

**Fig. 4.1** Mechanical load and muscle hypertrophy. Stretching of myofibers activates sarcolemmal stretch-activated channels (SACs), disrupts the cytoplasmic membrane, starts a cascade of anabolic signal transduction, and through activation of mTOR increases its mass and contractile force. Active muscle contraction also activates the Akt/mTOR pathway. The sarcomere structure might work one of the sensors of muscle contraction, and convert the mechanical information into biochemical signals. Several studies suggest that a variety of mechanical information converge on mTOR, which in turn activates downstream targets (S6K, 4E-BP1, or PGC-1 $\alpha$ ) to adapt the mechanical load. Note that some parts are not fully supported by experimental evidence

ablation of the gene in skeletal muscle would greatly accelerate the elucidation of the role of SACs in mechanotransduction in skeletal muscle, and would help develop pharmacological intervention of disuse-related muscle atrophy.

#### 4.2.4 Neuronal Nitric Oxide Synthase and Mechanotransduction

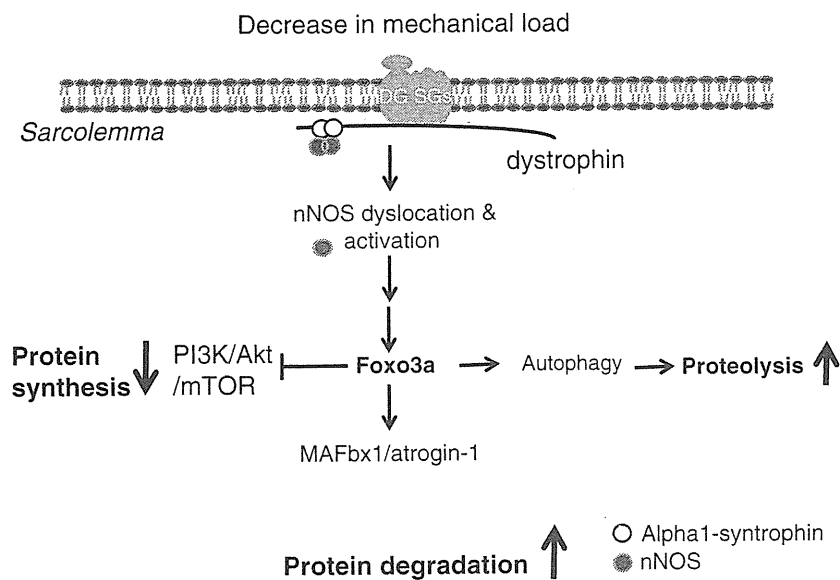
Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is a peripheral member of the dystrophin-glycoprotein complex at the sarcolemma (Brenman et al. 1996), and especially concentrated at myotendinous junctions, which are specialized for force transduction across the muscle cell membrane (Chang et al. 1996). The expression and activity

of nNOS are upregulated by exercise (Roberts et al. 1999), mechanical loading, electrical stimulation of muscle, and passive stretching (Reiser et al. 1997; Tidball et al. 1998). Criswell and co-workers reported that inhibition of NOS by L-NAME (a wide inhibitor of NOS) during functional overload attenuated the increase of muscle mass and fiber-type transition (Smith et al. 2002; Soltow et al. 2006). The same group further showed that NO upregulated contractile protein mRNAs including  $\alpha$ -actin and type 1 myosin heavy chain (Sellman et al. 2006). Steensberg et al. reported that L-NAME treatment inhibited exercise-induced mRNA expression of IL-6, HO-1 and PDK4 (Steensberg et al. 2007). Tidball et al. showed that talin and vinculin mRNA expressions induced by mechanical stimulation are mediated by NO (Tidball et al. 1999). Koh and Tidball showed that NO positively modulates sarcomere addition in immobilized–remobilized muscles (Koh and Tidball 1999). Together, these data strongly suggest that nNOS plays an important role in mechanotransduction in skeletal muscle.

Nitric oxide (NO) gas is reported to be released from myofibers when myofibers are stretched *in vitro*, and activate satellite cells via release of HGF (Tatsumi et al. 2002). Furthermore, Tatsumi et al. demonstrated that stretching of myofibers *in vivo* indeed activates satellite cells via production of NO (Tatsumi et al. 2006). The nitric gas is supposed to be generated by nNOS. Together, these findings suggest that the mechanosensor in skeletal muscle is directly or indirectly linked with nNOS and activate nNOS when the fibers are stretched. Alternatively, nNOS itself might sense the change in mechanical stimuli and be activated.

#### 4.2.5 *nNOS and Unloading*

Suzuki et al. recently reported that nNOS acts as an upstream regulator of forkhead box O (FoxO) transcription factors in unloading-induced muscle atrophy (Suzuki et al. 2007) (Fig. 4.2). The study showed that during hind limb suspension, nNOS was lost from the sarcolemma, and cytoplasmic nNOS produced high levels of NO and activated FoxO3a, which in turn upregulated MuRF-1 and atrogin-1/MAFbx, two major muscle-specific E3 ligases. Although the data suggest that nNOS is a mediator of mechanotransduction in skeletal muscle, the mechanism by which nNOS is activated remains unknown. It is also still to be determined how NO gas activates FoxO transcription factors. One possibility is that NO controls FoxO transcription factors via S-nitrosylation. NO reacts with thiol of protein cysteine residues to form S-nitrosothiol. This posttranslational modification affects the functions of a wide range of proteins, and regulates protein–protein interactions and DNA-binding activity of transcription factors (Hess et al. 2005). Recent studies show that FoxO transcription factors are necessary and sufficient for induction of autophagy in skeletal muscle (Mammucari et al. 2007; Zhao et al. 2007). Whether nNOS activates the autophagy–lysosome system through activation of FoxO3a in unloaded muscle is to be determined.



**Fig. 4.2** A mechanism by which an unloaded signal activates nNOS and promotes muscle atrophy (hypothetical). In skeletal muscle, a major fraction of nNOS exists as a member of the dystrophin-glycoprotein complex at the sarcolemma. nNOS interacts directly with  $\alpha$ 1-syntrophin through its N-terminal PDZ domain. In unloading condition, nNOS is lost from the sarcolemma, and cytoplasmic nNOS is activated, produces nitric oxide and activates FoxO3a transcription factor (Suzuki et al. 2007). FoxO3a activates the ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis and autophagy. How nNOS is activated and how it activates FoxO3a transcription factor remain to be determined in a future study

#### 4.2.6 *Phospholipase D and Phosphatidic Acid*

Hornberger et al. showed that mechanical stimulation causes phospholipase D (PLD)-dependent increase in phosphatidic acid (PA), which binds to mTOR in the FRB domain and activates mTOR signaling (Hornberger et al. 2006). Although the observation is exciting, it remains to be determined whether elevation of PA concentration is necessary and sufficient for mechanical load-induced muscle hypertrophy.

#### 4.2.7 *Integrins/FAK Signaling and Mechanotransduction*

The mechanical signal may be partly transmitted by focal adhesion complexes (FACs) in skeletal muscle. FACs connect cytoskeletal proteins to the extracellular matrix and therefore transmit force across the cell membrane. Beta-1 integrin in FACs is bound by focal adhesion kinase (FAK) and paxillin (Carson and Wei 2000; Flück et al. 1999). Mechanical loading on skeletal muscle results in phosphorylation of FAX or paxillin (Gordon et al. 2001). Furthermore, FAK is shown to affect

activation of Akt/mTOR independent of PI3K activity in fibroblasts (Xia et al. 2004). At present, however, there is no direct evidence that integrin/FAK signaling activates protein synthesis in mechanically stimulated skeletal muscle.

#### ***4.2.8 Sarcomere and Mechanotransduction***

The sarcomere is a candidate mediator of mechanical transduction. The M-band is proposed to be a hub mainly for protein kinase-regulated ubiquitin signaling and protein turnover, and the I-band and Z-disk contain stretch-sensitive pathways involving transcriptional modifiers (Gautel 2008). It is highly likely that signals from the sarcomere modify mass and contractile properties of overloaded muscle.

#### ***4.2.9 Growth Factors and Overload***

It has been suggested that a number of cytokines, including LIF (Spangenburg and Booth 2006), IGF-1 (Rommel et al. 2001; Ohanna et al. 2005), or a variant of IGF-1 termed mechano-growth factor (MGF) (Goldspink et al. 2008), are produced locally in overloaded muscle, and contribute to muscle hypertrophy. Since these cytokines activate the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway, mechanical loading is thought to induce the muscle hypertrophy, through production of growth-promoting autocrine/paracrine factors. For example, IGF-1 is shown to be a potent activator of the Akt/mTOR signaling pathway (Adams 2002; Glass 2005), and forced overexpression of IGF-1 in skeletal muscle increased muscle mass (Musarò et al. 2001; Barton 2006). If so, is IGF-1 production a trigger of overload-induced muscle hypertrophy? Upregulation of IGF-1 is, however, observed between 24 and 72 h after the onset of the mechanical load on muscle, whereas Akt/mTOR is activated a few hours after the onset of mechanical load. Furthermore, a recent study using transgenic mice expressing a dominant negative IGF-I receptor, suggested that IGF-1 signaling is dispensable in mechanical load-induced skeletal muscle hypertrophy (Spangenburg et al. 2008). Therefore, although IGF-1 would augment the hypertrophy by accelerating protein synthesis, it is not likely the trigger of increased protein synthesis. In contrast, the loss of leukemia inhibitory factor (LIF) is reported to result in a failed hypertrophic response after mechanical loading (Spangenburg and Booth 2006). The mechanisms by which LIF promotes muscle hypertrophy process remain to be determined.

### **4.3 Signaling Pathways in Mechanotransduction**

Although how mechanical stimuli are converted into biochemical events in skeletal muscle remains to be determined, several downstream signaling pathways are shown to be involved in the mechanotransduction.

### ***4.3.1 mTOR Is a Key Signaling Molecule for Mechanical Overload-Induced Muscle Hypertrophy***

How mechanical loading on skeletal muscle activates the Akt/mTOR signaling pathway remains largely unknown. Nonetheless, the importance of mTOR in mechanical load-induced hypertrophy was generally accepted due to the findings that rapamycin administration (a potent and selective inhibitor of mTOR) completely abolished the hypertrophy under overload conditions (Bodine et al. 2001; Hornberger et al. 2003; Bodine 2006).

mTOR activates p70S6K (ribosomal protein kinase S6) and 4E-BP1. p70S6K phosphorylated by mTOR, increases the translation of mRNAs with a 5'-tract of pyrimidine, which is contained in all known ribosomal proteins. 4E-BP1 regulates the initiation of protein synthesis by sequestering eIF4E. When phosphorylated, 4E-BP1 releases eIF4E, which in turn complexes with eIF4G and eIF3 and initiates translation (Rennie et al. 2004). Once again, we emphasize that we have a very limited understanding of how physical loading of the muscle fibers activates the mTOR signaling pathway.

### ***4.3.2 Unload (Inactivity or Disuse) and the Catabolic Signaling Pathway***

When the activity of skeletal muscle is reduced by spaceflight (microgravity), prolonged bed rest, immobilization, denervation, or hindlimb suspension, skeletal muscle loses its weight and contractile force. Two major signaling pathways are reported to play major roles in unload-induced skeletal muscle atrophy: nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) and FoxO pathways.

Genetically modified animal models confirmed that NF- $\kappa$ B is one of most important signaling pathways linked to the loss of skeletal muscle in both physiological and pathophysiological conditions. Hunter et al. reported that skeletal muscle inactivity leads to increased NF- $\kappa$ B transcriptional activity (Hunter et al. 2002). Later, it was reported that a specific NF- $\kappa$ B pathway (p50 and Bcl3), but not a classical p50-p65 NF- $\kappa$ B dimer, is required for disuse muscle atrophy (Hunter and Kandarian 2004; Judge et al. 2007). NF- $\kappa$ B activates the transcription of many genes, including skeletal muscle-specific E3 ligases, MuRF1. But how these target molecules induce muscle atrophy remains poorly defined.

Under atrophic conditions, it is proposed that the inhibition of FoxO activity by phosphorylation (possibly by Akt) is relieved, and the dephosphorylated FoxO transcription factors accumulate in the nucleus, activate an atrophy-related ubiquitin E3 ligase, atrogin-1/MAFbx-1 and induce skeletal muscle wasting (Sandri et al. 2004; Stitt et al. 2004).

Although the upstream events of NF- $\kappa$ B or FoxO activation are not clarified, candidate molecules which link disuse and activation of NF- $\kappa$ B or FoxO are reactive

oxygen species (ROS) (Powers et al. 2007; Dodd et al. 2010). But, how ROS activate NF- $\kappa$ B or FoxO transcription factors is not clearly defined.

#### 4.3.2.1 Downstream Targets of NF- $\kappa$ B and FoxO Transcription Factors

Downstream of these signaling pathways, three major proteolytic systems, (1) lysosomal proteases (cathepsins), (2) Ca<sup>2+</sup>-activated proteases (i.e., calpains), and (3) the ubiquitin-proteasome system, are thought to contribute to the degradation of muscle proteins. Unloading skeletal muscle also causes caspase-3 activation and myonuclear apoptosis, maintaining a constant ratio of cytoplasm to nuclei (myonuclear domain) (reviewed in Powers et al. 2007).

NF- $\kappa$ B is reported to activate muscle RING finger protein 1 (MuRF1) E3 ligase (Cai et al. 2004; Mourkioti et al. 2006). FoxO3 is shown to activate atrogin-1/MAFbx to activate the ubiquitin-proteasome pathway (Sandri et al. 2004). Increased FoxO3 function also leads to decreased myocyte cell size through induction of autophagy pathway genes, including *LC3*, *Gabarapl1*, and *Atg12* (Zhao et al. 2007; Mammucari et al. 2007).

## 4.4 Conclusion

Skeletal muscle is sensitive to mechanical load, and adapts the demand by increasing or decreasing its mass and contractile force. Muscle hypertrophy and wasting are accompanied by changes in fiber compositions and metabolic properties. Thanks to advances in gene manipulation techniques in mice, major players in signal transduction regulating muscle hypertrophy and atrophy have been identified. But how myofibers sense change in mechanical load, and how the information is translated into biochemical signaling pathways, remain to be determined.

**Acknowledgment** The authors wish to thank members of the laboratory for discussion and critical readings.

## References

- Acharyya S, Butchbach ME, Sahenk Z et al (2005) Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell* 8:421–432
- Adams GR (2002) Invited review: autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. *J Appl Physiol* 93:1159–1167
- Atherton PJ, Babraj J, Smith K et al (2005) Selective activation of AMPK-PGC-1 $\alpha$  or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J* 19:786–788
- Baar K, Nader G, Bodine S (2006) Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. *Essays Biochem* 42:61–74

- Barton ER (2006) Viral expression of insulin-like growth factor-I isoforms promotes different responses in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 100:1778–1784
- Bassel-Duby R, Olson EN (2006) Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 75:19–37
- Blaauw B, Canato M, Agatea L et al (2009) Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *FASEB J* 23:3896–3905
- Bodine SC (2006) mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 38:1950–1957
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M et al (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3:1014–1019
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH et al (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the post-synaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757–767
- Butterfield TA, Best TM (2009) Stretch-activated ion channel blockade attenuates adaptations to eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 41:351–356
- Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr et al (2004) IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119:285–298
- Carson JA (1997) The regulation of gene expression in hypertrophying skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 25:301–320
- Carson JA, Wei L (2000) Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle. *J Appl Physiol* 88:337–343
- Chang WJ, Iannaccone ST, Lau KS et al (1996) Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9142–9147
- Dodd SL, Gagnon BJ, Senf SM et al (2010) Ros-mediated activation of NF-kappaB and FoxO during muscle disuse. *Muscle Nerve* 41:110–113
- Eliasson J, Elfegoun T, Nilsson J et al (2006) Maximal lengthening contractions increase p70 S6 kinase phosphorylation in human skeletal muscle in the absence of nutritional supply. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E1197–E1205
- Flück M, Carson JA, Gordon SE et al (1999) Focal adhesion proteins FAK and paxillin increase in hypertrophied skeletal muscle. *Am J Physiol* 277:C152–C162
- Franco A Jr, Lansman JB (1990a) Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* 344:670–673
- Franco A Jr, Lansman JB (1990b) Stretch-sensitive channels in developing muscle cells from a mouse cell line. *J Physiol* 427:361–380
- Gautel M (2008) The sarcomere and the nucleus: functional links to hypertrophy, atrophy and sarcopenia. *Adv Exp Med Biol* 642:176–191
- Glass DJ (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1974–1984
- Goldspink G, Wessner B, Bachl N (2008) Growth factors, muscle function and doping. *Curr Opin Pharmacol* 8:352–357
- Gordon SE, Flück M, Booth FW (2001) Selected contribution: skeletal muscle focal adhesion kinase, paxillin, and serum response factor are loading dependent. *J Appl Physiol* 90:1174–1183
- Haddad F, Adams GR (2002) Selected contribution: acute cellular and molecular responses to resistance exercise. *J Appl Physiol* 93:394–403
- Hameed M, Orrell RW, Cobbold M et al (2003) Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *J Physiol* 547:247–254
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO et al (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:150–166
- Hornberger TA, McLoughlin TJ, Leszczynski JK et al (2003) Selenoprotein-deficient transgenic mice exhibit enhanced exercise-induced muscle growth. *J Nutr* 133:3091–3097
- Hornberger TA, Stuppard R, Conley KE et al (2004) Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *Biochem J* 380:795–804

- Hornberger TA, Chu WK, Mak YW et al (2006) The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4741–4746
- Hunter RB, Kandarian SC (2004) Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *J Clin Invest* 114:1504–1511
- Hunter RB, Stevenson E, Koncarevic A et al (2002) Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J* 16:529–538
- Jackman RW, Kandarian SC (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C834–C843
- Joulia-Ekaza D, Cabello G (2007) The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Curr Opin Pharmacol* 7:310–315
- Judge AR, Koncarevic A, Hunter RB, Liou HC, Jackman RW, Kandarian SC (2007) Role for IkappaBalpha, but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C372–C382
- Kadi F (2008) Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. *Br J Pharmacol* 154:522–528
- Koh TJ, Tidball JG (1999) Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle. *J Physiol* 519:189–196
- Mammucari C, Milan G, Romanello V et al (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 6:458–471
- McCarthy JJ, Esser KA (2007) Counterpoint: satellite cell addition is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 103:1100–1102
- Mourkioti F, Kratsios P, Luedde T et al (2006) Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *J Clin Invest* 116:2945–2954
- Musarò A, McCullagh K, Paul A et al (2001) Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* 27:195–200
- Nader GA, Esser KA (2001) Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *J Appl Physiol* 90:1936–1942
- O'Connor RS, Pavlath GK (2007) Point: counterpoint: satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 103:1099–1100
- Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T et al (2005) Atrophy of S6K1(–/–) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol* 7:286–294
- Powers SK, Kavazis AN, McClung JM (2007) Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol* 102:2389–2397
- Reiser PJ, Kline WO, Vaghy PL (1997) Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J Appl Physiol* 82:1250–1255
- Rennie MJ, Wackerhage H, Spangenburg EE, Booth FW (2004) Control of the size of the human muscle mass. *Annu Rev Physiol* 66:799–828
- Roberts CK, Barnard RJ, Jasman A, Balon TW (1999) Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am J Physiol* 277:E390–E394
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R et al (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3:1009–1013
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A et al (2004) FoxO transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117:399–412
- Sellman JE, DeRuisseau KC, Betters JL et al (2006) In vivo inhibition of nitric oxide synthase impairs upregulation of contractile protein mRNA in overloaded plantaris muscle. *J Appl Physiol* 100:258–265
- Smith LW, Smith JD, Criswell DS (2002) Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload. *J Appl Physiol* 92:2005–2011
- Soltow QA, Betters JL, Sellman JE et al (2006) Ibuprofen inhibits skeletal muscle hypertrophy in rats. *Med Sci Sports Exerc* 38:840–846
- Spangenburg EE (2009) Changes in muscle mass with mechanical load: possible cellular mechanisms. *Nutr Metab* 34:328–335



- Spangenburg EE, Booth FW (2006) Leukemia inhibitory factor restores the hypertrophic response to increased loading in the LIF(-/-) mouse. *Cytokine* 34:125–130
- Spangenburg EE, McBride TA (2006) Inhibition of stretch-activated channels during eccentric muscle contraction attenuates p70S6K activation. *Appl Physiol* 100:129–135
- Spangenburg EE, Le Roith D, Ward CW, Bodine SC (2008) A functional insulin-like growth factor receptor is not necessary for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *J Physiol* 586:283–291
- Steensberg A, Keller C, Hillig T et al (2007) Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in human skeletal muscle. *FASEB J* 21:2683–2694
- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA et al (2004) The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 14:395–403
- Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A et al (2007) NO production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS. *J Clin Invest* 117:2468–2476
- Tatsumi R, Hattori A, Ikeuchi Y et al (2002) Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol Biol Cell* 13:2909–2918
- Tatsumi R, Liu X, Pulido A et al (2006) Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1487–C1494
- Tidball JG, Lavergne E, Lau KS et al (1998) Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *Am J Physiol* 275:C260–C266
- Tidball JG, Spencer MJ, Wehling M, Lavergne E (1999) Nitric-oxide synthase is a mechanical signal transducer that modulates talin and vinculin expression. *J Biol Chem* 274:33155–33160
- Ventadour S, Attaix D (2006) Mechanisms of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Rheumatol* 18:631–635
- Widrick JJ, Stelzer JE, Shoepe TC, Garner DP (2002) Functional properties of human muscle fibers after short-term resistance exercise training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R408–R416
- Xia H, Nho RS, Kahm J, Kleidon J, Henke CA (2004) Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem* 279:33024–33034
- Zanchi NE, Lancha AH Jr (2008) Mechanical stimuli of skeletal muscle: implications on mTOR/p70s6k and protein synthesis. *Eur J Appl Physiol* 102:253–263
- Zhao J, Brault JJ, Schild A et al (2007) FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* 6:472–483

## 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ケースが多いが，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 (Remudy : registry of muscular dystrophy. <http://www.remudy.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か月でさらに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治験を実施する準備を進めている。



### 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

p155抗体は悪性腫瘍合併例で高率とされる。その他の膠原病を合併するオーバーラップ(重複)症候群では、抗PM-1抗体(強皮症)、抗Ku抗体(強皮症・全身性エリテマトーデス)、抗nRNP抗体(混合性結合組織病)が陽性となることがある。

#### 4. 診断

BohanとPeterの診断基準や皮膚筋炎・多発筋炎の改訂診断基準(厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班平成4年度研究報告, pp25-28, 1993)が汎用される。

#### 5. 治療方針

多発筋炎あるいは皮膚筋炎の確定診断後は、プレドニン® 1~1.5 mg/kg/日を1~2ヵ月間連日投与する。筋力の改善、血清CK値の減少がみられれば2週間に10%の割合でプレドニン®を減量し、2~3年程度は維持療法を行う。筋症状は早期治療例ほど回復がよい。改善がないときは同量を1~2ヵ月間投与するか、ステロイドパルス療法を2~3クール行う(メチルプレドニゾロン1g/回の3日間連続投与)。効果がない場合はメトトレキサート(メソトレキセート®, 5~25 mg/週, 経口あるいは筋肉内投与)、アザチオプリン(イムラン®, 50~100 mg/日, 経口投与)などを併用する。ステロイド、免疫抑制薬の無効例では、追加療法として免疫グロブリン療法を併用する。

#### 6. 治療のポイント

筋症状増悪時には筋炎の再燃か、ステロイドミオパチーの合併かの鑑別が重要であ

る。血清CK値上昇、筋電図で線維性収縮電位や陽性鋭波の出現頻度が上昇した場合には再燃を疑う。ステロイドミオパチーは、プレドニン内服を4週間以上続けた場合に発症し、下肢近位筋優位の筋力低下・筋萎縮を呈するが、顔面筋および頸部伸展筋は保たれ、血清CK値は低下する。

#### 7. 患者指導とリハビリテーション

急性期は等尺性収縮以外の運動は避ける。安定後は誤嚥性肺炎、廃用性筋萎縮、関節拘縮予防のための理学療法を早期に開始する。

謝辞：本稿の執筆にあたり貴重なご助言を頂いた国立病院機構東埼玉病院 神経内科 尾方克久先生、国立精神・神経センター病院 神経内科 大矢寧先生、同院 遺伝カウンセリング室 池上弥生遺伝カウンセラーに感謝します。

#### 文 献

- 1) Moxley RT 3rd, et al. : Practice parameter : corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy ; report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*, 64 : 13-20, 2005.
- 2) Bohan A & Peter JB : Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med*, 292 : 344-347, 1975.
- 3) Dalakas MC : Therapeutic targets in patients with inflammatory myopathies ; present approaches and a look to the future. *Neuromuscul Disord*, 16 : 223-236, 2006.

## 5. 骨格筋

骨格筋は傷害を受けると再生する（図1）。筋傷害シグナルにより骨格筋特異的幹細胞である筋衛星細胞（muscle satellite cells）が活性化され、分裂・増殖し、やがてお互いに融合、あるいは既存の筋線維と融合して筋線維を再生する。デュシェンヌ型筋ジストロフィー（Duchenne muscular dystrophy；DMD）等の重篤な遺伝性筋疾患に対して筋・幹細胞を移植する再生医療が期待されているが、その確立のためには、筋組織の再生がどのように制御されているかを理解することが重要である。

### a. 骨格筋衛星細胞

筋衛星細胞は筋基底膜と筋線維の間にある単

核の細胞で1961年にAlexander Mauroによって初めてその存在を記載された。通常、細胞周期のG0の状態にあるが、筋傷害時に活性化され、増殖して筋線維を再生する。生直後は骨格筋組織の中の核の30%程度が筋衛星細胞の核であるが、成体になると5%程度とほぼ一定になる。体幹と四肢の骨格筋の発生学的な起源は沿軸中胚葉由来の体節であり、その中に形成されるdermomyotomeに出現するPax3, Pax7陽性の筋前駆細胞（muscle progenitor cells）が増殖し、やがてMyf5, MyoD等の筋分化制御遺伝子を発現して筋芽細胞（myoblast）となり、次に増殖を止め、融合して、筋線維を形成する。筋衛星細胞はその過程で派生してく

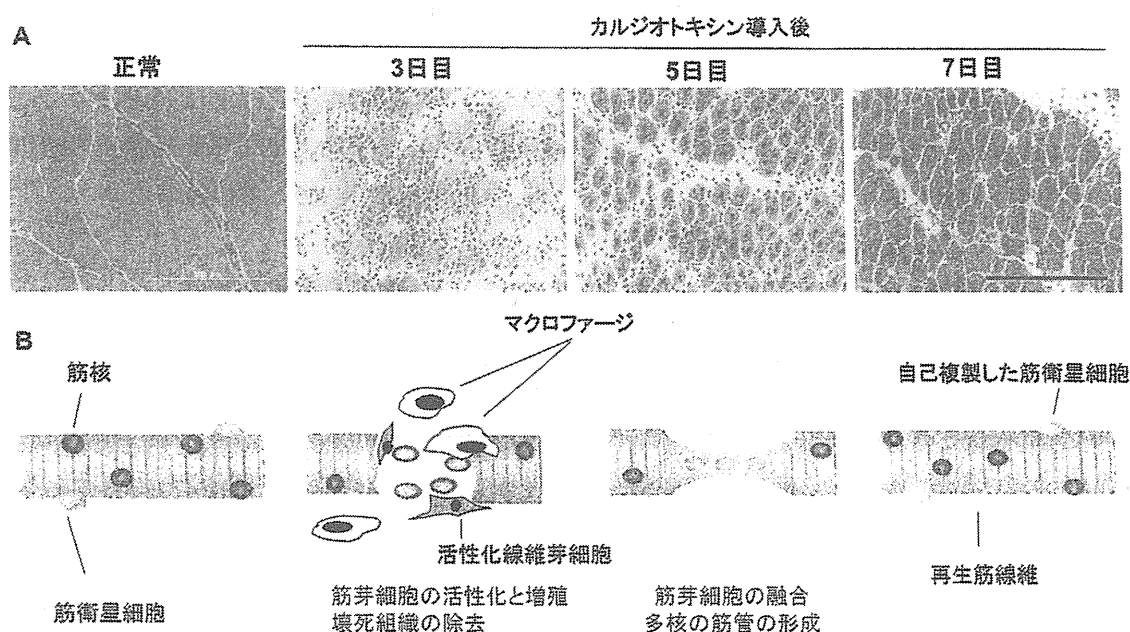


図1 骨格筋の再生

A) C57Bl/6 マウス骨格筋に蛇毒であるカルジオトキシンを導入して筋傷害を引き起こした後の組織修復過程を示す。ヘマトキシリン・エオジン染色。スケールバー：200 ミクロン。

B) 骨格筋特異的幹細胞である筋衛星細胞は、静止期の状態では筋基底膜と筋線維の間に存在するが、筋傷害時には活性化し、増殖する（筋芽細胞）。やがてお互いに融合し、あるいは既存の筋線維と融合して筋再生が完了する。この過程には好中球やマクロファージ等による壊死組織の貪食機能が重要である。活性化した筋衛星細胞の一部は、元の筋衛星細胞の状態に戻る（自己複製）。

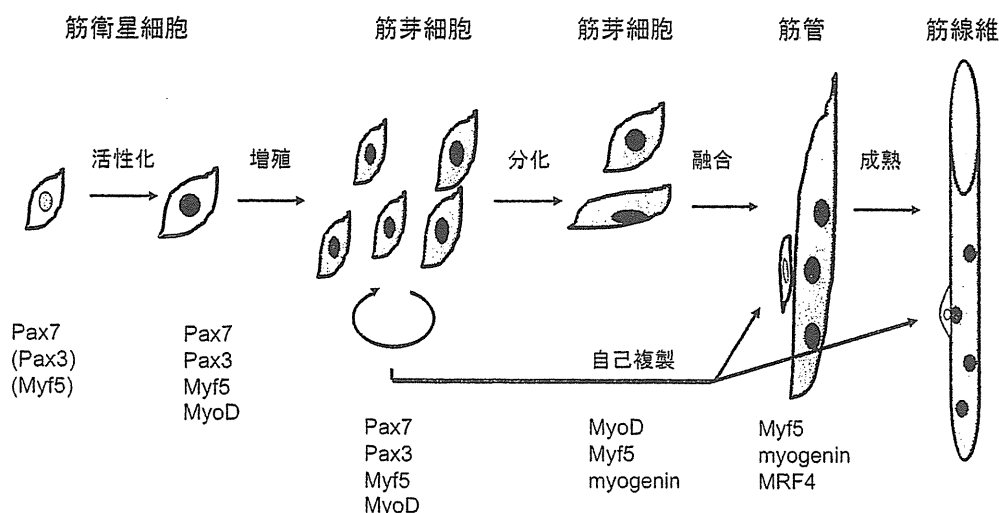


図2 筋衛星細胞の分化過程とその制御因子

筋衛星細胞の筋分化は、発生過程の筋分化と類似しているが、その維持には Pax7 が重要な働きを持つ。筋衛星細胞が不均等分裂により自己複製すると考えられているが、そのタイミングや制御分子に関しては不明な点が多い。

る。c-Met, Pax7, Myf5, M-cadherin, CD34 等が筋衛星細胞特異的マーカーとして知られているが、昨今の網羅的遺伝子発現研究等の結果、新しいマーカー（カルシトニン・レセプター、odz4 等）がリストに加わってきた。筋衛星細胞研究には実験動物の骨格筋から筋衛星細胞を高い純度で分離する方法が有用だが、従来は、線維芽細胞との培養皿への接着性の違いを利用した preplating 法、現在は各種細胞表面マーカーで染色しセル・ソーターで分離する方法が用いられている。筋衛星細胞は自己複製することで、一生涯にわたって筋再生能を維持する（図1, 図2）。その機構として不均等分裂が提唱されているが、その分裂様式、制御因子等、不明な点が残されている。

#### b. 筋衛星細胞の活性化, 増殖, 分化

骨格筋が傷害されると nitric oxide synthase (NOS) が活性化され, nitric oxide (NO) が産生され, hepatocyte growth factor (HGF; 肝細胞増殖因子) を活性化し, c-Met レセプターへ結合する。c-Met を介したシグナルが筋衛星細胞を活性化し, 筋衛星細胞は活発に増殖する。筋衛星細胞の増殖能は分裂を繰り返す

と徐々に低下する。とくに筋ジストロフィー等の、筋変性・壊死、再生を繰り返す筋疾患では、筋衛星細胞の増殖能は徐々に低下し、筋再生が筋壊死に追いつかなくなり、筋線維が脱落し、筋力が低下していく。筋衛星細胞は筋細胞の他に脂肪細胞、骨細胞にも分化することが報告されているので、筋疾患の進行した段階で認められる脂肪変性や、徐々に筋組織の骨化が進行する進行性骨化性線維異形成症等の遺伝性の疾患の発症に関与する可能性がある。

#### c. 筋・幹細胞と再生医療

1990年代前半、近親者から得た筋衛星細胞を培養後、DMD患者の骨格筋へ移植する筋芽細胞移植が行われたが、その効率は低かった。移植直後に多くの筋芽細胞が死んでしまうこと、移植後筋芽細胞があまり移動しないこと、免疫抑制が不十分であったこと等が原因であったと推察されている。1998年、骨髓細胞が筋線維へ分化し、さらに筋衛星細胞へ分化することが示され<sup>1)</sup>、造血幹細胞の可塑性との関連で、DMDへの治療応用が期待されたが、その筋線維再生への寄与率はわずかであり、またその分化機序は依然不明で、大部分は細胞融合に



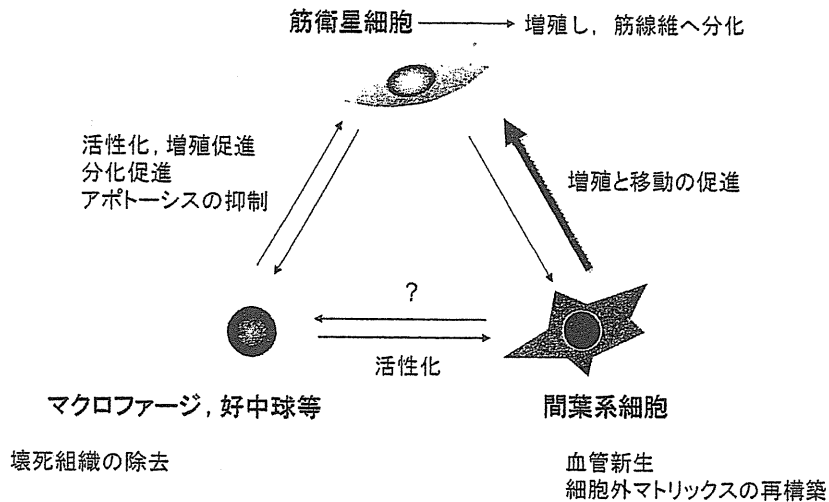


図3 筋再生を制御する細胞とそのネットワーク

筋再生過程では、筋前駆細胞である筋衛星細胞が中心的な役割を果たすが、その他に、壊死組織の除去を担うマクロファージ、好中球等が重要な細胞である。さらに間葉系細胞が間質に存在し、筋傷害時に活性化し、細胞外マトリックスの分解と再構築を促進し、血管新生を制御することで筋再生を制御している。これらの細胞は、直接相互作用する他に、サイトカイン等を介してお互いの活性化、増殖や移動、生存、分化を制御している。

よると思われた。しかし血中の AC133 陽性細胞は移植すると効率よく筋線維に分化するという報告もあり、循環している細胞の中に筋分化能を持つ特別な細胞が存在する可能性は否定できない。一方、骨格筋組織の間質や血管周囲にも、多能性を持ち、筋細胞へも分化する細胞が数多く報告されているが、これらの細胞の相互関係ははっきりしない。それらは、ヘキスト色素を排出する能力に富む side population 細胞 (SP cells)、血管周囲に存在するペリサイト (pericyte)、同じく血管組織に由来するメソアンギオブラスト (mesoangioblast)、muscle-derived stem cells、myo-endothelial cells 等である。数量的には筋衛星細胞が筋線維再生に最も寄与していることは広く認められているが、筋変性疾患に対する移植治療という観点では、移植後の生存率が低く、局所にしか生着しない筋衛星細胞に対して、経動脈的、あるいは経静脈的に移植可能なこれらの多能性幹細胞の利用が期待されている<sup>2)</sup>。

#### d. 筋再生におけるマクロファージや線維芽細胞の役割

筋再生はさまざまな細胞間の相互作用によって完了する。なかでもとくに重要な細胞はマクロファージと間質の線維芽細胞様の間葉系細胞であろう (図3)。マクロファージは壊死組織の除去の他に、筋衛星細胞の活性化やアポトーシスの抑制、筋分化の促進等の機能があると考えられており<sup>3)</sup>、その機能不全で筋再生は障害される。間葉系細胞も筋再生時に活性化され、増殖し、MMPs 等のプロテアーゼを分泌し、細胞移動の促進、細胞外マトリックスの分解・再構築、血管新生、各種成長因子の活性化に関わっている。また、各種ケモカインを分泌しており、炎症細胞、免疫担当細胞の制御にも関わっていると思われる。間葉系細胞は *in vitro* でも脂肪細胞へ分化しやすい傾向を持ち、この細胞の機能低下や異常な活性化が、筋再生の遅延、筋組織の線維化、脂肪変性に関わっていると考えられるので、再生医療の良き標的である。

[鈴木友子, 武田伸一]

参考文献

- 1) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al : Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279(5356) : 1528-1530, 1998.
- 2) Boldrin L, Morgan JE : Activating muscle stem cells : therapeutic potential in muscle diseases. *Curr Opin Neurol* 20(5) : 577-582, 2007.
- 3) Arnold L, Henry A, Poron F, et al : Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204(5) : 1057-1069, 2007.

筋ジストロフィーの遺伝子治療導入に向けての運動機能評価に関する検討～6分間歩行試験を中心に～

分担研究者大澤真木子  
東京女子医科大学 小児科  
石垣 景子, 村上てるみ, 佐藤孝俊, 宍倉啓子  
鈴木暘子, 平山義人, 斉藤加代子  
東京女子医科大学 小児科

<目的> Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する遺伝子治療の試験的な臨床実施にあたり、適切に運動機能の評価する尺度が必要である。既に過去の研究班では、DMD の適正な運動機能評価方法が検討されてきたが、遺伝子治療導入に際しては、先行する欧米の治験方法が用いられる可能性もある。欧米で頻用される6分間歩行試験 (6-minute walk test: 6MWT) に関し、小児 DMD 患者の運動機能評価に適正か評価を行う。

<対象と方法> (1) 小児 DMD 患者に 6MWT を実施し、実効性、患者の負担の評価を行い、(2) 酵素補充療法中の小児型 Pompe 病患者に用いた運動評価項目の有用性の評価を行った。(1)は東京女子医科大学小児科外来を2008年4月から12月の9ヵ月間に受診したDMD35例(年齢1歳3ヵ月～29歳7ヵ月)の内、自立歩行可能な12例(1歳3ヵ月～10歳1ヵ月)の中で同意を頂いた10例(3歳1ヵ月～9歳11ヵ月)に実施した。方法はアメリカ胸部学会のプロトコールを基本とした。塩化ビニール製廊下の床上で実施し、2m 間隔で被験者も確認可能な印をつけ、10m の距離間を折り返して歩行した。最初の10m の歩行時間、ならびに6分間の歩行距離を測定した。立会者は医師と母親のみとし、声掛け、励ましと、児に触れない距離で母親が付き添い歩行を可とした。患者が苦痛を訴えた場合は即座に中止とした。(2)は12歳小児型Pompe病男子に対して、酵素補充療法開始後1年6ヵ月の経過で、握力、MMT、体位変換時間、階段昇降・跳躍のビデオ評価、6MWT に関して、2週間毎に行った結果と臨床経過との相関を評価した。

<結果> (1)精神遅滞のある3歳1ヵ月(DQ60)では検査を嫌がり、実施出来なかった。検査を理解し実施した9例の内、完遂したのは4例(4歳1ヵ月、5歳9ヵ月2名、9歳4ヵ月)で、5例は途中で中止した。特に、8歳以上の5例(8歳6ヵ月～9歳11ヵ月)で完遂したのは1例のみ(9歳4ヵ月)で、残り4例は下肢の疲労、筋痛を理由に中止した(1分32秒～4分20秒)。施行前後でSpO<sub>2</sub>や心拍数の変化は認めなかった。10m 歩行時間結果は個人のばらつきが強く、6MWT の結果とも一致していなかった。(2)酵素補充療法開始後、臨床症状、呼吸機能、運動機

能ともに改善を認めたが、9ヵ月をピークに再び増悪した。この経過を最も適切に反映した項目は、体位変換時間の中で起座、起立に要する時間であった。握力、MMT、仰臥位から腹臥位の体位変換時間は相関していなかった。6MWT 結果は毎回200mほどのばらつきがあり、治療効果による病状の変化も反映しなかった。

<考察>結果(1)から、低年齢、精神遅滞のある例では実施が難しく、8歳以上の進行した状態では完遂が困難と言える。心肺機能への侵襲性は低いと推察できる一方で、半数が終了時に苦痛を訴え、負担を伴う検査であると評価した。10m 歩行時間は簡便ではあるが、重症度の反映度は低かった。結果(2)からは、小児型 Pompe 病は根本的治療が既に始まっており、かつDMDと類似の骨格筋症状を示すことから、運動機能評価には類似した項目が使用できると考えた。跳躍や階段昇降のビデオ撮影に関しては、数値的に評価できず客観性を欠くという意味で体位変換時間測定に劣った。6MWT は意欲、周囲からの励ましなどの影響が強く、患者本人が結果を調整可能であるという欠点も浮き彫りになった。

6MWT はアメリカ胸部学会に認定された持久力評価試験である。self paced な試験であることから、心肺に対する負担が少なく、簡便かつ経済的と評価されている。小児から成人まで対照データが多くある利点もある。心血管系、肺疾患に対しては、進行度や予後の予測値、治療導入時の効果判定の評価項目として確立している。欧米ではムコ多糖症やPompe病の酵素補充療法の治療評価項目としても使用され、本邦でも同様のガイドラインに従ってこの項目を使用している。しかし、本来筋疾患用の評価項目ではなく、文献上のエビデンスもない。欠点として、患者本人がコントロール可能な上、意欲や周囲の環境を受けやすく客観的評価としては難しいこと、さらに成長発達(加齢、身長、体重増加)と共にデータは上がるため、治療効果との区別は困難であること、学習効果があり長期的評価には向かないことがあげられる。さらには下肢に負担がかかり過ぎることから、小児 DMD 患者の治療効果評価として不適と考える。

<結論>6MWT は小児 DMD 患者の遺伝子治療の効果評価として不適である。長期評価には体位変換時間がより適している。

<文献>

- (1) A six-minute walk test for assessing exercise tolerance in severely ill children. Nixon PA, Joswiak ML, Fricker FJ. J Pediatr. 1996 Sep;129(3):362-6.
- (2) The six-minute walk test in healthy children: reliability and validity. Li AM, Yin J, Yu CC, Tsang T, Sung R et al. Eur Respir J. 2005 Jun;25(6):1057-60

# Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy

Mariko Taniguchi-Ikeda<sup>1,2\*</sup>, Kazuhiro Kobayashi<sup>1\*</sup>, Motoi Kanagawa<sup>1</sup>, Chih-chieh Yu<sup>1</sup>, Kouhei Mori<sup>1</sup>, Tetsuya Oda<sup>1</sup>, Atsushi Kuga<sup>1</sup>, Hiroki Kurahashi<sup>3</sup>, Hasan O. Akman<sup>4</sup>, Salvatore DiMauro<sup>4</sup>, Ryuji Kaji<sup>5</sup>, Toshifumi Yokota<sup>6</sup>, Shin'ichi Takeda<sup>7</sup> & Tatsushi Toda<sup>1</sup>

Fukuyama muscular dystrophy (FCMD; MIM253800), one of the most common autosomal recessive disorders in Japan, was the first human disease found to result from ancestral insertion of a SINE-VNTR-*Alu* (SVA) retrotransposon into a causative gene<sup>1–3</sup>. In FCMD, the SVA insertion occurs in the 3' untranslated region (UTR) of the *fukutin* gene. The pathogenic mechanism for FCMD is unknown, and no effective clinical treatments exist. Here we show that aberrant messenger RNA (mRNA) splicing, induced by SVA exon-trapping, underlies the molecular pathogenesis of FCMD. Quantitative mRNA analysis pinpointed a region that was missing from transcripts in patients with FCMD. This region spans part of the 3' end of the *fukutin* coding region, a proximal part of the 3' UTR and the SVA insertion. Correspondingly, *fukutin* mRNA transcripts in patients with FCMD and SVA knock-in model mice were shorter than the expected length. Sequence analysis revealed an abnormal splicing event, provoked by a strong acceptor site in SVA and a rare alternative donor site in *fukutin* exon 10. The resulting product truncates the *fukutin* carboxy (C) terminus and adds 129 amino acids encoded by the SVA. Introduction of antisense oligonucleotides (AONs) targeting the splice acceptor, the predicted exonic splicing enhancer and the intronic splicing enhancer prevented pathogenic exon-trapping by SVA in cells of patients with FCMD and model mice, rescuing normal *fukutin* mRNA expression and protein production. AON treatment also restored *fukutin* functions, including O-glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) and laminin binding by  $\alpha$ -DG. Moreover, we observe exon-trapping in other SVA insertions associated with disease (hypercholesterolemia<sup>4</sup>, neutral lipid storage disease<sup>5</sup>) and human-specific SVA insertion in a novel gene. Thus, although splicing into SVA is known<sup>6–8</sup>, we have discovered in human disease a role for SVA-mediated exon-trapping and demonstrated the promise of splicing modulation therapy as the first radical clinical treatment for FCMD and other SVA-mediated diseases.

FCMD (incidence 1/34,000 births) shares phenotypic similarities with other severe muscular dystrophies, including muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. All show deficiencies in O-glycosylation of  $\alpha$ -DG, an extracellular protein anchored on the plasma membrane. Insufficient O-glycosylation interferes with the ability of  $\alpha$ -DG to interact with extracellular matrix proteins such as laminin<sup>9,10</sup>. For this reason, FCMD, muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome are categorized as ' $\alpha$ -dystroglycanopathies ( $\alpha$ -DGopathy)<sup>10</sup>'; so far, no effective treatments exist for these conditions. SVA is a hominid-specific, composite non-coding retrotransposon that contains SINE (short interspersed sequence), VNTR (variable number of tandem repeat), and *Alu* sequences. It is still active

in humans, polymorphic and mobilized by the human LINE-1 *in trans*<sup>5,11–15</sup>.

In previous work, we showed that *fukutin* mRNA (10 exons, 7.4- and 6.4-kilobase (kb) cDNAs in size with two poly-A sites, 461-amino-acid protein with calculated molecular mass of 53.7 kDa) was not detectable by northern blot analysis in patients with FCMD carrying the SVA insertion<sup>2</sup>. To investigate the aetiology of this decreased expression, we have now analysed whole *fukutin* mRNA in lymphoblasts from patients with FCMD using quantitative PCR with reverse transcription (qRT-PCR). PCR products corresponding to the protein-coding region of *fukutin*, as well as those including sequences in the distal part of the 3' UTR (and thus downstream of the SVA insertion), were similar in abundance to those from an unaffected control (Fig. 1a). However, products located at sequence positions within the 3' UTR were markedly decreased relative to the control. From these results and along with previous reports of many 3' and 5' splice sites within SVA elements<sup>6–8</sup>, we hypothesized that abnormal splicing occurs somewhere between the end of the *fukutin* protein-coding region and the SVA insertion.

We then performed long-range RT-PCR using primers that flank the region corresponding to decreased expression. In patients with FCMD, we detected a single 3-kb PCR product, which is shorter than the 5-kb product seen in the normal control (Fig. 1b). This observation was consistent in several tissue types from patients with FCMD (Supplementary Fig. 1). PCR from genomic DNA produced an 8-kb product in patients with FCMD, compared with a 5-kb product in the control (Fig. 1b). Sequence analysis of the 3-kb product from FCMD cDNA revealed a splicing event (Supplementary Fig. 2). This event generates a new donor-side breakpoint within the final coding exon (exon 10), located 116 base pairs (bp) upstream from the authentic stop codon. A rare alternative donor site at that position is activated and trapped by an alternative acceptor site located within the inserted SVA, creating an additional and aberrant exonic sequence (exon 11) (Fig. 1c). The acceptor-side breakpoint is located 274 bp downstream from the start of the SVA insertion, between ag and TC (Fig. 1c). The acceptor site has not been described in the previous reports of SVA splicing<sup>6,7</sup>. This location is preceded by a pyrimidine-rich stretch, the SVA (TCTCCC)<sub>41</sub> hexamer at the 5' end of the SVA element, with a possible favourable branch point. Predicted exonic splicing enhancer sites occur around 70 bp downstream from the new acceptor site. We confirmed that the aberrant splicing event can be abolished by replacing AG with GG at the acceptor junction in cultured cells transfected with a *fukutin* construct carrying SVA insertion (Supplementary Fig. 3). *Fukutin* expression was not altered by cycloheximide treatment, indicating that the transcript was not subject to nonsense-mediated mRNA decay, possibly because this exon-trapping occurred within the last

<sup>1</sup>Division of Neurology/Molecular Brain Science, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe 650-0017, Japan. <sup>2</sup>Division of General Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe 650-0017, Japan. <sup>3</sup>Division of Molecular Genetics, Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University, Aichi 470-1192, Japan. <sup>4</sup>Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, NY 10032, USA. <sup>5</sup>Department of Clinical Neuroscience, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8503, Japan. <sup>6</sup>Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2H7, Canada. <sup>7</sup>Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo 187-8502, Japan.

\*These authors contributed equally to this work.