

厚生省「精神・神経疾患研究委託費」

筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態と
その病因に関する研究

杉田班

平成元年度研究報告書

平成2年3月（1990年）

研究報告書の作成にあたって

厚生省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究」班が昭和59年に結成され、その研究活動が開始されてから本年（平成元年）は2期目の最後の年にあたり、今年をもって本研究班は終止符を打つ事になります。その間不肖、私が班長として研究班のお世話をしてまいりワークショップ、或いは班会議におきましてその成果がまとめられて参りました。本年度も研究報告書を完成し得ました事は、顧問の先生方、班員ならびに共同研究者各位の絶大な努力に負うものであり深い敬意を表したいと思います。

本年度本報告書に集録された成果はいずれも国際的に水準の高いものであり、過去3年間の成果の積み重ねにより筋ジストロフィー症及び関連疾患としてのミトコンドリア脳筋症の分子生物学的研究は目ざましく進歩し、病態に関する幾つかの核心に迫る問題点が明らかにされつつあります。

本年度も「一日も早い」治療法の開発を待ちわびながら幾多の患児の尊い生命が失われた事に対し深い哀悼の意を表しますと共に本研究班が組織の上では終了致しますが今後の班員の皆様の断えざる研究に大いに期待したいと思います。

本研究班を活動の場として多くの若い研究者が本疾患研究にその情熱と意欲をかきたてて参りました事はまことに喜ばしい事であり、来年度も引続いて新しい班組織が実現される様に努力し、また関係各位の御援助を切に願うものであります。

本研究の推進に賜った厚生省、国立精神・神経センター、並びに日本筋ジストロフィー協会の深い御盡力、御支援と御理解に深く感謝致します。

平成2年3月

〈班長〉 杉 田 秀 夫

目 次

平成元年度総括研究報告	7
分担研究報告	13
I. 臨 床	21
II. 生 化 学	53
III. 遺 伝 子	77
IX. ジストロフィン	101
V. mdx マウス	125
VI. 培養・再生	161
VII. ミトコンドリア(1)	183
VIII. ミトコンドリア(2)	223
IX. ミトコンドリア(3)	251
平成元年度研究班名簿	279

平成元年度

総括研究報告

総括研究報告

班長 杉 田 秀 夫

〔はじめに〕

本研究班は進行性筋ジストロフィー及び関連疾患として、特にミトコンドリア脳筋症の病態及び病因の解明と治療法の開発を目標とし、内外の分子生物学の進歩に伴い3年間の間に幾つかの飛躍的な成果をあげる事が出来た。本年が研究班の最後の年でもあり過去3年間の研究成果を総括し、今後研究を進めて行く上で重要な意義を持つと考えられる2、3のトピックスについて述べる。

〔I. 3年間の研究班の研究目標と成果〕

A. 進行性筋ジストロフィー

1) デュシャンヌ型 (DMD)

DMD, BMD の病因が分子レベルで解明された。即ち DMD 遺伝子 cDNA の N 末端付近の一部から予測されるペプチドに対するポリクロナール抗体は、骨格筋、心筋の表面膜のみを認識する事がわかり、DMD 遺伝子産物、ジストロフィン は筋表面膜又はそれと密接に関連している物質である事が明らかになった。またこの抗体は DMD の骨格筋、心筋表面膜とは全く反応しない事から DMD は骨格筋表面膜におけるジストロフィンの欠損する疾患である事が確認された。

この発見は従来から提唱されて来た DMD の病因に関する“膜異常説”を分子レベルで実証した事になり、DMD の病因の解明にむけて“逆遺伝学”がもたらした成果は高く評価されよう。

また DMD 患者に認められる心筋障害は心筋におけるジストロフィン欠損がその原因と考えられ、心筋障害は二次現象ではないと想定される。

2) DMD 保因者

従来 DMD 保因者の発見には血清 CK 活性が用いられ、約70%の症例で異常高値が認められている。血清 CK 値が上昇し、軽度の筋力低下が認められる manifested carrier ではジストロフィンの免疫染色では陽性、陰性、部分染色の3種、即ちモザイク状を呈し Lyon 仮説が分子レベルでも証明された。筋細胞はジンキチウムを構成するので大部分の筋繊維は“部分染色”が期待されたが10%以下と少なく、陽性、

又は陰性繊維が大部分であった。また陰性繊維が多くなるに従って臨床症状が強く発現する傾向があり、今後保因者発見の一法となろう。

遺伝子による保因者検出法は DMD cDNA プロブを用い DMD の約60%について欠失が認められている。

3) ベッカー型 (BMD)

BMD は DMD と allelic な疾患であると考えられるが検索した BMD 全例でジストロフィン は骨格筋表面膜上に弱かつ部分的 (patchy) に発現された。

これらの症例についてジストロフィン分子量、含量を比較検討した。分子量は大部分の症例で正常の400kD より小さい。

Immunoblot によって得られたジストロフィン量は正常の5~60%と幅広く、分子量との間に一定の傾向はなく、免疫染色のデータとも一致しなかった。

臨床症状と関連があるのはジストロフィンの分子量ではなく含量であり、正常の20%以上存在する症例は進行が遅く臨床経過は良好であり、10%以下の症例では進行が速い事が明らかになり、ジストロフィン含量の測定は予後判定に重要な意義を有する事がわかった。

4) その他の神経・筋疾患

DMD, BMD 以外の遺伝子性、後天性神経・筋疾患は全て正常筋と全く同じようなジストロフィンの発現が認められた。唯一の例外は福山型先天性筋ジストロフィーと臨床的に診断された症例の中にまれではあるがジストロフィンが全く発現していない例のある事が見いだされ、今後検討を要すると思われる。

5) ジストロフィンの臨床応用

ジストロフィン抗体による免疫染色は臨床的に① DMD と BMD, ② DMD と肢帯型筋ジストロフィー, ③ DMD と福山型先天性筋ジストロフィー, ④ DMD 女性保因者と女性肢帯型の鑑別等に有効であり、今後進行性筋ジストロフィーの鑑別診断上血清 CK と共に重要な検査法となろう。また BMD の場合ジストロフィン含量の測定は予後判定上有益である。

B. ミトコンドリア脳筋症

ミトコンドリア (mt) 脳筋症は臨床症状の多様性を特徴としているが、本研究班の本邦における症例の分析ではその過半数は進行性外眼筋麻痺 (CPEO) を含む Kearns-Sayre 症候群 (KSS) であり、ついで MELAS, MERRF の順となっている。ミトコンドリア内の蛋白合成は核 DNA と mtDNA の両者に影響される複雑性

から、その病因や病態の遺伝子レベルでの解明は容易ではない。

当研究班員により mt の全ゲノムをカバーする28種類の遺伝子プローブが確立され、KSS 症候群の約60%で mtDNA の部分欠失を示す事が明らかになった。また CPEO の母娘例で共通部分を含む欠失例が報告された。

KSS 症候群についての詳細な遺伝子解析の結果、此等の症例の中には全く同じ配列 (direct repeat) 間に起こった複製上の誤り (slipped mispairing) によるもの、相同性は高いが direct repeat が認められない症例、或は一種類の欠失ではなく、多種類の欠失、即ち多重欠失の症例も報告された。

MELAS に関してはミトコンドリアの明らかな欠失は報告されておらず、クローン化した筋細胞について分子遺伝学的検索が続けられ、複合体 IV 欠損筋細胞でサブユニット 6 の mRNA が明らかに減少しており核 DNA の異常が予測された。

当研究班の福原班員によって初めて記載された福原病、MERRF は遺伝形式からは mtDNA の異常が強く示唆されるが、まだ明らかな mtDNA の異常は発見されていない。ミトコンドリアの遺伝子の異常が病因として推定されていた Leber 病については白人症例について点突然変異が報告されたが、本症例についても白人同様塩基番号11,778の位置が G から A への置換が認められ、この為に NADH dyhydrogenase のサブユニット 4 の340番の Arg が His に置換している事が明らかになり、人種を越えた塩基変異が本症の病因と断定し得ると考えられる。

〔II. 未解決の問題点〕

A. 進行性筋ジストロフィー

1) ジストロフィン欠損と筋壊死

DND におけるジストロフィン欠損がどのような機序で進行性の筋壊死、筋萎縮をもたらすかは完全には解明されていない。BMD は DMD と異なり、不完全ではあるがジストロフィンが発現する事がわかり、この事が DMD より予後が良好である事がある程度説明できると思われる。しかし免疫組織化学で認められるいわゆる“patchy”な染色の機序はなお不明であり、今後の課題である。

更に同じジストロフィンが欠損していても mdx マウスでは筋力低下は進行しない。両者の臨床経過の著しい差異がいかなる理由によるかを明らかにする事は DMD 治療法開発の重要な鍵になろう。

2) 治療法開発へのアプローチ

DMDにおけるジストロフィン欠損は遺伝子異常(60%は遺伝子部分欠失)による事が明らかになり、従って当面根本治療は望めない。

現在2つの対症療法が考慮されている。

①正常筋芽細胞注入法

正常筋芽細胞を患者筋肉に注入する事によりジストロフィンを発現させる事を目的としているが、注入細胞の数、注入時期、拒絶反応など解決すべき問題点が多い。

②蛋白分解酵素阻害剤

現在厚生省薬務局新薬開発班で二重盲検法で検討中である。

3) その他の筋ジストロフィー

ジストロフィン抗体の免疫染色、immunoblot法を用い従来臨床的に診断された筋萎縮性、特に肢帯型筋ジストロフィーを再検討する必要がある。

DMD、BMD以外の進行性筋ジストロフィー、例えば肢体型および福山型先天性筋ジストロフィー、顔面・肩胛・上腕型に関してはその原因は依然として不明であり連鎖解析も進んでいない。DMDとのアナロジーを考えるならばジストロフィン以外の蛋白欠損による筋表面膜異常が考えられるが、推定の域を脱していない。

B. ミトコンドリア脳筋症

1) ミトコンドリア脳筋症の臨床症状は複雑且つ多様であり、その理由として①異常発現臓器の多様性、②酵素活性の時間的変動が挙げられる。この2つの特徴が合理的に説明できれば病態解明は大きく前進するであろう。

2) ミトコンドリアDNか核ADNAか

CPEOを含むKSS症候群では高頻度にmtDNA異常が認められ且つ正常のmtDNAと決失を持つ異常mDNAが混在(heteroplasmy)しているが、MERRF、MELASの臨床的特徴を合わせ持った症例で小さい欠失が見いだされ、そしてその異常mtDNAは単独で存在していた(homoplasmy)。また、MELASでは複合体1のサブユニットに異常があるとの報告がある。一方MERRFに関しては遺伝子レベルの研究は全く進んでおらず、今後に残された課題である。

3) 治療に関して

当研究班員の研究によりCoenzyme Q10 (CoQ)の大量療法がKSS症候群に対し臨床症状、検査所見の改善効果を持つことが明らかになった。最近KSS症候群以外のミトコンドリア脳筋症に対しても有効であるという報告もあり、今後の検討が必要であろう。

分 担 研 究 報 告

目 次

I. 臨床

- 1) Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィにおける脊髄前根の変化について
——他の神経筋疾患との対比から——……………23
東京都立神経病院 田 邊 等
- 2) 常染色体劣性遠位型筋ジストロフィーの骨格筋 CT 像……………28
東邦大学医学部第四内科 栗 原 照 幸
- 3) 筋緊張性ジストロフィーにおける筋萎縮分布
——CT による検討——……………33
東京医科歯科大学医学部神経内科 塚 越 廣
- 4) 神経筋疾患における Ultrasound Imaging
——実画像のデジタル処理——……………40
北海道大学医学部神経内科 田 代 邦 雄
- 5) Lysosomal glycogen storage disease without acid maltase deficiency
3 症例の組織化学的, 生化学的検討……………46
鹿児島大学医学部第三内科 納 光 弘

II. 生化学

- 6) 絶食——再摂食時に於ける骨格筋速筋と遅筋のエネルギー代謝……………55
信州大学医学部第三内科 庄 司 進 一
- 7) ラット骨格筋収縮の燐 NMR……………59
大分医科大学生理学教室 山 田 和 廣
- 8) ヒト正常および筋ジストロフィー骨格筋における Ca 依存性
プロテアーゼおよびそのインヒビターの局在および動態について……………62
熊本大学医学部第一内科 荒 木 淑 郎
- 9) ラット培養筋細胞におけるリソソームの動態……………67
順天堂大学医学部生化学第一講座 木 南 英 紀
- 10) 筋ホスホフルクトキナーゼ欠損症における酵素異常について……………73
大阪大学医学部第二内科神経内科 垂 井 清一郎

III. 遺伝子

- 11) CANP 遺伝子の発現調節と機能79
東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部 鈴木 絃 一
- 12) Kennedy-Alter-Sung の症候群の遺伝子解析85
金沢大学医学部神経内科 高守 正 治
- 13) ジストロフィンおよびアセチルコリン受容体 mRNA 発現に対する
カルシトニン遺伝子関連ペプチドの修飾に関する研究.....88
金沢大学医学部神経内科 高守 正 治
- 14) 女性筋ジストロフィー患者に関する細胞遺伝学的並びに
分子遺伝学的検索.....91
東京医科歯科大学難治疾患研究所遺伝疾患部門 斎藤 深美子
- 15) 進行性筋ジストロフィー非定型例の遺伝子欠失部位の解析.....96
東京都臨床医学総合研究所臨床遺伝学 鈴木 義 之

IV. ジストロフィン

- 16) Duchenne 型筋ジストロフィーの異常遺伝子産物 (ジストロフィン) の
二次元電気泳動での検出103
助東京都神経科学総合研究所神経生化学 堀 眞一郎
- 17) 悪性肢帯型筋ジストロフィー症の骨格筋における
ジストロフィンの証明107
徳島大学医学部第一内科 川井 尚 臣
- 18) Dystrophin: Becker 型筋ジストロフィーにおける dystrophin の
分子異常並びにヒト臓器における dystrophin の局在について.....112
熊本大学医学部第一内科 荒木 淑 郎
- 19) ベッカー型筋ジストロフィーの筋病理
——ジストロフィン・テストで確定診断された20例の検討——116
国立精神・神経センター神経研究所 杉田 秀 夫
- 20) ジストロフィン分子における C 末端ドメインの臨床的意義121
国立精神・神経センター神経研究所 杉田 秀 夫

V. mdx マウス

- 21) mdx および control マウスの液体ヘリウム急速凍結骨格筋の freeze fracture, deep etching, rotary shadow replica 法による細胞膜裏打ち構造の研究127
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山 吉弘
- 22) mdx および control マウスの生後早期における骨格筋細胞膜内 orthogonal array 密度について132
昭和大学藤が丘病院神経内科 若山 吉弘
- 23) mdx マウス下肢骨格筋の SR-T membrane system および dipeptides136
聖マリアンナ医科大学第二生理学教室 吉岡 利忠
- 24) mdx マウスの筋小胞体機能 (続報)141
虎の門病院神経内科 高木 昭夫
- 25) mdx マウス骨格筋内の Ca イオン濃度145
国立精神・神経センター神経研究所 吉田 瑞子
- 26) mdx マウスの膜電位低下とミオトニー, 及びその治療147
東邦大学医学部第四内科 栗原 照幸
- 27) 「Immobilization」による mdx マウス筋変性への影響
——Local tetanus 法による検討——151
東京都立神経病院 田邊 等
- 28) mdx マウスの筋再生能(2)
マーカイン局注後の筋再生に及ぼす除神経の影響156
鳥取大学医学部神経病理 中村 晴臣

VI. 培養・再生

- 29) ヒト培養筋細胞の発達に対する筋収縮活動の影響163
東京医科歯科大学医学部神経内科 塚越 廣
- 30) カルシトニン遺伝子関連ペプチドによる筋芽細胞の分化誘導168
徳島大学医学部第一内科 川井 尚臣
- 31) 損傷筋組織におけるトランスフェリンについて172
東北大学医学部神経内科 高瀬 貞夫
- 32) ジストロフィー筋への正常マイオブラストの注射に関する研究177
帝京大学医学部第一内科 寺尾 寿夫

VII. ミトコンドリア(1)

- 33) ヒトミトコンドリア DNA・D ループ領域の塩基配列の解析185
国立遺伝学研究所 宝 来 聰
- 34) シトクロム酸化酵素小サブユニット遺伝子の
クローニングとその発現様式190
順天堂大学医学部脳神経内科 水 野 美 邦
- 35) MELAS クローン化筋細胞の分子遺伝学的検索194
自治医科大学小児科 桃 井 真里子
- 36) Leber 病家系におけるミトコンドリア遺伝子解析198
新潟大学脳研究所神経内科 宮 武 正
- 37) 慢性進行性外眼筋麻痺におけるミトコンドリア DNA 多重欠失の
PCR 法による分析202
名古屋大学医学部神経内科 杉 村 公 也
- 38) ミトコンドリアミオパチーのミトコンドリア DNA の解析
——Kearns-Sayre-Shy 症候群の一例について——207
九州大学医学部脳研神経内科 後 藤 幾 生
- 39) ミトコンドリア遺伝子病とミトコンドリア DNA 変異のタイプ212
名古屋大学医学部第二生化学 小 澤 高 將
- 40) Kearns-Sayre 症候群における異常ミトコンドリア DNA の解析218
大阪大学医学部第二内科神経内科 垂 井 清一郎

VIII. ミトコンドリア(2)

- 41) MERRF の臨床知見補遺225
国立療養所犀潟病院神経内科 福 原 信 義
- 42) ミトコンドリアミオパチーの³¹P MR spectroscopy による検討229
北海道大学医学部神経内科 田 代 邦 雄
- 43) Complex I 欠損症による Leigh 脳症と思われる 2 例234
国立療養所宇多野病院臨床研究部神経内科 齊 田 孝 彦
- 44) 高カルシウム血症とミオトニア様の手拳開排困難をきたした
mitochondrial neuromyopathy の 1 例238
東北大学医学部神経内科 高 瀬 貞 夫

- 45) ミトコンドリア脳筋症における下垂体機能異常243
筑波大学臨床医学系神経内科 金澤 一郎
- 46) チトクローム c 酸化酵素部分欠損
——筋線維ときほぐし標本による検討——247
国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部 埜中 征哉
- IX. ミトコンドリア(3)
- 47) 家族性ミトコンドリア・ミオパチーにおけるミトコンドリア DNA の
解析：non-D loop 領域の多重欠失について253
筑波大学臨床医学系神経内科 金澤 一郎
- 48) ミトコンドリア脳筋症におけるミトコンドリア DNA の欠失259
順天堂大学医学部脳神経内科 佐藤 猛
- 49) 多重欠失を伴いミトコンドリア DNA の減少のみられた
優性遺伝の疑われるミトコンドリアミオパチーの一例263
順天堂大学医学部脳神経内科 水野 美邦
- 50) 慢性外眼筋麻痺症候群におけるミトコンドリア DNA 異常と
臨床像・筋病理所見との対応267
国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部 埜中 征哉
- 51) Kearns-Shy 症候群における deleted mtDNA の組織分布と
RNA 転写について271
東京大学医学部神経内科 清水 輝夫

I. 臨 床

1) Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーにおける 脊髄前根の変化について

—他の神経筋疾患との対比から—

田 邊 等*

研究協力者 宮 本 和 人** 磯 崎 英 治** 林 理 之**
高 元 喜代美** 神 田 隆***

目 的

Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (ED) の筋病理像の解釈や、筋電図所見の解釈において従来から筋原性と神経原性変化の種々の程度の混在が指摘されている¹⁾。剖検例での報告でも脊髄前角及び前根に異常がなかったとする原らの報告²⁾と、前角に異常が見られたとする工藤らの報告³⁾があり、一定の見解が得られていない。本症が骨格筋自体に変性が起きる疾患であることは間違いないと思われるが、その並存する神経原性変化の責任病巣を同定するため、脊髄前根の形態学的変化及び定量的計測を実施した。急性脳血管障害 (CVD) を対照群とし、四肢の脱力と筋萎縮が軽い筋萎縮性側索硬化症 (ALS) も比較検討した。

対象および方法

ED 1 例 (高元らにより報告⁴⁾: 筋電図上も神経原性変化と筋原性変化の混在が確認されている)、CVD 2 例、ALS 2 例、の合計 5 例の剖検時採取した第 7 頸髄前根 (C₇)、第 2 胸髄前根 (Th₂)、第 3 腰髄前根 (L₃)、腓腹神経、大腿四頭筋を主な検索対象とした。

方法: 通常の病理組織学的検索に加えて、脊髄前根及び末梢神経を 2.5% グルタル固定後、エポンプロック作成、0.5 μ 切片をトルイジンブルーで染色し、デジタイザーとパーソナルコンピュータで短径を計測しヒストグラムを作成した。一部

については、有髄線維直径に対する髄鞘の内径の比すなわち G-ratio を計測した。更に各前根横断面総 endoneurial area の面積を計測した。筋組織については凍結切片で通常の組織化学的検索を行った。

結 果

まず、ED 例の筋病理所見で、支配神経として C₇ 成分が関与している上腕三頭筋について述べると、H-E 染色で正常大線維と萎縮線維よりなる中等度の大小不同を認める。萎縮線維は小角化線維の散在と小数の PNC が認められる。間質に軽度の脂肪浸潤と線維化を認め、また小数の再生線維と横断面円形化を呈する線維も認められる。ただし、明瞭な壊死線維、炎症細胞浸潤は認めない。ATPase 活性像にて小規模な fiber type grouping が認められる (図 1 a, 1 b)。支配神経として L₃ 成分が関与する大腿直筋では、筋線維直径に軽度の大小不同を認め、その内訳は小群集萎縮と小角化線維の散在と思われる。また、間質に軽度ないし中等度の線維化と脂肪浸潤を認め、非萎縮線維で横断面円形化が認められ、病理組織学的にも神経原性変化と筋原性変化の混在が示唆される (図 1 c, 1 d)。短腓骨筋では、間質の脂肪浸潤や線維化は殆ど認められず、小角化線維の散在及び一部群集が認められ、更に明らかな fiber type grouping が認められる。この筋では筋原性変化の所見に乏しく、神経原性変化が中心と考えられる (図 1 e, 1 f)。拇指球筋では大小不同が認められるが、萎縮線維も直径 30 μ までで高度の萎縮線維

* 東京都立神経病院
** 東京都立神経病院神経内科
*** 東京都立神経病院検査科病理

はなく、小角化線維も認められず、多くの線維は横断面円形化を呈している。又、ATPase 活性像では、type 1 atrophy が明瞭に認められる（図 1

g, 1 h). 傍脊柱筋を凸側と凹側で採取し観察したが両方とも変化がきわめて強く、殆ど脂肪組織と線維性結合織により置換されている。以上、観察

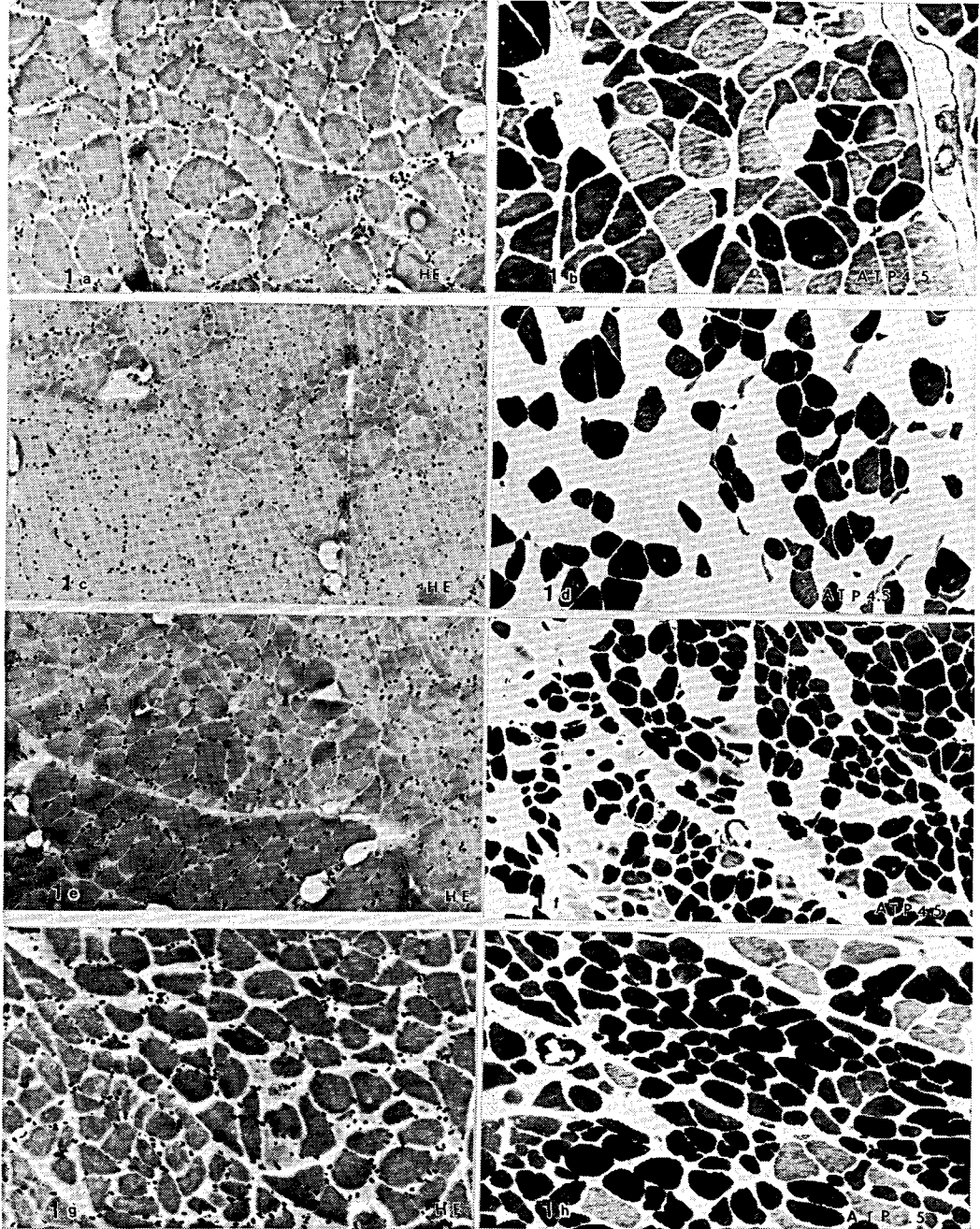


図 1

