

multiple systemic involvement. The 4<sup>th</sup> Oriental Congress of Neurology, 上海, 3. 28. 2015

Sakai C, Matsushima Y, Sasaki M, Miyamoto Y, Goto Y: Targeted exome sequencing identified a novel genetic disorder in mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation. Euromit 2014, Tampere, Finland, 6. 16, 2014

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 compound heterozygous mutations in mitochondrial poly(A) polymerase. Euromit 2014, Tampere, Finland, 6. 16, 2014

Goto Y: Mitochondrial Disease. Asian & Oceanian Epilepsy Congress 2014. Singapore, 8. 7, 2014

#### 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

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))

委託業務成果報告(業務項目)

遺伝性ミオパチーの次世代型統合的診断拠点形成  
2. 全エクソーム解析

業務主任者 西野一三 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

診断未知の筋疾患について、遺伝性筋疾患の原因となることが知られている遺伝子に対して網羅的解析を行った結果、診断が確定できなかった症例について、エクソームシーケンシングを行った。また、臨床病理学的所見から、既知遺伝子の変異では説明できない症例については、直接エクソーム解析を行った。Tubular aggregate myopathyの新規原因遺伝子 *OR11* を見出した他、世界第2例目の *DAG1* 変異例同定、新たなネマリンミオパチー原因遺伝子 *LMO3* の同定などの成果を上げた。この他にも多数の候補原因遺伝子を見出し、さらに病因解析を進めている。また、インフォマティクス解析パイプラインを GATK v. 3.1 を用いたものにアップデートするとともに、エクソーム解析のデータベースを横断的に解析するためのデータベースを構築した。今後、さらに効率よく原因遺伝子変異を見出すことが可能となることが期待される。

A. 研究目的

遺伝性筋疾患の原因となる遺伝子は、報告されているだけでも 100 種類以上あるが、これらの遺伝子の網羅的解析によっても、原因となる遺伝子変異が確定できない症例が多数存在する。本研究では、これらの症例に対して、エクソーム解析を行い、原因となる遺伝子変異の同定を目指す。

B. 研究方法

国立精神・神経医療研究センターに診断依頼された検体のうちで既知遺伝子変異ハイスループット解析を行ってもなお原因遺伝子不明であった 83 例および、遺伝子診断未知でいずれのカテゴリーにも属さず新規原因遺伝子が疑われる症例を含めた 192 例を対象とした。全エクソームキャプチャー

キットを用いてライブラリーを作製し、HiSeq1000にてゲノム情報を取得した。既に構築済みの解析パイプラインを通して、候補遺伝子を絞り込み、候補遺伝子変異は、サンガー法で確認した。バイオインフォマティクスおよび日本人多型の判断に関しては、横浜市立大学・松本直通教授(研究協力者)と連携して進めた。さらに、これまでに解析を行った 400 例についても、引き続き原因遺伝子の同定を進めている。

(倫理面への配慮)

本研究において使用するヒト試料は、共同研究施設である NCNP 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利用に対する検体の使用許可を得たものを用いた。

### C. 研究結果

これまでにエクソーム解析を行った475例中350例で、解析が終了している。このうち、60の症例で病気の原因である可能性のある遺伝子変異を見出すことができた。この中には、1. tubular aggregate myopathyの新規の変異遺伝子 *ORAI1* の同定、2.  $\alpha$ -dystroglycanopathyと病理学的に確定された例の中から世界第2例目となる *DAG1* 変異例を同定、3. *LMOD3* 変異がネマリンミオパチーの新たな原因であることを同定、4. *TK2* 変異による筋線維未熟性を伴う先天性ミオパチーの同定、5. 中心核ミオパチーの新規原因遺伝子Xの同定（海外の研究者との共同研究のため遺伝子名は未公表）、6. *LMNA* 変異による核内ロッドを伴う先天性ミオパチーの同定、7. 本邦初の *MEGF10* 先天性ミオパチーの同定、8. 本邦初の *ANOS5* 変異の同定、などの成果が含まれ、さらに病因解析を進めている。

Tubular aggregate myopathyでは、見いだされた変異をHEK293細胞に導入しFura-2を用いて細胞内カルシウム動態を評価した。その結果、野生型 *ORAI1* を導入した細胞では細胞外カルシウム濃度にかかわらず細胞内カルシウム濃度がほぼ一定に保たれるのに対し、変異体導入細胞では、細胞内カルシウム濃度が順次上昇した。この上昇はストア作動性チャネル特異的阻害剤で正常化されたことから、*ORAI1* 変異が *ORAI1* チャネルを constitute active に変え、常に開口状態にしていることが示された。患者筋管細胞を用いた実験でも同様の結果を得た。

平成26年度は、解析ソフトウェアを更新し、より信頼性の高い結果が得られることが期待されるGATKv. 3.1を用いた解析パイプラインを構築した。また解析の省力・省時間化を目指し、これまでに解析したNCNP内のエクソームデータベースを構築し、横断的に解析するシステムを構築した。これにより、同じ変異をもった症例を容易に見出すことや、病気の原因として疑わしい遺伝子に変異をもつ症例を抽出することが容易に可能となった。

### D. 考察

遺伝子診断が未知の遺伝性筋疾患に対して、筋疾患遺伝子パネルによる、次世代シーケンサーIonPGMによるスクリーニングを行った後、診断未知の筋疾患に対してエクソームシーケンスを行うことで、新規疾患原因遺伝子を見出す方法は、省コスト、省時間を考える上でも有効であると思われる。今後は、変異の病原性についての解析が必要であり、同じ変異を持った症例の蓄積が病原性の証明には大切であることから、今後さらにエクソームシーケンスによる、遺伝情報の蓄積を行い、新規の筋疾患原因が明らかにしていくことが必要である

### E. 結論

診断未知の筋疾患患者にたいするエクソーム解析によって、新規遺伝子の発見につながる結果を示した。今後は、さらに解析症例を増やし、エクソームデータベースを構築し、新規遺伝子発見と疾患病態解明に繋げて行く。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto YI, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I: Dominant mutations in *ORAI1* cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated  $Ca^{2+}$  channels. Hum Mol Genet. 2015 Feb 1; 24 (3): 637-48.

Dong M, Noguchi S, Endo Y, Hayashi YK, Yoshida S, Nonaka I, Nishino I: DAG1 mutations associated with asymptomatic hyperCKemia and hypoglycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan. Neurology. 2015 Jan 20; 84 (3): 273-9.

Yuen M, Sandaradura SA, Dowling JJ,

Kostyukova AS, Moroz N, Quinlan KG, Lehtokari VL, Ravenscroft G, Todd EJ, Ceyhan-Birsoy O, Gokhin DS, Maluenda J, Lek M, Nolent F, Pappas CT, Novak SM, D'Amico A, Malfatti E, Thomas BP, Gabriel SB, Gupta N, Daly MJ, Ilkovski B, Houweling PJ, Davidson AE, Swanson LC, Brownstein CA, Gupta VA, Medne L, Shannon P, Martin N, Bick DP, Flisberg A, Holmberg E, Van den Bergh P, Lapunzina P, Waddell LB, Sloboda DD, Bertini E, Chitayat D, Telfer WR, Laquerrière A, Gregorio CC, Ottenheijm CA, Bönnemann CG, Pelin K, Beggs AH, Hayashi YK, Romero NB, Laing NG, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Melki J, Fowler VM, MacArthur DG, North KN, Clarke NF: Leiomodlin-3 dysfunction results in thin filament disorganization and nemaline myopathy. *J Clin Invest.* 2014 Nov; 124(11): 4693-708.

Miyatake S, Koshimizu E, Hayashi YK, Miya K, Shiina M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, Nishino I, Matsumoto N: Deep sequencing detects very-low-grade somatic mosaicism in the unaffected mother of siblings with nemaline myopathy. *Neuromuscul Disord.* 2014 Jul; 24(7): 642-7.

## 2. 学会発表

Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y, Miyatake S, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I: Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. 19th International Congress of the World Muscle Society, Berlin, Germany (Langenbeck-Virchow-Haus), 10. 8, 2014 (10. 7-10. 11)

## 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

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))  
委託業務成果報告書 (業務項目)

遺伝性ミオパチーの次世代型統合的診断拠点形成  
3. 新規原因遺伝子変異の病原性証明と疾患分子病態解明

業務主任者 野口悟 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 室長

研究要旨

孤発例の原因遺伝子解析では、次世代シーケンサーによって数十にも及ぶ遺伝子変異候補が見いだされるが、真の変異を探し出すこと、変異の病原性を証明することは、依然として難しい課題である。

- ・ $\alpha$ -dystroglycanopathyおよびtubular aggregate myopathy患者を対象として行った全エクソーム解析から得られた変異候補を絞り込み、効率的に変異の病原性の証明をすることを目指した。
- ・ $\alpha$ -dystroglycanopathyについては、*POMGNT2*遺伝子変異について解析した。*POMGNT2*遺伝子を欠失した半数体株化細胞HAP1に対して、変異または野生型*POMGNT2* cDNAを導入することで、細胞の表現型が回復出来るのかを指標に、用いた遺伝子変異の病原性を判断した。さらに、変異*POMGNT2*の酵素活性の測定、細胞内局在の解析を行った。Tubular aggregate myopathyについては、見出したORAI1変異 (Gly98Ser, Leu138Phe) のストア作動性カルシウム流入への影響を確認するため、罹患者由来の筋管細胞及び上記変異を有するORAI1を過剰発現させたHEK293細胞を用いて、細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度変化に伴う細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を測定した。その結果、細胞外にCa<sup>2+</sup>を加えることで、変異ORAI1をもつ細胞では有意に細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し、ORAI1チャンネルの特異的阻害剤により抑制されることを見出した。このことは、ORAI1優性変異による恒常的SOCE活性化が、Tubular aggregate形成および骨格筋障害の原因であることを示している。

A. 研究目的

次世代シーケンサー解析によって見いだされる各種変異候補の病原性証明と分子病態解明のために、機能解析の系を確立することを目的としている。今年度は、全エクソーム解析で見いだされた $\alpha$ -dystroglycanopathy および tubular aggregate myopathy の候補変異を評価する系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

$\alpha$ -dystroglycanopathy患者20名を対象とし、イルミナ社HiSeq1000にて全エクソーム解析を行お見いだされた変異候補の $\alpha$ -dystroglycan糖鎖への影響を評価すべく、HAP1細胞 (野生型、*POMGNT2*-KO) の供与をNetherlands Cancer InstituteのDr. Brummelkampより受けた。ヒト*POMGNT2* cDNAは、ヒト

骨格筋cDNAプールからPCRにて増幅・クローニングした。PCRエラーにて生じた変異は、site-directed mutagenesisにて参照配列に矯正し、野生型cDNAを得た。変異の導入にはさらに、site-directed mutagenesisを用いた。野生型及び変異cDNAは、pLVSIN-IRES-ZsGreenにクローニングし、レンチウイルスベクタークローンを得た。レンチウイルスベクターの作製は定法を用いた。変異の病因性の評価は、HAP1生細胞を $\alpha$ -dystroglycanの糖鎖エピトープに対する抗体IIH6にて染色することで行った。今回用いた変異は劣性遺伝変異が予想されるため、もし、見いだされた変異が「真の変異」であり、変異タンパク質が機能を失っていた場合には、欠損細胞は変異遺伝子の導入で蛍光染色が陽性とならない。もし、変異が“多型”であって、依然として機能タンパク質が作られる場合には、蛍光染色が陽性となると考えられた。そこで、ZsGreen陽性にて遺伝子導入細胞を同定し、かつIIH6染色の回復の有無を調べることで、変異を評価した。ヒト野生型および変異myc POMGNT2 cDNAをHele myc標識タンパク質の細胞内局在を解析した。ヒト野生型および変異myc POMGNT2 cDNAをHEK293細胞に導入

分を調製した。1% TritonX-100にて抽出後、抽出物をMannose -  $\alpha$ -4-MU及びUDP-GlcNAcと6時間反応させた。反応生成物GlcNAc-Man -  $\alpha$ -4-MUをHPLCにて、Amide-80カラムにて分離定量した。同定した生成GlcNAc-Man -  $\alpha$ -4-MUが、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ消化により消失することを確認した。

Tubular aggregate myopathyを呈する18症例に対して行った全エクソーム解析により、罹患者6名のORAI1遺伝子にヘテロ接合性変異を見出した。骨格筋収縮は主に筋小胞体 (SR) から放出される

Ca<sup>2+</sup>濃度により制御されており、SR内のCa<sup>2+</sup>を一定に保つ機構としてストア作動性カルシウム流入 (store-operated Ca<sup>2+</sup> entry; SOCE) と呼ばれる細胞外から細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入機構が存在する。このCa<sup>2+</sup>流入を担うのがストア作動性Ca<sup>2+</sup>チャンネルであり、ORAI1はその主要構成成分である。見出したORAI1変異(Gly98Ser, Leu138Phe)のSOCEへの影響を確認するため、罹患者由来の筋管細胞及び上記変異を有するORAI1を過剰発現させたHEK293細胞を用いて、細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度変化に伴う細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を測定した。また、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化が細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入によるものなのか、SRをはじめとする細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵器官から放出されたものなのかを見極めるために、Mn<sup>2+</sup> quenching 実験を行った。

(倫理面への配慮)

すべての組み換え DNA 実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、国立精神・神経センター神経研究所組み換え DNA 実験安全委員会の審査・承認(筋疾患関連遺伝子のクローニング: 26-01)を得ている。

### C. 研究結果

$\alpha$ -dystroglycanopathy3名に POMGNT2変異 c.494T>C(p.M165T) 及び c.785C>T (p.P253L)複合ヘテロ接合変異(1名)、c.785C>T (p.P253L)ホモ接合変異(2名)を見出した。両方の変異は、ともにミスセンス変異であると推定された。また、両変異ともにグリコシルトランスフェラーゼ様ドメインに存在していた。変異が見出された患者には、きわめて軽い筋ジストロフィーを認めた。筋病理についても、わずかな壊死・再生線

維を示す、ごく軽いものであった。また、脳の形成不全などは認められなかった。

野生型 HAP1 細胞は、ラミニン上で培養することで、 $\alpha$ -dystroglycan は集積し、IIIH6 抗体で染色された。一方、*POMGNT2*-KO 細胞では IIIH6 抗体での染色は見られなかった。*POMGNT2*-KO 細胞への野生型 *POMGNT2*cDNA の導入により IIIH6 抗体陽性となった。一方、p. M165T 及び p.P253L 変異 *POMGNT2* cDNA の導入では、IIIH6 抗体陰性であった。Hela 細胞に導入された p. M165T 及び p.P253L 変異 *POMGNT2* は、野生型 *POMGNT2* と同様に、小胞体での局在が見られた。しかしながら、HEK293 細胞で発現させた p.M165T 及び p.P253L 変異 *POMGNT2* は、野生型 *POMGNT2* に比べ、10%以下の比活性しか検出されなかった。

罹患者由来の筋管細胞及び変異 *ORAI1* を過剰発現させた HEK293 細胞の液体培地を、 $\text{Ca}^{2+}$ を含有していない培養液、生体内における細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度と同等の 2mM を含有する培養液、20mM 高濃度  $\text{Ca}^{2+}$ を含有する培養液に変換することで、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度がどのように変化するのを経時的に測定した。細胞外に  $\text{Ca}^{2+}$ を加えることで、変異 *ORAI1* をもつ細胞では有意に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇し、*ORAI1* チャンネルの特異的阻害剤により抑制されることを見出した。またこの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵器官から放出されたものではなく、細胞外から細胞内へ  $\text{Ca}^{2+}$ が異常流入していることによるものであることを明らかにした。以上の結果より、*ORAI1* 優性変異による恒常的 SOCE 活性化が、Tubular aggregate 形成および骨格筋障害の原因であることが示された。

#### D. 考察

$\alpha$ -dystroglycanopathy の原因遺伝子は、現在 18 種類以上が同定されている。 $\alpha$ -dystroglycanopathy の原因遺伝子は、糖鎖合成に関わる酵素をコードしているものが大半であり、患者で同定された変異の証明には変異遺伝子産物の酵素活性を測定する方法が一般的である。しかしながら、変異遺伝子毎に異なるアッセイ系を構築せねばならず、十分に証明されていないままに報告されることもある。また、機能が同定されていない遺伝子に関しては、証明の方法もないのが現状である。Jae らによって報告された HAP1 細胞を用いた  $\alpha$ -dystroglycanopathy の候補遺伝子を予測、実証した方法は、理論上、すべての候補遺伝子、遺伝子変異を同じ方法にて検定しうるものである。今回、*POMGNT2* 変異に応用したが、変異 cDNA による機能回復は観察されず、当該変異が病因であることを証明することに成功した。

組み換え変異 *POMGNT2* タンパク質は、活性の低下を示し、これらの変異が病因変異であることを再び強く支持した。これまで、*POMGNT2* 変異による  $\alpha$ -dystroglycanopathy では、症状の重い WWS の報告がある。今回見出された患者は、非常に軽い肢帯型筋ジストロフィーであるが、興味深いことに、変異タンパク質活性は低下していたものの、まったく失われているわけではなく、少量の残存活性が検出された。この活性により、 $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖修飾が部分的に保持され、軽い症状を引き起こしているものと考えられた。また、遺伝子変異はグリコシルトランスフェラーゼドメインに存在したが、変異タンパク質の発現や細胞内分布には影響がなく、活性の低下のみが検出されたことと関係しているのかもしれない。以上の結果から、以前報告した *DAG1* 変異での

$\alpha$ -dystroglycanopathy と合わせて、HAP1 細胞を用いた変異の病因性の証明方法は、他の遺伝子変異を原因とする  $\alpha$ -dystroglycanopathy まで、広く利用することができることが示された。今後は、変異遺伝子補完実験で、HAP1 細胞が発現する  $\alpha$ -dystroglycan とラミニンとの結合実験など生化学的解析を行うことで、この方法の有効性を示していきたいと考えている。

これまで ORAI1 遺伝子の劣性変異により重症複合型免疫不全症が引き起こされることは知られていたが、今回優性変異により骨格筋疾患を来すという新たな知見を得た。また、ORAI1 と複合体を形成する STIM1 の優性変異でも同様に、SOCE が活性化され Tubular aggregate myopathy を発症することが報告されており、SOCE 活性による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化が骨格筋障害に関与していると推察された。以上の知見は、新規の筋疾患概念を提唱するものであり、細胞内  $Ca^{2+}$  動態と骨格筋障害の関連を解明する端緒となり得る。また、Tubular aggregate myopathy の病態が ORAI1 チャネルの機能獲得型変異であることを明らかにし、その特異的阻害剤が有効であるという *in vitro* での実験結果を得たことから、治療法への応用が期待される。

## E. 結論

$\alpha$ -dystroglycanopathy および tubular aggregate myopathy を対象に、遺伝子変異の病因性の証明をおこなった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Dong M, Noguchi S, Endo Y, Hayashi YK, Yoshida S, Nonaka I, Nishino I. *DAG1*

mutations associated with asymptomatic hyperCKemia and hypoglycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan. *Neurology*, 84, 273-279. 2015.

Uruha A, Hayashi YK, Oya Y, Mori-Yoshimura M, Kanai M, Murata M, Kawamura M, Ogata K, Matsumura T, Suzuki S, Takahashi Y, Kondo T, Kawarabayashi T, Ishii Y, Kokubun N, Yokoi S, Yasuda R, Kira JI, Mitsunashi S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I. Necklace cytoplasmic bodies in hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* jnnp-2014-309009. 2014

Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I. Dominant mutations in *ORAI1* cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated  $Ca^{2+}$  channels. *Hum Mol Genet* 24, 637-648, 2014.

## 2. 学会発表

Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y, Miyatake S, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I: Dominant mutations in *ORAI1* cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated  $Ca^{2+}$  channels. 19th International Congress of the World Muscle Society, Berlin, Germany (Langenbeck-Virchow-Haus), 10. 8, 2014 (10. 7-10. 11)

## 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

厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)  
委託業務成果報告

遺伝性ミオパチーの次世代型統合的診断拠点形成  
4. 病理・画像所見解析

業務主任者 石山 昭彦 国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経診療部 医師  
西野一三 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

遺伝性ミオパチーには多くの病型が存在する。遺伝学的に未診断の例は未だ多く存在するが次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析技術の進歩により、これまで未診断だった例の遺伝子変異が同定されるようになってきた。新規遺伝子の変異では遺伝子型と表現型の妥当性を評価する必要があるが、筋病理さらには骨格筋画像や脳画像所見は表現型として有用な情報となりうる。そのため臨床情報や筋レポジトリーに加え、骨格筋画像や脳画像を統合的に蓄積し管理することは重要であり、これらを適切に評価することで新たな疾患概念の確立に寄与する可能性がある。今年度は画像登録にあたっての体制整備を行い、遺伝学的未診断例の遺伝性ミオパチー47例の骨格筋画像、ミトコンドリアミオパチー12例の脳画像の集積を行った。また、本プロジェクトの中で同定された早期呼吸障害を伴う遺伝性ミオパチー(Hereditary myopathy with early respiratory failure: HMERF) 14家系 17例の筋病理所見の再検討を行い、necklace cytoplasmic bodyが感度・特異度ともに極めて高い優れた病理学的マーカーであることが分かった。

A. 研究目的

遺伝性ミオパチーには多様な病型が存在するが、これまでは主に筋病理所見にもとづいた診断がなされてきた。近年、次世代遺伝子解析の技術の進歩により、これまで遺伝学的に未診断だった例の変異が、既知あるいは新規を含め多く同定されるようになってきた。そのため現時点でも遺伝子型にもとづいた疾患名称が用いられるなど、疾患概念自体のパラダイムシフトが生じている。遺伝子型と表現型の相関を適切に評価することはその混乱を回避することのみならず、疾患名称や疾患概念の確立に重要な要素となる。

本研究では次世代遺伝子解析によって得られた遺伝子型と表現型の相関を評価するための表

現型評価ツールとして、筋レポジトリーとそれに伴う臨床情報に骨格筋ならびに脳画像を加え、画像情報の統合的な管理、評価を行う体制整備を構築する。また、遺伝子異常が明らかとなった疾患について筋病理所見ならびに画像所見を再検討することで、遺伝子型・表現型の相関を確立することを目的とする。

B. 研究方法

骨格筋および脳画像の管理については、(独)国立精神・神経医療研究センター脳病態統合イメージングセンター (IBIC; Integrative Brain Imaging Center) で開発した Web 上での画像登録、閲覧が可能なシステム (IBISS; Integrative Brain Imaging Support System) を用いた。こ

これは IBIC が独自に開発した臨床放射線画像登録に特化したオンラインサポートシステムで、厳重なセキュリティーのもと、研究に必要な画像情報、臨床情報を共有できるオンライン上の仮想空間である。これを用いることで将来的に多施設からの画像登録を視野に入れることが可能となる。

IBISS 内での遺伝性ミオパチー画像登録フォームを作成し、2005 年 1 月以降に当センターで精査を行った症例で、遺伝学的未確定なミオパチー症例の骨格筋画像、ミトコンドリアミオパチーの脳画像の登録を行った。

また、本プロジェクトの中で同定された早期呼吸障害を伴う遺伝性ミオパチー (Hereditary myopathy with early respiratory failure: HMERF) 14 家系 17 例の筋病理所見の再検討を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究において使用するすべ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に筋病理、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、血球など) 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当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が、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、得られた検査所見は過去に診断や経過観察等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資料や情報収集をすることはなく、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 1. 既存資料のみ用いる観察研究の場合」に該当することにあたり、同倫理委員会でも承認が得られている。

#### C. 研究結果

遺伝性ミオパチーでの IBISS 画像登録にあたっての倫理申請を行い承認を得て、遺伝性ミオパチー画像登録フォームを作成した。今年度は遺伝学的未診断例の遺伝性ミオパチー 47 例の骨格筋画像と、ミトコンドリアミオパチー 12 例の脳画像の集積を行った。今後は、次世代遺伝子解析で得られた遺伝子情報をもとに、表現型評価ツールとして筋病理とあわせて骨格筋画像や脳画像所見との相関を解析する。

HMERF については、筋病理所見を再検討した結果、cytoplasmic body が筋線維内でネックレス状に配列する所見 (necklace cytoplasmic body と命名) が感度 82%、特異度 99% と極めて優れた筋病理学的マーカーであることが明らかとなった。

#### D. 考察

遺伝性ミオパチーの骨格筋画像では、遺伝子型と表現型が明らかな例のなかで、疾患特異性の高い筋罹患分布の特徴が知られており、骨格筋画像における筋選択性として知られている。とくに単一遺伝子が原因である病型では明瞭な筋選択性を認める。本研究では、次世代遺伝子解析によって得られた遺伝子型の表現型を確認する目的で、筋病理や画像所見を組み合わせることで表現型との相関の統合的理解を深めることを第一の目的にしている。しかし遺伝学的に未診断例のなかの画像を見ると類似の所見を認める群があり、画像集積が進み症例蓄積が増え、データ管理が整うと、同様の所見を呈する表現型の一群の分類から候補遺伝子を絞り込める可能性が出てくる。そのためには多くの画像登録が必要であり、今後は他施設からの筋病理診断例のレポジトリ蓄積にあわせた画像登録が望まれる。画像登録を単施設から複数施設への登録システムへ発展し、筋レポジトリと関連付けられる画像集積を行うには、撮像条件等の統一な

ど検討課題は残るものの今後、重要であると考えられる。

HMRF については、過去の筋病理標本の再検討の結果、極めて優れた筋病理学的マーカーを同定することができた。筋病理所見は数多くあるものの、高度の疾患特異性を有する所見は数えるほどしかなく、今回の同定は極めて有意義であると考えられる。

## E. 結論

遺伝性ミオパチーでの骨格筋画像、脳画像登録システムを構築した。今後、次世代遺伝子解析で得られた遺伝子情報をもとに、遺伝子型と表現型相関について解析を行い新たな疾患概念の確立を目指す。また、筋レポジトリーとの関連付けを想定した他施設からの登録システムも課題である。

HMRF については、necklace cytoplasmic body が高度の疾患特異性を有する新たな病理学的マーカーであることを見いだした。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Uruha A, Hayashi YK, Oya Y, Mori-Yoshimura M, Kanai M, Murata M, Kawamura M, Ogata K, Matsumura T, Suzuki S, Takahashi Y, Kondo T, Kawarabayashi T, Ishii Y, Kokubun N, Yokoi S, Yasuda R, Kira JI, Mitsunashi S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I. Necklace cytoplasmic bodies in hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. [Epub ahead of print]

Kubota K, Saito Y, Ohba C, Saitsu H, Fukuyama T, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Matsumoto N. Brain magnetic resonance imaging findings and auditory brainstem response in a child with spastic paraplegia 2 due to a PLP1 splice site mutation. *Brain Dev.* 37(1):158-162, 2015

Okubo M, Fujita A, Saito Y, Komaki H, Ishiyama

A, Takeshita E, Kojima E, Koichihara R, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Yamazaki H, Kusaka K, Tanaka H, Miyake N, Matsumoto N, Sasaki M. A family of distal arthrogyrosis type 5 due to a novel PIEZO2 mutation. *Am J Med Genet A*. [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

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

Mariko Okubo, Akihiko Ishiyama, Hirofumi Komaki, Eri Takeshita, Takashi Saito, Yoshiaki Saito, Eiji Nakagawa, Kenji. Sugai, Yukiko K. Hayashi, Ichizo Nishino, Masayuki Sasaki: Selectivity patterns on lower limb skeletal muscle imaging in patients with nemaline myopathy. 19th international congress of the world muscle society, Berlin, Germany, October7- October 11, 2014

Shinpei Baba a, Satoko Takanoha, Aihiko Ishiyama, Hirofumi Komaki, Eri Takeshita, Hirofumi Imaizumi, Yuji Abe, Mariko Kobayashi, Yusuke Kumazawa, Masayuki Sasaki:

Association between resting energy expenditure and body weight change in patients with Duchenne muscular dystrophy. 19th international congress of the world muscle society, Berlin, Germany, October 7-October 11, 2014

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))

委託業務成果報告 (業務項目)

遺伝性ミオパチーの次世代型統合的診断拠点形成  
5. 国内外の連携

業務主任者 西野 一三 疾病研究第一部 部長

研究要旨

国立精神・神経医療研究センター (NCNP) は1978年以来過去35年以上に亘り、筋病理を中心とする筋疾患診断サービスを提供してきた。その結果、全国の医療機関から、本邦筋生検例の約8割の検体がNCNPに集積するに至っている。この強力な国内ネットワークを更に国際的に発展させるべく、アジア諸国からの医師 (タイ2名、中国1名) を研修目的で受け入れた。これに加えて、3月からは韓国人医師2名が来日し研修を開始している。また、インドネシア、マレーシア、タイ、台湾で臨床病理カンファレンスを開催して当該地域の筋疾患診療水準向上に寄与するとともに、エジプトでは筋疾患患者の診察を行うなど診療支援を行った。また、上記各国からの診断支援要請にも応え、将来的な国際的ネットワーク形成に向けた基板形成に努めた。筋疾患診断は現実的には本邦の医療の一部として組み込まれているにもかかわらず、その費用は研究費で賄われているのが現状であり、「隠れた医療費」となっている。このような診断サービスが本邦の医療にとって必要なことは明白であり、早急な財政的対策が求められる。

A. 研究目的

国立精神・神経医療研究センター (NCNP) は1978年以来過去35年以上に亘り、筋病理を中心とする筋疾患診断サービスを提供してきた。その結果、全国の医療機関から、本邦筋生検例の約8割の検体がNCNPに集積するに至っている。この強力な国内ネットワークを活用して、国内医療機関への診断サービス提供を継続することは元より、さらに国際的にも発展させていく必要がある。特に筋疾患は希少であり、専門家も少ないことから、特にアジア域においては日本が学問的に指導的立場を取らざるを得ない。言い換えれば、本邦はそのような責務を担っていると見える。

B. 研究方法

国内に向けては、従来より提供している

筋疾患診断サービスの提供を継続する。国外に向けては、アジアを中心とする諸外国からの研修医師・技師を受け入れ、筋疾患学の基礎とともに筋疾患研究の最先端を経験させることで、帰国後に当該地域で診断サービスを提供することができるようにするとともに、筋疾患分野で指導的な立場に立てるように支援する。また、専門家がおらず必要とされる地域に積極的に出向くアウトリーチ型の活動も加えることで、国際連携の基盤を形成する。

(倫理面への配慮)

ネットワーク形成は研究倫理指針とは関連しないものである。診断サービス提供については、「神経・筋疾患研究資源レポジトリーの構築と運用」(倫理委員会承認番号

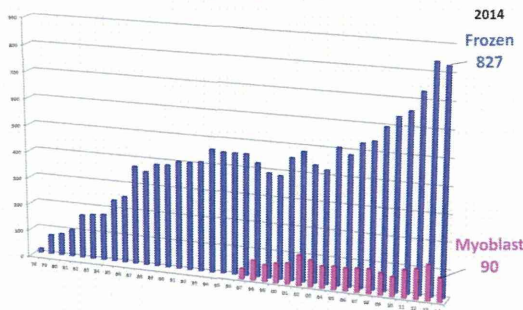
XXXX-116 (20-9-7)) において承認を受けている。

### C. 研究結果

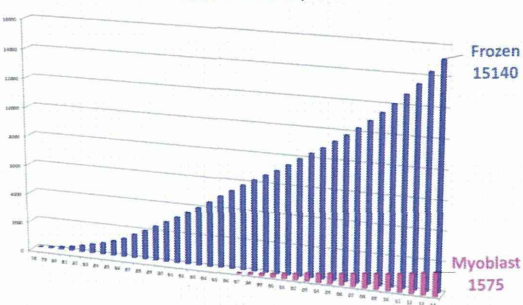
2014年には827件の筋病理診断を行った。諸外国の筋疾患診断拠点では殆どが年間検体数500件程度であり、国際的に最高水準にある筋疾患診断拠点であることが確認された。本邦における年間筋生検数は1000件を超える程度と予想されることから、約8割の検体が国立精神・神経医療研究センターに集まっていることが確認された。診断後の検体はレポジトリとして蓄積されているが、凍結筋の総検体数は2014年末で15140検体となり、世界有数の筋レポジトリとなっている。



Muscle pathology diagnosis  
As of December 31, 2014



Sample number in muscle repository  
As of December 31, 2014



諸外国との連携については、7月より、タイ人医師2名を、9月より中国人医師1名を、更に3月からは韓国人医師2名を受け入れて、筋疾患診断に関する研修ならびに研究に携わっている。アウトリーチ活動としては、8月にこれまで筋疾患専門医のいなかったインドネシアを訪問し、ジャカルタのCipto Mangunkusumo 病院において、講義、患者診

察、筋生検等を現地神経内科医とともに行った。これが契機となり、3月末には日本神経学会およびインドネシア神経学会の共催でワークショップが開催されることになっている。また、その他、タイ・バンコクのSiriraj病院およびBhumibol Adulyadej病院、マレーシア・クアラルンプールのマラヤ大学、台湾・高雄市の高雄医学大学において、臨床病理カンファレンスを開催するとともに、講義や患者診察などを行った。さらに、筋疾患専門医が殆どいないエジプトに出向き、カイロのEgyptair病院で、現地医師とともに筋疾患患者約150名を2度の訪問で診察し、更に筋生検を行った。加えて、これら地域からの診断支援要請に応じて、筋病理を初めとする筋疾患診断支援を行った。

### D. 考察

国内では筋生検検体の約8割の検体を集めて筋病理診断を中心とする筋疾患診断サービスを行った。診断件数においても診断内容においても世界最高水準のものであることが確認された。

この診断サービスに係る費用は研究の一環として研究費で賄われているが、実態は診療支援である。特に「難病の患者に対する医療等に関する法律」が施行され医療費助成の対象となる疾患が増えてその診断基準が整理されていく中で、多くの筋疾患の診断基準において、商業的サービスのない遺伝子診断や筋病理解析が必須条件となっている現実、事実上、研究者が無償で提供しているサービスが医療制度の根幹を担っていることを明白に示している。加えて、このようなサービス提供は、研究者が夜間や休日などの時間を削って提供しているのが実情であるが、その専門的な知識と技術、労働に対する対価は全く支払われていないのが現実である。このような診断サービスが日本の医療制度を維持するのに必須であることは明白であり、このようないわば「日本の隠れた医療費」に対する早急な財政的対策が求められる。

諸外国との連携については、順調にネットワークを拡大しつつある。特にこれまで

専門家が全くいなかったインドネシアとの接点ができただことは今後の発展に大きく寄与すると期待される。しかし、依然としてアジア域では、筋疾患専門医が存在しない地域があり、今後そのような地域へのアプローチも積極的に行い、筋疾患学分野での先進国である本邦の責務を果たすことが求められる。

#### E. 結論

国内に向けては筋病理診断を中心とする筋疾患診断サービスを提供した。筋病理診断については本邦筋生検総数の約 8 割が国立精神・神経医療研究センターに送られていると推測された。今後は、本サービス維持に必要な費用に対する財政的対策が早急に求められる。国外に向けては、アジア域から医師を受け入れて研修を行うとともに、アウトリーチ活動として現地に赴き、講義・カンファレンス・診療支援などを行い、ネットワーク拡大の基板を形成した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### 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



### III. 学会等発表実績

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「遺伝性ミオパチーの次世代型統合的診断拠点形成」

機関名 独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Treatment of GNE myopathy (口頭)	Nishino I	バンコク(14th AOMC ANNUAL SCIENTIFIC MEETING 2015)	3.3, 2015	国外
Metabolic Myopathies(口頭)	Nishino I	Egypt(1st Egyptian International Neuromuscular Conference (ENMC))	1.22, 2015	国外
GNE MYOPATHY – WILL IT BE TREATABLE?(口頭)	Nishino I	Soul(Brain Conference 2014 Joint Conference of the KSBNS )	11.6, 2014	国外
Introduction to clinical features of GNE myopathy (口頭)	Nishino I	Berlin, Germany(GNE myopathy Consortium Workshop)	10.12, 2014	国外
Sialyllactose trial on GNE myopathy mouse model (口頭)	Noguchi S	Berlin, Germany(GNE myopathy Consortium Workshop)	10.12, 2014	国外
Therapeutic interventions in GNE-myopathy and possible targets in myofibrillar myopathies(口頭)	Nishino I	Niece,France(13th Interntional Congress on Neuromuscular Diseases)	7.7, 2014	国外
Therapy of DMRV/hIBM (GNE) myopathies (口頭)	Nishino I	Nice,France(13th Interntional Congress on Neuromuscular Diseases)	7.7, 2014	国外
Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca <sup>2+</sup> channels (口頭)	Endo Y	Berlin, Germany(19th International Congress of the World Muscle Society)	10.8, 2014	国外
An 8-year-old girl with congenital cataracts and motor development delay (口頭)	Wen-Chen Liang	バンコク(14th AOMC ANNUAL SCIENTIFIC MEETING 2015)	3.4.2015	国外
A 35-year-old man with distal muscle weakness, contractures, and persistent hyperCKemia(口頭)	Wenhua Zhu	バンコク(14th AOMC ANNUAL SCIENTIFIC MEETING 2015)	3.4.2015	国外
A case report of TRAPPC11 disease: a wider clinical spectrum with multiple systemic involvement(口頭)	Wen-Chen Liang	上海(The 4th Oriental Congress of Neurology)	3.28.2015	国外
次世代シーケンサーを用いた筋疾患の遺伝子診断システムについて(口頭)	三橋里美	第3回骨格筋生物学研究会	3.7.2015	国内
Targeted exome sequencing identified a novel genetic disorder in mitochondrial fatty acid $\beta$ -oxidation.(poster)	Sakai C, Matsushima Y, Sasaki M, Miyamoto Y, Goto Y	Tampere, Finland (Euromit 2014)	6.16, 2014	国外

Leigh-like syndrome associated with calcification of the bilateral basal ganglia caused by compound heterozygous mutations in mitochondrial poly(A) polymerase (poster)	Matsushima Y, Hatakeyama H, Takeshita E, Kitamura T, Kobayashi K, Yoshinaga H, Goto Y.	Tampere, Finland (Euromit 2014)	6.16, 2014	国外
Mitochondrial Disease. (口頭)	Goto Y	Singapore (Asian & Oceanian Epilepsy Congress 2014.)	8.7, 2014	国外
ECHS1の変異は呼吸鎖の活性低下を伴うLeigh脳症を引き起こす。(口頭)	坂井千香, 松島雄一, 山口清次, 佐々木征行, 宮本雄策, 後藤雄一	福岡 (第14回日本ミトコンドリア学会年会)	12.5, 2014	国内
MELAS脳卒中発作におけるAQP4の発現低下。(口頭)	金田大太, 新宅雅幸, 窪田-坂下美恵, 加藤忠史, 後藤雄一	福岡 (第14回日本ミトコンドリア学会年会)	12.5, 2014	国内
脊髄性筋萎縮症における臨床病型とF波の多様性 (ポスター)	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	第44回日本臨床神経生理学会学術大会, 博多, 福岡	11/19-11/21, 2014	国内
Quantitative analysis of surface EMG for pediatric neuromuscular disorders (poster)	Mana Higashihara, Masahiro Sonoo, Akihiko Ishiyama, Yu Nagashima, Haruo Uesugi, Madoka Yoshimura Mori, Miho Murata, Shigeo Murayama, Hirofumi Komaki	Savannah, USA(American association of neuromuscular & electrodiagnostic medicine 61st Annual Meeting)	October 29- November 1, 2014	国外
Selectivity patterns on lower limb skeletal muscle imaging in patients with nemaline myopathy (poster)	Mariko Okubo, Akihiko Ishiyama, Hirofumi Komaki, Eri Takeshita, Takashi Saito, Yoshiaki Saito, Eiji Nakagawa, Kenji. Sugai, Yukiko K. Hayashi, Ichizo Nishino, Masayuki Sasaki	Berlin, Germany(19th international congress of the world muscle society)	October7- October 11, 2014	国外
Association between resting energy expenditure and body weight change in patients with Duchenne muscular dystrophy (poster)	Shinpei Baba a, Satoko Takanoha, Aihiko Ishiyama, Hirofumi Komaki, Eri Takeshita, Hirofumi Imaizumi, Yuji Abe, Mariko Kobayashi, Yusuke Kumazawa, Masayuki Sasaki	Berlin, Germany(19th international congress of the world muscle society)	October7- October 11, 2014	国外

## 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等)	発表した時期	国内・外の別
Necklace cytoplasmic bodies in hereditary myopathy with early respiratory failure	Uruha A, Hayashi YK, Oya Y, Mori-Yoshimura M, Kanai M, Murata M, Kawamura M, Ogata K, Matsumura T, Suzuki S, Takahashi Y, Kondo T, Kawarabayashi T, Ishii Y, Kokubun N, Yokoi S, Yasuda R, Kira JI, Mitsuhashi S, Noguchi S, Nonaka I, <u>Nishino I</u>	J Neurol Neurosurg Psychiatry	Epub Sep 2014	国外
Ullrich congenital muscular dystrophy: clinicopathological features, natural history and pathomechanism(s)	Yonekawa T, <u>Nishino I</u>	J Neurol Neurosurg Psychiatry	Mar, 2015	国外
Kyphoscoliosis and easy fatigability in a 14-year-old boy	Tanboon J, Hayashi YK, <u>Nishino I</u>	Neuropathology	Feb, 2015	国外
Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca <sup>2+</sup> channels	Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto YI, Matsumoto N, Nonaka I, <u>Nishino I</u>	Hum Mol Genet	Feb, 2015	国外
DAG1 mutations associated with asymptomatic hyperCKemia and hypoglycosylation of $\alpha$ -dystroglycan	Dong M, Noguchi S, Endo Y, Hayashi YK, Yoshida S, Nonaka I, <u>Nishino I</u>	Neurology	Jan, 2015	国外
Mutation profile of the GNE gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy)	Cho A, Hayashi YK, Monma K, Oya Y, Noguchi S, Nonaka I, <u>Nishino I</u>	J Neurol Neurosurg Psychiatry	Aug, 2014	国外
Deep sequencing detects very-low-grade somatic mosaicism in the unaffected mother of siblings with nemaline myopathy	Miyatake S, Koshimizu E, Hayashi YK, Miya K, Shiina M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, <u>Nishino I</u> , Matsumoto N	Neuromuscul Disord	Jul, 2014	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。