

厚生労働科学研究費補助金

(難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業))

## 希少難治性筋疾患に関する調査研究

平成 26～28 年度 総合研究報告書

研究代表者 青木 正志

東北大学大学院医学系研究科

神経・感覚器病態学講座神経内科学分野

平成 29 年 3 月

## 班体制

### 希少難治性筋疾患に関する調査研究

|       |       |                             |
|-------|-------|-----------------------------|
| 研究代表者 | 青木 正志 | 東北大学大学院医学系研究科 神経内科学分野       |
| 研究分担者 | 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 |
|       | 林 由起子 | 東京医科大学病態生理学分野               |
|       | 小牧 宏文 | 国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科     |
|       | 高橋 正紀 | 大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学         |
|       | 平澤 恵理 | 順天堂大学大学院 老人性疾患病態治療研究センター    |
|       | 大野 欽司 | 名古屋大学医学系研究科神経遺伝情報学          |
|       | 杉江 和馬 | 奈良県立医科大学 神経内科               |
| 事務局   | 鈴木 直輝 | 東北大学 神経内科                   |

# 目 次

## I. 総合研究報告書

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| 希少難治性筋疾患に関する調査研究.....       | 1 |
| 東北大学 大学院医学系研究科 神経内科学分野 青木正志 |   |

## II. 分担研究報告書

|  |    |
|--|----|
| 1. 封入体筋炎を中心とする炎症性筋疾患の調査研究と炎症性筋疾患識別マーカーの開発.....                           | 9  |
| 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 西野一三  |    |
| 2. マリネスコ・シェーグレン症候群および FHL ミオパチーに関する調査研究.....                             | 15 |
| 東京医科大学病態生理学分野 林由起子   |    |
| 3. 先天性ミオパチーの患者登録システムの構築.....   | 20 |
| 国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科 小牧宏文  |    |
| 4. 本邦における筋チャンネル病.....  | 25 |
| 診療手引き作成、患者 QOL 全国調査および孤発性周期性四肢麻痺の遺伝的背景の検討<br>大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学講座 高橋正紀 |    |
| 5. Schwartz-Jampel 症候群の病態解明と調査.....                                      | 29 |
| 順天堂大学大学院医学研究科 老人性疾患病態治療研究センター 平澤恵理                                       |    |
| 6. 先天性筋無力症候群.....  | 35 |
| 名古屋大学 医学系研究科 神経遺伝情報学 大野欽司  |    |
| 7. 自己貪食空胞性ミオパチーの実態調査と診療ガイドライン作成の試み.....                                  | 46 |
| 公立大学法人奈良県立医科大学 神経内科 杉江和馬   |    |

### III. 協力者研究報告書

|  |    |
|--|----|
| 1. 封入体筋炎の臨床的問題.....  | 54 |
| 国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科 森 まどか   |    |
| 2. 封入体筋炎におけるオートファジー初期過程の障害.....  | 56 |
| 関西医科大学 神経内科 日下博文   |    |
| 3. IBM における HTLV-1 感染およびミトコンドリア機能障害に関する研究 .....  | 60 |
| 鹿児島大学医学部保健学科理学療法学専攻 基礎理学療法学講座 樋口逸郎   |    |
| 4. ①H26 年度「骨格筋再生過程における Myostatin および関連蛋白の検討」<br>②H27 年度「中條西村症候群と IBM の臨床像・筋病理像の比較」<br>③H28 年度「中條西村症候群の臨床病態の解析 -IBM との比較-」..... | 62 |
| 和歌山県立医科大学 神経内科 村田顕也  |    |
| 5. 孤発性封入体筋炎の病態における抗 NT5C1A 抗体の意義.....  | 72 |
| 熊本大学大学院医学薬学研究部 神経内科学分野 山下 賢  |    |
| 6. 封入体筋炎の生理学的特徴検出の検討.....  | 82 |
| 徳島大学神経内科 梶 龍兒  |    |
| IV. 研究成果の刊行に関する一覧表.....  | 84 |

## 「希少難治性筋疾患に関する調査研究」

研究代表者：青木 正志  
東北大学 大学院医学系研究科 神経内科 教授

### 研究要旨

本研究班は平成 21 年度に開始された研究奨励分野での研究成果を元に、希少難治性筋疾患の中でも(1) 周期性四肢麻痺、非ジストロフィー性ミオトニー症候群といった筋チャネル病、(1) 先天性筋無力症候群、(2) Schwartz-Jampel 症候群、(3) Danon 病や過剰自己貪食を伴う X連鎖性ミオパチーなどの「自己貪食空胞性ミオパチー」、(4) 封入体筋炎、(5) 先天性ミオパチー、(6) 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（GNE ミオパチー）、(7) 眼・咽頭遠位型ミオパチー、(8) 三好型ミオパチー（およびその他の遠位型）、(9) マリネスコシェーグレン症候群、(10) ベスレムミオパチー・ウルリッヒミオパチーを対象として研究を続けてきている。平成 27 年 1 月からウルリッヒ病、自己貪食空胞性ミオパチー、Schwartz-Jampel 症候群は、小児慢性特定疾患治療研究事業の対象疾患に、さらに遠位型ミオパチー、先天性筋無力症候群、封入体筋炎、ベスレムミオパチーは指定難病とされ、個人調査票の作製に貢献した。これらの疾患に対しては診断基準を作成し、全国での患者数の把握、診断ガイドラインの策定を行ってきた。さらに診断基準・ガイドラインの策定や患者数調査にとどまらず、患者検体（DNA、筋生検サンプル、線維芽細胞）を合わせて収集することで、今後の病態研究の基盤整備を行った。診断精度の向上を目的とした遺伝子診断の診断体制の整備も、次世代シーケンサーを用いたスクリーニングを含めて行った。

### 研究分担者

西野 一三 （独立行政法人 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）  
林 由起子 （東京医科大学医学部医学科 病態生理学分野・主任教授）  
小牧 宏文 （国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経診療部 医長）  
高橋 正紀 （大阪大学大学院医学系研究科

保健学専攻 機能診断科学講座 臨床神経生理学研究室 教授）

平澤 恵理 （順天堂大学大学院医学研究科 老人性疾患病態治療研究センター 教授）

大野 欽司 （名古屋大学大学院医学系研究科 神経遺伝情報学 教授）

杉江 和馬 （公立大学法人 奈良県立医科大学 神経内科 准教授）

## 研究協力者

櫻井 英俊 (京都大学 iPS 細胞研究所  
臨床応用研究部門)

漆葉 章典 (独立行政法人 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 臨床開発部)

石山 昭彦 (独立行政法人 国立精神・神  
経医療研究センター病院 小  
児神経診療部)

大久保真理子 (独立行政法人 国立精神・神  
経医療研究センター病院 小  
児神経診療部)

竹下 絵里 (独立行政法人 国立精神・神経  
医療研究センター病院 臨床  
検査部)

米川 貴博 (独立行政法人 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)

伊藤美佳子 (名古屋大学大学院医学系研究  
科 神経遺伝情報学)

寧 亮 (順天堂大学大学院医学研究  
科)

野中 里紗 (順天堂大学大学院医学研究  
科)

木下 正信 (首都大学東京健康福祉学部・  
教授)

松浦 徹 (岡山大学大学院医歯薬学総合  
研究科 脳神経内科学・准教  
授)

佐々木良元 (三重大学医学部附属病院 神  
経内科)

古田 充 (大阪大学医学部附属病院 神  
経内科・脳卒中科)

森まどか (国立精神・神経医療研究セン  
ター病院 神経内科・医師)

日下 博文 (関西医科大学 神経内科・教  
授)

樋口 逸郎 (鹿児島大学医学部保健学科  
理学療法学専攻 基礎理学療

## 法学講座・教授)

村田 顕也 (和歌山県立医科大学 神経内  
科・准教授)

山下 賢 (熊本大学 神経内科・准教授)

梶 龍兒 (徳島大学 神経内科・教授)

織田友理子 (NPO 法人 PADM)

## A. 研究目的

本研究班では希少難治性筋疾患として

(1) 周期性四肢麻痺、非ジストロフィー  
性ミオトニー症候群といった筋チャンネル病

(1') 先天性筋無力症候群

(2) Schwartz-Jampel 症候群

(3) Danon 病や過剰自己食食を伴う X 連  
鎖性ミオパチーなどの「自己食食空胞性ミオ  
パチー」

(4) 封入体筋炎

(5) 先天性ミオパチー

さらに、平成 25 年度より

(6) 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー  
(DMRV または GNE ミオパチー)

(7) 眼・咽頭遠位型ミオパチー

(8) 三好型ミオパチー

(9) Marinesco-Sjögren 症候群

(10) ベスレムミオパチー

を対象として扱ってきた。各疾患の診断基準  
の策定・臨床調査・検体の収集・診療の手引  
き作製のための情報収集が目的であった。

**封入体筋炎**は骨格筋に縁取り空胞と呼ばれ  
る特徴的な組織変化を生じ炎症細胞浸潤を伴  
う疾患である。ステロイドや免疫グロブリン  
大量療法といった免疫学的治療に不応もしく  
は増悪することもあり、有効な治療法は無  
い。封入体筋炎の診断基準は 1995 年に  
Griggs らが提唱したものが改変され使用さ  
れているが多発筋炎との病理学的相違が問題  
になる例も多く、現行基準は見直しが必要で  
ある。また診断マーカーや有病率の評価など  
も求められている。また**三好型ミオパチー**、  
**眼咽頭遠位型ミオパチー**についても未確定診  
断例が多く存在する。

**ベスレムミオパチーとウルリッヒ型先天性  
筋ジストロフィー**は、VI 型コラーゲンをコ  
ードする COL6A1、COL6A2、COL6A3 遺  
伝子変異によって発症する。平成 22 年度  
「ベスレムミオパチーとその類縁疾患の実態  
調査」研究班(西野班)が、1978-2004 年  
の国立精神・神経医療研究センター(当施  
設)の筋病理および遺伝子診断実績に基づい  
て、ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィーの  
患者頻度 0.4-0.8 (10 万対)、ベスレムミオパ

チーは疑い例を含めたとしてもウルリッヒ型先天性筋ジストロフィーの 1/10 程度であることを明らかにした。一方、英国のウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー、ベスレムミオパチーの患者頻度はそれぞれ 0.13 (10 万対)、0.77 (10 万対) と報告されていることから、本邦の実際のベスレムミオパチーの患者数はもっと多いと考えられる。つまり、ベスレムミオパチーの患者のなかには、肢帯型筋ジストロフィーとしてフォローされていたり、筋力低下が軽度で未受診となっている例があると考えられ、ベスレムミオパチー症例の掘り起しが必要である。本研究では、これまでに確保されたベスレムミオパチー例に加え、当施設の凍結生検筋レポジトリーにおいて、臨床像、VI 型コラーゲン免疫染色、COL6A1、COL6A2、COL6A3 遺伝子変異スクリーニングから新たに確保された症例も含め、ベスレムミオパチー症例の掘り起しに役立つ臨床情報を明らかにすることを目的としてきている。

**縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー**は GNE 遺伝子の劣性変異により発症する疾患であり、最近では GNE ミオパチーと呼ばれていることが推奨されている。これまでに、本邦にはおよそ 200-300 人の患者が存在することが推定されることを明らかにしてきた。本疾患においては、既にシアル酸補充療法の第 II 相臨床試験が海外で行われており、平成 27 年度末には本邦でも東北大学および全国の計 5 施設で第 II/III 相試験が開始される。この臨床試験を成功させるためにも、引き続き新たな患者の同定が必要である。

**先天性ミオパチー**は生直後あるいは乳児期早期より全身の筋緊張低下、発達遅滞、呼吸・哺乳障害などを示す遺伝性筋疾患で、筋病理所見の特徴からいくつかの病型に分類されている。これまでに複数の原因遺伝子が明らかになっているが、まだ原因不明のものも多い。本研究では、先天性ミオパチーの各病型頻度、病因、及び臨床管理上の問題点を明らかにし、診断基準の作成を行うことを目的とする。先天性筋疾患の骨格筋画像では筋ごとに障害の程度が異なる筋選択性があることが報告されているが、病型または進行の程度により必ずしも一様なパターンを示さない。臨床所見、検査所見、筋病理所見、分子遺伝学的解析の特徴を統合させ、診断基準、ガイドラインを作成するため、診断に際し多くの施設で実施可能なこの骨格筋画像に着目し、画像データを病型ごとに収集し、解析を行い、臨床、検査、病理、遺伝学的情報との統合をすすめる必要がある。

**Marinesco-Sjögren 症候群**は、小脳失調、精神発達遅滞、先天性白内障、ミオパチーを

特徴とする乳幼児期発症の難治性疾患である。常染色体劣性遺伝形式をとり、その原因遺伝子 SIL1 が同定されている。我々の先行研究から、Marinesco-Sjögren 症候群は本邦での患者数が、50 人以下であることが推測される、きわめて希少な疾患であることが明らかとなった。加えて、乳幼児期に発症するも生命予後に直接関わる合併症が少ないことが示唆された。本研究では、超希少疾病で、かつ経過の長い Marinesco-Sjögren 症候群の臨床的特徴をとらえ、診断基準を作成し、学会承認を目指すことを目的とする。

細胞外マトリックスタンパク質・パールカンをコードする HSPG2 の遺伝子変異によるパールカン機能部分欠損は良性筋疾患 **Schwartz-Jampel 症候群**を惹起する。平澤等が、米国で診断した邦人例の他、本邦で遺伝子変異が確定をした Schwartz-Jampel 症候群はまだなく、潜在的な罹患者の存在が想定される。本研究の目的は、本邦における Schwartz-Jampel 症候群の遺伝子診断を確立し、その分子病態を明らかにすることである。

骨格筋の電氣的興奮・収縮などに不可欠なイオンチャネルの遺伝子異常が周期性四肢麻痺、ミオトニーなどの疾患の原因となることが判明した。これらは「チャネル病」と総称される疾患に含まれる。これら**骨格筋チャネル病**は、疾患として気づかれていない軽症例から、筋萎縮・筋力低下を呈する重症例まである。さらに、専門医であっても経験することが稀で、診断・治療などに困難を伴うことが多い。我々の 21 年度の調査から、遺伝子診断施行率が低く確定診断例が非常に少ないこと、臨床徴候（特にミオトニー症候群）に対する認識が低く見逃されている可能性のあることが浮き彫りになった。そこで、診断確定症例を増やし、臨床情報・電気生理検査所見を蓄積することにより、より精度の高い診断基準・検査指針の策定につなげることを目的とした。また、特に原因となる遺伝子異常が同定されないことの多い低カリウム性周期性四肢麻痺について、次世代シーケンサーによる網羅的解析を精力的に行い、原因遺伝子を同定することも目的とした。さらに**先天性筋無力症候群**に関しても対象疾患としている。

**自己貪食空胞性ミオパチー**は、筋鞘膜の性質を有する特異な自己貪食空胞 (AVSF) を伴う筋疾患で、代表疾患として Danon 病や過剰自己貪食を伴う X 連鎖性ミオパチー

(XMEA) がある。病態や発症機序は未解明なため、疾患概念確立に向け診断基準作成を試みた。また自己貪食空胞性ミオパチーの全国実態調査を行い、臨床的および筋病理学的

特徴を見出した。

## B. 研究方法

封入体筋炎については新たな診断基準に基づき患者登録、患者検体の集積およびそれを利用した解析研究を行う。本研究代表者・青木が研究を分担する「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）拠点(代表 松原洋一)」および、本申請研究分担者・林が研究を分担する「同・一般研究班(代表 西野一三)」と共同して次世代シーケンサーによる解析を行ってきた。また疾患バイオマーカーについて、病理学的マーカー（Glutathione peroxidase, mitochondria）、血清マーカーとしてのcN1A抗体、生理検査マーカーとしての超音波についても検証も行う。三好型ミオパチー、眼咽頭遠位型ミオパチーについても診断基準を確定する。三好型ミオパチーについては次世代シーケンサーを用いた診断も追及した。

ベスレムミオパチーについては当施設凍結生検筋レポジトリーにおいて、ベスレムミオパチーと考えられる例を抽出し、西野班で報告した例も加えて臨床情報を解析した。抽出基準は、西野班において作成されたベスレムミオパチーの診断基準におけるA-a.常染色体優性遺伝の家族歴があり、B-b.VI型コラーゲン免疫染色異常またはC-a.COL6A1, COL6A2, COL6A3 遺伝子変異を有する例とした。

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーについては患者血液または骨格筋よりゲノムDNAを抽出し、サンガー法により全エクソンおよびエクソン・イントロン境界領域のシーケンス決定を行った。全国での患者数をPADM患者会などの協力により集計し、平成27年度末からNアセチルノイラミン酸の第2/3相試験を開始している。本研究班で収集した臨床情報が臨床試験プロトコルの作製にも繋がった。

(独)国立精神・神経医療研究センター(NCNP)骨格筋レポジトリー約13,000検体のデータを分析し、先天性ミオパチーの各病型頻度を推計する。先天性ミオパチーは乳幼児期早期に発症する遺伝性筋疾患で、筋病理所見から複数の病型に分類される。しかし、近年は遺伝子結果に基づいた疾患名称が用いられることもあり分類自体が混沌とし、そのため診断基準の作成は困難なのが現状である。その中で疾患概要として、先天性ミオパチーに必要な十分な診断条件とは何か、について検討し診断基準作成を行った。登録システムについても整備を行なった。

先行研究で見いだした **Marinesco-Sjögren**

**症候群** 36名の臨床情報をもとに、その具体的な臨床経過、症状、合併症などを分析し、また、文献的知見も加味し、Marinesco-Sjögren 症候群の臨床的特徴を明らかにすることによって、診断基準および重症度分類の作成をめざす。

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

**Schwartz-Jampel 症候群**に関しては臨床診断・遺伝子診断方法を確立し、本邦における発症者を掌握し、その臨床的特徴、経過などを調査した。

全国から提供された筋チャネル病(周期性四肢麻痺、非ジストロフィー性ミオトニー症候群など)疑いの症例について、既知の原因遺伝子(SCN4A, CACNA1S, CLCN1, KCNJ2, KCNJ18)についてサンガー法によるシーケンス解析を施行した。骨格筋チャネル病の重症度分類の策定および診断確定のための適切な指針が重要である。なかでも周期性四肢麻痺は発作性疾患のため、症度分類が困難であるが、本年度われわれは3段階(軽・中等・重症)の分類を提案しその有用性を示した。QOLの調査も行った。

国立精神・神経医療研究センターで管理する、海外例を含む自己食空胞性ミオパチー患者の臨床病理学的特徴をもとに診断基準を作成した。全国2,617の関連施設(神経内科、循環器科、小児科)に実態調査を行い、臨床的特徴や合併症、治療法を明らかにした。また、新規を含めた自己食空胞性ミオパチー患者の生検筋の筋病理学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

研究分担・協力施設において、患者からの文書での十分なインフォームド・コンセントを得る。

患者からの血液検体は連結可能匿名化を行った後、外部委託施設に送付し、DNA抽出および血清分離を行う。処理された検体は国立精神・神経医療研究センター等に送り、個人情報管理者により、送付してきた施設を含まない通し番号を付与され、ゲノムDNAとして保管される。バックアップ施設(東北大学など)にも検体を分けて保存する。各研究協



力施設において、個人情報管理者を置き、連結可能匿名化で用いた匿名符号の管理について責任を持つものとする。

臨床調査票は主治医が記載し、血液検体と結び付けられる形で連結可能匿名化を行い、研究統括施設に送られ、個人情報管理者により検体と同一の通し番号（施設情報が含まれない）を付与され、臨床データセンターに送付、LANに接続されていないコンピュータに入力し保存する。このコンピュータのログインにはパスワードを設定し、研究統括施設の個人情報管理者が管理する。臨床調査票の原本は鍵の掛るロッカーに保存する。臨床調査票による臨床情報収集は原則として経時的（1年毎）に行い、臨床像の進行・治療応答性に関する情報も蓄積する。

正常対象として筋疾患に罹患しておらず患者と血縁関係のない人（患者の配偶者など）から文書で十分なインフォームド・コンセントを得た後、採血しDNA抽出および血清分離を行う。正常対象については採血した施設で検体を連結不可能匿名化する。筋生検については疾患対象となるが、同様にインフォームド・コンセントを得た上で病態の比較検討をする。

封入体筋炎に関しては東北大学で臨床研究につき平成23年に倫理審査委員会の承認が得られ、更新してきている。ほかの分担研究施設に関しても各々の施設で承認済みである。

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、収集するMRI画像情報は過去に診断や経過観察など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患者から資料や情報収集することはなく、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 イ 既存資料のみを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

対象疾患である(1)周期性四肢麻痺、非ジストロフィー性ミオトニー症候群といった筋チャンネル病、(1')先天性筋無力症候群、(2) Schwartz-Jampel 症候群、(3) Danon 病や過剰自己貪食を伴うX連鎖性ミ

オパチーなどの「自己貪食空胞性ミオパチー」、(4)封入体筋炎、(5)先天性ミオパチー、(6)縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (GNE ミオパチー)、(7)眼・咽頭遠位型ミオパチー、(8)三好型ミオパチー、(9) Marinesco-Sjögren 症候群、(10) ベスレムミオパチーのそれぞれについて、診断基準・ガイドラインの作製を行っている。

(1) **筋チャンネル病**に関しては診療の手引きの原案を12月末に完成。診断確定例に QOL 調査を実施し36例回収した。身体的健康度は諸外国と同様の傾向であったが、INQoLの自立、関係性、SF-36の心の健康など精神的健康度がより影響を受けていることが示唆された。いっぽうで新規症例の診断確定も精力的に進めた。Na と Cl チャンネル両方の遺伝子に変異を有する症例を同定し、臨床症状・病態について報告した(Kato et al. J Neurol Sci 2016)。原因遺伝子が同定されていない多くの周期性四肢麻痺症例に関し検討したところ、甲状腺中毒性周期性四肢麻痺と共通の遺伝的背景が存在することが明らかになりつつある。

(1') **先天性筋無力症候群**に関しては、診断基準、重症度分類、診療の手引き等作成に供するために、平成28年8月31日に開始した神経筋疾患患者登録 Remudy に先天性筋無力症候群のレジストリーと協調して本邦における先天性筋無力症候群のさらなる新規同定を進めた。また、難病情報センターホームページに一般向けの病気の解説、医療従事者向けの診断・治療指針を掲載した。

(2) **Schwartz Jampel 症候群**は平成28年度中に診療の手引き等の作製を行い、関連国内機関に配布する。海外機関とも提携し、症例発掘への呼びかけや自然歴、全身合併症の調査、パールカン完全欠損疾患である dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type 例の情報を把握し、疾患スペクトラムを調査継続している。

(3) **自己貪食空胞性ミオパチー**に関しては、追跡調査を行って治療状況を含めて臨床情報を継続・更新して蓄積している。特に致死性である心筋症については詳細に情報収集している。新規に見出した希少症例については病理学および遺伝学的解析を行い論文投稿済みである。また平成29年3月までに本疾患の診療の手引き等も作製する。

(4) **封入体筋炎**に関しては臨床情報および骨格筋・血清・DNAなどの生体試料を全国の協力施設での蓄積を継続している。診断のためのバイオマーカーについては血清中の自己抗体 NT5c1A の診断感度・特異度について AnnNeurol に掲載された。感受性遺伝子

に関しても多数例を用いて検討を続ける。平成 29 年 3 月までに全国アンケートによる患者数調査を行い、患者数の推移や自然歴について平成 22 年時点の調査と比較検証する。平成 22 年時点の調査に関しても学術誌に報告した (Suzuki et al. Orphanet J Rare Disease 2016)。また平成 29 年 3 月までに診療の手引き等も作製する。

(5) **先天性ミオパチー**に関しては、各病型の自然歴調査のため全国の協力施設から臨床情報を収集し、登録継続中である。また、平成 29 年 3 月までに診療の手引き等も作製する。

(6) **GNE ミオパチー**に関しては臨床情報と骨格筋などの生体試料を蓄積してきている。国内での II/III 相の臨床試験を継続中であり、新規患者の診断にもつとめている。平成 28 年 3 月には日本神経学会に GNE ミオパチーとしての診断基準の承認を得た。また一定数の患者が通常シークエンス解析では見逃されてしまうエクソン単位の大欠失を有していることを明らかにした (Zhu et al. J Hum Genet 2016)。

(7) **眼・咽頭遠位型ミオパチー**は引き続き筋病理診断・遺伝子診断を継続している。平成 28 年 3 月には日本神経学会に眼咽頭遠位型ミオパチーとしての診断基準の承認を得た。

(8) **ジスフェルリン異常症**の症例も全国から依頼を受けて次世代シークエンスを用いた遺伝子解析を継続している。平成 28 年 3 月には日本神経学会に三好型ミオパチーおよびその他の遠位型ミオパチーとしての診断基準の承認を得た。

(9) **マリネスコシュエーグレン症候群**に関しても症例を蓄積している。平成 28 年 3 月には日本神経学会および小児神経学会の診断基準の承認を得た。

(10) **ベスレムミオパチー・ウルリッヒミオパチー**は平成 27 年から指定難病となっており、引き続き症例の蓄積と新規例の診断を行っている。平成 28 年 3 月には日本神経学会および小児神経学会の診断基準の承認を得た。

#### D. 考察

診断基準の作成については**封入体筋炎**をはじめとした各対象領域で作成することができた。診断ガイドラインに関しては、全国調査等を通じてその妥当性について検討を続ける。バイオマーカーについても有用性について議論を続けることができた。指定難病制度が大きく改定されたが、認定基準や実際の運用上、患者にメリットが乏しく登録症例数が実態を反映していないという問題点も浮き彫

りになっている。**三好型ミオパチー**に関しては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 *dysferlin* 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次世代シークエンスを用いた検討で検出されてきている。

**ベスレムミオパチー**は班による診断基準には、筋鞘膜特異的欠損や部分欠損を含めている。VI 型コラーゲン免疫染色がベスレムミオパチーの診断に役立つと考えられる。

**縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー**は本邦には少なくとも 200 名以上の患者が確かに存在することが明らかとなっている。平成 27 年度末から治験が開始され、本研究班による成果が患者のリクルートや治験の運用に役立っている。CNV 解析による新たな変異も見出されている。

**先天性ミオパチー**の診断に際しての検査選択、所見解釈については診断を行う医療者側の主観が入り、診断・情報精度もそれに左右される可能性が残る。各病型の患者情報収集や病態解明も視野に入れたアプローチや解析を求める際、診断・情報の精度管理は解決すべき課題である。Remudy 登録も開始されている。

**Marinesco-Sjögren 症候群**に関しては臨床報告など、可及的多くの情報を収集し、診断基準の根拠を明確にしていく必要がある。患者追跡調査も行い、自然歴を明らかにしていく。

**Schwartz-Jampel 症候群**については原因遺伝子が明らかになったが、効果的対症療法、根治療法が確立しておらず患者調査が進んでいない。全身の合併症リスクを調査して注意を喚起する必要がある。

**チャネル病**の診断指針 (ガイドライン) 策定のための検討として、神経生理学的検査、とくに Fournier らによるショートおよびロングエクササイズテストにもとづく骨格筋チャネル病の神経生理学的分類の有用性を検討したが、その特異度は低い可能性が示された。QOL 調査により現状の問題点も明らかになった。患者登録におけるダイナミックコンセンストも検討している。

**自己貪食空胞性ミオパチー**のうち乳児型自己貪食空胞性ミオパチーと先天性自己貪食空胞性ミオパチーでは VMA21 変異を認め、XMEA のアレレル病であることを明らかにした。確定診断には、臨床症状に加えて、筋病理所見、遺伝子解析結果をもとに行う必要がある。現状では根本治療はなく、心筋症や不整脈への対症療法が主体となる。今回、診療ガイドライン策定に向けて、現状で最適と考えられる診断および治療法について検討し、

ガイドラインの骨子を作成した。多くの自己食空胞性ミオパチー患者でミオパチー症状は軽症である一方、Danon 病の心筋症は予後決定因子でありその診断および治療は重要である。希少疾病であり、追跡調査が重要である。

#### E. 結論

上記のように各疾患に関して、新規患者の診断を行うと共に、診断基準の整備と学会承認、自然歴の調査、レジストリーの発展などに寄与してきている。これらの基盤を元に将来的には各疾患において、(6) GNE ミオパチーで AMED の支援を受けて先進している臨床試験・治療法開発へとつなげていきたい。そのためには今後も継続した診断・患者調査が必要である。公費負担を含めた社会的支援も重要であり、指定難病制度の実際の運用にも協力していく。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. Tawara N, Yamashita S, Zhang X, Korogi M, Zhang Z, Doki T, Matsuo Y, Nakane S, Maeda Y, Sugie K, Suzuki N, Aoki M, Ando Y. Pathomechanisms of anti-cytosolic 5'-nucleotidase 1A autoantibodies in sporadic inclusion body myositis. *Ann Neurol* 81: 512-525, 2017.
2. Suzuki N, Izumi R, Kato M, Warita H, Aoki M. [Therapeutic development for GNE myopathy.]. *Clin Calcium* 27: 429-434, 2017.
3. Suzuki N, Mori-Yoshimura M, Yamashita S, Nakano S, Murata KY, Inamori Y, Matsui N, Kimura E, Kusaka H, Kondo T, Higuchi I, Kaji R, Tateyama M, Izumi R, Ono H, Kato M, Warita H, Takahashi T, Nishino I, Aoki M. Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan. *Orphanet J Rare Dis* 11: 146, 2016.
4. Suwa Y, Suzuki N, Soga T, Harada R, Shibui A, Kuroda H, Izumi R, Tateyama M, Nakashima I, Sonoo M, Aoki M. Sporadic Inclusion Body Myositis Manifesting as Isolated Muscle Weakness of the Finger Flexors Three Years after Disease

Onset. *Intern Med* 55: 3521-3524, 2016.

5. Tateyama M, Fujihara K, Misu T, Arai A, Kaneta T, Aoki M. Clinical values of FDG PET in polymyositis and dermatomyositis syndromes: imaging of skeletal muscle inflammation. *BMJ Open* 5: e006763, 2015.
6. Izumi R, Warita H, Niihori T, Takahashi T, Tateyama M, Suzuki N, Nishiyama A, Shirota M, Funayama R, Nakayama K, Mitsuhashi S, Nishino I, Aoki Y, Aoki M. Isolated inclusion body myopathy caused by a multisystem proteinopathy-linked hnRNPA1 mutation. *Neurol Genet* 1: e23, 2015.
7. 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. *Neurol Genet* 1: e36, 2015.
8. Kitajima Y, Tashiro Y, Suzuki N, Warita H, Kato M, Tateyama M, Ando R, Izumi R, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Ito H, Urushitani M, Nagatomi R, Takahashi R, Aoki M. Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *J Cell Sci* 127: 5204-5217, 2014.
9. Izumi R, Niihori T, Suzuki N, Sasahara Y, Rikiishi T, Nishiyama A, Nishiyama S, Endo K, Kato M, Warita H, Konno H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y, Aoki M. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord* 24: 1068-1072, 2014.
10. Aoki M, Suzuki N. [Sporadic inclusion body myositis and amyloid]. *Brain Nerve* 66: 739-748, 2014.
11. Aoki M, Suzuki N, Kato M, Warita H. [Recent progress in diagnosis and pathomechanism of inclusion body myositis].

*Rinsho Shinkeigaku* 54: 1115-1118, 2014.

\*各分担者および協力者の研究発表についてはそれぞれの項目に譲る。

#### **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

## 封入体筋炎を中心とする炎症性筋疾患の調査研究と

### 炎症性筋疾患識別マーカーの開発

研究分担者:西野一三<sup>1)2)</sup>

共同研究者:漆葉章典<sup>2)1)</sup>

- 1) 国立研究開発法人 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
- 2) 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター メディカル・ゲノムセンター ゲノム診療開発部

#### 研究要旨

2002年5月～2012年4月に国立精神・神経医療研究センター凍結生検筋レポジトリに登録された症例からIBMと診断された116例を抽出し、各主治医へのアンケート調査をもとにHCV抗体の有無を調査した。IBM患者の28.1%(32/114例)がHCV抗体陽性例であった。これは本邦一般人口のHCV抗体陽性率(60代:3.4%、2000年)および多発筋炎同齡患者のHCV抗体陽性率(4.5%、2/44例)より有意に高かった( $P < 0.001$ )。

抗cytosolic 5'-nucleotidase 1A(cN1A)抗体の診断マーカーとしての有用性を明らかにすることを目的とし、封入体筋炎患者34名、皮膚筋炎患者22名、抗SRP抗体陽性壊死性ミオパチー患者35名、GNEミオパチー患者15名の血漿でELISA法にて抗cN1A抗体を測定した。抗cN1A抗体は封入体筋炎では35%(12/34)で陽性であり、先行研究での陽性率と同等であった。皮膚筋炎、GNEミオパチーにおいて陽性例は見られなかったものの、抗SRP抗体陽性壊死性ミオパチーでは20%(7/35)で陽性であった。

臨床病理学的にGNEミオパチーが強く疑われるにも拘わらず、片側アレルにしか変異が見いだされない症例について、次世代シーケンサーを用いたcopy number variation(CNV)解析を行い、対側アレルの欠失や重複の有無を検討した。11家系13例で1つ以上のエクソンを含む欠失または重複を認めた。欠失側アレルのGNE遺伝子発現は認めなかった。

## A: 研究目的

1. C型肝炎ウイルス(HCV)既感染の封入体筋炎患者の頻度および臨床・病理学的特徴を明らかにすること。

2. 近年、封入体筋炎患者で同定された抗 cytosolic 5'-nucleotidase 1A (cN1A) 抗体の診断マーカーとしての有用性を明らかにするとともに、炎症性筋疾患と非炎症性筋疾患を鑑別するマーカーを同定すること。

3. 片側アレルにしか変異が見いだされない GNE ミオパチー症例について対側アレルに大欠失や重複などの copy number variation (CNV)解析が存在する可能性を検討すること。

## B: 研究方法

1. 2002年から2012年に国立精神・神経医療研究センター凍結筋レポジトリに登録された症例から、ENMC IBM Research Diagnostic Criteria 2011で clinicopathologically defined IBMに該当する症例116例を抽出し、主治医に回答を求める形でアンケート調査を行った。対照として同時期の多発筋炎(PM)同齡患者44例の主治医にも同様のアンケート調査を行った。

2. 封入体筋炎患者34名、皮膚筋炎患者22名、抗SRP抗体陽性壊死性ミオパチー患者35名、GNEミオパチー患者15名の血漿で、ELISA法を用いて抗cN1A抗体を測定した。先行研究にならい健常対照の平均値+3SDをカットオフ値とした。また、炎症性筋疾患患者100名(多発筋炎、皮膚筋炎、抗合成酵素症候群、免疫介在性壊死性ミオパチー、封入体筋炎)および遺伝性筋疾患患者50名(デュシェン

ヌ/ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、GNEミオパチー)の27種のサイトカイン血漿濃度を測定した。

3. 次世代シーケンサーを用いてGNE遺伝子領域を解析し、depth of coverage解析を施行した。欠失または重複が見いだされた例については、別途プライマーを設計し、断端部のシーケンス解析を行った。また、CNV変異が認められた例で凍結骨格筋が保存されている例については、mRNAの発現をRT-PCRによって確認した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いる全ての検体ならびに臨床情報は全例採取時に国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認された「診断と検体の研究使用に関する承諾書」をもとにインフォームド・コンセントされており、「神経・筋疾患の病態解明と治療法開発」を目的とした研究への使用が許可されている。

## C: 研究結果

1. 114例中32例(28%)がHCV抗体陽性であった。対照のPM同齡患者は2/44例(4.5%)、2000年時点の日本人同齡一般人口(60代)は3.4%であった。HCV抗体陽性例・陰性例との臨床病理学的側面の比較では、いずれの指標でも有意差はなかった。HCV抗体陽性のIBM患者凍結筋では32例中19例(59%)でHCV-RNAが検出された。一方、IBM以外のHCV抗体陽性神経筋疾患患者の凍結筋でHCV-RNAが検出されたのは21例中20例(95%)でIBM患者群より高頻度であった(P=0.004)。

2. 抗 cN1A 抗体は封入体筋炎では 35% (34 名中 12 名) で陽性であった。これは先行研究での陽性率と同等であった。皮膚筋炎、GNE ミオパチーにおいて陽性例は見られなかったものの、抗 SRP 抗体陽性壊死性ミオパチーでは 20% (35 名中 7 名) で陽性であった。尚、健常対照の平均値 + 3SD というカットオフ値は、正診率の最高値を示した (78%)。封入体筋炎患者群あるいは抗 SRP 抗体陽性壊死性ミオパチー患者群の中で、抗 cN1A 抗体の有無は臨床病理学的特徴に影響しなかった。IP-10 と eotaxin は各炎症性筋疾患患者群において遺伝性筋疾患患者群より有意に高値を示した ( $p < 0.01$ )。

3. 11 家系 13 例で 1 つ以上のエクソンを含む欠失または重複を認めた。特にエクソン 2 が欠失している例が 7 家系 8 例を占めていた。凍結筋が保存されていた 6 例での RT-PCR 解析からは、何れの例でも欠失側アレルの GNE 遺伝子発現を認めなかった。また片側アレルに CNV を有していた日本人患者 8 家系のうち、6 家系が対側アレルに D207V 変異を有していた。

#### D: 考察

1. 封入体筋炎において HCV 感染が統計学的に有意に高頻度に合併していることが示された。また解析した限りにおいて、HCV 抗体陽性群と陰性群との間に、臨床的または病理学的な重症度に差は認められなかった。このことから HCV が IBM 病態における修飾因子として働くものではないことが示唆され、おそらく IBM の誘発因子として作用しているものと思われる。

2. 抗 cN1A 抗体は、アメリカおよびオランダの研究グループによって封入体筋炎患者において発見された自己抗体である。両グループの報告

でも診断応用の目的では感度の低さが問題となっていたが、特異度の高さが強調されていた。しかしその後、オランダの同じグループから封入体筋炎以外の自己免疫疾患患者 (シェーグレン症候群や全身性エリテマトーデス) で抗 cN1A 抗体が検出され、疾患特異性にも疑問が出始めてきた (Herbert, et al. *Ann Rheum Dis* 2015)。今回の我々の検討で、封入体筋炎以外の筋疾患においても、抗 cN1A 抗体が封入体筋炎と遜色ない頻度で検出されることが明らかとなった。抗 cN1A 抗体の診断目的での測定は、相当慎重に行うべきであると考えられる。

3. 11 家系中 7 家系でエクソン 2 欠失を認めた。更に、凍結筋が入手可能であった 6 例全例で欠失側アレルの GNE 遺伝子発現を認めなかった。このことは、このエクソン 2 の配列が hGNE1 トランスクリプトの発現に必須であることを強く示唆している。シアル酸補充療法の承認が現実的なものとなる可能性が高まっている現在、このような CNV 変異を見逃さず、正確な診断を下すことが極めて重要と考えられる。

#### E: 結論

IBM においては HCV 感染症の頻度が 28% と高く、何らかの形で IBM の病態形成に関与していると考えられる。抗 cN1A 抗体の封入体筋炎診断マーカーとしての有用性は低いと考えられる。一部の GNE ミオパチー患者は CNV 変異を片側アレルに有している。一見ヘテロ接合型に見えても対側アレルに CNV 変異を有していることがあり、注意が必要である。

#### F: 健康危険情報

なし

## G: 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

### 1: 論文発表

Suzuki N, Mori-Yoshimura M, Yamashita S, Nakano S, Murata KY, Inamori Y, Matsui N, Kimura E, Kusaka H, Kondo T, Higuchi I, Kaji R, Tateyama M, Izumi R, Ono H, Kato M, Warita H, Takahashi T, Nishino I, Aoki M: Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan. *Orphanet J Rare Dis.* 11(1): 146, Nov, 2016 PMID: 27821140 DOI 10.1186/s13023-016-0524-x

Preethish-Kumar V, Pogoryelova O, Polavarapu K, Gayathri N, Seená V, Hudson J, Nishino I, Prasad C, Lochmuller H, Nalini A: Beevor's sign: a potential clinical marker for GNE myopathy. *Eur J Neurol.* 23(8): e46-8, Aug, 2016  
doi: 10.1111/ene.13041. PMID: 27431025

Uruha A, Noguchi S, Sato W, Nishimura H, Mitsunashi S, Yamamura T, Nishino I. Plasma IP-10 level distinguishes inflammatory myopathy. *Neurology* 85: 293-294, 2015

Uruha A, Noguchi S, Hayashi YK, Tsuburaya RS, Yonekawa T, Nonaka I, Nishino I. Hepatitis C virus infection in inclusion body myositis: A case-control study. *Neurology* 86: 211-7, 2016

Furuta A, Kikuchi H, Fujita H, Yamada

D, Fujiwara Y, Kabuta T, Nishino I, Wada K, Uchiyama Y: Property of Lysosomal Storage Disease Associated with Midbrain Pathology in the Central Nervous System of *Lamp-2*-Deficient Mice. *Am J Pathol.* 185(6): 1713-1723, Jun, 2015

Suzuki S, Nishikawa A, Kuwana M, Nishimura H, Watanabe Y, Nakahara J, Hayashi YK, Suzuki N, Nishino I: Inflammatory myopathy with anti-signal recognition particle antibodies: case series of 100 patients. *Orphanet J Rare Dis.* 10(1): 61, May 2015 [Epub May 2015]

Nishino I, Carrillo-Carrasco N, Argov Z: GNE myopathy: current update and future therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 86(4): 385-392, Apr, 2015

Yonekawa T, Nishino I: Ullrich congenital muscular dystrophy: clinicopathological features, natural history and pathomechanism(s). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 86(3): 280-287, Mar 2015

Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Yonemoto N, Nakamura H, Murata M, Takeda SI, Nishino I, Kimura E: Nationwide patient registry for GNE myopathy in Japan. *Orphanet J Rare Dis.* 9(1): 150, 2014 [Online journal]



- Yonekawa T, Malicdan MC, Cho A, Hayashi YK, Nonaka I, Mine T, Yamamoto T, Nishino I, Noguchi S: Sialyllactose ameliorates myopathic phenotypes in symptomatic GNE myopathy model mice. *Brain*. 137(10): 2670-2679, 2014
- Cho A, Hayashi YK, Monma K, Oya Y, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Mutation profile of the *GNE* gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 85(8): 912-915, 2014
- Noguchi S, Ogawa M, Kawahara G, Malicdan MC, Nishino I: Allele-specific Gene Silencing of Mutant mRNA Restores Cellular Function in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts. *Mol Ther Nucleic Acids*. 3: e171, 2014
- Huizing M, Carrillo-Carrasco N, Malicdan MC, Noguchi S, Gahl WA, Mitrani-Rosenbaum S, Argov Z, Nishino I: GNE myopathy: New name and new mutation nomenclature. *Neuromuscul Disord*. 24(5): 387-389, 2014
- Mori-Yoshimura M, Oya Y, Yajima H, Yonemoto N, Kobayashi Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I, Murata M: GNE myopathy: A prospective natural history study of disease progression. *Neuromuscul Disord*. 24(5): 380-386, 2014
- Goto M, Okada M, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: A nationwide survey on marinesco-sjogren syndrome in Japan. *Orphanet J Rare Dis*. 9(1): 58, 2014
- 2:学会発表**
- Uruha A, Noguchi S, Sato W, Nishimura H, Mitsuhashi S, Yamamura T, Nishino I: Plasma IP-10 level distinguishes inflammatory myopathy. 20th International Congress of the World Muscle Society, Brighton, UK (Brighton Dome), 10.2, 2015 (9.30-10.4)
- 漆葉章典, 野口 悟, 三橋里美, 西村洋昭, 後藤加奈子, 西野一三: Plasma IP-10 level distinguishes inflammatory myopathy. 第7回筋炎ワークショップ, 新宿(京王プラザホテル), 9.12, 2015
- 漆葉章典, 野口 悟, 佐藤和貴郎, 西村洋昭, 三橋里美, 山村 隆, 西野一三: 血漿 IP-10 で炎症性筋疾患と非炎症性筋疾患を鑑別できる. 第一回日本筋学会学術集会, 小平(国立精神・神経医療研究センター), 8.8, 2015
- Uruha A, Noguchi S, Mitsuhashi S, Sato W, Yamamura T, Nishimura H, Nishino I: Plasma IP-10 level distinguishes inflammatory myopathy. 第56回日本神経学会学術大会, 新潟(朱鷺メッセ[新潟コンベンションセンター]), 5.22, 2015 (5.20-5.23)

Uruha A, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: High Prevalence of Hepatitis C Virus Infection in a Japanese Inclusion Body Myositis Cohort. 2014 American College of Rheumatology (ACR)/ Association of Rheumatology Health Professionals (ARHP) Annual Meeting, Boston, USA, Nov 2014.

漆葉章典, 野口悟, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: C型肝炎ウイルス感染は封入体筋炎で高頻度である. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会・第26回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会, 金沢市, 9.4-9.6, 2014.

#### **H: 知的所有権の取得状況(予定を含む)**

##### **1: 特許取得**

炎症性筋疾患鑑別マーカー及びそれを用いた炎症性筋疾患と非炎症性筋疾患の鑑別方法. (出願中. 特願 2015-031517)

##### **2: 実用新案登録**

なし

##### **3: その他**

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業))  
希少難治性筋疾患に関する調査研究班 (総合)研究報告書

## マリネスコ・シェーグレン症候群および FHL ミオパチーに関する 調査研究

研究分担者:林 由起子<sup>1)</sup>

共同研究者:川原 玄理<sup>1)</sup>、小牧 宏文<sup>2)</sup>、西野 一三<sup>3)</sup>

1) 東京医科大学病態生理学分野

2) 国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科

3) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部

### 研究要旨

マリネスコ・シェーグレン症候群(MSS)ならびに FHL1 ミオパチーについて患者調査を中心に研究を遂行した。MSS は、小脳失調、精神遅滞、先天性白内障、ミオパチーを特徴とする乳幼児期発症の難治性疾患である。MSS 全国調査の結果および既報告例を解析し、MSS の診断基準ならびに重症度分類の作成を行うとともに難病情報センターホームページに一般向けの病気の解説、医療従事者向けの診断・治療指針を掲載した。また、患者追跡調査を実施し、MSS の長期経過についての情報を得た。治療法開発に向けてゼブラフィッシュが MSS のモデル動物として有用であるとの結果が得られた。一方、臨床的に多彩な症状を呈する FHL1 ミオパチーの本邦症例を集積・解析した結果、進行性に呼吸障害を示す例が多く、早期に診断し、慎重に経過観察をしていくことが重要であることを明らかにした。

### A:研究目的

マリネスコ・シェーグレン症候群(MSS)は、小脳失調、精神遅滞、先天性白内障、ミオパチーを主症状とする希少難病である。常染色体劣性遺伝形式をとり、原因遺伝子 *SIL1* が同定されている。*SIL1* タンパク質は小胞体シャペロンタンパク質 HSPA5 の ATP-ADP 交換因子として働き、小胞体におけるタンパク質の品質管理に関わっている。従って MSS の主病態は *SIL1* の機能損失による小胞体ストレスであると考えられている。我々はこれまでに MSS の全国調査を実施し、36 名の MSS (疑い例含む) についての臨床

情報ならびに遺伝子解析結果を得ている。本研究では、この全国調査結果と内外の既報告例を集積し、診断基準と重症度分類を作成し、また長期臨床経過に関する情報収集を行うことを目的とした。さらに治療法開発をめざして、小型魚類を用いたモデル動物の作製も行った。

一方、先天性ミオパチーの 1 つとして分類されている還元小胞体ミオパチー(RBM) は *FHL1* 遺伝子変異による X 染色体性の遺伝形式をとる疾患である。*FHL1* 変異は RBM の他、肩甲下腿型ミオパチー、体幹筋障害性ミオパチー、強直性脊椎症候群(RSS)、Emery-Dreifuss 型筋ジ

ストロフィー(EDMD)など多くのミオパチーの原因遺伝子であることが報告され、現在 FHL1 ミオパチーと総称されている。本研究では、FHL1 ミオパチーについて本邦患者の臨床的・病理学的・遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とした。

## B: 研究方法

H23 年度に実施した MSS 全国調査ならびにその後の遺伝子解析結果に基づき *SIL1* 遺伝子変異を有する MSS24 例を中心に臨床症状・検査所見などを解析した。また既報告例を集積し、その臨床病理学的所見を検討した。さらに長期臨床経過に関する情報収集を目的に、前回全国調査時に情報提供の得られた主治医に前回と同じアンケート用紙を送付し、臨床症状の変化を解析した。モデル動物としてゼブラフィッシュの有用性を検証するために、モルフォリノ核酸を用いて *sil1* のノックダウンモデルを作製し、表現型を観察した。

FHL1 ミオパチーに関しては、臨床的・筋病理学的に RBM、肩甲帯優位の筋障害、RSS、EDMD と診断されている症例について *FHL1* 変異解析を行い、有変異例について、臨床調査を行い、その解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守し、東京医科大学医学倫理委員会で承認を受けている。研究を実施するに当たり、プライバシーに十分配慮し、本研究で用いた臨床・病理学的データは連結可能匿名化の上、解析を行った。動物実験については、東京医科大学実験動物委員会の承認を受けて実施している。

## C: 研究結果

*SIL1* 変異のある MSS の臨床遺伝学的情報をもとに、診断基準ならびに重症度分類の作成を行った。また難病情報センターホームページにおける一般向けの病気の解説、医療従事者向けの診断・治療指針を掲載した。MSS 患者追跡調査では 7 名についての情報が得られ、小脳症状は進行性であること、独歩を獲得しても 30 歳までに車椅子生活となること、歩行困難になっても寝たきりになりにくいこと、呼吸・心障害をきたしにくいこと、などが明らかとなった。一方、モルフォリノ核酸を用いた *sil1* 発現抑制により、ゼブラフィッシュ幼魚は小眼球、小脳プルキンエ細胞の減少、筋構造の異常といった、MSS の臨床症状と似た表現型が認められた。

本邦 FHL1 ミオパチー 11 家系 21 例を見だし、いずれも *FHL1* 第 2LIM ドメインの Cys 残基の変化が認められた。臨床症状は重症度により 3 群に分けることが可能であった。筋障害は左右差を示すことが多く、頸部筋力低下、呼吸不全の頻度が高いという特徴があった。遅発型も含めた 10 検体の筋病理組織標本のうち 9 例で還元小体が見いだされ、診断に有用であると考えられた。

## D: 考察

MSS は幼児期に急速に進行する白内障に対する適切な管理がその後の QOL を左右する。また小脳症状は緩徐進行性であり、歩行障害の主因となっていると考えられた。50 歳以降も呼吸障害、心障害の合併がなく生命予後は良い疾患であると考えられた。モルフォリノ核酸によるノックダウンにより MSS の臨床症状を再現できたことから、ゼブラフィッシュは MSS の良いモデル動物になり得ると考えられた。

FHL1 ミオパチーの患者数は少ないが、臨床的にきわめて多様であることから、診断に至って

いない症例の存在も推測され、今後の臨床調査が重要であると考えられた。還元小体の存在は診断に有用であり、筋生検は診断の一助として重要であると考えられた。

#### **E: 結論**

MSS は乳幼児期に発症し経過の長い難病であるが生命予後の良い疾患である。ゼブラフィッシュは MSS のモデル動物として有用であり、今後薬剤スクリーニングなどに活用可能である。

FHL1 ミオパチーの臨床症状は多彩であるが、急速に呼吸不全が進行する場合があります、定期的な経過観察が重要である。

#### **F: 健康危険情報**

FHL1 ミオパチーは進行に伴い呼吸不全を来すこと、また、不整脈や心不全などの心障害も合併しうることから、定期的な経過観察が必須である。

#### **G: 研究発表**

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

##### **1: 論文発表**

- Goto M, Okada M, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK. A nationwide survey on Marinesco-Sjögren syndrome in Japan. *Orphanet J Rare Diseases* 9(1):58,2014
- Kajino S, Ishihara K, Goto K, Ishigaki K, Noguchi S, Nonaka I, Osawa M, Nishino I, Hayashi YK. Congenital fiber type disproportion myopathy caused by LMNA mutations. *J Neurol Sci* 340:94–98,2014
- Miyatake S, Koshimizu E, Hayashi YK, Miya K, Shiina M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito 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* 24(7):642-647,2014
- Mori-Yoshimura M, Oya Y, Yajima H, Yonemoto N, Kobayashi Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I, Murata M. GNE myopathy: A prospective natural history study of disease progression. *Neuromuscul Disord* 24(5):380-386,2014
- Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Yonemoto N, Nakamura H, Murata M, Takeda SI, Nishino I, Kimura E. Nationwide patient registry for GNE myopathy in Japan. *Orphanet J Rare Diseases* 9(1):150,2014
- Yuen M, Sandaradura SA, Dowling JJ, YK Hayashi, et al. Leiomodin-3 dysfunction results in thin filament disorganization and nemaline myopathy. *J Clin Invest* 125(1):456-457,2015
- 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*. 86(5):483-489,2015
- Suzuki S, Nishikawa A, Kuwana M, Nishimura H, Watanabe Y, Nakahara J, Hayashi YK, Suzuki N, Nishino I. Inflammatory myopathy with anti-signal recognition particle antibodies: case series of 100 patients. *Orphanet J Rare Diseases* 13:10:61,2015
  - Endo Y, Dong M, Noguchi S, Ogawa M, Hayashi YK, Kuru S, Sugiyama K, Nagai S, Ozasa S, Nonaka I, Nishino I. Milder forms of muscular dystrophy associated with *POMGNT2* mutations. *Neurol Genet* 1(4),e33,2015
  - 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* 53:394–401,2016
  - Dastgir J, Rutkowski A, Alvarez R, Cossette SA, Yan K, Hoffmann RG, Sewry C, Hayashi YK, Goebel HH, Bonnemann C, Lawlor MW. Common data elements for muscle biopsy 44 Reporting. *Arch Pathol Lab Med* 140(1),51-65,2016
  - Sugie K, Yoshizawa H, Onoue K, Nakanishi Y, Eura N, Ogawa M, Nakano T, Sakaguchi Y, Hayashi YK, Kishimoto T, Shima M, Saito Y, Nishino I, Ueno S. Early onset of cardiomyopathy and intellectual disability in a girl with Danon disease associated with a de novo novel mutation of the LAMP2 gene. *Neuropathology* 36(6), 561-565,2016
  - Kawahara G, Hayashi YK. Characterization of zebrafish models of Marinesco-Sjögren syndrome. *PLoS One* 11•10,2016
  - Miyatake S, Mitsushashi S, Hayashi YK, Purevjav E, Nishikawa A, Koshimizu E, Suzuki M, Yatabe K, Tanaka Y, Ogata K, Kuru S, Shiina M, Tsurusaki Y, Nakashima M, Mizuguchi T, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, Kawai M, Towbin J, Nonaka I, Nishino I, Matsumoto N. Biallelic mutations in *MYPN*, encoding myopalladin, are associated with childhood-onset, slowly progressive nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 100(1),169–178,2017
- 2:学会発表**
- Hayashi YK. Clinical application of the next-generation sequencing technology in diagnosis of limb girdle muscular dystrophy. Symposium on Advance in Neuromuscular Disease. Xi'an, China. 2014.8.22-25
  - Hayashi YK. Pathological diagnosis of muscle diseases. Symposium on Advance in Neuromuscular Disease. Xi'an, China. 2014.8.22-25

- 林 由起子, 後藤加奈子\*, 宮武聡子\*, 輿水江里子\*, 松本直通\*, 埜中征哉\*, 西野一三\*. ネマリンミオパチーの臨床遺伝学的多様性. 第 55 回日本神経学会学術大会 (2014.5.21-24)福岡. 2014 年 5 月 21-24 日
  - 林 由起子, 埜中征哉\*, 宮武聡子\*, 輿水絵里子\*, 松本直通\*, 西野一三\*. 次世代シーケンサーを活用したネマリンミオパチーの遺伝子変異解析. 第 56 回日本小児神経学会学術集会 (2014.5.29-31)浜松. 2014 年 5 月 29-31 日
  - Hayashi YK. Myopathy with prominent contractures. 14<sup>th</sup> Asian and Oceanian Myology Center Annual Scientific Meeting, Shangri-La Hotel, Bangkok, Thailand March 1-4 (2), 2015
  - 林由起子、西野一三. FHL1 ミオパチーの臨床病理学的解析. 日本人類遺伝学会第 60 回大会、2015 年 10 月 14-17 日、東京
  - Hayashi YK, Nishino I. Characterization of Japanese patients with FHL1 myopathy. 13<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics 2016.4.3-7 (6), Kyoto
  - 林由起子、西野一三. FHL1ミオパチーの臨床病理学的解析. 第113回日本内科学会年次総会・講演会 2016年4月15-17日、東京
  - 林由起子、西野一三. Clinical and pathological characterization of patients with FHL1 myopathy. 第57回日本神経学会総会.2016年5月18-21日、神戸
- H:知的所有権の取得状況(予定を含む)**
- 1:特許取得**  
なし
- 2:実用新案登録**  
なし
- 3:その他**  
なし

## 先天性ミオパチーの患者登録システムの構築

研究分担者:小牧 宏文<sup>1)</sup>

共同研究者:石山 昭彦<sup>1)</sup>、木村 円<sup>2)</sup>

- 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 トランスレーショナルメディカルセンター 臨床研究支援部

### 研究要旨

#### 研究要旨

先天性ミオパチーは、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ミオパチー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本邦での診断の現状を知り、また治験への参加者数の確保をも視野に入れて候補患者を広く把握できるように配慮した。一方で、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、診断根拠をもとに3段階のレベルに振り分け(階層付け)を行うこととした。倫理申請を行い登録体制の整備、構築を行い、平成28年9月より登録の開始を行った。これまで7名の登録があり、登録数は徐々に増加傾向にある。本登録システムの意義や目的を周知し、かつ登録推進をはかることが今後の課題と考える。また、このシステムから、本邦における患者分布や診療状況等の現状把握のための調査を行い、先天性ミオパチーにおける「治療の手引き」作成に向けて、課題および問題点を明らかとする必要がある。

### A:研究目的

先天性ミオパチーは、出生時または乳幼児期早期より全身性の筋力低下、筋緊張低下、発達

遅滞、呼吸・哺乳障害などを示す遺伝性筋疾患で、筋病理所見の特徴からいくつかの病型に分類されている。診断には、臨床症状や診察で先



天性ミオパチーが疑わしい場合、筋生検による病理診断が行われる。これまで診断は筋病理所見にもとづき行われていたが、近年では遺伝子で診断が行われる例もある。また、次世代シーケンサーの普及により、遺伝学的に未解明だった新規遺伝子変異例も見つかってきている。現時点では先天性ミオパチーの大半に有効性が認められた治療法はないが、分子病態解明に伴い、今後は治療法開発が重要な課題になってくる。

先天性ミオパチー自体はもともと患者数が非常に少ない希少疾病であるが、病型ごとの患者数となると、その数はさらに少なくなる。病型ごとに自然歴調査を行うにしても、また仮に新規治療や治験が可能になったとしても、参加出来る患者が極めて少ないと考えられ、短期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、希少疾患ではあるが、先天性ミオパチーよりは頻度の高い疾患である Duchenne 型筋ジストロフィーの新規臨床試験においてそうであったように、治療に対する有効性を含む臨床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のが現状である。これらの課題を克服するため、先天性ミオパチーを含む先天性筋疾患では、国際的登録システム CMDIR (congenital muscle disease international registry. <https://www.cmdir.org/>) といったレジストリ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 CMDIR ネットワークへの参画、システムとの協調を見据え、また、新規治療開発や治験をも視野に入れた候補患者数の把握や、自然歴調査を含む臨床研究の発展のためにも、本邦における先天性ミオパチーの患者登録システムを早急に構築する必要があると考えた。

## B:研究方法

対象は筋病理や遺伝子の診断、または臨床診断等で診断された先天性ミオパチー全病型の例とした。先天性ミオパチーの病型には、代表的なものに、ネマリンミオパチー、セントラルコア病/マルチコア病、ミオチューブラーミオパチー、中心核病、先天性筋線維タイプ不均等症、先天性全タイプ 1 線維ミオパチー、タイプ 1 線維優位を示す先天性ミオパチー、非特異的所見

(congenital myopathy without specific morphologic features, minimal change myopathy 等)といったものがあるが、これらの診断名は基本的に筋病理所見にもとづいた診断名である。そのため診断には本来、筋生検が必須である。しかし近年では、新規遺伝子を含め多くの原因遺伝子が見つかってきており、「原因遺伝子」関連ミオパチーといった診断名で呼ばれることもある。そのため、対象患者には筋病理または遺伝子診断いずれかが行われている方が好ましい。基本的には、登録対象としては、筋力低下を含めた先天性ミオパチー特有の臨床症状を認め、筋病理や遺伝子診断のいずれかで確認された例とした。そのうえで、これらの筋病理や遺伝子検査を実施したにも関わらず、確定診断の根拠が得られなかった例や、これらの検査は未実施であるが、臨床診断として矛盾しない例も登録対象に含めた。ただし、このように広く登録対象を設定すると、登録した例ごとでの診断プロセスが異なり、結果、診断精度も異なるため、診断精度を担保する目的で、3 段階のレベル振り分け(階層付)を行うこととした。また、臨床情報データは定期的に更新予定であるが、この階層付もデータ更新時(または随時申し出があれば)、追加検査や追加解析で結果が得られた場合は適宜変更可能とした。

各階層および登録臨床情報は以下の通りであ

る。

《階層付》

a) レベル A (診断カテゴリ A): ①筋生検での筋病理診断による確定診断、または(かつ)②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、①筋生検や②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。

《臨床情報》

患者記入: 氏名、生年月日、住所、電話番号、メールアドレス、連絡方法、患者会等の参加の有無

主治医記入: 記入日、受診されている病院のカルテ番号、家族歴、診断名、併存疾患、遺伝子診断施行施設、握力、初発症状、車いす使用状況、歩行状況、呼吸機能低下の有無、人工呼吸器使用の有無、心機能、CK、身長・体重、患者様御本人の同意能力、記入担当医所属施設、記入担当医氏名

(倫理面への配慮)

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、方法にもとづいて倫理申請を行い、登録体制の整備・構築を整え、平成 28 年 9 月より登録開始とした。先天性ミオパチーには、これまでに 7 名の登録があった。月別には月あたりの登録数は 1-3 名だが、少しずつ増加傾向にある。これまでの登録者は、いずれも筋生検または遺伝子解析がなされている「レベル A」(診断カテゴリ A)のみであった。今後、登録事業を継続の予定である。

### D: 考察

Duchenne 型筋ジストロフィー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/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、自然歴研究等にも貢献してきた功績がある。このようななか、先天性ミオパチー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、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場所である。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する。

現時点での登録者数は7名であるが、登録者および登録待機数は徐々に増加傾向にあり、登録数の増加が見込まれる。内訳では、その多くが、筋生検または遺伝子解析がなされている例である。本登録の目的が本邦の診断の現状を知ることにも目的としているため、筋生検または遺伝子解析で確定診断されなかった例も登録対象者であることを、登録対象者となる可能性のある患者に周知を行っていくことも今後の課題であると考えられた。

先天性ミオパチー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。患者登録の推進のなかで患者個別の対応は困難であるものの患者自身の声に耳を傾け、医療者および患者双方への情報発信を行うことも期待される。かかりつけ医や地域による医療格差を無くすために、また患者に有用な治験、治療、教育資料等を速やかに配布、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する。

## E: 結論

先天性ミオパチー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。本システムの構築後、実際に登録運用を開始したところである。登録情報をもとに、先天性筋疾患すべての疾患で、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を期待したい。

## F: 健康危険情報

なし

## G: 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

### 1: 論文発表

なし

### 2: 学会発表

石山昭彦、東原真奈、園生雅弘、長島優、上杉春雄、森まどか、村田美穂、村山繁雄、小牧宏文、佐々木征行: 小児神経筋疾患における表面筋電図定量解析 (Clustering Index 法の導入と有用性の検討). 第 57 回日本小児神経学会総会、大阪、5/28-5/30.2015

石山昭彦、高橋孝治、Jantima Tanboon、猪野直美、内藤朋巳、竹下絵里、本橋裕子、齋藤貴志、小牧宏文、中川栄二、須貝研司、三橋里美、野口悟、石黒秋生、金井雅代、大山昇一、西野一三、佐々木征行: *ISPD* 変異による  $\alpha$ -dystroglycanopathy 乳児例. 第 63 回日本小児神経学会関東地方会、千葉、9/5.2015

小橋孝介、石山昭彦、竹下絵里、本橋裕子、齋藤貴志、中川栄二、小牧宏文、須貝研司、西野一三、齋藤亘、高相 晶士、佐々木征行: Ullrich 型先天性筋ジストロフィーの進行性呼吸

機能障害に対する外科的側弯矯正の効果の検討. 第 57 回日本小児神経学会総会、大阪、5/28-5/30.2015

Kosuke Kohashi, Akihiko Ishiyama, Eri Takeshita, Yuko Motohashi, Takashi Saito, Eiji Nakagawa, Hirofumi Komaki, Kenji Sugai, Ichizo Nishino, Wataru Saito, Masashi Takaso, Masayuki Sasaki: Early scoliosis surgery may prevent deterioration of respiratory function in Ullrich congenital muscular dystrophy. 20<sup>th</sup> international congress of the world muscle society, Brighton, 30<sup>th</sup> September - 4<sup>th</sup> October

Michio Inoue, Akihiko Ishiyama, Hirofumi Komaki, Eri Takeshita, Yuko Shimizu-Motohashi, Takashi Saito, Eiji Nakagawa, Kenji Sugai, Narihiro Minami, Yuichi Goto, Masayuki Sasaki, Type-specific selectivity pattern of skeletal muscle images in spinal muscular atrophy. 20<sup>th</sup> international congress of the world muscle society, Brighton, 30<sup>th</sup> September - 4<sup>th</sup> October

E.Iwabuchi, M. Inoue, A. Ishiyama, H. Komaki, E. Takeshita, Y. Shimizu-Motohashi, T. Saito, E. Nakagawa, K. Sugai, S. Kuru, T. Nakayama, M. Sasaki: Selectivity pattern of lower limb skeletal

muscle images in Limb-Girdle muscular dystrophy 2A(LGMD 2A) with database of muscular images of patients with Limb-Girdle muscular dystrophy (IBIC-LG) in Japan. 21st international congress of the world muscle society, Granada, 4th - 8th October, 2016

Akihiko Ishiyama, Ikuhiko Shibuya, Satomi Mitsunashi, Yuko Motohashi, Eri Takeshita, Hirofumi Komaki, Kenji Sugai, Masayuki Sasaki, Satoru Noguchi, Ikuya Nonaka, and Ichizo Nishino: Fasciitis was demonstrated at early stage in patients with juvenile dermatomyositis. 21st international congress of the world muscle society, Granada, 4th - 8th October, 2016

**H:知的所有権の取得状況(予定を含む)**

**1:特許取得**

なし

**2:実用新案登録**

なし

**3:その他**

なし

## 本邦における筋チャンネル病

### (非ジストロフィー性ミオトニー症候群および周期性四肢麻痺)

研究分担者:高橋 正紀<sup>1)</sup>

共同研究者:佐々木 良元<sup>2)</sup>、仲座 真希<sup>1)</sup>、久保田智哉<sup>1)</sup>、

古田 充<sup>3)</sup>、中森 雅之<sup>3)</sup>、望月 秀樹<sup>3)</sup>

1)大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学講座

2)国立病院機構三重病院 神経内科

2)大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学講座

#### 研究要旨

骨格筋チャンネル病(非ジストロフィー性ミオトニー症候群および遺伝性周期性四肢麻痺)についての診療手引きを作成した。診断体制の整備として、広く神経筋のチャンネル病を標的とした遺伝子診断の体制を整えるとともに、孤発性周期性四肢麻痺の感受性一塩基多型について検討した。ADL障害が非常に軽度なにも関わらず、患者のQOLは疾患による影響を大きく受けていることが明らかになった。

#### A:研究目的

骨格筋チャンネル病は、低カリウム性周期性四肢麻痺、高カリウム性周期性四肢麻痺、先天性パラミオトニー、Naチャンネルミオトニー、先天性ミオトニー、Andersen-Tawil症候群など多くの疾患が含まれる。臨床症状のみから、これら疾患を鑑別することは、一般の神経内科医・小児神経科医にとってはしばしば困難である。exercise testといったルーチンには施行しない神経生理検査が鑑別診断・原因遺伝子推定に有用とされるが、まだまだ周知されておらず、検査法の標準化も望まれている。周期性四肢麻痺と臨床診断される患者の中に、

家族歴を認めず、原因となる変異が既知原因遺伝子に存在しない例(孤発性周期性四肢麻痺(SPP))が多数存在しており、臨床上の課題である。

筋チャンネル病は、進行性のADL障害をきたし難く、一部では発作時のみの症状であることなどから、一般に良性の疾患と考えられている。そのため、本邦では診断が未確定の患者が多いうえに、疾患が患者QOLに与える影響が十分に評価されていない。

診断の向上のために、診療の手引きの作成、遺伝子診断体制の整備や、遺伝子診断確定患者に対するQOL等の調査を目的とした。

## B:研究方法

筋チャンネル病に造詣の深い、臨床神経生理および臨床遺伝のエキスパート 8 名(有村公良、園生雅弘、國分則人、佐々木良元、東原真奈、北國圭一、久保田智哉、高橋正紀)からなる編集委員を設置し、筋チャンネル病、遺伝性周期性四肢麻痺、非ジストロフィー性ミオトニー症候群診療の手引きを策定することとした。

従来のサンガー法に加え、IonPGM®を用いた骨格筋チャンネル病に反復発作性運動失調症(episodic ataxia)も標的とした、ターゲットアンブリコンシークエンスの系を構築し、原因変異の同定できない周期性四肢麻痺症例を中心に、遺伝子解析を行った。いっぽうで、アジア人甲状腺中毒性周期性四肢麻痺(TPP)を対象とした複数の研究で報告され、*KCNJ2* 遺伝子近傍に存在する計 9 つの疾患感受性 SNP について、日本人の SPP 22 例を対象に多型の頻度について検討し、データベース上の一般日本人の集団と比較した。

三重大学あるいは大阪大学で遺伝子診断を施行し、診断確定した患者および家系内の 16 歳以上の罹患者に対し、麻痺発作の頻度、ミオトニーの部位・程度、Barthel Index に加え SF36、INQoL の QOL 指標を調査した。自記式評価票の記載依頼は手渡しあるいは郵送で行い、連結可能匿名化された評価票は、大阪大学に郵送により回収した。

(倫理面への配慮)

患者の遺伝子に関わる研究については大阪大学ヒトゲノム研究審査委員会にて承認済みである。同意を文書にて得て、研究への参加は患者の自由意思に基づくこと、同意の撤回が自由に行えること、連結可能匿名化を行い個人情報保護に最大限の配慮をすることなど「ヒトゲノム・遺

伝子解析研究に関する倫理指針」などを遵守し行った。患者の QOL などの調査は大阪大学医学部附属病院のほか、国立病院機構三重病院でも承認をうけ、連結可能匿名化を行い個人情報保護に最大限の配慮を行った。

## C:研究結果

大阪大学において、内外の文献ならびに委員施設の症例情報を集約し、初稿を作成した。本症になじみの薄い神経内科医・小児神経科医にも使いやすいように、診断に重要な神経生理検査の手法の標準化を目指し、委員の間で特に議論を行った。エキスパートの合意に基づき最終案を策定し、研究代表者に提出した。本班が担当する他の疾患と合わせて、学会審査、承認を受ける予定である。

骨格筋チャンネル病に反復発作性運動失調症(episodic ataxia)も標的とした、ターゲットアンブリコンシークエンスの系が確立できた。周期性四肢麻痺では従来は主要遺伝子の候補エクソンのみのシークエンスであったが、既知原因遺伝子の全エクソンについて簡便に解析することが可能となり、10 例近い解析を終了しているが、現在のところ原因と考えられる変異は見出されていない。いっぽうで、既報の 9 つの TPP 疾患感受性 SNP のうち 6 つでは、SPP で有意にリスクアレル頻度が高く、疾患感受性が存在すると考えられた。

QOL 調査は 36 例より回収した。身体的健康度は諸外国と同様の傾向だったが、INQoL の自立や関係性、SF-36 の心の健康など精神的健康度がより影響を受けていた。

## D:考察

臨床神経生理および臨床遺伝の専門家による、骨格筋チャンネル病の診療の手引きを作成でき

た。特に、exercise test などの神経生理検査施行手技についても詳細に記述したことから、疾患の臨床経験のない臨床家にとって非常に実用的なものになったと考えている。この手引きは、案としてインターネット上、

[http://square.umin.ac.jp/channel/2017guide\\_line.pdf](http://square.umin.ac.jp/channel/2017guide_line.pdf) に掲載しており、臨床現場で活用され未診断症例の同定につながることを期待される。

周期性四肢麻痺と臨床診断される患者の中に、家族歴を認めず、原因となる変異が既知原因遺伝子に存在しない例について、遺伝的素因が明らかとなりつつある。今後の臨床診断に活用される可能性に加え、病態解明にも重要な知見となる可能性がある。

また、本邦で筋チャンネル病患者の QOL についてまとめた症例数の調査はこれまでに行われていなかった。今回の調査では、ADL は良好であるものの、疾患が QOL に大きく影響を及ぼしている現状が浮き彫りとなった。本症は年齢により症状・発作の程度が変化することから、QOL データを経時的に蓄積していく必要性もあると考えられる。オックスフォード大や大阪大の倫理と公共政策学、医療情報部との共同研究で、web 上で入力できるシステムを構築している。

## E: 結論

一般専門医にも有用な診療の手引きが作成できた。孤発性を含む周期性四肢麻痺の原因として遺伝的素因が存在することを支持する結果を得た。周期性四肢麻痺患者の診断において有用な遺伝情報になるかもしれない。日本のチャンネル病患者では ADL に比し QOL の低下が著明に認められ、今後解決すべき医療・社会的問題である。

## F: 健康危険情報

なし

## G: 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

### 1: 論文発表

久保田智哉 高橋正紀 骨格筋チャンネル病の最新知見—ミオトニー症候群と周期性四肢麻痺を中心に 別冊 医学のあゆみ イオンチャンネル病のすべて pp. 38-45 2014

Yoshinaga H, Sakoda S, Shibata T, Akiyama T, Oka M, Yuan J-H, Takashima H, Takahashi MP, Kitamura T, Murakami N, Kobayashi K Phenotypic variability in childhood of skeletal muscle sodium channelopathies. *Pediatr Neurol*. 2015 May;52(5):504-8.

高橋正紀 周期性四肢麻痺 今日の整形外科治療指針 医学書院 2016 295-296.

階堂三砂子, 古田 充, 中森雅之, 湯浅義人, 高橋正紀 てんかん性脳波異常を伴う反復発作性運動失調症 2 型の一家系 臨床神経 2016 56(4):260-264.

Kato H, Kokunai Y, Dalle C, Kubota T, Madokoro Y, Yuasa H, Uchida Y, Ikeda T, Mochizuki H, Nicole S, Fontaine B, Takahashi MP, Mitake S. A case of non-dystrophic myotonia with concomitant mutations in the SCN4A and CLCN1 genes. *J Neurol Sci*. 2016 Oct 15;369:254-8.

Ueki J, Nakamori M, Nakamura M,

Nishikawa M, Yoshida Y, Tanaka A, Morizane A, Kamon M, Araki T, Takahashi MP, Watanabe A, Inagaki N, Sakurai H. Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs for the investigation of CTG repeat instability. Sci Rep. 2017 Feb 13;7:42522.

高橋正紀 周期性四肢麻痺 JMEDI 治療法便覧〜私の治療〜」猿田亨男、北村惣一郎 総監修 日本医事新報社 印刷中

## 2:学会発表

古田 充、中田智彦、穀内洋介、坂田宗平、木村紘美、相庭武司、吉永正夫、大崎裕亮、中森雅之、伊藤英樹、佐藤貴子、久保田智哉、門田一繁、進藤克郎、望月秀樹、清水 渉、堀江 稔、岡村康司、大野欽司、高橋正紀 Kir3.4 変異は Kir2.1 に対する抑制作用を通して Andersen-Tawil 症候群を引き起こす。第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月 23 日 福岡

加藤秀紀、湯浅浩之、三竹重久、打田佑人、池田知雅、間所佑太、穀内洋介、高橋正紀 遺伝子解析にて診断した Thomsen 病 3 例の臨床像と電気生理学的検査の検討 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月 福岡

階堂三砂子、古田 充、中森雅之、湯浅義人、高橋正紀 著明な脳波異常を伴う反復発作性運動失調症 2 型 (EA2) の一家系 日本神経学会 第 102 回近畿地方会 2015 年 7 月 4 日 大阪国際会議場 大阪

高橋正紀、佐々木良元、久保田智哉、穀内洋介、古田充、中森雅之、望月秀樹、富本秀和、大野欽司 筋チャンネル病-周期性四肢麻痺およ

び非ジストロフィー性ミオトニー症候群の遺伝子解析と麻痺発作重症度分類 第 1 回日本筋学会学術集会 2015 年 8 月 7 日 国立精神・神経医療研究センター 小平 東京

高橋正紀、佐々木良元、久保田智哉、古田充、中森雅之、加藤秀紀、阿部達哉、國分則人、望月秀樹 骨格筋チャンネル病の電気生理学的分類の限界について 第 45 回日本臨床神経生理学会学術大会 2015 年 11 月 6 日 大阪国際会議場 大阪

穀内洋介、Fernande Freyermuth、芦原貴司、伊藤英樹、紀嘉浩、中森雅之、木村卓、松村剛、藤村晴俊、望月秀樹、石浦章一、Swanson Maurice、堀江稔、Denis Furling Charlet-Berguerand Nicolas、高橋正紀 Na チャネルのスパライジング異常が筋強直性ジストロフィーの心臓伝導障害の原因となる 第 2 回日本筋学会学術集会 2016 年 8 月 5 日 東京

井村修、新垣ほのか、藤野陽生、齊藤利雄、藤村晴俊、尾方克久、諏訪園秀吾、高田博仁、高橋正紀、松村剛 筋ジストロフィーの QOL と自己評価法 第 70 回国立病院総合医学会 2016 年 11 月 11-12 日 沖縄

## H:知的所有権の取得状況(予定を含む)

### 1:特許取得

なし

### 2:実用新案登録

なし

### 3:その他

なし



## Schwartz-Jampel 症候群の病態解明と調査

研究分担者：平澤恵理<sup>1)</sup>

共同研究者：野中里紗<sup>1)</sup>、寧亮<sup>1)</sup>、山下由莉<sup>1)</sup>、大野 欽司<sup>2)</sup>、中田智史<sup>3)</sup>

1) 順天堂大学大学院医学研究科

2) 名古屋大学大学院医学系研究科

3) 順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科

### 研究要旨

本研究の目的は、細胞外マトリックス分子パールカン遺伝子の機能部分欠損による軟骨異栄養性筋強直症（Schwartz-Jampel 症候群, SJS）の臨床診断・遺伝子診断方法を確立し、本邦における発症者の発掘を喚起し、その臨床的特徴、経過などを調査することである。SJS は、筋、骨格の症状から ADL を著しく障害する難治性疾患である。原因遺伝子が明らかになったが、効果的対症療法、根治療法が確立しておらず患者調査が進んでいない。全身の合併症リスクを調査して注意を喚起する必要がある。

### A：研究目的

軟骨異栄養性筋強直（Schwartz-Jampel 症候群, SJS）はパールカン欠損疾患であり（*Nature Genetics*, 2001, *Am.J. Hum Genet.* 2002）、筋の自発持続収縮によるミオトニアと骨格病変を主症状とする。分担研究者らは、生体におけるパールカンの機能解明のため、遺伝子改変動物を作成し、軟骨発生にパールカンが必須であることを示し（*Nature Genetics* 1999, & 2001）、アセチルコリンエステラーゼを神経筋接合部に局在させる必須分子であることを示した（*Nature Neuroscience* 2002）。分担研究者らを含むこれまでの国内外の研究により、SJS の病態、原因遺伝子が明らかになりつつあるが、効果

的対症療法、根治療法が確立しておらず、かつ筋、骨格の症状から ADL を著しく障害する難治性疾患である。以前分担研究者らは、パールカンを欠損する 10 週齢マウスの全身状態を検証し、大動脈解離を高率に発症する知見を得た（未発表データ）。そこで、心血管系のリスクについての発症リスクをマウスモデルにより検討し、広報する必要があると考えた。本研究の目的は、SJS の臨床診断・遺伝子診断の精度をあげ、症例の蓄積と調査を促進することである。更に、分子病態解明と画期的治療開発を目指す基礎研究の成果を患者治療へ繋ぐことことに貢献することを目指している。

## B：研究方法

本邦においては、SJS の調査が十分に行われていないため、まず症例の蓄積を進める必要がある。これまでの研究室規模で進めてきた診断を臨床的に応用できるように、経費と労力を効率化する方法を検討する。これまでに蓄積された筋生検例のうち本疾患が疑われるものには免疫染色にてパールカン関連分子群の免疫染色でスクリーニングを行った。これにより可能性が高い場合には標本量が十分あればウェスタンブロット等に追加検査を行うこととした。血液などから DNA を採取している場合には、cDNA でのスクリーニング及びゲノム解析を進める。ここれらの検証を通し、本疾患の最適な診断方法と診断基準を再検討する。動物を使った実験としては、軟骨以外のすべての組織でパールカンを欠損させたモデルマウスおよび対照マウスを 10、20、50 週齢時点、胸部大動脈解離を肉眼的・組織学的に検証した。

(倫理面への配慮) Schwartz-Jampel 症候群調査に関しては、医学部倫理委員会の承認を得ている。組み換え DNA 実験と動物実験は順天堂大学及び名古屋大学の承認を得ている。動物実験は、カルタヘナ法、ならびに、順天堂大学の動物実験委員会の承認を得て動物実験指針を遵守して研究進めている。

## C：研究結果

研究分担者のグループおよび諸外国で行われた研究成果を検証し、診断基準の見直しを行った。また、診断の手引きを作成した。また、本研究と連携して、本調査班で発掘した 1 例から iPS 細胞を樹立することで、治療開発のためのモデル細胞系作成に成功した。現在、この iPS 細胞に由来する筋細胞の興奮性をカルシウムイメージングで評価する方法を検証

している。この評価系を用いることで既知の薬剤ライブラリから、Schwartz-Jampel 症候群の筋細胞の興奮異常を正常化する薬剤のスクリーニングが可能になると考えている。

また、モデルマウスで検証した結果、パールカン欠損胸部大動脈の肉眼的・組織学的観察より、胸部大動脈解離の罹患率は、10 週齢で 15.4%、20 週齢で 35.8%、50 週齢で 38.9%であった。同観察期間中、対照群での罹患率は 0%であった。パールカン欠損による大動脈解離リスクは加齢により増すと考えられた。

## D：考察

診断の手引きを作成することで、これまで Schwartz-Jampel 症候群と診断されず見逃されてきた患者の発掘が可能になったと考えられた。手引きの内容は神経内科学会で検証を行っているが、Schwartz-Jampel 症候群のような遺伝子変異疾患は小児期からの発掘が重要であることから、小児科や小児歯科、麻酔科、産婦人科、整形外科を始めとした他領域へも門戸を広げ、早期診断、治療を目指す必要があると考えられた。近年、次世代シーケンサーによる解析を行い、過去に遺伝子変異が判明しなかった症例も診断が可能になった。しかし、現状では、臨床、電気生理、及びタンパク質レベルの解析を併せ診断することが必要と考えられた。依然、患者数は少なく、さらなる症例発掘と診断基準の充実が必須である。患者数が少なく、経時的病態解析が困難であるため、治療研究や全身合併症検証にはモデルマウスを使用して進めることが適当と思われた。

## E：結論

診断の手引きを作成した。この手引きを小児

科や小児歯科、麻酔科、産婦人科、整形外科に門戸を広げ患者を発掘することができる。今後得られる情報を重ね、診療の手引書も作成する。

#### F : 健康危険情報

特になし。

#### G : 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

##### 1 : 論文発表

- |   |  |   |   |
|---|--|---|---|
| 1 | Furuya N, Ikeda SI, Sato S, Soma S, Ezaki J, Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, <u>Arikawa-Hirasawa E</u> , Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. Autophagy. Apr;10(4):631-41 2014 | 4 | Kerever A, Kamagata K, Yokosawa S, Otake Y, Ochi H, Yamada T, Hori M, Kamiya K, Nishikori A, Aoki S, <u>Arikawa-Hirasawa E</u> . See-through Brains and Diffusion Tensor MRI Clarified Fiber Connections: A Magnetic Resonance in Medical Sciences . 14:159-162, 2015   |
| 2 | Ning L, Kurihara H, de Vega S,* Ichikawa-Tomikawa n, Xu Z, Nonaka R, Kazuno S, Yamada Y, Miner JH, <u>Arikawa-Hirasawa E</u> , Laminin $\alpha 1$ regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF $\beta$ pathway The American Journal of Pathology . 2014 Jun;184(6):1683-94                                 | 5 | Iwata S, Ito M, Nakata T, Noguchi Y, Okuno T, Ohkawara B, Masuda A, Goto T, Adachi M, Osaka H, Nonaka R, <u>Arikawa-Hirasawa E</u> , Ohno K. A missense mutation in domain III in HSPG2 in Schwartz-Jampel syndrome compromises secretion of perlecan into the extracellular space Neurmusc Disord. 8.00153-00154. 2015 |
| 3 | Nonaka R, Iesaki T, de Vega S, Daida H, Okada T, Sasaki T, and <u>Arikawa-Hirasawa E</u> Perlecan deficiency causes endothelial  | 6 | Kerever A, Yamada T, Suzuki Y Mercier F, <u>Arikawa-Hirasawa E</u> Fractone aging in the subventricular zone of the lateral ventricle Journal of Chemical Neuroanatomy. :66-67:52-60, 20  |
|   |  | 7 | Ning L, Xu Z, Furuya N, Nonaka R, Yamada Y, <u>Arikawa-Hirasawa E</u> . Perlecan inhibits autophagy to maintain muscle homeostasis in mouse soleus muscle. Matrix Biol. Oct;48 26-35 2015   |
|   |  | 8 | de Vega S, Hozumi K, Suzuki N, Nonaka R, Seo E, Takeda A, Ikeuchi,  |

- T Nomizu, M Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E Identification of Peptides Derived from the C-terminal Domain of Fibulin-7 Active for Endothelial Cell Adhesion and Tube Formation Disruption. Peptide Science
- 9 Kamagata K, Kerever A, Yokosawa S, Otake Y, Ochi H, Hori M, Kamiya K, Tsuruta K, Tagawa K, Okazawa H, Aoki S, Arikawa-Hirasawa E. Quantitative Histological Validation of Diffusion Tensor MRI with Two-Photon Microscopy of Cleared Mouse Brain. Magn Reson Med Sci. 2016 Mar 30.
- 10 Sadatsuki R, Kaneko H, Kinoshita M, Futami I, Nonaka R, Culley KL, Otero M, Hada S, Goldring MB, Yamada Y, Kaneko K, Arikawa-Hirasawa E, Ishijima M. Perlecan is required for the chondrogenic differentiation of synovial mesenchymal cells through regulation of Sox9 gene expression. J Orthop Res. 2016 May 30. doi: 10.1002/j
- 11 Kanako Sato, Aurelien Kerever, Koji Kamagata, Kohei Tsuruta, Ryusuke Irie, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, Arikawa-Hirasawa E, Nobuhiro Nitta, Ichio Aoki and Shigeki Aoki Understanding microstructure of the brain by comparison of neurite orientation dispersion and density imaging (NODDI) with transparent mouse brain Acta Radiologica Open 6(4) 1–6 2017
- 2 : 学会発表
- 1 Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa. The role of the extracellular matrix protein Perlecan in the arterial wall. Experimental Biology 4.26-30 2014 San diego, USA
- 2 平澤 恵理、岩田 哲、野中 里紗、服部 信孝、中田 智彦、伊藤美佳子、大野 欽司 Schwartz-Jampel 症候群の原因遺伝子、パールカンの機能部分欠損変異の機能解析第 55 回日本神経学会学術大会 2014.5.21-24 (福岡)
- 3 野中 里紗、家崎 貴文、Susana de Vega、Aurelien Kerever、山田吉彦、平澤 (有川) 恵理 大動脈構造や機能におけるパールカンの役割第 46 回日本結合組織学会・第 61 回マトリックス研究会合同学術集会 2014.6.7-8(名古屋)
- 4 Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega., Aurerien Kerever, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa . Role of Perlecan in the Structural Integrity and Function of the Aorta. Gordon Research Conference on proteoglycan 2014.7.6-11 New Hampshire, USA
- 5 平澤 恵理、野中 里紗、大野 欽司 Schwaets-Jampel 症候群の病態

- 解明と調査希少難治性筋疾患に関する調査研究班 H26 年度班会議  
2015.2.6
- 6 Eri Arikawa-Hirasawa Role of Perlecan in Neurogenesis and Ageing" Gordon Research Conference on proteoglycan 2014.7.6-11
- 7 Takenori Inomata, Toru Matsunaga, Nobuyuki Ebihara, Akira Murakami, Eri Arikawa-Hirasawa Perlecan-deficient Mutation Impairs Homeostasis and Wound Healing in Mouse Corneal Epithelium Gordon Research Conference on proteoglycan 2014.7.6-11
- 8 Susana de Vega, Eimi Seo, Anna Takeda, Nobuharu Suzuki, Risa Nonaka, Kentaro Hozumi, Motoyoshi Nomizu, Yoshihiko Yamada, and Eri Arikawa-Hirasawa Identification of Fibulin-7 Peptides Active for Endothelial Cell Adhesion and Tube Formation 第 46 回日本結合組織学会・第 61 回マトリックス研究会合同学術集会 2014.6.7-8(名古屋)
- 9 Liang Ning, Hidetake Kurihara, Susana de Vega, Risa Nonaka, Eri Arikawa-Hirasawa, Role of Laminin□□1 in mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation 第 46 回日本結合組織学会・第 61 回マトリックス研究会合同学術集会 2014.6.7-8(名古屋)
- 10 Aurelien Kerever Taihei Yamada, and Eri Arikawa-Hirasawa Aging of the extracellular matrix structure fractone in the mouse subventricular zone 第 47 回日本結合組織学会学術大会 東京 平成 27 年 5 月 15、16 日
- 11 鈴木 佑治, Aurelien Kerever, 山田 泰平、平澤 恵理 老化マウス海馬における糖鎖構成の変化第 47 回日本結合組織学会学術大会 東京 平成 27 年 5 月 15、16 日
- 12 多賀 祐喜、石島 旨章、平澤 (有川) 恵理、田中 啓友、水野 一乗、楠畑 雅、服部 俊治安定同位体標識コラーゲンを用いた血中、尿中のコラーゲン由来因子の高精度定量分析 第 47 回日本結合組織学会学術大会 東京 平成 27 年 5 月 15、16 日
- 13 Aurelien Kerever Taihei Yamada, and Eri Arikawa-Hirasawa Extracellular matrix aging in mouse hippocampus 第 38 回日本神経科学大会 神戸 平成 27 年 7 月 28 日
- 14 Yuri Yamashita, Risa Nonaka, Nobutaka Hattori, Eri Arikawa-Hirasawa. The role of perlecan in lipid dynamism. Gordon Research Conference. Andover, NH. 2016 年 7 月 11, 12 日
- 15 Yuji Suzuki, Aurelien Kerever, Taihei Yamada, Yusuke Yoshimura, Kyohei Higashi, Toshihiko Toida, Nobutaka Hattori, Eri Arikawa-

- Hirasawa. The structural and compositional changes of chondroitin sulfate in the aged hippocampus. Gordon Research Conference: Proteoglycans. NH Andover, 2016年7月10日～15日
- 16 Taihei Yamada, Aurelien Kerever, Yusuke Yoshimura, Yuji Suzuki, Kyouhei Higashi, Toshihiko Toida and Eri Arikawa-Hirasawa Age-Associated Changes in Heparan Sulfate Structures Impair FGF-2 Signaling in Neurogenesis Gordon Research Conference: Proteoglycans. NH Andover, 2016年7月10日～15日
- 17 Aurelien Kerever Eri Arikawa-Hirasawa Immunohistochemical analysis of ECM structures in postnatal brain development of a mouse model of autism NH Andover, 2016年7月10日～15日
- 18 Taihei Yamadaa, Aurelien Kerevera, Yuusuke Yoshimuraa, Toshihiko Toidab, Kyohei Higashib and Eri Arikawa-Hirasawa Sulfated Glycosaminoglycans Analysis in the Aged Mouse Subventricular Zone The 3rd International Symposium on Glycol-Neuroscience. 淡路島, 2016年1月14日～16日
- 19 Yuji Suzuki, Aurelien Kerever, Kyohei Higashi, Toshihiko Toida, Eri Arikawa-Hirasawa. Analysis of Chondroitin Sulfate in the aged mouse hippocampus. The 3rd International Symposium on Glycol-Neuroscience. 淡路島, 2016年1月14日～16日
- 20 吉村祐輔, 山田泰平, ケレベールオーレリアン, 東恭平, 戸井田敏彦, 服部信孝, 平澤恵理 マウス成体神経新生領域の老化におけるヘパラン硫酸鎖の変化 2016.5.18-21 (神戸)
- 21 青木茂樹, 鎌形康司, Aurelien Kerever, 佐藤香菜子, 堀正明, 岡澤均, 平澤恵理 MRIで透明脳をみる Different visualization of transparent brain by MR imaging 57回 日本神経学会学術大会 2016.5.18-21 (神戸)

**H** : 知的所有権の取得状況 (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

## 先天性筋無力症候群

研究分担者:大野欽司<sup>1)</sup>

1)名古屋大学医学系研究科神経遺伝情報学

### 研究要旨

本邦の先天性筋無力症候群(CMS)の新規発掘のために、シーケンシング解析を行うとともに、診断基準、重症度分類、診療の手引き等作成に供するために、平成 28 年 8 月 31 日に開始した神経筋疾患患者登録 Remudy に先天性筋無力症候群のレジストリーを開始した。難病情報センターホームページに一般向けの病気の解説、医療従事者向けの診断・治療指針を掲載した。加えて、intron 中央部の塩基置換の病原性を類推する IntSplice ウェブサービスプログラムを開始するとともに、ミスセンス変異解析のための iMSVM ウェブサービスプログラムの構築を開始した。

### A:研究目的

本研究の目的は、本邦における先天性筋無力症候群(CMS)のさらなる発掘と、先天性筋無力症候群の指定難病登録へ向けて診断基準の策定・臨床調査個人票の作成・難病指定医向けテキストの作成を行うことにより、今後の病態研究への基盤整備を行うことである。また、診断精度の向上を目的とした遺伝子診断の診断体制の整備を行う。

### B:研究方法

過去の自らの分子病態研究成果と論文精読により CMS の分子病態を探り、難病情報センターホームページに情報提供を行った。

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、whole exome sequencing (WES)

解析、whole genome sequencing (WGS) 解析を外注により行った。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。

スプライシング強度を記述し得る 110 種類のパラメータを独立変数として、Human Gene Mutation Database (HGMD) の intronic SNV と dbSNP の minor allelic frequency > 0.01 の intronic SNV を弁別する support vector machine モデルを作成し、leave-one-out 法により検証を行った。Intronic SNV は IVS-50 から IVS-3 に限定した。機械学習により作成をしたモデルを IntSplice ウェブサービスプログラムとして公開した。

過去に報告された 25 種類のミスセンス変異重症度予測ツールを独立変数として、

HGMD の SNV と dbSNP の minor allelic frequency > 0.01 の SNV を弁別する support vector machine モデルを作成し、leave-one-out 法により検証を行った。機械学習により作成をしたモデルを iMSVM ウェブサービスプログラムとして公開に向けた準備を開始した。  
(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

CMS の指定難病登録のための臨床調査個人票案(新規・継続)を作成・検証・改定を行うとともに、難病指定医向けテキストを作成し、難病情報センターホームページに一般向けの病気の解説、医療従事者向けの診断・治療指針を掲載した。

本邦 CMS の whole exome sequencing (WES)解析・whole genome sequencing (WGS)解析を行い、3 例において原因遺伝子変異を同定した。2 例は *COLQ* 遺伝子変異による終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症であり、1 例は *CHRNE* 遺伝子変異によるスローチャンネル症候群であった。

イントロン塩基置換の病原性予測ツール IntSplice を機械学習により開発し、ウェブサービスプログラムを開始した。

ミスセンス変異の重症度予測ツール iMSVM を開発し、従来の 25 種類のいずれの予測ツールよりも感度・特異度が高いことを検証し、ウェブサービスプログラムを作成しローカル環境で検証を行った。

### D: 考察

研究者らが行ってきた CMS の分子病態研究成果に基づき、指定難病登録のための臨床調査個人票案(新規・継続)・難病情報センターホームページの作成に寄与した。

本邦 CMS の新規発掘を行った。機能解析をすることなく CMS の診断が可能な症例は 3 例のみであった。

機械学習法によるイントロン塩基置換病原性予測ツール IntSplice は IVS-50 から IVS-3 の塩基置換のスプライシングに与える影響を予測するツールであり、同部位の病原性予測ツールは過去に存在せず CMS のみならず多くの遺伝子変異の検出に有用であることを示した。

同様に機械学習法によるミスセンス変異予測ツール iMSVM は CMS のみならず各種遺伝性疾患の病原遺伝子変異の解析に有用であることが期待される。

### E: 結論

CMS の指定難病登録のための臨床調査個人票案(新規・継続)の作成を行った。3 例の先天性筋無力症候群確定診断を行った。難病情報センターホームページに一般向けの病気の解説、医療従事者向けの診断・治療指針を掲載した。本邦 CMS のシーケンシング解析を進めた。機械学習法を用いてイントロン塩基置換病原性予測ツール IntSplice、ならびに、ミスセンス変異予測ツール iMSVM の開発を行った。

### F: 健康危険情報

ありません。

### G: 研究発表

#### 1: 論文発表



### ***Original Articles***

1. Inaguma Y, Hamada N, Tabata H, Iwamoto I, Mizuno M, Nishimura YV, Ito H, Morishita R, Suzuki M, [Ohno K](#), Kumagai T, Nagata KI. SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *EMBO Mol Med* 2014, 6: 155 - 295.
2. Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, Ito M, Masuda A, Ito Y, Engel AG, [Ohno K](#). LRP4 third beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014, 23: 1856-1868.
3. Nakayama T, Nakamura H, Oya Y, Kimura T, Imahuku I, [Ohno K](#), Nishino I, Abe K, Matsuura T. Clinical and genetic analysis of the first known Asian family with myotonic dystrophy type 2. *J Hum Genet* 2014, 59: 129-133.
4. Kokunai Y\*, Nakata T\*, Furuta M\*, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, [Ohno K](#), Takahashi M. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 2014, 82: 1058-1064. \*Equal contribution.
5. Kobayashi M, Ohno T, Ihara K, Murai A, Kumazawa M, Hoshino H, Iwanaga K, Iwai H, Hamana Y, Ito M, [Ohno K](#), Horio F. Searching for genomic region of high-fat diet-induced type 2 diabetes in mouse chromosome 2 by analysis of congenic strains. *PLoS ONE* 2014, 9: e96271.
6. Yamashita Y\*, Matsuura T\*, Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita M, Ibi T, Sahashi K, [Ohno K](#). LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity. *Neurobiol Dis* 2014, 69: 200-205. \*Equal contribution.
7. Nasrin F, Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Takeda J, [Ohno K](#). HnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform. *Sci Rep* 2014, 4: 6841.
8. Azuma Y, Nakata T, Tanaka M, Shen XM, Ito M, Iwata S, Okuno T, Nomura Y, Ando N, Ishigaki K, Ohkawara B, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Sokabe M, [Ohno K](#). Congenital myasthenic syndrome in Japan: Ethnically unique mutations in muscle nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Neuromuscul Disord* 2015, 25: 60-69.
9. 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.
10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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 FTLD/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nat Commun* 2015, 6: 7098.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.

19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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*, 2015, 2: 2046-2061.
24. 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.
25. 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.
26. Gao K, Wang J, Li L, Zhai Y, Ren Y, You H, Wang B, Wu X, Li J, Liu Z, Li X, Huang Y, Luo XP, Hu D, Ohno K, Wang C. Polymorphisms in four genes (rs151290, rs972283, rs780094 and rs10830963) and their correlation with type 2 diabetes mellitus in Han Chinese in Henan Province, China. *Int J Env Res Public Health* 2016, 13.
27. Takegami Y, Ohkawara B, Ito M, Masuda A, Nakashima H, Ishiguro N, Ohno K. R-spondin 2 facilitates differentiation of proliferating chondrocytes into hypertrophic chondrocytes by enhancing Wnt/beta-catenin signaling in endochondral ossification. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, 473: 255-264.
28. Chen G, Masuda A, Konishi H,

- Ohkawara B, Ito M, Kinoshita M, Kiyama H, Matsuura T, [Ohno K](#). Phenylbutazone induces expression of MBNL1 and suppresses formation of MBNL1-CUG RNA foci in a mouse model of myotonic dystrophy. *Sci Rep* 2016, 6: 25317.
29. Hirayama M, Tsunoda M, Yamamoto M, Tsuda T, [Ohno K](#). Serum tyrosine-to-phenylalanine ratio is low in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2016, 6: 423-431.
30. Nakashima H\*, Ohkawara B\*, Ishigaki S, Fukudome T, Ito K, Tsushima M, Konishi H, Okuno T, Yoshimura T, Ito M, Masuda A, Sobue G, Kiyama H, Ishiguro N, [Ohno K](#). R-spondin 2 promotes acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction via Lgr5. *Sci Rep* 2016, 6: 28512. \*Equal contribution.
31. Bruun GH, Doktor TK, Borch J-J, Masuda A, Krainer AR, [Ohno K](#), Andresen BS. Global identification of hnRNP A1 binding sites for SSO-based splicing modulation. *BMC Biol* 2016, 14: 54.
32. Shibata A, Okuno T, Rahman MA, Azuma Y, Takeda J, Masuda A, Selcen D, Engel AG, [Ohno K](#). IntSplice: prediction of the splicing consequences of intronic single-nucleotide variations in the human genome. *J Hum Genet* 2016, 61: 633-640.
33. Muramatsu Y, Ito M, Oshima T, Kojima S, [Ohno K](#). Hydrogen-rich water ameliorates bronchopulmonary dysplasia (BPD) in newborn rats. *Pediatr Pulmonol* 2016, 51: 928-935.
34. Lin Y, Ohkawara B, Ito M, Misawa N, Miyamoto K, Takegami Y, Masuda A, Toyokuni S, [Ohno K](#). Molecular hydrogen suppresses activated Wnt/beta-catenin signaling. *Sci Rep* 2016, 6: 31986.
35. Hasegawa S, Ito M, Fukami M, Hashimoto M, Hirayama M, [Ohno K](#). Molecular hydrogen alleviates motor deficits and muscle degeneration in mdx mice. *Redox Rep* 2017, 22: 26-34.
36. Shen X-M\*, Okuno T\*, Milone M, Otsuka K, Takahashi K, Komaki H, Giles E, [Ohno K](#), Engel AG. Mutations causing slow-channel myasthenia reveal that a valine ring in the channel pore of muscle AChR is optimized for stabilizing channel gating. *Hum Mutat*, 2016, 37: 1051-1059. \*Equal contribution.
37. Matsushita M, Mishima K, Esaki R, Ishiguro N, Ohno K, Kitoh H. Maternal administration of meclozine for the treatment of foramen magnum stenosis in transgenic mice with achondroplasia. *J Neurosurg Pediatr* 2017, 19: 91-95.
38. Ushida T, Kotani T, Tsuda H, Imai K, Nakano T, Hirako S, Ito Y, Li H, Mano Y, Wang J, Miki R, Yamamoto E, Iwase A, Bando YK, Hirayama M, [Ohno K](#), Toyokuni S, Kikkawa F. Molecular hydrogen ameliorates several characteristics of preeclampsia in the Reduced Uterine Perfusion Pressure

- (RUPP) rat model. *Free Radic Biol Med* 2016, 101: 524-533.
39. Ito M\*, Ehara Y\*, Li J, Inada K, Ohno K. Protein-anchoring therapy of biglycan for *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*, in press. \*Equal contribution.
40. Nazim M, Masuda A, Rahman MA, Nasrin F, Takeda JI, Ohe K, Ohkawara B, Ito M, Ohno K. Competitive regulation of alternative splicing and alternative polyadenylation by hnRNP H and CstF64 determines acetylcholinesterase isoforms. *Nucleic Acids Res*, in press.
41. Takeda J, Masuda A, Ohno K. Six GU-rich (6GUR) FUS-binding motifs detected by normalization of CLIP-seq by Nascent-seq. *Gene*, in press.
3. Masuda A, Ohno K. Neurodegeneration-associated RNA-binding protein, FUS, regulates mRNA length. *Atlas of Science*. Ed. by Lynn C Yeoman. AoS Nordic AB, Stockholm, 2016, <http://atlasofscience.org/neurodegeneration-associated-rna-binding-protein-fus-regulates-mrna-length/> (査読有)

### 【Reviews】

### 【Chapters in Books】

1. Ohno K, Ohkawara B, Ito M, Engel AG. Molecular Genetics of Congenital Myasthenic Syndromes. *eLS*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2014, <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0024314]. (査読有)
2. Ito M, Ohno K. A hereditary mutation in Schwartz-Jampel syndrome. *Atlas of Science*. Ed. by Lynn C Yeoman. AoS Nordic AB, Stockholm, 2015, <http://atlasofscience.org/a-hereditary-mutation-in-schwartz-jampel-syndrome/> (査読有)
1. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Ohtsuka K. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J Mol Neurosci* 2014, 53: 359-361. (査読有)
2. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohno K. Decoding abnormal splicing code in human diseases. *J Invest Genomics* 2015, 2(1): 00016 (査読有)
3. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohno K. Decoding abnormal splicing code in human diseases. *J Investig Genomics* 2015, 2(1): 00016 (査読有)
4. 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)
5. Rahman MA, Ohno K. Splicing aberrations in congenital myasthenic syndromes. *J Investig Genomics*, 2015, 2: 00038. (査読有)

6. Ohno K, Yagi H, Ohkawara B. Repositioning again of zonisamide for nerve regeneration. *Neural Regener Res* 2016, 11: 541-542. (査読有)
7. Ohno K. Is the serum creatine kinase level elevated in congenital myasthenic syndrome? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016, 87: 801. (査読有)
8. Ohno K, Ohkawara B, Ito M. Recent advances in congenital myasthenic syndromes. *Clin Exp Neuroimmunol* 2016, 7: 246-259. (査読有)
9. Masuda A, Takeda J, Ohno K. FUS-mediated regulation of alternative RNA processing in neurons: insights from global transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2016, 7: 330-340. (査読有)
10. Ohno K, Otsuka K, Ito M. Roles of collagen Q in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Chem Biol Interact* 2016, 259: 266-270. (査読有)
11. Ohno K, Rahman MA, Nazim M, Nasrin F, Lin Y, Takeda JI, Masuda A. Splicing regulation and dysregulation of cholinergic genes expressed at the neuromuscular junction. *J Neurochem* 2017, in press. (査読有)
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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.
8. 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 (ラブシン、プレクチン、 $\beta$ 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
9. 大野欽司「先天性筋無力症候群」in 『筋ジストロフィー・筋疾患 最近の進歩』戸田達史監修 医学のあゆみ Vol. 259, No.1, pp. 80-

#### **【Chapters in Books in Japanese】**

1. 大野欽司「先天性筋無力症候群」*Clinical Neuroscience* 32 (9): 1006-1010, 2014.
2. 大野欽司「重症筋無力症の臨床検査 Update」*SRL 宝函* 35(3): 4-13, 2014.

- 86 医歯薬出版株式会社、東京、2016 (10 月号)
10. 大野欽司「疾患において破綻したスプライシング暗号を解読する」in 『Coding RNA ルネッサンス』片岡直行・前田明監修 実験医学 Vol. 34, No. 19, pp. 3133-3139 羊土社、東京、2016 (12 月号)
11. 大野欽司「先天性筋無力症候群の治療研究」in 『筋肉研究の最前線』武田伸一監修 CLINICAL CALCIUM Vol. 27, No. 3, pp. 97-104 医薬ジャーナル社、大阪、2017 (3 月号)
12. 大野欽司「先天性筋無力症候群はどのような病気ですか」in 『筋疾患』西野一三監修 神経内科 Clinical Question and Pearls 中外医学社 in press

## 2: 学会発表

### ***【Invited Presentations at Scientific Meetings】***

1. Ohno K Maintenance of the neuromuscular junction and its aberrations in hereditary and autoimmune disorders. Guarda-Symposium 2014 on the Molecular and Cell Biology of the Neuromuscular System, Guarda, Switzerland. Sep 1, 2014
2. 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

3. Ohno K  
Roles of collagen Q in MuSK antibody-positive myasthenia gravis  
12th International Meeting of Cholinesterases, Alicante, Spain  
Sep 27-Oct 2, 2015

8. Ohno K, Nazim M, Masuda A.  
Splicing regulation of the human acetylcholinesterase gene  
XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms, Marseille, France  
Oct 16-20, 2016

9. Ohno K  
Molecular hydrogen as an emerging therapeutic agent for neurological and neuromuscular disorders  
Molecular Hydrogen as Emerging Therapeutic Agent and Its Clinical Application,  
Seoul, Korea  
Sep 27, 2016

### ***【Presentations at Scientific Meetings】***

1. Shibata A, Okuno T, Masuda A, Ohno K. P16.49-S - IntSplice: A tool to predict the effect on pre-mRNA splicing of intronic nucleotide substitutions. European Society of Human Genetics 2014 (Poster), Milan, Lombardy, Italy. May 31-June 3, 2014
2. Ohno K, Shibata A, Okuno T, Rahman MA, Azuma Y, Masuda A. IntSplice: A

- tool to predict aberrant splicing of an SNV at intronic positions -50 to -3. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Diego, California, USA. Oct 18-22, 2014
3. Bruun GH, Doktor TK, Brøner S, Masuda A, Palhais B, Krainer AR, Ohno K, Andresen BS. Global identification of binding sites for the splicing regulatory factors SRSF5 and hnRNPA1. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Diego, California, USA. Oct 18-22, 2014
  4. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. Alternative splicing of human *MUSK* exon 10 is physiologically regulated by multiple splicing regulatory cis-elements and cognate trans-factors. RNA Biology Meeting, Cold Spring Harbor Asia Conference (Poster), Suzhou, China. Nov 10-14, 2014
  5. Selcen D, Shen X-M, Ohkawara B, McEvoy K, Ohno K, Engel AG. Congenital myasthenic syndrome (CMS) caused by novel mutation in LRP4. Phenotypic heterogeneity and defects in neuromuscular transmission (NMT) identified in a second kinship. 67th Annual Meeting of the American Academy of Neurology (Poster), Washington DC, USA. Apr 18-25, 2015
  6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. 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
10. 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
11. Takegami Y, Ohkawara B, Seki T, Ohno K, Ishiguro N  
R-spondin2 is a critical factor for extracellular matrix production and chondrogenesis via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway  
ORS 2016 Annual Meeting (Poster), Orlando, Florida, USA  
Mar 5 - 8, 2016
12. 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
13. Kishimoto Y, Ohkawara B, Miyamoto K, Ishiguro N, Ohno K, Sakai T  
Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Contributes To Gene Expressions Related In Tendon Differentiation And Homeostasis  
ORS 2016 Annual Meeting (Platform)), Orlando, Florida, USA  
Mar 5 - 8, 2016
14. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Sugiura H, Kitamura A, Ishiguro N, Ohno K  
Clinically Feasible Dose Of Meclozine Promotes Bone Growth In Mouse Model With Achondroplasia  
ORS 2017 Annual Meeting (Poster), San Diego, California, USA  
Mar 19 - 22, 2017

**H: 知的所有権の取得状況(予定を含む)**

**1: 特許取得**

なし

**2: 実用新案登録**

なし

**3: その他**

なし

## 自己貪食空胞性ミオパチーの実態調査と診療ガイドライン作成の試み

研究分担者:杉江 和馬<sup>1)2)</sup>

共同研究者:尾上 健児<sup>3)</sup> 江浦 信之<sup>1)</sup> 塩田 智<sup>1)</sup>

小牧 宏文<sup>4)</sup> 倉重 毅志<sup>5)</sup> 斎藤 能彦<sup>3)</sup>

上野 聡<sup>1)</sup> 西野 一三<sup>2)</sup>

- 1) 奈良県立医科大学 神経内科
- 2) 国立精神・神経医療研究センター疾病研究第一部
- 3) 奈良県立医科大学 循環器・腎臓・代謝内科
- 4) 国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科
- 5) 国立病院機構呉医療センター 神経内科

### 研究要旨

自己貪食空胞性ミオパチー (AVM) の実態解明と診療ガイドライン作成を目指して、2010年のAVM全国実態調査の結果を詳細に解析して、2016年にこの追跡調査を実施した。また、新たな症例を見出して実態を調査した結果、Danon病では、新規に7家系11例を見出し、現在までに20家系39例(男性17例、女性22例)を確認した。生存は19例で、死因の多くは心不全で、既に心臓移植実施例や左心補助人工心臓植込み患者もみられた。XMEAでは、アレル病である先天性AVMと乳児型AVMを含め4家系12例(いずれも男性)を見出した。追跡調査では3例が生存され、いずれもミオパチー主体で、心機能障害は認めなかった。Danon病ではLAMP-2変異、XMEAではVMA21変異を有し、確定診断には臨床症状と筋病理所見、遺伝子解析結果をもとに行う必要がある。一方、AVSF(筋鞘膜の性質を有する自己貪食空胞)を伴うが、LAMP-2や VMA21遺伝子に変異を認めない分類不明のAVMを約10例見出した。今回、診療の手引き作成に向けて、現状で最適と考えられる治療法について検討した。多くのAVM患者でミオパチー症状は軽症である一方、Danon病の心筋症は予後決定因子であり診療において大変重要である。

## A. 研究目的

自己貪食空胞性ミオパチー (AVM) は、筋病理学的に筋鞘膜の性質を有する極めて特異な自己貪食空胞 (AVSF: autophagic vacuoles with sarcolemmal features) を特徴とする稀少な筋疾患である。AVMの代表疾患であるDanon病は、2000年に初めてライソゾーム関連膜蛋白2型 (lysosome-associated membrane protein-2: LAMP-2) が原因遺伝子であることが発見され (Nishino I, et al. Nature, 2000)、さらに、私たちにより世界に先駆けて初めて臨床病型について報告された (Sugie K, et al. Neurology, 2002)。AVMのもう一つの代表疾患である過剰自己貪食を伴うX連鎖性ミオパチー (X-linked myopathy with excessive autophagy: XMEA) は、近年、原因遺伝子としてライソゾーム内蛋白であるVMA21が同定された。その他、AVSFは、乳児型AVM、X連鎖性先天性AVM (Yan C, Sugie K, et al. Neurology, 2005)、多臓器障害を伴う成人型AVM (Kaneda D, Sugie K, et al. Neurology, 2003) にも認められる。最近、乳児型AVMとX連鎖性先天性AVMにおいて、VMA21遺伝子変異が見出され、この2つの疾患はXMEAのアレル病であることが明らかにされた。AVSFは、疾患特異性が高く、ポンペ病 (糖原病2型) でみられる自己貪食空胞やrimmed vacuoleとは異なる性質である。

私たちは、平成21年度に、厚生労働科学研究費補助金「自己貪食空胞性ミオパチー (AVM)」研究班 (研究代表者 杉江和馬) の研究助成を得て、Danon病、XMEAを含めたAVMの診断基準を世界で初めて作成した。平成22～23年度は、私たちが作成した診断基準を踏まえて、専門医や関連施設を通じて全国でのAVM患者の実態について疫学調査を行った。平成24～

25年度は、本研究班において、AVMの全国調査の集計結果を精査し、本疾患の臨床病理学的特徴について解析してきた。

平成26～28年度は、これまで私たちが解析を行っていた海外例を含むDanon病家系の患者情報と、平成22～23年度のAVM症例の国内実態調査結果、さらに追跡調査結果を用いて、本疾患の自然歴と現状の治療状況を明らかにして、本疾患の診療ガイドライン策定に向けて、その骨子を作成し課題を明らかにした。

## B. 研究方法

### 1. 診療ガイドライン作成に向けて

私たちがこれまで解析を行っていた海外例を含むDanon病家系の患者情報と、平成22～23年度にAVM研究班で国内の専門施設に対して実態調査を行って得たAVM症例の調査結果を用いて、臨床病理学的特徴や合併症、現在行われている治療法について明らかにした。そして、現状、最適と考えられる診療の方法について検討し、診療ガイドラインおよび診療の手引きに必要とされる骨子を策定した。

### 2. AVM症例の国内実態調査の追跡調査

平成28年度には、平成22～23年度の国内実態調査で得たAVM症例の追跡調査を実施した。さらに、新規のAVM症例を見出して、その臨床病態と治療状況を調査した。

(倫理面への配慮)

AVM患者において行われた筋病理学的解析、遺伝子解析および臨床病態解析は、臨床研究および遺伝子研究に関する倫理指針、さらに当該研究施設で定めた倫理規程を遵守して、同施設倫理委員会で承認された説明書を用いて、臨床情報および生検筋の研究利用について十分な説明の上、所定の同意書に署名をしていただ

いて、研究を遂行した。

## C. 研究結果

### 1. 診療ガイドライン作成に向けて

これまで海外例を含むDanon病17家系51人の患者情報について解析を行った。さらに、本邦1,409施設から集計したAVM患者41例の解析を行った。41例の内訳は、Danon病 13家系28例（男性13例、女性15例）、XMEA 1家系3例、乳児型AVM 2例、成人型AVM 1例、先天性AVM 1家系7例、であった。ただ、先天性AVMと乳児型AVMでは、VMA21変異を認め、XMEAのアレル病であると考えられた。Danon病はX連鎖性優性遺伝で、男性患者ではミオパチー、精神遅滞、肥大型心筋症を3主徴とするが、女性では心筋症のみを呈した。発症年齢は男性10代、女性30代で、平均死亡年齢は男性20代、女性40代で、死因は心不全であった。治療として、βブロッカーを中心とした投薬加療が多く、一部でペースメーカー埋込や根治療法である心臓移植が施行された。一方、XMEAはミオパチー主体で心筋障害は稀であった。筋病理学的解析から、AVM患者すべての生検筋で特徴的なAVSFがみられた。また、筋細胞膜の重層化は、Danon病以外のXMEAなどで認めることから、Danon病と他の臨床病型を区別する重要な所見と考えられる。遺伝学的検討では、Danon病ではLAMP-2変異を、XMEAではVMA21変異を示した。Danon病の発端者の約1/2がde novo変異であった。以上から、確定診断には、臨床症状に加えて、筋病理所見、遺伝子解析結果をもとに行う必要がある。

### 2. AVM症例の国内実態調査の追跡調査

前回の全国調査で確認したDanon病13家系28例（男性13例、女性15例）に加えて、今回の調査で新たに7家系11例（男性4例、女性7例）を

見出した。本邦で現在までにDanon病と診断された症例として、20家系39例（男性17例、女性22例）を確認した。現在、12家系19例（男性8例、女性11例）が生存していた。死亡した20例の死因は、心不全が19例で、悪性腫瘍が1例であった。全例が心筋症を有し、一部は重症心不全を呈した。現在までに、1例で心臓移植が実施され、その他、左心補助人工心臓植込み患者も複数認められた。発症において、国内での地域の分布差はなく、遺伝子変異部位も家系によりすべて異なる。またde novoと考えられる例が10家系あった。

一方、XMEAは、アレル病である先天性AVMと乳児型AVMを含め4家系12例（いずれも男性）を見出した。追跡調査では2家系3例が生存され、いずれもミオパチー主体で、心機能障害は認めなかった。

さらに、AVSFを有してDanon病やXMEAとは筋病理学的に類似するが、LAMP-2やVMA21遺伝子に変異を認めない分類不明のAVMを約10例見出した。

## D. 考察

AVMは超希少な筋疾患で、これまで病態や病因について未解明で、本邦でのAVM患者の実態についても不明であった。このため、平成21年度に、AVMの疾患概念の確立のため、われわれは世界で初めてDanon病とXMEAの診断基準を作成した。そして、平成22～23年度に、本邦での実態を明らかにするため、本診断基準を踏まえて、専門医や関連施設を通じて本邦での初めての疫学調査を行い、患者数や臨床症状の多様性の実態把握を行った。

今回、Danon病とXMEAの2疾患について、診療ガイドライン作成のため、現在の診療実態を明らかにして、現状で最適な治療法を検討して、

その骨子の作成に努めた。診断の主要項目は、臨床症状、筋病理所見、遺伝子解析である。Danon病の臨床症状は、男性はミオパチーと心筋症、精神遅滞が、女性は心筋症が重要である。特に、致死性となる肥大型心筋症やWPW症候群などの心伝導異常が特徴である。生検筋では、AVSFに加えてLAMP-2欠損を示す。LAMP-2遺伝子変異が確定診断となる。XMEAは、緩徐進行性のミオパチーを示し、心筋障害は稀であった。生検筋では、AVSFと筋細胞膜の重層化を認めた。VMA21遺伝子変異が確定診断となる。両疾患ともX連鎖性疾患で予後不良であることから、診断には遺伝カウンセリングが必須となる。一方、心筋症や不整脈には現状心臓移植のみが根治療法で、特に心不全発症後2年以内の心臓移植が望まれる。ミオパチーに対しては運動療法が主体となる。精神遅滞については、精神科的アプローチなど対症療法が主体となる。今後、治療法については再検討を行い、現状で最適な治療法を確立することが求められる。

平成28年度は、平成22～23年度に実施した患者実態の追跡調査を行うとともに、新規症例も含めて実態調査を行った。その結果、本邦において、これまでにDanon病と遺伝学的に診断された例は20家系39例(男性17例、女性22例)で、現在、12家系19例(男性8例、女性11例)が生存されている。死因のほとんどが心不全で、致死性となる肥大型心筋症やWPW症候群などの心伝導異常が特徴である。根本治療は今のところ心臓移植のみで、本邦では女性1例において実施され、複数の心臓移植待機例において、左心補助人工心臓植込みが施行されていた。早期発見により不整脈による突然死を予防できる可能性があり、カテーテルアブレーションやICD埋め込み術、ペーシングなどが治療法として挙げられる。心不全や心房細動に対して、βブロッカーを中心

とした薬物療法も重要である。Danon病においては、心機能の定期的な観察のため、心エコーや心電図、心臓MRIに加えて、生活上の指導も重要である。

一方、XMEAにおいてはミオパチーが主体で心機能障害はほとんど認めず、先天型AVMおよび乳児型AVMとされた乳幼児期発症例を除いては、生命予後に関しては良好であった。

## E. 結論

本研究で、Danon病とXMEAの2疾患について、今後の診療ガイドライン作成のため、その骨子と課題を検討した。多くのAVM患者でミオパチーは軽症である一方、Danon病の心筋症は予後決定因子でありその診断と治療は重要で、早期からの治療介入が必要である。また、本邦でのAVM患者の追跡調査で、新規を含めてDanon病20家系、XMEA4家系を確認した。

今後は、診療の手引きを活用して、その検証を行いながら、治療法の確立を目指す。また、超稀少疾病である本疾患の病態解析解明や今後の治験の実現のためには、本疾患の臨床遺伝学的データベースの構築や自然歴の確立が重要で、さらに、患者のレジストリー構築や患者会設立も検討していく必要がある。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sugie K, Nishino I. Lysosomal Membrane Disorders: LAMP-2 Deficiency. In: Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease. 5th ed. Rosenberg R, Pascual J, Eds. Elsevier, Amsterdam, Nederland, 2014: 411-417.
- 2) Eura N, Sugie K, Kiriya T, Ueno S. Characteristic dysphagia as a manifestation of dermatomyositis on oropharyngeal muscle imaging. *J Clin Rheumatol.* 2015;21(2):105-6
- 3) 杉江和馬. ライソゾーム膜の異常:ダノン病. 神経症候群 III(第2版) - その他の神経疾患を含めて-. 日本臨床 2014年6月. 839-843.
- 4) Sugie K, Sugie M, Taoka T, Tonomura Y, Kumazawa A, Izumi T, Kichikawa K, Ueno S. Characteristic MRI Findings of upper limb muscle involvement in myotonic dystrophy type 1. *PLoS One.* 2015;10(4):e0125051
- 5) Sugie K, Kumazawa A, Ueno S. Sporadic inclusion body myositis presenting with Beevor's sign. *Intern Med.* 2015;54(21):2793-4.
- 6) 杉江和馬. VIII.自己貪食空胞性ミオパチー:Danon病. 骨格筋症候群(第2版) - その他の神経筋疾患を含めて-. (下). 日本臨床 2015年7月. 253-257.
- 7) 杉江和馬. VIII.自己貪食空胞性ミオパチー:過剰自己貪食を伴うX連鎖性ミオパチー. 骨格筋症候群(第2版) - その他の神経筋疾患を含めて-. (下). 日本臨床 2015年7月. 258-261.
- 8) Sugie K, Yoshizawa H, Onoue K, Nakanishi Y, Eura N, Ogawa M, Nakano T, Sakaguchi Y, Hayashi YK, Kishimoto T, Shima M, Saito Y, Nishino I, Ueno S. Early onset of cardiomyopathy and intellectual disability in a girl with Danon disease associated with a de novo novel mutation of the LAMP2 gene. *Neuropathology.* 2016; 36(6): 561-5.
- 9) Eura N, Sugie K, Kinugawa K, Nanaura H, Ohara H, Iwasa N, Shobatake R, Kiriya T, Izumi T, Kataoka H, Ueno S. Anti-cytosolic 5'-nucleotidase 1A (cN1A) positivity in muscle is helpful in the diagnosis of sporadic inclusion body myositis: A study of 35 Japanese patients. *J Neurol Neurosci.* 2016; 7(5):155.
- 10) Sugie M, Sugie K, Eura N, Iwasa N, Shiota T, Nanaura H, Izumi T, Ueno S. Characteristics of risk-factor profiles associated with stroke in patients with myotonic dystrophy type 1. *J Rare Dis Diagn Ther.* 2016; 2(4):19.
- 11) 杉江和馬、西野一三. 自己貪食空胞性ミオパチーとオートファジー. *Annual Review 神経* 2017. 中外医学社 2017年1月. 39-46.

### 2. 学会発表

- 1) Sugie K, Komaki H, Eura N, Nonaka

- I, Ueno S, Nishino I. A nationwide survey of Danon disease in Japan. The 13th International Congress on Neuromuscular Diseases (ICNMD XIII), Nice, France, July 5-10, 2014.
- 2) Kurashige T, Takahashi T, Nagano Y, Sugie K, Watanabe C, Maruyama H, Ueno S, Matsumoto M. KL-6/MUC1 is a novel diagnostic marker for GNE-myopathy. The 19th International Congress of the World Muscle Society (WMS 2014), Berlin, Germany, October 7-11, 2014.
  - 3) 杉江和馬、小牧宏文、江浦信之、上野聡、西野一三. 全国実態調査による Danon 病の臨床遺伝学的解析. 第 59 回日本人類遺伝学会、福岡、2014 年 11 月.
  - 4) 杉江和馬、小牧宏文、江浦信之、上野聡、西野一三. Danon 病の臨床病理学のおよび遺伝学的解析と診断基準作成の試み. 第 55 回日本神経学会学術集会、福岡、2014 年 5 月.
  - 5) 江浦信之、杉江和馬、小原啓弥、形岡博史、上野 聡. 抗 PL-7 抗体陽性ミオパチーの臨床病理学的検討. 第 55 回日本神経学会学術集会、福岡、2014 年 5 月.
  - 6) Sugie K, Sugie M, Taoka T, Tonomura Y, Kumazawa A, Izumi T, Kichikawa K, Ueno S. Characteristic MRI Findings of upper limb muscle involvement in myotonic dystrophy type 1. The 20th International Congress of the World Muscle Society, Brighton, United Kingdom, September 30-October 4, 2015.
  - 7) 杉江和馬、杉江美穂、田岡俊昭、殿村恭代、熊澤 綾、泉 哲石、吉川公彦、上野聡. 筋強直性ジストロフィー1型における上肢骨格筋障害の神経放射線学的検討. 第1回日本筋学会学術集会、東京、2015年8月.
  - 8) Sugie K, Eura N, Iwasa N, Ohara H, Izumi T, Kataoka H, Ueno S. Incidence and risk factors of stroke associated with myotonic dystrophy type 1. 第56回日本神経学会学術集会、新潟、2015年5月.
  - 9) Eura N, Sugie K, Kinugawa K, Nanaura H, Ohara H, Iwasa N, Shobatake R, Kiriya T, Izumi T, Kataoka H, Ueno S. Clinicopathological features of 35 patients with sporadic inclusion body myositis. 第56回日本神経学会学術集会、新潟、2015年5月.
  - 10) Sugie K, Eura N, Sugie M, Shiota T, Iwasa N, Shinmyo N, Kawahara M, Juo K, Horikawa H, Ueno S. Clinical features of knee osteoarthritis in patients with sporadic inclusion body myositis. The 21th International Congress of the World Muscle Society, Granada, Spain, October 4-8, 2016.
  - 11) Sugie K, Sugie M, Eura N, Iwasa N, Ohara H, Izumi T, Kataoka H, Ueno S. Incidence and risk factors of stroke associated with myotonic dystrophy type 1. 第2回日本筋学会学術集会、東京、2016年8月.
  - 12) 杉江和馬、江浦信之、杉江美穂、絹川

薫、塩田 智、岩佐直毅、桐山敬生、上野  
聡. 孤発性封入体筋炎における変形性膝  
関節症の臨床的特徴. 第 57 回日本神経  
学会学術集会、兵庫、2016 年 5 月.

- 13) 江浦信之、杉江和馬、上野 聡. 抗 Mi-2  
抗体陽性ミオパチーの臨床病理学的検  
討. 第 57 回日本神経学会学術集会、兵  
庫、2016 年 5 月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし



## 封入体筋炎の臨床的問題

研究協力者:森 まどか<sup>1)</sup>

共同研究者:川添 僚也<sup>1)</sup>, 大矢 寧<sup>1)</sup>, 山本 敏之<sup>1)</sup>, 西野 一三<sup>2), 3)</sup>

村田 美穂<sup>1)</sup>

- 1) 国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科 2) 同 神経研究所 疾病研究第一部  
3) 同 メディカルゲノムセンター

### 研究要旨

封入体筋炎の臨床と診断に関する問題提起を行う。近年、封入体筋炎 (inclusion body myositis, 以下 IBM) の診断的マーカーとして抗 cytosolic 5' nucleotidase 1A (以下 cN1A) 抗体が注目されている。陽性症例を詳細に検討し、抗 cN1A 抗体の臨床的意義について検討した。

### A:研究目的

近年、封入体筋炎 (inclusion body myositis, 以下 IBM) の診断的マーカーとして抗 cytosolic 5' nucleotidase 1A (以下 cN1A) 抗体が注目されている。陽性症例を詳細に検討し、抗 cN1A 抗体の臨床的意義について検討した。

### B:研究方法

IBM 診断基準として 2010 年封入体筋炎 (IBM) の臨床病理学的調査および診断基準の精度向上に関する研究班、および 2011 年 188th ENMC International Workshop 双方を満たす症例を IBM と診断した。当センター病院神経内科で「筋炎の統合的診断」プロジェクト研究に参加し、抗 cN1A 抗体を測定した 49 名のうち、抗体陽性症例について検討した。

IBM 以外の臨床診断であった患者の初発症状、筋力、嚥下障害、合併疾患および治療への反応性を検討した。抗 cN1A 抗体測定に関しては原著を参考に ERISA 法で行った[西村ら、投稿中]

(倫理面への配慮) 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に則り行った。

### C:研究結果

7 例(男性 3, 女性 4)が該当した。ENMC および 2010 年 IBM 班双方を満たす症例は 1 例のみで、他の最終診断は多発筋炎 3 例、抗 SRP 抗体陽性壊死性ミオパチー 1 例、強皮症合併筋炎 1 例、筋サルコイドーシス 1 例だった。

IBM 以外の症例では、全例手指屈筋や大腿四頭筋の著明な筋力低下は認めなかった。多発

筋炎 2 例、強皮症合併筋炎 1 例、筋サルコイドーシス症例の計 4 例は筋力低下に比して高度の嚥下障害を呈した。筋病理では全例 CD8 陽性炎症細胞浸潤を伴う HLA-ABC 抗体の異所性発現を認めた。筋サルコイドーシス例のみ筋病理でサルコイド結節とともにごく少量の縁取り空胞を認めた。治療反応性は、ステロイド+IVIg で著効1, 有効1, 免疫抑制剤で著効1, IVIg 単独で有効1であった。

一方 IBM の診断基準を満たす症例 7 例中、抗体陽性例は 1 例のみだった。炎症性筋疾患以外の症例群(筋ジストロフィー・ミオパチーなど)17 例では抗体陽性例は見られなかった。

#### D: 考察

抗 cN1A 抗体は炎症性筋疾患のうち嚥下障害が強い症例に関係がある症例で陽性だったが、嚥下障害が強い症例の全例が陽性ではなく、解釈には症例の蓄積が必要である。既報告との感度・特異度の相違および上記のような特異な経過をとった症例が存在する背景として NCNP に集積する非典型的慢性筋疾患を調査の母集団としたことに起因する可能性がある。また、検査方法の相違も影響した可能性がある。

#### E: 結論

抗 cN1A 抗体は高度の嚥下障害と関係がある可能性を考えた。IBM の診断ツールとしては感度・特異度も高いとは言えないが、嚥下障害や病態に関与する可能性がある。

#### F: 健康危険情報

特になし

#### G: 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

##### 1: 論文発表

Suzuki N, Mori-Yoshimura M, Yamashita S, et al. Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan. *J Hum Genet.* 2017;62:159-166.  
2. Ikeda K, Mori-Yoshimura M, Yamamoto T, et al. Chronic Myopathy Associated With Anti-Signal Recognition Particle Antibodies Can Be Misdiagnosed As Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *J Clin Neuromuscul Dis.* 2016;17:197-206.

##### 2: 学会発表

#### H: 知的所有権の取得状況(予定を含む)

##### 1: 特許取得

なし

##### 2: 実用新案登録

なし

##### 3: その他

特になし

## 封入体筋炎におけるオートファジー初期過程の障害

研究協力者: 日下 博文<sup>1)</sup>

共同研究者: 中野 智<sup>2)</sup>、隠岐 光彬<sup>1)</sup>

1) 関西医科大学神経内科

2) 大阪市立総合医療センター 神経内科

### 研究要旨

【目的・背景】 封入体筋炎の生検筋病理において、空胞化筋線維を中心に、種々のオートファジー関連蛋白の異常沈着がみとめられ、筋障害にはオートファジーの異常が関係しているといわれている。蛋白凝集体に対する選択的オートファジーの過程では、ユビキチン化された蛋白凝集体が、ユビキチンを介して p62 と結合し、その後 p62 の LC3 結合部位に LC3 が結合、複合体はさらに脂質膜と結合し、蛋白凝集体は2重膜空胞のオートファゴソーム内に取り込まれる。オートファゴソームはリソソームと結合、最終的に蛋白凝集体がこの空胞内で分解される。一方、p62 の Ser403 がリン酸化されるとユビキチンとの結合が増すことが明らかにされている。蛋白凝集体のオートファジーにかかわるユビキチンは Lys63 ユビキチンが中心である。

今回、選択的オートファジーが封入体筋炎でどのように発現しているかを検討した。

### 【方法】

予備実験として、8例の封入体筋炎患者の生検筋組織で、選択的オートファジーに関与する分子の抗体を免疫組織化学的に検討し、Lys63-linked ubiquitin、Ser403 がリン酸化された p62 (S403-pp62)が空胞化筋線維やその他形態学的に異常な筋線維に陽性凝集体として発現していることを明らかにした。

その後、16例の封入体筋炎患者生検筋組織で、1) S403-pp62、2) Lys63-linked ubiquitin、3) LC3 の分布と p62 (aa120-440)の分布を蛍光二重染色にて検討した。

### 【結果および考察】

S403-pp62、Lys63-linked ubiquitin、LC3 は、p62 凝集体とそれぞれ  $79.05\% \pm 13.64\%$  (mean  $\pm$  SD)、 $66.54\% \pm 19.91\%$ 、 $51.84\% \pm 14.1\%$ のレベルで共存していた(陽性部分が75%以上重なっている線維の割合)。また、LC3 と p62 の共存率は、S403-pp62 と比べ有意に低下していた ( $p < 0.001$ )。S403-pp62 と Lys63-linked ubiquitin 陽性沈着物は常に p62 凝集体内にあつたのに対し、LC3 はしばしば p62 の分布と異なっていた。

これらの結果は、封入体筋炎において、p62、Lys63-linked ubiquitin、LC3 は、共同して蛋白質凝集体のオートファジーに関与していることを示している。一方、封入体筋炎では、凝集体の p62 と LC3 の結合が十分でないため、蛋白質凝集体の分解がオートファジーの初期で停止しまっていることが推定される。

#### 【結論】

蛍光二重染色法で封入体筋炎における蛋白質凝集体のオートファジー初期過程にかかわる重要分子の異常発現を明らかにした。

蛍光二重染色法で封入体筋炎における蛋白質凝集体のオートファジー初期過程にかかわる重要分子の異常発現を明らかにした

### A: 研究目的

封入体筋炎の筋障害には、オートファジーの異常が関係しているといわれている。それは、生検筋病理において、空胞化筋線維を中心に、種々のオートファジー関連蛋白の異常沈着がみとめられるためである。いくつかの報告によると、オートファジー関連蛋白のうち、p62/SQSTM1 や LC3 が封入体筋炎の診断において感度・特異度ともに優れていることが示されている。蛋白質凝集体に対する選択的オートファジーの過程では、ユビキチン化された蛋白質凝集体が、ユビキチンを介して p62 と結合し、その後 p62 の LC3 結合部位に LC3 が結合、複合体はさらに脂質膜と結合し、蛋白質凝集体は 2 重膜空胞のオートファゴゾーム内に取り込まれる。オートファゴゾームはリソゾームと結合、最終的に蛋白質凝集体がこの空胞内で分解される。

一方、p62 の Ser403 がリン酸化されるとユビキチンとの結合が増すことが明らかにされている。蛋白質凝集体のオートファジーにかかわるユビキチンは Lys63 ユビキチンが中心である。今回、選択的オートファジーが封入体筋炎でどのように発現しているかを検討した。

### B: 研究方法

予備実験として、8 例の封入体筋炎患者の生検

筋組織で、選択的オートファジーに関与する分子の抗体を免疫組織化学的に検討し、Lys63-linked ubiquitin、Ser403 がリン酸化された p62 (S403-pp62) が空胞化筋線維やその他形態学的に異常な筋線維に陽性凝集体として発現していることを明らかにした。その後、16 例の封入体筋炎患者生検筋組織で、1) S403-pp62、2) Lys63-linked ubiquitin、3) LC3 の分布と p62 (aa120-440) の分布を蛍光二重染色にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は関西医科大学倫理委員会の指針に従った。また、本研究は大阪市立総合医療センターの倫理委員会の承認を得た。

### C: 研究結果

S403-pp62、Lys63-linked ubiquitin、LC3 は、p62 凝集体とそれぞれ 79.05% + 13.64% (mean + SD)、66.54% + 19.91%、51.84% + 14.1% のレベルで共存していた(陽性部分が 75% 以上重なっている線維の割合)。また、LC3 と p62 の共存率は、S403-pp62 と比べ有意に低下していた( $p < 0.001$ )。S403-pp62 と Lys63-linked ubiquitin 陽性沈着物は常に p62 凝集体内にあつたのに対し、LC3 はしばしば p62 の分布と異なっていた。

## D: 考察

封入体筋炎において、p62、Lys63-linked ubiquitin、LC3 は、共同して蛋白質凝集体のオートファジーに関与していることを示している。一方、封入体筋炎では、凝集体の p62 と LC3 の結合が十分でないため、蛋白質凝集体の分解がオートファジーの初期で停止しまっていることが推定される。

## E: 結論

蛍光二重染色法で封入体筋炎における蛋白凝集体のオートファジー初期過程にかかわる重要分子の異常発現を明らかにした。

蛍光二重染色法で封入体筋炎における蛋白凝集体のオートファジー初期過程にかかわる重要分子の異常発現を明らかにした。

## F: 健康危険情報

特になし。

## G: 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

### 1: 論文発表

1: Nakano S, Oki M, Kusaka H. The role of p62/SQSTM1 in sporadic inclusion body myositis. *Neuromuscul Disord.* 2017 Apr;27(4):363-369.

2: Suzuki N, Mori-Yoshimura M, Yamashita S, Nakano S, Murata KY, Inamori Y, Matsui N, Kimura E, Kusaka H, Kondo T, Higuchi I, Kaji R, Tateyama M, Izumi R, Ono H, Kato M, Warita H, Takahashi T, Nishino I, Aoki M. Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan. *Orphanet J Rare Dis.* 2016 Nov 8;11(1):146.

3: M Oki, S Hori, S Asayama, R Wate, S Kaneko, H Kusaka. Early-onset

parkinson's disease associated with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Intern med.* 2016;55(3):303-305.

4: S Iida, M Nakamura, R Wate, S Kaneko, H Kusaka. Successful treatment of paroxysmal tonic spasms with topiramate in a patient with neuromyelitis optica. *Mult Scler Relat Disord.* 2015 Sep;4(5):457-459.

5: Ayaki T, Ito H, Fukushima H, Inoue T, Kondo T, Ikemoto A, Asano T, Shodai A, Fujita T, Fukui S, Morino H, Nakano S, Kusaka H, Yamashita H, Ihara M, Matsumoto R, Kawamata J, Urushitani M, Kawakami H, Takahashi R.

Immunoreactivity of valosin-containing protein in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in a case of its novel mutant. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Dec 10;2(1):172. [Epub ahead of print]

6: 辰野健太郎, 中村聖香, 朝山知子, 中野智. 筋症状のみを呈した慢性ミオパチー型筋サルコイドーシスの 1 例. *臨床神経* 2014;54(4):313-316.

### 2: 学会発表

1: S Nakano, M Matsumoto, R Kanki, H Morihata, M Oki, H Kusaka. Ser403-phosphorylated p62/SQSTM1 in sporadic inclusion body myositis.

第 56 回神経学会学術集会 2015.5 新潟

2: 隠岐光彬ら. 封入体筋炎における Glutathione peroxidase 1/2 陽性封入体  
第 55 回神経学会学術集会 2014.5 福岡

3: 中野智ら. 封入体筋炎筋組織における p62/sequestosome1 の発現と核貪食

第 55 回神経学会学術集会 2014.5 福岡

4: 松本瑞樹ら, 抗ミトコンドリア抗体が陽性であった抗 SRP 抗体陽性壊死性筋症の一例 第

101 回 日本神経学会 近畿地方会 2014.12

神戸

**H: 知的所有権の取得状況(予定を含む)**

**1: 特許取得**

なし

**2: 実用新案登録**

なし

**3: その他**

なし

## IBM における HTLV-1 感染およびミトコンドリア機能障害に関する研究

研究協力者:樋口逸郎<sup>1)</sup>

共同研究者:橋口昭大<sup>2)</sup>、湯地美佳<sup>2)</sup>、野妻智<sup>2)</sup>、平松有<sup>2)</sup>、岡本裕嗣<sup>2)</sup>、松浦英治<sup>2)</sup>、  
高嶋 博<sup>2)</sup>

1) 鹿児島大学医学部保健学科理学療法学専攻 基礎理学療法学講座

2) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年病学

### 研究要旨

平成 26 年度は IBM における HTLV-1 感染との関連を他の炎症性筋疾患と比較し HTLV-1 感染 IBM では進行が速い傾向にあった。H27 年度は IBM 患者より得られた筋組織からミトコンドリア DNA を抽出し解析した。病理学的にミトコンドリア異常を認めた IBM 患者では全例でミトコンドリア DNA の欠失あるいは点変異を認めた。H28 年度はミトコンドリア機能障害に対する治療目的で IBM 患者にアルギニンを投与してその治療反応をみた。発症 10 年以上経過した進行 IBM 患者において筋力と歩様の改善を見た。5 例中 4 例に歩様の改善が得られた。

### A: 研究目的

HTLV-1 関連脊髄症に筋炎が合併することは知られており、IBM における HTLV-1 感染との関連を明らかにする。HTLV-1 感染を伴う筋炎では IBM 同様ミトコンドリア機能障害を伴うことも多く、病理学的にミトコンドリア異常を伴う IBM 筋組織においてミトコンドリア DNA 障害を解析し、ミトコンドリア機能障害をターゲットとした新たな治療戦略を検討する。

### B: 研究方法

精査目的で筋生検を実施され、ミトコンドリア異常を伴う IBM 患者の筋組織において HTLV-1 陽性リンパ球の浸潤を他の炎症性筋疾患と比較した。臨床像の違いを統計解析した。筋組織からミトコンドリア DNA を抽出し塩基配列を決定し、

欠失および変異の有無を解析した。ミトコンドリア機能障害に対する治療戦略としてミトコンドリアアンギオパチーおよび MIMCECK にて治療効果が認められているアルギニンを用いて IBM の筋力低下および歩行障害に治療効果が得られるかどうか検討した。

(倫理面への配慮)

病理学的検査(筋生検)に関してはインフォームドコンセントを得て実施し、筋組織の詳細な精査およびミトコンドリア DNA 解析の同意を得て実施した。アルギニン投与に関しては、ミトコンドリア機能障害を伴う神経筋疾患に対するアルギニン投与の倫理審査を受けている。

### C: 研究結果

IBM 患者における HTLV-1 陽性率は 27%で、

PM/DM の陽性率 20%よりも高く、HTLV-1 陽性 IBM では陰性 IBM よりも発症が遅く進行が早い傾向にあった。

ミトコンドリア異常を伴う IBM 患者筋由来のミトコンドリア DNA 解析ではほとんどの症例に欠失あるいは変異を認めた。欠失を 67%に認め、多重欠失を 40%に認めた。IBM で既報告の 548-4442 欠失が 2 例、8636-16073 欠失が 5 例にみられた。

5 例の IBM 患者にアルギニンを投与し 4 例に筋力と歩様の改善を認めた。

#### **D: 考察**

IBM 患者の HTLV-1 陽性率は高く、HTLV-1 感染は IBM 発症のリスクの可能性が示唆されるが、他の炎症性筋疾患でも IBM 程ではないが一般感染率よりも高い傾向にあった。ミトコンドリア DNA の多重欠失などは核遺伝子由来のミトコンドリア異常を示唆した。そのようなミトコンドリア機能障害に対してアルギニンの有効性が示唆されるが、IBM における病態を総合的に修飾する複合的治療が必要だろうと思われた。

#### **E: 結論**

HTLV-1 感染は IBM 発症のリスクの可能性はある。ミトコンドリア DNA 欠失および変異が IBM におけるミトコンドリア機能障害の一端を担っており、アルギニンによるミトコンドリア機能改善効果が期待された。

#### **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**

第 57 回日本神経学会学術大会 2016

##### **H: 知的所有権の取得状況(予定を含む)**

##### **1: 特許取得**

なし

##### **2: 実用新案登録**

なし

##### **3: その他**

なし



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業))  
希少難治性筋疾患に関する調査研究班 (総合)研究報告書

## ① H26 年度「骨格筋再生過程における Myostatin および関連蛋白 の検討」

研究協力者:村田顕也

共同研究者:高橋麻衣子、中山宜昭、森めぐみ、伊東秀文

和歌山県立医科大学 神経内科

## ② H27 年度「中條西村症候群と IBM の臨床像・筋病理像の比較」

研究協力者:村田顕也<sup>1)</sup>

共同研究者:綾木孝<sup>2)</sup>、金澤伸雄<sup>3)</sup>、漆葉章典<sup>4)</sup>、西野一三<sup>4)</sup>、大村浩一郎<sup>5)</sup>、杉江和馬<sup>6)</sup>、  
笠木伸平<sup>7)</sup>、上野聡<sup>6)</sup>、古川福実<sup>3)</sup>、伊東秀文<sup>1)</sup>、漆谷真<sup>2)</sup>、高橋良輔<sup>2)</sup>

1)和歌山県立医科大学 神経内科、2)京都大学 神経内科、3)和歌山県立医科大学  
皮膚科、4)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、  
5)京都大学 膠原病内科、6)奈良県立医科大学 神経内科、7)神戸大学医学部附属  
病院 検査部

## ③H28 年度「中條西村症候群の臨床病態の解析 –IBM との比較–」

研究協力者:村田顕也<sup>1)</sup>

共同研究者:森めぐみ<sup>1)</sup>、金澤伸雄<sup>2)</sup>、綾木孝<sup>3)</sup>、古川福実<sup>2)</sup>、伊東秀文<sup>1)</sup>

1)和歌山県立医科大学 神経内科、2)和歌山県立医科大学 皮膚科  
3)京都大学大学院 医学研究科臨床神経学

## 研究要旨

H26年度は、Cardiotoxin (CTX)による骨格筋損傷マウスモデルと炎症性ミオパチー (IBM、皮膚筋炎) の生検筋の筋再生過程における MSTN と ActR IIB の発現を病理学的に検討した。マウスの検討において CTX 非投与の対照群では、MSTN と ActR IIB は、Type 2 の萎縮筋線維の筋細胞膜と筋細胞質に発現していた。CTX 筋損傷モデルでは、MSTN と ActR IIB は、再生過程にある筋線維の内在核と筋細胞質に発現していた。再生筋線維に占める MSTN 陽性線維の割合は損傷後の時期を問わず 42-49%であった。また、ActR IIB 陽性筋線維は、常に MSTN 陽性であったが、MHC-d 陽性の再生筋線維に占める MSTN-ActR IIB 共陽性線維の割合は、損傷 1 週後は 8.4%、2 週後は 24.1%、3 週後は 18.3%と経時的に変化した。炎症性ミオパチーの検討において、MSTN と ActRIIB は、MHC-d 陽性の一部の再生筋線維と MHC-d 陰性の高度に萎縮した萎縮筋線維で、共発現していた。MSTN と ActR 共陽性の再生筋線維の割合が筋線維萎縮の予測に重要であると結論づけられた。

H27年度、28年度は、IBM と中條西村症候群 (NNS) について検討した。

H27年度は、プロテアソームサブユニットである  $\beta 5i$  をコードする PSMB8 遺伝子の変異により発症する中條西村症候群 (NNS) と IBM を比較し、臨床像、筋病理像の点から検討した。NNS の症例の中には、IBM に類似した筋病理像を呈する症例が認められ、鑑別の点から重要と考えられた。

H28年度は、H27年に引き続き、NNS と IBM における臨床症状や画像所見、および、筋病理の特徴を比較検討した。

NNS と IBM はいずれも大腿四頭筋と深指屈筋に筋力低下、筋萎縮が強い点が共通していた。病理所見では、免疫染色で類似の染色性がみられた。NNS と臨床症状や病理所見における共通点が多数認められたことから、IBM においてもプロテアソーム機能異常の関与が推測された。

## 【H26年】

### A: 研究目的

Myostatin (MSTN)は、骨格筋に特異的に発現する TGF  $\beta$  スーパーファミリーに属するサイトカインである。MSTN は、activin receptor IIB (ActR IIB)と結合後、Smad 依存性/非依存性経路を活性化し、筋分化や筋肥大を誘導する遺伝子群の発現を抑制し、筋線維萎縮を促す。

今回、私たちは、Cardiotoxin (CTX)による骨格筋損傷マウスモデルと炎症性ミオパチーの生検筋の筋再生過程における MSTN と ActR IIB

の発現を病理学的に検討し、その臨床的意義を解明した。

### B: 研究方法

① 生後 8-12 週の C57BL/6 マウスの大腿内転筋群に CTX (10  $\mu$  M)を投与し、筋損傷マウスモデルを作製した。CTX 投与 1,2,3 週後に sacrifice し、損傷部の病理学的変化を、MSTN, ActRIIB, myosin-heavy chain slow (MHC-s), myosin-heavy chain developmental (MHC-d) 抗体を用い検討した。CTX の代わりに生食を投与したマウスを対照群とし同様の検討を行った。

②炎症性ミオパチー(封入体筋炎、皮膚筋炎)の生検筋を用いて同様の病理学的検討を行った。

C: 研究結果

① 筋損傷モデル

CTX 非投与群: MSTN と ActR IIB は、Type 1 陰性の萎縮筋線維の筋細胞膜と筋細胞質に発現していた。(図 1)

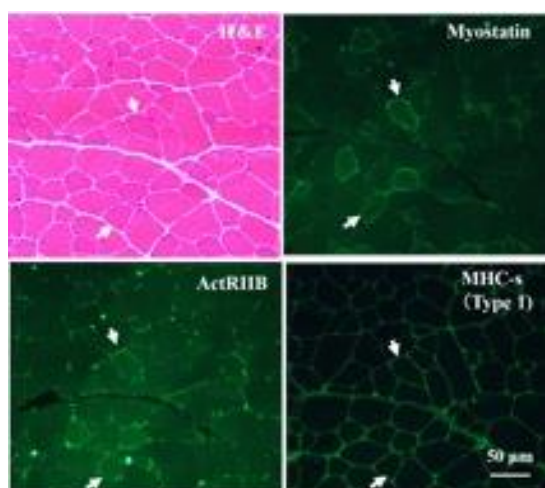


図 1. 正常対象の病理学的検討

CTX 投与群: CTX 損傷後 1 週間目には、MSTN と ActR IIB の発現は軽度であったが(図 2)、CTX 損傷後 3 週間目には、MSTN と ActR IIB は、MHC-d 陽性の再生過程の筋線維の内在核と筋細胞質に発現していた(図 3, 4)。

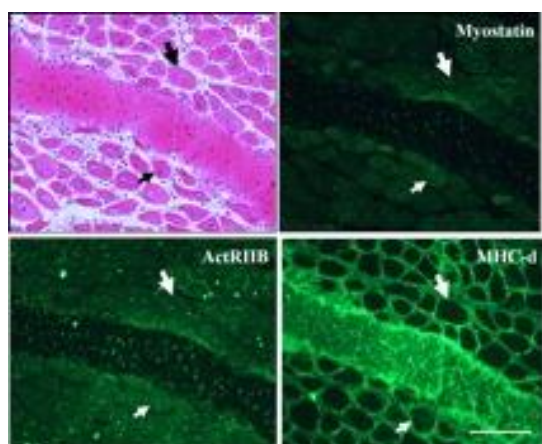


図 2 1week post CTX injury

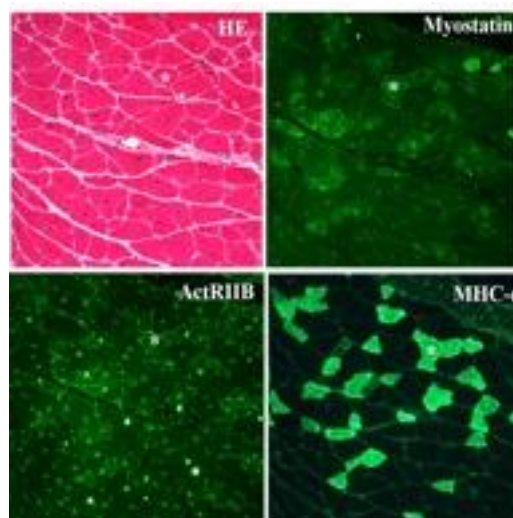


図 3 3week post CTX injury

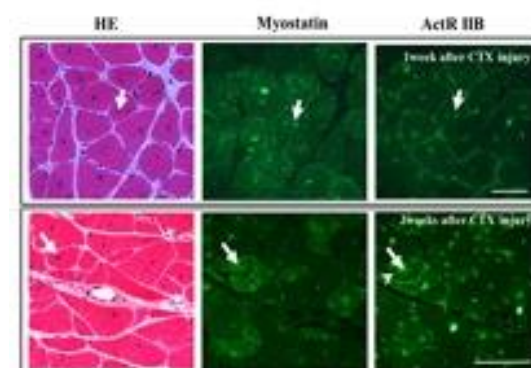


図4 Post CTX injury

再生筋線維に占める MSTN 陽性線維の割合は損傷後の時期を問わず 42-49%であった。

また、ActR IIB 陽性筋線維は、常に MSTN 陽性を呈したが、再生筋線維に占める MSTN-ActR IIB 共陽性線維の割合は、損傷 1 週後は 8.4%、2 週後は 24.1%、3 週後は 18.3%と経時的に変化した(表1)。



表1 Myostatin, Myostatin/ActRIIB 陽性線維の割合

② 生検筋

s-IBM: MSTN と ActRIIB は、MHC-d 陽性の再生筋線維で発現していたが Rimmed-vacuole を有する筋線維では発現していなかった(図 5)。MHC-d 陰性の高度に萎縮した筋線維でも MSTN と ActRIIB は共陽性を示した(図 6)。

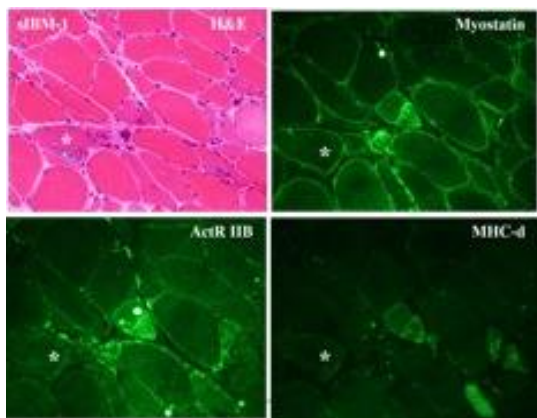


図 5 s-IBM

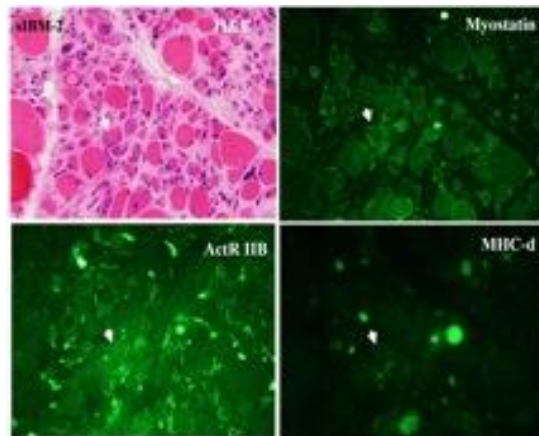


図 6 s-IBM (高度萎縮部分)

皮膚筋炎: perifascicular atrophy を来した筋線維のうち、MHC-d 陰性の萎縮筋線維において MSTN と ActRIIB は共陽性を示した(図 7)

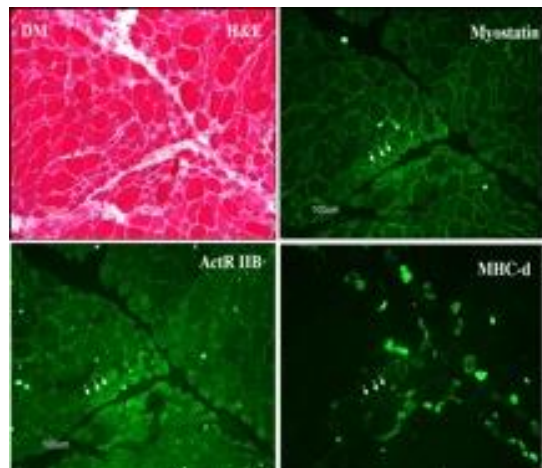


図 7 皮膚筋炎

【考察】

Myostatin (MSTN) は、骨格筋に特異的に発現する TGFβ スーパーファミリーに属するサイトカインで、activin receptor IIB (ActRIIB) と結合後、Smad 依存性/非依存性経路を活性化し、筋分化や筋肥大を誘導する遺伝子群の発現を抑制し筋萎縮を促す(図 8)。

MSTN は、Type 2 線維に発現するとの既報告はあるが、その受容体である ActRIIB の局在に

ついで報告はなされていない。

今回の CTX の筋損傷モデルから、筋再生時の MSTN と ActRIIB の発現パターンは、経時的に変化し、MSTN と ActRIIB は必ずしも同一の筋線維に発現するとは限らず、double-positive 線維の割合が経時的に変化することが判明した。

また、生検筋の検討から、MHC-d 陽性再生筋線維は、MSTN 陽性と陰性群に大別され、MSTN 陽性群は更に ActR IIB 陽性と陰性群に大別された。一方、MHC-d 陰性線維は、筋萎縮を免れた MSTN 陽性・ActR IIB 陰性 Type 1 線維と MSTN 陽性・ActR IIB 陽性筋線維に大別できた。この MSTN ActR IIB double positive 線維は、皮膚筋炎の perifascicular atrophy や sIBM の高度の萎縮した筋線維で発現していた。(図 9)

以上のことから、筋傷害後、再生過程にある筋線維でまず、MSTN が発現し、その後 ActR IIB が発現した筋線維が最終的に萎縮に陥ることが推測された。

**E: 結論**

MSTN と ActR IIB は筋線維萎縮に関係しているが再生過程の筋線維における両者の発現は必ずしも一致していない。筋萎縮の進行の予測には共陽性再生筋線維の割合を検討することが重要である。

**【H27 年】**

**A: 研究目的**

中條-西村症候群はプロテアソームのサブユニッ

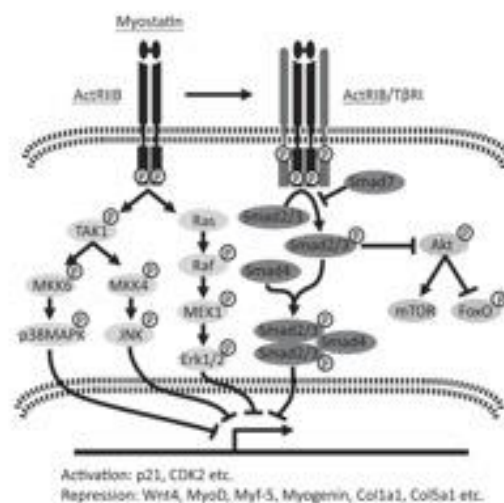


図 8 Myostatin と ActRIIB の作用機序

Myostatin および関連蛋白の発現パターン

|           | 1     | 2   | 3                | 4                                 |
|-----------|-------|-----|------------------|-----------------------------------|
| Myostatin | -     | +   | +                | +~±                               |
| ActR IIB  | -     | -/+ | -                | +                                 |
| MHC-d     | +     | +   | -                | -                                 |
|           | 再生筋線維 |     | 萎縮を免れた Type 1筋線維 | 高度な萎縮筋線維 (perifascicular atrophy) |

**F: 健康危険情報**

なし

**G: 研究発表**

論文発表

村田顕也, 伊東秀文: 封入体筋炎の病態と原因.

Brain and Nerve 66, 1385-1394, 2014

**H: 知的所有権の取得状況(予定を含む)**

1: 特許取得 2: 実用新案登録

3: その他 なし

トである β-5i サブユニットをコードする PSMB8 遺伝比の変異によって発症し、封入体筋炎と類

似した病理像を呈する例が報告されている。これらの疾患の類似点と相違点を臨床像、筋病理像において比較検討を行った。

#### B:研究方法

遺伝子検査によって PSMB8 遺伝子の変異が確認されている症例 1 例の筋凍結ブロックと、2 例のパラフィンブロック献体を用いて、HE 染色と免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

患者に対しては病理サンプル取得時に研究に用いられることを説明した上でサンプルを採取している。

#### C:研究結果

中條-西村症候群の症例の中には、IBM に類似した筋病理像を呈する症例があり、鑑別の点から重要と考えた。また、タンパク沈着の程度は、炎症細胞や、空胞の程度と関連していた。一方で、炎症の程度や空胞の有無は今回の検討症例や、既報告でも、症例によって異なっていた。

#### D:考察

プロテアソームの障害は IBM でも想定されており、中條-西村症候群はプロテアソーム障害によって、同等な病理像を呈し得ることは、炎症と変性の関係を知る上でも重要な所見と考えた。

#### E:結論

これらの筋病理所見が、病態を反映したものなのか、二次的なものであるかや、IBM との病態の共有の有無については、さらに症例の蓄積が必要と考えた。

#### F:健康危険情報

標本はいずれも、過去に既に採取されたもので

あり、本研究による患者への侵襲性はない。

#### G:研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

##### 1:論文発表

- ① Honjo Y, Ayaki T ら Increased GADD34 in oligodendrocytes in Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2015 Aug 18;602:50-5.
- ② Uchida T, Tamaki Y, Ayaki T ら CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. Sci Rep. 2016 Jan 11;6:19118

##### 2:学会発表

- ① 第 56 回日本神経学会, Takashi Ayaki, Hidefumi Ito, Osamu Komure ら Clinicopathologic study of autopsied familial ALS cases with optineurin mutation, 2015 (H27)/5/22, 新潟
- ② 第 56 回日本神経病理学会, 綾木孝, 伊東秀文, 小牟禮修ら, Optineurin 遺伝子にヘテロ接合 E478G 変異を認めた家族性 ALS の一部検例 2015(H27)/6/4, 福岡

#### H:知的所有権の取得状況(予定を含む)

##### 1:特許取得

なし

##### 2:実用新案登録

なし

##### 3:その他

なし

#### 【H28 年】

#### A:研究目的

中條-西村症候群(NNS)は、弛張熱や特徴

的な皮疹を伴い、顔面・上肢を中心とした上半身のやせと、拘縮を伴う長く節くれ立った指趾を呈する、常染色体劣性遺伝疾患である。免疫プロテアソーム  $\beta 5i$  サブユニットをコードする遺伝子の変異により発症し、プロテアソーム機能不全のためにユビキチン化・酸化蛋白が異常蓄積することで種々の症状を呈すると考えられている。一方、封入体筋炎 (IBM) は大腿四頭筋と深指屈筋に強い筋力低下、筋萎縮を特徴とする炎症性筋疾患である。炎症、変性、異常蛋白の蓄積、オートファジーやプロテアソーム機能低下など様々な原因が提唱されているが、明確な発症機序はまだ不明である。両疾患における臨床的、病理学的特徴を比較検討した。

#### B: 研究方法

① 遺伝子検査によって PSMB8 遺伝子のホモ変異が確認されている 4 例の NNS 症例について、臨床所見 (筋力低下、筋 MRI、血液データなど) を IBM の臨床像と比較した。さらに NNS 症例 2 例と IBM 患者の筋組織を用いて、HE 染色および免疫染色を行い比較検討した。

#### ② (倫理面への配慮)

各患者に対し、病理サンプル取得時に研究に用いられることを説明したうえサンプルを採取した。また、発表時には個人情報が入り込まない形で公開するよう配慮した。

#### C: 研究結果

##### ① 臨床症状

NNS 患者 4 例はいずれも深指屈筋の筋力低下を認め、そのうち 3 例は大腿四頭筋の筋力低下もみられ、IBM の筋力低下の分布に類似していた。

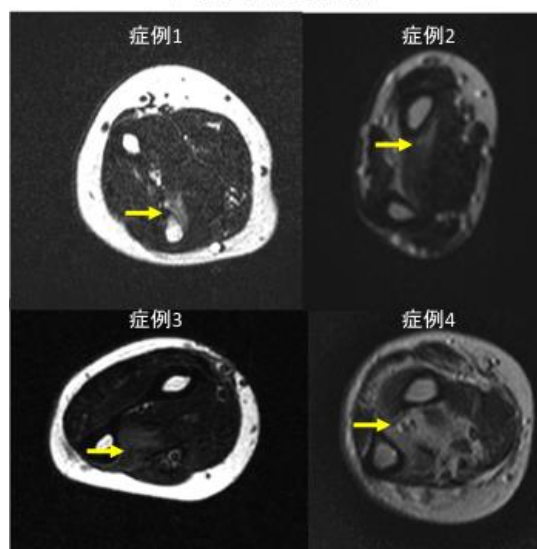
さらに嚥下造影所見では、嚥下障害が顕著

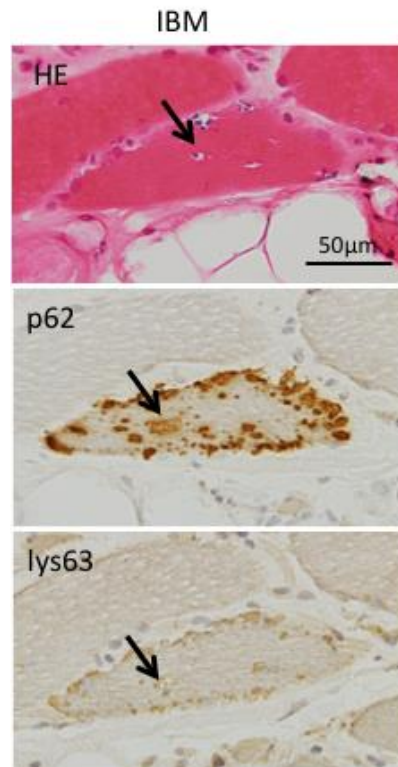
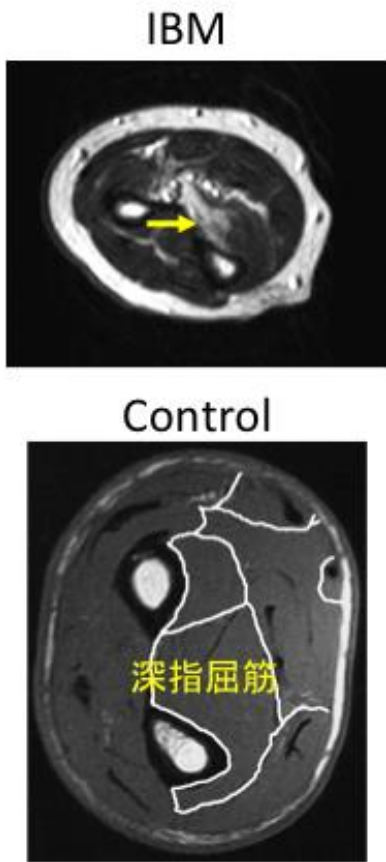
であった NNS1 例において、食道入口部開大障害が認められた。これは IBM における嚥下障害のパターンと同様であった。

##### ② MRI 所見

前腕 MRI では、4 症例全てにおいて深指屈筋の高信号変化が認められ、IBM に類似した所見であった。

#### 中條西村症候群

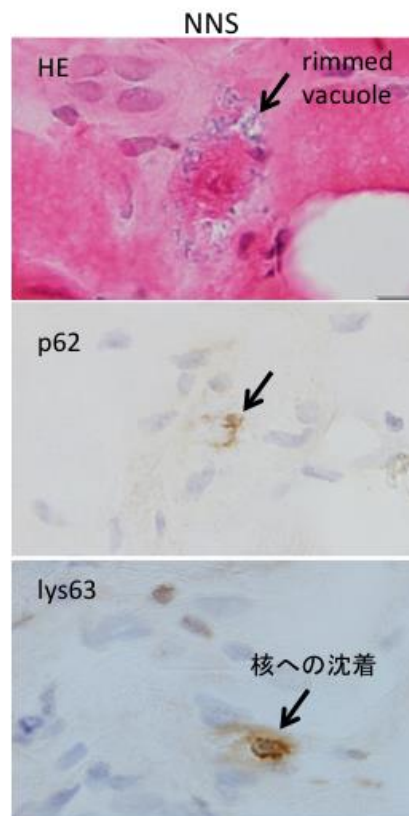




③ 病理所見

IBM、NNS のいずれでも縁取り空胞と、縁取り空胞内や空胞周囲細胞質への p62 沈着がみられた。IBM では、lys63-linked polyubiquitin による染色でも p62 とほぼ共通の染色性を認めた。

一方、NNS では lys63-linked polyubiquitin は細胞質には目立たず、核に淡い沈着を認めた。





#### D: 考察

IBM では p62 と lys63 polyubiquitin はいずれも縁取り空胞内や筋線維細胞膜下に沈着が目立った。選択的オートファジーにおいて p62 に LC3 が結合する際、p62 に k63 鎖ユビキチン化蛋白が結合して複合体を形成し、オートファゴソームへ取り込まれる。p62 と lys63 polyubiquitin の沈着部位が重複していたのは、これらの影響が推測された。

#### E: 結論

NNS と IBM には、多数の類似した臨床所見が確認された。

筋病理所見では、共通の特徴 (rimmed vacuole, p62, pTDP43 沈着) を有するが、ポリユビキチン鎖の染色性には相違点もみられた。NNS は遺伝子異常によりプロテアソーム機能不全をきたす稀な疾患である。NNS と臨床症状や病理所見における共通点が多数認められたことから、IBM においてもプロテアソーム機能異常の関与が推測された。今後症例数や免疫染色を追加してさらに検討する必要があると考えられた。

#### F: 健康危険情報

患者に実施した MRI や血液検査などの臨床検査は、いずれも通常診療の範囲で実施した。なお、標本はいずれも過去に既に採取されたものを用いており、本研究による患者への侵襲性はない。

#### G: 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

①Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan Suzuki N, Mori-Yoshimura M, Yamashita

S, Nakano S, Murata KY, Inamori Y, Matsui N, Kimura E, Kusaka H, Kondo T, Higuchi I, Kaji R, Tateyama M, Izumi R, Ono H, Kato M, Warita H, Takahashi T, Nishino I, Aoki M  
Orphanet J Rare Dis. 2016 Nov 8;11(1):146

②Anti-U3 ribonucleoprotein antibody-positive inflammatory myopathy: a case report

Murata KY, Nakatani K, Yamaneki M, Nakanishi I, Ito H  
J Med Case Rep. 2016 Jun 9;10:169.

③Fatigue-related differences in erector spinae between prepubertal children and young adults using surface

electromyographic power spectral analysis Tanina H, Nishimura Y, Tsuboi H, Sakata T, Nakamura T, Murata KY, Arakawa H, Umezu Y, Tajima F  
J Back Musculoskelet Rehabil. 2017 vol. 30, no.1, pp.1-9

④A case of paraneoplastic anti-3-hydroxy-

3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies positive immune-mediated necrotizing myopathy with uterine cancer Mizuma A, Koheji M, Netsu S, Yutani S, Kitao R, Suzuki S, Murata K, Nagata E, Takizawa S

Internal Medicine. In press

2:学会発表

村田顕也. ANCA 関連血管炎性ニューロパチーの臨床病理学的検討. 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016 年 5 月 19 日, 神戸

H:知的所有権の取得状況(予定を含む)

1:特許取得

なし

2:実用新案登録

なし

3:その他

なし

## 孤発性封入体筋炎の病態における抗 NT5C1A 抗体の意義

研究協力者:山下 賢<sup>1)</sup>

共同研究者:俵 望<sup>1)</sup>、張 霄<sup>1)</sup>、張 子微<sup>1)</sup>、道鬼 つかさ<sup>1)</sup>、  
松尾圭将<sup>1)</sup>、中根俊成<sup>1)</sup>、前田 寧<sup>1)</sup>、安東由喜雄<sup>1)</sup>

1)熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学

### 研究要旨

【目的】孤発性封入体筋炎 (sIBM) は難治性筋疾患であり、その病態には蛋白分解機構の破綻や異常な免疫反応の関与が想定されている。近年、一部の sIBM 患者血清および血漿中に cytosolic 5'-nucleotidase 1A (NT5C1A) に対する自己抗体の検出が報告された。本研究の目的は、sIBM の病態における本抗体の病因論的意義を解明することである。

【方法】我々は本抗体を検出可能な cell-based assay (CBA) 系を作成し、sIBM を含む神経筋疾患患者血清を用いて、sIBM 診断に対する感度および特異度を ELISA 法と比較した。また本抗体を有する sIBM 患者と有さない患者について臨床病理学的特徴を比較した。さらに in vitro および in vivo 受動免疫モデルにおいて、本抗体の病態に及ぼす影響を検討した。

【結果および考察】CBA 法による解析では、sIBM 患者 67 例中 24 例 (35.8%) が本抗体陽性であり、感度 35.8%、特異度 91.7%であった。ランダムに選択した 45 例の解析では CBA 法の感度 45%、特異度 96%であった一方、ELISA 法での感度は 45%、特異度は 88%であった。本抗体を有する sIBM 患者群では、C 型肝炎ウイルス抗体を有する割合が低く、タイプ 2 筋線維の平均面積が小さい特徴を認めた。in vitro モデルでは、本抗体陽性の sIBM 患者 IgG を添加した細胞で p62 の発現が増加し、p62 陽性の凝集を有する細胞が増加した。in vivo モデルでは、本抗体陽性の sIBM 患者 IgG を接種されたマウス筋線維内に p62 陽性の凝集を認め、マクロファージの浸潤を伴った。

【結論】CBA 法は、ELISA 法と同等の感度を有し、sIBM 診断に有用と考えられた。本抗体を有する sIBM 患者は特有の臨床病理学的特徴を認めた。本抗体は筋線維内の蛋白分解機構に影響する可能性が示された。

### A:研究目的

封入体筋炎(sIBM)は高齢者に頻発する進行

性筋疾患であるが、今日まで有効な治療法はなく、15年程度で車椅子生活になる難治性疾患で

ある。特異的な診断方法はなく、臨床症状や筋病理所見、電気生理検査所見より総合的に診断されるため、確定診断の時点で既に進行期に達していることも少なくない。現在筋肥大や分化を抑制するマイオスタチン経路を阻害するアクチビン受容体Ⅱ型モノクローナル抗体が治療候補として検討されているが、早期診断と治療効果判定に有用なバイオマーカーの開発が不可欠と考えられる。

sIBM のバイオマーカーに関する新たな発見として、2013 年に Larman ら、Pluk らの 2 つの異なるグループより sIBM 患者血清において Cytosolic 5'-nucleotidase 1A (NT5C1A) に対する自己抗体が存在するとの報告がなされた。Larman らは Dot blot assay 法を用いた抗体測定を行い、カットオフ値を 10IU と定めた場合の sIBM 診断の感度は 34%、特異度は 98%であると報告した。抗 NT5C1A 抗体測定はその特異性の高さから sIBM の診断に非常に有用である可能性がある。一方で、本抗体は sIBM のみならず、筋疾患を有さない全身性エリテマトーデス (SLE) やシェーグレン症候群 (SjS) の患者においても検出されることが報告された。すなわち、本抗体が病原性を有するか否かは未解明である。

本研究の目的は、我々が新たに開発した cell-based assay (CBA) 法を用いて、本抗体を有する sIBM 患者の臨床病理学的特徴を解明するとともに、受動免疫モデルを用いて本抗体の病因的意義を解明することである。

## B: 研究方法

### 1) 抗 NT5C1A 抗体測定における CBA 法と ELISA 法の比較.

CBA 法は COS7 細胞に GFP 標識 NT5C1A 発現ベクターを遺伝子導入後、一次抗体に患者および健常者血清、二次抗体

に Alexa594 標識抗ヒト IgG 抗体を用い、蛍光顕微鏡観察にて定性的に評価した。ELISA 法は、抗 NT5C1A 測定 ELISA キット (Cat. No. EA1675-4801G, EUROIMMUN AG, Lübeck, Germany) を用いた。ランダムに選択した同一検体 45 症例 (sIBM 患者 20 例、多発筋炎 11 例、皮膚筋炎 7 例、非炎症性筋疾患性のミオパチー 6 例、健常者 1 例) について、CBA 法および ELISA 法両者で本抗体を検出し、それぞれの sIBM 診断の感度および特異度を算出した。

### 2) sIBM を含む各疾患における抗 NT5C1A 抗体測定.

sIBM 患者 67 例、炎症性筋疾患 75 例 (多発筋炎 36 例、皮膚筋炎 31 例、壊死性ミオパチー 8 例)、非炎症性筋疾患性のミオパチー 41 例、筋膜炎 1 例、自己免疫疾患 (SLE、SjS) 15 例、神経原性筋萎縮疾患 16 例、健常者 10 例の計 225 例の血清について、CBA 法を用いて抗 NT5C1A 抗体の定性的評価を行い、sIBM の診断における感度、特異度の検討を行った。

### 3) 抗 NT5C1A 抗体陽性 sIBM 例および陰性 sIBM 例での臨床病理学的特徴の比較.

抗体陽性群と抗体陰性群について、男女比、発症年齢、初発症状、嚥下障害の有無、膝進展 > 股屈曲、手指屈曲 > 肩外転、合併症の有無 (自己免疫疾患、HTLV-I 抗体、HCV 抗体、HIV 抗体)、血清 CK 値、針筋電図における急性脱神経所見の有無、呼吸機能 (%VC、%FVC)、IBMFRS スコア、治療反応性 (IVIg、ステロイド) などに関して臨床像の比較を行った。また筋病理学的解析が可能であった 9 例 (抗体陽性 3 例、抗体陰性 6 例) について、タイプ 2 筋線維の平均面

積、縁取り空胞 (RV) を有する筋線維の頻度、高度の炎症細胞浸潤の有無、コンゴレット陽性筋線維の有無、NT5C1A と p62 の共局在の有無、核周囲への NT5C1A 局在の有無を比較した。

4) 抗 NT5C1A 抗体の in vitro 受動免疫モデルの評価.

抗 NT5C1A 抗体陽性および陰性患者、健康者各 3 例より IgG を抽出し、ヒト横紋筋肉腫細胞である RD 細胞の培地中にそれぞれ 7 mg/ml の濃度で添加し、i) MTS アッセイによる細胞生存性、ii) 抗原である NT5C1A 蛋白と、LC3 および p62 などのオートファジー関連蛋白の発現を免疫染色およびウェスタンブロットにて比較した。

5) 抗 NT5C1A 抗体の in vivo 受動免疫モデルの評価.

抗 NT5C1A 抗体陽性および陰性患者、健康者各 3 例より抽出した IgG (10 mg) を、それぞれ 3 匹ずつの C57BL/6J マウスに腹腔内投与し、経時的に体重推移、ロータロッドテストおよびメッシュハンギングテストによる運動機能評価を行った。また投与後 4 週の段階で筋病理学的評価を行い、p62 および IgG、CD68 の発現を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、熊本大学大学院生命科学研究部等疫学・一般研究倫理委員会で審査を受け、承認された (倫理第 937、1124 号)。

C: 研究結果

1) 抗 NT5C1A 抗体測定における CBA 法と ELISA 法の比較.

ランダムに選択した 45 例の解析では CBA 法の感度 45%、特異度 96%であった一方、

ELISA 法での感度は 45%、特異度は 88%であった。

2) sIBM を含む各疾患における抗 NT5C1A 抗体測定.

sIBM 患者 67 症例のうち、24 症例が抗 NT5C1A 抗体陽性であった (陽性率 35.8%)。他の炎症性筋疾患では、多発筋炎が 36 例中 5 例 (陽性率 13.9%)、皮膚筋炎が 31 例中 4 例 (陽性率 12.9%)、抗 SRP 抗体陽性ミオパチーを含む壊死性ミオパチーが 8 例中 2 例 (陽性率 25.0%) で抗体陽性であった。我々の検討では、筋膜炎 1 例、自己免疫疾患 (SLE、SjS) 15 例、神経原性筋萎縮 (運動ニューロン疾患など) 16 例、健康コントロール 10 例はいずれも抗体陰性であった。sIBM 診断における抗 NT5C1A 抗体測定の感度は 35.8%、特異度は 91.7%であった。sIBM と他の炎症性筋疾患、あるいは神経原性筋萎縮との鑑別において、特異度はそれぞれ 85.3%と 100%であった。

3) 抗 NT5C1A 抗体陽性 sIBM 例および陰性 sIBM 例での臨床病理学的特徴の比較.

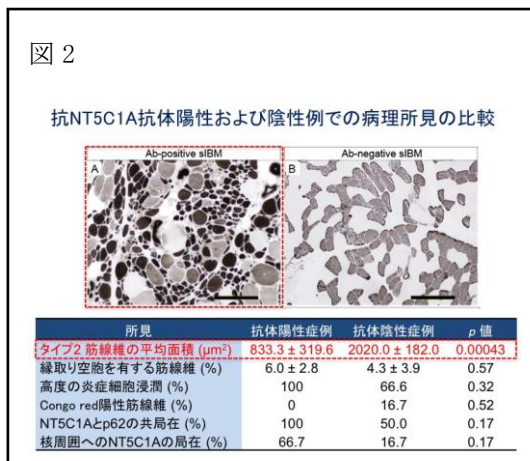
男女比、発症年齢、初発症状、嚥下障害の有無、血清 CK 値、針筋電図における急性脱神経所見の有無、呼吸機能 (%VC、%FVC)、IVIg やステロイドに対する治療反応性はいずれも有意差を示さなかった (図 1)。

図 1

抗NT5C1A抗体陽性および陰性例での臨床所見の比較

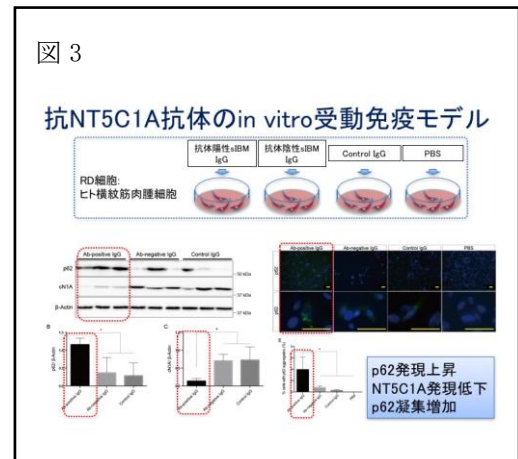
|                     | 抗体陽性症例 (n=24) | 抗体陰性症例 (n=45) | p 値   |
|---------------------|---------------|---------------|-------|
| 男性/女性               | 16/8          | 24/19         | 0.385 |
| 発症年齢 (歳)            | 61.6 ± 9.0    | 62.9 ± 12.2   | 0.389 |
| 初発症状                |               |               |       |
| 下肢 (%)              | 78.3          | 88.1          | 0.444 |
| 上肢 (%)              | 17.4          | 7.1           |       |
| その他 (%)             | 4.3           | 4.8           |       |
| 嚥下障害 (%)            | 38.1          | 32.5          | 0.662 |
| 筋力低下の分布             |               |               |       |
| 肩伸屈 > 股屈伸 (%)       | 84.6          | 60.0          | 0.133 |
| 手指屈伸 > 肩伸屈 (%)      | 75.0          | 69.0          | 0.669 |
| 合併症                 |               |               |       |
| 自己免疫疾患 (%)          | 14.3          | 19.0          | 0.714 |
| 抗HLA抗体 (%)          | 4.8           | 9.7           | 0.514 |
| 抗HCV抗体 (%)          | 4.5           | 26.5          | 0.096 |
| 血清クレアチニンキナーゼ (IU/L) | 412.3 ± 259.9 | 641.6 ± 819.5 | 0.284 |
| 急性脱神経所見 (%)         | 78.6          | 80.0          | 0.916 |
| 呼吸機能                |               |               |       |
| %VC                 | 93.8 ± 18.7   | 90.8 ± 15.4   | 0.859 |
| %FVC                | 93.3 ± 18.6   | 84.8 ± 15.8   | 0.447 |
| IBMFRSスコア           | 26.6 ± 9.3    | 29.9 ± 4.9    | 0.382 |
| 治療反応性               |               |               |       |
| 免疫グロブリン大量療法 (%)     | 50.0          | 40.0          | 0.714 |
| ステロイド (%)           | 71.4          | 50            | 0.377 |

しかし合併症の抗 HCV 抗体陽性の頻度は、抗 NT5C1A 抗体陽性症例において有意に低い結果を示した。筋病理学的比較では、抗 NT5C1A 抗体陽性症例においてタイプ 2 筋線維の平均面積が小さい結果を示した(図 2)。一方、縁取り空胞 (RV) を有する筋線維の頻度、高度の炎症細胞浸潤の有無、コンゴレッド陽性筋線維の有無、NT5C1A と p62 の共局在の有無、核周囲への NT5C1A 局在の有無について有意差はみられなかった(図 2)。



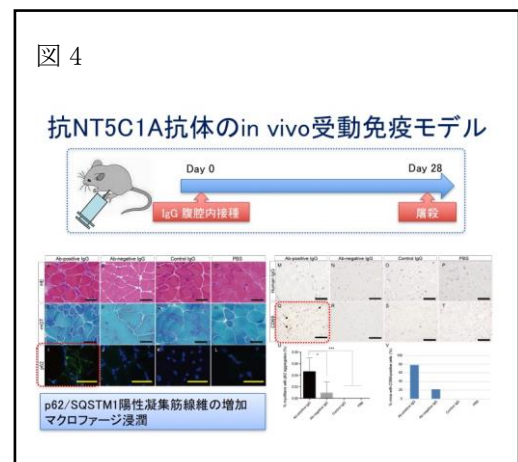
#### 4) 抗 NT5C1A 抗体の in vitro 受動免疫モデルの評価.

本抗体陽性および陰性 sIBM 患者、健常者より抽出した IgG を添加後 24 時間および 48 時間後に、MTS アッセイを用いて細胞生存性を評価したが、明らかな細胞毒性は見出されなかった。しかし、本抗体陽性患者 IgG 添加細胞では p62 の発現が増加し、NT5C1A の発現が低下していた。p62 抗体による免疫染色では、抗体陽性患者 IgG 添加細胞では p62 のドット状の凝集が見られた(図 3)。



#### 5) 抗 NT5C1A 抗体の in vivo 受動免疫モデルの評価.

本抗体陽性患者および陰性患者、健常者由来 IgG を投与されたマウスにおいて、体重推移、ロータロッドテストおよびメッシュハンギングテストによる運動機能に有意差はみられなかった。しかし、本抗体陽性患者 IgG 接種マウスでは、p62 陽性凝集筋線維が有意に増加し、CD68 陽性のマクロファージ浸潤を伴っていた(図 4)。



## D: 考察

### 1) 抗 NT5C1A 抗体測定 of 感度・特異度

我々が新たに開発した CBA 法は、従来のスタンダードと考えられる ELISA 法と同等の感度を有する一方、ELISA 法よりもさらに高い特異度を有する可能性が示された。本研究での抗 NT5C1A 抗体測定 of sIBM 診断における感度、特異度はそれぞれ 35.8%、91.7% となり、dot blot assay を用いた Larman ら、免疫沈降法を用いた Pluk らの既報告 of 感度、特異度と同程度であり、診断に有用と考えられる。一方、Greenberg らは sIBM 患者血清中には IgG 型抗体のみでなく、IgA、IgM 型抗体も存在すること、IgG、IgM、IgA 型の 3 つのサブタイプの抗 NT5C1A 抗体測定 of 併用により sIBM 診断感度を 76% まで高めることができることを報告している。今後 sIBM of 診断精度向上に対する抗 NT5C1A 抗体測定 of 有用性を確立するために、IgG、IgM、IgA 各クラス of 測定を含め、抗体測定 of 標準化が不可欠と考える。

### 2) 抗 NT5C1A 抗体陽性 sIBM 例および陰性 sIBM 例 of 臨床病理学的特徴 of 比較

これまで本抗体陽性症例と陰性症例 of 臨床および病理学的差異については、十分に解析されていない。Goyal らによると、sIBM 25 例中 9 例で同抗体が陽性であり、抗体陽性群では 6 分間歩行距離は同等であるものの起立に長時間を要し、車椅子や歩行器 of 使用頻度が高く、MRC 筋力スコアはより低く、嚥下障害 of 合併頻度が高く、努力性肺活量が低く、顔面筋 of 罹患頻度が高いことが報告されている。また Lilleker らは、sIBM 311 例中 102 例 (33%) で同抗体が陽性であり、同抗体陽性患者は高い致死率を有し、発症時に上肢近位筋 of 筋力低下を示す頻度が低く、

高度 of COX 陰性筋線維を有する頻度が高いことを報告している。これらの結果は、必ずしも我々の検討と一致せず、今後より多数例 of 解析が必要と考える。

### 3) 抗 NT5C1A 抗体 of 病原性

我々の in vitro および in vivo 受動免疫モデルでは、抗 NT5C1A 抗体陽性 IgG が p62 of 筋線維内凝集を誘導する可能性が示された。また同抗体陽性患者骨格筋において NT5C1A 抗原 of 発現が低下していたことは、本抗体が筋変性に影響することを示唆している。筋萎縮や蛋白分解経路 of 双方と関連が報告されている活性型 AMP activated kinase (p-AMPK) of 発現量を抗体陽性と陰性例で比較したところ、抗体陽性例で蛋白発現量が高い傾向がみられた。Kulkarni らは NT5C1A of 発現抑制が AMPK を活性化させると報告しており、また p-AMPK は筋萎縮を誘導するマイオスタチン of 発現を上昇させるとの報告もある。また AMPK はオートファジーを負に制御する mTOR を抑制することが知られている。すなわち NT5C1A of 機能低下や発現量低下は p-AMPK を介して筋萎縮や蛋白分解経路に関連する可能性があると考えられる。

## E: 結論

CBA 法は、ELISA 法より高い特異度を有し、sIBM 確定診断に有用と考えられた。本抗体を有する sIBM 患者は特有 of 臨床病理学的特徴を認めた。本抗体は筋線維内 of 蛋白分解機構に影響する可能性が示された。

## F: 健康危険情報

なし

## G: 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

### 1: 論文発表

- 1) Tawara N., Yamashita S., Zhang X., Korogi M., Zhang Z., Doki T., Matsuo Y., Nakane S., Maeda S., Sugie K., Suzuki N., Aoki M., Ando Y. Pathomechanisms of anti-cN1A autoantibodies in sporadic inclusion body myositis. *Ann. Neurol.*, in press (2017).
- 2) Ishizaki M., Kedoin C., Ueyama H., Maeda Y., Yamashita S., Ando Y. Utility of skinfold thickness measurement in non-ambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.*, 27, 24-28 (2017).
- 3) Mori Y., Yamashita S., Kato M., Masuda T., Takamatsu K., Kumamoto T., Sasaki R., Ando Y. Thomsen disease with ptosis and abnormal MR findings. *Neuromuscul. Disord.*, 26, 805-808 (2016).
- 4) Suzuki, N., Mori-Yoshimura, M., Yamashita S., Nakano S., Murata KY., Inamori Y., Matsui N., Kimura E., Kusaka H., Kondo T., Higuchi I., Kaji R., Tateyama M., Izumi R., Ono H., Kato M., Warita H., Takahashi T., Nishino I., Aoki M. Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan. *Orphanet J. Rare Dis.*, 11, 146 (2016).
- 5) Okumura K., Yamashita T., Masuda T., Misumi Y., Ueda A., Ueda M., Obayashi K., Jono H., Yamashita S., Inomata Y., Ando Y. Long-term outcome of patients with hereditary transthyretin V30M amyloidosis with polyneuropathy after liver transplantation. *Amyloid*, 23, 39-45 (2016).
- 6) Azuma M., Hirai T., Yamada K., Yamashita S., Ando Y., Tateishi M., Iryo Y., Yoneda T., Kitajima M., Wang Y., Yamashita Y. Lateral asymmetry and spatial difference of iron deposition in the substantia nigra of Parkinson's disease patients measured with quantitative susceptibility mapping. *AJNR Am J Neuroradiol.*, 37, 782-788 (2016).
- 7) Mori A., Yamashita S., Nakajima M., Hori H., Tawara A., Matsuo Y., Misumi Y., Ando Y. CMAP decrement as a potential diagnostic marker for ALS. *Acta Neurol. Scand.*, 134, 49-53 (2016).
- 8) Yamashita T., Ueda M., Saga N., Nanto K., Tasaki M., Masuda T., Misumi Y., Oda S., Fujimoto A., Amano T., Takamatsu K., Yamashita S., Obayashi K., Matsui H., Ando Y. Hereditary amyloidosis with cardiomyopathy caused by the novel variant transthyretin A36D. *Amyloid*, 23, 207-208 (2016).
- 9) 山下 賢, 安東 由喜雄. 眼咽頭遠位型ミオパチー. *Clinical Neuroscience*, 34, 332-333 (2016).
- 10) Yamashita S., Mori A., Nishida Y., Kurisaki R., Tawara N., Nishikami T.,



- Misumi Y., Ueyama H., Imamura S., Higuchi Y., Hashiguchi A., Higuchi I., Morishita S., Yoshimura J., Uchino M., Takashima H., Tsuji S., Ando Y. Clinicopathological features of the first Asian family having vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy due to a MATR3 mutation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 41, 391-398 (2015).
- 11) Hori H., Maeda Y., Ishizaki M., Hirahara T., Watanabe M., Yamashita S., Yamashita T., Uchino M., Ando Y. A carrier with de novo mutation in the dystrophin gene whose myopathic symptoms became seriously progressive after pregnancy and delivery. *Muscle Nerve*, 52, 913-914 (2015).
- 12) Yamashita S., Ando Y. Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. *Transl. Neurodegener.*, 4, 13 (2015).
- 13) Hirahara T., Yamashita S., Misumi Y., Kawakami K., Hori H., Honda S., Watanabe M., Ikeda T., Yamashita T., Maeda Y., Ando Y. Gait disturbance due to foot drop is refractory to the treatment in nonsystemic vasculitic neuropathy. *Eur. Neurol.* 71, 180-186 (2014).
- 14) Yamashita S., Fujimoto A., Mori A., Hirahara T., Mori A., Hirano T., Maeda Y., Uchino M., & Ando Y. Coexistence of amyotrophic lateral sclerosis and myasthenia gravis. *J. Neuromusc. Dis.*, 1, 111-115 (2014).
- 15) Kurisaki R., Yamashita S., Sakamoto T., Maruyoshi N., Uekawa K., Uchino M., & Ando Y. Decision making of amyotrophic lateral sclerosis patients on noninvasive ventilation to receive tracheostomy positive pressure ventilation. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 125, 28-31 (2014).
- 16) Yamashita S., Sakashita N., Yamashita T., Tawara N., Tasaki M., Kawakami K., Komohara Y., Fujiwara Y., Kamikawa M., Nakagawa T., Hirano T., Maeda Y., Hasegawa M., Takeya M., Ando Y. Concomitant accumulation of  $\alpha$ -synuclein and TDP-43 in a patient with corticobasal degeneration. *J. Neurol.*, 261, 2209-2217 (2014).
- 17) Hori H., Yamashita S., Tawara N., Hirahara T., Kawakami K., Nishikami T., Maeda Y., Ando Y. Clinical features of Japanese patients with inclusion body myositis. *J. Neurol. Sci.*, 346, 133-137 (2014).
- 18) Fujie Y., Fusaki N., Katayama T., Hamasaki M., Soejima Y., Soga M., Ban H., Hasegawa M., Yamashita S., Kimura S., Suzuki S., Matsuzawa T., Akari H., Era T. New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. *PLoS One*, 9, e113052 (2014).

## 2:学会発表

- 1) Yamashita S., et al. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of a murine model and patients of inclusion body myositis. 21st International Congress of the World Muscle Society, Oct 6, 2016, Congress Palace, Granada, Spain.
- 2) Tawara N., Yamashita S., et al. Effect of anti-Cytosolic 5'-nucleotidase 1A (NT5C1A) antibody on cultured muscle cells and muscle fibers of mice. 21st International Congress of the World Muscle Society, Oct 6, 2016, Congress Palace, Granada, Spain.
- 3) Doki T., Yamashita S., et al. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of oculopharyngeal muscular dystrophy. 21st International Congress of the World Muscle Society, Oct 5, 2016, Congress Palace, Granada, Spain.
- 4) Zhang X., Yamashita S., et al. Establishment of a murine model of vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy. 21st International Congress of the World Muscle Society, Oct 6, 2016, Congress Palace, Granada, Spain.
- 5) Yamashita S., et al. Endoplasmic reticulum stress in murine model and patients with inclusion body myositis. 第 57 回日本神経学会総会, May 20, 2016, 神戸.
- 6) 山下 賢. 運動ニューロン疾患の診断と鑑別疾患 第 57 回日本神経学会総会, May 21, 2016, 神戸.
- 7) 張 霄, 山下 賢他. VCPDM モデルマウスの作成および筋病理学的解析. 第 57 回日本神経学会総会, May 18, 2016, 神戸.
- 8) 中原圭一, 中根俊成, 高松孝太郎, 中島誠, 山下 賢他. 重症筋無力症の抗 AChR 抗体価と胸腺病理所見, 胸腺摘出術の有効性との関連. 第 57 回日本神経学会総会, May 18, 2016, 神戸.
- 9) 道鬼つかさ, 山下 賢他. 咽頭筋ジストロフィーにおけるミトコンドリア障害の解析. 第 57 回日本神経学会総会, May 18, 2016, 神戸.
- 10) 俵 望, 山下 賢他. 孤発性封入体筋炎における抗 NT5C1A 抗体の病態におよぼす影響. 第 57 回日本神経学会総会, May 20, 2016, 神戸.
- 11) 興梠 舞, 俵 望, 山下 賢他. 抗 NT5C1A 抗体の筋毒性. 第 57 回日本神経学会総会, May 20, 2016, 神戸.
- 12) 原健太朗, 山下 賢他. 入院時歩行不能状態にあった HTLV-I 関連脊髄症の臨床的検討. 第 57 回日本神経学会総会, May 20, 2016, 神戸.
- 13) 松尾淳一, 山下 賢他. 声帯および咽頭麻痺を伴う遠位型ミオパチー (VCPDM) の筋病理学的解析. 第 57 回日本神経学会総会, May 18, 2016, 神戸.
- 14) 長尾麻子, 石崎雅俊, 山下哲司, 奥村幸祐, 岡崎敏郎, 前田 寧, 上山秀嗣, 川田康誠, 山下 賢, 安東由喜雄. 呼吸不全をきたした ALS におけるより安全な胃瘻造設術の検討. 第 57 回日本神経学会総会, May 21, 2016, 神戸.
- 15) 天野朋子, 山下 賢他. 筋萎縮性側索硬化症患者の医療処置法の選択に影響を及ぼ

- す要因についての検討. 第 57 回日本神経学会総会, May 21, 2016, 神戸.
- 16) Yamashita S., et al. Analysis of the pathogenesis of vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy. 20th International Congress of the World Muscle Society, Oct 2, 2015, Brighton Dome, Brighton, England.
  - 17) Tawara N., Yamashita S., et al. A single center analysis of the clinicopathological findings of anti-cytosolic 5'-nucleotidase 1a antibody-positive sporadic inclusion body myositis. 20th International Congress of the World Muscle Society, Oct 1, 2015, Brighton Dome, Brighton, England.
  - 18) Doki T., Yamashita S., et al. Phenotype analysis of transgenic mice expressing mutant PABPN1. 20th International Congress of the World Muscle Society, Oct 1, 2015, Brighton Dome, Brighton, England.
  - 19) Nakajou Y., Yamashita S., et al. Influence of mesenchymal stem cell on STAT signalling pathway in muscle satellite cell. 20th International Congress of the World Muscle Society, Oct 1, 2015, Brighton Dome, Brighton, England.
  - 20) Yamashita S., et al. Analysis of the pathogenesis in muscular degeneration due to a MATR3 mutation. 第 56 回日本神経学会総会, May 20, 2015, 新潟.
  - 21) Tawara N., Yamashita S., et al. Analysis of anti-NT5C1A antibody-positive sporadic inclusion body myositis. 第 56 回日本神経学会総会, May 20, 2015, 新潟.
  - 22) 松尾圭将, 山下 賢他. アデノ随伴ウイルスベクターを用いた変異 Matrin 3 発現マウスモデル作成. 第 56 回日本神経学会総会, May 22, 2015, 新潟.
  - 23) 道鬼つかさ, 山下 賢他. 変異型 PABPN1 過剰発現マウスの表現型の解析. 第 56 回日本神経学会総会, May 22, 2015, 新潟.
  - 24) 山元康寛, 山下 賢他. 筋特異的 TDP-43 トランスジェニックマウスの変性筋内蛋白の網羅的解析. 第 56 回日本神経学会総会, May 22, 2015, 新潟.
  - 25) Yamashita S., et al. Analyses of the pathogenesis in muscle-specific wild-type TDP-43 transgenic mice. 19th International Congress of The World Muscle Society. Oct 8-11, 2014, Berlin, Germany.
  - 26) Tawara N., Yamashita S., at al. World muscle society congress 2014 Cytoplasmic 5'-nucleotidase 1A are aggregated in type 2 fiber in sporadic inclusion body myositis. 19th International Congress of The World Muscle Society. Oct 8-11, 2014, Berlin, Germany.
  - 27) Nishikami T., Yamashita S., et al. The first Asian family having vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy due to a MATR3 mutation. 19th International Congress of The

- World Muscle Society. Oct 8-11, 2014, Berlin, Germany.
- 28) 山下賢他. 筋特異的な TDP-43 発現による IBM モデルマウス作製と病態解析 第 55 回日本神経学会学術大会 May 21-24, 2014, 福岡.
- 29) 俵望, 山下賢他. 孤発性封入体筋炎の自己抗原 NT5C1A はタイプ2線維に凝集している 第 55 回日本神経学会学術大会 May 21-24, 2014, 福岡.
- 30) 西上朋, 山下賢他. アジア初の声帯および咽頭麻痺を伴う遠位型ミオパチー (MPD2/VCPDM) の 1 家系 2 症例に関する多角的検討 第 55 回日本神経学会学術大会 May 21-24, 2014, 福岡.
- 31) 山元雅典、俵望、山下賢他. 封入体筋炎における Cylindromatosis 蛋白発現の検討 第 55 回日本神経学会学術大会 May 21-24, 2014, 福岡.

**H:知的所有権の取得状況(予定を含む)**

**1:特許取得**

なし

**2:実用新案登録**

なし

**3:その他**

なし

## 封入体筋炎の生理学的特徴検出の検討

研究協力者:梶龍児<sup>1)</sup>

共同研究者:野寺裕之、松井尚子、高松直子

徳島大学大学院医歯薬学研究部 臨床神経科学

### 研究要旨

封入体筋炎(IBM)の診断は必ずしも容易でなく、類縁疾患を適切に鑑別することが重要である。我々は筋エコーを用いてIBMに特徴的な画像所見を明らかにした。(1) IBMではヒラメ筋に比較して内側腓腹筋の輝度上昇が特徴的である。(2)筋エコー画像の微細構造をテクスチャ解析を用いて評価したところ、IBMと神経原性疾患との鑑別が可能であった。また、炎症性筋疾患とも鑑別が可能だった。

### A:研究目的

非典型的な症状を呈する場合、封入体筋炎(IBM)の診断は容易ではない。筋生検の感度にも限界があることから、非侵襲的な診断手法が望まれる。筋エコーは全身検索が容易でMRIなどと比較して検査禁忌がほとんどないことが有用である。(1)IBMに特徴的な筋エコー所見が存在するか検討した。(2)筋エコー画像の微細構造を定量的に測定するテクスチャ解析を用いることでIBMに特徴的な所見が認められるかを検討した。

### B:研究方法

(1)筋エコー輝度の評価:  
IBM患者と多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)患者はそれぞれの診断基準を満たした者とし、神経筋疾患を持たない正常コントロールを加えた3群を対象とした。GE Healthcare社の

LOGIQ7 エコー機器と11Hzのリニア型プローブを用いて下腿三頭筋(内側腓腹筋とヒラメ筋)および前腕筋(深指屈筋と尺骨手根屈筋)を描出した。臨床情報を与えられていない3名がrevised Heckmattスケールを用いて筋エコー輝度を0(正常)から4(高度の輝度上昇)の評価を行った(主観的評価)。また画像処理ソフトウェアを用いて楕円形関心領域の輝度ヒストグラムを作成した(客観的評価)。

(2)テクスチャ解析:

probable以上のENMC診断基準を満たしたIBMおよびIM患者と正常人を対象とする。LOGIQ7超音波機器(GEヘルスケア・ジャパン)と11MHzリニア型プローブを用いて右内側腓腹筋のエコー画像を記録した。ROIを設定した後、MaZdaテクスチャ解析ソフトウェアを用いて計283個のテクスチャ特徴量を抽出した。

Weka 機械学習ソフトウェアを用いて各群の判別を行った。

(倫理面への配慮)

患者及び正常被験者には書面で同意を得た。研究計画は徳島大学病院倫理委員会にて承認されている。

### C: 研究結果

(1) 被験者数は各群 11 名で性差はなかったが、PM/DM 群は他 2 群より有意に若年であった。エコー輝度の主観的評価と客観的評価は正の相関を示した。客観的評価では、s-IBM 群では内側腓腹筋がヒラメ筋より、また深指屈筋が尺側手根屈筋より有意に高輝度だったが、PM/DM 群と正常コントロール群では筋間輝度差に乏しかった。内側腓腹筋とヒラメ筋のエコー輝度差を用いることで s-IBM 群と PM/DM 群を感度 72.7%、特異度 100%で鑑別できた。

(2) 被験者数は IBM10 名、IM15 名、正常コントロール 20 名だった。サポートベクターマシーン (SVM) アルゴリズムを用いると正常群と IBM+IM 群は 93.3%の正判別率を示した。IBM と IM 群は 88%の正判別率を示した。テキストチャ特徴量を6つのサブグループに分け、IBM と IM 群の判別を行ったところ、ヒストグラム特徴量 (N=9) では正判別率が 68%だったが、Run-length matrix (N=20)では 80%だった。

### D: 考察

二つの研究を行い、筋エコーを用いることで IBM に特徴的なパターンを得ることができた。下腿三頭筋は臨床的に筋力評価が容易ではないが、エコーで容易に描出できることから補助診断として有用と考える。テキスト解析は筋組織の微細構造を定量的にひよかすもので、今回明らかとなった鑑別診断のみならず、進行及び治療反応性をバイオマーカーとして客観的に評価することが可能となると期待される。

### E: 結論

筋エコーにより IBM に特徴的な画像所見を明らかにした。疾患ステージによる画像所見の変化など、多数例を対象とした長期間の経過観察が今後の発展には必要である。

### F: 健康危険情報

無し

### G: 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

#### 1: 論文発表

Sogawa K, Nodera H, Takamatsu N, Mori A, Yamazaki H, Shimatani Y, Izumi Y, Kaji R. Neurogenic and Myogenic Diseases: Quantitative Texture Analysis of Muscle US Data for Differentiation. Radiology. 2017 (in press)

Nodera H, Takamatsu N, Matsui N, Mori A, Terasawa Y, Shimatani Y, Osaki Y, Maruyama K, Izumi Y, Kaji R. Intramuscular dissociation of echogenicity in the triceps surae characterizes sporadic inclusion body myositis. European Journal of Neurology 23(3) 588-596. 2016

#### 2: 学会発表

無し

### H: 知的所有権の取得状況(予定を含む)

#### 1: 特許取得

無し

#### 2: 実用新案登録

無し

#### 3: その他

無し

| 発表者名  | 論文タイトル名   | 発表誌                  | 巻・号   | ページ     | 出版年   |
|---|---|----------------------|-------|---------|---|
| Suzuki N, Mori-Yoshimura M, Yamashita S, Nakano S, Murata KY, Inamori Y, Matsui N, Kimura E, Kusaka H, Kondo T, Higuchi I, Kaji R, Tateyama M, Izumi R, Ono H, Kato M, Warita H, Takahashi T, Nishino I, Aoki M | Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan. | Orphanet J Rare Dis. | 11(1) | 146     | 2016<br>PMID:<br>27821140<br>DOI<br>10.1186/s13023-016-0524-x |
| Preethish-Kumar V, Pogoryelova O, Polavarapu K, Gayathri N, Seena V, Hudson J, Nishino I, Prasad C, Lochmuller H, Nalini A  | Beevor's sign: a potential clinical marker for GNE myopathy.                    | Eur J Neurol.        | 23(8) | e46-8   | Aug, 2016<br>doi:<br>10.1111/ene.13041. PMID:<br>27431025     |
| Uruha A, Noguchi S, Sato W, Nishimura H, Mitsuhashi S, Yamamura T, Nishino I  | Plasma IP-10 level distinguishes inflammatory myopathy.                         | Neurology            | 85    | 293-294 | 2015  |

|   |   |                                      |        |               |      |
|---|---|--------------------------------------|--------|---------------|------|
| Uruha A,<br>Noguchi S,<br>Hayashi YK,<br>Tsuburaya RS,<br>Yonekawa T,<br>Nonaka I,<br>Nishino I                               | Hepatitis C virus<br>infection in inclusion<br>body myositis: A case-<br>control study.   | Neurology                            | 86     | 211-7         | 2016 |
| Furuta A,<br>Kikuchi H,<br>Fujita H,<br>Yamada D,<br>Fujiwara Y,<br>Kabuta T,<br>Nishino I, Wada<br>K, Uchiyama Y:            | Property of Lysosomal<br>Storage Disease<br>Associated with<br>Midbrain Pathology in<br>the Central Nervous<br>System of <i>Lamp-2</i> -<br>Deficient Mice. | Am J Pathol.                         | 185(6) | 1713-<br>1723 | 2015 |
| Suzuki S,<br>Nishikawa A,<br>Kuwana M,<br>Nishimura H,<br>Watanabe Y,<br>Nakahara J,<br>Hayashi YK,<br>Suzuki N,<br>Nishino I | Inflammatory<br>myopathy with anti-<br>signal recognition<br>particle antibodies:<br>case series of 100<br>patients.  | Orphanet J<br>Rare Dis.              | 10(1)  | 61            | 2015 |
| Nishino I,<br>Carrillo-<br>Carrasco N,<br>Argov Z   | GNE myopathy:<br>current update and<br>future therapy.  | J Neurol<br>Neurosurg<br>Psychiatry. | 86(4)  | 385-392       | 2015 |
| Yonekawa T,<br>Nishino I  | Ullrich congenital<br>muscular dystrophy:<br>clinicopathological<br>features, natural<br>history and<br>pathomechanism(s).                                  | J Neurol<br>Neurosurg<br>Psychiatry. | 86(3)  | 280-287       | 2015 |



|  |  |                                |         |           |                       |
|--|--|--------------------------------|---------|-----------|-----------------------|
| Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Yonemoto N, Nakamura H, Murata M, Takeda SI, Nishino I, Kimura E | Nationwide patient registry for GNE myopathy in Japan.   | Orphanet J Rare Dis.           | 9(1)    | 150       | 2014 [Online journal] |
| Yonekawa T, Malicdan MC, Cho A, Hayashi YK, Nonaka I, Mine T, Yamamoto T, Nishino I, Noguchi S | Sialyllactose ameliorates myopathic phenotypes in symptomatic GNE myopathy model mice.   | Brain.                         | 137(10) | 2670-2679 | 2014                  |
| Cho A, Hayashi YK, Monma K, Oya Y, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I                              | Mutation profile of the <i>GNE</i> gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy).         | J Neurol Neurosurg Psychiatry. | 85(8)   | 912-915   | 2014                  |
| Noguchi S, Ogawa M, Kawahara G, Malicdan MC, Nishino I   | Allele-specific Gene Silencing of Mutant mRNA Restores Cellular Function in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts. | Mol Ther Nucleic Acids.        | 3       | e171      | 2014                  |
| Huizing M, Carrillo-Carrasco N, Malicdan MC, Noguchi S, Gahl WA, Mitrani-Rosenbaum S,          | GNE myopathy: New name and new mutation nomenclature.  | Neuromuscul Disord.            | 24(5)   | 387-389   | 2014                  |

|   |  |                      |       |             |      |
|---|--|----------------------|-------|-------------|------|
| Argov Z,<br>Nishino I   |  |                      |       |             |      |
| Mori-Yoshimura M, Oya Y, Yajima H, Yonemoto N, Kobayashi Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I, Murata M  | GNE myopathy: A prospective natural history study of disease progression.  | Neuromuscul Disord.  | 24(5) | 380-386     | 2014 |
| Goto M, Okada M, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK  | A nationwide survey on marinesco-sjogren syndrome in Japan.  | Orphanet J Rare Dis. | 9(1)  | 58          | 2014 |
| Miyatake S, Mitsuhashi S, Hayashi YK, Purevjav E, Nishikawa A, Koshimizu E, Suzuki M, Yatabe K, Tanaka Y, Ogata K, Kuru S, Shiina M, Tsurusaki Y, Nakashima M, Mizuguchi T, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, Kawai M, | Biallelic mutations in MYPN, encoding myopalladin, are associated with childhood-onset, slowly progressive nemaline myopathy | Am J Hum Genet       | 100•1 | 169–<br>178 | 2017 |

|   |   |                     |       |         |      |
|---|---|---------------------|-------|---------|------|
| Towbin J,<br>Nonaka I,<br>Nishino I,<br>Matsumoto N   |   |                     |       |         |      |
| Kawahara G,<br>Hayashi YK   | Characterization of zebrafish models of Marinesco-Sjögren syndrome  | PLoS One            | 11•10 |         | 2016 |
| Sugie K,<br>Yoshizawa H,<br>Onoue K,<br>Nakanishi Y,<br>Eura N, Ogawa M,<br>Nakano T,<br>Sakaguchi Y,<br>Hayashi YK,<br>Kishimoto T,<br>Shima M, Saito Y,<br>Nishino I,<br>Ueno S | Early onset of cardiomyopathy and intellectual disability in a girl with Danon disease associated with a de novo novel mutation of the LAMP2 gene | Neuropathology      | 36•6  | 561-565 | 2016 |
| Endo Y, Dong M,<br>Noguchi S,<br>Ogawa M,<br>Hayashi YK,<br>Kuru S,<br>Sugiyama K,<br>Nagai S, Ozasa S,<br>Nonaka I,<br>Nishino I   | Milder forms of muscular dystrophy associated with <i>POMGNT2</i> mutations   | Neurol Genet        | 1•4   | e33     | 2015 |
| Dastgir J,<br>Rutkowski A,<br>Alvarez R,<br>Cossette SA, Yan K,<br>Hoffmann RG,<br>Sewry C,<br>Hayashi YK,  | Common Data Elements for Muscle Biopsy<br>44 Reporting  | Arch Pathol Lab Med | 140•1 | 51-65   | 2016 |

|  |  |                                     |      |         |      |
|--|--|-------------------------------------|------|---------|------|
| Goebel HH,<br>Bonnemann C,<br>Lawlor MW  |  |                                     |      |         |      |
| Nishikawa A,<br>Mori-Yoshimura<br>M, Segawa K,<br>Hayashi YK,<br>Takahashi T,<br>Saito Y, Nonaka<br>I, Krahn M, Levy<br>N, Shimizu J,<br>Kimura E, Goto<br>J, Yonemoto N,<br>Aoki M, Nishino<br>I, Oya Y, Murata<br>M. | Respiratory and<br>cardiac function in<br>Japanese patients with<br>dysferlinopathy.                       | Muscle Nerve                        | 53•3 | 394-401 | 2016 |
| Oda T, Xiong H,<br>Kobayashi K,<br>Wang S, Satake<br>W, Jiao H, Yang<br>Y, Cha PC,<br>Hayashi YK,<br>Nishino I, Suzuki<br>Y, Sugano S, Wu<br>X, Toda T   | A de novo mutation of<br>the MYH7 gene in a<br>large Chinese family<br>with autosomal<br>dominant myopathy | Human<br>Genome<br>Variation        | 2    | 15022   | 2015 |
| Uruha A,<br>Hayashi YK, Oya<br>Y, Mori-<br>Yoshimura M,<br>Kanai M, Murata<br>M, Kawamura<br>M, Ogata K,<br>Matsumura T,<br>Suzuki S,<br>Takahashi Y,<br>Kondo T,  | Necklace cytoplasmic<br>bodies in hereditary<br>myopathy with early<br>respiratory failure.                | J Neurol<br>Neurosurg<br>Psychiatry | 86•5 | 483-489 | 2015 |

|  |  |                                   |         |         |      |
|--|--|-----------------------------------|---------|---------|------|
| Kawarabayashi T, Ishii Y, Kokubun N, Yokoi S, Yasuda R, Kira JI, Mitsuhashi S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I. |  |                                   |         |         |      |
| Suzuki S, Nishikawa A, Kuwana M, Nishimura H, Watanabe Y, Nakahara J, Hayashi YK, Suzuki N, Nishino I.         | Inflammatory myopathy with anti-signal recognition particle antibodies: case series of 100 patients. | Orphanet Journal of Rare Diseases | 13•10   | 61      | 2015 |
| Yuen M, Sandaradura SA, Dowling JJ, YK Hayashi, et al.   | Leiomodin-3 dysfunction results in thin filament disorganization and nemaline myopathy.              | J Clin Invest                     | 125•1   | 456-457 | 2015 |
| Goto M, Okada M, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK                       | A nationwide survey on Marinesco-Sjögren syndrome in Japan.  | Orphanet J Rare Diseases          | 9•1     | 58      | 2014 |
| Kajino S, Ishihara K, Goto K, Ishigaki K, Noguchi S, Nonaka I, Osawa M, Nishino I,                             | Congenital fiber type disproportion myopathy caused by LMNA mutations.                               | J Neurol Sci                      | 340•1-2 | 94-98   | 2014 |

|  |  |                         |      |         |      |
|--|--|-------------------------|------|---------|------|
| Hayashi YK   |  |                         |      |         |      |
| Miyatake S,<br>Koshimizu E,<br>Hayashi YK,<br>Miya K, Shiina<br>M, Nakashima<br>M, Tsurusaki Y,<br>Miyake N, Saitsu<br>H, Ogata K,<br>Nishino I,<br>Matsumoto N. | Deep sequencing<br>detects very-low-grade<br>somatic mosaicism in<br>the unaffected mother<br>of siblings with<br>nemaline myopathy. | Neuromuscul<br>Disord   | 24•7 | 642-647 | 2014 |
| Mori-Yoshimura<br>M, Oya Y,<br>Yajima H,<br>Yonemoto N,<br>Kobayashi Y,<br>Hayashi YK,<br>Noguchi S,<br>Nishino I,<br>Murata M.                                  | GNE myopathy: A<br>prospective natural<br>history study of disease<br>progression.   | Neuromuscul<br>Disord   | 24•5 | 380-386 | 2014 |
| Mori-Yoshimura<br>M, Hayashi YK,<br>Yonemoto N,<br>Nakamura H,<br>Murata M,<br>Takeda SI,<br>Nishino I,<br>Kimura E.   | Nationwide patient<br>registry for GNE<br>myopathy in Japan.   | Orphanet J<br>Rare Dis. | 9•1  | 150     | 2014 |
| Ueki J, Nakamori M,<br>Nakamura M,<br>Nishikawa M,<br>Yoshida Y, Tanaka A,<br>Morizane A, Kamon  | Myotonic dystrophy<br>type 1 patient-derived<br>iPSCs for the<br>investigation of CTG<br>repeat instability.                         | Sci Rep.                | 7    | 42522   | 2017 |

|   |  |                           |            |         |      |
|---|--|---------------------------|------------|---------|------|
| M, Araki T,<br>Takahashi MP,<br>Watanabe A, Inagaki<br>N, Sakurai H.  |  |                           |            |         |      |
| Kato H, Kokunai Y,<br>Dalle C, Kubota T,<br>Madokoro Y, Yuasa H,<br>Uchida Y, Ikeda T,<br>Mochizuki H, Nicole<br>S, Fontaine B,<br>Takahashi MP,<br>Mitake S. | A case of non-<br>dystrophic myotonia<br>with concomitant<br>mutations in the<br>SCN4A and CLCN1<br>genes. | J Neurol Sci.             | 15・<br>369 | 254-258 | 2016 |
| Yoshinaga H, Sakoda<br>S, Shibata T,<br>Akiyama T, Oka M,<br>Yuan J-H, Takashima<br>H, Takahashi MP,<br>Kitamura T,<br>Murakami N,<br>Kobayashi K             | Phenotypic variability<br>in childhood of<br>skeletal muscle<br>sodium<br>channelopathies                  | Pediatric<br>Neurology    | 52・5       | 540-548 | 2015 |
| 高橋正紀  | 周期性四肢麻痺  | JMEDJ 治療<br>法便覧～私の<br>治療～ |            |         | 印刷中  |
| 高橋正紀  | 周期性四肢麻痺  | 今日の整形外<br>科治療指針<br>第7版    |            | 295-296 | 2016 |
| 階堂三砂子, 古<br>田 充, 中森雅之,<br>湯浅義人, 高橋<br>正紀  | てんかん性脳波異常を<br>伴う反復発作性運動失<br>調症2型の一家系   | 臨床神経                      | 56・4       | 260-264 | 2016 |
| 高橋正紀  | 周期性四肢麻痺  | 今日の診断指<br>針 第7版           |            | 680-681 | 2015 |

|  |  |                                   |               |         |      |
|--|--|-----------------------------------|---------------|---------|------|
| 久保田智哉<br>高橋正紀  | 骨格筋チャンネル病の最新知見 — ミオトニー症候群と周期性四肢麻痺を中心に  | 別冊 医学のあゆみ イオンチャンネル病のすべて           | pp.<br>38-45  |         | 2014 |
| Furuya N, Ikeda SI, Sato S, Soma S, Ezaki J, Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, <u>Arikawa-Hirasawa E</u> , Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. | PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. | Autophagy                         | Apr:10<br>(4) | :631-41 | 2014 |
| de Vega S, Suzuki N, Nonaka R, Sasaki T, Forcinito P, <u>Arikawa-Hirasawa E</u> , Yamada Y.  | A C-terminal fragment of fibulin-7 interacts with endothelial cells and inhibits their tube formation in culture.                                      | Arch Biochem Biophys.             | Mar<br>1;545: | 148-53. | 2014 |
| Ning L, Kurihara H, de Vega S,* Ichikawa-Tomikawa n, Xu Z, Nonaka R, Kazuno S, Yamada Y, Miner JH, <u>Arikawa-</u>   | Laminin $\alpha$ 1 regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF $\beta$ pathway                | The American Journal of Pathology | Jun;184(6)    | 1683-94 | 2014 |



|  |   |  |            |             |      |
|--|---|--|------------|-------------|------|
| <u>Hirasawa E</u>  |   |  |            |             |      |
| Nonaka R, Iesaki T, de Vega S, Daida H, Okada T, Sasaki T, <u>Arikawa-Hirasawa E</u>   | Perlecan deficiency causes endothelial dysfunction by reducing the expression of endothelial nitric oxide synthase.                   | 27:3. pii: e12272, 2015                    | 27:3. pii: | e12272,     | 2015 |
| Kerever A, Kamagata K, Yokosawa S, Otake Y, Ochi H, Yamada T, Hori M, Kamiya K, Nishikori A, Aoki S, <u>Arikawa-Hirasawa E.</u>            | See-through Brains and Diffusion Tensor MRI Clarified Fiber Connections:  | A Magnetic Resonance in Medical Sciences . | 14         | 159-162     | 2015 |
| Iwata S, Ito M, Nakata T, Noguchi Y, Okuno T, Ohkawara B, Masuda A, Goto T, Adachi M, Osaka H, Nonaka R, <u>Arikawa-Hirasawa E.</u> Ohno K | A missense mutation in domain III in HSPG2 in Schwartz-Jampel syndrome compromises secretion of perlecan into the extracellular space | Neuromuscul Disord.                        | 8          | 00153-00154 | 2015 |
| Kerever A, Yamada T, Suzuki Y, Mercier F, <u>Arikawa-Hirasawa, E</u>   | Fractone aging in the subventricular zone of the lateral ventricle  | Journal of Chemical Neuroanatomy.          | 66-67      | 52-60       | 2015 |

|   |  |                     |                                   |                       |                     |
|---|--|---------------------|-----------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Ning L, Xu Z,<br>Furuya N,<br>Nonaka R,<br>Yamada Y,<br><u>Arikawa-</u><br><u>Hirasawa E.</u>   | Perlecan inhibits autophagy to maintain muscle homeostasis in mouse soleus muscle.   | Matrix Biol.        | Oct;48                            | 26-35                 | 2015                |
| de Vega S,<br>Hozumi K,<br>Suzuki N,<br>Nonaka R, Seo E,<br>Takeda A,<br>Ikeuchi, T<br>Nomizu, M<br>Yamada Y,<br><u>Arikawa-</u><br><u>Hirasawa E</u>   | Identification of Peptides Derived from the C-terminal Domain of Fibulin-7 Active for Endothelial Cell Adhesion and Tube Formation Disruption. | Biopolymers         | Oct 22                            | [Epub ahead of print] | 2015                |
| Sadatsuki R,<br>Kaneko H,<br>Kinoshita M,<br>Futami I,<br>Nonaka R,<br>Culley KL, Otero M, Hada S,<br>Goldring MB,<br>Yamada Y,<br>Kaneko K,<br><u>Arikawa-</u><br><u>Hirasawa E.</u> ,<br>Ishijima M | Perlecan is required for the chondrogenic differentiation of synovial mesenchymal cells through regulation of Sox9 gene expression.J           | J Orthop Res        | 35(4).<br>Epub<br>2016<br>Jun 15. | 837-<br>846.          | 2017(<br>epub 2016) |
| Kamagata K,<br>Kerever A,<br>Yokosawa S,<br>Otake Y, Ochi H,<br>Hori M, Kamiya K, Tsuruta K,<br>Tagawa K,   | Quantitative Histological Validation of Diffusion Tensor MRI with Two-Photon Microscopy of Cleared Mouse Brain.                                | Magn Reson Med Sci. | 15(4)                             | 416-421               | 2016                |

|   |  |                      |      |           |       |
|---|--|----------------------|------|-----------|-------|
| Okazawa H, Aoki S, <u>Arikawa-Hirasawa E.</u>   |  |                      |      |           |       |
| Kanako Sato, Aurelien Kerever, Koji Kamagata, Kohei Tsuruta, Ryusuke Irie, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, <u>Arikawa-Hirasawa E.</u> Nobuhiro Nitta, Ichio Aoki and Shigeki Aoki | Understanding microstructure of the brain by comparison of neurite orientation dispersion and density imaging (NODDI) with transparent mouse brain           | Acta Radiologica     | 6(4) | 1-6       | 2017. |
| Inaguma Y, Hamada N, Tabata H, Iwamoto I, Mizuno M, Nishimura YV, Ito H, Morishita R, Suzuki M, <u>Ohno K,</u> Kumagai T, Nagata KI.  | SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex | <i>EMBO Mol Med</i>  | 6    | 155 - 295 | 2014  |
| Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, Ito M, Masuda A, Ito Y, Engel AG, <u>Ohno K.</u>  | LRP4 third beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner     | <i>Hum Mol Genet</i> | 23   | 1856-1868 | 2014  |

|   |  |                      |    |           |      |
|---|--|----------------------|----|-----------|------|
| Nakayama T,<br>Nakamura H,<br>Oya Y, Kimura T,<br>Imahuku I, <u>Ohno K</u> , Nishino I, Abe K, Matsuura T.  | Clinical and genetic analysis of the first known Asian family with myotonic dystrophy type 2   | <i>J Hum Genet</i>   | 59 | 129-133   | 2014 |
| Kokunai Y*,<br>Nakata T*,<br>Furuta M*,<br>Sakata S,<br>Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y,<br>Nakamori M,<br>Itoh H, Sato T,<br>Kubota T, Kadota K, Shindo K,<br>Mochizuki H,<br>Shimizu W, Horie M, Okamura Y,<br><u>Ohno K</u> ,<br>Takahashi M.<br>*Equal contribution. | A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1   | <i>Neurology</i>     | 82 | 1058-1064 | 2014 |
| Kobayashi M,<br>Ohno T, Ihara K,<br>Murai A,<br>Kumazawa M,<br>Hoshino H,<br>Iwanaga K, Iwai H, Hamana Y, Ito M, <u>Ohno K</u> ,<br>Horio F.  | Searching for genomic region of high-fat diet-induced type 2 diabetes in mouse chromosome 2 by analysis of congenic strains                | <i>PLoS ONE</i>      | 9  | e96271    | 2014 |
| Yamashita Y*,<br>Matsuura T*,<br>Kurosaki T,<br>Amakusa Y,<br>Kinoshita M, Ibi T, Sahashi K,<br><u>Ohno K</u> .<br>*Equal contribution.   | LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity | <i>Neurobiol Dis</i> | 69 | 200-205   | 2014 |

|  |   |   |    |   |      |
|--|---|---|----|---|------|
| Nasrin F,<br>Rahman MA,<br>Masuda A, Ohe<br>K, Takeda J,<br><u>Ohno K.</u>   | HnRNP C, YB-1 and<br>hnRNP L coordinately<br>enhance skipping of<br>human MUSK exon 10<br>to generate a Wnt-<br>insensitive MuSK<br>isoform                                 | <i>Sci Rep</i>  | 4  | 6841  | 2014 |
| <u>Ohno K.</u><br>Ohkawara B, Ito<br>M, Engel AG.  | Molecular Genetics of<br>Congenital Myasthenic<br>Syndromes   | <i>eLS. John<br/>Wiley &amp; Sons,<br/>Inc.,<br/>Chichester<br/>(査読有)</i> |    | <a href="http://www.els.net">http://www.els.net</a><br>[doi:<br>10.1002/<br>/978047<br>001590<br>2.a0024<br>314]. | 2014 |
| <u>Ohno K.</u> , Ito M,<br>Kawakami Y,<br>Ohtsuka K.   | Collagen Q is a key<br>player for developing<br>rational therapy for<br>congenital myasthenia<br>and for dissecting the<br>mechanisms of anti-<br>MuSK myasthenia<br>gravis | <i>J Mol<br/>Neurosci</i> (査読<br>有)                                       | 53 | 359-361   | 2014 |
| Azuma Y, Nakata<br>T, Tanaka M,<br>Shen XM, Ito M,<br>Iwata S, Okuno<br>T, Nomura Y,<br>Ando N, Ishigaki<br>K, Ohkawara B,<br>Masuda A,<br>Natsume J,<br>Kojima S, Sokabe<br>M, <u>Ohno K.</u> | Congenital myasthenic<br>syndrome in Japan:<br>Ethnically unique<br>mutations in muscle<br>nicotinic acetylcholine<br>receptor subunits                                     | <i>Neuromuscul<br/>ar Disorders</i>                                       | 25 | 60-69   | 2015 |

|   |   |                                |      |           |      |
|---|---|--------------------------------|------|-----------|------|
| Rahman MA,<br>Nasrin F,<br>Masuda A, <u>Ohno K.</u>   | Decoding abnormal splicing code in human diseases   | <i>J Invest Genomics</i> (査読有) | 2(1) | 00016     | 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              | <i>Neuromuscul Disord</i>      | 25   | 60-69     | 2015 |
| 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   | <i>Genes Dev</i>               | 29   | 1045-1057 | 2015 |
| Selcen D, Ohkawara B, Shen XM, McEvoy K, Ohno K, Engel AG.  | Impaired Synaptic Development, Maintenance, and Neuromuscular Transmission in LRP4-Related Myasthenia                                 | <i>JAMA Neurol</i>             | 72   | 889-896   | 2015 |
| Iwata S, Ito M, Nakata T, Noguchi Y, Okuno T, Ohkawara B, Masuda A, Goto T, Adachi M, Osaka H,  | A missense mutation in domain III in HSPG2 in Schwartz-Jampel syndrome compromises secretion of perlecan into the extracellular space | <i>Neuromuscul Disord</i>      | 25   | 667-671   | 2015 |

|   |   |  |   |   |      |
|---|---|--|---|---|------|
| Nonaka R,<br>Arikawa-<br>Hirasawa E,<br>Ohno K.   |   |  |   |   |      |
| Rahman MA,<br>Azuma Y, Nasrin<br>F, Takeda J,<br>Nazim M, Ahsan<br>KB, Masuda A,<br>Engel AG, Ohno<br>K.                                | SRSF1 and hnRNP H<br>antagonistically<br>regulate splicing of<br>COLQ exon 16 in a<br>congenital myasthenic<br>syndrome | <i>Sci Rep</i>   | 5 | 13208   | 2015 |
| Otsuka K, Ito M,<br>Ohkawara B,<br>Masuda A,<br>Kawakami Y,<br>Sahashi K,<br>Nishida H,<br>Mabuchi N,<br>Takano A, Engel<br>AG, Ohno K. | Collagen Q and anti-<br>MuSK autoantibody<br>competitively suppress<br>agrin/LRP4/MuSK<br>signaling                     | <i>Sci Rep</i>   | 5 | 13928   | 2015 |
| Ito M, Ohno K.  | A hereditary mutation<br>in Schwartz-Jampel<br>syndrome   | <i>Atlas of<br/>Science<br/>AoS Nordic<br/>AB,<br/>Stockholm</i> |   | <a href="http://atlasofscience.org/a-hereditary-mutation-in-schwartz-jampel-syndrome/">http://atlasofscience.org/a-hereditary-mutation-in-schwartz-jampel-syndrome/</a> (査読有) | 2015 |

|  |  |   |     |                  |      |
|--|--|---|-----|------------------|------|
| Rahman MA,<br>Ohno K.  | Splicing aberrations in congenital myasthenic syndromes  | <i>J Investig Genomics</i><br>Ed. by Lynn C Yeoman. | 2   | 00038<br>(査読有)   | 2015 |
| Nakashima H*,<br>Ohkawara B*,<br>Ishigaki S,<br>Fukudome T, Ito K,<br>Tsushima M,<br>Konishi H,<br>Okuno T,<br>Yoshimura T, Ito M,<br>Masuda A,<br>Sobue G, Kiyama H,<br>Ishiguro N,<br><u>Ohno K.</u><br>*Equal contribution. | R-spondin 2 promotes acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction via Lgr5  | <i>Sci Rep</i>                                      | 6   | 28512            | 2016 |
| Shibata A,<br>Okuno T,<br>Rahman MA,<br>Azuma Y, Takeda J,<br>Masuda A,<br>Selcen D, Engel AG,<br><u>Ohno K.</u>   | IntSplice: prediction of the splicing consequences of intronic single-nucleotide variations in the human genome                                    | <i>J Hum Genet</i>                                  | 61  | 633-640          | 2016 |
| Shen X-M*,<br>Okuno T*,<br>Milone M,<br>Otsuka K,<br>Takahashi K,<br>Komaki H, Giles E,<br><u>Ohno K.</u> , Engel AG.<br>*Equal contribution.  | Mutations causing slow-channel myasthenia reveal that a valine ring in the channel pore of muscle AChR is optimized for stabilizing channel gating | <i>Hum Mutat</i>                                    | 37  | 1051-1059        | 2016 |
| <u>Ohno K.</u> , Otsuka K,<br>Ito M.   | Roles of collagen Q in MuSK antibody-positive myasthenia gravis  | <i>Chem Biol Interact</i>                           | 259 | 266-270<br>(査読有) | 2016 |
| Nazim M,<br>Masuda A,<br>Rahman MA,  | Competitive regulation of alternative splicing and alternative   | <i>Nucleic Acids Res</i>                            |     | in press.        | 2017 |



|  |   |  |       |                       |      |
|--|---|--|-------|-----------------------|------|
| Nasrin F, Takeda<br>JI, Ohe K,<br>Ohkawara B, Ito<br>M, <u>Ohno K.</u>                                     | polyadenylation by<br>hnRNP H and CstF64<br>determines<br>acetylcholinesterase<br>isoforms                        |  |       |                       |      |
| <u>Ohno K</u> , Rahman<br>MA, Nazim M,<br>Nasrin F, Lin Y,<br>Takeda JI,<br>Masuda A.                      | Splicing regulation and<br>dysregulation of<br>cholinergic genes<br>expressed at the<br>neuromuscular<br>junction | <i>J Neurochem</i>   |       | in<br>press.<br>(査読有) | 2017 |
| <u>Sugie K</u> ,<br>Nishino I.   | Lysosomal Membrane<br>Disorders: LAMP-2<br>Deficiency.  | Rosenberg's<br>Molecular<br>and Genetic<br>Basis of<br>Neurological<br>and<br>Psychiatric<br>Disease (5th<br>Edition,<br>Elsevier) |       | 411-417               | 2015 |
| Eura N, <u>Sugie<br/>K</u> , Kiriyaama T,<br>Ueno S.   | Characteristic<br>dysphagia as a<br>manifestation of<br>dermatomyositis on<br>oropharyngeal muscle<br>imaging.    | Journal of<br>Clinical<br>Rheumatolog<br>y   | 21(2) | 105-106               | 2015 |
| <u>Sugie K</u> , Sugie<br>M, Taoka T,<br>Tonomura Y,<br>Kumazawa A,<br>Izumi T,<br>Kichikawa K,<br>Ueno S. | Characteristic MRI<br>Findings of upper<br>Limb Muscle<br>Involvement in<br>Myotonic Dystrophy<br>Type 1.         | PLoS One   | 10(4) | e01250<br>51          | 2015 |

|  |  |   |        |               |      |
|--|--|---|--------|---------------|------|
| <u>Sugie K</u> ,<br>Kumazawa A,<br>Ueno S.   | Sporadic inclusion<br>body myositis<br>presenting with<br>Beevor's sign  | Internal<br>Medicine                                      | 54(21) | 2793-<br>2794 | 2015 |
| <u>Sugie K</u> ,<br>Yoshizawa H,<br>Onoue K,<br>Nakanishi Y,<br>Eura N, Ogawa<br>M, Nakano T,<br>Sakaguchi Y,<br>Hayashi YK,<br>Kishimoto T,<br>Shima M, Saito<br>Y, Nishino I,<br>Ueno S. | Early onset of<br>cardiomyopathy and<br>intellectual disability<br>in a girl with Danon<br>disease associated<br>with a de novo novel<br>mutation of the<br>LAMP2 gene.                  | Neuropatholo<br>gy  | 36(6)  | 561-565       | 2016 |
| Eura N, <u>Sugie<br/>K</u> , Kinugawa K,<br>Nanaura H,<br>Ohara H, Iwasa<br>N, Shobatake R,<br>Kiryama T,<br>Izumi T,<br>Kataoka H,<br>Ueno S.   | Anti-cytosolic 5'-<br>nucleotidase 1A<br>(cN1A) positivity in<br>muscle is helpful in<br>the diagnosis of<br>sporadic inclusion<br>body myositis: A study<br>of 35 Japanese<br>patients. | Journal of<br>Neurology<br>and<br>Neuroscience            | 7(5)   | 155           | 2016 |
| Sugie M, <u>Sugie<br/>K</u> , Eura N,<br>Iwasa N, Shiota<br>T, Nanaura H,<br>Izumi T, Ueno S.  | Characteristics of<br>risk-factor profiles<br>associated with stroke<br>in patients with<br>myotonic dystrophy<br>type 1.  | Journal of<br>Rare Disease<br>Diagnosis<br>and<br>Therapy | 2(4)   | 19            | 2016 |
| 杉江和馬、西野一<br>三.   | 自己食空胞性ミオパ<br>チーとオートファジー  | Annual<br>Review 神経<br>2017                               |        | 39-46         | 2017 |

|   |   |                         |       |         |      |
|---|---|-------------------------|-------|---------|------|
| Suzuki N, Mori-Yoshimura M, Yamashita S, et al.                   | Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan.   | J Hum Genet.            | 62    | 159-166 | 2017 |
| Ikeda K, Mori-Yoshimura M, Yamamoto T, et al.                     | Chronic Myopathy Associated With Anti-Signal Recognition Particle Antibodies Can Be Misdiagnosed As Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. | J Clin Neuromuscul Dis. | 17    | 197-206 | 2016 |
| Nishikawa A, Mori-Yoshimura M, Segawa K, Hayashi YK, et al.       | Respiratory and cardiac function in Japanese patients with dysferlinopathy.   | Neuromuscul Disord      | 53(3) | 394-401 | 2016 |
| Madoka Mori-Yoshimura, Yasushi Oya, Hiroyuki Yajima, et al.       | GNE myopathy: a prospective natural history study of disease progression.   | Neuromuscul Disord.     | 24(5) | 380-386 | 2014 |
| Madoka Mori-Yoshimura, Yukiko K Hayashi, Naohiro Yonemoto, et al. | Nationwide patient registry for GNE myopathy in Japan.  | Orphanet J Rare Dis.    | 9     | 150     | 2014 |
| Nakano S, Oki M, Kusaka H.  | The role of p62/SQSTM1 in sporadic inclusion body myositis.   | Neuromuscul Disord.     | 27(4) | 363-369 | 2017 |

|  |  |                       |          |         |      |
|--|--|-----------------------|----------|---------|------|
| Suzuki N, Mori-Yoshimura M, Yamashita S, Nakano S, Murata KY, Inamori Y, Matsui N, Kimura E, Kusaka H, Kondo T, Higuchi I, Kaji R, Tateyama M, Izumi R, Ono H, Kato M, Warita H, Takahashi T, Nishino I, Aoki M. | Multicenter questionnaire survey for sporadic inclusion body myositis in Japan.                        | Orphanet J Rare Dis.  | 11(1)    | 146     | 2016 |
| Tawara N., Yamashita S., Zhang X., Korogi M., Zhang Z., Doki T., Matsuo Y., Nakane S., Maeda S., Sugie K., Suzuki N., Aoki M., Ando Y.   | Pathomechanisms of anti-cN1A autoantibodies in sporadic inclusion body myositis.                       | Ann. Neurol.          | in press |         | 2017 |
| Ishizaki M., Kedoin C., Ueyama H., Maeda Y., Yamashita S., Ando Y.   | Utility of skinfold thickness measurement in non-ambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy. | Neuromuscul . Disord. | 27(1)    | 24-28   | 2017 |
| Mori Y., Yamashita S., Kato M.,  | Thomsen disease with ptosis and abnormal MR findings.  | Neuromuscul . Disord. | 26(11)   | 805-808 | 2016 |

|  |   |                          |       |       |      |
|--|---|--------------------------|-------|-------|------|
| Masuda T.,<br>Takamatsu K.,<br>Kumamoto T.,<br>Sasaki R., Ando<br>Y.   |   |                          |       |       |      |
| Suzuki, N.,<br>Mori-<br>Yoshimura. M.,<br>Yamashita S.,<br>Nakano S.,<br>Murata KY.,<br>Inamori Y.,<br>Matsui N.,<br>Kimura E.,<br>Kusaka H.,<br>Kondo T.,<br>Higuchi I., Kaji<br>R., Tateyama<br>M., Izumi R.,<br>Ono H., Kato<br>M., Warita H.,<br>Takahashi T.,<br>Nishino I., Aoki<br>M. | Multicenter<br>questionnaire survey<br>for sporadic inclusion<br>body myositis in<br>Japan.   | Orphanet J.<br>Rare Dis. | 11(1) | 146   | 2016 |
| Okumura K.,<br>Yamashita T.,<br>Masuda T.,<br>Misumi Y., Ueda<br>A., Ueda M.,<br>Obayashi K.,<br>Jono H.,<br>Yamashita S.,<br>Inomata Y.,<br>Ando Y.   | Long-term outcome of<br>patients with<br>hereditary<br>transthyretin V30M<br>amyloidosis with<br>polyneuropathy after<br>liver transplantation. | Amyloid                  | 23(1) | 39-45 | 2016 |

|   |  |                           |        |         |      |
|---|--|---------------------------|--------|---------|------|
| Azuma M.,<br>Hirai T.,<br>Yamada K.,<br>Yamashita S.,<br>Ando Y.,<br>Tateishi M., Iryo<br>Y., Yoneda T.,<br>Kitajima M.,<br>Wang Y.,<br>Yamashita Y.  | Lateral asymmetry<br>and spatial difference<br>of iron deposition in<br>the substantia nigra<br>of Parkinson's disease<br>patients measured<br>with quantitative<br>susceptibility<br>mapping. | AJNR Am J<br>Neuroradiol. | 37(5)  | 782-788 | 2016 |
| Mori A.,<br>Yamashita S.,<br>Nakajima M.,<br>Hori H., Tawara<br>A., Matsuo Y.,<br>Misumi Y., Ando<br>Y.   | CMAP decrement as a<br>potential diagnostic<br>marker for ALS.   | Acta Neurol.<br>Scand.    | 134(1) | 49-53   | 2016 |
| Yamashita T.,<br>Ueda M., Saga<br>N., Nanto K.,<br>Tasaki M.,<br>Masuda T.,<br>Misumi Y., Oda<br>S., Fujimoto A.,<br>Amano T.,<br>Takamatsu K.,<br>Yamashita S.,<br>Obayashi K.,<br>Matsui H., Ando<br>Y. | Hereditary<br>amyloidosis with<br>cardiomyopathy<br>caused by the novel<br>variant transthyretin<br>A36D.  | Amyloid                   | 23(3)  | 207-208 | 2016 |
| 山下 賢, 安東<br>由喜雄   | 眼咽頭遠位型ミオパチ<br>ー.   | Clinical<br>Neuroscience  | 34(3)  | 332-333 | 2016 |

|   |   |                                     |             |         |      |
|---|---|-------------------------------------|-------------|---------|------|
| Yamashita S.,<br>Mori A., Nishida<br>Y., Kurisaki R.,<br>Tawara N.,<br>Nishikami T.,<br>Misumi Y.,<br>Ueyama H.,<br>Imamura S.,<br>Higuchi Y.,<br>Hashiguchi A.,<br>Higuchi I.,<br>Morishita S.,<br>Yoshimura J.,<br>Uchino M.,<br>Takashima H.,<br>Tsuji S., Ando Y. | Clinicopathological<br>features of the first<br>Asian family having<br>vocal cord and<br>pharyngeal weakness<br>with distal myopathy<br>due to a MATR3<br>mutation. | Neuropathol.<br>Appl.<br>Neurobiol. | 41(3)       | 391-398 | 2015 |
| Hori H., Maeda<br>Y., Ishizaki M.,<br>Hirahara T.,<br>Watanabe M.,<br>Yamashita S.,<br>Yamashita T.,<br>Uchino M., Ando<br>Y.   | A carrier with de novo<br>mutation in the<br>dystrophin gene<br>whose myopathic<br>symptoms became<br>seriously progressive<br>after pregnancy and<br>delivery.     | Muscle Nerve                        | 52(5)       | 913-914 | 2015 |
| Yamashita S.,<br>Ando Y.  | Genotype-phenotype<br>relationship in<br>hereditary<br>amyotrophic lateral<br>sclerosis.  | Transl.<br>Neurodegener             | 4           | 13      | 2015 |
| Hirahara T.,<br>Yamashita S.,<br>Misumi Y.,<br>Kawakami K.,<br>Hori H., Honda<br>S., Watanabe<br>M., Ikeda T.,  | Gait disturbance due<br>to foot drop is<br>refractory to the<br>treatment in<br>nonsystemic vasculitic<br>neuropathy.   | Eur. Neurol.                        | 71(3-<br>4) | 180-186 | 2014 |

|   |   |                             |             |               |      |
|---|---|-----------------------------|-------------|---------------|------|
| Yamashita T.,<br>Maeda Y., Ando<br>Y.   |   |                             |             |               |      |
| Yamashita S.,<br>Fujimoto A.,<br>Mori A.,<br>Hirahara T.,<br>Mori A., Hirano<br>T., Maeda Y.,<br>Uchino M., &<br>Ando Y.  | Coexistence of<br>amyotrophic lateral<br>sclerosis and<br>myasthenia gravis.  | J. Neuromusc.<br>Dis.       | 1(1)        | 111-115       | 2014 |
| Kurisasi R.,<br>Yamashita S.,<br>Sakamoto T.,<br>Maruyoshi N.,<br>Uekawa K.,<br>Uchino M., &<br>Ando Y.   | Decision making of<br>amyotrophic lateral<br>sclerosis patients on<br>noninvasive<br>ventilation to receive<br>tracheostomy positive<br>pressure ventilation. | Clin. Neurol.<br>Neurosurg. | 125         | 28-31         | 2014 |
| Yamashita S.,<br>Sakashita N.,<br>Yamashita T.,<br>Tawara N.,<br>Tasaki M.,<br>Kawakami K.,<br>Komohara Y.,<br>Fujiwara Y.,<br>Kamikawa M.,<br>Nakagawa T.,<br>Hirano T.,<br>Maeda Y.,<br>Hasegawa M.,<br>Takeya M., Ando<br>Y. | Concomitant<br>accumulation of $\alpha$ -<br>synuclein and TDP-43<br>in a patient with<br>corticobasal<br>degeneration.                                       | J. Neurol.                  | 261(1<br>1) | 2209-<br>2217 | 2014 |



|   |   |                                     |              |         |                 |
|---|---|-------------------------------------|--------------|---------|-----------------|
| Hori H.,<br>Yamashita S.,<br>Tawara N.,<br>Hirahara T.,<br>Kawakami K.,<br>Nishikami T.,<br>Maeda Y., Ando<br>Y.  | Clinical features of<br>Japanese patients<br>with inclusion body<br>myositis.   | J. Neurol. Sci.                     | 346(1-<br>2) | 133-137 | 2014            |
| Fujie Y., Fusaki<br>N., Katayama<br>T., Hamasaki<br>M., Soejima Y.,<br>Soga M., Ban<br>H., Hasegawa<br>M., Yamashita<br>S., Kimura S.,<br>Suzuki S.,<br>Matsuzawa T.,<br>Akari H., Era T. | New type of Sendai<br>virus vector provides<br>transgene-free iPS<br>cells derived from<br>chimpanzee blood.                      | PLoS One                            | 9(12)        | e113052 | 2014            |
| Sogawa K,<br>Nodera H,<br>Takamatsu N,<br>Mori A,<br>Yamazaki H,<br>Shimatani Y,<br>Izumi Y,<br>Kaji R  | Neurogenic and<br>Myogenic Diseases:<br>Quantitative Texture<br>Analysis of Muscle<br>US Data for<br>Differentiation              | Radiology                           |              |         | 2017 (in press) |
| Nodera H,<br>Takamatsu N,<br>Matsui N, Mori<br>A, Terasawa Y,<br>Shimatani Y,<br>Osaki Y,<br>Maruyama K,<br>Izumi Y, Kaji R   | Intramuscular<br>dissociation of<br>echogenicity in the<br>triceps surae<br>characterizes sporadic<br>inclusion body<br>myositis. | European<br>Journal of<br>Neurology | 23(3)        | 588-596 | 2016            |