

福山型筋ジストロフィー：遺伝子・病態の解明， 分子標的治療を目指して

戸 田 達 史¹，谷 口(池田) 真理子^{1,2}，金 川 基¹，小 林 千 浩¹

福山型筋ジストロフィー (FCMD) は筋と脳を侵す日本に多い常染色体性劣性遺伝性神経筋疾患である。我々は FCMD 原因遺伝子を同定し，原因タンパク質をフクチンと命名し，また類縁疾患，筋眼脳病の原因が糖転移酵素 POMGnT1 であることを証明した。ほとんどの FCMD 患者は，フクチン遺伝子の 3' 非翻訳領域に SVA 型レトロトランスポゾンの挿入を認めるが，疾患の発症機序は不明であった。我々は近年 FCMD がスプライシング異常症であることを見だし，この異常スプライシングを制御するアンチセンス核酸を用い患者細胞及びモデルマウスでの治療に成功した。この治療法は全ての FCMD 患者に適応となる初の根治療法となる可能性があり，今後臨床応用を目指したい。

1. は じ め に

筋ジストロフィーは，進行性の筋力低下と筋萎縮を伴う，筋線維の変性・壊死をおもな病理像とする遺伝性疾患の総称であり，その種類は多く，頻度，遺伝形式，発症年齢，臨床症状は原因により全く異なる。世界中で多くの患者が苦しんでおり，その救済のため，日本を含め世界の多くの国で専門病院ばかりでなく，筋ジストロフィー協会などの支援団体がつくられている。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子としてジストロフィンが発見されて以来，この 20 年間で，40 種以上の筋ジストロフィー原因遺伝子が報告されている。

福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama-type Congeni-

tal Muscular Dystrophy: FCMD) は，1960 年福山らにより発見，その後臨床的に集大成された筋ジストロフィーである。本症は先天性筋ジストロフィーに神経細胞移動障害による脳奇形を伴う常染色体性劣性遺伝疾患であり，日本人に特異的な疾患である。

我々は「日本人の名前のついた病気は日本人の手でなんとかしたい」と思い，患者集めから始め，ポジショナルクローニング法により，FCMD 原因遺伝子を同定し，原因タンパク質をフクチンと命名した¹⁾。さらに東京都健康長寿医療センター研究所の遠藤玉夫博士らと共同で福山型類縁疾患筋眼脳 (muscle-eye-brain: MEB) 病の原因遺伝子が糖転移酵素 POMGnT1 であることを証明した²⁾。近年，翻訳後の糖鎖修飾の異常が原因であるという新たな発症メカニズムを示唆する筋ジストロフィーの研究が相次ぎ，福山型は糖鎖との関わりが示唆された最初の筋ジストロフィーである。さらに我々は最近，福山型筋ジストロフィーの根本的治療につながる分子メカニズムと治療法を発見した³⁾。日本人のみに特異的に多く，日本人が発見し，日本人の研究者によって研究されてきた疾患であるので，普段本疾患になじみのない読者の皆様にも知っていただきたく，筆をとらせていただいた。

¹ 神戸大学大学院医学研究科神経内科学/分子脳科学 (〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1)，² 神戸大学大学院医学研究科小児科こども急性疾患学

Fukuyama muscular dystrophy: elucidation of the gene and pathogenesis and approaches toward molecular targeting therapy

Tatsushi Toda¹, Mariko Taniguchi-Ikeda^{1,2}, Motoi Kanagawa¹ and Kazuhiro Kobayashi¹ (¹Department of Neurology/Molecular Brain Science, Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1 Kusunoki-chou, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan, ²Department of General Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine)

2. 福山型先天性筋ジストロフィーの発見と確立 —骨格筋-眼-脳を中心に侵す一系統疾患

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、東京女子医科大学名誉教授の福山幸夫先生が、東京大学小児科に在籍された1960年に、「いわゆる脳性麻痺例から血清クレアチニンキナーゼ高値例」を見だし、本症を独立疾患として初めて提唱したところから、その疾患としての歴史が始まる。以後、福山らを中心として、多数の症例の報告や研究によって、疾患としての確立がなされていった⁴⁾。

FCMDは日本における小児期筋ジストロフィーのなかではデュシェンヌ型の次に多くみられ、発症率は2.9/10万人であり、日本人の約90人に1人が保因者である計算になる。日本には1,000~2,000人程の患者がいると推定され、海外からの診断確実例の報告は増えてきたものの(後述)、日本に特異的に多くみられる疾患である。

本症は重度の筋ジストロフィー病変とともに、多小脳回を基本とする高度の脳奇形を認め、さらに最近では近視、白内障、視神経低形成、網膜剥離などの眼症状も注目されている。すなわち本症は遺伝子異常により骨格筋-眼-脳を中心に侵す一系統疾患である(図1)。患児は生後~乳児早期に筋緊張低下、筋力低下で発症する。運動障害は重症で、2歳前後で坐位まで獲得するものは多いが、歩行まで獲得するものはまれである。本疾患は、乳児期から筋力低下があるにもかかわらず、病気のものの進行は緩徐であ

り、頸定または坐位保持の状態のまま、長時間同じ状態を維持する例が多い。また同時に脳奇形による中枢神経症状も伴い、全例に精神発達遅延を認め、約半数にけいれんを認める。6歳以降は運動機能の低下をみ、筋力低下、全身の関節拘縮により、10歳前後に完全臥床状態となる。平均寿命は17.6歳である。死亡原因としては肺炎が最も多く、次いで心不全、呼吸不全の順である⁴⁾。

中枢神経病変は、病理学的に多小脳回あるいは厚回様多小脳回、無脳回などの脳回異常の混合が必発であり、特徴的である(図1)。組織学的には、大脳では層構造が失われ、皮質外層部における細胞移動障害により、有髄線維を含むグリア間葉性膜組織が不規則に増殖している⁴⁾。

福山型筋ジストロフィーは1960年の発表後、日本国内ではスムーズに認知されたが、海外ではなかなか認知されなかった。理由は、発表された雑誌が大学発行の和文誌であったことと、海外に患者が存在しなかったためである。海外の総説では、1979年でさえ、「先天性筋ジストロフィーという疾患自体やがては分類から消えていくであろう」とあるくらいである。しかし福山らの不断の活動や幾つかの影響力のある論文を通して、徐々に本症の知識は世界に広がっていった。そして1986年にはMendelian Inheritance in Man (いわゆるMcKusickのカタログ)に登録された。しかし独立した疾患として国際疾病分類(神経)に登場したのが1991年であることは、我々日本人から見れば大変意外である。

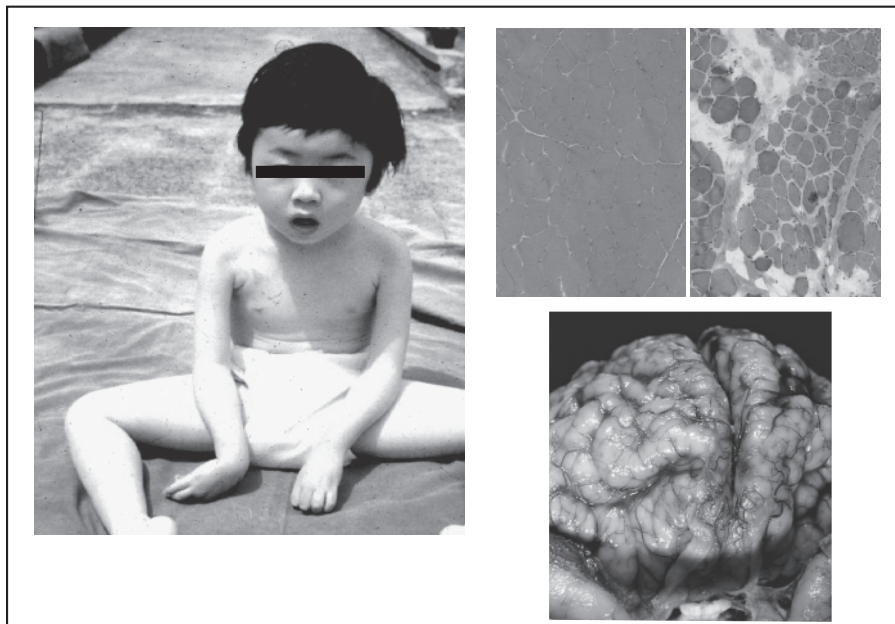


図1 FCMDの特徴

左：患者の全身像（5歳，座位しかできない，ミオパチー様顔貌と関節拘縮）。右上：生検筋の組織像（HE染色）。正常筋（左）とFCMD（右）。右下：多小脳回（小多脳回が集合して厚脳回様に見える）。

3. フクチン遺伝子と福山型の幅広い臨床スペクトラム

我々は「日本人の名前のついた病気は日本人の手でなんとかしたい」と思い、1990年に患者集めから始め、近親婚を利用した連鎖解析を行い、FCMD 遺伝子が 9q31-33 領域に存在することを、1993年に報告した⁵⁾。

その後も我々のグループは遺伝子の存在範囲を狭める解析を続けた⁶⁾。この領域の整列化コスミド各クローンをプローブとしてサザンブロット法で解析し、患者ゲノム DNA のほとんどに約 3 kb の挿入配列が入っていることを見だし、次に挿入配列のまわりの断片を起点として cDNA をスクリーニングし続け 1 種の cDNA を得た。そして 1998 年、我々はポジショナルクローニングにより福山型原因遺伝子をつきとめることに成功し、遺伝子産物をフクチンと命名した¹⁾。正常型のフクチン cDNA は約 7 kb で、骨格筋、心筋、脳で優位に発現している。ほとんどの患者ゲノム DNA でみられた約 3 kb の挿入配列は、この遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入されていた「利己的」な動く遺伝因子である SVA (SINE-VNTR-Alu) 型⁷⁾レトロトランスポゾンであった。古代から伝わったレトロトランスポゾンがヒトの遺伝性疾患の原因であることがわかったのは世界で初めてである (図 2)。

フクチンは、461 アミノ酸からなる分子量 53,700 のタンパク質であり、N 末端に膜貫通部位を持つ。抗フクチン抗体は発現量の少ない内在性フクチンを検出できないが、細胞に強制発現させるとフクチンはゴルジ体に認められる¹⁾。相同性を示す既知のタンパク質やモチーフ検索から、糖鎖修飾に関係するタンパク質である可能性が示唆されて

いる。

日本人患者のほとんどすべては、レトロトランスポゾン挿入型染色体のホモ接合体、または挿入型染色体と他の変異 (フレームシフト、ノンセンス、ミスセンスなど) との複合ヘテロ接合体である。挿入変異ホモ接合の患者と比べ、複合ヘテロ接合の患者は、水頭症、小眼球などを示す重症な場合⁸⁾と、心筋症と軽度筋力低下、知能正常の臨床的には肢帯型を示す例の報告もある⁹⁾。点変異を 2 個持つ症例は日本ではいまだ報告がないが、海外からは極めて重度の Walker-Warburg 症候群 (WWS) 様の症状を呈す例や、軽度の肢帯型の例も報告されている¹⁰⁾。これらは従来の福山型の先天型のイメージを変え、福山型のさらなる広い臨床スペクトラムを考えさせる。

4. ジストログリカンの糖鎖修飾異常と最近の話題

ジストロフィン糖タンパク質複合体の中の α ジストログリカンは高度に糖鎖修飾を受け、基底膜成分のラミニンと O 型糖鎖を介して結合している (図 3A)。ラミニンとの結合に重要な糖鎖は、哺乳類では珍しい O-マンノース型糖鎖 (Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man) である。 α ジストログリカンを介した基底膜と細胞骨格の一連のつながりは、骨格筋の収縮弛緩による機械的負荷に対して筋形質膜を保護している。

先天性筋ジストロフィーに加えて、II 型滑脳症、眼奇形を伴う筋眼脳病 (MEB 病) は、その病変部位、症状の類似性から FCMD と類縁疾患と考えられている。我々と東京都健康長寿医療センター研究所の遠藤らは、MEB 病が α ジストログリカンの O-マンノースに GlcNAc を付加する

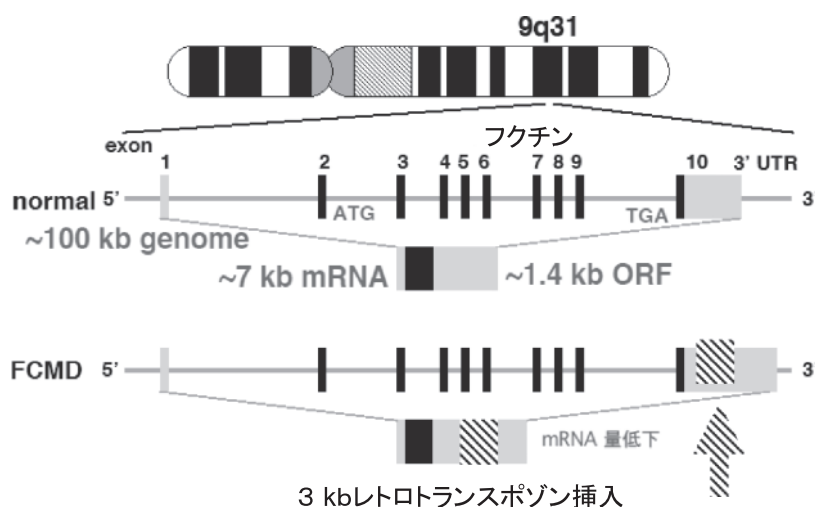


図2 フクチン遺伝子の模式図

フクチン遺伝子はゲノム上で約 100 kb にわたり、10 個のエクソンからなる。大部分の FCMD 染色体には、この遺伝子の 3' 非翻訳領域内にレトロトランスポゾン挿入変異がある。遺伝子産物フクチンは 461 個のアミノ酸 (分子量 53,700) からなる糖鎖修飾に関与する新規タンパク質である。

3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man に加え、最近、*O*-マンノシル糖鎖にはリン酸基を介した側鎖構造があり、リン酸基より先の修飾もラミニン結合に必要であることが報告された (図 3B)¹³⁾。この構造の合成には LARGE と呼ばれるタンパク質が関与することが示されているが、興味深いことに、FCMD 患者由来の細胞でもホスホジエステル結合を介した構造が欠如している。詳細な構造同定に加え、この修飾におけるフクチンの役割の解明が急がれる。また我々は、FKRP (fukutin-related protein) モデルマウスでもこのホスホジエステル結合を介した構造が欠如していること、さらには正常の肺や精巣組織でも α ジストログリカンのリン酸基を介した側鎖構造が欠如しておりラミニン結合能がないことを示し、この構造が正常組織でもラミニン結合能の決定因子であることを示した¹⁴⁾。さらに最近 *in vitro* で LARGE の酵素活性が明らかにされ、キシロースとグルクロン酸のリピートをつくる活性があることが示された。このキシロース-グルクロン酸リピートが天然の α ジストログリカンに存在するかは不明であるが、少なくとも、キシロースはラミニン結合活性に必要である¹⁵⁾。

5. FCMD はスプライシング異常症である

近年我々は FCMD の根本的治療法につながる分子メカニズムと治療法を発見した³⁾。フクチンは 10 個のエクソンと長い 3' 非翻訳領域 (3'-UTR) を持つ。ほとんどの FCMD 患者は、原因遺伝子の 3' 非翻訳領域に SVA 型レトロトランスポゾン (以降 SVA) の挿入を持つ。過去のデータではノザンプロット法では患者のフクチン mRNA は検出されなかった¹⁾。そこで今回我々は、フクチン内の全エクソン、SVA 挿入配列、及び 3'-UTR 領域の全域にわたる発現解析を再度検証し対照と比較した。その結果、フクチンの 5' 側の翻訳領域部分、及び 3'-UTR のうち SVA 挿入配列 3' 側の遺伝子発現は対照と患者間でほとんど変化がない一方、その配列に挟まれる領域での遺伝子発現は患者でのみ激減していた。よって、患者の mRNA では翻訳領域及び SVA の挿入配列には含まれた領域のどこかでスプライシングが起こっているのではないかと考えた。

そこで、発現の激減している配列をはさむ部分に PCR プライマーを設計し、患者及び対照の mRNA 由来の cDNA を鋳型に PCR を行ったところ、患者特異的に対照よりも短い遺伝子産物を検出した。この遺伝子産物の塩基配列の解析より、やはり患者ではフクチン mRNA が異常なスプライシングを受けていたことがわかった。

この異常スプライシングは、SVA 挿入配列内に存在する強力なスプライシング受容部位が、タンパク質をコードする最終エクソン内の潜在的なスプライシング供与部位を新たに活性化すること (エクソントラッピング) が原因となっていた (図 4A)³⁾。新たにスプライシング供与部位と

なった配列は、もともとは最終エクソン内に存在するために使われることのなかった、いわば眠っていたスプライシング供与部位であったのだが、SVA のエクソントラッピング機能により揺り起こされ、遺伝子の「切り取り」が生じたのである。次にこの異常スプライシング由来の配列を持つ発現ベクターを作製し、HeLa 細胞へ導入し強制発現させたところ、スプライシング由来のフクチンの局在が、正常においてみられるゴルジ体局在から小胞体へ変化していた。これらより、FCMD は SVA のエクソントラッピング機能がもたらすスプライシング異常症であることが証明された³⁾。

6. SVA によるエクソントラッピングとヒトの進化、多様性、疾患

次に我々は、SVA 挿入を認める他の二つの遺伝性疾患、一つは原因遺伝子 *LDLRAP1* のイントロン 1 に約 2.6 kb のセンス鎖の SVA 配列が挿入されている常染色体性劣性遺伝性高コレステロール血症、もう一つは原因遺伝子 *PNPLA2* のエクソン 3 内に約 1.9 kb のセンス鎖の SVA 配列の挿入を認める中性脂肪蓄積ミオパチーにおいて FCMD と同様のエクソントラッピングを確認した。またチンパンジーにはないヒト特異的な SVA のイントロンへの挿入を認める新規遺伝子 (*AB627340*) にて、エクソントラッピング由来の SVA 配列を持つ RNA をヒト脳において同定した。

SVA は進化的に最も新しいレトロトランスポゾンであり、霊長類に特異的である。そしてゲノムの中で進化とともにその数が増し、ヒトには約 2,700 コピー存在すると言われている¹⁶⁾。SVA がエクソントラッピングにより、新たな機能をヒト脳において獲得し、進化や脳の高次脳機能獲得に関与しているかもしれない。よってエクソントラッピングはヒトの疾患だけでなく進化、多様性にも関与している可能性があり非常に興味深い結果であると考えられる³⁾。

7. FCMD に対するアンチセンス療法「エクソントラップ阻害療法」

SVA が挿入された患者のフクチンは、異常スプライシングさえ受けなければ、正常のフクチンをコードする正常なエクソン配列を体内に持っている。そこで、この異常スプライシングを阻止する目的で、異常スプライシングの標的配列に対し、アンチセンス核酸を pre-mRNA レベルで結合させ、正常なスプライシングに戻す、「アンチセンス療法」が有効ではないかと考えた (図 4B)。そこで、これらの標的配列に対し有効なアンチセンス核酸を網羅的に設計し、さまざまな細胞系に投与しスプライシングの是正を検討し、3 種のアンチセンス核酸のカクテル (AED カクテルと命名) を選び出した。

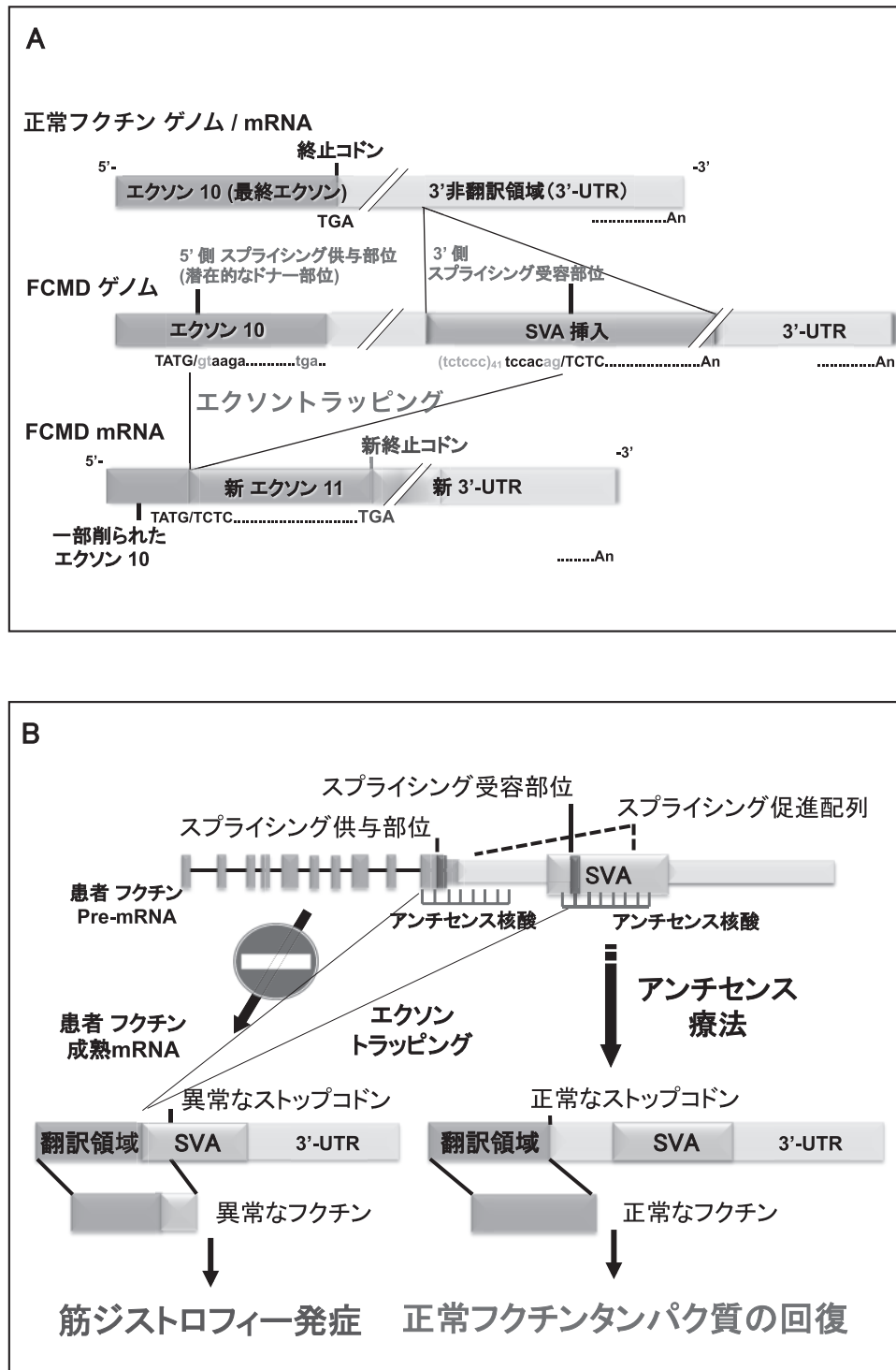


図4 FCMDのSVA型レトロトランスポゾン挿入によるエクソントラッピングがもたらすスプライシング異常とアンチセンス治療の構想

(A) FCMDではSVA内の強力な3'側スプライシング受容部位により最終エクソン内の潜在的ドナー部位が強力に活性化されエクソントラップが起こりスプライシング異常を引き起こす。

(B) 異常スプライシングを促進する配列に相補的なアンチセンス核酸を設計し、スプライシング配列をマスクすることにより異常スプライシングを阻止する。

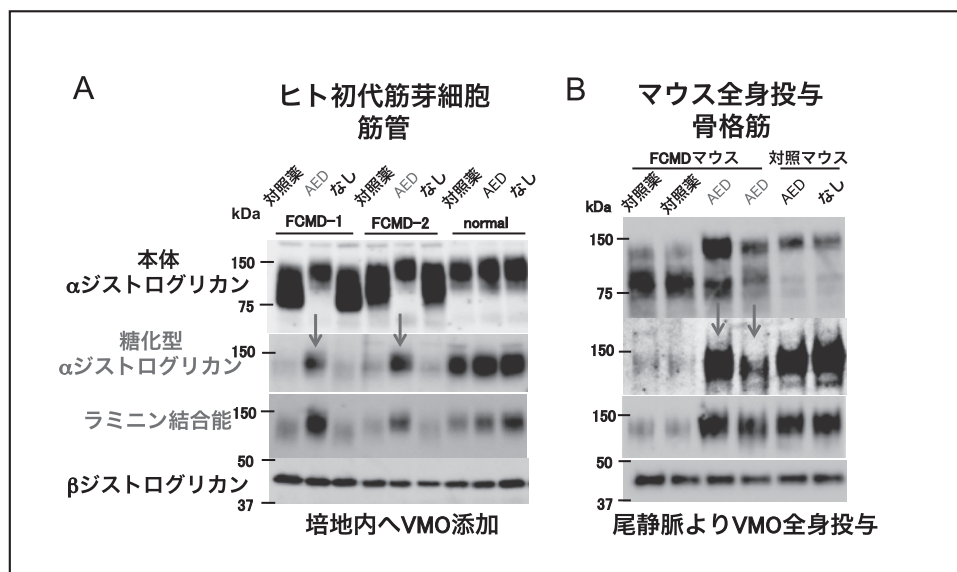


図5 FCMD に対する AED カクテル療法によりヒト筋管及びマウス骨格筋において α ジストログリカンの糖化及びピラミニン結合能が回復³⁾

(A) ヒト初代筋芽細胞より分化させた筋管のウエスタンブロッティング。糖化型 α ジストログリカン (矢印) 及びラミニン結合能が回復した。(B) マウス骨格筋のウエスタンブロッティング。尾静脈より AED カクテルを全身投与。糖化型 α ジストログリカン (矢印) 及びラミニン結合能が回復した。

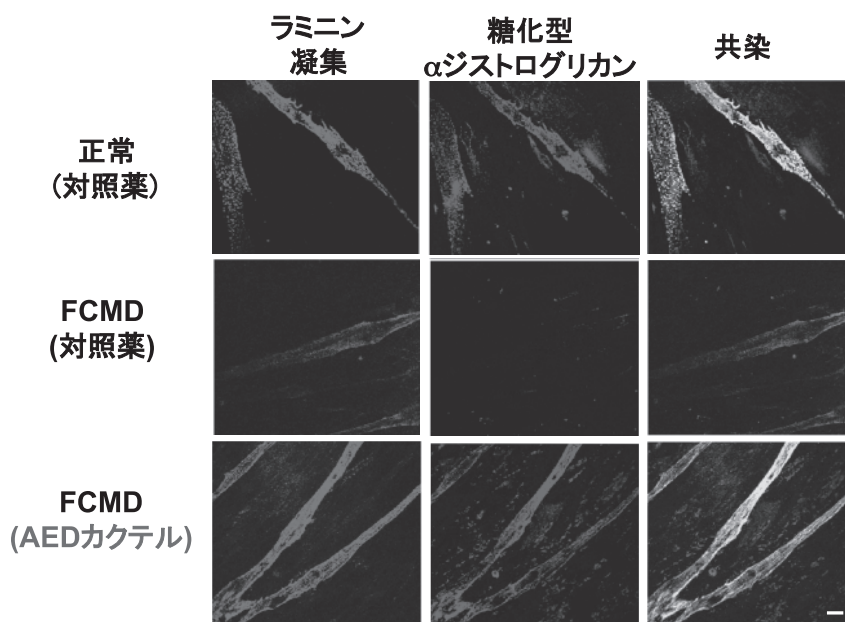


図6 ラミニンクラスタリングアッセイの蛍光免疫染色像³⁾

正常筋管（上段），FCMD 筋管に対し対照薬を添加（中段），FCMD 筋管に対し AED カクテル添加（下段）．ラミニン凝集（左），糖化型 α ジストログリカン（中），共染（右）．スケールバー = 20 μm ．

次に我々はビボモルフォリノ (Octa-Guanidine Morpholino: VMO) というアンチセンス核酸を用い、AED カクテルをモデル動物及び患者細胞に投与し治療効果を検討した。患者筋芽細胞に対し、AED カクテルを投与したと

ころ、対照薬投与に比較し、糖鎖の回復を示唆する糖化型 α ジストログリカンの劇的な増加がみられた (図 5A)³⁾。また尾静脈経由のモデルマウス¹⁷⁾への AED カクテル全身投与においても、*O*-マンノース型糖鎖の劇的な回復がみ

られた (図5B)³⁾. 最後に, 患者由来筋芽細胞を使い AED カクテル投与によるラミニン凝集アッセイを行った. 患者筋芽細胞では筋管での α ジストログリカンの発現は激減している. しかし AED カクテル投与により, 患者由来の筋管は α ジストログリカンの糖鎖が正常レベルに回復し, 正常と同程度の典型的なラミニンの凝集が観察された (図6)³⁾. これらの結果は AED カクテル投与により, 筋管が機能的にも回復したことを示唆する.

8. お わ り に

アンチセンス核酸を用いたスプライシング操作を標的とした治療法の一つに, 最も頻度の高い筋ジストロフィーであるデュシャンヌ型筋ジストロフィーをベッカー型にするエクソンスキップ療法があげられる. この治療法は現在国際治験が進行しており, 最も実現可能な治療薬剤として注目されている^{18,19)}.

今回我々が開発した方法はエクソンスキップ療法とは原理も異なり, 「エクソントラップ阻害療法」とでも命名できよう. 本邦 FCMD の根本的分子標的治療に道をひらくものである³⁾. また, デュシャンヌ型と異なり, 患者のほとんどが同じ変異なので, FCMD に対するアンチセンス療法は, 日本のすべての FCMD の患者を対象に同一の方法で行えるものであり有望である. 国際治験中のデュシャンヌ型エクソン 52 欠失は患者の 10% であり, FCMD 患者数をデュシャンヌ型の 1/3 としても, 日本での治療対象者は福山型の方が多い, と思われる. 至適配列や毒性の有無の問題など, まだ越えねばならぬ点はあるが, 今後臨床試験の実現を目指したい.

福山型は我が国で初めて記載された疾患であり, 患者数も多く, 我が国の研究により治療法開発を進めることは我々の責務であると考え. なお我々が同定開発したフクチンの遺伝子検査は, 2006 年より健康保険適応となっていることを付記しておく.

文 献

- 1) Kobayashi, K., Nakahori, Y., Miyake, M., Matsumura, K., Kondo-Iida, E., Nomura, Y., Segawa, M., Yoshioka, M., Saito, K., Osawa, M., Hamano, K., Sakakihara, Y., Nonaka, I., Nakagome, Y., Kanazawa, I., Nakamura, Y., Tokunaga, K., & Toda, T. (1998) *Nature*, 394, 388–392.
- 2) Yoshida, A., Kobayashi, K., Many, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsuhashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., Herrmann, R., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Toda, T., & Endo, T. (2001) *Dev. Cell*, 1, 717–724.
- 3) Taniguchi-Ikeda, M., Kobayashi, K., Kanagawa, M., Yu, C.C., Mori, K., Oda, T., Kuga, A., Kurahashi, H., Akman, H.O., DiMauro, S., Kaji, R., Yokota, T., Takeda, S., & Toda, T.

- (2011) *Nature*, 478, 127–131.
- 4) Fukuyama, Y., Osawa, M., & Suzuki, H. (1981) *Brain Dev.*, 3, 1–29.
- 5) Toda, T., Segawa, M., Nomura, Y., Nonaka, I., Masuda, K., Ishihara, T., Sakai, M., Tomita, I., Origuchi, Y., Ohno, K., Misugi, N., Sasaki, Y., Takada, K., Kawai, M., Otani, K., Murakami, T., Saito, K., Fukuyama, Y., Shimizu, T., Kanazawa, I., & Nakamura, Y. (1993) *Nat. Genet.*, 5, 283–286.
- 6) Toda, T., Miyake, M., Kobayashi, K., Mizuno, K., Saito, K., Osawa, M., Nakamura, Y., Kanazawa, I., Nakagome, Y., Tokunaga, K., & Nakahori, Y. (1996) *Am. J. Hum. Genet.*, 59, 1313–1320.
- 7) Watanabe, M., Kobayashi, K., Jin, F., Park, K.S., Yamada, T., Tokunaga, K., & Toda, T. (2005) *Am. J. Med. Genet.*, 138, 344–348.
- 8) Kondo-Iida, E., Kobayashi, K., Watanabe, M., Sasaki, J., Kumagai, T., Koide, H., Saito, K., Osawa, M., Nakamura, Y., & Toda, T. (1999) *Hum. Mol. Genet.*, 8, 2303–2309.
- 9) Murakami, T., Hayashi, Y.K., Noguchi, S., Ogawa, M., Nonaka, I., Tanabe, Y., Ogino, M., Takada, F., Eriguchi, M., Kotooka, N., Campbell, K.P., Osawa, M., & Nishino, I. (2006) *Ann. Neurol.*, 60, 597–602.
- 10) Godfrey, C., Clement, E., Mein, R., Brockington, M., Smith, J., Talim, B., Straub, V., Robb, S., Quinlivan, R., Feng, L., Jimenez-Mallebrera, C., Mercuri, E., Manzur, A.Y., Kinali, M., Torelli, S., Brown, S.C., Sewry, C.A., Bushby, K., Topaloglu, H., North, K., Abbs, S., & Muntoni, F. (2007) *Brain*, 130, 2725–2735.
- 11) Kanagawa, M. & Toda, T. (2006) *J. Hum. Genet.*, 51, 915–926.
- 12) Michele, D.E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Cohn, R. D., Satz, J.S., Dollar, J., Nishino, I., Kelley, R.I., Somer, H., Straub, V., Mathews, K.D., Moore, S.A., & Campbell, K.P. (2002) *Nature*, 418, 417–421.
- 13) Yoshida-Moriguchi, T., Yu, L., Stalnakier, S.H., Davis, S., Kunz, S., Madson, M., Oldstone, M.B., Schachter, H., Wells, L., & Campbell, K.P. (2010) *Science*, 327, 88–92.
- 14) Kuga, A., Kanagawa, M., Sudo, A., Chan, Y.M., Tajiri, M., Many, H., Kikkawa, Y., Nomizu, M., Kobayashi, K., Endo, T., Lu, Q.L., Wada, Y., & Toda, T. (2012) *J. Biol. Chem.*, 287, 9560–9567.
- 15) Inamori, K., Yoshida-Moriguchi, T., Hara, Y., Anderson, M.E., Yu, L., & Campbell, K.P. (2012) *Science*, 335, 93–96.
- 16) Cordaux, R. & Batzer, M.A. (2009) *Nat. Rev. Genet.*, 10, 691–703.
- 17) Kanagawa, M., Nishimoto, A., Chiyonobu, T., Takeda, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Wang, F., Fujikake, N., Taniguchi, M., Lu, Z., Tachikawa, M., Nagai, Y., Tashiro, F., Miyazaki, J., Tajima, Y., Takeda, S., Endo, T., Kobayashi, K., Campbell, K. P., & Toda, T. (2009) *Hum. Mol. Genet.*, 18, 621–631.
- 18) Goemans, N.M., Tulinius, M., van den Akker, J.T., Burm, B. E., Ekhardt, P.F., Heuvelmans, N., Holling, T., Janson, A.A., Platenburg, G.J., Sipkens, J.A., Sitsen, J.M., Aartsma-Rus, A., van Ommen, G.J., Buyse, G., Darin, N., Verschuuren, J.J., Campion, G.V., de Kimpe, S.J., & van Deutekom, J.C. (2011) *N. Engl. J. Med.*, 364, 1513–1522.
- 19) Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garralda, M.E., Bourke, J., Wells, D.J., Dickson, G., Wood, M.J., Wilton, S.D., Straub, V., Kole, R., Shrewsbury, S.B., Sewry, C., Morgan, J.E., Bushby, K., & Muntoni, F. (2011) *Lancet*, 378, 595–605.