

201231057A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

ベスレムミオパチーとその類縁疾患の診断と病態に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西野 一三

平成25（2013）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

ベスレムミオパチーとその類縁疾患の診断と病態に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西野 一三

平成25（2013）年 3月

目次

I. 総括研究報告

ベスレムミオパチーとその類縁疾患の診断と病態に関する研究	1
------------------------------	---

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】

II. 分担研究報告

1. collagen VI 関連筋疾患の臨床的、病理学的および遺伝子学的研究	7
---	---

樋口逸郎【鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年病学 准教授】

橋口昭大【鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 神経内科 医員】

2. ウルリッヒ型筋ジストロフィーの遺伝子型表現型解析	9
-----------------------------	---

米川貴博【(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】

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】

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	15
-----------------	----

I. 総括研究報告

「ベスレムミオパチーとその類縁疾患の診断と病態に関する研究」

研究代表者 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

研究要旨

VI型コラーゲンをコードする *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* 遺伝子の変異によって発症するベスレムミオパチー (BM) とウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー (UCMD) の患者データベースの構築、両疾患の病態解明・治療法開発研究を促進するためのデータを得ることを目的とした。また、実験的治療として recombinant thrombomodulin を COL6 欠損線維芽細胞に添加し、接着能と生存率が改善するかどうかをみる実験的治療を行った。

本研究班で自然歴の解析対象とした UCMD 33 例のうち、遺伝子変異未解析の 12 例について、*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* の全エクソン、隣接イントロンを直接シーケンシング法で解析した。遺伝学的に確定した 19 例について、遺伝子型表現型相関を解析した。BM 症例の長期経過を行い、根本的な治療法開発とは別に患者の機能予後を改善する方法を探索した。関節拘縮や過伸展を伴うミオパチー 2 例について次世代シーケンサーシステムを用いて遺伝子変異探索を行った。

CD は、recessive かつ VI 型コラーゲン蛋白を形成できない変異によって起こり、運動機能は最重症の経過をとる。SSCD 例は THD の dominant *de novo* 変異で起こり、*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* の各 THD とそこに生ずる変異の種類によって多様な表現型異質性をとる。*COL6A1* c. 850G>A (p. Gly284Arg) 変異は SSCD を呈するが、CD に近い重症の例から 14 歳まで歩行可能な比較的軽症の例まであり、同一の遺伝子変異であっても広い表現型異質性がみられる。遺伝子変異型から骨格筋における VI 型コラーゲン蛋白発現パターンは予測可能であるが、臨床像を予測することは容易ではない。THD のどのような部位が VI 型コラーゲンのアセンブリーにより影響を与えうるかを明らかにすることで、臨床像の予測につながる可能性がある。

BM では、リハビリテーションやアキレス腱延長術などの整形外科的治療の有効性を明らかにした。関節拘縮や過伸展を伴うミオパチー 2 例は、次世代シーケンサーによってそれぞれ *COL6A1*, *COL6A2* のヘテロ接合性変異が明らかとなり、遺伝学的に UCMD と診断した。劣性遺伝を呈する BM や軽症の UCMD は見逃されている可能性が高いと思われ、次世代シーケンサーシステムを利用した再検討を行うことで、効率的に新たな症例を発掘できる。recombinant thrombomodulin は VI 型コラーゲン欠損線維芽細胞の細胞接着能を改善した。

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

樋口逸郎・鹿児島大学大学院医歯学総合
研究科 神経内科・老年病学
准教授

米川貴博・(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

橋口昭大・鹿児島大学医学部歯学部附属
病院 神経内科 医員

A. 研究目的

ベスレムミオパチー (BM) とウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー (UCMD) は、VI型コラーゲン (COL6) をコードする *COL6A1*, *A2*, *A3* 遺伝子変異によって発症する。どちらの疾患も患者頻度が100万人に数人という超希少疾病あり、その臨床像の実態は十分に把握できていなかった。また、BMやUCMDに対する有効な治療法もまだ存在しない。しかし、近年ミトコンドリア permeability Transition Pore (PTP) 異常やオートファジー活性化異常などの治療標的が見出され、実際オートファジー賦活を狙ったBM、UCMD患者に対する低タンパク食臨床治験 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01438788) が進行中である。さらに、*COL6* 遺伝子のハプロ不全は病気にならないことから、最近変異アレルの発現を選択的に抑え、正常アレルの発現量を上げようとする遺伝子治療も患者由来細胞で試みられている。

そこで、本邦の患者実態の把握、自然

歴のまとめ、遺伝学的情報を含んだ患者データベースを構築すること、BM、UCMDの病態解明・治療法開発研究を促進するためのデータをを得ることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

本研究班で行った全国実態調査で解析対象としたUCMD症例に加え、TMC凍結生検筋レポジトリーで当研究班のUCMD診断基準を満たす症例を合わせた計49例のうち、遺伝子変異未解析の12例について、*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*の全エクソン、隣接イントロンを直接シークエンス法で解析した。

また、そのうち 19 例は遺伝学的に確定され、周生期・発達歴、臨床症状、骨格筋 COL6 異常、運動機能、呼吸や側弯症の長期経過についての情報があるため、genotype-phenotype の相関の有無を解析した。

優性遺伝を呈する典型的なBMの3世代にわたる家系例について、長期経過観察により病状変化を分析し、リハビリテーションや整形外科的治療の有効性を明らかにした。

COL6 関連筋疾患の遺伝子異常、筋病理および臨床徴候を解析し治療につながる因子を探索した。遺伝子解析は *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* および collagen XIV α 1 (*COL14A1*), collagen XV α 1 (*COL15A1*) などの各遺伝子について次世代シークエンスシステムを利用して行った。実験的治療として recombinant thrombomodulin を COL6 欠損線維芽細胞に添加し、接着能と生存率が改善するかどうかを検討した。

(倫理面への配慮)

本申請研究において使用するすべてのヒト検体は、生検時に NCNP 倫理委員会で承認を受けた「診断と検体の研究使用に関する承諾書」を用いてインフォームド・コンセントを得ており、「神経・筋疾患の病態解明と治療法開発」を目的とした研究への検体使用が認可されている。鹿児島大学における筋病理学的検索についても、インフォームド・コンセントを得て採取された組織を扱う。また、臨床情報を扱う際には、連結可能匿名化された既存の情報のみを扱う。遺伝子解析は「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る。解析情報を使用するにあたっては匿名化した上で使用する。

C. 研究結果

12 例のうち、3 例でヘテロ接合性変異が確認された。2 例は $\alpha 1$ 鎖の Tripple helical domain (THD) における Gly のミスセンス変異 (c. 850G>A (p. Gly284Arg)、c. 860G>A (p. Gly287Glu)) であり、1 例は $\alpha 2$ 鎖の THD の deletion 変異であった。残りの 9 例には、genome DNA の全エクソン、隣接イントロンに変異は同定できなかった。本研究で対象とした 49 例のうち、33 例 (67%) に変異を同定し、未同定は 15 例、未解析は 1 例となった。

骨格筋 COL6 の complete deficiency (CD) は 4/19 例で、うち 3 例では splice site 変異か frame shift 変異をホモ接合性或いは複合ヘテロ接合性に有していた。CD の 1 例は、 $\alpha 3$ 鎖の THD 外のミスセンス変異をヘテロ接合性に有していた。一方、sarcolemma specific collagen VI

deficiency (SSCD) を示す 15 例では、 $\alpha 1$ 鎖の THD に変異を有する例は 9 例、 $\alpha 2$ 鎖の THD に変異を有する例は 3 例、 $\alpha 3$ 鎖の THD に変異を有する例は 3 例であった。

CD 4 例のうち、3 例は独歩未獲得で、1 例は 6 歳で独歩不能となった。SSCD 例には、独歩未獲得 2 例、歩行機能を喪失した年齢が 6 歳 1 例、10 歳 1 例、11 歳 3 例、14 歳 1 例おり、また 16 歳でも歩行可能な例があるなど、運動機能について大きな表現型異質性が認められた。呼吸機能については、%VC 値の変化を CD、SSCD 群で比較することはできないが、noninvasive ventilation (NIV) 導入年齢については、運動機能ほど両群に違いはなかった。側弯症の悪化は、CD 3 例と SSCD 12 例の Cobb 角で評価し、SSCD の方が側弯は重度で進行も早い可能性が示唆された。

SSCD 4 例は *COL6A1* c. 850G>A (p. Gly284Arg) ヘテロ接合性変異を有していた。うち 2 例は独歩未獲得で、SSCD ながら CD に近い重症度を示した。一方、ほかの 2 例は独歩を獲得し、14 歳まで歩行可能であった例と、5 歳時で歩行可能であることが確認された例があった。同一変異を有する例の間にも重症度に大きな違いがみられた。

次世代シーケンサーを用いた *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* の遺伝子解析を関節拘縮や過伸展を伴うミオパチーを対象として行った。BM に近い軽症の UCMD 2 例において、それぞれ *COL6A1* および *COL6A2* のヘテロ変異を証明した。2 例とも共焦点レーザー顕微鏡観察によって基底膜に局限した COL6 部分欠損が証明された。

BM 患者におけるアキレス腱延長術などの整形外科的治療は歩行期間延長に有効であり、適切なりハビリテーションを行

うことにより効果は長期間持続した。

recombinant thrombomodulinを用いた実験的治療は、COL6欠損線維芽細胞の細胞接着能を改善した。

D. 考察

当研究班での mutation detection rate は67%であり、海外の他グループと同程度と考えられる。変異未同定の例では、deletion、duplication、或いは intronic な変異が存在すると考えられる。

CDは、splice site または frame shift 変異をホモ接合性或いは複合ヘテロ接合性に有することが報告されているが (Okada M, et al. 2007)、1例のCDは、 $\alpha 3$ 鎖のTHD外のミスセンス変異をヘテロ接合性に有するのみで、COL6の完全欠損に至るメカニズムは今回の研究では明らかではない。COL6A1, COL6A2, COL6A3の1つまたは複数にまたがる deletion や duplication、intronic な変異をホモ接合性ないしは複合ヘテロ接合性にもつ可能性が否定できない。

CDは、recessive かつ COL6 蛋白を形成できない変異によって起こるため、SSCD よりも重症の表現型をとることが予想される。実際、運動機能についてはSSCDより重症である。しかし、呼吸機能や側弯症の重症度との相関はみられず、むしろ側弯症はSSCD例の方が重度の側弯を呈するようである。SSCDはTHDの dominant *de novo* 変異で発症し、不完全なCOL6蛋白が形成されるために、筋線維膜へのアンカリングができないと考えられる。側弯症の重症度とCOL6局在異常との関係を明らかにするためにはさらに研究が必要である。

SSCDには大きな表現型異質性がみられる。THDの同じようなグリシンのミスセンス変異でも、COL6のアッセムブリーに關与する部位かどうかにより、COL6蛋白量および臨床像が異なることが知られており、COL6A1, COL6A2, COL6A3の各THDとそこに生ずる変異の種類が多様な重症度を引き起こすと考えられる。さらに、COL6A1 c. 850G>A (p. Gly284Arg) の変異例の表現型異質性からも明らかのように、modifier gene の存在も考える必要があり、遺伝子変異型から表現型を予測することは容易ではない。今後さらに症例を蓄積し、THDのどのような部位がCOL6のアッセムブリーにより影響を与えうるかを明らかにすることで、臨床像の予測につながる可能性がある。

劣性遺伝を呈するBMや軽症のUCMDは見逃されている可能性が高いと思われ、次世代シーケンサーシステムを利用した筋疾患患者の再検討を行うことで、効率的に新たな症例を発掘できる。

空間分解能の高い共焦点レーザー顕微鏡は基底膜に局限したCOL6の部分欠損の証明に有用であった。BMでは関節拘縮に対する整形外科的治療やリハビリテーションが機能予後の改善に有用である。

recombinant thrombomodulinはCOL6関連筋疾患の治療に応用できる可能性があり、今後実験動物レベルの検討が必要である。

E. 結論

骨格筋 COL6 異常型と遺伝子変異型の間には相関が認められる。CD は SSCD より少なくとも運動機能について重症である。SSCD は THD の dominant *de novo* 変異で起こるが、*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* の各 THD とそこに生ずる変異の種類によって多様な表現型異質性をみられる。

また、UCMD や BM の非定型例は見逃されている可能性が高い。次世代シーケンサーシステムを利用した患者の再検討は、遺伝学的な診断効率を向上する。

recombinant thrombomodulin は COL6 関連筋疾患の治療に応用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: *In Vivo* Characterization of Mutant Myotilins. *Am J Pathol.* 180 (4): 1570-1580, 2012.

米川貴博, 西野一三: ベスレムミオパチーとウルリッヒ病. 先天代謝異常症候群 (第2版) 下-病因・病態研究, 診断・治療の進歩-別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 20: 736-740, 2012.

2. 学会発表

米川貴博, 小牧宏文, 齋藤貴志, 齋藤義朗, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 岡田麻里, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィーの全国実態調査. 第54回日本小児神経学会総会. 札幌, 5. 17-5. 19, 2012.

Yonekawa T, Komaki H, Okada M, Hayashi YK, Nonaka I, Sugai K, Sasaki M, Nishino I: Natural course of Ullrich congenital muscular dystrophy in Japan. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6. 6-6. 8, 2012.

米川貴博, 小牧宏文, 岡田麻里, 林由起子, 埜中征哉, 樋口逸郎, 齋藤貴志, 齋藤義朗, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 西野一三: ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィーの全国実態調査. 第29回小児神経筋疾患懇話会. 東京, 8. 25, 2012.

Yuan J, Higuchi I, Sakiyama Y, Inamori Y, Matsuura E, Higuchi Y, Yoshimura A, Hashiguchi A, Higashi K, Koreeda Y, Arimura K, Takashima H: Novel Missense Mutations and Partial Deficiency of Collagen VI in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy. Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, San Francisco, 2012, 11. 7

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

「collagen VI 関連筋疾患の臨床的、病理学的および遺伝子学的研究」

研究分担者 樋口逸郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
神経内科・老年病学 准教授
研究協力者 橋口昭大 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院
神経内科 医員

研究要旨

Bethlem ミオパチーとその関連疾患の病態解明に関する研究を続けている。3世代にわたるBethlem ミオパチーの長期経過観察に基づく臨床的解析を行い、リハビリテーションやアキレス腱延長術などの整形外科的治療の有効性を明らかにし、より長期の経過観察中である。関節拘縮や過伸展を伴うミオパチーを対象として次世代シーケンサーを用いたcollagen VI $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ の遺伝子解析を行い、Bethlem ミオパチーに近い軽症のUlrich型先天性筋ジストロフィー (UCMD) においてcollagen VI のヘテロ変異を証明した。実験的治療としてrecombinant thrombomodulinをcollagen VI欠損線維芽細胞に加えたところ、細胞接着能が改善した。

A. 研究目的

collagen VI 関連筋疾患の臨床的研究および病態解明研究により本症の治療法開発につながるデータを得ることを目的とする。

B. 研究方法

優性遺伝を呈する典型的なBethlem ミオパチーの3世代にわたる家系例について、長期経過観察により病状変化を分析し、リハビリテーションや整形外科的治療の有効性を明らかにする。

collagen VI 関連筋疾患の遺伝子異常、筋病理および臨床徴候を解析し治療につながる因子を明らかにする。

遺伝子解析はcollagen VI の3遺伝子 (*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*), およびcollagen XIV $\alpha 1$ (*COL14A1*), collagen XV $\alpha 1$ (*COL15A1*), などの各遺伝子について次世代シーケンサーシステムを利用して行う。

実験的治療として recombinant thrombomodulin をcollagen VI 欠損線維芽細胞に添加し、接着能と生存率が改善するかどうかを検討する。

(倫理面への配慮)

筋病理学的検索はインフォームド・コンセントを得て採取された組織で行い、臨床情報

を扱う際には、匿名化した情報のみを扱う。

遺伝子解析は「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」を遵守した上で、施行される。解析情報を使用するにあたっては、匿名化した上で使用する。

C. 研究結果

関節拘縮や過伸展を伴うミオパチーを対象として次世代シーケンサーを用いcollagen VI $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ の遺伝子解析を行い、Bethlem ミオパチーに近い軽症のUCMD 2例において、それぞれcollagen VI $\alpha 1$ および $\alpha 2$ のヘテロ変異を証明した。共焦点レーザー顕微鏡による観察で両例とも基底膜に限局したcollagen VIの部分欠損が証明された。

Bethlem ミオパチー患者におけるアキレス腱延長術などの整形外科的治療は歩行期間延長に有効であり、適切なリハビリテーションを行うことにより効果は長期間持続していた。recombinant thrombomodulinを用いた実験的治療はcollagen VI欠損線維芽細胞の細胞接着能を改善した。

D. 考察

劣性遺伝を呈するBethlemミオパチーや軽症のUCMDは見逃されている可能性が高いと思われる、これまで原因不明であった筋疾患の再

検討を行い、次世代シークエンサーシステムを利用して効率的に新たな症例を発掘する必要がある。空間分解能の高い共焦点レーザー顕微鏡は基底膜に局限したcollagen VIの部分欠損の証明に有用であった。UCMDには呼吸不全の早期発見と治療が重要であるが、軽症のBethlem ミオパチーでは関節拘縮に対する整形外科的治療やリハビリテーションが機能予後の改善に有用である。recombinant thrombomodulinはcollagen VI関連筋疾患の治療に応用できる可能性があり、今後実験動物レベルの検討が必要である。

E. 結論

collagen VI関連筋疾患の非定型例は見逃されている可能性が高い。recombinant thrombomodulinはcollagen VI関連筋疾患の治療に応用できる可能性がある。

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

Yuan J, Higuchi I, Sakiyama Y, Inamori Y, Matsuura E, Higuchi Y, Yoshimura A, Hashiguchi A, Higashi K, Koreeda Y, Arimura K, Takashima H.

Novel Missense Mutations and Partial Deficiency of Collagen VI in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy.

Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, San Francisco, 2012. 11. 7

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。

「ウルリッヒ型筋ジストロフィーの遺伝子型表現型解析」

研究分担者 米川貴博

（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

研究代表者 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

研究要旨

VI型コラーゲンをコードする *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* 遺伝子の変異によって発症するベスレムミオパチー (BM) とウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー (UCMD) の患者データベースの構築を目的とした。本研究班で自然歴の解析対象とした UCMD33例のうち、遺伝子変異未解析の12例について、*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* の全エクソン、隣接イントロンを直接シークエンス法で解析し、遺伝学的にも確定された19例について、genotype-phenotypeの相関を解析した。CDは、recessiveかつVI型コラーゲン蛋白を形成できない変異によって起こり、運動機能は最重症の経過をとる。SSCD例はTHDの dominant *de novo* 変異で起こり、*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* の各THDとそこに生ずる変異の種類によって多様な表現型異質性をとる。*COL6A1* c. 850G>A (p. Gly284Arg) 変異はSSCDを呈するが、CDに近い重症の例から14歳まで歩行可能な比較的軽症の例まであり、同一の遺伝子変異であっても広い表現型異質性がみられる。遺伝子変異型から骨格筋におけるVI型コラーゲン蛋白発現パターンは予測可能であるが、臨床像を予測することは容易ではない。THDのどのような部位がCOL6のアッセンブリーにより影響を与えるかを明らかにすることで、臨床像の予測につながる可能性がある。

A. 研究目的

ベスレムミオパチー (BM) とウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー (UCMD) は、VI型コラーゲン (COL6) をコードする *COL6A1*, *A2*, *A3* 遺伝子変異によって発症する。どちらの疾患も患者頻度が100万人に数人という超希少疾病あり、その臨床像の実態は十分に把握できていなかった。また、BMやUCMDに対する有効な治療法もまだ存在しない。しかし、近年ミトコンドリアPermeability Transition Pore (PTP) 異常やオートファ

ジー活性化異常などの治療標的が見出され、実際オートファジー賦活を狙ったBM、UCMD患者に対する低タンパク食臨床治験 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01438788) が進行中である。さらに、*COL6* 遺伝子のハプロ不全は病気にならないことから、最近変異アレルの発現を選択的に抑え正常アレルの発現量を上げようとする遺伝子治療も患者由来細胞で試みられている。

そこで、本邦の患者実態の把握、自然歴のまとめ、遺伝学的情報を含んだ患者デー

データベースを構築し、BM、UCMDの病態解明・治療法開発研究を促進するための基盤づくりを目的としている。

B. 研究方法

本研究班で行った全国実態調査で解析対象としたUCMD症例に加え、TMC凍結生検筋レポジトリで当研究班のUCMD診断基準を満たす症例を合わせた計49例のうち、遺伝子変異未解析の12例について、*COL6A1*、*COL6A2*、*COL6A3*の全エクソン、隣接イントロンを直接シークエンス法で解析した。

また、そのうち19例は遺伝学的に確定され、周生期・発達歴、臨床症状、骨格筋COL6異常、運動機能、呼吸や側弯症の長期経過についての情報があるため、genotype-phenotypeの相関の有無を解析する。

(倫理面への配慮)

本申請研究において使用するすべてのヒト検体は、生検時にNCNP倫理委員会で承認を受けた「診断と検体の研究使用に関する承諾書」を用いてインフォームド・コンセントを得ており、「神経・筋疾患の病態解明と治療法開発」を目的とした研究への検体使用が認可されている。また、臨床情報を扱う際には、連結可能匿名化された既存の情報のみを扱う。遺伝子解析は「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る。解析情報を使用するにあたっては匿名化した上で使用する。

C. 研究結果

12例のうち、3例でヘテロ接合性変異が確認された。2例は $\alpha 1$ 鎖のTripple helical domain (THD)におけるGlyのミスセンス変異(c.850G>A (p.Gly284Arg)、c.860G>A (p.Gly287Glu))であり、1例は $\alpha 2$ 鎖のTHDのdeletion変異であった。残

りの9例には、genome DNAの全エクソン、隣接イントロンに変異は同定できなかった。本研究で対象とした49例のうち、33例(67%)に変異を同定し、未同定は15例、未解析は1例となった。

骨格筋COL6のcomplete deficiency (CD)は4/19例で、うち3例ではsplice site変異かframe shift変異をホモ接合性或いは複合ヘテロ接合性に有していた。CDの1例は、 $\alpha 3$ 鎖のTHD外のミスセンス変異をヘテロ接合性に有していた。一方、sarcolemma specific collagen VI deficiency (SSCD)を示す15例では、 $\alpha 1$ 鎖のTHDに変異を有する例は9例、 $\alpha 2$ 鎖のTHDに変異を有する例は3例、 $\alpha 3$ 鎖のTHDに変異を有する例は3例であった。

CD 4例のうち、3例は独歩未獲得で、1例は6歳で独歩不能となった。SSCD例には、独歩未獲得2例、歩行機能を喪失した年齢が6歳1例、10歳1例、11歳3例、14歳1例おり、また16歳でも歩行可能な例があるなど、運動機能について大きな表現型異質性が認められた。呼吸機能については、%VC値の変化をCD、SSCD群で比較することはできないが、noninvasive ventilation (NIV)導入年齢については、運動機能ほど両群に違いはなかった。側弯症の悪化は、CD 3例とSSCD 12例のCobb角で評価し、SSCDの方が側弯は重度で進行も早い可能性が示唆された。

SSCD 4例は*COL6A1* c.850G>A (p.Gly284Arg)ヘテロ接合性変異を有していた。うち2例は独歩未獲得で、SSCDながらCDに近い重症度を示した。一方、ほかの2例は独歩を獲得し、14歳まで歩行可能であった例と、5歳時で歩行可能であることが確認された例があった。同一変異を有する例の間にも重症度に大きな違いがみられた。

D. 考察

当研究班での mutation detection rate は 67%であり、海外の他グループと同程度と考えられる。変異未同定の例では、deletion、duplication、或いは intronic な変異が存在すると考えられる。

CD は、splice site または frame shift 変異をホモ接合性或いは複合ヘテロ接合性に有することが報告されているが (Okada M, et al. 2007)、1 例の CD は、 $\alpha 3$ 鎖の THD 外のミスセンス変異をヘテロ接合性に有するのみで、COL6 の完全欠損に至るメカニズムは今回の研究では明らかではない。COL6A1, COL6A2, COL6A3 の 1 つまたは複数にまたがる deletion や duplication、intronic な変異をホモ接合性ないしは複合ヘテロ接合性にもつ可能性が否定できない。

CD は、recessive かつ COL6 蛋白を形成できない変異によって起こるため、SSCD よりも重症の表現型をとることが予想される。実際、運動機能については SSCD より重症である。しかし、呼吸機能や側弯症の重症度との相関はみられず、むしろ側弯症は SSCD 例の方が重度の側弯を呈するようである。SSCD は THD の dominant *de novo* 変異で発症し、不完全な COL6 蛋白が形成されるために、筋線維膜へのアンカリングができないと考えられる。側弯症の重症度と COL6 局在異常との関係を明らかにするためにはさらに研究が必要である。

SSCD には大きな表現型異質性がみられる。THD の同じようなグリシンのミスセンス変異でも、COL6 のアッセンブリーに関与する部位かどうかにより、COL6 蛋白量および臨床像が異なることが知られており、COL6A1, COL6A2, COL6A3 の各 THD とそこに生ずる変異の種類が多様な重症度を引き起こすと考えられる。さらに、COL6A1 c. 850G>A (p. Gly284Arg) の変異例の表現型

異質性からも明らかのように、modifier gene の存在も考える必要があり、遺伝子変異型から表現型を予測することは容易ではない。今後さらに症例を蓄積し、THD のどのような部位が COL6 のアッセンブリーにより影響を与えうるかを明らかにすることで、臨床像の予測につながる可能性がある。

E. 結論

骨格筋 COL6 局在異常と遺伝子変異型の間には相関が認められる。CD は SSCD より少なくとも運動機能について重症である。SSCD は THD の dominant *de novo* 変異で起こるが、COL6A1, COL6A2, COL6A3 の各 THD とそこに生ずる変異の種類によって多様な表現型異質性をみられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yonekawa T, Komaki H, Okada M, Hayashi YK, Nonaka I, Sugai K, Sasaki M, Nishino I. Rapidly progressive scoliosis and respiratory deterioration in Ullrich congenital muscular dystrophy. submitted.

米川貴博, 西野一三. ベスレムミオパチーとウルリッヒ病. 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下—病因・病態研究, 診断・治療の進歩—別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 20 : 736-740, 2012.

2. 学会発表

米川貴博, 小牧宏文, 齋藤貴志, 齋藤義朗, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 岡田麻

里, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三. ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィーの全国実態調査. 第54回日本小児神経学会総会. 札幌, 5.17-5.19, 2012.

Yonekawa T, Komaki H, Okada M, Hayashi YK, Nonaka I, Sugai K, Sasaki M, Nishino I. Natural course of Ullrich congenital muscular dystrophy in Japan. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012.

米川貴博, 小牧宏文, 岡田麻里, 林由起子, 埜中征哉, 樋口逸郎, 齋藤貴志, 齋藤義朗, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 西野一三. ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィーの全国実態調査. 第29回小児神経筋疾患懇話会. 東京, 8.25, 2012.

Yonekawa T, Komaki H, Okada M, Hayashi YK, Nonaka I, Higuchi I, Sugai K, Sasaki M, Nishino I. Natural course of Ullrich congenital muscular dystrophy in Japan. 9th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy'. Tokyo, 9.7, 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

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

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I:
In Vivo Characterization of Mutant Myotilins. Am J Pathol. 180(4): 1570-1580,
2012.

米川貴博, 西野一三：ベスレムミオパチーとウルリッヒ病. 先天代謝異常症候群（第2
版）下－病因・病態研究, 診断・治療の進歩－別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ
No. 20 : 736-740, 2012.

IV. 研究成果の刊行物・別刷