

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659421

研究課題名(和文) 封入体を伴う筋疾患の大家系における新規原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Analysis to reveal a disease causing gene in a family with hereditary myopathy with inclusion body

研究代表者

青木 正志 (AOKI, Masashi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70302148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性遺伝形式をとるMyofibrillar myopathy(MFM)の家系では、下垂足を初発症状とし、慢性進行性の筋萎縮と筋力低下を呈するが、比較的早期に呼吸不全を合併する点に特徴がある。当該家系で連鎖解析を行った結果、TTNの変異c.90263G>T, p.W3008Lが原因変異であることを見出した。これらの変異はTTNのA-bandドメインの特定の領域に集簇しており表現型との強い相関を持つことが示唆された。またMFMの病態に重要と考えられるプロテアソームの骨格筋での役割を調べるため、プロテアソーム欠損マウスを作製・解析した。

研究成果の概要(英文)：Myofibrillar myopathy (MFM) is a group of chronic muscular disorders that show the focal dissolution of myofibrils and accumulation of degradation products. In this study, we performed linkage analysis and exome sequencing on the family of MFM patients and identified a novel c.90263G4T mutation in the TTN gene (NM\_001256850). Mutations in TTN in patients with hereditary myopathy with early respiratory failure (HMERF, MIM #603689) was reported very recently. The mutation identified in this study is located on the A-band domain of titin, suggesting a strong relationship between mutations in the A-band domain of titin and HMERF. It is possible that focused analysis of TTN may detect more mutations in patients with MFMs, especially in those with early respiratory failure.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：1C 臨床神経分子遺伝学 筋萎縮

## 1. 研究開始当初の背景

CytoPlasmic body Myopathy(CPM)の大家系から原因遺伝子に迫る

東北大学神経内科にて 20 年以上前より診療を続けている常染色体優性遺伝形式をとる世界有数のミオパチーの大家系があり、5 世代に渡り約 20 名の罹患者が出ている。

この疾患は、遠位筋、胸郭、肩甲帯を主体とした進行性の筋萎縮と筋力低下のために 5-10 年の経過の中で呼吸不全となってしまうが、呼吸管理を適切に行うことで ADL を維持することができ、臨床的に重要である。封入体筋炎(IBM)は原因不明で治療法が無い難病である。

IBM 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難治性疾患である。平成 21 年度より当科を中心に IBM の全国的な臨床調査を開始し DNA を含めた臨床検体を蓄積してきている。また当科から稀有な IBM の姉妹例を報告しており、病態の根本に迫るには家族歴のある症例を中心とした疾患関連遺伝子の解析が重要と考えられる。

異常蛋白蓄積・筋萎縮において重要な蛋白分解経路：プロテアソーム系

細胞の恒常性維持のためにはオートファジーやユビキチンプロテアソーム系に代表される不要蛋白処理機構が重要である。CPM や IBM では蛋白分解の異常が分子病態の背景にあると考えられる。

## 2. 研究の目的

次世代型シーケンサーおよび SNP/CNV array を用いて CPM の疾患原因遺伝子の同定を第一の目標とする。また機能未知の遺伝子だった場合に筋芽細胞モデルやマウスモデルの樹立を目指し、原因遺伝子の機能を明らかにする。現在表現型を検討中である骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスとの比

較検討を行い、異常蛋白が蓄積する機序について考察する。さらに IBM の遺伝子解析を行い、骨格筋異常蛋白蓄積病全体の病態解明につなげていく。

## 3. 研究の方法

本家系について罹患者 4 名、非罹患者 4 名の計 8 名について遺伝子解析の同意を得た。

### (1) 連鎖解析

全ゲノム SNP chip (Illumina Human Omni 2.5 BeadChip) で得られたデータの内、約 17000SNP の情報を用いて、MERLIN で多点解析を行った。

### (2) エクソーム濃縮

患者 DNA を SureSelect Human All Exon kit v2 (Agilent Technologies)を用いてエクソーム濃縮とライブラリ調整を行った。

### (3) Exome sequence

次世代シーケンサー (Applied Biosystems 社 SOLiD) を用いて全エクソンの遺伝子配列を解析し (exome sequence) 罹患者に共通した遺伝子変異の検出を行う。また、全ゲノム SNP chip を用いた連鎖解析によって変異遺伝子座位を決定し、次世代シーケンサーの結果と照らし合わせ原因遺伝子を同定する。機能解析及び病理学的検討を行い分子病態メカニズムの解明を目指す。

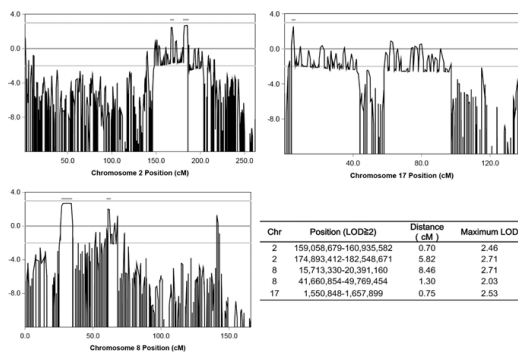
### (4) プロテアソーム欠損マウスにおける封入体形成の有無の検討

単純にプロテアソーム系の遺伝子を欠失させると胎生致死になってしまう。京都大学神経内科との共同研究により 26S プロテアソームの 19S lid 部分のサブユニット pmsc4/Rpt3 のコンディショナルノックアウトマウスを準備し、骨格筋特異的 Cre 発現マウスと掛け

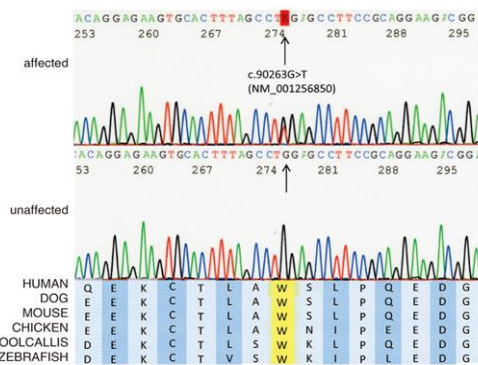
合わせ、現在 F2 世代を得ている。骨格筋の組織学的な評価を一般形態染色・免疫組織化学染色で行い、封入体形成の有無について調べモデルとしての有用性について生理学的検査等で評価する。

#### 4. 研究成果

家系の中の罹患者 5 名、非罹患者 5 名の計 10 名について遺伝子解析の同意を得た。連鎖解析を行った結果、LOD score > 2 の領域を 5 箇所同定した。



罹患者のみに共通するエクソン・スプライシング領域の変異を 64 個検出した。その内 TTN の変異 c. 90263G>T, p. W30088L のみが上記の連鎖領域内に存在した。シーケンサーの結果、segregation に矛盾なく、本変異が原因変異であると結論づけた。



健常コントロール 191 例では本変異を認めなかった。TTN は、現在まで前脛骨筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2J) の原因遺伝子として知られてきたが、次世代シーケンサーの普及に伴い、MFМ の病理像

を呈する Hereditary myopathy with early respiratory failure (HMERF #603689) の原因遺伝子として近日国外から数例の報告が続いている。これらの変異は TTN の A-band ドメインの特定の領域に集簇しており表現型との強い相関を持つことが示唆された。これらの成果を英文誌に報告した (Izumi et al. J Hum Genet. 58(5):259-66, 2013.)。

また MFМ の病態に重要と考えられるプロテアソームの骨格筋での役割を調べるため、26S プロテアソームのサブユニット pmsc4/Rpt3 の一部を lox 配列で囲んだ floxed Rpt3 マウスを筋特異的 Cre 発現マウスと掛け合わせた。mlc1f-Rpt3 の homozygote マウスは対象に比較して体重が約 50% と成長・発達の過程に異常が見られた。蛋白レベルの詳細な解析からオートファジーの経路も障害されていることを示した。プロテアソームとオートファジーは相互に関連してタンパク分解系を調整していると考えられる。さらに筋線維内には TDP43 や LC3、P62 などヒトの封入体筋炎で見られる沈着物も検出されており、タンパク分解能低下が病態に関与していると考えられるヒトの筋疾患の病態解明にも寄与できるものと考えられる。現在成果を投稿中である。

#### 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 2 件)

1. Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara Y.: Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. J Hum Genet. 58(5):259-66, 2013. 査読有. doi:

10.1038/jhg.2013.9. Epub 2013 Feb 28.

2. Takahashi T, Aoki M, Suzuki N, Tateyama M, Yaginuma C, Sato H, Hayasaka M, Sugawara H, Ito M, Abe-Kondo E, Shimakura N, Ibi T, Kuru S, Wakayama T, Sobue G, Fujii N, Saito T, Matsumura T, Funakawa I, Mukai E, Kawanami T, Morita M, Yamazaki M, Hasegawa T, Shimizu J, Tsuji S, Kuzuhara S, Tanaka H, Yoshioka M, Konno H, Onodera H, Itoyama Y. : Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 84(4):433-40, 2013. 査読有. doi: 10.1136/jnnp-2011-301339. Epub 2012 Dec 15.

[学会発表] (計 2 件)

1. Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara Y:

A mutation in A-band titin is associated with hereditary myopathy with early respiratory failure in a Japanese family. the 63rd Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Boston, MA, USA, Oct 24, 2013

2. 井泉瑠美子, 鈴木直輝, 加藤昌昭, 割田仁, 高橋俊明, 堅山真規, 新堀哲也, 青木洋子, 松原洋一, 舟山亮, 西田有一郎, 長嶋剛史, 中山啓子, 青木正志 : Myofibrillar myopathy の大家系における次世代型シーケンサーを用いた原因遺伝子の同定. 第54回日本神経学会学術大会, 東京, 2013年5月29日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青木 正志 (AOKI, MASASHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 7 0 3 0 2 1 4 8

### (2) 研究分担者

加藤 昌昭 (KATO, MASA AKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 5 0 6 2 2 4 7 9