



札幌医科大学学術機関リポジトリ *ikor*

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title	X連鎖性劣性遺伝を示した myotubular myopathy の遺伝子解析
Author(s)	小塚, 直樹; 舘, 延忠; 内田, 英二; 武田, 秀勝; 仙石, 泰仁; 小田中, 芳子
Citation	札幌医科大学保健医療学部紀要, 第 4 号: 61-67
Issue Date	2001 年
DOI	10.15114/bshs.4.61
Doc URL	http://ir.cc.sapmed.ac.jp/dspace/handle/123456789/6563
Type	Journal Article
Additional Information	
File Information	n13449192461.pdf

- コンテンツの著作権は、執筆者、出版社等が有します。
- 利用については、著作権法に規定されている私的使用や引用等の範囲内で行ってください。
- 著作権法に規定されている私的使用や引用等の範囲を越える利用を行う場合には、著作権者の許諾を得てください。

X連鎖性劣性遺伝を示したmyotubular myopathyの遺伝子解析

小塚 直樹¹, 舘 延忠², 内田 英二³, 武田 秀勝¹, 仙石 泰仁², 小田中芳子³

札幌医科大学保健医療学部理学療法学科¹

札幌医科大学保健医療学部作業療法学科²

札幌医科大学大学院保健医療学研究科³

要 旨

X連鎖性劣性遺伝形式をとり、出生時より発症するX-linked myotubular myopathy (XLMTM)は、重度の筋緊張低下と筋力低下、呼吸障害により人工呼吸管理を必要とし、運動発達も遅延する予後不良の疾患である。myotubularin gene (MTM1遺伝子)により発現する蛋白質myotubularinは、ヒトの筋組織に散在し、tyrosin phosphataseと相同性を有するが、既知の蛋白質ではなく、その機能についても不明である。XLMTMの原因遺伝子(MTM1遺伝子)はX染色体長腕部(Xq28)に位置し、15個のエクソンから構成されることが解明されており、この領域の遺伝子変異がXLMTMの発症に関わることが近年報告された。今回我々は、臨床症状、筋組織学的所見、遺伝子解析によりXLMTMと診断された2症例を報告する。症例1はMTM1遺伝子のエクソン4において193から196の4塩基(AAAG)の欠失を認めた。このためフレームシフト変異を生じ、その後方25番目のアミノ酸がストップコドンとなっていた。母親はこの欠失遺伝子と正常遺伝子をヘテロ接合体として有する保因者と診断された。症例2はエクソン3の塩基163CがTに置換し、このためCGAがTGA(ストップコドン)となるナンセンス変異であった。この症例の母親と一卵性の姉は、同一の変異遺伝子と正常遺伝子をヘテロ接合体として有する保因者と診断された。これらの遺伝子異常によって、この遺伝子によりコードされているmyotubularinの酵素活性の低下が発症の原因である可能性を考察した。

<索引用語>X-linked myotubular myopathy、MTM1遺伝子、myotubularin、遺伝子解析

緒 言

先天性ミオパチーはfloppy infantとして出生し、その後も筋緊張低下や筋力低下などの筋症候を示す非進行性、あるいは緩徐進行性疾患群である。その中で、筋病理学的特徴として、中心核を有する未熟なmyotubeに類似し、type 1線維が小径でかつ優位な所見を示すmyotubular myopathyは、発症時期が遅い常染色体劣性遺伝myotubular myopathyと、X連鎖性劣性遺伝形式をとり出生時より発症するX-linked myotubular myopathy (XLMTM)とに分類される^{1, 2)}。XLMTMは出生直後から全身の筋緊張が低下したfloppy infantであり、さらに重篤な呼吸障害を呈し、人工換気、経管栄養などの管理を余儀なくされる予後不良の疾患である。

XLMTMの原因遺伝子(MTM1遺伝子)はX染色体長腕部(Xq28)に位置し、2.4kbのmRNAから成り、15個のエクソンから構成されることが最近クローニングにより解明された^{3, 4)}。

今回我々は、臨床経過および筋生検により重症型myotubular myopathyと診断された2症例に対して、MTM1遺伝子の解析を行った。その結果、遺伝子変異を同定し、XLMTMと遺伝子診断されたので報告する。

方 法

1. 対象

(1) 症例1

Fig. 1に家系図を示した。患者は第1子として38週、2,100gで出生した男児である。妊娠中胎動が弱く、出生

直後より全身の筋緊張低下と呼吸不全により挿管され、人工呼吸器管理となった。myopathy様顔貌、筋緊張低下、筋萎縮、腱反射の消失を認めた。家系内には神経筋疾患はないが、母親は幼少時に運動発達遅滞が認められた。

(2) 症例 2

Fig. 2 に家系図を示した。患者は第 1 子として37週、2,116gで帝王切開により出生した男児である。妊娠中胎動が弱く、羊水過多があった。出生直後より全身の筋緊張低下と呼吸不全により挿管され、人工呼吸器管理となった。myopathy様顔貌、筋緊張の低下、筋萎縮、腱反射の消失を認めた。家系内には神経筋疾患はないが、母親は 1 卵性双生児の姉で、弟は出生直後に原因不明の呼吸不全で死亡している。

症例 1、2 の両親に対して、本疾患の遺伝形式、臨床経過と予後、および遺伝子診断とその目的に関する十分な説明を行い、次の妊娠のために遺伝子診断の依頼を受

けた。また同時に文書による同意を得ることができた。

2. 筋生検

筋生検に用いた筋肉は、大腿直筋より採取した。液体窒素で凍結したイソペンタン中で急速凍結し、クリオスタットを用いて10ミクロン厚の凍結切片を作製し、hematoxylin and eosin (H-E)、NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR)、Gomoriトリクローム変法(GT)でそれぞれ染色した。

3. 遺伝子解析

(1) DNAの抽出

対象患者の末梢血をリンパ球細胞ペレットとした後、核酸抽出キットセパジーン(三光純薬)によりDNAを抽出した。DNA濃度検定は吸光度計(Gene Quant II、ファルマシアバイオテック)を使用した。

(2) PCR

MTM1遺伝子の15のエクソンに対して、Table 1 に示す15セットのプライマー⁵⁾を作製した。DNA Thermal

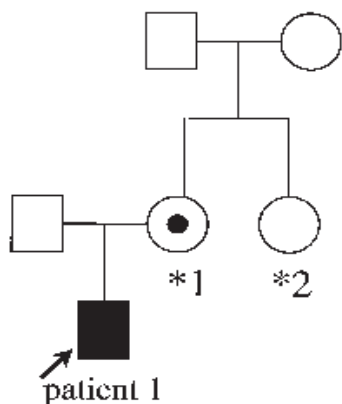


Figure 1. Pedigree of patient 1 family

- * 1 : Mother was carrier as X-linked recessive myotubular myopathy.
- * 2 : His aunt was normal.

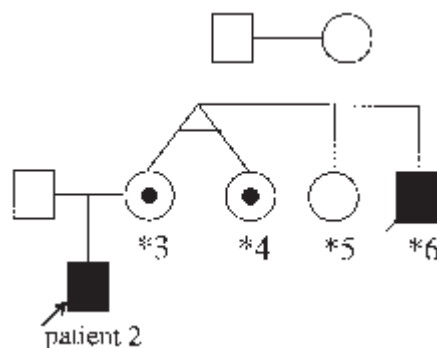


Figure 2. Pedigree of patient 2 family

- * 3, 4 : Mother and aunt were carrier as X-linked recessive myotubular myopathy.
- * 5 : Another aunt was normal.
- * 6 : He was dead at neonatal term and suspected myotubular myopathy.

Table 1. Oligonucleotide primers used for heteroduplex analysis and SSCP analysis

Exon	Exon limits	Forward primer	Reverse primer
1	1-44	5'-GGCGCCAGTCCAACTTC-3'	5'-CCAAGGAGTCCCAACTTC-3'
2	45-117	5'-AGAACCTGTAAAGTAGTACC-3'	5'-TAGCCAGCCAAAATGAC-3'
3	118-190	5'-AACAGTGTGTAATGTAACGTC-3'	5'-AGACTTCTCCTCAAGTTATGC-3'
4	191-285	5'-AGTGCCATTTGTTGTGTATC-3'	5'-TGACCCACAGTCAATCTTGC-3'
5	286-396	5'-TAATTATACTGACAGAAATACTG-3'	5'-TCCACATTAATTGTCTACTATC-3'
6	397-498	5'-TTGAAGACTGAAGTGCATAC-3'	5'-AACCTTCCCACGCTGAGG-3'
7	499-582	5'-AGATGTACTATAATAGTAGAC-3'	5'-AGGTTTCATCACATACCAGAC-3'
8	583-732	5'-TCCAGAGATGAGGTCAAGC-3'	5'-GGTGCTCTCAAGAGAAACG-3'
9	733-921	5'-TTGATAGCTTAAACTTTCTGAC-3'	5'-TCCAGCACATTAAGTCC-3'
10	922-1107	5'-CTGATTGTTTGTATTTTCATG-3'	5'-TATATACACAAATATTTTCAC-3'
11	1108-1314	5'-AACTCCCTACTGACTCACG-3'	5'-AATCCTGAATGGTAGTGATCT-3'
12	1315-1407	5'-ATGCTTCTCAGTTTTGTACC-3'	5'-TAAACAATGAGTTGAATGTA-3'
13	1408-1521	5'-TTATAAAGTTTTCAGTCCCAG-3'	5'-TTTGCAAGCCTAATGTATC-3'
14	1522-1698	5'-TTTTACTTAGGCTCTCCAC-3'	5'-CTATCTTTTAAACAGTGCTAC-3'
15	1699-3411	5'-AGTGTAACCAAGTCTCTGG-3'	5'-AAATGAAAGTCAGCTATCGC-3'

Cycler PJ480 (パーキンエルマージャパン、東京) を使用し、温度条件；[95℃ - 2分] × 1 サイクル → [95℃ - 15秒/52℃ - 15秒/72℃ - 45秒] × 28 サイクル → [72℃ - 7分] × 1 サイクルの設定で増幅した。

(3) heteroduplex法⁶⁾ および single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法

① heteroduplex法

正常対照PCR産物 5 μl と患者PCR産物 5 μl を混合し、95℃ に 5 分置き、それぞれを一本鎖DNAとした。37℃ で 60 分静置後、0.5 M ethylenediamine - N,N,N',N'-tetraacetic acid (EDTA) を 0.5 μl 加え、酵素を失活させ、正常対照産物と患者産物の混合二本鎖DNAを合成した。MDE Gel (AT Biochem, Inc.) 中にて 5 μl の混合二本鎖DNAを室温、800 Vにて14時間泳動した。泳動後、臭化プロミド染色にて泳動変異の有無を解析した。

② SSCP法

1 μl の患者PCR産物にローディングバッファー 15 μl を加え攪拌混合し、100℃ に 10 分置き、変性一本鎖DNAとした後、氷上で 10 分冷却した。正常対照PCR産物も同様の処理を行った。MDE Gel 中にてそれぞれ 15 μl の変性一本鎖DNAを 4℃、20mA で 6 時間泳動した。泳動後、銀染色にて泳動変異の有無を解析した。

(4) サブクローニング

本疾患の場合、点突然変異に加え、数塩基程度の欠失や挿入、あるいはエクソン単位の欠失が予想されたので、サブクローニング後に得られるプラスミドDNAを鋳型とする直接塩基配列決定を行うため、TA Cloning kit (Invitrogen Corp.) を用い、サブクローニングを実施した。

(5) 塩基配列決定

heteroduplex法およびSSCP法により泳動変異が検出された患者の該当エクソンのPCR産物についてサブクローニングを実施し、得られたプラスミドDNA 500 ng を鋳型として、末端に蛍光標識された M13 forward プライマーを用いて、Thermo Sequenase Core Sequencing kit (日立計測機器サービス、東京) によるシーケンシング反応を行った。DNA Thermal Cycler PJ480 の温度条件は [95℃ - 5分] × 1 サイクル → [95℃ - 30秒/60℃ - 30秒] × 25 サイクル → [4℃] である。5 μl のシーケンシング反応産物に 90% ホルムアミドローディングダイ 3 μl を加えた混合液を 20 分間真空吸引した後に、6% 変性ポリアクリルアミドゲルに投入し、自動シーケンサー SQ5500E (日立計測機器サービス、東京) を用いて解析した。

結 果

1. 症例 1

(1) 筋生検所見

H-E 染色では中心核を有する大小不同の未熟な

myotube 様筋線維が多数存在し、径の小さい type 1 筋線維が多数みられた。またこれら小径線維は数の上でも優位な所見を示した (Fig. 3)。NADH-TR では多数の筋線維中に sarcoplasmic halo を認めた。GT 染色ではネマリン小体を認めなかった。以上の筋生検所見より症例 1 は XLMTM と診断された。

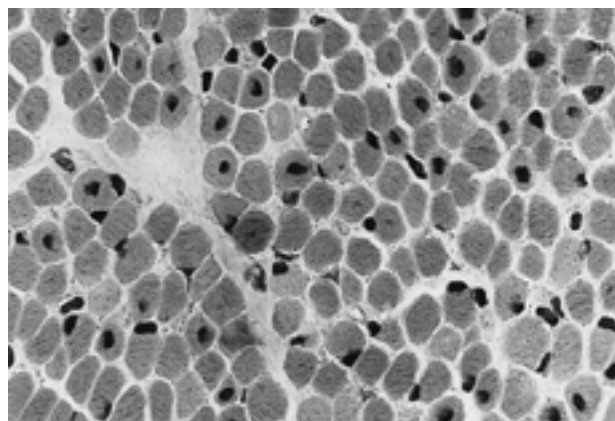


Figure 3. Muscle biopsy in patient 1 shows a slight variation in fiber size and centrally placed nuclei, consistently with myotubular myopathy. H-E staining, X500

(2) 遺伝子解析 (Table 2)

エクソン 4 の heteroduplex 法および SSCP 法において、患者と母親に遺伝子異常を示唆する特異なバンドを認めた。患者に対する同領域の塩基配列決定の結果、塩基 193 から 196 にかけて 4 塩基 (AAAG) の欠失を認めた (Fig. 4)。この欠失によりフレームシフト変異を生じ、下流 25 番目のアミノ酸がストップコドンに置換していた。母親はこの欠失遺伝子と正常遺伝子のヘテロ接合体であり、保因者と診断された。

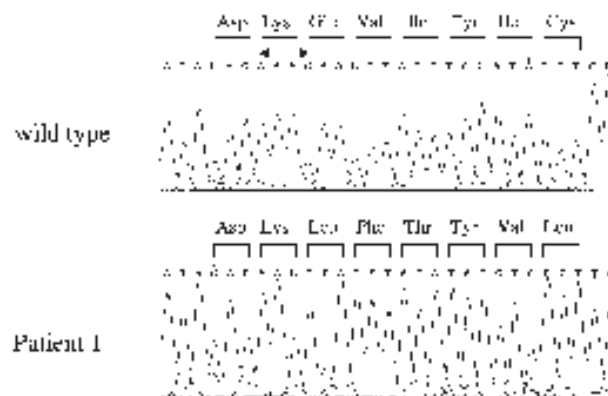


Figure 4. In patient 1, 4 bp deletion (AAAG) result in frameshift mutation and distal terminal codons after amino acid 25 in exon 4.

2. 症例 2

(1) 筋生検所見

筋生検所見は症例 1 とほぼ同様であり、XLMTMと診断された。

(2) 遺伝子解析 (Table 2)

エクソン 3 のheteroduplex法およびSSCP法において、患者と母親、母親の一卵性の姉に特異なバンドを認めた。患者に対する同領域の塩基配列決定の結果、塩基163CがTに置換しており、このためCGAがコードするアルギニンがTGAのストップコドンになり、ナンセンス変異となっていた (Fig. 5)。母親と姉は同一の変異遺伝子と正常遺伝子のヘテロ接合体であり、保因者と診断された。

Table 2. Summary of MTM1 mutations

Patient	Exon	Mutation	Predicted protein alteration	Family history
1	3	(193-6) del AAAG	Frameshift, truncation	mother heterozygote
2	4	C163T	Arg55 stop, truncation	mother and aunt heterozygote

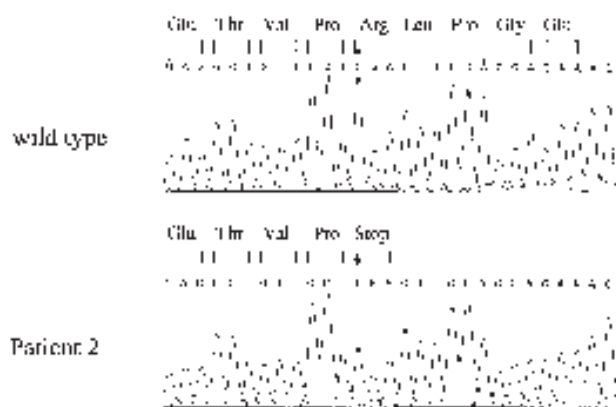


Figure 5. In patient 2, a nonsense mutation corresponding to C¹⁶³→T (arrowed) is demonstrated in exon 3.

考 察

1. 臨床経過

XLMTMは出生直後より全身の筋緊張低下を示し、自発呼吸が困難で人工換気による管理、および経管栄養が必要となる予後不良の筋疾患であり、多くは新生児期から乳児期の呼吸器感染症により死亡する。今回報告した2症例の臨床経過についても同様であり、以後の臨床経過の観察は重要かつ不可欠であると考えられる。

2. 筋病理所見

XLMTMの筋病理所見は、中心核を有する未熟なmyotube様筋線維が多数存在する特徴を有する。多くの先天性myopathyの中から本疾患を鑑別するために、筋生検は必要な検査と考える。

3. 遺伝子解析

XLMTM遺伝子の15個のエクソンによりコードされる蛋白質myotubularinは603個のアミノ酸から構成され、tyrosin phosphataseと相同性を有するが、既知の蛋白質ではなく^{3,4)}、細胞の局在および生理的機能についても不明である。本疾患は、myotubularin中のPTP (phosphatase) ドメインあるいはSID (set interaction domain) の損傷により、myotubularinのphosphatase活性が低下することが発症の一因と考えられている⁷⁾。エクソン11はPTPドメインをコードする領域、エクソン12はSIDをコードする領域であることが判明している。Laporteら⁷⁾はXLMTMの遺伝子異常に関して、自験例 (29症例) を含む198症例について、遺伝子変異部位、臨床症状、遺伝型式、多型を検討している。その中で変異症例は、エクソン1および15以外に認められている。本報告における症例1と同一の遺伝子変異を有するXLMTMは10例、症例2と同一の遺伝子変異を有するXLMTMは5例であり、いずれも国外で認められているものである。変異の種類 (Table 3) では、ミスセンス変異が198例中55例で、エクソン8~12に好発している。エクソン11、12に生じたミスセンス変異14症例の臨床症状は重度であるが、それ以外のエクソンで生じたミスセンス変異の臨床症状は軽度から中等度であり、比較的長期の生存例も存在している。一方、ナンセンス変異は症例2を含め40例、1塩基から12塩基程度の欠失、あるいは挿入が症例1を含め50例報告されており、それらの臨床症状は重度かつ予後不良である。その他としては、エクソン単位 (1個から全て) の欠失が15例、残りの38例はイントロンおよびプロモーター領域での遺伝子異常であり⁸⁻¹⁰⁾、臨床症状はやはり重度である。XLMTMの遺伝子変異の特徴としては、様々なタイプが生じることから、異質性ならびに多様性が高いことが報告されている。さらにエクソン3、4、8、9、11、12に発生した遺伝子異常の報告例が多いことから、PTPドメイン、SIDと本疾患との関連性を含め、hot spotがこの領域に存在すると考えられる。PTPドメインやSIDに関連するエクソンでのミスセンス変異を除いたミスセンス変異の場合、遺伝子発現の低下による発症と考えることができ、臨床症状は比較的軽度になる。一方ナンセンス変異やフレームシフトを生じる可能性のある欠失、挿入では、いずれも臨床症状が重度であり、生命予後も不良である。すなわちこれらの異常により、遺伝子の発現に異常をもたらす変異となっていることが予想される。またイントロンおよびプロモーター領域に発生する変異の場合、スプライシングを阻害することによる発現の低下や消失も考慮しなければならない。

最近、MTM1遺伝子の下流20kbに位置しMTM1遺伝子を含む225kbのMTMR1遺伝子が同定されXLMTMとの関係が注目されている¹¹⁾。いくつかのXLMTM症例に

Table 3. Type of MTM1 mutations in XLMTM⁷⁾

Type of mutations	Subtotal	Region
Missense mutations	55	Ex04 : 5 Ex05 : 1 Ex08 : 11 Ex09 : 13 Ex10 : 2 Ex11 : 14 Ex12 : 7 Ex13 : 1 Ex14 : 1
Nonsense mutations	40	Ex02 : 2 Ex03 : 9 Ex04 : 2 Ex05 : 1 Ex07 : 1 Ex08 : 7 Ex09 : 3 Ex10 : 1 Ex11 : 2 Ex12 : 5 Ex13 : 4 Ex14 : 3
Small deletion and insertion	50	Ex04 : 13 Ex05 : 4 Ex06 : 4 Ex07 : 1 Ex08 : 7 Ex09 : 6 Ex10 : 3 Ex11 : 4 Ex12 : 1 Ex13 : 4 Ex14 : 3
Large deletion	15	whole gene : 3 Ex01 : 2 Ex01-13 : 1 Ex01-07 : 1 Ex02 : 1 Ex02-06 : 1 Ex02-08 : 1 Ex04 : 1 Ex05-06 : 1 Ex06-11 : 2 Ex15 : 1
Splice site mutations	38	In02 : 1 In03 : 7 In05 : 1 In07 : 1 In08 : 6 In09 : 2 In10 : 1 In11 : 16 In12 : 2 In14 : 1
Total : 198		

幽門狭窄症、球状赤血球症、胆石、腎結石、肝障害等の合併が報告されMTM1蛋白質は単に筋細胞のみならず種々の臓器に関係していることが示唆されている¹²⁾。これらの関連を明確にするためには、今後の症例検討の蓄

積が重要な課題と考える。また母親が保因者となる遺伝形式のため、出生前診断を視野に入れた迅速かつ正確な遺伝子診断は重要であると考えられる。

文 献

- 1) Joseph M, Pai GS, Holden KR, et al: X-linked myotubular myopathy: clinical observations in ten additional cases. *Am. J. Med. Genet.* 59 : 168-173, 1995
- 2) Wallgren-Pettersson C, Clarke A, Samson F, et al : The myotubular myopathies: differential diagnosis of the X linked recessive, autosomal dominant, and autosomal recessive forms and present state of DNA studies. *J. Med. Genet.* 32 : 673-679, 1995
- 3) Laporte J, Hu LJ, Kretz C, et al : A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* 13 : 175-182, 1996
- 4) Laporte J, Blondeau F, Buj-Bello A, et al: Characterization of the myotubularin dual specificity phosphatases gene family yeast to human. *Hum. Mol. Genet.* 7 : 1703-1712, 1998
- 5) Laporte J, Guiraud-Chaumeil C, Vincent MC, et al: Mutations in the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 6 : 1505-1511, 1997
- 6) White MB, Carvalho M, Derse D, et al: Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 12 : 301-306, 1992
- 7) Laporte J, Biancalana V, Tanner S M, et al: MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mutat.* 15 : 393-409, 2000
- 8) de Gouyon BM, Zhao W, Laporte J, et al: Characterization of mutations in the myotubularin gene in twenty six patients with X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 6 : 1499-1504, 1997
- 9) Tanner SM, Laporte J, Guiraud-Chaumeil C, et al: Confirmation of prenatal diagnosis results of X-linked recessive myotubular myopathy by mutational screening, and description of three new mutations in the MTM1 gene. *Hum. Mutat.* 11 : 62-68, 1998
- 10) Tanner SM, Schneider V, Thomas NST, et al: Characterization of 34 novel and six known MTM1 gene mutations in 47 unrelated X-linked myotubular myopathy patients. *Neuromusc. Disord.* 9 : 41-49, 1999

- 11) Kioschis P, Wiemann S, Heiss NS, et al: Genomic organization of a 225 - kb region in Xq28 containing the gene for X-linked myotubular myopathy (MTM1) and a related gene (MTMR1) . Genomics 54 : 256 - 266, 1998
- 12) Herman GE, Finegold M, Zhao W, et al: Medical complications in long-term survivors with X-linked myotubular myopathy. J. Pediatr. 34 : 206 - 214, 1999

Analysis of myotubular myopathy with X-linked recessive trait

Naoki KOZUKA¹, Nobutada TACHI², Eiji UCHIDA³
Hidekatsu TAKEDA¹, Yasuhito SENGOKU², Yoshiko ODANAKA³

Department of Physical Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University¹

Department of Occupational Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University²

Graduate School of Health Sciences, Sapporo Medical University³

Abstract

X-linked recessive myotubular myopathy (XLMTM) is a congenital myopathy characterized by severe hypotonia and muscle weakness, and respiratory insufficiency after birth. Surviving patients have prolong ventilator dependence and severely delayed motor milestones. Myotubularin, which is encoded by MTM1 gene, is a new family of putative tyrosine phosphatase and appears to be ubiquitously expressed, with a 3.9 kb transcript detected in all adult and fetal tissues studied. We present clinical, histological, and molecular analysis of two patients with XLMTM in which we identified mutations of the MTM1 gene. In one patient, an AAAG deletion was identified at the position of nucleotide 193 in coding exon 4. These 4 bp deletions caused a shift of the reading frame and created a stop codon (frameshift mutation). His mother had both normal and mutant alleles heterozygously as a XLMTM carrier. In another patient, a C to T substitution of nucleotide 163, leading Arg 55 to stop codon (nonsense mutation) was identified. His mother who was an identical twin, had both normal and mutant alleles heterozygously as a XLMTM carrier. These mutations caused a development of an inactivation of the putative enzymatic activity of myotubularin.

Key words: X-linked myotubular myopathy, MTM1 gene, Myotubularin, Gene analysis