

201231129A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業

希少難治性筋疾患に関する調査研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 青木 正志

東北大学大学院医学系研究科 神経内科

平成 25 年 3 月 印刷

目 次

I. 班体制

II. 総括研究報告書

希少難治性筋疾患に関する調査研究	1
東北大学 大学院医学系研究科 神経内科 青木正志	

III. 分担研究報告書

1. 先天性ミオパチーの調査研究	7
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 林由起子 国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科 小牧宏文	
2. 筋チャンネル病の遺伝子解析および病態解析	11
大阪大学 大学院医学系研究科 神経内科 高橋正紀	
3. Schwartz-Jampel 症候群の病態分子機構	16
順天堂大学 大学院医学研究科 老人性疾患病態治療研究センター 平澤恵理	
4. 筋チャネロパチー・筋シナプトパチーの原因遺伝子研究	20
名古屋大学 医学系研究科 神経遺伝情報学 大野欽司	
5. 自己貧食空胞性ミオパチーの診断基準確率と診断ガイドライン作成のための研究	25
公立大学法人奈良県立医科大学 神経内科 杉江和馬	

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

51

V. 研究成果に関する刊行

61

平成 24 年度 班会議プログラム

239

I. 班体制

希少難治性筋疾患に関する調査研究

研究代表者	青木 正志	東北大学大学院医学系研究科 神経内科
研究分担者	林 由起子	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
	小牧 宏文	国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科
	高橋 正紀	大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学
	平澤 恵理	順天堂大学大学院 老人性疾患病態治療研究センター
	大野 欽司	名古屋大学医学系研究科神経遺伝情報学
	杉江 和馬	奈良県立医科大学 神経内科
事務局	加藤 昌昭	東北大学 神経内科
	三部美津恵	東北大学 神経内科

Ⅱ. 総括研究報告書

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

「希少難治性筋疾患に関する調査研究」

研究代表者： 青木 正志
東北大学 大学院医学系研究科 神経内科 教授

研究要旨

平成 21 年度から設立された厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業の研究奨励分野によりこれまで同事業としては対象になっていなかった多くの希少難治性筋疾患の調査研究が開始された。本研究はこれまでの研究奨励分野での研究成果を元に、希少難治性筋疾患を①周期性四肢麻痺、非ジストロフィー性ミオトニー症候群といった筋チャンネル病や Schwartz -Jampel 症候群などの細胞膜興奮伝達障害による「筋シナプトパチー・チャネロパチー」、②Danon 病や過剰自己食食を伴う X連鎖性ミオパチーなどの「自己食食空胞性ミオパチー」ならびに③封入体筋炎の 3 群に大別して診断基準の確定および関連学会での承認、診療ガイドラインの作成を行ってきた。さらにはこれらによる新たな患者登録、患者検体の集積およびそれを利用した解析研究、治療法の開発を行った。またこれまでに研究奨励分野に取り上げられなかった④先天性ミオパチーについても全国調査による本邦における患者数の把握などによって診断基準の作成を目指している。

研究分担者

林 由起子（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）
小牧 宏文（国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科 医長）
高橋 正紀（大阪大学 大学院医学系研究科 神経内科 助教）
平澤 恵理（順天堂大学 大学院医学研究科 老人性疾患病態治療研究センター准教授）
大野 欽司（名古屋大学 大学院医学系研究科 神経遺伝情報学 教授）
杉江 和馬（公立大学法人 奈良県立医科大学 神経内科 講師）

研究協力者

清水 玲子（独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター
トランスレーショナル・

メディカルセンター 臨床研究支援部 流動研究員）

石山昭彦（独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科 医師）
伊藤美佳子（名古屋大学 大学院医学系研究科 神経遺伝情報学・助教）
寧 亮（順天堂大学 大学院医学研究科）
野中里紗（順天堂大学 大学院医学研究科）
木下正信（首都大学東京 健康福祉学部・教授）
松浦 徹（岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学・准教授）
佐々木 良元（三重大学 医学部附属病

	院 神経内科)
西野一三	(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)
森まどか	(国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科・医師)
日下博文	(関西医科大学 神経内科・教授)
樋口逸郎	(鹿児島大学 神経内科・准教授)
村田顕也	(和歌山県立医科大学 神経内科・講師)
山下賢	(熊本大学 神経内科・助教)
梶 龍兒	(徳島大学 神経内科・教授)

A. 研究目的

平成 21 年度から設立された厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業の研究奨励分野によりこれまで同事業としては対象になっていなかった多くの希少難治性筋疾患の調査研究が開始された。本研究はこれまでの研究奨励分野での研究成果を元に、希少難治性筋疾患を①周期性四肢麻痺、非ジストロフィー性ミオトニー症候群といった筋チャンネル病や Schwartz -Jampel 症候群などの細胞膜興奮伝達障害による「筋シナプトパチー・チャネロパチー」、②Danon 病や過剰自己貪食を伴う X連鎖性ミオパチーなどの「自己貪食空胞性ミオパチー」ならびに③封入体筋炎の 3 群に大別して診断基準の確定および関連学会での承認、診療ガイドラインの作成を行う。さらにはこれらによる新たな患者登録、患者検体の集積およびそれを利用した解析研究、治療法の開発を行う。またこれまでに研究奨励分野に取り上げられなかった④先天性ミオパチーについても全国調査による本邦における患者数の把握などによって診

断基準の作成を目指す。筋シナプトパチー・チャネロパチーは遺伝子診断が有用な希少疾患であるが、候補遺伝子数・候補エクソン数が多いために遺伝子診断が困難であり、既知遺伝子に異常の認められない症例も多く、診断確定に苦慮することが多い。また、病態が膜興奮・伝達の障害であるため、低分子化合物などが症状改善に有効である可能性が高いにもかかわらず治療が進んでいない。自己貪食空胞性ミオパチーは原因不明で治療も未確立である。致死性心筋症や多臓器に合併症を来す病型や、長期に療養が必要な病型もあり、診療ガイドラインの作成が必要不可欠である。封入体筋炎は骨格筋に縁取り空胞と呼ばれる特徴的な組織変化を生じ炎症細胞浸潤を伴う疾患である。ステロイドや免疫グロブリン大量療法といった免疫学的治療に不応もしくは増悪することもあり、有効な治療法は無い。封入体筋炎の診断基準は 1995 年に Griggs らが提唱したものが改変され使用されているが多発筋炎との病理学的相違が問題になる例も多く、現行基準は見直しが必要である。さらに本研究では従来ほとんど研究されて来なかった本邦における先天性ミオパチーの各病型の頻度、診断及び臨床管理上の問題点を明らかにする。同時に分類不能の先天性ミオパチーの実態を明らかにし、診断基準およびガイドラインの作成を目的とする。

B. 研究方法

平成 21 年度から開始された研究奨励分野での研究実績を元に①周期性四肢麻痺、非ジストロフィー性ミオトニー症候群といった筋チャンネル病や Schwartz -Jampel 症候群など、細胞膜興奮伝達障害による「筋シナプトパチー・チャネロパチー」、②Danon 病や過剰自己貪食を伴う X連鎖

性ミオパチーなどの「自己貪食空胞性ミオパチー」ならびに③封入体筋炎の3群に大別して研究を行う。さらにはこれまでに研究奨励分野に取り上げられなかった④先天性ミオパチーについても研究対象に追加し、最終的には本邦で報告されている希少難治性筋疾患の全ての疾患を研究対象とする。

(平成24年度)

診断基準の確定、関連学会での承認

平成23年度までに各奨励研究班で行った全国調査やそれに基づき作成した診断基準を確定する。その後、日本神経学会・日本神経治療学会・日本小児神経学会等に対してこれらの診断基準を提出して学会診断基準として承認を受ける予定である。

診断ガイドラインの策定

例えば自己貪食空胞性ミオパチーにおける心筋症は致死性で予後規定因子であるが、現段階では根治療法は心臓移植しかない。現状では対症療法にならざるを得ないが、全国調査の二次調査票の集計結果より、これまで施行された治療方法を整理して、現状で最適な診療ガイドライン作成を行うべく検討中である。

先天性ミオパチーに関して

- 1) 国立精神・神経医療研究センター(NCNP)骨格筋レポジトリーにおける先天性ミオパチー患者の臨床病理学的解析
- 2) 新規疾患関連遺伝子候補の探索をすすめ、原因遺伝子の解明に努める。
- 3) 先天性ミオパチーの予後調査

(平成25年度)

患者検体の収集および分子病態の解析
新たな診断基準に基づき患者登録、患者検体の集積およびそれを利用した解析研究を行う。本申請代表・青木が研究を分担する「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)拠点(代表 松原洋一)」、および、本申請研究分担者・林が研究を分担する「同・一般研究班(代表 西野一三)」と共同して次世代シーケンサーによる解析を行う。例えば筋チャンネル病にチャンネル遺伝子に変異が同定されても、多型であるかどうか、病態に真に関与するのかを検討する必要がある。高橋・大野らは以前よりチャンネルの電気生理学的解析も行っており、新たに同定された遺伝子変異について培養細胞やツメガエル卵母細胞を用いた解析を行い、骨格筋の興奮性伝達に影響を及ぼすような機能異常があるかどうかを確認する。筋チャンネル病患者由来 iPS 細胞の樹立が確認できたため、病態研究・治療薬スクリーニングにむけての準備を行っていく。

またパールカンの部分欠損に起因するシュワルツヤンペル症候群(SJS)は、比較的生命予後が良く、天寿を全うしうることから、ミオトニア以外の臨床症状が診断、診療における重要検討事項となる。筋症状と並ぶ骨軟骨障害と心血管系のリスクについてマウスモデルによる検討を進め、最適な診療ガイドライン作成を目指していく。

自己貪食空胞性ミオパチーは超稀少疾患であるため、今回の実態調査解析から治療を含めた診療ガイドラインの策定、病理学的基礎研究から根本治療法の開発が必要である。

○倫理面への配慮

研究協力施設において、患者からの文書での十分なインフォームドコンセントを得る。

患者からの血液検体は連結可能匿名化を行った後、外部委託施設に送付し、DNA抽出および血清分離を行う。処理された検

体は国立精神神経医療研究センター等に送り、個人情報管理者により、送付してきた施設を含まない通し番号を付与され、ゲノム DNA として保管される。バックアップ施設（東北大学）にも検体を分けて保存する。各研究協力施設において、個人情報管理者を置き、連結可能匿名化で用いた匿名符号の管理について責任を持つものとする。

臨床調査票は主治医が記載し、血液検体と結び付けられる形で連結可能匿名化を行い、研究統括施設に送られ、個人情報管理者により検体と同一の通し番号（施設情報が含まれない）を付与され、臨床データセンターに送付、LAN に接続されていないコンピュータに入力し保存する。このコンピュータのログインにはパスワードを設定し、研究統括施設の個人情報管理者が管理する。臨床調査票の原本は鍵の掛るロッカーに保存する。臨床調査票による臨床情報収集は原則として経時的（1 年毎）に行い、臨床像の進行・治療応答性に関する情報も蓄積する。

正常対象として筋疾患に罹患しておらず患者と血縁関係のない人（患者の配偶者など）から文書で十分なインフォームドコンセントを得た後、採血し DNA 抽出および血清分離を行う。正常対象については採血した施設で検体を連結不可能匿名化する。筋生検については疾患対象となるが、同様にインフォームドコンセントを得た上で病態の比較検討をする。

封入体筋炎に関しては東北大学で臨床研究につき平成 23 年に倫理審査委員会の承認が得られている。ほかの分担研究施設に関しても各々の施設で承認済みである。

C. 研究結果

- ・ 研究班全体としての研究成果

診断基準の確定、関連学会での承認

平成 23 年度までに各奨励研究班で行った全国調査やそれに基づき作成した診断基準を確定した。これらの診断基準については成果物として添付する。日本神経学会・日本神経治療学会・日本小児神経学会等に対してこれらの診断基準を提出して学会診断基準として承認を受ける予定である。これらの成果により臨床的には疾患の認知度を高め、正確な診断に至る症例が増えると考えられ、また将来臨床試験を行う際に適切な症例を選択することが可能となるため、その意義は高い。

診断ガイドラインの策定

例えば自己貪食空胞性ミオパチーにおける心筋症は致死性で予後規定因子であるが、現段階では根治療法は心臓移植しかない。現状では対症療法にならざるを得ないが、全国調査の二次調査票の集計結果より、これまで施行された治療方法を整理して、現状で最適な診療ガイドライン作成を行うべく検討中である。

筋チャンネル病に関しては、筋チャンネル病疑いの約 30 症例の遺伝子解析を研究協力者と施行し、まれなケースを含め発見し、診断・病態解明を推進した。次世代シーケンサによる全エクソーム解析と、それに引き続くチャンネルの機能解析により、Andersen-Tawil 症候群のあらたな原因遺伝子を同定した。

また Schwartz-Jampel 症候群を疑う 1 症例に対して次世代シーケンサにて塩基配列を決定し、パールカンをコードする HSPG2 に D3954Y 変異と L1088P 変異を heterozygous に認めた症例を確認している。

自己貪食空胞性ミオパチー（AVM）の臨床病態について臨床病理学および遺

伝学的解析を行い、世界で初めて診断基準を作成し、本邦で初めての疫学調査によるAVM患者の実態調査を行った。各臨床病型により重症度や発症年齢、合併症、生命予後は大きく異なることを明らかにした。

※診断基準を添付する。

D. 考察

診断基準の作成については各対象領域で作成することができた。診断ガイドラインに関しては、前項調査等を通じてその妥当性について検討を続ける。先天性ミオパチー全体ならびに各病型の頻度については、NCNP骨格筋レポジトリーのデータを分析することで明らかにすることができた。そこで各病型の症状経過をよりの確に把握するため、当初、初年度に行う予定であった全国調査を、次年度に移行した。病因解析、画像解析は当初の研究計画通り、順調に進んでいる。平成25年度の目標である患者検体の収集、次世代シーケンサーを用いた解析に関しても一部疾患ですでに開始しており、当初の目標通り、順調に進んでいる。

また、臨床現場等への研究成果の活用面としては、封入体筋炎に関してはすでに暫定版として日本語版の診断基準を公表しており、総説などを通じて臨床医に浸透しつつある。診断基準として活用され、臨床的な意義が認められていると考えられる。ほか、各対象疾患に関しても臨床と病因、病型頻度情報が明らかになることで、診療上の注意点、予後予測などに関する情報提供が可能となる。病因・病態の解明は筋形成の分子メカニズムを明らかにするという基礎医学領域へ多大な寄与が可能となる。

E. 結論

今後も継続して前向き調査での病態解明や患者数把握が必要である。同時に診断基準の精度についても検証していく。さらにモデルマウスの開発や患者血清・筋サンプルを用いた病態解明を行っていく。公費負担を含めた社会的支援も必要と考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoki M, Suzuki N. [Sporadic inclusion body myositis in Japan]. *Nihon Rinsho*. 2012 ;70: 895-906.
2. Suzuki N, Aoki M. [Inclusion body myositis]. *Brain Nerve*. 2011 ;63 :1205-15.
3. 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*. 2012 ;259:554-6.
4. Takahashi T, Aoki M, Suzuki N, Tateyama M, Yaginuma C, Sato H, Hayasaka M, Sugawara H, Ito M, Abe-Kondo E, Shimakura N, Ibi T, Kuru S, Wakayama T, Sobue G, Fujii N, Saito T, Matsumura T, Funakawa I, Mukai E, Kawanami T, Morita M, Yamazaki M, Hasegawa T, Shimizu J, Tsuji S, Kuzuhara S, Tanaka H, Yoshioka M, Konno H, Onodera H, Itoyama Y. Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84:433-40.
5. Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara Y. Exome

sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. J Hum Genet 2013 (in press).

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 分担研究報告書

先天性ミオパチーの調査研究

研究分担者：林由起子¹⁾、小牧宏文²⁾

共同研究者：石山昭彦²⁾

1) 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

2) 国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科

研究要旨 先天性ミオパチーは乳児期早期に発症する遺伝性筋疾患で、筋病理学所見から複数の病型に分類されている。本研究では、本邦における先天性ミオパチーの病型頻度・臨床的特徴を明らかにすることを目的とする。本邦における先天性ミオパチー全体の頻度は Duchenne 型筋ジストロフィーとほぼ同じであり、そのうち、ネマリンミオパチーが最も多く 26%を占めた。ネマリンミオパチーでは *ACTA1* 変異が 15%を占め、そのほとんどが乳児重症型であった。また、先天性ミオパチーの画像を集積し、ネマリンミオパチーを中心に解析を進めた。今後、他の病型についてもその臨床病理学的特徴の解析を進めていく。

A：研究目的

先天性ミオパチーは生直後あるいは乳児期早期より全身の筋緊張低下、発達遅滞、呼吸・哺乳障害などを示す遺伝性筋疾患で、筋病理所見の特徴からいくつかの病型に分類されている。複数の原因遺伝子が明らかになっているが、まだ原因不明のものも多い。本研究では、先天性ミオパチーの各病型の頻度、診断及び臨床管理上の問題点を明らかにすると同時に先天性ミオパチー各病型の頻度を明らかにし、診断基準の作成を行う。

B：研究方法

1) 国立精神・神経医療研究センター(NCNP)骨格筋レポジトリーにおける先天性ミオパチ

一患者の臨床病理学的解析

全国の病院から筋病理診断を依頼されたヒト凍結骨格筋組織約1万3千検体を有する NCNP骨格筋レポジトリーに保存されている先天性ミオパチー症例について、病型の明らかである先天性ミオパチーと分類不能の先天性ミオパチー患者各々の数を明らかにする。また、ネマリンミオパチーの予後調査の一環として骨格筋画像を集積し、各病型における障害筋分布を明らかにする。

2) 新規疾患関連遺伝子候補の探索をすすめ、原因遺伝子の解明を進める。

(倫理面への配慮)

本研究において使用する全てのヒト資料・試料から得られた情報は、いずれも疾患の確定診断のために必要であり、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資料・試料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する。得られた研究結果は公開する。

C: 研究結果

1) 先天性ミオパチーの病型頻度

NCNP 骨格筋レポジトリ約 13,000 検体のデータを分析し、先天性ミオパチーの頻度が筋ジストロフィーの中で最も頻度の高いデュシェンヌ型筋ジストロフィーと同程度であることを明らかにするとともに、各病型頻度を推計した。その結果、先天性ミオパチー全体の数は Duchenne 型筋ジストロフィーとほぼ同数であった。ネマリンミオパチーが最も多く 26% を占め、次いで中心核ミオパチー、先天性筋線維タイプ不均等症、セントラルコア病の順で、分類不能のものも 31% 認められた。

2) 先天性ミオパチーの予後調査

先天性ミオパチー患者を診断している施設の協力を得て、臨床経過や画像情報等についてのデータの収集を開始した。今年度は、先

天性ミオパチー 45 例の骨格筋画像所見を国立精神・神経医療研究センター脳病態統合イメージングセンターに登録した。このうちネマリンミオパチー 11 例を中心に障害筋分布の特徴について詳細に検討した結果、*ACTA1* 変異をもつ 3 例では一部既報告と異なる筋選択性を示した。また原因遺伝子が同定されていない例の中で共通の筋障害分布を示す群を見いだした。

3) 先天性ミオパチーの原因遺伝子の同定

先天性ミオパチーの中で最も多いことが判明したネマリンミオパチーについて、既知原因遺伝子スクリーニングを行い、診断確定を進めるとともに、新規疾患候補遺伝子の探索をすすめている。*ACTA1* 変異例は約 15% に認められ、そのほとんどが乳児重症型となるが、例外的に常染色体優性遺伝形式をとる軽症例も存在した。一方、同じ *ACTA1* 変異でも筋病理学的にネマリン小体が認められず、先天性筋線維タイプ不均等症を示す場合もしばしば認められた。エクソン 183 個からなる巨大遺伝子 *NEB* に関しては、現在次世代シーケンサーが威力を発揮している。さらに他施設との共同研究の結果、ネマリンミオパチーの新規疾患原因候補遺伝子を複数見いだしており、現在更なる解析を進めているところである。

D: 考察

先天性ミオパチーの原因遺伝子は複数知られているが、まだ未知のものも多い。また、同じ遺伝子の変異であっても筋病理所見や障害筋分布が異なる場合も多く、分類は複雑である。今後、更なる医臨床病理学的・遺伝学的解析が必要であるとともに、骨格筋画像の定量的な評価法の開発を目指す。

E：結論

今年度は先天性ミオパチーの中で最も頻度の高いネマリンミオパチーを中心に解析を進めた。次年度はさらに対象を広げ、先天性ミオパチーの全体像に迫りたい。

F：健康危険情報

特になし

G：研究発表

1：論文発表他

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, Apr, 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.* 22(5): 389-393, May, 2012

Suzuki S, Hayashi YK, Kuwana M, Tsuburaya R, Suzuki N, Nishino I: Myopathy associated with antibodies to signal recognition particle: disease progression and neurological outcome. *Arch Neurol.* 69(6): 728-732, Jun, 2012

小牧宏文：小児の診療手技 100 筋生検. 小児科診療 75: 276-278, 2012

小牧宏文：症候・疾患と検査・診断 神経筋疾患の診断. 小児神経学の進歩 41:69-77, 2012

石山昭彦, 小牧宏文：小児慢性疾患の生活指導—最新の知見から— 10.神経・筋疾患 2) 先天性ミオパチー. 小児科臨床 65(4): 839-846, 2012

石山昭彦, 齋藤義朗: 先天性筋ジストロフィー. 小児内科 44: 794-795, 2012

2：学会発表

Kajino S, Hayashi YK, Ishigaki K, Nonaka I, Osawa M, Nishino I: Fiber type disproportion caused by LMNA mutations. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

Noju A, Suzuki M, Ogata K, Yatabe K, Honma Y, Ishihara T, Hayashi YK, Nishino I, Nonaka I, Tamura T, Kawai M: Adult-onset centronuclear myopathy with dynamin 2 (DNM2) mutation. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

Takata M, Suzuki M, Ogata K, Yatabe K, Shigeyama T, Honma Y, Hayashi YK, Nishino I, Nonaka I, Tamura T, Kawai M: Myopathy with tubular aggregates associated with miosis and ophthalmoplegia: a new disease? The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

Ishiyama A, Hayashi YK, Kajino S, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital fiber type disproportion with myofibrillar disorganization and altered internal nuclei is caused by RYR1 mutation. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

Endo Y, Komaki H, Sasaki M, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Familial cases of progressive muscle weakness with rigid spine syndrome. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

Uruha A, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: A 19-year old lady with progressive muscle weakness and atrophy. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

Hayashi YK: Japanese family phenotypes. NEMALINE MYOPATHY SATELLITE WORKSHOP. Perth, Australia, 10.14, 2012

Ishiyama A, Hayashi YK, Kajino S, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital fiber type disproportion with myofibrillar disorganization and altered internal nuclei is caused by RYR1 mutation. 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10.9-10.13, 2012

Kajino S, Hayashi YK, Ishigaki K, Nonaka I, Osawa M, Nishino I: Fiber type disproportion caused by LMNA mutations. 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10.9-10.13, 2012

石山昭彦, 林由起子, 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, 西野一三: 内在核と筋原線維間網の異常を有し二峰性筋線維不均等を示す先天性ミオパチーはRYR1変異が原因である. 第54回日本小児神経学会総会, 札幌, 5.17, 2012

岡崎哲也, 小牧宏文, 石山昭彦, 鋤柄小百合, 藤井克則, 齋藤貴志, 齋藤義朗, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 林由起子, 西野一三: 幼児期発症の遠位型ミオパチーの2例. 第54回日本小児神経学会総会, 札幌, 5.18, 2012

梶野幸子, 林由起子, 石垣景子, 埜中征哉, 大澤真木子, 西野一三: 筋線維タイプ不均等症を呈するLMNA 遺伝子変異例の検討. 第54回日本小児神経学会総会, 札幌, 5.18, 2012

H: 知的所有権の取得状況 (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

筋チャンネル病の遺伝子解析および病態解析

研究分担者：高橋 正紀¹⁾

共同研究者：穀内洋介¹⁾、大野欽司²⁾、木下正信³⁾、佐々木良元⁴⁾、
松浦 徹⁵⁾

- 1) 大阪大学大学院 医学系研究科 神経内科学
- 2) 名古屋大学大学院 医学系研究科 神経遺伝情報学
- 3) 首都大学東京 健康福祉学部
- 4) 三重大学医学部附属病院 神経内科
- 5) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経内科学

研究要旨 骨格筋チャンネル病の診断向上には、診断確定症例の臨床情報・検査所見蓄積が重要である。全国から依頼された症例について遺伝子解析を行った。あらたに見出された未報告の変異については、真に疾患変異であることを明白にし、病態を理解するため、チャンネル機能の電気生理学的解析を行い、コンピューターシミュレーションにより症状との関連を検討した。原因が最も同定されにくい低カリウム性周期性四肢麻痺について、次世代シーケンサによる解析により、1例で新規遺伝子に原因を同定した。

A：研究目的

骨格筋の電氣的興奮・収縮などに不可欠なイオンチャンネルの遺伝子異常が周期性四肢麻痺、ミオトニーなどの疾患の原因となることが判明した。これらは「チャンネル病」と総称される疾患に含まれる。これら骨格筋チャンネル病は、疾患として気づかれていない軽症例から、筋萎縮・筋力低下を呈する重症例までである。さらに、専門医であっても経験することが稀で、診断・治療などに困難を伴うことが多い。我々の21年度の調査から、遺伝子診断施行率が低く確定診断例が非常に少ないこと、臨床

徴候（特にミオトニー症候群）に対する認識が低く見逃されている可能性のあることが浮き彫りになった。そこで、診断確定症例を増やし、臨床情報・電気生理検査所見を蓄積することにより、より精度の高い診断基準・検査指針の策定につなげることを目的とした。

また、特に原因となる遺伝子異常が同定されないことの多い低カリウム性周期性四肢麻痺について、次世代シーケンサによる網羅的解析を精力的に行い、原因遺伝子を同定することも目的とした。

B：研究方法

全国から提供された筋チャンネル病(周期性四肢麻痺、非ジストロフィー性ミオトニー症候群など)疑いの症例について、既知の原因遺伝子 (*SCN4A*, *CACNA1S*, *CLCN1*, *KCNJ2*, *KCNJ18*) についてサンガーシークエンス解析を施行した。報告のない変異が見つかった場合には、培養細胞(HEK293)に変異チャンネルを発現させ、パッチクランプ法でチャンネルの電位依存性などの機能に異常が生じているかどうかを確認することとした。

既知の原因遺伝子に変異を認めない周期性四肢麻痺症例のうち5例を選び、次世代シークエンスによる全エクソーム解析を行い、原因遺伝子を同定することを試みた。具体的には、SureSelect Human All Exon v.2 (Agilent)でゲノムDNAから全エクソームを濃縮し、ライブラリを調整した後、SOLiD4システムで配列情報を取得した。163のイオンチャンネル遺伝子を疾患原因候補として解析した(大野欽司班員による)。

疾患変異の可能性がある変異チャンネルをツメガエル卵母細胞へRNAを注入し発現させ、チャンネル電流を二電極膜電位固定法にて解析し、チャンネル機能の異常が認められるかどうか検討した。

iPS細胞を用いた病態研究・治療薬スクリーニングを目指す研究も行った。筋チャンネル病の関連疾患である筋強直性ジストロフィーについて、患者由来線維芽細胞からiPS細胞の樹立を、昨年度から国立精神神経医療研究センター 神経研究所 荒木敏之部長のもとで行った。

(倫理面への配慮)

患者の遺伝子に関わる研究、患者情報・組織

を用いた研究については、それぞれ大阪大学ヒトゲノム研究審査委員会、大阪大学医学部・医学部附属病院倫理委員会にて承認済みである(下記一覧)。同意を文書にて得て、研究への参加は患者の自由意思に基づくこと、同意の撤回が自由にできること、連結可能匿名化を行い個人情報保護に最大限の配慮をすることなど「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」などを遵守し行った。

記) 承認状況

「神経・筋チャンネル病の遺伝子解析」 大阪大学研究倫理審査委員会 平成16年初版承認、2012年4月3日最新版承認

「本邦における筋チャンネル病の実態に関する研究」 大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会 2009年8月13日承認

「筋疾患患者からの人工多能性幹細胞(iPS細胞)樹立とそれを用いた病態解析・治療法探索」 大阪大学医学部倫理審査委員会 2011年9月5日承認

「神経疾患患者からのiPS細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」 大阪大学医学部倫理審査委員会 2012年4月25日承認

C：研究結果

12例の筋チャンネル病患者の遺伝子解析を施行し、貴重な症例がいくつも見出された。たとえば、トムゼン型先天性筋強直症(優性遺伝性)の家系において、*CLCN1*複合ヘテロ変異の患者がいるというまれなケースが見出され、なぜ重症化しているか臨床病態の理解が深まった。また、*SCN4A*, *CLCN1*の両方に報告のない変異が見出された、高カリウム性周期性四肢麻痺症例疑い症例も見出した。

後者についてはチャンネル機能の解析を現在遂行中である。なお、情報交換を行いながら研究協力者の三重大学 佐々木良元助教のもとでも 20 例弱の遺伝子解析を遂行した。

次世代シーケンサによる解析を行った 5 例のうち、Andersen-Tawil 症候群類似の心電図異常と周期性四肢麻痺を示す患者において、あるイオンチャンネル遺伝子にミスセンス変異を同定した。このチャンネルを Andersen-Tawil 症候群の原因である Kir2.1 チャンネルと共発現させるとヘテロマーを形成し、Kir2.1 電流の抑制することが示されているが、変異チャンネルではより強い抑制が観察された。このチャンネルは別の不整脈家系でも異常が報告されていることから、このチャンネル遺伝子は、Andersen-Tawil 症候群のあらたな原因遺伝子であると考えられ、チャンネル電流そのものの低下に加え、Kir2.1 チャンネルに対する抑制作用も筋病態に関連していることが示唆された。

筋強直性ジストロフィー患者由来 iPS 細胞を樹立し、病態研究・治療薬スクリーニングにむけての準備を開始した。今後、他のチャンネル病についても作成予定である。

D：考察

今年度のみで 10 例以上のチャンネル病の遺伝子解析を行い、新規変異を含む遺伝子異常を同定した。全国にはまだまだまだ確定診断のできていない患者が存在することが予想される。今後、効率的な遺伝子解析、未知の変異・原因遺伝子の同定を行うことが求められる。

低カリウム性周期性四肢麻痺では欧米に比して既知の変異が認められる割合が低かったことから、班員である名古屋大学神経情報遺伝学の大野欽司教授と次世代シーケンサに

よる解析を行った。その結果、原因遺伝子と考えられる異常を見出だし、チャンネル機能の電気生理学的解析の結果と合わせて、原因遺伝子であろうということを確認した。

また、新規変異の Na チャンネルについては見出された変異が多型でなく、疾患の原因となり症状を説明しうるか、チャンネル機能の解析、Hodgkin-Huxley モデルに基づくコンピュータシミュレーションまで行い、厳密に検証してきた。これは、遺伝子解析のみに終わらず、チャンネル病の病態解明に重要であるといえる。また、臨床的意義だけでなく、基礎研究では明らかにしえない、予想外の部位のイオンチャンネルの機能も明らかにできる可能性がある。

E：結論

本邦における骨格筋チャンネル病の遺伝子解析を積極的に行い、未報告の新規変異についてはチャンネル機能の解析まで行い疾患変異であること確定した。診断未確定患者が多く存在することから、今後はさらに効率的な遺伝子解析の体制が求められる。また、周期性四肢麻痺の次世代シーケンサを用いた解析を行い、新規原因遺伝子の同定という特筆すべき成果があった。

F：健康危険情報

なし

G：研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

1：論文発表

Yoshinaga Y, Sakoda S-I, Good JM, Takahashi MP, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K, Kitamura

T, Kobayashi K, Ohtsuka Y. A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J Neurol Sci.* 2012; 315(1-2):15-9.

Suenaga K, Lee KY, Nakamori M, Tatsumi Y, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Du H, Ares M Jr, Swanson MS, Kimura T. Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS One.* 2012;7(3):e33218.

Kokunai Y, Goto K, Kubota T, Fukuoka T, Sakoda S, Ibi T, Doyu M, Mochizuki H, Sahashi K, Takahashi MP. A sodium channel myotonia due to a novel SCN4A mutation accompanied by acquired autoimmune myasthenia gravis. *Neurosci Lett.* 2012; 519(1):67-72.

Charizanis K, Lee K-Y, Batra R, Goodwin M, Zhang C, Yuan Y, Shiue L, Cline M, Scotti MM, Xia G, Kumar A, Ashizawa T, Brent Clark H, Kimura T, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Gomes-Pereira M, Gourdon G, Sakai N, Nishino S, Ares Jr M, Darnell RB, Swanson M. Muscleblind-like 2 mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 2012; 75(3):437-50.

佐々木良元、高橋正紀、穀内洋介、平山正昭、衣斐 達、富本秀和、望月秀樹、佐橋 功 骨格筋型塩化物イオンチャンネル遺伝子

(CLCN1) の複合ヘテロ接合体変異で重症化した Thomsen 病 臨床神経学 印刷中

2 : 学会発表

(シンポジウム・招待講演)

Takahashi MP. Molecular mechanisms in myotonic syndromes. June 7, 2012, L'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC)-CNRS UMR 7104 - Inserm U 964 Illkirch フランス

Takahashi MP. RNA mis-splicing in myotonic disorders. The 9th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy' Sep 7, 2012 東京

(一般発表)

穀内 洋介, 紀 嘉浩, Li Moyi, 伊藤 英樹, 中森 雅之, 木村 卓, 松村 剛, 藤村 晴俊, 貫名 信行, 堀江 稔, 井本 敬二, 石浦 章一, Maurice Swanson, 佐古田 三郎, 高橋 正紀, 望月 秀樹 筋強直性ジストロフィーにおける心筋型 Na チャネルのスプライシング異常と心伝導障害 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 24 日 東京 (東京国際フォーラム)

末永 浩一, 木村 卓, Kuang-Yung Lee, 中森 雅之, 高橋 正紀, 藤村 晴俊, 陣内 研二, 久保 秀司, 玉置 (橋本) 知子, Manuel Ares, Maurice Swanson, 芳川 浩男 筋強直性ジストロフィー症における中枢神経スプライシング異常およびその分子機序の解明 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 25 日 東京 (東京国際フォーラム)

佐々木良元, 高橋正紀, 穀内洋介, 平山正昭,
衣斐 達, 佐橋 功, 富本秀和 骨格筋型塩
化物イオンチャネル遺伝子 (CLCN1) の複合
ヘテロ接合体変異で重症化したトムゼン病
第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月
25 日 東京 (東京国際フォーラム)

高谷将悟, 森田ゆかり, 大崎康史, 土居義典,
瀬尾宏美, 穀内洋介, 高橋正紀 家族性低カ
リウム性周期性四肢麻痺 2 型の 1 例 第 106
回日本内科学会四国地方会 2012 年 6 月 2 日

Freyermuth F, Thibault C, Alunni V,
Auboeuf D, Zimmer T, Takahashi M,
Charlet-Berguerand N. SCN5A splicing
alteration in heart of myotonic dystrophy
patients. 7th International Conference on
Unstable Microsatellites & Human Disease.
June 9-14, 2012, Mont Ste Odile,
Strasbourg フランス

H : 知的所有権の取得状況 (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