

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791100

研究課題名(和文) RYR1 遺伝子変異により多様な病理像を示すミオパチーの新たな疾患概念確立の研究

研究課題名(英文) Study of RYR1 gene analysis in a unique myopathy characterized as congenital fiber type disproportion associated with myofibrillar disorganization and altered internal nuclei

研究代表者

石山 昭彦 (Ishiyama, Akihiko)

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・医師

研究者番号：90377284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：先天性ミオパチーは筋病理所見の特徴から分類されるが、既病型に分類できない「多様な筋病理所見を示すミオパチー」を対象とし、RYR1遺伝子解析を実施した。ヘテロ接合型変異12例、複合ヘテロ接合型変異7例を同定したが、とくに後者の臨床像は類似性があり、呼吸障害、眼球運動制限や外眼筋麻痺を認めた。また、成長に伴う筋力改善や発達獲得という特徴も認めた。遺伝子変異は、片側アレルにナンセンス、欠失、スプライシング異常を呈する例を多く認めた。「多様な筋病理所見を示すミオパチー」で、RYR1遺伝子変異は考慮すべき候補遺伝子であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the gene encoding skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) have been implicated in various forms of neuromuscular diseases including congenital myopathy. There is a broad range of clinical and pathological features. We detected 7 unrelated Japanese patients with compound heterozygous RYR1 mutations showing a unique muscle pathology characterized as congenital fiber type disproportion associated with myofibrillar disorganization and altered internal nuclei. Clinically, all patients showed axial and proximal dominant muscle weakness of variable severity from neonatal period, and often required respiratory supports. Muscle weakness was stable or rather improved during childhood. In addition, some patients revealed ptosis and/or ophthalmoparesis. All patients had a compound heterozygous mutations including nonsense mutation, splicing mutation or deletion in the central portion of RYR1.

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児神経学

キーワード：先天性ミオパチー 病理 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

生下時より筋力・筋緊張が低下しており、乳幼児期に体が極端に柔らかい状態である「フロッピーインファント」として出生した小児の中に、骨格筋そのものが障害される筋原性疾患の罹患児が存在する。「フロッピーインファント」を呈し、さらに新生児期からの呼吸不全、哺乳力低下を認め、人工呼吸器や経管栄養を要するほど重篤な症状をみる代表的な筋原性疾患に「先天性ミオパチー」がある。「先天性ミオパチー」の診断は、病歴や臨床症状のみからの確定診断が困難であるため、麻酔手術下で骨格筋の生検を行い、筋病理標本からの特徴により、診断・細分類がされる。ネマリンミオパチー、ミオチューブラーミオパチー、中心核ミオパチー、セントラルコア病/マルチミニコア病、先天性筋線維タイプ不均等症が代表的な病型で、いずれにも分類が困難な例は、分類不能な先天性ミオパチーとして分類される。病型分類を行うことで予後推定が可能となるため、患児および家族にとって重要な情報である。近年、各病型において責任遺伝子の同定が進み、「先天性ミオパチー」も遺伝子レベルからの病態解明が進んできている。

筋病理診断を行うなかで、上記の典型的な病型に分類されない「分類不能な先天性ミオパチー」例の中には、先天性ミオパチーとして病歴、臨床症状は矛盾しないものの、筋病理像では特異構造を示さないもの、または多様な病理像が混在するため分類が困難な例も見られる。このような典型的な病理像を示さなかった例でも、先天性ミオパチーで同定されている遺伝子解析を行うことで変異が確認され、「先天性ミオパチー」と診断される例がある。これまで病型確定に必須であった筋病理分類で曖昧だった群でも、責任遺伝子が同定されるようになってきたことで、「責任遺伝子関連ミオパチー」として診断される例もみられようになった。このような現状から、診断に至るまでの手法が異なることで診断名も異なるという事態が起こる可能性があり、現時点では筋病理の病型と責任遺伝子の相関をみることは、診断のみならず、疾患としての全体像、病態、臨床像や予後把握のためにも重要である。

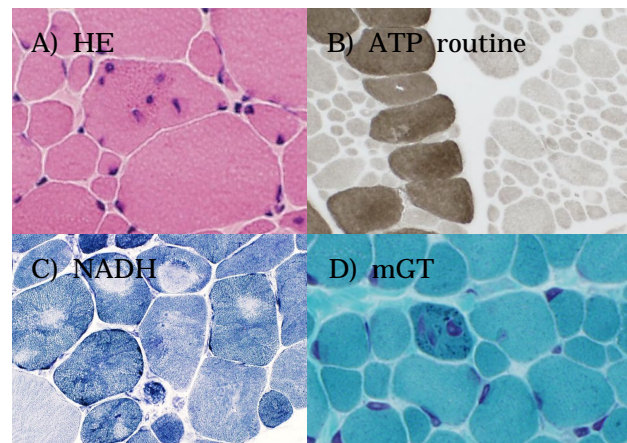
## 2. 研究の目的

当センターで、新生児期にフロッピーインファントを呈し、呼吸、栄養障害から人工呼吸器、経管栄養が導入され、その後の経過で、運動機能、知的発達の獲得が著しい、先天性ミオパチーに特徴的な臨床経過を示した症例の筋生検を行った。その筋病理は、筋線維が大小不均等かつ2峰性で、内在/中心核があり、筋線維内部の構造の乱れ(コア構造)を認め、さらにネマリン小体様の沈着物のある、

多様な病理構造を呈していた。Clarke NF(2010)らにより、先天性筋線維タイプ不均等症で *RYR1* 遺伝子変異のある例が報告されたが、*RYR1* 遺伝子変異は、これまでも典型的な病理像を呈する他病型の責任遺伝子としての報告もあり、ネマリンミオパチー、中心核ミオパチー、セントラルコア病の責任遺伝子としても知られる。本例は、これらの筋病理所見を複数あわせもっており、それぞれの特有所見を単独で有するような典型病型で *RYR1* 変異の存在が知られているため、本例のような多様な病理像を呈する群の責任遺伝子としての可能性が示唆された。そこで *RYR1* 遺伝子解析を行ったところ、複合ヘテロ接合型変異を同定した。この結果から、これまで「分類不能な先天性ミオパチー」とされてきた群の中で、多様な病理構造を有する例に *RYR1* 変異例を有する一群が存在するのではないかと考え、これを一つの病型として確立すること、この疾患群としての臨床像、病態解明を行うことを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では「分類不能な先天性ミオパチー」とされてきた群の中で、多様な病理構造を有する例を抽出するため、約30年におよぶ当センターの「筋疾患研究資源レポジトリ(筋肉組織バンク)」約12,000例の骨格筋の中から、筋線維が大小不均等かつ2峰性、内在/中心核があり、筋線維内部構造の乱れ(コア構造)を認め、さらにネマリン小体様の沈着物といった多種多様な病理所見を複数個認める症例をデータベースから抽出する(図)。



(図) 多様な筋病理所見 A) HE 染色: 筋線維大小不同、内在核/中心核、B) ATP 染色: 筋線維大小不同、C) NADH 染色: 筋線維内部構造の乱れ(コア構造) D) mGT 染色: ネマリン小体様の沈着物

(2) データベースから抽出した例が、解析対象症例として適切か否かをみるため、顕微

鏡下での病理組織標本の確認作業を行う。

(3) 解析に適していると判断した症例を Sanger 法で *RYR1* 全シーケンスを行い、遺伝子解析を行う。変異の同定ができた症例では、106 個あるエクソンの中で、どこにどのような変異があるかを症例毎に明記する。

(4) *RYR1* 遺伝子変異が同定された例において、症例毎に臨床情報との関連付けを行い、このような遺伝子変異、病理像を示す疾患が一つの疾患群として遺伝子変異 - 病理像 - 臨床像を結論づけられるか否かを検討する。さらに *RYR1* 遺伝子は、悪性高熱の責任遺伝子としても報告されており、悪性高熱と本病型との関連についても考察する。

(5) また、*RYR1* 変異解析を行う中で、変異同定に至らない場合には、その時節の最新情報に基づき、追加候補遺伝子が考慮されれば、その遺伝子解析を行う。また、これが困難な場合には、次世代シーケンスにより新たな候補遺伝子検索も検討する。

上記の流れに基づいて、当センター神経研究所疾病研究第一部に備えられている設備を用い、(1) ~ (5) までの症例抽出から遺伝子解析を行う。最終的に、これらの結果を研究成果としてまとめる。

(倫理面への配慮)

本研究において使用するすべてのヒト検体から得られた情報はいずれも疾患の確定診断のために筋病理、生化学、免疫学的ならびに遺伝子レベルでの解析が必要であり、かつ患者および家族もこれを希望し、患者および家族の理解を得た上で採取した組織(生検・剖検筋、皮膚、血球など)を用いて得られたものであり、かつ(独)国立精神・神経医療研究センター倫理委員会承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究使用に対する検体の使用許可(インフォームド・コンセント)を得たものである。遺伝子解析に関しては「ヒトゲノム解析に関する共通指針」を遵守した上で施行されたものである。これら情報を使用するに当たってはプライバシーを尊重し、匿名化した上で使用する。

#### 4. 研究成果

対象を当センター筋レポジトリーに登録されている症例から抽出し、*RYR1* ヘテロ接合型変異 12 例(診断年齢 4.9 歳)、複合ヘテロ接合型変異 7 例(平均 1.6 歳)を同定した。

ヘテロ接合型変異例では、筋力・筋緊張低下のほか、軽度発達遅滞(6 例)、呼吸不全(3 例)、経管栄養(3 例)、側彎(3 例)、多関節拘縮(2 例)、眼球運動制限(1 例)などを伴っており、臨床症状として多様で類似性に乏しく不均一な疾患群を呈していた。病理学的には、軽度の筋線維大小不同およびタイプ 1 線維萎縮、特異的な形態構造異常所見を疎らに認めていた。

一方、複合ヘテロ接合型変異例(7 例)では、重度の筋力・筋緊張低下のほか、呼吸障害のため新生児期からの呼吸管理が行われており(6 例)、運動発達でも予定が平均 8 ヶ月(正常 3-4 ヶ月)と粗大運動の遅れを認めた。しかし、以後の筋力改善や発達獲得が著しく、3 例で歩行獲得例があった。眼球運動制限、外眼筋麻痺を認める例も 3 例あった。病理学的には、ネマリン、内在核、コア構造等の特異的な所見が複数混在して認められ、筋線維径の大小不同はヘテロ接合型よりも顕著であった。複合ヘテロ接合型変異例では、臨床、病理像ともに類似性を呈していた。遺伝子変異の特徴として、片側アレルにナンセンス、欠失、スプライシング異常を有する例を多く認めた。

また、ヘテロ接合型変異例、複合ヘテロ接合型変異例のいずれにおいても、患児およびその家系において悪性高熱の既往のある家族歴は認めなかった。

重度な筋力・筋緊張低下を示し、運動発達遅滞を認めるも、発達獲得が著しく、出生時からの呼吸障害、眼球運動制限、外眼筋麻痺を呈するような例では、「多様な筋病理所見を示すミオパチー」の *RYR1* 複合ヘテロ接合型である可能性を考慮すべきである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

著者名: 石山昭彦、小牧宏文

論文標題: 小児慢性疾患の生活指導 - 最新の知見から II.10 神経・筋疾患 2) 先天性ミオパチー

雑誌名: 小児科臨床

査読: 無

巻: 65 巻

発行年: 2012

頁: 839-846

著者名: 石山昭彦、斎藤義朗

論文標題: 小児疾患の診断治療基準 第 2 部: 疾患 XVIII 運動器疾患 先天性筋ジストロフィー

雑誌名: 小児内科

査読: 無

巻: 44 巻

発行年: 2012

頁: 794-795

著者名: 石山昭彦

論文標題: 臨床医が知っておきたい先天異常. 4. 遺伝子変異による先天異常 12) 先天性ミオパチー

雑誌名: 小児科臨床

査読: 無

巻: 66 巻

発行年: 2013

頁: 1403-1409

著者名：石山昭彦  
論文標題：高口蓋  
雑誌名：小児内科  
査読：無  
巻：45 巻  
発行年 2013  
頁：1867-1870  
〔学会発表〕(計 4 件)  
発表者：Akihiko Ishiyama  
発表標題：A congenital myopathy with fiber type disproportion, core-like structure and internal nuclei is caused by recessive RYR1 mutation.  
学会名：The 11<sup>th</sup> annual scientific meeting of the Asian Oceanian mycology Center  
発表年月日：2012 年 6 月 6 日～2012 年 6 月 8 日  
発表場所：京都大学芝蘭会館  
発表者：Akihiko Ishiyama  
発表標題：Congenital fiber type disproportion with myofibrillar disorganization and altered internal nuclei is caused by RYR1 mutation.  
学会名：17th international world muscular society congress  
発表年月日：2012 年 10 月 9 日～2012 年 10 月 13 日  
発表場所：Perth Convention Center  
発表者：石山 昭彦  
発表標題：内在核と筋原線維間網の異常を有し二峰性筋線維不均等を示す先天性ミオパチーは RYR1 変異が原因である。  
学会名：第 54 回日本小児神経学会総会  
発表年月日：2012 年 5 月 17 日～5 月 19 日  
発表場所：ロイトン札幌  
発表者：石山 昭彦  
発表標題：福山型先天性筋ジストロフィーにおける骨格筋画像。  
学会名：第 55 回日本小児神経学会総会  
発表年月日：2013 年 5 月 29 日～6 月 1 日  
発表場所：iichiko 総合文化センター、大分オアシスタワーホテル  
〔図書〕(計 0 件)  
〔産業財産権〕出願状況(計 0 件)  
〔その他〕ホームページ等(計 0 件)

## 6. 研究組織

### 研究代表者

石山 昭彦 ( ISHIYAMA, Akihiko )

研究機関：独立行政法人国立精神・神経医療

研究センター・病院

部局：小児神経診療部

職名：医師

研究者番号：90377284