

肌強直型肌肉萎縮症

肌強直型肌肉萎縮症介紹 1. 肌強直型肌肉萎縮症分子暨臨床特徵 近年來陸續發現包括癌症、精神病、及遺傳病在內許多人類疾病是因為染色體內不穩定的核酸重複序列發生突變所致。其中由三聯核酸重複序列倍增突變所導致的遺傳疾病有易脆 X 染色體症候群(Fragile X syndrome)、延髓肌萎縮症(Spinal and bulbar muscular atrophy; SBMA)、亨丁頓氏舞蹈症(Huntington's disease; HD)、小腦脊髓幹運動失調症候群(spino-cerebellar ataxias; SCAs)、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症(Dentatorubral pallidolusyan atrophy; DRPLA/Haw River Syndrome; HRS)、Machado-Joseph disease(MJD)、以及肌強直型肌肉萎縮症(Myotonic Dystrophy; DM)等。這些不正常核酸重複序列有些是位於轉譯區(translated region)內，其特徵為基因座內有一段不穩定的 CAG 核酸重複序列倍增突變(expansion mutation)，所造成的神經退化性疾病(neurodegenerative disease)，如：HD、SBMA、SCAI、DRPLA/HRS、MJD。有些則是位於不轉譯區(untranslated region)內，由不穩定的 CTG 或 CGG 核苷酸重複序列倍增突變所造成的肌肉萎縮、智障等另一類遺傳疾病，如：DM、FRAXA。於正常的族群中，也會有核苷酸重複序列的基因出現，並伴隨高度的多形性(polymorphism)。此多形性指的是在正常範圍內，每個人的核酸重複序列的數目不一樣，但是都比造成突變基因的核酸重複序列倍增的數目為低。肌強直型肌肉萎縮症(DM)是一體染色體顯性遺傳(autosomal dominant)、神經肌肉方面疾病。在臨床症狀的表現上主要包括肌肉收縮後不易放鬆、肌肉(臉部、頸部、和四肢)無力及漸進性萎縮等。除此之外，亦可能影響眼睛、腦、皮膚、肺、心臟等器官及內分泌系統而出現白內障、智能障礙、禿頭、肺炎、心臟傳導缺陷、糖尿病、和男性不孕等症狀。造成此一多系統疾病的主要原因係因位於第十九對染色體長臂(19q13.3)上一段 CTG 三聯核酸重複序列，稱之為 *DMI* locus，發生倍增突變所導致。在正常人的染色體內，此段 CTG 核酸重複次數是 5-35 次，而 DM 患者之 CTG 數目則超過 50 次，甚至可達數千次之多。若重複次數在 50-200 次之間，則大多無臨床症狀(asymptomatic carriers)或僅有輕微肌肉無力、白內障等症狀(benign DM)。隨著 CTG 核酸重複次數之增加，DM 患者之臨床症狀也愈加明顯；如超過 200 次以上，則顯現出典型肌強直症神經肌肉的特徵，並伴隨漸進性肌肉無力和四肢末端萎縮。典型的 DM(classic DM)多在成人或成人早期(15~40 歲)開始發病，其 CTG 核酸重複次數絕大多數在 1000 次以下。最嚴重的 DM 型式是先天性的肌強直型肌肉萎縮症(congenital myotonic dystrophy，簡稱 CDM)，其臨床症狀通常在出生前或出生時就已顯現出來，此類患者的 CTG 核酸重複次數大多在 1000 次以上。主要症狀包括低肌張(hypotonia)、呼吸無力、發育遲緩等。所以 CTG 擴張重複序列的長度與患者的發病年齡成反比，而和疾病的嚴重程度成正比，其 $p(\text{CTG})_n$ 的 n 值愈大，通常發病年齡越早，而且發病症狀也越嚴重。

2. 台灣地區肌強直型肌肉萎縮症之盛行率及遺傳特性 DM 是成人肌肉萎縮症中最常出現的一種，在全世界分佈的範圍很廣，然而其發生率有區域性；在日本，發生率約為 1:18000，西歐及北美地區約為 1:8000，而在加拿大魁北克省 Saguenay-Lac-St-Jean 區域則高達 1:475。根據 Ashizawa and Epstein 等人對各大醫院之問卷調查結果顯示，東

南亞地區 DM 的流行率遠比上述區域為低。然而，截至目前為止，在此一區域各個國家，包括台灣在內的 DM 流行率並無確實數字之報告。為建立起本土性強直型肌肉萎縮症的盛行率資料，了解其遺傳特徵，以作為遺傳諮詢和探討致病機轉之依據，我們首先發展 DM 的分子診斷技術。二年前，我們發展出一套 FTA-PCR 分析系統來偵測正常及突變染色體內 CTG 重複序列數目並應用在其他三聯核酸增生疾病之診斷。此外，我們利用正常人、DM 帶原者、及 DM 病人的口腔內膜細胞和羊水細胞作為分析樣本，進一步探討了 FTA-PCR 分析系統在利用不同體細胞作為檢體以進行 DM 分子診斷之可能性。經由和各大醫院的合作，我們希望收集並鑑定本地區有 CTG 倍增突變之 DM 患者。由分析現有台灣地區 DM 家族之臨床症狀、CTG 序列長度、Alu 多型性等資料我們歸納出以下數項遺傳特性：A) CTG 倍增長度大致上與 DM 發病年齡提早及症狀嚴重程度呈正相關。表現出典型 DM 症狀之病人其血液 DNA 內 CTG 序列的長度皆大於 150，長度小於 150 者則多無肌肉方面之臨床症狀。B) 親子代間 CTG 重複序列長度變化(intergenerational CTG length stability)與性別(sex)的關係。基本上，DM 分佈沒有明顯的性別之分。由家族分析我們發現(CTG) n tract 非常不穩定，有 intergenerational expansion，亦有 intergenerational contraction，而這種(CTG) n tract 不穩定性由父親傳給下一代時比母親傳遞時更明顯。此外，我們亦發現一個 premutation case ($40 < (CTG)n < 50$)。此 carrier 有 CTG length heterogeneity 情形，而且其子之 CTG length 長達 1100。顯示 CTG 長度在 50 以下即可能產生 mitotic and meiotic instability。C) 單套型分析(Haplotype analysis)。為研究臺灣地區 DM 的遺傳特性以及 CTG 三聯核酸擴增突變途徑，我們收集了 248 位非 DM 族群人口及 12 個 DM 家族成員之血液和口腔內膜細胞檢體，分析其 DNA 檢體之 CTG 三聯核酸長度和涵蓋八個多型性標誌之單套型。結果顯示臺灣地區(CTG) >19 之 alleles 的比例遠低於日本及歐美地區，而與非洲黑人群類似，表示 DM 之流行率很低。此外，單套型分析結果顯示臺灣地區的 DM 有所謂的 "founder effect"，而且與歐美和日本等地之 DM 係來自同一起源。D) 基因體不安定性調查。為了解 DM patient 基因體內其他 loci CAG/CTG trinucleotide repeat 長度與正常人基因體內之分布是否一致，我們分析並比較四個 disease loci，包括 MJD，SCA8，DRPLA，and AR (androgen receptor)。結果顯示 DM 基因體在 MJD 及 SCA8 loci 之 CAG repeat distribution 明顯偏高，暗示著這些疾病有著某些共同的三聯核酸突變機制。這種基因體不安定性現象顯然亦存在於 idiopathic azoospermia patients，為 in vitro fertilization 提出遺傳上須注意的地方。

3. 肌強直型肌肉萎縮症的致病機轉 DM 基因座 CTG 的擴張突變可能影響至少二個基因，包括 DM protein kinase (DMPK)及 DM locus-associated homeodomain protein (DMAHP，或稱為 Six5)。它們是座落於第十九對染色體的長臂上(19q13.3)相連的二個基因。造成 DM 疾病的 CTG 重複序列倍增突變位於 DMPK 基因的 3'端非轉譯區，此區域亦是 DMAHP 基因的驅動子區域(promoter region)。由於 CTG 重複序列位於這二個基因的不轉譯區內，因此不太可能改變這些基因產物之特性，而可能是透過改變這些基因之轉錄效率以及 RNA 之 processing 和 transportation 來產生影響。就 DMPK 而言，CTG 位於此基因的 3'端非轉譯區內，而 CTG 倍增突變後對 DMPK RNA 及蛋白質濃度之影響，則因實驗材料及方法不同，觀

察到之結果有很大的差異。有報告指出在 classical DM 及 congenital DM 病人 DMPK 的 RNA 及蛋白質濃度皆比正常人低，顯示 CTG 倍增突變直接影響 DMPK 基因的表現。亦有報告指出 DMPK 基因的表現不受 CTG 倍增突變之影響，甚至有轉錄增加的現象。此外，擴增後之(CUG)_n track 可能使得 DMPK RNA 無法被送出核外造成 nuclear retention。最近的研究也顯示(CUG)_n track 會影響 DMPK 的 RNA processing，使得 DMPK mRNA isoform 在核內外的 ratios 發生改變，並進而產生 dominant effect。為探討 DMPK 基因與 DM 疾病之相關性，Reddy 及 Jansen 等人利用 gene knock-out 技術把 DMPK 基因從正常老鼠體內剔除，他們發現這些老鼠有晚發型漸進性肌病(progressive myopathy)產生，但並沒出現白內障，肌強直等典型 DM 症狀，顯示 DMPK 在維持骨骼肌的構造及功能上是必須的，卻不是造成 DM 的唯一關鍵因素。之後，Berul et al. (1999)利用電生理研究發現 DMPK 基因剔除老鼠出現心臟傳導方面問題而且與 gene dosage 有關，這可解釋為何 DM 病人常有心臟傳導不良，甚至因而喪失生命之情形。此外，CTG 的倍增突變會改變臨近區域染色體的構造，造成很強的 Nucleosome Positioning Elements。Nucleosome 是染色體構造的基本單位，由 146 bp DNA 纏繞八個組織蛋白複合體(octamer of histone proteins)而形成，此種構造會抑制轉錄之進行使基因無法表達。由於 nucleosome 形成的效率隨 CTG 的倍增程度而增加，所以 CTG 的倍增突變有可能影響到某些基因(如 DMAHP)之表達而造成肌強直型肌肉萎縮症。Klesert 及 Thornton 等人觀察到 DM 患者肌肉細胞內 DMAHP 之 RNA level 較正常人為低，而且是隨 CTG 倍增程度之增加而降低，雖然並沒有直接證據證明 DMAHP RNA level 之降低係因驅動子活性改變的緣故，他們的結果初步肯定上述說法。由於 DMAHP 是一 homeodomain-encoding gene，其基因產物很有可能是一種與個體發育有關的轉錄因子。利用 b-gal 為 reporter gene 接至 DMAHP 基因驅動子區域之下游而做成 fusion gene，然後以 transgenic mice 當模型，Heath 等人(1997)觀察此 fusion gene 在老鼠胚胎發育過程之表達而發現到 DMAHP 基因之驅動子在 12.5 天的鼠胚胎即活化，而且在多個出現 DM 臨床症狀的器官有活性。雖然他們的結果並不能代表真正 in vivo 的情形，這些觀察也顯示說 DMAHP 是一與個體發育有關的基因，並且 CTG 倍增突變造成 DMAHP 基因表達之不足(haplo-insufficiency)可能與 DM 的多系統臨床症狀(multisystematic symptoms)有關。最近的研究報告證實 DMAHP (or Six5) gene loss 即足以造成白內障。除了對基因之表現有影響之外，最近愈來愈多證據顯示 CTG 倍增使得 DMPK RNA 上 CUG 重複數目增加，因而搶走過多的 CUG-binding protein，造成“gain-of-function mutation”，干擾或破壞其他 CUG-containing RNA 之代謝和運輸。例如，insulin receptor mRNA 之 level 在 DM 病人肌肉內比正常肌肉組織為低。human cardiac troponin (cTNT) RNA 之正常剪接(splicing)在 DM 病人橫紋肌及在表達出含 CUG 序列 RNA 之正常細胞內會被破壞。此二個基因都含有 CTG repeat。近年來，DMPK 及 DMAHP 在 *C. elegans* genome 的同源基因(homologue)，LET-502 and ceh-32，相繼被發現。有趣的是這二個基因，LET-502 與 *C. elegans* 胚胎發育過程中 hypodermal cell shape change 有關而 ceh-32 可能造成 Vab phenotype (notched head)，都似乎和身體肌肉(body muscle)功能沒有直接關係。最近，*C. elegans* 體內一種 CUG-binding protein 稱為 ETR-1 則被發現與肌肉發

育有關，這意味著 DM 之發生可能與此類 CUG tract-binding protein 功能轉變或喪失有密切關係。Mankodi et al. (2000)於九月"Science"雜誌發表研究結果顯示 expanded (CUG)n repeats 會造成基因轉殖老鼠肌強直(myotonia)及肌病變(myopathy)等症狀。這些研究報告或觀察直指肌肉細胞內擴增之 CTG fragment 會造成 DM 一些主要臨床症狀。但是，為何大多數 classical DM patients 的發病年齡在青春期中之後?到底 expanded (CUG)n repeats 影響了那些基因或 RNA 之 metabolism or processing?它們與 development 之間的關係又是如何?在不同物種之間它們的生理功能是否一樣?等等問題仍有待進一步探討。