

先天性筋緊張性ジストロフィーにおける
ジストロフィン発現遅延の免疫学的解析

砂田芳秀

先天性筋緊張性ジストロフィーにおける ジストロフィン発現遅延の免疫学的解析

砂田 芳秀

1. 緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy, DMD) は伴性劣性遺伝形式をとる重症型筋ジストロフィーで、およそ新生男児3,000人に1人の割合で発症し、突然変異が多いことが特徴の一つとされてきた。多くの臨床的・生化学的研究にもかかわらず、100年余りにわたって原因不明であったが、1986年 Kunkelらにより DMD 遺伝子産物 (gene transcript) が reverse genetics の strategy を用いてクローニングされ¹⁾、構造解析がなされた。その後の研究もふまえて DMD 遺伝子は X染色体短腕 Xp21.1 に局在し、2,300kb にわたり 75 個以上の exon から成り²⁾、X染色体の 1% を占める巨大遺伝子であることが明らかにされた。その gene transcript は 14kb で、cDNA の塩基配列から 3685 個のアミノ酸から成る分子量 427kDa の巨大蛋白質ジストロフィンが演繹され、4つのドメイン構造を持つことが提唱された³⁾。N末端の 240 個のアミノ酸を含む球状の N末端ドメインは骨格筋構造蛋白 α -アクチニン、赤血球膜直下の細胞骨格蛋白スペクトリンと類似性が高くアクチン結合能を持つと考えられている⁴⁾。第二ドメインは三重らせん構造単位 24 個の繰り返しを持つ 2,700 個のアミノ酸の長い桿状構造をとり、膜蛋白であるスペクトリンに類似している⁵⁾。第三ドメインはシステインの多い 280 個のアミノ酸からなり EF hand に似た構造を持つ。第四ドメインは C末端の 420 個のアミノ酸からなるが、既知のどの蛋白質とも相同性が認められないジストロフィン特有の構造をとっており、種を越えてよく保存されている⁶⁾⁷⁾。蛋白質レベルにおいてもウエスタンブロット解析により分子量 ~400kDa 蛋白質が同定され⁸⁾、免疫組織化学⁹⁾¹⁰⁾ および免疫電顕¹¹⁾ により骨格筋の細胞膜直下に存在することが確認され、細胞膜の糖蛋白質と結合していることが強く示唆されている¹²⁾。ジストロフィンは骨格筋だけではなく心筋や平滑筋そして脳にも発現しており¹³⁾、しかも組織によって異なる polymorphism が存在することが明らかにされ、alternative splicing¹⁴⁾ または promotor の多型性¹⁵⁾ による polymorphism は現在までに約 10 種が報告されている。またマウスでは胎仔と成体とでサイズの異なるジストロフィン mRNA が発現していることが報告されており¹⁶⁾、多くの細胞骨格蛋白質同様、ジストロフィンでも胎児型 isoform の存在が示唆されている。しかしこうしたジストロフィン isoform の蛋白質レベルの同定はまだなされていない。また最近、第 6 染色体長腕上の

遺伝子によりコードされるジストロフィンと高いhomologyを持つ13kbのmRNAが骨格筋に発現していることがわかり、ジストロフィン類似蛋白質 (dystrophin related protein, DRP) の存在が示唆され¹⁷⁾、dystrophin familyがクローズアップされている。以上のような分子生物学・細胞生物学的研究の急速な発展と平行して臨床的な研究も勢力的に行われており、現在までに次のようなことが明らかにされている。すなわち、(1)DMD患者の約半数以上でDMD遺伝子の欠失(deletion)が発見され¹⁸⁾、大多数でジストロフィンが骨格筋形質膜に欠損している。(2)伴性劣性良性筋ジストロフィーであるベッカー型(Becker muscular dystrophy, BMD)はDMDのallelic disorderであり、欠失あるいは重複(duplication)の遺伝子異常により、分子量の異なる異常ジストロフィンが発現しているか、または少量の正常サイズのジストロフィンが発現している¹⁹⁾。(3)DMDとBMDのphenotypeの違いは欠失の大きさによるものではなく、欠失によりreading frameが変化するか(out of frame)、reading frameが維持されるか(in-frame)によるというframe shift仮説²⁰⁾が提唱されているが、それでも説明できない症例が存在する²¹⁾。(4)DMD/BMD以外にfamilial X-linked myalgia and cramps²²⁾, quadriceps myopathy²³⁾, spinal muscular atrophy²⁴⁾などの症例でもジストロフィン異常が指摘され、臨床病型とDMD遺伝子異常・ジストロフィン蛋白異常との対応が勢力的に研究されている。ともあれDMD/BMDはジストロフィン異常症と定義することができるが、ジストロフィンの生理機能やジストロフィン欠損が筋細胞死を引き起こす機序(臨床的発現)についてはまだ十分解明されていない。本研究はジストロフィン異常と臨床病型の対応を検討するため、様々な神経筋疾患の生検筋でジストロフィン発現を解析した中で、先天性筋緊張性ジストロフィーにおけるジストロフィン発現異常を見だし、これがジストロフィンの発現遅延によることを報告するものである。

2. 対象と方法

(1)研究対象：8例の先天性筋緊張性ジストロフィー（年齢：生後40日-18歳,男5例,女3例,表1）および疾患対照として筋緊張性ジストロフィー16例、多発筋炎2例、肢帯型筋ジストロフィー4例、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー1例、筋萎縮性側索硬化症1例、nemaline myopathy 6例、myotubular myopathy 2例、congenital fiber type disproportion 1例、セントラルコア病2例の生検筋について検討した。なお先天性筋緊張性ジストロフィーの診断根拠としては、(1)筋病理像が壊死・再生所見に乏しく、筋肉の未熟性（小円形線維・中心核線維・タイプ2C線維の増加、タイプ2B線維欠損などのタイプ分化不良）を呈すること(2)母親に筋緊張性ジストロフィーの病歴があることを重視した（表1）。

(2)抗ジストロフィン抗体：本研究では異なったドメインを認識する3種類の抗ジストロフィン抗体A1C,P04e,NCL-DYS2を使用した。前述したようにジストロフィンには複数のisoformがあり得、またBecker型の一部の症例では分子構造の一部が欠損したり、重複する異常なジストロフィン分子が作られている²⁷⁾。従ってジストロフィンの免疫学的解析には認識部位の異なる複数の抗体を併用する必要がある。A1CはN末側のアクチン結合ドメイン（アミノ酸215-264）を認識する単クローン抗体²⁸⁾、P04eは三重らせん構造部分（アミノ酸440-489）を認識するウサギ抗血清²⁹⁾、NCL-DYS2（New Castle Laboratory社）はC末端の17個のアミノ酸を認識する単クローン抗体で（図1）、いずれもIgG分画である。

(3)免疫組織化学：採取後-80℃にて凍結保存した生検筋ブロックをmicrotomeで切り出し8μmの凍結切片を作製し、冷エタノールで10分、続いて冷アセトンで10分固定したものを使用した。リン酸緩衝液pH7.2で洗浄し、50%正常羊血清を用いて室温で30分間ブロッキングをした後、一次抗体として抗ジストロフィン抗体を反応させた。抗体により適反応温度ならびに適反応時間に違いがあり、A1C,NCL-DYS2は室温で1時間、P04eは37℃で一晩incubateした。反応終了後PBSで洗浄し、再び50%正常羊血清で5分間ブロッキングし、マウスIgGあるいはウサギIgGに対するFITC標識二次抗体を室温で30分反応させた。標本はZeiss社の蛍光顕微鏡で観察した。

(4)電気泳動およびウエスタンブロット：-80℃にて凍結保存した生検筋ブロックの一部を蛋白溶解液（0.24M Tris/HCl pH6.7, 10% SDS, 10% 2-mercapto-ethanol, 3.4 mM EDTA）でhomogenizeし、直ちに3分間煮沸した後13,000xgで20分間遠沈し、その上清をRoss & Schatzの方法³⁰で蛋白定量した。ジストロフィン分子は桿状の巨大分子であるため、ドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動はDoucet & Trifaro(1988)の方法³¹により8%のゲルを用いて行った。各々のレーンには総蛋白量100 μ g相当の骨格筋ホモジェネートをapplyした。電気泳動終了後、Kyhse-Andersen(1984)の方法³²により、semidry systemでPVDF膜（Immobilon, Millipore社）に転写し、抗ジストロフィン抗体 P04e, NCL-DYS2と反応させABC法（Vectastain, Vector社）を用いて発色させた。なおA1CはSDSにより変性したジストロフィンに対する反応性が悪いため、ウエスタンブロットによるジストロフィンの半定量的解析には使用できなかった。

3. 結果

(1)筋組織化学：研究対象とした8例の先天性筋緊張性ジストロフィーの骨格筋は通常の組織化学で以下のような所見がみられた(表2)。case 1-3の乳児症例では豊富な間質成分の中に5-7 μ mの極めて細い円形の筋線維が散在し、groupingに乏しく、胎生筋に類似した組織構造がみられた。更にNADH-TR染色ではmyotube様構造を反映する peripheral haloや中心核を持った線維が多数認められ、ミオシンATPase染色でtype 2C線維の割合が55-90%と著しく高く、筋線維の未熟性が主体をなす所見であった。fiber type 分化の点からcase 1,3は胎生35週頃、case 2は胎生20週頃に相当すると判定される³⁹⁾。これらの症例では成人の筋緊張性ジストロフィーでみられるような、type 1線維優位やtype 1線維萎縮、pyknotic nuclear clump, sarcoplasmic mass, ring fiberなどの所見はみられず、壊死・再生像も観察されなかった。case 4-6の幼児症例では線維径が10 μ m前後の小径線維と40-50 μ mの線維の二峰性分布を示し、NADH-TR染色でも peripheral halo線維はみられなくなり、中心核の存在も激減した。すなわちmyotube様構造はみられなくなった。ミオシンATPase染色によるfiber type組成においてもtype 2C線維の割合は1-2%となり、type 1,2A,2B線維への分化が進む。しかしtype 1が明らかに優位であり、筋束によってはtype 2Bあるいはtype 2A欠損を認め、fiber type分化異常があった。しかもこのtype 1線維は明らかに萎縮性であり、中心核線維の増加(case 5)やsarcoplasmic mass(case 6)の所見が認められた。これらの変化はいずれも筋緊張性ジストロフィーにみられる形態変化であり、10歳を越えるcase 7,8では肥大線維を持った著しい大小不同、中心核線維の増加、type 1線維優位、type 1線維萎縮という筋緊張性ジストロフィーに特徴的な病理所見を備えるようになる。しかし壊死・再生像はほとんどみられない。

(2)抗ジストロフィン抗体の特異性：今回使用した3種類の抗ジストロフィン抗体は、多発筋炎患者の上腕二頭筋およびコントロールマウス(SCN)大腿四頭筋のイムノブロット解析において、ラミニンAとミオシン重鎖との間に泳動される蛋白質と反応した。この蛋白質は約400kDaの分子量を持ち、DMD患者あるいはmdxマウスの骨格筋では検出されないことからジストロフィンと同定される。従って、これら3種類の抗体はジストロ

フィンを認識し反応することが確認された。また α -actinin や DRP との交差反応性はなく、骨格筋ではジストロフィン特異的と考えられた (図2)。

(3)免疫組織化学:疾患対照として検索した筋緊張性ジストロフィー、多発筋炎、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、nemaline myopathy、myotubular myopathy、congenital fiber type disproportion、セントラルコア病については3種類の抗ジストロフィン抗体A1C,P04e,NCL-DYS2により、骨格筋細胞膜が全周にわたって均一に染色された(図3A,B)。ところが、先天性筋緊張性ジストロフィー 8例中3症例(case 1,2,3)では3種類全ての抗体についてジストロフィンの染色が不良であった(図3C,D,E)。すなわち、ジストロフィンが比較的良好に発現している筋線維も散見されるが、大多数は形質膜上の発現が部分的・不連続であったり全く発現していない筋線維であった。これらジストロフィンの発現が不良であった3症例は生後10カ月以下の症例であり、生後18カ月以降の5症例(case 4-8)では形質膜上に正常なジストロフィン染色パターンが観察された(図3F-H)。ジストロフィンの発現が不良であった3例について連続切片上でスペクトリンの免疫組織化学を行ったところ、ジストロフィンの染色が不良であった筋線維も含めて、全ての骨格筋形質膜全周にスペクトリンが染色された(図4)。

(4)ウエスタンブロット:対照とした筋緊張性ジストロフィーおよび多発筋炎ではP04eとNCL-DYS2の2種類の抗体により約400kDaの明瞭なジストロフィンバンドが検出される(図5 lane 1,2, 図6 lane 1)。先天性筋緊張性ジストロフィーの生後40日のcase 1および生後3ヶ月のcase 2は、P04eでほとんどバンドは検出されず(図5 lane 3,4)、NCL-DYS2で薄い~400kDaバンドが検出された(図6 lane 2,3)。生後10ヶ月のcase 3ではcase 1,2より若干明瞭なジストロフィンバンドが検出されるが、対照に比べるとジストロフィン量は少ない(図5 lane 5, 図6 lane 4)。すなわち、免疫組織化学上ジストロフィン染色が不良であった生後10カ月以下のcase 1,2,3は、ウエスタンブロットの上でも対照に比べてジストロフィン発現量が明らかに低下していた。他方、生後18ヶ月以降の5例では対照とほぼ同量のジストロフィンバンドがみられ(図5 lane 6-10, 図6 lane 5)、正常量のジストロフィンが発現していることが示唆された。次に組織学的に筋線維の未熟性を認めジストロフィンの発現量も少なかったcase 3の試料を、多発筋炎の試料と混

和し同一レーンで電気泳動シムノプロットしたところ、両者のジストロフィンは co-migrateして約400kDaの単一バンドだけが検出され、分子量の異なったジストロフィン isoform は検出されなかった (図6 lane 6)。

4. 考察

(1)先天性筋緊張性ジストロフィーにおけるジストロフィン発現異常

本研究は筋緊張性ジストロフィーに罹患している母親から生まれた筋緊張性ジストロフィー患児(先天性筋緊張性ジストロフィー)において、生後40日、3カ月および10カ月児ではジストロフィンの発現が不良で、18カ月以降18歳児では正常と同様の発現がみられたことを報告している。免疫組織化学で形質膜上のジストロフィン発現が不良であった3例は、ウエスタンブロットでも400kDaのジストロフィンバンドが極めて薄く、ジストロフィンの量自体が少ないことが明らかとなった。従って細胞膜上での発現が悪いのはジストロフィン分子の形質膜へのアセンブリー段階での異常によるものではなく、ジストロフィン分子の発現量自体が少ないためであると考えられるが、これら3症例におけるジストロフィン発現不全は乳児期骨格筋の生理的特徴なのか、あるいは何らかの病的過程によるものなのかが問題となる。

最近骨格筋の発生過程におけるジストロフィン発現様式が経時的に検討されている。Hagiwaraら²⁹⁾はラット骨格筋細胞において、ジストロフィンのdevelopmental expressionを免疫組織化学およびウエスタンブロットにより検討し、胎生15日より primary myotube上にジストロフィンの発現が始まり、生後5日には primaryおよび secondary myotubeの形質膜上へのジストロフィンの発現が完成することを報告している。またヒトの胎児筋におけるジストロフィン発現も検討されており、Strongら³⁴⁾はウエスタンブロット上、胎生8週ですでにジストロフィンが検出されると報告している。一方、Prelleら³⁵⁾は免疫組織化学上は胎生9週ではジストロフィンが検出されず胎生11週頃から細胞質および形質膜上に発現し始め、胎生22週には成人と同程度に形質膜上に発現していると報告している。我々も17週と35週の胎児筋におけるジストロフィン発現をA1Cを用いて検討し、ウエスタンブロット上は両時期にジストロフィンがみられ、免疫組織化学上は35週ではほとんどの筋線維の形質膜上にジストロフィンが均一に発現しているが、17週では一部にしか発現していないことを確認している²⁸⁾。すなわちヒトで胎生10週前後からジストロフィンの発現が始まり、生下時には筋形質膜上のジストロフィン発現は完成している。従って今回検討した生後10カ月までの先天性筋緊張性ジストロフィー

患児の骨格筋ではジストロフィン発現に異常があると考えられる。しかし本疾患は常染色体優性遺伝形式をとり、第19染色体長腕に遺伝子座が想定されている疾患であり、暦年齢を経るに従い正常サイズのジストロフィンが発現してくることからみても、X染色体上のDMD遺伝子の異常は考えにくい。DMD/BMDなどのDMD遺伝子に異常のある疾患以外で、ジストロフィン発現の異常がみつまっているのは常染色体劣性遺伝の福山型先天性筋ジストロフィーだけである。この場合ジストロフィン陰性線維と陽性線維とが混在するケース³⁶⁾と、全線維陰性のケース³⁷⁾が報告されている。前者におけるジストロフィン陰性線維は形態的に壊死線維であり、抗スペクトリン抗体でも筋質膜が染色されないことから壊死による二次的変化と考えられている。後者はDMDとの異同が問題となっており再検討が必要とされている。先天性筋緊張性ジストロフィーにおけるジストロフィン陰性線維は形態的にも、またスペクトリン免疫組織化学所見からも壊死線維とは区別されるのでジストロフィン発現異常の原因として別の機序を考えざるをえない。従来より先天性筋緊張性ジストロフィーでは中心核の増加、小径・円形線維の増加、ミオシンATPase染色による筋線維タイプの分別不良³⁸⁾、タイプ2B線維の欠損³⁹⁾など筋の未熟性を示唆する病理所見が報告されており、筋の成熟異常があることが指摘されている³⁸⁾³⁹⁾。今回検討した先天性筋緊張性ジストロフィー8例について、ジストロフィンの発現と筋組織所見を対比させてみると、ジストロフィン発現不全のあったcase 1-3の乳児症例ではいずれも peripheral haloや中心核といったmyotube様構造がみられ、未分化なtype 2C線維が55-90%を占めており、20-35週の胎生筋に匹敵する未熟性を認めた。他方、幼児期以降の5例ではperipheral haloは消失しtype 2C線維も5-10%以下で、type 1線維優位やtype 1線維萎縮など成人の筋緊張性ジストロフィーの所見を呈し、ジストロフィン発現は正常に発現していた。このようにジストロフィン発現不全が筋の未熟性の指標(①peripheral halo②中心核③type 2C線維優位)と一致して認められたことは本症のジストロフィン発現不全が筋の成熟異常に伴うジストロフィンの発現遅延によることを強く示唆している。ミオシンATPase染色によるfiber type分化の点からDubowitzは胎児期骨格筋の発達を3つのphaseに分類している⁴⁰⁾⁴¹⁾⁴²⁾。phase 1は胎生20週頃までの全ての筋線維が未分化なtype 2Cの時期、phase 2は胎生20~28週のtype 1への分化が始まる時期、phase 3は胎生28週以降type 2への分化を遂げる時期とされている。正常な

筋の発達プロセスではDubowitzのphase 1の段階でジストロフィン発現が検出され始め、phase 2で完成すると考えられる。ところが本症乳児例（10カ月以前）ではphase 2-3段階にありながらも未だジストロフィン発現が不良で、ジストロフィン発現が極めて遅延していると推定される。従って本症でのジストロフィンの発現遅延は正常な筋発達プロセスがそのまま遅延したのではなく、ジストロフィン発現の方がミオシンの分化よりもさらに遅延していると結論される。ジストロフィンの発現調節のメカニズムについてはほとんどわかっていないが、筋線維のfiber typeによってジストロフィンの発現に差異がみられないことや、ジストロフィンの発現時期とミオシンの分化程度の間に関係がみられないことから、両者は全く独立なメカニズムによるregulationを受けていると考えられる。このジストロフィン発現遅延の原因・機序については今後の課題である。

(2)ジストロフィン欠損と筋細胞死

現在、細胞内局在やアミノ酸配列などよりジストロフィンは形質膜の裏打ち構造を支える細胞骨格蛋白であると推定されているが、その生理機能は十分解明されていない。従ってDMDにおいてジストロフィン欠損筋が細胞死に至る機序についても完全に解明されているわけではない。従来の筋ジストロフィーの膜異常説²⁵⁾におけるprimaryな原因をジストロフィン欠損と解釈し、ジストロフィン欠損により細胞膜の脆弱化や細胞外Ca²⁺の流入が生じ、CANPなどのプロテアーゼが活性化され、筋構造蛋白が分解を受けることにより筋細胞が壊死に陥ると考えられている²⁶⁾。しかし、この図式の中で膜におけるジストロフィンの欠損がなぜ膜の脆弱化やCa²⁺の透過性の亢進を引き起こすのか、十分説明されていない。先天性筋緊張性ジストロフィーではジストロフィン発現不全例においても筋細胞壊死は生じておらず、このことは形質膜にジストロフィンが欠損しているだけでは必ずしも膜の脆弱化→細胞死に至るわけではないことを示唆している。従って、ジストロフィン欠損の上に更に何らかの要因が加わって膜の脆弱化やCa²⁺の透過性の亢進が生じると思われる。

(3)胎児型ジストロフィンisoform

収縮蛋白や細胞骨格蛋白など発達に伴って発現調節を受けるタンパク質は、通常embryonic isoformからadult isoformへ移行することが知られている。ジストロフィンにしても胎児型isoformが存在するか否か問題になっている。Dicksonら¹⁶⁾は胎仔マウスの骨格筋から抽出したジストロフィンmRNAを成体マウスのものと比較したところ胎仔マウスではジストロフィンmRNA量が少ないだけでなくそのサイズも明らかに小さいことを報告し胎児型isoformの存在を主張している。またStrongら³⁴⁾は8週 of 胎児骨格筋におけるジストロフィン発現をウエスタンブロットで調べたところ成人のジストロフィンよりもわずかに分子量の小さいジストロフィンが検出されたとし、これが胎児型ジストロフィンである可能性を指摘している。しかし、Kunkelら⁴⁴⁾は第7回国際神経筋学会において、幼若筋のgene transcriptの解析から明瞭に否定しており、幼若筋に特有なisoformは考えにくくなっている。今回先天性筋緊張性ジストロフィー症例のなかで組織学的に胎生筋に類似した未熟性を示し、ジストロフィンの発現も不良であったcase 3の生検筋を用いて、Strongらが指摘するような分子量の小さい胎児型ジストロフィンの検出を試みた。すなわちcase 3の骨格筋ホモジェネートを多発筋炎の骨格筋ホモジェネートと混和して同一レーンで電気泳動し、イムノブロットを行った。その結果、両者のジストロフィンはcomigrateし、約400kDaの単一バンドだけが検出された。従って両者のジストロフィンはウエスタンブロット上では同一サイズであり、分子量の異なった胎児型isoformの存在を示唆する結果は得られなかった。この結果だけではヒトにおける胎児型ジストロフィンの存在を否定するものではありえないが、Strongらの指摘する分子量の小さいジストロフィンについては否定的と考えられる。今後核酸レベルでの検討とともに、蛋白質レベルでも二次元電気泳動法や特異抗体の作成などによる検討が必要と思われる。先天性筋緊張性ジストロフィーではジストロフィン発現が不十分な未熟筋線維で何故筋壊死が生じないのかその理由は不明だが、胎児型isoformの解明が何らかの手がかりを与えてくれる可能性もあり研究の発展が期待される。

5. まとめ

(1)8例の先天性筋緊張性ジストロフィーおよび対照とした種々の神経筋疾患の生検筋について免疫組織化学およびウエスタンブロットによりジストロフィン発現様式を検討した。

(2)先天性筋緊張性ジストロフィーの生後18ヶ月から18歳までの5例ではジストロフィンが正常に発現していたが、組織学的に筋線維の未熟性が顕著であった生後10ヶ月以下の3例についてはジストロフィンの発現が不良であった。ヒト骨格筋では胎生10週前後からジストロフィンの発現が始まり生下時には完成していることから、先天性筋緊張性ジストロフィー乳児症例におけるジストロフィン発現異常は骨格筋の成熟異常に伴ったジストロフィンの発現遅延によるものと考えられた。

(3)正常筋発生ではミオシン ATPase染色性からみたミオシン分化に先んじてジストロフィン発現がみられるのに対し、先天性筋緊張性ジストロフィーではジストロフィン発現の方がミオシンの分化よりさらに遅れていた。

(4)先天性筋緊張性ジストロフィーの未熟筋線維では、ウエスタンブロット解析による胎児型ジストロフィンisoformは検出されなかった。

文 献

- 1) Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM: Isolation of candidate cDNAs for protein of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323:646-650,1986.
- 2) Mandel JL: Dystrophin: the gene and its product. *Nature* 339:584-586,1989.
- 3) Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM: The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53:219-228,1988.
- 4) Hammonds Jr RG : Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of α -actinin. *Cell* 51:1,1987.
- 5) Davison MD, Critchley DR : α -Actinins and the DMD protein contain spectrin-like repeats. *Cell* 52:159-160,1988.
- 6) Lemaire C, Heilig R, Mandel JL: The chicken dystrophin cDNA: striking conservation of the C-terminal coding and 3' untranslated regions between man and chicken. *EMBO J* 7:4157-4162,1988.
- 7) Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, Kunkel LM, Scott MO, Fischbeck KH, Kornegay JN, Avery RJ, Williams JR, Schmickel RD, Sylvester JE: The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334:154-156,1988.
- 8) Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928,1987.
- 9) Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AHM, Belfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN, Worton RG: The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 330:466-469,1988.
- 10) Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, Ishihara T, Nonaka I, Ozawa E, Sugita H: Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* 330:861-863,1988.
- 11) Watkins SC, Hoffman EP, Slayter HS, Kunkel LM : Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibers. *Nature* 333:863-866,1988
- 12) Campbell KP, Kahl SD: Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338:259-262,1989

- 13) Hoffman EP, Hudecki MS, Rosenberg PA, Pollina CM, Kunkel LM : Cell and fiber-type distribution of dystrophin. *Neuron* 1:411-420, 1988.
- 14) Feener CA, Koenig M, Kunkel LM : Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338:509-511, 1989.
- 15) Nudel U, Zuk D, Einay P, Zeelon E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D : Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 337:76-78, 1989.
- 16) Dickson G, Pizzey JA, Elsom VE, Love D, Davies KE, Walsh FS: Distinct dystrophin mRNA species are expressed in embryonic and adult mouse skeletal muscle. *FEBS Lett* 242:47-52, 1988.
- 17) Love DR, Hill DF, Dickson G, Spurr NK, Byth BC, Marsden RF, Walsh FS, Edwards YH, Davies KE : An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339:55-58, 1989.
- 18) Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM: 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.
- 19) Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, Waterston R, Brooke M, Specht L, Kupsy W, Chamberlain J, Caskey CT, Shapiro F, Kunkel LM: Characterization of dystrophin in muscle biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 318: 1363-1368, 1988.
- 20) Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gialati S, Moser H, Kunkel LM: An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2:90-95, 1988.
- 21) Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, Burghes AHM, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, Worton RG : Frameshift deletion in patients with Duchenne and Becker Muscular dystrophy. *Science* 241:755-759, 1988.
- 22) Gospe SM, Lazaro RP, Lava NS, Grootsholten PM, Scott MO, Fischbeck KH: Familial X-linked myalgia and cramps: a nonprogressive myopathy associated with a deletion in the dystrophin gene. *Neurology* 39:1277-1280, 1989.
- 23) Wada Y, Itoh Y, Furukawa T, Tsukagoshi H, Arahata K: Quadriceps myopathy: a

- clinical variant form of Becker muscular dystrophy. *J Neurol* 237:310-312,1990.
- 24) Lunt PW, Cumming WJK, Kingston H, Read AP, Mountford RC, Mahon M, Harris R: DNA probes in differential diagnosis of Becker muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Lancet* 1 :46-47,1989.
- 25) Rowland LP : Biochemistry of muscle membranes in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerves* 3:3-20,1980.
- 26) 塚原俊文, 石浦章一, 荒畑喜一, 杉田秀夫 : Dystrophin. *Annual Review 神経* 1990(5). 後藤文男, 高倉公朋, 木下真男, 柳澤信夫, 清水 輝夫編, 中外医学社, 東京, 1990, p326-338
- 27) England SB, Nicholson LVB, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Harris JB, Davies KE: Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343:180-182,1990.
- 28) Shimizu T, Matsumura K, Hashimoto K, Mannen T, Ishiguro T, Eguchi C, Nonaka I, Yoshida M, Ozawa E: A monoclonal antibody against a synthetic polypeptide fragment of dystrophin (amino acid sequence from position 215 to 264). *Proc Japan Acad* 64B:205-208, 1988.
- 29) Hagiwara Y, Yoshida M, Nonaka I, Ozawa E: Developmental expression of dystrophin on the plasma membrane of rat muscle cells. *Protoplasma* 151: 11-18,1989.
- 30) Ross E, Schatz G: Assay of protein in the presence of high concentrations of sulfhydryl compounds. *Anal Biochem* 54:304-306, 1973.
- 31) Doucet JP, Trifaro JM : A discontinuous and highly porous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide slab gel system of high resolution. *Anal Biochem* 168: 265-271,1988.
- 32) Kyhse-Andersen J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10:203-209,1984.
- 33) Colling-Saltin AF: Enzyme histochemistry on skeletal muscle of the human foetus. *J Neurol Sci* 39:169-185,1978.
- 34) Strong PN, Clerk A, Sherratt TG, Swery CA: Dystrophin expression in fetuses at risk for DMD and BMD. *J Neurol Sci* 98(Suppl): 231a,1990.
- 35) Prella A, Chianese L, Gallanti A, Moggio M, Scarpini E, Bonilla E, Scarlato G: Appearance and localization of dystrophin in normal human fetal muscle.

- J Neurol Sci 98(Suppl):229a,1990.
- 36)Arikawa E,Arahata K,Nonaka I,Sugita H : Dystrophin analysis in congenital muscular dystrophy. Neurology 40 (Suppl 1) :206a, 1990.
- 37)有川恵理、荒畑喜一、埜中征哉、杉田秀夫：福山型先天性筋ジストロフィーにおけるジストロフィンの研究. 医学のあゆみ 150:747-748, 1989.
- 38)Sarnat HB, Silbert SW : Maturational arrest of fetal muscle in neonatal myotonic dystrophy: a pathologic study of four cases. Arch Neurol 33:466-474,1976.
- 39)Argov Z, Gardner-Medwin D,Johnson MA,Mastaglia FL : Congenital myotonic dystrophy: fiber type abnormalities in two cases. Arch Neurol 37:693-696,1980.
- 40)Dubowitz V:Enzymatic maturation of skeletal muscle. Nature 197 :1215,1963.
- 41)Dubowitz V : Enzyme histochemistry of skeletal muscle. part 2: developing human muscle. J Neurol Neurosurg Psychiatry 28:519-524,1965.
- 42)Dubowitz V: Histochemistry,enzyme histochemistry of developing human muscle. Nature 211:884-885,1966.
- 43)Buckingham ME: Actin and myosin multigene families : their expression during the formation of skeletal muscle. Essays Biochem 20:77-109,1985.
- 44)Kunkel LM: personal communication.1990

表1. Clinical Data of 8 Patients with CMyD

#case	Age	Sex	maternal transmission	Biopsied site
1	40d	F	+	lt.quad.femoris
2	3m	F	+	rt.quad.femoris
3	10m	M	+	lt.biceps brachii
4	18m	F	+	lt.biceps brachii
5	4y	M	+	lt.quad.femoris
6	5y	M	?	lt.abd.hallucis
7	11y	M	+	lt.ext.hal.brevis
8	18y	M	+	lt.biceps brachii

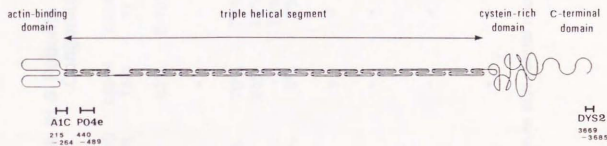


図1. ジストロフィン分子モデルと抗ジストロフィン抗体の認識部位
(ジストロフィン分子のシェーマは文献3)より引用した。)

表 2. Muscle Histopathologic Features of 8 Patients with
Congenital Myotonic Dystrophy

age	case1 40d	case2 3m	case3 10m	case4 18m	case5 4y	case6 5y	case7 11y	case8 18y
central nuclei	m	m	m	<3%	5-10%	2%	10%	80%
peripheral halo	+	+	+	-	-	-	-	-
type 1	5%	10%	30%	70%	70%	20%	72%	60%
type 2A	40%	-	-	25%	18%	70%	10%	13%
type 2B	-	-	5%	-	10%	4%	10%	26%
type 2C	55%	90%	65%	5%	2%	6%	8%	1%
type 1 atrophy	-	-	-	+	+	+	+	+
pyknotic nuclear clump	-	-	-	-	-	-	-	+
sarcoplasmic mass	-	-	-	-	-	+	-	-
necrotic fiber	-	-	-	-	-	-	-	-

m; myotube-like structure with central nuclei

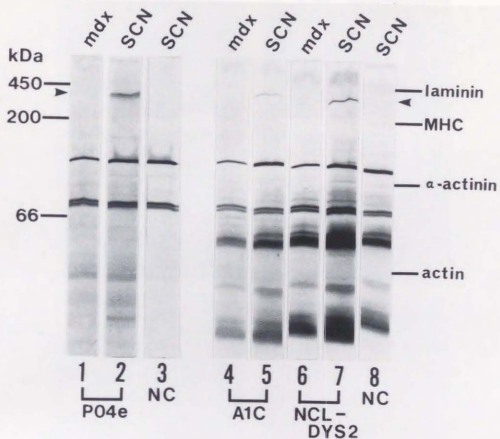


図2. 抗ジストロフィン抗体のcharacterization

lane 1,2 : P04e, lane 4,5 : A1C, lane 6,7 : NCL-DYS2 による
マウス骨格筋のウエスタンブロット。

lane 3,8 : 二次抗体だけを反応させたマウス骨格筋ウエスタン
ブロットによる非特異的バンド。

mdx : mdx-mouse, SCN : control mouse, NC : negative control

MHC : myosin heavy chain ▶ ジストロフィンバンド

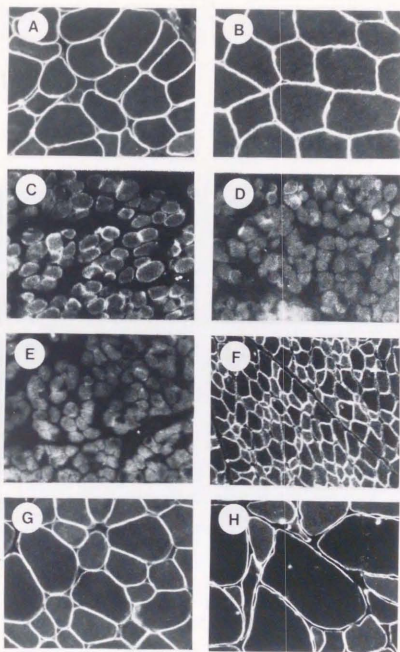


図3. 抗ジストロフィン抗体P04eによる骨格筋免疫組織化学
 A: 多発筋炎, B: 筋緊張性ジストロフィー, C-E: 先天性筋緊張性
 ジストロフィー case 1-3, F-H: 先天性筋緊張性ジストロフィー
 case 4,6,8 (A,B,F-H: X180, C-E: X450)

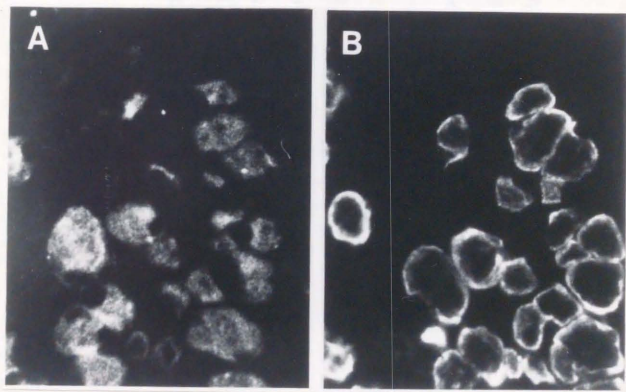


図4. 先天性筋緊張性ジストロフィーcase 3の骨格筋連続切片標本のジストロフィン(A)およびスペクトリン(B)免疫組織化学(抗ジストロフィン抗体P04eを使用。 X1,150)

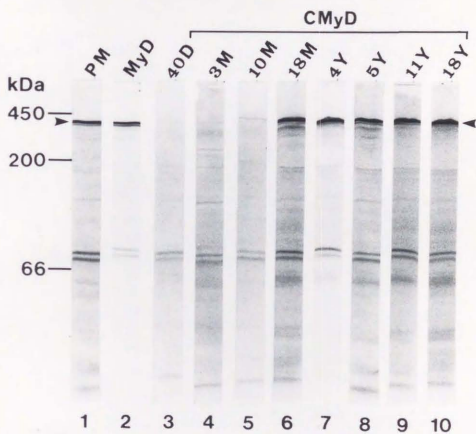


図5. 抗ジストロフィン抗体P04eによる骨格筋のウエスタンブロット
 lane 1: 多発筋炎(PM), lane 2: 筋緊張性ジストロフィー(MyD),
 lane 3-10: 先天性筋緊張性ジストロフィー(CMyD) case 1-8
 (laneの上に年齢を示した。) ▶ ジストロフィンバンド

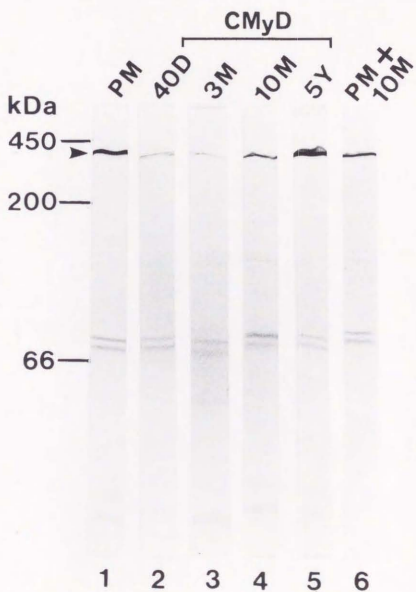
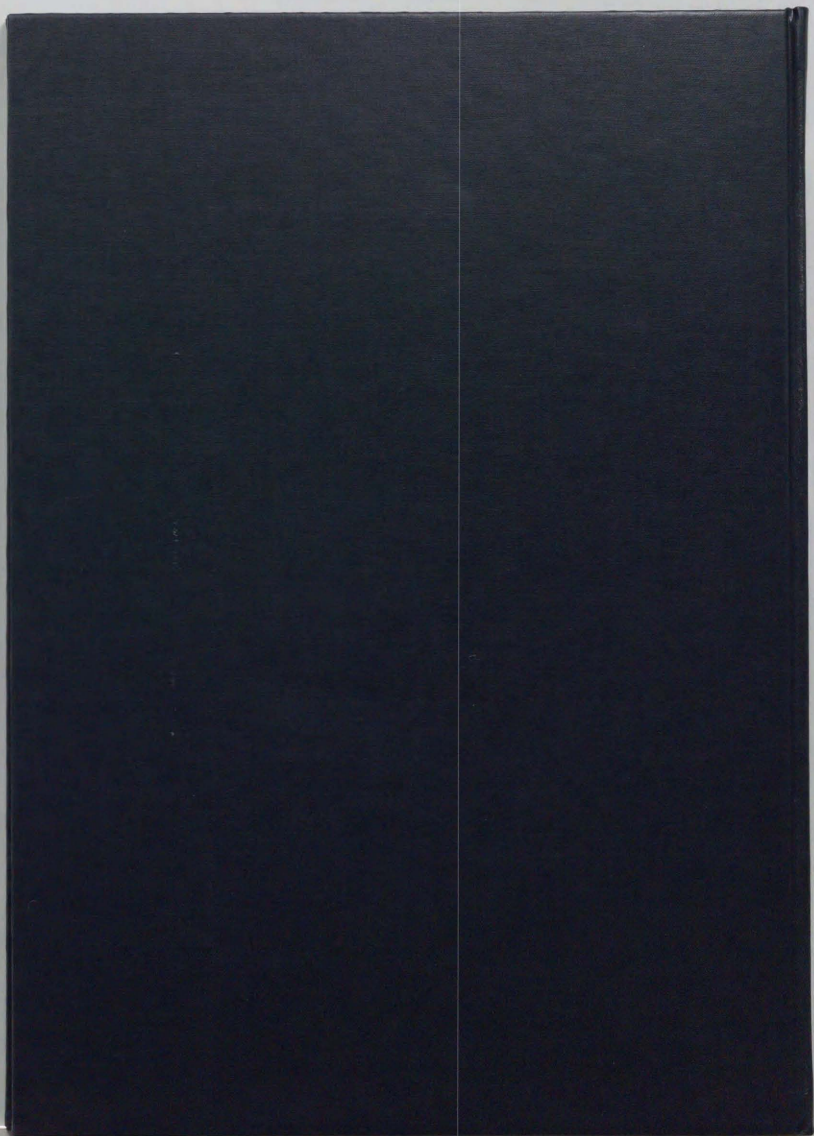
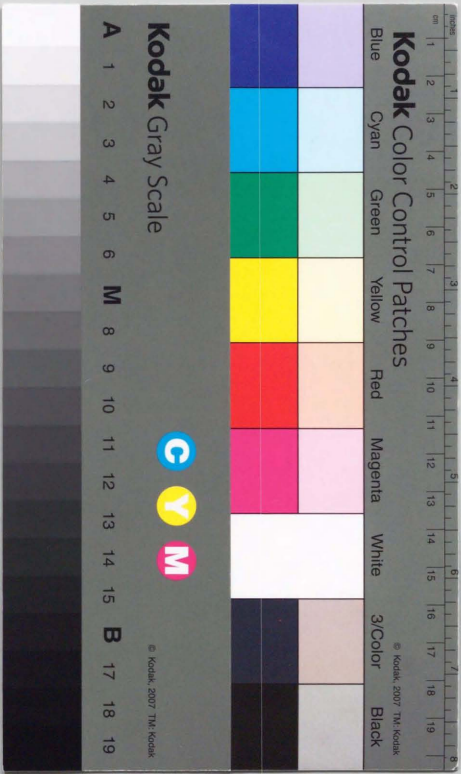


図6. 抗ジストロフィン抗体NCL-DYS2による骨格筋のウエスタンブロット
 lane 1: 多発筋炎(PM), lane 2-5: 先天性筋緊張性ジストロフィー(CMyD)
 case 1,2,3,6, lane 6: 多発筋炎+先天性筋緊張性ジストロフィー case 3
 ▶ ジストロフィンバンド





Kodak Color Control Patches

- Blue
- Cyan
- Green
- Yellow
- Red
- Magenta
- White
- 3/Color
- Black

Kodak Gray Scale

- A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak