

厚生省「精神・神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と  
治療法開発に関する研究

荒木班

平成3年度研究報告書

平成4年3月(1992年)

## 研究報告書の作成にあたって

平成3年は、本研究班発足以来第2年目に当る。初年度の本研究班の研究成果は、評価委員会において高い評価を受けたとの知らせを聞きおよび、班長として誠に喜びに耐えない。この機会をかりて研究班員の各位に心から感謝を申し上げたい。

本研究班の第2年目の班会議は、平成3年12月6日(金)～7日(土)の2日間、東京 全共連ビルで行われた。すでに本研究班の発足時にかかげた、5つの基本戦略、すなわち、1) geneの構造上の欠陥(defect)と変異の有無、2) 遺伝子から産生されるprotein productの正常と異常、3) 細胞障害の病態生理機構、4) 臨床上のphenotype、および5) phenotypeに影響を与える治療法の開発、に向かっての努力がなされ、実りある成果が発表された。

筋ジストロフィーでは、ジストロフィン欠失部位と臨床像との対比、mdxを用いての筋の壊死、再生機構ならびに分解酵素の役割、dantrolene sodiumを用いた治療効果と、myoblastの移植の検討などについての報告がなされた。ミトコンドリア脳筋症では、変異ミトコンドリアDNAの解析と臨床的多様性、およびMERRFやMELASの組織障害機構などが検討された。以上の2年度の研究成果は、初年度と比較して目標に向かって一段と掘り下げる試みがなされたという印象を受けた。

本研究班としては、今後とも遺伝子、蛋白異常、細胞障害の病態生理ならびに臨床との対比を検討し、終局的には遺伝子治療を含めた治療法の開発を求めて、最大限の努力を続けて行きたいと希望している。班員各位の一層の御精進を御願ひしたい。

おわりに、本研究に対し、終始懇切な御指導を賜った国立精神・神経センターの里吉榮二郎総長、杉田秀夫所長および事務局の方々、また厚生省保健医療局国立療養所の方々に深甚の謝意を表す。また日本筋ジストロフィー協会、河端静子氏の御支援に感謝する。

平成4年3月

〈班長〉 荒 木 淑 郎

## 目 次

平成3年度総括研究報告	7
平成3年度総合班会議研究報告抄録	19
分担研究報告	29
I. 臨床・病理	37
II. ジストロフィン (No. 1)	65
III. シストロフィン (No. 2)	85
IV. mdx マウス	99
V. 遺伝子・生化学	127
VI. ミトコンドリア脳筋症 (No. 1)	167
VII. ミトコンドリア脳筋症 (No. 2)	227
平成3年度研究班名簿	263

平成 3 年度

総括研究報告

# 総括研究報告

主任研究者 荒木 淑郎

## 研究目標

本研究班の研究目標は、“筋ジストロフィーおよび関連疾患を対象として、成因の解明と治療法の開発を行うこと”である。関連疾患として、本班としては、初年度に引きつづき、とくにミトコンドリア脳筋症をとりあげていくことにした。初年度（平成2年）の研究班発足以来、班の構成は、班長のほか、37名の班員と、3名の顧問、計41名である。

第2年目の研究戦略は、次のテーマに焦点をしばった。

### I 筋ジストロフィー

- 1 ジストロフィン
- 2 遺伝子と生化学
- 3 mdx マウス
- 4 治療

### II ミトコンドリア脳筋症

## 研究成果

### I 筋ジストロフィー

#### 1 筋ジストロフィーとジストロフィン

ジストロフィンは、3,685個のアミノ酸配列を有し、大きさ427kdの巨大蛋白質で、4つのdomainを有し、全sarcolemmal proteinの1～5%、全細胞蛋白質の0.01%を占めている。plasma membraneの内側に対してintramembranous glycoproteinを介して強く密着しており、機能的には、骨格筋線維の表面膜に対して構造上安全性を保つための細胞骨格蛋白質の役目をなしている。このジストロフィン蛋白質は、筋ジストロフィーの各病型において検討が加えられ、すでに初年度において各病型での発現様式は明らかにされた。

2年目の研究を紹介する。

- 1) 齊藤、池谷ら（東女医大小児科）は、Becker型筋ジストロフィー（BMD）

2例につき分子遺伝学的検討を行い、リンパ球由来のDNAで、exon45~49の欠失をもつ症例は、exon45~47の欠失をもつ症例と比較して、筋肉痛の訴えが著明であることを認めている。

2) 後藤, 波多江ら(九大神経内科)は、運動時筋痛と高CK血症を呈する症例の生検筋で、ジストロフィン含量の低下を認め、さらに末梢白血球のDNAを分析し、ジストロフィン exon45を含む部分の欠失を認めている。

3) 内野ら(国立療養所再春荘神経内科)は、低IQを示したDMD患者の剖検臓器について、ジストロフィンの発現様式をしらべた。また、16例のBMDの生検筋についても検討を加え、ジストロフィンは、DMDの脳で欠如しており、DMDの知能障害に、脳型ジストロフィンの異常が関与していることを示した。

4) 清水, 砂田ら(東大神経内科)は、7例のmyotubular myopathyの生検筋でジストロフィンの発現を検討し、7例とも約400kdの正常サイズのジストロフィンが発現していることを認めた。しかし生後1ヶ月の重症例では、少数のジストロフィン陰性線維が散在性にみられたと報告した。

5) 荒畑, 有川ら(国立精神・神経センター)は、ジストロフィン分子のC末端ドメインが保たれているにもかかわらず、非常に早期に重篤な臨床症状と経過を示した小児(2歳10ヶ月男)を報告した。ジストロフィンのN末端側の部分に対する抗体では、ジストロフィンは全く染色されず、今後、N末端側の臨床的重要性を見直す必要性をのべた。

6) 濱田, 塩坂ら(宮崎医大衛生学)は、ジストロフィンおよびそのファミリーに属するスベグトリン, アンキリンその他の膜固有蛋白質について、DMD赤血球膜を中心に、生理的機能を検討した。

7) 小林, 宮武ら(東京医歯大神経内科)は、ジストロフィンの局在と機能について検討し、ジストロフィンは、成熟骨格筋では、細胞膜直下でfilamentous networkを形成し、actin-like filamentと結合することを明らかにした。

## 2 筋ジストロフィーの遺伝子と生化学

1) 高守, 安川ら(金沢大神経内科)は、骨格筋特異的遺伝子発現に関するカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)について検討した。筋の決定, 分化因子としてMyoD1, Myogeninを、また筋特異的遺伝子として, CK, MLC1(ミオシン軽鎖1), MHC(ミオシン重鎖)をとりあげ、MyoD1とCKを除いてそ

の発現を証明した。遺伝子発現に CGRP は影響を与えないことを認めた。

2) 斉藤, 福山ら (東女医大小児科) は, DMD と BMD の遺伝子診断において, cDNA プローブを用いた Southern blot 法と PCR 法の結果を比較検討した。1 家系において, リンパ球由来 mRNA を用いた PCR により, 家系内の女性の保因者, 非保因者を明らかにした。

3) 荒畑ら (国立精神・神経センター) は, ジストロフィン関連遺伝のクローニングの重要性を考慮し, 遺伝子単離, degenerate PCR, サブクローニング, シークエンシングでの塩基配列の決定からコンピューター解析を試み, 144 個のクローニングを検索し,  $\alpha$ -アクチニン,  $\beta$ -スペクトリンの他に 17 個の不明のシークエンスを見出している。

4) 川井, 三ツ井ら (徳島大第一内科) は, DMD, ALS および非神経筋疾患患者を対象として, ミオグロビン (Mb)mRNA の局在と定量について検討した。MbmRNA の発現部位は病変にかかわらず大差はなく, MbmRNA 量は DMD 筋では高度萎縮筋以外は増加しており, Mb の生成を促進し細胞代謝障害を少なくしているとの所見が認められた。

5) 庄司ら (信州大第三内科) は, 動脈結紮による筋萎縮は, 速筋で強く, 湿重量当りの glucose uptake は, 速筋と遅筋とでは異なり, 速筋においてのみ有意な増加がみられた。

6) 木南ら (順大第一生化学) は, 筋細胞膜の変性・壊死に伴うリソゾームプロテアーゼの増加は, 筋細胞内の自食作用—リソゾーム内蛋白分解の異常に基づく場合と, 浸潤してきたマクロファージ由来のプロテアーゼによる場合があることに着目して検討し, 今回は, 細胞成分を取り囲みながら形成されるオートファゴゾーム膜は ER 由来であることを報告した。

7) 後藤, 笹ヶ迫ら (九大神経内科) は, 実験的に壊死筋を作成し, その再生の過程で, 塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) が, どのように発現されるかを, 免疫組織染色を用いて検討した。その結果, 筋壊死が強く, 細胞浸潤の著しい段階で, bFGF が局所時に増加している所見を認めた。これらは endomysium 中に貯蔵されている他, 浸潤した貪食細胞や活性化した筋衛星細胞に由来する可能性が示唆された。

8) 小林, 亀田ら (東京医歯大神経内科) は, ヒト成人骨格筋衛星細胞由来の培養筋細胞において, 神経支配によるミオシン重鎖 (MHC) isoform に対する



影響を検討し、adult slow MHC isoform の発現に神経支配の重要な役割を明らかにした。

9) 堀ら (東京都神経科学総合研神経生化学) は骨格筋筋原線維の C 蛋白質分解酵素の局在についてしらべ、骨格筋に特異的に存在していることを明らかにした。C 蛋白質は、骨格筋の AL 帯にあり、actin と myosin の間に介在しており、この蛋白質の分解がおこると、筋原線維の構造の安定性が弱まり、崩壊死へ進むとの見解を述べた。

10) 杉村、伊藤ら (名大神経内科) は、筋緊張性ジストロフィー (MyD) の IgG の糖鎖構造についてしらべ、MyD の血清 IgG の低下は、ガラクトース転移酵素の機能不全による糖鎖構造の変化が関与していることを報告した。

### 3 mdx を用いた病態の検討

mdx mice は、1984年に開発され、ジストロフィン遺伝子に点変異があり、exon 25での stop codon をおこすことが明らかにされている。またジストロフィン は、骨格筋線維と心筋細胞には欠失しており、ヒトの DMD と異なり、筋線維に再生像がみられ、筋壊死に対し再生線維の抵抗性がみられている。

本研究班の病態に関する研究は少ない。

1) 田辺、水野ら (東京都立神経病院神経内科) は、運動負荷と筋変性との関係をしらべ、mdx マウスでは、運動自体が筋変性を促進することを見出した。

2) 栗原、岸ら (東邦大第四内科) は、mdx を用いて電氣的病態と薬物治療、筋活動電位の分析とミオトニーの数理解析を行った。ヒトと先天性のヤギのミオトニーの発現には Na channel 異常や Cl conductance の低下など多くの要因の関与があることを報告した。

3) 吉田ら (国立精神・神経センター) は、mdx マウス胎仔骨格筋の膜電位依存性カルシウムチャンネルについてしらべ、カルシウムイオンが筋細胞内に流入するにあたり、カルシウムが徐々に蓄積する結果、筋細胞の壊死がおこるといふ考えを明らかにした。

4) 若山ら (昭和大藤が丘病院神経内科) は、抗ジストロフィン抗体修飾骨格筋標本について QDR (quick freeze, deep etch. rotary shadow) 法による replica 膜を作製し、ジストロフィン分子を観察した。細胞膜内表面にはビオチン化抗体で修飾されたジストロフィン分子の存在が電顕で確認された。

## 4 治 療

最近では、ジストロフィー筋線維内へ正常ジストロフィン遺伝子のコピーを導入する試みが行われている。その方法は myoblast transfer と gene transfer である。また corticosteroid が試みられている。わが国では、gene therapy はまだ行われていない。mdx マウスを用いて、dantrolene sodium を投与した実験的治療と正常 myoblast の注射に関する 2 つの発表があった。

1) 高木ら (虎の門病院神経内科) は、dantrolene sodium の効果について報告した。Dantrolene sodium には、骨格筋の興奮・収縮連関に直接作用して収縮力を減弱させる作用が認められている。Dantrolene sodium を mdx マウスに投与した結果、血清 CK 値と筋の組織変化は、投与群と非投与群との間に差はみられず、mdx 筋小胞体からの Ca イオン漏出亢進もおこらなかったことを述べた。

2) 寺尾ら (帝京大神経内科) は、正常 myoblast を mdx マウス筋に注射し、ジストロフィン陽性線維の数を目標に、ジストロフィー筋の正常化をしらべてきたが、今回は、拒絶反応を防ぐ目的で放射線処理を行った mdx マウスの長指伸筋に myoblast を注射し影響をしらべた。ジストロフィン陽性線維の出現率は、1 回注射群で 2.0%、3 回注射群で 2.9% となり、若干の増加が認められた。

## II ミトコンドリア脳筋症

最近、ミトコンドリア遺伝子の異常によるミトコンドリア脳筋症の研究は、めざましい進展をみせている。初年度の研究成果で示された如く、本研究班の班員によって MERRF では tRNA<sup>Lys</sup>(8344)、および MELAS では tRNA<sup>Leu</sup>(3243) の点突然変異が発見されたことは、国際的な業績として高く評価をうけている。本年度は、ミトコンドリア脳筋症に関して、次の如く活発な研究活動がみられた。

1) 福原ら (国立療養所犀潟病院神経内科) は、MELAS と糖尿病の合併について検討し、KSS より合併頻度は少ないが、女性で、10~30 歳台の発症が多く、原因としてインスリン分泌低下の可能性をのべた。

2) 福原ら (同上) は、筋生検でミトコンドリア異常を示さない MERRF の症例を検討した結果、MERRF には、筋萎縮が末期まで明らかでない例、ragged-red fiber のない例、胸鎖乳突筋や肩甲帯に筋萎縮のつよい例があることを認

め、mtDNA の分析なくしては、MERRF を否定できないものがあることを報告した。

3) 後藤、松岡ら (国立精神・神経センター) は、ミトコンドリア脳筋症における血管病変として SSV (strongly SDH-reactive blood vessels) の有無をしらべ、MERRF では高頻度に SSV が存在し、また同じ SSV でも、MELAS と MERRF とでは、その CCO (cytochrom *c* oxidase) 活性が異なることを明らかにした。

4) 田中ら (新潟大神経内科) は、MERRF の選択的な組織障害の機構を明らかにするため、組織の障害程度と電子伝達系酵素各 complex の発現比および変異遺伝子の存在比との相関をしらべた。結果は、いずれも相関は認められず、本症の組織障害は変異 mtDNA の多寡、組織のエネルギー代謝の高低のみでは説明できないと報告した。

5) 垂井ら (大手前病院) は、ミトコンドリア脳筋症について、筋運動時のプリン・尿酸代謝を分析した結果、運動時に筋プリン体の分解が亢進し、血中ヒポキサンチンが著増することを認めた。このことより、ミトコンドリア脳筋症では、運動筋にエネルギー危機が生じ、筋原性高尿酸血症が発現することが示唆された。

6) 佐橋ら (愛知医大第四内科) は、肢帯型症候群を呈したミトコンドリアミオパチーの 1 家系についてしらべた。生検筋に母子ともにミトコンドリア異常を認め、mtDNA 解析では A → G の塩基変異 mtDNA を確認し、塩基番号 3,243 の点変異を認めた。

7) 黒田ら (徳島大小児科) は、ミトコンドリア脳筋症の病因として、PDH (ピルビン酸脱水酵素) 複合体の異常が注目されているが、先天性高乳酸血症を呈した女兒に、PDH 複合体活性の著明な低下を認めたが、培養リンパ球様細胞では活性が正常を示したという興味ある 1 例について、遺伝子変異、変異遺伝子の発現度、両親での変異遺伝子の有無について検討した。

8) 森ら (熊本大学遺伝医学) は、ミトコンドリア形成におけるサイトゾル因子の役割について検討した。ミトコンドリアに存在する大部分の蛋白質は核遺伝子にコードされており、ミトコンドリア外部で合成された後、ミトコンドリア内部へ移行するが、この蛋白質のミトコンドリア移行の障害についてしらべた。実験系として、尿素サイクル酵素の 1 つであるオルニチントランスカルバ

ミラーゼ (OTC) の前駆体を大腸菌で大量に精製し、これを単離ミトコンドリアに取りこませる方法で、このトランスポートに、サイトゾールに存在する蛋白質因子の添加が必要であることを報告した。

9) 杉村, 大野ら (名大神経内科) は、ヒトミトコンドリア DNA の D-loop 領域における新しい調節因子 (Mt5因子) について報告した。ヒト mtDNA には、1,122bp よりなる非翻訳領域があり、mtDNA 発現調節に関わる若干の因子があることが知られている。今回の研究は、コントロール7例と各種疾患11例より DNA を単離し、直接法により非翻訳領域の塩基配列を決定した。Mt5因子と命名される領域は、塩基多様性の高い領域に存在しながら、313例で高度に保存されており重要な因子と考えられた。

10) 太田ら (自治医大第一生化学) は CPEO の大欠失と MELAS の点変異によって生じる mt 蛋白質合成を比較検討した。変異の種類によって蛋白質合成低下がみられることを認め、臨床的特徴の発現の違いに関与する可能性を示した。

11) 小澤, 田中ら (名大第二生化学) は、ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア遺伝子変異について報告した。MELAS 症候群の多くに、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) 遺伝子領域の塩基番号3243に A → G の塩基転位が発見されているが、この3243の変異をヘテロプラズミーの状態で有する患者において、臨床症状が多彩であることを明らかにした。

12) 荒木, 箕田ら (熊本大学第一内科) はミトコンドリア脳筋症における変異ミトコンドリア DNA (mtDNA) の解析に当り、とくに *in situ* hybridization (ISH) を用いて検討した。MERRF と MELAS では、CPEO と同様に SDH 染色で濃染する筋線維において全 mtDNA 量は増加していた。MELAS では、SSV を示す血管で全 mtDNA の著明な増加がみられた。また電顕レベルでの ISH は工夫によっては今後の有力な武器になる可能性を示唆した。

13) 宝来ら (国立遺伝研) は、多数のミトコンドリア脳筋症患者において、mtDNA・D ループ領域の塩基配列を決定し、個々の配列間の塩基置換数に基づいた系統解析を行なった。それらの値より遺伝子系統樹を作成した。その結果、CPEO, MERRF および MELAS の患者は、複数でかつ相互に異なる母系系統に由来すると考えられ、MERRF と MELAS 患者群に特異的にみられる点突然変異は、日本人の集団のなかでも比較的最近独立に生じたものと考えられた。

14) 岡田, 乾ら (大阪大小児科) は、ミトコンドリア脳筋症を呈する10家系に

ついて現在既知の mtDNA 異常と臨床症状との関連を検討した結果、すべての家系において発端者に変異が heteroplasmy として認められた。サザンブロット法による末梢血由来の DNA における変異 mtDNA 量は、臨床症状との相関を示さなかった。今回の検討でミトコンドリア脳筋症の臨床症状は多様であり、末梢血の mtDNA 変異より臨床症状を推定するのは困難であることが明らかにされた。

15) 佐藤ら（順天大神経内科）は、ミトコンドリア脳筋症の病型と遺伝子異常について検討した。

16) 川井、横井ら（徳島大第一内科）は、常染色体優性遺伝を示す CPEO 家系の発端者について骨格筋 mtDNA の遺伝的解析を行った結果、異なる欠失を有する 2 種類の異常 mtDNA が認められた。ヒトの mtDNA は母親由来とされており、常染色体優性遺伝型を示す家系の症例で mtDNA に多重欠失が認められたことは、mtDNA の複製に関与する核遺伝子の異常によって欠失が生じる可能性が示唆された。

17) 納、中川ら（鹿児島大第三内科）は、ミトコンドリア脳筋症における mtDNA 異常と臨床症状の多様性との関連を検討した。ミトコンドリア脳筋症 45 例中 31 例に mtDNA の異常を認め、臨床病型と mtDNA 異常は一定の関連を示したが、なかには対応しない症例がみられた。

18) 桃井ら（自治医大小児科）は MELAS 病態の細胞学的解析を行うため MELAS 細胞系より、正常と変異ミトコンドリア遺伝子をクローニングし、定量法を確立した。この方法により融合細胞における変異遺伝子の増幅機構の解析が可能であることを報告した。

19) 西澤ら（自治医大神経内科）は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の 3,243 位に A → G 点変異を有する MELAS の母親例を 3 年 6 カ月間 follow up し、この間における正常と変異 mtDNA 量の変動の有無と臨床症状との相関について検討した。MELAS が発症するには、各組織において点変異を有する mtDNA 量が一定の threshold を上回る必要があると考えられた。

20) 水澤、白岩ら（筑波大神経内科）は、MELAS の 1 割検例について、各組織での tRNA (UUR) の塩基置換の分布をしらべた。検査された臓器すべてにおいて、正常 mtDNA と変異 mtDNA が混在していることを認めた。

21) 後藤、作田ら（国立精神・神経センター）は、臨床的に MELAS と診断さ

れたが、nt3,243点変異が認められなかった例を検討し、新たに tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 領域の点変異を認めた。nt3,271点と nt3,243点変異は、ともに MELAS の病因と考えられた。

### 平成3年度の研究成果の要約

筋ジストロフィーでは、ジストロフィン欠失部位と臨床像との対比、mdx を用いた筋の壊死と再生機構ならびに分解酵素の役割、dantrolene sodium を用いた治療効果と myoblast の移植の検討が行われ、ミトコンドリア脳筋症では、mtDNA 変異に関する臨床的（典型例，非典型例），病理学的（全身臓器での分布，ragged red fiber および cytochrome c oxidase 活性線維との関係など），あるいは生化学的（蛋白合成能，mtDNA ループ領域の解析など）検討がなされ、臨床的にも基礎的にも、一步踏みこんだ研究が多かった。

### 平成4年度（第3年目）の研究班の研究計画

平成4年度は、本研究班としては最終の年を迎えるので、筋ジストロフィーを中心に、遺伝子および蛋白異常と臨床との対比、筋障害の発生機構および、遺伝子治療を含めた治療法の開発へ向かって研究を進めたいと希望している。またミトコンドリア脳筋症に対する関心は高く、研究発表が多くなったが、mtDNA 変異と臨床像の解析、筋病変ならびに治療面においての一層の解析を期待したいと思う。

### B166（ダントロレン ナトリウム）に関する筋ジストロフィー治験計画について

1967年に Snyder らによって合成されたヒダントイン誘導体のダントロレン ナトリウムは、1980年以降、我国において臨床応用され、経口剤は種々の原因による痙性麻痺の治療に、また注射剤は、麻酔時における悪性高熱症に対するすぐれた治療薬として用いられている。一方、ダントロレン ナトリウムは、筋小胞体からの Ca<sup>2+</sup> の放出を抑制することから、筋ジストロフィーなどの筋疾患において Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇に伴う筋組織への破壊を軽減することが期待されている。実際、筋ジストロフィーの動物モデルである mdx マウスにおいて本剤は血清 CK 値を下げる事が報告され (Quinlan, et al : Muscle & Nerve 3 :

268—269, 1990), 小数の DMD 患者においても本剤が血清 CK 値を下げ, 本症の進行を遅延させるとの報告がなされている (Bertorini, et al: Muscle & Nerve 14: 503—507, 1991).

以上のことより, 本研究班でも, ダントロレン ナトリウムをとり上げ, 多施設共同により DMD, BMD および L-G 型 MD を対象として, 有効性および安全性を評価するための治験を行うこととなった。

治験総括者は荒木淑郎, 中央委員は田代邦雄 (北大), 木村淳 (京大), 西谷裕 (国立宇多野病院) 後藤幾生 (九大) が担当し, 事務局は京大医学部神経内科 (梶龍兒), これに依頼事務局は山之内製薬株式会社開発本部, 開発第二部, 第三室が担当することとなった。この研究は, 厚生省新薬開発研究委託費研究費を受けて行うこととなる。関係各位の御協力を御願いたい。

平成3年度厚生省精神・神経疾患研究委託費

「筋ジストロフィー」総合班会議

筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法に関する研究  
研究報告抄録



# Dystrophin のヒト臓器分布並びに Becker 型筋ジストロフィーにおける発現様式について

内野 誠\* 寺本 仁郎\* 直江 弘昭\*  
三池 輝久\*\* 岩下 宏\*\*\* 荒木 淑郎\*\*\*\*

(\*国立療養所再春荘病院神経内科, \*\*熊本大学医学部発達小児科,  
\*\*\*国立療養所筑後病院, \*\*\*\*熊本大学医学部第一内科)

骨格筋や心筋における dystrophin (“d”) の発現様式については、疾病の場合を含め、詳細に検討されているが、筋以外の臓器の “d” の発現状況については不明な点が多い。ヒト臓器特に脳における “d” の発現状況を明らかにするため、抗 “d” 抗体を用いて Western blot (Wb) 及び免疫染色による検索を行った。また BMD 生検筋の “d” の発現様式についても同様に検索を加え、PCR 分析結果と比較検討した。

## 対象, 方法

正常対照 4 例 (42~74 歳), 筋緊張性ジストロフィー 1 例 (54 歳), 及び IQ50 以下の知能障害を認めた DMD 1 例 (26 歳) の各剖検臓器 (骨格筋, 心筋, 大脳・小脳, 胃, 膀胱など) について, モノクロナール抗 “d” 抗体 (NOVO 社の DYS-1, 2, 3) を用いて Wb 及び免疫染色による分析を行った。BMD16 例 (14~53 歳) の生検筋についても同様に検索し, Chamberlain 及び Beggs の 19 領域での PCR 分析 (SRL) と比較検討を行った。

## 結 果

正常対照及び筋緊張性ジストロフィー例では DYS-1, 3 の Wb にて骨格筋, 心筋のみならず, 胃・膀胱などの平滑筋臓器, さらに脳においても明らかな “d” の発現が認められた。DYS-2 (C 末端抗体) では骨格筋や心筋では明らかであったが, 脳や平滑筋臓器では “d” の発現は不明瞭であった。免疫染色では骨格筋, 心筋はいずれの抗体でも表面膜に抗体の局在がみられたが, 脳においては DYS-3 では neuron の胞体が, DYS-1 では主に glia 系細胞が染色され, DYS-2 では脳には抗体の局在は明らかではなかった。平滑筋線維は Wb では “d” の発現が明らかでなかった DYS-2 を含め, 全ての抗体で表面膜に抗体の局在が認められた。

DMD においてはいずれの抗体を用いても Wb 上全臓器で “d” の発現はみられず, 免疫染色上も心筋の intercalated disc が一部染色される他は明らかな抗体の局在はみられなかった。一方 BMD においては通常の Wb では “d” の分子量に変化がなく, 含量のみ減少するものが多数を占めた (8/12) が, 泳動時間を大幅に延長することにより, 低分子化を示した。遺伝子解析では, PCR が実施できた 15 例中 8 例 (53.3%) に欠失を認めたが, Exon 1~3 ヶの欠失の短い例が多く, 4 ヶ以上の欠失例は 1 例のみであった。欠失を認めなかった 7 例中 5 例も泳動時間を延長することにより Wb 上極軽度ながら “d” の低分子化を認めた。

## 考 案

“d”の mRNA は骨格筋や心筋のみならず、平滑筋組織や脳にも含まれていることが既に明らかにされているが、著者らも1988年以来“d”が健常者の骨格筋、心筋のみならず、平滑筋組織、さらに脳にも存在することを報告してきた。今回のモノクローナル抗体による検索も基本的には60kd抗体、30kd抗体での成績と一致し、平滑筋組織や脳にも“d”の存在が認められた。一方 DMD では高率に IQ 異常が認められるが、今回の DMD 脳では“d”が欠如しており、DMD の知能障害に脳型“d”の異常が関与する可能性が示唆された。BMD の Wb 所見について Hoffman らは54例の分析を行い、分子量330kd から600kd と広い範囲にわたることを報告しているが、今回の16例の検索では比較的短い欠失が多く、低分子化も軽度のものが大半を占めた。本邦の BMD 例は欧米より欠失の短い症例が多いのか否かについては今後多数例での検討が必要である。

## 結 論

“d”は健常者の脳においても発現しており、DMD では欠如していた。このことは DMD の知能障害に脳型“d”の異常が関与している可能性があり、知能障害の程度により“d”の発現に違いがみられるか否かについて、今後症例を増して検討が必要である。BMD の多くは Wb にて低分子化を示し、いわゆる frame-shift 仮説で説明可能であったが、欠失の短い症例が多く、Wb の泳動条件に工夫が必要であった。

# 骨格筋細胞膜におけるジストロフィンの局在と超微形態

若山吉弘  
(昭和大学藤が丘病院神経内科)

ジストロフィンの光顕レベルにおける正常骨格筋線維周辺部の局在は、杉田、荒畑らによる最初の報告 (Proc Jpn Acad 64B : 37-39, 1988 ; Nature 333, 861-863, 1988) 以来、多数の報告がある。その電顕レベルの筋細胞膜における局在と超微形態についても我々の報告を含めいくつかの報告があるので現時点においてそれらを整理し紹介してみたい。

## 1. ジストロフィンの正常骨格筋細胞膜における局在について

免疫透過電顕的に Watkins ら (Nature 333 : 863-866, 1988) は筋細胞膜裏打ち構造と横管周辺に、Cullen ら (Proc Roy Soc Lond B 240 : 197-210, 1990), Samitt ら (Muscle & Nerve 13 : 493-500, 1990) や著者ら (Acta Neuropathol 80 : 618-623, 1990 ; 同82 : 178-184, 1991) は筋細胞膜裏打ち構造にジストロフィンの存在を証明した。また Samitt らは筋腱接合部にジストロフィン抗体反応が強いことを電顕的に証明した。これらは主にジストロフィンN端近辺に対する抗体を用いた結果であるが、rod domain など他の部位に対する抗体でも類似の結果が得られている。例えば Byers らは最近 rod domain の抗体を用い筋細胞膜裏打ち構造にはジストロフィンの存在を示しているが、横管部にはジストロフィンが見られなかったことを報告 (J Cell Biol 115 : 411-421, 1991) した。彼等は筋腱接合部や神経筋接合部をも免疫透過電顕的に観察しこの部にジストロフィン分子密度が高く、神経筋接合部シナプス後膜では谷の部分に多く分布していることを記載している。

## 2. ジストロフィンの超微形態

生の骨格筋を液体ヘリウムで急速凍結し切断後 deep etching rotary shadow 法にて replica 膜を作製し観察しても細胞膜関連細胞骨格には特に目立った特徴をもったものは見られなかった (Wakayama ら Acta Neuropathol 80 : 618-623, 1990)。従ってジストロフィン分子を観察同定するためにはジストロフィンを骨格筋細胞膜から分離精製し rotary shadow 法により shadowing をして電顕にて観察する方法 (Pons ら Proc Natl Acad Sci USA 87 : 7851-7855, 1990 ; Murayama ら Proc Jpn Acad 66B : 96-99, 1990) や骨格筋細胞を抗ジストロフィン抗体とそのビチオン化二次抗体 (小林ら筋ジス荒木班平成2年度報告書 pp90-95 ; Wakayama ら J Electron Microsc 40 : 143-145, 1991) 又は金コロイド標識二次抗体 (Wakayama ら Acta Neuropathol 82 : 178-184, 1991) で修飾しその急速凍結標本の切断後 deep etching rotary shadow 法による replica 膜を作製して観察する方法を用いなければならない。我々の抗ジストロフィン抗体修飾検体の本法による骨格筋細胞膜付近の観察では筋細胞膜を細胞外から観る面と細胞内から観る面に2大別され、どちらも筋細胞膜関連細胞骨格を観察可能であるが、細胞膜内表面の観察可能な面より容易であった。細胞膜内表面には抗ジストロフィン抗体とそのビチオン化二次抗体で修飾されたジストロフィン分子が存在していた。ジストロフィン分子のなかには5 nmの周期をもつ筋原線維最外層の actin fil-

ament と連絡するものもみられた。更に金コロイド法では筋細胞外から観ると10nm 金コロイドの付着した細胞骨格は筋細胞膜P面にすぐ隣接してみられたが、部分的にしか露出しておらず、筋細胞内から筋細胞膜内表面に付着している金コロイド付着細胞骨格をみるとその全容を観察するのがより容易であった。形態は種々の形の桿状構造物で、多くは一端が他端より細く端がやや拡大したものやしてないもの、ややcurveした桿状構造物など種々であった。この結果は他の報告とおおむね一致するが、細部ではなお微妙な違いがある。今後この点を更に検討し、またジストロフィンと他の細胞骨格分子との相互関係を検討して、ジストロフィンの機能の解明を進める必要があると考えられる。

# ダントロレンナトリウムによる筋ジストロフィー治療の 試み

木村 淳 梶 龍 兒  
秋口 一郎 濱野 利明  
(京都大学医学部神経内科)

近年 Duchenne 型をはじめとする筋ジストロフィー症の病因が遺伝子レベルで解明されてきたが、未だ有効な治療法を確立するに到っていない。Duchenne 型では dystrophin の欠乏が示されているが、その正確な病因論的な役割は明らかではなく、その欠乏がなくとも筋破壊が進行するとの見解もある (Fischbeck et al. Muscle Nerve, in press)。しかし、筋破壊の共通のメカニズムとしてカルシウムの細胞体内への異常な流入が関与していることが示唆されている (Turner et al. Nature 335 : 735, 1988)。細胞体内のカルシウム濃度の異常な上昇は永続的な筋収縮を引き起こし、組織学的に見られる Opaque Fiber などの所見を説明するものと考えられる。

Dantrolene Sodium は、sarcoplasmic membrane を安定化する作用を持つ抗痙縮剤で Duchenne 型筋ジストロフィー症やその動物モデルの dystrophic mouse で血清 CPK を有意に下げ作用があることが報告されている (Quinlain et al. Muscle Nerve 13 : 268, 1990 ; Bertorini et al. Muscle Nerve 14 : 503, 1991)。また本剤はステロイド剤のような長期連用時の重篤な副作用は知られていない。我々は、今回 FSH 型筋ジストロフィー 2 例、Limb-girdle 型筋ジストロフィー 3 例において、Dantrolene Sodium を 12 ヶ月以上投与し、その血清 CK 値と症状の進行に与える影響を検討した。

## 対象, 方法

19~39歳の男性 2 名、女性 3 名で筋生検および筋電図で診断のついた FSH 型 2 例および Limb-Girdle (L-G) 型 3 例において、投与前 1 年間の臨床症状を患者の申告により現時点で評価し、投与後 1 年間の症状と比較した。評価法は、平成元年度厚生省「筋ジストロフィー症の遺伝、疫学、臨床および治療開発に関する研究」報告書にもとずいた簡易機能評価スケールによったが患者の記憶がさだかでない項目は除外した。ダントロレンナトリウムは経口にて 25~50mg/日を 1 回~2 回にわけて投与した。CK 値の統計解析は本剤の投与量との相関性を Simple Regression 法 (Stat Works) で検討した。

## 結 果

5 例中 4 例で Dantrolene Sodium の投与量は血清 CK 値の変動に関与しない確立は 0.05 以下であり何らかの関与がある、即ち低下させることが示唆された。

臨床症状の進行に関しては、FSH 型 2 例では投与前後各 1 年間で上肢機能区分における評点に変化は見られなかった。L-G 型のうち 1 例において前 1 年間で障害度区分の 2a, 階段昇降可 (片手すり) の評価が a から b へ進行したが後 1 年間ではそれ以上の進行は見られていない。残りの 1 例でも前 1 年間で動作を分起立動作で手を使わずできたものが (b) できなくなった (c) が、後 1 年間では変化を見なかった。

#### 考察, 結論

以上, Dantrolene Sodium は筋ジストロフィー患者においてCK 値を低下させることが示唆された。臨床症状に関してはレトロスペクティブで症例数も少なく, 統計的に結論を出すことは出来ないが, L-G 型 2 例において, 進行がダントロレンナトリウム投与後に緩和になっている可能性が示唆され, 今後さらに症例を増やして検討する価値があるものと思われる。

# ミトコンドリア遺伝子変異と表現型

小澤 高 將 田 中 雅 嗣 大 野 欽 司

(名古屋大学医学部生化学第二講座)

ミトコンドリア (mt) 脳筋症患者で検出される mtDNA の変異は、主として点変異と欠失である。

ヒト mtDNA は全塩基配列の数%を使った制限酵素消化断片によって解析され、多くの多型が報告されていた。今回、我々が mt ミオパチーを含む30例の mtDNA 全周塩基配列を決定し翻訳領域を分析した結果、244ヶ所もの塩基置換が見いだされ、同義塩基置換 (65%) と同様に、アミノ酸置換を引き起こす非同義塩基置換 (35%) も高い頻度で生じており、この中には哺乳類の間で保存されているアミノ酸残基の置換を引き起こす変異も含まれていた。アミノ酸置換を伴う数多くの点変異がヒト個体相互に存在し、mtDNA 由来の蛋白サブユニットには、標準となるべき一次構造は存在しない。即ち、エネルギー産生系の構築は、一定のゆらぎの範囲に存在すると言える。典型的な mt 脳筋症患者にみられる塩基置換は個体あたり40~60ヶ所も存在する<sup>1)</sup>。これら塩基置換の相当部分は系統的に分岐しており一部は生理的なゆらぎの範囲と考えられるが、多くはその範囲を越え点変異として病理的なものである可能性が高い。これら患者 mtDNA はいずれも大小の欠失を持っており、点変異と欠失の複合が疾患病因と考えられる。

mt 内膜から発生する活性酸素は mtDNA 中の dG を 8-OH-dG へ変化させる。8-OH-dG は複製の際に他の塩基に誤読されることが確認されており、8-OH-dG の蓄積と点変異の蓄積とは互いに同義である。酵母では点変異の蓄積が遺伝子の欠失を引き起こす<sup>2)</sup>。mtDNA が同一鎖内で欠失を起こすためには、一本鎖の状態であることが必須である。欠失を起こす機構については、mtDNA の分子内組み換え、複製時における slipped mispairing は考え難く、持続的な一本鎖の状態における疑似組み換え、ないし再配列が妥当である。即ち、8-OH-dG が蓄積してミスマッチを起こし、部分的に二重鎖が破られ持続的な一本鎖の状態になり欠失を起こすと考えられる。

実際に横隔膜の mtDNA を分析してみると、65歳以上の高齢者では加齢ともなって8-OH-dG が急増し、それに伴って欠失が顕著になる<sup>3)</sup>。心筋においては、ATPase 6 遺伝子とD-ループ上の12塩基の順方向繰り返し配列の間で7.4kbの欠失がみられ、その頻度が加齢と共に増大することを老人心との関係で報告した<sup>4)</sup>。実際にこの欠失を定量してみると、60歳以下では全 mtDNA の0.1%程度であったものが、60歳台から急増し、80歳台で3%、90歳台で9%に達する<sup>5)</sup>。従って、加齢に伴う8-OH-dG の増加が、点変異の蓄積、遺伝子の欠失を引き起こし、加齢に伴う筋力低下の重要因子の一つであると考えられる。mt 脳筋症、特発性心筋症患者の骨格筋、心筋 mtDNA の全周塩基配列を決定したところ<sup>6)</sup>、これら患者組織では発病時にすでに多くの点変異の蓄積と大小の欠失が存在しており、組織局所で早発性加齢が進行していることを示している。

8-OH-dG は加齢とか母系遺伝された点変異の蓄積といった内部要因のみならず、毒物、薬物などの外部要因によってももたらされる。昨年、azidothymidine (AZT) を3~6ヶ月投与された15症例ものエイズ患者が典型的な mt ミオパチーになったことが報告された<sup>7)</sup>。そこで実験動物として組織呼吸量がヒトの10倍高いマウスを選び、患者使用量の1/10のAZTを投与したところ自発的運動実験で運動量が50%低下し4週間で強制運動も不能となり、ほどなく死亡するに至った。筋肉

mtDNA をマイクロ高速液体クロマト/質量分析計で分析すると総 dG の25%が8-OH-dG に変化していた<sup>8)</sup>。この大量の核酸酸化物の生成は AZT の構造, 投与期間からして mtDNA が AZT によって直接障害されたこと, それがマウスの運動障害, 死亡の直接原因であることは明らかである。エイズ患者の AZT 投与による mt ミオパチーの病因もこれで容易に説明できる。

これらの事実から, 毒物, 薬物といった外部要因, 加齢ないし遺伝された点変異といった内部要因による点変異の蓄積によって mt エネルギー産生系の構築が障害され, 活性酸素の産生を促し mtDNA 中の8-OH-dG が増大し, mtDNA が持続した一本鎖状態となり大小の欠失が生まれると考えられる。1細胞内に1コピーの核遺伝子と異なり, 総千コピー存在する mtDNA は, 変異した遺伝子の総量が一定の閾値を越すと機能の障害として顕在化する。個体発生の段階での細胞分裂に伴い, 卵細胞に遺伝した変異 mtDNA の偏在が生じ, 偏在した細胞から発生した組織ではある時期, 閾値を越え症状が顕在化して, mt 脳筋症, mt ミオパチー, 心筋症など組織特異的な表現型を呈する。

要約すると, mtDNA 変異が患者共通にみられ, それがその症状を説明でき, 動物実験でも再現されるので, 病因の3原則を満たしており, mtDNA 変異は疾患の結果ではなく原因であることは明らかである。従って mt ミオパチーなどの疾患群は“mt 遺伝子病 (mtDNA disease)”と言えよう。

#### 文 献

- 1) Ozawa T, Tanaka M, Ino H, Ohno K, Sano T, Wada Y, Yoneda M, Tanno Y, Miyatake T, Tanaka T, Itoyama S, Ikebe S, Kondo T and Mizuno Y: *Biochem Biophys Res Commun*, 176 : 938-946, 1991.
- 2) Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T and Tanaka M: *Lancet* i: 642-645, 1989.
- 3) Hayakawa M, Torii K, Sugiyama S, Tanaka M and Ozawa T: *Biochem Biophys Res Commun* 179 : 1023-1029, 1991.
- 4) Hattori K, Ozawa T, Kondo T, Mochizuki M, Tanaka M, Sugiyama S, Ito T, Satake T and Ozawa T: *Amer Heart J* 122 : 866-869, 1991.
- 5) Sugiyama S, Hattori K, Hayakawa M and Ozawa T: *Biochem Biophys Res Commun* 180 : 894-899, 1991.
- 6) Ozawa T, Tanaka M, Sugiyama S, Ino H, Ohno K, Hattori K, Ohbayashi T, Ito T, Deguchi H, Kawamura K, Nakane Y and Hashiba K: *Biochem Biophys Res Commun* 177 : 518-525, 1991.
- 7) Dalakas MC, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis JP, Cohen B and Griffin JL: *N Engl J Med* 322 : 1098-1105, 1990.
- 8) Hayakawa M, Ogawa T, Sugiyama S, Tanaka M and Ozawa T: *Biochem Biophys Res Commun* 176 : 87-93, 1991.



# 分 担 研 究 報 告

# 目 次

## I. 臨床・病理

- 1) 筋疾患の再生線維における true acetylcholinesterase 活性像について  
——Togo 法による検討結果—— .....39  
東京都立神経病院 田 邊 等
- 2) 限局性筋疾患の画像診断.....43  
信州大学医学部第三内科 庄 司 進 一
- 3) Rimmed vacuole を伴った筋症における生検筋カテプシン L の活性,  
局在に関する検討.....47  
昭和大学藤が丘病院神経内科 若 山 吉 弘
- 4) Rimmed vacuole myopathy における熱ショック蛋白 hsp72 の局在.....51  
東京大学医学部脳研神経内科 清 水 輝 夫
- 5) 亜性高熱, セントラルコア病などの骨格筋ライアノジンレセプター異常55  
虎の門病院神経内科 高 木 昭 夫
- 6) 筋疾患の治療効果について  
——運動負荷試験による Anaerobic Threshold の検討—— .....59  
北海道大学医学部神経内科 田 代 邦 雄
- 7) ダントロレンナトリウムによる筋ジストロフィー治療の試み  
——1年間の臨床経験——.....62  
京都大学医学部神経内科 木 村 淳

## II. ジストロフィン(No. 1)

- 8) Becker 型筋ジストロフィー 3 例の分子遺伝学的, 免疫学的検討 .....67  
東京女子医科大学小児科 斎 藤 加代子
- 9) ジストロフィン遺伝子欠失を伴い, 運動時筋痛, 高CK血症を呈した  
症例.....73  
九州大学医学部脳研神経内科 後 藤 幾 生
- 10) Myotubular myopathy におけるジストロフィン発現の免疫学的検討...76  
東京大学医学部脳研神経内科 清 水 輝 夫

