



Two novel missense mutations in the myostatin gene identified in Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy

西山, 敦史

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4055

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004055>

※ 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	西山 敦史
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1859 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 19 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Two novel missense mutations in the myostatin gene identified in Japanese patients with
Duchenne muscular dystrophy（日本人デュセンヌ型筋ジストロフィー患者において 2 種類の新規ミ
オスタチン遺伝子ミスセンス変異を同定した）

審 査 委 員

主 査	教 授	熊谷 俊一
	教 授	丸尾 猛
	教 授	清野 進

【緒言】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は男児 3500 人に 1 人に起こる最も頻度の高い遺伝性筋疾患で、筋肉におけるジストロフィン蛋白の欠損がその病因である。ジストロフィン蛋白の欠損はジストロフィン遺伝子の読み取り枠のずれを起こすような変異、もしくはナンセンス変異によって起こる。DMD は年少時に発症し急速に進行し、12 歳には歩行不能、20 歳台には呼吸不全もしくは心不全で死亡するという経過をたどる。

DMD の筋力低下の進行はほぼ一定の経過をたどるが、稀に比較的軽症の DMD 症例も存在することから、症状を修飾する遺伝子の存在が示唆されていた。重症度の違いの中には変異の部位によるジストロフィン・ジストログリカン複合体形成に及ぼす影響の差やジストロフィン遺伝子の異常スプライシング産物により説明できるものもある。しかし同じジストロフィン遺伝子変異を有していても重症度が異なる症例も存在する。

症状の違いは食事、運動といった環境因子により生じる可能性もあるが、遺伝的因子が関与している可能性もある。事実、 γ サルコグリカン遺伝子の変異がジストロフィン・糖蛋白複合体異常マウスの表現型に影響を与えていることが示されている。このことから未知の遺伝因子が DMD の表現型を修飾している可能性も高い。

ミオスタチンは growth and differentiation factor 8 (GDF8) と呼ばれ筋肉の増大を抑制する働きをもつ筋特異的分泌ペプチドである。欧米ではミオスタチン遺伝子変異の解析がいくつかなされており、現在 6 つの多型と 1 つのイントロン変異が同定されている。多型のうち 1 つ (p.153K>R) は筋力トレーニングによる筋量増大と関連している。最近、ミオスタチン遺伝子のホモ接合性変異をもつ児が初めて発見され、著明な筋力増加と筋量増大を認めた。さらに羊においてミオスタチン遺伝子の 3' 非翻訳領域の一塩基置換により miRNA の標的部位が生み出され、翻訳が抑制され、筋量増大を認めることも明らかになった。

さらにジストロフィン遺伝子にナンセンス変異をもつ DMD モデルマウスである mdx マウスにおいて、ミオスタチンの機能をなくすことにより解剖学的、生化学的、生理学的に症状を改善させることも明らかとなっている。これらの知見はミオスタチンの機能抑制が DMD の治療戦略となる可能性を示唆している。

我々はミオスタチン遺伝子の遺伝的多様性が DMD の表現型を修飾していると仮定し、日本人 DMD 患者でミオスタチン遺伝子を解析した。その結果新規の変異を同定した。

【症例および方法】

症例

神戸大学医学部附属病院受診中の 102 人の DMD 患者がこの研究に参加した。全患者でジストロフィン mRNA に停止コドンができるようなジストロフィン遺伝子異常を確認している。読み取り枠にずれが生じるようなエクソンの欠失・重複を 51 例に、ナンセンス変異を 31 例に、1 から数塩基の欠失・挿入を 12 例に、スプライシング異常を起こすイントロン変異を 8 例に認めた。年齢は 1 歳から 31 歳 (平均 10 歳) であった。血清 CK 値を含む定期検査は外来で行った。最大自発等尺トルクは手動力量計による肘の屈筋と膝の伸筋の測定により算出した。車椅子を使用するようになった年齢は 5 歳から 11 歳までと明らかな表現型の違いを認めた。しかし中にはたとえジストロフィン蛋白を作り出せないような遺伝子変異を有していても、12 歳を過ぎても自立歩行方向可能な患者も存在した。

この研究は神戸大学医学部の倫理委員会の承認を受け、検体の採取は書面による同意を得た後に行った。

ミオスタチン遺伝子解析

ゲノム DNA の解析は PCR 法により行った。ミオスタチン遺伝子の全エクソン及び 3' 非翻訳領域の一部を PCR 法で増幅した。エクソン 1 を含む領域は 5' 非翻訳領域の 131 塩基及びイントロン 1 の 38 塩基を含む 542 塩基を、エクソン 2 を含む領域はイントロン 1 の 68 塩基及びイントロン 2 の 95 塩基を含む 537 塩基を、エクソン 3 を含む領域はイントロン 2 の 43 塩基及び 3' 非翻訳領域の 112 塩基を含む 536 塩基を増幅した。また 3' 非翻訳領域の一部については羊において同定されたミオスタチン遺伝子の 3' 非翻訳領域の一塩基置換により miRNA の標的部位が生み出された部位を含む 396 塩基を増幅した。

遺伝子配列はサブクローニングあるいはダイレクトシーケンス法によって決定した。決定した遺伝子配列は正常の配列と比較した。

【結果】

ミオスタチン遺伝子エクソン 1 の解析では 1 例で 283 番目の塩基に c.283G>G/C のヘテロ接合性変異を認めた。283 番目の塩基が G から C に置換するとミオスタチンの 95 番目のアミノ酸がアスパラギン酸からヒスチジンへと変化する。この変異はプロペプチド領域の保存された部位に位置し、ミオスタチンの機能に影響を与えることが予想された。しかし他の DMD 患

者との明らかな筋力の違いを見出すことはできなかった。現在 8 歳であるが助けなしに立ち上がることはできず、自立歩行は可能であるが動揺性歩行を呈している。

ミオスタチン遺伝子エクソン 2 の解析では 4 例で 490 番目の塩基に c.490G>G/A のヘテロ接合性変異を認めた。490 番目の塩基の G から A への置換は既報の多型であり、ミオスタチンの 164 番目のアミノ酸がグルタミン酸からリシンへと変化する。c.490G>A 変異の頻度は 2.0% であった。興味深いことに c.490G>A 変異をもつ 4 例中 1 例において 466 番目の塩基にも c.466C>C/A のヘテロ接合性変異を認めた。サブクローニングにより 2 つのクローンが得られ、ダイレクトシーケンス法により一方は正常と同じ塩基配列であり、他方は c.466C> A と c.490G>A の 2 つの塩基置換を認めた。c.466C> A は過去に報告の無い変異であり、ミオスタチンの 156 番目のアミノ酸がロイシンからイソロイシンへと変化する。新規のミスセンス変異は保存された部位に位置し、ミオスタチンの機能をなくすことが予想された。この 2 つの塩基置換を有する患者は 7 歳で車椅子を使用し始めており、14 歳の DMD 症例として明らかに軽症とはいえなかった。また c.490G>A を有する他の 3 人の DMD 患者も DMD 症例として臨床的に区別できる点はなかった。

アメリカで頻度の高い多型である p.55A>T および p.153K>R、また筋肥大幼児症例でみられたイントロン 2 の変異は今回の日本人 DMD 患者では認められなかった。さらにミオスタチン遺伝子エクソン 3 の解析では全く塩基置換を認めず、これは他の報告の結果とも一致する。

羊で報告された一塩基置換 (2402 番目の塩基の G から A への置換) を有する部位を含むミオスタチン遺伝子の 3' 非翻訳領域の 396 塩基の領域には塩基置換を認めなかった。しかし 1 例に 2264 番目と 2265 番目の塩基の AT の欠失を認めた。この欠失により miRNA の標的部位が生み出される可能性を検討したが、認めなかった。そのためこの欠失は 3' 非翻訳領域の多型と考えられた。

【考察】

ミオスタチンは筋量増加の抑制的調節因子であり DMD の筋量増加の新たな標的として注目を集めている。今回の研究では 102 人の日本人 DMD 患者においてミオスタチン遺伝子の塩基配列を解析した。その結果 2 つの新規ミスセンス変異 (p.95D>H、p.156L>I) を同定した。また既報の多型 (p.164E>K) を 4 例に認めた。p.156L>I と p.164E>K は同一アレルに見られたため、全体の変異頻度は 2.5% であった。しかし機能を喪失するような変異は見られなかった。特に筋肥大幼児症例でみられたイントロン 2 の変異は

認めなかった。羊においてみられた miRNA の標的部位が生み出され、翻訳が抑制されるようなミオスタチン遺伝子の 3' 非翻訳領域の一塩基置換も見られなかった。しかし 1 例で 3' 非翻訳領域の 2264 番目と 2265 番目の塩基の AT の欠失を認めた。この欠失の意義については今後更なる検討が必要である。

2 つの新規の変異 (p.95D>H、p.156L>I) は両方ともミオスタチンのプロペプチド領域の保存されたアミノ酸が変化しており、病因になると予想された。しかし p.95D>H、p.164E>K、p.164E>K および p.156L>I を有する DMD 患者において、その表現型は他の DMD 患者との明らかな差異は認めなかった。筋肥大幼児症例で、同じ変異を持つ保因者の母は筋肥大を認めていない。それゆえこれらの変異はヘテロ接合では個々人の筋量や筋力に影響を与えないのかもしれない。ミオスタチンのプロペプチド領域のミスセンス多型を有する女性群で筋力トレーニングでの筋量増大効果が高かったことを考えると、2 つのアミノ酸置換を有する症例では適切なりハビリテーションによって表現型を修飾できるかもしれない。さらに詳しく検討し将来、これを明らかにできるだろう。

ヒトのミオスタチン遺伝子変異は欧米諸国で検討されている。現在 6 つの塩基置換が同定されており、2 つは頻度が高く、4 つは稀である。p.55A>T、p.153K>R の 2 つの多型のアメリカでの頻度はそれぞれ 6.6%、9.8% であった。イタリアでの研究では p.55A>T、p.153K>R の頻度はそれぞれ 0.2%、3.8% であった。ベルギーでの研究では男性 57 人中たった 1 人に p.153K>R のヘテロ接合性変異を認めた。しかし今回の日本人での検討では p.55A>T も p.153K>R も認めなかった。これらのポリモルフィズムの頻度の違いは人種間での多様性を実証している。

特筆すべきことに p.164E>K は 102 人中 4 人に見られ、日本人での頻度は 3.9% であった。p.164E>K を認めたのはアメリカでは 189 人中たった 2 人、イタリア、では 120 人中 0 人、ベルギーでも 57 人中 0 人であった。日本人 DMD 患者のうち 1 人は同じアレル上に p.164E>K および p.156L>I を認めた。p.164E>K がアメリカと日本で同定されたことから、p.164E>K は共通の祖先から受け継いだものか、塩基置換のホットポイントかもしれない。

【結論】

今回の研究では、DMD 患者に限っての検討ではあるが、日本人におけるミオスタチン遺伝子変異を明らかにした。我々の検討は今回同定した 2 つの新規変異を含むミスセンス多型はヘテロ接合では、たとえ 2 つのアミノ酸置換が重なったとしても、DMD 患者の筋力や筋量を明らかに改善しないことを示した。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1857号	氏 名	西山 敦史
論文題目 Title of Dissertation	Two novel missense mutations in the myostatin gene identified in Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy 日本人デュセヌ型筋ジストロフィー患者において2種類の新規ミオスタチン遺伝子ミスセンス変異を同定した		
審査委員 Examiner	主 査 熊谷俊一 Chief Examiner 副 査 清野進 Vice-examiner 副 査 丸尾 猛 Vice-examiner		
審査終了日	平成 19 年 5 月 16 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は男児 3500 人に 1 人に起こる最も頻度の高い遺伝性筋疾患で、筋肉におけるジストロフィン蛋白の欠損がその病因である。DMD の筋力低下の進行はほぼ一定の経過をたどるが、稀に比較的軽症の DMD 症例も存在することから、症状を修飾する遺伝子の存在が示唆されていた。ミオスタチンは筋肉の増大を抑制する働きをもつ筋特異的分泌ペプチドである。最近、ミオスタチン遺伝子のホモ接合性変異をもつ児が初めて発見され、著明な筋力増加と筋量増大を認めた。さらに羊においてミオスタチン遺伝子の 3' 非翻訳領域の一塩基置換により miRNA の標的部位が生み出され、翻訳が抑制され、筋量増大を認めることも明らかになった。また DMD モデルマウスにおいて、ミオスタチンの機能をなくすことにより解剖学的、生化学的、生理学的に症状を改善させることも明らかとなっている。申請者はミオスタチン遺伝子の遺伝的多様性が DMD の表現型を修飾していると仮定し、日本人 DMD 患者でミオスタチン遺伝子を解析した。

ジストロフィン遺伝子異常を確認できた 102 人の DMD 患者が対象とした。年齢は 1 歳から 31 歳（平均 10 歳）であり、車椅子の使用開始年齢は 5 歳から 11 歳までに分布し、明らかな表現型の違いを認めた。しかし中には 12 歳を過ぎても自立歩行可能な患者も存在した。ゲノム DNA の解析は PCR 法により行った。ミオスタチン遺伝子の全エクソン及びエクソン/イントロ境界部を増幅した。また 3' 非翻訳領域の一部については羊において同定された一塩基置換を含む領域を増幅した。遺伝子配列はサブクローニングあるいはダイレクトシーケンシング法によって決定し、決定した遺伝子配列は正常の配列と比較した。

エクソン 1 の解析では 1 例で c.283G>G/C のヘテロ接合性変異を認めた。この塩基置換によりアミノ酸がアスパラギン酸からヒスチジンへと変化する。しかしこの変異を有する患者は他の DMD 患者との明らかな筋力の違いはなかった。エクソン 2 の解析では 4 例で c.490G>G/A のヘテロ接合性変異を認めた。この塩基置換は既報の多型であり、アミノ酸がグルタミン酸からリシンへと変化する。興味深いことに 4 例中 1 例において c.466C>C/A のヘテロ接合性変異も認めた。サブクローニングにより 2 つのクローンが得られ、一方は正常と同じ塩基配列であり、他方は c.466C> A と c.490G>A を認めた。c.466C> A は新規の変異で、アミノ酸がロイシンからイソロイシンへと変化する。この 2 つの塩基置換を有する患者は 7 歳で車椅子を使用し始めており、明らかに軽症とはいえなかった。また c.490G>A を有する他の 3 人も DMD 症例として臨床的に区別できる点はなかった。エクソン 3 の解析については全く塩基置換を認めなかった。さらに、3' 非翻訳領域の解析も行い、1 例に 2264 番目と 2265 番目の塩基の AT の欠失を認めた。この欠失により miRNA の標的部位が生み出される可能性を検討したが、認めなかった。

ミオスタチンは筋量増加の抑制的調節因子であり DMD の筋量増加の新たな標的として注目を集めている。今回の研究では 102 人の日本人 DMD 患者においてミオスタチン遺伝子の塩基配列を解析し、2 つの新規ミスセンス変異 (p.95D>H, p.156L>I) を同定した。2 つの新規の変異は両方ともミオスタチンのプロペプチド領域の保存されたアミノ酸が変化しており、病因になりうると予想された。しかしながら、その表現型は他の DMD 患者との明らかな差異は認めなかった。筋肥大幼児症例の母は保因者であるが筋肥大を認めていない。それゆえこれらの変異もヘテロ接合では個々人の筋量や筋力に影響を与えないのかもしれない。ミオスタチンのプロペプチド領域のミスセンス多型を有する女性群で筋力トレーニングでの筋量増大効果が高かったことを考えると、2 つのアミノ酸置換を有する症例では適切なりハピリテーションによって表現型を修飾できるかもしれない。さらに詳しく検討し将来、これを明らかにできるだろう。

ヒトのミオスタチン遺伝子変異は現在 6 つの塩基置換が同定されており、p.55A>T, p.153K>R の 2 つの多型は頻度が高く、アメリカでの頻度はそれぞれ 6.6%、9.8%、イタリアではそれぞれ 0.2%、3.3%であった。しかし今回の検討では p.55A>T も p.153K>R も認めなかった。今回の検討は DMD 患者のみを対象としていることから疾患による選択バイアスが掛かりうるが、これらの頻度の違いは人種間での多様性によるものと考えている。特筆すべきことに p.164E>K は 102 人中 4 人に見られ、日本人での頻度は 3.9%であった。p.164E>K を認めたのはアメリカでは 189 人中 2 人、イタリアでは 120 人中 0 人、ベルギーでも 57 人中 0 人であった。p.164E>K がアメリカと日本で同定されたことから、p.164E>K は共通の祖先から受け継いだものか、塩基置換のホットポイントかもしれない。

本研究は、DMD 患者におけるミオスタチン遺伝子変異を検討したものであるが、従来ほとんど解明されていなかった 2 つの新規変異を含む日本人のミオスタチン遺伝子や変異について、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。