

得た検体は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を得た研究に対してのみ使用される。研究を行う際には、全ての検体は匿名化されて、各種試料は検体番号で管理される。結果の発表に際しても個人情報は一切提示されない。

C. 研究結果

NCNP 骨格筋レポジトリー約 12,600 検体を検索した結果、診断確定のされていない先天性ミオパチー約 600 例を抽出した。このうち研究利用が可能で、かつゲノム DNA の抽出可能なサンプルを選出し、順次 DNA の抽出を開始している。また、貴重な組織サンプルを可能な限り保存するため、骨格筋から抽出した DNA については、増幅処理をおこなった。この増幅した DNA を用いて、次世代シーケンス解析する際の問題点についての検討をおこなっている。

先天性ミオパチー関連遺伝子について、網羅的エクソームシーケンスを行うために SureSelect を用いたカスタムキットを設計、作製し、イルミナ社 Miseq を用いて現在解析を始めている。

D. 考察

診断未確定の先天性ミオパチーについて、関連遺伝子の全エクソンを網羅的にスクリーニングすることによって、多くの症例の診断を効率的に確定することが可能となる。特に、極めて大きい *NEB* などは、変異を有する患者頻度は高いと推定されるも、従来の方法では変異解析は極めて困難であった。我々の開発している方法では、このような遺伝子の変異を効率的に見いだすことが可能となり、臨床的にきわめて重要である。さらに、各疾患の臨床病理学的所見について分子生物学的裏付けをもって検討することが可能となり、疾患病態の解明にも極めて有用であると考えられる。

E. 結論

次世代シーケンス解析を用いた先天性ミオパチーの変異スクリーニングは、従来困難であった巨大遺伝子の変異による患者診断を効率よく行う上で非常に有用であり、あらたな疾患病態を明らかにできることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))
分担研究報告書

「ミトコンドリアミオパチーの原因解明」

研究分担者 後藤 雄一
(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 部長疾病研究第二部 部長

研究要旨

ミトコンドリアミオパチーの病因は核 DNA 上の遺伝子の場合とミトコンドリア DNA の変異の場合など多様である。最近の核 DNA 上の責任遺伝子数の増加が著しく、それらの解析には次世代シーケンサーによる研究が必要である。当センターには 1500 例異常のミトコンドリアミオパチー症例の登録があり、そのうちの 200 例近くが凍結筋と同時に筋芽細胞/線維芽細胞を同時に登録させており、病因検索に適した研究資源がある。本年度はそれらの中からエキソーム解析を行うことで研究成果が確実に出ると考えられる疾患を選別し優先順位を付けた。次世代シーケンサーは平成 23 年度末に納入され、本格稼働ができる準備が整った。

A. 研究目的

ミトコンドリアミオパチーの病因は、核 DNA 上に存在する種々の遺伝子、もしくはミトコンドリア DNA の変異、もしくはその両方の場合など多様である。ミトコンドリア DNA の検査はほぼ確立しており、罹患臓器、主に骨格筋を用いて、欠失/重複、点変異、コピー数の減少(欠乏状態)を調べることが通常行われる。

一方、ミトコンドリアには約 1600 の核 DNA 上の遺伝子産物(タンパク質、RNA など)が関係していると推定されているので、そのそれぞれが病気の原因になり得る。新しい核 DNA 上の病因遺伝子が急速に増加している。すでに 100 を超える遺伝子が同定されていて、その勢いはすさまじい。

これらの状況を踏まえ、本研究では次世代

シーケンサーを用いて、原因不明のミトコンドリアミオパチーの原因を明らかにすることにある。

B. 研究方法

1) 研究対象の選別

ミトコンドリア病の臨床像、原因は多様性が大きく、闇雲に次世代シーケンサーの解析対象にすることはできない。しかも、ミトコンドリア機能の多様性から、病因の候補となる遺伝子が見つかった場合に機能的にその病因性を確認できることが望ましい。

したがって、ミトコンドリアミオパチーの中でどのような疾患を対象にすべきかを十分検討する必要がある。これまでの 2000 例近くの症例について、

2) ミトコンドリア DNA 異常のスクリーニング

ミトコンドリアミオパチーの遺伝学的検査を行う際に、まずミトコンドリア DNA の異常を調べておき、その上でエキソームシーケンスを行って新たな原因遺伝子を探索するのが次世代シーケンサーの効能を最大限に生かすことと考える。

これに対応するには、ミトコンドリア DNA の全周シーケンスを行うこと、しかも、血液ではミトコンドリア遺伝子変異を捉えられないことがあるために罹患臓器を使用する必要があるため、それらについて検討する。

3) ミトコンドリア機能検査

ミトコンドリア機能もエネルギー産生ばかりでなく、活性酸素生成、アポトーシス、カルシウムイオン濃度調節、感染防御などがある。今回の研究の対象とする機能解析手段を選定する。

4) 次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析

イルミナ社の HiSeq1000、もしくは MySeq を用いたエキソーム解析の準備を行う。

C. 研究結果

1) 研究対象の選別

国立精神・神経医療研究センター骨格筋レポジトリには、平成 24 年 12 月末現在で 12000 例を超えた症例の蓄積があり、その中に 1500 例近くのみトコンドリアミオパチーの凍結筋が登録されている。そのうちの 200 例以上については筋芽細胞/線維芽細胞も同時に登録されている。

凍結骨格筋のみの症例では、核 DNA の解析に十分な DNA を確保できない可能性があること、ミトコンドリア機能解析を十分行うためには培養細胞が必要であることを鑑み、今回の研究対象としては、凍結筋を用いた病理検査、生化学検査が終了し、線維芽細胞もしくは筋芽細胞を登録している症例からエキソ

ーム解析へと進める症例を選ぶこととした。

最初に、骨格筋及び筋芽細胞で、詳細な機能解析が終了しているびまん性シトクローム c 酸化酵素欠損症 8 例を対象とすることとした。

次に、もっとも代表的なミトコンドリア病である MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) で、ミトコンドリア DNA 異常が確実に否定されている症例、さらに Leigh 脳症の臨床病型でミトコンドリア DNA 変異が否定されている症例を順に対象とすることにしたい。

2) ミトコンドリア DNA 異常のスクリーニング

核 DNA の詳細な検索を行うためには、ミトコンドリア DNA 異常を確実にしておくことが重要である。まず、骨格筋から分離した total DNA (核 DNA とミトコンドリア DNA の混合物)を用いて、サザンブロットと long PCR を行い、欠失/重複の有無を調べた。欠失/重複を有しない症例については、ミトコンドリア DNA 全体のシーケンスをサンガー法で行った。その際、ミトコンドリア DNA 全体を 3 分割の DNA 鋳型として前もって増幅させておいた上でシーケンスを行った。

得られたデータは、公共的データベースである MITOMAP (www.mitomap.org)、ヒトミトコンドリアゲノム多型データベース

(GiiB-JST mtSNP; human mitochondrial genome single nucleotide polymorphism database (mitsnp.tmig.or.jp/

mitsnp/index.shtml)、我々が保有している正常日本人データ (200 人) を用いて、報告済の病因的変異、多型、病因の可能性のある変異と分類し、必要に応じて病因かどうかの検討を行った。

3) ミトコンドリア機能検査

骨格筋、培養細胞を用いてミトコンドリア分画を精製し、呼吸鎖酵素活性を測定した。また培養細胞がある例については、

Blue-Native PAGE を行い、複合体 I~V のタンパク量の測定を行った。

4) 次世代シーケンサーの稼働準備

研究代表者の西野と共同して、イルミナ社の HiSeq1000 および MySeq を稼働させる準備を整えた。

D. 考察

ミトコンドリアミオパチーの原因には、ミトコンドリア DNA と核 DNA があり、ミトコンドリア上には欠失/重複、280 余りの点変異が報告され、一方の核 DNA についてはすでに 100 余りの遺伝子が病因として報告されている。

本研究では、核 DNA 上の新たな遺伝子変異を明らかにすることを目的にしており、ミトコンドリア DNA 異常を原因とする症例は解析対象から除外しておく必要がある。その意味で、ミトコンドリア DNA 異常のスクリーニングは重要なステップである。しかし、ミトコンドリア異常でも、多重欠失例や欠乏状態（ミトコンドリア DNA の細胞内コピー数が減少する）では、それらを引き起こす核 DNA 上の原因遺伝子が複数報告されており、必ずしもミトコンドリア DNA 異常のあることが除外対象とはならないことも注意を有する。

さらに、次世代シーケンサーの特徴から膨大な解析結果が出ることが予想され、その中から病因遺伝子を探し出す際に、家族の検索などの遺伝学的な手法とともに、生化学検査などの機能的な絞り込みを可能にするデータをもち合わせていることが優位に働く可能性が高い。したがって、凍結骨格筋や培養細胞を用いた機能解析データを揃えておくことが重要であることは言うまでもない。我々の骨格筋レポジットリー（凍結筋、筋芽細胞）には、これらの条件を満たした症例が 100 例近く存在することが明らかになった。

したがって、次世代シーケンサーが稼働でき次第、これら症例のエキソーム解析を実施でき、新たな病因の同定が可能であると考

える。

E. 結論

ミトコンドリアミオパチーの新たな病因の同定に向けて、次世代シーケンサーを用いた核 DNA 解析を行う準備が整った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
(国際学会)

Sato Y, Ikegami Y, Minami N, Okamoto N, Mori M, Murata M, Goto Y. Predictive testing for adult-onset neuromuscular diseases. 12th International Congress of Human Genetics, 61st American Society of Human Genetics Annual Meeting, 11-15 Oct 2011, Montreal

Matsushima Y, Goto Y, Laurie S, Kaguni. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Kagoshima, Japan, Aug. 31-Sep. 4, 2011

Ishiyama A, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. Mitochondrial Disease with unusual

exocrine pancreatic manifestations. 5th Biennial Meeting of Society for Free RadicalResearch-Asia, 8thConference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Kagoshima, Japan, Aug. 31-Sep. 4, 2011

Goto M, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. MELAS phenotype associated with the m.3243A>G mutation in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene. 5th Biennial Meeting of Society for Free RadicalResearch-Asia, 8thConference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Kagoshima, Japan, Aug. 31-Sep. 4, 2011

後藤雄一. ミトコンドリア病の基礎と臨床. 第114回日本小児科学会、東京、8.13, 2011

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

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))
分担研究報告書

「次世代シーケンサーを用いた遺伝性ミオパチーの原因解明に関する臨床情報の集積」

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

研究要旨

先天性ミオパチーの病因は多因性であり、かつ未だ病因が不明な例も多く存在する。また先天性ミオパチーでこれまでに同定されている原因遺伝子の多くが、NebulinやRYR1などの巨大遺伝子であり、例え原因遺伝子が判明している疾患であっても従来のサンガー法では遺伝子診断を行うことは困難である。我々は臨床医の立場で次世代シーケンサーによる先天性ミオパチーの原因解明の基礎となる臨床データの集積を行う。今年度は計画立案と倫理申請を行った。

A. 研究目的

先天性ミオパチーは新生児期より強い呼吸障害、哺乳障害を認め、乳児期早期に死亡する乳児重症型、乳児期より筋緊張低下、発育・発達の遅れなどを示すが、歩行を獲得し、非進行性もしくは緩序進行性の経過を示す良性先天型、ならびに成人発症型に分類できる。しばしば高口蓋、呼吸障害、哺乳障害を認める。骨格筋の病理組織学的特徴から、ネマリンミオパチー、セントラルコア病、マルチミニコア病、ミオチューブラーミオパチー、中心核ミオパチー、先天性筋線維タイプ不均等症、先天性全タイプ1線維ミオパチー、タイプ1線維優位を示す先天性ミオパチー、還元小体ミオパチー、などに分類される。顔面筋を含む全身の筋緊張低下(フロッピーインファント)、高口蓋、呼吸障害、哺乳・嚥下障害、発育・発達の遅れ、関節拘縮、脊柱異常などを示す。

原因遺伝子として、ACTA1, NEB, TPM2,

TPM3, TNNT1, CFL2, KBTBD13, RYR1, SEPN1, MTM1, DMN2, BIN1, FHL1等が知られている。先天性ミオパチーの病因は多因性であり、かつ未だ病因が不明な例も多く存在する。また先天性ミオパチーでこれまでに同定されている原因遺伝子の多くが、NebulinやRYR1などの巨大遺伝子であり、例え原因遺伝子が判明している疾患であっても従来のサンガー法では遺伝子診断を行うことは困難である。我々は臨床医の立場で次世代シーケンサーによる先天性ミオパチーの原因解明の基礎となる臨床データの集積を行っていく。その中でも特に今回は骨格筋画像検査を重視して検討する。これまでの研究により、先天性ミオパチーの病型毎に骨格筋の障害の選択性(障害の強い筋とそうでない筋が存在すること)のパターンが異なる傾向があることが知られており、鑑別診断や運動機能の解析に役立てられている。また病因となる遺伝子変異の種類と画像所見との間に一定の相関があることが知られている。骨格筋画像解析はその病態解明の一つのツールとして有用と考え

ており、多数の症例の画像の集積により病態解明に寄与できる可能性が高い。

B. 研究方法

臨床経過：家族歴、妊娠分娩歴、出生時の状況、合併症状、臨床経過などを網羅的に把握する。

検査所見：CK値などの生化学的所見、筋電図、末梢神経伝導検査などの所見を把握する。

筋病理所見：筋生検を行なっている場合には病理レポートを参照し、筋病理診断のまとめを把握する。

遺伝子解析：すでに遺伝子診断を行なっている場合には、検索した遺伝子名、具体的な変異を把握する。

骨格筋画像検査：IBISSは(独)国立精神・神経医療研究センターの脳病態統合イメージングセンター(IBC)が独自に開発・提供するオンラインサポートシステムであり、ID・パスワード認証された全国の研究参加施設から連結可能匿名化された脳画像・臨床診断情報をHTTPS通信を通して収集し、それらの情報を統合的にWeb上で閲覧できるシステムである。研究に必要な画像情報・臨床情報を共有できる安全な仮想空間を構築することが出来る。本研究は、ミオパチーの診断や経過観察などの通常の診療の一環として撮影された骨格筋画像を既存の患者臨床情報とともに収集し、これをIBISS上に構築することにより、本疾患における臨床画像研究を推進するものである。本研究はIBISS運営推進委員会ですでに承認が得られている。骨格筋画像データは、共同研究者、研究協力者の医療施設において、連結可能匿名化され、個人情報を含まない状態にした上でHTTPS通信を通して収集する。送られた画像および臨床データは、研究代表者によりIBISSにアップロードされる。IBISSは、元画像(DICOMフォーマット)からヘッダを取り除き、画質を落とした

JPEG画像に変換して使用するため、他者による論文その他への盗用の防止、データ量を少なくすることによる通信の高速化、そしてDICOMヘッダからの情報流出の防止など、安全性と利便性を重視した技術である。

(独)国立精神・神経医療研究センター病院からIBISSに登録する場合には、個人情報管理担当者により連結匿名化を行ったうえで、その情報は常に鍵のかかった部屋(病院総合医局)でかつ鍵のついたボックス内に保管することとする。

得られた画像データおよび臨床情報は統合的に解析に供される。臨床診断、重症度、原因遺伝子変異の有無とその種類などと画像所見との関連性について検討する。

(倫理面への配慮)

IBISSを用いた画像集積に関してはすでに(独)国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

今年度は研究計画を立案し、倫理申請を行いすでに承認を得ている。次年度以降に画像、臨床データの集積を行っていく予定である。

D. 考察

本研究により多数例、時系列ごとの画像を解析することで、ミオパチーの病型ごとの病変の分布、進展様式などを検討していくことで、ミオパチーの骨格筋画像の新たな特徴を明らかにできる可能性があり、また本研究により、ミオパチーの新しい疾患概念が提唱できる可能性がある。

E. 結論

本研究は先天性ミオパチーの病態解析を目的とした次世代シーケンサーと骨格筋画像診断を統合解析するものであり独自性が高い。新しい知見を得るべく次年度も研究をすすめていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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

