

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

「遺伝性ミオパチーの原因解明へ向けた臨床情報集積と次世代シーケンスを用いた遺伝子解析」

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
研究協力者 石山 昭彦 (独)国立精神・神経医療研究センター 病院小児神経科
医師

研究要旨 遺伝性ミオパチーの病因は多因性であり、かつ未だ病因不明な例も多く存在する。また遺伝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、たと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グァー法で遺伝子診断を行うことは困難な状況であった。我々は臨床医の立場で遺伝子解析を効率良く行うべく、次世代シーケンサー解析へ向けての基礎となる臨床データ集積の基盤作成を行った。

その臨床情報データの集積の中から得られた症例から、中枢病変を伴うミオパチーの一群を見いだし、次世代シーケンサー解析を行い、ナンセンス変異を含む病因の可能性の高い遺伝子変異をコンパウンドヘテロ接合体で見いだした。その変異は、ミトコンドリア機能異常を疑わせる所見であり、病因確定のため、生化学的な機能解析を行い、遺伝子と病態についての解明を行っている。

A. 研究目的

遺伝性ミオパチーには新生児期より呼吸障害、哺乳障害を認める乳児重症型から、乳児期以降に筋緊張低下や発育・発達の遅れを示すが、それ以降、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まで、幅広い臨床像を認める。診断は筋病理所見に基づき行われるが、その特徴的所見から多くの病型が存在する。先天的な筋力低下、筋緊張低下を呈するミオパチーとしては、ネマリンミオパチー、セントラルコア病、中心核ミオパチー、ミオチューブラーミオパチーや先天性筋線維タイプ不均等症などが挙げられ、また代謝性疾患でも、ミトコンドリア機能異常による、高乳酸血症、卒中様症状を伴うミトコンドリア病(MELAS)、赤色ぼろ線維を伴うミオク

ローヌステんかん(MERRF)、慢性進行性外眼筋麻痺症候群(CPEO)、Leigh脳症等の幾つかの病型が知られる。

原因遺伝子として、ACTA1, NEB, TPM2, TPM3, TNNT1, CFL2, KBTBD13, RYR1, SEPN1, MTM1, DMN2, BIN1, FHL1等の他、ミトコンドリア機能異常関連では、ミトコンドリア遺伝子のみならず核遺伝子での原因遺伝子としてPOLG, TWINKLE, TK2, NDUFS, NDUFV, PDHA1, PDHB, PDHX等の多くの病因が知られている。遺伝性ミオパチーの病因は多因性であるが、その中には未だ病因が不明な例も多く存在する。また、遺伝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うち、NebulinやRYR1などの巨大な遺伝子もあり原因遺伝子が判明している例であっても容易に遺伝子診断を行うことは困難なのが現状である。

そこで我々は臨床医の立場から、次世代シークエンサーをより効率に行うために、遺伝性ミオパチー各病型の基礎となる臨床データの集積を行い、なかでも主観によらない客観的評価が可能な画像所見、とくに骨格筋画像や頭部画像検査を重視して検討することとした。これまでの研究にて遺伝性ミオパチーの病型毎に骨格筋障害の選択性（障害の強い筋とそうでない筋の存在）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解析に役立てられている。また代謝性疾患では、頭部MRIの病的所見の部位や年齢毎での所見が異なることが知られている。骨格筋画像や頭部画像の解析は、病態解明のひとつのツールとして有用と考えられ、多数の症例の画像集積が病態解明に寄与できる可能性が高く、またこの情報集積の中から特徴的な所見を呈する症例群に関しては新規または未知の病態像を示す疾患群である可能性を秘める。このような症例に対し、次世代シークエンサーを行うことで臨床情報を有効に用いた適切な症例選択や各種解析へとすすめられ、今回はその基盤作成を目的とする。

B. 研究方法

- 1) 臨床経過：家族歴、妊娠分娩歴、出生時の状況、合併症、臨床経過等を網羅的に把握する。
- 2) 検査所見：CK値等の生化学的所見、筋電図、末梢神経伝導検査の所見を把握する。
- 3) 筋病理所見：筋生検を行なっている例で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。
- 4) 遺伝子：すでに遺伝子解析を行なっている例には、検索した遺伝子名、具体的な変異を把握する。さらに不明な例ではエクソンキャプチャーチップを用いた既知遺伝子変異の解析を実施する。
- 5) 骨格筋画像：IBISSは(独)国立精神・神経医療研究センター内の脳病態統合イメージングセンター(IBIC)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 通信にて収集し、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。それにより研究に必要な画像情報・臨床情報を共有可能な仮想空間を構築することが出来る。本研究では、遺伝性ミオパチーの診断、経過観察など通常の診療の一環として撮影された頭部画像、骨格筋画像を既存の患者臨床情報とともに収集し IBISS 上に構築することにより、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、他者による論文盗用の防止や、データ量を少なくすることによる通信の高速化、DICOM ヘッダからの情報流出の防止等、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 に登録する場合は、個人情報管理担当者にて連結匿名化を行い、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。

(倫理面への配慮)

本研究において使用する全てのヒト検体から得られた情報はいずれも疾患の確定診断のため筋病理、生化学、免疫学的ならびに遺伝子レベルでの解析が必要であり、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した組織(生検・剖検筋、皮膚、血球等)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。これら情報を使用するにあたっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用する。

また、頭部、骨格筋画像において得られた情報も「疫学調査研究に関する倫理指針」に準じて行われ、本研究では個別のインフォームド・コンセントを得ることは計画していない。インフォームド・コンセントを得ずに本研究を実施可能とする根拠は、収集するMRI画像情報は過去に診断や経過観察等の診療のために得られた診療録情報の一部であり、本研究のために新たに患者から資料や情報収集することはなく、疫学研究の倫理指針(平成19年8月16日全部改正)の「第3 インフォームド・コンセント等 1. 研究対象者からインフォームド・コンセントを受ける手続等」の「(2) 観察研究を行う場合 [2] 人体から採取された資料を用いない場合 イ. 既存資料のみ用いる観察研究の場合」に該当し、同倫理委員会でも承認が得られている。

C. 研究結果

1) 臨床情報と画像情報の集積

先天的な筋力低下、筋緊張低下を示すミオパチー群では、全56例(MRI 45例、CT 48例)の骨格筋画像登録を行った。この登録情報を用いた解析により、セントラルコア病、中心核ミオパチー等の、原因遺伝子が単一あるいは比較的少数である疾患群では、遺伝子変異の種類と筋選択性としての表現型の相関が明瞭で、画像上の症例間の相違も少なかった。そのような症例群のなかでRYR1変異を有するセントラルコア病は、大腿直筋が腫大する所見を全例に認めており、進行例や年長例でもその所見を保っている等、経時的な変化の有無についても検討することが可能であった。ネマリンミオ

パチー、先天性筋線維タイプ不均等症では、筋選択性として病型内で一様でないものの、各病型とも数種類への細分類が可能で、原因遺伝子との関連性が示唆された。一方、特異的な所見を呈さない先天性ミオパチーとして分類されている例が6例存在したが、いずれも家族歴を有しておらず、また6例に共通な特徴的臨床像も認めず、次世代シーケンサーによる解析には至っていない。

代謝性疾患として、ミトコンドリアの機能異常による疾患群の頭部MRI画像登録を26例で実施した。うち両側基底核病変を有する例が23例、うち遺伝子解析が実施され変異同定に至っている例は9例あった。これらはすべてミトコンドリア遺伝子上の変異であった。頭部画像所見や遺伝子変異も多様性があり、これらの所見や臨床症状、筋病理所見等を用いた細分類は困難であった。一方で、大脳白質と脳梁に嚢胞性の病変を有する白質障害を認める3例が存在し、同一病態を呈していると考えられた。これをひとつの疾患群と考え遺伝子解析へとすすめた。

2) 画像上で特異的な所見を有する群での次世代シーケンサー解析

代謝性疾患として位置づけた症例の頭部画像登録例の中で、大脳白質と脳梁に嚢胞性病変を認める3例があり、これをひとつの疾患群と考え、候補遺伝子の検索のため次世代シーケンサーによる解析を行った。その結果、ナンセンス変異を含む病因の可能性が高い遺伝子変異をコンパウンドヘテロ接合体で見いだした。動物実験ではミトコンドリア機能に関連する遺伝子であるとの既報があり、病因確定のため患者検体を用いた生化学的なミトコンドリア機能解析を行い、遺伝子と病態の関連解明を行っている。

D. 考察

遺伝性ミオパチーの病型により、骨格筋画像での筋選択性や頭部画像所見等の有用性が高い病型、そのみでは鑑別や分類に不十分な病型が存在した。なかでも、単一遺伝子が原因である病型では、骨格筋の筋選択性も特異的であり、臨床情報の有用性も高い。このような疾患群では既知遺伝子解析をすすめていくことで、臨床情報から遺伝子変異を推定することも可能となり、将来的に臨床情報の有用性が高まるものと期待される。一方で、代謝性疾患としての遺伝性ミオパチーや先天性筋力低下、筋緊張を呈する群で、遺伝子変異が多様な例では、その表現型、臨床所見も多様である。そのため、何が有用な臨床情報であるかの見極めが遺伝子や病態を含めた更なる解析の鍵となる。今回登録された症例は、全例で遺伝子解析での結論が得られているわけでないため、これまでに当研究で実施しているエクソンキャプチャーチップを用いた既知遺伝子変異解析等をすすめることで、各症例の遺伝子変異と臨床型との因果関係についてより確実にしていく必要がある。そのような積み重ねの結果が既知の病型に分類できない新たな疾患群を発見するきっかけとなり新たな疾患群や遺伝子変異の同定に繋がると考えられる。

現在は単施設のみでの臨床情報集積であるが多施設に広げ、登録症例を広げ、症例毎での臨床情報を積み重ね、個々の解析ならびに症例全体としての特徴を明らかにすることで、典型例より逸脱する症例の抽出が可能となり、より効率的な次世代シーケンサーでの解析へとすすめられると考える。

E. 結論

遺伝性ミオパチーの骨格筋、頭部画像所見を主体とした臨床情報集積を行い、次世代シーケンサー解析前のデータベースとして単施設での画像、臨床情報登録を実施した。この登録を行った例の中から、脳画像所見上で特異な所見を有

する症例を見だし、次世代シーケンサーによる解析で、新たな原因遺伝子の解明へと至る例を選定することが可能であった。今後、解析へとすすむ症例の選別に課題は残るが、より効率的な次世代シーケンサーの活用に、臨床情報の適切な利用と、未知の疾患群のなかでの病型分類の必要性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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*. 2013;8:60.

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*. 2013; 84:982-8.

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.

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*. 2013; 48:59-62.

2. 学会発表

石山昭彦、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：福山型先天性筋ジストロフィーにおける骨格筋画像．第 55 回日本小児神経学会総会、大分、5/29-6/1.2013

青木雄介、小牧宏文、石山昭彦、齋藤貴志、齋藤義朗、中川栄二、須貝研司、佐々木征行：Duchenne 型筋ジストロフィーにおける脳梗塞発症の危険因子に関する検討．第 55 回日本小児神経学会総会、大分、5/29-6/1.2013

青木雄介、小牧宏文、竹下絵里、石山昭彦、齋藤貴志、齋藤義朗、中川栄二、須貝研司、林由起子、西野一三、佐々木征行：枢神経病変を認めない、フクチン遺伝子変異による先天性筋ジストロフィーの一例．第 59 回日本小児神経学会関東地方会、神奈川、9/21.2013

米川貴博、小牧宏文、齋藤祐子、大矢寧、石山昭彦、齋藤貴志、齋藤義朗、中川栄二、須貝研司、西野一三、橋口昭大、高嶋博、佐々木征行：MPZ 遺伝子の p.Asp61Asn ヘテロ接合性変異は先天性髄鞘形成不全性ニューロパチーと Charcot-Marie-Tooth type 1 の原因となる．第 54 回日本神経病理学会総会．東京、4/24-4/26.2013

仲村貞郎、石山昭彦、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：脊髄性筋萎縮症における末梢神経伝導検査の検討．第 43 回日本臨床神経生理学会学術大会．高知、11/7-11/9.2013

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