

201446029A

厚生労働科学研究委託費
障害者対策総合研究事業
(障害者対策総合研究開発事業 (神経・筋疾患分野))

福山型筋ジストロフィーの自然歴の把握と病状を反映する
バイオマーカーの検索

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 戸田 達史
神戸大学大学院医学研究科

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（障害者対策総合研究事業（障害者対策総合研究開発事業（神経・筋疾患分野）））による委託業務として、国立大学法人神戸大学が実施した平成26年度「福山型筋ジストロフィーの自然歴の把握と病状を反映するバイオマーカーの検索」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
福山型筋ジストロフィーの自然歴の把握と病状を反映するバイオマーカーの検索 -----	1
神戸大学大学院医学研究科神経内科学	戸田 達史
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 福山型筋ジストロフィーの自然歴の把握と病状を反映するバイオマーカーの検索 -----	7
神戸大学大学院医学研究科子ども急性疾患学講座	池田 真理子
神戸大学大学院医学研究科神経内科学	戸田 達史
2. 福山型先天性筋ジストロフィー患者における後方視的自然歴および 新しい筋量測定に関する検討 -----	9
東京女子医科大学医学部小児科	石垣 景子
3. 福山型筋ジストロフィーの治験実施に関する課題の検討、臨床評価法の確立 -----	11
国立精神・神経医療研究センター 小児神経診療部医長	
臨床研究推進部研究管理・調整室長	小牧 宏文
4. メタボローム解析による代謝物分析 -----	13
神戸大学大学院医学研究科内科系講座病因病態解析学分野	吉田 優
III. 学会等発表実績 -----	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	25

1. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（障害者対策総合研究事業
（障害者対策総合研究開発事業（神経・筋疾患分野）））
委託業務成果報告（総括）

福山型筋ジストロフィーの自然歴の把握と病状を反映するバイオマーカーの検索
業務主任者 戸田達史 神戸大学大学院医学研究科神経内科学 教授

研究要旨

福山型先天性筋ジストロフィーのアンチセンス核酸における臨床治験にむけて、運動機能評価・筋量測定・画像診断・発達機能評価を含めた自然歴の把握を後方視的・前方視的に行い、また遺伝子発現解析・メタボロミクスを用いて新規の血清バイオマーカーの探索を行う。この研究により分子標的治療の臨床試験にむけ適確な評価系を構築し、患者の適確な病態把握が可能となるだけでなく、臨床治験の適切なアウトカムやエンドポイントの設定ができる。また筋生検などの患者に侵襲的な検査以外の、非侵襲的な血清バイオマーカーによる治効果判定が可能となることで患者の負担を軽減できる。福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) に対する治療開発が進み、定量的かつ客観的な評価法の必要性が高まっている。過去に、臨床的に診断された FCMD の自然歴は報告されているが、その後のまとまった報告はない。遺伝子解析にて確定診断された FCMD の精神運動発達、特に運動機能の自然歴に関し再評価を行った。また、既存の骨格筋 MRI, CT による筋量評価に代わる安全でかつ患者負担の少ない筋量評価法の開発が期待されている。FCMD における生体電気インピーダンス法 (Bioelectrical impedance analysis: BIA) を用いた筋量評価に関して検討をした。また、収集した動物検体やヒト検体を用いたメタボローム解析を実施し、代謝物バイオマーカーの探索を行うことを目的とした。メタボローム解析とは、生体内に存在する低分子代謝物の総体を解析する技術であり、近年、その分析技術の発展に伴い、生命医学研究分野で広く利用されるようになってきている。本年度は、動物検体やヒト検体中の代謝物分析に先立ち、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた生体試料分析の最適化を行い、動物検体・ヒト検体中代謝物の分析を実施できる体制を整えるとともに、グループより提供されたマウス血漿検体の代謝物分析を行った。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

池田 真理子	神戸大学大学院医学研究科こども急性疾患学講座・特命講師
石垣 景子	東京女子医科大学医学部小児科・講師
小牧 宏文	国立精神・神経医療研究センター小児神経診療部医長、臨床研究推進部研究管理・調整室長
吉田 優	神戸大学大学院医学研究科内科系講座病因病態解析学分野・准教授

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、FKTN 遺伝子の 3kb のレトロトランスポゾン挿入変異のホモ接合型または、点変異とのヘテロ接合型により発症する。表現型は、最高到達運動能によって、軽症、典型、重症例に分類される。

福山型筋ジストロフィーの自然歴の把握と病状を反映するバイオマーカーの検索 を目標にしている。

遺伝子解析にて確定診断された FCMD の精神運動発達、特に運動機能の自然歴に関し再評価

を行った。また鎮静の必要がなく、被ばくもしない生体電気インピーダンス法

(Bioelectrical impedance analysis:BIA)にて用いてFCMD患者の成長や発達が評価できるか検討した。福山型先天性筋ジストロフィーの治験実施に関する課題を明らかにするとともに、適切な臨床評価法を見いだす。

さらに、福山型筋ジストロフィーに関連した動物検体やヒト検体に対して網羅的代謝物分析(メタボローム解析)を実施し、代謝物バイオマーカーの探索を行うことを目的としている。

B.研究方法

機能評価に関しては、リハビリテーション部との協力により運動機能評価を行う。

運動機能評価 画像評価 MRI CT SPECT 超音波 筋量測定 を行う。

アクチグラフ インピーダンス法をもちいた筋量測定

病状を反映するバイオマーカーの検索

具体的には、マイクロRNAを標的とした遺伝子発現解析・プロテオミクス・メタボロミクス・筋分化調節因子 既知&未知の探索を行う。

目標症例は100例、研究施設は国立精神神経医療センター・東京女子医科大学小児科・神戸大学医学部神経内科学・分子脳科学・小児科

資料 血液・尿・髄液・線維芽細胞・リンパ芽球

評価方法はELISA RTPCR 質量分析装置

後方視的研究では、1995年から2013年までの間に東京女子医大小児科に通院し、遺伝子解析にて確定診断されたFCMD68例のうち、退行開始までの一定期間評価しえた57例の診療録を後方視的に評価した。(倫理面への配慮)過去の診療録だけの研究であり患者の健康に直接影響を及ぼさない。個人情報はずべて匿名化さ

れてから解析を行った。

インピーダンス法にて対象は東京女子医科大学小児科通院中のFCMD患者21名で計測開始平均年齢は7.19歳(11ヶ月~20歳6ヶ月)。観察間隔は平均239±86日間。インピーダンス測定器(BCA-100, タニタ製)を用いて両側の上腕、大腿、下腿でインピーダンスを経時的に測定し、発達による変化を評価した。

筋ジストロフィー臨床試験ネットワーク

(Muscular Dystrophy Clinical Trial Network: MDCTN)や患者登録制度などを利用した治験実施に関する症例集積性向上策などを検討する。後方視的な臨床データ解析、前向き研究の準備を開始する。今年度は臨床評価項目の検討を行った。

メタボローム解析とは、生体内に存在する低分子代謝物を網羅的に解析する技術であり、近年、その手法が飛躍的に発展してきており、生命医学分野でも広く活用されるようになってきた。メタボローム解析では、様々な種類の質量分析計が使用されるが、本分担研究では、ガスクロマトグラフ質量分析計を使用する。ガスクロマトグラフ質量分析計による代謝物分析に関しては、多くの技術的知見やデータベースが既に蓄積していること、代謝物には動物種依存性がなく、前処理やデータベースを共通して利用できること、分析機器の再現性、汎用性に優れているなどが利点として挙げられ、これらがガスクロマトグラフ質量分析計によるメタボロミクスが活発である要因となっている。本年度は、動物検体やヒト検体中の代謝物分析に先立ち、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた生体試料分析の最適化を行い、動物検体・ヒト検体中の代謝物分析を実施できる体制を整えとともに、神戸大グループより提供されたマウス血漿検体の代謝物分析を行った。

マウス血漿検体(50 μL)と混合溶媒(250 μL;メタノール:クロロホルム:水=2.5:1:1)

とを混合して、さらに、内部標準物質として 2-イソプロピルリンゴ酸を添加し、続けて、振とうインキュベーション (37°C、30 分間、1200 rpm) に供した。次に、遠心分離処理を行い、得られた上清 (225 μ L) を新しいチューブに回収して、そこに、超純水 (200 μ L) を添加し、混合した。遠心分離後、上層 (250 μ L) を新しいチューブに回収し、濃縮遠心に供するとともに、凍結乾燥処理を行った。次に、凍結乾燥物をメトキシム化、ならびに、トリメチルシリル誘導体を行うことで、ガスクロマトグラフ質量分析計による分析のための前処理を実施するとともに、ガスクロマトグラフ質量分析計による代謝物測定を行った。取得されたデータは、内部標準物質に対する相対値として算出し、半定量解析を行った。

(倫理面への配慮)

この研究で用いる遺伝情報「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準じて行われる。本共同研究に参加する機関では倫理委員会での承認済もしくは申請中である。過去の検体においてはホームページ上にその旨を説明し研究参加に対し拒否する権利を与えるように配慮する。患者家族と理解がある場合には患者本人から同意を得て行った。

C. 研究結果

池田、戸田は、臨床評価・遺伝子解析・検体の収集・分子生物学的実験・データ解析を分担した。臨床評価面では運動機能評価は質問法をベースに開始した。心機能評価では超音波検査を行い、同時に行った採血検体をもちいマイクロ RNA の解析を開始した。またモデルマウスを用いまず血漿よりのメタボロミクスの解析を開始した。患者血より採取した microRNA では、microRNA16, 206 などが正常対照にくらべ異常高値であり感度、特異度が高いという結果

が出た。

石垣は、後方視的研究にて、57 例の内訳は、ホモ接合型が 36 例、ヘテロ接合型 21 例であった。ホモ接合型の定頸獲得時期は平均 7.6 か月、座位が 14.6 か月であるのに対し、ヘテロ接合型では、定頸が平均 16.5 か月、座位が 39.1 か月と大幅に遅れが見られた。最高到達運動能別に評価を行った結果、独歩群は、定頸が 4.5 か月、座位が 9 か月と極軽度の遅れであったのに対し、以後、いざりばい群は定頸 7.4 か月、座位 17.7 か月、座位群では定頸 10.5 か月、座位 21.3 か月、定頸のみの重症群では定頸 21.7 か月であった。退行時期は平均 7.6 歳であった。

インピーダンス法では、8 歳以下では上腕の質的指標が有意に増加し 8 歳以上では有意差傾向をもって低下する傾向を示した。また下腿は 8 歳以下・以上ともに低下傾向を示した。筋の量的指標は大腿のみ 8 歳以下で有意に増加する傾向を示した。典型例、軽症例で検討すると 8 歳以上では上腕・大腿・下腿の質的指標は有意に低下した。

小牧は、患者登録制度と連携した筋ジストロフィー臨床試験ネットワーク (Muscular Dystrophy Clinical Trial Network: MDCTN) は、ICH-GCP に準拠した臨床研究および症例集積性の向上を目指した臨床研究・治験の実施、教育・研修機能、臨床評価法の標準化に関するワーキンググループなどの多面的な機能を有し、これらを医師、理学療法士、CRC といった多職種チームで担うことで、各々の専門性を生かした活動を展開している。MDCTN は 2012 年に設立され、現在全国の 33 施設が加盟している。MDCTN 事務局は、国立精神・神経医療研究センター内に設置されており、分担研究者が事務局代表を担当している。加盟施設には年に 1 度の施設調査に協力することを課しているが、その

施設調査の内容には、各施設の治験を実施する場合の人員、設備などのほか、代表的な12の筋疾患に関して年齢別の患者数も登録するように依頼している。福山型先天性筋ジストロフィーも調査項目に含まれており、合計で約400名が把握されている。施設間での重複登録の可能性はあるものの、MDCTNと日本筋ジストロフィー協会が運営している福山型先天性筋ジストロフィーを対象とした患者登録制度を利用していくことで、1相～検証試験に至るまで、治験実施施設の選定と患者リクルートが見込めることが示唆された。

神経センター通院歴のある福山型先天性筋ジストロフィー患者について、日常生活活動（歩行・寝返り・上肢残存機能など）の運動機能を遠城寺式・乳幼児分析的発達検査法や8段階の運動能力スコア（Brain Dev. (1981)）を用い運動機能を数値化し、継時的なマイルストーンを作成する。心機能、てんかん・側彎症等合併症の有無やCK・ALDなどの血清筋由来逸脱酵素のデータ収集も行う計画を立案した。今後は東京女子医大や神戸大と連携したうえで前向き研究の準備を進めていく予定である。現在までのところ、後ろ向き（カルテ調査）研究は調査段階、前向きコホート研究は準備段階であり、次年度にかけて研究を進めていく。

吉田は、福山型筋ジストロフィーに関連したマウスの血漿検体中の代謝物分析に先立ち、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた生体試料分析の最適化を行い、分析体制を整えた上で、池田グループより提供されたマウス血漿検体の代謝物分析を実施した。分析したマウス血漿検体数は、6種類のGenotypeのマウスで、合計29検体である（Hp/+ : n=5, Hp/- : n=7, Hn/Hn : n=6, mdx : n=6, L/L : n=3, myd/myd : n=2）。まず、代謝物抽出から代謝物分析までが正しく行われているのか否かを確認するため、29検体す

べての分析結果から、内部標準物質（2-イソプロピルリンゴ酸）のデータを抽出し、2-イソプロピルリンゴ酸に対するピーク強度について、全29検体における相対標準偏差（%）（RSD%）を算出した。その結果、RSD%は、6.86%と低い値を示し、代謝物抽出から代謝物分析までが正しく行われていることが確認できた。続けて、血漿分析データを解析し、70種類の代謝物を検出できた。検出できた代謝物に関しては、ピーク強度の内部標準物質（2-イソプロピルリンゴ酸）に対する相対値を算出することで、各Genotypeのマウス間で比較評価できる形とし、そのデータを池田グループヘフィードバックした。

D. 考察

血清中のマイクロRNAは比較的血中でも安定であり、今後患者採血からの筋症状の重症度の指標として大きく期待が出来ると考えられた。またメタボローム解析などは現在解析中で、他共同機関からの検体もあつめN数を増やし有意な代謝物の同定を行う予定である。

後方視的研究にて、ホモ接合型が軽症と典型例のみであったのに対し、ヘテロ接合型には多く重症例が含まれた。最高到達運動能ごとに定頸、座位の平均時期に大きな差が認められ、定頸獲得時期により最高到達運動能の大よその予測は可能である。後方視的な検討のため、運動能獲得と退行時期の定義の不明確性が問題として残った。

インピーダンス法にて下腿の質的指標が8歳以下・以上ともに低下傾向を示していたことは、出生時より下腿の脂肪置換が始まることを示唆しており、大腿より下腿の脂肪置換が早く出現するFCMDの特徴に一致する結果だと考えた。また8歳以下で上腕の質的指標が有意に増加していた結果は下肢より上肢機能が保たれているFCMDの経過に一致すると考えた。

神経センターで後方視的臨床データ収集について、現在収集とともに得られたデータをもとに検討を進めている。前向き研究については今後計画を具体化させる予定である。今後開始される臨床試験を実施する際に有用なデータとなる。前向き研究で得られた自然歴を用いて臨床試験を実施できれば、今後の希少疾病の開発モデルを提示できる可能性がある。

本年度は、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた生体試料分析の最適化を行い、続けて、福山型筋ジストロフィーに関連したマウス検体の代謝物分析を実施した。この最適化における条件設定は、ヒト血漿検体でも適用可能であるため、その汎用性が担保されており、平成 27 年度以降に予定されているヒト血漿検体分析にも使用することができる。今回の実験では、分析に必要な血漿量の問題から、各 Genotype のマウスの N 数が上記（「C. 研究結果」）に明示しているとおりとなった。福山型筋ジストロフィーに関連したマウスの血漿検体を用いて代謝物バイオマーカーの可能性を評価するためには、さらに多い検体数が必要であると考えられ、現在、N 数を増やすため、更なる検体の準備を進めている。また、採血時のマウス状態や採血のタイミング（サーカディアン・リズムの影響）、溶血の有無なども考慮に入れておく必要があるかもしれない。

E. 結論

この一年間で倫理審査を受け、患者からの同意を得て臨床研究をスタートできた。臨床評価・遺伝子解析・検体の収集・分子生物学的実験・データ解析を担当するにあたり、患者よりの採血検体の保存や、臨床評価データのまとめや分類を行った。また micro RNA や発現解析、メタボロームなどは人検体だけでなくモデル動物からも順調に進行している。来年度はこれらのデータを総合的に解析し、共同研究期間と

の提携をとり学会発表や論文化を急ぐ。大型機器を使用しさらに臨床評価を精査する。

最高到達運動能ごとに定頸の平均時期に大きな差が認められ、定頸獲得時期により最高到達運動能の大よその予測は可能である。BIA は FCMD の重症度や運動機能を評価し予測するだけでなく、個々の成長や発達の評価、筋の脂肪置換の予測も可能であると考えた。

生体試料中の代謝物分析に先立ち、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた生体試料分析の最適化を完了し、福山型筋ジストロフィーに関連したマウス検体のメタボローム解析として、6 種類の Genotype のマウス血漿の分析を終了した。平成 27 年度以降も、池田グループ等と綿密な連携をとり、分析を進めていく計画にしている。

F. (健康危険情報)

G. 研究発表

1. 論文発表
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
(委託業務成果報告の項目参照)
2. 学会発表
(委託業務成果報告の項目参照)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費（障害者対策総合研究事業
（障害者対策総合研究開発事業（神経・筋疾患分野）））
委託業務成果報告（業務項目）

福山型筋ジストロフィーの自然歴の把握と病状を反映するバイオマーカーの検索
担当責任者 池田 真理子 神戸大学大学院医学研究科こども急性疾患学講座 特命講師
戸田達史 神戸大学大学院医学研究科神経内科学 教授

研究要旨

福山型先天性筋ジストロフィーのアンチセンス核酸における臨床治験にむけて、運動機能評価・筋量測定・画像診断・発達機能評価を含めた自然歴の把握を後方視的・前方視的に行い、また遺伝子発現解析・メタボロミクスを用いて新規の血清バイオマーカーの探索を行う。この研究により、分子標的治療の臨床試験にむけ適確な評価系を構築し、患者の適確な病態把握が可能となるだけでなく、臨床治験の適切なアウトカムやエンドポイントの設定ができる。また筋生検などの患者に侵襲的な検査以外の、非侵襲的な血清バイオマーカーによる治効果判定が可能となることで患者の負担を軽減できる。

A.研究目的

福山型筋ジストロフィーの自然歴の把握と病状を反映するバイオマーカーの検索 を目標にする。

B.研究方法

福山型筋ジストロフィーの自然歴の把握 運動機能評価に関しては、リハビリテーション部との協力により運動機能評価を行う。

運動機能評価 画像評価 MRI CT SP
ECT 超音波 筋量測定 を行う。

アクチグラフ インピーダンス法をもちいた筋量測定

病状を反映するバイオマーカーの検索

具体的には、マイクロRNAを標的とした遺伝子発現解析・プロテオミクス・メタボロミクス・筋分化調節因子 既知&未知の探索を行う。

目標症例は100例、研究施設は国立精神神経医療センター・東京女子医科大学小児科・神戸大学医学部神経内科学・分子脳科学・小児科

資料 血液・尿・髄液・線維芽細胞・リンパ芽球・

評価方法はELISA RTPCR 質量分析装置

（倫理面への配慮）

この研究で用いる遺伝情報「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準じて行われる。本共同研究に参加する機関では倫理委員会での承認済（神戸大学）もしくは申請中である。過去の検体においてはホームページ上にその

旨を説明し研究参加に対し拒否する権利を与えるように配慮する。

C.研究結果

臨床評価・遺伝子解析・検体の収集・分子生物学の実験・データ解析を分担した。臨床評価面では運動機能評価は質問法をベースに開始した。心機能評価では超音波検査を行い、同時に行った採血検体をもちいマイクロRNAの解析を開始した。またモデルマウスを用いまず血漿よりのメタボロミクスの解析を開始した。患者血より採取したmicroRNA では、microRNA16, 206などが正常対照にくらべ異常高値であり感度、特異度が高いという結果が出た。

D.考察

血清中のマイクロRNAは比較的血中でも安定であり、今後患者採血からの筋症状の重症度の指標として大きく期待が出来ると考えられた。またメタボローム解析などは現在解析中で、他共同機関からの検体もあつめN数を増やし有意な代謝物の同定を行う予定である。

E.結論

この一年間で倫理審査を受け、患者からの同意を得て臨床研究をスタートできた。臨床評価・遺伝

子解析・検体の収集・分子生物学的実験・データ解析を担当するにあたり、患者よりの採血検体の保存や、臨床評価データのまとめや分類を行った。またmicro RNAや発現解析、メタボロームなどは人検体だけでなくモデル動物からも順調に進行している。来年度はこれらのデータを総合的に解析し、共同研究期間との提携をとり学会発表や論文を急ぐ予定である。また大型機器を購入したのが年度末になったため、来年度にその機器を使用しさらに臨床評価を精査する予定である。

(健康危険情報)

なし

F.研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

なし

2. 学会発表

1. 池田真理子、小林千浩、佐藤洋平、若山達志、増田博文、竹島泰弘、飯島一誠、戸田達史 福山型先天性筋ジストロフィーのアンチセンス治療における至適薬剤の選択 日本小児遺伝学会 名古屋 4.10 2014年

2. 池田真理子、小林千浩、李知子、竹島泰弘、飯島一誠、戸田達史 福山型先天性筋ジストロ

フィーにおける血清中 miRNA の発現解析 日本小児科学会 名古屋 4.11-13 2014年

3. 池田真理子、小林千浩、佐藤洋平、若山達志、増田博文、竹島泰弘、飯島一誠、戸田達史 福山型先天性筋ジストロフィーにおける血清中 miRNA の発現解析 日本小児科神経学会 浜松 5.28-30 2014年

4. 池田真理子、小林千浩、佐藤洋平、若山達志、増田博文、竹島泰弘、飯島一誠、戸田達史 福山型先天性筋ジストロフィーにおける血清中 miRNA の発現解析 日本人類遺伝学会 東京 11.19 2014年

G.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特許出願 福山型筋ジストロフィー治療用医薬組成物 出願番号：特願 2012-86891

出願日：平成 24 年 (2012 年) 4 月 5 日

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（障害者対策総合研究事業
（障害者対策総合研究開発事業（神経・筋疾患分野）））
委託業務成果報告（業務項目）

福山型先天性筋ジストロフィー患者における後方視的自然歴および新しい筋量測定に関する検討

担当責任者 石垣 景子 東京女子医科大学医学部 小児科 講師

研究要旨

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)に対する治療開発が進み、定量的かつ客観的な評価法の必要性が高まっている。過去に、臨床的に診断された FCMD の自然歴は報告されているが、その後のまとまった報告はない。遺伝子解析にて確定診断された FCMD の精神運動発達、特に運動機能の自然歴に関し再評価を行った。また、既存の骨格筋 MRI, CT による筋量評価に代わる安全でかつ患者負担の少ない筋量評価法の開発が期待されている。FCMD における生体電気インピーダンス法(Bioelectrical impedance analysis:BIA)を用いた筋量評価に関して検討をした。

I. FCMD の運動機能に関する自然歴の検討

A.研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）は、FKTN 遺伝子の 3kb のレトロトランスポゾン挿入変異のホモ接合型または、点変異とのヘテロ接合型により発症する。表現型は、最高到達運動能によって、軽症、典型、重症例に分類される。遺伝子解析にて確定診断された FCMD の精神運動発達、特に運動機能の自然歴に関し再評価を行った。

B.研究方法

1995年から2013年までの間に東京女子医大小児科に通院し、遺伝子解析にて確定診断された FCMD68例のうち、退行開始までの一定期間評価しえた57例の診療録を後方視的に評価した。(倫理面への配慮)過去の診療録だけの研究であり患者の健康に直接影響を及ぼさない。個人情報はずべて匿名化されてから解析を行った。

C.研究結果

57例の内訳は、ホモ接合型が36例、ヘテロ接合型21例であった。ホモ接合型の定額獲得時期は平均7.6か月、座位が14.6か月であるのに対し、ヘテロ接合型では、定額が平均16.5か月、座位が39.1か月と大幅に遅れが見られた。最高到達

運動能別に評価を行った結果、独歩群は、定額が4.5か月、座位が9か月と極軽度の遅れであったのに対し、以後、いざりばい群は定額7.4か月、座位17.7か月、座位群では定額10.5か月、座位21.3か月、定額のみ重症群では定額21.7か月であった。退行時期は平均7.6歳であった。

D.考察

ホモ接合型が軽症と典型例のみであったのに対し、ヘテロ接合型には多く重症例が含まれた。最高到達運動能ごとに定額、座位の平均時期に大きな差が認められ、定額獲得時期により最高到達運動能の大よその予測は可能である。後方視的な検討のため、運動能獲得と退行時期の定義の不明確性が問題として残った。

E.結論

最高到達運動能ごとに定額の平均時期に大きな差が認められ、定額獲得時期により最高到達運動能の大よその予測は可能である。

II. FCMD における生体電気インピーダンス法による筋量評価

A.研究目的

鎮静の必要がなく、被ばくもしない生体電気イン

ピーダンス法 (Bioelectrical impedance analysis:BIA)にて用いて FCMD 患者の成長や発達が評価できるか検討した。

B.研究方法

対象は東京女子医科大学小児科通院中の FCMD 患者 21 名で計測開始平均年齢は 7.19 歳(11 ヶ月～20 歳 6 ヶ月)。観察間隔は平均 239±86 日間。インピーダンス測定器(BCA-100,タニタ製)を用いて両側の上腕、大腿、下腿でインピーダンスを経時的に測定し、発達による変化を評価した。

(倫理面への配慮)当研究は東京女子医科大学倫理委員会の承認を受けている。患者家族と理解がある場合には患者本人から同意を得て行った。

C.研究結果

8 歳以下では上腕の質的指標が有意に増加し 8 歳以上では有意差傾向をもって低下する傾向を示した。また下腿は 8 歳以下・以上ともに低下傾向を示した。筋の量的指標は大腿のみ 8 歳以下で有意に増加する傾向を示した。典型例、軽症例で検討すると 8 歳以上では上腕・大腿・下腿の質的指標は有意に低下した。

D.考察

下腿の質的指標が 8 歳以下・以上ともに低下傾向を示していたことは、出生時より下腿の脂肪置換が始まることを示唆しており、大腿より下腿の脂肪置換が早く出現する FCMD の特徴に一致する結果だと考えた。また 8 歳以下で上腕の質的指標が有意に増加していた結果は下肢より上肢機能が保たれている FCMD の経過に一致すると考えた。

E.結論

BIA は FCMD の重症度や運動機能を評価し予測するだけでなく、個々の成長や発達の評価、筋の脂肪置換の予測も可能であると考えた。

(健康危険情報)

特になし

F.研究発表

1. 論文発表

本年度は本研究に関してはなし。

2. 学会発表

(1) Ishigaki K et al. Renal dysfunction in patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy. 19th International Congress of The World muscle society, Berlin, Germany

(2) Ishiguro K et al. Natural history of motor function in patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy. 19th International Congress of The World muscle society, Berlin, Germany

(3) Murakami T et al. A new index of muscle development and disease progression for the pediatric patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy, using bioelectrical impedance analysis : An observation study. 19th International Congress of The World muscle society, Berlin, Germany

G.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 2. 実用新案登録

本研究はタニタ社との共同研究であり、タニタ社がインピーダンス測定器の開発、測定協力を行っている。上記、1,2 に関する権利は、タニタ社が有する

厚生労働科学研究委託費（障害者対策総合研究事業
（障害者対策総合研究開発事業（神経・筋疾患分野）））
委託業務成果報告（業務項目）

「福山型筋ジストロフィーの治験実施に関する課題の検討、臨床評価法の確立」

担当責任者 小牧宏文 国立精神・神経医療研究センター 小児神経診療部医長、臨床研究推進部研究管理・調整室長

研究要旨

福山型先天性筋ジストロフィーの治験実施に関する課題を明らかにするとともに、適切な臨床評価法を見いだす。今年度は症例集積性に関する検討、後ろ向き・前向きコホート研究開始に向けた準備を行った。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィーの治験実施に関する課題を明らかにするとともに、適切な臨床評価法を見いだす。

B. 研究方法

筋ジストロフィー臨床試験ネットワーク（Muscular Dystrophy Clinical Trial Network: MDCTN）や患者登録制度などを利用した治験実施に関する症例集積性向上策などを検討する。

後方視的な臨床データ解析、前向き研究の準備を開始する。今年度は臨床評価項目の検討を行った。

（倫理面への配慮）

既存のカルテを用いた検討等であり、現在までのところ倫理申請はおこなっていない。

C. 研究結果

患者登録制度と連携した筋ジストロフィー臨床試験ネットワーク（Muscular Dystrophy Clinical Trial Network: MDCTN）は、ICH-GCPに準拠した臨床研究および症例集積性の向上を目指した臨床研究・治験の実施、教育・研修

機能、臨床評価法の標準化に関するワーキンググループなどの多面的な機能を有し、これらを医師、理学療法士、CRCといった多職種チームで担うことで、各々の専門性を生かした活動を展開している。MDCTNは2012年に設立され、現在全国の33施設が加盟している。MDCTN事務局は、国立精神・神経医療研究センター内に設置されており、分担研究者が事務局代表を担当している。加盟施設には年に1度の施設調査に協力することを課しているが、その施設調査の内容には、各施設の治験を実施する場合の人員、設備などのほか、代表的な12の筋疾患に関して年齢別の患者数も登録するように依頼している。福山型先天性筋ジストロフィーも調査項目に含まれており、合計で約400名が把握されている。施設間での重複登録の可能性はあるものの、MDCTNと日本筋ジストロフィー協会が運営している福山型先天性筋ジストロフィーを対象とした患者登録制度を利用していくことで、I相～検証試験に至るまで、治験実施施設の選定と患者リクルートが見込めることが示唆された。

当院通院歴のある福山型先天性筋ジストロフィー患者について、日常生活活動（歩行・寝返り・上肢残存機能など）の運動機能を遠城寺

式・乳幼児分析的発達検査法や8段階の運動能力スコア (Brain Dev. (1981)) を用い運動機能を数値化し、継時的なマイルストーンを作成する。心機能、てんかん・側彎症等合併症の有無やCK・ALDなどの血清筋由来逸脱酵素のデータ収集も行う計画を立案した。今後は東京女子医大や神戸大と連携したうえで前向き研究の準備を進めていく予定である。現在までのところ、後ろ向き(カルテ調査)研究は調査段階、前向きコホート研究は準備段階であり、次年度にかけて研究を進めていく。

D. 考察

- 1) 達成度について
後方視的臨床データ収集について、現在収集とともに得られたデータをもとに検討を進めている。前向き研究については今後計画を具体化させる予定である。
- 2) 研究成果の学術的意義について
今後開始される臨床試験を実施する際に有用なデータとなる。
- 3) 研究成果の行政的意義について
前向き研究で得られた自然歴を用いて臨床試験を実施できれば、今後の希少疾病の開発モデルを提示できる可能性がある。
- 4) その他特記すべき事項について
特記事項なし。

E. 結論

研究途上にあり具体的な結果、考察ができる段階ではないが、臨床試験を実施するうえで基盤となるデータが得られる可能性が高い研究と考えられる。

(健康危険情報)

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
なし

2. 学会発表

小牧宏文. 臨床試験ネットワーク 魅力的なネットワークを目指して 希少疾病を対象とした臨床試験ネットワーク「筋ジストロフィー臨床試験ネットワーク」の目指すもの 第35回日本臨床薬理学会学術総会 2014/12/14

小牧宏文. オーフアンドラッグ開発推進に向けた国内、国際連携 筋疾患の医薬品開発に向けた国内、国際連携 希少疾病の医薬品開発モデルを目指したアカデミアの取り組み 第35回日本臨床薬理学会学術総会 2014/12/14

小牧宏文、永田哲也、齋藤崇、竹下絵里、立森久照、清水玲子、太幡真紀、玉浦明美、福田昂一、鈴木麻衣子、佐々木征行、武田伸一. デュシェンヌ型筋ジストロフィーを対象としたエクソン・スキップ (First-in-Human) 試験 小児臨床薬理学会 第41回日本小児臨床薬理学会 2014.10.3 大阪

G. 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（障害者対策総合研究事業
（障害者対策総合研究開発事業（神経・筋疾患分野）））
委託業務成果報告（業務項目）

メタボローム解析による代謝物分析

担当責任者 吉田 優（国立大学法人神戸大学大学院医学研究科内科系講座病因病態解析学分野・准教授）

研究要旨

本分担研究では、収集した動物検体やヒト検体を用いたメタボローム解析を実施し、代謝物バイオマーカーの探索を行うことを目的とした。メタボローム解析とは、生体内に存在する低分子代謝物の総体を解析する技術であり、近年、その分析技術の発展に伴い、生命医学研究分野で広く利用されるようになってきている。本年度は、動物検体やヒト検体中の代謝物分析に先立ち、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた生体試料分析の最適化を行い、動物検体・ヒト検体中代謝物の分析を実施できる体制を整えるとともに、池田グループより提供されたマウス血漿検体の代謝物分析を行った。

A.研究目的

本分担研究では、福山型筋ジストロフィーに関連した動物検体やヒト検体に対して網羅的代謝物分析（メタボローム解析）を実施し、代謝物バイオマーカーの探索を行うことを目的としている。メタボローム解析とは、生体内に存在する低分子代謝物を網羅的に解析する技術であり、近年、その手法が飛躍的に発展してきており、生命医学分野でも広く活用されるようになってきた。メタボローム解析では、様々な種類の質量分析計が使用されるが、本分担研究では、ガスクロマトグラフ質量分析計を使用する。ガスクロマトグラフ質量分析計による代謝物分析に関しては、多くの技術的知見やデータベースが既に蓄積していること、代謝物には動物種依存性がなく、前処理やデータベースを共通して利用できること、分析機器の再現性、汎用性に優れているなどが利点として挙げられ、これらがガスクロマトグラフ質量分析計によるメタボロミクスが活発である要因となっている。本年度は、動物検体やヒト検体中の代謝物分析に先立ち、ガスクロマトグラフ質量分

析計を用いた生体試料分析の最適化を行い、動物検体・ヒト検体中の代謝物分析を実施できる体制を整えるとともに、池田グループより提供されたマウス血漿検体の代謝物分析を行った。

B.研究方法

マウス血漿検体(50 μ L)と混合溶媒(250 μ L;メタノール:クロロホルム:水=2.5:1:1)とを混合して、さらに、内部部標準物質として2-イソプロピルリンゴ酸を添加し、続けて、振とうインキュベーション(37 $^{\circ}$ C、30分間、1200rpm)に供した。次に、遠心分離処理を行い、得られた上清(225 μ L)を新しいチューブに回収して、そこに、超純水(200 μ L)を添加し、混合した。遠心分離後、上層(250 μ L)を新しいチューブに回収し、濃縮遠心に供するとともに、凍結乾燥処理を行った。次に、凍結乾燥物をメトキシム化、ならびに、トリメチルシリル誘導体を行うことで、ガスクロマトグラフ質量分析計による分析のための前処理を実施するとともに、ガスクロマトグラフ質量分析計による代謝物測定を行った。取得されたデー

夕は、内部標準物質に対する相対値として算出し、半定量解析を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C.研究結果

福山型筋ジストロフィーに関連したマウスの血漿検体中の代謝物分析に先立ち、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた生体試料分析の最適化を行い、分析体制と整えた上で、池田グループより提供されたマウス血漿検体の代謝物分析を実施した。分析したマウス血漿検体数は、6種類の Genotype のマウスで、合計 29 検体である (Hp/+ : n=5, Hp/- : n=7, Hn/Hn : n=6, mdx : n=6, L/L : n=3, myd/myd : n=2)。

まず、代謝物抽出から代謝物分析までが正しく行われているのか否かを確認するため、29 検体すべての分析結果から、内部標準物質 (2-イソプロピルリンゴ酸) のデータを抽出し、2-イソプロピルリンゴ酸に対するピーク強度について、全 29 検体における相対標準偏差 (%)

(RSD%) を算出した。その結果、RSD%は、6.86%と低い値を示し、代謝物抽出から代謝物分析までが正しく行われていることが確認できた。続けて、血漿分析データを解析し、70 種類の代謝物を検出できた。検出できた代謝物に関しては、ピーク強度の内部標準物質 (2-イソプロピルリンゴ酸) に対する相対値を算出することで、各 Genotype のマウス間で比較評価できる形とし、そのデータを池田グループへフィードバックした。

D.考察

本年度は、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた生体試料分析の最適化を行い、続けて、福山型筋ジストロフィーに関連したマウス検体の代謝物分析を実施した。この最適化におけ

る条件設定は、ヒト血漿検体でも適用可能であるため、その汎用性が担保されており、平成 27 年度以降に予定されているヒト血漿検体分析にも使用することができる。今回の実験では、分析に必要な血漿量の問題から、各 Genotype のマウスの N 数が上記 (「C.研究結果」) に明示しているとおりとなった。福山型筋ジストロフィーに関連したマウスの血漿検体を用いて代謝物バイオマーカーの可能性を評価するためには、さらに多い検体数が必要であると考えられ、現在、N 数を増やすため、更なる検体の準備を進めている。また、採血時のマウス状態や採血のタイミング (サーカディアン・リズムの影響)、溶血の有無なども考慮に入れておく必要があるかもしれない。

E.結論

本年度は、生体試料中の代謝物分析に先立ち、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた生体試料分析の最適化を完了し、福山型筋ジストロフィーに関連したマウス検体のメタボローム解析として、6 種類の Genotype のマウス血漿の分析を終了した。平成 27 年度以降も、池田グループ等と綿密な連携をとり、分析を進めていく計画にしている。

(健康危険情報)

該当なし

F.研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

Nishiumi S., Suzuki M., Kobayashi T., Matsubara A., Azuma T., Yoshida M. (2014) Metabolomics for Biomarker Discovery in Gastroenterological Cancer. *Metabolites*, 4, 547-571.

Matsubara A., Izumi Y., Nishiumi S., Suzuki M., Azuma T., Fukusaki E., Bamba T.,

Yoshida M. (2014) Supercritical fluid extraction as a preparation method for mass spectrometry of dried blood spots. Journal of Chromatography B, 969, 199-204.

2. 学会発表

吉田 優. メタボロミクスの医療応用. 第 19 回日本心療内科学会, 2014.11.29-30, 東京.

Masaru Yoshida. Metabolome analysis for discovering biomarkers of cancers. 20th International Mass Spectrometry Conference

(IMSC2014), 2014.8.24-29, Geneva, Switzerland.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

III. 学会等発表実績