

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11479

研究課題名(和文) 難治性外眼筋疾患の簡易診断法の開発とデータベース構築

研究課題名(英文) Development of the simple diagnostic method for the patients with chronic progressive external ophthalmoplegia and the construction of the database

研究代表者

彦谷 明子 (Hikoya, Akiko)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80464113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)は眼瞼下垂と外眼筋麻痺を特徴とする疾患群である。確定診断には筋肉の生検により病理学的に行われているが、侵襲が大きく外来診療の中で行うことは容易ではない。一方、CPEOはミトコンドリアDNA(mtDNA)の欠失を伴うことが多い事から、本研究ではCPEOが疑われる症例から口腔粘膜や唾液や白血球の検体を得て、mtDNAの欠失の有無を検討する簡易診断を検討した。結果、15例のCPEO検体から6例のmtDNAの欠失を認めた。また、眼球突出を主訴とするCPEOの2症例について詳細に臨床像を調査して眼球突出がCPEOの1症状である可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

斜視手術は外眼筋の手術治療により良好な成績を修めているが、慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)のように手術治療でも予後不良の疾患を含んでいる。確定診断は筋肉の生検により病理学的に行われているが、侵襲が大きい。一方、ミトコンドリアDNA(mtDNA)の欠失を伴うことが多い事から、本研究ではCPEOが疑われる症例から侵襲の少ない組織(口腔粘膜、唾液、血液)の検体を得て、mtDNA欠失の有無を検討する簡易診断を実施し、複数症例からmtDNAの欠失を同定して確定診断を行った。本研究は診断に苦慮している眼科医の助けになるばかりでなく、全身合併症の早期診断も可能となり患者のQOL向上につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO) is a mitochondrial disease characterized by slowly progressive ptosis and limitations in ocular motility. Although pathological examination by muscle biopsy is performed for definitive diagnosis, it is difficult to perform the examination because a biopsy is highly invasive during outpatient treatment. On the other hand, some patients with CPEO have the deletion mutation of mitochondrial DNA (mtDNA). In this study, we performed the genetic test for mtDNA deletion mutation using samples of oral, saliva, or white blood cells of suspected CPEO. As a result, deletion mutations were detected in 6 out of 15 patients with CPEO. In addition, we examined in detail the clinical features of 2 patients of CPEO with chief complaint of the proptosis. It is possibility that proptosis is one of the features of CPEO.

研究分野：眼科

キーワード：慢性進行性外眼筋麻痺

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性進行性外眼筋麻痺(Chronic Progressive External Ophthalmoplegia: 以下、CPEO)は進行性の眼瞼下垂と眼球運動制限を特徴とするミトコンドリア病である。確定診断は筋生検にて Gomori-trichrome 染色で ragged-red fibers を確認することにより行われる。CPEO は、ミトコンドリア DNA(以下、mtDNA)の欠失がみられることも知られており[1,2]、mtDNA の遺伝子変異は正常型 mtDNA と変異型 mtDNA が混在するヘテロプラスミーであり、その量比は組織により異なる。生検筋を材料とした CPEO の遺伝子診断は過去に多数報告があるが、侵襲が高く、外来診療の一環としては行うことができないため、低侵襲な方法が望まれている。筋と比較して低侵襲な方法として末梢血による検査が過去に多く行われているが、変異型 mtDNA の割合が低い傾向にあり、陽性となりにくい[1-3]。筋や末梢血の他、口腔粘膜、尿細管上皮、毛根等を材料としたミトコンドリア遺伝子診断の有用性が報告されており[4]、筋よりは変異型 mtDNA の割合は低いものの筋で陽性である症例では陽性を呈したと報告されている[3-6]。侵襲性と検出率の両者において血液由来検体を用いた mtDNA 遺伝子診断よりも口腔粘膜由来検体を用いた mtDNA 遺伝子診断の方がより有用性が高いと考えて、我々は CPEO の疑われる 3 例の内転障害と眼瞼下垂を伴う外斜視患者に対して口腔粘膜からの CPEO の遺伝子診断を検討した。結果、最も予後が悪かった症例から口腔粘膜由来の mtDNA に約 5 kb の欠失を検出し CPEO の診断に至った[7]。口腔粘膜は筋、尿細管上皮、毛根と比較して低侵襲かつ日常外来で簡便に採取することができ、口腔粘膜由来検体の mtDNA 遺伝子診断は CPEO の確定診断に有用であると考え、症例数を増やして更なる検討を行った。

2. 研究の目的

本研究は CPEO 患者(疑いも含む)を大規模に収集して、口腔粘膜のみではなく血液、外眼筋等の検体を提供頂き、mtDNA の欠失の有無による mtDNA 遺伝子検査を検討する。本研究成果は、眼球運動制限と眼瞼下垂があり CPEO が疑われるが、筋生検が施行できない症例に対して事前に遺伝子検査を行うことにより全身合併症の検索や予後の予測に役立てることができ、また斜視手術前に施行可能であることから術後経過を推測するうえでも有用と考えた。

3. 研究の方法

(1) 検体収集

当院にて斜視手術を希望した内転障害と眼瞼下垂を伴う斜視患者を対象とする。全ての検体は浜松医科大学の倫理規定に基づき遺伝子検査について十分な説明を行い、インフォームドコンセントを得る(承認番号; 14-040)。明らかに CPEO の疑われる症例のみでなく、眼瞼下垂が比較的軽度な症例も含めて検討した。また、それぞれの症例に詳細な問診と眼科的検査も行う。

(2) 検体精製

患者より提供頂いた検体と DNA 精製法は下記の通り。

血液は 14ml 採取し、QIAamp DNA Blood Midi Kit(QIAGEN 社)を用いて DNA 精製を行った。口腔粘膜は、患者の両頬を綿棒で擦過して Buccal Cell DNA Extraction Kit (TrimGen 社)を用いて遺伝子診断用に検体を調製した。また、口腔粘膜細胞の DNA の収量と精製度を上げる為に 2018 年度以降は唾液中に存在する口腔粘膜細胞由来 DNA を検討する事に変更した。採取した唾液は

Oragene-DNA OG-500 (DNA Genotek 社)を用いて DNA 精製を行った。

(3) mtDNA の欠失検出

各患者の DNA 約 20ng を Polymerase chain reaction (以下 PCR)法に用いた。mtDNA の塩基配列は Genbank のアクセッション番号 NC_012920 を参照した。本研究で検討した mtDNA の欠失領域は m.4621-m.16449 領域とした。この領域は Hwang らの 2 例の他にも mtDNA の欠失が多く報告されている領域である [8]。m.4621-m.16449 領域を増幅するプライマーは下記の通り。Forward プライマー: 5` - GTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGT -3` (m.4621-m.4644) Reverse プライマー: 5` - GAGGAGAGTAGCACTCTTGTGCG -3` (m.16427-m.16449)。PCR 反応は、Tks Gflex DNA Polymerase kit (Takara) を使用した。Forward 及び Reverse プライマー各 0.3 μ M、添付バッファー5 μ l、酵素 0.2 unit を含む全量 10 μ l で行った。反応は PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TAKATA) を用いた。反応条件は [94 -1 分、(98 -10 秒、68 -6 分 ; 30 cycle)]で行った。

(4) 表現型の検討

変異が明らかになった症例について、細隙灯顕微鏡検査、眼底検査の他、眼位、眼球運動、立体視について詳細な検査を行った。

4 . 研究成果

本研究により CPEO 患者 (疑いも含む) を新たに 15 症例収集して mtDNA の遺伝子検査を実施した。インフォームドコンセントの上、同意が得られた 9 症例から血液と口腔粘膜 (または唾液) 検体の両方を提供頂いた。4 症例においては口腔粘膜細胞のみ提供頂いた。1 症例からは血液、唾液、斜視手術から得られた筋検体を提供頂いた。本研究の開始当初は口腔粘膜由来検体は両頬を綿棒で擦過して遺伝子検査用の検体に調整して mtDNA の遺伝子検査をしていたが、得られた調整検体の精製度が低く DNA の収量も少なかった事から、PCR 増幅が悪い為に遺伝子検査結果の再現性が悪かった。正確な CPEO の遺伝子診断を行うためには精製度の高い口腔粘膜由来 DNA を均一量得ることは非常に重要であると考えて 2018 年以降は唾液を採取して唾液中に含まれている口腔粘膜由来 DNA を用いて検討する方法に変更した。結果、4 症例から mtDNA 欠失を検出した。mtDNA 欠失が得られた検体種は唾液 2 例、口腔粘膜 1 例、筋 1 例であり、欠失を検出できた 4 症例の血液由来検体からは mtDNA 欠失は検出できなかった。唾液または口腔粘膜由来検体を用いた mtDNA 遺伝子検査は CPEO の確定診断に有用である事が症例を増やす事で改めて明らかになった。特に唾液由来検体を用いた検査を実施以降、mtDNA 欠失の検出率が上がった (唾液由来 DNA を用いた 3 症例中 2 症例から mtDNA 欠失を検出している) 事から唾液由来検体を用いた mtDNA 遺伝子検査は CPEO の診断に有用であった。本研究成果は CPEO の診断に苦慮している眼科医の助けになるばかりでなく、全身合併症の早期診断も可能となり患者の QOL 向上につながる事が期待できる。今後は、過去に頬を擦過して口腔粘膜由来検体で遺伝子検査を行い mtDNA 欠失が検出されなかった患者に対しても再度唾液由来の検体で検査を行う事を検討している。また、本研究で検討した mtDNA 欠失領域以外の欠失や点変異等が存在する可能性も考えられる事から確定診断には更なる検討も必要である。

また、本研究で mtDNA を検出した眼瞼下垂・眼球運動制限と共に眼球突出を主訴とする CPEO の 2 症例について更に詳細に臨床像を調査した。症例詳細は下記の通り。症例 A、12 歳女児。10 歳頃より左眼瞼下垂が目立ってきたため、他院眼窩形成外科を受診した。左眼球突出、非特異的な眼球運動制限のため、甲状腺眼症と重症筋無力症 (MG) が疑われ精密検査を受けたが、診断が

つかず当院紹介となった。初診時の視力は両眼ともに 1.5 (n.c)、左眼瞼下垂、左眼球突出を認め、眼球運動制限は右眼が上転 (-1) 内転 (-1) 左眼が上転 (-1) 下転 (-2) 内転 (-2) であった。症例 B、15 歳男児。12 歳頃より両眼瞼下垂、眼球突出が出現した。甲状腺眼症が疑われ小児科を受診したが原因不明であった。眼球運動制限が出現したため、当院へ紹介された。初診時の視力は両眼ともに 1.5 (n.c)、両眼瞼下垂、両眼球突出 (ヘルテル: 右 22mm、左 19mm) および全方向に眼球運動制限を認めた。CPEO に眼球突出を認めた報告はこれまで国内では 1 例のみで一般的には認識されていない。本研究により眼球突出は CPEO の 1 症状である可能性を示唆した[9,10]。

<引用文献・学会>

- #1: Holt IJ, Harding AE, M, et al: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331: 717-719, 1988.
- #2: Moraes CT, DiMauro S, et al: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320: 1293-1299, 1989.
- #3: Remes AM, Majamaa-Voltti K, et al: Prevalence of large-scale mitochondrial DNA deletions in an adult Finnish population. *Neurology* 64: 976-981, 2005.
- #4: Hwang J-M, Choung HK, et al: Ophthalmoplegia Diagnosis. *Ophthalmology* 116: 813-814, 2009.
- #5: Aure K, Baulny H0, et al: Chronic progressive ophthalmoplagia with large-scale mtDNA rearrangement: can we predict progression. *Brain* 130: 1516-1524, 2007.
- #6: Mkaouar-Rebai E, Chamkha I, et al: A case of Kearns-Sayre syndrome with two novel deletions of the mtDNA associated with the common deletion in blood leukocytes, buccal mucosa and hair follicles. *Mitochondrion* 10: 449-455, 2010.
- #7: 鳥居薫子、根岸貴志、他: 慢性進行性外眼筋麻痺の口腔粘膜からの遺伝子診断. *臨眼* 66: 1497-1502, 2012.
- #8: Sadikovic B, Wang J, et al: Sequence homology at the breakpoint and clinical phenotype of mitochondrial DNA deletion syndromes. *PLoS One* 5: e15687, 2010.
- #9: 武田優、鈴木寛子、飯森宏仁、細野克博、彦谷明子、堀田喜裕、佐藤美保. 眼球突出を主訴に受診し慢性進行性外眼筋麻痺と診断された 2 症例. 第 75 回日本弱視斜視学会総会 第 44 回日本小児眼科学会合同学会総会 合同学会. 2019.
- #10: Takeda Y, Suzuki H, Iimori H, Hosono K, Hikoya A, Sato M, Hotta Y. Chronic progressive external ophthalmoplegia associated with proptosis: A report of two cases. *AAPOS-RANZCO-APSPPOS 2019 Joint Meeting*. 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 新井慎司, 高木優里, 長谷岡宗, 稲垣理佐子, 秋山菜穂子, 飯森宏仁, 鈴木寛子, 古森美和, 彦谷明子, 柳田和夫, 堀田喜裕, 佐藤美保	4. 巻 13(2)
2. 論文標題 外斜視に対するPlicationとResectionの術後成績の比較	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 眼科臨床紀要	6. 最初と最後の頁 111-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 飯森宏仁, 佐藤美保, 鈴木寛子, 彦谷明子, 堀田喜裕, 吉田朋世, 仁科幸子, 東範行	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 (Ⅱ) 急性後天共同性内斜視に対する全国調査	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 眼科臨床紀要	6. 最初と最後の頁 42-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 鈴木寛子, 彦谷明子, 飯森宏仁, 新井慎司, 高木優里, 長谷岡宗, 稲垣理佐子, 梅田千賀子, 堀田喜裕, 佐藤美保	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 前眼部OCTで内直筋断裂と診断した1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 眼科臨床紀要	6. 最初と最後の頁 23-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 彦谷明子	4. 巻 61(10)
2. 論文標題 【眼科と薬剤】(第1部) 最近の眼科薬物治療 神経眼科疾患 調節麻痺剤	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 眼科	6. 最初と最後の頁 1191-1195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 彦谷明子, 堀田喜裕	4. 巻 75
2. 論文標題 【知っておきたい稀な網膜・硝子体ジストロフィ】白点状眼底	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 OCULISTA	6. 最初と最後の頁 38-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 新井慎司, 稲垣理佐子, 高木優里, 長谷岡宗, 鈴木寛子, 古森美和, 彦谷明子, 堀田 喜裕, 佐藤美保	4. 巻 12(4)
2. 論文標題 Prism adaptation test施行の有無による間欠性外斜視の術後成績	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 眼科臨床紀要	6. 最初と最後の頁 318-322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosono Katsuhiko, Nishina Sachiko, Yokoi Tadashi, Katagiri Satoshi, Saito Hiroto, Kurata Kentaro, Miyamichi Daisuke, Hikoya Akiko, Mizobuchi Kei, Nakano Tadashi, Minoshima Shinsei, Fukami Maki, Kondo Hiroyuki, Sato Miho, Hayashi Takaaki, Azuma Noriyuki, Hotta Yoshihiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Molecular Diagnosis of 34 Japanese Families with Leber Congenital Amaurosis Using Targeted Next Generation Sequencing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8279 ~ 8279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26524-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Hiroko, Hikoya Akiko, Komori Miwa, Inagaki Risako, Haseoka Takashi, Arai Shinji, Takagi Yuri, Hotta Yoshihiro, Sato Miho	4. 巻 62
2. 論文標題 Changes in conjunctival/scleral thickness after strabismus surgery measured with anterior segment optical coherence tomography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 554 ~ 559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-018-0609-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurata Kentaro, Hosono Katsuhiko, Hikoya Akiko, Kato Akihiko, Saitsu Hiroto, Minoshima Shinsei, Ogata Tsutomu, Hotta Yoshihiro	4. 巻 62
2. 論文標題 Clinical characteristics of a Japanese patient with Bardet-Biedl syndrome caused by BBS10 mutations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 458 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-018-0591-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 磯貝正智、古森美和、彦谷明子、鈴木寛子、王瑜、堀田喜裕、佐藤美保	4. 巻 11(5)
2. 論文標題 視神経低形成に占めるSepto-optic dysplasiaの割合	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 眼臨紀	6. 最初と最後の頁 391-394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 古森美和、鈴木寛子、彦谷明子、堀田喜裕、佐藤美保	4. 巻 123(1)
2. 論文標題 上斜筋麻痺に対する傍眼下直筋後転術が上下偏位に与える効果の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日眼会誌	6. 最初と最後の頁 45-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 瀧伶、鈴木寛子、倉田健太郎、古森美和、細野克博、彦谷明子、佐藤美保、堀田喜裕	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 診断にRETEVALが有用であった発達障害を伴うLeber先天盲の一例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 眼臨紀	6. 最初と最後の頁 49-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagase Yasunori, Kurata Kentaro, Hosono Katsuhiko, Suto Kimiko, Hikoya Akiko, Nakanishi Hiroshi, Mizuta Kunihiro, Mineta Hiroyuki, Minoshima Shinsei, Hotta Yoshihiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Visual Outcomes in Japanese Patients with Retinitis Pigmentosa and Usher Syndrome Caused by USH2A Mutations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Seminars in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 560 ~ 565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08820538.2017.1340487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hosono K, Nishina S, Yokoi T, Katagiri S, Saitsu H, Kurata K, Miyamichi D, Hikoya A, Mizobuchi K, Nakano T, Minoshima S, Fukami M, Kondo H, Sato M, Hayashi T, Azuma N, Hotta Y
2. 発表標題 Molecular Analysis of 34 Japanese Families with Leber Congenital Amaurosis Using Targeted Next Generation Sequencing
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第63回大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 彦谷明子
2. 発表標題 学童の眼の問題
3. 学会等名 第69回指定都市学校保健協議会 学校医研修会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 彦谷明子
2. 発表標題 眼窩CT・MRIが診断に役立つ斜視のはなし
3. 学会等名 第17回札幌医大眼科研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 彦谷明子
2. 発表標題 明日からできる小児眼科診療
3. 学会等名 第7回西濃眼科ゼミナル（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 彦谷明子
2. 発表標題 自信が持てる!弱視診療 インストラクションコース
3. 学会等名 第72回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田喜裕、仁科幸子、細野克博、宮道大督、横井匡、倉田健太郎、彦谷明子、佐藤美保、深見真紀、蓑島伸生、東範行
2. 発表標題 Leber先天盲の1家系3症例のターゲットシーケンス解析
3. 学会等名 第24回日本遺伝子診療学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 倉田健太郎、細野克博、彦谷明子、加藤明彦、才津浩智、蓑島伸生、緒方勤、堀田喜裕
2. 発表標題 BBS10遺伝子変異によるBardet-Biedl syndromeの1例
3. 学会等名 第43回日本小児眼科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 美保 (Sato Miho) (50252242)	浜松医科大学・医学部・准教授 (13802)	
研究分担者	細野 克博 (Hosono Katsuhiro) (60402260)	浜松医科大学・医学部・助教 (13802)	
研究分担者	堀田 喜裕 (Hotta Yoshihiro) (90173608)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	