

## アンチセンスによる筋強直性ジストロフィーの治療の最適化

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

先天性筋強直性ジストロフィー（CDM）は、しばしば筋病理学的に先天性筋線維タイプ不均等症（CFTD）やX連鎖性ミオチューブラーミオパチー（XLMTM）と類似の所見を呈することがある。従って、CFTDの鑑別診断を十分に検討することが、先天性筋強直性ジストロフィーの正確な診断に繋がる。CFTD様の病理所見を呈する例の中に、*LMNA*遺伝子変異による例や*RYR1*複合ヘテロ接合型の例があることを見出した。従って、*LMNA*変異例や*RYR1*変異例もCDMとの鑑別を考慮すべきである。ただし、*RYR1*変異例では、顔面筋罹患や外眼筋麻痺が見られることがあり、CDMと比較してCKが低値を示していた。また、XLMTMとの鑑別においては、タイプ2C線維数とperipheral halo線維数の比率が鑑別に有用であることを明らかにした。

### A. 研究目的

筋疾患が疑われる際には伝統的に筋生検が考慮されることに加えて、本邦では一部に遺伝子解析に対する慎重な考え方があることなどもあり、遺伝子診断に選考して筋生検が行われることが少なからずある。従って、筋病理から両疾患を鑑別する必要性は少なくない。我々はこれまでに、先天性筋強直性ジストロフィー（CDM）が臨床病理学的に先天性筋線維タイプ不均等症（CFTD）やX連鎖性ミオチューブラーミオパチー（XLMTM）と類似の所見を呈することを示してきた。このことは、CFTDやXLMTMとの鑑別診断を十分に検討することが、先天性筋強直性ジストロフィーの正確な診断に繋がることを示している。

そこで、1) CFTD様の病理所見を呈する例の中に核膜蛋白質A型ラミンをコードする*LMNA*遺伝子変異による例があるかどうか、2)変異未確定でCFTD所見を呈する例の中に筋小胞体Ca<sup>++</sup>遊離チャネルであるリアノジン受容体をコードする*RYR1*遺伝子変異例があるかどうか、3) XLMTMとCDMとの鑑別に有用な病理学的マーカーがあるかどうか、の検討

を行った。

CFTDは筋病理学的に、タイプ1線維がタイプ2線維より小径（12%以上の差）であることを特徴とする先天性ミオパチーである。臨床的には他の先天性ミオパチーと同様に筋緊張低下と筋力低下があり、多くは嚥下障害、関節拘縮、側弯症、細長い顔、高口蓋等を示す。原因遺伝子として*ACTA1*、*TPM3*、*SEPN1*の3遺伝子が知られている。しかし、悪性高熱症やセントラルコア病で認めるような筋病理所見とCFTDでは、筋病理学的に全く異なっているにも関わらず、乳幼児期に発症したCFTD類似の所見を呈する*RYR1*ミオパチーを見出したため、臨床、筋病理学的な検討を行った。

*LMNA*遺伝子は染色体1q21に存在し、その遺伝子変異は、Emery-Dreifuss型筋ジストロフィー（EDM）、肢体型筋ジストロフィー1B型（LGMD1B）、先天性筋ジストロフィー（L-CMD）などの原因となる。EDMDは幼小児期に発症する緩徐進行性の筋ジストロフィー、病初期からの関節拘縮、心伝導障害を伴う心筋症を三主徴とする。LGMD1Bは近位筋優位の筋力低下と心伝導障害を伴う心筋症を特徴とするが、関節拘縮は明らかではない。L-CMDは乳児期

早期に発症し、重症の筋力低下と筋緊張低下、呼吸筋と頸部筋の筋力低下が目立つ。LMNAミオパチーの筋病理は筋線維の大小不同、壊死再生所見、間質結合組織の増加といった非特異的な筋ジストロフィーの特徴を示し、タイプ1線維、タイプ2線維ともに侵される。LMNAミオパチーとCFTDは筋病理学的にも臨床的にも異なっているにも関わらず、乳幼児期に発症しCFTDに類似した筋病理所見を呈するLMNAミオパチーを見出したため、臨床・筋病理学的に検討を行った。

*RYR1* 遺伝子は染色体 19q13 上に存在し、その蛋白質であるリアノジン受容体は、筋小胞体膜のカルシウム調整チャネルとして作用し、骨格筋の筋収縮連関に関与する。これまで、悪性高熱症患者での遺伝子変異が同定されているほか、先天性ミオパチーのなかのセントラルコア病の責任遺伝子としても知られている。近年、マルチコア病、中心核病など、他の先天性ミオパチーでの報告も散見され、先天性ミオパチーのなかで比較的多く認められる変異ではないか、とも言われている。悪性高熱症患者は日常生活では無症状であるが、誘発薬を投与されることにより発症し、一度発症すると症状は急激に悪化し死に至る。筋病理所見はほぼ正常で特有の所見は認めない。セントラルコア病は、軽度の筋力低下のほか側彎を認めるが、生命予後としては良好な疾患である。筋病理では、NADH-TR 染色で筋線維の中心部がコア様に抜け染色されない特徴的な所見がみられ、同じ *RYR1* 変異でも、その表現型は異なる。悪性高熱症やセントラルコア病で認めるような筋病理所見と CFTD では、筋病理学的に全く異なっているにも関わらず、乳幼児期に発症した CFTD 類似の所見を呈する *RYR1* ミオパチーを見出し、臨床・筋病理学的な検討を行った。

さらに、CDMとXLMTMの病理学的鑑別方法を十分に検討することによってCDMおよびXLMTMの正確な診断に寄与したいと考え、CDMとXLMTMの筋病理学的鑑別に有用なマーカーを探索するため各種組織学的検討を行った。

## B. 研究方法

国立精神・神経医療研究センター骨格筋レポジトリに登録されている先天性ミオパチー症例 746 例のうち、筋病理学的に CFTD が示唆された 94 例 (CFTD 群) を対象とし、臨床像、臨床病理、遺伝学的解析を行った。また、遺伝学的に *DMPK* 遺伝子の三塩基配列伸長が示唆された 31 例 (CDM 群) 及び *MTM1* 変異の同定されている 37 例 (XLMTM 群) を対象とし、タイプ 2C 線維と peripheral halo を有する線維の割合を計算し、生検時年齢との関係を比較検討した。

### (倫理面への配慮)

今回の研究は、DM 患者生検筋からの mRNA スプライシング異常から派生した研究である。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書式を用いて、検体の研究利用に対するインフォームドコンセントを取得している。

## C. 研究結果

1) CFTD 群のうち 2 例に LMNA 遺伝子変異を見出した。一方、LMNA 群の 5 例で筋線維タイプ不均等 (FTD) が認められた。成人発症例 1 例を除く、6 例の発症年齢は 1 歳 2 ヶ月から 5 歳 (平均 2 歳 8 ヶ月) で、高口蓋や呼吸障害はなく、血清 CK 値は  $915 \pm 698$  IU/L と全例で高値を示した。筋病理所見から計算した fiber size disproportion (%FSD) [ $(\text{mean type 2 fiber diameter}) - (\text{mean type 1 fiber diameter}) / \text{mean type 2 fiber diameter} \times 100$ ] は  $27.8 \pm 17.8\%$  で *ACTA1* 及び *TPM3* に遺伝子変異のある CFTD 9 例の %FSD ( $41.3 \pm 13.5\%$ ) と比べ、有意差は認めなかった。

CFTD 群、LMNA 群それぞれのタイプ 1 線維とタイプ 2 線維の平均径を通常年齢における筋線維径と比較したところ、CFTD 群ではタイプ 1 線維萎縮を、LMNA 群ではタイプ 2 線維肥大を認めた。このことは、両群における FTD の成因の違いを示唆し

た。

2) CFTD 群のうち 6 例に RYR1 遺伝子変異を複合ヘテロ接合型で認めた。この 6 例の発症はいずれも生下時あるいは乳幼児期で、筋病理学的に診断されたのは 0 歳 6 カ月から 4 歳 (平均 1 歳 9 カ月) であった。出生時は、フロッピーインファントといった筋力・筋緊張低下を呈し、また呼吸障害も認め、人工呼吸器または酸素投与が行われている。しかし、その後の成長 (加齢) とともに軽快し、1 例を除いて人工呼吸器や酸素投与からの離脱が可能であった。運動発達も遅れを認めながらも、3 例で歩行獲得まで認めている。また顔面筋罹患は顕著で、外眼筋麻痺をも認めていた。血清 CK 値は、 $54 \pm 21$  IU/L (基準値 45-163) と基準値内ではあるが低値を示した。筋病理所見から計算した fiber size disproportion (%FSD) [(mean type2 fiber diameter)-(mean type1 fiber diameter)/mean type 2 fiber diameter]  $\times 100$  は  $56.2 \pm 5.1\%$  であり、ほかの筋病理所見として、内在核や非典型的なコア構造を示す例も散見された。

3) CDM、XLMTM 両疾患において、タイプ 2C 線維と peripheral halo を有する筋線維の割合を計算し、筋生検時の年齢と比較した。CDM においてはタイプ 2C 線維、peripheral halo 線維共に、出生直後は高い割合を占めた。この割合は、筋生検時の年齢が高くなるに従い低下した。一方、XLMTM においては、出生直後はタイプ 2C 線維、peripheral halo 線維共に割合は少ないが、年齢が高くなるにつれて、peripheral halo 線維のみ顕著な増加を認めた。これらの結果は、両疾患における peripheral halo の成因の違いを示唆している。

#### D. 考察

1) LMNA 変異は筋病理所見上、CFTD と鑑別困難な例が存在する。高口蓋や呼吸障害を認めず、高 CK 血症があり、CFTD に類似した所見を呈する症例においては LMNA 遺伝子解析も考慮すべきと考えられた。

2) 今回同定し得た RYR1 複合ヘテロ接合型の

CFTD 類似例は、同様の RYR1 変異である悪性高熱症やセントラルコア病の表現型とは全く異なり、成長に伴い人工呼吸器からの離脱が可能であるなど、むしろ先天性筋強直性ジストロフィーに類似の臨床症状を示していた。筋病理上のほか、臨床症状においても類似する点があるが、顔面筋罹患や外眼筋麻痺といった臨床所見や、CK 値が低値である点は、RYR1 遺伝子を考慮すべき所見であると考えられた。

3) CDM において、特に出生直後に多数のタイプ 2C 線維を認めたのは、近年指摘されている筋線維の成熟遅延、すなわち未熟性の遷延を反映したためと推測された。一方、XLMTM においてはタイプ 2C 線維は少なく、peripheral halo が筋未熟性によるものではなく、近年の研究で明らかにされている筋構造維持の欠陥により筋障害が起こるといふ説を支持する結果であると考えられた。

#### E. 結論

LMNA 遺伝子変異における FTD 所見は、CFTD と異なり、タイプ 2 線維の肥大による相対的なタイプ 1 線維萎縮で成り立っていることが示唆された。RYR1 複合ヘテロ接合型の例は、先天性筋強直性ジストロフィーと筋病理学的にも臨床症状においても共通する点を認めたことから病因としては互いに近い位置にある可能性があると考えられた。CDM と XLMTM は、両疾患の疾患発症メカニズムの違いを反映して、病理学的にタイプ 2C 線維と peripheral halo を有する筋線維の割合から鑑別可能であると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, Imamura T, Araki N, Nishino I, Hayashi YK: The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM 72). PLoS Curr. 4:e5035add8caff4. ,2012

Mori-Yoshimura M, Okuma A, Oya Y, Fujimura-Kiyono C, Nakajima H, Matsuura K, Takemura A, Malicdan MC, Hayashi YK, Nonaka I, Murata M, Nishino I: Clinicopathological features of centronuclear myopathy in Japanese populations harboring mutations in dynamin 2. Clin Neurol Neurosurg. 114(6): 678-683, 2012.

Motoki T, Fukuda M, Nakano T, Matsukage S, Fukui A, Akiyoshi S, Hayashi YK, Ishii E, Nishino I: Fatal hepatic hemorrhage by peliosis hepatis in X-linked myotubular myopathy: A case report. Neuromuscul Disord. 23(11): 917-921, 2013

Liang WC, Hayashi YK, Ogawa M, Wang CH, Huang WT, Nishino I, JongYJ: Limb-girdle muscular dystrophy type 2I is not rare in Taiwan. Neuromuscul Disord. 23(8): 675-681, 2013

Koebis M, Kiyatake T, Yamaura H, Nagano K, Higashihara M, Sonoo M, Hayashi YK, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Yanagihara D, Matsuda R, Takahashi MP, Nishino I, Ishiura S: Ultrasound-enhanced delivery of Morpholino with Bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice. Sci Rep. 3: 2242, 2013

Oana K, Oma Y, Suo S, Takahashi MP, Nishino I, Takeda S, Ishiura S: Manumycin A corrects aberrant splicing of Clcn1 in myotonic dystrophy

type 1 (DM1) mice. Sci Rep. 3: 2142, 2013

Murakami N, Hayashi YK, Oto Y, Shiraishi M, Itabashi H, Kudo K, Nishino I, Nonaka I, Nagai T: Congenital generalized lipodystrophy type 4 with muscular dystrophy: Clinical and pathological manifestations in early childhood. Neuromuscul Disord. 23(5): 441-444, 2013

## 2 . 学会発表

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

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

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, 5.17-5.19, 2012

## G. 知的所有権の取得情報

- 1 . 特許取得  
特になし

2 . 実用新案登録  
特になし

3 . その他  
特になし