : The frequency of patients with 50-kd dystrophin-associated glyco-protein (50DAG or adhalin) deficiency in a muscular dystrophy patient population in Japan. *Neurology* 45 : 551–554, 1995.
  - 17) Piccolo F, Roberds SL, Jeanpierre M, et al : Primary adhalinopathy ; a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nat Genet* 10 : 243–245, 1995.
  - 18) Passos-Bueno MR, Moreira ES, Vainzof M, et al : A common missense mutation in the adhalin gene in three unrelated Brazilian families with a relatively mild form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 4 : 1163–1167, 1995.
  - 19) Chomczynski P and Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 : 156–159, 1987.
  - 20) Frohman MA, Dush MK and Martin GR : Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts : amplification using a single genespecific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 8998–9002, 1988.
  - 21) Kaufman DL and Evans GA : Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *Biotechniques* 9 : 304–306, 1990.
  - 22) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 5463–5467, 1977.
  - 23) Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, et al : Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321 : 674–679, 1986.
  - 24) Gross-Bellard M, Oudet P and Chambon P : Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Eur J Biochem* 36 : 32–38, 1973.
  - 25) Ljunggren A, Duggan D, McNally E, et al : Primary adhalin deficiency as a cause of muscular dystrophy in patients with normal dystrophin. *Ann Neurol* 38 : 367–372, 1995.
  - 26) Kyte J and Doolittle RF : A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157 : 105–132, 1982.
  - 27) Ben Othmane K, Ben Hamida M, Pericak-

- Vance MA, et al: Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genet* 2 : 315-317, 1992.
- 28) McNally EM, Yoshida M, Mizuno Y, et al: Human adhalin is alternatively spliced and the gene is located on chromosome 17q21. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 9690-9694, 1994.
- 29) 松村喜一郎: Adhalin(50kDa dystrophin-associated glycoprotein)欠損と severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy (SCARMD). "Annual Review 神経 1995"(後藤文男ほか・編) 中外医学社, 東京, 1995, pp13-20.
- 30) Lim LE, Duclos F, Broux O, et al:  $\beta$ -sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nature Genet* 11 : 257-265, 1995.
- 31) Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, et al:  $\beta$ -sarcoglycan (A3b) mutations cause auto-somal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nature Genet* 11 : 266-273, 1995.
- 32) Noguchi S, McNally EM, Othmane KB, et al: Mutations in the dystrophin-associated protein  $\gamma$ -sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 270 : 819-822, 1995.
- 33) 川井尚臣, 赤池雅史, 遠藤武徳ほか: 悪性肢帯型筋ジストロフィー患者の adhalin 遺伝子の解析. "厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー及び類縁疾患の病態と治療法に関する研究" 平成6年度研究班会議抄録(演題番号10). 1994.

# 40) Adhalin 欠損悪性肢帯型筋ジストロフィーの心所見 —臨床像と剖検所見について

川井尚臣\*

研究協力者 赤池雅史\* 遠藤武徳\* 柏木節子\*  
国重誠\* 足立克仁\* 香川典子\*\*\*  
檜澤一夫\*\*\*\*

## はじめに

Adhalinは骨格筋と同様に心筋においても dystrophin と複合体を形成し、細胞膜の安定化の役割を担っていると考えられる<sup>1)2)</sup>。Duchenne/Becker型筋ジストロフィーでは、dystrophinの欠損ないし異常により拡張型心筋症に類似した心病変をきたすことが知られているが<sup>3)4)</sup>、adhalin欠損筋ジストロフィー<sup>5)6)</sup>の心病変についてはこれまでまとまった報告はない。

本研究では自験および文献例の adhalin 欠損筋ジストロフィーの心病変を臨床的に検討し、さらに1例の剖検例については病理学的に検討した。

## 対象および方法

対象は adhalin 遺伝子の異常が確認された adhalin 欠損筋ジストロフィー症例で、自験の3家系4症例(図1)と文献例の13家系21例(男性8例、女性13例、年齢7~36歳)である<sup>7)~10)</sup>。

自験例はいずれも小児期(3~8歳)に発症し、歩行障害や四肢体幹の筋力低下が主症状である。両親は近親婚である。骨格筋には adhalin の完全欠損があり、どの症例にも adhalin 遺伝子の異常が認められた(表1)。症例2は呼吸不全で死亡し(57歳)剖検を行った。心機能検査としては、心電図でQ波および高電位R波の有無を調べ、また、心機図により駆出前期/駆出時間(PEP/ET)を算出し、さらに心エコー図により左室拡張末期径、短縮率を計測した。症例3については<sup>201</sup>タリウム心筋SPECTを行った。症例2については剖検心の検討も行った。対照として Duchenne 型筋ジストロフィー44例(年齢12~31歳)の心機能を調べた。

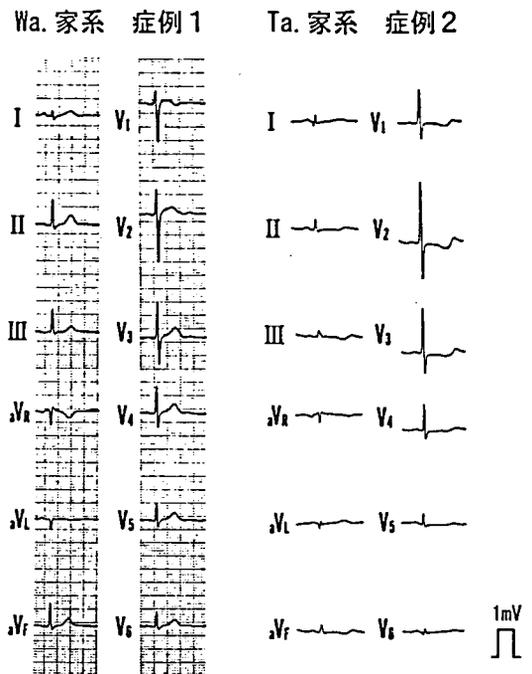


図1 心電図。症例1ではaVL誘導に小さなQS波がみられる。症例2ではV1誘導に高電位R波が認められ、I, aVL誘導には小さなq波がみられる。

## 結果

### 1. 自験例

心電図：症例1ではaVL誘導にQS波、症例2ではIとaVL誘導にQ波とV1誘導に高電位R波、症例3にはaVL誘導にQ波が認められた(図1)。

心機図：PEP/ETは adhalin 欠損悪性肢帯型では全例で正常であったが、Duchenne型(29例)では高値の例が多かった(52%)(図2)。

心エコー図：Adhalin欠損悪性肢帯型では断層法で左室壁の菲薄化や内腔の拡大はなく、壁運動の低下もみられなかった。Mモード法では adhalin 欠損悪性肢帯型では左室拡張末期径と左室短縮率が全例で正常であったが、Duchenne型では左室拡張末期径が増大した例がみられ(16%)、左室駆出率は低値の例が多かつ

\*徳島大学医学部第一内科  
\*\*国立療養所徳島病院内科  
\*\*\*徳島大学医療技術短期大学部  
\*\*\*\*四国中央病院

表1 自験例の臨床所見

	Wa. 家系	Ta. 家系		Ba. 家系
症例	1	2	3	4
年齢・性	23歳・女性	53歳・女性	31歳・女性	9歳・男性
発症年齢	3歳	5歳	5歳	8歳
家系図				
主症状	歩行障害 四肢の筋力低下	四肢, 体幹の筋力低下		歩行障害 四肢の筋力低下
初発症状	歩行時よく転倒	駈走遅い, 転倒	駈走遅い, 転倒	下肢痛, 歩行障害
歩行不能年齢	11歳	13歳	16歳	—
筋萎縮 腓腹筋仮性肥大	四肢近位部, 躯幹 (+)	全身性 (±)	四肢近位部, 躯幹 (+)	四肢近位部, 躯幹 (+)
血清CK値 (IU/L)	6,550 (11歳)	400	680	8415
骨格筋adhalin	完全欠損	完全欠損	完全欠損	完全欠損
Adhalin遺伝子	G229T	A410G, nt. 408-409間の15塩基挿入		G229T

■, ●:患者, □, ○:保因者, ↗:発端者, †:死亡, /:遺伝子解析済み, 血清CK活性値の正常値 <200 IU/L.

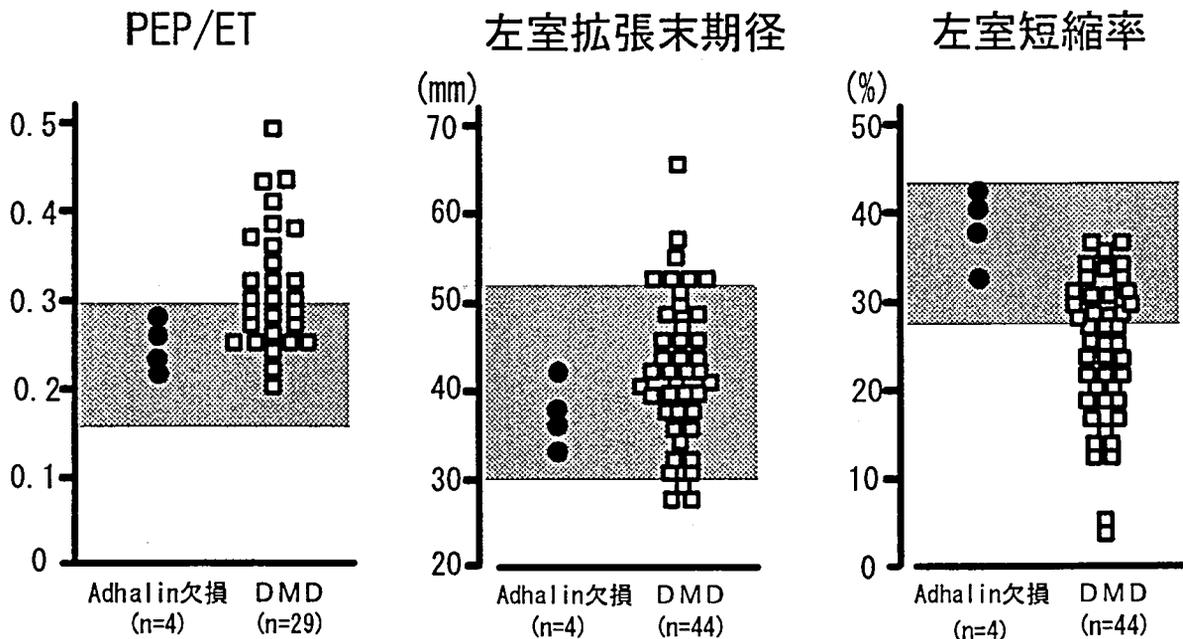


図2 心機能検査の成績。Duchenne型(自験)ではPEP/ETと左室拡張末期径が高値で左室短縮率が低値の例が多いが、自験のadhalin欠損悪性肢帯型ではこれらの値は正常範囲であった。網かけは正常値を示す。

PEP/ET: 駆出前期/駆出時間, DMD: Duchenne型筋ジストロフィー。

●: Adhalin欠損悪性肢帯型, □: Duchenne型。

た(59%)。

<sup>201</sup>Tlタリウム心筋SPECT: 症例3のみ調べたが、側壁、後下壁の灌流がわずかに低下していたが、あきらかな灌流欠損は検出されなかった。

## 2 Adhalin欠損筋ジストロフィーの文献報告例

25例(含自験例)の心所見について検討したが、心不全症状を示した例はなかった。心電図異常は3例(12%)にみられたが、いずれも自験例(3例)であった。

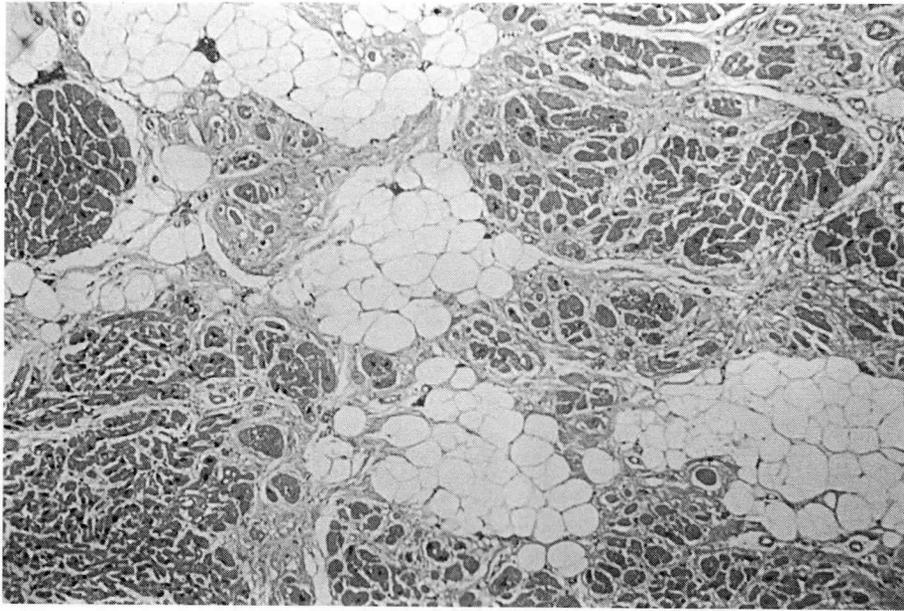


図3 心筋組織像. 症例2の剖検心であるが, 心筋線維の大小不同, 間質の線維化, 脂肪浸潤などが認められる. HE染色. 45倍.

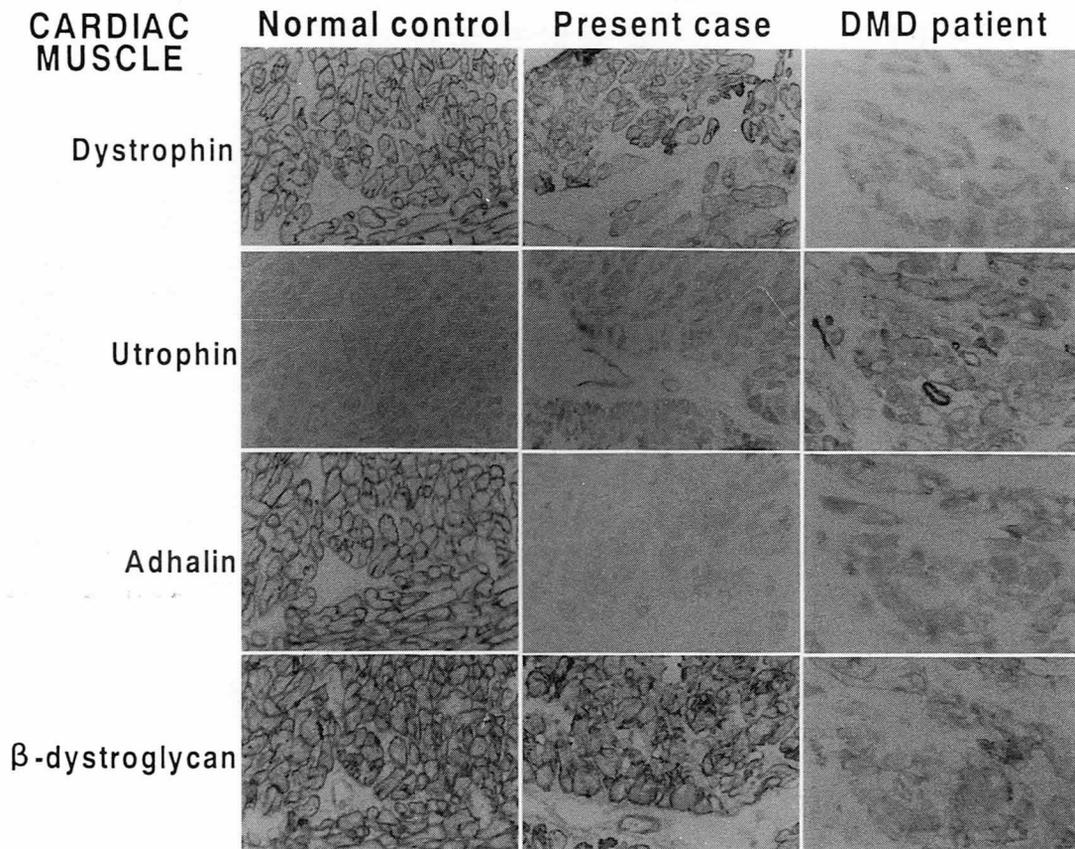


図4 心筋の免疫組織化学. 症例2の心筋細胞には adhalin はほぼ完全に欠損している.

### 3. 剖検心所見(症例2)

心重量は360gとやや増加し、心室壁の外側には厚い脂肪層が認められた。心筋層には肉眼的に左室の後下壁にわずかに白色調の部分が認められた。同部位の心筋組織のHematoxylin-Eosin (HE)染色像では心筋線維の大小不同、間質の線維化、心筋層内の脂肪浸潤などが認められた(図3)。また、心室中隔、左室の前壁、側壁、右室にも軽度ではあるが同様の所見がみられた。免疫組織化学ではdystrophin,  $\beta$ -dystroglycanの染色性はほぼ正常に認められたが、adhelinはほぼ完全に欠損していた(図4)。

### 考 察

Adhelin欠損筋ジストロフィーには、心不全で死亡する例が殆どないとされている。本研究では自験例と文献例の心所見を示した。自験例では心電図でV1の高電位R波やI, aVL誘導のQ波が認められ、病変としては左室の後壁、下壁、側壁に心筋障害が存在することが示唆された。これらの心電図変化はDuchenne型/Becker型の症例ではしばしば認められるものであり<sup>4)</sup>、また、剖検例(症例2)の左室後下壁の心筋組織にみられた心筋線維の大小不同、間質の線維化などの所見もやはりDuchenne型/Becker型の心筋組織所見とほぼ同じものである<sup>4)11)</sup>。剖検例については心筋にadhelinの完全欠損を確認したことより、adhelin欠損筋ジストロフィーでは心筋細胞におけるadhelinの欠損により心筋細胞膜の異常をきたし、心筋の壊死・変性が生じると考えられる。

一般にDuchenne/Becker型では左室の後下壁あるいは側壁が早期に変性をきたし、時間経過とともに変性領域が進展し末期には左室全体に及ぶとされている<sup>4)11)</sup>。Duchenne/Becker型で心病変の進行した例では左室内腔の拡大、左室壁の菲薄化と全周性の壁運動低下などの所見がみられ、いわゆる拡張型心筋症に類似した所見を呈する<sup>4)11)</sup>。しかし、adhelin欠損筋ジストロフィーでは自験例の検討で左室拡張末期径が増大した例はなく、PEP/ETおよび左室短縮率はいずれも正常であり左室収縮機能の低下はみられなかった。また、<sup>201</sup>Taリウム心筋SPECTでも灌流低下はごく軽度のものであった。自験例を含む文献例の検討でも心電図変化を示す頻度も少なく、心不全を発症した例はなかった。すなわち、adhelin欠損筋ジストロフィーの心病変はDuchenne/Becker型に比べると臨床的には軽症といえる。本症で臨床的に心障害が軽症である理由としては、心筋には骨格筋のadhelinとは異なるisoformが存在する可能性やadhelin欠損を代償する機構の存在の可能性などがあげられる。しかし、Zatzら<sup>12)</sup>やPiccoloら<sup>8)</sup>はadhelinの遺伝子異常を確認し

ていないadhelin欠損筋ジストロフィーで心不全の発症例を報告している。Adhelin遺伝子異常が確認された症例の報告は少なく、今後さらに詳細に検討すれば心機能異常のある例が見出される可能性は残っている。

以上述べたごとく本症の心臓は基本的にはDuchenne/Becker型と同じ変化を示すため、臨床的には心症状が不顕性であっても心不全の発症に留意すべきであると考えられる。

謝 辞：本研究の症例4は徳島大学小児科学教室のご協力を得ました。深謝いたします。

### 文 献

- 1) Roberds SL, Anderson RD, et al: Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (Adhelin). *J Biol Chem* 268: 23739, 1993.
- 2) Campbell KP: Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675, 1995.
- 3) Hunsaker RH, Fulkerson PK, et al: Cardiac function in Duchenne's muscular dystrophy: results of 10-year follow-up study and noninvasive tests. *Am J Med* 73: 235, 1982.
- 4) 斎藤美穂, 川井尚臣ほか: Becker型筋ジストロフィーにおける心不全の病態とその発生機序. *臨床神経学* 34: 134, 1994.
- 5) 川井尚臣, 乾 俊夫ほか: 悪性肢帯型筋ジストロフィー(三好)の骨格筋におけるadhelin(50kDa dystrophin-associated glycoprotein)の完全欠損. *臨床神経学* 35: 184, 1995.
- 6) Kawai H, Akaike M, et al: Adhelin gene mutations in patients with autosomal recessive childhood onset muscular dystrophy with adhelin deficiency. *J Clin Invest* 96: 1202, 1995.
- 7) Roberds SL, Leturcq F, et al: Missense mutation in the adhelin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78: 625, 1994.
- 8) Piccolo F, Roberds SL, et al: Primary adhelinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nature Genet* 10: 243, 1995.
- 9) Ljunggren A, Duggan D, et al: Primary adhelin deficiency as a cause of muscular dystrophy in patients with normal dystro-

- phin. *Ann Neurol* 38 : 367, 1995.
- 10) Passos Bueno MR, Moreira ES, et al : A common missense mutation in the adhalin gene in three unrelated Brazilian families with a relatively mild form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Molec Genet* 4 : 1163, 1995.
- 11) Perloff JK, Roberts WC, et al : The distinctive electrocardiogram of Duchenne's progressive muscular dystrophy. An electrocardiographic-pathologic correlative study. *Am J Med* 42 : 179, 1967.
- 12) Zatz M, Matsumura K, et al : Assessment of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein in Brazilian patients with severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 123 : 122, 1994.

# 41) 正常骨格筋線維における adhalin の超微局在と dystrophin, $\beta$ -dystroglycan, $\beta$ -spectrin との相互関係について

若山吉弘\*

研究協力者 井上昌彦\* 村橋真\* 澁谷誠二\*  
自見隆弘\* 小嶋宏子\* 鬼木弘明\*\*

## はじめに

Dystrophin associated (glyco) proteins (DAG 又は DAP) は 156kDa, 50kDa, 43kDa, 35kDa, 25kDa の成分から成る複合体である<sup>1)</sup>。このうち 50kDa の成分は adhalin と呼ばれ、筋細胞膜貫通蛋白である。この成分の異常は severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy (SCARMD) の原因の一つと考えられ、細胞外部分ペプチド遺伝子の点変異など種々の原因で生ずるとされている。このように adhalin の異常はヒト進行性筋萎縮症の原因にも成りうる重要な筋細胞膜成分であり、dystrophin や 43kDa DAG の一つの成分  $\beta$ -dystroglycan や  $\beta$ -spectrin との関係を検析するため、我々は adhalin の cDNA よりその cytoplasmic domain に対する合成ペプチドを作製、その筋細胞内における超微局在と dystrophin,  $\beta$ -dystroglycan,  $\beta$ -spectrin との関係を金コロイド 2 重標識免疫電顕法により検討する目的で本研究を行った。

## 材料と方法

### (1) 合成ペプチドとその性状分析

ペプチドは Roberds SL らのウサギ骨格筋 adhalin の C 端アミノ酸 (373-387) 15 残基を合成した<sup>2)</sup>。ハプテンとして thyroglobulin をつけ、ウサギと羊にて免疫し抗体を得、アフィニティー精製した。イムノプロットは以前報告した方法<sup>4)</sup>に準じた。

正常マウス骨格筋の光顕レベルでの免疫蛍光抗体法による標本は、6 $\mu$ m の厚さの骨格筋のクリオスタット横断標本を間接蛍光抗体法により作製した。

### (2) Immunogold labelling 法による 2 重免疫電顕標本作製について

mdx コントロールマウス大腿四頭筋を冷却した 4% パラフォルムアルデヒド 0.1M リン酸バッファー液で氷漬して 1 時間固定後、1 次抗体を反応させるまでは既報<sup>4)</sup>に準じて行った。1 次抗体として抗 adhalin 抗体

単独又は異種動物で産生した抗 adhalin 抗体と抗 dystrophin 抗体 (Dr. Byers, Dr. Kunkel より供与)、抗 adhalin 抗体と抗  $\beta$ -dystroglycan 抗体、抗 adhalin 抗体と  $\beta$ -spectrin 抗体の組合せの至適希釈 1 次抗体液の混合液で細切骨格筋標本を cold room で 24 時間反応させた。1 次抗体の性状や濃度は文献<sup>3)</sup>に示す。反応後、試料を冷却 PBS でよく洗浄した。2 次抗体は 20 倍希釈 5nm 金コロイド標識ロバ抗羊抗体、20 倍希釈 10nm 金コロイド標識ロバ抗羊抗体 (いずれも Bio Cell 社製)、20 倍希釈 5nm 金コロイド標識ヤギ抗ウサギ抗体、20 倍希釈 10nm 金コロイド標識ヤギ抗ウサギ抗体 (いずれも Amersham 社製) のうち (i) adhalin の単染色は 5nm 金粒子で標識した 2 次抗体を用い、2 重染色では (ii) adhalin は 5nm 金粒子で標識し、もう一つの 1 次抗体を 10nm 金粒子で標識する。(iii) 粒子サイズを逆転し、adhalin を 10nm 金粒子で標識し、もう一つの 1 次抗体を 5nm 金粒子で標識する組合せの標本を作製した。試料はこれらの 2 次抗体液の混合液と cold room で 24 時間反応させた。また免疫対照標本として 1 次抗体を作製したものと同一動物の正常血清を作用させたものを作製した。以下既報<sup>4)</sup>に準じて固定包埋し電顕にて観察した。

### (3) doublet 形成率の算定方法

adhalin と dystrophin, adhalin と  $\beta$ -dystroglycan, adhalin と  $\beta$ -spectrin のそれぞれの抗体組合せにて 2 つの epitope が 30nm 以内の距離で接近して存在するものを doublet と定義し、3 つの組合せにおける出現率を既報<sup>4)</sup>に準じて算出し統計的に有意差を検定した<sup>3)</sup>。

## 結 果

### (1) Immunoblot 及び光顕免疫蛍光抗体染色所見

Immunoblot では骨格筋の 50kDa の成分を認識する band がウサギ、羊両抗体で認められ (図 1)、光顕免疫蛍光抗体染色標本では、骨格筋の周辺部に抗体の認識部位が認められた。

### (2) Immunogold labelling 法による 2 重免疫電顕標本

\*昭和大学藤が丘病院神経内科

\*\*昭和大学藤が丘病院電顕室

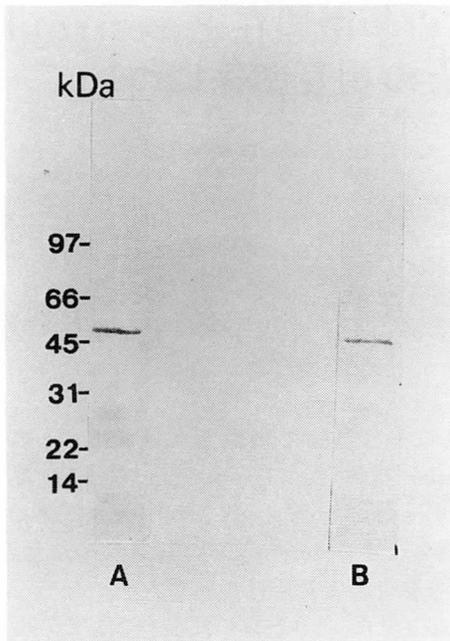


図 1A, B Immunoblot of adhalin in normal muscle tissue. Immunostaining was with rabbit antibody (lane A) and with sheep antibody (lane B). The adhalin band is observed at 50-kDa molecular weight in both antibodies.

### 所見

抗 adhalin 抗体だけの免疫染色標本では抗体の存在を示す 5nm の金粒子は骨格筋細胞膜の内側に細胞膜に随伴して認められた。また筋細胞膜に随伴する vesicle 膜にもその筋形質側に抗体の signal が認められた。しかし内部構造には有意な signal は認められなかった。

次に抗 adhalin と抗 dystrophin 抗体、抗 adhalin と抗  $\beta$ -dystroglycan 抗体、抗 adhalin と抗  $\beta$ -spectrin 抗体との組合せの 2 重免疫染色標本では、それぞれの抗体の存在を示す 5nm と 10nm の金粒子はいずれも骨格筋細胞膜の内側で細胞膜に随伴して認められ (図 2A-D)、また筋細胞膜内側に随伴した vesicle 膜にもその筋形質側に金粒子が認められた。興味ある所見として 5nm と 10nm の金粒子が 30nm 以下の距離で doublet を形成する像が 3 組の抗体の組合せにつきいずれも認められたが、抗 adhalin と抗 dystrophin 抗体及び抗  $\beta$ -dystroglycan 抗体との 2 つの組合せにおいて抗 adhalin と抗  $\beta$ -spectrin 抗体との組合せより高率に出現していた (図 2B-D)。この所見は粒子サイズを逆転した標本においても同様であった。尚、抗体を正常血清と置き換えて作製した免疫対照標本では金粒子の存在は認められなかった。

### (3) doublet 形成率について

3 種類の抗体の組合せ、すなわち a. 抗 adhalin-抗

表 1 Doublet Formation

Antibody combination	(group mean $\pm$ SE)*
Adhalin and dystrophin (5-nm gold) (10-nm gold)	30.8 $\pm$ 3.2
Adhalin and $\beta$ -dystroglycan (5-nm gold) (10-nm gold)	20.2 $\pm$ 3.2
Adhalin and $\beta$ -spectrin (5-nm gold) (10-nm gold)	9.6 $\pm$ 1.2
Adhalin and dystrophin (10-nm gold) (5-nm gold)	19.6 $\pm$ 0.8
Adhalin and $\beta$ -dystroglycan (10-nm gold) (5-nm gold)	25.8 $\pm$ 3.9
Adhalin and $\beta$ -spectrin (10-nm gold) (5-nm gold)	8.5 $\pm$ 1.0

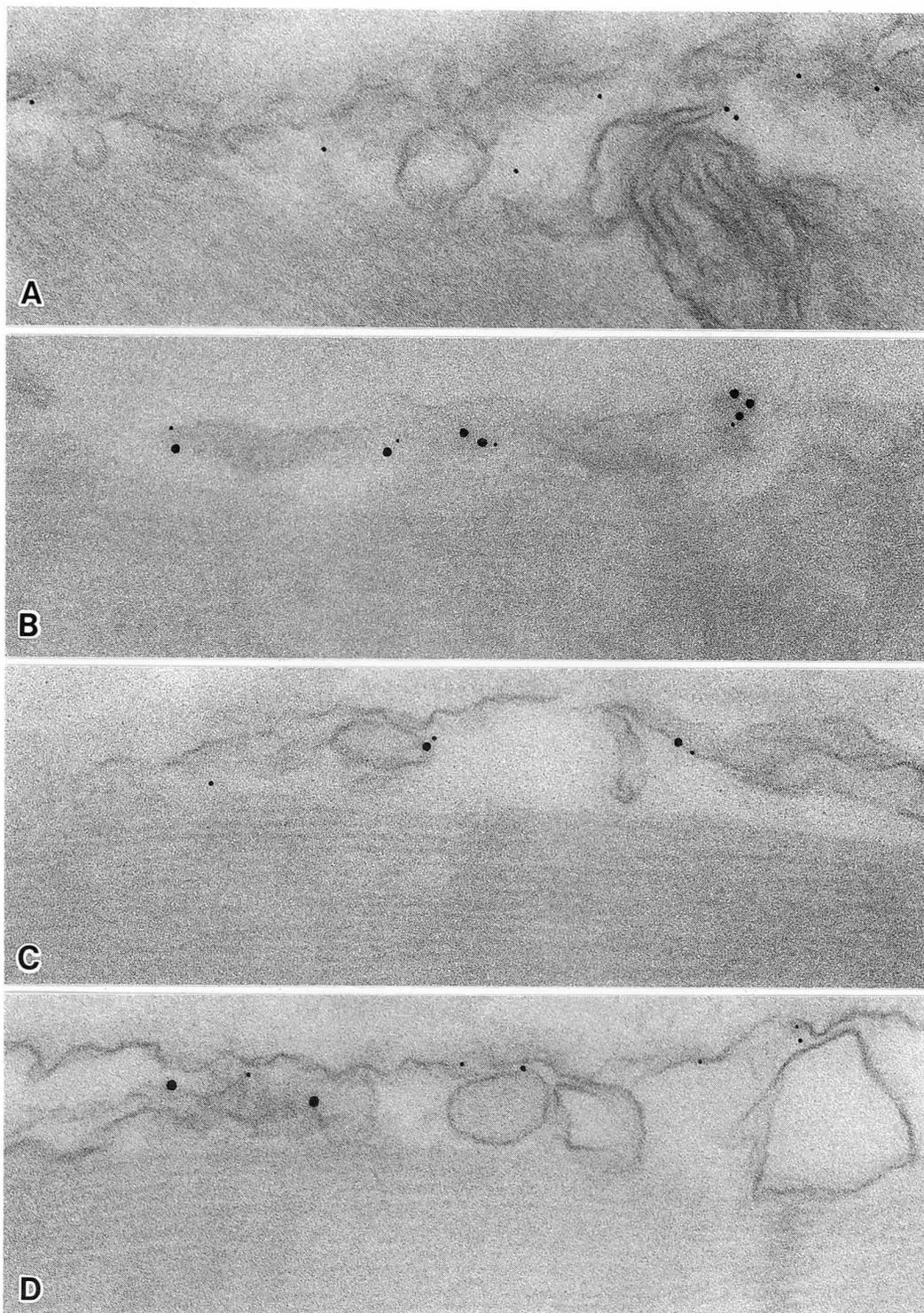
\* Percentage of doublets of 5-nm particles with 10-nm particles within 30 nm versus all 5-nm particles at the inner surface of muscle plasmalemma in three antibody combinations shown.

dystrophin 抗体 b. 抗 adhalin-抗  $\beta$ -dystroglycan 抗体 c. 抗 adhalin-抗  $\beta$ -spectrin 抗体のそれぞれにおいて doublet 形成率の group mean  $\pm$  SE はそれぞれ表 1 のようで、粒子サイズを逆転したものでもそれぞれ表 1 のようになり、doublet 形成率は a, b の組において有意に高率であった。

### 考 察

正常骨格筋細胞膜貫通蛋白である adhalin と、これに link している細胞骨格や細胞外基質との関係を検討することは、adhalin の機能を追求する意味においても重要と考えられる。これらの関係は生化学的手法を用いてよく研究されているが、超微形態学的側面よりの研究は少ない。

今回の結果より、adhalin と dystrophin、adhalin と同じ膜貫通蛋白である  $\beta$ -dystroglycan とは超微形態的に近位置にこれらの epitope が存在することが示された。しかしこれらの蛋白の間に直接的な何らかの link があるかどうかについてや、またない場合、どのような因子により近接関係にあるのかなどについては freeze etch replica の電顕的検索などにより今後更に検討を加えられる必要がある。



2 Electron micrographs of (A) sheep anti-adhalin antibody, double immunostaining with (B) sheep anti-adhalin and rabbit anti-6-10-dystrophin antibodies, (C) rabbit anti-adhalin and sheep anti- $\beta$ -dystroglycan antibodies, and (D) sheep anti-adhalin and rabbit anti- $\beta$ -spectrin antibodies in normal murine myofibers. Both 5-nm gold particles (adhalin) and 10-nm gold particles (dystrophin,  $\beta$ -dystroglycan and  $\beta$ -spectrin) are present at the inner surface of normal murine myofibers. Particles of both sizes are frequently associated with each other in Fig. B and C. ( $\times 128,000$ )

### ま と め

- (1) 抗adhalin抗体は正常骨格筋細胞膜の内側で細胞膜に随伴して認められた。
- (2) 抗adhalinと抗dystrophin抗体, 抗adhalinと抗 $\beta$ -dystroglycan抗体は抗adhalinと抗 $\beta$ -spectrin抗体に比し近接して存在する傾向がみられた。
- (3) (2)の所見は統計的に確認された。

### 文 献

- 1) Ahn AH and Kunkel LM: The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genet* 3: 283-291, 1993.
- 2) Roberds SL, Anderson RD, et al: Primary

structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin). *J Biol Chem* 268: 23739-23742, 1993.

- 3) Wakayama Y, Inoue M, et al: Ultrastructural localization of adhalin in normal murine skeletal myofiber. *Ann Neurol* (in press).
- 4) Wakayama Y, Shibuya S, et al: Ultrastructural localization of the C-terminus of the 43-kd dystrophin-associated glycoprotein and its relation to dystrophin in normal murine skeletal myofiber. *Am J Pathol* 146: 189-196, 1995.

## 42) Adhalin 欠損症の細胞接着分子に関する免疫組織化学的研究

納 光 弘\*

研究協力者 樋口逸郎\* 中川正法\* 新山尚仁\*  
福永秀敏\*\*

我々はこれまでに本邦初の adhalin 欠損症の 2 症例を報告し、本症の筋膜上において adhalin (50kDa dystrophin-associated glycoprotein) の欠損と共に、laminin B1<sup>1)</sup> およびヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG)<sup>2)</sup> の発現異常がみられることを明らかにした。今回我々は adhalin 欠損症の新たな 2 症例を提示するとともに、さらに本症の病態を明らかにするため、各種細胞接着分子に対する免疫組織化学的検索を施行した。

### 対象と方法

対象として adhalin 欠損症 4 例、Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 5 例、Becker 型筋ジストロフィー (BMD) 5 例、福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) 3 例および正常対照 (control) 3 例の生検筋の凍結切片を用いた。免疫組織化学は、一次抗体として dystrophin, adhalin,  $\beta$ -dystroglycan のモノクローナル抗体の他に、細胞接着分子に対する抗体として neural cell adhesion molecule (NCAM), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), および CD44 (HCAM) に対するモノクローナル抗体を使用し、ABC 法にて染色した。

Adhalin 欠損症の 4 例を表 1 に示すが、症例 3 と 4 が新たに見出された症例である。発症年齢は 4 歳から 10 歳に分布し、全例両親が血族結婚であり、知能は正常で CK がやや上昇していた。症例 3 がこの中では最も若年時に筋生検を受けていた。

表 1 Adhalin 欠損症 4 例のまとめ

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4
性別	男	男	女	女
発症年齢	5 歳	10 歳	4 歳	9 歳
筋生検時年齢	30 歳	41 歳	19 歳	46 歳
生検筋	前脛骨筋	腓腹筋	腓腹筋	上腕二頭筋
重症度	人工呼吸	車椅子	車椅子	臥床
知能	正常	正常	正常	正常
血清 CK (~195)	235	220	480	240
血族結婚	(+)	(+)	(+)	(+)

\*鹿児島大学医学部第三内科

\*\*国立療養所南九州病院

### 結 果

ジストロフィンの免疫染色は、DMD では欠損していたが正常対照および adhalin 欠損症ではよく保たれており、 $\beta$ -dystroglycan の免疫染色は、adhalin 欠損症、DMD をはじめ検索したすべての症例で、control とほぼ同様に染色された。Adhalin の免疫染色は、adhalin 欠損症では著明に低下していたが、DMD では control に比べ軽度低下していた (図 1)。NCAM の発現は検索したすべての疾患で正常対照に比べ、再生線維を中心に増加しており、疾患特異性は認められなかった (図 2)。また ICAM-1 の筋膜上の発現は、各疾患とも稀であり疾患による違いは明らかではなかった。CD44 の免疫組織化学であるが、CD44 は正常筋の筋膜上にはほとんど発現していなかったが、DMD, BMD, FCMD では筋膜上の発現が増加していた。一方 adhalin 欠損症の 4 例においては全症例で筋膜上の発現が極めて少なく、血管や結合織にのみ発現が増加していた (図 3)。Adhalin 欠損症の免疫組織化学的染色結果のまとめを表 2 に示す。筋膜上の発現に限定したものであるが、ラミニン B1 は比較的若年で筋生検をした症例 3 を除いた 3 例で低下しており、HSPG と

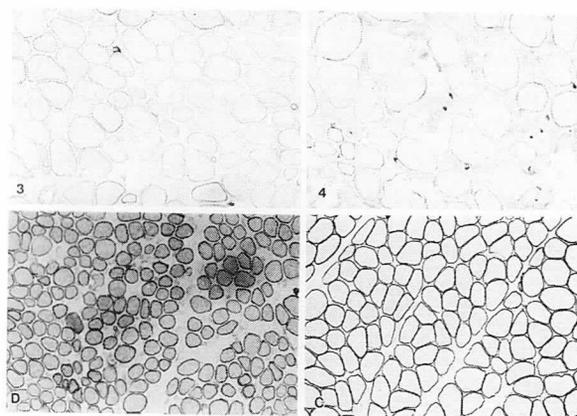


図 1 Adhalin の免疫組織化学的染色

adhalin 欠損症の症例 3 (3) および症例 4 (4) では著明に低下しており、DMD (D) では control (C) に比べ軽度低下している。

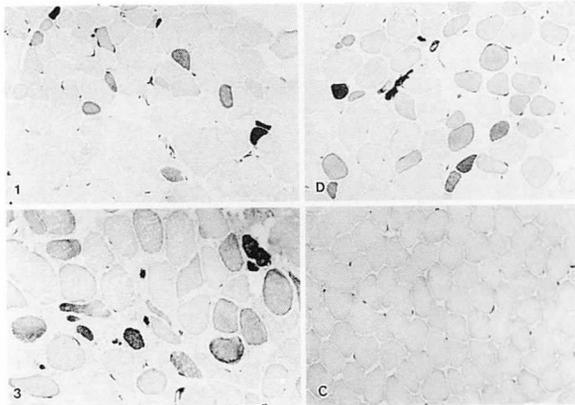


図2 NCAMの免疫組織化学的染色  
NCAMの発現は検索したすべての疾患でcontrolに比べ増加しており疾患特異性は認められない。ここにはadhelin欠損症の症例1(1)と症例3(3), DMD(D)およびcontrol(C)を提示する。

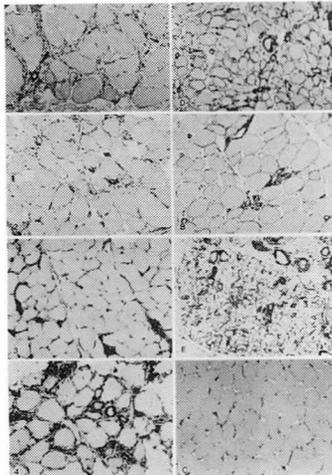


図3 CD44の免疫組織化学的染色  
CD44は正常筋ではほとんど染色されないが、DMD, BMD, FCMDでは筋膜上の発現が増加している。Adhelin欠損症の4例においては全症例で筋膜上の発現が極めて少なく、血管や結合織にのみ発現が増加している。Adhelin欠損症の症例1(1), 症例2(2), 症例3(3), 症例4(4) DMD(D), BMD(B), FCMD(F), 正常対照(C)。

表2 免疫組織化学所見のまとめ

	Adhalin deficiency				DMD	BMD	FCMD	Control
	症例1	症例2	症例3	症例4				
Adhalin	-	±	±	±	+	+	+	+
Dystrophin	+	+	+	+	-	±	+	+
β-DG	+	+	+	+	+	+	+	+
Lam. B1	±	±	+	±	+	+	+	+
HSPG	±	±	±	±	++	++	++	+
CD44	±	±	±	±	++	++	++	±

CD44はadhelin欠損症の全症例において発現が極めて少なく、他の筋ジストロフィーとの違いが際だっていた。

### 考 察

細胞接着分子は、筋細胞の分化、再生および神経再支配等に関与すると考えられており、さらに炎症性筋疾患やDMDの病態に関与する可能性も指摘されている。今回の検索結果のうち最も注目すべき所見は、各種筋ジストロフィーにおいては筋膜上のCD44の発現が増加しているにもかかわらず、adhelin欠損症では発現が極めて微量であるという点である。

CD44は生体内に広範に分布する細胞接着分子であり、リンパ球活性化や癌の転移との関連で注目されており、細胞外マトリックスの各種成分(hyaluronan, fibronectin, laminin, collagen I)との相互作用も報告されている。正常筋の筋膜上ではCD44の発現はほとんどみられないが、筋芽細胞や筋管細胞では強い発現が報告されている。また、keratinocyteのCD44は創傷治癒に関与すると報告されている。今回の検索結果は、adhelin欠損症においては他の筋ジストロフィーと異なる筋変成あるいは筋再生過程が存在することを示唆するものと考えられる。

Adhelin欠損症の自験4例の遺伝子学的検索は未だ進行中であるが、HSPGやCD44の発現異常がすべてのadhelin欠損症において認められるのか、あるいは本症のある種の遺伝子異常に特徴的であるのか、今後検索する必要がある。

### 結 論

1. NCAMおよびICAM-1の発現様式に関しては、疾患特異性は認められなかった。
2. Adhelin欠損症では、DMD, BMDおよびFCMDに比べ筋膜上のHSPGおよびCD44の発現が極めて微量であった。
3. Adhelin欠損症においては、他の筋ジストロフィーと異なる筋変成あるいは筋再生過程が存在する可能性があると思われる。

### 参 考 文 献

- 1) Higuchi I, Yamada H, Fukunaga H, Iwaki H, Okubo R, Nakagawa M, Osame M, Roberds SL, Shimizu T, Campbell KP and Matsumura K: Abnormal expression of laminin suggests disturbance of sarcolemmaextracellular matrix interaction in Japanese patients with autosomal recessive muscular dystrophy deficient in adhelin. J Clin Invest 94: 601-606, 1994.

2) Higuchi I, Fukunaga H, Matsumura K, Inose M, Izumi K, Okubo R, Nakagawa M, Shimizu T and Osame M : Abnormal expression of heparan sulfate proteoglycan of ba

sal lamina of muscle fibers in two Japanese patients with adhalin deficiency. *Neuromusc Disord* 5 : 467-474, 1995.

## 43) 末梢神経における dystrophin 関連・結合蛋白の機能・構造解析

清水輝夫\*

研究協力者 山田広樹\* 松村喜一郎\*

現在までに5つの筋ジストロフィーが、dystrophin 糖蛋白複合体(DGC)を介する細胞外基質と筋細胞膜下細胞骨格の架橋の破綻によって起こることが明らかになっており、すべて重篤な筋症状を呈するが、その神経症状は疾患によって異なっている。これらの疾患は dystrophin の欠損によるデュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD), adhalin( $\alpha$ -sarcoglycan),  $\gamma$ -sarcoglycan,  $\beta$ -sarcoglycan の欠損による3種の重症小児常染色体劣性筋ジストロフィー(SCARMD), および laminin-2欠損先天性筋ジストロフィーである。このうちDMDでは軽度の中樞神経障害が存在するが、3種のSCARMDのうち少なくとも adhalin および  $\gamma$ -sarcoglycan によるもの2種では神経症状は皆無である。また laminin-2欠損先天性筋ジストロフィーおよびその動物モデルである *dy/dy* mouse では末梢神経の髄鞘形成不全を来す<sup>1)~3)</sup>。DGCを構成する dystrophin 結合蛋白の一部や dystrophin の isoform は骨格筋以外の組織にも発現しており<sup>4)</sup>、この機能障害が上述の筋ジストロフィーの神経症状に関与していると推定される。一方、末梢神経 Schwann 細胞の髄鞘形成には基底膜に laminin が存在することが必須であるとの事実が知られており<sup>5)</sup>、この作用の Schwann 細胞側のレセプターが dystrophin 結合糖蛋白の一つで骨格筋で laminin と結合する  $\alpha$ -dystroglycan である可能性が考えられる。

骨格筋  $\alpha$ -dystroglycan は laminin 以外に agrin と結合することが明らかになっている。Agrin は acetylcholine receptor を集簇させる活性を持ち、神経筋接合部の形成に関与する細胞外基質糖蛋白として知られているが<sup>6)</sup>、多くの isoform を持ち<sup>6)~8)</sup>、その一つが末梢神経に存在している可能性が指摘されている<sup>9)</sup>。Agrin が末梢神経に存在するとすれば筋ジストロフィーにおける末梢神経障害の病像を修飾している可能性、laminin と共に髄鞘形成に関与している可能性がある。

これらの事実を背景として、筋ジストロフィーにお

ける神経症状発症の分子機構を知るためには、神経系における DGC の発現様式および、存在するとすれば laminin および agrin との相互作用を知る必要がある。そこで我々は、末梢神経を材料として、DGC 構成要素および laminin, agrin の発現、 $\alpha$ -dystroglycan と laminin および agrin の相互作用について検討した。

### 材料および方法

生化学的分析には主にウシ末梢神経を、免疫組織化学的分析には主にウサギ坐骨神経を用いた。末梢神経 dystroglycan 複合体および  $\alpha$ -dystroglycan の単離には、ウシ末梢神経粗膜分画のそれぞれ 1% digitonin 抽出物またはアルカリ抽出物から WGA-sepharose および laminin-sepharose による affinity chromatography を連続して用いた。単離した末梢神経  $\alpha$ -dystroglycan と laminin および agrin との結合を主に blot overlay の手法で検討した。

使用した抗体、レクチン、脱糖鎖酵素、その他の材料および方法、その他の実験の詳細については文献を参照<sup>10)~12)</sup>。

### 結 果

#### 末梢神経における dystroglycan 複合体の発現と機能

免疫染色、および末梢神経 SDS 抽出物の検討で末梢神経にはフルサイズの dystrophin は発現せず、dystrophin の C 末端相同産物の一つである Dp116 および常染色体性相同産物である utrophin が発現していること、末梢神経には dystrophin 結合蛋白のうち adhalin は発現せず、 $\alpha$ -および  $\beta$ -dystroglycan が発現していること、末梢神経  $\alpha$ -dystroglycan の分子量は筋型の 156kDa とは異なり約 120kDa であることが明らかになった(図示せず)。共焦点レーザー顕微鏡による光学的薄切像で見ると  $\alpha$ -および  $\beta$ -dystroglycan, laminin  $\alpha$ 2 鎖,  $\beta$ 1 鎖は髄鞘最外層に沿って発現していた(図1)。すなわち髄鞘最外層で  $\alpha$ -および  $\beta$ -dystroglycan と laminin-2 が共局在していた。これに対し、Dp116 および utrophin は Schwann 細胞質のマーカーである S-100 と同様の分布を示し、Schwann

\* 帝京大学医学部神経内科

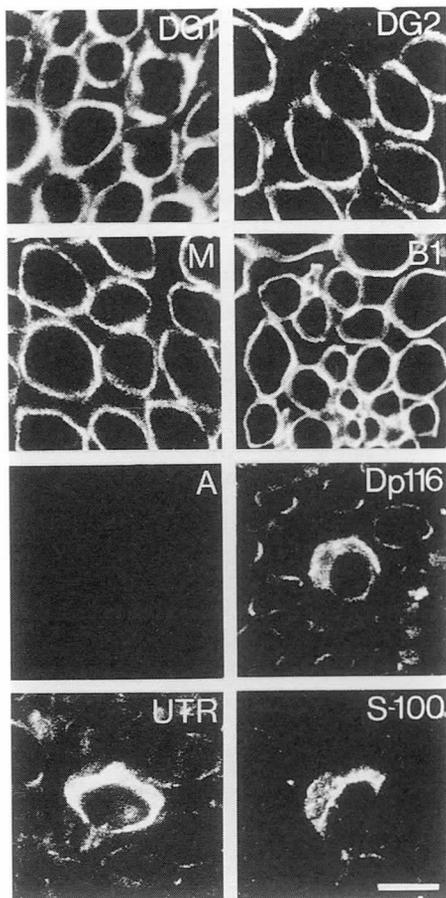


図1 ウサギ坐骨神経組織における,  $\alpha$ -,  $\beta$ -dystroglycan, laminin-2, Dp116 および utrophin の cLSM 画像.

ウサギ坐骨神経の凍結切片中に  $\alpha$ -dystroglycan (DG 1),  $\beta$ -dystroglycan (DG2), laminin  $\alpha$  2 鎖 (M), laminin  $\alpha$  1 鎖 (A), laminin  $\beta$  1 鎖 (B1), Dp116 および utrophin (UTR) を以下に述べる抗体を用いて検出し, cLSM により観察した. 用いた抗体はアフィニティー精製した dystroglycan fusion protein D に対するヒツジ抗体 (FPD), アフィニティー精製した  $\beta$ -dystroglycan ヒツジ抗体, ヒト laminin  $\alpha$  2 鎖に対するモノクローナル抗体 5H2, ヒト laminin  $\alpha$  1 鎖に対するモノクローナル抗体 11D5, ヒト laminin  $\beta$  1 鎖に対するモノクローナル抗体 4E8, VIA<sub>4</sub> および DRP1 である. 抗ウシ S-100 モノクローナル抗体 (S-100) によって Schwann 細胞を同定した. ヒト laminin  $\gamma$  1 鎖に対するモノクローナル抗体はウサギ組織と反応しなかったが, ヒトおよびウシ末梢神経で, 抗  $\alpha$  2 鎖, 抗  $\beta$  1 鎖と同じ部位を染色した (図示せず). Bar, 10  $\mu$ m.

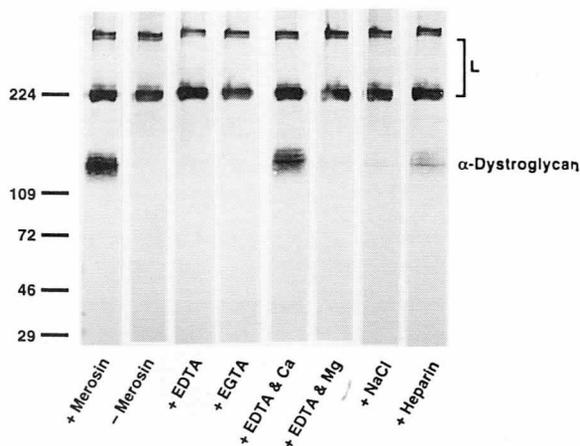


図2 末梢神経  $\alpha$ -dystroglycan の laminin-2 への結合. ウシ末梢神経粗膜分画の digitonin 抽出物を SDS-PAGE 後, ニトロセルロース膜に転写し, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  および 1 mM  $\text{MgCl}_2$  存在下で, laminin-2 を含む (+Merosin), あるいは含まない (-Merosin) 溶液をオーバーレイした. L は末梢神経内在性の laminin である. Laminin-2 の 120 kDa 末梢神経  $\alpha$ -dystroglycan への結合は 10 mM EDTA (+EDTA), または EGTA (+EGTA) をオーバーレイ溶液に加えることにより完全に阻止された. 10 mM の EDTA に加えて 20 mM の  $\text{CaCl}_2$  の添加は (+EDTA & Ca) は結合を回復させたが, 20 mM の  $\text{MgCl}_2$  の添加は (+EDTA & Mg) は結合を回復させなかった. 0.5 M NaCl (+NaCl), または laminin-2 に対し重量比 1000 倍の heparin の添加 (+Heparin) は結合を阻害した. 左端に分子量マーカー ( $\times 10^{-3}$  Da) を示す.

細胞体細胞質に局在していると考えられた (図 1). ウシ末梢神経粗膜分画の 1% digitonin 抽出物に対し, WGA-shepharose と laminin-sepharose を連続して用い affinity chromatography を行うと, 自身は laminin と結合しない  $\beta$ -dystroglycan が  $\alpha$ -dystroglycan と co-purify した. アルカリ抽出では末梢神経  $\alpha$ -dystroglycan は pH 11 で容易に抽出されたのに対し,  $\beta$ -dystroglycan は pH 12 でも抽出されず沈殿に残った (図示せず). このことは  $\alpha$ -dystroglycan が膜表面性蛋白であり,  $\beta$ -dystroglycan が膜貫通蛋白であることを意味する.

$\alpha$ -dystroglycan は末梢神経における主要な laminin 結合蛋白である

ウシ末梢神経粗膜分画から 1% digitonin によって蛋白を抽出, 各種の条件下で laminin-2 をオーバーレイした (図 2). この分画中で laminin との結合が確認で

きたのは  $\alpha$ -dystroglycan のみであり、この結合は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性であり、高塩濃度または heparin によって抑制された (図2)。

末梢神経  $\alpha$ -dystroglycan は laminin と agrin の dual receptor である

Agrin に対する抗血清はウシ末梢神経組織において、髄鞘最外層、Schwann 細胞表面を染色し、二重染色

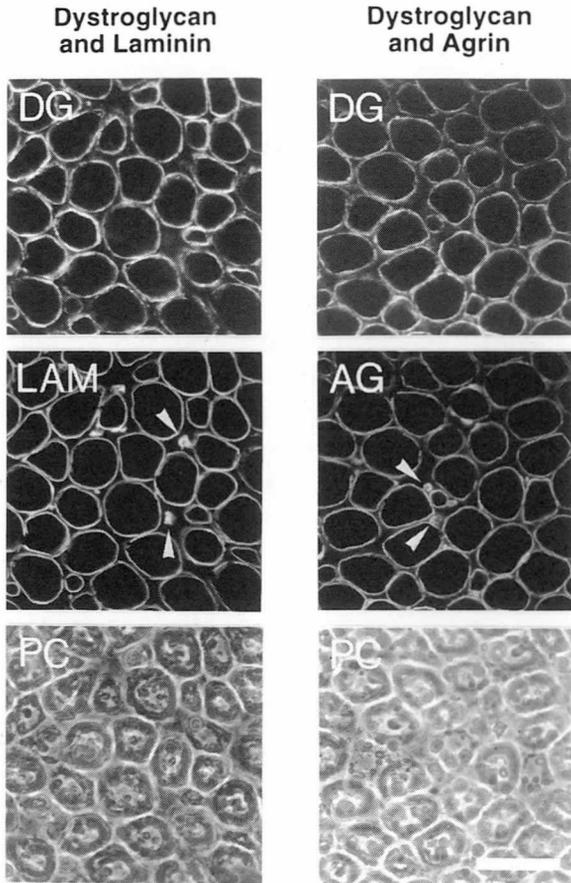


図3 ウシ末梢神経における dystroglycan と laminin, dystroglycan と agrin の二重染色。

以下の方法で二重染色を行った。(a) dystroglycan (DG) と laminin (Lam) に関しては  $\beta$ -dystroglycan に対するモノクローナル抗体 43DAG/8D5 と mouse EHS sarcoma laminin に対するアフィニティー精製したウサギ抗体を用いて (左列), (b) dystroglycan と agrin (AG) に関してはモノクローナル抗体 43DAG/8D5 とニワトリ胚 recombinant agrin に対するウサギ抗血清を用いた (右列)。マウス一次抗体は rhodamine を結合させた抗マウス IgG ヒツジ抗体によって、ウサギ一次抗体は biotin を結合させた抗ウサギ IgG ヒツジ抗体に FITC-streptavidin を連続して使用し検出した。矢印は血管を示す。Bar, 20  $\mu\text{m}$ 。

による光学顕微鏡観察で  $\beta$ -dystroglycan と共局在していた (図3)。単離した末梢神経  $\alpha$ -dystroglycan を用い、末梢神経粗膜分画のアルカリ抽出液から  $\alpha$ -dystroglycan 結合分画を単離すると、laminin-2 と共に agrin がこの分画中に存在した (図示せず)。単離した  $\alpha$ -dystroglycan に laminin-2 およびニワトリ胚 recombinant agrin をオーバーレイし結合能を検討した (図4)。Agrin は laminin-2 と同様  $\alpha$ -dystroglycan と結合し (図4)、その結合は EDTA または EGTA によって抑制された (図示せず)。過量の agrin をオーバーレイ溶液に加えると、laminin-2 との結合は抑制され (図4)、過量の laminin-2 を加えると agrin との結合が阻害された (図4)。また末梢神経  $\alpha$ -dystroglycan と agrin との結合は、laminin との結合同

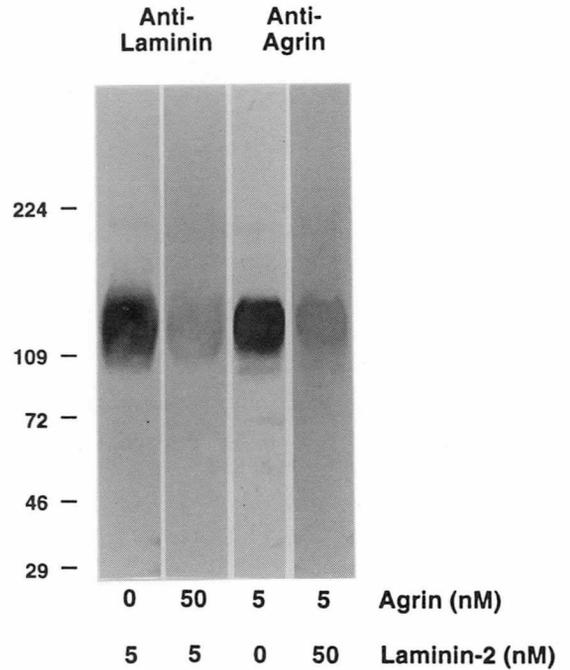


図4 末梢神経  $\alpha$ -dystroglycan に対する laminin-2 および agrin の結合。

単離した末梢神経  $\alpha$ -dystroglycan にヒト laminin-2 およびニワトリ胚 recombinant agrin をオーバーレイした。第1列は 5nM の laminin-2 を、第2列は 5nM の laminin-2 と 50nM の agrin を、第3列は 5nM の agrin を、第4列は 5nM の agrin と 50nM laminin-2 を加えた。結合した laminin-2 および agrin はそれぞれ mouse EHS sarcoma laminin に対するアフィニティー精製したウサギ抗体 (第1列および第2列) とニワトリ胚 recombinant agrin に対するウサギ抗血清 (第3列および第4列) を用いて検出した。左端に分子量マーカー ( $\times 10^{-3}$  Da) を示す。

様neuraminidase処理により消失した(図示せず)。このことは、末梢神経 $\alpha$ -dystroglycan上の laminin および agrin との結合部位が少なくとも部分的に重複している可能性を示唆する。

### 考 察

結果のまとめを図5に示す。末梢神経 Schwann 細胞外膜において、 $\alpha$ -および $\beta$ -dystroglycan が複合体を形成し、膜表在性蛋白である $\alpha$ -dystroglycan を膜貫通蛋白である $\beta$ -dystroglycan が細胞膜につないでいる構造が予想される。

本研究は末梢神経 $\alpha$ -dystroglycan は laminin/ agrin の dual receptor であることを示した。既に述べたように laminin-2 欠損先天性筋ジストロフィーおよび *dy/dy* mouse では末梢神経の髄鞘形成不全が存在するが、*dy/dy* mouse では末梢神経近位部のみが障害され、遠位部の髄鞘は保たれている<sup>13)</sup>。このことから末梢神経遠位部では何らかの分子が laminin-2 の作用を代償していることが予想され、我々の結果から agrin はこのような分子の候補の一つであると考えられる。

末梢神経 dystroglycan 複合体の構成は、図5に示したように骨格筋とは異なっていると考えられ、Dp116 や utrophin との相互作用も確認できなかった。このことは、骨格筋が強大な機械的ストレスに絶えずさらされる臓器であるという違いに加えて、末梢神経 dystroglycan 複合体と骨格筋 DGC の果たす機能の違いを反映している可能性がある。

最近、骨格筋 $\beta$ -dystroglycan が信号伝達の adapter protein である Grb-2 と結合することが報告され<sup>14)</sup>、骨格筋 DGC が単に筋細胞膜を構造的に支持しているのではなく、信号伝達の場になっている可能性が示された。今後、末梢神経でも dystroglycan 複合体を介する信号伝達が髄鞘形成などの生理現象に関与しているとの仮説のもとに、dystroglycan 複合体と Dp116, utrophin との相互作用に加え、Grb-2 や何らかの tyrosine phosphokinase など信号伝達に関与する因子との相互作用を検討する必要がある。

### 文 献

- 1) Campbell KP : Three muscular dystrophies : loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80 : 675-679, 1995.
- 2) Ozawa E, Yoshida M, Suzuki A, et al : Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 4 : 1711-1716, 1995.
- 3) Worton R : Muscular dystrophies : diseases

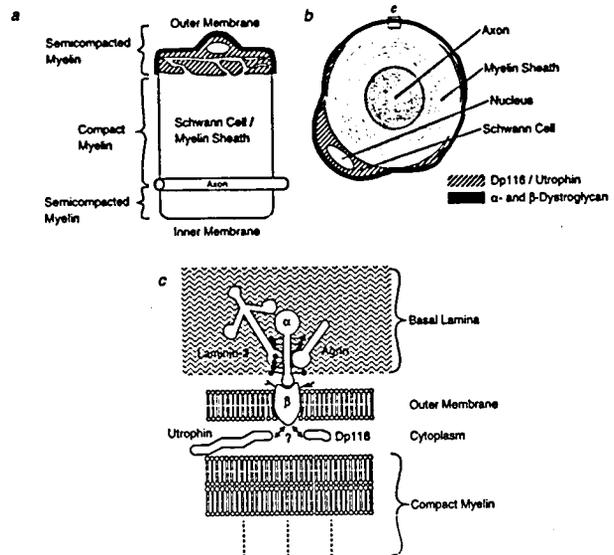


図5 結果 末梢神経 dystroglycan 複合体模式図。

(a) および (b)  $\alpha$ -dystroglycan および  $\beta$ -dystroglycan, Dp116, utrophin の局在の模式図  
(c) 神経内膜 laminin-2 および agrin と末梢神経 dystroglycan 複合体の相互作用の模式図

$\alpha$ -および $\beta$ -dystroglycan は Schwann 細胞/髄鞘の最外層に存在したのに対し、Dp116 および utrophin は Schwann 細胞質および外層の semicompacted myelin の部分に存在した。

$\alpha$ -Dystroglycan は膜表在性糖蛋白であり、膜貫通糖蛋白である $\beta$ -dystroglycan と神経内膜基底層の laminin-2 および agrin の間を結んでいる。 $\alpha$ -Dystroglycan は mucin 型の糖鎖を持つと考えられ、この部分は棒状に引き伸ばされていると予想される。 $\alpha$ -Dystroglycan は O 型糖鎖に cluster 状のシアル酸残基を持ち、これが laminin  $\alpha$ 2 鎖の G-domain と相互作用すると考えられる。糖鎖部分は多価の結合能を持つ可能性があり、二分子以上の laminin-2 または agrin と結合するのかもしれない。

of the dystrophin-glycoprotein complex. *Science* 270 : 755-756, 1995.

- 4) Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, et al : Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355 : 696-702, 1992.
- 5) Bunge MB, Bunge RP, Kleitman N, et al : Role of peripheral nerve extracellular matrix in Schwann cell function and in neurite regeneration. *Dev Neurosci* 11 : 348-360, 1989.

- 6) Fallon JR and Hall ZW : Building synapses : agrin and dystroglycan stick together. *Trends Neurosci* 17 : 469-473, 1994.
- 7) Hoch W, Campanelli JT and Scheller RH : Agrin-induced clustering of acetylcholine receptors : A cytoskeletal link. *J Cell Biol* 126 : 1-4, 1994.
- 8) Gesemann M, Denzer AJ and Ruegg MA : Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *J Cell Biol* 128 : 625-636, 1995.
- 9) Reist NE, Magill C and McMahan UJ : Agrin-like molecules at synaptic sites in normal, denervated, and damaged skeletal muscles. *J Cell Biol* 105 : 2457-2469, 1987.
- 10) Matsumura K, Yamada H, Shimizu T, et al : Differential expression of dystrophin, utrophin and dystrophin-associated proteins in peripheral nerve. *FEBS Lett* 334 : 281-285, 1993.
- 11) Yamada H, Shimizu T, Tanaka T, et al : Dystroglycan is a binding protein of laminin and merosin in peripheral nerve. *FEBS Lett* 352 : 49-53, 1994.
- 12) Yamada H, Chiba A, Endo T, et al : Characterization of dystroglycan-laminin interaction in peripheral nerve. *J Neurochem*, 1995 (in press).
- 13) Bradley WG and Jenkinson M : Abnormalities of peripheral nerves in murine muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 18 : 227-247, 1973.
- 14) Yang B, Jung D, Motto D, et al : SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem* 270 : 11711-11714, 1995.

# 44) dy マウス骨格筋細胞膜微細構造の解析 —mdx マウスとの比較検討—

若山吉弘\*

研究協力者 澁谷誠二\* 鬼木弘明\*\* 江藤智生\*\*\*  
斎藤宗雄\*\*\* 埜中征哉\*\*\*\*

## はじめに

細胞外マトリックス成分であるラミニンM鎖の欠損によっても筋ジストロフィー変化が引き起こされることが最近判明している<sup>1)2)</sup>。

本研究では、このラミニンM鎖が特異的に欠損しているdyマウス骨格筋<sup>3)</sup>を用いて、Freeze-Fracture法により詳細な筋細胞膜微細構造を解析し、すでに報告したmdxマウスの筋細胞膜微細構築異常<sup>4)5)</sup>と比較検討した。

## 材料および方法

材料：凍結受精卵を仮親に移植して得られた、すべて発症群であるが、まだ筋力低下を認めない生後7日、14日の幼若マウスおよび後肢ひきずりが明らかになる生後28日のdyマウス(C57BL/6J-dy/dy)、さらにそのcontrolマウス(C57BL/6J)各々6匹ずつの前脛骨筋および長趾伸筋を用いた。またdyマウスとの比較検討のため、同じ日齢のmdxマウス(C57BL/10ScSn-mdx)およびそのcontrolマウス(C57BL/10 ScSn)各々6匹ずつの同部位の骨格筋も用いた。

Freeze-Fracture法：それぞれのマウスから摘出した筋標本を、直ちに2.5%グルタルアルデヒドリン酸緩衝液で固定(4°C2h)し、小さなブロックに細切し、10%~30%グリセリン溶液で浸軟した後、Eiko FD IIAにて標本を切断(-120°C, 2.5~4×10<sup>-7</sup>Torr)した。さらに1%コロジオン液を滴下後、市販の次亜塩素酸Na液で余分な組織を消化し、数回蒸留水で洗浄した。作製した筋細胞膜のレプリカ膜を電顕用銅メッシュですくい、酢酸イソアミルでコロジオン液を除去した後、レプリカ膜を電顕にて観察した。筋細胞膜電顕写真は、最終倍率16万倍で、各々の標本につき最低10本の筋線維(5P面および5E面)について無作為に撮影した。各日齢ごとにdyマウス群60枚およびそのcontrolマ

ウス群60枚、合計120枚ずつ、さらにmdxマウスについても同様に、各々の電顕写真を抽出しcodeし、混ぜ合わせ、single blind法により、intramembranous particle (IMP)密度、orthogonal array (OA)密度、OAを構成するorthogonal array subunit particle (OASP)密度を算定し、decoding後、各日齢毎のdyマウス群およびcontrol群について統計学的に比較検討した。同様に、dyマウスとmdxマウスも比較検討した。

## 結 果

IMP密度(表1)：各日齢別のcontrolマウスおよびdyマウスにおけるIMP密度は、OASPを含まないP面の密度、OASPを含むP面の密度、E面の密度それぞれにおいて、いずれの日齢のdyマウスもcontrolマウスと比較して、統計的に有意差を認めなかった(p>0.1 by two-tailed t-test)。

OA密度(表2)：各日齢における1μm<sup>2</sup>あたりのgroup median densityと25%~75%のmidrange(括弧内)は、生後7日、14日、28日のcontrolマウスにおいて、それぞれ、5.4(2.7~10.2)、7.5(4.3~9.7)、5.3(1.7~8.6)であった。一方dyマウスでは3.0(1.6~7.5)、4.3(2.7~8.6)、0.5(0~2.7)であり、生後7日のdyマウスでは、まだcontrolマウスに対して統計的に有意差を認めないが(p>0.1 by Wilcoxon rank-sum test)、生後14日では有意にcontrolマウスより減少しており(p<0.01)、さらに生後28日では、OA密度の絶対値そのものも顕著に減少し、controlマウスより統計的に有意に減少していた(p<0.01)。

OASP密度(表3)：生後7日、14日、28日のcontrolマウスにおいて、そのgroup mean density±SEは11.3±0.3、13.8±0.5、15.1±0.9で、dyマウスでは11.6±0.2、12.0±0.7、12.0±0.6であり、生後28日のdyマウスのOASP密度は減少していたが(p<0.01 by two-tailed t-test)、それより幼若な生後7日、14日のdyマウスではcontrolマウスと統計的に有意差を認めなかった(p>0.1)。

\*昭和大学藤が丘病院神経内科

\*\*昭和大学藤が丘病院電顕室

\*\*\*実験動物中央研究所

\*\*\*\*国立精神・神経センター神経研究所

表1 Group mean intramembranous particle density/ $\mu\text{m}^2$  in muscle plasma membranes from control and dy mice at 7, 14 and 28 days after birth

Age (days)	Control			dy		
	P face <sup>a</sup>	P face <sup>b</sup>	E face	P face <sup>a</sup>	P face <sup>b</sup>	E face
7	1522±107 *	1693± 85 **	847 ± 62 ***	1505± 82 *	1665± 63 **	810± 39 ***
14	1755±153 #	1951±125 ##	860 ± 80 ***	1632±150 #	1704±164 ##	852± 43 ***
28	1853±213 *	2027±203 **	956 ±155 ***	1683±202 *	1744±216 **	833± 83 ***

P, protoplasmic  
E, extracellular  
a, without orthogonal array subunit particles  
b, with orthogonal array subunit particles

The figures listed are group mean density  $\pm$  standard error of the mean

\* p > 0.1, \*\* p > 0.1, \*\*\* p > 0.1

# p > 0.1, ## p > 0.1, ### p > 0.1

≠ p > 0.1, ≠≠ p > 0.1, ≠≠≠ p > 0.1

P values were calculated by two-tailed t-test

表2 Group median density of orthogonal arrays and their pits/ $\mu\text{m}^2$  in muscle plasma membranes from control and dy mice at 7, 14 and 28 days after birth

Age (days)		Median	Midrange(25% - 75%)	
7	Control	5.4	2.7 - 10.2	}
	dy	3.0	1.6 - 7.5	
14	Control	7.5	4.3 - 9.7	}
	dy	4.3	2.7 - 8.6	
28	Control	5.3	1.7 - 8.6	}
	dy	0.5	0 - 2.7	

\* p > 0.1

\*\* p < 0.01

\*\*\* p < 0.01

P values were calculated by Wilcoxon rank-sum test

mdx マウスとの比較(表4, 図): 生後7日, 14日, 28日のmdx マウスの筋細胞膜微細構造変化は, 以前報告した結果<sup>4)</sup>と同様であり, P面におけるIMP密度の減少, OA密度の減少, OASP密度の減少であったが, dyマウスの主要な変化は生後2週頃よりみられるOA密度の著明な減少であった. 従って, 生後28日のmdxマウスとdyマウスにおけるOA密度を比較するにあたって, それぞれのcontrolマウス同士の密度を

表3 Subunit particle number per orthogonal array in muscle plasma membranes from control and dy mice at 7, 14 and 28 days after birth

Age (days)	Control	dy
7	11.3±0.3 *	11.6±0.2 *
14	13.8±0.5 **	12.0±0.7 ***
28	15.1±0.9 ***	12.0±0.6 ***

The figures listed are the group mean  $\pm$  standard error of the mean

\* p > 0.1

\*\* p > 0.1

\*\*\* p < 0.05

P values were calculated by two-tailed t-test

表4 Group median density of orthogonal arrays and their pits/ $\mu\text{m}^2$  in muscle plasma membranes from mdx and dy mice at 28 days after birth

	Median	Midrange(25% - 75%)	
mdx	2.2	0.5 - 3.8	}
dy	0.5	0 - 2.7	

\* p < 0.05

P value was calculated by Wilcoxon rank-sum test

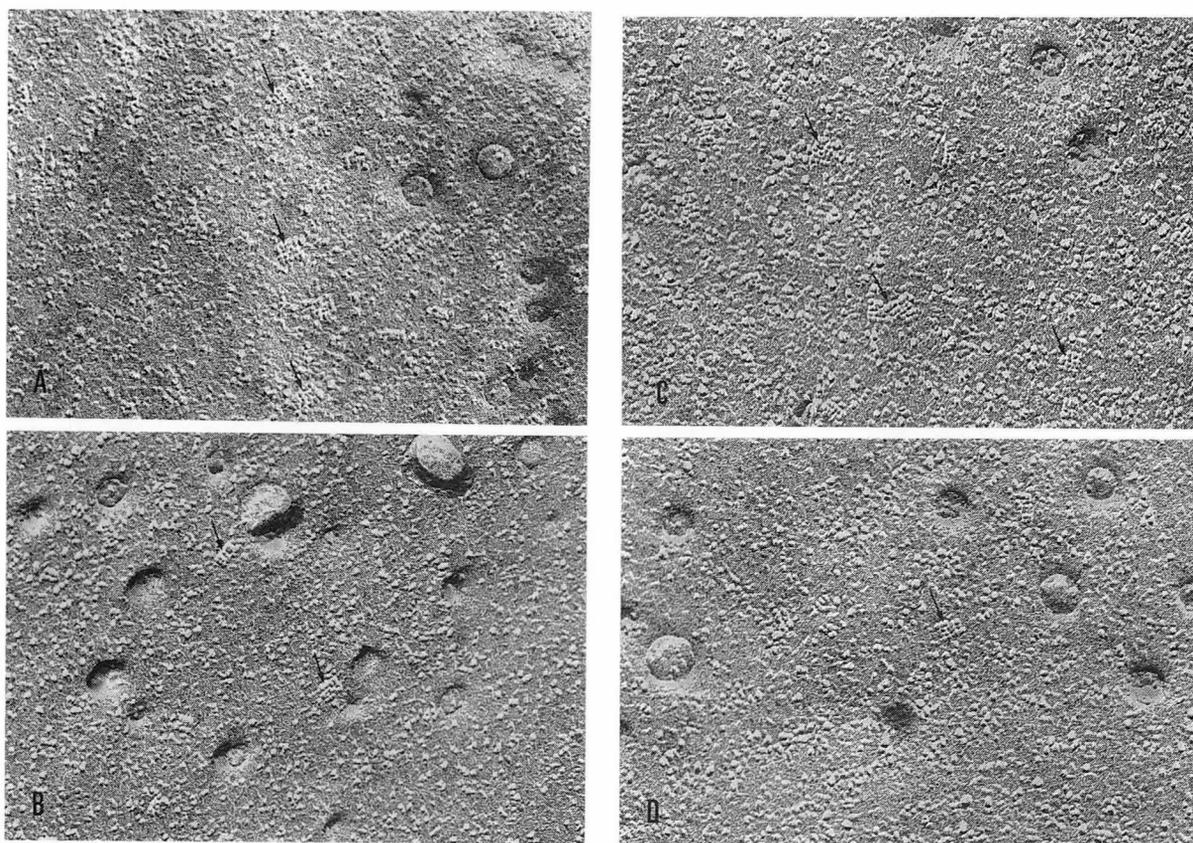


図 High magnification electron micrographs of freeze-fracture preparations illustrating densities of orthogonal arrays (arrows) on the protoplasmic face in muscle plasma membranes in (A) mdx control mouse, (B) mdx mouse, (C) dy control mouse and (D) dy mouse at 28 days after birth. Decreased densities are apparent in mdx and dy mouse muscle plasma membranes. Orthogonal array density is more decreased in muscle plasma membrane from dy mouse than in mdx mouse.  $\times 144,000$ .

最初に比較した。mdxのcontrolマウスでは、 $1\mu\text{m}^2$ あたりのgroup median density値と25%~75%のmidrange(括弧内)が、6.3(0.8~12.4)であり、同じ日齢のdyのcontrolマウスと統計的に有意差はみられず( $p>0.1$  by Wilcoxon rank-sum test), 従って、生後28日のmdxマウスとdyマウスのOA密度を単純に統計的に検定した。その結果、生後28日のmdxマウスのOA密度は、2.2(0.5~3.8)であり、筋力低下が著明になる同じ日齢のdyマウスのOA密度はmdxマウスより有意に減少していた( $p<0.05$ )。

### 考 察

常染色体劣性遺伝形式にて発症するdyマウスは、ヒト筋ジストロフィー症モデル動物として古くより知られている。dyマウスは生後2~3週頃になると後肢ひきずりが出現し、生後4週以降には筋力低下とるいそうが著明になる。予後は不良であり、通常の交配では確実にホモを得ることが難しい。本研究では確実に

ホモを得るため、凍結受精卵を仮親に移植して、すべて発症群の生後早期からのdyマウスを得た上で、Freeze-Fracture法による筋細胞膜微細構造の解析に供した。

本研究より、生後7日から28日のmdxマウスの筋細胞膜微細構造変化は、P面におけるIMP密度の減少、OA密度の減少、OASP密度の減少であり、以前の報告と同様であったが、dyマウスにおける筋細胞膜微細構造の主要な変化は、まだ筋症状をみない生後14日頃からみられるOA密度の減少であり、後肢ひきずりが顕著となる生後28日のdyマウスでは、筋症状の軽いmdxマウスのもより強い変化といえた。OAの生化学的特性、機能については依然として不明であるが、正常マウスやヒトでは成長過程にある若いマウスやヒトの方に多く認められ<sup>6)</sup>、一方、筋ジストロフィー症の障害の強さとも相関することを我々は報告している<sup>7)</sup>。OAがtype II筋線維に多く認められることから<sup>8)</sup>、この筋線維の特性である瞬発力などに関係した機能と

併せて、より円滑な筋細胞膜内外の物質輸送やエネルギー変換機能、また筋収縮から細胞膜そのものを保護する役割などに関係している可能性も考えられる。

最近、dyマウス骨格筋においてラミニンM鎖が特異的に欠損していることが判明し、筋ジストロフィー変化が細胞外マトリックスの異常によっても引き起こされることが報告されている<sup>1)~3)</sup>。dyマウス筋細胞膜のOAの減少は二次的な変化と考えられるが、基底膜成分と何らかの関係があるものと思われ、今後さらに検討の必要がある。

#### ま と め

- 1) dyマウス筋細胞膜微細構造変化は、生後14日頃の無症状期からみられるOA密度の減少といえた。
- 2) 後肢ひきずりのみられる生後28日のdyマウスのOA密度は、同じ日齢のmdxマウスと比較して、その減少程度はより顕著といえた。

#### 文 献

- 1) Tomé FMS, et al: C R Acad Sci Paris [III] 317: 351-357, 1994.
- 2) Hilaire D, et al: Hum Mol Genet 3: 1657-1661, 1994.
- 3) Arahata K, et al: Pro Japan Acad 69B: 259-264, 1993.
- 4) Shibuya S, et al: Acta Neuropathol 76: 179-184, 1988.
- 5) Shibuya S, et al: Neuropathol Appl Neurobiol 17: 335-344, 1991.
- 6) Wakayama Y, et al: J Neurol Sci 91: 191-205, 1989.
- 7) Shibuya S, et al: Neuropathol Appl Neurobiol 20: 487-494, 1994.
- 8) Ellisman MH, et al: J Cell Biol 68: 752-774, 1976.

## IX. ミトコンドリア脳筋症

# 45) ミトコンドリア脳筋症各病型の筋病理所見と変異mtDNAの比較検討

内野 誠\*

研究協力者 箕田修治\* 徳永 誠\* 安藤正幸\*\*

## はじめに

我々はミトコンドリア (mt) 脳筋症の原因である mtDNA 変異とその主要な筋病理学的特徴である ragged-red fibers (RRF), および cytochrome c oxidase (CCO) 活性欠損線維との関係を明らかにして, mt 脳筋症の病態解明を行うことを目標に研究を進めている。CPEO, MELAS, MERRF 患者筋において各病型間の筋病理は微妙に異なっており, RRF において CPEO, MERRF ではほとんど CCO 活性は欠損しているのに対し, MELAS では CCO 活性を有する筋線維が多い。また, 筋線維を縦断面で見ると CCO 活性はいずれも segmental な欠損であるが, その境界面は CPEO では鮮明であり, MELAS および MERRF では不鮮明である<sup>1)</sup>。これまで, 我々は, これら 3 病型患者筋において個々の筋線維の CCO 活性および succinate dehydrogenase (SDH) 活性と, total (正常および変異) mtDNA 量, さらにそこに占める変異 mtDNA の割合の関係を報告してきた<sup>2)~5)</sup>。

今回はこれら 3 病型の筋病理所見の相違と変異 mtDNA の関係を RRF と non-RRF との移行部位に着目して比較検討した。

## 対象および方法

対象は CPEO, MELAS, MERRF 患者より得られた生検筋各 3 症例である。各連続筋切片を CCO 染色, SDH 染色を行い, 写真撮影後, Desk scan II および NIH image を用いて個々の筋線維における染色性を定量化した。個々の筋線維における total mtDNA を *in situ* hybridization 法を用いて組織切片上で検出した。個々の筋線維における変異 mtDNA の割合を検討するため, CPEO では欠失部位の mtDNA をプローブとして *in situ* hybridization により正常 mtDNA を検出して total mtDNA から差し引き, また, MELAS および MERRF では single fiber PCR 法を用いた<sup>2)~5)</sup>。各病型患者の生検筋を 20  $\mu$ m ごとに連続切片を作成して SDH 染色を行い, 200  $\mu$ m 間に個々の筋線維の

SDH 活性がどのように変化するかを検討した。

## 結果

各病型の筋病理学的特徴である CCO 活性欠損と SDH 活性増加 (活性が著明に増加した筋線維を RRF とする) の関連を明らかにするために, 各病型患者筋の個々の筋線維の CCO 活性と SDH 活性を fiber type 別に検討した (図 1)。type I fibers においては CCO 活性低下に伴い SDH 活性が増加して RRF へ移行すると考えられたが, MELAS では SDH 活性が増加しても CCO 活性がほとんど低下しない筋線維 (CCO 活性陽性 RRF) も認められた。しかしながら, type II fibers はもともと CCO 活性が低いため, 本法による検討でははっきりした相関は認めなかった。

*in situ* hybridization 法を用いた検討では, いずれの病型においても RRF で total mtDNA 量は著明に増加しており, SDH 活性と total mtDNA 量とはよく相関していた。*in situ* hybridization 法あるいは single fiber PCR 法を用いて, 個々の筋線維における正常と変異 mtDNA の割合を検討すると, RRF で高率に変異

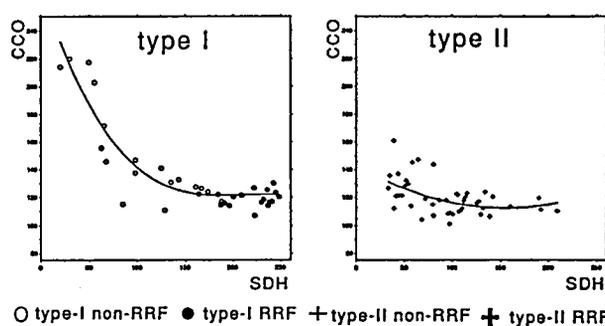


図 1 個々の筋線維における CCO 活性と SDH 活性の関係連続筋切片を CCO 染色, SDH 染色を行い写真撮影後, Desk scan II および NIH image を用いて, 個々の筋線維における染色性を定量化した。また, fiber type を区別するため, ATPase 染色を行った。本例は MERRF 患者症例を示す。縦軸に CCO 活性, 横軸に SDH 活性を示し, 数字は活性の強さを表す。

\*熊本大学医学部神経内科

\*\*熊本大学医学部第一内科

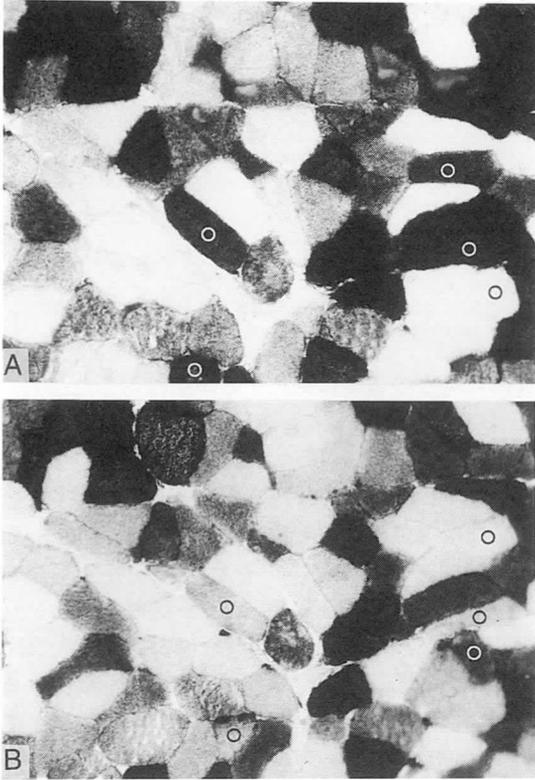


図2 個々の筋線維 200 μm 間における SDH 活性変化  
各病型患者筋の連続切片を 20 μm ごとに作成し、200 μm 離れた部位での SDH 活性を比較し、RRF と non-RRF 間の移行が見られた筋線維の頻度を検討した。  
本例は CPEO 患者症例を示す。○は RRF と non-RRF 間の移行がみられた筋線維。

mtDNA を認めた。

これらの 3 病型では、SDH 活性が total mtDNA 量を反映していることが明らかになったので、RRF と non-RRF の移行部の SDH 活性を観察することで、移行部における変異 mtDNA の分布を推測した。各病型の患者筋において 200 μm の間隔で RRF から non-RRF へ、あるいは non-RRF から RRF へと変化した筋線維は各々 5~10% に認められた (図 2, 表 1)。そして、移行のパターンを検討したところ、CPEO では急な移行が見られる筋線維が多かったが、MELAS および MERRF では比較的徐々に移行が見られる筋線維が多かった。

### 考 察

図 3 はこれまでの我々の結果をもとに 3 病型における変異 mtDNA と筋病理学的特徴の関係についてまとめたものである。

3 病型の個々の筋線維における CCO 活性と SDH 活性の間には、特に type I fibers において逆相関が認め

表 1 各病型患者の筋線維 200 μm 間における RRF と non-RRF 間の移行筋線維の頻度。  
各病型患者 1 症例ごとに 500 本の筋線維を検討した。ここでは各病型 1 症例の結果を示す。

	CPEO	MELAS	MERRF
R <--> Non	42	27	36
R <--> Int	22	24	15
Int <--> Non	43	27	21
R <--> R	113	93	50
Int <--> Int	39	19	8
Non <--> Non	241	310	370
合計	500	500	500

R: RRF, Int: 中間型, Non: non-RRF

R<--> Non の占める割合

CPEO 8.4%, MELAS 5.4%, MERRF 7.2%

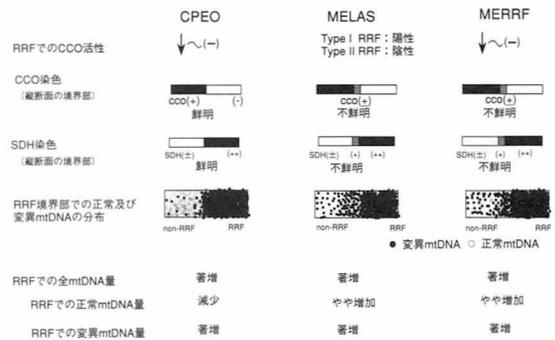


図3 3病型における筋病理学的特徴と変異 mtDNA の関係。

られ、正常な CCO 活性を有する線維 → CCO 活性が低下した線維 → CCO 活性を欠損した non-RRF → CCO 活性を欠損した RRF へと進行する可能性が示唆された。MELAS における CCO 活性陽性 RRF が CCO 活性を欠損した RRF から形成されるのか、CCO 活性が残ったまま RRF になるのか今後の検討が必要である。

3 病型とも RRF において total mtDNA 量が著明に増加しており、その中に占める変異 mtDNA の割合が非常に高率であったことから、著明に増加した total mtDNA の多くは変異 mtDNA 由来と考えられる。また、筋組織切片上で、個々の筋線維における total mtDNA 量と SDH 染色性とはほぼ一致していたので、SDH 染色性の強弱で変異 mtDNA 量の多少を推察できることが明らかになった。

この知見を利用して、non-RRF から RRF への移行を検討したが、CPEO では変異 mtDNA が比較的明瞭な境界をもって segmental に増加する筋線維が多い傾向にあり、MELAS および MERRF では変異 mtDNA が徐々に増加する筋線維が多い傾向にあった。これは、

先に Matsuoka ら<sup>1)</sup>によって報告された MERRF, CPEO 患者筋の縦断面における CCO 活性欠損の境界部位の研究と異なった側面から検討したものであり, 変異 mtDNA との関係が明らかになった。ただ, CPEO でも変異 mtDNA が徐々に増加する筋線維, MELAS および MERRF でも変異 mtDNA が急に増加する筋線維が観察されることから, さらに検討が必要と思われる。

#### 文 献

- 1) Matsuoka T, Goto Y, Yoneda M, et al: Muscle histochemistry in myoclonus epilepsy with ragged-red fibers (MERRF). *J Neurol Sci* 106: 193-198, 1991.
- 2) Mita S, Schmidt B, Schon EA, et al: Detection of "deleted" mitochondrial genomes in cytochrome c oxidase-deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9509-9513, 1989.
- 3) Tokunaga M, Mita S, Sakuta R, et al: Increased mitochondrial DNA in blood vessels and ragged-red fibers in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Ann Neurol* 33: 275-280, 1993.
- 4) Tokunaga M, Mita S, Murakami T, et al: Single muscle fiber analysis of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Ann Neurol* 35: 413-419, 1994.
- 5) Mita S, Tokunaga M, Kumamoto T, et al: Mitochondrial DNA mutation and muscle pathology in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode. *Muscle Nerve Sup* 3: 113-118, 1995.



表1 3243変異を有する患者と正常対照での挿入変異の頻度

症状	例数	挿入変異陽性者数
MELAS	68	2
ミオパチーのみ	4	0
CPEO	2	2
正常コントロール	116	1

pBluescriptにクローニングし、*in vitro*転写で得られたRNAに対して、RNaseを含む crude な核蛋白分画を用いてプロセシング実験を行ったところ、mutant transcriptsのみが切断された。切断部位は2ヶ所で、チロシン転移RNAとシステイン転移RNAの境界部位、及びチロシン転移RNA内部に認められた。また、この切断に関与している蛋白因子を調べたところ、RNase P類似物質であるという確証を得た。結局、この挿入変異があると異常な転移RNAが出現し、翻訳レベルの異常を惹起する可能性が示唆された。このことは、mtDNAの多型の中に、mtDNAの発現に影響を与えるものが存在する可能性を示すものであり、病因的mtDNA異常を考える上で、示唆的である。

## 2 構造異常をもつミトコンドリアDNAの検出システムの確立

ミトコンドリアDNAの構造異常は、欠失と重複が知られている。ともに慢性進行性外眼筋麻痺症候群(CPEO)の表現型と密接に関わっており、ここにも遺伝子型-表現型の関係の追求が必要である。欠失に比べ、重複はあまり研究されておらず、それは検出法に問題があった。われわれは、従来の検査法を再構築し、重複を含めた構造異常を検出するシステムを確立した(図3)。

まずはじめに、従来から行われているサザン法とPCR法で、欠失の有無を調べる。その際、PCRには、long PCRと呼ばれる方法を応用し、16 kilobaseのmtDNAを2組のプライマーでカバーした。もし、欠失に由来するPCR産物が得られたならば、3つの制限酵素を同時に反応させ、DNA断片の長さを正常の場合と比較することで、欠失部位の推定を行い、さらにそのDNA断片を用いて、欠失断点確定のための塩基

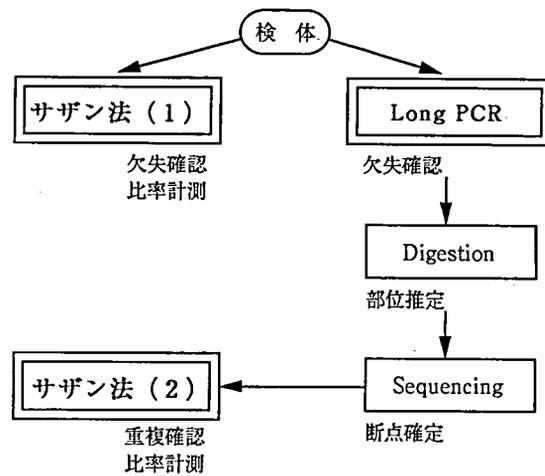


図3 mtDNA構造異常検出システム

配列決定を行った。この方法で、欠失断点決定にかかる時間が、飛躍的に短縮できた。

そして、次に重複の有無を調べるための2回目のサザン法を行った。これは、①欠失領域内と非欠失領域内でそれぞれmtDNAを1回切断する2種類の制限酵素を用いること、②欠失領域と非欠失領域を認識する2種類の部分プローブを用いることが特徴である。これにより、欠失DNAと重複DNAの区別が可能であり、25例のCPEOの症例の検討では、わずか2例に重複DNAが存在するのみであった。しかも、重複DNAは、正常大DNAや欠失DNAに対する存在比が低く、病気との関わりは決して大きいとは考えられない結果であった。

今回確立した検出システムを用いて重複DNAの研究を行い、詳細に重複DNAの病態への関わりを研究する予定である。

## 結 論

ミトコンドリアミオパチーの成因・病態研究は、ミトコンドリア、細胞、組織/臓器そして個体という種々の対象を用いて検討することが重要である。そしてその際、mtDNA異常が、転写レベル、RNAレベル、翻訳レベル、蛋白レベル、活性レベルという各レベルにどのように反映されるのかを明らかにしなければならない。このような観点から、新しい治療法の開発に向けて、さらに研究を押し進めていく予定である。

# 47) MERRFにおける新たなミトコンドリアtRNA遺伝子上の変異

宝 来 聡\*

研究協力者 西野一三\*\* 小澤真津子\*\*  
 榎中征哉\*\* 後藤雄一\*\*

## はじめに

Ragged-red fibers (RRF)を伴うミオクローヌスてんかん (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers: MERRF) は、1980年に Fukuharaらにより初めて報告された疾患概念で<sup>1)</sup>、典型的には小児期に発症し、小脳性失調・ミオクローヌス・てんかん発作を中心とする中枢神経症状に加え、進行性の筋力低下を来す疾患である。筋病理学的には cytochrome c oxidase 部分欠損, RRF, strongly SDH-reactive blood vessels (SSV) がみられる。

分子遺伝学的には、MERRFと関わる変異として、これまでにミトコンドリア・リジンtRNA上の8344番のA→G点変異<sup>2)</sup>と8356番のT→C点変異<sup>3)4)</sup>とが報告されている。8344変異は、MERRF患者の80%前後に認められるとされる。一方、8356変異は欧米より2家系の報告がある<sup>3)4)</sup>が本邦での報告例はない。従って、これまでのところ、本邦のMERRF患者で遺伝子異常が明らかにされた例はすべて8344変異である。

## 目的・対象

本邦MERRF患者で8344変異以外の変異によるものがあるかどうかを調べる目的で、臨床的にMERRFあるいはその疑いと診断され、筋生検を施行された患者の内、8344変異の認められない5人を対象として、MERRF発症と関わる新たな変異があるかどうかを検討した。

表1に5人の対象患者の臨床像を要約した。全例小児期発症で、中枢神経症状およびミオパチーに加え、乳酸値高値を認めた。患者1および2では、心筋症、腎障害、難聴などを認めた。

患者5は本研究エントリー後に、脳梗塞を来し、さらには以前にも頭痛や悪心などのエピソードがあったことが明らかにされたため、診断がMERRFから「ミオクローヌスを伴うMELAS」に変更された。

表1 Clinical and laboratory features

Patient	1	2	3	4	5
Age/Sex	2y9m/F	8y/M	15y/F	31y/M	10y/M
Age at onset	5m	7y	9y	10y	6y
Seizures	+	+	+	+	+
Myoclonus	±	+	+	+	+
Cerebellar ataxia	?	+	+	+	±
Myopathy	+	+	+	+	+
Cardiac involvement	+	+	-	-	-
Others	renal failure	hearing loss			stroke
Lactate* (mmol/l)					
Serum	↑7.5	↑5.6	↑3.8	1.4	↑10.1
CSF	↑4.3	↑4.3	↑2.2	↑2.2	↑5.8

\*normal range: 0.5 - 2.0 mmol/l

## 方 法

ミトコンドリアDNA (mtDNA) はアンダーソンらによりすでにその全塩基配列が決定されており、環状のmtDNA分子上には22個のtRNA遺伝子がコードされている<sup>5)</sup>。MERRFを含めミトコンドリア病の多くは、ミトコンドリアDNA (mtDNA) 上の点変異に由来するものが多く、tRNA遺伝子はミトコンドリア病点変異のホット・スポットとして知られている。そこで我々は、全tRNA領域の塩基配列を決定し、得られた配列をアンダーソン配列と比較した。

具体的には、全ミトコンドリアDNAをカバーするように12組のPCRプライマーをセットし、その内、tRNA遺伝子領域をカバーする11本のPCR断片をテンプレートとして、オートシーケンサー (model 377, Applied BioSystems) による直接シーケンスを行った。シーケンスプライマーは、tRNA遺伝子領域を上流と下流から挟むような位置に、合計30カ所にセットし (図1)、PRISM Ready Reaction Terminator Cycle Sequence Kitを用いてサイクル・シーケンス反応を行った。

## 結果・考察

結果を表2に示す。この表ではアンダーソン配列と異なっていたヌクレオチドをtRNA遺伝子ごとに示している。患者1では8298番のチミンがシトシンへと変異し、患者2と3で8363番のグアニンがアデニンへと変異していた。これらの変異は、現在までに報告のない新しい点変異であった。

\*国立遺伝学研究所

\*\*国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部

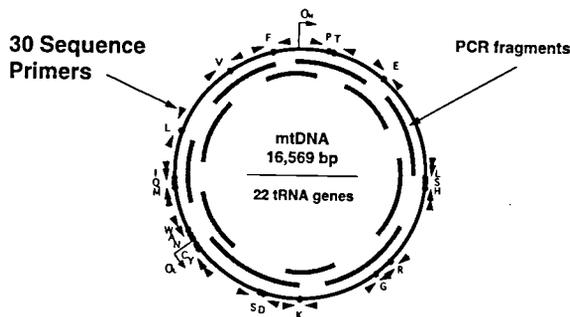


図1 Sequence analysis of Mitochondrial DNA

	8298	8363
Human	CACTGTAAA-----TT	TACAGTGA
Chimpanzee	CACTGTAAA-----TT	TACAGTGA
Gorilla	CACTGTAAA-----TT	TGCAGTGA
Orangutan	CATTGCAAA-----TT	TGCAGAGA
Bovine	CACATAAGAA-----TC	CTTGGTGA
Mouse	CACCTGTAAA-----TC	CATAGTGA
Rat	CATTGCGAA-----TC	CACAATGA
Chicken	CATTAAGAA-----CC	TAAATGA
Xenopus laevis	CACATAAGAA-----CC	TAAATGA
Sea urchin	CCTTAATTA-----TT	TAAAGGA
Drosophila melano.	CATTAGATG-----CT	TAAATGA
Mytilus edulis	TAACTAAA-----AG	TAGTTT
Zea mays	GGGTGTATA-----GC	TATACCA
Brassica napus	GGGTGTATA-----GC	TATACCCA

図2 Conservation through evolution

これら2つの点変異の病的意義を確認するために、ミスマッチプライマーを作成し酵素切断多型検査を行った。いずれの変異も患者・同胞・母親にヘテロプラスミーが認められ、血液よりも筋肉に変異型が多い傾向があった。相当数の正常人(8298変異は133人、8363変異は50人)を対象として同様の検査を行ったが、全員陰性であった。さらに患者2には、10410番のT→Cの一塩基置換を認めた。この塩基置換はすでにHattoriらにより多型として報告されているもので、その頻度は日本人60人につき2人とされている<sup>6)</sup>。従って、8363変異をもつ2例はそれぞれ遺伝学的に異なるクラスターに属することが示唆された。

8298番のチミンも8363番のグアニンもミトコンドリア・リジン tRNA の aminoacyl acceptor stem (AA stem) 上で対側の塩基と塩基結合を形成して AA stem の二重らせん構造の維持に関わっており、ひいては tRNA 全体の立体構造の維持に何らかの役割を担っている可能性が考えられた。進化の面からは、8298番・8363番とも、AA stem 上の対側の塩基とともに種を越えてよく保存されており、重要な塩基であることが示唆された(図2)。

以上の結果を併せて考えると、今回見出された新たな変異が、ともに単なる多型ではなく、MERRF 発症に深く関わっている変異であることが強く示唆される。しかし、これらの変異が直接 MERRF 発症の原因となっているかどうか確かめるためには、今後更に細胞レベルで蛋白合成能や酸化的リン酸化能を調べる必要

表2 Results

Patient	1	2	3	4	5
Phe	-	-	-	-	-
Val	-	-	-	-	-
Leu(UUR)	-	-	-	-	3260 A→G
Ile	-	-	-	-	-
Gln	-	-	-	-	-
Met	-	-	-	-	-
Trp	-	-	-	-	-
Ala	-	-	-	-	-
Asp	-	-	-	-	-
Cys	-	-	-	-	-
Tyr	-	-	-	-	-
Ser(UCN)	-	-	-	-	-
Asp	-	-	-	-	-
Lys	8298 T→C	8363 G→A	8363 G→A	8356 T→C	-
Gly	-	-	-	-	-
Arg	-	10410 T→C	-	-	-
His	-	-	-	-	-
Ser(AGY)	-	-	-	-	-
Leu(CUN)	-	-	-	-	-
Glu	-	-	-	-	-
Thr	-	-	-	-	-
Pro	-	-	-	-	-

があると考えられた。

また、患者4では8356番のチミンからシトシンへの点変異を、患者5では3260番のアデニンからグアニンへの点変異をそれぞれ見出した。これらの変異はいずれも、本邦第一例目の報告である。

MERRFではなく「ミオクロノスを伴う MELAS」とされた患者5において認めた3260変異は、これまでにヨーロッパから2家系の報告があり、いずれも母系遺伝するミオパチーと心筋症 (maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: MIMyCa) の表現型をとっている<sup>7)8)</sup>。我々の患者では経時的に調べた胸部X線写真、心電図、心エコーではいずれも異常を認めておらず、現在までのところ心筋障害を示唆する所見はない。MIMyCaの原因変異とされる3260変異でMELASを来たし得ることは興味深い。一方、3260番のヌクレオチドが存在するロイシン(UUR)tRNAは、MELASと関連する変異のホットスポットとして知られている。何らかの理由でロイシン(UUR)tRNA上の変異はMELASの表現型をとりやすいと想定すると、3260変異でMELASを来すことも理解可能である。遺伝型と表現型との関係については、さらなる検討が必要と考えられた。

#### まとめ

- 2つのミトコンドリア・リジン tRNA 上の新たな変異(8363(G→A)変異、8298(T→C)変異)を報告した。これらは、相当数の正常者で変異が認められないこと、進化の過程でよく保存されていること、ヘテロプラスミーを認めることなどから、多型ではなく症状発現と関わる変異であることが強く示唆された。
- 2つの本邦第一例目となる変異(8356変異、3260変異)を報告した。3260変異を認めた患者はMERRFよりもMELASの範疇に入るものであったが、従来よりMIMyCaの変異として報告されてきた3260変異でMELASを来たし得ることは興味深い。

## 文 献

- 1) Fukuhara N, et al: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities). Disease entity or syndrome? Light and electron microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci* 47: 117-133, 1980.
- 2) Shoffner JM, et al: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell* 61: 931-937, 1990.
- 3) Silvestri G, et al: A new mtDNA mutation in the tRNA<sup>Lys</sup> gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 51: 1213-1217, 1992.
- 4) Zeviani M, et al: A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> gene. *Eur J Hum Genet* 1: 80-87, 1993.
- 5) Anderson S, et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465, 1981.
- 6) Hattori Y, et al: Point mutations in mitochondrial tRNA genes: sequence analysis of chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO). *J Neurol Sci* 125: 50-55, 1994.
- 7) Zeviani M, et al: Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA<sup>Leu</sup>(UUR). *Lancet* 338: 143-147, 1991.
- 8) Sweeney MG, et al: Mitochondrial DNA transfer RNA mutation Leu(UUR)A → G 3260: a second family with myopathy and cardiomyopathy. *Q J Med* 86: 435-438, 1993.

# 48) MERRFの心筋ミトコンドリア病変についての研究

福原信義\*

研究協力者 中島 孝\* 巻 洵 隆 夫\*\*

## はじめに

MERRF<sup>1)</sup>はミトコンドリア脳筋症の1つで、脳と骨格筋のミトコンドリア異常が認められており、脳では神経細胞自体にミトコンドリアの形態的变化がみられる<sup>2)</sup>。そして、そのミトコンドリアの形態異常は、骨格筋のミトコンドリアの形態的变化と同一のものである<sup>3)</sup>。したがって、MERRFはMELASと異なり、脳の神経細胞の一次的な病変によって生じていると考えられている<sup>2)</sup>。

MELASでは、神経症状の他に心筋障害、腎障害(ネフローゼ症候群)<sup>3)</sup>や、糖尿病の合併がしばしば報告されている<sup>4)5)</sup>が、MERRFではこのような報告はまれである。MERRFの剖検例で心筋に注目し、ミトコンドリアのDNA変異と形態的变化について検討したので報告する。

## 症 例<sup>2)3)</sup>

60歳 男性

家系内に同様の疾患を持つものが多数みられる。45歳頃より構音障害が始まり、次第にミオクロームス、全般性痙攣、小脳性失調が生じ、徐々に痴呆と全身の筋萎縮が増強した。血液のmtDNA分析によりtRNA<sup>Lys</sup>(塩基番号8344)の点変異が認められた。約15年の経過で死亡。病理学的には、小脳、脳幹の萎縮が著明で、上小脳脚、小脳虫部、被殻、下オリーブ核などにびまん性グリオーシスがみられ、MERRFと診断された。生前の心電図では異常は認められず、胸部レ線写真でも心肥大は認められなかった。

## 材料、方法

剖検時に心筋を切り出し、直ちにグルタルアルデヒドで固定、オスミウムで後固定した後、型のごとく包埋、染色処理し、電顕で観察した。一方、組織の一部はmtDNAの分析の時まで凍結保存した。DNAを抽出した後、Yonedaら<sup>6)</sup>の方法によりPrimer 1: 5'-TCACTGTAAAGAGGTGCCGG-3' (塩基番号8345-8364)とPrimer 2: 5'-AACCACAGTTTCATGCCCA

-3' (塩基番号8191-8210)を用い、PCRを93°C 30sec, 50°C 1min, 72°C 3minの条件で25cyclesで行なった。Nae Iで消化の後、2.5%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色のDNAバンドにより判定した。mtDNAのヘテロプラスミーの定量のためには、上記のPCRの条件で、蛍光ラベルしたdUTPをdNTP mixに1:100の割合で混合し、PCRを行ない、同様の条件でNae Iで消化した。ABI PRIZSM 310 genetic analyzerでDNAのフラグメントを分離し、解析ソフトであるGenscanおよびGenotyperにて正常および異常DNAの割合をpeak areaより算出した。

## 結 果

### 1) mtDNAの変異

心筋でも脳組織と同様、tRNA<sup>Lys</sup>の塩基番号8344におけるAよりGへの点変異が認められたが、変異mtDNAの比率は33%で、他臓器に比べて低かった。ちなみに、

小脳歯状核	60.5%
大胸筋	65.7
脾臓	75.6
リンパ球	68.9
心筋	30.3

### 2) 電顕的観察

心臓は、肉眼的にはごく軽度の線維化がみられたが、著明な変化はみられなかった。電顕的には、少数のライソゾームが所々にみられたが、心筋の筋原線維自体には大きな変化は無く、脂肪沈着もみられなかった。一方、ミトコンドリアは非常に大きく、クリスタが著明に増加し、vesicularになっているもの(図1, 2)が多く、また中に電子密度のさまざまな無構造物質を入れているもの(図2, 3)が多くみられた。クリスタの一部が層状(図2, 3)となり、骨格筋、神経細胞で観察されたいわゆる結晶様構造物に近いもの(図4)も観察されたが、いずれも小さく、未熟なものと考えられた。心筋線維の間にみられた小血管(網細血管、静脈)ではこのような異常ミトコンドリアは観察されず。また、ミトコンドリアの集積もみられなかった。

\*国立療養所厚瀧病院神経内科

\*\*国立療養所厚瀧病院神経病理

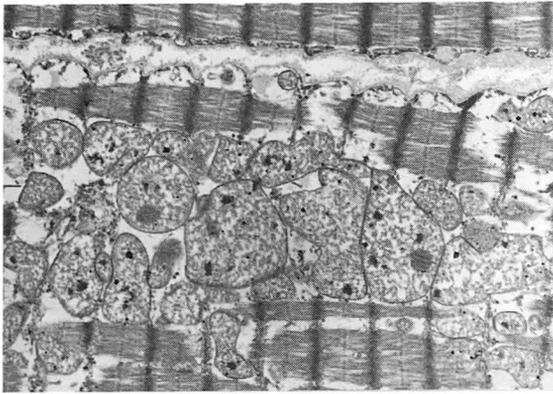


図1 心筋。筋原線維自体には大きな変化はないが、ミトコンドリアは巨大化し、種々の封入体が見られる。 ×7,000

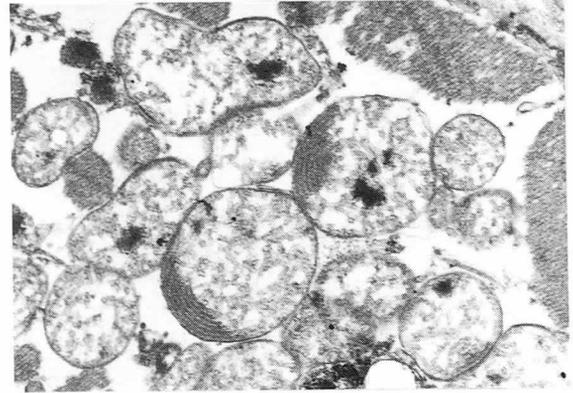


図3 心筋ミトコンドリア。クリスタが層状に配列している。 ×15,500

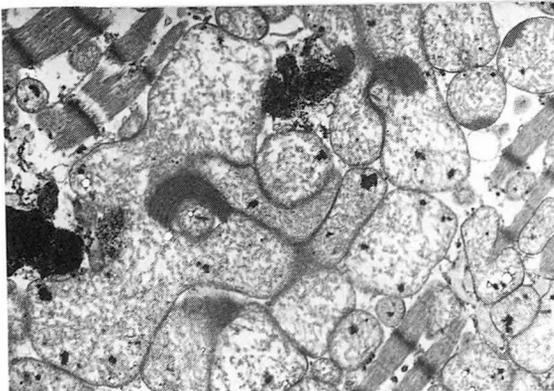


図2 心筋のミトコンドリア。ミトコンドリアは巨大化し、クリスタの一部は多層化し、結晶様構造となっている。 ×7,000

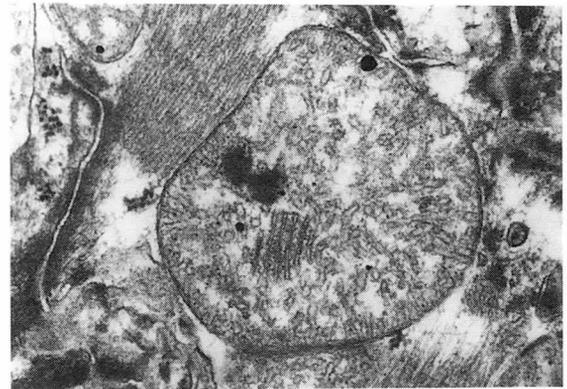


図4 心筋ミトコンドリア。高電子密度の封入体のほか、未熟な、いわゆる結晶様封入体が見られる。 ×35,000

### 考 察

MERRFは、mtDNAの塩基番号8344(tRNA<sup>Lys</sup>のcoding region)の変異によることが知られている。細胞内では、変異DNAと正常DNAがヘテロプラスミーを生じている。患者の家系内に遺伝子的には異常でありながら、臨床的に無症状のものが見出されるが、このヘテロプラスミーの比率がその臓器、あるいは組織の臨床症状の有無と関係していると疑われている。しかし、変異DNAの比率の高いものが必ず臨床症状を呈するとは限らず、この点は未だよく判っていない<sup>2)</sup>。

Kearns-Sayre症候群は、心伝導ブロックをその三主徴としているように病気の経過と共に高率に心臓異常を生じるようになり、死亡原因となる。また、MELASはミトコンドリアの異常集積が血管内膜、中膜に生じる<sup>7)8)</sup>と言われ、臨床的に心筋障害がみられ、病理学的にもかなり多くの例で心筋症があり、心筋に

ミトコンドリアの集積のあることが報告されている<sup>9)</sup>。一方、MERRFでは、脳神経系と骨格筋の障害のみで、一般臓器は侵されないとされてきたが、Ananら<sup>10)</sup>はMERRFで左心室の肥大と壁の動きの異常がみられやすいこと報告している。また、Ozawaら<sup>11)</sup>はMERRFの10例中4例で臨床的に心筋障害があり、その詳細は不明であるが、うち2例では心不全を生じており、MERRFでも心筋障害の頻度は高いという。しかし、病理学的な裏付けはなかった。Ozawaら<sup>11)</sup>は定型的な臨床症状を備えたMERRF例では骨格筋における変異DNAの比率は85%以上であるとしているが、本報告の症例の骨格筋の変異DNAの比率は65.7%であり、心筋の変異DNAはもっと少なく、30.33%であった。電顕で観察されるミトコンドリアの形態も明らかに異常であるが、骨格筋に比べればはるかに軽度なものであった。

## 結 論

MERRFでは、骨格筋よりは軽度であるが、心筋にもミトコンドリアの形態異常が観察される。

## 文 献

- 1) Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, et al: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres. Disease entity or a syndrome? Light and electron microscopic studies of two cases and review of the literature. *J Neurol Sci* 47: 117-133, 1980.
- 2) Fukuhara N: Clinicopathological features of MERRF. *Muscle Nerve, Suppl* 3: S90-S94, 1995.
- 3) 福原信義, 中島 孝, 卷淵隆夫: MERRF 脳の電顕的研究. "厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー及び類縁疾患の病態と治療法に関する研究" (高木班) 平成6年度研究報告書, (印刷中).
- 4) Onishi H, Inoue K, Osaka H, et al: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) and diabetes mellitus: molecular genetic analysis and family study. *J Neurol Sci* 114: 205-208, 1993.
- 5) Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, et al: A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N E J Med* 330: 962-968, 1994.
- 6) Yoneda M, Tanno Y, Nonaka I, et al: Simple detection of tRNA<sup>Lys</sup> mutation in myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) by polymerase chain reaction with a mismatched primer. *Neurology* 44: 1838-1840, 1991.
- 7) Ohama E, Ohara S, Ikuta F, et al: Mitochondrial angiopathy in cerebral blood vessels of mitochondrial encephalomyopathy. *Acta Neuropathol* 74: 226-233, 1987.
- 8) Monar M, Neudecker S and Schroder JM: Increase of mitochondria in vasa nervorum of cases with mitochondrial myopathy, Kearns-Sayre syndrome, progressive external ophthalmoplegia and MELAS. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21: 432-439, 1995.
- 9) 大浜栄作, 武田茂樹: ミトコンドリア脳筋症の病理. *脳神経* 41: 735-746, 1990.
- 10) Anan R, Nakagawa M, Miyata M, et al: Cardiac involvement in mitochondrial diseases. A study on 17 patients with documented mitochondrial DNA defects. *Circulation* 91: 955-961, 1995.
- 11) Ozawa M, Goto Y, Sakuta R, et al: The 8,344 mutation in mitochondrial DNA: A comparison between the proportion of mutant DNA and clinico-pathological findings. *Neuromuscular Disord* 5: 483-488, 1995.

# 49) 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* hybridizationによる 4977bpの欠失を伴う変異ミトコンドリアDNAの検出

水野美邦\*

研究協力者 中村 範行\* 服部 信孝\* 池邊 紳一郎\*  
平澤 恵理\* 後藤 雄一\*\* 埜中 征哉\*\*  
田中 雅嗣\*\*\*

## 目 的

ミトコンドリアに機能異常のある多くの場合、ミトコンドリアの数の増加・変形がみられ、ragged-red fiber (RRF) と称されている。これは、主としてミトコンドリアDNAに異常をもつミトコンドリア脳筋症で観察されるが、その他高齢者・筋ジストロフィー・筋炎等で非特異的に観察されることが知られている。

一方我々は、パーキンソン病の発症機序を追求する過程で、パーキンソン病において4977bpの欠失(いわゆる common deletion)を伴う変異ミトコンドリアDNA (mtDNA)の蓄積を報告した<sup>1)</sup>。その後、加齢<sup>2)</sup>・肥大型心筋症<sup>3)</sup>・筋緊張性ジストロフィー症<sup>4)</sup>で、common deletionのみならず様々なサイズの欠失の蓄積を伴うことが報告されている。特にcommon deletionは、加齢現象の指標となりうるものであり、諸組織に認められている<sup>5)</sup>。

これらの欠失を伴う変異mtDNAの組織上分布を検討することは、従来の生化学的方法では不可能であり、組織上分布を検討するには*in situ* hybridizationを用いることが有効である。しかし、サブトラクションを用いた従来の方法<sup>6)7)</sup>では、KSSのように欠失が多量に存在する組織での検出は可能であるが、組織中で数%程度の欠失を検出することは不可能である。我々は、老化で多く認められるcommon deletionに焦点をあて、この欠失を伴う変異DNAを直接検出する合成オリゴヌクレオチドプローブを調整し、その有用性を検討するとともに、非特異的に観察されるRRFとの関連について検討した。

## 方 法

対象：KSS3例 (common deletion2例, 7663bpの欠

失1例)・MELAS2例・MERRF2例・筋緊張性ジストロフィー症1例・高齢者MG1例、計9例で、表1に詳細を示した。それぞれの生検筋組織から6μmの凍結切片を切り出し、連続切片でSDH染色とCCO染色を施行した。

プローブの調整：図1に示すような部位に相補的な45bpのオリゴヌクレオチド2種類を合成し、Boehringer Mannheim社のDig tailing kitを用い、ジゴキシゲニンで標識してプローブとし、変異DNA検出用をATP8/ND5 chimera probe, 正常DNA検出用をWild probeと明記した。

サザンハイブリダイゼーション：高齢者剖検脳から抽出したDNAをテンプレートとし、common deletionを挟むプライマー対(L790とH1363)を用いて増幅した後、得られたPCR産物をサザンプロット解析し、プローブの特異性を確認した。

*In situ* hybridization：ISHはPinkelら<sup>8)</sup>、Breitschopfら<sup>9)</sup>の方法に基づき、42℃で一昼夜hybridizationを行い37℃で洗浄した。ジゴキシゲニンの検出は、抗ジゴキシゲニン単クローン性抗体を一次抗体として用い、二次抗体にアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgGを用い、さらにAPAAPを反応させ、NBT/BCIPにて発色した。

表 1

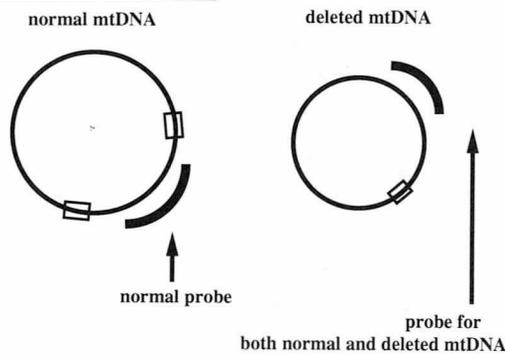
症例	診断	年齢	性別	RRF	mutation
1	KSS	14	M	2.5%	common deletion
2	KSS	26	F	11.5%	common deletion
3	KSS	15	F	1.5%	common deletion
4	MELAS	23	F	1%>	3243(-)
5	MELAS	62	F	7.5%	3243(+)
6	MERRF	12	F	10%	8344(+)
7	MERRF	11	F	1%>	8344(-)
8	MyD	52	F	0.65%	multiple
9	MG	72	F	0.68%	common deletion

\*順天堂大学医学部脳神経内科

\*\*国立精神・神経センター神経研究部微細構造研究部

\*\*\*名古屋大学医学部第二生化学

### A. Subtraction method



### B. Fused gene method

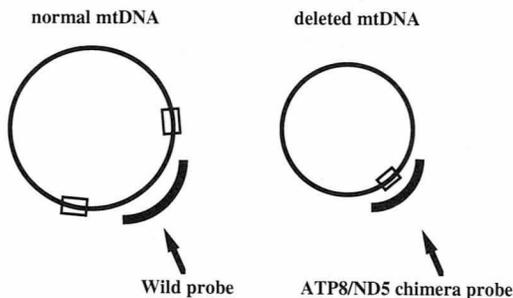


図1 プローブの設定位置

### 結果

PCR・サザンハイブリダイゼーション：高齢者剖検脳から抽出したDNAをテンプレートとして common deletion を挟むプライマー対 (L790とH1363) を用いて PCR を行うと、正常ミトコンドリア DNA 由来の 5.7 kbp の band (wild band) と common deletion を伴う変異ミトコンドリア DNA 由来の 770bp の band (mutant band) の 2 本を認めた (図 2, lane A). さらにこれを、サザンプロットで解析すると、ATP8/ND5 chimera probe を用いては mutant band のみにシグナルを認め (図 2, lane B), また、Wild probe を用いては、wild band のみにシグナルを認めた (図 2, lane C). 症例 8 の筋から抽出した DNA をテンプレートとして PCR を行うと、770bp の mutant band を含む 3 本のバンドを認めた。これらは、100bp ずらしたプライマー対 (L800 と H1363) でプライマーシフトを確認した。症例 9 の筋から抽出した DNA をテンプレートとして PCR を行い、770bp の mutant band を認めた (data not shown).

*In situ* hybridization：症例 1 (common deletion が判明している KSS) では、図 3-A で認められる 11 本の RRF (このうち 10 本が CCO negative fiber, 図 3-B) のうち 9 本に ATP8/ND5 chimera probe の集積を認めた (図 3-C). Wild probe では RRF とその他の fiber で差がなく、ほぼ均一に Wild probe のシグナルが認

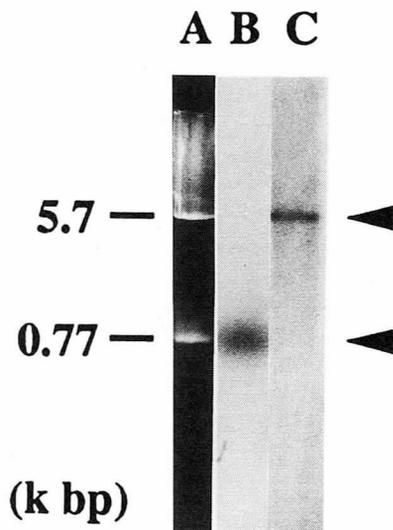


図 2 PCR 及びサザンプロット解析

レーン A : PCR

レーン B : ATP8/ND5 chimera probe を用いたサザンプロット

レーン C : Wild probe を用いたサザンプロット

められた (図 3-D).

症例 3 (common deletion をこえて ATP8/ND5 chimera probe の設定部位をも含む、7663bp の欠失が判明している KSS の症例) では、RRF に一致した ATP8/ND5 chimera probe の集積は認められず (図 3-G), Wild probe のシグナルもほぼ均一に分布していた (図 3-H).

症例 5 (MELAS) および症例 6 (MERRF) では、RRF には ATP8/ND5 chimera probe の集積は認められなかった (data not shown). 症例 8 (筋緊張性ジストロフィー症) では、ここに示す 2 本の SDH positive fiber (図 4-A) のうち 1 本は CCO negative fiber (図 4-B) で、ここに ATP8/ND5 chimera probe の集積を認めた (図 4-C). 症例 9 (高齢者 MG) では、切片上の SDH positive fiber (図 4-D) はすべて CCO negative fiber (図 4-E) で、そこに ATP8/ND5 chimera probe の集積を認めた (図 4-F).

### 考 察

我々の作成した ATP8/ND5 chimera probe 及び Wild probe は、サザンプロットにて特異性の高いオリゴヌクレオチドプローブであることを確認できた。また ISH でも、common deletion が判明している筋組織の RRF には、ATP8/ND5 chimera probe の集積を認めるものの、7663bp の欠失が判明している RRF や、MELAS・MERRF の RRF には ATP8/ND5 chimera probe の集積を認めないことより、ATP8/

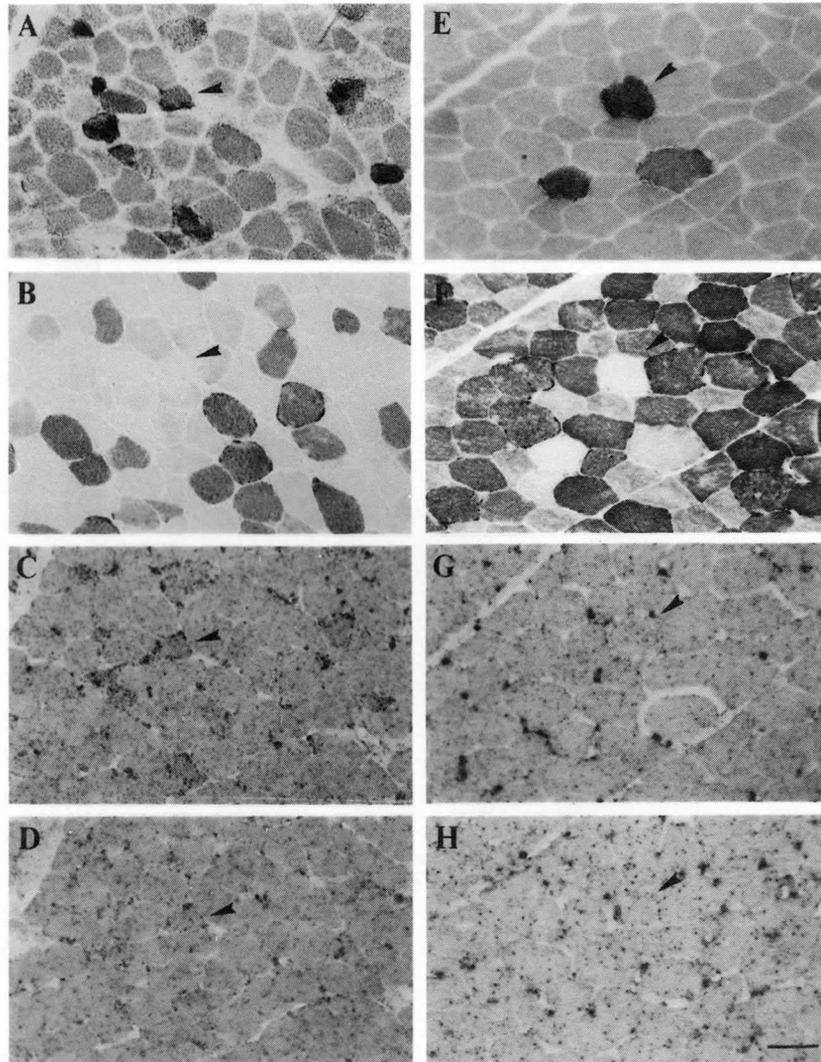


図3 症例1 (KSS, common deletion)及び症例3 (KSS, 7663bp deletion)の連続切片  
 (A) (E) : SDH 染色 (B) (F) : CCO 染色  
 (C) (G) : ATP8/ND5 chimera probe を用いた ISH  
 (D) (H) : Wild probe を用いた ISH Bar=50  $\mu$ m

ND5 chimera probeを用いたISHは, common deletionを伴う変異ミトコンドリアDNAを特異的に検出し得ると考えた。

MELASやMERRFでのRRFにおけるcommon deletionの関与する割合は低く, 少なくとも検出感度以下であると考えられた。

高齢者に認められるcommon deletionを伴う変異mtDNAを, 組織上で検出し得た報告はこれまでになく, 本法を用いることにより, common deletionを伴う変異mtDNAが, RRFに一致して集積していることを証明することができた。また, KSSでの報告<sup>6)</sup>と同様に筋緊張性ジストロフィー症でも, common deletionを伴う変異mtDNAが, SDH positive fiberの中でもCCO negative fiberに多く存在する傾向を

認めることができた。今後, それぞれの症例数を重ね, この傾向を確認していきたい。

また, この方法を用いることにより, 筋緊張性ジストロフィー症のようにmultiple deletionを有する疾患群において, 特定の欠失を伴う変異mtDNAを組織上で特異的に検出することが可能と考える。

## 文 献

- 1) Ikebe S, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Hattori K, Kondo T, Mizuno Y and Ozawa T: Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence. *Biochem Biophys Res Commun*

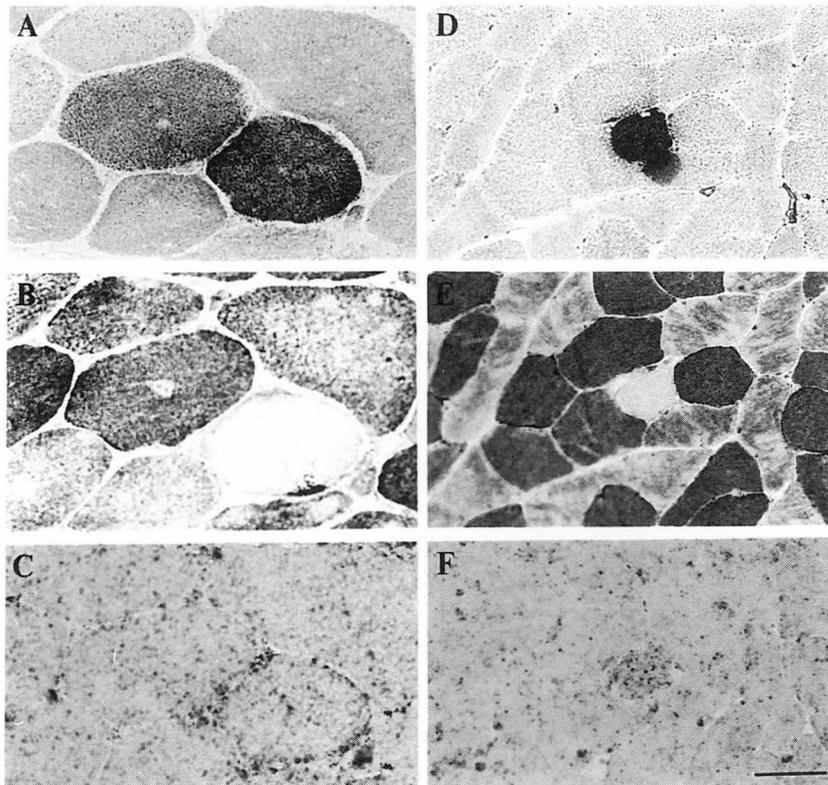


図4 症例8(筋緊張性ジストロフィー症)及び症例9(高齢者MG)の連続切片  
 (A) (D) : SDH 染色 (B) (E) : CCO 染色  
 (C) (F) : ATP8/ND5 chimera probeを用いた ISH Bar=50 $\mu$ m

170 : 1044-1048, 1990.

- 2) Hattori K, Tanaka M, Sugiyama S, Obayashi T, Ito T, Satake T, Hanaki Y, Asai J, Nagano M and Ozawa T : Age-dependent increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart : possible contributory factor to presbycardia. *Am Heart J* 1735-1742, 1991.
- 3) Ozawa T, Tanaka M, Sugiyama S, Hattori K, Ito T, Ohno K, Takahashi A, Sato W, Takada G, Mayumi B, Yamamoto K, Adachi K, Koga Y and Toshima H : Multiple mitochondrial DNA deletions exist in cardiomyocytes of patients with hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 170 : 830-836, 1990.
- 4) Sahashi K, Tanaka M, Tashiro M, Ohno K, Ibi T, Takahashi A and Ozawa T : Increased mitochondrial DNA deletions in the skeletal muscle of myotonic dystrophy [published erratum appears in *Gerontology* 1993 ; 39 (2) : 124]. *Gerontology* 38 : 18-29, 1992.

- 5) Zhang C, Baumer A, Maxwell RJ, Linnane AW and Nagley P : Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual. *Febs Lett* 297 : 34-38, 1992.
- 6) Mita S, Schmidt B, Schon EA, DiMauro S and Bonilla E : Detection of "deleted" mitochondrial genomes in cytochrome-c oxidase-deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 : 9509-9513, 1989.
- 7) Collins S, Rudduck C, Marzuki S, Dennett X and Byrne E : Mitochondrial genome distribution in histochemically cytochrome c oxidase-negative muscle fibres in patients with a mixture of deleted and wild type mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 1097 : 309-317, 1991.
- 8) Pinkel D, Straume T and Gray JW : Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 : 2934-2938, 1986.
- 9) Breitschopf H, Suchanek G, Gould RM, Colman DR and Lassmann H : In situ hy-

bridization with digoxigenin-labeled probes:  
sensitive and reliable detection method ap

plied to myelinating rat brain. *Acta Neuro-*  
*pathol Berl* 84 : 581-587, 1992.

## 50) ミトコンドリア遺伝子変異型と表現型

小澤 高 将\*

### はじめに

我々は、個人が生涯に獲得するミトコンドリア・DNA (mtDNA) の体細胞変異は遺伝された変異の蓄積よりも遙に速い速度で起き、これら変異の蓄積が加齢変化およびミトコンドリア病などの退行性疾患を起こす重要な因子であろうとした<sup>7)</sup>。本研究はこの主題にそって、ミトコンドリア病と考えられる患者について、生殖腺細胞由来の点変異の全解析を行い、さらに点変異によって誘起される体細胞変異である遺伝子欠失を包括的に定量し、患者の遺伝子型とその表現型である病態との相関を明確にしようとした。

本研究前半の骨子はストックホルム・ノーベル財団主催による「ミトコンドリア病」に関するノーベル・シンポジウムで招待講演し、出版した<sup>8)</sup>。

### 研究計画及び材料及び方法

i. 生殖腺細胞変異：剖検、生検心筋などの微量の標品中のmtDNAをPCRによって増幅し、我々の考案した直接塩基配列決定法<sup>11)</sup>を用いmtDNA全周塩基配列を決定した。

ii. 体細胞変異：PCR増幅したmtDNAでは失われる体細胞変異の情報、特に活性酸素ラジカルによって生成し、複製に際して誤読され体細胞変異の原因となる8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG)を直接マイクロHPLC/質量分析計を使って定量した<sup>4)</sup>。また、8-OH-dGの蓄積によって惹起されるmtDNAの欠失をH鎖およびL鎖の複製開始点(OrH, OrL)も含めてくまなく検出するため、180対のプライマーを合成してtotal detection system (TDシステム)を開発し標品のmtDNAの欠失を網羅的に検出した<sup>6)</sup>。

iii. 最近Chanceによって開発された光ダイオードを用いた近赤外二波長光度計で、健常者、高齢者、およびmtDNA変異が確認されているmt・ミオパチー患者の運動時における筋肉組織酸素濃度を非侵襲的に測定した<sup>10)</sup>。

iv. ヒト培養細胞系を高濃度酸素に暴露する酸素・ストレスを与えアポトーシスを惹起させ、この際のmtDNAの断片化を解析した<sup>13)</sup>。対照として同一の核遺伝子を保有するが、mtDNAを欠落させたp<sup>0</sup>細胞を用いた。

### 研究の成果

i. 日本人およびイギリス系オーストラリア人のミトコンドリア・心筋症患者のmtDNA全周塩基配列を決定した。そこにみられた塩基置換の集積には顕著なクラスターが認められ、変異がミトコンドリア・イブから順次系統的に分岐したことを示しており、患者は世界的な広がりを持った一つの遺伝子ファミリーを形成している<sup>8)</sup>。

ミトコンドリア病患者のmtDNA生殖腺細胞遺伝子型は、構造遺伝子上の点変異のみ存在するmit<sup>-</sup>型と蛋白合成系遺伝子の点変異のみを有するsyn<sup>-</sup>型、mit<sup>-</sup>変異とsyn<sup>-</sup>変異が共存するmit<sup>-</sup>+syn<sup>-</sup>型に大別できる。死亡患者についてその死亡年齢にもとづいてKaplan-Meier法によって累積生存率を計算した。メデアン生存率はmit<sup>-</sup>型患者が75歳であるのに対してmit<sup>-</sup>+syn<sup>-</sup>型患者は21歳と著明な差のあることが判明した(図1)。即ち、点変異の表現型に及ぼす影響は相乗的である<sup>9)</sup>。

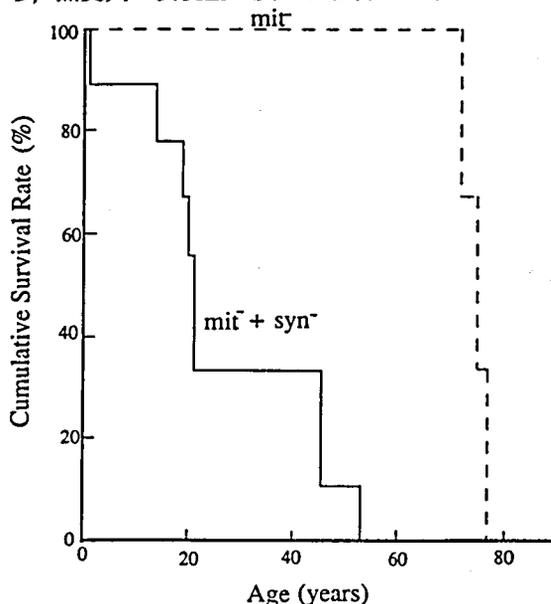
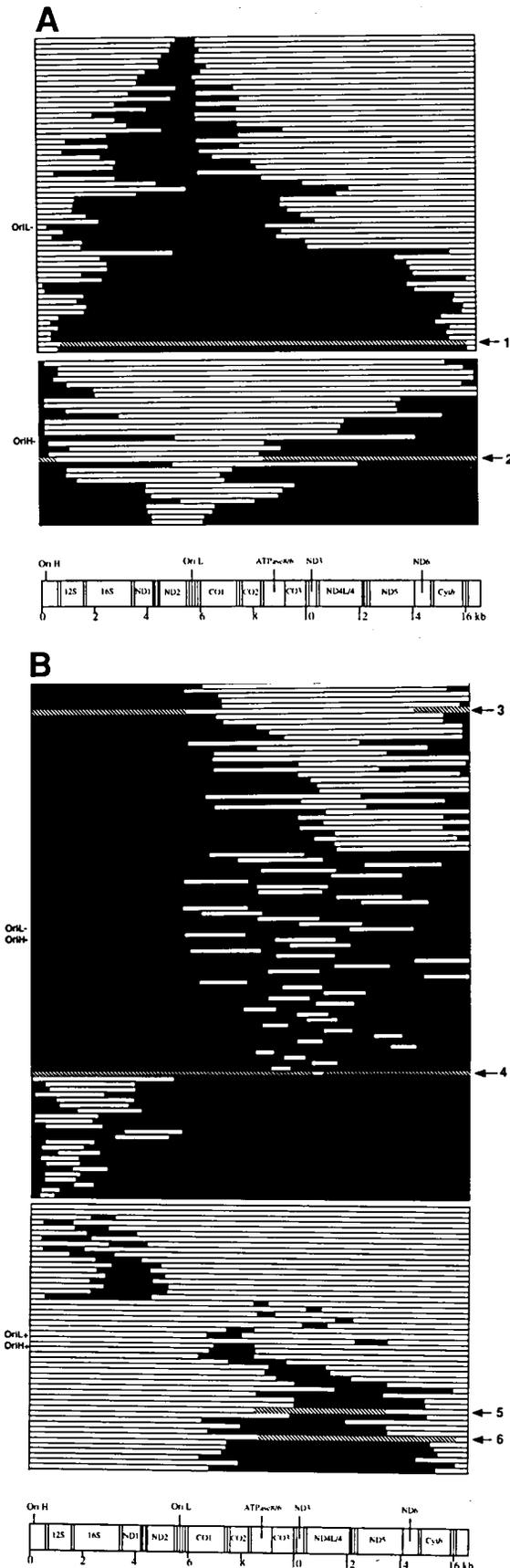


図1 mtDNA点変異型と患者生存率

ミトコンドリア病患者の点変異をmit<sup>-</sup>変異のみ存在するmit<sup>-</sup>型とsyn<sup>-</sup>変異のみを共有するsyn<sup>-</sup>型、mit<sup>-</sup>変異とsyn<sup>-</sup>変異が共存するmit<sup>-</sup>+syn<sup>-</sup>型に大別し、死亡患者についてその死亡年齢にもとづいてKaplan-Meier法によって累積生存率を計算した。メデアン生存時間は、mit<sup>-</sup>型患者が75歳であるのに対してmit<sup>-</sup>+syn<sup>-</sup>型患者は21歳と著明な差がある。点変異の表現型に及ぼす影響は相乗的である<sup>9)</sup>。

\*名古屋大学医学部生化学第二講座



ii. 65歳以上の高齢者で8-OH-dG量が急増し、これとよい相関( $r=0.93$ )を示して、欠失が増大した<sup>4)5)</sup>. mtDNA二本鎖中に8-OH-dG量が蓄積すると、その部分は相補鎖とミスマッチを起こし、二重鎖の一定範囲が解け持続的な一本鎖になった状態での疑似組み換え、ないし再配列が欠失を起こす機構として考えられる。

重篤な点変異を有し19歳ミトコンドリア心筋症のため死亡した患者心筋mtDNAをTDシステムによって検索した結果、実に235種類の欠失が検出され(図2), こうした欠失により野生型mtDNAの84%が断片化し崩壊していた<sup>6)</sup>. OrHおよびOrLを持つ欠失は全欠失の20%に過ぎず、残りの欠失は、複製開始点の一方か、両方を欠いたminicircleであった。また、同様に重篤な点変異を有し拡張型心筋症のためユタ大学で心臓移植を受けた7歳児の心筋mtDNAは212種類の欠失が証明された<sup>9)</sup>. 対象とした3歳児の心筋mtDNAでは欠失は5種類にとどまっていた。また97歳で死亡した女性の心筋mtDNAでは欠失は358種類、全mtDNAの88%に及んだ。こうしたmtDNAの顕著な断片化、崩壊はエネルギー産生の著しい低下、細胞死、個体の死をもたらすものと考えられた。

iii. 歩行時、正常者では運動に伴う組織呼吸の増大によって著明な組織酸素濃度の低下を示すが、重篤な点変異を持つミトコンドリア病患者や、mtDNA欠失が顕著な老人、ミトコンドリア病患者では逆に新鮮血流入により組織中のオキシ・ヘモグロビンは、遺伝子変異、欠失による断片化の程度に比例して利用されず著明な酸素化が証明された(図3)。組織酸素化の程度は正常者との比較において鏡像を示し最大で数オーダーの差をしめしていた<sup>10)</sup>.

iv. ヒト培養細胞系を2日間酸素・ストレスを与えると、通常大気に戻した後もアポトーシスが進行して、

図2 ミトコンドリア心筋症患者心筋mtDNAの断片化による崩壊

19歳でミトコンドリア心筋症のため死亡した患者心筋mtDNAをTDシステムによって全欠失を検出し、欠失部位を黒色で示した。アラビア数字で示した欠失のクロス・オーバー部位は直接塩基配列決定を行った。

A-上段: OrLを欠くminicircle, 59種類

A-下段: OrHを欠くminicircle, 31種類

B-上段: OrL, OrHを共に欠くminicircle, 97種類

B-下段: OrL, OrHを共に有する断片, 48種類  
患者の野生型mtDNAの84%が、上記の235種類の断片に崩壊していた<sup>6)</sup>.

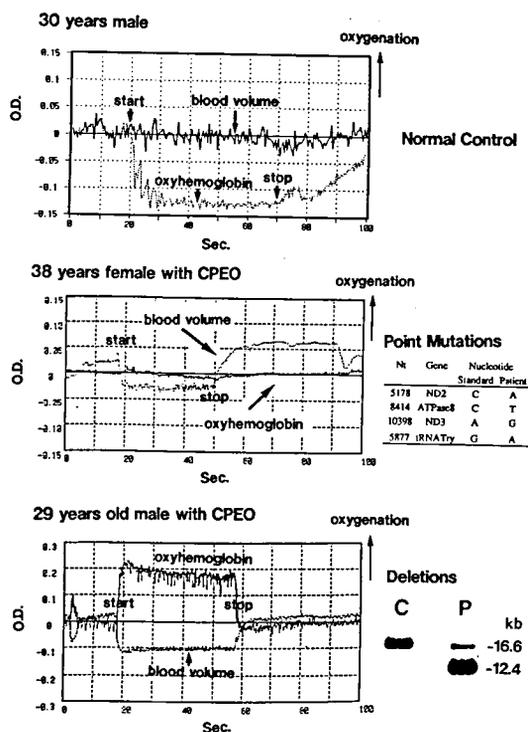


図3 進行性外眼筋麻痺症患者における運動時筋組織の著しい酸素化

光ダイオードを用いた近赤外二波長光度計を装着した、健常者、高齢者、および図示したようにmtDNA変異が確認されている進行性外眼筋麻痺症患者をエルゴ・メーター上で1 mile/hrで緩やかに歩行させた際の、筋肉組織中オキシ・ヘモグロビンおよび全血量の変動を非侵襲的に測定し記録した。

30歳の健常者では運動開始と共に、ミトコンドリアによる酸素消費のためのオキシ・ヘモグロビンのレベルは低下し、運動終了と共に元のレベルに復帰する。一方、3ヶのmitと1ヶのsynを保持する38歳の進行性外眼筋麻痺症患者では、オキシ・ヘモグロビンの低下はみられず、ミトコンドリアにおける酸素消費の障害が示された。80歳以上の高齢者ではこうしたパターンが一般的であった。

さらに野生型mtDNAの80%以上が欠失を持つことがサザンプロットにより示された29歳の進行性外眼筋麻痺症患者の場合、新鮮血と共に組織に流入したオキシ・ヘモグロビンはほとんど利用されず、健常者と鏡像を示し組織の著しい酸素化が証明された<sup>10)</sup>。

即ち、mtDNAの変異、断片化に比例したミトコンドリアにおける酸素利用の障害が非侵襲的に証明された。

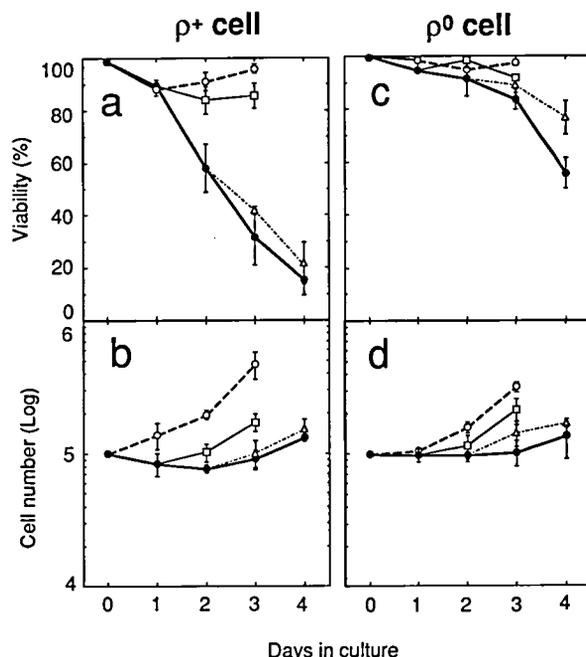


図4 ヒト培養系細胞の酸素ストレスによるアポトーシス

ヒト培養系, 701. 2. 8c, p+細胞と、対照として同一の核遺伝子を保有するが、mtDNAを欠落させたp<sup>0</sup>細胞を95%酸素に暴露する酸素ストレスを与えて、アポトーシスさせ、細胞生存率、細胞数を経日的に観察し、その際のmtDNAの断片化をTDシステムによって解析した。

●—●: 4日間連続してストレスを与えた細胞  
△…△: 2日間酸素ストレスを与えた後、大気圧に戻した細胞

□—□: 1日間酸素ストレスを与えた後、大気圧に戻した細胞

○…○: 4日間大気圧に保った対照細胞

酸素ストレス開始前に49種類であった欠失は、酸素ストレス3日目にして187種類に激増し、mtDNAの断片化の進行を示した。一方、p<sup>0</sup>細胞は酸素ストレスに対して生存率、細胞数を保っており、mtDNAの断片化がこのアポトーシスの原因であることを示した<sup>13)</sup>。

系の細胞は4~5日で死滅する(図4)。この時、mtDNAは酸素暴露3日目にして187種類の欠失によって著明に断裂していた。一方、mtDNAを欠落させたp<sup>0</sup>細胞は高濃度酸素暴露の影響を受けず、細胞数は保たれていた<sup>13)</sup>。即ち、mtDNAの断片化、崩壊がアポトーシスに必要なエネルギーである活性酸素の産生を促し酸素・ストレスによる細胞アポトーシスの原因であることが証明された。

## 考 察

ミトコンドリア病患者のメデアン生存時間は mtDNA 生殖腺細胞変異の遺伝子型の分類によって大きく変動する。mit<sup>-</sup>型患者が75歳であるのに対して mit<sup>-</sup>+syn<sup>-</sup>型患者は21歳と著明に差がある<sup>9)</sup>。このことは、生殖腺細胞変異が相乗的な効果を患者に表現することを示しており、mtDNA 全周塩基配列決定による遺伝子診断は、患者の平均余命を知り、その治療、心臓移植、遺伝子治療への適応などを知る上に極めて有用であると考えられる(図1)。

体細胞変異が主である欠失については、従来のミトコンドリア病報告の間で表現型である症状との間に不一致が奇異な点として指摘されていた<sup>3)</sup>。その原因は、OrH, OrLがmtDNAの複製のために必須であると言

われた<sup>2)</sup>ため、研究者がOrHおよびOrL領域を避けた部分についてのみ検索を行っていた<sup>12)</sup>ためである。我々がTDシステムによって、ミトコンドリア病患者を検索したところ、多量の欠失が見出された(図2)。即ち、従来の検索は全欠失の氷山の一角を検出していたのみであり、表現型との乖離は当然であったと言える。網羅的に全欠失を検索することによって、遺伝子型と表現型との奇異な不一致は解消されるものと考えられる。またこうした多種類の欠失、その結果としての多量の minicircle の蓄積は、mtDNA の断片化、細胞死をもたらすものである。こうした minicircle の蓄積は、従来説明されてきたヒト mtDNA 複製機構が再考を要することを示している。また DNA の著しい minicircle 化は生物種中 Trypanosoma で知られてい

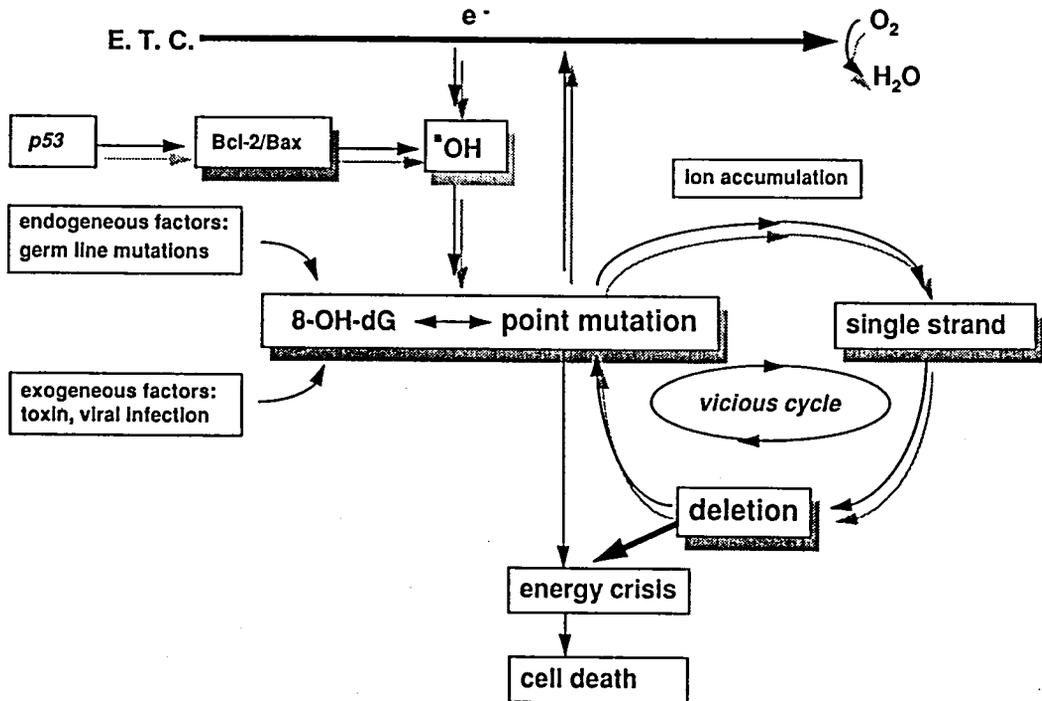


図5 mtDNA 変異, 断片化の模式図

末梢組織の生理的酸素濃度(50 μM)では、細胞内での主たる活性酸素源は、ミトコンドリア電子伝達系(E. T. C.)のチトクローム酸化酵素である。即ち、酸素を4電子還元してH<sub>2</sub>Oを生成する中、副産物として、1電子還元によるO<sub>2</sub><sup>-</sup>、2電子還元によるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が生成され、一定の割合で(1~3%)漏出し、Fenton反応によってハイドロキシ・ラジカル(•OH)となる。反応性に富む•OHはmtDNAのデオキシ・グアノシン(dG)との付加化合物8-OH-dGを生成する。8-OH-dGは複製に際して点変異を生ずるとともに、一定に蓄積すると二重鎖を解裂させ欠失に導く。こうした変異の蓄積によって電子伝達系からの活性酸素漏出が増大して更なる変異の蓄積という悪循環のためmtDNAは断片化、崩壊して細胞死に至る。

•OH, 8-OH-dGの生成を増大せしめる細胞内要因は、遺伝された生殖腺細胞変異であり、細胞外要因としては、各種の毒素、ウイルス感染が挙げられる。また、•OH産生はガン制御遺伝子p53によって個別に制御されるプロト・オンコジェン産物Bcl-2およびBaxによってそれぞれ抑制、促進され細胞のアポトーシスに関与する。

た<sup>1)</sup>だけであり、その生成、複製機構は現在の分子生物学では説明がつかず、将来の研究課題である。

ミトコンドリア病患者の運動時における筋肉組織中のオキシ・ヘモグロビンは、遺伝子変異、欠失による断片化の程度に比例して利用されず組織の著明な酸素化が証明された(図3)。このことは、体細胞変異の蓄積が細胞呼吸活性を低下させ、その結果、組織酸素化を促進し、これが要因となって更なる体細胞変異を促す悪循環が実際に人体組織において進行していることを示している<sup>8)</sup>。このことは、加齢やミトコンドリア病に伴って不可避免的に進行する脳神経、筋肉の萎縮に、組織酸素化による細胞死が重要となっていることを示している。

こうしたミトコンドリア病に伴う組織酸素濃度の変化が与える効果についてヒト培養細胞系を用いて再現したところ、酸素・ストレスによるアポトーシスに際してmtDNAが多量の欠失によって著明に断裂していることが判明した<sup>13)</sup>。一方、p<sup>0</sup>細胞は高濃度酸素暴露の影響を受けず、mtDNAの断片化が、活性酸素の産生を促しアポトーシスの原因であることが証明された(図4)。

研究の結果得られた事実を総合すると、毒物などの外部要因、点変異集積の内部要因によりエネルギー産生系の構築が障害され、活性酸素の産生を促し、8-OH-dGが増大してmtDNAの一部が一本鎖状態となることにより大小の欠失が体細胞変異として獲得され、その結果さらに、活性酸素の産生を促進し体細胞変異の新生を促進するという悪循環が、体細胞変異の指数級数的な増大として実測されたものといえる。こうした欠失と点変異の蓄積とが複合した変異mtDNA量の増大によって遺伝子の断片化、崩壊が進行した結果、細胞のエネルギー産生が需要の閾値を下まわると、機能障害として顕在化しミトコンドリア病あるいはアポトーシスとして発現し、高齢者の体細胞死、ひいては個体の死を規定しているものと考えられる(図5)。

## 文 献

- 1) Abeliovich H, Tzfaty Y and Shlomai J: A Trypanosomal CCHC-Type Zinc Finger Protein which Binds the conserved universal sequence of kinetoplast DNA minicircles: Isolation and analysis of the complete cDNA from crithidia fasciculata. *Mol Cell Biol* 13: 7766-7773, 1993.
- 2) Clayton DA: Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693-705, 1982.

- 3) Grivell LA: Mitochondrial DNA: Small, beautiful and essential. *Nature* 341: 569-571, 1989.
- 4) Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S and Ozawa T: Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 979-985, 1992.
- 5) Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, et al: Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Mol Cell Biochem* 119: 95-103, 1993.
- 6) Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, et al: Fragmentation of human heart mitochondrial DNA associated with premature aging. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 102-110, 1994.
- 7) Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T and Tanaka M: Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases. *Lancet* i: 642-645, 1989.
- 8) Ozawa T: Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271: 177-189, 1995.
- 9) Ozawa T, Katsumata K, Hayakawa M, et al: Mitochondrial DNA mutations and survival rate. *Lancet* 355, 189, 1995.
- 10) Ozawa T, Sahashi K, Nakase T and Chance B: Extensive tissue oxygenation associated with mitochondrial DNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 423-438, 1995.
- 11) Tanaka M and Ozawa T: Analysis of Mitochondrial DNA Mutations "Protocols in Molecular Neurobiology". (Longstaff & Revest ed). The human Press, Totawa, 1992.
- 12) Wallace DC: Disease of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 61: 1175-1212, 1992.
- 13) Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M, et al: Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 723-729, 1995.

# 51) ミトコンドリア損傷によるアポトーシス誘導のシグナル —ミトコンドリア脳筋症の負の遺伝子治療をめざして

太田 成男\*

研究協力者 麻生 定光\*

## 目 的

ミトコンドリア脳筋症は遺伝的変異を持ったミトコンドリア DNA (mtDNA) によって引き起こされる疾患で、その遺伝子診断は部分的に可能となったにもかかわらずその根本的治療法は確立されていない。現在遺伝子治療法が様々な疾患で実験的に模索されているが、その根底となっている考え (正常な遺伝子の導入とその発現) をミトコンドリア脳筋症に適用することはできない。mtDNA は一細胞に数十から数千存在し、ミトコンドリア遺伝子病では正常 mtDNA と変異 mtDNA がひとつの細胞に混在している (ヘテロプラズミー) のが通常である。正常 mtDNA を選択的に増殖させることができれば、正常 mtDNA を導入する必要はない。ミトコンドリア遺伝病の治療法として正常 mtDNA の導入ではなく変異 mtDNA の除去が有効であると考えている。変異 mtDNA は特定の細胞に蓄積する傾向があり、変異 mtDNA を蓄積した細胞を取り除いたあと正常細胞による機能的補償も期待できる。細胞を除去するには炎症を引き起こさないアポトーシスによる細胞死が適している。変異 mtDNA が蓄積した細胞に選択的にアポトーシスを誘導する方法を検索した。

## 材料と方法

### 用いた細胞

細胞 EB8 および EB3 は HeLa 細胞由来で mtDNA を完全に欠失している<sup>1)</sup>。EB8 に CPEO 患者由来の部分欠失 (約 5kb) した mtDNA (欠失 mtDNA) 導入して得たサイブリッド CP8 細胞ではひとつの細胞の中に正常 mtDNA と欠失 mtDNA が共存している<sup>2)</sup>。サイブリッド CM1-1-4-5 は心筋症患者からミトコンドリア tRNA-Ile 遺伝子に点変異がある変異 mtDNA を EB8 に導入して得られた<sup>3)</sup>。対象として EB8 に正常胎児由来のミトコンドリアを導入したサイブリッド Ft2-11 を用いた。

### 抗 Fas 抗体に対する感受性

$5 \times 10^4$  の細胞を 35-mm ディッシュに植えついで、抗 Fas 抗体<sup>4)</sup> を加えて 24 時間保温した。トリプシンを用いて細胞を回収し、トリパンブルー排除法で生細胞数を測定した。抗体未処理のものを 100% として感受性 (生存率) を計算した。

### 断片化された DNA の検出

抗 Fas 抗体 (20ng/ml) で EB8 細胞を 2, 4, 6, 8, 10, 12 時間処理した。細胞をトリトン X-100 で溶解し、正常な核を遠心で除いた。遠心上清にある断片化された DNA をエタノール沈殿で回収し、アガロース電気泳動で解析した。

### 細胞核の染色

細胞を抗体 (20ng/ml) で 5 時間処理した後カバーグラス上にアルコール固定した。TUNEL 法により断片化されたクロマチンを特異的に染色した。後染色としてヘマトキシリンを用いた。

### mRNA の調製と RT-PCR 法

増殖期の細胞をグアニジンチオシアネートで溶解し oligo (dT) セルロースカラムを用いて mRNA を精製した。oligo (dT) をプライマーにして逆転写酵素を用いて mRNA から cDNA を合成した。Fas 抗原の mRNA 量を検討するために Fas 遺伝子の cDNA<sup>5)</sup> に特異的な一組のプライマーと [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP の存在下 PCR によって Fas の cDNA を増幅した (8~15 サイクル)。個々の PCR 反応を定量的に比較するために、PCR 反応途中で解糖系酵素グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子に特異的なプライマーを加えて GAPDH の cDNA を増幅した (15 サイクル)。ポリアクリルアミド電気泳動で PCR 産物を分画した後、Fas の PCR 産物の放射能を GAPDH の PCR 産物の放射能で規格化し、対象のそれを 1 にして Fas 遺伝子発現量の増加 (倍率) を計算した。

### CP8 サブクローンの欠失 mtDNA の定量

細胞から SDS とプロテイナーゼ K を用いて全 DNA を調製した。制限酵素 Pvu II で切断後、アガロース電気泳動で正常 mtDNA (16kb) と欠失 mtDNA (11kb) を分けた。メンブレンにプロットしたのち、これらの

\*日本医科大学老人病研究所生化学部門

mtDNAを<sup>32</sup>Pで標識されたmtDNA特異的なプローブを用いて検出した。正常mtDNAと欠失mtDNAのそれぞれの放射能の和を100%として、欠失mtDNAの相対的含有量を求めた。

### 結果と考察

**変異mtDNAを持つ細胞の抗Fas抗体に対する感受性**  
 mtDNAを持たない細胞EB8は、1, 10ng/mlの抗体に対しそれぞれ70, 35%の生存率を示し、感受性であるに対し対象の細胞Ft2-11では耐性であった(図1)。20ng/mlの抗体に対する他の細胞の感受性を調べた(図2)。mtDNAを持たない細胞EB8, EB3は10%から20%の生存率で、変異mtDNAを持つ細胞CM 1-1-4-5, CP8-4(CP8のサブクローンのひとつ)でも30%の生存率であった。Fas抗原と同じレセプターファミリーに属するTNFレセプターのリガンドTNF $\alpha$  (660 U/ml)に対する感受性にはEB8, Ft2-11は差を示さなかった。抗Fas抗体がFasリガンドとしてFas抗原と結合し、選択的に遺伝的に異常なミトコンドリアを持つ細胞を死に至らすことがわかった。

#### 抗Fas抗体による細胞死の特徴

EB8のFas抗原を介した細胞死がアポトーシスであるか否かを検討した。抗体処理6時間で著しく断片化されたDNAが検出され、ヌクレオソーム単位からなる梯子状の切断パターンが認められた(図3)。抗体処理5時間の核では凝縮したクロマチンが観察され、細胞体積の減少および空胞の発達がみられた。同じように抗体処理したFt2-11ではこれらのことは認められなかつ

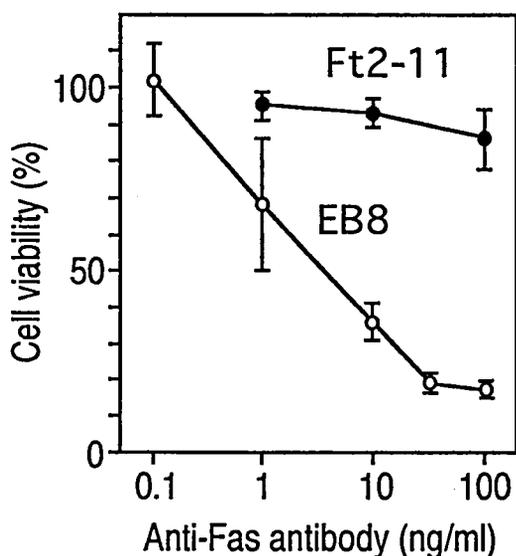


図1 抗Fas抗体に対する細胞の感受性。

mtDNAを持たない細胞EB8(○)は正常mtDNAを持つ細胞Ft2-11(●)に比べ抗Fas抗体に対して感受性であった。

た。以上の結果から、抗Fas抗体によるEB8の細胞死はアポトーシスであると結論された。

#### Fas遺伝子発現の増加

抗Fas抗体による細胞死の原因を明らかにするために、poly(A)<sup>+</sup>RNAを細胞から調製し、RT-PCR法でFas遺伝子の相対的転写量を検討した。FasのcDNAに由来するPCR産物量をGAPDH cDNAのそれで規格化したところ、対象のFt2-11に比べてEB8(mtDNAの完全欠損)で50倍、CM1-1-4-5(点変異を持つmtDNA)で3倍、Fas遺伝子の転写量が増加していることがわかった(図4)。部分欠損がある欠失mtDNAを持つCP8も以下に述べるようにFas mRNAの量を高めていた。これらのことから、異常なミトコンドリアを持つ細胞ではFas遺伝子の発現が誘導されており、これが原因の一つとなって抗Fas抗体によって細胞死に至ることが示唆された。

欠失mtDNAを持つ細胞でのFas遺伝子の発現量、抗Fas抗体感受性および呼吸鎖酵素活性の相関関係  
 CPEO患者由来の細胞からEB8にミトコンドリアを導入して得たCP8では、正常mtDNAと欠失mtDNAが種々の割合で共存している(ヘテロプラズミー)。CP8から5個の細胞をサブクローン化して、これらの細胞が持つ欠失mtDNAの割合を調べた。さらに、これらサブクローンの抗Fas抗体に対する感受性とRT-PCR法でFas遺伝子の転写量を調べ、その結果を図5に示した。5個のサブクローンでFas mRNAの発現量が

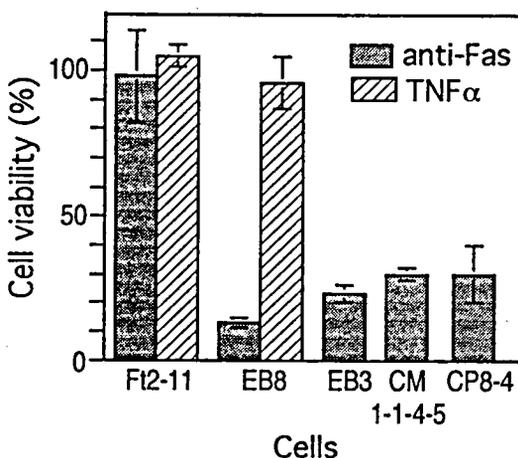


図2 各種変異mtDNAを持つ細胞の抗Fas抗体およびTNF $\alpha$ に対する感受性。

mtDNAを持たない二つの異なる細胞(EB8とEB3)、点変異があるmtDNAを持つ細胞(CM1-1-4-5)、部分欠失しているmtDNAを持つ細胞(CP8-4)いずれも抗Fas抗体(20ng/ml)に感受性であった。TNF $\alpha$ (660U/ml, 24時間処理)に対してはEB8とFt2-11に感受性の差は認められなかった。

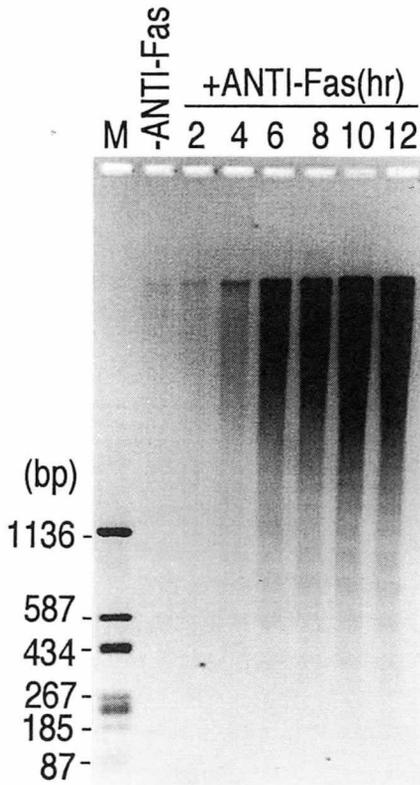


図3 断片化されたDNAの検出。  
mtDNAを持たない細胞EB8を抗Fas抗体(20ng/ml)で2~12時間処理し断片化されたDNAを調製してアガロース電気泳動によって分析した。抗体処理6時間でDNA断片化がはっきりと認められた。

-ANTI-Fas: 抗体未処理の細胞  
M: 分子量マーカー

2.4倍から4.5倍増加していた。しかしながら、抗体に対する感受性はFas mRNAの発現量の増加に比例していないことがわかった。欠失mtDNAを一番多く持つ細胞はFas mRNAの発現量の増加が一番低いにもかかわらず、抗体に対する感受性は一番高かった。欠失mtDNAを62%以上の割合で持つ細胞では、ミトコンドリアの蛋白合成活性とシトクロムcオキシダーゼ活性が著しく低下している<sup>2)</sup>。Fas抗原の発現量が増加している細胞のFasリガンドに対する感受性の強さは、その細胞が持つ呼吸鎖酵素活性に依存していることが考えられる。

### 結 論

遺伝的に異常なミトコンドリアを持つ細胞ではFas遺伝子の発現が高まっていた。また、Fas遺伝子発現の増加がわずかであってもミトコンドリアの機能が十分低いと細胞はFasリガンドによってアポトーシスが

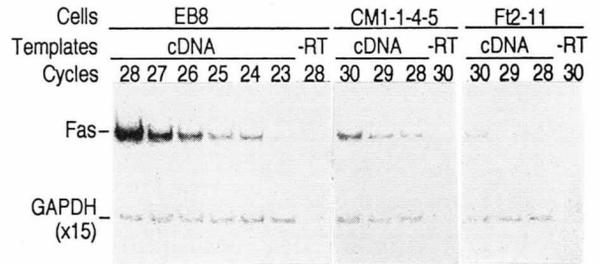


図4 RT-PCR法によるFas mRNAの発現量の解析。  
各種細胞から調製されたmRNAからoligo(dT)をプライマーにして逆転写酵素でcDNAを合成した。Fas cDNAに特異的なプライマーを用いて、その一部の領域をPCRによって増幅した。反応のサイクル数を各レーンの上部に示した。最後の15サイクルはGAPDHのcDNAに特異的なプライマーを加えて行われた。PCRは $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP存在下で行った。mtDNAを持たないEB8、点変異mtDNAを持つCM1-1-4-5では正常mtDNAをもつFt2-11に比べFasの発現量が50倍、3倍にそれぞれ増加していた。染色体DNAのmRNA試料への混入を検討するために、-RTのレーンでは逆転写酵素を除いてcDNA合成反応させた試料で行ったPCR産物を解析した。

Fas PCR産物: 346bp  
GAPDH PCR産物: 214bp

誘導されやすかった。以上のように、変異mtDNAを持つ細胞をFas抗原を介したアポトーシスによって生体から除去することは可能である。

### 文 献

- 1) Hayashi JI, Yonekawa H, Watanabe S, et al: Somatic cell genetical approaches to mitochondrial diseases in "Progress in Neuropathology" (eds Sato T & DiMauro S) Raven Press, New York, 1990, Vol. 7, pp93-102.
- 2) Hayashi JI, Ohta S, Kikuchi A, et al: Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. Proc Natl Acad Sci USA 88: 10614-10618, 1991.
- 3) Hayashi JI, Ohta S, Kagawa Y, et al: Functional and Morphological Abnormalities of mitochondria in human cells containing mitochondrial DNA with pathogenic point mutations in tRNA genes. J Biol Chem 269:

19060-19066.

4) Yonehara S, Ishii A and Yonehara M: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169: 1747-1756, 1989.

5) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66: 233-243, 1991.

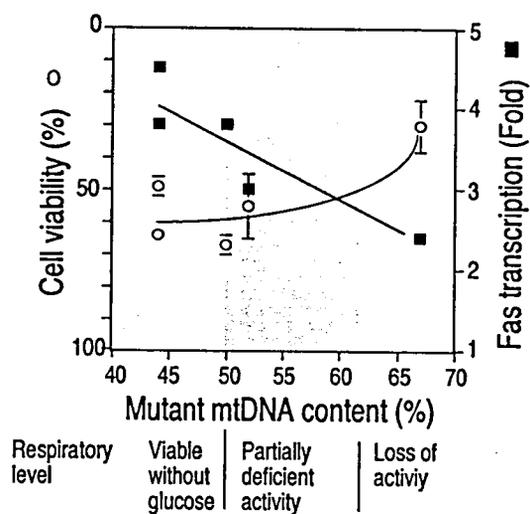


図5 部分欠失している変異mtDNAの相対含量と抗Fas抗体感受性とFas mRNA発現量の相関関係。細胞CP8には部分欠失が起きている変異mtDNA(欠失mtDNA)と正常なmtDNAとが共存している。CP8から5個の細胞をサブクローニングした。それぞれの細胞について、細胞のもつ全mtDNAに対する欠失mtDNAの相対含量(横軸)、抗Fas抗体に対する感受性(○)、RT-PCR法によって検討されたFas mRNA発現量の増加(■)を示した。欠失mtDNAの相対含量50%まではグルコース非存在下でも細胞は生育し、相対含量約60%を境にしてミトコンドリアの蛋白合成活性とシトクロムcオキシダーゼ活性が著しく減少する<sup>2)</sup>。

## X. 治 療

## 52) プレドニゾンによる mdx マウスの実験的治療

高木 昭夫\*

研究協力者 渡辺 知司\*

### はじめに

Duchenne型筋ジストロフィーの副腎皮質ステロイド投与による治療では筋力、肺活量などの点で改善を認めたとする報告が散見される<sup>1)~4)</sup>。一方、mdx マウスについてはWellerらによって行われた実験があるが、血清CK、筋病理所見についての改善は認められていない<sup>5)</sup>。しかし、彼等の実験では体重1 kgあたり1 mgと通常量のプレドニゾンが投与されており、大量の副腎皮質ステロイドを投与した際の変化については不明である。今回我々はmdx マウスに対しプレドニゾンの大量投与を行い、筋壊死の進行を抑制するか否かを検討した。

### 対象・方法

対象として4~5週齢のmdx マウスを用いた。内訳は、プレドニゾン投与群13匹、対照群16匹とした。プレドニゾン(PSL)投与群には、PSL 30mg/kg(生食0.1mlに溶解)対照群には生食0.1mlを週6回4週間、背部に皮下注射した。注射終了後、体重測定しpentobarbitalによる深麻酔下で、心臓または腹部大動脈より採血した。血清CK活性をSSCC準拠法により測定した。大腿四頭筋(QF)と前脛骨(TA)より凍結標本を作成しHE染色を行った。横断面において500~1,000本の筋線維中の壊死線維数、周辺核線維数を計測した。壊死線維数の一部は、壊死面積から推定した。標本1平方ミリあたりの浸潤細胞集団の個数を計測した。D90抗体を用いBiotin-Streptavidin法によりdystrophin染色を施行した。体重、血清CK値、壊死線維数および周辺核線維数の比率(%), 炎症細胞群集の個数についてt検定法にて有意差を検定した。

### 結 果

体重は、両群間で有意差を認めなかった(表1)。血清CK値は、個体差によるばらつきが大きかった。平均値ではPSL投与群がむしろ高値を示したが、有意差は認めなかった(表2)。組織学的には、両群ともに壊死・再生線維、炎症性細胞浸潤の所見を認めた(図1)。

線維化や脂肪変性は認めなかった。壊死線維数、周辺核線維数の比率は両群で有意差を認めなかった(表3-1, 2)。単位面積あたりの浸潤細胞群集の個数は、PSL投与群のTAにおいて減少していた(表3-3)。dystrophin染色では、PSL投与群の一部においてdystrophin陽性細胞の小群集が認められた(図2-A, B)。

### 考 案

DMD骨格筋に対するPSL治療の効果については2つの機序が考えられている。すなわち免疫系の抑制と筋再生の促進である<sup>6)</sup>。KisselらはDMD生検筋を用

表1 体重(g, 平均 ± SD)

PSL	19.6 ± 3.3
対 照	19.5 ± 2.9
t	0.79 (p>0.1)

表2 血清CK値(IU/L, 平均 ± SD)

PSL	20400 ± 18100
対 照	18000 ± 12300
t	0.39 (p>0.5)

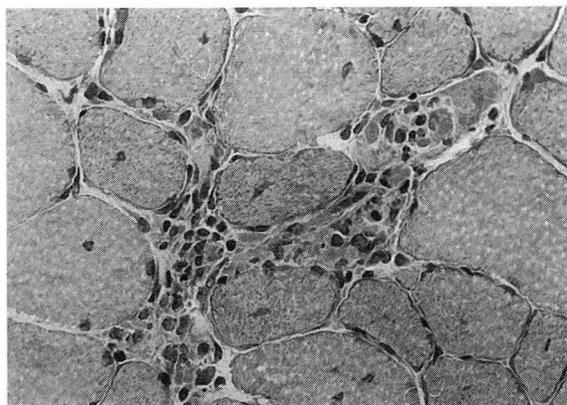


図1 PSL投与群の大腿四頭筋のHE染色標本。細胞浸潤をともなう壊死線維、中心核を有する再生線維を認める。

\* 虎の門病院神経内科

表 3-1 壊死線維数(% , 平均 ± SD)  
 3-2 周辺核線維数(% , 平均 ± SD)  
 3-3 浸潤細胞群集集(個/平方ミリ, 平均 ± SD)

	QF	TA
PSL	4.4±4.7	4.1±5.0
対 照	7.3±8.2	4.1±4.5
t	1.03 (p>0.1)	0.02 (p>0.5)
(QF;大腿四頭筋, TA;前脛骨筋)		

	QF	TA
PSL	7.9±4.0	12.4±9.4
対 照	8.5±3.1	10.8±4.0
t	0.23 (p>0.5)	0.58 (p>0.5)

	QF	TA
PSL	1.3±0.2	0.1±0.0
対 照	1.1±0.1	0.6±0.1
t	0.14 (p>0.5)	2.25 (p<0.05)

い浸潤リンパ球の解析を行っている。その結果、総細胞数、CD8陽性細胞の減少を認めたと報告した。しかし、壊死細胞の減少は認められなかった<sup>7)</sup>。我々の実験では、PSL投与群のTAにおいて浸潤細胞集団の個数が減少していた。このことはPSL投与がmdxマウスの免疫系を抑制した可能性を示唆した。しかし、壊死線維数、周辺核線維数については対照群と有意差は認められなかった。すなわち免疫系の抑制を通じて筋壊死の進行が抑制される証拠は得られなかったといえる(周辺核筋線維は壊死・再生の過程を経ていない正常筋線維と考えている)。

筋再生の促進については正常筋とdystrophy筋で同じ作用を示すか否かは議論がある。mdxマウス筋においてヒトdystrophy筋と同様の作用があるかどうかは知られていない。in vitroのヒト正常筋においてはステロイドが筋新生の過程で筋管細胞の壊死を抑制したという報告がある。その結果、新生筋が増加しdystrophin発現量も増加したと述べられている<sup>8)</sup>。一方、dystrophy筋では筋新生が抑制されたという報告がある。これは筋芽細胞の融合を阻害した結果であると説明されている<sup>9)</sup>。しかし、dystrophin発現に関しては筋芽細胞の融合とは無関係に増加させたという報告もある<sup>10)</sup>。BurrowらはDMD生検筋において、western blotting法によってdystrophinの定量を行った。PSL投与によるdystrophin発現量の増加ハ

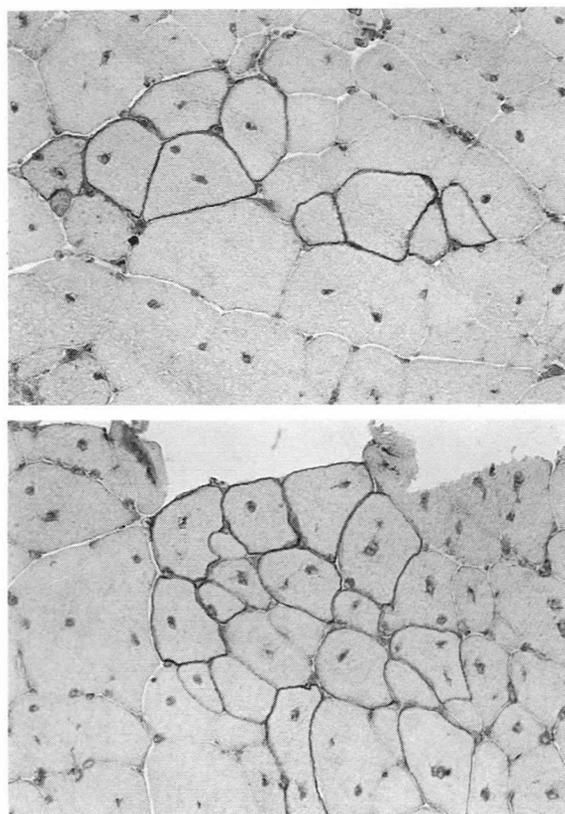


図 2-A, B PSL投与群の大腿四頭筋のdystrophin染色標本。dystrophin陽性線維の小群集を認める。

認められなかった。しかし、組織化学的検査ではdystrophin陽性線維の増加が認められたと報告している<sup>11)</sup>。我々の実験でも、PSL投与群の一部においてdystrophin陽性線維の小群集が認められた。これがPSL投与の効果かどうかはさらに検討が必要だが、興味深い所見と考えられた。

### 結 論

1. 血清CK値、壊死線維および周辺核線維数の比率についてPSL投与群と対照群の間に有意差は認められなかった。
2. 少なくともmdxマウスにおいては、副腎皮質ステロイドの大量投与によっても筋壊死は抑制されなかった。

### 文 献

- 1) De Silva S, Drachman DB, Mellitis D, et al: Prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. Long term benefit. Arch Neurol 44: 818-822, 1987.
- 2) Griggs RC, Moxley RT, Mendel JR, et al:

- Prednisone in Duchenne dystrophy. A randomized, controlled trial defining the time course and dose response. *Arch Neurol* 48 : 383-388, 1991.
- 3) Kawai H, Adachi K, Nishida Y, et al : Decreased in urinary excretion of 3-methylhistidine by patients with Duchenne muscular dystrophy during glucocorticoid treatment. *J Neurol* 240 : 181-186, 1993.
  - 4) Angelini C, Pegoraro E, Turella E, et al : Deflazacort in Duchenne dystrophy : Study of long-term effect. *Muscle Nerve* 17 : 386-391, 1994.
  - 5) Weller B, Massa R, Karpati G, et al : Glucocorticoids and immunosuppressants do not change the prevalence of necrosis and regeneration in mdx skeletal muscles. *Muscle Nerve* 14 : 771-774, 1991.
  - 6) Brown Jr RH : Prednisone therapy for Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 320 : 1621-1623, 1989.
  - 7) Kissel JT, Burrow KL, Rammohan KW, et al : Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone-treated and untreated Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 41 : 667-672, 1991.
  - 8) Sklar RM and Brown Jr RH : Methylprednisolone increase dystrophin levels by inhibiting myotube death during myogenesis of normal human muscle in vitro. *J Neurol Sci* 101 : 73-81, 1991.
  - 9) Hardiman O, Brown Jr RH, Beggs AH, et al : Differential glucocorticoid effects on the fusion of Duchenne/Becker and control muscle cultures : Pharmacologic detection of accelerated aging in dystrophic muscle. *Neurology* 42 : 1085-1091, 1992.
  - 10) Hardiman O and Brown Jr RH : Methylprednisolone selectively affects dystrophin expression in human muscle cultures. *Neurology* 43 : 342-345, 1993.
  - 11) Burrow KL, Coovert BS, Bulman DE, et al : Dystrophin expression and somatic reversion in prednisone-treated and untreated Duchenne dystrophy. *Neurology* 41 : 661-666, 1991.

# 53) ジストロフィン欠損症 heterozygote の筋病理学的研究

田邊 等\*

研究協力者 松原四郎\*\* 磯崎英治\*\* 宮本和人\*\*

## 背景と目的

Duchenne型筋ジストロフィーの病態解明が進み、欠損した dystrophin の補充が試みられている。しかし得られた“部分的に dystrophin が存在する状態”を治療に結びつけるためには、有用な dystrophin の存在様式を確かめる必要がある。これを検討するモデルの1つとして、ヒトおよび *mdx* マウス heterozygote の筋病理学的な解析を行った。特に、ヒトと *mdx* マウスの heterozygote の間にみられる症状および病理学的な差には重要な意味が含まれている可能性があり、この点に注目して調べる必要があると考えられる。

Dystrophin の存在様式を考える上で、特に注目されるのは微細なレベルでの dystrophin の構造であるが、この点、近年の共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による知見は特に重要な情報をもたらした。heterozygote の解析にあっても不可欠なアプローチと思われる。今回はなかでも、dystrophin 存在部と欠損部の移行状態、および欠損部に増加する dystrophin related protein (DRP, utrophin) の構造に注目して観察した。

## 対象と方法

Duchenne型筋ジストロフィーの definite carrier 2例の生検筋を用いた。抗 dystrophin, spectrin および dystrophin related protein (DRP) 抗体を使用し、主に FITC を用いた蛍光抗体法で CLSM (カルツアイス LSM10) により観察した。対物レンズとして 63 倍油浸レンズを用い、スリット幅 20, コントラストと輝度は固定した。通常はズーム率 160 倍、8 秒の低速スキャンで 16 回の linear averaging を行った。別に抗 dystrophin 抗体をビオチンで標識し、筋に作用させた後 FITC 標識 streptavidin を作用させる直接法でも観察した。

一方、雄 *mdx* マウスと雌 B10 マウスの交配で得られた F1 雌の腓腹筋を切除し、直接法で dystrophin を FITC 標識 streptavidin と ABC 法で可視化した。

## 結果

正常筋 dystrophin の CLSM 像では、横断面では陽性部分は筋線維周辺に見られ、一部周期的に濃淡に差のあるほぼ連続した線として観察された (図 1A)。縦断面でも類似の所見であった。筋膜を筋線維長軸に近い斜め、すなわち接線方向に横断するいわゆる un face 像では、抗 dystrophin 抗体と反応するリボン様の構造が 0.37 から 0.44  $\mu\text{m}$  のほぼ一定の間隔で、筋線維長軸と直角の方向に配列するのが見られた (図 1B)。さらにこのリボン様構造は、85 ないし 170 (平均 127) nm の間隔で平行に配列する幅 85 から 255 nm の紡錘状構造の列から構成されていた (図 1C)。

通常の蛍光顕微鏡で観察すると、Duchenne carrier では、症例 1, 2 のいずれでも dystrophin の蛍光強度は多くの筋線維で欠損しているか、あるいは微弱で不規則であった (図 2A)。dystrophin が欠損した線維の大部分で spectrin は保たれていた。

CLSM 像 (図 2B) でも dystrophin の分布は弱く不規則であった。正常筋と似た周期性を示す濃淡の繰り返しがみとめられ線維が存在する一方、dystrophin が認められない線維が多数観察された。

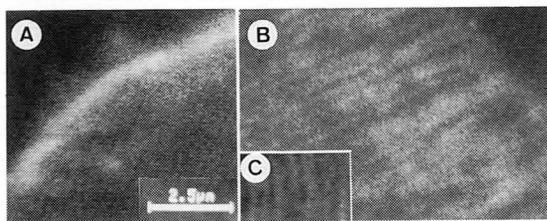


図 1A Confocal laser scan micrograph (CLSM) of dystrophin positive structure in a transverse section of normal muscle. Alteration in brightness of positive structure was noticed along the periphery of the fibre.

B In an en face view, numerous parallel lines were seen running perpendicular to the long axis of the muscle fibre.

C Each line consisted of rod-shaped structures. The long axes of the rods ran perpendicular to the line.

\*東京都立神経病院

\*\*東京都立神経病院神経内科

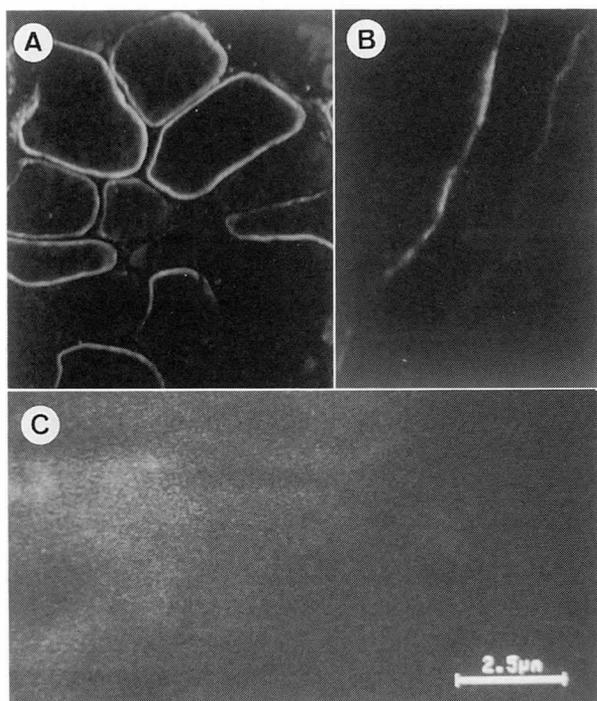


図2A Dystrophin of skeletal muscle of a female carrier of DMD (case 1).

B CLSM of dystrophin in a transverse section of the carrier muscle.

C An en face view of dystrophin in the carrier muscle at an area between dystrophin-positive and negative regions.

Carrierのen face像では、dystrophinがよく発現した筋線維では正常と同じ所見が得られた。しかしdystrophin陽性と陰性部位の移行部におけるen face像ではほぼ一定の間隔で配列する構造が不規則に中断され、中断部位の近くには構造のはっきりしない陽性部分が認められた(図2C)。

Carrierでは、DRPの発現が一部の線維に認められた(図3A)。DRPのCLSMでは横断面で淡いながらdystrophinに似た濃淡の繰り返されたプロフィールが見られた(図3B)。しかし、少数のみ観察できたen face像ではdystrophinで観察されたような微細な配列は確認できなかった(図3C)。

Mdxのheterozygoteでは、dystrophinの筋表面での発現は比較的保たれており、筋線維横断面全周にわたる欠損は比較的少数しか観察されなかった。

### 考 察

CLSMでdystrophinの形態についてはMasudaら<sup>1)</sup>、Minettiら<sup>2)</sup>、Ponsら<sup>3)</sup>の詳細な報告がある。従来正常筋でdystrophinが周期的に濃淡を示し、一部破線

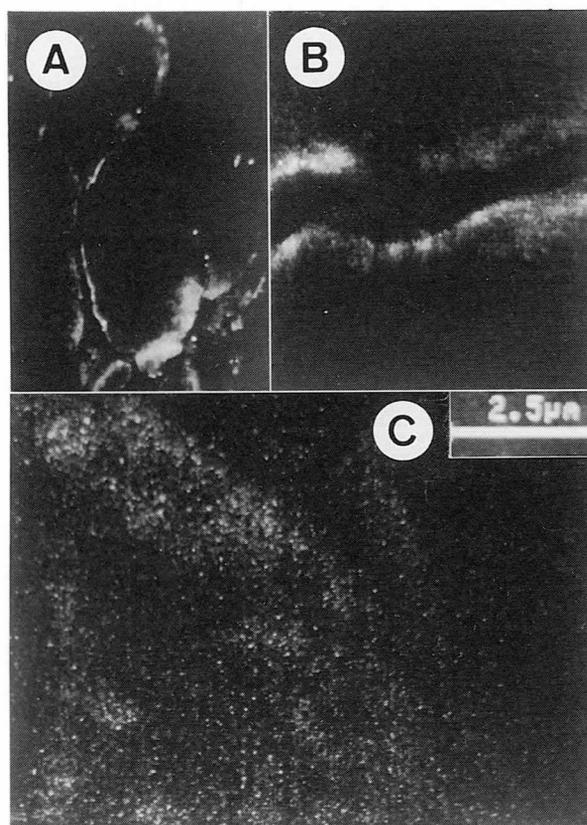


図3A Dystrophin related protein (DRP) in a transverse section of female DMD carrier muscle.

B CLSM of DRP in a transverse section.

C An en face view of DRP in a carrier muscle.

状にみえることが指摘されたが、今回長時間スキャンを多数回平均加算すると、これが一部周期的な濃淡を伴ったほぼ連続した構造として観察された。このような観察条件の差や、ヒトと動物の差が影響している可能性も考えられる。さらにen face像では、すでに従来報告されている周期性をもって並ぶりボン状の構造が観察され、従来との報告と共通する点であった。しかし、今回の観察ではリボンの配列の周期は約400nmと従来の所見より短めで、また紡錘状構造の長さおよび隣接する紡錘間の距離は100から170nmであった。この数値は従来CLSMで観察された間隔周期よりむしろ電顕免疫組織化学的にWatkinsら<sup>4)</sup>の観察した配列周期である約125nmに近いものと考えられる。

Duchenne carrierでは、dystrophinの量的な減少と不規則性があると思われた。DRPに関しては横断面でPonsらが記載したようなドット状の所見に対応すると思われる濃淡の繰り返しが見られたが、従来記載のないen face像に関しては明瞭な規則的配列を示す

観察できた en face 像が少数だったことから、この点についてはなお検討する必要がある。

Mdxマウスの heterozygote において dystrophin 欠損線維が少ないことは既に Tanaka ら<sup>5)</sup>により報告されている。ヒトとマウスの heterozygote の間に見られるこの差異の背景にどのような病態の差が存在するのかは、きわめて重要と思われるが、依然不明である。今後はこの点を含めてマウスの heterozygote における dystrophin の動態について更に検討を続けたい。

#### 結 論

1. 共焦点レーザー顕微鏡で正常骨格筋の筋膜の接線方向の断面で、抗 dystrophin 抗体と反応する構造がほぼ一定の間隔で配列する部分が見られた。
2. Duchenne carrier では dystrophin の蛍光強度は多くの筋線維で欠損または弱く不規則で、個々の構造の大きさや蛍光強度が不規則となっている傾向が見られた。
3. Carrier では DRP の発現が見られたが、低倍率で強弱の繰り返しは見られるものの、高倍率では明らかな等間隔の配列構造は確認されなかった。
4. Mdx heterozygote では、dystrophin の発現は比較的保たれ、全周にわたる欠損は稀であった。

#### 文 献

- 1) Masuda T, Fujimaki N, Ozawa E and Ishikawa H: Confocal laser microscopy of dystrophin localization in guinea pig skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 119: 543-548, 1992.
- 2) Minetti C, Beltrame F, Marcenaro G and Boniala E: Dystrophin at the plasma membrane of human muscle fibers shows a costameric localization. *Neuromusc Disord* 2: 99-109, 1992.
- 3) Pons F, Nicholson LVB, Robert A, Voit T and Leger JJ: Dystrophin and dystrophin-related protein (utrophin) distribution in normal and dystrophin-deficient skeletal muscles. *Neuromusc Disord* 3: 507-514, 1993.
- 4) Watkins SC, Hoffman EP, Slayter HS and Kunkel LM: Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature* 333: 863-866, 1988.
- 5) Tanaka H, Hayashi K and Ozawa E: Positive immunostaining with dystrophin antibodies in mdx skeletal muscle. *Proc Jpn Acad* 67B: 148-152, 1991.

# 54) mdx 骨格筋崩壊抑制の試み (治療)

吉田 瑞子\*

研究協力者 松崎 哲也\*

## はじめに

私達は、Duchenne型筋ジストロフィー症(DMD)の骨格筋崩壊の原因を見出すために、モデルマウス(mdx)を用いて、骨格筋崩壊現象を、細胞レベルで調べてきた。その結果、刺激により、mdxマウス骨格筋のCa<sup>2+</sup>-channelが、対照よりも深い電位で活性化し、そのchannelを通過して細胞外Ca<sup>2+</sup>が細胞内に対照よりも多く流入する。増加した細胞内Ca<sup>2+</sup>によってある時過収縮を生じ、筋崩壊を生じる。その筋崩壊は、L-型Ca<sup>2+</sup>-channel阻害剤によって、抑制される<sup>1)</sup>。即ちL-型Ca<sup>2+</sup>-channelから流入するCa<sup>2+</sup>を抑制すれば、骨格筋崩壊を、防ぐことが出来るということである。

今回は、L-型Ca<sup>2+</sup>-channel阻害剤を用いて、mdxマウスの個体レベルで、骨格筋崩壊抑制を試みた。

## 試料と方法

mdxを無投与1群、阻害剤の溶媒投与1群、阻害剤投与2群の4群に分けた。各1群は、3組のmdxマウスから生まれた仔ども、10匹から16匹を使用した。L-型Ca<sup>2+</sup>-channel阻害剤は、疎水性の性質を持つ、nifedipine(純度99%, Biomol)を使用し、15% ethanol(純度99.5% 和光)、15% polyethylene glycol(PEG: #400, 関東化学)を含む0.9% NaClに溶解した。その濃度は、6mg/Kg/dayと14mg/Kg/dayとし、1日2回に分けて皮下投与(肩、背面)した。容量は1回につき、体重4gから6gまでと6g以上12gまで、それぞれ体重比例で0.05-0.1mlとした。投与期間は骨格筋崩壊抑制を調べるために、光学顕微鏡上筋崩壊が開始していない、日齢8日目より、筋崩壊が生じている24日目までの17日間投与した。投与終了翌日、日齢25日目にether深麻酔をし、腹大静脈より採血した。血液は、室温に1時間放置後、血清を分離し、CK値を測定した。また同時に、前頸骨筋を採取し、凍結標本とし、厚さ10μmの切片を作成、H&E染色した。H&E染色組織標本で、全線維数(平均、2200本)に対する、壊死・再生線維数の割合を計測した。壊死部位で線維数を計測できない部分は、画像解析(高速カ

ラー画像解析システム; オリンパス SP500)で面積を測定、線維数測定可能な面積より比例計算で、壊死線維数を算出した。CK値、組織標本計測値は、non-parametricのTukey法で統計処理、検定を行った。

## 結果

血清CK値の結果を図1及び表に示す。mdx無投与群の血清CK値は、バラツキが大きかった。無投与群の血清CK値に対して、溶媒投与群及び溶媒とnifedipine投与群のCK値は1/2以下となり、p≤0.01の確立で有意差を以て減少した。しかし、nifedipine単独のCK値減少効果は認められなかった。

前頸骨筋組織標本の全線維数に対する、壊死・再生線維数(ダメージ線維数)の割合を図2と表に示す。無投与群の結果は、CK値の結果と同様にバラツキが大きかった。無投与群の壊死・再生線維数に対して、溶媒投与群の壊死・再生線維数の割合は、0.01<p≤0.05の確立で有意に減少し、nifedipineと溶媒投与群の壊死・再生線維数は、p≤0.01の確立で有意差を以て減少した。CK値の結果と同様に、溶媒が壊死・再生線維を減少させた。nifedipineを投与した群は、投与量に応じて壊死・再生線維が減少する傾向を示した。

## 結論と考察

mdxマウスの個体レベルで、nifedipine(L-型Ca<sup>2+</sup>-channel阻害剤)の有意な効果は、認められなかった。理由として次のことが考えられる。1) nifedipineの効果を見るためには、nifedipineを溶解した溶媒系が適切でなかったこと、2) nifedipineの血圧降下作用が、8時間で無効となるので、1日に2回の投与回数は治療

表 血清CK値と前頸骨筋の組織標本全筋線維数(平均2200本)に対する、(壊死・再生線維)ダメージ線維の割合

	無投与群	溶媒投与群	nifedipine 6 mg/Kg/day	nifedipine 14 mg/Kg/day
CK値(IU/l)	12400 ± 4600 n=14	4750 ± 2800 n=13	5690 ± 2460 n=12	5990 ± 2050 n=10
ダメージ線維(%)	37 ± 12 n=16	21 ± 6 n=11	19 ± 9 n=14	16 ± 6 n=10

\*国立精神・神経センター神経研究所

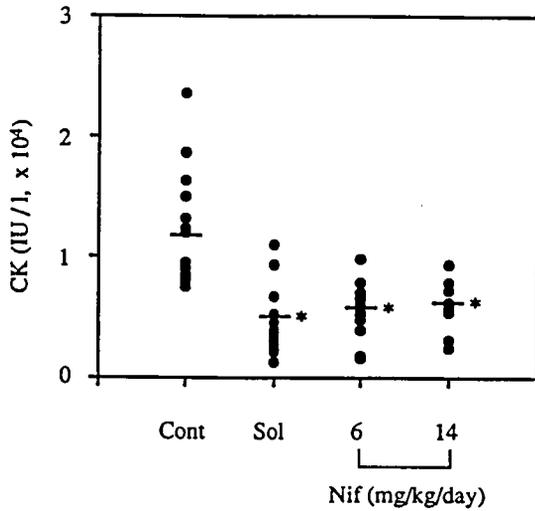


図1 血清CK値(25日齢)

Cont: 無投与群, Sol: 溶媒投与群, Nif: nifedipine投与群, —: 平均値, \*:  $p \leq 0.01$

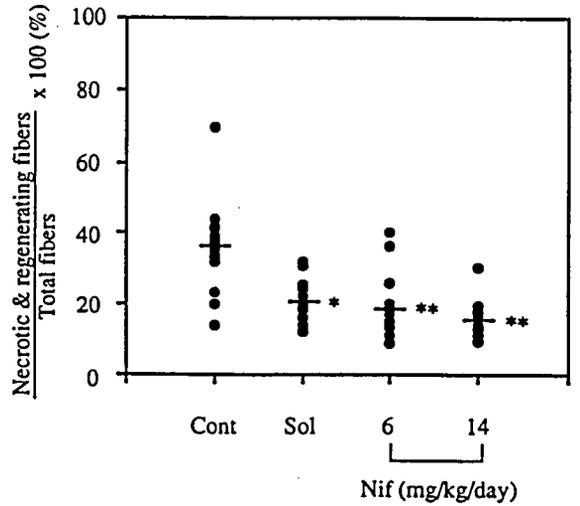


図2 前頸骨筋の壊死・再生線維数(25日齢)

Cont: 無投与群, Sol: 溶媒投与群, Nif: nifedipine投与群, —: 平均値, \*:  $0.05 < p \leq 0.01$ , \*\*:  $p \leq 0.01$

のためには不足であったことである。しかし壊死・再生線維数の結果では、nifedipine投与量に応じて、壊死・再生線維数が減少する傾向を示しているので、nifedipineのL-型 $Ca^{2+}$ -channelの阻害効果を見捨てることはできない。

溶媒のみの投与で、CK値、壊死・再生線維数が有意に減少し、筋崩壊が抑制された。その作用機序は現在のところ分からないが、溶媒中のPEGが作用していると考えられる。両親媒性の性質を持つPEGが、どのような作用をしているのか不明である。しかし次のようなことが考えられる。1) 細胞膜の疎水性部位と接し、単に糊のような働きをし、細胞膜を補強し、細胞の崩壊を防いでいる。2) PEGのエーテル結合の

酸素は、電子共与体である。この酸素は金属イオンを抱え込む性質を持つ。すなわちクラウン構造的構造を取り、 $Ca^{2+}$ を抱え込むと考えられる。疎水性であるエチレン基側は、細胞膜と接合する可能性がある。従ってクラウン構造的構造をとって、L-型 $Ca^{2+}$ -channelに作用し、 $Ca^{2+}$ 電流を減少させている可能性がある。今後、PEGの細胞膜に対する作用を調べ、最も良い筋崩壊抑制の条件を見出すよう努力する。

#### 文 献

- 1) 吉田瑞子, 松崎哲也, 和田圭司: 強縮刺激によるmdxマウス骨格筋崩壊現象“平成6年度厚生省精神・神経疾患研究委託費”による研究報告集, p56.

## 55) mdx マウスに対する治療的研究： idebenone と glycyrrhizin の効果

栗原 照幸\*

研究協力者 大迫 正行\* 岸 雅彦\* 木下 真男\*

筋ジストロフィーの治療は、Duchenne 型筋ジストロフィーで dysstrophin が欠損していることが明らかになってからも、困難を極めている。治療法としては、筋芽細胞移植、遺伝子治療、薬物療法などが試みてこられたが、実用になる治療法は未だ見出されていない<sup>1)</sup>。

我々は治療開発の目的で、種々の薬物を dystrophin が欠損している mdx マウスに使用してみて、治療効果のある薬物が見出せないものかと実験を行ってきた。また、治療薬物の評価が客観的にできるように、筋細胞内記録によって mdx マウスの生理学的異常を見出し、これを指標として薬物の効果のみてきた。客観的指標がなくて薬物の効果のみるのは、極めて困難なことである。mdx マウスでは、この点生理学的に次のような異常が見つかっている。

筋細胞膜の dystrophin が欠損している mdx マウスでは、1) 膜電位が低い筋線維と膜電位が正常な筋線維が混在し、2) 微小電極を筋細胞内に刺入した際 myotonic burst が筋線維の約 20% に認められる<sup>2)</sup>。

我々は、平成 6 年度の本研究で、脳代謝賦活剤である idebenone<sup>3)4)</sup> を用い、mdx マウスに対して治療的効果の検討を行ったところ、40mg/l という濃度で用いると、膜電位を改善し、myotonic burst を完全に阻止することができた。平成 7 年度は、投与量を 2~20mg/l と、より少ない投与量で効果が得られないかどうかを検討した。また、Duchenne 型筋ジストロフィー患者の車椅子移動速度を改善させたという報告<sup>5)</sup>のある glycyrrhizin についても筋細胞膜に対する治療的効果があるか否か検討した。

### 方 法

4~8 週齢の mdx マウスの横隔膜標本を作成し、3M の KCl を満たしたガラス管微小電極を自作して、筋細胞内記録を行った。実験は、95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub> の混合ガスで酸素化した Tyrode 溶液に idebenone を種々の濃度で加えて、膜電位の記録を行った。glycy-

rrhizin は、50mg、250mg の濃度で、Tyrode 溶液に加えて筋細胞内記録を行い効果をみた。対照として、同週齢の B10 マウスを用いた。

### 結 果

平成 6 年度の研究では、次の 4 点が明らかになった。

1) mdx マウスの膜電位は、平均 -75mV と対照の B10 マウスの平均膜電位 -90mV に比べて低い。これは mdx マウスの筋標本では、正常な膜電位の筋線維と、-70mV 以下の筋線維が混在しているためである。idebenone 40mg/l を加えると、膜電位の平均値は -84.5mV と有意に改善した。

2) myotonic burst の出現率は、Tyrode 溶液のみの mdx マウスにおいて、筋線維 250 本中 55 本と、約 22.0% に myotonic burst が認められたが、idebenone を加えた mdx マウスでは、筋線維 268 本中 myotonic burst は全く認められなかった。

3) mdx マウスは anoxia に弱く、膜電位の変化を時間経過を追ってみると、90 分間の anoxia で、膜電位は、-76.2mV から -64.0mV となり 12mV の低下が起こったが、idebenone を加えておくと 3.5mV の低下に抑えられた。対照の B10 マウスでは、90 分間の anoxia 負荷でも膜電位は、ほとんど低下しなかった。

4) 筋標本に閾上刺激による運動負荷を与え、膜電位の変化を記録した。B-10 マウスと、mdx マウスに 30Hz、5V の閾上刺激を 5 分間加え、その前後の膜電位の平均値を比較すると、B-10 マウスの膜電位は刺激後、約 0.8mV の低下しかみられなかったが、mdx マウスは刺激後約 6.4mV の低下がみられ、Wilcoxon 検定にて 1% 以下の危険率で有意差を認めた。この結果から、mdx マウスは運動負荷により膜電位が低下することがわかる。このように、idebenone は 40mg/l という高濃度でもちいれば、mdx マウスの筋細胞膜異常を、機能的には改善させることができる。実際に人に idebenone を投与するとなると、40mg/l は大量なので、もっと低い濃度でも効果がみられないか否か、平成 7 年度に検討を加えた。idebenone の投与量を 2, 5, 10, 20mg/l と変化させ、膜電位の改善と、myotonic

\*東邦大学医学部第四内科

表 1 idebenoneの濃度とmdx マウスの膜電位, myotonic burstの頻度.

idebenoneが2mg/lと5mg/lの濃度では, mdx マウスの膜電位は, 前値の-74.4mV と比べ改善はみられないが, 10mg/lと20mg/lでは, 膜電位はそれぞれ-81.9, -82.9mV と改善がみられる. また, myotonic burstについても, 濃度依存性に抑制がみられ, 20mg/lでは完全に抑制された.

	mdx	mdx + idebenone			
		前値	2 mg/l	5 mg/l	10 mg/l
RMP ± S.D.	-74.4 ± 9.7mV	-77.1 ± 10.3mV	-75.4 ± 13.2mV	-81.9 ± 8.5mV	-82.9 ± 9.3mV
myotonic burst	19.8%	15.6%	12.9%	2.5%	0%

burstの抑制について, 有効な投与量を見出す実験を行った. 表1のように, 投与前のmdx マウスの膜電位は平均-74.4mVであった. idebenoneが2mg, 5mgの濃度では, 膜電位は約1から3mVの改善しか認められず, 有意差も認められなかった. 10mg, 20mgの濃度においては約7から8mV以上の膜電位の改善があり, これは危険率1%以下で有意差を認めた. myotonic burstの頻度についても10mg/l以上で2.5%と著明に低下し, 20mg/lでは完全に抑制された. 膜電位の分布を図1に示した. 横軸に膜電位を5mV間隔でとり, 縦軸にはそれぞれの膜電位の筋線維の%を示した. 黒は投与前を示し, 縦縞はidebenone 2mg投与後, 白は5mg投与後, 横縞は10mg投与後, また灰色は20mg投与後の膜電位の変化を示した. 5mg投与のグラフから, 膜電位の分布としては, -90から-95mV付近にピークを作り, 10mg投与後は-85から-90mVの筋線維の割合が増加している. このことからidebenone 40mg/lを投与した際と同様に, 膜電位の低い筋線維が減少して, 全体の膜電位平均値が改善されたものと思われる.

次にmdx マウスにglycyrrhizinを投与し, 膜電位の変化とmyotonic burstの出現率を検討した. 表2のように, 投与前のmdx マウスの膜電位は平均-74.4mVであった. glycyrrhizin 50mg/lの濃度では膜電位平均は-75.8mVとほぼ変化は認められなかった. またglycyrrhizinを250mg/lと高濃度にすると, 膜電位平均は-76.4mVとなり, 膜電位の大きな改善は認められなかった. myotonic burstの出現率は投与前のmdx マウスでは19.8%の頻度で認められたが, glycyrrhizin 50mg/lでも18.1%と変化はみられず, 250mg/lの高濃度でも27.2%とむしろ頻度は増大し, myotonic burstの抑制効果は全く認められなかった. 膜電位の分布を図2に示した. 横軸に膜電位を5mV間

表 2 glycyrrhizinとmdx マウスの膜電位, myotonic burstの頻度.

glycyrrhizinを50mg/l, 250mg/lの濃度で用いてみたが, mdx マウスの膜電位には有意な改善はみられなかった. またmyotonic burstについても, これを阻止する効果はみられなかった.

	mdx	mdx + glycyrrhizin	
		前値	50mg/l
RMP ± S.D.	-74.4 ± 9.7mV	-75.8 ± 2.3mV	-76.4 ± 2.1mV
myotonic burst	19.8%	18.1%	27.2%

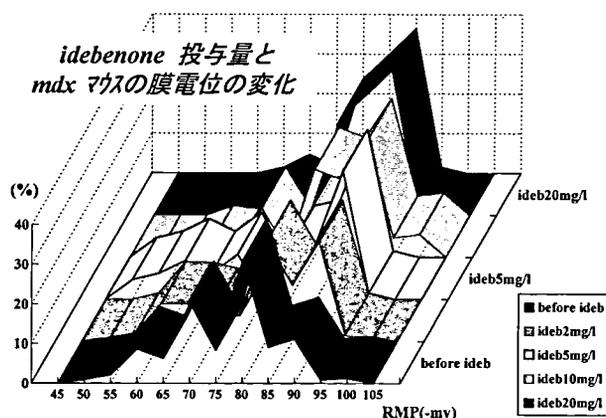


図 1 idebenone投与量とmdx マウスの膜電位の変化. mdx マウスの筋標本では, -70mV以下の低い膜電位の筋線維と-80mV前後の正常な膜電位の筋線維が混在している. この分布を黒のグラフで示す. idebenoneを2, 5, 10, 20mg/lの濃度でTyrode溶液に加えると, 10mg及び20mg/lでは低い膜電位の筋線維が減って, 正常の膜電位をもった筋線維が増えてくる. そして, 膜電位の平均値も-74.4から-82.9mVまで有意に改善する.

隔でとり, 縦軸にはそれぞれの膜電位の筋線維の%を示した. 黒は投与前のmdx マウスを示し, 白はglycyrrhizin 50mg投与後, また灰色は250mg投与後の膜電位の変化を示している. 投与前は-70mVと-80mV付近に二峰性のピークを形成しているが, glycyrrhizin 50mg/lでは, -80と-90mVにピークが移動, 250mg/lでは-70mV付近に小さいピークと, -90mV付近に大きなピークを形成している. 表2で示したように膜電位の平均値に有意差は認めないが, このグラフから膜電位の分布にいくらかの影響を与えているように思える.

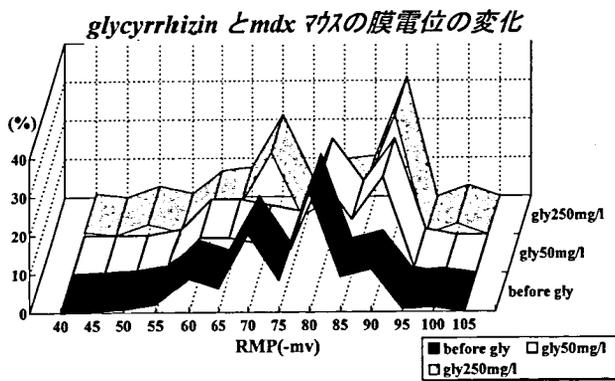


図2 glycyrrhizinとmdxマウスの膜電位の変化。  
mdxマウスでは低い膜電位と正常な膜電位をもった筋線維が混在するが、glycyrrhizinは、膜電位の分布においてより正常な方向へ移動させる傾向はみられるが、統計的に有意な改善はみられなかった。

## 考 察

### 1. idebenoneの効果

脳代謝賦活剤であるidebenoneの薬理作用として、①ミトコンドリアの呼吸活性を賦活し、脳神経細胞のグルコース利用率とATP産生を促進する、(虚血時の脳ミトコンドリアのATP産生低下を抑制)、また、乳酸の増加も抑制する<sup>3)4)</sup>。②Anoxiaの状態において、細胞内へのCaイオンの流入や遊離による細胞死の過程で発生するフリーラジカルの消去作用により、ミトコンドリアの破壊をおさえ、細胞壊死を抑制する作用があることが知られている。

今回我々の行った実験で、mdxマウスの筋細胞膜の電気生理学的異常の改善を認めた。またidebenoneは、anoxiaによって膜電位が低下するmdxマウス筋標本に用いても改善効果を認めた。

この機序として、idebenoneによりATP産生が高められ筋細胞膜における能動輸送が改善するのではないかと考えられる。anoxia状態においても脳に対する同様のエネルギー代謝改善作用を筋に及ぼし、膜電位の低下を抑制するのではないかと考えられる。

薬用量については、当初Tyrode溶液中に40mg/lの高濃度でmdxマウス筋標本に作用させたところ、膜電位の改善とmyotonic burstの抑制効果が認められたが、これは投与量としては大量と思われ、もっと少量で治療効果がみられないものかと、2~20mg/lの4段階の濃度で実験を行い、10mg/l以上なら有効であるという結論を得た。

運動負荷：B10マウスでは、運動負荷をかけても膜電位の低下は認められなかったが、mdxマウスでは、30Hz、5V、5分間の神経刺激で、膜電位が-76.2から

表3 今までmdxマウスについて我々が検討してきた種々の薬物の効果を表にまとめた。

myotonic burstは、Cl conductanceが低下したときや、fast Na currentが増加したときに起こるほか、両者の変化が一緒に起こった時にも起こるが、治療としては、Na channelをblockするような薬物をもちいれば阻止できる。mdxマウスの低温で見られるmyotonic burstは、表のように、diphenylhydantoin, mexiletine, nicardipine, bestatin, そして今回のidebenoneによって阻止できる。それよりも、低下した膜電位を改善することはずっと困難であり、我々が検索した薬物の中ではbestatin, idebenoneの2剤のみが、膜電位を改善することができた。

薬 剤	効果	低下した膜電位の改善	ミオトニーの抑制効果
diphenylhydantoin		-	+
mexiletine		±	+
nicardipine		-	+
bestatin		+	+
dantrolene Na		-	-
idebenone		+	++
glycyrrhizin		-	-

-69.9mVに低下した。mdxマウスでは、dystrophinが欠如しているためにdystrophinの代わりにユートロフィンが現れ、ユートロフィン軸ができるが、これが運動負荷には耐えきれずに、膜電位が低下する要因となっているのではないかと考えられる。その他の要因としては、energy failureの可能性も考えられる。

### 2. glycyrrhizinの効果

安徳ら<sup>5)</sup>により、Duchenne型筋ジストロフィーの患者の平均筋力スコアがglycyrrhizinにより3.59から3.92に改善し、車椅子こぎ試験の所用時間にも多少の改善がみられた、という報告があった。glycyrrhizinの作用としては、

1. ライソゾーム膜を中心とした細胞膜の安定化、
2. 筋小胞体からのCaの遊離の抑制、
3. 内因性及び外因性のsteroidホルモンの代謝抑制による活性増強作用などがある。

今回、我々のmdxマウスを用いた筋細胞内記録では、高濃度(250mg/l)のglycyrrhizin投与でも、膜異常の改善は認められなかった。

最後に、これまでmdxマウスについて我々が検討してきた種々の薬物の効果を表3にまとめた。

## 結 語

mdxマウスに対するidebenoneの効果を検討した。10mg/l以上の濃度で膜電位の改善、並びにmyotonic

burstの抑制効果が認められることが明らかになった。また、mdxマウスは、anoxiaや運動負荷によって膜電位の低下を認めた。glycyrrhizinについても検討したが、今回の我々の実験ではmdxマウスに対する膜電位の改善、myotonic burstの抑制効果は認められなかった。

#### 引用文献

- 1) 栗原照幸：進行性筋ジストロフィー症治療の展望・神経治療 10(3)：203, 1993.
- 2) Kurihara T, Osako M, Kishi M, et al: Therapeutic trial for X-linked muscular dystrophy mice by idebenone. Electroencephal Clin Neurophysiol 97(4)：S129, 1995.
- 3) Sugiyama Y, Fujita T, Matsumoto M, et al: Effects of idebenone(CV-2619) and its metabolites on respiratory activity and lipid peroxidation in brain mitochondria from rats and dogs. J Pharmacobio-Dyn 8：1006, 1985.
- 4) Suno M, Shibota M and Nagaoka A: Effect of idebenone on lipid peroxidation and hemolysis in erythrocytes of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Arch Gerontol Geriatr 8：307, 1989.
- 5) 安徳恭演, 塚本浩介, 小池文彦ほか：Duchenne型筋ジストロフィーに対するグリチルリチンの効果. 神経内科 39：573, 1993.

# 56) 筋ジストロフィーに対する Glycyrrhizine の効果について

田代邦雄\*

研究協力者 伊藤和則\* 牧野均\*\*  
森若文雄\* 島功二\*\*\*

## はじめに

今回われわれは Dantrolene sodium と Glycyrrhizine を筋ジストロフィーの症例に投与し、その有効性について検討を行った。Dantrolene sodium は骨格筋の興奮-収縮連関に作用し、筋小胞体からの Ca 放出を抑制する薬物である。この Dantrolene sodium を筋ジストロフィー患者に投与し、CK 値の低下と筋力の改善が報告されている。また Glycyrrhizine はステロイド様作用を有することでその効果が期待される。この薬剤の作用機序と Glucocorticoid の作用増強、および効果延長作用が考えられている。それは corticoids の不活性化を抑制し、その効果を延長させる<sup>1)</sup>。

このことから筋ジストロフィー3例に Dantrolene sodium と Glycyrrhizine を併用または単独投与し、血清CK値、AT (Anaerobic threshold)、筋力を経時的に測定し、その有効性、安全性を含めて検討した。

## 対象と方法

対象は症例1: Becker型PMD, 症例2: FSH型PMD, 症例3: Limb-girdle型PMDの各1症例に対して検討を行った。

症例1はGlycyrrhizine 150mg単独投与を行った。症例2はDantrolene sodium 75mgとGlycyrrhizine 150mgの併用療法を、また症例3 Dantrolene sodium 25mgとGlycyrrhizine 150mgの併用療法を施行した。

運動能力を客観的に把握する方法としてAT (anaerobic threshold), max. VO<sub>2</sub> (最大酸素摂取量) が代表的な指標であるが、運動処方を行う場合、peak VO<sub>2</sub>や最大心拍数を基準とする方法は最大運動が必要となり、健常人でも困難な点が多い。ましてや種々の疾患を有する患者にはこの方法では判定できない。ATは最大運動を必要とせず、トレーニング効果、運動能力を鋭敏で安全な方法である。ATを考える場合、種々のパラメーターが存在し、それぞれの状態で

区別して用いられているが、われわれが使用しているにはVT (換気閾値) を基準としている<sup>2)3)</sup>。

1. 各症例についてGlycyrrhizine, またはDantrolene sodiumとGlycyrrhizine併用投与前のVO<sub>2</sub>/W, HR, Loadを測定した。薬剤投与後経時的にVO<sub>2</sub>/W, HR, Load, peak時のLoad等を測定し、投与前値と比較した。

2. 各症例に筋訓練測定装置(KIN/COM)を使用し、右下腿(Hamstring, Quadriceps muscle)の筋力を測定し、薬剤投与前後での筋力差を検討した。

{VO<sub>2</sub>/W, HR, Load, 筋力の測定}

呼吸ガス分析はMINATO医科製エアロモニターAE280Eを使用しbreath by breath法で3秒毎、酸素摂取量、二酸化炭素排出量、換気当量、心拍数等を連続して測定した。運動負荷はエルゴメーターを使用し、漸増運動負荷(ramp負荷)で行った。

筋力測定は筋訓練測定装置(KIN/COM)を用い、右下腿(Hamstring, Quadriceps muscle)の最大筋力を測定した。Isokinetic modeで角速度30°にてconcentric contraction動作で実施した。最大筋力と平均の下腿筋力を測定した<sup>4)5)</sup>。

## 結 果

症例1はGlycyrrhizine投与前のATは8.32ml/Kg/minとコントロール群の平均値と比較しても相当な低下がみられ、最大運動量も30wattsと低下していた。Glycyrrhizine 150mg (単独投与)を投与後約3か月後にはATは9.90ml/Kg/minと改善がみられ、peak VO<sub>2</sub>も9.47ml/Kg/minから10.61ml/Kg/minへ上昇した。しかしPeakの運動量は投与前30wattsから投与後31wattsと変化はみられなかった(表1)。

筋力に関してはQuadriceps, Hamstringの平均筋力を測定した。Quadriceps muscleはGlycyrrhizine投与前の筋力測定では20N、投与3か月後でも28Nと有意な改善はみられなかった。しかしHamstring muscleは投与前27Nであったが、投与3か月後には49Nと上昇がみられた。自覚的筋力の改善はみられ、とくに歩行時の安定性が観察された。血清CK値は投

\*北海道大学医学部神経内科

\*\*美唄労災病院リハビリテーション科

\*\*\*国立療養所札幌南病院神経内科

表1 Becker型PMDの運動機能を示す。

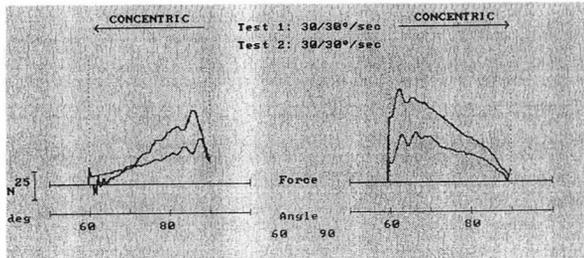
Glycyrrhizine 投与前 ATは 8.32ml/Kg/min と低値を示し投与後3か月ではAT9.90ml/Kg/min と有意な改善がみられた。しかしLoad の変化, peak Loadの増加はみられなかった。

Date	8/29 95	11/21 95
A T (ml/Kg/min)	8.32	9.90
H R (/min)	103	113
Load (watts)	15	12
peak V O <sub>2</sub> (ml/Kg/min)	9.47	10.61
peak H R (/min)	115	143
peak Load (watts)	30	31

表2 Becker型PMDの下肢筋力を示す。

Glycyrrhizine 投与前後での下肢筋力は Hamstring muscleの改善は認められたが, Quadriceps muscleは変化がなかった。

	8/29 95	11/21 95
Quadriceps muscle	20 (N)	28 (N)
Hamstring muscle	27 (N)	49 (N)



与前後で変化は認められなかった(表2)。

症例2では Dantrolene sodium 75mg 投与後 Glycyrrhizine 150mg を加えて検討したが, Dantrolene sodium 投与前の ATは 10.7ml/Kg/min, その時点での運動量は 25.0watts とコントロール群と比較して非常に低下していた。運動療法と Dantrolene sodium 75mg 投与後8か月後には ATが 18.4ml/Kg/min, 運動量は 65watts と有意な改善がみられた。この時点から Glycyrrhizine 150mg を併用した。併用後4か月後には ATは 19.9ml/Kg/min, 運動量 81watts, peakVO<sub>2</sub> も前値 18.2ml/Kg/min から併用時 32.6ml/Kg/min と有意な上昇がみられた。また併用後15か月後の検討では AT18.8ml/Kg/min, 運動量 77.2watts, peakVO<sub>2</sub> は 30.8ml/Kg/min と運動能力としては維持していることが示唆された(表3)。

下腿筋力に関しては投与前値は Quadriceps muscle は 148N, Hamstring muscle は 148N, とともに平均筋力を示した。Dantrolene sodium 75mg 投与後8か月

表3 FSH型PMDの運動機能と筋力を示す。

(上段は運動機能, 下段は下肢筋力)

Dantrolene sodium 投与前後で有意な AT, Load の改善がみられ, 2/7 94 からは Glycyrrhizine と Dantrolene sodium の併用療法を開始し, AT, Load 等の維持がみられ, 有効性が示唆された。また筋力に関しても, Quadriceps, Hamstring muscle とともに有意な改善が認められた。

	2/3 93	10/7 93	2/7 94	5/15 95
A T (ml/Kg/min)	10.7	18.4	19.9	18.8
HR (/min)	102	103	119	118
Load (watts)	25.0	65.0	81.0	77.2
peak VO <sub>2</sub> (ml/Kg/min)	18.2	31.6	32.6	30.8
peak HR (/min)	104	158	149	155
peak Load (watts)	25.8	144	135	125

Date	2/3 93	10/7 93	2/7 94	5/15 95
Quadriceps (平均)	148 (N)	196 (N)	259 (N)	237 (N)
Hamstring (平均)	148 (N)	142 (N)	266 (N)	246 (N)

では 196N, 142N と Quadriceps muscle の有意な改善がみられた。Dantrolene sodium, Glycyrrhizine 併用後 259N, 266N と Dantrolene 単独投与時よりも筋力の改善がみられた。また併用後15か月では Quadriceps muscle 237N, Hamstring muscle 246N と筋力もほぼ維持されていた。また血清 CK 値は投与前 1250IU/l であったが, Dantrolene sodium 投与後 850-500IU/l 程度を推移していた。自覚的, 他覚的にも筋力改善と歩行の安定, 持久力, 易疲労性の改善がみられた。

症例3はまず Dantrolene sodium 25mg から開始し, 1か月毎 25mg ずつ増量し, 75mg までで維持量とし, その後 Glycyrrhizine 150mg を追加するプロトコルでおこなう予定であった。投与前は AT9.7ml/Kg/min, 運動量 12.7watts, peakVO<sub>2</sub> 14.7ml/Kg/min と低値を示していた。Dantrolene sodium 25mg 投与後約1か月後には AT 10.5ml/Kg/min, 運動量 12.8watts, peakVO<sub>2</sub> 13.4ml/Kg/min であった(表4)。ATはやや上昇したが, 運動量, peakVO<sub>2</sub> は変化なかった。つぎに Dantrolene sodium 50mg に増量したが, 自覚的に脱力が強いとのことでこの時点での運動機能を測定したが, AT10.0ml/Kg/min, 運動量 10.0watts で Dantrolene sodium 25mg 投与時よりも

表4 Limb-girdle型PMDの運動機能を示す。

Dantrolene sodium 25mg, 50mg 投与でLoadの低下を認め、Glycyrrhizineとの併用療法開始後約1か月ではAT10.1ml/Kg/minと有効性はみられなかったが、併用後長期になり、その有効性が出現してきた。AT, Loadの増大がみられた。

Date	6/23 94	8/4 94	8/31 94	10/1 94	11/10 94	12/8 94	4/7 95	8/31 95
AT (ml/Kg/min)	9.7	10.5	10.0	10.1	11.4	10.4	11.54	11.36
HR (/min)	104	114	109	107	117	115	118	120
Load (watts)	12.7	12.8	10.0	12.0	16.0	12.0	13.0	15.0
peakVO2 (ml/Kg/min)	14.7	13.4	16.9	15.0	16.0	15.6	13.8	15.1
peakHR (/min)	146	149	142	143	149	148	145	153
peakLoad (watts)	36.0	31.0	31.0	31.0	32.0	30.0	27.0	28.0

表5 Limb-girdle型PMDの下肢筋力の推移を示す。

Dantrolene sodium 投与にてQuadriceps, Hamstring muscleともに低下して脱力感と一致した結果となった。Dantrolene sodium 25mgとGlycyrrhizine 150mgの併用療法直後は同様に筋力低下は持続していたが、徐々にもとの状態にまで改善し、そのまま筋力が維持されていた。

	6/23 94	8/4 94	8/31 94	10/6 94	11/10 94	12/8 94	6/9 95	8/31 95
Quadriceps (平均)	23.0	15.0	16.0	17.0	10.	28	24	23
Quadriceps (peak)	48	53	43	45	43	64	52	48
Hamstring (平均)	41	33	39	31	39	43	44	35
Hamstring (peak)	69	61	55	51	60	75	66	60

や低下していた。Dantrolene sodium 25mg, Glycyrrhizine 150mgの併用療法にて検討することとした。併用投与後1か月ではAT10.1ml/Kg/min, 運動量12.0watts, peakVO2 15.0ml/Kg/minと変化はみられなかった。併用療法後2か月後頃からAT, Load, peakVO2の上昇, 改善傾向がみられるようになってきた。8か月後にはAT11.54ml/Kg/min, 運動量13.0watts, 約1年後にはAT11.36ml/Kg/min, 運動量15.0watts, peakVO2 15.1ml/Kg/minと改善し、投与前及びDantrolene sodium単独投与時と比較するとAT, ATのLoadは有意な改善が認められた。しかし、peakVO2は有意差はなかった。

筋力に関しては投与前Quadriceps muscleの最大筋力は48N, 平均筋力23N, Hamstring muscleの最大筋力69N, 平均筋力41Nとコントロール群の1/5程度の筋力を示していた(表5)。Dantrolene sodium

25, 50mg投与にてQuadriceps, Hamstring muscleともに平均筋力の低下が認められた。

Dantrolene sodiumとGlycyrrhizine併用療法では投与3か月頃からやや上昇傾向がみられ、約1年経過した時点での筋力は投与前値とほぼ有意差がなく、積極的に筋力の改善には結びつかない可能性が示唆されるが、筋力の維持に対しての有効性が考えられる。

#### 考 察

筋ジストロフィーに対してステロイドの有効性はある程度周知ではあるが、投与量, 期間などの制約があり、容易にまた安易に投与できないのが現状であるが、そこでGlycyrrhizineに注目し、検討を行った。Glycyrrhizineは内因性の副腎ステロイド増強することでステロイドホルモン作用を示し、また肝臓におけるコルチコイドの酵素的不活性化を抑制し、消失速度の遅

延が報告されている。今回 Glycyrrhizine 単独投与例では投与3か月でATの有意な上昇がみられ、その有効性が推測された。また筋力に関してはHamstring muscleの増強効果が考えられた。Dantrolene sodium単独ではFSH型PMDに有効性が考えられるが、しかし筋力低下が著しい症例に対してはむしろ脱力感として作用することが予想された。血清CK値は投与前値の10~35%程度低下することは観察されたが、筋崩壊の抑制=筋力改善にはつながることなかった。Limb-girdle型PMDはDantrolene sodium投与にて脱力が増強し、筋力低下、Loadの低下、peak Load低下がみられ、Glycyrrhizine投与にてATの改善はみられたが、筋力は改善というよりは維持できたことが成果と考えられた。

1. 筋ジストロフィーの3症例にGlycyrrhizine, Dantrolene sodiumの単独または併用療法を行った。
2. Glycyrrhizine単独投与例では投与3か月でAT, 筋力の改善が認められた。
3. 併用療法ではDantrolene sodiumが有効な場合と脱力を引き起こす場合があり、有効性は一定しない、しかしGlycyrrhizine投与ではATの改善が有意にみ

とめられた。しかし筋力改善までは至っていないことが予想された。

#### 文 献

- 1) 熊谷 朗：グリチルリチンの研究。ライフ・サイエンス出版，東京，1986，p65.
- 2) 谷口興一：心肺運動負荷テスト。南江堂，東京，1993，p155.
- 3) 中村好男：乳酸閾値と換気閾値との関連についてのBeaver, Wasserman, Whippの主張に対する疑問。体育の科学 40：453-460，1990.
- 4) 田代邦雄，伊藤和則ほか：筋疾患の治療効果について—運動負荷試験によるAT(Anaerobic Threshold)の検討—。“厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法開発に関する研究”(荒木班)平成3年度研究報告書，1992，pp59-61.
- 5) 田代邦雄，伊藤和則ほか：筋疾患の治療効果。“厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法開発に関する研究”(荒木班)平成4年度研究報告書，1993，pp64-67.

# 57) Duchenne型筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の基礎的研究—カチオン性脂質を用いた培養筋細胞への遺伝子導入

庄 司 進 一\*

研究協力者 石井亜紀子\* \*\* 萩原康子\*\* 斎藤陽子\*\*  
埜中征哉\*\* 荒畑喜一\*\* 武田伸一\*\*

## 目 的

体細胞遺伝子治療の対象として考えられているデュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) において、効率的な遺伝子治療を行うためには、骨格筋細胞に対して効率と安全性の高い遺伝子導入法の開発が望まれる。カチオン性脂質による遺伝子導入は簡便で再現性が高く、免疫反応を起しにくい方法<sup>1)</sup>として注目されている。我々は培養骨格筋細胞に対する遺伝子導入法を確立することを目的として、種々のカチオン性脂質を用いて遺伝子導入を行い一過性発現と安定発現の効率を検討した。さらに、筋細胞増殖・分化のどの段階でカチオン性脂質遺伝子複合体が効率よく取り込まれるかを明らかにし、*in vivo*への応用として塩酸プロピカインにより、壊死再生を惹起した<sup>2)</sup>ラットひらめ筋への遺伝子導入を行った。

## 対象および方法

### 1. 一過性発現系および安定発現系における遺伝子導入の効率

lacZ 遺伝子, CAT 遺伝子をレポーターとしてリン酸カルシウム法, 5種類のカチオン性脂質を用いてマウス筋細胞系のC2細胞およびマウス線維芽細胞系の10T1/2細胞に導入し一過性発現の効率を比較した。導入効率は $\beta$ -galactosidase 染色および活性, CAT 活性を測定することにより比較検討した。細胞毒性については細胞抽出液の蛋白濃度を測定し検討した。

安定発現の検討のためにはneo 耐性遺伝子を用いG418存在下に3週間培養した。さらに、サザンブロット法により、導入遺伝子の核内存在様式を検討した。

### 2. 筋細胞の増殖・分化と遺伝子導入効率の検討

培養骨格筋細胞株であるC2/4細胞について増殖あるいは分化を誘導し、その各段階で、DOGSを用いて

paSRNlacZ, pCAGGSlacZ 遺伝子の導入を行い、 $\beta$ -galactosidase 活性を測定した。

### 3. *in vivo* 実験における遺伝子導入の効率

ウイスターラット(8週齢, 雄)の右ひらめ筋に0.5%塩酸プロピカインを0.2ml注射した2日後, 5日後, あるいは前処置なしにDOGSと混合したpaSRNlacZ 遺伝子10 $\mu$ gを注射した<sup>2)</sup>。対側は25% sucrose 前処置15分後に, paSRNlacZ 遺伝子100 $\mu$ gを直接注射した。遺伝子導入7日目にラットを屠殺し, ひらめ筋を取り出し, 凍結後, クリオスタットで薄切し, 固定,  $\beta$ -galactosidase 染色, HE 染色を行い,  $\beta$ -galactosidase 陽性筋線維数を算定した。

## 結 果

### 1. 一過性発現系および安定発現系における遺伝子導入効率

一過性発現系においてはカチオン性脂質法はリン酸カルシウム法に比し、有意に導入効率は高く、なかでも polycationic lipid である DOGS および DOSPA は C2 細胞, 10T1/2 細胞とも高値であった (表1)。

polycationic lipid は monocationic lipid と比較し、細胞障害が強かったが、反応時間の短縮により軽減することが可能であった。安定発現系においても DOSPA, DOGS の導入効率は高かった (表2)。一過性発現系では培養骨格筋細胞への遺伝子導入効率は線維芽細胞に比べ、有意に低値であったが、安定発現系では明らかな差は認められなかった。選択された細胞に対し、核内での導入遺伝子の存在様式をサザンブロット法を用いて検討したところ、Neo 遺伝子が染色体に integrate されていることを確認できた。

### 2. 筋細胞の増殖・分化と遺伝子導入効率

カチオン性脂質による遺伝子導入を行った後に分化誘導培地に変換した場合に、最も高い  $\beta$ -galactosidase 活性値が得られ (図1)、しかも、分化誘

\*筑波大学臨床医学系神経内科

\*\*国立精神・神経センター神経研究所

表1 一過性発現系における遺伝子導入効率

The methods of transfection	percent stained cells	
	C2 cells(%)	10T1/2 cells(%)
Calcium phosphate	0.2±0.1	1.4±0.3
Cationic lipids		
monocationic lipids		
DDAB/DOPE	7.2±2.2	9.2±3.2
DOTMA/DOPE	4.7±1.1	6.4±2.0
DOTAP	3.6±0.6	9.4±2.8
polycationic lipids		
DOSPA/DOPE	16.4±0.7	71.9±4.4
DOGS	9.7±3.6	83.0±9.0

表2 安定形質発現系における遺伝子導入効率

	C2 cells(%)	10T1/2 cells(%)
Calcium Phosphate Precipitation	0.02±0.01	0.04±0.03
monocationic lipid		
DOTMA/DOPE	0.14±0.07	0.31±0.14
polycationic lipid		
DOSPA/DOPE	4.20±1.27	4.82±2.25
DOGS	3.20±1.71	3.71±2.99

導後2日目ないし3日目の遺伝子導入では低い導入効率しか得られなかったことから、カチオン性脂質によって遺伝子が導入されるためには、筋芽細胞が増殖中であることが必要と考えた。

### 3. *in vivo*実験における遺伝子導入の効率

筋再生の前処置なしにDOGS/DNA複合体を投与したところ、 $\beta$ -galactosidase陽性筋線維は認められなかった。単核細胞が出現し、筋管細胞形成以前である塩酸ピバカイン処置後2日目の $\beta$ -galactosidase陽性筋線維出現率(表3)は、0.2~6.9%であり、一方、中心核線維が認められる塩酸ピバカイン処置後5日目には $\beta$ -galactosidase陽性筋線維の出現は認められなかった。 $\beta$ -galactosidase陽性の筋線維を見ると、中心核線維、小径線維が多く、DOGS/DNA複合体を投与した場合には再生過程が遅延する傾向が認められた。DOGS/DNA複合体のみの投与により、筋細胞の変性、細胞浸潤を生じていることから、*in vivo*におけるDOGS/DNA複合体の細胞毒性が強いことが考えられた。

### 考 察

lipid/DNA複合体は細胞膜と作用し、endocytosisまたは、細胞膜を不安定化させることにより直接、細胞内に取り込まれる<sup>3)</sup>。したがって、骨格筋細胞系のC2細胞と線維芽細胞系の10T1/2細胞の一過性導入効率の

表3 *in vivo* 遺伝子導入における $\beta$ -galactosidase陽性筋線維出現率

	塩酸ピバカイン処置 2日, 6日後 DOGS/DNA複合体筋注	対側コントロール 25% sucrose 処置15分後 Plasmid DNA 筋注
2日目の導入	2.0 (0.13-6.9)	1.7 (0.3-3.9)
6日目の導入	0	0.5 (0.3-0.6)
DOGS/DNA複合体 前処置なしの導入		0.2 (0.1-0.3)

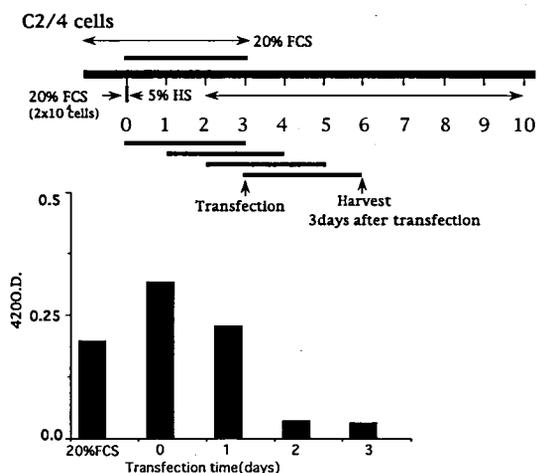


図1 筋細胞の増殖・分化の各段階での $\beta$ -galactosidase遺伝子の発現

差の原因としては、lipid/DNA複合体と細胞膜の相互作用、endocytosis能、endosomeから細胞質への移行、細胞分裂能等の相違が考えられる。培養細胞では、倍化時間(C2細胞: 16.2時間, 10T1/2細胞: 16.5時間)には差はなく、細胞外多糖類の有無、endocytosis能などの差であると推測される。一方、安定形質発現系では骨格筋細胞と線維芽細胞との差は認められず、遺伝子が核内で染色体へ取り込まれる効率には差がないことが予想された。

細胞質から核内への導入遺伝子の移行のメカニズムはまだ解明されていない。Endocytosisで取り込まれた場合にはendosome内にとどまれば遺伝子は消化されてしまうので、endosome膜の破壊により、細胞質内へ遺伝子が移行することが重要であり、細胞質の遺伝子が核内へ移行するには、細胞分裂による核膜の消失が必要と考えられている<sup>3)</sup>。今回の実験で、骨格筋細胞へのカチオン性脂質による遺伝子導入には、細胞が増殖中であることが必要であったことは、このこと

を支持するものであり、これまでの報告と一致する<sup>4)5)</sup>。*in vivo*実験においては、筋の壊死・再生系を用いて、DOGS/DNA複合体を投与したが、単核の筋芽細胞が増殖している時期に導入した場合にのみ $\beta$ -galactosidase陽性細胞が出現し、培養細胞で得られた事実と一致していた。しかしその効率は低く、しかもばらつきが大きく、対側で実施した10倍量のDNAの直接導入と変わらなかった。しかも、DOGS/DNA複合体の投与により強い細胞障害性が観察されたことから、カチオン性脂質(少なくともDOGS)をけっ歯類に対する*in vivo*遺伝子導入に応用することは困難と考えられた。

今後は、monocationic lipidのような遺伝子導入効率は低くても細胞毒性の低い安全なカチオン性脂質の開発が望まれる。また、カチオン性脂質を用いた骨格筋に対する遺伝子導入法が霊長類においてどのような効率を示すのかが注目される。

#### 参考文献

- 1) Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP, et al: Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. Proc Natl Acad Sci USA 86: 6982-6986, 1989.
- 2) Saito Y and Nonaka I: Initiation of satellite cell replication in bupivacaine-induced myonecrosis. Acta Neuropathol 88: 252-257, 1994.
- 3) Zhou X and Huang L: DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. Biochim Biophys. Acta 1189: 195-203, 1994.
- 4) Trivedi RA and Dickson G: Liposome-mediated gene transfer into normal and dystrophin-deficient mouse myoblasts. J Neurochem 64: 2230-2238, 1995.
- 5) Kojima H, Ohishi N, Takamori M, et al: Cationic multilamellar liposome-mediated gene transfer into primary myoblasts. Biocem Biophys Res Commun 207: 8-12, 1995.

# 58) ラット骨格筋における遺伝子直接導入法による ポリカチオン、ポリアニオンの影響に関する研究

高 守 正 治\*

研究協力者 土 井 建 朗\* 小 島 久 典\*

## 目 的

1990年, Wolffら<sup>1)</sup>はプラスミドDNAを単独でマウス骨格筋に注射すると, プラスミドDNA上の遺伝子とその骨格筋で発現することを報告した. この現象は, 遺伝子直接導入法と名付けられ新たな遺伝子導入法として, 主としてワクチンとしての利用を目的とする研究が進められた. また, この技術を応用して, 遺伝性筋疾患の遺伝子治療の可能性が検討されてきた<sup>2)</sup>. この間, 精製されたDNAの, 生体中の骨格筋細胞への取り込み機序解明の努力が続けられているが, 未だ不明のままである<sup>3)</sup>.

上記の疑問に対し, 本研究では, 精製されたDNAが陰性荷電をもつ巨大分子である点に注目して, 同様に陰性荷電の巨大分子であるグリコサミノグリカンが, 遺伝子直接導入において導入効率に影響を与えるのか否かを中心に, DNA溶液に骨格筋細胞基底膜機能を修飾する可能性のある物質を加え, その影響について検討した.

## 対象および方法

I. プラスミド構築およびプラスミドDNAの大量調整  
pRc/RSVプラスミド (Invitrogen社, USA) のラウスザルコーマウイルスロングターミナルリピート (Rous sarcoma virus long terminal repeat, RSV-LTR) 由来のプロモーター下流にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 遺伝子, あるいはホタルルシフェラーゼ遺伝子を挿入し, レポーター遺伝子として使用した. pRSV-CATはpRc/RSVのHindIII-NotI領域にpSV0-CAT由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含むHindIII-HpaI断片を挿入し作成した. また, pRSV-lucはPGV-B (東洋インキ, 東京) のBgIII-HindIII領域にpRc/RSVのRSVプロモーターを含むBgIII-HindIII断片を挿入し作成した. 骨格筋への遺伝子導入に使用するDNAは, アルカリ-SDS法にて抽

出後, ポリエチレングリコール (polyethyleneglycol, Sigma) にて精製したものを使用した.

## II. プラスミドDNAの骨格筋内注入

生後2週齢のウイスターラット (平均体重23g) を水中で活動性を低下させ, 大腿部に皮膚切開を加え, 大腿四頭筋を露出した. DNA溶液の注入は, 脳定位装置に固定した28ゲージ注射針 (ミサワ, 東京) を用いて, 露出された大腿四頭筋を直接穿刺して行なった. 注入時間は30秒間とし, 注入後, 皮膚を縫合した. 注入3日後, ラットを断頭屠殺し, 大腿四頭筋を切除し, これをレポーター遺伝子の発現量の測定に使用した. 注入したDNA溶液は, 種々の濃度で調整したヘパリン (heparin, Sigma), ヘパラン硫酸 (heparan sulfate, Sigma), スラミン (suramin sodium, フナコシ, 東京), デルマタン硫酸 (dermatan sulfate Sigma), ヒアルロン酸 (hyaluronate, Sigma), poly-Lリジン (poly-L-lysine, Sigma), ヒストン (histone, Sigma), トリプシン (trypsin, Sigma), プロテナーゼ K (proteinaseK, 和光純薬), コラゲナーゼ (collagenase, Sigma), ヘパリナーゼ (heparinase, Sigma) の各溶液に, プラスミドDNA 20  $\mu$ g を加え, 100  $\mu$ l の浮遊液 (NaCl 0.9%) とした.

## III. CAT活性, ルシフェラーゼ活性測定

CAT活性はRosenthal<sup>4)</sup>の方法, ルシフェラーゼ活性はWolffら<sup>2)</sup>の方法に準じて測定した.

## 結 果

CATアッセイでは, DNAと静電的に結合することが予想されるポリカチオンのpoly-Lリジン, 高濃度ヒストンをDNA浮遊液に加えて筋注射した場合, トランスフェクション阻害傾向が認められた. ポリアニオンのヘパリンにもトランスフェクション阻害傾向が認められた. 一方ヘパリナーゼには明らかなトランスフェクション阻害傾向は認められなかった. 蛋白分解酵素のトリプシンに非常にはっきりしたトランスフェクション阻害傾向が認められた. カチオニックリピッドのリポフェクチンにも若干のトランスフェクション阻害傾向が認められた (図1).

\*金沢大学医学部神経内科

ヘパリンに阻害作用が認められたため、グリコサミノグリカンに注目し、ヘパリン及びその対照としてヒアルロン酸を選択し、その阻害効果の濃度依存性を検討した。各々10 $\mu$ gから100pgまでの6つの濃度群に分け、DNA浮遊液に加えて筋注した。さらに陽性対

照としてDNA浮遊液を単独で筋注した。ヒアルロン酸には遺伝子導入効率に阻害傾向は認められなかったが、10 $\mu$ gのヘパリン群において、コントロール群と比較して遺伝子導入効率に対する有意の阻害が認められた(図2)。

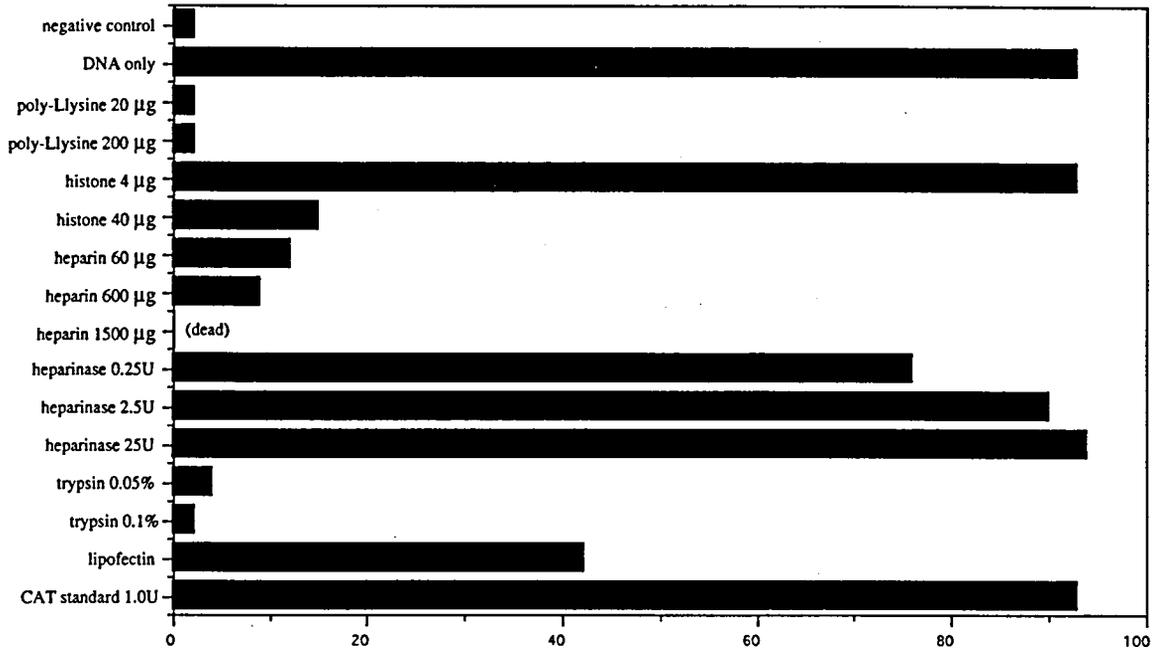


図1 CAT activity (%conversion)

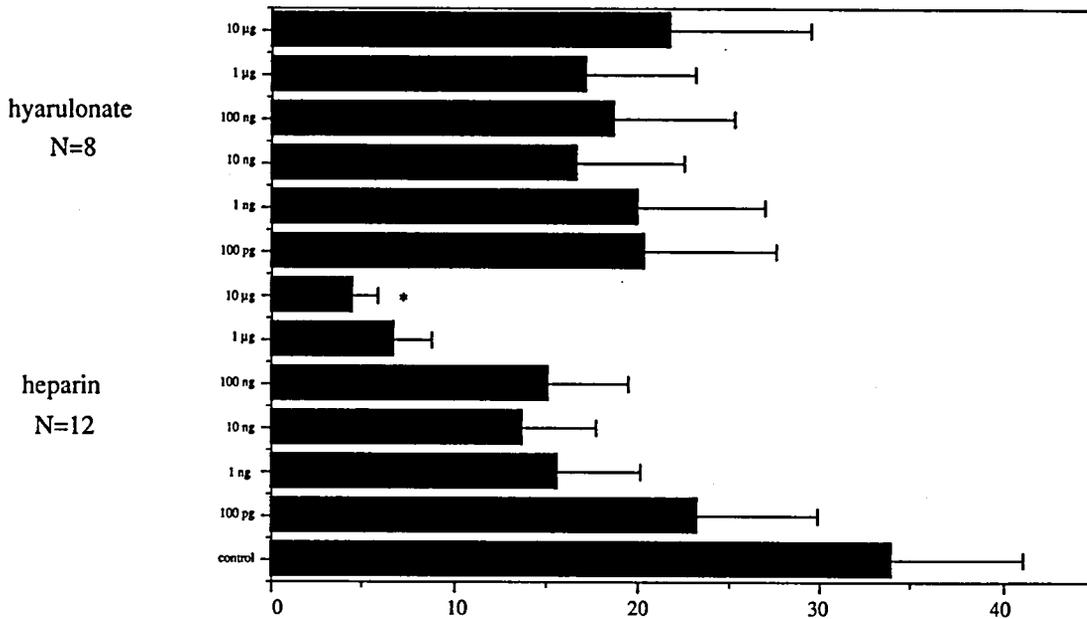


図2 CAT activity (%conversion)

\* $p < 0.01$  compared to control

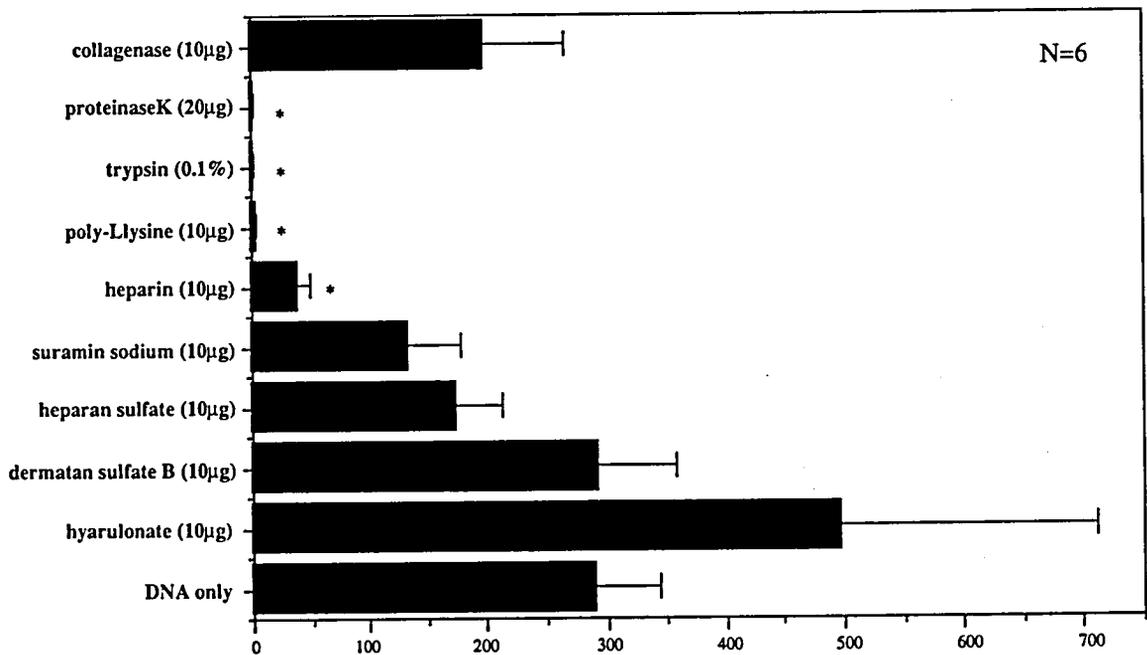


図3 Mean luciferase LU ( $\times 10^3$ )  
\*  $p < 0.01$  compared to DNA only

さらにヘパリン以外のグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸や低分子のヘパリン類似化合物であるスラミンについて pRc/RSV-luc を利用して遺伝子発現量の比較を試みたが、明らかなトランスフェクション阻害は認められなかった。蛋白分解酵素のトリプシン及びDNA分解酵素の混入のないプロテナーゼKに於ても遺伝子導入効率に対する著明な阻害が認められた。コラゲナーゼには明らかなトランスフェクション阻害は認められなかった(図3)。

#### 考 察

遺伝子直接導入法により、骨格筋のDNA取り込み機構に対する阻害因子の研究を行なった。ポリアニオン、ポリカチオン両者にトランスフェクション阻害作用を認めた。トランスフェクションが阻害される理由は明らかではないが、ヘパリンとプラスミドDNAはともにポリアニオニックな巨大分子であり、高濃度のヘパリンがDNAの細胞内取り込みにおいて競合している可能性が考えられた。poly-Lリジン及び高濃度ヒストンで導入が阻害されるのは、そのカチオニックな性状によるDNAとの静電的結合が理由と考えられた。蛋白分解酵素のトリプシン及びDNaseの混入のないプロテナーゼKに強い導入阻害が認められたことより、トランスフェクションの阻害は蛋白分解酵素に混入するDNaseによるDNAの分解がその主因とは考え

られず、筋のDNA取り込みに筋膜、又は細胞外の蛋白質が重要な役割を果たしていることが予想された。以上骨格筋内へのDNA取り込みの機序は明らかとなっていないものの、骨格筋細胞の表面にもポリアニオニックな分子を結合させる機構が存在する可能性が考えられた。

#### 文 献

- 1) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A and Felgner PL: Direct gene transfer into mouse in vivo. *Science* 247, 1465-1468, 1990.
- 2) Wolff JA, Williams P, Acsadi G, Jiao S, Jani A and Chong W: Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques* 11, 474-485, 1991.
- 3) Wolff JA, Dowty ME, Jiao S, Repetto G, Berg RK, Ludtke JJ, Williams P and Slaughterback DB: Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubes and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J Cell Sci* 103, 1249-1259, 1992a.
- 4) Rosenthal N: Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. *Methods Enzymol* 152, 704-720, 1987.

# 59) 筋ジストロフィーにおける接着分子の検討と遺伝子治療の可能性に関する研究

岡田 伸太郎\*

研究協力者 柳原 格\* 乾 幸治\*

## 緒言

我々は昨年までDuchenne型筋ジストロフィーモデルマウス (mdx) に対してヒトジストロフィン遺伝子導入を行いその効果を検討してきた。しかしながらジストロフィンのような巨大遺伝子を効率よく治療レベルまで発現させることは困難であった。そこで筋細胞膜を細胞外マトリックスに結合し線維化を予防できれば、筋ジストロフィーの進行をくい止めることができるのではないかと考え、種々の接着分子に着目それらの発現を抗体染色を用いて検討した。

## 方法

Duchenne型筋ジストロフィー (DMD), 正常コントロール, mdx及びコントロールマウス筋を1) 特異的糖鎖を認識するRCA<sup>1)</sup>, SBA, WGA, ConA, DBAのレクチン染色, セレクチンのリガンドであるs-Le<sup>x</sup>, s-Le<sup>a</sup>抗体染色, 2) 細胞外マトリックスと結合するインテグリンVLA-2, 3, 4, 6, VLA-4のカウンターレセプターVCAM-1<sup>2)</sup>抗体染色, 3) 筋自身の接着因子であるNCAM, N-cadherin抗体染色, 4) ジストロフィン, 43K, 50KDAG抗体染色などを行った。

## 結果

1) レクチン染色の結果ConA, WGAのみが正常筋線維周囲, 及び罹患筋の線維化を起こした部位で陽性であったことから, 筋線維周囲にはAsn型糖鎖(共通構造; Man $\alpha$ 1-6 (Man $\alpha$ 1-3) Man $\beta$ 1-4GlcNAc1-4GlcNAc)を持つことが予想された。一方L, E, P-セレクチンのリガンドであるs-Le<sup>x</sup>, E, P-セレクチンのリガンドであるs-Le<sup>a</sup>は, 筋線維周囲では陰性であり, セレクチンによる糖鎖を介した接着はないと考えられた。2) コラーゲン, ラミニンと結合するVLA-2, フィブロネクチンと結合するVLA-4, そのレセプターであるVCAM-1, ラミニンE8断片と結合するVLA-6はそれぞれ正常筋及びDMD筋線維には陰性であった。ただし, VLA-6は, 血管周囲で特異的に陽

性を示した。3) N-cadherinはコントロール, 罹患筋共ではほぼ陰性, NCAMはDMD再生筋で強い発現を見た。mdx筋で, 中心核を持った筋線維においてNCAMの発現が正常と差を認めなかった。4) ジストロフィン, DAGに関しては報告されている結果と矛盾しなかった。

## 考察

我々は, ジストロフィンやジストロフィン関連蛋白質の欠損している筋線維の一つの治療の方向として筋線維内のアクチンと細胞外マトリックスのラミニンな

表1 レクチン・ルイス抗原染色

	RCA	SBA	DBA	WGA	ConA	sLe <sup>x</sup>	sLe <sup>a</sup>
SPMA	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(-)	(+)
DMD	(-)	(+)	(-)	(+++)	(+++)	(-)	(-)
control							
mouse	(-)	(-)	(-)	(++)	(++)		
mdx	(-)	(+)	(-)	(+++)	(+++)		

表2 インテグリン染色

	VLA-2	VLA-3	VLA-4	VLA-6
SPMA	(-)	(+)	(+)	(+)
DMD	(-)	(+)	(+)	(++)

間質 血管・神経

表3 CAM, cadherin 染色

	NCAM	N-cadherin	VCAM	ICAM
SPMA	(+++)	(+/-)	(+)	(+)
小径筋		間質	小径線維	血管
神経				
DMD	(++)	(+/-)	(-)	(+)
再生筋		間質		血管
myotubular myopathy		(+++)		
		再生筋		
control	(+)			
AchR				

\*大阪大学医学部小児科

どを人為的な蛋白質で架橋させることができると考  
えている。WGA, ConAは、ラミニン、フィブロネク  
チンなどの細胞外マトリックスに豊富に存在するこ  
とが知られており、染色上これらが筋線維周囲には豊富  
に存在していることが判明した。また、調べた範囲内  
では、幼若、小径筋線維では多くの細胞接着分子が膜  
表面に存在していたが、成熟した筋線維には殆ど認め

られなかった。今後これらの因子を利用しながら筋ジ  
ストロフィーの治療に役立てたい。

#### 参 考 文 献

- 1) Voit T, et al: J Neurol Sci 89: 199-211, 1989.
- 2) Rosen GD, et al: Cell 69: 1107-1119, 1992.

# 60) IL-12p40 遺伝子導入による同種筋芽細胞移植拒絶抑制効果

佐藤 猛\*

研究協力者 星 研一\*\* 加藤和則\*\* 下里 修\*\*  
八木田 秀雄\*\* 奥村 康\*\*

## 目 的

筋ジストロフィーに対する治療法の1つとして正常筋芽細胞移植が試みられているが実際には細胞導入効率の低さ、拒絶反応などの問題により長期生着は困難である。

すでにジストロフィン欠損マウスmdxに同系マウスの正常筋芽細胞を移植した場合、抗ジストロフィン抗体の産生、CTLの誘導といった宿主側の免疫反応が認められることが報告されており<sup>1)</sup>、このような免疫反応を抑制することを目的に様々な方法が試みられている。今回我々は移植筋芽細胞拒絶反応の初期に関与する細胞性免疫応答を調節しているサイトカインの一種であるインターロイキン12(IL-12)に着目し、そのアンタゴニストとして働き得るIL-12p40の遺伝子導入を移植筋芽細胞に行いそのアロ生体内での生着延長効果について検討した。

## 材料・方法と結果

C3H/Heマウス由来の筋芽細胞C2/4(国立精神神経センター神経研究所鍋島先生より供与)に、マーカー遺伝子としてlacZ遺伝子をレトロウイルスベクターlacZ/MFGを用いて導入しC2/4βを作製した。さらにIL-12p40/MFG(癌研、濱田、脇本先生より供与)を用いてIL-12p40サブユニット遺伝子を導入しC2/4βp40を樹立した。作製した筋芽細胞のX-gal染色、FACS法でC2/4βとC2/4βp40のみにβ-galactosidase(β-gal)の発現を確認し、さらにC2/4βp40のみがIL-12p40を産生していることをELISA法にて確認した。次にC2/4βp40から産生されるIL-12p40がIL-12依存性のリンパ球増殖を抑制しまたIFN-γの産生を抑制することを確認し、IL-12の活性を抑制していることを*in vivo*で確認した。

次にアロ個体であるC57BL/6マウスの右大腿四頭筋にC2/4βまたはC2/4βp40を $5 \times 10^6$ 乗個注入した。C2/4βp40移植マウスでは血清中の抗β-gal抗体価の減少、特にIgG2a, IgG2b, IgG3の減少を認めた。また

C2/4βp40移植マウスではその脾臓細胞の移植筋芽細胞片に対するIFN-γ産生及びCTL活性が抑制されている事を確認した。

次に1週間後にその凍結組織切片を作製した。図1aはC2/4β移植のX-gal, HE染色の組織像であるが正常筋組織中にβ-gal活性を持つ注入筋芽細胞部がやや黒色に染まり、多数の浸潤細胞を認めた。図1bのC2/4βp40移植では注入筋芽細胞がより濃染し、細胞形態も分化傾向にあった。浸潤細胞に対する免疫組織化学染色を行ない、抗Mφ抗体染色ではC2/4β移植(図2a)と比較してC2/4βp40移植(図2b)でMφ細胞浸潤の減少を認めた。

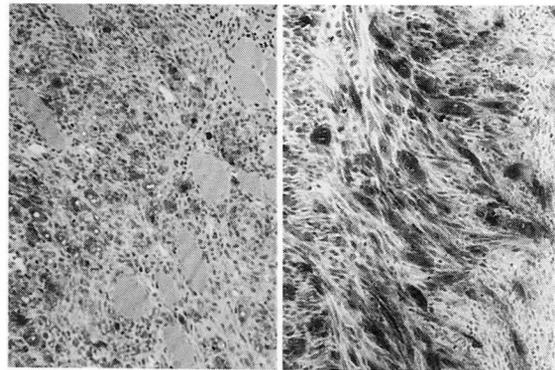


図1 HE+Xgal染色 130倍  
a : C2/4β移植 b : C2/4βIL12p40移植

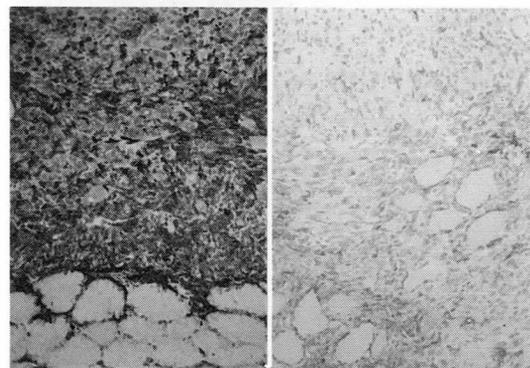


図2 抗Mφ抗体による免疫組織化学染色 130倍  
a : C2/4β移植 b : C2/4βIL12p40移植

\*国立精神神経センター国府台病院神経内科  
\*\*順天堂大学医学部免疫学

次にTh1型反応である delayed-type hypersensitivity に対する IL-12p40 の作用を検討した。C57BL/6 マウスに C2/4  $\beta$  または C2/4  $\beta$  p40 を移植し 10 日後の耳朶に C2/4  $\beta$  を接種し 48 時間後の同部組織を観察した。C2/4  $\beta$  移植後と比較して、C2/4  $\beta$  p40 移植後の耳朶では浮腫が弱かった。浸潤細胞に対する抗 M  $\phi$  抗体による免疫組織化学染色で、C2/4  $\beta$  移植後に比べ C2/4  $\beta$  p40 移植後で M  $\phi$  細胞浸潤の減少を認めた。

### 考 察

抗原を認識した T ヘルパー細胞は特定のサイトカインによって Th1 または Th2 どちらかが優位となり Th1 は IFN- $\gamma$  の産生により主に細胞性免疫を増強し、一方 Th2 は各種インターロイキンの産生や Ig class スイッチにより液性免疫を増強するという Th1/Th2 パラダイムが提唱されている (図 3)。移植細胞片の拒絶は主に細胞性免疫、Th1 型の免疫反応である<sup>2</sup>が、この Th1 反応に誘導するサイトカインとして IL-12 がある。IL-12 は活性化された M  $\phi$ 、単球等から産生される 75kDa の糖蛋白であり 40kDa と 35kDa の 2 つのサブユニットが S-S 結合を介したヘテロダイマー構造をもつ。それぞれのサブユニットに対するレセプターに IL-12 が結合すると、T 細胞、NK 細胞の増殖やその IFN- $\gamma$  の産生を促進し、また NK/LAK 細胞の細胞障害活性を増強することで Th1 タイプの免疫反応すなわち細胞性免疫を引き起こす。in vitro の系では IL-12 のサブユニット IL-12p40 のみを単独にレセプターに結合させると IL-12 自身の結合を競合阻害しその結果として IL-12 に対するアンタゴニストとして作用することが知られている<sup>3)~5)</sup>。本研究から in vivo において IL-12p40 を用いて IL-12 の活性を抑制することにより、より選択的な免疫抑制が可能であると考えられた。

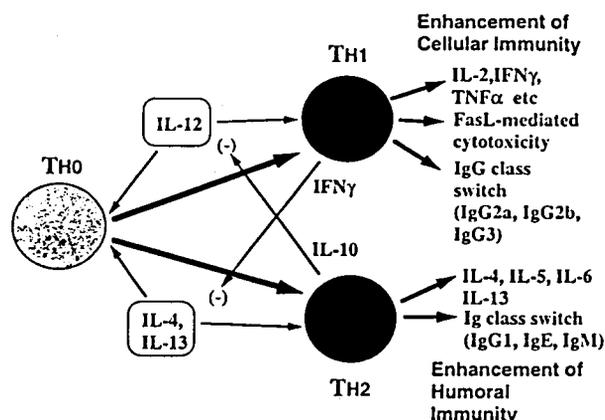


図 3 Th1/Th2 パラダイム

### ま と め

in vitro において、筋芽細胞により産生される IL-12p40 は IL-12 依存的反応に対するアンタゴニストとして働き、in vivo において、IL-12p40 の局所発現は、同種移植片に対する CTL 誘導を阻害し、同種移植片に対する Th1 型の液性免疫反応を抑制した。すなわち IL-12p40 遺伝子導入は同種細胞片移植拒絶反応を抑制する為有効な方法と考えられた。

今後は、IL-12p40 による移植片拒絶抑制がどこまで長期の生着につながるかを既に報告されている他の免疫抑制法すなわち抗接着分子抗体や FK506 などとの併用を含めて検討する予定である。

謝 辞: 本研究にあたり、筋芽細胞 C2/4 を供与して下さいました国立精神神経センター神経研究所鍋島陽一先生、並びに IL-12p40/MFG を供与して下さいました (財) 癌研究所濱田、脇本先生に深謝致します。

### 文 献

- 1) 大塚宜一, 山城雄一郎, 八木田秀雄, 奥村 康: mdx マウスに於ける筋移植の試み—細胞性免疫機序の関与について—. 1994 日本免疫学会総会・学術集会記録. 396. 1994.
- 2) Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW and Strom TB: Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. Curr Opin Immunol 6: 757-764, 1994.
- 3) Mattner F, Fischer S, Guckes S, Jin S, Kaulen H, Schmitt E, Rude E and Germann T: The interleukin-12 sunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. Eur J Immunol 23: 2202-2208, 1993.
- 4) Gillessen S, Carvajal D, Ling P, Podlaski FJ, Stremlo DL, Familletti PC, Gubler U, Presky DH, Stern AS, and Gately MK: Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. Eur J Immunol 25: 200-206, 1995.
- 5) Ling P, Gately MK, Gubler U, Stern AS, Lin P, Hollfelder K, Su C, Pan YE and Hakimi J: Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. J Immunol 154: 116-127, 1995.

# 平成7年度研究班名簿

## 筋ジストロフィー及び類縁疾患の病態との治療法に関する研究

## 平成7年度 高木班 名簿

区分	氏名	所属施設 所在地	所属における地位	連絡の際の電話
主任	高木昭夫	虎の門病院神経内科 〒105 東京都港区虎ノ門2-2-2	部長	03-3588-1111 (内2016)
監事	寺尾寿夫	北東京寿栄園 〒173 東京都板橋区加賀2-1-1	園長	03-3579-0661
幹事	岡田伸太郎	大阪大学医学部小児科 〒565 吹田市山田丘2-2	教授	06-879-5111 (内3930)
〃	小澤高将	名古屋大学医学部第二生化学 〒466 名古屋市昭和区鶴舞町65	教授	052-741-2111 (内2031)
〃	佐藤猛	国立精神・神経センター国府台病院 〒272 市川市国府台1-7-1	院長	0473-72-3501 (内2112)
〃	清水輝夫	帝京大学医学部神経内科 〒173 東京都板橋区加賀2-11-1	教授	03-3964-1211 (内1911)
〃	若山吉弘	昭和大学藤が丘病院神経内科 〒227 横浜市青葉区藤が丘1-30	教授	045-971-1151 (内6269)
運営幹事	荒畑喜一	国立精神・神経センター神経研究所 〒187 小平市小川東町4-1-1	部長	0423-41-2711 (内5111)
班員	内野誠	熊本大学医学部附属病院神経内科 〒860 熊本市本荘1-1-1	教授	096-344-2111 (内5147)
〃	太田成男	日本医科大学老人病研究所生化学部門 〒211 川崎市中原区小杉町1-396	教授	044-733-9267
〃	納光弘	鹿児島大学医学部第三内科 〒890 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1	教授	0992-75-5330
〃	梶龍児	京都大学医学部神経内科 〒606 京都市左京区聖護院川原町54	講師	075-751-3772
〃	川井尚臣	徳島大学医学部第一内科 〒770 徳島市蔵本町3-18	助教授	0886-31-3111 (内3204)
〃	栗原照幸	東邦大学医学部第四内科 〒153 東京都目黒区大橋2-17-6	教授	03-3468-1251 (内2322)
〃	後藤雄一	国立精神・神経センター神経研究所 〒187 小平市小川東町4-1-1	室長	0423-41-2711 (内5214)
〃	小林高義	東京医科歯科大学医学部神経内科 〒113 東京都文京区湯島1-5-45	講師	03-3813-6111 (内3386)
〃	小林卓郎	九州大学医学部神経内科 〒812 福岡市東区馬出3-1-1	教授	092-641-1151 (内2281)
〃	木南英紀	順天堂大学医学部第一生化学 〒113 東京都文京区本郷2-1-1	教授	03-5802-1030
〃	斎藤加代子	東京女子医科大学小児科 〒162 東京都新宿区河田町8-1	助教授	03-3353-8111 (内31230)
〃	斎藤深美子	東京医科歯科大学難治疾患研究所 遺伝疾患研究部門 〒113 東京都文京区湯島1-5-45	助手	03-5803-5821
〃	佐橋功	愛知医科大学第四内科 〒480-11 愛知県愛知郡長久手町岩作雁又21	助教授	0561-62-3311 (内2176)

区 分	氏 名	所 属 施 設 名 地 所 在 地	所属にお ける地位	連絡の際の電話
〃	庄 司 進 一	筑波大学臨床医学系神経内科 〒305 つくば市天王台1-1-1	教 授	0298-53-3192
〃	杉 村 公 也	名古屋大学医療技術短期大学部 作業療法学科 〒461 名古屋市東区大幸南1-1-20	教 授	052-723-1111 (内303)
〃	高 守 正 治	金沢大学医学部神経内科 〒920 金沢市宝町13-1	教 授	0762-62-8151 (内3950)
〃	田 代 邦 雄	北海道大学医学部神経内科 〒060 札幌市北区北14条西5丁目	教 授	011-716-1161 (内6027)
〃	田 邊 等	東京都立神経病院 〒183 府中市武蔵台2-6-1	院 長	0423-23-5110 (内3201)
〃	垂 井 清一郎	国家公務員等共済組合連合会 大手前病院 〒540 大阪市中央区大手前1-5-34	院 長	06-941-0484
〃	辻 省 次	新潟大学脳研究所神経内科 〒951 新潟市旭町通1番町757	教 授	025-223-6161 (内5180)
〃	戸 田 達 史	東京大学医学部人類遺伝学 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	助 手	03-3812-2111 (内3654)
〃	福 原 信 義	国立療養所犀潟病院 〒949-31 新潟県大潟町犀潟468-1	副 院 長	0255-34-3131 (内201)
〃	宝 来 聰	国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門 〒411 三島市谷田1111	助 教 授	0559-81-6797
〃	水 野 美 邦	順天堂大学医学部脳神経内科 〒113 東京都文京区本郷2-1-1	教 授	03-3813-3111 (内3321)
〃	桃 井 真理子	自治医科大学小児科 〒329-04 栃木県南河内町薬師寺3311-1	教 授	0285-44-2111 (内3449)
〃	吉 田 瑞 子	国立精神・神経センター神経研究所 〒187 小平市小川東町4-1-1	室 長	0423-46-1715
〃	池 田 修 一	信州大学医学部附属病院第三内科 〒390 松本市旭3-1-1	講 師	0263-35-4600 (内5324)
顧 問	荒 木 淑 郎	熊本大学 〒860 熊本市本荘1-1-1	名誉教授	096-344-2111
〃	宇尾野 公 義	国立静岡病院 〒420 静岡市城東町24-1	名誉院長	0542-45-0101
〃	豊 倉 康 夫	東京都老人医療センター 〒173 東京都板橋区栄町35-2	名誉院長	03-3964-1131
〃	三 好 和 夫	徳島大学 〒770 徳島市蔵本町3-18	名誉教授	0886-31-3111
事務担当者	光 村 征 子	国立精神・神経センター神経研究所 〒187 小平市小川東町4-1-1		0423-41-2711 (内5119)