

厚生労働省「精神・神経疾患研究委託費」

# 筋ジストロフィーに関連する疾患の 病態解明と治療法の開発に関する研究

清水班

平成14～16年度研究報告書

平成17年3月（2005年）

## 研究報告書の作成にあたって

本報告書は、平成 14～16 年度に行われた「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究（14 公—4）」の最終報告である。

当研究は、基礎医学・臨床医学関係の 38 名の分担研究者（公募）とともに行われ、筋ジストロフィー関連疾患の克服のため functional genomics を重視した以下の 3 側面から推進した。①診断研究；未解明筋疾患責任遺伝子／蛋白の機能解明と遺伝子／蛋白診断法、②病態研究；疾患に関連する遺伝子／message／蛋白の病態と表現型との関連、疾患責任遺伝子異常に併発する他分子の発現／機能の変化と臨床病態との関連、③治療の開発；薬物治療の開発と遺伝子／細胞治療への基盤研究。これらを定例班会議に加え、実務者による目標設定型 small group workshop を企画し重点研究の促進を図った。

その結果、診断・病態解明分野で、DMD/BMD に関連して  $\beta$ -dystroglycan の細胞内ドメインに結合する情報伝達系 MAGI-1/ $\beta$ -catenin/Tcf の細胞死への関与、肢帯型に関連し日本人 41 家系 dysferlinopathy の遺伝子異常・表現型の集計、遠位型に関連し日本人 44 名の DMRV の遺伝子(GNE)異常と表現型の集計、先天性筋ジストロフィーに関連して日本人独特の福山型筋ジストロフィー、muscle-eye-brain 病、Walker-Warburg 症候群の責任遺伝子と O-mannose glycan 生合成障害機序の解明、筋緊張性ジストロフィーの RNA 仮説（CUG/CCUG 結合蛋白の発見と RNA 発現機能障害）の提唱、その他 collagenopathy・selenoprotein-N(SEPN) related myopathy・Schwarz-Jampel 症候群などの分子病態解明が行われた。特に、先天性筋ジストロフィーの分子病態解明に長足の進歩があった。

治療面では、DMD に関連して gentamicin の代替え read-through 薬（negamycin）、小欠失エクソン部分のスプライシング促進オリゴヌクレオチド薬（AS-oligo, ENA/RNA chimera）、成熟筋からの安全で容易な幹細胞誘導薬（Msx-1 cDNA）が、肢帯型に関連して sarcoglycanopathy（LGMDs 2C-F）での  $\beta$ -dystroglycan 分解阻止薬 BPHA, caveolinopathy(LGMD 1A)での myostatin 阻害薬(myostatin prodomain)、collagenopathy での RNA decay 阻害薬などが開発され、検討段階にきた。特に、AS-oligo では exon 20 を欠失した一名の DMA 患者でのトライアルが始まった。慎重な検討を加え臨床応用への道を強く促進する時が来ている。

反省として、FSH 型、肢帯型の約 1/3、ミトコンドリア脳筋症の病態研究が進んでいない点があげられる。また、近い将来到達すべき点として、福山型の責任蛋白 fukutin の機能の最終決着、筋緊張性ジストロフィーの RNA 仮説の検証、DMD/BMD の細胞死に関する分子病態機序（ $\beta$ -dystroglycan 関連情報伝達系）の解明があげられる。

最後に、永年にわたり研究の促進に甚大な努力をされている日本筋ジストロフィー協会理事長河端静子氏、様々なご助言をいただきました前国立精神・神経センター武蔵病院長埜中征哉先生、国立精神・神経センター名誉総長・筋ジストロフィー総合班班長杉田秀夫先生に深謝するとともに、当班の幹事として努力された栗原照幸東邦大学教授および石浦章一東京大学教授、斉藤加代子東京女子医大教授、佐橋功愛知医科大学教授、瀬原淳子京都大学教授、戸田達志大阪大学教授、西野一三国立神経研究所部長、松田良一東京大学助教授、吉田幹晴国立神経研究所室長に感謝申し上げる次第である。

平成 17 年 3 月

主任研究者 帝京大学医学部神経内科

主任教授 清水輝夫

# 目 次

平成 14～16 年度総括研究報告 .....	1
分担研究報告	
I. LGDM(肢帯型筋ジストロフィー) .....	15
II. FCMD(福山型先天性筋ジストロフィー) .....	49
III. OPMD(眼咽頭筋ジストロフィー)およびミオパチー .....	61
IV. 遠位型筋ジストロフィー, Emery-Dreifuss 症候群, DMRV など .....	79
V. DMD/BMD, およびジストロフィンその他 .....	91
VI. 先天性ミオトニー, 筋強直性ジストロフィー, 治療法の開発 .....	117
VII. 骨格筋形成, 壊死, アポトーシス .....	135
VIII. ミトコンドリア異常症と治療 .....	155
IX. 筋ジストロフィー骨格筋の酸化ストレス, 耐性系, 遺伝子治療など .....	169
Small Group Workshop .....	175
Summary .....	195
平成 14～16 年度 班員名簿 .....	201

平成 14～16 年度

# 総 括 研 究 報 告

# 総括研究報告

主任研究者 清水輝夫

筋ジストロフィー関連疾患の診断／病態研究と治療法の開発について、診断研究（筋疾患関連遺伝子／蛋白の解明と診断法の確立）、病態研究（病態関連遺伝子／産物の分子病態と表現型との関わり）、治療法開発（薬物治療と遺伝子／細胞治療への基盤研究）の3側面からアプローチした。

1. DMD/BMD 関連；治療面で、1) 小欠失の exon 内に存在するスプライシング促進配列に相補的な antisense oligonucleotide(AS-oligo)の導入により、欠失 exon をスキップした in frame truncated dystrophin mRNA を発現させられることが示された。3 種の変異症例の培養骨格筋細胞への投与で dystrophin 発現が確認でき、一例の DMD 患者で臨床応用へと進んだ。Exon 20 の欠失例で、exon 19 の splicing 促進配列に相補的に結合する AS-oligo を、週 1 回、0.5 mg/kg、2 時間点滴静注で 4 回投与した結果、3 週目から末梢血リンパ球に dystrophin mRNA の発現が観察され、血清 CK 値や筋力には変化がなかったものの、5 週目の筋生検で dystrophin の発現がわずかに観察された。副作用もなく今後の検討が必要だが、有望な治療法の可能性がある。2) 細胞治療への基盤研究として、胎児、肝・骨髄・臍帯血からよりも簡便、安全、容易にえられる幹細胞を探求した結果、マウス成熟筋にホメオボックスの一つ Msx-1 cDNA の導入により効率良く、骨細胞・脂肪細胞・骨格筋に再分化可能な幹細胞が得られた。コントロールマウスの前脛骨筋に Msx-1 cDNA を直接注入すると、1-2 週間で豊富な幹細胞がえられ、筋ジストロフィー動物 mdx マウス前脛骨筋に移植すると、3 ヶ月にわたって dystrophin 発現移植細胞が筋線維を形成・生存していた。拒絶反応は乏しく、適切な drug delivery system にのせると有用な治療法の可能性がある。3) 点変異の下流にできた stop codon の読みとばし薬として、欧米で試みられるアミノグリコシド系抗菌薬（gentamicin, ampicillin）には副作用の点で難点があるため、その代替薬物を探した。その結果、日本独自に開発された古い dipeptide 系抗菌薬 negamycin が培養細胞系、mdx マウスへの投与にて、副作用が少なく、約 10 %の dystrophin 発現がえられることが判明した。Negamycin は開発の段階で中断され実際には市場にでなかった経緯から、その供給に不安定要素があり、現在その類似体を含め検討を継続している。米国では gentamicin 類似物質から PTC124 を見いだし、その経口摂取による治験が開始される動きがある。いずれにしても、上記 3 者 1),2),3)はいずれも臨床応用への可能性が高いと考えられる。

病態面では、DMD/BMD の重症化に筋細胞死の進行があげられ、従来、膜直下の細胞骨格成分 dystrophin の先天性欠損で膜の脆弱性がある上に、筋収縮などストレスにより膜が断裂して細胞外 Ca イオンが流入して細胞死が生じると考えられてきた（Ca 説）。この過程で何らかの機序により筋形質膜の内外（細胞骨格とラミニン）を連結する架橋構造の中心  $\alpha$ ,  $\beta$ -dystroglycan の崩壊が起きていることがわかっていた。今回、膜貫通成分である  $\beta$ -dystroglycan の細胞内ドメインに MAGI-1/ $\beta$ -catenin/Tcf signal transduction 系が結合しており、その欠損により細胞死をきたすことが判明した。筋ジストロフィーでの筋細胞死の具体的分子機構の解明の糸口が見いだせた点で大きな進歩と考える。

## 2. LGMDs 関連

1) dysferlinopathy(LGMD 2B)関連；①2B 型の原因蛋白 dysferlin の機能には筋形質膜に存在する Ca 結合蛋白質であるという以外に、細胞内小胞体系（LAMP-1 陽性小胞＝リソソーム、後期エンドソーム、ゴルジ体、小胞体）に存在して形質膜との融合や筋 T 管系にも局在して EC カップリングに関与する機能があることが指摘された。これに関して、dysferlin が syntaxin や SNA 25 と結合し、Ca 依存性に AAATPase である VCP と複合体を形成、形質膜修復やゴルジ体の膜融合・膜輸送への関与が示唆された。②遠位型と肢帯型の両型をしめす dysferlin 異常症の日本人 41 家系 44 人（遠位型）と 23 家系 26 人（肢帯型）の遺伝子解析結果と臨床的特徴の集計が出され、遠位型で 28 種、肢帯型で 12 種（うち 5 種は共通）が見い出され、遠位型では C1939G, G3370T, 3746delG, 4870delT が多く、特に 3746delG は肢帯型にはみられなかった。他方肢帯型では G3370T, 4870delT が多く、両者

とも G3370T 変異で発症年齢が遅い傾向があった。しかし、変異型と臨床的重症度の間で強い相関はなかった。Dysferlin 異常症（遠位型、肢帯型）の臨床像についてまとめ、診断指針を作成する方針である。③dysferlinopathy 筋変性機序として SR stress 仮説（dysferlin 欠損→SR stress→JNK/caspase 12 の活性化→筋細胞死）が提唱された。④炎症性筋疾患モデル SJL/J mouse が dysferlin 欠損症であることが示され、type I fiber atrophy, 中心核, 細胞浸潤, 筋内運動神経の脱髄（神経原性変化）, が経時的に出現すること, 浸潤細胞は macrophage が 60-70 %, CD4 陽性 T 細胞が 15-25 %, CD8 陽性 T 細胞が 10 % であり, ヒトの dysferlinopathy との形態的相違が明かされた。

2) sarcoglycanopathy(LGMD2C~2F)関連; 特異的病態として  $\beta$ -dystroglycan 43 kDa が膜外ドメインで膜型 matrix metalloproteinase の分解を受け, 膜貫通ドメイン・膜内ドメイン 30 kDa と断端 13 kDa に分解を受けることが判明し, in vivo では, その阻害薬 BPHA によってこの分解過程が抑えられることから治療の可能性が提唱された。この筋崩壊機序は Duchenne/Becker 型でも存在するが, sarcoglycan complex が二次的に崩壊されてから生じると考えられる。それ以外の筋疾患には福山型を含め存在しない。従って, sarcoglycanopathy の進行予防薬として有用である可能性がある。

3) caveolinopathy(LGMD1C)関連; myostatin(45 kDa)活性抑制薬が筋増大をきたすため治療薬として米国では抗 myostatin 抗体の点滴静注による筋ジストロフィー群の治験が開始される動きがある。しかし, 抗体を打ち続けるには難点があるため, 別の myostatin inhibitor の検索をしてきた。その結果, follistatin および follistatin-related gene(FLRG)の 2 種の蛋白質および myostatin prodomain(30 kDa)が myostatin receptor と結合して強力な機能抑制効果があることが判明した。今回, LGMD1C の原因蛋白質 caveolin-3 の変異型(P104L)の transgenic mouse に myostatin prodomain 過剰発現マウスを交配して得られた double tg mouse で検討してみたところ, 変異 caveolin mRNA と prodomain mRNA の発現が強くみられたが変異 caveolin-3 の筋内発現はなかった (dominant negative)。それにも関わらず, ミオパチー変化の改善, 骨格筋線維数の増大, 軽度肥大化がえられ, トレッドミル試験でコントロールマウス同様の走力改善がみられ, LCMD 1C 型の有力な治療法の可能性がえられた。

4) collagen VI 異常症; collagen VI は筋基底膜の外周, collagen IV のさらに外側に存在する成分であるが, この  $\alpha$  subunit の遺伝子異常により 2 つの病型; Bethlem myopathy (常優, 遠位関節の拘縮を伴う緩徐進行性) と Ullrich myopathy (常劣, 近位関節の拘縮と遠位関節の過伸展を伴う緩徐進行性) をきたすことが判明した。その遺伝子異常と発現型との関係は未解明である。26 塩基のホモの欠失があり, フレームシフトが起こって下流に premature termination codon が出現している Ullrich myopathy 患者の線維芽細胞を用いて, カフェイン, wortmannin, siRNA により nonsense-mediated mRNA decay を抑制したところ, 変異 collagen  $\alpha$  を含む collagen 3 量体が細胞外へ分泌され細胞外マトリックスへ取り込まれ, 一部の機能回復 (fibronectin receptor の増加や細胞遊離性の亢進) がみられた。従って, stop codon を有する遺伝疾患一般の治療法として有望と考えられた。

### 3. 先天性最重症型筋ジストロフィー関連

1) Muscle-eye-brain 病 (MEB) の原因遺伝子/蛋白質 POMGnT1 (Ser/Thr-mannose に GlcNAc 添加する酵素) が解明され, Finland のみでなく日本を含む全世界に分布する 13 種の点突然変異が報告された。いずれも酵素活性は完全消失 (loss of function) していた。

2) 最も重症な先天性筋ジスである Walker-Warburg syndrome (WWS) の原因遺伝子が下等動物で見つかった *pmt* (Ser/Thr に mannose を添加する酵素) の相同遺伝子 POMT(protein O-mannosyl transferase)であることがオランダで報告されたが, ヒトを含む高等動物での研究がなく実態が不明であった。ヒトを始めとする哺乳類での検討を行った結果, POMT1 と POMT2 の 2 成分の存在が必要で, 臨床的 WWS の約 10 % が POMT1 の遺伝子異常 (点変異) によることを確認した。その糖添加酵素活性のアッセイ系を確立し完全消失(loss of function)であった。MEB と WWS について遺伝子診断, 生化学的酵素測定での診断が可能となった。なお, 約 9 割の臨床的 WWS については未解明である。

3) 遺伝子異常が解明された MEB と WWS については, いずれも  $\alpha$ -dystroglycan DG の糖鎖異常が存在しラミンニンとの結合不全が明らかとなり, 両者は  $\alpha$  DG の O-mannosyl glycan(Sia-Gal-GlcNAc-Mann-ser/thr)の合成障害→laminin- $\alpha$  DG 結合不全→筋細胞死が支持された。福山型についても同一の  $\alpha$  DG 糖鎖異常・laminin- $\alpha$  DG 結合不全が確認されているので, これら 3 疾患は  $\alpha$ -dystroglycanopathy である。

4) 日本に独特の福山型先天性筋ジストロフィーFCMD の責任蛋白質 fukutin の生理機能について、fukutin はその N 末でゴルジ体膜に存在する成分で、糖添加活性はなく、MEB の責任蛋白質である POMGnT1 に結合する成分であることが判明した。N 末を欠失するとゴルジ体ではなく小胞体に移行する。Fukutin 機能の最終決着が必要である。

5) FCMD, MEB, WWS の類縁 3 疾患は確実な遺伝子診断が可能となったので、確実症例の集計を行い臨床診断指針を作成する必要がある。

6) FKRП 遺伝子異常を有し、精神発達正常な先天性筋ジストロフィーの日本人女児一名がイギリス、チュニジア、トルコ以外の日本で始めて発見された。大脳異常はないが小脳に多発小嚢胞をみとめ、福山型に準ずる臨床症状で、 $\alpha$ DG 糖鎖異常を伴っていた。

7) 古くから知られる dystrophy chicken の  $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖が検討され O-glycan のシアル酸付加に障害が確認され、福山型、MEB と類似の病態を有すると判断され、福山型関連疾患の自然発症動物モデルが見つかった。欧米で検討されている WWS, FKRП 異常症, LARGE 異常症とともに当班で行われた福山型, MEB, WWS, dystrophy chicken は、いずれも  $\alpha$ -dystroglycan の O-mannose glycan の合成障害  $\rightarrow$  laminin と  $\alpha$ DG の結合不全を共通の病態としてもち、 $\alpha$ -dystroglycanopathy を呈する疾患群ができつつある。

#### 4. Distal myopathy with rimmed vacuoles(DMRV)

諸外国の遺伝性封入体ミオパチーHIBM の原因遺伝子 GNE (UDP-GlcNAc 2 epimerase/ManNAc kinase ; シアル酸合成関連酵素) の異常であることが判明し、その日本人 66 名 (4 施設) の臨床病型が集計された。その結果、25 種の変異 (missense 変異 23, nonsense 変異 2) が、分子全領域に生じ、特別の hot spot は存在しない、V572L 変異が最も多く、31 名はこのホモ接合体であり、次いで D176V 変異が多かった。発症の平均年齢は 25.4 歳、ほとんど下肢遠位部前脛骨筋からの発症で、近位部もかなり早期からおかされるが大腿四頭筋は保たれる。平均歩行可能期間は 9.4 年、重篤な心機能障害例が 4 例存在した。血清 CK 値は 91% で上昇し、20% は 1,000 IU/L 以上の高値であった。本疾患の診断指針を作成予定である。筋糖蛋白質のシアル酸異常など分子病態について一部でシアル酸低下が報告されるも今後の課題である。

#### 5. ミオトニア症候群関連

1) 筋緊張性ジストロフィーDM (DM1=DMPK の CTG リピート病, DM2=ZFF 9 の CCTG リピート病) の骨格筋では、インスリン受容体, NMDA 受容体, Cl チャンネル, six 5, リアノジン受容体, 筋小胞体 Ca-ATPase(Serca 1), タウ蛋白, amyloid precursor protein, 心筋トロポニン T, myotubularin-related protein 1 など多数の蛋白質が幼弱型であり、これらの発現レベルでスプライシング異常をきたし様々な臨床症状に関与することが判明した。その機序として、DM1, DM2 の遺伝子にみられる非翻訳領域での CTG, CCTG リピートの異常伸長の結果できる mRNA の異常伸長部に強固に結合する蛋白 CUG-BP, MBNL1, 2, 3 が同定され、これらが本来もっている RNA splicing 機能が異常伸長部にトラップされるため多数の RNA splicing に影響を及ぼす結果、多くの mRNA が幼弱型を発現させる機序が解明された (RNA 機能障害仮説)。異常伸長リピートがどの遺伝子に存在するかは疾患発症とは無関係であると推測された。

2) Schwartz-Jampel 症候群が、筋基底層蛋白 perlecan の遺伝子異常による部分欠損症であることが判明し、神経筋接合部での  $\alpha$ DG-perlecan-AchE 機能が低下することが示された。

#### 6. ミトコンドリア脳筋症

ミトコンドリア異常症 ; MELAS, MERRF の主要 mt DNA 変異である 3243 変異, 3271 変異, 8377 変異から複製される変異 tRNA には taurine が結合していないことから、高濃度 taurine 療法の開発をすすめており、変異 tRNA をもつサイブリッド細胞培養を数 mM taurine 存在下で膜電位、ミトコンドリア形態、呼吸機能のみでなく蛋白合成能にも明白な改善がみられ、MELAS, MERRF の治療薬として有用である。

## 7. その他

1) 筋接着因子 laminin-integrin に結合する細胞内シグナル伝達系として ILK-リン酸化 affn-Rac 1/Cdc 42 が同定され、筋原線維の actin filament の形成、fibroblast 接着、血小板病集に関与することが解明された。

2) PTD FNK ; 筋細胞死の一つの有力機序として apoptosis が考えられ、その抑制薬候補として Bcl2 の改造蛋白 PTD FNK が開発され、スタウロスポリン、グルタミン酸、虚血による細胞死をいずれも効率良く低濃度 (pM) で抑制できた。各種細胞死予防薬として有力である。

3) 筋発生の negative regulator である myostatin の抑制薬として抗 myostatin 抗体が米国で開発されつつあるが、本研究班では 高分子蛋白質である follistatin や follistatin-related gene (FLRG), ペプチドである myostatin prodomain が開発され、種々の筋疾患への効果判定を動物実験できる段階に来ている。

4) 先天性ミオパチーに属する SEPN(selenoprotein N)-related myopathy, すなわち rigid spine syndrome, multimimicore disease, desmin-related myopathy が筋小胞体蛋白質 selenoprotein 1 の遺伝子異常で発症すること、悪性高熱/central core disease が筋小胞体蛋白質 ryanodine receptor の遺伝子異常で発症すること、X-linked myotubular myopathy が脱リン酸化活性をもつ myotubularin (MTM1) の遺伝子異常で発症することなど新たな筋疾患責任遺伝子が日本人家系で報告された。

## 8. 問題点と今後の研究

1) FSH 型について遺伝子診断まではできるがその分子病態解明・治療開発は滞っている。先天性筋ジストロフィーについては、MEB, 約 10 %の WWS, FCMD の遺伝子異常, 分子病態解明に大きな進歩がえられ、fukutin がゴルジ体膜で GlcNAc 添加酵素 POMGnT1 に結合して作用する非酵素であることまでは解明したがその最終的生理機能の解明には至っていない。また、 $\alpha$ DG 糖鎖合成の第 3, 4 段階の酵素 Gal-T, Sia-T や Large, FKR, ジストロフィー鶏の実態解明と筋ジストロフィー発症との関連, 先天性筋ジストロフィーでの脳奇形, 眼奇形発症機序の解明が必要である。

2) DMD/BMD, LGMDs の 2/3, 筋緊張性ジストロフィーの原因遺伝子の解明がなされ、遺伝子診断・蛋白質診断が正確に可能となったが、治療薬開発の観点から筋障害の分子病態の解明に一層の努力が必要である。

3) negamycin, AS-oligo, myostatin inhibitors (抗体, follistatin, follistatin-related gene, myostatin prodomain), Msx-1 誘導幹細胞, taurine など有望な治療薬候補が出されており、今後その臨床治験への具体的方策を探る。

4) ミトコンドリア脳筋症の分野にみるべき成果がなく、特に核由来遺伝子異常症の解明に遅れが出ている。

5) 遺伝子診断で確定できるいくつかの筋ジス病型 (dysferlinopathy, distal myopathy with rimmed vacuoles, FCMD/MEB/WWS) の診断指針を作成, 社会に公表する必要がある。

## 9. 倫理面の運用

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済省告示第 1 号)」, 国立精神・神経センター倫理規定を遵守し, 各研究施設の定める倫理規定にもとづいた倫理委員会の承認を得るものとしている。



# 分 担 研 究 報 告

# 目 次

## I. LGMD (肢帯型筋ジストロフィー)

- 1) 血清抗 giantin 抗体陽性の肢帯型ミオパチー ..... 17  
愛知医科大学医学部神経内科 佐 橋 功
- 2) 筋特異的カルパイン・コネクチンを中心とするネットワークと  
肢帯型筋ジストロフィー症の病態機序 ..... 19  
東京都臨床医学総合研究所酵素機能制御研究部門 反 町 洋 之
- 3) 筋ジストロフィーモデルマウスにおけるマトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子発現の  
検討 ..... 23  
川崎医科大学神経内科 砂 田 芳 秀
- 4) 変異 caveolin-3 トランスジェニックマウスにおける肥大型心筋症の発現 ..... 25  
川崎医科大学神経内科 砂 田 芳 秀
- 5) Myostatin prodomain による変異 caveolin-3 トランスジェニックマウス表現型の改善 ..... 27  
川崎医科大学神経内科 砂 田 芳 秀
- 6) 筋ジストロフィーの分子発病機序としての matrix metalloproteinase による  
dystroglycan 複合体の崩壊に関する研究 ..... 29  
帝京大学医学部神経内科 清 水 輝 夫
- 7) 遺伝子二重変異筋ジストロフィーマウスの作成と解析による病態の解明 ..... 31  
国立精神・神経センター神経研究所モデル動物開発部 荻 原 康 子
- 8) Calpain3 の筋線維内局在 ..... 33  
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部 西 野 一 三
- 9) 新しいサルコグリカン分子の組織発現と機能に関する研究 ..... 34  
国立精神・神経センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部 今 村 道 博
- 10) サルコグリカン異常症：日本人における原因サブユニット，遺伝子変異，  
及び免疫組織化学染色パターンの再検討 ..... 36  
国立精神・神経センター武蔵病院 南 成 祐
- 11) 日本人 dysferlinopathy における遺伝子変異と臨床型の特徴 ..... 38  
東北大学医学部神経内科 青 木 正 志
- 12) SJL マウス骨格筋における遺伝子発現解析 ..... 40  
東北大学医学部神経内科 青 木 正 志

13) 筋ジストロフィー発症機構の理解をめざす関連タンパク質の分子論的研究 .....	42
国立精神・神経センター神経研究所 吉田 幹 晴	
14) 三好型筋ジストロフィー(LGMD2B)責任遺伝子産物ジスフェルリンと (ER)ストレス発生の機構 .....	44
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第五部 桃 井 隆	
15) SJL/J マウス骨格筋における炎症性細胞と NF kappa B 発現の経時的検討 .....	46
東邦大学大橋病院神経内科 栗 原 照 幸	
<b>II. FCMD (福山型先天性筋ジストロフィー)</b>	
16) 福山型先天性筋ジストロフィーにみられるてんかんと遺伝子異常との関連 .....	51
神戸市総合療育センター小児神経科 吉 岡 三恵子	
17) 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の遺伝子異常と蛋白質/ 細胞病態および治療に関する研究 .....	53
大阪大学院医ゲノム機能分野 戸 田 達 史	
18) 筋ジストロフィーにおける糖鎖異常と病態機序の解明 .....	55
東京都老人総合研究所 遠 藤 玉 夫	
19) 筋形質膜蛋白質に起因しない筋ジストロフィーの病態解明についての研究 .....	57
国立精神・神経センター神経研究所 林 由起子	
20) 新たなモデル動物を用いた $\alpha$ -dystroglycanopathy の発症機序に関する研究 .....	59
帝京大学医学部神経内科 清 水 輝 夫	
<b>III. OPMD (眼咽頭筋ジストロフィー)およびミオパチー</b>	
21) Agrin/MuSK 系障害における限局性骨格筋障害の臨床と病因的考察 .....	63
愛知医科大学神経内科 佐 橋 功	
22) 筋型糖原病の生化学・遺伝子診断法の確立および病態に即した治療法の開発 .....	65
浜松市発達医療総合センター小児神経科 杉 江 秀 夫	
23) コラーゲン VI 異常による筋疾患(Ullrich 病, Bethlem myopathy)の臨床的, 病理学的 および遺伝子学的研究 .....	67
鹿児島大学神経内科・老年病学 樋 口 逸 郎	
24) 眼咽頭筋ジストロフィーモデルマウスの作製 .....	69
熊本大学大学院医学薬学研究部先端生命医療科学部門 脳・神経科学講座・神経内科学分野 内 野 誠	
25) 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素(VLCAD)欠損症の 免疫組織化学染色によるスクリーニング .....	71
国立精神・神経センター武蔵病院 DNA 診断・治療室 南 成 祐	

26) 悪性高熱症およびセントラルコア病：リアノジン受容体 RYR1 の遺伝子変異検索	72
国立精神・神経センター武蔵病院 DNA 診断・治療室 南 成 祐	
27) X-linked ミオチューブラーミオパチー：日本人患者の遺伝子変異スペクトラム及び臨床・筋病理学的検討	74
国立精神・神経センター武蔵病院 DNA 診断・治療室 南 成 祐	
28) デスミンミオパチー細胞傷害機構の検討	76
秋田大学医学部神経内科 豊 島 至	
29) 家族性還元小体ミオパチー — ER ストレス関連疾患？ —	78
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部 西 野 一 三	
<b>IV. 遠位型筋ジストロフィー, Emery-Dreifuss 症候群, DMRV など</b>	
30) DMRV における分子生物学的検討および遺伝子変異型と臨床症状の関連についての検討	81
東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 水 澤 英 洋	
31) Rimmed vacuole 型遠位型ミオパチーの筋変性機序に関する研究	83
新潟大学脳研究所神経内科 田 中 恵 子	
32) Rimmed vacuole を伴うミオパチーにおける免疫染色 —レクチンを中心に—	85
愛知医科大学神経内科 佐 橋 功	
33) アセチルコリン受容体 $\alpha$ サブユニット遺伝子の機能を有さないエクソン P3A 上のミスセンス変異は mRNA スプライシング異常を誘発する	87
愛知医科大学神経内科 佐 橋 功	
34) Rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチーの骨格筋における糖蛋白のシアル酸負荷に関する研究	88
帝京大学医学部神経内科 清 水 輝 夫	
35) 縁取り空砲を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)におけるシアリル化異常	90
国立精神・神経センター神経研究所 西 野 一 三	
<b>V. DMD/BMD, およびジストロフィンその他</b>	
36) 新しい中間径フィラメントである $\beta$ -synemin の分化に関する研究	93
群馬大学大学院脳神経内科学 水 野 裕 司	
37) ジストロフィン欠損骨格筋における MAPK および matrix metalloproteinase-2,9 の検討	95
信州大学医学部第三内科 池 田 修 一	
38) 筋原線維から筋形質膜への分子連関構築と筋ジストロフィー発症機序の相関解析	98
武蔵野大学薬学部機能形態学 土 方 貴 雄	
群馬大学大学院医学系研究科器官機能構築学 依 藤 宏	

39) Duchenne 型筋ジストロフィー筋における浸潤細胞の解析 .....	100
新潟大学脳研究所神経内科 田中 恵子	
40) mdx マウスに対する同系筋前駆細胞移植によるジストロフィン導入 .....	102
熊本大学医学部発達小児科 三池 輝久	
41) Syntrophin, aquaporin の骨格筋における発現と局在の研究 .....	104
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山 吉弘	
42) Aquaporin4 過剰発現トランスジェニックマウスの作製と mdx マウスの治療 .....	106
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山 吉弘	
43) ジストロフィン遺伝子のスプライシング制御機序の解明とその治療への応用 .....	108
神戸大学大学院医学系研究科小児科 松尾 雅文	
44) ヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクターによる骨格筋への ジストロフィン遺伝子導入効率と治療効果 .....	110
熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学分野 内野 誠	
45) Read-Through 活性物質を検索するためのダブル・レポーター遺伝子 を導入したトランスジェニックマウスの開発 .....	112
東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系(生物学) 松田 良一	
46) 筋ジストロフィー治療法の開発 — 培養骨格筋細胞におけるステロイドおよびゲンタマイシンの影響 — .....	114
東京女子医科大学遺伝子医療センター 斎藤 加代子	
<b>VI. 先天性ミオトニー, 筋強直性ジストロフィー, 治療法の開発</b>	
47) 筋強直性ジストロフィー骨格筋における mRNA スプライシングの異常 .....	119
大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学(神経内科) 佐古田 三郎	
48) クラス Ic 抗不整脈薬の骨格筋型ナトリウムチャンネルに対する作用 — ミオトニー治療薬としての検討 — .....	121
大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学(神経内科) 佐古田 三郎	
49) ミオトニーの筋活動電位反復発火の減衰に関する研究 .....	123
東邦大学大橋病院神経内科 栗原 照幸	
50) 筋強直性ジストロフィーの分子病態と治療 .....	125
東京大学大学院総合文化研究科 石浦 章一	
51) RNA 結合因子としての SIX5 と筋強直性ジストロフィーの関わり .....	127
自治医科大学分子病態治療研究センター細胞生物研究部 川上 潔	

52) Nonsense-mediated mRNA decay(NMD)抑制による神経筋疾患の病態と治療に関する研究 .....	128
国立水俣病総合研究センター 白 杵 扶佐子	
53) PC12 細胞を用いた筋強直性ジストロフィーモデル細胞の作成：薬剤スクリーニングシステムの確立を目指して .....	130
九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科 吉 良 潤 一	
54) Schwartz-Jampel 症候群におけるミオトニア発症機序の解明 .....	132
順天堂大学脳神経内科 平 澤 恵 理	
<b>VII. 骨格筋形成, 壊死, アポトーシス</b>	
55) 骨格筋の脱分化と再生：筋ジストロフィーの再生治療にむけて .....	137
千葉大学理学部生物学教室 遠 藤 剛	
56) ミオフィラメント動態制御因子の変異に起因する筋異常に関する研究 — コフィリンおよびC-蛋白質に焦点をおいて .....	140
千葉大学理学部生物学科 大日方 昂	
57) 筋肉形成におけるマイオスタチンの役割 .....	143
徳島大学工学部生物工学科 野 地 澄 晴	
58) 筋細胞特異的に必須な役割を果たしているインテグリン-ILK-affixin 系シグナル伝達の研究 .....	145
横浜市立大学大学院医学研究科分子細胞生物学教室 鈴 木 厚	
59) 筋分化・筋形成と Six 遺伝子とのかかわり .....	147
自治医科大学分子病態治療研究センター細胞生物研究部 川 上 潔	
60) SIX5 の標的分子と筋緊張性ジストロフィーの関わり .....	148
自治医科大学分子病態治療研究センター細胞生物研究部 川 上 潔	
61) Dystroglycan 結合蛋白質 MAGI-1 の生理機能の研究 .....	150
鳥取大学医学部神経生物学 二 宮 治 明	
62) 細胞死抑制の蛋白質細胞内導入治療法の開発 .....	152
日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野 太 田 成 男	
<b>VIII. ミトコンドリア異常症と治療</b>	
63) ミトコンドリア脳筋症のタウリン療法 —培養細胞を用いての効果検定 .....	157
日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野 太 田 成 男	
64) ミトコンドリア ALDH2 欠損によるミトコンドリア病病態モデルマウスの作製とその病態改善法 —ビタミンEの効果 .....	160
日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野 太 田 成 男	

65) MELAS 筋芽細胞における細胞死とその抑制 .....	162
自治医科大学小児科学 桃井真里子	
66) ミトコンドリアゲノム多型データベースを用いた病的変異と多型の鑑別 .....	164
東京老人総合研究所健康長寿ゲノム探索 田中雅嗣	
67) 筋形成に関わる細胞間相互作用の解明 .....	166
京都大学再生医科学研究所再生増殖制御学分野 瀬原淳子	
<b>IX. 筋ジストロフィー骨格筋の酸化ストレス, 耐性系, 遺伝子治療など</b>	
68) 筋ジストロフィーに対するゲンタマシン治療対象患者のスクリーニング及び ハイブリット型リポソームを用いた治療法の開発 .....	171
熊本大学医学薬学研究部発達小児科 三池輝久	
69) 筋疾患と小胞体ストレスの関連 .....	173
九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科 吉良潤一	

# I. LGMD(肢帯型筋ジストロフィー)



# 血清抗 giantin 抗体陽性の肢帯型ミオパチー

佐橋 功\*

研究協力者 衣斐 達\* 近藤 久雄\*\* 大野 欽司\*\*\*

## はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー (F-CMD), Walker-Warburg 症候群 (WWS), muscle-eye-brain disease (MEB 病), 肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 2I 等は,  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) の欠陥によりグリコシル化と laminin  $\alpha$ 2, neuregulin, agrin 連関への二次的異常も来す遺伝性  $\alpha$ -dystroglycanopathy ( $\alpha$ -DGpathy) である<sup>1,2)</sup>。しかし, 現在まで後天性・二次性  $\alpha$ -DGpathy に伴う筋疾患の報告はない。

Giantin は, 372kDa のゴルジ体膜タンパク質であり, 輸送小胞 (transport vesicle) とゴルジ膜間の架橋をなす<sup>3,4)</sup>。

我々は血清抗ゴルジ (giantin) 抗体を有する成人発症で  $\alpha$ -DG 染色が特異的に減弱した進行性 LGMD 様ミオパチーの世界初報告をする。

## 症例報告

患者; 59 歳, 女性, 既往歴・家族歴; 2 人弟に不整脈, 虚血性心疾患, 子供 3 名は健康。

44 歳時に, 立ち上がり困難を自覚し, 進行性。47 歳の筋生検で慢性炎症性筋疾患の診断。48 歳に愛知医大初診。第 2 回目の筋生検→パルス療法, 48 歳以降はプレゾニゾン (PSL) 経口療法を受けたが, 進行性。当時の身体・神経所見; 意識・知能正常, 150.5 cm, 51.0 kg, 134/70 mmHg, 36.3°C, 球結膜は浮腫様, 紅斑性皮膚変化, リンパ節症, レイノー現象, 関節症はない。流涙正常, シルマー試験陰性。顔面・球筋は正常, 頸部屈筋/伸筋・体幹筋・骨盤周囲筋・大腿筋は高度障害。歩行は高度動揺性, ガワーズ徴候陽性, 運動不耐性。四肢遠位筋は良く保持 (握力正常)。筋痛, 筋緊張, 筋浮腫, 仮性肥大, 線維束性筋れん縮なし。深部腱反射は減弱, Babinski 徴候陰性。

## 主要検査

血清 CK 値は常に正常。蛍光 Hepana 試験 (MBL, 名古屋, 日本) を使用した血清中の抗核抗体 ( $\times 160$ ) のスクリーニングで, 細胞質内のまだら蛍光が観察され, 抗ゴルジ抗体を示唆。自己抗体と SSA (Ro) 陽性 (ELISA  $\times 31.4$ )。15 年間以上にわたる悪性腫瘍に関する可能な限りの検討は陰性。心電図 ST-T 異常, 針 EMG 筋原性, 骨格筋 CT は近位筋優位の高度の四肢筋肉の脂肪置換を

伴う筋萎縮。生検筋より抽出した DNA 変異検索, LGMD2A, 2B, 2I 遺伝子異常はなかった。

## 病理学的検討

上腕二頭筋生検筋の光顕所見は, 1) 酸化還元酵素 (NADH-TR, cytochrome c oxidase 等) 異常を示す散在性・集簇性の小径壊死線維, 2) 間質結合組織の中等度増加, 3) cytoplasmic body と空胞変性, 4) 結合組織中の散在性 AcPase 陽性小円形細胞浸潤, 5) type 2 線維萎縮, 6) dystrophin, utrophin, emerin, caveolin 3, sarcoglycan 複合体, calpain 3, dysferlin, telethonin, merosin の免疫染色正常, 7)  $\alpha$ -DG 免疫染色 (VIA4-1 抗体使用) の減弱。電子顕微鏡所見は, 筋原線維の走行障害, 細胞内の細胞小器官の変性, 核近辺の小水疱変化, 運動終板は正常。

## 免疫学的検討

抗ゴルジ抗体陽性患者血清は, Hep-2 細胞の核周囲構造と免疫反応し, Hela 細胞抽出物で 300 kDa 以上の分子と同定された (図 1A, 1B)。Giantin がゴルジ体において 300 kDa の分子量を上回る唯一の既知の分子であり, 患者血清と giantin との反応の検索をしたところ, giantin と抗 giantin 抗体は良く反応した (図 1C)。そして患者血清と免疫沈降した蛋白は, 抗 giantin 抗体で染色された (図 1D)。

## 考 察

本症例は LGMD 2A, 2B 等の劣性疾患に似ていたが除外された。Giantin は, Sjogren 症候群<sup>6)</sup>, 強皮症<sup>6)</sup> と RA<sup>5,7)</sup> 患者より分離され, これら症例では高力価の抗 giantin 自己抗体を有したが筋疾患はなかった。血清抗 giantin 抗体のスクリーニングで自己免疫疾患や筋疾患はなかったが, 64 人の健康対照者は陰性であったが, HIV 陽性患者の 164 人中の 18 人に低力価で抗 giantin 抗体が検出されたという<sup>6)</sup>。

Giantin は輸送小胞とゴルジ膜間の架橋をなし, 抗 giantin 抗体は筋ゴルジ体において蛋白輸送に潜在的な影響を与えらると思われる<sup>3,5)</sup>。

F-CMD, WWS, MEB, LGMD 2I 等は,  $\alpha$ -DG 欠陥とさらに二次性 laminin-2, neurexin, agrin 2) のグリコシル化欠陥を伴う遺伝性疾患である。 $\alpha$ -DG 染色性の減弱は, laminin-2 の免疫染色は正常であったが, 遺伝性  $\alpha$ -DGpathy 類似の病態への関与が想定された。また患者血清 CK 値

\* 愛知医科大学神経内科

\*\* ケンブリッジ大学

\*\*\* 名古屋大学神経疾患腫瘍センター神経遺伝情報学

