

厚生省「精神・神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー及び類縁疾患の  
病態と治療法に関する研究

高木 班

平成7年度研究報告書

平成8年3月（1996年）

# 総括研究報告

主任研究者 高木昭夫

## 1. 研究目標とその成果

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

## 2) DMD/BMD

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

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

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

### 3) 先天性筋ジストロフィー (CMD)

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

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

#### 4) FSH

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

#### 5) LG

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

#### 6) 三好型遠位筋ジストロフィー

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

#### 7) 遠位型ミオパチー (DMRV)

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

#### 8) 筋緊張性ジストロフィー (MYD)

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

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

## 9) ミトコンドリア脳筋症

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

## 2. 未解決の問題点と解決の見通し

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

## 目 次

### I. 臨床・分子病理学

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

### II. 臨床・分子遺伝学

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

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

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

## VIII. Adhalin欠損症

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

## IX. ミトコンドリア脳筋症

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

## X. 治療

52) プレドニゾンによる mdx マウスの実験的治療	205
虎の門病院神経内科 高木昭夫	
53) ジストロフィン欠損症 heterozygote の筋病理学的研究	208
東京都立神経病院 田邊 等	
54) mdx 骨格筋崩壊抑制の試み (治療)	211
国立精神・神経センター神経研究所 吉田瑞子	
55) mdx マウスに対する治療的研究: idebenone と glycyrrhizin の効果	213
東邦大学医学部第四内科 栗原照幸	
56) 筋ジストロフィーに対する Glycyrrhizine の効果について	217
北海道大学医学部神経内科 田代邦雄	
57) Duchenne 型筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の基礎的研究 一カチオン性脂質を用いた培養筋細胞への遺伝子導入	221
筑波大学臨床医学系神経内科 庄司進一	
58) ラット骨格筋における遺伝子直接導入法によるポリカチオン, ポリアニオンの影響に関する研究	224
金沢大学医学部神経内科 高守正治	
59) 筋ジストロフィーにおける接着分子の検討と遺伝子治療の 可能性に関する研究	227
大阪大学医学部小児科 岡田伸太郎	
60) IL-12p40 遺伝子導入による同種筋芽細胞移植拒絶抑制効果	229
国立精神神経センター国府台病院神経内科 佐藤 猛	
平成7年度研究班名簿	233

# I . 臨床・分子病理学

