

福山型筋ジストロフィーのスプライシング異常に 対するアンチセンス治療

Abnormal splicing and antisense therapy for Fukuyama muscular dystrophy

神戸大学大学院医学研究科神経内科学／分子脳科学／
小児科こども急性疾患学特命助教

谷口(池田)真理子 *Mariko Taniguchi-Ikeda*

神戸大学大学院医学研究科神経内科学／分子脳科学准教授

小林 千浩 *Kazuhiro Kobayashi*

神戸大学大学院医学研究科神経内科学／分子脳科学教授

戸田 達史 *Tatsushi Toda*

Key words : 筋ジストロフィー, スプライシング異常, レトロトランスポゾン, アンチセンス療法, エクソントラッピング

▶ 歴史的背景 ◀

福山型先天性筋ジストロフィー(Fukuyama-type congenital muscular dystrophy ; FCMD)は日本特有の疾患である。筋, 脳, 眼に特異的な症状をきたす常染色体劣性の遺伝性疾患であり, 乳幼児早期から発症する重度の先天性筋ジストロフィー, II型滑脳症や多小脳回などの脳奇形, 精神運動発達遅延やてんかんの合併, および網膜剥離や近視などの眼奇形がみられる。小児の筋疾患の中では日本で2番目に多く, 10代のうちに死に至る重篤な疾患であるがいまだに治療法がない。

われわれのグループは1998年に, FCMDの疾患責任遺伝子であるフクチン遺伝子(*fukutin*, 9q31)をポジショナルクローニング法により同定した¹⁾。ほとんどのFCMD患者は, フクチン遺伝子の末端側の, タンパク質をコードしない3'非翻訳領域に「動く遺伝子」である約3,000塩基長(3kb)のSVA(Sine-VNTR-*Alu*)型レトロトランスポゾンの挿入型変異を認める¹⁾。この変異は約100世代前, 日本人祖先の1人に生じたとされ, 日本人の88人に1人が保因者で約30,000出生に1人が発症すると考えられている。われわれは, さらに糖転移酵素の遺伝子POMGnT1がFCMDの類縁疾患であ

る muscle-eye-brain 病の原因遺伝子であることを明らかにした²⁾。これら患者の骨格筋では, 細胞膜と基底膜をつなぐ糖タンパク, α -ジストログリカン(α -DG)のO-マンノース型糖鎖修飾に欠損があり, この糖鎖を介する細胞膜-基底膜間の結合が破綻するために重度の筋ジストロフィーが発症することも明らかにされた³⁾。フクチンタンパクはゴルジ体に局在し, 既知の糖転移酵素とのアミノ酸配列相同性より α -DGの糖鎖修飾に関与する糖転移酵素ではないかと考えられているが, その機能を含め未知な点が多い。

▶ 仮説 ◀

フクチン遺伝子は10個のエクソンと長い3'側非翻訳領域をもつ。過去のデータでは, ノーザンハイブリダイゼーション法では患者のフクチンmRNAは検出されなかった⁴⁾。このことよりFCMDの発症機序は, ①SVAの挿入変異が3'非翻訳領域にあるため, フクチンのmRNAが不安定化し分解される, あるいは②レトロトランスポゾンの中のグアニン・シトシンの多い反復配列の影響でDNAがメチル化やヒストン脱アセチル化などの制御を受け, またフクチン遺伝子周辺がエピジェネティックな不活性化を受けるため発現抑制や転写伸長障

害が起こる、などと考えられてきた。しかし、SVA配列はグアニン、シトシンが豊富であるため解析が難しく疾患機序は未解明のままであった。今回、FCMDの病態を解析するため、フクチン遺伝子のそれぞれのエクソン、SVA型レトロトランスポソンの挿入の周辺領域、および、3'側非翻訳領域の全域にわたり患者のリンパ球におけるフクチン遺伝子のmRNAの発現について定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)法による解析を行い、再度検証して健常人と比較した。その結果、フクチン遺伝子の5'側翻訳領域および3'側非翻訳領域のうち、SVA型レトロトランスポソンの挿入より3'側の領域のmRNA量は健常人と患者とのあいだではほとんど違いのない一方、その配列に挟まれる領域におけるmRNA量は患者において激減していた。よって、患者のmRNAでは翻訳領域およびSVA型レトロトランスポソン挿入配列のあいだのどこかでmRNAの「切り取り」である異常スプライシングが起こっているのではないかと考えた。

▶ 新知見の要点 ◀

1. FCMDはスプライシング異常症である

そこで、発現の激減している配列を挟む部分にPCRプライマーを設計し、患者および対照由来RNAよりcDNAを合成しlong-PCRを行った。このlong-PCRはSVA挿入配列がグアニンやシトシン、またリピートも多いため非常に難しく、さまざまな条件設定が必要であったが、予想どおり患者特異的に正常より短い遺伝子産物を検出した。この短い遺伝子産物は患者脳、骨格筋においても検出された。次に、この遺伝子産物を直接シーケンス法により塩基配列を確認したところ、やはりFCMDで特異的にフクチンmRNAが異常なスプライシングを受けていることが確認された。この異常スプライシングは、SVA挿入配列内に存在する強力なスプライシング受容部位が、タンパク質をコードする最終エクソン内にある潜在的スプライシング供与部位を新たに活性化すること(エクソントラッピング)が原因となっていた

(図1A)。新たにスプライシング供与部位となった配列は、もともとは最終エクソン内に存在するために使われることのなかった、いわば眠っていたスプライシング供与部位であったのだが、SVAのエクソントラッピング機能により揺り起こされ、遺伝子の「切り取り」が生じたのである。以前、ノーザンハイブリダイゼーションを用いた実験でフクチンmRNAが検出できなかった理由として、①異常スプライシングを受けた患者型フクチンmRNAがGC-richなSVA由来の遺伝子産物を含むため高次構造が変化した、あるいは②異常スプライシング由来のフクチンmRNAの泳動度が、偶然にもmRNAの大部分を占めるリボソームRNAのそれとほぼ一致するため、フクチンプローブのハイブリダイゼーションが阻害され検出されなくなった、などが考えられた。よって今回われわれはまず、フクチンプローブのハイブリダイズに競合する大量のリボソームRNAをtotal RNAより除去し、RNA泳動時の変性条件を厳しく設定して実験を行った。これらの工夫が効を奏し、正常に比べ短い異常なフクチンmRNAを検出することができた。この異常な「切り取り」を受けたフクチンタンパクは、新生エクソン11となるSVA型レトロトランスポソン由来の配列を含み、新生終止コドンまでを含めると約552アミノ酸となることが予想された。そこで免疫沈降およびウエスタンブロット法により患者のフクチンタンパクを調べたところ、予想どおり552アミノ酸の分子量に一致する、62.3 KDaの位置に異常スプライシング由来のフクチンタンパクが検出された。次にこの異常スプライシング由来の配列をもつコンストラクトを作成し、HeLa細胞へ導入し強制発現させたところ、スプライシング由来のフクチンの局在が、正常においてみられるゴルジ体局在から小胞体へ変化していた。これらの事実より、FCMDはSVA型レトロトランスポソンのエクソントラップ機能がもたらすスプライシング異常症であることが証明された。

2. エクソントラッピングとヒトの進化, 選択, 多様性, 疾患の発生

次にわれわれは, SVA 挿入を認める他の遺伝性疾患においてもこのSVA のもつエクソントラッピング機能が疾患の発生に関与するかを検討した。常染色体劣性遺伝性高コレステロール血症において, 原因遺伝子 *LDLRAP1* のイントロン1内に約2.6kbのセンス鎖のSVA 配列が挿入されている症例が報告され, また, 中性脂肪蓄積ミオパチー

においても, 原因遺伝子 *PNPLA2* のエクソン3内に約1.9kbのセンス鎖のSVA 配列の挿入を認める症例が報告されていたが, これらの疾患の病態は未知のままであった。そこでこれら2つの疾患の患者由来の遺伝子産物を調べたところ, FCMDと同様のSVA によるエクソントラッピングが認められた。またチンパンジーにはないヒト特異的なSVA 挿入を認める新規遺伝子 *AB627340* のエクソントラッピング由来の遺伝子産物をヒト脳にお

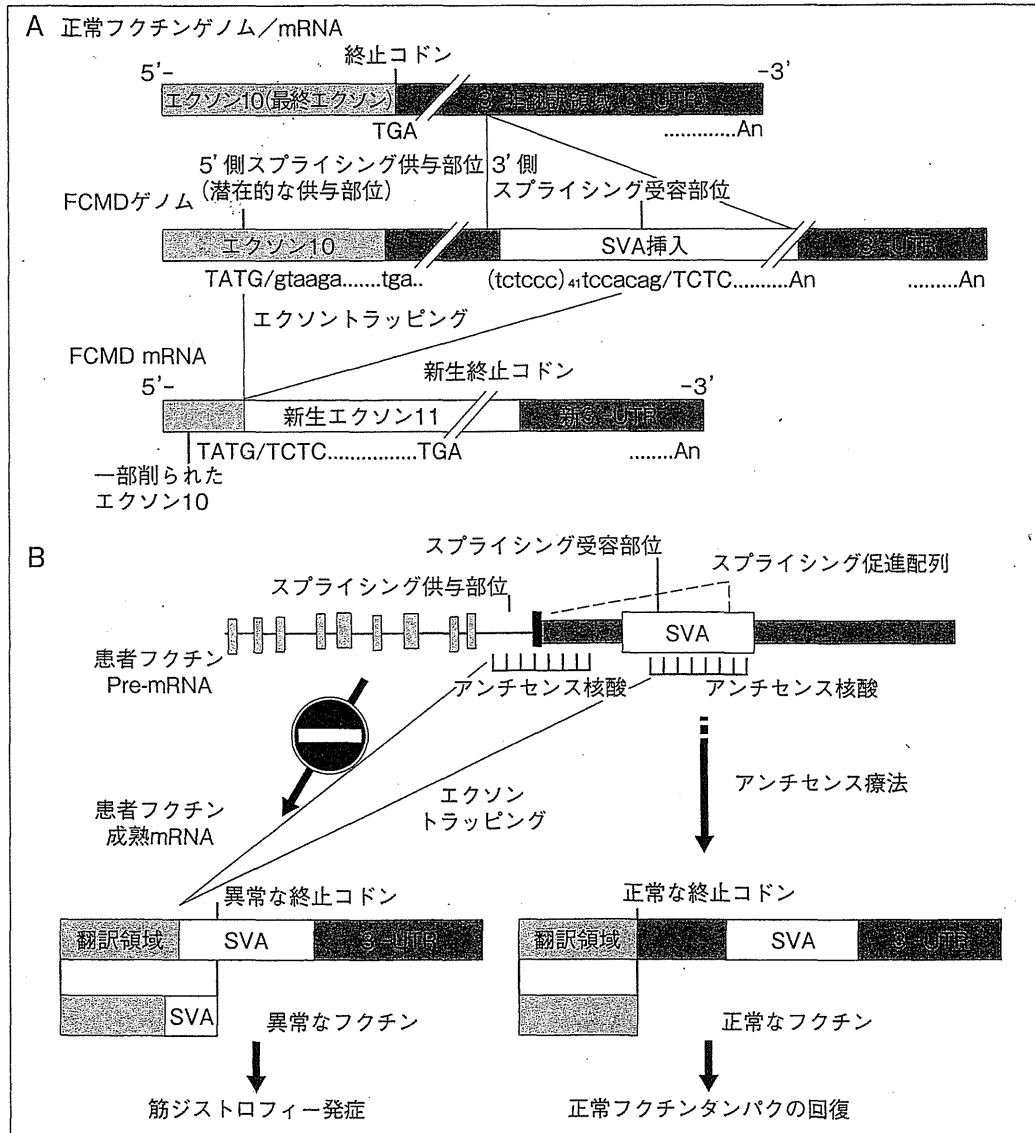


図1. FCMDのスパライシング異常とアンチセンス治療の構想

A: FCMDではSVA内の強力な3'側スパライシング受容部位により最終エクソン内の潜在的供与部位が強力に活性化され, エクソントラッピングが起きスパライシング異常が引き起こされる。

B: 異常スパライシングを促進する配列に対し相補的なアンチセンス核酸を設計し, スパライシングを促進する配列をマスクすることにより異常スパライシングを阻止し, 正常タンパクを回復させる。

いて同定した。これらの新規遺伝子由来の機能は未知であるがノンコーディングRNAで、なんらかの機能をもっているのではないかと考えてい

る。SVA型は進化的に最も新しいレトロトランスポゾンであり、霊長類に特異的である。そしてゲノムの中で進化とともにその数が増し、ヒトに

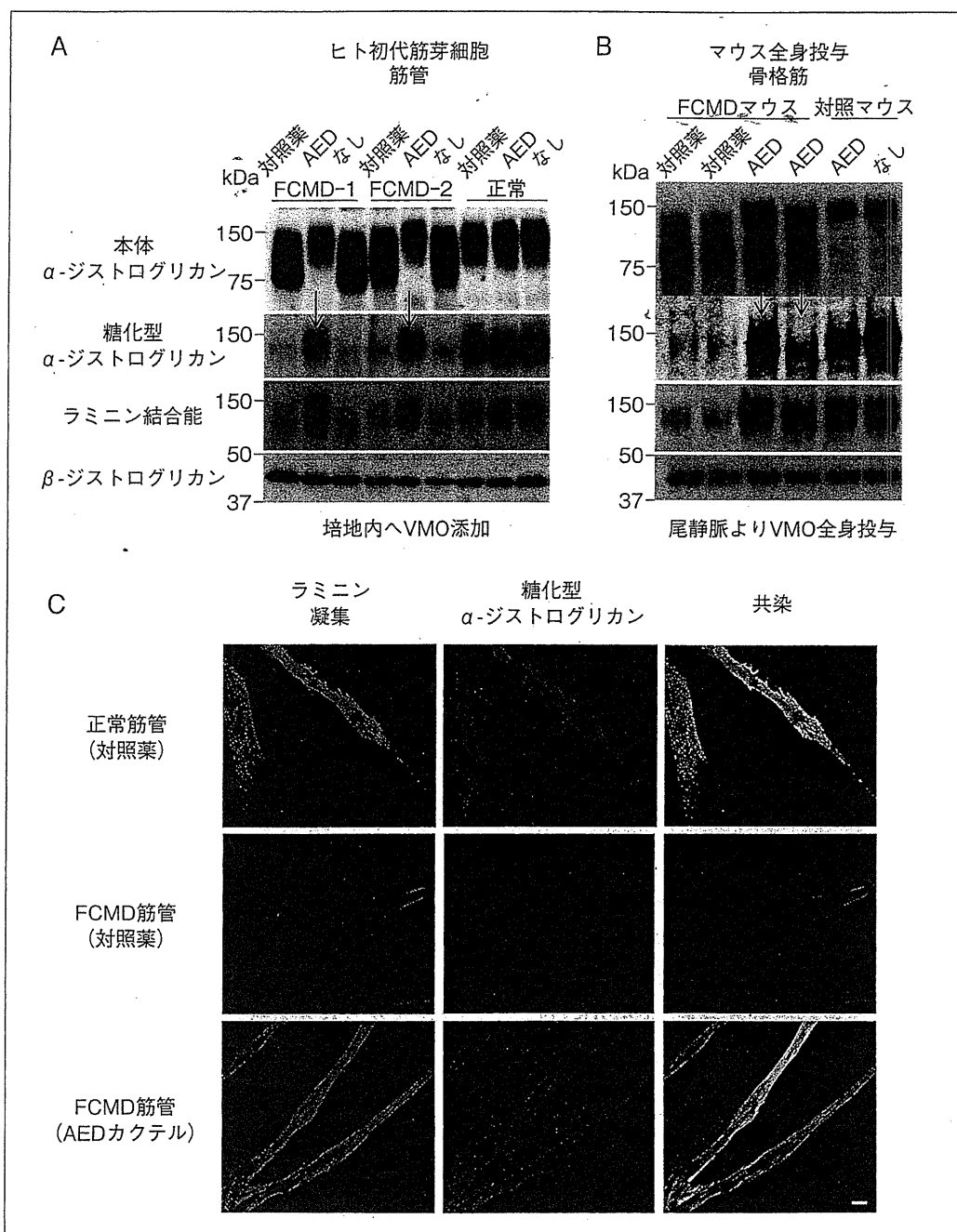


図2. FCMD に対する AED カクテル療法によりヒト筋管およびマウス骨格筋において α -ジストログリカン (α -DG) の糖化およびラミニン結合能が回復した

A: ヒト初代筋芽細胞より分化させた筋管のウエスタンブロットティング。糖化型 α -DG (矢印) およびラミニン結合能が回復した。B: マウス骨格筋のウエスタンブロットティング。尾静脈より AED カクテルを全身投与。糖化型 α -DG (矢印) およびラミニン結合能が回復した。C: ラミニンクラスターリングアッセイの蛍光免疫染色像。正常筋管 (上段), FCMD 筋管に対し対照薬を添加 (中段), FCMD 筋管に対し AED カクテル添加 (下段)。ラミニン凝集 (左), 糖化型 α -DG (中央), 共染 (右)。スケールバー = 20 μ m。

(巻頭グラビア p.12参照)



は約2,700コピー存在するといわれている。この機能がエクソントラッピングにより、さらに新たな機能をヒト脳において獲得し、進化や脳の高次脳機能獲得に関与しているかもしれない。よって、エクソントラッピングはヒトの進化、多様性、疾患に関与している可能性があると考えられる。

3. FCMD に対するアンチセンス療法

SVA型レトロトランスポゾンが挿入された患者のフクチン遺伝子は、異常スプライシングさえ受けなければ、正常のフクチンをコードする正常なエクソン配列を体内にもっている。そこで、この異常スプライシングを阻止する目的で、異常スプライシングを誘導する標的配列(スプライシング受容サイト、イントロン内/エクソン内スプライシング促進部位、スプライシング供与部位)に対し、アンチセンス核酸を pre-mRNA レベルにおいて結合させることで、正常なスプライシングパターンに戻す「アンチセンス療法」が有効ではないかと考えた(図1B)。そこで2'-OメチルRNAという種類のアンチセンス核酸を用い、標的配列の周辺に網羅的にアンチセンス核酸を設計し、さまざまな細胞系[FCMDモデルマウス由来胚性幹(embryonic stem; ES)細胞, 患者由来初代筋芽細胞系, 患者由来初代線維芽細胞, 患者由来リンパ芽球系]に投与し、異常スプライシングの抑制効果および正常フクチン mRNA の発現を検討した。これらの配列よりスプライシングを是正し、かつ正常なフクチン mRNA を最も効率よく回復させるアンチセンス核酸のカクテル, A3E3D5(以降 AED カクテル)を選び出した。この結果をもとに、次にわれわれはジボモルフォリノ(vivo-morpholino, octa-guanidine morpholino; VMO)という種類のアンチセンス核酸を用い、この AED カクテルを FCMD モデルマウスおよび患者細胞に投与し治療効果を検討した。まず FCMD マウスの前脛骨筋へ AED カクテルの局所注射を行ったところ、スプライシング異常が是正され、終止コドンまで達する正常なフクチン mRNA が約30%回復した。またウエスタンブロット法により、糖鎖の回復を示唆する O-マンノース型糖鎖分子量

の増加がみられた(図2A)。ヒト患者由来リンパ芽球に AED カクテルをエレクトロポレーション法により導入したところ、正常なフクチン mRNA が60%以上回復し、AED カクテル投与群において正常由来のフクチンタンパクが検出された。尾静脈経由に AED カクテルを全身投与したところ、局所注射同様に O-マンノース型糖鎖の劇的な回復がみられた(図2B)。最後に、患者由来の筋管で低下している基底膜成分であるラミニンの凝集(クラスタリング)能力が AED カクテル投与によって回復するかについて、ラミニンクラスタリングアッセイを行い検討した。患者由来の筋管における α -ジストログリカンの発現は激減しており、ラミニンクラスタリング能力もほとんどみられない(図2C中段)。しかし AED カクテル投与により、患者の筋管において正常レベルの α -DG の糖鎖が蛍光免疫染色にて検出されるようになり、ラミニンクラスタリング能力も正常と同程度に回復した(図2C下段)。これらの結果はアンチセンス療法によって、FCMD が機能的にも回復する可能性を示唆する。

▶ 将来の可能性, 問題点 ◀

アンチセンス核酸を用いたスプライシング操作を標的とした治療法の1つに、世界で最も頻度の高い筋ジストロフィーであるデュシェンヌ型筋ジストロフィー(Duchenne muscular dystrophy; DMD)に対する「エクソンスキップ療法」が注目されている。DMDでは責任遺伝子である、筋の構造タンパクをコードするジストロフィン遺伝子に欠損を認める。エクソンスキップ療法とは、アンチセンス核酸を用いて患者において欠損のあるジストロフィン遺伝子内の一部のエクソンを人工的に取り去る治療法である。この治療の結果、ジストロフィンタンパクとしては不完全ながらも、いわゆる軽症型のベッカー型筋ジストロフィーでみられるようなジストロフィンタンパクの発現を誘導し、完治ではなく軽症化を目指す治療法である。この治療法は現在国際治験が進行しており最も実現可能な治療薬剤として注目されている⁶⁾。一方、われわれが目指す FCMD に対するアンチセ

ンス療法は、エクソンスキッピング療法と違い、完全なフクチタンパクの回復を目指す根治療法であり、しかも日本のすべてのFCMD患者を対象に同一の方法で行えるものである。フクチンの機能は未知であるが、糖転移酵素やその補酵素ではないかと考えられており、フクチンが酵素のような作用をもつのであれば、アンチセンス療法によりたとえ少量でも正常のフクチタンパクが回復することで、十分な治療効果が得られる可能性

が期待できる。現時点では、このアンチセンス療法には脳や心筋組織への移行が困難である点、また先天性疾患であるため、脳の形成異常を治療するためには胎児治療が必要になる点など、解決すべき問題が多い。しかし、まずは筋力を回復する治療が実現され、患者およびその家族の生活の質 (quality of life ; QOL) の上昇につながればと考えている。今後は臨床応用の実現に向け、核酸化合物の至適化や毒性試験などを行っていききたい。

Summary

FCMD は日本に多い神経・筋疾患であり、ほとんどのFCMD患者は、原因遺伝子フクチンの3'非翻訳領域にSVA型レトロトランスポゾンの挿入を認めるが、疾患の発症機序は不明であった。われわれは今回、FCMDがスプライシング異常症であることを見出し、この異常スプライシング

を制御するアンチセンス核酸を用いて患者細胞およびモデルマウスでの治療に成功した。この治療法はすべてのFCMD患者に適応となる初の根治療法となる可能性があり、今後臨床応用を目指したい。

文 献

- 1) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake, M, et al : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998 ; 394 : 388-92.
- 2) Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, et al : Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001 ; 1 : 717-24.
- 3) Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, et al : Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 2002 ; 418 : 417-22.
- 4) Tanguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, et al : Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 2011 ; 478 : 127-31.
- 5) Cordaux R, Batzer MA : The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Rev Genet* 2009 ; 10 : 691-703.
- 6) Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, et al : Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2011 ; 364 : 1513-22.

【福山型先天性筋ジストロフィーの発症機序と治療戦略】

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

谷口(池田) 真理子^{1,2)}・戸田 達史¹⁾

Mariko I. Taniguti

Tatsushi Toda

Key words

福山型先天性筋ジストロフィー、スプライシング異常、
エクソントラップ、アンチセンス療法、
レトロトランスポゾン

要 約

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は日本に多い常染色体劣性遺伝性の神経・筋疾患であり、治療法はない。殆どの患者は疾患責任遺伝子であるフクチン遺伝子の3'非翻訳領域にSVA型レトロトランスポゾン(以降SVA)の挿入をもつが、その発症機序は不明であった。今回我々は、FCMDがSVAの挿入によりエクソントラップが誘導され発症する、スプライシング異常症であることを証明した。そこで、この異常スプライシングを制御するアンチセンス治療が有効と考え、アンチセンス核酸を設計し、患者由来細胞へ導入、また疾患モデルマウスに投与した。その結果、正常なフクチン蛋白の発現が回復し、 α ジストログリカンの糖鎖修飾とラミニン結合能の回復が確認された。さらに、同様のSVAの挿入変異をもつ2つの疾患においても同様の機序による異常スプライシングを観察し、さらにヒト特異的なSVAによるエクソントラップ由来のRNAを脳において同定した。以上、SVAのもつエクソントラップ機能はヒトの疾患や進化に関与している可能性があり、また、FCMDに対しては初の根治療法の可能性が示唆された。

はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy: FCMD) は1960年に福山らにより発見された常染色体劣性の遺伝性疾患である¹⁾。わが国でDuchenne型に次いで2番目に多

い小児期の筋ジストロフィーで、日本人の90人に一人が保因者であり、日本には1000~2000人位の患者が存在すると推定され、日本特有の疾患とされていたが、近年海外からの報告も相次いでいる。FCMDは重度の先天性筋ジストロフィー病変とともに、多小脳回、II型滑脳症など高度の脳奇形や、近視、白内障、視神経低形成、網膜剥離などの眼奇形の3症状を示す一系統疾患である。またFCMDは10代のうちに死にいたる重篤な疾患だがいまだ根本的治療法がない。われわれは最近、福山型筋ジストロフィーの根本的治療法につながる分子メカニズムと治療法を発見した²⁾。本稿ではFCMDの発症機序と治療戦略について解説する。

1. FCMDと α ジストログリカノパチー

われわれのグループはポジショナルクローニング法によりFCMDの疾患責任遺伝子であるフクチンを1998年に同定した³⁾。正常型のフクチンcDNAは約7kbで、骨格筋、心筋、脳で優位に発現している。ほとんどのFCMD患者は、この遺伝子の3'非翻訳領域(3'-UTR)に「利己的」な動く遺伝子である約3kbのSVA(SINE-VNTR-*Alu*)型レトロトランスポゾン(以降SVA)の挿入型変異を認める。この変異は約100世代前、日本人祖先の一人に生じたとされている。古代から伝わったレトロトランスポゾンがヒトの遺伝性疾患の原因であることがわかったのは世界で初めてである。

一方ジストログリカンは筋細胞膜上に存在し、ジ

神戸大学大学院医学研究科 1) 神経内科学/分子脳科学 2) 小児科 こども急性疾患学

Department of Neurology/Molecular Brain Science, ¹⁾ Department of General Pediatrics, ²⁾

Kobe University Graduate School of Medicine

〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町7丁目5-1 TEL: 078-382-5111

22 (598)

- 482 -

細胞 44 (14), 2012

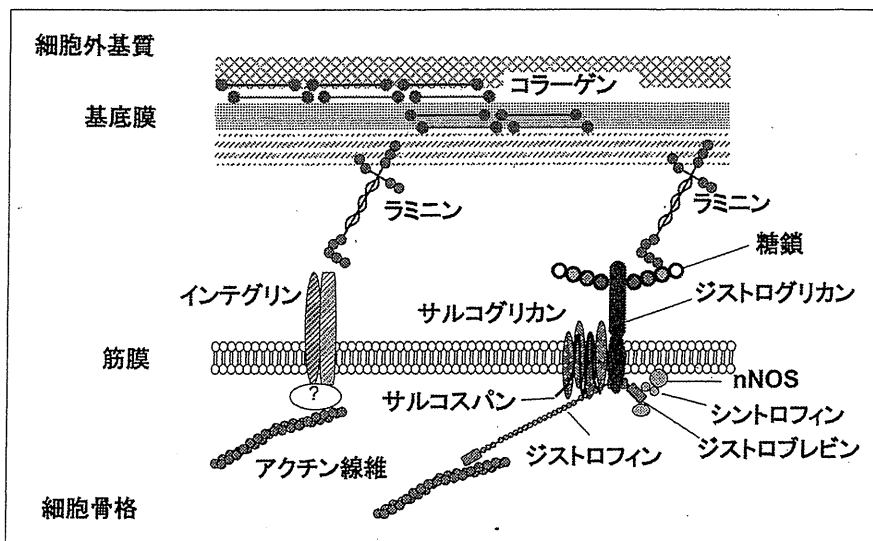


図1 筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体

ストロフィン糖蛋白質複合体の中で高度に糖鎖修飾を受け、基底膜成分のラミニンとO型糖鎖を介して結合している(図1)。αジストログリカン(αDG)を介した基底膜と細胞骨格の一連のつながりは、骨格筋の収縮弛緩による機械的負荷に対して筋形質膜を保護している。われわれは、このαジストログリカンのO-マンノースにGlcNAcを付加する新規の糖転移酵素POMGnT1がFCMDの類縁疾患であるmuscle-eye-brain病の原因であることを明らかにした⁴⁾。その後、αDGの糖鎖異常を認める筋ジストロフィー(Walker-Warburg症候群、先天性筋ジストロフィー1C型、1D型、肢帯型2I)とその原因遺伝子が次々と報告され、これら疾患群を総称する「αジストログリカノパチー」という概念ができた⁵⁾。FCMDをはじめこれらの疾患群ではαDGの糖鎖修飾異常の結果、ラミニンなどの細胞外基質との結合能が低下し、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発症すると考えられる⁶⁾。フクチン蛋白はゴルジ体に局在し、既知の糖転移酵素とのアミノ酸配列相同性よりαDGの糖鎖修飾に関与する糖転移酵素ではないかと考えられているが、その機能を含め未知である。またFCMDの発症機序も未解明のままであった。

2. FCMDはスプライシング異常症である

フクチンは10個のエクソンと長い3'-UTRを持ち、殆どのFCMD患者はこの3'-UTR内にSVAが挿

入している。過去のデータでは、ノザンハイブリダイゼーション法では患者のフクチンmRNAは検出されなかった³⁾。そこで今回我々は、フクチン内の全エクソン、SVA挿入配列、及び3'-UTR領域の全域にわたる発現解析を再度検証し対照と比較した。その結果、フクチンの5'側の翻訳領域部分、及び3'-UTRのうちSVA挿入配列3'側の遺伝子発現は対照と患者間で殆ど変化がない一方、その配列に挟まれる領域での遺伝子発現は患者でのみ激減していた。よって、患者のmRNAでは翻訳領域及びSVAの挿入のあいだのどこかでスプライシングが起きているのではないかと考えた。そこで、発現の激減している配列をはさむ部分にPCRプライマーを設計し、患者及び対照のmRNA由来のcDNAを鋳型にPCRを行ったところ患者特異的に対照よりも短い遺伝子産物を検出した。この遺伝子産物の塩基配列の解析より、やはり患者ではフクチンmRNAが異常なスプライシングを受けていたことがわかった。この異常スプライシングは、SVA挿入配列内に存在する強力なスプライシング受容部位が、蛋白質をコードする最終エクソン内の潜在的なスプライシング供与部位を新たに活性化すること(エクソントラップ)が原因となっていた(図2-A)²⁾。新たにスプライシング供与部位となった配列は、もとは最終エクソン内に存在するために使われることのなかった、いわば眠っていたスプライシング供与部位であったのであるが、SVAのエクソントラップ機能により揺り起こされた結果、遺伝子の「切り取り」が生じたのである。次

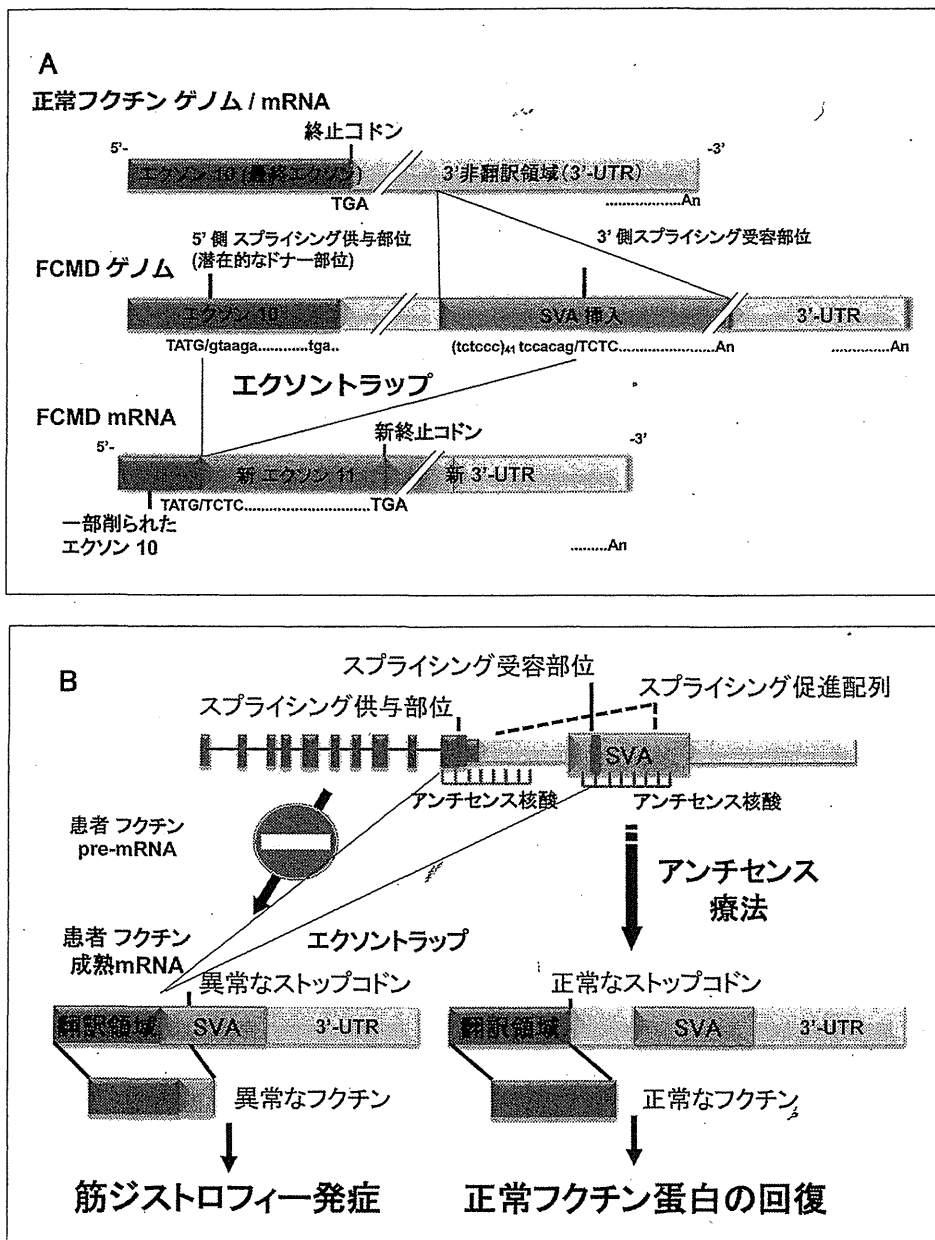


図2
FCMDのSVA型レトロトランスポゾン挿入によるエクソントラップがもたらすスプライシング異常とアンチセンス治療の構想

A) FCMDではSVAのエクソントラップ機能により最終エクソン内の潜在的ドナー部位が活性化され、スプライシング異常が引き起こされる

B) 異常スプライシングを促進する配列に相補的なアンチセンス核酸を設計し、スプライシング配列をマスクすることにより異常スプライシングを阻止する

にこの異常スプライシング由来の配列をもつコンストラクトを作成し、HeLa細胞へ導入し強制発現させたところ、スプライシング由来のフクチンの局在が、正常において見られるゴルジ体局在から小胞体へ変化していた。これらより、FCMDはSVAのエクソントラップ機能がもたらすスプライシング異常症であることが証明された²⁾。

3. SVAによるエクソントラップとヒトの進化、多様性、疾患

次に我々は、SVA挿入を認める他の2つの遺伝性疾患、ひとつは原因遺伝子 *LDLRAP1* のイントロン1に

約2.6kbのセンス鎖のSVA配列が挿入されている常染色体劣性遺伝性高コレステロール血症、もうひとつは原因遺伝子 *PNPLA2* のエクソン3内に約1.9kbのセンス鎖のSVA配列の挿入を認める中性脂肪蓄積ミオパチーにおいてFCMDと同様のエクソントラップを確認した。またチンパンジーにはないヒト特異的なSVA挿入を認める新規遺伝子 (*AB627340*) のエクソントラップ由来の遺伝子産物をヒト脳において同定した。この遺伝子産物の機能は未知であるがノンコーディングRNAで、何らかの機能をもっているのではないかと考えている。

SVAは進化的に最も新しいレトロトランスポゾンであり、霊長類に特異的である。そしてゲノムの中で進

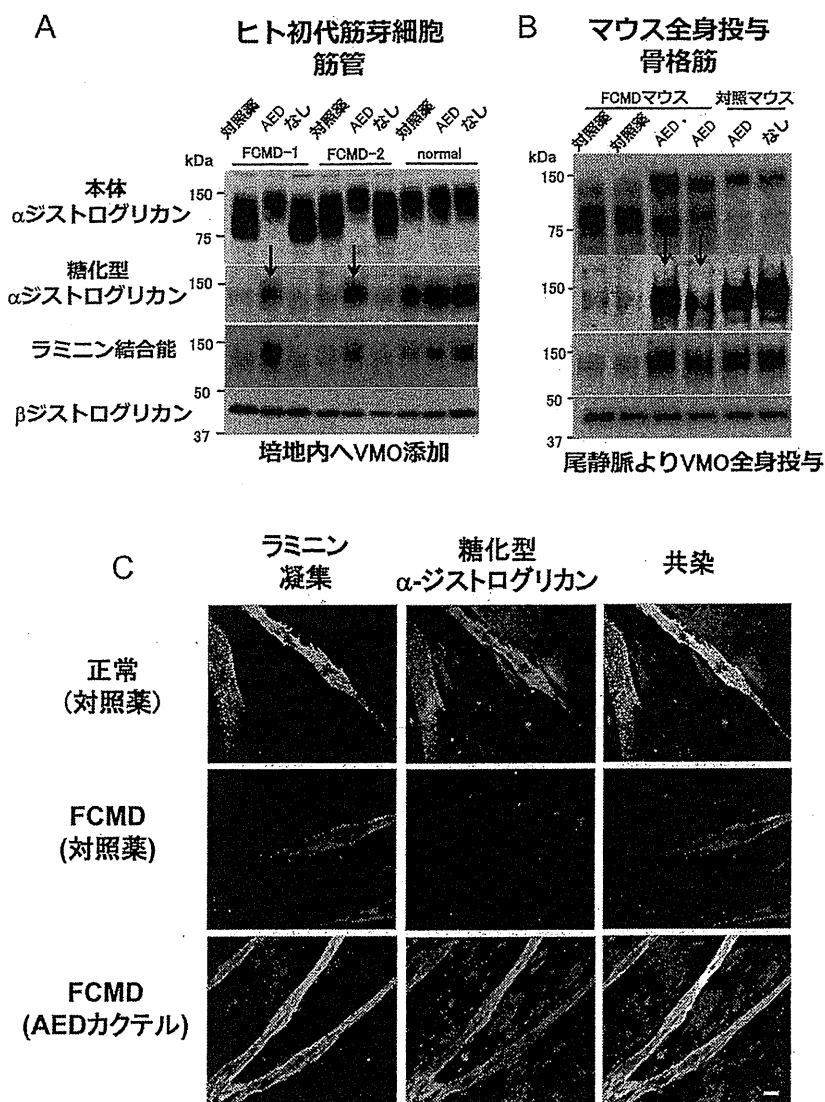


図3 FCMD に対するアンチセンス療法によりヒト筋管及びマウス骨格筋において α DG の糖化及びラミニン結合能が回復

- A) ヒト初代筋芽細胞より分化させた筋管のウエスタンブロットイング。糖化型 aDG (矢印) 及びラミニン結合能が回復した。
- B) マウス骨格筋のウエスタンブロットイング。尾静脈より AED カクテルを全身投与。糖化型 aDG (矢印) 及びラミニン結合能が回復した。
- C) ラミニンクラスターリングアッセイの蛍光免疫染色像。正常筋管 (上段), FCMD 筋管に対し対照薬を添加 (中段), FCMD 筋管に対し AED カクテル添加 (下段)。ラミニン凝集 (左), 糖化型 aDG (中), 共染 (右)。Scale bar = 20mm.

化とともにその数が増し、ヒトには約 2700 コピー存在すると言われている²⁾。SVA がエクソントラップにより、新たな機能をヒト脳において獲得し、進化や脳の高次脳機能獲得に関与しているかもしれない。よってエクソントラップはヒトの疾患だけでなく進化、多様性にも関与している可能性があり非常に興味深い結果であった²⁾。

3. FCMD に対するアンチセンス療法

SVA が挿入された患者のフクチンは、異常スプライシングさえ受けなければ、正常のフクチンをコードする正常なエクソン配列を体内に持っている。そこで、この異常スプライシングを阻止する目的で、異常

スプライシングの標的配列に対し、アンチセンス核酸を pre-mRNA レベルで結合させ、エクソントラップを阻止し、正常なスプライシングに戻す、「アンチセンス療法」が有効ではないかと考えた (図 2-B)。そこで、これらの標的配列に対し有効なアンチセンス核酸を網羅的に設計し、さまざまな細胞系に投与しスプライシングの是正を検討し、アンチセンス核酸のカクテル、AED (以降 AED カクテル) を選び出した。次に我々はビボモルフォリノ (Octa-Guanidine Morpholino: VMO) というアンチセンス核酸を用い、AED カクテルをモデル動物及び患者細胞に投与し治療効果を検討した。患者筋芽細胞に対し、AED カクテルを投与したところ、非投与マウスと比較し、糖鎖の回復を示唆する糖化型 α DG の分子量の劇的な増加がみられた (図 3-A) ²⁾。また尾静脈経由のモデルマウスへの AED カクテル全身投与においても、O マンノース型糖鎖の劇的な回復がみられた (図 3-B) ²⁾。最後に、患者由来筋芽細胞を使い AED カクテル投与によるラミニン凝集アッセイを行った。患者筋芽細胞では筋管での α DG の発現は激減している。しかし AED カクテル投与により、患者由来の筋管は α DG の糖鎖が正常レベルに回復し、正常と同程度の典型的なラミニンの凝集が観察された (図 2-C) ²⁾。これらの結果は AED カクテル投与により、筋管が機能的にも回復したことを示唆する。

おわりに

アンチセンス核酸を用いたスプライシング操作を標的とした治療法の一つに、もっとも頻度の高い筋ジストロフィーである Duchenne 型筋ジストロフィーを Becker 型にするエクソンスキップ療法があげられる。

この治療法は現在国際治験が進行しており最も実現可能な治療薬剤として注目されている ²⁾。今回われわれが開発した方法は、エクソントラップ阻害の原理に基づく治療法であり、エクソンスキップとは原理が異なり、FCMD の根本的分子標的治療に道を開くものである ²⁾。Duchenne 型と異なり、患者のほとんどが同じ変異をもつため、FCMD に対するアンチセンス療法は、日本のすべての FCMD の患者を対象に同一の方法で行えるものであり有望であると考え。今後医療応用の実現を目指したい。

文 献

- 1) Fukuyama, Y. *et al.* : Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type - clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev.*, 3 : 1-29, 1981
- 2) Tanguchi-Ikeda, M. *et al.* : Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature*, 478: 127-131, 2011
- 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 & Toda, T. The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *J. Hum. Genet.*, 51 : 915-926, 2006
- 6) Michele, D. E. *et al.* : Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*, 418 : 417-422, 2002
- 7) Cordaux, R. & Batzer, M. A. : The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Rev. Genet.*, 10 : 691-703, 2009
- 8) Goemans, N.M. *et al.* : Systemic administration of PRO51 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl. J.M.*, 364 : 1513-1522, 2011

< 細胞 ニュース >

第 39 回日本股関節学会

開催年月日: 2012 年 12 月 7 日 (金)・8 日 (土)

代表者: 遠藤 直人 (新潟大学教授)

開催地: 新潟市中央区

会場: 朱鷺メッセ (新潟コンベンションセンター)

事務局連絡先: 新潟大学大学院医歯学総合研究科 整形外科学分野

TEL: 025-227-2272 FAX: 025-227-0782

開催案内 URL: <http://shinsen.biz/hip39/index.html>

テーマ: 評価と実践 - 質の高い安全な医療を行うために -

特別講演

1. Kjeid Seballe, M.D.

(Department of Orthopaedics, Aarhus University, Denmark)

「Periacetabular Osteotomy Surgery using The Minimally Invasive Approach」

2. 松下 隆先生 (帝京大学医学部整形外科学 主任教授)
「脆弱性骨折 現状と今後の対応」

3. Carlos Sancineto, M.D. (Hospital Italiano de Buenos Aires Orthopaedic Trauma Section Argentina)

The treatment of nonunion and malunion of acetabular fractures.

4. 田邊 裕治先生 (新潟大学工学部機械システム工学科 教授)
「股関節バイオメカニクスに関する最近の話題」

5. Guoan Li, Ph.D. (Bioengineering Lab., Department of Orthopaedic Surgery, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School)

Innovative Investigation of Native and Artificial Hip Kinematics Using Dual Fluoroscopic Imaging System …他

《神経内科で診る認知症のある疾患》

9 筋疾患の身体症状と認知症状

久我 敦*

戸田 達史*



- 筋疾患には筋力低下・筋萎縮などの身体症状に認知症状を合併するものがある。
- 近年、筋疾患の病態の解明が急速に進展したことで、認知症状を合併するメカニズムも明らかになりつつある。
- 筋疾患に合併する認知症状の特徴を知ることが日常診療に有用である。



キーワード デュシェンヌ型/ベッカー型筋ジストロフィー、福山型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、知的障害

*神戸大学大学院医学研究科 神経内科・分子脳科学

はじめに

筋疾患の身体症状の基本は近位筋優位の筋力低下と筋萎縮であるが、筋疾患の一部には認知症状が合併する。骨格筋は中枢神経の最終効果器であるから、身体症状と認知症状はずいぶんかけ離れているように思える。しかし、両者が合併するメカニズムには各疾患の病態が深くかかわっており、その理解は日常臨床においても有用であると思われる。

本稿では、その代表的疾患としてデュシェンヌ型/ベッカー型筋ジストロフィー、福山型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィーを取り挙げる。

●認知症状を合併する筋疾患

1. デュシェンヌ型/ベッカー型筋ジストロフィー

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) は 3,000 出生男児に 1 人の頻度で見られる X 染色体劣性遺伝の進行性筋疾患である。筋力低下の進行は早く、乳幼児期に歩行の獲得が遅い、転びやすいといった症

状が始まり、10 歳代に車いす、20 歳以降は人工呼吸管理を必要とする。現時点で確立した治療法はないが、原因遺伝子ジストロフィンの変異を是正するエクソン・スキッピング治療の臨床治験が進行中である。

Duchenne は最初に診た DMD 症例を「脳性麻痺と偽性 (筋) 肥大の共存」という視点で報告しており、この症例は知的障害を合併していたと推察されている¹⁾。ポリオと筋ジストロフィーの鑑別すら困難であった 19 世紀半ばにおいて¹⁾、同じ DMD でも知的障害を合併する場合と、しない場合があることは非常に理解しづらい現象であったにちがいない。では 21 世紀の我々はその理由を正確に説明できるだろうか？

まず DMD に合併する知的障害の臨床的特徴は以下のようにまとめられる。その特徴とはすなわち、①筋力低下の重症度と知的障害の重症度は関連しない、②知的障害は進行性の経過をとらない、③IQ の低下は -1SD ほどの軽症のものから IQ が 50 以下という severe mental retardation までかなりの個人差がある、④IQ のなかでも特に言語性 IQ が低下していること、の 4 点である。Cotton らは DMD 患者の知能に関する 32

の臨床研究の meta-analysis を行った²⁾。それによると 1,146 名の DMD 患者の IQ 測定結果の解析で、Full-scale IQ < 70 の患者が全体の 34.8% を占めた。その一方で 5.9% の患者の IQ は 110 を超えており、平均以上の知能を有する患者も存在することが確認された。これまでの報告では脳重量や脳室拡大と知的障害合併の関係は判然としない。また病理学的所見に疾患特異的といえるものはない。

1987 年 Kunkel らによってジストロフィン遺伝子がクローニングされてから、ジストロフィン遺伝子の変異部位と知的障害の合併の間に何らかの規則性を見出そうとする研究が始まった。すると 5' 側に変異がある症例と較べて 3' 側に変異がある症例のほうが知的障害を合併しやすい傾向が明らかになった。ジストロフィン遺伝子は 79 のエクソンからなる全長 2.3Mb の巨大な遺伝子であるが、発現する組織や発生の時期によって、複雑なスプライシング調節を受けている。中枢神経系に発現するジストロフィンでは少なくとも 7ヵ所のプロモーター領域があることが確認されており、主なアイソフォームとして分子量の大きい Dp427 と分子量の小さい Dp140, Dp116, Dp71 がある (図 1a)。最近の研究では特に Dp140 と Dp71 の発現に影響を与える変異が知的障害の合併と関連していることが明らかとなってきた^{3,4)}。特に Dp71 はジストロフィン蛋白の C 末端ドメインのみから作られる。したがって、N 末端側でアクチンと結合するという骨格筋全長ジストロフィンとは機能が大きく異なると考えられている。これらの知見は「筋力低下の重症度と知的障害の重症度は相関しない」という事実ともよく合致している (図 1b)。

近年 DMD 患者の脳を対象とした機能的画像検査の研究も行われており PET を用いた検討では健常者と比べて右中心後回など 5 つの領域で FDG の取り込み低下が確認された⁵⁾。これらの領域で発現しているジストロフィンのアイソフォームは何か？ そのアイソフォームの生理的機能は何か？ ということが今後さらに検討されていくであろう。

ベッカー型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy : BMD) は DMD とは異なり、多くは in frame の変異であるためジストロフィン蛋白は完全には欠失していない。しかし筋力低下が軽度な BMD でもこれまで述べてきた理由から知的障害が強い場合がある (図 1c)。BMD は神経内科ではなく、不整脈や心不全で循環器科のみに通院していることもある。原因不明の心筋症患者で、意思疎通が困難であったり、服薬コンプライアンスが悪いケースでは BMD の可能性を考慮する必要がある。

2. 福山型筋ジストロフィー

福山型筋ジストロフィー (Fukuyama congenital muscular dystrophy : FCMD) はわが国では DMD に次いで 2 番目に多い小児の筋ジストロフィーである。生後早期から哺乳力の低下などの症状があり、終生歩行を獲得することはない。多小脳回を典型とする脳奇形を合併して、重篤な知的障害を必発する。FCMD は 1959 年わが国の福山によって初めて報告されたが、当時は知的障害を伴う筋疾患という概念自体が世界でも類をみないものであった⁶⁾。

1998 年に原因遺伝子 fukutin が同定され、fukutin 遺伝子の 3' 非翻訳領域に存在するレトロトランスポゾン挿入変異が日本人に特異的にみられるものであることがわかった (ヘテロ保因者は日本人の約 90 人に 1 人と高率である)⁷⁾。つまり、わが国の FCMD は遺伝的に単一な疾患であり、DMD/BMD のようなアレル異質性は生じないので、知的障害が必発するのである。

ところで FCMD の分子病態は α ジストログリカン (α -dystroglycan : α DG) という糖蛋白質を中心に説明される。 α DG は基底膜側の構成成分ラミニンと結合することで骨格筋の物理的強度を保証しているが、この結合には α DG に複雑な糖鎖修飾が施される必要がある。詳細は筆者らの総説⁸⁾をご参照いただきたいが、FCMD においてはこの糖鎖修飾に異常が生じた結果、 α DG がラミニンと結合できなくなり、筋ジストロフィーを発症する。FCMD の原因遺伝子 fukutin の生理的機能は現在のところ不明だが、糖鎖修飾に関

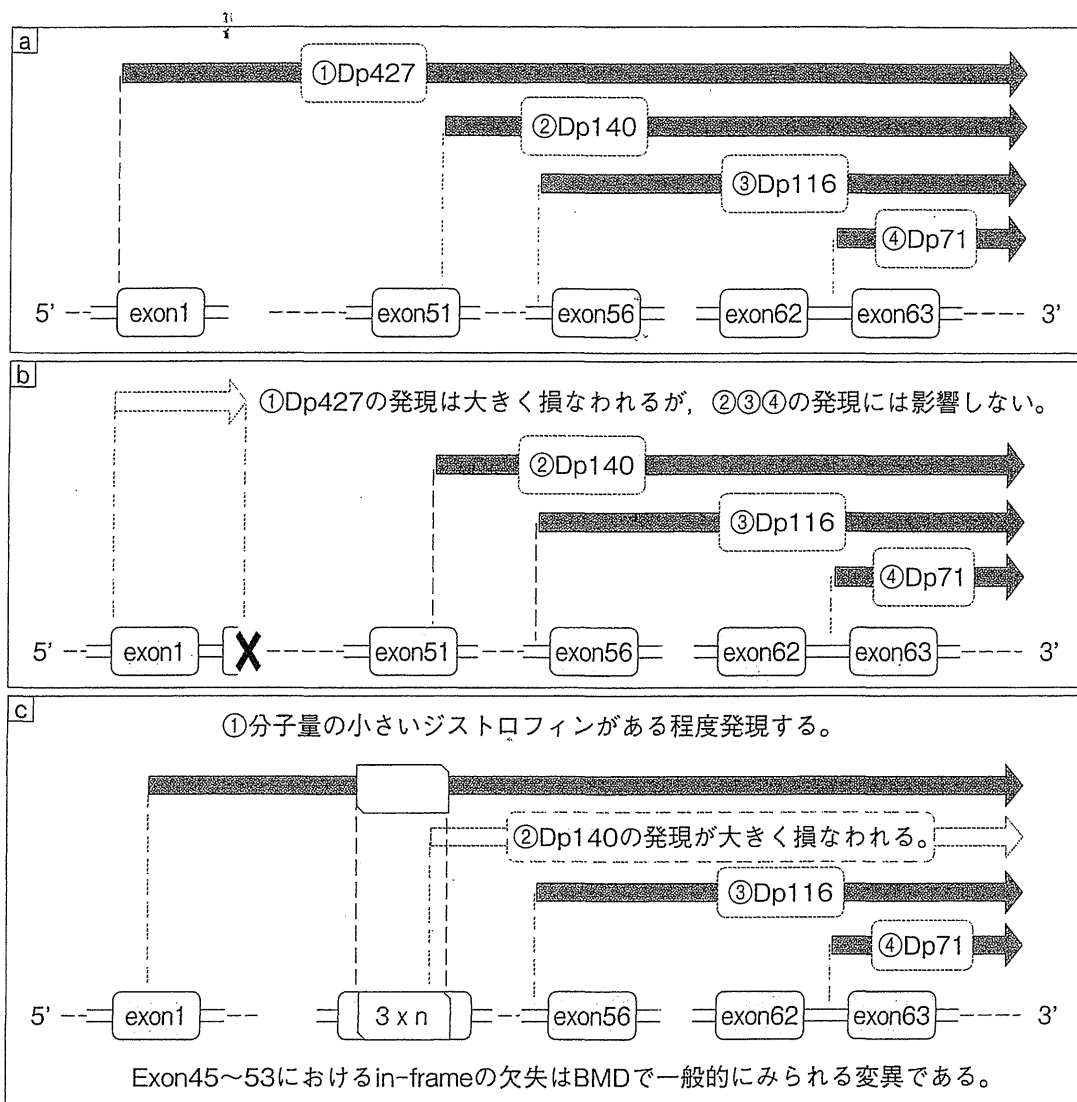


図 1 ジストロフィンアイソフォームの発現と筋症状/認知症状の関係

a : 正常例

- ① 全長ジストロフィン Dp427 は中枢神経系でも発現しているが、骨格筋でより重要な機能を果たしている。
- ② Dp140 の発現調節は複雑で、プロモーター領域は intron44 に存在しており、exon45～51 の 5' 非翻訳領域の影響も受けている。
- ③ Dp116 は成人の末梢神経に発現しているが、胎生期には脳でも発現しているため、知的障害との関係がある。
- ④ Dp71 は全長ジストロフィンの C 末端側にあたる部分だけで構成される。

註. 網膜にのみ発現するアイソフォーム Dp260 は省略した。

b : 筋症状が重篤でも知的障害を合併しない例

c : Becker 型でも知的障害が重篤である例

与する何らかの機能を有していると推測されている。

α DG は骨格筋だけでなく脳でも豊富に発現しており、多小脳回を基本とする脳病変の発生においても α DG の糖鎖修飾異常が病態の中心であると考えられる。通常、大脳皮質の表面はグリア境界膜—基底膜複合体によって覆われており、神経

組織が露出することはない。しかし FCMD では、基底膜の構成成分ラミニンとの結合能が低下するため、グリア境界膜—基底膜複合体に破れが生じ、胎生期の神経細胞の移動を阻止できずに神経組織がくも膜下腔へ迷出し、多小脳回が発生するものと考えられる。

表 1 筋強直性ジストロフィーの臨床症状

・中枢神経系	精神発達遅延～知能低下, 日中の傾眠, 情緒障害
・筋骨格系	筋力低下, 筋萎縮, ミオトニア
・循環器系	心伝導ブロック, 不整脈, 心筋症
・消化器系	消化管運動障害
・呼吸器系	呼吸不全
・内分泌系	耐糖能異常, 女性化乳房, 性腺機能不全
・血液系	低ガンマグロブリン血症
・その他	白内障, 前頭部禿頭

さらに近年, fukutin 遺伝子の点変異症例は古典的 FCMD と異なる臨床像をとることがわかってきた. 点変異のホモ接合あるいは点変異とレトロトランスポゾン挿入変異の複合ヘテロ接合の場合, その点変異の影響の大きさによって重症度が変化する. 一般に複合ヘテロ接合の患者は重症であることが多いが, 最近ではむしろ軽症で知的障害を合併しない症例の報告もあり, 注目されている^{9,10)}.

3. 筋強直性ジストロフィー

筋強直性ジストロフィー (Myotonic dystrophy: DM) の特徴として表 1 に挙げた多彩な身体症状がある. DM は筋原性疾患ではないので, その筋症状と認知症状は全身性疾患の一症状と理解することができる.

DM の原因遺伝子には 2 種類あって, わが国では DMPK 遺伝子が原因の DM type 1 (DM1) が大多数である. しかし, 最近になって ZNF9 遺伝子が原因の DM type 2 (DM2) がわが国にも存在することが報告された¹¹⁾. DM1, DM2 は共に常染色体優性遺伝形式をとる. DM1 では 3' 非翻訳領域内で CTG リピートが, DM2 では最初のイントロン内で CCTG リピートが異常伸長している. 患者家系では世代を経るに従ってリピート数が増加するため, 発症年齢が低下して重症化する現象 (anticipation) が観察される. この現象は特に女性 DM 患者から子供へ遺伝する場合により顕著である.

DM ではリピート数の増加と相関して IQ が低

下する¹²⁾. リピート数が数千まで伸長すると著明な筋力低下に精神発達遅延を合併する congenital form となる (註. DM2 には congenital form はない). たとえば産婦人科から「フロッピーインファント」に関してコンサルトを受けて NICU へ行くと, 母親が診断未確定の DM 患者であった, というような事態に遭遇すると, anticipation という現象の深刻さを痛感させられるものである. Congenital form あるいは小児発症例では精神発達遅滞に加えて, 自閉症やアスペルガー症候群, 注意欠陥障害などの範疇で捉えられる症状の合併も少なくない.

一方で, 内科を受診する DM 患者の多くは成人発症である. 成人 DM 患者の日常臨床で問題になる認知症状は, IQ の低下といった数値では表現しづらい独特のものである. 本症患者と接する医療者誰もが診療上困難を感じるのは, 特有の「コミュニケーションのとりづらさ」ではないだろうか. わが国の小早川, 河村らの検討¹³⁾によると DM1 患者ではネガティブな情動 (怒り, 嫌悪, 恐怖など) を示す表情の認知が障害されており, コミュニケーション障害の要因の一つになっている可能性がある.

最近の研究によって, DM1 患者では CUG リピートが延長した DMPK1 転写産物によって RNA 結合蛋白の機能が障害され, さまざまな遺伝子の pre-mRNA にスプライシング異常が生じることがわかってきた. たとえば病名の由来であるミオトニアの原因としては骨格筋の Cl チャンネル遺伝子のスプライシング異常が考えられており, 動物モデルでも実証されている. あるいは耐糖能異常に関して, インスリン受容体遺伝子のスプライシング異常が示されている.

認知症状の原因として, 脳に発現する遺伝子のなかでもっともよく研究されているのがタウ遺伝子のスプライシングの変化である. リピート数の増加に従ってタウの胎児型アイソフォームの発現量が増えることが実証されており, 病態との関連が推測されている. タウ蛋白はアルツハイマー病の病理所見である神経原線維性変化のなかに見出されることで有名で, またタウ遺伝子の変異に

よって前頭側頭葉型認知症が生じる。これらはDM患者の脳において、脳室拡大と脳萎縮を認めること、病理所見としてアルツハイマー病と同じく神経原線維変化を認めることとよく合致している。

ま と め

筋ジストロフィーは遺伝子の異常にアプローチする治療の対象疾患として今後さらに注目を集めると考えられる。本稿で述べた疾患はいずれも筋症状に認知症状を合併しうる。合併する背景にある分子病態の理解が今後の遺伝子診療には不可欠であると思われる。

文 献

- 1) Bach JR : The Duchenne de Boulogne. Journal of history of Medicine 55 : 158-178, 2000
- 2) Cotton SM, Voudouris NJ, Greenwood KM : Intelligence and Duchenne muscular dystrophy : full scale, verbal, and performance intelligence quotients. Dev Med Child Neurol 43 : 497-501, 2001
- 3) Daoud F, Angeard N, Demerre B, et al. : Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. Hum Mol Genet 18 : 3779-3794, 2009
- 4) Taylor PJ, Betts GA, Maroulis S, et al. : Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. PLoS One 5 : e8803, 2010
- 5) Lee JS, Pfund Z, Juhasz C, et al. : Altered regional brain glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy : a PET study. Muscle Nerve 26 : 506-512, 2002
- 6) Fukuyama Y : Fukuyama congenital muscular dystrophy, histroy and perspectives. Brain and Nerve 60 : 43-51, 2008
- 7) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, et al. : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Nature 394 : 388-392, 1998
- 8) 久我 敦, 金川 基, 戸田達史 : α ジストログリカン異常症. Brain and Nerve 63 : 1189-1195, 2011
- 9) Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Hayashi YK, et al. : A case of Fukuyama-type congenital muscular dystrophy with a very mild mental deficit. Neuromuscul Disord 16 : 274-276, 2006
- 10) Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, et al. : Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. Ann Neurol 60 : 597-602, 2006
- 11) Saito T, Amakusa Y, Kimura T, et al. : Myotonic dystrophy type 2 in Japan : ancestral origin distinct from Caucasian families. Neurogenetics 9 : 61-63, 2008
- 12) Turnpenny P, Clark C, Kelly K : Intelligence quotient profile in myotonic dystrophy, intergenerational deficit, and correlation with CTG amplification. J Med Genet 31 : 300-305, 1994
- 13) Kobayakawa M, Tsuruya N, Takeda A, et al. : Facial emotion recognition and cerebral white matter lesions in myotonic dystrophy type 1. J Neurol Sci 290 : 48-51, 2010

症例報告

骨格筋でのみアミロイドの沈着を確認しえた
アミロイドーシスの1例大塚 喜久^{1)*} 安井 直子¹⁾ 関口 兼司¹⁾ 古和 久朋¹⁾
西野 一三²⁾ 荻田 典生¹⁾ 戸田 達史¹⁾

要旨：症例は75歳男性，7カ月前から進行する歩行障害を主訴に入院した。両下肢近位筋優位の四肢筋力低下と腱反射低下をみとめた。血清免疫電気泳動検査でIgA型M蛋白が陽性，骨髓中に形質細胞の単クローン性増加をみとめIgA型多発性骨髓腫と診断した。CTにて異常がみられた外側広筋の筋生検ではring fiber様の異常筋線維をみとめ，その細胞質周囲はCongo redで染色され，アミロイドミオパチーと診断した。多発性骨髓腫にともなう貧血・腎障害・骨病変などの臓器障害はみとめず，心筋・直腸粘膜および腓腹神経の生検ではアミロイドの沈着を証明できなかった。本例は骨格筋においてのみ証明しえたアミロイドーシスであった。

(臨床神経 2012;52:739-743)

Key words：アミロイドミオパチー，アミロイドーシス，多発性骨髓腫

はじめに

アミロイドーシスとは不溶性の線維蛋白質であるアミロイドが諸臓器に沈着することによって生じる疾患群である。神経系では末梢神経へのアミロイド沈着が多く，骨格筋への沈着はまれである。今回，われわれは骨格筋生検によりアミロイドの沈着を確認しえたアミロイドミオパチーの症例を経験した。アミロイドーシスでは多臓器が障害され，各臓器での生検にてアミロイドの沈着が確認されることも多いが，本例ではアミロイドの沈着は骨格筋のみに限局して証明された。

症 例

症例：75歳 男性

主訴：歩行障害

既往歴：10代後半から慢性C型肝炎，68歳より高血圧，70歳より肥大型心筋症と診断され利尿薬を投与されていた。

家族歴：特記事項なし。

現病歴：2008年9月より両下肢の脱力感が出現し，階段を昇りづらくなった。同12月から手をつかなくとも床から立ち上がれなくなった。2009年1月に他院にて血清中CKが500 IU/l台の上昇を指摘された。同3月から歩行の際に杖が必要になった。同4月，筋疾患がうたがわれ当科に紹介受診した。

一般身体所見：両下腿にpitting edemaをみとめた。

神経学的所見：意識清明で，高次機能や脳神経領域に異常はなかった。四肢にMMT3~4/5程度の下肢優位，近位筋優位の筋力低下をみとめた。筋萎縮や筋肥大はみとめなかった。四肢腱反射はすべて低下しており，両下肢で振動覚が低下していた。

検査所見：一般検血に異常はなかったが，生化学検査でCK 519IU/lと上昇していた。抗核抗体，抗Jo-1抗体，抗U1-RNP抗体など自己抗体は陰性であった。IgG 651mg/l，IgM 29mg/lと低下，IgA 1,130mg/dlと上昇していた。血清免疫電気泳動検査ではIgA型M蛋白陽性，尿中入型Bence-Jones蛋白も陽性であった。骨髓穿刺で，形質細胞の単クローン性増加をみとめたためIgA型多発性骨髓腫と診断した。

筋CTでは両側下肢筋に低吸収域をみとめ，広範な脂肪置換がうたがわれた。上肢の筋には明らかな異常はみとめられなかった(Fig. 1)。運動神経伝導検査では両側正中神経で遠位潜時の延長(右5.2ms，左4.3ms)をみとめた。感覚神経伝導検査では左正中神経の感覚神経活動電位(sensory action potential, SAP)が8.0μVと低値で，右正中神経のSAPや両側腓腹神経のSAPは導出されなかった。針筋電図検査では右上腕二頭筋・右大腿直筋・右三角筋でfibrillationやpositive sharp wave(PSW)，低振幅，短持続のmotor unit potentials(MUP)をみとめ，早期動員パターンを呈していた。

以上の所見から，骨髓腫にともなった筋障害と遠位優位の末梢神経障害の合併をうたがった。筋障害の確定診断の目的で左外側広筋から筋生検をおこなった。ヘマトキシリン・エ

*Corresponding author: 神戸大学大学院医学研究科神経内科学 [〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-2]

¹⁾神戸大学大学院医学研究科神経内科学²⁾国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部

(受付日：2011年5月23日)

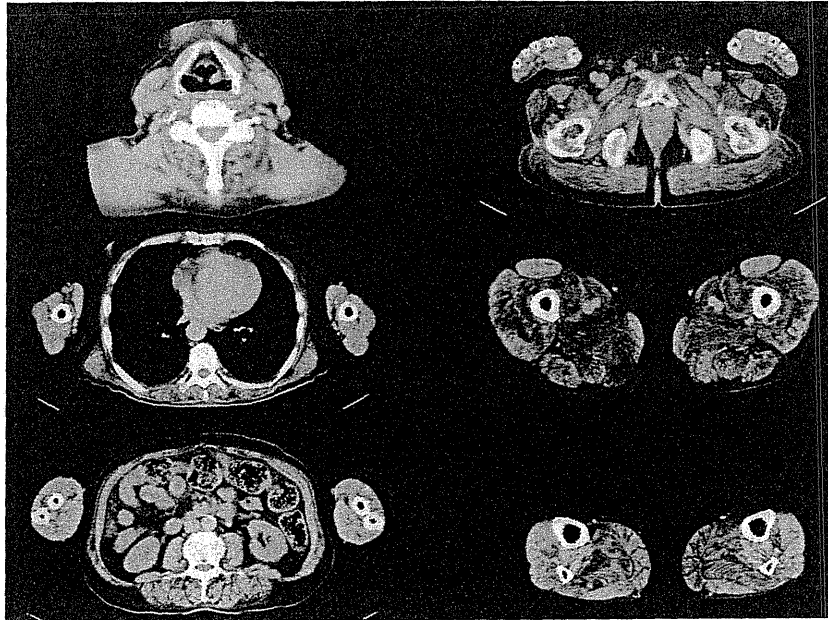


Fig. 1 Muscle CT scan images.

Muscle CT scan showed severe fatty infiltration of femoral muscles. Moderate fatty infiltration was observed in gastrocnemius, soleus, and tibialis anterior muscles.

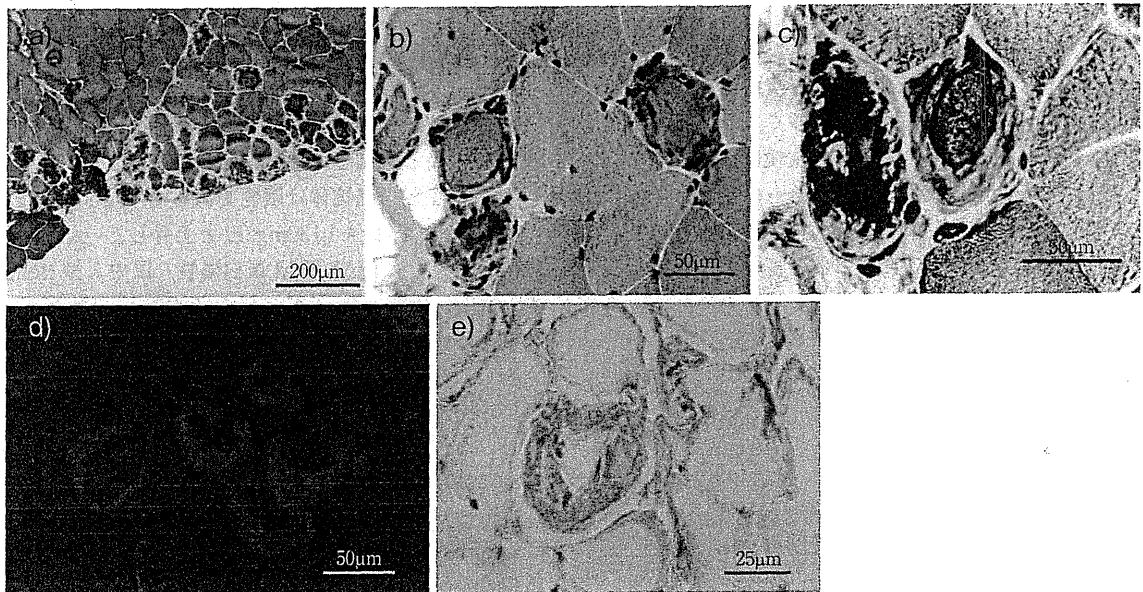


Fig. 2 Microscopic findings of biopsied specimen of left vastus lateralis muscle tissue.

- a), b) Hematoxylin and eosin stained cryosections showed peripheral replacement of cytoarchitecture with basophilic material and a preserved core ringed with nuclei in some fibers.
- c) NADH cryosections showed disorganized intermyofibrillar networks at the periphery of abnormal fibers.
- d) Congo red-stained cryosections viewed under a fluorescence microscope demonstrates marked congophilia of endomysium.
- e) Amyloid deposits were stained by anti- λ light chain antibody (detection by DAB).

オジン (HE) 染色では、著明な筋線維の大小不同に加えて、ring fiber 様に辺縁部が好塩基性に染色され多数の核を有する筋線維をみとめた。これらの筋線維の周辺部は NADH 活

性を欠いているか、筋原線維の配列がいちじるしく乱れていた。異常筋線維の細胞質周囲、ならびに一部の間質は Congo red で染色されるアミロイドの沈着をみとめ、アミロイドミ

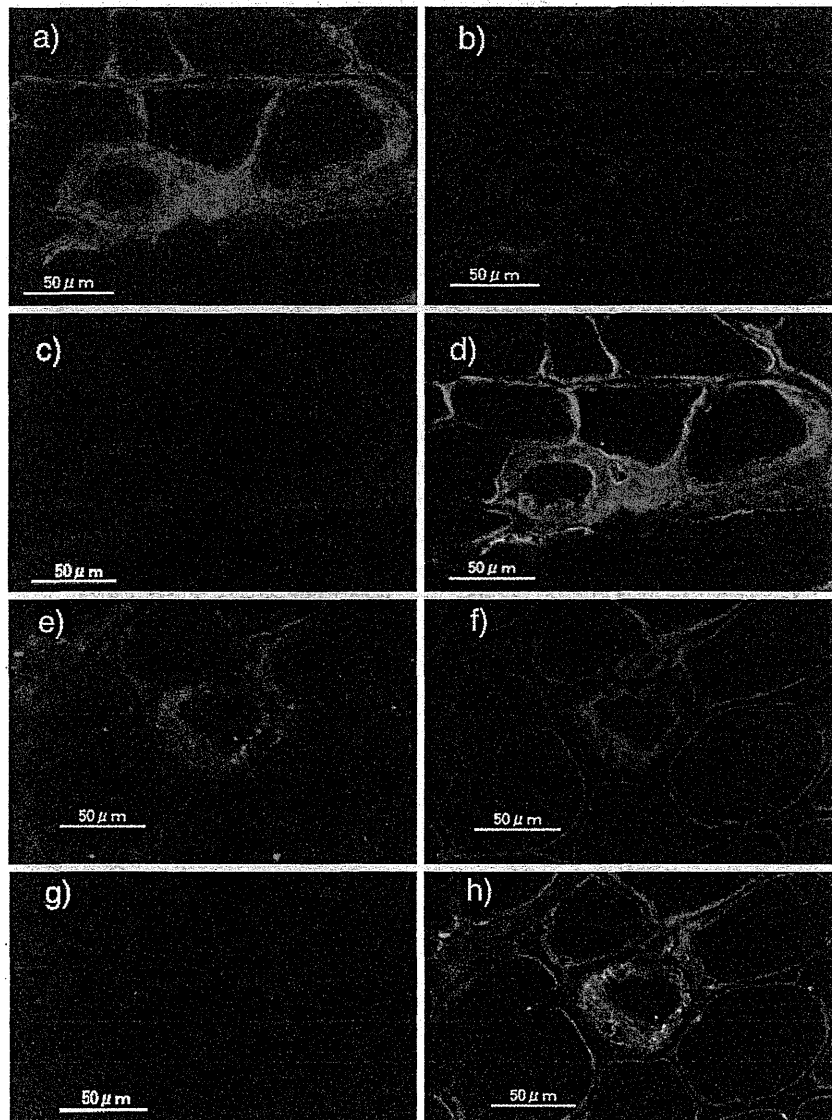


Fig. 3 Double immunohistochemical staining of left vastus lateralis muscle tissue using anti-dystrophin antibody and anti- λ light chain antibody (green: anti- λ light chain antibody, red: anti-dystrophin antibody, blue: DAPI).

a)-d) Anti- λ light chain antibody-positive sites were present outside of the anti-dystrophin antibody positive sites. Deposition of amyloid on the outside of the cell membrane was indicated.

e)-h) In some muscle fibers, the anti-dystrophin antibody and anti- λ light chain antibody positive area looked like a thick layered membrane. Many nuclei were observed on the periphery of these muscle fibers.

オパチーと診断した。抗 λ 鎖抗体をもちいた免疫染色でアミロイド沈着部分に抗 λ 鎖抗体陽性所見をみとめ、ALアミロイドの沈着であることを確認した(Fig. 2)。またアミロイドの沈着部位と細胞膜との位置関係を確認するため抗ジストロフィン抗体と抗 λ 鎖抗体との二重免疫染色をおこない、筋細胞膜より外側にアミロイドが沈着していることを確認した。また一部の筋線維では筋細胞膜が重なるように厚くなり、同部位にアミロイドが沈着していた(Fig. 3)。末梢神経障害合併の有無を確認するため、左腓腹神経生検を施行したが軽度の有髄線維密度の低下をみとめるのみで、アミロイドの沈着は

みとめなかった。全身検索の目的で、直腸粘膜生検や心筋生検もおこなったが、これらの組織にはアミロイドの沈着はみとめられなかった。

考 察

アミロイドーシスとは β シート構造を有する蛋白質の立体構造のミスフォールディングと重合により生じた不溶性の線維蛋白質であるアミロイドが諸臓器に沈着することによって臓器障害をきたす疾患群である。アミロイドーシスの原因と

しては原発性または多発性骨髄腫にともなう AL アミロイドーシスや家族性アミロイドーシスなどが知られている。アミロイドの沈着臓器としては腎臓、心臓、肝臓、末梢神経などが多く、筋組織への沈着はまれとされており、Prayson らの報告によると生検筋 3,937 例のうちアミロイド沈着をみとめたのは 16 例 (0.4%) に過ぎなかった¹⁾。

一般にアミロイドミオパチーは中高齢の男性に多く、下肢近位筋優位の筋力低下を呈し、筋の仮性肥大による巨舌やヘラクレス体型が特徴的所見として知られている²⁾。しかし Chapin らの報告によると、仮性肥大がみとめられたのはアミロイドミオパチー 79 例中 27 例で⁴⁾、Gertz らの報告でも 12 例中 3 例のみと⁵⁾、その出現頻度は決して高いとはいえ、本例のように仮性肥大がみとめられない症例も多い。中高齢者の原因不明の筋障害のばあい、仮性肥大がみとめられなくともアミロイドミオパチーを鑑別にあげる必要がある。

検査所見では血清 CK は正常ないし上昇しても軽度にとどまることが多い。血清中もしくは尿中に M 蛋白をみとめることは、アミロイドーシスの原因疾患を診断する上で重要な所見である。針筋電図では安静時放電をともなう筋原性変化を呈する。筋病理所見ではアミロイドの沈着が筋周膜や筋内膜・血管周囲にみとめられる。本例では HE 染色で ring fiber 様に周囲が好塩基性に染色され、辺縁部に多数の核を有する異常筋線維をみとめており、Chapin らの報告⁴⁾と比較しても、アミロイドミオパチーに特徴的な病理所見と考えられる。しかし異常筋線維の周囲にみられた核は筋鞘核か他の細胞成分の核かなのかは不明であり今後、検討すべき課題である。筋原性変化に加えて小角化線維の集簇や筋線維タイプ群化といった神経原性変化をみとめることが多く、Prayson ら¹⁾はアミロイドミオパチーで腓腹神経生検をおこなった 7 例のうち、全例で末梢神経にアミロイドを確認している。筋病理所見において高頻度に神経原性変化が混在しているのはアミロイドミオパチーを発症する時点ですでにアミロイドニューロパチーをきたしている症例が多いためと考えられる。本例では神経伝導検査では末梢神経障害の存在が示唆され、筋生検でも一部に小角化線維の集簇をみとめた。腓腹神経生検では軽度の有髄線維密度の低下をみとめ、末梢神経障害の原因がアミロイドーシスである可能性は否定できないが Congo red 染色は陰性であり、アミロイドは同定されなかった。また直腸粘膜・心筋の生検でもアミロイドは同定されなかった。

アミロイドミオパチーにおける骨格筋の機能障害の機序としては、筋線維の直接的な障害が原因とする説やアミロイド

が血管に沈着することで筋細胞が虚血に陥ることによる説がある⁶⁾。アミロイドミオパチーの症例において生検筋の電子顕微鏡による観察でアミロイドフィラメントに取りこまれた筋の筋細胞膜・基底膜の破壊をみとめたことが報告されている⁶⁾。われわれの症例では、抗入鎖抗体による免疫染色で筋細胞の周囲にアミロイドが沈着している像が確認された。また筋細胞膜が重なるように変化している像もみとめられ、アミロイドによる筋細胞膜への直接的な障害の可能性が示唆された。

本例は多発性骨髄腫にともなうアミロイドミオパチーであるが、貧血・腎障害・骨病変など典型的な臓器障害をみとめず、通常診断に有用とされる直腸粘膜生検や神経生検ではアミロイドの沈着を証明できなかった。そのため筋力低下の原因特定のために筋生検をおこない、はじめてアミロイドーシスの診断が確定した。筋障害の所見があり、他の臓器においてアミロイドーシスを示唆する所見が乏しいばあいは、積極的に筋生検をおこなうべきである。

謝辞：免疫染色をご指導いただいた神戸大学大学院医学研究科分子脳科学教室・金川基先生、末梢神経の病理診断を施行していただいた国立病院機構南京都病院リハビリテーション科・岡伸幸先生に深謝いたします。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- 1) Prayson RA. Amyloid myopathy: Clinicopathologic study of 16 cases. *Hum Pathol* 1998;29:463-468.
- 2) 小宮山純, 鬼頭正典, 高橋三津男ら. 骨格筋仮性肥大型アミロイドミオパチーの運動障害の成因について. *臨床神経* 1991;31:296-300.
- 3) 豊岡圭子, 安井久美子, 上田佳世ら. アミロイドーシスにみられた筋の仮性肥大. *神経内科* 2009;70:217-219.
- 4) Chapin JE, Kornfeld M, Harris A. Amyloid myopathy: characteristic features of a still underdiagnosed disease. *Muscle Nerve* 2005;31:266-272.
- 5) Gertz MA, Kyle RA. Myopathy in primary systemic amyloidosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60:655-660.
- 6) Kyriakides T, Marquez B, Panousopoulos A, et al. Amyloid myopathy: evidence for mechanical injury to the sarcolemma. *Clin Neuropathol* 2002;21:145-148.