

# 福山型筋ジストロフィーの治療戦略

神戸大学大学院 医学研究科  
神経内科学／分子脳科学 教授

とだ たつし  
戸田 達史

## 福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) とは

先天性筋ジストロフィーとは生まれて間もない頃から乳児期にかけて、筋肉の力が弱く発達の遅れが見られる筋ジストロフィーのことをいいます。筋ジストロフィーですから、筋肉を顕微鏡で見ると筋細胞が壊れて、筋細胞の数が減っています。検査では、血液のクレアチンキナーゼ（CKともいいます）が高い値を示します。筋肉の病気なのに知的発達の遅れ、ひきつけなど中枢神経系の異常を伴う疾患がいくつかあります。その代表的疾患が福山幸夫・東京女子医大名誉教授が最初に報告された福山型と呼ばれる病気です。

福山型先天性筋ジストロフィーは、1960年に福山先生が発見した筋ジストロフィーの一つです。生後9ヵ月以内（つまり先天性）に重度の筋力低下という筋ジストロフィーに特有の症状とともに、脳の構造異常による精神遅滞があらわれるという特徴もっています。約半数にけいれんを認め、また近視、網膜剥離などの眼の症状を伴う場合もあります。日本人に多く、海外には極めてまれな病気です。お座りまでできるお子さんは多いのですが、歩行可能な子は10%以下と数少ないです。

常染色体性劣性遺伝疾患ですので、両方の親からともに、原因となる遺伝子の変異を1個ずつ受け継いだ子供さんが発症します。わが国の小児期筋ジストロフィーの中ではデュシャンヌ型の次に多いと考えられており、発生率は男女ともに同じで、3/10万人などと言われています。日本人でこの病気の原因となる遺伝子の異常を1個もっている人は、約90人に1人程度とみられています。これを保因者といい、



両親も保因者です。保因者の数ではデュシャンヌ型より多いわけです。

最近では、日本から知能正常で軽度の筋力低下と心筋症の大学生のケースも報告されており<sup>2)</sup>、また同様に外国から臨床診断は肢帯型筋ジストロフィーの例があいついで報告され、従来の福山型の先天型筋ジストロフィーのイメージを変え、臨床症状はずっと幅が広いと思われています。

## 福山型原因遺伝子フクチン

我々はゲノム解析の手法を使って福山型原因遺伝子を同定しました<sup>3)</sup>。正常の福山型遺伝子は、第9番染色体長腕31領域に存在し、転写される基本単位であるメッセンジャーRNAとして約7000塩基対であり、本症の病変のある骨格筋、心筋、脳で優位に発現していました。患者染色体のほぼ90%には同一の変異が見られました。原因遺伝子内に「レトロトランスポゾン」という「動く遺伝子」の約3000塩基対の挿入があって、正常なメッセンジャーRNAとしては正常な産物蛋白質の産生が妨げられていたのです（図1）。

この変異は約100世代前の1人の人から由来し、現在の日本のほとんどの患者さんの祖先は1人、ということもわかりました。また残りの約1割の患者染色体には、福山型遺伝子に点突然変異が起こって

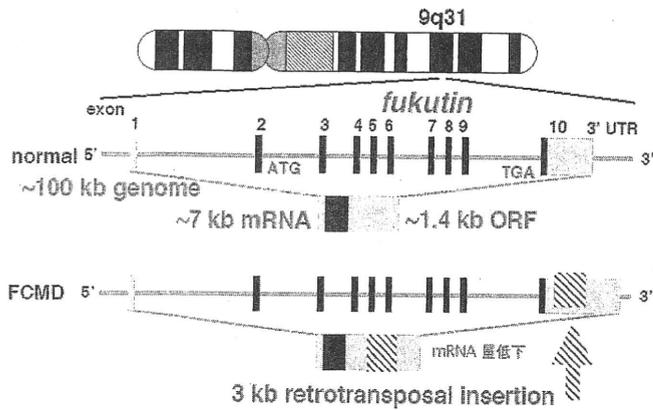


図1 フクチン遺伝子の模式図

大部分の患者染色体には、この遺伝子内に動く遺伝子レトロトランスポゾン挿入変異（矢印）があります。

産物蛋白質が短くなってしまうことが明らかになりました。我々は正常遺伝子の産物蛋白質にフクチンと名付けました。フクチンは461個のアミノ酸から成る新しい蛋白質でした。フクチンは、ゴルジ体中存在し、次に出てくる $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖修飾に関係する蛋白であると考えられています。2006年より福山型の遺伝子診断は、保険収載されています。

フィンとはさまざまな蛋白質と複合体をつくっており、これらの成分の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ます。そのうち $\alpha$ ジストログリカンは、0マンノース型糖鎖といわれる糖で、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、骨格筋ののびちぢみによる負荷に対して、筋膜の保護をしています（図2）。

その後、東京都老人研の遠藤先生のグループと我々は、福山型と類似した疾患の筋-眼-脳（MEB）病が、この $\alpha$ 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、見出しました<sup>4)</sup>。また福山型では $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖部分の染色が悪いことがわかりました。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ました。すなわち $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖修飾に異常をきたし、ラミニンなどとの結合が低下し、基底膜と細胞骨格のつながりがこわれるために、筋ジストロフィーがおきるというものです。これらの疾患群を総称して「 $\alpha$ ジストログリカノパチー」とよんでいます（図2）。

## ジストログリカンの糖鎖の異常

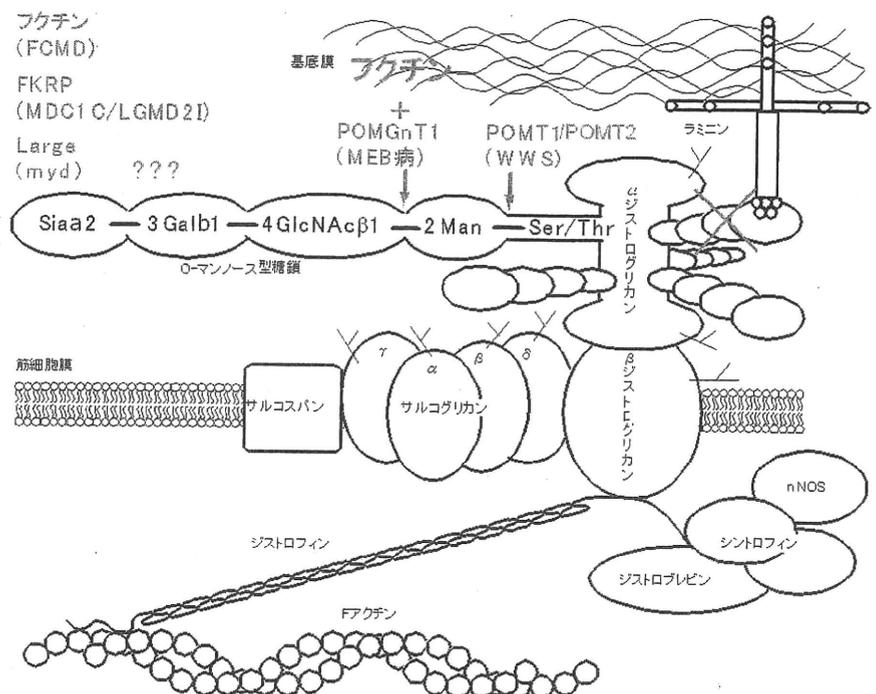
## 治療へのヒント

ところで、デュシャンヌ型の原因蛋白のジストロ

福山型にはデュシャンヌ型筋ジストロフィーにお

図2 筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体と $\alpha$ ジストログリカノパチー

$\alpha$ ジストログリカンはラミニンと糖鎖で結合しています。この糖鎖に異常をきたすと、ラミニンとの結合が低下し、膜が不安定になり $\alpha$ ジストログリカノパチーを発症すると考えられています。



けるmdxのような自然発症のモデルマウスがありません。我々は、患者さんのようなレトロトランスポゾン挿入変異をもつモデルマウスを作成しました。モデルマウスでは $\alpha$ ジストログリカン糖鎖に異常が生じていたましたが、正常糖鎖型の $\alpha$ ジストログリカンの残存も検出されました。しかも筋ジストロフィー症状は認められませんでした。人の患者さんにおいても先述した知能正常の軽症例では $\alpha$ ジストログリカン糖鎖は残っていました。この結果から、正常糖鎖型の $\alpha$ ジストログリカン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ります<sup>9)</sup>。

更に、LARGEという $\alpha$ ジストログリカノパチーの1つの型の遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んで導入すると、福山型モデルマウス、MEB病モデルマウスの $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖異常が解消できることが明らかになりました<sup>9)</sup> (図3)。つまり、LARGEなどで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を含む類縁疾患群の治療につながると考えられます。現在米国で $\alpha$ ジストログリカン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ます。

### おわりに

新世紀になってから、筋ジストロフィーに $\alpha$ 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いでいます。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」でしょう。デュシャンヌ型に関する治療研究は世界各国で盛んに行われています。一部臨床試験を行っている治療法もあります。一方で、福山型、MEB病原因遺伝子同定を契機に $\alpha$ ジストログリカノパチーの病態研究が大きく進展しましたが、治療とし

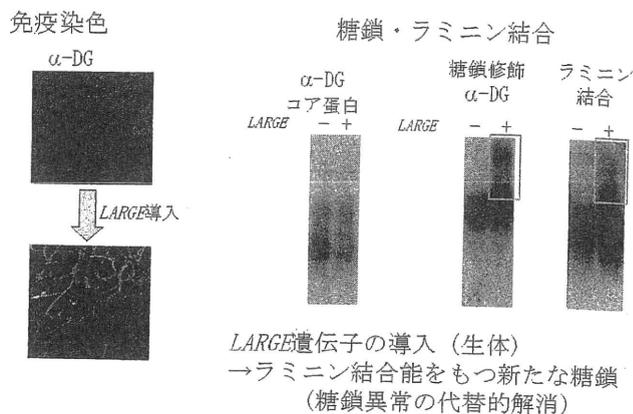


図3 FCMDモデルマウスへのLARGE遺伝子導入アデノウイルスベクターを用いたLARGE遺伝子導入により、FCMDノックインマウスの $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖異常が解消できることが明らかになりました。同様の所見は筋-眼-脳 (MEB) 病モデルマウスでも得られました。

$\alpha$  DG= $\alpha$ ジストログリカン

ては報告がありません。福山型は我が国で初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我々の責務である、と考えており、頑張っていきたいと思えます。

### 文 献

- 1) 戸田達史: 福山型先天性筋ジストロフィー. 小児科(増刊), 50: 899-906, 2009
- 2) Murakami T et al: Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. Ann Neurol 60: 597-602, 2006
- 3) Kobayashi K et al: An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Nature 394: 388-392, 1998
- 4) Yoshida A et al: Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. Dev Cell 1: 717-724, 2001
- 5) Kanagawa M et al: Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation in novel model mice to dystroglycanopathy. Hum Mol Genet 18: 621-631, 2009

## N E W S

### 筋ジス協会新理事長に 貝谷 久宣氏

日本筋ジストロフィー協会の平成22年度総会は5月16日、東京都新宿区の戸山サンライズで開催し、任期満了に伴う新理事長に、理事の貝谷久宣氏を選出した。貝谷医師はパ

ニック精神障害症候群を証明して今日のブームの先駆けとなったパイオニアで、名古屋駅前と東京都赤坂駅前に精神科クリニックを経営する精神科医で、会員の貝谷嘉洋氏の父君。

総会後の第47回全国大会では、大阪市の開業医・神野進氏、川崎医科大学・砂田芳秀氏、NHO東埼玉病

院・川井充氏、国立精神・神経医療研究センター・武田伸一氏の各研究班長が、貴重な研究の現況を報告。そのあと患者代表の藤井敏孝氏が「1. 研究費の増額と根本治療法の開発促進、2. 入所患者の療養生活の質の向上促進」など5項目にわたる決議を採択して閉会した。



糸山泰人 病院長

多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) という一般の方には不思議な名称の神経難病があります。19世紀半ばに「中枢神経に多発性に不規則な硬化性病変が存在する疾患」としてヨーロッパを中心に報告され始め、髄鞘が障害される

脱髄疾患といわれていますが、いまだに原因も病態も不明な疾患です。

この病気の概念や歴史は、我が国においては紆余曲折の経緯をたどってきました。その一つは、日本の神経学の遅れの為か、長い間我が国ではMSは存在しないと信じられてきた歴史があります。その当時は、「MSは日本にないと教科書に書いてあるからMSではない」といった考え方や意見がまかり通っていたエピソードも知られ

## 日本の多発性硬化症 (MS)

### の概念が変わってきた

ています。その後1950年代になり「MSの診断上の特徴である中枢神経系の時間的および空間的多発性」にのっとり、視神経炎や脊髄炎の再発を繰り返す病型を中心に日本にもMSが存在することが明らかにされました。この特殊な病型を視神経脊髄型MS (OSMS) と呼称して、アジアのMSの特徴と考えてきました。実はこの病型のMSの概念が今大きく発展的に変わろうとしています。

2000年初頭からの米国のメーヨークリニックのグループと東北大学のグループによる一連の共同研究から、OSMSは欧米でいう視神経脊髄炎 (Neuromyelitis Optica, NMO) と同じ疾患であり、しかもこの病気の患者はNMO-IgGという特異な抗体を持つことが明らかにされ、更にそれはアクアポリン4 (AQP4) という水チャンネルに対する自己抗体であることが示されました。更に興味あることにはNMOの病変部では、脱髄変化ではなくAQP4が局在するアストロサイトが傷害され、その結果として組織破壊が生じていることが示されつつあります。すなわち「日本のMSと考えられてきた約1/3はMSではなくNMOであり、その病態は脱髄ではなくアストロサイトパチーである」という新たな疾患概念が作られつつあります。

しかし、医学を始めとした科学の世界においても既成概念の変更には様々な抵抗が付きまといまいます。コペルニクス的転回といった大袈裟なものでもありませんが、この新たな概念での病態の解明を我々は時間がかかっても一つ一つ実証していくことが求められています。

(糸山泰人 病院長 記)

#### 〇〇〇 ニュースレター No.7 目次 〇〇〇

#### P.1 (巻頭言) 日本多発性硬化症の 概念が変わってきた

(独) 国立精神・神経医療研究センター  
病院長 糸山 泰人 先生

#### P.2 - エキスパートに聞く その6 - 「福山型先天性筋ジストロフィー」

神戸大学 神経内科  
教授 戸田 達史 先生

#### P.7 財団からのお知らせ

- ・平成22年度調査研究助成金 採択者
- ・平成22年度研究集会等助成金 採択者

#### P.8 編集後記

## エキスパートに聞く その6 「福山型筋ジストロフィー」

戸田 達史先生

(神戸大学大学院 神経内科 教授)

×

聞き手

財団法人精神・神経科学振興財団  
常務理事 埜中征哉

### 福山型先天性筋ジストロフィーとは？

福山型先天性筋ジストロフィーは福山幸夫先生（東京女子医大小児科名誉教授）によって、精神遅滞、けいれんなど中枢神経症状を伴うユニークな筋ジストロフィーとして1960年に報告されました。今からちょうど50年前のことです。筋ジストロフィーで中枢神経症状が必発というのはおかしいと、しばらくはその存在は無視され、外国の教科書には記載されない時代もありました。本症がほとんど日本人に限られること、発表される論文の多くが日本語だったことも、世界に広がるのに時間がかかった原因と思われる。しかし、臨床症状や中枢神経、筋肉の病理学的特徴が英文で次々と記載されるようになり、次第に世界から認められるようになってきました。今日、座談会にご出席の戸田達史先生（神戸大学教授）が、本症の遺伝子を決められてから、もうその存在を疑う人はいなくなりました。日本ではデュシェンヌ型について多い筋ジストロフィー。遺伝子変異（異常）が明らかにされ、原因も次第にわかってきて、根本治療法への道もひらかれつつあります。

### 福山型先天性筋ジストロフィーと フクチン遺伝子

埜中：今日は福山型筋ジストロフィーについて、先生にお話を伺いたいと思います。

まず、福山先生が福山型筋ジストロフィーを初めて報告されたのが1960年です。この病気は日本人固有の筋ジストロフィーと言われていて注目をあつめていたのですが、長く原因は不明でした。先生がこの原因である遺伝子を見つけられ、それをフクチン遺伝子（遺伝子産物をフクチン）（図1）と名前を付けられたわけですね？

戸田：はい、そうです。

埜中：この病気は、本当に日本人だけに限られているのですか？

戸田：私は1960年生まれでして、福山先生が論文を出された年に生まれているのです。フクチン遺伝子を明らかにして、それをみますとほとんどが日本人です。た

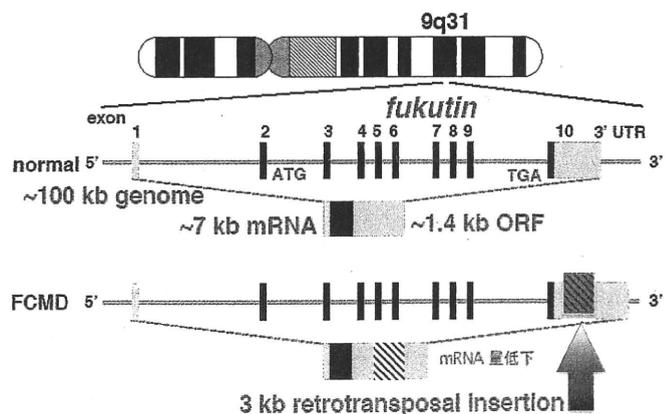


図1 フクチン遺伝子の模式図

フクチン遺伝子は第9染色体の長腕（9q31）というところにあり、10個のエクソンからなる。日本人固有の遺伝子の異常は、3,000個の塩基（3kb）のレトロトランスポゾンが、最後（10番目）のエクソンの後（非翻訳領域：遺伝子としての働きに必要なところに入りこんでいる（赤矢印）

だ遺伝子を調べると、外国でも最近ではフクチン遺伝子を持った患者さんがパラパラと出てきています。その場合は、先天性ではなく肢帯型筋ジストロフィーになる場合が多いようです。最近韓国や中国にも福山型の報告がみられています。

埜中：福山型の患者さんでは、フクチン遺伝子に3キロベース（3,000個の塩基からなる）のトランスポゾンの挿入があると先生は報告されています。トランスポゾンって何ですか？

戸田：トランスポゾンというのは、動く遺伝子という意味で、遺伝子の中にカセットになったような別の遺伝子が入り込むのです。ウィルス由来など、外から割り込んできた遺伝子といわれています。ゲノム上にあちこちに入り込んでいる。一言でいうと、動く遺伝子です。

埜中：すると、トランスポゾンというのは本来は、人のDNAの中にあるものではなくて、外来のものなんですね。すると、それはどこにでも入り得るものなののでしょうか。

戸田：DNAのたまたま傷があったところに入りこむことが多いといわれています。そして、一回入ってしまうと、それから先は全部遺伝するというのです。

埜中：先生の論文を拝見すると、日本人の何千年前かにもそのような突然変異があったということですね？

戸田：はい、約100世代ぐらい前、2500年前ぐらいにもそのような突然変異があったと計算しております。

埜中：すると、3キロベースの挿入というのは日本人だけですか？

戸田：基本的にはそうだと思います。つい最近、中国人・韓国人からも患者さんが報告されていますが、ただ、それは昔から日本と行き来があった近隣国ですから、保因者が日本から韓国や中国に行き、そのまま住み着いた可能性があります。

埜中：韓国や中国以外の国でも、フクチン遺伝子の変異を持っている人がいる。しかし、その人たちは福山型と異なって、肢帯型などの症状を示すとおっしゃいました。すると、その人たちは日本人の祖先とは関係なくフクチン遺伝子に異常をもっているということですか？

戸田：はい、その通りです。ただし、3キロベースの挿入ではなくて、点変異といって一塩基が異なっているのです。点変異の人は重症化し、早期に死亡するといわれています。しかし、点変異をもっている、たまたま軽い人がいて、そのような人は症状が軽い肢帯型を示すとおもわれています。

埜中：なるほど。すると、日本でもフクチン遺伝子に変異がある肢帯型の患者さんがおられるのですか？

戸田：国立精神・神経医療研究センターの西野一三先生

たちが報告された症例では、レトロトランスポゾンと点変異を持った方ですが、福山型と異なり心筋症だけで知能は正常で、筋力低下も軽いということです。これは、肢帯型筋ジストロフィーに分類できると思います。

埜中：すると、フクチンの遺伝子変異が分かってくる、古典的な福山型先天性筋ジストロフィーだけでなく肢帯型とか色々な病気が起こってくるということですね。

福山型は、日本ではデュシェンヌ型に続いて多いといわれていますがその頻度はどれくらいですか？

戸田：大体、発症率としては、日本人10万人に3人ぐらいだといわれています。しかし、遺伝子変異を1個もつ、いわゆる病気にはなっていない保因者は約90人に1人といわれています。

埜中：話が戻りますが、フクチンを見つけれられた時の苦労話をお聞かせ頂けますか？

戸田：二つあります。遺伝子を決めるには、連鎖解析をするために沢山の患者さんのDNAが必要です。DNAは血液から分離します。いとこ婚で生まれた福山型の患者さん探しに全国の病院に手紙を送ったり、あちこち血液を採りに行ったりしましたが、最初のうちは病院側から全然相手にされなかったりして苦労しました。もう一つは、フクチン遺伝子の断片を取ったのは実際に発表するより3年も前にそこに辿りついていたのです。で、そこはcDNAのしっぽのところだったのですね。そこをいくら解析してもアミノ酸になるDNA配列が出てこないんです。あれは、3'端がすごく長いのでそれをいくら読んでも出てこない、これはひょっとして、cDNAではなくて、ゲノムがたまたま混入していたのを見てるだけではないかと思いました。

## フクチン遺伝子変異があると 蛋白の糖鎖が欠ける

埜中：そのような大変な苦労をされて、フクチン遺伝子を見つけられたとは存知あげませんでした。フクチンとは一体どんな働きをしているのですか？

戸田：フクチンの機能というのは実はまだ明らかになっていないのです。福山型もそうですが、筋・眼・脳病（muscle eye brain disease: MEBD）とかウォーカー・ワールブルグ症候群など、みんな脳と筋肉と目が侵されるのです。それらの病気で共通なのは $\alpha$ ジストログリカンという膜蛋白が欠損していることです。

$\alpha$ ジストログリカンという蛋白にはお砂糖が沢山ついています（それを糖鎖といいます）。蛋白がちゃんと働く

には蛋白についている糖鎖が必要なのです。そこのお砂糖が、福山型などは変になっているのですね。 $\alpha$ ジストログリカンが欠損している病気をひとまとめにして $\alpha$ ジストログリカノパチーとよんでいます。

埜中：筋ジストロフィーと聞くと膜タンパクの異常という風に思いますが、そのお砂糖とタンパクの関係はどうなっているのでしょうか？

戸田：お砂糖を作る酵素・補酵素といいますが、お砂糖

を作るのも酵素がするわけで、酵素もタンパクなんです。だから、お砂糖をつくる酵素=タンパクの異常というわけです。

結局はタンパクの異常なんです。

埜中：すると、図にあるような基底膜にあるラミニンと糖鎖と $\alpha$ ジストログリカン、そここのところが切れちゃうとどうなるんですか？

戸田：正確なところは難しいのですが、ラミニン・ジス

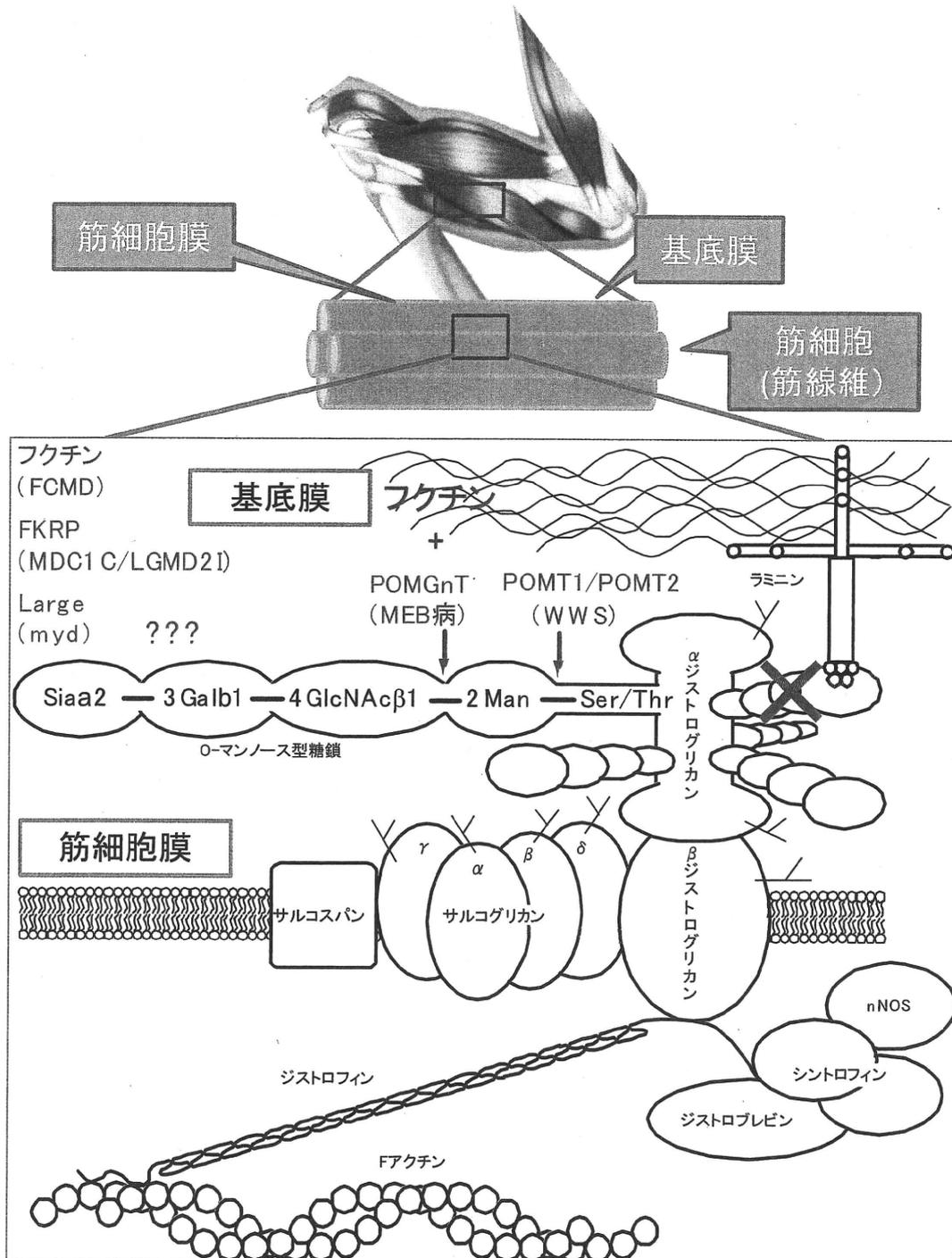


図2 筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体と $\alpha$ ジストログリカノパチー

トログリカン・ $\alpha$ ジストログリカン・ $\beta$ ジストログリカン・ジストロフィン・その下アクチン、その全体の連結が運動負荷に対して筋肉を強くしている。どこか一箇所切れると、ラミニンが剥がれやすいということで、膜が不安定になっているじゃないかと考えられています。

## 福山型の治療研究が進行中

埜中：デュシェンヌ型ではもうエクソンスキッピングであるとかリードスルーとか色んな治療の目処が立っていると聞かされています。福山型は治療から取り残されているといつも患者さんがおっしゃるわけです。患者さん達が一番期待しておられる福山型の治療についてお話を聞かせ下さい。

戸田：まず、福山型が取り残されているというわけではないと思います。デュシェンヌ型では原因遺伝子ジストロフィンが分かってから、20年以上経っています。でも、福山型ではフクチンが分かってから10年ほどです。だから取り残されてるっていうわけではなく、これから治療研究するという段階です。また、遺伝子治療ですとデュシェンヌ型で行われていることと同じですので、われわれの研究室でも遺伝子治療の研究を進めています。

埜中：フクチン遺伝子が大きいとアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに組み込みにくいと思うのですが、フクチン遺伝子の大きさはどれくらいですか？

戸田：DNAとしては、コーディング部分(蛋白をつくるのに必要な部分)は1.4キロベースですので、十分AAVベクターに入るわけです。AAVベクターを使っただけの遺伝子治療もデュシェンヌ型より、効率よくできる可能性があります。

埜中：最近、幹細胞治療がよく話題にのびます。その幹細胞治療については、どの筋ジストロフィーでも同じかとは思いますが、福山型とデュシェンヌ型との違いはありますか？

戸田：福山型もデュシェンヌ型も、幹細胞治療実験はまだ十分に行われていないので比較することはできません。砂田先生(川崎医大神経内科)のデータでは、mdxマウス(デュシェンヌ型のモデルマウス)とdyマウス(筋ジストロフィーマウスで細胞の基底膜蛋白が欠損している)を比較すると、dyマウスの方が移植した筋細胞の定着がよいという結果があります。つまり基底膜が壊れている方が、外からの細胞が筋肉に入りやすいということなのです。福山型も基底膜はその連結がおかしくて壊れやすいと考えられています。そういう意味ではひよっと

## $\alpha$ (アルファ) ジストロフィノパチー ( $\alpha$ ジストログリカン欠損症)

多くの蛋白は蛋白自体では機能しないで、糖が蛋白に付着することで活発な働きをします。筋細胞には基底膜と細胞膜という2枚の膜からなっています。基底膜と細胞膜がずれないようにボルトのようなもので、2枚の膜は固定されています。そのボルトのようなものは幾つかの蛋白が連なって出来ています。デュシェンヌ型で欠損しているジストロフィンもボルトを作っている蛋白のひとつです。ボルトを作っているものにはジストログリカンという蛋白もあり、それはさらに $\alpha$ と $\beta$ という蛋白からなっています。 $\alpha$ ジストログリカンにはひげのように沢山の糖鎖(糖がつながって鎖のようになっています)がついています。(図2をご覧ください) 福山型ではこの糖鎖に異常があることが証明されています。この糖鎖がないと基底膜のラミニンという蛋白と筋細胞膜がきちんと固定されなくなります。福山型では、なぜ、どうして糖鎖に異常があるのかはよく分かっていません。

この糖鎖がうまく形成されない病気がいくつかあり、筋・眼・脳病とかウォーカー・ワルブルグ症候群などとよばれています。これらの病気も先天性筋ジストロフィーと精神遅滞などの中枢神経症状があります。このような病気をまとめて $\alpha$ ジストログリカン欠損症とよんでいます。糖鎖の研究は日本が世界をリードしています。糖を補給する方法がみつければ病気が治ると研究者は努力を積み重ねています。

したらデュシェンヌよりも福山型の方が幹細胞も入りやすいかもしれない。生着しやすいのかもしれないけど、ただ、まだそこまではデータがないです。

埜中：iPS細胞を使って治療をすすめるということは考えておられるわけですね。

戸田：当然考えています。

埜中：他に福山型で考えられる治療法は何ですか？

戸田：福山型の治療法のひとつとして、ラーズ(large)という分子が、ジストログリカンのお砂糖を回復させる働きがあることが分かっています。それで、遺伝子治療でもフクチンを入れる以外にラーズの遺伝子治療でも、治



戸田達史先生（右）と聞き手の埜中常務理事（左）

療の見込みはあるんじゃないかなと考えています。

埜中：そのラージというのはどういう遺伝子ですか？

戸田：ラージ遺伝子というのは、先ほどお話したジストログリカノパチーの仲間の病気の原因遺伝子です。ある種類の先天性の筋ジストロフィーの原因遺伝子がラージ、大きい遺伝子ということからその名前がきたそうです。ラージの遺伝子が欠損しているモデル動物に myd マウスというものがあります。福山型の筋細胞とか、筋・眼・脳病の細胞とか色んな細胞にラージ遺伝子を入れると  $\alpha$  ジストログリカンのお砂糖が回復するというデータがあるんですね。それで、ラージというのはいわゆる万能薬的などころがありまして、福山型以外にも色んなところで治療できるんじゃないかと考えています。

埜中：ラージを入れるというのは、どういうところからヒントを得たんでしょうか？偶然ですか？

戸田：キャンベルたちは、もともとラージという遺伝子を強制発現させるマウスをつくったんですね。そうするとジストログリカンが普段よりぴっかり光って何でだろうというところから、ヒントを得たんです。

埜中：それでラージ遺伝子の欠損マウス、myd マウスにラージ遺伝子を入れたらよい結果がでたのですね。

戸田：そうです。ラージの欠損にラージを入れるわけだから・・・当然のことです。しかもラージの強制発現マウスにはジストログリカンが濃かったということです。

埜中：けれども、ラージの遺伝子って cDNA で大きそうですが、AAV ベクターで入るんですか？

戸田：詳しくは計算したことがありませんが、ジストロフィンほどは大きくないと思います。

埜中：わかりました。お話を伺っていると、デュシェンヌよりも福山の方が治療に関しては夢があると・・・

戸田：デュシェンヌは構造タンパクだから、柱がないわ

けです。柱を補うのは難しいと思います。お砂糖がないことを補う方がまだやりやすいのかなと思うんです。

埜中：先生、筋肉は良くなるんですね？中枢神経の方も良くなるんでしょうか？

戸田：とっても難しい問題でして、胎生期で、すでに起きているので胎児治療が出来ないと難しいかもしれません。それはまだ倫理的に難しい話ですね。ただ、親御さんにとってはですね、福山の患者さんは動けませんから、ある程度筋肉が回復してまず動けるようになるだけでもかなりの福音だと思うんです。今いっぺんに中枢神経までとかそこまで進めなくて、まずは骨格筋を治してあげることができればいいと思います。

埜中：そうすると、動きも良くなって、社会を見て、知的活動が良くなると二次的な効果というのはありますね。それは朗報ですよ。

戸田：しかも、福山型は若いうちから夜中に何回も体位交換をしなくてはならないですよ、それが無くなるだけでも、親御さんは随分と楽になるのではないのでしょうか。

埜中：そうですね。

今日は先生、夢多いお話を沢山伺いました。本当にありがとうございました。

収録 2010年1月26日



## 福山先天性筋ジストロフィー

先天性筋ジストロフィーとは生まれて間もない頃から乳児期にかけて、筋肉の力が弱く発達の遅れがみられる筋ジストロフィーのことをいいます。筋ジストロフィーですから、筋肉を顕微鏡で見ると筋細胞が壊れて、筋細胞の数が減っています。検査では、血液のクレアチンキナーゼ(CK,CPKともいいます)が高い値を示します。筋肉の病気なのに知的発達の遅れ、ひきつけなど中枢神経系の異常を伴う疾患がいくつかあります。その代表的疾患が福山先生が最初に報告された福山型と呼ばれる病気です。日本人に多く、海外には極めてまれな病気です。お座りまでできるお子さんは多いのですが、歩行可能な子は10%以下と数少ないです。

# 福山型先天性筋ジストロフィーについて

【研究課題】福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の  
ユニークな治療法開発と病態解明

戸田達史

神戸大学大学院 医学研究科 教授

### 1. 福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama type congenital muscular dystrophy; FCMD) とは

福山型先天性筋ジストロフィーは、1960年に福山幸夫・現東京女子医大名誉教授が発見した筋ジストロフィーの一つです。生後9ヵ月以内(つまり先天性)に重度の筋力低下という筋ジストロフィーに特有の症状とともに、脳の奇形による精神遅滞があらわれるという特徴をもっています。約半数にけいれんを認め、また近視、網膜剥離などの眼の症状を伴う場合もあります。常染色体性劣性遺伝疾患ですので、両方の親からともに、原因となる遺伝子の変異を1個ずつ受け継いだ子供さんが発症します。わが国の小児期筋ジストロフィーの中ではデュシャンヌ型の次に多いと考えられており、発生率は男女ともに同じで、3/10万人などと言われています。日本人でこの病気の原因となる遺伝子の異常を1個もっている人は、約90人に1人程度とみられています。これを保因者といい、両親も保因者です。保因者の数ではデュシャンヌ型より多いわけです。最近では、知能正常で軽度の筋力低下と心筋症の大学生のケースも報告されており、臨床症状はずっと幅が広いと思われま

### 2. 福山型原因遺伝子フクチン

我々はゲノム解析の手法を使って福山型原因遺伝子を同定しました。正常の福山型遺伝子は、第9番染色体長腕31領域に存在し、転写される基本単位であるメッセンジャーRNAとして約7000塩基対であり、本症の病変のある骨格筋、心筋、脳で優位に発現していました。患者染色体のほぼ90%には同一の変異が見られました。

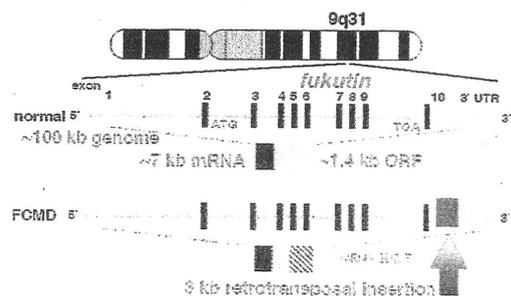


図1 フクチン遺伝子の模式図

大部分の患者染色体には、この遺伝子内にレトロトランスポゾン挿入変異(赤矢印)があります。

原因遺伝子内に「レトロトランスポゾン」という「動く遺伝子」の約300塩基対の挿入があって、正常なメッセジャーRNAとしては正常な産物蛋白質の産生が妨げられていたのです(図1)。この変異は約100世代前の1人の人から由来し、現在の日本のほとんどの患者さんの祖先は1人、ということもわかりました。また残りの約1割の患者染色体には、福山型遺伝子に点突然変異が起こって産物蛋白質が短くなってしまふことが明らかになりました。我々は正常遺伝子の産物蛋白質にフクチンと名付けました。フクチンは、ゴルジ体中存在し、次に出てくる $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖修飾に関係する蛋白であると考えられています。2006年より福山型の遺伝子診断は、保険収載されています。

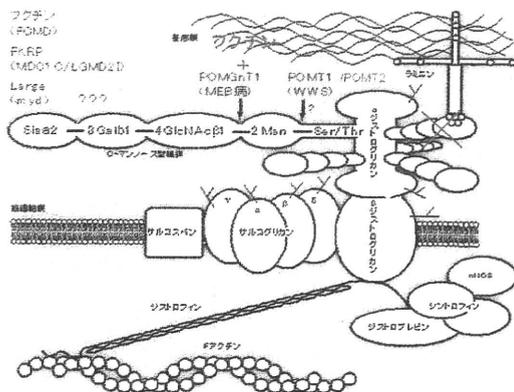


図2 筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体と $\alpha$ ジストログリカノパチー

$\alpha$ ジストログリカンはラミニンと糖鎖で結合しています。この糖鎖に異常をきたすと、ラミニンとの結合が低下し、膜が不安定になり、筋細胞が壊れると考えられます。

### 3. ジストログリカンの糖鎖の異常

ところで、デュシャンヌ型の原因蛋白のジストロフィンにはさまざまな蛋白質と複合体をつかっており、これらの成分の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ます。そのうち $\alpha$ ジストログリカンは、0マンノース型糖鎖といわれる糖で、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、骨格筋ののびぢぢみによる負荷に対して、筋膜の保護をしています(図2)。その後、東京都老人研の遠藤先生のグループと我々は、福山型と類似した疾患の筋・眼・脳病(muscle-eye-brain:MEB)が、この $\alpha$ 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ました。また福山型では $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖部分の染色が悪いことがわかりました。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型などでも同様の異常が発見されました。すなわち $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖修飾に異常をきたし、ラミニンなどとの結合が低下し、基底膜と細胞骨格のつながりが破綻するために、筋ジストロフィーがおきるというものです。これらの疾患群を総称して「 $\alpha$ ジストログリカノパチー」とよんでいます(図2)。

### 4. 治療へのヒント

福山型にはデュシャンヌ型におけるmdxのような自然発症のモデルマウスがありません。我々は、患者さんのようなレトロトランスポゾン挿入変異をもつモデルマウスを作成しました。モデルマウスでは $\alpha$ ジストログリカン糖鎖に異常が生じていたましたが、正常糖鎖型の $\alpha$ ジストログリカンの残存も検出されました。筋ジストロフィー症状は認められませんでした。人の患者さんにおいても先述した知能正常の軽症例では $\alpha$ ジストログリカン糖鎖は残っていました。この結果から、正常糖鎖型の $\alpha$ ジストログリカン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ります。さらに、LARGEという $\alpha$ ジストログリカノパチーの1つの型の遺伝子導入により、福山型モデルマウス、MEB病モデルマウスの $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖異常が解消できることが明らかになりました(図3)。つまり、LARGEなどで糖鎖異常を部分的にでも解消できればLARGEは、膜脆弱化や筋再生異常を抑制し、FCMDを含む類縁疾患群の治療につながると思われます。現在米国で $\alpha$ ジストログリカン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ます。

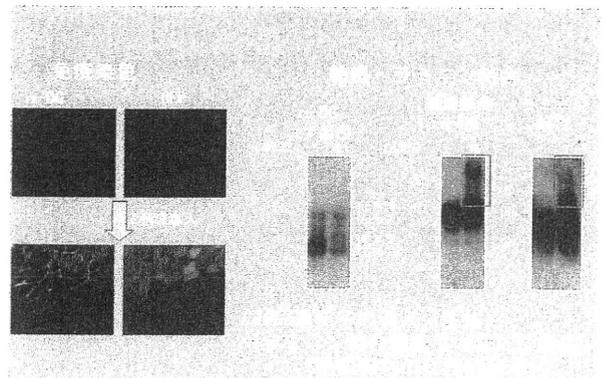


図3 FCMDモデルマウスへのLARGE遺伝子導入

アデノウイルスベクターを用いたLARGE遺伝子導入により、FCMDノックインマウスの $\alpha$ ジストログリカンの糖鎖異常が解消できることが明らかになりました。同様の所見はMEB病モデルマウスでも得られました。 $\alpha$ DG= $\alpha$ ジストログリカン

## 筋ジストロフィーの分子病態\*

砂田 芳秀\*\*

**Key Words :** muscular dystrophy, dystrophin, TRPV2, dysferlin, RNA splicing

### はじめに

筋ジストロフィーは何らかの遺伝子異常により筋細胞が壊死・再生を繰り返しながら正常筋組織が崩壊し、臨床的には進行性の筋萎縮と筋力低下を呈する疾患の総称である。根本的な治療法の確立には、原因遺伝子の同定だけでなく、発症の分子病態の解明が必要不可欠であることはいうまでもない。1987年のジストロフィン遺伝子のクローニングを端緒として現在までに30を超える原因遺伝子が同定されており、発症にいたる分子病態の多様性が推測されるものの、その本態は未だに十分解明されていない。もとより、多様な分子病態をすべて網羅することは不可能であり、本講演では特に筋鞘膜の脆弱性とCa<sup>2+</sup>イオンの透過性亢進、膜修復機構の異常、筋内血管拡張障害に焦点をあてて最近の研究成果を紹介する。

### I. 原因蛋白の局在からみた筋ジストロフィー

分子病態を原因蛋白の細胞レベルでの局在という観点から見ると、以下の5つのグループに分類できる。(1) 細胞外マトリックス成分の異常: ラミニン $\alpha$ 2 (メロシン) 欠損による先天性筋ジストロフィー MDC1A, コラーゲンVI異常によるUllrich型やBethlem myopathyなど先天性筋ジストロフィ

ー (congenital muscular dystrophy: CMD), (2) 細胞膜関連蛋白の異常: ジストロフィン異常によるDuchenne型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy: DMD), サルコグリカン異常による肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 2C-F,  $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖異常による福山型などのCMDやLGMD2I, 細胞膜修復に関与するジスフェルリン欠損によるLGMD2B, シグナル伝達制御の関わるカベオリン3異常によるLGMD1Cなど, (3) 細胞骨格や筋原線維関連蛋白の異常: ミオティリン, タイティン, FHL-1などの異常によるLGMD, (4) 核膜関連蛋白の異常: エメリン異常によるX連鎖Emery-Dreifuss型筋ジストロフィー (EDMD), ラミンA/C異常による常染色体性EDMD, (5) その他: カルパイン3異常によるLGMD2A, ユビキチンリガーゼと推定されるTRIM32異常によるLGMD2Hなど。

こうした分子病態の中である程度コンセンサスがえられているのは①筋形質膜の脆弱性や膜修復機構の破綻による、細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入とプロテアーゼの活性化, ②細胞外マトリックス成分の欠損や $\alpha$ -ジストログリカンのラミニン結合能の喪失など細胞内外の生存シグナルの減損であるが、最近NOS活性低下による筋肉内血管の拡張

\* Molecular Pathogenesis of Muscular Dystrophies.

\*\* 川崎医科大学神経内科学教室 Yoshihide SUNADA: Department of Neurology, Kawasaki Medical School

障害説も提唱されている。

## II. 細胞膜の脆弱性とCa<sup>2+</sup>イオン透過性亢進の分子機構

従来からDMDの病態として細胞膜仮説、すなわち細胞膜の脆弱性と細胞内へのCa<sup>2+</sup>イオンの流入とプロテアーゼの活性化により筋細胞壊死が生じると考えられていた。ミシガン大学Metzger教授のグループはジストロフィン欠損心筋細胞を単離しマイクロカーボンを用いて筋節長だけ伸展させ、発生する張力と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を測定した<sup>1)</sup>。ジストロフィン欠損心筋細胞では伸長により細胞内へCa<sup>2+</sup>が流入して、過収縮が起こり心筋細胞の死滅が観察された。このようにジストロフィン欠損筋で伸長によりCa<sup>2+</sup>イオンが細胞内へ流入するチャンネルについては長い間わかっていなかった。最近Iwataら<sup>2)</sup>は、ストレッチ感受性イオンチャンネルであるTRPV2がCa<sup>2+</sup>イオン流入のpathwayであることを見いだした。正常な骨格筋ではTRPV2は細胞質内の膜系に局在しているが、ジストロフィン欠損筋では筋鞘膜に濃縮して局在するようになる。そこで彼らは筋鞘膜に局在したTRPV2が活性化して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇する結果、筋細胞が壊死に陥るとの作業仮説を考えた。この仮説を検証するため、ドミナントネガティブ変異を導入してTRPV2を不活化したトランスジェニックマウスを作出し、*mdx*マウスと交配して筋肉の変化を解析した。TRPV2を特異的に阻害した*mdx*マウスでは、筋細胞の壊死や線維化が有意に抑制され、筋ジストロフィー変化が改善することが示された。したがって、TRPV2の特異的な阻害薬が開発されればジストロフィノパシーの有効な治療薬として期待される。

## III. 膜修復機構の異常による細胞膜の脆弱性

骨格筋は収縮と弛緩を繰り返すことから、筋鞘膜は力学的なストレスに曝されており、細胞膜が損傷を受けやすい。そこで、生体には損傷した細胞膜を修復する生理的なメカニズムが存在することが推定される。アイオワ大学のCampbellらは、三好型遠位型筋ジストロフィーやLGMD2Bの原因蛋白であるジスフェルリンが膜修復に関与することを明らかにした<sup>3)</sup>。単一筋線維にレーザー照

射により筋鞘膜損傷を与えると損傷部位にジスフェルリンが集積して、速やかに膜を修復する。一方で、ジスフェルリン欠損マウスでは膜が修復されないため、細胞外液が容易に細胞内に流入することが示された。ジスフェルリン欠損筋では損傷した筋鞘膜の直下に膜小胞が集積した像が観察されるが、修復機転において表面膜に融合できなかった小胞が集積したものと解釈できる。ジスフェルリンによる膜修復過程はCa<sup>2+</sup>依存性であることが解明されている。

最近、京都大学の竹島教授のグループはジスフェルリンとは異なり、Ca<sup>2+</sup>非依存性に膜修復に関与するミツグミン (MG53) という新たな分子を発見した<sup>4)</sup>。ミツグミンのノックアウトマウスでは、筋ジストロフィー変化が観察されることから、筋ジストロフィーの発症機序への関与も推測される。また、筋ジストロフィーの新たな原因蛋白候補というだけでなく、治療薬開発の新たなシーズとしても注目されている。

## IV. nNOS活性低下による血管拡張障害

熊本大学のMiikeら<sup>5)</sup>は、電顕での観察からDMDでは早い段階から筋内血管内皮細胞が腫大して毛細血管内腔が狭小化することを指摘していた。Bredtらはジストロフィン欠損筋ではnNOSの局在が筋鞘膜から細胞質へと変化するとともに活性が低下することを見いだした<sup>6)</sup>。しかし、nNOSノックアウトマウスでは筋障害がみられないことから、筋ジストロフィーの発症機序にnNOS活性低下がどのように関与するかは長らく不明であった。Yasuharaらは高頻度電気刺激により筋収縮運動を反復させた時、正常でみられる筋血流量の増大が*mdx*マウス (ジストロフィン欠損筋) では欠如することを見いだした<sup>7)</sup>。さらに*mdx*マウスでは筋収縮後のNO産生が減弱していることが明らかにされた。すなわち、ジストロフィン欠損筋ではnNOS活性の減弱により筋収縮に伴う血管拡張反応を担うNO産生が低下していると推測される。そこで、NOの下流で働くcGMPを上昇させるphosphodiesterase 5 (PDE5) 阻害薬を*mdx*マウスに投与したところ、筋ジストロフィー変化の有意な改善が観察された。CampbellのグループもPDE5阻害薬投与により、*mdx*マウスに

において運動負荷後の筋血流量が顕著に増大することを示している<sup>9)</sup>。

正常な骨格筋でnNOS活性が低下しても、それだけでは筋ジストロフィーは発症しないが、ジストロフィン欠損というfirst hitの上にnNOS活性低下による筋血管拡張障害というsecond hitが加わることにより筋ジストロフィーが増悪するという、いわゆる“筋ジストロフィー発症のtwo-hit mechanism”が提唱されている。

## V. RNA病としての筋ジストロフィー

スプライシングやエディティングなどのRNAプロセッシングの異常に起因する疾患はRNA病と呼ばれる。筋強直性ジストロフィーはいろいろな遺伝子のスプライシング異常によって多彩な症状を呈するRNA病であることが解明されてきた。この疾患(1型)では第19染色体のDMキナーゼ(DMPK)遺伝子の3'非翻訳領域にあるCTGリピートの異常伸長がみられるが<sup>9)</sup>、DMPK蛋白自体には異常がない。つまり原因蛋白レベルの異常で病気が発症するわけではない。異常伸長したCTGリピートはDMPK遺伝子のRNAへの転写段階でCUGリピートとなるが、異常伸長したCUGにはMBNL1-3やCELF1-6などのRNA結合蛋白が結合する。これらのRNA結合蛋白は様々な遺伝子のmRNAへの転写過程で、スプライシングを制御している。したがって、異常伸長したCUGリピートにスプライシングを調節するRNA結合蛋白質が結合してトラップされると、正常なスプライシングの制御に支障をきたすと考えられる。この病気の特徴であるミオトニアは塩素チャネルの機能異常で生じるが、患者の筋肉では塩素チャネルCLCN1遺伝子の異常スプライシングにより幼若型CLCN1が発現している<sup>10)</sup>。また、インスリン受容体においても、スプライシング異常により幼若型受容体が優位になっていて、おそらくインスリン耐性の原因と考えられている<sup>11)</sup>。

## VI. RNAレベルの分子病態から新たな治療戦略へ

従来のような蛋白レベルの分子病態の理解だけでなくRNAレベルにおける分子病態の理解が、新たな治療法開発へのアプローチに重要になると

思われる。DMDの場合DNAレベルでout-of-flame欠失を修正することは困難であるが、欠失に隣接するexonをRNAへの転写段階でスプライシングによりスキップさせることでin-flame欠失に変換して軽症化を試みる、いわゆるexon skippingという治療法が注目されている。今後はDMD以外の筋ジストロフィーに対しても、このようなRNAレベルを標的とした治療戦略の応用が考えられる。したがって、重症度など臨床表現型との相関を含め、RNAレベルでの分子病態の詳細な解析が重要になると思われる。

## 文 献

- 1) Yasuda S, Townsend D, Michele DE et al : Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature* 436 : 1025-1029, 2005
- 2) Iwata Y, Katanosaka Y, Arai Y et al : Dominant-negative inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. *Hum Mol Genet* 18 : 824-834, 2009
- 3) Bansal D, Miyake K, Vogel SS et al : Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423 : 168-172, 2003
- 4) Cai C, Masumiya H, Weisleder N et al : MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol* 11 : 56-64, 2009
- 5) Miike T, Sugino S, Ohtani Y et al : Vascular endothelial cell injury and platelet embolism in Duchenne muscular dystrophy at the preclinical stage. *J Neurol Sci* 82 : 67-80, 1987
- 6) Brenman JE, Chao DS, Xia H et al : Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82 : 743-752, 1995
- 7) Asai A, Sahani N, Kaneki M et al : Primary role of functional ischemia, quantitative evidence for the two-hit mechanism, and phosphodiesterase-5 inhibitor therapy in mouse muscular dystrophy. *Plos One* 8 : 1-16, 2007
- 8) Kobayashi YM, Rader EP, Crawford RW et al : Sarcolemma-localized nNOS is required to maintain activity after mild exercise. *Nature* 456 : 511-515, 2008
- 9) Brook JD, Mila E, McCurrach HG et al : Molecular basis of myotonic dystrophy : expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68 : 799-808, 1992

10) Nezu Y, Kino Y, Sasagawa N et al : Expression of MBNL and CELF mRNA transcripts in muscles with myotonic dystrophy. *Neuromuscul Disord* 17 : 306-312, 2007

11) Savkur RS, Philips AV, Cooper TA : Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29 : 40-47, 2001

## Molecular Pathogenesis of Muscular Dystrophies

Yoshihide SUNADA

Department of Neurology, Kawasaki Medical School

Muscular dystrophy is one of the most devastating diseases for which there is no effective therapy at present. In an attempt to develop effective therapeutics, a considerable number of causative genes for the numerous types of muscular dystrophy have been identified in the last twenty years. However, uncovering causative genes alone is not enough. It is crucial to comprehend molecular pathogenesis of muscular dystrophy, focusing on the causative proteins. It is further necessary to investigate the RNA processing defects.

Muscular dystrophies can be divided into five groups depending on the subcellular localization of the causative proteins as follows : (1) the extracellular matrix proteins such as laminin  $\alpha 2$  or collagen VI, (2) the sarcolemmal proteins including dystrophin, sarcoglycans, and dysferlin, (3) the sarcomeric proteins like myotilin, titin, and FHL-1, (4) the nuclear membrane proteins like emerin and lamin A/C, and (5) other miscellaneous proteins such as calpain 3 and TRIM32.

Given the number of proteins attributed to muscular dystrophy, it can be said to be a heterogeneous and variable pathogenesis. However, recent research has revealed important molecular mechanisms leading to muscle degeneration. We discuss three major issues. First, in the patho-

genesis of dystrophinopathy, increased sarcolemmal fragility and increased  $Ca^{2+}$  influx have been observed. It is also revealed that TRPV2, a stretch-sensitive ion channel, plays a significant role in increasing  $Ca^{2+}$  influx. Second, dysferlin has been proved to be involved in the membrane repair system. In addition to the molecule dysferlin which works in a  $Ca^{2+}$  dependent manner, MG53 has been identified to play a significant role in membrane repair without  $Ca^{2+}$ . MG53 is also expected to be a novel therapeutic target molecule. Third, as a major underlying factor causing muscle damage in dystrophin-deficient skeletal muscle, decreased nNOS activity has been pointed. Dystrophin-deficient skeletal muscle is damaged as a consequence of disturbed vasodilation after muscle contraction. This is proved with *mdx* mice, where administration of a phosphodiesterase 5 inhibitor, a potent vasodilator, ameliorates muscle damage.

Although these findings at the protein level have great implications for the therapy of muscular dystrophy, clarifying the molecular mechanisms at the RNA level will be the key in developing novel therapeutic strategies. One of the new therapies for DMD could be the exon-skipping therapy where anti-sense agents are used to modify RNA splicing.

## 筋ジストロフィー\*

鈴木友子<sup>1)</sup> 武田伸一<sup>1)</sup>

Key Words : 筋ジストロフィー, 筋衛星細胞, 骨格筋, iPS 細胞, 骨格筋再生, メソアンギオブラスト

### はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は, X 染色体上のジストロフィン遺伝子変異により, 骨格筋の細胞質膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンが欠損し, 膜が脆弱性になり, 骨格筋線維が変性・壊死する重症の X 連鎖性の筋疾患である. 幼児期から始まる筋力低下, 動揺性歩行, 登攀性歩行, 仮性肥大を特徴とする.

治療としては, プレドニゾロンやデフラザコートの糖質コルチコステロイド療法が, ある程度 DMD の進行を抑制する. 次世代の治療法としては, 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用いて, スプライシングパターンを変え, premature stop codon を回避するエクソン・スキッピング法が注目されており, 日本も, 欧米を中心に行われている国際共同治験に参加しようとしている. しかし, アンチセンス・オリゴヌクレオチドの効果は一過性であり, ジストロフィンの発現を維持するには繰り返し投与が必要である. また, 心筋に取り込まれる効率が低いこと, 患者によって用いるアンチセンス配列が異なること, 治療費が高額になることが懸念材料として残っている.

遺伝子治療研究は, 骨格筋での長期発現が可能

なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが主流であり, 骨格筋に親和性のある血清型や systemic delivery に威力を発揮する血清型が用いられてきた. しかし, ヒトでは AAV 抗体を有している人が多く, また, 一度投与すると中和抗体ができるため, 2 度目以降の投与は有効でない. さらに, ベクターに搭載できる外来遺伝子のサイズに制限があり, AAV 単独では DMD の治療法とはなりにくいと考えられる. 一方, 骨格筋は旺盛な再生能力を有しており, 最近の iPS 細胞の出現に刺激されて, 幹細胞を用いた再生医療は DMD の治療法として大いに期待されている.

### 組織幹細胞による骨格筋再生と筋ジストロフィー

#### 1. 筋衛星細胞

骨格筋には組織特異的幹細胞である筋衛星細胞 (muscle satellite cells) が, 通常は骨格筋線維と共通の基底膜で挟まれて, dormant な状態で存在する. 一旦, 筋が傷害を受けると, 筋衛星細胞は活性化し, 分裂し, 筋芽細胞となり, お互い融合して, あるいは傷ついた筋線維と融合して筋線維を再生する (図 1). また, 生後の筋の成長や, 筋肥大や筋萎縮といった筋の可塑性にも関与している. 筋衛星細胞は, 旺盛な筋再生能を担う主役であるが, その分裂能は無限ではなく, 筋ジストロ

\* Muscular dystrophy.

<sup>1)</sup> 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部: ☎187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1

Yuko Suzuki, MD, PhD, Shin'ichi Takeda, MD, PhD : Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

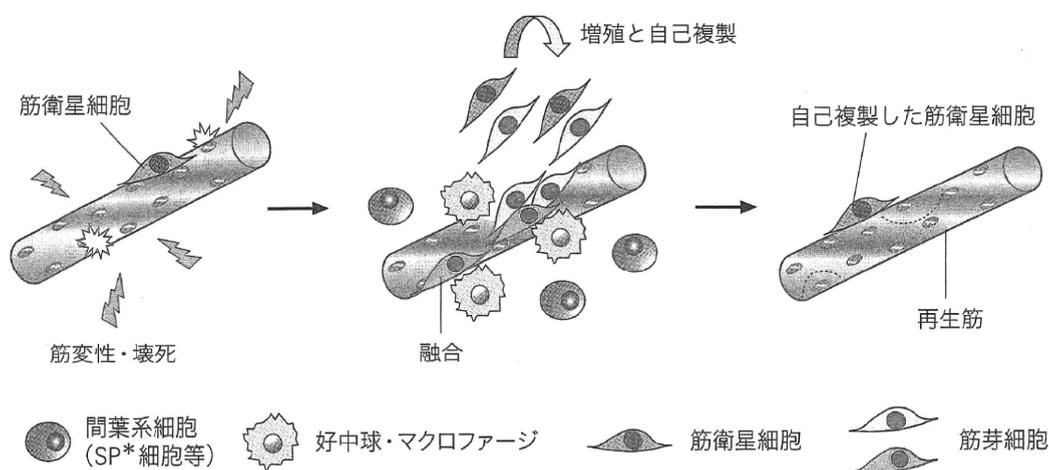


図 1 筋傷害時、活性化され、筋線維を再生する組織特異的幹細胞である筋衛星細胞

筋衛星細胞は通常は dormant な状態で筋線維と基底膜の間に存在するが、筋が傷害されると活性化され、増殖して筋芽細胞となり、傷害された筋線維と融合して、筋線維を再生する。一部は分化せずに筋衛星細胞となる（自己複製）。好中球やマクロファージは壊死線維の除去を行う。間葉系細胞は、筋衛星細胞の増殖や遊走の促進、細胞外マトリックスの再構成に寄与すると考えられる。筋線維再生がうまく進まない状況では、筋組織の線維化や脂肪化の原因になる。

\*SP : side population

フィーなどで繰り返し筋衛星細胞が動員されると、徐々に分裂能、分化能を失い、筋再生が変性、壊死に追いつかなくなる。加齢に伴う筋萎縮（サルコペニア）でも、筋衛星細胞の増殖能の低下が一因になっていると考えられる。

## 2. 筋芽細胞移植

1990年代前半、近親者から得た筋衛星細胞を培養して増殖させた後、DMD患者の骨格筋へ移植する筋芽細胞移植が行われたが、患者の筋力回復は得られなかった。マウスを用いた実験から、その原因として、①培養した筋衛星細胞（筋芽細胞）では、増殖能、分化能が低下していること、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、などが推察されている。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生着率の低下の原因の一つと推察されている<sup>1)</sup>。一方、マウスの系では、筋衛星細胞の旺盛な筋再生能も示されており、酵素処理して骨格筋組織をばらばらにする従来の筋衛星細胞の調整法が、著しく再生能を損なっているのではないかという報告もなされている<sup>2)</sup>。筋衛星細胞を治療に应用するためには、さらに筋衛星細胞の調整法や、*in vitro*での培養条件を検討していく必要がある。

現在、筋芽細胞移植は、比較的侵されている筋が限局している眼咽頭型筋ジストロフィー（oculo-pharyngeal muscular dystrophy；OPMD）（<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00773227?term=OPMD%E3%80%81myoblasts&rank=1>）、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（fascio-scapulo-humeral muscular dystrophy；FSHD）などに対して行われており、機能が保たれている筋の生検組織から筋芽細胞を調整し、機能低下の著しい筋へ移植する自家細胞移植治療として応用されつつある。

## 3. メソアンギオブラスト（mesoangioblast）

近年、血中や骨格筋組織の間質、血管周囲にも、多能性をもち、筋細胞へ分化する幹細胞が数多くあることが報告されている。代表的なものが血管周囲に存在するペリサイト（pericyte；周皮細胞）やメソアンギオブラストである<sup>3-6)</sup>。筋衛星細胞の筋再生能は非常に高く、筋線維再生において他の細胞に比べて圧倒的に寄与していることは明らかである<sup>2)</sup>。内在性のメソアンギオブラストがどの程度、筋線維の再生に寄与しているかは定かではないが、筋ジストロフィーでは全身の筋が治療の対象であり、局所にしか生着しない筋衛星細胞に対して、経動脈的、経静脈的に骨格筋へ生着し筋線維へ分化すると報告されている幹細胞の利用は

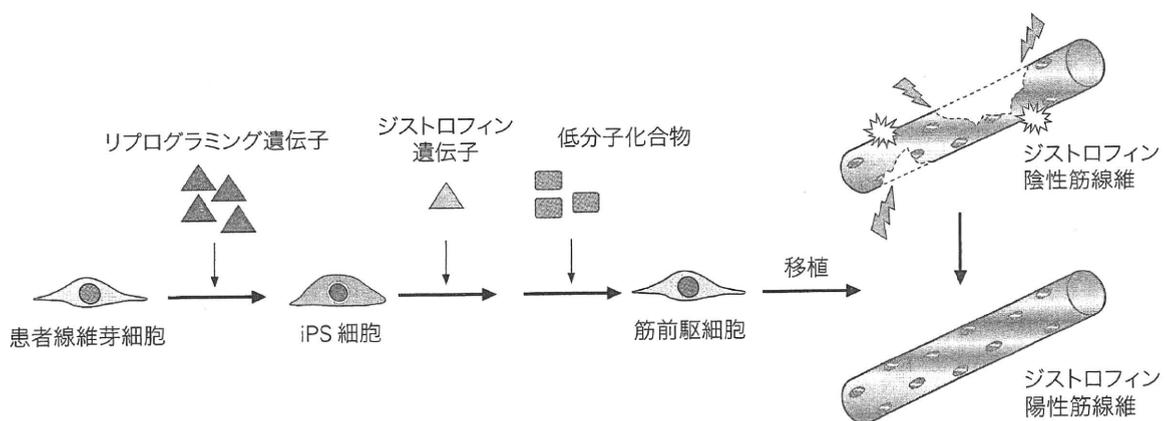


図 2 iPS 細胞を用いた DMD に対する幹細胞移植治療の概念図

患者の体細胞に初期化因子を導入することで iPS 細胞を誘導し、正常なジストロフィン遺伝子を導入後、筋分化を誘導し、患者へ移植する。効率のよい骨格筋系譜への筋分化誘導と、腫瘍形成能をもつ細胞の除去が課題である。

大いに期待される場所である。すでにメソアンギオブラストは、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ることが証明されており<sup>5)</sup>、成体からも調整可能で、イタリアで phase I の clinical trial の準備が行われている。

#### 4. リプログラミング技術による骨格筋幹細胞の誘導—iPS 細胞の筋ジストロフィー治療への応用

2006 年、京都大学の山中らは、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) に類似した性質をもつ人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) を樹立した<sup>7)</sup>。翌年にはヒト線維芽細胞から iPS 細胞が樹立され<sup>8,9)</sup>、2008 年には 6 歳の DMD 患者と 38 歳の Becker 型筋ジストロフィー (DMD の allelic な疾患。軽症で、通常、小型のジストロフィンの発現がある) 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<sup>10)</sup>。患者由来 iPS 細胞は、ヒト人工染色体 (HAC) ベクターを利用した完全長ジストロフィン遺伝子の導入技術と組み合わせることで<sup>11)</sup>、次世代の DMD の自家細胞を用いた細胞移植治療法の細胞源として、期待されている (図 2)。

骨格筋は ES 細胞から誘導されにくい組織の一

つであり、iPS 細胞を筋ジストロフィーの治療に用いる場合においても分化誘導技術の確立が急務である。舌、体幹・四肢の骨格筋の起源は、沿軸中胚葉からできる体節である (図 3)。体節の細胞はこの時期に周囲の組織や器官からさまざまなシグナルを受け取り、筋発生のプログラムを進行させていく。最近、マウス ES 細胞では、*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、効率よくジストロフィンの発現を回復させ、筋収縮力が改善したという報告がなされた<sup>12)</sup>。ヒト iPS 細胞での応用はまだ報告されていないが、将来、ヒト iPS 細胞でも効率よく筋分化誘導する方法が確立されると期待される。われわれは、*Pax3* に代わる低分子化合物を用いて筋細胞系譜への分化誘導を試みている。

#### MyoD によって線維芽細胞を筋細胞へ conversion する方法

MyoD などを用いて線維芽細胞を筋細胞へダイレクトにリプログラミングする方法も試みられている<sup>13)</sup>。MyoD は basic helix-loop-helix 構造をもつ骨格筋特異的転写因子で、非筋細胞に導入すると、強力に骨格筋への分化を誘導する。Kimura ら<sup>13)</sup>は、単離した筋ジストロフィーマウスの線維芽細胞にタモキシフェン制御下で MyoD を発現するカセットと骨格筋特異的なヒト skeletal  $\alpha$ -

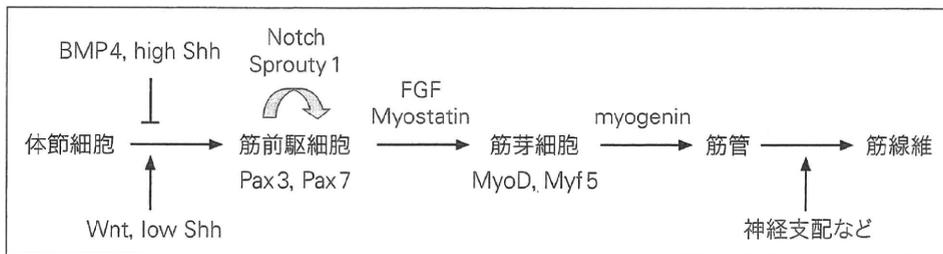
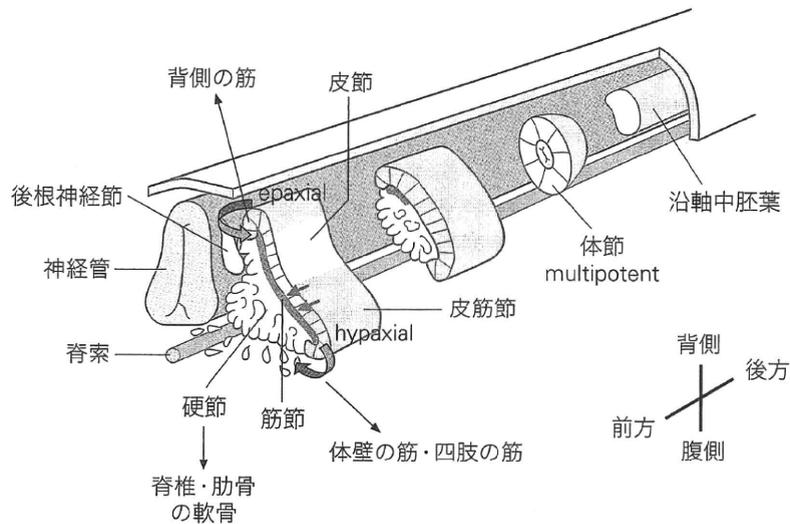


図3 体幹・四肢の骨格筋細胞の発生と分化(主にマウスを用いた研究から)(文献<sup>17,18)</sup>改変)  
 上図: 体節 (somite) は、沿軸中胚葉 (paraxial mesoderm) に由来する中胚葉細胞の塊で、神経管・脊索、側板中胚葉、上皮から分泌される誘導因子 (Shh, Wnt, BMP4, NT3, FGF5 など) に応答している様々な細胞系譜へ分化する。最初 epaxial dermamyotome から細胞が移動してきて初期の筋節 (myotome) ができ、次に hypaxial dermamyotome から細胞が移動してきて筋芽細胞になる。最後に皮筋節 (dermamyotome) から矢印 (←) のように Pax3 陽性、Pax7 陽性の筋前駆細胞が移動してくると考えられている。四肢の筋は hypaxial myotome から細胞が移動していき、筋分化することで形成される。  
 下図: 筋分化と主な制御因子

actin (HSA) のプロモーターの制御下でマイクロジストロフィン遺伝子を発現するカセットをレンチウイルスベクターで導入し、mdx4cv マウス骨格筋へ移植後、タモキシフェンを投与して fibroblast を筋細胞へ分化誘導すると、多くのジストロフィン陽性筋線維が出現することを示した。しかし、多くの移植細胞が間質で小径の筋管を形成していて、既存の筋線維と融合しておらず、融合する割合を高めることが今後の課題である。

### 骨格筋再生促進治療

骨格筋再生には、筋衛星細胞以外のいろいろな細胞の関与が必要である。たとえば、好中球・マクロファージの遊走能や貪食機能が低下すると、

正常な筋再生が起こらない<sup>14)</sup>。また、間質に存在する間葉系細胞も、筋再生時に活性化され、増殖し、いろいろなサイトカインや細胞外マトリックスを産生し、筋衛星細胞の増殖や遊走を促進し、細胞外マトリックスの再構築を行うなど、筋再生を促進する<sup>15)</sup>。一方、筋の変性・壊死が進行し、筋再生がそれに追いつかなくなり、筋線維が減少した状況では同じ細胞がコラーゲンなどを産生し、fibrosis や脂肪化を促進する<sup>16)</sup>。これらの間葉系の細胞の筋再生促進能力を最大限に高めるような薬剤の開発が骨格筋の再生医療の成功に必要である。

## おわりに

多能性幹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、その前に明らかにしていくべき点が多く残されている。特に 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、まだ時間を要すると思われる。生後の筋成長や筋肥大、筋再生に中心的役割を果たす筋衛星細胞の活性化、増殖・分化、自己複製の制御機構の解明を進めることが、再生医療への早道かもしれない。

## 文献

- 1) Mouly V, et al : Myoblast transfer therapy : is there any light at the end of the tunnel?. *Acta Myol* **24** : 128-133, 2005
- 2) Collins CA, et al : Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* **122** : 289-301, 2005
- 3) Minasi MG, et al : The meso-angioblast : a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* **129** : 2773-2783, 2002
- 4) Sampaolesi M, et al : Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* **301** (5632) : 487-492, 2003
- 5) Sampaolesi M, et al : Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* **444** (7119) : 574-579, 2006
- 6) Dellavalle A, et al : Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* **9** : 255-267, 2007
- 7) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** : 663-676, 2006
- 8) Takahashi K, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 861-872, 2007
- 9) Yu J, et al : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318** (5858) : 1917-1920, 2007
- 10) Park IH, et al : Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* **134** : 877-886, 2008
- 11) Hoshiya H, et al : A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4 Mb entire human dystrophin gene. *Mol Ther* **17** : 309-317, 2009
- 12) Darabi R, et al : Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* **14** : 134-143, 2008
- 13) Kimura E, et al : Cell-lineage regulated myogenesis for dystrophin replacement : a novel therapeutic approach for treatment of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **17** : 2507-2517, 2008
- 14) Segawa M, et al : Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res* **314** : 3232-3244, 2008
- 15) Motohashi N, et al : Muscle CD31 (-) CD45 (-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am J Pathol* **173** : 781-791, 2008
- 16) Uezumi A, et al : Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* **12** : 143-152, 2010
- 17) Buckingham M, Vincent SD : Distinct and dynamic myogenic populations in the vertebrate embryo. *Curr Opin Genet Dev* **19** : 444-453, 2009
- 18) Buckingham M, et al : The formation of skeletal muscle : from somite to limb. *J Anat* **202** : 59-68, 2003

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

<JNスペシャル>

## 「治る力」を引き出す 実践! 臨床栄養

編集 東口高志

●AB判 頁312 2010年  
定価3,780円(本体3,600円+税5%)  
[ISBN978-4-260-01030-6]

「どの栄養素を?」「どれだけ?」「どこから?」「どのように?」はもちろん、栄養サポートの基本の「なぜ?」がこの1冊でわかる臨床栄養ガイドの決定版。アセスメントやモニタリングではとくに何をみたらいいのか? 輸液・栄養剤投与を安全確実に実施するには? 合併症やトラブルの予防・対策は? などなど、NST活動のみならず、「毎日の栄養管理」にも役に立つ実践の書です。患者さんの「治る力」「生きる力」を引き出す仕組みをビジュアルに解説しました。