

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.

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もあります。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。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²⁾、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性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³⁾。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

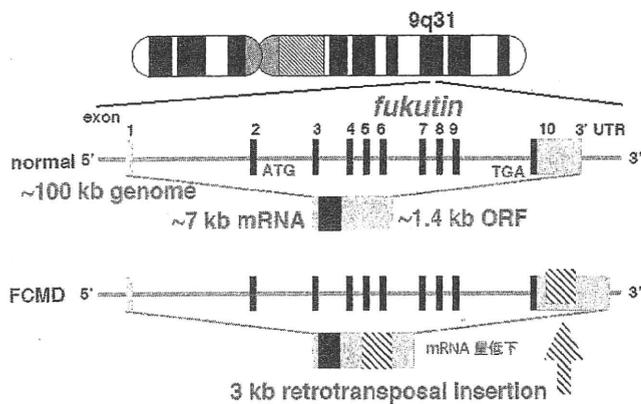


図1 フクチン遺伝子の模式図

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 α 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。

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 α ジストログリカンは、O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)。

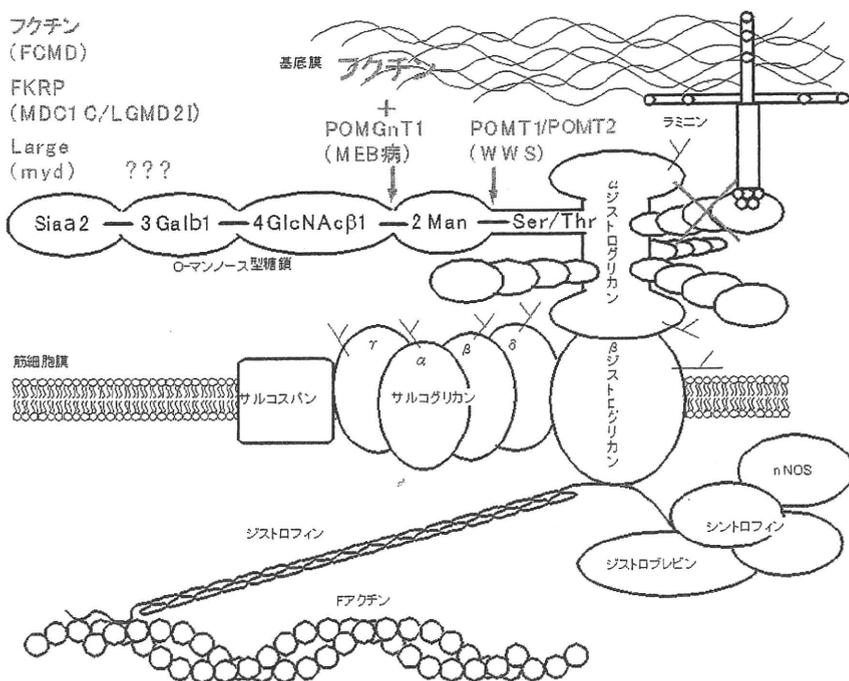
その後、東京都老人研の遠藤先生のグループと我々は、福山型と類似した疾患の筋-眼-脳(MEB)病が、この α ジストログリカンとラミニンの連結部の糖鎖をつくる酵素POMGnT1の異常により発症することを、見出しました⁴⁾。また福山型では α ジストログリカンの糖鎖部分の染色が悪くなりました。その後五月雨式に、Walker-Warburg症候群、先天性筋ジストロフィー1C、1D型、肢帯型筋ジストロフィー2I型などでも同様の異常が発見されました。すなわち α ジストログリカンの糖鎖修飾に異常をきたし、ラミニンなどとの結合が低下し、基底膜と細胞骨格のつながりがこわれるために、筋ジストロフィーがおきるというものです。これらの疾患群を総称して「 α ジストログリカノパチー」とよんでいます(図2)。

治療へのヒント

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 α ジストログリカノパチー

α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 α 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⁹⁾。

更に、LARGEという α 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 α 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⁹⁾(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 α 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 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 α 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

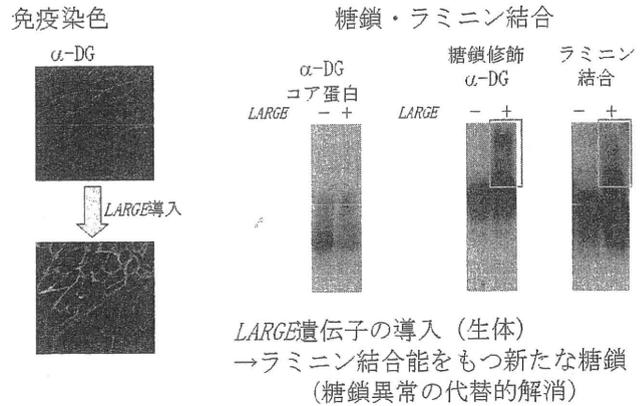


図3 FCMDモデルマウスへのLARGE遺伝子導入アデノウイルスベクターを用いたLARGE遺伝子導入により、FCMDノックインマウスの α ジストログリカンの糖鎖異常が解消できることが明らかになりました。同様の所見は筋-眼-脳(MEB)病モデルマウスでも得られました。

α DG= α 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。

Newsletter

No.7



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はじめました。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存概念の変更には様々な抵抗がつきまといまいます。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

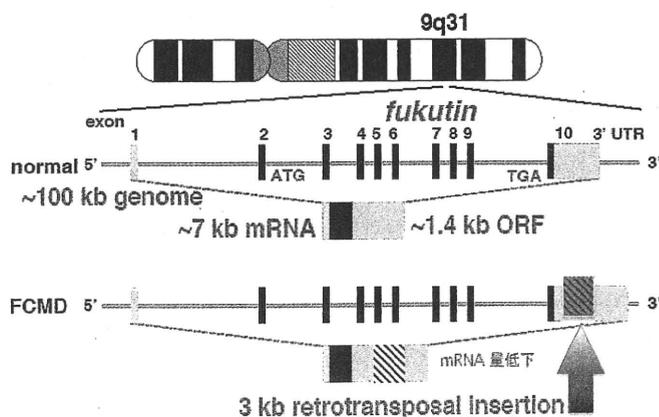


図1 フクチン遺伝子の模式図

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って、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きて、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んな病気が起こってくるということですね。

福山型は、日本ではデユ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。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た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 α 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。

α 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。 α 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 α 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・補酵素といいますか、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ね。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 α 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

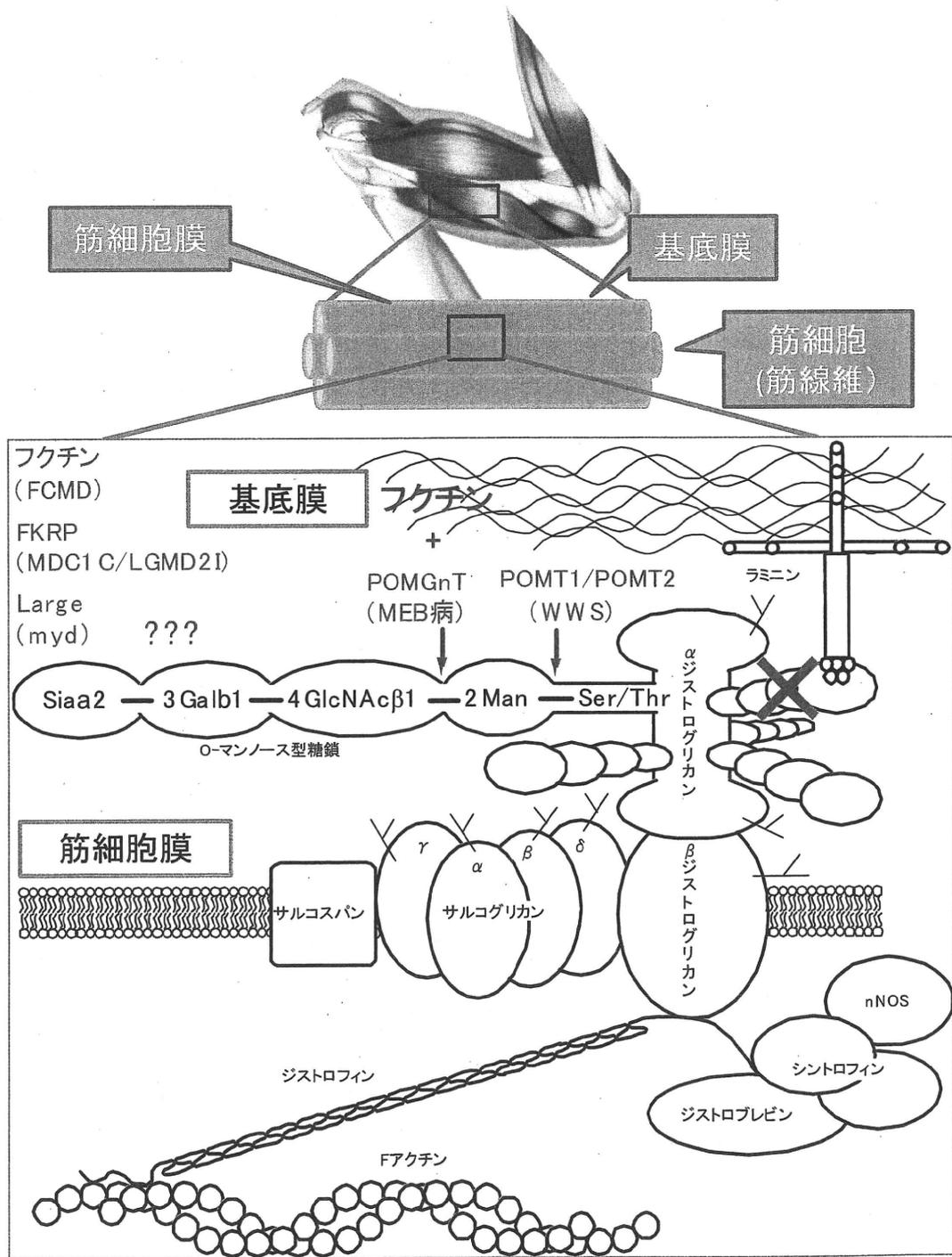


図2 筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体と α ジストログリカノパチー

トログリカン・ α ジストログリカン・ β 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う方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ベクターを使つて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ります。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ょっと

α (アルファ) ジストロフィノパチー (α 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 α と β という蛋白からなっています。 α 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 α 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 α 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ところがありまして、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はありませんが、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よね？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。

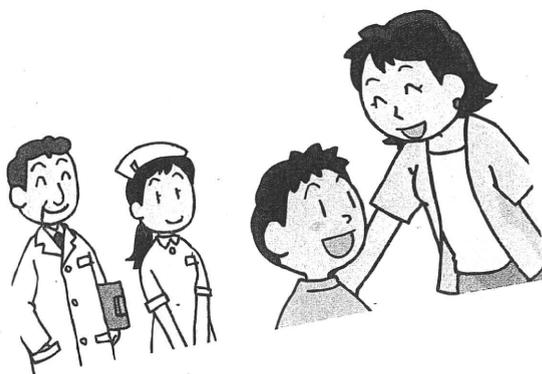
埜中：そうすると、動きも良くなって、社会を見て、知的活動が良くなると二次的な効果というのはありますね。それは朗報ですよ。

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カ月以内(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。

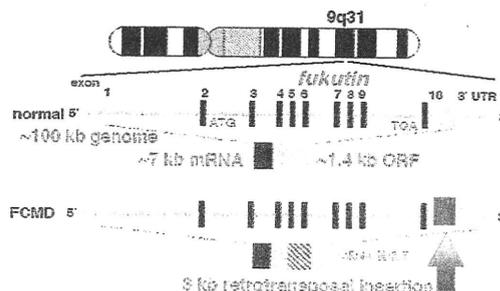


図1 フクチン遺伝子の模式図

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3000塩基対の挿入があって、正常なメッセージRNA しい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 α 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。

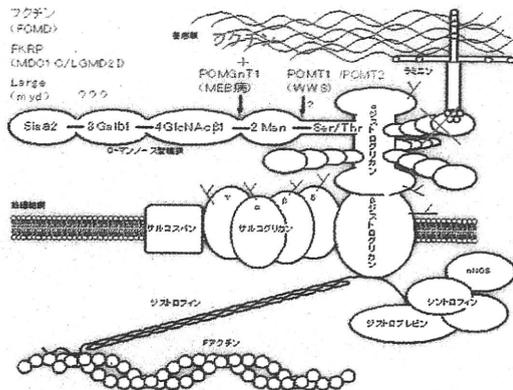


図2 筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体と α ジストログリカノパチー

α 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 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 α 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・脳病 (muscle-eye-brain: MEB) が、この 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ました。また福山型では α 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 α 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「 α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 α 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、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 α 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。

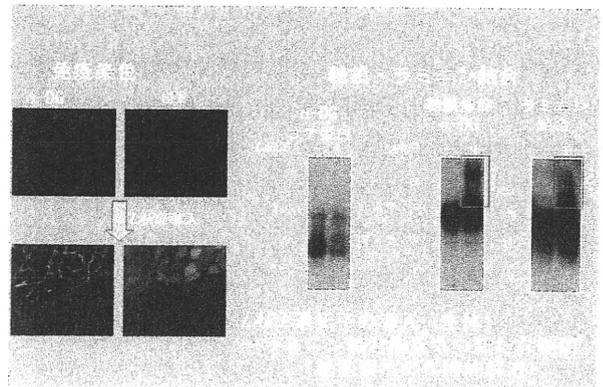


図3 FCMD モデルマウスへの LARGE 遺伝子導入

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 ノックアウトマウスの α 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。 α DG= α ジストログリカン

抗マイオスタチン療法

Anti-myostatin therapy against muscular dystrophy



砂田 芳秀

Yoshihide SUNADA

川崎医科大学神経内科学教室

◎マイオスタチンは TGF- β ファミリーに属する骨格筋形成抑制因子で、個体の骨格筋量を負に調節している。この遺伝子に変異をもつ家畜やヒト、遺伝子ノックアウトマウスではこの抑制が解除されるため、骨格筋量が著明に増大する。筋ジストロフィーモデル *mdx* マウスに中和抗体を投与したところ、ジストロフィー病理変化と筋力が改善したことから、抗マイオスタチン療法は新規治療法として注目されてきた。欧米ではヒト抗体 MYO-029 の第Ⅱ相試験が行われ、安全性が確認された。抗体療法以外にも阻害結合蛋白や可溶性受容体蛋白、受容体阻害薬、siRNA など多様な抗マイオスタチン療法の開発が進んでいる。筋ジストロフィー治療以外にも、ステロイドミオパチーや高齢者における骨格筋減少症(sarcopenia)などに対して有効性が期待される。



Key word

筋ジストロフィー、マイオスタチン、TGF- β ファミリー、カベオリン

● マイオスタチン：

骨格筋量の抑制性調節因子

マイオスタチン(myostatin)は骨格筋特異的に発現する TGF- β ファミリー分子で、1997年に Se-Jin Lee 博士らにより degenerative PCR を用いてクローニングされた¹⁾。当初 GDF-8 と命名された新規分子の機能はわかっていなかったが、作出されたノックアウトマウスでは骨格筋量が驚くほど増大したことから、骨格筋の増殖を強力に抑制する因子であることがわかった¹⁾。以前からヨーロッパでは筋肉量が増大した肉牛(Belgian Blue, Piedmontese)やヒツジ(Texel)などの家畜が知られていたが、こうした家畜のマイオスタチン遺伝子を調べてみるといろいろな変異が発見された²⁻⁴⁾。さらに2005年には、マイオスタチン遺伝子変異をもつ男児も報告された⁵⁾。この男児は新生児のころから筋肉がよく発達していて、5歳にして3kgのダンベルを水平挙上できたという。いまのところ、体脂肪の少ない筋肉質の体形であること以外には知能の発達や心臓機能にも問題はないようである。このようにマイオスタチンはヒトにおいても

骨格筋量を抑制的に調節していることが明らかになってきた。

マイオスタチンが骨格筋形成を抑制する作用機序はアポトーシスによるものではなく、G1期→S期への細胞周期のブロックによることが明らかにされている。すなわち、マイオスタチンはC2C12筋芽細胞においてサイクリン依存性キナーゼ2(cdk2)の発現を抑制するとともに、その阻害因子p21の発現を誘導する⁶⁾。したがって、マイオスタチンノックアウトマウスの骨格筋過形成(hyperplasia)は筋芽細胞の増殖規制が解除された結果と考えられる。一方、成獣においてもマイオスタチンを阻害すると筋線維が肥大するが、この場合の標的は筋衛星細胞であると考えられている⁷⁾。また、マイオスタチンは間葉系細胞の運命決定にも関与しており、筋芽細胞への分化を阻害し脂肪細胞への分化を促進する⁸⁾。

● マイオスタチンの生合成と活性化、細胞内シグナル伝達機構

マイオスタチンは骨格筋で産生され、分泌され

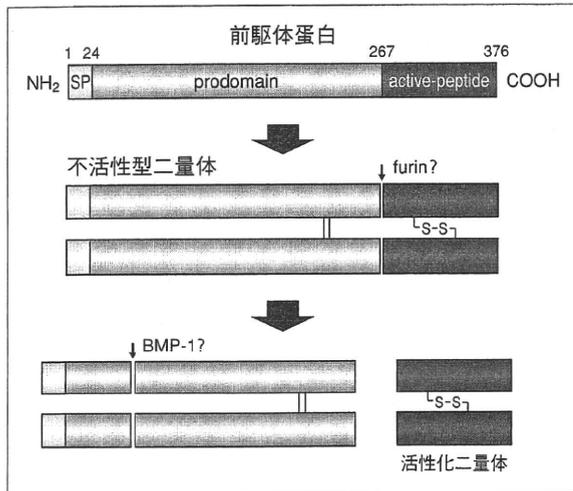


図1 マイオスタチンの生成と活性化の分子機構
 プロドメインを含む前駆体蛋白として合成され、不活性型二量体となるが、プロセッシングを受けて活性化二量体がリリースされる。

るが、多くの TGF- β ファミリー分子と同様に、いったん 50kDa の前駆体蛋白として合成された後、N 末端側 2/3 を占めるプロドメイン(プロペプチドともよばれる)が切り離されて、C 末端側 1/3 に相当する 26kDa の活性ペプチド二量体が形成される(図 1)。この活性化二量体は細胞膜受容体に結合してマイオスタチンシグナルが細胞内へと伝達される。一般に TGF- β 受容体はタイプ I 型とタイプ II 型からなるヘテロ二量体構造をとるが、マイオスタチン活性化二量体はまず II 型受容

体(ActR II B あるいは II A)に結合する。ついで I 型受容体(ALK4 あるいは ALK5)がリン酸化されると、これが細胞内エフェクター分子である Smad をリン酸化し、リン酸化された Smad は核内へ移行して標的遺伝子の転写調節領域に結合する。こうして種々の標的遺伝子の発現が制御された結果、骨格筋形成が抑制されると考えられている(図 2)。一方、ActR II B 活性化は MAPK 経路を介して、AKT や p21/Rb 経路の活性化や MyoD を含む muscle regulatory factors (MRFs) の抑制も引き起こすと考えられている。

マイオスタチンは骨格筋量およびエネルギー代謝のホメオスタシス維持にきわめて重要な Key 分子であり、その活性化やシグナル量は生体内で厳密に制御されているはずであるが、その制御機構の全貌はいまだに解明されていない。著者らは肢帯型筋ジストロフィーの原因蛋白であるカベオリン-3 が II 型受容体に結合すると、そのリン酸化を阻害してマイオスタチンシグナルの細胞内への伝達を抑制的に制御していることを明らかにした⁹⁾。したがって、カベオリン-3 が欠損する筋ジストロフィーではマイオスタチンシグナルが過剰になり、筋萎縮を生じる一因になっていると考えられる(図 3)。

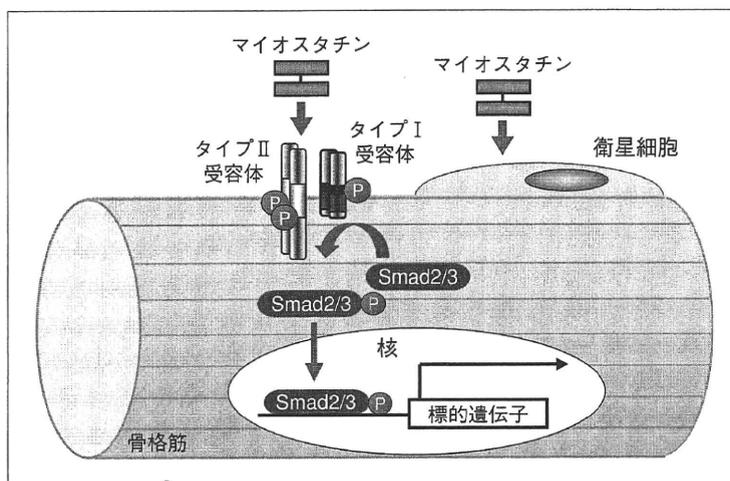


図2 マイオスタチン受容体と細胞内シグナル伝達
 活性化二量体が細胞膜受容体(II型およびI型受容体のヘテロ二量体)に結合すると、リン酸化した受容体が細胞内エフェクター分子 Smad2/3 をリン酸化する。これが核内に移行し、標的遺伝子の転写を調節する。

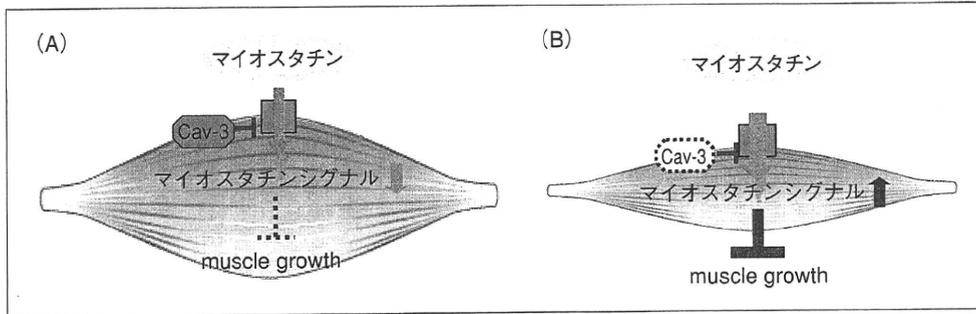


図 3 カベオリン-3(Cav-3)によるマイオスタチンシグナルの制御機構

種々のシグナル分子の足場蛋白であるカベオリンは、マイオスタチン受容体に結合するとそのリン酸化を抑制することによりマイオスタチンシグナルをネガティブに制御している(A)。カベオリン-3欠損による肢帯型筋ジストロフィーでは、この制御機構の破綻により筋萎縮が生じると推測される(B)。

● 抗マイオスタチン抗体による筋ジストロフィー治療

WagnerらはDuchenne型筋ジストロフィーモデルである*mdx*マウスとマイオスタチンノックアウトマウスとの交配により、マイオスタチンを欠損させた*mdx*マウスをつくりだした¹⁰⁾。骨格筋重量・骨格筋収縮力とも有意に増加し、骨格筋病理像においてもジストロフィー変化に改善がみられたことを報告した。さらに2002年、Bogdanovichらはマイオスタチン中和抗体を*mdx*マウスに腹腔内投与することで、同様の治療効果が得られたことを報告した¹¹⁾。これを契機に抗マイオスタチン療法があらたな筋ジストロフィー治療法として世界的に注目されるようになった。

ジストロフィン欠損マウス以外にも、肢帯型筋ジストロフィーモデルである δ -サルコグリカン欠損マウスとメロシン欠損先天性筋ジストロフィーモデルである*dy*マウスに対しても、マイオスタチン中和抗体の投与が行われている。 δ -サルコグリカン欠損マウスにおいては、発症早期に投与した場合には有効であったが、発症後時間が経過した成獣では効果がみられなかった¹²⁾。一方、*dy*マウスでは骨格筋量は増加したものの、脂肪量が過度に低下したため全身状態が悪化した¹³⁾。したがって、マイオスタチン阻害療法はすべてのタイプの筋ジストロフィーに効果があるわけではなく、将来の臨床応用に際してはどのような病態あるいは病型に適応となるかさらに検討する必要がある。

欧米ではWyeth社が開発したヒト型マイオスタチン阻害抗体(MYO-029)の臨床治験が行われた¹⁴⁾。Becker型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー患者、合計116例を対象として、プラセボと4段階の用量設定でI/II相試験が行われ、安全性には大きな問題がないことがわかった。全体としては徒手筋力テストや筋MRI検査では有意な改善はみられなかったが、なかには筋サイズが増加し、筋病理所見に改善がみられた患者もいたという。今後は小児のDuchenne型筋ジストロフィーにも適応を拡大した治験が開始される見込みである。

● 多様なマイオスタチン阻害戦略

マイオスタチンを阻害する方略としては中和抗体以外にもいろいろな戦略が考えられる。著者らの研究グループを含めて、世界中の研究室や製薬企業で開発競争にしのぎが削られている。

1. プロドメイン

マイオスタチン前駆蛋白のN末端側2/3を占めるプロドメイン部分は活性化二量体に結合し、受容体との結合を阻害することが知られている。徳島大学の野地らのグループはプロドメインだけを過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、骨格筋量が著明に増加することを確認している¹⁵⁾。また、精製されたプロドメインを正常マウスに投与すると筋量増大効果を呈し、さらに*mdx*マウスに投与しても中和抗体と同等以上のジストロフィー変化改善効果が報告されている¹⁶⁾。また、

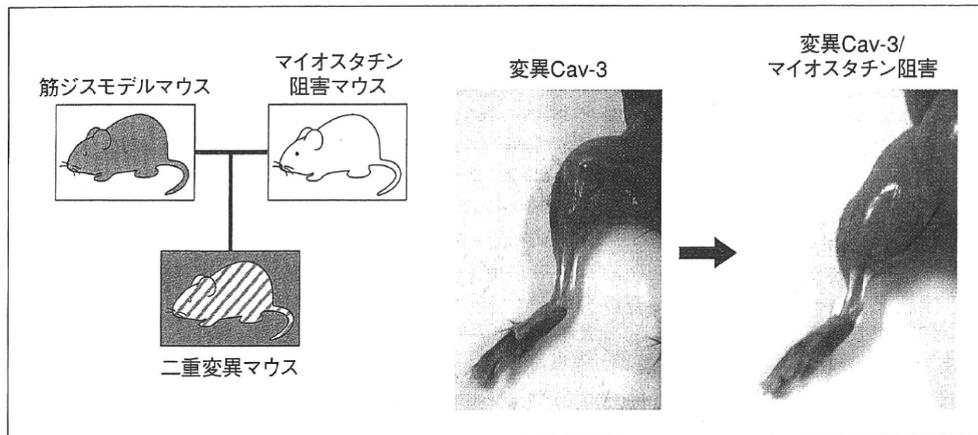


図 4 マイオスタチン阻害による肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスの治療効果
 カベオリン-3 欠損マウス(肢帯型筋ジストロフィーモデル)とマイオスタチン阻害マウスを
 交配して作出した二重変異マウスにおいて、マイオスタチン阻害の顕著な治療効果がみられた。

肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスにウイルスベクターを用いてプロドメインを導入しても治療効果が報告されている¹⁷⁾。

著者らは変異カベオリン-3 マウスに遺伝交配によりプロドメイン遺伝子を導入し、治療効果を検討したが、筋萎縮はほぼ野生型マウス同等に回復し、筋力や運動能力も著明に改善した(図 4)⁶⁾。プロドメインが中和抗体を上まわる治療効果を発揮する機序のひとつとして、活性化マイオスタチン二量体以外にもマイオスタチン類似の TGF- β ファミリー分子(GDF-11 など)にも結合して活性を阻害するためではないかと考えられている。

2. フォリスタチン改変体

フォリスタチンはマイオスタチンに直接結合してその作用を阻害する生体内分子である。Lee と McPherron は骨格筋特異的にフォリスタチンを過剰発現するマウスを作製したが、驚くべきことに骨格筋量は 3.27 倍に増加し、マイオスタチン遺伝子をノックアウトした場合を上まわった¹⁸⁾。このことから、フォリスタチンはマイオスタチン以外の筋肉抑制因子の作用も阻害する可能性が示唆される。ところが、フォリスタチン過剰発現マウスではおそらくアクチビンも阻害されて生殖能が失われるため、フォリスタチン自体を治療に用いることはできない。

そこで、土田らはフォリスタチン分子を改変し、マイオスタチンを選択的に阻害する変異体を創製した¹⁹⁾。このフォリスタチン改変体分子 FSI-I を

過剰発現するマウスを作出したところ、顕著な骨格筋量の増加がみられた。骨格筋での遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイで解析すると、ミトコンドリアで脂肪酸代謝に関与するカルニチンパルミトイル転移酵素-1(CPT-1)が顕著に上昇していた。ついで、この FSI-I マウスを *mdx* マウスと交配して筋ジストロフィー治療効果を解析したところ、FSI-I/*mdx* マウスでは筋線維径が増大するとともに、*mdx* マウスでみられる筋線維径の大小不同の程度が改善していた。また、細胞浸潤や線維化にも明らかな改善傾向が観察され、機能的にはグリップ試験で正常マウスと同等の筋力の回復効果も確認されている¹⁶⁾。

3. 可溶化受容体

受容体レベルでマイオスタチンシグナルを抑制する方法のひとつに受容体の不活化が考えられる。Lee と McPherron は II 型受容体 ActRIIB の細胞内 kinase domain を欠失させたドミナントネガティブ型受容体を設計してマウスで過剰発現させた。その結果、骨格筋量は有意に増加し、ドミナントネガティブ型受容体が治療応用できる可能性が示された¹⁵⁾。そこで、II 型受容体分子のリガンド結合部位を有する細胞外ドメインだけからなる可溶化ドミナントネガティブ受容体を精製し、*mdx* マウスに腹腔内投与したところ、わずか 5 回の投与で有意に骨格筋量が増大した²⁰⁾。著者らも同じ可溶化受容体を変異カベオリン-3 マウスに同じプロトコールで投与してみたが、やはり顕著

な改善がみられた⁹⁾。

4. 低分子受容体阻害薬

低分子阻害薬で細胞膜受容体を不活化する戦略である。こうした分子標的療法はすでに白血病や肺癌の治療に臨床応用されている。ただし、現在臨床応用されているのはチロシンキナーゼ型受容体の阻害薬であるのに対して、マイオスタチン受容体はセリン・スレオニンキナーゼ型である。セリン・スレオニンキナーゼ型受容体阻害薬はすでに何種類かの低分子医薬品が開発されており、前立腺癌、肝硬変、尋常性乾癬などに対して臨床応用が検討されている。

著者らは HEK293 培養細胞でのルシフェラーゼ転写活性アッセイ系を用いて、入手可能であった3種類のセリン・スレオニンキナーゼ阻害薬のマイオスタチン阻害活性を調べた。そのなかでもっともマイオスタチン阻害活性の高い化合物は阻害特異性も高いことがわかり、これを10週間にわたって変異カベオリン-3 マウスに経口投与した。投与6週目から非投与群との間に体重増加に有意差が現れ、10週後には骨格筋重量は1.2~1.3倍に増加した。血清中のマイオスタチン活性はほぼ完全に抑制されており、骨格筋においてはマイオスタチンの標的遺伝子である p21 の mRNA 発現が顕著に抑制されていることが確認された(論文投稿中)。長期投与によるめだつた副作用はみられなかったことから、臨床応用も可能ではないかと考えられる。

5. siRNA

最近、さまざまな疾患の治療法として、RNA 干渉法(RNAi)を用いた遺伝子サイレンシングが注目されている。Artaza らは、C3H10T(1/2)細胞で RNAi でマイオスタチン活性を抑制すると筋細胞へ分化誘導できることを示した⁸⁾。さらに、ニワトリの胎仔筋芽細胞初代培養系に siRNA を添加すると筋管細胞への分化が促進することが示された²¹⁾。C 末端 active peptide に相当する dsRNA をゼブラフィッシュに注射すると body mass が増加し、筋の過形成と肥大が生じることが報告された²²⁾。野地らはマイオスタチンの siRNA を設計し、それをアテロコラーゲンという担体と混和してマウス骨格筋に局所投与して骨格筋を肥大させ

ることに成功した²³⁾。肥大した筋ではマイオスタチンの蛋白発現が抑制されていることを確認した。さらに驚くべきことに、眼窩静脈からの全身投与によっても全身性の筋肥大が生じた²¹⁾。この結果は効率よく siRNA が筋細胞内に移行することを示唆しており、今後 siRNA の全身投与による筋ジストロフィー治療の可能性がでてきた。

● 今後の展望と問題点

上述したように、さまざまなアプローチによるマイオスタチン阻害療法の開発が進展しつつあるが、実際の臨床応用までにはいくつかの解決すべき問題点もある。

まず、筋ジストロフィーのどの病型に適応があるかを明らかにする必要がある。実験動物モデルを用いた研究では抗マイオスタチン療法が有効である病型が多く報告されているが、メロシン欠損先天性筋ジストロフィーモデルである *dy* マウスでは脂肪量減少のため生命予後の悪化が報告されている。また、どのタイミングで抗マイオスタチン療法を開始するのが適当なのか、よく検討する必要もある。サルコグリカノパチーモデルマウスでは進行期中に中和抗体を投与しても治療効果はなかったと報告されている。マイオスタチン活性を阻害すると筋基底膜直下に局在する筋衛星細胞が活性化し、筋再生が促進されると考えられているが、長期にわたって抗マイオスタチン療法を継続していると筋衛星細胞が枯渇し、結果的には病状が進行することも懸念される。マイオスタチン阻害によりたしかに筋線維は肥大するが、ジストロフィン欠損筋では太い筋線維ほど障害されやすいともいわれている。ジストロフィン欠損筋を肥大させることの是非についてはさらに詳細な検討が必要とされる。また、マイオスタチン変異をもった動物は筋肉量は増えるが、疲労しやすいともいわれている。これはマイオスタチンが主としてタイプ2線維(いわゆる速筋)に作用するためであると考えられている。また、マイオスタチン阻害により骨格筋のミトコンドリアが減少するという報告と増加するという報告があり、この点についてもさらに検討する必要がある。

いずれにせよ、抗マイオスタチン療法は筋ジス

トロフィーの遺伝子欠損に対する根本的治療法ではなく、共通したジストロフィー変化の分子病態に介入する“支持療法”と理解するべきである。したがって、遺伝子治療や幹細胞移植治療と併用すると相乗効果が期待される。

● その他の神経筋疾患への応用

筋ジストロフィー以外のミオパチーの治療においても抗マイオスタチン療法の有効性が期待されている。ステロイドミオパチーにおいては骨格筋でマイオスタチンの発現が上昇しており、筋萎縮への関与が推定されることから²⁴⁾、抗マイオスタチン療法が有効であると思われる。また、マイオスタチン阻害は、脂肪酸のミトコンドリアへの輸送をつかさどる CPT-1 の発現を増加させることから、脂肪酸輸送系やβ酸化酵素系障害によるミオパチーにも治療効果が期待される¹⁹⁾。

骨格筋はインスリンの標的臓器でもあり、肥満や糖尿病の病態生理にも重要や役割を果たしている。マイオスタチン阻害により骨格筋量が増加するとともに体脂肪量は低下する。レプチンの低下や脂肪分化に必須の転写因子 C/EBPα や PPARγ の発現低下が報告されている²⁵⁾。肥満・2型糖尿病マウスである KKAy マウスや ob/ob マウスでマイオスタチンを欠損させると、脂肪が筋肉に置き換わった体型になり、肥満や糖代謝の改善がみられる²⁶⁾。

さらに、老化によって起こる筋量低下(sarcopenia)は、高齢者の ADL 低下とそれに伴う合併症や介護負担の増加と密接に関連している。抗マイオスタチン療法により高齢者の sarcopenia が改善されれば、介護負担の軽減に大きな意義を有すると思われる。

文献

- 1) McPherron, A. C. et al. : *Nature*, **387** : 83-90, 1997.
- 2) Grobet, L. et al. : *Nat. Genet.*, **17** : 71-74, 1997.
- 3) Kambadur, R. et al. : *Genome Res.*, **7** : 910-916, 1997.
- 4) Clop, A. et al. : *Nat. Genet.*, **38** : 813-818, 2006.
- 5) Schuelke, M. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **350** : 2682-2688, 2004.
- 6) Thomas, M. et al. : *J. Biol. Chem.*, **275** : 40235-40243, 2000.
- 7) McCroskery, S. et al. : *J. Cell Biol.*, **162** : 1135-1147, 2003.
- 8) Artaza, J.N. et al. : *Endocrinology*, **146** : 3547-3557, 2005.
- 9) Ohsawa, Y. et al. : *J. Clin. Invest.*, **116** : 2924-2934, 2006.
- 10) Wagner, K.R. et al. : *Ann. Neurol.*, **52** : 832-836, 2002.
- 11) Bogdanovich, S. et al. : *Nature*, **420** : 418-421, 2002.
- 12) Parsons, S.A. et al. : *Am. J. Pathol.*, **168** : 1975-1985, 2006.
- 13) Li, Z. F. et al. : *Am. J. Pathol.*, **166** : 491-497, 2005.
- 14) Wagner, K.R. et al. : *Ann. Neurol.*, **63** : 543-545, 2008.
- 15) Nishi, M. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293** : 247-251, 2002.
- 16) Bogdanovich, S. et al. : *Faseb. J.*, **19** : 543-549, 2005.
- 17) Bartoli, M. et al. : *Gene Ther.*, **14** : 733-740, 2007.
- 18) Lee, S. J. and McPherron, A. C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** : 9306-9311, 2001.
- 19) Nakatani, M. et al. : *Faseb. J.*, **22** : 477-487, 2008.
- 20) Lee, S. J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** : 18117-18122, 2005.
- 21) Sato, F. et al. : *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291** : C538-C545, 2006.
- 22) Acosta, J. et al. : *J. Biotechnol.*, **119** : 324-331, 2005.
- 23) Kinouchi, N. et al. : *Gene Ther.*, 2008. (Epub ahead of print)
- 24) Schakman, O. et al. : *J. Endocrinol.*, **197** : 1-10, 2008.
- 25) Lin, J. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291** : 701-706, 2002.
- 26) McPherron, A. C. and Lee, S. J. : *J. Clin. Invest.*, **109** : 595-601, 2002.

* * *

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はなく、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を越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Ca²⁺イオンの透過性亢進、膜修復機構の異常、筋内血管拡張障害説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 α 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, α -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, タイチン, 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Ca²⁺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 α -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Ca²⁺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Ca²⁺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Ca²⁺濃度を測定した¹⁾。ジストロフィン欠損心筋細胞では伸長により細胞内へCa²⁺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Ca²⁺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²⁾は、ストレッチ感受性イオンチャンネルであるTRPV2がCa²⁺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Ca²⁺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チ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³⁾。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Ca²⁺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、Ca²⁺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⁴⁾。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⁵⁾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⁶⁾。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⁷⁾。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