

原 著

筋型プロモーター，脳型プロモーターの欠失を有するにも拘らず
正常知能である Duchenne 型筋ジストロフィーの1例

東京女子医科大学 小児科（主任：福山幸夫教授）

サクマ イズミ サイトウカヨコ ヤマウチ イケヤキヨコ
佐久間 泉・斎藤加代子・山内あけみ・池谷紀代子
モリタ レイコ イマノ マキ オオサワマキコ フクヤマ ユキオ
森田 玲子・今野 真紀・大澤真木子・福山 幸夫

（受付 平成5年6月22日）

A Case of Duchenne Muscular Dystrophy with Normal Intelligence Despite
Genomic Deletion of Both Muscle and Brain PromotersIzumi SAKUMA, Kayoko SAITO, Akemi YAMAUCHI, Kiyoko IKEYA, Reiko MORITA,
Maki IMANO, Makiko OSAWA and Yukio FUKUYAMA

Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical College

We report a Duchenne muscular dystrophy (DMD) patient with normal mentality who had deletions of brain and muscle promoters as well as exons 2 through 7 of the dystrophin gene. The patient, a 21 year old male, had no family history of DMD. The Wechsler adult intelligence scale revealed a normal verbal IQ (97) at the age of 21. He has a third grade English proficiency license. High molecular weight DNA was prepared from peripheral lymphocytes. The dystrophin gene, including brain and muscle promoters, was examined. A dystrophin gene deletion, encompassing brain and muscle promoters as well as exons 2 through 7, was detected. Lack of brain type dystrophin has been hypothesized by some investigators to cause mental retardation, often seen in DMD patients.

We report herein a brain promoter deletion in a patient with normal mentality which should prompt reconsideration of the above hypothesis.

はじめに

筋ジストロフィーは遺伝性進行性筋疾患で，遺伝形式や臨床症状によっていくつかの病型に分類されている。このうち，最も頻度が高く（男児出生約3,500人に1人¹⁾），また最も重篤な経過を示すのが Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）である。近年の分子遺伝学的研究の進歩によって，DMD 遺伝子がクローニングされ²⁾，それによってコードされる膜関連細胞骨格タンパク質「ジストロフィン」が発見されて³⁾，DMD の病因がジストロフィンの欠損と密接に関係することが明らかになった⁴⁾⁻⁶⁾。更に，DMD 遺伝子の発現は筋組織（骨格筋・心筋・平滑筋）のみならず脳（ニューロン）

にも認められることが分かり⁷⁾⁻⁹⁾，続いて筋型プロモーター¹⁰⁾とは異なる脳型プロモーター¹¹⁾の存在も明らかとなった。一方，DMD の約30%に精神遅滞を伴うことが知られており¹²⁾，脳型プロモーターの異常が何らかの関連を示すのではないかと考えられてきている¹¹⁾⁸⁾¹³⁾。今回我々は，脳型プロモーターが欠損しているにも拘らず，正常知能を有する DMD 男児を経験したので報告する。

対象および方法

1. 対象

症例：21歳，男子。

主訴：筋力低下，筋萎縮。

家族歴：特記すべきことなし（図1）。

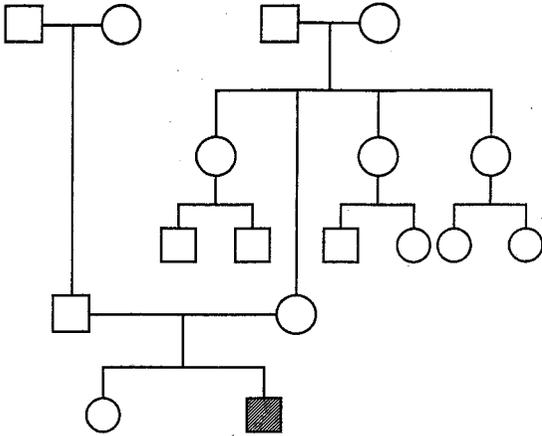


図1 家系図

家族に DMD および他の筋疾患はなく、症例は孤発例である。

既往歴：在胎40週，3,000gにて出生。出生前，周産期の異常はなし。

発達歴：定頸3カ月，坐位6カ月，歩行1歳3カ月，排尿自立1歳6カ月，有意語11カ月で，3歳までは成長発達の異常を指摘されたことはなかった。

現病歴：4歳時に，転びやすいことを主訴に他院の小児科を受診し，筋生検等でDMDと診断された。5歳頃より尖足傾向が目立つようになったが，装具装着にて6歳頃までは早歩きも可能であった。7歳時動揺性歩行が著明となり，段階昇降不能となった。7歳11カ月より転居に伴い，当科に転院，9歳より歩行不能，12歳で四つ這い不能，13歳でいざり這いと上肢挙上ができなくなり，体位交換に介助を要するようになった。15歳時には坐位の保持に支えが必要となり，現在は，手指と上腕，および下肢をわずかに動かすのみである。

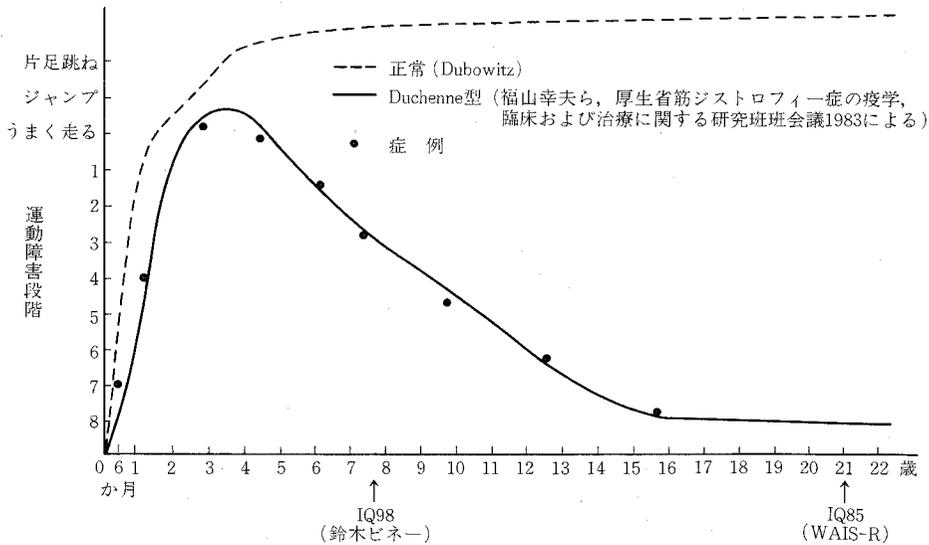


図2 年齢による運動機能変化の模式図

左縦軸の運動障害段階は上田²⁴⁾による。

- 段階1：歩行可能，介助なく段階昇降可能（手すりも用いない）。
- 段階2：階段昇降に介助（手すり，手による膝おさえなど）を必要とする。
- 段階3：階段昇降不能，平地歩行可能，通常の高さの椅子からの立上り可能。
- 段階4：平地歩行可能，椅子からの立上がり不能。
- 段階5：歩行不能，四つんばい可能。
- 段階6：四つんばい不能だが，それ以外のはいかた（いざりばい）可能。
- 段階7：はうことはできないが，自力で座位保持可能。
- 段階8：ベッドに寝たままで体動不能，全介助。

21歳5カ月より夜間睡眠時に体外式陰圧呼吸器と酸素吸入を行っている(図2)。

小学校は普通学級に入学し、成績も普通であったが、7歳11カ月時東京への転居に伴って養護学校へ移った。当科を受診した7歳11カ月時のIQは鈴木ビネー式で98であった。13歳時にハム無線免許、および17歳時に英検3級を取得し、養護学校を卒業後、簿記3級の資格を取り、障害者労働自立センターに勤務してワープロの仕事を週に3回行っている。21歳時のIQはWAIS-R知能検査にて85(言語性97、動作性72)であった。動作性IQは制限時間内の動作完了が困難なため低い値となっているが、言語性IQは97と正常であり¹⁴⁾、DMDの平均IQ 81.4 ± 12.1 ¹⁵⁾と比較しても+1.3SDであった(図3)。

2. DNA 分析

患者および家族の末梢血をヘパリン採取し、リンパ球から高分子DNAを調整した。これをHind III、またはBgl IIにより制限酵素処理した後、ア

ガロースゲル電気泳動、Southernブロッティング、³²Pラベルしたプローブを用いてのハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィーを行った⁹⁾。使用したcDNAプローブはATCC社(American Type Culture Collection: 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 USA)より購入したcDNA 1-2a, 2b-3, 4-5a, 5b-7, 8, 9-14の6種類である(図4)。

また患者の高分子DNAに対してBeggsらの方法¹⁶⁾に従ってpolymerase chain reaction(PCR)を行った。使用したプライマーは脳型プロモーターが5'-GAAGATCTATATTTTCAACGCAGAAATGTGG-3'と5'-CTTCCATGCCAGCTGTTTTTCTGTCACTC-3'。筋型プロモーターが5'-GAAGATCTAGACAGTGATACATAACAAATGCATG-3'と5'-TTCTCCGAAGGTAATTGCCTCCAGATCTGAGTCC-3'である。内部標準としてはエクソン12を用いて脳型プロモーター、筋型プロモ

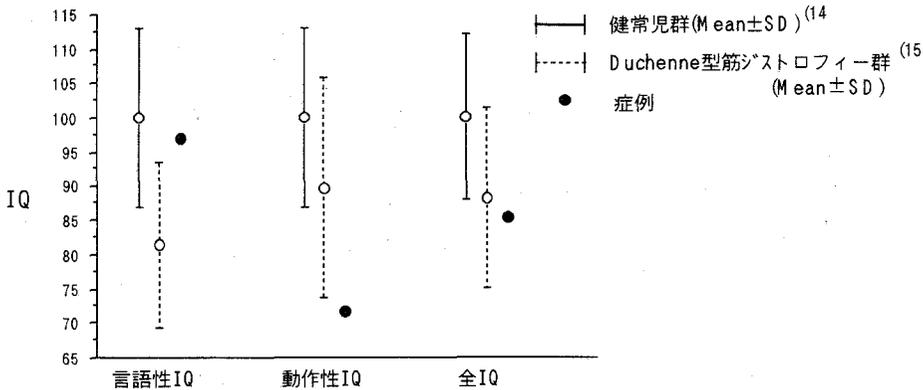


図3 健常児群とDMD群のIQの比較

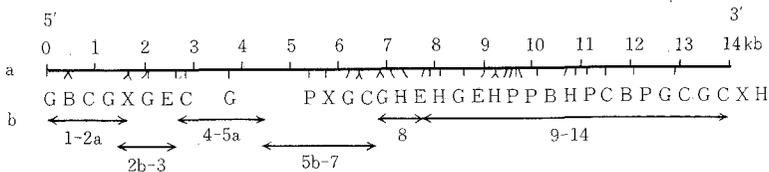


図4 使用したcDNAプローブ

a, cDNA restriction map, b, cDNA fragments used as probes

B=Bam HI, C=Hinc II, E=Eco RI, G=Bgl II, H=Hind III, P=Pst I, X=Xba I

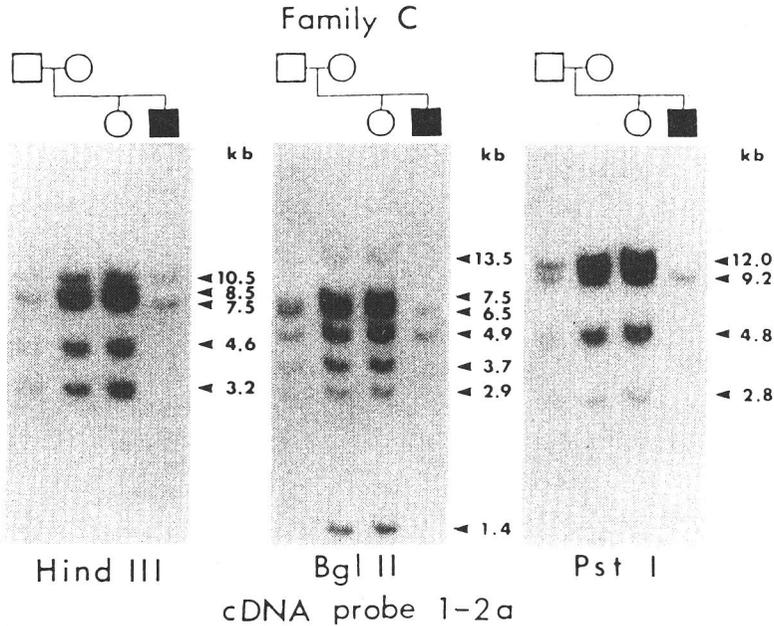


図5 Southern プロット法による DMD 遺伝子解析

ター、エクソン12を同時に増幅した。条件は94°Cで7分間ディネイチャーした後、94°Cで30秒のディネイチャーと、65°Cで4分のアニーリングを1サイクルとして30サイクル行い、最後のサイクルのみアニーリングを10分間に延長した。PCR産物を3%アガロースゲル電気泳動によって解析し、脳型プロモーター、筋型プロモーターの存在を確認した。

結 果

Southern プロット法によって症例ではエクソン1から7のDMD遺伝子の欠失が確認された(図5)。

PCRの結果ではコントロールのエクソン12、脳型、筋型プロモーターと症例のエクソン12は正常に増幅されたが、症例のプロモーターは両者共に欠失していた(図6)。

考 察

DMD遺伝子が同定され、DMDではその病因がジストロフィンの欠損であることが明らかになった。一方、蛋白質としてのジストロフィンそのものの研究がすすめられ、筋以外の組織におけるジストロフィンの局在を解明する研究報告がなされ

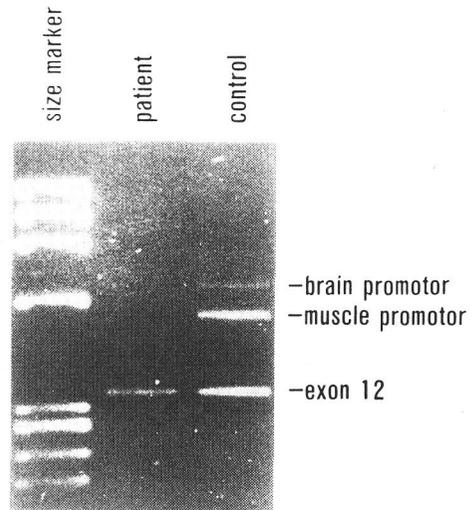


図6 PCRによるプロモーターの解析

てきている^{7)~9)17)~19)}。その結果、脳(ニューロン)にも僅かながらジストロフィンが存在すること、しかもそれは、ニューロンの postsynaptic membrane上に発現していることが明らかになっている¹⁹⁾。そして、Nudelら¹³⁾はDMDの14kbのmRNAの解析を行い、脳型ジストロフィンの

mRNA は5'端側で筋型ジストロフィンの mRNA とは異なることを発見し、両者は、プロモーターも異なっていると推測した。続いて、筋には脳型ジストロフィンの mRNA の発現が少なく、脳には筋型ジストロフィンの mRNA が少ないこと¹⁸⁾、グリアには筋型の DMD mRNA のみが存在すること¹⁷⁾が明らかになった。これにより、脳のジストロフィンの異常、つまりは、脳型プロモーターの異常が精神遅滞と関係するのではないかと考えられるようになった⁸⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。

1991年に、Boyce, Kunkel ら¹¹⁾は筋型プロモーターより90kb 以上も上流(エクソン2よりは400 kb 上流)にある脳型プロモーターを同定し、脳型プロモーターの特異的な欠失が Y 染色体連鎖性の精神遅滞の一因ではないかと述べている。彼らはまた、脳型プロモーターは正常であり、筋型プロモーターのみが欠失した Becker 型筋ジストロフィー1例を報告した。脳型プロモーターの欠損例の報告は他に2例認められる。Rapaport ら²⁰⁾は脳型プロモーターからスペクトリン様ドメインの一部までの広範な欠失にも拘らず知能は正常な例を報告した。本邦で石川ら²¹⁾が報告したもう1例も脳型ジストロフィンの欠失はあるが知能は正常であった。しかし、まだ、脳型ジストロフィンの役割は明らかでない。

今回我々が経験した症例は Southern プロット法でエクソン1から7の欠損が確認されていた DMD²²⁾で、筋型および脳型プロモーターの欠失も証明されたが知能は正常であった。従って、脳型プロモーターの欠失が精神遅滞の直接の原因にはならないのではないかと考えられる。Bar ら²³⁾はジストロフィン遺伝子の3'端側から発現する6.5 kb の DMD mRNA を発見し、この蛋白質はジストロフィンのアイソザイムとして、Dp71と名付けられている。これらは筋には少なく脳や肝、睾丸に多く発現している事を報告している。精神遅滞にはこの mRNA を含めて他の因子が関与している可能性も考えられる。本症は脳におけるジストロフィンの欠損と知能障害との関係を明らかにしていく上で、貴重な症例と考えた。

結 語

1. 正常知能の21歳 Duchenne 型ジストロフィーにおいて、脳型および筋型プロモーターを含むエクソン7より上流の遺伝子欠失を示したので報告した。
2. 脳型プロモーターの欠失が精神遅滞の直接の原因にはならないと考えられた。

文 献

- 1) Nakagawa M, Nakahara K, Yoshidome H et al: Epidemiology of progressive muscular dystrophy in Okinawa, Japan. *Neuroepidemiology* 10: 185-191, 1991
- 2) Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ et al: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50: 509-517, 1987
- 3) Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM et al: Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51: 919-928, 1987
- 4) Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T et al: Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* 333: 861-863, 1988
- 5) Watkins SC, Hoffman EP, Slayter HS et al: Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature* 333: 863-866, 1988
- 6) Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G et al: The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 333: 466-469, 1988
- 7) Nudel U, Robzyk K, Yaffe D et al: Expression of the putative Duchenne muscular dystrophy gene in differentiated myogenic cell cultures and in the brain. *Nature* 331: 635-638, 1988
- 8) Chamberlain JS, Pearlman JA, Muzny DM et al: Expression of the murine Duchenne muscular dystrophy gene in muscle and brain. *Science* 239: 1416-1418, 1988
- 9) Hoffman EP, Hudecki MS, Rosenberg PA et al: Cell and fibertype distribution of dystrophin. *Neuron* 1: 411-420, 1988
- 10) Klamut HJ, Gangopadhyay SB, Worton RG et al: Molecular and functional analysis of

- the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Cell Biol* 10 : 193-205, 1990
- 11) **Boyce FM, Beggs AH, Feener C et al**: Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 1276-1280, 1991
 - 12) **Moser H**: Duchenne muscular dystrophy: Pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet* 66 : 17-40, 1984
 - 13) **Nudel U, Zuk D, Einat P et al**: Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 337 : 76-78, 1989
 - 14) **Wechsler D**: Japanese Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised 日本版 WISC-R 知能検査法 (児玉 省, 品川不二郎, 茂木茂八 共訳), 日本文化科学社, 東京 (1978)
 - 15) **Karagan NJ, Sorensen JP**: Intellectual functioning in non-Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 31 : 448, 1981
 - 16) **Beggs AH, Koenig M, Boyce FM et al**: Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 86 : 45-48, 1990
 - 17) **Chelly J, Hamard G, Koulakoff A et al**: Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature* 344 : 64-65, 1990
 - 18) **Barnea E, Zuk D, Simantov R et al**: Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* 5 : 881-888, 1990
 - 19) **Lidov HGW, Byers TJ, Watkins SC et al**: Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature* 348 : 725-728, 1990
 - 20) **Rapaport D, Passos BMR, Takata RI et al**: A deletion including the brain promoter of the Duchenne muscular dystrophy gene is not associated with mental retardation. *Neuromuscul-Disord* 2 : 117-120, 1992
 - 21) 石川悠加, 石川幸辰, 西尾久英ほか: ジストロフィンの脳型プロモーターと Xp21 muscular dystrophy における mental retardation との関係, 厚生省精神・神経疾患研究委託費, 筋ジストロフィーの臨床病態と遺伝相談及び疫学に関する研究 (筋ジス第3班) 平成4年度研究報告書: 77-79, 1992
 - 22) **Saito K, Ikeya K, Yamauti A et al**: Molecular genetic analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy families. *In Fetal and Perinatal Neurology* (Fukuyama Y et al eds) pp46-59, Karger, Basel (1992)
 - 23) **Bar S, Barnea E, Levy Z et al**: A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J* 272 : 557-560, 1990
 - 24) 上田 敏: 進行性筋ジストロフィー症のリハビリテーション, 理学療法と作業療法 2 : 14-23, 1968