

生検筋と培養筋における Dystrophin と Dystrophin related protein の発現について

— Duchenne 型筋ジストロフィーを中心に —

渡辺 幸恵¹⁾ 舘 延忠²⁾

¹⁾ 札幌医科大学医学部小児科講座 (主任 千葉峻三 教授)

²⁾ 札幌医科大学保健医療学部作業療法学科

Expression of dystrophin and dystrophin-related protein
in biopsied and cultured muscle from patients with Duchenne muscular dystrophy
and other muscular diseases.

Yukie WATANABE¹, Nobutada TACHI²

¹ *Department of Pediatrics, Sapporo Medical College*
(Chief : Prof. S. CHIBA)

² *School of Health Science, Sapporo Medical University*

ABSTRACT The expression of dystrophin and dystrophin-related protein (DRP) in biopsied and cultured muscles from eight Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients, four DMD carriers, seven Becker muscular dystrophy (BMD) patients, two dermatomyositis patients and ten normal controls were studied by immunocytochemistry and Western blot analysis.

In muscle biopsies, DRP was located on the sarcolemma of dystrophin deficient muscle fibers from patients with DMD, BMD and DMD carriers and regenerating muscle fibers from patients with dermatomyositis. Successive sections of muscles from patients with DMD, DMD carrier, BMD, dermatomyositis, and controls were stained with anti-dystrophin antibodies and anti-DRP antibodies. DRP expression on dystrophin deficient fibers did not completely compensate dystrophin.

In muscle cultures, dystrophin was not demonstrable in undifferentiated myoblasts from patients with DMD and controls. After myoblast fusion from control muscles, dystrophin appeared in the cytoplasm of myotubes as discrete round packages in perinuclear regions, and along the surface of more mature myotubes. There was no staining in myotubes from DMD patients. DRP was expressed in the cytoplasm of myoblasts and myotubes from control patients and patients with DMD. Thus far, these results indicate that DRP was expressed by activation of satellite cell irrespective of the cause of muscle damage.

Some DMD patients had rare staining dystrophin-positive fibres, termed "revertant fibers". Immunocytochemistry was performed on serial sections from deleted and non-deleted patients by using a panel of anti-dystrophin antibodies. In patients with deletions, revertant fibers did not stain with antibody raised to polypeptide sequences within the deletion. Based on analysis of dystrophin protein in revertant fibers, the most likely mechanism giving rise to revertant fibers appears to be a second site in-frame deletion.

(Received June 7, 1995 and accepted September 8, 1995)

Key words: Duchenne muscular dystrophy, Dystrophin, Dystrophin related protein,
Revertant fibers, a second site in-frame deletion

1 緒 言

Duchenne 型筋ジストロフィー(Duchenne muscular dystrophy: 以下 DMD と略す)は、発育とともに筋細胞が変性・壊死する伴性劣性の遺伝形式をとる疾患である。その病態および根本的な治療法については、いまだに明らかになっていない。近年 DMD 患者で欠失している遺伝子(DMD 遺伝子)が単離され¹⁾、DMD 遺伝子の翻訳産物であるジストロフィン蛋白の存在が明らかになった^{2),3)}。ジストロフィン蛋白は正常筋細胞形質膜の細胞質側に存在する細胞骨格蛋白で、ジストロフィン結合糖蛋白質(dystrophin associated glycoprotein: 以下 DAG と略す)と結合し、さらに DAG は細胞膜を貫通して基底膜のラミニンと結合している⁴⁾。DMD ではジストロフィン蛋白が欠損しているため、DAG 付着部位が存在せず⁵⁾、それに伴って DAG も欠損していることが明らかになっている⁶⁾。

ジストロフィン蛋白と分子量がほぼ等しく、アミノ酸配列でも 83%の相同性を有するジストロフィン関連蛋白(dystrophin related protein: 以下 DRP と略す)は、ヒトでは第 6 番染色体(6q24)上に存在し⁷⁾、ジストロフィンの代償作用を有する可能性があると考えられている⁸⁾。DRP がジストロフィンを代償しているかどうかを調べる目的で、DMD 筋のジストロフィン蛋白と DRP の関係を免疫組織学的に検討した。またジストロフィン蛋白が量的に減少または質的に変異している Becker 型筋ジストロフィー症(Becker muscular dystrophy: 以下 BMD と略す)とジストロフィン蛋白がモザイクに発現している DMD 保因者および再生筋線維が著明な皮膚筋炎と正常コントロールについても同様の検索を行った。

最近 Nicholson ら⁹⁾と Shimizu ら¹⁰⁾は、DMD 筋のジストロフィン陰性の筋線維中に、細胞膜の全周が一樣に陽性に染まる筋線維が少数存在することを報告した。このジストロフィン陽性線維の成因については、現在のところ明らかになっていない。本研究では DMD 患者について、RF の有無と RF のジストロフィン蛋白の性状についても検討した。

また、筋発生過程でのジストロフィン蛋白および DRP を検討するために、DMD, BMD, 正常筋を培養し、筋芽細胞および筋管細胞レベルでのこれらの蛋白の発現を検討した。

2 対象および方法

2.1 対 象

DMD 8 例, DMD 保因者 4 例, BMD 7 例, 皮膚筋炎 2 例, 正常コントロール 10 例の計 31 例を対象とした。正常コントロールは、年齢が 8 歳から 40 歳で、手術時に筋肉を得た。このうち、DMD 5 例・BMD 1 例・正常コントロール 10 例の 16 例について筋肉細胞培養を施行した。

2.2 使用した抗体

本研究では一次抗体として以下の抗体を使用した。

抗ジストロフィン抗体は、Novocastra 社のモノクローナル抗体である DYS3(アミノ酸残基 321-494, エクソン 10-12 に対応する抗体)と DYS 1(アミノ酸残基 1181-1388, エクソン 26-29 に対応する抗体)と DYS 2(アミノ酸残基 C 末端部の 17 個 3669-3685 に対応する抗体), 合成ポリペプチドに対するポリクローナル抗体の P 23(アミノ酸残基 2360-2409, エクソン 49-51 に対応する抗体), マウスジストロフィンの融合蛋白質に対するポリクローナル抗体である 60 kDa(アミノ酸残基 407-815 に対応する抗体)の 5 種類である。なお抗ジストロフィン抗体の P 23 は国立精神神経センター所長小沢鏑三郎博士より供与されました。

また抗 DRP 抗体は、Novocastra 社の DRP 1 抗体(DRP 最 C 末端 11 のアミノ酸残基に対応する抗体)を用いた。

2 次抗体は、ABC 法では Vectastain ABC キットを、蛍光抗体法では各 1 次抗体に対応した Fluorescein Isothiocyanate (FITC) あるいは Tetramethyl Rhodamine (RITC) 標識 2 次抗体をそれぞれ用いた。

2.3 生検筋の光顕的免疫組織化学(Avidin-biotinperoxidase complex method, ABC 法による)におけるジストロフィン蛋白と DRP の検討

対象患者と正常コントロールから採取した筋肉は、液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速冷凍させた。このブロックをクリオスタット内で 6 μm の厚さに薄切し、 -20°C に冷却したアセトンで固定した。切片を室温で一時間乾燥させた後、2 次抗体と同じ動物種血清 5%/リン酸緩衝液でブロッキングし、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。ついで Vecstain ABC キットを使用し、ABC 法で免疫組織染色した。

2.4 筋肉細胞培養の方法

筋肉細胞の培養は、Blau らの方法¹¹⁾と Delaporte らの方法¹²⁾を一部改変して行った。筋生検時に得られた

筋組織を無菌的に切り出し、4°Cに冷却した HamF-10 液内で 1 mm³ 前後の大きさに細切した。次にこの組織切片を 0.2% トリプシン-リン酸緩衝液を入れたフラスコの中で、37°C、45 分間、ゆっくり攪拌させた。遠沈して上清を捨てた後、培養液を加えナイロンシートで濾過して得られた単離細胞浮遊液を 1 cm² あたり 5.0 × 10⁴ 個の細胞濃度でシャーレに分注した。一週間に 2 回、Growth Medium を交換して、十分に筋芽細胞が増殖したところでクローニングした。一個の筋芽細胞が 35 mm のシャーレの 80% 程度に増殖した時点で、Fusion Medium に変更し筋細胞を分化させた。培養経過を位相差顕微鏡で観察した後、-20°C で冷却したアセトンで固定した。

2.5 培養筋の光顕的免疫組織化学(蛍光抗体法・ABC 法)における筋細胞骨格蛋白の検討

ABC 法は生検筋と同じ手順で行った。蛍光抗体法は、ブロッッキングと一次抗体との反応までは生検筋と同様に行い、続いて一次抗体と対応した FITC あるいは RITC 標識二次抗体を反応させ、50% グリセロールで封入して蛍光顕微鏡で観察した。

2.6 ウェスタンブロット法によるジストロフィン蛋白の解析方法

生検筋を秤量後細切して検体の 10 倍量のサンプルバッファーを加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。続いて 100°C の沸騰水中で 2 分間インキュベーションした後、9500 rpm・3 分間遠心した。得られた上清を 10 μg/μl の蛋白濃度になるように調節したものをジストロフィンのサンプルとした。

次に、3.5-12.5% 勾配ポリアクリルアミドゲルを使用して、Laemmli 法¹³⁾により電気泳動を行った。続いて、バッファータンク型転写装置の周囲を氷で冷却するクーリングシステムを用いて、100 V の電圧を 5 時間通電し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜に一次抗体を 37°C 90 分間反応させた後、Vectastain 社 ABC キットを用いて染色し、ペルオキシダーゼ基質溶液で発色させた。

2.7 ジストロフィン遺伝子欠失の解析

ジストロフィン遺伝子の欠失については、Chamberlain ら¹⁴⁾と Beggs ら¹⁵⁾の方法にもとずき PCR (polymerase chain reaction) 法により解析を行った。これは、ジストロフィン遺伝子の 19 の領域 (Chamberlain らの方法によるエクソン 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51 と、Beggs らの方法による muscle-specific promoter, エクソン 3, 6, 13, 43, 47, 49, 50, 52, 60) を PCR 法で増幅し、アガロースゲル電気泳動で各

増幅 DNA バンドを検出する方法である。なお実際の遺伝子解析は、SRL の遺伝子部遺伝子課で行われた。

3 結 果

3.1 各種筋疾患の生検筋におけるジストロフィン蛋白と DRP の免疫組織学的所見について

3.1.1 正常生検筋

正常筋では、ジストロフィン蛋白は全ての筋細胞膜に一樣に発現した。DRP は筋細胞膜には発現されなかった (Fig. 1-A, B)。

3.1.2 DMD 生検筋

DMD 筋のすべての筋細胞膜にはジストロフィン蛋白は発現されなかった。DRP は、筋細胞膜に不均一に発現していた。DRP の発現の割合は、DMD の症例によりばらつきがあり、全筋細胞膜のうち 15-50% であった (Fig. 1-C, D)。

3.1.3 BMD 生検筋

BMD 筋は、ジストロフィン蛋白が筋細胞膜の一部に弱く (faint)、つぎはぎ状に (patchy) 発現していたが、再生筋線維の筋細胞膜にはジストロフィン蛋白は発現されていなかった。連続切片でジストロフィン蛋白と DRP の関連をみると、ジストロフィン蛋白が発現されていない再生筋線維には DRP が発現していた。ジストロフィン蛋白が faint & patchy に発現している筋線維では、DRP が発現している筋線維と発現していない筋線維が存在した (Fig. 1-E, F)。

3.1.4 DMD 保因者生検筋

ジストロフィン蛋白がモザイクに発現している DMD 保因者において、連続切片でジストロフィン蛋白と DRP の発現の関連をみた。ジストロフィン蛋白が発現していない筋線維の 70% で DRP が発現し、ジストロフィン蛋白が発現している筋線維の 80% は DRP が発現していなかった。ジストロフィン蛋白と DRP がいずれも発現している筋線維および両方とも発現していない筋線維が、全筋線維の 25% に存在した (Fig. 1-G, H)。

3.1.5 皮膚筋炎生検筋

ジストロフィン蛋白は、筋束周辺の再生筋線維を含めた筋線維膜に一樣に発現されていた。DRP は筋束周囲の再生筋線維細胞膜にのみ発現していた (Fig. 1-I, J)。

3.2 DMD 患者の生検筋のジストロフィン陽性線維について

DMD 患者 8 例のうち 3 例は、検索しえた筋線維膜のすべてにジストロフィン蛋白の発現が認められなかった。残りの 5 例には全筋線維の 0.5-2.0% にジストロ

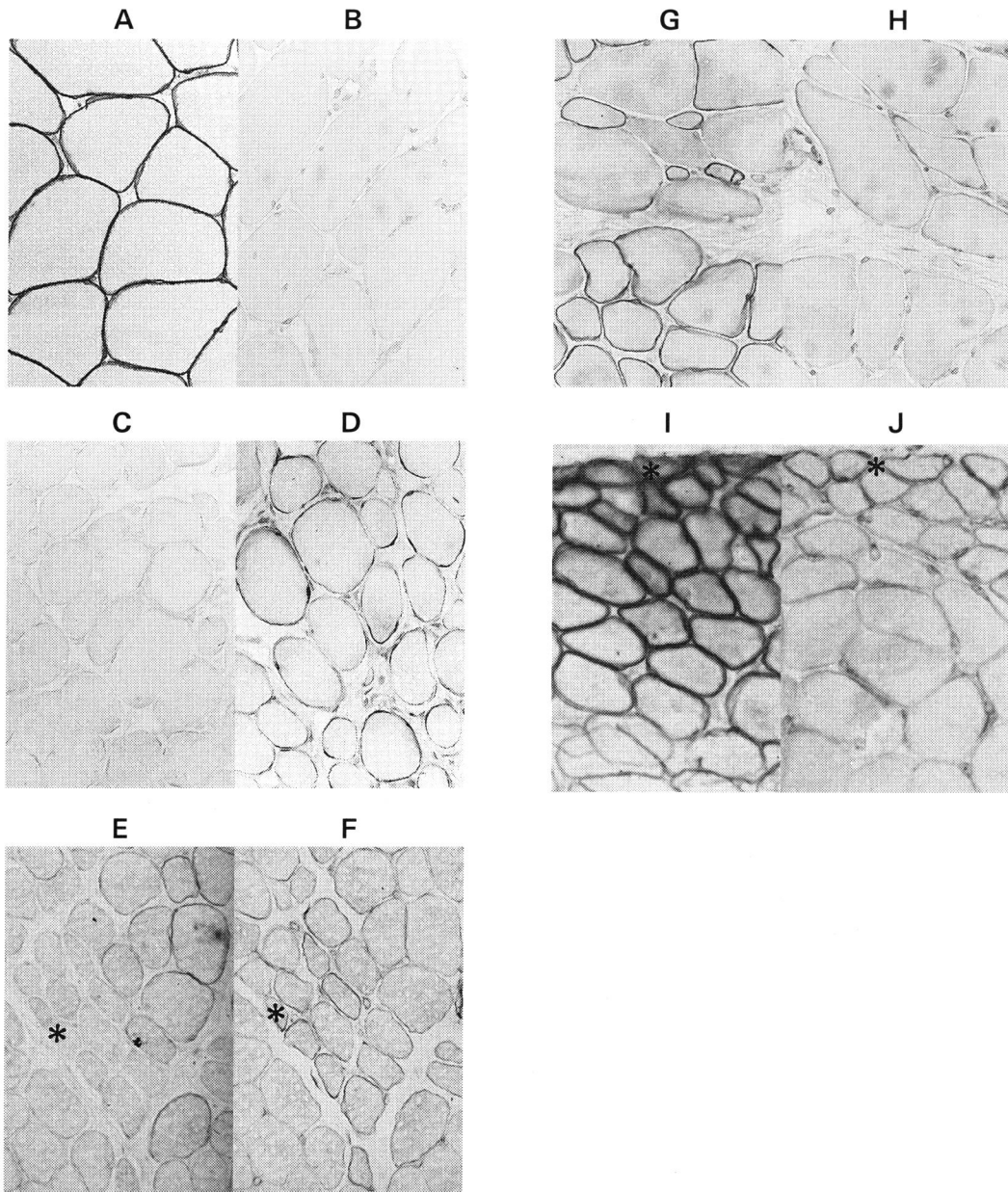


Fig. 1 Immunohistochemical localization of dystrophin and DRP in skeletal muscles obtained from normal control, DMD, BMD, DMD carrier and dermatomyositis.

Biopsied muscles from control (A and B), DMD (C and D), BMD (E and F), DMD carrier (G and H), and dermatomyositis (I and J) were stained with anti-dystrophin antibodies (Dys 2) (A, C, E, G, and I) and anti-DRP antibodies (DRP 1) (B, D, F, H, and J). A. B. C. D.: $\times 85$, E. F. G. H. I. J.: $\times 170$

*: regenerating fiber.

フィン陽性線維が、1個あるいは数個集まった形で認められた。

8例のDMD患者のジストロフィン遺伝子分析の結果

と生検筋に認められたジストロフィン陽性線維の割合を示した (Table 1)。またジストロフィン陽性線維が認められた症例1, 2, 3, 4, 5のジストロフィン陽性

Table 1 Analysis of dystrophin gene on lymphocytes and frequency of revertant fiber on biopsied muscles from DMD patients

Case No	Age at biopsy	DNA analysis (deleted exons)	Frequency of revertant fibre per total muscle fibers (%)
1	4	48, 49, 50	0.8
2	5	51	0.8
3	5	none	1.7
4	2	none	2.0
5	4	none	0.8
6	2	48, 49, 50	0.0
7	5	52	0.0
8	8	none	0.0

線維を4種類の抗ジストロフィン抗体で染色した結果を示した(Table 2) (Fig. 2). その結果を要約すると、次のようになる。(1)ジストロフィン陽性線維の有無と遺伝子欠失の有無に関連は認められなかった。(2)遺伝子欠失があるDMD 1 (欠失エクソン48, 49, 50)とDMD 2 (欠失エクソン51)のRFはエクソン49-51に対応するP 23抗体で染色されなかった(Fig. 2-A)。(3)遺伝子欠失のないDMD 3, 4, 5の患者のRFは、P 23・Dys 1・Dys 2・Dys 3の抗体の全部で染色された(Fig. 2-B)。

3・3 ヒト正常筋とDMD, BMD罹患筋の培養経過について

正常筋, DMD筋, およびBMD筋では, ともに培養開始4-5日目より単核の筋芽細胞が出現した(Fig. 3-A, B)。筋芽細胞の形態および培養経過中の増殖と分化の速度は, 正常筋, DMD筋, BMD筋との間で差は認められなかった。DMD筋の全例で, 正常筋よりも筋管細胞の細胞質内に空胞が多数認められた(Fig. 3-C, D)。

3・4 正常およびDMDの培養筋におけるジストロフィン蛋白とDRPの発現について

正常培養筋を分化の各段階ごとにジストロフィン染色を行った。正常筋の筋芽細胞ではジストロフィン蛋白は発現されなかった(Fig. 4-A)が, 筋管細胞の初期に核周囲の筋細胞質にspot状に発現した(Fig. 4-B)。筋管細胞のさらに分化したものではジストロフィン蛋白は筋細胞膜に発現していた(Fig. 4-C)。DMD培養筋では筋管細胞にジストロフィン蛋白の発現はなかった(Fig. 4-D)。

DRP染色は, 正常筋とDMD筋ともに筋芽細胞では細胞質に比較的うすく, 筋管細胞では細胞質全体に強く発現されていた(Fig. 4-E, F, G, H)

Table 2 Dystrophin immunocytochemistry of revertant fibers in DMD patients

Case No	Antibody			
	DYS3	DYS1	P23	DYS2
1	+	+	-	+
2	+	+	-	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+

3・5 DMDとBMDの生検筋のイムノプロットの結果

正常コントロールとDMD, BMDの生検筋のイムノプロットの結果を示す(Fig. 5)。正常筋では, 427 kDaのジストロフィン蛋白が認められるが, DMD筋ではジストロフィン蛋白が認められない。またBMD筋では量的に少ないジストロフィン蛋白が認められた。

4 考 察

4・1 各種筋疾患におけるDRPの発現について

DRPの発現機序および筋疾患との関係は明らかになっていない。DRPは構造的にジストロフィン蛋白と類似し, DAPと結合できることから, 機能的にもジストロフィン蛋白と類似していると推定された¹⁶⁾。DMDのモデル動物であるmdxマウスは, 胎児期にはDRPが正常マウスより過剰にあり筋線維の壊死は認められないが, 出生後にDRPが減少すると筋線維に壊死が認められるという報告は⁸⁾、DRPにはジストロフィン蛋白の代償機能がある可能性を示唆している。本研究ではDRPの発現機序を知る目的で, 各種筋疾患の生検筋と培養筋のDRPとジストロフィン蛋白の発現を対比して検討した。

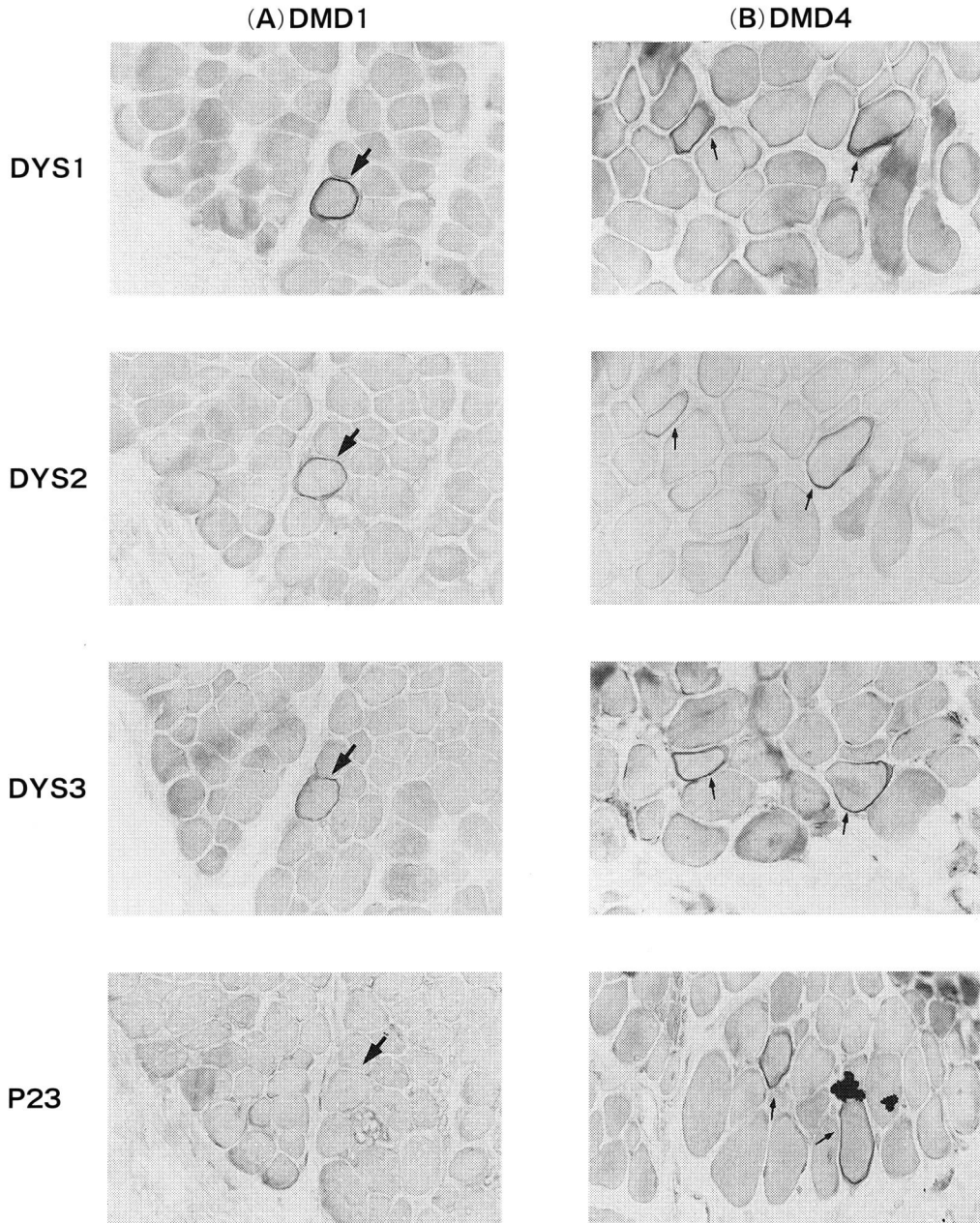


Fig. 2 Immunocytochemistry of serial sections of revertant fiber from DMD1 and DMD4 by various anti-dystrophin antibodies (Dys 1, 2, 3, and P23) ($\times 85$)

第一段階として生検筋でのDRPの発現を免疫組織学的にみたが、DRPはDMD、BMD、DMD保因者のように主にジストロフィン蛋白が欠損した筋線維膜と、皮膚筋炎にみられたように再生筋細胞の細胞膜に認められた。

DRPがジストロフィン蛋白の代償として発現するかを調べるため、細胞レベルでのジストロフィン蛋白とDRPの関係を検索した。正常筋ではジストロフィン蛋白は、すべての筋線維膜に発現しているのに比べて、DRPは全ての筋線維膜に発現されていなかった。DMD

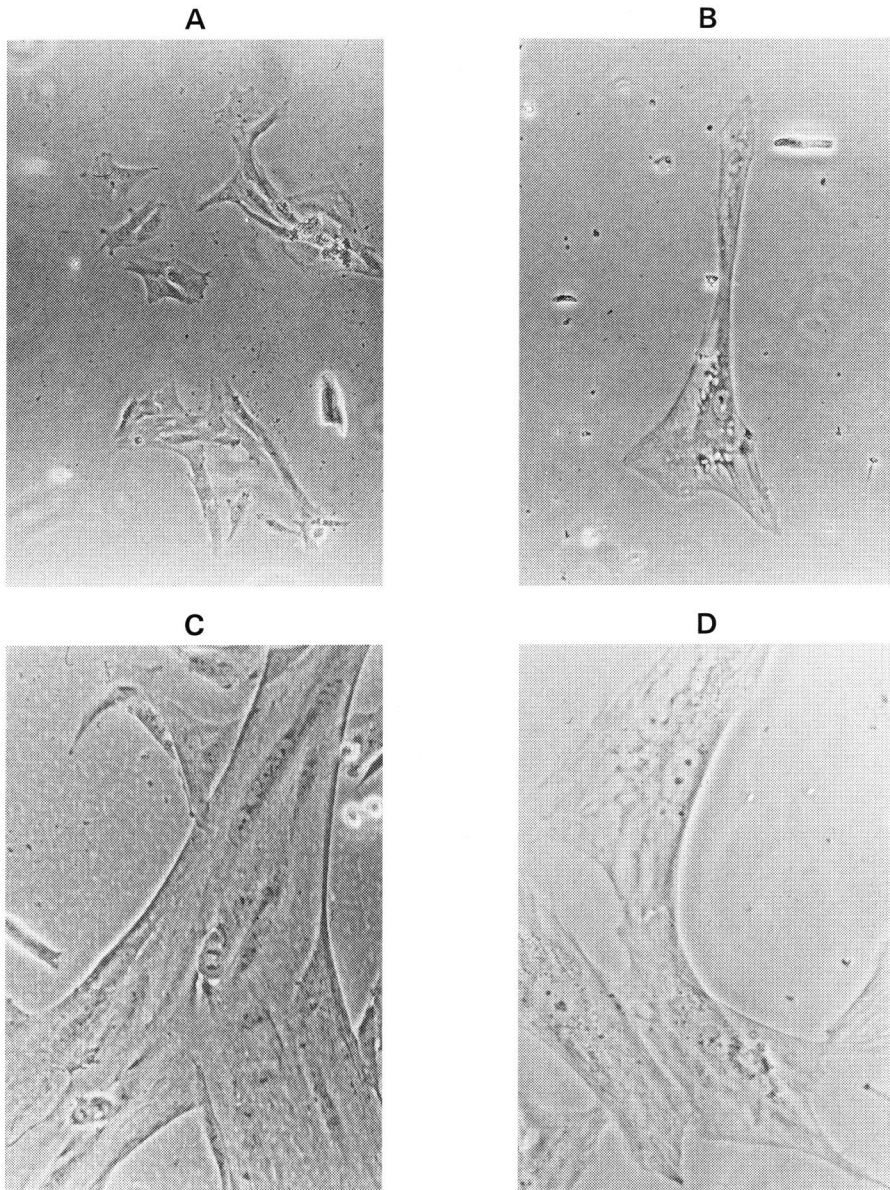


Fig. 3 Phase contrast photography of control (A, B) and DMD (C, D) in muscle cultures.

- A: Myoblast 5 days from control ($\times 170$)
 B: Myoblast 5 days from DMD ($\times 170$)
 C: Myotube 21 days from control ($\times 340$)
 D: Myotube 21 days from DMD ($\times 340$)

では、ジストロフィン蛋白の発現のない筋線維の 15-50%で DRP が発現していた。BMD の再生筋線維の細胞膜にはジストロフィン蛋白の発現はなく、DRP が発現していた。再生筋以外の筋線維ではジストロフィン蛋白は faint & patchy に発現していたが、DRP は

不規則に発現している細胞と全く発現していない細胞が混在していた。DMD 保因者では、ジストロフィンと DRP が相補的な関係にある筋線維が全筋線維の 75% をしめた。残りの 25% はジストロフィン蛋白と DRP の両方が発現している、あるいは両方とも発現していない

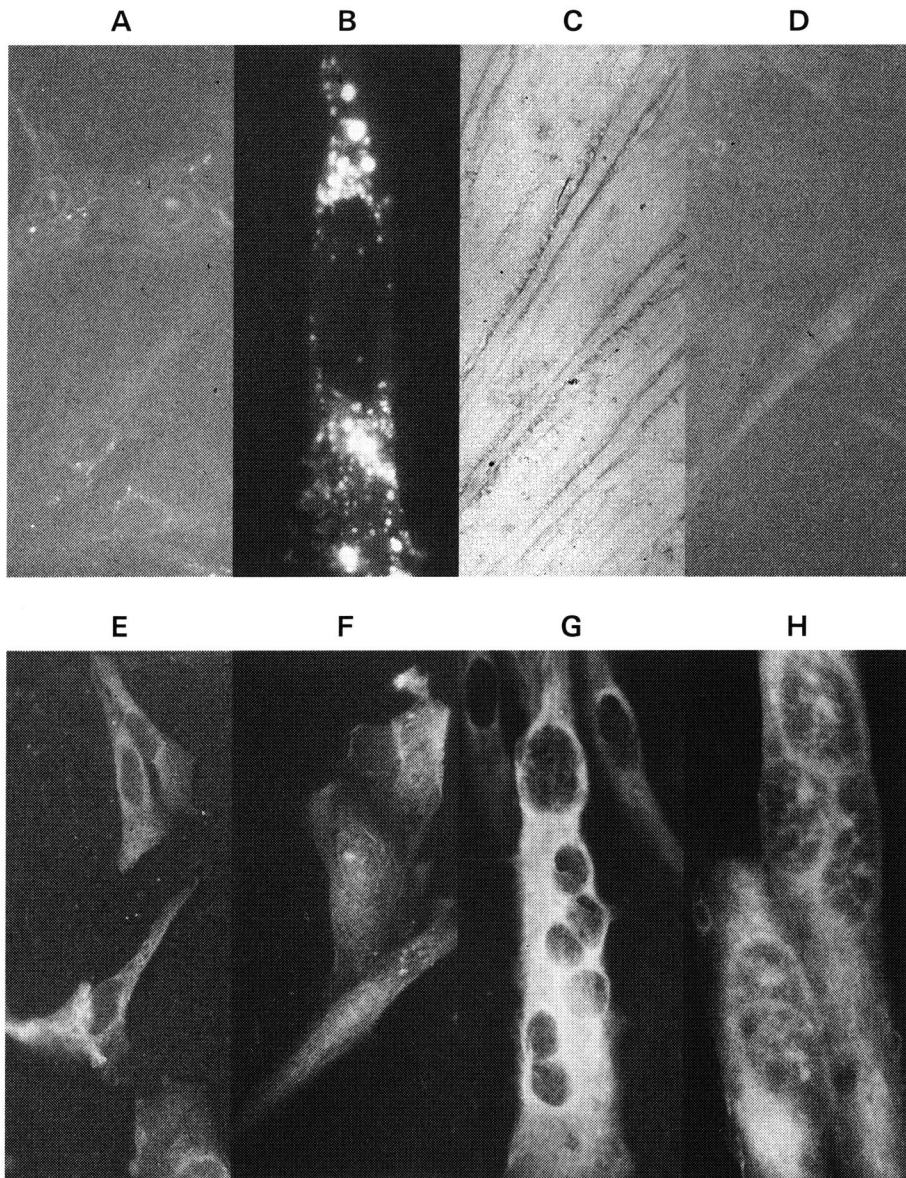


Fig. 4 Immunocytochemical localization of dystrophin and DRP in muscle cultures from control (A, B, C, E, and G) and DMD (D, F, and H) ($\times 340$)

(1) Dystrophin (A, B, D; FITC labelled, C; ABC method)

A: Myoblast 5 days from control B: Myotube 15 days from control

C: Myotube 25 days from control D: Myotube 15 days from DMD

(2) DRP (FITC labelled)

E: Myoblast 5 days from control F: Myoblast 5 days from DMD

G: Myotube 15 days from control H: Myotube 15 days from DMD

筋線維であった。皮膚筋炎では、ジストロフィン蛋白は再生筋線維も含めて全ての筋線維に発現し、DRPは再生筋線維の細胞膜にのみ発現していた。これらの結

果から、ジストロフィン蛋白陰性の代償として全ての細胞にDRPが発現しているわけではないことが明らかになった。

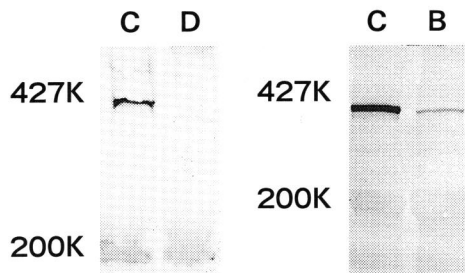


Fig. 5 Western blot analysis of biopsied muscle specimens from DMD(D), BMD(B), and normal control(C) by using dystrophin antibody (Dys 2)

DRP の機能は何かという問題であるが、DRP は、正常成熟筋では神経筋接合部に、再生筋では筋線維細胞膜全体に、神経支配を受けない培養筋では細胞質に存在する。これらはアセチルコリン受容体の発現と一致することから¹⁷⁾、アセチルコリン受容体の支持蛋白であることが推察された。

4.2 培養筋におけるジストロフィン蛋白と DRP について

DMD 筋の筋芽細胞は、形態学および増殖・分化能において、正常培養筋と差を認めなかったが、DMD 筋の筋管細胞には著明に空胞が多かったのが特徴的であった。

正常筋肉培養におけるジストロフィン蛋白は、筋芽細胞には出現せず、筋管細胞の初期に細胞質に patchy 状に蓄積し、次第に細胞膜に向かって移動し、筋線維細胞では細胞膜に存在した。DMDmRNA は、筋管細胞の段階で発現するという報告¹⁸⁾があり、本研究の結果を裏づけるものと考えられた。これに対し、DMD 筋ではいずれの分化の段階でもジストロフィン陰性であった。

培養筋における DRP は、正常筋と DMD 筋ともに、筋芽細胞では細胞質の一部に、筋管細胞では細胞質全体に様に発現した。培養筋細胞は衛星細胞由来であるが、衛星細胞は筋線維に損傷が加わると核分裂し多数の単核細胞となって壊死した筋線維におきかわり、成熟した筋線維になる。筋線維が壊死に陥らない時は、分裂した衛星細胞が筋線維と融合し肥大線維が生じる。このことから筋線維になんらかの損傷が加わり衛星細胞が活動化すると、DRP の発現調節機能が働くと考えられた。

4.3 ジストロフィン陽性線維について

DMD 遺伝子の変化とジストロフィン蛋白の異常につ

いて、現在 Reading-frame-theory¹⁹⁾ の考え方が一般的である。これは、DMD 遺伝子に部分的な欠失や重複があるために、残った塩基数が 3 の倍数にならないと、読み枠の移動 (frame-shift) がおこり、停止コドンが現れる、あるいは one point mutation に続いて停止コドンができ、これより先の蛋白質の合成が止まったために、C 末端部を欠くジストロフィン蛋白が出現するというものである。本研究で検索した 2 例の DMD 患者のジストロフィン陽性線維では、遺伝子欠失部位を認識する抗ジストロフィン抗体 (P 23) での反応を欠いていたが、欠失部位の下流にあたる C 末端を認識する抗体で染色された。以上の結果からジストロフィン陽性線維の成因を考えてみた。(1) DMD 筋では、理論上遺伝子の欠失などが存在する点までは正常な蛋白質が、遺伝子異常の部位から停止コドンが現れるまでは別のアミノ酸配列をもった蛋白質が合成され、正常より短いジストロフィンが作られるはずである。普通このようなジストロフィンは、作られても分解されてしまうと考えられているが²⁰⁾、ある程度のは細胞膜に固定される可能性もある。この場合はジストロフィンの N 末端に近い部分に対する抗体では染色されるが、C 末端に対する抗体では染色されない²¹⁾。今回調べたジストロフィン陽性線維には、C 末端に対する抗体 (Dys 2) で染色される細胞もあったことから、このようなジストロフィン蛋白である可能性は否定的であった。(2) Hoffman らは、mdx マウスにおけるジストロフィン陽性線維の発生機序として体細胞モザイシズム (somatic mosaicism) の可能性についても言及されているが²²⁾、今回調べたジストロフィン陽性線維は、遺伝子欠失部に対する抗体では染色されなかったことから、この考え方は否定的であった。(3) Klein らは、ジストロフィン陽性線維の発現機序は、遺伝子レベルで欠失あるいは one-point-mutation などの第二の変化がおきたことによって塩基数が 3 の倍数になると読み枠が戻り (in-frame)、その結果本来の DNA 変異をスキップした短いジストロフィンが出現したためであると述べている²³⁾。本研究は、Klein らと同じ免疫組織学的結果を示したことより、彼らの結論を支持したことになる。Nicholson ら²⁴⁾ は、遺伝子の欠損が明らかになっている DMD 患者では、ジストロフィン陽性線維のジストロフィン蛋白の分子量が、ジストロフィンが停止コドンまで合成されたと仮定した時に予測される分子量よりもはるかに高かったとしている。このことから、第二の変異により読み枠が戻るといふ説を支持している。

5 結 論

(1) 各種筋疾患の生検筋では、DRPはジストロフィン蛋白が欠損している筋細胞の一部と再生筋細胞に発現していた。個々の細胞レベルではジストロフィン蛋白が欠損している場合、その100%がDRPの発現で代償されてはいなかった。

(2) 培養筋でのジストロフィン蛋白は、正常筋の筋管細胞に発現し、DMD筋には認められなかった。DRPは、正常およびDMD培養筋の筋芽細胞・筋管細胞の細胞質に存在した。培養系では筋疾患の有無にかかわらずDRPが発現していたことから、衛星細胞が活動化するとDRPの発現調節機能が働くと考えられた。

(3) 一部のDMD患者に認められたジストロフィン陽性線維は、患者の遺伝子欠失部位に対応するジストロフィン抗体では染色されなかったが、欠失部位以外に対応するジストロフィン抗体で陽性に染色された。このことからジストロフィン陽性線維のジストロフィン蛋白は、遺伝子レベルで第二の変化が生じ塩基数が3の倍数になったとき読み枠がもどり、本来のDNA変異をスキップして出現した蛋白であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導・御校閲を賜りました札幌医科大学小児科千葉峻三教授に深謝致します。

参 考 文 献

1. Kunkel LM. co-authors. (合計77名) Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1986, 322: 73-77
2. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin; The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987, 51: 919-928
3. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988, 53: 219-228.
4. Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991, 66: 1121-1131
5. Beggs AH, Hoffman EP, Synder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Sugita H, Kunkel LM. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy; dystrophin gene protein studies. *Am J Hum Genet* 1991, 49: 54-67
6. Ibraghimov-Beskrovnyaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992, 355: 696-702.
7. Buckle VJ, Guenet JL, Simon-Chazottes D, Love DR, Davies KE. Localization of a dystrophin-related autosomal gene to 6q24 in man, and to mouse chromosome 10 in the region of the dystrophin muscularis (dy) locus. *Hum Genet* 1990, 85: 324-326.
8. Khurana TS, Watkins SC, Chafey P, Chelly J, Tome FMS, Fardeau M, Kaplan JC, Kunkel LM. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 1991, 1: 185-194
9. Nicholson LVB, Davison K, Johnson MA, Slater CR, Young C, Bhattacharya S, Gardner-Medwin D, Harris JB. Dystrophin in skeletal muscle II. Immunoreactivity in patients with Xp21 muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1989, 94: 137-146.
10. 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 Jpn Acad Ser B* 1988, 64: 205-208.
11. Blau MH, Webster C. Isolation and characterization of human muscle cells (differentiation/contractile protein synthesis). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, 78: 5623-5627
12. Delaporte C, Dehaupas M, Fardeau M. Comparison between the growth pattern of cell cultures from normal and Duchenne dystrophy muscle. *J Neurol Sci* 1984, 64: 149-160
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 683-685.
14. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In; Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors: PCR protocols. A guide to methods and applications. New York, Academic Press, 1990, 272-281
15. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990, 86:

- 45-48
16. Matsumura K, Evasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Campbell KP. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* 1992, 360: 588-591
 17. Bekoff A, Betz WJ. Acetylcholine hot spots; development on myotubes cultured from aneural limb buds. *Science* 1976, 193: 915-917.
 18. Lev AA, Feener CC, Kunkel LM, Brown RH. Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene in cultured muscle cells. *J Biol Chem* 1987, 262: 15817-15820.
 19. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Sherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H, de la Chapelle A, Kiuru A, Savontaus M-L, Gilgenkrantz H, Recan D, Ch-elly J, Kaplan J-C, Covone AE, *et al.* The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy; correlation of severity, with type of deletion. *Am J Hum Genet* 1989, 45: 498-506
 20. Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 1989, 2: 1019-1029
 21. Bulman DE, Murphy EG, Zubrzycka-Gaarn EE, Worton RG, Ray PN. Differentiation of Duchenne and Becker muscular dystrophy phenotypes with amino- and carboxy-terminal antisera specific for dystrophin. *Am J Hum Genet* 1991, 48: 295-304.
 22. Hoffman EP, Morgan JE, Watkins SC, Partridge TA. Somatic reversion/suppression of the mouse mdx phenotype in vivo. *J Neurol Sci* 1990, 99: 9-25
 23. Klein CJ, Covert DD, Bulman DE, Ray PN, Mendell JR, Burghes AHM. Somatic reversion/suppression in Duchenne muscular dystrophy (DMD); Evidence supporting a frame-restoring mechanism in rare dystrophin-positive fibers. *Am J Hum Genet* 1992, 50: 950-959
 24. Nicholson JVB, Bushby KMD, Johnson MA, den Dunnen JT, Ginjaar IB, van Ommen G-JB. Predicted and observed sizes of dystrophin in some patients with gene deletions that disrupt the open reading frame *J Med Genet* 1992, 29: 892-896.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部〇〇〇講座 〇〇〇〇