

201122014A

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

総括・分担研究報告書

平成 23 年度

研究代表者 林 由起子

平成 24 (2012) 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（独立行政法人 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（独立行政法人 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	14
	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）	
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	20
	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）	
4.	<i>In vivo</i> 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	24
	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）	
5.	メダカを用いた筋原線維性ミオパチーの病態解明	27
	大久 敬（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）	
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	29
	松田 知栄（独立行政法人 産業技術総合研究所）	
7.	Nebulin ファミリーの異常を病因とした筋疾患の分子病理学的解析	31
	高橋 和儀（国立大学法人 千葉大学）	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV	研究成果の刊行物・別刷	37

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 サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィー(MFM)の病因・病態を明らかにする目的で、本邦 129 家系について計 16 遺伝子におよぶ大規模スクリーニングを行った。その結果、新規疾患原因遺伝子と考えられる遺伝子も含め、約半数に遺伝子変化が認められた。既知疾患原因遺伝子については、原因遺伝子ごとの臨床病理学的解析を行い、それぞれの特徴を明らかにした。特に今年度は本邦で初めて見いだされた VCP 変異 7 家系を中心に臨床病理学的解析を行った。また数多く見いだされた新規変異候補に対しては、病態との関連を明らかにするために、細胞生物学的解析ならびにモデル動物を使った解析を行った。その結果、エレクトロポレーション法を用いたマウス骨格筋への変異遺伝子発現は、ヒト病理変化を効率よく再現でき、効果的な方法であることを明らかにした。

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 疾病研究第一部 部長

野口 悟

(独) 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

毛塚悦子

(独) 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

大久 敬

(独) 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) 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

高野和儀

国立大学法人 千葉大学大学院融合科学研究科 分子細胞生物学 助教

A. 研究目的

横紋筋の基本収縮構造単位であるサルコメアの配列の乱れを主病変とし、細胞内に

タンパク質の異常蓄積を伴う筋ジストロフィー（筋原線維性ミオパチー；MFM）について、その病因・病態を明らかにすることを

目的とする。これまでに MFM の原因遺伝子として6 遺伝子が報告されているが、昨年度までの研究で、既知遺伝子に変異の見いだされる本邦患者はごく一部に過ぎないことを明らかにしている。今年度は新規疾患関連遺伝子の探索を進め、MFM の全体像を把握するとともに、各遺伝子変異による疾患病態についても詳細な検討を進めることを目的とした。

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ーを活用し、サルコメア配列の異常を主病理変化とする本邦ミオパチ一家系を 129 家系、および Z 線形成不全が病態と深く関わっていると考えられる原因不明のネマリンミオパチ 30 例を抽出し、MFM の既知 6 原因遺伝子 *DES*、*CRYAB*、*MYOT*、*ZASP*、*FLNC*、*BAG3* の変異スクリーニングを行い、遺伝子毎の臨床病理学的特徴を明らかにした。また、MFM の病態と密接に関連する Z 線関連タンパク質を中心とした新規 10 遺伝子についても、大規模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、臨床症状の検討、免疫組織化学法や電子顕微鏡観察などを含めた詳細な筋病理学的解析を行った。見いだした変異が新規である場合は、細胞での発現実験、マウスを用いたエレクトロポレーション法、ならびに変異遺伝子発現メダカの作製を行った。また原因遺伝子産物について、その結合タンパク質との相互作用について生化学的に検討し、病態への関与について検討した。

(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。

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様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

1) 変異スクリーニング

本邦MFM129家系について既知 6 遺伝子について変異スクリーニングを行った結果、計22例 (17.1%) でのみ変異を見出した。遺伝子毎の臨床病理学的特徴について解析を行った。

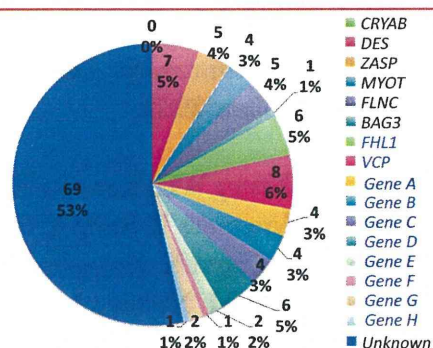
さらに関連遺伝子と考えられる *FHL1*、*VCP*などを含む10遺伝子解析の結果、MFM 家系の計47%で変異が見いだされた。このうち、これまでに本邦で報告のなかった *VCP*の変異例を7家系見いだした。*VCP*変異例はいずれもMFMの病理所見に加え、神経

臨床症状

	DES	CRYAB	ZASP	MYOT	FLNC	BAG3
遺伝形式	AD/AR	AD	AD	AD	AD	AD
本邦の頻度	5%	0%	4%	3%	4%	1%
米国の頻度	6%	3%	15%	10%	3%	6%
発症年齢	6-60代	30-50代	60代	42-77才	1-57才	0-67才
障害筋分布	遠位, 近位 顔面, 咽頭	近位>遠位 咽頭	近位, 遠位	近位, 遠位	近位>遠位	四肢, 体幹 背椎強直
呼吸障害	あり	あり	なし	あり	あり	あり
心症状	頻発, 不整脈	あり	なし	頻発	あり	あり
末梢神経障害	あり	あり	あり	あり	あり	あり
白内障	なし	あり	なし	なし	なし	なし
血清CK	正常~軽度上昇					

原性変化を合併しており、核内、および細胞内凝集体を特徴とした。また、新たに解析し、変異の見いだされた7遺伝子は新規疾患関連遺伝子と考えられ、病態との関連について検討を進めた。

疾患関連候補遺伝子解析結果 (129家系)



2) 新規変異と病態との関連

変異スクリーニングの結果、複数の新規遺伝子変化を同定した。日本人コントロール100人で同じ変化が見いだされないこと、データベースでの登録のないことを確認後、変異体を培養細胞、マウス骨格筋、およびメダカ受精卵に発現させ、その変化を観察した。培養細胞での細胞内凝集体の形成は、DES変異体では高率に再現できたが、BAG3やMYOT変異体では凝集体を形成しない変異が多く認められた。一方、マウス骨格筋へのエレクトロポレーション法は高率にヒト骨格筋で見いだされる筋病理変化を再現でき、スクリーニングに有用な方法であることが示唆された。変異体発現メダカも順調に解析を進め、さまざまな表現型

や筋病理変化を見いだすことが可能であった。現在電子顕微鏡的観察も加え、新規遺伝子変化と疾患との関連について、さらなる解析をすすめている。また新規疾患関連遺伝子Eの変異体については、免疫沈降法の結果、結合タンパク質である α アクチニンとの結合能に変化が認められることが明らかとなった。

3) アクチン重合とミオパチー

Z線形成不全が病態と深く関わっていると考えられるネマリンミオパチー30例について、その原因遺伝子の1つであるNebulinのC端側の欠損例は見いだされなかったが、タンパク量の減少しているものが5例見いだされた。またnebulin結合タンパク質であるN-WASPはネマリン小体には局在していないことを明らかにした。

D. 考察

本邦MFMM患者では、既知疾患原因遺伝子に変異の認められる例が少なく、その全体像の把握には、新たな原因遺伝子の同定が必要である。また、新たに見いだした遺伝子変化の疾患との関連については、複数の手法を用いた解析が必要となる。サルコメアの構造と機能を理解し、治療法の開発を進める上で、更なる検討が不可欠であると考えられる。

E. 結論

本邦MFMM129家系の臨床病理学的、分子遺伝学的解析を行った。その結果、17%には既知遺伝子の変異が同定され、30%には新規疾患関連遺伝子に変化が見いだされた。新規遺伝子変異に関しては、それぞれについて病態との直接の関連を検討している。しかしながら、MFMMの半数は原因すら明らかでなく、今後、新たな手法を用いた解析が必要であると考えられる。さらにまた、

筋原線維形成に重要な役割を担っていると考えられるnebulinについても解析を進めており、サルコメアの構築および機能維持に関する多角的な解析を継続していく予定である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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*. 69(6): 1005-1013, Jun, 2011.

Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Quinlivan R, Sewry C, Mitsuhashi H, Goto K, Koksal B, Kale G, Ikeda K, Taguchi R, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H, Nishino I: A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. *Am J Hum Genet*. 88(6): 845-851, Jun, 2011.

Senju Y, Itoh Y, Takano K, Hamada S, Suetsugu S: Essential roles of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *J. Cell Sci* 124: 2032-2040, Jun, 2011.

Komaki H, Hayashi YK, Tsuburaya R, Sugie K, Kato M, Nagai T, Imataka G, Suzuki S, Saitoh S, Asahina N, Honke K, Higuchi Y, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nonaka I, Nishino I: Inflammatory changes in

infantile-onset *LMNA*-associated myopathy. *Neuromuscul Disord*. 21(8): 563-568, Aug, 2011.

Mitsuhashi S, Hatakeyama H, Karahashi M, Koumura T, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S, Sher RB, Nakagawa Y, Manfredi G, Goto YI, Cox GA, Nishino I: Muscle choline kinase beta defect causes mitochondrial dysfunction and increased mitophagy. *Hum Mol Genet*. 20(19): 3841-3851, Oct, 2011.

Fujita M, Mitsuhashi H, Isogai S, Nakata T, Kawakami A, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I, Kudo A: Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant zacro. *Dev Biol*. 361(1): 79-89, Jan, 2012.

Sukigara S, Liang WC, Komaki H, Fukuda T, Miyamoto T, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Hayashi YK, Sugie H, Sasaki M, Nishino I: Muscle glycogen storage disease 0 presenting recurrent syncope with weakness and myalgia. *Neuromuscul Disord*. 22(2): 162-165, Feb, 2012.

Shi Z, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Goto K, Kaneda D, Choi YC, Toyoda C, Hieda S, Kamiyama T, Sato H, Wada M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Characterization of the Asian myopathy patients with *VCP* mutations. *Eur J Neurol*. 19(3): 501-509, Mar, 2012.

Furusawa Y, Mori-Yoshimura M, Yamamoto T, Sakamoto C, Wakita M, Kobayashi Y, Fukumoto Y, Oya Y, Fukuda T, Sugie H, Hayashi YK, Nishino I, Nonaka I, Murata M: Effects of enzyme replacement therapy on five patients

with advanced late-onset glycogen storage disease type II: a 2-year follow-up study. *J Inherit Metab Dis*. 35(2): 301-310, Mar, 2012.

Suzuki N, Aoki M, Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Increase in number of sporadic inclusion body myositis (sIBM) in Japan. *J Neurol*. 259(3): 554-556, Mar, 2012.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: *In Vivo* Characterization of Mutant Myotilins. *Am J Pathol*. Epub Feb 18, 2012.

圓谷理恵, 西野一三: 心筋症をきたす筋疾患. 病理と臨床 循環器病理 I 1. 心筋疾患 話題の心筋症. 29: 154-158, Apr, 2011.

林由起子: 新たな肢帯型筋ジストロフィー. 生体の科学 特集 筋ジストロフィーの分子病態から治療へ. 62(2): 100-102, Apr, 2011.

佐藤孝俊, 西野一三: Dystrophin 解説編. 病理と臨床 臨時創刊号 病理診断に役立つ分子生物学. 29: 210-212, Apr, 2011.

林由起子: Myofibrillar myopathy と類縁疾患. 神経内科. 75(1): 52-59, Jul, 2011.

西野一三: 筋病理の基本. 臨床神経学. 51(9): 669-676, Sep, 2011.

林由起子: Nucleophagy. 生体の科学 増大号 細胞核-構造と機能. 62(5): 374-375, Oct, 2011.

林由起子: A型ラミン. 生体の科学 増大号 細胞核-構造と機能. 62(5): 404-405, Oct, 2011.

林由起子: 筋原線維性ミオパチー. BRAIN and NERVE 特集: 筋疾患 up date. 63(11): 1179-1188, Nov, 2011.

2. 学会発表

Cowling B, Amoasii L, Toussaint A, Koebel P, Ferry A, Davignon L, Nishino I, Mandel JL, Laporte J: Increased wild-type dynamin 2 expression or a CNM mutant of dynamin 2 expressed in skeletal muscle of adult wild-type mice leads to structural defects and muscle weakness. 4th international congress of myology, Paris, France, 5.9-13, 2011.

Bartoli M, Nguyen K, Bernard R, Walrafen P, Attarian S, Hayashi YK, Pouget J, Nishino I, Krahn M, Helmbacher F, Levy N: Detection of genomic defects at the 4Q35 FSHD-associated locus by using multiple and large scale genomic tools. 4th international congress of myology, Paris, France, 5.12, 2011.

Liang WC, Er TK, Ohkuma A, Hayashi YK, Lopez LC, Hirano M, Nonaka I, Nishino I, Jong YJ: Patients with Riboflavin-Responsive Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Taiwan. 第53回日本小児神経学会総会, 横浜, 5.27, 2011.

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Takeshima H, Keduka E, Araki N, Nishino I, Hayashi YK: Real time analysis of sarcolemmal repair mediated by dysferlin and MG53. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.19, 2011.

Shi ZH, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Momma K, Noguchi S, Nonaka I, Nishino

I: Expanding clinicopathological findings observed in the Asian patients with VCP mutation. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.19, 2011.

Hayashi YK, Goto K, Kure Y, Ohnishi M, Sato T, Keduka E, Shalaby S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Characterization of Japanese patients with myofibrillar myopathy. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.20, 2011.

Quinlivan R, Nishino I, Mitsuhashi S, Aoyama C, Sewry C, Muntoni F, Cirak S, Robb S, Moore D, Abbs S, Bushby K, Straub V: Myopathy associated with mutations in CHKB in three UK patients. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.20, 2011.

Martinez Arroyo A, Naberhaus B, Liang WC, Nishino I, Alonso E, Jucgla A, Olive M: Novel mutation in PNPLA2 presenting with distal myopathy and lipodystrophy. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: In vivo characterization of mutant myotilins. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

Sato T, Hayashi YK, Keduka E, Noguchi S, Osawa M, Nonaka I, Nishino I: Novel BAG3 mutations in myofibrillar myopathy patients. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

Nishino I: PATHOLOGICAL FEATURES. 20th World Congress of Neurology, Marrakesh, Morocco, 11.13, 2011.

Nishino I: Distal myopathy: What's new? The Fourth Thai-Japanese Workshop on Muscle Diseases. Bangkok, 2.23, 2012.

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: 筋疾患の病態解明を目指したメダカの利用. 第32回国立精神・神経医療研究センター神経研究所研究発表会, 小平, 5.9, 2011.

三橋里美, 大熊 彩, Talim B, 唐橋美奈子, 幸村知子, 青山智英子, 栗原まな, Quinlivan R, Sewry C, 三橋弘明, 後藤加奈子, Koksal B, Kale G, 杉本博之, 中川靖一, Cox GA, Topaloglu H, 西野一三: ホスファチジルコリン合成酵素 CHKB 変異により先天性筋ジストロフィーが引き起こされる. 第32回国立精神・神経医療研究センター神経研究所研究発表会, 小平, 5.9, 2011,

毛塚悦子, 林由起子, Shalaby S, 三橋弘明, 野口 悟, 西野一三: エレクトロポレーション法を用いた変異ミオティリンの解析. 第32回国立精神・神経医療研究センター神経研究所研究発表会, 小平, 5.10, 2011.

倉重毅志, 高橋哲也, 近藤啓太, 中村 毅, 山脇健盛, 圓谷理恵, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三, 松本昌泰: X-linked myopathy with excessive autophagyの一家系. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011.

林由起子, 後藤加奈子, 埜中征哉, 西野一三: 本邦における筋原線維性ミオパチーの臨床遺伝学的・筋病理学的特徴. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.19, 2011.

尾内幸子, 石垣景子, 村上てるみ, 佐藤孝俊, 齊藤 崇, 宍倉啓子, 鈴木暘子, 平山義人, 林由起子, 大澤真木子: CAV3遺伝子変異によるRippling muscle diseaseの1例. 第53回日本小児神経学会総会, 横浜, 5.26, 2011.

高野和儀, 竹縄忠臣, 遠藤剛: Nebulette と N-WASP は心筋筋原線維のアクチン線維形成にかかわっている. 第 63 回日本細胞生物学会大会, 北海道大学, 6.28, 2011.

遠藤剛, 高野和儀: 筋収縮と筋再生・筋肥大を担う筋原線維のアクチン線維形成機構. 第 84 回日本生化学会大会, 京都国際会館, 9.21, 2011.

高野和儀, 渡邊-高野晴子, 竹縄忠臣, 遠藤剛: 骨格筋と心筋におけるアクチン重合核形成と伸長の分子機構. 第 84 回日本生化学会大会, 京都国際会館, 9.23, 2011.

林由起子: 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. 障害者対策総合 (神経・筋疾患分野) 研究成果発表会, 東京, 2.8, 2012.

佐藤孝俊, 林由起子, 後藤加奈子, 高見真希, 鈴木茂文, 野口 悟, 西野一三: DNAJB6 ミオパチー. 平成23年度(第33回)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 研究発表会, 小平, 3.22, 2012.

毛塚悦子, 林由起子, Shalaby S, 三橋弘明, 野口 悟, 埜中征哉, 西野一三: 筋原線維性ミオパチーに関連する変異タンパク質の解析. 平成23年度 (第33回) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 研究発表会, 小平, 3.23, 2012.

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

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

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 129 家系について、既知の 6 疾患関連遺伝子（*DES*、*CRYAB*、*MYOT*、*ZASP*、*FLNC*、*BAG3*）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。さらに新規候補 10 遺伝子を選定し、スクリーニングを行った。その結果、約半数で何らかの遺伝子変異が同定され、疾患との関連についての解析をすすめている。

A. 研究目的

NCNP 骨格筋レポジトリから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) 計 129 家系を抽出した。この 129 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。

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。新規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。さらに新規疾患候補遺伝子として Z 線関連タンパク質をコードする 10 遺伝子に着目し、変異スクリーニングを行った。

B. 研究方法

MFM の既知原因 6 遺伝子である *DES*、*CRYAB*、*MYOT*、*ZASP*、*FLNC*、*BAG3*に

(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

計129家系についてスクリーニングを行った結果、*DES* 7例、*ZASP* 5例、*FLNC* 5例、*MYOT* 4例、*BAG3* 1例に変異を見出した。*CRYAB* 変異例は認められなかった。また、疾患関連遺伝子としてスクリーニングした*FHL1*に6例の変異例を見いだした。また、Z線に関連するタンパク質を中心に、新規疾患候補遺伝子9つを候補とし、スクリーニングを書けた結果、それぞれ1-7例の変異が見いだされた。このうち、最も高頻度に変異がみいだされたのが*VCP*で、7家系に新規p.Ala439Pro変異を含むミスセンス変異が同定された。本邦で*VCP*変異例が見いだされたのは初めてである。

スクリーニングはまだ進行中であるが、これまでに約半数に何らかの遺伝子変異を同定することができた。約半数は新規の遺伝子変異であることから、現在、細胞生物学的手法を用い、順次その機能解析を進めている。

D. 考察

既知6遺伝子についての、全129家系について変異スクリーニングを終了したが、変異が見いだされたのは計22家系、17%にすぎず、これまでの諸外国からの報告と比較すると低頻度であった。これは、人種による差とともに、本研究ではスクリーニング対象範囲を広めに設定したためと考えられる。

今回、本邦ではじめて*VCP*変異例を7家系、同定し得た。臨床的には、成人期以降に発症する緩徐進行性の筋力低下を主症状とし、常染色体優性の遺伝形式をとる家系が多かった。家系内での臨床症状も均一でなく、またこれまでの報告にあるような、骨変化や痴呆といった症状に乏しいことから、診断に至っていなかったことが示唆された。

約半数の家系では新規原因遺伝子候補も含む何らかの遺伝子変異が同定されたが、新規変異も多く、今後疾患との具体的関わりについての検討を進めていく必要がある。

E. 結論

日本人129家系についてMFMM関連10遺伝子の変異スクリーニングを行い、約半数に何らかの遺伝子変異を見いだした。新規疾患関連遺伝子も複数含まれるため、今後病態解明を進めていく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Liang WC, Mitsushashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, Hayashi YK: TMEM43 Mutations in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy. *Ann Neurol*. 69(6): 1005-1013, Jun, 2011.

Mitsushashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Quinlivan R, Sewry C, Mitsushashi H, Goto K, Koksall B, Kale G, Ikeda K, Taguchi R, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H, Nishino I: A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. *Am J Hum Genet*. 88(6): 845-851, Jun, 2011.

Komaki H, Hayashi YK, Tsuburaya R, Sugie K, Kato M, Nagai T, Imataka G,

Suzuki S, Saitoh S, Asahina N, Honke K, Higuchi Y, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nonaka I, Nishino I: Inflammatory changes in infantile-onset *LMNA*-associated myopathy. *Neuromuscul Disord*. 21(8): 563-568, Aug, 2011.

Mitsushashi S, Hatakeyama H, Karahashi M, Koumura T, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S, Sher RB, Nakagawa Y, Manfredi G, Goto YI, Cox GA, Nishino I: Muscle choline kinase beta defect causes mitochondrial dysfunction and increased mitophagy. *Hum Mol Genet*. 20(19): 3841-3851, Oct, 2011.

Fujita M, Mitsushashi H, Isogai S, Nakata T, Kawakami A, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I, Kudo A: Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant zacro. *Dev Biol*. 361(1): 79-89, Jan, 2012.

Sukigara S, Liang WC, Komaki H, Fukuda T, Miyamoto T, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Hayashi YK, Sugie H, Sasaki M, Nishino I: Muscle glycogen storage disease 0 presenting recurrent syncope with weakness and myalgia. *Neuromuscul Disord*. 22(2):

162-165, Feb, 2012.

Shi Z, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Goto K, Kaneda D, Choi YC, Toyoda C, Hieda S, Kamiyama T, Sato H, Wada M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Characterization of the Asian myopathy patients with *VCP* mutations. *Eur J Neurol*. 19(3): 501-509, Mar, 2012.

Furusawa Y, Mori-Yoshimura M, Yamamoto T, Sakamoto C, Wakita M, Kobayashi Y, Fukumoto Y, Oya Y, Fukuda T, Sugie H, Hayashi YK, Nishino I, Nonaka I, Murata M: Effects of enzyme replacement therapy on five patients with advanced late-onset glycogen storage disease type II: a 2-year follow-up study. *J Inherit Metab Dis*. 35(2): 301-310, Mar, 2012.

Suzuki N, Aoki M, Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Increase in number of sporadic inclusion body myositis (sIBM) in Japan. *J Neurol*. 259(3): 554-556, Mar, 2012.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: *In Vivo* Characterization of Mutant Myotilins. *Am J Pathol*. Epub Feb 18, 2012.

林由起子: 新たな肢帯型筋ジストロフィー. 生体の科学 特集 筋ジストロフィーの分子病態から治療へ. 62(2): 100-102, Apr. 2011.

林由起子: Myofibrillar myopathy と類縁疾患. 神経内科. 75(1): 52-59, Jul. 2011.

林由起子: Nucleophagy. 生体の科学 増大号 細胞核—構造と機能. 62(5): 374-375, Oct, 2011.

林由起子: A型ラミン. 生体の科学 増大号 細胞核—構造と機能. 62(5): 404-405, Oct, 2011.

林由起子: 筋原線維性ミオパチー. BRAIN and NERVE 特集: 筋疾患update. 63(11): 1179-1188, Nov, 2011.

2. 学会発表

Bartoli M, Nguyen K, Bernard R, Walrafen P, Attarian S, Hayashi YK, Pouget J, Nishino I, Krahn M, Helmbacher F, Levy N: Detection of genomic defects at the 4Q35 FSHD-associated locus by using multiple and large scale genomic tools. 4th international congress of myology, Paris, France, 5.12, 2011.

Liang WC, Er TK, Ohkuma A, Hayashi YK, Lopez LC, Hirano M, Nonaka I,

Nishino I, Jong YJ: Patients with Riboflavin-Responsive Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Taiwan. 第53回日本小児神経学会総会, 横浜, 5.27, 2011.

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Takeshima H, Keduka E, Araki N, Nishino I, Hayashi YK: Real time analysis of sarcolemmal repair mediated by dysferlin and MG53. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.19, 2011.

Shi ZH, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Momma K, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Expanding clinicopathological findings observed in the Asian patients with VCP mutation. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.19, 2011.

Hayashi YK, Goto K, Kure Y, Ohnishi M, Sato T, Keduka E, Shalaby S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Characterization of Japanese patients with myofibrillar myopathy. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.20, 2011.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I,

Nishino I: In vivo characterization of mutant myotilins. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

Sato T, Hayashi YK, Keduka E, Noguchi S, Osawa M, Nonaka I, Nishino I: Novel BAG3 mutations in myofibrillar myopathy patients. 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 10.21, 2011.

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: 筋疾患の病態解明を目指したメダカの利用. 第32回国立精神・神経医療研究センター神経研究所研究発表会, 小平, 5.9, 2011.

毛塚悦子, 林由起子, Shalaby S, 三橋弘明, 野口 悟, 西野一三: エレクトロポレーション法を用いた変異ミオティリンの解析. 第32回国立精神・神経医療研究センター神経研究所研究発表会, 小平, 5.10, 2011.

倉重毅志, 高橋哲也, 近藤啓太, 中村 毅, 山脇健盛, 圓谷理恵, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三, 松本昌泰: X-linked myopathy with excessive autophagyの一家系. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011.

林由起子, 後藤加奈子, 埜中征哉, 西野一

三：本邦における筋原線維性ミオパチーの臨床遺伝学的・筋病理学的特徴. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.19, 2011.

尾内幸子, 石垣景子, 村上てるみ, 佐藤孝俊, 齊藤 崇, 穴倉啓子, 鈴木暘子, 平山義人, 林由起子, 大澤真木子: CAV3遺伝子変異によるRippling muscle diseaseの1例. 第53回日本小児神経学会総会, 横浜, 5.26, 2011.

林由起子: 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. 障害者対策総合 (神経・筋疾患分野) 研究成果発表会, 東京, 2.8, 2012.

佐藤孝俊, 林由起子, 後藤加奈子, 高見真希, 鈴木茂文, 野口 悟, 西野一三: DNAJB6ミオパチー. 平成23年度(第33回)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 研究発表会, 小平, 3.22, 2012.

毛塚悦子, 林由起子, Shalaby S, 三橋弘明, 野口 悟, 埜中征哉, 西野一三: 筋原線維性ミオパチーに関連する変異タンパク質の解析. 平成23年度 (第33回) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 研究発表会, 小平, 3.23, 2012.

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、（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から、計 129 家系の筋病理学的に本疾患が疑われる症例を抽出し、筋病理学的解析を行った。その結果、筋原線維の配列の乱れ、細胞内封入体の存在と神経原性変化とを併せ持つ一群を見いだし、本邦初の *VCP* ミオパチーであることを明らかにした。

A. 研究目的

サルコメア配列異常を主病変とする筋ジストロフィーあるいは筋原線維性ミオパチー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 12,000 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順次抽出し、一般組織化学法、免疫組織化学法、イムノブロット法を用いて組織学的解析を行った。

また、変異の見いだされた症例については、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

一般組織染色結果から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129家系を抽出し、その結果を集積した。

このうち、筋原線維の配列の乱れ、細胞内凝集体の存在といった筋原線維性ミオパチーの筋病理学的特徴とともに、筋線維の群集萎縮やfiber type groupingといった神経原性の変化を特徴とする7家系を見いだした。臨床的には、常染色体優性遺伝形式を示し、成人以降に発症する進行性の筋力低下、筋萎縮を示し、電気生理学的に筋原性および神経原性の混在する所見を認めた。

変異スクリーニングにより、*VCP*遺伝子変異が本邦で初めて同定された。*VCP*変異は、inclusion body myopathy with Paget's bone disease and front-temporal dementia (IBMPFD)や家族性筋萎縮性側索硬化症の原因であることが知られているが、今回見いだした症例はいずれも、筋症状を主症状とし、骨変化や中枢神経症状に乏しいことから、*VCP*ミオパチーといえるものと考えられた。*VCP*変異例の骨格筋を用いて、免疫組織化学法を用いた検討を行った結果、

*VCP*やユビキチンの細胞質および核内の凝集、TDP-43の核外への局在変化とともに、*VCP*結合タンパク質であるHDAC6の凝集も新たに見いだした。

D. 考察

*VCP*変異は筋原線維性ミオパチーの約6%を占める頻度の高い疾患であることが明らかになった。臨床的にこれまで報告されているような典型的な骨や中枢神経症状を呈することは希であり、筋病理所見で筋原性変化と神経原性変化の混在する特徴を見いだした場合、本疾患を考慮する必要がある。

E. 結論

本邦初の*VCP*変異例を7家系見いだした。筋原線維性ミオパチーの中に高頻度で認められたこと、これまでの報告例と比べ筋症状以外の症状は目立たないことから、潜在的な患者が複数いるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.* 69(6): 1005-1013, Jun, 2011.