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臨床病態と治療法に関する研究

高 木 班

平成８～10年度研究報告書

平成11年３月（１９９９年）

# 総 括 研 究 報 告

主任研究者　高　木　昭　夫

本研究班では，筋ジストロフィーとしてはDuchenne/Becker型(DMD/BMD)，福山型(FCMD)，肢帯型(LGMD)，顔面肩甲上腕型(FSHMD)など，関連疾患としては筋緊張性ジストロフィー(MD)，遠位型ミオパチー，ミトコンドリア脳筋症などと幅広い疾病を対象としてきた．これらの疾病のうち，青年期以前に歩行能力を失う重症の病型はFCMD，DMD/BMD，LGMDなどである．また患者数が多く，医療サイドからのニードでは，MDが問題となる．これらの疾病に重点をおいた．この間の研究において，2-3の重要な病気の原因遺伝子が同定され，大きな前進を見た．またLGMDや先天ミオパチーでも新たに遺伝子異常が発見され，新疾患単位として注目される．治療の分野では，DMDとMELASに関して，緩和的薬物治療が検討された．以下に個々の疾患別に，研究成果と今後の問題を記述する．

1)　DMD/BMD

BMDにおける心筋症ないしX染色体連鎖心筋症の病態が研究された．ジストロフィン遺伝子exon 1近傍の欠失や挿入変異としばしば関係していた．この際骨格筋には，脳型やPurkinje細胞型ジストロフィンが発現するが，心筋ではこれらの発現を認めなかった．骨格筋症状が軽いのは脳型ジストロフィンなどで代償されるためと推定される．mdxマウス筋では，アラキドン酸カスケードに関与するプロスタグランジン合成酵素発現が増加しており，筋壊死への関与が推定された．mdxマウスでは，運動を負荷するとapoptosisの筋核が10倍に増加するといわれる．この現象に関連して，DMD筋では，細胞死抑制蛋白であるBcl-2の減少が証明された．ジストロフィー筋では，αsyntrophinやnNOSの染色性の低下が証明される．前者はジストロフィンC端に，後者はN端に結合すると推定された．これら分子の欠損が病変の進行に如何に関連するかは今後の問題である．脳型ジストロフィンはシナプス後膜に発現し，postsynaptic densityの構造を形成している．DMDではこの構造の欠落があるが，機能との対比は未解決である．

**治療研究**　ジストロフィー筋にはCD8/CD4のTリンパ球の浸潤があり，筋病変の二次的増悪の原因と推定される．すなわちサイトカインを介する炎症惹起，アラキドン酸カスケード誘発，apoptosis誘発などである．臨床的にはDMD患者にコルチコステロイドが投与され，一時的には筋力を維持し，歩行可能期間を延長する事がが証明された．mdxマウスのプレドニンによる実験的治療では，長期に亘り血清CK値は低下し，筋壊死は減少した．ヒトとmdxマウスいずれでも，Tリンパ球の浸潤は減少していた．しかし投与中も病変は進行し，完全に抑制するものではなかった．また臨床的にはコルチコステロイドの副作用の問題があり，この点が解決される必要がある．

遺伝子治療はまだ基礎研究の段階である．mdxマウスで脳へのmini-geneの注入が試験され，シナプス膜での発現が観察された．adenovirus receptor geneの強制発現，各種promoterの検討，vectorの研究が行われた．

2)　LGMD

α-sarcoglycanopathy(LGMD2D)の症例が集積され，その臨床的特徴が明らかにされた．発症年齢は平均7.5(1～23)歳，歩行不能は平均13(8～)歳であり，DMDより多彩である．同一遺伝子異常の症例間にも，症状の変動があり後天的要因の影響が指摘された．本邦にもcalpainopathy(LGMD2A)の症例の存在が判明した．3家系7症例の臨床経過では，発症は10歳頃，歩行不能年齢は平均38歳であった．sarcoglycanopathyに比して，経過はやや緩徐である．筋のNADH-TR染色では，網様構造の乱れや分葉(lobulated)筋線維が見られることが指摘された．calpain 3のウエスターンブロットによる診断法が検討された．LGMDの新病型としては，50歳頃発症の兄妹においてlaminin β1鎖のミスセンス変異によることが判明した．caveolin-3の異常がLGMDの一病型であると既に報告されている．caveolin-3遺伝子異常を有するトランスジェニックマウスが作製され，病態研究に供される．

遠位型筋ジストロフィー(三好型，Miyoshi myopathy)はLGMD2Bと同一遺伝子，2p13に局在するdysferlinの異常によることが明らかとなった．三好型ではC端に変異が集積していた．dysferlinは哺乳類には相同の遺伝子はなく，線虫のfer-1とのみホモロジーを認めた．dysferlinの局在や機能は今後の問題である．

3)　FCMD

病因遺伝子は9q31に局在する未知の遺伝子であることが判明した．コードする53.7kDaの蛋白は"fukutin"と命名された．fukutinの局在と機能は未解決であ

る．発症者は創始者変異としての3kb retropozonの挿入をホモないしヘテロに有しており，mRNAが著減する．複合ヘテロの症例では，より重症となることが注目された．fukutinの抗体作製は未成功であり，局在や機能は今後の問題である．別の研究により，本症では筋細胞外マトリックスの180kDa蛋白が骨格筋，脳，肝臓，腎臓，肺臓などで欠損していた．この蛋白とfukutinとの関係が問題とされている(分子量が異なっている)．本症の骨格筋や中枢神経の超微形態が研究された．骨格筋では基底膜に部分的な断裂が観察される．また形質膜と基底膜間の解離を呈する箇所をみとめた．本症胎児の大脳や小脳には，グリア境界膜ー基底膜複合体に断裂があり，小多脳回の形成の一因と推定されている．大脳では出生後にもこの異常が観察された．本症では細胞外マトリックスに存在するであろう形態形成に関与する重要な因子の異常が推定される．

4) rimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチー(DMRV)

本邦で多く報告される病型である．連鎖解析から遺伝子座は9p13と判明した．ユダヤ系イラン人にみられる遺伝性封入体ミオパチー(HIBM)と同一疾患とされた．遺伝子座はD9S1878~D9S1859の2cMに絞り込まれた．責任遺伝子が追求されている．

5) FSHMD

責任遺伝子は4q35~qterに局在するが，未同定である．本症では同部位における(D4Z4)nの反復配列の短縮を証明する事で，ほぼ100%の遺伝子診断が可能である．10kb以下の短縮では，てんかん，精神遅滞の合併がみられた．

6) 眼咽頭型筋ジストロフィー(OPMD)

原因遺伝子はpoly(A)binding protein 2(PABP2)であり，N端側の(GCG)nリピートのわずかな延長のため発症している．本邦の家系では，対照の6ヶから10ないし11ヶへの反復延長が観察された．本邦の症例はFrench canadianの創始者とは関係しないことが明らかとなった．筋核内にポリアラニン鎖を持つ封入体が出現する．

7) 筋緊張性ジストロフィー

多系統疾患として，骨格筋，心臓，平滑筋，中枢神経，内分泌，免疫系などの多彩な症候を呈するが，myotonin kinase(DMPK)の遺伝子異常がどのように関与しているかは未だに解明されていない．正常者では，DMPK蛋白は筋小胞

体終槽，corbularおよびjunctional SR(心筋)，ER(神経系)に発現した．3'-UTRにおける(CTG)nリピートの病的延長により，mRNAが核内に残存貯留した．また(CTG)nの延長した遺伝子の発現は抑制された．(CTG)nの延長は隣接遺伝子(MDAHP，MDRP，ferritin L chain)の転写を抑制した．このように本疾患の多系統性を隣接遺伝子への影響とする仮説がある．また(CUG)n反復RNA結合蛋白が病態に関与するとも指摘された．

薬物治療として，dehydroepiandrosterone sulfateのミオトニアに対する効果が検討された．in vitroでは，ミオトニアモデルやmdxマウスのミオトニア放電に対して有効であった．ヒト筋緊張性ジストロフィーにおける糖代謝異常にtroglitazoneが有効であった．

8) ミトコンドリア脳筋症

本症における臓器や組織障害とヘテロプラスミー(正常と変異ミトコンドリアの種々の比率での混在)の関係が各種の病型で検討された．MERFFの一剖検例では，各臓器で変異率は約80%前後と共通していた．しかし臓器障害の程度と必ずしも一致しなかった．ミトコンドリアDNAの5178番塩基がAまたはCかにより，ミトコンドリア遺伝子型をA型とC型に分類した．A型にはミトコンドリア脳筋症の発生は少ない．A型に長寿者が多いなど，他の疾病との関連も推定された．

ジクロロ酢酸ナトリウム内服はMELASの一部症状やADLの改善に有効であった．しかし難聴や脳波異常は反応しない．また肝障害や末梢神経障害の副作用が問題となった．本症の遺伝子治療に関して，基礎的検討が続けられている．例えば，病的細胞へのアポトーシスの誘導，変異にのみ対応する制限酵素の導入，tRNAの塩基修飾により正常化する方法などである．

9) その他

先天性ミオパチーの一型において，インテグリンα7の遺伝子変異による欠損症が発見された．筋芽細胞移植治療における拒絶反応抑止を目的として，IL-12p40遺伝子導入やCD80，CD86抗体投与の有効性が示された．筋移植に関して，骨髄にわずかに存在するmuscle precursor cellがクローン化された．triplet repeat病の病態に関して，アフリカツメガエル卵核に遺伝子を注入する研究方法が開発された．顔面肩甲上腕型や筋緊張性ジストロフィーに関して，FISH法やRNA in situ hybridization法が臨床応用された．近赤外分光法酸素モニターにより，疾病筋のエネルギー代謝が分析された．

10) 今後の問題

研究報告数から見ても，DMD/BMDの治療への関心が高まってきている．遺伝子治療が最終目標であるにしろ，より安全な緩和治療の研究を推進すべきと考える．症例数の多さから見て，筋緊張性ジストロフィーの研究は重要であろう．病態の解明とともに，どの症状を治療上のターゲットにするかの選択が必要である．分子遺伝学の分野では，顔面肩甲上腕型ジストロフィーや遠位型ミオパチーの原因遺伝子の同定が火急のテーマとなっている．更に新発見蛋白，DMPK，fukutin，dysferlinの機能や局在が解明されねばならない．

# 目　　次

## Ⅰ．ジストロフィン異常症

1) メチレーション特異的PCRによるDMD,BMD保因者のX染色体不活化の検討 …… 19
国立精神・神経センター神経研究所　加　茂　　功

2) 筋ジストロフィー患者生検筋における免疫組織学的検討
ージストロフィンおよびその関連蛋白の局在とホルマリン固定パラフィン包埋標本でのジストロフィン染色の検討ー …… 22
筑波大学臨床医学系神経内科　庄　司　進　一

3) X連鎖拡張型心筋症(X-linked dilated cardiomyopathy)における分子生物学的研究 …… 26
信州大学医学部第三内科　吉　田　邦　広

4) ジストロフィン異常症におけるプロスタグランジンD合成酵素の発現 …… 30
大阪大学医学部小児科　谷　池　雅　子

5) ジストロフィン遺伝子exon 52ノックアウトマウス骨格筋細胞膜微細構造の解析
ーmdxマウスとの比較研究ー …… 33
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

6) Computerized wheelを用いたmdxマウスのphenotype解析 …… 38
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

7) mdxマウスの血液中のK,Ca,とNaのイオン濃度とそれらに対するNaClの効果 …… 40
国立精神・神経センター神経研究所　吉　田　瑞　子

8) dy/dyマウス骨格筋細胞膜微細構造の解析　ーmdxマウスとの比較検討ー …… 43
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

9) αDystroglycanの糖鎖構造とその機能的役割の解明 …… 44
東京都老人総合研究所　遠　藤　玉　夫

## Ⅱ．肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)

10) 肢帯型筋ジストロフィーにおけるカルパイン3遺伝子変異の検討 …… 49
国立精神・神経センター神経研究所　後　藤　雄　一

11) Calpain 3の遺伝子異常が認められた常染色体劣性肢帯型筋ジストロフィー(LGMD2A)の4家系9症例の臨床，筋病理，遺伝子異常ならびに骨格筋におけるcalpainの発現 …… 52
高松市民病院内科　川　井　尚　臣

12) 筋ジストロフィー生検筋におけるカルパインの免疫組織化学的観察
およびウエスタンブロット解析 …… 56
愛知医科大学第四内科　佐　橋　　功

13) Sarcoglycanopathyにおける遺伝子異常と各sarcoglycan欠損様式の
関連についての研究 …… 60
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

14) α-Sarcoglycanopathyの遺伝子異常と臨床的heterogeneity …… 63
徳島大学医学部第1内科　川　井　尚　臣

15) 免疫多重染色によるα-, β-, γ-, δ-sarcoglycanの超微局在と相互関係の検討 …… 67
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

16) 成人発症の肢帯型筋ジストロフィーにおける臨床的，筋病理学的，
分子生物学的検討 …… 71
信州大学医学部第三内科　吉　田　邦　広

17) 関節拘縮を伴う常染色体優性遺伝型の肢帯型筋ジストロフィー日本人家系の
臨床と遺伝子解析 …… 75
九州大学医学部脳神経病研究施設内科部門　吉　良　潤　一

18) Caveolin-3遺伝子変異トランスジェニックマウスの作製 …… 77
帝京大学医学部神経内科　清　水　輝　夫

## Ⅲ. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)

19) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの分子遺伝学的研究 …… 81
国立精神・神経センター神経研究所　荒　畑　喜　一

20) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)における染色体再構成に関する
分子細胞遺伝学的研究 …… 85
東京医科歯科大学難治療疾患研究所　斎　藤　深美子

21) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーにおける細胞増殖因子の免疫組織化学的研究 …… 87
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

## Ⅳ. 福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)

22) 福山型先天性筋ジストロフィー原因遺伝子単離と機能解析に関する研究 …… 93
東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター　戸　田　達　史

23) 福山型筋ジストロフィーの臨床的重症度の分子レベルの解析 …… 95
東京女子医科大学小児科　斎　藤　加代子

24) 福山型先天性筋ジストロフィーにおける180kDa蛋白(p180)の欠損 …… 98
帝京大学医学部神経内科　清　水　輝　夫

25) 福山型筋ジストロフィー(FCMD)骨格筋におけるlaminin α2 chainの検討 …… 101
東京女子医科大学小児科　斎　藤　加代子

26) 福山型先天性筋ジストロフィーにおける筋細胞表面の変化.
共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡による観察 …… 104
東京都立神経病院神経内科　松　原　四　郎

27) 福山型先天性筋ジストロフィーの小多脳回
ー特にglia limitans-基底膜複合体病変との関連についてー …… 107
自治医科大学神経内科　中　野　今　治

28) 遺伝子診断が行なわれた福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)胎児(14週)の
病理学的検索　ー胎児脳に基底膜欠損は存在するかー …… 112
東京女子医科大学小児科　斎　藤　加代子

29) 福山型筋ジストロフィー剖検脳ガングリオシドの分析 …… 115
国立精神・神経センター国府台病院神経内科　吉　野　　英

## V．ミオパチー(遠位型，インテグクンα7欠損型，その他)

30) 三好遠位型ミオパチー(筋ジストロフィー)原因遺伝子(dysferlin)の同定 …… 119
国立精神・神経センター神経研究所　荒　畑　喜　一

31) 三好遠位型筋ジストロフィー2家系の臨床的，遺伝学的検討 …… 120
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

32) Rimmed vacuole型遠位型ミオパチーの遺伝子解析 …… 124
新潟大学脳研究所神経内科　田　中　恵　子

33) Rimmed-vacuole型遠位型ミオパチーの遺伝子解析 …… 126
金沢大学医学部神経内科　高　守　正　治

34) 多数のRimmed vacuoleを伴う筋病理像を示す疾患群に関する研究
ー臨床的，免疫組織学，遺伝学的検討ー …… 129
北海道大学医学部附属病院神経内科　田　代　邦　雄

35) Micro- and macro-vacuolar myopathy (a dystrophic disorder ?) :
ーとくにmyopathy with tubular aggregatesとsarcotubular myopathyとの
異同に関してー …… 133
愛知医科大学第四内科 佐 橋 功

36) Tubulomembranous myopathyのその後に関する研究 …… 137
国立療養所犀潟病院神経内科 福 原 信 義

37) 成人発症ネマリンミオパチーの筋病理学的検討 …… 139
横浜市立大学医学部神経内科 鈴 木 ゆ め

38) インテグリンα7欠損型先天性ミオパチー …… 142
国立精神・神経センター神経研究所 荒 畑 喜 一

## Ⅵ. 眼咽頭筋ジストロフィー（OPMD）

39) 眼咽頭筋ジストロフィーの表現型/遺伝子型とorigin …… 147
熊本大学医学部附属病院神経内科 内 野 誠

40) 眼咽頭型筋萎縮症14例の臨床病理学的検討 …… 150
東京都立神経病院神経内科 松 原 四 郎

## Ⅶ. 筋強直性ジストロフィー(DM)

41) ミオトニンキナーゼの生理機能に関する研究 …… 155
東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系 石 浦 章 一

42) 筋強直性ジストロフィーの分子病態発症機構に関する研究 …… 157
東京医科歯科大学医学部神経内科 小 林 高 義

43) Myotonin protein kinaseの3'非翻訳領域に存在する
CTGリピートの遺伝子発現に及ぼす影響 …… 158
九州大学医学部脳神経病研究施設神経内科部門 吉 良 潤 一

44) Myotonic dystrophyにおけるCTG repeatの周辺遺伝子発現に与える効果の検討 …… 161
名古屋大学医学部神経内科 永 松 正 明

45) 筋強直性ジストロフィー線維芽細胞，体細胞分裂におけるDMPK蛋白量
及び(CTG)nリピート数の変化 …… 162
東京医科歯科大学医学部神経内科 小 林 高 義

46) 筋緊張性ジストロフィー(DM)におけるDMPK転写産物の
細胞内動態に関する分子細胞遺伝学的研究 …… 164
東京医科歯科大学難治療疾患研究所　斎　藤　深美子

47) 筋緊張性ジストロフィーにおけるフェリチン遺伝子
および関連遺伝子の発現について …… 166
虎の門病院神経内科　中　瀬　浩　史

48) 筋緊張性ジストロフィーの骨格筋および培養皮膚線維芽細胞における糖鎖異常 …… 169
名古屋大学医学部神経内科　祖父江　　元

49) アフリカツメガエル卵に導入したCTGおよび
CAGリピート含有ルシフェラーゼ遺伝子の発現 …… 172
東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻　塩　川　光一郎

## Ⅷ. ミトコンドリア異常症

50) ミトコンドリアDNA多型からみた日本人およびアジア諸集団の遺伝的関係 …… 177
総合研究大学院大学先導科学研究　宝　来　　聰

51) ミトコンドリア脳筋症とミトコンドリア遺伝子型 …… 179
岐阜国際バイオ研究所遺伝子治療研究部　田　中　雅　嗣

52) こはく酸脱水素酵素欠損症の臨床病理学的，分子遺伝学的検討 …… 180
国立精神・神経センター神経研究所　後　藤　雄　一

53) ミトコンドリアDNA欠失症のミトコンドリアDNA異常の解析，
Dual-color FISH法による病態解析に関する研究 …… 183
大阪大学医学部小児科　岡　田　伸太郎

54) MELAS患者の卵巣のmtDNA分析 …… 185
国立療養所犀潟病院神経内科　福　原　信　義

55) 家族性ビタミンB1欠乏，心筋症，ミトコンドリアDNA 3243-to-G変異を示す
ミトコンドリアミオパチー例の長期経過観察 …… 187
鹿児島大学医学部第三内科　納　　光　弘

56) ミトコンドリア血小板電子伝達系酵素活性との関連の検討 …… 190
東京女子医科大学小児科　斎　藤　加代子

57) ミトコンドリアDNA欠失疾患の培養細胞における遺伝子の動的変化 …… 192
自治医科大学小児科　桃　井　真里子

58) ミトコンドリア病とアポトーシス …… 194
岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部　田　中　雅　嗣

59) 多重欠失を示す家族性CPEOの2症例に認められた
末梢神経内の血管病変：電顕的観察 …… 195
国立精神・神経センター国府台病院神経内科　吉　野　　英

60) 神経・筋疾患における長寿に関するミトコンドリア遺伝子型に関する検討 …… 197
愛知医科大学第四内科　佐　橋　　功

61) 長寿に伴うミトコンドリア遺伝子型 …… 200
岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部　田　中　雅　嗣

## IX. 筋の発生・分化・再生，その他

62) Triad蛋白の筋発達に伴う発現，局在，機能 …… 205
東京医科歯科大学医学部神経内科　小　林　高　義

63) アンキリピートを持つ新規可溶性タンパク質V-1の骨格筋細胞における発現 …… 209
東京医科歯科大学医学部神経内科　小　林　高　義

64) ヒト骨格筋－ラット脊髄併置培養下におけるAChR subunitの
神経支配による発現調節 …… 212
東京医科歯科大学医学部神経内科　小　林　高　義

65) ラット骨髄からの筋様細胞のクローン化 …… 214
国立精神・神経センター神経研究所　加　茂　　功

66) ラット骨髄筋再生過程におけるdystrophin, α sarcoglycan, α1 syntrophin,
nNOSの免疫組織化学的検討 …… 216
筑波大学臨床医学系神経内科　庄　司　進　一

67) 筋ジストロフィーを中心とした生検筋におけるBcl-2 familyの免疫染色 …… 220
愛知医科大学第四内科　佐　橋　　功

68) キマーゼを指標とした病的筋における肥満細胞の局在と臨床的意義 …… 223
愛知医科大学第四内科　佐　橋　　功

69) 多発性筋炎の生検筋におけるTNFα発現 －in situ hybridizationによる検討－ …… 228
名古屋大学医学部神経内科　永　松　正　明

70) 多発性筋炎におけるMHC classⅡ分子の発現に関する研究 …… 230
名古屋大学医学部神経内科　祖父江　元

71) McArdle病における虚血運動時の血管収縮物質の動態 …… 232
大阪大学医学部保健学科生体情報学　依　藤　史　郎

72) 筋疾患における近赤外分光法酸素モニターの臨床的有用性の検討 …… 234
大阪大学医学部保健学科生体情報学　依　藤　史　郎

73) リソソーム蛋白分解系と筋萎縮：神経性セロイド様リポフスチン蓄積症における解析から …… 237
順天堂大学医学部生化学第一　木　南　英　紀

X．緩和的薬物治療および遺伝子治療

74) mdxマウスの血清creatine kinaseと筋組織に対するprednisolone長期投与の効果 …… 241
虎の門病院神経内科　髙　木　昭　夫

75) 培養筋細胞におけるジストロフィンの発現とステロイドの影響 …… 242
東京都立神経病院神経内科　松　原　四　郎

76) Double-mutant mdxマウスの病態生理と治療に関する研究 …… 244
東邦大学医学部第四内科　栗　原　照　幸

77) 筋ジストロフィー患者に対するダントロレンナトリウムの治療効果 …… 247
京都大学医学部神経内科　梶　龍　兒

78) 皮膚線維芽細胞を用いたDuchenne型筋ジストロフィーの遺伝子治療に向けた基礎的研究 …… 250
東京医科歯科大学医学部神経内科　小　林　高　義

79) Muscle specific promoter活性の定量的解析 …… 251
昭和大学藤が丘病院神経内科　若　山　吉　弘

80) アデノウイルスベクターを用いたアデノウイルスレセプター遺伝子導入による繰り返し遺伝子導入の試み …… 253
熊本大学医学部附属病院神経内科　内　野　誠

81) アデノウイルスベクターを用いたminidystrophin gene導入によるジストロフィンの中枢神経系での機能解析の試み …… 256
熊本大学医学部附属病院神経内科　内　野　誠

82) ジストロフィン遺伝子導入：多コピー発現ベクターと長期発現ベクターの
mdxマウスへの応用に関する研究 …… 258
大阪大学医学部小児科　岡　田　伸太郎

83) IL-12p40遺伝子導入と抗CD80，抗CD86抗体投与による
同種筋芽細胞移植拒絶の抑制に関する研究 …… 260
国立精神・神経センター国府台病院神経内科　吉　野　　英

84) 筋緊張性ジストロフィーの耐糖能異常に対するtroglitazoneによる治療 …… 262
高松市民病院内科　川　井　尚　臣

85) ミトコンドリア異常症におけるジクロロ酢酸ナトリウム治療 …… 265
自治医科大学小児科　桃　井　真里子

86) ミトコンドリア病変異遺伝子の選択的破壊による遺伝子治療の基礎開発 …… 266
岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部　田　中　雅　嗣

87) ミトコンドリア脳筋症の発症機序と治療に関する分子生物学的研究 …… 268
日本医科大学老人病研究所生化学部門　太　田　成　男

Summary …… 273

平成8年度～10年度研究班名簿 …… 277

# Ⅰ．ジストロフィン異常症

# メチレーション特異的PCRによるDMD,BMD保因者のX染色体不活化の検討

加茂　功*

研究協力者　小林　治**　後藤雄一**　埜中征哉*
久保田健夫***　福嶋義光***

## はじめに

X連鎖性劣性遺伝疾患で女性保因者が発病する機序として，X染色体の不活化の偏りが関与していると考えられている．不活化されているX染色体上では，各遺伝子のプロモーター領域や5'側に存在するCpG island内のシトシンが5-メチルシトシンになることでその発現が抑制されている．これまでDMD[1]，伴性遺伝性免疫不全症[2]，ミオチュブラーミオパチー[3]，血友病A[4),5)]等のX連鎖性劣性遺伝疾患に対して，メチル化感受性制限酵素によるX染色体の不活化の研究がなされている[6]．しかし，この方法では制限酵素の不完全消化や，スター活性，アレルのサイズの小さい方がより多く増幅されるというようにいくつかの問題がある．Herman[7]が報告したメチレーション特異的PCR(MPCR)を研究協力者の久保田がX染色体に応用することに成功した[8]．我々はDMDならびにBMD保因者でのX染色体の不活化をMPCRを用いて検討し，新しい知見を得たので報告する．

## 対　象

国立精神・神経センター神経研究所のバンクに保存されているDMD保因者ならびにBMD保因者のDNA検体を対象とした．DMD保因者(54例)では血液より23検体，筋肉より32検体，BMD保因者(8例)では血液より6検体，筋肉より4検体のDNAを分離し使用した．重複した計3人については血液と筋肉両方について調べた．診断に際しては，臨床所見，家族歴，筋病理所見，免疫組織学的所見，ウエスタンブロット，半定量PCRによるジストロフィン遺伝子検査を施行した．また血液検体例ではout of frame欠失を持つDMD保因者とin frame欠失を持つBMD保因者のみを対象とした．

## 原理ならびに方法

Sodium bisulfiteで一本鎖DNAを処理するとシトシンはウラシル硫酸となり[9]，さらに水酸化ナトリウムを加えることでウラシルに変わる(図1)．一方sodium bisulfiteはメチル化シトシンは変化させない．したがって，元々の配列は，sodium bisulfite処理後に適切なプライマーを用いたPCRを行うことでシトシンのメチル化の有無により変化する(図2)．X染色体上のアンドロゲン受容体(HUMARA)のプロモーター領域にはCpG islandに挟まれた非常に多型性に富んだshort tandem repeats(STR)があり，このSTRは90%のアレルで区別可能である(図3)．このCpG islandは不活性X染色体ではメチル化され，活性X染色体では非メチル化されている．よって，この領域をターゲットに

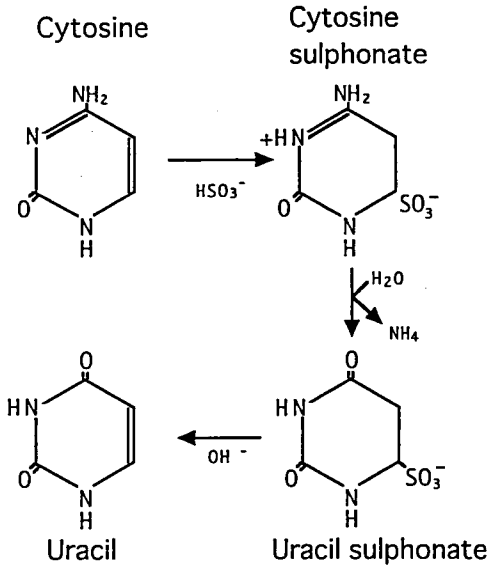



図1　Bisulfite treatment. Sodium bisulfite (NaHSO4/Na2S2O5)はアルカリ変性したDNAのシトシンをシトシン硫酸をへてウラシル硫酸に化学変化させる．水酸化ナトリウム処理により最終的にはウラシルに変わる．

| Original seuence | | Bisulfite treatment | | after PCR |
|---|---|---|---|---|
| *CCG CAT* | → | UUG UAT | → | *TTG TAT* |
| *C*$^{m}$CG *CCT* | → | U$^{m}$CG UTT | → | *T*CG *T*TT |

図2　遺伝子が不活化してないX染色体ではbisulfite treatmentによりシトシン(C)はウラシル(U)に変わり，それに対するプライマーを使いPCRすることで最終的にはチミン(T)にかわる．不活化X染色体にある5-メチルシトシン(mC)はbisulfite treatmentによっても塩基の変化を受けない．変化する塩基を各々イタリックで表した．

* 国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部
** 国立精神・神経センター神経研究所
*** 信州大学医学部衛生学教室

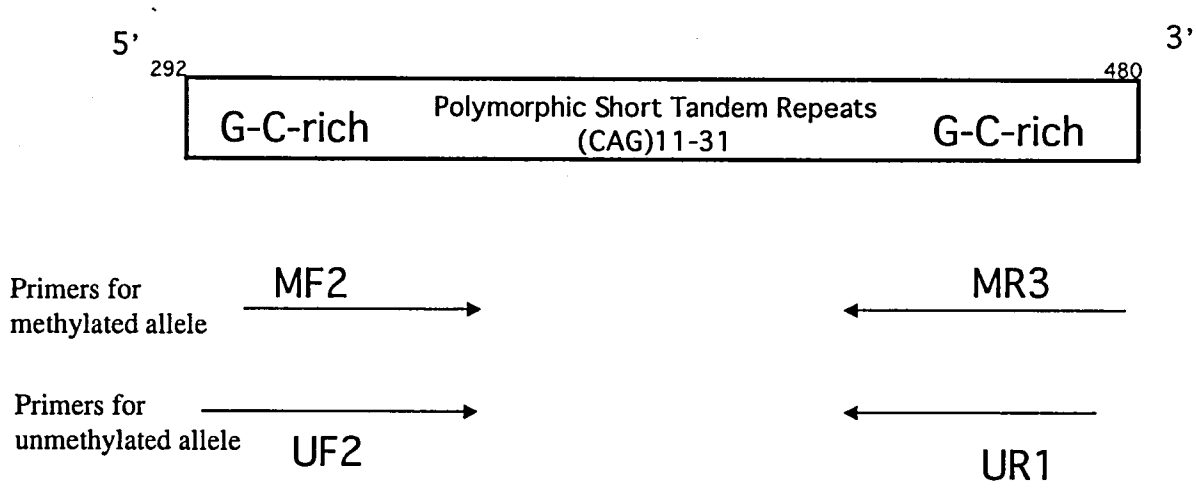



図3 HUMARA遺伝子（Genbank accession number M35844）の構造とエクソン1内に設定したPCRプライマーセット．G-C richな配列に囲まれた多型STRは11個から31個の(CAG)の繰り返し配列から成る．これは90%のアレルで区別可能である．

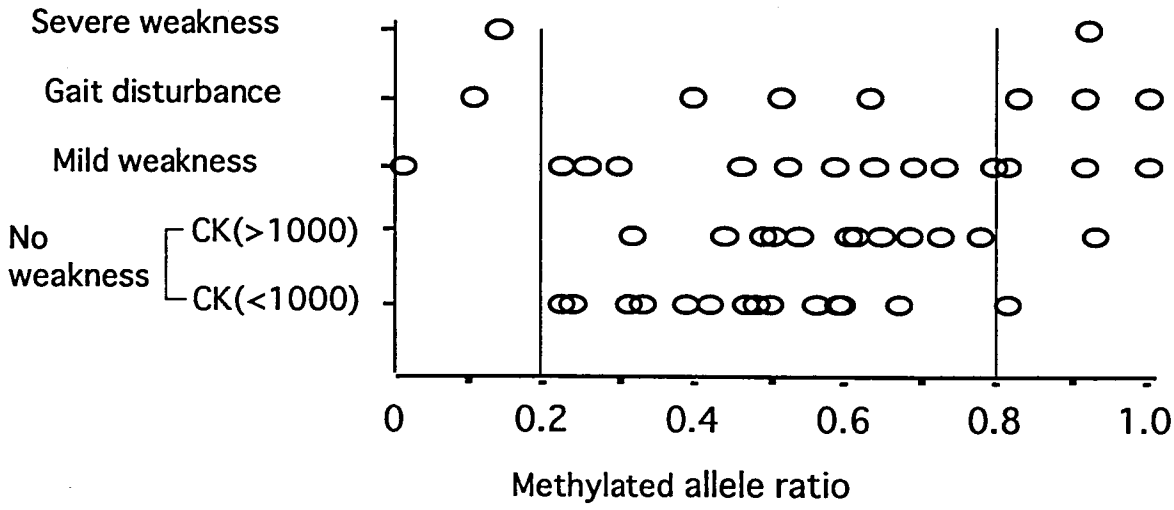



図4 DMD保因者のメチル化アレルの比率．筋症状の重症度を縦軸に表している．メチル化アレルは0.2から0.8がランダムな不活化の範囲である．

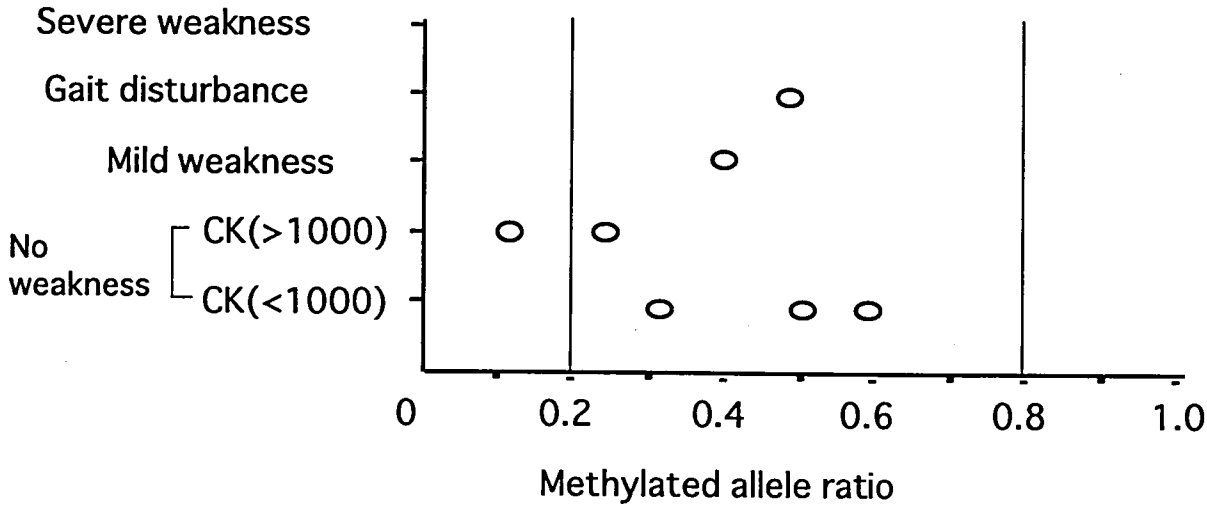



図5 BMD保因者のメチル化アレルの比率.症状を有する保因者は2名であるがいずれもメチル化アレル比は正常範囲にある．

して，活性X由来の変化した非メチル化配列に対するプライマーセットと不活性化X由来の配列に対するメチル化プライマーセットをデザインし各々PCRを行った．このPCR産物をABI310(Perkin-Elmer)を用いて，両アレルを識別し，その生成比率を解析した．

## 結　　果

同一患者で血液と筋肉両方より調べた3例では，いずれもほぼ等しい値をとっていた．DMD保因者54例中51例でアレルの識別可能な異なる長さのPCR産物を得た(図4)．51例のメチル化の比率は，偏りがあるもの(80%以上又は20%以下)12例，偏りのないもの39例であった．偏りのあるものは概して筋力低下を認め症候性であったが，CK値1000 IU/L以下の無症候性ものも1例存在した．偏りのないもののうち13例(33%)は筋力低下を訴え，うち3例は歩行障害を認めた．BMD保因者では8例中1例が同一サイズのアレルを有しており，偏りは不明であった．残る7例は1例の例外を除きランダムにメチル化されており，うち2例は筋力低下を認めた．むしろ不活化の偏りがある例は臨床的には高CK血症(1500IU/L)のみであった(図5)．

## 考　　察

MPCRは制限酵素を用いた従来のメチル化感受性制限酵素法に比べて，1)費用が安く，2)酵素処理に比べて化学処理のため反応効率がよく，3)DNAの純度が低くても可能で，4)同一検体に対しメチル化と非メチルの両方の評価を行えるため信頼性がより高いという利点がある．研究協力者の久保田は同一検体を用いてMPCRとメチル化感受性制限酵素法の結果の関係をみたが，従来法がやや高い値となることを除き，この二つの方法は良く相関していた[8]．従来のX連鎖性劣性遺伝疾患の保因者でのX染色体の不活化を調べた報告1,[3)-5)]によると発症している保因者はX染色体の不活化の偏りを認めている．しかし，我々は23例のDMD症候性保因者で10例は不活化の偏りを認めたが，13例は正常範囲であった．またBMD症候性保因者は2例ともX染色体の不活化は正常範囲であった．我々の結果が Azofeifa[1)]の報告と一致しなかったのは，方法の違いだけでは説明できない．Azofeifa[1)]は11例のジストロフィン異常症について10例は血液より，1例のみ筋肉由来のDNAを用いて検討している．我々は62例のジストロフィン異常症で筋肉より36検体のDNAを抽出し検討している．我々は筋肉と血液のメチレーションの比率の違いについて3例で検討し，ほぼ同一の結果を得たが，少数の検討でありさらに症例を増やせば臓器の違いによりメチル化パターンの差がある可能性もある．筋ジストロフィーは骨格筋を標的臓器とする疾患であり，骨格筋におけるDNAのメチル化パターンの方がより病態を反映していると思われる．また，MPCRは筋肉をすりつぶして行っているため，筋肉組織全体のメチレーションの状態を解析できるが，組織内での分布の偏りは評価できない．異常ジストロフィン遺伝子が活性化されたアレルが筋肉内で均等に存在すると，骨格筋は多数の核が癒合してできた多核体のため，正常ジストロフィン遺伝子が活性化された核で合成された正常ジストロフィンmRNAが異常ジストロフィン遺伝子が活性化された核支配領域まで到達し正常ジストロフィンを合成するため筋症状が顕性化しない．症候性保因者でランダムに不活化されている例では，逆に正常ジストロフィン遺伝子が活性化された核が偏在し，正常ジストロフィンmRNAが異常ジストロフィン遺伝子が活性化された核支配領域まで到達できず，蛋白欠損により筋症状を引き起こすという機序が考えられる．いずれにしても症状のあるDMDならびにBMD保因者の中にランダムなX不活化パターンの者が含まれていることは，これまで支持されていた不活化の偏りだけでは発症のメカニズムを説明できず，それ以外の因子も関与していることを示唆している．

## 文　　献


1) Azofeifa J, et al : X-chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios among first degree female relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes. Hum Genet 96 : 167-76, 1995.

2) Schmucker B, et al : A PCR based X-chromosome inactivation assay for carrier detection in X-linked immunodeficiencies using differential methylation of the androgen receptor gene. Immunodeficiency 5 : 187-92, 1995

3) Dahl N, et al : Myotubular myopathy in a girl with a delation at Xq27-q28 and unbalanced X inactivation assigns the MTMI gene to a 600-kb region. Am J Hum Genet 56 : 1108-15, 1995.

4) Nissen PD, et al : Nonrandom X chromosome DNA methylation patterns in hemophiliac females. J Clin Invest 83 : 1400-3, 1989.

5) Ingerslev J, et al : Female haemophilia A in a family with seeming eXtreme bidirectional lyonization tendency: abnormal premature X-chromosome inactivation? Clin Genet 35 : 41-8, 1989.

6) Allen RC, et al : Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. Am J Hum Genet 51 : 1229-39, 1992.

7) Herman JG, et al : Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 : 9821-6, 1996.

8) Kubota T, et al : A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. Hum Genet. (in press)

9) Susan JC, et al : High sensitivity mapping of methy-lated cytosines. Nucleic Acid Research 22 : 2990-7, 1994.

# 筋ジストロフィー患者生検筋における免疫組織学的検討
# ージストロフィンおよびその関連蛋白の局在とホルマリン固定パラフィン包埋標本でのジストロフィン染色の検討ー

庄 司 進 一*

研究協力者 大 越 教 夫* 渡 邊 雅 彦* 星 野 幸 子*
石 井 亜紀子* 藤 田 恒 夫** 亀 谷 修 平***
武 田 伸 一***

## はじめに

ジストロフィンは筋細胞膜において複数の細胞膜蛋白と結合し．複合体dystrophin-glycoprotein complex(DGC)を形成している．Duchenne型筋ジストロフィー症(DMD)では，これまでジストロフィンの欠損とともにα-サルコグリカン，α1シントロフィンなども連動して脱落することが報告されている．また，神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)も筋細胞膜，主にtype2線維に局在し，DMD症例ではジストロフィン欠損と連動して脱落すること報告されている[1]．Becker型筋ジストロフィー症(BMD)も，ジストロフィン遺伝子の欠失を原因とする臨床的にDMDより軽症な疾患である．DMDはジストロフィン遺伝子のout-of-frame shiftの欠失によりジストロフィン蛋白が欠損するのに対し，BMDではジストロフィン遺伝子のin-frame shiftの欠失により不安定なジストロフィン蛋白が合成される．したがって，筋細胞膜におけるジストロフィンの免疫組織染色性も異なり，一般にBMDでは斑状あるいは淡く染色される．今回の研究の目的は，筋ジストロフィー症，特にBMD患者の生検筋におけるジストロフィンおよびそれに関連するジストロフィン結合蛋白の局在を明らかにすることである．

さらに，われわれはCatalyzed Signal Amplification(CSA)システム(DAKO社)を利用することにより，ホルマリン固定パラフィン包埋標本でのジストロフィン免疫染色が一部可能であることを見出した．これまで筋ジストロフィー患者生検筋におけるホルマリン固定パラフィン包埋標本でのジストロフィン免疫染色は困難で，凍結切片での染色が余儀なくされていた．CSAシステム用いたDMD，BMD，DMD保因者のホルマリン固定パラフィン包埋標本での検討もあわせて報告する．

## 対象と方法

(1)筋ジストロフィー症生検筋におけるジストロフィンおよびその関連蛋白の局在

対象：①Becker型筋ジストロフィー症例1(BMD-1)；20歳男性．5-6歳発症，20歳歩行はかろうじて可能な比較的重症例．ジストロフィン遺伝子はBeggsとChaimberlainのプライマーを用いたPCR法にて，exon 12 - 19の欠失．

②Becker型筋ジストロフィー症例2(BMD-2)；21歳男性．学童期より走るのが遅い程度で，筋力ほぼ正常の歩行可能な軽症例．ジストロフィン遺伝子はexon 49の欠失．

③Duchenne型筋ジストロフィー発症保因者；25歳女性，22歳発症で歩行可能な軽症例．ジストロフィン遺伝子検索は未実施．

方法：上記3例の生検筋凍結切片を用い，一次抗体としてモノクローナル抗ジストロフィン抗体(DYS1,DYS2,DYS3: Novocastra社)，ポリクローナル抗α1シントロフィン抗体(共著者 武田，亀谷作製)，ポリクローナル抗nNOS抗体(ALEXIS社)，モノクローナル抗αサルコグリカン抗体(YLEM社)を用いてABC法，DAB染色による免疫組織化学染色を行った．

(2)筋ジストロフィー患者生検筋におけるホルマリン固定パラフィン包埋標本でのジストロフィン染色の検討

対象：Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)6例，Becker型筋ジストロフィー(BMD)5例，Duchenne型筋ジストロフィー発症保因者5例，疾患コントロール5例，正常例2例の生検筋ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた．

方法：上記標本を脱パラフィン後，Target Retrieval solution(DAKO)にて95℃，20分の前処置後，Catalyzed Signal Amplification(CSA)システム(DAKO社)を用いて，モノクローナル抗ジストロフィン抗体(DYS1,DYS2,DYS3)，モノクローナル抗αサルコグリカン抗体の免疫組織化学染色を行った．

* 筑波大学臨床医学系神経内科
** 日立製作所日立総合病院神経内科
*** 国立精神・神経センター神経研究所

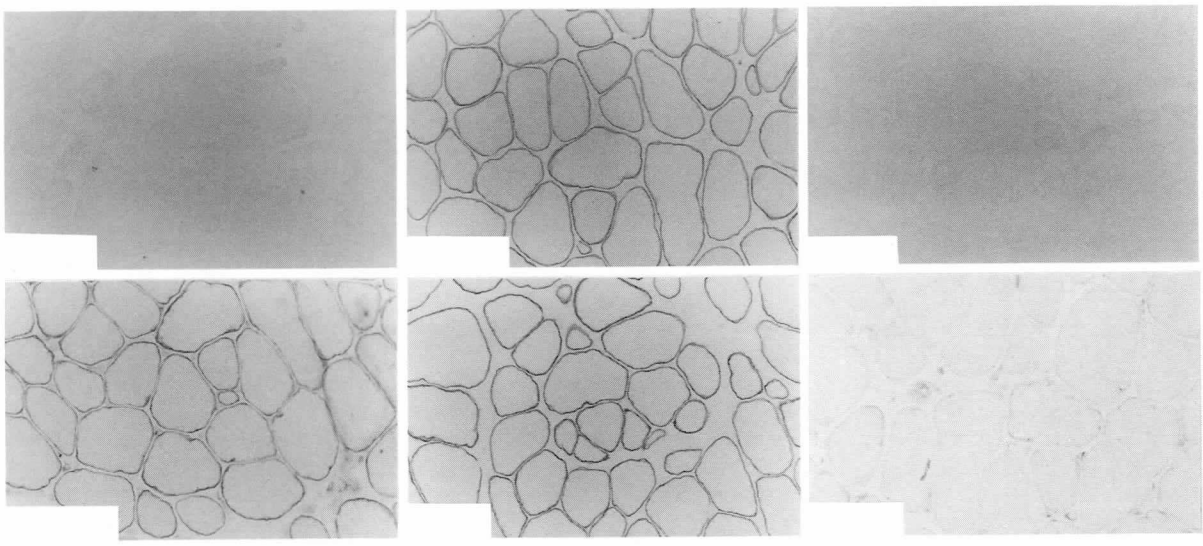


**図1** Becker型筋ジストロフィー症例(BMD-1)生検筋の免疫組織化学染色
DYS1(rod domain),DYS3(N端),nNOSの各抗体の免疫染色では全線維が陰性であり，DYS2(C端), α 1syntrophin( α 1syn), α sarcoglycan( α SG)の各抗体ではほぼ全線維が明瞭に染色された.

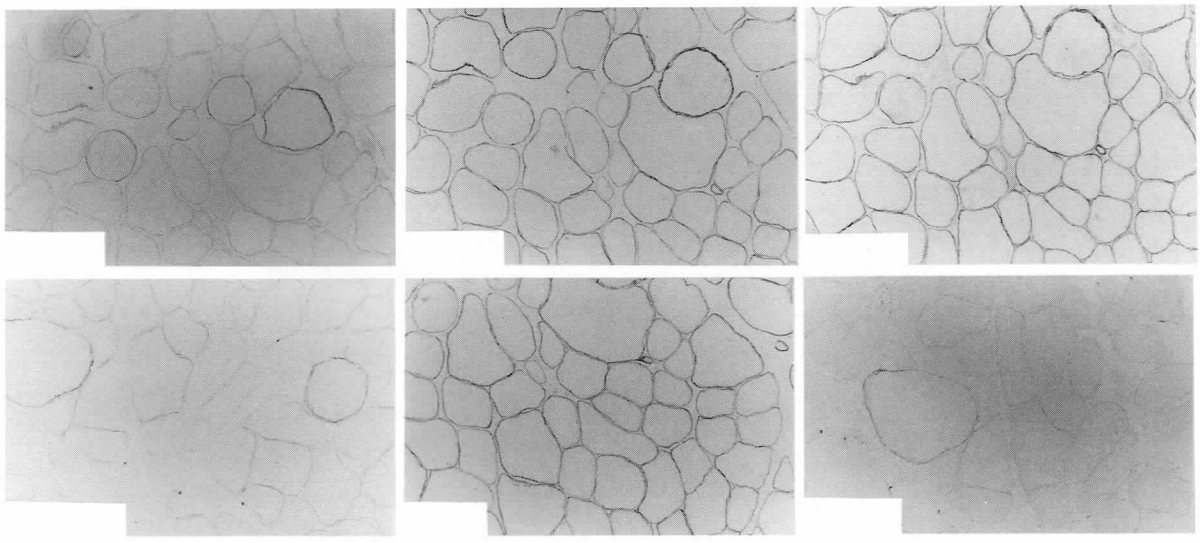


**図2** Becker型筋ジストロフィー症例(BMD-2)生検筋の免疫組織化学染色
DYS1(rod domain)，α 1syntrophin( α 1syn)，nNOSの各抗体の免疫染色では，全体に染色性が弱く，また不均一な(patchy)染色性であった．DYS2(C端), DYS3(N端)でも不均一性がみられ，α sarcoglycan( α SG)はほぼ全線維が明瞭に染色された.

## 結　　果

(1)筋ジストロフィー症生検筋におけるジストロフィンおよびその関連蛋白の局在

症例BMD-1では，筋細胞膜においてDYS1(rod domain), DYS3(N端)，nNOSが全線維で陰性となり，DYS2(C端), α 1シントロフィン，α サルコグリカンは全線維で陽性に染色された(**図1**)．また，BMD-2では，DYS1(rod domain), DYS2(C端)，DYS3(N端)，α 1シントロフィン，nNOSにて一部の線維で不均一な染色性を有し，α サルコグリカンはほぼ全線維で陽性となった(**図2**)．一方，Duchenne型筋ジストロフィー発症保因者では，DYS1，DYS2，DYS3ともにモザイク状に陰性線維が認められ，α 1シントロフィン，α サルコグリカン，nNOSも同様にモザイク状に陰性を呈していた(**図3**).

(2)筋ジストロフィー患者生検筋におけるホルマリン固定パラフィン包埋標本でのジストロフィン染色の検討

正常，疾患コントロール例ではDYS1，DYS2が明瞭に染色されたが，DYS3，α サルコグリカンではほとんど染色されなかった．DMD，BMD，DMD保因者の症例は，DYS1，DYS2染色についてのみ行った．DMDでは筋細胞膜に染色性がなく，BMDでは部分的な染色性を有し，保因者では陰性線維がモザイク状に染色され，凍結標本と同様の結果が得られた(**図4**)．なお，同時に行ったABC法の免疫染色では上記の抗体では全く染色されなかった.

## 考　　察

1994年，Kobzik, et al.[2]によりnNOSが筋細胞膜，特にtype2線維に存在していることが報告されて以来，筋組織におけるnNOSの局在や役割が注目されてきた．DMDの

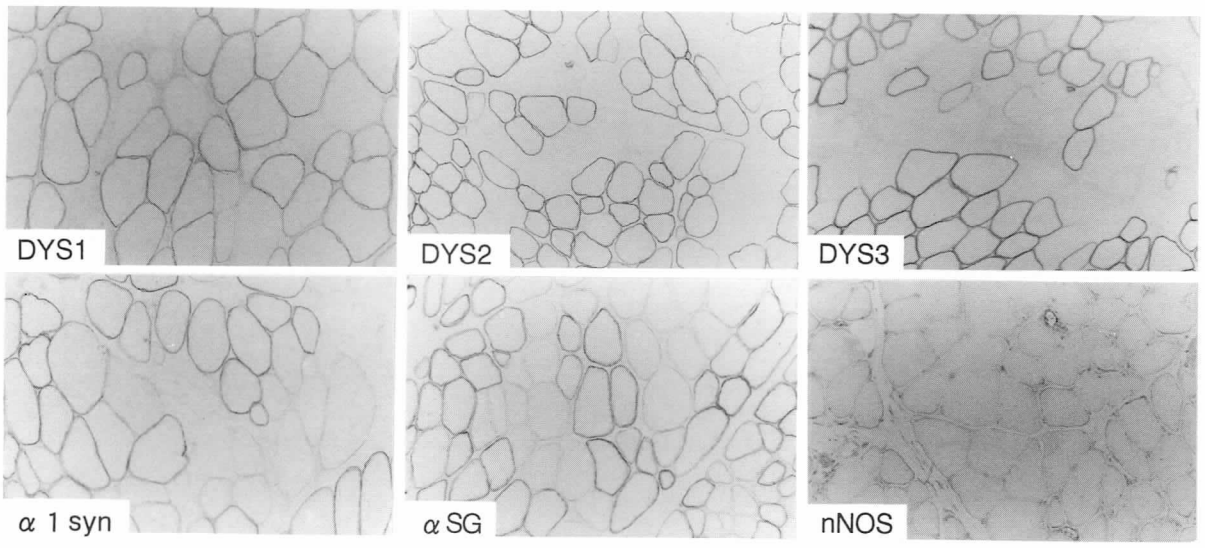



**図3** DMD発症保因者の生検筋の免疫組織化学染色
DYS1(rod domain),DYS2(C端),DYS3(N端), α 1syntrophin( α 1syn), α sarcoglycan( α SG),nNOSの各抗体の免疫染色では，陽性線維と陰性線維がモザイク状に染色された.

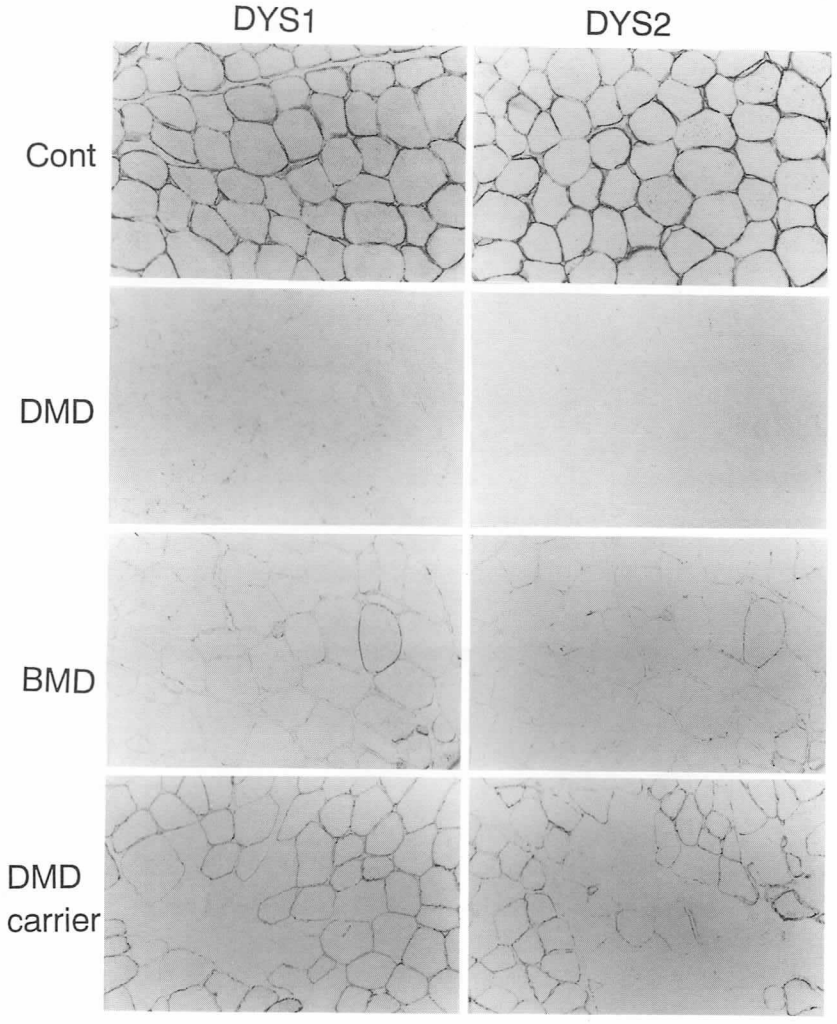



**図4** CSAシステムによるDYS1，DYS2抗体の免疫組織化学染色
コントロール(Cont)症例は，筋線維の筋細胞膜は明瞭に染色された．Duchenne型筋ジストロフィー症例(DMD)ではDYS1，DYS2とも全く染色されなかった．Becker型筋ジストロフィー症例(BMD)では，DYS1，DYS2とも全体にやや染色性が弱く，また不均一な(patchy)染色性であった．DMD発症保因者では，DYS1，DYS2とも陽性線維と陰性線維がモザイク状に染色された.

生検筋ではジストロフィンの消失とともにnNOSも消失し，ジストロフィンと関連して消長することが報告された．一方，シントロフィンは，ジストログリカン複合体やサルコグリカン複合体と同様にジストロフィン関連蛋白を構成する蛋白の一つである．α1シントロフィンはその一つで，ジストロフィンとC端に近い部位にて結合し，DMDの生検筋ではジストロフィンの消失とともに消失する．また，骨格筋ではPDZドメインのモチーフを介してα1シントロフィンとnNOSが結合していることが報告されている[3]．また，BMDにおけるジストロフィン，α1シントロフィン，nNOSの局在も検討されており，nNOSはジストロフィン同様不均一に染色されるものや消失するものまで症例によりその染色性は異なり，一方α1シントロフィンは陽性に染色されることが報告されている[4]．

今回，われわれの検討では，比較的重症な症例BMD-1では，DYS2(C端)，α1シントロフィン，αサルコグリカンは明瞭に染色されたが，DYS1(rod domain)，DYS3(N端)のジストロフィン，nNOSの染色性がともにも消失していた．症例BMD-1のジストロフィン遺伝子は少なくともexon12-19が欠失しており，DYS1(rod domain)，DYS3(N端)のジストロフィンの染色性が陰性であることに一致している．この結果はChao, et al.の報告[4]に類似しているが，N端，rod domainのジストロフィン染色性が完全に消失しているにもかかわらず，C端のジストロフィンが残存するという従来の報告とは異なる特異な染色性を有している．この症例では，α1シントロフィンおよびDYS2(C端)は陽性に染色され，DYS1(rod domain)，DYS3(N端)，nNOSの染色性が陰性となったことより，筋細胞膜におけるnNOSは，N端あるいはrod domainのジストロフィンとも何らかの関連をもって存在することを示唆する結果と考えられる．軽症のBMD-2では従来の結果とほぼ同様の結果と考えられる．したがって，BMDでは重症度や遺伝子の欠失部位などにより，ジストロフィン，α1シントロフィン，nNOSの染色性が異なることが示された．

CSAシステムは，従来のABC法の反応ステップにビオチン標識タイラマイドとパーオキシダーゼ酵素の触媒反応ステップを加えた免疫染色システムである．ABC法に比較して超高感度であり，ホルマリン固定パラフィン包埋標本に対してこれまで検出できなかったモノクローナル抗体の一部が検出可能となるなど，臨床的に病変を有する組織での応用も報告されている[5]．今回のわれわれの結果は，CSAシステムを利用することによりホルマリン固定パラフィン包埋標本での抗ジストロフィン抗体DYS1，DYS2の免疫染色が可能となり，凍結標本が得られない症例でのDMD，BMD，DMD保因者の診断やスクリーニングに有用と考えられる．

## 文　献


1) Brenman JE, Chao DS, Xia H, et al : Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. Cell 82 : 743-752, 1995.
2) Kobzik L, Bredt DS, Reid MB, et al : Nitric oxide in skeletal muscle. Nature 372 : 546-548, 1994.
3) Brenman JE, Chao DS, Gee SH, et al : Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and a 1 syntrophin mediated by PDZ domains. Cell 84 : 757-767, 1996
4) Chao DS, Gorospe JRM, Brenman JE, et al : Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy. J Exp Med 184 : 609-618, 1996.
5) Sanno N, Teramoto A, Sugiyama M, et al : Application of catalyzed signal amplification in immunodetection of gonadotropin subunit in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. Am J Clin Patholgy 106 : 16-21, 1996.

# X連鎖拡張型心筋症(X-linked dilated cardiomyopathy)における分子生物学的研究

吉田邦広*

研究協力者　中村昭則*　矢崎正英*　池田修一*
武田伸一**　石原傳幸***

## 諸言

X連鎖拡張型心筋症(X-linked dilated cardiomyopathy, XLDCMと略す)はジストロフィン異常症の一病型であり，臨床的に骨格筋障害が軽微でありながら10-20歳代で致死的な拡張型心筋症を呈することが特徴である．我々は本研究班においてジストロフィン遺伝子筋型exon1近傍の欠失が疑われたXLDCM2家系に注目し，臨床病理学的および分子遺伝学的な検討を行った．同様にジストロフィン遺伝子5'端に異常を有するXLDCM患者はMuntoniら，Milasinらによっても報告され[1)-3)]，XLDCMの中でも1つのサブタイプをなすものと考えられる．このような特異な遺伝子異常と臨床表現型との関連についてはintron1に存在する転写制御配列の関与が推測されている[4)]．またジストロフィン遺伝子の発現に関連して脳型やプルキンエ細胞型など筋型以外のジストロフィン分子種の代償的発現が病態の修飾に関与する可能性も指摘されている[1)-3)]．そこで我々は自験例についてその詳細な欠失地図を作製するとともに骨格筋において筋型，脳型，プルキンエ細胞型の各ジストロフィン分子種の発現を検討した．

## 対象と方法

対象は当科で経験したXLDCM2家系4患者である(図1)[5)-7)]．うち3名はすでに拡張型心筋症によるうっ血性心不全のためいずれも10歳代で死亡している．いずれの患者も高CK血症が見られたが，臨床的に明らかな筋萎縮や筋力低下は認めなかった．

この2家系においては以前にmultiplex PCR法およびSouthern blot法によりジストロフィン遺伝子を解析し，筋型exon1からintron1にかけての欠失を示唆する結果を得ていたため[5)]，今回はその詳細な欠失範囲を決定するためinverse PCR法を用いた．方法は患者ゲノムDNAを*Hin*dIIIで完全消化し，self-ligateしたものを鋳型としてinverse PCRを行った[7)]．inverse PCRのプライマーは筋型exon1およびその上流に設定した(図2A)．得られたPCR産物の塩基配列を決定し，正常のジストロフィン遺伝子配列と比較検討した．ジストロフィン分子種の発現に関しては骨格筋からtotal RNAを抽出した後，筋型、脳型、プルキンエ細胞型各分子種に特異的なexon1内にセンスプライマーを設定，exon 4に設定したアンチセンスプライマーとの組み合わせでRT-PCRを行った[6)]．

## 結果

ジストロフィン遺伝子の筋型exon1を含む*Hin*dIII断片は3.4kbとされ[4)]，プライマーの設定上，正常対照ではinverse PCR法にて2.7kbのPCR産物が予測されるが(図2A)，実際に患者では約3.0kbの産物が特異的に増幅された(図2B)[7)]．このPCR産物の塩基配列を調べたところexon1内に603 bpの挿入配列が見られ[7)]，これにより筋型exon1は中断されていた(図2C)．この挿入配列は両端を16塩基ないしは17塩基のdirect repeatsではさまれ，かつ一端に約70個あまりのpoly(T) tractsを有していた(図2A)．また今回検討した2家系患者で同一部位に同一の挿入配列が確認された(図3)[7)]．

骨格筋における各分子種の発現に関してはXLDCM患者(図1の症例1)では筋型が検出されず，脳型，プルキンエ細胞型はいずれも過剰発現していた[6)]．疾患対照として用いたBecker型筋ジストロフィー患者2名(exon45-47欠失症例，exon45-48欠失症例)の骨格筋では正常対照と比べて筋型，脳型，プルキンエ細胞型のいずれも過剰発現していたが，脳型およびプルキンエ細胞型の発現はXLDCM患者に比較してその程度が軽度であった(図3)[6)]．

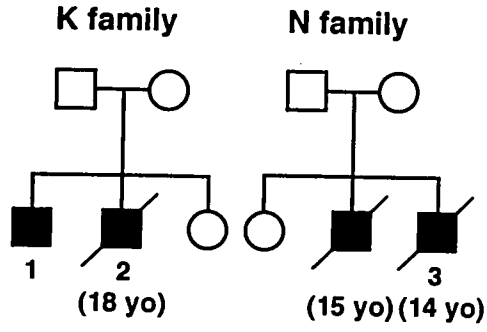
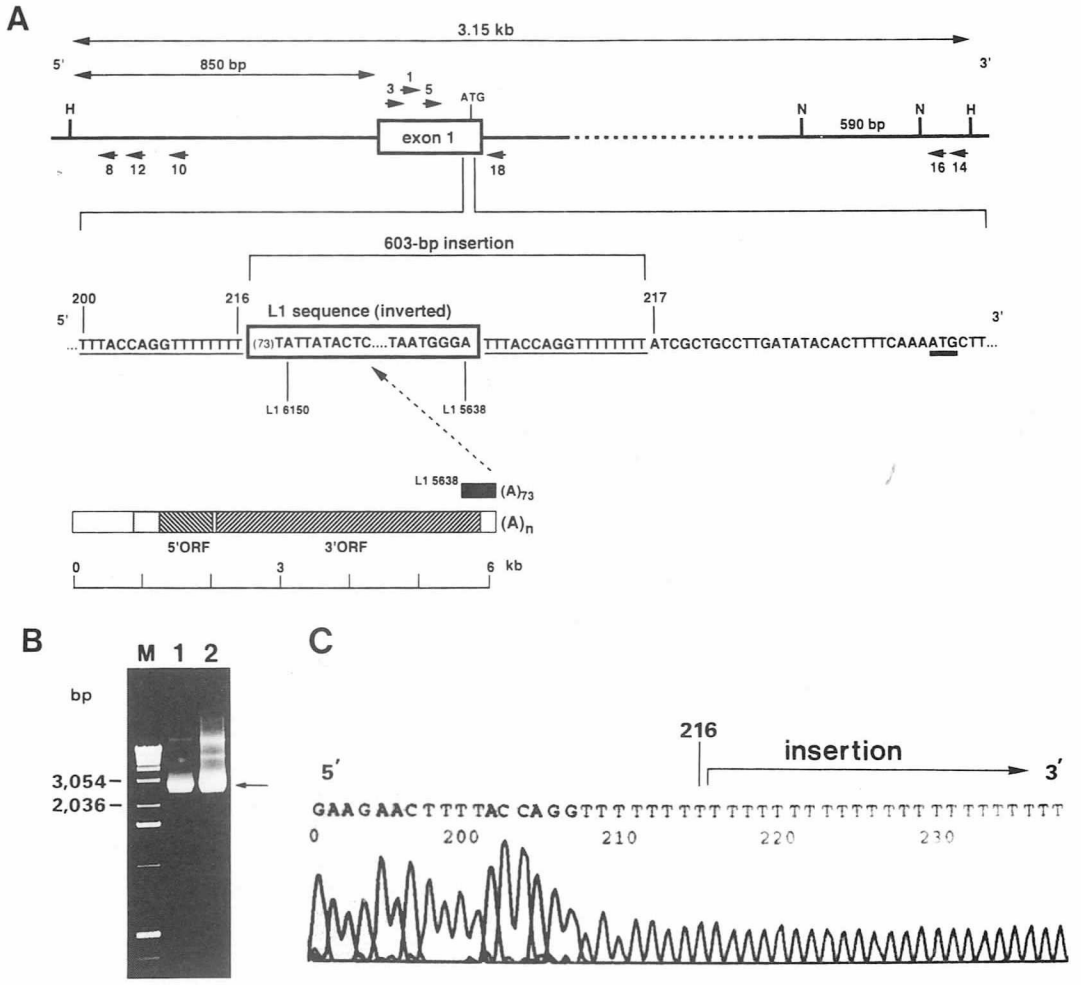



図1　XLDCM2家系の家系図．(　)内は死亡時の年齢を示す．

* 信州大学医学部第三内科
** 国立精神・神経センター
*** 国立療養所東埼玉病院


A
3.15 kb
5'
3'
850 bp
1
3
5
ATG
H
exon 1
N
590 bp
N
H
8 12 10
18
16 14
603-bp insertion
200
216
217
L1 sequence (inverted)
5'
3'
...TTTACCAGGTTTTTTTT (73)TATTATACTC....TAATGGGA TTTACCAGGTTTTTTTT ATCGCTGCCTTGATATACACTTTTCAAAATGCTT...
L1 6150
L1 5638
L1 5638
(A)73
(A)n
5'ORF
3'ORF
0
3
6 kb
B
M 1 2
bp
3,054
2,036
C
216
insertion
5'
3'
GAAGAACTTTTACCAGGTTTTTTT

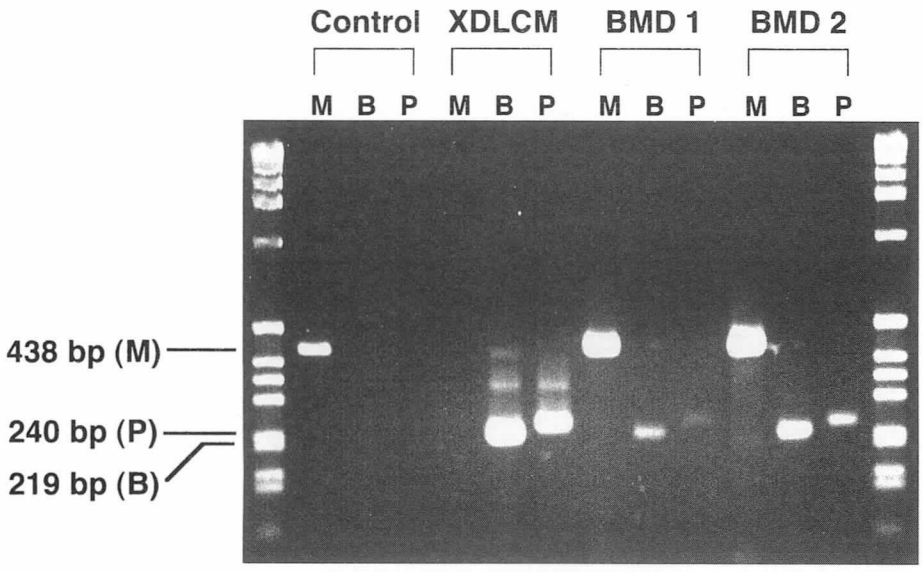



**図4** 骨格筋における筋型，脳型，プルキンエ細胞型ジストロフィンの発現．XLDCM患者(図1の症例1)では筋型が検出されず，脳型およびプルキンエ細胞型が過剰発現している．Becker型患者(BMD1(exon45-47欠失症例)，BMD2(exon45-48欠失症例))では筋型のみならず脳型およびプルキンエ細胞型の過剰発現が見られる．controlは皮膚筋炎患者骨格筋．

骨格筋におけるジストロフィン分子種の発現に関しては臨床表現型のいかんにかかわらず筋型ジストロフィンの減少に伴い，脳型およびプルキンエ細胞型ジストロフィンが代償性に過剰発現するものと考えられる．また自験XLDCM患者において筋型が検出されなかったことはexon1内に存在する特異な挿入変異が筋型の転写を阻害するものと推測される．自験XLDCM患者においてはその変異が筋型exon1内に限局するため過剰発現した脳型およびプルキンエ細胞型はいずれもintactなものであり，骨格筋の変性に対して抑止的に機能する可能性が考えられる．一方，hot-spotに欠失を持つBecker型筋ジストロフィー患者においては過剰発現した脳型およびプルキンエ細胞型も筋型と同様に構造的に，および機能的に不完全なものであり，結果的に筋型を代償し得ないのではないかと思われる．

今回の検討ではXLDCM患者の心筋が入手し得なかったが，臨床的に心筋障害を有する他のジストロフィン異常症患者(Duchenne型2名，Becker型3名)において骨格筋および心筋からtotal RNAを抽出し，RT-PCR法にて脳型ジストロフィンの発現を正常対照と比較検討したところジストロフィン異常症患者においては脳型は骨格筋では一様に過剰発現しているが，心筋では対照と有意差を認めなかった．このことはジストロフィン分子種の発現調節機構が骨格筋と心筋で異なることを示唆するものであり，心筋では骨格筋に比べて脳型による機能的代償が起こりにくいことが予測される．

したがって筋型以外のジストロフィン分子種の代償性過剰発現はジストロフィン異常症では一様に起こるが，たまたまその遺伝子異常が筋型exon1周辺に限局する場合，full-lengthの脳型およびプルキンエ細胞型ジストロフィンが効果的に筋型の機能を補完すること，この代償機構が心筋に比べ骨格筋において起こりやすいことがXLDCMの特異な病像の形成に関与するものと思われる．ただしXLDCM患者においてはジストロフィン遺伝子5'端以外の部位にも変異が複数同定されており，XLDCMの成因に関しては他にいくつかの要素が関与することは疑いない．XLDCMにおける分子遺伝学的および細胞生物学的検討はジストロフィン分子の構造と骨格筋および心筋におけるその機能を解明する上で興味深いアプローチであると考える．

## 文　献


1) Muntoni F, Wilson L, Marrosu G, et al : A muation in the dystrophin gene selectively affecting dystrophin expression in the heart. J Clin Invest 96 : 693-699, 1995.

2) Muntoni F, Melis MA, Ganau A, et al : Transcription of the dystrophin gene in normal tissues and in skeletal muscle of a family with X-linked dilated cardiomyopathy. Am J Hum Genet 56 : 151-157, 1995.

3) Milasin J, Muntoni F, Severini GM, et al : A point mutation in the 5' splice site of the dystrophin gene first intron responsible for X-linked dilated cardiomyopathy. Hum Molec Genet 5 : 73-79, 1996.

4) Klamut HJ, Bosnoyan-Collins LO, Worton RG, et al : Identification of of a transcriptional enhancer within muscle intron 1 of the human dystrophin gene. Hum Molec Genet 5 : 1599-1606,1996.

5) Yoshida K, Ikeda S, Nakamura A, et al : Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy gene in patients with Becker muscular dystrophy presenting with dilated cardiomyopathy. Muscle & Nerve 16 : 1161-1166, 1993.

6) Nakamura A, Ikeda S, Yazaki M, et al : Up-regulation of the brain and Purkinje-cell forms of dystrophin transcripts, in Becker muscular dystrophy. Am J Hum Genet 60 : 1555-1558, 1997.

7) Yoshida K, Nakamura A, Yazaki M, et al : Insertional mutation by transposable element, L1, in the *DMD* gene results in X-linked dilated cardiomyopathy. Hum Molec Genet 7 : 1129-1132, 1998.

# ジストロフィン異常症におけるプロスタグランジンD合成酵素の発現

谷 池 雅 子*

研究協力者　毛 利 育 子*　岡 田 伸太郎*

**要 旨** ジストロフィン異常症患者(Duchenne型型筋ジストロフィー症・Becker型筋ジストロフィー症)生検筋においてプロスタグランジン$D_2$の合成に関わる酵素群の発現を免疫組織化学法を用いて調べた．重症型のDuchenne型筋ジストロフィー症においては，ホスホリパーゼ$A_2$，シクロオキシゲナーゼ-2，造血型プロスタグランジンD合成酵素はいずれも壊死線維に強い発現が認められたが，軽症型のBecker型筋ジストロフィー症及び対照筋線維にはこれらの酵素の発現は認められず，病態へプロスタグランジン$D_2$が関与している可能性が考えられた．

## はじめに

エイコサノイドはホスホリパーゼ$A_2$($PLA_2$)の作用により作られるアラキドン酸を前駆体とする脂質メディエーターの総称であり，炎症を含めた広範な生体反応に関与している．アラキドン酸よりシクロオキシゲナーゼ(COX-2)の作用によりプロスタグランジンペルオキシドが合成され，さらに酵素反応により種々のプロスタグランジンが合成される．これらの合成系をアラキドン酸カスケードと呼ぶ．$PLA_2$，COXはそれぞれ構造型・誘導型のアイソフォームを持ち，分泌型IIA $PLA_2$，COX-2はそれぞれの誘導型である．また，プロスタフランジン$D_2$($PGD_2$)についてはこれを合成するプロスタグランジンD合成酵素(PGDS)が知られている．

近年種々の筋ジストロフィー症の原因として多様な分子生物学的異常が明らかになっているが，筋線維がなぜどのようにして壊死に陥るのかについては未だ明らかでは無い．Duchenne型(DMD)およびBecker型筋ジストロフィー症(BMD)患者の筋組織で$PLA_2$活性が上昇していたとの報告[1]，ヘビ毒より抽出された$PLA_2$を動物に投与してDMD類似の壊死・再生を生じたとの報告[2]，DMD患者由来の筋組織培養上清にプロスタグランジン$E_2$($PGE_2$)増加が認められたという報告があり[3]，筋芽細胞壊死・再生へのエイコサノイドの関与が示唆されている．一方，ジストロフィン異常症の壊死・筋線維化と肥満細胞浸潤が相関するとの報告があり[4]，しかも肥満細胞は造血型PGDS(hPGDS)を発現して，$PGD_2$を産生することが知られている[5]．我々は$PGD_2$がジストロフィン異常症の病態へ関与している可能性を検証するために，免疫染色を用いた予備実験を行った．

* 大阪大学医学部小児科

## 対象および方法

リンパ球DNAを用いたPCRまたは生検筋のジストロフし，臨床的にDMDまたはBMDと診断した1歳・7歳のDMDィン免疫染色にてジストロフィン異常症との診断を確定患者，14歳のBMD患者の生検筋と，壊死再生を認めない筋疾患患者の生検筋を対照として用いた．5μm凍結切片をアセトンにて4℃10分間固定後に，0.3% $H_2O_2$/メタノールにて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害，0.3% トライトン X-100・20% 正常血清／phosphate buffered saline (PBS)にて非特異的反応を抑制した後，1次抗体としてマウス抗ヒトIIA $PLA_2$抗体(2クローン・塩野義株式会社研究所 有田先生より供与)，ヤギ抗ヒトCOX-2抗体(Santa Cruz社)，ウサギ抗ヒトhPGDS抗体(大阪バイオサイエンス研究所 裏出先生より供与)を用いた．対応する2次抗体(ビオチン化 抗マウス・抗ヤギ・抗ウサギ IgG抗体)，引き続きABC試薬(Vector)を用いて，ペルオキシダーゼ活性をDABにて可視化した．また，連続切片にHE，Gomori-trichrome，及びtoluidine blue染色を施行した．

## 結　果

対照筋・BMD患者筋・DMD患者筋全てにおいて間質内に散在性にhPGDS陽性細胞が認められ，これらは連続切片のtoluidine blue染色にてメタクロマジアを示す顆粒を有することより肥満細胞と考えられたが，その数はDMD>対照筋・BMDであった．

DMD筋ではこれらの間質の陽性細胞以外に，hPGDS陽性の筋線維を多く認め，連続切片におけるHE染色との対比により壊死線維であると考えられた．hPGDS吸収抗体との反応，また1次抗体を省略するとこれらの壊死線維は染色されず，免疫反応は特異的であると考えられた．必ずしも肥満細胞とh-PGDS陽性壊死線維の局在は一致せず，hPGDS陽性線維は幼少患者筋では散在していたが，年長患者筋では群を形成し，その大半はIIA $PLA_2$またCOX-2

でも陽性であった．BMD筋では壊死線維は稀であったが，hPGDS・COX-2・IIA $PLA_2$陽性線維を認めず，対照筋でもhPGDS・COX-2・IIA $PLA_2$陽性線維を認めなかった．

## 考　　察

わずか2例のみの検討であるが，DMD患者壊死筋においてhPGDS並びにその上流酵素の誘導型が強発現しており，$PGD_2$の産生が誘導されていると考えられた．肥満細胞はhPGDS陽性であったが，必ずしも壊死線維の近傍に局在する訳ではなく，両者の関連に関しては不明である．LindahlらはDMD患者筋・BMD患者筋において，$PLA_2$活性は年齢依存的に変化すると報告しており[1]，$PGD_2$の産生誘導も年齢(病期)依存的であることが考えられる．今後検討症例を増やすことにより，壊死線維におけるhPGDSの強発現がDMDに特異的なものであるのか或いは他の病因による筋壊死にも普遍的に認められる現象であるのか，また，病期との関連についても検討していく予定である．

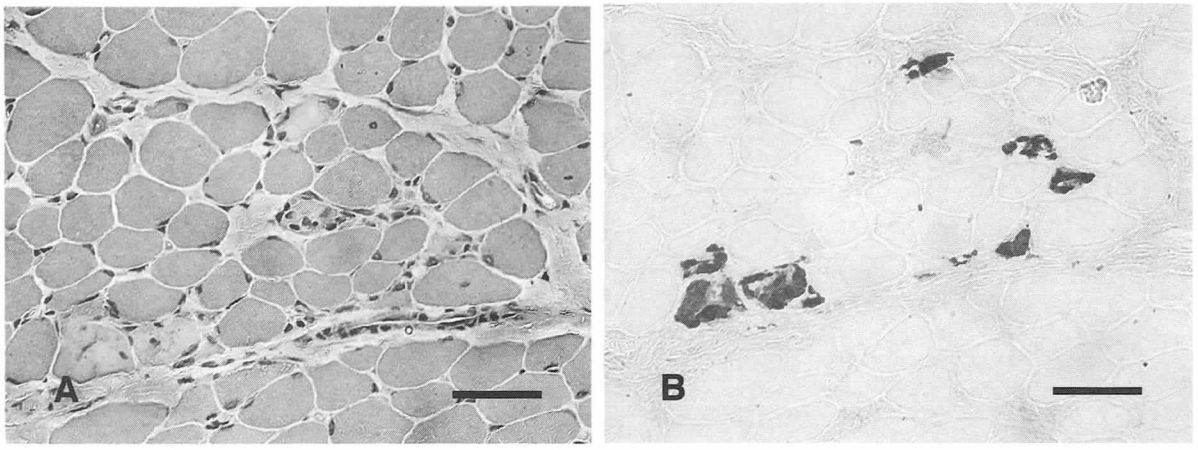



図1　7歳DMD患者筋連続切片
A HE染色，B hPGDS免疫染色．壊死線維にhPGDS陽性は強発現されている．スケールバー：39μm

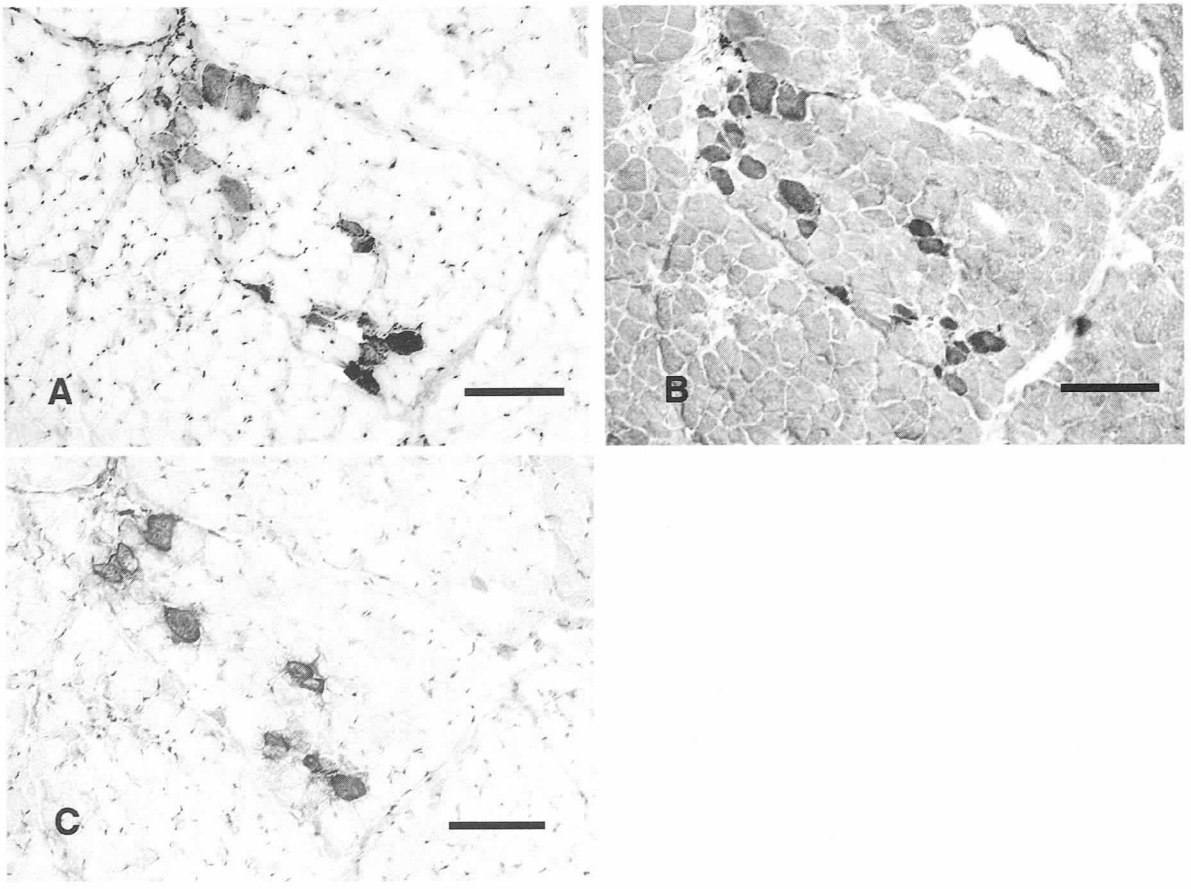



図2　7歳DMD患者連続切片
A IIA $PLA_2$免疫染色，B COX-2免疫染色，C hPGDS免疫染色．hPGDS陽性線維はIIA $PLA_2$，COX-2も強発現している．
スケールバー：79μm

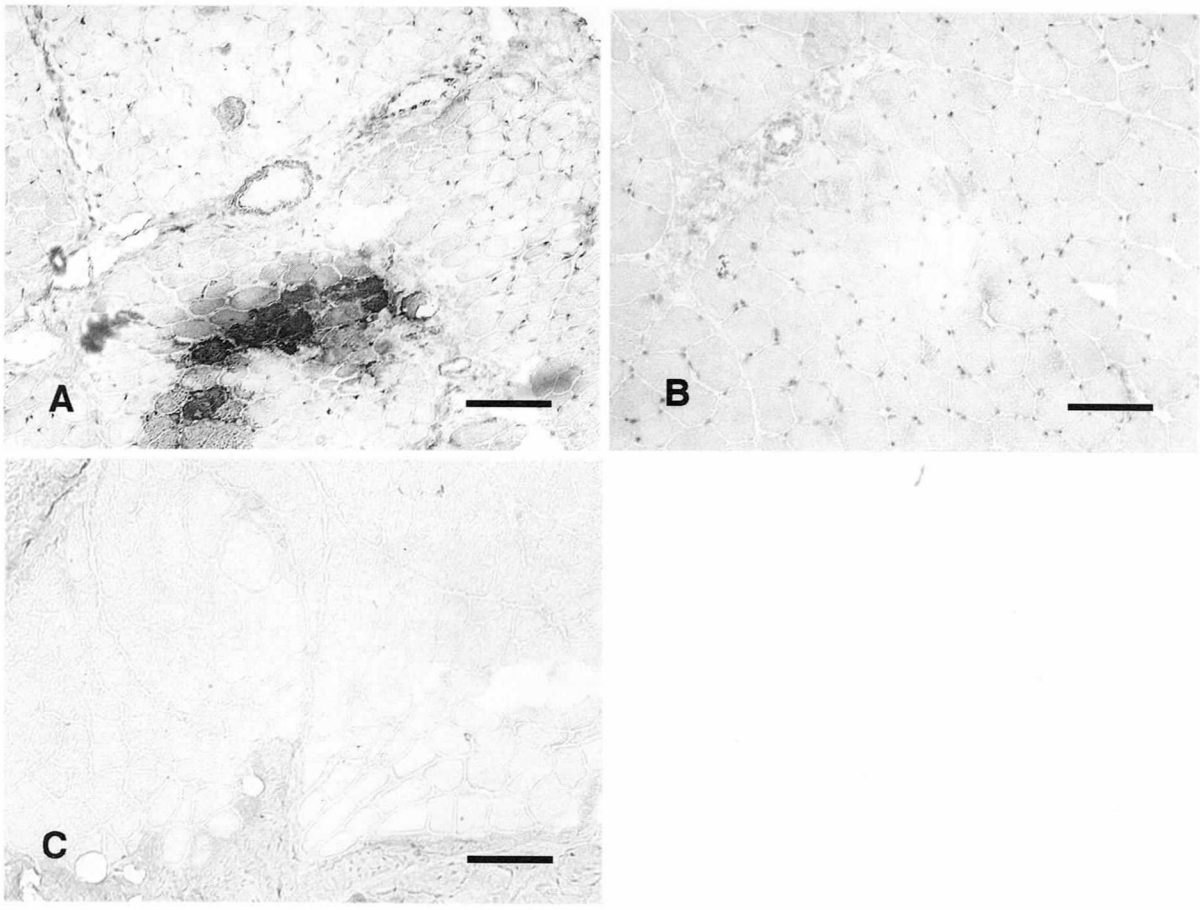



**図3** hPGDS免疫染色
A 1歳DMD患者，B BMD患者，C 対照．BMD，対照筋ではhPGDS陽性線維は認められない．スケールバー：84 μm

## 文　献


1) Lindahl M, Backman E, Henriksson KG, et al : Phospholipase $A_2$ activity in dystrophinopathies. Neuromusc Disord 5 : 193-199, 1995.

2) Gutiérrez JM, Núñez J, Díaz C, et al : Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase $A_2$ isolated from the venom of the snake Bothrops jararacussu. Exp Mol Pathol 55 : 217-229, 1991.

3) Jackson MJ, Brooke MH, Kaiser K, et al : Creatine kinase and prostaglandin $E_2$ release from isolated Duchenne muscle. Neurology 41 : 101-104, 1991.

4) Gorospe JRM, Tharp MD, Hinckley, et al : A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? J Neurol Sci 122 : 44-56, 1994.

5) Urade Y, Ujihara M, Horiguchi Y, et al : Mast cells contain spleen-type prostaglandin D synthase. J Biol Chem 265 : 371-375, 1990.

# ジストロフィン遺伝子exon 52ノックアウトマウス骨格筋細胞膜微細構造の解析
## ー mdxマウスとの比較検討 ー

若 山 吉 弘*

研究協力者　澁 谷 誠 二*　鬼 木 弘 明**
松 崎 哲 也***　埜 中 征 哉***

**要　旨**　凍結割断法により，ジストロフィン遺伝子exon 52ノックアウトマウス(mdx52)生後8週の筋細胞膜微細構造を解析し，mdxマウスのものと比較検討した．本研究より，生後8週のmdx52筋細胞膜微細構造変化は，caveola密度の増加，P面膜内粒子密度の減少，orthogonal arrayおよびorthogonal array subunit particle密度の減少であった．これらの変化は，exon 23に点変異を認めるmdxマウスの膜内粒子密度の変化と類似していたが，筋細胞膜微細構造全体の変化は，よりDuchenne型筋ジストロフィー症に類似していた．以上から，ジストロフィン蛋白が完全欠損するジストロフィン遺伝子異常であれば，筋細胞膜微細構造学的にもほぼ類似の傾向を認めるといえた．

### はじめに

最近開発されたdystrophin遺伝子exon 52ノックアウトマウス(以下mdx52マウス)は，筋力低下がみられず，その筋病理組織像もmdxマウスに近似しているが，dystrophin欠損以外にDp140やDp260のdystrophin isoformの欠損を認め，臨床的にはDuchenne筋ジストロフィー症(DMD)と類似した下腿の筋肥大もみられる[1]．本研究では，Freeze-Fracture法を用い，mdx52マウス筋細胞膜微細構造を解析し，以前報告したmdxマウスのもの[2]と比較検討した．

### 材料と方法

生後8週のmdx52およびcontrolマウス (C57BL/6J) 各々6匹ずつの両側長趾伸筋を摘出．左側は2.5% glutaraldehyde溶液で固定し(4℃，2h.)，Eiko FDⅡA凍結割断装置で筋細胞膜レプリカ電顕標本を作成した．

右側はisopentane・液体窒素で凍結後，一般光顕組織標本を作成したが，筋細胞膜微細構造物であるcaveolaやorthogonal array(OA)の密度はtypeⅡC線維の割合に影響され，またOAはtype1線維にはほとんどみられないためATPase染色による筋細胞膜微細構造を解析した筋標本のfiber typeの分析も行った．さらにdystrophin, β-dystroglycan, α-sarcoglycan, α1-syntrophin, aquaporin 4に対する抗体を用い蛍光免疫染色標本も作成した．dystrophin抗体はHoffman・Kunkel両博士より供与された羊抗60KDa抗体を使用し，β-dystroglycanとα1-syntrophinは羊に，α-sarcoglycanはウサギに免疫して作成した抗体で，いずれも我々が以前の研究で使用したC末端領域に対する抗体と同様のものである[3),4)]．一方，抗aquaporin 4抗体はペプチド合成装置により，aquaporin 4のC末端領域(アミノ酸287-301)[5)]のペプチドを合成し，ウサギに免疫して得たオリジナル抗体を使用した．

筋細胞膜レプリカ標本は，電顕にて無作為に筋細胞膜写真を撮影し(各々のマウスにつき5P面，5E面)，最終倍率40,000倍でcaveola密度，160,000倍でintramembranous particle(IMP)，orthogonal array(OA)，さらにorthogonal array subunit particle(OASP)密度をsingle blind法にて算出し,それぞれcontrol群とmdx52群について統計的に比較検討した．

### 結　　果

**1. 一般光顕組織所見およびfiber type分析**：生後8週のmdx52マウス長趾伸筋のH&E染色による光顕組織所見は，細胞浸潤を伴う変性・壊死線維や再生線維よりなる集塊が認められ，周辺には中心核線維が多数みられたが，結合織増生や脂肪組織はほとんどみられず，mdxマウスの組織像と非常に類似しているといえた．

Fiber type分析では，生後8週のcontrol群およびmdx52群長趾伸筋はともにtype 2線維が99%占めており，その内mdx52群ではtype 2C線維が平均で6%占めていた．

**2. 免疫組織化学所見(図1)**：mdx52マウス長趾伸筋では，dystrophinならびにα-sarcoglycanの欠損がみられ，一方，β-dystroglycanは，controlマウスと比較してその染色性が乏しかったものの，筋表面膜に認められた．α1-syntrophinは同様にcontrolマウスよりも全体に染色性が乏しかったものの，筋表面膜が明瞭に染色される陽性線維もしばしば観察された．aquaporin 4は，全体的には欠損している線維が多いといえたが，数個の陽性線維が集塊をなしてみられる所見が散見された．

* 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
*** 国立精神・神経センター研究所

3. **筋細胞膜微細構造変化**：mdx52マウスにおける筋線維の多くは，control マウスに比べてcaveolaが増加していた(**図2**)．control群におけるcaveola密度は11.6±0.2であるのに対して，mdx52群では13.3±0.3であり，統計的にも有意に増加していた（$p<0.05$，two-tailed t-test)(**表**)．mdx52マウスのP面IMPは，controlマウスと比較して少なくみえる筋線維が多くを占めたが(**図3**)，E面IMPはあまり差がみられなかった．統計学的比較においても，mdx52群においてP面IMP密度は，OASPを除いた場合($p<0.05$，two-tailed t-test)も含んだ場合($p<0.01$)もともにcontrol群よりも有意に減少していた(**表**)．OA密度はcontrol群において，Median値およびその25～75% midrange(括弧内)は3.34(1.54～10.34)であったが，mdx52群では1.38(0.54～2.45)と明らかに低下していた($p<0.01$，Wilcoxon rank-sum test)(**表**)．またOAが全くみられない線維も多く認められた(**図3B**)．この減少したmdx52マウスにおけるOAは，controlよりも小さなOAからなるものが多く，OASP密度はcontrol群と比較して有意に減少していた（$p<0.05$，two-tailedt-test)(**表**)．

## 考　　察

本研究結果から，生後8週mdx52マウス長趾伸筋細胞膜微細構造変化は，caveola密度の増加，P面のIMP密度減少，

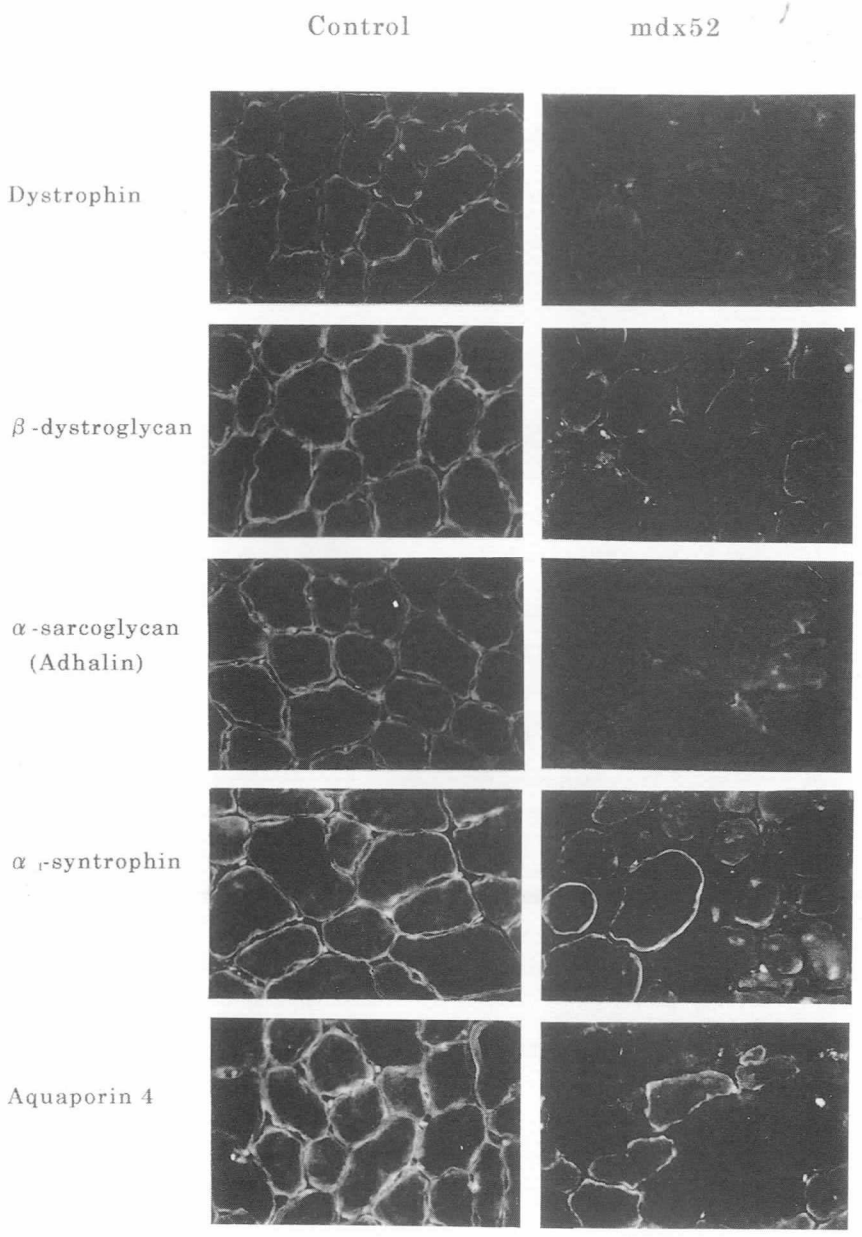



**図1** Immunohistochemical staining with sheep anti-dystrophin, sheep anti-β-dystroglycan, rabbit anti-α-sarcoglycan, sheep anti-α1-syntrophin and rabbit anti-aquaporin 4 antisera in muscle tissue from controland mdx52 mice. Immunore action of all antisera is observed at the surface membranes of myofibers in control mouse. In mdx52 mouse, the immunoreactions of anti-dsytrophin and anti-α-sarcoglycan antisera were absent; while aquaporin 4 immunoreactivity was not also seen except for occasionally positive immunostaining of small groupedmyofibers. The reactions of anti-β-dystroglycan and anti-α1-syntrophin antisera were more decreased than those in control mouse except for clear α1-syntrophin immunoreactivity of some myofibers. Original maginification ×150.

OA密度およびOASP密度の減少であることが判明した．これらの変化は，caveola密度やOA密度に影響を及ぼすtype 2C線維の割合がmdx52マウスではそれほど多くなかったことから，mdx52マウス筋細胞膜全体の微細構造変化を反映していると思われる．

以前報告した同週齢のmdxマウス長趾伸筋細胞膜微細構造変化[2]と比較した場合，mdxマウスではcaveola密度およびP面のOASPを除くIMP密度は正常であったが，mdx52マウス筋細胞膜微細構造変化は，dystrophin遺伝子のexon23の点変異を認めるmdxマウスと比較的類似していた．しかしながら，caveola密度の増加やP面とE面のIMP全体の減少を示すDMDの変化[6)-8)]ともmdx52マウスは近似しているといえた．一方dystrophin遺伝子に異常があるが，dystrophin蛋白は不完全ながら保存されているBecker筋ジストロフィー症では，IMP密度は正常で，OA密度やOASP密度のみ減少がみられる[9]．このことから，dystrophin蛋

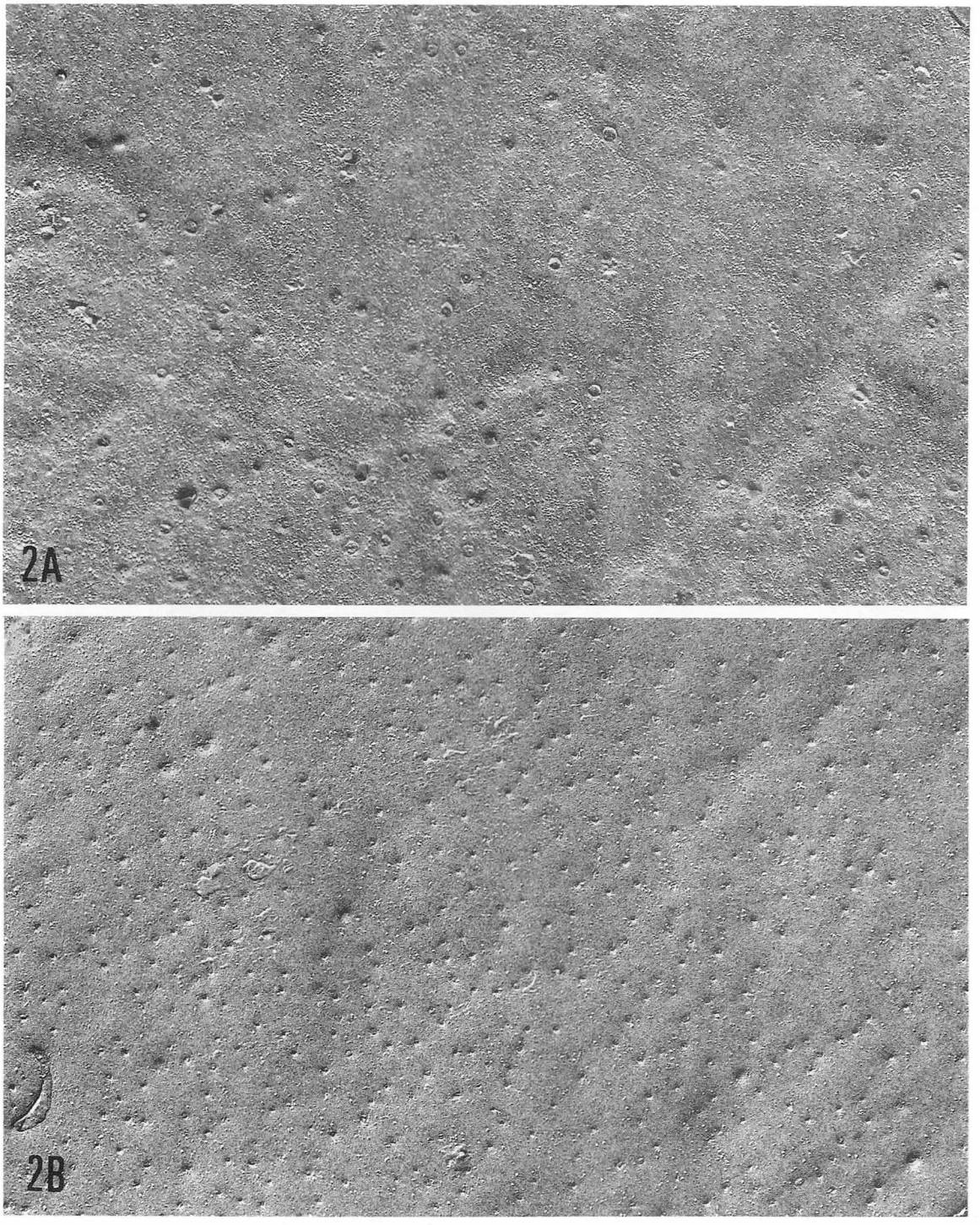



**図2A-B** Low magnification electron photomicro-graphs of the sarcolemma plasma membrane from a control mouse EDL muscle (A) and a mdx52 mouse EDL muscle (B). Increased density of caveolae is apparent in the mdx52 mouse. riginal magnification ×38,000.

白が完全欠損するdystrophin遺伝子異常において，そのexon部位の異常の違いに関わらず，筋細胞膜微細構造も類似の傾向を示すといえた．

また，我々は，筋細胞膜分子構築に強く影響を及ぼすと考えられるdystrophin結合蛋白および最近，OAの構成蛋白でありwater channelの一員であることが判明したaquaporin 4[5]の，筋細胞膜での発現様式を免疫組織学的に検討した．その結果mdx52マウスではα-sarcoglycanの欠損，β-dystroglycanの免疫反応低下，同様にα1-syntrophinも免疫反応低下がみられたが陽性線維も多くみられた．さらにaquaporin 4は全体的に欠損していたが，陽性線維も数個の集団をなして散見された．これらの所見とmdx52

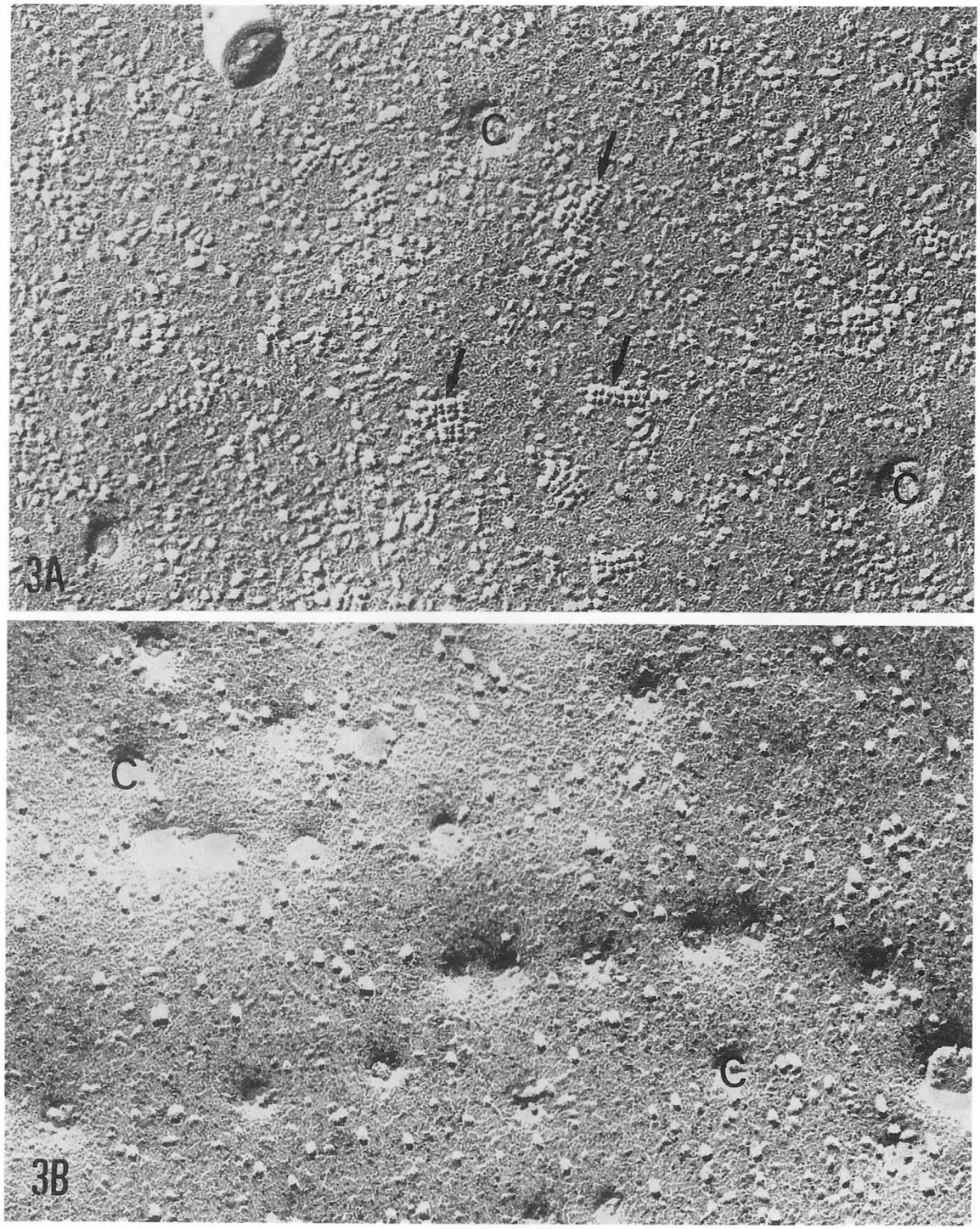



**図3A-B** High magnification electron photomicro-graphs of freeze-fracture preparations illustrating intramembranous particle density and orthogonal array (arrows) density in EDL muscle plasma membrane of control (A) and mdx52 (B) mice. Decreased densities of both intramebranous particles and orthogonal arrays are apparent in mdx52 mouse membrane. C=Caveolae. Original magnification×152,000.

表　Alterations of EDL muscle plasma membranes from control and mdx52 mice

| | Caveola (Group mean ± SEM) | IMP (Group mean ± SEM) P face excluding OASP | P face including OASP | E face | OA (Median/midrange) | OASP (Group mean±SEM) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 11.6±0.2* | 2177±42** | 2388±35** | 902±18# | 3.34(1.54～10.34)## | 18.4±0.2*** |
| mdx52 | 13.3±0.3 | 1921±47** | 2053±48*** | 872±12# | 1.38(0.54～ 2.45)## | 15.4±0.7*** |

EDL : extensor digitorum longus, P : protoplasmic, E : extracellular,
IMP : intramembranous particle, OA : orthogonal array, OASP : orthogonal array subunit particle
* p<0.05 by two-tailed t-test.　　# p>0.1 by two-tailed t-test
** p<0.05 by two-tailed t-test.　　## p>0.01 by Wilcoxon rank-sum test.
*** p<0.05 by two-tailed t-test.　　### p<0.05 by two-tailed t-test.

マウスでみられたP面でのIMP減少との関係は不明であるが，OA密度の分布状態とaquaporin 4の免疫組織学的所見はパラレルな結果を示すといえた．最近，Frigeriらは[10]免疫組織化学による検討で，mdxマウス骨格筋ではaquaporin 4が完全に欠損している結果を報告しているが，mdxマウスにおいても，OAは不完全ながらも残存していることを我々は確認しており[2]，今後さらに検討を要するといえる．

## 文　献


1) Araki E, Nakamura K, Nakao K, et al : Targeted disruption of exon 52 in the mouse dytrophin gene induced muscle degeneration similar to that observed In Duchenne muscular dystrophy. Biochem Biophys Res Comm 238 : 492-497, 1997.
2) Shibuya S and Wakayama Y : Freeze-fracture studies of myofiber plasma membrane in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mice. Acta Neuropathol 76 : 179-184, 1988.
3) Wakayama Y, Inoue M, Murahashi M, et al : Ultrastructural localization of adhalin in normal murine skeletal myofiber. Ann Neurol 39 : 217-223, 1996.
4) Wakayama Y, Inoue M, Murahashi M, et al : Ultrastructural localization of α1-syntrophin and neuronal nitric oxide synthase in normal skeletal myofiber, and their relation to each other and to dystrophin. Acta Neuropathol 94 : 455-464, 1997.
5) Hasegawa H, Ma T, Skach W et al : Molecular cloning of a mercurialinsensitive water channel expressed in selected watertransporting tissues. J Biol Chem 269 : 5497-5500, 1994.
6) Bonilla E, Fishbeck KH, Schotland DL : Freeze-fracture studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy. Am J Pathol 104 : 167-173, 1981.
7) Schotland DL, Bonilla E, VanMeter P : Duchenne dystrophy: alteration in muscle plasma membrane structure. Science 196 : 1005-1007, 1977.
8) Wakayama Y, Okayasu H, Shibuya S, et al : Duchenne dystrophy: reduced density of orthogonal array subunit particles in muscle plasma membrane. Neurology 35 : 1587-1593, 1985.
9) Shibuya S, Wakayama Y, Jimi T, et al : Freeze-fracture analysis of muscle plasma membrane in Becker's muscular dystrophy. Neuropathol Appl Neurobiol 20 : 487-494, 1994.
10) Frigeri A, Nicchia GP, Verbavatz JM, et al : Expression of aquaporin-4 in fast-twitch fibers of mammalian skeletal muscle. J Clin Invest 102 : 695- 703, 1998.

# Computerized wheelを用いたmdxマウスのphenotype解析

若　山　吉　弘*

研究協力者　原　　一*　Fischbeck KH**　Bucan M***

**要　旨**　Mdxマウス[1]はDuchenne型筋ジストロフィー症(DMD)のモデル動物として広く利用されているがそのphenotypeはDMDと異なり，骨格筋の筋力において特に若年マウスでは正常対照と大きな違いは無いと考えられてきた[2),3)]．またmdxの運動耐久能の異常を示した精密な研究は報告されていない．我々はコンピューターと接続したwheelの中でのマウスの自発運動を解析し，mdxには持続走行能の著しい低下がある事を始めて発見した．この現象に統計学的検討を加え，今後のin vivo phenotypeの評価方法としての有益性を考察した．

## はじめに

MdxマウスはBulfieldら[1]により発見されたDMDの最初のモデル動物であり，同じdystrophinopathyとして近年ＤＭＤの病態解明や遺伝子治療の基礎研究等において頻繁に使用され，ますます重要になりつつある．しかしそのin vivo phenotypeはDMDと異なり明らかな筋力低下をきたさず，治療研究の対象として評価方法の困難さの問題が浮かびつつある．我々はコンピューターと接続したwheelの中でのマウスの自発運動に正常マウスとは著しく異なる行動が見られる事を発見した．この現象をphenotypeの評価方法として利用することで，将来のより有効な治療研究に役立つと思い検討した．

## 目　的

mdxマウスの自発的走行能力をcomputerized wheelを用いて詳細に検討する．同じ家系内のwild typeとmdxを比較し，この方法がin vivo phenotypeの評価方法として有用であるか，2つのパラメータ(持続走行時間，総回転数)により統計学的に解析する．

## 対象と方法

マウスの家系間phenotypeの違いを避けるために同一家系内でのmdx及び wild type littermateを使用した．対象は全て雄で，8匹のmdxと8匹のwild typeを用いた．全てのマウスは生後第3週に母親から離され，genotypeの分析のため尾の一部を切除された後，4週より解析終了までwheel付きのケージで朝7時より夜7時が照明下で，夜間は無照明で飼育・解析が行われた．解析はマウスのサーカデイアンリズムの研究用装置[4]を使用し，解析期間中は各ケージの5分毎の回転数をコンピューターが24時間連続で測定した．測定期間は5,9,13及び21週齢に1週間連続の解析を行った．データーは解析用ソフトウエア(Circadia020: Behavioral cybernets)にてグラフィック化され，数値は表計算ソフトに移行し統計処理を行った．Genotypeの解析には我々が独自に開発したf-sscp(fluorescent-single strand conformation polimorphism)法が用いられた．

## 結　果

マウスの走行パターンを示すrunning activityグラフを見ると，全てのマウスで日中は活動せず夜間に活発な走行が見られた．また消灯後1時間は不規則な行動が多かった．このためデーターの解析は夜8時より朝7時までとした．またほぼ全てのmdxで短時間の走行～停止パターンの繰り返しを示したがwild typeでは長時間の連続走行を示す事が多かった(図1)．この現象を数値化するために一日の総回転数(TR : total revolution)及び平均持続走行時間(ACRT : average continuous running time)を求めた．ACRTは一定速度以上(100回転/5分)で走り始めた時点を開始点とし停止した時点で終了として平均値を求めた.全経過中mdxのACRTは18.8~38.5(平均 26.4) wild typeは34.6~128(平均 65.6)であり2群間の差を2標本T検定試験にて統計処理を行うと各週毎および全期間のいずれにおいても有意差が認められた($p<0.001$)．TRは9週以降で有意差を認めたが，2群間のTR値の解離はより少なかった(図2)．

## 考　察

1990年にCarlsonら[5]はforce transducerを用いて始めてmdx群とwild type群の骨格筋の筋力に差がある事を示した．しかしその差は2群間で統計的有意差を示したものの，各々のデータをみてmdxとwild typeとの判別ができるほど著しいものではなかった．また歴史的には様々な方法でmdxのphenotypeの解析が試みられたが，その殆どはwild typeとの違いを見い出せなかった[2),3)]．今回我々が示したACRTの著しい差の原因として，以下の3つの可能性を考えた．1)mdxの横隔膜には骨格筋と比べ著しい変性が見られmdxはhypoxiaを呈する[6),7)]．このため，走行によりmdx

* 昭和大学藤が丘病院神経内科
** Pennsylvania大学Neurology
*** Pennsylvania大学Psychiatry

は容易に呼吸苦を来すことが想像される．2)骨格筋には横隔膜ほどの変性は認められないが，正常との差を生理学的に認めた報告もある．運動によりcrampや筋肉痛が生じ不快感により走行を停止する可能性もある．3)mdxの中枢神経系にはdystrophinの異常があると思われ[8]，これが自発運動のmotibationに影響を与える可能性も否定は出来ないが，その可能性は低いと思われる．

## ま と め

1)mdxマウスのIn vivo phenotypeについてこれまで知られていなかった自発運動耐久能の異常がcomputerized wheelを使用し示された．2)running activityグラフを肉眼的に見てもmdxとwild typeの判別はほぼ可能と思われた．またこの現象を数値的に解析すると全期間を通じACRT40以上はwild type，30以下はmdxとの判別が可能と思われた．3)ACRT,TRとも2群間の統計的解析では有意差が認めらたが，全経過を通じての評価方法としてはACRTがより優れていた．

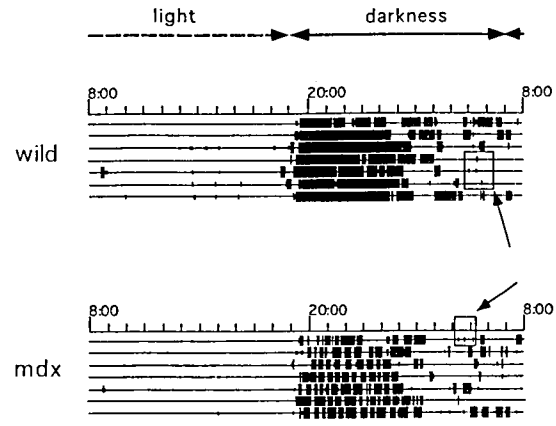



図1 第9週齢の代表的なmdxとwild typeの走行を示すrunning activity graph. Wild typeでは連続走行をしめす黒い横長のbarが消灯直後より数時間，連日続いているが，mdxでは不連続な走行を示す細かいbarが毎日続いている．四角で囲ってある短時間の不規則な走行はデータから削除されている．

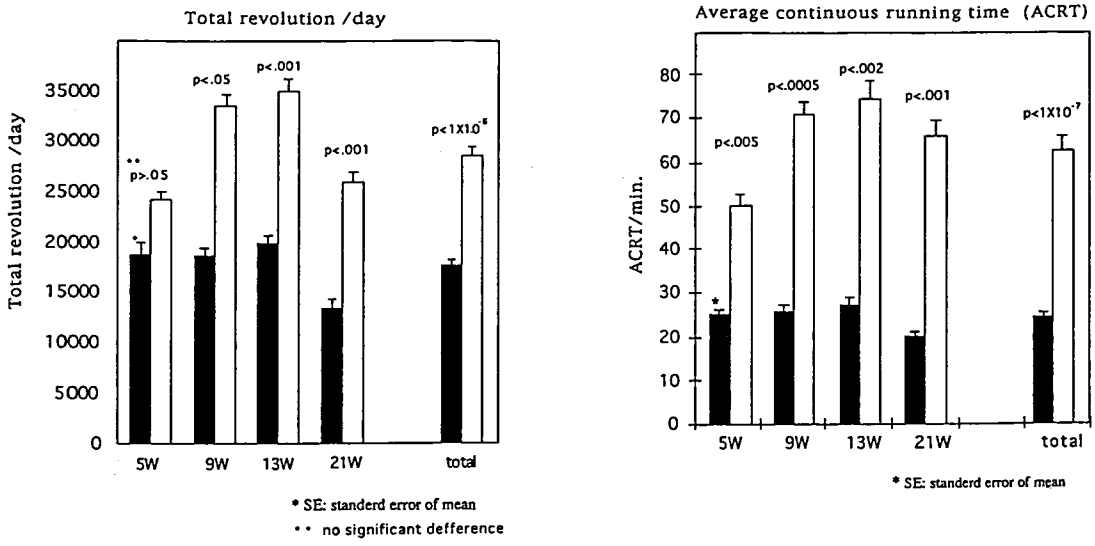



図2 ACRTとTRの各週及びtotalの結果．いずれも黒のbarはmdxを示し白のbarはwild typeを示している．ACRTは全期間を通じ2群間で有意差を示しており，dataの解離もより大きい．

## 文 献


1) Bulfield GS, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ, et al : X chromosome-linked muscular dystrophy(mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. 81 : 1189-1192,1984

2) Hudecki MS and Pollina PC : Mdx mouse as therapeutic model system: developmnet and implementation of phenotypic monitoring. Adv. Exp. Med. Biol. 280 : 251-265, 1990

3) Brown SC and Lucy JA : Dystrophin;gene,protein and cell biology. In: eds. Cambridge:Cambridge Univrsity Press, : 1-20, 1997

4) Pickard GE, Sollars PJ, Rinchik EM, et al : Mutagenesis and behavioral screening for altered circadian activity identifies the mouse mutant,wheel. Brain Research 705 : 255-266, 1995

5) Carlson CG and Makiejus RV : A noninvasive prcedure to detect muscle weakness in the mdx mouse. Muscle nerve 13 : 480-484, 1990

6) Stedman HH, Sweeny HL, Shrager JB, et al : The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative change of Duchenne muscular dystrophy. Nature 352:536-539, 1991

7) Dupont-Versteegden EE, Katz M and McCarter RJ : Beneficial versus adverse effects of long-term use of clenbuterol in mdx mice. Muscle nerve 18 : 1447-1459, 1995

8) Chamberlain JS, Pealman JA, Muzny DM, et al : Expression of the murine Duchenne muscular dystrophy gene in muscle and brain. Science 239 : 1413-1418, 1988

# mdxマウスの血液中のK, Ca, とNaの各イオン濃度とそれらに対するNaClの効果

吉 田 瑞 子*

研究協力者 和 田 圭 司*

**要 旨** NaClがmdxマウスの骨格筋崩壊を抑制する．その原因究明のため，mdxマウスの新鮮血液中の無機イオン濃度(K，CaとNaイオン濃度)を，7日から60日齢まで調べ，それらのイオン濃度に対するNaClの影響を調べた．その結果，mdxマウスの筋病理学的研究から知られている骨格筋崩壊過程に一致して，血液中のKイオン濃度が増加した． このKイオン濃度の増加が，NaClの摂取で抑制された．Caイオン濃度は，mdx及びB10マウスともに，7日齢から25日齢まで減少し続けた．Naイオン濃度は，両マウス共にCaイオン濃度とは逆に増加した．

## はじめに

私達は，Duchenne型筋ジストロフィー症(DMD)の骨格筋崩壊の直接原因は，骨格筋のL-型$Ca^{2+}$-channelの機能異常であることを，モデルマウスmdxを用いて明らかにした[1]．現在，この原因に基づいて治療方法を見い出すことを試みている．その中で，NaClが骨格筋崩壊を抑制することを見出した．NaClの骨格筋崩壊抑制機構を明らかにすれば，治療に応用出来ると考え，初めに血液中の無機イオン濃度に対するNaClの影響を調べた．

## 対照と方法

mdxとB10マウスの新鮮血液を用いた(n：20~30).

血液中の無機イオン濃度に対するNaClの影響は，普通飼料にNaClを加えた餌を親に与え，その親から生まれた仔の血液中の無機イオン濃度を調べた．

飼料は，0.3%Naが含まれる普通飼料(対照マウス用)と5%のNaを含む飼料を使用した．5%のNaを含む飼料は，普通飼料にNaClを加えて調製した(日本クレア).

血液中のNa，CaとKの無機イオン濃度は，i-STAT(扶桑薬品)を使用して，同時に測定した．血液中のCaイオン濃度は，pHに左右される．i-STAT装置は，pHが変化を受ける前に，イオン濃度を測定することが出来るため採用した．採血をマウスの正常状態で行い，イオン濃度を正しく測定したとする判断は，pH，ヘマトクリット値，Glucose量を同時に測定し，それらの値を指標にした．

血液は，マウスに軽いエーテル麻酔をかけ，心臓より採血した．採血後，すぐi-STAT装置用カートリッジに封入し測定した．測定は採血後約3分間で終了した．採血，測定過程で，血液凝固防止剤は使用しなかった．

## 結 果

**Kイオン濃度(図1)**：B10マウスのKイオン濃度は，日齢に従う変化はあまりなく，3.6から4.0mMの間でほぼ一定していた．一方mdxマウスは，日齢と共にKイオン濃度が増加した．7日齢の濃度は，B10の濃度に近い3.8mMを示した．しかし8日，10日齢で急激に増加し，20日齢から再び急激に濃度が増加，25日齢で最高濃度を示した．25日齢以後はKイオン濃度の大きな変化は無かった．8日齢のmdxマウスの中には，B10マウスに近いKイオン濃度を示すグループとmdxマウスの20日齢に近いKイオン濃度を示すグループがあった．

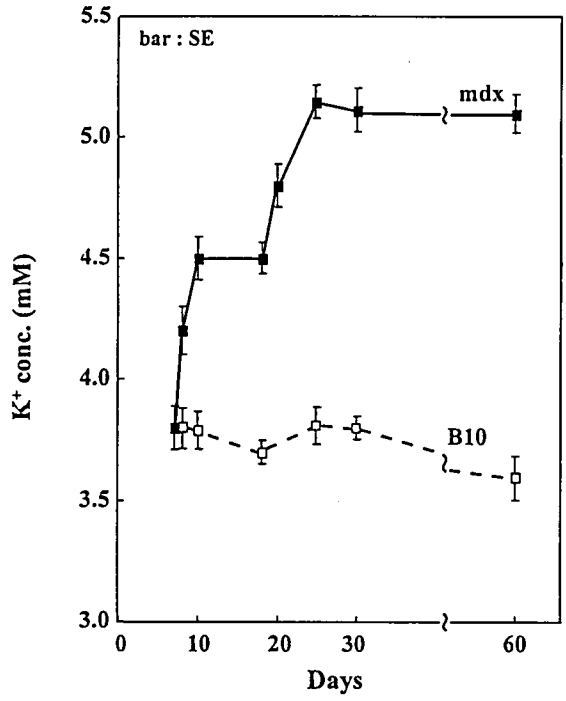



図1 mdxとB10マウスの日齢に対する血液中のKイオン濃度

* 国立精神・神経センター神経研究所

CaとNaイオン濃度(図2)：mdxとB10マウスのCaイオン濃度は，7日から25日齢まで急激に減少し，Naイオン濃度は増加した．mdxとB10マウスの日齢における，Caイオン濃度間に有意な差は認められず，またNaイオン濃度間にも有意な差は認められなかった．

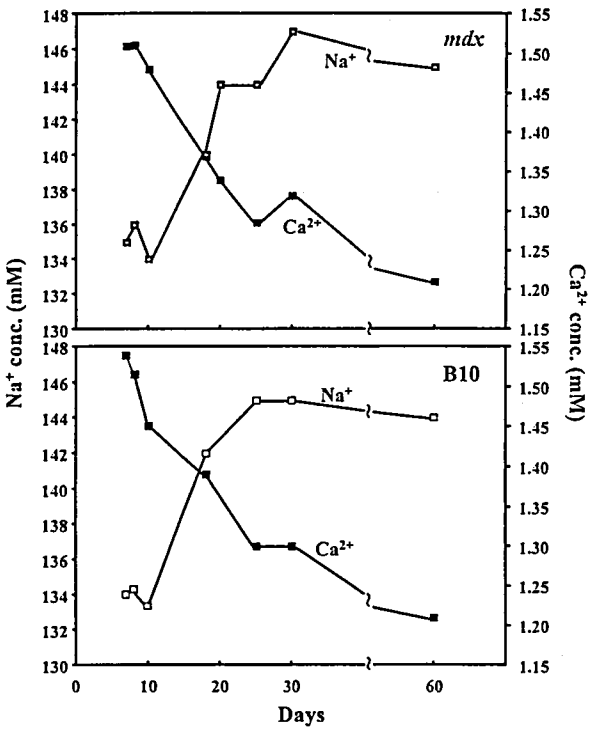



図2　mdxとB10マウスの日齢に対する血液中のCaとNaイオン濃度

NaClの影響：Kイオン濃度に対するのNaClの影響を図3に示す．

B10マウスの結果は，30日齢のみであるが，普通食餌のものよりも高Kイオン濃度になる傾向を示した．mdxマウスの場合，7日齢では，B10マウスの30日齢の結果と同様に高Kイオン濃度となった．しかし10,25,30日齢では，普通食よりも有意に濃度が減少した．

Caイオン濃度に対するNaClの影響を図4に示す．

β10マウスの結果は，30日齢のみであるが，普通食餌のCaイオン濃度とほぼ同じ濃度を示した．mdxマウスの場合，7日齢では普通食餌のものとほぼ同じ濃度を示した．しかし10日齢では有意に減少し，18日と25日齢では，有意に高Caイオン濃度になった．30日齢では，再び普通食餌のCaイオン濃度とほぼ同じ濃度を示した．

Naイオン濃度に対するNaClの影響は，mdxマウスの場合，18日齢から普通食餌のNaイオン濃度に対して有意に($p<0.02$)増加し，30日齢では普通食餌の145±0.4mMから154±1.3mMと増加した($p<0.0001$)．B10マウスの場合は，30日齢のみであるが，普通食餌の145±0.3mMから150±1.1mMと有意($p<0.0001$)に増加した．

## 考　　察

mdxマウスの7日齢のKイオン濃度は，B10マウスの濃度に近い3.8mMであった．しかし30日齢まで成長する間に2回急激にKイオン濃度が増加した．初めは8日，10日齢で急激に増加した．mdxマウスの骨格筋は，この10日齢頃から壊死線維が見られると言う報告がある[2]．2回目は20日齢から急激に濃度が増加し，25日齢で最高濃度を

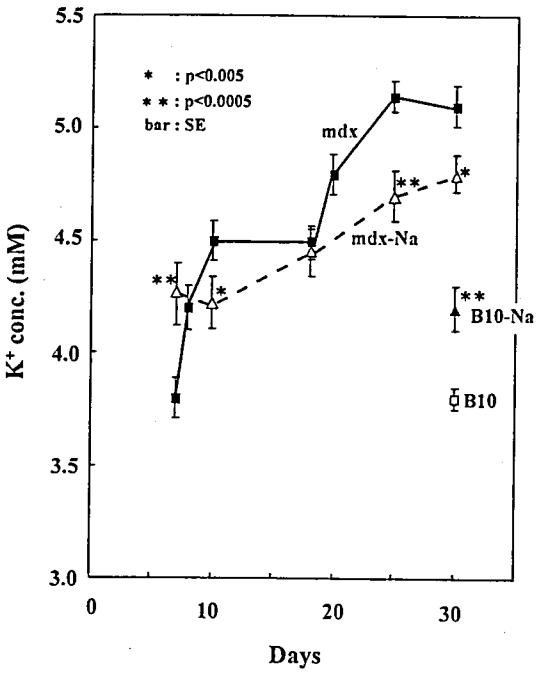



図3　mdxとB10マウスの血液中のKイオン濃度に対するNaClの影響
mdx-NaとB10-NaはNaCl摂取マウスのKイオン濃度

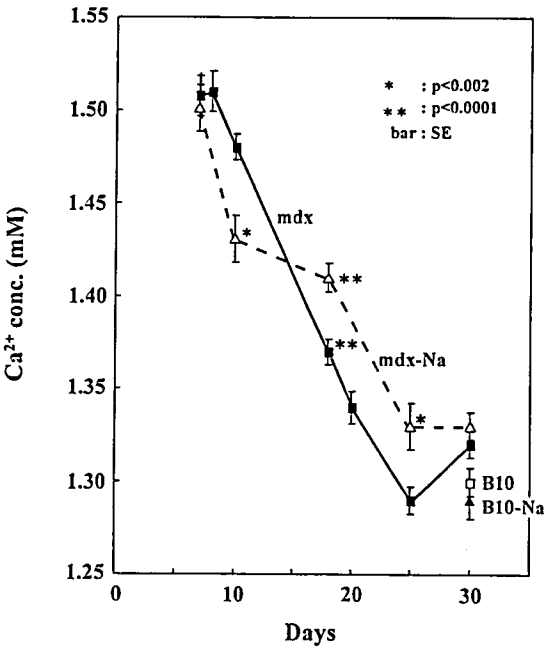



図4　mdxとB10マウスの血液中のCaイオン濃度に対するNaClの影響
mdx-NaとB10-NaはNaCl摂取マウスのNaイオン濃度

示した．この20日齢頃では壊死線維が多く見られ，25日齢頃では壊死・再生が盛んに生じている．30日齢では再生線維が多く見られるようになる．しかし壊死も生じているため，25日齢以後のKイオン濃度に大きな変化はなかった．このようにmdxマウスの日齢に従うKイオン濃度の増加は，mdxの筋病理学的研究から得られた壊死再生過程と一致した．従ってKイオン濃度の日齢に従う増加は，骨格筋崩壊により，細胞内から細胞外に流出したためと考えた．mdxマウスの7日から10日齢の間に，正常に近いKイオン濃度から急激に増加することは，この期間の発育過程で，骨格筋に筋崩壊を起こす原因が生じるのではないかと考える．

このような日齢によるKイオン濃度変化を起こすmdxマウスに，NaClを摂取させると，10日，25日と30日齢で，普通食餌のmdxマウスのKイオン濃度よりも有意に減少した． NaCl摂取のmdxマウスのKイオン濃度の変化の根底には，B10マウスのように，また正常値を示すmdxマウス7日齢のように，普通食餌のKイオン濃度より高濃度になる変化が含まれていると考えられる．しかしNaClの摂取により日齢によるKイオン濃度の増加が抑制されたことは， NaClによって筋崩壊が抑制されたためと考える．これらの結果は，5%のNa付加の食餌を与えた親から生まれた仔の，30日齢の血清中のCK値が，普通食餌のmdxマウスのCK値の約1/2の値までに有意($p<0.01$)に減少し，またそれらのマウスの前脛骨筋の壊死・再生線維面積が，普通食餌のmdxマウスに比較して有意($p<0.01$)に減少した結果[3]に一致した．

CaとNaイオン濃度の日齢による変化には，筋崩壊の影響はなかった．NaClを摂取した結果，血液中のNaイオン濃度が増加(18日齢以降)したことは，一般に知られている事実に一致する．Caイオン濃度に対するNaClの影響は，今後データを加え検討する．

## 文　献


1) Yoshida M, Matsuzaki T, Date M, et al : Skeletal muscle fiber degeneration in mdx mice induced by electrical stimulation. Muscle & Nerve 20 : 1422-1432, 1997.
2) 杉田秀夫，田辺雄三，埜中征哉ら：筋ジストロフィー症モデル動物の開発mdxマウス骨格筋の病理学的研究．厚生省「筋ジストロフィー症動物開発供給に関する研究」昭和55年度報告書：13-18, 1985.
3) 吉田瑞子，井上勲：mdxマウス骨格筋崩壊抑制に対するNaClの効果．厚生省精神・神経疾患研究委託費による研究報告書 平成8年度：223, 1996.

# dy/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*　小 嶋 宏 子*　鬼 木 弘 明**
斎 藤 宗 雄***　江 藤 智 生***　埜 中 征 哉****

**要　旨**　凍結割断法により，生後早期からのdy/dyマウス骨格筋細胞膜微細構造を解析し，mdxマウスのものと比較検討した．dy/dyマウスの生後7日～28日の膜内粒子密度はいずれも正常であったが，orthogonal array(OA)密度は生後14日より減少がみられ，そのsubunit particle密度は生後28日で有意に減少していた．また生後28日の筋症状が著明なdy/dyマウスと無症状のmdxマウスの微細構造変化を比較したところ，dy/dyマウス骨格筋細胞膜OA密度は，mdxマウスより著明に減少していた．従って，OA密度の変化は，特に筋ジストロフィー症の場合では，その障害程度と相関することが示唆された．尚，本研究の詳細な内容は下記論文に記述されている[1]．

## 文　献

1) Shibuya S, Wakayama Y, Oniki H, et al : A comparative freeze-fracture study of plasma membrane of dystrophic skeletal muscles in dy/dy mice with merosin (laminin 2) deficiency and mdx mice with dystrophin deficiency. Neuropathol Appl Neurobiol 23 : 123-131, 1997.

* 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
*** 実験中央動物研究所
**** 国立精神・神経センター研究所

# αDystroglycanの糖鎖構造とその機能的役割の解明

遠藤玉夫*

研究協力者　佐々木　翼*　木幡　陽*　山田広樹**
KP Campbell**　千葉厚郎*,***　楠　進***
金澤一郎***　松村喜一郎****　清水輝夫****

## はじめに

筋細胞膜においてαdystroglycanを含む複合体は，細胞内ではdystrophinと結合し，細胞外では細胞外マトリックスのlamininと結合し，筋細胞膜の安定化機構に深く関与すると考えられている．αdystroglycanは最初に骨格筋で見つかったが，その後様々な組織に存在することが分かった．この分子はその由来組織によって異なる分子量を示すが，組織により結合している糖鎖が異なるためにこうした差が生じると考えられている．これまでに我々はαdystroglycanがSchwann細胞の主要なlaminin結合蛋白であり，その結合にはαdystroglycanのO結合型シアル化糖鎖が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた[1]．そこで本研究では，αdystroglycan糖鎖の機能的役割を明らかにする研究の一貫として，その糖鎖構造について詳細な解析を加えた．

## 材料と方法

ウシ末梢神経の膜分画およびウサギ骨格筋の膜画分よりアルカリ抽出後，WGA-Sepharose columnおよびlaminin-Sepharose columnによりαdystroglycanを精製した.そして，βエリミネーション法および弱ヒドラジン分解法によりO結合型糖鎖を切り出し，それぞれ標識後陰イオン交換，ゲル濾過，レクチン，逆相の各カラムクロマトグラフィーと特異的な酵素による逐次消化を組み合わせ，その構造を解析した．また，各種シアル化オリゴ糖のαdystroglycanとlamininとの結合に及ぼす阻害効果についても検討した．

## 結　果

ウシ末梢神経およびウサギ骨格筋のαdystroglycanの精製品の電気泳動像を図1に示す．それぞれの分子量は，前者では約116K後者では約150Kであった．ウシ末梢神経αdystroglycanは，1モル当り約15モルのシアル酸(Sia)を含んでおり，そのうち約80%がN-アセチル体，残り20%がN-グリコリル体であった．なお，シアル酸の結合はα2→3であった．シアリダーゼにより中性化したオリゴ糖は，ゲル濾過で3.9グルコース単位(GU)の位置に主要ピークを与え，このオリゴ糖はGalβ1-4GlcNAc結合のみを特異的に切断する肺炎双球菌由来のβ-ガラクトシダーゼにより2.9GUに消化され，さらに同じく肺炎双球菌由来のβ-N-アセチルヘキソサミニダーゼにより0.8GUにまで消化された．この最終消化産物はマンノースであった．また，β-ガラクトシダーゼ消化後の2.9GUのオリゴ糖は，逆相カラムにてGlcNAcβ1-2Manの標準品と同一の位置に溶出した．以上の結果より，末梢神経αdystroglycanの主要なO結合型シアル化オリゴ糖は，哺乳動物には珍しいマンノースを還元末端に持つSiaα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manであることが判明した．さらに，この糖鎖と同じ末端構造を持つ3'-sialyl-N-acetyllactosamine(Siaα2-3Galβ1-4GlcNAc)により末梢神経αdystroglycanとlamininとの結合は最も強く阻害された(図2)[2]．次に，ウサギ骨格筋αdystroglycanについても同様に糖鎖解析を実施した結果，やはりSiaα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Man構造を含むことが判明した[3]．なお，それに加えてウサギ骨格筋αdystroglycanにはシアル化されたGalβ1-3GalNAc(コア1)構造も存在した．骨格筋αdystroglycanは，シアル酸を除くと初めてGalβ1-3GalNAcと強く結合するピーナッツレクチン(PNA)と反応するようになることが知られており[4]，我々の結果は構造的にこれを支持している．

## 考　察

Oマンノシル型糖鎖は，これまで真菌の細胞壁やゴカイの皮膚で中性あるいはグルクロン酸化されたものが報告されている．一方，シアル酸を含んだものは，ラット脳プロテオグリカン型糖蛋白にSiaα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Man→Ser/Thrの構造が報告されているのみである[5]．本研究で，我々が見出した糖鎖構造はこのラット脳糖蛋白に見られたものと極似しているが，GlcNAcとManの結合様式が異なっていた．一方，結合阻害実験の結果から，糖鎖末端のSiaα2-3Galβ1-4GlcNAc構造がlamininとの結合に関与していることが示唆された．lamininの欠損は，筋ジストロフィーや末梢神経における脱髄に関連することが良く知られている．本研究結果を踏まえると，αdystroglycan，特にそこに含まれるOマンノシル型新規糖

* 東京都老人総合研究所糖鎖生物学部門
** HHMIおよびIowa大学医学部
*** 東京大学医学部神経内科
**** 帝京大学医学部神経内科

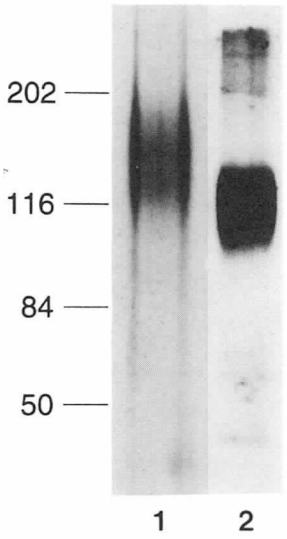



**図1** ウシ末梢神経およびウサギ骨格筋のα dystroglycanのSDS-PAGE像
レーン1：ウサギ骨格筋α dystroglycan
レーン2：ウシ末梢神経α dystroglycan
左端に分子量マーカー(x $10^{-3}$ Da)を示す.

鎖とlamininとの結合が，末梢神経における髄鞘形成において重要な役割を果たしている可能性が考えられた．さらに，骨格筋のα dystroglycanでもこの糖鎖が見出されたことは，我々が提唱しているlamininの糖鎖リガンドとして役割機能説を支持するものであり非常に興味深い.我々がOマンノシル型糖鎖の存在を報告した後，追いかけるようにOマンノシル型糖鎖に関する報告が相次ぎ，興味深いことにいずれも細胞接着に係わるといわれている糖鎖構造を含んでいた[6),7)]．その一つはヒツジ脳由来のα dystroglycanに関するものであった[7)]．これらの結果は，動物種を越え組織を越えα dystroglycan上には哺乳動物には珍しいOマンノシル型糖鎖が結合していることを示しており，α dystroglycan機能発現におけるこの糖鎖の役割解明に興味が持たれる．さらに，Oマンノシル型糖鎖の生合成経路の解明および糖鎖異常と筋ジストロフィーや脱髄疾患などの病態との関連の解明が急務な研究課題となっている.

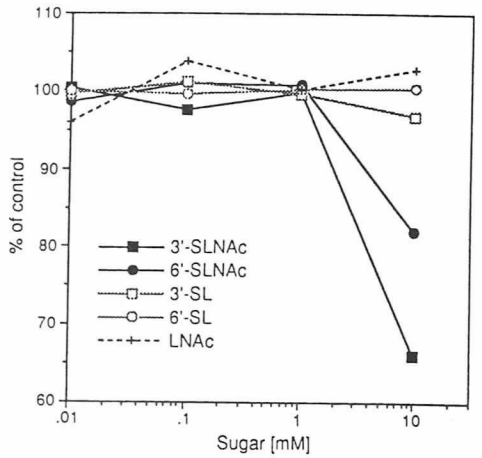



**図2** α dystroglycanとlamininの結合に及ぼすオリゴ糖の影響
それぞれ各濃度の3'-sialyl-N-acetyllactosamine (3'-SLNAc), 6'-sialyl-N-acetyllactosamine (6'-SLNAc), 3'-sialyllactose (3'-SL), 6'-sialyllactose (6'-SL), およびN-acetyllactosamine (LNAc)存在下α dystroglycanとlamininとの結合を測定した．96穴プレートにα dystroglycan(16ng)張り付け，各オリゴ糖存在下および非存在下ビオチン標識したlamininを反応させた．結合したlamininn量はavidin-biotin complex kitとo-phenylenediamine dihydrochlorideの発色により定量した．オリゴ糖非存在下での値を100%とした.

## 文　献


1) Yamada H, Chiba A, Endo T, et al : Characterization of dystroglycan-laminin interaction in peripheral nerve. J Neurochem 66 : 1518-1524, 1996.

2) Chiba A, Matsumura K, Yamada H, et al : Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve α-dystroglycan : the role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of α-dystroglycan with laminin. J Biol Chem 272 : 2156-2162, 1997.

3) Sasaki T, Yamada H, Matsumura K, et al : Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle α-dystroglycan. Biochim Biophys Acta 1425 : 599-606, 1998.

4) Ervasti JM, Burwell AL and Geissler AL : Tissue-specific heterogeneity in α-dystroglycan sialoglycosylation : skeletal muscle α-dystroglycan is a latent receptor for Vicia villosa agglutinin B4 masked by sialic acid modification. J Biol Chem 272 : 22315-22321, 1997.

5) Krusius T, Finne J, Margolis RK, et al : Identification of an O-glycosidic mannose-linked sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin sulfate proteoglycan of brain. J Biol Chem 261 : 8237-8242, 1986.

6) Yuen C-T, Chai RW, Loveless AM, et al : Brain contains HNK-1 immunoreactive O-glycans of the sulfoglucuronyl lactosamine series that terminate in 2-linked or 2,6-linked hexose (mannose). J Biol Chem 272 : 8924-8931, 1997.

7) Smalheiser NR, Haslam SM, Sutton-Smith M, et al : Structural analysis of sequence O-linked to mannose reveals a novel Lewis x structure in cranin(dystroglycan) purified from sheep brain. J Biol Chem 273 : 23698-23703, 1998.

# II．肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)

# 肢帯型筋ジストロフィーにおける カルパイン3遺伝子変異の検討

後 藤 雄 一*

研究協力者 南 成 祐*,** 村 山 久美子* 埜 中 征 哉*,**

## 緒 言

肢帯型筋ジストロフィー(limb-girdle muscular dystrophy: LGMD)は肩甲帯，腰帯などが好んで侵され，主に常染色体劣性，または常染色体優性遺伝を呈する筋ジストロフィーである．近年，遺伝学的解析が進み，異なる遺伝子座を有するサブタイプが次々に明らかになった．現在，常染色体優性のLGMD1A～1C，常染色体劣性のLGMD2A～2Hが知られている．

15番染色体長腕に連鎖するLGMD2Aは，1995年に至って，骨格筋特異的に発現する細胞内プロテアーゼであるcalpain3の遺伝子に変異があることが明らかにされた[1]．このサブタイプは当初Renion島住民から見いだされたものだが，北米のAmish，ブラジル，フランス，イスラエル，イタリア，レバノン，スイス，トルコ，アメリカのLGMD家系からも変異が見いだされた[1),2)]．

世界的な分布が明らかとなったLGMD2Aだが，本邦においてはその存在の有無すら不明であった．そこで本研究班において我々は，本邦における存在を確認することが急務であると考え，国立精神・神経センターの凍結筋バンクに保存されているLGMD患者の筋肉を使用し，calpain3遺伝子変異の探索を行った．また，筋病理像の検討結果から，分葉線維(lobulated fiber)を高頻度に有するLGMD患者は高率にLGMD2Aではないかという仮定を立てられ，それを確かめるための検索を行った．

## 患 者

まず，国立精神・神経センターにおいて臨床所見と筋病理所見からLGMDと診断した患者より18名を無作為に選んで対象とした．LGMDはしばしばBMDと誤診断されるため，ジストロフィン抗体による免疫染色を行ってBMDではないことを確認した．また，サルコグリカン抗体による免疫染色の結果，LGMD2C～2Fにあたるサルコグリカン異常症は除外された．家族歴に関しては常染色体劣性と思われる患者が4名，孤発患者が14名である．つぎに，分葉線維を高頻度に認めるLGMD患者9名を選び対象とした検索も行った．

* 国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部
** 国立精神・神経センター武蔵病院臨床検査部DNA診断・情報室

## 方 法

凍結筋より抽出した全RNAを用い，calpain3遺伝子の全翻訳領域を内包するRT-PCR 産物を得てその塩基配列をサイクルシーケンシング法により決定し，正常配列と比較した．さらにゲノムDNAにおいて変異の存在を確認するため，患者から抽出したDNAの変異周辺部をPCR増幅してシーケンシングを行い，また変異を見分ける制限酵素切断法を行った．そのままでは適当な制限酵素による認識部位の変化がない変異はミスマッチプライマーを設計した．また，この制限酵素切断法を用いて正常対照群94名のスクリーニングを行った．

## 結 果

18名のLGMD患者を検索した結果，5名の患者から4種の塩基置換を見出した(表1)．アミノ酸置換を引き起こす440G→C(R147P)，1381 C→T (R461C)，2120A→G(D707G)と，intron5のスプライスドナー部位変異801+1g→aであり，いずれもこれまでに報告のない変異である．アミノ酸置換は以下の3点より病的変異と判断した．(ｉ)本来のアミノ酸が進化上よく保存されている，(ii)側鎖の性質が変化している，(iii)94名の対照集団(正常者と他疾患患者)からは見出されなかった．一方，スプライス部位変異は，RT-PCR産物のシーケンシングの結果，mRNAにおいてexon4&5skipping を引き起こすことが判明し，タンパク質としてはプロテアーゼ・ドメイン中の101個のアミノ酸が欠失することが予想された．

表1 見出された変異
左列にヌクレオチドの変化を，右列にタンパク質への影響を示す．上から3つはアミノ酸置換を，一番下の変異は異常なスプライシング(exon 4 & 5 skipping)をそれぞれ引き起こす．ヌクレオチドの番号はcDNA上の翻訳開始コドンATGのAを1としている．

| *Mutations* | *Effects* |
|---|---|
| 440G→C | R147P |
| 1381C→T | R461C |
| 2120A→G | D707G |
| 801+1g→a (1st nt of intron 5) | Aberrant splicing |

表2　変異が認められた患者のまとめ

| Pt | Mutation | Sex | Age at MBx | Age at Onset | MMT Prox | MMT Dist | CK |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | R461C / R461C | F | 63y | 50y | 3+ | 4+ | 579 |
| 2 | D707G / D707G | M | 54y | 35y | 3+ | 4+ | 457 |
| 3 | R461C / R461C | M | 55y | 14y | 4 | 5 | 1460 |
| 4 | R147P / unknown | M | 27y | 10y | 3 | 4+ | 1558 |
| 5 | R461C / Exon 4 & 5 skipping | M | 7y | 6y | 5 | 5 | 7669 |

表3　分葉線維を多数有するLGMD患者の検索結果

| Pt | Sex | Age | Lobulated fibers | Mutations* |
|---|---|---|---|---|
| 1 | M | 49y | 80% | R461C / R461C |
| 2 | M | 35y | 80% | G233V / G233V |
| 3 | F | 26y | 40% | G233V / D707G |
| 4 | F | 21y | 30% | G233V / G233V |

* 4 / 8 (50%) families

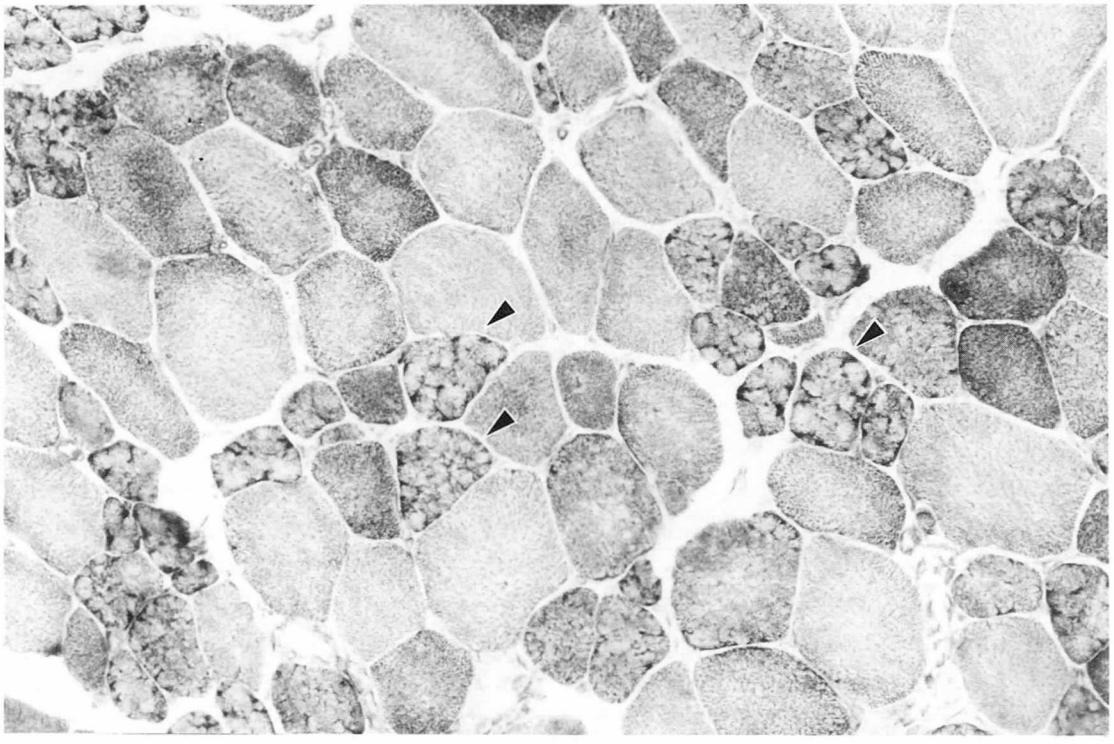


図1　患者4のNADH染色像　　分葉線維(lobulated fiber)が多数認められる(矢尻).

ゲノムDNAでの確認を行った結果，患者1と3ではR461C，患者2ではD707Gのアレルのみを認め，ホモ接合である可能性が高いと考えられた．患者4はR147Pのヘテロ接合，患者5はR461Cとスプライス部位変異801+1g→aとのコンパウンドヘテロ接合であることが確認された(表2)．患者4の片方のアレルの変異は同定できていないが，その転写産物が検出されないことから，mRNAの発現量や安定性の低下を招く変異の存在が予想された．

臨床像を比較すると，アミノ酸置換のホモ接合である患者1～3よりも，より破壊的と予想されるnull変異とのヘテロ接合である患者4と5の方が発症年齢が低く，筋力低下の進行も早い，CK値も高い，といった傾向があった(表2)．心筋症は認められなかった．患者5はまだ若く筋力低下が認められないが，筋痛と腓腹筋の仮性肥大が認められた．5名とも家族歴はなく，近親婚については患者1の両親がいとこ婚であった．

筋病理像については，全5例で筋原線維間網の乱れが顕著で，とくに分葉線維(lobulated fiber)の出現が4名に認められた点が特徴的であった(図1)．

分葉線維を数多く有するLGMD患者8名を対象として新たな検索を行ったところ，4名(50%)に変異を認めた(表3)．すなわち，無作為にLGMD患者を対象としたとき(4/18名=28%)よりも高率にcalpain3の変異が見いだされた．新たに見つかったアミノ酸置換の変異698G→T(G233V)のホモ接合が2名，R461Cのホモ接合が1名，G233VとD707Gのコンパウンドヘテロ接合が1名である．なお，G233V変異も94名の対照集団には見られなかった．

## 考　　察

無作為に対象としたLGMD患者18名から5名(28%)にcalpain3遺伝子変異を見出した．これまで，本邦におけるLGMD2Aの存在を疑問視する考えもあったが，今回の研究によりその存在が明白になったのみならず，LGMDのなかでかなりの割合を占めることが示唆された．5名がす

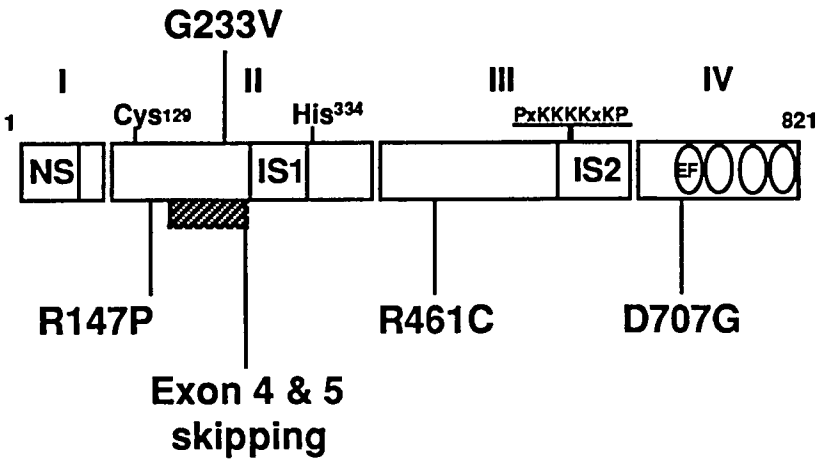



**図2** Calpain3タンパク質構造上での変異の位置
Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳはcalpain3のドメインを表す．アミノ酸置換を起こす3つの変異はドメインⅡ，Ⅲ，Ⅳに散在して存在する．Intron5のスプライスドナー部位の変異はexon 4 & 5 skippingを引き起こし，ドメインⅡの101個のアミノ酸を欠失させる．ドメインⅡはプロテアーゼ活性を示し，Cys129とHis334が活性部位をなしている．ドメインⅢの機能は分かっていない．ドメインⅣはカルシウム感受性ドメインであり，カルシウム結合モチーフであるEF hand構造を4つ持つ．NS，IS1，IS2はcalpain3以外のcalpainファミリーには見られない配列である．

べて孤発例であったことも重要である．LGMDの過半数は孤発例であり，正確な頻度を知るには，より多くの患者について変異を調べる必要がある．

今回見つかったのべ5種の変異はcalpain3遺伝子全域に散在しており(図2)，ホットスポットはないとする報告に一致している[1),2)]．しかし一方で，4名でR461Cを，3名でG233Vを認めたことは興味深い．本邦ではこれらの変異が比較的高頻度に存在している可能性がある．Calpain3抗体を用いたイムノブロットによりLGMD2A患者ではcalpain3タンパク質が欠損するとの報告があるが[3)]，calpain3の自己消化現象から識別する方法が確立されない限り診断に応用することはできないであろう．従って，LGMD2Aについては遺伝子診断が必須である状況が続くと思われる．その際，全シーケンスの解析をする前に，一次スクリーニングとしてR461CやG233Vを調べることが有効であると期待される．

最近，calpain3の変異体の生化学的性質の解析から，プロテアーゼ活性の低下がLGMD2Aの発症原因であることを示唆する報告がなされた[4)]．しかしながら，どのようにして筋病変へと至るのかについては未だ想像の域を出ていない．また，calpain3が筋原線維の巨大弾性タンパク質であるconnectinと相互作用することも，分子レベルの病態を考える上で大変興味深い[5)]．我々の結果は，calpain3異常筋において分葉線維が出現しやすい傾向にあることを示しているが，この分葉線維を研究することでこれらの過程について情報を得られる可能性があり，今後，微細形態学的な検討などを進める必要性があるだろう．

## 文　献


1) Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannilkulchai N, Bourg N, Brenguier L et al : Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. Cell 81 : 27-40, 1995

2) Richard I, Brenguier L, Dincer P, Roudaut C, Bady B, Burgunder JM, Chemaly R et al : Multiple independent molecular etiology for limb-girdle muscular dystrophy type 2A patients from various geographical origins. Am J Hum Genet 60 : 1128-1138, 1997.

3) Spencer MJ, Tidball JG, Anderson LV, Bushby KM, Harris JB, Passos-Bueno MR, Somer H et al : Absence of calpain 3 in a form of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2A). J Neurol Sci 146:173-178, 1997.

4) Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, Richard I, Saido TC, Beckmann JS, Ishiura S et al : Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. J Biol Chem 273 : 17073-8, 1998.

5) Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, Sasagawa N, Sorimachi N et al:Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. J Biol Chem 270 : 31158-31162, 1995.

# Calpain 3の遺伝子異常が認められた常染色体劣性肢帯型筋ジストロフィー(LGMD2A)の4家系9症例の臨床，筋病理，遺伝子異常ならびに骨格筋におけるcalpainの発現

川　井　尚　臣*

研究協力者　足　立　克　仁**　乾　俊　夫***　佐　橋　功****　衣　斐　達****
柏　木　節　子*****　西　田　善　彦******　Richard, I*******
Beckmann, JS*******　石　浦　章　一********　反　町　洋　之********

**要　約**　Calpain 3の遺伝子異常を有する症例の臨床，筋病理，遺伝子異常，並びに骨格筋におけるcalpain 3の発現について述べた．筋萎縮は肢帯型優位で，発症年齢は10歳前後，歩行不能は40歳前後と経過は比較的緩徐であった．筋病理ではいわゆる筋ジストロフィー所見をし示したが，opaque線維はきわめて少なく，再生筋細胞はほとんどみられなかった．遺伝子異常は，家系1と2にG1080C，家系3には1796insAが，そして家系4の例には-35exon12⊿Gが認められた．生検骨格筋を試料としたウエスタンブロットでは，家系1の症例はcalpain 3はほぼ正常に残存しており，家系3と4の症例は完全に欠失していた．

## はじめに

Calpain 3は骨格筋に特異な蛋白分解酵素である．1991年Richardら[1]によりはじめて常染色体劣性肢帯型筋ジストロフィー(LGMD2A)患者に本蛋白質の遺伝子異常のあることが明らかにされた．その後，我が国[2]を含め世界各国から本症の遺伝子異常が報告されている[2,3]．

本論文では，我々がほぼ35年前より常染色体劣性の肢帯型筋ジストロフィーとして経過を観察していた症例にcalpain 3の遺伝子異常を見出したので，それらの症例について臨床像，筋病理組織像ならびに遺伝子異常を述べ，さらに骨格筋中のcalpain 3の発現についての成績を述べる．

## 対象と方法

対象として，両親に近親婚があり，筋萎縮は肢帯型優位で，筋病理組織所見がいわゆるジストロフィー変化を示した4家系(Ⅰ,Ⅱ,ⅢおよびⅣ)9症例である．現在の年齢は53～64歳(平均54.5歳)で，発症年齢は8～12歳(平均9.7歳)である(表1)．

**方法**：上記4家系のうち，生検筋が得られた4症例(1-Ⅳ-2,2-Ⅳ-6, 3-Ⅳ-4, 4-Ⅲ-5)の筋病理組織像を調べた．染色はヘマトキシリン・エオジン(HE)，Gomoritrichrome変法，NADH-TR，ATPase(pH9.2)などの染色を行った．その他に，各種後述の膜関連蛋白(後述)を免疫組織化学的に調べた．

遺伝子解析は，培養末梢血リンパ球より抽出したRNAならびにDNAを試料として，calpain 3遺伝子に特異的なプライマー[1,2]を用いてDNA断片の塩基配列を調べた．

骨格筋試料のウエスタンブロット方法としては凍結生検筋ホモジネート20～40mgをSDS PAGEミニゲル(8～16%)にて電気泳動後，PVDF膜に転写し，抗calpain 3抗体(山羊抗体でcalpain 3のIS2領域のN端側22個のアミノ酸残基からなるオリゴペプチドで免疫して得られたものを1次抗体として，4℃でインキュベートし，ABC法を用いてDABにて発色した．なお，筋試料解凍からSDS PAGEゲルにかけるまで20分以内で行った．

## 結　果

**筋病理組織所見**：大腿四頭筋，あるいは大殿筋の生検筋で，筋細胞の大小不同，円形化があり，筋細胞の内部構築もやや乱れていた．壊死・変性細胞は少なく，opaque細胞はみられなかった．しかし，特殊な構造物もなく，間質も増生しているなど，いわゆるジストロフィー性変化がみられた(図1)．ミトコンドリア異常はみられなかった．免疫組織化学ではジストロフィン，サルコグリカン($\alpha,\beta,\gamma$)，ラミニン2などは正常に染色された(図略)．電顕的にはpatchyにZ帯の崩壊がみられ，隣接するI帯，そしてA帯にも崩壊像がみられた．ミトコンドリアの変形や膨化も認められた．

* 高松市民病院内科
** 国立療養所徳島病院内科
*** 国立療養所徳島病院神経内科
**** 愛知医科大学第四内科
***** 徳島県健診センター
****** 徳島大学医学部第一内科
******* Genethon, France
******** 東京大学大学院総合文化研究科
********* 東京大学分子細胞生物学研究所

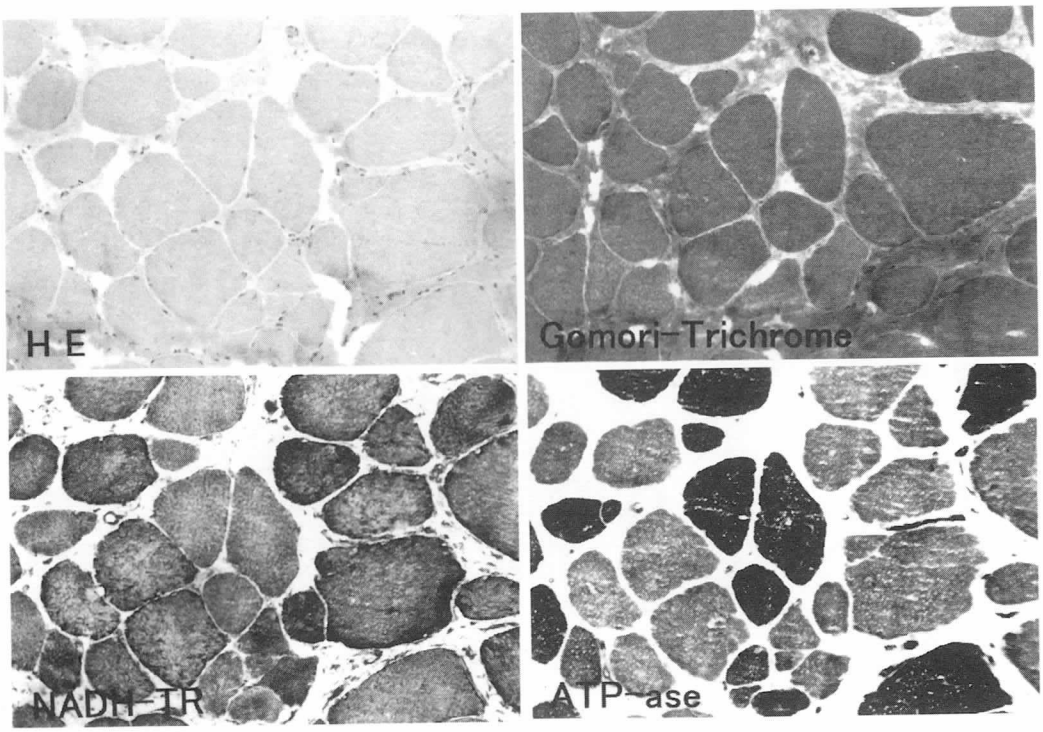



**図1** 病理組織像．筋細胞の大小不同があり，壊死と再生細胞は少ないが存在し，内部構造の乱れなどもみられる.いわゆる筋ジストロフィー変化を示す．75倍.

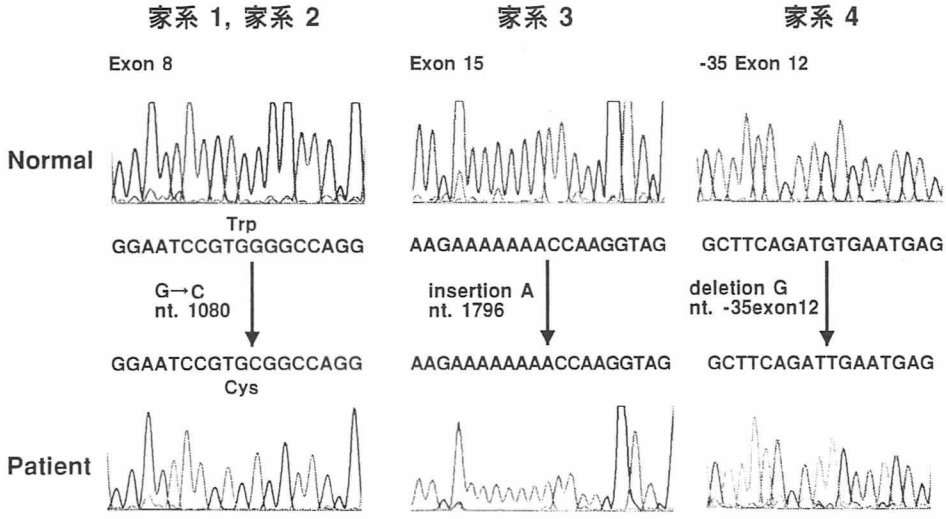



**図2** 遺伝子解析．家系Ⅰ，ⅡはG1080C，家系Ⅲには1796insAがあり，家系Ⅳには-35exon12⊿Gの変異が認められた.

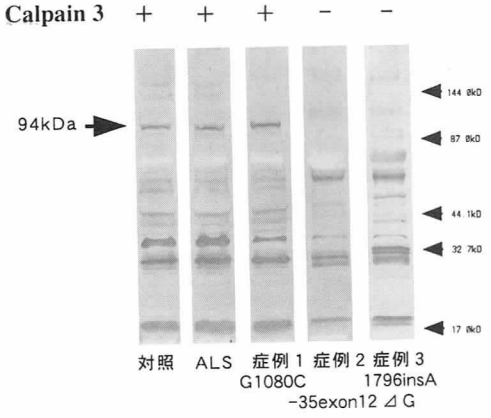



**図3** Calpain 3のウエスタンブロット検索．症例1(1-Ⅳ-2)ではcalpain 3量は対照とほぼ同じ量，あるいはそれと似上認められ，症例2(4-Ⅲ-5)と症例3(3-Ⅲ-4)とは完全に欠損していた.

**表1** 症例の臨床所見

| 家系 | 1 | | | 2 | | 3 | | 4 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 症例 | Ⅳ-1 | Ⅳ-2 | Ⅳ-3 | Ⅳ-4 | Ⅳ-6 | Ⅲ-3 | Ⅲ-4 | Ⅲ-5 | Ⅲ-6 |
| 年齢 | 57 | 55 | 53 | 50 † | 54 | 49 † | 61 | 64 | 59 |
| 性 | 男 | 男 | 男 | 女 | 男 | 男 | 男 | 女 | 女 |
| 発症年齢 | 10 | 10 | 8 | 8 | 8 | 12 | 8 | 9 | 10 |
| 両親の近親婚 | またいとこ婚 | | | またいとこ婚 | | いとこ婚 | | いとこ婚 | |
| 同胞数（病者数） | 6(3) | | | 8(2) | | 4(2) | | 6(2) | |
| 下肢機能障害 | Ⅶ | Ⅶ | Ⅶ | Ⅴ | Ⅶ | Ⅵ | Ⅶ | Ⅶ | Ⅵ |
| 歩行不能年齢 | 40 | 40 | 35 | 42 | 37 | ? | 40 | 37 | 39 |
| 血清 CK 値 (IU/L) (47～277 IU/L) | 196 | 174 | 297 | 600 | 305 | (-) | 132 | 411 | 596 |
| 青年期 CK 値 | 8 倍 | 18 倍 | 20 倍 | 15 倍 | 12 倍 | ? | 10 倍 | ? | 10 倍 |
| 筋萎縮 | 肢帯部優位 | | | 肢帯部優位 | | 肢帯部優位 | | 肢帯部優位 | |
| 筋病理所見 | ジストロフィー変化 | | | ジストロフィー変化 | | ジストロフィー変化 | | ジストロフィー変化 | |
| ジストロフィン | n.e. | + | n.e. | n.e. | n.e. | n.e. | + | + | + |
| α-SAG | n.e. | + | n.e. | n.e. | n.e. | n.e. | + | + | + |
| ラミニン2 | n.e. | + | n.e. | n.e. | n.e. | n.e. | + | + | + |
| 遺伝子異常 | G1080C | | | G1080C | | 1796 △ G | | -35exon12 △ G | |

n.e ; not examinned, SAG ; sarcoglycan

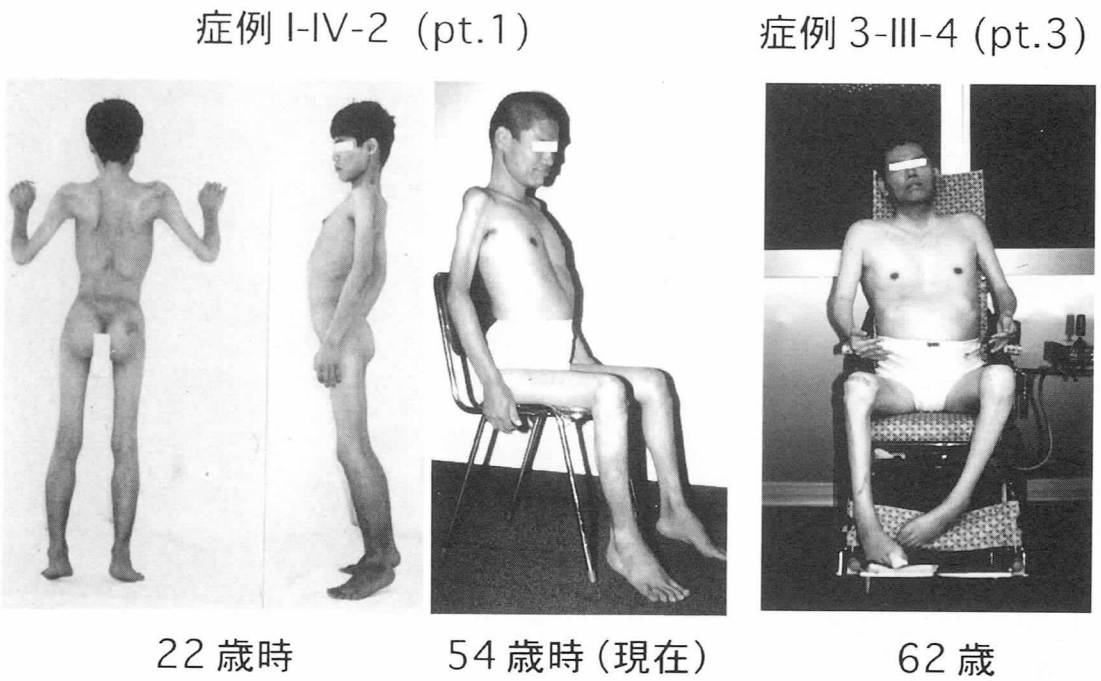



**図4** 症例の写真．左二つは症例1(1-IV-2)の約32年前の写真である．肢帯，腰帯，四肢近位部に優位な筋萎縮がみられる．中央はその54歳時のもので独歩は不能で全身の筋萎縮がみられるが，肢帯優位の傾向がみられる．右端は症例3(3-III-4)の現在のものであるが，筋萎縮は全身，四肢遠位部に及んでいる．

**Calpain 3の遺伝子異常**：遺伝子解析については，家系IとIIでは，ゲノム DNAに同じG1080Cの変異が認められた．この2家系はcalpain 3遺伝子の近辺のマーカーDNA(5種類)のハプロタイプ(D15S514, D15S779, D15S782, D15S780,D15S778)も同じであった．一方，家系IIIでは1796insAの変異がみられた．家系IVでは-35exon12△Gが検出された(**表1**，**図2**)．これらの家系ではDNAハプロタイプはホモ接合型であった．

**生検骨格筋中calpain 3のウエスタンブロット**：症例1(1-IV-2)では94kDの位置に一本のバンドが認められ，これがcalpain 3と考えられた(**図3**)．このバンドは正常対照筋，ALS筋のものに比べむしろ濃く認められた．症例2(4-III-5)ではcalpain 3に相当する94kDのバンドは全く認められず，症例3(3-III-4)でも同じく94kDのバンドは認められなかった(**図3**)．

**臨床症状と経過**：初期の青年期には筋萎縮は腰帯部，肩胛部，四肢近位などに優位に認められた(**図4**，左，中央)．腓腹筋の軽度の肥大所見も認められた．顔面の筋萎縮は軽度であった．現在は，筋萎縮は全身性に認められる(**図4**，中央，右端)が，やはり同上部位に優位な傾向が認められた．軽度ながら関節の拘縮も認められた．血清CK活性値は現在(50～60歳代)ではほぼ正常値を示すが，青年期には正常の10～20倍とDuchenne型に比べ中等度の上昇が認められた．

我々の症例の臨床経過は比較的緩徐で，互いに極めて類似していた．臨床経過は筋ジストロフィーのDuchenne型や悪性肢帯型(SCARMDとほぼ同じ)に比べ発症年齢は8～12歳と遅く，歩行不能年齢は35～42歳(平均38.5歳)と緩徐であった．

## 考　　察

Calpain 3の遺伝子異常を有する4家系9症例について，臨床的な特徴は，筋萎縮はいずれも腰帯部優位であり，発症年齢，経過なども同じくDuchenne型あるいは悪性肢帯型(MLGMD)やSCARMDと比べ緩徐であった．顔面筋は比較的障害が少なかった．

筋病理所見は，基本的には筋ジストロフィー性変化であった．他の報告者[4]により指摘されているlobulated fiberはみられなかった．我々の症例は，年長時に採取した生検筋を用いたためこの所見がなかったのかも知れないが，必ずしも本症に特異的な所見とは云えないと思われた．

電顕的にはZ帯の崩壊，その近接のI帯，A帯にも変化が認められた．これは他の筋ジストロフィーにもみられる所見であるが，本症の筋崩壊がZ帯にはじまり，I帯，そしてA帯へと進展していくことを示唆している．この筋崩壊のプロセスとcalpain 3の機能との直接の関連は今のところ明らかでない．

遺伝子異常については，自験家系はすべて両親に近親婚があり,またDNAマーカーもホモ接合型であった．そしてcalpainの遺伝子に変異が認められたことから,これらの例の病因はcalpain 3の遺伝子異常によるものと考えられる．更に家系IとIIの祖父母は近隣地域の出身であること,DNAハプロタイプも同じであることより,これらの家系例の遺伝子変異は創始者効果によることが考えられた．

自験例の遺伝子異常はいづれもcalpain 3の活性ならびに構造に異常を生じ，本蛋白質の機能が異常になることが推定されるが，calpain 3分子が実際に筋細胞内にどの程度に存在するかが問題となる．これをウエスタンブロットにより確かめた．その結果，3家系3症例のうち1例ではcalpain蛋白が正常筋とほぼ同じように認められた．この症例はC1080Gの遺伝子異常をもつ症例であるが，アミノ酸としては，W360Cのアミノ酸変異，すなわちトリプトファンがシステインに置換するものであり，この部位にSH基を有するアミノ酸が一つ増えることになる．異常部位が蛋白分解酵素の活性部位に当たることから，恐らく酵素活性の低下したcalpain 3分子が合成され，このため，代償的にcalpain 3の生成が増加した可能性がある．次に症例2(4-Ⅲ-5)であるが，この症例の塩基変異はイントロンに検出され，エクソンには認められなかった．本例ではスプライシング部位(splicing site)の近傍に変異が生じたため，スプライシング異常がおこり，蛋白生合成不全が生じたと考えられる．症例3(3-Ⅲ-4)では塩基番号1796にadenine(A)の挿入が生じたためコドン360が終止コドンになり，その結果，calpain 3の$Ca^{+}$結合部位を含むC末端部分が欠損することが同蛋白質の欠損理由と考えられる．以上のことより，calpain 3の遺伝子異常の座位や種類によって同蛋白質に種々の生合成異常がおこり，生合成がむしろ亢進する例や，欠損する例のあること，さらに，同遺伝子のエクソンに異常がなくともcalpain 3の欠損が生じることなどが明らかになった．国外におけるLGMD2Aの報告例の中で，calpain 3の生合成の増加(減少していない)例や，イントロンの遺伝子異常によるcalpain 3の欠損例の報告はみられない．

Calpain 3のウエスタンブロットによる検索はすでにSpencerら(1997)[5]の報告があるが，全ての例でcalpain 3が欠損している．Calpain 3の遺伝子異常は本遺伝子の各部位に生じ，とくにhot spotは見当たらない．このことは遺伝子異常により種々の変異calpain 3が生成することを示唆するものであり，本症の症例の臨床経過，臨床症状にかなりの多様性が生じることが推定される．

## 文　献


1) Richard I, Broux O, Allamond V, et al : Muttions in the protolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. Cell 81 : 27-40, 1995
2) Kawai H, Akaike M, Kunishige M, et at : Clinical pathological, and genetic features of limb-girdle muscular dystrophy type 2A with new calpain 3 gene mutations in seven patients from three Japanese families. Muscle Nerve 21 : 1493-1501, 1998.
3) Urtasun M, Saenz A, Roudaut C, et al : Limb-girdle muscular dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country, Spain). Brain 121(Pt 9), 1736-1747, 1998.
4) 後藤雄一：肢帯型筋ジストロフィーにおけるカルパイン3遺伝子変異の検討．平成9年度厚生省精神・神経疾患研究委託費による研究報告集 (2年度班・初年度班) 1997, p51
5) Spencer MJ, Tidball JG, Anderson LVB, et al : Absence of calpain 3 in a form of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2A). J Neurol Sci 146 : 173-178, 1997.

# 筋ジストロフィー生検筋におけるカルパインの免疫組織化学的観察およびウエスタンブロット解析

佐橋　功[*,**]

研究協力者　衣斐　達[*,**]　井上裕康[*]　張　桂珍[*]
任　立群[*]　乾　俊夫[***]　川井尚臣[****]
南　成祐[*****]　埜中征哉[*****]　反町洋之[******]
石浦章一[*******]

**要　旨**　カルパイン・ファミリー；カルパイン1,2,3の筋ジストロフィー生検筋における免疫染色と，肢帯型ジストロフィー(LGMD)2A型生検筋のカルパイン3・ウエスタンブロット(WB)解析を行なった．免疫染色ではカルパイン1,2,3ともに筋形質にびまん性に分布し，カルパイン1,2は形質膜に，カルパイン3は核に強く発現していた．病的筋では再生筋に多く発現し，筋の発達/分化への関与またrimmed vacuole型遠位型ミオパチーの萎縮線維での高い発現は筋構成蛋白のダウンレギュレーションとの関連を考えた．WB解析では24例中8例でカルパイン3のバンドが検出されなかったが，LGMD 2A遺伝子異常が確認された一部症例でも検出/非検出例があり，WB法の問題点や限界を考察した．

## はじめに

カルパイン・ファミリーには普遍的カルパインと組織特異的なカルパインのグループに分けられる[1]．前者にはカルパイン1(μ)と2(m)があり，後者には骨格筋に特異的なカルパイン3 (nCL-1、p94)があり，肢帯型ジストロフィー (LGMD)2A型の病因として知られている[2]．我々はカルパインの各アイソフォームに対する抗体を用い，筋ジストロフィー(PMD)の生検筋においてその局在を免疫組織化学的に検討した．またカルパイン3の自験LGMD症例の生検筋凍結保存材料においてウエスタンブロット(WB)法を行い，カルパイン3欠損を確認できるか否かにつき検討をおこなった．

## 対象および方法

### 免疫組織化学的検討

PMDとしてDuchenne型PMD(DMD) 4，DMD保因者 4，Becker型PMD (BMD) 5 ，LGMD 15，顔面肩甲上腕型PMD (FSH) 3，筋緊張性ジストロフィー(MyD) 6，rimmed vacuole型遠位型ミオパチー(DMRV) 4の生検骨格筋の新鮮凍結切片を用いた．

免疫組織化学染色は，生検筋新鮮凍結切片(8μm厚)をABC法(Vectastain elite kitを使用)により，一次抗体として抗カルパイン1抗体(マウス単クローン抗体，Chemicon)，抗カルパインS(small subunit，30kDa)抗体(マウス単クローン抗体，Chemicon)，抗カルパイン2抗体 (家兎抗体，Chemicon社)，抗カルパイン3抗体 (山羊抗体，カルパイン3のIS2領域N端側22アミノ酸残基からなるオリゴペプチドで免疫)を用い免疫染色した．

### ウエスタンブロット(WB)法

対照骨格筋にて上述の各抗体を用いWB法を行った．また抗カルパイン3抗体によるウエスタンブロット法の対象は，診断未定のLGMD24例(3例はカルパイン3遺伝子解析にてLGMD2A型と診断済[3])を用いた．疾患対照としてBMD 2，FSH 2，MyD 2，筋萎縮性側索硬化症(ALS) 1，急性骨格筋壊死 1の生検筋凍結保存標本を用いた．

WB法は，ドライアイス凍結保存生検筋ホモジネート20-40μg をSDS PAGEミニゲル(8-16%)にて電気泳動後，PVDF膜に転写し抗カルパイン3抗体を1次抗体として4℃でovernightインキュベートし，ABC法を用いDABにて発色し検討した．

またWB法にてLGMD2A型が疑われた6例において，カルパイン3遺伝子のRT-PCR産物よりLGMD2A遺伝子領域の塩基配列を検討した[4]．

## 結　果

### 免疫染色

カルパイン1の免疫染色は，筋形質内にびまん性に陽性であり形質膜と核により濃染していた．また再生線維や一部萎縮線維の筋形質で他線維より濃染していた．MyDでのsarcoplasmic massやDMRVでの萎縮線維でより濃染したが，rimmed vacuoleの壁は濃染しなかった(図1)．

* 愛知医科大学第4内科
** 愛知医科大学加齢医科学研究所
*** 国療徳島病院
**** 高松市民病院
***** 国立精神・神経センター
****** 東京大学分子細胞生物学研究所
******* 東京大学大学院総合文化研究科

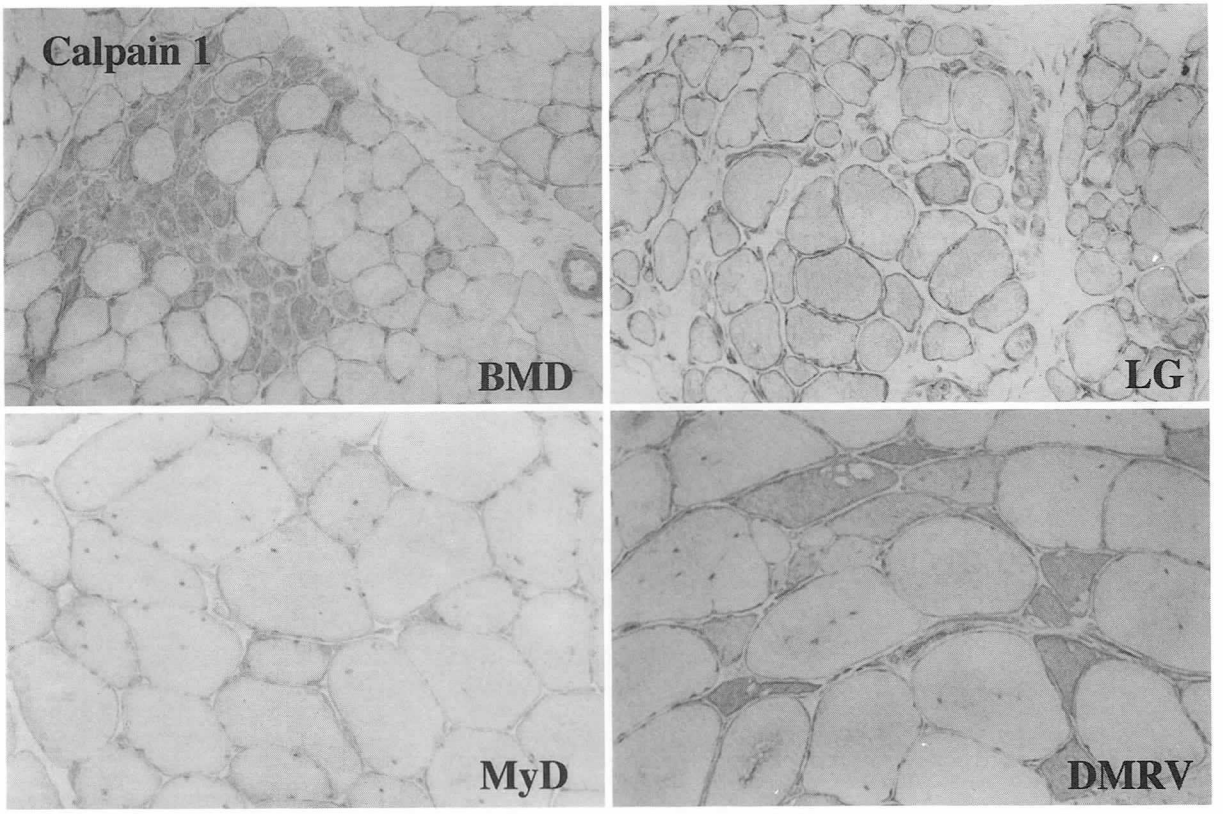



**図1**　カルパイン1のミオパチー筋における局在
カルパイン1の免疫染色では筋形質内にびまん性に陽性であり，形質膜と核により濃染していた．再生線維や一部萎縮線維の筋形質で他線維より濃染していた．筋緊張性ジストロフィー(MyD)でのsarcoplasmic massやrimmed vacuole型遠位型ミオパチー(DMRV)での萎縮線維でより濃染したが，rimmed vacuoleの壁は濃染しなかった．

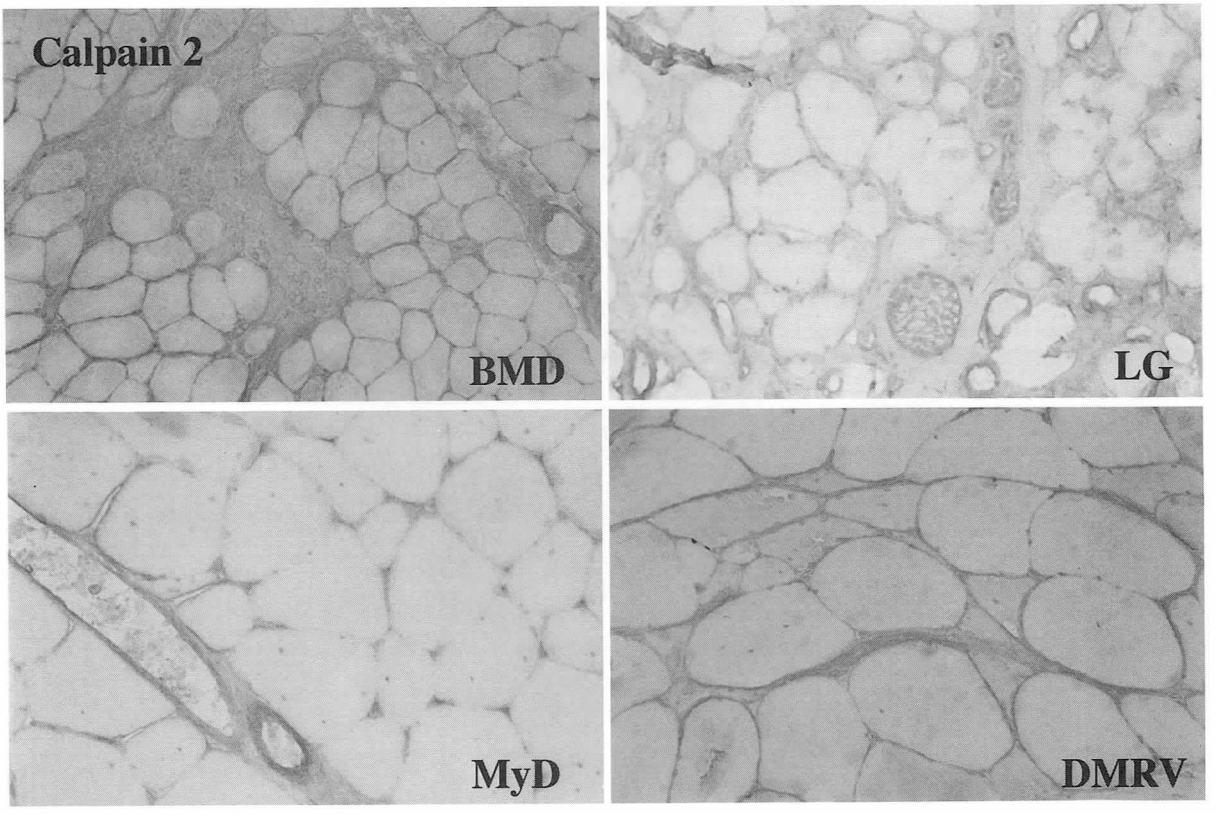



**図2**　カルパイン2のミオパチー筋における局在
カルパイン2では筋形質に比し，間質膠原線維が濃染していたが，他はカルパイン1とほぼ同様の結果であった．

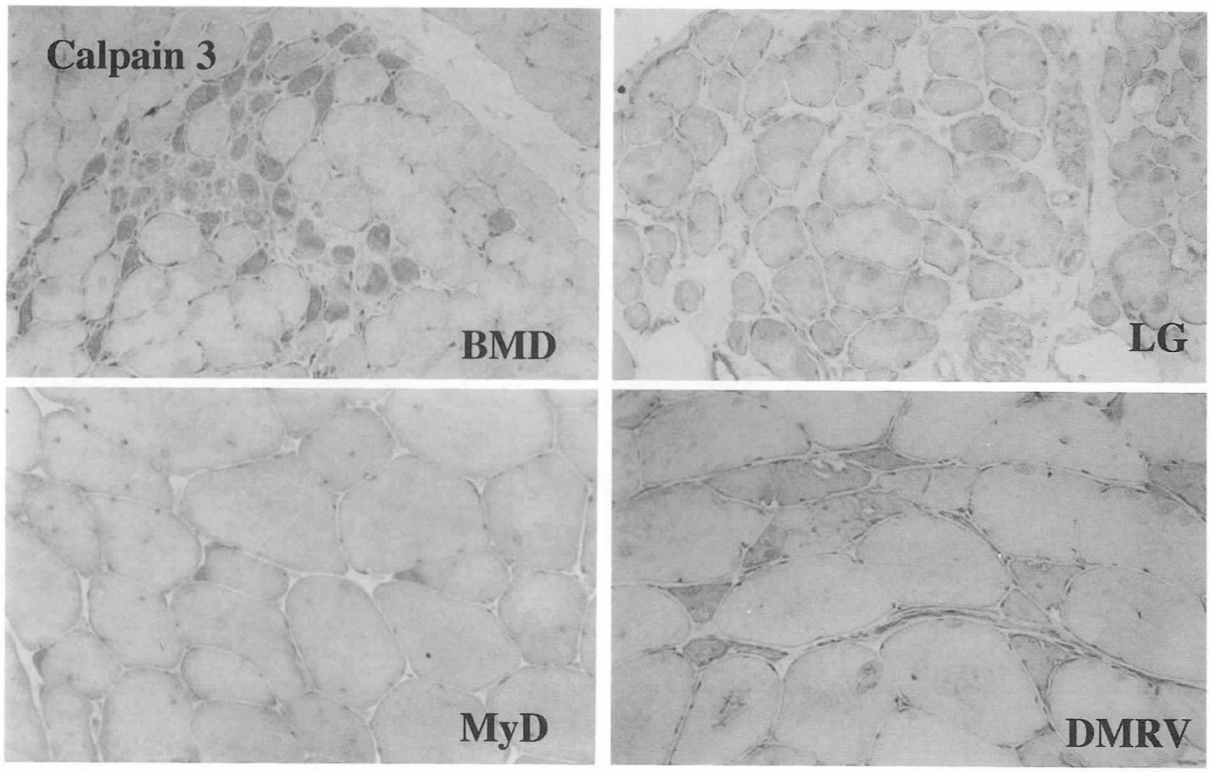



**図3** カルパイン3のミオパチー筋における局在
カルパイン3では筋形質にびまん性に染まり，カルパイン1より核に濃染していたが形質膜は明瞭ではなかった．再生線維，sarcoplasmic massやDMRVについてもカルパイン1とほぼ同様の結果が得られた．

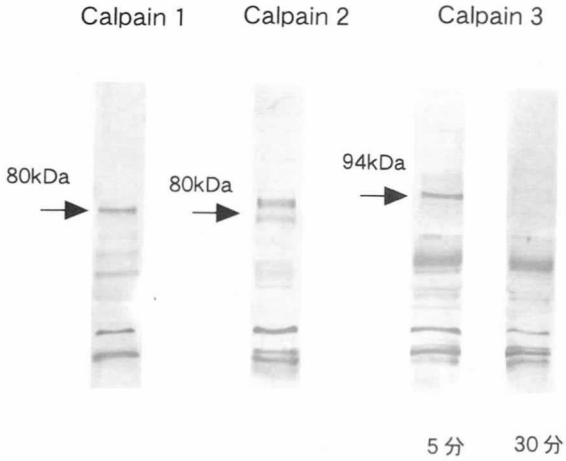



**図4** 対照筋でのカルパイン1,2,3のウエスタンブロット解析
カルパイン1と2では，分子量80kDaに各カルパインに対するバンドが見られた．カルパイン3は自己消化による分解が早いため，筋組織を解凍してゲルに乗せるまでの時間を5分と30分に分けて比較したが，処理時間5分ではカルパイン3に対応する94kDaとより低分子の部位に分解産物と考えられるバンドが見られたが，処理時間30分では検出されず，分解産物のバンドのみ見られた．

カルパイン2は，筋形質に比し間質内の線維性結合織が濃染していたが，他はカルパイン1とほぼ同様の結果であった(図2).

カルパイン3は，筋形質にびまん性に染まり，カルパイン1より核に濃染していたが形質膜は明瞭ではなかった．再生線維，sarcoplasmic massやDMRVについてもカルパイン1とほぼ同様の結果が得られた(図3)．なおLGMD例についてLGMD2A型の確定診断は明らかではないが，筋形質および核での染色性が明らかに低下した症例はみられなかった．

カルパインSは，カルパイン1とほぼ類似の結果を得た．

**ウエスタンブロット解析**

対照筋のWB解析は，カルパイン1,2では分子量80kDaに各カルパインに対するバンドが見られた．カルパイン3は自己消化による分解が早いため，筋組織の解凍後にゲルに乗せるまでの時間を5分と30分に分けて比較したが，処理時間5分ではカルパイン3に対応する94kDaとより低分子の部位に分解産物と考えられるバンドが見られた．しかし処理時間が30分では検出されず，分解産物のバンドのみ見られた(図4)．ゆえに本検討では20分以内で出来る限り迅速な処理を心掛けた．

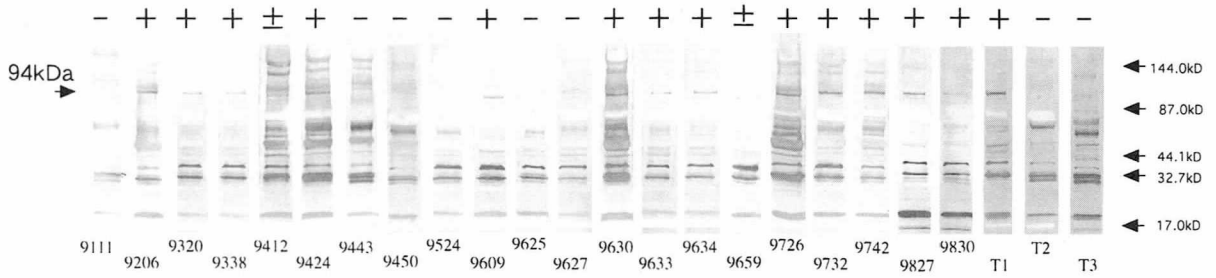



**図5** LGMD24例でのウエスタンブロット解析
LGMD2Aの分子遺伝子学的な確定診断を終了していた3症例(T1-T3)では，2例で欠損を1例でバンドを検出した．遺伝子解析が未施行21例中6例では94kDaのカルパイン3のバンドが検出されなかった．

カルパイン3のLGMD筋および疾患対照筋の結果については，後者の全例に94 kDaのカルパイン3のバンドが検出された．LGMD筋では，LGMD2A型の分子遺伝子学的な確定診断を終了していた3例では，2例で欠損を1例ではバンドを検出した．遺伝子解析未施行の21例中6例では，94 kDaのカルパイン3のバンドが検出されなかった(図5)．遺伝子解析が未施行例で，WBでバンドが陰性の4症例と検出量が微量であった2症例の愛知医大例において遺伝子解析がなされたが．陰性症例1例(後記)にのみC-565-G変異(Leu189Val)が検出された．これはカルパイン3のプロテアーゼ活性部位；ドメイン2遺伝子領域内にある変異であり，他のカルパインにおいても保存されているアミノ酸であった．

愛知医大LGMD2A症例の臨床像

症例は45歳女性で両親が従兄妹婚，25歳より下肢筋力低下にて発症し，筋力低下は緩徐に進行し入院精査となった．入院時所見は身長162cm，体重44kg．上肢より下肢に強い近位筋の筋力低下があったが，顔面筋，前頸筋および上下肢の遠位筋の筋力はほぼ保たれていた．検査所見はCKなどの筋逸脱酵素は軽度に増加していた．筋電図では筋原性変化であった．骨格筋CTでは体幹の傍脊柱筋や腹筋，臀筋の脂肪化が著明で下肢では大腿および下腿の屈筋群の脂肪化が著明であった．大腿四頭筋での筋生検所見はNADH-TR染色やcytochrome *c* oxidase染色で萎縮タイプ1線維のlobulated fiberが多数見られ，myosin ATPase染色でタイプ1線維萎縮，myosin heavy chain developmental, neonatal isoforms染色で陽性の再生線維が散在していた．

## 考　　察

カルパインの骨格筋における局在はカルパイン1,2,3ともに筋形質にびまん性に分布しており，カルパイン1,2では形質膜に，カルパイン3では核により強く発現していた．カルパイン1,2では生体膜との，カルパイン3では核とのその機能上の関連が示された．病的筋では再生筋に多く発現することは筋の発達/分化への関与、またDMRVでの萎縮線維における発現は筋構成蛋白のダウンレギュレーションとの関連性が考えられた．

カルパイン3は骨格筋に特異的に存在し，カルパイン1,2より多量に存在する．そしてLGMD2Aの病因としてカルパイン3遺伝子異常が指摘されているが，自験LG例での免疫染色では明らかなカルパイン3の欠損を組織学的に確認できなかった．これに関してはカルパイン3抗体の他のカルパインへの交叉反応や非特異染色の可能性も否定できなかった．

つぎにWB解析の結果は，対照筋の結果ではカルパイン3は自己消化による分解が早いとされ自験例でも処理時間が長いものでは検出できなかったが，短時間の処理では検出可能であり，LGMD2A型のスクリーニングとしての有用性が示唆された．しかしLGMD2Aの凍結保存の生検骨格筋の本解析では，遺伝子異常が証明された症例においてもカルパイン3のバンドが検出され，LGMD2Aの中にはカルパイン3の蛋白または類似蛋白が産生される症例が存在する可能性が示唆された．またカルパイン3が検出されない症例で遺伝子異常が確認できなかったことは，今回のWB解析の方法論的な問題や限界，さらに検体の保存やfibrosisにより筋構成蛋白量が充分でなかった可能性などを考えた．

## 文　　献

1) Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T, et al : Calpain : Novel family members, activation, and physiological function. Biol Chem 376 : 523-529, 1995.
2) Richard I, Broux O, Allamand V, et al : Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. Cell 81 : 27-40, 1995.
3) Kawai H, Akaike M, Kunishige M, et al : Clinical, pathological, and genetic features of limb-girdle muscular dystrophy type 2A with new calpain 3 gene mutations in seven patients from three japanese families. Muscle & Nerve 21 : 1493-1501, 1998.
4) 後藤雄一，南　成祐，村山久美子ら：肢帯型筋ジストロフィーにおけるカルパイン3遺伝子変異の検討．平成9年度厚生省精神・神経疾患研究委託費による研究報告集(2年度班・初年度班)1997. pp51.

# Sarcoglycanopathyにおける遺伝子異常と各sarcoglycan欠損様式の関連についての研究

納　光弘*

協力研究者：樋口逸郎*　中川正法*　岩城宏之*
川井尚臣**　福永秀敏***

**要　旨**　遺伝子異常の確定したα-sarcoglycan 欠損症3例とγ-sarcoglycan欠損症1例の免疫組織化学的検索を行ったところ，遺伝子異常が存在するsarcoglycanの方が欠損の程度がより著明であった．各sarcoglycanに対する免疫組織化学的染色によりsarcoglycanの遺伝子異常をある程度推定できる可能性があり，今後より多くのsarcoglycanopathyにおいて遺伝子異常と各sarcoglycan分子の発現異常についての詳細な検討が必要である．またγ-sarcoglycan欠損症の1例ではδ-sarcoglycanは特によく保たれており，sarcoglycanopathyの免疫組織化学的スクリーニングの際に単一の抗体のみの検索では見落とす可能性があることを示唆しており，注意を要する．

## はじめに

我々はこれまでにsarcoglycanopathyの4症例を報告し，本症の筋膜上においてsarcoglycanの欠損とともにlaminin β1，ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)及びCD44(HCAM)の発現異常が見られることを明らかにし[1),2),3)]，また，sarcoglycanopathyにおいては症例により各sarcoglycanの欠損様式が異ることを報告した[4)]．今回我々は遺伝子異常の確定したsarcoglycanopathyについて，各sarcoglycanに対する免疫組織化学的染色によりsarcoglycanの遺伝子異常を推定できるか否かについて検討した[5)]．

## 方　法

免疫組織化学は，遺伝子異常の確定したα-sarcoglycan欠損症3例(症例1,2,3)とγ-sarcoglycan欠損症1例(症例4)の生検筋の連続凍結切片について，α-sarcoglycan, β-sarcoglycan, γ-sarcoglycan, δ-sarcoglycan及びdystrophin C末端に対するモノクローナル抗体を用いてABC法にて染色し比較検討した．

## 結　果

図1と表1に4症例の染色結果を示す．α-sarcoglycanの遺伝子異常がある3例では，程度の差はあるがα-sarcoglycanに比較してγ-sarcoglycanの抗原性がより保たれていた．一方γ-sarcoglycanの遺伝子異常がある症例4においては，γ-sarcoglycanに比較してα-sarcoglycanの抗原性がより保たれていた．またβ-sarcoglycanの染色性は，α-sarcoglycan欠損症3例ではα-sarcoglycanの染色性と同程度まで低下していたが，γ-sarcoglycan欠損症においてはγ-sarcoglycanの染色性の低下に比べ保たれていた．これらの結果は，各sarcoglycanに対する免疫組織化学的染色によりsarcoglycanの遺伝子異常をある程度推定できることを示唆している．また注目すべき所見としてγ-sarcoglycanの遺伝子異常がある症例4においてはδ-sarcoglycanは非常によく保たれていた．正常対照例ではα,β,γ,δ-sarcoglycanおよびdystrophin C末端はすべて筋膜上に全周性に発現していた．

## 考　察

sarcoglycanの一つが欠損すると他のsarcoglycanも同様に欠損あるいは減少すると考えられているが，α,β,γ,δの各sarcoglycan遺伝子異常における各sarcoglycan分子の欠損の程度の詳細については報告が少ない．今回の我々の検討ではα-sarcoglycan遺伝子異常が確認された3例とγ-sarcoglycan遺伝子異常が確認された1例のsarcoglycan欠損様式には差が認められており，遺伝子異常が存在するsarcoglycanの方が欠損の程度がより著明であった．

表1　Sarcoglycanopathy 4例の遺伝子異常と免疫組織化学

| 症例 | 1 | 2 | 3* | 4 |
|---|---|---|---|---|
| 変異Sarcoglycan | α | α | α | γ |
| 遺伝子異常の種類 | BS | BS** | BS** | D |
| 免疫組織化学 | | | | |
| α-Sarcoglycan | ± | 0 | 0 | + |
| β-Sarcoglycan | + | ± | ± | ± |
| γ-Sarcoglycan | ++ | ± | ± | 0 |
| δ-Sarcoglycan | + | ± | ± | ++ |
| dystrophin | N | N | N | N |

N：normal expression，++：moderate expression，
+：slight expression，±：faint expression，0：no expression
*　症例2の姪，** nt 408と409の間に15塩基の挿入も伴う
BS：塩基置換，D：欠失

*　鹿児島大学医学部第三内科
**　徳島大学医学部第一内科，高松市民病院
***　国立療養所南九州病院

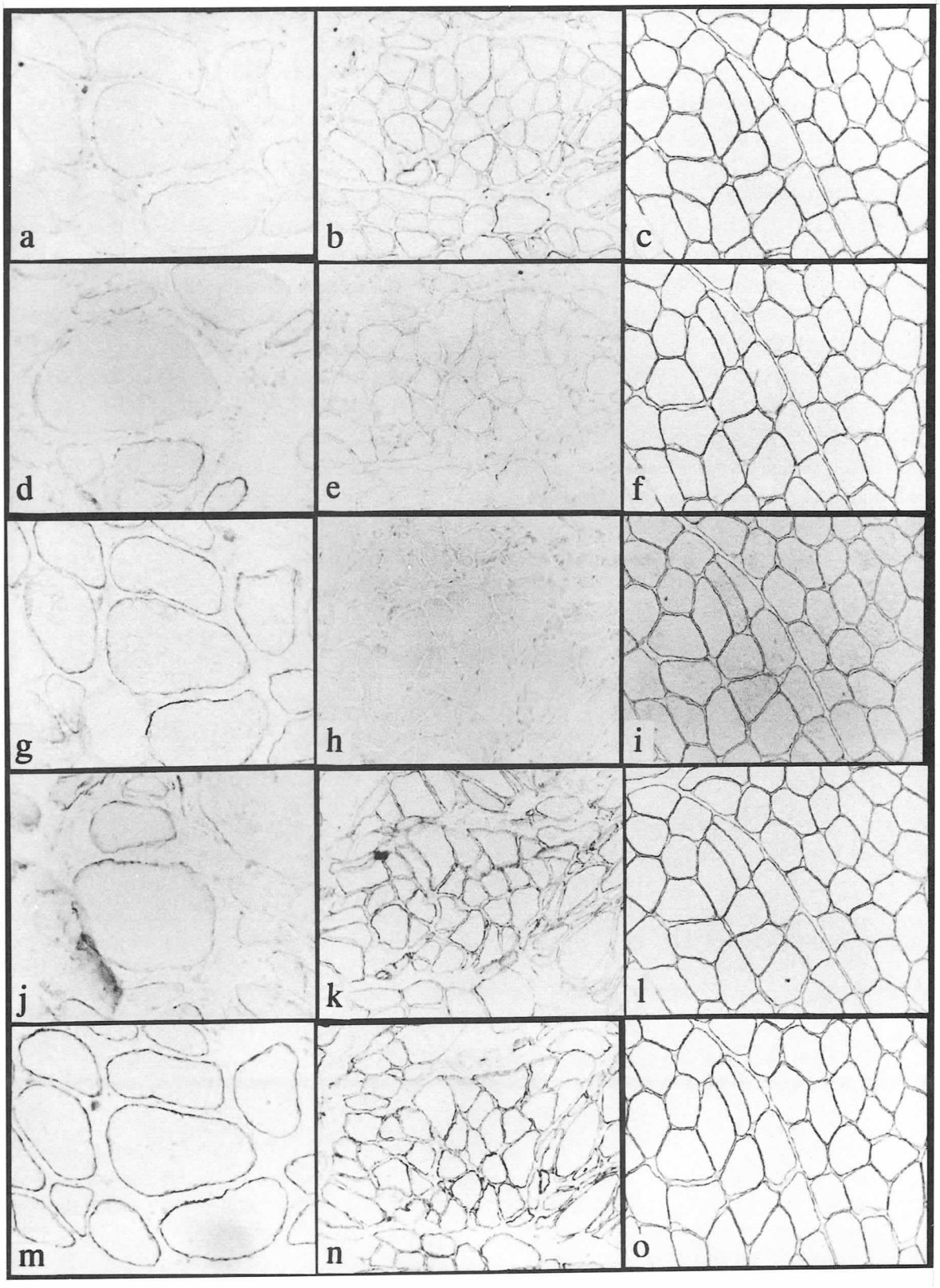



図1　Sarcoglycanに対するモノクローナル抗体による免疫組織化学的染色
α-Sarcoglycan (a, b, c), β-Sarcoglycan (d, e, f), γ-Sarcoglycan (g, h, i), δ-Sarcoglycan(j, k, l),Dystrophin C末端(m, n, o).
症例1(a, d, g, j, m)，症例4(b, e, h, k, n)，正常対照(c, f, i, l, o).

このことがsarcoglycanopathyに一般的に認められるのか，あるいは一部の症例においてのみ認められるのかを明らかにするため，今後より多くのsarcoglycanopathyにおいて遺伝子異常と各sarcoglycan分子の発現異常についての詳細な検討が必要であり，さらにsarcoglycanopathyの臨床的重症度と各sarcoglycan分子欠損の程度の相関に関する検索も，本症の病態解明のため不可欠であると思われる．また，δ-sarcoglycanの発現はγ-sarcoglycanの遺伝子異常がある症例4で非常によく保たれていたが，このことはsarcoglycanopathyの免疫組織化学的スクリーニングの際に単一の抗体のみの検索では見落とす可能性があることを示唆しており，注意を要する．

## 文　献


1) 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 : 601-616, 1994.

2) Higuchi I, Fukunaga H, Matsumura K, et al : Abnormal expression of heparan sulfate proteoglycan on basal lamina of muscle fibers in two Japanese patients with adhalin deficiency. Neuromusc Disord 5 : 467-474, 1995.

3) Higuchi I, Fukunaga H, Motokura F, et al : Characteristic expression of cell adhesion molecules in adhalin deficiency. J Neurol Sci 143 : 79-83, 1996

4) Higuchi I, Iwaki H, Kawai H, et al : New missense mutation in the alpha-sarcoglycan gene in a Japanese patient with severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with incomplete alpha-sarcoglycan deficiency. J Neurol Sci 153 : 100-105, 1997.

5) Higuchi I, Kawai H, Umaki Y, et al : Different manners of sarcoglycan expression in genetically proven alpha-sarcoglycan deficiency and gamma-sarcoglycan deficiency. Acta Neuropathol 96 : 202-206, 1998.

# α-Sarcoglycanopathyの遺伝子異常と臨床的heterogeneity

川 井 尚 臣*

研究協力者 足 立 克 仁** 乾 俊 夫*** 遠 藤 武 徳****
柏 木 節 子* 西 田 善 彦* 国 重 誠*

**要 旨** α-サルコグリカンの遺伝子異常を有する自験例8家系14例と文献例55例の臨床経過の多様性について述べた．発症年齢は1～22歳(7.12±4.8)，歩行不能年齢は，5～22歳(13.0±4.7)と症例によってかなり異なっていた．臥床年齢は，19～30歳とやはり幅がみられた．また発症年齢の若い例が歩行不能年齢も低いことが認められた．これらの所見は遺伝子異常の違いによるサルコグリカン分子の違いによると考えられる．しかし，同一家系内の症例や同じ遺伝子異常(C229T)を有する症例でも症例によって，臨床経過にかなりの違いがみられるので，臨床経過の多様性には遺伝子異常以外の要素の関与を示唆する．

## はじめに

臨床遺伝的に悪性肢帯型(malignant limb-girdle type)(MLGMD)(三好)[1]あるいはsevere childhood autosomal recessive muscular dystrophy(SCARMD)(Ben Hamida)[2] は臨床経過に多様性heterogeneityがあることは原著者らによりすでに記載されているが，サルコグリカン(sarcoglycan)の遺伝子解析が行われ[3-5]，遺伝子異常が明らかになるに伴い，両者が臨床および遺伝子異常がほぼ同じものであることが明らかになった．本論文ではα-サルコグリカン(adhalin)の遺伝子異常が解明された自験例ならびに文献例の臨床経過を調べ，それらの遺伝子異常と臨床経過の多様性との関連について検討した．

## 対象と方法

対象は文献例と自験例を含めた45家系59症例のprimary α-sarcoglycanopathy(α-サルコグリカンの遺伝子異常を有する例)である．このうち，自験例は18家系22例である．これらの症例についてα-サルコグリカンの遺伝子異常を検討するとともに，α-，β-，γ-サルコグリカンとβ-ジストログリカン，ジストロフィン，ラミニン2(メロシン)を免疫組織学的に調べ，さらに発症年齢，歩行不能年齢，臥床年齢などを検討した．

文献例は1997年4月までに報告された37家系45症例であるが，やはりα-サルコグリカンの遺伝子異常が明らかになっている症例である．これらの症例はアルジェリア人，モロッコ人，フランス人，ドイツ人，イタリア人，アメリカ人などを含んでいる．遺伝子異常の種類は塩基の置換，欠失，挿入，重複などが報告されている．

遺伝子解析は，試料として生検骨格筋を用いる場合は，骨格筋よりRNAを抽出してRT-PCR法によりα-サルコグリカンの9個の各エクソンを増幅し，また白血球を用いる場合は，ゲノムDNAを抽出してPCR法により各エクソンを増幅し，異常PCR産物をサブクローニングし，それぞれの塩基配列を自動解析装置(autosequencer)により調べた．(詳細は先に発表した著者らの論文[5]を参照のこと)ゲノムDNAの配列を決定するためイントロンを増幅し，その塩基配列を決定して，ゲノムDNA増幅するための特異的はプライマーを作製して用いた．

## 成 績

### 臨床症状

**1. 自験例**：8家系14症例にα-サルコグリカンの遺伝子異常が認められた．症例の年齢は9～56歳(29.7±17.2，平均±SD)で，両親の近親婚は8家系のうち6家系にみられた．男女比は0.75，発症年齢は1～7歳(3.7±1.7)で，歩行不能年齢は8～16歳(10.9±2.7)であった．このうち4例は臥床患者あるいは車椅子患者であった．すべての症例に四肢近位筋と腰帯筋の萎縮がみられたが，下腿の仮性肥大もみられた．血清CK活性値は正常値の42倍までの上昇が認められた．知能障害や明らかな心障害はみられなかった．

**2. 文献例**：45例あったが，年齢は9～41歳であった．近親婚は15家系のうち5家系(33%)に認められた．男女比は0.87で発症年齢は9歳から41歳(19.4±8.1)であり，歩行不能年齢は10～22歳(14.0±4.0)あるいはそれ以上であった．多くの例(70%)は歩行可能例であった．2家系の4例は寝たきりであった．下肢の仮性肥大は2例に記載がみられた．

**3. 自験例と文献例を合わせた59例の成績**：症例の検索時の年齢は9歳から56歳(19.7±9.7歳)で，両親の近親婚は47.8%に認められた．男女比は0.87であった．発症年齢と歩行不能年齢は表1に示したが，前者は1～23歳(7.1±4.8)に分布しており，後者は8～22歳(13.0±4.7)，あるいはそ

* 徳島大学医学部第一内科
** 国立療養所徳島病院内科
*** 国立療養所徳島病院神経内科
**** 徳島逓信病院内科

表1　Primary α-sarcoglycanopathy例のまとめ

| 家系数 | 患者数 | 近親婚 | 年齢 (n=49) | 性 | 発症年齢 (n=34) | 歩行不能年齢(n=21) | 歩行可能例(%) | 仮性肥大(%) | 筋中α-SAG欠失 | α-SAG遺伝子の種類 | 変異エクソン | 遺伝子接合型 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 45 | 59 | 47.6% (11/23) | 9-56歳 (19.7 ±9.7) | 男:20 女:23 | 1-23歳 (7.1 ±4.8) | 8-22歳 (13.0 ±4.7) | 60% (32/53) | 100% (16/16) | 100% (41/41) | Mis:90% (56/62) | E3:55.8% (29/52) | ホモ :51.1% (23/45) Comp:48.9% ヘテロ(22/45) |

SAG: sarcoglycan, E: exon, Comp:compound

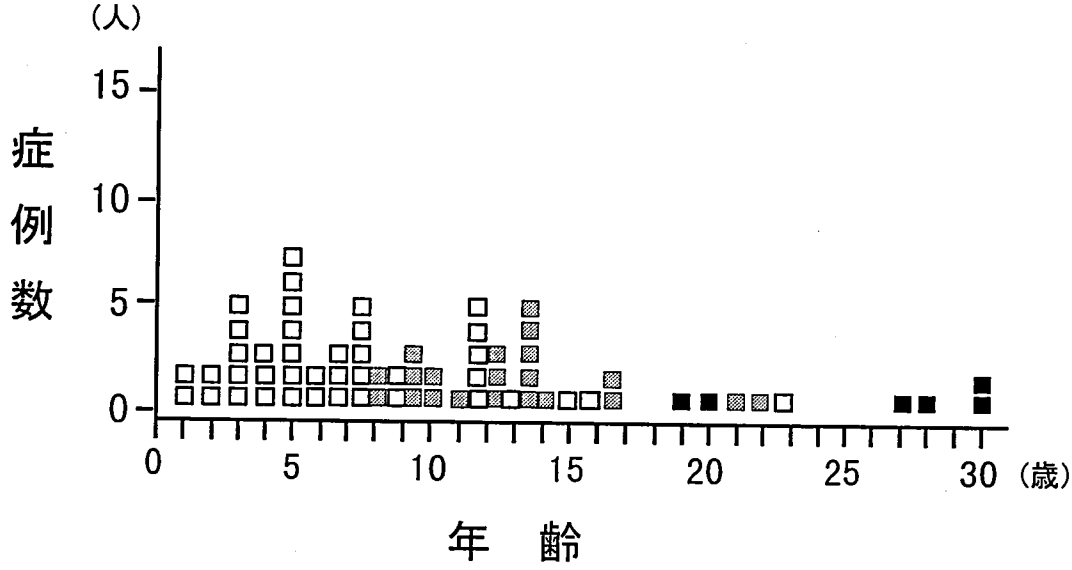



図1　Primary α-sarcoglycanopathyの発現年齢(□), 歩行不能年齢(▨), および臥床年齢(■). 発症年齢は1～23歳と幅がみられる. 歩行不能年齢は8～22歳である. しかし多くは歩行可能である. 臥床年齢は20歳以上が多い.

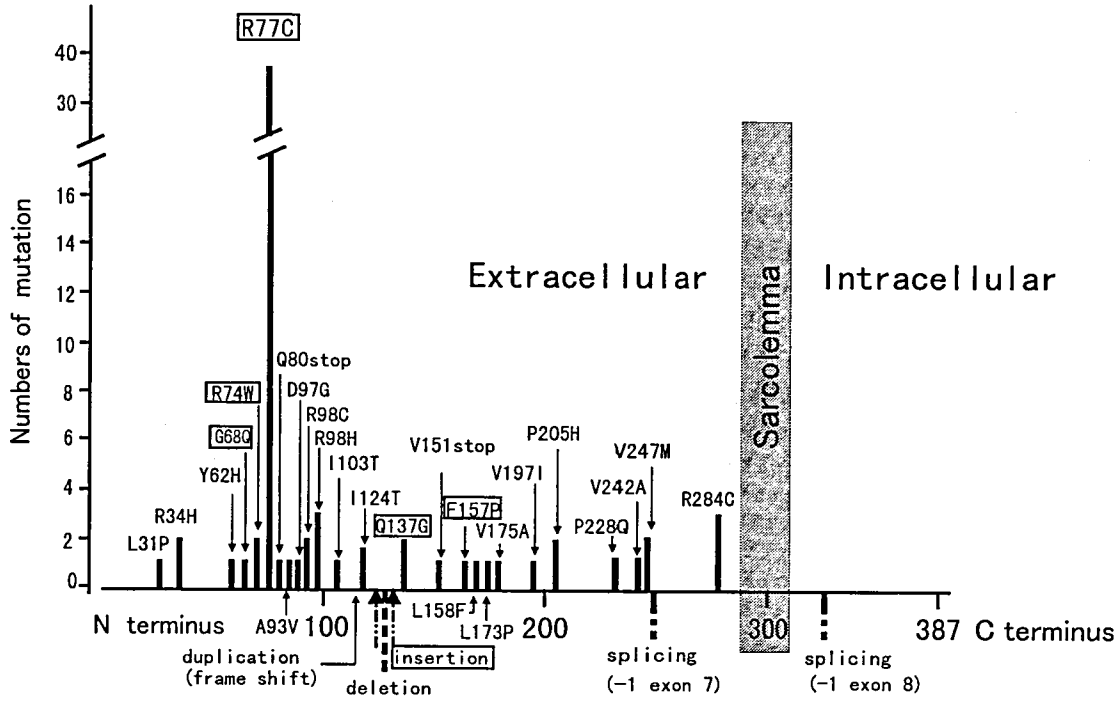



図2　α-sarcoglycan分子上の構成アミノ酸の変異部位と変異数. 種々の遺伝子異常が遺伝子全体にわたって認められる. 34種類の遺伝子異常を記入してある. 自験例は□で囲んである. 実線は変異遺伝子数. 点線および破線は, それぞれアミノ酸の欠失, 挿入を示す.

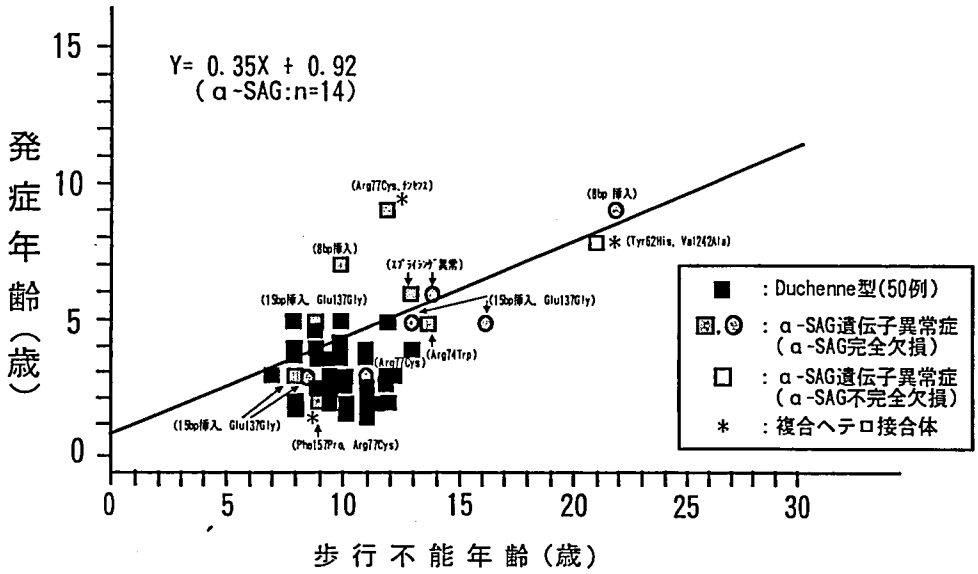



図3　発症年齢と歩行不能年齢との関係．両者の間には相関関係が認められた．

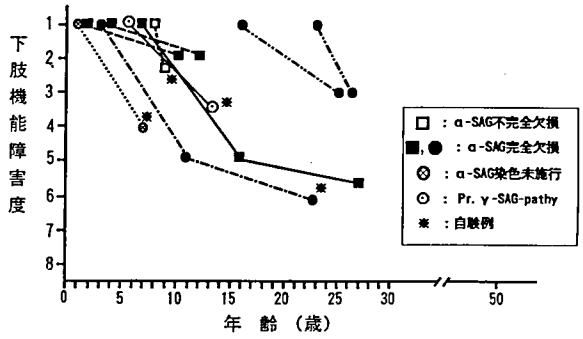



図4　同一遺伝子異常を有する症例における臨床経過の違い（多様性）．

れ以上に分布していた．患者の多く(60%)は9～41歳で未だ歩行可能であった．臥床年齢は19～30歳(25.8±4.5)であった．下肢の仮性肥大は，それが調べられたすべての例に認められた．図1に発症年齢，歩行不能年齢，臥床年齢をまとめて示した．

**骨格筋におけるジストロフィン関連膜蛋白**

自験例ではジストロフィン，ジストログリカンそしてラミニン2は，これらの蛋白の調べた6例全例において正常であった．α-サルコグリカンは5例で完全に欠損しており，1例で不完全欠損であった．

文献例では，これらの蛋白質が調べられた35家系43例全例に欠損していたが，完全欠損が34例(79%)，不完全が9例(21.0%)であった．臨床経過は不完全欠損の例に臨床経過のよいものが多く認められた(図略)．

**遺伝子異常**

自験例と文献例をまとめるとミスセンス異常が56例(96%)に認められ，重複が1，挿入1，スプライシング異常が2であった．これらの異常はエクソン2から8の種々の位置に認められた．その中ではエクソン3の変異が最も多く，55.8%であった．挿入や欠失は塩基番号400付近に集まっていた．ホモ接合体の変異は45家系23例(51.1%)に認められた．詳細は著者らの論文[6),7)]参照．

**アミノ酸変異**

図2にα-サルコグリカン蛋白分子のアミノ酸変異をまとめて示した．C229Tの遺伝子異常によるArg77Cysの変異が最も多く，88.7%であった．ほとんどの変異はα-サルコグリカン分子の細胞外の部分に認められた．アミノ酸の欠損や挿入はコドン120と130の間に多く認められた．

**発症年齢と歩行不能年齢との関係**

発症年齢と歩行不能年齢との間には相関関係($\gamma$ =0.71)が認められた.回帰曲線はY=0.35X±0.92であった(図3)．

**同一遺伝子を有する患者および同一家系内の患者における臨床経過の多様性**

遺伝子異常の最も多いC229Tでみると発症年齢は1～23歳とかなり幅がみられた．2例で10歳と16歳に歩行不能になっていた．他の患者はまだ歩行可能であった．25歳と26歳でまだ歩行可能な例もあった(図4)．

同一家系内の患者においては臨床経過はよく似ている家系もあるが，別の家系ではかなりの違いがみられた(図略)．

## 考　察

本論文では自験例と文献例のprimary α-sarcoglycanopathy例について遺伝子異常と臨床症状の重症度を述べ，両者の関係を検討した．

臨床的には本症はすべてα-サルコグリカンの遺伝子によるものであるにもかかわらず，発症年齢，歩行不能年齢,臥床年齢などにはかなりの差が認められた.遺伝子異常は遺伝子の各部位に生じるので図2に示したごとくα-サルコグリカンの蛋白分子には種々の変異が生じることになる.とくにArg77Cysの変異が約半数と多く[1),2)]，この部位は本遺伝子異常のhot spotと考えられる[6),7)]．

α-Sarcoglycanopathyの経過に多様性がみられるのは[6),8)]遺伝子異常の部位や種類によりα-サルコグリカン 分子が異なっており，筋細胞膜の障害がそれぞれ異なるためと考えられる．

発症年齢が若い例は進行が早いとの成績がえられたが，これも同じくα-サルコグリカン分子の異常のあり方と極めて密接に関係していると思われる．α-サルコグリカンの筋細胞膜上の発現との関係としては，多くは完全欠損の例が経過が早いが，必ずしもそうでない例もあり，経過を早くする何らかの要素が遺伝子異常以外にも存在する可能性がある．

遺伝子異常はエクソン3に多いが，この部位変異と臨床経過との関連も明らかでない．また，欠失や挿入は塩基番号400近辺に多かったが，我々が調べたところでは欠失や挿入例の方が経過が早いとの証拠はない．しかし，これらの異常は終止コドンが生じ，ミスセンス変異などに比べるとα-サルコグリカン分子が大きく変化するので，筋細胞膜上で完全に欠損することが推定され，このような症例では経過が早くなりうる．実際，骨格筋におけるα-サルコグリカン欠失には完全なもの，不完全なものがあり，前者の経過が早い傾向があることを先の研究報告書(平成7年度)で述べた．

同一遺伝子異常を有すると推定される同一家系内の例でも，同じ遺伝子異常を有する例でも成績の項でも述べたように必ずしも進行の速さは似ていないものもあった．このような現象は臨床経過が本遺伝子異常の関係のみでは説明できないことを示す．遺伝子異常の種類や部位の違いにより産生されるα-サルコグリカンの分子が，それぞれ異なっているので，同じくα-サルコグリカンに遺伝子異常を有する症例でも，症例によって異常の座位や種類が異なり，このことより経過が異なることは理解できる．

文献的にはEymardら[9)]は，ナンセンス変異のホモ接合型症例では臨床経過は重症になる傾向があるとしており，ナンセンス変異とミスセンス変異のcompound heterozygote例やミスセンス変異のホモ接合型症例では臨床経過は一定とならず，多様性ができることを指摘している．なお，ほか(β，γ，δ)のsarcoglycanopathyでも同様の多様性は存在する[10)]．

以上のように，本症の臨床経過の多様性は，主として遺伝子異常の違いによって生じるα-サルコグリカンの分子の多様性によって説明できるが，前述のようにこれのみでは必ずしも説明できないので，他の因子の存在を考えざるを得ない．

## 文　献


1) 三好和夫，西條一夫，栗生陽次郎他：進行性筋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, 1996.

2) Ben Hamida, Fardeau M and Attita N : Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunijia. Muscle Nerve 6 : 400-480, 1983.

3) Roberts SL, Leturcq F, Allamond V, et al : Missense mutations in the adhalin gene linked autosomal recessive muscular dystrophy. Cell 78 : 625-600, 1994.

4) Piccolo F, Roberds SL, Jeanpierre M, et al : Primary adhalinopathy : a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. Nature Genet 10 : 243-245, 1995.

5) 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 : 1200-1207, 1995.

6) 遠藤武徳，川井尚臣：悪性肢帯型筋ジストロフィー(MLGMD三好)のadhalin(α-sarcoglycan)遺伝子異常．日本臨牀 55：3159-3164, 1997.

7) 赤池雅史，川井尚臣：筋ジストロフィーの遺伝子診断ーとくに悪性肢帯型筋ジストロフィーにおけるα-sarcoglycan(adhalin)の遺伝子異常について．臨床病理45：136-140, 1997.

8) Morandi L, Borrisi R, Di Blasic, et al : Clinical heterogeneity of adhalin deficiency. Ann Neurol 39 : 196-202, 1996.

9) Eymard B, Romero NB, Leturcq F, et al : Primary adhalinopathy (α-sarcoglycanopathy) : Clinical, pathological and genetic correlation in 20 patients with autosomal recessive muscular dystrophy. Neurology 48 : 1227-1234, 1996.

10) NcNally EM, Passos-Bueno MR, Borremann CG, et al : Mild and severe muscular dystrophy caused by a single γ-sarcoglycan mutation. Am J Hum Genet 59 : 1040-1047, 1996.

# 免疫多重染色によるα-, β-, γ-, δ-sarcoglycanの超微局在と相互関係の検討

若山吉弘*

研究協力者　井上昌彦*　小嶋宏子*　村橋　真*
原　一*　渋谷誠二*　自見隆弘*
鬼木弘明**

**要　旨**　Sarcoglycan complexの正常骨格筋における存在様式を検討するため免疫多重染色によりα-, β-, γ-, δ-sarcoglycanの超微局在を検討した．免疫透過電顕的にはα-, β-, γ-, δ-sarcoglycanの信号は正常骨格筋細胞膜周辺部において細胞膜を隔てその内外で，抗体を作製した抗原のepitopeの存在する細胞領域におおむね一致して存在していた．免疫3重染色においても上記4種類のsarcoglycanのうち3種が同時に出現する頻度は比較的少なく，むしろ2種のsarcoglycanが近接して存在する頻度がもっとも高かった．更にfreeze etch replicaのα-sarcoglycanの観察では筋細胞の真表面にα-sarcoglycanがかなりの密度で点在するのが認められた．

## はじめに

Dystrophin associated (glyco)proteinsはdystroglycan complex (α-, β-dystroglycan), sarcoglycan complex (α-, β-, γ-, δ-sarcoglycan)とsarcospan及びcytoplasmic complex (syntrophin dystrobrevin)とから成る．このうち筋細胞膜貫通domainをもつものは50kdのα-sarcoglycan (SG), 43kdのβ-dystroglycanとβ-SG, 35kdのγ-とδ-SG, 25kdのいわゆるsarcospanである．このうち43kdのdoubletの1つはβ-SG, 35kdのdoubletはγ-及びδ-SGと呼ばれ，これらはtype2ペプチドでC端が細胞外へ出ている．本研究ではα-, β-, γ-, δ-SG分子の超微局在や相互位置関係を検討するため，本年度はδ-SGのcytoplasmic domainを認識するウサギと羊の合成ペプチド抗体を作成し，この抗体と今迄我々の作成したα-, β-, γ-SG抗体や市販のモノクローナル抗SG抗体を用いてα-, β-, γ-, δ-SGの正常骨格筋細胞における超微局在を3重コロイド金標識免疫電顕法により検討した．

## 材料と方法

**合成ペプチド抗体作製とその特性の検討**: δ-SGはNigro V. et al. (Hum Mol Genet 5 : 1179-1186,1996) による糖蛋白のcytoplasmic domainを認識するアミノ酸残基1-17 (MMPQEQYTHHRSTMPGSC-$NH_2$)を合成し，thyroglobulinをハプテンとして付加し，ウサギと羊に免疫して抗体を得た．これらの抗体のイムノブロットと間接蛍光抗体法による光顕免疫染色標本を作製した．また市販抗体として抗α-とγ-SG抗体はウサギα-とγ-SGのそれぞれアミノ酸残基217-289と同じく167-178(いずれも細胞外領域)のそれぞれfusion蛋白と合成ペプチドを抗原としたモノクローナル抗体(IgG)を使用した．尚本実験で使用する，以前我々の作製した[1),2),3)]ウサギ，羊抗α-, β-, γ-SG抗体はいずれも細胞内領域の合成ペプチドを抗原としたポリクローナル抗体である．

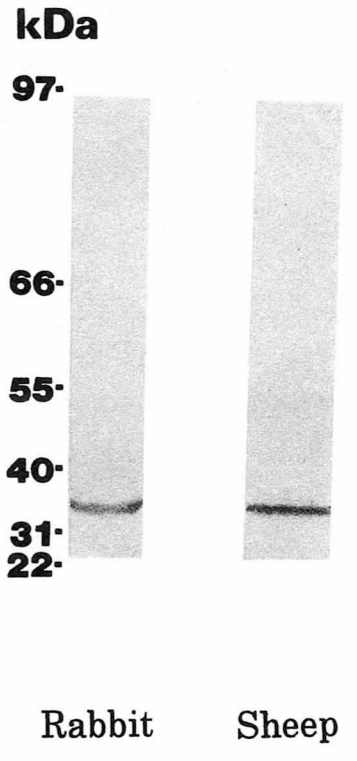
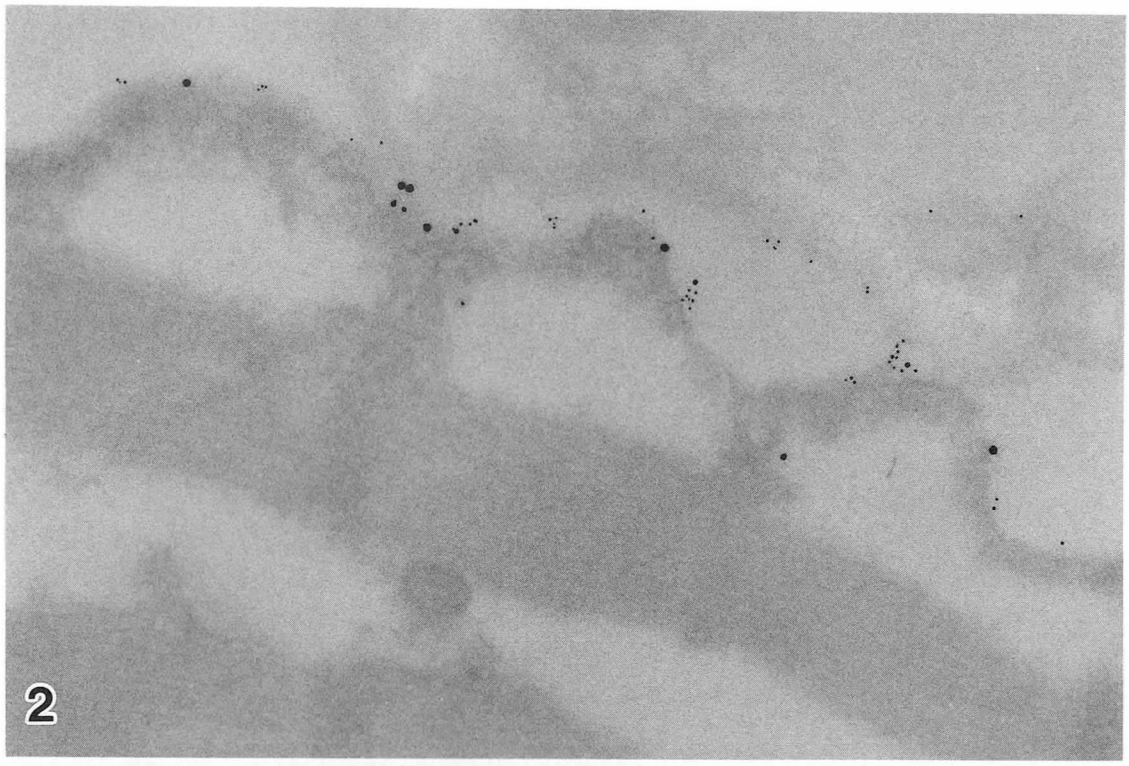



**図1**　抗δ-sarcoglycan抗体のimmunoblotを示す．組織化学的に正常なヒト生検大腿四頭筋のホモジェネートに対し，ウサギ，羊抗δ-sarcoglycan抗血清をそれぞれ500倍に希釈し反応させたもので，ウサギ，羊抗血清とも35kDaの蛋白成分を認識する1本のbandが認められる。

* 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



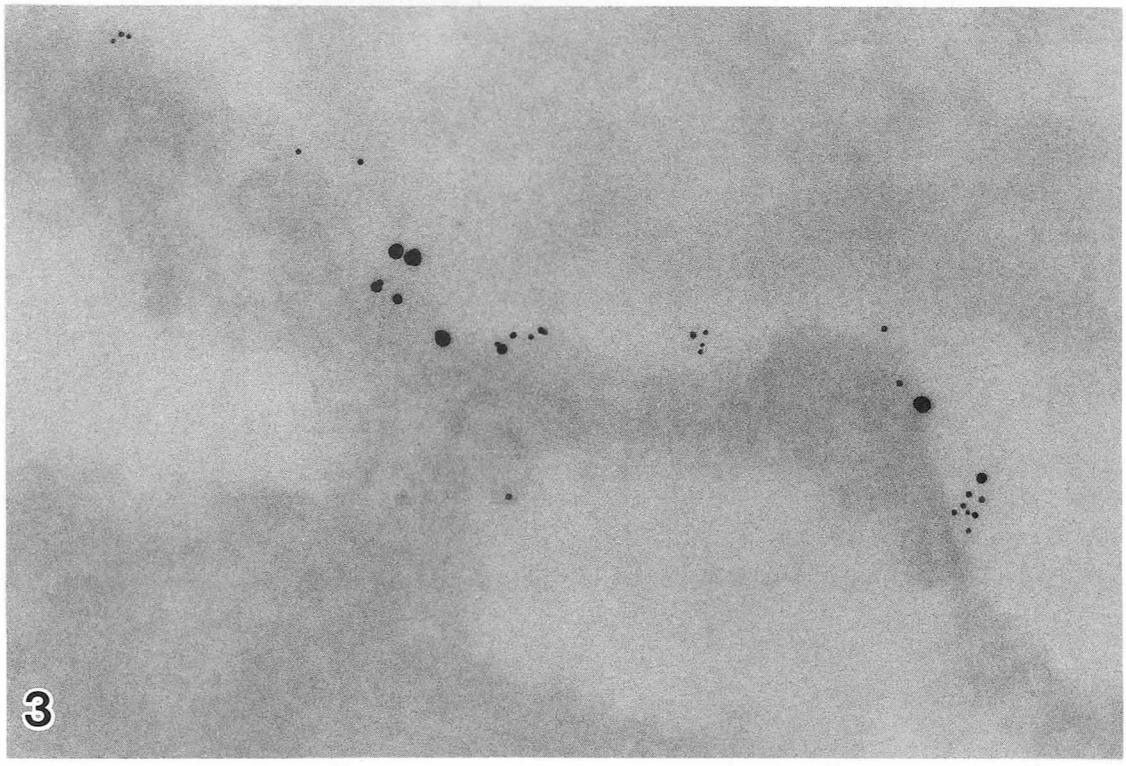




**図2, 3**　**図2**は1次抗体がウサギポリクローナル抗α-sarcoglycan，羊ポリクローナル抗β-sarcoglycan，マウスモノクローナル抗γ-sarcoglycan抗体，および2次抗体としてそれぞれ15nm，10nm，15nm金粒子標識ヤギ抗ウサギ，ロバ抗羊，ヤギ抗マウス抗体で3重標識した正常骨格筋細胞の比較的低倍の電顕写真で，筋細胞周辺にはsarcoglycanのepitopeを示す信号がみられるが，筋腺維の内部深くには信号はみられない．**図3**は**図2**の中央部分の拡大像で，α-, β-, γ-sarcoglycanそれぞれの信号がclusterを形成していたり，α-, β-sarcoglycan，β-, γ-sarcoglycan，γ-, δ-sarcoglycanの近接した所見が認められる。
（**図2**×72,000，**図3**×144,000）

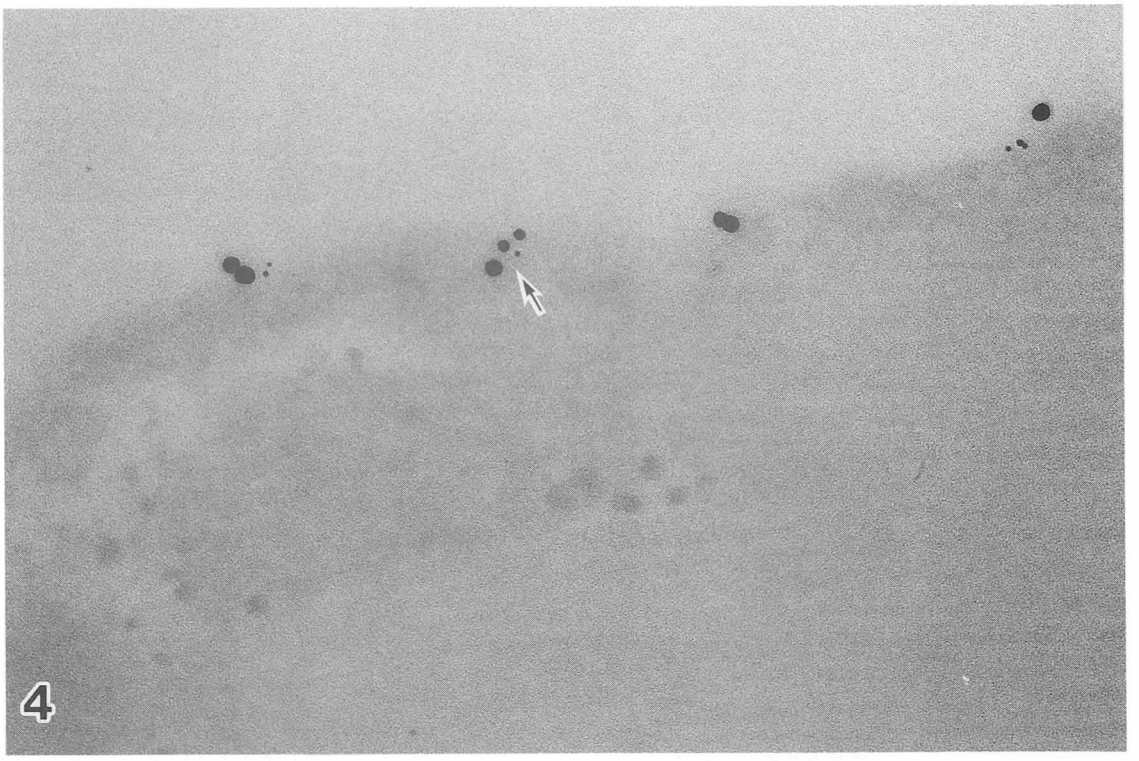



**図4** この電顕写真は1次抗体がマウスモノクローナル抗α-sarcoglycan，羊ポリクローナル抗γ-sarcoglycan，ウサギポリクローナル抗δ-sarcoglycan抗体および2次抗体としてそれぞれ5nm，10nm，15nm金粒子標識ヤギ抗ウサギ，ロバ抗羊，ヤギ抗マウス抗体で3重標識した正常骨格筋細胞の比較的高倍の電顕写真で，筋細胞膜周辺にはsarcoglycanのepitopeを示す信号が見られる。α-, γ-, δ-sarcoglycanのうち2つのsarcoglycanがdoubletを形成している像や，α-, γ-, δ-sarcoglycanが3種とも標識されている所見(矢印)が見られる。(×144,000)

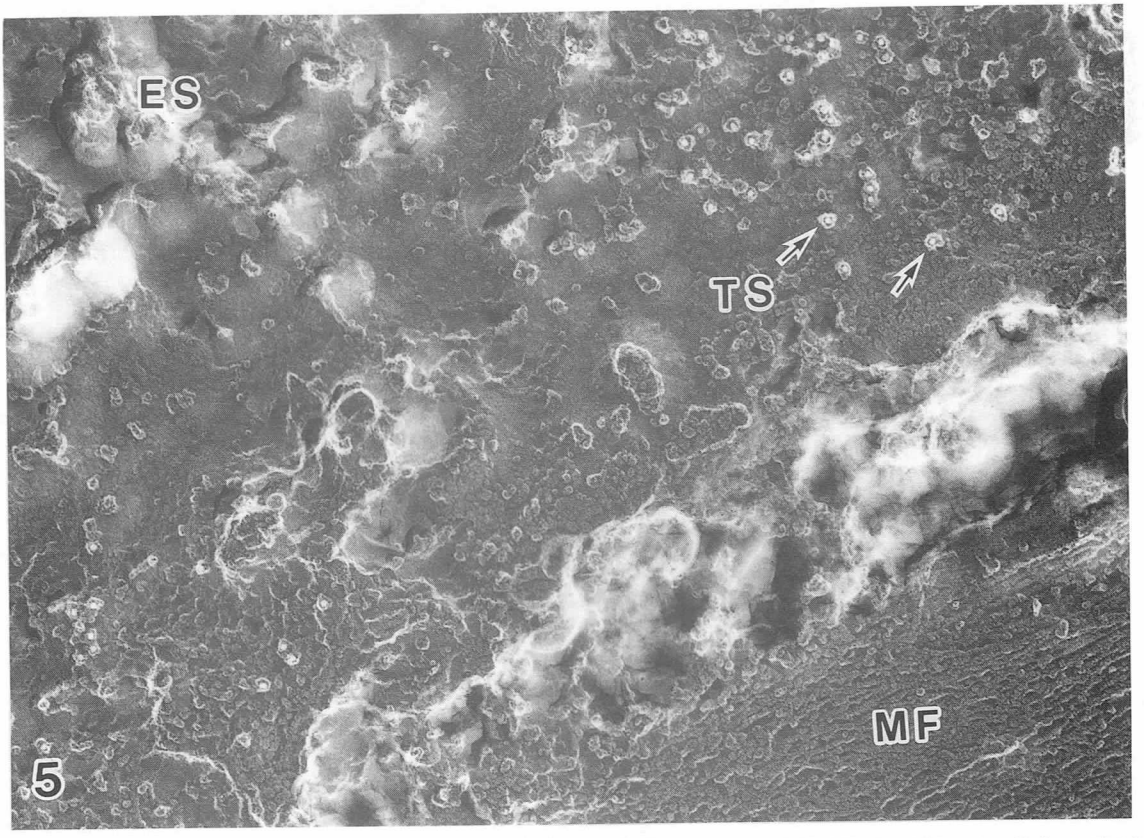



**図5** 1次抗体としてマウスモノクローナル抗α-sarcoglycan抗体と2次抗体として10nm金粒子標識ヤギ抗マウス抗体にて標識したヒト正常骨格筋のfreeze etch replicaの電顕所見を示す．右下に筋線維内部の筋原線維(MF)が，左上には細胞外腔(ES)がみられる。その間に筋細胞膜の真表面(TS)がみられ，ここにα-sarcoglycanのepitopeを示す10nmの金粒子(矢印)がかなりの密度で分布しているのが観察される。(×144,000)

**免疫電顕細胞学的検討**：ヒト生検筋のうち組織化学的に正常な大腿四頭筋6例を冷却4%パラフォルムアルデヒド溶液で1時間固定，凍結後クリオスタットで細切した．正常血清で非特異的反応を除去後，1次抗体としてマウスモノクローナル抗α-SG抗体とウサギポリクローナル抗δ-SG抗体，及び羊ポリクローナル抗β-又はγ-SG抗体の組合せを主として使用した．更にマウスモノクローナル抗γ-SG抗体にはウサギポリクローナル抗α-SG抗体と羊ポリクローナル抗β-SG抗体を主として使用した．2次抗体はモノクローナル抗体には15nm金粒子標識ヤギ抗マウス抗体を，ウサギと羊のポリクローナル抗体には10nm又は5nm金粒子標識ヤギ抗ウサギ抗体又はロバ抗羊抗体を適度に希釈混合しcold roomで24時間反応し電顕標本を作製した．

**Freeze etch replica電顕法**：上記の筋組織の1部を1次抗体としてマウスモノクローナル抗α-SG抗体，2次抗体として10nm金粒子標識ヤギ抗マウス抗体で標識し，標本を既報[4]の方法に従いreplica膜を作製，電顕にて解析した．

## 結　　果

免疫透過電顕的にはα-, β-, γ-, δ-SGのそれぞれは正常骨格筋細胞膜周辺に局在し，上記4種のSGの信号は抗体を作製した抗原のepitopeの存在する細胞膜領域に概して一致して存在していた．すなわち市販のモノクローナル抗α-, γ-SG抗体はα-, γ-SGのextracellular domainをおおむね認識し，我々の作製したウサギ，羊ポリクローナル抗α-, β-, γ-, δ-SG抗体はおおむね筋細胞膜内面に局在していた．免疫3重染色においても上記4種のSGのうち3種が同時に出現する頻度は比較的少なく，むしろα-, β-, γ-, δ-SGのうち2種のSGが近接して存在する頻度が最も高かった．また同じSGが複数存在することもしばしば認められた．更にfreeze etch replicaのα-SGのextracellular domainの局在と分布の観察では筋細胞膜の真表面に，α-SGがかなりの密度で点在するのが認められた．

## 考　　察

SG complexが正常骨格筋細胞膜周辺部でどの様な存在様式をとっているかについてはモデル[5]が呈示されているが，それを裏付ける充分なデータは現在迄に示されていない．我々は本研究班3年間のうち最初の2年間にα-, β-, γ-SGの正常骨格筋における局在を2重及び3重コロイド金標識法により解析し，その結果はActa Neuropathologicaに発表した[3]．今年度はこれをextendし，ウサギ，羊でポリクローナル抗δ-SG抗体を作製し，α-, β-, γ-, δ-SGの局在を解析した．その結果3重コロイド金標識法にて上記4種のSGのうち3種より2種のものの近接して点在する頻度の方が多かったという興味ある知見を得た．これがrealな所見なのか抗体の大きさのために3種のものが同時に標識出来ないのかが問題になる．5nmなど金粒子径の小さい金粒子が5～6個以上clusterを形成し存在する所見もしばしば認められたことから，抗体分子の大きさのために3種の抗原が同時に標識出来ない可能性は低いと思われる．今後Freeze etch replica法などを用いて更にSGの存在様式を検討してゆきたい．

## 文　　献


1) Wakayama Y, Shibuya S, Takeda A, 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.
2) Wakayama Y, Inoue M, Murahashi M, et al : Ultrastructural localization of adhalin in normal murine skeletal myofiber. Ann Neurol 39 : 217-223, 1996.
3) Wakayama Y, Inoue M, Kojima H, et al : Ultrastructural localization of α-, β- and γ-sarcoglycan and their mutual relations, and their relation to dystrophin, β-dystroglycan and β-spectrin in normal skeletal myofiber. Acta Neuropathol. 97 : 288-296, 1999.
4) Wakayama Y and Shibuya S : Gold labelled dystrophin molecule in muscle plasmalemma of mdx control mice as seen by electron microscopy of deep etching replica. Acta Neuropathol 82 : 178-184, 1991.
5) Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, et al : From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy : evolution of a concept of muscular dystrophy. Muscle Nerve 21 : 421-438, 1998.

# 成人発症の肢帯型筋ジストロフィーにおける臨床的，筋病理学的，分子生物学的検討

吉田邦広*

研究協力者　中村昭則*　矢崎正英*
池田修一*　武田伸一*

## 緒言

近年，肢帯型筋ジストロフィー(limb girdle muscular dystrophy, LGMD)の原因遺伝子が次々と明らかにされ，筋形質膜周囲の構造の解明が急速に進んできている．特に細胞外マトリックス成分においてはmerosin欠損の先天性筋ジストロフィーのようにlamininの異常に起因した疾患が明らかにされている[1]．さらにlamininを構成するlaminin β1鎖の発現についても肢帯型筋ジストロフィーや福山型筋ジストロフィーなどのいくつかの筋疾患で二次的に減少していることが報告されている[2)-6)]．今回，我々はlaminin β1鎖の選択的な発現低下を示した成人発症の肢帯型筋ジストロフィー兄妹例を経験し，その臨床的，筋病理学的，分子生物学的に検討を行った．

## 対象

対象は長野県在住の肢帯型筋ジストロフィー兄妹例(61歳男性と52歳女性)で，いずれも50歳前後で発症し緩徐進行性の経過をとっているが，現在も自力歩行は可能である．患者1は61歳男性．生来健康であったが，49歳頃から階段昇降時の困難を自覚．50歳頃から四肢の筋萎縮に気づいた．60歳時に動揺性歩行のため近医を受診．四肢近位筋・傍脊柱筋の筋萎縮，深部腱反射消失，四肢近位筋優位の筋力低下を認めた．患者2は患者1の妹で，52歳女性．51歳時の検診で高LDH血症を指摘されたのを機に受診．神経学的に軽度の上腕二頭筋筋力低下，下肢近位筋の筋力低下，動揺性歩行がみられた．両患者とも臨床的には上腕二頭筋の筋力低下が高度で，血清CK値はともに500-1000IU/lと中等度に上昇していた．筋電図ではともにmyogenic changeを認めたが，心電図，胸部レントゲンでは心筋障害を示唆する所見はみられなかった．筋CTでは両患者に共通して上腕二頭筋，傍脊柱筋および下肢の抗重力筋群に強い萎縮像および虫食い像がみられた．家族歴では両親はいとこ婚で父親は60歳代に脳卒中で，母親は50歳時に肺炎で死亡している．また検索可能であった同胞健常者1名と患者1の娘は神経学的に正常で，血清CK値も正常であった．

* 信州大学医学部第三内科
** 国立精神・神経センター

## 方法

患者の上腕二頭筋生検筋を用いてHE，Gomori trichrome変法，NADH-TR染色を行った．また免疫組織化学は一次抗体としてdystrophin(NCL Dys 1-3)，α，β，γ，δ-各sarcoglycan(NCL)，β-dystroglycan(NCL)，α2，β1，γ1各laminin鎖(Chemicon)に対する各抗体を，また二次抗体にFITCでラベルした抗mouse IgG抗体を用いた．

## 結果

1. **筋病理学的検討**：両患者ともHE染色では筋線維の大小不同，中心核の増加，間質の増大，壊死・再生像がみられ典型的なジストロフィー変化を呈していた．さらにGomori trichrome変法(mGT)では多数のrimmed vacuoleを認めた(図1)，NADH-TR染色では高度の筋線維間網の乱れがみられた．免疫組織化学ではdystrophin，α，β-sarcoglycanおよびβ-dystroglycanの染色性は両患者とも明らかな異常はみられなかった．またγ，δ-sarcoglycanにも異常はみられなかった．Laminin α2およびγ1鎖の染色性にも明らかな異常はなかったが，laminin β1鎖の染色性は両患者とも明らかに低下していた(図2)．Laminin β1鎖の染色性は毛細血管組織においても低下していたことから，laminin β1鎖の一次的な異常である可能性も考えられ，laminin β1鎖遺伝子について検討を行った．

2. **分子生物学的検討**：両患者の生検骨格筋からtotal RNAを抽出し，cDNAを作成した後，laminin β1鎖遺伝子cDNAの全長を増幅するために作製したprimerを用いて一次および二次増幅を行い，その産物についてシークエンスを行った．結果は患者1および2でexon 12内のnt 1564のcがtに変異し，ArgからCysへのアミノ酸の置換を伴っていたが，その他の箇所には異常がみられなかった(図3)．そこで点変異により制限酵素*Bsp* 1286 Iの切断部位が生じるように設計したmismatch primerを用いてgenomic DNAの制限酵素解析を行った．対照では制限酵素で切断されなかったが，患者1では完全に切断され点変異を持つalleleのホモ接合体であり，患者2ではそのヘテロ接合体であった．また同胞健常者や患者1の娘もヘテロ接合体であった(図4a)．患者2におけるcDNAのシークエンスの結果は点変異のホモ接合体であったことから，cDNAを用いて

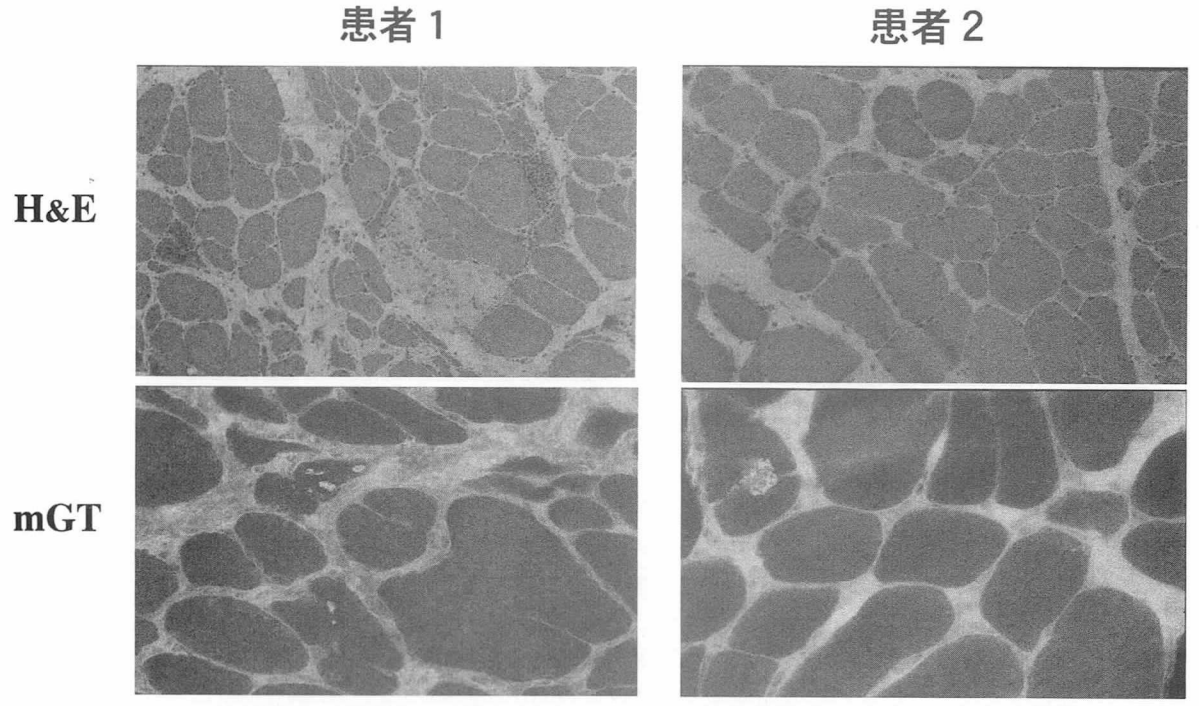



**図1**　一般筋生検所見．両患者ともH&E染色では筋線維の大小不同，中心核の増加，間質の増大，壊死・再生像がみられ典型的なジストロフィー変化を認める．またmGT染色ではrimmed vacuoleを認める．

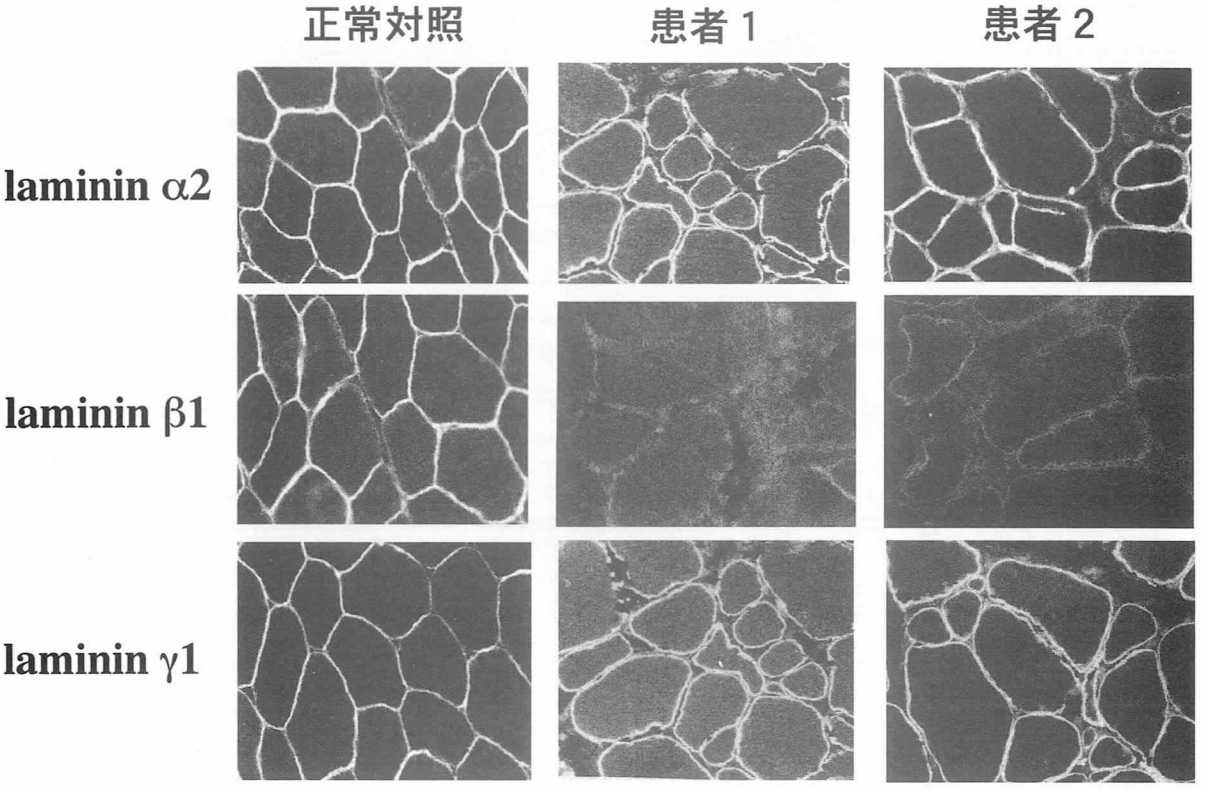



**図2**　免疫組織化学．両患者でlaminin α2およびγ1鎖の染色性に明らかな異常はないが，laminin β1鎖の染色性は低下している．

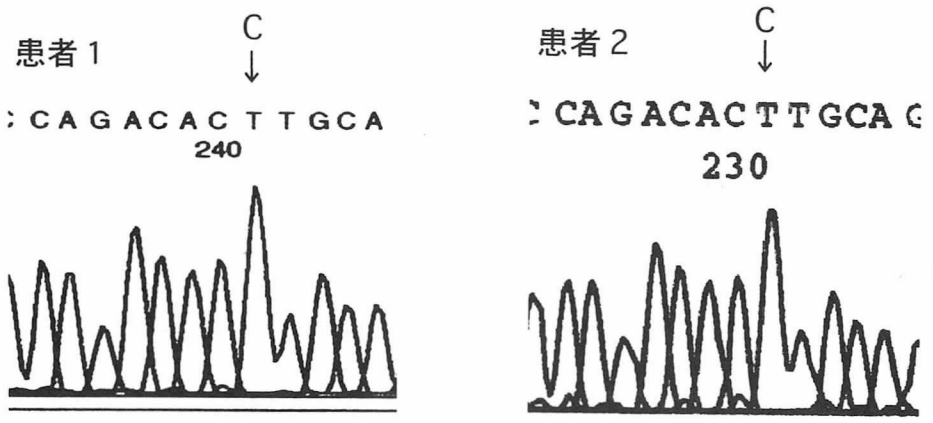



**図3** Laminin β1 chain gene (LAMB1) cDNAのsequenceの結果．両患者でexon 12内のnt 1564がC→Tへ変異し，Arg→Cysへのアミノ酸置換を伴っていた．

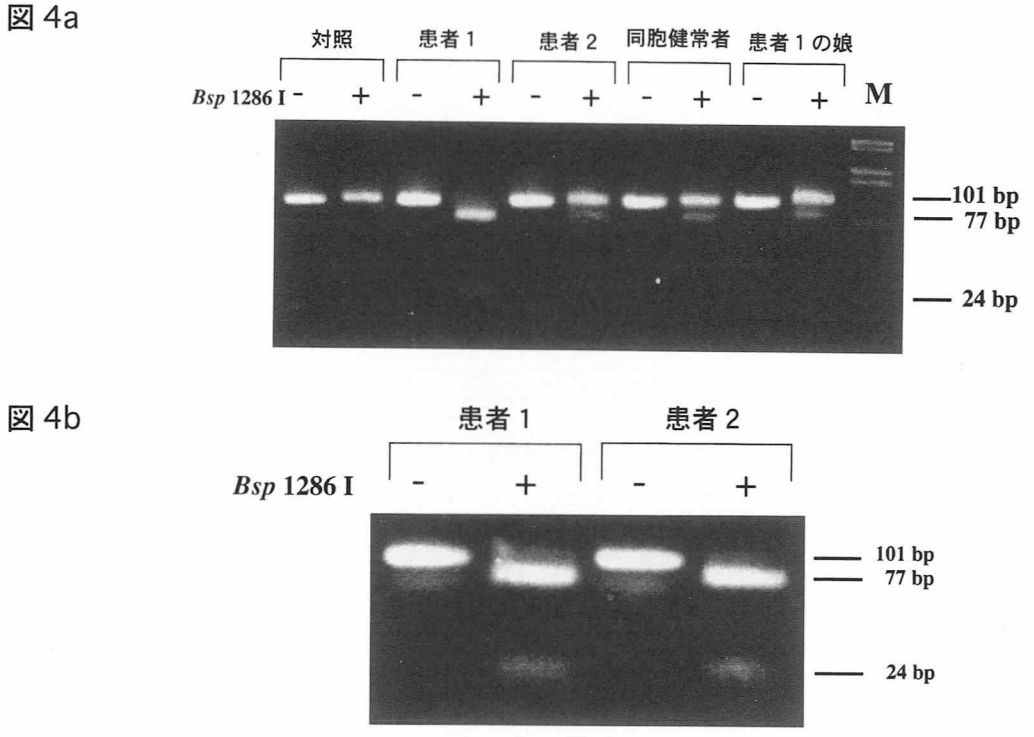



**図4** a．点変異により制限酵素*Bsp* 1286 Iの切断部位が生じるように設計したmismatch primerを用いたgenomic DNAの制限酵素解析結果．対照では制限酵素で切断されず，患者1では完全に切断され点変異を持つalleleのホモ接合体である．患者2，同胞健常者，患者1の娘ではヘテロ接合体である．
b．cDNAの*Bsp* 1286 I制限酵素解析結果．患者2では患者1と同様に制限酵素で完全に切断され，この変異のホモ接合体である．

同様の制限酵素解析を行ったところ，患者2では患者1と同様に制限酵素で完全に切断され，この変異のホモ接合体と考えられた(**図4b**)．すなわち患者2ではgenomic DNAとcDNAの制限酵素解析のパターンは異なっていた．なお対照75名の150染色体について検索したが，同様の点変異はみられなかった．

## 考　　察

この点変異が本症の病因でないとすれば稀なpolymorphismの可能性が考えられる．一方，本症の病因とすれば以下の2つの可能性が考えられる．1つは両親はこの点変異のヘテロ接合体すなわち保因者であり，子の世代ではどちらか片親由来のalleleがimprintされている可能性である．しかしながら両親がすでに亡くなっておりこの可能性を証明することは困難と考えられる．もう1つは患者1はこの点変異のホモ接合体であり，患者2はこの点変異とmRNAの著減をもたらすような他の変異との複合ヘテロ接合体である可能性である．現在この点についての検索を行っている．laminin β1鎖の発現低下を認めた筋疾患は，adult-onsetのLGMD[2]，α-sarcoglycanopathy[3]，rigid spineを伴うmyopathy[4]，BMD[5]，merosin陽性または陰性の先天性筋ジストロフィー[5]，福山型筋ジストロフィー[6]で報告されている．しかし，これらの疾患ではlaminin β1鎖の発現低下はいずれも二次性に起こっており，現在

までに一次性に起こっている疾患の報告は見あたらない．特にLiらが報告したadult-onset LGMD[3]やTaylorらが報告したrigid spineを伴うmyopathy[5]では一次的原因については同定されていないが，laminin β1鎖の染色性は毛細血管組織では正常であったことから筋線維での発現低下は二次的に起こっていると考えられている．本症例は筋病理学的および分子生物学的検索から，不完全欠損ではあるが一次性のlaminin β1鎖異常症の可能性が考えられ，今後類似症例の蓄積およびlaminin β1鎖の検討が必要である．


## 謝　辞

最後に本研究にあたり筋病理所見について御教示いただいた国立精神・神経センターの埜中征哉先生，小林　治先生に深謝いたします．


## 参考文献


1) Wewer UM and Engvall E：Merosin/Laminin-2 and muscular dystrophy. Neuromusc Disord 6：409-418, 1996.
2) Li M, Dickson DW and Spiro AJ：Abnormal expression of laminin β1 chain in skeletal muscle of adult-onset limb-girdle muscular dystrophy. Arch Neurol 54：1457-1461, 1997.
3) 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.
4) Taylor J, Muntoni F, Robb S, et al：Early onset autosomal dominant myopathy with rigidity of the spine: a possible role for laminin β1? Neuromusc Disord 7：211-216, 1997
5) Sewry CA, Philpot J, Mahony D, et al：Expression of laminin subunits in congenital muscular dystrophy. Neuromusc Disord 5：307-316, 1995.
6) Hayashi YK, Engvall E, Arikawa-Hirasawa E, et al：Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophy. J Neurol Sci 119：53-64, 1993.

# 関節拘縮を伴う常染色体優性遺伝型の肢帯型筋ジストロフィー日本人家系の臨床と遺伝子解析

吉 良 潤 一*

研究協力者 古 谷 博 和* 田 中 公 裕*
由 村 健 夫* 山 田 猛*

## はじめに

肢帯型筋ジストロフィー(limb-girdle muscular dystrophy, LGMD)は常染色体劣性遺伝をするものが多いが，常染色体優性遺伝型のもの(AD-LGMD)も報告されている．AD-LGMDには臨床的にも遺伝学的にも異なるものが含まれ，AD-LGMDは単一の疾患ではない．我々は発症早期から足関節の拘縮を呈するAD-LGMDの日本人家系の臨床特徴を明らかにし，連鎖解析の結果から2q37への連鎖を考え，同領域に存在するCOL6A3遺伝子変異の有無を検索している．

## 症　例

本症は常染色体優性遺伝と考えられ，二世代で4人の患者がみられた(図1)．代表例を紹介する．症例Ⅲ-1は，27歳男で，12歳頃から尖足がみられ，輸血時に血清トランスアミナーゼの上昇を指摘された．17歳頃から歩行障害がみられ，26歳時には支えがないと歩けなくなった．神経学的には四肢近位優位の中等度の筋萎縮と筋力低下，足関節の尖足位拘縮がみられた．血清CK 8,800U/L(正常値60-160)と著明に上昇し，筋電図で筋原性パターンがみられた．腓腹筋生検では，筋線維の大小不同と散在性の壊死筋線維がみとめられた．

本家系の臨床特徴をまとめると，10～20代で発症し，早期から足関節に限局した拘縮がみられ，肢帯型の筋萎縮・筋力低下を呈する．血清CKは正常の50倍と著明に上昇する(表1)．

## 方　法

本家系の患者4名を含む計7名の末梢血から抽出したゲノムDNAについて，21q22.3(D21S171,D21S266)及び2q37(D2S336,D2S345,D2S395)のマイクロサテライトマーカーをプライマーとして連鎖解析を行った．次に症例Ⅲ-1の培養線維芽細胞から抽出したmRNAを使ってRT-PCRを行い，COL6A3の全翻訳領域(約9kb)を4つの領域に分けて増幅し，サブクローニング後にシーケンスを行った．

## 結果と考察

Bethlem型ミオパチーは，小児期発症で慢性進行性の筋萎縮と関節拘縮を伴うAD-LGMDであり，比較的良性の経過をとる[1]．本家系でみられたAD-LGMDは早期から関節拘縮をみとめる点で類似しているが，発症年齢がやや遅く進行が早いこと，血清CKの著明な上昇をみとめる点が異なる．最近，Bethlem型ミオパチーについて連鎖解析に続き遺伝子変異の発見がなされた．21q22.3に連鎖する家系についてはVI型コラーゲンα1,α2サブユニット遺伝子(COL6A1,COL6A2)の変異が報告され[2]，2q37に連鎖する家系についてはVI型コラーゲンα3サブユニット遺伝子(COL6A3)の変異がみいだされた[3]．

本家系についても21q22.3と2q37領域について連鎖解析を行ったところ，21q22.3については全く連鎖を認めなかったが，2q37領域についてはD2S345でZmax=1.0, D2S336でZmax=1.2と軽度の連鎖を認めた．この値は有意とはいえないが，サンプル数，家系数から考えると，本家系が遺伝学的に2q37領域に連鎖する可能性が示唆された．そこでこの領域に存在するCOL6A3遺伝子に関して解析を行った．これまでにアミノ酸置換が報告されているGly-X-Y繰り返し配列の領域を含めてCOL6A3の約2.2kbに関して塩基配列を決定した．COL6A3はCOL6A1，COL6A2と同様にGly-X-Y繰り返し配列領域を有しているが，この部分に6個のアミノ酸置換を見いだしている．今後，こ

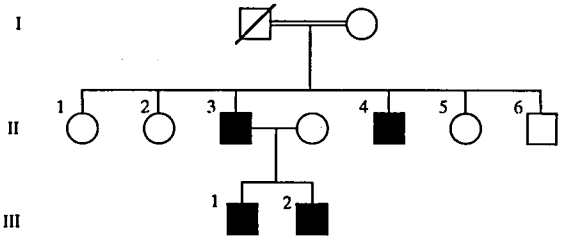



図1　家系図　■：罹患者，□：健常者

表1　臨床像のまとめ

| 症例 | 年齢 | 発症年齢 | 関節拘縮 | 現況 | CK(IU/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| Ⅱ-3 | 57 | 10代後半 | 足 | 車椅子 | 2,250 |
| Ⅱ-4 | 56 | 28 | 足 | ベット上 | 2,000 |
| Ⅲ-1 | 27 | 10代後半 | 足 | 杖歩行 | 8,800 |
| Ⅲ-2 | 25 | 18 | 足 | 自立歩行 | 8,000 |

* 九州大学医学部脳神経病研究施設内科部門

れらの変異が疾患特異的なものか，日本人に多い多型であるかを明らかにするとともに，他の領域に関しても塩基配列を調べていく予定である．

## 文　献


1) Bethlem J and van Wijngaarden GK : Benign myopathy with autosomal dominant inheritance : a report on three pedigrees. Brain 99 : 91-100, 1976.

2) Jöbsis GJ, Keizers H, Vreijling JP, et al : Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures. Nature Genet 14 : 113-115, 1996

3) Pan T-C, Zhang R-Z, Pericak-Vance MA, et al : Missense mutation in a von Willebrand factor type A domain of the a3(VI) collagen gene (COL6A3) in a family with Bethlem myopathy. Hum Mol Genet 7 : 807-812, 1998.

# Caveolin-3遺伝子変異トランスジェニックマウスの作製

清 水 輝 夫*

研究協力者 砂 田 芳 秀* 大 井 浩 明** 荒 田 悟***
斉 藤 史 明* 松 村 喜一郎*

**抄 録** caveolinは細胞膜のcaveolaeと呼ばれる陥入部を構成する一群の膜貫通蛋白であり，そのうちcaveolin-3は主として骨格筋に発現するisoformである．最近，caveolin-3遺伝子異常による常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー(LGMD1C)の家系が報告された．そこでわれわれはcaveolin-3遺伝子のdominant negative変異を検証し，その発症の分子機構を解析する目的でcaveolin-3遺伝子変異トランスジェニックマウスの作出を試みた．マウスcaveolin-3 cDNAに1アミノ酸置換Pro105Leu，あるいは1アミノ酸欠失ΔPhe65の遺伝子変異を導入し，上流にマウスmuscle creatine kinase (MCK)のpromoter/enhancer/first exon/first intron/second exonの一部を含む6.5kbの発現調節エレメントを接続し，下流にSV40 polyadenylation配列を接続したtransgenic constructを作製した．現在産出したマウスのゲノム解析を行っている．

## 緒 言

caveolinは細胞膜のcaveolaeと呼ばれる陥入部を構成する一群の膜貫通蛋白であり，そのうちcaveolin-3は主として骨格筋に発現するisoformである[1,2]．caveolinはG-protein, eNOS, c-Src, H-Ras, protein kinase Cなど種々のsignaling 分子と結合し，シグナル伝達を調節することが示唆されている．またcaveolin-3がジストロフィン糖蛋白複合体(DGC)とも結合することが示され，筋ジストロフィーの病態機構への関与も推測されていた．そして本年，caveolin-3遺伝子異常による常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー(LGMD1C)の家系[3]と劣性遺伝形式の症例[4]が相次いで二つのグループにより報告された．

これまでに同定された筋ジストロフィーの原因遺伝子の多くは構造蛋白であり，その欠損は細胞膜の脆弱性を引き起こし筋ジストロフィーの発症に至ると説明されている．しかし，最近筋ジストロフィーにおける筋細胞の変性には初期の段階でアポトーシスが関与するといわれている．上述したように，caveolinはシグナル伝達の調整に関与することから，その欠損による筋ジストロフィーの発症には何らかのシグナル伝達異常の関与が推測される．そこでわれわれはヒトの常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー(LGMD1C)で報告されているcaveolin-3遺伝子変異によるdominant negative効果を検証し，その発症の分子機構を解析する目的でcaveolin-3遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスを作製することにした．

## 方法および結果

B10マウス骨格筋よりpoly(A)+RNAを抽出し，RT-PCRを用いてマウスcaveolin-3 cDNAをクローニングした．LGMD1C症例で同定された2つのcaveolin-3遺伝子変異に準じて，1アミノ酸置換Pro105Leu，1アミノ酸欠失ΔPhe65の遺伝子変異をin vitro site directed mutagenesisによりマウスcaveolin-3 cDNAに導入した．上流にマウスmuscle creatine kinase (MCK)のpromoter/enhancer/first exon/first intron/second exonの一部を含む6.5kbの発現調節エレメントを接続し，下流にSV40 polyadenylation配列を接続したtransgenic constructを作製した．これを，C3Hマウス受精卵にmicroinjectionし，偽妊娠状態にしたICRマウスの卵管に移植した．9匹の里親より合計41匹の生存産子を得，現在ゲノム解析を行っている．表現型の解析結果については次回の班会議にて報告したいと考えている．

## 文 献

1) Tang Z, et al : Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. J Biol Chem 271 : 2255-2261, 1996.
2) Song K.S, et al : Expression of caveolin-3 in skeletal muscle, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and cofractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. J Biol Chem 271 : 15160-15165, 1996.
3) Minetti C, et al : Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. Nature Genet 18 : 365-368, 1998.
4) McNally E.M, et al : Caveolin-3 in muscular dystrophy. Hum Mol Genet 7 : 871-877, 1998.

* 帝京大学医学部神経内科
** 昭和大学薬学部薬剤学
*** 昭和大学組換えDNA実験施設

# Ⅲ．顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)

# 顔面肩甲上腕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　船　越　政　範***　後　藤　加奈子*　松　村　　剛*
佐　橋　　功***　熊　谷　俊　幸****　斉　藤　加代子*****
後　藤　雄　一*　埜　中　征　哉*　米　本　恭　三******

**要　旨**　顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD; MIM158900) は緩徐進行性の筋萎縮と筋力低下を認める常染色体性優性遺伝形式の進行性筋疾患である．FSHD原因遺伝子は未だ同定されていないが，ほとんどの症例では第4染色体長腕のテロメア側(4q35-qter)に位置する．4q35由来の短い(<35kb：正常は50～300kb)*Eco*RIフラグメントがプローブp13E-11で検出され*Eco*RI/*Bln*I二重消化法にて特異性を確認できる．本研究で我々は二重消化法とハプロタイプ解析を行いFSHD遺伝子診断法を確立した．さらに遺伝子欠失と臨床表現形の関連について検討し，それらの現況と問題点について報告した．

## 目　　的

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーfacioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD; MIM158900) は主として顔面と上肢帯・上腕に分布する緩徐進行性の筋萎縮と筋力低下を認める常染色体性優性遺伝形式の進行性筋疾患であり，生命予後は良好であるが，進行すると筋病変は躯幹および下肢帯・下肢にも及ぶ[1),2)]．FSHDでは，臨床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ことから，症候群であるとする立場もある[3)]．FSHD原因遺伝子は未だ同定されていないが，ほとんどの症例(>95%)では第4染色体長腕のテロメア側(4q35-qter)に位置することが報告されている(FSHD1A)[4)]．FSHD患者には4q35由来の短い(<35kb：正常は50～300kb)*Eco*RIフラグメントがプローブp13E-11/pFR-1で検出される．4番染色体と高い相同性を認める10番染色体由来の短い*Eco*RIフラグメントが診断上の問題点となっていたが，10番染色体には*Kpn*I反復配列の80塩基上流に*Bln*Iサイトがあり，*Eco*RI/*Bln*I二重消化法にて消化されることで特異性を確認できることが報告されている[5)]．本研究で我々は二重消化法とハプロタイプ解析を行いFSHD遺伝子診断法を確立した．さらに遺伝子欠失と臨床表現形の関連について検討した．それらの現況と問題点について報告する．

* 国立精神・神経センター神経研究所
** 東京慈恵会医科大学リハビリテーション科
*** 愛知医科大学第四内科
**** 愛知県身体障害者コロニー中央病院
***** 東京女子医科大学小児科
****** 東京都立保健科学大学

## 対象・方法

対象は臨床的にFSHDの疑われた96家系167例と正常コントロール200例である．インフォームド・コンセントに基づき末梢血リンパ球を得，ゲノムDNAを抽出した．すでに報告した方法を用いてサザンブロット解析を行った[6)]．ハプロタイプ解析は4q35-qterの特異的マーカー(D4S163, D4S139,D4F104S1,pFR-1)と10q26-qterの特異的マーカー(D10S590,D10S212,D10S555,D10F104S2)を用いて行った．*Eco*RI/*Bln*I二重消化法はDeiddaらの方法を用い4q35由来の*Bln*I resistant fragmentと10q26由来の*Bln*I sensitive fragmentの検出を行った．(**図1**)これらの結果に基づき臨床・遺伝学的データーベースを作成した．

## 結　　果

4q35由来の短い(<35kb)*Bln*I resistant fragmentを認めたFSHD1A家系は82家系であり，残りの14家系には認めず，*Eco*RI/*Bln*I二重消化法の感度は85.4%(82/96)であった．正常コントロールの4例でも4q35由来と考えられる短い(<35kb) *Bln*I resistant fragmentを認め，特異度は98% (196/

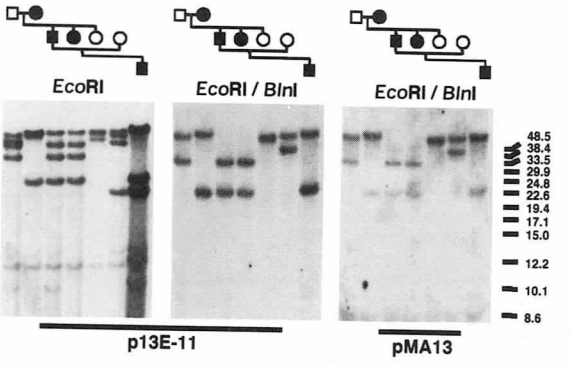



**図1**　Southern blot analysis of a family (F-77)

200)であった(表1). 表2に示す様に, single digestionとdouble digestionでは感度, 特異度ともに明らかに差を認めた. 遺伝型(欠失のサイズ)ー表現形関連について検討したところ, 欠失の最も大きい群(*Kpn*Iリピートが一個のみの群)に早期発症重症群が存在し, なおかつこの群にはてんかんと精神遅滞が効率に認められた(表3).

## 考　察

FSHDの遺伝子診断を飛躍的に発展させた最も大きな発見は, ホメオボックス遺伝子を探索する過程で得られたD4S139近傍のコスミドクローン13Eの獲得である. とりわけ1992年にWijmengaらが4q35に高い相同性を認めるプローブp13E-11(D4F104S1)を開発した意義は高い[7]. このプローブp13E-11を用いて, 制限酵素*Eco*RIにて検出されたsingle digestion fragmentは通常健常人においては50kb以上(～300kb)になるが, 大部分のFSHD家系では, 28kbより短い*Eco*RI断片であった. また様々な長さの*Eco*RI断片のDNA rearrangement現象は*Eco*RI断片内に並んでいる3.3kbの*Kpn*I反復配列の部分欠失による. すなわち健常人では約14～100コピー数の3.3kb *Kpn*I反復配列を持つが, FSHD患者ではこの反復配列がランダムに欠失して1～6個と減少している. しかしFSHDの特異的な遺伝子マーカーとされるプローブp13E-11は, 1q12, 10q26など, 4q35以外の遺伝子座とも相同性部分がありクロスハイブリッドすることが遺伝子診断上の問題とされてきた. 幸いにも, Deiddaらにより4q35と10q26の高い相同性は認めるが, 10q26には個々の*Kpn*I配列中に加えて, 最初の*Kpn*I配列の制限酵素部位より80塩基上流に*Bln*Iサイトが発見されている[5]. このことにより, *Eco*RI/*Bln*I二重消化法にて, 4q35由来の*Eco*RI断片と10q26由来の断片を特異的に識別することが可能となった. つまり10q26由来の断片は*Bln*Iにより二重消化されて消失するが(*Bln*I sensitive fragment), 4q35由来の*Eco*RI断片は3kb短くなり(*Bln*I resistant fragment), 特異的に検出できるわけである. 本研究において我々はまず, double digestion法による診断精度の向上について, 従来用いてきたsingle digestionとの比較も含めて検討した.

FSHDの診断は臨床的に行われたが, 4つの主要な診断基準にもとずいた. すなわち, (1)発症は顔面もしくは上肢帯から始まる, (2)顔面筋の筋力低下は発症した家族の50%以上に認める, (3)家族例においては常染色体性優性遺伝形式をとる, (4)少なくとも発症した家族一人の筋電図と筋生検を行い他の疾患を除外する等である. これらの診断基準の範疇に入る患者の遺伝子診断を行ったわけであるが, double digestionによる遺伝子診断の感度は85%であった. 感度の低下した理由は臨床的にFSHDの範疇に入り, 遺伝子欠失を認めなかったFSHD?群が15%も存在していたことによる. この群にはその後の検索によりBMDやLGMDが含まれていたことがわかりヘテロであることが判明した. FSHDの臨床診断の難しさを示唆している. 今回の研究結果から我々はFSHDにおける遺伝子診断の重要性を再確認した. また特異度が100%にならなかったのは, 遺伝子相談上の大きな問題となるが, これについては表2に示したように, 正常人において2%(4/200)に診断上の境界群となる28～34kbの*Bln*I resistant fragmentが検出されたことによる. この境界群についてはsingle digestionのみを用いていた頃は, 病気と関係するのか不明であったがdouble digestion を行うようになってから指摘されるようになった群であり, 今後のさらなる検討が必要である.

また*Eco*RI fragment sizeと発症年齢に相関が有ることは, 以前我々も報告している[6]. その後の検討では, FSHDの家族間・家族内での遺伝子欠失のサイズと臨床表現型には多様性があったが, 20例の若年発症グループは他に比べて遺伝子欠失のサイズが大きかった(p<.001). さらに*Eco*RI断片サイズが11kb以下の遺伝子欠失の大きい(1つの*Kpn*I反復配列しか持たない)グループ(4%, 8症例)は全て孤発例で, 発症年齢は5歳以下であり, てんかん(50%), 精神遅滞(88%)の合併が高率であり, 身体機能面でも重症であった[8]. 遺伝子欠失の大きいグループにてんかん, 精神遅滞という中枢神経系の異常の合併が高率に認められたことは, 境界群とともに臨床表現型の多様性を考える上でも, FSHDにおける遺伝子欠失による位置効果の関与が示唆された.

FSHD原因遺伝子は未だ同定されていないが, 発症機構については反復配列と遺伝子欠失に関連した様々な仮説が立てられている. なかでも染色体の位置効果(position

表1　FSHD患者とcontrolsにおける*Bln*I-resistant fragmentsの分布

| | FSHD | | | Controls |
|---|---|---|---|---|
| | 家族性 | 弧発性 | 合計 | |
| Blnl resistant fragment(<35 kb) | 109 | 41 | 150 | 4 |
| No Blnl resistant fragment(<35 kb) | 6 | 11 | 17 | 196 |
| 合計 | 115 | 52 | 167 | 200 |

表2　*Eco*RI single digestと*Eco*RI/*Bln*I double digestによるp13E-11断片長分布(%)の違い

*Eco*RI single digestでの最小断片長

| | <28 kb | 28～34 kb | >35 kb | 合計 |
|---|---|---|---|---|
| FSHD患者 | 148(89) | 4(2) | 15(9) | 167 |
| Controls | 11(6) | 22(11) | 167(83) | 200 |

*Eco*RI/*Bln*I double digestでの最小断片長

| | <28 kb | 28～34 kb | >35 kb | 合計 |
|---|---|---|---|---|
| FSHD患者 | 148(89) | 2(1) | 17(10) | 167 |
| Controls | 0(0) | 4(2) | 196(98) | 200 |

表3 Summary of 20 early onset cases with 4q35-FSHD (文献8より引用)

| Patients No./ Sex/ Age,y/ Genetics* | *Eco*RI fragment size (kb) | Age at onset (yrs.) | Mental retardation (IQ) £ | Hearing loss | Epilepsy | Severity † |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Eco*RI fragment size smaller than 11 kb (one *Kpn*I unit) | | | | | | |
| 1/F/6/SP | 10 | 4 | +(38) | - | Infantile spasms | Mild |
| 2/F/14/SP | 10 | 1 | +(45) | + | Symptomatic focal epilepsy | Severe |
| 3/M/4/SP | 10 | 0 | + | - | - | Mild |
| 4/M/11/SP | 10 | 1 | + | + | Symptomatic focal epilepsy | Severe |
| 5/M/17/SP | 10 | 5 | +(35) | + | - | Moderate |
| 6/F/9/SP | 11 | 0 | - | + | - | Moderate |
| 7/M/10/SP | 11 | 1 | +(26) | + | Symptomatic focal epilepsy | Moderate |
| 8/F/25/SP | 11 | 3 | +(29) | + | - | Severe |
| 9/F/20/SP | 10 | 2 | +(35-40) | + | - | Severe |
| *Eco*RI fragment size larger than 13 kb (more than two *Kpn*I units) | | | | | | |
| 10/M/7/SP | 13 | 0 | - | + | - | Moderate |
| 11/F/13/FA | 13 | 4 | - | + | - | Moderate |
| 12/M/10/FA | 13 | 3 | - | - | - | Moderate |
| 13/F/3/FA | 13 | 0 | - | - | - | Mild |
| 14/M/23/FA | 16 | 4 | - | - | - | Moderate |
| 15/M/6/SP | 17 | 4 | - | - | - | Mild |
| 16/F/20/SP | 17 | 5 | - | + | - | Severe |
| 17/M/34/FA | 17 | 5 | - | - | - | Moderate |
| 18/M/29/FA | 17 | 5 | - | - | - | Moderate |
| 19/F/30/FA | 17 | 0 | - | - | - | Moderate |
| 20/F/42/FA | 20 | 4 | - | - | - | Severe |

* M: male F: female SP: new mutation cases FA: familial cases
£ Case 1 and 2 were measured by the Tanaka-Binet intelligence test. Case 5 was measured by Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised (WAIS-R). Case 8 and 9 were measured by The Children's development (DQ). Case 3 and 4 were not given an IQ test.
† Classification of "severity" of disease as "mild," "moderate," or "severe" according to Lunt 's criteria.[22]
Case 9 was previously reported by Matsuzaka.[27]

effect variegation:PEV)はDrosophilaで最初に発見された現象で，ユークロクロマチン領域がヘテロクロマチン領域と並んでいるとき，染色体配列組換えなどによって遺伝子の相対的位置が変わり，その結果，遺伝子の発現に変化が起こる現象である．FSHD遺伝子領域はテロメアのヘテロクロマチンに極めて密接しており，位置効果を受けやすい事が予測される．また，反復配列の欠失の大きさと発症年齢の相関についての報告は位置効果を考える上で矛盾せず興味深い．FSHD位置効果としては，少ない反復配列がヘテロクロマチンのセントロメア側への拡がりを防ぐことが出来なくなるヘテロクロマチナイゼーションが起こっているか，少ない反復配列がユークロマチンとなりユークロマチナイゼーションがおこりなんらかの遺伝子が発現し近傍の遺伝子に影響を及ぼすと考えられている．FSHD Region Gene 1 (FRG1)が反復配列の100kb上流に位置することが報告された．しかしFRG1の位置効果を指示するような結果はいまだ報告されてはいない．我々も一つしか反復配列を持たないFSHD患者と正常とFRG1のmRNAレベルでの検討を行ったが位置効果を示すような結果は得られていない．位置効果は数百kb離れた遺伝子に起こることも知られており,今後セントロメア領域に向けてFSHD遺伝子の検索を進めていく必要がある．

## 文　献


1) Padberg GW : Facioscapulohumeral Disease, Thesis, Leiden University, Leiden, The Netherlands, 1982.
2) Emery AE : Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders, 2nd ed, pp9-15, Royal Society of Medicine Press, London, 1997.
3) Arahata K and Sugita H : Introduction: The Expansion of Clinical and Molecular Genetic Knowledge in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD). Muscle Nerve 2 : S1-3, 1995.
4) Wijmenga C, Frants RR, Brouwer OF, et al : Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. Lancet 336 : 651-653, 1990.
5) Deidda G, Cacurri S, Piazzo N, et al : Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). J. Med. Genet 33 : 361-365, 1996.
6) Goto K, Lee JH, Matsuda C, et al : DNA rearrangements in Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy patients : clinical correlations. Neuromuscul. Disord. 5 : 201-208, 1995.
7) Wijmenga C, Hewitt E, Lodewijk A, et al : Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. Nature Genetics 2 : 26-30, 1992.
8) Funakoshi M, Goto K and Arahata K : Epilepsy and mental retardation in a subset of early onset 4q35- facioscapulohumeral muscular dystrophy. Neurology 50 : 1791-1794, 1998.

# 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)における染色体再構成に関する分子細胞遺伝学的研究

斎　藤　深美子*

## 緒　言

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD; MIM 158900)は，主として顔面と上肢帯～上腕に分布する緩徐進行性の筋萎縮と筋力低下を認める常染色体優性遺伝の進行性筋疾患である．有病率は10万人に約5人(0.2～6.7人)で，筋ジストロフィー全体の2～10%を占める[1]．患者の臨床症状においては，家族間のみならず家族内においても著しい差異が認められている[2]．原因遺伝子は未だ同定されていないが，ほとんどの症例(>95%)では，4番染色体長腕の末端側(4q35-qter)に遺伝子座があることが報告されており[3]，連鎖解析および蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)法による検索結果から，FSHD遺伝子(FSHMD1A)およびその関連領域由来の各種 DNAクローンは各々，4番染色体動原体側から，D4S163-D4S139(pH30)-D4F35S1(CEB8)-D4F104S1(p13E11/pFR-1)-D4Z4(FSHMD1A)-telo(4番末端)の順にマップされている．

FSHMD1A患者では，プローブp13E-11を用いたサザン解析で4q35由来の35kb以下の短いEcoRI断片が検出される(健常人では40～150kb)[4]．これはEcoRI断片内に並んでいる長さ3.3 kbの反復配列(MA13)(図1)の部分欠失によるもので，健常人ではこの反復配列は約12～50コピーあるが，患者ではこれがランダムに欠失しているため1～6コピーしか存在しない[5]．ところが，この反復配列と相同な配列が10q26(末端部)にも存在するためDNA診断上の障害となっていたが，EcoRI/BlnI二重消化法を用いれば4q35由来のEcoRI断片を特異的に識別できることが判明し[4]，これによりDNA診断の精度が向上した．

しかし，この二重消化法を行った場合でも未解決の問題があり，その一つとして，4q35由来と考えられるEcoRI断片が3本(本来は2本)検出される場合，あるいは患者特有の短い断片が検出されない場合等がある．この説明として「反復配列を含む4q35と10q26の領域間での微小な染色体再構成により生ずる位置効果」を挙げる仮説もあるが，まだ確証はない[6]．

そこで本研究では，上記仮説に関する検討を行うため，FSHD患者10例を対象に，4q末端領域における染色体再構成の有無についてFISH法により分子細胞遺伝学的な解析を行った．

*東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝学

## 方　法

FSHD患者10例(表1)および健常者由来の末梢血から，MTXおよびBrdUを用いた同調培養法により染色体R分染標本を作製し，FISH法に用いた[7,8]．使用したプローブは，4q-telo(4q末端)，MA13(FSHD領域の反復配列)，および10q-telo(10q末端)である．

MA13はNick translation法によりビオチンで標識する標準法を用いた．また，末端プローブ(4q-teloおよび10q-telo)はCytocell社製のものを用い，それらのFISH解析は添付されたプロトコールに従って行った．

## 結　果

FSHD患者10症例(表1)について，反復配列を含むEcoRI断片のサザン法による検索結果により4qと10qの各々の末端間での染色体再構成の可能性が示唆されたのは，10例中1例であった．この症例に関して，各々の染色体の末端

表1

| FSHD-No | EcoRI size (kb) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 4q | | | 10q |
| B2 | 19 | >50 | | |
| B3 | >50 | >50 | | |
| B4 | 23 | 40 | | |
| B5 | 14 | 38 | >50 | 24 |
| B6 | 21 | >50 | | 50, >50 |
| B7 | 21 | >50 | | 10, >50 |
| B8 | 23 | >50 | | 30, >50 |
| B9 | >50 | 48 | | >50 |
| B10 | 24 | 45 | | |
| B11 | 17 | 45 | | >50 |

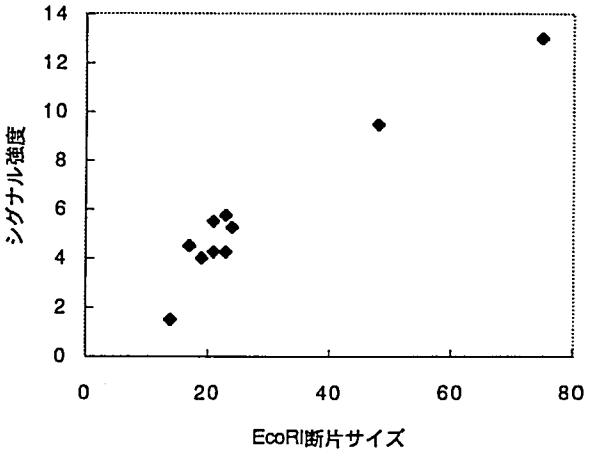



図1　EcoRI断片サイズと蛍光シグナル強度

プローブ(4q-teloおよび10q-telo)を用いてFISH解析を行ったが，シグナルの検出部位は共に正常コントロールと同様に各染色体末端のみであり，染色体再構成を示す知見は得られなかった．

一方，MA13プローブを用いたFISHの結果では，反復配列を含むEcoRI断片サイズの小さい(欠失が大きい)症例において蛍光シグナルが小さい傾向にあった．特に，断片サイズが 17～21kb以下(つまり反復配列が3～4コピー以下)の場合(症例B2, B5, B6, B7およびB11)は，蛍光シグナルが明らかに小さいことが観察された．

## 考　　察

FSHDは原因遺伝子が未だ同定されていないため，その診断はまず臨床的に行われ，その結果を元に遺伝子診断が行われている．臨床診断の主要な基準は4つあり，①発症は顔面もしくは肩甲帯から始まる，②顔面筋の筋力低下は発症した家族の50%以上に認める，③家族例においては常染色体性優性遺伝形式をとる，④少なくとも発症した家族一人の筋電図と筋生検を行い他の疾患を除外する．重要なことは，顔面筋の罹患が顔面神経領域に限定されていることで，外眼筋や咬筋，咽頭筋，舌筋に障害はみられないことである[7]．

一方，遺伝子診断の場合には，患者由来のDNAに関して，FSHD特異的マーカーとされるp13E-11を用いてEcoRI/BlnI二重消化法によるサザンブロットを行い，EcoRI断片内に存在する3.3kbの反復配列(MA13)の部分欠失の有無を調べる．健常人は通常約12～50コピーの反復配列を持ち，p13E-11で検出されるEcoRI断片サイズは40～150kbであるが，患者は1～7コピーしか反復配列を持たず，EcoRI断片サイズは 34kbより短い(90%は10～24kbしかない)[9]．この二重消化法によるサザンブロット解析法は，近年，FSHDの遺伝子診断法として用いられているが，結果が出るまでにかなりの時間や労力が必要である．

今回行った，MA13プローブを用いたFISHによる解析では，反復配列を含むEcoRI断片サイズの小さいものは蛍光シグナルが明らかに小さく観察された．特に，断片サイズが17～21kb以下(つまり反復配列が3～4コピー以下)の場合は，蛍光シグナルが極端に小さいことが判り，さらに，今回扱った症例の中で一番短い14kbのEcoRI断片を持つ患者の場合は，全観察細胞の中の50%は可視的にシグナルが検出されないほどであった．このように，EcoRI断片サイズと蛍光シグナルの大小との間にある程度の相関性が認められたことから(図1)，FISH法がFSHDの遺伝子診断の迅速なスクリーニング法の一つとなりうる可能性が示唆された．今後，症例数を増やしてさらに検討する予定である．

また，今回の検索では，4q末端のtrisomy型の例での4q末端部と10q末端部間の染色体再構成に関する検証はできなかったが，3つの4q末端部のうち疾患の原因となるEcoRI断片の小さい(kb)部位は，本来の4番染色体末端に位置していることが判明し，「反復配列を含む4q35と10q26の領域間での微小な染色体再構成により生ずる位置効果」の仮説を支持する結果であった．今後さらに症例を増やして検討を行いたい．

尚，本研究は以下の方々との共同研究により行われたもので，ここに深謝いたします．
小杉知宏**，後藤加奈子*，松村　剛*，稲澤譲治**，荒畑喜一*（*国立精神・神経センター 神経研究所，**東京医科歯科大学・難治疾患研究所）

## 参考文献

1) Emery AEH：Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders, 2nd ed, pp9-15, Royal Society of Medicine Press, London, 1997.
2) Arahata K and Sugita H：Introduction：The expansion of clinical and molecular genetic knowledge in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). Muscle Nerve 2：S1-3, 1995.
3) Wijmenga C, et al：Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. Lancet 336：651-653, 1990.
4) Deidda G, et al：Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). J Med Genet 33：361-365, 1996.
5) 後藤加奈子，荒畑喜一：「顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー」ミオパチー．医歯薬出版(株)，東京，1997.
6) Upadhyaya M, et al：Improved molecular diagnosis of facioscapulo-humeral muscular dystrophy (FSHD)：validation of the differential double digestion for FSHD. J Med Genet 34：467-479, 1997.
7) F Saito, et al：Mapping of the newly identified biliverdin-IX β reductase gene (BLVB) to human chromosome 19q13.3->q13.2 by fluorescence in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 71：179-181, 1995.
8) 斎藤(小原)深美子：遺伝子分析「FISH」 臨床免疫 29 (suppl 17)：470-475, 1997.
9) 船越政範ら：顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)．日本臨床 55：3181-3185, 1997.

# 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーにおける細胞増殖因子の免疫組織化学的研究

納　光弘*

協力研究者　樋口逸郎*　中川正法*　斉藤明子*
内田裕一*　猪瀬優*　有村公良*
笠井武史**　新山尚仁**　福永秀敏**

**要　旨**　顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの生検筋内における各種細胞増殖因子の発現異常の有無について免疫組織化学的に検討した．呼吸不全を伴う重症のFSHDの一例で，筋膜上において線維芽細胞増殖因子(acidic FGFおよびbasic FGF)の著明な発現亢進が認められた．本症例は組織化学的に結合織の線維化が他の顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー例よりも強く，lobulated fiberがみられるなどの特徴があった．線維芽細胞増殖因子の過剰発現は結合織の線維化を促進する可能性がある．

## はじめに

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーFSHDの原因遺伝子は未だ同定されていないが，大部分の症例で第4染色体長腕(4q35-qter)由来の短いEcoRIフラグメントが検出される[1),2)]．本症では臨床表現型の著しい差異が同じ家系内でもみられ，遺伝子欠失のサイズのみでは表現型の差を説明できない[3,4,5)]．今回我々は本症の病態を明らかにするため，生検筋内における線維芽細胞増殖因子(FGF)を含む各種細胞増殖因子の発現異常の有無について検索した．その結果重症例の一例で注目すべき所見を得たので報告する．

## 対象と方法

4q35由来の短いEcoRIフラグメントが証明された9例のFSHD(**表1**)生検筋の連続凍結切片について，acidic FGF，basic FGF，FGF receptor，platelet-derived growth factor (PDGF)，PDGF receptor α，PDGF receptor β，およびヘパラン硫酸プロテオグリカンに対するモノクローナル抗体を用いてABC法にて免疫組織化学染色を施行した．FSHD各症例間およびFSHDと他のミオパチー間で染色結果を比較検討した．生検筋はcase1とcase2が腓腹筋で他の症例は上腕二頭筋である．9例のFSHDの中で呼吸不全を呈しているのはcase1のみであり，今回の報告の中心となる本症例の臨床像を簡単に提示する．症例は41歳の女性で主訴は顔面，四肢の筋萎縮，筋力低下および呼吸不全である．家族歴では母親に顔面，四肢の軽度の筋力低下があり，82才時に肺炎で死亡している．現病歴は，小学校高学年の頃から鉄棒ができず転びやすくなり，16歳時松葉杖歩行，22歳時車椅子，41歳時肺炎を契機に呼吸不全を呈し人工呼吸管理となり寝たきり状態となっている．41歳時筋生検を施行した．現症では知能，感覚は正常で，顔面，四肢近位筋優位の筋萎縮，筋力低下を認める．腱反射は消失しており，仮性肥大はなく嚥下は可能である．検査所見では血清CK値は98と正常であった．

## 結　果

acidic FGF(FGF1)の免疫染色を**図1**に示す．DMDでも軽度亢進していたが，FSHD case1における筋膜上の発現亢進が際だっていた．case1以外のFSHDではこのような著明なacidic FGFの発現亢進は見られなかった．control 筋においては血管には発現しているが，筋膜上の発現は微量であった．

basic FGF(FGF2)の免疫染色を**図2**に示す．acidic FGF程ではないが，FSHD case1においてbasic FGFも筋膜上の発現亢進が認められた．case1以外のFSHDではこのような著明なbasicFGFの発現は見られなかった．

FGF以外の細胞増殖因子あるいはリセプターであるFGF receptor，PDGF，PDGF receptor α，PDGF receptor β，およびヘパラン硫酸プロテオグリカンについては症例間の差は見られなかった．

FSHD case1におけるHE染色を**図3**に示すが，組織学的には筋線維の大小不同や少数の壊死再生線維の存在は他のFSHDと同様であったが，本症例では結合織の線維化が他のFSHDよりも著明であった．またかなり多くのlobulated fiberがみられたことも特徴的であった．

## 考　察

筋再生における細胞増殖因子の重要性については多くの報告により，ほぼ確立されたものとなっているが，各種細胞増殖因子の相対的重要性，疾患による相違点，および結合織の線維化との関連については不明な点が多い．

* 鹿児島大学医学部第三内科
** 国立療養所南九州病院

表1　FSHD 9症例のまとめ

| 症例 | 年齢 | 性別 | 欠失バンドのサイズ（*Eco*RI） | 発症年齢 | 血清CK |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 41 | F | 13kb | 16 | 98 |
| 2 | 54 | M | 30kb | 30 | 310 |
| 3 | 19 | F | 13kb | 幼少時 | 264 |
| 4 | 17 | F | 20kb | 小学生 | 170 |
| 5 | 16 | M | 24kb | 15 | 539 |
| 6 | 50 | M | 20kb | 40 | 正常 |
| 7 | 17 | F | 20kb | 16 | 230 |
| 8 | 55 | F | 24kb | 52 | 267 |
| 9 | 22 | F | 24kb | 幼少時 | 104 |

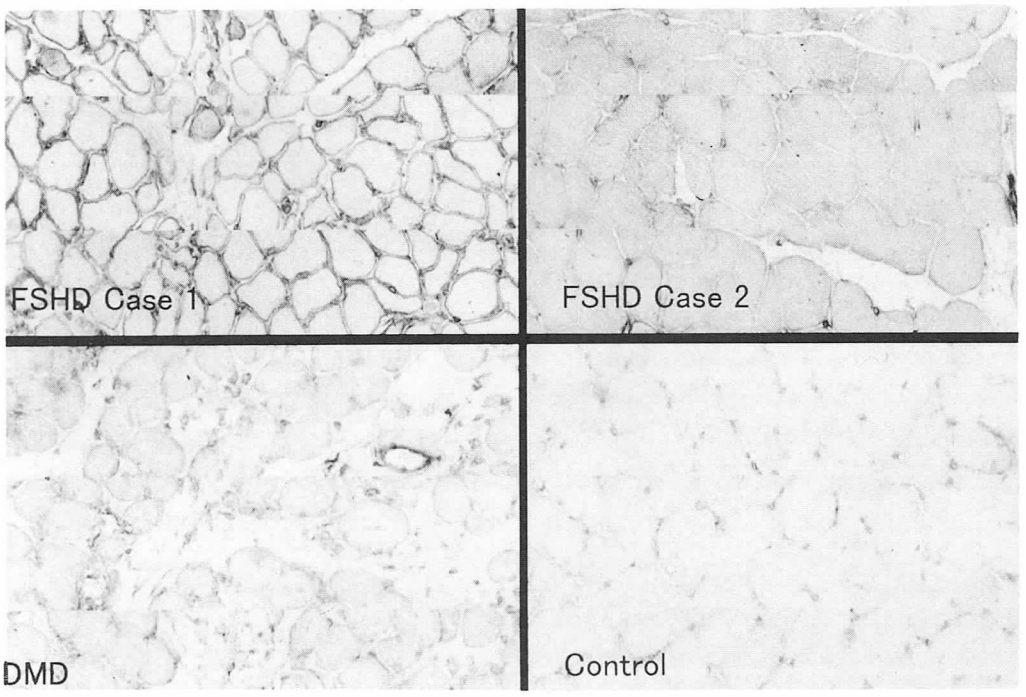



図1　acidic FGFの免疫組織化学的染色

FGFはヘパリンに高親和性で内皮細胞，間葉系細胞，神経細胞および上皮細胞などの増殖促進作用を有しており，FGFの筋芽細胞や筋衛星細胞に対する増殖促進作用については多くの報告がある[6),7),8)]．また，mdxマウスでは筋膜上での発現が亢進していることが報告されており[9),10)]，その活発な筋再生を説明しうるとする考えもある．しかしヒトの骨格筋内におけるin vivoでのFGFの作用については不明な点が多く，その過剰発現の効果については筋再生を増強し有用である可能性と，結合織の線維化を誘発し有害である可能性の両者が存在する．今回のbFGF発現亢進を呈するFSHD例は臨床的に重症であり，結合織の線維化も目立つなど後者の可能性を示唆する症例であると思われる．筋膜上のFGFの発現亢進がFSHDの重症例に一般的に認められるのか，本症例においてのみ認められる例外的なものなのかを明らかにするため，他のFSHD重症例についてもFGFに関する検討が必要であると思われる．

## 文　献

1) Deidda G, Cacurri S, Grisanti P et al : Physical mapping evidence for a duplicated region on chromosome 10qter showing high homology with the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus on chromosome 4qter. Eur J Hum Genet 3 : 155-167, 1995.

2) Deidda G, Cacurri S, Piazzo N et al : Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). J Med Genet 33 : 361-365, 1996.

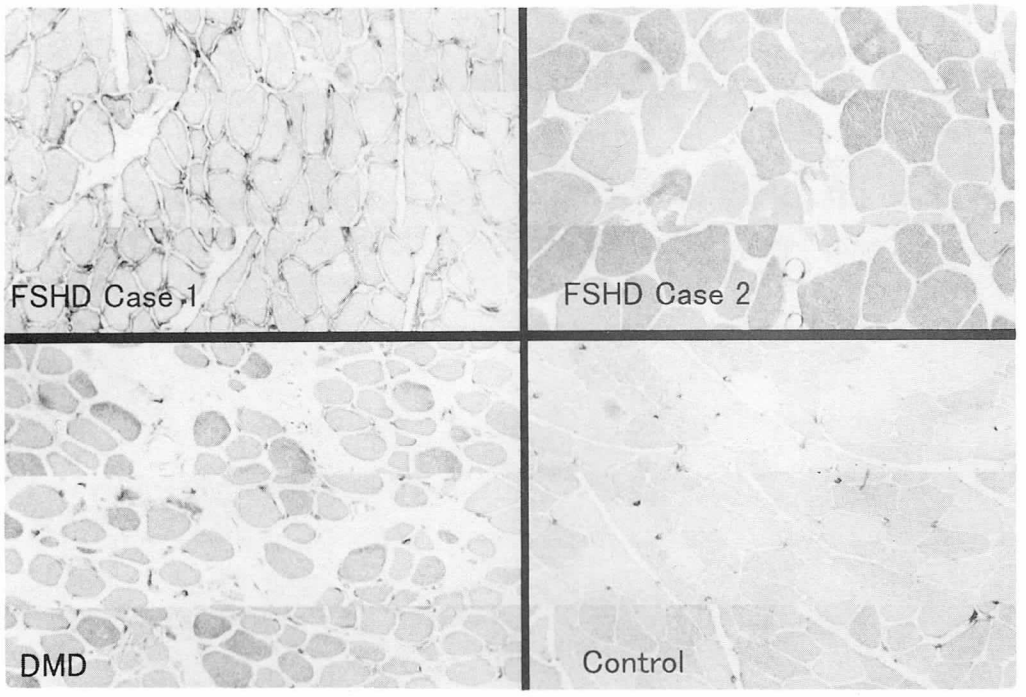



図2　basic FGFの免疫組織化学的染色

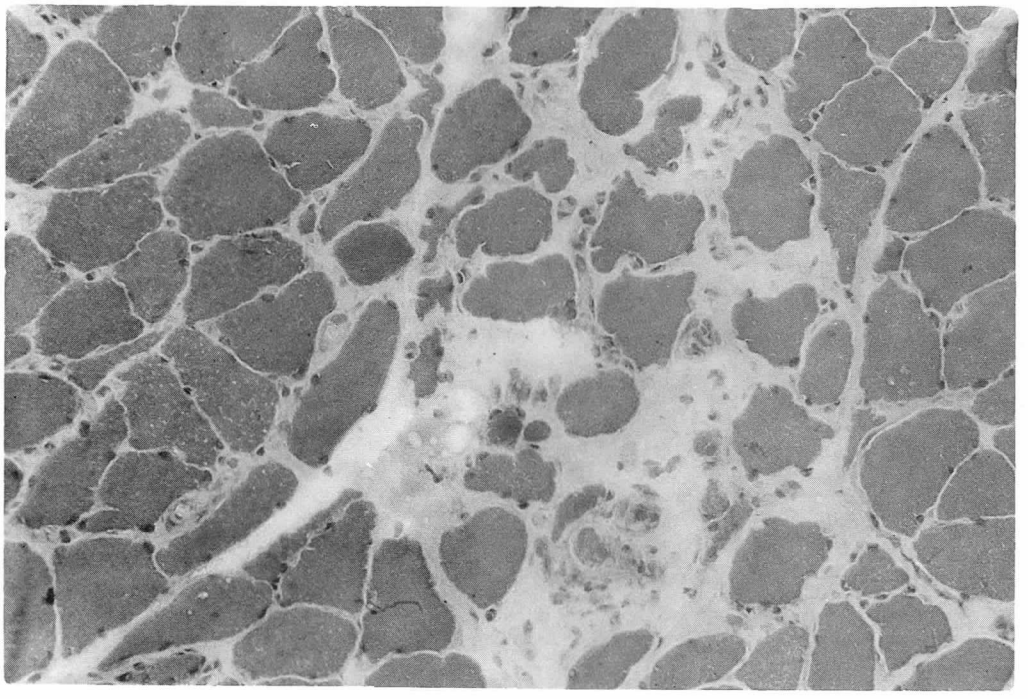


図3　FSHD case 1におけるHE染色

3) Lunt P.W, Jardine P.E, Koch M, et al : Phenotypic-genotypic correlation will assist genetic counseling in 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy. Muscle Nerve Suppl 2 : 103-109, 1995.

4) Nakagawa M, Higuchi I, Yoshidome H, et al : Familial facioscapulohumeral muscular dystrophy : phenotypic diversity and genetic abnormalitiy. Acta Neurol Scand 93 : 189-192, 1996.

5) Nakagawa M, Matsuzaki T, Higuchi I, et al : Facioscapulohumeral muscular dystrophy:Clinical diversity and genetic abnormalities in japanese patients. Intern Med 36 : 333-339, 1997.

6) Allen R.E and Boxhorn L.K : Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. J Cell Physiol 138 : 311-315, 1989.

7) Alterio J, Courtois Y, Robelin J, et al : Acidic and basic fibroblast growth factor mRNAs are expressed by skeletal muscle satellite cells. Biochem. Biophys Res Commun 166 : 1205-1212, 1990.

8) Groux-Muscatelli B, Bassaglia Y, Barritault D, et al : Proliferating satellite cells express acidic fibroblast growth factor during in vitro mitogenesis. Dev Biol 142: 380-385, 1990

9) DiMario J and Strohman RC : Satellite cells from dystrophic (mdx) mouse muscle are stimulated by fibroblast growth factor in vitro. Differentiation 39 : 42-49, 1988.

10) DiMario J, Buffinger N, Yamada S, et al : Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. Sience 244: 688-690, 1989.

# Ⅳ．福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)

# 福山型先天性筋ジストロフィー原因遺伝子単離と機能解析に関する研究

戸田達史*

研究協力者　小林千浩*　近藤恵里*,**　佐々木淳子*,***
中村祐輔*　斎藤加代子**　大澤真木子**
榊原洋一***　高井泰****　堤治****
三宅正志*****　徳永勝士*****　中堀豊******

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は，重度の筋ジストロフィー病変と共に，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であり，わが国の筋ジストロフィー中，Duchenne型の次に多い．

我々は福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)遺伝子座を9q31に決定した後，今回の3年間でこの班として以下のことを明らかにした．

1. 遺伝子存在領域を連鎖不平衡マッピングにより一気にD9S2107を含んだ約100kb以下に[1]，さらに創始者ハプロタイプマッピングによりD9S2170の動原体側のごく近くに限局化した[2]．

2. その多型周辺のYACならびにコスミド整列化クローンを作製し[3]，さらに独自にマイクロサテライト多型を単離した[1]．

3. 新たにFCMD8家系において出生前診断を行った[4]．

4. ハプロタイプ解析により病気の創始者は1人でありそれが全国に広がったこと，日本のFCMD変異はそれ以外に少なくとも9回起きた[2]．

5. 患者ゲノムDNAには予想領域にinsertionが存在し，それはFCMD染色体の87%に認められ，FCMD患者の95%以上がinsertionを1ないし2本持つ[5]．

6. このinsertionの付近からcDNAライブラリーのスクリーニングを続け，ついに福山型原因遺伝子を同定した．福山型遺伝子はmRNAとして約7000塩基対，本症の病変のある骨格筋，心筋，脳で優位に発現していた．われわれは正常遺伝子の産物蛋白質にフクチンと名付けた[5]．フクチンは461個のアミノ酸から成る全く新しい蛋白質であった．異常染色体のほぼ90%には同一の変異が見られ，原因遺伝子内に約3000塩基対の挿入があって，正常なフクチン蛋白質の産生が妨げられていた．この挿入配列は,今から約100世代(2000-2500年)前の一人の祖先から今日の患者の大部分へと受け継がれたものと推定され[2),6)]，動く遺伝因子である「レトロトランスポゾン」であった．古代から伝わったレトロトランスポゾンがヒトの遺伝病の原因であることがわかったのは初めてである[5]．

7. フクチンは既知の蛋白質とは相同性を示さない，機能未知の新規蛋白質であり，構造予測ではフクチンはN末端に分泌シグナル配列をもち，膜貫通ドメインをもたない蛋白質であった．GFPまたはHAタグをつけた強制発現細胞では，フクチンはゴルジ系と細胞培養液中に観察され，細胞膜には見られなかった．transfectionと構造予測により，フクチンは細胞外に存在する蛋白質であることが示唆された[5]．

8. さらにFCMD患者において5種のフクチン点突然変異を見い出した．レトロトランスポゾンinsertionと比較的上流exonでの変異とのcompound heterozygoteの表現型は重症の傾向を示すと思われた．小眼球，瞳孔膜遺残を合併するWWS類似症例にもFCMD変異が証明され，本疾患のより広い臨床的スペクトラムを示唆した．今までのところinsertionを示さない症例は1ヶとして点変異が見つからず，これらの診断が別のCMDであれば，点変異を2つ有する症例は胎生致死である可能性も推測される．

* 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター
** 東京女子医科大学小児科
*** 東京大学大学院医学系研究科小児科
**** 東京大学大学院医学系研究科産婦人科
***** 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学
****** 徳島大学医学部公衆衛生学

## 参考文献

1) Toda T, Miyake M, Kobayashi K, Mizuno K, Saito K, Osawa M, Nakamura Y, Kanazawa I, Nakagome Y, Tokunaga K and Nakahori Y : Linkage-disequilibrium mapping narrows the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) candidate region to <100kb. Am J Hum Genet 59 : 1313-1320, 1996.

2) Kobayashi K, Nakahori Y, Mizuno K, Miyake M, Kumagai T, Honma A, Nonaka I, Nakamura Y, Tokunaga K and Toda T : Founder-haplotype analysis in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). Hum Genet 103 : 323-327, 1998.

3) Miyake M, Nakahori Y, Matsushita I, Kobayashi K, Mizuno K, Hirai M, Kanazawa I, Nakagome Y,

Tokunaga K and Toda T : YAC and cosmid contigs encompassing the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) candidate region on 9q31. Genomics 40 : 284-293, 1997.

4) Takai Y, Tsutsumi O, Harada I, Fujii T, Kashima T, Kobayashi K, Toda T and Taketani Y : Prenatal diagnosis of Fukuyama-type congenital muscular dystrophy by microsatellite analysis. Hum Reprod 13 : 320-323, 1998

5) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshioka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara Y, Nonaka I, Nakagome Y, Kanazawa I, Nakamura Y, Tokunaga K and Toda T : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Nature 394 : 388-392, 1998.

6) Eberhart DE and Curran T : Yayoi era mutation disrupts brain and muscle. Nature Med 4 : 1002-1003, 1998

# 福山型筋ジストロフィーの臨床的重症度の分子レベルの解析

斎　藤　加代子*

協力研究者　河　北　有規子*　王　　治　平*　池　谷　紀代子*
大　澤　真木子*　近　藤　恵　里*,**　戸　田　達　史**

## 目　　的

中枢神経障害を伴う先天型筋ジストロフィーには福山型筋ジストロフィー(FCMD)[1]，Walker-Warburg症候群(WWS)[2]，muscle-eye-brain病(MEBD)[3]がある．臨床的には，FCMDの重症例は他の2疾患と鑑別が困難である．臨床的に，FCMDの最高到達運動機能は支持なし座位または座位にての移動までである．ある時期，歩行可能な少数例と，定頚さえ獲得しない少数例も，臨床的にFCMDと考えられている．我々は，FCMDを運動機能によって軽症例，典型例，重症例に分類し，FCMD遺伝子近傍のマイクロサテライトDNA多型マーカー[4),5)]を用いて，各型のハプロタイプ解析を行い，臨床所見と比較した．

## 対象と方法

運動機能が支持による起立，歩行，階段昇降可能な例(レベル5以上)を軽症例，起立，歩行が不可能であり，最高到達運動機能が坐位にての移動までの例(レベル2～4)を典型例，定頚未獲得または坐位に支持を要する例(レベル0,1)を重症例とした．血縁関係のない日本人のFCMD典型例35例，軽症例12例，重症例9例において臨床症状を検討し，マイクロサテライトDNA多型マーカーD9S2105,D9S2170,D9S2171,D9S2107,D9S172を用いたハプロタイプ解析を行った．

## 結　　果

### 1) FCMD典型例のハプロタイプ解析

35家系について調べた．27例(77%)は創始者ハプロタイプをホモ接合性に示し，7家系(20%)はヘテロ接合性に示していた．1家系は臨床的には典型例であったが，FCMD例で認められないハプロタイプをホモ接合性に示していた．FCMDの両親の健常ハプロタイプをコントロールとして調べたところ，79染色体がFCMDで認められないハプロタイプを示していた．

### 2) FCMD軽症例のハプロタイプ解析

軽症例12例のうち8例は歩行可能，4例は支持起立可能．MRIは8例に施行し，全例軽度～中等度の変化であり，脳幹の低形成は全例に認められなかった．眼所見も重症例より軽度であった(表1).10家系で創始者ハプロタイプをホモ接合性に示したが,2家系でヘテロ接合性であった(図1).

### 3) FCMD重症例のハプロタイプ解析

重症例9例では定頚なし7例，坐位に支持を要する例2例．MRIにて進行性水頭症3例(うち2例でシャント手術施行)，MRI施行7例全例において，脳幹の低形成を認めた．9例中7例で眼症状を示した．網膜低形成(5例)，斜視(5例)，視神経低形成(3例)，特に1例では小眼球症，網膜剥離を示した(表2)．ハプロタイプ解析では1例で創始者ハプロタイプのホモ接合性を示していたが，8例(89%)が1本の創始者ハプロタイプと他のハプロタイプとのヘテロ接合であった．特に，水頭症を示した3例を含む5例が同様のハプロタイプを示していた(図2).

## 考　　察

典型例，軽症例，重症例共に遺伝子的にもFCMDであることが確認できた．水頭症を示した例や小眼球症，網膜剥離を示し，WWSやMEBDと臨床的に鑑別が困難な例が，創始者ハプロタイプを1本示していた．有意差をもって($p<0.005$)，典型例，軽症例は創始者ハプロタイプをホモ接合性に示し，重症例はヘテロ接合性に示すことが明らかになった(表3)．FCMDは広い臨床的スペクトラムを有し，重症例はWWSやMEBDとオーバーラップしていると考えられる．また，重症例はFCMD遺伝子変異の複合ヘテロ接合であると考えられた．

## 文　　献

1) Fukuyama Y, Kawazura M and Haruna H : A peculiar form of congenital progressive muscular dystrophy. Report of fifteen cases. Pediatr Univ Tokyo 4 : 5-8, 1960.
2) Dobyns WB, Kirkpatrick JB, Hittner HM, Roberts RM and Kretzer FL : Syndrome with lissencephaly. II : Walker-Warburg and cerebro-oculo-muscular syndromes and a new syndrome with type II lissencephaly. Am J Med Genet 22 : 157-195, 1985.
3) Santavuori P and Leisti J : Muscle, eye and brain disease : a new syndrome. Neuropaediatrie 8 (Suppl) : 553-558, 1977.

* 東京女子医科大学小児科
** 東京大学医科学研究所ゲノム解析センター

表1　FCMD軽症例の臨床のまとめ

| No. | sex | age at last observation | motor max. ability | brain gyral abnorm. | brain ventricular dilatation | brain brain stem hypoplasia | eyes fundi abnorm. | eyes strabismus | eyes myopia | others |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | F | 16:0 | 8 | n | n | n | - | + | - | - |
| 2 | F | 20:1 | 8 | + | + | - | - | - | + | - |
| 3 | F | 20:10 | 8 | + | + | - | - | - | + | cataract |
| 4 | M | 10:11 | 7 | + | - | - | + | - | - | - |
| 5 | F | 15:11 | 7 | n | n | n | n | - | n | n |
| 6 | F | 17:3 | 7 | + | + | - | - | - | - | nystagmus |
| 7 | F | 23:6 | 7 | n | n | n | n | - | n | n |
| 8 | M | 27:7 | 7 | + | + | - | - | - | - | - |
| 9 | M | 7:6 | 5 | + | + | - | - | - | + | - |
| 10 | M | 10:5 | 5 | + | + | - | - | - | - | - |
| 11 | F | 22:7 | 5 | n | n | n | n | - | n | n |
| 12 | F | 27:10 | 5 | + | + | - | - | - | + | - |
| positive rate | | | | 8/8 | 7/8 | 0/8 | 1/9 | 1/12 | 4/9 | 2/9 |
| (%) | | | | 100 | 88 | 0 | 11 | 8 | 44 | 22 |

max. motor ability: 5= maintain stand posture with support, 7= ambulant, 8= walk up stairs,
n: not examined

表2　FCMD重症例の臨床のまとめ

| No. | sex | age at last observation | motor max. ability | brain gyral abnorm. | brain ventricular dilatation | brain hydro-cephalus | brain brain stem hypoplasia | eyes fundi abnorm. | eyes strabismus | eyes ant. chamber abnormality |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 13 | M | 8:2 | 1 | ++ | ++ | + ope | + | + | + | - |
| 14 | M | 4:4 | 0 | ++ | ++ | + ope | + | - | - | - |
| 15 | M | 1:10 | 0 | ++ | ++ | + | + | - | - | - |
| 16 | M | 1:2 | 0 | ++ | ++ | - | + | - | + | - |
| 17 | F | 1:3 | 0 | ++ | ++ | - | nc | + | + | - |
| 18 | M | 0:4 | 0 | ++ | ++ | - | + | ++ | - | + |
| 19 | F | 1:3 | 0 | ++ | ++ | - | + | - | + | - |
| 20 | F | 3:5 | 0 | ++ | ++ | - | + | + | + | - |
| 21 | M | 11:8 | 1 | ++ | ++ | - | + | + | - | - |
| positive rate | | | | 9/9 | 9/9 | 3/9 | 8/8 | 5/9 | 5/9 | 1/9 |
| (%) | | | | 100 | 100 | 33 | 100 | 56 | 56 | 11 |

max. motor ability: 0= not acqired head control , 1= acquired head control but unable to sit without support
nc= not confirmed, ope= shunt operated

表3　FCMDの重症度と創始者ハプロタイプの接合性の関係

| phenotype | allele typing homozygosity | | allele typing heterozygosity | | allele typing others | | statistical | analysis |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| typical | 27 | 77% | 7 | 20% | 1 | 3% | N.S. | p<.005 |
| mild | 10 | 83% | 2 | 17% | | | p<.005 | |
| severe | 1 | 11% | 8 | 89% | | | | |

others=homozygosity of other haplotypes than the ancestral ones
N.S.=not significant

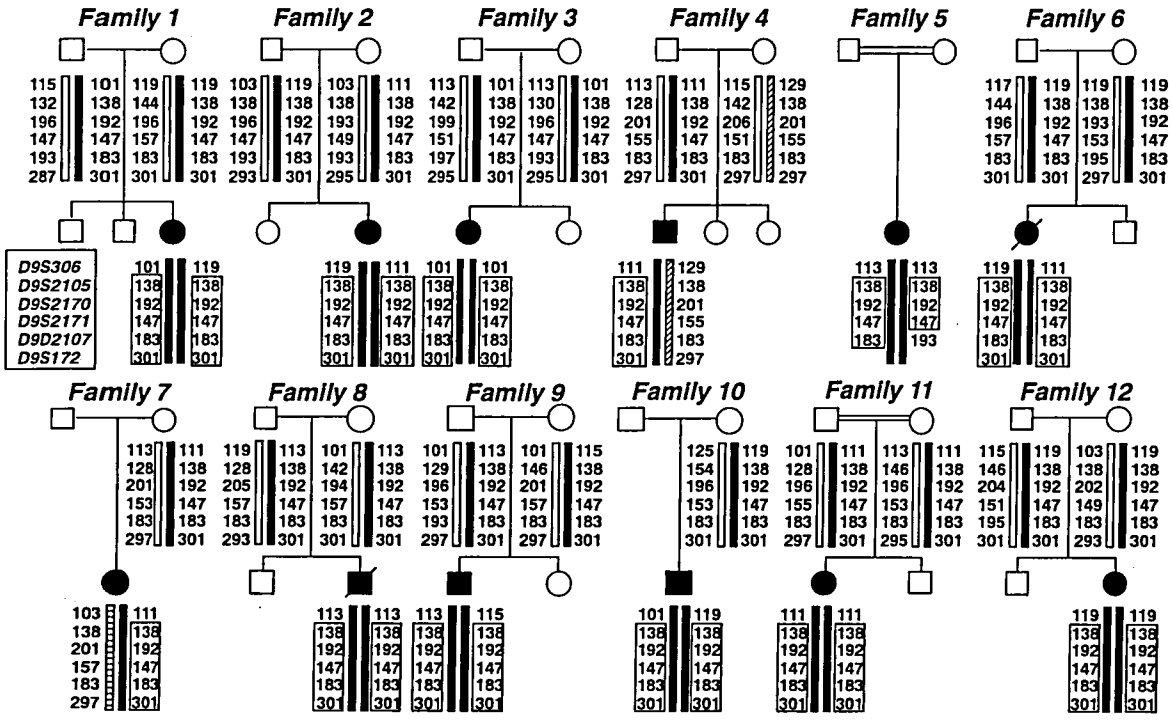



図1　FCMD軽症例のハプロタイプ解析

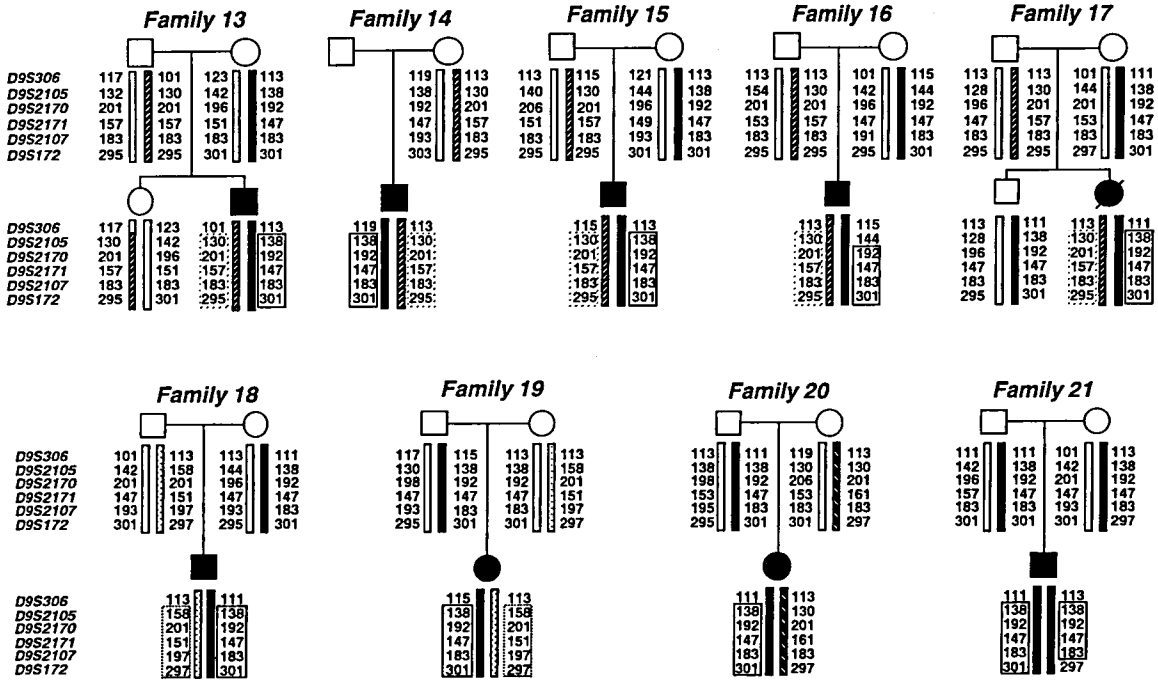



図2　FCMD重症例のハプロタイプ解析


4) Toda T, Miyake M, Kobayashi K, et al : Linkage-disequilibrium mapping narrows the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) candidate region to 100 kb. Am J Hum Genet 59 : 1313-1320. 1996.

5) Kobayashi K, Nakahori Y, Mizuno K, et al : Founder-haplotype analysis in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). Hum Genet 103 : 323-327, 1998.

# 福山型先天性筋ジストロフィーにおける 180kDa蛋白(p180)の欠損

清 水 輝 夫*

研究協力者 砂 田 芳 秀* 樋 口 逸 郎**
斉 藤 史 明* 松 村 喜一郎*

**抄 録** 最近，福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)の原因遺伝子がクローニングされたが，その蛋白産物であるfukutinは未だ同定されていない．われわれは，FCMDの原因蛋白あるいはその関連蛋白は細胞外マトリックス蛋白であろうとの作業仮説に基づき，pH12で可溶化した細胞外マトリックス蛋白に対する単クローナル抗体を作製した．そのうち一つの抗体(M1抗体)でFCMD骨格筋のsarcolemmaにおける有意な免疫染色性の低下が観察された．ウエスタンブロット解析ではM1抗体はウサギ骨格筋では分子量160kDaと180kDaの蛋白(各々p160，p180と呼称)を認識するが，ヒト骨格筋ではp180だけが検出された．患者生検筋材料より2% Triton-X100存在下でp180を抽出しウエスタンブロット解析を行い，FCMD筋ではp180が欠損していることを見いだした．

## 緒 言

最近，第9染色体長腕上9q31にマップされていた福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)の原因遺伝子がクローニングされ[1),2)]，病態解明への第一歩が踏み出された．しかし，その蛋白産物であるfukutinは未だ同定されておらず，今後蛋白レベルでの研究の進展が期待されている．

FCMD骨格筋においては二次的にlaminin α2鎖発現が減少していたり[3)]，骨格筋[4)]および中枢神経系における基底膜の断裂[5)]が報告されている．こうした所見から，われわれは，FCMDの原因蛋白あるいはその関連蛋白は細胞外マトリックス蛋白であろうとの作業仮説を立て，免疫生化学的手法を用いてFCMDでの欠損蛋白の同定を試みてきた．平成8年度の本班会議で既に報告したように，可溶化した細胞外マトリックス蛋白に対する単クローナル抗体を作製し，そのうち一つの抗体(M1抗体)でFCMD骨格筋のsarcolemmaにおける有意な免疫染色性の低下が観察された．今回，M1抗体を用いてヒト骨格筋材料のウエスタンブロット解析を行い，FCMDでは分子量180kDaの蛋白が欠損していることを見いだしたので報告する．

## 方 法

**ウサギ骨格筋pH12抽出分画の調整**：ウサギ骨格筋のtotal microsome分画を10vol.のBuffer A (50mM Tris-HCl,pH7.4, 0.15M NaCl,0.1mM PMSF,0.75mM benzamidine,2.5mg/ml aprotinin,2.5mg/ml leupeptin,0.5mg/ml pepstatin A)にresuspendし1M NaOHでpH11に滴定し25℃，1時間アルカリ処理した．100,000xg遠心後，不溶性pellet画分を10vol. Buffer Aに再懸濁しpH12で25℃，1時間処理した．遠心後，1N HClで，pH7.4としpH12抽出分画を調整した．またウサギ心筋，脳，肝臓，腎臓，肺からも同様な方法でpH12抽出分画を調整しウエスタンブロット解析をおこなった．

**単クローン抗体の作製**：上述したウサギ骨格筋pH12抽出分画(細胞外マトリックス蛋白を含む)でBalb/cマウスを免疫し，その脾細胞をマウスミエローマ細胞と融合させて単クローン抗体を作製した．

**M1免疫affinity beadsの作成**：M1抗体を腹水化しIgGをAffi-Gel ptotein A beads (Bio-Rad)を用いて精製した後に，CNBr-sepharose 4B (Pharmacia)にconjugateして免疫affinityカラムを作製した．このカラムを用いてM1抗体に結合する蛋白をウサギ骨格筋pH12抽出分画より精製した．

**免疫組織化学**：ヒト生検骨格筋(FCMD3例，対照3例)より8μmの凍結切片を作製し，FITC標識抗マウス二次抗体を用いて間接免疫蛍光染色を行った．

**生検筋のウエスタンブロット解析**：FCMD2例，対照2例について，凍結切片を20vol.のBuffer Aでhomogenizeし，遠心後pelletの2% Triton-X100/Buffer Aの可溶化画分をウエスタンブロット解析した．

## 結 果

得られた単クローン抗体の一つM1抗体を用いると対照ヒト骨格筋凍結切片ではsarcolemmaに一致した免疫染色がみられた．ところが3例のFCMD生検筋においては全例でsarcolemmaの免疫染色性が著減していた(図1)．そこで，ウサギ骨格筋のpH12可溶化分画をM1抗体を用いてウエスタンブロット解析したところ，180kDa(p180)と160kDa(p160)の二つのバンドが検出された(図2)．次いでウサギの心筋，脳，肝臓，腎臓，肺からも同様にpH12可溶化分画を調整し，これらの蛋白の組織分布を検討した．p160

* 帝京大学医学部神経内科
** 鹿児島大学医学部第3内科

は骨格筋，心筋に限局して発現していたが，p180は脳，肝臓，腎臓，肺など非筋組織にも広く発現していた(図3). ウサギpH12可溶化分画をM1抗体IgG免疫吸着カラムに通すと，p160だけが吸着し，nativeな状態ではp180は吸着しなかった．

次いで，ヒト対照骨格筋よりpH12アルカリ抽出分画を調整し，M1抗体を用いてウエスタンブロット解析を行ったところp180のみが検出され，p160は検出されなかった(図4). このp180は10mM EDTAあるいは2% Triton-X 100存在下でも可溶化された．一方，非還元状態で電気泳動を行った場合にはウエスタンブロット解析で，p180は検出されなかった．そこで，FCMD2例の筋生検材料および2例の対照筋生検材料より2% Triton-X100可溶化分画を調整し，M1抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った．FCMD2例とも，対照に比べてp180の発現が著減していた(図5).

## 考　　察

われわれはFCMD骨格筋ではM1抗体で検出される180kDa蛋白(p180)が欠損していることをみいだした. p180は，界面活性剤だけでなくpH12という強アルカリ条件，およびEDTA存在下で可溶化されることから，膜貫通蛋

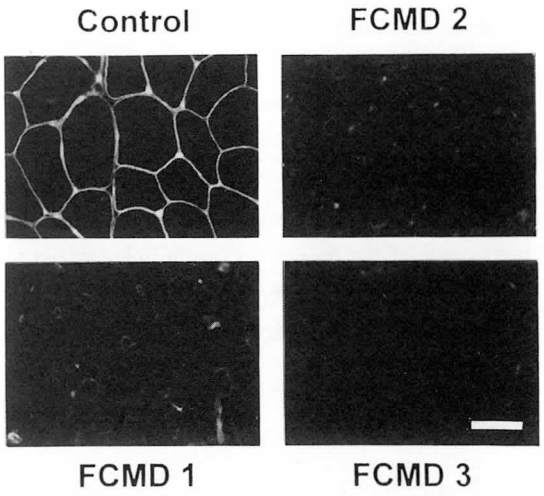



図1　M1抗体によるヒト生検筋の免疫蛍光染色FCMD3例ともsarcolemmaにおける免疫染色性が著減している．

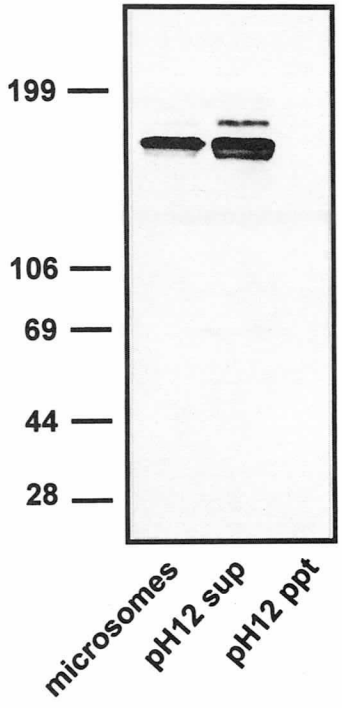



図2　M1抗体によるウサギ骨格筋のウエスタンブロット解析

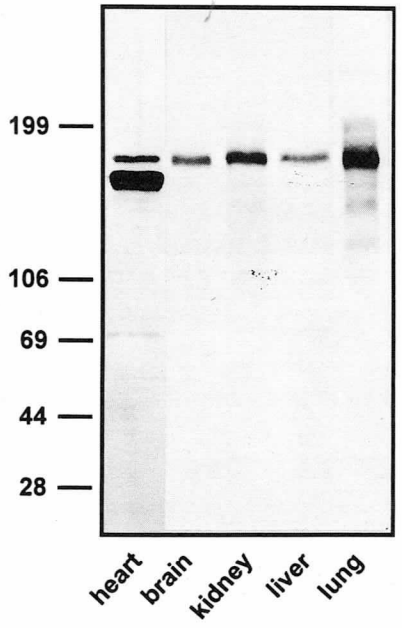



図3　p160, p180の組織分布

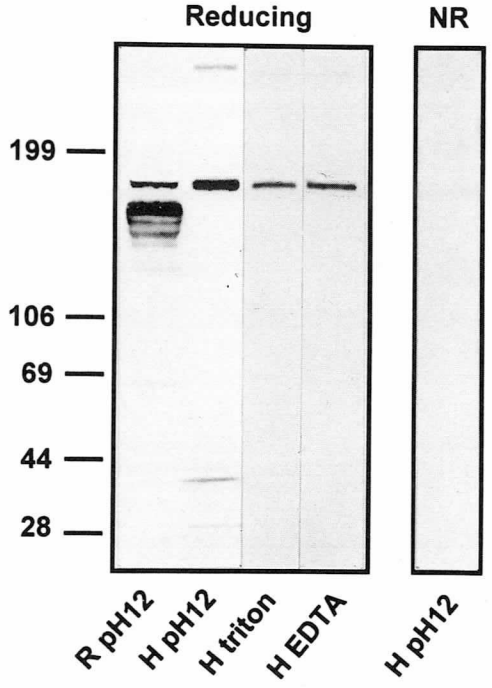



図4　M1抗体によるヒト骨格筋のウエスタンブロット解析

白integral membrane proteinではなく$Ca^{2+}$依存性細胞外マトリックス蛋白であると推測される．fukutinの推定分子量(53.6kDa)を考慮すると，p180がfukutin自体である可能性は低いと思われる．われわれはp180がfukutin結合蛋白でありFCMD筋で二次的に欠損しているのではないかと推察している．今後fukutinの生理機能の解明，FCMDの病態の解明の上からもp180の同定が必要であると思われる．

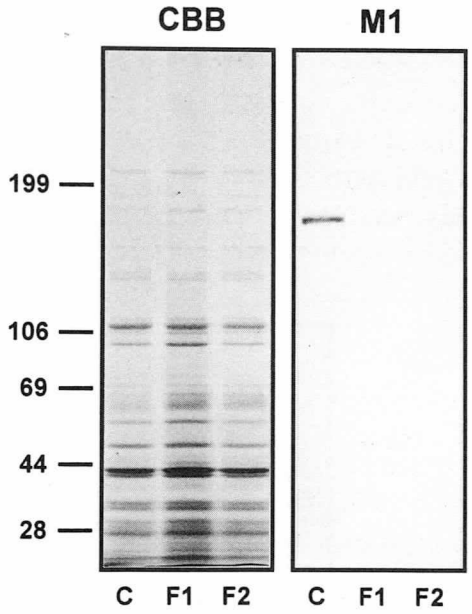



**図5** ヒト生検筋2% Triton-X100抽出分画のウエスタンブロット解析
CBB：ゲルのクマシーブルー染色
M1：M1抗体による免疫染色

## 文　献


1) Toda T, et al : Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. Nature Genet 5 : 283-286, 1993.
2) Kobayashi K, et al : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Nature 394 : 388-392, 1998.
3) Hayashi K.Y, et al : Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophies. J Neurol Sci 119 : 53-64, 1993.
4) Ishii H, et al : Electron microscopic examination of basal lamina in Fukuyama congenital muscular dystrophy. Neuromus Disord 7 : 191-197, 1997
5) Nakano I, et al : Are breaches in the glia limitans the primary cause of the micropolygyria in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD)?－Pathological study of the cerebral cortex of an FCMD fetus. Acta Neuropathol 91 : 313-321, 1996.

# 福山型筋ジストロフィー(FCMD)骨格筋における laminin α2 chainの検討

斎　藤　加代子*

研究協力者　池　谷　紀代子*　小　峯　　聡*　宮　川　桃　香*
河　北　有規子*　高　橋　里恵子*　宍　倉　啓　子*
鈴　木　暘　子*　平　山　義　人*　大　澤　真木子*

## 目　的

福山型筋ジストロフィー(FCMD)の骨格筋における laminin α2 chainの発現を調べ，臨床症状と比較検討する．

## 対象と方法(表，図1)

FCMD16例と出生前診断で診断された胎児3例について検討を行った．FCMD例は，男性6例，女性10例，生検時の年齢は，生後4ヶ月から21歳であった．最大運動能力により歩行可能であった軽症，いざり／よつばい可能であった典型，頸定できない重症の3つに分類し，顔面筋罹患，関節拘縮，仮性肥大の有無，知能発達について比較した．

胎児3例は，いずれも罹患同胞をもつ家系で，じゅうぶんなインフォームドコンセントのもとに，家族の希望により羊水細胞のハプロタイプ解析による出生前診断を行った．罹患同胞と同じfounder haplotypeのhomozygoteであったことから診断し，それぞれ17,18,20週での脳病理所見により診断を確認した．

これらの例について，新鮮凍結標本を作製した．骨格筋病変の程度を知るため，観察視野に占める残存筋線維の面積の割合をコンピューターソフトNIH imageにより計算した．HE標本の画像をコンピューターに取込み，染色の濃淡の差を利用して，結合織よりも濃く染色される筋線維の部分を選択し，面積を測定して，取り込んだ画像全体に対する選択された部分の面積比を求めた(図2)．laminin α2 chainの発現は，Chemicon社のanti-human Merosin, M-chain monoclonal antibodyを用いた螢光免疫染色により検討した．観察視野の全筋線維とlaminin α2 chain陽性線維数を数えて，その割合を求めた．

| FCMD例 | FCMD胎児 |
|---|---|
| ＊臨床症状の分析 | ＊ハプロタイプ解析による出生前診断と脳の病理所見による診断の確認<br>＊胎児同胞の臨床症状の分析 |

＊骨格筋病理
　ルーチン染色
　　＋　大腿四頭筋のHE染色標本上に占める骨格筋線維面積の割合
　laminin α2 chain抗体(Chemicon Co.)を用いた免疫組織染色
　　＋　laminin α2 chain陽性陽性線維の割合

図1　方　法

表　対　象

| # | 性 | 生検時年齢(歳:か月) | 顔面罹患 | 仮性肥大 | 関節拘縮 | 最高運動能 | DQ(年齢) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 典型1 | F | 0：6 | ＋ | — | ＋ | いざり | 34(1：11) |
| 2 | F | 0：10 | ＋ | — | ＋ | いざり | 44(1：1) |
| 3 | F | 0：11 | ＋ | — | ＋ | いざり | nd |
| 4 | F | 1：3 | ＋ | ± | ＋ | いざり | nd |
| 5 | F | 1：4 | ＋ | ± | ＋ | いざり | 56(1：5) |
| 6 | F | 1：5 | ＋ | ＋ | ＋ | 四つ這い | nd |
| 7 | M | 4：2 | ＋ | ＋ | ＋ | いざり | 66(4：2) |
| 8 | M | 14：0 | ＋ | ＋ | ＋ | いざり | 31(2：11) |
| 軽症9 | M | 0：11 | ＋ | ＋ | ＋ | 歩行 | 62(1：6) |
| 10 | M | 14：4 | ＋ | ＋ | ＋ | 歩行 | 13(10：9) |
| 11 | F | 20：0 | ＋ | ＋ | ＋ | 歩行 | 22(20：0) |
| 12 | F | 21：0 | ＋ | ＋ | ＋ | 歩行 | nd |
| 重症13 | F | 0：4 | ＋ | — | ＋ | 頸定未 | 18(0：11) |
| 14 | M | 0：4 | ＋ | — | ＋ | 頸定未 | nd |
| 15 | M | 0：5 | ＋ | — | ＋ | 頸定未 | nd |
| 16 | M | 0：10 | ＋ | — | ＋ | 頸定未 | 34(0：10) |

＊ 東京女子医科大学小児科

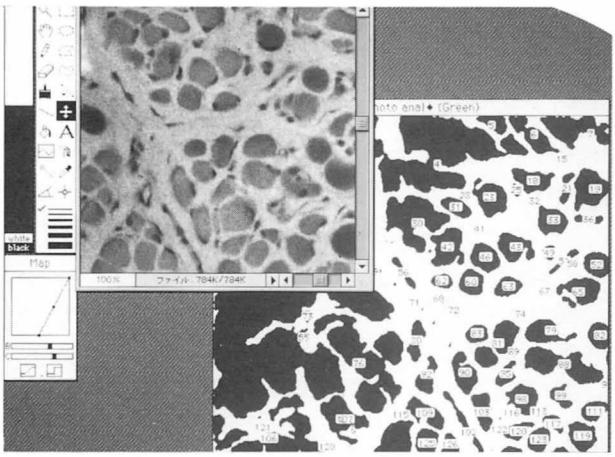


**図2**　HE染色標本における残存筋線維面積の割合の計測法

## 結　　果

FCMD例の内訳は，軽症4例，典型8例，重症4例であった．いずれの型も顔面筋罹患と関節拘縮を認めたが，仮性肥大は運動能力が比較的よい軽症と典型例の一部にみられた．胎児の罹患同胞4例は，すべて典型的経過を示した(**図3**).

laminin α2 chainの発現はFCMD15例と胎児3例の骨格筋線維膜に認められた(**図4, 5**)．すなわち，在胎17週においてlaminin α2 chainは骨格筋線維膜にすでに発現していた．陽性線維の割合は在胎週数とともに増加していた．FCMD典型例の1例に筋線維膜におけるlaminin α2 chain発現の明らかな低下が観察されたが，この例の筋紡垂内線維ははっきり染色されていた．

laminin α2 chain低下例を除くFCMD15例において，年齢とともに観察視野に占める残存筋線維の面積の割合は低下する傾向をみた．しかし，laminin α2 chain陽性線維の割合と年齢には明らかな関係は認められなかった．最高運動能と残存筋線維の面積の割合，最高運動能とlaminin α2 chain陽性線維の割合に，はっきりした相関は認められなかった．

laminin α2 chain低下例は，ほぼ同じ運動能のlaminin α2 chain陽性例と比べ，知能障害の程度が比較的軽度であった．筋病理所見では，残存筋線維の面積の割合が小さく，病変は高度と思われた．

## 考　　察

FCMD16例中15例は，免疫組織染色により骨格筋線維膜に明らかなlaminin α2 chainの発現を認めた．1例のみに明らかな低下をみた．この例の筋紡垂内線維には発現がみられ，欠損ではなく何らかの二次的原因による発現の低下と思われた．臨床的には，4歳2ヶ月でいざり可能である典型的経過を示し，下腿に仮性肥大が認められた．知能障害はlaminin α2 chain陽性の典型例，軽症例，重症例と比較して軽度であり，4歳2ヶ月で66，発達年齢は2歳8ヶ月相当であった．筋病理所見では，筋線維の占める面積が小さく，病変は高度と考えられた．このように，laminin α2 chain低下例では，病理所見に比較して臨床像が軽度という傾向がみられた．

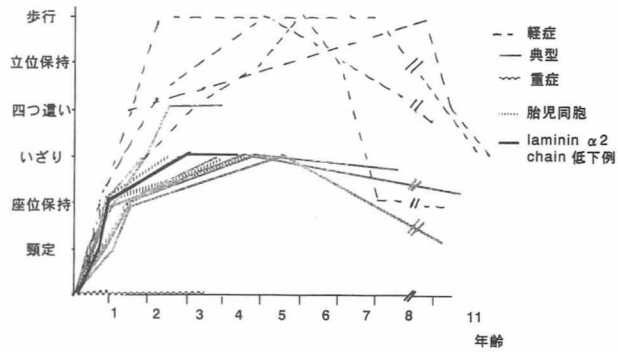



**図3**　FCMD症例の運動発達

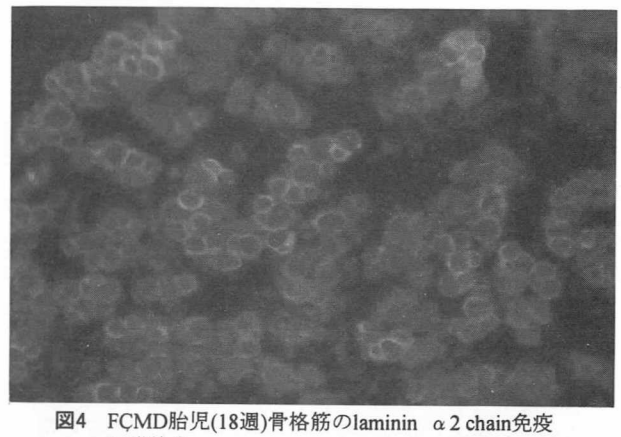


**図4**　FCMD胎児(18週)骨格筋のlaminin α2 chain免疫組織染色

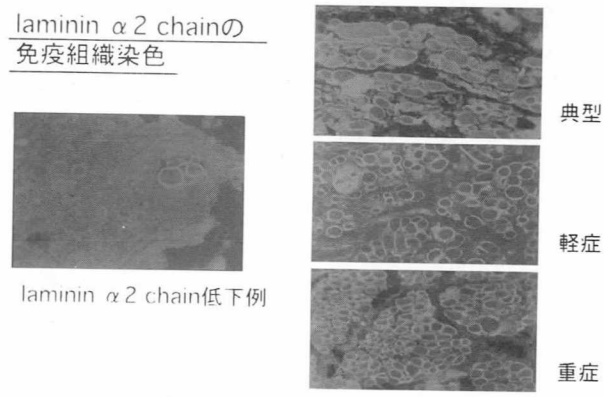



**図5**　FCMD症例骨格筋のlaminin α2 chain免疫組織染色

laminin α2 chain陽性例の臨床像は，頸定不能のものから歩行可能なものまで，多彩であった．laminin α2 chain陽性線維の割合と臨床像に，はっきりした相関は認められなかった．すなわち，laminin α2 chain低下例を含むFCMD例の臨床症状は，laminin α2 chainの発現以外の要因に，より強く修飾されていると考えられた．

laminin α2 chain陽性例の骨格筋の病変の程度は，laminin α2 chainの発現にほとんど影響されていなかった．陽性例における陽性線維の割合は，小さいものでも50%程度はあったので，laminin α2 chainは高度の低下を示す場合にのみ，病理像に影響を与えるのかもしれない．

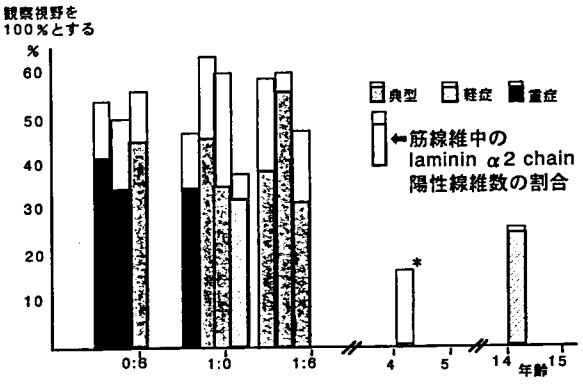



図6　FCMD骨格筋標本における筋線維面積とlaminin α2 chain陽性線維の割合
横軸に年齢，縦軸に観察視野を100%としたときの筋線維の面積の割合を棒グラフで示し，そのなかでのlaminin α2 chain陽性線維の割合を臨床型別に色分けして示した．＊はlaminin α2 chain低下例である．

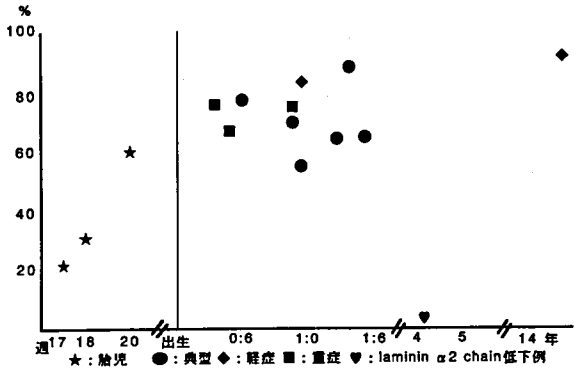



図7　FCMD骨格筋線維中のlaminin α2 chain陽性線維の割合
横軸に年齢，縦軸に観察筋腺維中のlaminin α2 chain陽性線維の割合を示した．臨床型別に記号を変えている．胎児では在胎週数が進むにつれて陽性線維の割合が上昇しているが，出生後には一定の傾向は見られない．

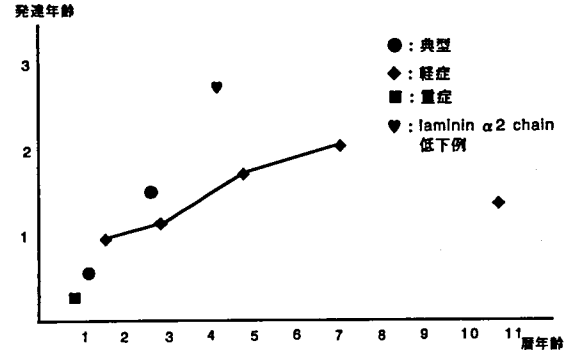



図8　FCMD症例の知能発達

laminin α2 chain陽性線維は在胎17週の胎児から観察された．18週，20週と週数が進むにつれてlaminin α2 chain陽性線維の割合が上昇した．出生後，加齢とともに残存筋線維面積は低下傾向をみたが，laminin α2 chain陽性線維の割合に一定の傾向はなく，骨格筋の病理的変化は進行するが，laminin α2 chainの発現は変化しないと思われた．

筋線維面積の測定やlaminin α2 chain陽性線維の計測は，生検部位や標本の状態に大きく影響されて誤差を生じやすい．誤差を小さくするためには，生検部位を統一し，状態の良い新鮮凍結標本を作製し，一つの例での検討数を増やすことが必要と思われる．

## 結　論

FCMD16例中1例のみに，免疫組織染色により，骨格筋線維膜の二次的と思われるlaminin α2 chainの発現低下をみた．低下例では，病理所見に比較して臨床像が軽度という傾向がみられた．

FCMD例の多くはlaminin α2 chain陽性であり，陽性線維の割合とFCMD例の臨床症状，骨格筋の病変の程度に，はっきりした相関は認められなかった．加齢にともない病理的変化は進行するが，laminin α2 chain陽性線維の割合に一定の傾向はみられなかった．

laminin α2 chain陽性線維は在胎17週の胎児から観察され，在胎週数とともに陽性線維の割合が上昇した．

# 福山型先天性筋ジストロフィーにおける筋細胞表面の変化．共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡による観察

松　原　四　郎*

研究協力者　水　野　美　彦**　北　口　哲　雄*　磯　崎　英　治*
宮　本　和　人*　平　井　俊　策*

**要　旨**　福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)の生検筋を免疫組織化学および電顕的に観察した．その結果，
1.FMCDの筋線維では筋線維を包むlaminin α2 chain(LA2, merosin)が局所的に減少していた．共焦点レーザー顕微鏡によるen face像ではLA2の局所的な破綻が観察された．
2.FCMDの筋線維では，正常の筋線維では殆ど認められないlaminin α5(LA5)のepitopeが発現し，それはLA2減少部位で観察されやすい傾向があった．また，LA5の発現を見た筋線維で一部にneural cell adhesion molecule(NCAM)が発現していた.これらの所見はFMCD筋線維表面には,発生途上筋や再生筋と共通性のある状態が存在することを示唆した．
3.電顕では筋細胞基底膜が同定できない部位を局所的にもつ筋線維があった．定量的解析の結果，基底膜が同定できる部位における形質膜の電子密度は，同定できない部位よりも高かった．さらに，基底膜と形質膜の電子密度のピークの間の距離は不規則で，分散が大きかった．

これらの所見は基底膜と形質膜の電顕上の変化が，たがいに密接に関連していることを示唆した．FMCD関連遺伝子の産物であるFukutinの分布，機能には不明な点が多いが，FMCDの病態の本質に，筋形質膜と基底膜の関連を正常に形成し，それを維持する機構の異常が関与している可能性がある．

## 緒　　言

本邦では福山型先天性筋ジストロフィー(FMCD)が先天性筋ジストロフィーのなかでもっとも重要な病型である．しかし本疾患についての最近の分子遺伝学的研究の進歩[1]にもかかわらず，筋が障害される機序については不明の点が多く残されている．形態学的にはすでに筋細胞基底膜の主な構成蛋白の一つであるlaminin α2 subunit(LA2)すなわちmerosinが先天性筋ジストロフィー(CMD)の一部で欠損していることが報告され[2]，FCMDについてもHayashiら[3]によってLA2の部分的欠損が報告された．一方 Ishiiら[4]は筋細胞基底膜の一部に，電顕的に同定しにくい部位のあることを報告した．しかし，基底膜の変化が筋の変性に関与している証拠はこれまで見つかっていない．そこでこの問題を解く手がかりを得るために，共焦点レーザー顕微鏡で筋細胞表面を観察し，さらに筋形質膜の変化を中心に定量的方法で電顕像を解析した．

## 症例と方法

臨床的にFCMDと診断された4例の生検筋を対象にした．全例精神発達の遅滞と頭部MRIまたはCTの異常があり，血清CKは高値であった．Lamininに対する抗体としては抗LA2抗体とChemicon社の抗laminin α5(LA5, 従来laminin Aまたはlaminin α1と記載されていたもの)抗体を使用した．また筋再生現象との関係を調べる目的で，再生筋で発現するneural cell adhesion molecule(NCAM)に対する抗体を用いた．対照として，病的所見の無い生検筋を同じ方法で観察した．

同一の方法と条件で包埋と薄切および重染色を行った生検筋の電顕用ブロックを材料として，基底膜が観察できる部位とできない部位について，形質膜の形態的な差異の有無を検討した．また，形質膜とその周辺の電子密度の分布を定量的に測定した．各例について一つのグリッド上で電子ビームの条件を変えずに連続して筋細胞表面を6万倍の固定した倍率で20枚以上撮影した．撮影は同一条件で行い，一作業工程で現像した．この画像を固定した条件でimage scannerでfileに変換しNIH-imageで解析した．各ピクセルの濃度を256段階で定量化したのち，距離を横軸にして電子密度をグラフ化した．このグラフを同一平面上に一定間隔で並べ，疑似的な鳥瞰図を作製した．また基底膜と形質膜の電子密度のピークの高さとともに，両ピーク間の間隔を測定した．このよう集計したデータを推計学的に分析した．

* 東京都立神経病院神経内科
** 水野医院

表1 Summary of quantitative analysis of electron density of the cell surface

| cases | basal lamina (BL) gray scale (gs) (s.d.) | plasma membrane (PM) BL visible (gs) | plasma membrane (PM) BL invisible (gs) | | BL-PM distance (nm) |
|---|---|---|---|---|---|
| case 1 | 76.0 (14.1) (n=177) | 123.3 (12.1) | 109.1(14.7) (n=73) | ** | 48.9 (22.6**) |
| case 2 | 63.3 (12.7) (n=112) | 116.3 (16.8) | 85.5 (16.6) (n=32) | ** | 43.9 (20.0**) |
| case 3 | 33.8 (10.6) (n=100) | 95.1 (15.1) | 73.3 (10.4) (n=23) | ** | 38.3 (10.2) |
| case 4 | 78.9 (25.4) (n=130) | 141.8 (39.2) | 66.2 (28.0) (n=21) | ** | 36.6 (14.5**) |
| control 1 | 67.8(14.0) (n=163) | 130.2(18.0) | ——— | —— | 44.3 ( 9.5) |
| control 2 | 101.2 (9.4) (n=157) | 140.1 (14.4) | ——— | —— | 37.3 ( 9.2) |

** $p < 0.0001$

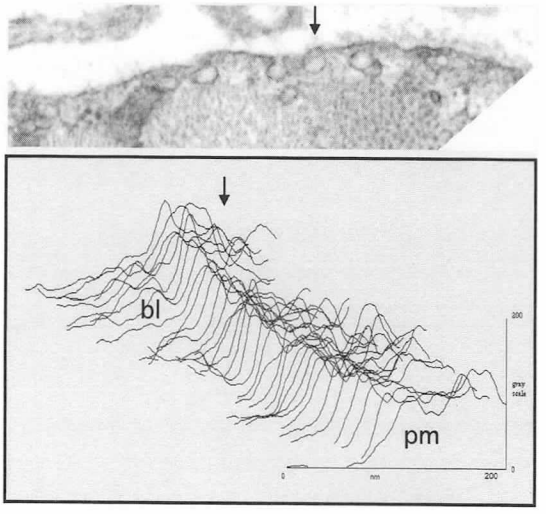



図1 Quantitative analyses of cell surface electron density. Keys pm:plasma membrane, bl:basal lamina, Arrows show corresponding region on the cell surface.

## 結　　果

筋生検の一般組織学的な検査では，筋線維の大小不同，横断面の円形化，opaque線維散在，間質の線維化と脂肪沈着がみられた．

LA2はFCMDでは蛍光強度は全般に弱く，しかも線維によって差が著しかった．また同一線維の周囲でも場所によって強弱が一定せず，一部または全周にわたって蛍光の見られない線維が多数あった．正常対照筋では抗LA5抗体では，筋線維周囲には極微弱な反応があるのみで，主に血管に強い陽性反応が認められたが，FCMDでは，抗LA5抗体では一部の筋線維周囲に分布，強度ともに不規則ながら，明らかな陽性の反応をみとめた．

正常筋のLA2を共焦点レーザーで観察すると，規則正しい筋線維周囲への分布が見られた．縦断面の切片上で得られたen face像では，ほぼ均質な膜構造が観察された．一方FCMDのLA2は共焦点像でも陽性反応は弱く，多くの線維で全周または部分的に無反応であった．en face像では均質な構造を見ることは少なく，大部分の観察部位で一部欠損部を伴う不規則な像が得られた．

FCMD筋のLA2とLA5の2重染色では，同一線維に於ける両者の関係は様々で，部位によって異なっていたが，全般的には，LA2の発現が微弱な線維にLA5が発現している傾向が見られた．抗LA5抗体で染色した FCMD筋のen face像では，LA2より一層不規則で断片的な分布が観察された．

NCAMの発現は正常筋ではまれであった．一方FCMD筋では，多数の線維で，筋細胞膜と一部の筋形質に発現が認められた．二重染色では，筋膜にLA5陽性部位を持つ線維の一部で筋膜あるいは筋形質にNCAMが発現している像が観察された．

電顕では筋細胞の基底膜が局所的に同定できない部位があった．高倍率で観察すると，このような部位では，時に形質膜の外側に，不規則な厚さで基底膜類似の電子密度を持ったamorphousな部分が観察された．基底膜の同定できる部位でも，同膜と形質膜の間隙は不規則で密着したり，逆に異常に広がった部位がしばしば見られた．

定量的な解析の結果(1)基底膜が同定できる部位における形質膜の電子密度は，同定できない部位における電子密度よりも高かった(**図1**)．(2)基底膜と形質膜の電子密度のピークの間の距離は，FCMDで分散が大きい傾向が見られ，F検定で4例中3例で分散に有意な差が，対照と比較して見られた(**表1**)．

## 考　　察

Sewryら[5]はmerosin欠損CMDで,またHayashiらは[3]FCMDでLA5がupregulateされていることを報告した．LA5は筋再生過程で出現することが知られており，そ

の発現に筋再生現象が一部関与する可能性がある．今回のNCAMとの同一線維に於ける発現は，FMCD筋線維表面に発生途上筋や再生筋と共通性のある状態が存在することを示唆した．

LA2は基底膜の最も重要な構成成分であると同時に，形質膜とその周辺に分布する他のdystroglycan，sarcoglycan，dystrophin等の細胞骨格蛋白と基底膜の連関の要となる部位に位置している．基底膜及びLA2の変化がFCMDの一次的な変化であるか否かは断定できないが，今回の我々の観察結果は，基底膜の変化が形質膜の電顕上の形態変化と，密接に関連していることを示している．また電子密度ばかりでなく，両者間の距離が正常に保たれておらず，空間的な関係にも異常がある可能性が考えられる．Fukutin[1]の分布，機能には不明な点が多いが，FCMDの病態の本質に，筋形質膜と基底膜の関連を正常に形成し，それを維持する機構の異常が関与している可能性がある．

## 文　献


1) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, et al : An ancient retrotransposal insertioncauses Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Nature 394 : 388-392, 1998.
2) Tome FMS, Evangelista L, Leclerc A, et al : Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. C RAcad Sci (Life Science) 317 : 351-357, 1994.
3) Hayashi YK, et al : Abnormal expression of laminin subunits in musculardystrophies. J Neurol Sci 119 : 53-64, 1993.
4) Ishii H, Hayashi YK, Nonaka I and Arahata K : Electron microscopic examination of basal lamina in Fukuyama congenital muscular dystrophy. Neuromusc Disord 7 : 191-197, 1977.
5) Sewry CA, Philpot J, Mahony D, Wilson LA, Muntoni F and Dubowitz V : Expression of laminin subunits in congenital musculardystrophy. Neuromusc Disord 5 : 307-316, 1995.

# 福山型先天性筋ジストロフィーの小多脳回
# －特にglia limitans-基底膜複合体病変との関連について－

中　野　今　治*

研究協力者　齋　藤　祐　子**　戸　田　達　史***　村　山　繁　雄**
川　井　　充****　本　吉　慶　史*****

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)の大脳・小脳の小多脳回の形成機序は，その初期像(胎児脳)の検索ができなかったことからほとんど分かっていなかった．しかし，最近FCMDの遺伝子(Fukutin)が同定され[1]て本症の出生前診断が可能となったことから，脳病変の初期像が検索できるようになり，小多脳回形成機序の理解が大幅に進んだ．

脳の最表面は，アストログリアの突起からなるglia limitans(GL)により覆われており，神経組織が脳表に露出することはない．GLの外側はアストログリアにより形成された基底膜(basal lamina：BL)で覆われている(このBLはGLの要素とみなすことにする)．われわれはFCMD胎児脳ではこのGLに破れがあることを見だし[2]，さらに，出生後FCMDの大脳でもGLの破れを認め[3]，これが本症の小多脳回の遠因である可能性を示した．

## 症例と方法

1. **胎児例**：遺伝子診断の後人工流産した胎齢18週のFCMD胎児．10%中性ホルマリンで固定した大脳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 type Ⅳ抗体(抗co4抗体)で免疫染色を行った．正常対照として，神経疾患の無い在胎19週と23週の胎児脳を使った．FCMDでは前頭葉，後頭葉，小脳の一部をグルタール固定して電顕観察した．

2. **生後例**：症例は生前にFCMDと診断され，剖検にて大脳・小脳に小多脳回を認めた3例(男2例，女1例；平均年齢15歳(12歳～21歳)．対照はDuchenne型筋ジストロフィー例を含む剖検脳3例である．前頭葉と小脳の小多脳回の部分を通常の染色に加えて抗GFAP抗体，抗co4抗体，抗laminin抗体で免疫染色した．また，1例(21歳男性)では前頭葉と小脳の小多脳回の部分をグルタール固定し，電顕検索した．

## 結　　果

### 1. 胎児例

#### 1) 大脳皮質

**(1) 組織所見**：大脳皮質は広範に異常な組織(neuro-gliomesenchymal tissue：NGMT)で覆われていた(図1)．前頭葉ではGLに多数の破れがあり，そこから皮質板の神経細胞が噴水状に外に出ていた(図1A)．GLが保たれている部分では，神経細胞はGLの下に留まり，それを迂回して遊走する像は見られなかった．

GFAP染色ではGL表層が線状に染まり，破れの部分ではこれが途切れていた．BLを染める抗CO4抗体染色では，NGMT浅層と深部白質の血管壁BLは陽性だったが，GLや皮質内の血管壁は陰性であった．対照脳も抗CO4抗体に対して同じ染色態度を示した．

後頭葉には，異形性の強い皮質と正常に見える皮質とが明瞭な境をなして隣り合っている部分があった(図1B)．前者ではGLの破れが大きくかつ多数で，GFAP染色でも

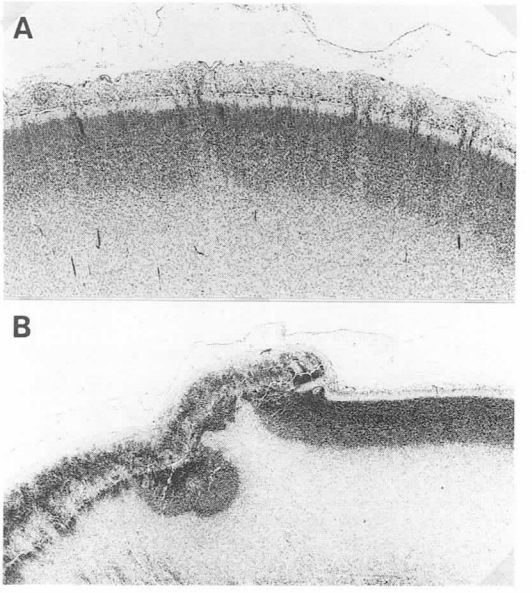



図1　胎齢18週のFCMD 胎児大脳
A：前頭葉皮質．表面はneurogliomesenchymal tissue (NGMT) で覆われており，皮質板神経細胞がglia limitansの破れから飛び出している．HE，×6.
B：後頭葉：左半分で皮質ニューロンが高度に過剰遊走している．Nissl，×3.

* 自治医科大学神経内科
** 東京大学医学部神経内科
*** 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター
**** 国立精神・神経センター武蔵病院神経内科
***** 国立療養所下志津病院神経内科

GLの線条の染色性は認められず，神経細胞の大半がこの破れを通って遊走していた．この神経細胞は脳表面に垂直な柱状配列を示し，接線方向への移動は見られなかった．正常皮質部分では，GLのGFAP陽性の連続した線状構造が認められ，その外にはNGMTは観察されなかった．

**(2) 電子顕微鏡所見**：前頭葉では，GLを形成しているastrocyteのendfeet の最表面と，このendfeetに面するNGMT部分にBLが認められた．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．GL側のBLは連続だったが，NGMT側のは不連続であった．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．NGMTの最表層でくも膜下腔に露出している部分にはBLは見られなかった．GLの破れの部分ではBLやpial fibroblastの層も断列して，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2**).

後頭葉の異形皮質では，GLに相当すると思われる部分にはBLを有するendfeetはなく，表面に平行な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．

**2) 小脳皮質**

**(1) 組織所見**：小脳皮質は外顆粒細胞(EGC)層，分子層，Purkinje細胞層で構成されていた．皮質にはEGC層表面が滑らかな部位と不規則な凹凸を示す部位とがあった．BLとコラーゲン線維を染める渡辺ーナウメンコ鍍銀染色法では，前者は連続したBLで覆われていたのに対し，後者ではこの連続性が途切れてEGCがこぼれ出ていた．破れたGLを有する隣合うfoliaは，遊出したEGCを介して癒合し，血管を含むくも膜組織がfissure深部に閉じこめられていた．

**(2) 電顕所見**：滑らかな皮質部分では，GLの表面に連続したBLが認められた．BLにはlamina densaとlamina lucidaが識別された．表面が不規則な部分ではBLが途切れており，EGCが数個～10数個の小集塊をなしてくも膜下腔に遊出・露出し，狭い空隙を挟んでpial fibroblastの突起と対峙しているのが観察された．

**2. 出生後例**

**1) 大脳皮質**

**(1) 組織所見**：前頭葉の小多脳回部分では，脳表が陥入している部位に異常に大きな血管が多数認められた．抗co4抗体染色では，脳表のGLのBLが途切れて脳組織が外に出ている像がときどき観察された(**図3A**)．また，脳表の陥入部位の血管周囲腔のGLのBLにも断列が見られ，脳組織が血管周囲腔に迷出していた(**図3B, C**)．また，この血管近傍の脳実質に抗co4抗体陽性の顆粒状構造が認められた．対照例では，GLのBLの断列や抗CO4抗体陽性の顆粒状構造は見られなかった．

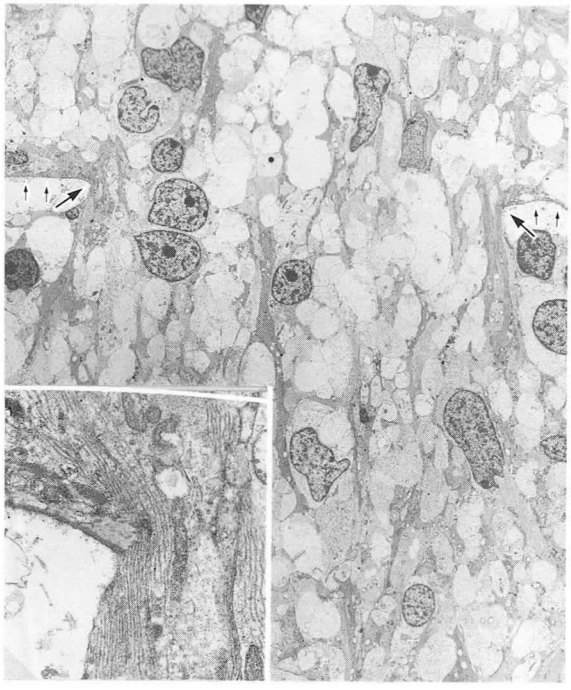


**図2**　胎齢18週のFCMD胎児前頭葉皮質
Glia limitans (small arrows)の破れ(large arrows)から皮質ニューロンが突起とともに外に出ている．
×1,200.
挿入図．左のlarge arrowの部分を拡大したもの．
×12,000.

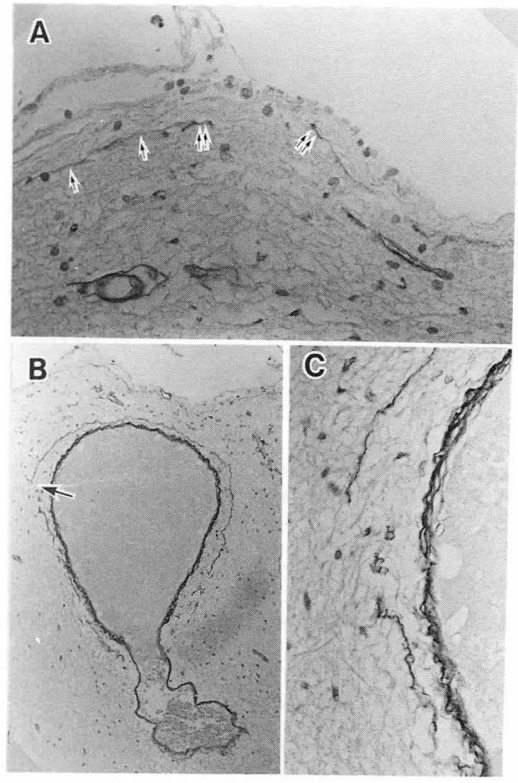



**図3**　出生後FCMDの前頭葉の小多脳回部分
A：脳表のglia limitansの基底膜(arrows)は途中で途切れている(double arrows).
B：脳内にトラップされた大きな血管．血管周囲腔のglia limitansの基底膜は途中で途切れている(arrow).
C：Bのarrowの部分を拡大したもの．
A～C：抗collagen type Ⅳ抗体による免疫染色．
A, C：×65,　B：×6.5

**(2) 電子顕微鏡所見**：脳表面のGLには一部に破れがあり，シナプス構造，アストログリアの突起，神経突起から成る中枢神経組織がそこからくも膜下腔に出て，脳表に平行に広がっていた(**図4**)．とび出した脳組織の一部ではその最外層にBLが形成されていたが，大部分はBLを欠きくも膜下腔に露出していた．皮質の陥入部位の血管周囲腔のGLに脳表と同様に破れがあり，シナプス構造，アストログリアの突起，多数の微小管を含む神経突起，BLで囲まれていない有髄線維から成る脳組織がこの腔に迷入していた(**図5**)．しかし，くも膜下腔や血管周囲腔には神経細胞やアストログリアの細胞体の迷入は見られなかった．また,血管自体のBLには明らかな異常は見られなかった．

**2) 小脳皮質**

**(1) 組織所見**：小多脳回の部位では，異常分子層の中心に，正常ではみられない径の大きな血管が存在し，PASでは基底膜の肥厚が観察された．抗CO4抗体，抗laminin抗体免疫染色では，点状陽性構造物の集簇が小多脳回内血管に接した発達異常分子層内に時に認められたが，脳表基底膜および血管周囲脳実質側の基底膜には破れや重複の所見は明らかでなかった．

**(2) 電子顕微鏡所見**：小多脳回内の血管の基底膜は肥厚し，血管周囲腔に面した脳側の基底膜は，不規則に蛇行し，血管の基底膜にほとんど接している部位も見られたが，基底膜の破れは明らかではなかった．脳表のグリア限界膜の破れも認められなかった．

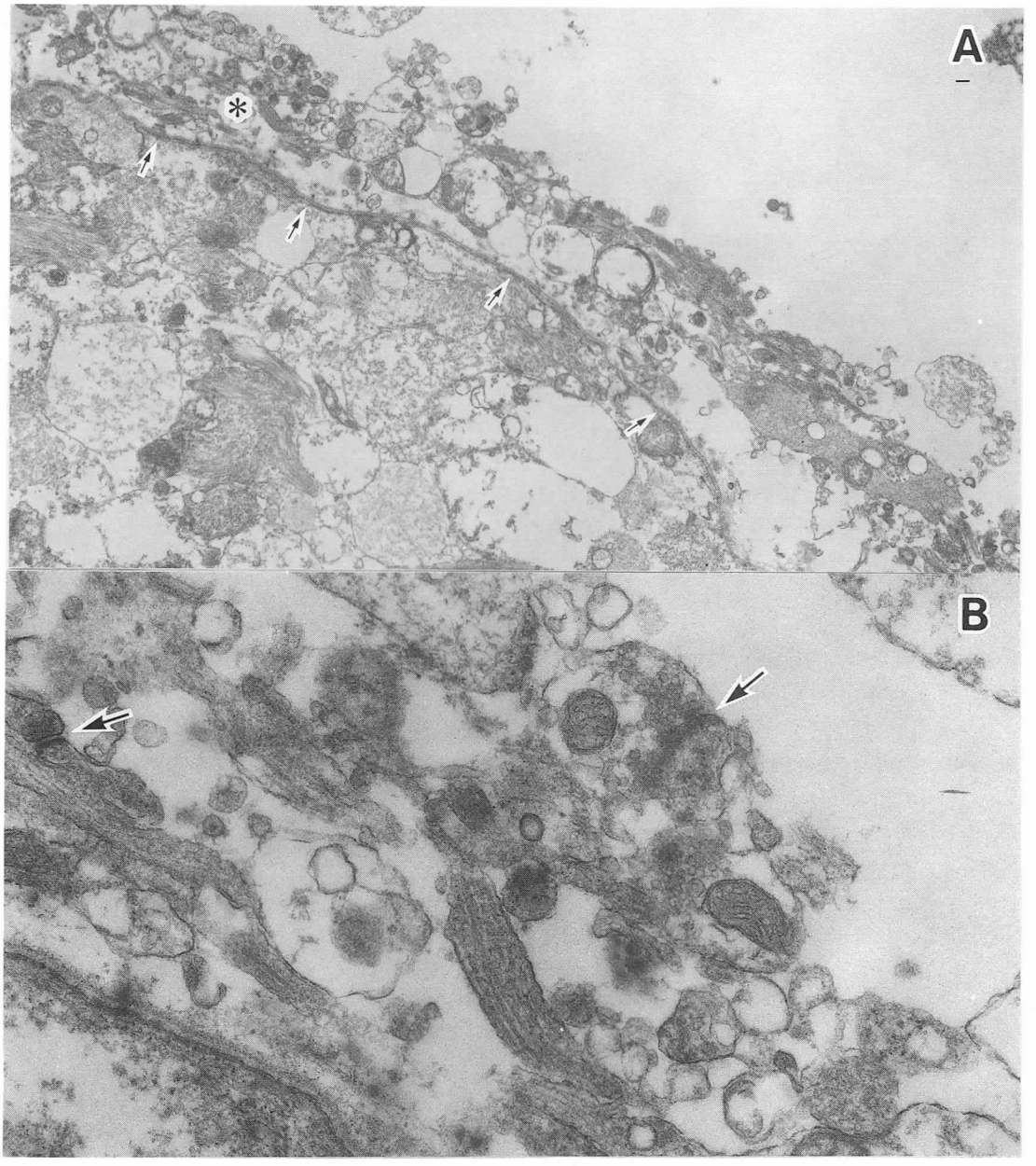



**図4**　出生後FCMDの前頭葉の小多脳回部分．脳表のglia limitansの基底膜(A；arrows) の外に異常組織がみられる(A)．一部(*)拡大するとシナプス(B；arrows)が認められ，脳組織が外に出たものであることが分かる．
A：×5,820,　B：×29,100.

## 考　　察

GLの破れは他のFCMD胎児でも確認されている[4]．GLに破れのある皮質部分にのみNGMTがあり，この皮質でも正常に保たれたGL部分では神経細胞はGL下に留まっていた．また，異形性の強い皮質では過剰遊走した神経細胞は表面にほぼ垂直に柱状配列をしており，正常皮質との境を超えて正常皮質を覆うことはなかった．以上の所見は，NGMTの形成にはその場におけるGL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原因である可能性を示すものである．BLは実質

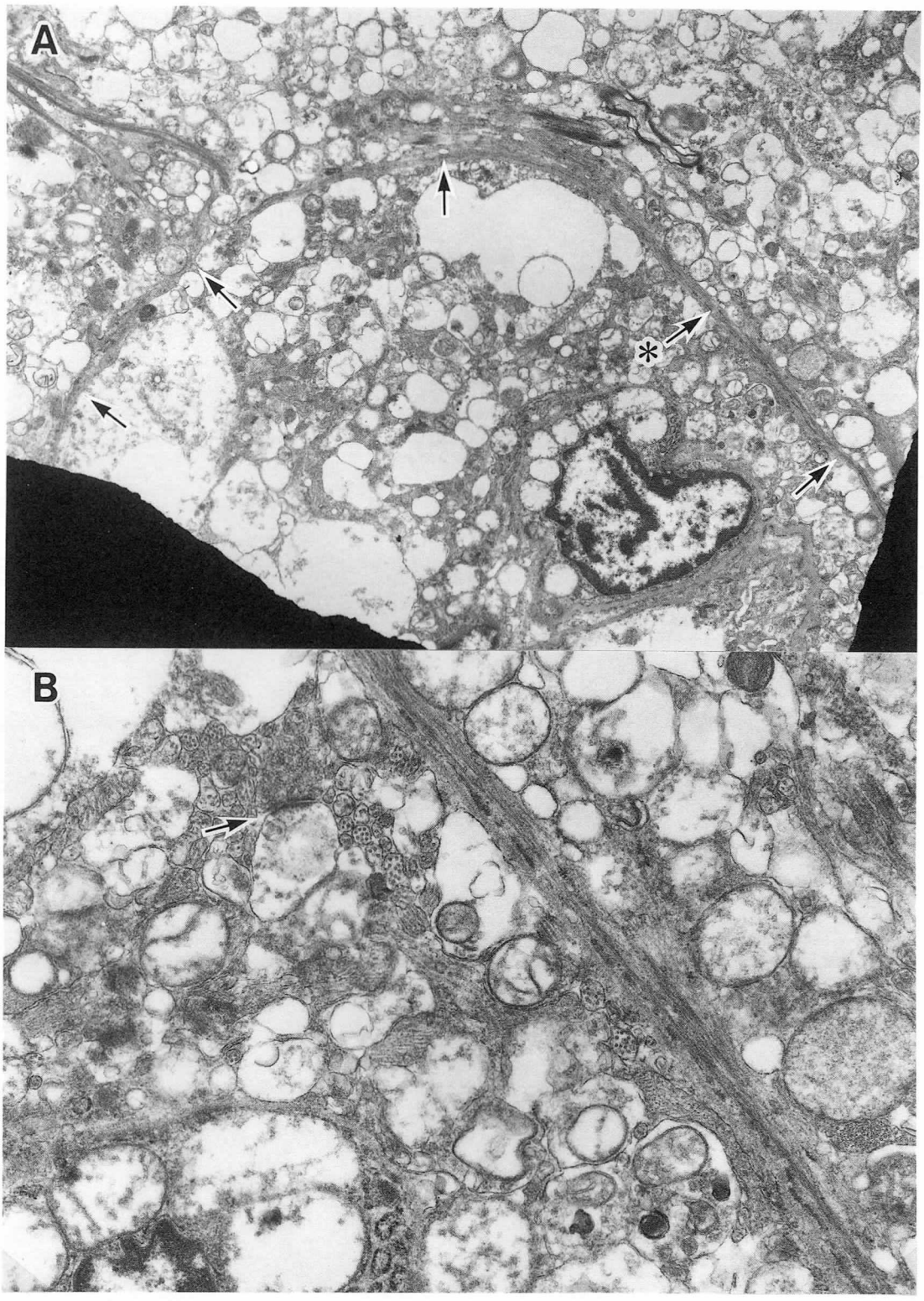



**図5**　出生後FCMDの前頭葉の小多脳回部分．トラップされた血管の周囲腔のglia limitansの基底膜(A；arrows)が認められ，血管周囲腔には脳組織と類似した組織が占めている．Aの一部(*)を拡大(B)するとシナプスと微小細管を含む神経突起が認められ，これは脳組織であることが分かる．
A：×5,820，　B：×19,400.

組織を間質組織から隔離する働きがあり[5]，隣りあう脳回を分離する作用がある[6]．NGMT表面でのBLの未形成も本症の生後例でみられる脳回癒合に寄与したものと思われる．

FCMD胎児小脳の滑らかな皮質部分は連続したBLを有し，そこではEGCの遊出は認められなかったのに対し，GLの途切れた部分からはEGCの小集塊がくも膜下腔に遊出しており，大脳と同様GLの破れがEGC遊出の原因と考えられた．また，GLに破れを有するfolia同士が癒合して，深部にくも膜組織を閉じこめた状態は，FCMD小脳の小多脳回の基本構造に酷似している．

本症成人例の大脳においても脳表と血管周囲腔のGLに破れがあり，脳組織がくも膜下腔や血管周囲腔に迷出していた．このことは本症大脳では出生後もGLの破れが持続的に存在あるいは新たに出現する可能性を示しており，皮質ニューロンの遊走が停止した後も本症の大脳奇形に修飾が加わるものと推測された．

出生後FCMD小脳の小多脳回では血管周囲腔脳側と脳表のBLは走向は著明に不規則になっていたが，大脳と異なり，破れ自体は認められなかった．この大脳・小脳の所見差が何に由来するのか今後の検討が必要である．

以上，FCMDの脳奇形には胎生期におけるGLBLの形成不全が大きく関わっていることが考えられる．この形成不全の原因についてはFukutin蛋白の局在や機能の解明により明らかにされるものと思われる．

## 文　献


1) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, et al : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Nature 394 : 388-392, 1998.

2) Nakano I, Funahashi M, Takada M, et al : Are breaches in the glia limitans the primary cause of the micropolygyria in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD)?--Pathological study of the cerebral cortex of an FCMD fetus. Acta Neuropathol 91 : 313-321, 1996.

3) Saito Y, Murayama S, Kawai M, et al : Breached cerebral glia limitans-basal lamina complex in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Acta Neuropathol. (in press)

4) Yamamoto T, Shibata N, Kanazawa M, et al : Early ultrastructural changes in the central nervous system in Fukuyama congenital muscular dystrophy. Ultrastructural Pathol 21 : 355-360, 1997.

5) 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.

6) 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.

# 遺伝子診断が行なわれた福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)胎児(14週)の病理学的検索
## －胎児脳に基底膜欠損は存在するか－

斎　藤　加代子*

研究協力者　小　林　槇　雄**　柴　田　亮　行**
山　本　智　子**　大　澤　真木子*

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は，広範囲な中枢神経系の奇形を伴い進行性の筋ジストロフィーが共存する特異な病態で，常染色体劣性遺伝による家族集積がみられる．1993年，戸田ら[1]により第9番染色体31-33に遺伝子座が決定された．中枢神経系の主病変は，大脳と小脳の皮質異形成で，皮質外層における細胞移動障害による glio-neuro-mesenchymal dysgenesis[2]に原因が求められている．高田ら[3]は，本症23週胎児脳を詳細に検討し，組織学的形態を3型に分類し，皮質病変の成因をpial-glial barrierの破綻によると結論している．我々も，これまでに17,18週および20週胎児脳を検索し，FCMD胎児には大脳皮質の基底膜構造に微小欠損が多数存在し，欠損部から表層を覆う間葉組織内に脳実質の吹き出し状病変が形成されることを観察，同様の機序を想定している．

今回，胎齢14週胎児脳を検索し，基底膜欠損の意義につき考察した．

### 症　　例

胎齢14週の21トリソミーを伴う人工死産児．家族歴で，同胞1名がFCMDと診断されている．胎齢13週に施行された遺伝子診断で，組み換えなく，FCMDと診断され，両親の希望により14週で人工的流産に至った．病理学的所見：剖検脳は，肉眼的に17,18,20週に比べ明らかな異常はなく，大脳皮質の軟膜下は半透明の薄い膜様組織が覆う．組織学的に，大脳皮質板と外套層が区別できた．PAM染色を行うと，脳表の髄膜間葉組織との境界に位置する線状の基底膜構造の部分的欠損を観察できるが，極めて限局した範囲にとどまる(図1)．さらに，間葉組織内への脳実質の吹き出し状病変は認められないが，前頭葉の一部に，基底膜の破れに一致して脳表に向かい突出するニューロンと間葉組織内に混入した少数の細胞が識別できた(図2)．免疫組織化学的には，ラミニン免疫活性は部分陰性であった．脳表の間葉組織を剥離し，膜状のままで抗4型コラーゲン抗体で反応させると，樹枝状に拡がる血管網の間に，無血管領域が観察され，基底膜欠損部位に一致していた．皮質表層の細胞はS100蛋白陽性，ニューロフィラメント陰性，シナプトフィジン陰性，GFAP陰性で，ニューロン，グリアのいずれの形質も発現していなかった．髄膜間葉組織内に混入した細胞も同様の形質を発現していたが，SMI31で，細胞質からのびる突起が識別された．皮質以外の海馬，線条体，視床，白質は正常であった．小脳では，皮質内の血管を伴う髄膜間葉組織の不規則な増殖を認めた．脳幹周囲にも同様の構造が認められた．眼球の形態に異常はないが，網膜は未熟な網膜芽細胞層からなる．免疫組織化学的にGFAP陰性であるが，ornithineaminotransferase(OAT)活性(藤田保健衛生大学生化学松沢健夫教授より恵与)を欠如しており，ミューラー細胞の分化の遅延が想定された(図3)．心筋，骨格筋の形質

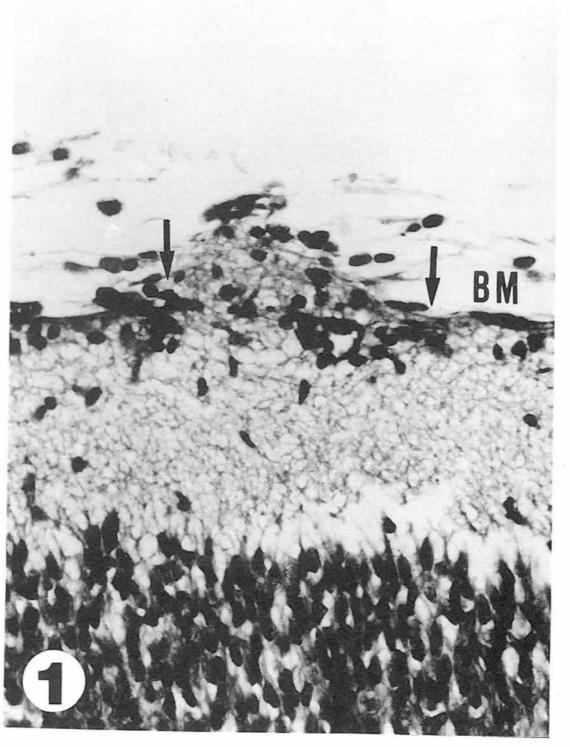



図1　前頭葉皮質にみられた基底膜の部分欠損
(PAM染色，360×)

* 東京女子医科大学医学部小児科
** 東京女子医科大学医学部第一病理

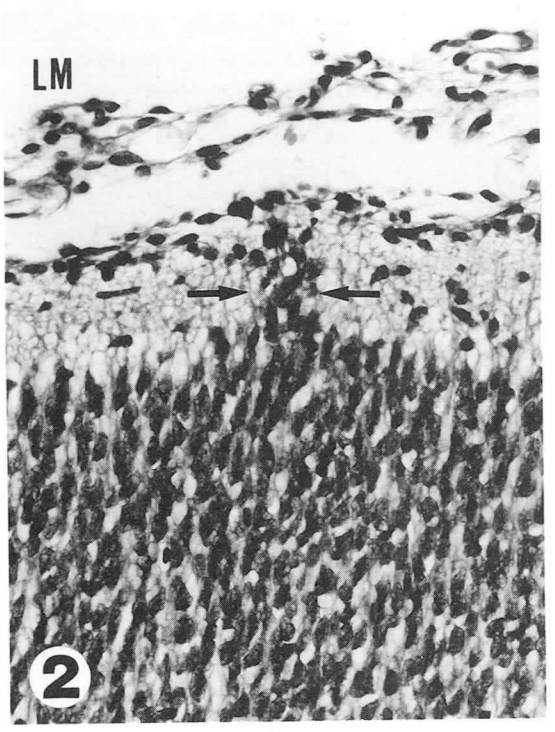



**図2** 基底膜の破れと髄膜間葉組織内の細胞集団
(HE染色，360×)

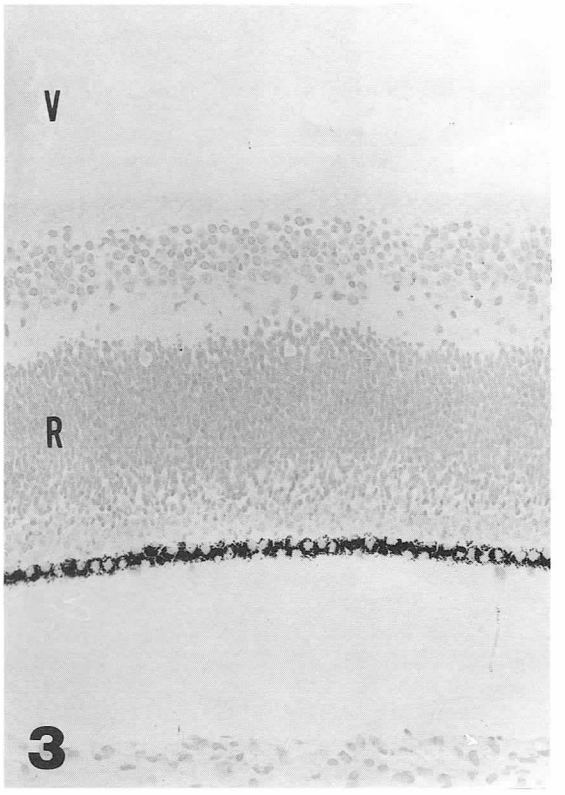



**図3** 網膜組織でのornitineaminotransferase(OAT)免疫活性の欠如(抗OAT抗体，1：500，酵素抗体法)

膜にラミニンは陽性であった．四肢骨格筋の変性，萎縮は認めない．

## 考　　察

FCMDにおける皮質異形成は，髄膜内への過剰なニューロンの移動で，グリア細胞突起に誘導されるニューロブラストの移動が障害された位置異常として理解される．これまでの検索[4]から，病変形成は17週以前から開始されると考えられるが，14週胎児では明らかな吹き出し状病変を欠き，基底膜欠損は限局していた．ニューロンの移動以前に，基底膜異常が存在することは極めて重要である．神経管の形成に基底膜は重要な役割を果たし，Loop-tail[5]やSplotch[6]などの神経管閉鎖不全ミュータント動物の脳胞では神経上皮基底膜の不連続性が指摘されている．皮質原基の形成とニューロンの移動には，細胞間相互作用に関与する分子の解析が必要で，integrin α6ノックアウトマウスでの抗ラミニン抗体を用いた検索[7]では，皮質表層にニューロンが移動した部位では，基底膜構造の不連続性が確認され，基底膜の退行あるいはリモデリングが想定された．最近Pax6がradial gliaの分化を調節していることが報告[8]された．Pax6欠損ミュータントマウスでの基底膜の解析が期待される．FCMDで異常とintegrin α6ノックアウトマウスの異常が類似し，ともに網膜層構造の異常を伴うことは興味深い．胎齢6週から10週にかけて出現し，網膜全層を貫き，網膜の層構築と形態維持に関与するミューラー細胞の異常は，内境界膜(基底膜)の機能障害を意味する[9]．

14週胎児脳の髄膜間葉組織内に混入した細胞は，局在および形態的にカハール レッチウス細胞と考えられ，軟膜下のSMI31陽性構造は，同細胞からのびる突起網であろう．calbindin,calretinin,GABA,microtubule associate protein 2, palvalbumin, AChE, NADPH, reelinの免疫組織化学的同定[10]が必要である．reelinは，ニューロンの移動に抑制的に作用するともいわれ，カハール レッチウス細胞の異常がFCMDにおける皮質構築の異常につながる可能性は大きい．

## 結　　論

14週胎児脳において，ニューロンの欠損部を超えた移動に乏しく，皮質異形成に至る初期像とする確証はないが，基底膜構造の部分的欠損は厳密な対照例との対比が必要である．しかし網膜では，すでに10週に出現し，網膜の層構築と形態維持に関わるミューラー細胞の分化に遅延をみたことは，FCMDにおける脳－網膜病変の形成に共通のプロセスが存在する可能性を示唆している．

## 文　　献

1) Toda T, Segawa M, Nomura Y, et al : Nature Genet 5 : 283-286, 1993.
2) Nakano I, Funahashi M, Takada K, et al : Acta Neuropathol 91 : 313-321, 1996.
3) Takada K, Nakamura H and Tanaka J : J Neuropathol Exp Neurol 43 : 395-407, 1984.

4) Yamamoto T, Komori T, Shibata N, et al : Neuropathology 16 : 184-189, 1996.
5) Wilson DB : Virchow's Archiv (Cellular Pathol) 48 : 9-17, 1985.
6) Morris GL and O'shea KS : Dev Brain Res. 9 : 408-410, 1983.
7) Georges-Labouesse E, Mark M, Messadeq N and Gansmüller A : Current Biology 8 : 983-986, 1998.
8) Götz M, Stoykova A and Peter G : Neuron 21 : 1031-1044, 1998.
9) 小林慎雄，柴田亮行，澤田達男，金澤美穂，大澤真木子 : Neuropatholgy 18 (suppl.) : 313, 1998.
10) Marin-Padilla M : TINS 21 : 64-71, 1998.

# 福山型筋ジストロフィー剖検脳ガングリオシドの分析

吉　野　　英*

研究協力者　佐　藤　　猛*　荒　畑　喜　一**

**要　旨**　福山型筋ジストロフィーの中枢病変の生化学的背景を検索するため，神経組織の分化，発達にともなって変化するガングリオシドの組成を2例のFCMD剖検脳を用いて調べた．大脳皮質においてはコントロールと比し明らかな差異をを認めなかったが，白質において1例ではGM4，GM3の減少を認め，またこの症例ではGM1ガングリオシドは二重バンドになっており，脂肪酸組成が正常と異なると考えられた．FCMDにおいて糖脂質の異常が中枢神経病理の背景に存在する可能性が示唆された．

## はじめに

福山型筋ジストロフィー症 (FCMD) は重度の精神知能発達障害をきたし，神経病理学的には，大脳皮質のpial-glial barrierの破綻が関与すると考えられている．すなわち大脳外表の病変と皮質が不規則に連続し，未熟な神経細胞と考えられる細胞が皮質外へ不規則に進展している所見が認められる[1]．また大脳白質にはMRIでT2 high intensityが認められ，白質の髄鞘の形成遅延が指摘されており[2]，骨格筋のみならず中枢神経も広範な先天性の異常を有する．

一方FCMDにおける中枢神経の生化学的分析は今までにほとんどなく，中枢神経の発達異常の分子的機序の解明がまたれる．ガングリオシドは中枢神経系の細胞膜表面に豊富に発現する複合糖脂質であり，その組成は中枢神経の発達に応じて大きく変化し，神経細胞の分化，遊走，シナプス形成，髄鞘形成に応じてそれぞれ特徴的なガングリオシドを発現する．本研究では，FCMD剖検脳におけるガングリオシドを分析し，本症の中枢病変の背景に特徴的なガングリオシドの変化があるか検索した．

## 対象と方法

対象は死亡時17歳(case 1)，25歳(case 2)のFCMD児．コントロールは，死亡時25歳のDMD児，56歳ALSで，疾患コントロールは死亡時22歳のSSPEである．神経細胞の組成を反映すると予想される大脳皮質，ミエリンの変化が予想される大脳白質を検討した．

脂質は約100mgの脳組織をクロロフォルム/メタノールにて抽出し，脱塩の後，イオン交換カラムSephadex DEAE A-25を用いてガングリオシドを回収した．ガングリオシドは薄層クロマトグラムに展開され，レゾルシノール塩酸により発色し，組成はデンシトメーターにより測定した．GM1の確認のため，薄層免疫染色法を用いた．

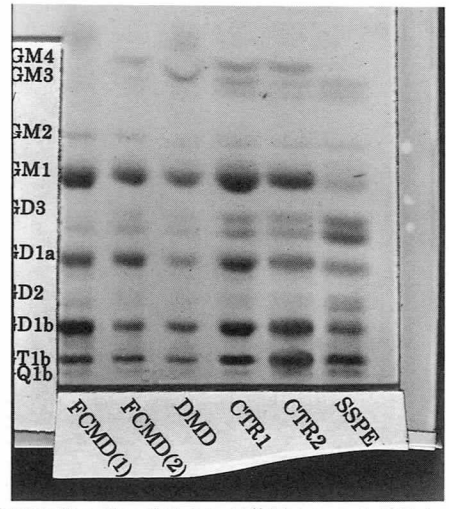



**図1**　大脳白質のガングリオシド薄層クロマトグラム
Case 1 (FCMD(1)) においてはGM4, GM3の発現が低下している．

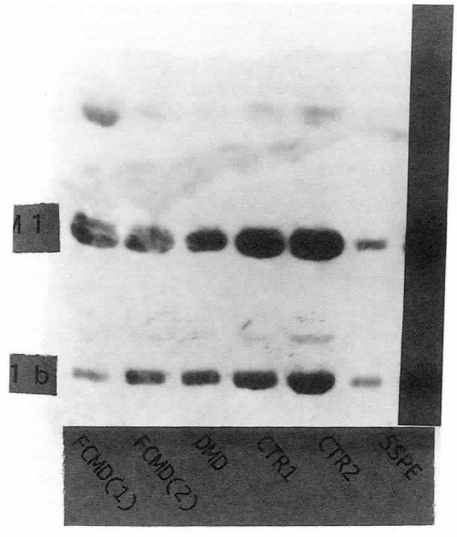



**図2**　大脳ガングリオシドに対するGM1抗体を用いた薄層免疫染色
FCMD(1)ではGM1は二重バンドになっている．

* 国立精神・神経センター国府台病院神経内科
** 国立精神・神経センター神経研究所

## 結　　果

大脳皮質においては単純脂質，ガングリオシドともFCMDとコントロールに差を認めなかった．SSPEではGM1が著しく減少し，GD3が増加した．これは高度の脱髄と，astorocytic gliosisを反映していると思われた(図1)．一方，白質のガングリオシドは，case 1ではGM3とGM4の減少を認めたが，case 2ではこれは認められなかった．またcase 1の白質GM1はdouble bandになっており(図2)，脂肪酸の代謝異常が存在すると思われた．

## 考　　察

FCMDではFukutinと命名された遺伝子産物が福山型筋ジストロフィーの責任蛋白質であることが最近明らかにされた[3]．その異常がどのような機序で脳病理に関わるのか今後の課題である．本研究では，神経系の発生，分化に重要な役割を果たす脳ガングリオシドを分析し，本症の病態を解析した．

今回2例のFCMD脳ガングリオシドを分析し，結果は異常がある症例と，はっきりした異常が無い症例に別れ，共通の異常は指摘できなかった．これはサンプリングの部位の問題もあると思われ，更に症例を集積し，検討する必要がある．

## 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.
2) Yoshioka M, Saiwai S, et al : MR imaging of thr brain in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Am J Neuroradiol 12 : 63-65, 1991.
3) Kobayashi K, Nakahori Y, et al : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Nature 394 : 388-92, 1998.

# V．ミオパチー

## (遠位型，インテグクンα7欠損型，その他)

# 三好遠位型ミオパチー(筋ジストロフィー)原因遺伝子(dysferlin)の同定

荒 畑 喜 一*

研究協力者 青 木 正 志** 糸 山 泰 人** Robert H. Brown Jr.***
後 藤 加奈子* 松 村 剛* 平 林 久 吾****
船 越 政 範*****

**要 旨** すでに我々は，三好遠位型ミオパチー(筋ジストロフィー)(MM)が染色体2p13に連鎖する事を報告してきた[1]．次いで我々は，MMの原因遺伝子を単離する事を目的に，この領域の3Mbにわたる，P1-derived artificial chromosome(PAC)によるcontigを作製した．この領域の新しい多型マーカーと骨格筋に強く発現が見られる5つの候補遺伝子を得て，それら候補遺伝子のクローニングを行った．その結果一つの遺伝子において，患者固有の(対照群には認められない)変異(欠失と点変異；多くはフレームシフトを伴う)を検出した．この遺伝子は，これまでに明らかにされているヒトを含めた哺乳類の遺伝子とはhomologyを示さず，線虫のfer-1遺伝子のみにhomologyが認められた．このことから，我々は，dystrophy associated fer-1 like protein, "dysferlin" と名付けた[2]．Dysferlinは，アミノ酸 2,080，エクソン55個，ORF 6,243bp，cds 6911bp，cDNA全長 6.9kbであった．

## 文 献

1) Bejaoui K, Hirabayashi K, Hentati F, Haines JL, Ben Hamida C, Belal S, Miller RG, McKenna-Yasek D, Weissenbach J, Rowland LP, Griggs RC, Munsat TL, Ben Hamida M, Arahata K, de Jong PJ and Brown Jr RH : Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. Neurology 45 : 768-72, 1995

2) Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Ben Hamida M, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ and Brown Jr RH : Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. Nat Genet 20 : 31-6, 1998

* 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部
** 東北大学医学部神経内科
*** マサチューセッツ総合病院・ハーバード大学医学部
**** 都立荏原病院神経内科
***** 東京慈恵会医科大学リハビリテーション科

# 三好遠位型筋ジストロフィー2家系の臨床的，遺伝学的検討

納　光弘*

研究協力者　中川正法*　松崎敏男*　高嶋博*
樋口逸郎*　末原雅人**　望月昭英***
水澤英洋****

**要　旨**　三好遠位型筋ジストロフィー(MDMD)2家系，第1家系8例(男：女＝2：6)，第2家系3例(男：女＝2：1)の計11名，の臨床的，遺伝学的検討を行った．11例中8例は下腿屈筋群障害を初発とする遠位部優位の筋障害を示したが，1例は発症初期には近位筋優位の障害を示し，その後遠位部の障害が著明となっていた．2例は肩甲下腿型筋萎縮を示した．遺伝子連鎖解析では，D2S2113，D2S292で最大lod score3.49($\theta$=0.00)を得た．2p13領域のDNAマーカーハプロタイプ分析では，発症者はすべてホモ接合体をを示した．2家系ともに沖縄県宮古・八重山地方に血縁があり，同地方におけるMDMDの集積が示唆された．最近，クローニングされたMDMD遺伝子Dysferlinの本家系における変異について検討中である．

## はじめに

三好遠位型筋ジストロフィー(MDMD)は，下腿屈筋群の障害を初発症状とする遠位部優位の筋萎縮・筋力低下を主症状とする常染色体劣性遺伝を示す疾患であり，Miyoshiらの報告により，ひとつの疾患単位として確立されている[1]．1967年の三好らの最初の報告以来，1994年末の時点での報告例は，国内71(男38，女33)例(50家系)，国外14(男10，女4)例(12家系)である[2]．Bejaouiらは MDMD35例の連鎖解析を行い，MDMD遺伝子座が2p12-14領域にマッピングされることを報告した[3]．一方，Bashirらは常染色体劣性遺伝を示す，Limb-Girdle Muscular Dystrophy (LGMD2B)の遺伝子座がやはり2p13に存在することを報告した．Illarioshkinらは，同一家系内にdistal myopathy, LGMDおよびatypical variant of Duchenne muscular dystrophyの異なる3臨床型をしめし，D2S286とD2S292の間に連鎖が認められた大家系を報告している[4]．したがって，MDMDとLGMD2Bが同一遺伝子によるallelic variantsである可能性が高いことが指摘されていた．Bashirらは，LGMD2B遺伝子を2p13領域のDNAマーカーD2S21113とD2S2112の0cMの領域まで絞り込んでいたが[5]，本年ついにBrownらのグループによりMDMD遺伝子がクローニングされ，Dysferlinと命名された[6]．今回，われわれは，2家系11名のMDMD家系の臨床的，遺伝学的検討を行い，臨床症状の多様性と2p13領域のDNAマーカーD2S21113との連鎖を認めたので報告する．

現在，本家系におけるDysferlin遺伝子異常について検討中である．

* 鹿児島大学医学部第三内科
** 国立療養所沖縄病院神経内科
*** 筑波大学臨床医学系神経内科
**** 東京医科歯科大学神経内科

## 家系調査

第一家系は，25歳男性を発端者とする8例(男性2名，女性6名)で，少なくとも，3世代にわたる血族結婚を認めた(図1A)．第2家系は，45歳女性を発端者とする3例(男性2名,女性1名)であり,診察と採血が可能であった罹患者2名について検討した．両親は，又従兄弟婚である(図1B)．

## 症　例

**症例1**：25歳男性(図1A-Ⅵ-3)，第1家系の発端者．18歳頃よりつま先立ちが出来ないことを自覚．下腿屈筋群の筋力低下は高度,下肢近位筋の筋力低下は中等度．上肢遠位筋の筋力低下は軽度，筋萎縮の分布はびまん性遠位部優位，CK値は8310IU/L(正常26-200)，筋生検所見は筋原性変化を示した．CTにて，臨床的に認められる筋障害の分布に一致して，下腿屈筋群を主とする筋のdensityの低下が認められた．大腿部においても，大腿四頭筋，大腿二頭筋の障害が示された．現在，動揺性歩行で，階段昇降は手すり使用にて可能である．

**症例2**：30歳男性(図1A－Ⅵ-2)．発端者の兄．17歳頃より，つま先立ちが出来ないことを自覚．動揺性歩行で，階段昇降に手すりを要する．下腿屈筋群の筋力低下は高度，下肢近位筋の筋力低下は中等度.前脛骨筋筋力はほぼ正常，上肢遠位筋の筋力低下は軽度，筋萎縮の分布はびまん性遠位部優位である．CK値2462IU/L(正常26-200)，筋生検所見は筋原性変化．

**症例3**：32歳女性(図1A-Ⅵ-1)．発端者の姉．20歳頃より歩行困難出現．下腿屈筋群の筋力低下は軽度，下肢近位筋の筋力低下は中等度,上肢遠位筋の筋力低下はごく軽度である．筋萎縮は，びまん性遠位部優位である．動揺性歩行，鶏歩を示す．CK値7860IU/L(正常26-200)．

**症例4**：55歳女性(図1A－Ⅴ-1)．発端者の母．37歳頃より，つま先立ちが出来ないことを自覚．下腿屈筋群の筋力低下は，中等度，前脛骨筋筋力はほぼ正常，下肢近位筋の中等度の筋力低下を示す．上肢遠位筋の軽度の筋力低下，びまん性でやや遠位部優位の筋萎縮を示す．CK値1320 IU/L(正常26-200).

**症例5**：57歳女性(図1A-Ⅴ-2)．発端者の叔母．31歳頃より，つま先立ちがしにくい，階段が上がりにくいなどの症状を自覚．下腿屈筋群，下肢近位筋の筋力低下は高度，上肢遠位筋の筋力低下は中等度，前脛骨筋筋力はかなり保たれている．筋萎縮の分布はびまん性で，遠位部優位である．CK値は640IU/L(正常26-200)．現在，つかまり歩行可能,階段は手をついて可能.顔面筋罹患はごく軽度.

**症例6**：83歳女性(図1A-Ⅲ-13)．59歳頃より，歩行困難，握力低下あり．72歳児には歩行不能．77歳までは，座位保持可能．79歳より寝たきりとなる．筋萎縮，筋力低下はびまん性遠位部優位で高度に認められる．CK値332IU/L(正常43-146)．現在，寝たきり状態，痴呆症状あり．顔面筋罹患軽度．両側肘関節・股関節の屈曲拘縮を認める．

**症例7**：33歳女性(図1A-Ⅵ-7)．21歳頃より歩行困難を自覚．発症初期は近位筋優位の筋力低下があり，多発性筋炎を疑われている．現在，動揺性歩行，鶏歩を示す．上肢は近位筋優位の筋力低下・萎縮，下肢はびまん性遠位部優位の筋力低下・萎縮を示す．CK値は10535IU/L(正常26-200).

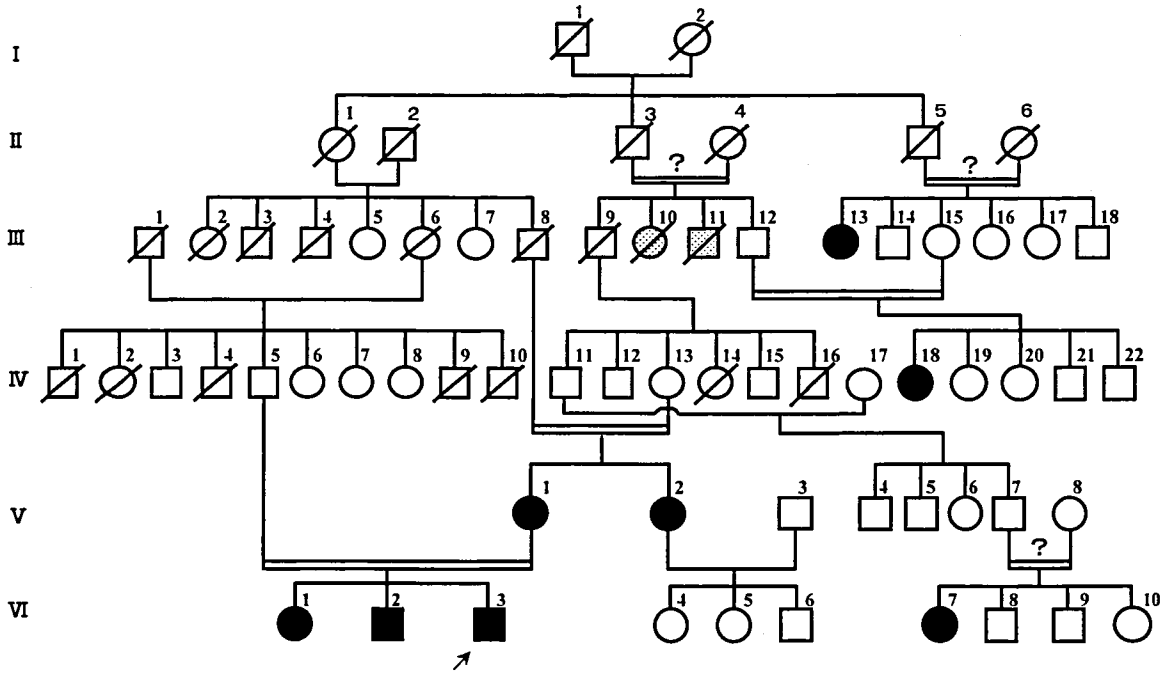



図1A　三好遠位型筋ジストロフィーの家系図(第1家系)

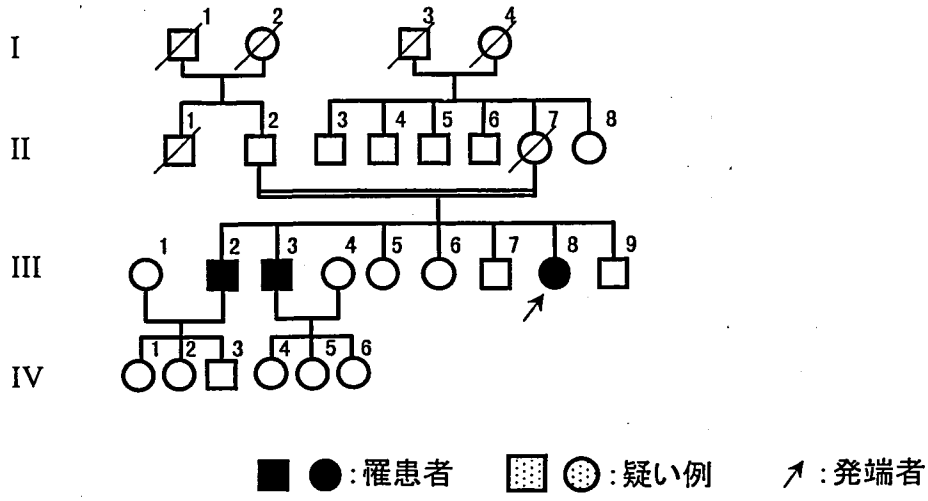



図1B 三好遠位置型筋ジストロフィー(第2家系図)

**症例8**：56歳女性(図1A-Ⅳ-18)．20歳頃より歩行困難を自覚．現在，肩甲下腿型の筋萎縮・筋力低下を示す．動揺性歩行，鶏歩．CK値は1385(正常43-146)IU/L.

**症例9**：45歳女性(図1B-Ⅲ-8)，第2家系の発端者．14歳頃より，走行困難，つま先立ち困難出現．30歳より片杖歩行，上肢挙上困難出現，35歳より両杖歩行．上肢はびまん性遠位部優位の筋力低下，筋萎縮は近位部にやや優位．下肢は，遠位部優位に腰帯部におよぶ筋力低下・筋萎縮を示す．CK値は4049IU/L(25-200)，筋生検では，筋原性変化を示しlobulated fibersを認めた．

**症例10**：59歳男性(図1B-Ⅲ-3)．症例9の兄．15歳頃より，走りにくくなり，19歳頃より立ち上がり困難出現，22歳上肢挙上困難出現．上肢はびまん性近位部優位の筋力低下・筋萎縮．下肢は，遠位部優位に腰帯部におよぶ筋力低下，筋萎縮を示し，足関節の背屈と底屈では，底屈障害がやや高度である．筋生検では筋原性変化を認めた．これら10症例のまとめを表に示す(表)．

**表**　三好遠位型筋ジストロフィー10例の臨床所見のまとめ

| | 第一家系 | | | | | | | | 第二家系 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 症例 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 性 | 男 | 男 | 女 | 女 | 女 | 女 | 女 | 女 | 女 | 男 |
| 年齢 | 25 | 30 | 32 | 55 | 57 | 83 | 33 | 57 | 45 | 59 |
| 発症年齢 | 18 | 17 | 20 | 37 | 31 | 59 | 21 | 20? | 14 | 15 |
| 初発症状 | つま先立ちが出来ない | つま先立ちが出来ない | 歩行困難 | つま先立ちが出来ない | 歩行困難 | 歩行困難 | 歩行困難 | 歩行困難 | 走行困難 | 走行困難 |
| 筋力低下 | | | | | | | | | | |
| 下肢屈筋群 | 高度 | 高度 | 軽度 | 中等度 | 高度 | 高度 | 高度 | 高度 | 高度 | 高度 |
| 下肢近位筋 | 中等度 | 中等度 | 中等度 | 中等度 | 高度 | 高度 | 高度 | 中等度 | 中等度 | 中等度 |
| 上肢遠位筋 | 軽度 | 軽度 | ごく軽度 | 軽度 | 中等度 | 高度 | 中等度 | 中等度 | 中等度 | 中等度 |
| 上肢近位筋 | 軽度 | 軽度 | 軽度 | 軽度 | 中等度 | 高度 | 中等度 | 高度 | 高度 | 高度 |
| 筋萎縮の分布 | びまん性遠位部優位 | びまん性遠位部優位 | びまん性遠位部優位 | びまん性やや遠位部優位 | びまん性遠位部優位 | びまん性遠位部優位 | びまん性上肢：やや近位部優位下肢：遠位部優位 | びまん性上肢：近位下肢：遠位 | びまん性上肢：近位下肢：遠位 | びまん性遠位部優位 |
| 血清CK値(正常：26-200) | 8310 | 2462 | 7860 | 1320 | 640 | 332 | 10535 | 1385 | 4049 | 3569 |
| 筋生検所見 | 筋原性 | 筋原性 | 未検 | 未検 | 未検 | 未検 | 筋原性 | 未検 | 筋原性 | 筋原性 |

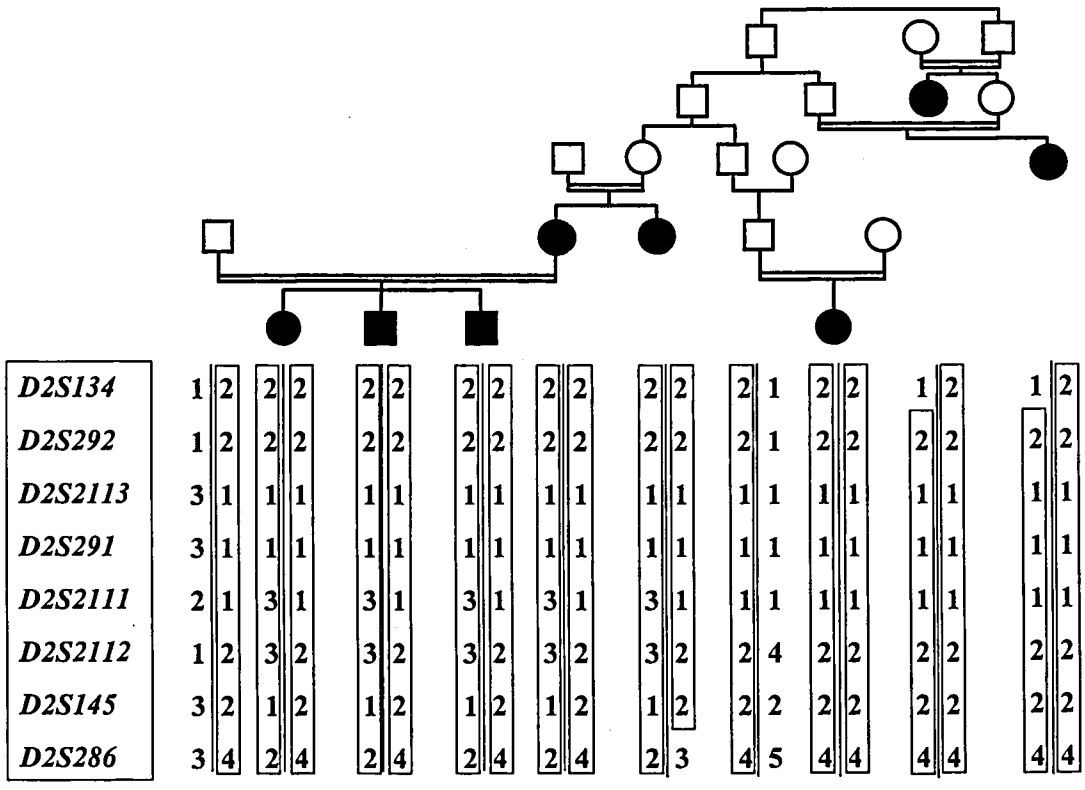



図2　第1家系の2p13領域におけるDNAハプロタイプ

### 遺伝子連鎖解析

遺伝子連鎖解析は，これら2家系の罹患者10名と非罹患者7名の計17名について，同意を得た上で採血を行い，末梢血よりDNAを抽出し，三好遠位型筋ジストロフィーの遺伝子座領域のマイクロサテライト多型マーカーD2S134，D2S292，D2S291，D2S2111，D2S2112，D2S2113，D2S145，D2S286を用いて，連鎖解析を行った．Lod scoreはMLINK programを用いて算出した．尚，allele frequencyは，沖縄出身者50名より採血を行い算出した．2家系の疾患遺伝子座とMDMD遺伝子座がmappingされている第2染色体遺伝子マーカーとの2点連鎖解析では，D2S2113で最大lod score 4.00($\theta$=0.0)を得た．さらに，同領域のDNAハプロタイプの分析では，第一家系では，父親はヘテロ接合体で，3人の兄弟は，すべて，発症している母親と同じハプロタイプを示した．また，発端者の叔母とも共通するハプロタイプを認めた(図2)．第2家系でも，父親はヘテロ接合体で，2名の発症者は，ホモ接合体をを示した．

### 考　　察

両家系とも基本的には下肢遠位部屈筋群優位の筋力低下を主症状としていたが，第1家系には肢帯型筋ジストロフィ類似例と肩甲下腿型筋萎縮症類似例が，第2家系は肩甲下腿型筋萎縮症類似例がみられ，当初確定診断が出来なかった．しかし，今回行った2点連鎖解析および2p13領域のDNAマーカーハプロタイプ分析より，三好遠位型筋ジストロフィー遺伝子座(2p13)との連鎖が認められた．以上より，この2家系は，三好遠位型筋ジストロフィーと診断された．2家系ともに沖縄県のごく狭い地域にである宮古・八重山地方にルーツがあり，この地方における三好型の集積が示唆された．また，鹿児島県奄美地方，鹿児島県本土にも三好型を認めており，今後，さらに疫学的，遺伝学的調査を行う必要がある．最近，MDMDの疾患遺伝子dysferlinがクローニングされたが，現在，本家系におけるdysferlin遺伝子の異常について検討中である．

### 文　　献


1) Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, et al : Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy: seventeen cases in eight families including an autopsied case. Brain 109 : 31-54, 1986.
2) 三好和夫．三好遠位型筋ジストロフィー症例の報告例数（1967-1994）ならびに本症に早期にみられる肢帯型筋萎縮．神経内科 44 : 61-65, 1996.
3) Bejaoui K, Hirabayashi K, Hentati F, et al : Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. Neurology 45 : 768-72, 1995.
4) Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Tanaka H, et al : Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. Brain 119 : 1895-1909, 1996
5) Bashir R, Keers S, Strachan T, et al : Genetic and physical mapping at the Limb-Girdle muscular dystrophy locus (LGMDB) on chromosome 2p. Genomics 33:46-52, 1996.
6) Liu J, Aoki M, Illa I, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. Nat Genet 20 : 31-6, 1998.

# Rimmed vacuole型遠位型ミオパチーの遺伝子解析

田 中 恵 子*

研究協力者 池 内 健* 斎 藤 正 明* 田 中 一*
樋 口 砂 里* 辻 省 次* 浅 賀 知 也**
高 守 正 治**

**要 旨** Rimmed vacuole型遠位型ミオパチー(DMRV)は常染色体劣性遺伝性で，特徴的な筋障害分布と筋線維内のrimmed vacuole形成を特徴とする．我々はDMRV9家系について連鎖解析を行い，本症の原因遺伝子がマイクロサテライト多型マーカーのD9S1868からD9S1788までの間の12.3cMに存在し，ハプロタイプ解析からD9S1804からD9S1859の1.5cM周辺が候補領域として有望であることを示した．この領域にマップされるexpressed sequence tag(EST)から筋細胞に発現する10個のESTを選択し，DMRV生検筋から抽出したRNAについて，TaqMan probeを用いて定量的PCRを行い，本候補領域に存在するESTはタイプ1線維に発現の多い遺伝子である可能性を示した．

## はじめに

Rimmed vacuole型遠位型ミオパチー(DMRV)は常染色体劣性遺伝性あるいは弧発性で，20歳前後の発症が多く，前脛骨筋の筋力低下を初発症状とし，比較的早期に大腿から腰帯部に筋力低下が進行するが，大腿前面の筋群は末期まで保たれるのに比し，後面の筋群は高度に変性する特徴的な障害分布を呈する[1),2)]．生検筋ではrimmed vacuoleの出現を最大の特徴とする．本症の病因や病態機序は不明であり，分子遺伝学的なアプローチにより病因遺伝子を同定することは，本症の診断に有用となるのみならず，rimmed vacuoleの形成を伴う筋障害のメカニズムを解明する糸口となる可能性が期待できる．我々は本症の病因遺伝子の単離にむけて，まず連鎖解析により遺伝子座位を決定し，さらに病因遺伝子を同定することを目的とした．

この間，ペルシア系ユダヤ人で報告されていたhereditary inclusion body myopathy(HIBM)が第9染色体p1-q1に連鎖することが明らかにされた[3)]．HIBMは遺伝的，臨床病理学的にDMRVに類似しているため，我々は両者がallelicな疾患である可能性を考え，第9染色体について連鎖解析を行った．さらに候補領域にマップされるExpressed sequence tag(EST)について，筋細胞に発現するESTを候補遺伝子として選び出し，定量的PCRにより各筋群での発現の多寡と罹患筋分布との関連について検討を加えた．

## 対象および方法

本邦DMRV9家系，発症者18人，非発症者19人に対してマイクロサテライト多型マーカーによる連鎖解析を行った．被験者の同意を得た上で，末梢血より高分子ゲノムDNAを抽出した．マイクロサテライト多型マーカーは，D9S1868-1.9cM-D9S1853-4.3cM-D9S1788-1.1cM-D9S1878-0.1cM-D9S1804-1.4cM-D9S1859-3.5cM-D9S1787-1.1cM-D9S1844-0.5cM-D9S1799を用い，DNA多型を自動シークエンサーにて解析した．ロッド得点は，LINKAGE (version 5.2)とFASTLINKのMLINKならびにLINKMAPを用いて計算した．

ついで，DMRVおよび対照各4例の生検筋からTotal RNAを抽出し，reverse transcriptaseでcDNAを作成し，連鎖解析により絞り込んだ領域を含むD9S165からD9S1874までの3cMにマップされ，Stanford G3 hybrid panel上に登録されている12個のESTについて，筋細胞に発現するESTを候補遺伝子として選択するため，RT-PCRによる解析を行った．さらに，その発現量がDMRVと対照で著しく異なるものが候補となりうると考え，ABI 7700にてTaqMan probeを用いた定量的PCRを行った．内部標準としてデスミン，ミオシン，アルファアクチンを用いた．定量的PCRの原理は，両端を蛍光ラベルしたTaqMan probeが，PCRの過程で一本鎖DNAに先にアニールし，Taq DNA polymeraseによる伸長の際，Taq DNA polymeraseの5'exonuclease活性により5'端のリポーター色素が遊離して発する蛍光を検出することによる．検量線作成のため，デスミンのcDNAを標準サンプルとして希釈系列を作り，増幅曲線をプロットし，指数関数的増幅領域内に各濃度でのthreshould cycle，Ct値を求め，対数グラフにプロットした．

## 結 果

マイクロサテライト多型マーカーを用いた連鎖解析では，2点連鎖解析によりD9S1878において，最大ロッド得点5.50(q=0)をえた．多点連鎖解析では，D9S1788におい

* 新潟大学脳研究所神経内科
** 金沢大学医学部神経内科

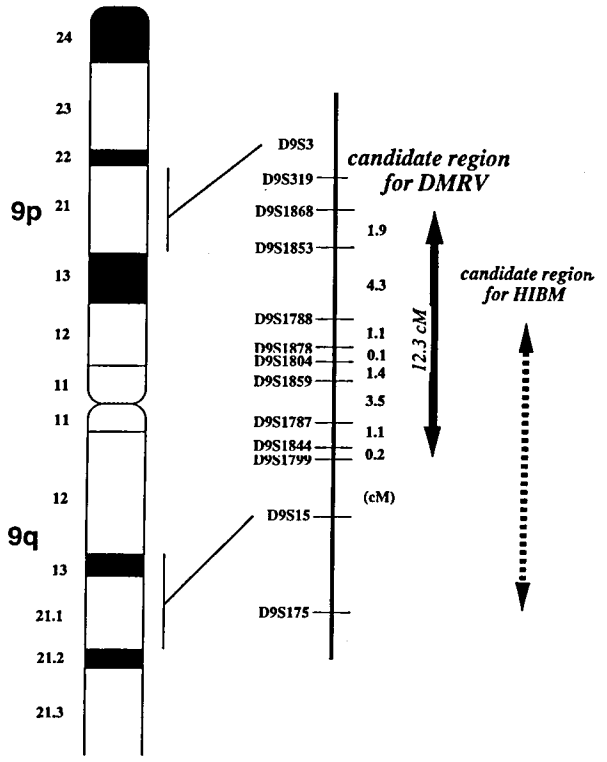



図1　DMRVの遺伝子座

て最大ロッド得点7.40を示した．またD9S1868，D9S1787においてobligateな組換えを示す家系を認めた．以上より，DMRVの遺伝子座はD9S1868からD9S1788までの間の12.3cMに存在すると結論した[4]．

ハプロタイプ解析では，血縁関係のない2家系において，D9S1868からD9S1859の間で共通のハプロタイプを認めた．特にD9S1804とD9S1859では，想定される14個のうち8個のハプロタイプが同一であり，創始者効果を有した共通のハプロタイプの存在が示唆され，この間の1.5cM周辺が有力な候補領域と考えられた．

さらに，この領域で候補となる遺伝子を絞り込むため，生検筋から抽出したRNAからreverse transcriptaseでcDNAを作成し，このD9S1859を中心として，D9S165からD9S1874までの3cMにマップされた12個のESTでRT-PCRを行ったところ，10個のESTが筋細胞に発現していることが確認された．この10個のESTを用いてDMRVおよび対照筋のRNA発現量を定量した．筋各部位による分子構成の違いも考えられることから，部位別(Quadriceps(Q), hamstrings(H), tibialis anterior(TA))の値をアクチンとの比で算出したところ，いずれのESTにおいてもDMRVのTA，HでのRNA発現量比が高かった．

## 考　察

連鎖解析で絞り込んだ本症の候補領域，とくに複数の家系に共通する特定のハプロタイプの存在が示唆されたD9S1804とD9S1859の1.5cMの領域は，HIBMの病因遺伝子の候補領域と重複しており，両疾患がallelic diseaseである可能性が高い．原因遺伝子の特定のため，今回上記領域にマップされるESTについて，筋細胞に発現しているものをRT-PCRにより選択したところ，10個のESTの発現が確認された．このうちDMRVと対照で発現量の著しく異なるものから解析するため，TaqMan probeを用いた定量的PCRを行った．骨格筋は部位により各筋線維タイプの分布比に著しい差があるため[5]，その構成分子の発現量も異なることが考えられる．そこで，部位別に各ESTの発現を内部標準として用いたアクチンとの比で算出したところ，いずれのESTでもDMRVで変性の強いTA，Hで発現が多かった．これらの筋ではタイプ1線維の存在比が高いことから，定量的PCRの結果はその存在比を反映したものと思われ，DMRVの候補領域にはタイプ1線維をコードするDNAが集積している可能性が考えられた．

## 文　献

1) 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.
2) Mizusawa H, Kurisaki H, Takatsu T, et al : Rimmed vacuola distal myopathy. A clinical, electrophysiological, histopathological and computed tomographic study of seven cases. J Neurol 234 : 129-136, 1987.
3) Mitrani-Rosenbaum S, Argov Z, Blumenfeld A, et al : Hereditary inclusion body myopathy maps to chromsome 9p1-q1. Hum Mol Gent 5 : 159-163, 1996
4) Ikeuchi T, Asaka T, Saito M, et al : Gene locus for autosomal recessive distal myopathy with rimmed vacuoles maps to chromosome 9. Ann Neurol 41 : 432-437, 1997.
5) Johnson MA, Polgar J, Weightman D, et al : Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. J Neurol Sci 18 : 111-129, 1973.

# Rimmed-vacuole型遠位型ミオパチーの遺伝子解析

高 守 正 治*

研究協力者 浅賀知也* 沖野惣一* 滝沢泰樹*
駒井清暢* 新田永俊* 池内健**
斉藤正明** 田中一** 田中恵子**
辻省次**

**要 約** Rimmed-vacuole型遠位型ミオパチー(DMRV)は四肢遠位部の筋力低下，筋萎縮を初発症状とする希な遺伝性筋疾患で，その疾患遺伝子座は第9染色体p1-q1に存在することが知られている．本研究ではまずrefined mappingを行い，homozygosity mapping，2点連鎖解析，haplotype分析および連鎖不均衡の検討よりDMRVの疾患遺伝子がマイクロサテライト多型DNAマーカーD9S1878-D9S1859間の1.5cMに存在することを示した．更にD9S1878-D9S1859近傍にはβトロポミオシン遺伝子(TPM2)がmappingされていることから，TPM2異常の有無について検討した．その結果，1家系においてexon6Bのsplicing enhancer配列にA to Gのpoint mutationを認めたが，他のDMRV症例にはTPM2の変異は認められず，TPM2はDMRVの疾患遺伝子ではないものと考えられた．現在DMRVの疾患遺伝子を同定する目的でBAC libraryを用いてD9S1878-D9S1859間の部分的contigしている．

## はじめに

Rimmed-vacuoleを伴う遠位型ミオパチー(DMRV)は比較的希な疾患単位であり本邦を中心に研究が進められてきた疾患単位である．近年DMRVと臨床像の類似する"quadriceps-sparing myopathy"の連鎖解析がイスラエルにおいて行われ，第9染色体p1-q1に連鎖することが示された．その後本邦のDMRV家系も第9染色体に連鎖することが示され，両疾患の原因遺伝子の異同が注目されている．DMRVの臨床的特徴は下腿では伸筋群，大腿では屈筋群が選択的に障害されイスラエルの"quadriceps-sparing myopathy"と同様大腿四頭筋の筋力が比較的遅くまで保たれることである．

本研究ではDMRV疾患遺伝子を同定する目的で行っているポジショナルクローニングの研究経過について報告する

## 対象および方法

11名のDMRV症例を含む9家系29名を対象とした．9家系は全て日本人であり，9家系中6家系は発症者の両親が近親婚であった．DMRVの診断は以下の基準を満たすものとした．

(1)遺伝様式が常染色体劣性遺伝もしくは孤発症例
(2)病初期の筋力低下，筋萎縮が下腿遠位部の伸筋群(前脛骨筋など)，大腿後面の屈筋群優位
(3)筋病理学的には筋線維内にrimmed-vacuoleを認める

### Refined mapping

発症者および非発症者のgenome DNAを分離し，第9染色体上のD9S1678からD9S273間，15cMについて17のマイクロサテライト多型DNAマーカー(D9S1678-D9S165-D9S1845-D9S1791-D9S1805-D9S1817-D9S1878-D9S1804-D9S1859-D9S1874-D9S1862-D9S1787-D9S1800-D9S1777-D9S1844-D9S273およびAFM326vd1)を用いて対象29名全例のハプロタイプをPCR法により決定した．各マーカーに対するプライマーの塩基配列は既に報告されているものを使用した．2点連鎖解析はLINKAGE ver.5.1 and FASTLINK ver.2.2プログラムを用いて行い，各アレル頻度は日本人正常者31名より得たhaplotypeより計算した．また，6種類のマイクロサテライト多型DNAマーカー，D9S1791,D9S1805, D9S1817,D9S1878,D9S1804,D9S1859を用いてhaplotype解析を行い，更にカイ二乗検定(Yatesの補正)を用いて連鎖不均衡の検討も行った．

### βトロポミオシン遺伝子変異の検討

DMRV 2症例の骨格筋よりtotal RNAを抽出し，RT-PCR法にてTPM2 cDNAを増幅，TA cloning vectorにcloning後全塩基配列を決定した．またDMRV全症例のgenomic DNAよりTPM2の構造解析を行った．

### BAC contigの作成

既にD9S1878-D9S1859間にmappingされているSTS (D9S1878, BAC1, D9S1804, D9S1859)を用いてBAC libraryをスクリーニングし部分的contigを作成した．

* 金沢大学医学部神経内科学
** 新潟大学脳研究所神経内科

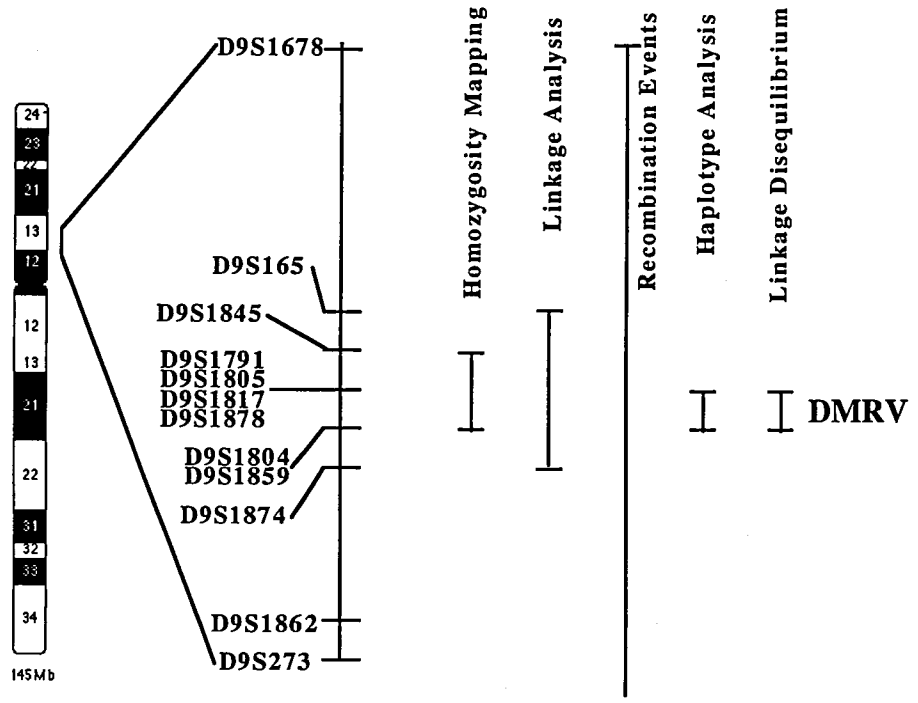



図1 Refined genetic location of DMRV gene

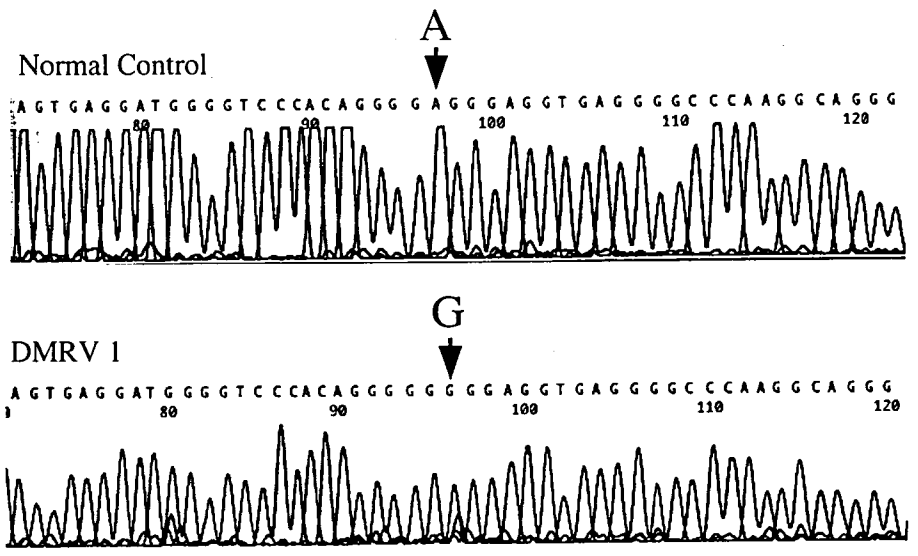



図2 Mutation of intron splicing enhancer

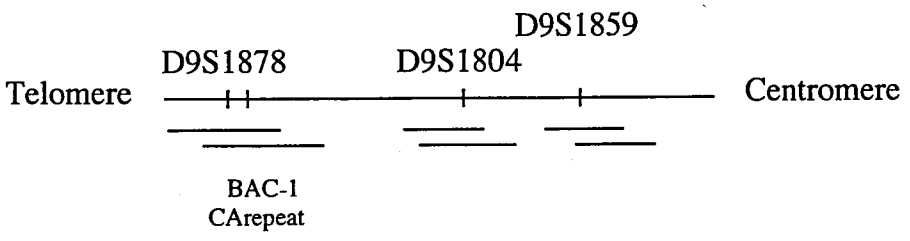



図3 BAC contig between D9S1878 and D9S185

## 結　　果

**Homozygosity mapping，2点連鎖解析，haplotype分析および連鎖不均衡(図1)**

Homozygosity mapping では D9S1845,D9S1791,D9S1878,D9S1859では両親の血族結婚の有無に関わらずDMRV症例においてジェノタイプがホモ接合になる頻度が有意に高かった．2点連鎖解析ではD9S1859において最大LOD得点6.53($\theta$=0)を得た．更にD9S1878, D9S1791, D9S1845およびD9S165においてもそれぞれ有意なLOD得点を得た．Haplotype分析では，6つのマーカーを用いたハプロタイプの分析でD9S1878/ D9S1859のマーカーの組み合わせに於いてDMRV症例ではハプロタイプ"9/2"を10染色体中7染色体(70%)が持つのに対して両親の非疾患染色体では0%(0/12)であった(カイ二乗値は18.975，p＝0.0008)．更に両親の正常染色体と比較したときD9S1878において有意な連鎖不均衡を認めた(カイ二乗値13.382，p=0.0374)．また，DMRV家系と関連のない正常者染色体と比較した場合D9S165, D9S1791, D9S1817, D9S1878, D9S1859 およびD9S1874において有意な連鎖不均衡が認められた．

**$\beta$トロポミオシン遺伝子変異の検討**

2例のDMRV症例の骨格筋RNAより932bpのRT-PCR productを得た．Cloning後全塩基配列を決定したが変異は認められなかった．一方，TPM2の構造解析では，1家系においてTPM2 exon 6Bのsplicing enhancer配列にA to G(図2)の変異を認めたが，他の家系では認められなかった．

**BAC contigの作成(図3)**

STSを含む6つのBAC cloneを分離し，部分的contigを作成した．

## 考　　察

原因遺伝子を決定する方法として既知の生化学的異常から原因遺伝子を推測し分子生物学的に決定する方法が有効なこともあるがDMRVに関する限り今のところ成功していない．このようなクローニングの手法に対して最近ではポジショナルクローニング法が盛んに使用され大きな成果をあげており，最近連鎖解析の結果hereditary inclusion body myositisおよびDMRVの原因遺伝子が第9染色体に存在することが示され，D9S319からD9S276の間の23.3cMの範囲にDMRV疾患遺伝子が存在すると考えられた．更に本研究でrefine mappingを行った結果，DMRVの疾患遺伝子はD9S1878-D9S1859間の約1.5cMに存在する可能性が示唆された．

D9S1878-D9S1859近傍にはいくつかの遺伝子が既にマッピングされているが，特に$\beta$トロポミオシンはDMRV原因遺伝子のcandidateとして検討されるべき遺伝子である．トロポミオシンにはアミノ酸残基数が284の4種類のアイソフォームが存在し，そのうちTPM3の異常によりネマリンミオパチーを，またTPM1の異常により遺伝性心筋症が起こることが知られており，TPM2およびTMP4の異常でも何らかの遺伝性筋疾患が生じる可能性が示唆されている．しかし，本研究の結果ではTPM2はDMRVの疾患遺伝子から除外された．今後はD9S1878-D9S1859間でBAC contigを作成し，疾患遺伝子を突き止めたいと考えている．

**謝　辞**　貴重な検体を御供与下さいました厚生省筋ジストロフィー班会議の諸先生方に深謝致します．

# 多数のRimmed Vacuoleを伴う筋病理像を示す疾患群に関する研究
## －臨床的，免疫組織学，遺伝学的検討－

田　代　邦　雄*

研究協力者　吉　田　一　人*　東　　琢　哉*
矢　部　一　郎*　島　　功　二**

**要　約**　われわれは，今期当班において多数のrimmed vacuole(以下RV)を伴う筋病理像を特徴とする疾患群の臨床的，免疫組織学的および遺伝学的検討を行った．初年度は「多数のRVに炎症反応を伴う筋病理像－鑑別診断上の問題点について」の研究を行い多数のRVに炎症細胞浸潤を伴う筋病理像を呈する疾患の臨床像に注目し，これら疾患群を整理し，inclusion body myositis(以下IBM)との異同につき検討を加えた．次年度は「RVを特徴とする疾患群における免疫組織学的検討－細胞骨格蛋白を中心として－」の研究を行い，RVにおいて細胞骨格蛋白のpost translational modificationに注目し，RVの免疫組織学的検索を行い，臨床病型との関連を検討した．本年度は「DMRV様筋障害分布を示した若年発症封入体筋炎の兄弟例－臨床的，免疫組織学，遺伝学的検討－」の研究を行い，臨床的に若年発症で筋障害分布はhereditary inclusion body myopathy(以下h-IBM)およびdistal myopathy with rimmed vacuole formation(以下DMRV)と近似するも筋病理像はRVと炎症細胞浸潤出現を特徴としIBMに近似した兄弟例の臨床的，免疫組織学，遺伝学的検討を行いその位置づけについて報告した．

これらの研究を通して，IBMとh-IBM/DMRVなどの周辺疾患との関係，問題点を明らかにしてきた．以下，初年度，次年度の成果の概略と今年度の成果をまとめた．

### 初年度(96年)の成果の概略

IBMは，欧米では成人の炎症性筋疾患中最多とされるが，本邦では炎症性筋疾患に占めるIBMの頻度は3.5%と少なく，その違いに関して人種，環境，診断基準の違いが指摘されている[1]．我々の検討でも1980年から90年の11年間にIBM症例は1例のみで炎症性筋疾患に占める割合は1/73(1.3%)であった．しかし，91年以降毎年1～3例がIBMと診断され，炎症性筋疾患に占める割合は91～96年で6/82(7.3%)と増加している．また，明らかにpolymyositis(以下PM)，dermatomyositis(以下DM)と診断される症例においても多数のRVを認める例がある．IBMに関しては，以前より疾患単位としての不均一性が指摘されている．そこで，多数のRVに炎症反応を伴う筋病理像を呈する疾患群を整理し，IBMとの異同につき検討を加えた．

1980年1月より96年10月までに得られた筋生検846例中，炎症性筋疾患と診断された156例を対象とした．IBMについてはGriggs等の診断基準に従った[2]．RVは，光学顕微鏡観察で40倍1視野に5個以上認める症例を陽性と判断した．陽性例において臨床経過，罹患筋部位，治療に対する反応の検討と筋病理学的検索を行った．IBMと診断された2症例では治療前後で筋生検を行い治療効果の検討も試みた．

IBM 7例，DMRV近似の臨床症状，経過を示し大腿四頭筋群が保持され筋病理上は炎症細胞浸潤を認めたQuadriceps saring type myositis(以下QSM) 3例，PM/DM 3例，HAMに伴う筋炎1例に分けられた(表1)．IBM症例は高齢発症で大腿四頭筋侵襲を特徴とし，筋病理上び漫性細胞浸潤，RVの出現を認めたが，壊死，再生線維は乏しかった．RVは比較的保存された線維にも多くみられた．経口ステロイド剤，免疫抑制剤で治療を行った5例は何れも治療に抵抗を示した．2例において治療前後で筋生検を行い，ステロイド剤使用例では，治療後，炎症細胞浸潤はやや減少を示したが，筋変性の進行，および結合織，RVの増加を認めた．また，1例は当初DMと診断されたが，その後の経過，筋病理所見より，IBMと診断した．大腿四頭筋が保持された例は何れも20歳代の発症であり，IBMに近似した病理所見を示すも，細胞浸潤は血管周囲に限局する傾向が認められた．PM/DM症例は近位筋優位の脱力を示した．筋病理上，び漫性細胞浸潤を示し，RVの出現を認め，壊死，再生線維も多数みられた．RVは，変性した萎縮線維中心に観察された．全例経口ステロイド剤に良好に反応した．HAMに伴う筋炎では，IBMに近似した所見であったが，ragged red fiberが散見された．

以上より近年のIBM発生頻度増加が疑われたが，多数例による検討が必要である．当初DMが疑われた症例は

* 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

表1　RVを伴う炎症性筋疾患の臨床像

| | IBM | DM->IBM | QSA | PM/DM | HAM |
|---|---|---|---|---|---|
| 症例数 | 6 | 1 | 3 | 3 | 1 |
| 初診時年齢 | 67±7 | 54 | 26±4 | 32±27 | 63 |
| 発症年齢 | 61±9 | 48 | 23±2 | 31±28 | 58 |
| 罹病期間 | 4.4±2.5 | 6 | 3.0±2.6 | 2.6±2.8 | 5 |
| (年，平均±SD) | | | | | |
| 性(男/女) | 3/3 | 1/0 | 2/1 | 0/3 | 1/0 |
| 筋脱力，萎縮分布 | | | | | |
| Finger flexors | 4(4- to 5) | 4 | 4-(3+ to 4) | 4(3+ to 5) | 5 |
| Shoulder abductor | 4(4 to 5) | 4 | 4+(4+ to 5) | 4(3+ to 5) | 2 |
| Ankle dorsiflexours | 4+(4 to 5) | 5- | 4+(4 to 4+) | 4(3 to 5) | 5 |
| Knee extensors | 2+(2 to 4) | 2+ | 5 | 4(3 to 5) | 2 |
| Hip flexors | 4(3 to 4+) | 3 | 3(3- to 3) | 3+(3 to 4) | 2 |
| CK(IU/L mean Å}SD) | 803±641 | 863 | 966±1154 | 4291±3418 | 311 |

IBM：inclusion body myositis　PM：polymyositis　DM：dermatomyositis　QSM：quadriceps sparing type myositis
HAM：HAM associated myositis

表2　本兄弟例の臨床，病理的特徴

| | 症例1(兄26歳) | 症例2(弟24歳) |
|---|---|---|
| 発症年齢 | 21歳 | 21歳 |
| 罹病期間 | 5年 | 3年 |
| 筋力低下，萎縮分布 | | |
| Finger flexors | 4 | 3 |
| Shoulder abductors | 5 | 5 |
| Ankle dorsiflexors | 4 | 2 |
| Knee extensors | 5 | 5 |
| Hip flexors | 3 | 4 |
| CK(IU/L mean) | 1975 | 1128 |
| 病理像 | | |
| Inflammation | ++ | + |
| Rimmed vacuole | ++ | ++ |
| CD4:CD8 | CD4<CD8 | CD4<CD8 |
| SMI-31 | + | + |
| Inclusion body | + | ? |
| 治療効果 | − | ? |

表3　Difference of familal/hereditary IBM

| | f-IBM | h-IBM/DMRV | our cases |
|---|---|---|---|
| 発症年令 | 高齢 | 若年 | 21歳 |
| 筋障害分布 | | | |
| Knee extensor | 侵襲 | 保持 | 保持 |
| 血清CK | 上昇 | 正常 | 上昇 |
| 筋病理像 | | | |
| 炎症細胞浸潤 | ++ | − | ++ |
| Rimmed vacuole | ++ | ++ | ++ |
| SMI-31 | + | + | + |
| Gene locus | ? | 9p | ? |
| HLA DNA | DRB1 0301 | ? | DRB1 1302 |
| | DRB1 0302 | | DRB1 0901 |

f-IBM:familial inclusion body myositis
h-IBM:hereditary inclusion body myopathy
DMRV:distal myopathy with rimmed vacuole formation

IBMの発症に免疫的機序の関与を考える上で重要である．大腿四頭筋が保持される例は，IBMとして診断される可能性があるが，その分類に関しては今後の検討課題である．IBM，PM/DMには鑑別が容易でない症例が存在し，治療感受性も異なるので，慎重な診断が必要である．

### 2年度(97年度)成果概略

多数のRVを伴うPMとIBMの鑑別は予後，治療指針を決定する上で重要となる．また，臨床的には孤発性DMRVと近似するQSMは筋病理上ほぼIBMと同様の所見を示し，その位置づけが問題となる．そこで，これら疾患に見られるRVにおいて細胞骨格蛋白のpost translational modificationに注目し，RVの免疫組織学的検索を行い，臨床病型との関連を検討した．

IBM 4例，QSM 1例，多数のRVを伴うPM 2例，DMRV 6例の生検骨格筋組織を対象とした．これらの新鮮凍結切片にて細胞骨格蛋白のpost translational modificationの内phosphorylationとしてニューロフィラメント及びmicrotubule associated protein(MAP)のTau，MAP1b，MAP2と中間系フィラメントであるビメンチン，デスミンに対して検討を行った．抗体はSMI-31，32，34(STB)，NF200，MAP1b(Sigma)，MAP2(Leino Techno)，タウ，ビメンチン，デスミン(DAKO)を用いABC法にて染色した．

IBM，QSM，DMRV例では抗ニューロフィラメント抗体の内，リン酸化heavy chainを認識するSMI-31，34，NF200でRVは陽性を示したが，非リン酸化heavy chainを認識するSMI-32は陰性であった．特にIBMとQSMではSMI-31でRV周囲および筋細胞質が顆粒状強陽性に染色された．一方多数のRVを伴うPM例，及びコントロール例ではSMI-31,32,34，NF200とも陰性であった．非リン酸化TauでRVは非特異的に陽性を示したが，リン酸化されたTau及びMap1b，Map2では陰性であった．全例でビメンチン，デスミンはRVを伴う筋線維，および萎縮筋線維で陽性を認めた．RV周囲への集積は見られなかった．

IBMとQSMは今回の免疫染色でも同様の染色性を示し，QSMはIBMに含まれる病態と考えられる．PMにみられるRVは抗ニューロフィラメント抗体陰性であり，IBMにみられるRVとは異なった．今回の検討結果は，IBMにおけるAskanasら[3]の報告と一致した．筋線維内へのニューロフィラメント出現の原因は不明である．Abeら[4]，はマウ

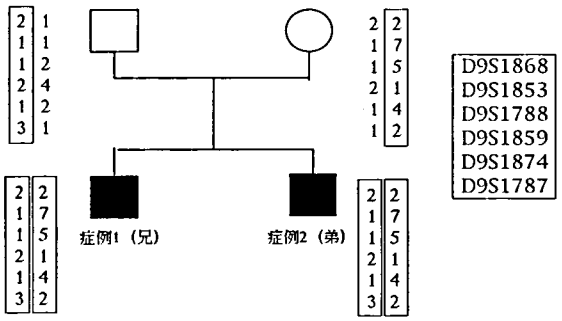



図1　Haplotype analysis of our cases

スの培養系で未分化な筋線維にニューロフィラメントが出現することを報告しており，IBMにおけるRVの出現機序を考える上で興味が持たれる．

### 今年度(98年度)研究成果

**目的**：IBMは一般的に孤発性であり，遺伝性，家族性IBMの報告は少ない．また従来報告されている遺伝性，家族性IBMは比較的高令発症で大腿四頭筋群侵襲を示し，臨床的に孤発性IBMと近似した臨床像を示す[5]．一方，h-IBM/DMRVはIBMと近似する筋病理像を示すも炎症細胞浸潤を認めないことが鑑別点とされる．今回，われわれは若年発症で筋障害分布はh-IBM/DMRVと近似するも筋病理像ではRVと炎症細胞浸潤出現を特徴とした兄弟例を経験したので，臨床的，免疫組織学，遺伝学的検討を行いその位置づけを考察した．

**対象**：症例1(兄)は26歳，症例2(弟)は24歳の兄弟例である．両親，その他近親者には発症はみられない．症例1(兄)は一昨年QSMとして報告した中の1例である．兄弟ともに21歳時，歩行障害にて発症した．症例1(兄)は21歳時，坐位よりの立ち上がり困難出現し，数カ月の経過で握力低下が加わる．22歳時に当科初診し，上肢では遠位部，下肢では大腿四頭筋群を除き全般的に筋力低下および筋萎縮を認めた．血清CK値は1975 IU/Lと上昇を示した．ステロイド，免疫抑制剤使用にて血清CK値低下を認めるも，病状は改善せず進行し，25歳時には車椅子使用となる．症例2(弟)は21歳時，階段昇降困難出現，続いて書字困難加わる．23歳時当科初診．上肢では遠位尺側に強い，下肢では大腿四頭筋群を除き全般的な筋力低下および筋萎縮を認めた．血清CK値は1128 IU/Lと上昇を示した．筋病理像は両者ともに，多数のRVを認め，症例1(兄)では著明な，症例2(弟)では中程度の炎症細胞浸潤がみられた．炎症細胞はCD8優位であった．RVはSMI-31染色陽性を示し，症例1(兄)では電子顕微鏡検索で核内封入体も確認された．以上より筋病理学的には両症例ともIBMと診断した(表2)．両症例および両親において同意の上DNA検索を行った．田中らの報告[6]に基づきD9S1868～D9S1787間に6つのmakerを設定し，その各々をPCR法にて増幅し多型を蛍光DNA sequencerにて解析した．兄弟は二人とも共通のhaplotypeを持ち9pに連鎖するか,否か不明であった(図1)．

**考察**：本兄弟例は遺伝性，家族性IBMとh-IBM/ DMRVとの鑑別が重要となり，血清CK高値，筋病理像はfamilial IBMと発症年齢，筋障害分布はh-IBM/DMRVと近似する(表3)．現状では本兄弟例の位置づけは困難であり，取りあえず家族性IBMの範疇に入れ今後の遺伝子解析の進歩に伴い，h-IBM/DMRVの異同の解明が進むものと期待される．

### 文　献


1) 村上信行ら：神経筋疾患におけるrimmed vacuoleの意義．封入体筋炎とrimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチーの免疫組織学的検討を中心として．臨床神経 34：782, 1994.
2) Griggs RC, et al : Inclusion body myositis and myopathies. Ann Neurol 38 : 705, 1995.
3) Askanas V, et al : Use of anti-neruofilament antibody to identify paired-helical filament in inclusion body myositis. Ann Neurol 39 : 389, 1996.
4) Abe M, et al : Expression of neurofilament proteins in proliferating C2C12 mouse skeltetal muscle cells. Exp. Cell Res. 229 : 48, 1996.
5) Sivakumar K, et al : An inflammatory,familial,inclusion body myositis with autoimmune features and a phenotype identical to sporadic inclusion body myositis. Studies in three families. Brain. 120 : 653, 1997.
6) 田中恵子ら：常染色体劣性遺伝性rimmed vacuole型遠位型ミオパチーの病因遺伝子のfine mapping．平成9年度厚生省精神・神経疾患研究委託費による研究報告集(2年度班・初年度班) p72, 1997.

# Micro- and macro-vacuolar myopathy (a dystrophic disorder ?)：－とくにmyopathy with tubular aggregatesとsarcotubular myopathyとの異同に関して－

佐橋　功[*,**]

研究協力者　衣斐　達[*,**]　井上裕康[*]　小栗千枝[*]
中尾直樹[*,**]　張桂珍[*]　任立群[*]
中込祐治[***]　三宅辰仁[***]

**要　旨**　症例：50歳，家婦．多世代にわたり血族結婚歴がある．30歳頃より四肢筋の脱力にて発症し，緩徐に進行し，顔面筋・前頸筋・腸腰筋の一部を除くほぼ全身性の高度の障害(CT上は脂肪化)を来した．四肢筋生検では筋線維の中央部に塊状物が約10%の線維内にあり，特異な組織化学的変化を示した．電顕的に塊状物はtubular aggregatesと明らかに異なる一層膜の嚢胞様・管状構造体(直径60nm～6μm以上)の集合体であり，筋原線維と分離しT管や筋小胞体との連続性が一部に示唆された．本例は肢帯型筋ジストロフィーの病態を示した特異なミオパチーと考えた．

## はじめに

進行性の筋線維の破壊を来す筋ジストロフィー(PMD)には様々な病因が存在する．とくに肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)は依然として多彩な病因が示唆されている．そして近年の研究進歩により，LGMDの中からquadriceps myopathy(Becker型PMD)をはじめとし，とくに筋線維その膜異常に伴う病態が次々と明らかにされつつある．我々は進行性・高度のLGMD様所見を主徴とした症例において，筋線維内に大小様々な嚢胞・管状様形成の集簇を伴う症例を経験したので，その臨床および骨格筋の病理組織学的な検討結果を報告する．

## 症例報告

症例は50歳の女性，両親の従姉妹結婚を含む長年・多世代にわたる近親婚があったが，調査を拒否され詳細は不明であった．幼小児期より運動能力はやや劣っていたとのことであるが，日常生活は正常にできた．32歳頃に歩行が不安定でしばしば転倒することを自覚した．その後症状は緩徐に進行し，手の脱力も出現し，物に掴まらずに立位の保持も不能となったが，45歳頃迄はしゃがんで移動可能であった．50歳時に精査目的にて当院へ入院した．

**身体神経所見**：肥満傾向であり，小奇形として眼瞼内眼角贅皮と皮膚の先天性網状青斑(livedo rasemosa)がみられた．

**神経学的所見**：知能は正常．脳神経では，顔面筋の極軽度の筋力低下と，後頸筋に萎縮と筋力低下を認めた．四肢・体幹の運動系では全身性の高度の筋萎縮(弛緩性)・筋力低下を認めた．立位は不可能，座位保持は可能であり，車椅子にて辛うじて自力移動が可能であった．線維束筋収縮・筋痛・筋無力症々状はなかった．深部腱反射は消失，病的反射は陰性であった．また四肢冷感を認めたが自律神経系に特別な異常はなかった．

主な血液検査では，LDH 665(n；154-397 IU/l),CK 70(n；36-203 IU/l)，乳酸・ピルビン酸は正常．左腎臓の欠損が認められた．骨格筋CTでは前頸筋と体幹屈筋である腸腰筋は比較的残存していたが傍脊柱筋は完全に脂肪化し，四肢筋では若干の左右差を示したが高度の脂肪化を示した．針筋電図は筋原性＋神経原性で末梢神経伝導速度は異常なかった．WAISは言語性IQ 82，動作性IQ 71，総IQ 75であった．

## 大腿直筋の生検病理所見

### 光顕所見

**一般組織染色**：筋線維の大小不同，中心核の軽度増加，間質結合織の増生を認めた．特徴的な変化は，約10%の筋線維に，HEにて淡好塩基性に，Gomori trichrome変法染色で赤紫染する充実性の塊状構造を主に筋線維内の中央部に認めた(図1A)．

**組織化学染色**：先述の塊状構造物は，NADH-TRで紫色で周辺部にはハローが形成され(図1B)，コハク酸脱水素酵素(SDH)およびcytochrome *c* oxidase(CCO)活性は陰性であった(図1C)．これは非特異性エステラーゼ(NSE)で強陽

* 愛知医科大学第4内科
** 愛知医科大学加齢医科学研究所
*** 愛知医科大学電顕室

性(図2A)，酸性フォスファターゼ染色は陰性であった(図2B)．さらに免疫染色ではミオシン重鎖(MHC)；ファーストとスロー・アイソフォームは陰性でタイプ1線維に多いもののタイプ1・2両線維内に認め(図2C, D)，GRP78(図2E)とクラスリンは陽性(図2G)，HSP72とユビキチンは多くが陰性(図2F)であった．さらにジストロフィン染色は大部分の塊状構造部に小空胞の集合として陽性所見(図2H)を示した．

つぎにこの塊状構造物を自験例の周期性四肢麻痺の生検骨格筋に認められたtubular aggregates(TA)の染色性と比較検討した．TAの多くは主に筋線維周辺部に局在し，多巣性に認められた．また組織化学染色では本症例における反応性に比し，濃染しより鮮明であり，何等かの構造的な共通性を示唆したが異質性も示された(表1)．

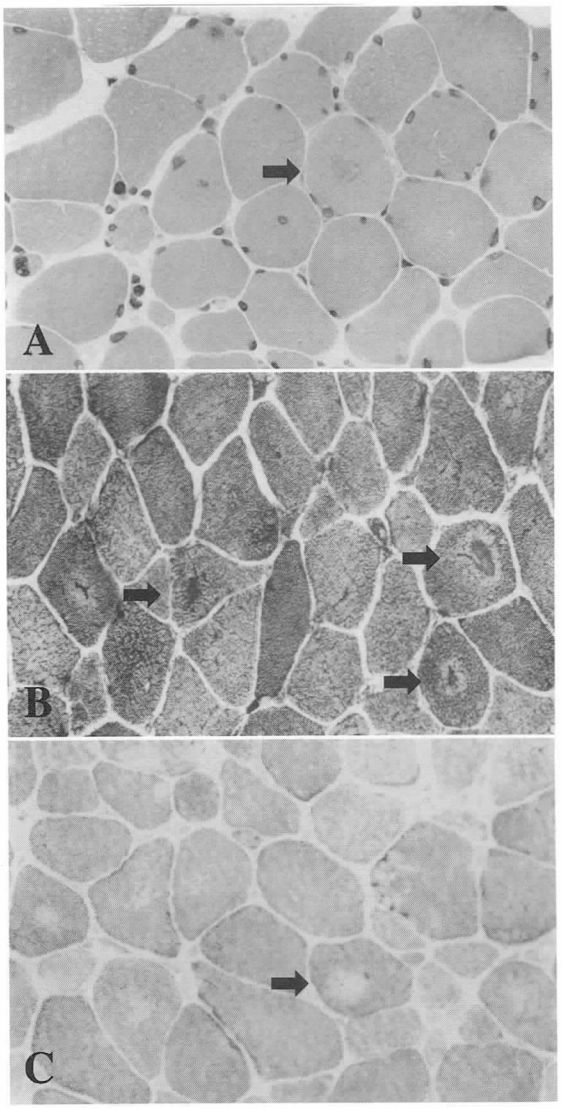



図1 [一般組織染色] 筋線維の大小不同，中心核の軽度増加，間質結合織の増生を認めたが，炎症細胞浸潤，ragged-red fibers，脂質蓄積はなく，活動性の変性・再生線維も明らかではなく変性産物も殆ど認められなかった．しかし特徴的な変化として，HEで好塩基性，Gomori trichrome変法染色の赤紫染する充実性の塊状構造(矢印)を約10%の筋線維の主に中央部に認めた(図1A)．
[組織化学染色] 先述の塊状構造物(矢印)はNADH-TRで紫色に染まり，多くは周辺部にhaloを形成していた(図1B)．これはコハク酸脱水素酵素およびcytochrome c oxidase(CCO)活性は陰性であった(図1C)．
A：HE，B：NADH-TR，C：CCO (×332).

**電顕所見**

光顕病理所見での塊状構造物は，縦断像は様々な直径(約60nmから6μm以上)よりなる管状・嚢胞様構造物の集簇が筋線維内の長軸に沿い限局し，TAの様に整然としてではなく雑然と認められた(図3A, B)．そして強拡大横断像では 約10nmの一層の膜構造よりなっていた(図2A)．内容は均一無形質物質で充満され，周辺の筋原線維周辺には筋小胞体(SR)とT管を中心とした細管状構造が増加し，主にT管との連続性が認められた(図2B)．また異常な管状・嚢胞様構造物の近隣の筋原線維間には正常なT管の縦断像が見られた．また筋原線維の変性はなく，ミエリン様構造物やリポフスチン顆粒の変性産物はほとんど見られなかった．また極一部のミトコンドリア内に非特異的と考えられる棍棒様の封入体が存在していた．

## 考　　察

本例は成人期に筋症状が顕在化し緩徐進行性の経過をとり，特異な筋病理学的変化を伴った筋ジストロフィー類似の病態に属するミオパチーである．本例は家族内発症は聴取できなかったが累代にわたる血族結婚より浸透率の低い常染色体劣性遺伝が推定された．さて本例の特色は骨格筋病理所見にあった．光顕では一般的な筋原性変化の他に筋線維の約10%に特異的な構造物が見られ，それは筋線維の主に中央に存在し，HEで淡塩基好性，Gomori trichrome変法で赤紫染し，内容は充実性であった．さらに組織化学染色では，NADH-TR陽性やSDHやCCO活性陰性の染色結果は，ミトコンドリア関連ではなくT管や筋小胞体(SR)[1),2)]などの類縁成分が示唆された．また免疫染色ではMHCが陰性で筋原線維では構成されず，またHSPの一種のSRに局在するとされるGRP78(BiP)[3)]が陽性で，さらにendocytotic vesicleと関連するクラスリン[4)]の陽性所見も示した．つぎにジストロフィン分子の異なった部分を認識する3種類の抗体とも塊状構造の空胞部に陽性であり，筋形質膜の裏打ち蛋白であるジストロフィンが同部に発現していた．類似の報告は酸性マルターゼ欠損症(AMD)や低カリウム性周期性四肢麻痺の空胞膜にも報告されている[5),6)]．すなわち空胞膜がexocytosisの過程で筋形質膜と融合する前段階で形質膜構成蛋白を発現するため[5)]，あるいは筋収縮などによる空胞の破裂による筋細胞への障害を避けるため空胞膜を補強するためジストロフィンが発現するのではないかとされた[6)]．以上本構造は膜構造の集合体としてT管とSRを中心にendocytosisとexocytosisに基づく嚢胞(空胞)と管状物が混在した構造と考えられた．

つぎに電顕では本構造は1層の膜に囲まれた大小不揃い

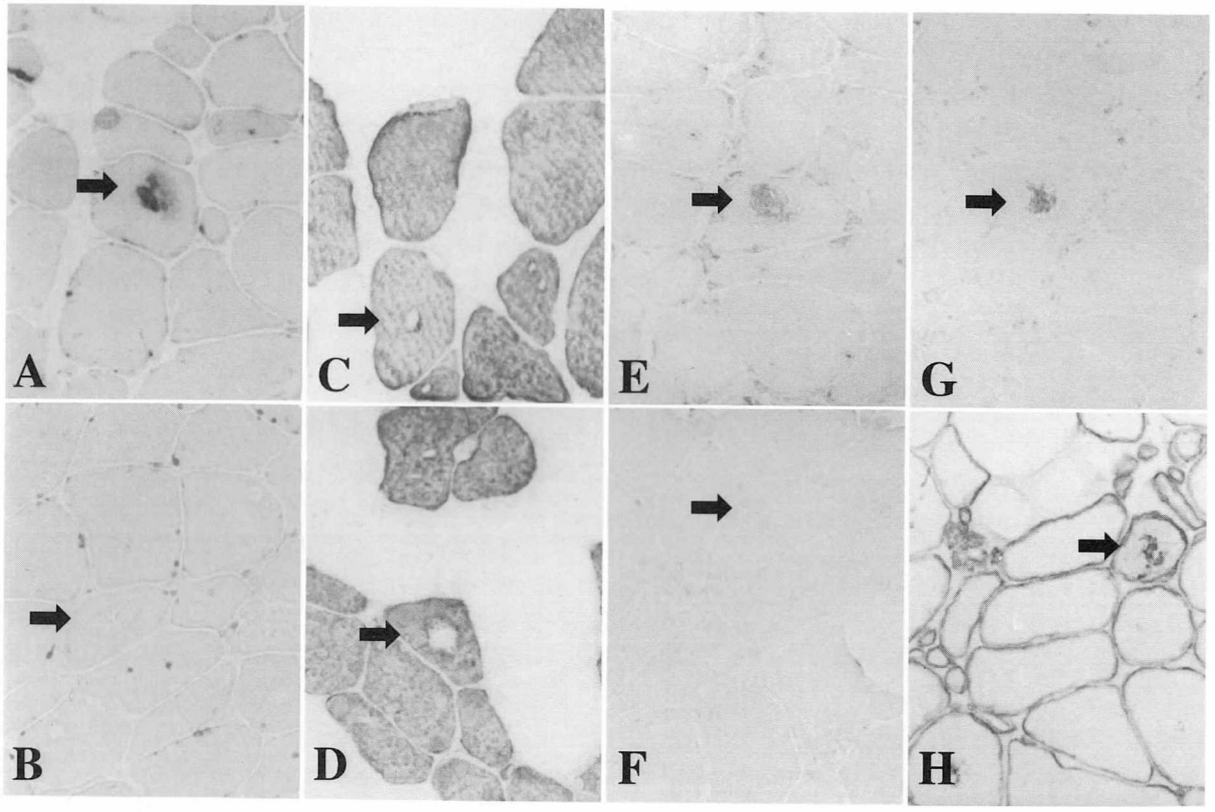



**図2** [組織化学染色] この塊状構造物(矢印)は非特異性エステラーゼ(NSE)では強陽性(**図2A**), 酸性フォスファターゼ染色(ACP)は陰性であった(**図2B**).
[免疫染色] 充実性の塊状構造物はミオシン重鎖(MHC)アイソフォーム；ファースト(-f)とスロー(-s)染色に陰性であり，タイプ1,2両線維に認めた(**図2C, D**). ストレス蛋白については，GRP78(**図2E**)やクラスリンは陽性(**図2G**), ユビキチンは多くが陰性(**図2F**)であった. ジストロフィン(Dys 2)染色では陽性(**図2H**)であった.
A：NSE, B：ACP, C：MHC-f, D：MHC-s, E：GRP78, F：ユビキチン, G：クラスリン, H：Dys (すべて×712)

**表1** Tubular aggregatesとの各種染色所見の比較
**図1, 2**での塊状構造物の染色性を自験周期性四肢麻痺例の生検骨格筋に認められたtubular aggregates(TA)の染色性と比較検討した. その結果，TAでは多くは横断面内に主に筋線維の周辺部位に局在し，多巣性に認められた. また組織化学染色では本症例における反応性に比し，一般的には濃染またはより鮮明であり，何等かの構造的な共通性を示唆したが異質性も示された.
Trichrome：Gomori trichrome変法, NADH：NADH-tetrazolium reductase, SDH：コハク酸脱水素酵素, CCO：cytochrome *c* oxidase, ACP：酸性フォスファターゼ, NSE：非特異性エステラーゼ, MHC：ミオシン重鎖

| | 本例 | Tubular aggregates |
|---|---|---|
| 局在 | 中央＞辺縁 | 辺縁 |
| Fiber type | 1＞2 | 2 |
| HE | 淡青 | 青 |
| Trichrome | 赤紫 | 赤 |
| NADH | ＋紫（ハロー＋／－） | ＋＋濃藍 |
| SDH | － | － |
| CCO | － | － |
| ACP | － | － |
| NSE | ＋＋ | ＋＋ |
| MHC | － | － |
| HSP27 | －＞＋ | ＋ |
| HSP72 | － | － |
| GRP78 | ＋ | ＋ |
| HSP90 | ＋／－ | ＋ |
| Ubiquitin | －＞＋ | － |
| Clathrin | ＋ | ＋ |
| Dystrophin | ＋ | －（空胞は＋） |

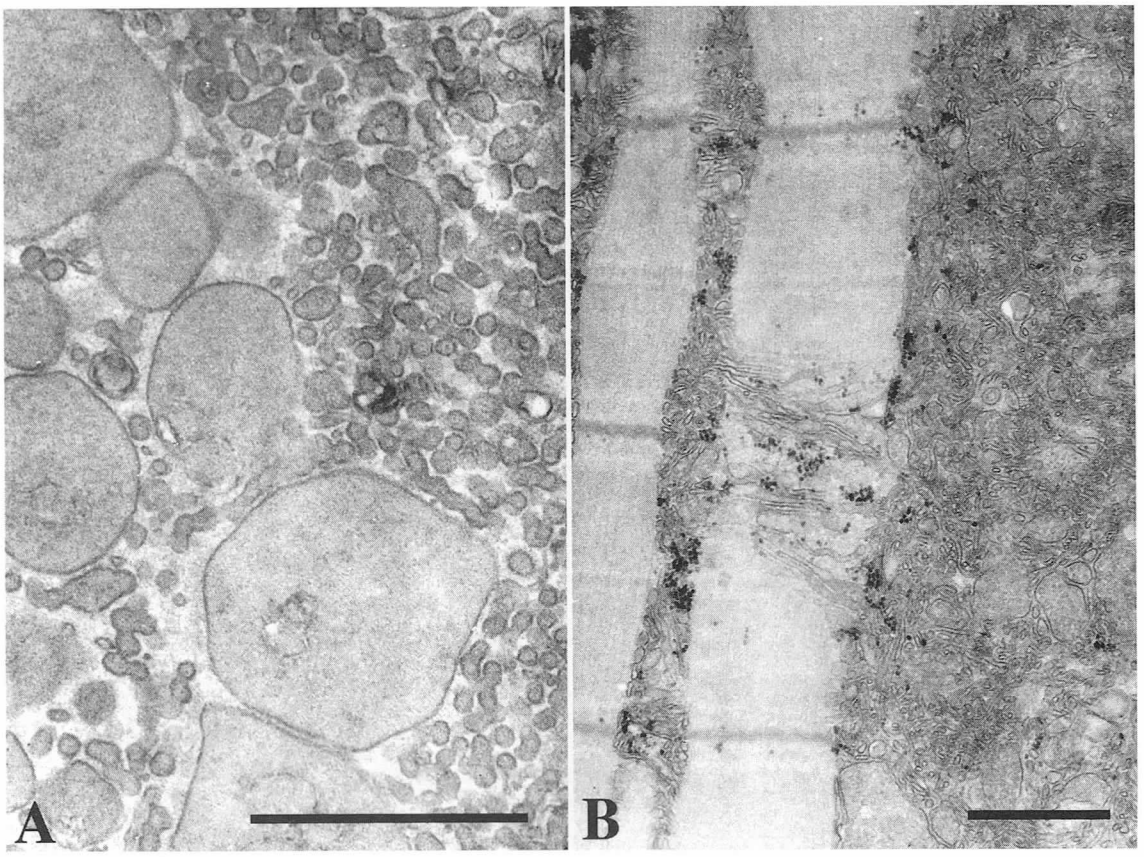



**図3** [電顕所見] 横断像は様々な直径(60nmから6μm以上)よりなる管状・嚢胞様構造物の集簇が存在し，内容は均一物質で充満され，約10nmの一層の限界膜構造 よりなっていた(**図3A**). 縦断像では筋線維の長軸に沿い筋線維内に限局性に存在し，tubular aggregatesの様に整然としてではなく雑然と認められ，主にT管との連続性を示した．周辺の筋原線維周辺にはSRとT管と考えられる異常微細管状構造が増加していた(**図3B**). A：×36,660, B：×18,800 (Bar=1μm)

の雑然とした直径が60nmから数μm以上にも及ぶ嚢胞・管状構造の集合体で，主にT管を中心にSRなどが嚢胞・管状構造形成に直接関連している所見もえられた．この構造物と最も鑑別上重要なtubular aggregates(TA)の特徴と比較してみる．光顕的にはTAはパラフィン切片では多くは見逃され，凍結切片ではHEで塩基好性，Gomori trichrome変法で濃赤染，NADHでは濃青紫染(diformazane色)し，NSE濃染，SDHやmyosin ATPaseでは染まらず[7]類似点も多い点は本例がTAと同様にSRと関連する[8]と考えられる．つぎにTAについては72kDaのHSPが陽性とされ，HSP72が筋障害によるストレスにより発現しSRやT管の構成蛋白の構造変化を引き起こしTAを形成するとの報告があるが[9]，我々の自験TA症例および本例では必ずしもHSP72が陽性ではなかった．また電顕的にTAは周囲の筋原線維とは分離され，主に筋線維に複数存在する．そして筋線維の長軸に沿って平行し比較的整然としたtubulesとして多くは存在し，直径は60-80nmで二重膜の構造(膜間隔；6-12nm)をとるなど[7]本例の電顕所見とは異なっていた．

さて本構造物がSR由来であれば，先天性ミオパチーで単一報告の非進行性の近位筋優位の障害を持つ兄弟小児例に報告され，SRの異常増殖に伴うsarcotubular myopathy[10]につき言及する必要がある．Sarcotubular myopathyの筋病理は，光顕ではタイプ2線維内に多発散在性の微小空胞を20-30%の筋線維に認め，電顕では一層の膜に囲まれた空虚な小管状空胞でありSRとT管の関連が示唆された．またその内容物は無定形物質の痕跡を残す小空胞であったが，今回の自験例では無定形物質で内容が満たされていた．これはsarcotubular myopathyでは標本処理の段階で逸脱したことも否定できないが，自験例では光顕において空胞の確認はできず，電顕的にも嚢胞(空胞)サイズが不揃いで管状構造を併せもつ集合体であるなど，多くはsarcotubular myopathyの報告所見と異なっていた．

以上，本症例は筋形態学的にはmyopathy with TAやsarcotubular myopathyの類似疾患と考えたが異なる所見も多く，慢性で緩徐進行性の筋ジストロフィー様の経過などを特徴とした新たなミオパチーと考えた．

## 引用文献

1) Dubowitz V, Sewry CA, Fitzsimons RB, et al : Muscle biopsy: a practical approach. Bailliere Tindall, London, 1985, pp.74-75

2) 埜中征哉:臨床のための筋病理．第2版 日本醫事新報社，東京，1993，pp15-39

3) Munro S and Pelham HRB: : A c-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. Cell 48 : 899-907, 1987.
4) Schekman R and Orci L : Coat proteins and vesicle budding. Science 271 : 1526-1533, 1996.
5) Vita G, Migliorato A, Toscano A, et al : Immunocytochemistry of muscle cytoskeletal proteins in acid maltase deficiency. Muscle Nerve 17 : 655-661, 1994.
6) Bleecker JLD, Engel AG, Winkelmann JC : Localization of dystrophin and b-spectrin in vacuolar myopathies. Am J Pathol 143 : 1200-1208, 1993.
7) Fardeau M and Tome FMS : Congenital myopathies. In Myology, ed by Engel AG, Franzini-Armstrong C. Vol 2. McGraw-Hill, New York, 1994, pp.1487-1532
8) Salviati G, Pierobon-Bormioli S, Betto R, et al : Tubular aggregates : Sarcoplasmic reticulum origin, calcium storage ability and functional implications. Muscle Nerve 8 : 299-306, 1985.
9) Martin JE, Mather K, Swash M, et al : Expression of heat shock protein epitopes in tubular aggregates. Muscle Nerve 14 : 219-225, 1991.
10) Jerusalem F, Engel AG and Gomez MR : Sarcotubular myopathy. A newly recognized benign, congenital, familial muscle disease. Neurology 23 : 897-906, 1973.

# Tubulomembranous myopathyのその後に関する研究

福　原　信　義*

研究協力者　近　藤　　浩**　中　島　　孝*
古　井　英　介*　林　　恒　美*

## はじめに

S55年の筋ジス三好班の班会議において，それまで報告の無かった特異な筋構造物を有する筋疾患を先天性ミオパチーとしてTubulomembranous myopathy(TM)と名付けて報告した[1]．その後，その構造物(tubulomembranous structure)[1]については，葛原ら[2]によりrimmed vacuopleを有する遠位型ミオパチーにおいても見られることが報告されたが，TMの様に，大きさにおいても数においても著明なものは報告されてはいない．最初の報告から約15年を経た現在の状態を報告するとともに，同じように長期経過を経たrimmed vacuole型遠位型ミオパチー[3]と比較検討した．

## 方　　法

同じように長期経過のTMとRV型遠位型ミオパチーについて臨床経過，筋障害の分布について臨床的観点から比較検討するとともに，骨格筋の変性の状態についてComputed tomography (CT)で検査した．

対象症例は，

**症例1：35歳男性(TM)[1]**

血族結婚(+)．生来，運動能力が非常に劣り，15歳より歩行が不安定，16歳時に入院．軽いミオパチー様顔貌．四肢の近位筋と下腿のふくらはぎに軽度の筋萎縮が見られた．CKは軽度増加．筋電図はミオパチーの所見．筋力低下，筋萎縮はその後も進み，先ず大腿，下腿筋に強くなり，歩行が困難となる．上肢も筋力低下が進み，今では両側の拇指がわずかに動くのを除いて，四肢は全く動かせない．しかし，眼球運動，構音，嚥下は正常のままであり，わずかに動く拇指でモールス信号によるパソコンを操作している(**図1**)．

**症例2：41歳男性(RV型遠位型ミオパチー)[2]**

血族結婚(+)．23歳時に下肢の筋力低下で発症．次いで上肢遠位筋の筋力が低下．次第に歩行が困難，今では四肢の筋力萎縮が著明で，両側の拇指がわずかに動き，ワープロを使用することが出来るほか，四肢はほとんど動かせず，全介助状態である(**図2**)．眼球運動，構音，嚥下には支障はない．

## 結　　果

この2例を比較してみると，TMの症例1は，発病後約20年を経過し，比較した遠位型ミオパチーの症例2は，18年を経過している．両者とも，病気の進行としては極期に達していると言えるが，現在の臨床状態は非常によく似ている．また，症例2は，初期には典型的なRV型遠位型ミオパチーの筋萎縮の分布であったが，進行した現在ではむしろ指の動きの方が残っている．

骨格筋のCT検査所見では，TMの症例では，わずかに前頚部の筋肉が筋組織を残存しているのみで，他の四肢筋，体幹筋のほとんどが脂肪化していた．RV型ミオパチーの症例でも頚部屈筋，上腕二頭筋，前腕屈筋の一部がわずかに筋組織を残すのみで，他の四肢筋，体幹筋は全て脂肪化していた．

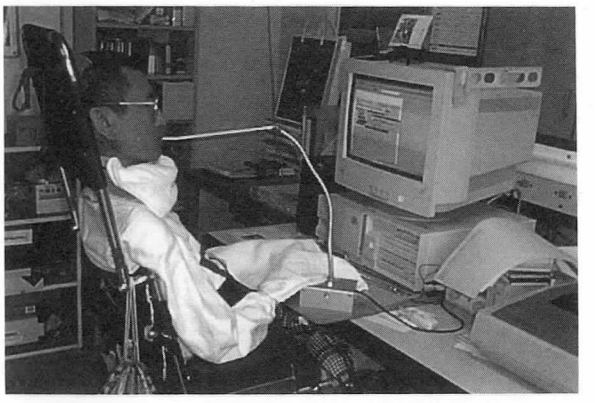


**図1**　症例1

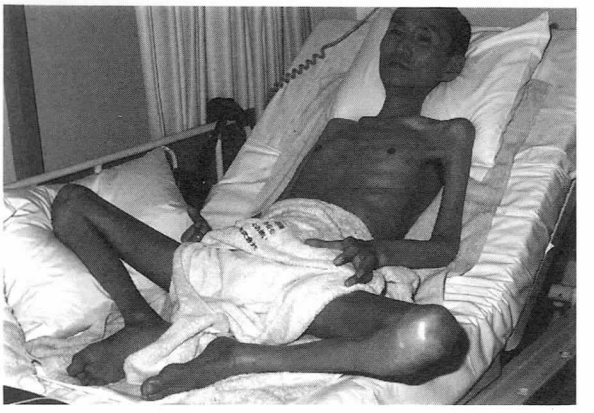


**図2**　症例2

* 国立療養所犀潟病院
** 国立療養所新潟病院

## 考　　察

TMの臨床症状は遠位型ミオパチーとは異なり，近位筋が優位であり，発病の様子も先天性ミオパチーを思わせるものがある．また，RV型遠位型ミオパチーでみられるtubulomembranous structureはTMにおけるほどには大きくはなく，数も多くはない．恐らく，tubulomembranous structureとTMの関係はnemaline rodとネマリンミオパチーの関係に類比することが出来るであろう．RV型遠位型ミオパチーの骨格筋CT像に関しては，水沢ら[4]，国本ら[5]の研究がみられ，病初期には下腿伸筋，大腿屈筋，内転筋が選択的に障害される，傍背柱筋も障害されやすく，臨床的な筋力低下の分布と一致すると報告されている．このように，TMとRV型遠位型ミオパチーでは発症状況，筋障害の分布，筋生検像は明らかに異なるが，十数年を経た進行期では筋障害の分布には特徴が無くなり，骨格筋CT像も非常によく似ており，区別できなくなっている．したがって，TMの診断には初期における筋障害の分布と筋生検が重要になる．

## 結　　論

1) TMが進行したときの病像は，RV型遠位型ミオパチーと区別が付かない．

2) 初期の筋障害の分布の把握と筋生検が重要である．

3) RV型遠位型ミオパチーは，病気の進行により遠位筋のみならず近位筋も著明に萎縮し，筋障害の分布には特徴が無くなる．むしろ，一部の遠位筋の動きの方が残存される．

## 文　　献


1) Fukuhara N, Kumamoto T, Hirahara H, et al : A new myopathy with tubulomembranous inclusions. J Neurological Sci 50 : 95-107, 1981.

2) Kuzuhara S and Nakanishi T : Tubulomembranous and fingerprint-like inclusions in biopsied muscle of distal myopathy with rimmed vacuoles. Acta Neuropathol 62 : 194-200, 1984.

3) Kumamoto T, Fukuhara N, Nagashima M, et al : Distal myopathy. Arch Neurol 39 : 367-371, 1982.

4) 水澤英洋，井上聖啓，豊倉康夫ら：Rimmed vacuole型遠位型ミオパチーにおける骨格筋障害様式：臨床的ならびにCtによる検討．臨床神経 26 : 1174-1181, 1986.

5) 国本雅也，川井充，後藤順ら：Rimmed vacuole型distal myopathyの骨格筋CT所見．神経内科 26 : 287-294, 1997.

# 成人発症ネマリンミオパチーの筋病理学的検討

鈴 木 ゆ め[*,**]

研究協力者　埜 中 征 哉[*,***] 井 元 千佳子[*]　黒 岩 義 之[**]

**要 旨**　常染色体劣性遺伝形式を有するネマリンミオパチーの遺伝子座は2q21.2-22に存在することが知られている．この候補遺伝子は骨格筋の構成蛋白であるネブリンをコードする遺伝子を含んでいる．そこで，成人期に筋生検が行われた22例の臨床経過，筋病理学的所見を検討，分類した上で，抗ネブリン抗体を用いて特にネブリンの発現を中心に検討した．成人発症ネマリンミオパチーにおける免疫染色ではネブリン蛋白は全ての筋線維に正常に発現しており，異常は見られなかった．

## はじめに

ネマリン小体は，他の筋疾患でも経過中に筋原線維の乱れに伴って非特異的に生ずることがあるため，成人例では診断に十分な検討を必要とする[1),2)]．そこで今回私たちは，成人期に行われた筋生検でネマリン小体が多数認められ，ネマリンミオパチーと診断された症例を検討し，成人型の臨床的および筋病理学的特徴を明らかにして分類した上で，常染色体劣性遺伝形式をもつネマリンミオパチーの候補遺伝子中に責任遺伝子が含まれるネブリン蛋白の異常について検討することとした．

## 対　　象

筋生検施行時の年齢が18-84歳までで，生検筋の少なくとも1%以上の筋線維にネマリン小体を認めた患者，男11人，女11人，計22人．

## 方　　法

対象患者22例の臨床経過と、生検筋の筋病理における特徴について検討した．

臨床経過は，発症年齢，筋萎縮の分布，先天性ミオパチーの症例に見られる身体的特徴としての骨格異常である高口蓋，脊柱変形，関節拘縮の有無を中心に，筋病理学的には，急速凍結切片にヘマトキシリン・エオジン染色，Gomoriトリクローム変法染色，NADH染色，ATPase染色など一連の組織化学染色を施し，また，抗αアクチニン抗体[3)]，抗ネブリン抗体(Sigma)を用いた免疫染色を行った．乳児重症型ネマリンミオパチーの生検筋の蛋白にイムノブロットを行った．

## 結　　果

病歴と臨床所見から，幼小児期に症状が存在したが軽微であり，特に異常とは思っていなかった者(先天型成人期増悪群)13例，成人期に症状が明らかとなったが筋症状の分布から先天性を示唆するもの(先天型成人期発症群6例)，および成人期まで全く正常で，先天型をうらづける症状を欠く3例に分類できた．

先天型成人期増悪群13例では，全ての例で筋力低下に家族または本人が，15歳以下の若年で気付いており，処女歩行遅延の見られたものが4例あった．家族歴は3例にあり，妹1例，弟1例，同胞2人1例，また，血族婚としてはいとこ婚が1例あり常染色体劣性遺伝が推定された．症状では「先天性」を強く裏付ける高口蓋が7例，顔面筋罹患は4例，頸部屈筋群に強い筋力低下を5例，嚥下障害など咽頭筋の筋力低下を4例に，さらに先天性股関節脱臼を1例に認めた．全例生検は上腕二頭筋で行われた．良性先天型ネマリンミオパチーの特徴であるタイプ1線維萎縮は5例に，タイプ1線維優位は6例に，またタイプ2B線維欠損は2例に認められた(表1)．全ての症例で上記のいずれかの所見をみた(図1)．

先天型成人期発症群の6例では顔面筋罹患は1例に，頸筋の選択的筋力低下または嚥下障害を4例に認めた．1例では眼瞼下垂と眼球運動制限が主症状だった．先天型成人期発症群の生検筋は，大腿直筋1例，上腕二頭筋5例だった．タイプ1線維萎縮は4例，タイプ1線維優位は3例，タイプ2B線維欠損は2例に認められ，6例全ての症例で先天型の特徴のいずれかがみられた(表1, 図2)．

表1　三群における筋線維タイプの異常

| | 先天性<br>成人期増悪群 | 先天性<br>成人期発症群 | 非先天型<br>成人期発症群 |
|---|---|---|---|
| 全タイプ1 | 3例 | 0 | 0 |
| タイプ1優位 | 6例 | 3例 | 0 |
| タイプ1萎縮 | 5例 | 4例 | 0 |
| タイプ2B欠損 | 2例 | 2例 | 0 |

* 国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部
** 横浜市立大学医学部神経内科
*** 国立精神・神経センター武蔵病院

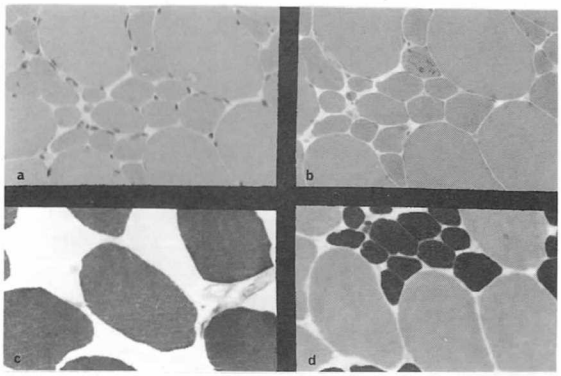



**図1**　先天型成人期増悪群の筋病理像
a；HE，b；mGt，c；routine ATPase，d；ATPase pH4.6(a-d；×330)

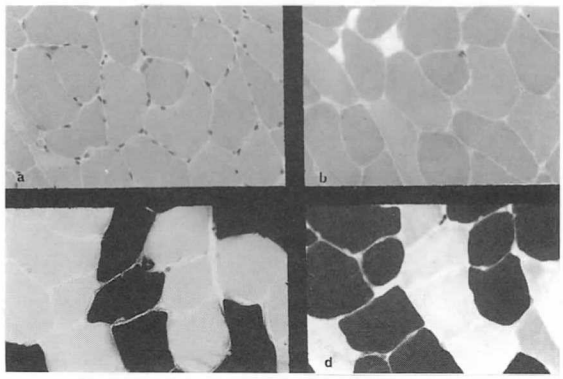



**図2**　先天型成人期発症群の筋病理像
a；HE，b；mGt，c；routine ATPase，d；ATPase pH4.6(a-d；×330)

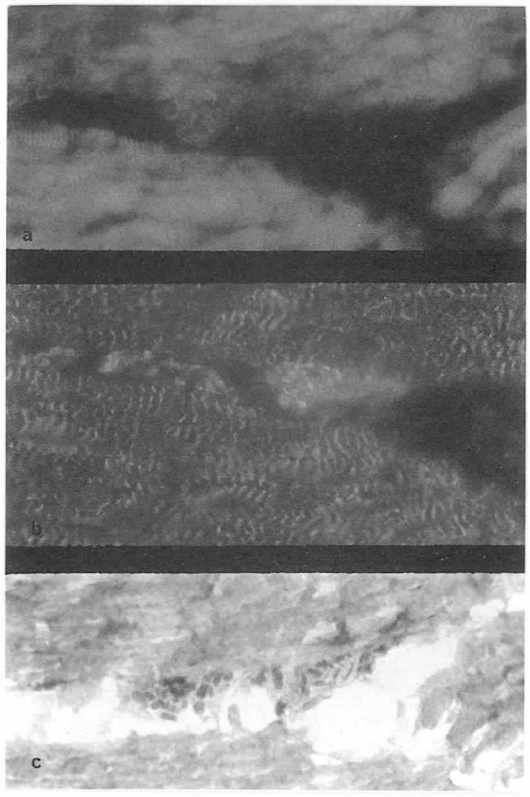



**図3**　先天型成人発症の一例
上段は抗ネブリン抗体，中段は抗α-アクチニン抗体，下段はゴモリのトリクローム変法による各染色結果を示す(×713.6).

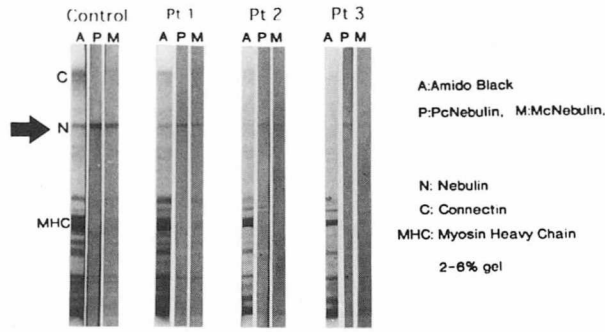



**図4**　重症先天型3例のイムノブロッティングを示す．
ネブリン蛋白のバンドは正常対象と同様の部位に現れている．

非先天型成人期発症群の3例はそれぞれ46歳，41歳，71歳の発症で全て女性だった．1例は胸膜炎，もう1例は潰瘍性大腸炎を合併しており，特に後者では筋症状がステロイドに反応して軽快している．筋病理学的に上記二群に共通する所見はネマリン小体以外みられなかった．

抗αアクチニン抗体，抗ネブリン抗体による免疫染色では，小児におけると同様，前者はZ帯とネマリン小体，後者はZ帯を挟んで線状に陽性となった(**図3**)．乳児重症型のイムノブロットでは，ネブリン蛋白のバンドが明らかに見えた(**図4**).

## 考　　察

成人型ネマリンミオパチーは，臨床経過，筋病理学的所見から，先天型成人期増悪群，先天型成人期発症群，非先天型成人期発症群の三群に分けられた．良性先天型も小児期まで全く異常に気付かれない例があることがわかった．高口蓋，足変形という特徴があったことから良性先天型が成人期に急激に増悪したと考えられ，先天型成人期増悪群の中には成人期まで気付かれないほど筋症状の軽微な例があることは留意すべきである．先天型成人期発症群は，高口蓋，側弯，尖足といった先天性筋症の身体的特徴は有さず，筋症状も明らかに成人期に発症しているが，先天型に通ずる筋病理所見，すなわちタイプ1線維萎縮，タイプ1線維優位，タイプ2B線維欠損のいずれかを全例が示していて，それが本群の診断的根拠となった．

何れにおいても家族歴には欠けていたため，優性遺伝は存在しないと考えられ，多くは常染色体劣性遺伝と推察された．

一方，ネマリンミオパチーの遺伝子座は，常染色体優性遺伝形式を有するものは1q21-23[4]，常染色体劣性遺伝形式を有するものは2q21.2-22に存在[5]することが知られている．また，骨格筋の構成蛋白であるネブリンは，分子量800Kdの巨大なアクチン結合蛋白[6]で，コードする遺伝子は常染色体劣性遺伝形式をもつネマリンミオパチーの候補遺伝子の中にある[7].

そこで，抗ネブリン抗体を用いてネブリン蛋白の異常をまず小児のネマリンミオパチーで調べたところ，ネブ

リン蛋白の発現異常は見られなかった[8]．成人例の免疫染色ではネブリン蛋白は全ての筋線維に小児例と同様正常に発現しており，免疫組織化学的検索では異常は見られなかった．乳児重症型のイムノブロットでは，ネブリン蛋白のバンドが明らかに見えるが，量的に減っている．この意義については不明である．

今後，乳児重症型におけるイムノブロットの結果を踏まえて，成人型ネマリンミオパチーにおけるネブリン蛋白の異常の有無について検索を深める必要がある．


## 謝　辞

臨床症状，経過などを詳しくご連絡いただき，また各方面から本研究にご協力いただいた諸先生方に深謝いたします．


## 参考文献


1) Engel AG : Late-onset rod myopathy (a new syndrome?), light and electron microscopic observations in two cases. Mayo Clin Proc 41 : 713-741, 1966.
2) Engel WK : Rod (nemaline) disease. In Scientific Approaches to Clinical Neurology, ed by Goldensohn ES, Appel SH, Lea & Febiger 1977, vol 2, pp1667-1691.
3) North KN and Beggs AH : Deficiency of a skeletal muscle isoform of α-actinin (α-actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy. neuromuscul Dis, 1996.
4) Laing NG, Wilton SD, Akkari PA, et al : A mutation in the α tropomyosin gene TPM3 associated with autosomal dominant nemaline myopathy. Nat Genet 9 : 75-79, 1995.
5) Wallgren-Pettersson C, Avela K, Marchand S, et al: A gene for autosomal recessive nemaline myopathy. Eur J Hum Genet 5: 229-234, 1997.
6) Labeit S and Kolmerer B : The complete primary structure of human nebulin and its correlation to muscle structure. J Mol Biol 248 : 308-315, 1995.
7) Pelin K, Ridanpaa M, Donner K, et al : Refined localization of the genes for nebulin and titin on chromosome 2q allows the assignment of nebulin as a candidate gene for autosomal recessive nemaline myopathy. Eur J Hum Genet 5 : 229-234, 1997.
8) 井元千佳子，川井　充，埜中征哉：ネブリン抗体を用いたネマリンミオパチーの免疫組織学的検討．脳と発達 30 : S254, 1998.

# インテグリンα7欠損型先天性ミオパチー

荒 畑 喜 一*

研究協力者 林 由起子* 石 井 弘 子** 小 川 恵*
塚 原 俊 文* 平 林 伸 一*** 横 地 健 治****
埜 中 征 哉*

**要 旨** 骨格筋の機能ならびに恒常性の維持には，細胞膜内外のタンパク質連関が重要な役割を果たしていると考えられている．我々は，筋細胞基底膜のラミニンに異常のある先天性筋ジストロフィーにおいて，その筋細胞膜側の受容体であるインテグリンα7β1Dの発現にも二次的異常が認められることから，骨格筋におけるラミニン-インテグリンの相互作用の重要性を示唆した．さらにその後の検索でインテグリンα7の遺伝子異常が，先天性ミオパチーの原因の一つになり得ることを発見した．

## 研究の背景

骨格筋の機能を正常に保つためには多くのタンパク質が関わっているが，筋細胞膜内外のタンパク質連関の重要性が，筋ジストロフィーの病因解明の研究を通して，近年徐々に明らかになってきた．筋ジストロフィーのうち最も頻度の高いDuchenne型筋ジストロフィーの原因タンパク質・ジストロフィンは，筋細胞膜関連細胞骨格タンパク質であり，筋細胞膜の細胞質面にこれを裏打ちするように存在する．ジストロフィンは筋細胞膜にあるジストロフィン結合タンパク質複合体(dystrophin-associated proteins; DAPs)を介して筋細胞の外側を覆っている基底膜の主成分であるラミニンと結合している．また，DAPsの一部であるサルコグリカン複合体に異常が起こった場合，肢帯型筋ジストロフィー2C～2F型(またはサルコグリカノパチー)になることが知られている．さらに，ラミニンα2鎖に一次的異常があるとメロシン欠損型先天性筋ジストロフィー(MCMD)になる．このように，筋細胞膜内外を結ぶタンパク質に異常があると筋ジストロフィーを発症することが判明し,ラミニン-DAPs-ジストロフィンというタンパク質連関の重要性が指摘されてきたのである[1](図1)．我々は，この三者以外にも筋細胞膜内外の連絡に重要な役割を担っているタンパク質が存在するであろうと考え，ラミニンレセプターであるインテグリンに注目し，その発現を検討した．

インテグリンは，αとβのヘテロダイマーで構成される膜貫通型細胞接着因子であり，細胞-細胞，あるいは細胞-細胞外マトリックス(基底膜)を機械的につなぐとともに，シグナル伝達機構を介して細胞の発生・分化や増殖，さらには細胞死などにも関わっている重要な分子である．インテグリンα，βともに，これまでに多くのサブユニットが報告されている．成熟骨格筋細胞においては，主としてα7β1Dタイプのインテグリンが発現している．このうちインテグリンα7は主に骨格筋・心筋に発現しており，一方のβ1Dは，全身各組織に発現しているβ1サブユニットの筋特異的スプライシングアイソフォームである．このα7β1Dインテグリンは，筋細胞基底膜のラミニンの重要な受容体の1つであり，骨格筋の形成や恒常性の維持に重要な役割を担っていることがin vitroの実験で示唆されている．

CMDは，出生時，もしくは乳児期早期より筋緊張低下，運動発達遅滞を示す先天性ミオパチーで，臨床・病理学的に筋ジストロフィーの特徴を有するものを総称している．CMDのうち，欧米に多く認められるものがMCMDである．これは，主として骨格筋基底膜に発現しているラミニンα2鎖の遺伝子に異常があり，α2鎖を含むラミニン，すなわちメロシンの発現に異常を来すCMDである[2)3)4)]．一方，本邦に多い福山型CMD(FCMD)の骨格筋でも，ラミニンα2鎖に二次的な異常が認めらる．MCMD，FCMDともに基底膜の脆弱性が認めめられ[5)]，電顕的にも非薄・分断化した異常な基底膜を観察することができる[6)]．

## 研究結果

我々は,ラミニンに異常を認めるMCMDならびにFCMDの骨格筋について，その受容体であるインテグリンα7β1D，ならびにDAPsの発現を検討した．その結果，DAPsおよびジストロフィンの免疫反応には著しい異常は認められないが，インテグリンα7，β1Dには，ともに強い変化が認められた[7)8)]．さらに，ラミニンα2鎖を欠損する筋細胞株においては，インテグリンα7β1Dの局在が乱れ，アポトーシスが引き起こされるが，この細胞株にα2鎖を強発現させると，α7β1Dの局在が正常化し生存可能となることも判明した[7)]．

* 国立精神・神経センター神経研究所
** 東京都立東大和療育センター
*** 長野県立こども病院小児科
**** 聖隷三方原病院小児科

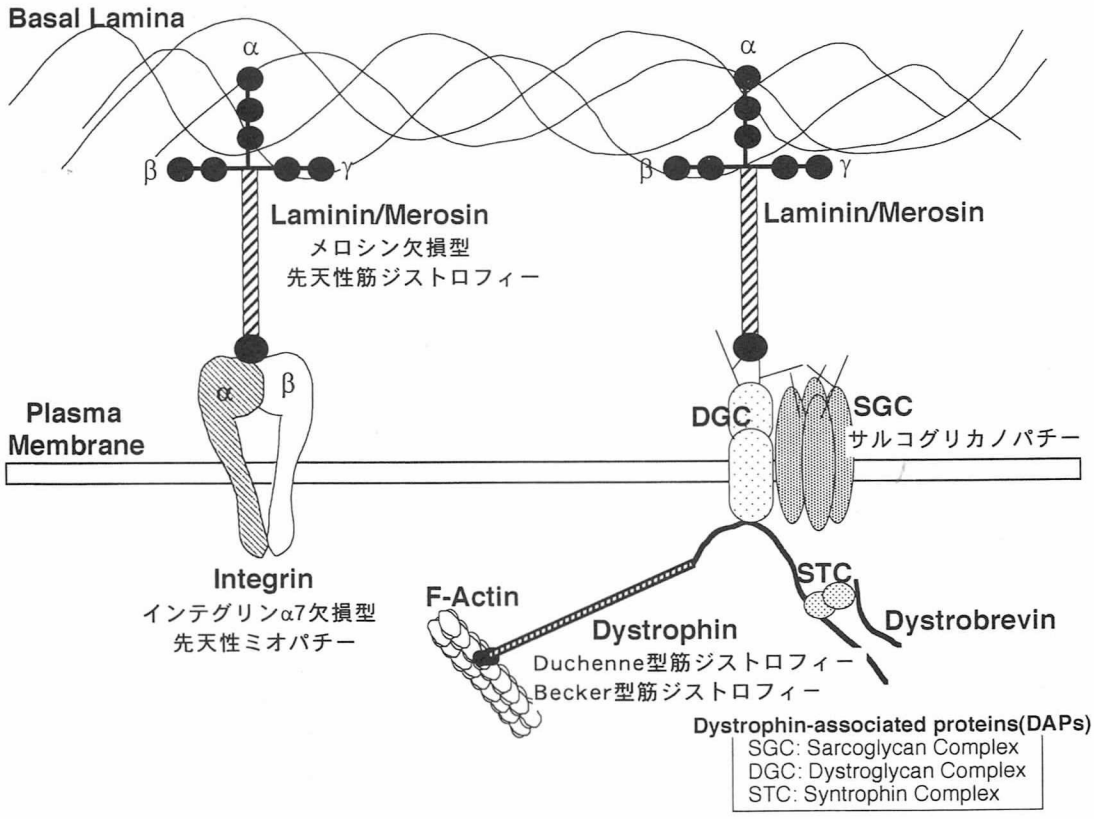



**図1**　筋細胞膜内外のタンパク質と筋疾患

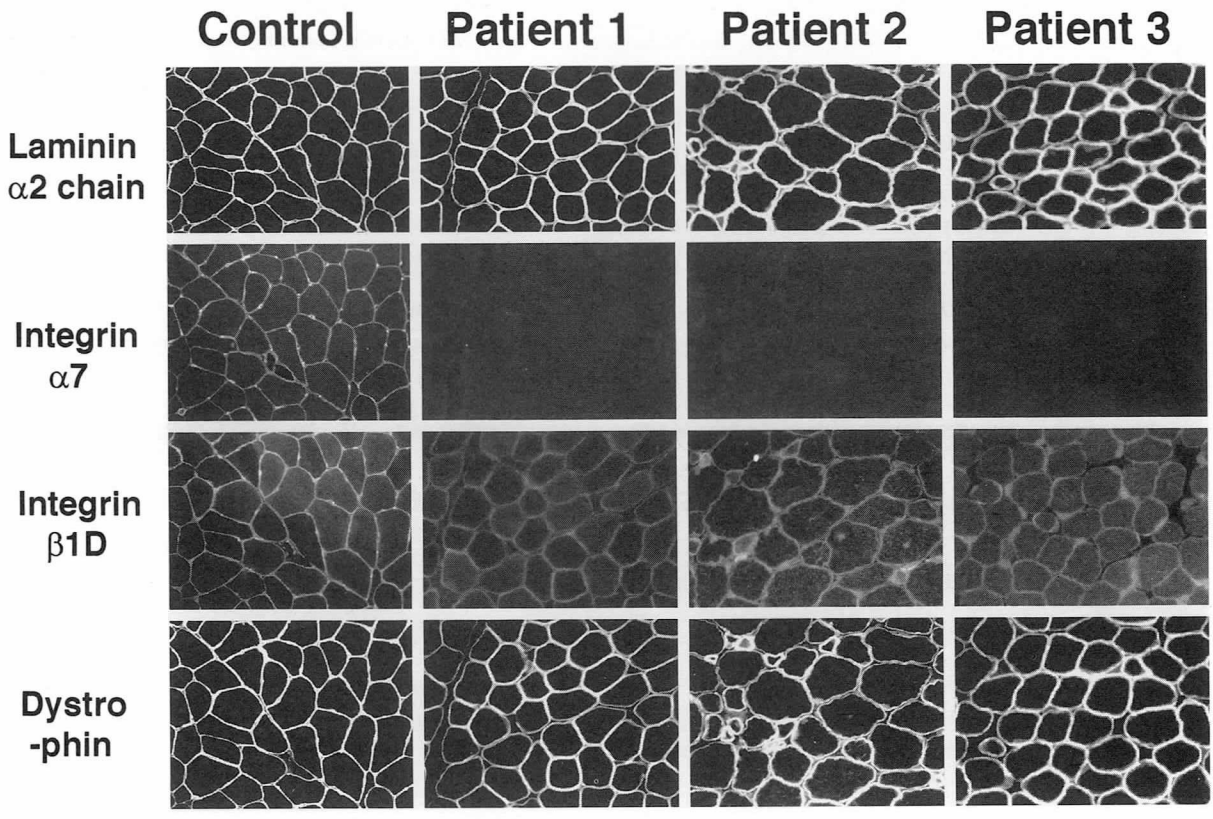



**図2**　インテグリンα7欠損症筋の免疫染色
疾患筋では，インテグリンα7の免疫反応は欠損し，インテグリンβ1Dの免疫反応は減弱している．一方，ラミニンα2鎖ならびにジストロフィンの免疫反応に異常は認めない．

次いで我々は，確定診断のついていないCMDを含む先天性ミオパチー117例の生検筋について，免疫組織化学的にインテグリンα7β1Dの発現を検討した．その結果，3症例でα7の免疫反応が欠損しており，同時にヘテロダイマーを形成しているβ1Dの免疫反応も減弱していることを発見した(図2)．そこでヒトインテグリンα7 cDNAの全塩基配列を決定し，この3症例に関して生検筋および末梢血リンパ球より抽出したRNA・DNAを用いて遺伝子変異の有無を検索した．その結果2例でヘテロな遺伝子異常が，1例ではα7mRNAの著減が認められた．3症例とも孤発例で，生下時，あるいは乳児期より運動発達遅滞を認めているが，筋症状は緩徐進行性もしくは非進行性，血清クレアチンキナーゼ値も正常から軽度上昇程度，筋病理像は，筋ジストロフィーの特徴である筋線維の壊死・再生像はあってもわずかであり，臨床的には先天性ミオパチーの範疇に入るものであった[9]．

## 考　　察

以上のことから，インテグリンα7欠損症は，先天性ミオパチーの一原因となることが判明した．また，そのそのリガンドであるラミニンに異常が存在すると，二次的にインテグリンα7β1Dに強い影響を及ぼすことから，骨格筋におけるラミニンとインテグリンとの関連の重要性が示唆される．

一方，インテグリンα7遺伝子をノックアウトしたマウスもすでに報告されている[10]．このマウスは，臨床的には明らかな症状は認められないが，筋病理像を見ると筋線維の大小不同，中心核線維の増加など，ミオパチーの所見を呈することが報告されており，我々の報告したヒトのα7欠損症の所見と矛盾しない．

インテグリンは，細胞の内→外へ，あるいは外→内へのシグナルを伝達している．α7β1Dインテグリンは筋細胞において，どの様な信号を送ったり受け取ったりしているのだろうか，興味が持たれる．そして，その異常がどの様に筋障害の発生に関わっているのであろうか，検討されるべき課題である．筋疾患の発症機構を考える上で，インテグリンα7欠損症は大きなヒントを与えてくれるものと考えられる．

## 参考文献


1) Campbell KP : Three muscular dystrophies : Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage.Cell 80:675-679, 1995.
2) Hayashi YK, Engvall E, Arikawa-Hirasawa E, Goto K, Koga R, Nonaka I, Sugita H and Arahata K : Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophies. J Neurol Sci 119 : 53-64, 1993.
3) Ishii H, Hayashi YK, Nonaka I and Arahata K : Electron microscopic analysis of basement membrane in Fukuyama congenital muscular dystrophy. Neuromusc Disord 7 : 191-197, 1997.
4) Tomé FMS, Evangelista T, Leclerc A, Sunada Y, Manole E, Estournet B, Barois A, Campbell KP and Fardeau M : Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. C R Acad Sci Ⅲ 317 : 351-7, 1994.
5) Helbling-Leclerc A, Topaloglu H, Tome FMS, Sewry C, Gyapay G, Naom I, Muntoni F, Dubowitz V, Barois A, Estournet B, Urtizberea JA, Weissenbach J, Schwartz K, Fardeau M and Guicheney P : Readjusting the localization of merosin (laminin α2-chain) deficient congenital muscular dystrophy locus on chromosome 6q2. C R Acad Sci Paris 318 : 1245-1252, 1995.
6) Hayashi YK, Ishihara T, Domen K, Hori H and Arahata K : A benign allelic form of laminin α2 chain deficient muscular dystrophy. Lancet 349 : 1147, 1997.
7) Vachon PH, Xu H, Liu L, Loechel F, Hayashi Y, Arahata K, Reed JC, Wewer UM and Engvall E : Integrins (α7β1) in muscle function and survival. Disrupted expression in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. J Clin Invest 100 : 1870-1881, 1997.
8) Hodges BL, Hayashi YK, Nonaka I, Wang W, Arahata K and Kaufman SJ : Altered expression of the α7β1 integrin in human and murine muscular dystrophies. J Cell Sci 110 : 2873-2881, 1997.
9) Hayashi YK, et al : Mutations in the integrin α7 gene cause congenital myopathy. Nature Genet 19:94-97, 1998.
10) Mayer U, et al : Absence of integrin α7 causes a novel form of muscular dystrophy. Nature Genet 17 : 318-323, 1997.

# Ⅵ．眼咽頭筋ジストロフィー(OPMD)

# 眼咽頭筋ジストロフィーの表現型/遺伝子型とorigin

内野　誠*

研究協力者　宇山英一郎*　日野洋健*　有馬寿之*
後藤加奈子**　塚原俊文**　荒畑喜一**
Brais B***　Rouleau GA***

## はじめに

眼咽頭筋ジストロフィー(oculopharyngeal muscular dystrophy : OPMD)は，(1)40歳以降の発症，(2)主症状は眼瞼下垂と嚥下障害，(3)外径8.5nmの骨格筋筋鞘核内封入体を特徴とする常染色体優性の遺伝性疾患である[1), 2)]従来，French-Canadianをはじめ欧米白人間で家系が集積され，one founder effectで世界中に広まったと推定されていた[3)].

一方，我々は本症の日本人家系例を熊本と静岡に見い出し[4)]，phenotypeの相違などから，祖先とgenotypeが異なる可能性を指摘した[5)]. 本症の原因遺伝子に関しては，1995年にQuebecのFrench-Canadian家系例で14q11.2-q13に局在することがまず同定され[6)]，その後米国在住のFrench-CanadianとEnglish/Scottishの家系[7)]，静岡の日本人家系[8)]，およびGermanを祖先とするオーストラリアの家系[9)]においても同じ局在であることが確認された. その後カナダ，フランス，日本など世界15カ国の共同研究を続け，今回14q11上のpoly(A)-binding protein 2 gene (*PABP2*)が原因遺伝子として同定された[10)].

## 目　的

1)日本人家系例の遺伝子型を同定し，本邦OPMD患者の表現型/遺伝子型の関連性について検討する. 2)先に報告した熊本の家系のハプロタイプ解析を行い，静岡の家系および欧米白人家系と比較し，遺伝子型の結果と合わせ，そのoriginを検討する. 3)OPMDと異なる疾患として本邦で提唱された眼・咽頭・遠位型ミオパチー(oculopharyngodistal myopathy: OPDM)[11)]との異同を明らかにする.

## 対象および方法

1)上記(1)-(3)の特徴を有し，かつ遺伝子解析の同意が得られた熊本在住の4家系(2家系は大分出身)，静岡の1家系および東京在住の1家系. 正常対照者は健常日本人91名. 末梢血またはgenomic DNAを抽出し，PCR，fragment managerを用いて*PABP2*のexon1の$(GCG)_n$をスクニーニングし，シークエンス解析で遺伝子型を同定した. 2)ハプロタイプはマイクロサテライト多型DNAマーカーのD14S283, D14S990, R7002, MYH7.24, MYH7.1, D14S1041を用いて解析した. 3)熊本出身のOPDM1家系2兄弟(51歳と48歳)例について家系調査，臨床・筋病理学的検討を行った. 疾患対照はOPMD確実例の6家系40例(平均年齢58歳)と常染色体劣性distal myopathy with rimmed vacuole(AR-DMRV)の2家系4例(平均年齢41歳).

## 結　果

1)*PABP2*遺伝子型は，熊本出身の2家系と大分出身の1家系において$(GCG)_6/(GCG)_{11}$，静岡の1家系が$(GCG)_6/(GCG)_{10}$，大分出身の1家系が$(GCG)_6/(GCG)_9$，東京在住の1家系が$(GCG)_6/(GCG)_8$であった(図1). 一方，健常な正常対照の90名(98.9%)は$(GCG)_6/(GCG)_6$で，1名(1.1%)のみが$(GCG)_6/(GCG)_7$であった. 2)本邦初家系例として報告した熊本の家系では，小家系のため2点連鎖解析は困難であったが，ハプロタイプ解析では発病者2例のみにおいて原因遺伝子領域のマーカーに対してヘテロに同じハプロタイプを有し，組み替えが見られないことから，14q11.2-q13の局在が示唆された(図2). この熊本の家系と静岡の家系は同領域のマーカーに対して，全く異なるハプロタイプを示した(図3). さらに，静岡の家系が一部French-Canadianの家系と共通のハプロタイプを共有していたのに対し，熊本の家系は，検索し得た欧米諸国の家系例とは全く異なるハプロタイプを示した. 3)OPDMの家系調査では，両親がいとこ婚で，文政5年誕生の祖先以降，他に同様の発病者はなく，常染色体劣性遺伝が考えられた. 2兄弟例は各々40歳，35歳より，前脛骨筋の筋力低下と筋萎縮で発病し，次第に両手の筋力低下，眼瞼下垂，外筋眼筋麻痺，および嚥下障害が進行した. 血清CKが中等度上昇し，針筋電図は筋原性を示した. 筋組織上兄は軽度，弟は高度筋原性変化を呈し，RVを各々3%，6%認めた. 電顕ではRVの近傍に15-18nmの微細管状構造の封入体(IB)を認めた(図4). 進行期のAR-DMRVの4例に嚥下障害と眼症状はなく，RVが平均20%と高頻度出現し，OPDMに酷似したIBを認めた. 一方，OPMDでは全例に高度外眼筋麻痺や遠位筋優位の筋力低下はなく，RVは0.1%以下と低頻度で，核内IBは外径8.5nmと小型であった. 3つの疾患の比較を表1に示す.

* 熊本大学医学部附属病院神経内科
** 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部
*** McGill University & Montreal General Hospital

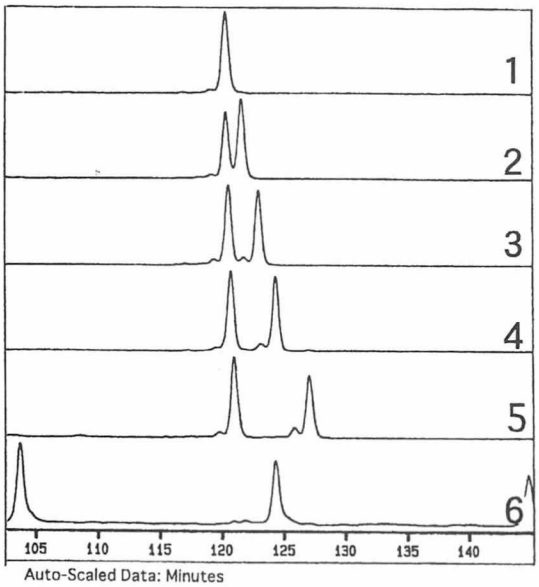



**図1** フラグメント・マネージャーを用いたPoly(A)-binding protein2 (*PABP2*)の変異の解析．正常対照者では98.9%が$(GCG)_6/(GCG)_6$(lane1)で，1.1%が$(GCG)_6/(GCG)_7$(lane2)であり，OPMD患者では，ヘテロに$(GCG)_8$(東京，lane 3)，$(GCG)_9$(大分，lane 4)，$(GCG)_{11}$(熊本，lane 5)と(GCG)nの異常伸長を認めた.lane 6はマーカー.

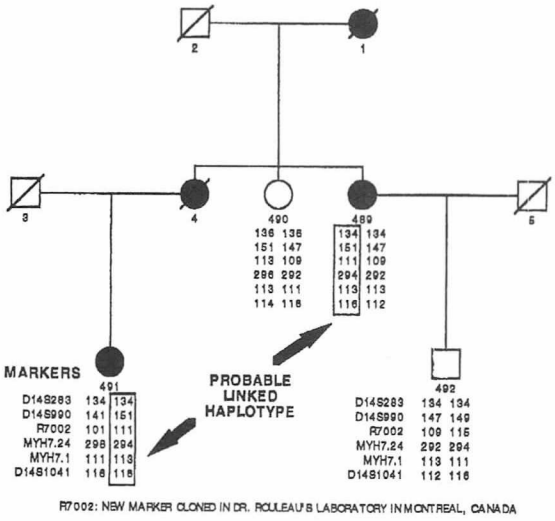



**図2** 熊本の家系[4),5)]のハプロタイプ解析の結果を示す．発病者には14q11.2-q13のマーカーに対して，共通のハプロタイプが1つのallele上に存在している(➡のbox).

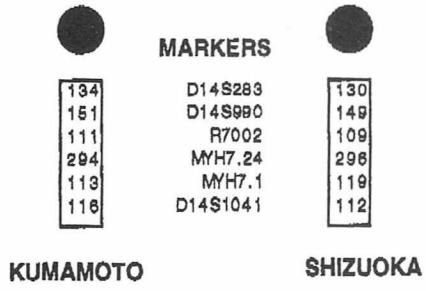



**図3** 熊本の家系[4),5)]と静岡の家系[4),5)]のハプロタイプを示す．14q11.2-q13上の各マーカーに対するハプロタイプは全く異なっている．

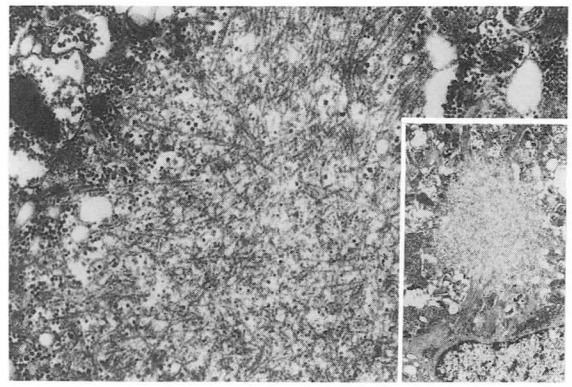


**図4** 常染色体劣性遺伝性眼・咽頭・遠位型ミオパチー(AR-OPDM)の家系の発端者の骨格筋電顕写真(上腕二頭筋:×62,725, insert:×7,475). 細胞質内のrimmed vacuoleの近傍に16-18nmのfilamentの集塊が認められる.

**表1** 常染色体劣性眼・咽頭・遠位型ミオパチー(AR-OPDM)，常染色体劣性のrimmed vacuoleを伴う遠位型ミオパチー(AR-DMRV)，および眼咽頭筋ジストロフィー(OPMD)の比較検討.

| | OPDM | DMRV | OPMD |
|---|---|---|---|
| Transmission | AR | AR | AD |
| Number of patients | 2 | 4 | 36 |
| Mean age at examination (years) | 50 | 41 | 58 |
| Mean age of onset | 38y | 27y | 50y |
| Ptosis | + | − | + |
| External ophthalmoplegia | + | − | ± |
| Dysphagia | + | − | + |
| Serum CK | ↑ | ↑ | → or ↑ |
| Mean frequency of RV | 5% | 20% | <1% |
| 15–18-nm cytoplasmic inclusions | + | + | ∓ |
| 8.5-nm intranuclear inclusions | − | − | + |
| Gene locus | ? | 9p1-q1 | 14q11.2-13q |

OPDM, oculopharyngodistal myopathy; DMRV, distal myopathy with rimmed vacuoles; OPMD: oculopharyngeal muscular dystrophy; AR: autosomal recessive; AD: autosomal dominant; CK: creatine kinase; RV: rimmed vacuoles.

## 考　　察

眼咽頭筋ジストロフィーの原因遺伝子は，14q11上の217kbの候補領域からクローニングされた*PABP2*であり，このmRNAは骨格筋に多く発現し，コードされた蛋白は核内に局在している[10),12),13)]．この*PABP2*は核内での転写後mRNAのポリアデニル化を誘導する3'-processing reactionで遊離3'-OH末端のpoly(A)の付加反応を刺激し，poly(A)-tailが長くなるように働き，mRNAの安定性に関与すると推定されている[14)]．健常日本人の遺伝子型は，French-Canadianと同様に，そのほとんどが$(GCG)_6/(GCG)_6$であり，患者は全例$(GCG)_6/(GCG)_{8\text{-}11}$と1つのalleleにGCG反復配列の短い異常伸長を認めた．Huntington病やDRPLAなどのlong repeat病とは対照的に，世代間促進現象は本邦家系例では明らかでなく，本症の$(GCG)_n$の伸長は安定している点が特徴的である．

軽度上昇していた．一方，$(GCG)_{10}$の静岡の家系と$(GCG)_9$の大分出身の家系では，嚥下障害が先行し，血清CKが中等度上昇し，下肢近位筋の筋力低下がある点で相違が認められた．北米在住のFrench-Canadianの多数の家系例では，従来1634年にフランスからQuebecに移住した1夫婦が共通祖先であり，連鎖解析からもone founder effectが示唆され，実際一部の例外の他はほとんど$(GCG)_6/(GCG)_9$であった．これに対し本邦では6家系で4種類の遺伝子型が今回同定されたことは，本邦においては複数の祖先が存在している可能性があると思われる．特に熊本の最初の家系のハプロタイプは他の国内，国外のものとは全く異なるものであり，そのoriginは欧米からもたらされたものではなく，突然変異で独自に生じた変異と推定される．

今回，眼咽頭筋ジストロフィー(OPMD)と類縁疾患との異同が少しでも明らかにされることを目的として，常染色体劣性眼・咽頭・遠位型ミオパチー(AR-OPDM)の家系例を検討したが，電顕的に外径8.5nmの核内封入体は認められず，常染色体劣性のOPDMは，常染色体優性[4]または常染色体劣性のOPMD[10]とは異なる疾患である可能性が高いと思われる[15]．今後，AR-OPDM家系例においても*PABP2*の変異の有無を検討したい．最後に，OPMDでは上眼瞼挙筋や輪状咽頭筋は高度(dystrophic)に障害されるが，三角筋や上腕二頭筋などは軽度の変化がみられるのみで，障害される筋に著明な選択性があり，同じ遺伝子型でも重症度に明らかな差がみられること[16]から，*PABP2*に連鎖した修飾遺伝子または因子が存在することが推定される．今後，病態と発症機序のoriginをさらに検索する必要がある．

## 謝　辞

本研究に御協力頂きました，静岡赤十字病院神経内科の野平　修博士，京都府立医科大学神経内科の森　敏博士およびフランスのTomé博士に深謝致します．

## 文　献

1) Tomé FMS and Fardeau M : Oculopharyngeal muscular dystrophy. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. Myology, 2nd ed. New York: McGraw-Hill : 1233-1245, 1994.

2) Tomé FMS and Fardeau M : Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. Acta Neuropathol : 49:85-87,1980.

3) Bouchard J-P, Brais B, Brunet D, Gould PV and Rouleau GA : Recent studies on oculopharyngeal muscular dystrophy in Quebec. Neuromusc Disord 7 (Suppl. 1) : S22-S29, 1997.

4) Uyama E, Nohira O, Chateau D, et al : Oculopharyngeal muscular dystrophy in two unrelated Japanese families. Neurology 46 : 773-778, 1996.

5) Uyama E, Nohira O, Tomé FMS, et al : Oculopharyngeal muscular dystrophy in Japan. Neuromusc Disord 7 (Suppl. 1) : S41-S49, 1997.

6) 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.

7) Stajich JM, Gilchrist JM, Lennon F, et al. Confirmation of linkage of oculopharyngeal muscular dystrophy to chromosome 14q11.2-q13. Ann Neurol 40 : 801-804, 1996.

8) Uyama E, Nohira O, Brais B, et al : Oculopharyngeal muscular dystrophy in Japanese: clinicopathological and genetic studies [abstract]. Ann Neurol 40 : 954, 1996.

9) Teh BT, Sullivan A-A, Farnebo F, et al : Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD)-report and genetic studies of an Australian kindred. Clin Genet 51 : 52-55, 1997.

10) Brais B, Bouchard J-P, Xie Y-G, et al : Short expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. Nature Genet 18 : 164-167, 1998.

11) Satoyoshi E and Kinoshita : Oculopharyngodistal myopathy. Arch Neurol 34 : 89-92, 1997.

12) Nemeth A, Krause S, Blank D, et al : Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. Nucleic Acids Res 23 : 4031-4041, 1995.

13) Krause S, Fakan S, Weis K and Wahle E : Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. Exp Cell Res 214 : 75-82, 1994.

14) Keller W : No end yet to messenger RNA 3' processing! Cell 81 : 829-832, 1995.

15) Uyama E, Uchino M, Chateau D and Tomé FMS : Autosomal recessive oculopharyngodistal myopathy in light of distal myopathy with rimmed vacuoles and oculopharyngeal muscular dystrophy. Neuromusc Disord 8 : 119-125, 1998.

16) Brais B, Bouchard J-P, Tomé FMS, et al : Genetic evidence for the involvement of other genes in modulating the severity of oculopharyngeal muscular dystrophy [abstract]. Ann Neurol 44 : 455, 1998.

# 眼咽頭型筋萎縮症14例の臨床病理学的検討

松 原 四 郎*

研究協力者　宮 本 和 人*　北 口 哲 雄*
磯 崎 英 治*　平 井 俊 策*

**要　旨**　眼咽頭型筋萎縮症(眼咽頭型筋ジストロフィー症OPMD並びに類縁疾患)14例について，眼球運動障害を中心にして臨床像を検討した．明らかな眼球運動障害を伴う例を10例認めた．また明らかな四肢筋脱力を11例に認めた．これらの頻度および重症度は，French Canadianの原著より高い．遺伝形式は，常染色体優性，同劣性，孤発例がみられ，臨床徴候が類似したいくつかの疾患群が含まれる可能性が示唆された．

## はじめに

Barbeauらが報告したFrench Canadianの眼咽頭型筋ジストロフィー症(OPMD)は，常染色体性優性遺伝で眼瞼下垂にて発症し，嚥下障害が出現するが，眼球運動障害と四肢筋力低下は極く軽度とされた[1]．その後，世界の多くの地域から類似例が報告され，眼球運動障害や四肢筋萎縮例もあり,Barbeauの症例との異同が問題になっている[2]．我が国では，Satoyosiらが報告したOculopharyngodistal myopathyは，優性遺伝で眼球運動障害と四肢遠位部の著明な筋萎縮を伴う疾患として注目されている[3]．OPMDの遺伝子異常が解明されつつあり，眼咽頭型筋萎縮症を臨床的に整理する必要があると考えた．

## 目　的

眼咽頭型筋萎縮症を眼球運動障害を中心に臨床病理学的観点から検討する．

## 対　象

本院に入院した14例で，眼瞼下垂または，嚥下障害で初発した．

## 方　法

筋生検で組織化学染色，一部の例で電顕観察とアミロイド蛋白等を免疫染色した．眼瞼下垂・眼球運動障害を半定量的に検討(眼瞼下垂がなく正常5～開眼不可を0，両眼正常で10．眼球運動は，障害がない時5～全く動かない時0，正常なら40，30以下を眼球運動障害とした)．嚥下障害や四肢体幹の筋力低下は，日常生活動作を明らかに障害するもの．骨格筋CTは，大腿部の所見をselectivity patternとcompact atrophy patternに分けた．眼窩部のCT scan (OM lineに平行)を参照した．

## 結　果

初発年齢は，28歳から66歳(20代1例，30代2例，40代4例，50代5例，60代2例)，眼瞼下垂で発症10例，嚥下障害4例．遺伝形式は，常優疑い(父母のいずれかが同症)6例(5家系)，常劣性疑い(両親が従兄弟婚)3例(2家系)，孤発例5例．眼球運動障害は，10例存在し，常劣群に多く，眼窩部CTで外眼筋の萎縮が示された．

四肢の明らかな脱力および筋萎縮は，11例で観察され，近位優位6例，遠位優位3例，近位と遠位の差がないもの2例であった．眼球運動障害と遠位優位の筋萎縮分布が認められた例は，2例あった．

筋生検の免疫染色でアミロイド前駆蛋白が陽性例が4例の検索で2例，リン酸化タウ蛋白陽性例が4例の検索で2例認められた．

電顕は，3例の検索で全例直径15-20nmの細胞質内の封入体を確認したが，核内封入体については，さらに検討を要する．

## 考　察

今回の症例群で，French Canadian caseに臨床的に極めて近いものと，発症が若年で，外眼筋や四肢に障害が及ぶ例がみられ，遺伝的にも劣性遺伝が疑われるものも，孤発例と見なせるれいが含まれた．外眼筋麻痺や四肢筋萎縮は，French canadian caseの剖検例で程度は軽いもののみられるとしている．Tomeらは，筋生検の特徴的な核内封入体が疾患特異性が極めて高いとし，それにて診断を下した例で,外眼筋麻痺や四肢筋障害を容認している[5]．

OPMD及び類似例で rimmed vacuoleは，出現頻度が低く，核内封入体がより疾患特異性が高いと考えられているため,診断的特異性や病的意義が少ないとされている．しかし，筋電図で，安静時の脱神経電位がみられる例が多く，随意運動時高振幅で干渉に乏しい放電様式みられることがあること，さらに筋生検で小角化線維がみられる頻度が高いことは，封入体筋炎やrimmed vacuoleを伴う

* 東京都立神経病院神経内科

遠位型ミオパチーと共通の筋障害パターンの存在を示唆する．我々の検索でアミロイド前駆蛋白とリン酸化タウ蛋白が免疫組織学的に陽性であったことは，封入体筋炎と共通のrimmed vacuole形成課程が存在することを指示する．

現在，核内封入体の構成成分や筋障害発現機構との関連は明らかになっていない．里吉らの症例では，8.5nmの核内封入体がみられるとされ，これがOPMDに果たして特異的なのか極めて興味が持たれる．今後，遺伝子異常と核内封入体の関連，さらに今回提示したような類似病態例の解明が待たれる．

## 文　献


1) Barbeau A. : Ocular myopathy in French Canada (abstrct). Proceedings of the 8th International Congress of Neurology, Vienna, September 1965, Vol. II : 257-259.
2) Peterman AF, Lillington GA, and Jamplis RW : Progressive muscular dystrophy with ptosis and dysphagia. Arch Neurol 10 : 33-41, 1964.
3) Satoyoshi E and Kinoshita M : Oculopharyngodistal Myopathy. Arch Neurol 34 : 89-92, 1977.
4) Brian WL and Daniel PP : Oculopharyngeal muscular dystrophy; An autopsied case from French-Canadian Kindred. J Neurol Scienc 53 : 145-158,1982.
5) Tome FMS and Fardeau M : Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. Acta Neuropathol 49 : 85-87, 1980.

# Ⅶ．筋強直性ジストロフィー(DM)

# ミオトニンキナーゼの生理機能に関する研究

石　浦　章　一*

## はじめに

筋強直性ジストロフィー(DM)の責任遺伝子ミオトニンキナーゼ(MtPK)には，その3'非翻訳領域にCTGリピートが存在し，その伸長とDM症状との間に相関があると考えられているが，正確な発症機構については未知のままである．3年間の本研究により，蛋白質としてのMtPKの性状，局在などを明らかにした．また,MtPK過剰発現細胞で新しく発現が強化される新規遺伝子DMRP(DM-related protein)の同定や，塩素チャネルへの影響についての生理学的知見を得ることに成功した.本年度は,人工的にCTGリピートを増幅させる手法を開発し,CTG140を含むMtPK cDNAを安定形質発現する筋芽細胞株C2C12を確立した．この株は，治療の開発にも有用であることが示された．以下に，3年間の研究の総括をする．

### 1. MtPKの精製

私たちは，ラットを用いてMtPKの精製に世界で初めて成功した．筋小胞体画分から，各種のクロマトグラフィーによって，分子量7万のMtPKを精製した．MtPKにはC末端が異なる2つのアイソフォームの存在がcDNAの構造から指摘されていたが，それぞれに応じたペプチドLTAVWRRPGAARAP(RAP型)とSGAAQEPPALPEP(PEP型)に対するウサギポリクローン抗体を作製し検討したところ，RAP型が大半を占める(筋小胞体1mg当たり0.54mg)ことが明らかになった．

### 2. MtPKの生理作用

MtPKの生理作用を明らかにする目的でMtPKcDNAをバキュロウイルスに発現させ，自己リン酸化活性を検討した結果，確かに活性を持つことが明らかになった．MtPKcDNAを過剰発現させたC2C12細胞では，塩素チャネルの開口確率が増加した．

次に， MtPK(CTG5)過剰発現株とベクターのみを導入した株を用いてディファレンシャル・ディスプレイを行い，ノーザン解析で顕著に発現が上昇している遺伝子を探索した．その結果，フェリチン重鎖と新規の遺伝子DM-related protein(DMRP) の発現が上昇することを発見した．マウスとヒトに，DMRPに相同な遺伝子が存在することも確認した．ノーザンブロットによって，MtPK発現が少ないDM患者筋肉では，DMRPの発現が有意に少ないことが明らかになった．

### 3. CTGリピートの人工的増加

現在まで，CTGリピートが100を越えると，PCRがうまくいかない，大腸菌のトランスフォーメーションがうまくいかない，などの問題が出てくるために，長いリピートを持つ細胞株の確立が容易ではなかった．私たちは，PCRをうまく応用することによって，試験管内でCTGリピートを増加させることに成功し，現在，CTG190まで伸長させることができた．このPCRによる伸長には奇妙な法則があり，リピートが20単位で伸びることが明らかになっている．これはCTG20を単位とする高次構造が存在することを示唆するものであった．

### 4. 長いCTGリピートを持つ安定形質発現細胞の取得

3の手法を応用して，マウス筋芽細胞株C2C12に長いCTGリピートを持つMtPK cDNAを導入した．現在，CTG数が0,5,46,60,140,160の株が得られている．

特に，リピートが長いcDNAを導入した株では，血清除去後の筋分化が遅れることがわかった．また，酸化ストレス(重金属)を与えたところ，リピート数が伸びるに従ってアポトーシスすることが判明した．水銀などの重金属を投与すると，細胞内の活性酸素の量が増大した．このアポトーシスは，Nアセチルシステインや可溶性ビタミンDによって回避することができた．

### 5. CUGリピート結合蛋白質の同定

MtPK遺伝子は，エクソン1がテロメア側に，CTGリピートを含むエクソン15がセントロメア側に配置している．MtPKの3'末端の停止コドンより外側の非翻訳領域に存在するCTGリピートは確かに転写されることが確認されており，MtPKmRNAの3'側にあってCUGリピートとなっている．

私たちは一重鎖のCUGリピートが翻訳レベルで影響を与えているのではないかと考え，CUG結合蛋白質(CUG-BP)のクローニングを行った．その結果，ヒトcDNAライブラリーより2種類のCUG-BPの存在を確認した．酵母three-hybrid法を用いてCUG-BPの特異性を検討した結果，CUG-BPは，CUGリピートだけではなく，UGリピートにも結合することが明らかになった．

## おわりに

DMがなぜ優性遺伝するかについては，現在にところ確かな理論は得られていない．いったん転写されたCTG/GACリピートがMtPKmRNAにのみCUGリピートとして存在するため，gain of functionの考え方を優先すればこのCUGリピートが何かを行っているはずである．第一

* 東京大学大学院総合文化研究科

の可能性が翻訳阻害で，DM患者でのMtPK蛋白質の減少が確かに報告されている．しかしながらMtPK mRNA中のCUGリピートがTF-IIDやアンドロゲン受容体など他の遺伝子中のCAGリピートと相補的に結合して，翻訳に影響を与える場合もある．この3年間の研究により，CTG/GACリピート，CUG-BP，DMRPなど，役者がそろった感がある．DMの病態は，今後数年の間に明らかになるであろう．

## 文　献


1) Koike H, Saitoh N, Sasagawa N, Watanabe T, Shimokawa M, Sorimachi H, Ishiura S and Suzuki K : Identification and purification of myotonin protein kinase (MtPK) from rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Biomed. Res. 19 : 93-99, 1998.

2) Saitoh N, Usuki F, Sasagawa N, Koike H, Sorimachi H, Yabe I, Ishiura S and Suzuki K : Myotonin protein kinase (MtPK) affects the chloride permeability of C2C12 myogenic cells. Biomed. Res. 19 : 191-198, 1998.

3) Suzuki A, Sugiyama Y, Hayashi Y, Nyu-i N, Yoshida M, Nonaka I, Ishiura S, Arahata K and Ohno S : MKBP, a novel member of the small heat shock protein family, binds and activates the myotonic dystrophy kinase. J. Cell Biol. 140 : 1113-1124, 1998.

4) Kameda N, Ueda H, Ohno S, Shimokawa M, Usuki F, Ishiura S and Kobayashi T : Developmental regulation of myotonic dystrophy protein kinase in human muscle cells in vitro. Neuroscience 85 : 311-322, 1998.

5) Ueda H, Kameda N, Baba T, Terada N, Shimokawa M, Yamamoto M, Ishiura S, Kobayashi T and Ohno S : Immunolocalization of myotonic dystrophy protein kinase in corbular and junctional sarcoplasmic reticulum of human cardiac muscle. Histochem. J. 30 : 245-251

6) Usuki F and Ishiura S : Expanded CTG repeats in myotonin protein kinase increase susceptibility to oxidative stress. NeuroReport 9 : 2291-2296, 1998.

# 筋強直性ジストロフィーの分子病態発症機構に関する研究

小 林 高 義*

研究協力者　下 川 雅 丈*　亀 田 典 佳*　山 本 雅 彦*
田 中 宏 明*　水 澤 英 洋*　植 田 秀 穂**
大 野 伸 一**　笹 川 昇***　反 町 洋 之***
石 浦 章 一***　鈴 木 紘 一***

**要　旨**　我々は筋強直性ジストロフィー(DM)の分子病態発症機構を明らかにするために(1)DMの原因遺伝子蛋白と考えられているDM protein kinase(DMPK)のポリクローナル抗体を作製し，この抗体が，full lengthのDMPKを認識すること．成熟した骨格筋では，従来の報告にある神経筋接合部，筋紡錘のみでなく，骨格筋のtype I筋線維に強く局在することを明らかにし，更に免疫組織化学的，免疫電顕的に筋小胞体(SR)のterminal cisternaeに局在することを初めて明らかにした(Shimokawa et al., 1997 ; Kobayashi et al., 1997). また，心筋では，corbular及びjunctional SRに局在することを免疫組織化学的，免疫電顕的に初めて明らかにした(Ueda et al., 1998). (2)DM骨格筋において，Western blotによる検討でＤＭＰＫの発現は低下し，形態学的にはDMPKはDM筋おいてもSRに局在するが，DMPK陽性の筋小胞体は筋病変の初期から変化すること．更に古典的なDM筋病理上，DM筋の特徴的変化と考えられているcentral nuclei, nuclear chains, sarcoplasmic mass, type I atrophyはいずれもDMPK陽性筋線維に多く存在することを明らかにし，DM筋変性の基本はDMPKの機能異常によるものであることを初めて明らかにした(Ueda et al, 1999). (4)更に，ヒト骨格筋ーラット脊髄併置培養系を使用して，ヒト骨格筋の発達段階におけるDMPK mRNAの変化及びDMPKの局在の変化に関して，RT-PCR法，Western blot法及び免疫組織学的，電顕的検討を行い，神経支配後一過性にDMPKmRNAが減少すること．DMPKは神経支配によって細胞内の局在を変えSRに限局していくことを初めて明らかにした(Kameda et al., 1998).

## 文　献

1) Shimokawa M, Ishiura S, Kameda N, Yamamoto M, Sasagawa N, Saitoh N, Sorimachi H, Ueda H, Ohno S, Suzuki K and Kobayashi T : Novel isoform of myotonin protein kinase Gene product of myotonic dystrophy is localized in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Am J Pathol 150 : 1285-1295, 1997.

2) Kobayashi T, Shimokawa M, Kameda N, Yamamoto M, Tanaka H, Mizusawa H, Ishiura S, Ueda H and Ohno S : Myotonic dystrophy protein kinase is a sarcoplasmic reticulum protein specifically localized in type I muscle fibers without colocalization of SERCA II ATPase. Basic and Applied Myology 7 (5) : 311-316, 1997.

3) Ueda H, Kameda N, Baba T, Terada N, Shimokawa M, Yamamoto M, Ishiura S, Kobayashi T and Ohno S : Immunlocalization of myotonic dystrophy protein kinase in corbular and junctional sarcoplasmic reticulum of human cardiac muscle. Histochem J 30 (4) : 245-251, 1998.

4) Kameda N, Ueda H, Ohno S, Shimokawa M, Usuki F, Ishiura S and Kobayashi T : Developmental regulation of myotonic dystrophy proetin kinase in human muscle cells in vitro. Neuroscience 85 (1) : 311-322, 1998.

5) Ueda H, Shimokawa M, Yamamoto M, Kameda N, Mizusawa H, Baba T, Terada N, Fujii Y, Ohno S, Ishiura S, and Kobayashi T: Decreased expression of myotonic dystrophy protein kinase and disorganization of sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle of myotonic dystrophy. J Neurol Sci 162 : 38-50, 1999.

* 東京医科歯科大学医学部神経内科
** 山梨医科大学第1解剖学教室
*** 東京大学分子細胞生物学研究所生体超高分子分野

# Myotonin protein kinaseの3'非翻訳領域に存在するCTGリピートの遺伝子発現に及ぼす影響

吉 良 潤 一*

研究協力者 古 谷 博 和* 長 野 祐 久* 山 田 猛*
大 野 みずき** 佐々木 裕 之** 林 健 志**

## はじめに

筋緊張性ジストロフィー(DM)はmyotonin protein kinase (DMPK)遺伝子の3'非翻訳領域にあるCTGリピートの延長により生じるリピート病であるが，DMの発症機序に関しては未だ不明である．DMPK遺伝子の5'上流にはgene 59, 3'下流にはDM associated homeodomain protein(DMAHP)遺伝子が近接して存在しており，CTGリピートの異常延長はこれらの遺伝子の発現を増加させる，影響しない，減少させるという様々な報告があり，意見の一致をみていない[1)-4)]．臨床的にDMは全身性の疾患で，DMPK遺伝子のみならず隣接遺伝子の発現異常が病態に関与している可能性も考えられる．我々は，CTGリピートの遺伝子発現に及ぼす影響について，リポーター遺伝子の3'非翻訳領域にCTGリピートを挿入した発現ベクターを作製し，CTGリピートの延長が強力に5'上流のリポーター遺伝子の発現を抑制することを明らかにした．また，fluorescence in situ hybridization(FISH)法によりDM細胞におけるDMPK, DMAHP遺伝子の発現変化を単一核レベルで明らかにした．

## 方 法

### 1) CTGリピートを含むリポーター遺伝子の構築と発現

リポーター遺伝子としてルシフェラーゼ(LUC)とリソソーム酵素のgalactosylceramidase(GALC)を用いた．135回CTGリピートを有するDM患者のゲノムDNAからリピートを含む領域(約500bp)をPCR法で増幅して，プラスミドpUC19にサブクローニングした．CTGリピート部分を制限酵素で切り出し，LUCの発現ベクターpGL-LUC, GALCの発現ベクターpCAGGS-GALCの3'非翻訳領域に挿入した．シーケンスによりリピートの方向とリピート数を確認した．発現ベクターをlipofectamineを用いて，COS-1，グリオーマ細胞(U251)，筋芽細胞(L6) に導入して，LUC活性とGALC活性を測定した．

### 2) 培養細胞を用いたDMPKとDMAHPのRNA-FISH解析

細胞はDM患者および正常コントロール由来の線維芽細胞，不死化線維芽細胞，筋芽細胞を各1例ずつ，PHA刺激末梢血リンパ球を2例ずつ使用した．

線維芽細胞と筋芽細胞はトリプシン処理により細胞を回収し，メタノール・酢酸液により前固定と後固定を行い，核標本を作成した．cDNAプローブは，DMPKは第14イントロンからCTGリピートを含む第15エキソン部分を，DMAHPは開始コドンの下流部分のエキソンからイントロン部分を，ビオチンあるいはジゴキシンでランダムプライムラベルしたものを使用した．また，異常伸長CTGリピートを検出するために，合成オリゴCAG(30mer)をジゴキシンで末端ラベルしたものを使用した．cDNAは最終濃度10ng/μl，オリゴDNAは10pmol/μlになるようにhybrimix(35%formamide,2×SSC)を調整した．RNA-FISHは通常の方法に従って行い，未変性標本に対して熱変性処理した1本鎖DNAを37℃，2時間ハイブリダイズさせ，2XSSCで3分間2回，0.5%TX-100/PBSで3分間1回洗浄した．3%BSA/0.1% TX-100/4XSSC液でブロッキングし，avidin-rhodamin，avidin-FITCあるいはFITC標識抗ジゴキシン抗体を反応させ，蛍光顕微鏡にて観察した．

## 結 果

### 1) CTGリピートを含むリポーター遺伝子の構築と発現

サブクローニングにより，リピート部分はしばしば短縮され，LUCでは85回および135回のCTG，CAGリピート，GALCでは58回のCTG，CAGリピートを含むクローンが得られた．細胞の種類によらず，LUCではCTGリピートの方がCAGリピートよりもLUC活性の発現を抑制した(図1A)．GALCでもCTGリピートにより活性の発現が明らかに抑制された(図1B)．

### 2) 培養細胞におけるDMPKとDMAHP転写産物のRNA-FISH解析

CAGプローブのシグナルは正常線維芽細胞では検出されず，DM線維芽細胞ではCAGプローブのシグナルが多数のスポットとして検出され，異常伸長CUGリピートを含むRNAのみを検出することが確認された．したがってCAGシグナルとDMPKあるいはDMAHPシグナルの関係はDM細胞のみで評価した．DMPKあるいはDMAHP cDNAプローブのシグナルは1ないし2領域にみられ,CAGプローブのシグナルと重なるものと重ならないものがみられた．

* 九州大学医学部脳神経病研究施設内科部門
** 九州大学遺伝情報実験施設

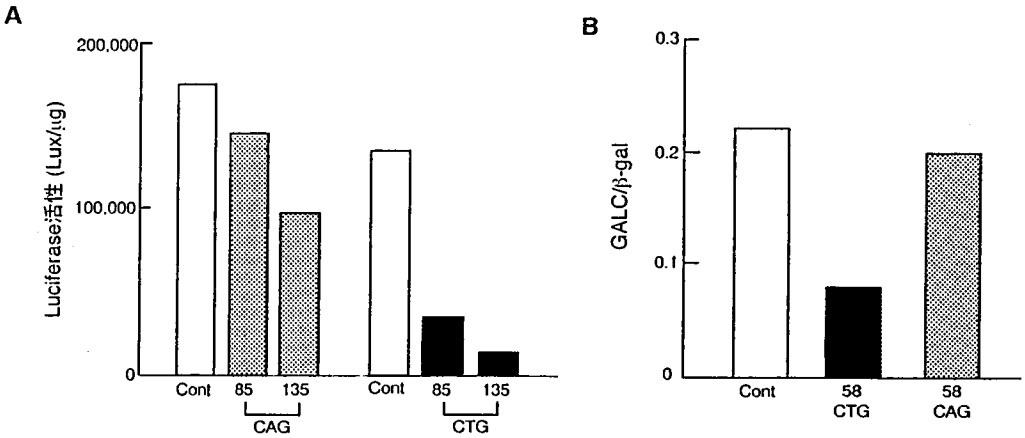



図1　リピートを含むリポーター遺伝子の発現
A：筋芽細胞L6とルシフェラーゼリポーター
B：COS-1細胞とgalactocerebrosidaseリポーター．リポーター遺伝子の発現をβ-galactosidaseにて補正．

DMPKとDMAHPのシグナルは，正常線維芽細胞では異なる領域あるいは同一領域にみられた．DM線維芽細胞では，両方のシグナルが同一核内で1～数スポット検出され，それらの分布は一致していることが多かった．正常筋芽細胞ではどちらか一方のシグナルだけが一つの核内で検出され，DM筋芽細胞では両方のシグナルが同一核内で検出されることが多かった．

正常リンパ球ではDMPKの発現は低かったが，DMAHPは20～30%の核で1個のスポット状シグナルとして検出された．DMリンパ球ではDMPKの発現はやはり低かったが，DMAHPは60～80%の核でシグナルが検出され，30～50%で2個のスポットが検出された．

## 考　察

リピートの存在とその方向性により遺伝子の発現が影響を受け，CTGリピートでリピート数が大きくなるほど遺伝子発現の抑制効果が強くなることが示された．また，その抑制効果は遺伝子の種類にはよらなかった．これまでに短いCTGリピートで遺伝子発現の抑制効果を示した報告[5]はあるが，DMが発症するほどのCTGリピート数での証明は初めてである．その機序については不明な点が多いが，異常伸長リピートをもつmRNAは核内にとどまって核外に輸送されないため，発現が低下するのではないかという考え方が提唱されている[6]．

本研究では，DMPKとDMAHPの遺伝子由来の転写産物を単一核内で同時に検出することにより，両者の分布を比較することが可能であった．DMAHPの発現が筋芽細胞では線維芽細胞より少なかった以外は，RNA-FISH上のDMPKとDMAHPの発現パターンは両細胞で類似していた．DM細胞ではCAGとDMAHPシグナルが重なること，およびDMAHPシグナルは二つの領域にみられる場合があることから，DMAHPは変異アリルからも転写されていると考えられた．CAGのシグナルの方がDMPKのシグナルより多くみられシグナルの重ならないものが多いことから，CAGプローブはDMPK mRNA以外にも分解されたCUG RNA断片を認識していると考えられた．正常細胞ではDMAHPのシグナルは1領域にみられることが多く，DMAHP遺伝子は一方のアレルからのみ発現していることが多いと考えられた．DM細胞ではDMAHPのシグナルが複数みられることから，DMAHP遺伝子が両方のアレルから発現している可能性が考えられた．また，DMPKのシグナルとよく重なることから，DMAHP転写産物がDMPK転写産物と一緒に核内にスタッグしている可能性もある．

リンパ球ではDMPKのシグナルは検出されなかったが，核1個あたりのDMAHPのシグナル数はコントロールに比べてDMで多く，CTGリピートの異常伸長がDMAHPの発現を促進している可能性が考えられた．これは筋芽細胞ではCTGリピートの異常伸長によりDMAHPの発現が抑制されているという報告[3),4)]とは異なるが，単一核レベルと核・細胞質を一緒に分析するという実験系の違い，あるいは細胞の種類が異なるためかもしれない．

## 文　献

1) Sabouri LA, Mahadevan MS, Narang M, et al : Effect of the myotonic dystrophy (DM) mutation on mRNA levels of the DM gene. Nature Genet 4 : 233-238, 1993.
2) Hamshere MG, Newman EE, Alwazzan M, et al : Transcriptional abnormality in myotonic dystrophy affects DMPK but not neighboring genes. Proc Natl Acad Sci USA 94 : 7394-7399, 1997.
3) Klesert TR, Otten AD, Bird TD, et al : Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. Nature Genet 16 : 402-406, 1997.
4) Thornton CA, Wymer JP, Simmons Z, et al : Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of

the flanking DMAHP gene. Nature Genet 16 : 407-409, 1997.

5) Sasagawa N, Saitoh N, Shimokawa M, et al : Effect of artificial (CTG) repeat expansion on the expression of myotonin protein kinase (MtPK) in COS-1 cells. Biochem Biophys Acta 1315 : 112-116, 1996.

6) Davis BM, McCurrach ME, Taneja KL, et al : Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. Proc Natl Acad Sci USA 94 : 7388-7393, 1997.

# Myotonic dystrophyにおけるCTG repeatの周辺遺伝子発現に与える効果の検討

永　松　正　明*

研究協力者　犬　飼　　晃*　久　留　　聡*　梁　　亦　鄧*
高　野　明　美*　祖父江　　元*

## 目　的

Myotonic dystrophy(DM)の遺伝子異常として，MTPK遺伝子の3'-UTRのCTG repeatの延長が同定されてはいるものの[1]，いまだその異常が疾患を惹起する機構は明らかにされていない．またDMはmultisystemに障害が及ぶ疾患として知られており[2]，単にCTG repeatがMTPK遺伝子の発現だけに影響をおよぼすものとは考えがたい．今回は，CTG repeatの延長が近接の遺伝子発現レベルに影響を及ぼすか否かを検討してみた．

## 対　象

DM 6例，正常対象者(NC) 6例の生検筋組織より抽出したDNA&RNA.

## 方　法

①DM 6例のDNA各5μgを制限酵素EcoRI, BglIIで消化し，PFGで分離し，膜に転写後，$^{32}$Pでラベルしたp5B1.4 probeでhybridizationを行いCTG expansionを確認した．

②筋組織よりtotal RNAを抽出し，DMPK, DMAHP, β-actinのprimerを用いてcompetitive RT-PCR[3]を行い，そのRNA量を定量した．

各々のPCR fragmentをpGEM-T Easy vectorにsubcloningし，その配列の中に無関係な83bpのDNAを挿入し，SP6 or T7 RNA polymeraseでin vitro transcriptionを行いcRNAを作製しcompetitorとした．このcRNAを定量し，serial dilutionを行い，sample RNAに加え，その混合液をtemplateとしたRT-PCR後，反応物を2%アガロースゲルで分離，エチジウムブロマイド染色し，各bandの濃さをNIH imageで読取ってその比よりRNA量を定量した．

## 結　果

①6例すべてのDNAで非常にexpandしたDMPK alleleが観察された．Repeat 数は4000～4800と計算された．

②各mRNA量(attomoles/0.2μg total RNA)は，DMPK: DM 1.0267±0.4801, NC 0.6970±0.5104(p=0.3367)，DMAHP: DM0.1538±0.1129, NC 1.1834±1.0386(p=0.0250)，またその内部スタンダードとの比は，DMPK/β-actin：DM0.0106 ± 0.0147, NC0.0030 ± 0.0023(p = 0.1495)，DMAHP/β-actin：DM0.0016±0.0023,NC0.0048±0.0032(p=0.0374)

## 考　察

今回の検討では，CTG repeatの延長はすくなくともその3'に近接するDMAHP遺伝子の発現に影響をあたえている(発現低下)ことが示された．すなわちCTG repeatはDMPK以外の遺伝子に影響をあたえmultisystemな疾患を形成していると思われる．その機序が，DNA or RNAのconformational changeによるものか，結合蛋白の影響によるものかは不明である．

## 結　論

CTG repeatの延長は，周辺遺伝子の発現に影響をおよぼしていた．

## 参考文献

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) Harper PS : Myotonic dystrophy. 2nd edn, WB Saunders, Philadelphia, 1989.
3) Clark MS and Russo AF : Tissue-specific glucocorticoid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA levels. Mol Brain Res 48 : 346-354, 1997.

* 名古屋大学医学部神経内科

# 筋強直性ジストロフィー線維芽細胞，体細胞分裂における DMPK蛋白量及び(CTG)nリピート数の変化

小　林　高　義*

研究協力者　下　川　雅　丈*　水　澤　英　洋*
五十嵐　晃**　石　浦　章　一***

**要　旨**　筋強直性ジストロフィー(DM)患者，正常対象の生検筋を初代培養し線維芽細胞を分離した．これを更に分裂増殖させ，前後でDMPK遺伝子の(CTG)nリピート数およびDMPK蛋白量を各々サザン法，ウエスタン法で検討した．DM患者1例において(CTG)nリピート数の増大とDMPK蛋白量の減少を認めた．DMPK遺伝子(CTG)nリピート数は体細胞分裂により増大し，リピートの増大によりDMPK蛋白量が減少することが明らかにされた．

## はじめに

筋強直性ジストロフィー(myotonic dystrophy ; DM)は常染色体優性の遺伝性疾患で，筋強直，筋力低下，筋萎縮などの骨格筋症状のほか種々の臓器を障害し，多彩な症状を呈する全身疾患である．また，DMは成人型筋ジストロフィーの中で最も発症頻度が高いことでも重要な疾患である．DMの原因遺伝子は，1992年にクローニングされた第19染色体長腕13.3のDMプロテインキナーゼ(DMPK)遺伝子である．その3'非翻訳領域に存在する(CTG)nリピートは，正常人のリピート数が5～37回に対して，患者では50～数千回となっており，そのリピート数の伸長がDMの発症と深く関わっていると考えられている．DM家系では表現促進現象がみられるが，これは(CTG)nリピート数の増大現象と置き換えることができる．(CTG)nリピート数の増大は体細胞分裂ではなく，減数分裂時に生じると推測されているが詳細は未だ不明である．我々は体細胞分裂に伴って(CTG)nリピート数およびDMPK蛋白量が変化するか否かを検討した．

## 対象および方法

ヒト生検筋(コントロール3例，DM4例)を初代培養し，線維芽細胞を分離した．これらを更に13週以上培養し，分裂増殖させた．培養7週と13週の線維芽細胞よりDNAを抽出した．各20μgのDNAを*Bam* HIで消化し，32Pでラベルした DMPK遺伝子のプローブ(BML社製：図1)を用いてサザン法で(CTG)nリピート数の変化を検討した(*Bam* HI断片は(CTG)nリピートを含む)．また，7週と13週の線維芽細胞を膜分画と可溶性分画に分画した後，DMPKのC末端に対するポリクローナル抗体[1]を用いて，ウエスタン法により蛋白量の変化を検討した．

* 東京医科歯科大学医学部神経内科
** BML研究開発本部
*** 東京大学分子細胞生物学研究所生体超高分子研究分野

## 結　果

4例のDMの内，1例(case2)において*Bam* HI断片はmid pointで7.1kb(7週)から10kb(13週)へ増大し，体細胞分裂に伴う(CTG)nリピート数の増大が確認された．更に21週まで培養したところ，*Bam* HI断片は10.25kb(mid point)まで増大した(図2)．また，DMPK蛋白量は13週において7週との比較で著しい減少がみられた(図3)．コントロール3例及び他の3例のDM由来の線維芽細胞では7週と13週において*Bam* HI断片の大きさ及びDMPK蛋白量に変化は認められなかった．

## 考　察

従来(CTG)nリピート数の増大は減数分裂の際におこると考えられてきた．しかし，我々の検討の結果，DM患者骨格筋由来線維芽細胞では体細胞分裂においても(CTG)nリピート数の増大が起こり得ることが初めて明らかにされた．4例のDMの患者の内，リピート数の比較的少ない(約1500～2700回)case 2でのみ(CTG)nリピート数の増大が見られたのは，他の3例のリピート数が限界まで伸びていたためと考えられる．

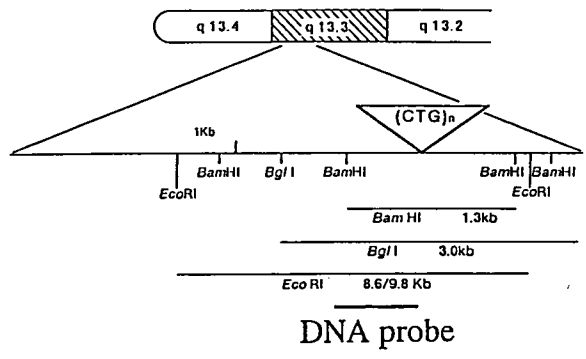



図1　DMPK遺伝子の構造及び使用したプローブの位置

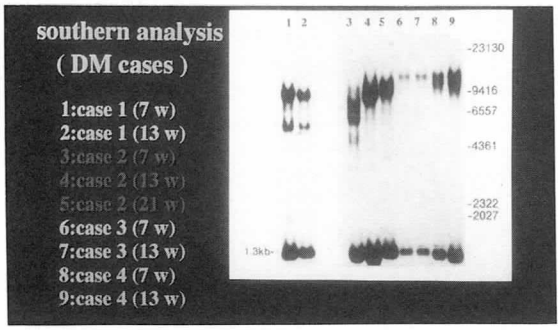



**図2** DM患者由来線維芽細胞のサザン法による検討

| | Bam HI fragment |
|---|---|
| lane 1: case 1( 7 weeks) | 1.3kb and 10.5kb |
| lane 2: case 1(13weeks) | 1.3kb and 10.5kb |
| lane 3: case 2( 7 weeks) | 1.3kb and 5.7-8.5kb |
| lane 4: case 2(13weeks) | 1.3kb and 8.5-11.5kb |
| lane 5: case 2(21weeks) | 1.3kb and 9.0-11.5kb |
| lane 6: case 3( 7 weeks) | 1.3kb and 13kb |
| lane 7: case 3(13weeks) | 1.3kb and 13kb |
| lane 8: case 4( 7 weeks) | 1.3kb and 13.5kb |
| lane 9: case 4(13weeks) | 1.3kb and 13.5kb |

一方，DM患者筋におけるDMPK蛋白量は減少しているとの見解が主流であるが，(CTG)nリピート数の増大とDMPK蛋白量の減少の関係は明らかでなかった．今回の結果から(CTG)nリピート数の増大が直接DMPK蛋白量の減少につながることが明らかとなった．現在，DMの病態にはDMPK遺伝子の他にDMAHP遺伝子などの関与が指摘されている．我々の系は今後DM病態解明のモデルとなり得ると考えられる．

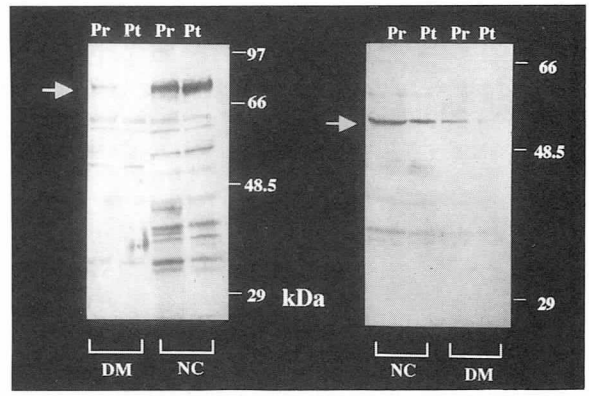



**図3** 線維芽細胞のウエスタン法による検討
left panel：membrane fraction
right panel：soluble fraction
Pr：7 weeks　Pt：13 weeks
DM：case 2 in **図2**
NC：normal control
Arrow：DMPK.Each lane includes equal protein amount of myosin heavy chain.

## 文　献

1) Shimokawa M, Ishiura S, Kameda N, et al : Novel isoform of myotonic protein kinase Gene product of myotonic dystrophy is localized in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Am J Pathol 150 : 1285-1295, 1997.

# 筋緊張性ジストロフィー(DM)におけるDMPK転写産物の細胞内動態に関する分子細胞遺伝学的研究

斎　藤　深美子*

## 緒　言

Myotonic dystrophy(DM)は常染色体優性の疾患であるが，3塩基反復配列の異常伸長という新しいタイプの突然変異によって発症する疾患(トリプレットリピート病)の一つである．この種の疾患としては，現在約10種類同定されているが，リピートの伸長する部位は疾患により異なる．DMの場合は，protein kinaseの一種であるDMPK(DM kinase)の3'側非翻訳領域で，CTGリピートが異常伸長している．ハンチントン舞踏病など，翻訳領域でリピートが異常伸長している疾患の場合は，それに起因する異常蛋白の産生で疾患の発症が説明されている．しかし，非翻訳領域での異常の場合は，本来，スプライシングされて蛋白に翻訳されない部位での異常であるから，蛋白レベルの異常では説明できない．転写時あるいは転写後の異常(つまりRNAレベルでの異常)が想定されるが，mRNAの発現量に関しては，正常細胞と比較して増大あるいは減少しているという相反する報告[1),2),3),4)]がなされており，発症機構の詳細はまだ不明である．

本研究では，RNAレベルでの異常の検索に焦点を当て，RNAの転写後の核内動態に関して検索することを目的として，まず，リピートのオリゴヌクレオチドプローブを用いたin situ hybridization(ISH)法を行い，異常なリピートを有するDMPK 遺伝子転写産物の細胞核内での局在を調べることにした．次に，リピートシグナルだけでなく，2種類の転写産物(pre-mRNA，mRNA)の局在をも併せて検討を行うため，各種RNAプローブ(アンチセンス鎖およびセンス鎖)を作製し，ISH法により分子細胞遺伝学的検索を行った．

## 方　法

検索の対象としては，DM患者8例および健常者6例に由来したリンパ芽球細胞株(LCL)を用いた．これらの細胞は，0.075MKClで処理し，アルコール・酢酸固定した後，スライド上に展開させる．これら標本に関して，以下のプローブを用いてISH法[5)]を行った．

使用した検出プローブは，以下の通りである．

・異常伸長したトリプレットリピートを検出するためのプローブ(オリゴヌクレオチドプローブ)の合成：アンチセンスプローブとしてCAGの10リピートから成るCAG-30，およびセンスプローブとしてのCTGの10回リピートから成るCTG-30を合成し，ローダミン(赤色)あるいはFITC(緑色)で標識し,逆相HPLC精製を行ったものである．

・DMPK遺伝子転写産物(pre-mRNA，mRNA)由来のRNAプローブ(アンチセンス鎖およびセンス鎖)の作製：SP6/T7プロモーターを持つ転写ベクターに，pre-mRNA(int2/Ex3およびint9/Ex10の領域の2種類)およびmRNA(Ex2/Ex3および Ex 9/Ex 10領域の2種類)に対応するテンプレートDNA(PCR産物)をサブクローニングした後，RNAポリメラーゼを用いてin vitroで転写を行い，その際に基質としてFITC-UTPを用いて転写産物をダイレクトにFITCラベルし，精製する．上記のCTG(CAG)リピート・オリゴプローブ(ローダミン標識)およびDMPK mRNAあるいはpre-mRNAに対応するRNAプローブ(FITC標識)を用いて，患者および健常人の細胞核内でのtwo-color ISH法を行った．

## 結　果

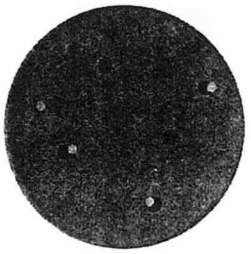
(1)のプローブを用いてISH法を行った結果，アンチセンスのシグナルは，核内の数カ所以上で明るい明確なシグナルとして検出された．一方，核DNAをdenatureした後にISH法を行った場合は，アンチセンスおよびセンスプローブのシグナルは，患者の細胞核内の一カ所にco-localizeして存在することが観察された．また，アンチセンスシグナル陽性の細胞の割合は，健常者では0～1%であるが，患者では43～93%と明らかに高い値であった．また，hybridizationの時間を経時的に変化させた場合，細胞核のアンチセンスシグナル陽性率は時間に依存して増加し，6～7時間でほぼプラトーに達した．

さらに(2)のプローブを用いてISH法を行った結果，DMPK mRNAあるいはpre-mRNAに対するアンチセンスRNAプローブは，それぞれ核内にFITC(黄緑色)のシグナルとして観察された．そして，異常なalleleから由来したRNAのシグナルは正常なそれと比較して相対的に多く，その傾向はpre-mRNAよりもmRNAでの方がさらに増大していた(図1)．

## 考　察

CTGリピートの異常伸張を含むMTPK遺伝子転写産物は，アンチセンスプローブにより，患者のリンパ芽球細胞の核内で明るいスポットとして検出され，健常人の細胞核ではこのようなスポットは観察されなかった．3塩基反復配列へのセンスおよびアンチセンスのプローブを同時に用いた実験から，アンチセンスプローブは異常伸張

* 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝学



DMPK transcript

Mutant allele 由来の transcript (M)

Normal allele 由来の transcript (N)

| | N | M |
|---|---|---|
| pre-mRNA | 1 | 1.6 |
| mRNA | 1 | 4.2 |

**図1** DM細胞核内でのallele-specific transcriptの検出

した遺伝子とその転写産物の両方を示していると考えられる．つまり，患者の細胞核内に明るく散在するアンチセンスシグナルの中で，1つのスポットのみ遺伝子DNAとRNAを含み，他のシグナルはpost-transcriptional RNAを示していることになる．この患者細胞の核内で観察された転写産物の集積性は，RNAの異常なプロセシングを示している可能性がある．

そこで，転写産物の核内集積性と患者の病態との関連性を考えるためにもさらに検討必要と思われ，(2)のCTG(CAG)リピート・オリゴプローブ(ローダミン標識)およびDMPK mRNAあるいはpre-mRNAに対応するRNAプローブ(FITC標識)を用いて，患者および健常人の細胞核内でのtwo-color ISH法を行った．その結果，異常なalleleから由来したRNAのシグナルは正常なそれと比較して相対的に多く，その傾向はpre-mRNAよりもmRNAでの方がさらに増大していた．つまり，DMPK転写産物のプロセシングはある程度,正常遺伝子のそれと同様に行われており，核内集積しているRNAは異常なallele由来のpre-mRNAよりもmRNAが主であることが示唆された．

以上のことから，リピート伸長を伴う異常なallele由来のDMPK遺伝子転写産物(RNA)は，転写後にほぼ正常にスプライシングを受けるが，mRNAのレベルで核内に集積するという動態異常を示すことを，分子細胞遺伝学的手法により検出することができた．

今後は，その実態を分子生物学的に検証すると共に，核内集積したmRNAの動態についてさらに検討を加え，DMの多様な病態について解明すべく分子細胞遺伝学的に解析する予定である．

尚，本研究は以下の方々との共同研究により行われたもので，ここに深謝いたします．

塚原俊文*，古城　徹*，後藤加奈子*，池内達郎**，稲澤譲治**，荒畑喜一*（* 国立精神・神経センター神経研究所，** 東京医科歯科大学・難治疾患研究所）

## 参考文献

1) Fu YH, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs RA, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman MB, Scarlato G, Fenwick RG Jr., et al : Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. Science 260 (5105) : 235-8, 1993.

2) 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 (2) : 340-8, 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 gene. Nature Genet 4 (3) : 233-8, 1993.

4) Koga R, Nakao Y, Kurano Y, Tsukahara T, Nakamura A, Ishiura S, Nonaka I and Arahata K : Decreased myotonin-protein kinase in the skeletal and cardiac muscles in myotonic dystrophy. Biochem Biophys Res Commun 202 (1) : 577-85, 1994.

5) 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.

# 筋緊張性ジストロフィーにおけるフェリチン遺伝子および関連遺伝子の発現について

中 瀬 浩 史*

研究協力者 渡 辺 知 司* 笹 川 昇** 石 浦 章 一**
尾 形 克 久*,*** 高 木 昭 夫*,****

**要 旨** 筋緊張性ジストロフィー患者組織におけるferritin，および関連遺伝子の発現について検討した．対象として患者生検筋，白血球および唾液腺腫瘍組織，正常者骨格筋および白血球を用いた．サザンブロット法によってCTGリピート長を決定した．ノザンブロット法によりFerritin (Heavy chain; FN-H, Light chain; FN-L)，Interleukin one alpha（IL1-α），Tumor necrosis factor alpha（TNF α）遺伝子の発現量を調べた．発現量とCTGリピート長との関係についても検討した．その結果，FN-H，IL1-α，TNF αの各遺伝子については，発現量の差は認められなかったが FN-L遺伝子の発現量は患者骨格筋において減少していた．また，発現量はリピート長が長くなるにつれ減少する傾向が認められた．FN-L遺伝子座はDMPK遺伝子の近傍にあり， CTGリピートがその発現に影響を及ぼしている可能性も考えられた．

## はじめに

昨年度までに，筋緊張性ジストロフィー遺伝子(DMPK遺伝子)を導入したC2C12培養筋芽細胞において，Ferritin heavy chain (FN-H)，Interleukin one alpha (IL1-α)のmRNAの発現量が変化したことを明らかにした．すなわち3'非翻訳領域にCTG repeatを5個つけたヒトDMPK遺伝子を導入した細胞ではFN-Hの発現量が増加した．repeatを46に延長すると発現が減少した[1),2),3)]．FN-HはTumor necrosis factor alpha(TNF α)やIL1-αなどによって発現が規定される[4),5)]．そこでこれらのcytokineの発現量についても検討した結果，IL1-αがFN-Hと同様の変化を示した．このことから，少なくともvitroではCTG repeatの延長がFN-Hの発現を抑制したこと，これにIL1-αが関与している可能性があることが示唆された(Watanabe T, Sasagawa N, et al. 投稿中)．今年度,筋緊張性ジストロフィー患者組織におけるferritinおよび関連遺伝子の発現について検討した．

## 対象・方法

**対象**：筋緊張性ジストロフィー患者生検骨格筋5例，白血球6例，唾液腺腫瘍組織1例．対照として剖検骨格筋4例，生検骨格筋2例，正常白血球6例を用いた．剖検例は，すべて脳血管障害．対照生検筋は，無症候性高CK血症(組織学的にほぼ正常)である．

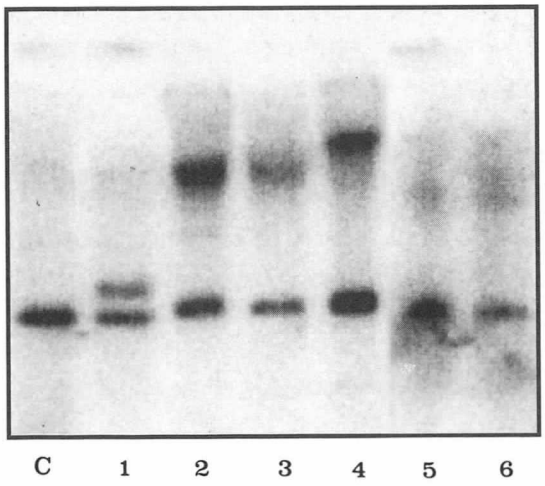
Southern Blotting：1)各組織を protein Kで処理しDNAを調製した．このうち10μgをBam H1で消化し1%アガロースゲルに電気泳動した．これをポジティブチャージナイロンフィルターにアルカリトランスファーし紫外線固定した．2)DMPK遺伝子のCTG repeatを含む3'端の317bpをPCRによって増幅しサブクローニングした．これを制限酵素で切り出し[32]Pでラベルしてプローブとして用いた．3)バンドはBas2000イメージアナライザー(FUJIX)で可視化した．

Nothern Blotting：1)AGPC法でtotal RNAを調製した．Dnase1で処理した後，10μgを変性ゲルに泳動した．これをポジティブチャージナイロンフィルターにトランスファーし紫外線固定した．2)正常白血球から調製したtotal RNAを用いてcDNA first strandを調製した．これをtempleteとして FN-H，FN-L，IL1-α，TNF αのそれぞれについてその配列の一部をPCRによって増幅した．得られたPCR産物をサブクローニングし，これを制限酵素で切り出し[32]Pでラベルしてプローブとして用いた．FN-H，FN-Lについては骨格筋及び唾液腺腫瘍での発現量を調べた．IL1-α，TNF αについては骨格筋ではシグナルがきわめて微弱であるため，白血球での発現量を調べた．各々の分子の発現量はG3PDHプローブで標準化した．3)バンドはBas2000イメージアナライザー(FUJIX)で可視化した．バンドの濃度をNIH imageによって測定し定量化した．

## 結 果

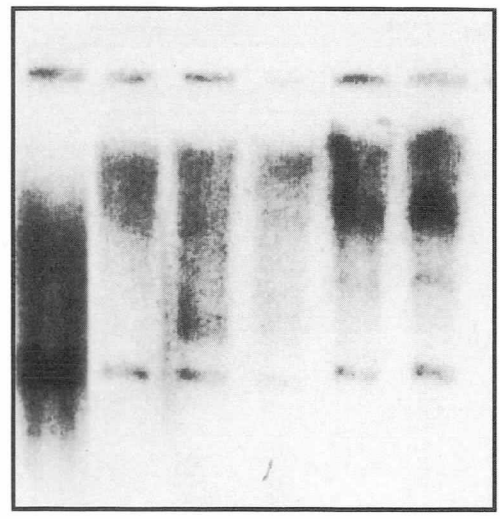
Southern Blotting：正常alleleのバンドとともに，CTG expansionを有する変異alleleのバンドが高分子域に認められた(図1A, B)．一部では，変異alleleのバンドはスメア状に認められた．DM患者では，CTG repeatのサイズは50～5000と推定された．

* 虎の門病院神経内科
** 東京大学教養学部生命・認知科学科
*** 東京大学医学部神経内科
**** 大蔵省診療所



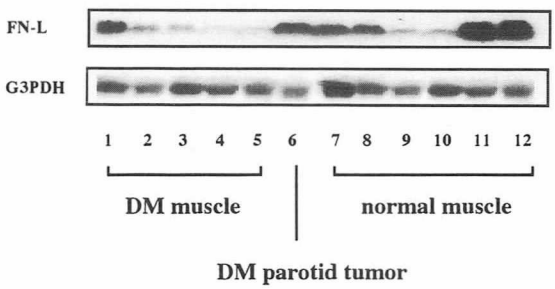

C：nomal skeletal muscle
1-5：DM biopsied muscle
6：patient 5 parotid tumor

**図1A** 骨格筋・唾液腺腫瘍におけるSouthern blottingの結果
DM患者では，正常alleleのbandとともに sizeの増大した変異alleleのbandを認める．CTG repeatのsizeは50～5000と推定された．同一患者の骨格筋と唾液腺腫瘍では後者の方がrepeatのsizeが大きい．




1-6：DM WBC

**図1B** 白血球におけるSouthern blottingの結果
骨格筋と同様だが，変異alleleのbandは一部の患者ではsmear状になっている．



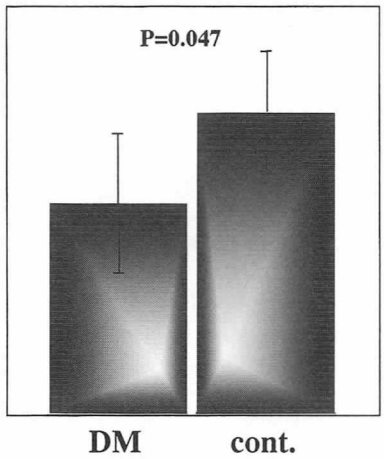




**図2** 骨格筋におけるNothern blottingの結果
DM患者では，Ferritin light chainの発現量が対照に比して減少している(P<0.05).

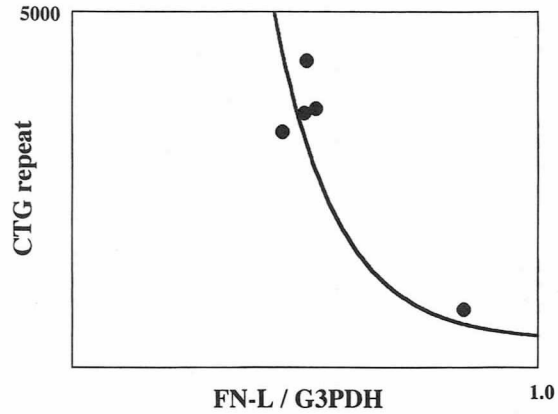



**図3** Ferritin light chainの発現量とCTG repeat sizeとの関係
患者骨格筋におけるFerritin light chainの発現量はCTG repeatのサイズが増大するにつれ減少する傾向が認められる．

Nothern Blotting：FN-Lの発現量は，DM骨格筋において対照骨格筋に比し減少していた(P＜0.05)(**図2**)．DM骨格筋における発現量はCTG repeatのサイズが増大するにつれ減少する傾向が認められた(**図3**)．患者唾液腺腫瘍においては，同患者骨格筋に比し発現が増加していたが，対照骨格筋よりは減少していた(**図4**)．FN-HはDM骨格筋において，IL1-α，TNF-αはDM白血球においてそれぞれ減少傾向が認められたが有意差はなかった．

## 考　　案

DMPK遺伝子周辺には多くの遺伝子があり[6]，CTG repeatがそれらの遺伝子の転写に影響を及ぼしている可能性が示唆されている．すなわち，repeatが延長するとnucleosomeの安定性が増し[7]，DNA高次構造に変化が生ずる可能性がある[8),9),10]．例えばCTG repeatのすぐ下流にはDMAHP遺伝子が存在し，患者ではその発現が減少しているという報告がある[11]．今回われわれは，FN-L遺伝子の発現量が患者骨格筋において減少していることを明らかにした．その発現量はリピート長が長くなるにつれ減

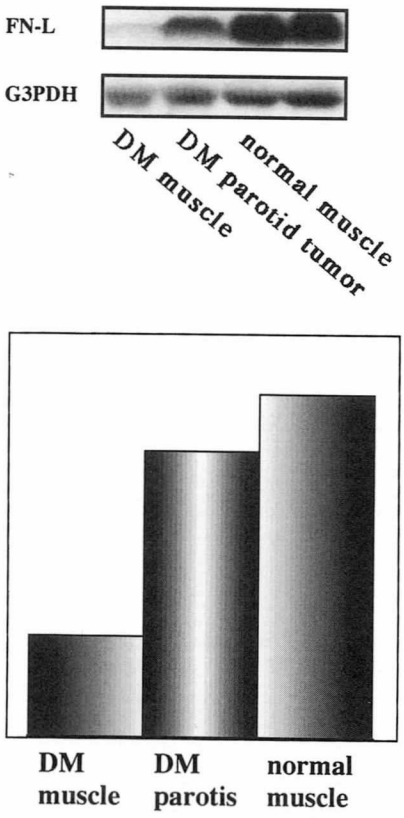



**図4** 唾液腺腫瘍におけるNothern blottingの結果
唾液腺腫瘍においては同患者骨格筋に比し発現量が増加しているが，対照骨格筋に比べると減少している．

少する傾向が認められた．FN-L遺伝子はDMPK遺伝子と同じく第19染色体長腕13.3に存在する．しかし，DMPK遺伝子との距離は約1000kb離れておりDMAHP遺伝子がDMPK遺伝子にほとんど隣接しているのとは異なる．したがって，DMPK遺伝子のCTG repeatが直接FN-L遺伝子の発現に影響を及ぼしている可能性は低いと考えられる．また，DM患者における骨格筋の分化の障害や変性にともなう二次的な発現量の減少である可能性も否定できないと思われる．一方，患者腫瘍組織では同患者の骨格筋に比し発現量が増加していたが対照骨格筋よりは減少していた．一般に腫瘍組織ではFN-L遺伝子の発現量は増加することが報告されている[12]．異臓器での比較であり慎重な解釈が必要だが，DM患者においては何らかの形でFN-L遺伝子の発現が抑制されていることが示唆される．

DMPK遺伝子の周辺にはFOS-BなどFN-Lの発現に影響を及ぼしうる遺伝子が存在する．これらの遺伝子の発現についても検討する必要があると考えられる．

## 文　献


1) Watanabe T, Sasagawa N, et al : Overexpression of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in C2C12 myogenic culture involved in the expression of ferritin heavy chain mRNA. MUSCLE NERVE suppl. 7 : S189, 1998
2) 渡辺知司，笹川昇ほか：筋緊張性ジストロフィーの細胞生物学．神経研究の進歩 41 : 471-477, 1997
3) 笹川昇，渡辺知司ほか：筋緊張性ジストロフィー(培養細胞系を用いた発症機構解明への試み)．細胞工学 16 : 1446-1452, 1997
4) Miller LL, Miller SC, et al : Iron-independent induction of ferritin H chain by tumor necrosis factor. Proc Natl Acad Sci USA 88 : 4946-4950, 1991
5) Wei V, Miller SC, et al : Interleukin 1 induces ferritin heavy chain in human muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 169 : 289-296, 1990
6) Boucher CA, Nillesen W, et al : A novel homeodomein-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)n repeat. Hum Mol Genet 4 : 1919-1925, 1995
7) Otten AD, Tapscott SJ, et al : Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. Proc Natl Acad Sci USA 92 : 5465-5469, 1995
8) Harris S, Moncrieff C, et al. Myotonic dystrophy : Will the real gene please step forward! Hum Mol Genet 4 : 1417-1423, 1996
9) Henikoff S : Dosage-dependent modification of position-effect variegation in Drosophilia. BioEssays 18 : 401-409, 1996
10) Wallrath LL and Elgin SC : Position effect variegation in Drosophilia is associated with an altered chromatin structure. Genes Dev 9 : 1263-1277, 1995
11) Thornton CA and Wymer JP : Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. Nat Genet 16 : 407-9, 1997
12) Bomford AB and Munro HN : Ferritin gene expression in health and malignancy. Pathobiology 60 : 10-8, 1992

# 筋緊張性ジストロフィーの骨格筋および培養皮膚線維芽細胞における糖鎖異常

祖父江　元*

研究協力者　高野明美*　犬飼晃*　久留聡*
梁亦鄧*　小林靖*　本田仁*
伊藤慶太**

## 目的

筋緊張性ジストロフィー(MyD)においてmyotonin protein kinase(MT-PK)の3'端非翻訳領域に存在するCTG repeatの延長が最終的にどのような生化学的変化をもたらし，MyDの発症へと結びつくかは不明である．Repeatの延長がcisやtransに転写や蛋白質への翻訳が障害されるという報告がある一方，MT-PKのRNA CUG repeatに特異的に結合するnuclear proteinの存在が報告され，chromatin構造の変化にともなう複製，転写障害が推定されている．私達はこれまでに，MyD患者の免疫グロブリンG(IgG)の糖蛋白における非還元末端のN-acetylglucosamin(GlcNAc)にβ1-4結合するgalactoseで終わる糖鎖の相対的低下(hypogalactosylation)，およびGlcNAcの非還元末端に露出する糖鎖の相対的増加，という糖鎖異常が見られることを指摘した[1]．また，同様の糖鎖の変化はMyD患者の筋組織や赤血球膜においても存在することを報告した．これらのhypogalactosylationをきたす原因の一つとしてβ1-4galactosyl transferase(Gal T)活性の低下が推定される．従ってMyD患者の筋組織におけるhypogalactosylationの程度，Gal T活性，MT-PKのCTG repeat数との関係を検討した．また骨格筋におけるlectin染色性の差異を，核について詳細に検討するとともに，糖鎖異常が遺伝子異常の結果としての生化学的変化か否か明かにする目的で，培養皮膚線維芽細胞のlectin染色性を検討した．

## 対象・方法

**レクチン組織化学**：成人発症型MyD 28例，正常対照(NC) 6例の四肢筋より採取した生検筋の凍結切片を，固定後ビオチン化succinylated wheat germ agglutinin(sWGA)と反応させ，ABC法を用い，diaminobenzidineにて発色させ，光顕で観察した．光顕画像上の筋細胞膜/基底膜と筋核の輝度をNIH imageで測定した．

**Total Gal T活性**：MyD 10例，NC 6例の凍結生検筋を可溶化し，UDP-galactose，pyridylaminated agalactosyl complexと37℃で反応させた．反応物であるpyridylaminated galactosylated complexの量を，ODSシリカカラムを用いHPLCにて測定した．

**CTG expansionの測定**：筋組織よりDNAを抽出し，EcoRI，BglIで処理し，p5B1.4 probeを用いた用いSouthern blot法で確認した．

培養皮膚線維芽細胞はMyD 8例，対照 4例．FITC-sWGA，FITC-RCA-1で染色を行うとともに，一部は固定後β-galactosidase，endo-β-galasctosidaseにて処理し染色性の変化を検討した．また，sWGAの細胞内結合部位を焦点レーザー顕微鏡で観察した．

## 結果

筋細胞膜/基底膜のsWGA染色性はMyDで31.4±10.7/256 gray scale，NCで14.7±3.0/ 256 gray scaleとMyDで有意に増加していた($p<0.001$)．MyDの筋病理変化を筋線維径の大小，中心核線維の割合，間質の線維化の程度を指標として軽度，中等度，重度の3群に分類し，病理変化の程度とsWGA染色性を検討した．sWGA 染色性は病理変化の強い例で増加していた(図1)．筋胞膜/基底膜のsWGA染色性と筋MT-PKのCTG repeat数との関係は，筋CTG repeatの長い例で筋 sWGA染色性は強い傾向が見られた(図2)．筋組織のsWGA染色で筋核はMyD群でより強く染色され，MyD群では26.8±5.0/256gray scale，NC群で18.77±8.3/256 gray scaleとMyD群で有意に増加していた(図3)．MyD群において筋核のsWGA結合性と筋MT-PKのCTG repeat数との関係を検討すると，repeat数の長い例でsWGA染色性は増強していた(図4)．GlcNAcにgalactoseが結合した糖鎖を認識するRCA-1では筋組織では細胞膜や結合識がMyD，NC群とも同様に強く染色されたが，両群とも筋核は染色されず，染色性の差は見られなかった．

筋組織におけるGal T活性は反応物であるpyridylaminated galactosylated complexの量を測定することにより得た．MyDで3.28±1.15pg/50mg protein，NCでは2.67±0.62pg/50mg proteinとMyDとNCとの間に差は見られなかった．またGal T活性と筋組織のsWGA染色性，筋MT-PKのCTG repeat数との間に有意な相関を認めなかった．

* 名古屋大学医学部神経内科
** 福井医科大学内科学第二講座

培養皮膚線維芽細胞のsWGA染色性はMyD群，対照群とも非常に淡く染色されたが，その染色性は骨格筋とは異なり，細胞膜の染色性は目立たず，核および核周辺の細胞質により強く染まる傾向があった．培養皮膚線維芽細胞のRCA-1染色はMyD群では対照群より染色性が低下していた．β-galactosidaseあるいはendo-β-galascosidase処理後にsWGA染色を行うと，共に未処理のsWGA染色に比べ染色性は増加したが，endo-β-galactosidase処理後

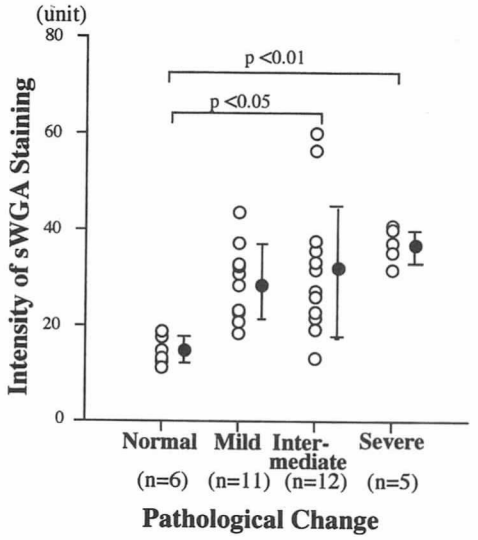



図1　筋細胞膜におけるsWGA染色性
左はNC，右3群はMyD. MyD群ではNC群よりsWGA染色性は強く，MyD群のなかでは筋病理変化の強い群でより強く染色された．

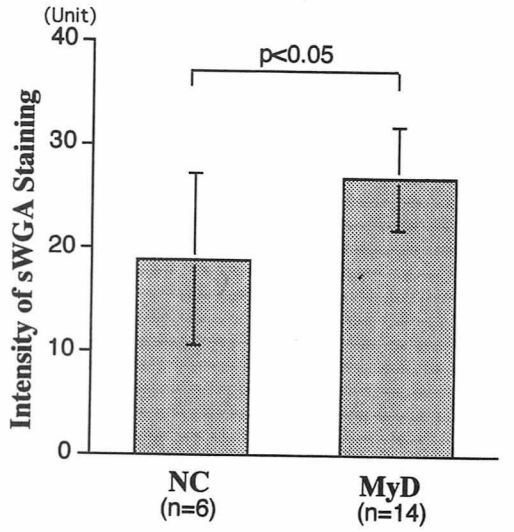



図3　筋核のsWGA染色
MyD群では有意にsWGA染色性が増加していた．

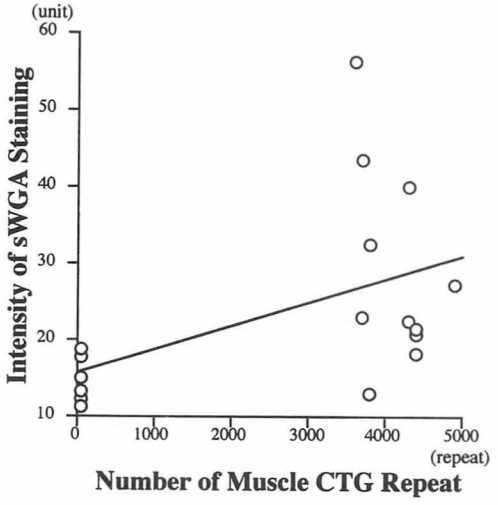



図2　筋細胞膜のsWGA染色性と筋CTG repeat
Repeat数が多い例で染色性が強い傾向が見られた．

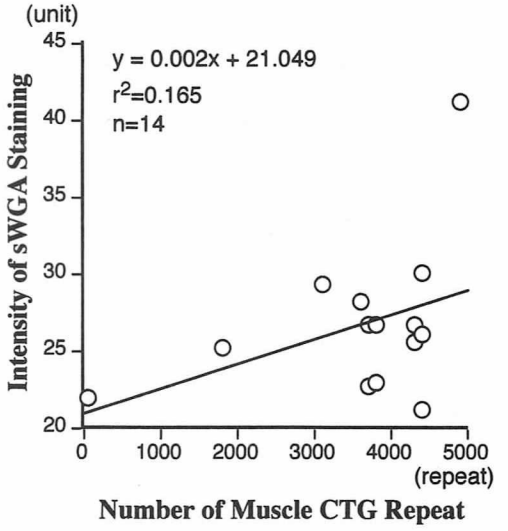



図4　筋核のsWGA染色性と筋CTG repeat数
Repeat数が多い例で染色性が強い傾向が見られた．

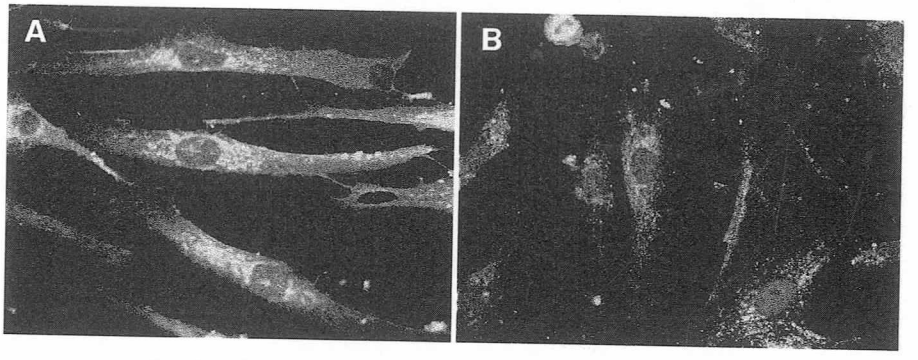



図5　共焦点レーザー顕微鏡による培養皮膚腺維芽細胞のsWGA染色
A　MyDでは核内および核周辺の細胞質が強く染色された．
B　NCでは核内，細胞質とも淡く瀰漫性に染色された．

の染色性はβ-galactosidase処理後の染色性より低下していた．この染色性の変化からsWGAが認識している糖鎖はポリラクトサミンと推定される．sWGAの細胞内結合部位を焦点レーザー顕微鏡で観察すると，対照群では核内が瀰慢性に淡く染色されるのに対し,MyD群では強く凝集して染色され,細胞内小器官がより強く染色された(図5).

## 考　　察

MyD患者の筋組織(筋胞膜/基底膜と筋核)ではsWGAによる染色性の増加，線維芽細胞ではRCA-1による染色性の低下がみられたことはともに糖鎖の非還元末端に結合するガラクトースの転移障害を示唆している．MyD患者では骨格筋細胞膜，筋核，および培養皮膚線維芽細胞において糖鎖異常が認められたことより我々が観察した糖鎖異常は，遺伝子異常の結果生じる現象である可能性が考えられる．糖蛋白質の糖鎖部分はさまざまな働きをしており，細胞表面のreceptor機能や，蛋白質を特定のsub-cellular compartmentへ輸送するtargetting signalとして働くことも知られているが，核においてはRNA polymerase transcription factorの活性や，macromoleculeのnuclear transportにも関与していると報告されている[2),3)]．MyDにおける多臓器障害は糖鎖の多様な機能の障害である可能性が考えられる．

筋組織においてhypogalactosylationが認められたにもかかわらずMyD患者において筋total Gal T活性の低下は認められなかった原因として，ゴルジ体におけるGal Tの基質であるUDP- galactoseのavailabilityの問題や，Gal Tの各isozymeの比率の問題があると考えられた．しかし，MyDの筋組織においてhypogalactosylationは存在し，その程度は筋病理変化と相関し，筋MT-PKのCTG repeat数との関連も推定されることから，MT-PKが何らかの機序で糖代謝を調整している可能性が推定される．

## 結　　論

MyDでは筋細胞膜のsWGA染色性はNCと比べ有意な増強を認め，かつその染色性は病理変化の程度と正相関し，筋MT-PKのCTG repeat数が増大しているものはsWGA染色性は強い傾向が見られた．MyDの筋核，培養皮膚線維芽細胞の核においてsWGA染色性はが増加しており，MyDでは核においても一部の糖蛋白質の糖鎖構造に変化が生じている可能性が示唆された．

筋組織のtotal Gal T活性はMyDとNCとの間で有意な差は見られず，かつ筋MT-PKのCTG repeat数との関係は明らかではなかったが，今後Gal Tの基質の問題，Gal Tのisozymeに関し検討する必要があると思われた．

MyD培養皮膚線維芽細胞においてsWGA染色性の著明な増加が認められたことより，我々の観察してきた糖鎖異常が環境因子によるものではなく，遺伝子異常の結果直接的に生じた生化学的変化であることが推定された．

## 参考文献


1) Ito K, Takahashi N, Hirayama M, et al : Abnormalities in the oligosaccharide moieties of immunoglobulin G in patients with myotonic dystrophy. Clin Biochem Nutri 14 : 60-69, 1993.
2) Jackson SP and Tjian R : O-glycation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. Cell 55 : 125-133, 1988.
3) Yoneda Y, Imamoto-Sonobe N, Yamaizumi M, et al : Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells. Exp Cell Res 173 : 586-595, 1987.

# アフリカツメガエル卵に導入したCTGおよびCAGリピート含有ルシフェラーゼ遺伝子の発現

塩　川　光一郎*

研究協力者　今　井　直　志*　深　町　博　史*
古　谷　博　和**　吉　良　潤　一**

**要　旨**　本研究では，リピート構造を3'-UTRに持つ遺伝子の発現が阻害される仕組みの解析を目指し，まず実験系を確立することを試みた．135回の繰り返し構造を持つCTGリピートおよび比較のため準備したCAGリピートを，3'-UTR内に持つルシフェラーゼ遺伝子をツメガエル卵母細胞の核に注入し4-9時間後に調べた．何れの場合にも，これらのリピートを含む遺伝子では，対照遺伝子に比べ，ルシフェラーゼ活性の発現が阻害された．ところが，アフリカツメガエル受精卵にこれらのDNAを注入し，卵割期から胞胚期(約6時間後)にかけて調べたところ，対照に比べてほとんど差がなかった．卵母細胞は，用いた実験条件では分裂することがなく，従って，核膜は実験期間中消失することはない．しかし，受精卵は活発に卵割を行うため，その核膜は約30分ごとに消失する．この違いを考慮すると，得られた結果は，リピート構造を持つ遺伝子では，転写よりも，mRNAの核から細胞質へのトランスポートが強く阻害されている可能性が高いと思われる．そこで今後は，この方向で，リピート構造を持つ遺伝子の発現阻害の機構を検討する必要があると思われる．

## はじめに

筋緊張性ジストロフィー(MyD)は，いわゆる常染色体の異常に基づく優性型の筋疾患で，CTGヌクレオチドの増加によることが知られている．MyD患者においては，ミオトニン・カイネース(MK)遺伝子の3'-非翻訳領域(3'-UTR)に50から2000個のタンデムに増殖したCTGリピートが含まれ，これが疾患の原因であると目されている．

この遺伝子は染色体19q13.2-13.3に位置し，ゲノム遺伝子構造については，既に明らかにされている(Mahadevanら，1993; Hamshere and Brook, 1996)．しかし，この遺伝子の異常(リピートの増幅)がどのようにして筋ジストロフィーを生じるかについては明らかになっていない．他方で，MyD以外でも，いわゆるリピート病については多くの研究がなされており，例えば，CGGリピート病であるFragile X-症の患者ではmRNAの5'非翻訳領域に含まれるメチル化されたCpGが増加していることがつき止められ，これが病因であると考えられている(Tsuji,1997)．また，ハンチントン病，その他ではCGGリピート部位から翻訳されて生じるポリグルタミン酸がニューロンやグリア細胞の細胞死を引き起こすことが明らかにされている(Tsuji, 1997)．我々は筋ジストロフィーの病態解明・治療法開発の一助となることを期待して，MK遺伝子mRNAの3'-UTRに存在するCTGリピートの転写調節に注目し，この研究の基礎的実験系の開発という観点から，アフリカツメガエル卵母細胞および受精卵を用いて研究を行った．

* 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻分子発生学研究室
** 九州大学医学部脳神経病研究施設神経内科

ツメガエル卵は巨大な細胞である(直径1.2mm)ため，マイクロインジェクションなどの操作が容易に行える．また，卵母細胞の場合，核と細胞質を手術によって容易に分離することができるという利点もある．そこでまず，上記の各遺伝子およびそれがつくるmRNAあるいはタンパク質が受精卵の発生，および胚の筋組織構築に及ぼす作用を調べる実験系の開発の基礎研究として，各種のプラスミド，CAT遺伝子，あるいはカエルから単離した各種遺伝子を環状または直鎖状にして，受精卵，未受精卵，および卵母細胞に注入し，その挙動を検討した．次にMK遺伝子の3'-UTRに含まれるCTGリピートを持つルシフェラーゼ遺伝子を作製し，卵母細胞および受精卵に注入し，分子細胞生物学的検討を行ない，以下の結果を得た．

## 材料と方法

リピート構造を持つ遺伝子として，MyD患者のゲノムDNAからPCRにより分離した135回のCTGリピートを3'-UTRにもつルシフェラーゼ遺伝子を作製した(図1)．これをツメガエル卵母細胞の核に注入して，ルシフェラーゼの酵素活性の発現を調べた．対照として135回のCAGリピートを持つルシフェラーゼ遺伝子を作製し，CTGリピートの結果と比較した．卵母細胞は，ツメガエルの雌の卵巣を摘出し，これをハサミで小さな塊に切り分けた後，Barthの培養液中でコラゲナーゼ処理して得た．マイクロインジェクションは，Barthの培養液中の卵母細胞の核(卵核胞)に，環状の上記プラスミドをマイクロインジェクションすることにより行った．注入した遺伝子の発現は，

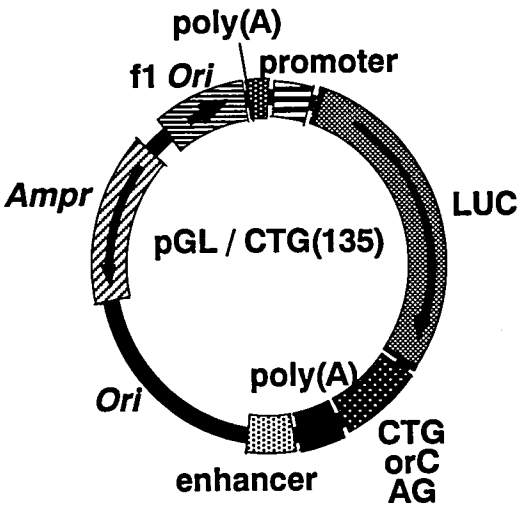



図1　ルシフェラーゼコンストラクト

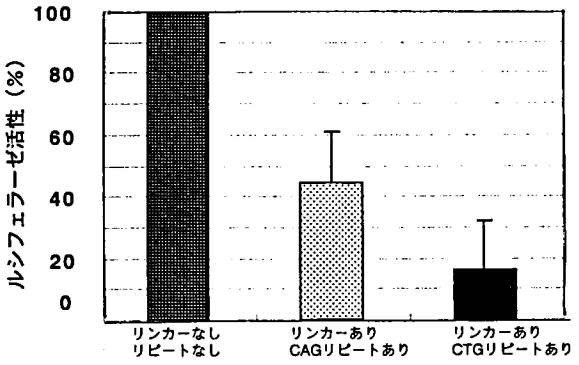



図2　卵母細胞への注入実験(1)

ルシフェラーゼ活性を測定して調べた．ツメガエルの雌に生殖腺刺激ホルモンを注入して排卵させ，未受精卵を採取して人工授精を行った卵を準備した．これらに各種プラスミドを環状DNAとして注入した(Shiokawaら，1997).

## 結　　果

### (1)卵母細胞，未受精卵および受精卵への外来性CAT DNA注入実験の成績

1～30ngの種々のCAT遺伝子を含むプラスミドDNAあるいは含まないプラスミドDNAを卵母細胞の核および未受精卵および受精卵の細胞質に注入し，その発現を調べるため，時間あるいは発生の時期を追って，CATアッセイを行ったところ，注入された外来性DNAは複製され，実際にmRNAに転写されること，この系で遺伝子プロモーターの機能解析が可能なことが明らかとなった．また，受精卵と未受精卵の細胞質に多量の外来性DNAを注入すると，核様構造が形成されることも明らかにした．更に，受精卵に注入したmRNA(アクチビンレセプター，β-ガラクトシダーゼ，およびS-アデノシルメチオニンの各mRNA)は安定に保たれ，タンパク質に翻訳され，胚体内で機能することが確認された．

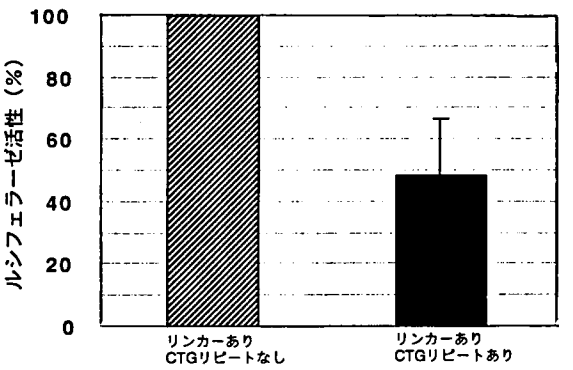



図3　卵母細胞への注入実験(2)

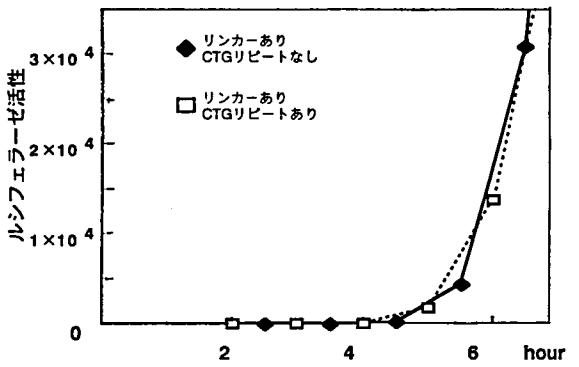



図4　初期胚への注入実験

### (2)CTGあるいはCAGリピートを含むルシフェラーゼ遺伝子の卵母細胞および受精卵への注入実験の成績

卵母細胞の核に135個のリピート構造を持つ上記2種類のルシフェラーゼ遺伝子を注入し，9時間後のルシフェラーゼ活性を調べたところ，対照に比べ，CTGリピートを持つ遺伝子を注入した場合では，対照の約20%，CAGリピートを含む遺伝子注入の場合には，約50%のルシフェラーゼ活性が見られた(図2). これらの結果は，3'-UTRにCTGリピートを含む遺伝子の場合，その発現が阻害されることを示している．次に卵母細胞を用いて，CTGを含む遺伝子の構造と発現の関係を更に詳細に検討するために，リンカーを含むルシフェラーゼ遺伝子を対照として，上記の結果を検討した．リピート構造導入の際に3'UTRにリンカーを導入するので，これを含むルシフェラーゼ遺伝子を対照として調べたわけである．リンカーを含むルシフェラーゼ遺伝子を注入すると，それを含まない遺伝子に比べて，ルシフェラーゼ活性が低くなる(図省略)が，CTGが含まれているとこれが更に低下することが判明した(図3に注入後3時間の結果をリンカーありリピートなしの場合を対照として示す). そこで，この結果を踏まえ，リンカーを含む遺伝子を対照として，ツメガエル卵母細胞と受精卵の両方について，CTGリピートの作用を検討した．その結果，卵割を全く行わない卵母細胞では，これまでと同様にCTGリピートによって遺伝子発現が阻害されることが確認できた(図省略)が，平均25分に1回の割合で活発に分裂を行う受精卵では，CTGリピートによる

阻害はほとんど見られないという興味ある結果が得られた(図4).

## 考　　察

本実験では，我々はまず，ツメガエル卵母細胞，未受精卵，および受精卵へ外来性のDNAを注入した際のDNAの挙動，転写活性，およびその際のプロモーター活性などについて検討した．その結果を踏まえ，MyDの原因と目されるMK遺伝子の3'-UTRに含まれるCTGリピートの持つ作用，および比較検討のためにCAGリピートの持つ作用，について検討を行った．そして卵母細胞ではリピートの存在がレポーター遺伝子の発現を阻害するが，卵割中の胚ではほとんど阻害しないという結果を得た．MyDの場合，CTGリピートの作用機序について，3つの仮説が提唱されている．即ち，(1)CTGリピートによって，それを含む遺伝子の転写，またはそのmRNAからのタンパク質の発現(翻訳)が阻害されるという説，(2)CTGリピートを持つ遺伝子が近隣の遺伝子の発現を阻害するという説(Harrisら, 1996)および，(3)CTGリピートを持つmRNAは核内から細胞質へ輸送されないという説(Hamsheres,1997)がある．今回のツメガエル卵を用いた実験によって得られた結果は，予備的なものではあるが，この(3)の，CTGリピートを含むmRNAは核から細胞質へ輸送されないという仮説を支持するものと思われる．即ち，核が速やかに消失し続ける初期発生でリピートによる遺伝子の発現阻害がほとんど見られないのは，核膜が消失する度に核から直接にmRNAが細胞質の翻訳の場に移されるためであり，核膜の消失が起こらない卵母細胞では，この移動が阻害されているのではないかと考えられるのである．今後，この考えに沿って実験を進めていく予定である．

## 引用文献


1) Mahaderan M.S, et al : Hum. Mol. Genet. 2 : 299-304, 1993.
2) Hamshere M.G. and Brook J.P. : Trends Genet. 12 : 332-334, 1996.
3) Tsuji S : Int. Med. 36 : 3-8, 1997.
4) Harris C, et al : Hum. Mol. Genet. 5 : 1417-1423, 1996.
5) Shiokawa K, et al : Meth. Mol. Biol. 62 : 247-270, 1997.
6) Hamshere M.G, et al : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 7393-7399, 1997.

# Ⅷ. ミトコンドリア異常症

# ミトコンドリアDNA多型からみた日本人およびアジア諸集団の遺伝的関係

宝来　聡*

## 緒　言

現在の日本列島に住むわれわれ日本人は，いつ何処からやってきたのか．われわれ日本人はどのようにして形成されたのであろうか．日本人の起源をめぐる研究とその論争には長い歴史があり，いくつかの仮説が提唱された．本研究では，現在論争となっている縄文人の「東南アジア起源」あるいは「北東アジア起源」の仮説を検証するため，東南アジアおよび北東アジアの集団に着目し，ミトコンドリアDNAの塩基配列の決定と分析により，日本人およびアジア諸集団の遺伝的関係を検討した．

## 対象・方法

本研究では、タイの3集団(コンケン、チェンマイ、少数民族サカイ)、マレーシアおよびインドネシア集団を含む東南アジアの5人集団について，ミトコンドリアDNAのDループ領域の塩基配列を分析した．159人の東南アジア人について563bpの塩基配列を比較したところ，119の異なる配列のタイプが見られた．これらのうち98タイプは，それぞれの集団に特有のものであり，残りの21タイプは集団間に共通して見られた．系統樹分析によって，東南アジア人は少なくとも6個の単系統クラスターに分類されるが，5集団からの系統は各クラスター中に完全に混じりあっていた．東アジアの5集団（本土日本人62人，アイヌ51人，沖縄の人々50人，韓国人64人，台湾中国人66人）の分析では，全体では207種類の異なる配列のタイプが観察された．このうち189種類のタイプはそれぞれの集団に固有のものである．つまりタイプの大部分は一つの集団でのみ観察され，他の集団では見られないということである．残りの18種類のタイプだけが集団間で共通して見られるもので，これらのタイプのうち2集団間に共通して観察されるタイプを検討した．本土日本人と韓国人には，8種類のタイプが共通して見られることは注目された．これらのタイプを持った個体数は，14人の本土日本人(集団の23%に当たる)と17人の韓国人(集団の27%に当たる)である．本土日本人はアイヌとも四種類のタイプを共通してもつが，その他の集団間の比較では共有するタイプの三種類以下である．また10人のアイヌは4人の韓国人と共通のタイプを三種類持っているが，これらの3タイプのうちの一種類は8人のアイヌとたった1人の韓国人が共有しているので，必ずしもアイヌと韓国人が近縁な関係があることを示すのではない．アイヌと沖縄の人々は，ともに縄文人の直系の子孫であると考えられているが，共有する塩基配列のタイプが一つも観察されないということは注目に値する．二集団間で共通したタイプが存在するということは，それら二集団が遺伝的により近い関係があるか，二集団間での移住が比較的最近あったことを示すものであろう．アイヌと沖縄の人々は，本土日本人に比べて，韓国人と共有するタイプの種類は少ない．本土日本人と韓国人で共通するタイプが数多く見い出されることは，朝鮮半島からの日本列島に人々の移住があった考えるのが自然であろう。

## 結　果

それではアジアの人々は、他の地域の人々とはどのような関係にあるのだろうか。アフリカ人、ヨーロッパ人そしてアメリカ先住民などとの関係である。これらの塩基配列のデータはすでに分析ずみだったので，直ちにアジアの集団との比較が可能であった．これら以外に，新たに分析したハルピンの中国人(60人)，アフリカ人，ヨーロッパ人，アメリカ先住民のデータを併せて解析した．ミトコンドリアDNAの多型解析の利点は，個々の配列に基づいた分析のほかに集団としてまとめた分析もできるところにある．一つの集団から多数のヒトの塩基配列が調べられたとき，平均的な塩基配列の違いを知る指標として「塩基多様度」という値を計算することが出来る．調べた個体間で総当たりの塩基置換数をカウントし，その平均値が「塩基多様度」となる．まずそれぞれの集団内での塩基多様度をみてみた．東アジアの五集団間での塩基多様度は，中国人1.65%，韓国人1.22%，本土日本人1.32%，沖縄の人々は1.01%，アイヌ1.26%であった．これら五集団では中国人の値が最も高く，中国人は遺伝的には多様な人々はの集まりということになり，値の最も低い沖縄の人々は比較的近縁な人々の集まりということになる．アフリカ人は2.98%，ヨーロッパ人は0.95%，アメリカ先住民は1.29%であり，どの集団よりも大きな値を示すアフリカ人が遺伝的にもっとも多様性の高い集団であることが明らかとなった．

## 考　察

さて集団間での近縁度をみる尺度して塩基多様度のネット値(DA)というものを利用することができる．アフリカ人は，他のどの集団と比較しても大きなDAをもっていた．これとは対照的に東アジアの五集団は，それぞれの

* 総合研究大学院大学先導科学研究科

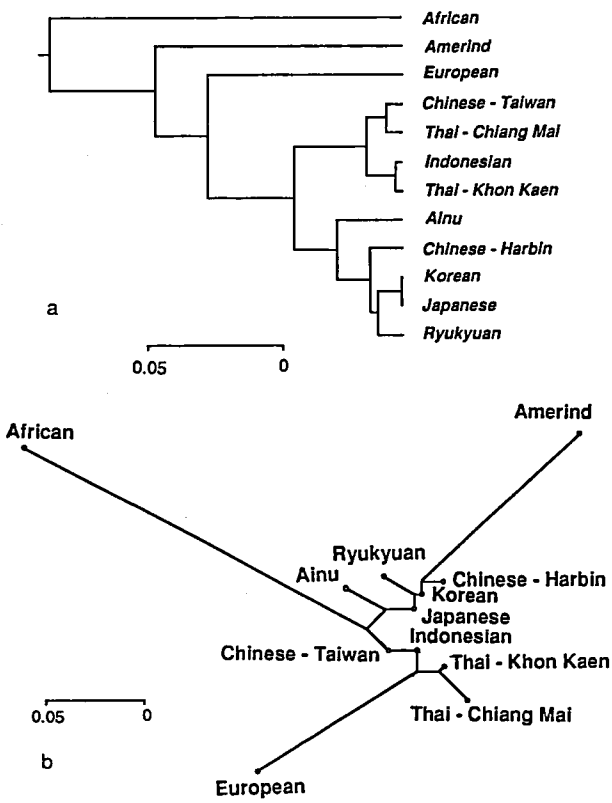



**図1** 現代人12集団の系統樹
(a)平均距離法，(b)近隣接合法

集団間のDAが非常に小さいことがわかった．特に韓国人と本土日本人の二集団間のDAはゼロであった．やはりこの分析でも韓国人と本土日本人は遺伝的に究めてかつ近縁な関係にあることが明らかとなったのである．塩基多様度のネット値(DA)に基づき集団の系統樹を作成した．系統樹では，アフリカ人が他の人類集団に先駆けて分岐し，続いてヨーロッパ人が分かれ，さらにアメリカ先住民が分岐している．最後に東アジアと東南アジアの各集団は単系統クラスターを形成するが，アジア人集団はさらに南と北のグループに分割される傾向が読み取れた．平均距離法による系統樹(図1a)では，南グループには台湾中国人，インドネシア人とタイ人が含まれ，北グループには，本土日本人，韓国人，ハルピンの中国人，琉球人とアイヌが含まれた．北グループでは東アジア人五集団が単一系統のクラスターを形成して枝分かれしている．このクラスターでは，アイヌが最初に分岐し，続いてハルピンの中国人が枝分かれしてきたことが読み取れる．続いて沖縄の人々が枝分かれし，最後に韓国人と本土日本人が緊密なグループとして分岐してくる．しかし近隣結合法による系統樹(図1b)では，アイヌは南グループと北グループの中間に現れるという微妙な系統的位置を示した．本研究の結果は，日本人の起源に関する仮説のうち，混血説を支持するものである．

## 文　献


1) Horai S, Kondo R, Sonoda S and Tajima K : The first Americans : Different waves of migration to the New World inferred from mitochondrial DNA sequence polymorphisms. In : Prehistoric dispersal of Mongoloids. T. Akazawa & E. Szathmary (eds.), Oxford University Press, pp.270-283, 1996.
2) Horai S, Odani S, Nakazawa N and Otsuka R : The origin and dispersal of modern humans as viewed from mitochondrial DNA. In : Ethnoepidemiology on Cancer. Tajima K & Sonoda S (eds.), Gann Monograph on Cancer Research No.44, Japan Scientific Societies Press, pp.97-105, 1996.
3) Horai S, Murayama K, Hayasaka K, Matsubayashi S, Hattori Y, Fucharoen G, Harihara S, Park K-S, Omoto K and Pan I-H : Mitochondrial DNA polymorphism in East Asian populations, with special reference to the peopling of Japan. Am. J. Hum. Genet. 59 : 579-590, 1996.
4) 宝来　聡：DNA人類進化学、岩波科学ライブラリー(52), 120頁、岩波書店：1997.
5) Horai S and Omoto K : Peopling of Japan inferred from mitochondrial DNA polymorphisms in East Asians. In : The origin and past of modern humans - Towards a reconciliation. Omoto K & Tobias P.V (eds.), pp54-73, World Scientific, 1998.

# ミトコンドリア脳筋症とミトコンドリア遺伝子型

田 中 雅 嗣*

研究協力者 Jian-Sheng Gong* Jin Zhang* 米 田 誠**
八 木 國 夫* 衣 斐 達*** 佐 橋 功***
宮 林 重 明**** 後 藤 雄 一***** 埜 中 征 哉*****
宝 来 聰******

## 目 的

宝来らはミトコンドリア遺伝子変異を伴う患者のミトコンドリアDNA(mtDNA)のDループ領域の塩基配列を決定し，その系統樹から個々の症例がそれぞれ別の分岐に属し，多くの家系において独立に新規の変異(*de novo* mutation)が生じていることを報告した．ミトコンドリア脳筋症に関連する遺伝子変異の発生にどのような遺伝的背景が関与しているかを明らかにするために，ミトコンドリア遺伝子の翻訳領域の塩基置換に基づいて遺伝子型を分類し，患者における遺伝子型の頻度を調べた．

## 方法・対象

mtDNAの2つの領域(塩基番号5131-5369，および10345-10518)をPCR法により増幅し，制限酵素*Alu*Iを用いて消化し，それらの断片長(PCR-RFLP)に基づいてMtype A (Mt5178A+Mt10398G), Mtype B (Mt5178C+Mt10398G), Mtype C (Mt5178C+Mt10398A)の3型に大別した．ミトコンドリア脳筋症患者群：既知のミトコンドリア遺伝子変異を有する患者130例(A3243G 60例, Single deletion 39例, T8993G 13例，T9176C 5例，A8344G 11例，G8363A 3例)．対照群：愛知県の男性献血者252名および岐阜県の健康診断受診者381名(女性197名，男性184名)，計633名．

## 結 果

ミトコンドリア脳筋症患者群における遺伝子型の頻度はMt5178A：C=41：89であり，対照群における頻度Mt5178A：C=277：356と比較して，有意にMt5178C型の頻度が高かった(p=0.006，odds ratio=1.69，Fisher 法)．T8993G 変異を伴った Leigh 脳症の患者 13 例のうち全例が Mt5178C 型であり(Mt5178A：C＝0：13, Mtype A：B：C ＝ 0：3：10)，T8993G 変異以外を伴ったミトコンドリア脳筋症患者 117 例の患者での頻度(Mt5178A：C＝41：76, p=0.005)あるいは対照群での頻度(Mt5178A：C＝277：356, p=0.0006) と比較して統計学的に有意に Mt5178C の頻度が高かった．

## 考 察

DNA鎖における8-oxo-Aの生成およびDNA合成の前駆体であるdGTPから8-oxo-dGTPの生成にヒドロキシラジカルが関与している．T→GあるいはA→C transversionは，8-oxo-Aとグアニンの対合(A：T → 8-oxo-A：T → 8-oxo-A：G → C：G)あるいは，アデニンと8-oxo-dGTPとの対合(A：T → A：8-oxo-G → C：G)によって生じうる．ミトコンドリア脳筋症患者群において対照群と比較してMt5178C型の頻度が高かったことは，mtDNA変異の発生頻度にミトコンドリア遺伝子型が影響を与えていることを示している．特にT8993G変異に基づくLeigh脳症の患者におけるMt5178C型の頻度が，他のmtDNA変異の患者群あるいは対照群での頻度と比較して高かったことは，この部位におけるT→G transversionの発生頻度がMt5178C型の遺伝的背景によって上昇することを示唆している．

## 文 献

発表準備中

* 財団法人岐阜県国際バイオ研究所
** 福井医科大学医学部第二内科
*** 愛知医科大学第四内科
**** 東北大学大学院医学系研究科小児病態分野
***** 国立精神・神経センター神経研究所
****** 総合研究大学院大学先導科学研究科

# こはく酸脱水素酵素欠損症の臨床病理学的，分子遺伝学的検討

後　藤　雄　一*

研究協力者　村　山　久美子*　北　　潔**　平　訳　浩　子**
依　藤　史　郎***　二　瓶　健　次****　下　平　雅　之*****
大　澤　由記子*****

## 結　　言

こはく酸脱水素酵素(succinate dehydrogenase : SDH)は，電子伝達系酵素複合体の一つである複合体Ⅱ(complexⅡ)の主要な活性成分である．複合体Ⅱは4つのサブユニットからなり，SDH活性に直接的に関与するFlavoprotein(Fp)サブユニットおよびIron-sulfur protein(Ip)サブユニットと，これらを膜に結合させておくヘムを含む2つのサブユニット(CybL，CybS)から成っている(図1)．現在までに4家系6例が単独SDH欠損症として報告されており[1)-4)]，最近Fp内の点変異を有する症例がはじめて報告された[5)]．

われわれは，組織化学および生化学検査でSDH活性低下を認めた4家系5症例について，その臨床像と骨格筋生検所見を基に，その臨床的，生化学的多様性について考察した．さらに，これらの患者に関して，骨格筋から得たRNAを用いて，複合体Ⅱを構成するFp，Ip，CybL，CybS遺伝子について，遺伝子異常の有無を検討した．

## 患　　者

骨格筋のSDH活性の低下を示した4家系5名(男4名，女1名)の年齢，発症症状，主症状を表1にまとめた．

症例1と症例2は兄弟例である．共に乳児期に喘鳴・嚥下障害で発症し，精神運動発達遅延，筋力低下を主症状とする．症例3は，生後7ヶ月時に意識障害，多呼吸，眼振で発症し，9ヶ月時に心不全で死亡した．症例4は，37歳発症の女性で，症状は筋力低下のみで，中枢神経症状はない．症例5は，股関節脱臼を既往歴にもつ2歳男児例であり,現在筋力低下はあるものの,中枢神経症状はない．

検査所見としては，血清CK値，血中乳酸値，脳CT所見をまとめた(表1)．CKが明らかに高かったのは，症例4のみであり，乳酸値は症例3で高度上昇，症例4で軽度上昇していた．明らかなCT所見を示したのは症例3のみで，脳室周囲の低吸収域が認められた．

## 方　　法

(1)生検筋の病理学的，生化学的検査

生検骨格筋をSDH染色，cytochrome c oxidase(CCO)染色を含む各種染色を施し，光学顕微鏡で観察した．また，凍結検体から遠心分離法で，ミトコンドリア分画を採取し，電子伝達系酵素活性を生化学的に測定した．

(2)生検骨格筋からRNAを分離し，4つのサブユニットのcDNAをRT-PCR法で増幅したあと，塩基配列をABI377 Autosequencerで決定した．得られた配列を既知の配列と比較した．

## 結　　果

**(1)生検筋の病理学的，生化学的検査結果**

4家系5症例の生検筋所見を表2にまとめる．病理学的には，同胞例でありながら症例1ではragged-red fiber(RRF)が30%であったのに対して，症例2は0.1%以下であった．また，高CK血症を示した症例4も約30%の筋線維がRRFであった．SDH染色では，検査したいずれの症例も活性が低下していたが，興味深いことに，症例2,3,4では，骨格筋間質内に存在する小血管には，活性が残っていた．一方，症例5は，血管にも活性を認めなかった(図2)．

また，CCO活性では，症例1,2,3では，明らかに低下していた．症例4では，全般性の低下を認めたが，RRFでCCO活性の残存するものも存在していた．症例5には，CCO活性の低下は認めなかった(図2)．

生化学的には，SDH活性を含む複合体Ⅱ＋Ⅲ活性の低下が，全例で認められた．さらに，組織化学検査で認めたCCO活性の低下は，生化学的にも確認できた．

**(2)複合体Ⅱを構成する4つの遺伝子の検査**

各症例の骨格筋からRNAを分離し，複合体Ⅱの4つのサブユニット遺伝子のcDNA配列を決定したところ，症例5のFp遺伝子に変異を発見した(表3)．その遺伝子変異は，Compound heterozygousな点変異であり，1つは塩基番号1181のC→T変異，もう1つは塩基番号1793のG deletionであった．1181変異は386番のThrがIleへ変化し，1793変異は590番のglyがalaに変化したあとout of frameになり，54個下流でstop codonが生じる．

* 国立精神・神経センター神経研究所
** 東京大学大学院医学系研究科生物医科学教室
*** 大阪大学医学部保健学科
**** 国立小児病院神経科
***** 東京医科歯科大学医学部小児科

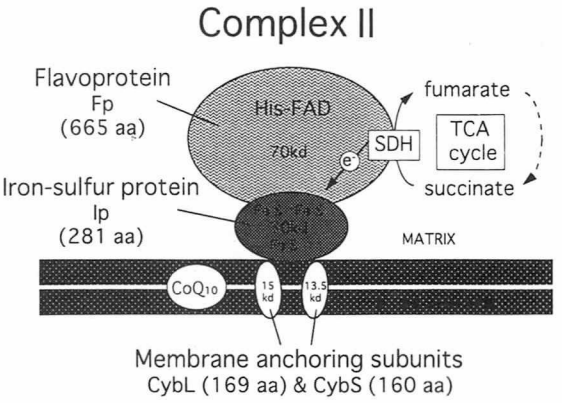



**図1** 複合体Ⅱの全体図
こはく酸脱水素酵素(SDH)は，電子伝達系複合体・活性の部分反応であるとともにTCA回路の一反応でもある．SDH活性は4つのサブユニットのうちの,Fflavoprotein(Fp)に存在している．他の3つのサブユニット(iron-sulfur protein,2つのmembrane anchoring proteins)は,直接SDH活性には関係ないとされているが,電子がコエンザイムQ(CoQ)に伝わるためには必須である．

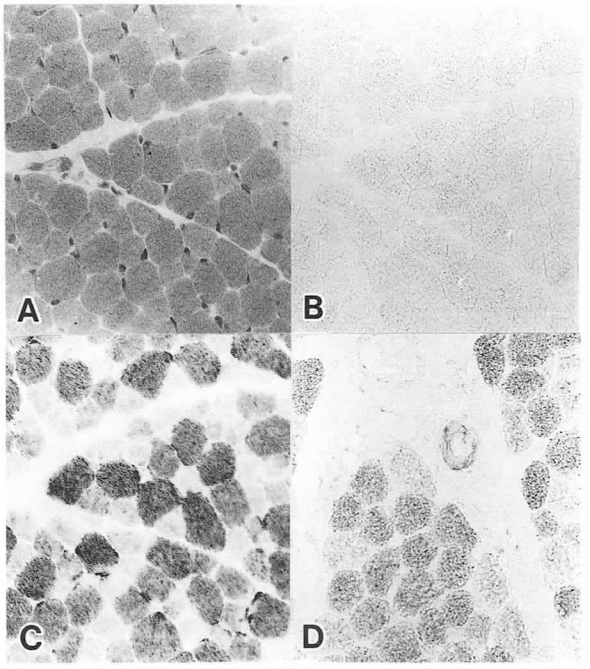



**図2** 症例5の筋病理所見
HE染色(A)，SDH染色(B)，CCO染色(C)，年齢相当の正常コントロールのSDH染色(D)．症例5では，正常に比して，SDH活性が極端に低下している．しかし，CCO活性は色素顆粒が比較的よく保たれ，正常に近い活性を示している．

これらcDNA上での変異がゲノムDNA上に存在するかどうかを確認するために，変異部位を含む領域をゲノムDNAを鋳型としてpolymerase chain reaction(PCR)を行い，塩基配列を調べた．その結果，確かに変異を有するDNA断片を確認できたが，1793変異近辺のPCRでは，いくつものDNA断片が得られ，偽遺伝子の存在が強く疑われた．また家族のDNAの検査で，1181変異は父から，1193変異は母から伝わったものである証拠を得た．

**表1** SDH欠損症5例の臨床所見

| Patient No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Age/Sex | 2y5m, M | 5m, M | 9m, M | 37y, F | 2y7m, M |
| Onset | Stridor Dysphagia | | Unconsciousness Tachypnea Nystagmus | Muscle weakness | Muscle weakness |
| Chief manifestations | Mental Retardation Muscle weakness | | Cardiac failure (Dead at 9M) | | Dislocation of hip joint |
| Serum CK | →～↑ | → | → | ↑↑ | →～↗ |
| Lactate | → | → | ↑↑ | ↑ | → |
| Brain CT | WNL | WNL | Low density in periventricular area | − | WNL |

**表2** SDH欠損症5例の生検筋所見

| | | 症例 1 | 症例 2 | 症例 3 | 症例 4 | 症例 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 年齢/性 | | 2y5m, M | 5m, M | 9m, M | 37y, F | 2y7m, M |
| 筋病理 | RRF | 30 % | < 0.1 % | < 0.1 % | 30 % | < 0.1 % |
| | SDH活性 | 未施行 | ↓↓ 血管にはある | ↓↓ 血管にはある | ↓↓ 血管にはある | ↓↓ 血管にもない |
| | CCO活性 | ↓ diffuse | ↓ diffuse | ↓ diffuse | ↘ | → |
| 筋生化学 | I + III 活性 | 未施行 | 165 % | 10 % | 280 % | 134 % |
| | II + III 活性 | 7 % | 20 % | 8 % | 23 % | 46 % |
| | CCO活性 | 10 % | 14 % | 52 % | 38 % | 64 % |

**表3** SDH欠損症5例のcDNA配列異常

| Subunit | Size (bp) | 症例 1 | 症例 2 | 症例 3 | 症例 4 | 症例 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Fp | 1995 | − | − | − | − | + |
| Ip | 843 | − | − | − | − | − |
| CybL | 507 | − | − | − | − | − |
| CybS | 480 | − | − | − | − | − |

**表4** 単独SDH欠損症

| Age | Sex | Clinical Diagnosis | Muscle pathology | | Authors |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | SDH stain | RRF | |
| 13 y | F | Kearns-Sayre synd. | mosaic | +++ | Rivner et al. |
| 21 y | F | Myoglobinuria | ↓ diffuse | − | Linderholm et al. |
| 19 m<br>10 m | M<br>F | Leigh encephalopathy | N.D. | N.D. | Bourgeois et al. |
| 56 y<br>62 y | F<br>F | Late-onset optic atrophy, ataxia (onset at mid-40s) | ↓ diffuse | − | Taylor et al. |
| 2 y | M | Myopathy | ↓ diffuse | − | Our case |

## 考　　察

筋SDH活性が低下する原因は4つに大別され，①SDH活性を担うFpサブユニットとそれを含む複合体Ⅱの異常，②他の酵素複合体との共通のコンポーネントの異常，③ミトコンドリアへの酵素蛋白の移送障害，④2次的に障害をうける場合，が考えられる．今回の症例のうち，症例5は①の単独SDH欠損症にあたり，症例1から4までは②もしくは④の可能性が高い．したがって，臨床症状に大きな違いがあることに矛盾がない．

一方，症例5は，今回の症例の中で単独SDH欠損を示した．現在までに，単独SDH欠損症として報告されているのは，4家系6例である[1)-4)](表4)．発症年齢，中枢神経症状，RRFの存在などの筋病理所見など，症例によって様々である．このなかで，Leigh脳症を示したBourgeoisらの報告した兄妹例でも，Fp遺伝子の異常が見つけられており，同じ遺伝子に異常を有しながらも,われわれの症例は明らかな中枢神経症状は認めていない[5)].このような臨床症状の多様性は，同じ遺伝子異常をもつ場合にも認められる．

われわれが今回見出したFp遺伝子の異常は，Bourgeronらが報告したミスセンス変異(Arg554Trp)とは異なり，Thr386Ileというミスセンス変異と1756番のGが欠失するナンセンス変異とのコンパウンドヘテロ接合体であった．しかし，ナンセンス変異とはいっても，変異部位(Arg589)から54個下流のアミノ酸ではじめて終始コドンが出現する．そのため，全665アミノ酸のうち，588までは正常と同じペプチド，589から632までは異常な配列となり，ペプチドの長さとしては33アミノ酸しか短くない．

患者cDNA上で認めた変異をゲノムDNAで確認する実験で，少なくとも4つのFp遺伝子もしくはその偽遺伝子が存在することを発見した．それは，1756G近傍のPCRで，4つのDNA断片が得られ，しかも塩基配列の結果，イントロンを含めて極めて類似した構造をもつことを突き止めた．これらのうち，発現されているものはどれなのかなどの問題は，Fp遺伝子のゲノム構造の全体を把握することが必要であり，今後はその点を明らかにしてゆく予定である．

## 文　献


1) Rivner MH, et al : Neurology 39 : 693-696, 1989.
2) Linderholm H, et al : J Intern Med 228 : 43-52, 1990.
3) Bourgeois M, et al : Brain Dev 14 : 404-408, 1992.
4) Taylor RW, et al : Ann Neurol 39 : 224-232, 1996.
5) Bourgeron T, et al : Nat Genet 11 : 144-149, 1995.

# ミトコンドリアDNA欠失症のミトコンドリアDNA異常の解析，Dual-color FISH法による病態解析に関する研究

岡　田　伸太郎*

研究協力者　乾　幸治*　柳原　格**　柳原恵子**
大薗恵一**　倉橋浩樹*

**要　旨**　ミトコンドリアDNAの欠失を伴うPearson-Marrow syndrome(PS)，Kearns-Sayre syndrome(KSS)，Chronic Progressive External Opthalmoplegia(CPEO)患者における病態を明らかにするため，欠失部位の同定を行い，また，臨床症状と正常ミトコンドリアDNA(mtDNA)量との相関についての検討した．その結果今までに報告されていない領域の欠失を同定したが，病態とは相関がなかった．しかし，正常ミトコンドリアDNAの絶対量が病態に相関することが判明した．さらに，異常と正常mtDNAの経時的変化，組織でのヘテロプラスミーの状態，病態との関連を検討するため，Dual-color FISH法を用いて正常，異常mtDNAの分布をPS患者，KSS，CPEO患者において解析した．その結果，末梢血では，乳児期発症のPSでは，正常と異常mtDNAは細胞内でヘテロプラスミーの状態で，KSS，CPEOでは細胞間ヘテロプラスミーの状態であることが判明した．異常mtDNAの組織での存在様式が病態に大きく影響を与えると考えられた．

## はじめに

ミトコンドリアDNA異常症においては，mtDNAの点突然変異と臨床病型はある程度知られているが[1]，特にmtDNA欠失を伴う疾患においては，欠失部位が同じでも臨床的に大いに異なることが知られている[2]．また，乳児期にPSで発症し，PSが緩解後，KSSとなった症例が報告されている[3]．このため，mtDNA欠失患者における異常mtDNAの同定，正常mtDNAの定量，組織内でのヘテロプラスミーの状態を検討することは，mtDNAの欠失における病態を検討する上で重要である．このため，PS，KSS，CPEOにおける，異常mtDNAの同定，異常，正常mtDNAの定量，細胞内での分布をFISH法にて行ったので報告する．

## 対象および方法

患者末梢血DNAに対してミトコンドリア特異的プライマーを用いてlong distance PCRを行い，PCR産物の直接塩基配列決定を行い，欠失領域の決定を行った．また欠失領域以外の部分にプローブを設計し，胎盤より細胞分画法により別々に抽出した核分画由来の核DNA及びミトコンドリア分画由来のミトコンドリアDNA(mtDNA)を適当な割合で混合し(total 10mg)制限酵素PvuⅡにて消化後，サザンブロット解析にて標準曲線を作製し，ハイブリダイゼーション後コンピューターによってバンドの濃さを解析し，患者由来のミトコンドリアDNAの定量的サザンブロットを行った．

FISH法は，PS患者2名，KSS，CPEO患者それぞれ1名の末梢血リンパ球をPHA下で培養し，低張処理後酢酸メタノールで火炎固定した．PS患児1名においては，リンパ芽球化し，経時的にDual-color FISHを行った．また，CPEO患者の筋生検の凍結切片を用いDual-color FISH法にて検討した．FISHに用いたプローブは，欠失部位，非欠失部位をPCRにて増幅し(約3kb)，ジゴケシギニンまたはビオチンラベルし，それぞれローダミン標識の抗ジゴケシギニン抗体とFITC標識のアビジンを用いDual-color FISHを行った．

## 結　果

シークエンスの結果，3例のPS患者において，mtDNAに塩基番号(10158-10169)と(15405-15415)の間の約5.2kb，(10942-10951)と(15362-15371)の間の約4.4kb，(11034-11036)と(14595-14597)の間の約3.6kbに欠失を認めた．またサザンブロット上，異常ミトコンドリアDNAの末梢血における頻度はそれぞれ68%，65%，91%であった．定量的サザンブロットの結果，9カ月で死亡した5.2kbの欠失を認めた症例では，正常ミトコンドリア量は抽出DNA 10mg当たり31%，現在ほぼ健康な4.4kbの欠失を認めた症例では，正常ミトコンドリア量は抽出DNA10mg当たり103%，著明な汎血球減少を認める3.6kbの欠失を認めた症例では，正常ミトコンドリア量は抽出DNA10mg当たり10%であった．以上の結果，正常ミトコンドリアDNAの絶対量が臨床的症状の重症度に負に相関していることが推測された．

Dual-color FISH法では，正常ではFITCとローダミンの

* 大阪大学医学部
** 大阪府立母子保健総合医療センター

混ざった色であるオレンジの色を示し，欠失mtDNAではFITCの緑色を示した．PS患者におけるリンパ球では，1細胞内で正常と異常mtDNAが混在すること(オレンジ，緑色)を見いだした(細胞内ヘテロプラスミー)．一方，KSS，CPEO患者でのリンパ球では，異常mtDNA(緑色)を優位に持つ細胞と，正常mtDNA(オレンジ)を優位に持つ細胞が分布しており，細胞間ヘテロプラスミーのパターンを認めた．さらにPS患者の細胞内ヘテロプラスミーを認めたリンパ球をリンパ芽球化を行った後に100日間培養を行うと，細胞内ヘテロプラスミーから細胞間ヘテロプラスミーのパターンに次第に変化することが確認された．また細胞内ヘテロプラスミーを認めたPS患者末梢血リンパ球の約1年に渡る経時的mtDNAのヘテロプラスミーパターンの変化を検討すると，血液病変の所見を示す時には，正常，異常mtDNAが混在する細胞が多数を占めるのに対し，血液所見が軽快するに従い，正常mtDNAを持つ細胞と異常mtDNAを持つ細胞に2極化を示すようになり，*in vivo*に於いても細胞内ヘテロプラスミーから細胞間ヘテロプラスミーへの移行を認めた．KSS生検筋でのDual-color FISH法による検討では，Gomoriトリクロム染色でRRFを示す部位に異常mtDNAの集積が認められた．またRRFを示さない部位でも異常mtDNAの存在があり，この方法は感度が良いと思われた．

## 考　　察

Pearson-Marrow syndrome(PS) 3例に報告のない新たな遺伝子欠失を認めた．欠失部位は，いわゆるcommon deletion部位よりはやや塩基番号で後ろよりの部分に集中していた．これまでの報告から欠失部位と欠失の大きさは，臨床症状とあまり相関しないとされている．さらに血液における欠失の割合は必ずしも臨床症状を反映しないとされてきた．しかしながらPearson症候群において主要罹患臓器である造血系を検討すると，定量的サザンブロット法にて，欠失mtDNAの割合は臨床的重症度とは相関せず正常なmtDNA量と相関することが示された．このことはミトコンドリア病の病態を考える上でも重要な所見と考える．

mtDNAに対するFISH法は最初van de Corputらにより報告された[4]．FISH法は感度良く，比較的簡便であり，ミトコンドリア病のように正常，異常mtDNAがヘテロプラスミーの状態で存在する疾患の病態解析に有力な手段であると考えられた．PS患児が血液所見が改善した後，KSSになった症例が報告されているが，今回のFISH法から，異常mtDNAの分布が細胞内ヘテロプラスミーから細胞間のヘテロプラスミーへと移行することが，KSSへの病態への移行になることが判明した．リンパ球のような分裂の盛んな臓器ではミトコンドリアDNAは細胞内ヘテロプラスミーの状態から細胞間ヘテロプラスミーへ分裂を通して移行し，最終分化段階にある筋肉では，筋細胞内で異常mtDNAが蓄積していき，細胞内ヘテロプラスミーが保たれているものと考えられた．

**謝　辞**：検体をお送り下さった奈良県立大小児科 朴永東先生，堺市立病院小児科 田中順子先生，東大阪市立中央病院小児科 赤澤英樹先生，大阪厚生年金病院神経内科 深田慶先生に深謝致します．

## 文　　献

1) Scheffner JM and WallaceDA : Oxidative phosphorylation diseases. In The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Scriver CR et al. eds McGraw-Hill New York. pp1535-1609, 1995.

2) Moras CT, Dimauro S, Zeviani A, et al : Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Engl J Med 320 : 1293-1299, 1989.

3) McShane MA, Hammans M, Sweeney IJ, et al : Pearson syndrome and mitochondrial encephalopathy in a patient with a deletion of mtDNA. Am J Hum Genet 48 : 39-42, 1991.

4) van de Coput MPC, van den Ouweland JMW, Dirks RW, et al : Detection of mitochondrial DNA deletions in human skin fibroblasts with Pearson's syndrome by two-color fluorescence in situ hybridazation. J Histochem Cytochem 45 : 55-61, 1997.

# MELAS患者の卵巣のmtDNA分析

福 原 信 義*

研究協力者 中 島 孝* 石 田 千 穂* 遠 藤 稔*
巻 淵 隆 夫** 丹 野 芳 範***

## はじめに

ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群(MELAS)はmtDNAの点変異を原因として，母系遺伝を呈する疾患である．患者のmtDNAはwild typeとmutant typeとのheteroplasmyを呈しており，heteroplasmyの程度が患者の臨床症状の発現に関係しているものと考えられるが，その詳細は明らかではない．その手がかりを得るためにMELAS患者の卵細胞のmtDNAを分析し，そのheteroplasmyについて検討した．

## 症　例

患者は死亡時41歳女性

家族歴：姉，母方伯父，母方いとこが類似疾患で死亡．一人娘は無症状である．

現病歴：1979年(22歳時)に糖尿病を指摘され，25歳よりインシュリン療法を開始．32歳時より難聴が始まる．33歳時，Jackson型痙攣発作があり，痙攣重積状態となる．34歳時の所見では，四肢は瀰漫性に筋萎縮し，軽度の運動失調があった．血液乳酸20.6mg/dl,ピルビン酸0.93 mg/dl, L/P 22.2, 髄液乳酸30.2mg/dl,ピルビン酸1.65mg/dl, L/P 18.3 筋生検:ragged-red fibers(+), 白血球DNA分析によりmtDNA 3243のG→A変異があり，MELASと診断した．頭部CTで，右後頭葉(鳥距皮質)に低吸収域が見られた．脳SPECT検査では，左頭頂部，右頭頂・後頭部右側頭部，右小脳の血流低下があり，その後，右下1/4盲，小脳性運動失調の増強が生じ，痴呆(IQ 57)が生じた．36歳時の全身痙攣後，両側視力が光覚弁となり，失調性構音障害，全身の筋萎縮が著明となり，左不全片麻痺が新たに出現した．脳波：右優位のsharp & slow complex (+)，脳SPECT：右後頭葉の血流が増加．1週間後に視力が右視野で手動弁となり，麻痺は回復した．約2月後には，左視野は以前の状態に戻るも，右視野は回復せず，低血糖が頻発した．時に拍動性の頭痛が後頭部にあり，相貌失認が生じた．脳MRI検査では，両側後頭葉内側部に萎縮が見られ，外側部の皮質はT2-高信号であった．その後，相貌失認は軽快していたが，難聴は次第に増強していた．41歳時に難聴が増強，頭痛，ふらつき，全身痙攣のために入院．意識は錯乱，傾眠状態で，左肩にミオクローヌスが連続して出現し，内容のおかしい暴言を吐くようになる．左上肢に拘縮が強まった．脳MRI検査では，右側頭葉，頭頂葉に浮腫があり，新鮮な脳梗塞と考えられた．脳SPECT検査では，右側頭葉の血流が著明に増加していた．1月後には暴言はなくなった．左上肢の筋力はかなり良いが，運動失調，または運動失行，感覚障害のために左手は動かさない．ミオクローヌスは次第に目立たなくなった．4月後に，全失語，相貌失認，運動失行が著明となり，脳MRI検査で左側頭葉，頭頂葉に新しい病巣が出現．右上肢，顔面，左上肢にミオクローヌスが頻発して死亡した．

剖検では，大脳の左頭頂葉，左側頭葉，両側後頭葉に新旧，様々な程度の層状皮質壊死が認められたが，特に脳回の頂部に強かった．小脳顆粒細胞の減少が見られ，骨格筋の萎縮，変成が顕著であった．心筋ではびまん性の繊維化が見られた．膵臓では，びまん性の繊維化とランゲルハンス島の萎縮がみられ，MELASの典型例と診断された．

## 卵細胞のmtDNAの分析

### 1) 予備実験

**方法**：卵細胞の一つからミトコンドリアDNAをPCR可能か，卵細胞からmtDNAを分離するときのPCR条件はどうか知るために，豚卵巣を用いて検討した．妊娠歴のない生後6月の雌豚より卵巣を取り出し，実体顕微鏡下で周囲組織を取り除き1個ずつ卵細胞を取り出し，マイクロチューブに入れ-80℃で凍結保存した．凍結卵細胞に1/15molのPBS 20μlを入れて100℃10分加熱した後，チューブ内ですりつぶし，さらに5分間100℃にて加熱処理した．遠心後上清を希釈しPCR用サンプルとした．

PCR用primerとしては豚のmtDNAのD-loop regionをGENEBANK，AB01592 Okinawa native pigとAB015093 Yukatan miniature pigのDNA配列より最低限，primer部分がhomologousでサイズが同じ部分のものから選び出し，primer-F：3'-TGA AAC CAG CAA CCC GCT TGG CAG-5' primer-R：3'-TAT GCG CGT GTA CGC ACG TTA TGT CCC-3'をPCGENE/PCRPLANで作成した．target DNAのサイズは383bpであった．

* 国立療養所犀潟病院神経内科
** 国立療養所犀潟病院神経病理
*** 新潟大学神経内科

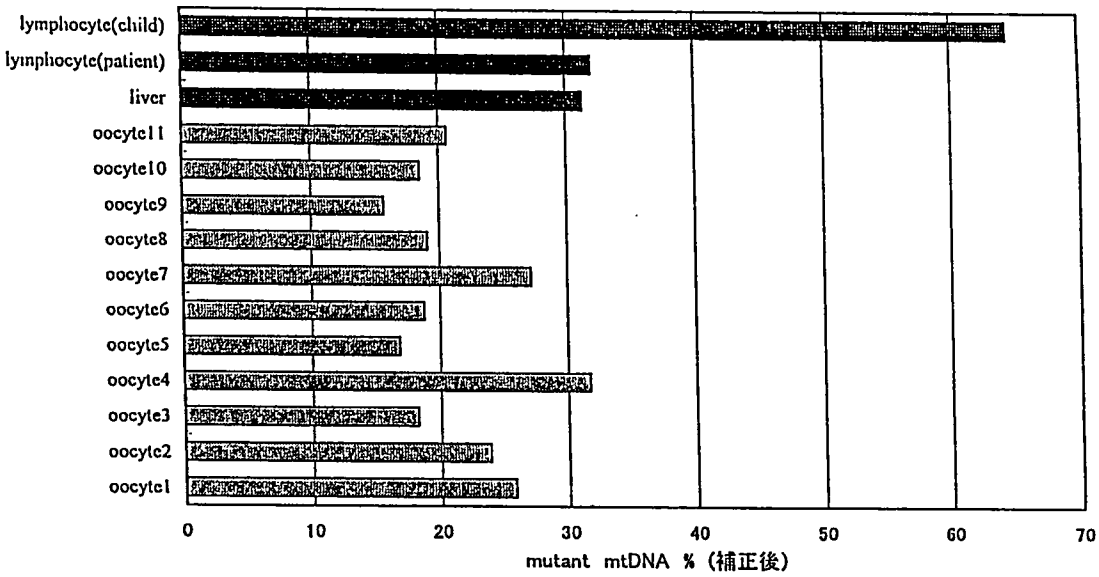



図1 oocyteのheteroplasmyの割合

**結果**：アガロースゲル電気泳動で目標となるバンドが増幅され，そのゲル中のDNAを蛍光シークエンサーでDNA配列を確認したところYukatan miniature pigと同様であり，豚卵巣ではその単一の卵細胞から十分に判断可能なミトコンドリアDNAのPCRが可能であった．

**2) MELAS患者の卵細胞の分析**

**方法**：剖検開始後直ちに卵巣より11個の卵細胞をとりだし，-80℃にて凍結保存した．上記の予備実験のPCR条件と同じ条件でPCR用サンプルを作成した．

MELASのnp.3243A→Gの変異の検出は，Gotoら(1990)[1]の方法により以下のprimerを用いた．

primer-F: 5'-AGG ACA AGA GAA ATA AGG CC-3'

primer-R: 5'-TAG AAG AGC GAT GGT GAG AG-3'

[F]d-UTPを混和しPCR後，制限酵素ApaIで消化をおこない，アガロース電気泳動と同時にPRISM310(Perkinelmer社)蛍光DNA自動解析装置フラグメント解析でピークを面積を計算して変異の割合を出した．

検量曲線(図1)は，Tannoら(1995)[2]の方法により丹野よりPCR資料を得て行った．

**結果**：卵細胞のmtDNA3243変異の比率は，図2の如くで，分析した11個の卵細胞はいずれも患者の末梢リンパ球と肝臓における変異率よりも低かった．一方，未発症の娘のリンパ球における変異の比率はそれらに比べて，66%と高率であった．

## 考　察

Tannoら[2]は，卵細胞の分析は行っていないが，MELAS患者2例における種々の組織でのheteroplasmyを検討し，何れの組織でも82-95%と一様に高率であったと報告している．母のmtDNAにおける変異が卵細胞に伝えられるとき，randomに生じるのか，それともnonrandomに生じるのかは不明である．すでに生まれている娘のリンパ球における変異率に比べ，11個の卵細胞での変異率がいずれも低く，この変異が卵細胞にrandomに伝えられるだけのものかどうかは問題がある．これまでMELAS患者の卵細胞でmtDNAの変異を検討した報告は見られないが，Marchingtonら[3]はKearns-Sayre症候群患者で我々と同じ様に個々の卵細胞のmtDNA分析を行い，変異mtDNAの比率が0～50%近くまで様々であったという．

## 結　論

MELAS患者の卵細胞のmtDNAを解析した．

1) 卵細胞の1個ずつから十分に判断可能なmtNDAをPCRすることは可能であった．

2) MELAS患者の卵細胞11個のmtDNA3243における変異の比率は，患者のリンパ球におけるよりも低かった．

## 文　献

1) Goto Y, Nonaka I and Horai S : A mutation in the tRNA-Leu(UUR) gene associated with the MELAS susbgroup of mitohcondrial encephalomyopahties. Nature 348 : 651-653, 1990.

2) Tanno Y, Yoneda M, Tanaka K, et al : Quantitation of heteroplasmy of mitochondrial tRNALeu(UUR) gene using PCR-SSCP. Muscle Nerve 18 : 1390-1397, 1995.

3) Marchington D.R, Macaulay V, Hartshorne G.M, et al : Evidence from human oocytes for a genetic bottleneck in an mtDNA disease. Am.J.Hum.Genet. 63 : 769-775, 1998.

# 家族性ビタミンB1欠乏，心筋症，ミトコンドリアDNA 3243A-to-G変異を示すミトコンドリアミオパチー例の長期経過観察

納　光弘*

研究協力者　中川正法*　佐藤能啓**　樋口逸郎*

**要旨**　ビタミンB1(B1)欠乏を家族性に認め，心筋症，ミトコンドリアDNA (mt DNA)3243A-to-G変異(3243変異)を示し，17年間の経過中，何らの中枢神経異常を認めなかったミトコンドリアミオパチーの兄弟例を報告した．Ragged-red fibers(RRFs)は10-40%と高率であったが，cytochrome c oxidase欠損線維，strongly SDH-reactive blood vesselsは認めなかった．血液mtDNAにおける3243変異の割合は，症例1：87%，症例2：89%，母親：57%であった．本家系のB1欠乏の原因は明らかに出来なかったが，両症例ともに慢性のB1欠乏状態にあり，成長に伴うB1必要量の増加が脚気症状を引き起こし，それに伴ってmtDNA変異によるミトコンドリア機能障害が顕在化した可能性が考えられた．

## はじめに

ミトコンドリアDNA(mtDNA)3243A-to-G変異は，その臨床病型として，MELAS，Chronic progressive external ophthalmoplegia，Diabetes mellitus，Renal failure，Cardiomyopathy，Sensorineural hearing lossなどが知られている[1]．今回，ビタミンB1(以下B1)欠乏を家族性に認め，脚気心にて発症したmtDNA3243A-to-G変異(3243変異)を示すミトコンドリアミオパチーの兄弟例[2]を17年間に渡って経過観察し，その経過中，何ら中枢神経症状を認めなかったので，その臨床経過，筋病理所見，mtDNAの検討結果について報告する．

## 症　例

**症例1**：36歳，男性．主訴：呼吸困難，四肢筋力低下．家族歴：両親は又従兄弟結婚．両親は神経学的に異常なし．末弟は小児期に原因不明の心疾患で急死している．現病歴：小学生の頃より易疲労性あり．15歳頃より下腿浮腫出現．19歳時，久留米大学第三内科初診．下腿浮腫，腹部膨満，呼吸困難出現し入院．脳神経系に異常なし．四肢近位筋優位の筋力低下・萎縮を認めた．creatine kinase(CK) 73.2 IU(正常40以下)，血中B1値 34(正常50-70 ng/ml)と低値．心拡大(CTR 63%)，心拍出量増加，Transketolase活性(TKA)低下，サイアミン投与にて急速に症状が改善したことより，脚気心と診断された．心内膜心筋生検施行．高乳酸・ピルビン酸血症を認め，筋生検施行．退院後，日常生活に問題なし．この間B1製剤を時々服用，中止すると筋脱力増悪，動悸が生じていた．30歳頃より，四肢近位部・体幹・顔面の筋萎縮が目立ち，階段昇降困難出現．握力30kg，脈拍110/分，B1：98ng/ml，CK 81 IU(正常0～85)，胸部XP上心陰影は拡大なし．32歳時より，ユビデカレノン投与．動悸改善，心拍数は108/分から90/分へ低下したが，筋力は変化なし．CK182mU(正常0～85)．33歳時より，近位筋筋力低下が進行．36歳再評価のため久留米大学医療センター入院．

36歳時再入院時の所見：身長168cm，体重41kg．近位筋優位の筋力低下・萎縮，B1：1090(正常20～50ng/ml)，乳酸39mg/dl，ピルビン酸0.89mg/dl，CK 134(正常62～287)，CK MB 19%，心拍数104/分．B1投与中止にて，動悸，易疲労感性，脱力が悪化．髄液中乳酸17.3mg/dl，ピルビン酸1.03mg/dl．HbAl：正常．頭部CT，MRI：異常なし．末梢神経伝導検査：正常範囲．全経過を通して，精神症状，知的障害，脳卒中様発作，外眼筋麻痺，難聴，四肢感覚障害，耐糖能異常はみられていない．アルコール多飲歴なし．

**症例2**：34歳，男性．症例1の弟．15歳頃より時々下腿浮腫出現．脈圧増加(148/40mmHg)を指摘されている．18歳時，知能は正常で自覚症状はないが，四肢近位筋の軽度の萎縮を認め，四肢深部反射は減弱．胸部XP，心電図，血液ガス分析に異常なし．血中CK値は正常，血中クレアチン0.62mg/d1と軽度上昇．血中乳酸19.3mg/d1，ピルビン酸1.24mg/d1と軽度上昇．上下肢近位部と肩甲帯に軽度筋萎縮をみるが日常生活には支障なし．事務員として勤務．症例1と同様に，全経過を通して，精神症状，知的障害，脳卒中様発作，外眼筋麻痺，難聴，四肢感覚障害，耐糖能異常はみられていない．アルコール多飲歴なし．

* 鹿児島大学医学部第三内科
** 久留米大学医学部付属医療センター神経内科

表1　本家系のB1欠乏，乳酸・ピルビン酸代謝および筋障害に関する血液検査成績
〔1981年9月におけるデータ，文献1より引用〕

| | 父親 | 母親 | 症例1 | 症例2 | Normal value |
|---|---|---|---|---|---|
| Thiamine (ng/ml) | 28.1 | 39.1 | 40.6 | 21.5 | 50～70 |
| TKA (g/m1.RBC/hr.) | 248 | 363 | 286 | 439 | 500～1000 |
| TPP effect (%) | 14.5 | 50.9 | 102.6 | 14.5 | 0～15 |
| Pyruvate (mg/dl) | 0.64 | 0.77 | 2.43 | 1.24 | 0.3～0.9 |
| Lactate (mg/dl) | 8.8 | 9.1 | 32.8 | 19.3 | 4～16 |
| Alanine (mg/dl) | − | − | 5.4 | 5.7 | 1.3～4.9 |
| pH (arterial blood) | 7.39 | 7.40 | 7.38 | 7.37 | 7.35～7.45 |
| CPK (IU) | 17.2 | 15.8 | 15.7 | 23.4 | 40以下 |
| Creatine (mg/dl) | 0.58 | 0.52 | 0.98 | 0.62 | 0.17～0.50 (M)<br>0.35～0.93 (F) |
| Carnitine (nmol/ml) | − | − | 52.2 | 67.5 | 48～63 |

TKA: Transketolase activity in erythrocytes,
TPP effect: Thiamine pyrophosphate effect of transketolase in erythrocytes

表2　症例1の36歳時の生検筋におけるミトコンドリア電子伝達系酵素活性

| | 症例 1 | Control (n=20) (mean±S.D. and range) |
|---|---|---|
| NADH cytochrome c reductase (complex I+III) | 8.51 | 7.80±1.94　5.41-12.01 |
| Succinate cytochrome c reductase (complex II+III) | 3.04 | 2.07±0.62　1.30-2.92 |
| Cytochrome c oxidase (complex IV) | 5.61 | 7.55±2.47　4.50-11.70 |
| Citrate synthase | 28.86 | 9.03±1.64　6.69-12.50 |

Enzyme activities are expressed as μmol/min/g of tissue

### ビタミンB1代謝に関する検討

症例1の初回入院時における本家系の，B1欠乏，乳酸・ピルビン酸代謝および筋障害に関する血液検査では，両親，弟の血中B1値，TKAは低く,さらに母親はTPP効果が高く,全例B1欠乏と診断された(表1)[2].ビタミンB1 75mg/日1週間内服投与にて，2症例ともに，乳酸，ピルビン酸，CKの改善を認めた．症例1の初回入院時おける骨格筋のpyruvate dehydrogenase complex(PDHC)，pyruvate decarboxylase(PDC), α-ketoglutarate dehydro-genase complex(KGDHC), α-ketoglutarate decarboxylase(KGDC)，リンパ球のα-1,4-glucosidase活性の測定では，症例1ではPDHC活性が正常下限，症例2ではPDHCとPDC活性が低下していた[2].

### 筋生検所見

症例1は，20歳時 Ragged-red fibersを3～12%の筋線維に，36歳時には40%に認めている．なお，strongly SDH-reactive blood vessels，cytochrome c oxidase欠損線維 を認めていない．症例2は18歳時に，RRFsを5～12%に認めた．症例1の20歳時の心筋生検所見では，グリコーゲンの蓄積と異常ミトコンドリアの集積を認めた．

### MtDNA分析およびミトコンドリア電子伝達系複合体活性

2症例および両親の末梢血よりDNAを抽出し，mtDNA分析を行った．3243変異を症例1,2およびその母親に認めた．変異mtDNAの全mtDNAに対する割合は，症例1の血液で87%，筋肉で96%，症例2の血液で89%，母親の血液で57%であった(図)．36歳時に行った症例1の生検筋を用いたミトコンドリア電子伝達系複合体活性の測定では，複合体Ⅰ+Ⅲ，Ⅱ+Ⅲ，Ⅳともに正常範囲であったが，citrate synthase活性が正常の3倍に上昇していた(表2).

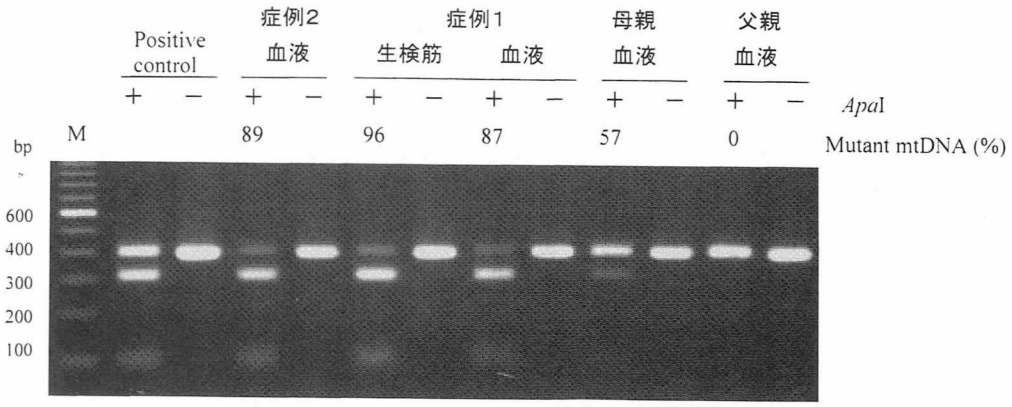



図　PCR-RFLPによるmtDNA3243A-to-G変異の検出

## 考　　察

本家系例はmtDNA3243A-to-G変異を伴うミトコンドリアミオパチーであるが，その特徴は家族性にB1低下がみられること，3243変異を有しながら17年間の経過期間中，中枢神経症状を全く示していないことである．3243変異は，主にMELASに見られるmtDNA変異であり，種々の中枢神経症状を伴うことが多い．しかし，本例のように中枢神経症状を長期間に渡って示さない例の報告もあり[3]，MELASとの違いが何によっているのか，今後，分子病態的検討が必要である．症例1の心筋症については，ビタミンB1投与により改善し，その後症状の進行をみていないことより，脚気心の可能性が高い．また，その後，心機能の悪化も見ていない．しかし，心筋にミトコンドリア異常が存在することは，心筋生検所見からみて疑いはないものと考える．症例1は，脚気心発症を契機として，ミコンドリアミオパチーの症状が顕在化したものと考えられる．両症例ともに慢性のB1欠乏状態にあり，成長に伴いB1必要量が増加し，TCAサイクルの機能低下，mtDNA変異によるミトコンドリア機能障害の顕在化とつながって行った可能性が考えられる．本家系のB1欠乏の原因として，食事性，B1吸収障害，B1需要量増加などが考えられるが，遺伝的要因やミトコンドリア異常との直接の関連も否定できない．これまで高乳酸，高ピルピン酸血症を伴うミトコンドリアミオパチーで，高拍出性心不全を合併し，サイアミン投与が有効であった例がMastaglaiaら[4]およびRowlesら[5]によって報告されている．われわれも，脚気にて発症し，肥大型心筋症をきたしたMERRF例を経験している(Ananの症例10)[6]．発症時の症例の栄養状態や生活習慣などによるB1摂取不良が存在した可能性も考えられるが，ミトコンドリア異常症が基礎に存在する場合には脚気を発症しやすい可能性も否定できない．

## ま と め

ビタミンB1欠乏を家族性に認め，脚気心にて発症したmtDNA3243A-to-G変異を示すミトコンドリアミオパチーの兄弟例を報告した．初診時より，17年間に渡って経過観察したが，全経過を通じて，心筋症の進行もなく，外眼筋麻痺，難聴，四肢感覚障害，脳卒中様発作，精神症状，知的障害，耐糖能異常は認められなかった．ミトコンドリア3243変異の臨床病型のひとつとして，今後，筋症状のみを示す例や脚気との関連にも注目する必要があることを指摘した．

## 文　　献

1) DiMauro S and Bonilla E : Mitochondrial encephalomyopathies. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL (eds) The molecular and genetic basis of neurological disease, Second edition. Butterworth-Heinemann, Boston Oxford Johannesburg Melbourne New Delhi Singapore, 1997, pp201-235

2) 佐藤能啓，納　光弘，松石豊次郎，糸川嘉則，加地正郎：ビタミンB1欠乏を有する家系内にみられた高乳酸，高ピルビン酸血症を伴うミトコンドリアミオパチーの同胞例．臨床神経 23：668-677, 1983

3) Damian MS, Hertel A, et al : Follow-up in carriers of the 'MELAS' mutation without strokes. Eur Neurol 39 : 9-15, 1998

4) Mastaglia FL, Thompson PL, et al : Mitochondrial myopathy with cardiomyopathy, lactic acidosis and response to predonisone and thiamine. Aust NZ J Med 10 : 660, 1980.

5) Rowles JM and Weller RO : Familial association of metabolic myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia. Am J Med 56 : 891, 1974.

6) Anan R, Nakagawa M, et al : Cardiac involvement in mitochondrial diseases : a study on 17 patients with documented mitochondrial DNA defects. Circulation 91 : 955-961, 1995.

# ミトコンドリア血小板電子伝達系酵素活性との関連の検討

斎　藤　加代子*

研究協力者　中　野　和　俊*　臼　井　紀　久*　伊　藤　知賀子*
中　山　智　博*　王　　崇　玫*　坂　本　由美子*
大　澤　真木子*

## 緒　　論

mitochondria(mt)脳筋症において電子伝達系酵素の経時的評価は，患者におけるmt機能の変化を客観的に評価する意味で重要であるが，十分な検討が為されてこなかった．私達はこれまで末梢血から血小板を分離し，さらにmitの分離を行い，一部microplatereaderを用いた測定法を用いた(第38回先天代謝異常学会(1995年)に発表した．この度，私達は比較的少量(5-10ml)の末梢血から分離した血小板(PLT)で，microplatereaderでcomplex Ⅱ+Ⅲ(Ⅱ+Ⅲ), Ⅳ(Ⅳ),citrate synthetase(CS), 蛋白を測定するシステムを開発した.この方法を応用し,MELAS(mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes)患児のmt酵素の変化を経時的に測定した．その結果を臨床症状，治療と対応させて検討し，患児の卒中様症状とPLT mt機能との相関を評価したので報告する．

## 対　　象

症例は7歳女児．3歳時より筋力低下を認め，歩行，立位保持が不可能になったため5歳時当科受診した．筋生検でragged red fibers, Ⅳの低下を認め，血液mtDNAの検討でnp 3243(A→G)の点変異を認めた．入院後cytochrome cの点滴および経口投与を行い筋力は改善したが軽い頭痛，視覚異常が出現し，6歳1ヵ月時に頑固な頭痛が出現したためジクロロ酢酸ナトリウム(DCA)を徳島大小児科方式に従って投与した．DCA投与後は頑固な頭痛は消失し軽い頭痛，視覚異常も軽減した．血中乳酸値はDCA投与前が50-100mg/mlと高値を呈していたが，DCA投与後は20-50mg/mlと低下が認められた．

## 方　　法

患児末梢血5-10mlを血沈用citrateとともに採血し低速の遠心を繰り返してPLTの分離し液体窒素で保存した．microplatereader(iEMS リーダーMF；大日本製薬株式会社)を用いてⅡ+Ⅲ，Ⅳ，CS，蛋白を測定した．PLT分離法，Ⅱ+Ⅲ，CS，蛋白の測定法はRH Haasら(1995)の方法に準じ，Ⅳは新たにmicroplatereaderでの測定法に改良した．

## 結　　果(図1, 2)

PLT Ⅱ+Ⅲはcytochrome cを投与中から中枢神経症状の出現とともに次第に低下し，卒中様症状(頑固な頭痛)出現時およびDCA投与直後が最も低値となった．DCA投与後は上昇が認められた．PLT ⅣはPLT Ⅱ+Ⅲと同様にcytochrome cを投与中から中枢神経症状の出現とともに次第に低下し，卒中様症状(頑固な頭痛)出現時が最も低値となりDCA投与後は上昇が認められた．CSも卒中様症状(頑固な頭痛)出現時に低下傾向となりDCA投与後は上昇傾向が認められたがPLT Ⅱ+Ⅲ，Ⅳほどその傾向は明らかではなかった．PLT Ⅱ+ⅢとⅣの比較では，Ⅳがより卒中様症状(頑固な頭痛)に相関しているようであった．PLT Ⅱ+Ⅲ，Ⅳは血小板蛋白単位の酵素活性でありmitochondria蛋白単位の酵素活性を反映しない可能性がある．これを補正するために，mitochondria量を反映すると言われているCSでPLT Ⅱ+ⅢとⅣを除して,PLT Ⅱ+Ⅲ/CSとⅣ/CSで検討した．PLT Ⅱ+Ⅲ/CSは卒中様症状出現に明らかに低下なく，Ⅳ/CSの検討ではⅣ/CSが卒中様症状出現に明らかに低下したことから卒中様症状出現時の電子伝達系酵素複合体Ⅳの特異的低下が示唆された．

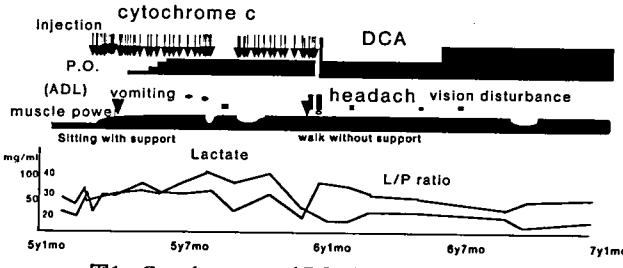



図1　Cytochrome c and DCA Treatment in MELAS

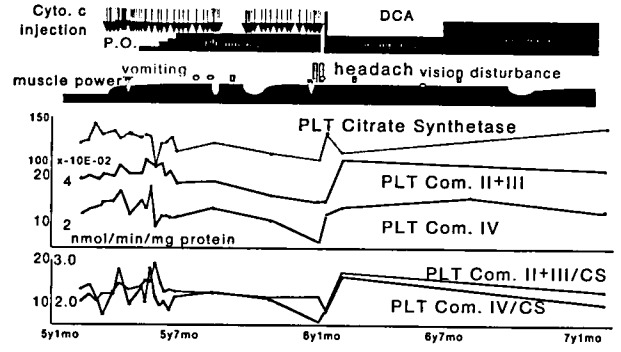



図2　PLT mitochondrial activities in MELAS

* 東京女子医科大学小児科

## 考　　察

今回の結果から卒中様症状時のPLT Ⅱ+Ⅲ，Ⅳ，CS，Ⅳ/CSの低下が示唆された．従来，中枢神経とPLT電子伝達系酵素の異常ではParkinson病(Haas, 1995), Alzheimer病，特発性ジストニアがあるがMELASにおいてもPLT電子伝達系酵素の異常が中枢神経mitochondria機能を反映している可能性がある．また，PLT機能低下と卒中様症状との関連の可能性も考慮する必要があると思われた．

## 結　　論

卒中様症状とPLT Ⅱ+Ⅲ，Ⅳ，Ⅳ/CSとの相関，DCAによるPLT Ⅱ+Ⅲ，Ⅳの改善が認められMELASにおけるPLT電子伝達系酵素測定の有用性が示唆された．

## 謝　　辞

ミトコンドリアDNAを測定いただいた国立精神・神経センター，埜中征哉先生，後藤雄一先生に感謝します．

## 文　　献

1) Haas RH, Nakano K, et al : Low platelet mitochondrial complex I and comlex Ⅱ/Ⅲ acticity in early untreated Parkinson's disease. Ann Neurol 37 : 714-722, 1995.

# ミトコンドリアDNA欠失疾患の培養細胞における遺伝子の動的変化

桃　井　真里子*

研究協力者　斎　藤　茂　子*

**要　旨**　Pearson症候群患者とKearns-Sayre症候群患者からのリンパ球，継代培養したリンパ芽球，筋芽細胞，線維芽細胞の変異mtDNAの割合の変化を明らかにした．Pearson症候群患者のin vivoでのリンパ球の変異mtDNAは，日齢313では82%，464では65%，662では47%と減少しており，臨床的な血液学的異常の改善と相関していた．Pearson症候群のリンパ芽球細胞株では，継代培養により変異mtDNAが82%から急激に減少し，Passage 4では消失した．Kearns-Sayre症候群のリンパ芽球細胞株では培養による変動はなかった．これらは1個の細胞内の変異mtDNA量が異なることによると推定された．また，Kearns-Sayre症候群筋芽細胞での変異mtDNAは，68%から3passageで10%まで減少したが，細胞の継代を続け，発育速度が遅くなるにつれて，再び変異mtDNAが増加した．線維芽細胞は30%から15%前後まで減少し，継代を続けてもほぼ一定の値を示した．このような疾患または組織による変異遺伝子の割合の変化様式の違いは，変異遺伝子の複製速度と細胞の分裂増殖速度の違いによると推察した．

## はじめに

ミトコンドリア異常症の一つであるPearson症候群は，乳児期に汎血球減少と膵外分泌不全，高乳酸血症を呈する致死率の高い疾患であるが，生存例では貧血が自然緩解する．自然緩解するメカニズムの解明はミトコンドリア異常症の治療に結びつく可能性があることから，我々は症状の改善と関連した変異mtDNAの動的変化について検討した．はじめに患者の血液学的異常の改善と変異mtDNAの割合の変化をin vivoのリンパ球を用いて明らかにした．また，細胞分裂能を高くするためリンパ球をEBウイルスにより形質転換させ，細胞増殖に伴う変異mtDNAの推移をみた．疾患の違いによる変異mtDNAの推移を比較するため，Kearns-Sayre症候群(KSS)患者のリンパ球から同様の培養リンパ芽球の系を確立した．さらに，KSS患者の線維芽細胞，筋芽細胞を継代培養し，組織毎の相違を検討した．

## 方　法

**症例**：症例1は8か月から発熱，汎血球減少症，肝機能障害を呈し，mtDNA欠失からPearson症候群と診断された．1歳2か月から貧血は改善したが，1歳9か月，感染に伴うアシドーシスの悪化のため死亡した．症例2は10歳男児．貧血の既往はなく，8歳から小脳失調が顕著となったKSS患者である．

**検体と培養**:症例1は,生後313日と輸血が不要となった464日，662日にリンパ球分離し，一部を形質転換させリンパ芽球細胞株を継代培養した．passageの際には，細胞数を一定にし，分裂回数を計算した．症例2は，リンパ芽球と皮膚線維芽細胞，筋芽細胞の培養を行った．

**遺伝子解析**：PCR direct sequenceにより欠失部位を同定した．定量解析は，DNAをPvuIIで切断後Southern blot法を行い，Fujix Bioimaging analyzer(BAS2000)を用いて全mtDNAに対する変異mtDNAの割合を測定した．

## 結　果

**(1)mtDNA欠失部位**：症例1はmtDNA塩基番号10942-15361の4420bpの欠失であり，欠失部位の両端には10bpの繰り返し配列を認めた．症例2は8826-14818の5993bpの欠失であり，繰り返し配列は存在していなかった．

**(2)リンパ球(in vivo)の経時的変化(図1-a)**：症例1のリンパ球の変異mtDNAは，日齢313では82%，464では65%，662では47%と減少していた．

**(3)リンパ芽球培養細胞の経時的変化(図1-b, 2-a)**：症例1のリンパ芽球細胞株での変異mtDNAは，継代培養により，82%から急激に減少し，Passage4では消失した．培養リンパ芽球での分裂回数を計算すると，Passage1から4までの間は15.5回であった．症例2では，リンパ球の変異mtDNA量は5%で，培養による変動はなかった．

**(4)各培養細胞の経時的変化(図2-b, c)**：症例2の筋芽細胞での変異mtDNAは，68%から3passageで10%まで減少したが，細胞の継代を続け，発育速度が遅くなるにつれて，再び変異mtDNAが増加した．線維芽細胞は30%から15%前後まで減少し，継代を続けてもほぼ一定の値を示した．

* 自治医科大学小児科

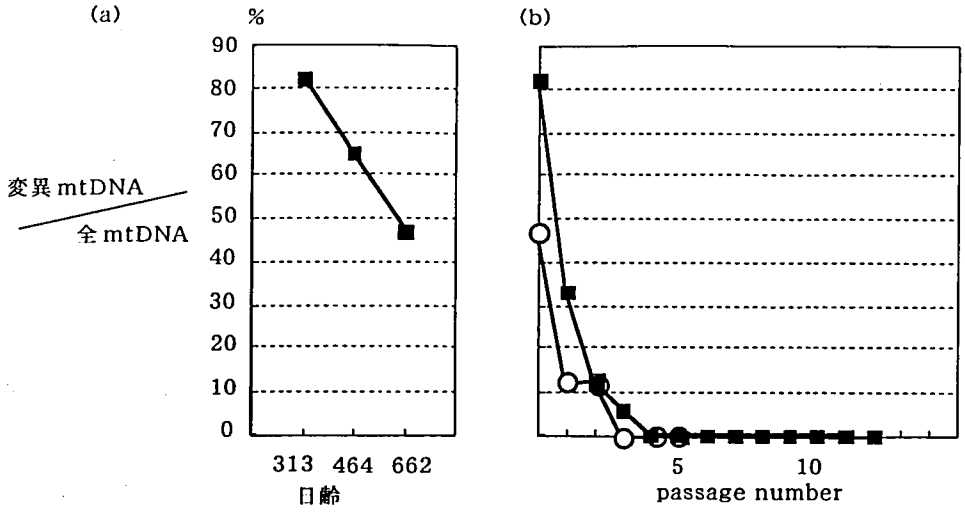



**図1** 症例1のリンパ球と培養リンパ芽球中の変異mtDNAの経時的変化
サザンブロット法によって得られた全mtDNA(正常mtDNAフラグメント+変異mtDNAフラグメント)に対する変異mtDNAフラグメントの割合を計算し，経時的推移をグラフ化した．
(a)リンパ球(in vivo)
(b)培養リンパ芽球 ■：日齢313のリンパ球の培養，○：日齢662のリンパ球の培養

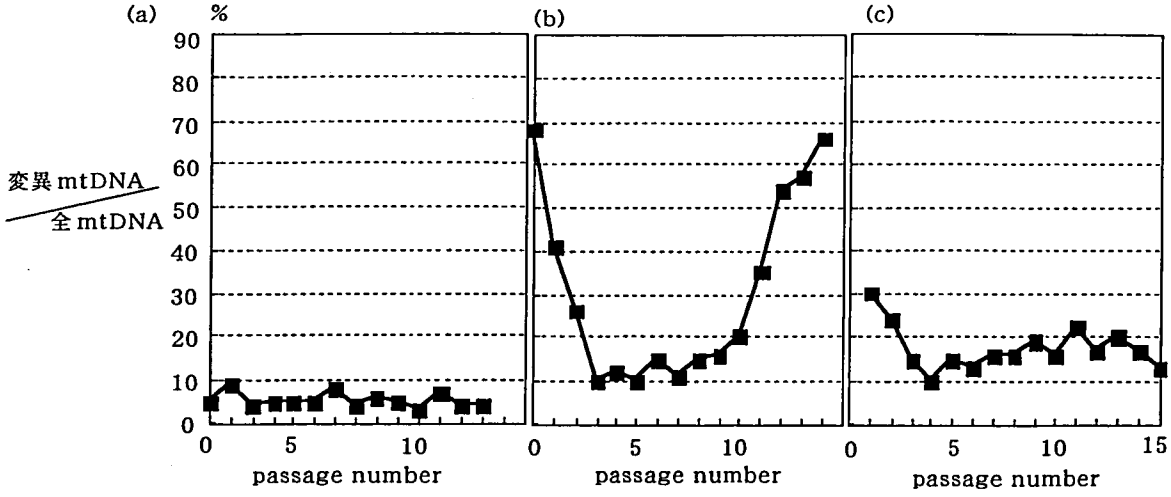



**図2** 症例2の各培養細胞における変異mtDNAの変化
継代培養した細胞から抽出したDNAのサザンブロット法を行い，検出された全mtDNAに対する変異mtDNAの割合の推移を示した．
(a)リンパ芽球 (b)筋芽細胞 (c)腺維芽細胞

## 考　　案

Pearson症候群のin vivoでのリンパ球の変異mtDNAの推移は，本症の血液所見の改善と相関していた．

症例1と2の培養リンパ芽球の変異mtDNAの経時的変化の様式は異なっており，病態の違いにより変化の様式にも違いがみられた．欠失mtDNAは，複製速度が正常mtDNAよりも速いと考えられるが，変異遺伝子を多く有する細胞と正常遺伝子を多く有する細胞では分裂増殖能が異なるため，細胞集団あるいは組織の変異mtDNA量は，変異遺伝子の複製速度と細胞の分裂増殖速度により規定されると推察される．Pearson症候群のような血液学的異常が前面に立つ疾患では，1個のリンパ球内の変異mtDNAの割合が非常に高く，機能的に劣ると考えられる．細胞増殖に伴って正常mtDNAが優位になることは，変異遺伝子を多く有する細胞のアポトーシスが起こり細胞が淘汰されているか，または増殖が停止し，正常細胞のみが速い速度で分裂を繰り返していることが考えられる．アポトーシスとの関連性に関してはさらに検討する必要性がある．

# ミトコンドリア病とアポトーシス

田　中　雅　嗣*

研究協力者　米　田　　誠**　Jin Zhang*　成　瀬　恵　治***
Harm-Jan W. Borgeld****　Jian-Sheng Gong*　八　木　國　夫*

## 緒　言

ミトコンドリア病の病因・病態に関しては，病型特異的なミトコンドリア遺伝子(mtDNA)変異と，それに伴う呼吸鎖の機能的障害が明らかとなっている．しかし，呼吸鎖異常がいかなる機構で細胞障害，しいては細胞死をもたらすかは明らかにされていない．ミトコンドリア病患者の細胞は，呼吸鎖機能の障害によって好気的エネルギー供給が低下すると共に，電子伝達の障害によって活性酸素種(ROS)の漏出が高まっていると考えられる．この考えに基づき，我々は，患者の変異型mtDNAを細胞質融合によって導入したサイブリッドにおいて，高濃度酸素下の培養による酸素ストレスによって，細胞死が誘導されることを報告してきた．今回，この細胞死がアポトーシスの範疇に属することを明らかにすると共に，アポトーシスを引き起こすミトコンドリア内での早期変化を検討した．

## 方　法

細胞株として，正常mtDNAを有する培養細胞($\rho^+$細胞)，mtDNAを欠損した培養細胞($\rho^0$細胞)，MELAS3243あるいはMERRF8344変異を導入したサイブリッド($syn^-$細胞)を用い，95%酸素下で4日間培養し細胞死を誘導した．アポトーシスに伴う，核の分葉化・クロマチン濃縮を蛍光色素H33342を用い解析した．正常大気圧および酸素ストレス下におけるperoxide産生を，蛍光色素dichlorofluorescin diacetate ($H_2$DCF-DA)を用い，蛍光顕微鏡下あるいは共焦点レーザー顕微鏡下で形態学的および定量的解析を行った．また，ミトコンドリアの膜電位($\Delta\psi m$)を蛍光色素JC-1を用い同様に解析した．さらに，ROS産生を抑制する*N*-acetyl-*l*-cysteine (NAC)が，アポトーシスに及ぼす影響を解析した．また，アポトーシスとの関連が注目されているプロテアーゼであるcaspase-3の発現および活性の変動も検討した．

## 結　果

H33342を用いた観察では，酸素負荷2日以降に核の分葉化・クロマチン濃縮等の明らかなアポトーシスを示す細胞が出現し，$syn^-$細胞では$\rho^+$細胞や$\rho^0$細胞に比し強い変化が認められた．正常大気圧下においても，$syn^-$細胞は$\rho^+$細胞に比し，peroxide産生の上昇が認められた．逆に，$\rho^0$細胞ではperoxide産生が著明に低下していた．$\Delta\psi m$は，$syn^-$細胞，$\rho^0$細胞共に$\rho^+$細胞に比し低下していた．さらに，酸素負荷開始後6時間目に，$syn^-$細胞で著明なperoxide産生の増大(ROS burst)が認められたが，$\Delta\psi m$の低下はこれに比し軽微であった．NAC添加によって，$syn^-$細胞における酸素負荷時のアポトーシスは約50%抑えられたが，ROS burst後にNACを添加しても，アポトーシスの抑制は観察されなかった．さらに，アポトーシスの出現に先行して，caspase-3の発現および活性の上昇が観察された．

## 考　察

酸素ストレスによって$syn^-$細胞に強く誘導されるアポトーシスは，ミトコンドリア内での早期のROS burstが引き金になっており，ROS burstの方がミトコンドリアの膜電位の低下より，酸素ストレス誘導性アポトーシスにおいて重要と考えられた．また，アポトーシスの分子機構の上で注目されているプロテアーゼであるcaspase-3との関連も認められた．実際の患者細胞においても，慢性的酸素ストレスによって，ROSの増大が繰り返されることで，アポトーシスを含めた細胞死が生じていると考えられる．

## 文　献

1) Zhang J, Yoneda M, Naruse K, Borgeld H-J W, Gong JS, Obata S, Tanaka M and Yagi K : Peroxide production and apoptosis in cultured cells carying mtDNA mutation causing encephalomyopathy. Biochem. Molec. Biol. Int. 46 : 71-79, 1998.

* 財団法人岐阜県国際バイオ研究所
** 福井医科大学第二内科
*** 名古屋大学医学部第二生理学
**** 名古屋大学医学部第二生化学

# 多重欠失を示す家族性CPEOの2症例に認められた末梢神経内の血管病変：電顕的観察

吉野　英*

研究協力者　宗像　紳*　佐藤　猛*

**要　旨**　ミトコンドリア遺伝子の多重欠失を有し，常染色体優性遺伝形式を示すCPEOの2家系，2例の末梢神経を電子顕微鏡で観察した．2例とも末梢神経有髄線維の脱落，残存線維の軸索の変性が認められた．末梢神経内の小血管の平滑筋内および内皮細胞内にミトコンドリアの著明な集積を認めた．これらのミトコンドリアには顆粒状封入体や空胞状変性を示すものがあり，電子密度の高い顆粒を多数含む壊死に陥った平滑筋細胞も多数存在していた．mtDNAの多重欠失を示すCPEOに合併する末梢神経障害の成立機転として，小血管の平滑筋や内皮細胞のミトコンドリア異常による末梢神経の微小な循環障害も関与していることが示唆された．

## はじめに

進行性外眼筋麻痺症候群(CPEO)の中にミトコンドリアDNA(mtDNA)の多重欠失を示し，常染色体性優性遺伝形式を示す症例が存在する．われわれはこの家系内の1例において感覚障害と運動障害とを混在する末梢神経障害をきたした1例を経験した．この症例の末梢神経を電子顕微鏡で観察し，血管内の平滑筋細胞にミトコンドリアの集積と形態異常とを認めた．他の家族性CPEOの1剖検例の末梢神経も電顕で観察し，内皮細胞内のミトコンドリアに形態異常を認めた．末梢神経病変の成因としてミトコンドリア異常による神経節細胞，シュワン細胞などの代謝異常に加え，血管の変化も加わっていると考えたので報告する．

## 症　例

[症例1]　60歳，男性

家族歴では母親および妹2名がCPEO，1名の妹の生検筋のミトコンドリア遺伝子解析にて多重欠失が認められている．本例は44歳頃より外眼筋障害が発症した．59歳時より下肢にglobe&stocking型の末梢神経障害が生じた．膝蓋腱およびアキレス反射は消失，末梢に強い感覚障害および運動障害が認められた．症状は徐々に進行し，手指の末端にもしびれ感が生じ，歩行障害を呈するようになった．末梢神経伝導速度は腓腹神経において反応は導出不能であった．橈骨神経の伝導速度も低下していた．臨床検査では血中，髄液の乳酸，ピルビン酸値は正常，耐糖能も正常であった．

[症例2]　47歳，男性(剖検例)

家族歴では妹2名に同病．3歳時より難聴，34歳より四肢筋萎縮，45歳入院時には外眼筋麻痺，全身の骨格筋の軽度萎縮，性腺機能低下，腎機能障害，易疲労性，軽度の末梢神経伝導速度の低下を認めた．47歳心不全で死亡し剖検を行った．

## 結　果

症例1，2とも筋生検ではragged-redfiberが認められ，チトクロームC酸化酵素(CCO)の反応は陰性，抗CCO抗体を用いた免疫組織化学では酵素蛋白の低下を示す線維も存在していた．しかし，生検筋内にはMELASで記載されているようなSSVを示す血管は認められなかった．

骨格筋から抽出したmtDNA解析では多重欠失を示した．症例2の妹も全く同様の臨床症状と経過を示し，筋のmtDNA解析でも全く同じサイズの多重欠失を示した．

症例1の腓腹神経生検では光顕上，大径線維を主体にした神経線維の高度の減少が見られた．電顕では末梢神経内の小血管の平滑筋内にミトコンドリアの著明な集積を認めた(**写真1**)．この増加したミトコンドリアには顆粒状封入体や空胞状変性を示すものがあり，さらに電子密度の高い顆粒を多数含む壊死に陥った平滑筋細胞も多数存在していた．末梢神経では有髄線維の脱落が著明，残存線維では軸索の変性が認められた．

症例2では光顕では，脊髄後根部で有髄線維の脱落が認められた．腓腹神経の電顕では末梢神経の小血管の内皮細胞にてミトコンドリアの増加とその内部に顆粒状封入体を認めた(**写真2**)．

## 考　察

常染色体性優性遺伝を示す家族性CPEOではミトコンドリアDNAの多重欠失が特徴である．家族例においてmtDNAの欠失サイズが同一であること，臓器毎に欠失ミトコンドリアのパターンが同一であることなどから，核由来のミトコンドリア遺伝子異常の関与も推定されているが，まだ実証されていない．われわれはミトコンドリ

* 国立精神・神経センター国府台病院神経内科

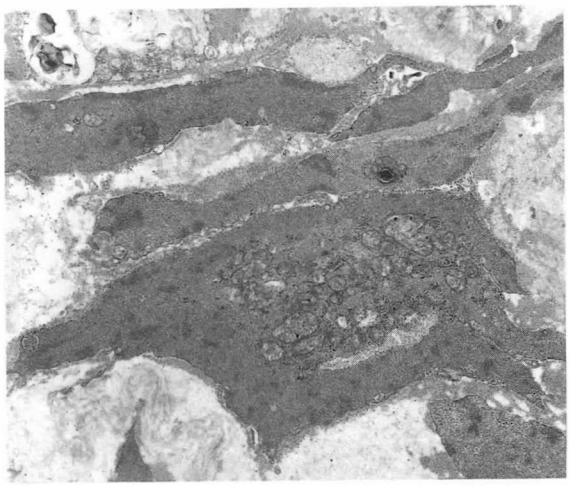


**写真1**　症例1の末梢神経内の小血管の電子顕微鏡写真．平滑筋細胞内にミトコンドリアが集積している．(×8,450)

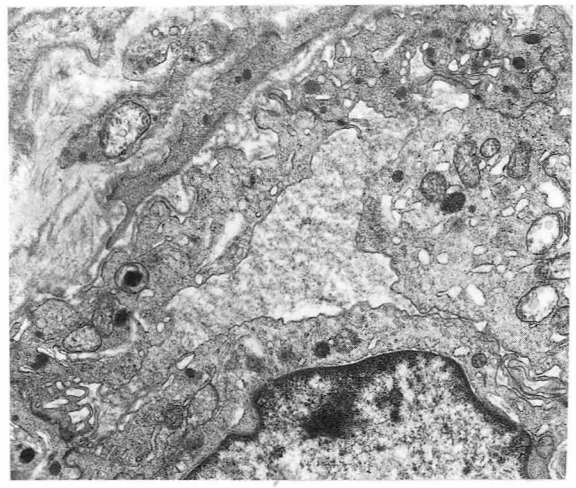


**写真2**　症例2の末梢神経内の小血管．内皮細胞内のミトコンドリアの増加と顆粒状封入体か認められる．(×7,800)

アDNAの多重欠失を示す2家系の2症例に末梢神経障害を認め，電顕的に末梢神経内の小血管の平滑筋内にミトコンドリアの増加と変性，あるいは内皮細胞内のミトコンドリアの増加を認めた．

MtDNAの多重欠失を示すCPEOに合併する末梢神経障害の成立機転として，神経節細胞や軸索，さらにシュワン細胞のミトコンドリアの電子伝達系酵素の代謝障害が考えられる．さらに，電顕で観察されたように軽度ではあるが小血管の平滑筋や内皮細胞のミトコンドリア異常による末梢神経の微小な循環障害も関与していることを示唆した．

# 神経・筋疾患における長寿に関するミトコンドリア遺伝子型に関する検討

佐橋　功[*,**]

研究協力者　衣斐　達[*,**]　中尾直樹[*,**]　清水宏伸[***]
岸　孝彦[***]　Jian-Shen Gong[****]　Jin Zhang[****]
田中雅嗣[****]

**要　旨**　ヒトの長寿関連mtDNA型としてLeu→Metアミノ酸置換をもたらすmtDNAのND2領域内のMt5178C→A塩基置換が報告され，C型に疾病罹患率が高いとされた．我々は神経筋疾患308例の冷凍血球より総DNAを抽出し，mtDNAのPCR産物を制限酵素*Alu*Iを用いて消化しMt5178C/Aを鑑別し健常対照者の結果と比較した．結果：Mt5178A型に比し有意なMt5178C型の増加が重症筋無力症，パーキンソン病，脳血管障害にあり，進行性筋ジストロフィーは有意でなかった．結語：成人疾患に伴うmtDNA遺伝子のMt5178C型は，ミトコンドリアからのラジカル産生量や電子伝達系の機能低下などにより，神経筋疾患の病態に関連している可能性を考えた．

## はじめに

ミトコンドリア脳筋症[1)-3)]，心筋症[4),5)]，糖尿病[6)-8)]などにおけるミトコンドリアDNA(mtDNA)の異常が報告されて久しい．他方，老化や変性疾患とのmtDNA変異について加齢との関連で注目されている[9)]．また百寿者の研究を通じ，ヒトの長寿(longevity)に関連したミトコンドリア遺伝子(mtDNA)型としてLeu-to-Metアミノ酸置換をもたらすmtDNAのNADH dehydrogenaseの第2サブユニット遺伝子(ND2)領域内の塩基番号5178のC-to-A塩基置換(多型)が報告され，本邦成人とくに壮年以降の例ではMt5178C型に疾病罹患率が高く，Mt5178A型は百寿者を含む高齢健常者が多いとされた[10)]．しかしmtDNAの変異速度は早く[11)]，ゆえに個々人の間でのmtDNAの多様性は大きく[12)]，さらにMt5178A型は全世界レベルでは少なく[13)]，本邦では比較的多い傾向が指摘されている[14)]．またつい最近ではMt5178A型とC型はND2のLeu→Met置換に加え，ATP合成酵素の第8サブユニット(ATP8)のLeu→Phe置換および16Sリボソーム RNAの塩基置換Mt3010G→Aという2カ所の置換との関連で研究が進行している．

本報告は進行性筋ジストロフィー(PMD)を含む神経筋疾患の発症に関わる遺伝的背景を解明するために，長寿に関連するミトコンドリア遺伝子型Mt5178A型(以下A型)とMt5178C型(以下C型)が神経筋疾患に如何に修飾しているかを検討するために，各疾患におけるmtDNAのMt5178型を解析した．

* 愛知医科大学第4内科
** 愛知医科大学加齢医科学研究所
*** 愛知医科大学中央検査部
**** 岐阜県国際バイオ研究所

## 対象および方法

**対象**：神経・筋疾患の308例であり，内訳はPMDとしてBecker型(BMD)，肢帯型(LGMD)，筋緊張性(MyD)，顔面肩甲上腕型(FSHD)，rimmed vacuoleを伴う遠位型(DMRV)を含むPMD(40.8±12.3歳)，CPEOやMELAS症候群などのミトコンドリア病(Mt-D；42.1±13.9歳)，運動ニューロン疾患(MND；57.6±7.5歳)，脊髄小脳失調症(SCA；61.1±12.8歳)，アルツハイマー病(Alz；74.0±9.86歳)，パーキンソン病(PD；65.2±13.5歳)，脳血管障害(CVD；70.0±9.6歳)，自己免疫性神経筋疾患(AID；53.6±15.5歳)の重症筋無力症 (MG)，多発・皮膚筋炎(PM/DM)，その他などである．対照は愛知・岐阜県在住からの健常者633例(男436，女 197；44±12.4歳；男41.3±12.5歳，女49.9±9.7歳)であった．すなわち愛知県の男性400ml献血サンプルからの252例，岐阜県の健診受診の男184例と女197例であり施設の許可をえた残り血球である．なお今回はPMDも少なく症例数のバラつきが大きく，さらに疾患サンプルを多数分析中であり現時点での結果を記す．

**方法**：本研究3年間の当初2年間に渡り，その臨床経過中に何等かの理由で末梢血検査を行なった後の破棄血球を凍結保存したものを用いた．そして血液資料を解凍し総DNAを抽出し，一部はfluorescence-based automated direct sequencing[15)]で，また多くはmtDNAをPCRで増幅し制限酵素*Alu*Iを用いMt5178C→A型を検出し，対照者の結果と比較した．

なお対照者のA型：C型の比率は277：356であった．そして各疾患のMt5178A/C型の頻度や臨床パラメーターと比較検討した．また可能な症例につき，ミトコンドリアを中心とした細胞機能の低下や細胞死をもたらす血中の過酸化脂質(LPO；lipid peroxide)を八木法にて測定し検討

した．統計処理はFisher法およびOdds比にて行なった．

## 結　　果

全体の疾患対象の年齢分布は40歳代以上の症例が多いが，より高齢者にA型が多い傾向があり(80歳代，A型：C型=20：14)，70歳代以下(70歳代，A型：C型=34：69；60歳代，A型：C型=9：63；50歳代，A型：C型=12：41；40歳代，A型：C型=11：27；30歳代以下，A型：C型=8：31)はC型が多く(A型：C型=49：193)で80歳代との比較ではC型が有意に多く(p=0.0000067，Odds比=5.63)，C型の成人壮年疾患に対する高頻度が示唆された．以下に疾患別の結果を記す(表1)．

1)PMD：症例数が少ないが，A 型が多く男女差や年齢との関連は不明であった．LPO 値は C 型に高く($p<0.05$)，年齢と正の有意な相関がみられた．PMD の病型別では，BMD(n=3)は A 型：C 型=2：1，MyD(n=3)は A 型：C 型=2：1，DMRV(n=1)は A 型=1，LGMD(n=2)は C 型 2，FSHD(n=2)は A 型：C 型=1：1 であったが，症例数が少なく結果の記載に留める．

2)Mt-D:共同演者田中が前演題で発表し詳細は割愛する．今回の症例ではC型がより有意に頻度が高く，LPOは加齢と正の有意な相関を示した．

3)AID：MG：C型が有意に多く($p<0.01$)，症例数の男女差でも女性例に有意にC型が多かった($p<0.03$)．右側の年齢比較ではA型とC型には平均年齢に差はなく，LPO値も同様であった．MGにおける胸腺の過形成(hyperplasia)および胸腺腫(thymoma)合併群の比較では，過形成例(A型：C型=8：21)に比し胸腺腫例(A型：C型=1：9)によりC型に多い傾向がみられた(p=0.250，Odds比=5.63)．また血清中の抗AChR抗体価はC型(68.79±150.8 nMol/ml)はA型(18.71±24.76 nmol/ml)に比し高かったが，分散幅が大きく有意ではなかった．LPOの結果も，加齢と正の有意な相関を示した．

PM/DM：C型が男女ともに多く，加齢との関連も示唆されたが，LPOは，加齢と共にむしろ減少していた．

4)PD：中枢神経の代表的な変性疾患であるPDでは，有意なC型の増加が男女を含めてあったが($p<0.002$)，LPOと加齢と間には相関はなかった．

5)SCA：全て外来通院中の症例で経過年数は大部分5年以内の症例であった．より女性を中心にC型が多かったが，A型の症例における年齢は高く，有意ではないが，C型SCAの若年性が示された．またSCAの遺伝歴「あり」・「なし」群の比較では，遺伝歴「あり」群(A型：C型=2：2)に比し遺伝歴の「なし」の弧発群(A型：C型=3：12) にC型が多かった．

6)CVD：CVDでは有意にC型が多く($p<0.001$)，男性(A型：C型=11：31)に比し女性(A型：C型=3：20)にその傾向が強かった．CVDのLPO値と加齢と間には相関はなかった．CVDにおける糖尿病「あり」群(A型：C型=1：9)と「なし」群(A型：C型=13：41)または高血圧「あり」群(A型：C型=4：18)と「なし」群(A型：C型=10：34)では，ともに合併群にC型が高かった．

7)**その他の疾患**：MNDなど，何れの疾患でもC型がより高かった．

表1

| 疾患名/総数 | Mt5178A | Mt5178C | 危険率(Fisher) | Odds 比 |
|---|---|---|---|---|
| PMD (11) | 6 | 5 | p=0.54 | |
| Mt-D (10) | 3 | 7 | p=0.35 | |
| MND (5) | 4 | 1 | p=0.18 | |
| SCA (19) | 5 | 14 | p=0.16 | |
| Alz (6) | 3 | 3 | p=0.99 | |
| PD (36) | 6 | 30 | p=0.0008 | 3.89 |
| CVD (64) | 14 | 50 | p=0.0004 | 2.78 |
| AID (72) | 19 | 53 | p=0.003 | 2.17 |
| MG (42) | 9 | 33 | p=0.003 | 2.85 |
| PM/DM(9) | 2 | 7 | p=0.31 | |
| 対照 (633) | 277 | 356 | | |

## 考　　察

今回の検討を通じ，ヒトmtDNAのND2遺伝子領域内のmtDNAの塩基番号5178(Mt5178)C型は神経・筋難病のうち，とくに壮年期前後に発症する成人疾患であるCVD，PD，MGなどで有意に頻度が高く，その症状の発現に影響を及ぼしている可能性が示唆された．すなわち本結果はmtDNA多型であるA型とC型の間で，おそらくミトコンドリアからのラジカル産生量，加齢に伴うmtDNA変異の蓄積および電子伝達系の機能低下の経過が異なり，疾患が顕在化するための1条件となっている可能性が考えられた．

また本検討では疾患別の症例数が異なり，一概に全ての疾患にC型が決定的であるとの断定は現時点では差し控えたい．とくにPMDではA型が高かったが，今回は検索症例数が多い疾患ほどC型が高い傾向がえられ，この結果現時点では記載に留めたい．また男女差ではMGとPM/DMを含むAIDやPDで有意に女性に多いC型があったが，しかしこれら2疾患群は，本来女性例が多い疾患である点を考慮する必要があろう．とくにPDでは発症年齢と性差間に有意差があるとの結果が一部に示されており，Mt5178C/A塩基置換と年齢を含む性差の検討は更に追及課題と考える．

血中の過酸化脂質(LPO)は，血中のフリーラジカルや活性酸素を通じて生成され種々疾病の引き金となりミトコンドリアを中心とした細胞機能の低下や細胞死をもたらすが，PMDを含む多くの疾患群で加齢とともに正の相関を示した．しかし正常者加齢や糖尿病などにもみられる事実でもあり，疾患特異的な意味づけは更に検討が必要と考えられる．

最後に先天性疾患であるPMDは症例数が少なくA型とC型が本症の修飾因子になっていると判断しえなかった．しかし症例数を増し心機能や予後などの臨床所見との比較を通し，PMDにおいてミトコンドリア酵素活性の低下，欠失を有するmtDNAの蓄積，脂質アルデヒド4-hydroxy-2-nonenalが付加した蛋白質の増加などの関与も考慮し，

PMDの症状進行(寿命延長)に関し酸化的ストレスとmtDNA多型との関与につき検討してゆきたい.

## 引用文献


1) Goto Y, Nonaka I and Horai S : A mutation in the transfer RNA$^{Leu\ (UUR)}$ gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalo-myo-pathies. Nature 348 : 651-653, 1990.

2) Ino H, Tanaka M, Ohno K, et al : Mithochondrial leucine tRNA mutation in a mitochondrial encephalomyopathy. Lancet 337 : 234-235, 1991.

3) Tanaka M, Ino H, Ohno K, et al : Mitochondrial DNA mutations in mitochon-drial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). Biochem Biophys Res Commun 174 : 861-868, 1991.

4) Tanaka M, Ino H, Ohno K, et al : Mitochondrial mutation in fatal infantile cardiomiopathy. Lancet 336 : 1452, 1990.

5) Zeviani M, Gellera C, Antozzi C, et al : Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy:Association with mutation in mitochondrial DNA tRNA$^{Leu\ (UUR)}$. Lancet 338 : 143-147, 1991.

6) Van den Ouweland JMW, Lemkes HH, et al : Mutation in mitochondrial tRNA$^{Leu\ (UUR)}$ gene in a large pedigree with maternally transmitted type Ⅱ diabetes mellitus and deafness. Nature Genet 1 : 368-371, 1992.

7) Kishimoto M, Hashiramoto M, Kanda F, et al : Mitochondrial mutation in diabetic patient with gastro-intestinal symptoms. Lancet 345 : 452, 1995.

8) Kadowaki H, Tobe K, Mori Y et al : Mitochondrial gene mutation and insulin-dependent type of diabetes mellitus. Lancet 341 : 893-894, 1993.

9) Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, et al: Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. Lancet I : 642-645, 1989.

10) Tanaka M, Gong J-C, Zhang J et al : Mitochondrial genotype associated with longevity. Lancet 351 : 185-186, 1998.

11) Vawter L and Brown W : Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. Science 234 : 194-196, 1986.

12) Horai S, Hayasaka K, Kondo R, et al : Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs. Proc Natl Acad Sci (USA) 92 : 532-536, 1995.

13) Cann RL, Stoneking M and Wilson AC : Mito-chondrial DNA and human evolution. Nature 325 : 31-36, 1987.

14) Tanaka M and Ozawa T : Strand asymmetry in human mitochondrial DNA mutations. Genomics 22 : 327-335, 1994.

15) Tanaka M, Hayakawa M and Ozawa T : Automated sequencing of mitochondrial DNA, in Methods in Enzymology. Mitochonmdrial Genetics and Biogenesis, Vol. 264, ed by Attardi G. and Chomyn A. Academic Press, Orlando FL, 1996 pp.407-421

# 長寿に伴うミトコンドリア遺伝子型

田　中　雅　嗣*

研究協力者　Jian-Sheng Gong*　米　田　　誠**　Jin Zhang*
宮　嶋　裕　明***　佐　橋　　功****　八　木　國　夫*

## 緒　　言

ミトコンドリアDNA (mtDNA)の変異がミトコンドリア脳筋症，心筋症，糖尿病で報告されている．体細胞におけるmtDNA変異の蓄積が加齢と変性疾患に関与していることが提唱されている．mtDNAの進化速度は核DNAの進化速度の5-10倍高いために，mtDNAの塩基配列の多様性は個体間で顕著である．冠動脈心疾患に関する疫学的研究によれば，寿命は父親の死亡年齢よりも母親の死亡年齢によって強い影響を受ける．母系遺伝によって伝えられたミトコンドリア遺伝子型が，mtDNAに対する酸化的損傷，mtDNA変異の蓄積速度，変性疾患に対する罹り易さ，さらには個体の寿命に影響を及ぼしている可能性がある．この仮説を検証するために，我々は37例の日本人の百寿者のmtDNAを分析した．

## 方法と結果

はじめに，11例の百寿者において，mtDNAの全塩基配列を蛍光を利用した自動塩基配列決定法によって解析した．多様な塩基置換が存在したが，mtDNAの全塩基配列が既に決定されていた43例の対照群と比較して，これらの百寿者において数個の塩基置換がより高い頻度で検出された．アミノ酸置換を伴う2ヶ所の塩基置換(第1はND2遺伝子領域内の塩基番号5178のC→A転換に基づくLeu→Met置換，第2はATP8遺伝子領域内の塩基番号8414のC→T転位に基づくLeu→Phe置換)および16S rRNA遺伝子領域内の塩基番号3010のG→A塩基転位が，対照群と比較して百寿者群でより高い頻度で検出された．Mt5178Aは百寿者の11例中9例で検出されたのに対し，対照群では43例中12例にのみ検出された($p<0.01$)．Mt8414Tは百寿者の11例中7例で検出されたのに対し，対照群では43例中11例にのみ検出された($p<0.05$)．Mt3010Aは百寿者の11例中7例で検出されたのに対し，対照群では42例中11例にのみ検出された($p<0.05$)．Mt8414TとMt3010Aの両者と有する百寿者7例はMt5178Aを有する百寿者9例に含まれていたので，これらの塩基置換の大部分は連鎖していることが示唆された．

これらの塩基置換の中からMt5178Aに注目し，PCR-RFLP法によって，37例の百寿者と252例の愛知県内の健康な献血者の試料をスクリーニングした．Mt5178Aの百寿者における頻度(23/37, 62%)は，献血者における頻度(114/252,45%)より統計学的に有意に高かった($p=0.04$，オッズ比=1.99)．このことはMt5178Aが長寿に関連していることを示唆している．

これらのmtDNAの塩基置換が疾患の発生に及ぼす影響を評価するために，Mt5178AとMt5178Cの頻度を，無作為抽出した大学病院の入院患者および外来患者338例において調べた．Mt5178AまたはMt5178Cを有する患者の年齢分布から，46歳未満の若い患者におけるMt5178Cの頻度はMt5178Aの頻度とほぼ等しかったのに対し(A:C=46:40)，46歳以上の高齢の患者におけるMt5178Cの頻度はMt5178Aの頻度と比較してより顕著な増加を示し(A:C=86:166)，45歳において明瞭な屈折点を示すことが明らかになった．高齢の患者におけるMt5178 A/C比(86:166)は，百寿者(23:14, $p=0.001$)および健常人対照(114:138, $p=0.01$)と比較して統計学的に有意に低かった．この結果はMt5178Cを有する個体が,Mt5178Aを有する個体と比較して,成人発症性の疾患に罹患しやすいことを示唆している．

## 考　　察

Cannらはヒトの進化に関する研究において，世界中から集めた147例の試料の中で，わずかに5例のアジア人と1例のヨーロッパ人がMt5178Aを有していたと報告した．この観察はMt5178Aが世界のヒト集団の中で比較的稀であることを示している．Mt5178Aの頻度が日本人集団の中で45%と高いことは，日本の平均余命(女性83.59歳，男性77.01歳)が世界中で最も高いことと関連している可能性がある．

我々の知見は，成人発症性の疾患を発症しにくいmtDNA遺伝子型を有することが長寿となる遺伝的要因の一つであるという考えを支持する．今後，mtDNA遺伝子型の間の機能的相違を明らかにする必要がある．また，Mt5178Cを有する個体がどのような成人発症性の疾患に罹患しやすいかを明らかにすることも興味ある課題である．ミトコンドリア脳筋症の病態に対するMt5178AおよびMt5178Cの関与を明らかにする必要がある．

* 財団法人岐阜県国際バイオ研究所
** 福井医科大学医学部第二内科
*** 浜松医科大学第一内科
**** 愛知医科大学第四内科

## 文　献

1) Tanaka M, Gong J-S, Zhang J, Yoneda M and Yagi K : Mitochondrial genotype associated with longevity. Lancet 351 : 185-186, 1998.

2) Gong J-S, Zhang J, Yoneda M, Sahashi K, Miyajima H, Yamauchi K, Yagi K and Tanaka M : Mitochondrial genotype frequent in centenarians predisposes resistance to adult-onset diseases. J. Clin. Biochem. Nutr. 24 : 105-111, 1998.

# Ⅸ．筋の発生・分化・再生，その他

# Triad蛋白の筋発達に伴う発現，局在，機能

小　林　高　義*

研究協力者　田　中　宏　明*　古　屋　徳　郎*
亀　田　典　佳*　水　澤　英　洋*

**要　旨**　成熟筋においてtriadに局在し，興奮収縮連関において重要な役割を果たす蛋白であるdihydropyridine receptor，ryanodine receptor及びtriadinのヒト培養筋細胞の発達に伴う発現，局在，機能について検討した．これらの蛋白が，筋芽細胞の融合による筋管細胞の形成に伴い機能的に発現し，神経支配による収縮と横紋状の収縮装置の形成に伴って成熟筋に類似した分布および機能に変化することが示唆された．

## はじめに

筋の興奮収縮連関における細胞内ストアからのカルシウムイオン($Ca^{2+}$)放出は，T管系と筋小胞体(SR)終末槽の接合部である三つ組(triad)において，T管系の電位センサーであるdihydropyridine受容体(DHPR)と，SRのカルシウム放出チャンネルである ryanodine受容体(RyR)の分子間相互作用によって引き起こされると考えられている[1]．DHPRはL型カルシウムチャンネルであり，またRyRは細胞内$Ca^{2+}$濃度の上昇によって刺激され$Ca^{2+}$を放出する(calcium-induced calcium release：CICR)ことが知られているが，成熟骨格筋における興奮収縮連関においては，細胞外からの $Ca^{2+}$流入は重要な関与をしないとされている．また，SR終末槽に存在する膜蛋白triadinは，DHPRないしRyRと結合することが報告され，カルシウム放出に関与して機能することが示唆されている[2),3),4)]．疾患との関連では，DHPRは家族性低カルシウム性周期性四肢麻痺の原因遺伝子であり，RyRは悪性高熱症及びセントラルコア病の原因遺伝子であることが報告されている[5)]．しかし，これらのtiradに局在する蛋白のヒト骨格筋における発達については現在まで報告がない．そこで，これらの疾患の発症機序を解明するための基礎的研究として，ヒト培養筋細胞の発達に伴うmRNAの発現，蛋白の発現と局在，更にその機能について細胞内$Ca^{2+}$濃度制御の発達を含めて検討した．

## 材料及び方法

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異常がないと考えられる疾患16例の筋生検材料よりヒト筋細胞を培養した[6)]．更に筋細胞をラット胎児脊髄と共培養することにより神経支配を形成させた[7)]．単核細胞のみの段階(mononucleated cells：MC)，筋芽細胞の融合により多核の筋管細胞を形成した段階(aneural myotubes: AM)，神経支配により反復する筋収縮を認め，横紋を形成した段階(innervated muscle fibers：IMF)で各々全mRNAを分離してRT-PCRにより各mRNAの発現を調べた．RyR及びtriadinは骨格筋型アイソフォームに関して検討し，DHPRについては骨格筋型アイソフォームに加え心筋型アイソフォームについても検討した．また筋細胞への分化のマーカーとして，筋特異的中間径フィラメントdesminの発現を同時に調べた．蛋白レベルでは，蛍光免疫染色を行い，共焦点レーザー顕微鏡を使用し，各発達段階の筋細胞における発現，局在を検討した．一次抗体は，骨格筋型アイソフォームのDHPRを認識するmonoclonal抗体，心筋型アイソフォームのDHPRを認識するウサギ抗ペプチド抗体，骨格筋および心筋型のRyRを認識するmonoclonal抗体，骨格筋および心筋型のtriadinを認識するmono-

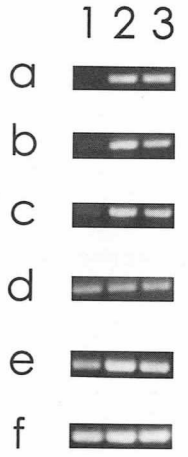



**図1**　Developmental changes of the accumulation of the skeletal muscle isoforms of DHPR (a), RyR (b), triadin (c), and the cardiac isoform of DHPR (d) transcripts in aneural and innervated culture dishes. e and f are desmin and GAPDH transcripts. Agarose gel showing the ethidium bromide stained products of RT-PCR. Lane 1, mononucleated cells; lane 2, aneurally cultured muscle cells; lane 3, innervated muscle cells. The skeletal muscle isoforms of DHPR, RyR, and triadin are at low levels in mononucleated cells, but increase remarkably at the later stages, whereas the cardiac isoform of DHPR is detected at similar levels among all three stages.

* 東京医科歯科大学医学部神経内科

clonal抗体及びdesminに対するウサギpolyclonal抗体を使用した．細胞内$Ca^{2+}$濃度については，蛍光指示薬fluo-3を用い，灌流下でレーザー顕微鏡を用いて観察した．細胞内ストアからのCICRによる$Ca^{2+}$放出能を検討するため，カフェインによる刺激実験を行った．また脱分極による細胞内ストアからのカルシウム放出に対する細胞外カルシウム流入の影響を検討するため，カルシウムを含む灌流液での灌流下における脱分極の効果とカルシウムを加えない灌流液での灌流下における脱分極の効果を比較し検討した．更に，カルシウムチャンネル阻害薬nifedipine及びcadmiumの効果も検討した．

## 結　　果

### 1. mRNAの発現（図1）

骨格筋型DHPR，骨格筋型RyR，骨格筋型triadinのmRNAは，MCにおいてはほとんど検出されず，AMの形成により著明に増加した．AMとIMFの間では明らかな変化は認められなかった．心筋型アイソフォームのDHPRが3段階の培養のいずれにおいても検出されたが，心筋型DHPRは皮膚線維芽細胞においても発現しており筋芽細胞での発現については確証は得られなかった．

### 2. 蛋白の発現と局在（図2, 3）

骨格筋型DHPR，RyRおよびtriadinはdesimin陽性のMC(筋芽細胞)には染色されず，AMでは主に細胞質領域に染色された．骨格筋型DHPRは筋管細胞の両端の細胞質領域に強く染色され，また細胞膜に一致して染色された．RyRおよびtriadinは，主に細胞質領域に顆粒状に染色され，その一部は細胞膜に一致して分布した．また，MC及び AMにおいては心筋型DHPRも細胞質領域に染色され，AMでは一部，細胞膜に一致して染色された(**図2**). IMFにおいては，DHPRは主に細胞膜に一致して染色され，一部，細胞質領域にも染色された．更に，長期共培養では細胞質領域に横紋状に染色された．RyRは，短期共培養におけるIMFの細胞質領域に横紋状に染色され，長期

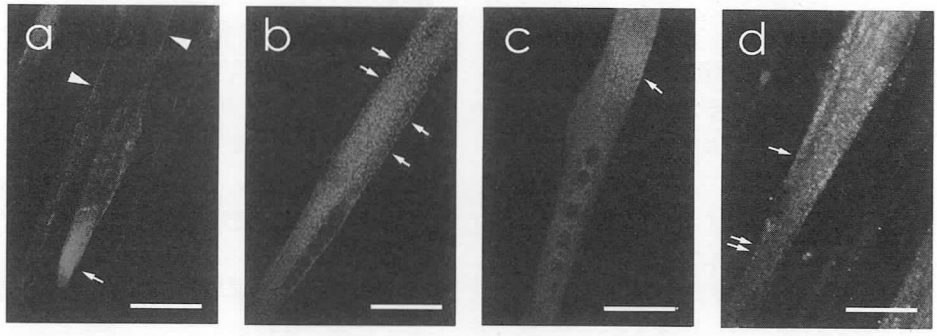



**図2** Fluorescent immunolabeling of the skeletal muscle isoforms of DHPR (a), RyR (b), triadin (c), and the cardiac isoform of DHPR (d) in aneurally cultured muscle cells . The skeletal muscle isoform of DHPR (a) is mainly localized within the cytoplasm of myotubes, particularly densely at the both ends (arrow), but partly corresponds to the plasma membrane (arrowheads). RyR (b) is visualized as small granules mainly within the cytoplasmic area of myotubes, but a number of immunoreactive dots are also located at the periphery of the myotubes, very close or corresponding to the plasma membrane (arrows). Triadin (c) is localized within the cytoplasm of myotubes predominantly around the nuclei and partly corresponds to the plasma membrane (arrow). The cardiac isoform of DHPR (d) is mainly localized within the cytoplasm of myotubes but partly along the plasma membrane (arrows) Bar, 50mm.

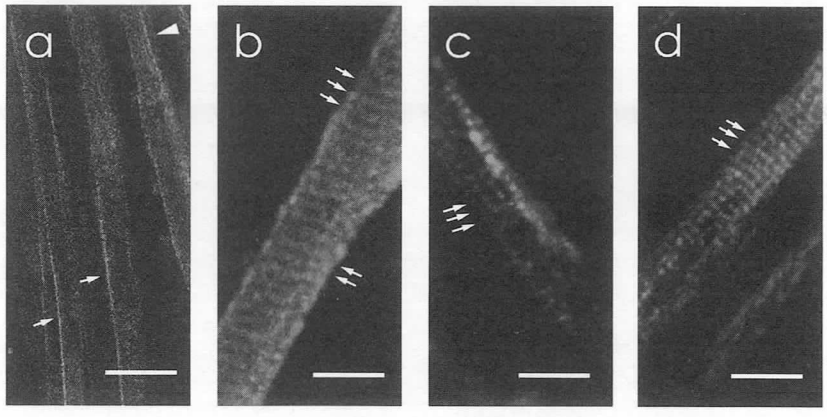



**図3** Fluorescent immunolabeling of the skeletal muscle isoforms of DHPR (a, b), RyR (c), and triadin (d) in continuously contracting innervated muscle fibers co-cultured with fetal rat spinal cord. The skeletal muscle isoform of DHPR is localized mainly along the plasma membrane (arrows in a) and partly in the cytoplasm (arrowhead in a) in continuously contracting innervated muscle fibers. In highly differentiated parts of continuously contracting innervated muscle fibers in long-term co-culture, the skeletal muscle isoform of DHPR is stained within the cytoplasmic area with a cross-striated pattern as well as along the plasma membrane with periodic enhancement (arrows in b). RyR is localized in a cross-striated pattern and partly appears as indistinct double rows in continuously contracting innervated muscle fibers in long-term co-culture (arrows in c). Triadin (d) immunoreactivity distributes also in a cross-striated pattern in continuously contracting innervated muscle fibers in long-term co-culture. Bar, 25mm (a); 12.5mm (b~d).

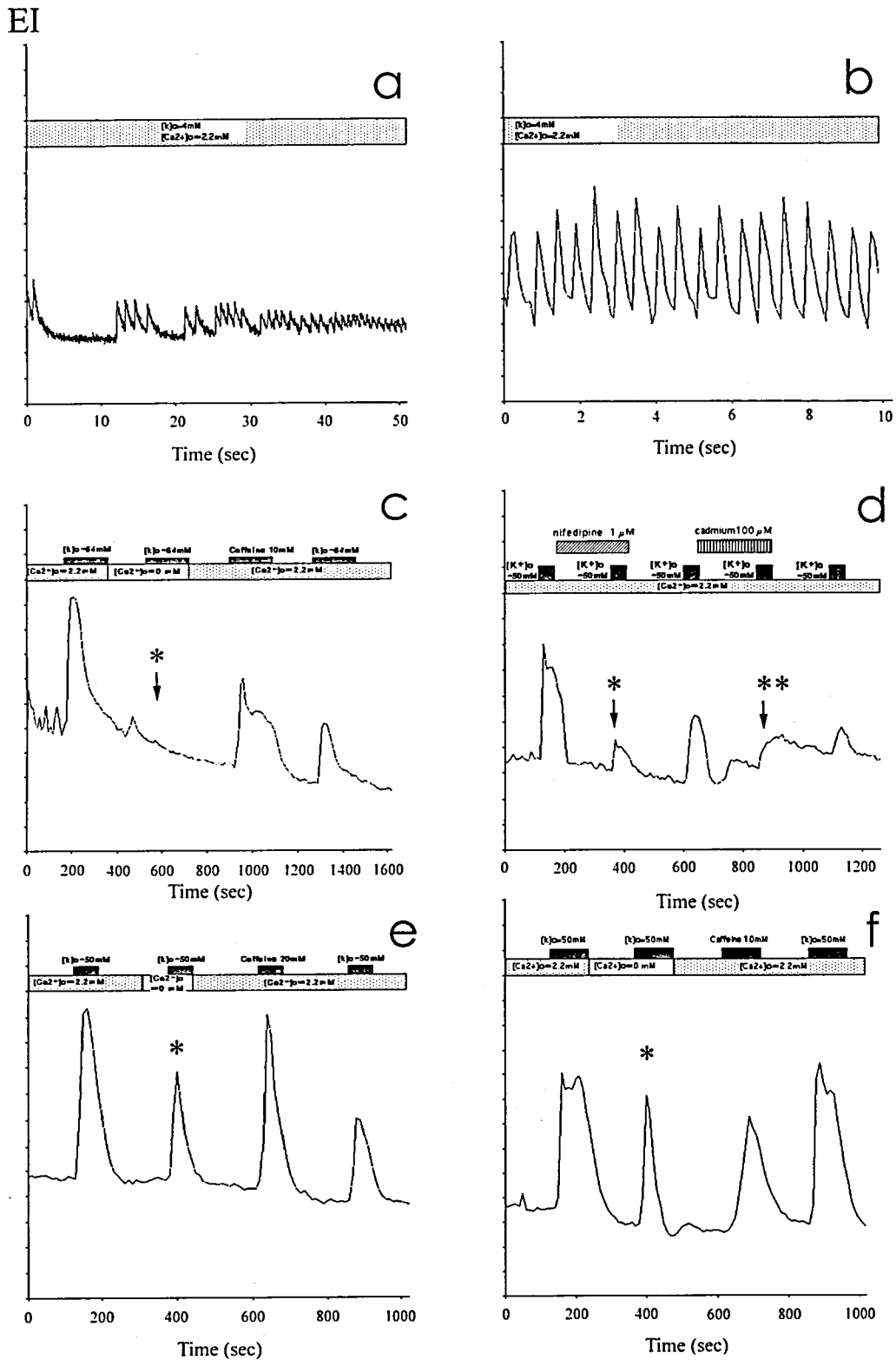



図4 Calcium transients in cultured human muscle cells monitored using fluo-3. Slow $[Ca^{2+}]_i$ oscillations are observed spontaneously in aneurally cultured myotubes with irregular intervals and without apparent contractions (a). In continuously contracting muscle fibers, regular fast $[Ca^{2+}]_i$ oscillations are observed accompanying spontaneous nerve-driven contractions (b). $[Ca^{2+}]_i$ transients are induced by sequential stimulation with high-$K^+$ in $Ca^{2+}$-containing (2.2mM) solution, high-$K^+$ in $Ca^{2+}$-free solution, 10 mM caffeine solution and high-$K^+$ in $Ca^{2+}$-containing solution again in aneurally cultured myotubes (c, e) and innervated muscle fibers (f). Depolarization-induced $[Ca^{2+}]_i$ transients are highly dependent on extracellular $Ca^{2+}$ in many aneurally cultured myotubes and relatively independent in the small population of aneurally cultured myotubes in longer-term culture (e). Depolarization-induced $[Ca^{2+}]_i$ transients are partly blocked by 1 mM nifedipine (* in d) and 100 mM cadmium (** in d) in aneurally cultured myotubes. Depolarization-induced $[Ca^{2+}]_i$ transients in contracting innervated muscle fibers reach similar levels in $Ca^{2+}$-free solution (* in f) and $Ca^{2+}$-containing solution even in non-cross striated ones in short-term co-culture . EI, emission intensity.

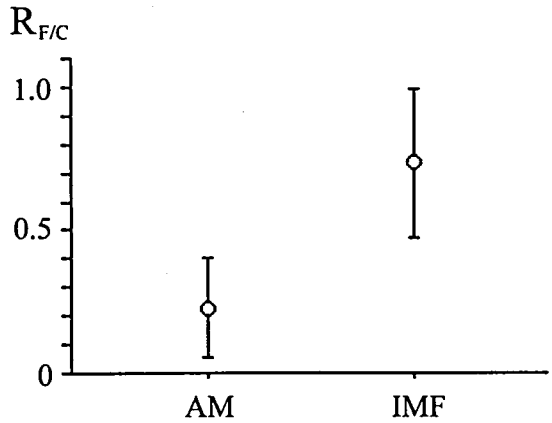



図5 Innervation alters extracellular $Ca^{2+}$-dependence of depolarization-induced $Ca^{2+}$ transients in cultured human muscle cells. The peak amplitude ratio of depolarization-induced $Ca^{2+}$ transients in $Ca^{2+}$-free vs. $Ca^{2+}$-containing external solutions is significantly higher ($p<0.001$ by t test) in innervated muscle fibers (n=20) than aneurally cultured myotubes (n=58). Open circles, mean of RF/C; bars, ±SD. RF/C=AF/AC. AF and AC, peak amplitude of depolarization-induced intracellular $Ca^{2+}$ transient in $Ca^{2+}$-free and $Ca^{2+}$-containing external solutions, respectively. AM, aneurally cultured myotubes; IMF, innervated muscle fibers.

培養では，一部の横紋が2重(doublet)に染色された．triadinは短期共培養のIMFでは，細胞質領域に染色され，ごくわずかな横紋状の分布が認められたが，長期共培養のIMFでは，横紋状に染色された(図3).

**3. 細胞内カルシウム濃度変化(図4)**

AMにおいては，時に不規則で周期の遅い(0.5Hz程度) calcium oscillationが観察された．神経支配を受けた筋管細胞においては，自発収縮開始前から規則的なcalcium oscillationが観察され，IMFでは収縮に同期した速い(2Hz前後)oscillaionが持続的に観察された．刺激実験では，AMおよびIMFにおいて脱分極およびカフェイン刺激による細胞内$Ca^{2+}$濃度の一過性上昇(calcium transient : CT)を認めた．MCにおいては明らかなCTは認められなかった．AMにおいては，CTの振幅は明らかに細胞外$Ca^{2+}$濃度に依存したが，神経支配形成後はこの依存性は有意に減少した($p<0.001$ by Student t test)(図5). AM においては，カルシウムチャンネル阻害薬によってCTの抑制がみられ，細胞外からの$Ca^{2+}$流入がCTの形成に関与していることが示唆された．

## 考　　察

RT-PCR及び免疫染色により，triad蛋白が筋芽細胞の融合による筋管細胞の形成に伴い発現することが示された．この結果は，過去に報告されたmyogenic cell lineおよびラット筋初代培養系における結果とほぼ一致するものであるが，ヒト筋細胞培養系においては収縮および横紋状の収縮装置の形成には神経支配を要するのと同様に，triad蛋白の分布においても神経支配によってより成熟した分布へ変化する現象が認められる点で異なっていた．また，神経支配前の筋管細胞においても，DHPRおよびRyRが機能的に発現していること，神経支配前の筋管細胞においては，脱分極刺激による細胞内への$Ca^{2+}$放出において，細胞外からの$Ca^{2+}$流入を必要とするが，神経支配後は細胞外$Ca^{2+}$流入への依存性が減少し，成熟筋に近い特性に変化することが示された．この細胞外$Ca^{2+}$流入への依存性は心筋における興奮収縮連関に類似し，心筋型DHPRの関与の可能性も考えられる．現在まで，神経支配以前の収縮開始前の未熟な筋管細胞におけるtriad蛋白の機能については知られていないが，細胞内$Ca^{2+}$の制御を通じて筋管細胞の発達に関与する可能性が考えられ，特にcongenital myopathyであるセントラルコア病の発症機序を解明する上で重要と考えられる．

## 文　　献


1) Franzini-Armstrong C and Jorgensen AO : Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. Annu Rev Physiol 56 : 509-534, 1994.
2) Brandt NR, Caswell AH, Wen SR et al : Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. Journal of Membrane Biology 113 : 237-251, 1990.
3) Brandt NR, Caswell AH, Brunschwig J-P et al : Effects of anti-triadin antibody on $Ca^{2+}$ release from sarcoplasmic reticulum. FEBS Letters 299 : 57-59, 1992.
4) Kim KC, Caswell AH, Talvenheimo JA et al : Isolation of a terminal cisterna protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. Biochemistry 29 : 9281-9289, 1990.
5) Greenberg DA : Calcium channels in neurological disease. Neurology 42 : 275-282, 1997.
6) Askanas V and Engel WK : A new program for investigating adult human skeletal muscle grown aneurally in tissue culture. Neurology 25 : 58-67, 1975.
7) Kobayashi T, Askanas V and Engel WK : Human muscle cultured in monolayer and cocultured with fetal rat spinal cord: importance of dorsal root ganglia for achieving successful functional innervation. J Neurosci 7 : 3131-3141, 1987.

# アンキリンリピートを持つ新規可溶性タンパク質V-1の骨格筋細胞における発現

小 林 高 義*

研究代表者　古 川 優 子*,**　田 中 宏 明*　藤ヶ崎 浩 人*
水 澤 英 洋*　鈴 木 伸 英**,***　石 田 行 知**
宋 時 栄**　山 国 徹**　安 達 栄治郎***

**要　旨**　V-1はタンパク質間相互作用に必要な分子モチーフであるアンキリンリピートを2回半繰り返して持つアミノ酸117個から成るタンパク質である．V-1分子は，神経細胞や卵巣，副腎に加えて，胎生期のラット骨格筋組織でも発現している．我々は骨格筋分化におけるV-1分子の機能を調べるため，骨格筋株細胞($C_2C_{12}$およびR615細胞)とヒト筋細胞ーラット胎児脊髄共培養系を用いてV-1分子の発現変化を分析した．その結果，骨格筋細胞の分化・発達に伴いV-1遺伝子の発現が抑制されていることが判った．以上の結果から，V-1分子は骨格筋細胞の分化制御に関与していることが推察された．

## はじめに

V-1は我々のグループがラット脳より発見した新規可溶性タンパク質である[1]．我々は，分子クローニングによりV-1分子がアンキリンリピートを2回半繰り返して持ち，アミノ酸117個からなることを明らかにした[1),2)]．アンキリンリピートは酵母の細胞周期調節因子であるcdc10，ショウジョウバエの細胞運命決定因子であるNotch，哺乳類の赤血球の構造タンパク質であるankyrinや，免疫グロブリンκ鎖遺伝子の転写調節因子NF-κBの阻害分子であるIκBを含む種々のタンパク質に認められ，これらの分子はアンキリンリピートタンパク質スーパーファミリーを形成し，真核細胞生物の多様な生物学的現象に関わっている．また，IκBタンパク質のアンキリンリピートはタンパク質間相互作用に必須であることが証明されている[3),4)]．したがって，V-1分子全体の73%がアンキリンリピートで占められるという構造上の特徴から，V-1分子は何らかのタンパク質と結合して生理的機能を発現するものと推察される．V-1分子は神経細胞に広範に分布し，海馬や小脳では主に神経軸索および樹状突起に存在する．また，卵巣や副腎を含む神経以外の組織でも発現が認められる[2),5),6),10)]．更に最近になって，胎生期のラット骨格筋組織においてV-1遺伝子が強く発現していることが判ってきた．そこで我々は骨格筋分化におけるV-1分子の機能的役割を調べるため，骨格筋株細胞の発達に伴うV-1分子の発現変化を分析した．更にヒト筋細胞ーラット胎児脊髄共培養下でのV-1分子の発現についても検討した．

* 東京医科歯科大学医学部神経内科
** 三菱化学生命科学研究所
*** 北里大学大学院

## 対象と方法

株細胞として$C_2C_{12}$筋芽細胞[7]，R615筋細胞[8]を用いて，増殖培地(growth medium : GM)から分化培地(differentiation medium : DM)に換えて1週間培養し，筋芽細胞のみの段階から筋芽細胞の融合による多核の筋管細胞へ分化誘導した．これらの株細胞の分化段階におけるV-1分子の発現変化をウエスタンブロット分析で検討すると共に，抗V-1抗体による免疫蛍光染色を行い，共焦点レーザー顕微鏡で観察した．更に筋細胞自身に内因性の疾患がないと考えられるヒトの筋生検材料を用いて，explant-reexplant法(Askanas&Engel)により筋細胞を培養し，筋細胞をラット脊髄片と併置培養することによって，神経筋接合を形成させた[9]．本培養下では，筋芽細胞のみの段階(myoblasts)，筋管細胞を形成した段階(aneural myotubes : AM)，更に神経支配による反復する収縮を示して横紋を形成した段階(innervated muscle fibers : IM)の3つの分化段階が観察され，これらの細胞でのV-1分子の発現変化を免疫蛍光染色を行い，共焦点レーザー顕微鏡で観察した．

## 結　果

$C_2C_{12}$細胞の分化誘導前と後でのV-1分子の発現変化をウエスタンブロット分析で検討した結果，増殖培地中で培養した$C_2C_{12}$筋芽細胞の細胞抽出液中に，分子量12kDaの免疫陽性のシグナルが検出された(図1)．一方，増殖培地から分化培地に変えて1週間培養し，分化誘導して筋管細胞を形成させると，このV-1免疫陽性のシグナルの強度は著明に低下した．すなわち，$C_2C_{12}$細胞の分化に伴ってV-1分子の発現は減少した(図1)．

次に$C_2C_{12}$筋芽細胞の分化誘導前と後でのV-1分子の細胞内分布を，抗V-1抗体による免疫蛍光染色を行い共焦

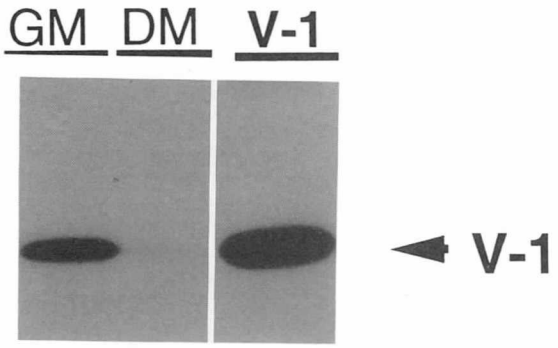



**図1** $C_2C_{12}$筋芽細胞の分化誘導に伴うV-1分子発現の変動
増殖培地(GM)および分化培地(DM)中で培養した$C_2C_{12}$細胞の全細胞抽出液タンパク質(28μg)を18% SDS-PAGEで分離した後PVDF膜に転写して，V-1分子を抗V-1抗体を用いて検出した．

点レーザー顕微鏡で観察した．未分化な紡錘形の筋芽細胞の細胞質は強く染色されたが，核は染色されなかった(**図2**)．また，筋芽細胞が融合して細長い多核の筋管細胞へ分化すると抗 V-1 抗体での染色性は低下した(**図2**)．本実験で得られた，未分化な筋芽細胞ではV-1分子が強く発現し，筋管細胞に分化すると発現が低下するという所見はウエスタンブロット分析の結果と一致した．一方，R615筋細胞の抗V-1抗体による免疫蛍光染色を行ったが，陽性所見は得られなかった．

また，ヒト筋細胞ーラット胎児脊髄共培養の抗V-1抗体による免疫蛍光染色の結果(**図3**)，筋芽細胞と神経支配を受ける前の幼若な筋管細胞の細胞質でV-1が強く染色された．一方，既に神経支配を受けて反復収縮する横紋を形成した筋管細胞では，V-1の染色反応は低下し，細胞質にびまん性に分布していた．共培養に用いたラットの脊髄神経細胞や後根神経節の大型細胞では 比較的強いV-1の発現が認められた．

更に，上記の免疫蛍光染色反応の特異性を確かめるため，胎生13日目のラット後根神経節，骨格筋組織及び脊髄の組織抽出液を用いて，ウエスタンブロットを行ってV-1の発現を分析した．その結果，後根神経節，骨格筋及び脊髄いずれの組織でも分子量12kDaのV-1免疫陽性の単一のシグナルが検出された(**図4**)．このことは免疫染色反応がV-1特異的であることを示している．

## 考　　察

$C_2C_{12}$細胞およびヒト筋細胞ーラット胎児脊髄共培養系を用いた本研究により，V-1遺伝子の発現が，骨格筋細胞の分化・発達に伴い抑制されることが示唆された．V-1は分子全体の73%がアンキリンリピートで占められている．アンキリンリピートはタンパク質間相互作用に必要な分子モチーフであることが報告されていることから[4),5)]，我々は，V-1分子が筋細胞の細胞質においてある種のタンパク質と結合して機能を発揮するものと推察する．興味深いことに，神経分化のモデル系であるPC12細胞の細胞抽出液を抗V-1抗体で免疫沈降すると，実際にV-1分子と共に沈降するタンパク質が検出された(未発表データ)．また，PC12細胞を用いたV-1遺伝子過剰実験からは，V-1

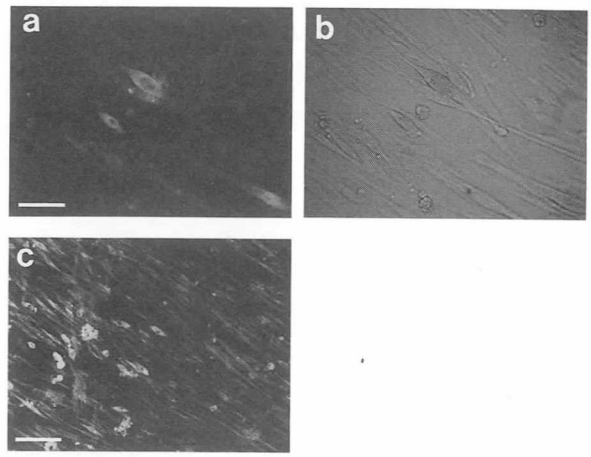



**図2** $C_2C_{12}$筋芽細胞の抗V-1抗体による免疫蛍光染色
a：共焦点レーザー顕微鏡強拡大像　図のスケールは50μmを示す
b：パネルaの位相差顕微鏡強拡大像
c：共焦点レーザー顕微鏡弱拡大像　図のスケールは100μmを示す

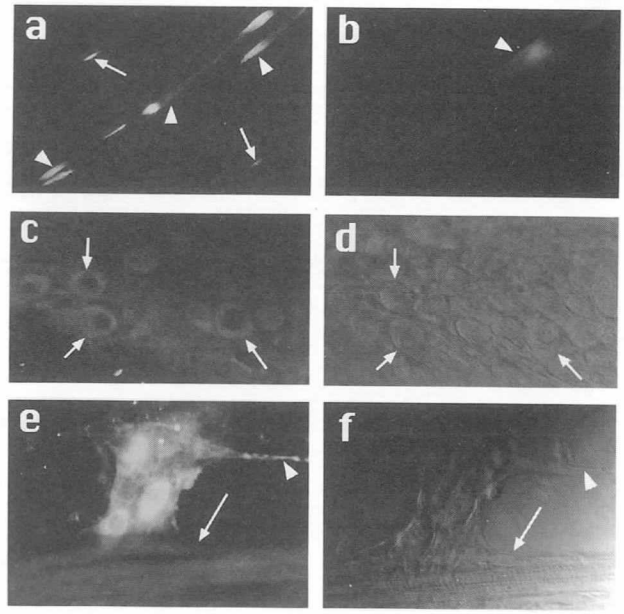



**図3** ヒト筋細胞ーラット胎児脊髄共培養の抗V-1抗体による免疫蛍光染色
a,b,c,e：共焦点レーザー顕微鏡像
d,f：位相差顕微鏡像
パネルa,bは，筋芽細胞(矢印)と幼若な筋管細胞(矢頭)の細胞質でV-1が強く染色されている所見である．パネルeに示した細胞は，既に神経支配を受けて成熟した筋管細胞(矢印)で，反復する収縮が観察され，横紋を形成している．上に見える移動した脊髄神経細胞及びその神経線維(矢頭)でもV-1が強く発現している．一方，神経支配を受けた筋管細胞では，筋芽細胞と比べると，V-1の発現は低下して，細胞にびまん性に分布している．パネルcに示す後根神経節(DRG：dorsal root ganglia)の大型細胞(矢印)でもV-1が発現している．
パネルdとfは各々パネルcとeの位相差顕微鏡の写真である．

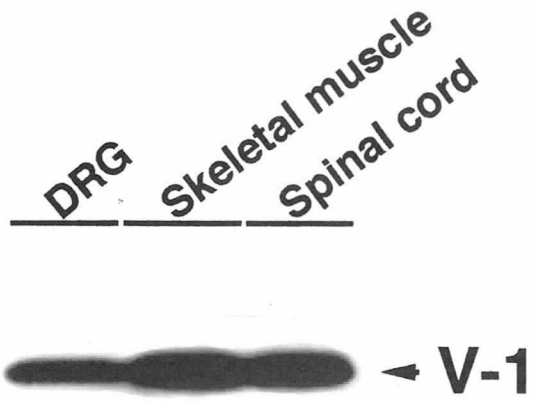



**図4** 胎生13日目のラット後根神経節，骨格筋及び脊髄におけるV-1分子発現のウエスタンブロット分析の結果
各組織抽出液は図1に記載した実験方法に従ってウエスタンブロット法で分析された．

分子が神経型遺伝子の発現制御に関与することを示唆する有力な証拠が得られている[10),11)]．以上の実験事実に基づいて，細胞質のprotein/protein adapterとして機能するV-1分子はV-1結合タンパク質とのタンパク質間相互作用により細胞質シグナル伝達系と共役し，筋細胞の分化制御に関わっていると推察される．

## 文　献


1) Taoka M, Yamakuni T, Song S-Y, et al : A rat cerebellar protein containing the cdc10/SWI6 motif. Eur J Biochem 207 : 615-620, 1992.
2) Taoka M, Isobe T, Okuyama T, et al : Murine cerebellar neurons express a novel gene encoding a protein related to cell cycle control and cell fate determination proteins. J Biol Chem 269 : 9946-9951, 1994.
3) Blank V, Kourilsky P and Israel A : NF-κB and related proteins : Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. Trends Biochem Sci 17 : 135-140, 1992.
4) Inoue J-I, Kerr LD, Rashid D, et al : Direct association of pp40/Iκ Bbeta with rel/NF-κB transcription factors : role of ankyrin repeats in the inhibition of DNA binding activity. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 4333-4337, 1992.
5) Fujigasaki H, Song S-Y, Kobayashi T, et al : Murine central neurons express a novel member of the cdc10/SWI6 motif-containing protein family. Mol brain Res 40 : 203-213, 1996.
6) Song S-Y, Asakai R, Kenmotsu N, et al : Changes in the gene expression of a protein with the cdc10/SWI6 motif, V-1, during rat follicular development and corpus luteum formation. Endocrinology 137 : 1423-1428, 1996.
7) Blau HM, Chiu C-P and Webster C : Cytolpasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. Cell 32 : 1171-1180, 1983.
8) Kobayashi T, Sano M, Tsukagoshi H, et al : Muscle inactivity reduces the content of parvalbumin in rat thymic myoid cells in vitro. Neurosci Lett 131 : 221-224, 1991.
9) Kobayashi T, Askanas V and Engle WK : Human muscle cultured in monolayer and cocultured with fetal rat spinal cord : Importance of dorsal root ganglia for achieving successful functional innervation. J Neurosci 7 : 3131-3141, 1987.
10) Yamakuni T, Yamamoto T, Hoshino M, et al : A novel protein containing cdc10/SWI6 motif regulates expression of mRNA encoding catecholamine biosynthesizing enzymes. J Biol Chem 273 : 27051-27054, 1998.
11) Yamakuni T, Yamamoto T, Hoshino M, et al : A new regulatory protein of catecholamine synthesizing-enzyme expression. In Advances in Pharmacology, ed by Goldstein DS, Eisenhofer G, McCarty R, Vol 42, Catecholamines, Academic Press, San Diego, 1998, pp30-32

# ヒト骨格筋－ラット脊髄併置培養下における AChR subunitの神経支配による発現調節

小　林　高　義*

研究協力者　下　川　雅　丈*　水　澤　英　洋*
臼　杵　扶美子**　石　浦　章　一***

**要　旨**　ヒト骨格筋－ラット脊髄併置培養系で，AChR subunit mRNAの神経支配による発現調節をRT-PCR法で検討した．筋単独培養では，γ-subunit mRNAは出現していたが，ε-subunit mRNAは存在していなかった．脊髄との併置培養下では，筋収縮のない状態でもε-subunit mRNAは出現していたが，γ-subunit mRNAの抑制は認められなかった．一方，持続的な筋収縮のある培養系では，経過と共にε-subunit mRNAが増加し，γ-subunit mRNAの明らかな発現抑制が認められ，neuronal regulationが存在していることが明らかにされた．

## はじめに

Acetylcholine受容体(AChR)は，神経終末から放出されたAChと結合し，化学的信号を電気的信号に変換し，筋細胞膜が脱分極することによりT管系に存在するdihydropyridine受容体の立体構造が変化し，SRに存在するryanodine受容体に情報を伝え，SRからカルシウムが放出されるというEC couplingの一連の変化の窓口になる重要な受容体である．そのα-subunitに対する自己抗体が，重症筋無力症(MG)で出現し，またε-subunitの点変異が，先天性MGで知られている．また，最も単純なシナプスと考えられている神経筋接合部の生理機構の解明は，神経細胞—標的器官あるいは中枢における神経細胞—神経細胞のシナプス機構の解明のために極めて重要である．Mishinaら[1]は，AChR subunitsのcloningを行い，5つのsubunitsのうち，γ-subunitがinnervationによりε-subunitに変換されることを明らかにしているが，ヒトでは，詳細は明らかでなく，また一般的にいって，その変換に及ぼす因子に関しての詳細は未だ不明である．今回，我々はin vitroでヒト神経筋接合部の発生，分化，成熟過程におけるAChR subunitsの変化を，神経筋接合部の形態学的，電気生理学的変化と共に，RT-PCR法で検討を行った．

## 材料及び方法

ヒト生検筋を初代培養し，2-3週間後，ラット脊髄片を併置培養後，2-3ヶ月培養を続け，継時的に，微少電極法により細胞内電位を記録すると共に，形態学的に，AChEを組織化学的方法で検討し，AChRを$I^{125}$α-Bungarotoxinを使用したautoradiographyによって検討した．AChR subunitsのうち，ヒト特異的なγ及びε-subunitのprimerを作成し，RT-PCR法によって，筋単独培養，脊髄との併置培養の初期，長期培養で，横紋形成し持続的に収縮している培養皿と，筋収縮のない培養皿に関して検討を行った．

## 結　　果

筋単独培養では，AChR cluster, AchE活性は認められず，図1に示すごとくγ-subunit mRNAは出現していたが，ε-subunit mRNAは存在しなかった．脊髄との併置培養後，24時間以内にmeppは記録され，数日後にはeppが出現し，筋細胞が持続的に収縮し始める数日前にはspontaneous firingが記録された．AchE染色は，培養の経過と共に複雑

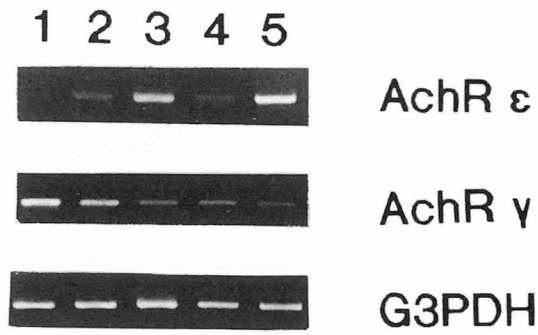



図1　Developmental changes in the accumulation of AchR γ- and ε-subunit transcript in aneural and innervated culture dishes. G3PDH was used as a positive control. Agarose gel showing the ethidium bromide stained products of RT-PCR. Lane 1, aneural culture (41 days of culture); lane 2, early innervation culture without muscle contraction from 20 days of muscle culture alone and 21 days of co-culture with spinal cord; lane 3, early innervation culture undergoing continuous muscle contraction from 27 days of muscle culture alone and 31 days of co-culture with spinal cord; lane 4, long-term innervation culture without muscle contractions from 17 days of muscle culture alone and 59 days of co-cultrue withs pinal cord; lane 5, long-term innervation culture undergoing continuous muscle contraction from 17 days muscle culture alone and 59 days of co-cylture with spinal cord.

* 東京医科歯科大学医学部神経内科
** 国立水俣病センター
*** 東京大学大学院生命環境科学

な形態をとるようになった.脊髄片との併置培養下では，筋が全く収縮していない培養皿においてもε-subunit mRNAの出現が認められたが，γ-subunit mRNAの抑制は初期の併置培養では認められなかった．一方，持続的に筋が収縮している培養皿では，培養の経過と共にε-subunit mRNAの出現が増加し，γ-subunit mRNAの明らかな発現抑制が認められた.

## 考　　察

今まで，発生学的に筋が神経支配を受けるとAChRは，γ-subunitからε-subunitに変換が起ることが知られていた．今回の我々のin vitroにおける実験により，ヒトの神経筋接合部の形成に伴いAChR subunitsのmRNAの発現は，他の哺乳類と同様にinnervationによって，γ-subunit からε-subunitに変換が起ることが明らかにされた.この変換は，脊髄神経が添加されているが，筋が全く収縮していない系においても生じていることから，ε-subunitの発現には，筋の収縮活動は必要でなく，筋と神経との接触が重要であることが示唆された．しかし，筋が持続的に収縮している培養系では，培養の経過と共にε-subunit mRNAの発現が増加し，γ-subunitの発現が抑制されることから，完全にγ-subunitからε-subunitへ変換する発現調節には，筋収縮が大きく関与していると考えられる．筋の収縮，E-C couplingに重要な役割を果たすと考えられている蛋白としては，骨格筋のT system上に存在し，筋細胞膜が脱分極した時に立体構造が変化し情報を伝えると考えられているCa channelであるdihydropyridine受容体，またsarcoplasmic reticulumからCaを遊離させるryanodine受容体などがあり，これらの蛋白と関連したカルシウムによる細胞内の情報伝達機構が，γ-subunitからε-subunitへのAChR subunitsの変換に重要な役割を果たしていると推察される.

## 文　　献

1) Mishina M, Takai T, Imoto K, et al : Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. Nature 32 : 1-6, 1986.

# ラット骨髄からの筋様細胞のクローン化

加茂　功*

研究協力者　菊池愛子*　石井弘子**　松岡太郎***
古川昭栄****　後藤雄一*　埜中征哉*
石浦章一*****

## 目　的

1個の受精卵から出発した生体細胞は多くの系列の臓器や器官の幹細胞へと分化増殖し，そこからさらに，分化段階と増殖を繰り返し，最終的な機能を有する生体構成細胞へと分化成熟する．各系列の幹細胞の起源と制御因子群は基礎並びに疾病治療の観点からも興味が持たれ，多数の報告がなされている．このなかでも，骨髄は成体型の血球系細胞が多能性造血幹細胞から分化増殖してくる器官として知られている．骨髄が，他の系譜の幹細胞を含有するのか否かに関しては，殆ど知られていない．我々は骨髄浮遊細胞培養中に，希にストロマ細胞が骨格筋の様に融合し，多核細胞に分化する現象を観察してきた．そこで，この様な細胞が骨格筋の特徴を持つ細胞へと分化する能力を有するのか否か，もしそうだとしたら血球系細胞と共通した系列から分化してくるのか，独立した筋への分化系列の幹細胞が骨髄に存在するのか等の疑問に解答する手段として，筋へと分化する細胞をクローン化し，その筋分化能について検討したので報告する．

## 材料と方法

動物：8日令ウイスターラット．大腿骨の分離：筋肉組織から大腿骨を分離し，滅菌ガーゼで，残存筋組織片をこすりとり，数秒間エタノールに浸漬後，バーナーの火焔を瞬時通過させ，即時に，冷培地中に戻す．大腿骨の両端を切断後，予め用意したRPMI 1640 + 10% FCSを充たした23G針付き5ml注射器で，内腔細胞をフラッシュアウトして，細胞浮遊液を作成する．2度遠心洗浄後，細胞数を調整し，24穴プレートにてRPMI 1640 + 10% FCS中で培養．筋様細胞のクローニング：約1周間程培養後，非付着性細胞を洗浄除去し，ストロマ細胞中に融合する細胞集団を位相差顕微鏡下で確認し，ペニシリンカップで一次クローン化し，さらに96穴マイクロプレートで1～2週培養後融合能を指標に2次クローニングした．AChRのアッセイ：クローン化融合細胞を1%トリトンx100で可溶化し，$^{125}$I-α bungarotoxin の結合量を測定し，nicotinic AChRの存在を同定した．免疫化学的筋蛋白の同定：家兎抗ヒトmyosin H chain IgG, 家兎抗ヒト α-actinin IgGによるイムノブロッテイングで，筋特異的蛋白を同定した．筋細胞の形態学的同定：電子顕微鏡によって筋構造蛋白を同定した．

* 国立精神・神経センター神経研究所
** 東京都立東大和療育センター
*** 大阪大学医学部附属病院
**** 岐阜薬科大学
***** 東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系

## 結果と考察

骨髄細胞からの筋様細胞の発達：骨髄浮遊細胞を培養開始後，1週間目位から2~3核の細胞が観察される．この様な細胞には周囲に融合に参画する前の単核細胞も存在するので，数10個になった時点で，滅菌シリコングリースを付着させたペニシリンカップで，周囲の細胞と目的とする細胞をを隔離し，トリプシンで，目的細胞集団を回収し，さらに96穴マイクロプレートに1穴につき1個以下になるように培養し，数時間後に，1個入っている箇所をマークし，1～2週培養し，3～4核になる細胞を含むものをクローンとして，樹立．継代は，融合を避けるため2日ごとに分散して維持した．骨格筋由来でないことを確認するために用いた空洞化した大腿骨からは細胞の増殖は長期培養しても全く認められなかった．このことは樹立された筋様細胞は骨髄内から発達してきたことを示唆している．樹立細胞の生化学的，形態学的特徴：本細胞は対数増殖期には繊維芽細胞様単核細胞として約24時間のサイクルで増殖し，分散継代せず長期培養すると，融合し，骨格筋と同様，長軸方向に伸展した多核細胞となる．この過程は10-100nMのデキサメサゾンの添加でより促進される．融合した細胞を1%トリトンx100で可溶化し，家兎抗ヒトmyosin H chain IgG, 家兎抗ヒトα-actinin IgGによるイムノブロッテイングでmyosin H chain, α-actinin が確認でき，$^{125}$I-α bungarotoxinにより，nicotinic AChRの存在を定量的に確認した．さらに，電子顕微鏡による観察で，z蛋白などの筋細胞固有の構造も観察された．以上のように，骨髄から筋様細胞としてクローン化した細胞は骨格筋へとして分化する性質を有していた．このことは骨髄が骨格筋に分化する幹細胞を含む臓器である可能性が考えられる．この様な幹細胞が，筋の再生分化にどの様にコミットするのか，血球系細胞と同一のさらに上流の幹細胞から分化してきたのか，または血球系細胞とは全く異なる系譜から分化してきたのか興味がもたれる．

## 参考文献

1) Kamo I, Kikuchi A, Ishii H, Matsuoka T, Furukawa S and Ishiura S : Establishement of myoid cells from bone marrow. Cell Biology International Reports 14 : 595-600, 1990.

# ラット骨格筋再生過程におけるdystrophin, αsarcoglycan, α1 syntrophin, nNOSの免疫組織化学的検討

庄 司 進 一*

研究協力者 星 野 幸 子* 大 越 教 夫* 石 井 亜紀子*
亀 谷 修 平** 武 田 伸 一**

**要 旨** カルジオトキシンを用いたラットの実験的骨格筋壊死再生過程におけるdystrophin(DYS), α sarcoglycan (α SG), α 1 syntrophin(α 1S), 神経型NOS(nNOS)の動態について免疫組織化学的検討を行った．再生筋の筋形質膜においてDYS, α SGが最も早く3日後に形態学的に発現し，ついでα 1Sが5日後に，nNOSが最も遅く10日後に発現した．発現開始時期および全ての再生線維が陽性線維化する時期を検討すると，DYS, α SG, α 1Sは筋線維のtype1, type2への分化の前に発現を終了し，nNOSはtype1, type2への分化とともに発現が進む特徴を認めた．nNOSは再生筋線維のタイプ分化の結果，生ずる可能性が考えられた．

## はじめに

ジストロフィン結合蛋白質は，細胞膜蛋白質群であるジストロフィン結合糖蛋白質(ジストログリカン複合体，サルコグリカン複合体)，細胞内蛋白質群であるシントロフィン複合体から構成される．神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)は骨格筋の筋形質膜に存在し，Duchenne型筋ジストロフィーやmdxマウスではジストロフィンの消失とともに筋形質膜からのnNOSの消失が報告されており，筋変性と関連している可能性も示唆されている[1].動物実験で，骨格筋壊死，再生におけるジストロフィン，ジストロフィン結合糖蛋白質の発現，局在，両者の関係が検討されている．ラット骨格筋では，再生開始後の比較的遅い時期にジストロフィンが筋形質膜に発現したと報告されている[2]．また，ジストロフィン結合糖蛋白質との関連では，β-dystroglycanはジストロフィンよりも早期に発現したことから，ジストロフィン結合糖蛋白質はジストロフィンが筋形質膜に付着するための固定装置であると考えられている[3].

今回，我々はラット骨格筋再生過程におけるdystrophin (DYS), α 1 syntrophin(α 1S), α sarcoglycan(α SG), nNOSの発現，動態について免疫組織化学染色を用いて検討した．

## 対象と方法

8週齢のwister系雄ラットの右前脛骨筋にカルジオトキシン10μM,1mlを筋注し，壊死再生モデルを作成した．コントロールは対側前脛骨筋に生理食塩水1mlを筋注し作成した．1,3,5,7,10,21,32日後に両側前脛骨筋を採取した．凍結標本より8μの切片を作り，免疫組織化学染色は一次抗体(後記)反応後，ABC法，DAB反応にて施行した．一次抗体は抗dystorphin抗体(DYS2 [C-terminal : Novo castra社])，抗α 1syntrophin抗体(共著者 武田，亀谷作製)，抗α sarcoglycan(Adhalin)抗体(Ylem社)，抗neuronal NOS抗体(Alexis社)を用いた．免疫組織染色性の評価は各日数において免疫組織染色性が弱陽性ないし陽性である再生筋線維のうち比較的小さい20個の再生筋線維の直径を測定した．弱陽性，陽性の各々の平均直径を各免疫組織染色において経時的に表に示した．

## 結 果

今回のラット骨格筋の再生過程における免疫組織化学染色を用いた検討において，1日後はH&E染色は薬剤浸潤部位では壊死に陥った線維と細胞浸潤が認められた．抗α SG抗体，抗DYS2抗体，抗α 1S抗体，抗nNOS抗体は壊死線維の筋鞘膜に染色されなかった．3日後(図1)にH&E染色では筋衛星細胞の浸潤を認め，少数の小径の再生筋線維が出現した．抗α SG抗体で一部の再生筋線維の筋鞘膜が不連続に淡く染色された(弱陽性)．抗DYS2抗体では一部の再生筋線維で筋鞘膜が弱陽性に染色された．抗α 1S抗体は再生筋線維の筋鞘膜に染色されなかった．抗nNOS抗体は再生筋線維の筋鞘膜に染色されなかった．5日後(図1)にはH&E染色では，中心核を持つ小径の再生筋線維が確認されるようになった．抗α SG抗体，抗DYS2抗体では再生筋線維の筋形質膜が弱陽性に染色された．抗α 1S抗体では抗α SG抗体，抗DYS2抗体よりも径の大きい再生筋線維の筋形質膜に弱陽性に染色された．抗nNOS抗体は再生筋線維の筋形質膜には染色されなかった．7日後(図1)には，H&E染色では中心核を持つ大型な再生筋線維が認められるようになった．抗α SG抗体，抗DYS2抗体，抗α 1S抗体は比較的小さい径の再生筋線維の筋形質膜は弱陽性に染色され，大きい径の再生筋線維の筋形

* 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

質膜は連続性に明瞭に染色された(陽性).抗nNOS抗体は大きい径の再生筋線維の筋形質膜に弱陽性に染色された.10日後(**図2**)はH&E染色では再生筋線維は中等度以上の径の再生筋線維が主体となった．抗αSG抗体，抗DYS2抗体では弱陽性に染色される線維は消失しほぼ全てが陽性に染色された．抗α1S抗体は中等度の径の再生筋線維では弱陽性に染色され，比較的大きい再生筋線維の筋形質膜に陽性に染色された．抗nNOS抗体では比較的大きい再生筋線維の筋形質膜には弱陽性に染色された．14日後(**図2**)はH&E染色では正常径に近い再生筋線維の数が増加した．抗αSG抗体，抗DYS2抗体で弱陽性に染色される再生筋線維は消失し，全ての再生筋線維が陽性に染色されるようになった．抗α1S抗体は弱陽性に染色される再生筋線維はごく少数となり，ほぼ全ての再生筋線維が陽性に染色されるようになった．抗nNOS抗体では中等度の径の再生線維では筋形質膜は弱陽性に，比較的大きい径の再生筋線維の筋形質膜は陽性に染色された．21日後(**図2**)はH&E染色では中心核は残っているがほぼ正常径に近い再

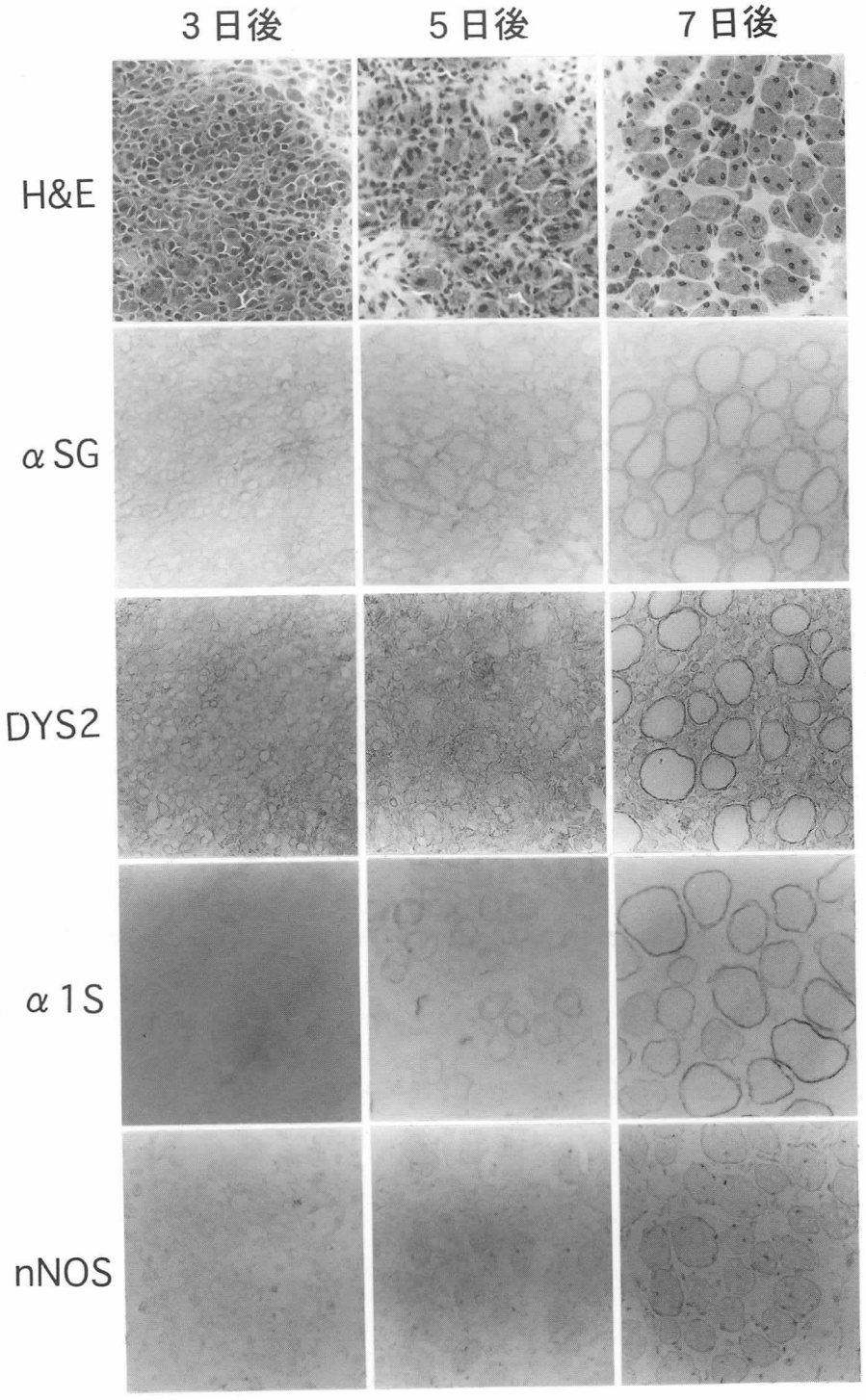



**図1**　カルジオトキシン筋注ラット生検筋におけるH&E染色，各種免疫組織染色の経時的変化
(×60；3日，5日，7日)

生筋線維が主体となった．抗αSG抗体，抗DYS2抗体，抗α1S抗体は弱陽性に染色される再生筋線維は消失し，全ての再生筋線維が陽性に染色されるようになった．抗nNOS抗体では比較的大きい径の再生線維でも弱陽性に染色されるものを認めたが，陽性に染色されるものも増加した．図に提示していないが，各日数においてATPase染色を施行した．14日目頃から，type1，type2への分化が確認されるようになり，32日目には明確になった．

以上の結果を各染色ごとに弱陽性，陽性線維の発現時期とその線維径を表にしたものが**表1**であり，ジストロフィン結合蛋白質の中では，αSG，DYS2が最も早く，α1Sが次ぎに，nNOSは最も遅く筋形質膜に発現した．なお，表中の同日採取の再生筋線維平均径が各免疫組織染色により異なる理由は，計測した筋線維が壊死を免れた残存線維ではなく，壊死後の再生筋線維であることはH&E染色で確認しており，手技のうえでカルジオトキシンによる筋の傷害程度に差が生じてしまうため，各筋線維により再生速度にばらつきが生じたためである．

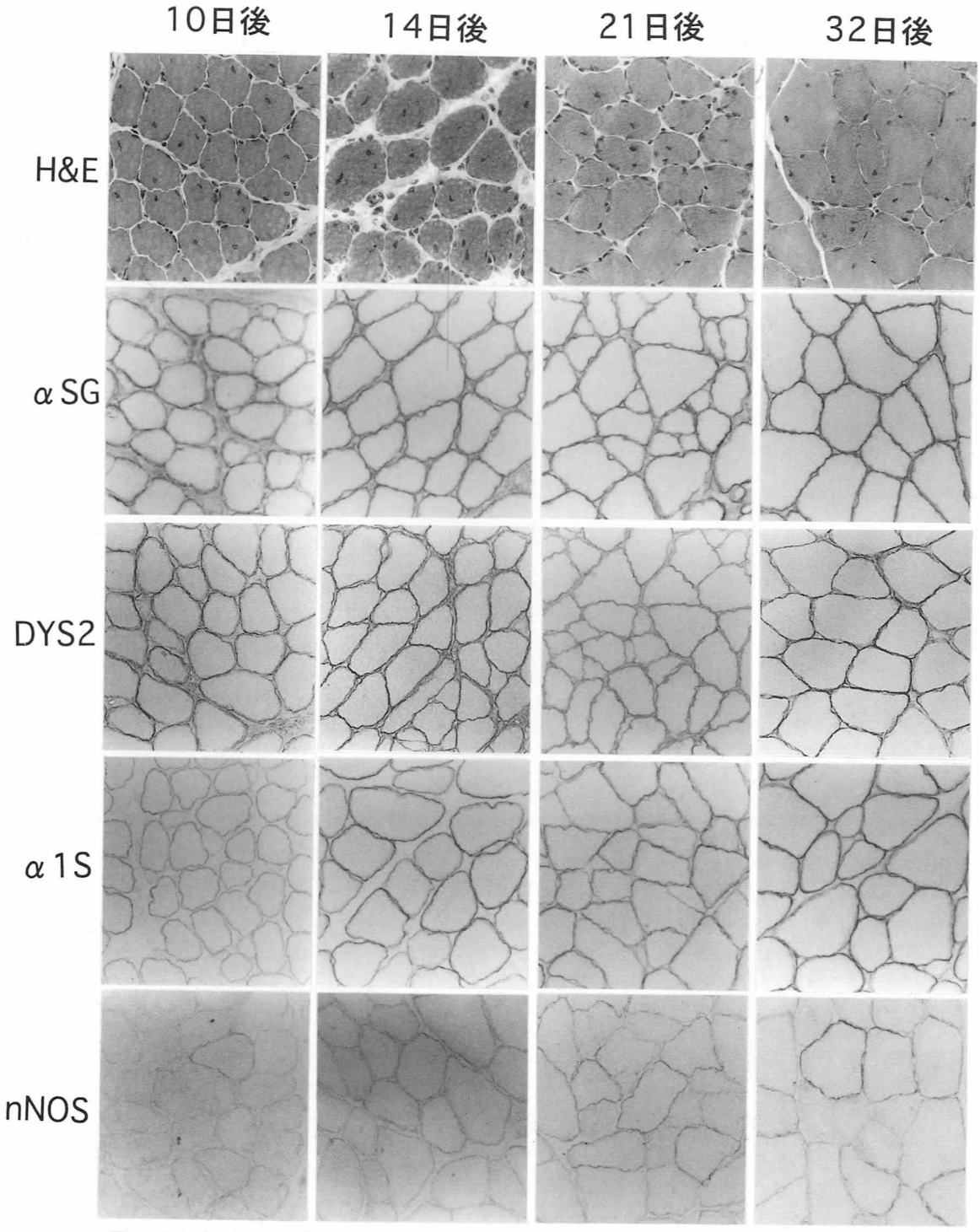



**図2**　カルジオトキシン筋注ラット生検筋におけるH&E染色，各種免疫組織染色の経時的変化
(×60；10日，14日，21日，32日)

表　ラット骨格筋再生線維の免疫組織染色性
弱陽性，陽性を呈する再生線維の平均直径の経時的変化

| 筋注後日数 | 3 | 5 | 7 | 10 | 14 | 21 | 32 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 弱陽性 αSG | 5.2≦ | 5.3≦ | 12.6≦ | * | * | * | * |
| DYS2 | 5.7≦ | 5.1≦ | 12.6≦ | * | * | * | * |
| α1S | − | 12.5≦ | 14.2≦ | 13.0≦ | * | * | * |
| nNOS | − | − | 20.0≦ | 32.0≦ | 28.7≦ | 27.4≦ | 32.7≦ |
| 陽性　αSG | − | − | 20.2≦ | 29.0≦ | 22.5≦ | 23.3≦ | 20.8≦ |
| DYS2 | − | − | 28.1≦ | 30.2≦ | 30.9≦ | 28.9≦ | 26.1≦ |
| α1S | − | − | 28.8≦ | 37.3≦ | 38.6≦ | 26.7≦ | 41.8≦ |
| nNOS | − | − | − | − | 37.1≦ | 41.3≦ | 46.7≦ |

−：出現せず　　＊：弱陽性筋線維は消失し，陽性線維となった
免疫組織染色性の評価は各日数において免疫組織染色性が弱陽性，陽性である再生筋線維のうち比較的小さい20個の再生筋線維の直径を測定し，平均直径を経時的に表に示した．
より大きい筋線維も弱陽性ないし陽性に観察されており，≦を付記した．

## 結論および考察

今回のラット骨格筋の再生過程における免疫組織化学染色を用いた検討において，ジストロフィン結合蛋白質の中では，αSG，DYS2が最も速く，α1Sが次ぎに，nNOSは最も遅く筋形質膜に発現した．塩酸ブピバカインを用いたラットの実験的筋壊死後の筋再生過程に関する報告では[4]，12時間目頃より貪食細胞が出現し，1日から2日後に貪食細胞や分裂を開始した筋衛生細胞で満たされる．3日後にはHEで好塩基性の胞体で大型の核をもつ再生線維として確認でき，5日から7日目には中心核を有する明らかな再生線維となる．この時期の再生筋は未分化でATPase染色ではタイプ2C反応を示す．壊死後10から15日目頃には直径はほぼ壊死前に近くなり筋線維タイプも次第に分化し始める．ラットの白筋では21日目頃，赤筋では28日目頃に完了する．今回の実験では，表に示すように，αSG，Dys2は3日目に，直径5μと小さく，H&E染色でも未熟な再生段階の筋線維に弱陽性に発現した．7日目には直径20~30μ程度の進んだ段階の再生筋線維に陽性に発現し，10日目以後は全ての筋線維において陽性に発現した．我々の研究ではカルジオトキシンを用いて壊死を惹起しており条件が異なるが，ラットの筋再生においてはジストロフィン，αSGは再生の極初期の段階から形態学的に発現が開始し，type1，type2への分化前のタイプ2Cの段階で発現は進行し，type1，type2への分化開始時には発現が終了している可能性が考えられた．α1Sは5日目に直径12.5μ，H&E染色でもαSG，DYS2に比べ進んだ再生段階の筋線維に初めて弱陽性に発現し，14日目に全ての再生筋線維が陽性となった．これらの結果からα1Sの形態学的な発現の動向は，type1，type2への分化前に進行し終了する点ではジストロフィンやαSGと同様であるが，開始時期や終了時期はジストロフィンとαSGに比べ遅れると考えられた．nNOSは7日目に直径20μの再生筋線維に初めて弱陽性に染色され，14日目に30μと大きい再生線維のうち一部が陽性に染色された．この14日目の時点においてもαSG，ジストロフィン，α1Sと異なり，大きい径の再生線維でも陰性線維，弱陽性線維が多数認められた．21日目，32日目と陽性線維の数は増加したが，大径の弱陽性線維，陰性線維が混在した．32日目のATPase染色ではtype2筋線維は陽性に染色された．これらの結果から，nNOSはジストロフィン，ジストロフィン結合蛋白質と異なり，タイプ分化の途中で発現が始まり，タイプ分化の終了した筋線維では，強い発現，弱い発現，発現しない線維が混在することが示唆された．nNOSは筋線維のタイプ分化の結果に付随して生ずる可能性が考えられた．nNOSがtype2線維の筋形質膜に陽性に免疫組織化学染色されることが報告されており[5]，上記の結果はこれに矛盾しないと思われる．

## 参考文献


1) Brenman JE, Chao DS, Xia H, et al : Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. Cell 82 : 743-752, 1995.
2) Vater R, Cullen MJ, Nicholson LVB, et al : The fate of dystrophin during the degeneration and regeneration of the soleus muscle of the rat. Acta Neuropathol 83 : 140-148, 1992.
3) Vater R, Harris JB, Anderson LVB, et al : The expression of dystrophin-associated glycoproteins during skeletal muscle degeneration and regeneration. An immunofluorescence study. J Neuropathol Exp Neurol 54 : 557-569, 1995.
4) 檜澤一夫，埜中征哉，小沢鉄二郎：筋病理学．第1版，文光堂，東京，1989，p65.
5) Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, et al : Nitric oxide in skeletal muscle. Nature 372 : 546-548, 1994.

# 筋ジストロフィーを中心とした生検筋における Bcl-2 familyの免疫染色

佐橋　功[*,**]

研究協力者　衣斐　達[*,**]　張　桂珍[*]

**要　旨**　細胞死関連蛋白であるBcl-2とその相同蛋白であるBcl-x，Baxの局在についてジストロフィノパチーを含む筋ジストロフィー生検筋において免疫組織学的に検討した．Bcl-xは骨格筋線維には発現が見られなかったが，Bcl-2はタイプ2線維に強く染まり，再生線維に染まらず，一方Baxはタイプ1線維，再生線維に強く染まり，Bcl-2とBaxがヘテロダイマーを形成し細胞死の抑制とその促進という相反した作用を有することと関連し，興味深い事実が得られた．

## 緒　言

bcl-2遺伝子はヒト濾胞性リンパ腫にみられる癌遺伝子であるが[1]，Bcl-2蛋白は細胞死を抑制する蛋白[2]であることが知られている．近年それに関連し，bcl-x[3]，bax[4]などが相同遺伝子としてクローニングされてきている．BaxはBcl-2とヘテロダイマーを形成しBcl-2の細胞死抑制活性を阻害する[4]．Bcl-xはBcl-xLとして細胞死を抑制するが，細胞分化においてBcl-2とともに排他的に発現する[3]とされている．

我々は本班会議で細胞死関連蛋白であるFas，Bcl-2のジストロフィノパチーなどの病的筋における局在を免疫組織化学的に検討してきた．今回はBcl-x，Baxの局在についてBcl-2と対比し検討を行った．

## 方　法

Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)，Becker型筋ジストロフィー(BMD)，DMD保因者(DMD c)などのジストロフィノパチーに加え，肢帯型筋ジストロフィー(LG)，筋緊張性ジストロフィー(MyD)，rimmed vacuole型遠位型ミオパチー(DMRV)，慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)，多発筋炎(PM)と対照筋計70筋の生検筋を用いた．新鮮凍結連続切片(8μm厚)にてBcl-x，Baxに対する家兎多クローン抗体(Santa Cruz)，Bcl-2に対するマウス単クローン抗体(Dako)を用いABC法にて染色した．対比染色として，HE，modified Gomori trichrome染色，myosin ATPase pH10.4, 4.5,4.2染色およびABC法にてmyosin heavy chain isoforms (neonatal, developmental, fast, slow)を染色した．

## 結　果

**Bcl-2**：対照筋ではタイプ2線維(とくにタイプ2B線維)の細胞質に強く染まり核により濃染した．病的筋ではジストロフィノパチーではDMDでのBcl-2の筋線維への発現は乏しく，DMD cではBcl-2陰性線維がジストロフィン陰性であることが多くLG，MyDとも萎縮線維にBcl-2の強い発現が見られた(図1)．これらのミオパチーではタイプ2C・再生線維への発現は乏しかった．また神経原性疾患では萎縮線維に強く発現していた．

**Bax**：対照筋では筋線維が全般的に染まったが，細胞膜・核により濃染した．筋線維タイプではタイプ1線維がやや濃染した．病的筋では再生線維に強く染まった(図2)．Bcl-2と連続切片で比較すると筋線維には相補的に発現していた(図3)．

**Bcl-x**：対照筋病的筋ともに筋線維にはほとんど発現が見られなかったが，神経・筋接合部や末梢神経に発現していた(図4)．

## 考　察

細胞死抑制蛋白であるBcl-2 は染色体18q21上にコードされ，ヒト濾胞性Bリンパ腫の染色体転座点t(14;18)(q32;q21)の解析から同定された遺伝子(bcl-2：B-cell lymphoma/leukemia-2)であり[1]，Fas抗原[5]が細胞死(アポトーシス)を誘導するのに対し,それを抑制する作用を有する[2]．そしてbcl-2遺伝子から産生されるBcl-2蛋白は分子量26kDaでありC末端には膜局在シグナルを持つ膜蛋白[6]であり，ミトコンドリア膜の他に核膜，小胞体膜などに局在するという[2,7,8]．Bcl-2はリンパ系と神経系組織での発現が顕著であり，皮膚真皮の基底層や腸粘膜の腺窩などにも発現をみるが，骨格筋での発現は乏しいとされている[9]．Bcl-2にはBcl-x，Bax，Bad，Mcl-1などの数多くの相同蛋白が発見されてきている．Baxは分子量21.4kDaでありC末端には膜局在シグナルを持ち，Bcl-2とヘテロダ

* 愛知医科大学第4内科
** 愛知医科大学加齢医科学研究所

イマーを形成しBcl-2とは逆に細胞死を誘導する[4]．またBcl-xはBcl-2と同様に細胞死を抑制するが，組織分布および発生段階においてBcl-2とは異なった分布をする[3),10)]．

Bcl-2の細胞内局在はミトコンドリア，小胞体，核膜などの膜・細管系に認められるというが[2),7),8)]，我々の結果はおもに筋形質と陽性線維核膜に発現していた．

いっぽうBaxは筋形質と細胞膜・核により濃染した．筋線維のタイプではBcl-2がタイプ2線維に強く染まり，再生線維に染まらず，一方Baxはタイプ1線維，再生線維に強く染まり，Bcl-2とBaxがヘテロダイマーを形成し細胞死の抑制とその促進という相反した作用を有することと関連し，興味深い事実が得られた．これはBcl-2は成熟リンパ球や神経細胞など長寿命を有する細胞に発現し未熟なリンパ球には発現しないという事実[9)]より，筋細胞も幼弱な再生線維には発現せず成熟筋線維には発現し，筋細胞の分化との関連が考えられた．

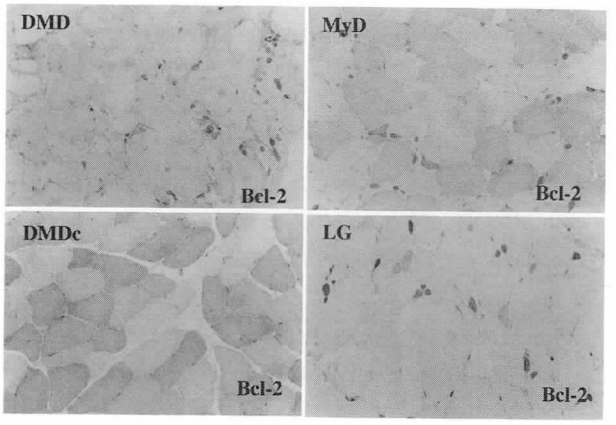



**図1**　Bcl-2の各疾患筋における局在
Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)でのBcl-2の筋線維への発現は乏しく，DMD保因者(DMD c)ではBcl-2陰性線維がジストロフィン陰性であることが多く肢帯型筋ジストロフィー(LG)，筋緊張性ジストロフィー(MyD)とも萎縮線維にBcl-2の強い発現が見られた．

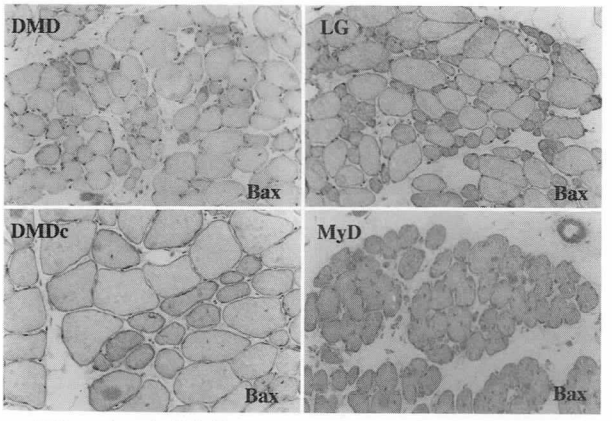



**図2**　Baxの各疾患筋における局在
Baxは筋形質が全般的に染まったが，細胞膜・核により濃染し，タイプ1線維がやや濃染した．病的筋では再生線維に強く染まった．

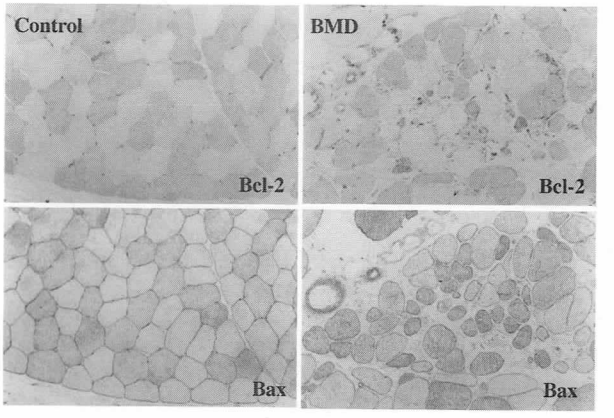



**図3**　Bcl-2とBaxの連続切片における局在の相違
対照筋(control)ではBcl-2はタイプ2線維にBaxはタイプ1線維に相補的に発現しており，Becker型筋ジストロフィー(BMD)病でも両者は相補的に発現している．

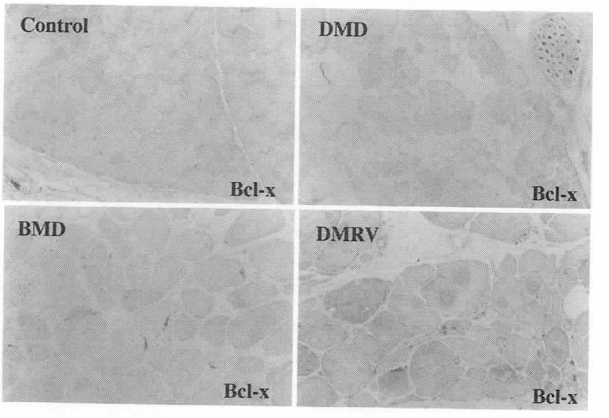



**図4**　Bcl-xの各疾患筋における局在
対照筋病的筋ともに筋線維にはほとんど発現が見られなかったが，神経・筋接合部や末梢神経に発現している．

**表**　Bcl-2 Bax，Bcl-xの筋組織における局在

| | Bcl-2 | Bax | Bcl-x |
|---|---|---|---|
| Type 1 fiber | − | ++ | — |
| Type 2 fiber | + | + | — |
| 再生腺維 | − | ++ | +／− |
| 萎縮腺維 | ++ | ++ | — |
| 神経・筋接合部 | − | ++ | + |
| 末梢神経 | − | ++ | + |
| 血管壁 | − | ++ | + |

またBcl-xは骨格筋線維には軽度発現が見られるとされる[10]が，今回の検討では発現が見られなかった．これは組織分布における機能上の相違あるいは抗体の力価の相違が推察された．

## 結　語

Bcl-xは骨格筋線維には発現が見られなかったが，Baxはタイプ1線維，再生線維に強く染まり，一方Bcl-2がタイプ2線維に強く染まり，再生線維に染まらないことより，Bcl-2とBaxがヘテロダイマーを形成し細胞死の抑制とその促進という相反した作用を有することと関連し，興味深い事実が得られた．

## 文　献


1) Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, et al : Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science 228 : 1440-1443, 1985.
2) Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, et al : Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 348 : 334-336, 1990.
3) Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, et al : bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell 74 : 597-608, 1993.
4) Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ : Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programed cell death. Cell 74 : 609-619, 1993.
5) 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.
6) Tsujimoto Y and Croce CM : Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. Proc Natl Acad Sci (USA) 83 : 5214-5218, 1986.
7) Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, et al : Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. Canc Res 53 : 4701-4714, 1993.
8) Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, et al : Multiple subcellular localizaiton of bcl-2: Detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. Canc Res 54 : 2468-2471, 1994.
9) Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, et al : BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci (USA) 88 : 6961-6965, 1991.
10) Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, et al : Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. Canc Res 54 : 5501, 1994.

# キマーゼを指標とした病的筋における肥満細胞の局在と臨床的意義

佐橋　功[*,**]

研究協力者　衣斐　達[*,**]　張　桂珍[*]

**要　旨**　神経筋疾患の91四肢生検筋につきキマーゼ(chymase)を指標とし肥満細胞の免疫染色を行なった．対照筋に比し再生や細胞浸潤が多い病的筋の筋線維間に散在し，キマーゼはユビキチンとの一部対応性が示された．またジストロフィノパチーや炎症性筋疾患に頻度が多く高活性であり，筋強直性ジストロフィーや神経原性疾患では少なく低活性であった．骨格筋組織中の結合組織型キマーゼ陽性肥満細胞は組織破壊に伴い増加し，さらにアンギオテンシン系を介した慢性増殖性変化や筋内血流量の低下は病的筋の修復阻害を惹起するものと考えた．ゆえにキマーゼの抑制すなわちACE阻害薬治療は，筋ジストロフィー(PMD)に対し有効である可能性が示された．

## はじめに

Duchenne型PMD(DMD)の終末期には，心不全が予後を決定する場合が多い．そして一般的な心不全の治療を含みDMDにおける心不全の治療薬として，循環動態の改善面からアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬[1),2)]が報告されてきた．また近年ジストロフィノパチィーの治療選択枝としては，他の側面より副腎皮質ステロイドの有効性[3),4)]も指摘されている．

さてACE阻害薬はアンギオテンシンⅠ(AⅠ)からアンギオテンシンⅡ(AⅡ)への変換に作用するが，各組織の障害局所におけるAⅡ産生にはACEを介する産生系より，肥満細胞[5)-8)]においてほぼ特異的に増殖・分泌(脱顆粒)される中性セリン・プロテアーゼであるキマーゼ(chymase；以下Chym.)がAⅠ→AⅡへの変換により深く関与しているという[7)-9)]．本報告はジストロフィノパチーを含む主に慢性経過を示す骨格筋疾患の生検筋標本において，肥満細胞におけるChym.を指標とした免疫染色を行い，その臨床的意義について考察した．

## 対象および方法

代表的な神経筋疾患のうち，文書にて承諾をえて実施した保存期間の比較的短期間の91症例からの生検筋[PMD：DMD 4，DMD保因者(DMD-C) 4，Becker型(BMD) 10，肢帯型(LG) 7，顔面肩甲上腕型(FSH) 5，筋強直型(MyD) 8，rimmed vacuoleを伴う遠位型(DMRV) 2，炎症性筋疾患(多発筋炎；PM 5，皮膚筋炎；DM 10，封入体筋炎；IBM 4，筋サルコイドーシス；sarcoidosis8，ミトコンドリア筋症(Mt Myop) 4，低カリウム性ミオパチー(Hypo K) 4，原因不明な急性骨格筋壊死症(A Rhab) 3，神経原性筋疾患[筋萎縮性側索硬化症(ALS) 6，Kennedy病とCharcot-Marie-Tooth病を含む脊髄性筋萎縮症(SPMA) 5]と対照筋6症例の四肢生検骨格筋(主に上腕2頭筋)の6μm厚の横断凍結連続切片を用いた．

肥満細胞内のChym.に対する免疫染色は1次抗体としてヒト特異的な抗Chym.単クローン抗体(Chemicon；1:2,000希釈)を用い，ABC法にて免疫染色した．なお本抗体に関し1次抗体を除く対照実験も平行して実施した．また細胞死関連蛋白(Fas IgG；MBL，1：2,000希釈，Bcl-2；DAKO，1：1,000希釈)，組織適合性抗原Class Ⅰ：HLA-ABC(DAKO；1:2,000希釈)，Class Ⅰ：HLR-DR(DAKO；1:2,000希釈)，CD3(DAKO；1:2,000希釈)やCD68(DAKO；1:2,000希釈)などの各種のリンパ球マーカーに加え，リンパ球分泌成分であるグランザイムA(荒畑喜一先生より供与；1:2,000希釈)やパーフォリン(荒畑喜一先生より供与；1:2,000希釈)，さらに非特異的に細胞内に存在し時に増加するユビキチン(Chemicon；1:2,000希釈)などの対比染色も実施した．

ついでChym.陽性の肥満細胞を，直視下に全視野面積中の陽性数をカウントし，NIHイメージを利用し標本の全横断面積を計測し，単位骨格筋面積当たり($1mm^2$)のChym.陽性肥満細胞の頻度を各疾患毎に算出した．また染色に先立ちBMDおよび多発筋炎の生骨格筋材料のウエスタン・ブロットを行い，MW約25,000のChym.の存在を予め確認した．

## 結　果

### 骨格筋の免疫染色

対照筋では全疾患筋に比較してChym.陽性細胞の頻度は少なく，また染色標本上では活性の領域(脱顆粒)も狭くかつ低く(図1A-1)，また一部はユビキチンに対し陽性を示した(図1A-2)．またChym.陽性部位とFas抗原，Bcl-2，グランザイムA，Chym.やリンパ球マーカーであるCD3，

* 愛知医科大学第4内科
** 愛知医科大学加齢医科学研究所

CD68陽性細胞とも対応しなかった．

疾患筋の結果を以下に記す．DMDでは検索数が少なかったが，光顕上で極めてChym.高活性な陽性肥満細胞が多数観察されたが(図1C)，opaque fiberとの関連はなかった．また一部は強陽性のユビキチン(図1D)染色結果と対応したが，他の細胞死関連蛋白，免疫マーカーなどとは関連しなかった．BMDでもChym.陽性細胞は多く(図1B)，ユビキチン染色の結果もDMDに類似であった．すなわちDMD-Cを除くジストロフィノパチーでは明らかにその頻度は増加していた．そして陽性細胞は主に筋線維に接したペリミジウム，エンドミジウム内の間質や一部血管周囲に存在した．なおDMD-Cでは頻度が少なかった．

DMD,BMD以外のPMDまた自己免疫性炎症性ミオパチーのPM/DMとIBMでも頻度は高く，陽性細胞はしばしば筋束周辺領域のペリミジウムの結合組織内や血管に接して出現していた(図2A)．またsarcoidosisでは多くはサルコイド結節に接して陽性細胞が観察された(図2B)．なおこれら高頻度を示した疾患群は，一般光顕上では再生線維や線維化傾向も多く，またマクロファージなどの細胞浸潤を認める疾患が多く，浸潤細胞の一部が肥満細胞であることが示された．なお他のPMDでは，約半数のLGやDMRVでも高い出現をみた．

一方,いわゆる筋原性疾患の中でMyDでは陽性頻度が低かった(図2C).さらに神経原性筋疾患であるALS,Charcot-Marie-Tooth病を含むSPMAでは，MyD同様に筋線維間に存在した陽性細胞の活性は低く頻度も少ない傾向を示した(図2D).

疾患別キマーゼ陽性肥満細胞の頻度(図3)

症例数の多い疾患での結果を強調するが，陽性細胞数の頻度はDMD, BMD, DMRVまた炎症性筋疾患で多く，MyDや神経原性疾患で低いことが確認された．なお疾患群と対照群との比較では前者で明らかに分散も頻度も前者に高かった．骨格筋標本上の単位面積(1mm$^2$)当たりのChym.陽性肥満細胞の頻度は，多くは数個以内(最高値はPM)であった．なお疾患別の頻度差は大きかったが，陽性細胞が少なかったMyDでの結果は一般組織染色における再生・変性現象の乏しさとの関連が示唆された．しかし筋原性また神経原性の病因はともあれ，病的骨格筋中へ肥満細胞が程度差をもって増殖・脱顆粒化されていることが示された．

## 考　　察

肥満細胞は1889年Ehrlichにて塩基好性顆粒を有する細胞として発見され，その起源は骨髄系幹細胞からの前駆細胞から血中に入り組織に行き着き，線維芽細胞から分泌されるstem cell factor(肥満細胞増殖因子)により分化し成熟する[5),10),11)]．肥満細胞は各種のサイトカインをはじめヘパリン，ヒスタミン，プロテアーゼなどの多彩な炎症

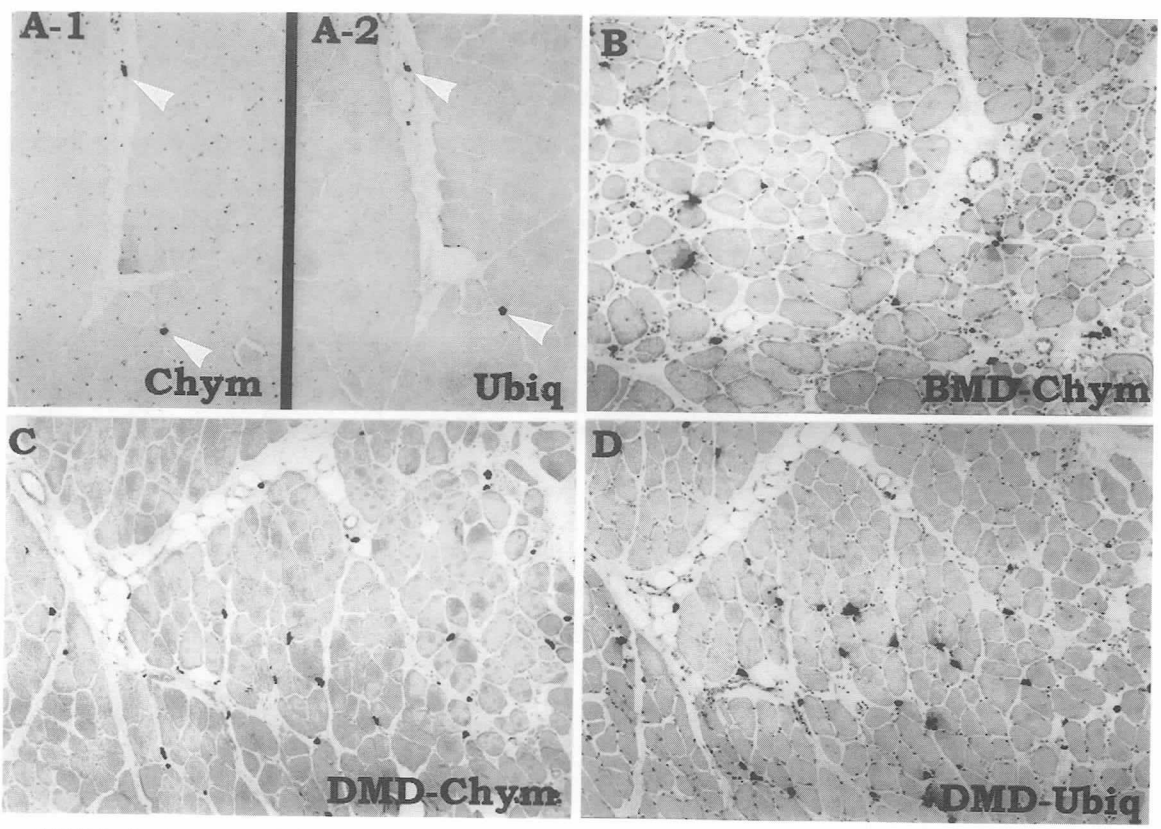



**図1**　対照筋とジストロフィノパチーにおけるキマーゼ・ユビキチン免疫染色
対照筋(Control)ではキマーゼ(Chym)陽性細胞は極めて少なく活性は低く(図1A-1)一部はユビキチン(Ubiq)染色(図1A-2)と陽性所見と対応した(矢印)．Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)では高活性な陽性細胞が多数観察され(図1C)，一部はユビキチン(Ubiq)陽性所見と対応していた(図1D)．Becker型筋ジストロフィー(BMD)ではキマーゼ陽性細胞は主にエンドミジウムやペリミジウム内で筋線維に接して多くは存在していた(図1B)．Original mag. x200

修飾物質の宝庫であり[12]，動脈硬化などの線維性増殖や修復に対し中心的な役割を担うとされる[7)-13)]．また肥満細胞内で合成・貯蔵・分泌されるプロテアーゼはトリプターゼとChym.そしてカルボキシダーゼがあり，後2者は結合組織型に発現し，固定化酵素として内因性プロテアーゼ阻害物質(serpin)や自己分解および他のプロテアーゼの攻撃から防護され細胞外空間で長期間にわたり酵素活性を発揮する[7)]．Chym.は分子量約25,000の中性セリン・プロテアーゼであり，Chym.サブファミリーとしてカテプシンG，グランザイムとともに染色体14q1に近接してコードされ，炎症時に誘導され相互に協調して酵素機能を発揮するものという．またChym.の発現は遺伝子上で転写因子GATAにより制御されている[14),15)]．

さてChym.はほぼ選択的かつ多量に肥満細胞(極一部はマクロファージや血管内皮のWeibel-Palade体に発現)で合成・貯蔵され[7),16)]，細胞外へ緩徐で持続的な脱顆粒(piece-meal脱顆粒)により放出される[17)]．Chym.の*in vitro*の機能は間質の線維化や血管の新生などを中心に極めて多様と考えられ，臨床的には動脈硬化や心肥大や高血圧症の発症などへの関与に注目されている[7)]．すなわち細胞増殖作用を有するペプチドのプロセッシング；すなわち潜在性の血管収縮因子(AⅠからAⅡへ)や血管収縮因子(ビッグ・エンドセリンからエンドセリンへ)，またサイトカイン・ネットワークへはIL-1～6，TNF-α，INF-γなどへの作用，またコラーゲン，フブロネクチンなどの関連細胞外マトリックスを限定分解する作用などを有するという．

つぎにChym.陽性肥満細胞は心筋や消化管の平滑筋を含む種々の組織への分布が報告されているが[6)]，骨格筋の分布には触れられていない．今回のChym.の骨格筋免疫染色の検討では，肥満細胞は対照筋に比し高頻度に疾患筋に出現し高活性なChym.染色性がみられ，何等かの生理的役割を担っていることが示された．そして免疫学的異常や遺伝的筋膜疾患すなわち変性過程とともに再生現象が強い慢性骨格筋疾患としてのジストロフィノパチー，DMRVまた炎症性骨格筋疾患，sarcoidosisなどの疾患により多かった．病的筋における肥満細胞に関連しては，筋形質膜ジストロフィン異常によるDMDについて間質内の線維性結合織・血管の増生また小径変性線維群の出現に対応した増加が報告されている[18)]．今回の検討ではDMD症例数は少なかったが，その傾向を確認した．しかしChym.陽性肥満細胞頻度はジストロフィノパチー以外の疾患筋にも多く，疾患特異性に乏しかったが，これは種々の役割を示す肥満細胞の性質を考えた時，当然の結果とも思われた．

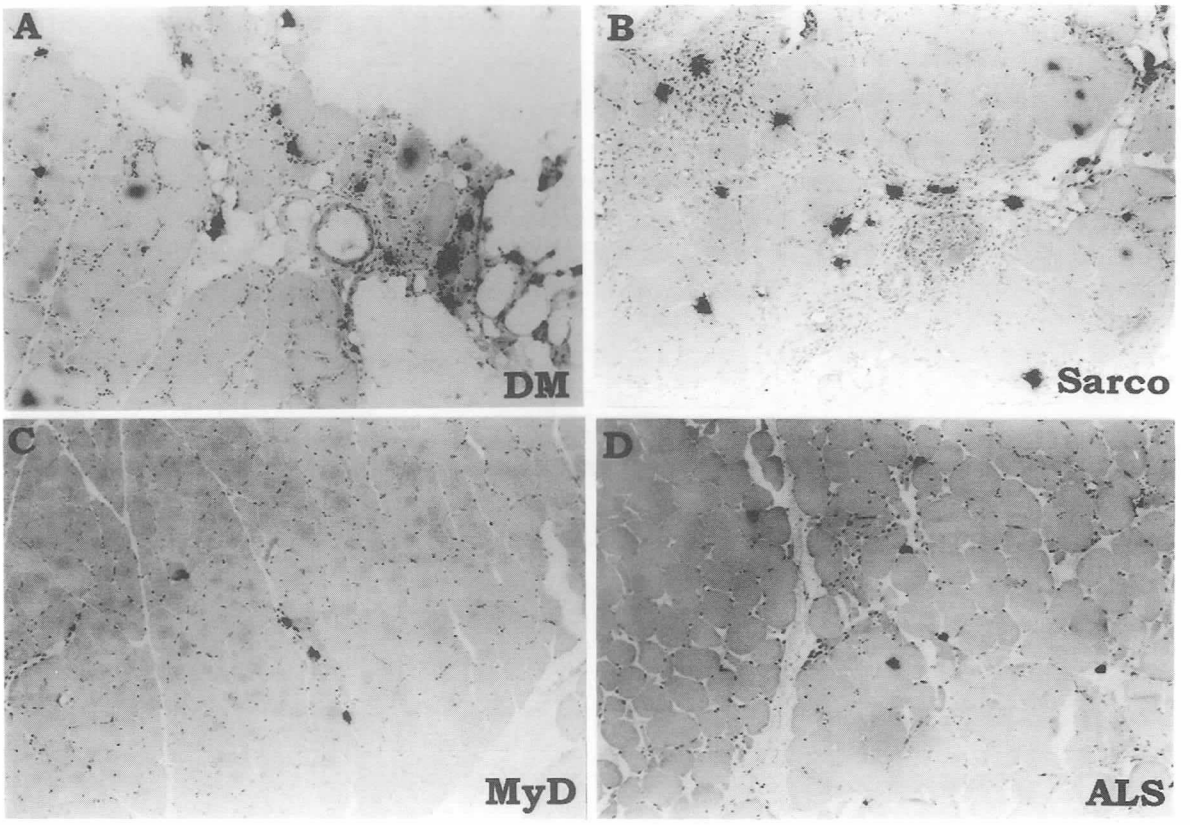



**図2** ジストロフィノパチー以外の筋ジストロフィと炎症性ミオパチーのキマーゼ免疫染色
自己免疫性炎症性ミオパチーである皮膚筋炎(DM) (**図2A**)では，しばしば陽性細胞はペリミジウム内の筋束周辺領域や血管周囲のペリミジウム内に出現していた．サルコイドーシス(Sarco.)(**図2B**)では，結節周辺部に多くが観察された．またこれら疾患では再生線維や結合織の増生，細胞浸潤が多い傾向があり，その中の一部が肥満細胞であることが示された．筋強直性ジストロフィー(MyD) (**図2C**)や神経原性疾患筋である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) (**図2D**)では，筋線維間に存在するキマーゼ陽性細胞の活性は低く頻度も少なかった．Original mag. x200

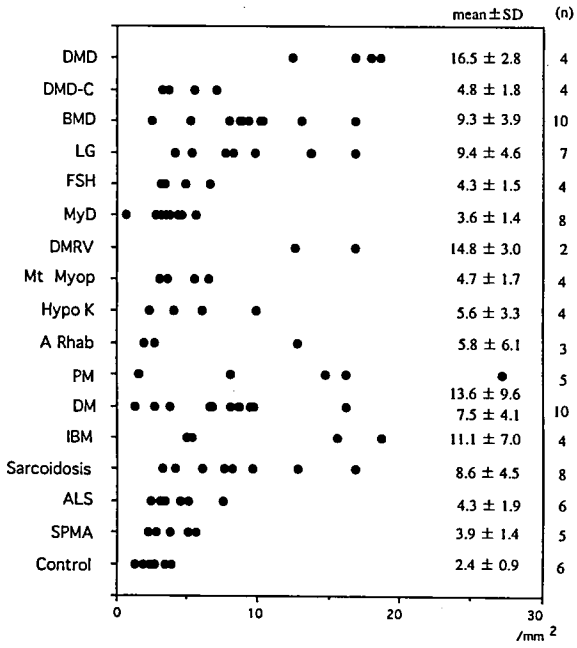



**図3** 骨格筋の疾患別キマーゼ陽性頻度
筋生検断面内の単位面積(1mm²内)当たりのキマーゼ陽性肥満細胞を示す.
ジストロフィノパチー(DMD, BMD)や炎症性筋疾患に多く，MyDや神経原性疾患で頻度が少ないことが確認された．なお疾患群と対照筋との比較では，前者に高く骨格筋障害との関連が示された.

さてChym.はAⅡ産生に対し組織間で結合組織型に存在し，AⅡを含む炎症修飾因子を介し血管などの慢性増殖性変化をもたらす．それは組織破壊に伴う二次的変化とも考えられるが，MyDやMNDでは病理学的に骨格筋の変性が存在するにもかかわらず肥満細胞の頻度は少なかった．これはMyDやMNDでは筋病変部位に細胞浸潤が比較的少なく，かつ筋線維また核の変化を含み再生への所見も乏しく，さらにMyDでは分子遺伝学的にはミトコンドリアDNA解析にて小欠失も多く[19]，故にこれら疾患では障害筋の再生現象が少ないことと関連しているものとも考えた．すなわち細胞浸潤＋再生現象と肥満細胞の出現とはおそらく相互に関連し，肥満細胞から分泌されるChym.は組織破壊に伴い出現したマクロファージやリンパ球などとサイトカイン・ネットワークを構成する細胞成分と協調し，骨格筋病変の修復や障害の一端を担っていることが示唆された．事実肥満細胞から遊離したChym.を含む各種の顆粒は線維芽細胞に取り込まれ，線維芽細胞のコラゲナーゼ発現を誘導して細胞外マトリックスの構築を改変し，線維化(障害機構?)も引き起こすという[7]．一方，Chym.はAⅡ産生を介して筋萎縮に伴う骨格筋組織内の血流異常を助長し筋修復機構を障害する可能性がある．これは臨床的には本現象に抗するACE阻害薬とサイトカインなどを抑制する副腎皮質ステロイドの有効性を支持する結果とも考えられた．

またChym.染色は一部のユビキチン陽性細胞と対応したが，ユビキチンが蛋白の分解と処理に関わり全ての生命細胞内に存在することを考えると当然の結果と思われる[20]．しかし通常の組織化学染色ではユビキチンは明らかな染色性を示さず，故に肥満細胞においては対照筋を含むユビキチン陽性所見は，肥満細胞内のChym.発現がユビキチンを介する蛋白分解の処理と関連していることが推察された．すなわちChym.の高活性肥満細胞がマクロファージやリンパ球などとは異なる作用を示しており，筋病理組織の評価上のChym.染色の有用性を考えた．

最後に更に強力なChym.に伴うAⅡ産生と脱顆粒の抑制は，慢性骨格筋疾患におけるPMDの心血管系への循環動態などを臨床的に改善することが期待される．事実，免疫抑制薬で肥満細胞の阻害作用を有するサイクロスポリンが皮膚への抗炎症作用を示すことが報告され[21]，また同薬のDMDに対する臨床効果も指摘されている[22]．他方，免疫抑制薬であるアザチオプリンではDMDへ筋病理学変化への有効性が否定されている[23]．故により選択的な肥満細胞の抑制すなわち全身性の抗Chym.作用は，慢性骨格筋疾患の一部で，特に病理学的に再生所見が強い疾患群において治療の開発につながる可能性を考えた．

## 引用文献


1) Massie BM, Kramer BL and Topic N : Long-term captoprill therapy for chronic congestive heart failure. Am J Cardiol 53 : 1316-1320, 1984
2) 田村拓久，渋谷統寿：Duchenne型筋ジストロフィーの慢性心不全の治療にcaptoprilは有効である．神経内科 42 : 22-26, 1995
3) Fenichel GM, Florence JM, Pestronk A, et al : Long-term benefit from predisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. Neurology 41 : 1874-1877, 1991.
4) Griggs RC, Moxley RT, Mendell JR, et al : Duchenne dystrophy: Randomized, controlled trial of prednisone (18 months) and azathioprine (12 months). Neurology 43 : 520-527, 1993.
5) Enerback L and Norrby K : The mast cells. Curr Top Pathol 79 : 169-204, 1989
6) Urata H, Strobel F and Ganten D : Widespread tissue distribution of human chymase. J Hypertens 12 (suppl 9) : 517-522, 1994.
7) 奥西秀樹，塩田直孝：特集；循環器系と免疫．動脈硬化と肥満細胞．免疫薬理 13 : 29-34, 1995
8) Reilly CF, Tewsksbury DA, Schechter NM, et al : Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. J Biol Chem 257 : 8619-8622, 1982.
9) 宮崎瑞夫，守口知則：アンジオテンシンⅡの産生酵素－ACEとキマーゼ．日和田邦男，猿田享男(著者)：アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬．東京，医薬ジャーナル社．1996．pp11-21.

10) Denburg JA : Vasophil and mast cell lineages in vitro and in vivo. Blood 79 : 846-860, 1992.
11) Galli SJ, Tsai M and Wershil BK : Regulation of mast cell proliferation, maturation and function by stem cell factor, a ligand for the c-kit Receptor. Int Arch Allergy Immunol 99 : 234-237, 1992.
12) Galli SJ, Gordon JR and Wershil BK : Cytokine production by mast cells and basophils. Curr Opin Immunol 3 : 865-873, 1993.
13) Schelling P, Fischer H and Ganten D: Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy ?. J Hypertens 9 : 3-15, 1991.
14) Caughey GH, Schaumberg TH, Zerweck EH, et al : The human mast cell chymase gene (CMA1) : Mapping to the catepsin G/granzyme gene cluster and lineage-restricted expression. Genomics 15 : 614-620, 1993.
15) Woodard SL, Jackson DS, Abuelyaman AS, et al : Chymase-directed serine protease inhibitor that reactes with a single 30-kDa granzyme and blocks NK-mediated cytotoxicity. J Immunol 153 : 5016-5025, 1995.
16) Jenne DE, Tschopp J: Angiotensin II-forming heart chymase is a mast-cell-specific enzyme. Biochem J 276 : 567-568, 1991.
17) Urata H, Boehm KD, Philip A, et al : Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. J Clin Invest 91 : 1269-1281, 1993.
18) Gorospe JRM, Tharp MD, Hinckley J, et al : A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy ?. Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs, and mice. J Neurol Sci 122 : 44-56, 1994
19) Sahashi K, Tanaka M, Tashiro M, et al : Increased mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of myotonic dystrophy. Gerontology 38 : 18-29, 1992.
20) Rawn JD (川上　潔 訳) : Biochemistry (ローン生化学). J David Rawn, Ed (監訳 : 長野　敬, 吉田賢右), 医学書院, 東京. 1991, pp942-955.
21) Stellato C, de Paulis A, Ciccarelli A, et al : Anti-inflammatory effect of cyclosporin A on human skin mast cells. J Invest Dermatol 98 : 800-804, 1992
22) Sharma KR, Mynhier MA and Miller RG : Cyclosporine increases muscular force generation in Duchenne muscular dystrophy. Neurology 43 : 527-532, 1993.
23) Kissel JT, Lynn DJ, Rammohan KW, et al : Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone- and azathioprine-treated Duchenne muscular dystrophy. Neurology 43 : 532-536, 1993.

# 多発性筋炎の生検筋におけるTNFα発現
## — in situ hybridizationによる検討 —

永 松 正 明*

研究協力者 久 留 聡* 梁 亦 鄧* 高 野 明 美*
犬 飼 晃* 祖父江 元*

### 目 的

多発性筋炎(PM)における筋障害は細胞障害性T細胞によるとされており，その過程にTNFαの関与が想定されているが明確な証明はない．今回in situ hybridizationを用いて筋組織におけるTNFα mRNAの発現を調べ，その病態形成における役割を検討した．

### 対象・方法

対象はPM12例(男性7例，女性5例，平均61.8±14.5歳)，皮膚筋炎(DM)5例(男性2例，女性3例，平均54.0±10.5歳)．生検筋より10μmの凍結切片を作成して以下の方法によりin situ hybridization(ISH)を施行した．TNFα mRNAに対するオリゴDNAプローブ(48mer)を4種類作製しジゴキシゲニン(DIG)で標識した．4%PFA/PBSで固定し，0.2N HCl, proteinase Kにより前処理を行なった後42℃にて一晩hybridizationした．2×SSCで洗浄後，アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体を反応させ，X-phosphate/NBTで発色を行なった．対照としてセンス・プローブを用いたISHを連続切片に対して施行した．一部の症例ではTNFα mRNA陽性細胞のphenotype解析のため免疫染色による二重染色を施行した．二重染色はISH終了後に抗CD8,CD68に対するモノクローナル抗体を用いてABC法により行った．さらにTNFαに対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色も行った．計数は筋線維500本当たりの全浸潤細胞数，およびTNFα陽性細胞数を測定し比率を求めた．

### 結 果

PM12例，DM5例全例にTNFα mRNA陽性の浸潤単核細胞が認められた．TNFα mRNA陽性浸潤細胞の比率はPMとDMとで比較すると，全体でみても部位別でみても有意な差はみられなかった(図1)．Endomysiumとperimysiumとで比較すると，PMではperimysiumの方が比率が高く，DMでは差がみられなかった(図2)．

PMでは単核細胞が非壊死線維を取り囲み浸潤する像(図3a)がみられたが，この場面における浸潤細胞の中にTNFα mRNAの発現(図3b)を認めた．これらの細胞にはCD8/TNFα二重陽性のものとCD68/TNFα二重陽性のものとがみられた(図4)．またこれらの細胞は免疫染色においても抗TNFα抗体にて陽性に染色された(図3c)．

### 考 察

炎症性ミオパチーの浸潤細胞におけるTNFαの発現を調べた研究は，これまでに免疫染色[1]やRT-PCR[2]を用いて検討したものなどいくつかの報告があるがin situ hybridizationを用いたのは本研究が初めてである．報告により結果がかなり異なっており，特に免疫染色での結果はRT-PCRやわれわれのin situ hybridizationの結果と比較して陽性細胞のみられた症例数が少ない傾向がある．これはTNFαが分泌性の蛋白であるためmRNAレベルでの発現と蛋白レベルでの発現とに解離があり，それを反映したものと考えられる．この中でTNFαのPMの病態機序における役割について言及したものはTateryamaらの報告[1]のみであり，筋萎縮との関係を推定している．

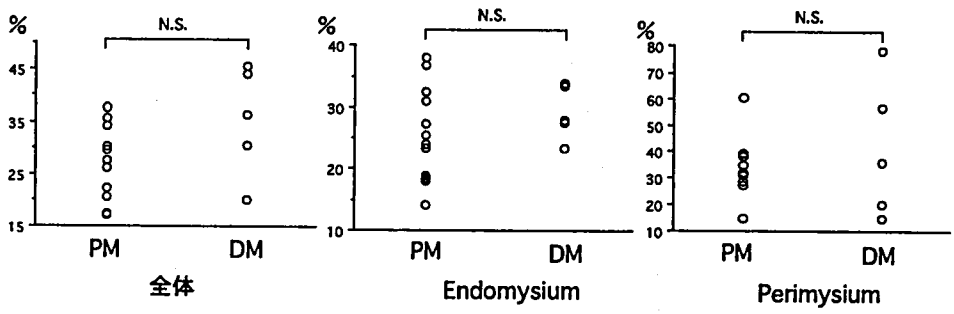



図1 浸潤細胞に占めるTNFα陽性細胞の比率

* 名古屋大学医学部神経内科

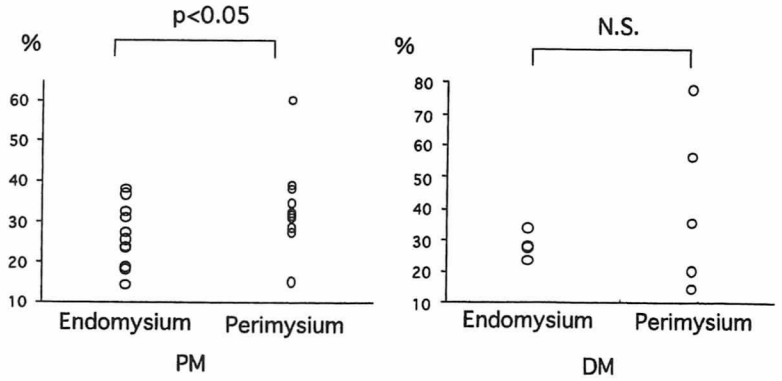



**図2**　TNFα陽性細胞の比率の部位別比較

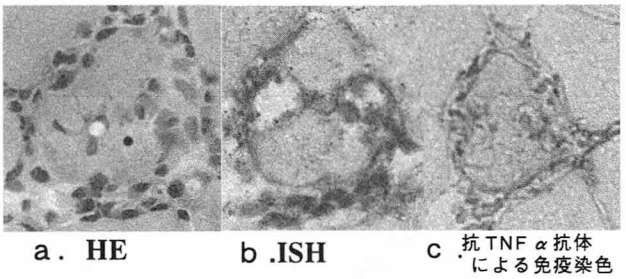



**図3**　非壊死腺維に浸潤する細胞におけるTNFα発現

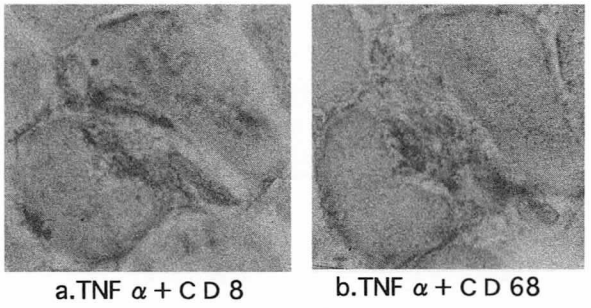



**図4**　TNFα陽性細胞のサブセット

本研究の結果に基づいてTNFαのPMの病態機序における役割を考えると，まず第一に筋障害への関与が挙げられる．PMは細胞性免疫機序が関与することが知られおり，その筋障害は細胞障害性T細胞によるMHC拘束性細胞障害であると考えられている．CD8陽性細胞が非壊死線維に浸潤する像はPMに特徴的な所見であるが，そのCD8陽性細胞にTNFα mRNAの発現が認められた．これはTNFαがPMにおける筋障害に関与することを強く示唆するものと考えられる．従来細胞性免疫における細胞障害性T細胞による細胞障害の機序に関してはperforinやgranzymeのexocytosisによる経路とFas-FasLの関与する経路の二つが考えられてきた．最近これ以外にTNFαが関係するとの報告が出ており，我々の結果もそれを支持している．

しかし細胞障害機序が異なるとされるPM,DMいずれにも同様の発現がみられること，endomysiumよりもperimysiumで陽性細胞の比率が高いという結果が出ており，筋障害以外の作用についても今後検討する必要がある．

## 参考文献

1) Tateyama M, Nagano I, et al : Expression of tumor necrosis factor-α in muscles of polymyositis. J Neurol Sci 146 : 45-51, 1997.

2) Andreetta F, Bernasconi P, Torchiana E, et al : T cell infiltration in polymyositis is characterized by co-expression of cytotoxic and T-cell activating cytokine transcripts. Ann NY Acad Sci 756 : 418-420, 1995.

# 多発性筋炎におけるMHC classⅡ分子の発現に関する研究

祖父江　　元*

研究協力者　犬飼　晃*　久留　聡*
高野明美*　梁　亦鄧*

## 目　的

多発性筋炎が自己免疫性疾患であることは以前より多数の事実,実験結果の報告から明らかにされてはいるが[1],いまだその自己抗原を含めpathomechanismは明らかではない．今回，多発性筋炎患者の生検筋組織の筋細胞でのMHC class II分子発現の状態及び抗原提示に必要とされる種々の分子を観察することを通して筋細胞自体の炎症機転への係りを検討した．

## 対　象

Conventional criteriaに基づき診断された多発性筋炎患者(PM) 20例[2]，非炎症性神経筋疾患患者(NC) 6例より診断目的で得た生検筋組織とそれより抽出したRNA.

## 方　法

①Immunohistochemistry：凍結生検筋より，厚さ8μmの切片を作製し，抗HLA-DR(MHC classⅡ)抗体を一次抗体とし，ABC法を用いDABで発色する免疫染色を行った．
②Semiquantitative RT-PCR：PM 16例，NC 6例の筋組織よりTRIzolを用いてtotal RNAを抽出し,ClassⅡ transactivator (CⅡTA),HLA-DMB,Invariant chain(Ii),HLA-DRA,IFN-γ,β-actinのprimerを用いsemiquantitative RT-PCRを行った．あらかじめ各々のprimer setにおいて定量された初期投与cloned PCR productを用いPCRを施行し，そのproductのgel上のbandの濃度をNIH imageにて解析し検量線を作製した．その検量可能範囲において各RNA sampleのPCR productを同方法にて定量し，そのmRNA発現量をβ-actin mRNA発現量との比(relative units)で表現した[3].
③In situ RT-PCR：凍結生検筋より切片を作製．3% PFAにて固定後，proteinase K処理し，DNase Iで42℃，overnight incubation. 3' primerを用いてRT反応後,各primerとdig-11-dUTPを含むPCR反応液にてPCR施行．AP標識抗dig抗体を反応させ，NBT/X-phosphateにて発色した．Negative controlとしてRT反応を除いたものを用いた[4].

## 結　果

①PMでは19/20例，NCでは0/6例が筋細胞膜でHLA-DRが陽性である筋線維が存在した(図1，表1).
②PM群，NC群それぞれの筋組織におけるmRNAの発現量は(relative unit)，CIITA：84.80±32.23,60.57±11.61 ($p<0.05$),HLA-DMB：158.79±111.51,59.47±19.95($p<0.01$), Ii：246.34±189.42,62.21±21.37($p<0.01$),HLA-DRA：117.45±110.36,41.23±20.29($p<0.05$),IFN-γ：138.17±133.54, 29.00±14.94($p<0.01$)であり，いずれのmRNAもPM群でその発現量は増加していた．
③各々のprimerによるPCRで，筋細胞のsubsarcolemmaを中心に染色される陽性線維と推察されるものがPM群に存在した(図2).

## 考　察

①の結果より，PMでは，その筋細胞膜上に正常では発現されていないMHC classⅡ分子が発現していることが確認された．そのclassⅡ分子発現は②の結果から，IFN-γによりup-regulateされたもので，professional antigen presenting cellと同様に，CIITA,HLA-DM,Iiの各分子の発現が伴っていることが推察され，③の結果より，それら分子が筋細胞で産生されていることが推察された．以上の事実は，PM筋において，筋細胞はprofessional antigen presenting cellと同様の機序で,充分な抗原提示能を持つclassⅡ分子を発現し，筋細胞それ自身が炎症を惹起させている可能性を強く示唆しているものと考えられた．

## 結　論

PM患者の筋組織において，筋細胞は炎症を惹起させるべく抗原提示を行っている可能性が考えられた．

表1　HLA-DR陽性筋細胞頻度

| | |
|---|---|
| Polymyositis | 19/20 |
| Duchenne muscular dystrophy | 0/4 |
| Becker muscular dystrophy | 0/4 |
| fasioscapulohumeral | 1/5 |
| myotonic dystrophy | 0/3 |
| amyotrophic lateral sclerosis | 0/3 |
| spinal musculart atrophy | 0/3 |
| normal control | 0/6 |

HLA-DR陽性筋腺維の存在する筋サンプル数/検索サンプル数

* 名古屋大学医学部神経内科

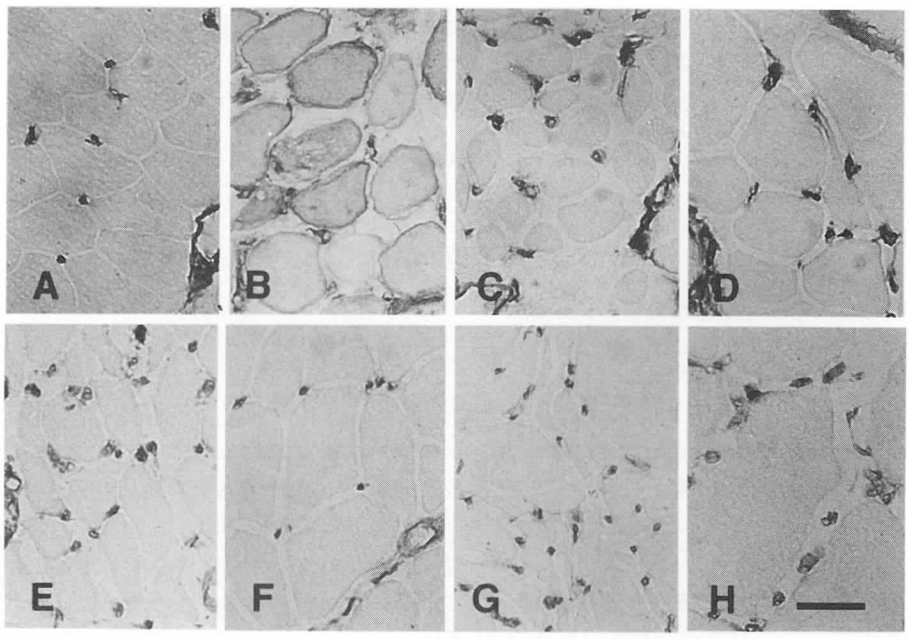



**図1** HLA-DR 染色
A 陰性コントロール，B 多発性筋炎，C Duchenne型筋ジストロフィー，D Becker型筋ジストロフィー，E 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー，F 筋緊張性ジストロフィー，G 筋萎縮性側索硬化症，H 脊髄性筋萎縮症 (Scale bar is 50 $\mu$ m.)

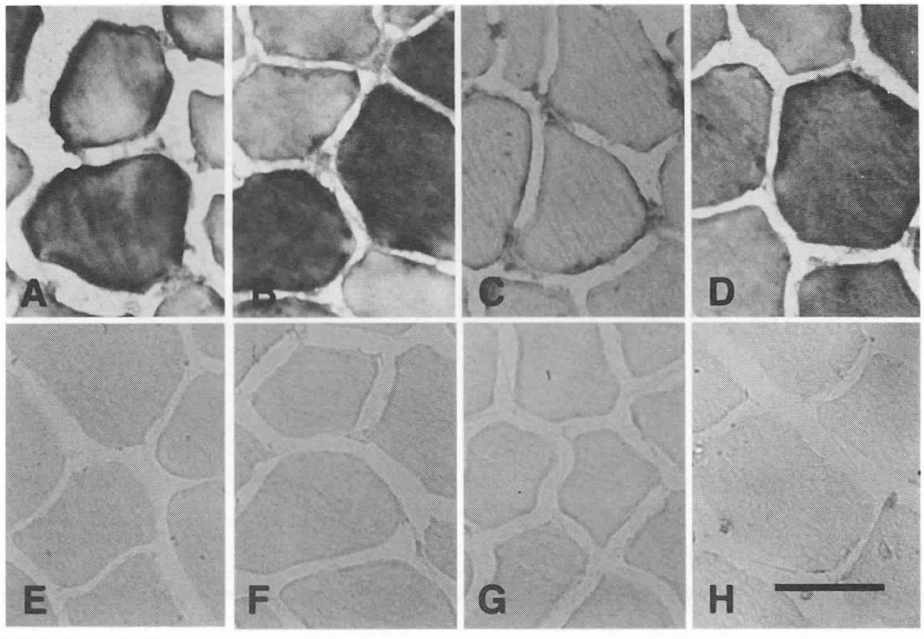



**図2** 多発性筋炎患者の筋組織におけるin situ RT-PCR
A CIITA，B HLA-DMB，C Ii，D HLA-DRA，E CIITAの陰性コントロール，F HLA-DMBの陰性コントロール，G Iiの陰性コントロール，H HLA-DRAの陰性コントロール (Scale bar is 50 $\mu$ m.)

## 参考文献


1) Rowe DJ, Isenberg DA, Mcdougall J, et al : Characterization of polymyositis infiltrates using monoclonal antibodies to himan leucocyte antigens. Clin exp Immunol 45 : 290-298, 1981.

2) Bohan A and Peter JB : Polymyositis and dermatomyositis. N Engl J Med 292 : 344-347, 403-407, 1975.

3) Rieckman P, Albrecht M, Kitze B, et al : Tumor necrosis factor-a messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. Ann Neurol 37 : 82-88, 1995.

4) Patel VG, Shum-Siu A, Heniford BW, et al : Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in tissue sections from biopsy specimens using in situ polymerase chain reaction. Am J Pathol 144 : 7-14, 1994.

# McArdle病における虚血運動時の血管収縮物質の動態

依　藤　史　郎*

研究協力者　平　野　千　景**　中　西　　史**
草　野　恵美子*　今　岡　弘　之**

**要　旨**　McArdle病で前腕虚血運動負荷試験を行なうと，運動終了直後に肘静脈より採血した血液中のノルエピネフリンが過剰に上昇していた．この結果は先に行った近赤外分光法による酸素モニターによって示された，運動後に筋肉内血流が低下し酸素回復が遅延するという結果と生化学的に合致すると考えた．

## はじめに

近赤外分光法による酸素モニターにて筋内の酸素動態を調べるなかで，McArdle病では前腕虚血運動後に筋内の酸素回復が遅れており筋内血流の回復が障害されていると考えられる結果を得た[1]．そこで血管収縮物質の変動を虚血運動前後で測定した．

## 方　法

虚血運動負荷試験を行い経時的に静脈採血して血管収縮物質の測定を行った．すなわち15分間の安静の後，前腕で2分間 semi-ischemic exercise testを行い，その前と直後，2分後，4分後，6分後に前腕肘静脈より経時的にEDTAを加えて採血し，norepinephrine, epinephrine, dopamine, 及びendothelin(1-21)の変動を測定した．測定方法はnorepinephrine, epinephrine, dopamineはHPLC, endothelinはELISAで行った．

## 結　果

測定した4種類の物質の中で有意な変動を示したのはnorepinephrineであった．正常対照に比し運動負荷直後と2分後で著しい上昇を認めた(図1)．しかしその他の4物質については，epinephrineは正常対照でも変動しており両者の間に差は認めず(図2)，dopamineも殆ど変動を認めなかった(図3)．endothelinも同じく変動を認めなかった(図4)．

## 考　察

McArdle病の骨格筋に近赤外酸素モニターをつけて前腕虚血運動負荷試験を行い正常対照と比較したところ，組織の相対的な酸素濃度は運動中までは対照と変らなかったが，運動終了後元の値に戻るのがきわめて遅くなっていることを見い出した[1]．このことは運動が終了し上腕での虚血負荷も解除されて本来なら正常対照の様に血流が回復して組織の酸素濃度も回復しなければならないのに，何らかの原因で血管が収縮して血流がすぐに回復していないことを示しているのではないかと考えた．そのため候補に上がる血管収縮物質を経時的に測定したところノルエピネフリンが有意に過大に上昇を示した．すなわちこの度測定した物質のなかではノルエピネフリンのみが虚血運動と関連して著しい上昇を示し，今回見い出した酸素濃度の変化をうまく説明出来ると考えられた．

なおこの他の血管収縮物質としては，アンギオテンシンII，ADPとATP(P2 purine receptor)，バソプレッシン，トロンボキサンA2，セロトニン，ムスカリン，ヒスタミンなどが知られているがいずれも骨格筋中では大きく関与しているとは考えにくく測定の対象には含めなかった．

本症を含め解糖系酵素欠損による代謝性ミオパチーは，虚血運動負荷中から後に有痛性筋拘縮や筋のこわばりを感じるとともに横紋筋融解を生じることがあるが，この現象のメカニズムは十分には明らかにされていない．今

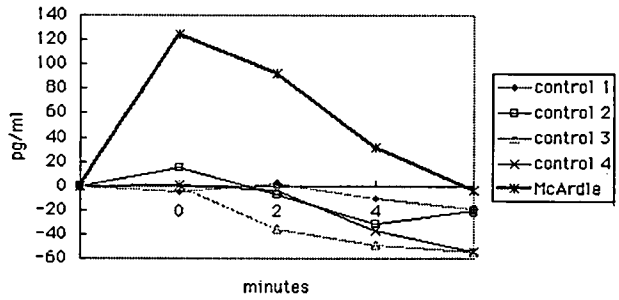



図1　Changes of plasma norepinephrine after semi-ischemic exercise

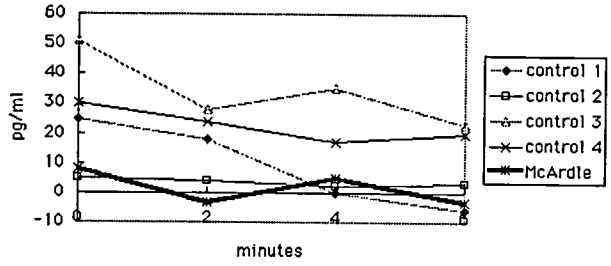



図2　Change of plasma epinephrine level after semi-ischemic exercise

* 大阪大学医学部保健学科生体情報学
** 大阪大学医学部看護学

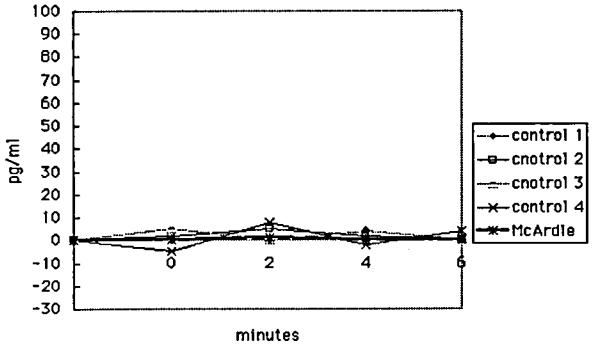



図3 Changes of plasma dopamine after semi-ischemic exercise

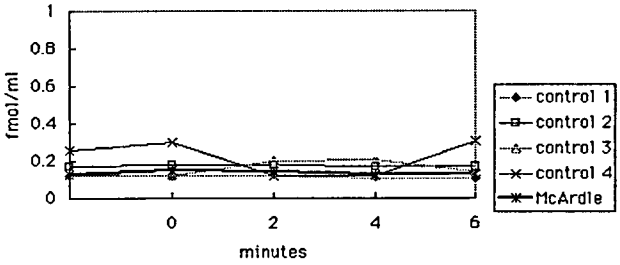



図4 Change of plasma endothelin after semi-ischemic exercise

回認められた血管の過剰収縮による血流障害及びその結果として生じる持続性の低酸素状態が，筋拘縮や筋崩壊を生じさせているのではないかと考えられた．

## 結　論

McArdle病では虚血運動後に血流が回復せず，過剰な血管収縮が見られその時期に一致してノルエピネフリンが有意に上昇した．

## 文　献

1) 依藤史郎，阿部和夫，松尾善美ら：近赤外光法による代謝性ミオパチーの運動筋内酸素動態．平成8年度厚生省精神・神経疾患研究委託費による研究報告集，国立精神・神経センター：p.226, 1997.

# 筋疾患における近赤外分光法酸素モニターの臨床的有用性の検討

依　藤　史　郎*

研究協力者　平　野　千　景*　阿　部　和　夫**　松　尾　善　美***
井　上　　悟***　今　岡　弘　之*　中　西　　史*
草　野　恵美子*

**要　旨**　代謝性筋症を中心に種々の筋疾患に対して，近赤外分光法による酸素モニターの臨床的有用性について分析した．解糖系障害及びミトコンドリア異常の病態を反映した筋内酸素動態を非侵襲的に測定出来ていると考えられる結果が得られた．特にMcArdle病では虚血運動後に筋内の血流が低下しており酸素回復が遅延していた．本検査はエネルギー代謝病や関連疾患の病態解析，経過観察，治療効果判定に役立つと考えられた．

## はじめに

我々は本研究班において筋疾患に対する近赤外分光法による酸素モニターの臨床的有用性を検討した．本検査の長所は非侵襲的に生体組織内の酸化還元状態の変動をリアルタイムに測定できることであるが，測定開始時からの変動を測定するので絶対値が求まらない欠点がある[1]．これらの点をふまえ筋疾患に負荷試験を行いながら測定を行った．

## 対象と方法

対象は代謝性ミオパチーを中心に各種の筋疾患で検討した．

方法はオムロン社製酸素モニターHEO-200を用いた．ゴム製の板にプローブがはめ込んであり，測定原理はプローブに付いた発光ダイオードから特定の波長の近赤外光がパルス状に出て組織内を通過しフォトダイオードがついた受光部でその吸収値を経時的に測定するものである．近赤外光は生体組織による散乱が比較的少なく，また生体を透過しやすい性質がある．測定時の光路は発光部と受光部を結ぶバナナ型の部分であり平均の深さは発光部と受光部の距離の約半分になるので今回使用したプローブでは3cm間隔のため約半分の1.5cmの深度までの測定になる．筋組織内の酸化及び還元ヘモグロビンの変動を2波長法の原理で測定するようにソフトが組み込まれている．

握力計を握る際に収縮する筋肉で皮下脂肪の少ない部分の上にプローブを装着し，皮膚に密着させて運動中ずれない様に巻き付け，ベッド上安静でベースライン値を取り込んだ後に以下の2つの条件で測定した．

1：完全虚血2分間での酸素消費速度と虚血解除後の酸素回復速度，2：semi-ischemic forearm exercise testで，中間血圧で上腕を圧迫しながら2分間最大力で握力計を繰り返し握る運動を行い酸素消費と回復速度を測定した．

グラフの黒線は組織中の酸化ヘモグロビンから還元ヘモグロビンを引いたものであり，組織内の酸化還元状態の指標となり酸素が減ると値が減少する．一方破線は酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの和で組織中の血液量の指標となり血液量が増えると値が増加する．

## 結　　果

正常者では安静虚血時には酸素消費はほぼ直線状に進んだが，McArdle病では完全虚血開始後徐々に酸素消費速度は遅くなった．組織中に残った酸素の利用が障害されていると考えられた．McArdle病で2分間完全虚血後にどの程度酸素消費速度が遅くなるかを見るためにグラフ上に初速度のままで直線を引き2分間虚血にした時点での実測値との差を見ると，正常対照は殆ど0となり虚血開始時の酸素消費速度のまま直線状に進んでいくが，McArdle病では明らかに酸素利用が障害されていた(図1)．

一方semi-ischemic forearm exerciseテストをMcArdle病に行うと，終了後に筋組織中の酸素が正常者ではすぐに回復するのに比べ明らかに遅延していた(図2)．これは平成9年度に報告したが，虚血下で運動すると血液中のノルアドレナリンが過剰に上昇しており筋肉内の血管が収縮して血流速度遅延を生じたことに対応した結果と考えられた．以上の結果は時期を空けて繰り返したが同様の結果を示した．

次にミトコンドリアミオパチーのなかで極めて稀なTCAサイクルの障害であるコハク酸脱水素酵素欠損症(SDH deficiency)について検討した．本検討時41才の女性で，病歴は29才頃から近位筋の筋力低下によると考えら

* 大阪大学医学部保健学科生体情報学
** 大阪大学医学部神経内科
*** 大阪大学医学部理学療法部

れる運動機能障害が徐々に出現し，膝の痛みのため整形外科で測定したCKが5427と高値を示したため，約4年前に近医へ入院し筋生検などの精査を行った．筋生検の結果は組織化学染色でコハク酸脱水素酵素の染色性が低下していた．近医より紹介を受け白血球を用いて測定したミトコンドリア関連酵素活性はコハク酸脱水素酵素活性とともにミトコンドリア内膜電子伝達系複合体2であるコハク酸シトクロムc還元酵素も低下していた．一方NADHシトクロムc還元酵素活性は正常であり，TCAサイクルのクエン酸合成酵素活性は正常対照より高値を示していた．このような生化学的異常を持つ症例に本検査を行なった．

臨床病型はlimb-girdle型を示しており，酸素モニターによる完全虚血時の酸素消費速度は開始後約1分半頃から極めて軽度に遅くなったのみであった．一方握力計を3回最

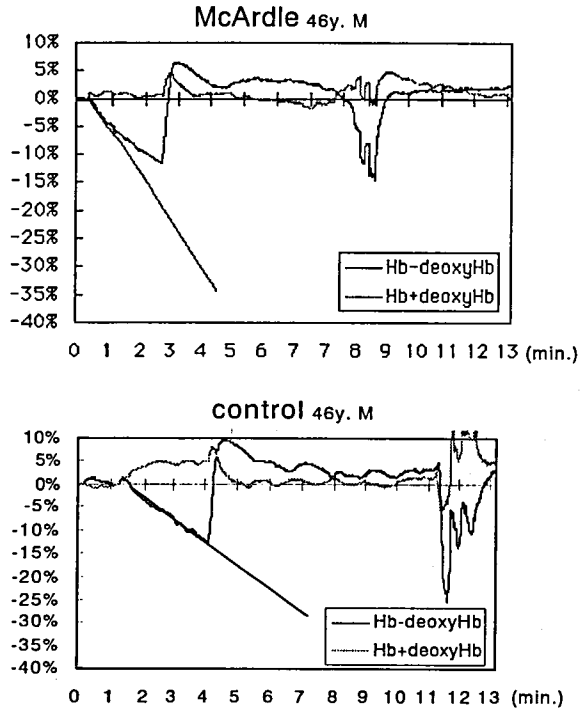



図1

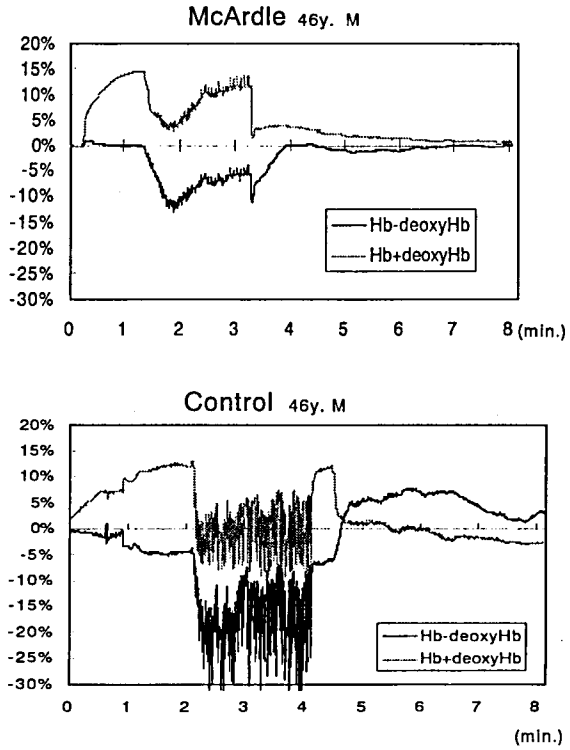



図2

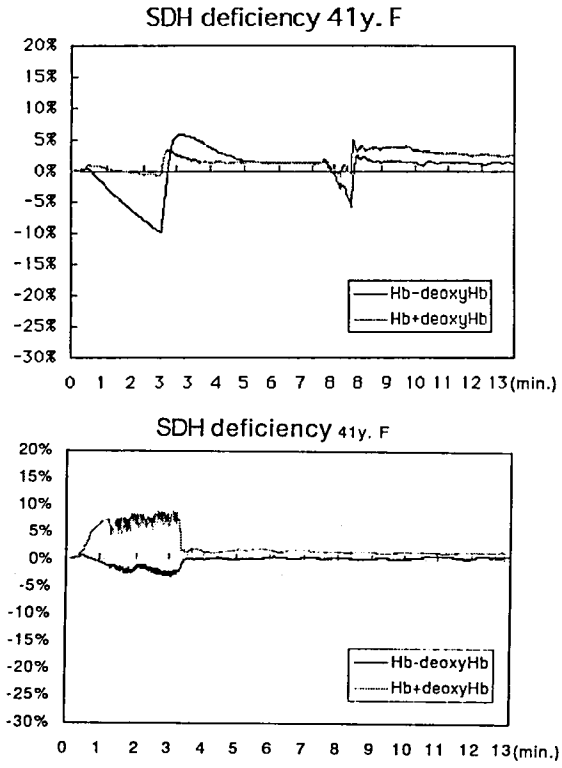



図3

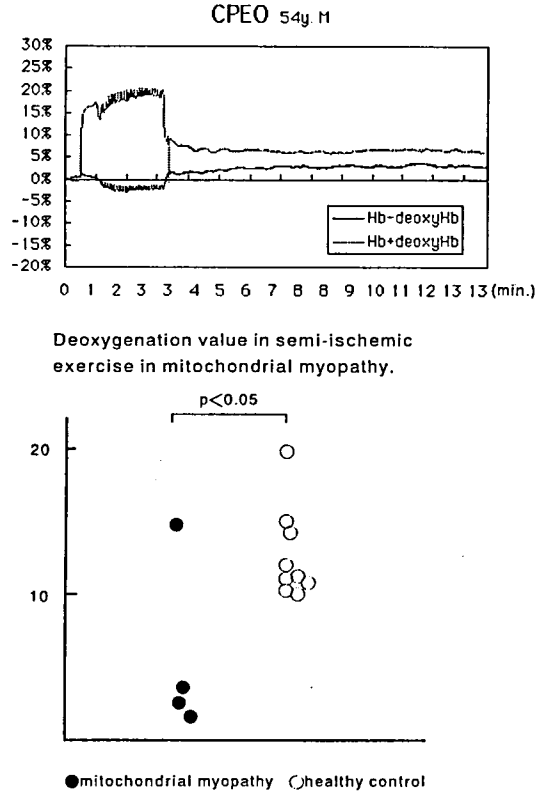



図4

Differencial value of muscle deoxygenation rate between initial and final state in anoxic loading.

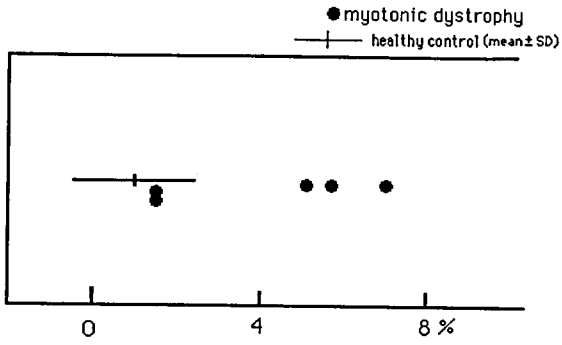



図5

大力で握る運動では力は出ているのに，酸素消費が少なくベースラインよりわずかに低下したのみであった(図3上)．次にさらに激しい運動としてsemi-ischemic forearm exercise test を行なったところ，2分間の握力計を反復握る運動中も酸素の低下はわずかであった(図3下)．本例ではミトコンドリア電子伝達系のNADH oxidationは保たれているがコハク酸脱水素酵素の活性低下によりTCA cycleの代謝の流れが障害され結果としてはNADHが産生されないことを示している結果と考えられた．

一方CPEOではsemi-ischemic forearm exercise test中の酸素消費は少なく，正常対照との間に差を認めた(図4上)．4例のCPEOに対してsemi-ischemic forearm exercise testの組織内酸素の減少値をグラフに示した(図4下)．ミトコンドリアミオパチーでは運動時にも酸素が減らず病態を反映していると考えられた．しかし一部の例では正常と差がなくミトコンドリアミオパチーの筋病変が均一でないことを反映していると考えた．

次に筋緊張性ジストロフィー5例について安静虚血状態で組織の酸素消費をみると正常対照の様に直線的に低下しない例が見られた(図5)．

しかしその他の筋疾患に対して行った同様の検討では正常対照との間に差は認められなかった．

## 考　　察

McArdle病では完全に駆血すると組織内の酸素は途中から直線的には下がらず酸素消費速度が遅くなった．この理由として次の2つの可能性が考えられた．1つは筋肉内の酸素が消費されてしまったというもの．もう一つは酸素を利用して分解される基質がなくなってしまったことである．正常対照のデータから組織内酸素はまだ十分に残っていると考えられるのではじめの可能性はないと思われ，2つ目の駆血後3分頃から酸素を利用する基質がなくなった所謂燃料切れの状態になったと考えられた．

本症では従来から嫌気性解糖のみでなく好気性解糖も障害されている[2]といわれており，筋内のグリコーゲンは分解されないので，血液からブドウ糖などの基質が持続的に供給されなければ筋肉内の基質が枯渇してしまう可能性が考えられた．ただ一般的には安静時は解糖系よりも脂肪酸の分解でエネルギーを得ているといわれているので本症ではこの点に興味がもたれる．

CPEO患者では酸素濃度は徐々に低下していくものの正常対照と比べて低下する速度がおそく酸素の利用が悪いことを示していた．このデータは検査している部分の筋肉内ミトコンドリアの酸化的リン酸化の速度をそのまま反映していると考えられた．しかし四肢の筋症状が比較的軽いCPEO症例でも行うと正常の範囲の値を示しており臨床症状や重症度を反映する可能性もあると考えられた．

## 結　　論

筋疾患の骨格筋内の酸化還元動態を近赤外酸素モニターで検討した．筋組織内の酸化還元状態の変動が非侵襲的にリアルタイムで記録できていると考えられた．この測定法はエネルギー代謝病や関連疾患の病態解析，経過観察，治療効果判定に役立つと考えられた．

## 文　　献

1) Hamaoka T, Iwane H, Shimomitsu T, et al : Noninvasive measures of oxidative metabolism on working human muscles by near-infrared spectroscopy. J Appl Physiol 81 : 1410-1417, 1996.

2) De Stefano N, Argov Z, Matthews P, et al : Impairment of muscle mitochondrial oxidative metobolism in McArdle's disease. Muscle Nerve 19 : 764-769, 1996.

# リソソーム蛋白分解系と筋委縮：神経性セロイド様リポフスチン蓄積症における解析から

木 南 英 紀*

研究協力者　江 崎 淳 二*　谷 田 以 誠*

## はじめに

神経・筋細胞内に自己貪食胞・空胞形成のみられる神経性セロイド様リポフスチン蓄積症(NCL)は疎水性蛋白のリソソーム蓄積症である可能性が非常に強くなってきた．Batten病は，主に乳児期から小児期ならびに青年期の初期に神経系に障害が発生する致命的な疾患であり，その特徴として，神経細胞や骨格筋およびその他の細胞中に自家蛍光を発するリポフスチン様顆粒が蓄積する．最近の研究によって，本症は発症年齢，臨床症状，連鎖解析から，6グループに分けられることが提唱され，その内4つの型について原因遺伝子が判明した(表1)．乳児型(CLN1)では，スフィンゴ脂質活性化タンパクAとDが蓄積しており，リソソーム酵素であるPalmitoyl protein thioeteraseの欠損に基づく．他の5つの型はミトコンドリア内膜に局在するATP合成酵素のサブユニットcの蓄積が主体であり，遅幼児型(CLN2)ではリソソームのプロテアーゼ(?)の欠損，幼児型(CLN3)と遅幼児型のFinish variant(CLN5)では膜貫通蛋白，おそらくリソソーム膜蛋白をコードする遺伝子の変異によることが明らかになった．我々はこれまでに，遅幼児型(CLN2)の線維芽細胞を用いて，サブユニットcはリソソーム内に蓄積しており，その蓄積機構はサブユニットcの特異的な分解の遅延によることを明らかにしてきた[1)-4)]．今回の研究によって，リソソームに運搬された疎水性蛋白の分解には新しい分解系が必要であり，このシステムの不調によりセロイド様リポフスチン蓄積症がおこり，やがて神経・筋細胞内に自己貪食胞・空胞形成に至ると考えられた．

## 材料と方法

**対象**：神経性セロイド様リポフスチン蓄積症(遅幼児型，すべてカナダおよびアメリカ合衆国の施設より供与)および対照線維芽細胞は10%胎児牛血清で培養した．試験内分解実験：線維芽細胞からミトコンドリアーリソソーム分画を分離し，pH5.0で一定時間インキュベート後，残存サブユニットc量をSDS-PAGEとwestern blotで解析した．

## 結　　果

### 1) 特異的なサブユニットc分解遅延の試験管内実験による再現

遅幼児型NCL細胞でのサブユニットcの特異的分解遅延というIn vivoの実験の結果は無細胞系のin vitroの実験でも再現できた．正常，患者細胞からリソソームーミトコンドリア分画を調製し，pH5.0でインキュベートすると，ミトコンドリアのATP合成酵素のβ-サブユニット，シトクロームオキシダーゼのサブユニットIVといった内膜タンパクだけでなく，マトリックス酵素であるMn2+-SODの分解速度は正常と患者細胞間では差がない．それに対し，サブユニットcの分解速度は患者細胞では大きく遅延した．

次に，サブユニットc分解遅延がリソソームの分解系の異常によるのか，基質サブユニットcの構造異常によるのかを同様にin vitroの実験系で調べた．今度は，正常および患者細胞からリソソームとミトコンドリア分画をそれぞれ単離し，組み合わせ実験を行なった．リソソームとミトコンドリア分画にはそれぞれ混入がないことを確認

表1　神経性セロイド様リポフスチン蓄積症の分類

| 原因遺伝子 | 名称 | 蓄積物 | 原因遺伝子座位 | 原因遺伝子産物 |
|---|---|---|---|---|
| CLN1 | 幼児型 | SAP-A, D | 1p32 | PPT |
| CLN2 | 遅幼児型 | subnit c | 11p15.5 | Cln2p(PICP) |
| CLN3 | 若年型 | subnit c | 16p12 | Cln3p(Lys.m.p) |
| CLN4 | 成人型 | subnit c | ? | ? |
| CLN5 | 遅幼児型 variant | subnit c | 13q21 | Cln5p(Lys.m.p) |
| CLN6 | 早期若年型 | subnit c | 15q21-3 | ? |

SAP : sphingolipid activator protein,　PPT : palmytoyl protein thioesterase
PICP : pepstatin sensitive carbokyl peptidase, Lys.m.p. : lysosomal membrane protein

* 順天堂大学医学部生化学第一

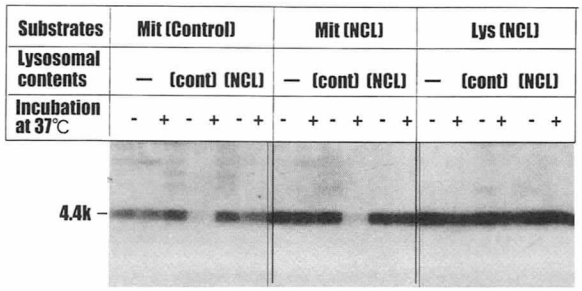



**図1** 遅幼児性神経性セロイド様リポフスチン蓄積症では，ATP合成酵素サブユニットcの分解システムに欠陥がある．正常および患者細胞からリソソームとミトコンドリア分画をそれぞれ単離し，図のような組み合わせで，pH5でインキュベートし，サブユニットc分解能を調べた．

してある．**図1**に示すように，正常細胞から分離したリソソーム分画は正常および患者細胞ミトコンドリア分画中のサブユニットcを分解できるのに対して，患者細胞から分離したリソソーム分画は正常および患者細胞いづれのミトコンドリア分画中のサブユニットcをも分解できない．このことは患者細胞ではリソソームのサブユニットc分解能に欠陥があることを強く示唆する．**図1**に示されるように，患者細胞のリソソームに蓄積したサブユニットcは変性し，凝集体をつくっているため正常細胞のリソソーム分画でも分解されない．

**2) 既知のリソソームプロテアーゼ群の活性**

遅幼児型NCLではリソソームの分解系に異常があることは判明したが，ではリソソームプロテアーゼ群に異常が，ひいては遺伝子変異があるのだろうか?そこで正常および患者細胞のリソソームの既知のエンドペプチダーゼとエキソペプチダーゼの活性，タンパクおよびmRNAのレベルを調べた．カテプシンB,L,H,C,DジペプチジールペプチダーゼⅠおよびⅡ，カルボキシペプチダーゼA(保護タンパク)，アミノペプチダーゼなど調べた限り，正常と患者細胞細胞間には有意な差はなかった．

**3) 遅幼児型NCLの原因遺伝子産物**

遅幼児型NCLの原因遺伝子の連鎖解析から，その座位は11p15にあることがことが確認され，さらにその局在の範囲を狭ばめるべく努力されていた．一方，我々の研究の進展をみていたSleatら[5]のグループは非常に巧妙な方法を使って，タンパクレベルの解析から遅幼児型NCLの原因遺伝子を突き止めた．コードする推定アミノ酸配列から，原因遺伝子産物(CLN2)は細菌にみられるペプスタチン非感受性カルボキシルプロテアーゼにホモロジーがあり，高等動物では全く発見されていないタンパクであることが判明した．

**4) CLN2遺伝子産物の削除によるサブユニットc分解遅延**

我々は，ヒトのCLN2遺伝子産物に対する特異抗体を作成し，この遺伝子産物がサブユニットcの分解に関与するかどうか調べてみた．作成した抗体が正常細胞では46kDaのタンパクを特異的に認識し，4例の異なる遅幼児型NCL繊維芽細胞では，CLN2遺伝子産物を全く欠損していることを確認した．そこで，正常細胞のミトコンドリアーリソソーム分画からCLN2遺伝子産物を免疫的に除去し，前述のようにin vitroでのサブユニットcの分解速度を調べた．CLN2遺伝子産物を除去した抽出液と除去していない抽出液の間でATP合成酵素のβ-サブユニットの分解速度には差がなかったが，サブユニットcの分解はCLN2遺伝子産物の除去によって大きく遅延した．この結果はCLN2遺伝子産物がサブユニットcの分解に関与していることを指示している．

## 考　　察

ヒトのCLN2遺伝子産物の酵素学的な性質はまだ全くわかっていない．本当に細菌にみられるペプスタチン非感受性カルボキシルプロテアーゼのような性質をもつのか，タンパク基質に対してどんな切断特異性を示すのかは興味あるところである．大腸菌で発現したCLN2遺伝子産物の性質を現在検討している．サブユニットcの蓄積は遅幼児型だけではなく，若年型など他のNCLでも蓄積する．若年型(CLN3)と遅幼児型variant(CLN5)の原因遺伝子が同定されているが，いずれも膜貫通ドメインをもつ膜蛋白質で，おそらくリソソーム膜タンパクと推定されている．サブユニットCのように非常に疎水性の高い蛋白質の分解には通常のリソソーム分解系に加えて，新しいプロテアーゼ(群?)と膜系からなる特殊な分解系が必要なのであろう．サブユニットCのリソソーム内蓄積と病態の発現の関連については別のアプローチが必要である．

## 文　　献


1) Kominami E, Ezaki J, Muno D, et al : Specific storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in lysosomes of neuronal ceroid lipofscinosis (Batten's disease). J Biochem 111 : 278-282, 1992.

2) Ezaki J, Wolfe LS, Higuti T, et al : Specific Delay of Degradation of Mitochondrial ATP Synthase Subunit c in Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (Batten Disease). J. Neurochem. 64 : 733-741, 1995.

3) Ezaki J, Wolfe LS and Kominami E : Specific delay in the degradation of mitochondrial ATP synthase subunit c in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis is derived from cellular proteolytic dysfunction rather than structural alteration of subunit c. J. Neurochem. 67 : 1677-1687, 1996

4) Ezaki J, Wolfe LS and Kominami E : Decreased lysosomal subunit c- degrading activity in fibroblasts from patients with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Neuropediatrics 28 : 53-55, 1997.

5) Sleat D.E, Donnelly R J, et al : Association of Mutations in a Lysosomal Protein with Classical Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. Science 277 : 1802-1805, 1997.

# X．緩和的薬物治療および遺伝子治療

# mdxマウスの血清creatine kinaseと筋組織に対するprednisolone長期投与の効果

高　木　昭　夫*

研究協力者　渡　辺　知　司*　小　島　　進***　遠　藤　雄　三**

**要　旨**　Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)の緩和的治療のため，corticosteroid製剤が投与されることがある．筋脱力の進行を抑え，歩行期間を延長させたと言われる．しかしその作用機序には不明な点が多い．本報告では，DMDのモデルであるmdxマウスにprednisolone(PSL)を30週に亘って間歇投与し，血清creatine kinase(CK)値や筋組織への影響を分析した．投与期間中，血清CK値は対照の23%に低下した．これに比して，筋組織上の改善は軽微であったが，筋壊死の減少を示唆する結果を得た．骨格筋以外では，肝臓の細胞質障害が疑われた．PSLは筋細胞膜破綻後に生ずる二次的組織反応を抑制し，病変の拡大を制御する可能性を推定した．この機序の解明は今後の治療法開発上の重要な課題と思われた．

**発表論文**

高木昭夫，渡辺知司，小島　進，遠藤雄三：mdxマウスの血清creatine kinasaeと筋組織に対するprednisolone長期投与の効果．臨床神経 38：724-728, 1998.

* 虎ノ門病院神経内科
** 虎ノ門病院病理学科
*** 三宿病院神経内科

# 培養筋細胞におけるジストロフィンの発現とステロイドの影響

松　原　四　郎*

研究協力者　北　口　哲　雄*　平　井　俊　策*

## 緒　言

Duchenne型筋ジストロフィー症ではジストロフィンの欠損によりmuscle fiber degenerationをきたすが，その詳細なメカニズムについては解明すべき不明な点も未だ残されている．

治療に関してはステロイドの投与が有用であるとの指摘が以前よりあったが，最近少量の長期投与が患者のambulationの延長に効果があるとして再評価されてきている(Backman E他，1995)．われわれはDMDの動物モデルであるmdxマウスをもちいてステロイドの効果を検討してきたが，本年も筋細胞の発育・分化にどのように影響するかをin vitro初代筋培養系を用いて検討した．

## 方　法

初代培養はmdxマウス(C57BL/10ScSn-mdx)と，対照として野生種であるC57BL/10SnJマウス(B10)の新生仔マウスから後肢筋・背筋を採取し，細切した後にトリプシン酵素処理で分散した．細胞数は$10^5$/cm$^2$となるように調製した．PLL,type1コラーゲンでコーティングした培養器を使い,同時に採取した脊髄とともにDMEM+F121:1mixtureに15%fetal bovine serum (FBS)，5%horse serum (HS)を含む増殖培地の条件下で48時間培養した．その後2%HSを含む分化培地に交換してfusionさせた．またB10，mdx双方に由来するmyoblastを細胞数1:1でco-cultureして上記と同様の条件で培養しheteromyotubeを形成させた．培養開始から120時間以上培養を継続して形態学的変化とともにジストロフィンやミオシンなど筋特異蛋白の発現を免疫組織化学的に観察した．

ステロイドはα-Methylprednisolone(PDN)を用い，最終濃度が$10^{-5}$Mとなるように培養開始後48時間後，72時間後，96時間後に培地中に添加した．上記の条件で培養開始から7日後に形成されたmyotubeの数，細胞長を計測し推計学的な有意差を検討した．またPDNにはanti-oxidant actionがあることから，free radicalを生じる代表的なものであるhydrogen peroxideをもちいてoxidative stressの影響とPDNの効果を検討した．培養開始から48時間後に$H_2O_2$を0.5mMとなるように培地中に添加して8時間暴露し，その後$H_2O$を含まない分化培地に交換して培養をさらに継続し，PDNを添加した群と非添加群で培養開始から7日後に形成されたmyotubeの数を計測した．細胞死もtrypan blue dye exlusion assayで推定した．

培養上清から血清を取り除き無血清・成長因子の欠乏状態におくと48時間後から細胞死(apoptosis) が起こるが，これがPDNによって抑制されるかも検討した．24時間後に増殖培地から血清を除去し，0.1%BSAを含む1:1 DMEM/F12培地にて24時間培養した．その後は同様に分化培地に交換して培養を継続し，培養開始から7日目に形成されたmyotubeの数を計測した．

## 結　果

培養開始後4日目でmyotubeの形成がみられるが，ジストロフィンに対するimmunoreactivityは細胞質全体でdiffuseに陽性に染色されmatureなmuscle fiberにみられるような細胞膜への局在はみとめられなかった．PDN存在下，非存在下でも明らかな差異はなかった．そこでPDNと筋細胞の初期発生・分化に対する影響を検討した．PDNは48時間後，72時間後，96時間後に添加し7日後のmyotubeの

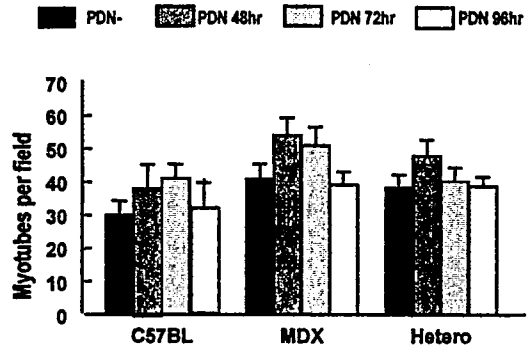



図1　Proliferative Activity

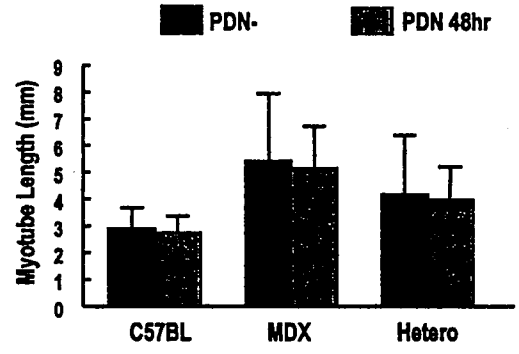



図2　Morphological Change

* 東京都立神経病院神経内科

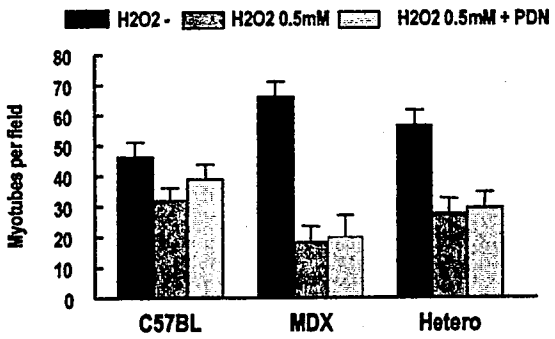



図3 Free Radicals

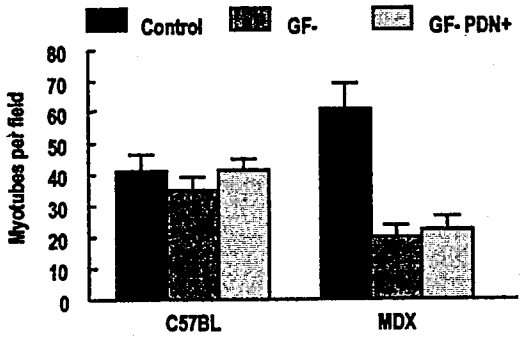



図4 Growth Factor Deprivation

形成の数を示す(図1). B10群ではmyotubeの数は72時間後PDNを添加群した群が7日後のmyotubeの形成が最も多く，次いで48時間後に添加した場合であり72時間後のみ推計学的に有意差があった．Mdx群では48時間後に添加した場合に最も増加し，次いで72時間後の順で，いずれも推計学的に有意であった．しかし96時間後に添加した場合には効果はみとめなかった．B10/mdxのco-cultureでheteromyotubeを形成させた群でもmdxと同様の結果でB10, mdx群の丁度中間となった．またmyotube sizeの計測ではB10, mdx, heteroのいずれにも大きな有意差はなく，形態学的に大きな差はないと考えられた(図2).

Myotubeの形成に対してfree radical, hydrogen peroxideの及ぼす影響をグラフに示す(図3). mdx群がmyotubeの形成が最も少なく，これと逆相関の関係で細胞死もいちばん多かった．次いでheteromyotube群であり，B10群でもっとも影響が少なかった．PDNを添加後に3群とも形成数の増加がみられたが推計学的に有意ではなかった．

増殖培地で24時間培養した後，血清を一切含まないDMEM培地のみのGF除去の条件下ではmyoblastはapoptosisをおこし，形成されるmyotubeが大幅に減少することが知られている．mdx群において7日後のmyotube数の減少が著明であるがB10群ではmyotub e の減少はそれに比して軽度であった．PDN添加によってmyotubeの形成数の増加がわずかにみとめられるが統計学的に有意なものではなく抑制効果はみられなかった(図4).

## 考　察

初代培養筋細胞においてPDNは明らかにmdx mouseのmuscleの分化・増殖に作用していると考えられた．またMdx mouseは少なくとも培養条件下ではoxidative stressに対して感受性が亢進していることもわかった．PDNの添加でこのoxidative stressは抑制されたが推計学的には有意なものではなく，PDNのmuscleに対する効果がanti-oxidant effectによると考えられる確証は得られなかった．また同様にapoptosisによるとされる細胞死の抑制も有意なものではなかった．今後さらにPDNの作用がそのほかのメカニズムの関与によるものかどうか検討が必要と考えられた．

## 文　献

1) Backman E and Henriksson K.G : Low-dose prednisolone treatment in Duchenne and Becker muscular dystrophy. Neuromuscul. Disord. 5 : 233-241, 1995.

2) Rando T.A, Disatnik M-H, Yu Y and Franco A : Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility to oxidative stress. Neuromuscul. Disord. 8 : 14-21, 1998.

# Double-mutant mdxマウスの病態生理と治療に関する研究

栗 原 照 幸*

研究協力者　大 迫 正 行*　杉 本 英 樹*
岸　雅 彦*　木 下 真 男*

**要 旨** Mdxマウスでは，Duchenne型筋ジストロフィーと同様にdystrophinが欠損しているが，再生が活発で，進行性の筋力低下は起こさない．筋崩壊を来す要因が，dystrophinの欠損以外にないかどうか，強皮症のモデルマウスであるtight-skinned mouseとmdxマウスを交配したdouble-mutant mdxマウスを用いて筋細胞内記録を行い，病態生理の検討とdehydroepiandrosterone sulfate(DHEAS)を用いてミオトニーの治療の試みをした．double-mutant mdxマウスでは，組織学的には細胞浸潤，脂肪浸潤，壊死・再生線維が見られ，変化がmdxマウスより強かったが，膜電位は正常であった．微小電極刺入時のinsertion myotoniaは15%の筋線維で認められたが，DHEASを用いると，insertion myotoniaを完全に抑制することができた．

## はじめに

Mdxマウスでdystrophinの欠損があることは，Duchenne型筋ジストロフィーと同様であるが，再生が活発に起こるため進行性の筋力低下をきたさない．mdxマウスでは，筋肉の線維化が起こらないことが，再生能力がある理由とも考えられている．

線維化が強く起こる病気として，強皮症がある．強皮症の実験モデルとして，tight-skinned(tsk) mouseがある[1]．Mast cellの分泌顆粒の中にtryptaseがあり，これはfibroblastの強力なmitogenである[2]．Tsk mouseでは，mast cellの活動によって膠原線維が増生し，これが他の炎症細胞も引き寄せる．そして組織の破壊も起こる．Mdxマウスとtskマウスを交配すると，dystrophinの欠損したマウスにmast cellが作用して，fibrosis, muscle necrosisが強く起こると考えられる[3]．ジストロフィー様の変化が筋肉に起こり，mdxマウスよりdouble-mutant mdxマウス[1),4)]の方が進行性筋ジストロフィーのモデルとしてより適切ではないかと考えられるので，これを用いて筋細胞内記録と筋組織所見を検討したので報告する．

## 目　的

Mdxおよびtight-skinned mouseの交配によってできたdouble-mutant mdx mouseでは，筋力低下が起こるので，このマウスを用いて，横隔膜標本より筋細胞内記録を行い，静止膜電位および，微小電極刺入時のinsertion myotoniaを記録した．Myotonic burstにたいしては，Dehydroepiandrosterone sulfate(DHEAS)を用いて治療の試みをした．筋組織については，4,12,17週齢のdouble-mutant mdx mouseの前脛骨筋について凍結切片をつくり検討したので合わせて結果を報告する．

## 方　法

メスのmdxマウスと，オスのtight-skinned mouse(tsk mouse)を交配した．12週齢F1のオスを用いて実験をおこなった．ガラス管微小電極を用いて横隔膜標本の筋細胞内記録を行った．治療開発の目的で，dehydroepiandrosterone sulfate(DHEAS)を160mg/lの濃度でTyrode溶液に加えて横隔膜標本の静止膜電位と，微小電極刺入時のinsertion myotoniaに対する効果をみた．筋肉の組織標本は，4,12,17週齢F1のオスの前脛骨筋を用いてHE染色とdystrophin染色をして検討を加えた．

**表1** Double-mutant mdx マウスの膜電位，微小電極刺入時のinsertion myotoniaの頻度および治療の試みとして，DHEASを160mg/lでTyrode溶液に加えたときの膜電位および，insertion myotoniaの頻度をしめす．Double-mutant mdxマウスの膜電位は正常であった．Insertion myotoniaは8-20%の筋線維に認められ，DHEASを用いると，ミオトニーは完全に抑制された．

| | 実験1 | DHEAS 160mg/l | 実験2 | DHEAS 160mg/l |
|---|---|---|---|---|
| 平均RMP(-mV) | 79.0 | 81.04 | 83.96 | 82.05 |
| ±S.D. | ±6.50 | ±7.32 | ±4.38 | ±4.89 |
| n=総数 | 80 | 100 | 50 | 55 |
| insertion myotoniaの頻度 | 20.0% | 0% | 8.0% | 0% |

* 東邦大学医学部第四内科

## 結　　果

Double-mutant mdxマウスでは，膜電位は計測できた筋線維では，**表1**の様に正常であった．Insertion myotoniaは**図1**のように見られたが，短いburstであった．DHEASは，**図2, 3**のようにmyotonic burstを抑制することに有効であった．正常な膜電位に対しては,**表1**のようにDHEASは変化を与えなかった．

筋組織については，**図4**のようにdouble-mutant mdxマウスでは，筋の壊死，脂肪浸潤，細胞浸潤が見られた．17週齢mdxマウスでは，この時期ほとんどすべて再生筋に置き換わっているのに対してdouble-mutantでは変化が強かった．Dystrophinが欠損していることに加え，double-mutantではmast cellの活動が高いために，tryptaseの活性が高まって筋崩壊の所見が強いものと考えられる．

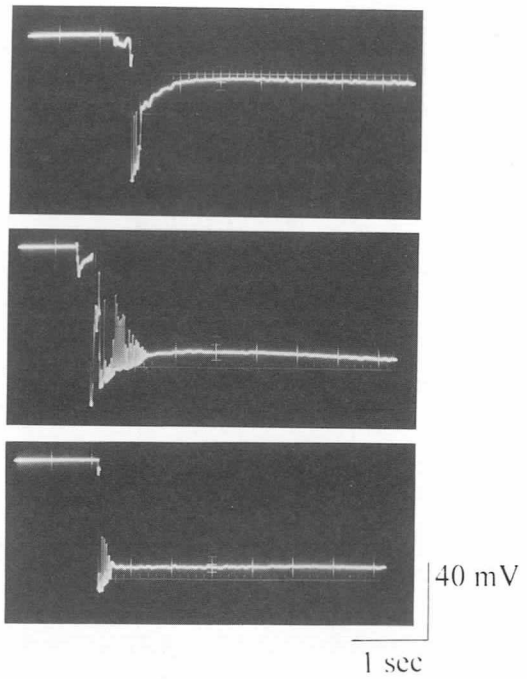



**図1**　Double-mutant mdxの横隔膜標本で，微小電極刺入時のinsertion myotoniaを3つの筋線維で示す．どれもmyotonic burstの持続は短かった．

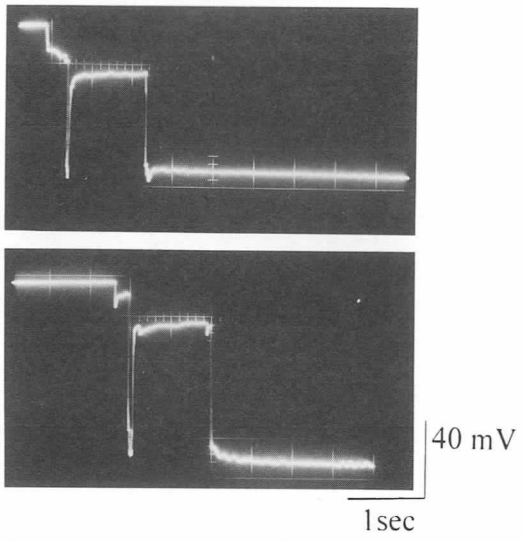



**図2**　Double-mutant mdxの横隔膜標本で，DHEASを160mg/lの濃度でmuscle chamberのなかのTyrode溶液に加えると，微小電極刺入時にもinsertion myotoniaは抑制されたことを2つの筋線維を例にして示す．

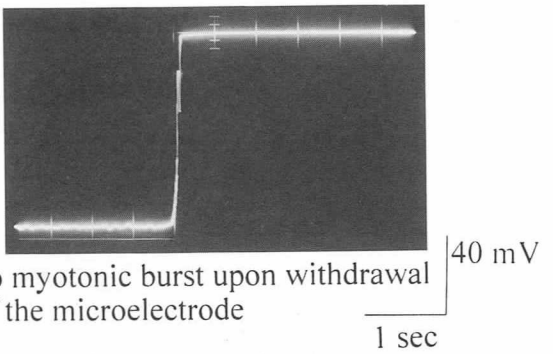



**図3**　Double-mutant mdxの横隔膜標本で，DHEASを160mg/lの濃度でmuscle chamberのなかのTyrode溶液に加えると，筋細胞内に入っている微小電極を抜き去る時の機械的刺激でもmyotonic burstは抑制されることを示す．

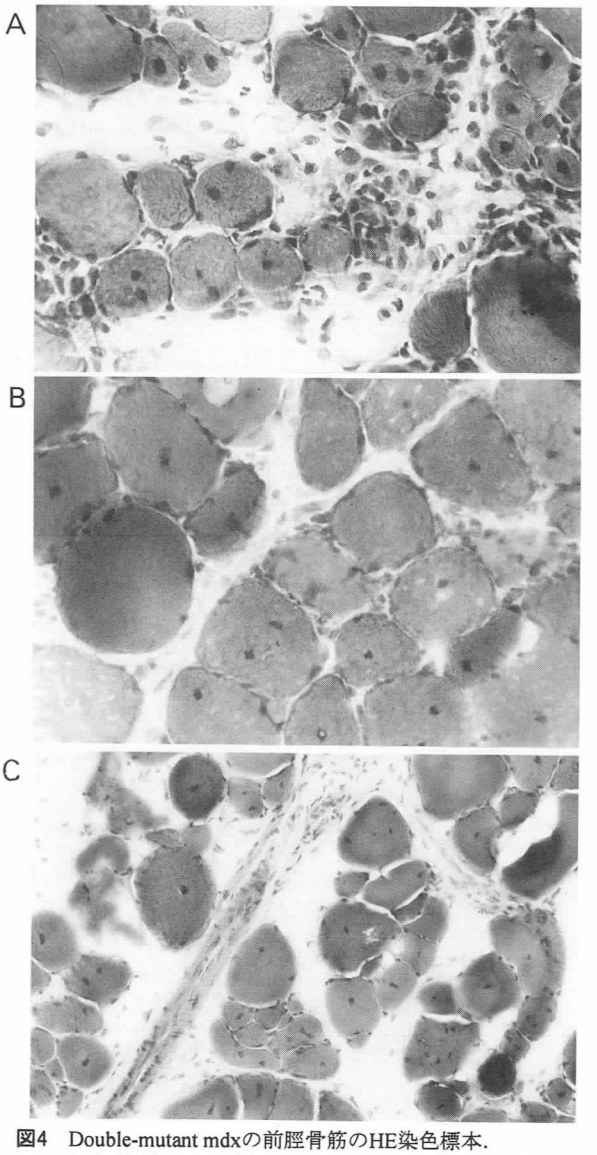



**図4**　Double-mutant mdxの前脛骨筋のHE染色標本．
Aは4週齢のHE標本(200x)，Bは12週齢のHE標本(200x)，Cは17週齢のHE標本(100x)である．Mdxマウスより，単核球の細胞浸潤が強く，脂肪浸潤，壊死・再生線維がみられ，変性が時間的にも mdxマウスより遷延する．

## 考　察

Dystrophinが欠損している場合に，gene therapyによってdystrophin を発現させることは，直接的な治療法で現在も試みられている．もう1つの方法は，今回の実験で考えられたようにdystrophinが欠損している上にさらに他の要因が加わって筋崩壊が起こるならば，その要因を抑えることも重要である．例えば，mast cellの活動を抑制するような薬剤の試みも意味があると考えられる．Mast cellの活動を抑制する薬剤は，Cromolyn sodiumや，その新しい誘導体nedocromilという薬剤がある．これらは，気管支喘息の治療薬として現在のところ吸入薬の形でだけ有効なものがある．これらの薬が筋ジストロフィーにも有効であるかどうかは，今後検討すべきものと考えられる．

Dehydroepiandrosterone sulfateのmyotoniaに対する治療効果：Suginoらによるmyotonic dystrophy に対するpilot studyがあり[5]，11人の患者で200mg/day ivで8週間用いてみて，1)ADL改善，2)筋力改善，3)ミオトニーが減少または消失，4)心臓ではPVC減少，AV blockの改善などが報告されている．

我々が，昨年度の班研究で示したように筋細胞内記録では，Na channelの不活化阻止によるミオトニーにも，またCl channel blockerによるミオトニーにもDHEASはミオトニーを抑制する効果が認められている．Double mutant mdxマウスのinsertion myotoniaは，mdxマウスでみられたものより短いburstであるが，DHEASはミオトニーを完全に抑制する効果が認められた．

## 文　献


1) Granchelli JA, Pollina C and Hudecki MS : Duchenne-like myopathy in double-mutant mdx mice expressing exaggerated mast cell activity. J Neurol Sci 131 : 1-7, 1995.
2) Ruoss SJ, Hatmann T and Caughey GH : Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. J Clin Invest 88 : 493-499, 1991.
3) Gorospe JRM, Tharp M, Demitsu T, et al : Dystrophin-deficient myofibers are vulnerable to mast cell granule-induced necrosis. Neuromusc Disord 4 : 325-333, 1994.
4) Gorospe JRM, Tharp MD, Hinckley J, et al : A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy ? J Neurol Sci 122 : 44-56, 1994.
5) Sugino M, Ohsawa N, Ito T, et al : A pilot study of dehydroepiandrosterone sulfate in myotonic dystrophy. Neurology 51 : 586-589, 1998.

# 筋ジストロフィー患者に対する ダントロレンナトリウムの治療効果

梶　　龍　兒*

研究協力者　小　島　康　祐*　木　村　　淳*　荒　木　淑　郎**

## はじめに

Duchenne型筋ジストロフィーでは，ジストロフィン蛋白の欠損のために，細胞内への過剰なCa流入が生じ，筋壊死をもたらすことが推察されている．ダントロレンナトリウムは骨格筋に作用し，筋小胞体からのCa放出を抑制する作用がある薬物であり，Ca濃度の上昇に伴う筋崩壊を軽減する効果が期待される．

実際に，Duchenne型筋ジストロフィーのモデル動物であるmdxマウスに対してダントロレンナトリウムを投与し，血清CK値の低下が認められたとする結果が1990年Quinlanらにより報告された[1]．1991年にBertoriniらは，6-13歳のDMD患者7例にダントロレンナトリウムを2年間投与し，血清CK値の低下および臨床症状の悪化軽減が認められたことを報告している[2]．

そこで本邦でも，ダントロレンナトリウムの筋ジストロフィーにおける血清CK値ならびに臨床症状に及ぼす効果について検討を行い，筋ジストロフィーの進行を遅延させるのに有効かどうか，また筋ジストロフィー患者における安全性を検討する目的として，多施設共同により臨床試験を施行した．

投与終了後の追跡調査として，臨床試験に参加した患者を対象に，歩行不能となった時期等にダントロレンナトリウム投与が影響を与えたかどうか，また投与終了後の血清CK値の変化についても検討を行った．

## 対象・方法

対象は，Duchenne型(以下，DMDと略)，Becker型(以下，BMD)，Limb-Girdle型(以下，L-G)の筋ジストロフィーで，投与開始時に機能障害度1-3度の独立歩行可能な患者を対象とした．DMDでは，投与開始時年齢6-12歳の患者を対象とした．

治験参加の同意は患者本人から文書あるいは口頭で得た．患者が未成年の場合は法定代理人等患者に代わって同意をなし得る者の同意を得た．

DMDおよび，BMDまたはL-Gの各病型において，高用量投与群(H群)と低用量投与群(L群：プラセボ相当)に無作為に割り付け，多施設二重盲検比較試験をおこなった．H群では20-100mg/日(体重1kgあたり約2mg)，L群では0.4mg/日のダントロレンナトリウムを維持量として，2年間にわたり投与を行った．

臨床的な評価項目として，ADLに基づく機能検査，筋力テスト，機能障害度，およびROMテストを用いた．副作用および随伴症状においては随時観察を行った．投与12カ月後，24カ月後および投与終了時において，機能検査，総合改善度，総合安全度，有用度および血清CK値の変化を各病型において比較検討した．

追跡調査は，投与終了後の平成8年から9年にかけて，調査表を治験参加施設に郵送し施行した．独立歩行不能となった時期および血清CK値(原則として投与終了3ヶ月後の値)について調査を行い，両群間で比較検討を行った．

血清CK値においては，治験期間中は同一検査施設にて集中測定を行ったが，追跡調査時点では各施設により測定された値を用いた．

## 結　　果

### (1) 患者内訳

本治験の総症例数はDMD124名，BMD38例，L-G19例の合計180例であった．

DMD124例の内訳は，H群65例，L群59例であり，このうち中止症例は26例で，H群13例，L群13例であった．BMDおよびL-G群57例の内訳はH群29例，L群28例であり，このうち中止症例は11例で，H群6例，L群5例であった．中止理由は，副作用出現，症状悪化，合併症併発などが大半であった．

### (2) 有効性の検討

**A. 機能検査**：機能検査の合計点数は，DMDにおける投与前値に対する最終時点の変化量は，H群は-14.00+/-6.33，L群は-12.87+/-7.22であり，H群とL群間で有意な差は認められなかった．BMD・L-Gにおいても，H群は-4.04+/-6.19，L群は-1.83+/-3.66であり，両群間に有意差は認めなかった(図1)．

**B. 血清CK値**：DMDにおける血清CK値(対数値)の投与前値に対する最終時点の変化率は，H群は-8.0+/-6.2%，L群は-4.5+/-8.4%であり，H群ではL群に比べて有意な低下が認められた(p=0.023)．投与12，24カ月においてもH群はL群に比べて低下する傾向にあり，投与12カ月後ではその低下が有意であった．(12カ月後：p=0.001,24カ月後：p=0.079)．

* 京都大学医学部神経内科
** 三井大牟田病院神経病総合医療センター

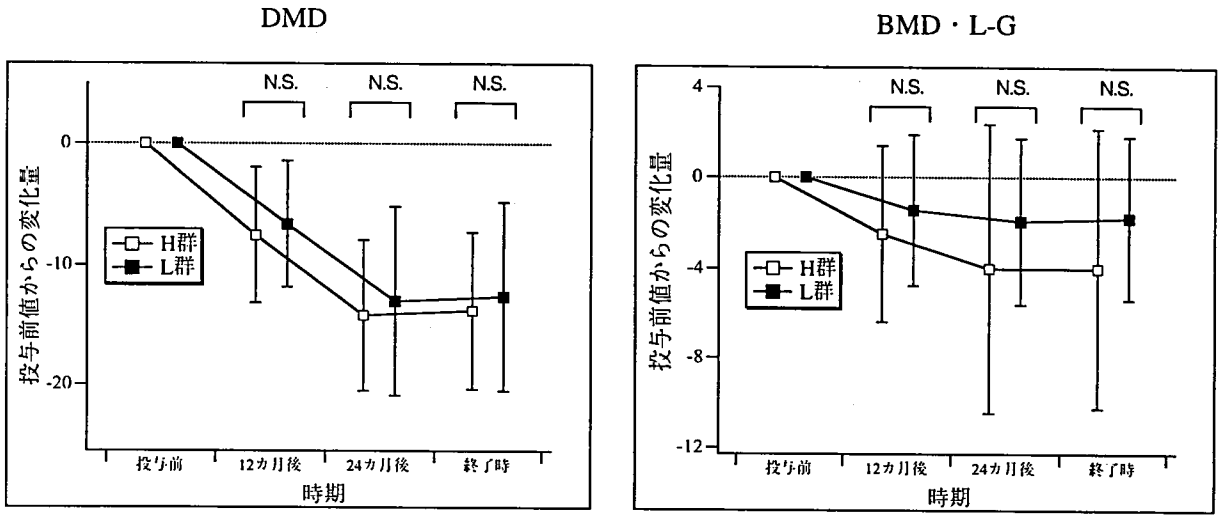



図1 機能検査（投与前値からの変化量）.
DMD,BMD・L-Gとも，両群間に有意差を認めなかった.

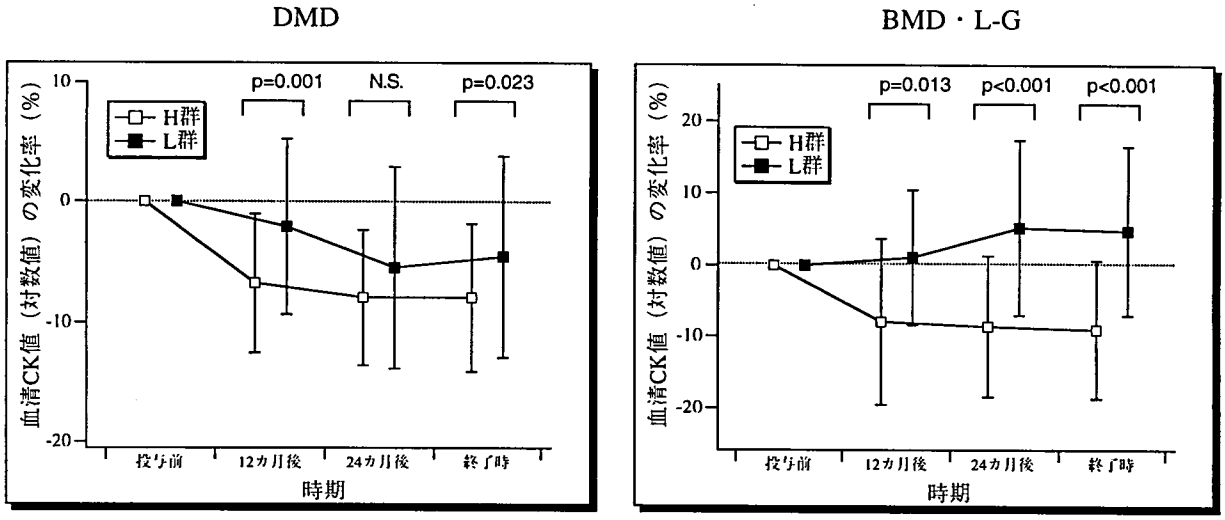



図2 血清CK値(対数値)の変化率
DMD,BMD・L-Gとも，H群ではダントロレンナトリウム投与により血清CK値の低下をみとめた.

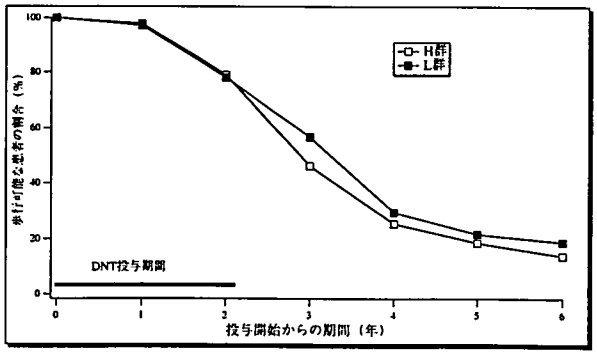



図3 歩行可能な患者の割合(DMD)
両群間で有意差を認めなかった.

BMD・L-Gにおいても，血清CK値(対数値)の投与前値に対する最終時点の変化率は，H群は-9.1+/-9.5%，L群は4.6+/-11.7%であり，H群ではL群に比べて有意な低下が認められた(p=0.000)．投与12,24カ月後においても，H群はL群に比べて有意に血清CK値の低下が見られた(12カ月後：p=0.013，24カ月後：p=0.000)(図2).

**C. 筋力テスト** DMDにおいては最終時点で,H群はL群に比べて有意に改善度が低かった(p=0.040)．最終時点における「不変」以上の改善率は,H群7.8%,L群15.2%であった．BMD・L-Gにおいては両群間で改善率に有意差は認められなかった．最終時点における「不変」以上の改善率は，H群54.2%，L群72.7%であった.

**D. 機能障害度，ROMテスト** DMD，BMD・L-Gとも，両群間で有意な差は認められなかった.

**(3) 有害事象**

副作用は，DMDではH群に21例27件，L群に10例12件，BMD・L-GではH群に15例20件，L群に6例10件発現した．主な副作用は，ダントロレンナトリウムの薬理作用に基づくと考えられる脱力，脱力感で，副作用の半数以上を占めた．その他には，ダントロレンナトリウムの筋弛緩作用に基づくと推察される，倦怠感，筋力低下，ふらつき，筋痛などの副作用などが見られた.

臨床検査値異常はDMDではH群の13例24件，L群の12例19件，BMD・L-GではH群に6例15件，L群に4例7件認められたが，特に発現頻度の高い項目はなかった.

**(4) 主治医判定**

**A. 総合改善度**：DMDにおいては，最終時点での「不変」以上の改善率は，H群7.5%，L群10.9%，BMD・L-Gでは，H群50.0%，L群65.2%で，いずれも有意差は認められなかった．

**B. 総合安全度**：DMD，BMD・L-Gとも，安全率ではH群はL群に比べて低い値を示した．最終時点における「安全である」異常の安全率は，DMDではH群57.8%，L群70.7%，BMD・L-GではH群44.8%，L群77.8%であった．群間の比較では，DMDでは12カ月後，BMD・L-Gでは12，24カ月後および最終総合安全度において，H群はL群に比べて有意に安全性が低かった．

**C. 有用度**：DMD，BMD・L-Gとも，有用度はH群とL群で有意差を認めなかった．

**(5) 追跡調査**

追跡調査は，回答が得られたDMD86例，BMD31例，L-G15例の合計132例について検討を行った．

追跡調査時点で歩行可能な患者の割合は，DMDにおいては，H群で43例中6例，L群で37例中7例であり，両群間で有意差を認めなかった．投与開始から歩行不能となったまでの期間についても，H群，L群間で有意な差は認められなかった(図3)．

BMDでは，H群で14例中12例，L群では16例中14例で歩行可能で，両群間に差は認めなかった．L-Gにおいても同様に両群間に差は認められなかった．

投与終了後の血清CK値は，DMDにおいては，H群では6411+/-4391IU/l，L群では6021+/-3236IU/lで，両群間に有意差を認めなかった．BMDにおいては，H群では2603+/-1164IU/l，L群では1964+/-1556IU/lであり，両群間に有意差は認められなかった．L-Gにおいては，H群では835+/-502IU/l，L群では2533+/-2422IU/lで，平均値ではH群で低下傾向にはあるが，有意差は認められなかった．

## まとめ

筋ジストロフィーの根本的な治療法は現在のところ見つかっていない．これまでビタミンE，蛋白同化ホルモンなどが用いられてきたが，効果は不定のままである．

ダントロレンナトリウムは筋小胞体からのCa放出を抑制する作用があり,Ca濃度の上昇に伴う筋崩壊を軽減する効果が期待されることからこの治験が計画・施行された．

結果として，ダントロレンナトリウムは筋ジストロフィー患者において血清CK値を有意に低下させるものの，その他の有効性の評価項目では改善が認められなかった．本治験では，血清CK値の低下と筋ジストロフィーの病態の進行抑制との相関を立証できず，ダントロレンナトリウムは筋ジストロフィー治療薬として有用とは判断できなかった．

追跡調査においても歩行不能となった時期に対する改善効果は認められなかった．投与終了3ヶ月後の血清CK値にも有意差を認めなかった．

## 文　献


1) Quinlan JG, Johnson SR and Samaha FJ : Dantrolene normalizes serum creatine kinase in MDX mice. Muscle Nerve 13 : 2689-269, 1990.

2) Bertorini TE, Palmieri GMA, Griffin J, et al : Effect of dantrolene in Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve 14 : 503-507, 1991.

# 皮膚線維芽細胞を用いたDuchenne型筋ジストロフィーの遺伝子治療に向けた基礎的研究

小 林 高 義*

研究協力者　古 屋 徳 郎*　田 中 宏 明*
亀 田 典 佳*　水 澤 英 洋*

**要　旨**　Duchenne型筋ジストロフィーの治療として筋芽細胞移植が試みられてきたが，免疫学的拒絶反応の問題もあり，現在までのところ臨床的に有効であるとの結果は得られていない．また患者本人の筋芽細胞を用いるex vivo遺伝子治療の研究も行われているが，筋ジストロフィーの患者筋芽細胞は正常の筋芽細胞に比べて増殖能が劣り，充分な筋芽細胞を培養することは困難である．本研究では，筋ジストロフィーの患者においても大量に培養することが可能な皮膚線維芽細胞を筋芽細胞の代わりにex vivo遺伝子治療に応用できるかを検討するために，線維芽細胞と筋細胞の共培養の系を用いて，線維芽細胞の筋細胞への変換の機構について検討した．皮膚及び筋生検よりヒトの皮膚線維芽細胞，筋細胞の初代培養を行った．線維芽細胞は10代以上継代したものを使用，筋系細胞の混在を完全に除外するために限外希釈法によるクローニングも施行した．細胞株として$C_2C_{12}$筋芽細胞，$NIH_3T_3$線維芽細胞，$C_3H_{10}T_{1/2}$線維芽細胞を用いた．線維芽細胞にレトロウイルスBAGを用いてマーカー遺伝子LacZ(βgal)を導入し，G418にて安定に遺伝子が導入された細胞を選別した．LacZ導入線維芽細胞を筋細胞と一定期間共培養後，Xgal染色，免疫組織化学的染色を施行した．ヒトの筋細胞に対しては胎性ラット脊髄片を用いて神経筋支配を形成させた．LacZ遺伝子を導入した線維芽細胞と筋細胞を共培養しXgal染色を行うと，細胞株，初代培養のいずれの場合でもβgal陽性の筋管細胞が観察された．各種のLacZ導入線維芽細胞と$C_2C_{12}$細胞を共培養し，βgal陽性筋管細胞の出現頻度を定量的に比較すると，ヒト線維芽細胞＞$C_3H_{10}T_{1/2}$＞$NIH_3T_3$の順であった．筋細胞のconditioned mediumでLacZ導入ヒト皮膚線維芽細胞を培養すると，培養後１週間で皮膚線維芽細胞の中からβgal陽性筋管細胞が少量出現した．LacZ遺伝子導入ヒト皮膚線維芽細胞とヒト筋細胞の共培養に対して，ラット脊髄片の併置培養を行うと，神経支配を受け自発収縮を伴い横紋を形成した成熟した筋線維群の一部にXgal染色陽性の筋管細胞が出現した．LacZ遺伝子を導入した正常ヒト皮膚線維芽細胞とDMD筋細胞を共培養し，抗βgalモノクローナル抗体と抗ジストロフィンポリクローナル抗体を用いて免疫２重染色を行うと，βgal陽性の筋管細胞の一部にジストロフィン陽性細胞が認められた．以上の我々の研究により，線維芽細胞は筋細胞に変換するpotentialを有しており，変換には筋細胞によって培養液中に産出される可溶性因子が関与していることが推定された．今後，変換の機序を解明し，線維芽細胞から筋細胞に変換する頻度を上げることができれば，DMDのex vivo遺伝子治療への臨床応用も可能であると考えられる．

* 東京医科歯科大学医学部神経内科

# Muscle specific promoter活性の定量的解析

若 山 吉 弘*

研究協力者　原　一*　青 木 和 子*
Fischbeck KH**　Patterson TH**

**要 旨** 筋肉内に特異的に発現をもたらすhuman skeletal muscle α-actin promoter (HSA)[1]に対し，やはり筋肉特異的な遺伝子発現に対する増強効果をもつmyosin light chain enhancer(mlc-e)[2]を組み合わせることでHSAの活性を増強するか否かを筋培養細胞を用いて検討した．HSA単独及びHSA+mlc-eを含む発現ベクターを作成し，H9C2細胞へtransfectionし培養細胞を回収，蛋白を精製後CAT asseyを行った．アセチル化/非アセチル化のバンドの濃度を測定し，HSAとHSA+mlc-eの比較を行った．HSA+mlc-eはHSA単独に比べ約3.7倍のアセチル化/非アセチル化濃度を示した．結果よりmlc-eはHSA promoterの活性を増強させると思われた．

## はじめに

筋疾患の病態解明や治療研究にとり，様々な蛋白を筋肉内に発現させるトランスジェニックマウスは大変重要であり，今日さまざまなトランスジェニックマウスが開発され研究されている[3),4),5)]．これらのトランスジェニックマウスのgene constructには蛋白に翻訳されるcoding regionの他に転写を調節するpromoter領域が必要であるが，内在性のpromoterよりも発現活性の強い外来性の筋肉特異的なpromoterが組み込まれることも多い．これらのpromoterの中で最も頻繁に利用されるものとしてHSAやmuscle creatine kinase(MCK)[3)]のpromoterがある．また同じく筋肉特異的な発現増強をもつmlc-eも高い筋組織特異性を持ち注目を集めている．これらのpromoter間での活性の相対的比較は重要と思われるが，現在まで定量的な比較研究は無い．我々はトランスジェニックマウスの開発や将来のgene therapyの基礎的研究として本研究の必要性を強く認識しpromoter間の活性の相対比を定量化できるように研究をデザインした．

## 目　的

筋肉内に特異的な発現とdevelopmental regulationをもつpromoterとして今日広く使用されているHSAに対し，やはり筋肉組織特異的な遺伝子発現に対する増強効果をもつmlc-eを組み合わせることによりHSAのpromoterとしての活性をmlc-eが増強するか否かを筋培養細胞を用いて検討する．

## 対象と方法

Dr. Fischbeckより供与されたplasmid(pHSA/CAT)[1)]にはHSA promoter及びCAT gene(Chloramphenicol-acetyltransferase)がすでに組み込まれており，これを制限酵素BamHIにて切断，同じくBamHIの断片として供与されたmlc-e[2]をsticky end ligationした．得られたplasmid (pHH-1：図1参照)を増殖後，接合部位の塩基配列を確認した．ラット心筋培養細胞であるH9C2を通常の培養プレート上でほぼconfluentになるまで培養しHSA，pHH-1，及びコントロール(pBR322：backbone) plasmid各100μgをリン酸Ca法にて各3枚のプレートにtransfectionし48時間培養後細胞を回収，蛋白を精製しC14 Chloramphenicol及びacetyl-CoAの存在下でCAT assayを行った．TLC plateを泳動後autoradiographyを行いアセチル化/非アセチル化のChloramphenicolバンドの濃度をimage prosystemを用いて測定し，HSAとpHH-1の比較をした．

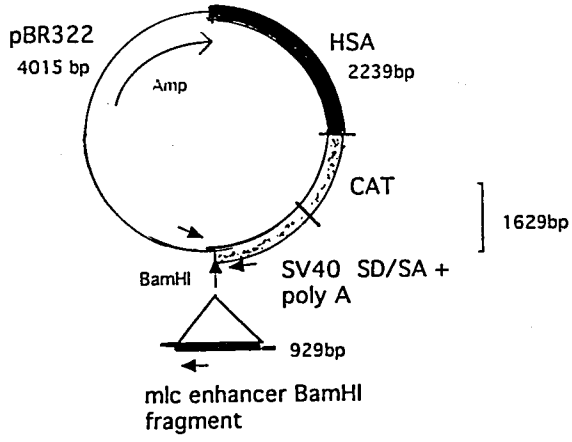



**図1** pHH-1の作成方法と構造．HSAのplasmidはPBR322をbackboneとしHSA及びCAT/SV40 polyAが図に示す様に連結した構造で供与された．PolyA tale構造の終末にはBamHI siteがあり，ここにBamHIの断片として得られたmlc-eをlagationしpHH-1を作成した．

* 昭和大学藤が丘病院神経内科
** National Institutes of Health
*** MHC Hahnemann University

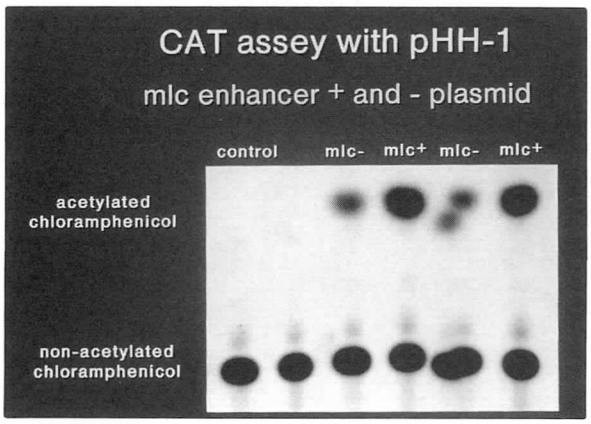



**図2** Control, pHH-1, original (mlc-eを持たないpromoterのみ)によるCAT assayの結果．mlc-eを含むpHH-1では，含まないoriginal plasmidに比べ明らかにアセチル化Chloramphenicolバンドの濃度が増強している．

## 結　　果

各々3枚の培養細胞プレートにおいてpHH-1はHSAに比べ肉眼的にも明らかにアセチル化したChloramphenicolのバンド濃度の上昇がみられた，すなわちCATの活性の上昇が認められた．これを定量し比較するとpHH-1はHSAよりも約3.7倍のアセチル化／非アセチル化濃度を示した．コントロールにはアセチル化Chloramphenicolのバンドは見られなかった(**図2**).

## 考察とまとめ

実験結果ではpHH-1ではよりCATの活性が高く，mlc-eはHSAのpromoter活性を増強させると思われる．今後試行回数をふやし統計学的に検討する必要がある．またより精密な結果を得るためtransfection後のDNA normalizationのためHIRT assayを行うべきである．一般にenhancerの増強効果はin-vitroよりもin-vivoにおいてより増幅する事が知られており，トランスジェニックマウスではHSAにmlc-eを組み合わせた構造がHSA単独のpromoterよりもはるかに強い発現活性を有すると考えられる．筋肉内での導入遺伝子の強い発現を必要とする実験ではこの構造は従来のものより有利と考えられる．また今後HSA，HSA+mlc-e，MCKの3者の比較を計画しており，現時点での利用可能な筋肉特異的プロモターの相対的活性及び発生学的検討が有用と思われる．

## 文　　献

1) Brennmann KJ and Hardeman EC : Quantitative analysis of the human α-skeletal actin gene in transgenic mice. J.Biol.Chem 268 : 712-725, 1993.

2) Rosenthal N, Kornhauser JM, Donoghue M, et al : Myosin light chain enhancer activates muscle-specific developmentally regulated gene expression in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci 86 : 7780-7784, 1989.

3) Jynes JB, Johnson JE, Buskin JN, et al : The muscle creatinine kinase gene is regulated by multiple upstream elements, including a muscle specific enhancer. Mol. Cell. Biol. 8 : 62-70, 1988.

4) Dahler A, Wade RP, Muscat GEO, et al : Expression vectors encoding human growth hormone (hGH) controlled by human muscle-specific promoters : prospects for regulated production of hGH delivered by myoblast transfer or intravenous injection. Gene 145 : 305-310, 1994.

5) Fazeli S, Well DJ, Hobbs C, et al : Altered secondary myogenesis in transgenic animals expressing the neural cell adhesion molecule under the control of a skeletal muscle α-actin promoter. J. Cell. Biol. 135 : 241-251, 1996.

# アデノウイルスベクターを用いたアデノウイルスレセプター遺伝子導入による繰り返し遺伝子導入の試み

内野　誠*

研究協力者　木村　円*　前田　寧*　有馬寿之*
西田泰斗*　原　暁生*　村上龍文*
宇山英一郎*　箕田修治*

**要　旨**　アデノウイルスベクター(Adv)を用いた骨格筋への遺伝子導入法を改良するために，我々はヒトコクサッキーグループB，アデノウイルス2及び5型レセプター(hCAR)[1]に着目した．生理的にヒトやマウスでは骨格筋にCARの発現はみられない．in vitroで，CAR negativeの培養細胞にhCARを導入し強制発現させるとAdvに対する感受性が増強した．C2C12 myotubeとマウス骨格筋に，AdvでhCARを強制発現させAdvを用いた繰り返し遺伝子導入を行った．我々はhCAR遺伝子を用いて，Advを用いた遺伝性骨格筋疾患の遺伝子治療のための一つの方法を提示した．

## はじめに

アデノウイルスベクター(Adv)を用いた遺伝性筋疾患，特にDuchenne型筋ジストロフィーに対する遺伝子治療は既に多くの研究が行われ導入遺伝子の発現によって部分的ながら機能的な改善を得るなど，一定の成果を上げている[2),3)]．Advは他のベクターに比べて比較的効率がよくtransgeneがepisomalに存在するために危険性も少ない．しかし一回の遺伝子導入では目的遺伝子を長期的に発現させ続けることは困難である．また長期的な発現を目的とした繰り返し導入は，ベクターの免疫原性と筋組織側のアデノウイルス(Ad)感受性が低下するために，2回目以降の導入効率が極めて悪くなることが知られている．このことが実際の臨床応用上問題となっている．ベクターの免疫原性はアデノウイルスゲノムの大部分を欠く次世代Advにより改善されている[4),5)]．さらに筋組織の感受性を上げるために，我々はヒトコクサッキーグループB,アデノウイルス2及び5型レセプター(hCAR)[1]に着目した．hCARはpenton fiberと特異的に接着する膜蛋白質で，細胞表面に吸着したウイルス粒子はαv containing integrinを介してendocytosisを受け細胞内に取り込まれる．生理的にCARは骨格筋には存在しない．我々は，hCARを骨格筋にあらかじめ導入しAdvに対する感受性を上げ2回目以降の遺伝子導入効率を良くすることを目的としている．

## 材料と方法

**細胞**；293，NIH3T3，C2C12はDMEM，10%FCS，1%PSに発現する発現カセットpCITE-lacZにhCAR cDNAを組みで維持した．C2C12の分化誘導は，DMEM，1%FCS，1%PSを用いた．

**プラスミド**；CMV PromoterとIRES(internal ribosome entry site)およびSV40 polyA signalによりlacZを同時に発現する発現カセットpCITE-lacZにhCAR cDNAを組み込みphCAR-lacZとし精製した．

**ウイルス**；AdhCAR-lacZ：COS-TPC法に従って作製，精製・濃縮を行った．293でtiter checkを行った($7.5\times10^{10}$ pfu/ml)．AdlacZ及びAdGFP$_{S65T}$：同様の方法でCMVpromoter及びSV40polyA signalを用い作製した($2\times10^{11}$, $5\times10^{10}$pfu/ml)．

hCARの生物学的活性；NIH3T3を播き($2\times10^5$cells/60mm dish)1日後にphCAR-lacZをリン酸カルシウム法にて導入，さらに1日後にAdGFP$_{S65T}$を感染させた．ウイルス液はPBS(+)で2MOI=$2\times10^5$,10MOI=$1\times10^6$,50MOI=$5\times10^6$ (pfu/200μl)に調整した．2日後に共焦点レーザー顕微鏡(LSM410,ZEISS社製)を用いて観察し，X-gal染色を行った．

**RT-PCR**；筋系細胞のCARの発現を確認するために，生後1,2,3,5,14日目のBALB/C nu/-マウス骨格筋及び脳，C2C12，NIH3T3からtotalRNAを抽出，mCAR及びGAPDHのmRNAを特異的primer setを用いてRT-PCRを行った．

**培養筋管細胞へのhCARの導入**；C2C12を$2\times10^4$cells/1.6cm$^2$に播き1日後に分化誘導した．5日後にAdhCAR-lacZ及びAdlacZをそれぞれ1x10$^6$pfu/50μlの濃度で感染させた．さらに2日後にAdGFP$_{S65T}$を1x10$^5$pfu/50μlの濃度で感染させ2日後に回収し，4%PFAで固定，抗GFP抗体及び抗β-gal抗体で免疫染色をした．

**動物への注入**；生後4日目のBALB/C nu/nuマウス下腿に，33G針を用いて$2\times10^9$pfu(2.5μl)のAdhCAR-lacZを直接注入した．さらに7日後に$2\times10^9$pfu(4μl)のAdGFP$_{S65T}$をほぼ同じ場所に注入した．さらに7日後に屠殺し下腿筋をイソペンタンと液体窒素を用いて凍結したのちにcryostatを用

* 熊本大学医学部附属病院神経内科

いて10μmの連続切片を作製した．共焦点レーザー顕微鏡で観察し，隣の切片はX-gal染色を行った．

## 結　　果

NIH3T3にphCAR-lacZおよびpCITE-lacZを導入した効率は，X-gal染色の結果はどちらも10%程度だった．$AdGFP_{S65T}$を感染させた結果，10MOI，50MOIではphCAR-lacZを導入した細胞でGFPの蛍光を観察できたが，コントロールのpCITE-lacZを導入したものでは蛍光は認めなかった(図1)．C2C12，生後1,2,3,5,14日のマウス骨格筋及び脳でのmCARのmRNAは，脳を除いて発現はみられなかった(図2)．C2C12myotubeにAdhCAR-lacZを用いhCARを強制発現させ，β-gal陽性のhCARを発現したmyotubeは低濃度(5-10MOI)の$AdGFP_{S65T}$に感染した(図3)．さらにin vivoの実験を行った．BALB/C nu/nuマウス骨格筋にAdhCAR-lacZを注入し，さらに7日後に$AdGFP_{S65T}$をほぼ同部位に注入した結果，前脛骨筋を中心に広範囲の感染を認め，hCAR positiveの骨格筋には比較的広範囲にGFPの発現を観察できた(図4)．

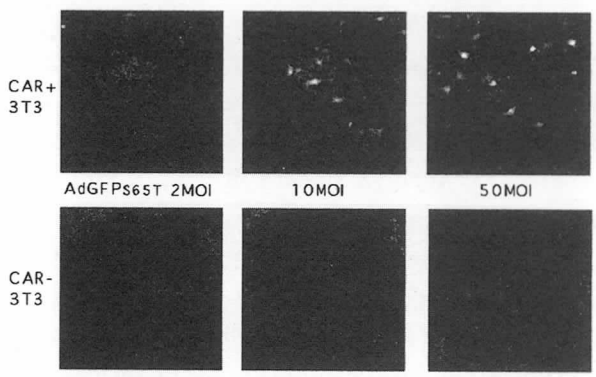



図1　NIH3T3にphCAR-lacZをtransfectionし2MOI，10MOI，50MOIの$AdGFP_{S65T}$を感染させた(上段)．下段はコントロールとしてpCITE-lacZをtransfectionした．hCAR posi-tiveの細胞は10MOI，50MOIで感染した．倍率は75倍

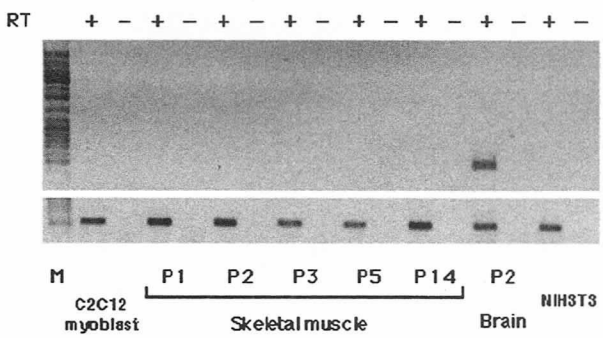



図2　C2C12，NIH3T3，生後1,2,3,5,14日目のBALB/C nu/-マウス骨格筋及び脳からtotalRNAを抽出しmCARのmRNAを特異的primer setを用いてRT-PCRを行った．筋系の細胞ではCARの発現はみられなかった．

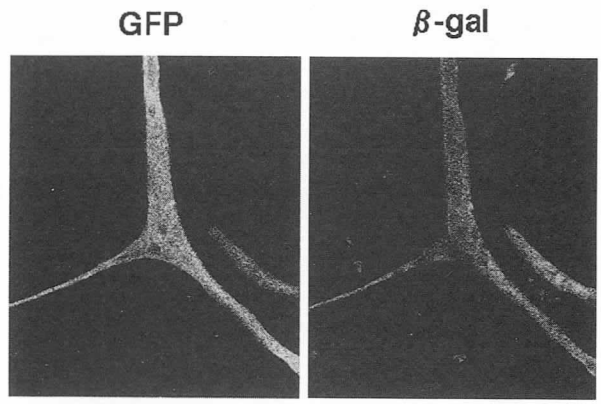



図3　C2C12(2x104cells/1.6cm2)を分化誘導しAdhCAR-lacZ(1x106pfu/50μl)を感染させた．さらに48時間後$AdGFP_{S65T}$(1x105pfu/50μl)を感染させた．2日後に回収し，4%PFAで固定，抗GFP抗体及び抗β-gal抗体で免疫染色した．CARを強制発現させたmyotubeにGFPの発現がみられた．倍率は300倍

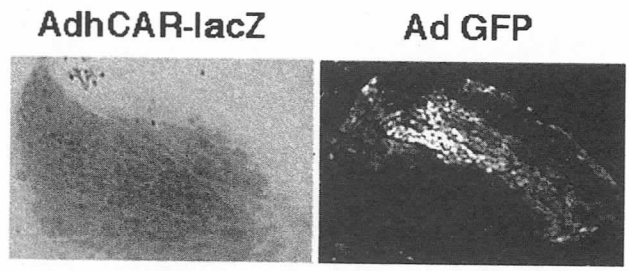



図4　生後4日目のBALB/C nu/nuマウス下腿にAdhCAR-lacZ(2x109pfu/2.5μl)を直接注入し，さらに7日後に$AdGFP_{S65T}$(2x109pfu/4μl)をほぼ同じ場所に注入した.さらに7日後に屠殺して観察した．倍率は100倍

## 考　　察

hCARのAdvの感染性に対する効果は，TomkoらがCARのcDNAを導入した細胞はAdによる感染性が約1000倍も改善したと報告している[6]が我々も同様の結果を得た．hCARを発現した細胞は低いMOIでもかなりよく感染したと考えられる．またRT-PCRの結果は，myoblast, immature myotube, mature myofiberのいずれもmCARの発現はみられなかった．これは骨格筋に対するAdvによる遺伝子導入の有効性を否定するものではない．われわれが行った実験の結果では，筋系細胞は低濃度では感染効率が低いが，高濃度では比較的よく感染する．mCAR以外にpenton fiberと弱いながら親和性がある膜蛋白がレセプターとして働いている可能性が示唆される．また培養系ではmyoblast，myotubeのいずれにおいてもAdvへの感受性は認められたが，比較的低濃度(5-20MOI程度)ではほとんど感染しなかった．比較的高濃度のAdhCAR-lacZを感染させhCARを発現させたものは，低濃度のAdvにも感受性を示した．in vivoにおいては，X-gal陽性かつhCAR陽性の骨格筋には比較的広範囲にGFPの発現を観察でき，hCARによる感染効率の増強効果が示唆された．しかし現時点では，ウイルスの投与量や部位，投与方法などさらに検討が必要である．一方でfasciaを越える感染は弱く，物理的または生化学的なバリアに阻まれることが伺われた[7]．

また高濃度のウイルスはそれ自体が細胞毒性があると考えられていたが，我々の方法ではin vitroでも，おそらくはin vivoでも，高濃度である必要はないと考えられ，毒性を抑えることも期待できる．

現在，Advは治療目的に最も期待される遺伝子導入方法であるが，骨格筋疾患の治療のためには患者の一生涯という長い期間，治療遺伝子の発現を可能にすることが望まれている．transgeneがepisomeとしてとどまる現在の方法では，治療遺伝子を繰り返して投与し発現量を維持する必要があるだろう．我々の研究の結果は，hCAR遺伝子を用いることで一つの方法を提示している．

## 文　献


1) Bergelson J, Cunningham J, Finberg R, et al : Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science 275 (5304) : 1320-1323, 1997.
2) Quantin B, Perricaudet LD, Mandel J-L et al : Adenovirus as an expression vector in muscle cell in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 2581-2584, 1992.
3) Deconinck N, Ragot T, Gillis JM et al : Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene. Proc Natl Acad Sci USA 93 : 3570-3574, 1996.
4) Haecker SE, Stedman HH, Wilson JM, et al : In vivo expression of full-length human dystrophin from adenoviral vectors deleted of all viral genes. Human Gene Therapy 7 (15) : 1907-1914, 1996.
5) Chen H, Mack L, Clemens P, et al : Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes. Proc Natl Acad Sci USA 94 : 1645-1650, 1997.
6) Tomko RP, Xu R, Philipson L. : HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenovirouses and group B coxsackieviruses. Proc Natl Acad Sci USA 94 : 3352-3356, 1997.
7) Acsadi G, Jani A, Karpati G, et al : A differential efficiency of adenovirus-mediated in vivo gene transfer into skeletal muscle cell of different maturity. Hum Mol Genet 3 (4) : 579-584, 1994.

# アデノウイルスベクターを用いたminidystrophin gene導入によるジストロフィンの中枢神経系での機能解析の試み

内野　誠*

研究協力者　有馬寿之*　前田寧*　木村円*
西田泰斗*　原暁生*　村上龍文*
宇山英一郎*　箕田修治*

**要　旨**　controlマウス(B-10)におけるdystrophinおよびβ-dystroglycanの発現は，おもにシナプス後膜に局在していたが，mdxマウスにおけるβ-dystroglycanの発現は，controlマウス(B-10)と比較してシナプス後膜において減少していた．dystrophinの中枢神経における役割について検討するためにadenoviral vectorにdystrophin-minigeneを導入しmdxマウスの中枢神経にて発現させたところcontrolマウスと同様にシナプス後膜に強くBecker type dystrophinの発現を認め，それに引き続きβ-dystroglycanの発現もシナプス後膜において増強されていた．

mdxマウスの中枢神経では，形態学的異常は報告されていないが記憶の獲得に障害があるとの報告がある．今回の実験は，dystrophinが欠損することにより主にシナプス後膜に局在すると考えられる蛋白の局在に違いが生じ，その結果，記憶学習の障害がおこる可能性を示唆する．

## はじめに

ジストロフィンは骨格筋，心筋，平滑筋のみならず中枢神経においても大脳および小脳皮質に豊富に存在し，主にシナプス後膜に局在している[1),2)]．中枢神経ではdystrophinは筋組織とは異なるpromotorにより制御されており中枢神経においては筋組織と異なる生理機能を担っている可能性があるが，現在のところその正確な役割は不明である．

1st generation adenoviral vectorは効率良くin vivoにて中枢神経細胞に外来遺伝子を導入できるため，dystrophin-minigeneを中枢神経で発現させ，dystrophinの中枢神経における機能を解明するための実験を行った．

## 対象と方法

1) adenoviral vectorにdystrophin-minigeneを導入し培養細胞(COS7)に感染させBecker type dystrophin(約220KDa)の発現をwestern blotにて確認した．

2) in vivoにてdystrophin-minigeneを導入したadenoviral vectorをmdxマウス(生後3から5日)のbrainにinjectionし7日後に蛍光免疫染色にて発現を確認した．

3) injectionしたmdxマウスのbrainにおけるBecker type dystrophinとcontrolマウス(B-10)のdystrophinの発現様式を蛍光免疫染色にて比較検討した．

4) mdxマウスとcontrolマウス(B-10)の中枢神経でのβ-dystroglycanの発現様式を蛍光免疫染色にて比較した．

5) injectionしたmdxマウスとcontrolマウス(B-10)の中枢神経でのβ-dystroglycanの発現様式を蛍光免疫染色にて比較検討した．

6) controlマウス(B-10)とmdxマウスの中枢神経でのβ-dystroglycanの発現量を膜分画，シナプス分画，シナプス後膜分画においてwestern blotにて比較した．

## 結　果

1) CMVプロモーターをもったBecker type dystorphinは，培養細胞に発現を認めた．

2) in vivoでも中枢神経でのBecker type dystrophinは，効率良く発現していた．(図1，図2)

3) 導入したBecker type dystrophinは，controlマウス(B-10)と同様に主にシナプス後膜に局在していた．(図3)

4) controlマウス(B-10)における中枢神経でのβ-dystroglycanの発現は，mdxマウスと比較してシナプス後膜において強い発現が認められた．

5) injectionしたmdxマウスにおいては中枢神経でのβ-dystroglycanの発現はcontrolマウス(B-10)と同様にシナプス後膜に強い発現が認められた．

6) western blotによる検索でcontrolマウスと比較してmdxマウスのβ-dystroglycanの発現は，シナプス後膜分画において減少していた．(図4)

## 考　察

dystrophinの中枢神経での機能解析の為にCMVプロモーターをもつdystrophin-minigeneをadenoviral vectorを用いて中枢神経へ導入し検討した．

* 熊本大学医学部附属病院神経内科

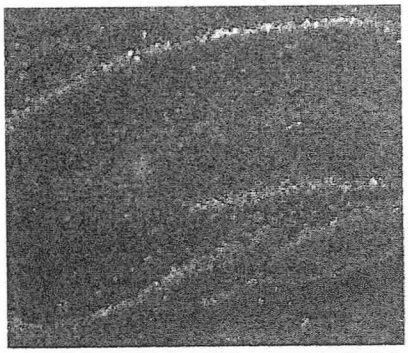


図1　Control mouse(B-10)のdystrophin蛍光免疫染色(110×). 海馬に強い発現が認められた.

図2　Control mouse(B-10)のdystrophin蛍光免疫染色(440×). 海馬CA3領域. 細胞膜に沿って斑状にdystrophinの発現が認められる.

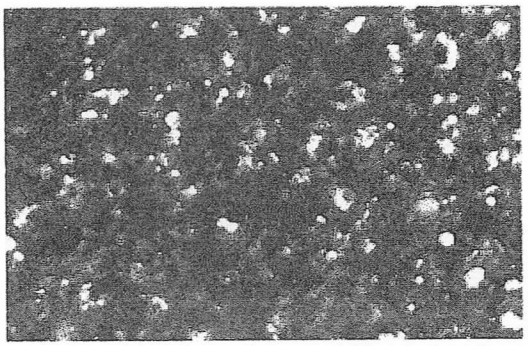


図3　Mdx mouse にBecker type dystrophinを発現させたdystrophin蛍光免疫染色(220×).
Control mouseと同様に細胞膜に沿って斑状にdystrophinの発現が認められる.

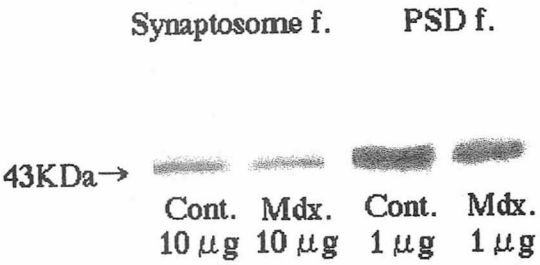



図4　Control mouse(B-10), Mdx mouse brain(大脳)のβ-dystroglycanのWestern blot.
controlマウスと比較してmdxマウスのβ-dystroglycanの発現は，シナプス後膜分画において減少している.

controlマウス(B-10)の中枢神経におけるdystrophinの発現はｼﾅﾌﾟｽ後膜に局在しており蛍光免疫染色により斑状に染色された．また，β-dystroglycanも同様に主にシナプス後膜に局在しdystrophinとの二重染色では完全に分布が一致した．一方，mdxマウスにおけるβ-dystroglycanの発現をcontrolマウスと比較してみたところ，蛍光免疫染色では，細胞膜において特に強く染色される部位は認められず，western blotではシナプス後膜分画において発現量の減少が認められた．

次に，導入したBecker type dystrophinは，controlマウスと同様に主にシナプス後膜に局在することが確認できた．また，Becker type dystrophinを導入することによりmdxマウスの中枢神経細胞でのβ-dystroglycanの局在が変化しdystrophinが強発現している部位に一致してβ-dystroglycanの発現が認められた．

これまで，mdxマウスの中枢神経における形態学的異常は報告されていない．また，機能に関する報告として長期記憶に関連すると考えられているLTPは，異常がなく，空間認識試験である水迷路試験でも有意差は認められないとの報告[3]がある一方，受動的回避試験であるステップスルー試験法では，controlマウスと比較してmdxマウスでは著明に反応遷時が延長し，mdxマウスでは記憶の獲得に障害があるとの報告がある[4]．以上の報告と今回の実験結果から，mdxマウスの中枢神経では，形態学的な差異はなくてもdystrophinが欠損することにより主にシナプス後膜に局在すると考えられる蛋白の局在に違いが生じ，その結果，記憶学習の障害がおこる可能性が考えられる．

今後，シナプス後膜に発現しているその他の蛋白も含めてさらに dystrophin の中枢神経での機能解析を行う予定である．

## 文　献


1) Hart G.W. Lidov, Timoyhy J. Byers, et al : Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. Nature. 348 : 20/27 725-728 December 1990.

2) H.G.W. Lidov, L.M. Kunkel, et al : The distribution of dystrophin in the murine central nervous system. An immunocytochemical study. Neuroscience. 54 (1) : 167-187, 1993.

3) A.K. Sesay, M.L. Errington, et al : Spatial learning and hippocampal long-term potentiation are not impaired in mdx mice. Neuroscience Letters. 211 : 203-206, 1996.

4) Francesco Muntoni and Anna Mateddu : Passive avoidance behaviour deficit in the mdx mouse. Neuromuscular Disorders. 1 (2) : 121-123, 1993.

# ジストロフィン遺伝子導入：多コピー発現ベクターと長期発現ベクターのmdxマウスへの応用に関する研究

岡　田　伸太郎*

研究協力者　塚　本　浩　子*　乾　　幸　治*

**要　旨**　多コピーの核内プラスミドとして複製し，挿入遺伝子を安定して高発現させることが可能である，ウシパピローマウイルス(bovine papilloma virus, BPV)ベクター[1]と複製機能と核内保留機能を合わせ持ち，挿入遺伝子の組織での長期発現が期待できるEpstein-Barr virus(EBV)ベクター[2]をジストロフィン遺伝子導入に応用してその発現の持続効果を検討した．その結果BPVベクターを用いたとき，*in vitro*のLacZの発現は1日目では差を認めなかったが，7日目では約3倍となった．一方EBVベクターでは*mdx*マウスを用いたジストロフィン発現を7日目と28日目で比較すると，約1.5倍に上昇していた．これら2種のベクターを組み合わせ，多コピーでかつ長期発現が可能なベクターを作製すれば，遺伝子治療への応用が考えられる．

## はじめに

BPVベクターの利点は，レトロウイルスのように染色体DNAに影響を及ぼさず，多コピーの核内プラスミドとして複製し，挿入した遺伝子を安定して高発現させることが可能である．またヒトに対して感染性がないことも遺伝子治療ベクターとして優れた特徴であり期待される点ではあるが，欠点として細胞への遺伝子導入効率が低いことがあげられる．

EBVベクターは複製機能と核内保留機能を併せ持つため，挿入外来遺伝子の組織での長期発現を期待できる．また，EBVの核内保留機能はいずれの種の細胞にも働きうる[3]．非分裂細胞からなる筋組織では，細胞分裂によるプラスミドDNAの希釈がさけられるので，分裂細胞組織に比べさらに核内保留機能の効果を期待することができる．

以上の点より，非ウイルスベクターを用いた筋ジストロフィーの遺伝子治療の試みとして，BPV type1(BPV-1)遺伝子を含むBPVベクターを用いて，ジストロフィン遺伝子を導入した多コピー発現ベクターを開発し筋肉への遺伝子治療を目的とする研究と，EBNA+oriP遺伝子を含むEBVベクターを用いたジストロフィン遺伝子導入を目的とする長期発現複製ベクターの開発を試みた．

## 方　　法

**BPVベクターの応用**：マイアミ大学Dr.Podackより供与されたBPV45neoNot(-)をもとに，pCMVβにlongPCRによって作製した4kbの51%BPV-1フラグメントを挿入したLacZ遺伝子発現ベクター(BPV-β,BPV-P)を作製し，CMVをプロモーターに持つpCMVβとともに筋芽細胞C2C12とヒト皮膚線維芽細胞NIH3T3へのlipofectAMINE(GIBCO)使用による発現実験を行い，X-gal染色によってβ-gal陽性細胞数を比較検討した．β-gal活性の経時的変化はC2C12とpCMVβ，BPV-Pの2種類のプラスミドを用いて比較検討した．さらにSV40プロモーターと6.3kbのBecker型ミニジストロフィン遺伝子を入れたpRSVDyB,これに同じく51%BPV-1フラグメントを挿入したpRSVDyBBを作製して，C2C12を利用して2つのプラスミドのジストロフィン発現の差異を免疫蛍光抗体染色(12B2,6C5；mouse monoclonal antibody)を行い，蛍光顕微鏡・共焦点顕微鏡にて比較検討した．

**EBVベクターの応用**：3種類のLacZ遺伝子発現ベクター，pCMVβ，pRSVβ，pPGKβにInvitrogen社のEBVベクターREP10のEBNA-1+oriPのEBフラグメント(EBF,4.2kb)を挿入し，これら6種類のLacZベクターを用いて，lipofectAMINEによるC2C12への導入を行い，導入後3日目と7日目でX-gal染色による比較を行った．続いてpRSVβ，pRSVβ+EBを用いて，C2C12，NIH3T3，ヒト胎児腎由来細胞293細胞への遺伝子導入を行い，β-gal活性の経時的変化を比較した．またミニジストロフィンを組み込んだpRSVDyB(N)とこれにEBFを挿入したpRSVDyB(N)+EBを作製し，C2C12とNIH3T3への遺伝子導入を行った．続いて，週令7.5週-10週の*nude/mdx*(9匹)の左右前脛骨筋を1.2%塩化バリウム溶液を用いて変性し，5日後左側にpRSVDyB(N)+EB，右側にpRSVDyB(N)を直接注入した．7日目，28日目に両脛骨筋を取り出し，凍結切片を作製し，P6(rabbit polyclonal antibody)による抗ジストロフィン抗体染色を行い，ジストロフィン陽性線維数について比較検討した．

* 大阪大学医学部

## 結　果

**BPVベクターの応用**：LacZ発現ベクター(pCMVβ，BPV-P)をトランスフェクション後1日目のβ-gal陽性細胞は，それぞれ40%，35%であり，筋管細胞出現後の7日目にもpCMVβとBPV-Pには同程度の陽性筋管細胞を認めた．β-gal活性の経時的変化は，2日目のOD値を100%とした場合，7日目はそれぞれ8%と23%となり，BPV-1フラグメントの挿入効果を認めた．NIH3T3を用いた発現実験でもC2C12の結果と同じ傾向を認めた．2種類のミニジストロフィン発現ベクター(pRSVDyB，pRSVDyBB)のC2C12に対するトランスフェクションの結果は，7日目にはN端・C端いずれの抗体でも染まるジストロフィン陽性筋管細胞を，低率ではあるがほぼ同程度に認め，共焦点顕微鏡でもジストロフィンの筋細胞膜への局在を確認した．

**EBVベクターの応用**：6種類のLacZ遺伝子発現ベクターを用いたC2C12への遺伝子導入では，いずれのプロモーターでも導入後3日目のX-gal染色で，+EBベクターに有意なβ-gal陽性細胞を認めた．7日目(筋管細胞形成後)にも同様な傾向を見たが，CMVプロモーターを持つ2つのベクター(pCMVβ，pCMVβ+EB)の陽性細胞数は他のプロモーターを持つ4種類のベクターに比べ低率であったので，その後の経時的なX-gal染色とβ-gal活性の観察にはpRSVβとpRSVβ+EBを用いた．いずれの3種類の細胞についても，pRSVβ+EB導入3日目以降，染色性優位，活性上昇の有意な持続を認めた．ミニジストロフィン遺伝子導入後のC2C12，293細胞でも導入後6日目に，それぞれ筋細胞膜へのジストロフィンの局在と有意なジストロフィン陽性細胞の増加を認めた．また*nude/mdx*へのプラスミド直接注入後7日目，28日目の各筋の最高ジストロフィン陽性細胞数を比較すると7日目(109±39vs154±24)，28日目(100±21vs151±37)ともにpRSVDyB(N)+EBに陽性線維をより多く認め効果の持続も確認した．

## 考　察

BPVベクターについては，短期間の結果ではあるが，LacZ発現ベクターの検討で，筋管細胞の出現後にはBPV-1フラグメント挿入によるLacZ遺伝子発現の持続効果が確認できた．このことは次にBPVフラグメントを含むジストロフィン発現ベクターを作成し，筋肉での*in vitro*や*in vivo*での検討を行っていくべき可能性を示唆するものであった．

EBVベクターについては，LacZ発現ベクターを用いた*in vitro*の実験でマウス(C2C12,NIH3T3)，ヒト(293)いずれの細胞についても挿入遺伝子LacZの有意な発現持続を確認することができた．ミニジストロフィンの遺伝子導入については，7日目と28日目ともにpRSVDyB(N)+EBに，より多くの陽性細胞を持続的に認めることができた．投与対照数を増やし，投与観察期間を延長することでジストロフィン遺伝子導入に対するEBVベクターの有効性をさらに確認する予定である．直接投与・リポフェクション・HVJ-liposome法といった方法とともに，非ウイルスベクターの欠点である遺伝子導入効率を改善するためリガンドを用いた導入方法の開発や導入効率が良いとされる横隔膜への投与なども行ってみたい．多コピー発現ベクターと長期発現複製ベクターの開発は,筋ジストロフィー遺伝子治療の有効な手段の1つとなりうるものと考えられる．

## 文　献


1) Ohe Y, Zhao D, Saijo N, et al : Construction of a novel bovine papilloma virus vector without detectable transforming activity suitable for gene transfer. Hum Gene Ther 6 : 325-333, 1995.
2) Yate JL and Guan N : Stable replication of plasmid derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. Nature 313 : 812-815, 1985.
3) Wohlgemuth JG, Kang SH, Bulboaca GH, et al : Long-term gene expression from autonomously replicating vectors in mammalian cells. Gene Ther 3 : 503-512, 1996.

# IL-12p40遺伝子導入と抗CD80，抗CD86抗体投与による同種筋芽細胞移植拒絶の抑制に関する研究

吉野　英*

研究協力者　星　研一*　佐藤　猛*　加藤和則**
下里　修**　八木田秀雄**　奥村　康**

**要　約**　筋ジストロフィーの将来の治療方の一つとして正常筋芽細胞の移植が考えられているが，拒絶反応により長期生着が困難である．そこで移植筋芽細胞の拒絶反応に関わる免疫反応を抑制することで長期の生着を試みた．移植免疫拒絶に関わる細胞性免疫Th1を誘導するサイトカインの1つにIL-12があるが，IL-12の働きを阻害するp40を組み込んだ筋芽細胞を同系マウスに移植したところ，拒絶反応を抑制することを見いだした．更にcostimulatory分子に対する特異抗体である，抗CD80抗体，抗CD86抗体を併用したところ，筋芽細胞のmdxマウスへの長期生着効果が認められた．

## はじめに

遺伝性や難治性疾患の遺伝子治療がこころみられているが，必要な遺伝子をどのように導入するかがひとつの課題となっている．導入した遺伝子の産生するタンパク質等は宿主すなわち患者自身の免疫反応を通じて異物と認識されて排除される場合があることが報告されている．我々の実験はその解決法として免疫反応の初期段階を修飾すること，すなわち抗原特異的T細胞不応答状態(antigen-specific T cell unresponsiveness)を導入することで免疫拒絶を抑制する試みである．対象として昨年度に引き続いて筋芽細胞移植による筋ジストロフィーの治療を目標にマウスを用いて検討した．

## 方　法

C3Hマウス(H-2Kk)由来筋芽細胞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)およびマウスとしてC57BL/6(H-2Kb)，C57BL/10ScSn(H-2Kb)，mdx(H-2Kb筋ジストロフィーのモデル)を本実験に用いた．

1. LacZ/MFGを用いてマーカーLacZ遺伝子を導入した筋芽細胞を作成し(C2/4 β-gal)，さらにIL-12p40/MFG(癌研究会附属病院濱田，脇本先生より供与)を用いてIL-12p40サブユニットを導入した筋芽細胞を作成した(C2/4 β-gal-p40)．次にC2/4 β-gal細胞またはC2/4 β-gal-p40細胞をそれぞれ$5\times10^6$個づつC57BL/6マウス後肢大腿四頭筋に直視下にシリンジを用いて筋肉内注入した．同時に抗CD80抗体(1G10)と抗CD86抗体(GL-1)をともに50 μgづつ移植後3日間連続して腹腔内投与した．その後経時的に組織切片を作製し，H&E染色やX-gal染色により組織学的に筋組織中の移植筋芽細胞を検討した．

2. 次にC57BL/10ScSnマウスの骨格筋より筋細胞を分離し，1と同様にLacZ，IL12-p40遺伝子を導入しmdxマウスの後肢大腿四頭筋に同様に$5\times10^6$個注入し，同時に抗CD80抗体と抗CD86抗体をともに50 μgづつ移植後3日間連続して腹腔内投与し，経時的に組織学的に筋組織中の移植筋芽細胞を検討した．

## 結　果

1. 同種移植(C3H由来C2/4筋芽細胞→C57BL/6マウス)ではIL-12p40と抗体併用群で少なくとも4週間後の移植筋芽細胞の生着が認められた．
2. 同系移植(C57BL/10ScSn由来筋細胞→mdxマウス)では4週間後同様にIL-12p40と抗体併用群でさらに強い生着を認めた．
3. IL-12p40遺伝子導入と抗CD80,抗CD86抗体併用投与は同種及び同系筋芽細胞移植拒絶反応を抑制するために有効な方法である．

## 考　察

筋ジストロフィーに対する治療方法のひとつとして正常筋芽細胞の移植方法が報告されているが実際は，細胞導入効率の低さ，拒絶反応などにより長期生着は困難である．そこで移植筋芽細胞拒絶に関わる免疫反応を抑制することでより長期の移植細胞の生着を試みた．拒絶反応を引き起こすT細胞の活性化には移植筋芽細胞を認識した抗原提示細胞が，MHCを介して抗原刺激をT cell receptorからT細胞へ伝えられる第一シグナルだけではなく，第二のシグナルである共刺激costimulatory分子が必要である．このシグナルとしてはCD28, CTLA-4/CD80, CD87などの細胞接着分子が知られている．さらに抗原提示を受けたT helper細胞はTh1またはTh2に分化する．このうち移植細胞拒絶におもに関与する細胞性免疫はTh1によ

* 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

り強められ，Th1に分化させるサイトカインのひとつにIL-12がある．我々ははじめにIL-12に着目した．In vivoでそのサブユニットp40のみを働かせるとIL-12のアンタゴニストとなることが報告されていたが，我々はこのIL-12p40サブユニットを筋芽細胞に移植し，in vivoにおいてIL12-p40サブユニットがTh1型の免疫反応を抑制し移植細胞拒絶の初期を抑制することを見出し報告した[1]．しかし同種細胞移植の拒絶に対する抑制効果には不十分であった．そこで今回はさらにcostimulatory分子に対する特異的抗体を用いてブロックすることを併用して，移植細胞拒絶の抑制ひいては長期生着に向けての抗原特異的T細胞不応答状態の導入を試み，その効果を確認した．

## 参考文献


1) K Kato, O Shimozato, K Hoshi, et al : PNAS 93 : 9085-9089, 1996.

# 筋緊張性ジストロフィーの耐糖能異常に対するtroglitazoneによる治療

川 井 尚 臣*

研究協力者 西 田 善 彦** 松 本 俊 夫*** 足 立 克 仁****
木 村 千代美**** 乾 俊 夫*****

## 緒 言

筋緊張性ジストロフィー(MyD)は，ミオトニアを伴う筋萎縮を特徴とする遺伝性筋疾患であるが，多系統にわたる全身症状の1つとして耐糖能異常も高頻度に併発することが知られている[1]．本研究では本症の耐糖能異常の病態を明らかにし，インスリン抵抗性改善剤であるtroglitazone(TGZ)[2]の治療効果を検討した．

## 対象と方法

**1) 症例**：MyDの16例で，年齢は31歳から66歳(46.3±8.1歳，平均±標準偏差)で男性9例，女性7例である．3例はすでに糖尿病の治療を受けていた．肥満度を表すbody mass index(BMI)[3]は14.3から29.3(22.5±3.4，同)であり，2例に肥満が認められた．Ruskによる下肢機能障害度のステージ[4]はⅠが2例，Ⅱが3例，Ⅲが3例，Ⅳが2例，Ⅴが1例，Ⅵが5例であった．またCTGリピート数は400から2400(1400±670，同)であった．

**2) 耐糖能異常の判定**：75g経口ブドウ糖負荷試験(75gOGTT)を行い，血糖とimmunoreactive insulin(IRI)を負荷前から30分，60分，120分，180分まで経時的に測定し，日本糖尿病学会の診断基準[5]に従ってそのパターンより正常型，境界型，糖尿病型に分類した．各症例についてインスリンの初期分泌能の指標であるinsulinogenic index(I.I.)[6]とインスリン抵抗性の指標であるfasting insulin resistance index(FIRI)[7]を算出した．

**3) TGZによる耐糖能異常の治療**：糖尿病型を示した症例のうちNIDDMで投与を希望する症例には，TGZを1回200mg，1日2回朝夕食後に投与し，1カ月毎に血糖，HbAlc，握力，肺活量などを測定し，3カ月後に75gOGTTを再検した．

**4) TGZの長期投与**：3カ月間の投与期間終了後もさらに治療の継続を希望する症例については，1カ月に一度肝機能を検査しながら投与を継続した．

* 高松市民病院
** 伊月病院
*** 徳島大学第一内科
**** 国立療養所徳島病院内科
***** 国立療養所徳島病院神経内科

## 結 果

**1) 耐糖能異常の判定(図1)**：75gOGTTで血糖のパターンが正常型であったものは5例，境界型は5例，糖尿病型は6例(5例はNIDDM,1例はIDDM)であった．IRIの分泌反応は正常型では過剰を示し，境界型，糖尿病型となるに伴い徐々に低下した．各型とBMI，下肢機能障害度，CTGリピート数の間には明らかな関係は認められなかった．

**2) インスリン分泌能とインスリン抵抗性(図2)**：I.I.は正常型では2.28から7.13，境界型では1.77から3.02といずれも高値であるのに対し，糖尿病型では0.006から0.34と全例低下していた．一方，FIRIは正常型の2例を除き高値を示した．

**3) TGZによる耐糖能異常の治療(図3)**：NIDDMと診断された3例には，TGZの投与を行い，1ヶ月後より空腹時血糖値の低下が，次いでHbAlcの低下も認められた．75gOGTTの再検では，血糖の総和(ΣBG)は著明に減少し，耐糖能異常の改善が認められた．

**4) TGZの長期投与(図4)**：TGZの長期投与例は2例で，HbA1cは正常化していたが，1例は14カ月以上投与を継続したのに対して，もう1例では肝障害のため8カ月で中止した．なお，この期間内に両例とも握力や肺活量に有意な変動はなかった．

## 考 察

筋緊張性ジストロフィー(MyD)には，高インスリン血症と耐糖能異常が高頻度にみられることが知られている[1]が，本研究でも75gOGTTで糖尿病型を示す症例が高頻度(37.5%)にみられ，さらに血糖の変動パターンが前記のどの型であってもIRI分泌は大部分の症例で過剰反応がみられ，インスリン抵抗性が存在することが示された．

TGZは，骨格筋においてもインスリン受容体のチロシンキナーゼを活性化し，骨格筋への糖の取り込みを促進させるなどの作用を示し，インスリン抵抗性を改善させるチアゾリン系薬剤である[2]．MyDでは，インスリン分泌の過剰反応が長年にわたり存在すると考えられるが，その結果，膵β-細胞の疲弊がおこり，インスリン分泌の減少あるいは標的器官の骨格筋の障害によるインスリン作用の減弱などが生じ，糖尿病を発症するものと考えら

れる．TGZは，本症において骨格筋の萎縮や障害があるにもかかわらずインスリンの分泌を増加させることなく負荷後の過血糖を抑えてHbA1cを正常化させることができ，本症の糖尿病に対して有効な治療薬と思われる．そしてさらに本薬を耐糖能異常の早期から投与することにより境界型から糖尿病への進展を遅延させ糖尿病に伴う二次的筋萎縮を予防できるものと考えられる．一方，Moxleyら[8]は，本症のインスリン抵抗性の機序として骨格筋におけるブドウ糖摂取能の低下をあげており，TGZの投与が筋の糖利用の増加につながれば本症にみられる筋症状その他を改善させる可能性も考えられる．

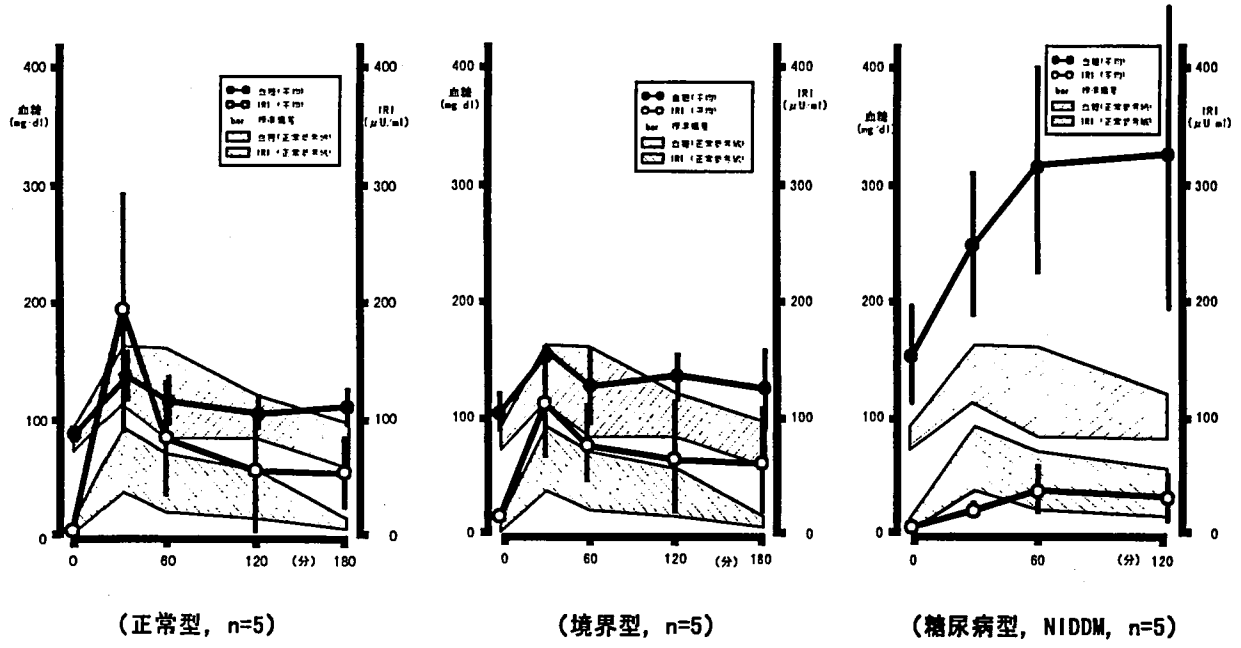



図1　筋緊張性ジストロフィー(MyD)症例に対する75gOGTTの結果
16例中5例が正常型，5例が境界型，6例が糖尿病型(5例はNIDDM，1例はIDDM)と判定された．図には各型の血糖とIRIの平均値を示した．正常型ではインスリン分泌反応は明らかに過剰で，境界型でも分泌は多いが，糖尿病型では分泌反応が低下している．

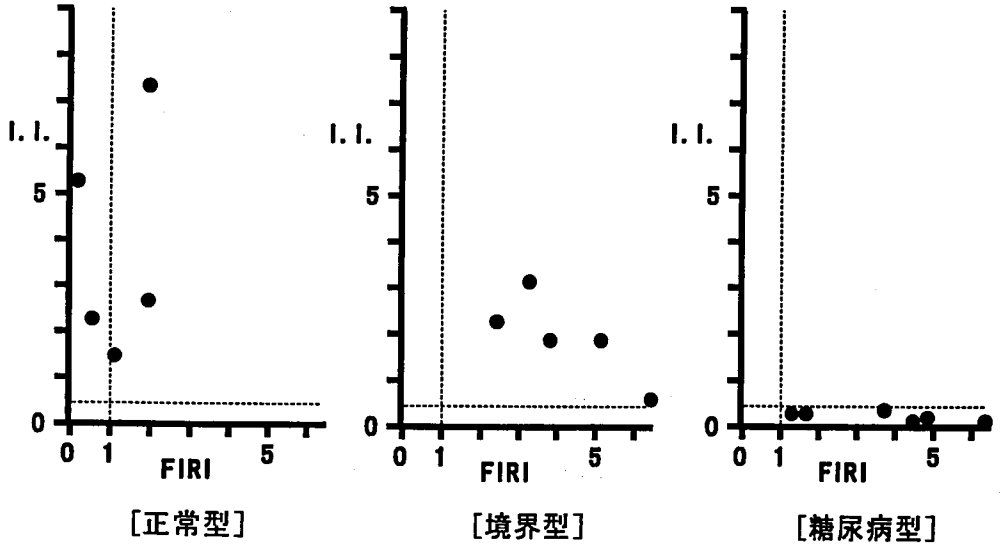



図2　MyD症例の75gOGTT各型におけるインスリン分泌能とインスリン抵抗性
縦軸にはインスリン分泌能を表すinsulinogenic index(I.I.)#を，横軸にはインスリン抵抗性を表すfasting insulin registance index (FIRI) $を示した．I.I.は正常型から境界型，糖尿病型となるに伴い徐々に低下し，糖尿病型では全例低下している.一方，FIRIは正常型の2例を除き高値を示した．
#：ΔIRI(30分)/Δ血糖(30分)(0.4以下でインスリンの初期分泌の低下)
$：(空腹時血糖(mg/dl)÷18)×空腹時IRI÷22.5(1.0以上でインスリン抵抗性)

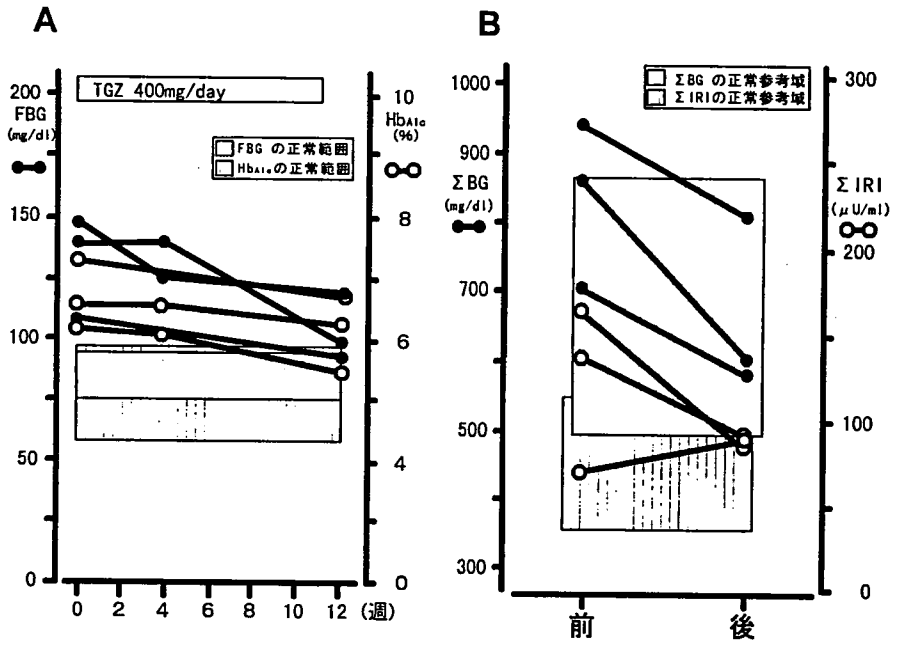



**図3** MyD症例の糖尿病に対するtroglitazone(TGZ)の治療効果
A(治療経過)：TGZの投与を行ったのは3例で，投与開始後1カ月頃から空腹時血糖(FBG)が，次いでHbA1cが徐々に低下傾向を示した．
B(75gOGTTによる前後の比較)：75gOGTT検査時の前，30分，60分，120分の血糖あるいはIRIの総和(それぞれΣBG，ΣIRI)で比較したが，ΣBGは3例とも投与後に著明な減少が認められた．一方，ΣIRIは2例では減少，1例では軽度増加しいずれも正常参考域下限のよく似た数値を示した．

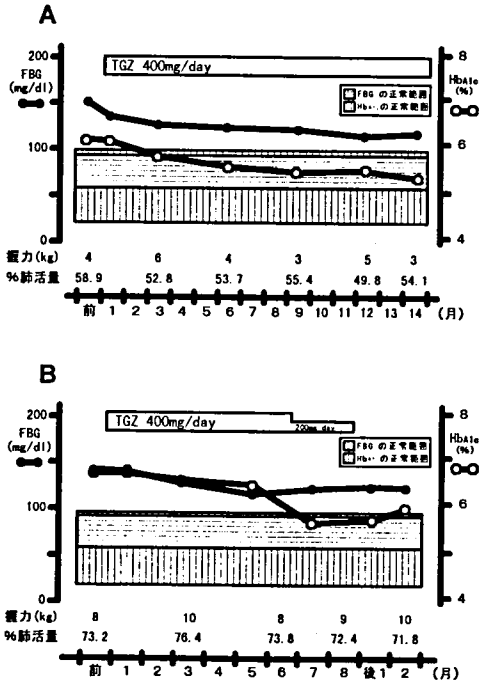



**図4** 糖尿病症例に対するtroglitazone(TGZ)の長期治療効果
A(53歳，女性)：14カ月にわたり投与を続けている．空腹時血糖(FBG)はやや高値を持続しているが，HbA1cは3カ月めより正常域に戻っている．なお握力や肺活量などには有意な改善は認められていない．
B(46歳，男性)：投与開始6カ月めに肝障害が出現したため投与量を半量に減らし，耐糖能異常と肝障害の両者が改善したが，8カ月後に肝障害が再発したため投与を中止した．その後耐糖能異常は徐々に増悪している．

## 文　献


1) Harper PS : Myotonic Dystrophy. Philadelphia, WB Saunders : 115-138, 1979.
2) Lee M-K, Miles PDG, Khoursheed M, et al : Metabolic effects of troglitazone on fluctose-induced insulin resistance in the rat. Diabetes 43 : 1435-1439, 1994
3) Keys A, et al : Indices of relative weight and obesity. J Chronic Dis 25 : 329, 1972.
4) Rusk HA : Rehabilitation Medicine. Mosby, St Louis, USA, 1977 : 440.
5) 小坂樹徳ほか：糖尿病の診断に関する委員会報告. 糖尿病 25 : 857, 1982.
6) Seltzer HS, Allen EW, Herron Al and Brennan MT : Insulin secretion in response to glycemic stimulus: relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes. J Clin Invest 46 : 323-335, 1967.
7) Duncan MH, Singh BM, Wise PH, Carter G and Alaghband-Zadeh J : A simple measure of insulin resistance. Lancet 346 : 120-121, 1995.
8) Moxley RT, Corbett AJ, Minaker KL and Rowe JW : Whole body insulin resistance in myotonic dystrophy. Ann Neurol 15 : 157-162, 1984.

# ミトコンドリア異常症におけるジクロロ酢酸ナトリウム治療

桃　井　真里子*

研究協力者　斎　藤　茂　子*

**要　旨**　MELAS患者4例に1年1カ月～3年2カ月間ジクロロ酢酸ナトリウム(DCA)を投与し，有効性と副作用を評価した．治療開始後，脳卒中様発作はなく，頭痛，腹痛が軽減しており，臨床的に可逆性を示す血管性病変には明らかに有効であった．すでに障害のある神経細胞への効果は乏しく，難聴，知能障害や脳波異常は改善しなかった．DCAの作用はピルビン酸脱水素酵素の不活化の阻害であるが，MELASのような電子伝達系の障害であっても，残存する正常mtDNAによる代謝系の活性化が起こるため，periodicな臨床像に効果を示したと考えられる．

さらに，ミトコンドリアDNA(mtDNA)塩基番号8993のT→G変異に起因するLeigh脳症1例へのDCA治療を行った．治療により意識レベルはやや改善したが心不全が進行し死亡した．剖検組織では，検索した全ての組織で90%以上の変異mtDNAを有しており，このことは，個々の細胞レベルにおいても変異mtDNAが大部分を占め，ATPaseの機能障害を有すると考えられる．残存する正常代謝系が一定レベル以下では，DCA投与によりTCA cycleへのAcetyl CoAの供給が増えてもATPが産生されず，かえって電子伝達系からの活性酸素増大を引き起こし，細胞障害性に働くことが推察された．

DCAは，MELASでは有効な治療であるが，Leigh脳症では症例毎の検討が必要である．今後，残存正常mtDNAとDCAの有効性の関係など，細胞レベルでのDCAによる代謝変化についての検討も必要と考えられる．

## 文　献

1) Saitoh S, Momoi MY, Yamagata T, Mori Y and Imai M : Effects of dichloroacetate in three patients with MELAS. Neurology 50 : 531-534, 1998.

* 自治医科大学小児科

# ミトコンドリア病変異遺伝子の選択的破壊による遺伝子治療の基礎開発

田　中　雅　嗣*

研究協力者　米　田　　誠**　Harm-Jan Borgeld***　Jin Zhang*
Jian-Sheng Gong*　宮　林　重　明****　瀬戸口　靖　弘*****

## 緒　　言

ミトコンドリアゲノムは1細胞あたり数千コピー存在し，ミトコンドリア病患者の組織・細胞においては，変異型mtDNAと正常型mtDNAが共存している(ヘテロプラスミー)．変異型mtDNAの割合が一定の閾値を越えた場合にミトコンドリア機能異常がもたらされる．従って，変異型mtDNAのみを選択的に破壊・減少させ，正常型mtDNAを細胞内で優位に立たせることができれば，機能回復が期待できる．本研究では，変異型mtDNAのみを切断する制限酵素を，ミトコンドリアへの移入に必要な特異的シグナルペプチドと結合させ，融合タンパクとして細胞質内で合成させ，ミトコンドリア内へ選択的に運び入れる．ミトコンドリアには，組換え修復の機構が存在しないため，二重鎖切断を受けた変異型mtDNAは複製不能となり，正常型mtDNAが増加し，ミトコンドリア機能が回復するものと期待される．

## 方法および結果

1. 8993変異を有するサイブリッドの構築：Leigh脳症の患者より採取された線維芽細胞を骨肉腫由来のmtDNAを欠如した細胞($\rho^0$206)と細胞質融合させ，8993T→G変異を有する不死化細胞系を確立した．

2. 制限酵素*Sma*IとミトコンドリアシグナルペプチドcDNAの融合遺伝子の構築：制限酵素*Sma*I遺伝子を*Serratia macescens*の菌株のDNAからPCR増幅しクローン化した．ラットのornitine transcarbamylase (OTC)のシグナルペプチド(sOTC)の遺伝子に制限酵素*Sma*I遺伝子をrecombinant PCR法を用いて結合した．この融合遺伝子をCMVプロモーターを持つ哺乳類発現ベクター(pCR3-Uni)に挿入し発現プラスミドを得た(sOTC-*Sma*I/pCR3-Uni)．また，同時にsOTC-S*ma*Iの下流にGFP (green fluorenscent protein) 遺伝子を結合させたプラスミド(sOTC-S*ma*I-GFP/pCR3-Uni)およびsOTCに直接GFP連結したプラスミド(sOTC-GFP/pCR3-Uni)を構築した．

3. SmaI遺伝子の発現とミトコンドリア内への移入の確認：8993T→G変異を有するサイブリッドにsOTC-GFP融合遺伝子を持つ哺乳類発現プラスミドを導入した．蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果，細胞質に顆粒状に蛍光が観察され，sOTCによってGFPを選択的にミトコンドリアに移入できることを確認した(図1)．sOTC-S*ma*I-GFPプラスミドを導入した場合にも，蛍光強度は低いものの，細胞質に顆粒状に蛍光が観察された．sOTC-S*ma*I-GFPプラスミドを導入した細胞から，ネオマイシン耐性を指標として選択を行い，安定形質発現株が得られた．現在，安定形質発現株における変異mtDNAを解析中である．

## 考　　察

本研究によって，ミトコンドリアゲノムを外来遺伝子の導入によって制御する基礎が得られた．従来，ミトコンドリア脳筋症に対する遺伝子治療として，1)遺伝子銃

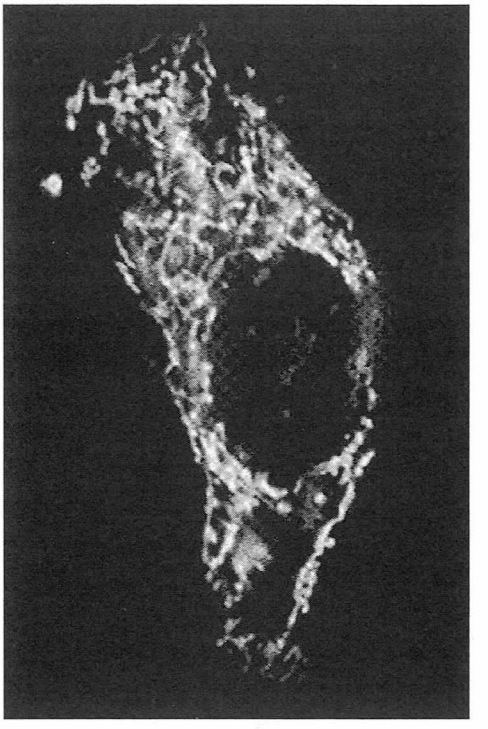


図1

* 財団法人岐阜県国際バイオ研究所
** 福井医科大学第二内科
*** 名古屋大学医学部第二生化学
**** 東北大学大学院医学系研究科小児病態分野
***** 順天堂大学医学部呼吸器内科

を用いてミトコンドリアにDNAを打ち込む，2)シグナルペプチドをDNAに結合しその複合体をミトコンドリアに運び入れる，などの方法が提唱されてきた．前者は到達深度の浅さと細胞障害性のために培養細胞レベルの実験に止まる．後者は運び込むことのできるDNAの長さに限界があることと，残存する変異mtDNAの影響を消すことができない点で問題がある．

本研究は制限酵素の特異性を利用して変異型mtDNAの選択的除去をめざすものである．制限酵素を細胞核に導入すると相同組換えが促進されると報告されている．哺乳類のミトコンドリアでは相同組換えがないとされている．ミトコンドリアへの制限酵素の移入によって，欠失mtDNAの生成が促進されるか，あるいは切断をうけたmtDNAがDNaseによって処理されるかなど，細胞内のmtDNAの動態に関する基礎研究を行っていく必要がある．

## 文　献


1) Tanaka M, Gong J-S, Zhang J, Yoneda M and Yagi K : Mitochondrial genotype associated with longevity. Lancet 351 : 185-186, 1998.

2) Gong J-S, Zhang J, Yoneda M, Sahashi K, Miyajima H, Yamauchi K, Yagi K and Tanaka M : Mitochondrial genotype frequent in centenarians predisposes resistance to adult-onset diseases. J. Clin. Biochem. Nutr. 24 : 105-111, 1998.

3) Zhang J, Yoneda M, Naruse K, Borgeld H-J W, Gong J-S, Obata S-I, Tanaka M and Yagi K : Peroxide production and apoptosis in cultured cells carrying mtDNA mutation causing encephalomyopathy. Biochem. Mol. Biol. Int. 46 : 71-79, 1998.

4) Miura J, Uchigata Y, Sato A, Matsunaga R, Fujito T, Borgeld H-J, Tanaka M, Babazono T, Takahashi and Iwamoto Y : An IDDM patient who complained of chest oppression with ischemic changes on ECG in insulin-induced hypoglycemia. Diabetes. Res. Clin. Pract. 39 : 31-37, 1998.

5) Hattori N, Yoshino H, Tanaka M, Suzuki H and Mizuno Y : Genotype in the 24-kDa subunit gene (NDUFV2) of mitochondrial complex I and susceptibility to Parkinson disease. Genomics 49 : 52-58, 1998.

6) Yoshino H, Hattori N, Urabe T, Uchida K, Tanaka M and Mizuno Y : Postischemic accumulation of the lipid peroxidation products in the rat brain: immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins. Brain Res. 767 : 81-86, 1997.

7) Morikawa S, Kurauchi O, Tanaka M, Yoneda M, Uchida K, Itakura A, Furugori K, Mizutani S and Tomoda Y : Increased mitochondrial damage by lipid peroxidation in trophoblast cells of preeclamptic placentas. Biochem. Mol. Biol. Int. 41 : 767-775, 1997.

8) Kovalenko SA, Harms PJ, Tanaka M, Baumer A, Kelso J, Ozawa T and Linnane AW : Method for *in situ* investigation of mitochondrial DNA deletions. Hum. Mutat. 10 : 489-95, 1997.

9) Islam MM, Suzuki H, Yoneda M and Tanaka M : Primary structure of the smallest (6.4-kDa) subunit of human and bovine ubiquinol-cytochrome *c* reductase deduced from cDNA sequences. Biochem. Mol. Biol. Int. 41 : 1109-1119, 1997.

10) Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Mizuno Y and Stadtman ER : Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 2696-2701, 1996.

11) Tanaka M, Kovalenko S, Gong J-S, Borgeld H-J, Katsumata K, Hayakawa M, Yoneda M and Ozawa T : Accumulation of deletions and point mutations in mitochondrial genome in degenerative diseases. In "Annals of New York Academy of Sciences: Pharmacological Intervention in Aging and Age-associated Disorders" (K. Kitani, A. Aoba, and S. Goto, eds.), pp.102-111, New York Academy of Sciences, New York, (1996)

12. Tanaka M, Hayakawa M and Ozawa T : Automated sequencing of mitochondrial DNA. In "Methods in Enzymology, Mitochondrial Genetics and Biogenesis" (G.M. Attardi and A. Chomyn, eds.), pp.407-421, Academic Press, Orlando, FL, (1996)

13) Sawano T, Tanaka M, Ohno K, Yoneda M, Ota Y, Terasaki H, Awaya S and Ozawa T : Mitochondrial DNA mutations associated with the 11778 mutation in Leber's disease. Biochem. Mol. Biol. Int. 38 : 693-700, 1996.

14) Onoue S, Suzuki H, Nimura Y, Shimizu Y, Nagino M, Tanaka M and Ozawa T : Increase of mtDNA-binding proteins and mitochondrial mRNAs in regenerating liver. J. Surg. Res. 62 : 172-178, 1996.

15) Nakamura N, Hattori N, Tanaka M and Mizuno Y : Specific detection of deleted mitochondrial DNA by *in situ* hybridization using a chimera probe. Biochim. Biophys. Acta 1308 : 215-221, 1996.

16) Kovalenko SA, Tanaka M, Yoneda M, Iakovlev AF and Ozawa T : Accumulation of somatic nucleotide substitutions in mitochondrial DNA associated with the 3243 A->G tRNALeu(UUR) mutation in encephalopathy and cardiomyopathy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 222 : 201-207, 1996.

17) Hayakawa M, Katsumata K, Yoneda M, Tanaka M, Sugiyama S and Ozawa T : Age-related extensive fragmentation of mitochondrial DNA into minicircles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 226 : 369-377, 1996.

# ミトコンドリア脳筋症の発症機序と治療に関する分子生物学的研究

太田成男*

研究協力者　安川武宏*,**　渡辺公綱**

**要　旨**　ミトコンドリア脳筋症のMELASの原因遺伝子変異はミトコンドリアtRNA$^{Leu(UUR)}$遺伝子の変異によることが判明しているが，その変異によって何故呼吸鎖酵素活性が低下するかの分子機構は不明であった．そこで，塩基番号3243あるいは3271に変異をもつtRNAを精製して修飾塩基を含む塩基配列構造を決定した．すると3243，3271いずれの変異によってもアンチコドンの第一塩基が修飾されなくなることが判明した．アンチコドンはmRNAのコドンを識別する場所であり，修飾塩基が変化することによって，取り込まれるアミノ酸が変化し，異常蛋白が合成され，呼吸鎖酵素の活性が低下したり，活性酸素を放出することが推定された．

## はじめに

ミトコンドリア脳筋症の原因遺伝子が同定され，ミトコンドリアtRNA遺伝子の変異が多数同定されている．MELAS，MERRF，心筋症の原因変異としてそれぞれミトコンドリアtRNA$^{Leu(UUR)}$遺伝子，tRNA$^{Lys}$遺伝子，tRNA$^{Ile}$遺伝子に変異が同定されている[1]．しかしながら，何故，tRNAの遺伝子の変異によってミトコンドリアの機能異常が現われるのかなど不明な点は依然多い．従来の研究によって，ミトコンドリアtRNA遺伝子の点変異あるいは欠失変異によって核の遺伝子とは独立に呼吸鎖活性が低下することが判明している．この証明はミトコンドリアDNAを完全に消失させた細胞に脱核した細胞質を融合させ，完全に核の影響をなくすことによってなされた[2),3)]．この人為的に作成された細胞株は細胞質（サイトゾル）の融合であるのでサイブリドと呼ばれる．このサイブリドはHeLa細胞の核をもつため，無限増殖が可能であり，変異mtDNAをもつ細胞を大量に培養することが可能になった．従来変異tRNA分子を精製してその構造を決定する必要があると思われていたが技術的困難さから，変異tRNAを実際に精製したという報告はない．渡辺らによって，固相ハイブリダイズ法によって極微量なtRNAを精製する方法が確立された[4]．

tRNAは転写後に塩基が修飾され変化することが知られている．tRNAにはAGUCの他に塩基が修飾された修飾塩基が多く見い出されるが，ヒトのミトコンドリアtRNAでは現在までに22種類のtRNAのうち2種類のtRNAの塩基配列のみが決定されているにすぎない[5),6)]．tRNA$^{Leu(UUR)}$はまだ正常tRNAの塩基配列も決定されていないかった．そこで，A3243G，C3271T変異をそれぞれもつtRNA$^{Leu(UUR)}$と正常tRNALeu(UUR)を精製してその塩基配列を決定した．

* 日本医科大学老人病研究所生化学部門
** 東京大学大学院工学系研究科生命工学

## 対象および方法

**サイブリド**：変異mtDNAをもつ細胞はサイブリドを用いた．すなわち，MELAS患者由来の培養細胞を脱核して，mtDNAを完全に消失したHeLa細胞と融合した．3271変異をもつサイブリドはほぼ100%変異mtDNAを有し，3243変異をもつサイブリドは90%変異mtDNA，正常mtDNA 10%であった．対照正常細胞はmtDNAを失った細胞に胎児由来ミトコンドリアを導入したサイブリドを用いた．

**tRNAの精製**：サイブリドクローンをそれぞれ$10^9$細胞培養した．まず，酸グアニジンチオシアネート法によってRNA分画を分離し，イオン交換カラムクロマトグラフィー法によって精製度をあげ，固相ハイブリダイゼーション法[4]により精製した．さらにアガロース電気泳動法により最終精製tRNAを得た．

**塩基配列決定**：Donis-Kellerの方法[7]にしたがって，RNA塩基配列を決定した．すなわち，RNaseT1(G特異的に切断)，RNaseU2(AとGを切断，Aにより特異的)，RNasePhyM(AとUに特異的)，RNaseCL3(Cに特異的)のような塩基特異的にRNAを切断する酵素で5'ラベルしたRNAを部分消化して塩基配列決定用の電気泳動ゲルで泳動した．これらの酵素では修飾塩基部位は切断されない．

**修飾塩基の同定**：Kuchinoらの方法[8]にしたがって修飾塩基を同定した．具体的には5'ラベルしたtRNAをアルカリ処理して部分切断し，電気泳動により一塩基ずつ異なる断片を分離し，5'ラベルを除去してから3'ラベルし，ヌクレオチドまで分解した．こうすることによって3'末端のヌクレオシドにのみラベルされることになり，二次元薄層クロマトにより塩基を同定した．

## 結　果

哺乳類ミトコンドリアtRNA$^{Leu(UUR)}$の塩基配列が初めて決定された．結果は図1のようであった．修飾塩基はm1G

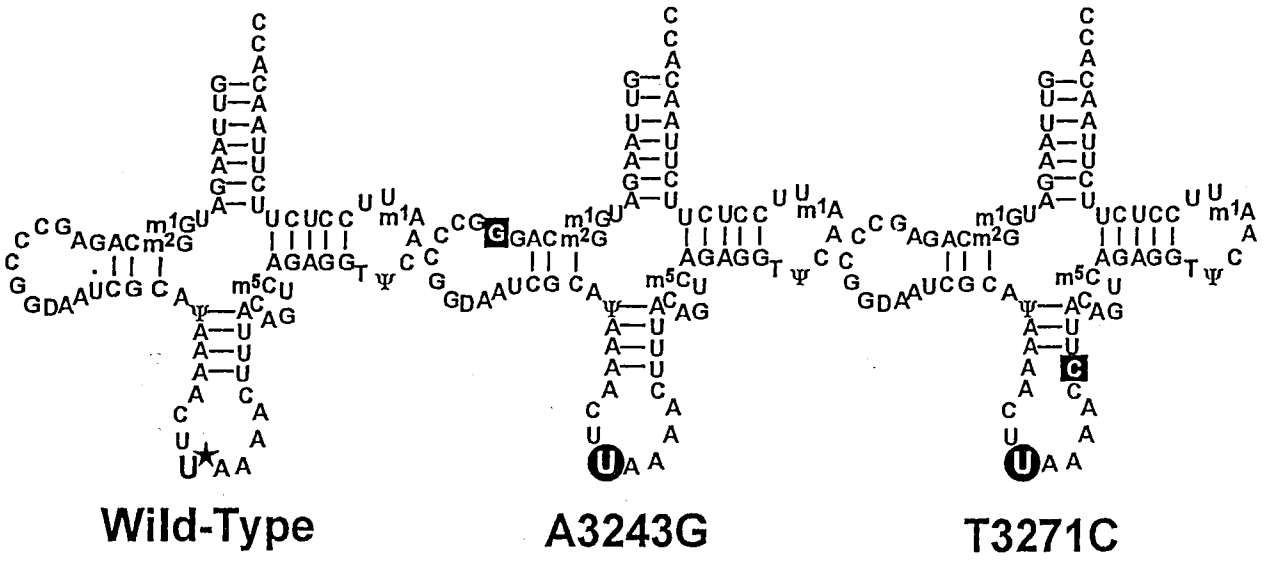



図1　ヒトミトコンドリアtRNALeu(UUR)の塩基配列およびA3243G,C3271T変異をもつtRNA$^{Leu(UUR)}$の塩基配列.

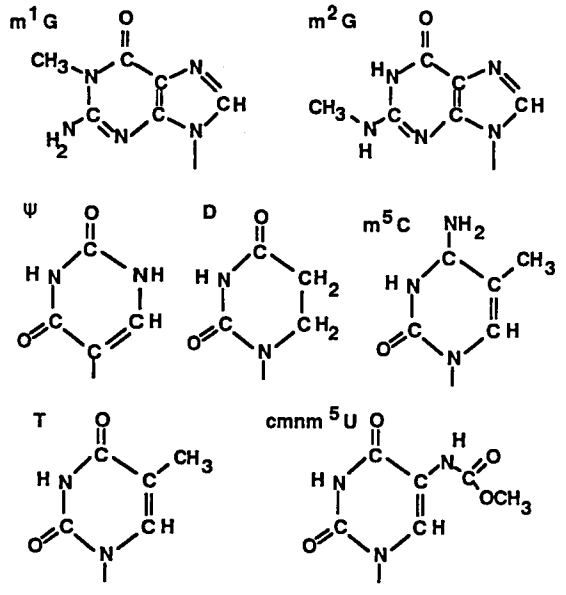



図2　ヒトミトコンドリアtRNA$^{Leu(UUR)}$に認められた修飾塩基の構造

(塩基番号3238),m2G(3239),D(3250),Ψ(3258),cm5nU(3265),m5C(3279),T(3286),Ψ(3287),m1A(3290)に認められた．ただし，cm5nUについては薄層クロマトによって移動度が一致しただけで，新規修飾Uである可能性も残されている．修飾塩基の構造式を図2に示す．

塩基番号3265はアンチコドンの第一文字にあたり，この塩基が修飾されていることによって，コドンの第3文字のAとGだけを識別していることが推定された．さらに，3243変異をもつサイブリドと3271変異をもつサイブリドを大量に培養し，変異tRNAを精製に同じように修飾塩基を含むtRNAの塩基配列を決定した．mtDNAの遺伝子変異によって対応するtRNAの塩基もAからG，CからUに変化した．遺伝子の変異によってtRNAの塩基が対応して変化することが初めて示された．さらに，3243変異，3271変異tRNAいづれもアンチコドンの第一文字に対応する3265の塩基は修飾されておらず，Uのままであった．

## 考　察

ヒトtRNA$^{Leu(UUR)}$ははじめて精製されその塩基構造が決定された．結果で述べたように9塩基が修飾されていた．さらに変異tRNA分子がはじめて精製され構造が決定された．正常tRNA遺伝子3243変異，3271変異とも共通にアンチコドンの第一文字の塩基が修飾されていなかった．この塩基はmRNAを識別するアンチコドンの一文字にあたり，tRNAがmRNAを識別するのに多いに影響を及ぼすはずである[9),10)]．ミトコンドリアtRNAは22種類のtRNAしか存在せず，一種類のtRNAで4つのコドンを識別するのはアンチコドンの一文字目がUであることが必要であることが判明している．この未修飾塩基UをもつtRNAが，mRNAの識別を誤り，蛋白合成の際にアミノ酸の取り込みが正常に機能せず，異常蛋白が生じて酵素活性が低下したり活性酸素を生じさせたりすることが示唆された．また，この発見は遺伝子を変化させなくても，tRNAの塩基の修飾を促進すれば，変異tRNAが正常tRNAにすることが可能であることを示している．今後，tRNAの塩基修飾の研究を進めることで，治療への道が開かれるものと期待される．

## 文　献

1) Schon EA, Bonilla E and DiMauro S : Mitochondrial DNA Mutations and Pathogenesis. J Bioener Biomemb 29 : 131-149, 1997.

2) Hayashi J-I, 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, 1994.

3) Hayashi J-I, Ohta S, Takai D, et al : Accumulation of mtDNA with a mutation at position 3271 in tRNA(Leu)(UUR) gene introduced from a MELAS patient to HeLa cells lacking mtDNA results in progressive inhibition of mitochondrial respiratory function. Biochem Biophy Res Commun. 197 : 1049-1055, 1993.

4) Tsurui H, Kumazawa Y, Sanokawa R, et al : Batchwise-purification of specific tRNAs by a solid-phase DNA probe. Anal Biochem 221 : 166-172, 1994.

5) Brule H, Holmes WM, Keith G, Giege R and Florentz C : Effect of a mutation in the anticodon of human mitochondrial tRNAPro on its post-transcriptional modification pattern. Nucleic Acids Res 26 : 537-43, 1998.

6) Helm M, Brule H, Degoul F, Cepanec C, Leroux JP, Giege R and Florentz C : The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA. Nucleic Acids Res 26 : 1636-1643, 1998.

7) Donis-Keller H and Phy M : an RNase activity specific for U and A residues useful in RNA sequence analysis. Nucleic Acids Res 8 : 3133-42, 1980.

8) Kuchino Y, Hanyu N and Nishimura S : Analysis of modified nucleosides and nucleotide sequence of tRNA. Meth Enzymol 155 : 379-396, 1987.

9) Andachi Y, Yamao F, Iwami M, Muto A, et al. Occurrence of unmodified adenine and uracil at the first position of anticodon in threonine tRNAs in Mycoplasma capricolum. Proc Nat Acad Sci USA 84:7398-7402, 1987.

10) Matsuyama S, Ueda T, Crain PF, et al : A novel wobble rule found in starfish mitochondria. Presence of 7-methylguanosine at the anticodon wobble position expands decoding capability of tRNA. J Biol Chem 273 : 3363-3368, 1998.

# Summary

# Summary of activities of working group on pathogenesis and treatment of muscular dystrophy and related disorders

by Akio Takagi, M.D.

**Duchenne/Becker muscular dystrophy** In some cases of Becker muscular dystrophy presenting predominant cardiac symptoms, dystrophin of brain type was amply expressed in the skeletal muscle, but not in the cardiac muscle. Bcl-2, a protecting protein against apoptosis was reduced in muscle of Duchenne muscular dystrophy. In relation to the arachidonate cascade, prostagrandin D synthetase was markedly expressed in mdx mouse muscle. In mdx mice, treatment with prednisolone reduced serum CK values, muscle necrosis and lymphocyte infiltration. However, muscle degeneration was nevertheless progressive during the treatment. Mini-dystrophin gene was successfully introduced into the brain of mdx mice. Concernig gene therapy, various promoters, vectors or adenoviral receptor gene were investigated.

**Limb-girdle muscular dystrophy** Cases with $\alpha$-sarcoglycanopathy (LGMD2D) or calpainopathy(LGMD2A) were collected and clinical features were summarized. Average age of loss of ambulation was 13 years for LGMD2D and 38 years for LGMD2A. Lobulated muscle fibers were more prominent in LGMD2A. In a family with very mild form of LGMD, mis-sense mutation of laminin $\beta$ 1 chain was discovered.

**Fukuyama congenital muscular dystrophy** A new gene for this disease was cloned, which was located in 9q31. A founder mutation was a retropozonal insertion of 3kb, which markedly reduced mRNA level. The responsible protein was 53.7kDa and named "fukutin". So far, function and localization of fukutin is not clear. In another research, 180kDa extracellular matrical protein was lost in the skeletal muscle, brain, kidney, liver and lung of this disease. Its relation to fukutin is under study.

**Distal myopathy with rimmed vacuoles** The genetic locus was 9p13 and the same with hereditary inclusion body myopathy of Iranian jewish people. The responsible gene was not identified yet.

**Myotonic dystrophy** In normal controls, MDPK protein was located in the terminal cisterna of sarcoplasmic reticulum(SR), corbular and junctional SR of heart and endoplasmic reticulum of brain. Due to the elongation of (CTG)n repeat, mRNA was accumulated in nuclei and amount of DMPK was reduced. Expression of neighboring genes (MDAHP, MDRP, ferritin L chain) was also affected. Myotonic discharges in vitro of mdx mouse muscle or experimental myotonia model were corrected by dehydroepiandrosterone sulfate.

**Mitochondrial encephalomyopathy** In an autopsy case with MERFF, population of mutated mitochondria was about 80% in all the organs and tissues examined. But extent of pathological changes was not the same among these tissues irrespective of the constant heteroplasmy. Mitochondrial DNA type was classed to A and C, according to the 5178th base. In the type A, incidence of mitochondrial disease was much less and longevity of life was more marked. In treatment of MELAS, sodium dichloroacetate was partly effective, but difficulty of hearing and abnormal EEG did not respond to the drug.

**Facioscapulohumeral muscular dystrophy** DNA diagnosis by the southern blot method was applicable in most cases. The responsible gene is not identified yet. In cases with extreme shortening of 4q35~qter, epilepsy or mental retardation was associated with the disease.

**Oculopharyngeal muscular dystrophy** In japanese families with the disease, (GCG)n of PABP2 repeated 10 or 11 times, in comparison to controls of 6 times. The haplotype of these families was different from French canadian cases, suggesting a seperate origin of mutation.

**Others** In a form of congenital myopathy, mutation of gene of integrin $\alpha$ 7 was discovered. Genes with elongated (CTG)n repeats were injected into nuclei of zenopas ovum and processing of RNA was analyzed. Oxygen monitoring by near infrared spectroscopy was apllied to various metabolic muscle diseases.

# 平成8～10年度研究班員名簿

# 筋ジストロフィー及び関連疾患の臨床病態と治療法に関する研究
## 平成8～10年度　高木班　名簿

| 区分 | 氏名 | 所属施設名<br>所在地 | 所属における地位 | 連絡の際の電話 |
|---|---|---|---|---|
| 主任 | 高木昭夫 | 大蔵省診療所<br>〒100-8940　東京都千代田区霞が関3-1-1 | 所長 | 03-3581-4111<br>(内2973) |
| 幹事 | 内野誠 | 熊本大学医学部附属病院神経内科<br>〒860-0811　熊本県熊本市本荘1-1-1 | 教授 | 096-373-5890 |
| 監事 | 岡田伸太郎 | 大阪大学医学部小児科<br>〒565-0871　大阪府吹田市山田丘2-2 | 教授 | 06-6879-3932 |
| 幹事 | 川井尚臣 | 高松市民病院<br>〒760-8538　香川県高松市宮脇町2-36-1 | 院長 | 087-834-2181 |
| 〃 | 清水輝夫 | 帝京大学医学部神経内科<br>〒173-8605　東京都板橋区加賀2-11-1 | 教授 | 03-3964-1211<br>(内1910) |
| 〃 | 若山吉弘 | 昭和大学藤が丘病院神経内科<br>〒227-0043　神奈川県横浜市青葉区藤が丘1-30 | 教授 | 045-974-6269 |
| 運営幹事 | 荒畑喜一 | 国立精神・神経センター神経研究所<br>〒187-8502　東京都小平市小川東町4-1-1 | 部長 | 042-341-2711<br>(内5111) |
| 分担 | 池田修一<br>(平成8～9年) | 信州大学医学部神経内科<br>〒390-8621　長野県松本市旭3-1-1 | 講師 | 0263-37-2673 |
| 〃 | 吉田邦広<br>(平成10年) | 信州大学医学部神経内科<br>〒390-8621　長野県松本市旭3-1-1 | 助手 | 0263-37-2673 |
| 〃 | 石浦章一 | 東京大学大学院総合文化研究科<br>〒153-8902　東京都目黒区駒場3-8-1 | 教授 | 03-5454-6739 |
| 〃 | 太田成男 | 日本医科大学老人病研究所<br>〒211-8553　神奈川県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<br>〒890-8520　鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 | 教授 | 099-275-5330 |
| 〃 | 梶龍兒 | 京都大学大学院医学研究科<br>〒606-8507　京都府京都市左京区聖護院川原町54 | 講師 | 075-751-3772 |
| 〃 | 栗原照幸 | 東邦大学医学部第4内科<br>〒153-8515　東京都目黒区大橋2-17-6 | 教授 | 03-3468-1251<br>(内2322) |
| 〃 | 後藤雄一<br>(平成8～9年) | 国立精神・神経センター神経研究所<br>〒187-8502　東京都小平市小川東町4-1-1 | 室長 | 042-341-2711<br>(内5214) |
| 〃 | 加茂功<br>(平成10年) | 国立精神・神経センター神経研究所<br>〒187-8502　東京都小平市小川東町4-1-1 | 室長 | 042-341-2711<br>(内5214) |
| 〃 | 小林高義 | 東京医科歯科大学医学部神経内科<br>〒113-8510　東京都文京区湯島1-5-45 | 講師 | 03-5803-5235 |
| 〃 | 木南英紀 | 順天堂大学医学部第一生化学<br>〒113-8421　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<br>〒162-8666　東京都新宿区河田町8-1 | 助教授 | 03-3353-8111<br>(内31230) |
| 〃 | 斎藤深美子 | 東京医科歯科大学難治疾患研究所<br>〒113-8510　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4内科<br>〒480-1103　愛知県愛知郡長久手町岩作雁又21 | 助教授 | 0561-62-3311<br>(内2176) |

| 区　分 | 氏　　名 | 所　属　施　設　名<br>所　　在　　地 | 所属における地位 | 連絡の際の電話 |
|---|---|---|---|---|
| 分　担 | 塩　川　光一郎 | 東京大学大学院理学系研究科<br>〒113-0033　東京都文京区本郷7-3-1 | 教　授 | 03-3812-2111<br>(内4431) |
| 〃 | 庄　司　進　一 | 筑波大学臨床医学系神経内科<br>〒305-8575　茨城県つくば市天王台1-1-1 | 教　授 | 0298-53-3223 |
| 〃 | 祖父江　　元<br>(平成8～9年) | 名古屋大学医学部神経内科<br>〒466-8550　愛知県名古屋市昭和区鶴舞町65 | 教　授 | 052-744-2111<br>(内2387) |
| 〃 | 永　松　正　明<br>(平成10年) | 名古屋大学医学部神経内科<br>〒466-8550　愛知県名古屋市昭和区鶴舞町65 | 講　師 | 052-744-2111<br>(内2387) |
| 〃 | 高　守　正　治 | 金沢大学医学部神経内科<br>〒920-8641　石川県金沢市宝町13-1 | 教　授 | 076-265-2290 |
| 〃 | 田　代　邦　雄 | 北海道大学医学部神経内科<br>〒060-8638　北海道札幌市北区北14条西5丁目 | 教　授 | 011-716-1161<br>(内6027) |
| 〃 | 田　中　恵　子 | 新潟大学医学部附属病院神経内科<br>〒951-8585　新潟県新潟市旭町通1番町754 | 助　手 | 025-227-0666 |
| 〃 | 田　中　雅　嗣 | 岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部<br>〒505-0116　岐阜県可児郡御嵩町八木記念パーク | 部　長 | 0574-68-0073 |
| 〃 | 戸　田　達　史 | 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター<br>〒108-8639　東京都港区白金台4-6-1 | 助教授 | 03-5449-5237 |
| 〃 | 中　野　今　治 | 自治医科大学神経内科<br>〒329-0498　栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1 | 教　授 | 0285-58-7351 |
| 〃 | 福　原　信　義 | 国立療養所犀潟病院<br>〒949-3193　新潟県中頸城郡大潟町犀潟468-1 | 副院長 | 0255-34-3131<br>(内601) |
| 〃 | 小　林　卓　郎<br>(平成8年) | 九州大学医学部神経内科<br>〒812-8582　福岡県福岡市東区馬出3-1-1 | 教　授 | 092-642-5337 |
| 〃 | 古　谷　博　和<br>(平成8～9年) | 九州大学医学部神経内科<br>〒812-8582　福岡県福岡市東区馬出3-1-1 | 助　手 | 092-642-5337 |
| 〃 | 吉　良　潤　一<br>(平成10年) | 九州大学医学部神経内科<br>〒812-8582　福岡県福岡市東区馬出3-1-1 | 教　授 | 092-642-5337 |
| 〃 | 宝　来　　聰 | 総合研究大学院先導科学研究科<br>〒240-0193　神奈川県三浦郡葉山町湘南国際村 | 教　授 | 0468-58-1552 |
| 〃 | 松　原　四　郎 | 東京都立神経病院神経内科<br>〒183-0042　東京都府中市武蔵台2-6-1 | 部　長 | 042-323-5110<br>(内3462) |
| 〃 | 桃　井　真里子 | 自治医科大学小児科<br>〒329-0498　栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1 | 教　授 | 0285-58-7365 |
| 〃 | 吉　田　瑞　子<br>(平成8～9年) | 国立精神・神経センター神経研究所<br>〒187-8502　東京都小平市小川東町4-1-1 | 室　長 | 042-341-2711<br>(内5146) |
| 〃 | 吉　野　　英<br>(平成8～9年) | 国立精神・神経センター国府台病院神経内科<br>〒272-8516　千葉県市川市国府台1-7-1 | 医　長 | 0473-72-1858 |
| 〃 | 依　藤　史　郎 | 大阪大学医学部保健学科<br>〒565-0871　大阪府吹田市山田丘1-7 | 教　授 | 06-6879-2583 |
| 〃 | 遠　藤　玉　夫 | 東京都老人総合研究所糖鎖生物部門<br>〒173-0015　東京都板橋区栄町35-2 | 研究室長 | 03-3964-3241<br>(内3080) |
| 〃 | 鈴　木　ゆ　め<br>(平成10年) | 横浜市立大学医学部附属病院神経内科<br>〒236-0004　神奈川県横浜市金沢区福浦3-9 | 講　師 | 045-787-2800<br>(内2725) |
| | 谷　池　雅　子<br>(平成10年) | 大阪大学医学部小児科<br>〒565-0871　大阪府吹田市山田丘2-2 | 助　手 | 06-6879-3932 |

| 区　分 | 氏　　名 | 所　属　施　設　名<br>所　　在　　地 | 所属における地位 | 連絡の際の電話 |
|---|---|---|---|---|
| 分　担 | 中　瀬　浩　史<br>(平成10年) | 虎の門病院神経内科<br>〒105-8470　東京都港区虎ノ門2-2-2 | 部　長 | 03-3588-1111<br>(内2016) |
| 顧　問 | 荒　木　淑　郎 | 熊本大学<br>〒860-0811　熊本県熊本市本荘1-1-1 | 名誉教授 | 096-344-2111 |
| 〃 | 宇尾野　公　義 | 国立静岡病院<br>〒420-0846　静岡県静岡市城東町24-1 | 名誉院長 | 0542-45-0101 |
| 〃 | 佐　藤　　猛 | 国立精神・神経センター国府台病院神経内科<br>〒272-8516　千葉県市川市国府台1-7-1 | 名誉院長 | 0473-72-3501<br>(内2111) |
| 〃 | 杉　田　秀　夫 | 国立精神・神経センター<br>〒187-8502　東京都小平市小川東町4-1-1 | 名誉総長 | 042-341-2711 |
| 〃 | 垂　井　清一郎 | 国家公務員共済組合連合会 大手前病院<br>〒540-0008　大阪府大阪市中央区大手前1-5-34 | 院　長 | 06-6941-0484 |
| 〃 | 寺　尾　寿　夫 | 北東京寿栄園<br>〒173-0003　東京都板橋区加賀2-1-1 | 園　長 | 03-3579-0661 |
| 〃 | 豊　倉　康　夫 | 東京都老人医療センター<br>〒173-0015　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<br>〒770-0042　徳島県徳島市蔵本町3-18 | 名誉教授 | 0886-31-3111 |