

「次世代シーケンサーを用いた遺伝性ミオパチーの原因解明」

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

次世代型シーケンサーを用い、ヒトゲノム全エクソンまたはターゲット遺伝子全エクソンのシーケンス情報を網羅的に取得し、候補遺伝子を抽出する系を構築した。国立精神・神経医療研究センター骨格筋レポジトリ登録検体のうち診断未確定の遺伝性筋疾患例を対象として全エクソーム解析を行った。これまでに288エクソームの解析を終了した。Tubular aggregateミオパチー、 α -ジストログリカノパチー、呼吸障害を伴うミオパチーなどにおいて、原因遺伝子変異同定することができた。特に α -ジストログリカノパチーのGTDC2変異例については、見いだされた3例全例に共通する変異が存在することから、潜在的に多くの患者が本邦に存在する可能性が示された。また、共同研究により、ネマリンミオパチー新規疾患関連遺伝子としてKLHL40, KLHL41を見いだした。特に本邦では、乳児重症型を示すKLHL40変異例に共通変異が認められ、共同研究を実施した他国よりも患者が多く認められた。主に先天性ミオパチー原因遺伝子39遺伝子を対象として、MiSeqを用いターゲットリシーケンシングによる網羅的既知遺伝子スクリーニングシステムを構築した。変異未確定の先天性ミオパチー計120例の解析を行い、約半数で変異を同定できた。ただし臨床応用するには、更に診断効率を上げるべく、ほぼ全ての既知筋疾患遺伝子をカバーするスクリーニングシステムの確立が必要と考えられた。遺伝性ミオパチー患者臨床情報集積を目指して、56例の骨格筋画像登録を行った。セントラルコア病、中心核ミオパチー等の先天にミオパチーにおいては、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く、有用性が示された。また代謝性疾患として脳画像を収集した例の中に類似の白質脳症を示す例があり、エクソーム解析により原因遺伝子を同定した。ミトコンドリア病に関しては、7368箇所の領域を解析するシステムを構築した。一例で新たな原因遺伝子を同定した。候補遺伝子変異が得られても、候補遺伝子変異の病原性を証明するためには、疾患特異的に実証実験を行う必要がある。翻訳阻害、エキソンスキップによる遺伝子ノックダウン法を用いた劣性遺伝性筋疾患のモデルマウス的高速作成の試みと患者細胞、ゲノム編集によりモデル化した半数体細胞の表現型の解析と変異遺伝子導入による相補性試験をおこない、有用性を確認した。

研究分担者

野口 悟 ・ (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

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
(H25.7.31まで)
東京医科大学 主任教授
(H25.8.1より現在まで)

後藤 雄一 ・ (独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所
疾病研究第二部 部長

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

本村 和嗣 ・ (独)国立精神・神経医療研究センター トランスレ
ーションナルメディカルセ
ンター臨床開発部先端診
断開発室 室長(H25.1.31
まで)

研究協力者

遠藤ゆかり ・ (独)国立精神・神経医療研究センター トランスレ
ーションナルメディカルセ
ンター

高山 和子 ・ (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所

西村 洋昭 ・ (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所

ドン ミンルイ ・ (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所

舟山 亮 ・ 東北大学大学院医学系
研究科附属創生応用医学
研究センター 助教

辻 省次 ・ 東京大学 教授

松本 直通 ・ 横浜市立大学 教授

佐藤有希子 ・ (独)国立精神・神経医療研究センター 病院外来
部遺伝カウンセリング室
遺伝カウンセラー

佐藤孝俊 ・ (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 研究生

清水玲子 ・ (独)国立精神・神経医療研究センター トランスレ
ーションナルメディカルセ
ンター 臨床開発支援部
流動研究員

竹内芙美 ・ (独)国立精神・神経医療研究センター病院 小児神
経診療部 研究生

竹下絵里 ・ (独)国立精神・神経医療研究センター病院 小児神
経診療部 レジデント

石山 昭彦 ・ (独)国立精神・神経医療研究センター 病院

A. 研究目的

原因不明の遺伝性ミオパチー例に対して、次世代シーケンサーを用いたエクソームの

リシーケンス解析を行って原因遺伝子を同定し、分子病態を明らかにする。

B. 研究方法

(1) 全エクソーム解析

国立精神・神経医療研究センター（NCNP）骨格筋レポジトリ登録検体のうち診断未確定の遺伝性筋疾患例140例についてゲノムDNAを抽出した。3 μ gのゲノムDNAを200bpsの長さの断片化後アダプター分子を接合し、エクソームの部分配列DNAをプローブとし、ヒト全エクソームを濃縮した。得られたDNAライブラリーを用いて、ゲノム情報を収集した。得られたゲノム情報を構築したパイプラインを用いて解析した。ヒト染色体DNAの参照配列は、hg19を用いた。BWAを用いてマッピングを行い、Samtoolsを用いて一塩基変異多型（SNPs）を抽出し、さらに、得られたSNPs情報を、dbSNPや1000Genome等の公共データベースを用いて比較し、未報告の新規のSNPsのみを抽出するパイプラインを構築した。未報告の新規のSNPsのみを抽出するパイプラインを構築した。さらに、遺伝形式を考慮するとともに、インハウスのデータを用いるなどして日本人特有のSNPsを除外して候補遺伝子を絞り込んだ。

(2) 網羅的既知遺伝子スクリーニング

先天性ミオパチーの遺伝子診断は臨床病理学的類縁疾患が多い、巨大遺伝子が多いなどの理由により困難を伴う場合が多い。そこで遺伝子診

断を効率的に進めるべく既知遺伝子を網羅的にスクリーニングすることを目的に、パーソナル型次世代シーケンサーMiSeqを用いて、先天性ミオパチー関連39遺伝子を対象としてターゲットリシーケンシングを行った。

(3) 遺伝性ミオパチー患者臨床情報の集積

遺伝性ミオパチーの病因は多因性であり、かつ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多くが、NebulinやRYR1などの巨大遺伝子であり、例えば原因遺伝子が判明している疾患であっても従来のサンガー法では遺伝子診断を行うことは困難である。そこで遺伝性ミオパチーの原因解明の基礎となる臨床データの集積を行った。

(4) 遺伝子変異病原性の実証実験

候補遺伝子変異の病原性を証明するためには、疾患特異的に実証実験を行う必要がある。候補遺伝子変異の病原性を証明するためには、疾患特異的に実証実験を行う必要がある。本研究では、翻訳阻害、エキソンスキップによる遺伝子ノックダウン法を用いた劣性遺伝性筋疾患のモデルマウス的高速作成の試みと患者細胞、ゲノム編集によりモデル化した半数体細胞の表現型の解析と変異遺伝子導入による相補性試験をおこなった。

(5) ミトコンドリアミオパチーの原因解明

約800のミトコンドリア関連タンパクをコードする遺伝子配列を調べるために、7368箇所の領域をキャプチャーするHaloplex®を用いた解析システムを構築した。生化学検査において複数の呼吸鎖酵素活性低下及びミトコンドリアDNA由来タンパク

の翻訳活性の低下している 2 検体を選定した。患者 1 は 1 ヶ月の男児で Leigh 症候群を呈し、患者 2 は 16 歳の男性で高乳酸血症を呈している。いずれの患者の両親も血族婚ではなかった。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して研究を遂行する。国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリ検体は、検体採取時に、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、各種診断への同意とともに、神経・筋疾患の病態解明と治療法開発研究に対する検体利用に対してインフォームドコンセントを得ている。この同意を得た検体は、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研究に対してのみ使用される。研究を行う際には、全ての検体は匿名化されて、各種試料は検体番号で管理される。結果の発表に際しても個人情報は一切提示されない。

すべての動物実験は、(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従い、同研究所小型実験動物倫理問題検討委員会にて審査・承認を得ている。また、IBISS を用いた画像集積に関しても国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) 全エクソーム解析

これまでに 288 エクソームを解析した。その結果、下記を代表とする各種遺伝性筋疾患について原因遺伝子変異を同定することができた。

a) Tubular aggregate ミオパチー GFPT1 遺伝子変異をサウジアラビア人 1 家系および日本人患者 1 名に見いだした。3 家系に ORAI1 遺伝子変異を、1 家系に STIM1 遺伝子変異を見出した。このうち ORAI1 はこれまでに報告のない新規原因遺伝子であった。その他の遺伝子変異は何れもアジアで初めての発見であった。

b) -ジストログリカノパチー 11 例で biallelic な変異を同定した。8 例の日本人患者のうち、GTDC2 変異は 3 例に、ISPD 変異は 2 例に、DAG1、FKRP、GMPPB 変異はそれぞれ 1 例に見いだされた。FKRP を除いて、何れもアジア初の患者同定であった。特に GTDC2 については、同定された 3 例に共通の変異が存在しており、更に多数の患者の存在が示唆された。

c) 呼吸筋障害を伴うミオパチー 一例で MEGF10 遺伝子に null 変異を認めた。同例は、呼吸筋障害が早期に出現し、嚥下障害も伴っていることから、アジアで初めての Early-onset myopathy with areflexia, respiratory distress and dysphagia (EMARDD) の例であることが明らかとなった。

d) ネマリンミオパチー

共同研究により、新規原因遺伝子として KLHL40, KLHL41 を見いだした。特に KLHL40 変異については、本邦で共通変異を有する例が多く認められ、全例が超重症乳児型であった。ネマリンミオパチー既知原因遺伝子について、次項のターゲットリシーケンス法を活用するなどして網羅的スクリーニングを行ったが、60%の例では原因遺伝子が同定できなかった。

(2) 網羅的既知遺伝子スクリーニング

39 遺伝子について全エクソームのタ

ーゲットリシーケンシングを行い、網羅的既知原因遺伝子変異スクリーニングを行った。120例の変異未確定の先天性ミオパチー例の約半数で変異を同定した。

(3) 遺伝性ミオパチー患者臨床情報の集積

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。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。また、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。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全エクソーム解析を行い、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。

(4) 遺伝子変異病原性の実証実験

劣性型遺伝形式をとる自己貪食空胞性ミオパチーにおいて培養細胞を用いた実証実験の可能性を探ること、遺伝子ノックダウン法を用いて劣性遺伝性筋疾患のモデルマウスを高速に作成とその解析方法の構築、モルフォリノオリゴを用いたエキソンスキップの誘導による遺伝子ノックダウン法を用いた劣性遺伝性筋疾患のモデルマウスを高速作成と解析方法の構築、-ジストログリカノパチーの様々な原因遺伝子に見いだされた候補変異の病原性を、簡単に評価しうる単一プラットフォームの作製を行った。特にHAP1細胞については、CRISPR/Cas9システムを用いてISPD、FKTN、FKRP、GMPPB遺伝子KO細胞を作製することに成功し、病原性をスクリーニングに活用できることを示した。

(5) ミトコンドリアミオパチーの原因解明

7368の全ターゲット領域で見いだされた変異をマッピング後、SNPデータベース等で絞り込み、更に常染色体劣性遺伝形式を想定して、候補遺伝子変異を絞り込んだ。患者1で見いだされた遺伝子Aの変異は複合ヘテロ接合型であった。さらに、患者由来細胞に正常な配列をもつ発現ベクターを導入して、活性低下が回復することを確認した。患者2で見いだされた遺伝子Bが病因かどうかの確定作業は現在も継続中である。

D. 考察

次世代シーケンサーは平成23年度末に納入され、本格稼働ができる体制が整った。

次世代シーケンサーのSNVデータを

解析すべく、BWAやSamtoolsを組み合わせたパイプラインを構築し、これまでに288例のエクソームを終えた。特に、Tubular aggregate ミオパチー、

-ジストログリカノパチー、呼吸筋障害を伴うミオパチーに注目して解析を進め、原因遺伝子変異を同定することができた。特にORAI1遺伝子は新たな原因遺伝子同定である。その他、STIM1、GTDC2、ISPD、DAG1、GMPPB、MEG10は全てアジア域で初めての患者同定であり、次世代解析の有用性が示された。また、共同研究でネマリノミオパチーの新たな原因遺伝子（KLHL40, KLHL41）を同定することができた。特に、GTDC2とKLHL40については、本邦患者に共通変異が認められ、潜在的に多くの患者が存在する可能性が示唆された。

依然として、全エクソーム解析を行っても原因変異の絞り込みに成功していない例も多いが、初期と比較して変異動定例が増加した。これは、日本人多型のデータベースが公開されたことと、松本直通教授（横浜市立大学・研究協力者）の協力が得られ、インハウス多型データによる候補変異の絞り込みを行えたことが大きいと考えられる。このことは、本邦における多型データベースの構築の重要性を明瞭に示している。

先天性ミオパチーを中心とする既知遺伝子のハイスループット変異スクリーニングに着いては、約半数例で何らかの変異が同定された。ただし、劣性遺伝が想定されるにも関わらず、ヘテロ接合型変異が一つしか見出されない例などもあり、診断が確定できたと考えられるのは、全体の約1/3であった。筋疾患遺伝子は大きなものが多く、デスクトップ型のシーケンサーを用いたターゲットリシーケンシング法では、全既知遺伝子を1回でカバーすることは困難である。

今後診断スクリーニングへと臨床応用を目指すに当たっては、今後は、疾患群ごとの既知遺伝子変異スクリーニングシステムを構築し、それで変異が見いだされない場合には全エクソーム解析を行うような2段階のシステムの構築を目指していくべきと考えられた。

次世代シーケンサーを用いた遺伝性ミオパチーの原因解明に関する臨床情報の集積については、次世代シーケンス解析に併せて対象症例の臨床情報ならびに画像情報を順調に集積しつつある。特にセントラルコア病、中心核ミオパチー等の先天性ミオパチーにおいては、遺伝子型と画像上の変化に相関が認められ、今後の診断の有用性が示された。また、代謝疾患群の画像登録の中から新たな疾患原因遺伝子が同定され、現在園検証が進んでいる。このことは画像登録の有用性を示している。

遺伝子変異病原性の実証実験では、再現性がよく、ハイスループット解析も可能な患者培養細胞を用いた相補性試験と遺伝子ノックダウン法を用いたモデルマウス作成法を開発した。さらに -ジストログリカノパチーを対象に、効率的な変異の病因性の証明をするための半数体細胞のゲノム編集、相補性試験の方法を開発した。いずれの方法も、次世代シーケンサーから得られる遺伝子変異候補の実証に有用であり、短期間に遺伝子変異の病因性の証明が可能になった。

ミトコンドリアミオパチーの原因解明については、Haloplex®を用いて7368箇所の領域をキャプチャーするシステムを構築し、生化学的に呼吸鎖酵素複合体機能低下症と診断されている例2症例に対して解析を試み、その内一例で原因遺伝子変異を同定した。現在、その変

異の病原性検証実験を行っている。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた遺伝性筋疾患の全エクソーム解析パイプラインの構築が完了し、これまでに288エクソームの解析を終えた。特に、Tutubular aggregate ミオパチー、ジストログリカノパチー、呼吸筋障害を伴うミオパチーなどの遺伝性筋疾患において、原因遺伝子変異を同定することができた。このことは全エクソーム解析が臨床的遺伝子診断に有用であることを示している。日本人多型データベースが整備されつつあることもあり、以前と比較して原因変異同定に至る確率が高くはなったが、依然として原因解明に至らない例も多い。今後はデータベースの充実や技術的問題の克服が進み、その結果として将来的には診断精度も上がっていくものと予想されるが、本邦を上げてこのプロセスを加速させることが必要であると思われる。

一方、ターゲットリシーケンシングによる既知遺伝子に対する網羅的既知遺伝子スクリーニング法は、確実に一部の患者で変異を同定できることが示されたが、やはり変異が同定できない例も多い。これは、そもそも選択的に遺伝子を解析していることが一つの原因と考えられ、完全な臨床応用には、より広範に既知遺伝子をカバーすることに加えて、一次スクリーニングで変異が同定できなかった場合には、全エクソーム解析を2次的に行う2段階のシステムが望ましいと考えられた。HAP1細胞は遺伝子変異病原性の確認に有用であることが示された。今後は次世代解析だけでなく、そこから得られた候補変異の病原性を如何に高速に証明するかが重要な課題となると考えられ、その意味で、今回の我々の一連の研究は今後の発展に希望

を与えるものである。ミトコンドリア病の核遺伝子についても、探索的に施行した解析において、有力候補となる劣性変異が見出された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 著書、総説

須藤 章, 他. *ACTA1* 遺伝子変異を有する重症乳児型ネマリニンミオパチーの兄弟例. *脳と発達*. 45(6): 452-456, 2013

林由起子: *筋ジストロフィー*. 検査と技術. 41(6): 448-453, Jun, 2013

林由起子: *Emery Dreifuss 型筋ジストロフィー*. *筋疾患診療ハンドブック*. (監修: 内野 誠, 編集: 青木正志), 中外医学社, 東京, pp160-164, Jun, 2013

後藤雄一. *ミトコンドリア病*, 「*遺伝医学やさしい系統講義 18 講*」, *メディカル・サイエンス・インターナショナル*, 東京, pp.95-111, 2013

後藤雄一. *ミトコンドリア病*, 「*内科学, 第 10 版*」, 朝倉書店, 東京, pp.2339-2342, 2013

後藤雄一. *ミトコンドリア病*, 「*希少疾患/難病の診断・治療と製品開発*」, (株)技術情報協会, 東京, pp.999-1005, 2012

後藤雄一. *ミトコンドリア病* (ミトコンドリア脳筋症), 「*すべての内科医が知っておきたい神経疾患の診かた、考え方とその対応*」, 羊土社, 東京, pp. 282-289,

2012

後藤雄一 . ミトコンドリア脳筋症. 「疾患・症状別 今日の治療と看護」、南江堂、東京、pp. 771-773、2011

後藤雄一 . ミトコンドリア病の治療と最新ケアの情報 . 難病と在宅ケア 18:28-30, 2012.

後藤雄一 . ミトコンドリア病の解明、生体の科学 63: 440-441, 2012

2) 原著論文

Kajino S, Ishihara K, Goto K, Ishigaki K, Noguchi S, Nonaka I, Osawa M, Nishino I, Hayashi YK: Congenital fiber type disproportion myopathy caused by LMNA mutations. J Neurol Sci. [Epub 2014 Mar] ahead of print

Cho A, Hayashi YK, Monma K, Oya Y, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Mutation profile of the *GNE* gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy). J Neurol Neurosurg Psychiatry. [Epub 2013 Sep] ahead of print

Gupta VA, Ravenscroft G, Shaheen R, Todd EJ, Swanson LC, Shiina M, Ogata K, Hsu C, Clarke NF, Darras BT, Farrar MA, Hashem A, Manton ND, Muntoni F, North KN, Sandaradura SA, Nishino I, Hayashi YK, Sewry CA, Thompson EM, Yau KS, Brownstein CA, Yu TW, Allcock RJ, Davis MR, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Alkuraya FS, Laing NG, Beggs AH: 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, Dec, 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, Sep, 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, Aug, 2013

Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saito H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Anthor H, Kresoje N, Sivadurai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJ, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Laing NG: Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy. Am J Hum. 93(1): 6-18, Jul, 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, May, 2013

Ishiyama A, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Itagaki Y, Matsuzaki K, Nakura M, Nishino I, Goto Y, Sasaki M. Unusual exocrine complication of pancreatitis in mitochondrial disease. *Brain Dev* 35:654-659, 2013 August

Goto M, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. MELAS phenotype associated with m.3302A>G mutation in mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene. *Brain Dev* 36: 180-182, 2014 Feb

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

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

Ramachandran N, Munteanu I, Wang P, Ruggieri A, Rilstone JJ, Israeli N, Naranian T, Paroutis P, Guo R, Ren ZP, Nishino I, Chabrol B, Pellissier JF, Minetti C, Udd B, Fardeau M, Taylor CS, Mahuran DJ, Kissel JT, Kalimo H, Levy N, Manolson MF, Ackerley CA, Minassian BA: VMA21 deficiency prevents vacuolar ATPase assembly and causes autophagic vacuolar myopathy. *Acta Neuropathol*. 125(3): 439-457, Mar, 2013

Kakisaka Y, Haginoya K, Takahashi Y, Ochiai T, Fujiwara I, Kikuchi A, Wakusawa K, Kobayashi S, Kikuchi H, Ichihara Y, Takahashi S, Nishino I: Additional evidence that the ryanodine receptor gene (RYR1) causes malignant hyperthermia and severe skeletal malformations. *Am J Med Genet A*. 161(1): 234-235, Jan, 2013

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. Nov, 2012

Boyden SE, Mahoney LJ, Kawahara G, Myers JA, Mitsuhashi S, Estrella EA, Duncan AR, Dey F, Dechene ET, Blasko-Goehring JM, Bonnemann CG, Darras BT, Mendell JR, Lidov HG, Nishino I, Beggs AH, Kunkel LM, Kang PB: Mutations in the satellite cell gene MEGF10 cause a recessive congenital myopathy with minicores. *Neurogenetics*. 13(2): 115-124, May, 2012

Miyake N, Yano S, Sakai C, Hatakeyama H, Matsushima Y, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Nakashima M, Saitsu H, Ogata K, Goto Y, Matsumoto N. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Hum Mut* 34:446-452, 2013

Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Matsushima Y, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I, and Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC). A homozygous mutation of *C12orf65* causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). *J Med Genet* 49: 777-784, 2012

Kim SJ, Kwon M, Ryu MJ, Chung HK, Tadi S, Kim YK, Kim JM, Lee SH, Park JH, Kweon GR, Ryu SW, Jo YS, Lee CH, Hatakeyama H, Goto Y, Yim YH, Chung J, Kong YY, Shong M. CRIF1 is essential

for the synthesis and insertion of oxidative phosphorylation polypeptides in the mammalian mitochondrial membrane. *Cell Metabolism* 16: 274-283, 2012

Sangatsuda Y, Nakamura M, Tomiyasu A, Deguchi A, Toyota Y, Goto Y, Nishino I, Ueno A, Sano A. Heteroplasmic m.1624C>T mutation of the mitochondrial tRNA-Val gene in a proband and his mother with repeated consciousness disturbances. *Mitochondrion* 12: 617-622, 2012

Furukawa R, Yamada Y, Matsushima Y, Goto Y, Harashima H. The manner in which DNA is packed with TFAM has an impact on transcription activation and inhibition. *FEBS OpenBio* 2: 145-150, 2012

2 . 学会発表

1) 国際学会

Nishino I, Wehl C: Muscle biopsy. EUROPEAN NEURO MUSCULAR CENTRE (ENMC) WORKSHOP, Bussum, The Netherlands (NH Jan Tabak Hotel), 11.3, 2013 (11.1-11.3)

Nishino I: Danon disease. EUROPEAN NEURO MUSCULAR CENTRE (ENMC) WORKSHOP, Bussum, The Netherlands (NH Jan Tabak Hotel), 11.1, 2013 (11.1-11.3)

Nishino I: Dysfunction of autophagy in MDs. EUROPEAN NEURO MUSCULAR CENTRE (ENMC) WORKSHOP, Bussum, The Netherlands (NH Jan Tabak Hotel), 11.1, 2013 (11.1-11.3)

Nishino I: Natural history studies and

therapy development in GNE myopathy. TREAT-NMD Alliance Meeting, Newcastle, UK (Newcastle University), 10.31, 2013 (10.30-11.1)

Nishino I: Recent advances in metabolic myopathy. The XXI World Congress of Neurology (WCN), Vienna, Austria (Reed Messe Wien GmbH Congress Center), 9.24, 2013 (9.21-9.26)

Nishino I: Basics in muscle pathology. The XXI World Congress of Neurology (WCN), Vienna, Austria (Reed Messe Wien GmbH Congress Center), 9.22, 2013 (9.21-9.26)

Endo Y, Motomura K, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Nishino I: Exome analysis on tubular aggregate myopathy. American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, Boston, USA (Boston Convention & Exhibition Center), 10.23, 2013 (10.22-10.26)

Hayashi YK, Goto K, Noguchi S, Matsumoto N, Laing N, North K, Clark N, Nonaka I, Nishino I: Mutation screening of a large cohort of nemaline myopathy. 18th International Congress of the World Muscle Society, Asilomer, USA (Asilomar Conference Grounds), 10.2, 2013 (10.1-10.5)

Uruha A, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: High prevalence of hepatitis C virus infection in a Japanese inclusion body myositis cohort. 18th International Congress of the World Muscle Society, Asilomer, USA (Asilomar Conference Grounds), 10.3, 2013 (10.1-10.5)

Hayashi YK, et al. FHL1 Myopathies in Japan. 199th ENMC International Workshop, Naarden, The Netherlands

(NH Naarden Hotel), 6.8, 2013

Takeshita E, Mimaki M, Ishii T, Awazu M, Shinjoh M, Hasegawa T, Miki J, Hidaka Y, Motobayashi M, Kumagai E, Goto Y. Novel mitochondrial point mutation (m.9155A>G) in two patients with chronic renal failure caused by focal glomerular sclerosis. International Congress of Pediatrics 2013, the 27th Congress of the International Pediatric Association, Melbourne, Australia, 8.24-29, 2013

Ito S, Hirano Y, Nakano K, Goto Y, Ohtani Y, Shimada S, Ishigaki K, Funatsuka M, Oguni H, Osawa M, Nahgata S: The first case of infantile-onset spinocerebellar ataxia in Japan caused by novel autosomal recessive Twinkle/C12orf2 mutations. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013

Matsushima Y, Hatakeyama H, Takeshita E, Kitamura T, Kobayashi K, Yoshinaga H, Goto Y: Leigh-like syndrome associated with calcification of the bilateral basal ganglia caused by mutations in mitochondrial poly(A) polymerase. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013

Yokota M, Hatakeyama H, Okabe S, Ono Y, Goto Y. Mitochondrial dysfunction is the barrier against cellular reprogramming. but not the maintenance of pluripotency. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013

Hatakeyama H, Yokota M, Okabe S, Ono Y, Goto Y. *in vitro* neural modeling of various mitochondrial disorders using

patient-derived iPSC cells. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013

Hatakeyama H, Yokota M, Okabe S, Ono Y, Goto Y. Molecular pathogenesis and iPSC-cell-based disease modeling of MELAS caused by a mutation in anti-codon-stem of *MTTW* gene. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013

Sato T, Hayashi YK, Noguchi S, Osawa M, Nonaka I, Nishino I: DNAJB6 myopathy in Japanese cohort. 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10.9-10.13, 2012

Sato T, Hayashi YK, Noguchi S, Osawa M, Nonaka I, Nishino I: DNAJB6 myopathy in Japanese cohort. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

Goto Y. Mitochondrial disease. Joint Congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Brisbane, Australia, 5.27-6.1, 2012

Goto Y, Mimaki M, Hatakeyama H, Komaki H, Yokoyama M, Arai H, Kirino K, Suzuki T, Nishino I, Nonaka I. Reversible infantile respiratory chain deficiency: a clinical and molecular study. The 11th Asian Oceanian Myology Center, Kyoto, Japan, 6.7, 2012

Sato Y, Goto Y. Furnishing appropriate

information on mitochondrial disease to patients and their families. 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11.7, 2012

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

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

Sato Y, Ikegami Y, Minami N, Okamoto N, Mori M, Murata M, Goto Y. Predictive testing for adult-onset neuromuscular diseases. 12th International Congress of Human Genetics, 61st American Society of Human Genetics Annual Meeting, 11-15 Oct 2011, Montreal

Matsushima Y, Goto Y, Laurie S. Kaguni. Mitochondrial Lon protease regulates

mitochondrial DNA copy number and transcription. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Kagoshima, Japan, Aug. 31-Sep.4, 2011

Ishiyama A, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. Mitochondrial Disease with unusual exocrine pancreatic manifestations. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Kagoshima, Japan, Aug. 31-Sep.4, 2011

Goto M, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. MELAS phenotype associated with the m.3243A>G mutation in the mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Kagoshima, Japan, Aug. 31-Sep.4, 2011

2)国内学会

西野一三：新しい先天性筋ジストロフィー。第54回日本神経学会学術大会，千代田区(東京国際フォーラム)，5.30, 2013 (5.29-6.1)

Endo Y, Hayashi YK, Komaki H, Nonaka I, Nishino I: Whole Exome Sequencing Analysis on hereditary muscle disease with tubular aggregates. 第55回日本小児神経学会学術集会，大分市(大分オアシスタワーホテル)，5.30, 2013 (5.30-6.1)

西野一三：Tubular aggregatesを伴う遺伝型筋疾患の原因遺伝子。第54回日本神経学会学術大会，千代田区(東京国際フォーラム)，5.30, 2013 (5.29-6.1)

漆葉章典, 米川貴博, 鈴木理恵, 野口 悟, 林由起子, 西野一三：封入体筋炎とC型肝炎ウイルス感染に関する多数例解析。第54回日本神経学会学術大会，千代田区(東京国際フォーラム)，5.29, 2013 (5.29-6.1)

林由起子：骨パジェット病および前頭側頭型痴呆をともなう封入体ミオパチー (IBMPFD)。第54回日本神経学会学術大会，千代田区(東京国際フォーラム)，5.31, 2013

林由起子，他。ネマリンミオパチーの臨床遺伝学的解析。第54回日本神経学会学術大会，千代田区(東京国際フォーラム)，5.29, 2013

林由起子：Myofibrillar myopathy. 第54回日本神経学会学術大会，千代田区(東京国際フォーラム)，5.30, 2013

竹下絵里，石井智弘，栗津緑，新庄正宜，長谷川奉延，三木純，日高義彦，本林光雄，熊谷悦子，後藤雄一：巣状系球体硬化症による慢性腎不全を呈したミトコンドリア DNA9155A>G 変異の2例。第116回日本小児科学会総会，広島，4.20, 2013

竹下絵里, 三牧正和, 西野一三, 桢中征哉, 後藤雄一: ミトコンドリア病の遺伝子診断には、long PCR 法、サザンブロット法、全周シーケンス法を用いた解析と総合的な判断が必要である。第 55 回日本小児神経学会総会, 大分, 6.1, 2013

後藤雄一. 難病に対する生殖医療の近未来-アタ棚対策の方向性を求めて-. ART FORUM 2013, 大分, 8.5, 2013

根岸裕, 服部文子, 竹下絵里, 安藤直樹, 伊藤哲哉, 後藤雄一, 齋藤伸治. ミトコンドリア DNA3697G>A ホモプラスミー変異を認めた Leigh 脳症の 3 同胞例. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 仙台, 11.23, 2013

三宅紀子, 矢野正三, 後藤雄一, 松本直通. UQCR2 ホモ接合性変異による新規ミトコンドリア呼吸鎖複合体 欠損症. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 仙台, 11.23, 2013

竹下絵里, 三牧正和, 吉田寿美子, 西野一三, 後藤雄一. Leigh 脳症 64 例における原因遺伝子の検討. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 仙台, 11.23, 2013

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: 中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

佐藤有希子, 後藤雄一: ミトコンドリア病に関する情報ツール作成の試み. 第 54 回日本小児神経学会総会, 札幌, 5.18, 2012

佐藤有希子, 後藤雄一: ミトコンドリア病に関する情報提供の充実に向けた取り組み. 第 36 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 松本, 6.9, 2012

後藤雄一. ミトコンドリアと老化. ART FORUM 2012, 大阪, 8.30, 2012

末岡浩, 佐藤卓, 水口雄貴, 泉陽子, 高橋香織, 佐藤健二, 中林章, 吉村泰典, 後藤雄一. ミトコンドリア遺伝病における着床前遺伝子診断の不効率例

に対する新たな対策の必要性. 第57回
日本人類遺伝学会, 東京, 10.26, 2012

後藤雄一. ヒトミトコンドリアの特性-
ヒト疾患の病態基盤. 第12回日本ミト
コンドリア学会, 筑波, 12.21, 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

林由起子: 筋ジストロフィー研究の進歩.
東京医科大学総合研究所主催シンポジ
ウム(第12回医学総合研究所セミナー),
東京, 6.26, 2012

本村和嗣, 林由起子, 野口悟, 内海貴夫,
森澤学, 西野一三, “次世代型シークエ
ンサーを用いた遺伝性筋疾患の病態解
明の試み” 第二回 NGS 現場の会
2012.05.24, 大阪

内海貴夫, 森澤学, 本村和嗣, 西野一三,
“次世代シークエンサーを用いた遺伝
性疾患の原因遺伝子の探索法について
1” 第二回 NGS 現場の会 2012.05.24, 大
阪

森澤学, 内海貴夫, 本村和嗣, 西野一三,
“次世代シークエンサーを用いた遺伝
性疾患の原因遺伝子の探索法について
2” 第二回 NGS 現場の会 2012.05.24, 大
阪

後藤雄一. ミトコンドリア病の基礎と臨
床. 第114回日本小児科学会, 東京, 8.13,
2011

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