

Mochizuki H, Hayashi Y, Nishino I,
Takahashi MP. Phenotype-genotype
correlation in congenital myotonic
dystrophy. 9th International Myotonic
Dystrophy Consortium Meeting, Donostia
San Sebastian, Spain 2013 年 10 月 17 日

Kokunai Y, Itoh H, Kino Y, Li M, Nakamori
M, Kimura T, Matsumura T, Fujimura H,
Nukina N, Mochizuki H, Sakoda S, Horie M,
Ishiura S, Imoto K, Swanson MS, Charlet
Berguerand N, Takahashi MP. Altered
splicing of cardiac sodium channel might be
responsible for cardiac conduction defects
in myotonic dystrophy. 9th International
Myotonic Dystrophy Consortium Meeting,
Donostia San Sebastian, Spain 2013 年 10
月 17 日

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

Schwartz-Jampel 症候群の病態分子機構

研究分担者：平澤恵理⁽¹⁾

共同研究者：野中里紗⁽¹⁾，寧亮⁽¹⁾ 大野欽司⁽²⁾

(1) 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

(2) 名古屋大学大学院医学系研究科

研究要旨

SJS の原因遺伝子が初めて解ったが、効果的対症療法、根治療法が確立しておらず、かつ筋、骨格の症状から ADL を著しく障害する難治性疾患である。

本邦で遺伝子変異確定はまだ、潜在的な罹患者の存在が想定される。本研究の目的は、本邦における Schwartz-Jampel 症候群(SJS)の遺伝子診断は確立しておらず、潜在的な罹患者の存在が想定される。本邦における SJS の遺伝子診断を確立し、その分子病態を明らかにするための基礎研究を推進する。

A：研究目的

軟骨異栄養性筋強直症 (Schwartz-Jampel 症候群, SJS) はパールカン欠損疾患であり (*Nature Genetics*, 2001, *Am.J.Hum Genet* .2002)、筋の自発持続収縮によるミオトニアと骨格病変を主症状とする。申請者らは、生体におけるパールカンの機能解明のため、遺伝子改変動物を作成し、軟骨発生にパールカンが必須であることを示し (*Nature Genetics* 1999, & 2001)、アセチルコリンエステラーゼを神経筋接合部に局在させる必須分子であることを示した (*Nature Neuroscience* 2002)。これらの研究成果により、SJS の原因遺伝子が初めて明らかになった。効果的対症療法、根治療法が確立しておらず、かつ筋、骨格の症状から ADL を著しく障害する難治性疾患である。平澤等が、米国

で診断した邦人例の他、本邦で遺伝子変異が確定をした SJS はまだなく、潜在的な罹患者の存在が想定される。本研究の目的は、本邦における SJS の遺伝子診断を確立し、その分子病態を明らかにすることである。

B：研究方法

1999 年までに精神・神経センター (NCNP) 筋バンクに臨床診断 SJS として登録された 4 中 2 例はパールカン遺伝子変異が検出された。その後、パールカン遺伝子 (*HSPG2*) は巨大遺伝子であるので (mRNA で 14294 bp) 生検筋を使ったパールカン免疫染色で除外診断してきた。本邦症例を中心に診断システムの構築を目指すため、症例の蓄積が重要である。候補例には、臨床診断・電気生理学検査、必要であれば筋生検を行う。遺伝子変異解析は大野、タンパク質解析は平澤が行

うことにしている。SJS を疑う 1 症例の

初代線維芽細胞をドメイン特異的抗体で染色し、細胞外局在を確認した。Agilent 社 SureSelect Human All Exon kit V4 を用いてエクソン領域の DNA を濃縮し、ABI SOLiD4 シークエンサにてエキソームリシークエンシング解析を行った。パールカンのドメイン III の 2nd laminin type B を cloning し細胞外分泌シグナルをつなげて、変異パールカンの細胞外分泌能を解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子変異解析は順天堂大学および名古屋大学の生命倫理委員会の承認を得てヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に従い解析する。治療研究を開始する場合には、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)」に則り、順天堂大学及び名古屋大学の倫理委員会の承認を得た後に進める。

組み換え DNA 実験と動物実験は順天堂大学及び名古屋大学の承認を得ている。動物実験は、カルタヘナ法、ならびに、順天堂大学の動物実験委員会の承認を得て動物実験指針を遵守して研究を進める。

C : 研究結果

パールカンドメイン特異的抗体による初代線維芽細胞染色ではドメイン I, IV, V に対する特異的抗体により細胞外パールカンが染色されたが、ドメイン III に対する抗体では染色されなかった。エキソームリシークエンシング解析でドメイン III の 2nd laminin type B に p.Leu1088Pro ヘテロ変異を認め、サンガー法にて確認を行った。Leu1088 はオボッサムを除く哺乳類で高度に保存をされていた。ドメイン III の 2nd laminin type B に細胞外分泌シグナルを付加し HEK293 細胞に発現をさせたところ、細胞内にも培養液中にも組み換えパールカンの発現を認めた。p.Leu1088Pro を導入したところ細胞内の組み換えパールカンの発現が減弱した。この変異組み換えパールカンの細胞外分泌を全く認めなかった。プロテアーゼ阻害剤 MG132 を加えたところ変

異組み換えパールカンの細胞内発現が正常化し変異組み換えパールカンがプロテアーゼによって分解をされていることが示唆された。

もう一方のアレルにも遺伝子変異が存在することが想定をされるために、エキソームリシークエンシング断片を、BWA にて再度 mapping を行い、unmapped reads を BLAT で mapping を行い、stringency を下げて SNV コールを行ったが、もう一方の変異は同定できなかった。また、網羅的な RT-PCR でもエクソンレベルの large InDel を同定できなかった。

D : 考察

本邦で初めて診断した新規遺伝子変異を同定し、機能解析によりパールカンの分泌の障害を実証した。遺伝子診断は可能になったが、現状では、臨床、電気生理、及びタンパク質レベルの解析を併せ診断することが必要と考えられた。依然、患者数は少なく、さらなる症例発掘と診断基準の充実が必須である。報告例の多いフランスとの情報交換も重要と思われた。病態解析及び治療研究にはモデルマウスを使用して進めることが適正と思われた。さらに、マウス解析の結果より、全身合併症の注意点も警告して行きたい。

E : 結論

SJS の一例において新規ミスセンス変異を同定し、機能解析を行った。本邦においても SJS の診断を確立する必要せいがある。

F : 健康危険情報

特になし。

G : 研究発表

1 : 論文発表 論文発表

- 1 Ning R de Vega S, Kurihara H, Ichikawa-Tomikawa N, Xu Z, Nonaka R, Yamada Y, Miner J, Arikawa-Hirasawa E. Laminin $\alpha 1$ regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF β pathway. *Am J Pathol* in press.
- 2 de Vega S, Suzuki N, Nonaka R, Sasaki T, Forcinito P, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y. A C-terminal fragment of

- fibulin-7 interacts with endothelial cells and inhibits their tube formation in culture. *Arch Biochem Biophys* in press.
- 3 Furuya N, Ikeda SI, Sato S, Soma S, Ezaki J, Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy* in press.
- 4 Suzuki N, Numakawa T, Joshua Chou J, de Vega, S, Mizuniwa C, Sekimoto K, Adachi N, Kunugi N, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y, Akazawa C. Teneurin-4 promotes cellular protrusion formation and neurite outgrowth through focal adhesion kinase signaling. *FASEB J* in press.
- 5 ○Kerever A, Mercier F, Nonaka R, de Vega S, Oda Y, Zalc B, Okada Y, Hattori N, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E, Perlecan is required for FGF-2 signaling in the neural stem cell niche. *Stem Cell Res* 2013, 12: 492-505.
- 6 Nakazawa N, Miyahara K, Okawada M, Yamataka A, Suzuki R, Akazawa C, Tomikawa-Ichikawa N, Arikawa-Hirasawa E. Laminin-1 promotes enteric nervous system development in mouse embryo. *Pediatr Surg Int* 2013, 29: 1205-1208.
- 7 Douet V, Arikawa-Hirasawa E, Mercier F. Fractone-heparan sulfates mediate FGF-2 stimulation of cell proliferation in the adult subventricular zone. *Cell Proliferation* **2013**, 46: 137-145.
- 2 : 学会発表
1. Kerever A, Mercier F, Oda Y and Arikawa-Hirasawa E, Perlecan is necessary for the maintenance of CD133 expressing neural stem cells in the subventricular zone. **ISSCR 10th Annual Meeting**, June 13-16 2013 Yokohama Japan
2. Mercier F, Vanessa Douet, Arikawa-Hirasawa E, Heparan sulfate connective tissue niche for the regulation of stem cell proliferation in the adult brain. **ISSCR 10th Annual Meeting**, June 13-16 2013 Yokohama Japan
3. Nakazawa N, Miyahara K, Okawada M, Liu Y, Akazawa C, Yamataka A, Arikawa-Hirasawa E, Laminin-1 promotes neuronal development in mouse embryonic gut. **XXVth International Symposium on Paediatric Surgical Research** 21st-22nd September 2012 London UK
4. Arikawa-Hirasawa E, Douet V, Alarcon VB, Kerver A, Mercier F, Fractone niche for neuroepithelial and neural stem cell proliferation: From early brain development to adult subventricular zone. **Society for Neuroscience annual meeting 2013** San Diego CA USA
5. Kerver A, Yamada Y, Nonaka R, Mercier F, Arikawa-Hirasawa E. Age-related alteration of extracellular matrix in the subventricular zone of the lateral ventricles. **Society for Neuroscience annual meeting 2013** San Diego CA USA

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

本邦における終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症の分子病態

研究分担者：大野欽司¹⁾

共同研究者：中田智彦¹⁾、伊藤美佳子¹⁾、東慶輝¹⁾、大塚健司¹⁾
小牧宏文²⁾、奥村彰久³⁾、白石一浩⁴⁾

- 1) 名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学
- 2) 国立精神・神経医療研究センター病院・小児神経科
- 3) 順天堂大学医学部小児科
- 4) 国立病院機構宇多野病院小児神経科

研究要旨

本邦終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症(endplate AChE deficiency, EAD)3例で同定をした5種類のCOLQ遺伝子変異の解析を行った。AChE分画解析にて2変異(p.R227X, p.V322D)は非対称性AChE分子を作ることができなかった。C末端ドメインの3変異(p.C444Y, p.D447H, p.R452C)はColQのMuSKへの結合を阻害することを明らかにするとともに、変異ColQはColQノックアウトマウス神経筋接合部に係留ができないことを明らかにした。

A：研究目的

終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症(endplate AChE deficiency, EAD)は、AChEを終板基底膜に係留をするcollagen QをコードするCOLQ遺伝子の変異によって起きる。本研究の目的は、本邦EAD3症例で同定をした5種類のCOLQ遺伝子変異の分子病態を明らかにすることである。

B：研究方法

(i) COS細胞にヒトACHE遺伝子とヒトCOLQ遺伝子を発現させショ糖濃度勾配超遠心によりAChE分子を分画した。(ii) ColQノックアウトマウス筋切片に精製非対称型AChEをオーバーレイし、AChEの神経筋接合部への係留を調べた。(iii) プレートに精製

MuSKを吸着させ精製非対称型AChEをオーバーレイし、AChE活性を測定した。(iv) ColQノックアウトマウスの前脛骨筋に正常COLQならびに変異COLQを*in vivo* electroporationにて導入し、神経筋接合部におけるAChEの発現を調べた。(v) AAV8-COLQ-p.Asp447HisをColQノックアウトマウス尾静脈より導入し神経筋接合部におけるAChEの発現を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学系研究科、国立精神・神経医療研究センター、順天堂大学医学部、国立病院機構宇多野病院の生命倫理委員会の承認を得た後、患者のインフォームドコンセントを得た上で、関係倫理指針に則り行

った。

C : 研究結果

3名の EAD 患者において同定をした5種類の *COLQ* 変異のうち collagen domain の truncation mutations (p.Arg227X) と missense mutation (p.Val322Asp) は、シヨ糖濃度勾配超遠心による AChE 分子分画解析にて正常の非対称性 AChE 分子を作ることができないことが判明した。p.Cys444Tyr, p.Asp447His, p.Arg452Cys の3種類の *COLQ* ミスセンス変異はいずれも ColQ C 末端ドメインに存在する。*Colq* ノックアウトマウス筋切片への精製変異非対称型 AChE をオーバーレイする *in vitro overlay* 解析にて、3種類のいずれのミスセンス変異も神経筋接合部に係留できなかつた。プレートに精製 MuSK を吸着させ精製変異非対称型 AChE をオーバーレイする *in vitro plate-binding assay* でも3種類のいずれのミスセンス変異も MuSK に結合をできなかつた。*Colq* ノックアウトマウスの前脛骨筋に正常 *COLQ* を *in vivo electroporation* にて導入したところ、AChE の神経筋接合部における発現を認めた。一方、変異 *COLQ* の *in vivo electroporation* では AChE の神経筋接合部における発現を認めなかつた。同様に、正常 AAV8-*COLQ* の *Colq* ノックアウトマウス尾静脈注射にて、すべての神経筋接合部に AChE の発現を認め、運動機能の顕著な改善を認めた。一方、AAV8-*COLQ*-p.Asp447His の *Colq* ノックアウトマウス尾静脈注射では神経筋接合部における AChE の発現を認めず、マウス運動機能改善も認めなかつた。

D : 考察

ColQ C 末端ドメインが筋終板細胞膜の MuSK に結合をすることが 2004 年に報告を

された (Cartaud et al. *J. Cell Biol.*, 165: 505-515, 2004) が、本研究まで追試は行われていながつた。本研究により ColQ-MuSK 結合を検証するとともに、ColQ C 末端ドメインの遺伝子変異の分子機構を初めて明らかにすることができた。

E : 結論

本邦 EAD における *COLQ* 変異の解析にて、ColQ C-terminal domain は MuSK と結合し、変異が ColQ と MuSK との結合能を阻害することにより EAD を発症することが明らかにした。

F : 健康危険情報

特記事項なし。

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

(Original Article)

1. Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K. Mutations in the C-terminal domain of ColQ in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise ColQ-MuSK interaction. *Hum Mutat* 2013, 34: 997-1004.
2. Selcen D, Shen XM, Milone M, Brengman J, Ohno K, Deymeer F, Finkel R, Rowin J, Engel AG. Gfpt1-myasthenia: Clinical, structural, and electrophysiologic heterogeneity. *Neurology* 2013, 81: 370-378.
3. Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Ito M, Hutchinson DO, Mayeda A, Engel AG, Ohno K. HnRNP L and hnRNP LL antagonistically modulate PTB-mediated splicing suppression of *CHRNA1* pre-mRNA. *Sci Rep* 2013, 3: 2931.
4. Matsuura T, Nakayama T, Nakamura H, Ohya Y, Kimura T, Imahuku I, Ohno K, Nishino I, Abe K. Clinical and genetic analysis of the first known Asian family with myotonic dystrophy type 2. *J Hum Genet*, in press.
5. Ohkawara B, Cabrera Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, Ito M, Masuda

- A, Ito Y, Engel AG, [Ohno K](#). LRP4 third β -propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet*, in press.
- Kokunai Y*, Nakata T*, Furuta M*, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, [Ohno K](#), Takahashi MP. A mutation of Kir3.4 is responsible for Andersen-Tawil syndrome by dominant negative effect on Kir2.1. *Neurology*, in press. *Equal contribution.
 - Selcen D, Shen X-M, Milone M, Brengman J, [Ohno K](#), McQuillen M, Deymeer F, Finkel R, Rowin J, Engel AG. Investigation of 11 patients with GFPT1-myasthenia reveals clinical, structural, and electrophysiologic heterogeneity. 65th American Academy of Neurology (Platform), San Diego, California, USA Mar 16-23, 2013
 - Ohkawara B, Cabrera M, Nakata T, Milone M, Ito Y, Engel AG, [Ohno K](#). Mutations in the third β -propeller domain of LRP4 in congenital myasthenia compromise agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Poster), Kyoto, Japan Jun 22, 2013
 - Nakashima H, Ohkawara B, Imagama S, Ito Z, Ishiguro N, [Ohno K](#). R-spondin2 is crucial for neuromuscular junction formation. 43rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (Poster), San Diego, California, USA Nov 13, 2013
 - Ohkawara B, Cabrera M, Nakata T, Shen X, Ito Y, Engel AG, [Ohno K](#). Mutations in LRP4 in congenital myasthenia reveal position-specific regulations of agrin and Wnt signaling of LRP4. 43rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (Poster), San Diego, California, USA Nov 13, 2013

(Reviews and Book Chapters)

- Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Krejci E, Engel AG. Specific binding of collagen Q to the neuromuscular junction is exploited to cure congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis. *Chem Biol Interact*, 2013, 203: pp 335-340. (査読有)
- Ohe K, Masuda A, Ohno K. Chapter 2: Intronic and exonic nucleotide variations that affect RNA splicing in humans. *Genomics I - Humans, Animals and Plants*. ISBN: 978-1-477554-91-3. iConcept Press, Hong Kong, 2013. (査読有)
- Ohno K, Ito M, Kawakami Y. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J Mol Neurosci*, Springer, New York, 2013, DOI 10.1007/s12031-013-0170-x, 3 pages (査読有)
- Ohno K, Ohkawara B, Ito M, Engel AG. *Molecular Genetics of Congenital Myasthenic Syndromes*. eLS. John Wiley & Sons, Inc., Manuscript ID: A24314.R1, in press. (査読有)

2 : 学会発表

(Poster Presentation)

- Nasrin F, Rahman MA, Ohe K, Masuda A, [Ohno K](#). Alternative RNA splicing regulating the molecular architecture of NMJ. 5th NAGOYA Global Retreat (Poster), Nagoya, Japan Feb 2, 2013
- #### (Invited Presentation)
- [Ohno K](#). RNA diseases caused by defects in cis-acting elements and trans-acting factors. "Danish-Japanese joint seminar on aberrant RNA splicing in neuromuscular disease", Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark (SDU), Odense, Denmark Mar 7, 2013
 - [Ohno K](#), Ito M, Kawakami Y, Ohtsuka K, Krejci E. Collagen Q is a key player for developing

rational therapy for congenital myasthenia
and for causing anti-MuSK myasthenia
gravis
XIV International Symposium on
Cholinergic Mechanisms, Hangzhou, China
May 5-9, 2013

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

特記事項なし。

日本国内における Danon 病患者の臨床病理学および遺伝学的検討

研究分担者 杉江 和馬^{1) 2)}
研究協力者 江浦 信之¹⁾ 上野 聡¹⁾ 西野 一三²⁾

- 1) 奈良県立医科大学 神経内科
- 2) 国立精神・神経医療研究センター疾病研究第一部

研究要旨

Danon病は稀少な自己貪食空胞性ミオパチー（AVM）の代表疾患で、ライソソーム関連膜蛋白2型（LAMP2）の原発性欠損により引き起こされる。病態や発症機序は未解明な部分が多い。今回、全国実態調査を行い、臨床的特徴や合併症、治療状況を明らかにした。集計結果から、Danon病13家系28例（男性16例、女性12例）を確認した。Danon病はX連鎖性優性遺伝で、発症年齢は男性10代、女性30代で、死亡年齢は男性20代、女性40代であった。男性患者ではミオパチー、知的遅滞、心筋症を3主徴とするが、女性では心筋症のみを呈した。男女とも死因は心不全であった。心電図ではWPW症候群が高頻度にみられた。βブロッカーを中心とした投薬加療は多くの症例で行われ、ペースメーカー埋込 6例、心臓移植 1例で施行された。生検筋で筋鞘膜の性質を有する特異な自己貪食空胞（AVSF）がみられた。遺伝子解析では全例でLAMP-2変異を示し、発端者の約1/2がde novo変異であった。本研究で、新規を含めDanon病患者 28例を確認し、本邦で初めてDanon病患者の実態を明らかにした。心筋症は予後を規定する重要な因子であった。今後、Danon病の診療ガイドライン作成を目指す。

A. 研究目的

Danon病は、原因遺伝子としてライソソーム関連膜蛋白2型（lysosome-associated membrane protein-2: LAMP-2）が2000年に初めて発見され（Nishino I, et al. Nature, 2000）、さらに、われわれにより世界に先駆けて初めて臨床病型について報告された（Sugie K, et al. Neurology, 2002）。筋病理学的に筋鞘膜の性質を有する極めて特異な自己貪食空胞（AVSF : autophagic vacuoles with sarco-

lemmal features) を特徴とする稀少な筋疾患である。

この疾患特異性の高いAVSFを有する筋疾患をわれわれは自己貪食空胞性ミオパチー（AVM）として、臨床病態について研究してきた。AVMのもう一つの代表疾患であるXMEA（過剰自己貪食を伴うX連鎖性ミオパチー : X-linked myopathy with excessive autophagy）は、近年、原因遺伝子としてライソソーム内蛋白であるVMA21が同定さ

れた。その他、AVSFは、乳児型AVM、多臓器障害を伴う成人型AVM (Kaneda D, Sugie K, et al. Neurology, 2003)、X連鎖性先天性AVM (Yan C, Sugie K, et al. Neurology, 2005) にも認められる。

われわれは、平成21年度に、厚生労働科学研究費補助金「自己貪食空胞性ミオパチー研究」班 (研究代表者 杉江和馬) の研究助成を得て、Danon病、XMEAを含めたAVMの診断基準を世界で初めて作成した。平成22-23年度は、われわれが作成した診断基準を踏まえて、専門医や関連施設を通じて全国でのAVM患者の実態について疫学調査を行った。

平成24年度、本研究班において、AVMの全国調査の集計結果を精査し、本疾患の臨床的特徴について解析した。今回、平成25年度は、Danon病の新規患者を見出し、本邦でのDanon病患者の臨床的および筋病理学的、遺伝学的特徴を解析した。

B. 研究方法

平成21年度にAVM研究班で作成したDanon病の診断基準を踏まえ、平成22-24年度に日本神経学会 (735施設)、日本循環器学会 (1,265施設)、日本小児神経学会 (479施設)、日本小児循環器学会 (138施設) の合計 2,617の各学会の専門医施設に本邦での実態調査を行い、Danon病が疑われる一部の症例では、ダイレクトシーケンス法によるLAMP-2遺伝子解析を実施した。その集計結果を整理し、臨床的特徴や合併症について見出した。今年度は、新規患者を含め、臨床情報の整理と生検筋での筋病理学的特徴を解析した。

(倫理面への配慮)

AVM患者において行われた筋病理学的解析、遺伝子解析および臨床病態解析は、臨床研究および遺伝子研究に関する倫理指針、さらに当該研究施設で定めた倫理規程を遵守して、同施設倫理委員会で承認された説明書を用いて、臨床情報および生検筋の研究利用について十分な説明の上、所定の同意書に署名をしていただいて、研究を遂行した。

C. 研究結果

全国47都道府県の合計2,617施設のうち、1,409施設から回答を得た (回収率 54%)。全アンケートを集計した結果、Danon病は、12家系27例を確認した。今年度に新たに15歳女性患者1家系1例を見出し、本邦でのDanon病患者は、13家系28例 (男性患者16例、女性患者12例) となった。

Danon病はX連鎖性優性遺伝で、男性患者ではミオパチー、知的遅滞、心筋症を3主徴とするが、女性では心筋症のみを呈した。男性患者13例を集計した結果、ミオパチーと心筋症は全例に認められ、知的遅滞は6例 (46%) にみられた。心筋症のうち、肥大型心筋症が10例 (77%)、拡張型が2例 (15%)、混合型が1例 (8%) であった。心電図ではWPW症候群が高頻度にみられ、その他異常Q波、AVブロックを認めた。合併症として、網膜症や肝腫大、低身長、pes cavusを呈する患者がみられた。発症年齢は男性10代、女性30代で、平均死亡年齢は男性20代、女性40代で、死因は心不全であった。治療として、βブロッカーを中心とした投薬加療が多く、6例でペースメーカー埋込、1例で根治療法である心臓移植が施行され

ていた。遺伝子解析ではLAMP-2変異を示し、発端者の約1/2がde novo変異であった。

筋病理学的解析から、AVMの診断に生検筋での特徴的な自己貪食空胞：AVSFの筋病理所見は必要不可欠である。また、AVMのもう一つの重要な所見として、筋細胞膜の重層化が挙げられる。但し、本所見はDanon病では認めることはなく、Danon病以外のXMEAや先天性AVMなどで特徴的に認めることから、Danon病と他の臨床病型を区別する重要な所見と考えられる。

D. 考察

Danon病は超希少な筋疾患で、これまで病態や病因について未解明で、本邦でのDanon病患者の実態についても不明であった。このため、平成21年度に、Danon病の疾患概念の確立のため、われわれは世界で初めて診断基準を作成した。そして、平成22-24年度に、本邦での実態を明らかにするため、本診断基準を踏まえて、専門医や関連施設を通じて本邦での初めての疫学調査を行い、患者数や臨床症状の多様性の実態把握に努めた。今年度は、新たなDanon病患者を見出し、集計結果を精査した。

Danon病の診断基準を確立し、治療法の開発を目指すことは、今後のDanon病患者の診療において大きな意義がある。正確な診断と現状で最適な治療を行うために、各臨床病型の詳細な分類や診断基準項目の選定を行い、感度・特異度のより高い診断基準の確立は必要不可欠である。今年度、当研究班において、Danon病の診断基準を再精査し、一部修正を行った。

今回明らかとなった現在施行されている治療法について再検討を行い、将来の治療

法開発に向けての研究が必要である。そして、現状で最適な治療法を確立して診療ガイドライン策定が求められる。さらに、共通する分子病態の解明から根本治療への手掛かりを発見し、治療への道筋の構築を目指す。加えて、超稀少疾患といえる本疾患の病態解析や今後の治験の実現を考えるためには、日本国内の連携のみならず、海外と連携した臨床遺伝学的検討とデータベース構築が必要である。

E. 結論

Danon病の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た。本邦で初めてDanon病患者の実態を調査し、新規を含め患者28例を確認した。心筋症は予後を規定する重要な因子であった。Danon病は超稀少疾患であり、今後、診療ガイドライン作成を目指す。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

一の臨床病理学的検討. 第54回日本神経学会総会、東京、2013年5月.

1. 論文発表

- 1) Sato T, Hayashi YK, Oya Y, Kondo T, Sugie K, Kaneda D, Houzen H, Yabe I, Sasaki H, Noguchi S, Nonaka I, Osawa M, Nishino I. DNAJB6 myopathy in an Asian cohort and cytoplasmic/nuclear inclusions. *Neuromuscul Disord*, 2013; 23(3): 269-276.
- 2) Kataoka H, Saeki K, Kobayashi Y, Kiriya T, Sugie K, Ueno S. Predictors of outcomes in acyclovir-treated limbic encephalitis. *J Infect*, 2013; 66(2): 201-205.
- 3) 杉江和馬. ライソゾーム膜の異常: ダノン病. 神経症候群 III (第2版) - その他の神経疾患を含めて -. 日本臨床 2014年. (印刷中)

2. 学会発表

- 1) Sugie K, Eura N, Kobayashi Y, Sawa N, Ueno S. Clinicopathological and neuroradiological features of myopathy associated with antibodies to signal recognition particle (SRP). The 12th European Congress of Internal Medicine, Prague, Czech, October 2-5, 2013.
- 2) 杉江和馬、江浦信之、小林恭代、澤 信宏、形岡博史、上野 聡. 抗SRP抗体陽性ミオパチーの臨床病理学および神経放射線学的検討. 第54回日本神経学会総会、東京、2013年5月.
- 3) 江浦信之、杉江和馬、小林信彦、正嶋良悟、桐山敬生、上野 聡. モルフェア (限局性強皮症) を伴ったミオパチ

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

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

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻・号	ページ	出版年
Mori-Yoshimura M, Oya Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I, Murata M	Respiratory dysfunction in patients severely affected by GNE myopathy (distal myopathy with rimmed vacuoles).	Neuromuscul Disord	23(1)	84-88	2013
Nalini A, Gayathri N, Nishino I, Hayashi YK	GNE myopathy in India.	Neurol India	61(4)	371-374	2013
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.	J Neurol Neurosurg Psychiatry.	84(9)	982-988	2013
Cho A, Hayashi YK, Monma K, Oya Y, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I	Mutation profile of the <i>GNE</i> gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy).	J Neurol Neurosurg Psychiatry.	[Epub]		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

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻・号	ページ	出版年
Gupta VA, et al.	Identification of KLHL41 Mutations Implicates BTB-Kelch-Mediated Ubiquitination as an Alternate Pathway to Myofibrillar Disruption in Nemaline Myopathy.	Am J Hum Genet	93・6	1108-1117	2013
Motoki T, et al.	Fatal hepatic hemorrhage by peliosis hepatis in X-linked myotubular myopathy: A case report.	Neuromuscul Disord	23・11	917-921	2013
Matsuura T, et al.	Exome sequencing as a diagnostic tool to identify a causal mutation in genetically highly heterogeneous limb-girdle muscular dystrophy.	J Hum Genet	58・8	546-565	2013
Liang WC, et al.	Limb-girdle muscular dystrophy type 2I is not rare in Taiwan.	Neuromuscul Disord.	23・8	675-681	2013
Ravenscroft G, et al.	Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy.	Am J Hum Genet	93・1	6-18	2013
Murakami N, et al.	Congenital generalized lipodystrophy type 4 with muscular dystrophy: Clinical and pathological manifestations in early childhood.	Neuromuscul Disord	23・5	441-444	2013

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻・号	ページ	出版年
須藤 章、他	<i>ACTA1</i> 遺伝子変異を有する重症乳児型ネマリンミオパチーの兄弟例.	脳と発達	45・6	452-456	2013
林 由起子	Myofibrillar myopathy	臨床神経学	53・11	1105-1108	2013
Nakamura H, Kimura E, Mori-Yoshimura M, Komaki H, Matsuda Y, Goto K, Hayashi YK, Nishino I, Takeda SI, Kawai M.	Characteristics of Japanese Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in a novel Japanese national registry of muscular dystrophy (Remudy).	Orphanet J Rare Dis.	8(1)	60	2013
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.	J Neurol Neurosurg Psychiatry.	84	982-988	2013

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻・号	ページ	出版年
Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K.	Mutations in the C-terminal domain of ColQ in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise ColQ-MuSK interaction.	Hum Mutat.	34	997-1004	2013
Yonekawa T, Komaki H, Saito Y, Takashima H, Sasaki M.	Congenital hypomyelinating neuropathy attributable to a de novo p.Asp61Asn mutation of the myelin protein zero gene.	Pediatr Neurol.	48	59-62	2013
Takeuchi F, Yonemoto N, Nakamura H, Shimizu R, Komaki H, Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Nishino I, Kawai M, Kimura E, Takeda S.	Prednisolone improves walking in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients.	J Neurol.	In press		

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻・号	ページ	出版年
Kokunai Y, Nakata T, Furuta M, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, Ohno K, Takahashi MP.	A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1.	Neurology	印刷中		2014
Koebis M, Kiyatake T, Yamaura H, Nagano K, Higashihara M, Sonoo M, Hayashi Y, 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
久保田智哉、高橋正紀	骨格筋チャネル病の最新知見—ミオトニー症候群と周期性四肢麻痺を中心に	医学のあゆみ	245・9	732-739	2013
高橋正紀	周期性四肢麻痺	今日の診断指針	印刷中		

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻・号	ページ	出版年
Ning R de Vega S, Kurihara H, Ichikawa-Tomikawa N, Xu Z, Nonaka R, Yamada Y, Miner J, Arikawa-Hirasawa E.	Laminin $\alpha 1$ regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF β pathway.	Am J Pathol	in press.		2013
Furuya N, Ikeda SI, Sato S, Soma S, Ezaki J, Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T.	PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation.	Autophagy	in press.		2013
Kerever A, Mercier F, Nonaka R, de Vega S, Oda Y, Zalc B, Okada Y, Hattori N, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa,	Perlecan is required for FGF-2 signaling in the neural stem cell niche.	Stem Cell Res	121	492-505	2013

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻・号	ページ	出版年
Douet V, Arikawa-Hiras awa E, Mercier F	Fractone-heparan sulfates mediate FGF-2 stimulation of cell proliferation in the adult subventricular zone	Cell Prolif	46	137-145	2013
Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K.	Mutations in the C-terminal domain of ColQ in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise ColQ-MuSK interaction	Hum Mutat	34	997-100 4	2013
Selcen D, Shen XM, Milone M, Bregman J, Ohno K, Deymeer F, Finkel R, Rowin J, Engel AG.	Gfpt1-myasthenia: Clinical, structural, and electrophysiologic heterogeneity	Neurology	81	370-378	2013
Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, Sobue G.	FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD	Sci Rep	3	2388	2013