

論文要旨

Miyoshi myopathy patients with novel 5' splicing donor site mutations showed different dysferlin immunostaining at sarcolemma.

5'スプライス部位に新規の遺伝子変異を持つ三好型ミオパチー患者は筋細胞膜において特異なジスフェルリン蛋白の染色性を呈する

齊藤明子

【序論および目的】

三好型ミオパチー(三好型筋ジストロフィー)は、本邦の三好和夫博士により記述された下肢遠位部、特に下腿屈筋群が強く侵される常染色体性劣性遺伝性の筋ジストロフィーである。1998年以降、主に米国の研究グループにより、三好型ミオパチーがジスフェルリン(dysferlin)蛋白質の遺伝子変異により発症すること、常染色体劣性肢体型筋ジストロフィーの一部(LGMD2B)と同一の遺伝子変異に起因する疾患であることが報告された。ジストロフィン遺伝子変異に起因するデュシャンヌ型およびベッカー型筋ジストロフィーにおいては、ジストロフィンの完全欠損型、部分欠損(内部欠損)型の遺伝子変異がそれぞれ筋細胞膜内部のジストロフィン蛋白質の完全欠損、部分欠損を引き起こし、疾患の重症度に密接に関連していることが明らかになっているが、同様の解析は三好型ミオパチーやLGMD2Bでは行われていなかった。そこで、本邦の三好型ミオパチー症例における遺伝子変異のタイプを明らかにすることと、各遺伝子変異が筋病理所見、臨床症状、臨床経過とどのように関連するのかを明らかにすることを目的に本研究を行なった。

【材料および方法】

患者：鹿児島大学病院神経内科および関連病院にて三好型ミオパチーと臨床診断された5症例。

方法：

(1) ジスフェルリン遺伝子変異の検索

リンパ球から抽出したゲノムDNAを用いて、各症例のジスフェルリン遺伝子の全55エクソンをPCR法で増幅した。得られた各症例あたり55本のPCR産物を熱変性後、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、遺伝子変異に伴い核酸の移動度が異なるPCR断片の有無を検索した(PCR-SSCP法)。移動度が異なるPCR断片は、直接塩基配列決定法により遺伝子変異を同定した。

(2) 筋病理組織検査とウェスタンブロット法によるジスフェルリン蛋白発現の解析

各症例の生検筋についてHematoxylin and eosin, Gomori trichrome, ATPase, NADH-TR, PAS, oil Red O染色により病理組織検査を行い、筋病理所見を明らかにした。一方、抗ジスフェルリンモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学法により、ジスフェルリン蛋白の筋組織における発現パターンを同定した。また、同じ抗ジスフェルリンモノクローナル抗体を用いて、生検筋から抽出した蛋白のウェスタンブロット解析を行い筋病理組織所見と対比した。

(3) 遺伝子変異のタイプと筋病理所見、ジスフェルリン蛋白の筋組織における発現パターン、臨床症状、臨床経過との関連を比較検討した。

【結 果】

検索した全症例にジスフェルリン遺伝子変異を見だし、臨床診断された5症例すべてが遺伝子学的にも三好型ミオパチーであることを確認した。5症例中3症例はジスフェルリン蛋白質コーディング領域に停止コドンをもたらす変異であったが、2症例において5' スプライス部位に過去に報告のない、それぞれ異なる2種類の新規の遺伝子変異を見出した。停止コドンをもたらす変異を持つ症例の抗ジスフェルリンモノクローナル抗体による免疫組織化学染色では、ジスフェルリン蛋白の発現を確認できなかったが、5' スプライス部位に変異を持つ2症例では、ジスフェルリン蛋白のまだら状の発現が認められた。しかしながら、生検筋から抽出した蛋白のウエスタンブロット解析では、5症例ともジスフェルリン蛋白の発現が確認できなかった。一方、検索した5症例の遺伝子変異、蛋白発現と臨床症状、経過との間には、ジストロフィン遺伝子変異による筋ジストロフィー症（完全欠損、重症型：デュシャンヌ型筋ジストロフィー、部分欠損、軽症型：ベッカー型筋ジストロフィー）において報告されているような明らかな遺伝子変異と臨床症状・経過との関連は見出せなかった。

【結論及び考察】

本邦の三好型ミオパチー患者2症例に、スプライス異常により内部欠損型の変異蛋白発現を引き起こすタイプの新規の遺伝子変異を見だし、実際に免疫組織化学法でジスフェルリン蛋白の筋細胞におけるまだら状の発現を確認した。しかし、ジストロフィン欠損による筋ジストロフィーとは対照的に、ジスフェルリン蛋白の部分的な発現が認められるからといって臨床症状が軽症型となるわけではないことが明らかになり、ジストロフィン欠損による筋ジストロフィー（完全欠損、重症型：デュシャンヌ型筋ジストロフィー、部分欠損、軽症型：ベッカー型筋ジストロフィー）とジスフェルリン欠損による筋ジストロフィー（三好型ミオパチー）では病態機序が異なることが考えられる。また、抗ジスフェルリンモノクローナル抗体による生検筋の免疫組織化学染色が、三好型ミオパチーの診断においてきわめて有用であることが示された。本研究は、ジストロフィン欠損による筋ジストロフィーにおいて筋病理所見と遺伝子変異を比較検討したはじめての報告であり、筋ジストロフィー症の病態解明に大きく寄与するものである。

(Acta Neuropathologica. 2002 ; 104: 615-620 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1417 号	氏名	齊藤明子
審査委員	主査	出雲周二	
	副査	佐野輝	米澤傑

Miyoshi myopathy patients with novel 5' splicing donor site mutations showed different dysferlin immunostaining at sarcolemma.

(5'スプライス部位に新規の遺伝子変異を持つ三好型ミオパチー患者は筋細胞膜において特異なジスフェルリン蛋白の染色性を呈する。)

三好型ミオパチー（三好型筋ジストロフィー）は、下肢遠位部、特に下腿屈筋群が強く侵される常染色体性劣性遺伝性の筋ジストロフィーであり、1998年以降、主に米国の研究グループによりジスフェルリン（dysferlin）蛋白質の遺伝子異常により発症すること、常染色体劣性肢体型筋ジストロフィーの一部（LGMD2B）と同一の遺伝子異常に起因する疾患であることが報告された。しかし、本邦の症例について遺伝子異常のタイプと、筋病理所見、臨床症状、臨床経過との関連を比較した報告は存在しなかった。そこで著者らは、鹿児島大学病院神経内科および関連病院にて三好型ミオパチーと臨床診断された5症例を対象に以下の解析を行なっている。すなわち、（1）ジスフェルリン遺伝子異常の検索：リンパ球から抽出したゲノムDNAを用いてジスフェルリン遺伝子の全55エクソンについて、PCR-SSCP法と塩基配列解析により遺伝子異常を同定した。（2）筋病理組織検査とウェスタンブロット法によるジスフェルリン蛋白発現の解析：生検筋の一般病理組織検査と、ジスフェルリンモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法ならびに免疫組織化学法により、ジスフェルリン蛋白の発現解析を行った。（3）遺伝子異常のタイプと筋病理所見、ジスフェルリン蛋白の発現パターン、臨床症状、臨床経過との関連を比較した。尚、本研究は鹿児島大学大学院医歯学総合研究科遺伝子解析倫理委員会の承認を受けたものである。

本研究で得られた新知見は次の5点である。

1. 全症例にジスフェルリン遺伝子変異を同定し、三好型ミオパチーの臨床診断を遺伝子学的に確定した。
2. 5症例中3症例にジスフェルリン蛋白質翻訳領域にフレームシフトまたは停止コドンをもたらす変異を、2症例に5'スプライス部位に2種類の新規の遺伝子変異を見いだした。
3. ジスフェルリン遺伝子の5'スプライス部位に変異をもつ症例は、免疫組織化学法にてジスフェルリン蛋白のまだら状の発現を呈することを始めて明らかにした。
4. ウェスタンブロット法では蛋白の発現が確認できず、変異蛋白の不安定性あるいはアッセイの低感度が可能性として考えられた。
5. 検索した5症例の遺伝子異常、蛋白発現と臨床症状、経過との間に明らかな関連は見出せなかった。

以上より、ジスフェルリン蛋白のまだら状の発現を呈する三好型ミオパチー症例の存在を始めて明らかにすることで、診断における抗ジスフェルリンモノクローナル抗体による免疫染色の有用性を示す一方、ジスフェルリン蛋白の部分的な発現が、臨床症状の軽症化に寄与しないことを証明した。

本研究は、ジスフェルリン欠損による筋ジストロフィーにおいて筋病理所見と遺伝子変異とを比較検討した初めての報告であり、筋ジストロフィー症の病態解明に大きく寄与するものである。よって、本研究は博士（医学）の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1417 号	氏名	齊藤 明子
審査委員	主査	出雲 周二	
	副査	佐野 輝	米澤 傑
<p>主査および副査の3名は、平成17年1月6日、学位請求者 齊藤 明子 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) ミオパチーの分類を述べよ。その中で三好型ミオパチーはどう位置付けられるか。 (回答) 神経の障害によることなく、骨格筋そのものの障害によって筋萎縮や筋力低下をきたす疾患をミオパチーというが、大きく筋ジストロフィーとそれ以外の筋疾患とに分けられる。筋ジストロフィー以外の筋疾患の主なもの、非遺伝性自己免疫性疾患である多発性筋炎に代表される炎症性筋疾患、神経筋接合部に存在するアセチルコリン受容体を標的とする抗体により神経筋接合部の伝達が阻害される自己免疫疾患である重症筋無力症、ミトコンドリア病、さらに甲状腺機能異常などの内科疾患に伴う筋疾患、中毒性筋疾患などがある。筋ジストロフィーは、臨床的に進行性の筋力低下と筋萎縮を示し、病理学的には筋細胞の変性と再生が繰り返されることが特徴であるが、最近になるまで病態機序、原因遺伝子が十分に解明されていなかったため、その分類は主に臨床像に基づいてなされてきた。具体的には、遺伝形式、発症年齢、強く障害される筋の分布を組み合わせて表現することにより行われてきた。三好型ミオパチーは、常染色体劣性遺伝の、遠位型筋ジストロフィーとして分類される。</p> <p>質問2) 使用した筋肉の採取部位はどこか。筋生検を行う場合、疾患は異なっても採取部位は同じなのか。また、採取部位による筋病理所見の分布に違いはあるか。 (回答) 上腕二頭筋より採取した。ほとんどのミオパチーは全身性疾患であるので、症状が一部の筋に限られる場合にも全身の骨格筋に病変が認められるため、通常筋生検を行う場合、筋量が豊富で皮下脂肪が少ないため生検しやすく、運動への影響が少ない上腕二頭筋を選ぶことが多い。ただし、疾患により筋障害部位が限局される場合、その部位で行うこともある。多くの筋量を必要とする場合は大腿直筋から採取することもある。採取部位による筋病理所見の分布にある程度の違いはあると考えられるが、逆に筋力低下が非常に強い部位を選ぶと、筋線維がすでに脂肪や結合織で置換して十分な情報を得られないことがある。</p> <p>質問3) 免疫染色とウェスタンブロットは同一の筋標本を用いて行ったものか。同一標本の連続切片を用いて行った免疫染色とウェスタンブロットの結果に解離があるのはなぜか。 (回答) 免疫染色とウェスタンブロットは同一の筋標本を用いて行った。まず染色用に筋凍結切片をスライスし、残りの凍結切片からウェスタンブロット用にスライスしたものをホモジナイズして使用した。免疫染色とウェスタンブロットの結果に解離があるのは、ジスフェルリン変異蛋白が極めて不安定であるためか、ウェスタンブロット自体の感度が低いからと考えられる。抗体の種類を変えることや、反応条件を変えることで変異蛋白を検出できる可能性はあり、今後の課題である。</p> <p>質問4) 三好型ミオパチーで筋症状が遠位に起こるのはなぜか。症例1では拡張型心筋症を合併していることから、ジスフェルリンが骨格筋のみでなく、心筋にも分布していることがうかがわれるが、心筋も含め、ジスフェルリンの発現分布について、ジストロフィンの場合と比較して説明せよ。 (回答) ジスフェルリンやジストロフィンは全身の骨格筋に分布していると考えられるが、四肢の近位、遠位筋での発現量の差について調べた報告はなく、分布の差があるかどうかについては明らかになっていない。また、三好型ミオパチーでジスフェルリンが心筋に分布しているか、なぜ遠位筋から症状が出現しやすいか</p>			

についても現段階では不明である。デュシャンヌ型、ベッカー型筋ジストロフィーいわゆるジストロフィノパチーでは心筋や横隔膜も侵され、心不全や呼吸不全をきたし主な死因となることが広く知られているが、三好型ミオパチーで心筋障害を呈した症例の報告は今のところ認められない。ジストロフィン(ジスフェルリン)は細胞骨格蛋白であることから、その障害により幼児期からとくに重力に抗することに寄与している近位筋の発達が不十分かつ脆弱となり、症状が出現しやすいことが推定される。一方、ジスフェルリンは膜修復に関与しており、発症もジストロフィノパチーより遅いことから、筋肉が発達したあとに日常の負荷により壊れていく際の修復過程が不十分であることから発症すると推定され、負荷がかかりやすい遠位筋に症状が出やすいのかもしれない。また、ジスフェルリンと相互作用する他の蛋白が発症に関与している可能性もある。

質問5) 5' スプライス部位に変異を持つ症例4、5に対し、cDNAの解析は行ったか。cDNAを解析することにより、エクソンスキッピングが実際に起こっているかなど、重要な情報が得られる可能性がある。

(回答) ご指摘の点は大変興味深く、きわめて重要な実験であり今後検討すべきであると考えますが、今回の研究においては、必ずしも解析に十分な生検筋検体が残っていると思われなかったため行っていません。

質問6) ウェスタンブロットにジスフェルリン蛋白のC末端に対するモノクローナル抗体を用いているが、これは市販されているものか。N末端側にエピトープを持つモノクローナル抗体やポリクローナル抗体を使えばウェスタンブロットの結果が異なっていた可能性がある。またこの抗体のエピトープはジスフェルリン蛋白の構造上どのような部位に位置するのか。

(回答) 今回使用したモノクローナル抗体は現在のところ市販されている唯一のものであるが、世界の研究者に広く使われているスタンダードな抗体である。エピトープはC末端エクソン53の1999から2016番目のアミノ酸であり、膜結合部位近傍の細胞外で、C2ドメインなど機能ドメインではない部位に存在する。また、ご指摘のようにN末端側にエピトープをもつ抗体や、ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットにより、新たな所見が得られる可能性があり、今後の検討課題であると考えます。

質問7) 三好型ミオパチーにおいて遺伝子変異の種類と臨床型について相関があるか。また、患者の両親など、ジスフェルリン変異のキャリアーに何らかの臨床症状が認められるか。

(回答) 東北大学の青木らの報告によると、三好型ミオパチーにおいてG3510Aの変異をもつ症例は平均発症年齢が早く、血清CK値が高い一方、G3370T変異をもつ症例は発症年齢が遅く、CK値が比較的低い傾向にあるとされている。また、肢体型筋ジストロフィー2B型(LGMD2B)においても三好型ミオパチーと同様にG3370T変異をもつ症例は発症年齢が遅い反面、上肢の症状の進行速度が速い傾向があると報告されている。キャリアーについては、本研究では詳しく検索していないので何らかの臨床症状が認められるかどうかは不明である。文献的にも筋力低下など何らかの臨床症状を有するキャリアーの報告は無いようである。

質問8) 同じ遺伝子異常で異なる表現型をとっているLGMD2Bと三好型ミオパチーは一つの疾患とみなしていいのか。

(回答) 三好型筋ジストロフィーとLGMD2Bを同一疾患とみなしていいか否かは常に議論となるところであり、いまだ結論には至っていないが、遺伝子学的見地より、dysferlinopathy(ジスフェルリン関連筋ジストロフィー症候群あるいはdysferlin異常症)という新たな疾患概念が提唱され、三好型筋ジストロフィーとLGMD2Bはdysferlinopathyの中の異なる表現型であるという考え方が一般的となりつつある。

質問9) ジスフェルリン免疫染色で細胞質内にも染まっているようであるが、意味のある所見と考えるか。

(回答) 細胞内小胞が染まっていると考えられ、意義あるものと思われる。最近、ジスフェルリンがカベオリン-3という蛋白と結合することが報告されているが、カベオリン-3は成熟筋で形質膜に結合する一方、膜小胞と結合して筋線維内に分布し小胞輸送にも関わっていることが知られており、カベオリンと結合しているジスフェルリンが小胞膜の融合に関わっている可能性も考えられる。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。