

原 著

先天性筋ジストロフィーにおけるジストロフィン遺伝子欠失の検討

東京女子医科大学 小児科学 (主任: 福山幸夫教授)

サイトウカヨコ オオサワマキコ コンドウ エリ イケヤキヨコ
 斎藤加代子・大澤真木子・近藤 恵里・池谷紀代子
 ヤマウチ コミネ サトシ サクマ イズミ モリタ レイコ
 山内あけみ・小峯 聡・佐久間 泉・森田 玲子
 シシクラ ケイコ スズキ ハルコ ハラダ タカヨ フクヤマ ユキオ
 実倉 啓子・鈴木 暘子・原田 隆代・福山 幸夫

(受付 平成5年6月22日)

Genomic Deletion Study of the Dystrophin Gene in Congenital Muscular Dystrophy

**Kayoko SAITO, Makiko OSAWA, Eri KONDO, Kiyoko IKEYA, Akemi YAMAUCHI,
 Satoshi KOMINE, Izumi SAKUMA, Reiko MORITA, Keiko SHISHIKURA,
 Haruko SUZUKI, Takayo HARADA and Yukio FUKUYAMA**

Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical College

The authors examined mutations of the dystrophin gene in 33 patients clinically diagnosed as having Fukuyama type congenital muscular dystrophy (FCMD) and in one non-FCMD patient. Deletion of exons 48-52 of the dystrophin gene was found in a patient with a non-FCMD phenotype and intellectual impairment. A survey of the literature revealed that there were seven similar cases, clinically resembling FCMD or CMD, in which dystrophin gene deletions were demonstrated. The common properties in this particular group of patients include: (1) All cases male. (2) The disease onset was in infancy. Some had begun to walk alone very late, while the others has never been able to walk. (3) They lost the ability to walk earlier than the average age for Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients. (4) Intellectual impairment was seen in all cases. (5) CT scan or MRI revealed cortical atrophy and cerebral ventricular dilatation, but neither gyral abnormality nor low density areas in the white matter.

As for the absence of dystrophin in some patients with clinical diagnoses of FCMD, it has been hypothesized that this might represent a unique state in which the patient is simultaneously heterozygous for the FCMD gene and hemizygous for dystrophin abnormalities. However, we suggest another possibility, i.e. that DMD may have a spectrum wider than the clinical features considered thus far, and that severe DMD cases with earlier onsets may be misdiagnosed as FCMD or CMD.

はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD)¹⁾は、Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD)より早い時期に、DMDより強い骨格筋のジストロフィー変化を示し、さらに中枢神経系の奇形性病変を呈する。常染色体性劣性遺伝形式をとることが、家系調査で証明されている²⁾が、その遺伝子異常や発症機序は不明である。近年ジストロフィンの遺

伝子レベル、蛋白質レベルの異常を示したFCMD、先天性筋ジストロフィー (CMD)の症例の報告がある³⁾⁻⁶⁾。この病因に関して、Beggsら⁴⁾はその機構として、FCMD遺伝子変異がヘテロ接合、DMD遺伝子変異がヘミ接合であり、それが同一個体に同時に発現した状態との仮説を発表した。我々は、FCMDと臨床診断された33例、および臨床的に非福山型CMD (n-FCMD)と診断した

1例においてジストロフィン遺伝子変異を調べた。中枢神経障害を有するn-FCMDの1例でジストロフィン遺伝子欠失と、骨格筋におけるジストロフィンの欠損を認めた。また、臨床的にCMDと診断され、ジストロフィン欠損を示す他の文献報告例^{3)~6)}についても考察する。

対象と方法

1. 対象

臨床診断FCMD 33例、n-FCMD 1例の合計34例の患者のリンパ球より得たDNAを用いた。

2. 方法

得られたDNAに関して、multiplex PCR⁷⁾⁸⁾を行い、ジストロフィン遺伝子の18個のエクソンと、筋型・脳型プロモーター⁹⁾について遺伝子欠失を調べた。遺伝子欠失例は、cDNAプローブを用いたサザンブロット法¹⁰⁾にて欠失の範囲の確認をした。

遺伝子欠失例では、大腿筋の針筋生検を行ない、抗ジストロフィン、ウサギポリクローナル抗体P00（認識アミノ酸番号11-60）、P04（440-489）、P23（2360-2409）、P34（3495-3544）を用いて免疫組織化学染色を行った。

3. 遺伝子欠失を示した症例O

採血時10歳（図1）

〔家族歴〕両親に近親婚なく、健康な兄が1人。血清CK値父兄正常、母は167mU/mlと軽度高値。

〔現病歴〕妊娠中異常なく、40週3,480gにて出生。2～3カ月に追視、3～4カ月にあやし笑い出現。定頸は5～6カ月。4カ月時に無熱性全身性強直性間代性痙攣が出現。近医より抗痙攣剤を投与されるも、以後発作は漸増し、7～8カ月よりほとんど毎日認められた。9カ月時嘔吐、意識障害があり、近医に入院し3～4日点滴を受け、食欲は回復したが、定頸不能となり、表情も喪失した。11カ月時に当科初診。

〔初診時現症〕体格中等度。無欲状顔貌。引き起こし反応で頭部後屈著明、弛緩肩現象陽性。PTR、ATR 軽度低下。足間代陽性。

〔その後の経過と発達〕痙攣は周期的に群発し、痙攣の頻発している時期に、運動、知能ともに退行していた。痙攣はcarbamazepineにて抑制され、その後、部分的にコントロールされている。

1歳4カ月時、家族の認識あり、追視180度可能。

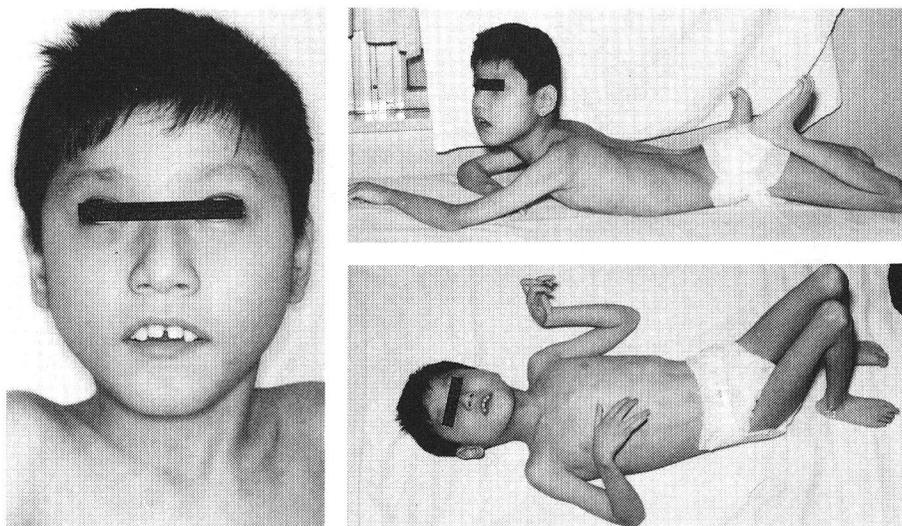
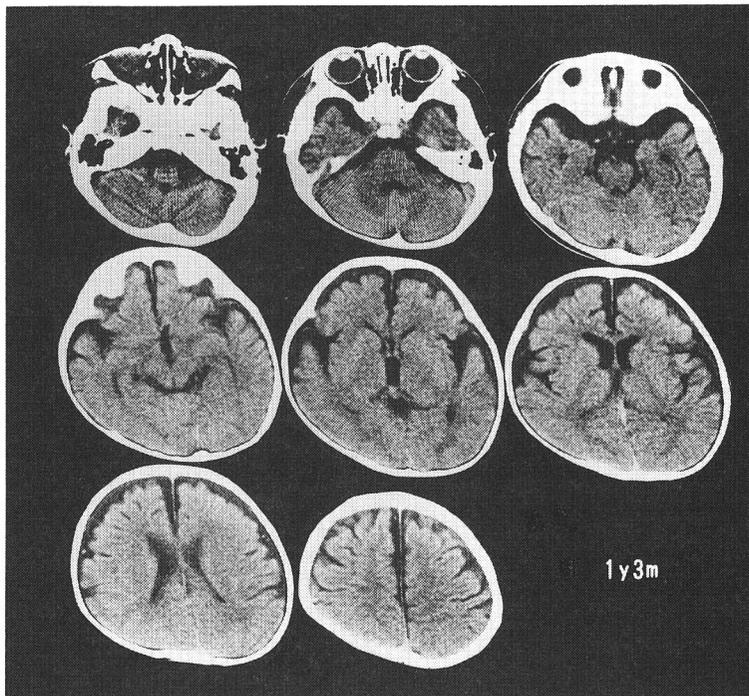
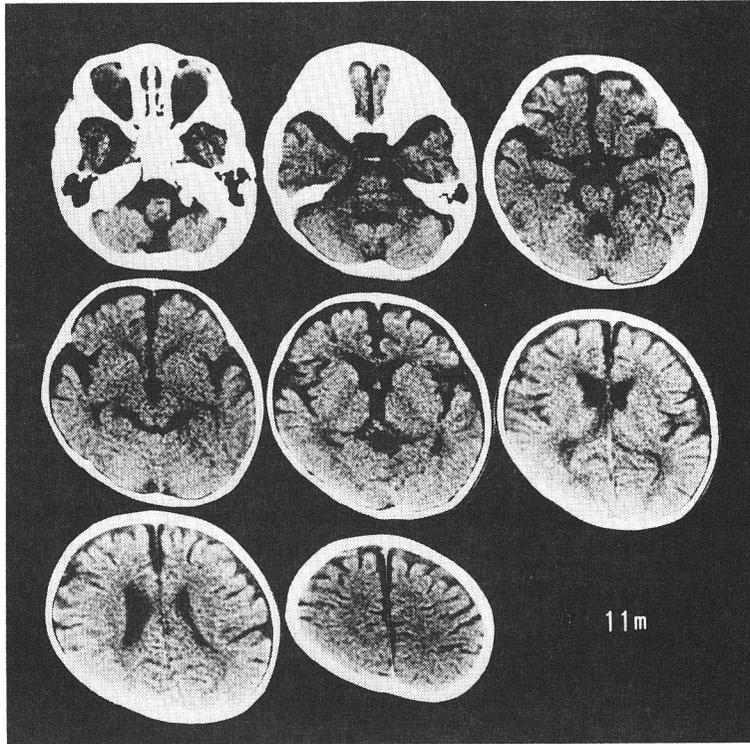


図1 n-FCMDと臨床診断していたが、ジストロフィン遺伝子欠失を示した症例O 臨床的に乳児期に顔面筋罹患が明瞭でないこと、痙攣の改善に伴い筋緊張低下が目立たなくなった点、自閉傾向を示した点などからn-FCMDと臨床診断していた。



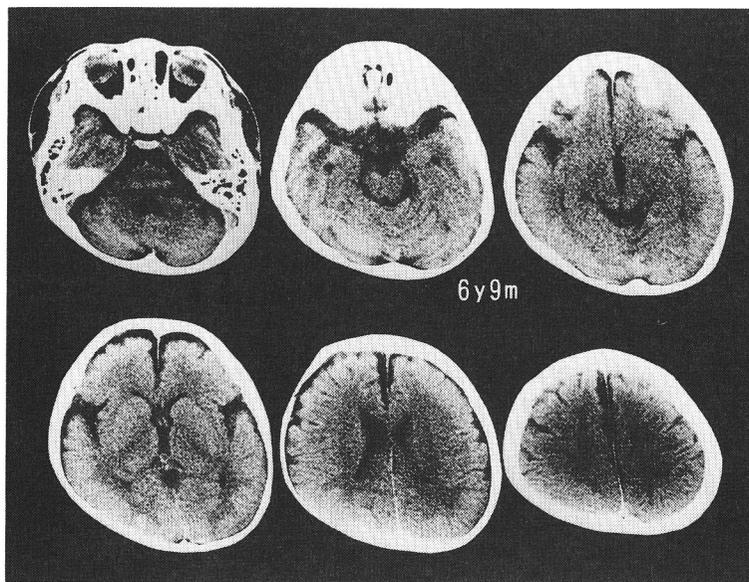


図2 症例Oの頭部CTスキャン

11か月，1歳3か月，6歳9か月において施行した，前頭部脳溝，Sylvius裂，脳室軽度拡大を認めるが，経年的に程度は軽くなってきている．白質の低吸収域はみられない．

1歳7か月寝返り可能．腹臥位にて頭部挙上可能．1歳8か月より喃語．1歳11か月より時に視線が合うようになり，声を出して笑う．知能検査では，生活年齢1歳11か月8日において発達年齢4か月29日，発達指数(DQ)21．3歳11か月玩具に手を出す．全経過中視線は合いがたく，常同運動，自閉傾向あり．四つ這い，座位保持，起立，歩行共に未獲得．腹臥位にて，上肢の支持にて上体を胸まで挙上可能．顔面筋痿患がなく，仮性肥大なし．現在，腱反射陰性．

〔検査所見〕血清CK値3,500～22,000mU/ml，GOT，GPT，LDH，HBD，Aldが軽度高値．

頭部CTスキャン(図2)：11か月，1歳3か月，6歳9か月時に施行している．前頭部脳溝，Sylvius裂，脳室軽度拡大を認めるが，経年的に程度は軽くなってきている．白質の低吸収域はない．

染色体検査：Gバンド法にて46,XY,15p+であった(図3)．15番染色体の過剰部位の由来を調べるために，Cバンド法，Qバンド法，高精度分染法を行い，Y染色体q12と同じ塩基配列を有すると推定された．さらに，Y染色体FISH法にて，

15番染色体短腕の過剰部位にY染色体長腕の一部q12が検出された．X染色体の高精度分染法では異常はなかった．臨床症状の全くない母親と兄も15番染色体の過剰部位を認めた．以上より，本症例の染色体核型は，46,XY,-15,+der(15)t(Y;15)(q12;q13)matであった．

筋生検(図4)：大腿筋より針生検を行い，組織化学染色を行った．結合組織，脂肪のperimysiumへの浸潤を高度に認める．個々の筋線維は円形化し，大小不同が著明である．筋線維の壊死，貪食像はわずかに認められるが，再生筋はほとんど認められず，中心核を含めて変性所見にも乏しい．NADH-TR染色ではintermyofibrillary networkの乱れが軽度にあるが，グリコーゲン，脂肪滴の増多は認められなかった．Modified ATPase染色では，type specific atrophy，type predominance等，特異的所見はみられなかった．進行した筋ジストロフィーの所見であった．

結 果

multiplex PCRの結果，FCMD 33例には，遺伝子欠失を認めず，n-FCMDの1例(症例O)にお

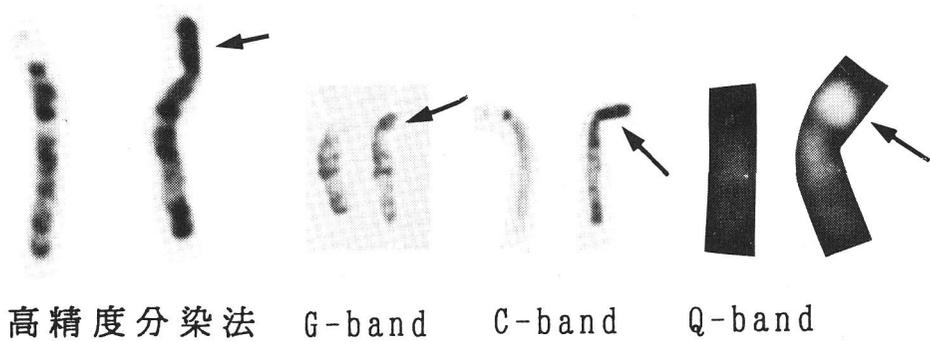


図3 症例Oの染色体検査結果（15番染色体のみを示す）
矢印は15番染色体の過剰部位。

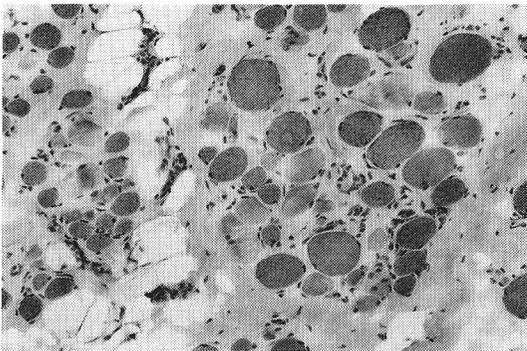


図4 症例Oの大腿筋針生検
進行した筋ジストロフィー所見であった。

いてジストロフィン遺伝子のエクソン48, 50, 51, 52の欠失を認めた(図5, lane10)。さらにエクソン53, 54は正常に存在していた(図6)。症例Oの遺伝子欠失例領域はエクソン48~52であると推定し、cDNAプローブを用いたサザンプロット法を行い、PCRの結果と同様、エクソン48~52の欠失を確認した(図7)。また、母親は保因者であると考えられた。

筋生検組織の抗ジストロフィン抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、ジストロフィン陰性であった(図8)。

症例Oの知能レベルはDQ21であり、図9に示

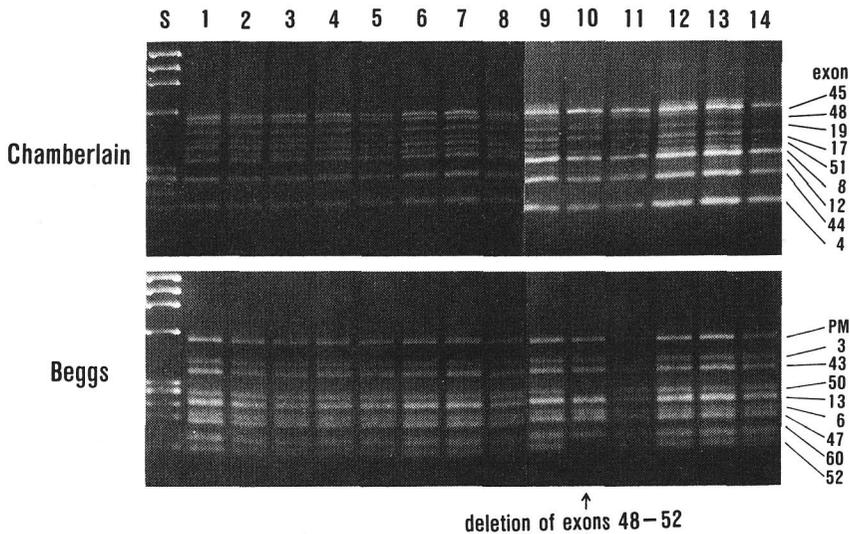


図5 FCMD 33例とn-FCMD 1例（症例O, lane 10）のジストロフィン遺伝子領域の multiplex PCR 増幅の結果（14例のみを示す）。

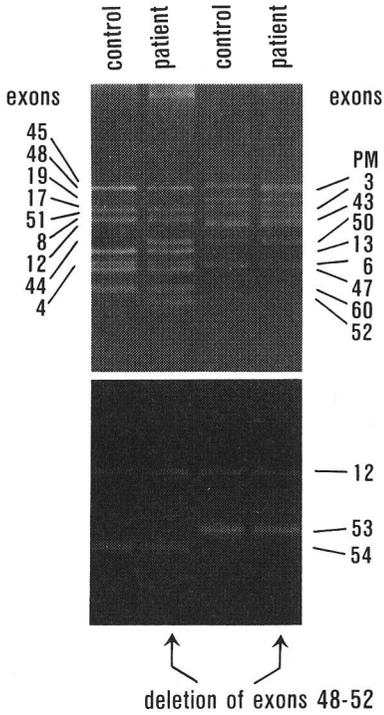


図6 症例Oのジストロフィン遺伝子領域の multiplex PCR 増幅の結果
 エクソン53, 54の増幅時に内部標準としてエクソン12を同時に増幅した。

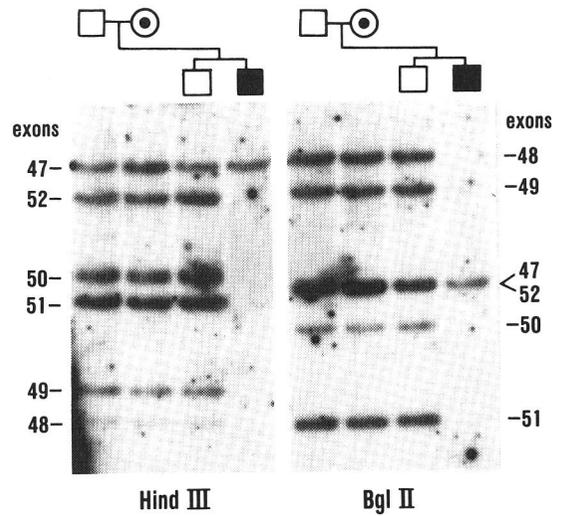


図7 症例Oの家族DNAにおける、cDNAプローブ8を用いたサザンブロット法の結果

すDMDの知能レベルを逸脱して低く、むしろFCMDの知能レベルの範囲であった。FCMD 33例と症例の合計34例全例において、筋型プロモーター、脳型プロモーターを同時にPCR増幅したところ、両プロモーターの欠失はなかった(図10)。

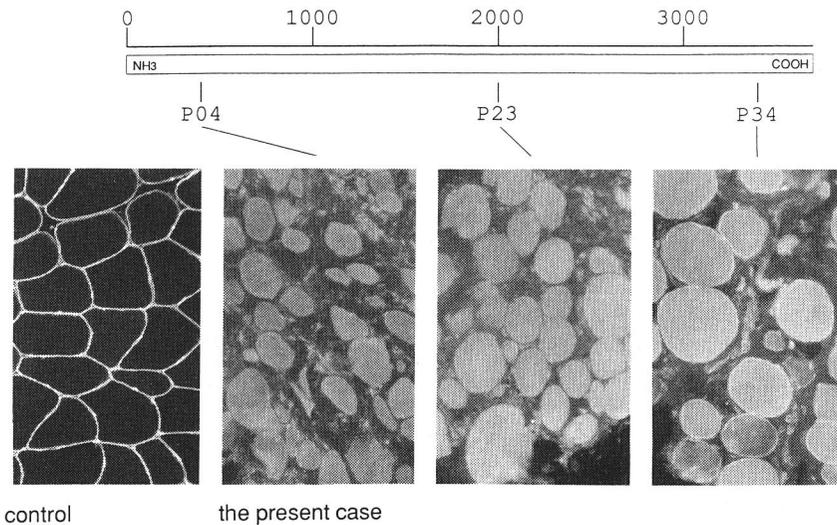


図8 症例Oの抗ジストロフィン抗体(アミノ酸認識番号は図の上を示す)を用いた間接蛍光抗体法
 症例ではコントロールのような細胞膜に一致した蛍光は認められない。

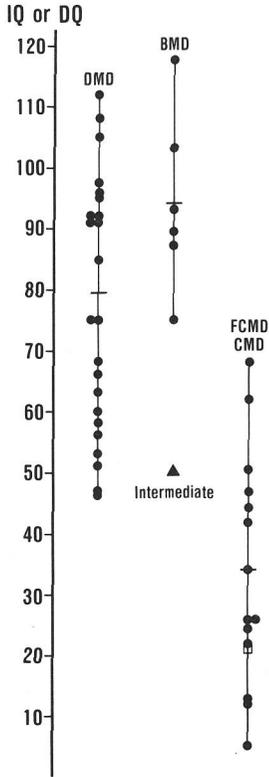


図9 ジストロフィン遺伝子診断を施行したDMD, 中間型, BMD, FCMD, CMDの知能レベル。症例OはFCMD, CMDの項に□で示してある。

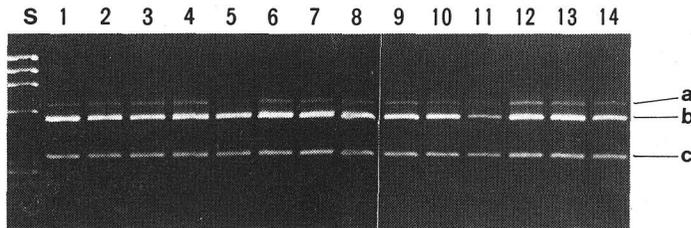
考 察

ジストロフィン遺伝子の欠失を示した症例Oは、臨床的には乳児期に顔面筋罹患が明瞭でないこと、痙攣の改善に伴い筋緊張低下が目立たなく

なった点、自閉傾向を示した点などからn-FCMDと診断した。臨床経過を見直してみると、生下時より精神運動発達遅滞を認めた患児が、痙攣発作の漸増、9カ月時の意識障害を契機に発達が著明に遅れた。痙攣発作の増悪している時に発達は退行し、痙攣がコントロールされると回復する状態であり、中枢神経障害を伴うn-FCMDと考えられた。

本症例の染色体核型分析の結果、15番染色体に過剰部位を見出したため、染色体異常を伴ったCMDの可能性を考え、種々の染色体分染法を施行した(図3)。Cバンド法¹¹⁾とはYの長腕端とその他の染色体の着糸点にある異質染色質heterochromatinを特異的に染色する。Qバンド法¹¹⁾ではY染色体の長腕端に蛍光を示すことができる。さらに、Yq12の塩基配列の一部をプローブとしたFISH法¹²⁾によって、15番染色体の過剰部位に蛍光を認め、第15番染色体の短腕の過剰部位は、Yq12と同じ塩基配列を有すると推定された。また、高精度分染法によりX染色体の異常はなかった。

染色体の分染法の発達に応じて、一般に、染色体の特定部位に多様性があることが明らかになってきた。これらの染色体の異形性heteromorphismは個人差として理解されており¹¹⁾、特定の遺伝的発現には関与しない変化であると考えられる。この患者と母親と兄に認められた核型は染色体のheteromorphismと考えられ、病的意義を持



a : brain promoter
b : muscle promoter
c : exon 12

図10 FCMD, n-FCMDにおける筋型プロモーター、脳型プロモーターのPCR増幅の結果

14例のみ示す。症例Oはlane 10である。内部標準としてエクソン12を同時に増幅した。

表 臨床的に、CMD または FCMD と診断され、ジストロフィンが陰性であった報告例のまとめ

	race	age	sex	diag.	walk	loss of walk	MR (DQ)	CT, MRI			karyotype	dystrophin gene deletion	
								a	b	c			
Tanaka ³⁾ (1991)	Japan	5	M	CMD	4y		+	(48)	+	+	-	46,XY,del (X)(p21.2)	-1.0kb of 5' end-exon 55
	Japan	4	M	CMD	2y		±	(70)	-	-	-		-
Beggs ⁴⁾ (1992)	Japan	5	M	FCMD	2y8m	5	+	(65)	+	+	-		exon 51-54
	Japan	6	M	FCMD	1y8m	5	+		+		-		-
	Japan	15	M	FCMD	3y	7	+		+	+	-		-
Prella ⁵⁾ (1992)	Italy	5	M	CMD	not yet		+		-	-	-		exon 9
Echenne ⁶⁾ (1993)	France	10	M	CMD	2y6m		+	(45)	-	-	-		exon 44-51
Saito (1993)	Japan	10	M	CMD	not yet		+	(21)	+	+	-	46,XY,15p+	exon 48-52

a: cortical atrophy, b: ventricular dilatation, c: gyrus abnormality.

たないと考えた。

臨床的に、CMD または FCMD と診断され、ジストロフィンが陰性であった症例を文献から収集すると、表のようになる。田中らの 2 例³⁾、Beggs ら⁴⁾の 3 例(但しこの 3 例は全て日本人であり、検査材料だけが米国へ送付されたもの)、イタリアの Prella らの 1 例⁵⁾、フランスの Echenne らの 1 例⁶⁾と今回報告した 1 例である。その共通する特徴は、①全例男性である。②乳児期の発症であり、歩行開始が遅いか獲得できない。③歩行不能年齢は DMD より早期である。④全例に知能障害を認める。⑤ CT の変化は皮質の萎縮、脳室拡大はあっても、白質の低吸収域がなく、MRI では、脳回の異常が認められない、である。

顔面筋罹患は Beggs らの 3 例、Echenne らの 1 例では存在すると記載されている。田中ら、Prella、本症例では顔面筋罹患はない。遺伝子欠失は 8 例全て調べているが、共通の領域はないようであり、ジストロフィン遺伝子の N 端の欠失が 1 例、rod 部分の欠失が 4 例、遺伝子変異の同定されなかったものが 3 例であった。

もしも、この症例は本来は DMD、すなわち、遺伝子変異は DMD のみであったとすると、DMD としての phenotype を変化させるような出来事は、生後 9 カ月の意識障害があげられる。これを

契機として退行し、その後の発達が極めて遅れ、本来の DMD の臨床経過を示さなかった可能性も考えられる。しかし、他の報告例では、田中らの 2 例目において、生後 8 日目に原因不明の一過性チアノーゼが認められたこと以外には、特に何もなかった。

Beggs ら⁴⁾は、FCMD の一部の例にジストロフィン遺伝子異常がみられたことの説明として、3 点を挙げている。第 1 は、3,500 人に 1 人の頻度で認められる DMD¹³⁾と、10,000 人に 1 人の頻度の FCMD²⁾の偶然の合併である。従って、ジストロフィン欠損を伴う FCMD は、

$$\frac{1}{3.5 \times 10^3} \times \frac{1}{1 \times 10^4} = \frac{1}{3.5 \times 10^7}$$

の頻度で認められることになる。彼らは 23 人の FCMD 男性に 3 人という高い頻度でジストロフィン欠損を認めたため、この説は考えにくいとした。第 2 は、これらの症例は、DMD/BMD のスペクトラムの中の極端な例であるとする説である。この説は、日本人でない CMD にはジストロフィン欠損を示す例がないことを指摘して否定している。そして、第 3 にジストロフィンと FCMD 遺伝子産物との間には相互作用があり、これらの症例は FCMD 遺伝子変異のヘテロ接合体であると同時に、DMD 遺伝子変異に関してはヘミ接合

体でもあり、その相互作用によって、両疾患の間のような表現型をとるに至ったという仮説を述べている。FCMD 遺伝子の異常をヘテロ接合体として有する人が、DMD 遺伝子異常に関してはヘミ接合体を有する割合は、彼らの計算によると、FCMD の男性患者の5.4%となる。さらに、血族結婚を考慮すると、この数値はさらに増加する。彼らはこの第3の仮説を最も可能性のあるものとしている。

本症例をはじめ、表にまとめた報告例の全てについて、この第3の仮説はあてはまるのであろうか。第2の仮説のように、DMD が従来考えられていた臨床型以上に広いスペクトラムを有しており、その程度の重いもの即ち発症の早いグループが CMD または FCMD と診断されている可能性は簡単には否定できない。我々の教室では、知能障害、著明な仮性肥大を呈する例を重症 DMD として提唱してきた¹⁴⁾が、Beggs らの症例の臨床像はそれに一致する。また、他院で FCMD と診断を受け¹⁵⁾、生後7カ月に当科に紹介された症例で、我々の診断では DMD としていたが、最近、生検筋のジストロフィン染色により DMD であると確定した例もある。Beggs らは、日本人以外の CMD ではジストロフィン欠損の合併の報告がないことを述べ、それを根拠として、第2の仮説を否定している。しかし、我々の検索では、表のように、イタリア、フランスより各1例ずつの報告があった。さらに、本来は DMD の臨床像を示すべきものが、出生後の何らかの因子によって重症化し、CMD または FCMD と診断される可能性もある。これらの仮説の妥当性を検討するためには、中枢神経系の奇形性病変の有無、顔面筋罹患、仮性肥大、腱反射、血清 CK 値などの臨床所見、常染色体性劣性遺伝を示すかなどの観察と記載が必要である。また、FCMD における遺伝子変異の追求がこれらの症例の病因成立機構の解明として望まれる。

結 語

FCMD と臨床診断された33例および n-FCMD と診断された1例について、ジストロフィン遺伝子変異を調べた。中枢神経障害を有する n-FCMD

の1例でエクソン48~52の欠失と、骨格筋におけるジストロフィン欠損を認めた。また、臨床的に CMD または FCMD と診断され、ジストロフィン欠損が証明された文献報告7例と本例を考察した。これらの症例は、FCMD 遺伝子異常はヘテロ接合体であり、DMD 遺伝子に関してはヘミ接合体であるという仮説がある。しかし、DMD が従来考えられていた臨床型以上に広いスペクトラムを有しており、その程度の重いもの即ち発症の早いグループが CMD または FCMD と診断されている可能性も否定できないと考えた。

本稿を恩師福山幸夫教授の退職記念論文として捧げます。

本研究は平成2年度岡本系枝研究助成金、平成4、5年度厚生省精神神経研究委託費(2指-2-13)、文部省科学研究費補助金一般(A)課題番号02404046によって行われた。

文 献

- 1) Fukuyama Y, Kawazura M, Haruna H: A peculiar form of congenital progressive muscular dystrophy. *Pediatr Univ Tokyo* 4: 5-8, 1960
- 2) 大澤真木子, 鈴木暁子, 福山幸夫: 先天性筋ジストロフィー症(福山型)の遺伝、臨床、病理。神経進歩 24: 702-717, 1980
- 3) 田中順子, 塚本浩子, 谷地雅子ほか: 発達遅滞を伴った Duchenne 型筋ジストロフィーと福山型先天性筋ジストロフィーの比較。第8回小児神経・筋疾患懇話会, 1991
- 4) Beggs AH, Neumann PE, Arahata K et al: Possible influences on the expression of X chromosome-linked dystrophin abnormalities by heterozygosity for autosomal recessive Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 623-627, 1992
- 5) Prella A, Medori R, Moggio M et al: Dystrophin deficiency in a case of congenital myopathy. *J Neurol* 239: 76-78, 1992
- 6) Echenne B, Chevron M-P, Pons F et al: Congenital muscular dystrophy with absence of dystrophin, 6th Congress of the International Child Neurology Association and 1st Ibero-american Congress of Pediatric Neurology. Abstracts: 111, 1992
- 7) Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE et al: Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *In* PCR Protocols: A

- Guide to Methods and Applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ et al eds) pp272-281, Academic Press, New York, London (1990)
- 8) **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
 - 9) **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
 - 10) **Saito K, Ikeya K, Yamauchi A et al:** Molecular genetic analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy families. *In Fetal and Prenatal Neurology* (Fukuyama Y et al eds) pp46-59, Karger, Basel (1992)
 - 11) 祖父尼俊雄: 染色体の異形性(個人差). *医学のあゆみ* 121 : 582-589, 1982
 - 12) **Nakahori Y, Mitani K, Yamada M et al:** A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acid Res* 14 : 7569-7580, 1986
 - 13) **Moser H:** Duchenne muscular dystrophy: Pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Gen* 66 : 17-40, 1984
 - 14) 福山幸夫, 平山義人, 鈴木暘子ほか: 1) 先天性進行性筋ジストロフィー症の臨床遺伝学的, 疫学的, 疾病分類学的研究 I. 先天性進行性筋ジストロフィー症の臨床遺伝学的研究, II. 先天性進行性筋ジストロフィー症の診療実態調査, III. 早期乳児期発症の進行性筋ジストロフィー症の分類について. 厚生省心身障害研究費補助金, 筋ジストロフィー症の病因究明に関する研究沖中班, 昭和50年度研究報告書: 123-129, 1976
 - 15) 竹内山水, 梶原真人, 大塚正秋ほか: 新生児期に血清 CPK 高値, 筋緊張亢進を認め筋生検で診断した先天性筋ジストロフィーの2例. *大分病医誌* 16 : 102-105, 1987