

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 年～2009 年

課題番号：19591209

研究課題名（和文）ジストロフィン遺伝子異常による拡張型心筋症の治療へのアプローチ

研究課題名（英文）An approach to treatment of dilated cardiomyopathy caused by dystrophin abnormality

研究代表者

木村 重美（KIMURA SHIGEMI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：60284767

研究成果の概要（和文）：

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィン(dys)遺伝子のエクソン1周囲（筋型）の異常により、筋力低下無しで拡張型心筋症が発症することが報告されている。今回の研究ではその原因の解析と頻度を調査した。全国調査の結果、該当する患者は2例で1例は dys のエクソン1のスプライス・ドナーの部位に変異を認めた。dys の異常にもかかわらず、筋力低下を示さないのは骨格筋で dy のアイソフォームが代償していることを証明した。DNA アレイを使用して dys の発現制御機構を解析したが、既知の pathway に該当するものはなかった。

研究成果の概要（英文）：

One of the causes of dilated cardiomyopathy is reported the abnormality of around exon 1 of the dystrophin, which is cause of Duchenne muscular dystrophy. We investigated analysis of the onset mechanisms and the frequency in this study. One of two cases showed that mutation in the splice donor site of exon 1 of dystrophin but another case did not. In spite of abnormality of dystrophin, the non-muscle weakness is explained that dystrophin isoform compensated in a skeletal muscle. We analyzed dystrophin regulation with DNA array, but the known pathway did not have shown.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児神経学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科

キーワード：筋ジストロフィー、拡張型心筋症、アイソフォーム、ジストロフィン、全国調査、エクソン1

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症は、心臓の内腔が著しく拡張し、心筋の収縮不全を起こし、うっ血性心不全の臨床像を呈することが特徴である。その拡張型心筋症はウイルス性心筋炎などの関与が考えられている。しかし、原因不明の特発性のものが多く、家族発症などもあり、ミトコンドリア DNA、心筋 -ミオシン重鎖遺伝子、ジストロフィン(dys)遺伝子などの遺伝的素因も考えられている。

一方、Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)は進行性の筋力低下を示し、dys 遺伝子異常による dys の完全欠損が原因である。現在の死因は拡張型心筋症による心不全が最も多く、平均寿命は 28 歳である。Becker 型筋ジストロフィー(BMD)は DMD の軽症タイプで予後は比較的良好で、筋組織では dys の発現がまだらに存在する。dys 遺伝子は X 染色体上に存在し、79 のエクソンが存在する。その dys 遺伝子(他のアイソフォームと区別するために、筋型 dys と呼ぶ)の主な発現部位は骨格筋、心筋、平滑筋である。dys は現在分かっているだけでも、7 つのアイソフォームが存在する。その中でも、脳型とプルキンエ型の dys はプロモーターとエクソン 1 がそれぞれ独立して存在し、エクソン 2 以降は筋型 dys と同じであり、大きさもほぼ同じ長さである。脳型 dys 遺伝子の主な発現部位は脳の皮質や海馬で、プルキンエ型は小脳のプルキンエ細胞である。

Muntoni らは 1993 年に筋型 dys のプロモーターとエクソン 1 の領域の欠損により、伴性劣性の遺伝形式を示し、筋力低下を示さない拡張型心筋症となった家系を報告している(*N Engl J Med*1993;329:921-925)。分子生物学的解析により筋力低下を示さないのは、その患者の骨格筋では、本来発現するはずの筋型 dys の代わりに、脳型とプルキンエ型の dys が発現しているためである結論づけている。

2. 研究の目的

目的は大きく分けて 3 つある。

- (1) Dys 異常による拡張型心筋症(筋力低下無し)の頻度を明らかにする。
- (2) 患者の dys 異常の解析をする。
- (3) 動物実験で筋型 dys を抑制し、ヒトと同じ病態を再現し、筋型 dys と他のアイソフォームの発現調節機構を解明して、治療に応用できないか検討する。

3. 研究の方法

- (1) 全国調査

「拡張型心筋症における dys 遺伝子異常に関する研究」というタイトルで熊本大学の倫理委員会承認後、各大学の附属病院・循環器内科や小児循環器科などに依頼し、筋力低下を示さず高 CK 血症と拡張型心筋症を示す患者の全国調査を行った。

(2) 患者の解析

対象は明らかに筋力低下がなく拡張型心筋症を示し、高 CK 血症を呈する患者である。コントロールは筋ジストロフィーでない患者である。

a) 免疫組織染色

常法を用いて免疫組織染色を行った。抗体は monoclonal anti-dystrophin, anti- β -dystroglycan, anti- α , β , γ -sarcoglycan antibodies (DYS1, DYS2, DYS3, dystroglycan, and sarcoglycan; Novocastra Laboratories Ltd, UK)を使用した。

b) ウェスタン解析

dys の抗体 DYS2; (Novocastra Laboratories Ltd, UK) を用いてウェスタン解析を行った。c) 筋生検の筋組織より RNA を分離し、RT-PCR を施行し、それぞれアイソフォームの dys の発現を解析した。

以下のプロモーターを使用した。

筋型

Mp1(5' -CTCACTTTCCCTACAGGACTC-3'),
exon2R(5' -CTTAGAAAATTGTGCATTTACCCA-3')

脳型

Bp5(5' -CGGCAGTAATAGAATGCTTTCAGGAA-3'),
exon2R

プルキンエ型

P-F(5' -CAGCAAAAAGCTTTCCTATGAAGG-3')

P-R(5' -GCAGTGCCTTGTGACATTGTTCCAG-3')

コントロール

G3PDH-F (5' -TCCATGACAACCTTGGCATCGTGG-3')

G3PDH-R (5' -GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC-3')

d) シークエンスの解析

筋型エクソン 1 とプロモーター領域の解析のために以下のプライマーを用いて各領域を増幅してシークエンスを行った。

プライマー部位 Mp-F, (5' -GAAGATCTAGACAGTGGATACATAACAAATGCATG-3'),

と Mp-R, (5' -TTCTCCGAAGGTAATTGCCTCCAGATCTGAGTCC-3')

エクソン 1 領域

Mexon-F, (5' -GGGCTCTACAGAATCCTGGC-3')

と Mexon-R, (5' -CAGTCCCTACTTCTTCCCACC-3')

イントロン 1 領域

Mintro-F, (5' -AAAGCTGCTGAAGTTTGTGG-3'),

と Mintro-R, (5 ' ,
-CTGCAGTGGTTTGTTAATCAAG-3 ') .

(3) DNA アレイ

BMD の骨格筋と拡張型心筋症の患者の骨格筋より RNA を抽出して、cDNA を作製し、網羅的 DNA アレイにハイブリダイズさせ、BMD の患者と拡張型心筋症の患者の各遺伝子の発現の違いを解析した。

(Filgen Japan)

(4) *in vitro*, *in vivo*にて、発現モデルの作製

a) *In vitro*

ヒトの線維芽細胞にAdMyoD (adenoviral vectors encoding MyoD regulated by CAG Promoter)を感染させ、筋線維に分化誘導する。4日後、筋型dysの発現を抑制する目的で、下記のアンチセンス・モルフォリノを end-porterにてトランスフェクションする。7日後にRNAを抽出し、上記のRT-PCR用のプライマーを使用してdysのアイソフォームの発現を解析する。

筋型dysのエクソン1の5'側に設定したモルフォリノ: DYS/EXON-5' (5' - TACTTCTTCCCACCAAAGCATTGG-3')

筋型dysのエクソン1の3'側に設定したモルフォリノ: DYS/EXON-5'; (5' - TATTTTGTACTTACAACAGTCCTCT-3')

b) *In Vivo*

a)で使用したモルフォリノをB10マウス(正常)に400mgを週に1回、4週間、腹腔内投与し、5週目にRNAを抽出し(2)のc)で用いたのプライマーを用いてRT-PCRで解析した。また、dys染色も施行した。

4. 研究成果

(1) 全国調査

約80の大学病院などに調査を依頼したが、該当する患者は1件のみであった。頻度的にはかなり低いものと考え

既に解析中だった患者の結果を示す。

(2) 患者の解析

a) 拡張型心筋症の心筋と骨格筋の免疫組織染色(図1)

b) 患者の骨格筋で dystrophin, β -dystroglycan, and α , β , γ -sarcoglycan, の染色性は認めしたが、患者の dys 染色(N-terminal (DYS3), rod-domain (DYS1) と C-terminal (DYS2) anti-dystrophin antibodies)ではコントロールに比べて染色性は弱い

もであった。

c) 心筋では dys の N-terminus (DYS3) と rod-domain (DYS1) の抗体では dys の発現を認めなかったが、C-terminus anti-dystrophin antibody (DYS2)の抗体では弱いシグナルを認めた。これは Dp71 dystrophin isoform,が発現している為だと考える。

d) 骨格筋のウエスタン解析

コントロールと患者では骨格筋の dys のタンパクレベルでの発現量は変わりなかった。

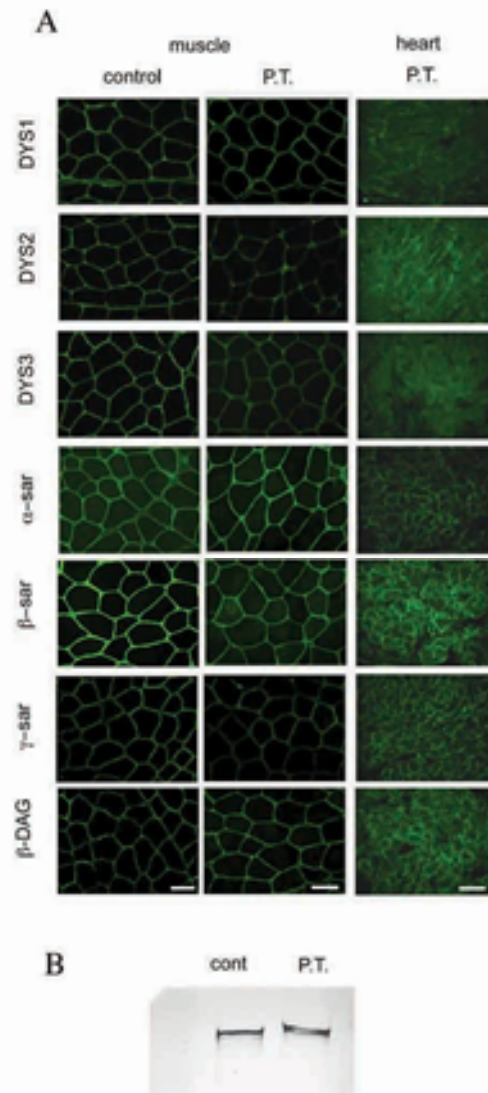


図1 免疫組織染色とウエスタン解析

A 骨格筋と心筋の免疫組織染色 B ウエスタン解析

d) dys の各アイソフォームの発現の解析

コントロールの骨格筋では筋型の dys が発現しており、脳型とブルキンエ型は発現していなかった。

一方、患者では筋型は発現しておらず、脳型とブルキンエ型の発現を認めた。患者の心筋では dys の発現を認めなかった。このことを図 2 に示す。

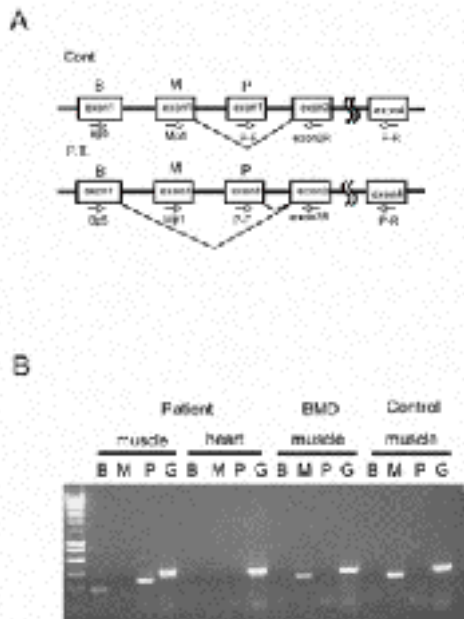


図 2 A 患者 (PT) と健常者 (Cont) のジストロフィンのアイソフォームの発現調節
B 各アイソフォームの RT-PCR による解析
BMD. ベッカー型筋ジストロフィー: B, 脳型ジストロフィン: M, 筋型ジストロフィン: P, プルキンエ型ジストロフィン: G, G3PDH

d) シークエンス解析
拡張型心筋症の患者のイントロン 1 のスプライシングドナーの部位 ((IVS1+5G>A)) に異常を認めている (図 3)。

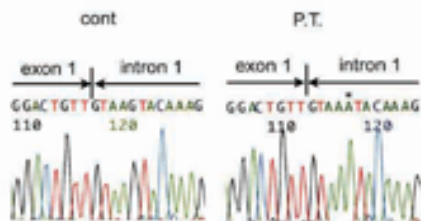


図 3 患者のシークエンス解析

もう一人の高 CK 血症と拡張型心筋症を呈する患者を同様の方法で解析したが、調べ

る範囲では dys 遺伝子に異常を認めなかった。
(3) DNA アレイ
拡張型心筋症患者と BMD の患者の網羅的解析を示す。今まで分かっている既知の pathway に該当するものはなかった (図 4)。



図 4 DNA アレイ

(4) *in vitro*, *in vivo*にて、発現モデルの作製

a) *in vitro*

MyoD 遺伝子を線維芽細胞に導入して、筋細胞に分化させ、脳型、筋型、ブルキンエ型の発現を RT-PCR で調べた結果、すべての発現を認めた。これは線維芽細胞から筋管線維までのいろんな分化段階の細胞が含まれるためと考える。未熟な筋細胞では成熟した筋細胞とは違い様々なアイソフォームが発現していた。

b) *in vivo*

アンチセンス・モルフォリノを B10 マウスに腹腔内投与して、筋型の dys の抑制を試みた。

骨格筋ではコントロールに比べて脳型とブルキンエ型の発現の上昇は認めなかった (図 5)。モルフォリノでは筋型 dys の発現が抑制されていなかったのかもしれない。

心臓ではコントロールでもわずかに脳型が発現しており、ブルキンエ型が発現していた (図 6)。

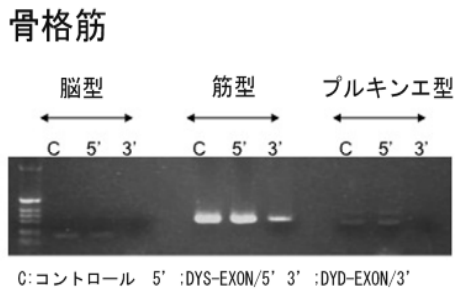


図5 モルフォリノ投与後、骨格筋での各アイソフォームの発現

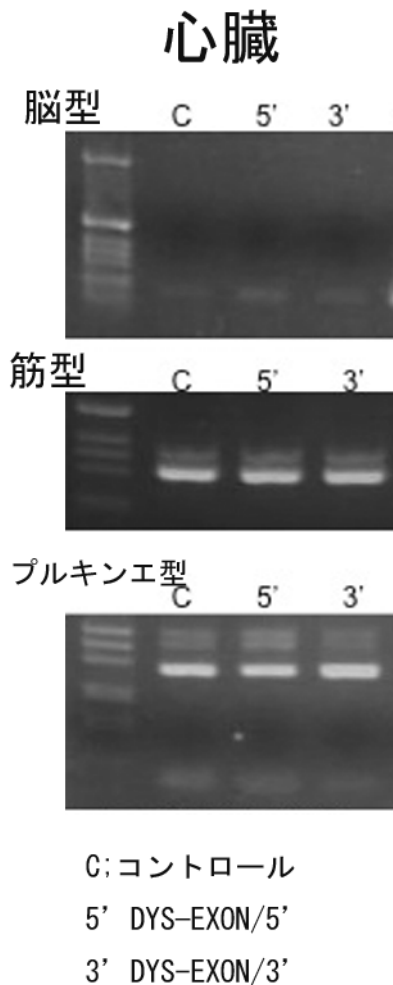


図6 モルフォリノ投与後、心臓でのアイソフォームの解析

考察

拡張型心筋症で高 CK 血症を呈する患者の中には dys の異常を示す患者が、きわめて希であるが、存在することが証明された。筋型 dys のエクソン1領域の異常のため、骨格筋では筋型の dys が発現せず、その代わりに脳型とプルキンエ型の dys が発現しており、そのため、筋力低下を示さないこ

とがわかった。DNA アレイでは残念ながら、この発現調節機構を解明する手がかりを得ることは出来なかった。

また、筋型 dys をアンチセンス・モルフォリノで抑制して、この患者と同じような状態を再現しようとしたが、再現ができなかった。しかし、心臓や未熟な細胞では脳型、プルキンエ型の dys が発現しており、その発現調節機構をより深く調べることにより、この患者の治療法の可能性があることを示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)(すべて査読あり)

- 1, Kimura S, Ozasa S, Nakamura K, Nomura K, and Kosuge H. A case report of myoclonic epilepsy with ragged-red fibers without increased lactate levels. *Pediatr Neurol* 2009;41:46-48
- 2, Kimura S, Ito K, Ueno H, Ikezawa M, Takeshima Y, Yoshioka K, Ozasa S, Nakamura K, Nomura K, Matsukura M, Mitsui K, Matsuo M, Miike T. A 2-bp deletion in exon 74 of the dystrophin gene does not clearly induce muscle weakness. *Brain Dev* 2009;31:169-172
- 3, Nicolino M, Byrne B, Wraith JE, Leslie N, Mandel H, Freyer DR, Arnold GL, Pivnick EK, Ottinger CJ, Robinson PH, Loo JC, Smitka M, Jardine P, Tatò L, Chabrol B, McCandless S, Kimura S, Mehta L, Bali D, Skrinar A, Morgan C, Rangachari L, Corzo D, Kishnani PS. Clinical Outcomes after Long-term Treatment with Alglucosidase Alfa in Infants and Children with Advanced Pompe Disease. *Genet Med* 2009;11:210-219
4. Ozasa S, Kimura S, Ito K, Ueno H, Ikezawa M, Matsukura M, Yoshioka K, Araki K, Yamamura KI, Abe K, Niwa H, Miike T. Efficient Conversion of ES Cells into Myogenic Lineage Using the Gene-Inducible System. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 2007;357:957-963
5. Kimura S, Ikezawa M, Ozasa S, Ito K, Ueno H, Yoshioka K, Ijiri S, Nomura K, Nakamura K, Matsukura M, Miike T. Novel mutation in splicing donor of dystrophin gene first exon in a patient with dilated cardiomyopathy but no clinical signs of skeletal myopathy. *J*

Child Neurol 2007;22: 901-906

〔学会発表〕(計5件)

- 1, Nakano S et al., Checking exon-skipping events in candidates for clinical trials of morpholino The 14th international congress of WMS, Uni mail, Geneva Switzerland, 10 Sept. 2009
- 2, 木村重美 他、エクソンスキッピング誘導による治療の臨床応用に向けて、適正アンチセンスと適応患者のスクリーニング法の確立 その2、第51回日本小児神経学会総会、5月28日 鳥取(米子コンベンションセンター) 2009年
- 3, 木村重美 他、デュシェンヌ筋ジストロフィーに対してエクソンスキップ誘導を用いた治療の適応患者のスクリーニング法の確立 第50回日本小児神経学会総会、5月29日 東京(ホテル日航東京) 2008年
- 4, Shigemi Kimura et al., Importance of checking exon skipping events prior to clinical trials using systemically delivered antisense morpholino in Duchenne muscular dystrophy patients, European Society of Gene and cell Therapy, Concertgebouw Brugge, Belgium, 11 Oct. 2008
- 5, Shigemi Kimura et al., Efficient Conversion of ES Cells into Myogenic Lineage Using the Gene-Inducible System. American Society of Gene Therapy, Convention and trade center, Seattle USA, 28 May, 2007

〔図書〕(計5件)

1. 木村重美
先天性ミオパチー 2010(in press) 診断と治療社
2. 木村重美
小児の患者さんに対して、子どもの気持ちができる医師であれ
研修医通信, 2008;24:10-11 中外製薬
3. 木村重美
筋無力症症候群 小児科学 第4版, 2008;1653-1654, 医学書院
4. 木村重美
駿ちゃん、ごめんね 駿ちゃんがくれた宝物, 2007;177-188 田迎保育園編

5. 木村重美

小児疾患

知っておきたい臨床検値, 2007;169-172
日本薬学会編

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/childdev/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 重美 (KIMURA SHIGEMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 60284767

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし