

肢帯型筋ジストロフィーの発症機構

反町洋之、小野弥子

肢帯型筋ジストロフィー (Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD)) は、主に近位筋に症状が出る筋ジストロフィーで、多くは常染色体劣性遺伝を示す。LGMDの発症率は2万人に一人程度であるが、その中では2A型が最も頻度が高い(30~50%、本邦では2B型と同程度で30%)。現在までに18種類の多様な責任遺伝子と4種の(座)が同定されている(表1)。そこにコードされるタンパク質は、大別すると4つに分類でき、構造タンパク質、タンパク質分解酵素、糖鎖修飾酵素、イオンチャネル、となる。構造タンパク質には、lamin A/Cのように核膜を裏打ちするもの、sarcoglycanのように筋細胞膜を裏打ちするもの、caveolin-3やdysferlinのように膜機能に関与するもの、そして、myotilin、T-cap/telethonin、connectin/titinのように筋原線維を構成するものが含まれる。また、タンパク質分解酵素には、Ca²⁺-要求性細胞質システインプロテアーゼであるcalpainとユビキチン(Ub)リガーゼであるTRIM32が含まれる。これらの筋ジストロフィーは、各分子機能が欠損することで病態を発症するという一方で、さらに臨床的に他の疾患として分類される例もあることを考慮して分子名に"-opathy"を付加して呼ばれることも多い。

1 構造タンパク質由来(1) ジストロフィン複合体

細胞外マトリックスと細胞膜との協調的機能に関わる複数のタンパク質が含まれるが、最も良く研究されているのは α -、 β -、 γ -あるいは δ -sarcoglycanをコードするSGCA、SGCB、SGCDあるいはSGCGの変異で発症するsarcoglycanopathy (LGMD2C~2F)である。これらのタンパク質は膜を貫通してジストロフィンや細胞外マトリックスと共に巨大なジストロフィン複合体を形成しており、いずれか一つが欠損すると、全ての複合体成分がダウンレギュレーションされる。その結果、複合体としての機能欠陥、さらには筋細胞膜の脆弱性を生じることが発症の直接の原因になると考えられている。即ち、デュシェンヌ型筋ジストロフィーと同様の発症機序が想定されている¹⁾。

2 構造タンパク質由来(2) 細胞膜輸送・修復系

筋特異的に膜小胞輸送に関与するcaveolin-3にミスセンス変異が入ると、優性阻害効果により共存する野生型caveolin-3と共に発現低下を引き起こすことが

Pathogenic mechanisms of limb-girdle muscular dystrophies

Hiroyuki Sorimachi: 東京都医学総合研究所 カルパインプロジェクト (〒156-8506 東京都世田谷区上北沢 2-1-6) プロジェクトリーダー

Yasuko Ono: 同 主席研究員

明らかとなっている。即ち、caveolinopathy は優性遺伝を示す。マウスモデルにおいても、点変異体 caveolin-3: P104L を過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスでは、caveolin-3 の発現低下と筋ジストロフィー症状が確認された²⁾。一方、*Cav3*^{+/-}マウスでは全く異常はなく、*Cav3*^{-/-}マウスで軽微な筋ジストロフィー症状を呈する。その発症機序には、筋特異的な TGF- β ファミリー分子であるマイオスタチンのシグナル伝達系の関与が報告されている³⁾。

dysferlin は三好ミオパチーの責任遺伝子産物でもある。230 kDa の II 型膜貫通タンパク質で、細胞内領域に 6 つの Ca^{2+} -結合性 C2 ドメインを持つ。その機能は膜小胞の融合に関与するもので、特に筋細胞膜の修復に重要と考えられている⁴⁾。SJL/J 及び A/J マウスは、*Dysf* に天然変異を持つマウスであり、前者では老齢のマウスに軽度の筋萎縮が見られている⁵⁾。caveolin-3 をはじめ、annexin などとの相互作用も確認されている⁶⁾。

3 構造タンパク質由来(3) 核膜系

lamin A/C の変異で生じる laminopathies は、LGMD1B だけではなくハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群や拘束性皮膚障害などの重篤かつ多様な疾患を含む。いずれの場合も発症機序は不明な部分が多いが、核膜の構造に何らかの欠損が生じ、その結果ゲノムの不安定性が引き起こされている可能性が指摘されている⁷⁾。LGMD1B は優性遺伝であるため何らかの優性阻害効果、例えば核膜における複合体構築の欠陥などが発症機構に介在すると考えられる。

4 構造タンパク質由来(4) 筋原線維成分

その欠損が LGMD1A を発症する myotilin は、desmin や α -B crystallin と共に筋原線維ミオパチーの責任遺伝子産物にも分類される⁸⁾。発症機序は不明な点が多いが、共通の所見として、サルコメア Z 線の構造の不安定化があげられる。telethonin/T-cap は connectin/titin の N 末端に結合して、やはり Z 線に局在し、この変異は LGMD2G を発症する。また connectin/titin は、Z 線から M 線を一分子で繋ぐ、3,000 kDa 以上もある巨大線維状タンパク質である。免疫グロブリン及びフィブロネクチンのモチーフを合わせて 300 反復した構造を持ち、物理的に筋の伸長収縮を支持するだけでなく、calpain-3 をはじめ様々な筋タンパク質を結合する足場となっている。C 末端付近にはキナーゼドメインも有する。M 線に位置する C 末端の calpain-3 結合部位付近の変異が LGMD2J で見出されている。一方、天然の変異マウス *mdm* では、connectin/titin の N2A 領域付近 (N 末端から 1/3 程度) に微小な欠失が生じており、重篤な筋ジストロフィーを呈する。この欠失部位も calpain-3 の結合部位となっており、この付近に結合する転写制御因子 MARPs (筋特異的アンキリン反復タンパク質) と共に、筋細胞の重要な情報伝達中継部位となっていることが予想される。即ち、これらの発症機序には、calpain-3 を介した情報伝達異常の関与が考えられる。

5 タンパク質分解酵素由来(1) Ub リガーゼ

筋ジストロフィーでは筋の壊死>再生というバランスの偏り、即ち筋タンパク質の過剰分解が想定されることから、タンパク質分解酵素の欠損が、その発症原因であるという事実は、一見矛盾するように見える。しかし、タンパク質分解の生理的意義、特にタンパク質の再生・品質管理・情報伝達などへの決定的な関与が明らかにされるにつれ、筋組織に必須な機能調節システムの破綻という観点から、発症機構の解明が進展している。

TRIM32 は RING-finger/B-box/coiled-coil モチーフと C-末端 NHL ドメインを有する Ub リガーゼ (E3) であり、特定の基質を認識してポリ Ub 鎖を付加し、プロテアソームに引き渡すことで速やかな分解に導く。筋肉では Z 線に局在するが、筋肉以外にも広く発現している。TRIM32 のターゲットとしてアクチン、Abi2、disbindin などが見出されている⁹⁾。disbindin は dystrobrevins と結合してジストロフィン複合体を形成しており、TRIM32 は disbindin の量の調節を介して複合体の寿命制御に関与する。興味深いことに LGMD2H で見られる変異は TRIM32 の NHL ドメインに集中している。一方 B-box の変異では、肥満、網膜色素変性、多指症・合指症、知能障害、性腺機能低下症などを示すバルデー・ビードル症候群を発症することから、筋以外の発現組織においても特異的かつ多様な機能が示唆される。また、ガン細胞での高発現も報告されている¹⁰⁾。Trim32^{-/-}マウスは軽微なミオパチーと共に神経変成の症状を呈することが報告されているが¹¹⁾、上述の疾患の発症機序の解明は難航している。

6 タンパク質分解酵素由来(2) カルパイン

骨格筋特異的カルパインである calpain-3 (p94 とも呼ばれた) の遺伝子変異が原因で発症する calpainopathy は、特定の地域 (フランス・リュニオン島、スペイン・バスク国、アメリカ・インディアナ州など) ではかなり高い頻度 (100~4,000 人に 1 人) で発症している¹²⁾。calpainopathy でのみ観察される特徴的な病理所見はないが、calpain-3 は心筋に発現しないため心筋での症状は見られない。

カルパインは細胞質内のシステインプロテアーゼであり、ヒトでは 15 種の遺伝子にコードされる。μ-および m-カルパインなど組織普遍的に発現するタイプと、calpain-3 のように組織特異的なタイプが存在する¹³⁾。基質タンパク質をバラバラに分解するプロテアソームなどとは異なり、カルパインは基質を限定的 (=ドメイン構造をある程度残すよう) に切断することで、その基質の新たな機能を引き出すモジュレータープロテアーゼである。

calpainopathy は calpain-3 の活性不全が発症の根本原因であることが明らかとなるには主に 3 つの段階があった。in vitro での生化学的解析¹⁴⁾に加え、プロテアーゼ不活性型 calpain-3:C129S 変異体を発現する Tg マウスの骨格筋がミオパチー症状を呈したこと¹⁵⁾、そして Capn3^{-/-}マウス¹⁶⁾だけでなく calpain-3:C129S を

野生型の代わりに発現するノックイン (*Capn3^{CS/CS}*) マウスが筋ジストロフィーを呈したこと¹⁷⁾、である。現在までに *calpain-3* 遺伝子には 197 種のミスセンス変異が報告されているが、ホットスポットは存在しない。

calpain-3 の *in vitro* 基質としては HSP60、フォドリン、カルパスタチンなどが見出されている^{18),19)}。さらにプロテオーム解析による基質候補検索も行われ、翻訳系、解糖系、膜輸送などに関与するタンパク質も新たな候補となっている^{17),20),21)}。しかし *in vivo* における基質は明確にはなっていない。最近、*calpain-3* のプロテアーゼ活性と骨格筋細胞でのサルコメアにおける *calpain-3* の局在に関連性があることが報告された^{17),22)}。*calpain-3* は筋原線維において connectin/titin の M 線および N2A 領域に直接結合している。興味深いことに、M 線に局在する *calpain-3* の半減期は約 1 分と短く、M 線と細胞質間でダイナミックな移動が行われていること、その局在は伸長したサルコメアにおいて M 線よりも N2A 領域へと変化する傾向を示すこと、その局在変化は *calpain-3* のプロテアーゼ活性に依存していることが明らかとなった¹⁷⁾。また *Capn3^{CS/CS}* マウスでは運動に伴う HSP 発現高進など野生型で認められるストレス応答の不全も見出された¹⁷⁾。つまり *calpain-3* は、通常の活動レベルにある筋細胞では細胞質と筋原線維内の複数の部位をダイナミックに移行して、一種のセンサーとして機能し、ストレス下では自身の N2A 領域集積を介して、他のシグナル伝達分子 (MARF2 など) が核からストレス反応を誘導する経路を賦活化することが示唆される (図 1)。*calpain-3* の活性やタンパク質がない場合はこの情報伝達が遅延・減弱するため、結果的に骨格筋細胞が伸展刺激などの物理的ストレスに応答することができなくなり、徐々に筋ジストロフィーが発症すると考えられた。

7 その他

比較的最近発見された *anoctamin 5* は、*LGMD2L* の責任遺伝子産物であるが、これは Ca^{2+} -依存性 Cl⁻チャネルであるものであり²³⁾、成人発症型の筋ジストロフィーとしては、*dysferlinopathy* の約 2 倍と、高頻度で存在している²⁴⁾。興味深いことに、*ANO5* の変異は三好ミオパチーの原因ともなる。これまで三好ミオパチーは *dysferlin* の変異が発症の原因と考えられてきた。このことから、*anoctamin 5* と *dysferlin* との機能関連、特に膜修復に関わる Ca^{2+} の動態の重要性を示唆する可能性がある。

糖鎖修飾酵素では、O-マンノース転移酵素など 4 種が同定されており、タンパク質機能における糖鎖修飾の重要性を実証することとなった。これについては *dystroglycanopathy* 及び福山型筋ジストロフィーの項を参照されたい。

おわりに

こうして概観すると、*LGMD* がいかに多様なタンパク質の欠損で起きているか、改めて驚かされる。機能・作用の異なるタンパク質の欠損が、同様な症状に収

束することは個体機能において筋肉が果たす役割、さらには筋肉自体の特性でもあろう。即ち、様々な理由から端を発した不具合が、ボトルネックのような形で類似の方向に進行する、という過程は筋肉が持つ筋原線維という特殊でダイナミックなタンパク質構造体の作用機構と無関係ではないだろう。多様な原因から生じる過程を詳細に調べることにより、その共通項から筋ジストロフィー発症の本質を見出すことが可能になるかもしれない。未だに肢帯型筋ジストロフィーの半分以上の患者で責任遺伝子が未同定であることも考え合わせると、この極めてヘテロな責任遺伝子群が一体何を我々に問いかけているのか、広い視野でもう一度考え直してみる必要が痛感される。そこに隠されているであろう筋ジストロフィーの発症原理を明らかにし、治療法へのヒントを発信すべくこれからの基礎研究の場から貢献していきたい。

謝辞

本稿の calpain-3 関連で紹介した研究は、東京都臨床医学総合研究所カルパインプロジェクトのメンバー全員の協力の下、現(独)農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所の尾嶋孝一博士との共同研究により行われたものです。この場をお借りして深謝いたします。

文献

- 1) Ozawa E.: *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**: 798-821, 2010
- 2) Sunada Y., Ohi H., Hase A. et al: *Hum Mol Genet* **10**: 173-178, 2001
- 3) Ohsawa Y., Okada T., Kuga A. et al: *Acta Myol* **27**: 19-24, 2008
- 4) Urtizbera J. A., Bassez G., Leturcq F. et al: *Neurol India* **56**: 289-297, 2008
- 5) Nemoto H., Konno S., Nakazora H. et al: *Eur Neurol* **57**: 19-25, 2007
- 6) Matsuda C., Hayashi Y. K., Ogawa M. et al: *Hum Mol Genet* **10**: 1761-1766, 2001
- 7) Liu B., Zhou Z.: *Histol Histopathol* **23**: 747-763, 2008
- 8) Selcen D.: *Curr Opin Neurol* **23**: 477-481, 2010
- 9) Locke M., Tinsley C. L., Benson M. A. et al: *Hum Mol Genet* **18**: 2344-2358, 2009
- 10) Kano S., Miyajima N., Fukuda S. et al: *Cancer Res* **68**: 5572-5580, 2008
- 11) Kudryashova E., Wu J., Havton L. A. et al: *Hum Mol Genet* **18**: 1353-1367, 2009
- 12) Richard I., Broux O., Allamand V. et al: *Cell* **81**: 27-40, 1995
- 13) Sorimachi H., Hata S., Ono Y.: *Exp Anim* **59**: 549-566, 2010
- 14) Ono Y., Shimada H., Sorimachi H. et al: *J. Biol. Chem.* **273**: 17073-17078, 1998
- 15) Tagawa K., Taya C., Hayashi Y. et al: *Hum. Mol. Genet.* **9**: 1393-1402, 2000
- 16) Richard I., Roudaut C., Marchand S. et al: *J. Cell Biol.* **151**: 1583-1590, 2000
- 17) Ojima K., Kawabata Y., Nakao H. et al: *J Clin Invest* **120**: 2672-2683, 2010
- 18) Ono Y., Kakinuma K., Torii F. et al: *J. Biol. Chem.* **279**: 2761-2771, 2004

- 19) Sorimachi H., Toyama-Sorimachi N., Saido T. C. et al: *J. Biol. Chem.* **268**: 10593-10605, 1993
- 20) Ono Y., Hayashi C., Doi N. et al: *Biotechnol. J.* **2**: 565-576, 2007
- 21) Ono Y., Ojima K., Torii F. et al: *J Biol Chem* **285**: 22986-22998, 2010
- 22) Ojima K., Ono Y., Doi N. et al: *J. Biol. Chem.* **282**: 14493-11504, 2007
- 23) Bolduc V., Marlow G., Boycott K. M. et al: *Am J Hum Genet* **86**: 213-221, 2010
- 24) Hicks D., Sarkozy A., Muelas N. et al: *Brain* **134**: 171-182, 2011

表 1 肢帯型筋ジストロフィーの責任遺伝子

その他の筋疾患に関しては、文献 Kaplan JC: *Neuromuscul. Disord.* 20: 852-873, 2010 及び <http://www.muscle.genetable.org> を参照

| 型 | 責任遺伝子座 | 責任遺伝子 | 遺伝形式 | 責任遺伝子産物 | 機能 | 同一遺伝子による主な他の筋疾患 |
|----|-------------|----------------|------|--|---------------------------|-----------------|
| 1A | 5q31.2 | <i>MYOT</i> | 優性 | myotilin | 筋原線維構造タンパク質 | |
| 1B | 1q22 | <i>LMNA</i> | 優性 | lamin A/C | 核膜構造タンパク質 | EDMD2, 3, CMD1A |
| 1C | 3p25 | <i>CAV3</i> | 優性 | caveolin-3 | 筋細胞膜構造タンパク質 | |
| 1D | 7q | n.d. | 優性 | n.d. | - | |
| 1E | 6q23 | n.d. | 優性 | n.d. | - | =CMD1F |
| 1F | 7q32.1-32.2 | n.d. | 優性 | n.d. | - | |
| 1G | 4q21 | n.d. | 優性 | n.d. | - | |
| 2A | 15q15.1 | <i>CAPN3</i> | 劣性 | calpain-3/p94 | プロテアーゼ | |
| 2B | 2p13 | <i>DYSF</i> | 劣性 | dysferlin | 筋細胞膜構造タンパク質 | MM |
| 2C | 13q12 | <i>SGCG</i> | 劣性 | γ -sarcoglycan | 筋細胞膜構造タンパク質 | |
| 2D | 17q12-21 | <i>SGCA</i> | 劣性 | α -sarcoglycan | 筋細胞膜構造タンパク質 | |
| 2E | 4q12 | <i>SGCB</i> | 劣性 | β -sarcoglycan | 筋細胞膜構造タンパク質 | |
| 2F | 5q33 | <i>SCGD</i> | 劣性 | δ -sarcoglycan | 筋細胞膜構造タンパク質 | |
| 2G | 17q12 | <i>TCAP</i> | 劣性 | Telethonin/T-cap | 筋原線維構造タンパク質 | |
| 2H | 9q33 | <i>TRIM32</i> | 劣性 | TRIM32 | RING 型 Ub リガーゼ | |
| 2I | 19q13.3 | <i>FKRP</i> | 劣性 | fukutin-related protein | 糖鎖修飾酵素 | MDC1C |
| 2J | 2q31 | <i>TTN</i> | 劣性 | connectin/titin | 筋原線維構造タンパク質 (リン酸化酵素領域を含む) | TMD, CMD1G |
| 2K | 9q34 | <i>POMT1</i> | 劣性 | protein-O-mannosyl-transferase 1 | 糖鎖修飾酵素 | |
| 2L | 11p14.3 | <i>ANO5</i> | 劣性 | anoctamin 5 | イオン・チャネル | MM |
| 2M | 9q31 | <i>FKTN</i> | 劣性 | fukutin | 糖鎖修飾酵素 | FCMD, CMD |
| 2N | 14q24 | <i>POMT2</i> | 劣性 | protein-O-mannosyl-transferase 2 | 糖鎖修飾酵素 | |
| 2O | 1p34 | <i>POMGNT1</i> | 劣性 | protein-O-linked mannose β -1,2-N-acetylglucosaminyl-transferase 2 | 糖鎖修飾酵素 | |

n.d.: 未同定, CMD: cardiomyopathy, EDMD: Emery-Dreifuss muscular dystrophy, FCMD: Fukuyama-type congenital muscular dystrophy, MDC: muscular dystrophy, congenital, MM: Miyoshi myopathy, TMD: tibial muscular dystrophy

図の説明

図 1 骨格筋特異的カルパイン calpain-3 のサルコメア長に依存した局在変化
(A) 野生型及び *Capn3*^{CS/CS} マウスの筋原線維を抗 calpain-3 抗体などで染色し、M 線と N2A 領域への calpain-3 存在比をシグナル強度によって定量し、サルコメア長に対してプロットした。サルコメアが長くなると $M > N2A \rightarrow M < N2A$ の移行が認められる。また、*Capn3*^{CS/CS} マウス由来の calpain-3:C129S は野生型に比べてその移行がわずかではあるが有意に遅延する。(B) calpain-3 の生理機能の作業仮説。骨格筋が通常レベルで活動している状態では、calpain-3 は Z 線、N2A 領域、M 線、細胞質をダイナミックに移行している。過剰伸長など物理ストレスがかかると N2A 領域に集積し、同所に局在する制御転写因子 MARP2 などを介して核へとその情報を伝達する。calpainopathy では calpain-3 の活性またはタンパク質が欠損するため、この情報伝達が遅延または無効となり、ストレスによる細胞内環境の様々なレベルでの増悪が解消されない、または反復される結果、筋ジストロフィーを引き起こすと考えられる。

