

2) 筋ジストロフィーの生化学的研究

—筋ジストロフィーのアデニルサイクレース及び除神経筋の cyclic AMP の変動—

井村裕夫*

研究協力者 高橋桂一* 高井恒夫*
高尾尚*

緒 論

筋ジストロフィー症患者に糖コルチコイド、例えばプレドニソロン 1 mg/kg を静脈内投与すると血清クレアチンフォスホキナーゼ (CPK) は 2 時間より 4 時間後に一時上昇する。多発性筋炎や他の CPK 上昇を示す神経筋疾患、甲状腺機能低下症などでは逆に CPK は低下するか、不変である¹⁾。この現象は一つには本症で筋漿膜及び T-system あるいは sarcoplasmic reticulum を含めた膜の異常 (透過性亢進) があり、他の一つには筋漿酵素蛋白のターンオーバー、特に catabolism の異常亢進が特徴的であることを示唆する。ここでは膜の構造異常を知るため膜酵素の一つである adenylyl cyclase をジストロフィー筋について検索した結果を報告する。また本症の成因に神経支配が関与するか否かを明らかにするための基礎的なアプローチとして除神経筋の cyclic AMP (cAMP と略) の変動、及び白鼠の下腿筋の生後の分化過程における cAMP の測定結果を検討した。

方 法

イ) adenylyl cyclase 活性は次の条件で測定した。ATP- α -³²P, または ATP-8-¹⁴C 1mM (1 μ Ci), テオフィリン 10mM, MgCl₂ 5mM, フォスフォエノールピルビン酸 4 mM, ピル

ビン酸キナーゼ 100 μ g/ml, 牛アルブミン 0.05 %, トリス緩衝液 50mM (pH 7.5), 組織粗酵素 100~200 μ g 蛋白, NaF 10mM あるいは他の生理活性物質を加えて反応容量 70 μ l で 37°C 15 分反応させた。反応後 50 μ l の 6mM cAMP を加えて 2.5 分煮沸し反応を止めた。遠沈して上清の一定量を凍結乾燥し、少量の水にとかし Bar の方法に従い二次元の DEAE セルロースの薄層クロマトグラフィを行った。一次はイソプロピルアルコール: 28% アンモニア: 水 (7: 1: 2) で、二次はエタノール: 1 M 酢酸アンモン (7: 3) で展開した。UV で cAMP のスポットを検出し、試験管にかき取り 50% エタノールで抽出し、その一部を 265m μ で吸光度を測定し、回収率を計算した。他の一部を Bray のシンチレーターを用い液体シンチレーションカウンターで測定し adenylyl cyclase (以下 AC と略) の活性を算定した。蛋白量は Lowry 法で測定した。

測定には生検筋の 0.25M ショ糖によるホモジネートを主に用いた。場合により 1mM の MgCl₂ を含むグリシルグリシン緩衝液 (2mM, pH 7.5) でホモジナイズし、26,000 \times g で 2 回洗浄した顆粒成分を用いた。²⁾

ロ) cAMP の測定は Gilman の方法に準じ、家兔骨格筋より精製した cAMP 結合蛋白を用いて競合反応で測定した。

ハ) その他のパラメーターとしてピルビン酸キナーゼ (PK), 乳酸脱水素酵素 (LDH)

* 神戸大学医学部第三内科

及びそのアイソザイム, CPK, ミオグロビンなどを測定した。

二) 除神経の実験にはウィスター系雄白鼠を用いペントバルビタール麻酔下で一側の坐骨神経を坐骨結節下で1 cm切除したあと経時的変化を観察した。術後1~4週間で白鼠を50~75mg/kgのペントバルビタールソーダの腹腔内投与で麻酔し, 腓腹筋をとり出し, ドライアイスアセトンで冷却したイソペンタンにつけ凍結し秤量後cAMPやPKその他を測定した。

結果及び結論

1) ジストロフィー筋のアデニルサイクレーズ。我々は電顕でSRの拡大のみを示す極めて初期のデュシヤヌ型筋ジストロフィーの腓腹筋のACが正常より低く, 多発性筋炎に比しエピネフリンに対する反応が低下していることを報告したが,²⁾ この場合測定した検体の不均一性, 即ち脂肪浸潤や間質の混在が問題である。例えば次に示す如く脂肪浸潤の著明な福山型の先天性筋ジストロフィー例ではACの基礎値は必ずしも低くなく, グルカゴンやプロスタグラディンE₁ (PGE₁) に対して反応したので脂肪細胞や線維組織の混在によるものであることが推定されたが, これは組織学的所見と対応するものである。正常筋のACはカテコラミンとNaFによってのみ活性化され, 脂肪組織のACはPGE₁で活性化されないことが特徴である。従って培養した線維芽細胞のMakmanらのデータ³⁾より類推して, ジストロフィー筋のPGE₁による活性化は筋の異常よりむしろ混在する線維細胞

に由来するものと考えられる。

単位はpmole cAMP/mg蛋白/15分, 37°C。C: コントロール (基礎値), E: エピネフリン0.1mM, NE: ノルエピネフリン0.1mM, PGE₁: 10⁻⁵M, G: グルカゴン0.1mM, ACTH: 20µg/ml, NaF: 10mM, いずれも最終濃度, 数値は3測定値の平均及び土標準誤差で示してある。

以上のことよりジストロフィー筋のACは基礎値, NaFに対する反応共に低下しているが, 特にEに対する反応の低下が特徴的な所見であると言える。このことよりEの受容体の異常やACの構成成分の異常が筋ジストロフィーに起っていることが推定される。

2) 除神経筋のAMPの変動

最近筋ジストロフィーの成因に神経系が関与することが報告されている。神経切断が支配筋のAC-cAMP系に及ぼす影響をみる目的で白鼠を用い除神経筋のcAMPの変動を他のパラメーターとともに観察した。

腓腹筋のcAMPは除神経前は285±21(14), pmole/g 湿重量 (平均値±標準誤差, ()内は検体数) であり, 坐骨神経切断後2週目で除神経側では307±11(8), 対側では226±15(8)と1%の危険率で有意に除神経側が高くなった。1週目では除神経側324±34(4), 対側262±16(4), 3週目では392±54(6)及び270±25(6), 4週目で281±22(4)及び237±22(4)とそれぞれ除神経側で高値を示したが推計学的に有意ではなかった。同時に測定したPKの比活性 (u/mg 蛋白) は前値が3.59±0.11(7)であり, 1週目では切断側3.08±0.15(5), 対側3.81±0.15(5), 2週目で切断側2.56±0.08(4), 対側3.83±0.16(4), 3週目で切断側2.23±0.11(7), 対側5.17±0.20(7), 4週目で切断側1.74±0.16(5), 対側4.43±0.24(5)と神経切断側で直線的にPKの比活性が低下してゆき, 対側に比べいずれの週でも1%の危険率で有意に低かった。LDHは切断側で2週目より急に低下し, アイソザイムの分析でも赤筋系のサブユニットの占める比率が漸増した。ミオグロビン量も切断側で増加した。CPK

	福山型3才女	D型4才男	6才男	正常筋	正常脂肪
C	675	232	316	300±10	743±121
E	738	275	429	437±22	5957±662
NE	-	-	-	424±12	6442±344
PGE ₁	1161	377	364	334±43	680±118
G	1251	235	-	309±10	6121±335
ACTH	-	-	335	304±6	5843±332
NaF	1347	726	477	807±39	6162±491

は神経切断によっても比活性はあまり変りなかった。即ち神経切断により起る筋の萎縮過程で、腓腹筋(概ね白筋)は白筋の特徴即ち解糖系の優位性を失い(PKの低下),赤筋に類似した所見(LDHのHサブユニットの増加,ミオグロビンの増加)を呈するが,その過程(一種の脱分化とも考えられる変化)で一過性にcAMP濃度の高まる時期がある。

3) 除神経筋のcAMPに及ぼす β 受容体遮断剤の影響。筋のcAMPは血中のカテコラミンレベルによって変動し, β 受容体刺激剤で増加し, β 遮断剤で低下することが知られ我々も確認している。先に述べた除神経2週目のcAMPの上昇が脱神経に伴う現象であるか否かを確認するために,除神経後2週目の白鼠に麻酔10分後にプロプラノロールを体重100g当り0.4mg腹腔内に投与し,15分後に下肢をドライアイスアセトンにつけて凍結後,除神経側と対側の腓腹筋のcAMPを測定したがやはり除神経側が有意に高く,単なるカテコラミンに対する感受性の変化に基くものでないことが明らかになった。

4) 白鼠の発達段階における筋のcAMPの変動。他方発生途上即ち分化の段階で筋のcAMPはどの様に変化するか興味ある問題である。白鼠は生後14日で腹這をはじめ21日で立ち上りその後離乳をして急速に体重を増してゆく。この時期のcAMPを白鼠の下腿筋について測定してみると生後3日では 1.54 ± 0.24 (4)(pmole/mg蛋白),1週 3.68 ± 0.13 (3),2週 26.88 ± 4.67 (5),3週 27.79 ± 6.19 (4)4週

14.09 ± 3.41 (5),5週 4.10 ± 0.42 (6),7週 6.44 ± 1.53 (4)と2~3週で著明にcAMPが上昇しあと成熟ラットの値に近く低下することが判った。2~3週はEngelらの組織化学的検索⁴⁾によると丁度fiber typeの分化の起る時期と一致している。このことと先に示した除神経のデータと合せて考えると,cAMPの変化が筋の分化や脱分化に重要な役割をはたしていることが推定される。

以上要約すると筋ジストロフィーの筋ではadenyl cyclase活性の基礎値や反応,とくにエピネフリンに対する反応の低下が認められる。しかしこの現象が何によって招来されるかは明らかでない。変化が生じる理由の一つとして神経系の異常が考えられるが,白鼠における除神経の実験では,むしろcAMPの増加が認められ,cAMPは筋の分化と関係していることがうかがわれた。今後除神経筋のACの検索を行ない,ジストロフィー筋との異同を一層明らかにしたい。

参考文献

- 1) K. Takahashi, H. Imura et al, Arch. Neurol. 32, 89, 1975
- 2) 高橋桂一, 高井恒夫, 井村裕夫, 臨床化学シンポジウム第13集, 19頁, 1973
- 3) M. H. Makman, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 68, 2127, 1971
- 4) W. K. Engel et al, Develop. Biol. 17, 713, 1968



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



緒論

筋ジストロフィー症患者に糖コルチコイド,例えばプレドニソロン 1mg/kg を静脈内投与すると血清クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK)は2時間より4時間後に一時上昇する.多発性筋炎や他のCPK上昇を示す神経筋疾患,甲状腺機能低下症などでは逆にCPKは低下するか,不変である¹⁾.この現象は一つには本症で筋漿膜及びT-systemあるいはsarcoplasmic reticulumを含めた膜の異常(透過性亢進)があり,他の一つには筋漿酵素蛋白のターンオーバー,特にcatabolismの異常亢進が特徴的であることを示唆する.