

患者の治療につながると考えられる。また一方現在米国で α -DG 糖鎖異常の回復を指標にして、低分子化合物のスクリーニングが行われている。

おわりに

新世紀になってから、筋ジストロフィーに α -DG の糖鎖異常という新しい病態メカニズムを提唱する報告が相次ぎ、興味深い展開となっている。しかし筋ジストロフィーとしてみた場合、重要なのは「治療」である。Duchenne 型に関する治療研究は世界各国で盛んに行われている。一方で、FCMD, MEB 原因遺伝子同定を契機に α ジストログリカノパチーの病態研究が大きく進展したが、治療としては報告がない。福山型はわが国で初めて記載された疾患であり、患者数も多く、わが国の研究により、治療法開発を進めることはわれわれの責務であると考える。

なおわれわれが同定開発したフクチンの遺伝子検査は、2006 年より健康保険適用となっていることを付記しておく。

文献

- 1) Fukuyama Y, Osawa M, Suzuki H : Congenital muscular dystrophy of the Fukuyama type—clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev* 1981 ; 3 : 1-29
- 2) Lander ES, Botstein D : Homozygosity mapping : a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 1987 ; 236 : 1567-1570
- 3) Toda T et al : Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. *Nat Genet* 1993 ; 5 : 283-286
- 4) Toda T et al : Linkage-disequilibrium mapping narrows the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) candidate region to <100 kb. *Am J Hum Genet* 1996 ; 59 : 1313-1320
- 5) Kobayashi K et al : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998 ; 394 : 388-392
- 6) Kondo-Iida E et al : Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet* 1999 ; 8 : 2303-2309
- 7) Silan F et al : A new mutation of the *fukutin* gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 2003 ; 53 : 392-396
- 8) Kurahashi H et al : Basement membrane fragility underlies embryonic lethality in *fukutin*-null mice. *Neurobiol Dis* 2005 ; 19 : 208-217
- 9) Murakami T et al : Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann Neurol* 2006 ; 60 : 597-602
- 10) Godfrey C et al : Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain* 2007 ; 130 : 2725-2735
- 11) Yoshida A et al : Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001 ; 1 : 717-724
- 12) Muntoni F et al : Defective glycosylation in muscular dystrophy. *Lancet* 2002 ; 360 : 1419-1421
- 13) Michele DE et al : Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 2002 ; 418 : 417-421
- 14) Xiong H et al : Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of α -dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 ; 350 : 935-941
- 15) Taniguchi M et al : Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in α -dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet* 2006 ; 15 : 1279-1289
- 16) Barresi R et al : LARGE can functionally bypass α -dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med* 2004 ; 10 : 696-703
- 17) Takeda S et al : Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 2003 ; 12 : 1449-1459
- 18) Kanagawa M et al : Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet* 2009 ; 18 : 621-631

＜シンポジウム 5—3＞難治性筋疾患の病態機序—CK 発見から 50 年—治療の時代へ

福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の病態・治療戦略

戸田 達史

(臨床神経, 49 : 859—862, 2009)

Key words : 福山型筋ジストロフィー, フクチン, ジストログリカノパチー, LARGE, 糖鎖

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) の特徴

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は 1960 年福山らにより発見された常染色体性劣性遺伝である。わが国の小児筋ジストロフィー中 Duchenne 型の次に多く、日本人の約 90 人に 1 人が保因者と計算され、日本に 1,000~2,000 人位の患者が存在すると推定され、日本人特有の疾患とされていたが、近年海外からの報告が相次いでいる (後述)。本症は重度の筋ジストロフィー病変とともに、多小脳回を基本とする高度の脳奇形 (数石 (2 型) 滑脳症) が共存し、さらに最近では近視、白内障、視神経低形成、網膜剝離などの眼症状も注目されている。すなわち本症は遺伝子異常により骨格筋—眼—脳を中心に侵す一系統疾患である。

患児は生後~乳児早期に筋緊張低下、筋力低下で発症する。運動障害は重症で、2 歳前後で坐位まで獲得するものは多いが、歩行まで獲得するものはまれである。また同時に脳奇形による中枢神経症状ともない、全例に精神発達遅延をみとめ、約半数にけいれんをみとめる。筋力低下、全身関節拘縮により、10 歳前後に完全臥床状態となり、多くは 20 歳までに死亡する。

フクチン遺伝子の同定

私たちは、世界に先駆け、糖鎖異常をともなう筋ジストロフィーの原因遺伝子として、フクチン (福山型筋ジストロフィー) と POMGnT1 (筋・眼・脳病) を同定した。

正常型のフクチン cDNA は約 7kb で、骨格筋、心筋、脳で優位に発現している。患者染色体のほぼ 90% には同一の変異がみられ、原因遺伝子の 3' 非翻訳領域内に約 3kb の DNA 挿入があり、mRNA の発現が検出できない。この挿入配列は、今から約 100 世代前の一人の祖先から今日の患者の大部分へと受け継がれたものと推定され、動く遺伝子である「レトロトランスポゾン」である¹⁾。

正常遺伝子の産物蛋白質フクチンは、461 個のアミノ酸からなる分子量 53.7kD の蛋白であり、細胞内ではゴルジ体に局

在し、相同性を示す既知の蛋白やモチーフ検索から、糖鎖修飾に関係する蛋白である可能性が示唆されている (Fig. 2)。

福山型の幅広い臨床スペクトラム

—胎生致死から心筋症まで、超軽症 FCMD の存在—

日本人患者のほとんどすべては、約 3kb のレトロトランスポゾン挿入型染色体のホモ接合体、またはレトロトランスポゾン挿入型染色体と他の変異 (フレームシフト、ノンセンスなど) の複合ヘテロ接合体である。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水頭症、小眼球などを示すなど重症である²⁾。点変異を 2 個持つ症例は日本には未だ報告がなく、海外の 2 報告例ではさらに重度の症状を呈し、それぞれ 10 日と 6 カ月で死亡している³⁾。点変異は表現型を重症化し、点変異 2 個の患者が見つからないのは、胎生致死と考えられた。西欧では点変異 2 個であり (したがって胎生致死)、これこそが本症が西欧に存在しにくい理由であり、これはフクチン遺伝子のノックアウトマウスが胎生致死であることとよく一致していた。

しかしながら 2006 年日本から心筋症と軽度筋力低下、知能正常の臨床的には肢帯型の成人 6 例が報告された⁴⁾。これはレトロトランスポゾン挿入型染色体とミスセンス変異の複合ヘテロ接合であった。また同様にユダヤ人で肢帯型例 3 例が報告され、点変異 2 個のホモ例であった。これらは従来の福山型の先天型のイメージを変え、福山型のさらなる広い臨床スペクトラムを考えさせる。また西洋から同様の報告が続き、フクチン遺伝子変異は、さまざまな臨床型をひきおこすことが明らかになった⁵⁾。点変異もその位置によっては、軽症型変異が存在すると思われる。

福山型筋ジストロフィーと α ジストログリカンの糖鎖修飾異常

ジストロフィン関連糖蛋白質複合体の中の α ジストログリカンは高度に糖鎖修飾を受け、全体が細胞外に存在し基底膜構成成分ラミニンと O-mannose 型糖鎖 Siaa2-3Galb1-

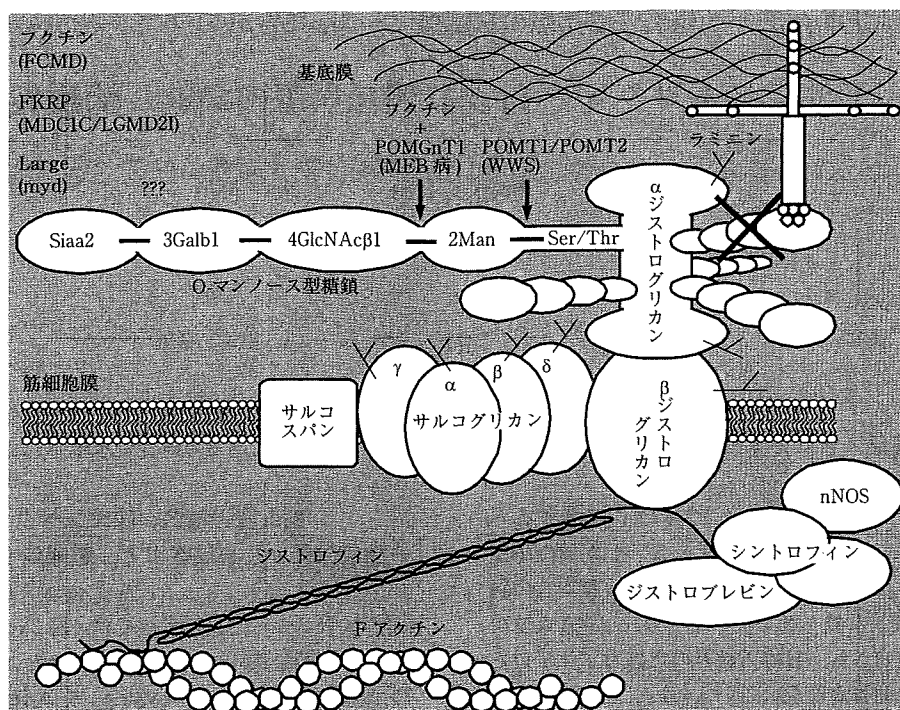


Fig. 1 筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体 DGC と α ジストログリカンに対する糖鎖修飾の異常によるとされている疾患群「 α ジストログリカノパチー」

細胞外基底膜から細胞内骨格につながる DGC 内の α ジストログリカンはラミニン $\alpha 2$ 鎖と O-マンノース型糖鎖で結合している。この糖鎖修飾に異常をきたすと、ラミニンなどのリガンド結合能が低下し、 α ジストログリカノパチーを発症すると考えられている。確実な活性が明らかなのは、POMGnT1 (MEB), POMT1 (WWS) のみ。フクチンは POMGnT1 と複合体を形成し、その活性を修飾していると考えられている。

4GlcNAc β 1-2Man-Ser/Thr)で結合しており、一連のつながりは、骨格筋の収縮弛緩による機械的負荷に対して筋形質膜の保護をしている (Fig. 1)。

先天性筋ジストロフィーに、II 型滑脳症、眼奇形をともなう muscle-eye-brain (MEB) 病や Walker-Warburg 症候群 (WWS) は、その病変部位、症状の類似性から FCMD と類縁疾患と考えられている。遠藤らとわれわれは類縁疾患、MEB 病が、この α ジストログリカンとラミニンの連結部の O-mannose に GlcNAc を付加する新規の糖転移酵素 POMGnT1 の異常により発症する疾患であることを、みいだした。筋ジストロフィーの原因遺伝子として糖転移酵素が同定され、実際に患者で変異が確認されたのははじめてのことである⁶⁾。

続けて、一部の Walker-Warburg 症候群に O-mannose 転移酵素 POMT1 と POMT2 の変異が発見された。さらにフクチンもアミノ酸の相同性などから、糖鎖修飾に関わる酵素と推測されており、また先天性筋ジストロフィー 1C 型や肢帯型筋ジストロフィー 2I 型の原因がフクチンと相同性のある fukutin-related protein (FKRP) という糖鎖修飾酵素と考えられるタンパク質であることが報告された。他に、myodystrophy マウスや先天性筋ジストロフィー 1D 型の原因が Large という糖転移酵素と推定されているタンパク質の異常が原因

であることが報告された。これらすべての疾患において 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する異常がみられている。

つまり Walker-Warburg 症候群、肢帯型 2I 型などもあわせ、糖転移酵素の欠損により α ジストログリカンの糖鎖修飾が乱れ、ラミニンなどとの結合ができなくなり、基底膜と細胞骨格のつながりが破綻するために筋ジストロフィー、脳表奇形が発症すると考えられ⁷⁾、これら疾患群を総称して「 α ジストログリカノパチー」という概念ができた (Fig. 1)。

その後も世界中から報告が続き、現在 FKRP, POMT1, POMT2, POMGnT1, フクチン, LARGE 遺伝子変異は、それぞれが WWS, MEB, FCMD, 肢帯型など、さまざまな臨床型をひき起こすことが明らかになっている⁵⁾。最近の私たちの研究から、フクチンと POMGnT1 は、細胞内で複合体を形成すること、また、フクチンの変異によって、POMGnT1 の細胞内局在異常や糖転移酵素活性の低下が引き起こされることが示された⁸⁾。

FCMD および α ジストログリカノパチーの治療へのヒント

多くの神経・筋変性疾患と同様、現在の所、福山型をふくむ

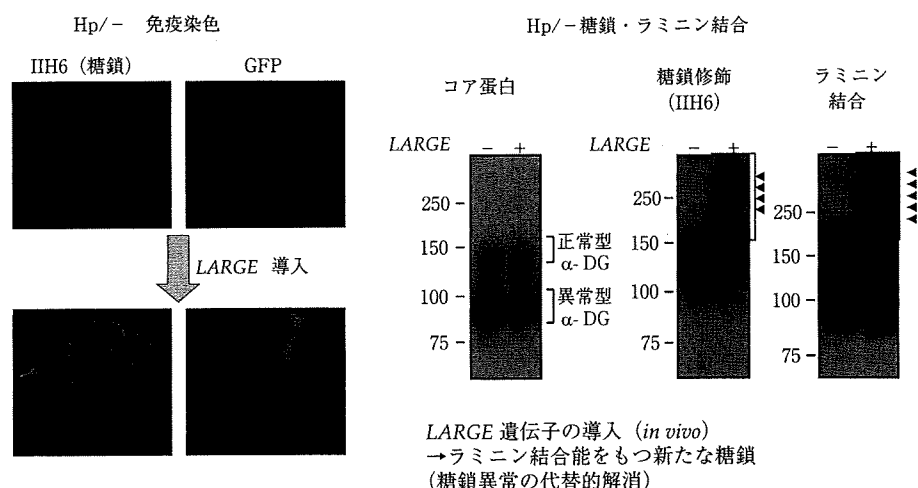


Fig. 2 FCMD モデルマウスへの LARGE 遺伝子導入

アデノウイルスベクターをもちいた LARGE 遺伝子導入により, FCMD ノックインマウスの α -DG の糖鎖異常が *in vivo* で解消できることが明らかになった. 糖鎖抗体 IiH6 の免疫染色やラミニン結合能も回復している. 同様の所見は POMGnT1 ノックアウトマウスでもえられた.

α ジストログリカノパチーに治療法はないが, 治療的アプローチにむけて研究が緒についたところである.

アデノウイルスベクターをもちいて myd マウスの骨格筋に原因遺伝子である LARGE 遺伝子を発現させると, α ジストログリカンの糖鎖異常が回復し, 筋ジストロフィーが改善することが報告された. さらに興味深いことに, FCMD, MEB 病および WWS 患者由来の細胞 (筋芽細胞, 線維芽細胞) においても, LARGE の過剰発現により α ジストログリカンの糖鎖異常に改善をみとめ, リガンドとの結合能が回復した⁹⁾. LARGE が付加する糖鎖が MEB 病などで欠損する通常のラミニン結合 O-マンノース型糖鎖である保証はないが, 遺伝的にことなるこれらの疾患群に対して, 共通の病態である「 α ジストログリカンの糖鎖異常」を標的とした治療法の開発につながる可能性があり, 大変興味深い.

FCMD の病態解明, および治療法の構築には, モデルマウスをもちいた研究が不可欠であるが, フクチン欠損マウスは, 胎生致死であり, フクチン欠損キメラマウスは個体ごとに組織ごとにキメラ率が異なり¹⁰⁾, モデルとしては有効ではない. そこで, われわれは, レトロトランスポゾン挿入変異をもつノックインモデルマウスを作成し, その解析を行った. レトロトランスポゾン挿入変異ホモ接合, より重症と思われる複合ヘテロ接合, いずれのモデルマウスにおいても, 筋ジストロフィー症状はみとめられなかった. いずれのマウスにおいても, α -DG 糖鎖に異常が生じていたが, 正常糖鎖型の α -DG 分子種の残存も検出された. 複合ヘテロ接合モデルにおけるラミニン結合能は, 50% 程度残存していた. 一方 FCMD 類縁疾患のモデルで, 顕著な病態を示す Large^{myd} マウスでは, 糖鎖正常型 α -DG 分子種も, ラミニン結合能も, ほとんど検出されない¹¹⁾.

FCMD ノックインマウス, Large^{myd} マウスの結果から, 正常糖鎖型の α -DG が少し残存していれば, 筋ジストロフィー

発症を抑制できる可能性がある. 更に, アデノウイルスベクターを用いた LARGE 遺伝子導入により, FCMD ノックインマウス, POMGnT1 ノックアウトマウスの α -DG の糖鎖異常が *in vivo* で解消できることが明らかになった (Fig.2)¹⁸⁾. つまり, 糖鎖異常を部分的にでも解消できれば, 膜脆弱化や筋再生異常を抑制し, FCMD をふくむ類縁疾患群の治療につながると考えられる. また一方現在米国で α -DG 糖鎖異常の回復を指標にして, 低分子化合物のスクリーニングがおこなわれている.

おわりに

新世紀になってから, 筋ジストロフィーに α ジストログリカンの糖鎖の異常という新しい病態メカニズムを提唱する報告が相次ぎ, 興味深い展開となっている. しかし筋ジストロフィーとしてみたばあい, 重要なのは「治療」である. デュシャンヌ型に関する治療研究は世界各国で盛んにおこなわれている. 一方で, FCMD, MEB 原因遺伝子同定を契機に α ジストログリカノパチーの病態研究が大きく進展したが, 治療としては報告がない. 福山型は我が国ではじめて記載された疾患であり, 患者数も多く, 我が国の研究により, 治療法開発をすすめることはわれわれの責務である, と考える.

なおわれわれが同定開発したフクチンの遺伝子検査は, 2006 年より健康保険適応となっていることを, 付記しておく.

文 献

- 1) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, et al: An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998; 394: 388—392
- 2) Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, et al: Novel mu-

- tation and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet* 1999; 8: 2303—2309
- 3) Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, et al: A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 2003; 53: 392—396
 - 4) Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, et al: Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann Neurol* 2006; 60: 597—602
 - 5) Godfrey C, Clement E, Mein R, et al: Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain* 2007; 130: 2725—2735
 - 6) Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, et al: Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001; 1: 717—724
 - 7) Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, et al: Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 2002; 418: 417—421
 - 8) Xiong H, Kobayashi K, Tachikawa M, et al: Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of α -dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 935—941
 - 9) Barresi R, Michele DE, Kanagawa M, et al: LARGE can functionally bypass α -dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med* 2004; 10: 696—703
 - 10) Takeda S, Kondo M, Sasaki J, et al: Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1449—1459
 - 11) Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, et al: Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 621—631

Abstract

Pathomechanism and therapeutic strategy of Fukuyama congenital muscular dystrophy and related disorders

Tatsushi Toda, M.D.

Division of Neurology, Kobe University Graduate School of Medicine

Hypoglycosylation and reduced laminin-binding activity of α -dystroglycan are common characteristics of dystroglycanopathy, which is a group of congenital and limb-girdle muscular dystrophies. We previously identified the genes for Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) and muscle-eye-brain disease (MEB). FCMD, caused by a mutation in the *fukutin* gene, is a severe form of dystroglycanopathy. Knock-in mice carrying the founder retrotransposal insertion exhibited hypoglycosylated α -dystroglycan; however, no signs of muscular dystrophy were observed. More sensitive methods detected minor levels of intact α -dystroglycan, and solid-phase assays determined laminin binding levels to be approximately 50% of normal. In contrast, intact α -dystroglycan is undetectable in the dystrophic Large mouse, and laminin-binding activity is markedly reduced. These data indicate that a small amount of intact α -dystroglycan is sufficient to maintain muscle cell integrity in knock-in mice, suggesting that the treatment of dystroglycanopathies might not require the full recovery of glycosylation. Transfer of fukutin into knock-in mice restored glycosylation of α -dystroglycan. Transfer of LARGE produced laminin-binding forms of α -dystroglycan in both knock-in mice and the POMGnT1 mutant mouse. These data suggest that even partial restoration of α -dystroglycan glycosylation and laminin-binding activity by replacing or augmenting glycosylation-related genes might effectively deter dystroglycanopathy progression and thus provide therapeutic benefits.

(*Clin Neurol*, 49: 859—862, 2009)

Key words: Fukuyama congenital muscular dystrophy, fukutin, dystroglycanopathy, LARGE, sugar chain

筋ジストロフィーの最新検査

戸田 達史

神戸大学大学院医学研究科 神経内科学/分子脳科学 教授

Summary

筋ジストロフィーは、進行性の筋力低下と筋萎縮、筋線維の変性・壊死を示す遺伝性疾患の総称であり、40種以上に分類される。代表的なものは Duchenne 型、先天性、肢帯型、筋強直型であり、Duchenne 型では巨大遺伝子に対して MLPA 法による遺伝子診断が行われ、治療研究、臨床試験、患者登録が進められている。また、日本で特異的な福山型などに共通して、 α ジストログリカンの糖鎖修飾異常が注目されている。今後は次世代シーケンサーも検査に応用されることが期待される。筋ジストロフィーはもはや不治の病ではなくなりつつある。

Key words

Duchenne 型筋ジストロフィー、MLPA 法、福山型、 α ジストログリカン、筋強直型

1. はじめに

筋ジストロフィーは、進行性の筋力低下と筋萎縮を伴う、筋線維の変性・壊死を主な病理像とする遺伝性疾患の総称である。筋ジストロフィーは1つの疾患のように考えられている場合があるが、これは誤りである。筋ジストロフィーの種類は40種以上と多く、頻度、遺伝形式、発症年齢、臨床症状、原因遺伝子により全く異なる。現在でも、世界中で多くの患者が苦しんでおり、その救済のため、わが国を含めた世界の多くの国で専門病院が設置されている他、筋ジストロフィー協会などの支援団体が設立されている。

また、近年の分子遺伝学の進展により、筋ジストロフィーに関するほとんどの原因遺伝子が発見され、確定診断、病

態解析、治療法開発が可能になった。本稿では、比較的頻度が高く、よく検査が行われる、代表的な Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィー、先天性(主に福山型)、肢帯型、筋強直型筋ジストロフィーの4つの型について、疾患の概略、トピックス、最新の遺伝学的検査法について述べる。

2. Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィー (DMD/BMD)

1) 疾患の概略

Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィー(DMD/BMD)ともに、筋細胞膜の裏打ち蛋白であるジストロフィン遺伝子(Xp21.2)の変異が原因(ジストロフィンパチー)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、DMD は出生男児 1/3,500 人の割合で発症する。X連鎖性劣性遺伝をとり、男児が罹患し、女性では保因者(carrier)となるが、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)しているが、BMD では少量存在(~30%)し、BMD はDMDの軽症型である。この違いはインフレーム変異かアウトオブフレーム変異かの遺伝子変異の差による。

DMD は運動発達の遅れ、転びやすい、階段昇降を嫌がるなどの症状から、2~3歳で発見される。採血の際の血清CK(クレアチンキナーゼ)、ALD(アルドラーゼ)、

PROFILE

戸田 達史



1985年 東京大学医学部卒業
1987年 東京大学医学部神経内科医員
1994年 東京大学大学院人類遺伝学助手
1996年 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター助教授
2000年 大阪大学大学院臨床遺伝学教授
2008年 神戸大学大学院医学研究科神経内科学/分子脳科学教授
朝日賞、文部科学大臣表彰、神経学会賞、人類遺伝学会賞など

AST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)、ALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ) 高値から偶然に発見されることもある。特徴的な Gowers 徴候(登攀性起立)、動揺性歩行、仮性筋肥大を認め、平均9歳頃より歩行困難、10代で車イスの使用を開始し、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、以前は20代といわれたが、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。一方、BMDは発症が5歳以上で、20代以降に車イス生活となる例が多いが、筋肉痛のみの例や生涯無症状の例もある。

2) 診断・検査

従来のDMD遺伝子検査では、ジストロフィン遺伝子の2か所のエクソン欠失のホットスポットにある多数のエクソンを同時にPCR(Polymerase Chain Reaction)増幅するマルチプレックスPCR法が最も容易な方法として採用されてきた。しかし、特定のエクソンのみを増幅するため、DMD患者の約5割でしか遺伝子異常が同定できないという欠点があった。

最近では、ジストロフィン遺伝子の79個のエクソン全

てを対象として、その欠失・重複が解析できる Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法が主流となっている。MLPA法では、患者DNAにジストロフィン遺伝子の全79個のエクソンに対する特異プローブ(各エクソンについて隣接するAプローブとBプローブ)をハイブリダイズさせ、次にAプローブとBプローブをライゲーション(連結)させた後、PCRにより増幅する。患者DNAと対照ヒトDNAのシグナル強度を比較することで、欠失だけでなく重複も検出でき、さらに女性保因者においても、それらを判定することが可能である。また、全エクソンを測定するため、1回の検査で欠失や重複の範囲を決定することができる(図1)。

MLPA法は比較的容易な方法で、しかも欠失のみならず重複の異常も検出可能となり、遺伝子検査の精度を向上させた。しかも本遺伝子検査は保険適応でもあり、このMLPA法によりDMD/BMDの約6割の患者で遺伝子診断が可能となった。またMLPA法では、エクソン単位の欠失・重複の異常に加え、微細な遺伝子の異常が検出できることもあり、MLPA法の有用性はさらに高くなっている⁹⁾。

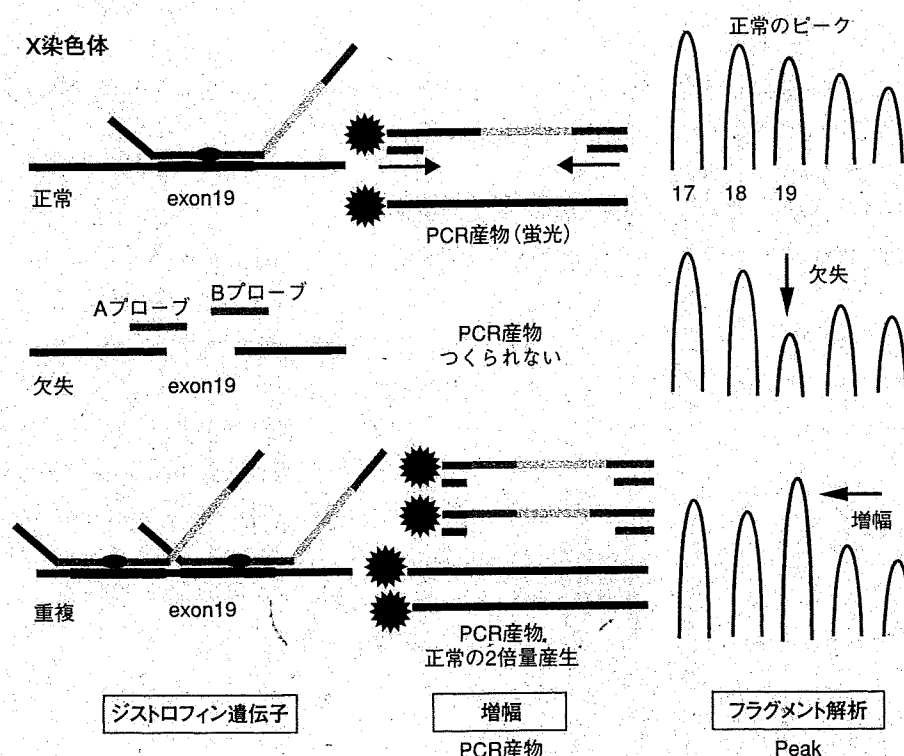


図1 MLPA法の原理

現在、DMDなどのジストロフィン異常症の診断に用いられる。

しかし、DMDの残る40%の例では、ナンセンス変異のような微細な遺伝子の異常を有している。こうした微細な遺伝子の異常の検出は、ゲノムを用いてジストロフィン遺伝子の各エクソンをPCR増幅し、その塩基配列を明らかにしなければ同定できない。79のエクソンを個別にシーケンスすることは時間を要するため、ジストロフィンcDNAの全長の配列の塩基配列を決定する。これらにより、ほぼ全例で遺伝子診断が可能である。

神戸大学の松尾らは、数百例のDMD/BMD患者で詳細な遺伝子診断を進め、わが国でのジストロフィン遺伝子異常の分布を示した。その結果、ジストロフィン遺伝子のエクソン単位の大きな欠失・重複の異常を約70%の患者が有し、さらにナンセンス変異を約15%の患者が、その他の異常を15%の患者が有していることが明らかとなった。またDMDのほとんどの症例でアウトオブフレーム変異あるいはナンセンス変異が同定され、ジストロフィンが産生されないフレームシフト則が適合していた。

3) 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、薬剤治療に向けて研究の進歩は目覚ましい。エキソンスキッピング法は、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にする治療法で²³⁾、治療が進んでいる。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認められている。また微小変異のうち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)の治療が海外で行われている⁹⁾。このようにしてDMD/BMD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があるが、最新の治療に関する研究成果の情報把握は重要であり、厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーの臨床試験実施体制構築に関する研究班」では、臨床試験へ向けて遺伝子情報も含めた患者登録制度の登録サイトREMUDY(Registry of Muscular Dystrophy)が始まっている⁹⁾。

4) 検査のポイント

DMDの診断は、臨床経過、家族歴、診察所見、血清

CK値の高値によって行われる。一方、BMDについては、肢帯型筋ジストロフィーとの鑑別が困難な例がある。遺伝子診断の実施にあたっては、マルチプレックスPCR法またはMLPA法による遺伝子診断を行い、エクソン欠失や重複を認めない場合に生検筋のジストロフィン染色を施行する方法が主流になってきている。その場合には、生検筋の抗ジストロフィン抗体による免疫染色が確定診断となる。BMDと肢帯型筋ジストロフィーの鑑別診断は、遺伝子検査と生検筋組織のジストロフィン免疫染色、サルコグリカン免疫染色による。

3. 福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)

1) 疾患の概略

福山型先天性筋ジストロフィー(Fukuyama type Congenital Muscular Dystrophy: 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。わが国における小児期の筋ジストロフィーでは2番目に頻度が高く(2.9/10万人)、約1/90人が保因者である。FCMDの原因遺伝子(9q31)は、1998年に筆者らのグループにより同定され、原因蛋白をフクチン(fukutin)と名づけた⁹⁾。ほとんどの患者は、遺伝子の3'非翻訳領域に約3Kbのレトロトランスポゾ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持ち、もう片アレルに点変異などの微小変異を持つ複合ヘテロ症例も存在する。一般に複合ヘテロ症例のほうが重症である。

典型例では生後から乳児早期の間に全身性、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の運動機能である。約半数に痙攣、また眼症状(視神経萎縮、眼振、網膜剥離)を認め、精神運動発達遅延は、ほぼ全例に認める。病理学的には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10歳前後に完全臥床となる。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、知能正常、心筋症、肢帯型筋ジストロフィーを呈す患者もみられる⁹⁾。

ジストロフィン様は様々な蛋白質と複合体をつくっており、これらはジストロフィン・糖蛋白質複合体(Dystrophin-Glycoprotein Complex: DGC)と呼ばれ、それぞれが肢帯型などの筋ジストロフィーの原因になっている。そのう

ち α ジストログリカンは、O マンノース型糖鎖と呼ばれる糖で、その外側の基底膜のラミニンと結合しており、一連のつながりは、骨格筋の伸び縮みによる負荷に対して、筋膜の保護をしている。筆者らと遠藤らは、FCMD と類似した疾患の筋-眼-脳 (Muscle-Eye-brain : MEB) 病が、 α ジストログリカンとラミニンの連結部の糖鎖をつくる酵素 POMGnT1 の異常により発症することを見出した⁹⁾。また FCMD では α ジストログリカンの糖鎖部分の染色が悪い。その後、五月雨式に、Walker-Warburg 症候群、先天性筋ジストロフィー 1C、1D 型、肢帯型筋ジストロフィー 2I 型などでも同様の異常が発見された。すなわち α ジストログリカンの糖鎖修飾に異常をきたすことから、ラミニンなどとの結合が低下し、基底膜と細胞内骨格のつながりが壊れるために筋ジストロフィーが発症するというもので、これらの疾患群を総称して「 α ジストログリカ

ノバチー」と呼ぶ⁹⁾ (図 2)。

2) 診断・検査

臨床的徴候、血清学的検査 (数千単位の CK 上昇) に、画像検査での筋組織の萎縮、脂肪変性、頭部 CT での厚脳回様所見、頭部 MRI での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* レトロトランスポゾ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、PCR 法は保険適応となった。筋生検では、筋線維の壊死、再生があり、筋ジストロフィー所見を示す。DMD 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。また、 α ジストログリカンの糖鎖に対する抗体 IIH6 の反応が特異的に低下しているが、遺伝子検査で確定診断となる現

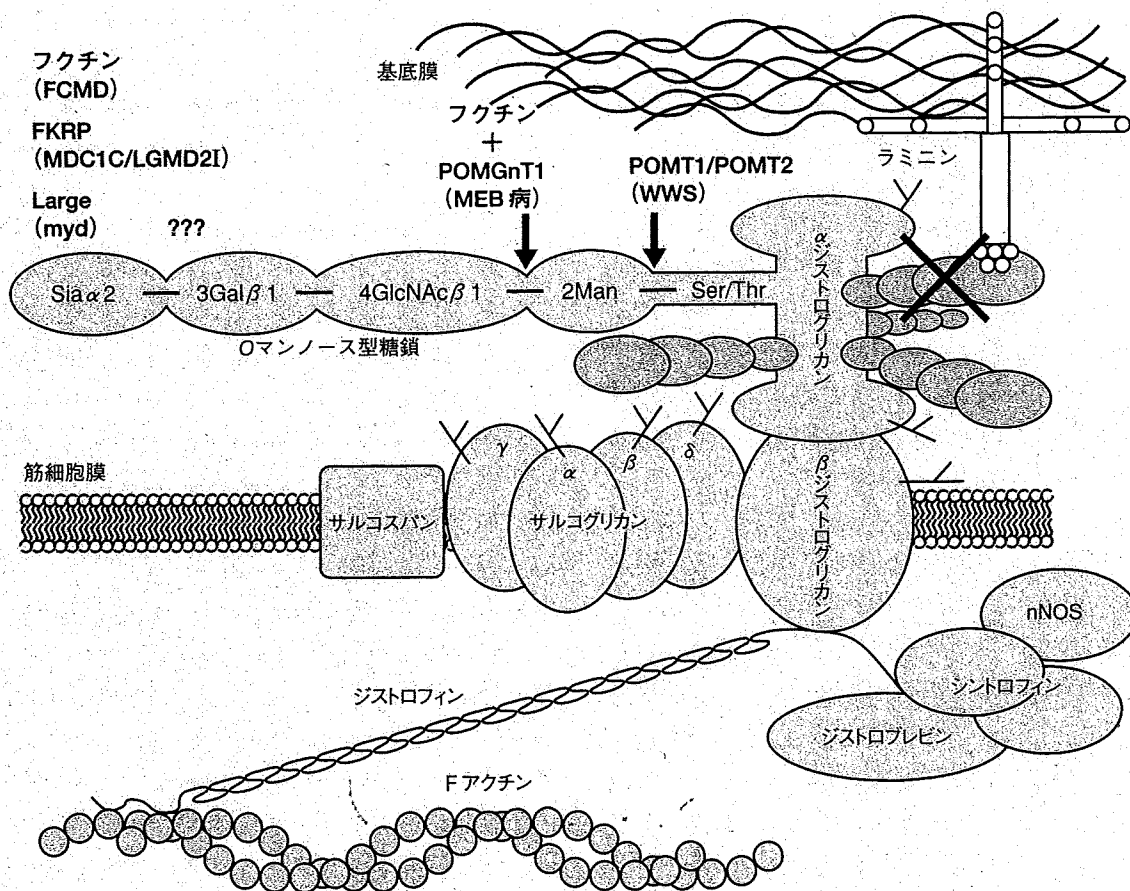


図2 筋細胞膜のジストロフィン・糖蛋白質複合体 (DGC) と α ジストログリカノバチー

細胞外基底膜から細胞内骨格につながる DGC 内の α ジストログリカンはラミニン $\alpha 2$ 鎖と O マンノース型糖鎖で結合している。この糖鎖修飾に異常をきたすと、ラミニンとの結合能が低下し、 α ジストログリカノバチーを発症すると考えられている。

在では、この検査はあまり実施されなくなった。

3) 検査のポイント

遺伝子検査により遺伝子診断が可能で、また、出生前診断、保因者診断にも応用できる。前述のように日本人の患者のほぼ全てはレトロトランスポゾン DNA の挿入を認めるため、まず PCR 法¹⁰⁾によるレトロトランスポゾン挿入のスクリーニングから始める。レトロトランスポゾン挿入のホモは確実に FCMD であり、診断はこの時点で終了する。一方、レトロトランスポゾン挿入を 1 本持つ場合は、診断的にはこの段階で FCMD であるとしてよいが、他方の染色体について全エクソンとその周辺のイントロンの塩基配列を PCR にて増幅しダイレクトシーケンス法で決定し、点変異の検索を行う。

わが国ではこれまで点変異は全てレトロトランスポゾン挿入を 1 本持つ患者の、もう一方の染色体において発見されており、レトロトランスポゾン挿入を 1 本も持たなかった患者に点変異が発見されたことはない。つまり、レトロトランスポゾン挿入を 1 本も持たなかった時点で、わが国ではその患者は FCMD ではなく、別の先天性筋ジストロフィーである可能性が高い。しかし西洋人では 2 個の点変異例が報告されている⁹⁾。またレトロトランスポゾン挿入を 1 本持ちながらもう片方の染色体に変異が同定できない例が数%存在する。こうした例では診断的には FCMD でよいが、通常のエクソンとその周囲の検索では見つからない変異が存在すると考えられる。

4. 肢帯型筋ジストロフィー (LGMD)

1) 疾患・診断・検査

筋ジストロフィーや多発性筋炎といった筋原性疾患は、一般的には躯幹やそれに近い腰帯筋や肩甲筋などの近位筋に優位な障害がみられる。肢帯型筋ジストロフィー (Limb-Girdle Muscular Dystrophy : LGMD) でもこの近位筋に優位な障害が認められるが、DMD/BMD といったジストロフィノパチーや顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーなどの他の筋ジストロフィーを除外した残りの筋ジストロフィーは、LGMD と定義され、X連鎖の疾患は含まれない。従来は原因や病態は全く不明で、分類も不明な一群の疾患を含む疾患群であり、診断のくずかご的存在であった。

しかしながら、近年の分子遺伝学の進歩により、その

遺伝子座および責任遺伝子が次々に明らかにされ、判明した責任遺伝子による再分類が進み、新たな疾患概念が構築されている。歴史的には、この中でも小児期に発症して DMD に多少似ているが常染色体劣性遺伝をとる疾患を、わが国では悪性肢帯型筋ジストロフィー (三好) として、アラブ諸国、特にチュニジア共和国に多くみられる患者は重症小児常染色体劣性筋ジストロフィー (Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy : SCARM) として報告されていたが、これらも LGMD に分類される。

これまでに、原因遺伝子座、あるいは原因遺伝子および遺伝子産物として、常染色体優性遺伝形式をとる LGMD が 7 個、常染色体劣性遺伝形式をとる LGMD が 14 個、X 染色体劣性の遺伝形式をとる LGMD 1 個が明らかになっているが、なお原因不明の LGMD も多い。また各病型の頻度は地域差、人種差が著しいことも明らかになってきている。LGMD は遺伝形式に基づいて常染色体優性遺伝形式をとるものを LGMD1、常染色体劣性遺伝形式をとるものを LGMD2 と大きく分類し、さらには遺伝子座が確定した順番に LGMD1A、1B、1C など、LGMD2A、2B、2C などと命名されている (表 1)。LGMD2 の中でもそれぞれ α 、 β 、 γ 、 δ -サルコグリカン (sarcoglycan) の異常は、いずれもジストロフィン・糖蛋白質複合体 (Dystrophin-Glycoprotein Complex : DGC、図 2) の中で、サルコグリカン複合体を構成する全ての構成成分に影響をきたすために、LGMD2C、2D、2E、2F はまとめてサルコグリカンノパチー (sarcoglycanopathy) とも呼ばれる。肢帯型の中では LGMD1 は非常に頻度が低く、多くは LGMD2 である。わが国では LGMD1 は LGMD 全体の 5% 以下と推定されている。

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部によると、同センター筋バンクにおける 2000～2004 年の 5 年間での計 189 例の解析では、筋ジストロフィー患者骨格筋標本に占める LGMD 筋標本の頻度は約 1/3 程度であり、このうち、LGMD2A は約 13%、LGMD2B (ジスフェルリノパチー) は約 17%、その他が約 10% であった。しかしながら、いずれの病型にも該当しないと考えられるものが 60% 以上も占めており、今後、これらの症例の詳細な解析、および原因遺伝子同定が重要であると考えられた¹¹⁾。

2) 検査のポイント

LGMD において遺伝子診断を臨床現場で鑑別に用いることは必ずしも実用的ではない。臨床型および筋生検の病理、免疫組織化学法あるいはウエスタンブロット法によるスクリーニングによって DMD などの他の筋ジストロフィーや多発性筋炎、Pompe 病などの筋疾患との鑑別を最初に行う。次に免疫組織化学法、マルチプレックスウエスタンブロット法、およびシーケンス解析を行い、LGMD の病型分類を行う。

5. 筋強直型ジストロフィー (DM)

1) 疾患の概略

筋強直型ジストロフィー (Dystrophia Myotonica : 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。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。

先天性 DM は出生時より低緊張で、特徴的顔貌 (逆 V

字型上口唇、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。軽症型では白内障のみの例もある。成人型や軽症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、弛緩出血、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。

2) 診断・検査

19q13.3 上の *DMPK* の 3' 非翻訳領域の CTG リピートの異常な伸長が原因である。CTG リピートが正常では 5 ~ 37 回繰り返すのに対して患者では 50 ~ 3,000 回と増加する。リピート数と発症年齢や重症度の間には負の相関が認められ、臨床的にはある程度重複する 3 つの病型 (軽症型、古典型、先天性) に分類されているが、これらはおおまかに CTG リピート数と関連する (表 2)。先天性 DM 罹患児の CTG リピート数はおよそ 700 回以上 (大半

表 1 常染色体劣性肢帯型筋ジストロフィー

病名	病型	遺伝子座	遺伝子産物	臨床的特徴
calpainopathy	LGMD2A	15q15.1-q21.1	calpain 3	発症年齢 6 ~ 52 歳 平均発症年齢 20.9 歳
dysferlinopathy	LGMD2B	2p13	dysferlin	
sarcoglycanopathy				
α-sarcoglycanopathy	LGMD2D	17q21	α-sarcoglycan	重症例は DMD と同様に小児期に発症するが、精神発達遅延はない
β-sarcoglycanopathy	LGMD2E	4q12	β-sarcoglycan	
γ-sarcoglycanopathy	LGMD2C	13q12	γ-sarcoglycan	
δ-sarcoglycanopathy	LGMD2F	5q33	δ-sarcoglycan	
telethoninopathy	LGMD2G	17q12	telethonin	遠位筋障害
LGMD2H	LGMD2H	9q31-q34	TRIM32	発症年齢 1 ~ 9 歳
LGMD2I	LGMD2I	19q13.3	fukutin related protein	発症年齢 1.5 ~ 27 歳 平均発症年齢 11.5 歳
titinopathy	LGMD2J	2q24	titin (connectin)	原因は tibial muscular dystrophy と同じ遺伝子
LGMD2K	LGMD2K	9q34.1	POMT1	6 歳までに発症し、小頭症、精神発達遅延を認める。原因は Walker-Warburg 症候群と同じ遺伝子
LGMD2L	LGMD2L	11p31-q33	不明	
LGMD2M	LGMD2M	9q31	fukutin	原因は福山型と同じ遺伝子

(文献 13 より引用改変)

が1,000回以上)とされる。

DM1と類似した症候を呈するが、DMPK内のCTGリピートの異常伸長がなく、3q21.3に連鎖する家系が知られていることから従来のDMをDM1、3q21に連鎖するDMをDM2あるいはProximal Myotonic Myopathy (PROMM)と称するようになった。DM2ではZinc Finger protein 9遺伝子(ZNF9)のイントロン1内にあるCCTGリピートの異常伸長が確認された。わが国から報告はまだ1家系のみである¹²⁾。

発症機構としては、伸長したリピートRNAに特異的に結合する蛋白質があり、正常ではスプライシング調節をしているこの蛋白質が伸長リピートに捕捉され、ミオトニアの原因となるクロライドチャネル遺伝子などに異常スプライシングが起きる、と考えられている。

3) 検査のポイント

典型例(発症者)の診断においては、臨床経過、症候、家族歴、血清CK、筋電図、筋生検などから臨床的にDM1と診断できる場合が多い。確定診断を得るには、遺伝子診断が必要となることがある。一方、遺伝子診断は、患者自身の診断という面だけでなく、非発症者も含めた親族全体の診断という側面を持っている点にも十分な配慮を行う必要がある。

3つの病型はおおまかにCTGリピート数と関連するが、リピート数は各病型間でかなりの重複があるため、CTGリピート数を基に病気の重症度を予測する際には十分な注意が必要である。また先天性DM1の症例はほとんどが母親由来である。先天性DM1症例では他病型に比べてリピート回数が多い傾向にあるが、両者のリピート数の間にはかなりの重なりがある。父親から遺伝子変異を受け継ぐ場合に世代間でCTGリピート数が減少し、臨床的にも軽症化ないしは稀であるが、正常化する場合があることが知られている。

DMに罹患した母親では、胎動減少、羊水過多、遷延分娩、分娩後子宮出血、自然流死産などの妊娠・分娩合併症を生じる頻度が高い。また母親が本症罹患者の場合、子供の50%が正常、約30%が通常のDM1、約20%が先天性DM1となる。ただし先天性DM1罹患児の約半数は流死産に至ると推測されている。また第一子が先天性DM1罹患児であれば、その母親は第二子以降も同様に先天性DM1罹患児を産む確率が高いことが経験的に知られている。

6. おわりに

以上、代表的な4つの型の筋ジストロフィーについて、各疾患の病態と検査の最新情報を基に述べた。現状では、DMD/BMDで欠失・重複変異でない場合は、多数のエクソンを持つ巨大なジストロフィン遺伝子をシーケンスしなければならず、また肢帯型などの場合は、シーケンスの対象となる遺伝子の種類が20個以上にも及び、多大な労力を要する。これらの問題は、次世代シーケンサーの登場により、高速シーケンスを行いたい領域のキャプチャーカスタムアレイを作製し、次世代シーケンサーにて高速シーケンスを行うことによって解決できると思われる。

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、2008年度よりDMDおよびFCMDの遺伝子検査が保険適応となった。特に治療法が確立されていない難病においては、一生不変の遺伝情報を容易に検査で明かすことには慎重でなければならない。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びかけられており、筋ジストロフィー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が明記されている¹³⁾。

表2 筋強直型ジストロフィーの分類

臨床型	臨床症候	CTGリピート数	発病年齢(歳)	平均死亡年齢(歳)
前変異	なし	38～49		一般集団と同じ
軽症型	白内障、軽度のミオトニア	50～150	20～70	60～
古典型	筋力低下、ミオトニア、白内障、前頭部禿頭、心臓不整脈、その他	～100～1,000-1,500	10～30	48～55
先天性	乳児筋緊張低下、呼吸障害、精神発達遅滞、古典型の症状	～1,000～2,000以上	生下時～10	45

(文献13より引用)

■ 文献

- 1) Okizuka, Y. et al. Small mutations detected by multiplex ligation-dependent probe amplification of the dystrophin gene. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*. 2009, 13, p.427-431.
- 2) Takeshima, Y. et al. Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Res.* 2006, 59, p.690-694.
- 3) Yokota, T. et al. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann. Neurol.* 2009, 65, p.667-676.
- 4) Welch, EM. et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*. 2007, 447, p.87-91.
- 5) Remudy 筋ジストロフィー患者登録サイト.
<http://www.remudy.jp/> (accessed 2010-1-18)
- 6) Kobayashi, K. et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*. 1998, 394, p.388-392.
- 7) Murakami, T. et al. Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann. Neurol.* 2006, 60, p.597-602.
- 8) Yoshida, A. et al. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell*. 2001, 1, p.717-724.
- 9) Godfrey, C. et al. Refining genotype-phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*. 2007, 130, p.2725-2735.
- 10) Watanabe, M. et al. Founder SVA retrotransposal insertion in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and its origin in Japanese and Northeast Asian populations. *Am. J. Med. Genet. A*. 2005, 138, p.344-348.
- 11) 林由起子ほか. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究班」. 平成 19 年度班会議抄録集.
- 12) Saito, T. et al. Myotonic dystrophy type 2 in Japan: ancestral origin distinct from Caucasian families. *Neurogenetics*. 2008, 9, p.61-63.
- 13) 日本神経学会「神経疾患の遺伝子診断ガイドライン」作成委員会. 神経疾患の遺伝子診断ガイドライン 2009. 医学書院, 2009.

ゲノムと再生医療

筋ジストロフィーに対する 先端治療法の開発

SUZUKI Yuko 鈴木友子

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室長

TAKEDA Shin'ichi 武田伸一

同 遺伝子疾患治療研究部長

国立精神・神経センタートランスレーショナル・メディカル・センター長

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の原因が、骨格筋の細胞質膜の裏打ち蛋白質であるジストロフィンの欠損による膜の脆弱性によることが明らかになってから 20 年近くを経たが¹⁾、その根本的な治療法はいまだ確立されていない。ほかの遺伝子の異常による筋ジストロフィーに関してもおおむね同じ状況である。

本稿では、これまでの筋ジストロフィーに対する細胞移植治療研究を概説し、最近の人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) 研究の目覚ましい発展が、どのように筋ジストロフィーに対する先端医療法へ結びついていくか、その可能性に関して述べてみたい。

筋ジストロフィーに対する 治療の現状

DMD の進行抑制効果があるとされている治療法には、プレドニゾロンや deflazacort のステロイド療法がある。その作用機序については諸説あり、よくわかっていない。次世代の治療法として期待されているものとして、ジストロフィン転写産物のスプライシングに重要な配列を標的としたアンチセンス・オリゴヌクレオチドを患者に投与して、ジストロフィン転写産物のスプライシングパターンを変え、premature stop codon の出現を回避するエクソン・スキッピング法がある。筆者らもアンチセンス・モルフォリーノの効果を筋ジストロフィー犬で検討しており、重篤な副作用なしに全身の骨格筋にジストロフィンの発現を回復

表1: 2009年5月の段階で進行中の clinical trials の例 (ClinicalTrials.gov)

種 類	作用機序
PTC124 Gentamicin	Premature stop codon の read-through 効果.
AVI-4658 (PMO)	アンチセンスモルフォリーノを用いたスプライシング段階でのエクソン 51 のスキッピング. リーディングフレームの回復.
rAAV vector expressing Mini-dystrophin with CMV promoter	AAV ベクターによる短縮型ジストロフィン遺伝子導入. AAV ベクターはホストの免疫を惹起することが少なく, 長期安定した発現が期待される.
MYO-029	組換えヒト抗 myostatin 抗体.

させることができた²⁾。しかし、モルフォリーノはやがて体外へ排出されるため、繰り返し投与が必要であること、骨格筋に比べて心筋に取り込まれる効率が低いこと、患者によって遺伝子変異が異なり、用いるアンチセンス配列が異なること、モルフォリーノ自体が高価であることなどが課題として残る。そのほかにも、動物実験レベルでは有効であり、現在臨床試験が進行中であるものがいくつかある(表1)。

今までの幹細胞移植と その問題点

骨格筋は組織特異的幹細胞である筋衛星細胞(muscle satellite cells)を有し、筋が傷害を受けると、この筋衛星細胞が分裂し、融合して筋線維を再生する。1990年代前半、近親者から得た筋衛星細胞を培養後、DMD患者の骨格筋へ移植する筋芽細胞移植が行われたが、筋力回復などの期待された治療効果は得られなかった。その原因と

して、

- ① 筋衛星細胞を *in vitro* で培養すると、徐々に幹細胞としての能力を失うこと
 - ② 移植直後に多くの筋芽細胞が死んでしまうこと
 - ③ 移植後筋芽細胞が筋組織内をあまり移動しないこと
- が挙げられている。さらに、
- ④ 免疫抑制が不十分であったこと

が挙げられている。さらに、

④ 免疫抑制が不十分であったことも筋芽細胞移植の失敗の原因のひとつであったと推察されている。今後の発展のためには、この骨格筋幹細胞の自己複製，増殖・分化の分子機構を解明していく必要がある。

■ ■ ■ 新しい幹細胞の発見

一方、骨格筋組織の間質や血管周囲にも、多能性をもち、筋細胞へ分化する細胞が報告されている。ヘキスト色素を排出する能力に富む side population (SP) 細胞、血管周囲に存在する

ペリサイト(pericyte), 同じく血管組織に由来する mesoangioblast, muscle-derived stem cells, myo-endothelial cells などである。これらの細胞の表面マーカーや分化能はよく似ており, その異同は興味をもたれる。数量的には筋衛星細胞が筋線維再生に最も寄与していることは明らかであるが, 全身の筋変性疾患に対する移植治療という観点では, 局所にしか生着しない筋衛星細胞に対して, 経動脈的, あるいは経静脈的に移植可能であると報告されている多能性幹細胞の利用は多いに期待されるところである。特に mesoangioblasts は筋ジストロフィー犬への経動脈投与後, 全身の骨格筋でジストロフィンの発現を回復させ, 筋ジストロフィーの症状を顕著に改善させており, その臨床応用が待たれる³⁾。

中へ細胞の登場と筋シストロフィー の細胞移植への応用

2006 年, 4 つの転写因子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を強制発現させることでマウスの胎児線維芽細胞から, 胚性幹細胞 (embryonic stem cells ; ES 細胞) に類似した性質を示す人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells ; iPS 細胞) が樹立された⁴⁾. 2008 年には 6 歳の Duchenne 型筋ジストロフィー患者と 38 歳の Becker 型筋ジストロフィーの患者の皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立が報告されている⁵⁾. その後は iPS 細胞の再生医療への応用を視野に入れて, 低分子化合物やペプチドを用いて iPS 細胞を誘導する方法や, ゲノムに inte-

grate しないウイルスベクター(アデノウイルスベクターなど)やプラスミドベクターを用いた iPS 細胞の誘導が試みられている。さらに一度細胞のゲノムに導入した *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* の発現カセットを, Cre-lox, あるいは transposon のシステムを利用してホストのゲノムから切り出す方法で iPS 細胞を樹立する方法が報告されている。ウイルスの integration のない患者由来 iPS 細胞は, 次世代の DMD の治療法の tool として十分期待される。

図1 iPS細胞を移植治療に応用する際の利点・懸念される問題点(表2)

成人に達したジストロフィー患者の線維芽細胞からも多能性幹細胞を確立できることは, iPS テクノロジーの優れた点である。樹立された iPS 細胞の増殖能は高く, 正常なジストロフィンを発現するように遺伝子を導入し, 筋分化を誘導し, 患者に移植する治療法も将来は可能になると考えられる(図1)。しかし, 臨床応用には, 未分化な iPS 細胞が混在することによる腫瘍形成を回避する方法, すなわち, 目的とする細胞系譜へコミットした細胞を純化し, 分化誘導に抵抗性の未分化細胞を完全に除去する技術の確立が必要である。また, ヒト iPS 細胞から効率よく骨格筋への分化を誘導する方法を確立することも必要である。最近マウスの系で Pax3 を tet-on の系を用いて強制発現することで, 筋前駆細胞を誘導でき, ジストロフィン欠損マウスに移植すると, 効率よくジスト

表2 ヒト筋衛星細胞とヒト iPS 細胞の比較

	ヒト筋衛星細胞	ヒト iPS 細胞
採取, 樹立	骨格筋組織から移植に十分な細胞数を調整することは難しい	成人の線維芽細胞からも樹立可能
増殖能	細胞老化に至る	無限
骨格筋への分化能・誘導方法	良好	有効な誘導方法がない Pax3 の強制発現が有効か? (文献6)
移植における安全性	比較的安全	腫瘍形成の可能性
遺伝子導入, 遺伝子改変方法	レンチウイルスベクターなど	可能 ヒト人工染色体(HAC)ベクターの応用など

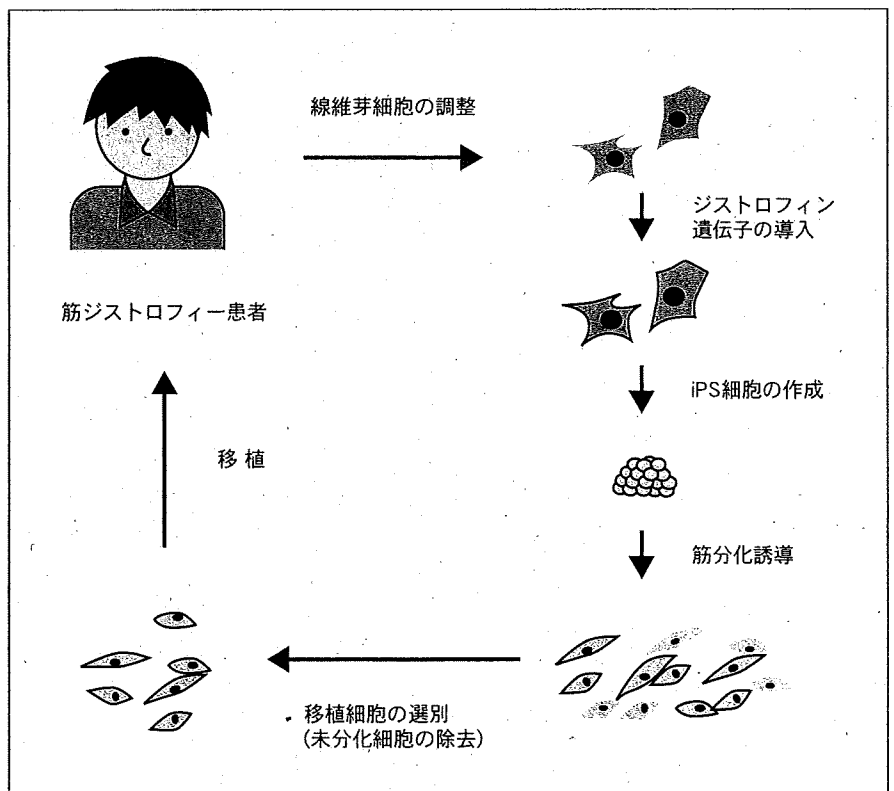


図1 Duchenne 型筋ジストロフィーに対する iPS 細胞を用いた移植治療
患者由来の iPS 細胞に正常なジストロフィン遺伝子を導入後, iPS 細胞を樹立し, 筋分化誘導し, 患者へ移植する細胞治療法。効率よい筋分化誘導法と, 腫瘍形成能をもつ細胞の除去が課題である。

ロフィンの発現を回復させ、筋収縮力の改善を確認したという報告があり⁶⁾, ヒト iPS 細胞でも近い将来, 効率よく筋分化誘導する方法が確立されると期待できる。

おわりに

iPS 細胞の筋ジストロフィーに対する臨床応用が期待されるが, その前に克服すべき問題がいくつかある。特に

ヒト iPS 細胞を骨格筋細胞系譜へ分化誘導する方法の開発には, まだまだ時を要すると思われる。骨格筋発生における Pax3, Pax7 の役割の解明, 生後の筋成長や再生に中心的役割を果たす筋衛星細胞の維持, 増殖・分化, 自己複製の分子メカニズムの解明を進めることが大事であり, 再生医療への早道なのかもしれない。

References

- 1) Hoffman EP et al : *Cell* 51 : 919-928, 1987
- 2) Yokota T et al : *Ann Neurol* 65 : 667-676, 2009
- 3) Sampaolesi M et al : *Nature* 444 : 574-579, 2006
- 4) Takahashi K, Yamanaka S : *Cell* 126 : 663-676, 2006
- 5) Park IH et al : *Cell* 134 : 877-886, 2008
- 6) Darabi R et al : *Nat Med* 14 : 134-143, 2008

