

201024084A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成23（2011）年4月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成23（2011）年4月

目 次

I.	総括研究報告	
	先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究	1
	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）	
II.	分担研究報告	
	1. 先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究	8
	福留隆泰（長崎川棚医療センター・神経内科部長）	
	2. Collagen Q欠損症の臨床的検討	9
	奥村彰久（順天堂大学医学部小児科・准教授）	
	3. 先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究	15
	小牧宏文（（独）国立精神・神経医療研究センター・小児神経科医長）	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV.	研究成果の刊行物・別刷	22
V.	平成22年度班会議プログラム	229

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 総括研究報告書

先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究

研究代表者 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

研究要旨

先天性筋無力症候群(congenital myasthenic syndromes, CMS)は神経筋接合部の先天的な分子欠損症により筋力低下・易疲労性を呈する疾患群である。CMS は世界中から 800 症例以上が報告されているが平成 21 年度までの本邦の CMS 確定診断例（遺伝子変異同定例）は 2 例のみであった。本研究事業は本邦における CMS 症例に対して臨床診断・電気生理検査・遺伝子診断サービスを提供することにより、新規症例の発掘・原因遺伝子変異の同定・分子病態解明研究ならびに制御研究を行うことを目的とした。我々は平成 22 年度に 13 例の新規 CMS 症例の臨床診断を行い 11 例において既存候補遺伝子に変異を同定し、2 例において神経筋接合部に発現をする新規分子に変異を同定した。また 4 例において病態に応じたエフェドリン療法・フルオキセチン療法を開始し効果を認めている。また動物実験レベルであるが collagen Q 欠損症に対して protein anchoring therapy が著効を示すことを示した。さらに本邦患者で同定をした collagen Q 遺伝子変異の病原性を *in vitro*, *in vivo* で証明を行った。さらに、新規に同定をした遺伝子変異の発現実験を開始した。

研究分担者

- 福留隆泰 独立行政法人国立病院機構長崎川棚医療センター・神経内科部長
- 奥村彰久 順天堂大学医学部小児科・小児神経学・准教授
- 小牧宏文 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・小児神経科医長

A. 研究目的

先天性筋無力症候群(congenital myasthenic syndromes, CMS)は、神経筋接合部の先天的分子欠損によって起きる筋力低下と易疲労性を特徴とする疾患群である。研究代表者は以下の 8 種類の遺伝子に変異を同定してきた：骨格筋アセチルコリンレセプター(AChR) α , β , δ , ϵ サブユニット遺伝子 (*CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNA1*), アセチルコリンエステラーゼをシナプス基底膜に係留する collagen Q (*COLQ*)、神経終末に取り込まれたコリンから

アセチルコリンを再合成するコリンアセチルトランスフェラーゼ(*CHAT*)、AChR を筋終極に集積させる rapsyn (*RAPSN*)、骨格筋電位依存性ナトリウムチャンネル(*SCN4A*)。さらに別のグループにより 3 種類の遺伝子における変異が同定をされてきた：神経終末から放出され神経筋接合部の形成を促進する agrin (*AGRN*)、agrin の情報を LRP4 を介して受け取る骨格筋特異的受容体チロシンキナーゼ MuSK (*MUSK*)、MuSK のシグナルを受け取り rapsyn リン酸化さらに AChR の集積につなげる Dok-7 (*DOK7*)。なおこれらのうち AChR, MuSk, LRP4 は自己免疫による重症筋無力症の自己抗体の標的でもある。

先天性筋無力症候群は、2 歳以下の発症を特徴とするが出生直後の筋力低下が軽快し、思春期・成人期に再憎悪する例や、症状が軽微なためと思われる成人発症例も存在する。特に唯一の優性遺伝性疾患であるスローチャンネル症

候群では成人発症例が多い。他の CMS はいずれも劣性遺伝を示す。また、四肢筋萎縮症、顔面小奇形、多発性関節拘縮症(arthrogryposis multiplex)が認められることも多く、明らかな日内変動や筋無力症を認めない例もある。外眼筋麻痺の日内変動がある場合でも幼少時より外眼筋麻痺が存在するため複視を訴えることは稀である。これらの理由により、CMS は重症筋無力症とのみ鑑別をされる疾患ではなく、むしろ肢体型筋ジストロフィーを含む筋疾患との鑑別が重要であり、同時に CMS の臨床診断を困難にしている。

本研究事業は本邦における CMS 症例に対して臨床診断・電気生理検査・遺伝子診断サービスを提供することにより、新規症例の発掘・原因遺伝子変異の同定・分子病態解明研究ならびに制御研究を行うことを目的とした。CMS は世界中から 800 症例以上が報告されているが平成 21 年度までは本邦の CMS 確定診断例は 2 例のみであった。本研究事業は平成 22 年度に 13 例の新規臨床診断を行い 10 例において既存遺伝子に変異を同定し、2 例において神経筋接合部に発現をする新規分子に変異を同定した。また 4 例において病態に応じたエフェドリン療法・フルオキセチン療法を開始し効果を認めている。諸外国同様に本邦においても CMS は未診断、もしくは、筋ジストロフィー・先天性筋症・重症筋無力症と誤診され未治療ないしは胸腺摘出術・長期免疫抑制療法など不適切な治療を受けている症例がまだ数多く存在すると推定される。CMS には抗コリンエステラーゼ剤で症状が憎悪する病型もあり、CMS 症例の新規発掘・病型同定は重要である。

B. 研究方法

研究分担者らがそれぞれの症例の主治医と共同して詳細に臨床診断ならびに臨床電気生理学検討を行うことにより症例を発掘した。capillary sequencing により 10 種類の既存の遺伝子変異を同定した。また 3 症例に対しては Agilent 社 SureSelect Human All Exon Kit により exome の濃縮を行ったのち名古屋大学遺

伝子実験施設に導入をされた ABI SOLiD 3 Plus 次世代シーケンサにより解析を行った。その後、ABI 社 BioScope 1.2.1 を用いてヒトゲノム hg19/GRCh37 に mapping を行い SNV の検出を行った。さらに dbSNP Build 132 に含まれる SNP を除き、さらに、Human Gene Mutation Database (HGMD) に登録をされた遺伝子変異で dbSNP Build 132 に含まれるものを再度加えた。これらの解析を独自のプログラムを開発することにより行った。また、SOLiD により同定をした候補遺伝子変異を capillary sequencing により確認を行った。

Protein anchoring therapy の研究においては AAV cassette にヒト COLQ cDNA を挿入し、骨格筋と肝臓に親和性のある AAV8-COLQ を作成した。フランス INSERM Dr. Eric Krejci より輸入をした Colq ノックアウトマウス尾静脈より AAV8-COLQ ウィルスを投与しマウスの行動解析、病理組織解析、電気生理学的、生化学的解析を行った。

本邦で同定をされた変異 ColQ の研究では、上記と同様に変異 AAV8-COLQ を作成し Colq ノックアウトマウス尾静脈に投与し、行動解析、病理組織解析を行った。

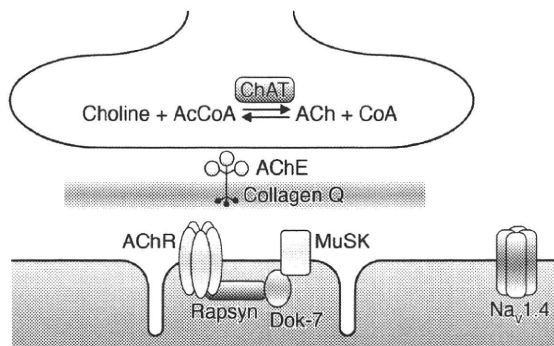
(倫理面への配慮)

先天性筋無力症候群の遺伝子変異解析は次世代シーケンサ解析を含めて名古屋大学医学系研究科生命倫理委員会の承認を得ている。平成 20 年 12 月 1 日改正の 3 省によるヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に従い研究を行っている。

組み換え DNA 実験と動物実験は名古屋大学・長崎川棚医療センターの承認を得ている。動物実験は、カルタヘナ法、ならびに、名古屋大学・長崎川棚医療センターの動物実験指針を遵守して研究を行っている。

C. 研究結果 (図 2)

ColQ をコードする COLQ 遺伝子変異を CMS 3 症例において同定した。症例 1 は C444Y と R452C の compound heterozygote であった。症例 2 は D447H の homozygote で



あった。**症例 3** は R227X と V322D の compound heterozygote であった。C444Y は過去に別の症例において同定をされた本邦で最初の CMS 関連遺伝子変異であるが、他の 4 種類の遺伝子変異は本邦のみで同定をされた新規変異である。これら 3 症例に対して ephedrine を開始し、いずれもなんらかの効果を認めている。これら 5 種類の遺伝子変異はいずれも ColQ C terminal domain に存在する。COS 細胞への発現解析にてこれらの変異はいずれも ColQ の collagen triple helix の形成を阻害しない。C444Y, R452C, D447H 変異を COLQ に導入し、アセチルコリンエステラーゼ (ACHE) 遺伝子とともに COS 細胞に発現をさせ、生成された AChE-ColQ 複合体をヘパリンカラムで精製を行った。精製 AChE-ColQ 複合体を Colq ノックアウトマウス筋切片と overnight incubation を行ったところいずれの変異 ColQ も神経筋接合部に係留されず C444Y, R452C, D447H 変異の病原性を実証することができた。C444Y, R452C, D447H 変異がある ColQ C terminal domain は MuSK への結合部位であることが知られており、これらの変異は MuSK との結合を阻害したものと思われた。さらに AAV8-COLQ-C444Y を作成し ColQ ノックアウトマウスに投与をしたが Wild-type AAV8-COLQ と異なりマウスの行動の改善を全く認めず神経筋接合部における AChE-ColQ 複合体の係留も全く認めなかった。

AChR β サブユニットをコードする *CHRNA1* 遺伝子変異の heterozygous mutation M443T を **症例 4** に同定をした。無

症状の父親も M443T heterozygote であり M443T は recessive mutation と思われる。しかし症例 4 のもう一方の allele 上に遺伝子変異を同定できておらず promoter mutation, deep intronic mutation, large-scale deletion の可能性を考えて SOLiD 解析を含めてさらに sequencing 解析を行う予定である。*CHRNA1*-M443T を *CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNA1* とともに HEK293 細胞に発現をさせ α -bungarotoxin 染色を行ったところ組織学的にも高発現を認め、EGFP を共発現させた HEK293 細胞の FACS による解析でも変異 AChR は正常と同程度の発現が認められた。HEK293 細胞に発現をした β M443T-AChR の single channel 解析を開始した。M443T は発現量に影響を与えない loss-of-function 変異のために fast channel syndrome が予想をされる。

AChR δ サブユニットをコードする *CHRND* 遺伝子変異の heterozygous mutation c.1309-1G>A を **症例 5** に同定した。無症状の父親も *CHRND* c.1309-1G>A heterozygote であり c.1309-1G>A は recessive mutation と思われる。しかし症例 5 のもう一方の allele 上に遺伝子変異を同定できておらず症例 4 と同様に promoter mutation, deep intronic mutation, large-scale deletion の可能性を考えて SOLiD 解析を含めてさらに sequencing 解析を行う予定である。c.1309-1G>A の mRNA splicing に対する効果を患者生検骨格筋より mRNA を抽出し解析を行う。

AChR ϵ サブユニットをコードする *CHRNE* 遺伝子変異を CMS 4 症例において同定をした。**症例 6** は C591del11 homozygote であり、AChR ϵ サブユニットは全く発現をしないことが予測をされた。AChR ϵ サブユニットの null mutation は CMS の原因として最多である。胎児型の AChR γ サブユニットが欠損をした AChR ϵ サブユニットの代償をすることが可能なためと思われ、症例 6 においても胎児型 γ -AChR が神経筋接合部に発現をしていると想定をされた。なお両親はいずれも *CHRNE*

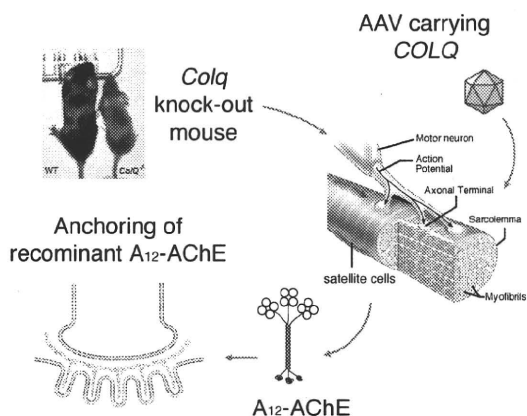
C511del11 の heterozygote であった。症例 7 は Y242X heterozygote であり、この allele 由来の AChR ϵ サブユニットは全く発現をしないことが予測をされた。この症例のもう一方の allele には D138D の synonymous mutation が同定された。D138D は exonic splicing enhancer を破壊する遺伝子変異である可能性を考えて変異 minigene を HeLa 細胞に導入を行い splicing 解析を行ったが D138D はこの系において splicing に影響を与えなかった。他の細胞ならびに *in vitro* splicing 系を用いて D138D の分子病態機構の解明を行っていく。さらに D138D は病的遺伝子変異ではない可能性も考えてさらなる変異検索を今後行う。**症例 8** は L284R homozygote であった。無症状の両親はいずれも L284R heterozygote であることを確認した。*CHRNE*-L284R を *CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNA1* とともに HEK293 細胞に発現をさせ α -bungarotoxin 染色を行ったところ組織学的にも高発現を認め、EGFP を共発現させた HEK293 細胞の FACS による解析でも変異 AChR は正常と同程度の発現が認められた。上記 β M443T と同様に HEK293 細胞に発現をした ϵ L284R-AChR の single channel 解析を開始した。L284R も β M443T と同様に発現量に影響を与えない loss-of-function 変異のために fast channel syndrome が予想をされる。**症例 9** は T264P heterozygote であった。T264P は研究代表者が世界で初めて同定を行い single channel 解析により slow channel syndrome の原因であることを同定した遺伝子変異である。本邦の CMS 症例の解析にて同定をした遺伝子変異のうち T264P のみが Caucasian と共通の遺伝子変異である。この症例に対して SSRI fluoxetine の投与を開始し効果を得ているとの報告を主治医より受けている。

DOK7 遺伝子における G64R, c.653-1G>C compound heterozygote 遺伝子変異を**症例 10** に同定をした。父親 c653-1C>G heterozygote、母親は G64R の heterozygote であり、症例 10

が compound heterozygote であることを確認した。G64R の Dok-7 signaling pathway に対する効果の解析を計画中である。

さらに SOLiD 次世代シーケンサ解析を 3 症例に対して行い遺伝子変異を同定した。いずれの変異も dbSNP Build 132 に登録をされていなかった。**症例 11** において perlecan をコードする *HSPG2* 遺伝子において heterozygous missense mutation を同定した。*HSPG2* 遺伝子変異は Schwartz-Jampel 症候群の原因となることが知られている。Perlecan は collagen Q の collagen domain に結合し AChE-ColQ 複合体をシナプス基底膜に係留する作用がある。事実 Schwartz-Jampel 症候群では終板 AChE 欠損病態となる。ただし *COLQ* 遺伝子変異にともなう終板 AChE 欠損症とことなり *HSPG2* 遺伝子変異では AChE 欠損がパーシャルとなるため表現型は myotonia になると想定されている。*HSPG2* 遺伝子変異によっては重度の終板 AChE 欠損病態として CMS の表現型を取る可能性もあり CMS の新規原因遺伝子の可能性が高い。**症例 12** においては plectin をコードする *PLEC* 遺伝子の heterozygous missense mutation を同定した。Plectin は皮膚と筋に発現をする 500 kDa の構造タンパクであり、その変異は進行性筋ジストロフィー、epidermolysis bullosa simplex (EBS)、CMS の表現型を取ることが知られている。我々は *PLEC* 遺伝子変異を CMS の 2 症例において報告を行ってきたがいずれも EBS を合併していた。症例 12 では CMS のみで EBS を認めず *PLEC* 遺伝子変異の phenotypic variability を示している可能性がある。今後同定をした *PLEC* 遺伝子変異の機能解析を行っていく予定である。**症例 13** において CMS を含めたあらゆる疾患との関連が知られていない遺伝子において homozygous missense mutation を認めた。この新規遺伝子は CMS の新たな原因遺伝子の可能性が高く今後機能解析を予定している。

Protein anchoring therapy(図 2)による



Colq ノックアウトモデルマウスの治療研究では、まずはじめにヒト *ColQ* のマウス神経筋接合部への *in vitro* anchoring を調べた。*Colq* ノックアウトモデルマウスから神経筋接合部終板切片を作成し、COS 細胞に発現をさせペリカラムにより精製ヒト AChE-*ColQ* 複合体と一晚インキュベーションを行った。結果、ヒト AChE-*ColQ* 複合体 *Colq* ノックアウトマウスの終板に係留した。つぎにヒト *COLQ* 遺伝子を組み込んだ AAV8 を作成し、5 週齢の *Colq* ノックアウトマウスの尾静脈より注射を行ったところ 2.0×10^{12} vg の AAV8-*COLQ* の投与にてマウスの行動をほぼ正常化できた。易疲労性試験でも正常マウスと同様に筋疲労性を示さなくなり、全くロタロッドから落下をしなくなる程度まで回復した。行動の観察でも同腹の正常マウスよりも活発に動き回った。さらに、骨格筋切片の染色でも collagen Q と AChE の神経筋接合部への係留を確認した。ショ糖濃度勾配遠心にて AChE-*ColQ* 複合体の分画を行ったところ、*Colq* ノックアウトマウスでは AChE-*ColQ* 複合体が全く存在しないが、AAV8-*COLQ* 治療により正常マウス骨格筋と同様の AChE-*ColQ* 複合体分画が得られた。Collagen Q を持たない球状 AChE と collagen Q を持つ AChE-*ColQ* 複合体の定量をおこなったところ、AChE-*ColQ* 複合体は正常マウスの約 70% のレベルまで改善していた。定量 PCR では約 30% の骨格筋が AAV8-*COLQ* に感染をしていると見積られるため、タンパク量が正常の 70% まで改善したことは、感染をした骨格筋より放出された非対称性アセチル

コリンエステラーゼが周囲のシナプス基底膜に運ばれたと推察された。いずれのアッセイ手法を用いても予想以上に良好な効果が得られており protein anchoring therapy の有用性を示唆している。

D. 考察

本邦における 13 症例の CMS の遺伝子変異検索を行い *COLQ* 遺伝子変異 3 例、*CHRNA1* 変異 1 例、*CHRND* 変異 1 例、*CHRNE* 変異 4 例、*DOK7* 変異 1 例、*HSPG2* 変異 1 例、*PLEC* 変異 1 例に加えて、1 例において新規 CMS 原因遺伝子を見出した。またモデル動物実験の段階であるが Protein anchoring therapy の有用性を検証するとともに、この protein anchoring の系を用いることにより *COLQ* 遺伝子変異 C444Y の病原性をモデル動物により検証することができた。

E. 結論

本研究事業により本邦における 13 症例の CMS の発掘を行うことができた。一般に遺伝子変異解析は臨床サービスであり研究として成立が困難である。しかし本研究事業を開始することによりまだ 13 症例のみであるが本邦にも CMS 症例が存在すること、しかも、ほとんどが本邦独自の遺伝子変異によるものであることが判明した。さらに CMS 症例の同定を行うとともに今回同定をした遺伝子変異の病態分子機構の解明を続ける。特に SOLiD 次世代シーケンサ解析により同定をした新規変異遺伝子は本邦から世界に向けて新しい CMS 病態を提唱できる可能性があり今後とも分子病態研究を続けたい。

F. 健康危険情報

研究代表者の研究室においても、研究分担者の施設においても、特記事項はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

(Original Article)

1) Selcen D, Juel VC, Hobson-Webb LD,

- Smith EC, Stickler DE, Bite AV, Ohno K, Engel AG. Myasthenic Syndrome Caused by Plectinopathy. *Neurology* 2011, 76:327-336.
- 2) Hirayama M, Nakamura T, Watanabe H, Uchida K, Hama T, Hara T, Niimi Y, Ito M, Ohno K, Sobue G. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine correlate with hallucinations rather than motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011, 17:46-49.
- 3) Fu Y, Masuda A, Ito M, Shinmi J, Ohno K. AG-dependent 3' splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon. *Nucleic Acids Research* in press.
- 4) Kaneko H, Kitoh H, Matsuura T, Masuda A, Ito M, Mottes M, Rauch F, Ishiguro N, Ohno K. Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in *GPATCH8*. *Human Genetics* in press.
- 5) Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Nishida H, Mabuchi N, Engel AG, Ohno K. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* in press.
- 4) Ohno K, Engel AG. Molecular defects of acetylcholine receptor subunits in congenital myasthenic syndromes. *Pharmacology of Nicotinic Acetylcholine Receptors from the Basic and Therapeutic Perspectives*. Research Signpost, in press.
- 5) Engel AG, Shen X-M, Ohno K, Sine SM. *Congenital myasthenic syndromes. Myasthenia gravis and myasthenic disorders* 2nd ed. Ed. by Engel AG. Oxford University Press, New York, in press.

2. 学会発表

(Platform Presentation)

- 1) Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K. rAAV8-Mediated Protein-Anchoring Therapy for Targeting Collagen Q-Tailed Acetylcholinesterase to the Neuromuscular Junction. *American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual Meeting*, Washington DC, USA. May 17-22, 2010

(Poster Presentation)

- 1) Sugiyama A, Ito M, Nakata T, Azuma Y, Masuda A, Okumura A, Komaki H, Ohno K. Mutations at the C-terminal domain (CTD) of collagen Q (ColQ) causing acetylcholinesterase (AChE) deficiency prevent anchoring of ColQ to the neuromuscular junction (NMJ). *Society for Neuroscience Annual Meeting*, San Diego, USA. Nov 13-17, 2010.

(Invited Presentation)

- 1) 大野欽司。「先天性筋無力症候群の病態と治療戦略」神経研究 Hot Spot 200X 大阪市、2010年10月1日

(Book Chapters)

- 1) 大野欽司「神経領域のRNA病」細胞工学 29(2) 131-136, 2010.
- 2) 大野欽司「神経筋接合部における遺伝子異常と疾患」脳と神経 in press, 2011.
- 3) Ohno K, Masuda A. RNA pathologies in neurological disorders. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* 3rd ed. Vol. 25 *Neurochemical Mechanisms in Disease*. Ed by Abel Lajtha. Springer, New York, 2011, 1: pp399-415.

H. 知的所有権の取得状況

出願年月日:2010年8月11日

知的財産権の種類・番号:PCT/JP2010/062054

発明等の名称:筋強直性ジストロフィー治療薬 発

明者:大野欽司・松浦徹

出願人:国立大学法人名古屋大学

特許事務所番号:NU09006P

国際公開日:2011年1月20日

国際公開番号:WO2011/007866

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究
研究分担者 福留隆泰 長崎川棚医療センター・神経内科部長

研究要旨

神経筋接合部の先天的な分子欠損症による先天性筋無力症候群(congenital myasthenic syndrome, CMS)の臨床診断・電気生理検査・遺伝子診断サービスを提供するとともにさらなる分子病態解明を行う。特に欠損分子が有する機能について電気生理学的に解析する。

A. 研究目的

未診断ならびに誤診断をされている本邦CMS症例に対して、臨床診断・電気生理検査・遺伝子診断サービスを提供するとともに、さらなるCMSの分子病態機構の解明ならびに治療法開発研究を行う。

B. 研究方法

症例を集積に関しては、抗AChR抗体や抗MuSK抗体が陰性の患者に注目すると共に、筋疾患として誤った診断がされている症例に注目して電気生理学的検討を行う。

反復神経刺激検査は診断に有用な手段だが、当班の班会議で提示されたCMS症例をみると様々な所見を呈している。CMSが疑われる症例での反復神経刺激検査について啓蒙することが症例の蓄積つながると考えられる。

新たなCMS例については欠損分子の同定を主任研究者の大野が行う。欠損分子が神経筋伝達に及ぼす作用の解析を福留が担当する。

また欠損分子を有するCMSのモデル動物を作成し、神経筋伝達機能を評価する。同時に治療効果の判定を行う。

(倫理面への配慮)

組み換えDNA実験と動物実験は名古屋大学・長崎川棚医療センターの承認を得ている。動物実験は、カルタヘナ法、ならびに、名古屋大学・長崎川棚医療センターの動物実験指針を遵守して研究を進める。

C. 研究結果

本邦のCMS確定診断例は平成21年度までに2例のみであった。平成22年度にCMS研究班を発足させ、新規に13症例のCMS症例の臨床・電気生理学診断を行った。特に変異C

olQ遺伝子治療モデルマウスの電気生理学的検討を行っている。また、抗MuSK抗体が陽性の重症筋無力症患者のIgGを用いてMuSK蛋白が神経筋伝達に及ぼす作用について解析した。MuSK抗体はアセチルコリンエステラーゼの集簇に関与しアセチルコリンエステラーゼ欠損の原因となる可能性が示唆された。

反復神経刺激検査は診断に有用な手段だが、当班の班会議で提示されたCMS症例をみると様々な所見を呈していた。

D. 考察

兄弟発症の重症筋無力症で抗AChR抗体や抗MuSK抗体が陰性でありながら、ステロイドが有効であった例が報告されている。このことは、Seronegative MGと称される重症筋無力症例の中に、神経筋接合部にある分子欠損が発症に関わっている可能性を示唆する。また、これらの症例を検討することでMGの原因となる未知の抗体が見いだされる可能性がある。Seronegative MG例は重症筋無力症例の約10%に認めることから、神経筋伝達を阻害する病態の解析方法として欠損分子の検索は有用である。また、欠損分子を発現させたモデル動物を作成することで病態のより詳細な解析が可能となり、治療法の開発にも応用できる。

E. 結論

CMSは本邦でも決して稀な疾患ではなく、今後認知度をあげることでさらなる症例の蓄積が期待できる。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究研究事業）
分担研究報告書

Collagen Q 欠損症の臨床的検討

研究分担者 奥村彰久 順天堂大学医学部小児科・准教授

研究要旨

Collagen Q 欠損症自験例の臨床像を、神経生理学的検査とともに明らかにした。症例は幼児期から筋の易疲労性に気づかれ、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬投与による症状の悪化を認めた。遺伝子解析の結果 heteroallelic な点変異が同定され、Collagen Q 欠損症と診断した。患児の自覚症状はエフェドリン投与にて改善したため、治療前後に神経生理学的検査を行って比較した。30Hz 反復刺激で振幅の改善がみられたものの治療前後の大きな変化は認めず、エフェドリンの効果を客観的に示すことはできなかった。

A. 研究目的

Collagen Q 欠損症は先天性筋無力症候群の一つであり、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) と結合する蛋白である Collagen Q をコードする *COLQ* 遺伝子の変異が原因となる。*COLQ* 遺伝子変異の結果、神経筋接合部に AChE を係留することができないためシナプス間隙にアセチルコリンが長時間とどまる。そのためにアセチルコリンレセプター (AChR) の開口時間が異常に延長し、結果として筋の易疲労性がもたらされる。

現在まで日本における Collagen Q 欠損症は数例が知られているのみであるが、欧米の先天性筋無力症候群の発症頻度を考えると、多くの未診断の症例が存在すると推測される。こうした症例を新たに診断するためには、日本の Collagen Q 欠損症の臨床像を明らかにする必要がある。本研究では Collagen Q 欠損症自験例の臨床像を、神経生理学的検査とともに報告する。

B. 症例の概要と研究方法

症例：7歳男児

主訴：運動後の易疲労性、筋力低下

家族歴：父方祖母が重症筋無力症（詳細は不明）

周生期：在胎 40 週、体重 3358 g で出生。仮死徴候は認めなかったが、出生後 2~3 日目は呼吸不安定で保育器に収容された。が
発達歴：坐位 8 か月、つかまり立ち 1 歳過ぎ、独歩 1 歳 6 か月と軽度の運動発達遅滞を認めた。明らかな精神発達遅滞は認めない。

現病歴：3 歳で保育園に入園したが、遠足や散歩などの途中で長く歩行できなくなること気づかれた。疲れてくるとお腹を突き出して体を揺らすように歩行し、頭部が下垂する姿勢をとっていた。このような症状は、30~60 分ほど休憩すると回復した。眼瞼下垂は認めなかった。日内変動はないが、日により調子が変わることに気づかっていた。国立精神神経医療研究センター病院にて精査を行ったところ、反復刺激にて

上腕二頭筋および僧帽筋で Waning と repetitive CMAP とを認めた。重症筋無力症が疑われたが、AChE 阻害薬を処方したところ症状の悪化を認めた。先天性筋無力症候群が疑われたため、名古屋大学医学部附属環境医学研究所にて遺伝子解析を施行した。COLQ 遺伝子に、p.C444Y (c.1331G>A) および p.R452C (c.1354C>T) の heteroallelic な点変異を同定し、Collagen Q 欠損症と診断した。患児の自覚症状はエフェドリンの投与で軽減している。

Collagen Q 欠損症の神経生理学的特徴を明らかにするために、以下の検査をエフェドリン投与開始前後に施行し比較した。

- M 波および M 波回復曲線
- 連続刺激検査
- テンシロン試験
- Post-tetanic Cycle Study

C. 研究結果

M 波の振幅および形態には、エフェドリン投与前後で明らかな変化を認めなかった。M 波回復曲線では、治療前後とも高頻度刺激にて waning を認め (図 1)、エフェドリン

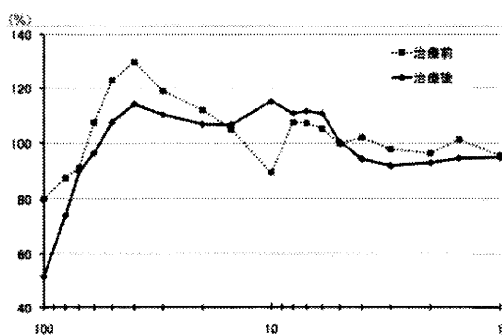


図1 M波回復曲線

投与による改善は明らかでなかった。連続刺激試験では、治療前後とも高頻度刺激で waning を認めた (図 2)。治療後には 30Hz 連続刺激で振幅の改善がみられた (表 1)。Repetitive CMAP は明らかではなかった。テンシロン試験では治療前後とも投与開始後 2~3 分に振幅の改善が示されたが (図 3)、

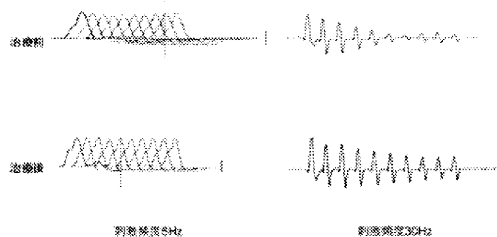


図2 連続刺激検査

表1 連続刺激

刺激強度	治療前 (%)	治療後 (%)
3Hz	98.3	93.8
5Hz	97.3	96.1
10Hz	106.4	79.6
20Hz	58.4	41.9
30Hz	49.2	82.9

表2 筋力測定

刺激強度	治療前 (%)	治療後 (%)
3Hz	87.9	95.5
5Hz	101.6	98.9
10Hz	113.3	92.8
20Hz	68.3	34.9
30Hz	22.3	54.3

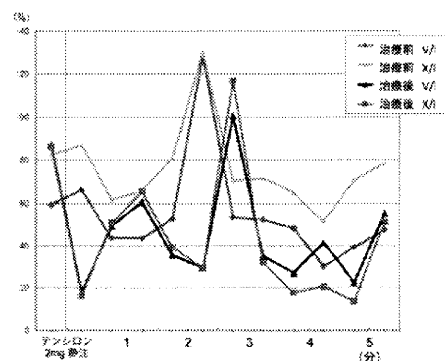


図3 テンシロン試験

体動などのアーチファクトの可能性もある。Post-tetanic cycle study では治療前後で明らかな差を認めなかった (図 4)。

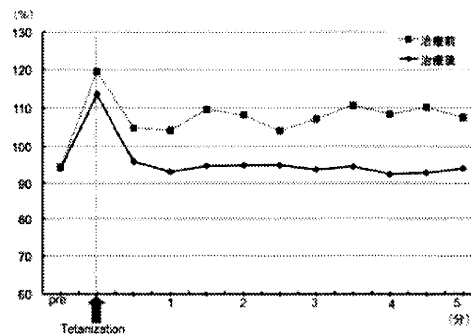


図4 Post-tetanic cycle study

D. 考察

Collagen Q 欠損症は、神経筋接合部の AChE の欠損のため相対的にシナプス間隙のアセチルコリン濃度が高まることにより、筋の易疲労性がもたらされる。したがって、AChE 阻害薬の投与はかえってその症状を悪化させるが、先天性筋無力症候群でもこのような所見を認める疾患は限られている。本症例でも AChE 阻害薬の投与による症状悪化が、診断への手掛かりの一つとなった。しかし、治療前のテンシロンテストではそれを客観的に示す所見は得られなかった。この原因は現時点では不明であるが、試験を行う筋によって所見の出やすさが異なる可能性があると思われる。

Collagen Q 欠損症に対するエフェドリンの治療効果については、いくつかの報告がある。自験例でも、明らかな自覚症状の改善を認め、有効であったと思われる。しかし本症例の神経生理学的検査の結果では、30Hz 連続刺激で振幅の改善がみられたものの治療前後の大きな変化は無く、エフェドリンの効果を客観的に示すことはできなかった。この理由は、エフェドリンの作用が今回の検査では評価できない神経筋接合部の機能に影響を与えている可能性や、エフェドリンの効果が神経筋接合部以外に対するものである可能性などがあると思われる。

E. 結論

Collagen Q 欠損症の神経生理学的検査所見としては、高頻度刺激の waning と repetitive CMAP を認めた。エフェドリン投与は自覚症状を改善したが、神経生理学的検査による客観的な証明は困難であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okumura A, Abe S, Hara S, Aoyagi Y, Shimizu

T, Watanabe K. Transiently reduced water diffusion in the corpus callosum in infants with benign partial epilepsy in infancy. *Brain Dev* 2010; 32(7): 564-566.

Okumura A, Hayakawa M, Oshiro M, Hayakawa F, Shimizu T, Watanabe K. Nutritional state, maturational delay on electroencephalogram, and developmental outcome in extremely low birth weight infants. *Brain Dev* 2010; 32(8): 613-618.

Okumura A, Yamamoto T, Kidokoro H, Kato T, Kubota T, Shoji H, Sato H, Shimojima K, Shimizu T. Altered gene expression in umbilical cord mononuclear cells in preterm infants with periventricular leukomalacia. *Early Hum Dev* 2010; 86(10): 665-667.

Okumura A, Komatsu M, Abe S, Kitamura T, Matsui K, Ikeno M, Shimizu T. Amplitude-integrated electroencephalography in patients with acute encephalopathy with refractory, repetitive partial seizures. *Brain Dev* 2011; 33(1): 77-82.

Okumura A, Morita M, Ikeno M, Abe S, Shimizu T. Acute encephalopathy in a child with secondary carnitine deficiency due to pivalate-conjugated antibiotics. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30(1): 92.

Sekigawa M, Okumura A, Nijima S, Hayashi M, Tanaka K, Shimizu T. Autoimmune focal encephalitis shows marked hypermetabolism on positron emission tomography. *J Pediatr* 2010; 156(1): 158-60.

Kato T, Hayakawa F, Tsuji T, Natsume J, Okumura A. Early diffusion-weighted images

in infants with subcortical leukomalacia.

Pediatr Neurol 2010; 42(5): 375-379.

Komatsu M, Okumura A, Matsui K, Kitamura T, Sato T, Shimizu T, Watanabe K. Clustered subclinical seizures in a patient with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev* 2010; 32(6): 472-476.

Tanuma N, Miyata R, Kumada S, Kubota M, Takanashi JI, Okumura A, Hamano SI, Hayashi M. The axonal damage marker tau protein in the cerebrospinal fluid is increased in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev* 2010; 32(6): 435-439.

Inage E, Suzuki M, Minowa K, Akimoto N, Hisata K, Shoji H, Okumura A, Shimojima K, Shimizu T, Yamamoto T. Phenotypic overlapping of trisomy 12p and Pallister-Killian syndrome. *Eur J Med Genet.* 2010; 53(3): 159-161.

Tadokoro R, Okumura A, Nakazawa T, Hara S, Yamakawa Y, Kamata A, Kinoshita K, Obinata K, Shimizu T. Acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion associated with hemophagocytic syndrome. *Brain Dev* 2010; 32(6): 477-481.

Nakajima-Kawakami Y, Okumura A, Yamashita S, Mori M, Ishikawa A, Sameshima K, Shimizu T. A neonate with focal cerebritis caused by *Campylobacter fetus*. *J Pediatr Infect Dis* 2010; 5(3): 289-292.

Maruyama K, Okumura A, Negoro T, Watanabe K. Congenital infiltrating lipomatosis of the

face with ipsilateral hemimegalencephaly, band heterotopia, and hypertrophy of brainstem and cerebellum. *Neuropediatrics* 2010; 41(3): 147-150.

Sakai R, Okumura A, Marui E, Shimizu T. Does the pediatricians' work setting or years of experience influence febrile seizure education? *Neuropediatrics* 2010; 41(3): 144-146.

Kobayashi K, Ouchida M, Okumura A, Maegaki Y, Nishiyama I, Matsui H, Ohtsuka Y, Ohmori I. Genetic seizure susceptibility underlying acute encephalopathies in childhood. *Epilepsy Res* 2010; 91(2-3): 143-152.

Obinata K, Okumura A, Nakazawa T, Kamata A, Niizuma T, Kinoshita K, Shimizu T. Norovirus encephalopathy in a previously healthy child. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29(11): 1057-1059.

Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Hayashi S, Kubota T, Fukasawa T, Suzuki M, Maruyama K, Oshiro M, Hattori T, Kidokoro H, Natsume J, Hayakawa M, Watanabe K. Prolonged EEG depression in term and near-term infants with hypoxic ischemic encephalopathy and later development of West syndrome. *Epilepsia* 2010; 51(12): 2392-2396.

Suganuma H, Arai Y, Kitamura Y, Hayashi M, Okumura A, Shimizu T. Maternal docosahexaenoic acid-enriched diet prevents neonatal brain injury. *Neuropathology.* 2010; 30(6): 597-605.

Kubota T, Suzuki T, Kitase Y, Kidokoro H, Miyajima Y, Ogawa A, Natsume J, Okumura A. Chronological diffusion-weighted imaging

changes and mutism in the course of rotavirus-associated acute cerebellitis/cerebellopathy concurrent with encephalitis/encephalopathy. *Brain Dev.* 2011; 33(1): 21-27.

Abe S, Okumura A, Hamano S, Tanaka M, Shiihara T, Aizaki K, Tsuru T, Toribe Y, Arai H, Shimizu T. Early infantile manifestations of incontinentia pigmenti mimicking acute encephalopathy. *Brain Dev.* 2011; 33(1): 28-34.

2. 学会発表

奥村彰久. 新生児発作と脳波モニタリング. 第 66 回東海てんかん集談会、静岡、2010.2.6.

奥村彰久. 新生児脳梗塞と新生児発作. 第 572 回日本小児科学会東京都地方会講話会、東京、2010.2.13

奥村彰久. aEEG を使って新生児の脳を見よう！第 12 回新生児呼吸療法・モニタリングフォーラム、大町、2010.2.18.

奥村彰久. 新生児の脳を見るために aEEG を上手に使おう. 第 12 回新生児呼吸療法・モニタリングフォーラム、大町、2010.2.18.

奥村彰久. 新生児脳波：判読のエッセンス. 第 10 回 NeuKids 常総セミナー、大洗、2010.2.27.

奥村彰久. 新生児発作と脳波モニタリング. 第 19 回近畿新生児研究会、大阪、2010.3.6.

奥村彰久. 小児の急性脳症—最近の話題—. 2009 年度日本神経学会北海道地区生涯教育講演会、札幌、2010.3.7.

奥村彰久. 急性脳炎・脳症の臨床症状と治

療法. 第 27 回神経研都民講座、国分寺、2010.4.13.

奥村彰久、谷本愛子、安部信平、池野充、斎藤雅子、清水俊明. 早産児核黄疸の 1 例. 第 113 回日本小児神経学会総会、盛岡、2010.4.23.

奥村彰久、清水俊明、辻健史、久保田哲夫、山下進太郎、新島新一、平岩朋子. 新型インフルエンザ関連脳症の臨床像. 第 52 回日本小児神経学会総会、福岡、2010.5.21.

Akihisa Okumura, Tetsuo Kubota, Hiroyuki Kidokoro, Takeshi Tsuji, Fumio Hayakawa, Koichi Maruyama, Motomasa Suzuki, Kazuya Itomi, Toshiaki Shimizu. Clinical Features of Acute Encephalopathy in Children with Underlying Disorders. 第 52 回日本小児神経学会総会、福岡、2010.5.21.

奥村彰久. シンポジウム：急性脳症における脳波. 第 52 回日本小児神経学会総会、福岡、2010.5.22

奥村彰久、安部信平、池野充、斎藤雅子、清水俊明. 幼児期に epileptic spasms を認める多小脳回の 1 例. 第 4 回日本てんかん学会関東甲信越地方会、東京、2010.6.12.

奥村彰久. 新生児の脳波と脳波モニタリング. 第 433 回福岡臨床と脳波懇話会、福岡、2010.7.9.

Akihisa Okumura, Toshiyuki Yamamoto, Hiroyuki Kidokoro, Toru Kato, Tetsuo Kubota, Hiromichi Shoji, Hiroaki Sato, Keiko Shimojima, Toshiaki Shimizu. Altered Gene Expression in Umbilical Cord Mononuclear Cells in Preterm Infants with Periventricular

Leukomalacia.第46回日本周産期・新生児医学会学術集会、神戸、2010.7.12.

奥村彰久. 小児のけいれん —熱性けいれんからてんかんまで—. 亀田メディカルセンター小児科学術講演会、鴨川、2010.7.23.

奥村彰久. 小児の急性脳炎・脳症—Bright tree appearance を示す急性脳症の最近の知見から—. 第17回ヘルペス感染症フォーラム、札幌、2010.8.20.

奥村彰久、植松貢、今高城治、田中学、岡西徹、久保田哲夫、須藤章、遠山潤、辻恵、大守伊織、内木美佐子、平岩文子、佐藤仁志、斎藤伸治. Dravet 症候群における急性脳症. 第44回日本てんかん学会総会、岡山、2010.10.14.

奥村彰久. 小児良性部分てんかんの病態と治療 良性乳児部分てんかん. 第44回日本

てんかん学会総会、岡山、2010.10.15.

奥村彰久. 教育講演:新生児発作の Evidence に基づく診断と治療を目指して. 第55回日本未熟児新生児学会、神戸、2010.11.5.

奥村彰久. 新生児における脳波・脳波モニタリング. 第57回九州新生児研究会、長門、2010.11.20.

G. 知的所有権の取得状況

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究

研究分担者 小牧 宏文（独）国立精神・神経医療研究センター 病院小児神経科
医長

研究協力者 苛原 香（独）国立精神・神経医療研究センター 病院小児神経科医員

研究要旨 先天性筋無力症候群 5 例の臨床的および電気生理学的特徴を検討した。4 例が乳児期に運動発達遅滞で発症し初発時は筋力低下、筋緊張低下が主症状であった。眼瞼下垂、眼球運動制限は新生児期発症例にのみ認めた。筋力変動は幼児期以降に明らかになった。筋力変動は間欠的または数日間持続する筋力低下を全例に認め、日内変動を呈したのは 1 例のみであった。副神経の反復神経刺激では評価した全例が減衰を示したが、正中神経、尺骨神経、後脛骨神経では筋力低下を呈していても減衰を認めない例があった。テンシロンテストでは眼瞼下垂が改善せず反復神経刺激での減衰率改善が判定に有用であった。診断まで平均 6 年を要しており診断に難渋した例が多かった。

にて病的な変異が判明した 5 例を対象とし、

A. 研究目的

先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndrome: 以下 CMS) は、神経筋接合部の先天的分子欠損により全身の筋力低下、易疲労性を呈し¹⁾²⁾、生後 1 年以内に発症することが多い³⁾稀な疾患である。多くは近位筋優位の筋力低下に加えて外眼筋障害、眼瞼下垂を呈し自己免疫性の重症筋無力症や先天性ミオパチーと似た臨床像を呈する⁴⁾⁵⁾が、軽度の筋力低下のみを呈し眼瞼下垂を欠く例⁵⁾や成人発症例²⁾³⁾⁶⁾があり、診断に長期間を要する例が少なくない²⁾⁷⁾。欧米を中心にすでに 200 家系以上の CMS が報告されている⁸⁾が本邦での報告は我々の検索する限り 4 例⁹⁾¹²⁾であり、未診断例が多い可能性がある。我々は日本人小児の CMS 5 例の臨床情報をもとに、他疾患との鑑別となる症状と電気生理学的特徴について検討した。

B. 研究方法

発症時期、臨床症状、自己抗体陰性、反復神経刺激 (repetitive nerve stimulation: 以下 RNS) 減衰から CMS を疑い、遺伝子解析

診療録に基づいて臨床的特徴について検討した。自己抗体は抗アセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor: 以下 AChR) 抗体、抗 muscle specific kinase (以下 MuSK) 抗体を検索した。反復神経刺激 (repetitive nerve stimulation; RNS) は正中神経 2 例、尺骨神経 3 例、後脛骨神経 3 例、副神経 3 例を 1, 3, 5, 10Hz の刺激頻度で評価した (重複含む)。第 1 反応と最小振幅の波形を比較してその差が第 1 反応の 10% 以上あれば減衰現象陽性とした。テンシロンテストは投与後の compound muscle action potential (以下 CMAP) 減衰率の改善または運動負荷の所要時間の短縮を陽性とし、症状の悪化を悪化とした。

(倫理面への配慮)

本研究は診療録などを用いて情報収集した後方視的研究であり、倫理委員会の申請は行っていない。

C. 研究結果

1. 臨床的特徴