

Figure 1. Effective induction of myogenic lineage cells from mES cells *in vitro*. *A*) *In vitro* culture system for ES cells. *B–E*) Skeletal myofibers observed within the culture system (*B–D*), which were positive for the mature myofiber marker MHC (*E*). *F, G*) Commonly recognized markers for satellite cells, Pax7 (*F*) and Myf5 (*G*), were observed in the cultures. *H, I*) MyoD-positive (*H*) and myogenin-positive fibers (*I*) were also observed in the cultures. *J*) RT-PCR expression of MRFs including Pax3, Pax7, Myf5, MyoD, and myogenin in ES cells in our novel culture system at d 0, 3 + 3, 3 + 3 + 7, 3 + 3 + 14, and 3 + 3 + 21. Scale bars = 50 μ m (*A–D*); 100 μ m (*E–I*).

14, but Myf5, MyoD, and myogenin continued to be expressed after d 3 + 3 + 14.

Thus, using Matrigel plates and differentiation medium containing HS, myogenic lineages including Pax7-positive satellite-like cells were successfully induced from mES cells.

A novel antibody, SM/C-2.6, can enrich for Pax7-positive satellite-like cells derived from ES cells

To examine the characteristics of ES-derived Pax7-positive satellite-like cells, we needed to isolate these cells from the culture. Since Pax7 is a nuclear protein rather than a

surface marker, anti-Pax7 antibodies cannot be used for living cell separation by FACS. Therefore, a novel antibody, SM/C-2.6 (23), was used to detect satellite cells. SM/C-2.6 detects quiescent adult mouse satellite cells, as well as satellite cells in neonatal muscle tissue, as determined by immunostaining (Supplemental Fig. 2). RT-PCR confirmed that sorted SM/C-2.6-positive cells expressed Pax3, Pax7, Myf5, and c-met, whereas sorted SM/C-2.6-negative cells did not (Supplemental Fig. 3). Thus, the SM/C-2.6 antibody was shown to be useful for isolating living satellite cells by FACS.

We collected all the differentiated ES cells (1×10^6 cells) from cultures on d 3 + 3 + 14. FACS analysis using the SM/C-2.6 antibody showed that 15.7% of the cells were SM/C-2.6 positive (Fig. 2A). RT-PCR analysis revealed that sorted SM/C-2.6-positive cells strongly expressed Pax3, Pax7, Myf5, c-met, and M-cadherin (Fig. 2B). Using a cytospin preparation of sorted SM/C-2.6-positive cells, we also confirmed the expression of M-cadherin (Fig. 2C) and Pax7 (Fig. 2D; $70.7 \pm 16.5\%$ and $59.9 \pm 1.1\%$ positive, respectively); only $2.3 \pm 0.49\%$ of the sorted SM/C-2.6-negative cells expressed

M-cadherin, and $2.7 \pm 0.1\%$ expressed Pax7. Thus, the SM/C-2.6 antibody could enrich for satellite-like cells derived from mES cells *in vitro*.

ES-derived satellite-like cells have strong myogenic potential *in vitro*

To evaluate the myogenic potential of ES-derived SM/C-2.6-positive satellite-like cells *in vitro*, both SM/C-2.6-positive and -negative cells were sorted by FACS and plated in 96-well Matrigel-coated plates (see Fig. 4A). One week after cultivation, the number of muscle fibers in the wells was assessed. Although there were fibroblast-like and endothelium-like cells, MHC-positive fibers (787.3 ± 123.7 well, $10.7 \pm 0.8\%$ of the total cells per well, $n=3$) and Pax7-positive cells (222 ± 81.4 /well, $2.9 \pm 1.1\%$ of the total cells per well, $n=9$) were observed in the SM/C-2.6-positive wells. In contrast, very few MHC-positive fibers (8.75 ± 32.6 /well, $n=15$; $0.12 \pm 0.46\%$) or Pax7-positive cells (2.6 ± 2.0 /well, $n=8$; $0.03 \pm 0.01\%$) were seen in the SM/C-2.6-negative wells

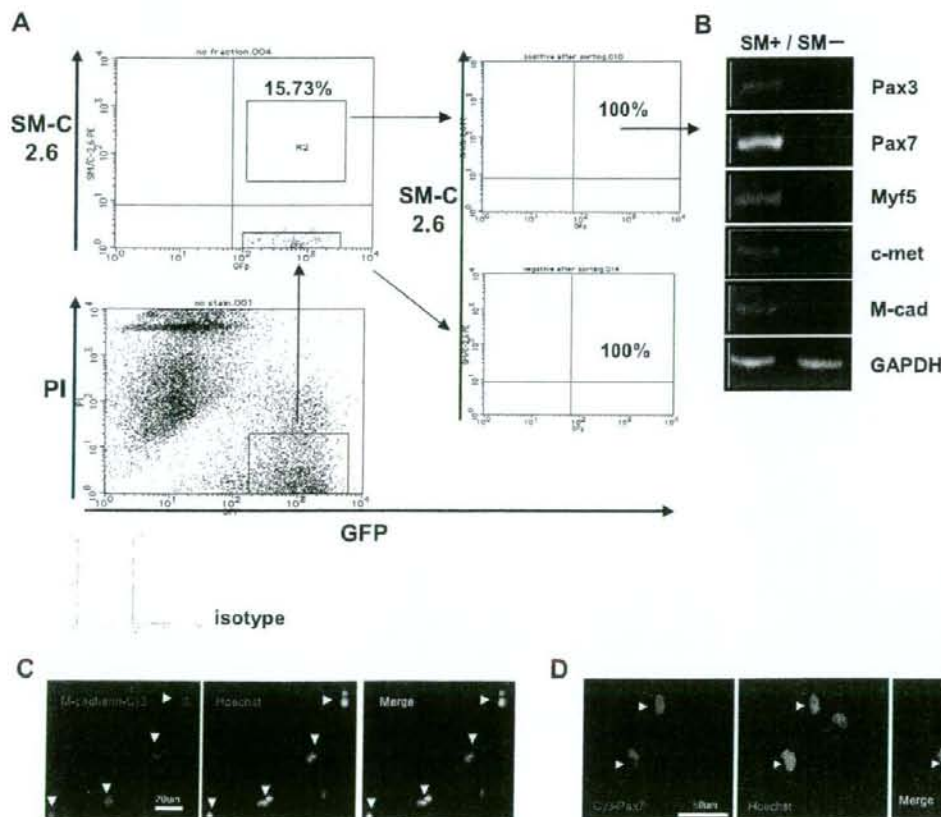


Figure 2. A novel antibody, SM/C-2.6, can enrich Pax7-positive satellite-like cells derived from ES cells. **A**) FACS data of cultured ES cells at d 3 + 3 + 14 indicate that 15.7% of total cultured cells are SM/C-2.6-positive cells. **B**) RT-PCR of the SM/C-2.6-positive fraction showed strong expression of Pax3, Pax7, Myf5, c-met, and M-cadherin. Immunostaining of a cytospin preparation of the sorted SM/C-2.6-positive cells showed that these cells were positive for M-cadherin (**C**), and Pax7 (**D**) (white arrowheads). Scale bars = 20 μ m (**C**); 50 μ m (**D**).

(both $P < 0.05$; Fig. 3). Thus, ES-derived satellite-like cells isolated using the SM/C-2.6 antibody possess strong myogenic potential *in vitro*.

Damaged muscle can be repaired by transplantation of ES-derived satellite-like cells

To examine the myogenic potential of ES-derived satellite-like cells *in vivo*, SM/C-2.6-positive and -negative cells were transplanted into conditioned mdx mice (15). The LTA muscles of recipient mdx mice were preinjured with CTX (primary injury; ref. 30) 24 h prior to transplantation, and mice were exposed to 8 cGy of γ -irradiation (whole body) 12 h prior to transplantation (Fig. 4A). GFP-positive ES cells were used as donor cells in this experiment. GFP⁺ ES-derived SM/C-2.6-positive and -negative cells were directly injected into the predamaged LTA muscles. The recipient mice were analyzed 3 wk post-transplantation. By fluorescence stereomicroscopy, GFP-positive tissues were clearly observed within the LTA muscles injected with SM/C-2.6-

positive cells (Fig. 1D) and Table 1). In contrast, no GFP-positive tissue was observed in muscles injected with SM/C-2.6-negative cells (Fig. 4C). These GFP-positive tissues were further confirmed by diaminebenzidine staining using anti-GFP and a peroxidase-conjugated secondary antibody (Supplemental Fig. 4) to exclude the possibility of autofluorescence of the muscle tissues. Immunostaining with anti-MHC confirmed that these GFP-positive tissues were mature skeletal myofibers (Fig. 1D). In addition, GFP/Pax7 double-positive cells were observed within the LTA muscles of the recipient mice (Fig. 4E and Supplemental Fig. 5) and in isolated single fibers (Fig. 4F and Table 1). The GFP-positive cells were also confirmed to be positive for other satellite cell markers such as Myf5 and Mcadherin (Supplemental Figs. 6 and 7). These GFP/Pax7-double-positive cells were located along the periphery of the muscle fascicle. With laminin immunostaining we verified that the location of the GFP-positive mononuclear cells was between the basal lamina and the muscle cell plasma membrane, a location consistent with the anatomical definition of satellite cells

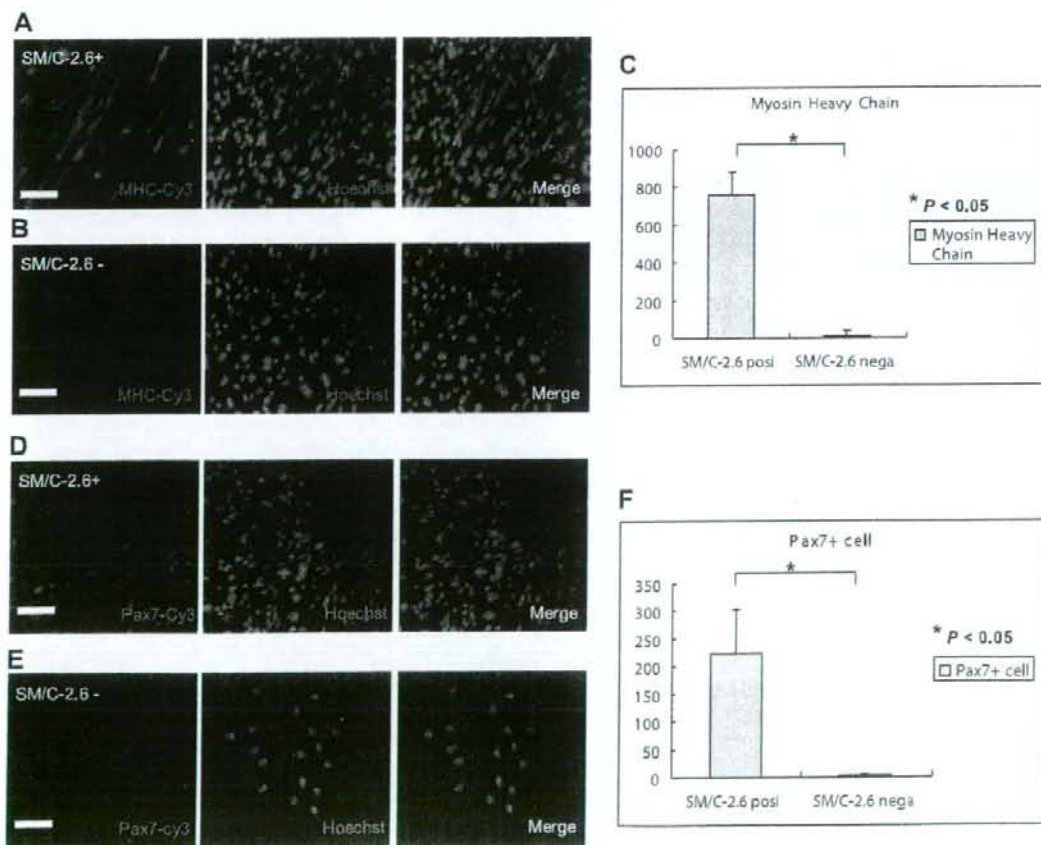


Figure 3. ES-derived satellite-like cells have strong myogenic potential *in vitro*. Immunostaining detected an abundant number of MHC-positive fibers and Pax7-positive cells in SM/C-2.6-positive cell culture (A, D) but not SM/C-2.6-negative cells (B, E) after 1 wk in culture. Scale bars = 50 μ m. Significant differences were observed in the number of MHC-positive fibers and Pax7-positive cells per cell between sorted SM/C-2.6-positive and -negative cell cultures (C, F).

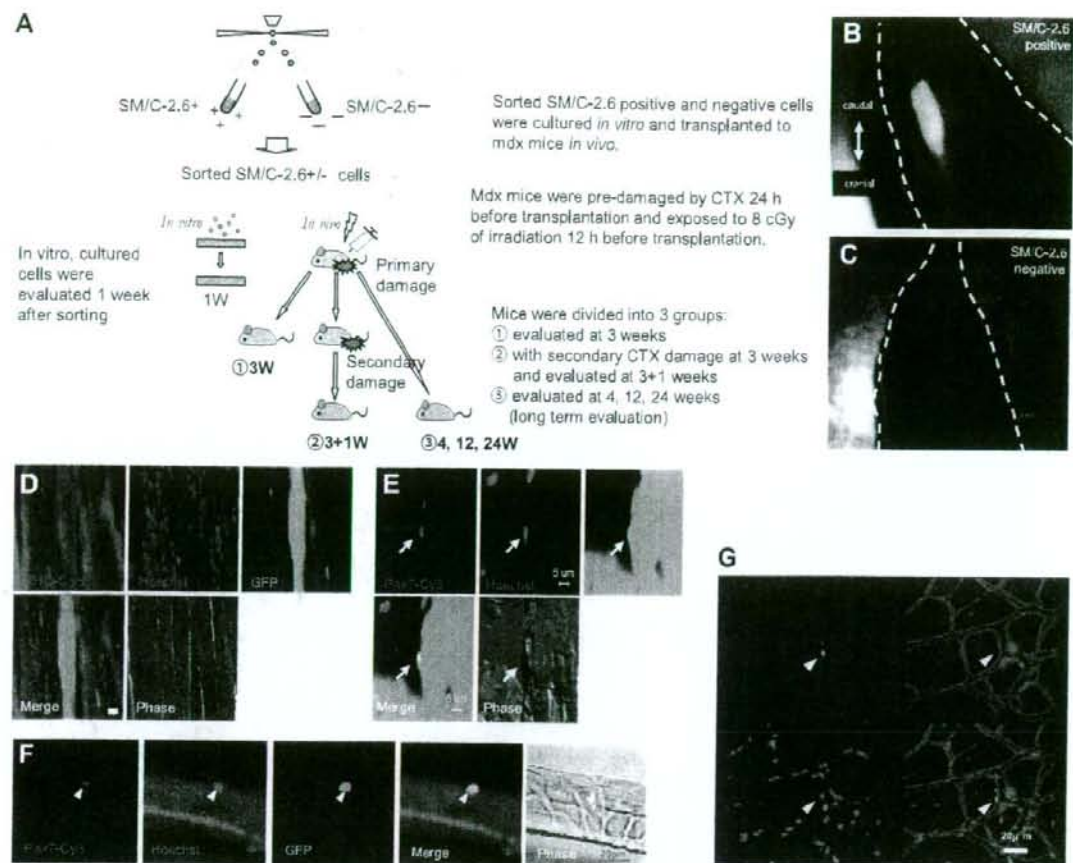


Figure 4. ES-derived satellite-like cells can repair damaged muscle *in vivo*. *A*) Methods for *in vitro* and *in vivo* analysis of sorted SM/C-2.6-positive and -negative cells derived from mES cells. *B*, *C*) ES-derived GFP-positive tissue engrafted to the LTA muscle of a recipient mouse that received SM/C-2.6-positive cells (*B*) but SM/C-2.6-negative cells (*C*). *D*) Grafted GFP-positive tissues were histologically MHC positive. *E*) GFP/Pax7-double-positive cells were observed in mice that received SM/C-2.6-positive cells by anti-Pax7 immunostaining. *F*) GFP/Pax7-double-positive cells were also confirmed by immunostaining of isolated single fibers. *G*) Laminin immunostaining indicated that the GFP-positive cells were located between the basal lamina and the muscle cell plasma membrane, which is consistent with the anatomical definition of muscle satellite cells. Scale bars = 1 mm (*B*, *C*); 15 μ m (*D*); 5 μ m (*E*); 20 μ m (*F*, *G*).

(Fig. 4*G*). In contrast, in mice transplanted with SM/C-2.6-negative cells, GFP-positive tissues were rarely observed, and none of the GFP-positive cells were positive for skeletal MHC. H&E staining indicated that these GFP-positive tissues were surrounded by inflammatory cells (Supplemental Fig. 8), suggesting that these nonmyogenic tissues may undergo phagocytosis. These results demonstrate that ES-derived SM/C-2.6-positive satellite-like cells could be engrafted *in vivo* and repair damaged muscle tissues of the host.

Engrafted ES-derived satellite-like cells function as satellite cells following muscle damage

Muscle satellite cells are generally considered to be self-renewing multipotent stem cells that differentiate into myoblasts and myofibers to repair damaged skeletal muscles. To determine whether these engrafted GFP⁺ES-

derived satellite-like cells are functional stem cells, we injured the LTA muscle of primary recipient mice 3 wk after primary transplantation with GFP⁺ SM/C-2.6-positive cells. This experiment let us assess the ability of satellite-like cells to repair damaged muscle fibers and self-renew *in vivo* (14). The LTA muscles were removed and analyzed 1 wk after the secondary injury (reinjured group). Mice that were initially injected with GFP⁺ SM/C-2.6-positive cells without a second injury were used as a control (nonreinjured group). These control mice were analyzed 3 or 4 wk after transplantation (Fig. 4*A*). GFP-positive muscle fascicles were counted in sections of both reinjured and nonreinjured muscle (Fig. 5*A*, *B*). In the reinjured group 161.7 ± 117.4 ($n=6$; per view, $\times 100$) GFP-positive muscle fascicles were observed. In comparison, only 136.7 ± 27.9 ($n=4$) and 168.7 ± 72.9 ($n=6$; per view, $\times 100$) GFP-positive muscle fascicles were evident in

TABLE 1. Transplantation of uninjured and uninjured mice and long-term evaluation

Group	TA with GFP ⁺ fascicles [%]†	Mouse	Cells TA injected (n)	GFP ⁺ fascicles/TA (avg)‡	GFP ⁺ , Pax7 ⁺ cells/TA (avg)‡	Engraftment efficiency
SM/C-2.6⁻						
3W	4/8 (50%)	1	1.75 × 10 ⁴	125.3	5.3	
		2	3.5 × 10 ⁴	111.1	7.1	
		3	5 × 10 ⁴	134.2	5.1	
		4	8 × 10 ⁴	176.1	4.2	
Mean		4.5 ± 2.6 × 10 ⁴	136.7 ± 27.0	5.4 ± 1.2	0.30%	
4W	6/9 (66.67%)	1	2 × 10 ⁴	77.3	6.1	
		2	1.3 × 10 ⁵	153.2	4.6	
		3	5 × 10 ⁴	163.1	6.8	
		4	3.5 × 10 ⁴	168.9	5.1	
		5	8 × 10 ⁴	281.1	7.2	
		6	1.75 × 10 ⁵	169.4	6.2	
Mean		3.6 ± 2.5 × 10 ⁴	168.7 ± 72.9	6 ± 1	0.47%	
3 + 1W	6/8 (75%)	1	2 × 10 ⁴	581.2	11.2	
		2	1.3 × 10 ⁵	370.3	11.5	
		3	5 × 10 ⁴	586.6	10.1	
		4	3.5 × 10 ⁴	486.6	5.9	
		5	8 × 10 ⁴	347.1	15.3	
		6	1.75 × 10 ⁵	542.9	10.8	
Mean		5.5 ± 4.3 × 10 ⁴	461.7 ± 117.3	10.8 ± 3	0.84%	
12W	3/5 (60%)	1	2 × 10 ⁴	391.5	9.7	
		2	5 × 10 ⁴	266	9.3	
		3	8 × 10 ⁴	280.2	6	
Mean		5 ± 3 × 10 ⁴	312.6 ± 68.7	8.3 ± 2	0.59%	
24W	1/2 (50%)	1	2 × 10 ⁴	58.62	3.45	
Mean			2 × 10 ⁴	58.62	3.45	0.20%
SM/C-2.6⁻						
3W	0/8 (0%)	1-8	1-8 × 10 ⁴	0	0	0%
4W	0/9 (0%)	1-9	1.3-8 × 10 ⁴	0	0	0%
3 + 1W	0/8 (0%)	1-8	1.75-13 × 10 ⁴	0	0	0%
12W	0/5 (0%)	1-8	2-8 × 10 ⁴	0	0	0%
24W	0/2 (0%)	1-2	2 × 10 ⁴	0	0	0%
Serial transplantation						
	Primary transplantation			Secondary transplantation		
Mouse	Cells injected	Collected GFP ⁺ cells/TA	Cells injected	GFP ⁺ fascicles/TA	Engraftment efficiency	
1	2 × 10 ⁴	3253	200	29.3	14.7%	
2	2 × 10 ⁴	2277	200	28.6	14.3%	
Mean	2 × 10 ⁴	2765	200	29 ± 0.5	14.5%	

TA, tibialis anterior; 3W, nonrejured group analyzed 3 wk after cell transplantation; 4W, nonrejured group analyzed 4 wk after cell transplantation; 3 + 1W, re-injured group re-injured 3 wk after cell transplantation and analyzed 1 wk after re-injury; 12W, long-term engraftment evaluation analyzed 12 wk after cell transplantation; 24W, long-term engraftment evaluation analyzed 24 wk after cell transplantation. †Percentage of TA that had engrafted with GFP⁺ fibers was calculated as number of TAs with GFP⁺ fibers/total TAs injected with cells. ‡Average determined from number of GFP⁺ muscle fascicles counted per field at ×100 in 10 fields. §Average determined from number of GFP⁺, Pax7⁺ cells counted per field at ×100 in 10 fields.

the nonrejured groups at 3 and 4 wk, respectively, after transplantation (Fig. 5B and Table 1). Furthermore, we also observed that many GFP-positive muscle fibers had a typical central nucleus in the re-injured group (Fig. 5C), indicating regenerating muscle fibers. Taken together, these results suggest that these GFP-positive muscle tubes were freshly regenerated by the engrafted GFP⁺ ES-derived satellite-like cells in response to the second injury. Surprisingly, immunostaining with anti-Pax7 revealed an increase in number of GFP/Pax7-double-positive cells in the re-injured group (10.8 ± 3.0/view compared to 5.4 ± 1.2, and 6.0 ± 1.0 in the

nonrejured group; Fig. 5D and Table 1). This result strongly suggests that engrafted ES-derived satellite-like cells not only self-renewed but also expanded in number, possibly replacing the recipient satellite cells lost because of excessive repair of skeletal muscle in response to the second injury.

ES-derived satellite-like cells are capable of long-term engraftment in recipient muscles

Long-term engraftment is an important characteristic of self-renewing stem cells. If these ES-derived satellite-

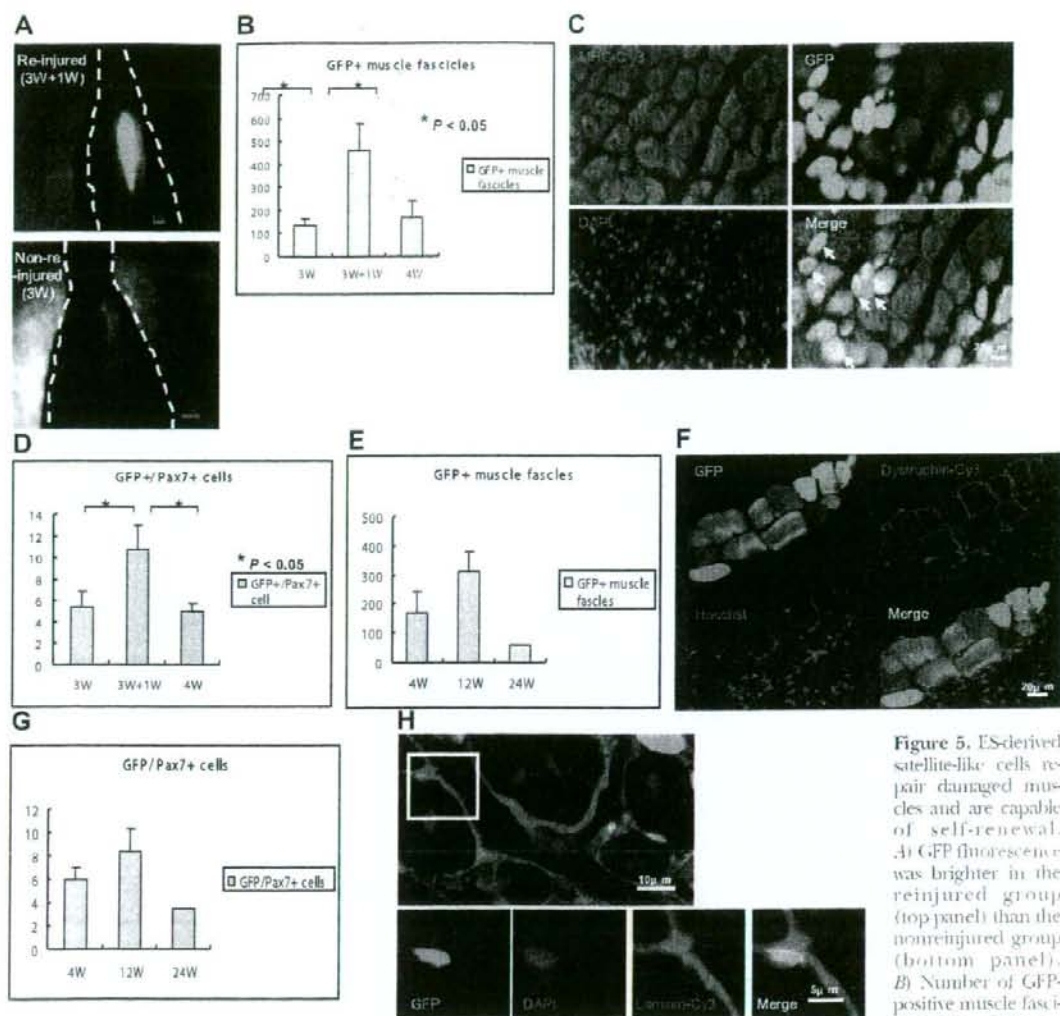


Figure 5. ES-derived satellite-like cells repair damaged muscles and are capable of self-renewal. *A*) GFP fluorescence was brighter in the re-injured group (top panel) than the noninjured group (bottom panel). *B*) Number of GFP-positive muscle fascicles was 461.7 ± 117.3 in the re-injured group (3W+1W) and 136.7 ± 27.9 and 168.7 ± 72.9 in the nonre-injured group at 3 wk (3W) and 4 wk (4W), respectively. *C*) GFP-positive fibers were confirmed to be MHC positive and contained central nuclei (arrows). *D*) Number of GFP, Pax7-double-positive cells also increased significantly in the re-injured group (10.8 ± 3.0 cells at 3W+1W) compared to the nonre-injured group (5.4 ± 1.2 and 6.0 ± 1.0 at 3W and 4W, respectively). *E*) In long-term evaluations, number of GFP-positive muscle fascicles at 12 wk (12W) increased relative to number at 4 wk after transplantation [312.6 ± 68.7 ($n=3$) vs. 168.7 ± 72.9]. However, a decrease was observed at 24 wk (58.6 ; $n=1$). *F*) Immunostaining showed dystrophin (red) surrounding the donor-derived GFP-positive fibers (green), 24 wk after transplantation of SM-C-2.6-positive cells. *G*) Results similar to *E* were observed with the number of GFP Pax7-double-positive cells. *H*) A GFP-positive cell beneath the basal lamina was observed. Scale bars = 1 mm (*A*); 20 μ m (*C*); 20 μ m (*F*); 10 μ m (*H*, top panel); 5 μ m (*H*, bottom panels).

like cells function as normal stem cells in skeletal muscle, they should be able to reside within the tissue for long periods of time and undergo asymmetric cell divisions to maintain the number of satellite cells and to generate muscle fibers. To examine this stem cell function, we analyzed the recipient mice at 4, 12, and 24 wk after transplantation. Intriguingly, in the LTA muscle of mdx mice transplanted with SM-C-2.6-positive cells, the number of GFP-positive fascicles at 12 wk increased over that at 4 wk [12.6 ± 68.7 ($n=3$) vs.

168.7 ± 72.9 ; Fig. 5E] but decreased by 24 wk (58.6 ; $n=1$). These engrafted GFP-positive tissues were confirmed to be MHC positive through immunostaining (Supplemental Fig. 9), and surrounding these GFP-positive fibers, dystrophin was observed (Fig. 5F). The numbers of GFP/Pax7-double-positive cells were maintained from week 4 to week 24 (Fig. 5G, Table I, and Supplemental Fig. 10) and the location of GFP-positive cells under the basal lamina meets the anatomical definition of satellite cells (Fig. 5H). No teratomas were

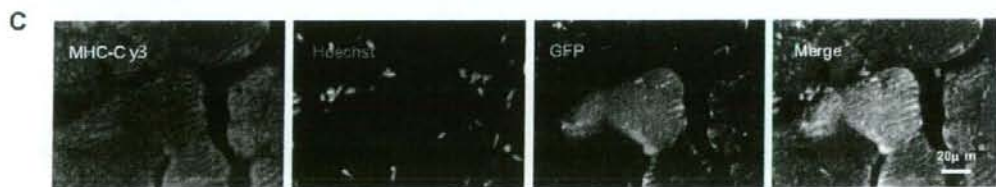
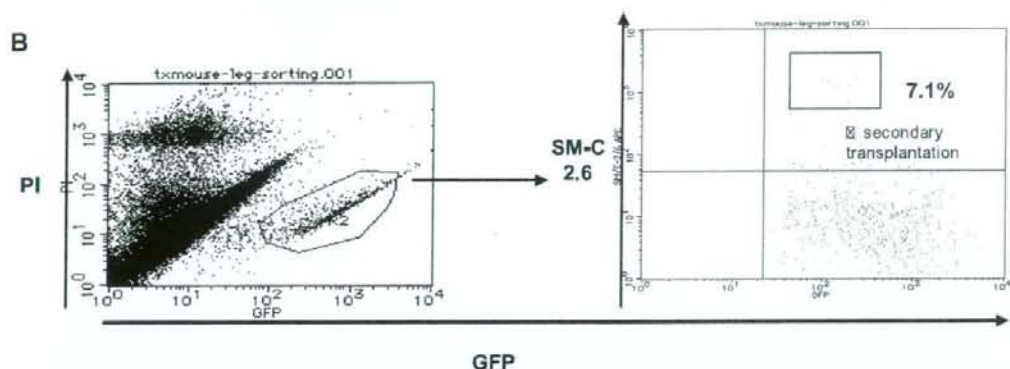
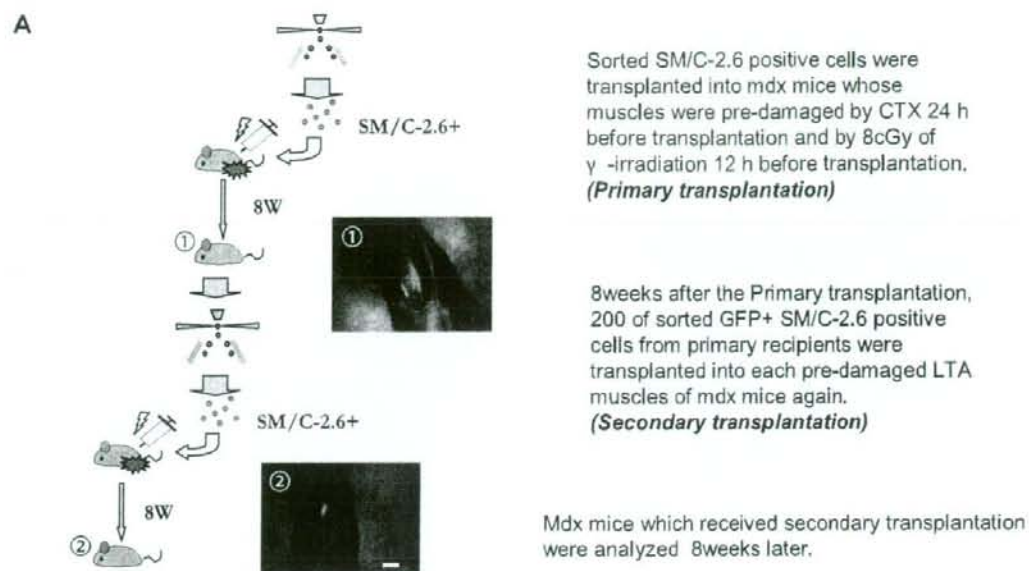


Figure 6. ES-derived satellite-like cells can be secondarily transplanted. *A*) SM/C-2.6-positive cells (2.5×10^4) were transplanted into the LTA muscle of recipient mice in primary transplantation, and as few as 200 SM/C-2.6-positive cells collected from the primary recipients were retransplanted (secondary transplantation) into the LTA muscle of secondary recipient mice. *B*) FACS data of primary transplantation indicated that 7.1% of engrafted (GFP-positive) cells were SM/C-2.6-positive. *C*) Eight weeks after secondary transplantation, immunostaining of LTA muscle for MHC showed that engrafted ES-derived GFP-positive tissues formed mature skeletal muscle fibers. *D*) GFP⁺Pax7⁺ double-positive cells (arrowhead) located beneath the basal lamina were observed within GFP-positive LTA muscle of secondary recipient mice. Scale bars = 2 mm (*A*); 20 μ m (*C*); 10 μ m (*D*).

found in recipient mice transplanted with SM/C-2.6-positive cells. Thus, ES-derived satellite-like cells effectively engrafted and provided long-term stem cells, which played an important role in maintenance of the integrity of the surrounding muscle tissue.

ES-derived satellite-like cells can be secondarily transplanted

For a more thorough characterization of the ES-derived satellite-like cells, we performed serial transplantations. Eight weeks after the primary cell transplantation with 2×10^5 SM/C-2.6-positive cells, the LTA muscles of the primary recipient mice were dissected to isolate the engrafted ES-derived cells, 2765 ± 685.9 ($n=2$; Fig. 6A). The GFP⁺/SM/C-2.6-positive cells within the engrafted cells were sorted by FACS (204 ± 33.9 ; $n=2$), and only 200 GFP⁺/SM/C-2.6-positive cells/mouse were transplanted into predamaged LTA muscles of mdx mice (Fig. 6B). Eight weeks later (16 wk after the primary transplantation), the recipient mice were analyzed. GFP-positive tissue in the LTA muscle of the secondary recipient mice was observed (Fig. 6A). The GFP-positive tissues were confirmed to be MHC-positive mature skeletal muscle (Fig. 6C), and surrounding these engrafted GFP-positive skeletal muscle fascicles, dystrophin was observed (Supplemental Fig. 11). GFP/Pax7-double-positive cells located beneath the basal lamina were also detected in the engrafted tissue (Fig. 6D). Thus, with only 200 GFP⁺SM/C-2.6-positive cells, injured skeletal muscle and Pax7⁺ cells were successfully restored in the secondary recipients. These findings demonstrate that stem cell fraction contained within SM/C-2.6-positive cells was enriched *in vivo* through transplantation.

DISCUSSION

Many attempts have been made to induce mES cells into the skeletal muscle lineage, with hanging drop cultures for EB formation being the most widely applied method (25). However, although EBs contain cells derived from all 3 germ layers, effective induction of mES cells into the myogenic lineage, including myogenic stem cells (satellite cells), has not yet been achieved. Because of the lack of adequate surface markers, purifying ES-derived myogenic precursor/stem cells from differentiated mES cells *in vitro* has been difficult. To overcome these problems, we modified the classic EB culture system by combining it with aspects of the single-fiber culture method. Single-fiber culture (33) has been used for functional evaluation of satellite cells. When a single myofiber is plated on a Matrigel-coated plate with DMEM containing HS, satellite cells migrate out of the fiber and differentiate into myoblasts to form myofibers *in vitro*. Matrigel allows the migrating satellite cells to proliferate before differentiating and fusing into large multinucleated myotubes (35). We hypothesized that this Matrigel

environment might be suitable for ES cell differentiation into satellite cells and myoblasts. Therefore, we introduced Matrigel and HS into the classic EB culture system and established an efficient induction system for myogenic lineage cells, including cells expressing Pax7, a commonly recognized marker for skeletal muscle stem cells. Furthermore, we also successfully enriched ES-derived Pax7-positive myogenic precursor/stem cells using the SM/C-2.6 antibody.

The steps in ES cell induction are thought to be homologous to normal embryogenesis. During normal skeletal myogenesis, the initial wave of myogenic precursor cells in the dermomyotome express Myf5/MRF4 and Pax3, followed by a wave of Pax3/Pax7 expression (36). These waves of myogenesis act upstream of the primary myogenic transcription factor MyoD (37–39). In myotome formation skeletal myogenesis begins with myoblasts, termed somitic myoblasts, which appear at approximately E8.5, followed by the appearance of embryonic myoblasts (E11.5), fetal myoblasts (E16.5), and, ultimately, satellite cells, which are responsible for postnatal muscle regeneration (40). Our RT-PCR results (Fig. 1f) showed an earlier appearance of Pax3 expression, on d 3 + 3, followed by Pax3/Pax7 expression on d 3 + 3 + 7 and stronger expression of Pax3 than Pax7. These results resemble normal myogenesis, in which the primary wave of myogenesis is followed by a secondary wave of Pax3/Pax7-dependent myogenesis (41). Considering that in the time course of myogenesis satellite cells emerge during late fetal development, ES-derived Pax7-positive cells were collected on d 3 + 3 + 14 in an attempt to acquire cells that correspond to those of the late fetal to neonatal period. However, RT-PCR results of myogenic factors in SM/C-2.6-positive cells (Fig. 2B) indicated that these ES-derived SM/C-2.6-positive cells are a heterogeneous population, because they express not only Pax3 and Pax7 but also Myf5 and c-met. Although further confirmation is needed, we hypothesize that both embryonic/fetal myoblasts expressing Myf-5 and/or c-met and satellite/long-term stem cells expressing Pax3/Pax7 are present.

To confirm that the ES-derived SM/C-2.6-positive cell population contained functional satellite cells, the muscle regeneration and self-renewal capacities were examined. Recently Collins *et al.* established an excellent system in which sequential damage to the muscle of a recipient mouse was applied, to evaluate both muscle regeneration and self-renewal (14). Using their experimental approach, a significant increase in numbers of both ES-derived GFP-positive muscle fascicles and GFP/Pax7-double-positive cells was observed in mice that received a second injury. This result not only demonstrates the myogenic ability of ES-derived cells but also strongly supports the idea that these cells undergo self-renewal *in vivo*.

Analysis of long-term engraftment is an important method to verify self-renewal ability, for 2 reasons. First, ES-derived satellite cells must be able to engraft for long periods of time in order to provide the amount of progeny needed for repairing damaged tissue for an

extended period. In our study the ES-derived GFP-positive skeletal muscle tissues and Pax7-positive cells engrafted up to 24 wk and were located beneath the basal lamina, which is consistent with the anatomical definition of satellite cells. Although the number of GFP-positive fascicles at 24 wk decreased compared to 12 wk, this diminution may be due to the heterogeneity of ES-derived SM/C-2.6-positive cells as we mentioned. Because myoblasts cannot support myogenesis in the long term, we believe that GFP-positive fascicles at 24 wk are products of ES-derived satellite-like cells. Second, one of the potential risks of ES cell transplantation is teratoma formation. Considering clinical applications, it is extremely important to prevent formation of teratomas in the recipients. In our study more than 60 transplanted mice were evaluated through gross morphological and histological examination. There were no teratomas formed in mice that received SM/C-2.6-positive cells, and only 1 teratoma was found among the mice that received SM/C-2.6-negative cells. This result suggests that the risk of tumor formation by the ES cells was eliminated by using sorted SM/C-2.6-positive cells.

In addition to the sequential damage model and the long-term engraftment evaluation, we performed serial transplantations to further confirm the stem cell properties of these ES-derived SM/C-2.6-positive cells. Serial transplantation enables the identification and separation of long-term stem cells from short-term progenitors (42). To eliminate myoblast involvement, we designed a serial transplantation protocol of 8 + 8 wk (*i.e.*, a second transplantation 8 wk after the primary transplantation and an analysis of recipient mice 8 wk after the second transplantation). Strikingly these recollected ES-derived SM/C-2.6-positive cells showed significantly higher engraftment efficiency compared to the primary transplantation. In the previous reports engraftment efficiencies of myoblasts transplantation was ~0.1–0.2%, with the highest reported value being 2% (43–45). This engraftment efficiency is similar to our primary transplantation (0.2–0.8%) as well as the plating efficiency of SM/C-2.6-positive cells *in vitro* (0.07%). In our study as few as 200 recollected ES-derived SM/C-2.6-positive cells were transplanted in the second transplantation, and 29.0 ± 0.47 ($n=2$) fascicles were observed, which indicates 14.7% of higher engraftment efficiency. Thus, through the serial transplantation, ES-derived stem cell fraction was purified. A comparison of these SM/C-2.6-positive cells before and after injection might help to characterize the stem cell fraction derived from ES cells.

There have been few reports describing transplantation of ES-derived myogenic cells into injured muscles, and the report of engraftable skeletal myoblasts derived from human ES cells represents significant progress (26). Recently Darabi *et al.* (46) have reported that by introducing Pax3 into mouse embryoid bodies, autonomous myogenesis was initiated *in vitro*, and Pax3-induced cells regenerated skeletal muscles *in vivo* by sorting the PDGF- α +Flk-1- cells. The Pax3 expression was not observed until 7 d of differentiation culture,

but introduced Pax3 expression pushed EBs to myogenic differentiation. Interestingly, we observed Pax3 expression at d 3 + 3 weakly and d 3 + 3 + 7 strongly, and gene expression process in our culture is very similar to theirs. In prolonged culture using Matrigel and HS, EBs were able to initiate myogenesis without gene modification in our system.

In conclusion, we successfully generated transplantable myogenic cells, including satellite-like cells, from mES cells. The ES-derived myogenic precursor/stem cells could be enriched using a novel antibody, SM/C-2.6. These ES-derived SM/C-2.6-positive cells possess a high myogenic potential, participate in muscle regeneration, and are located beneath the basal lamina where satellite cells normally reside. The self-renewal of these ES-derived satellite-like cells enabled them to survive long-term engraftment, up to 24 wk. Through serial transplantation, these ES-derived SM/C-2.6-positive cells were further enriched and produced a high engraftment efficiency of 14.7%.

Our success in inducing mES cells to form functional muscle stem cells, the satellite-like cells, will provide an important foundation for clinical applications in the treatment of DMD patients. [E]

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (S) (19109006) and a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (18390298) from the Ministry of Education, Science, Technology, Sports, and Culture of Japan.

REFERENCES

- Nawrotzki, R., Blake, D. J., and Davies, K. E. (1996) The genetic basis of neuromuscular disorders. *Trends Genet.* **12**, 294–298
- Emery, A. E. (2002) The muscular dystrophies. *Lancet* **359**, 687–695
- Michalak, M., and Opas, M. (1997) Functions of dystrophin and dystrophin associated proteins. *Curr. Opin. Neurol.* **10**, 436–442
- Suzuki, A., Yoshida, M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., and Ozawa, E. (1994) Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. *Eur. J. Biochem./FEBS* **220**, 283–292
- Bonilla, E., Samitt, C. E., Miranda, A. F., Hays, A. P., Salviati, G., DiMauro, S., Kunkel, L. M., Hoffman, E. P., and Rowland, L. P. (1988) Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* **54**, 447–452
- Mauro, A. (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 493–495
- Moss, F. P., and Leblond, C. P. (1971) Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat. Rec.* **170**, 421–435
- Snow, M. H. (1978) An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tissue Res.* **186**, 535–540
- Jejurikar, S. S., and Kuzon, W. M., Jr. (2003) Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis* **8**, 573–578
- Schultz, E., and Jarvazak, D. L. (1985) Effects of skeletal muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells. *Mech. Ageing Dev.* **30**, 63–72
- Webster, C., and Blau, H. M. (1990) Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat. Mol. Genet.* **16**, 557–565
- Hashimoto, N., Murase, T., Kondo, S., Okuda, A., and Inagawa-Ogashima, M. (2004) Muscle reconstitution by muscle satellite

- cell descendants with stem cell-like properties. *Development (Camb.)* **131**, 5481-5490
13. Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zafran, S., Curnan, A., Partridge, T., and Buckingham, M. (2005) Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* **309**, 2064-2067
 14. Collins, C. A., Olsen, I., Zammit, P. S., Heslop, L., Petric, A., Partridge, T. A., and Morgan, J. E. (2005) Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* **122**, 289-301
 15. Partridge, T. A., Morgan, J. E., Goulton, G. R., Hoffman, E. P., and Kuikel, L. M. (1989) Conversion of mdx myofibers from dystrophin-negative to positive by injection of normal myoblasts. *Nature* **337**, 176-179
 16. Mendell, J. R., Kissel, J. T., Amato, A. A., King, W., Signore, L., Prior, T. W., Sahenk, Z., Benson, S., McAndrew, P. E., Rice, R., Nagaraja, H., Stephens, R., Lantzy, L., Morris, G. E., and Burghes, A. H. M. (1995) Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **333**, 832-838
 17. Weissman, I. L., Anderson, D. J., and Gage, F. (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 387-403
 18. Relaix, F., Montarras, D., Zafran, S., Gavraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Curnan, A., and Buckingham, M. (2006) Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J. Cell Biol.* **172**, 91-102
 19. Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M. A. (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**, 777-786
 20. Cornelison, D. D., and Wold, B. J. (1997) Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* **191**, 270-283
 21. Hollnagel, A., Grund, C., Franke, W. W., and Arnold, H. H. (2002) The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Mol. Cell Biol.* **22**, 4760-4770
 22. Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faleto, D. L., Chan, A. M., Kmieciak, T. E., Vande Woude, G. F., and Aaronson, S. A. (1991) Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* **251**, 802-804
 23. Fukada, S., Higuchi, S., Segawa, M., Koda, K., Yamamoto, Y., Tsujikawa, K., Kohama, Y., Uezumi, A., Imamura, M., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., and Yamamoto, H. (2004) Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Exp. Cell Res.* **296**, 245-255
 24. Dekel, I., Magal, Y., Pearson-White, S., Emerson, C. P., and Shani, M. (1992) Conditional conversion of ES cells to skeletal muscle by an exogenous MyoD1 gene. *New Biol.* **4**, 217-224
 25. Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H. H., Heschler, J., and Wobus, A. M. (1994) Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev. Biol.* **164**, 87-101
 26. Barberi, T., Bradbury, M., Dincer, Z., Panagiotakos, G., Socci, N. D., and Studer, L. (2007) Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat. Med.* **13**, 642-648
 27. Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **87**, 27-45
 28. Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-199
 29. Yoshimoto, M., Chang, H., Shioya, M., Kobayashi, H., Umeda, K., Kawakami, A., Heike, T., and Nakahata, T. (2005) Two different roles of purified CD45⁺c-Ki-1⁺Sca-1⁺Lin⁻ cells after transplantation in muscles. *Stem Cells (Dayton)* **23**, 610-618
 30. Harris, J. B. (2003) Myotonic phospholipase A2 and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicol.* **42**, 933-945
 31. Fukada, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Tsukihara, H., Yuasa, K., Higuchi, S., Ono, S., Tsujikawa, K., Takeda, S., and Yamamoto, H. (2002) Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J. Cell Sci.* **115**, 1285-1293
 32. Gross, J. G., and Morgan, J. E. (1999) Muscle precursor cells injected into irradiated mdx mouse muscle persist after serial injury. *Muscle Nerve* **22**, 174-185
 33. Rosenthal, J. D., Lunt, A. L., Parry, D. J., and Partridge, T. A. (1995) Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **31**, 773-779
 34. Dhawan, J., and Rando, T. A. (2005) Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* **15**, 666-673
 35. Zammit, P. S., Relaix, F., Nagata, Y., Ruiz, A. P., Collins, C. A., Partridge, T. A., and Beauchamp, J. R. (2006) Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Sci.* **119**, 1824-1832
 36. Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005) A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* **435**, 948-953
 37. Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G., and Buckingham, M. (1997) Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* **89**, 127-138
 38. Kieler, J. C., and Hauschka, S. D. (2001) Myf-5 is transiently expressed in nonmuscle mesoderm and exhibits dynamic regional changes within the presegmented mesoderm and somites I-IV. *Dev. Biol.* **232**, 77-90
 39. Hirsinger, E., Malapert, P., Dubrulle, J., Delfani, M. C., Duprez, D., Henrique, D., Ish-Horowitz, D., and Pourquie, O. (2001) Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. *Development (Camb.)* **128**, 107-116
 40. Smith, T. H., Block, N. E., Rhodes, S. J., Konieczny, S. F., and Miller, J. B. (1993) A unique pattern of expression of the four muscle regulatory factor proteins distinguishes somitic from embryonic, fetal and newborn mouse myogenic cells. *Development (Camb.)* **117**, 1125-1133
 41. Kassam-Duchossoy, L., Giacone, E., Gavraud-Morel, B., Jorv, A., Gomes, D., and Tajbakhsh, S. (2005) Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* **19**, 1426-1431
 42. Harrison, D. E., Astle, C. M., and Delaitre, J. A. (1978) Loss of proliferative capacity in immunohemopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging. *J. Exp. Med.* **147**, 1526-1531
 43. Yao, S. N., and Kurachi, K. (1993) Implanted myoblasts not only fuse with myofibers but also survive as muscle precursor cells. *J. Cell Sci.* **105**(Pt. 4), 957-963
 44. Rando, T. A., and Blau, H. M. (1994) Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J. Cell Biol.* **125**, 1275-1287
 45. Sherwood, R. I., Christensen, J. L., Conboy, I. M., Conboy, M. J., Rando, T. A., Weissman, I. L., and Wagers, A. J. (2004) Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell* **119**, 543-554
 46. Darabi, R., Gehlbach, K., Bachoo, R. M., Kamath, S., Osawa, M., Kamm, K. E., Kyba, M., and Perlingeiro, R. C. (2008) Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat. Med.* **14**, 134-143

Received for publication October 21, 2008

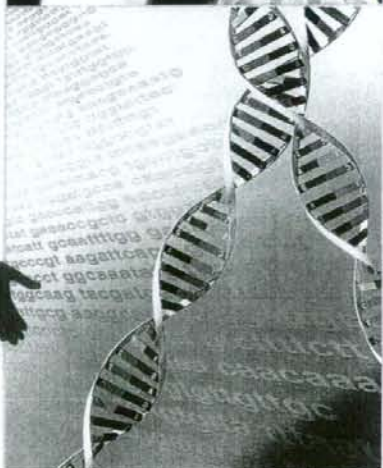
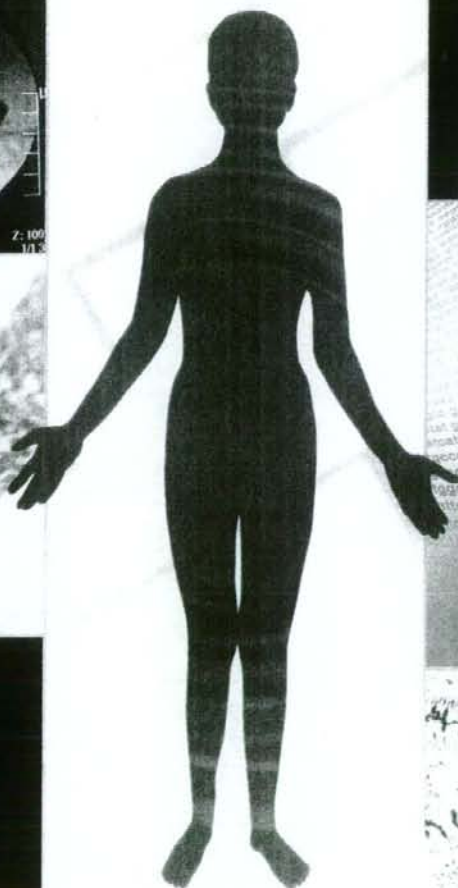
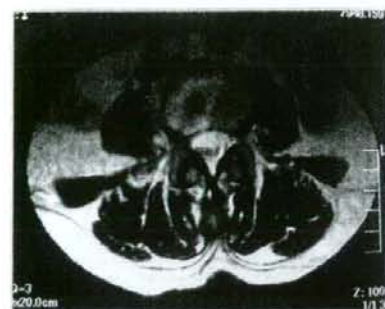
Accepted for publication January 8, 2009

眼で見る

遺伝病と ターナー症候群

監修(遺伝病): 北海道医療大学 個体差健康科学研究所 教授・所長 新川 昭夫

監修(ターナー症候群): 国立成育医療センター研究所 小児思春期発育研究部 部長 緒方 勤



福山型筋ジストロフィー

Fukuyama congenital muscular dystrophy

戸田達史

大阪大学大学院医学系研究科 予防環境医学専攻 遺伝医学講座臨床遺伝学 教授



図1. 福山型筋ジストロフィー (症例1: 6歳女児)

顔面筋罹患による特徴的な顔貌 (表情に乏しく、口を半開きにして)。頬は仮性肥太のためふくらみ、全身の関節拘縮を示す。最高運動能は坐位。精神発達遅滞を伴う (神戸市総合療育センター: 吉岡三恵子博士の症例)



図2. 福山型筋ジストロフィー (症例2: 15歳男性)

顔面筋罹患著明。自力座位保持不可、全身関節拘縮著明。最高到達運動能は「いざり」

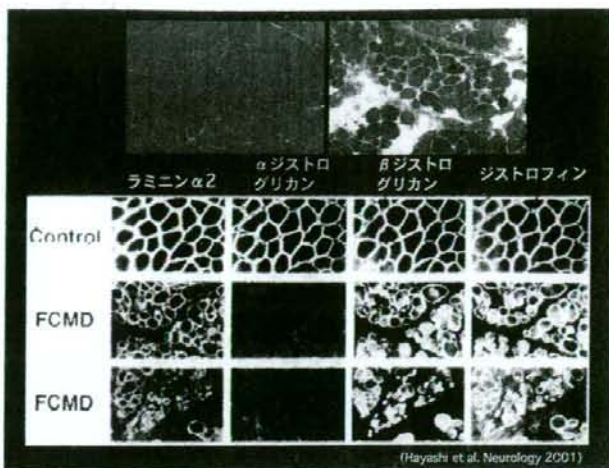


図3. 正常筋 (左) およびFCMD筋 (右) の生検筋での組織像 (HE染色) と免疫組織染色

FCMDでは、 α -ジストログリカン糖鎖認識抗体での反応性が落ちている (Hayashi, et al. Selective deficiency of α -dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Neurology 2001;57:115-121)



図4. 福山型筋ジストロフィーの脳MRI (T2強調画像)

前頭葉を中心に厚脳回、白質の高信号を認める



図5. 福山型筋ジストロフィーの脳剖検例

MRIでみられる異常は小多脳回であり、浅い脳溝で囲まれた小さな脳回が多数認められる。多小脳回が集まって厚脳回様に見える。脳表基底膜破綻による胎生初期の神経細胞のovermigrationによると考えられている

症例紹介

症例1: 6歳女児(図1)。家族歴なし。首のすわりが遅れる。現在、最高運動能は座位、股関節、手関節に拘縮を認める。精神発達遅滞。

症例2: 15歳男児(図2)。家族歴は、兄が福山型筋ジストロフィー。自力座位保持不可、全身関節拘縮著明、最高到達運動能は「いざり」。2語文。呼吸不全にて死亡。剖検にて、浅い脳溝で囲まれた小さな脳回が多数(小多脳回)認められる(図5)。

疾患解説

■ 概念

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は、1960年に福山らにより提唱された常染色体性劣性遺伝疾患であり、重度の筋ジストロフィー病変とともに、小多脳回を基本とする高度の脳奇形を特徴とする。本症は筋脳眼を中心に侵す系統疾患である。

■ 遺伝学的発生機序

常染色体性劣性遺伝。9q31に存在するフクチン遺伝子の機能喪失型変異により発症。患者染色体のほぼ90%には1人の祖先から由来する変異がみられ、原因遺伝子の3'非翻訳領域内に約3kbのSVAレトロトランスポゾン挿入があり、mRNAが検出できない。ほとんどすべての患者は挿入変異のホモ接合体、または他の変異との複合ヘテロ接合体である。一般的に、複合ヘテロ接合の患者は挿入変異ホモ接合の患者よりも重症で、点変異をホモ接合にもつ2例はさらに重度の症状を呈し、臨床診断はWalker-Warburg症候群(WWS)である。しかし、極まれに知能正常、肢帯型の表現型を示す複合ヘテロ接合体の報告もある。

α -ジストログリカンの糖鎖認識抗体による免疫組織染色性が低下し、ラミニン結合能の低下が見出され、類縁疾患のmuscle-eye-brain病、Walker-Warburg症候群で α -ジストログリカンとラミニンの連結部の糖鎖に関係する糖転移酵素POMGnT1、POMT1/2の変異が発見された。ラミニンとの結合に関わる部分の α -ジストログリカンの糖鎖が正常に付加されないため、細胞外の基底膜と筋細胞との結合性が低下し、基底膜と細胞骨格の関係が破綻し、筋ジストロフィーが生じる。これら疾患群を総称して「 α -ジストログリカンパチー」という。

■ 頻度

日本における小児期筋ジストロフィーのなかでは、Duchenne型の次に多くみられ、発症率は2.9/10万人であり、日本人の約90人に1人が保因者。日本には1000~2000人程の患者がいると推定されるが、海外からの診断確実例の報告は数例のみで、日本に特異的に多くみられる。

■ 臨床的特徴・検査所見

1) 患児は生後8カ月以内に筋緊張低下、筋力低下にて発病

する。

- 2) 運動障害は重症で、通常、起立歩行能力を獲得せず、生涯歩行不能である。多くは3~4歳時の「いざり」が最高到達運動機能(図1, 2)。
- 3) Duchenne型と比べて関節拘縮を早期に合併する(図1, 2)。
- 4) 顔面筋罹患により、口を半開きにした特徴的な顔貌を呈する(図1, 2)。
- 5) 高度の精神発達遅滞を伴い、2語文以上話せる例は少ない。
- 6) 約半数に痙攣・脳波異常を伴う。
- 7) 近視、遠視、視神経萎縮、眼振、網膜剥離などの眼病変が約70%に発見される。
- 8) 血清CK値は数1,000単位と上昇する。骨格筋には筋線維の壊死、再生があり、筋ジストロフィー所見を示す。Duchenne型と比べ小径線維が多く、早期から間質の結合組織の増加が特徴的である。 α -ジストログリカンの糖鎖に対する抗体の反応が特異的に低下しているが、同蛋白の本体部分に対する抗体では、分子量は低下しているものの組織染色では正常である(図3)。
- 9) 脳CT、MRIで厚脳回、白質ジストロフィー様変化(髄鞘化の遅れ)、小脳cyst様変化をみる(図4)。
- 10) 主要中枢神経病変は、小多脳回、厚脳回であり、脳表基底膜破綻による胎生初期の神経細胞のovermigrationによると考えられている。大脳では層構造が失われている(図5)。FCMD胎児脳にもglia limitans-基底膜複合体の亀裂を認める。

■ 治療・合併症

対症的、保存的療法が中心で、理学療法、リハビリテーションによる運動能力の向上と関節拘縮の進行防止が主体となる。けいれんに対しては、抗てんかん薬の投与を必要とする例が多い。筋力低下が呼吸筋におよぶと呼吸不全や呼吸器感染を繰り返すので、感染症の早期発見・早期治療が重要である。

■ 予後

乳児期から筋力低下があるにもかかわらず、病気のものの進行は緩徐であり、予定または座位保持の状態のまま、長期間同じ状態を維持する例が多い。6歳以降は運動機能の低下をみ、筋力低下、全身の関節拘縮により、10歳前後に完全臥床状態となる。平均寿命は17.6歳である。死亡原因としては、肺炎が最も多く、次いで心不全、呼吸不全の順である。

【参考文献】

- 1) Fukuyama Y, et al.: Congenital muscular dystrophy of the Fukuyama type-clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev* 1981; 3:1-30
- 2) Kobayashi K et al.: An ancient retrotransposon insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998; 394:388-392
- 3) Michele DE, et al.: Post-translational disruption of dystroglycan ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 2002; 418: 417-422
- 4) Kanagawa M, Toda T: The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *J Hum Genet* 2006; 51:915-927

筋ジストロフィー

谷口真理子*

Mariko Taniguchi

戸田達史

Tatsushi Toda

はじめに

筋ジストロフィーとは骨格筋が慢性、進行性に壊死、再生をくり返し徐々に筋力低下、筋萎縮をきたす遺伝性筋疾患の総称である。遺伝子診療での筋疾患の相談頻度は高く、患者や家族、血縁者から妊娠、結婚、次子の再発率などの相談が多い。この稿では、紙数の都合上小児科領域で比較的頻度の高い Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィー (DMD/BMD; X連鎖性劣性遺伝: XLR) や福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD; 常染色体劣性遺伝: AR), また筋強直症候群に分類されるか頻度の高い筋強直性ジストロフィー (DM; 常染色体優性遺伝: AD) について遺伝学的な基礎知識および両親への説明、遺伝学的検査法について要約する。

の差による。

2. 自然歴

DMD は運動発達の遅れ、転びやすい、階段昇降を嫌がるなどで 2~3 歳で気づかれる。採血の際偶然血清 CK, ALD, AST, ALT の高値で発見されることもある。特徴的な Gowers 兆候 (登攀性起立), 動揺性歩行, 仮性筋肥大を認め, 平均 9 歳ごろより歩行困難, 10 代で車椅子, 徐々に完全臥床となる。軽度の知能低下を伴う例もある。寿命は以前 20 歳台といわれたが, 呼吸器や理学療法の進歩により延びている。死因は心筋症, 左心不全が多い。BMD は発症が 5 歳以上で 20 歳台以降に車椅子生活となる例が多いが, 筋肉痛のみ, 生涯無症状の例もある。

1. Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィー

1. 疾患の概略

DMD/BMD とともに, 筋細胞膜の裏うち蛋白である *dystrophin* 遺伝子 (X21.2) の変異が原因である。最も頻度の高い小児期発症の筋ジストロフィーであり, 出生男児 1/3500 人で発症, 男児が罹患し, 女性では保因者 (carrier) となるか症状のある例 (manifesting carrier) もある。DMD ではジストロフィン蛋白がほぼ完全欠損 (3%以下) であるが, BMD では少量 (~30%) 存在し, BMD は DMD の軽症型である。この違いは遺伝子変異

3. 診断

前述の臨床的兆候, 血清学的検査, 画像検査で近位筋優位の萎縮より疑われ, 末梢血での遺伝子検査により *dystrophin* に変異が同定できれば確定診断となる。検査方法には MLPA 法 (図 1), multiplex PCR 法, 直接シークエンス法, サザンブロット法, FISH 法, CGH マイクロアレイ法など (表) があり, 一部保険適用となった。変異は欠失, 重複型が最多だが (DMD 70%, BMD 85%, hot spot は exon 3~8 および 45~53), 微小変異のナンセンス, フレームシフト変異もある。変異由来のジストロフィン蛋白の残存機能の善し悪しが症状と相関する。筋生検は侵襲性の問題はあるが, 遺伝子変異が特定できない場合や症状が非典型的である場合有用である。筋組織の抗ジストロフィン抗体による免疫染色法, ウェスタンブロット法により他疾患との鑑別が可能である。

* 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学
〔〒565-0871 吹田市山田丘 2-2 B9〕
TEL 06-6879-3381 FAX 06-6879-3389
E-mail: mtaniguchi@clgene.med.osaka-u.ac.jp

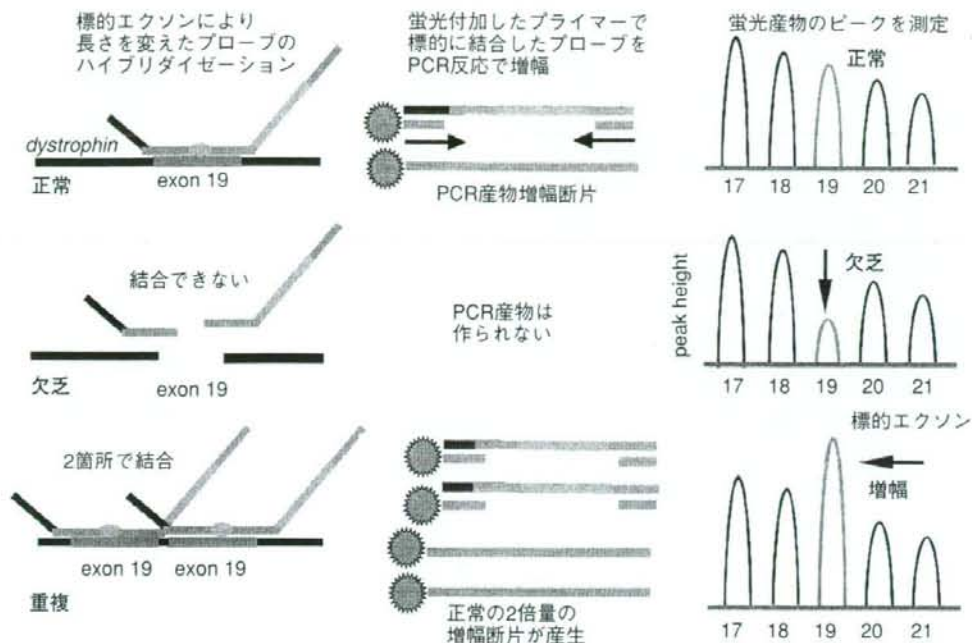


図 1 MLPA 法の原理 概略のため実際の結果とは異なる。

表 1 MD の CTG リピート数と重症度の相関

臨床型	臨床症状	CTG リピート数 (重複あり)	発症年齢	平均死亡年齢
前変異	なし	38~50	正常	正常
軽微型	白内障 軽いミオトニア	50~150	20~70 歳	60~正常
成人型	筋症状、不整脈 白内障 前頭部禿頭 悪性腫瘍	100~ 1000~1500	10~30 歳	48~55
先天型	筋緊張低下 呼吸障害 精神発達遅滞	~1000~ 2000~ (1000 以下の報告あり)	新生児 ~10 歳	45 (周産期死亡は除く)

(出典: Gene Review)

4. 遺伝形式、再発率

XLR. 母親が保因者の場合、息子の 50% が罹患し娘の 50% は保因者。父親が患者である場合、息子は罹患せず、娘は 100% 保因者。孤発例は約 1/3 だが、新生 (*de novo*) 突然変異以外に、性腺モザイクや体細胞モザイク例もみられるため、孤発例の場合、再発率は経験的に 5% 程度である^{1,2)}。

5. 親への説明において気をつけること

筋ジストロフィーは難病である。まだ幼児である子が、DMD と告知された両親の落胆は想像を絶する。また母親が保因者の場合、自身が保因者であることに對し自責の念を覚えたり、次子への再発率の不安も生じたりと家族の心理的負担は大きい。X 染色体上に存在するジストロフィン巨大なため変異率が高く、X 染色体を 1 本もつ男性

で発症し、2本もつ女性で保因者となる。つまり、DMDは母親のせいでは発症するわけではない。結果の告知においてそのような印象が伝わると母は深く傷つき、医療不信に陥ったり、疾患や患児の受け入れに問題が出たり、家族が崩壊することさえある。母親の保因者診断は、manifesting carrierの診断を除き、次子への再発率を知るための情報への目的で行われ、その結果は必ずしも本人の健康管理や利益のためとならず、夫婦関係の変化や、親族からの差別など、良くない影響があることも十分に話し合ったうえで検討される必要がある。また発端者に姉妹がいる場合、保因者である可能性は50%である。母は娘が将来自分と同じ苦しみをもつのだろうか、と苦悩し、なかには両親が娘の保因者診断を性急に希望される場合がある。しかし、保因者診断は本人の自由意志によってなされるものであり、原則として娘が成人になるまで検査は行わない³⁾。

このようにDMD/BMDの遺伝子検査は結果が発端者だけでなく、その家系全体に及ぼすストレスが大きい。遺伝子検査は、検査の意義やその結果による影響を十分検討されたうえで実施されるのが望ましく、結果告知後のフォローや心理的ケアも大切である。

6. 最近の治療法の進歩

近年、DMDに対し、既存のステロイド療法に加え遺伝子治療、薬剤治療にむけて研究の進歩は目覚ましい。エキソスキッピング法は、特定の変異型の患者において、核酸化合物を用いて変異由来のジストロフィン蛋白の機能を低下させる部分のみを取り除き、完全ではないが改良した蛋白に換えて軽症のDMD、つまりBMDにする治療法⁴⁾で、治験が進んでいる。また、遺伝子治療や幹細胞移植の研究においては、動物実験で著明な治療効果が出る事が報告された^{5,6)}。また、微小変異のなかでもナンセンス変異の患者に対し、変異により翻訳が停止して壊される蛋白の“翻訳を完結させる”リードスルー薬剤(PTC124)の治験が海外で始まった⁷⁾。この疾患はもはや不治の病ではなくなりつつある。実現化という面ではまだ改良すべき問題はあろうが、最新の治療に関する研究成

果の正確な情報を気にかけて、患者や家族に情報提供することも大切である。

7. 出生前診断

DMDに対し一部の施設で実施可能。妊娠前に発端者の遺伝子変異が同定され、母親がその保因者と同定されていることが必須条件である。ただし、孤発例でも性腺モザイク例が10~20%あるため、母親に変異が同定できない場合でも、発端者の変異が同定されている場合は羊水検査の適応になる^{1,2)}。胎児が女兒か、また男児であれば発端者と同じ変異を有するかを羊水検査(妊娠14~16週)あるいは絨毛検査(妊娠10~12週)により抽出した胎児由来のDNAで診断する。出生前診断は侵襲性があり、診断が中絶を選択しうる医療行為であり、家族の心理的、身体的負担は大きい。しかもこの検査は、健常児を保証する検査ではない。よって十分な遺伝カウンセリングは必須であり、希望される夫婦には必ず妊娠前に来談するよう勧める。一部施設で許可された着床前診断は、中絶を回避できるメリットがある一方、成功率、費用に関し議論がある。BMDに対しては生命予後の倫理的観点より適応はない。

8. 親の会

最も代表的な筋ジストロフィーの親の会として日本筋ジストロフィー協会(<http://www.jmda.or.jp/>)がある。会員数は約3000名、地方支部は8つに及ぶ全国組織で、「根本治療法の開発促進」、「患者のQOLの向上」を事業目標に活発にセミナーや集会を開催している。生活面での不安、療育、教育に関する相談や、患者家族同士の情報交換ができる家族会の存在は患者家族にとって心理的、社会的に貴重な支えとなる。

II. 福山型先天性筋ジストロフィー

1. 疾患の概略

FCMDは1960年に、福山らにより発見された、脳奇形に眼症状を伴う先天性筋ジストロフィーである⁸⁾。小児期の筋ジストロフィーでは日本で2番目に頻度が高い(2.9/10万人)。原因遺伝子 fuku-

tin (9q13) は 1998 年に、小林、戸田らにより同定された⁹⁾。ほとんどの患者で遺伝子の 3' 非翻訳領域に約 3kb のレトロトランスポソンの挿入変異を両アレルに保有する。この変異を片アレルのみにもち、もう片アレルに点変異などの微小変異をもつ複合ヘテロ症例も存在する。

2. 自然歴

典型例では生後から乳児時期早期の間に全身性、進行性、対称性の筋力低下、筋萎縮を認める (floppy infant)。遅い顎定 (約 8 か月)、座位保持までは獲得しても、3~4 歳のいざり這いが最高到達運動機能である。約半数にけいれん、約 70% で眼症状 (視神経萎縮、眼振、網膜剝離) を認め、精神運動発達遅延は全例に認める。筋症状の進行は緩徐だが 6 歳以降に関節拘縮や筋力低下が著明となり完全臥床となる。肺炎、心不全、呼吸不全などの合併症により成人に達することは難しい。非典型例には歩行可能な例や心筋症、肢帯型筋ジストロフィーを呈す患者もみられる。

3. 診断

前述した臨床的兆候、血清学的検査 (数 1000 単位の CK 上昇) に、画像検査で筋組織の萎縮、脂肪変性、頭部 CT で厚脳回様所見、頭部 MRI で白質髄鞘化遅延などの所見より疑われ、遺伝子検査により *fukutin* ヘレトロトランスポソンの挿入変異が認められれば確定診断となる。末梢血での遺伝子検査法は PCR 法、直接シーケンス法、サザンブロット法などが用いられ、一部保険適用となった。筋生検は、遺伝子検査で確定診断となる現在、ほとんど実施されなくなった。

4. 遺伝形式、再発率

AR。約 1/90 人が保因者で、日本には約 1000~2000 人の患者が存在する。性差はない。両親は保因者であり、再発率は 25%。50% は保因者となる。保因者は生涯無症状である。

5. 親への説明において気をつけること

fukutin にレトロトランスポソンが挿入されたのは約 100 世代前の 1 人の日本人の祖先である (創

始者効果)。挿入変異の保因者である夫婦は遠い親戚同士である。両親は自分たちがその保因者であることにショックを受ける。しかし、両親が劣性遺伝病の保因者であることは決して珍しくない。私たちは誰しも少なくとも 10 個以上の劣性遺伝病の遺伝子変異の保因者といわれる。つまり“人類みな保因者”なのである。説明する私たちもそのことを自覚しておくことは大事である。

6. 最近の治療法の進歩

有効な治療法は未だないが、*fukutin* の変異がもたらす病態解明が進んでいる。

7. 出生前診断

一部の施設 (東京女子医科大学、大阪大学) で可能。妊娠前に発端者の遺伝子変異が同定されていることが条件である。絨毛または羊水培養細胞より抽出した胎児 DNA で挿入変異を検出する PCR 法などを用い、発端者と同じ変異を保有するかを検査する。当院では母親の組織混入を除外するために、個人を識別するマイクロサテライトマーカーを使用し、診断した DNA が間違いなく胎児由来であることを確認する (図 2)。診断の精度は 99.999% 以上である。着床前診断は行われていない。出生前診断には十分な遺伝カウンセリングが必須である。

III. 筋強直性ジストロフィー

1. 疾患の概略

DM は筋症状以外に全身症状を伴う、比較的頻度の高い (5/10 万人) 筋強直症候群である。原因遺伝子 DMPK (DM1) は 19q13.2~q13.3 に存在し、患者では遺伝子の非翻訳領域にある CTG リピート数が延長する。このリピート数と発症、重症度は負の相関を示す (表)。この延長は世代を経て伸張し重症化する表現促進現象 (anticipation) を伴う (短縮する場合もある)。次世代でのリピート数は母親が DM の場合、父親の場合に比し有意に伸張度が高い (機序は不明)。最近、DM のもうひとつの遺伝子 DM2 が原因である DM2 型が見つかり²⁾、日本でも 1 例報告があるが DM1 型に比し症状は軽

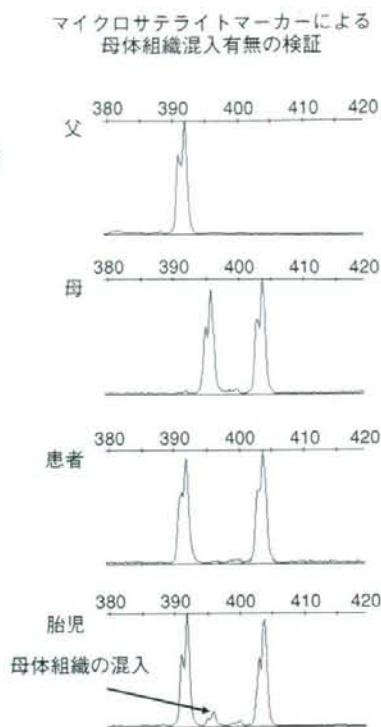
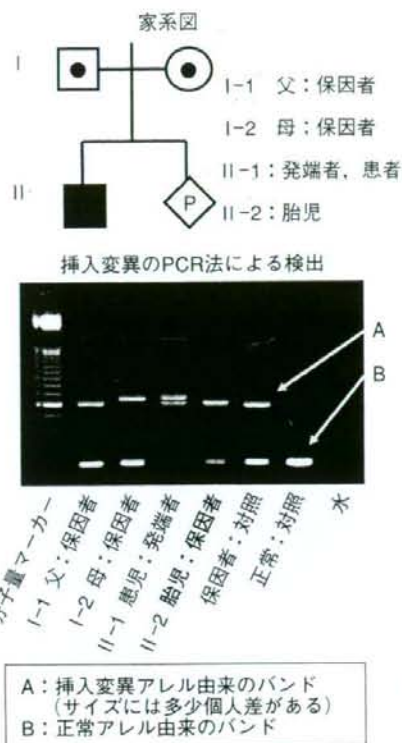


図 2 FCMD の出生前診断 実際の検査結果を多少改変

いとされる。

2. 自然歴

先天型 DM は出生時より低緊張で、特徴的顔貌 (逆 V 字型上唇、高口蓋)、哺乳困難、呼吸障害、精神運動発達遅延を伴い重症である。乳児期を過ぎると筋症状は少し改善し歩行可能となる例もあるが、知的障害は全例に認め、思春期以降には徐々に運動機能が低下する。成人型では特徴的な顔貌 (斧様顔貌)、ミオトニア、筋力低下、呼吸障害、嚥下困難などの平滑筋症状、心筋伝導障害以外に内分泌系 (糖尿病、性腺機能低下)、前頭部禿頭、白内障、精神症状などの全身症状や悪性腫瘍の合併がみられる。軽微型では白内障のみの例もある。成人型や軽微型では症状に個人差が大きく、筋力低下が軽い例、本人が自覚していない例もある。成人型女性では妊娠を契機に発症する例や、羊水過多、遷延分娩、子癇出血、自然流産、死産など、妊娠、分娩に伴う合併症のリスクが高

い。

3. 診断

上記臨床症状や家族歴により疑われ、遺伝子検査により DM1 の CTG リピート数の延長があれば確定診断となる。成人型では臨床症状として、握った手を開くのに時間がかかる grip myotonia や、母指球を叩くと持続性の筋収縮が起きる percussion myotonia を認め、筋電図所見も参考になる。筋生検はほとんど行われない。

4. 遺伝形式、再発率

AD。性差なく再発率は 50%。先天型が出生した場合、ほとんどの場合母親が成人型 DM である。突然変異はなく、浸透率は 100%。成人型の母が先天型を出生した場合の再発率は、経験的に 20~40% と高い。リピート数が 300 回以下の女性が先天型の患児をもつリスクは 10% である一方、300 回以上ではリスクが 59% となる報告もある¹⁾。し

かし、個々の症例において次世代のリポート数を予測するのは困難である。成人型の男性から先天型が生まれるケースはまれである。

5. 親への説明において気をつけること

先天型 DM の出生、診断を契機に母が同疾患であることに気づかれる。成人型の母は DM を発症するとそれ以降の妊娠、出産のリスクに加え不整脈、窒息による突然死の危険性もありうるため、診断確定が必ずしも家族にとって不利益な情報ではない。しかし、母親が未発症の場合や、自覚のない場合は発症前診断と同様に慎重に扱われなければならない。母親の診断に際しては、遺伝子診断の前に、まずは先天型 DM も含め、この幅広い症状をきたす疾患の特徴を家族に十分理解してもらうことが重要である。その際に、神経内科受診の必要性や不整脈に対する検診、内分泌系の精査や眼科的検査など医学的に必要性のある情報を伝える。そもそも遺伝子検査は、臨床的診断に基づいて行われることが望ましく、その逆は好ましくない。すでに未発症の兄弟がいる場合の遺伝子診断も、臨床症状の有無に基づき検討されるのが望ましい。発端者の診断ついでに家族全員のリポート数を調べるようなことは望ましくない。

この疾患に突然変異はない。家族歴の聴取により家系内で罹患の可能性のある人が多数いることが判明する。しかしこの疾患は、症状に個人差が大きく、加えて世代間でのリポート数の伸張による違いもあり、症状の出現年齢や重症度、出現する症状部位の予想が困難である。この疾患は発端者の診断を契機に、家系がさまざまな不安やストレスを抱えることになる。しかし、私たちは経験的な事実に基づいた、必ずしも十分でない情報提供をせざるをえず、その情報の限界性のなかで、患者やその家族がさまざまな決断をしてゆかなければならないことを認識しなければならない。

6. 最近の治療法の進歩

最近、この疾患の病態機序が解明された。DM1 遺伝子で伸張している CTG リポートが、さまざまな遺伝子の pre-messenger RNA のスプライシング異常を誘発し全身の臓器にさまざまな症状が出

るという^{10,11)}。この病態機序の解明に伴い、スプライシングを制御する核酸化合物や薬剤化合物を用いた治療法開発に向け研究が進んでいる。

7. 出生前診断

一部の施設で実施されている（着床前診断も一部の施設で認可）。妊娠前に母親が成人型 DM でリポート数が同定されていることが必須条件である。絨毛または羊水培養細胞から抽出した胎児 DNA を用い、直接リポート数を調べる方法や、増幅した遺伝子を電気泳動し、大まかな伸張を検出する方法がある。留意すべきは、この出生前診断ではリポート伸張の有無の判定は可能だが、胎児が先天型を発症するかについての診断は困難なことである。出生前診断の相談に来る夫婦には、この検査の限界性は必ず伝える。また、妊娠自体が母体、胎児の両方にとってリスクとなることも伝える。父が成人型 DM の場合の次子の出生前診断は、成人発症の疾患の出生前診断と同意義となり、わが国では適応にならない。

おわりに

近年、筋疾患に対し臨床診断、病理診断に加え遺伝子検査が確定診断に必須の要素となりつつあり、平成 20 年度より DMD および FCMD の遺伝子検査が保険適用となった。それは医学の進歩による恩恵である一方で、とくに治療法が確立されていない難病において、一生不変の遺伝情報を容易に検査で明かすことには危険性を感じる。遺伝学的検査は、適切な時期に心理・社会的ケアができる環境で、十分な知識、準備をもってなされなければ、患者や家族、血縁者に対し不安や絶望、拒絶、誤解など大きなストレスを与えかねない。よって近年は、臨床遺伝専門医、遺伝カウンセラーによる遺伝カウンセリングの実施の重要性が呼ばれており、DMD、FCMD の遺伝子検査にも遺伝カウンセリングの実施およびガイドラインの遵守³⁾が明記されている。

当然、主治医と患者やその家族との信頼関係は患者の治療やフォローにおいて最も大切である。よって発端者の遺伝子診断は、主治医、専門機関、臨床遺伝専門医が連携をとり、患者や家族の利益

を最大限配慮して検討されることが望ましい。家系内の遺伝子診断についても、臨床遺伝専門医や各科専門医、各地の遺伝科や遺伝子診療部門に紹介し、医学的・遺伝学的情報を十分提供し検査の妥当性を検討できる場を設けることが大切である。今後は各疾患の遺伝子診断に対するガイドラインが作成され、さまざまな医療機関においても、同等の倫理基準や診療体制をもって遺伝子検査に取り組めるようになることが望まれる。

文 献

- 1) Darras BT, Korf BR, Urion DK : Dystrophinopathy (March 2008) ; Thomas BD : Myotonic dystrophy type 1 (November 2007) ; In GeneReviews at Gene Tests : Medical Genetics Information Resource (database online). University of Washington, Seattle, 1997-2008. <http://www.genetests.org/>
- 2) Firth VH, Hurst AJ : Clinical Genetics, Oxford University Press, 2005
- 3) 遺伝学的検査に関するガイドライン, 遺伝医学関連 10 学会, 2003 年 8 月
- 4) van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, et al : Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. N Engl J Med 357 : 2677-2686, 2007
- 5) Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, et al : Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. Nat Med 14 : 134-143, 2008
- 6) Sampaoli M, Blot S, D'Antona G, et al : Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. Nature 444 : 574-579, 2006
- 7) Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al : PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. Nature 447 : 87-91, 2007
- 8) Fukuyama Y, Osawa M, Suzuki H : Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type—clinical, genetic and pathological considerations. Brain Dev 3 : 1-29, 1981
- 9) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, et al : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Nature 394 : 388-392, 1998
- 10) Philips AV, Timchenko LT, Cooper TA : Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. Science 280 : 737-741, 1998
- 11) Mahadevan MS, Yadava RS, Yu Q, et al : Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. Nat Genet 38 : 1066-1070, 2006

* * *