

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ズでは、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、 $\alpha$  syntrophin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

$\alpha$ -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  $\beta$ 1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 retropon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の抗体作製は不成功であり、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。本症胎児の脳や小脳には、グリア境界膜-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。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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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 $\alpha 7$ 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  
—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— ..... 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  
—mdxマウスとの比較研究— ..... 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 —mdxマウスとの比較検討— ..... 43  
昭和大学藤が丘病院神経内科 若 山 吉 弘
- 9)  $\alpha$  Dystroglycan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) $\alpha$ -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 $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -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	
 <b>Ⅲ. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)</b>	
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	
 <b>Ⅳ. 福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)</b>	
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 齋藤 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 $\alpha$ 2 chainの検討 .....	101
東京女子医科大学小児科 齋藤 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 —特にglia limitans-基底膜複合体病変との関連について— .....	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 —胎児脳に基底膜欠損は存在するか— .....	112
東京女子医科大学小児科 齋藤 加代子	
29) 福山型筋ジストロフィー剖検脳gangliosid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	
 <b>V. ミオパチー(遠位型, インテグリン<math>\alpha</math>7欠損型, その他)</b>	
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 —臨床的, 免疫組織学, 遺伝学的検討— .....	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 $\alpha$ 7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
<b>VI. 眼咽頭筋ジストロフィー (OPMD)</b>	
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
<b>VII. 筋強直性ジストロフィー (DM)</b>	
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 齋藤 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	
 <b>VIII. ミトコンドリア異常症</b>	
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關係 .....	177
総合研究大学院大学先端科学研究 宝来 聡	
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 齋藤 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	
 <b>IX. 筋の発生・分化・再生，その他</b>	
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) ヒト骨格筋ー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, $\alpha$ sarcoglycan, $\alpha$ 1 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TNF $\alpha$ 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 class II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creatin 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 高木 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 龍児	
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樞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<sup>1)</sup>、伴性遺伝性免疫不全症<sup>2)</sup>、ミオチューブラーミオパチー<sup>3)</sup>、血友病A<sup>4)</sup>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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>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染色体に適用することに成功した<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>、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

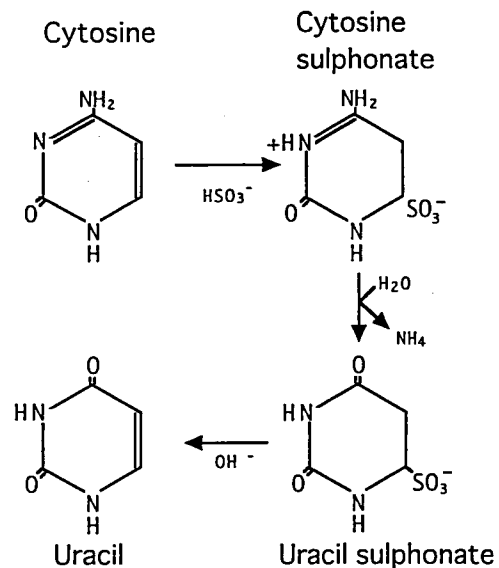


図1 Bisulfite treatment. Sodium bisulfite ( $\text{NaHSO}_4/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )はアルカリ変性したDNAのシトシンをシトシン硫酸をへてウラシル硫酸に化学変化させる。水酸化ナトリウム処理により最終的にはウラシルに変わる。

Original sequence	Bisulfite treatment	after PCR
CCG CAT	→ UUG UAT	→ TTG TAT
C <sup>m</sup> CG CCT	→ U <sup>m</sup> CG UTT	→ TCG TTT

図2 遺伝子が不活化していない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



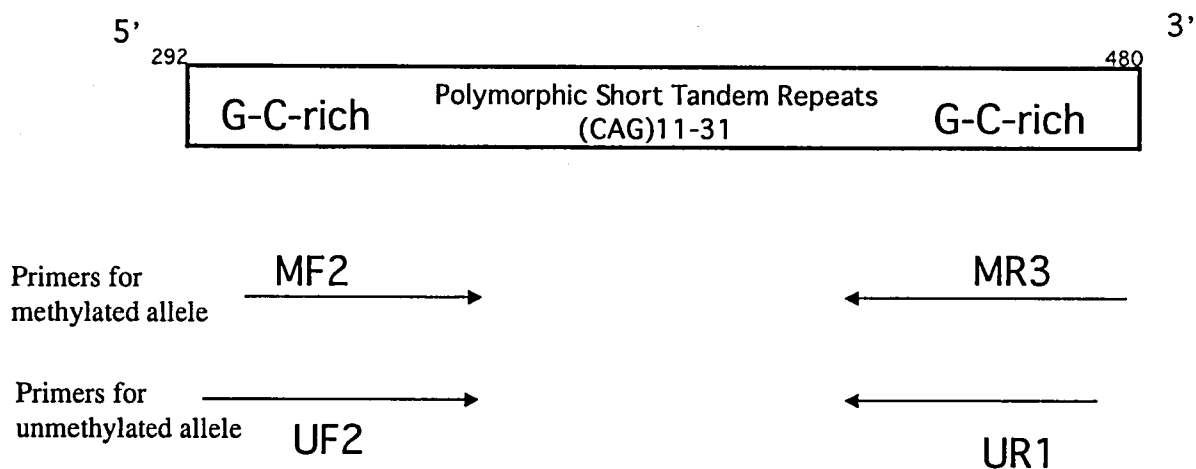


図3 HUMARA遺伝子 (Genbank accession number M35844) の構造とエクソン1内に設定したPCRプライマーセット. G-C richな配列に囲まれた多型STRは11個から31個の(CAG)の繰り返し配列から成る. これは90%のアレルで区別可能である.

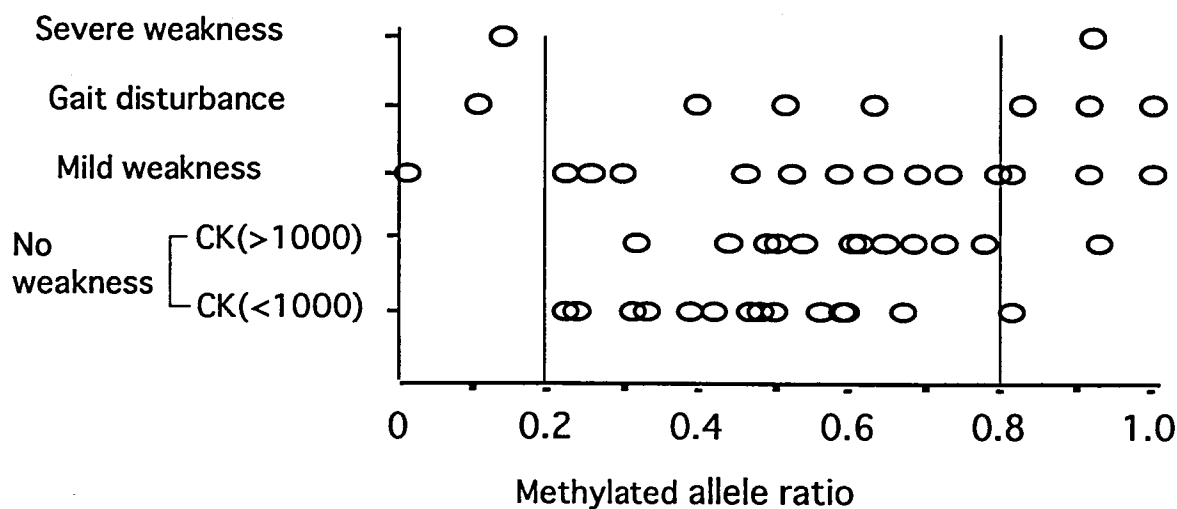


図4 DMD保因者のメチル化アレルの比率. 筋症状の重症度を縦軸に表している. メチル化アレルは0.2から0.8がランダムな不活化の範囲である.

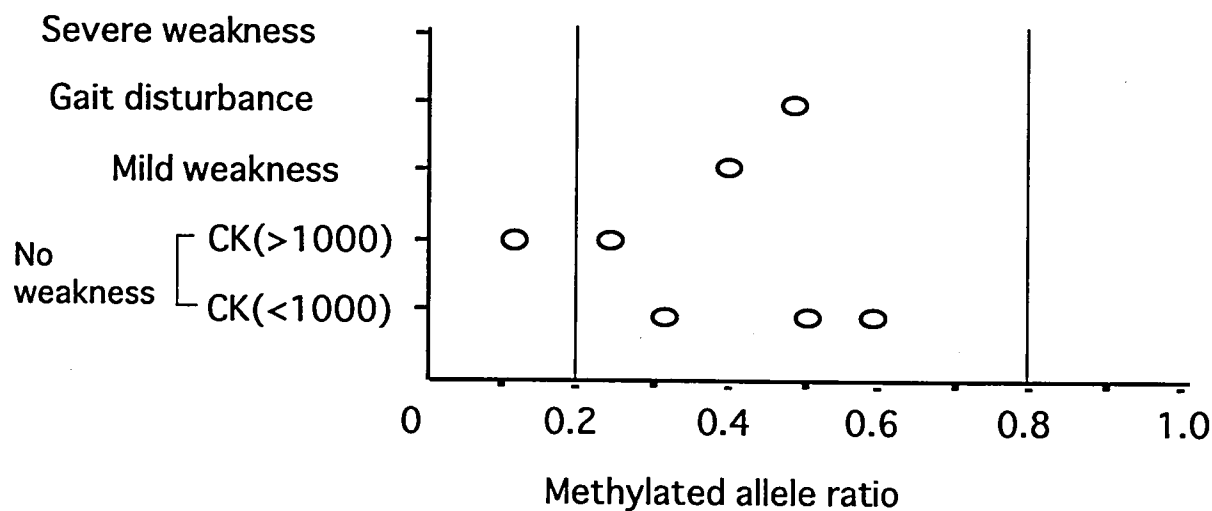


図5 BMD保因者のメチル化アレルの比率. 症状を有する保因者は2名であるがいずれもメチル化アレル比は正常範囲にある.

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<sup>8)</sup>。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<sup>1,3,9)</sup>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<sup>10)</sup>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<sup>10)</sup>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 deletion 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 hemophilic 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 methylated 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 —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—

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<sup>1)</sup>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 $\alpha$ -サルコグリカン、 $\alpha$ 1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<sup>2)</sup>。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システムを用いた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Chamberlain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 $\alpha$ 1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 $\alpha$ 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°C、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 $\alpha$ 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

