

201128261A

厚生労働科学研究補助金

難治性疾患克服研究事業

マリネスコ-シェーグレン症候群におけるシャペロン機能と病態との関連

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 由起子

平成24年(2012年)3月

厚生労働科学研究補助金

難治性疾患克服研究事業

マリネスコ-シェーグレン症候群におけるシャペロン機能と病態との関連

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 由起子

平成24年（2012年）3月

# 目次

## I. 総括研究報告

マリネスコ-シェーグレン症候群におけるシャペロン機能と病態との関連	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 疾病研究第一部 室長】

## II. 分担研究報告

1. 本邦におけるマリネスコ-シェーグレン症候群 (MSS) の臨床医学的特徴の解明	5
--	---

後藤昌英【(独)国立精神・神経医療研究センター 病院小児神経科 医療研究生】

小牧宏文【(独)国立精神・神経医療研究センター 病院小児神経科 医長】

林由起子【(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 室長】

(資料1) マリネスコ-シェーグレン症候群の診断基準

(資料2) マリネスコ-シェーグレン症候群 35 例のまとめ

2. マリネスコ-シェーグレン症候群の疾患モデルメダカの作成	11
--------------------------------	----

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】

林由起子【(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 室長】

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	15
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	16
-----------------	----

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

「マリネスコ-シェーグレン症候群におけるシャペロン機能と病態との関連」

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 疾病研究第一部 室長

研究要旨

マリネスコ-シェーグレン症候群 (MSS) は、小脳失調、精神発達遅滞、先天性白内障、ミオパチーを四徴とする常染色体劣性の遺伝形式をとる乳幼児期発症のまれな難治性疾患である。本研究では、我々の行った全国規模のアンケート調査結果をもとに、MSSの詳細な臨床病理学的解析、ならびに遺伝学的解析を行った。その結果、*SIL1*変異を有する確実例の主要臨床症状は、白内障（100%）、小脳症状（100%）、精神発達遅滞（86%）、ミオパチー（96%）であり、予後は比較的良好であった。一方、*SIL1*に変異がなくても、臨床的にはMSSの臨床的四徴のほとんどを満たす症例もあり、MSSの遺伝的多様性が示唆された。遺伝子解析の結果、23人中21人はc. 937dupGをホモ接合性に有しており、本邦に好発する変異であることが示された。

メダカモデルの探索では、ミスセンス変異を有する一系統をみだし、現在、*SIL1*欠損変異体の探索を続けており、今後の病態解明や治療法開発に向けた分子探索などに利用していく予定である。

研究分担者

小牧 宏文・(独) 国立精神・神経医療研究センター 病院 小児神経科 医長

後藤 昌英・(独) 国立精神・神経医療研究センター 病院 小児神経科 医療研究生

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

研究協力者

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

埜中 征哉・(独) 国立精神・神経医療研究センター 病院 名誉院長

岡田 麻里・東邦大学医療センター大橋病院小児科 研究員

梶野 幸子・(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 研究生

## A. 研究目的

マリネスコ-シェーグレン症候群 (MSS) は、小脳失調、精神発達遅滞、先天性白内障、ミオパチーを四徴とする、乳幼児期発症のまれな難治性疾患である。常染色体劣性の遺伝形式をとり、その原因遺伝子産物 *SIL1* は小胞体シャペロン蛋白質 HSPA5 の ATP-ADP 交換因子として働き、小胞体におけるタンパク質の refolding に関わっていることが知られている。すなわち、MSS は *SIL1* の機能喪失によって小胞体ストレスを引き起こし、refolding されなかったタンパク質が蓄積することによる疾患と考えられている。実際、患者生検筋では自己貪食空胞の集合である縁取り空胞が多数認められるという特徴を有し、misfolding タンパク質の集積による結果と考えられる。

我々は、全国規模の MSS に関するアンケート調査を実施し、その結果を掘り下げ、MSS の臨床的特徴を明らかにするとともに、遺伝子解析を進め、遺伝子変異と臨床病型についての解析を進めた。また、バイオリソースを用いて、モデル生物として活用できる *sill* 変異を有するメダカモデルの探索を行った。

## B. 研究方法

全国アンケート調査の結果をふまえ、二次調査を行い、情報収集ならびにデータ解析を行った。また承諾の得られた患者さんについては、ゲノム DNA を抽出し、*SIL1* 遺伝子変異解析を行った。一方、国立精神・神経医療研究センター骨格筋ライブラリーより MSS 疑い例を抽出し、筋病理学的解析を行った。また、モデルメダカの獲得を目的に、大阪大学との共同研究でメダカ ENU 変異体ライブラリーのスクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

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

アンケート調査の結果、35 名の MSS 疑い例を見だし、本邦 MSS 患者の発症頻度は、10 万人当たり 1~2 人程度であると推計された。*SIL1* 変異解析の結果、26 人中 23 人に変異が見いだされ、MSS 確実例とした。一方、変異の認められなかった 3 例ならびに変異解析が不可能であった 9 例は、MSS 疑い例として分類した。両群について臨床症状を分析した結果、*SIL1* 変異を有する確実例の主要症状は、白内障 (100%)、小脳症状 (100%)、精神発達遅滞 (86%)、ミオパチー (96%) であった。乳児期より精神運動発達の遅れがあるものの、予後は比較的良好で、最高齢は 52 才であった。一方、*SIL1* に変異がなくても、臨床的には MSS の 4 徴のほとんどを満たす症例もあり、MSS の遺伝的多様性が示唆された。遺伝子解析の結果、23 人中 21 人は c. 937dupG をホモ接合性に有しており、本邦に好発する変異であることが示された。

一方、変異メダカのスクリーニングでは、Exon2 にミスセンス変異を有する 1 系統が得られたが、現在ナンセンス変異を有する個体の選別を目的に exon 9, 10 の変異体のスクリーニングをおこなっている。

## D. 考察

MSS の発症は乳幼児期と早期であるにも

かかわらず、進行は緩徐で、心・呼吸器障害の合併が希であることから、比較的予後の良い疾患であると考えられた。*SIL1*に変異が認められないにもかかわらず臨床的に鑑別困難な症例も存在したことから、MSSが疑われる症例は遺伝学的に確定診断を行う必要がある。また骨格筋の縁取り空胞の存在はMSSに特徴的であり、診断に非常に有用であると考えられる。

## E. 結論

本邦 MSS 患者の発症頻度は、10 万人当たり 1~2 人程度である希少疾病であること、*SIL1* 遺伝子変異は c. 937dupG のホモ接合変異が大半を占め、日本人における好発変異であること、を明らかにした。また *SIL1* 遺伝子変異を有する症例はいずれも典型的な臨床病理学的所見を呈しているが、*SIL1* 変異がないにもかかわらず類似した症状を示す症例も見出され、MSS は遺伝的に多様性である可能性を明らかにした。メダカモデルスクリーニングは現在進行中である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

Suzuki S, Ohta M, Shimizu Y, Hayashi YK,

Nishino I: Anti-signal recognition particle myopathy in the first decade of life. *Pediatr Neurol.* 45 (2) : 114-116, 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: 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, Jan, 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.

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.

Matsuura T, Minami N, Arahata H, Ohno K, Abe K, Hayashi YK, Nishino: Myotonic dystrophy type 2 is rare in the Japanese population. J Hum Genet. 57 (3): 219-220, Mar, 2012.

Tsuburaya RS, Monma K, Oya Y, Nakayama T, Fukuda T, Sugie H, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Acid phosphatase-positive globular inclusions is a good diagnostic marker for two patients with adult-onset Pompe disease lacking disease specific pathology. Neuromuscul Disord. Dec, 2011. [Epub ahead of print]

## 2. 学会発表

該当無し

## 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（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

「本邦におけるマリネスコ-シェーグレン症候群 (MSS) の臨床医学的特徴の解明」

- 研究分担者 後藤 昌英 (独) 国立精神・神経医療研究センター 病院小児神経科  
医療研究生
- 研究分担者 小牧 宏文 (独) 国立精神・神経医療研究センター 病院小児神経科  
医長
- 研究分担者 林 由起子 (独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所  
疾病研究第一部 室長

研究要旨

*SIL1* 遺伝子変異を原因とするマリネスコ-シェーグレン症候群は、希な小児遺伝性疾患である。本研究では、本邦におけるマリネスコ-シェーグレン症候群の特徴を明らかにすることを目的に、全国アンケート調査の結果をもとに臨床遺伝学的解析を行った。

その結果、35例のマリネスコ-シェーグレン症候群（疑い例も含む）の臨床遺伝学情報を検討した。遺伝子変異の確定している23例（1-52歳）の臨床症状は、乳児期から発達の遅れで発症、小脳萎縮、白内障が全例で認められ、精神発達遅滞が86%、筋力低下95%、低身長や骨格変形も高頻度に認められた。遺伝子変異部位と臨床症状の関連は認められなかった。遺伝子変異の認められなかった3例および変異未解析例でも臨床的には極めてよく似た症状を呈しており、臨床症状のみからでは *SIL1* 変異の有無を推測することは困難であったが、筋病理所見上の縁取り空胞の存在は、有変異例では全例に認められており、診断上、重要な所見であることが示唆された。

マリネスコ-シェーグレン症候群は、ある程度の発達は認められ、また生命予後が比較的良いことが明らかとなった。白内障が幼児期に急速に進行することから、早期に発見し、視機能の維持を図ることの重要性が示唆された。

A. 研究目的

マリネスコ-シェーグレン症候群は、小胞体シャペロンタンパク質であるBiPのATP-ADP交換因子*SIL1*をコードする遺伝子 (*SIL1*) 変異による常染色体劣性遺伝形式をとる疾患である。中枢神経系、眼、骨格筋の障害の他、性腺機能低下や低身長、骨格

異常など多彩な症状を呈する難治性疾患である。筋病理学的には自己貪食空胞である縁取り空胞の存在を特徴とする。頻度の少ない疾患であり、本邦における発症頻度や臨床的問題点、疾患自然歴など明らかでない点が多い。

昨年度実施した全国アンケート調査の結果を詳細に分析し、本邦におけるマリネスコ-シェーグレン症候群の自然経過、臨床医学上の問題点を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

昨年度の研究において、小児神経専門医、神経内科専門医および専門医療機関へマリネスコ-シェーグレン症候群の診療経験を問う一次・二次アンケート調査を行い、その結果から診断基準を作成した。それをもとにアンケート調査結果を詳細に分析し、併せて *SIL1* 遺伝子解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた全国アンケート調査は、(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、個人の特定できない様式を用いて行った。

## C. 研究結果

診断基準(添付資料 1) を満たす、確実例 23 例、疑い例 12 例(遺伝子解析施行例 3 例、未施行例 9 例)について検討(添付資料 2) した。

*SIL1* 変異の確認された 23 例について臨床症状は、年齢は 1~52 才(中央値 9 才)、男:女=13:10。臨床症状の中核の 1 つである白内障は 2~6 才(中央値 3 才)で全例、両側に認められ、急激に増悪し、ほぼ全例で手術が施行されていた。斜視も 57%と高頻度に認められた。小脳症状は筋緊張低下 100%、体幹失調を含めた運動失調が最も多く 71%に認められた。また、頭部画像所見では全例で小脳萎縮が認められ、3 例は虫部に優位であった。一方、精神発達面では 86%で軽度から重度の精神発達遅滞が認められた。その多くは軽度であり、就学は特

別支援学校であった。有意語は全例獲得するが独語を獲得する時期が 1~3 才(中央値 2 才)と乳児期からの遅れが認められた。筋力低下は 8 歳の 1 例のみ低下なしであったが、それ以外で近位筋優位あるいは全身性に認められ、頸定 4~18 か月(中央値 8 か月)、座位 10~36 か月(中央値 18 か月)、つかまり立ち獲得 16/21 例(76%) (中央値 2 才)、独歩獲得は 6/20 例(35%) (中央値 7 才)であった。血清 CK 値は正常から軽度高値であり、 $309 \pm 289$  IU/l であった。筋病理所見では施行例全例で縁取り空胞の存在が認められ、本疾患に特徴的であると考えられた。その他の症状として、低身長が 43% (-3.6SD) に、脊柱変形、足の変形など骨格異常が 20~30%に認められた。本症では 52 才例でも呼吸機能、心機能、嚥下機能は保たれており、生命予後は比較的良好であると考えられた。*SIL1* 遺伝子変異は、Exon 4 c. 331C>T ; p. R111X が 1 例、Exon 6 c. 603-607del ; p. E201fs が 1 例、Exon 9 c. 937dupG ; p. L313fs が 21 例であったが、genotype-phenotype の関連は明らかではなかった。

疑い例の *SIL1* 変異の認められなかった 3 例(3 才、6 才、29 才いずれも女性)は変異を有する例と同様、小脳症状、精神発達遅滞、白内障、筋力低下(運動発達遅滞)を認め、画像上も虫部優位の小脳萎縮が認められた。29 才女性のみ筋生検を施行しているが、筋原生変化ではあるが縁取り空胞は認められなかった。

また、遺伝子解析未実施の 9 例も変異同定患者と似た臨床症状を示し、白内障 100%、小脳症状 100%、精神発達遅滞 100%、筋力低下 100%、低身長 38%、何らかの骨格異常 14~43%、斜視 71%であり、小脳萎縮も 100%に認められたが、生検筋の縁取り空胞の存在は生検を施行した 6 例中 2 例であった。

## D. 考察

主要徴候の白内障は、3才頃に発症し手術が必要になるほど急激に増悪する傾向にあった。小脳症状は全例に出現するが、乳幼児期は筋緊張低下が主であり、運動発達の獲得により徐々に運動失調が表面化してくるものと推測された。画像上からも虫部優位の萎縮が多いことから、体幹・運動失調優位に出現することが多いと考えられる。*SILI*に変異が認められないにもかかわらず臨床的に鑑別困難な症例も存在したことから、マリネスコ-シェーグレン症候群が疑われる症例は遺伝学的に確定診断を行う必要があることが示唆される。また骨格筋の縁取り空胞の存在も診断的に非常に有用であると考えられる。

## E. 結論

*SILI*変異によるマリネスコ-シェーグレン症候群症候群の具体的臨床像を明らかにした。発症は乳幼児期からと早期であるが、生命予後は比較的保たれていることが明らかとなった。マリネスコ-シェーグレン症候群の診断には臨床症状のみならず、遺伝子解析や病理所見が重要であると考えられた。

## F. 健康危険情報

とくになし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hattori A, Komaki H, Kawatani M, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. A novel mutation in the LMNA gene causes congenital muscular dystrophy with dropped head and brain involvement. *Neuromuscul Disord.* In press.

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, Jan, 2012.

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.* 2011;21:563-8.

Shimizu-Fujiwara M, Komaki H, Nakagawa E, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Fujisaki T, Tokita Y, Kubota N, Shimazaki R, Sato K, Ishikawa T, Goto K, Mochizuki H, Takanoha S, Ogata K, Kawai M, Konagaya M, Miyazaki T, Tatara K, Sugai K, Sasaki M. Decreased resting energy expenditure in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Brain Dev.* In press.

Saito Y, Komaki H, Hattori A, Takeuchi F, Sasaki M, Kawabata K, Mitsuhashi S, Tominaga K, Hayashi YK, Nowak KJ, Laing NG, Nonaka I, Nishino I. Extramuscular manifestations in children with severe congenital myopathy due to ACTA1 gene mutations. *Neuromuscul Disord.* 2011;21:489-93.

### 2. 学会発表

とくになし

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

## マリネスコ-シェーグレン症候群の診断基準 (Marinesco-Shögren syndrome; MSS)

MIM #248800

常染色体劣性遺伝形式あるいは孤発性

遺伝子座：5q31

原因遺伝子 *SIL1* (Gene ID:64374)

診断に有用な特徴

### A. 臨床症状

#### 【主要項目】

1. 白内障：幼児期に発症，両側性，急速進行性
2. 精神運動発達遅滞
3. 筋緊張低下
4. 小脳症状：運動失調が目立つ
5. 全身性あるいは近位筋優位の筋力低下

#### 【補助項目】

6. 低身長
7. 性腺機能低下
8. 骨格異常（脊柱変形，外反扁平足，短趾症）
9. 斜視

### B. 頭部画像所見：小脳萎縮

### C. 筋生検：筋原性変化，縁取り空胞の存在

### D. 遺伝子検査

*SIL1* にホモ接合性または複合ヘテロ接合性変異

*SIL1* 変異の認められない例もある

### 診断カテゴリー

確実例 A（主要項目のうち3項目以上）+D をみたすもの

疑い例 A（主要項目のうち3項目以上）+B をみたすもの

A（主要項目のうち3項目以上）+C をみたすもの

### 類縁疾患

- Congenital cataracts, facial dysmorphism, and neuropathy (CCFDN)
- Ataxia-microcephaly-cataract syndrome
- Cataract-ataxia-deafness-retardation syndrome
- VLDLR-associated cerebellar hypoplasia
- Familial Danish dement

## Marinesco-Sjögren 症候群 35 例のまとめ

<i>SIL1</i> 変異		あり (n=23)	なし (3, 6, 29y)	未解析 (n=9)
① 眼	白内障	23/23 (100%) 2歳から6歳 (3.5±1.5歳) 両側性, 急速進行性で手術を要する	3/3	9/9 (100%)
	斜視	8/14 (57%)	1/3	5/7 (71%)
② 運動	筋力低下	22/23 (95%) 2~52歳 (中央値9歳)	3/3	9/9 (100%)
	頸定	23/23 (100%) 4~18か月 (中央値8か月)	5~8か月	4~7か月
		23/23 (100%) 10~36ヶ月 (中央値18ヶ月)	12~18か月	12~36か月
	つかまり立ち	16/21 (76%) 11~36か月 (中央値24ヶ月)	15~24か月	15か月~6歳
	発達 独歩	6/20 (30%) 2~10歳 (6.5±2.9歳)	2y9m	6歳
③ 小脳	筋緊張低下	23/23 (100%)	3/3	9/9 (100%)
	運動失調	17/23 (74%) 2~52歳 (中央値9歳)	2/3	6/8 (75%)
	眼振	9/23 (38%) 2~45歳 (中央値12歳)	0/3	5/8 (63%)
	構音障害	7/23 (30%) 2~48歳 (中央値15歳)	2/3	4/9 (44%)
④ 精神発達遅滞	18/21 (86%) IQ (DQ) : 24~67 (中央値54)	3/3	9/9 (100%)	
骨格系	低身長	9/21 (43%) (思春期以前では平均-3.6SD)	1/3	3/8 (38%)
	脊柱変形	6/21 (29%)	1/3	3/7(43%)
	外反扁平足	6/21 (29%)	0/3	1/7 (14%)
	短趾症	3/21 (14%)	0/3	2/8 (25%)
検査	血清CK値	28~1000 (309±289)	144~3010	95~600
	小脳萎縮	19/19 (100%) 虫部優位	3/3	9/9 (100%)
	縁取り空胞	16/16 (100%)	0/1	2/6 (33%)
	<i>SIL1</i> 変異 (homozygous)	Exon 4 c. 331C>T ; p. R111X 1例 Exon 6 c. 603-607del ; p. E201fs 1例 Exon 9 c. 937dupG ; p. L313fs 21例	なし	未解析

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

「マリネスコ-シェーグレン症候群の疾患モデルメダカの作成」

研究分担者 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  
研究分担者 林 由起子 (独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所  
疾病研究第一部 室長

研究要旨

マリネスコ-シェーグレン症候群の病態形成機序の解明、治療法の開発に向け、TILLING法によるメダカ*sil1*機能欠損突然変異体の確立を試みた。変異体のスクリーニングは現在進行中だが、メダカ*sil1*遺伝子内でのミスセンス変異個体を同定することができた。

A. 研究目的

マリネスコ-シェーグレン症候群(MSS)は、小脳失調、精神発達遅滞、先天性白内障、ミオパチーを主症状とする乳幼児期発症のまれな難治性多臓器障害性疾患である。常染色体劣性遺伝形式をとり、その原因遺伝子として*SIL1*が同定されている。*SIL1*は小胞体シャペロン蛋白質HSPA5のATP-ADP交換因子として働き、小胞体におけるタンパク質の再折りたたみ(refolding)に関わることが分かっている。しかし、病態に至る詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。また、本研究では、メダカ*Sil1*機能欠損突然変異体系統を確立することにより、病態を引き起こす分子メカニズムの解明、および治療法の開発に向けたシャペロン機能を改善する分子の探索を行うことを目的とする。

B. 研究方法

メダカ*Sil1*機能欠損突然変異体を得るため

の手法として、TILLING法を用いた。TILLING法とは、雄成魚にENU 処理を行い、その後F1 雄の精子とゲノムDNA をライブラリー化し、ゲノムDNA を解析することでターゲット遺伝子に偶然入った変異を検出してその個体の精子から変異体を得る手法である。約6000個体からなる変異体ライブラリーを所有する大阪大学医学系研究科・藤堂研究室との共同研究により、5760個体について、メダカ*sil1*内に変異を持つ個体をスクリーニングした。具体的には、*sil1* 第2エクソンおよび第9、第10エクソンをPCRによって増幅し、High Resolution Melt (HRM) 法により、変異を有する可能性のある個体を抽出後、シーケンスを行い、変異を同定した。

(倫理面への配慮)

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・承認を得ている。



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・承認を得ている。

### C. 研究結果

メダカ *sil1* 第2エクソンのスクリーニングの結果、68番目のロイシンがグルタミンに置換している個体を同定した。第9、第10エクソンについては、HRMによる変異体候補の抽出が完了し、シークエンスによる変異の同定に移行するところである。

### D. 考察

メダカ *sil1* 第2エクソンにおいて変異が認められた68番目のロイシンは哺乳類とも種間で保存されているアミノ酸で、この部位の変異は *Sil1* の機能に影響を与える可能性がある。現在進行している第9、第10エクソンのスクリーニングから得られるであろう変異体と併せて人工授精を行い、表現型の解析を行う予定である。

### E. 結論

メダカ変異体ライブラリーを用いて、*sil1* 突然変異体のスクリーニングを行った結果、ミスセンス変異体を得ることができた。スクリーニングはまだ完了していないが、機能欠損変異体を得られれば、組織、個体レベルでの *Sil1* の機能解析、病態形成機序の解明、治療に向けた分子探索等のための強

力なツールとなるはずである。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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.

Suzuki S, Ohta M, Shimizu Y, Hayashi YK, Nishino I: Anti-signal recognition particle myopathy in the first decade of life. *Pediatr Neurol.* 45 (2): 114-116, 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: 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, Jan, 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.

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.

Matsuura T, Minami N, Arahata H, Ohno K, Abe K, Hayashi YK, Nishino: Myotonic dystrophy type 2 is rare in the Japanese population. *J Hum Genet.* 57 (3) : 219-220, Mar, 2012.

Tsuburaya RS, Monma K, Oya Y, Nakayama T, Fukuda T, Sugie H, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Acid phosphatase-positive globular inclusions is a good diagnostic

marker for two patients with adult-onset Pompe disease lacking disease specific pathology. *Neuromuscul Disord.* Dec, 2011. [Epub ahead of print]

2. 学会発表  
なし

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

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名：論文タイトル名. 発表誌名 巻号：ページ, 出版年
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. <i>Am J Hum Genet.</i> 88(6): 845-851, Jun, 2011.
Suzuki S, Ohta M, Shimizu Y, Hayashi YK, Nishino I: Anti-signal recognition particle myopathy in the first decade of life. <i>Pediatr Neurol.</i> 45(2): 114-116, 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. <i>Hum Mol Genet.</i> 20(19): 3841-3851, Oct, 2011.
Fujita M, Mitsuhashi H, Isogai S, Nakata T, Kawakami A, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant zacro. <i>Dev Biol.</i> 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. <i>Neuromuscul Disord.</i> 22(2): 162-165, Jan, 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. <i>J Neurol.</i> 259(3): 554-556, Mar, 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 <i>VCP</i> mutations. <i>Eur J Neurol.</i> 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. <i>J Inherit Metab Dis.</i> 35(2):301-310, Mar, 2012.
Matsuura T, Minami N, Arahata H, Ohno K, Abe K, Hayashi YK, Nishino: Myotonic dystrophy type 2 is rare in the Japanese population. <i>J Hum Genet.</i> 57(3): 219-220, Mar, 2012.