The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular genetic analysis of dysferlin in Japanese patients with Miyoshi myopathy
Author(s)	松村, 剛
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44436
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	松村　剛（まつむら　つよし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　17286　号
学位授与年月日	平成14年9月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Molecular genetic analysis of dysferlin in Japanese patients with Miyoshi myopathy （日本人三好ミオパチー家系におけるdysferlinの分子遺伝学的検討）
論文審査委員	（主査） 教　授　佐古田三郎 （副査） 教　授　大薗　恵一　　教　授　戸田　達史

論文内容の要旨

〔目　的〕三好ミオパチー（Miyoshi myopathy：MM）は青年期発症の下腿屈筋優位の筋力低下と著明な血清CK高値を特徴とする常染色体劣性遺伝形式の筋ジストロフィーである。我々は、これまでにMMの遺伝子座を2p12-14に特定した。一方、近位筋が優位に障害される肢帯型筋ジストロフィー（Limb-Girdle muscular dystrophy：LGMD）の一つLGMD2Bの遺伝子座も同じ領域に特定され、これらが同一遺伝子の変異によって生じる可能性が示唆されていた。1998年に、我々は2p13に新しい遺伝子*DYSF*を発見、欧米のMMおよびLGMD患者で変異を検出した。同じ頃BashirらもLGMD2Bの患者で*DYSF*に変異を検出した。*DYSF*の転写産物は*C. elegans*のspermatogenesis factor FER-1に高い相同性を示す蛋白で、dysferlinと命名された。我々は、MMのメカニズムを明らかにする目的で、日本人MM家系でdysferlinの検索を行った。

〔方　法〕**対象**：対象は日本人MM7家系で、近親婚を3家系に認めた。発端者は臨床症状、血清CX高値、筋病理所見などから全員MMと診断されていたが、2家系では遠位筋優位の罹患者と近位筋優位の罹患者が共に存在した。**分子遺伝学的検索**：Informed consentを得て、7家系から40人（患者14名、非罹患者26名）の血液を採取し、リンパ球よりgenomic DNAを抽出した。ハプロタイプ分析を各家系で実施し、55個すべてのexonをsingle strand conformation polymorphism（SSCP）を用いて検索、mobility shiftが見られたexonで塩基配列解析を実施した。家系・対照の検索は、変異により制限酵素認識部位が変化した場合は制限酵素処理、変化がない場合は塩基配列解析を用いた。**免疫組織化学的検索**：3家系の発端者から筋肉サンプルを得た。抗dysferlin一次抗体として、C末端側123アミノ酸を認識するpolyclonal抗体を作製した。急速凍結筋肉から6 μm切片を作製、抗dysferlin抗体の他、抗dystrophin、α-、β-、γ-、δ-sarcoglycan、merosin、integrin α7抗体を用い免疫組織化学的検索とimmunoblottingを実施した。

〔結　果〕**分子遺伝学的検索**：すべての家系で、同一家系内の発症者は病型に関係なく共通のハプロタイプを示した。近親婚家系の発症者は同一ハプロタイプのホモ接合体であった。SSCPと塩基配列解析により、新しい8個の変異（missense：3、nonsense 3、frame-shift：2）と3個のpolymorphismを検出した。近親婚2家系ではホモ接合の変異を、非近親婚2家系ではヘテロ接合の変異を2つとも検出したが、残りの非近親婚2家系ではヘテロ接合の変異を1つ、近親婚1家系ではpolymorphismを1つ検出しただけであった。制限酵素処理で、変異のある染色体はハプロタイプ・SSCPと同一の遺伝形式を示し、正常対照では変異は認めなかった。**免疫組織化学的検索**：Dysferlin

は対照で骨格筋の細胞膜全周に認められ、患者では発現が著明に低下ないし消失していた。他の dystrophin、sarcoglycans、merosin、integrin α7の発現は正常であった。Immunoblotting では対照筋で dysferlin は 237 kDa のバンドとして検出された。MM 患者では dysferlin は immunoblotting で検出されなかったが、dystrophin やすべての sarcoglycan などは正常に発現していた。

〔考　察〕今回の検索で、我々は7家系から新しい8個の変異と3つの polymorphism を検出した。アラブ家系では 23 塩基の欠失が報告され、欧米人では変異が C 末端側に多発する傾向が見られたが、我々の検出した変異はすべて点変異で、hot spot は認められず全域より変異が検出された。現時点で3家系ではすべての変異が検出されておらず、今後 intron や promoter 領域を含む他の領域で変異が検出される可能性があるが、dominant negative 効果や haploinsufficiency なども考慮される。筋細胞膜での dysferlin 発現は患者で著明に低下ないし消失していたが、dystrophin や sarcoglycan などの発現は正常で、*DYSF* の変異は dystrophinopathy や sarcoglycanopathies と同様の dystrophic な変化を生じさせるが、そのメカニズムには異なる部分があると思われる。現在 dysferlin の機能は不明であるが、複数の C2-domain を有することからシナプス顆粒輸送や myoblast 融合、細胞膜の recycling などに関与する可能性がある。今回の検索で病型や重症度と遺伝型の間には明確な関連が見られず、他の遺伝的・環境的要素が表現形の決定に関与している可能性が示唆された。オランダの MM 家系では 10 番染色体への連鎖が示されており、この様な genetic heterogeneity の存在は重要と考えられる。今後 dysferlin の機能解明や dysferlin 関連蛋白の同定が本症のメカニズム解明に重要と思われる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、日本人三好ミオパチー家系において、初めて dysferlin の分子遺伝学的検討を行い、その結果を示したものである。三好ミオパチーは、三好らにより本邦で疾患概念が確立された、常染色体劣性の遠位型筋ジストロフィーである。本症の責任遺伝子 *DYSF* は 1998 年に Boston のグループが発見したが、遺伝子座の同定、遺伝子発見の過程においても日本人が大きく貢献した。*DYSF* の変異は三好ミオパチー以外にも、肢帯型筋ジストロフィー（LGMD2B）を生じるなど clinical heterogeneity が存在することも注目に値する。

今回の研究では、日本人三好ミオパチー7家系で責任遺伝子 *DYSF* の遺伝学的検索を行い、10 個の新たな変異を検出した。検索した家系の中には、clinical heterogeneity を認めた家系もあったが、表現型の違いにかかわらず遺伝子変異は同一で、表現型の決定に dysferlin 以外の遺伝的・環境因子が存在することが示唆された。免疫組織学的検索では、dysferlin が正常骨格筋で細胞膜に局在すること、immunoblotting では分子量 237 kDa の蛋白として検出されること、一方本症では dysferlin の発現が著明に低下ないし消失していることが証明された。他の筋ジストロフィーに関連した膜関連蛋白、dystrophin、α-、β-、γ-および δ-sarcoglycans、laminin α7、caveolin-3 が、本症では正常に発現していることも明らかにした。これらにより、三好ミオパチーは *DYSF* の変異が dysferlin の発現を低下させることによって生じること、病理学的には dystrophinopathy や sarcoglycanopathy などと同様の変化を示すものの、異なるメカニズムを介して発症していることを示した。

本研究は、日本人三好ミオパチー家系での dysferlin 異常を明らかにしたことにとどまらず、その後の dysferlin 異常症研究の基礎となるものであり、その意義は極めて高く、学位の授与に値すると考えられる。