



A Japanese boy with myalgia and cramps has a novel in-frame deletion of the dystrophin gene

石垣, 智永子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1821

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001821>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	いし がき ち え こ 石 垣 智永子	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1168号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成10年3月31日	
学位論文題目	A Japanese boy with myaogia and cramps has a novel in-frame deletion of the dystrophin gene （主症状として筋肉痛と筋痙攣を示した、ジストロフィン遺伝子に新しいインフレーム欠失を有する日本人男児例）	
審査委員	主査 教授 松 尾 雅 文 教授 中 村 肇 教授 千 原 和 夫	

論文内容の要旨

【緒 言】

ジストロフィン遺伝子の変異によって生じるX連鎖性筋ジストロフィーは男性の遺伝性神経筋疾患のなかで最も頻度の高い疾患であり、軽症のベッカー型（BMD）から重症のデュシェンヌ型（DMD）まで重症度は多様である。DMDは急速に進行する病型であり、12歳までに独歩能力が失われることが多い。BMDはDMDに比べ、より遅い進行を示す。BMD患者でも筋力低下が最も重要な臨床症状であると考えられているが、非典型的な症状を有するBMDの報告が増加している。例えば、運動が誘発する筋痙攣や筋肉痛、拡張型心筋症、無症候性血清CK値上昇、ミオグロビン尿である。BMDで認められる運動が誘発する筋肉痛は、各線維の構造的脆弱性が増すことによる二次的なものと考えられている。しかし、筋力低下を示さず、運動時の筋肉痛と筋痙攣がBMD患者の唯一の症状であるような症例の報告はない。

ジストロフィン遺伝子は79エクソンあり、427kDの蛋白は、4領域-N端、ロッド、システインリッチ、C端に分けられる。しかし各領域の機能は未だ明らかではない。DMD／BMD患者の3分の2はジストロフィン遺伝子に大きな欠失を示す。多くのエクソンの欠失形式が報告されている。以前報告した症例ではエクソン13のスキッピングにより拡張型心筋症が見られ、責任部位であることが示唆された。はっきりとした欠失範囲のわかる筋ジストロフィーの症例を蓄積し、その症状を解析することにより、ジストロフィンの各領域の機能的な役割を明らかにすることが可能となる。

我々は、主症状として筋肉痛と筋痙攣を示した日本人男児について、ジストロフィン遺伝子に今まで報告のなかった新しいインフレーム欠失（エクソン13-18）を見いだしたので報告する。

【症 例】

症例は現在13歳の男児である。近親婚のない両親の次男として生まれ、2歳4カ月まで明らかに異常は見られなかった。しかしその後運動時にしばしば筋肉痛と筋痙攣を訴え始めた。褐色尿が激しい運動の後見られたこともあった。家族歴では、神経筋疾患は認められなかった。

その後も筋肉痛と筋痙攣は持続するため、4歳時に、精査が行われた。当時の神経学的検査では異

常はなく、下腿の仮性肥大も見られなかった。血液検査で高CK血症が指摘された（2200から17000units/I）が筋電図では異常がなかった。また、心機能にも異常はなかった。ブドウ糖負荷テスト、グルカゴン負荷テストの結果は正常だった。

大腿四頭筋を用いた筋生検の結果、軽度の筋の壊死と再生パターンが見られたが、糖質や脂質の蓄積は認めなかった。抗ジトロフィン抗体による検索では、ロッド領域、C端、N端特異的な3種類を使用した、すべての筋線維で陽性で、染色パターンにも明らかな異常は認めなかった。

【方 法】

ジストロフィン遺伝子の欠失領域のスクリーニングはPCR法を用いて行った。末梢血より抽出したゲノムDNAを用いて19領域（筋型プロモーター、エクソン3, 4, 6, 8, 12, 13, 18, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 60）を増幅し、さらに個々のエクソンについて検討した。さらにmRNAレベルでのスプライシング異常の可能性を検討するため、リンパ球より抽出したmRNAを用いて、Reverse transcription PCR(RT-PCR)法を行った。得られたRT-PCR産物は、サブクローニング後、自動塩基配列解析機を用いて塩基配列を決定した。

【結果と考察】

症例についてジストロフィン遺伝子のスクリーニングを行った結果、エクソン13, 18は増幅されなかった。他の17領域は増幅された。エクソン12が増幅されたことより、欠失の5'端はイントロン12にあると考えられた。一方エクソン19が増幅されたことより、欠失の3'端はエクソン19の上流にあると考えられた。

3'端を調べるため、RT-PCR法を用いてジストロフィンmRNAの解析を行った。リンパ球を用いて合成されたジストロフィンcDNAを用いてエクソン12から19に及ぶ1526bpを増幅した。この症例では、約700bpの大きさの産物が得られた。これは、正常より約800bp小さく、この大きさの違いはエクソン13から18の欠失（810bp）に相当するものであった。

欠失範囲を決定するため、増幅産物の塩基配列を検討したところ、エクソン12の3'端がエクソン19の5'端に直接つながっていた。これらの結果よりこの患者で認められたcDNAの欠失範囲は810塩基あり、translational-reading frameを維持するものである（インフレーム型欠失）。

アガロースゲル上での他のDNA産物は見られなかったため、mRNAレベルでのスプライシングの異常は除外された。

患者の遺伝子欠失に対応する蛋白欠失の領域は、ロッド領域の繰り返し配列2から4を含む270アミノ酸を含んでいる。ロッド領域は、筋線維の収縮弛緩での柔軟性を維持すると考えられるが、筋力低下に直接的につながらないのかもしれない。

また筋ジストロフィー症での重要な合併症として、心筋症に現在非常に注目が集められている。以前我々はエクソン13の欠失が心筋症の進展の責任部位である可能性を報告した。我々は、エクソン13の臨床的検討を進めるため、エクソン13に欠失の5'端が存在する報告例を調べた。この症例を含めて7例報告され、心筋症は2例で報告されている。本患者も加齢によって心筋症が出現するかもしれないため、今後も経過観察を慎重に行う必要があると考えられた。

【結 論】

今回、筋ジストロフィーの主症状として筋肉痛と筋痙攣のみを呈し、ジストロフィン遺伝子エクソン13から18を欠失する、今まで報告のなかった新しいインフレーム欠失の症例を報告した。本症例の検討により、ジストロフィン蛋白のロッド領域の機能を明らかにすることができた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【要 旨】

ジストロフィン遺伝子の変異によって生じるX連鎖性筋ジストロフィーは遺伝性神経筋疾患のなかで最も頻度の高い疾患であり、軽症のベッカー型（BMD）から重症のデュシェンヌ型（DMD）まで重症度は多様である。DMDは急速に進行する病型であり、12歳までに独歩能力が失われる。これに対し、BMDは発症年齢も高く、より遅い進行を示す。BMD患者でも筋力低下が最も重要な臨床症状であると考えられているが、非典型的な症状を有するBMDの報告が増加している。

本論文は、筋力低下を示さず、運動時の筋肉痛と筋痙攣という非典型的な症状のみを示した日本人男児を対象ジストロフィン遺伝子の解析を行い、ジストロフィン遺伝子に今まで報告のなかったインフレーム欠失を見だし、BMDと診断し得たことを明らかにしたものである。

【症 例】

症例は現在13歳の男児である。2歳4カ月まで明らかに異常は見られなかった。しかし、その後運動時にしばしば筋肉痛と筋痙攣を訴え始めた。褐色尿が激しい運動の後見られたこともあった。その後も筋肉痛と筋痙攣は持続するため、4歳時に精査が行われた。しかし、神経学的検査では異常はなく、下腿の仮性肥大も見られなかった。血液検査で高CK血症（2200から17000units/l）が指摘されたが、筋電図では異常がなかった。また、大腿四頭筋を用いた筋生検の結果でも、軽度の筋の壊死と再生パターンが見られたが、糖質や脂質の蓄積は認めなかった。さらにロッド領域、C端、N端に特異的な3種類の抗ジストロフィン抗体を用いた染色でも、すべての筋線維がジストロフィン陽性で、染色パターンにも明らかな異常は認めなかった。このため診断確定には至らなかった。

13歳になっても同症状が持続するため、ジストロフィン遺伝子の異常を解析することとなった。

【方 法】

ジストロフィン遺伝子の欠失領域のスクリーニングをPCR法を用いて行った。末梢血より抽出したゲノムDNAを用いてジストロフィン遺伝子の19領域（筋型プロモーター、エクソン3, 4, 6, 8, 12, 13, 18, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 60）を増幅した。また欠失領域を同定するためにジストロフィンmRNAを逆転写酵素PCR（RT-PCR）法にて増幅し、得られたRT-PCR産物を自動塩基配列解析装置を用いて塩基配列を決定した。

【結果と考察】

本症例についてジストロフィン遺伝子のスクリーニングを行った結果、エクソン13と17が増幅されず、患者がこれらのエクソンを含む領域を欠失していることが明らかになった。一方、エクソン12が増幅されたことより、患者の欠失の5'端はイントロン12にある決定できた。しかし、欠失の3'端については、エクソン19が増幅されたことより、エクソン19の上流にあると考えられたがその部位を特

定することはできなかった。

そこで、患者の欠失の3' 端を明らかにするため、患者のジストロフィンmRNAの解析を行った。リンパ球から得たジストロフィンcDNAをテンプレートとしてエクソン12から19に及び1526bpを増幅した。この症例では、正常より約800bp小さい約700bpの大きさの産物が得られた。さらに、この増幅産物の塩基配列を解析したところ、エクソン12の3' 端がエクソン19の5' 端に直接つながり、エクソン13から18の6 けたのエクソンの配列が消失していることが判明した。これらの結果から、この患者はエクソン13から18までの6 エクソンを欠失するが、その欠失範囲が810塩基であるためそのアミノ酸読み取り枠が維持でき、ジストロフィンの合成が可能であることを示し、BMDと診断し得た。

患者の遺伝子欠失に対応する蛋白欠失の領域は、ジストロフィンのロッド領域の24回の繰り返し配列のうち2 回目から4 回目の繰り返し配列に相当する270アミノ酸である。ロッド領域は、筋線維の収縮弛緩での柔軟性を維持すると考えられ、本症例の様にたとえジストロフィンから本領域の一部が消失しても筋力低下に直接的につながらないものと考えられた。

本研究は、Becker型筋ジストロフィーについて、その遺伝子の異常を研究したものであるが、従来報告のなかった筋力低下を示さない症例で、はじめてジストロフィン遺伝子のエクソン13-18の欠失を発見したもので、価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。