

毛の太さと形状 (2-4) 毛の幹細胞 (bulge) マーカーの mRNA 発現量 (2-5) 毛の毛包マーカーの mRNA 発現量 (3) *Mcl1* mRNA の発現部位、成長による表現型や発現量の変化の解析もおこなった。

4) 24~28 週齢の野生型 (C57BL/6) 雄性マウスの右側咬筋に *Mst*-siRNA と特殊加工コラーゲン複合体を局所投与し、対照群として左側咬筋に scr-siRNA と特殊加工コラーゲン複合体を局所投与し、形態学的・組織学的解析を行った。

倫理面への配慮: 動物に対する動物愛護上の配慮については、徳島大学動物実験施設の動物実験に関する規定に従った。また、遺伝子組換え実験に関しては、徳島大学の規定に従って実験を行った。

### C. 研究結果

1) 変異 caveolin-3 Tg マウスに対する咬筋局所投与において全てのマウスで、*Mst*-siRNA とアテロコラーゲンの複合体投与の右側咬筋は、対照側と比較して筋重量、筋線維断面積ともに有意に増加した。また、組織学的解析により、咬筋内のマイオスタチン発現抑制が認められた (Fig. 1)。

mCAV-3Tgマウスにおける咬筋のマイオスタチン発現と形態的变化

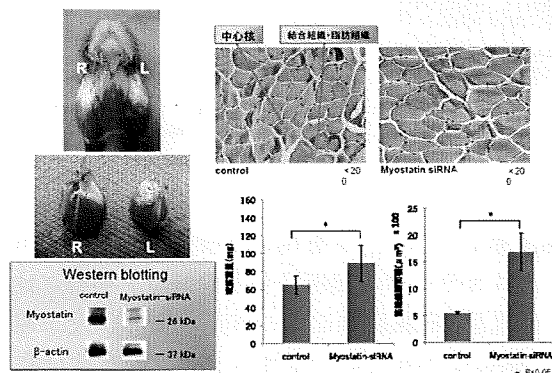


Fig. 1.

2) 変異 caveolin-3 Tg マウスに対する全身投与では投与前後での体重、握力には有意差がなかったが (Fig. 2)、変異 caveolin-3 Tg マウスにおいて張力検査による筋機能解析の結果、*Mst*-siRNA とアテロコラーゲン複合体投与群において対照群の約 3 倍の張力増加が見られた。また、その回復した張力は野生型 (C3H) マウスの約 55% に達することが認められた (Fig. 2 別紙)。

caveolin-3Tgマウス体重・握力変化(全身投与)

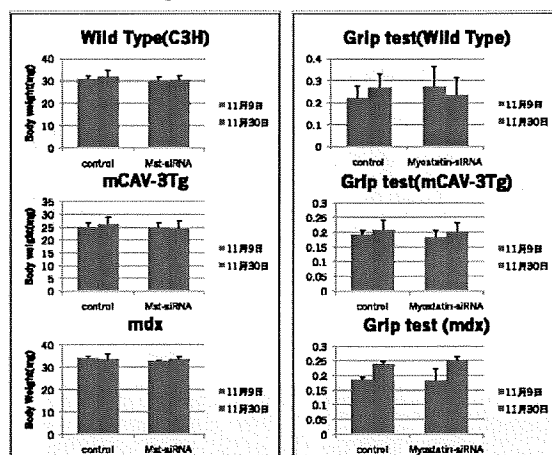


Fig. 2.

3) (1) Alexa555 scr-siRNA とアテロコラーゲン複合体を C57 BL/6 マウスの咬筋と皮下に局所投与した結果、咬筋では筋繊維の間で siRNA とアテロコラーゲン複合体が留まっている様子が観察された (Fig. 3)。皮下でも上皮組織と結合組織の間で siRNA とアテロコラーゲン複合体が留まっている様子が観察された (Fig. 3 別紙)。

### siRNA+アテロコラーゲン複合体の局在

siRNA Myostatin+アテロコラーゲン複合体の効果

現在2weekで咬筋採取し、解析をおこなっている

アテロコラーゲンとsiRNA複合体の局在を見たい

Alexa555 scramble siRNA-アテロコラーゲン基礎実験  
Alexa555 siRNAは10 μMでアテロコラーゲンとの複合体100 μl/片側咬筋で局所投与

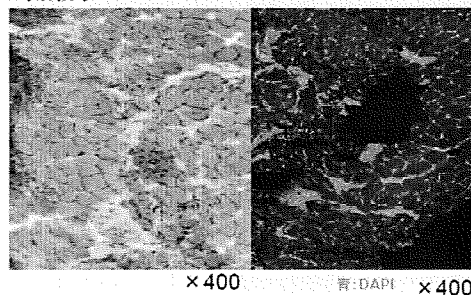


Fig. 3.

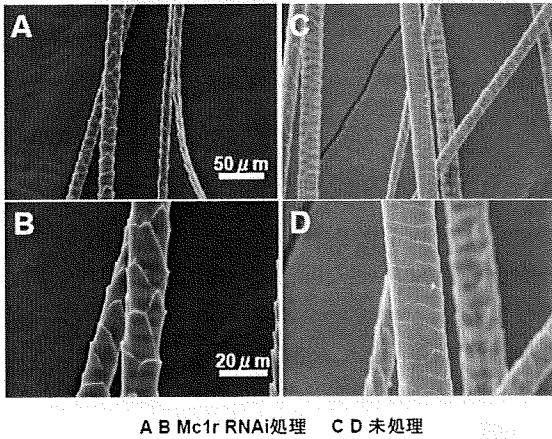
成獣で *Mcl1* RNAi 処理を行った結果、*Mcl1* siRNA の濃度依存的に脱毛した (Fig. 4)。*Mcl1* RNAi 処理群はその mRNA 量が減少した (Fig. 6)。*Mcl1* RNAi 処理群は未処理群と比べて毛のキューティクルの幅が広く、毛の直径も減少した (Fig. 5)。

Mc1r siRNA処理マウスの脱毛化



Fig. 4.

Mc1r siRNA処理を行ったマウス毛の電子顕微鏡写真



A B Mc1r RNAi処理 C D 未処理

Fig. 5.

Mc1r RNAi 処理群は未処理群と比べて bulge マーカーの CD34 と DKK3 の発現が減少した (Fig. 6)。

Mc1r siRNA処理マウスバルジ細胞マーカーの遺伝子発現量

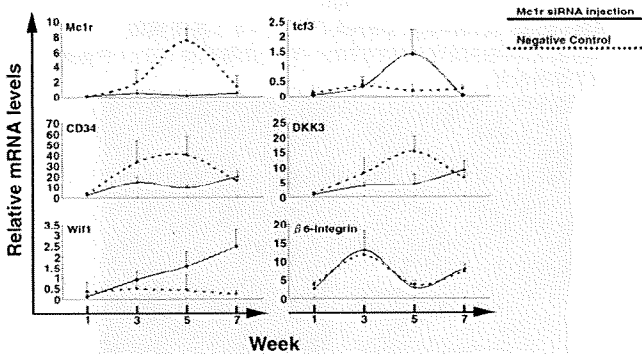


Fig. 6.

Mc1r RNAi 処理群は未処理群と比べて毛包マーカーの Wnt10b と  $\beta$ -catenin1 の発現が減少した (Fig. 7)。

(3) Mc1r の発現部位は毛球下部で、成長に合わせてその発現量は変動した (Fig. 8)。

Mc1r siRNA処理マウス毛包マーカーの遺伝子発現量

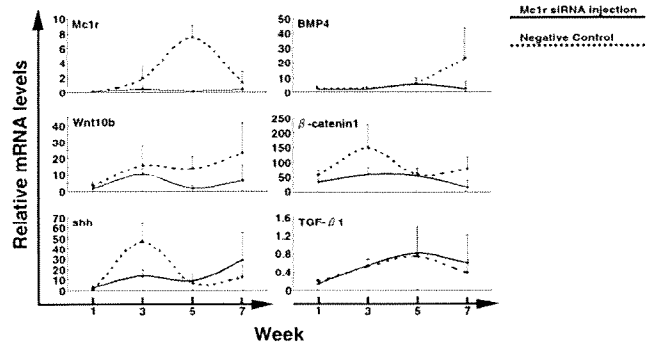


Fig. 7.

Mc1rの遺伝子発現部位と上皮での遺伝子発現の推移

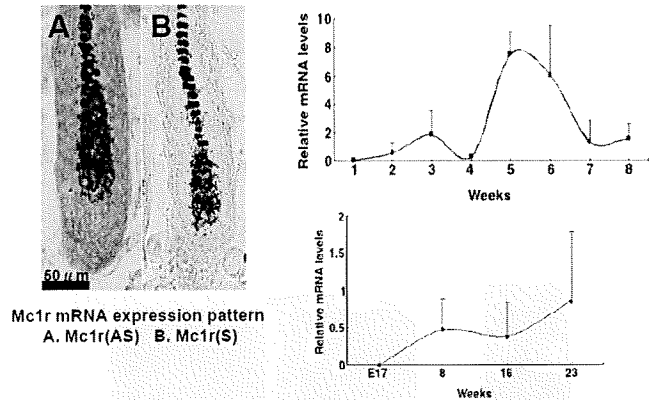


Fig. 8.

4) 特殊加工コラーゲンを用いた咬筋への局所投与は、アテロコラーゲン局所投与と同様、対照群と比較して筋重量、筋繊維断面積の有意な増加 (Fig. 9 別紙) と、mRNA レベルでのマイオスタチンの有意な抑制が確認できた (Fig. 10 別紙 2)。

D. 考察

アテロコラーゲン、特殊加工コラーゲンを用いた咬筋への局所投与はともにマイオスタチン抑制による咬筋の肥大を認めたが、全身投与では局所投与ほどの有意差はみられなかったにも関わらず、機能的な回復を認める結果となった。その要因としては筋繊維タイプが関わっている可能性がある。筋繊維タイプについては今後の課題である。siRNA とアテロコラーゲン複合体を投与した部位で、siRNA が生体内

で破壊されることなく留まることによって徐々に siRNA が細胞内に取り込まれる事によって持続した RNAi の効力が得られると考えられる。上皮への *Mc1r* siRNA 投与では *Mc1r* mRNA の発現量は周期的に変動しており、その変動は bulge マーカーと同一の周期で観察されたことから *Mc1r* の毛周期への関与が考えられる。*Mc1r* RNAi による *in vivo* でのノックダウンにより、毛への影響が認められたことから、メラノサイト以外のキューティクルを構成するケラチノサイトにも影響を与えていると思われる。以上の結果より *Mc1r* のメラニン色素調節機能以外の bulge と毛包を介した毛周期の制御機構の存在が示唆された。このことによって、siRNA とアテロコラーゲン複合体が咬筋以外の組織に対して優位に効力を発揮していることが示唆される。

#### E. 結論

アテロコラーゲンおよび特殊加工コラーゲンと *Mst*-siRNA 複合体の局所導入は、筋肉内に発現するマイオスタチン遺伝子を特異的に抑制し、咬筋形成に影響を及ぼすことが示された。また、全身投与において筋張力の回復を示したことから、骨格筋形成量の制御法として有効である。siRNA とアテロコラーゲン複合体を局所投与したとき、siRNA は投与部位に約 3 週間の保持が認められ、長期間効力を発揮するところで筋ジストロフィーに対する治療法となりうる可能性が示唆された。また、臨床応用で筋肉以外の部位での siRNA とアテロコラーゲン複合体の効力を上皮で検討した結果、同様に効力があることが認められ、RNAi 治療薬が幅広く疾患に応用できる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし(現在投稿予定)

2. 学会発表

1. 川上 恵実、木内 奈央、田中 栄二、野地 澄

晴:慢性筋萎縮疾患制圧を目指した RNA 干渉法を利用した咀嚼筋量制御法の開発研究. 先端歯学スクール 2009、平成 21 年 8 月 28-29 日、淡路島.

2. 川上 恵実:慢性筋萎縮疾患制圧を目指した RNA 干渉法を利用した咀嚼筋量制御法の開発研究. Tokushima Bioscience Retreat 2009、平成 21 年 9 月 17-19 日、小豆島

3. E Kawakami, N Kinouchi, T Adachi, Y. Osawa, N Ishimaru, H Ouchji, Y Sunada, Y Hayashi, E Tanaka, S Noji:Strategic study atelocollagen-mediated application of myostatin-targeting siRNA for therapeutic use for muscular atrophy diseases. QOL International Symposium 2010、平成 22 年 2 月 9-10 日、新潟.

4. 足立太郎、古谷拓磨、石丸直澄、林良夫、大内淑代、野地澄晴:色素細胞刺激ホルモン受容体 *Mc1r* の毛周期制御機構への影響. 第 32 回日本分子生物学学会年会 平成 21 年 12 月 9~12 日、横浜

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
人工コラーゲンをを用いた RNA 干渉による治療法  
(予定)
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

caveorin-3Tgマウス張力検査

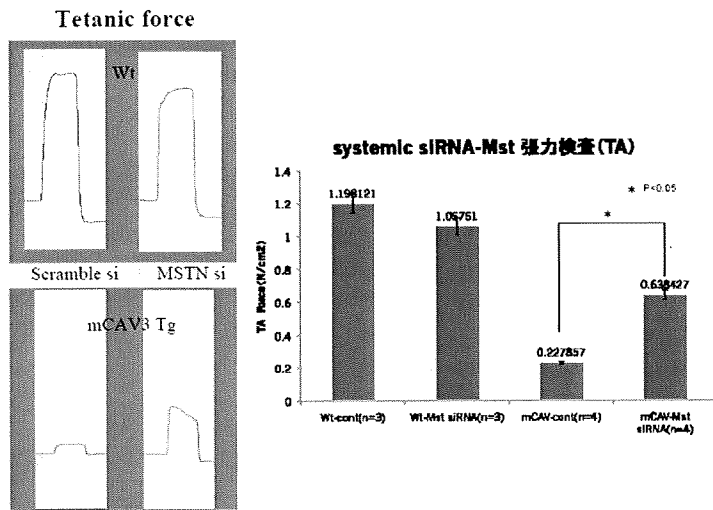


Fig. 2 別紙

8週齢のマウス背中上皮に蛍光標識したscramble siRNAとアテロコラーゲンを投与し、14日目に観察した。14日目まで皮下に留まり続けた。

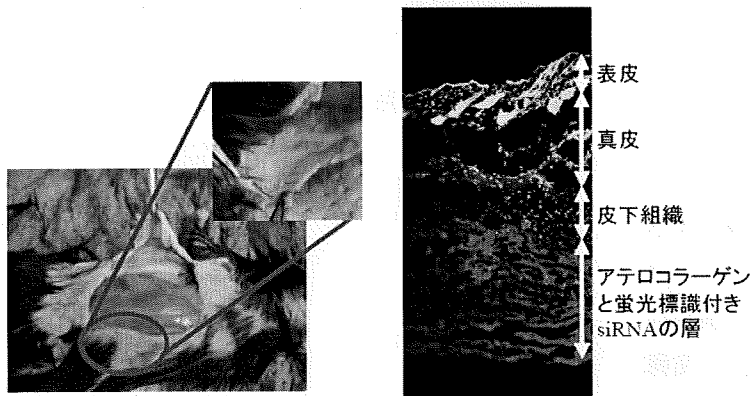


Fig. 3別紙

野生型マウスにおける咬筋の形態的变化  
(合成コラーゲン使用)

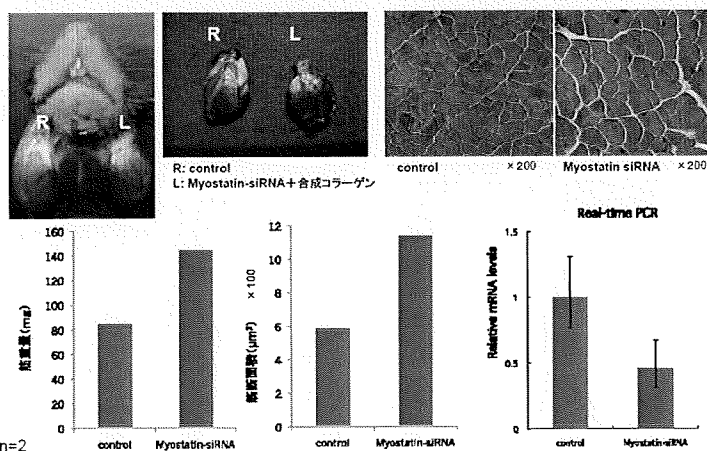


Fig. 9. 別紙

別紙2 Figure

アテロコラーゲンと合成コラーゲンの効力比較

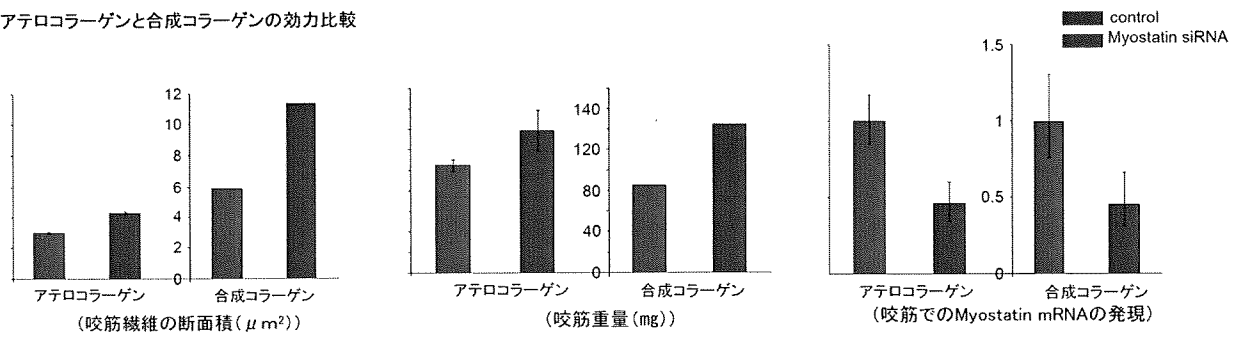


Fig.10 別紙2

マイオスタチン作用に拮抗する因子による筋疾患の治療法の開発

研究分担者 濃野 勉 川崎医科大学 教授

研究要旨

骨格筋の成長を抑制するマイオスタチン(myostatin)の作用機序をもとに、Wnt4 と furin に注目し骨格筋形成における機能を解析し筋ジストロフィー治療薬の開発を目指している。Wnt4は、マイオスタチン欠損マウスで発現が上昇し、筋分化を促進することを明らかにしている。筋芽細胞 C2C12 を用いて Wnt シグナル経路について解析したところ、Wnt4 は  $\beta$  カテニン経路と拮抗するシグナル経路を介して筋分化を促進していることがわかった。Furin はマイオスタチン前駆体を切断し活性化に関与する酵素と考えられている。Furin 遺伝子を骨格筋特異的に破壊したところ、マイオスタチンの活性化が抑制され骨格筋が肥大化すると予測されたが、実際には雄の変異マウスで成長速度が低下したばかりでなく握力も低下した。雌の変異マウスではそうした変化は認められないことから、furin の骨格筋における作用には性差があることがわかった。今後、Wnt4 については筋ジストロフィーモデルマウスで筋分化促進効果がみられるか、Furin については神経原性筋疾患を含む病態との関連を解析する必要がある。

A.研究目的

マイオスタチンは骨格筋の増殖を抑制する因子として働き、その機能が阻害されると筋形成が促進されて肥大化する。これをもとに筋ジストロフィーの治療薬の開発が米国を中心に進められている。我々はマイオスタチンの上流と下流で作用してマイオスタチン活性に拮抗的な影響をおよぼす Wnt4 と furin に注目し、これらの分子の骨格筋形成および再生における病態生理学的な機能を明らかにするとともに、筋ジストロフィーの新たな治療薬となる分子の開拓と臨床応用を目指している。

マイオスタチンの機能欠損変異マウスでは Wnt4 の発現が上昇することが知られている。またニワトリ胚において Wnt4 を過剰発現すると、筋分化が促進され骨格筋が肥大化することを明らかにした。Wnt ファミリーのシグナル伝達は代表的な  $\beta$  カテニン経路以外にも複数の経路があることが知られているが、筋芽細胞での経路は不明のままである。シグナル経路が明らかになれば、骨格筋特異的な遮断薬を開発することも可能になる。

Furin は、マイオスタチン前駆体を切断し活性型タンパク質に変換する酵素と予想されて

いるものの、実体は不明のままである。Furin はマイオスタチン以外にも  $\alpha$ -dystroglycan の切断にも関与することが示唆されており、骨格筋特異的に furin 遺伝子を破壊したマウスを作成し、骨格筋形成に及ぼす影響を検討する必要がある。

B.研究方法

1. 筋芽細胞における Wnt4 の機能解析

Wnt4 はマイオスタチンの欠損変異により発現が上昇することが知られている。これまでにニワトリ胚や筋芽細胞株(C2C12細胞)を使ったアッセイで Wnt4 にマイオスタチンと拮抗する作用があり筋分化を促進する活性があることを確かめた。本年度は、C2C12細胞における Wnt シグナルの経路について、増殖培地で培養した場合と分化培地で培養した場合の遺伝子発現の変化をマイクロアレイにより解析した。また Wnt4 を恒常的に発現する細胞株を樹立し、スクラッチテストにより細胞動態の変化を分析した。

2. マウス骨格筋特異的な Wnt4 の過剰発現

培養細胞やニワトリ胚だけでなく、マウスを使って Wnt4 の機能を解析している。Wnt4 をマ

ウスの骨格筋特異的に過剰発現させるために、組換えアデノウイルスを作成した。また MCK プロモーターの下流に Wnt4 cDNA を連結したコンストラクト(MCK-Wnt4)をマウス受精卵前核に顕微注入し TG マウスの作出を試みた。

### 3. 骨格筋における furin の機能阻害の効果

Furin 遺伝子のエクソン2の両端に loxP 配列を挿入したマウスと Myf5 プロモーター下で Cre 酵素を発現するマウスを交配することにより、筋衛星細胞において furin 遺伝子が破壊されたマウスを作出した。成長速度、握力について解析した。

(倫理面への配慮)

動物个体を使用した実験は川崎医科大学動物実験指針に従って行い、遺伝子組換え実験については川崎医科大学の規定に従って行った。

## C. 研究結果および考察

### 1. 筋芽細胞株における Wnt シグナル経路の解析

筋芽細胞株 C2C12 を増殖培地から分化培地に交換し培養すると、Wnt4 の発現が上昇するだけでなく Wnt9a、Wnt6、Wnt10a の発現も上昇することがわかった。また Wnt タンパク質の分泌に関与する Porcupine の発現が 10 倍以上高くなる一方で、c-Myc と Fos1 の発現は低下していた。Wnt ファミリーの  $\beta$  カテニン経路への影響を調べたところ、Wnt4 の  $\beta$  カテニン経路に対する作用は見られず、逆に Wnt3a による  $\beta$  カテニン経路の促進に対して拮抗することがわかった。

恒常的に Wnt4 を発現する C2C12 細胞株を樹立したところ、増殖培地での増殖速度が 1/2 以下に低下し、同時に自発的な筋分化が見られた。これらのことから、Wnt4 による筋分化の誘導は、 $\beta$  カテニン経路に拮抗するシグナル経路を介して筋芽細胞の増殖と細胞移動を抑制していることがわかった。

### 2. マウス骨格筋特異的な Wnt4 の過剰発現

アデノウイルスベクターに組み込んだ

Ad-Wnt4 は C2C12 に感染させると筋分化の促進が見られたが、組換えウイルスの力価が低く、マウス個体での実験を行うために力価を上げる試みと濃縮を行っている途中にある。Wnt4 トランスジェニックマウスは系統樹立の作業を行っている。

### 3. 骨格筋における furin の役割

Furin コンディショナル変異マウス (Furin<sup>fllox/fllox</sup>) と Myf5 プロモーターの制御下で組換え酵素 Cre を発現するマウス (Myf5<sup>Cre</sup>) を交配し産仔を得た。Myf5 は筋衛星細胞で発現することがわかっているが、その細胞で furin 遺伝子が破壊された雄マウス (furin<sup>-/-</sup>) と対照群 (furin<sup>+/-</sup>) を比べたところ、体重が3割ほど少なく成長速度に遅滞がみとめられた。握力も減少していることがわかった。雌マウスでは対照群との相違がないことから、性差があることがわかった。

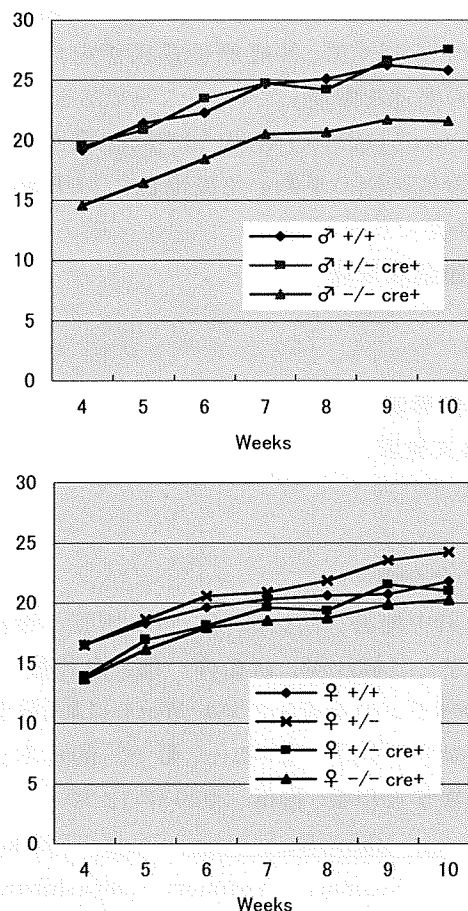


図1 Furin 変異マウスの体重変化 (雄(上段)、雌(下段))

16週齢の雄マウスの四肢の筋重量を比較したところ、*furin*<sup>-/-</sup>マウスでは前脛骨筋と腓腹筋の重量が減少していたのに対し、上腕二頭筋と大腿四頭筋では差がなかった。また前脛骨筋の組織像を解析したところ、筋繊維のサイズは全体として細くなっていたが、中心核など病的な症状は認められなかった。*Furin* 阻害によりマイオスタチンだけでなく IGF や成長ホルモンの切断が阻害され、遠位筋の成長が影響を受けるのではないかと示唆された。

#### E. 結論

*Wnt4* は  $\beta$  カテニン経路に拮抗するシグナル経路を介して筋分化を促進していることがわかった。今後、*Wnt4* 組換えアデノウイルス (*Ad-Wnt4*) を濃縮しマウス個体での検証を行う。また *Wnt4* トランスジェニックマウスができた後、筋ジスモデルマウス (*CAV-3<sup>P104L</sup>-Tg*) と交配しその効果を検証する。*Furin* マウスについては、マイオスタチンなどのホルモンの動態を解析するとともに、神経原性筋疾患を含む病態との関連を解析しているところである。また *cardiotoxin* (*CDTX*) 処理により筋組織を破壊し筋衛星細胞の挙動を免疫染色により解析を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 田中伸吾, 高田温行, 山本康弘, 寺田久美子, 三棹聡美, 西松伸一郎, 濃野勉: マイオスタチンの下流シグナル *Wnt4* による筋分化に対する作用—第4報—、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月

2) Shin-ichiro Nishimatsu, Shingo Tanaka, Hiroshi Kiyonari, Yasunori Hayashibara, Shinichi Aizawa, Yutaka Ohsawa, Yoshihide Sunada, and Tsutomu Nohno: Muscle mass

regulation by myostatin- signaling related molecules. 第 8 回日仏筋ジストロフィーシンポジウム (Paris, France) 2009 年 7 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

筋ジストロフィー犬での治療効果と安全性の解析  
— イヌ血清 CRP 値を用いた早期妊娠診断および胎仔数との関連性 —

研究分担者 武田 伸一 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 部長

研究要旨

Duchenne 型筋ジストロフィーのモデル動物である筋ジストロフィー犬は、エクソン・スキップ治療をはじめとする様々な治療研究に利用されている。しかし、新生仔期が極めて重篤かつ死亡率が高いために、効率の良い繁殖計画と妊娠頭数予測が急務となっている。そこで、妊娠期におけるイヌ血清 CRP 値を用いて検討した結果、従来法より早期に妊娠の有無と胎仔数の予測が可能であり、繁殖計画に極めて有用であることが分った。

A. 研究目的

筋ジストロフィー犬（筋ジス犬）は、Duchenne 型筋ジストロフィーに最も類似した進行性で重症の症候を有するため、筋ジストロフィーに対する治療薬を開発し、評価を行う上では重要な位置を占める実験動物である。しかし、筋ジス犬は新生仔期の死亡率が非常に高く、実験への安定供給が困難であったために、繁殖計画の立案上、正確かつ早期の妊娠診断および胎仔数予測が急務となっている。

犬における妊娠診断法には内分泌検査（尿中エストロゲン濃度測定）、超音波検査、腹部触診、および X 線検査がある。尿中エストロゲン濃度は交配後 21 日以降、超音波検査は交配後 25 日以降、腹部触診は交配後 28 日以降で可能であるが、胎仔数予測は困難である。一方、X 線検査は妊娠、胎仔数ともに評価が可能であるが、被曝のため胎仔骨格形成（交配後約 45 日）前に実施することが出来ない。一方、急性相蛋白質である C 反応性蛋白質（CRP）は、胎盤組織においても産生され、妊娠期に増加することから、妊娠犬のイヌ血清 CRP 値が妊娠の有無および胎仔数の予測に有用であるかについて検討した。

B. 研究方法

1~7歳齢までの筋ジス保因犬29交配（妊娠25頭、不妊娠4頭）、および1~2歳齢の正常犬3交配（妊娠2頭、不妊娠1頭）について、発情出血確認後、Witness LH（Synbiotics社）を用いてLHサージを検出した。LHサージ検出から3日後と6日後に交配を実施し、1回目の交配日をDay 0とし、Day 15, 20, 25, 30, 35, 40 および50に静脈採血し血清分離した。

Dog C-Reactive Protein（CRP）ELISA Test Kit（Life Diagnostics社）を用いて血清CRP値を測定し、統計学的に解析した。

C. 研究成果

1. 妊娠日数の血清 CRP 値の比較

不妊娠と妊娠犬のそれぞれの血清 CRP 値（mg/dl）（平均±標準誤差、 $p$  値）は、Day 15（ $0.31 \pm 0.10$ ,  $0.55 \pm 0.09$ ,  $p > 0.05$ ）、Day 20（ $0.34 \pm 0.12$ ,  $7.57 \pm 1.14$ ,  $p < 0.0001$ ）、Day 25（ $0.35 \pm 0.04$ ,  $30.47 \pm 4.79$ ,  $p < 0.0001$ ）、Day 30（ $0.51 \pm 0.13$ ,  $33.96 \pm 4.44$ ,  $p < 0.0001$ ）、Day 35（ $0.47 \pm 0.07$ ,  $19.79 \pm 2.51$ ,  $p < 0.0001$ ）、Day 40（ $0.55 \pm 0.18$ ,  $12.15 \pm 1.29$ ,  $p < 0.0001$ ）、Day 50（ $0.92 \pm 0.18$ ,  $3.23 \pm 0.37$ ,  $p < 0.0001$ ）であり、Day 20 ~ Day 50 において両者の間に有意差が認められ、

差は Day30 で最も大きかった。

## 2. 胎仔数と血清 CRP 値の相関関係

保因犬では、Day15 では血清 CRP 値と胎仔数の間に相関関係は認められなかったが、Day20~50 では、有意な正相関が認められた。特に、Day 30 では、 $r = 0.8995$ 、 $p < 0.0001$  と極めて強い相関が認められた。また、正常犬についても、保因犬とほぼ同等の結果が得られた。

## D. 考察

血清CRP値を用いた妊娠診断については、Day 20 で可能と考えられ、従来の妊娠診断法と比較してより早期に診断が可能であることが分った。一方、胎仔数においてもDay 20から可能であるが、特に、Day30で最も信頼できる結果が得られた。また、血清CRP値を用いた妊娠診断および胎仔数予測は、正常犬においても可能であり、保因犬に特有な現象でないことも分った。以上から、血清CRP値を用いることにより、筋ジス犬の供給および繁殖計画の効率を上げることが可能と考えられた。

## E. 結論

妊娠期におけるイヌ血清CRP値を用いることにより、従来法より早期に妊娠の有無および胎仔数予測が可能である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### I 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Masamizu Y, Okada T, Ishibashi H, Takeda S, Yuasa S, Nakahara K: Efficient gene transfer into neurons in monkey brain by adeno-associated virus 8. *NeuroReport*, (in press)
2. Uezumi A, Fukuda S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K: Mesenchymal progenitors

distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 12: 143-52, 2010

3. Matsumoto H, Maruse H, Sasazaki S, Fujiwara A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H: Expression pattern of WWP1 in muscular dystrophic and normal chickens, *J. Poult. Sci.* 46: 95-99, 2009
4. Kobayashi M, Nakamura A, Hasegawa D, Fujita M, Orima H, Takeda S: Evaluation of dystrophic dog pathology by fat-suppressed T2-weighted imaging. *Muscle Nerve*, 40: 815-826, 2009
5. Cui R, Duan XL, Anderson GJ, Qiao YT, Yu P, Qian ZM, Yoshida K, Takeda S, Guo P, Yang ZL, Chang YZ: Age-dependent expression of hephaestin in the brain of ceruloplasmin-deficient mice. *J Trace Elem Med Biol.* 23: 290-299, 2009
6. Guo P, Cui R, Chang YZ, Wu WS, Qian ZM, Yoshida K, Qiao YT, Takeda S, Duan XL: Hepcidin, an antimicrobial peptide is downregulated in ceruloplasmin-deficient mice. *Peptides.* 30: 262-266, 2009
7. Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Kinoshita K, Hayashita-Kinoh H, Nitahara-Kasahara Y, Takeda S, Ozawa K: Scalable purification of AAV1 and AAV8 vectors using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther.* 20: 1013-1021, 2009
8. Katsube K, Ichikawa S, Katsuki Y, Kihara T, Terai M, Lau LF, Tamamura Y, Takeda S, Umezawa A, Sakamoto K, Yamaguchi A: CCN3 and bone marrow cells. *J Cell Commun Signal.* 3: 135-145, 2009
9. Nakamura A, Takeda S: Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy, *Neuropathology.* 29: 494-501, 2009
10. Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T: Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative

regulator for IGF-1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol.* 17: 4798-4811, 2009

11. Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E: Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol.* 65: 667-676, 2009
12. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada S, Yamamoto H, Motohashi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J.* 23: 1907-1919, 2009
13. Ohshima S, Shin JH, Yuasa K, Nishiyama A, Kira J, Okada T, Takeda S: Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle. *Mol Ther* 17: 73-80, 2009

#### 【欧文著書】

1. Okada T., Takeda S.: Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. in A Guide to Human Gene Therapy (ed. by Roland W. Herzog and Sergei Zolotukhin), World Scientific, NJ.(in press)

#### <和文>

##### 【和文著書】

1. 青木 吉嗣, 武田 伸一: 研修医のための神経内科診療, 新興医学出版社, 東京, 2010, pp248-252
2. 鈴木 友子, 武田 伸一: 骨格筋, 炎症・再生医学事典, 朝倉書店, 東京, 2009, pp453-456

##### 【和文総説】

1. 武田 伸一: モルフォリノをもちいた Duchenne 型筋ジストロフィーの治療, 臨床神経学, 49: 856-858, 2009
2. 武田 伸一: 筋ジストロフィーの遺伝子治療—エクソン・スキッピングを中心に—, 神経治療学, Vol.26, No.6, 715-718, 2009
3. 永田 哲也, 武田 伸一: 筋ジストロフィーとエクソン・スキッピング, 生物の科学, 遺伝, Vol.63, No.5, 84-89, 2009

4. 鈴木 友子, 武田 伸一: 筋ジストロフィーに対する先端治療法の開発, ゲノム医学, Vol.9, No.3, 195-198, 2009
5. 矢田 英理香, 武田 伸一: iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー治療の展望, 難病と在宅ケア, vol.15, No.1, 2009

#### II 学会発表

##### <国外>

##### 【特別講演・シンポジウム】

1. Takeda S: Potential of muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. Invited lecture, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.12, 2009
2. Takeda S: The dystrophic dogs as an excellent animal model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). Invited lecture, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.10, 2009
3. Takeda S: Exon skipping therapy toward Duchenne muscular dystrophy. Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7.4, 2009
4. Miyagoe-Suzuki Y, Motohashi N, Yada E, Segawa M, Wang B, Harano C, Masuda S, Yoshida M, Takeda S: Making muscle from induced pluripotent stem (iPS) cells. Eighth French-Japanese workshop on muscular dystrophies, Paris, France, 7.3, 2009
5. Takeda S: Exon skipping, Panel introductions and Project summaries: Parent project muscular dystrophy, Atlanta, USA, 6.26, 2009
6. Takeda S: Muscle stem cells and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. 18th Lake Shirakaba Conference, Vedbaek, Denmark, 6. 21, 2009
7. Takeda S: Significance of the dystrophin-glycoprotein complex that connects the cytoskeleton to the basal lamina. Yokosuka Science Festa 2009, 8<sup>th</sup> Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Yokosuka, 6.6, 2009
8. Takeda S: Plenary Lecture: Advances of Molecular Therapy Research on Dystrophin-deficient Muscular Dystrophy. 8th Annual Meeting of the Asian Oceanian Myology Center (AOMC),

Mumbai, India, 5.23, 2009

【国際学会】

1. Segawa M, Wang B, Harano C, Suzuki Y, Matsuda R, Takeda S: Generation and muscle differentiation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mdx mice. (poster) Keystone Symposia: Stem cell differentiation and dedifferentiation. , Keystone Resort, Keystone, Colorado, February 15 - 20, 2010
2. Imamura M, Takeda S: Searching for Loss of Imprinting of the  $\epsilon$ -Sarcoglycan Gene in Cells of  $\epsilon$ -Sarcoglycan Partial Knockout Mice. Poster, The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting, San Diego, USA, 12.10, 2009
3. Takeda S: Rodent vs. "Large Animal" models, Animal models assessment session, Bringing down barriers-translational medicine in inherited neuromuscular diseases, TREAT-NMD NIH International Conference, Brussels, Belgium, 11.18, 2009
4. Yokota T, Takeda S: PMO and PPMO in the dystrophic dog. CINRG (The Cooperative International Neuromuscular Research Group) annual meeting, Washington D.C., USA, 11.7, 2009
5. Nakamura A, Kobayashi M, Yuasa K., Yugeta N, Takeda S: The opening of pulmonary respiration resulted in muscle degeneration of diaphragm in canine X-linked muscular dystrophy. Poster, 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9.11, 2009
6. Ito N, Ampong BN, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Neuronal nitric oxide synthase is an essential mediator for muscle hypertrophy, International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 7.29, 2009
7. Yada E, Harano C, Motohashi N, Segawa M, Wada MR, Nakagawa R, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adultmdx mice, 7th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research. Barcelona, Spain, 7.9, 2009
8. Ishii A, Shin JH, Katakai Y, Ono F, Okada T, Takeda S. Feasibility study of AAV8-mediated gene therapy for muscular dystrophy using normal

primates. American Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, May 27-30, 2009

<国内>

【特別講演・シンポジウム】

1. 鈴木 友子、武田 伸一: Molecular and cellular mechanisms of mechanosensing nNOS regulates skeletal muscle mass, 第 32 回分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
2. 鈴木 友子, 伊藤 尚基, 武田 伸一, 鈴木 直輝: 神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) は骨格筋の可塑性の制御因子である, 第 17 回日本運動生理学会大会 シンポジウム V: 骨格筋の可塑性, 東京, 7.26, 2009
3. 武田 伸一: 筋疾患のトランスレーショナルリサーチ (基礎から臨床へ), シンポジウム「精神・神経・筋疾患のトランスレーショナルリサーチ」, 第 52 回日本神経化学学会大会, 伊香保, 6.24, 2009
4. 武田 伸一: 遺伝子治療と再生医療, 筋ジストロフィーの遺伝子治療～エキソスキッピングを中心に, 第 27 回日本神経治療学会総会, 熊本, 6.11, 2009
5. 武田 伸一: 難治性筋疾患の病態機序—CK 発見から 50 年—治療の時代へ, モルフォリノを用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの治療, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5.21, 2009
6. 武田 伸一: 遺伝子治療の夢と現実, 第 6 回日本神経学会生涯教育講演セミナー, 仙台, 5.19, 2009

【一般学会】

1. 伊藤 尚基, Beryl Nyamekye Ampong, 工藤 明, 鈴木 友子, 武田 伸一: Neural nitric oxide synthase is an essential mediator for early stage of muscle hypertrophy, 第 32 回分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
2. 瀬川 亮, 王 博, 原野 千加, 鈴木 友子, 松田 良一, 武田 伸一: Mdx マウスからの iPS 細胞の樹立と筋分化条件の検討, 第 32 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 12.10, 2009
3. 笠原 優子, 喜納 裕美, 西山 章代, Jin-Hong Shin, 大島 幸子, 岡田 尚巳, 武田 伸一: MyoD 発現アデノウイルスベクターによる骨髄間葉系幹細胞の骨格筋分化誘導と細胞移植

- 治療, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 10.26, 2009
4. 岡田 尚巳, 喜納 裕美, 笠原 優子, 岡田 浩典, 武田 伸一: AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療, 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 東京, 9.24, 2009
  5. 青木 吉嗣, 横田 俊文, 齊藤 崇, 永田 哲也, 中村 昭則, 武田 伸一: mdx52 マウスを用いたモルフォリンによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの前臨床研究, 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 東京, 9.24, 2009
  6. Ishii A, Shin JH, Katakai Y, Ono F, Okada T, Takeda S: Effective AAV8 vector-mediated microdystrophin transduction of skeletal muscles in normal primate, Japan Society of Gene Therapy The 15<sup>th</sup> Annual Meeting 2009, Osaka, 7.11, 2009
  7. Kasahara Y.N, Kinoh H, Shin JH, Nishiyama A, Hosoyama SO, Maeda MW, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Cell therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesencymal stromal cells in dog, Japan Society of Gene Therapy The 15<sup>th</sup> Annual Meeting 2009, Osaka, 7.11, 2009
  8. 中村 昭則, 小林 正典, 武田 伸一: 筋ジストロフィー新生仔劇症型の病態機序に関する検討, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5.19, 2009
  9. 青木 吉嗣, 横田 俊文, 齊藤 崇, 中村 昭則, 武田 伸一: Mdx52 を用いたジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキッピングの前臨床研究, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5.19, 2009
- 【その他】
1. 高橋 明男, 小林 正典, 八幡 由美子, 北 秀樹, 市川 慎一, 弓削田 直子, 中村 昭則, 武田 伸一: イヌ血清 CRP 値を用いた早期妊娠診断および胎仔数との関連性, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009
  2. 万年 英之, 松本 大和, 笹崎 晋史, 藤原 哲, 市原 伸恒, 菊池 建機, 中村 昭則, 今村 道博, 武田 伸一: ニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子の同定と発症機序の解明, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009
  3. 武田 伸一, 瀬川 亮, 本橋 紀夫, 王 博, 矢田 英理香, 増田 智, 松田 良一, 鈴木 友子: 人工多能性幹細胞からの骨格筋幹細胞の誘導, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009
  4. 山元 弘, 深田 宗一郎, 森川 大亮, 伊藤 尊仁, 山口 賢彦, 辻川 和文, 鈴木 友子, 武田 伸一: mdx の病態・機能に与える遺伝背景の影響, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009
  5. 上住 聡芳, 深田 宗一郎, 山元 弘, 山田 治基, 武田 伸一, 土田 邦博: 骨格筋に内在する間葉系前駆細胞の解析, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009
  6. 裏出 良博, 有竹 浩介, 鎌内 慎也, 林 正裕, 永田 奈々恵, 小林 正典, 中村 昭則, 武田 伸一: 筋ジストロフィーの進行性軽減療法の開発, ~プロスタグランジン D2 をターゲットとした筋ジストロフィーの 2 次炎症軽減と尿中代謝物を対象とした病態進行マーカーの開発~, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009
  7. 武田 伸一, 喜納 裕美, 岡田 浩典, 笠原 優子, 岡田 尚巳, 9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎児・新生児への遺伝子導入, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.4, 2009
  8. 武田 伸一, 齊藤 崇, 中村 昭則, 清水 裕子, 青木 吉嗣, 横田 俊文, 永田 哲也, 大澤 真木子: 筋ジストロフィーモデル犬のマルチエクソンスキッピングに有効であったアンチセンスオリゴヌクレオチドの DMD 患者細胞への応用, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.3, 2009
  9. 横田 俊文, Qi-long Lu, Terence Partridge, 小林 正典, 浦澤 延幸, 中村 昭則, Ryszard Kole, Peter Sazani, Hong Moulton, Eric Hoffman, 武田

- 伸一: 新世代モルフォリノによる筋ジストロフィー治療, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.3, 2009
10. 若尾 義人, 高野 裕史, 藤井 洋子, 弓削田 直子, 中村 昭則, 武田 伸一: Speckle Tracking Echocardiography を用いた CXMDJ 犬および保因犬の左室心筋局所機能評価, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究 (武田班), 12.3, 2009
11. 喜納 裕美, 岡田 浩典, 笠原 優子, 岡田 尚巳, 武田 伸一: 9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎児・新生児への遺伝子導入, 第 4 回筋ジストロフィー研究合同発表会, 倉敷, 10.31, 2009
12. 齊藤 崇, 中村 昭則, 清水 裕子, 青木 吉嗣, 横田 俊文, 大澤 真木子, 武田 伸一: 筋ジストロフィーモデル犬のマルチエクソンスキッピングに有効であったアンチセンスオリゴヌクレオチドの DMD 患者細胞への応用, 第 4 回筋ジストロフィー研究合同発表会, 倉敷, 10.31, 2009
13. 瀬川 亮, 本橋 紀夫, 王 博, 矢田 英理香, 増田 智, 松田 良一, 鈴木 友子, 武田 伸一: 人工多能性幹細胞からの骨格筋幹細胞の誘導, 第 4 回筋ジストロフィー研究合同発表会, 倉敷, 10.31, 2009
14. 武田 伸一: RNA splicing を標的とした神経筋疾患の治療戦略, 厚生労働省化学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)「筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発」班, 平成 21 年度ワークショップ, 東京, 7.31, 2009
15. 武田 伸一: 筋ジストロフィーの治療研究の進歩, 筋ジストロフィーという病気をもっと知ろう, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー集学的治療と均てん化に関する研究 (神野班), 特別講演, 平成 21 年度 第一回筋ジストロフィーに関する市民公開講座, 名古屋, 7.18, 2009
16. 青木 吉嗣, 横田 俊文, 齊藤 崇, 中村 昭則, 武田 伸一: mdx52 マウスを用いたモルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの前臨床研究, 第 13 回 3 施設合同研究発表会, 東京, 6.16, 2009
17. 武田 伸一: 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究, 第 46 回筋ジストロフィー研究合同発表会, 東京, 5.17, 2009

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表(1)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
青木 吉嗣, 武田 伸一	筋ジストロフィー, 多発筋炎	阿部 康二	研修医のための 神経内科診療	新興医学出版社	東京	2010	248-252
鈴木 友子, 武田 伸一	骨格筋	松島 綱治, 西脇 徹	炎症・再生医学事典	朝倉書店	東京	2009	453-456

研究成果の刊行に関する一覧表(2)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsuchida K, Nakatani M, Hitachi K, Uezumi A, Sunada Y, Ageta H, Inokuchi K.	Activin signaling as an emerging target for therapeutic intervention.	Cell Commun. Signal.	7(1)	15	2009
Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen JP.	Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin.	Am. J. Physiol. Endocrinol & Metabol.	297(1)	157-164	2009
Oshima Y, Ouchi N, Shimano M, Pimentel DR, Papanicolaou KN, Panse KD, Tsuchida K, Lara-Pezzi E, Lee SJ, Walsh K.	Activin A and follistatin-like3 determine the susceptibility of heart to ischemic injury.	Circulation	120(16)	1606-1615	2009
Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K.	Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle.	Nature Cell Biology	12(2)	143-152	2009
Ageta H, Ikegami S, Miura M, Masuda M, Migishima R, Hino T, Takashima N, Murayama A, Sugino H, Setou M, Kida S, Yokoyama M, Hasegawa Y, Tsuchida K, Aosaki T, Inokuchi K.	Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP.	Learning and memory	In press		2010
Murakami T, Tsuchida K, Hashida M, Imahori H.	Size control of lipid-based drug carrier by drug loading.	Mol. BioSystems	In press		2010
Matsumoto H, Maruse H, Sasazaki S, Fujiwara A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H	Expression pattern of WWP1 in muscular dystrophic and normal chickens	J. Poult. Sci	46	95-99	2009
Kobayashi M, Nakamura A, Hasegawa D, Fujita M, Orima H, Takeda S	Evaluation of dystrophic dog pathology by fat-suppressed T2-weighted imaging	Muscle Nerve	40(5)	815-826	2009
Nakamura A, Takeda S	Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy	Neuropathology	29(4)	494-501	2009
Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E	Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs	Ann Neurol.	65(6)	667-676	2009
Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanesaki H, Kudo A, Manya H, Endo T, Takeda S	Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro	Mech Dev	126(3-4)	107-116	2009
Yokota T, Takeda S, Lu QL, Partridge TA, Nakamura A, Hoffman EP	A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground	Arch Neurol.	66(1)	32-38	2009
Ohshima S, Shin JH, Yuasa K, Nishiyama A, Kira J, Okada T, Takeda S	Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle	Mol Ther.	17(1)	73-80	2009



## 疾患編

## 17. 筋ジストロフィー，多発筋炎

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 青木吉嗣・武田伸一

## Key words

Duchenne 型筋ジストロフィー，多発筋炎，皮膚筋炎

## 要点

- ① Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の確定診断は，遺伝学的検査あるいは筋生検により行う。
- ② DMD の骨格筋および呼吸機能の改善を目的にステロイド投与を行う。
- ③ DMD では，心不全と呼吸障害を中心とした全身管理が重要である。
- ④ 多発筋炎・皮膚筋炎は，ステロイド，免疫抑制剤，免疫グロブリンにより加療を行う。
- ⑤ 多発筋炎・皮膚筋炎は，悪性腫瘍や間質性肺炎の合併に注意する。

## 重要ポイント

- ① 筋ジストロフィーは，骨格筋の壊死・変性を主病変とし，臨床的には進行性の筋力低下をみる遺伝性の疾患である。筋ジストロフィーのうち，もっとも頻度が高く重症の経過をとる Duchenne 型筋ジストロフィーを中心に，呼吸および循環管理に加えて，ステロイド，アンジオテンシン変換酵素阻害薬，交感神経β受容体遮断薬などにより筋障害の改善が試みられている。
- ② 後天性筋疾患の代表である特発性炎症性ミオパチーは，多発筋炎，皮膚筋炎，封入体筋炎に分類される。特に多発筋炎は横紋筋のびまん性炎症性筋疾患であり，特徴的な皮疹を呈するものは皮膚筋炎という。成人に比較的多くみられ，ステロイド，免疫抑制剤，免疫グロブリンが筋力低下に奏効する 경우가多いが，悪性腫瘍や間質性肺炎の合併例は予後不良である。

**A** Duchenne 型筋ジストロフィー  
(Duchenne muscular dystrophy : DMD)

筋ジストロフィーは「骨格筋の壊死・変性を主病変とし，臨床的には進行性の筋力

低下をみる遺伝性の疾患である」と定義される。筋ジストロフィーのうち，もっとも頻度が高く重症の経過をとる Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は，ジストロフィン遺伝子 (Xp21.2) の変異により，骨格筋膜の安定性に重要なジストロフィンが欠損す

ることで発症する。ジストロフィンの欠損が不完全な場合はベッカー型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy: BMD) の表現型をとる。DMDは, X染色体連鎖遺伝形式をとり, 新生男児3,500人に1人の割合で発症する。

## 1. 臨床像

2~5歳前後で転びやすい, 歩行が遅いなどの症状で気づかれることが多いが, 高CK血症を偶発的に指摘され診断に至ることもある。特徴的な登はん性起立 (Gowers 徴候) を呈する。病初期には明らかな筋萎縮は認めず, 腓腹部や舌などの筋肥大を示す場合が多いが, 徐々に近位筋優位の筋力低下が進行して歩行は動揺性となり, 12歳までに歩行不能となり車椅子生活に移行する。前後して脊柱側彎や関節拘縮の出現をみる。13歳前後で座位の保持も困難となる。呼吸筋の筋力低下のため10歳後半に呼吸不全が生じ, 次第に心機能の低下も出現する。主として呼吸管理の進歩により, 平均死亡年齢は過去20年で10年程度延長し, 30歳前後になった。現在の死因は主に心不全および呼吸不全である。

## 2. 検査所見

### 1) 血液生化学検査

乳児期より著明な高CK血症 (20,000~40,000 U/L), アルドラーゼなどの筋原性酵素の上昇をみるが, 筋萎縮の進行とともに低下する。AST, ALT, LDHも上昇し, 肝機能障害と誤る場合がある。

### 2) 筋電図

随意収縮時に, 低振幅・短持続時間の運動単位, 運動単位の早期動員 (early recruit-

ment) がみられる。

### 3) 画像検査

骨格筋CT, MRIでは5歳頃から大殿筋の脂肪置換を認める。10歳以降では大腿四頭筋 (特に大腿直筋), 大内転筋と大腿二頭筋, 傍脊柱筋を中心に近位筋優位に筋容積の減少や脂肪置換が顕著となるが, 薄筋と縫工筋は比較的保たれる (selectivity pattern)。

### 4) 遺伝学的検査

他の検査所見からDMD/BMDの可能性が疑われ, 臨床的および遺伝医学的に有用と考えられる場合に実施を検討する。遺伝学的検査は, 生涯変化しない個人の重要な遺伝学的情報を扱うため, 担当医師から被験者 (保護者) に対して, 検査を行う意義, 利点と限界, その結果が家族や親族に及ぼす影響について十分説明し, 書面による同意を得た上で, 遺伝子異常が診断されたときの支援まで準備して実施されるべきである。検査実施前後に遺伝カウンセラーが遺伝カウンセリングを実施することが望ましい。

最近, 遺伝子変異が確立した男性のDMD/BMD患者を対象に, 臨床試験/治験の実施を目的とした筋ジストロフィー患者登録サイトの運用が開始された (Remedy: registry of muscular dystrophy. <http://www.remedy.jp/index.html>)。登録に際しては, 全例に multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法によるスクリーニング検査を行い (保険診療), 必要に応じてシーケンス解析, 筋生検を実施する。

### 5) 筋生検

筋病理では, 筋の壊死・変性, 再生線維の混在, 筋線維の大小不同, 結合織の増生

がみられる。免疫組織化学染色では、DMDの筋細胞膜はジストロフィンをほぼ完全に欠損するが、BMDの細胞膜はまだら状(faint and patchy)に染色される。

### 3. 治療方針

DMDに対するステロイド投与の有効性に関して、筋力の増強あるいは維持と呼吸機能の改善がランダム化比較対照試験により証明されている。5～15歳の症例ではプレドニゾン(プレドニン®) 0.75 mg/kg/日の連続投与が治療の第一選択である。体重増加などの副作用の面から投与量の減量が望ましい場合には、0.5 mg/kg/日に減量し、3～4ヵ月でさらに0.3 mg/kg/日へと減量する。

#### 【心不全】

定期的に脳性ナトリウム利尿ペプチド(brain natriuretic peptide : BNP)の測定や心エコーを施行し、左室駆出率40%以下(BNP: 20～60 pg/mL)で、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(レニベース®, 2.5 mg/日から開始し漸増)、交感神経β受容体遮断薬(アーチスト®, 1.25 mg/日から開始し漸増。上限は10 mg/日)を開始する。心筋障害が進行した際は拡張型心筋症の心不全に準じ、強心薬、利尿薬も加える。

#### 【呼吸障害】

定期的なSpO<sub>2</sub>、%VC、ピークカフフロー、終末呼気炭酸ガス濃度の測定が重要である。開始時期は、低酸素に基づく症状がある場合、睡眠時にSpO<sub>2</sub>低下がある場合、VCが1L(あるいは%VCが20%)を下回る時期の前後、PaCO<sub>2</sub>が55 Torr以上であれば夜間に非侵襲的陽圧換気療法(Noninvasive Positive Pressure Ventilation : NPPV)を開

始する。病状、病態に応じて昼間にもNPPVを追加する。排痰障害にはカフレーター(Mechanical In-Exsufflator : MI-E)や肺内パーカッション換気療法(IPV)も有効である。

### 4. 患者指導とリハビリテーション

早期より側彎と関節拘縮の予防に努め、必要に応じて装具、コルセットを作製する。最大強制吸気量維持のため呼吸訓練を行い、舌咽頭呼吸の習得を試みる。側彎は外科的治療も含め積極的に治療する。過度の痩せは消化管機能を低下させるため栄養指導が大切である。

### 5. 根本的治療開発の動向

現在DMDに対して、PTC124によるリード・スルー療法、ES/iPS細胞や筋芽細胞の移植治療、ウイルスベクターによる遺伝子治療などの開発が進められている。当研究部では、これまでアンチセンス・モルフォリノを用いたエクソン・スキッピング療法の前臨床試験を行ってきた。この成果を踏まえて、DMDを対象にしたエクソン51スキッピングの臨床試験を実施する準備を進めている。

## B 多発筋炎(polymyositis : PM), 皮膚筋炎(dermatomyositis : DM)

後天性筋疾患の代表である特発性炎症性ミオパチーは、多発筋炎、皮膚筋炎、封入体筋炎に分類される。特に多発筋炎は横紋筋のびまん性炎症性筋疾患であり、特徴的な皮疹を呈するものは皮膚筋炎という。多発筋炎・皮膚筋炎の有病率は人口10万あた

り約6人と推定される。男女比は女性が約2倍と多い。発症年齢の約半数は40～60歳である。

## 1. 病因

発症には自己免疫機序が関与する。多発筋炎では、筋線維・間質・血管周囲にマクロファージ，CD8<sup>+</sup>T細胞が浸潤し，筋線維内のカルパインなどのタンパク分解酵素を活性化する結果，筋線維は壊死する（細胞性免疫）。皮膚筋炎では，主に筋周膜の血管周囲や間質にB細胞，CD4<sup>+</sup>T細胞（ヘルパーT細胞）が浸潤する（液性免疫）。筋内微小血管の内皮細胞が傷害される結果，循環障害による筋束周囲萎縮が生じる。

## 2. 臨床像

急性ないし亜急性（数週～数ヵ月）に進行する。初発症状は，四肢近位筋・頸筋・体幹の筋力低下，筋痛，関節痛がみられることが多い。遠位筋力の低下は遅れて生ずる。進行例では筋萎縮を認めることがある。嚥下障害が生じることがあるが，構音障害を伴うことは少ない。びまん性間質性肺炎，肺線維症，心筋炎をしばしば合併する。自然寛解や増悪を繰り返しつつ徐々に進行し，5年生存率は約75%である。皮膚筋炎は多発筋炎と類似した臨床像を呈するが，ゴットロン徴候（指関節伸側で肥厚した紅斑），ヘリオトロープ疹（上眼瞼の紫紅色の浮腫性紅斑）を伴うことを特徴とする。皮膚筋炎の悪性腫瘍合併頻度は約20%であり，多発筋炎と比べて2.1～6.5倍高い。女性では，乳癌・卵巣腫瘍，男性では肺癌・消化器癌・前立腺癌が多い。女性の悪性腫瘍合併率は男性の約2倍で，50歳以上は高い。

## 3. 検査所見

### 1) 血液生化学検査

活動期には血清CK値は正常値の約10倍に上昇し，ミオグロビン値も上昇する。アルドラーゼ，AST，ALT，LDH，%クレアチン尿（尿中クレアチン/尿中クレアチン+尿中クレアチニン）が上昇し，活動性の指標判定に有用である。

### 2) 筋電図

随意収縮時には，低振幅・短持続時間の運動単位，運動単位の早期動員（early recruitment）がみられる。刺入電位は亢進していることが多い。安静時には線維性収縮電位，陽性鋭波を認める。

### 3) 画像検査

急性期の骨格筋MRIは，STIR（Short TI Inversion Recovery）法および脂肪抑制T2強調画像では，病変は多巣性あるいはびまん性の高信号を示す。進行例は，筋萎縮およびT1強調画像で高信号を示す。

### 4) 筋生検

筋束内の周辺・筋線維の内部・血管周囲にCD8<sup>+</sup>T細胞やマクロファージの浸潤像，筋線維の変性と再生，結合織の増生を認める。特に皮膚筋炎では血管周囲の細胞浸潤が主体であり，筋束周囲萎縮が認められることが多い。

### 5) 自己抗体

抗Jo-1抗体は肺線維症の合併のある多発筋炎の50%，皮膚筋炎の20%に認められる。抗シグナル認識粒子（SRP）抗体は筋炎と心障害を伴う急性発症の重症皮膚筋炎および多発筋炎の5%に検出される。皮膚筋炎に特異的な抗Mi-2抗体は35%で検出され，抗