

症例は男児 4 例、女児 1 例で研究時の年齢は 6~19 歳であった。新生児期発症 3 例(症例 1~3)、乳児期発症 1 例(症例 4)、幼児期発症 1 例(症例 5)で、4 例が生後 1 年以内に発症した。妊娠経過中の異常は全例指摘されなかった。1 例(症例 1)で生直後から自発呼吸が確立せず人工呼吸管理を行った。初発症状は 4 例(症例 1~4)に運動発達遅滞を伴う筋緊張低下または筋力低下を認めたが、経過中に無投薬で徐々に改善し 3 例が 1 歳 7 か月までに、最も遅い例(症例 1)でも 4 歳時に独歩を獲得した。1 例(症例 5)は 3 歳時に長距離歩行後の動揺性歩行で発症した。家族歴は 1 例のみに認め父方祖母が重症筋無力症であった(症例 5)。

研究時には全身の筋力低下を 2 例、頸部・四肢のみの筋力低下を 3 例に認めた。筋力変動は全例に認め、夕方や運動負荷後に筋力低下を呈し同日中に改善する日内変動 1 例、1 日ごとに程度の異なる間欠的変動 3 例、筋力低下が数日単位で持続する長期変動 3 例であった(症例重複あり)。日内変動のみを呈した例はなかった。具体的には間欠的変動では歩行距離と呼吸器離脱可能な時間(症例 1)、階段昇降の段数(症例 2)、運動不耐の程度(症例 5)が 1 日ごとに変動した。長期変動では疲労による歩行距離の短縮(症例 1)運動負荷による疲労(症例 3)が数日続く例と、感冒罹患や喘息発作から 1 週間後に筋力低下を認めるがさらに 1 週間かけて徐々に回復する(症例 4)例を認めた。

## 2. 検査所見

遠位の運動神経では、正中神経 1 例、尺骨神経 3 例(うち 1 例は手掌を最大収縮で 30 秒間握らせた後)、後脛骨神経 2 例で減衰を認めた。尺骨神経と後脛骨神経では repetitive

CMAP をそれぞれ 1 例に認めた。近位の運動神経である副神経では評価した全例が減衰した。症例 1, 2 の波形を図 1 に示す。テンシロンテストは投与後の CMAP 減衰率の改善を認めた 2 例と、運動負荷への所要時間の短縮を認めた 1 例を陽性と判定した。また投与後に呼吸不全を呈した 1 例を悪化と判定した。眼瞼下垂の改善を認めた例はなかった。抗 AChR 抗体、抗 MuSK 抗体は検索した全例で陰性であった。筋生検は施行した 4 例全てで非特異的所見のみであった。遺伝子変異は *COLQ* 変異 3 例、*CHRNE* 変異 1 例、*DOK7* 変異 1 例であった。

## 3. 治療

*COLQ* 変異例(症例 2~4)は塩酸エフェドリンが全例で有効であり、易疲労性、運動不耐の改善を認めた。症例 2 では 6 分間歩行距離が 130m から 280m に延長した。*DOK7* 変異例(症例 1)ではピリドスチグミン臭化物開始後の筋力改善は明らかでなかったが、3,4-Diaminopyridine(3,4-DAP) 開始後に階段昇降の時間が短縮しジャンプが可能となった。さらに塩酸エフェドリンを追加したところ両上肢の挙上時間が 10 秒から 20 秒へ延長し、臥位から立位への体位変換に要する時間が 10 秒から 3~4 秒に短縮した。症例 4 ではピリドスチグミン臭化物、3,4DAP、塩酸エフェドリンのいずれでも易疲労感が若干改善したが、階段昇降の所要時間は変動が大きく明らかな運動不耐の改善は認めていない。

## D. 考察

CMS は先天性ミオパチー、抗体陰性重症筋無力症、肢帯型筋無力症、中枢性低緊張、代謝性疾患、先天性筋ジストロフィー、ミトコンドリア病<sup>2)5)13)14)</sup>と診断されている例が多

く、これらの疾患との鑑別が重要である。遺伝子変異ごとに呈する症状が若干異なることが報告されており、今回の検討例にある遺伝子変異では *DOK7* 変異例での肢帯型の筋力低下<sup>5)14)</sup>、*COLQ* 変異例での早期からの筋力低下、呼吸不全、進行性の体幹の筋力低下と側彎、拘束性呼吸不全<sup>15)</sup>、*CHRNE* 変異例では新生児期発症、眼球運動制限、球麻痺、軽度の近位筋力低下、遠位筋萎縮、呼吸器感染の反復<sup>16)17)</sup>である。今回の検討例での *COLQ* 変異例と報告での臨床像は一致していたが、*DOK7* 変異例では呼吸不全、運動発達遅滞、眼瞼下垂を伴う重症例であり、*CHRNE* 変異例では球麻痺、眼瞼運動制限を伴わずより軽症であった。また *DOK7* 変異例では長期間での筋力変動を呈することがある<sup>14)18)</sup>が今回の検討では *COLQ* 変異例、*CHRNE* 変異例も間欠的あるいは長期での筋力変動を呈し、日内変動のみを呈した例はなかった。また間欠的変動、長期変動ともに眼瞼下垂の程度には変化がなく、易疲労性、運動不耐、呼吸筋疲労が変動の中心であった。休息によって回復しない筋力変動を呈する理由は不明であるが、遺伝子変異に関係なく CMS に特徴的な症状である可能性がある。

代表的な神経筋接合部評価手法に RNS とテンシロンテストがある。RNS では遠位の運動神経である正中神経、尺骨神経、後脛骨神経で CMAP の減衰を認めない例があり、近位の運動神経である副神経では評価した全例が減衰を認めた。Ben らは筋力低下を呈する遠位筋に複数回行った RNS のうち 12 例中 9 例が 1 回は減衰を呈さなかったと報告しており、<sup>14)</sup> Violeta Mihaylova らは近位筋、遠位筋ともに減衰を呈さなかった *COLQ* 変異例 2 例を報告している<sup>19)</sup>。我々の症例でも症例 1, 2 は遠位筋の筋力低下を認めるにもかかわら

ず、これらの筋を支配する運動神経は RNS での減衰を示さなかった。筋力低下と易疲労性はそれぞれ独立した症状であり、筋力低下を認める筋での RNS が減衰しなくても CMS を否定することにはならないと考えられた。テンシロンテストの評価は眼瞼下垂を呈さない例が半数を占めていたため、負荷前後の RNS 減衰率や階段昇降の所要時間を比較することで効果を判定したが、眼瞼下垂を呈する例でもテンシロンテストでの眼瞼下垂の改善は認めなかった。眼瞼下垂のみをテンシロンテストの評価対象としていると異常なしと判断する可能性が高い。眼瞼下垂の改善が見られない理由は不明であるが、CMS に特徴的な症状と考えられた。

## E. 結論

CMS ではこれまで報告されている全身の筋力低下、易疲労性、生後 1 年以内の発症<sup>1-3)</sup>以外に、間欠的または長期的な筋力変動、近位筋支配の運動神経での RNS 減衰、テンシロンテストで眼瞼下垂の変化を認めないことが特徴であった。これらは原因遺伝子にかかわらず共通する症状であった。

## 文献

- 1) Engel AG, Ohno K, Sine SM. Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:339-52.
- 2) Kinali M, Beeson D, Pitt MC, et al. Congenital myasthenic syndromes in childhood: diagnostic and management challenges. *J Neuroimmunol* 2008;15:201-202:6-12.
- 3) Engel AG, Shen XM, Selcen D, Sine SM.

- What Have We Learned from the Congenital Myasthenic Syndromes. *J Mol Neurosci* 2010;40:143-53.
- 4) Yeung WL, Lam CW, Fung LW, Hon KL, Ng PC. Severe congenital myasthenia gravis of the presynaptic type with choline acetyltransferase mutation in a Chinese infant with respiratory failure. *Neonatology*. 2009;95:183-6.
- 5) Srour M, Bolduc V, Guergueltcheva V, et al. *DOK7* mutations presenting as a proximal myopathy in French Canadians. *Neuromuscul Disord*. 2010;20:453-7.
- 6) Engel AG, Sine SM. Current understanding of congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:308-21.
- 7) Ishigaki K, Nicolle D, Krejci E, et al. Two novel mutations in the *COLQ* gene cause endplate acetylcholinesterase deficiency. *Neuromuscul Disord* 2003;13:236-44.
- 8) 石垣景子, 大澤真木子 先天性筋無力症候群 小児科 2009;50:1053-8
- 9) 桂千晶, 池田ちづる, 小牧宏文ら. 新生児期より呼吸障害、筋緊張低下を呈した先天性筋無力症候群の 1 例. 脳と発達 2009;41:307
- 10) 佐橋健太郎, 大野欽司, 山田新一, 犬飼晃, 祖父江元. 硫酸キニジンが奏効した先天性筋無力症候群 臨床神経学 2005;45:1136
- 11) Kohara N, Lin TS, Fukudome T, et al. Pathophysiology of weakness in a patient with congenital end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Muscle Nerve* 2002;25:585-92.
- 12) 石垣景子, 村上てるみ, 伊藤康ら. アセチルコリン受容体欠乏症による先天性筋無力症候群患児に対する治療の取り組み. 脳と発達 2009;41:37-42
- 13) Engel AG. The therapy of congenital myasthenic syndrome. *Neurotherapeutics*. 2007;4:252-7.
- 14) A. Ben Ammar, F. Petit, N. Alexandri, et al. Phenotype genotype analysis in 15 patients presenting a congenital myasthenic syndrome due to mutations in *DOK7*. *J Neurol*. 2010;257:754-766.
- 15) Engel AG, Ohno K, Sine SM. Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:339-52
- 16) Beeson D, Hantaï D, Lochmüller H, Engel AG. 126th International Workshop: congenital myasthenic syndromes, 24-26 September 2004, Naarden, the Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2005;15:498-512.
- 17) Salih MA, Oystreck DT, Al-Faky YH, et al. Congenital Myasthenic Syndrome Due to Homozygous *CHRNAE* Mutations: Report of Patients in Arabia. *J Neuroophthalmol*. 2011;31:42-47.
- 18) Juliane S. Muller, Agnes Herczegfalvi, Juan J. Vilchez, et al. Phenotypical spectrum of *DOK7* mutations in congenital myasthenic syndromes. *Brain* 2007;130:1497-1506
- 19) Mihaylova V, Müller JS, Vilchez JJ, et al. Clinical and molecular genetic findings in *COLQ*-mutant congenital myasthenic syndromes. *Brain*. 2008;131:747-59.

**F. 研究発表**

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

**G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

# 研究成果の刊行に関する一覧表

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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			2011	in press
Ohno K, Masuda A	RNA pathologies in neurological disorders  Neurochemical Mechanisms in Disease	Abel Lajtha.	Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology 3rd ed	Springer	New York	2011	Vol. 25 1: pp399-415
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
Engel AG, Shen X-M, Ohno K, Sine SM	Congenital myasthenic syndromes	Engel AG	<i>Myasthenia gravis and myasthenic disorders</i> 2nd ed	Oxford University Press	New York		in press

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	86(10)	665-667	2010
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	53(3)	159-161.	2010
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	41(3)	147-150	2010
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	91(2-3)	143-152	2010
Selcen D, Juel VC, Hobson-Webb LD, Smith EC, Stickler DE, Bite AV, Ohno K, Engel AG	Myasthenic Syndrome Caused by Plectinopathy	Neurology	76	327-336	2011
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 <i>GPATCH8</i> .	<i>Human Genetics</i>		in press	
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.	<i>Neurology</i>		in press	

研究成果の刊行物・別刷

# 神経筋接合部における遺伝子異常と疾患

## Genetic Defects and Disorders at the Neuromuscular Junction

名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学

大野欽司

Kinji Ohno

Neurogenetics, Nagoya University Graduate School of Medicine

### Address:

〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞 65

名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学

Neurogenetics, Center for Neurological Diseases and Cancer

Nagoya University Graduate School of Medicine

65 Tsurumai, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

### Key words

Congenital myasthenic syndromes; neuromuscular junction; neuromuscular synaptic transmission; nicotinic acetylcholine receptor

### Abstract

Genetic defects of molecules expressed at the neuromuscular junction (NMJ) cause congenital myasthenic syndromes (CMS), which are characterized by muscle weakness, abnormal fatigability, amyotrophy, and minor facial anomalies. Muscle weakness mostly develops under 2 years of age but also in adults in some cases. Mutations identified to date include: (i) muscle nicotinic acetylcholine receptor (AChR) subunits, (ii) rapsyn that anchors and clusters AChRs at the neuromuscular junction, (iii) agrin that is released from the nerve terminal and induces AChR clustering by stimulating the downstream LRP4/MuSK/Dok-7/rapsyn/AChR pathway, (iv) MuSK that transmits the AChR-clustering signal from agrin/LRP4 to rapsyn/AChR, (v) Dok-7 that transmits the AChR-clustering signal from agrin/LRP4/MuSK to rapsyn/AChR, (vi) skeletal muscle sodium channel type 1.4 ( $Na_v1.4$ ) that spreads depolarization potential from endplate throughout muscle fibers, (vii) collagen Q that anchors acetylcholinesterase to the synaptic basal lamina, and (viii) choline acetyltransferase that resynthesizes acetylcholine from recycled choline at the nerve terminal. In addition, mutations in a heparin sulfate proteoglycan, perlecan, which binds to many molecules including collagen Q and dystroglycan, cause Schwartz-Jampel syndrome. Interestingly, mutations in *LRP4* cause Cenani-Lenz syndactyly syndrome but not CMS. AChR, MuSK, and LRP4 are also targets of auto-antibodies in myasthenia gravis. In addition, molecules at the NMJ are targets of many other disease states: AChR are blocked by a snake toxin, alpha-bungarotoxin, and a plant poison, curare; the presynaptic SNARE complex is attacked by botulinum toxin; and acetylcholinesterase is inhibited by a nerve gas, sarin, and by organophosphate pesticides. This review focuses on molecular bases of defects of AChR, rapsyn,  $Na_v1.4$ , collagen Q, and choline acetyltransferase.

はじめに

神経筋接合部はプロトタイプシナプスとしてシナプス電気生理機構ならびにシナプス分子構築機構が古くから精力的に研究が行われてきており最も解明が行われてきたシナプスである。神経筋接合に発現をする分子の先天的な遺伝子変異による神経筋接合部信号伝達異常は筋力低下・易疲労性・筋萎縮・顔面小奇形を特徴とする先天性筋無力症候群(*congenital myasthenic syndromes, CMS*)を惹き起こす<sup>1)</sup>。CMSは欠損する分子の部位により、前シナプス型、シナプス型、後シナプス型に分類される(図1)。CMSにおいて同定をされてきた変異分子は(i)ニコチン作動性筋アセチルコリン受容体(*muscle nicotinic acetylcholine receptor, AChR*)<sup>2,3)</sup>、(ii)AChRを筋終板に集積をさせるラプシン(*rapsyn*)<sup>4,5)</sup>、(iii)神経終末より放出をされAChRクラスター形成を促進するアグリン(*agrin*)<sup>6)</sup>、(iv)Agrinのシグナルを受容しAChRクラスター形成を促進するMuSK<sup>7,8)</sup>、(v)MuSKと協調をしてAChRクラスター形成に作用をするDok-7<sup>9,10)</sup>、(vi)筋終板のAChRの脱分極を骨格筋全般に伝播する電位依存性筋ナトリウムチャンネル(*voltage-gated muscle sodium channel, Nav1.4*)<sup>11)</sup>、(vii)アセチルコリンエステラーゼ(*acetylcholinesterase, AChE*)をシナプス基底膜に係留をするコラーゲンQ(*collagen Q, ColQ*)<sup>12-14)</sup>、(viii)神経終末から再取り込みをされたコリンからアセチルコリン(ACh)を再合成するコリンアセチルトランフェラーゼ(*choline acetyltransferase, ChAT*)<sup>15)</sup>がある。本稿ではこれらのうち著者らが同定をしてきたAChR, rapsyn, Nav1.4, ColQ, ChATを中心に紹介をする。

さらに、ヒトは胎生33週まではAChRεサブユニットの代わりにAChRγサブユニットを使うγ-AChRを神経筋接合において発現しているため<sup>16)</sup>、AChRγサブユニットの先天的な遺伝子変異<sup>17,18)</sup>は*fetal akinesia deformation sequence (FADS)*を惹き起こす。また、AChRαサブユニットとAChRδサブユニットの変異によってもFADSが起きることが報告をされている<sup>19)</sup>。また、シナプス基底膜に集積しColQや*dystroglycan*をはじめとする数多くの分子との結合が知られているパルカン(*perlecan*)の欠損はSchwartz-Jampel症候群の原因となる<sup>20,21)</sup>。興味深いことにagrin受容体であるLRP4の遺伝子変異は神経筋接合部信号伝達障害ではなく、Cenani-Lenz合指症候群(*Cenani-Lenz syndactyly syndrome*)の原因となる<sup>22)</sup>。Lrp4ノックアウトマウスも多指症の表現型を取ることが報告をされている<sup>23)</sup>。

これら遺伝性疾患に加えて、神経筋接合部分子は自己免疫疾患の標的にもなり、アセチルコリン受容体(*acetylcholine receptor, AChR*)<sup>24)</sup>・筋特異的受容体チロシンキナーゼ(*muscle-specific receptor tyrosine kinase, MuSK*)<sup>25,26)</sup>・LDL receptor-related protein 4 (*LRP4*)<sup>27)</sup>に対する自己抗体は重症筋無力症の原因になる。さらに、AChRαサブユニットのプロモータ領域のSNPが若年発症の重症筋無力症の発症を2.01倍から2.35倍増加させることが報告をされている<sup>28)</sup>。このSNPは、胸腺上皮細胞におけるAChRαサブユニットの発現を減弱させ、T細胞のAChRに対する免疫寛容を成立させにくくすることにより重症筋無力症の発症確率を上げる。神経終末のP/Q型電位依存性カルシウムチャンネル(*P/Q-type voltage-gated calcium channel, VGCC*)に対する自己抗体はランバート・イートン筋無力症候群(*Lambert-Eaton myasthenic syndrome*)を惹き起こす<sup>24)</sup>。同様に神経終末の電位依存性カリウムチャンネル(*voltage-gated*

potassium channel, VGKC)に対する自己抗体は Isaac's 症候群 (神経ミオトニア, neuromyotonia) の原因となる<sup>29)</sup>。さらに、神経筋接合部分子を標的とする病態として、サリンや有機リン農薬などの AChE 阻害作用、蛇毒  $\alpha$  バンガロトキシンや植物毒クラレの AChR 阻害作用、ボツリヌス毒の SNARE 複合体阻害作用が知られている。

## I. 神経筋接合部信号伝達

はじめに神経筋接合部における信号伝達を概説する。神経終末に到達をした神経活動電位は神経終末の P/Q 型カルシウムチャンネル(VGCC)を開口する。VGCC より流入をしたカルシウムイオンは ACh を充填したシナプス小胞膜に存在をするシナプトタグミンに結合しシナプトブレビン・SNAP-25・シンタキシンから構成される SNARE 複合体の形成を促進する。シナプス小胞ひとつあたり 6000 個から 8000 個の ACh 分子が含まれる。シナプス小胞より放出をされた ACh は 10-50 nm のシナプス間隙を隔てた筋終板の AChR に結合をする。AChR 一分子に 2 分子の ACh が結合をすることにより AChR イオンチャンネルが開口する。

開口した AChR はナトリウムチャンネルなどと異なりすべての陽イオンを細胞外から細胞内に通し筋終板局所の脱分極を惹き起こす。ナトリウムが主たる細胞外陽イオンのためにナトリウムの流入が主たる脱分極電位を構成するがマグネシウム・カルシウムも流入し脱分極電位を構成する。運動神経の活動電位によって起きる AChR による脱分極を終板電位(endplate potential, EPP)と呼ぶ。シナプス小胞は神経活動電位がないときにも断続的にシナプス間隙に「漏れる」ことにより少数の AChR の開口を惹き起こし微小終板電位(miniature endplate potential, MEPP)として記録をされる。

EPP による脱分極は骨格筋膜ならびに T 管に多数存在するナトリウムチャンネル Nav1.4 の開口を順次惹起する。T 管の脱分極をリアノジン受容体(ryanodine receptor)が感知し、筋小胞体膜の L 型カルシウムチャンネルの開口を促す。筋小胞体から放出をされたカルシウムイオンはトロポニンに結合し、アクチンに結合をしたトロポミオシンの「ずれ」を生じさせることにより、ミオシンとアクチンのスライディングによる筋収縮が開始する。

## II. CMS の臨床

### 1. 臨床症状

スローチャンネル症候群のみが AChR の gain-of-function 変異による常染色体優性遺伝であり、他はいずれも各種神経筋接合部分子の loss-of-function 変異による常染色体劣性遺伝である。常染色体優性遺伝性疾患の発症年齢の一般法則に従い、CMS の成人発症例はスローチャンネル症候群に最も多い。常染色体劣性遺伝による CMS 症例の多くは 2 歳以前に発症をするが、出生直後の筋力低下が軽快し、思春期まで無症状で経過するケースも少なからず存在する。CMS では胎生期から神経筋接合部信号伝達異常があることによると推定をされるが、limb-girdle 型筋萎縮を呈することが多く、また、顔面の軽度の奇形や多発性関節拘縮症(arthrogryposis multiplex)が認められることもある。明らかな日内変動や筋無力症を認めずむしろ日差変動をする症例も多い。また、外眼筋麻痺の有無は診断には役立たず、同じ欠損分子による CMS でも

外眼筋麻痺のある例とない例が存在する。これらの理由により、CMSは重症筋無力症とのみ鑑別される疾患ではなく、むしろ limb-girdle 型筋萎縮症を含む筋萎縮症および先天性筋症との鑑別が重要である。

## 2. 電気生理学的検査

血中抗 AChR 抗体と血中抗 MuSK 抗体が陰性であることの確認は必須である。CMS の確定診断は電気生理学的検査を用いて行う。CMS では重症筋無力症と同様に、2-3 Hz の低頻度反復神経刺激により複合筋活動電位(compound muscle action potential, CMAP)が異常減衰をする。しかし、以下に述べる発作性無呼吸を伴う CMS (CMS with episodic apnea)とナトリウムチャンネル筋無力症では、2-3 Hz の低頻度反復神経刺激では、CMAP の減衰は見られず、10 Hz 5-10 分間の反復神経刺激負荷後、または、自発筋収縮後の 2-3 Hz 反復神経刺激にて減衰を誘発できる。また、スローチャンネル症候群と終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症では、アセチルコリンレセプターがナトリウムチャンネルの不応期を超えて開口し続けるために、単一の神経刺激にて反復する CMAP が認められることが特徴である (図 2)。反復 CMAP は、抗コリンエステラーゼ剤の過剰投与や有機リン中毒でも認められる。

Mayo Clinic では、単一筋線維筋電図(single fiber EMG)による診断は、擬陽性率が高いために行わなかった。しかし、単一筋線維筋電図のみで異常を検出し、ほぼ 100%の正診率で我々に多数の症例を紹介してきた医師もいる。Mayo Clinic に CMS を多く紹介してきた医師は、例外なく電気生理医であり、反復神経刺激試験、または、単一筋線維筋電図を、筋力低下の診断スクリーニングにルーチンで含めている医師であった。これらの事実も、CMS の診断には、重症筋無力症との鑑別だけでは不十分であることを示している。

## III. 前シナプス型 CMS

### 1. 発作性無呼吸を伴う CMS (CMS with episodic apnea)

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酵素、コリンアセチルトランスフェラーゼ(choline acetyltransferase, ChAT)の遺伝子変異により、アセチルコリンの再合成が障害される病態である (図 3)<sup>15,30)</sup>。乳児期より頻発する無呼吸発作を特徴とし、非発作時には無症状の例もある。無呼吸発作は他の CMS でも認められる症状である。2-3 Hz の低頻度神経刺激では、CMAP の減衰は見られず、10 Hz 5-10 分間の反復神経刺激負荷、または、自発筋収縮負荷により、減衰が誘発される。無呼吸発作による低酸素脳症を認める例では精神発達遅延を認める。ChAT は中枢神経系においてコリン作動性ニューロンの同定に使われるほど重要な酵素であるが、低酸素脳症を認めない例では ChAT 欠損による精神発達遅延を認めない。

変異 ChAT の解析にて、酵素動態異常が認められる。ChAT ナル変異も存在するが、ナル変異をホモで持つ患者は存在しない。また、ナル変異をヘテロで持つ親は無症状であることから、50%の ChAT 活性があれば発症をしないと思われる。

本症候群では、抗コリンエステラーゼ剤、3,4-ジアミノピリジンが有効である。乳幼児の無呼吸発作に対して apnea monitor も重要である。

## IV. シナプス型 CMS

## 1. 終板アセチルコリンエステラーゼ(AChE)欠損症

シナプス基底膜の AChE が欠損することにより、シナプス間隙にアセチルコリンが長期間留まり、AChR の開口時間を延長させる病態である (図 4)<sup>12-14, 31)</sup>。四肢筋筋力低下に加えて体幹筋筋力低下・脊椎側彎を認めることが多い。反復神経刺激にて、CAMP の異常減衰と反復 CMAP が認められる (図 2)。

神経筋接合部の AChE は、12 個の catalytic subunits が、3 個の collagen Q と結合をして、非対称型 AChE を作り、collagen Q を介して、シナプス基底膜に係留される。患者では、collagen Q に遺伝子変異を認める。発現実験によると collagen Q を 3 種類に分類することが可能である。(1) AChE catalytic subunits への結合が障害されるもの、(2) collagen Q の 3 重鎖構造ができないもの、(3) collagen Q の C 末端ドメインの変異のためにシナプス基底膜への係留が障害されるものの 3 種類である。

本症候群に対して常用量のエフェドリンが有用である<sup>32, 33)</sup>。高濃度のエフェドリンは AChR をブロックする作用があるが<sup>34, 35)</sup>、低用量のエフェドリンの作用機構は不明である。一方、抗コリンエステラーゼ剤は残存している butyrylcholinesterase や collagen Q に結合していない globular AChE を阻害するため、むしろ症状を悪化させる。

## V. 後シナプス型 CMS

### 1. スローチャンネル症候群(Slow channel CMS, SCCMS)

AChR のチャンネル開口時間が異常に延長する病態である (図 5)<sup>2, 3)</sup>。本症候群は CMS の中で唯一、常染色体優性遺伝を示し、成人発症例も多い。四肢遠位筋優位の筋力低下を特徴とし、特に手指伸筋の筋力低下が顕著である。反復神経刺激にて、CAMP の異常減衰と反復 CMAP が認められる (図 2)。AChR の異常開口時間延長は、以下の理由により神経筋接合部信号伝達を阻害する。(1) 終板筋細胞内への過剰な Ca 流入による終板筋症(endplate myopathy)を引き起こし、終板の構造を破壊するとともに AChR 欠損症となる。(2) AChR を介した過剰な陽イオンの流入により静止膜電位が上昇し、AChR の開口による脱分極が十分な電位変動を起こすことができなくなり、電位依存性ナトリウムチャンネルが反応をしなくなる。(3) アセチルコリンと AChR の親和性が高くなることにより、AChR が脱感作を受け、AChR のイオンチャンネルが閉じたままになる。

SCCMS は、常染色体優性遺伝性疾患であり AChR の各種サブユニットにミスセンス変異を認める。アセチルコリンとの結合部位やチャンネル孔を形成する M2 ドメインに変異が集積している。組み換え変異 AChR は、タンパク発現量は正常であるが、アセチルコリンに対する親和性が増加し、単一チャンネル記録で異常に延長したチャンネル開口時間が認められる。

SCCMS では、常用量の半量の 10  $\mu$ M の quinidine や、常用量の倍量の 5  $\mu$ M の fluoxetine が有効であり、実際に臨床応用を行っており良好な効果が得られている<sup>36, 37)</sup>。抗コリンエステラーゼ剤は症状を悪化させることも軽度改善をさせることもある。AChR の脱感作が本症候群に対する抗コリンエステラーゼ剤の作用機序と考えられるが、endplate myopathy を悪化させると考えられるため、抗コリンエステラーゼ剤を使うべきではない。本症候群は有効な治

療薬が存在するために診断が極めて重要である。

## 2. ファーストチャンネル症候群(Fast channel CMS, FCCMS)

アセチルコリンレセプター(AChR)のチャンネル開口時間が異常に短縮する病態である(図6)<sup>38-42)</sup>。臨床症状や電気生理学的所見は、重症筋無力症と類似している。

FCCMSでは、AChRの特定のサブユニットの一方のalleleにミスセンス変異を認める。組み換え変異AChRの解析では、タンパク発現量は正常かむしろ増加し、アセチルコリンに対する親和性は現弱し、単一チャンネル記録で異常に短縮したチャンネル開口時間が認められる。もう一方のalleleには、ミスセンス変異、ナンセンス変異、フレームシフト変異を認めるが、いずれも細胞膜表面AChRを作ることができないナル変異である。

FCCMSでは、抗コリンエステラーゼ剤に加えて、3,4-ジアミノピリジン(3,4-DAP)が有効である。後者は、神経終末の電位依存性カリウムチャンネル(VGKC)をブロックすることにより神経インパルスによる脱分極を延長させ、アセチルコリン放出量を増大させる効果がある。

## 3. 終板 AChR 欠損症 (AChR 変異)

重症筋無力症に似た病態であり、臨床症状も電気生理学的所見も、重症筋無力症と類似している。本症候群と重症筋無力症の発症年齢は2歳を境にするが、厳密な年齢の境界は存在せず、本症候群でも成人になって症状が発現する症例が存在する。

本症候群では、AChRにその発現を低下させる変異を認める。変異は特にεサブユニットに集積している(図7)<sup>43-45)</sup>。ヒトでは、胎生期にはγサブユニットからなるAChRが作られるが、出生とともにγサブユニットがεサブユニットに置換されε-AChRが作られる。εサブユニットのナル変異があると、胎生型のγ-AChRが作られ、患者は生存できるが、他のサブユニットのナル変異では、置換するサブユニットが存在しないために、出生できないと思われる。

本症候群は、重症筋無力症同様に抗コリンエステラーゼ剤を用いる。

## 4. 終板 AChR 欠損症 (rapsyn 変異)

AChRを終板に集積させる細胞膜下構造タンパク rapsyn の変異により病態である(図8)<sup>4,5)</sup>。臨床症状、電気生理学的所見、治療方法も上記のAChR変異による終板AChR欠損症とほぼ同一であるが、rapsynのプロモータ領域の変異では顔面奇形が必発する<sup>46)</sup>。

Rapsyn変異は、AChRεサブユニット変異について多くみつき、特にN88K変異は、すべてのrapsyn翻訳領域変異を有する患者で存在する。N88Kのfounder効果の解析では、N88Kはきわめて古い変異と想定され、founderハプロタイプは存在しなかった<sup>47)</sup>。N88Kは現在までのところコーカソイドのみに見つかっている。

本症候群は、AChR変異による終板AChR欠損症と同様に抗コリンエステラーゼ剤が有効である。

## 5. ナトリウムチャンネル筋無力症

骨格筋膜電位依存性ナトリウムチャンネルの gain-of-function 変異は、高カリウム性周期性四肢麻痺、先天性パラミオトニア、potassium-aggravated myotonia の原因となる<sup>48)</sup>。一方、軽度の loss-of-function 変異による低カリウム性周期性四肢麻痺の症例が報告されていた<sup>49)</sup>。高度の loss-of-function 変異は、AChR による脱分極(endplate potential)を筋膜表面の活動電位(action potential)として伝達することができず CMS を惹き起こす (図 9)<sup>11)</sup>。臨床症状、電気生理学検査所見は上述の ChAT 変異による発作性無呼吸を伴う CMS と区別ができない。

#### おわりに

CMS 症例の報告は世界中からなされているが、日本で遺伝子診断が行われたのは終板 AChE 欠損の一例のみであった<sup>31)</sup>。2010 年度より厚生労働省難治性疾患克服事業の支援を受け、我が国における CMS 症例の解析を開始し 2010 年 3 月末までの 1 年間で 12 例の CMS 遺伝子変異を同定した。2 種類の新規遺伝子の変異も同定しており、これらの病態分子機構の解析を開始している。CMS は病態によって治療方法が異なり、また薬物療法が著効を示す群が存在するため、稀な疾患ではあるが見逃してはいけない重要な疾患のひとつと思われる。

## 図説

- 図1 神経筋接合部の分子構築。
- 図2 スローチャンネル症候群と終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症では単一神経刺激にて反復する複合筋活動電位 (CMAP, 矢印) を認める。低頻度反復神経刺激にて、反復 CMAP は、最初の CMAP よりも大きく減衰する。
- 図3 **A.** コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)のゲノム構造と遺伝子変異。ChAT ゲノムの第1イントロンに vesicular acetylcholine transporter 遺伝子(vAChT)がコードされている。**B.** ChAT 酵素活性アッセイ。ChAT は、choline と acetyl CoA を基質として acetylcholine を合成する。例えば、L210P では、acetyl CoA に対する結合能が失われ、R560H では、choline に対する結合能が失われる。
- 図4 神経筋接合部シナプス基底膜の A<sub>12</sub> 非対称性アセチルコリンエステラーゼ(AChE)と collagen Q 上に同定された遺伝子変異。A<sub>12</sub>は 12 個の AChE catalytic subunits (中抜き丸) と 3 本の collagen Q 分子からなる。Collagen Q 分子は中心部の collagen domain が 3 本鎖構造を取る。
- 図5 **A.** AChR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ サブユニット上に同定されたミスセンス変異。M2 ドメインがチャンネル孔を形成する。スローチャンネル症候群患者神経筋接合部から記録をした miniature endplate current (MEPC)(**B**)と単一チャンネル記録(**C**)。患者では、MEPC の減衰が遅延し、チャンネルの開口持続時間 (上向き) が延長する。
- 図6 ファーストチャンネル症候群患者神経筋接合部から記録をした miniature endplate current (MEPC)(**B**)と単一チャンネル記録(**C**)。患者では、MEPC の減衰が促進し、チャンネルの開口持続時間 (上向き) が短縮する。**C.** AChR  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ サブユニット上に同定されたミスセンス変異。
- 図7 終板 AChR 欠損症の原因となる AChR サブユニット変異。
- 図8 Rapsyn のゲノム構造(**A**)とドメイン構造(**B**)、及び、同定された遺伝子変異。TPR, tetratricopeptide repeat。
- 図9 **A.** 骨格筋電位依存性ナトリウムチャンネルのドメイン構造とミスセンス変異。**B.** 変異ナトリウムチャンネルは正常に活性化されるが、fast inactivation が増強し、特に V1442E は静止膜電位の-80mV ですでに不活化されている。**C.** 50 Hz の反復脱分極刺激にて V1442E 変異は容易に不活化される。

## 文献

- 1) Engel AG, Ohno K, and Sine SM: Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* **4**: 339-352, 2003
- 2) Ohno K, Hutchinson DO, Milone M, Brengman JM, Bouzat C, et al.: Congenital myasthenic syndrome caused by prolonged acetylcholine receptor channel openings due to a mutation in the M2 domain of the epsilon subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 758-762, 1995
- 3) Sine SM, Ohno K, Bouzat C, Auerbach A, Milone M, et al.: Mutation of the acetylcholine receptor alpha subunit causes a slow-channel myasthenic syndrome by enhancing agonist binding affinity. *Neuron* **15**: 229-239, 1995
- 4) Ohno K, Engel AG, Shen X-M, Selcen D, Brengman J, et al.: Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome. *Am J Hum Genet* **70**: 875-885, 2002
- 5) Milone M, Shen XM, Selcen D, Ohno K, Brengman J, et al.: Myasthenic syndrome due to defects in rapsyn: Clinical and molecular findings in 39 patients. *Neurology* **73**: 228-235, 2009
- 6) Huze C, Bauche S, Richard P, Chevessier F, Goillot E, et al.: Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *Am J Hum Genet* **85**: 155-167, 2009
- 7) Chevessier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, Richard P, Gaudon K, et al.: MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* **13**: 3229-3240, 2004
- 8) Chevessier F, Girard E, Molgo J, Bartling S, Koenig J, et al.: A mouse model for congenital myasthenic syndrome due to MuSK mutations reveals defects in structure and function of neuromuscular junctions. *Hum Mol Genet* **17**: 3577-3595, 2008
- 9) Beeson D, Higuchi O, Palace J, Cossins J, Spearman H, et al.: Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science* **313**: 1975-1978, 2006
- 10) Hamuro J, Higuchi O, Okada K, Ueno M, Iemura S, et al.: Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. *J Biol Chem* **283**: 5518-5524, 2008
- 11) Tsujino A, Maertens C, Ohno K, Shen X-M, Fukuda T, et al.: Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7377-7382, 2003
- 12) Ohno K, Brengman J, Tsujino A, and Engel AG: Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9654-9659, 1998
- 13) Ohno K, Brengman JM, Felice KJ, Cornblath DR, and Engel AG: Congenital end-plate acetylcholinesterase deficiency caused by a nonsense mutation and an A-->G splice-donor-site mutation at position +3 of the collagenlike-tail-subunit gene (COLQ): how does G at position +3 result in aberrant splicing? *Am J Hum Genet* **65**: 635-644, 1999
- 14) Kimbell LM, Ohno K, Engel AG, and Rotundo RL: C-terminal and heparin-binding domains of collagenic tail subunit are both essential for anchoring acetylcholinesterase at the synapse. *J Biol Chem* **279**: 10997-11005, 2004

- 15) Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Harper CM, Bajzer Z, et al.: Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2017-2022, 2001
- 16) Hesselmans LF, Jennekens FG, Van den Oord CJ, Veldman H, and Vincent A: Development of innervation of skeletal muscle fibers in man: relation to acetylcholine receptors. *Anat Rec* **236**: 553-562, 1993
- 17) Morgan NV, Brueton LA, Cox P, Grealley MT, Tolmie J, et al.: Mutations in the embryonal subunit of the acetylcholine receptor (CHRNG) cause lethal and Escobar variants of multiple pterygium syndrome. *Am J Hum Genet* **79**: 390-395, 2006
- 18) Hoffmann K, Muller JS, Stricker S, Megarbane A, Rajab A, et al.: Escobar syndrome is a prenatal myasthenia caused by disruption of the acetylcholine receptor fetal gamma subunit. *Am J Hum Genet* **79**: 303-312, 2006
- 19) Michalk A, Stricker S, Becker J, Rupps R, Pantzar T, et al.: Acetylcholine receptor pathway mutations explain various fetal akinesia deformation sequence disorders. *Am J Hum Genet* **82**: 464-476, 2008
- 20) Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, and Yamada Y: Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* **23**: 354-358, 1999
- 21) Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, and Yamada Y: Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci* **5**: 119-123, 2002
- 22) Li Y, Pawlik B, Elcioglu N, Aglan M, Kayserili H, et al.: LRP4 mutations alter Wnt/beta-catenin signaling and cause limb and kidney malformations in Cenani-Lenz syndrome. *Am J Hum Genet* **86**: 696-706, 2010
- 23) Johnson EB, Hammer RE, and Herz J: Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in *Megf7*-deficient mice. *Hum Mol Genet* **14**: 3523-3538, 2005
- 24) Farrugia ME, and Vincent A: Autoimmune mediated neuromuscular junction defects. *Curr Opin Neurol* **23**: 489-495, 2010
- 25) Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, et al.: Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* **7**: 365-368, 2001
- 26) Cole RN, Reddel SW, Gervasio OL, and Phillips WD: Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction. *Ann Neurol* **63**: 782-789, 2008
- 27) Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, and Yamanashi Y: Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol* **69**: 418-422, 2011
- 28) Giraud M, Taubert R, Vandiedonck C, Ke X, Levi-Strauss M, et al.: An IRF8-binding promoter variant and AIRE control *CHRNA1* promiscuous expression in thymus. *Nature* **448**: 934-937, 2007
- 29) Shillito P, Molenaar PC, Vincent A, Leys K, Zheng W, et al.: Acquired neuromyotonia: evidence for autoantibodies directed against K<sup>+</sup> channels of peripheral nerves. *Ann Neurol* **38**: 714-722, 1995
- 30) Cai Y, Cronin CN, Engel AG, Ohno K, Hersh LB, et al.: Choline acetyltransferase structure reveals distribution of mutations that cause motor disorders. *EMBO J* **23**: 2047-2058, 2004

- 31) Ohno K, Engel AG, Brengman JM, Shen X-M, Heidenrich FR, et al.: The spectrum of mutations causing endplate acetylcholinesterase deficiency. *Ann Neurol* **47**: 162-170, 2000
- 32) Bestue-Cardiel M, Saenz de Cabezón-Alvarez A, Capablo-Liesa JL, Lopez-Pison J, Pena-Segura JL, et al.: Congenital endplate acetylcholinesterase deficiency responsive to ephedrine. *Neurology* **65**: 144-146, 2005
- 33) Mihaylova V, Muller JS, Vilchez JJ, Salih MA, Kabiraj MM, et al.: Clinical and molecular genetic findings in COLQ-mutant congenital myasthenic syndromes. *Brain* **131**: 747-759, 2008
- 34) Sieb JP, and Engel AG: Ephedrine: effects on neuromuscular transmission. *Brain Res* **623**: 167-171, 1993
- 35) Milone M, and Engel AG: Block of the endplate acetylcholine receptor channel by the sympathomimetic agents ephedrine, pseudoephedrine, and albuterol. *Brain Res* **740**: 346-352, 1996
- 36) Fukudome T, Ohno K, Brengman JM, and Engel AG: Quinidine normalizes the open duration of slow-channel mutants of the acetylcholine receptor. *Neuroreport* **9**: 1907-1911, 1998
- 37) Harper CM, Fukudome T, and Engel AG: Treatment of slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine. *Neurology* **60**: 1710-1713, 2003
- 38) Ohno K, Wang H-L, Milone M, Bren N, Brengman JM, et al.: Congenital myasthenic syndrome caused by decreased agonist binding affinity due to a mutation in the acetylcholine receptor epsilon subunit. *Neuron* **17**: 157-170, 1996
- 39) Milone M, Wang H-L, Ohno K, Prince R, Fukudome T, et al.: Mode switching kinetics produced by a naturally occurring mutation in the cytoplasmic loop of the human acetylcholine receptor epsilon subunit. *Neuron* **20**: 575-588, 1998
- 40) Wang H-L, Milone M, Ohno K, Shen X-M, Tsujino A, et al.: Acetylcholine receptor M3 domain: stereochemical and volume contributions to channel gating. *Nat Neurosci* **2**: 226-233, 1999
- 41) Shen X-M, Ohno K, Sine SM, and Engel AG: Subunit-specific contribution to agonist binding and channel gating revealed by inherited mutation in muscle acetylcholine receptor M3-M4 linker. *Brain* **128**: 345-355, 2005
- 42) Shen XM, Fukuda T, Ohno K, Sine SM, and Engel AG: Congenital myasthenia-related AChR delta subunit mutation interferes with intersubunit communication essential for channel gating. *J Clin Invest* **118**: 1867-1876, 2008
- 43) Ohno K, Quiram PA, Milone M, Wang H-L, Harper MC, et al.: Congenital myasthenic syndromes due to heteroallelic nonsense/missense mutations in the acetylcholine receptor epsilon subunit gene: identification and functional characterization of six new mutations. *Hum Mol Genet* **6**: 753-766, 1997
- 44) Ohno K, Anlar B, Özdirim E, Brengman JM, DeBleecker JL, et al.: Myasthenic syndromes in Turkish kinships due to mutations in the acetylcholine receptor. *Ann Neurol* **44**: 234-241, 1998
- 45) Ohno K, and Engel AG: Congenital myasthenic syndromes: Genetic defects of the neuromuscular junction. *Curr Neurol Neurosci Rep* **2**: 78-88, 2002
- 46) Ohno K, Sadeh M, Blatt I, Brengman JM, and Engel AG: E-box mutations in the *RAPSN* promoter region in eight cases with congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* **12**: 739-748, 2003

- 47) Ohno K, and Engel AG: Lack of founder haplotype for the rapsyn N88K mutation: N88K is an ancient founder mutation or arises from multiple founders. *J Med Genet* **41**: e8, 2004
- 48) Raja Rayan DL, and Hanna MG: Skeletal muscle channelopathies: nondystrophic myotonias and periodic paralysis. *Curr Opin Neurol* **23**: 466-476, 2010
- 49) Struyk AF, Scoggan KA, Bulman DE, and Cannon SC: The human skeletal muscle Na channel mutation R669H associated with hypokalemic periodic paralysis enhances slow inactivation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**: 8610-8617, 2000