

201027082A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの

病因・病態の解明と治療法の開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 由起子

平成 23 (2011) 年 5 月

目次

I.	総括研究報告	
	サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの 病因・病態の解明と治療法の開発	1
	林 由起子（（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）	
II.	分担研究報告	
1.	サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィー患者の 遺伝子変異スクリーニングに関する研究	8
	林 由起子（（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）	
2.	サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの 臨床病理学的解析に関する研究	13
	西野 一三（（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）	
3.	サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーで見いだされた 変異遺伝子の機能解析法の確立に関する研究	18
	野口 悟（（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）	
4.	メダカをモデルとしたサルコメア配列異常を主病変とする 筋ジストロフィーに関する研究	22
	三橋 弘明（（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）	
5.	エレクトロポレーション法を用いたサルコメア配列異常を主病変とする 筋ジストロフィーに関する研究	25
	毛塚 悦子（（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）	
6.	サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの 細胞生物学的解析に関する研究	28
	松田 知栄（独立行政法人産業技術総合研究所）	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	31
IV.	研究成果の刊行物・別刷	32

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
総括研究報告書

サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの病因・病態の解明と治療法の開発

研究代表者 林 由起子 （独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 室長

研究要旨 本研究はサルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーである筋原線維性ミオパチー(MFM)について、本邦における臨床病理学的特徴を明らかにすることを目的としている。我々は、日本人 MFM 107 家系について既知の7疾患関連遺伝子の変異スクリーニングを完了し、本邦における各原因遺伝子の変異頻度、ならびに臨床病理学的特徴を明らかにした。また、約70%にのぼる変異未同定例については、新規疾患候補遺伝子の変異解析を進めている。新たに同定した遺伝子変異の病態への関与を効率よく検証する方法として、*MYOT*変異を用いた *in vivo* エレクトロポレーション法の有用性を示した。さらに変異メダカの解析により、サルコメア構造の維持におけるフィラミン C の重要性を明らかにした。

研究分担者

西野 一三

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部 部長

野口 悟

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部 室長

三橋弘明

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部
流動研究員

毛塚悦子

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部
流動研究員

松田 知栄

独立行政法人 産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門 脳遺伝子研究グループ
主任研究員

A. 研究目的

サルコミアは横紋筋の基本収縮構造単位である。近年、サルコミアの配列の乱れを主病変とし、細胞内異常タンパク質の蓄積を伴う筋ジストロフィーとして筋原線維性ミオパチー(myofibrillar myopathy: MFM)が注目を集めている。MFMの発症年齢や臨床症状はきわめて多彩で、肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)や遠位型ミオパチーなどと診断されることが多い。しばしば嚥下、呼吸、心、末梢神経障害も合併する。本研究では、MFMの病因・病態解明を進めることを目的に研究を進めた。

B. 研究方法

(独)国立精神・神経医療研究センターの保管する骨格筋レポジトリを活用し、サルコミア配列の異常を主病理変化とする本邦107家系を抽出し、MFMの既知原因遺伝子 *DES*, *CRYAB*, *MYOT*, *ZASP*, *FLNC*, *BAG3*, および類縁疾患である *FHL1* の変異スクリーニングを行った。変異の見いだされた症例については詳細な臨床病理解析を行った。また、モデル動物を用いた効果的な変異遺伝子の機能解析法の確立を目指し、マウスを用いたエレクトロポレーション法を用いた方法の確立を図った。さらに *FLNC* に変異を有するメダカの発生・発育、病理解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究において使用した全てのヒト検体

は、いずれも疾患の確定診断のために病理学的、生化学的、免疫学的ならびに遺伝子レベルの解析が必要であり、かつ患者および家族もこれを希望し、患者および家族の了解を得た上で採取された組織(生検・剖検筋、皮膚、血球など)を用いて得られたものであり、かつ、(独)国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究使用に対する検体の使用許可(インフォームドコンセント)を得たものである。遺伝子解析に関しては「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」を遵守した上で、施行されたものである。これらの情報を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用した。

またすべての動物実験は、(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従い行い、(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所動物実験管理委員会の審査・承認を得た。研究に使用する際には、必要最小限度の動物を使用するとともに、動物に苦痛を与えないよう最大限の注意を払った。すべての組み換えDNA実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所組み換えDNA実験安全委員会の審査・承認を得た。

C. 研究結果

サルコメア配列の異常を主病理変化とする日本人患者、計107家系について、既知の疾患関連7遺伝子の変異スクリーニングを終了した。その結果、*DES*、*ZASP*、*FLNC*、*FHL1*各6例、*MYOT*4例、*BAG3*2例に変異を見出したが、*CRYAB*変異例は1例もいなかった。変異の見出された症例については、臨床病理学的解析をすることによって、各変異遺伝子による特徴をあきらかにした。一方、広範な変異スクリーニングにもかかわらず変異の見出されない症例は約70%に達した。

既知原因遺伝子解析結果 (107家系)

	Japanese (%)	USA (%)
<i>DES</i>	6 (3)	6
<i>CRYAB</i>	0	3
<i>ZASP</i>	6	15
<i>MYOT</i>	4	10
<i>FLNC</i>	(6)	3
<i>BAG3</i>	(2)	6
<i>FHL1</i>	6	
Unknown	70	67

(): 新規変異

一方モデル動物を用いた病態機序の解明では、エレクトロポレーション法を用いて野生型及び変異型タンパク質をマウス骨格筋に導入・解析することにより、ヒトミオティリノパチー骨格筋で認められるものと同様の筋病理変化を再現しうることを明らかにした (論文投稿準備中)。また、*FLNC* 変異メダカを用いた解析から、フィラミンCの骨格筋及び心筋のサルコメア構造維持における重要性を明らかにした。

D. 考察

本邦 MFM 患者の変異スクリーニングを終了し、各遺伝子変異の頻度はこれまで報告されている米国のそれとは頻度が異なることを明らかにした。一方、今回同定した変異の約半数は、新規変異であることから、今後、各変異について病態との具体的関連を明らかにしていく必要がある。さらに臨床病理学的解析を統合すると、MFM は臨床的、病理学的、遺伝学的に極めて多彩な疾患群であることをあらためて裏付ける結果となり、原因遺伝子を臨床病理学的所見から推測することは、現時点では困難であることも明らかとなった。

同定した遺伝子変異と病態との関連を明らかにする方法として、培養細胞への発現系とエレクトロポレーション法を用いた変異遺伝子導入法を試みた。その結果、両者ともに、ヒト疾患筋で認められる変化を再現しうる有効な方法ではあるが、候補遺伝子産物の特性を考慮し、細かく条件を変化させることによって、高率的に病態との関連を明らかにする必要があるものと考えられた。

E. 結論

MFMは近年増加傾向にある疾患であり、発症年齢や臨床症状、筋病理所見も多彩であることから、効率よく診断することは重要である。モデル動物を活用し、今後もMFMの病院・病態を明らかにすべく、研究を進めていく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology. *Acta Neuropathol* 119: 481-486, Apr, 2010.

Yamazaki Y, Kamei Y, Sugita S, Akaike F, Kanai S, Miura S, Hirata Y, Troen BR, Kitamura T, Nishino I, Suganami T, Ezaki O, Ogawa Y: The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle. *Biochem J* 427: 171-178, Apr, 2010.

Mitsuhashi H, Hayashi YK, Matsuda C, Noguchi S, Nishino I: Specific phosphorylation on Ser 458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. *J Cell Sci* 123: 3893-3900, Nov, 2010.

Liang WC, Nishino I: Lipid Storage Myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11: 97-103, Feb, 2011.

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi

YK: TMEM43 Mutations in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy. *Ann Neurol*, 2011 (Epub ahead of print).

2. 学会発表

林由起子: 二次性カベオリン欠損症の新規原因遺伝子同定とその臨床病態についての検討. 第107回日本内科学会講演会, 東京, 4.9, 2010.

林由起子: PTRF 欠損症の臨床病態に関する研究. 第51回日本神経学会総会, 東京, 5.20, 2010.

三橋里美, 畠山英之, 唐橋美奈子, 幸村知子, 野口 悟, 林由起子, 埜中征哉, 中川靖一, 後藤雄一, 西野一三: rmd マウスにおけるミトコンドリア巨大化機構の解明. 第51回日本神経学会総会, 東京, 5.20, 2010.

三橋弘明, 藤田深里, 安田裕隆, 林由起子, 野口 悟, 埜中征哉, 川上厚志, 工藤 明, 西野一三: 心筋・骨格筋に異常を示すメダカ変異体 *zacro* の解析. 第16回小型魚類研究会, 埼玉, 9.18, 2010.

林由起子: PTRF 欠損症の頻度並びに臨床病態. 第55回人類遺伝学会, 埼玉, 10.29, 2010.

三橋弘明, 林由起子, 松田知栄, 野口 悟,

若月修二, 荒木敏之, 西野一三: 筋ジストロフィー患者に特異的な A 型ラミン Ser458 のリン酸化. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12.7, 2010.

Nishino I: Recent advance in congenital muscular dystrophy. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research & 51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, 4.17, 2010.

Hayashi YK: Molecular diagnosis by long range PCR. Best Practice Meeting Molecular Diagnosis of FSHD, Leiden, the Netherlands, 6.9, 2010.

Shalaby S, Quinzii CM, Hayashi YK, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Hirano M, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy, rigid spine and myofibrillar myopathy. 20th Meeting of the European-Neurological-Society, Berlin, Germany, 6.19-23, 2010.

Hayashi YK, Matsuda C, Nonaka I, Nishino I: Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. World Federation of Neurology, XII International Congress on

Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.18, 2010.

Matsuda C, Kameyama K, Takeshima H, Nishino I, Hayashi YK: Dysferlin C2A domain is important for association with MG53 (TRIM72). World Federation of Neurology, XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.18, 2010.

Nishino I: State of the art in muscle lipid diseases. World Federation of Neurology, XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.19, 2010.

Liang WC, Hayashi YK, Park YE, Mitsuhashi H, Arimura T, Bonne G, Noguchi S, Nishino I: Characterization of $Emd^{-/-}/Lmna^{H222P/H222P}$ mice: focus on the heart. World Federation of Neurology, XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.19, 2010.

Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Noguchi S, Nishino I: Expression of cavin family members in skeletal muscle. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: In vivo electroporation is an effective method to reproduce pathological changes in myofibrillar myopathy. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Mitsuhashi H, Fujita M, Yasuta H, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Kawakami A, Kudo A, Nishino I: Filamin C is required for the maintenance of sarcomere structure in medaka. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Tsuburaya R, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: High nonspecific esterase activity may be a good marker for vascular involvement in inflammatory myopathies. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Genetic, clinical, and pathological features of congenital fiber type disproportion in Japan. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto,

Japan, 10.13, 2010.

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy-like patients cause dysfunctions of a nuclear membrane protein, LUMA. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010.

Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Mitsuhashi H, Goto K, Koksal B, Kale G, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H, Nishino I: A novel congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010.

Nishino I: RYR1 gene mutation in congenital myopathies. NCNP International Symposium CONGENITAL MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23, 2010.

Hayashi YK, Shalaby S, Xiao X, Goto K, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: FHL1 gene mutation in congenital myopathies. NCNP International Symposium CONGENITAL MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23, 2010.

Tominaga K, Tsuburaya R, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Congenital myopathy with extreme muscle immaturity. NCNP International Symposium CONGENITAL MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23, 2010.

Mitsuhashi H, Fujita M, Yasuta H, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Noguchi S, Nonaka I, Kawakami A, Kudo A, Nishino I: Filamin C is required for the maintenance of sarcomere structure in medaka. NCNP International Symposium CONGENITAL MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23, 2010.

Mitsuhashi S, Hatakeyama H, Nonaka I, Sher R, Cox G, Goto Y, Nishino I: Mitochondrial dysfunction and mitophagy in muscle choline kinase beta defect. The 7th conference of Asian

society for mitochondrial research and medicine (ASMRM) And The 10th conference of Japanese society of mitochondrial research and medicine (J-mit). Fukuoka, Japan, 12.18, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
分担研究報告書

サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィー患者の遺伝子変異スクリーニング
に関する研究

研究代表者 林 由起子（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 室長

研究要旨 筋病理学的にサルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィー計 107 家系について、既知の 7 疾患関連遺伝子 (*DES*, *CRYAB*, *MYOT*, *ZASP*, *FLNC*, *BAG3*, *FHL1*) の変異スクリーニングを終了し、本邦における各遺伝子変異の頻度を明らかにした。その結果、約 70% では、既知の遺伝子に変異は認められず、新規の原因候補遺伝子ならびに多彩な臨床症状を引き起こす修飾因子の同定が必須であることが明らかとなった。

A. 研究目的

サルコメアの配列の乱れを主病変とし、細胞内異常タンパク質の蓄積を伴う筋ジストロフィー (myofibrillar myopathy: MFM) について、新規に 19 家系を加え、計 107 家系について既知、ならびに新規疾患候補遺伝子の変異スクリーニングを行い、本邦における分子遺伝学的特徴を明らかにする。

B. 研究方法

MFM の既知原因遺伝子 *DES*, *CRYAB*, *MYOT*, *ZASP*, *FLNC*, *BAG3* について、末梢血あるいは骨格筋から抽出したゲノム DNA を用いた変異スクリーニングを行った。各遺伝子の全コーディングエクソンならびにエクソン-イントロン境界領域について直接シーケンス法を用いて変異解析

を行った。未知の変異が見いだされた症例については、正常コントロール 50 人の DNA を用いたコントロール実験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究において使用した全てのヒト検体は、いずれも疾患の確定診断のために病理学的、生化学的、免疫学的ならびに遺伝子レベルの解析が必要であり、かつ患者および家族もこれを希望し、患者および家族の了解を得た上で採取された組織（生検・剖検筋、皮膚、血球など）を用いて得られたものであり、かつ、(独) 国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会で承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究使用に対する検体の使用許可（インフォームドコンセント）を得たものである。遺伝子解析に

関しては「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」を遵守した上で、施行されたものである。これらの情報を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用した。

C. 研究結果

今年度は、既知疾患関連遺伝子の変異解析を終了した。その結果、*DES*、*ZASP*、*FLNC* 各6例、*MYOT*4例、*BAG3*2例に変異を見出したが、このうちの約半数は新規の遺伝子変異であった。*CRYAB* 変異例は認められなかった。また、類縁疾患である *FHL1* 変異も6例で認められた。

D. 考察

我々の MFM 患者変異スクリーニングの結果では、各遺伝子変異の頻度はこれまで報告されている米国のそれとは若干異なっていたが、変異の認められない症例が 70% 以上存在することから、新規疾患関連遺伝子候補の同定及びその変異解析が急務である。また、新規の変異に関しては、病態との具体的な関連を明らかにしていく必要がある。

E. 結論

MFMの既知疾患関連遺伝子変異のスクリーニングを終了し、本邦における頻度を明らかにしたが、約半数の変異は新規の変異であること、約7割の症例には変異が見出されなかった点など、更なる検討が必要で

ある。MFMは近年増加傾向にある疾患であり、発症年齢や臨床症状も多彩であることから、新規原因遺伝子の探索とともにその修飾因子の同定は重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology. *Acta Neuropathol* 119: 481-486, Apr, 2010.

Mitsuhashi H, Hayashi YK, Matsuda C, Noguchi S, Nishino I: Specific phosphorylation on Ser 458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. *J Cell Sci* 123: 3893-3900, Nov, 2010.

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 Mutations in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy. *Ann Neurol*, 2011 (Epub ahead of print).

2. 学会発表

林由起子：二次性カベオリン欠損症の新規原因遺伝子同定とその臨床病態についての検討。第107回日本内科学会講演会，東京，4.9, 2010.

林由起子：PTRF 欠損症の臨床病態に関する研究. 第 51 回日本神経学会総会, 東京, 5.20, 2010.

三橋里美, 畠山英之, 唐橋美奈子, 幸村知子, 野口 悟, 林由起子, 埜中征哉, 中川靖一, 後藤雄一, 西野一三：rmd マウスにおけるミトコンドリア巨大化機構の解明. 第 51 回日本神経学会総会, 東京, 5.20, 2010.

三橋弘明, 藤田深里, 安田裕隆, 林由起子, 野口 悟, 埜中征哉, 川上厚志, 工藤 明, 西野一三：心筋・骨格筋に異常を示すメダカ変異体 *zacro* の解析. 第 16 回小型魚類研究会, 埼玉, 9.18, 2010.

林由起子：PTRF 欠損症の頻度並びに臨床病態. 第 55 回人類遺伝学会, 埼玉, 10.29, 2010.

三橋弘明, 林由起子, 松田知栄, 野口 悟, 若月修二, 荒木敏之, 西野一三：筋ジストロフィー患者に特異的な A 型ラミン Ser458 のリン酸化. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12.7, 2010.

Hayashi YK: Molecular diagnosis by long range PCR. Best Practice Meeting Molecular Diagnosis of FSHD, Leiden, the Netherlands, 6.9, 2010.

Shalaby S, Quinzii CM, Hayashi YK, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Hirano M, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy, rigid spine and myofibrillar myopathy. 20th Meeting of the European Neurological Society, Berlin, Germany, 6.19-23, 2010.

Matsuda C, Kameyama K, Takeshima H, Nishino I, Hayashi YK: Dysferlin C2A domain is important for association with MG53 (TRIM72). World Federation of Neurology, XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.18, 2010.

Hayashi YK, Matsuda C, Nonaka I, Nishino I: Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. World Federation of Neurology, XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.18, 2010.

Liang WC, Hayashi YK, Park YE, Mitsuhashi H, Arimura T, Bonne G, Noguchi S, Nishino I: Characterization of *Emd^{-/-}/Lmna^{H222P/H222P}* mice: focus on the heart. World Federation of Neurology, XII International Congress on

Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.19, 2010.

Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Noguchi S, Nishino I: Expression of cavin family members in skeletal muscle. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: In vivo electroporation is an effective method to reproduce pathological changes in myofibrillar myopathy. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Mitsuhashi H, Fujita M, Yasuta H, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Kawakami A, Kudo A, Nishino I: Filamin C is required for the maintenance of sarcomere structure in medaka. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Tsuburaya R, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: High nonspecific esterase activity may be a good marker for vascular involvement in inflammatory myopathies. 15th International Congress

of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Genetic, clinical, and pathological features of congenital fiber type disproportion in Japan. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy-like patients cause dysfunctions of a nuclear membrane protein, LUMA. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010.

Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Mitsuhashi H, Goto K, Koksal B, Kale G, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H, Nishino I: A novel congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. 15th International Congress of the World

Muscle Society (WMS), Kumamoto,
Japan, 10.14, 2010.

Hayashi YK, Shalaby S, Xiao X, Goto K,
Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: FHL1
gene mutation in congenital myopathies.
NCNP International Symposium
CONGENITAL MYOPATHIES:
PATHOGENESIS AND MANAGEMENT,
Kodaira, Japan, 10.23, 2010.

Tominaga K, Tsuburaya R, Hayashi YK,
Nonaka I, Nishino I: Congenital
myopathy with extreme muscle
immaturity. NCNP International
Symposium CONGENITAL
MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND
MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23,
2010.

Mitsuhashi H, Fujita M, Yasuta H,
Hayashi YK, Mitsuhashi S, Noguchi S,
Nonaka I, Kawakami A, Kudo A, Nishino
I: Filamin C is required for the
maintenance of sarcomere structure in
medaka. NCNP International
Symposium CONGENITAL
MYOPATHIES: PATHOGENESIS AND
MANAGEMENT, Kodaira, Japan, 10.23,
2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
分担研究報告書

サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーの臨床病理学的解析に関する研究

研究分担者 西野 一三 （独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 部長

研究要旨 サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーである筋原線維性ミオパチーについて、本邦における本疾患の臨床病理学的特徴をあきらかにする目的で、（独）国立精神・神経医療研究センターヒト骨格筋レポジトリーのうち、新たに 19 家系を加えた計 107 家系の筋病理学的に本疾患が疑われる症例について、筋病理学的解析を行った。

A. 研究目的

筋原線維性ミオパチー患者の筋病理学的特徴を明らかにするとともに、変異を同定しえた例についての臨床的解析を行う。

B. 研究方法

（独）国立精神・神経医療研究センターで保管されている 1 万 2 千検体以上のヒト骨格筋レポジトリーから、筋原線維性ミオパチーの可能性のある症例を抽出し、一般組織化学法、免疫組織化学法、イムノプロット法を用いて組織学的解析を行った。また、変異を同定しえた症例については、臨床的特徴を明らかにした。

（倫理面への配慮）

本研究において使用した全てのヒト検体は、いずれも疾患の確定診断のために病理学的、生化学的、免疫学的ならびに遺伝子

レベルの解析が必要であり、かつ患者および家族もこれを希望し、患者および家族の了解を得た上で採取された組織（生検・剖検筋、皮膚、血球など）を用いて得られたものであり、かつ、（独）国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会で承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究使用に対する検体の使用許可（インフォームドコンセント）を得たものである。遺伝子解析に関しては「ヒトゲノム解析に関する共通指針」を遵守した上で、施行されたものである。これらの情報を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用した。

C. 研究結果

昨年より新たに本疾患の疑われた 19 家系を加え、サルコメア配列の異常を主病理変化とする日本人患者、計 107 家系について、

一般組織染色をおこない、その結果を集積している。新たに変異を見いだした骨格筋組織については、免疫組織化学法を用いて、蓄積タンパク質の解析を行った。

その結果、同じ*MYOT* 遺伝子の変異であっても、変異部位により、筋病理所見が著しく異なり、好発部位であるエクソン2の変異例では、強い筋原線維の配列の乱れと多くの細胞内封入体が形成されるのに対し、エクソン9の変異では臨床的重症度に明らかに差がないにもかかわらず、筋病理変化は軽度であることが明らかになった。また、本邦の*MYOT* 変異例はいずれも近位筋優位の筋力低下を示す肢帯型筋ジストロフィー1A型の範疇に入るものであった。*DES* 変異例では全例で心症状を来しており、心筋症が主症状である症例も多いことが明らかになった。また、*FLNC* 変異例でも心筋症の合併が目立った。*BAG3* 変異例は、他の原因遺伝子によるものと異なり、小児期早期に発症し、進行性のミオパチーを呈する。我々の見出した1例は、小児進行性の重症ミオパチーであったが、一例の新規変異例は、成人発症であり、*BAG3* 変異例の臨床的多様性が示唆された。

D. 考察

MFМ患者骨格筋では、同じ遺伝子の変異であっても、変異部位により筋病理所見が著しく異なる場合があり、筋病理変化のみから原因遺伝子を推測することは困難であることが示唆された。また、臨床的にも、

心症状の他、末梢神経障害、呼吸障害、顔面筋罹患など、きわめて多彩であり、なんらかの効率的な診断方法の開発が必要であると考えられた。

E. 結論

MFМ患者骨格筋の変異遺伝子の違いによる臨床的、筋病理学的特徴の一端を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology. *Acta Neuropathol* 119: 481-486, Apr, 2010.

Yamazaki Y, Kamei Y, Sugita S, Akaike F, Kanai S, Miura S, Hirata Y, Troen BR, Kitamura T, Nishino I, Suganami T, Ezaki O, Ogawa Y: The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle. *Biochem J* 427: 171-178, Apr, 2010.

Mitsuhashi H, Hayashi YK, Matsuda C, Noguchi S, Nishino I: Specific phosphorylation on Ser 458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. *J Cell Sci* 123: 3893-3900, Nov, 2010.

Liang WC, Nishino I: Lipid Storage Myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11: 97-103, Feb, 2011.

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 Mutations in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy. *Ann Neurol*, 2011 (Epub ahead of print).

2. 学会発表

三橋里美, 畠山英之, 唐橋美奈子, 幸村知子, 野口 悟, 林由起子, 埜中征哉, 中川靖一, 後藤雄一, 西野一三: rmd マウスにおけるミトコンドリア巨大化機構の解明. 第 51 回日本神経学会総会, 東京, 5.20, 2010.

三橋弘明, 藤田深里, 安田裕隆, 林由起子, 野口 悟, 埜中征哉, 川上厚志, 工藤 明, 西野一三: 心筋・骨格筋に異常を示すメダカ変異体 *zacro* の解析. 第 16 回小型魚類研究会, 埼玉, 9.18, 2010.

三橋弘明, 林由起子, 松田知栄, 野口 悟, 若月修二, 荒木敏之, 西野一三: 筋ジストロフィー患者に特異的な A 型ラミン Ser458 のリン酸化. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12.7, 2010.

Nishino I: Recent advance in congenital muscular dystrophy. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research &

51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, 4.17, 2010.

Shalaby S, Quinzii CM, Hayashi YK, Goto K, Nonaka I, Noguchi S, Hirano M, Nishino I: Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy, rigid spine and myofibrillar myopathy. 20th Meeting of the European-Neurological-Society, Berlin, Germany, 6.19-23, 2010.

Matsuda C, Kameyama K, Takeshima H, Nishino I, Hayashi YK: Dysferlin C2A domain is important for association with MG53 (TRIM72). World Federation of Neurology, XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.18, 2010.

Hayashi YK, Matsuda C, Nonaka I, Nishino I: Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. World Federation of Neurology, XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.18, 2010.

Nishino I: State of the art in muscle lipid diseases. World Federation of Neurology, XII International Congress on

Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.19, 2010.

Liang WC, Hayashi YK, Park YE, Mitsuhashi H, Arimura T, Bonne G, Noguchi S, Nishino I: Characterization of Emd^{-/-}/Lmna^{H222P/H222P} mice: focus on the heart. World Federation of Neurology, XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 7.19, 2010.

Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Noguchi S, Nishino I: Expression of cavin family members in skeletal muscle. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: In vivo electroporation is an effective method to reproduce pathological changes in myofibrillar myopathy. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Mitsuhashi H, Fujita M, Yasuta H, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Kawakami A, Kudo A, Nishino I: Filamin C is required for the maintenance of sarcomere structure in medaka. 15th

International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Tsuburaya R, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: High nonspecific esterase activity may be a good marker for vascular involvement in inflammatory myopathies. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Genetic, clinical, and pathological features of congenital fiber type disproportion in Japan. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.

Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy-like patients cause dysfunctions of a nuclear membrane protein, LUMA. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.14, 2010.

Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C,