

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)

**難治性筋疾患の疫学・自然歴の収集および
治療開発促進を目的とした疾患レジストリー研究**

H26 - 難治等(難) - 一般 - 086

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木村 円

平成 28 年(2016 年) 3 月

目 次

総括研究報告

難治性筋疾患の疫学・自然歴の収集および治療開発促進を目的とした
疾患レジストリー研究

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター
トランスレーショナル・メディカルセンター

木村 円

Kimura En

分担研究報告

1 . 筋チャンネル病およびその関連疾患の患者登録の現状と新たな展開

大阪大学大学院
医学系研究科 神経内科学

高橋 正紀

Takahashi Masanori

2 . 本邦における DM2 調査研究

自治医科大学
医学部 内科学講座 神経内科学部門

松浦 徹

Toru Matsuura

3 . 眼瞼下垂を伴った Thomsen 型先天性筋強直症の 1 例

熊本大学大学院
生命科学研究部 神経内科学

山下 賢

Yamashita Satoshi

4 . 日本人ジスフェルリン異常症の遺伝子検索への次世代シーケンサーの導入

東北大学大学院
医学系研究科 神経内科学

青木 正志

Aoki Masashi

5 . 希少筋疾患の患者登録事業についての検討

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター
病院 神経内科

森 まどか

Mori-Yoshimura

Madoka

6 . 先天性筋疾患の患者登録システム

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター
病院 小児神経科

石山 昭彦

Ishiyama Akihiko

7 . 先天性ミオパチーの疾患レジストリー研究

川崎医科大学
神経内科学

大澤 裕

Ohsawa Yutaka

8 . 先天性筋無力症候群疾患登録システム樹立に向けて

名古屋大学
医学系研究科 神経遺伝情報学

大野 欽司

Ohno Kinji

9 . デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬開発に関するFDA ガイダンスに関する研究

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 精神薬理研究部

米本 直裕

Yonemoto Naohiro

10 . 希少疾患の系統的レビュー作成に関する考察

京都大学大学院
医学研究科 社会健康医学系専攻 健康増進・行動学分野

渡辺 範雄

Watanabe Norio

参考資料

資料1

先天性筋疾患診断登録用紙(案)

研究成果の刊行に関する一覧表

難治性筋疾患の疫学・自然歴の収集および 治療開発促進を目的とした疾患レジストリー研究

主任研究者 木村 円¹⁾

研究要旨

希少な難治性筋疾患について、正確な診断に基づく臨床情報を収集し、疫学・自然歴を解明し、新規治療開発を目指した治験・臨床研究の実施を円滑にするとともに、国の施策への貢献を目的とした全国規模のレジストリーを構築する。国際的な協調のもと、国立精神・神経医療研究センターにおいて神経筋疾患患者情報登録 Remudy を運用してきたノウハウを活用し、セキュリティに優れたウェブ登録システムにより、特に要望が大きい疾患群の疾患レジストリーを構築し臨床研究基盤整備を推進する。

A. 研究目的

希少な難治性筋疾患の疾患レジストリーを構築し、疫学・自然歴の収集および治療開発を促進する。特に、臨床試験の対象になるべき軽症患者が参加でき、精度の高い詳細な疫学データを収集・解析し、患者の QOL 向上や政策に活用しうる基礎的知見の集積と将来的な臨床開発に寄与する登録体制の整備モデルを示し、新・難病対策事業における登録制度が抱える課題を補完するとともに有益な情報を提供し、難治性疾患全般の研究の進展と政策に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

研究計画: 本研究は観察研究である。

対象は、希少な難治性筋疾患のカテゴリーに含まれかつ遺伝子解析などの方法により診断が確定したミオトニー症候群、ディスファリノパチー、先天性ミオパチー、先天性筋無力症候群等の患者で、インフォームド・コンセントにより参加に同意したものを対象とする。登録項目は Remudy のフォームを参考にして調整し、臨床情報・遺伝情報の確認の体制、アウトプットなどを、専門家と相談しながら進める。

登録方法: 研究に関する情報を Remudy、共同研究者の施設のホームページなど、及び専門の学会(日本神経学会、日本小児神経学会、日本神経治療学会)等を通じ公開する。インフォームド・コンセントに同意し、登録を希望する患者本人が、原則として医師に受診したうえで必要事項を確認し、ウェブ登録システムを経由して登録する。依頼者自身が初期登録を行うとシステムから ID とパスワード(PW)を通知され、以後はこの ID と PW によって入力を行う。必要に応じ登録用紙を準備し、患者情報登録事務局へ書留により郵送する。登録情報は、個人情報(氏名、住所、生年月日、e-mail アドレスなど)と臨床情報(遺伝子解析など診断に関する情報、進行度に応じて変化する臨床情報)であり、連結可能匿名化され、独立して管理される。個人情報は情報セキュリティを強化した個人情報サーバに、連結可能匿名化された臨床情報はセキュリティに優れたクラウドサーバー(日立製作所「匿名バンクサービス」)で保守管理され、常時バックアップされる。登録データは原則として 1 年に 1 回定期的に更新とし、登録情報に変更が生じた際は適宜更新を行う。また遺伝子変異が判明していないなど登録条件に満たない登録を希望する患者の場合は仮登録とし、遺伝子変異が判明するなど診断が確定した時点で登録の手続きを進める。その際、必要に応じ遺伝子解析等を請け負う施設と連携して患者への便宜を図る。また登録者および協力する医療機関等向けに研究・医療に関する情報提供を継続して行う。

研究結果の公表は、集団として連結不可能匿名化された解析結果のみとする。学術論文、プレスリリース、ウェブサイトを通じて行う。研究利用目的の情報開示依頼については、登録情報利用及び情報提供審査委員会において公平な審査を行った上で、研究対象者個人が特定できないように完全に匿名化した情報のみを提供する。国際的なグローバルレジストリー等と共同で情報提供を

1) 国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンター

行う場合も同様の手続きをとる。

1. NCNP に、登録事務に関する調整、各疾患群での登録の進捗マネージメント、国際登録との調整等の役割をになう中央登録事務局を整備する。疾患毎に専門家、学会、患者支援団体、国際的な登録との調整、運営委員会・事務局の準備、倫理申請、登録項目と登録システムの設定を行う。準備が整った疾患から、患者・支援団体への情報提供と実際の登録を開始する。
2. ミオトニー症候群(目標:500名・H26年に開始:高橋正紀(研究協力者・古谷博和、中森雅之、松村剛、高田博仁)、松浦徹)の登録を開始。必要に応じて情報提供と情報開示を行う。
3. ディスファリノパチー(目標:200名・H27~28年度に開始:青木正志(研究協力者・鈴木直輝)、森まどか、木村円(研究協力者・林由起子))
4. 先天性ミオパチー(ネマリンミオパチー・目標:200名・H27~28年度に開始、コラーゲンVI異常症・目標:100名・H27~28年度に開始):石山昭彦(研究協力者・西野一三、小牧宏文、林由起子)、大澤裕)
5. 先天性筋無力症候群(目標:100名・H27~28年度に開始:大野欽司(研究協力者・小牧宏文)、森まどか、山下賢)の登録を開始。必要に応じて情報提供と情報開示を行う。
6. 登録情報の更新、必要に応じて情報提供と情報開示、および登録情報の解析と評価を順次行う。
(倫理面への配慮)
- 1) インフォームド・コンセントの方法とその説明事項(研究等の対象者に理解を求め同意を得る方法)
本研究は観察研究であり、「疫学研究に関する倫理指針」及び「臨床研究に関する倫理指針」をふまえて行われる。当該研究の目的を含む研究の実施についての情報を、独立行政法人国立精神・神経医療研究センター及び神経筋疾患患者情報登録 Remudy、分担・協力研究者のウェブページなどに情報公開を行う。遺伝子解析の結果を含む情報を登録することについてのインフォームド・コンセントと同意を得ることを必須とするとともに、研究対象者となる者が研究対象者となることを拒否できるよう十分に配慮する。また分担研究者・研究協力者の施設において遺伝子解析を実施する場合においては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」をふまえ、当該施設における倫理審査を受けた上で実施するものとする。
- 2) 研究等の対象とする個人の人権擁護(プライバシーの保護など)

対象患者は、自らの意思に基づき本研究に参加し、参加することに同意しなくても、また同意後にその同意を撤回しても、そのために患者が通常の診療に関して不利益を被ることはない。登録情報の公開、研究成果の発表にあたっては患者個人を同定できる情報は公開されず、プライバシーは完全に保護される。

- 3) 研究等によって生じる個人の安全性・不利益に対する配慮
患者情報の収集に関する研究であり、患者自身に対する危険性は発生しない。取り扱う情報は、遺伝子解析の結果を含む個人情報であり個人情報管理については十分な配慮を行う。
- 4) 被験者への結果説明
患者登録に当たっての、患者からの問い合わせに関しては、患者情報登録事務局に相談窓口を設置し、登録に当たり適切な助言を行う。また、患者からの登録情報の公開依頼があった時には、速やかに知らせることとする。問い合わせ先(対応窓口:住所〒187-8551東京都小平市小川東町4丁目1番1号 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター TMC 神経・筋疾患患者登録 Remudy 患者情報登録事務局 電話番号 042-346-2309)についても掲示する。また各施設に事務局を置く場合も同様の対応とする。

C. 研究結果

中央登録事務局:NCNP TMC 臨床研究支援部 (Remudy 患者情報登録部門、平成26年12月~)に設置。中央登録事務局整備のため事務助手1名の採用をNCNP に申請中。登録事務局の支援業務は国立精神・神経医療研究センター研究開発費による Remudy 事務局のメンバーが代行して実施中。

- 1) ミオトニー症候群について、代表的な筋強直性ジストロフィー登録(DMPK, ZNF9 に遺伝子変異を有するもの)を、平成26年度厚生労働科学研究委託費(障害者対策総合事業)「筋強直性ジストロフィー治験推進のための臨床基盤整備の研究」(研究代表者 松村剛・国立病院機構 刀根山病院)と協調して、H26年10月2日より大阪大学神経内科を事務局(分担研究者・高橋政紀講師)として開始。2016年2月29日現在、登録依頼者は417名となった。また登録された臨床情報の解析を開始した。また
- 2) ディスファリノパチー登録(東北大学):現在計画および関係者との調整を行った(分担研究者・青木正志 東北大学教授)。国際共同自然歴研究に関連する登録との連携を視野に入れるために情報共有を行った。

また患者支援団体の主催する講演会において研究報告を行った。

- 3) 先天性筋無力症候群登録:現在計画および関係者との調整を行った(大野欽司名古屋大学教授)。国際協調を見据えてヨーロッパにおける同疾患登録のエキスパートと、登録項目を含めて意見交換を行った。本邦の症例数は少数であり、先天性筋疾患登録としてまとめた形を検討した。
- 4) 先天性ミオパチー登録(石山昭彦国立精神・神経医療研究センター病院医師):米国の先天性筋疾患全体の登録を行う CMDIR など関係する登録内容との調整を行った。先天性筋無力症候群を包含し、先行する福山型先天性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィーなど登録が稼働中のタイプを除く形での登録が検討された。現在、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で審査中である。

H27年2月4日に研究班会議を開催し、本研究を実際に実施する際の問題点を議論した。特に、登録項目の設定にかかる専門家・研究者、患者及び支援団体、情報の利用者たる製薬企業の開発関係者間の調整、遺伝子解析にかかるコストとマンパワー、実際の臨床研究での利用に関する考え方などが、ディスカッションの焦点となった。また、一方で計画中のディスファリノパチー登録(東北大学)、先天性筋疾患登録(国立精神・神経医療研究センター)等の準備についても意見交換を行った。

D. 考察

研究初年度から開始したミオトニー症候群の中で代表的な筋強直性ジストロフィー登録(*DMPK*, *ZNF9* に遺伝子変異を有するもの)は順調に進められている。大阪大学の事務局を充実させ、一方で、中央登録事務局を設置しNCNP TMCを、限られたリソースを活かして、運用している。また、最新のICT技術を活かしたウェブ登録システムは、マンパワーとコストの増大を抑制しつつ、ニーズに対応する方法として検討され、筋ジストロフィー登録に応用され現在テスト中である。ウェブ登録システムを用いた疾患拡充の方法は、筋強直性ジストロフィー登録にも適用の準備を進めており、十分な検討とブラッシュアップのちほかの希少疾患群にも応用されると考えている。

また、H27年から施行された新しい「難病の患者に対する医療等に関する法律による指定難病」の進捗状況を確認しつつ、本研究で行う登録システム構築が新しい指定難病の登録システムに対して貢献出来るような体制構築が望ましい。本研究で進めるシステムは、治験・臨床試

験のフィージビリティスタディおよびクルートに関わる登録者への情報提供を行うことを目的としており、正確な遺伝子・臨床情報を登録し、かつ発症初期の軽症患者の参加が予想されている。これを進め臨床試験の実施、新薬の開発につなげることで情報の精度や全例登録をすすめることの重要性を提言してきた。指定難病登録の現状はシステム開発を見直しており、我々の取り組みが新しいシステム開発に有用な情報を提供できている。将来的には一つのシステムに統合されることが望ましい。喫緊の課題である臨床開発を加速させ革新的医療技術を創出し、医療分野の成長戦略を実現するためには最先端のICTシステムを活かした方法の拡充が重要である。

E. 結論

ミオトニー症候群の代表として筋強直性ジストロフィー登録を開始し、ディスファリノパチー登録、先天性筋無力症候群登録、先天性ミオパチー登録についても着実に準備を進めつつ、他の候補疾患についての検討も行っている。指定難病登録との将来的な統合を見据えつつ、現実問題として近づいてくる臨床開発を促進するレジストリーシステムを提案している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, Dawkins H, Lamont L, Roy AJ, Chamova T, Guergueltcheva V, Chan S, Korngut L, Campbell C, Dai Y, Wang J, Barisic N, Brabec P, Lahdetie J, Walter MC, Schreiber-Katz O, Karcagi V, Garami M, Viswanathan V, Bayat F, Buccella F, **Kimura E**, Koeks Z, van den Bergen JC, Rodrigues M, Roxburgh R, Lusakowska A, Kostera-Pruszczyk A, Zimowski J, Santos R, Neagu E, Artemieva S, Rasic VM, Vojinovic D, Posada M, Bloetzer C, Jeannet PY, Joncourt F, Diaz-Manera J, Gallardo E, Karaduman AA, Topaloglu H, El Sherif R, Stringer A, Shatillo AV, Martin AS, Peay HL, Bellgard MI, Kirschner J, Flanigan KM, Straub V, Bushby K, Verschuuren J, Aartsma-Rus A, Beroud C, Lochmuller H. The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum mutation*, 36(4):395-402, 2015.

- 2) Nishikawa A, Mori-Yoshimura M, Segawa K, Hayashi YK, Takahashi T, Saito Y, Nonaka I, Krahn M, Levy N, Shimizu J, **Kimura E**, Goto J, Yonemoto N, Aoki M, Nishino I, Oya Y, Murata M: Respiratory and cardiac function in Japanese patients with dysferlinopathy. *Muscle & nerve*, 53(3):394-401, 2016.

2. 学会発表

- 1) **木村 円**, 中村治雅, 三橋里美, 森まどか, 竹内芙実, 小牧宏文, 西野一三, 川井 充, 武田伸一: DMD/BMD のナショナルレジストリー – Remudy が進める臨床研究基盤の整備状況 Remudy, as an infrastructure for clinical research - The national registry of DMD/BMD in Japan, 第 56 回日本神経学会学術大会, 2015/5/20-23(21), 朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター), 新潟
- 2) 高橋正紀, 高田博仁, 尾方克久, 久留 聡, 高橋俊明, 木村 隆, 中森雅之, 松浦 徹, 石垣景子, 小牧宏文, 望月秀樹, 川井 充, 武田伸一, 松村 剛
木村 円: ナショナルレジストリー運用の新しいスタイルの確立 - 筋強直性ジストロフィー, 第 56 回日本神経学会学術大会, 2015/5/20-23(20), 朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター), 新潟
- 3) Takahashi PM, Matsumura T, Nakamori M, Takada H, Kuru S, Ogata K, Ishigaki K, Komaki H, Kawai M, Takeda S, **Kimura E**: The Japanese registry for myotonic dystrophy: collaboration between a national center, a national hospital network, and an academic institute, International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, 2015/6/8-12, Campus des cordeliers Paris, France

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

筋チャンネル病およびその関連疾患の患者登録の現状と新たな展開

研究分担者 高橋 正紀¹⁾

研究協力者 中森 雅之¹⁾, 松村 剛²⁾, 松村 泰志³⁾
加藤 和人⁴⁾, 木村 円⁵⁾

研究要旨

筋チャンネル病及びその関連疾患には、周期性四肢麻痺、先天性ミオトニー、先天性パラミオトニー、筋強直性ジストロフィーなどいくつかの疾患がある。筋強直性ジストロフィーについては2014年10月より登録を開始し、登録数は400例に上り、遺伝学的検査、各種臨床検査、治療状況などについて解析がすでに可能であった。その他の筋チャンネル病に関しては、双方向性の研究ツールを目指し、ICTを用いた患者登録として運用準備を開始した。

A. 研究目的

希少疾患の臨床開発はその希少性ゆえに様々な困難が予想される。これを解決し、臨床開発を円滑に進めるためにも疫学や自然歴を明らかにすることが重要であり、ジストロフィノパチーを皮切りに神経筋疾患の患者登録が国立精神・神経医療研究センターによる Remudy として開始された。Remudy は治験・臨床研究の促進に成果を挙げ、ナショナルレジストリーとして国際協調に基づく研究にも貢献している。

筋チャンネル病及びその関連疾患には、周期性四肢麻痺、先天性ミオトニー、先天性パラミオトニー、筋強直性ジストロフィーなどいくつかの疾患がある。患者数が多く、国際的にも患者登録の必要性が最も高い、筋強直性ジストロフィーについては2014年10月より登録を開始し、登録患者数は400例に上っている。この登録データを治験や臨床研究にどのように用いる事が可能かを検討するため、遺伝学的検査、各種臨床検査、治療状況などについて解析を試みることにした。

また、そのほかの筋チャンネル病については患者数が非常に少ない疾患であり、診断確定患者は遺伝子解析を行っている数施設で把握できている。治験のための患者登録というよりも、未診断患者の診断確定や臨床研究を

主目的とすべきと考えられることから、双方向性の研究ツールを目指した ICT を用いた患者登録について検討すべきと考えられる。

B. 研究方法

筋強直性ジストロフィーの患者登録データの解析については、診断・年齢・性別・居住都道府県・ADL などの背景情報について集計を行った。提供されている遺伝子診断情報については、発症年齢とリポート長の相関について、全体および検査会社による違いについて検討した。さらに、親子登録例について、リポート数の比較を行った。また、検査データや治療の状況と照らし合わせて検討した。

そのほかの筋チャンネル病の登録のための準備として、オックスフォード大の Jane Kaye, Kassim Javaid らが遺伝性骨疾患で行っている Rudy プロジェクトについての情報提供を受け、大阪大学で筋チャンネル病の登録に利用できるかどうかを、技術・倫理面を中心に検討し、日本語化にむけた準備を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は「神経筋疾患(筋強直性ジストロフィーおよび関連疾患)の患者情報登録システムの構築及び効率的な運用に関する研究」として大阪大学臨床研究倫理審査委員会の承認を受けている。実際の患者登録に際し、すべての登録患者ならびに協力医師から書面で同意を取得している。

C. 研究結果

筋強直性ジストロフィーの登録患者の診断は、古典的 DM1 が 85%、先天性 DM15% である。平均年齢は 41 歳。独歩可能が約半数、装具歩行、歩行不能がそれぞれ約 1/4 である。年齢、ADL などからは幅広い患者の登録が

1) 大阪大学大学院 医学系研究科 神経内科学

2) 国立病院機構 刀根山病院

3) 大阪大学大学院 医学系研究科 医療情報学

4) 大阪大学大学院 医学系研究科 医の倫理と公共政策学

5) 国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンター

Key Words

患者登録、筋強直性ジストロフィー、
ダイナミックコンセント、

進んでいることがうかがえたが、都道府県別の人口 10 万人あたりの登録患者数には、かなりの違いが都道府県により存在した。

遺伝学的な面では、CTG リピート数と発症年齢には従来から指摘されているように、逆相関を認めた。大手検査会社二社の患者データについて、別々に CTG リピート数と発症年齢の関係を検討したが、有意な差異は認めなかった。親子例については 27 例の登録があり、うち 17 例は cDM 例であり、その母のリピート数は 100~1850 とかなり幅があった。治療面では、登録患者のうち 28% が補助換気を用いていたが、ペースメーカー (PM) / 埋込型除細動器 (ICD) の装着は 1.5% のみと欧米との違いが改めて浮き彫りとなった。糖尿病の治療薬剤としては DDP4 阻害薬やピグアナイドの使用が多かった。

オックスフォード大の Jane Kaye, Kassim Javaid らが遺伝性骨疾患で行っている Rudy プロジェクトについての情報提供を受け、大阪大学内で倫理・医療情報の専門からと検討を行い、オックスフォード大と共同で日本語化を行うこととなった。

D. 考察

筋強直性ジストロフィーの患者登録については、400 例の症例蓄積があることから、遺伝学的解析、臨床検査、治療に関する簡単な解析が、すでに可能であった。今後、詳細な解析を行い臨床研究への活用が期待される。

都道府県別の人口 10 万人あたりの登録患者数には、かなりの違いが都道府県により存在したことから、まだ患者登録についての周知が不十分であることが窺え、更なる広報周知活動が必要と考えられる。

さらに、患者登録では情報の更新、継続的なデータ集積が重要である。近日 Web 入力化が可能になる予定であるが、患者、臨床医、事務局がそれぞれの立場でデータにアクセスできることは、登録継続に重要であるとともに、臨床研究への応用が期待される。

その他の筋チャンネル病に関して、双方向性の研究ツールを目指した ICT を用いた患者登録としてすでに運用を開始し成功を収めているオックスフォード大の全面的な協力が得られることとなった。患者参加やダイナミックコンセンストといった新たな取り組み・考え方が、本邦の患者・社会・研究者においてどのように受け止められ評価されていくのかを検証していくことは非常に興味深い。

E. 結論

筋強直性ジストロフィーの患者登録については、登録化医師 1 年余りの段階で順調なデータ蓄積が得られ、デ

ータの分析が可能である。その他の筋チャンネル病について、双方向のコミュニケーションが可能な ICT を用いた登録システムをめざし検証を開始した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Takahashi MP, Matsumura T, Nakamori M, Takada H, Kuru S, Ogata K, Ishigaki K, Komaki H, Kawai M, Takeda S, Kimura E. The Japanese registry for myotonic dystrophy –collaboration between national center, national hospital network and academic institute. The 10th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, Campus des Cordeliers, Paris, France 2015 年 6 月 18-22 日

2) 高橋正紀、中森雅之、石垣景子、望月秀樹、武田伸一、松村 剛、木村 円
本邦における筋強直性ジストロフィー 1 型の遺伝学的現況 患者登録データの解析 日本人類遺伝学会 第 60 回大会
2015 年 10 月 15 日 京王プラザホテル 東京

3) 高橋正紀、高田博仁、尾方克久、中森雅之、久留 聡、松村 剛、木村 円
筋強直性ジストロフィー患者登録の現状 - 登録開始 1 年を迎えて第 2 回日本筋ジストロフィー医療研究会
2015 年 10 月 24 日 大阪大学中之島センター 大阪

4) 高橋正紀、久留 聡、木村 隆、小森哲夫、小林道雄、木村 円、松村 剛
筋強直性ジストロフィーの医療の現況について 患者登録データによる解析 第 33 回日本神経治療学会総会
2015 年 11 月 26 日 名古屋国際会議場

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

本邦における DM2 調査研究

研究分担者 松浦 徹¹⁾

研究要旨

筋強直性ジストロフィー 2 型 (DM2) の遺伝子変異は、*ZNF9* 遺伝子イントロン 1 上の CCTG リピート異常伸長である。DM2 はヨーロッパ系白人に認めることが多いが、本邦を含めたアジアでの実態調査は十分になされていない。DM2 の臨床症状は幅広く、その程度は DM1 に比べ遥かに軽度であることから、見過ごされている症例が少なからず存在する可能性がある。全国の神経内科関連施設から DM1 遺伝子変異を否定され、臨床的に DM2 を疑われた症例の、DM2 遺伝子診断を継続して行っている。これまでのところ DM2 3 家系を見出している。現時点で、本邦における DM2 は稀少疾患であるが、その実態を明らかにする臨床遺伝研究が急務である。

A. 研究目的

日本の筋強直性ジストロフィーはタイプ 1 (DM1) しかないと考えられてきたが、2008 年に筋強直性ジストロフィータイプ 2 (DM2) も本邦に存在することを我々は初めて報告した (Saito T et al. *Neurogenetics* 2008)。そこで、本邦における DM2 頻度、臨床症状の特徴を調査すると共に、DM2 として神経・筋疾患患者登録センター (Remudy) 患者情報登録を目指す。

B. 研究方法

全国の神経内科関連施設より臨床的に DM2 を疑われた症例から抽出された DNA を用いて、DM2 リピートの PCR 解析、repeat-primed PCR 法を用いて DM2 遺伝子変異の有無を前年度に引き続き検索した。DM2 リピート PCR 解析で異なるリピート数を持つヘテロ症例はその時点で DM2 を除外し、単一アレルを示す症例に repeat-primed PCR 法を施行し、CCTG 伸長変異の有無を検討した。この結果 CCTG 伸長変異の存在を確認した症例に、サザンプロット解析を施行し、伸長変異サイズ(リ

ピート数)を解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断にあたり、各施設のヒトゲノム研究審査委員会などにて全て承認済みであった。遺伝子診断時にすべての患者から同意を文書にて取得した。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、文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号の「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

DM1 と比較した DM2 の臨床的特徴は、成人高齢発症が多く、その筋障害が近位筋優位であること、ミオトニア現象が経過を通じて目立たないことが多いことである。また、症状に多様性があることに注意を要する。これまでのところ、本邦には DM2 の 4 家系が存在し、7 症例を確認している。糖尿病や白内障の浸透率は 100% に近く、両症を合併し DM1 が否定された患者には積極的に遺伝子診断することが、DM2 診断に重要であると思われる。

D. 考察

これまでの調査から、DM2 は稀少疾患であると考えられるものの、本邦にも複数家系が存在する事が確認されている。Remudy 患者情報登録部門では、2014 年 10 月 2 日より筋強直性ジストロフィーの登録を開始しており、本邦の DM2 患者登録に寄与したいと考えている。

E. 結論

本邦にも DM2 の複数家系が存在している。欧米症例との臨床遺伝学的な比較検討が必要である。臨床診断の不十分さ・遺伝子診断施行率の低さもその診断を妨げている可能性があり、今後の課題

である。Remedy における筋強直性ジストロフィー登録促進に貢献できるよう努力したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gao R, Liu Y, Silva-Fernandes A, Fang X, Paulucci-Holthauzen A, Chatterjee A, Zhang HL, Matsuura T, Choudhary S, Ashizawa T, Koeppen AH, Maciel P, Hazra TK, Sarkar PS. Inactivation of PNKP by mutant ATXN3 triggers apoptosis by activating the DNA damage response pathway in SCA3. **PLoS Genet** 2015;11:e1004834.
- 2) Imada H, Sakatani T, Sawada M, Matsuura T, Fukushima N, Nakano I. A lethal intracranial Rosai-Dorfman disease of the brainstem diagnosed at autopsy. **Pathol Int.** 2015; 65:549-553.

2. 学会発表

松浦 徹 . 「RNA disease mechanism in DM1 and SCA10 brain」 . 第 38 回日本神経科学大会シンポジウム講演 . 神戸、2015 年 7 月 29 日 .

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

眼瞼下垂を伴った Thomsen 型先天性筋強直症の 1 例

研究分担者 山下 賢¹⁾

研究協力者 加藤 麻衣¹⁾, 森 由紀子¹⁾, 増田 曜章¹⁾, 高松 孝太郎¹⁾
安東 由喜雄¹⁾

研究要旨

症例は 21 歳男性。幼少期から動作開始時のミオトニアを認めていた。周囲から異常を指摘され 21 歳時に受診。ヘラクレス様体型、増強法で誘発される両側眼瞼下垂、反復運動によって改善するミオトニアを認めた。CK 上昇や白内障、心伝導障害、内分泌障害はなかった。針筋電図でミオトニー放電がみられたが、筋生検でジストロフィー変化はなかった。CLCN1 遺伝子解析で、c.1439C>A のヘテロ接合性変異が認められた。母親、母方の祖父および曾祖父に同様の症状がみられ、優性遺伝形式の家族歴を有しており、Thomsen 病と診断した。Thomsen 病はまれながら眼瞼下垂を呈するものがあることに留意すべきである。

A. 研究目的

先天性筋強直症はミオトニア現象を主徴とする遺伝性疾患で、筋のジストロフィー変化は伴わない。骨格筋塩化物イオンチャンネル遺伝子 (CLCN1) の変異が原因であり、常染色体優性遺伝形式の Thomsen 病、常染色体劣性遺伝形式の Becker 病に分類され、Thomsen 病の有病率は 400,000 人に 1 人と推定されている (1)。先天性筋強直症は幼少期から症状を呈し、外眼筋や顔面筋、舌筋を含むすべての横紋筋にミオトニアが出現しうる。

われわれは眼瞼ミオトニアや lid lag は伴わず、眼症状として眼瞼下垂のみを認めた Thomsen 病の 1 例を経験したので報告する。本症例のような特異的な表現系を呈する症例を報告することにより、希少な難治性筋疾患のレジストリーの基盤を構築することが本研究の目的である。

B. 研究方法(症例呈示)

患者: 21 歳、男性

主訴: 動き始めの筋肉のこわばり

既往歴: アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎あり。

家族歴: 母、母方祖父、母方曾祖父に同様の症状あり。

嗜好歴: 喫煙はなく、飲酒は機会飲酒である。

現病歴: 出産に特に問題はなかったが、幼児期から四肢の動きのぎこちなさに家族は気づいていた。小学校ではソフトボール部に所属していた。小学 4 年生頃から走りだす時に足がこわばって動かしにくいことを自覚するようになったが、運動能力は普通で、日常生活で症状を自覚することはなかった。高校では野球部に所属していた。運動開始時の筋肉のこわばりは持続しており、一度動作を中断すると、再度動き出す時にも筋肉のこわばりが出現していた。高校 3 年生時には、歩行や階段昇降開始時などの日常生活でも足の動かしにくさを自覚するようになった。大学入学時から摂食開始時の開口困難もみられるようになったが、会話や嚥下には問題なかった。大学実習中に四肢の動きのぎこちなさを指摘され、2015 年 4 月に当科外来を受診し、精査加療目的に入院となった。

入院時現症: 身長 167.7 cm、体重 71.85 kg、BMI 25.6、体温 36.4、血圧 122/72 mmHg、脈拍 83/分・整。全身の軽度筋肥大を認めた(ヘラクレス様体型)。神経所見では、意識清明で高次脳機能障害はなかった。脳神経系では、眼球運動制限や複視はなかったが、両眼裂がやや狭小化し、両側とも増強法で眼瞼下垂が誘発された。また、舌ミオトニアを認めた。筋力低下はなかった。叩打性ミオトニアおよび把握性ミオトニアを両側に認めたが、動作の繰り返して軽減した(warm-up 現象)。

(倫理面への配慮)

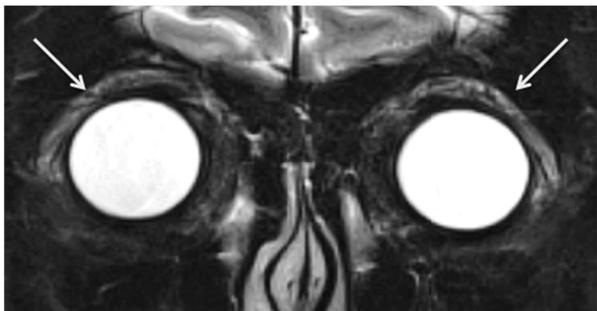
本研究における医療情報の収集に当たっては、患者自身より書面による説明と同意(インフォームド・コンセント)を取得し、個人情報特定されないように配慮した。

C. 研究結果

血算に異常ないが、生化学検査では TG 177 mg/dL と軽度上昇を認めた。血清 CK 値上昇はなく、糖尿病や甲状腺機能などの内分泌障害もなかった。24 時間心電図で心伝導障害はみられず、眼科的異常もなかった。針筋電図ではミオトニー放電と軽度の筋原性変化を認めた。50Hz の高頻度反復刺激試験で約 25% の waning がみられ、short exercise test と cooling test は正常であった。上腕および大腿部骨格筋 MRI で異常所見はなかった。頭部 MRI では STIR で上眼瞼挙筋を含む軟組織が高信号を呈したが(図 1)、その他の異常所見はなかった。本人の同意を得て、右上腕二頭筋からの筋生検と遺伝子検査を行った。筋病理では筋線維の軽度大小不同と僅かな内在核を認めたが、炎症細胞の浸潤はなく、筋線維タイプに異常はなかった。CLCN1 遺伝子解析で、c.1439C>A (p.P480H) ヘテロ接合性変異を認めた。

臨床所見および検査結果から Thomsen 病と診断した。ミオトニアによって日常生活に支障をきたしており、筋強直軽減のためメキシレチン 300 mg/日を導入した。

図 1 眼窩 MRI



D. 考察

本例は舌ミオトニア、叩打性ミオトニア、把握性ミオトニアを呈し、針筋電図でもミオトニー放電を認めたが、筋病理で明らかなジストロフィー変化はなかった。優性遺伝形式の家族歴を持ち、筋痛や麻痺発作はなく、安静がミオトニアの誘因となり、寒冷の影響は受けないが動作の繰り返して症状が軽減する warm-up 現象やヘラクレス様体型を認めたことから、Thomsen 病を疑い、遺伝子検査にて確定診断に至った。

CLCN1 は 7 番染色体に位置し、電位依存性 Cl⁻ イオンチャンネルである CLC-1 をコードしている。CLC-1 チャンネルは、イオン透過部であるポアを持つサブユニットがホモ二量体を形成しているため(2)、2 つのポアを有する

double-barreled チャンネルである(3)。機能としては静止膜電位の形成に関与しており、CLCN1 変異が存在すると、膜電位の脱分極が持続するためミオトニアが誘発される(4)。CLC-1 は主に骨格筋に発現しているが、腎臓や心臓、平滑筋、グリア細胞にもごく少数発現しているとの報告がある(4-6)。現在までに、200 以上の先天性筋強直症に関連した遺伝子変異が報告されているが(2)、変異のホットスポットは特になく、全体的に分布している(1)。優性遺伝形式でも発症する機序としては、変異のあるサブユニットが、正常のサブユニットの機能も抑制する dominant negative 効果が推定されている(7-8)。

外眼筋や顔面筋、舌筋を含むすべての横紋筋でミオトニアが出現するため、眼症状として眼瞼ミオトニアや lid lag を呈することもあり、衝動性眼球運動障害がみられた報告もある(9)。ただし、先天性筋強直症では四肢の症状が特徴的であり、眼症状の頻度は同じ骨格筋チャンネル病である Na⁺ チャンネル病よりも少ない(10-11)。本症例では、眼症状として眼瞼ミオトニアや lid lag、眼球運動障害は認めず、両側性の瞼裂狭小化がみられた。増強法で両側とも眼瞼下垂が誘発され、上眼瞼挙筋の関与が考えられた。眼瞼下垂に日内変動はなく、本人および家族はももとの顔貌と考えており、眼瞼下垂の認識はなかった。眼瞼下垂を呈した先天性筋強直症の報告は 1 例あるが、報告例の眼瞼下垂は変動しており、本症例のように持続的なものではなかった(12)。

E. 結論

眼瞼下垂を伴った先天性筋強直症の 1 例を報告した。本疾患における眼瞼下垂の合併は稀であり、病態解明にはさらなる症例の蓄積が必要である。

参考文献

- 1) 佐々木良元. 先天性筋強直症: 常染色体優性型 (Thomsen 病). 骨格筋症候群. 第 2 版, 大阪: 日本臨床; 2015. p192-196
- 2) Portaro S, Altamura C, Licata N, et al. Clinical, Molecular, and Functional Characterization of CLCN1 Mutations in Three Families with Recessive Myotonia Congenita. Neuromolecular Med 2015, 17: 285-296.
- 3) Saviane C, Conti F, Pusch M, et al. The muscle chloride channel CLC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. J Gen Physiol 1999, 113: 457-468.
- 4) Tang CY, Chen TY. Physiology and pathophysiology

of CLC-1: mechanisms of a chloride channel disease, myotonia. J Biomed Biotechnol 2011,

- 5) Steinmeyer K, Ortlund C, Jentsch TJ. Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. Nature 1991, 354: 301–304.
- 6) Zhang XD, Morishima S, Ando-Akatsuka Y, et al. Expression of novel isoforms of the ClC-1 chloride channel, in astrocytic glial cells in vitro. Glia 2004,47: 46–57.
- 7) Steinmeyer K, Lorenz C, Pusch M, et al. Multimeric structure of ClC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen).EMBO J 1994, 13: 737-743.
- 8) Pusch M, Steinmeyer K, Koch MC, et al. Mutations in Dominant Human Myotonia Congenita Drastically Alter the Voltage Dependence of the CL-1 Chloride Channel. Neuron 1995, 15: 1455-1463.
- 9) Wakeman B, Babu D, Tarleton J, et al. Extraocular muscle hypertrophy in myotonia congenita. JAAPOS 2008, 12: 294-296.
- 10) Suetterlin K, Männikkö R, Hanna MG. Muscle channelopathies: recent advances in genetics, pathophysiology and therapy. Curr Opin Neurol 2014, 27: 538-590.
- 11) Trip J, Drost G, Ginggaar HB, et al. Redefining the clinical phenotypes of non-dystrophic myotonic syndromes. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2009, 80: 647-652.
- 12) Odrzywolski K, Johnson NE, Twydell PT. Myotonia congenita in a patient who presented with diplopia and ptosis. Muscle Nerve 2013, 47: 307-308.

謝辞

CLCN1 遺伝子検索を施行頂きました三重大学大学院医学系研究科 神経病態内科学分野 佐々木良元先生に深謝申し上げます。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

なし(投稿準備中)

2. 学会発表

加藤 麻衣、森由紀子、山下賢、増田曜章、高松孝太郎、熊本俊秀、安東由喜雄
第 212 回日本神経学会九州地方会、
2015 年 12 月 12 日、北九州

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

日本人ジスフェリン異常症の遺伝子検索への次世代シーケンサーの導入

研究分担者 青木 正志¹⁾

研究協力者 高橋 俊明²⁾, 鈴木 直輝¹⁾, 井泉瑠美子^{1),3)}, 八木沼智香子⁴⁾, 小野 洋也¹⁾,
島倉奈緒子¹⁾, 新堀 哲也³⁾, 片山 望⁵⁾, 齋藤 京之⁶⁾, 谷口さやか²⁾, 大泉 英樹²⁾,
田中 洋康²⁾, 吉岡 勝^{2),4)}, 武田 篤²⁾, 青木 洋子³⁾, 三橋 里美⁷⁾, 西野 一三⁷⁾

研究要旨

当科では、1995 年より三好型遠位型ミオパチーもしくは肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2B) の疑われる患者に対する *DYSF* 遺伝子の変異スクリーニングを SSCP 法により行ってきたが(参考文献 1, 2)、発端者 169 例の約 40% で診断が未確定である。本解析の第一の目的は、ターゲットシーケンズ解析により、これら未診断例における診断率の改善を得ることである。また診断例における臨床的特徴について考察する。さらに遺伝子解析のシステムについても考察する。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いてターゲットシーケンズ解析を行う。解析対象としては、既知の筋疾患関連遺伝子である 44 遺伝子の検索を行う。また、診断例での臨床的特徴について、とくに変異の種類について考察する。

B. 研究方法

次世代シーケンサーを用いてターゲットシーケンズ解析を行う。解析対象としては、既知の筋疾患関連遺伝子である 44 遺伝子の検索を行う(H25 年 2 月時点で作製)。また見出した *Dysferlin* 変異に関しては変異のタイプについて調べた。

(倫理面への配慮)

患者からの臨床情報の取得および DNA の採取に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、最初に東北大学医学部のヒトゲノム委員会および倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得ている。

C. 研究結果

現在までに、20 例のターゲットシーケンズ解析を行った。12 サンプル毎のターゲットシーケンズ解析を行った結果、解析対象とした全標的領域の約 90% 以上が、目標としている最低 Depth 30 以上でカバーされた。

SSCP 法で片アレルにのみ *DYSF* の病的変異を検出していた 9 例中、6 例に病因となりうるホモ接合もしくは複合ヘテロ接合の *DYSF* 遺伝子変異を検出した。全く *DYSF* に変異を検出していなかった 11 例では、*DYSF* には病的変異を認めなかったものの、3 例でその他の筋疾患遺伝子に原因の可能性のある変異を検出した。

c.2997G>T (p.W999C)変異が日本人で最も高頻度に見出された(24.2%)。この変異は肢体型に多く、発症が比較的遅く、つま先立ちが保たれることも見出した。

さらにこれまで解析した 180 家系を振り返ると nonsense が 19 種類、small insertion/deletion が 16 種類、missense が 25 種類、splice 異常が 13 種類あることがわかった。In frame の deletion も 1 種類見出した。1 アレルのみに変化が見出されたのも 9 家系あった。

D. 考察

既に解析した症例で、従来の解析方法で検出できていなかった *DYSF* 遺伝子の変異の検出や、遠位型ミオパチーと類似の臨床・病理像をとる、他の筋関連遺伝子での変異が検出されてきている。今後、サンガー法に相当する結果を得るためにサンプル当たりどの程度のデータを得る必要があるかについては検討が必要である。また、変異の病的意義を考える上では、解析症例の蓄積やデータベース化も重要である。1 アレルのみ見出した 9 家系ではもう片側のアレルに検出できていない splice 異常な

1) 東北大学大学院 医学系研究科 神経内科学

2) 国立病院機構 仙台西多賀病院 神経内科

3) 東北大学大学院 医学系研究科 遺伝科

4) 国立病院機構 仙台西多賀病院 臨床検査科

5) 国立病院機構 仙台西多賀病院 リハビリテーション科

6) 国立病院機構 仙台西多賀病院 薬剤科

7) 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

どが見出される可能性が有り、エクソンイントロン境界を中心に今後の検討が必要と考えられた。

今年度は dysferlinopathy が疑われる症例の次世代シーケンサー結果のまとめを Neurology Genetics 誌に報告することができた。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンズ解析が筋疾患網羅的スクリーニングとして有用である。今後診断率の向上をめざし、実用的で有用な診断システムとなるよう検討を行う。また、病因変異が同定されなかった症例では新規原因遺伝子同定を目指しエクソーム解析を行う。診断を確実にし、自然歴の把握や患者数把握に努めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Izumi R, Niihori T, Takahashi T, Suzuki N, Tateyama M, Watanabe C, Sugie K, Nakanishi H, Sobue G, Kato M, Warita H, Aoki Y, Aoki M. Genetic profile for suspected dysferlinopathy identified by targeted next-generation sequencing. Neurology Genetics 2015;1:e36; doi: 10.1212/NXG.0000000000000036

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

希少筋疾患の患者登録事業についての検討

研究分担者 森 まどか¹⁾

研究協力者 木村 円²⁾

研究要旨

今後行うべき希少筋疾患の登録事業のあり方について検討する。とくに dysferlinopathy について、GNE ミオパチー登録事業、および海外における international dysferlinopathy registry を参考に提言を行った。

A. 研究目的

患者登録は希少疾患の治験・治療促進に有用なツールである。GNE ミオパチー登録事業の経験から dysferlinopathy および 先天性筋無力症について検討した。

B. 研究方法

登録の原資料となるべき疫学面や臨床面での比較検討を行った。国内希少疾病登録として神経・筋疾患患者登録 (Remudy) による GNE ミオパチー患者登録、国際登録として GNE ミオパチーの国際登録である GNEM-DMP (<https://www.gnem-dmp.com>)、患者会運営モデルとして国際ジスフェルリノパチー患者登録事業 (<http://www.dysferlinregistry.org>) を参考にした。

(倫理面への配慮)

NCNP の筋疾患患者の後ろ向きカルテ調査については疫学研究として国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

2015 年末現在で、神経・筋疾患患者登録 (Remudy) に登録している GNE ミオパチー患者は 161 名である。本邦の GNE ミオパチー患者のうち、頻度の多い遺伝子変異は V603L (28 名)、D207V/V603L (28 名) であり、歩行喪失年齢など変異登録データを元にした疫学研究が可能であった一方、それ以外の変異では同一変異を持つ

患者数が 4 名以下であった。GNEM-DMP は日本以外の患者を対象として行われている国際登録である。患者は 26 カ国 200 名以上に達している。国際ジスフェルリノパチー登録では患者数は 300 名以上 (日本からの 17 名を含む) であった。

昨年の本研究で、dysferlinopathy での登録患者数は 160 名程度になることを予測したが、NCNP カルテ調査では遺伝子変異のパリエーションは GNE ミオパチーよりも多く、NCNP 患者 48 名のうち頻度の最も高い遺伝子変異でも 4 名の患者しかおらず、genotype-phenotype correlation を検討することは困難と考えた。

D. 考察

dysferlinopathy 登録については国内登録として GNE ミオパチー同様に運営できると思われる。日本語でもエントリーできる International dysferlinopathy registry との分業や協力・整合性を考慮しつつ、登録事業のあり方を考えたい。とくに遺伝子変異に基づく表現型の確立した国際登録とのタイアップにより疫学研究をより促進することが必要と考えた。また難病事業制度とのタイアップも有効な可能性がある。

E. 結論

希少筋疾患の患者登録を運営するに当たっては、国際協調や包括的な登録制度の作成、指定難病事業との協調を考慮して進めるべきである。

F. 健康危険情報

特になし

1) 国立精神・神経医療研究センター 病院 神経内科
2) 国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンター

Key Words

GNE ミオパチー、先天性筋無力症、dysferlinopathy、患者登録、治験促進、国際登録、希少疾病

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishikawa A, Mori-Yoshimura M, Segawa K, et al.:
Respiratory and cardiac function in japanese patients
with dysferlinopathy. Neuromuscul Disord 2016 Mar;
53(3): 394-401.

2. 学会発表

GNE ミオパチー患者登録 ○森まどかほか
第 112 回日本内科学会総会・講演会 京都
2015 年 4 月 12 日

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

先天性筋疾患の患者登録システム

研究分担者 石山 昭彦¹⁾

研究協力者 木村 円²⁾, 小牧 宏文¹⁾, 佐々木 征行¹⁾

研究要旨

先天性筋疾患に含まれる各疾患は、希少疾病であるため自然歴を含む臨床研究を行うことや、治験に際して参加出来る患者を集めること自体に困難が生じる。将来的に、このような臨床研究や治験を実施する基礎を構築する目的で、かつ国際的な登録システムと歩調をあわせ参画していくため、本邦における先天性筋疾患患者登録システムを構築することとした。対象患者は、筋力低下を含めた臨床症状が、筋病理や遺伝子診断、または臨床診断として矛盾しないと判断できる先天性筋疾患例とした。確定診断にあたっては、筋病理または遺伝子診断のいずれが行われている方が好ましいが、臨床診断として矛盾しない例も含めることで診断の現状を知り、また治験への参加者数の確保をも視野に入れ、候補患者を広く把握できるように配慮した。一方、自然歴等の臨床研究では、正確な診断が重要な要素となるため、それを担保するにあたり、登録に際して、診断根拠をもとに 3 段階のレベルに振り分け(階層付)を行うこととした。倫理申請を行い登録体制の整備、構築を行った。平成 28 年度より登録開始を行う予定である。

A. 研究目的

先天性筋疾患には、出生時または乳幼児期早期より筋力低下、筋緊張低下を認め、骨格筋を病変の首座とする疾患群が含まれる。1)福山型先天性筋ジストロフィー、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー、Ullrich 型先天性筋ジストロフィーなどの先天性筋ジストロフィー、2)先天性筋強直性ジストロフィー、3)先天性ミオパチー、4)先天性筋無力症、5)筋原線維ミオパチー、6)脊髄性筋萎縮症等の疾患が含まれる。診断には、臨床症状や診察で先天性筋疾患が疑わしい場合、筋生検による病理診断が行われ、あるいは疾患によっては遺伝子診断が行われる。

近年では次世代シーケンサーの登場により、遺伝学的に未解明だった例の遺伝子変異も新規に見つかっており、各疾患の分子生物学的な病態解明がすすんでいる。先天性筋疾患の大半に有効性が認められた治療法はないが、将来的には、病態解明がすすむにつれ、今後は治療法開発が重要な課題になってくる。

先天性筋疾患の各疾患は、各疾患の患者数が非常に少ない希少疾病であることから、自然歴を含む臨床研究や治験に参加出来る患者は極めて少ないと考えられ、短時間で対象患者をリクルートすることには困難が予想される。また、これまでの神経筋疾患での新規治療の臨床試験においてもそうであったように、治療に対する有効性を含む臨床的評価をどのように行うべきかについても十分に確立しているとは言い難い。これら課題を克服するため、先天性筋疾患においては、国際的に CMDIR (congenital muscle disease international registry, <https://www.cmdir.org/>) という先天性筋疾患の患者登録システム、国際的ネットワークが構築されつつある。このような背景から、本邦でも将来的に国際的な登録システム、ネットワークへの参画、ならびに新規治療開発や治験をも視野に入れ、また自然歴調査等を含む臨床研究の発展のためにも、本邦における先天性筋疾患の患者登録システムの早期構築を行うことが重要であると考えた。

B. 研究方法

対象は筋病理診断、遺伝子診断、臨床診断などにより診断された先天性筋ジストロフィー、先天性ミオパチーの全ての病型、またこれらの疾患の診断に際して鑑別診断として挙げられる先天性筋無力症、筋原線維ミオパチーなど全ての先天性筋疾患を対象とした。このうち、Duchenne 型筋ジストロフィー、Becker 型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、福山型先天性筋ジストロフィー

1) 国立精神・神経医療研究センター 病院 小児神経科

2) 国立精神・神経医療研究センター トラスレーショナル・メディカルセンター

に関しては患者登録システム「Remudy」(Registry of Muscular Dystrophy)があり、脊髄性筋萎縮症も個別の患者登録システムが存在するため、今回の登録システムの対象からは除外した。また、疾患によっては軽症患者も存在し、先天性という診断名であっても成人年齢で発症し診断がされる例もある。そのため、先天性筋疾患の診断として矛盾がなければ成人例も登録可とし、本登録における年齢制限は設けないこととした。

対象患者は、筋力低下を含め臨床症状が、筋病理や遺伝子診断、または臨床診断により確定し、かつ筋逸脱酵素、神経伝導検査、筋電図、骨格筋CT/MRI等でも矛盾しないと判断できる例とした。診断の根拠にあたっては、筋病理または遺伝子診断のいずれかが行われている方が好ましいが、これらの検査を実施したにも関わらず診断根拠が得られなかった例や臨床診断例も対象に含めた。ただし、患者登録を行うにあたっては、症例ごとの診断プロセスが異なるため、診断精度を担保するにあたり、3段階のレベル振り分け(階層付)を行うこととした。また、臨床情報データに関しては、定期的に更新を行う予定であるが、この階層付も、データ更新時(または随時申し出があれば)等で、追加検査や追加解析で結果が得られた結果を提示いただくことで、適宜変更可能とした。各階層は以下の通りである。

a) レベル A (診断カテゴリ A): 筋生検での筋病理診断による確定診断、または(かつ) 遺伝子解析により原因遺伝子が同定され、臨床経過に矛盾のない例。筋病理または遺伝子診断をされたことが原本コピーなどで確認出来ることを条件とする(確認できない場合はレベル B へ登録する)。

b) レベル B (診断カテゴリ B): 臨床症状や検査所見に矛盾はないが、筋生検や 遺伝子解析を行っても原因が同定されなかった例。診断は小児神経専門医、神経内科専門医が矛盾しないと判断した例とする。

c) レベル C (診断カテゴリ C): 筋生検による診断や遺伝子解析は行われていない。しかし臨床症状や検査所見から、小児神経専門医、神経内科専門医が臨床診断として矛盾しない、と判断した臨床診断例とする。

本研究では、人体から採取された試料は用いず、日常診療のなかで行われている診察所見、検査所見といった患者情報のみを用いる。本研究の患者情報の収集は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成26年11月25日一部改正)に該当し、その規定に従い、「自由意思にもとづく文書による同意(インフォームド・コンセント)を受け、試料・情報の提供を受ける」こととする。

また、個人情報の保護に関する措置として、患者情報登録部門に個人情報(プライバシー)保護管理責任者を定めるとともに個人情報保護にかかる体制の整備、資料の保存及び利用等に関する措置を行う。

C. 研究結果

上記目的および方法にもとづき倫理申請を行い、登録体制の整備・構築を行った。平成28年度より登録を開始予定である。

D. 考察

Duchenne 型筋ジストロフィーをはじめ分子治療の臨床応用可能な筋ジストロフィーでは、ヨーロッパおよび北米の一部で TREAT-NMD という国際的ネットワークがある。本邦でも TREAT-NMD に参加し、患者登録システム「Remudy」(Registry of Muscular Dystrophy)を運用することで新規治験の早期実施に大きな役割を果たしてきた。これまで本邦では、Duchenne 型筋ジストロフィーに次いで、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー、福山型先天性筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィーで同様の登録システムが構築され、患者登録がすすんできた。とくに Duchenne 型筋ジストロフィーでは病態にもとづいた新規治療法が開発され、治験として取り組まれ、自然歴研究にも貢献してきた功績がある。このようななか、先天性筋疾患でも新規治療法の開発や治験実施、自然歴調査等を含む臨床研究の必要性が生じてくると考えられ、また、先天性筋疾患に関わる患者会や家族会などの支援団体からの期待も高まることである。将来的な展望を視野に入れると、これらの基礎として、本登録システムは重要な位置を占めるものと考えられる。

さらに先天性筋疾患は希少疾病であることから、一般に診療機会が少なく、医療的な知識が広く一般医家には行き渡らないことは、患者 QOL を損ねる可能性もある。かかりつけ医や地域格差を無くすため、また患者に有用な治験、治療、教育資料を速やかに配布、提示していくことも、本システムにおける今後の課題、役割として重要であると考えられる。

E. 結論

先天性筋疾患は疾患が多岐にわたり、また現時点では病態に即した治療法がない。そのため治験や臨床研究等の目的に応じた利用が可能なシステムが、これらの研究発展には必要であり、それを可能としたのが今回の先天性筋疾患の患者登録システムである。本年度は本システムの構築準備を行った。次年度より登録を開始し

運用予定である。本登録情報をもとに、先天性筋疾患のすべての疾患で、より効率的な自然歴調査を行える基盤が構築され、これをもとに新規治療法、治験へ発展することが期待される。

F. 健康危険情報

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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

先天性ミオパチーの疾患レジストリー研究

研究分担者 大澤 裕¹⁾

研究協力者 砂田 芳秀¹⁾

研究要旨

「先天性ミオパチー」は、その治療法の確立が待望されている難病で、いわゆる”unmet medical needs”に該当する。最近、その多様な分子病態が次第に明らかとなってきたが、疫学、自然歴の詳細は不明であり、一刻も早い「臨床試験のための患者登録」である「レジストリー」の構築が必要となっている。また、難病助成法に基づく「医療費補助のための患者登録」として「指定難病」制度が本年度から開始された。この「筋ジストロフィー」の患者認定のための診断基準、重症度分類の作成作業に昨年度から参加した。これによって得られた患者登録の観点から、「先天性ミオパチー」レジストリー戦略についての課題と対策について考察する。

A. 研究目的

難治性筋疾患の疫学・自然歴の収集と治療法開発促進を目的とした全国規模のレジストリーを構築する。分担研究者として、このうち、先天性ミオパチーを担当する。

B. 研究方法

「指定難病筋ジストロフィー」ファクトシート作成協力：国立病院機構刀根山病院松村 剛博士を中心に、「筋ジストロフィー」を「指定難病」とすべく、多様な筋ジストロフィーの疫学・自然歴・診断基準・重症度分類が作成された。このうち国立病院機構鈴鹿病院臨床研究部久留 聡博士、国立病院機構青森病院高田博仁博士が記載された「肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)」の項について、その改訂作業に協力した。

「先天性ミオパチー」レジストリー：「先天性ミオパチー」を含む「先天性筋疾患」の疫学・自然歴の収集および治療開始促進を目的とした疾患レジストリー研究班・班会議に出席し、「先天性ミオパチー」登録戦略の障壁について確

認した。

(倫理面への配慮)

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して行われ、開示すべき COI 関係にある企業等はない。

C. 研究結果

指定難病「筋ジストロフィー」資料作成協力：

難治性疾患の「医療費補助」という観点から、臨床病型や責任遺伝子によらない総括的な診断基準が提唱された。また責任遺伝子が同定されない筋ジストロフィーの遺伝子検査の扱い、病理診断が実施できない小児筋ジストロフィーの登録について議論された。疫学：多くの筋ジストロフィー病型で、疫学調査が実施されていない実態が明らかとなった。重症度分類：世界的に運動機能の評価が問題となった。補助無く階段昇降可能(手すりも用いない)、からの患者登録が可能な基準となった。

「先天性ミオパチー」レジストリー戦略構築：先天性ミオパチーは骨格筋の先天的な構造異常によって、乳児期から筋力・筋緊張の低下(floppy infant)を呈し、経過は緩徐ながら進行性の経過を示す遺伝性筋疾患の総称である。その病理学的特徴から、ネマリンミオパチー、セントラルコア病、マルチミニコア病、ミオチューブラーミオパチー、先天性筋線維不均衡症といった病型分類がされていた。最近の次世代シーケンサーによる解析から様々な責任遺伝子が同定されてきたが、未だ責任遺伝子が同定されない症例も多い。NCNP 分担研究者石山昭彦博士の推進する「先天性ミオパチー」「先天性筋ジストロフィー」「筋原線維ミオパチー」「先天性筋無力症候群」を包括する「先天性筋疾患」レジストリーの現状と、平成 28 年春からの開始について、登録戦略上の障壁について確認し対策を議論した。

D. 結論

「指定難病」は、本来、中等症ないし重症の患者を対象とした「医療費補助のための患者登録」であり、一方、「臨床試験のための患者登録」である「レジストリー」は、その疫学・自然歴研究を基盤として、最終的には軽症ないし中等症の患者を対象とした「臨床治験・創薬」を目標とする。ところが、難治性筋疾患では、その希少性から、自然歴研究が必須であることから、軽症から重症までの、全患者を対象とした、レジストリーおよび指定難病の同時進行が必要と考えられる。本研究による「先天性筋疾患」レジストリーが、CMDIR (Congenital muscle disease international registry) と協調して発展し、病態と自然歴解明から、臨床治験に繋がるのが望まれる。

E. 結論

先天性ミオパチーおよび先天性筋疾患レジストリーについて、その基盤となる、問題点を抽出し、その 2016 年度からの実施戦略を構築した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohsawa Y, Takayama K, Nishimatsu S, Okada T, Fujino M, Fukai Y, Murakami T, Hagiwara H, Itoh F, Tsuchida K, Hayashi Y, Sunada Y. The Inhibitory Core of the Myostatin Prodomain: Its Interaction with Both Type I and II Membrane Receptors, and Potential to Treat Muscle Atrophy. PLoS One, 10(7):e0133713, 2015
- 2) Kutoku Y, Ohsawa Y, Kuwano R, Ikeuchi T, Inoue H, Ataka S, Shimada H, Mori Hi, and Sunada Y. A Second Pedigree with Amyloid-less Familial Alzheimer's Disease Harboring an Identical Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene (E693delta). Intern Med, 54(2):205-208, 2015
- 3) Takayama K, Noguchi Y, Aoki S, Takayama S, Yoshida M, Asari T, Yakushiji F, Nishimatsu S, Ohsawa Y, Itoh F, Negishi Y, Sunada Y, Hayashi Y. Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. J Med Chem, 12;58(3):1544-1549, 2015

2. 学会発表

- 1) 大澤 裕. マイオスタチンプロドメインの Inhibitory core はリガンド受容体結合を阻害する. 第56回日本神経学会学術大会. 新潟. 2015.5.22
- 2) 深井雄太, 大澤 裕, 村上龍文, 砂田芳秀. nNOS/caveolin-3二重変異マウスの骨格筋解析 第56回日本神経学会学術大会. 新潟 2015.5.22
- 3) 大澤 裕, 砂田芳秀, 深井雄太, 藤野雅広, 西松伸一郎, 高山健太郎, 伊東史子, 林 良雄, 土田邦博「筋ジストロフィー関連疾患における TFG-β シグナルの解明と標的医薬の開発」平成 26 年度精神・神経疾患研究開発費 26-8; 西野班班会議 2015 年 12 月 7 日 東京
- 4) 深井雄太, 砂田芳秀, 藤野雅広, 西松伸一郎, 大澤 裕 「筋鞘膜 nNOS はカベオリン3欠損による筋萎縮を抑制する」平成 26 年度精神・神経疾患研究開発費 26-8; 西野班班会議 2015 年 12 月 7 日 東京
- 5) 大澤 裕, 砂田芳秀, 深井雄太, 藤野雅広, 西松伸一郎, 高山健太郎, 伊東史子, 林 良雄, 土田邦博 「筋ジストロフィー関連疾患における TFG-β シグナルの解明と標的医薬の開発」平成 26 年度精神・神経疾患研究開発費; 合同班会議 2016 年 1 月 8 日 東京
- 6) Ohsawa Y. Taurine supplemental therapy prevents stroke-like episodes in MELAS. 10th Japanese-French Workshop. Paris, France, 2015.7.2-4.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明者: 大澤 裕, 砂田芳秀 (学校法人川崎学園)

発明の名称: 「心疾患または筋疾患の診断薬」

特許願提出日: 平成 27 年 12 月 1 日

出願番号: 特願 2015-234714

特許出願人: 学校法人川崎学園

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

先天性筋無力症候群疾患登録システム樹立に向けて

研究分担者 大野 欽司¹⁾

研究要旨

先天性筋無力症候群の疾患登録システム樹立に向けて研究代表者木村らと打ち合わせを行うとともに、英国における筋疾患登録拠点の TREAT-NMD の Professor Hanns Lochmuller (Chair of Experimental Myology, The John Walton Muscular Dystrophy Research Centre, MRC Centre for Neuromuscular Diseases, Institute of Genetic Medicine, Newcastle University, UK)と Professor Ulrike Schara (Paediatric Neurology, University of Essen, Germany)との打ち合わせを開始した。先天性筋無力症候群は世界で 1000 例以下、本邦において 20 例以下しか診断をされておらず orphan diseases の中でも稀な疾患のため国際共同登録システムの樹立が必須であることを確認した。

A. 研究目的

先天性筋無力症候群の疾患登録システム樹立に向けた環境整備を行うことを目的とする。また、本邦における先天性筋無力症候群の診断精度の向上を目的とした次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断の診断体制の整備を行う。

B. 研究方法

過去の自らの分子病態研究成果と関連文献の精読により先天性筋無力症候群の疾患登録システムの入力項目の検討を行い、木村研究代表、Prof. Hanns Lochmuller, Prof. Ulrike Schara と意見のすり合わせを行った。

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、MacroGen 社に依頼し、Illumina HiSeq X により x30 coverage で whole genome resequencing 解析を行った。

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疾患登録システムのための入力項目の素案を作成した。

本邦の先天性筋無力症候群疑い 9 例のコンサルテーションを受け、8 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。

D. 考察

本邦の先天性筋無力症候群の 9 割を超える症例の解析を本報告者が行っており、筋ジストロフィーとは異なる

1) 名古屋大学 医学系研究科 神経遺伝情報学

疾患登録システムの樹立が必要と思われる。主治医の遺伝子解析依頼のための紹介状と疾患登録システムをリンクさせた取組、ならびに、2段階の疾患登録システムの導入の必要性を議論した。

E. 結論

先天性筋無力症候群の疾患登録システムの樹立に向けたドラフト案の作成を行った。本邦における3例の新規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. 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. *Neuromuscul Disord* 2015, 25: 60-69.
2. Matsushita M, Hasegawa S, Kitoh H, Mori K, Ohkawara B, Yasoda A, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine promotes longitudinal skeletal growth in transgenic mice with achondroplasia carrying a gain-of-function mutation in the FGFR3 gene. *Endocrinology* 2015, 156: 548-554.
3. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. *CHCHD2* mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol* 2015, 14: 274-282.
4. Tsunoda M, Hirayama M, Tsuda T, Ohno K. Noninvasive monitoring of plasma l-dopa concentrations using sweat samples in Parkinson's disease. *Clin Chim Acta* 2015, 442: 52-55.
5. Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Iwamoto T, Qiao S, Ohkuwa T, Ichihara M. Simultaneous oral and inhalational intake of molecular hydrogen additively suppresses signaling pathways in rodents. *Mol Cell Biochem* 2015, 403: 231-241.
6. Masuda A, Takeda J, Okuno T, Okamoto T, Ohkawara B, Ito M, Ishigaki S, Sobue G, Ohno K. Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length. *Genes Dev* 2015, 29: 1045-1057.
7. Selcen D, Ohkawara B, Shen XM, McEvoy K, Ohno K, Engel AG. Impaired Synaptic Development, Maintenance, and Neuromuscular Transmission in LRP4-Related Myasthenia. *JAMA Neurol* 2015, 72: 889-896.
8. Udagawa T, Fujioka Y, Tanaka M, Honda D, Yokoi S, Riku Y, Ibi D, Nagai T, Yamada K, Watanabe H, Katsuno M, Inada T, Ohno K, Sokabe M, Okado H, Ishigaki S, Sobue G. FUS regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nat Commun* 2015, 6: 7098.
9. Fujii H, Matsubara K, Sakai K, Ito M, Ohno K, Ueda M, Yamamoto A. Dopaminergic differentiation of stem cells from human deciduous teeth and their therapeutic benefits for Parkinsonian rats. *Brain Res* 2015, 1613: 59-72.
10. Iwata S, Ito M, Nakata T, Noguchi Y, Okuno T, Ohkawara B, Masuda A, Goto T, Adachi M, Osaka H, Nonaka R, Arikawa-Hirasawa E, Ohno K. A missense mutation in domain III in HSPG2 in Schwartz-Jampel syndrome compromises secretion of perlecan into the extracellular space. *Neuromuscul Disord* 2015, 25: 667-671.
11. Rahman MA, Azuma Y, Nasrin F, Takeda J, Nazim M, Ahsan KB, Masuda A, Engel AG, Ohno K. SRSF1 and hnRNP H antagonistically regulate splicing of COLQ exon 16 in a congenital myasthenic syndrome. *Sci Rep* 2015, 5: 13208.
12. Kishimoto Y, Kato T, Ito M, Azuma Y, Fukasawa Y, Ohno K, Kojima S. Hydrogen ameliorates pulmonary hypertension in rats by anti-inflammatory and antioxidant effects. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015, 150: 645-654 e643.
13. Otsuka K, Ito M, Ohkawara B, Masuda A, Kawakami Y, Sahashi K, Nishida H, Mabuchi N, Takano A, Engel AG, Ohno K. Collagen Q and anti-MuSK

- autoantibody competitively suppress agrin/LRP4/MuSK signaling. *Sci Rep* 2015, 5: 13928.
14. Yagi H, Ohkawara B, Nakashima H, Ito K, Tsushima M, Ishii H, Noto K, Ohta K, Masuda M, Imagama S, Ishiguro N, Ohno K. Zonisamide enhances neurite elongation of primary motor neurons and facilitates peripheral nerve regeneration in vitro and in a mouse model. *PLoS One* 2015, 10: e0142786.
 15. Hasegawa S, Goto S, Tsuji H, Okuno T, Asahara T, Nomoto K, Shibata A, Fujisawa Y, Okamoto A, Ohno K, Hirayama M. Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease. *PLoS One* 2015, 10: e0142164.
 16. Imai K, Kotani T, Tsuda H, Mano Y, Nakano T, Ushida T, Hirako S, Li H, Miki R, Sumigama S, Iwase A, Hirakawa A, Ohno K, Toyokuni S, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A, Kikkawa F. Neuroprotective potential of molecular hydrogen against perinatal brain injury via suppression of activated microglia. *Free Radical Biol Med*, 2016, 91: 154-163.
 17. Mishima K, Kitoh H, Ohkawara B, Okuno T, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Lansoprazole upregulates polyubiquitination of TRAF6 and facilitates Runx2-mediated osteoblastogenesis. *EBioMedicine*, in press.
 18. Hasegawa S, Ito M, Fukami M, Hashimoto M, Hirayama M, Ohno K. Molecular hydrogen alleviates motor deficits and muscle degeneration in mdx mice. *Redox Report*, in press.
 19. Hasegawa S, Kitoh H, Ohkawara B, Mishima K, Matsushita M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Tranilast stimulates endochondral ossification by upregulating SOX9 and RUNX2 promoters. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470: 356-361.
 20. Muramatsu Y, Ito M, Oshima T, Kojima S, Ohno K. Hydrogen-rich water ameliorates bronchopulmonary dysplasia (BPD) in newborn rats. *Pediatr Pulmonol*, in press.
 21. Gao K, Wang J, Li I, Zhai Y, Ren Y, You H, Wang B, Wu X, Li J, Liu Z, Li X, Huang Y, Luo X, Hu D, Ohno K, Wang C. Polymorphisms in four genes (KCNQ1 rs151290, KLF14 rs972283, GCKR rs780094 and MTNR1B rs10830963) and their correlation with type 2 diabetes mellitus in Han Chinese in Henan Province, China. *Int J Environ Res Public Health*, in press.
 22. Shibata A, Okuno T, Rahman MA, Azuma Y, Takeda J, Masuda A, Ohno K. IntSplice: Prediction of the splicing consequences of intronic single nucleotide variations in the human genome. *J Hum Genet*, in press.
- 【Chapters in Books】**
1. Ito M, Ohno K. A hereditary mutation in Schwartz-Jampel syndrome. *Atlas of Science*. AoS Nordic AB, Stockholm, 2015, <http://atlasofscience.org/a-hereditary-mutation-in-schwartz-jampel-syndrome/> (査読有)
 2. Masuda A, Ohno K. Neurodegeneration-associated RNA-binding protein, FUS, regulates mRNA length. *Atlas of Science*. AoS Nordic AB, Stockholm, 2016, <http://atlasofscience.org/neurodegeneration-associated-rna-binding-protein-fus-regulates-mrna-length/> (査読有)
- 【Reviews】**
1. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohno K. Decoding abnormal splicing code in human diseases. *J Investig Genomics* 2015, 2: 00016. (査読有)
 2. Ichihara M, Sobue S, Ito M, Ito M, Hirayama M, Ohno K. Beneficial biological effects and the underlying mechanisms of molecular hydrogen - Comprehensive review of 321 original articles -. *Med Gas Res* 2015, 5: 12. (査読有)
 3. Rahman MA, Ohno K. Splicing aberrations in congenital myasthenic syndromes. *J Investig Genomics*, 2015, 2: 00038. (査読有)
 4. Masuda A, Takeda J, Ohno K. FUS-mediated regulation of alternative RNA processing in neurons: insights from global transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, in press (査読有)
- 【Chapters in Books in Japanese】**
1. 大野 欽司「終板アセチルコリン受容体欠損症(アセチルコリン受容体サブユニット変異)」pp402-408 日本臨牀社、大阪、2015
 2. 大野 欽司「スローチャンネル症候群、ファーストチャンネル症候群(アセチルコリン受容体サブユニット変異)」骨格筋症候群(第2版)下 (別冊日本臨牀 新領域

- 別症候群シリーズ No. 33)pp409-417 日本臨牀社、大阪、2015
3. 大野欽司「終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症 (コラーゲン Q 変異)」骨格筋症候群(第2版)下 (別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 33)pp 418-424 日本臨牀社、大阪、2015
 4. 大野欽司「発作性無呼吸を伴う先天性筋無力症候群 (コリンアセチルトランスフェラーゼ・骨格筋ナトリウムチャンネル変異)」骨格筋症候群(第2版)下 (別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 33)pp425-430 日本臨牀社、大阪、2015
 5. 大野欽司「神経筋接合部シグナル分子欠損による先天性筋無力症候群(アグリン, LRP4, MuSK, Dok-7 変異)」骨格筋症候群(第2版)下 (別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 33)pp431-435 日本臨牀社、大阪、2015.
 6. 大野欽司「構造タンパク欠損と糖化酵素欠損による先天性筋無力症候群(ラプシン、プレクチン、 β 2 ラミニン、GFPT1, DPAGT1, ALG2, ALG4 変異)」骨格筋症候群(第2版)下 (別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 33)pp436-440 日本臨牀社、大阪、2015
2. 学会発表
- 【Invited Presentations at Scientific Meetings】**
1. Ohno K
Physiology and hereditary/autoimmune pathology of acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction
10th Japanese-French Workshop“New advances in treatments of neuromuscular diseases: From Basic to Applied Myology”, Paris, France
July 2-4, 2015
 2. Ohno K
Roles of collagen Q in MuSK antibody positive myasthenia gravis
12th International Meeting of Cholinesterases, Alicante, Spain
Sep 27-Oct 2, 2015
- 【Presentations at Scientific Meetings】**
1. 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
Neurology 2015, 84(14): (Suppl P2): 021
 2. Selcen D, Ohkawara B, Shen X-M, McEvoy K, Ohno K, Engel AG
LRP4 Myasthenia. Investigation of second kinship reveals impaired development and maintenance of the neuromuscular junction.
20th International WMS Congress (Poster), Brighton, UK
Sep 30-Oct 4, 2015
Neuromuscular Disorders 25: (Suppl 2) : S186–S187
 3. Sobue S, Inoue C, Hori F, Ito M, Ohno K, Ichihara M
Molecular hydrogen is a novel antioxidant to reduce oxidative stress and attenuate disease progression through modification of cell signaling and gene expressions
15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants (Poster), Paris, France
June 22-24, 2015
 4. Ishihara N, Azuma Y, Nakata T, Takeuchi T, Okuno T, Ohno K, Natsume J.
LGI2 heterozygous variant identified in a Japanese family with autosomal dominant cryptogenic West syndrome
65th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), Baltimore, Maryland, USA
Oct 6 - 10, 2015
 5. Bruun GH, Doktor TK, Masuda A, Krainer AR, Ohno K, Andresen BS.
Global binding map of the splicing regulatory factor SRSF5
65th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), Baltimore, Maryland, USA
Oct 6 - 10, 2015
 6. Takegami Y, Ohkawara B, Seki T, Ohno K, Ishiguro N
R-spondin2 is a critical factor for extracellular matrix production and chondrogenesis via Wnt/ β -catenin signaling pathway

ORS 2016 Annual Meeting (Poster),

Orlando, Florida, USA

Mar 5 - 8, 2016

7. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Sugiura H,
Hasegawa S, Ishiguro N, Ohno K
Radical therapeutic strategy for foramen magnum
stenosis and spinal canal stenosis in achondroplasia
ORS 2016 Annual Meeting (Platform)),
Orlando, Florida, USA
Mar 5 - 8, 2016

8. Kishimoto Y, Ohkawara B, Miyamoto K, Ishiguro N,
Ohno K, Sakai T
Wnt/ β -catenin Signaling Contributes To Gene
Expressions Related In Tendon Differentiation And
Homeostasis
ORS 2016 Annual Meeting (Platform)),
Orlando, Florida, USA
Mar 5 - 8, 2016

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

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬開発に関する FDA ガイダンスに関する研究

研究分担者 米本 直裕¹⁾

研究要旨

2015 年 6 月に米国 FDA から刊行されたデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬開発に関するガイダンスに関して分析を行い、本邦における治療薬開発への適応について検討を行った。規制当局の立場から企業が治療薬開発において検討すべきポイント、リストを提示されていた。本邦での臨床試験のみならず臨床研究を行う上でも参考となるものであった。

A. 研究目的

米国 FDA のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬開発に関するガイダンスに関して分析を行い、本邦における治療薬開発への適応について検討を行う。

B. 研究方法

FDA ガイダンスの各項目について、臨床研究としての課題、わが国での適応可能性について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は文献研究である。

C. 研究結果

2015 年 6 月に米国 FDA から刊行されたデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬開発に関するガイダンス

(Duchenne Muscular Dystrophy and Related

Dystrophinopathies: Developing Drugs for Treatment

Guidance for Industry) は企業の開発者向けに、規制

当局(米国 FDA)が治療薬の開発方針について示したも

のであり、ドラフト版 13 ページである。1.イントロダクション、

2.背景、3.開発プログラム、の 3 章があり、3.開発プログラ

ムは、A. 一般的な事項、B. 有効性試験に関する特定の

事項、C. その他 にわかれる。

A. 一般的な事項 では、臨床開発の早期段階での課題、

開発の対象者の選択、有効性、安全性の評価における

課題について記載されていた。

B. 有効性試験に関する特定の事項 では、1. 研究デザイン、特にランダム化比較試験、適切な対照群の設定について、2. 研究の対象集団、特に適切な対象集団設定とバイオマーカーについて、3. 有効性エンドポイント、特に複数のエンドポイントの設定に患者報告アウトカム (Patient Reported Outcomes)、小児での年齢に応じた検査について、4. 研究手順と評価時期 5. エンドポイントの判定、特にブラインドについて、6. 統計学的考察、7. 迅速承認(Subpart H)の考察、8. ベネフィットとリスク が記載されていた。

C. その他 では、非臨床と安全性、薬物動態、結果の外挿、一般化可能性について記載されていた。

D. 考察

本ガイダンスは、わが国での企業主導の治験(臨床試験)のみならず、医師および研究者主導の臨床研究にも示唆に富むものであった。特に、開発を特定の対象者に限定することは、有効性を示すには有用かもしれないが、一般化可能性に課題を残すかもしれないこと、有効性、安全性の指標において複数のエンドポイントを設定する場合、多重比較などの解析上の問題、エンドポイントの客観性、妥当性について検討する必要があること、安全性評価委員会の設置、児の発達にあわせた評価、評価時期の検討が必要であること、は今後行われる研究の計画で考慮すべき点であると考えらる。

E. 結論

本ガイダンスは、規制当局の立場から企業が治療薬開発において検討すべきポイント、リストを提示したものであったが、わが国での臨床試験のみならず臨床研究を行う上で考慮すべき事項が記載されていた。

1) 国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 精神薬理研究部

F. 健康危険情報

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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

希少疾患の系統的レビュー作成に関する考察

研究分担者 渡辺 範雄¹⁾

研究協力者 本橋 裕子²⁾, 村上 てるみ³⁾, 木村 円⁴⁾

研究要旨

治療介入の効果を検証する研究では、強いエビデンスを創出する研究デザイン、特に無作為割付対照試験(randomized controlled trial: RCT)や、RCTを収集・質を評価したうえで統計的手法を用いて統合することで偶然誤差を減じたエビデンスをもたらす系統的レビュー・メタアナリシスが用いられるべきである。しかしながら、筋ジストロフィーや多発性硬化症等の希少疾患では、そもそも施行・発表されている RCT の数が他領域に比較して圧倒的に少なく、系統的レビューやメタアナリシスもほとんど行われていない。

それでもなお、少ない RCT から系統的レビューを行い、診療に役立つエビデンスを創出することが必要と考えられる。

そのため、今年度は研究協力者を募り、希少疾患における系統的レビューを作成する体制作りを行った。具体的方法として、系統的レビュー・メタアナリシスの実施経験がほとんどない研究者らとともにこれらの研究の概要・意義・手順等を講義や演習、インターネット接続による遠隔ミーティング等により習得し、チームとして系統的レビュー・メタアナリシスを実施できる体制を構築した。またこの過程で、希少疾患を対象とする系統的レビューの問題点を抽出した。さらに、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキッピング薬剤をテーマとした研究計画書を完成し、実際に系統的レビュー・メタアナリシスを開始した。

A. 研究目的

治療介入の効果を検証する研究では、無作為割付対照試験(randomized controlled trial: RCT)や、RCTを収集・質を評価したうえで統計的手法を用いて統合することで偶然誤差を減じたエビデンスをもたらす系統的レビ

ュー・メタアナリシスが用いられるべきである。しかしながら、筋ジストロフィーや多発性硬化症等の希少疾患では、そもそも施行・発表されている RCT の数が他領域に比較して圧倒的に少なく、系統的レビューやメタアナリシスもほとんど行われていない。

RCT が少ない要因として、昨年度までの本研究で、患者数がもともと少なく研究に組み入れることのできる症例が多くはないため十分な症例数のある無作為割付け対照試験は組みづらいこと、希少疾患ゆえに予後や自然経過に関する知見が不十分でそれゆえに治療介入の研究が難しいことなどがあることが明らかとなった。

それでもなお、治療につながる臨床決断は必要であり、少ない RCT から系統的レビューを行い、診療に役立つエビデンスを創出することが必要と考えられる。

そのため、今年度は研究協力者を募り、希少疾患における系統的レビューを作成する体制作りを行なうことを目的とした。加えて、この過程において希少疾患を対象とする系統的レビューやガイドライン作成の問題点を抽出して、今後の系統的レビュー作成に活用することを目指した。

B. 研究方法

まず希少疾患研究におけるエキスパートの意見をもとに、系統的レビュー・メタアナリシスの実施経験がほとんどないながらも臨床研究の経験を持ち、また研究にモチベーションの高い研究協力者の抽出を行った。そのうえで研究チームを組織し、下記のようなカリキュラムで系統的に系統的レビュー・メタアナリシスの講義・演習を行った。

1. 系統的レビュー・メタアナリシスのルーツ
2. その重要性
3. 作成方法

1) 京都大学大学院医学研究科 社会健康医学系専攻 健康増進・行動学分野

2) 国立精神・神経医療研究センター 病院 小児神経科

3) 東京女子医科大学病院 小児科

4) 国立精神・神経医療研究センター トラスレーショナル・メディカルセンター

4. 限界点
5. 最近のトレンド
6. 統計ソフトウェア演習

追加として、GRADE システムを利用した系統的レビュー・診療ガイドライン作成方法に関する講義を行った。ソフトウェア演習では、演習用の実地データを用いてメタアナリシスを実行するところまで行った。

またその後のミーティングによって、実際に系統的レビュー・メタアナリシスの研究計画書を作成した。

さらに、希少疾患における系統的レビュー・診療ガイドラインにおける留意点・限界点等の文献レビューを行い、抽出した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床研究体制作りと、方法論に関する文献レビューであるため、倫理面への配慮は特に必要なく、万が一ある場合にも一次研究で既になされていると考えられる。また本研究は、個人情報等が明らかになる可能性は皆無である。

C. 研究結果

モチベーションの高い若手研究者を研究協力者として得ることができ、計 3 回の講義・演習と 10 回のミーティングを行った。

途中、分担研究者の転任によるインターネットを介した遠隔ミーティングも行ったが、特に問題なく効率的な会合が可能であった。

結果としてチームとしての系統的レビュー・メタアナリシスを行う体制が構築された。さらに、Exon skipping for Duchenne Muscular Dystrophy と題した系統的レビューの研究計画書が完成した。来年度はこの計画書を基盤として実際にレビューを行ってエビデンスをまとめるとともに、Read through に関してもチームで系統的レビューを行う予定である。

また文献検索によって、希少疾患の系統的レビュー・診療ガイドラインの特徴・限界点は下記のことになった。

診療ガイドラインの作成における促進因子と阻害因子 (Pai M, et al. Rare Diseases 2015; e1058463-1)

促進因子:

- 希少疾患ではその方法論がまだ発展途上と考えられるため、方法論発展のために RARE-Bestpractices のような公共研究資金が与えられるべきである。
- 他の疾患でも診療ガイドライン作成について積極的

に用いられている GRADE システムによるエビデンスのサマリー、質の評価、診療における推奨作成の透明性担保を希少疾患においても求められる。

阻害因子:

- 希少疾患に関するデータ公表は少なく、質も低い。
- 臨床において最重要と考えられるアウトカムや、患者の価値観や好みに関するアウトカムにおいても、まったく既存のエビデンスがないことがありうる。

D. 考察

一般疾患とは異なり、希少疾患には系統的レビュー・メタアナリシスや診療ガイドライン作成を行うための阻害要因があること、しかしこれらを行うことは不可欠でそのための体制作りは可能であることが明らかになった。

今年度完成した研究計画を、今後実施していく過程でさらに本領域の研究を進めるための示唆が蓄積されることが期待される。

E. 結論

希少疾患においては、系統的レビュー、診療ガイドラインの作成は困難があるものの、正しくチーム編成・教育・演習を行うことで可能であると考えられる。今後のこの領域の系統的レビューの増加が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yonemoto N, Watanabe N, et al. Strategic use of new generation antidepressants for depression: SUN(^_^) D protocol update and statistical analysis plan. *Trials* 2015; **16**(1): 459.
- 2) Watanabe N, et al. Adding smartphone-based cognitive-behavior therapy to pharmacotherapy for major depression (FLATT project): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015; **16**(1): 293.
- 3) Watanabe N, et al. Cost-effectiveness of cognitive behavioral therapy for insomnia comorbid with depression: Analysis of a randomized controlled trial. *Psychiatry Clin Neurosci* 2015; **69**(6): 335-43.
- 4) Sato T, Murakami T, et al. Respiratory management of patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Brain Dev.* 2016 Mar;38(3):324-30.
- 5) Shimizu-Motohashi Y, et al. Pregnancy-induced

amelioration of muscular dystrophy phenotype in mdx mice via muscle membrane stabilization effect of glucocorticoid. *PLoS One*. 2015; 16; 10(3): e0120325.

- 6) Motoki T, Shimizu-Motohashi Y, et al. Treatable renal failure found in non-ambulatory Duchenne muscular dystrophy patients. *Neuromuscul Disord*. 2015; 25(10): 754-7.
- 7) Kubota K, Shimizu-Motohashi Y, et al. The long-term health impact and potential predictors of cardiopulmonary arrest in patients with childhood-onset psychomotor impairments. *Brain Dev*. 2015; pii: S0387-7604.
- 8) 渡辺範雄. 展望: 大規模データベース研究の歴史、可能性と限界点. *臨床精神薬理* 2015; 18(8): 975-80.

2. 学会発表

- 1) 渡辺範雄. 臨床研究デザインワークショップ: 研究デザインを考える. 第33回日本神経治療学会総会; 2015 11月26日-11月28日; 名古屋国際会議場: 日本神経治療学会; 2015.
- 2) 渡辺範雄. 教育・研究入門講座: 疫学調査研究の基本的手法と論文文化について. 第34回日本社会精神医学会; 2015 3月5日-6日; 富山: 第34回日本社会精神医学会
- 3) 村上てるみ、内山朋香、中山貴博、石黒久美子、佐藤孝俊、久留聡、石垣景子. 福山型先天性筋ジストロフィー患者における生体電気インピーダンス法による発達・成長の評価 第57回小児神経学会総会. 2015 5月27日-5月30日.大阪
- 4) Shimizu-Motohashi Y. The unmet needs in the respite service for the family with neurological disorder. 第118回日本小児科学会学術集会/ Asian Society for Pediatric Research; 2015 4月15日-19日; 大阪 .
- 5) Shimizu-Motohashi Y. Glucocorticoid-induced muscle membrane stabilization in mdx mice during pregnancy. 第一回日本筋学会学術集会; 2015 8月8日; 東京
- 6) Murakami T, et al. Assessment of growth and development in patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy using bioelectrical impedance analysis. 30th World Muscle Society 2015. 9. 30-10.4 Briton England

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍
なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishikawa A, Mori-Yoshimura M , Segawa K, Hayashi YK, Takahashi T, Saito Y, Nonaka I, Krahn M, Levy N, Shimizu J, Mitsui J, Kimura E , Goto J, Yonemoto N, Aoki M , <i>et al.</i>	Respiratory and cardiac function in Japanese patients with dysferlinopathy.	Muscle Nerve	53 (3)	394-401	2016
Izumi R, Niihori T, T akahashi T, Suzuki N, Tateyama M, Watana be C, Sugie K, Nakani shi H, Sobue G, Kato M, Warita H, Aoki Y, Aoki M .	Genetic profile for suspected dysferlinopathy identified by targeted next-generation sequencing.	Neurol Genet	1	e36	2015
Yamashita S , Mori A, Nishida Y, Kurisaki R, Tawara N, Nishikami T, Misumi Y, Ueyama H, <i>et al.</i>	Clinicopathological features of the first Asian family having vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy due to a <i>MATR3</i> mutation.	Neuropathol Appl Neurobiol	41	391-398	2015
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	Neuromuscul Disord	25	60-69	2015
Selcen D, Ohkawara B, Shen XM, McEvoy K, Ohno K , Engel AG.	Impaired Synaptic Development, Maintenance, and Neuromuscular Transmission in LRP4-Related Myasthenia	JAMA Neurol	72	889-896	2015
Rahman MA, Azuma Y, Nasrin F, Takeda J, Nazim M, Ahsan KB, Masuda A, Engel AG, Ohno K .	SRSF1 and hnRNP H antagonistically regulate splicing of COLQ exon 16 in a congenital myasthenic syndrome	Sci Rep	5	13208	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe N , Horikoshi M, Yamada M, Shimodera S, Akechi T, Miki K, Inagaki M, Yonemoto N , <i>et al.</i>	Adding smartphone-based cognitive-behavior therapy to pharmacotherapy for major depression (FLATT project): study protocol for a randomized controlled trial	<i>Trials</i>	16	293	2015
Watanabe N , Furukawa TA, Shimodera S, Katsuki F, Fujita H, Sasaki M, Sado M, Perlis ML.	Cost-effectiveness of cognitive behavioral therapy for insomnia comorbid with depression: Analysis of a randomized controlled trial	<i>Psychiatry Clin Neurosc</i>	69	335-343	2015