

の先天性ミオパチー以外の筋症状を呈しうる疾患を除外する目的で有用性が高いと考えられた。採血項目では当院精査例で先天性ミオパチーと確定診断された例のCK値平均は106 IU/l (58-202)であり、閾値を500 IU/lに区切ることで当科での経験症例をすべて満たし、文献からもこのカットオフ値が妥当であると考えた。

これらをもとに、I) 筋病理または遺伝子で確定診断された例、II) 臨床症状および採血、生理検査、画像検査との組み合わせから臨床的に確定診断した例の2群に大別し診断基準作成を行った。

I) 確定診断例は、基本的な臨床症状として、1) 筋力低下、2) 筋緊張低下、3) 腱反射低下または消失の臨床症状を基本症状とし、筋病理所見または遺伝子から診断確定されたものとした。次いで、II) 臨床的な確定診断例では、上記の基本的臨床症状 1)-3)を満たし、a) 骨格筋画像での異常所見、b) 呼吸機能障害、c) 経鼻胃管または胃瘻による経管栄養、d) 側彎または関節拘縮、e) 顔面筋罹患または高口蓋、眼瞼下垂、外眼筋麻痺、f) 家族歴という項目から、3項目以上を満たす例を臨床的な確定診断例とした。ただし臨床的な確定診断例の場合は、①中枢神経病変の否定、②骨格筋画像、針筋電図または遺伝子検査で筋炎や神経原性疾患の除外、③染色体異常の否定、④CK値<500 IU/lを全て満たすことが鑑別疾患の除外に必須であると考えられた。

D : 考察

先天性ミオパチーの疾患概要としての診断基準作成を行った。診断にあたっては筋病理検査や遺伝子解析が確定されていれば精度の高い診断と考えられるが、臨床的検査として

骨格筋画像や電気生理学的検査の所見も客観性に富み、先天性ミオパチーの診断や鑑別には有用であり、難病対策としての対象患者を網羅するという目的には十分であると考えられた。しかし診断に際しての検査選択、所見解釈については診断を行う医療者側の主観が入り、診断・情報の精度もそれに左右される可能性があり、精度管理、維持については、今後解決すべき課題である。

E : 結論

先天性ミオパチーの診断基準を作成した。難病対策としての対象患者の選択という目的においては利にかなった診断基準と考える。しかし、これらの情報を用いた患者情報収集や病態解析も視野に入れた場合、情報の正確性については課題が残り、高精度の情報収集のためのアプローチや解析方法の確立が求められ、今後の検討課題である。

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

なし

2 : 学会発表

大久保真理子、石山昭彦、小牧宏文、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：ネマリンミオパチーにおける下肢骨格筋画像の筋選択性の特徴。第56回日本小児神経学会総会、浜松、5/29-5/31.2014

馬場信平、石山昭彦、小牧宏文、齋藤貴志、齋藤義朗、中川栄二、須貝研司、鷹羽智子、今泉博文、阿部裕二、小林麻里子、熊澤勇介、佐々木征行：Duchenne 型筋ジストロフィー患者における体重変化と安静時エネルギー消費量の変化の関連. 第 56 回日本小児神経学会総会、浜松、5/29-5/31.2014

3：その他
なし

石山昭彦、湯浅正太、本橋裕子、竹下絵里、齋藤貴志、小牧宏文、中川栄二、須貝研司、佐々木征行：脊髄性筋萎縮症における臨床病型と F 波の多様性. 第 44 回日本臨床神経生理学会学術大会、福岡、11/19-11/21.2014

湯浅正太、石山昭彦、齋藤 祐子、齋藤貴志、齋藤義朗、小牧宏文、中川栄二、須貝研司、佐々木征行：多趾症を伴い、進行性運動障害を呈した 11 歳男性例. 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、6/5-6/7.2014

Mana Higashihara, Masahiro Sonoo,
Akihiko Ishiyama, Yu Nagashima, Haruo
Uesugi, Madoka Yoshimura Mori, Miho
Murata, Shigeo Murayama, Hirofumi
Komaki: Quantitative analysis of surface
EMG for pediatric neuromuscular disorders.
American association of neuromuscular &
electrodiagnostic medicine 61st Annual
Meeting, Savannah, October 29-November
1, 2014

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業））

希少難治性筋疾患に関する調査研究班 分担研究報告書

本邦における骨格筋チャネル病の実態について

—重症度分類および診断ガイドラインに向けて—

研究分担者：高橋 正紀¹⁾

共同研究者：古田充¹⁾、久保田智哉¹⁾、中森雅之¹⁾、木下正信²⁾、
佐々木良元³⁾、望月秀樹¹⁾

1) 大阪大学大学院 医学系研究科 神経内科学

2) 首都大学東京 健康福祉学部

3) 三重大学医学部附属病院 神経内科

研究要旨

骨格筋チャネル病の重症度分類の策定および診断確定のための適切な指針が重要である。なかでも周期性四肢麻痺は発作性疾患のため、症度分類が困難であるが、本年度われわれは3段階（軽・中等・重症）の分類を提案しその有用性を示した。また、診断指針（ガイドライン）策定のための検討として、神経生理学的検査、とくに Fournier らによるショートおよびロングエクササイズテストにもとづく骨格筋チャネル病の神経生理学的分類の有用性を検討したが、その特異度は低い可能性が示された。

A：研究目的

骨格筋の電気的興奮・収縮などに不可欠なイオンチャ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「チャネル病」と総称される疾患に含まれる。われわれは平成 21 年度「本邦における筋チャネル病の実態に関する研究（H21-難治-一般-132）」、平成 22～23 年度「筋チャネル病および関連疾患の診断・治療指針作成および新規治療法開発に向けた基盤整備のための研究」班（H22-難治-一般-118）、平成 24～25 年度「希少難治性筋疾患に関する調査研究」（H24-難治等（難）-

一般-028）（研究代表者 青木正志教授）の一連の研究の中で、全国アンケート調査、啓蒙活動、遺伝子診断の推進を図るとともに、診断基準案の策定とその学会承認を受けた。

骨格筋チャネル病の実態解明には、重症度分類の策定および診断確定のための適切な指針が重要である。とくに周期性四肢麻痺は発作性疾患のため、重症度分類が困難であるが、本年度われわれが提案した3段階（軽・中等・重症）の分類について、診断確定例で検討することを目的とした。

また、骨格筋チャネル病の診断確定のためには、臨床神経生理学的検査が重要である。

そこで、診断指針の策定のため、神経生理学的検査の有用性をまず検討することにした。とくに、Fournierらによるショートおよびロングエクササイズテストにもとづく骨格筋チャンネル病の神経生理学的分類が、原因遺伝子推定や診断確定に有用と示されているため、まだその妥当性を本邦の症例で検討することとした。

B：研究方法

大阪大学および三重大学が全国から遺伝子解析依頼を受けた筋チャンネル病のうち、遺伝子診断が確定した症例について、その症例要約について後方視的に検討した。

今年度、研究協力者など専門家の討議により、周期性四肢麻痺の麻痺発作重症度について検討した。さらに、周期性四肢麻痺 25 症例のうち 12 家系 19 症例の病歴について、この重症度に基づき分類し特徴を検討した。

またすべての骨格筋チャンネル病の診断確定例のうち十分な神経生理学的検査データの存在する 16 例の神経生理検査結果について検討した。

(倫理面への配慮)

患者の遺伝子に関わる研究、患者情報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、大阪大学医学部附属病院倫理委員会にて承認済みである。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。

C：研究結果

重症度分類については、今年度、研究協力者など専門家の討議により、周期性四肢麻痺の麻痺発作重症度について以下の様に提案した。

麻痺発作重症度（最低 6 カ月の診療観察期間の後に判定する）

歩行に介助を要する状態が 1 時間以上続く麻痺発作のあった日が、

軽症	平均	月に 1 日未満
中等症	平均	月に 1 日以上
重症	平均	月に 4 日以上

われわれの提案する発作頻度による重症度分類を適用すると、低カリウム性周期性四肢麻痺(hypoPP)では軽症と重症に 2 極化する傾向があった。いっぽう高カリウム性(hyperPP)では重症に分類されるものはなかった。永続的筋力低下を示す症例は hypoPP および hyperPP 1 例ずつ存在した。

Fournier らによる I から V の分類では、Cl チャンネル異常による先天性ミオトニー(MC)は II に分類されるが、本邦の 5 例はすべて III に分類された。周期性四肢麻痺の再現といわれるロングエクササイズテストは hypoPP および hyperPP の半数で陽性を示し、先天性パラミオトニーでも 1 例で陽性を呈した。

D：考察

麻痺発作は低カリウム性が高カリウム性よりも重度であり、年齢とともに軽症化していくことが知られている。われわれの提案した重症度分類はこれらの特徴を良く表すことができることが判明した。遺伝子診断を依頼された発端者症例は、家系内でも重症であることが多いことから、家系内のすべての発症者についての調査をすることにより、本邦の症

例の全体像が明らかになると考えられる。

今回のわれわれの検討同様、Fournier らによる I から V の分類が、原報告ほどの特異度がないことが報告されている。しかしながら、われわれの結果は非常に特異度が低かった。各施設の手技的問題が存在することも考えられるが、典型例の少なさ、人種による違いなどの影響も考えられる。今後、前向き多施設共同研究なども検討すべきであると考えられた。

E : 結論

周期性四肢麻痺の重症度分類は有効である可能性が示された。Fournier らによる神経生理学的分類を診断指針に用いることについては、更なる検討が必要である。

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 H, Sakoda S, Shibata T, Akiyama T, Oka M, Yuan J-H, Takashima H, Takahashi MP, Kitamura T, Murakami N, Kobayashi K Phenotypic variability in childhood of skeletal muscle sodium channelopathies. *Pediatric Neurology*. in press.

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 別冊 医学のあゆみ イオンチャネル病のすべて pp. 38-45 2014

高橋正紀 周期性四肢麻痺 今日の整形外科治療指針 第7版 印刷中

2 : 学会発表

古田 充、中田智彦、穀内洋介、坂田宗平、木村紘美、相庭武司、吉永正夫、大崎裕亮、中森雅之、伊藤英樹、佐藤貴子、久保田智哉、門田一繁、進藤克郎、望月秀樹、清水 渉、堀江 稔、岡村康司、大野欽司、高橋正紀 Kir3.4 変異は Kir2.1 に対する抑制作用を通して Andersen-Tawil 症候群を引き起こす。第55回日本神経学会学術大会 平成26年5月23日 福岡

加藤秀紀, 湯浅浩之, 三竹重久, 打田佑人, 池田知雅, 間所佑太, 穀内洋介, 高橋正紀 遺伝子解析にて診断しえた Thomsen 病3例の臨床像と電気生理学的検査の検討 第55回日本神経学会学術大会 平成26年5月 福岡

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 症候群の病態解明と調査

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神経遺伝情報学

研究要旨

本研究の目的は、細胞外マトリックス分子パールカン欠損による軟骨異栄養性筋強直症

(Schwartz-Jampel 症候群, SJS) の臨床診断・遺伝子診断方法を確立し、本邦における発症者を掌握し、その臨床的特徴、経過などを調査することである。SJS は、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。原因遺伝子が明らかになったが、効果的対症療法、根治療法が確立しておらず患者調査が進んでいない。全身の合併症リスクを調査して注意を喚起する必要がある。

A：研究目的

軟骨異栄養性筋強直 (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。本研究の目的は、細胞外マトリックス分子パールカン欠損による SJS の分子病態解明と画期的治療に向けた基礎研究の成果を活用するため、臨床診断・遺伝子診断を必要とする対象を発掘、調査することを目的とする。

B：研究方法

本邦においては、SJS の調査が十分に行われていないため、まず症例の蓄積を進める必要がある。これまでの研究室規模で進めてきた診断を臨床的に応用できるように、経費と労力を効率化する方法を検討する。これまでに蓄積された筋生検例のうち本疾患が疑われるものには免疫染色にてパールカン関連分子群

の免疫染色でスクリーニングを行った。これにより可能性が高い場合には標本量が十分あればウェスタンブロット等に追加検査を行うこととした。血液などから DNA を採取している場合には、cDNA でのスクリーニング及びゲノム解析を進めた。

(倫理面への配慮)

本研究による遺伝子診断は順天堂大学医学部の承認を受けた後に、患者への説明と文書による同意に基づいて行った。

C : 研究結果

本邦での患者調査のための対象発掘を行った。臨床的に SJS を疑われた症例の免疫染色ではパールカン欠損例及びパールカン関連分子の染色性異常は発見できなかった。SJS の病態機序解明のため、これまでにモデルマウスの表現系から予測した全身合併症を検証し、その周知及び患者調査のための準備を行った。パールカン欠損に起因する疾患スペクトラムを班会議で提案した。これまでに提示された SJS 疾患分類を検証した。1 例に対し遺伝子検査を行い、2 つの新しい遺伝子変異を検出した (論文投稿中)。

D : 考察

幼少時の発症。骨格症状、筋症状、開口障害などの多様な臨床症状を考慮し、小児科、整形外科、神経内科、麻酔科、小児歯科等への疾患の周知とアンケート調査が必要と考えられた。また、SJS 症例の調査と同時に成人後の全身合併症の周知が必要とと考えられた。

E : 結論

SJS の発症機序を解明すると同時に、病態機序から予測されるパールカン欠損に起因する

疾患スペクトラムを提示し、これまでの疾患分類を検証する必要があると考えられた

F : 健康危険情報

特になし

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

分担研究者 平澤

- 1 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*. Apr;10(4):631-41 2014
- 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*. 2014 Jan 27
- 3 Ning L, Kurihara H, de Vega S,* Ichikawa-Tomikawa n, Xu Z, Nonaka R, Kazuno S, Yamada Y, Miner JH, Arikawa-Hirasawa E, Laminin $\alpha 1$ regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the

- TGFβ pathway The American Journal of Pathology . 2014 Jun;184(6):1683-94
- 4 Nonaka R, Iesaki T, de Vega S, Daida H, Okada T, Sasaki T, and Arikawa-Hirasawa E Perlecan deficiency causes endothelial dysfunction by reducing the expression of endothelial nitric oxide synthase. *Physiological Reports* in press
- 5 Kerever A, Kamagata K, Yokosawa S, Yosuke Otake Y, Ochi H, Hori M, Nishikori A, Aoki S, Arikawa-Hirasawa E. High-Resolution MRI and Three-Dimensional Imaging of Cleared Mouse Brain: A Preliminary Microstructural Study in a Mouse with callosal agenesis *Magnetic Resonance in Medical Sciences* in press
- 協力研究者 大野
1. Inaguma Y, Hamada N, Tabata H, Iwamoto I, Mizuno M, Nishimura YV, Ito H, Morishita R, Suzuki M, Ohno K, Kumagai T, Nagata KI. SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *EMBO Mol Med* 2014, 6: 155 - 295.
2. 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 beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014, 23: 1856-1868.
3. Nakayama T, Nakamura H, Oya Y, Kimura T, Imahuku I, Ohno K, Nishino I, Abe K, Matsuura T. Clinical and genetic analysis of the first known Asian family with myotonic dystrophy type 2. *J Hum Genet* 2014, 59: 129-133.
4. 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 M. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 2014, 82: 1058-1064. *Equal contribution.
5. Kobayashi M, Ohno T, Ihara K, Murai A, Kumazawa M, Hoshino H, Iwanaga K, Iwai H, Hamana Y, Ito M, Ohno K, Horio F. Searching for genomic region of high-fat diet-induced type 2 diabetes in mouse chromosome 2 by analysis of congenic strains. *PLoS ONE* 2014, 9: e96271.
6. Yamashita Y*, Matsuura T*, Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita M, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. LDB3

- splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity. *Neurobiol Dis* 2014, 69: 200-205. *Equal contribution.
7. Nasrin F, Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. HnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform. *Sci Rep* 2014, 4: 6841.
 8. Azuma Y, Nakata T, Tanaka M, Shen XM, Ito M, Iwata S, Okuno T, Nomura Y, Ando N, Ishigaki K, Ohkawara B, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Sokabe M, Ohno K. Congenital myasthenic syndrome in Japan: Ethnically unique mutations in muscle nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Neuromuscular Disorders* 2015, 25: 60-69.
- 2 : 学会発表
- 1 Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa. The role of the extracellular matrix protein Perlecan in the arterial wall. *Experimental Biology* 4.26-30 2014 San diego, USA
 - 2 平澤 恵理、岩田 哲、野中 里紗、服部 信孝、中田 智彦、伊藤 美佳子、大野 欽司 Schwartz-Jampel 症候群の原因遺伝子、パールカンの機能部分欠損変異の機能解析第 55 回日本神経学会学術大会 2014.5.21-24 (福岡)
 - 3 野中 里紗、家崎 貴文、Susana de Vega、Aurelien Kerever、山田 吉彦、平澤 (有川) 恵理 大動脈構造や機能におけるパールカンの役割 第 46 回日本結合組織学会・第 61 回マトリックス研究会合同学術集会 2014.6.7-8(名古屋)
 - 4 Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega., Aurelien Kerever, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa . Role of Perlecan in the Structural Integrity and Function of the Aorta. Gordon Research Conference on proteoglycan 2014.7.6-11 New Hampshire, USA
 - 5 平澤 恵理、野中 里紗、大野 欽司 Schwaets-Jampel 症候群の病態解明と調査希少難治性筋疾患に関する調査研究班 H26 年度班会議 2015.2.6
 - 6 Eri Arikawa-Hirasawa Role of Perlecan in Neurogenesis and Ageing" Gordon Research Conference on proteoglycan 2014.7.6-11
 - 7 Takenori Inomata, Toru Matsunaga, Nobuyuki Ebihara, Akira Murakami, Eri Arikawa-Hirasawa Perlecan-deficient Mutation Impairs Homeostasis and Wound Healing in Mouse Corneal Epithelium Gordon Research Conference on proteoglycan 2014.7.6-11
 - 8 Susana de Vega, Eimi Seo, Anna Takeda, Nobuharu Suzuki, Risa Nonaka, Kentaro Hozumi, Motoyoshi

of Fibulin-7 Peptides Active for
Endothelial Cell Adhesion and Tube
Formation 第 46 回日本結合組織学会・
第 61 回マトリックス研究会合同学術
集会 2014.6.7-8(名古屋)

- 9 Liang Ning, Hidetake Kurihara,
Susana de Vega, Risa Nonaka, Eri
Arikawa-Hirasawa, Role of Laminin1
in mesangial cell proliferation and
mesangial matrix accumulation 第 46
回日本結合組織学会・第 61 回マトリッ
クス研究会合同学術集会 2014.6.7-8(名
古屋)

H : 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1 : 特許取得

特記事項なし。

2 : 実用新案登録

特記事項なし。

3 : その他

特記事項なし。

先天性筋無力症候群

研究分担者：大野欽司¹⁾

1) 名古屋大学医学系研究科神経遺伝情報学

研究要旨

平成 25 年度までに作成した診断基準の検証・改定を行い、先天性筋無力症候群の指定難病への登録に向けて、臨床調査個人票案（新規・継続）を作成するとともに、難病指定医向けテキストを作成し、難病情報センターウェブページの原稿を作成した。本邦の先天性筋無力症候群を発掘するためにエキソームシーケンス・全ゲノムシーケンス・サンガーシーケンス解析を行い、平成 26 年度に新たに 3 症例の診断を行った。

A：研究目的

本研究の目的は、本邦における先天性筋無力症候群のさらなる発掘と、先天性筋無力症候群の指定難病登録へ向けに診断基準の策定・臨床調査個人票の作成・難病指定医向けテキストの作成を行うことにより、今後の病態研究への基盤整備を行うことである。また、診断精度の向上を目的とした遺伝子診断の診断体制の整備も、次世代シーケンサーを用いたスクリーニングを含めて行っていく。

B：研究方法

過去の自らの分子病態研究成果と文献検索結果の解析により臨床調査個人票案（新規・継続）を作成した。同様に、難病指定医向けテキスト・難病情報センターウェブページ原稿を作成した。

本邦の先天性筋無力症候群の新規発掘のために、候補遺伝子が類推可能な場合には、候

補遺伝子の Sanger sequencing 解析を行った。候補遺伝子が不明の場合には、Otogenetics 社によりに依頼し、Agilent 社 Sure Select V5 により exome capture を行い Illumina HiSeq 2500 により x50 coverage で exome capture resequencing 解析を行った。また、2015 年 9 月以降は、Macrogen 社に依頼し、Illumina HiSeq X により x30 coverage で whole genome resequencing 解析を必要に応じて行った。

次世代シーケンサデータは exome capture resequencing も whole genome resequencing も同一パイプラインにより解析を行った。FastX-toolkit と FastQC により quality check を行い、BWA と BLAT により mapping を行い、Samtools により post-processing を行った。Samtools と VarScan により variant call を行い、VarScan により filtering を行った。AnnoVar と独自プ

ログラムにより annotation をつけ、CMS 既報告 21 遺伝子ならびに神経筋接合部に高発現の約 100 種類の遺伝子を候補遺伝子として解析を行った。dbSNP, NHLBI ESP, 1000 genome project, HGVD, NCI60, ExAC65000, HGMD, ClinVar, COSMIC に登録をされた SNP のうち minor allelic frequency が高いものを候補原因遺伝子から除外した。

(倫理面への配慮)

本研究による遺伝子診断は名古屋大学医学系研究科生命倫理委員会ならびに遺伝子解析依頼各施設の生命倫理委員会の承認を受けた後に、患者への説明と文書による同意に基づいて行った。

C : 研究結果

先天性筋無力症候群の指定難病への登録に向けて、臨床調査個人票案（新規・継続）を作成するとともに、難病指定医向けテキストを作成し、難病情報センターウェブページの原稿を作成した。

本邦の先天性筋無力症候群性 7 例の次世代シーケンサ解析を行い、現在までに 3 例において原因遺伝子変異を同定した。2 例は *COLQ* 遺伝子変異による終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症であり、1 例は *CHRNE* 遺伝子変異によるスローチャンネル症候群であった。

D : 考察

同一施設から 6 例目の先天性筋無力症候群診断例が見出された。6 例はいずれも先天性筋無力症候群疑いでその施設に紹介をされた患者ではなく主治医が注意深い診察により臨床診断を行っている。本邦にはまだ未診断の先天性筋無力症候群例が数多くいることが示

唆される。

E : 結論

先天性筋無力症候群の指定難病への登録に向けた資料の作成を行った。3 例の先天性筋無力症候群確定診断を行った。

F : 健康危険情報

ありません。

G : 研究発表

1 : 論文発表

【Original Articles】

1. Inaguma Y, Hamada N, Tabata H, Iwamoto I, Mizuno M, Nishimura YV, Ito H, Morishita R, Suzuki M, Ohno K, Kumagai T, Nagata KI. SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *EMBO Mol Med* 2014, 6: 155 - 295.
2. 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 beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014, 23: 1856-1868.
3. Nakayama T, Nakamura H, Oya Y, Kimura T, Imahuku I, Ohno K, Nishino I, Abe K, Matsuura T. Clinical and genetic analysis of the first known Asian family

- with myotonic dystrophy type 2. *J Hum Genet* 2014, 59: 129-133.
4. 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 M. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 2014, 82: 1058-1064.
*Equal contribution.
 5. Kobayashi M, Ohno T, Ihara K, Murai A, Kumazawa M, Hoshino H, Iwanaga K, Iwai H, Hamana Y, Ito M, Ohno K, Horio F. Searching for genomic region of high-fat diet-induced type 2 diabetes in mouse chromosome 2 by analysis of congenic strains. *PLoS ONE* 2014, 9: e96271.
 6. Yamashita Y*, Matsuura T*, Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita M, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity. *Neurobiol Dis* 2014, 69: 200-205.
*Equal contribution.
 7. Nasrin F, Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. HnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform. *Sci Rep* 2014, 4: 6841.
 8. Azuma Y, Nakata T, Tanaka M, Shen XM, Ito M, Iwata S, Okuno T, Nomura Y, Ando N, Ishigaki K, Ohkawara B, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Sokabe M, Ohno K. Congenital myasthenic syndrome in Japan: Ethnically unique mutations in muscle nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Neuromuscular Disorders* 2015, 25: 60-69.
- 【Chapters in Books】**
1. Ohno K, Ohkawara B, Ito M, Engel AG. Molecular Genetics of Congenital Myasthenic Syndromes. *eLS*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2014, <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0024314]. (査読有)
- 【Reviews】**
1. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Ohtsuka K. 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* 2014, 53: 359-361. (査読有)
 2. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohno K. Decoding abnormal splicing code in human diseases. *J Invest Genomics* 2015, 2(1): 00016 (査読有)
- 2 : 学会発表
- 【Invited Presentations at Scientific Meetings】**
1. Ohno K Maintenance of the neuromuscular junction and its aberrations in hereditary and autoimmune disorders. Guarda-Symposium 2014 on the

Molecular and Cell Biology of the Neuromuscular System, Guarda, Switzerland. Sep 1, 2014

【Presentations at Scientific Meetings】

1. Shibata A, Okuno T, Masuda A, Ohno K. P16.49-S · IntSplice: A tool to predict the effect on pre-mRNA splicing of intronic nucleotide substitutions. European Society of Human Genetics 2014 (Poster), Milan, Lombardy, Italy. May 31-June 3, 2014
2. Ohno K, Shibata A, Okuno T, Rahman MA, Azuma Y, Masuda A. IntSplice: A tool to predict aberrant splicing of an SNV at intronic positions -50 to -3. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Diego, California, USA. Oct 18-22, 2014
3. Bruun GH, Doktor TK, Brøner S, Masuda A, Palhais B, Krainer AR, Ohno K, Andresen BS. Global identification of binding sites for the splicing regulatory factors SRSF5 and hnRNPA1. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Diego, California, USA. Oct 18-22, 2014
4. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. Alternative splicing of human *MUSK* exon 10 is physiologically regulated by multiple splicing regulatory cis-elements and cognate trans-factors. RNA Biology Meeting, Cold Spring Harbor Asia Conference (Poster), Suzhou, China. Nov 10-14, 2014

5. Selcen D, Shen X-M, Ohkawara B, McEvoy K, Ohno K, Engel AG. Congenital myasthenic syndrome (CMS) caused by novel mutation in LRP4. Phenotypic heterogeneity and defects in neuromuscular transmission (NMT) identified in a second kinship. 67th Annual Meeting of the American Academy of Neurology (Poster), Washington DC, USA. Apr 18-25, 2015

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

自己貪食空胞性ミオパチーの診療実態と診療ガイドライン作成の試み

研究分担者：杉江 和馬^{1) 2)}

共同研究者：倉重 毅志³⁾ 江浦 信之¹⁾ 尾上 健児⁴⁾
齋藤 能彦⁴⁾ 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

3) 広島大学 脳神経内科

4) 奈良県立医科大学 循環器・腎臓・代謝内科

研究要旨

自己貪食空胞性ミオパチー（AVM）は、筋鞘膜の性質を有する特異な自己貪食空胞（AVSF）を伴う筋疾患である。病態や発症機序は未解明なため、AVMの全国実態調査結果をもとに、臨床的および筋病理学的特徴を見出した。集計結果から、AVM患者41例を確認した（Danon病13家系28例、過剰自己貪食を伴うX連鎖性ミオパチー（XMEA）1家系3例、ほか）。Danon病患者は、ミオパチーと肥大型心筋症を示し、死因は心不全であった。ペースメーカー埋込 6例、心臓移植 1例で施行された。一方、XMEAと先天性AVMはミオパチーのみで心筋障害は稀であった。AVM患者すべての生検筋で特徴的なAVSFがみられた。Danon病ではLAMP-2変異を、XMEAではVMA21変異を示した。乳児型AVMと先天性AVMではVMA21変異を認め、XMEAのアレル病であることを明らかにした。確定診断には、臨床症状に加えて、筋病理所見、遺伝子解析結果をもとに行う必要がある。現状では根本治療はなく、心筋症や不整脈への対症療法が主体となる。今回、診療ガイドライン策定に向けて、現状で最適と考えられる診断および治療法について検討し、ガイドラインの骨子を作成した。多くのAVM患者でミオパチー症状は軽症である一方、Danon病の心筋症は予後決定因子でありその診断および治療は重要である。

A. 研究目的

自己貪食空胞性ミオパチー（AVM）は、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 sarcolemmal features）を特徴とする希少な筋

疾患である。AVMの代表疾患であるDanon病は、2000年に初めてライソゾーム関連膜蛋白2型（lysosome-associated membrane protein-2: LAMP-2）が原因遺伝子であることが発見され（Nishino I, et al. Nature, 2000）、さらに、私

たち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)。AVMのもう一つの代表疾患である過剰自己食食を伴うX連鎖性ミオパチー (X-linked myopathy with excessive autophagy : XMEA) は、近年、原因遺伝子としてライソゾーム内蛋白である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。AVSFは、疾患特異性が高く、ポンペ病 (糖原病2型) でみられる自己食食空胞やrimmed vacuoleとは異なる性質である。

私たちは、平成21年度に、厚生労働科学研究費補助金「自己食食空胞性ミオパチー (AVM)」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、私たち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24-25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26年度は、これまでの本邦でのAVM病患者の集計結果をもとに、本邦での診療実態、特に治療実態について明らかにして、将来の診療ガイドライン策定のための骨子について検討した。

B. 研究方法

平成21年度にAVM研究班で作成したAVM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、新規の症例においては、ダイレクトシーケンス法によるLAMP-2遺伝子あるいはVMA21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。

特に今年度は、臨床的特徴や合併症に加えて、現在行われている治療法について明らかにした。そして、現状、最適と考えられる診断法および治療法について検討した。

(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させていただいて、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、AVM患者41例を確認した。Danon病は13家系28例 (男性16例、女性12例)、XMEAは1家系3例であり、その他、乳児型 AVM 2例、成人型 AVM 1例、先天性 AVM 1家系7例を見出した。

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、精神遅滞は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、発症者の約1/2がde novo変異であった。

筋病理学的解析から、AVM患者すべての生検筋で特徴的なAVSFがみられた。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。

XMEAと先天性AVMはミオパチー主体で心筋障害は稀であった。遺伝学的検討では、Danon病ではLAMP-2変異を、XMEAではVMA21変異を示した。また、乳児型AVMと先天性AVMではVMA21変異を認め、XMEAのアレル病であることを明らかにした。確定診断には、臨床症状に加えて、筋病理所見、遺伝子解析結果をもとに行う必要がある。Danon病では、肥大型心筋症やWPW症候群などの心伝導異常が特徴的な所見である。

一方、治療においては、現状では根本的な治療はなく、心筋症や不整脈への対症療法が治療の主体となる。ミオパチー症状は軽症のことが多い。また、予後不良な遺伝性疾患であることから、遺伝カウンセリングも重要な役割を果たすと考えられる。

D. 考察

AVM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AVM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、AVMの疾患概念の確立のため、われわれは世界で初めてDanon病とXMEAの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を行った。

今年度は、将来の診療ガイドライン策定のため、現在の診療実態を明らかにして、現状で最適な治療法を検討して、ガイドラインの骨子の作成に努めた。

まず、診断については、Danon病とXMEAの診断基準に従って、1) 臨床症状、2) 筋病理所見、3) 遺伝子解析（LAMP-2、VMA21遺伝子）結果に基づいて行われる必要がある。特に筋病理所見でのAVSFが必要不可欠な所見となる。

治療については、AVMの臨床症状の3主徴である、1) 心筋症、2) ミオパチー、3) 精神遅滞についての対処が求められる。しかし、現状では、ミオパチーについては、リハビリテーションと廃用性萎縮の予防、精神遅滞については、精神科的アプローチなど対症療法が主体となる。一方、心筋症は、致死性となりうる予後決定因子である。しかし、現状では、心移植のみが根本治療であり、特に心不全発症後2年以内の心移植が望まれる。但し、早期発見により不整脈による突然死を予防できる可能性があり、カテーテルアブレーションやICD埋め込み術、ペーシングなどが治療法として挙げられる。心不全や心房細動などの不整脈に対する投薬も必要である。また、心機能の定期的な観察のため、心エコーや心電図、心臓MRIに加えて、生活上の

指導も重要である。今後、治療法については再検討を行い、現状で最適な治療法を確立することが求められる。

今後、AVMの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必要がある。加えて、超稀少疾病である本疾患の病態解析解明や今後の治験の実現のためには、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

本邦での AVM 患者の実態を調査し、新規を含め AVM 患者 41 例を確認した。今後の AVM の診療ガイドライン作成に向けて、現状で最適と考えられる診断法および治療法について検討した。多くの AVM 患者でミオパチー症状は軽症である一方、Danon 病の心筋症は予後決定因子でありその診断および治療は重要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugie K, Nishino I. Lysosomal Membrane Disorders: LAMP-2 Deficiency. In: Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease. 5th ed. Rosenberg R, Pascual J, Eds. Elsevier, Amsterdam, Nederland, 2014: 411-417.
- 2) Eura N, Sugie K, Kiriya T, Ueno S. Characteristic dysphagia as a manifestation of dermatomyositis on

oropharyngeal muscle imaging. J Clin Rheumatol (in press).

- 3) 杉江和馬. ライソゾーム膜の異常：Danon 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 6 月. 839-843.

2. 学会発表

- 1) Sugie K, Komaki H, Eura N, Nonaka I, Ueno S, Nishino I. A nationwide survey of Danon disease in Japan. The 13th International Congress on Neuromuscular Diseases (ICNMD XIII), Nice, France, July 5-10, 2014.
- 2) Kurashige T, Takahashi T, Nagano Y, Sugie K, Watanabe C, Maruyama H, Ueno S, Matsumoto M. KL-6/MUC1 is a novel diagnostic marker for GNE-myopathy. The 19th International Congress of the World Muscle Society (WMS 2014), Berlin, Germany, October 7-11, 2014.
- 3) 杉江和馬, 小牧宏文、江浦信之、上野 聡、西野一三. 全国実態調査による Danon 病の臨床遺伝学的解析. 第 59 回日本人類遺伝学会、福岡、2014 年 11 月.
- 3) 杉江和馬, 小牧宏文、江浦信之、上野 聡、西野一三. Danon 病の臨床病理学および遺伝学的解析と診断基準作成の試み. 第 55 回日本神経学会学術集会、福岡、2014 年 5 月.
- 4) 江浦信之、杉江和馬、小原啓弥、形岡博史、上野 聡. 抗 PL-7 抗体陽性ミオパチーの臨床病理学的検討. 第 55 回日本神経学会学術集会、福岡、2014 年 5 月.

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. 協力者研究報告書