

201128079A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

筋チャンネル病および関連疾患の診断・治療指針作成
および新規治療法開発に向けた基盤整備のための研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 正紀

平成24（2012）年 3月

目 次

I : 総括研究報告書	
「筋チャンネル病および関連疾患の診断・治療指針作成および新規治療法開発に向けた基盤整備のための研究」	1
研究代表者：高橋 正紀 大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学 助教	
II : 分担研究報告書	
1. 「筋チャンネル病の遺伝子解析および病態解析」	14
高橋 正紀 大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学 助教	
2. 「骨格筋チャンネル病の遺伝子解析」	20
佐々木良元 三重大学医学部附属病院神経内科 助教	
3. 「骨格筋 Na チャネロパチーの筋電図所見」	23
木下 正信 首都大学東京 健康福祉学部 教授	
4. 「筋強直性ジストロフィー脳スプライシング異常に関する研究」	30
木村 卓 兵庫医科大学 内科学（神経・脳卒中科） 講師	
5. 「筋強直性ジストロフィーにおけるミスプライシングの制御」	34
石浦 章一 東京大学大学院総合文化研究科 教授	
6. 「本邦における DM2 調査研究」	37
松浦 徹 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学 准教授	
7. 「筋強直性ジストロフィー新規治療法の開発」	39
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	
8. 「イオンチャンネルと神経細胞のオートファジー制御機構」	43
荒木 敏之 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 部長	
9. 「筋強直性ジストロフィー簡易スクリーニング法作成に関する研究」	48
松村 剛 国立病院機構刀根山病院 神経内科医長	
10. 「筋強直性ジストロフィーにおける心電図異常」	50
尾方 克久 国立病院機構東埼玉病院 臨床研究部長	
(資料) 平成23年度 患者講演会	53
(資料) 平成23年度 班員会議・ワークショップ	54
III : 研究成果の刊行に関する一覧表	55
IV : 研究成果の刊行物・別刷	62

「筋チャンネル病および関連疾患の診断・治療指針作成および新規治療法
開発に向けた基盤整備のための研究」

研究代表者： 高橋 正紀 大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学 助教

研究要旨： 一次性チャンネル病について遺伝子診断を精力的に行い、いくつかの新規変異を含む異常を確定した。診断に有用な針筋電図所見を明らかにするとともに、原因遺伝子推定のためのフローチャートの妥当性を検証した。未報告の新規変異ではチャンネル機能の解析を行い、病態との関連を明らかにした。さらに既知の遺伝子に異常のない症例について次世代シーケンサーによる解析を施行し、周期性四肢麻痺の新たな原因遺伝子の候補を見出した。

二次性チャンネル病である筋強直性ジストロフィー(DM)の治療の前提となる病態解明として、骨格筋および脳心筋において病態と密接に関係する可能性が期待されるスプライシング異常をあらたに発見した。スプライシングあるいは CELF 安定化を指標に、低分子化合物のスクリーニングを *in vitro* で行い、候補化合物を見出した。また患者由来 iPS 細胞の樹立に着手した。いっぽう患者の早期発見の観点から、初発症状・初診時主訴を分析するとともに、一般臨床医が使える本症のスクリーニング法の開発を行った。臨床データベースを拡充し、運用継続した。欧米では数割を占めるにもかかわらず本邦では 1 家系しか同定されていなかった DM2 について、あらたに 2 家系を同定した。細胞内イオン環境の恒常性と疾患に関する基礎研究も推進した。

班のホームページ、患者講演会などを通じて疾患に関する情報発信に努めた。また、関連疾患の奨励研究班、心臓のチャンネル病研究者、患者と積極的に意見・情報交換を行った。

分担研究者

石浦 章一	東京大学大学院 総合文化研究科 教授	尾方 克久	国立病院機構東埼玉病院 臨床研究部長
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	佐々木 良元	三重大学医学部附属病院 神経内科 助教
木下 正信	首都大学東京 健康福祉学部 教授	木村 卓	兵庫医科大学 内科学(神経・脳卒中科) 講師
松浦 徹	岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経内科学 准教授	荒木 敏之	国立精神・神経医療研究センター 疾病研究第 5 部長
松村 剛	国立病院機構刀根山病院 神経内科医長	川井 充	国立病院機構東埼玉病院 院長

田村 拓久 国立病院機構東埼玉病院
神経疾患部門部長
鈴木 幹也 国立病院機構東埼玉病院
神経内科医長
岩橋 博見 大阪大学大学院医学系研究科
内分泌・代謝内科学・助教
久保田 智哉 大阪大学医学部附属病院
神経内科・脳卒中科 医員
穀内 洋介 大阪大学医学部附属病院
神経内科・脳卒中科 医員

A. 研究目的

骨格筋の電氣的興奮・収縮などに不可欠なイオンチャネルの遺伝子異常が周期性四肢麻痺、ミオトニーなどの疾患の原因となることが判明した。これらは「チャネル病」と総称される疾患に含まれる。これら骨格筋チャネル病は良性疾患と考えられているが、実際には、疾患として気づかれていない軽症例から、筋萎縮・筋力低下を呈する重症例まである。専門医であっても経験は少なく、診断・治療などに困難を伴うことが多い。我々は平成 21 年度厚生労働科学研究「本邦における筋チャネル病の実態に関する研究」で、臨床診断の問題点、遺伝子診断施行の少なさを明らかにした。一方欧米では、Consortium for Clinical Investigations of Neurological Channelopathies などの研究組織が発足し、体系的な研究体制が構築されつつある。我々は本邦の遺伝子診断施行例の多くを把握しており、それらを中心に解析し、臨床病型分類を確立し、電気生理学的診断の有用性について検討する。さらに臨床診断・電気生理学的診断のための指針を作成し、今後の臨床診断の向上、

遺伝子診断による確定につなげる。さらに次世代シーケンサーを用いて診断向上を図る。また、薬物治療効果についても検討し治療の標準化をめざす。

また、二次的チャネル病である筋強直性ジストロフィー(DM)については、病態にもとづく治療薬スクリーニングが行われ候補薬が同定されるに至っている。それら薬剤の有用性を、臨床家の有する患者組織・細胞などのリソースを用いて検討し、臨床応用につなげることを目的とする。動物モデルの治療研究を推進する。研究リソースのひとつとして患者由来の iPS 細胞の樹立を行う。実際の臨床応用には臨床情報が不可欠であり、患者データベースの原型ができたことから、発展拡充し本格運用を開始する。一般臨床家の本症に対する認識の問題が浮き彫りになったため、スクリーナーを作成する。また、欧米では数割を占めるにもかかわらず本邦で一家系しか同定されていない DM2 については、見逃されていると思われる患者の同定を行い、遺伝学的特徴を明らかにすることを旨とする。

B. 研究方法

一次筋チャネル病

1. 遺伝子解析・チャネル機能解析

臨床症状に応じ、*CACNA1S*、*SCN4A*、*KCNJ2*、*CLCN1* のうち可能性の高いものから解析を開始し、必要性に応じ全エクソンの塩基配列を決定した。

これまでに報告の無い変異が見出された場合、その変異が単なる多型であるのか、あるいは疾患関連性を有するかどうか、変異チャネルを培養細胞に発現させパッチクランプにより Na 電流の機能解析を行い、活性化、速い不活性化の

電位依存性などを正常型と比較した。

2. 診断・検査指針—診断確定例の検討

大阪大および三重大で遺伝子異常が確定した症例について、臨床データを匿名情報として共通フォームで抽出し検討した。そのうち電気生理学的所見が利用可能ものについて、針筋電図所見の特徴、Fournierらにより提唱されている原因遺伝子を推定するための電気生理検査フローチャートの有用性を検討した。

3. 次世代シーケンサーによる解析

低カリウム性周期性四肢麻痺については、海外に比較し遺伝子異常の同定できない割合が多いことから、本邦特有の原因遺伝子同定を試みるべく、5例の検体について次世代シーケンサーによるエクソームの網羅的解析を行った。

二次性チャネル病（筋強直性ジストロフィー）

1. DM2患者の同定

DM2の臨床症状などに関する情報提供を本研究班のホームページ上に掲載し、臨床医に対し情報発信を行った。臨床的にDM2を疑われた症例について、リピートのPCR解析、repeat-primed PCR法を用いてCCTG伸長変異の有無を検索した。

2. 臨床応用に向けた基盤整備

本症の自然歴の解明のひとつとしてデータベースについては引き続き症例の蓄積を行った。心電図異常について、東埼玉病院の患者について分析し、その特性を抽出した。非専門医が筋強直性ジストロフィーを一般診察室で簡便に診

断できるためのスクリーニング法の作成については、本症の特徴的症状や合併症を診察と問診によりチェックするスクリーニング表(問診21項目、診察18項目)を作成。初期研修医にこれを用いた診察を行ってもらい、感度・特異度を調査した。

新規治療法の開発

筋強直性ジストロフィー症患者サンプル

(脳・骨格筋・心筋)を用いた病態研究について mRNA スプライシング異常の解析を行った。エクソナレイをもちいた網羅的解析および標的候補についての個別解析を行った。

筋強直性ジストロフィー筋において異常なスプライシングの見られるSERCA1のミニジーンを培養細胞に発現させ、そのスプライシングに影響を与える化合物を400種の薬物から調べた。

また、過剰なリン酸化により安定化することが知られているCELF分子を不安定化する薬剤を既認可薬パネルから同定した。

さらに細胞内イオン環境の恒常性と疾患に関する基礎的研究も行った。近年細胞死の機構として注目されている、オートファジーの誘導機構へのNa⁺/H⁺交換担体の関与について、神経系培養細胞に発現させその影響を検討することにより検討した。

患者由来iPS細胞の樹立

手術あるいは生検時に採取した患者皮膚、筋組織由来の線維芽細胞を培養し、Sox2, Klf4, Oct3/4, c-mycを発現するレトロウイルスもしくはセンダイウイルスベクターを感染させ、iPS細胞を樹立することを試みた。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断・解析に関わる研究については大阪大学、三重大、DM2 遺伝子については名古屋大および岡山大の各倫理委員会で承認を得て、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針などを遵守し行った。診断確定例臨床調査研究については、大阪大、三重大、筋強直性ジストロフィー患者由来組織に関わる研究については大阪大、名古屋大、岡山大、患者由来 iPSC 細胞の樹立に関しては大阪大および国立精神・神経医療研究センター、筋強直性ジストロフィーを簡易スクリーニング法の作成については大阪大・国立病院機構刀根山病院・東埼玉病院、それぞれの倫理委員会の承認を得た。いずれも研究への参加は患者の自由意思に基づくこと、同意の撤回が自由にできること、連結可能匿名化を行うなど最大限の配慮をした。

動物実験については、大阪大・東京大・名古屋大の動物実験委員会の承認を受け、動物実験の指針に従い、動物愛護上の配慮を十分に行い実験した。国立精神・神経医療研究センターでの動物実験については厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針も順守した。

C. 研究結果

一次性筋チャンネル病

1. 遺伝子解析・チャンネル機能解析

全国から依頼のあった患者について、チャンネル病の遺伝子解析を行い、新規変異を含む遺伝子異常を同定した。

なかでも、重症筋無力症を合併した *SCN4A* 変異、麻痺数日後に高カリウム血症を呈した低カリウム性周期性四肢麻痺、Schwartz-Jampel 症候

群との鑑別が困難だった例などの稀有な症例で、これまでに報告のない新規変異を見出した。

2. 診断・検査指針—診断確定例の検討

骨格筋チャンネル病の電気生理検査所見について検討し、Fournier らにより提唱されている原因遺伝子を推定のためのフローチャートは、ある程度有用であるものの、合致しない例も少なからずあることが明らかとなった。いっぽう、針筋電図結果の波形が解析し得た Na チャンネルパッチでは、針筋電図にてミオトニア状態ではパイパーリズムという特異な筋電図所見を示すことが明らかになった。

3. 次世代シーケンサーによる解析

いくつかの検体においてイオンチャンネルの変異を複数同定した。どの変異が疾患と関連するのか検討が必要である。特に、不整脈の家族歴を伴う 1 例では、遺伝性不整脈の原因として近年報告された遺伝子に変異が見出された。周期性四肢麻痺との関連性はこれまで知られておらず、重要な知見である可能性がある。

二次性チャンネル病 (筋強直性ジストロフィー)

1. DM2 患者の同定

本研究班のホームページ上で臨床医に対し情報発信を行い、臨床的に DM2 を疑われた症例の、DM2 遺伝子解析を施行した。解析症例の中で 2 例の DM2 変異陽性例を新たに見出した。なお、この 2 例は、それぞれ異なる家系出身であった。

2. 臨床応用に向けた基盤整備

本症の自然歴の解明のひとつとしてデータベ

ースについては引き続き症例の蓄積を行った。患者の47%に、12誘導心電図で何らかの伝導障害が記録されていた。経時的な心電図所見の変化を今後検討する必要がある。

本症のスクリーニングのために、特徴的な症状・所見を整理した。診察項目以外の特徴的な症状、合併症、家族歴、検査所見などについて補助項目として列挙し、簡易スクリーニング法の方案を作成した。これをもとに、患者、健常者、疾患対照者を、非専門医8名と専門医1名が診察した。自覚的症状では筋のこわばり、口笛が吹けないなどが、理学所見では把握ミオトニア、手指筋力低下、下垂足などが感度・特異度が高い傾向が示された。

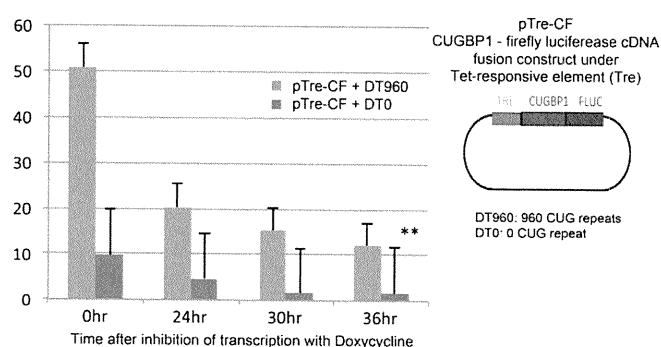
病態機序解明・治療法の探索

筋強直性ジストロフィーモデルマウス

(MBNL1、MBNL2ノックアウト)の脳をエクソソレイで網羅的にスプライシング解析した結果を患者脳で検証した。脳においてもMBNL1のノックアウトマウス脳と患者脳にみられる4種の新規スプライシング異常を見出した。特に脳ではMBNL2も重要な役割を果たしていることが判明した。また、心伝導障害に関与する可能性の高い心筋型Naチャンネルにもスプライス異常を見出した。

筋強直性ジストロフィー筋において異常なスプライシングの見られるSERCA1のミニジーンを培養細胞に発現させ、そのスプライシングに影響を与える化合物を400種の薬物から調べた。ホルボールエステルによる活性化とsiRNAによる阻害によって、PKC依存性リン酸化がスプライシングに関与していることが明らかになった。CELFの不安定化を起こす薬剤のスクリーニン

グのために、Tre下流にCELFとluciferaseのfusion geneを挿入した(pTre-CF)。960回CUG繰り返し配列を持つDT960と繰り返し配列を除去したDT0と同時にC2C12細胞に導入したところDT960はfusion gene productの発現量を上昇させていた(図)。Doxycyclineにて転写を止めた後の時系列解析にはDT960はCUGBP1の安定化させていることが示された。1020種類の既認可薬パネルを用いてfusion geneを不安定化する薬剤のスクリーニングを開始し、有効と思われる化合物を同定した。



細胞膜・細胞内膜系に存在するNa/H交換機構のなかで、特にNHE1、NHE5のいずれかもしくは両方が、細胞の栄養飢餓状態とは異なる新規のオートファジー活性化メカニズムに関与し、細胞内異常蛋白蓄積を制御している可能性を示した。

患者由来iPS細胞の樹立

大阪大学で手術時あるいは生検時に採取したDM1患者組織由来の線維芽細胞を、国立精神神経医療研究センターに送付し、iPS細胞の樹立に着手した。

iPS細胞が樹立出来たかどうか、増殖能・分化能、分子マーカーなどの発現などで解析を行う必要があるさらに筋細胞等への分化誘導後の細

胞の形態、分子機能などを調べることで、筋変性のメカニズムを明らかにするとともに、治療研究を行うことができることが期待される。

情報発信・研究協力

研究班のホームページなどを用い、積極的に情報発信を行った。また2011年10月には患者対象の講演会を主催し、患者連携も推進した。2012年1月22日にチャンネル病と関連する難治性疾患克服研究事業の奨励研究分野の二つの研究班（先天性筋無力症候群・大野班長、Schwartz-Jampel 症候群・平澤班長）と合同のワークショップを開催し意見交換をおこない、骨格筋と類似した心臓のチャンネル病について、堀江班とも情報交換した。

D. 考察

骨格筋のチャンネル病についての臨床診断、電気生理検査、遺伝子検索、治療についての共同研究体制の構築が遅れていた本邦でも、平成21年度厚生労働科学研究「本邦における筋チャンネル病の実態に関する研究」班の発足によりようやく研究実施体制が整備されるにいたった。同研究班の成果をふまえて組織された本研究班は、より幅広く基礎から臨床まで各方面の研究者を班員として網羅したのが特徴である。

本研究班では、診断確定のために積極的に遺伝子解析を行い、これまでに報告のない複数の変異を同定した。また、Naチャンネル病の診断に有用なパイパーリズムという針筋電図所見も明らかにすることができた。また、成書にもよく取り上げられる原因遺伝子を推定のためのフローチャートの問題点も指摘できた。これら成果を、筋チャンネル病の正確な臨床診断、適切な電

気生理検査、標準治療法の確立につなげるべく、診療指針原案を近日中に作成する予定である。また、症例を蓄積することで、将来的には遺伝子変異にもとづく個別化治療にもつながると考えられる。

また、二次性チャンネル病に関しては、病態解明のために、臨床医と基礎研究者が共同で、病態・治療に関する研究に取り組んでいく体制が形成されたことが特筆すべきである。病態解明の点では、本症の主要病態にかかわる分子異常について、患者検体を用いた研究で明らかにすることができた。さらに、低分子化合物のスクリーニング研究が進んでいる。今後の実際の臨床応用に向けて、臨床医と基礎研究者の共同作業が必要と予想される。

また、本症の早期発見という観点から、初発症状、初診時主訴の解析、一般臨床医が簡易に使用できるスクリーニング法の開発も行った。後方視的解析が示すように初発症状発症から初診までが長いので、適切な医学的管理導入のために的確に早期診断できるスクリーナー等の開発が有用と考える。地味ではあるが、本症の治療研究の推進を支えるために有用な研究である。本症の自然歴の解明のひとつとしてデータベースの運用を引き続き行った。今後 REMUDY との連携や Treat-NMD など国際データベースへの接続なども推進されよう。

今回の調査から、DM2は稀少疾患であると考えられるものの、本邦にも複数家系が存在する事が確認された。DM2の臨床症状の多様性、臨床診断の不十分さ・遺伝子診断施行率の低さがその診断を妨げている可能性があり、今後の課題である。欧米症例との臨床遺伝学的な比較検討が必要である。

種々の活動が班員間の共同で行われたことも特筆すべきであろう。また、低カリウム性周期性四肢麻痺については、海外に比較し遺伝子異常の同定できない割合が多いことから、本邦特有の原因遺伝子同定を試みるべく、次世代シーケンサーによる網羅的解析にも着手し未発表ながら一定の成果が得られた。これも遺伝情報学の専門家と臨床医とが共同できる本研究班の場があつてこそなしえる研究であろう。

E. 結論

本研究班は筋チャンネル病について、一次性に加え二次性のチャンネル病として筋強直性ジストロフィーも対象として、基礎から臨床まで各方面の研究者を班員として網羅し研究を進めた。遺伝子解析・チャンネル機能の生理学的解析・分子病態解析を精力的に推進し、成果をあげるとともに、トランスレーショナルリサーチのもととなる臨床研究も推進した。また、疾患に対する認識を向上させ、早期の発見・正確な診断につながるよう臨床研究および情報発信を積極的に行った。今後も、診断から治療までを向上させ、患者のADL・QOL向上につながるよう、いっそう共同研究の推進が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

(雑誌)

Yoshinaga H, Sakoda S, Good JM, Takahashi MP, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K,

Kitamura T, Kobayashi K, Ohtsuka Y. A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J Neurol Sci.* 印刷中

Hirano M, Kokunai Y, Nagai A, Nakamura Y, Saigoh K, Kusunoki S, Takahashi MP. A novel mutation in the calcium channel gene in a family with hypokalemic periodic paralysis. *J Neurol Sci.* 309(1-2):9-11, 2011.

Rau F, Freyermuth F, Fugier C, Villemin JP, Fischer MC, Jost B, Dembele D, Gourdon G, Nicole A, Duboc D, Wahbi K, Day JW, Fujimura H, Takahashi MP, Auboeuf D, Dreumont N, Furling D, Charlet-Berguerand N. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol.* 18(7):840-5, 2011.

Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, Tosch V, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Kokunai Y, Tsuburaya R, de la Grange P, Dembele D, Francois V, Precigout G, Boulade-Ladame C, Hummel MC, de Munain AL, Sergeant N, Laquerrière A, Thibault C, Deryckere F, Auboeuf D, Garcia L, Zimmermann P, Udd B, Schoser B, Takahashi MP, Nishino I, Bassez G, Laporte J, Furling D, Charlet-Berguerand N. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nature Medicine* 17(6):720-5, 2011.

- Kubota T, Roca X, Kimura T, Kokunai Y, Nishino I, Sakoda S, Krainer AR, and Takahashi MP. A mutation in a rare type of intron in a sodium-channel gene results in aberrant splicing and causes myotonia. *Human Mutation* 32:773-782, 2011.
- Yata K, Oikawa S, Sasaki R, Shindo A, Yang R, Murata M, Kanamaru K, Tomimoto H. Astrocytic neuroprotection through induction of cytoprotective molecules; a proteomic analysis of mutant P301S tau-transgenic mouse. *Brain Res.* 1410:12-23, 2011
- Tomiyama H, Yoshino H, Ogaki K, Li L, Yamashita C, Li Y, Funayama M, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Hattori N. PLA2G6 variant in Parkinson's disease. *J Hum Genet.* 56:401-3, 2011.
- Yonemura Y, Futai E, Yagishita S, Suo S, Tomita T, Iwatsubo T. & Ishiura S. Comparison of presenilin 1 and presenilin 2 gamma-secretase activities using a yeast reconstitution system *J.Biol.Chem.* 286: 44569-75, 2011.
- Sato K., Tanabe C, Yonemura Y, Watahiki H, Zhao Y, Yagishita S, Ebina M, Suo S, Futai E, Murata M, & Ishiura S. Localization of mature neprilysin in lipid rafts *J.Neurosci.Res.* 印刷中
- Ohsawa, N., Koebis, M., Suo, S., Nishino, I. & Ishiura, S. Alternative splicing of PDLIM3/ALP, for α -actinin -associated LIM protein 3, is aberrant in persons with myotonic dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 409, 64-69, 2011
- Koebis, M., Ohsawa, N., Kino, Y., Sasagawa, N., Nishino, I. & Ishiura, S. The alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1. *Genes to Cells*, 16, 961-972, 2011
- Kanno K, Ishiura S Differential effects of the HESR/HEY transcription factor family on dopamine transporter (DAT1) reporter gene expression via variable number of tandem repeats. *J. Neurosci. Res.* 89: 562-575, 2011.
- Asai M, Yagishita S., Iwata N., Saido TC, Ishiura S. & Maruyama K. An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model. *FASEB J.* 25: 3720-3730, 2011.
- Oguro A., Kubota H., Ishiura S., Shimizu M. & Atomi, Y. Protective role of the ubiquitin binding protein Tollip against the toxicity of polyglutamine -expansion proteins. *Neurosci.Lett.* 503: 234-239, 2011.
- #Kobayashi H, #Abe K, #Matsuura T (#equally contributed), Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Yang LW, Okuda H, Koizumi A. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes a type of spinocerebellar ataxia (SCA36) accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet* 89:121-130, 2011
- Ikeda Y, Nagai M, Kurata T, Yamashita T, Ohta Y, Nagotani S, Deguchi K, Takehisa Y, Shiro Y,

Matsuura T, Abe K. Comparisons of acoustic function in SCA31 and other forms of ataxias. *Neurol Res* 33:427-432 2011.

Matsuura T, Minami N, Arahata H, Ohno K, Abe K, Hayashi YK, Nishino I. Myotonic dystrophy type 2 (DM2) is rare in the Japanese population. *J Hum Genet* in press

Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Scientific Reports*. in press

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* 39: 4396-4404, 2011.

Itoh T, Hamada N, Terazawa R, Ito M, Ohno K, Ichihara M, Nozawa Y, Ito M. Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon gamma-induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 411:143-149, 2011.

Ito M, Ibi T, Sahashi K, Ichihara M, Ito M, Ohno K. Open-label trial and randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of hydrogen-enriched water for mitochondrial and inflammatory myopathies. *Medical Gas Research* 1:24, 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 GPATCH8. *Hum Genet* 130: 671-683, 2011.

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* 77:1819-1826, 2011.

Ohta S, Nakao A, and Ohno K.: The 2011 Medical Molecular Hydrogen Symposium: An Inaugural Symposium of the Journal Medical Gas Research. *Medical Gas Research* 2011, 1:10.

Araki T, Nagano S, Tateno M, Kaido M, Ogata K, Arima K. Misfolded SOD1 forms high-density molecular complexes with synaptic molecules in mutant SOD1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis cases. *J Neurol Sci*. in press

中森雅之 高橋正紀 筋強直性ジストロフィー—異常 RNA による病態機序と新たな治療法の探索 *BRAIN and NERVE* 63(11): 1161-1168, 2011.

松村剛、木村卓、穀内洋介、久保田智哉、高橋正紀、佐古田三郎 大阪府下筋強直性ジストロフィー患者の受療動向調査 *臨床神経学* 51: 677-682, 2011.

久保田智哉 佐々木良元 高橋正紀 骨格筋チ

チャンネル病—ミオトニー症候群と周期性四肢麻痺
— 神経内科 75(1): 65-74, 2011.

古戎道典、石浦章一 RNA 結合タンパク質が引き起こす筋強直性ジストロフィー 医学のあゆみ 238: 481-484, 2011.

計 29 件

(書籍)

Engel AG, Shen X-M, Ohno K, and Sine SM. Congenital myasthenic syndromes. Myasthenia gravis and myasthenic disorders 2nd ed. Ed. by Engel AG. Oxford University Press, New York, in press.

Ohno K, Ito M, and Engel AG. Congenital Myasthenic Syndromes - Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction - Myopathy. InTech Rijeka, 印刷中

Ohno K, Engel AG Molecular defects of acetylcholine receptor subunits in congenital myasthenic syndromes. Hugo R. Arias Pharmacology of Nicotinic Acetylcholine Receptors from the Basic and Therapeutic Perspectives. Research Signpost, Kerala, India, 2011, pp. 175-186.

計 3 件

2. 学会発表:

(国内学会)

シンポジウム講演

荒木敏之 NAD 代謝とミトコンドリアの機能変化による神経保護的疾患治療の可能性

2011 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ シナプス病態若手シンポジウム、2011 年 8 月 23 日 神戸

荒木敏之、徳永慎治 ミトコンドリアの機能変化による神経保護的疾患治療の可能性

第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 24 日 京都

計 2 件

一般演題

伊藤愛、佐々木良元、伊井裕一郎、富本秀和、島本亮、高尾仁二、中山茂穂、本村政勝。胸腺腫を合併した抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の 1 例。第 131 回日本神経学会東海北陸地方会 2011 年 12 月 7 日 富山

島田拓弥、佐々木良元、伊井裕一郎、谷口彰、富本秀和、上田有紀人。下位脳神経障害を呈した Churg-Strauss 症候群の 1 例。第 131 回日本神経学会東海北陸地方会、2011 年 12 月 7 日 富山

木下正信、穀内洋介、久保田智哉、高橋正紀、佐々木良元、大野欽司、廣瀬和彦 ナトリウムチャネロパチーの診断に有益な筋電図所見。第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月 名古屋

木下正信、穀内洋介、久保田智哉、高橋正紀、佐々木良元、大野欽司、廣瀬和彦 ナトリウムチャンネルパチーの筋電図所見 第41回日本臨床神経生理学会・学術大会 2011年11月11日 静岡

穀内洋介 中森雅之 木村卓 松村剛 藤村晴俊 佐古田三郎 高橋正紀 筋強直性ジストロフィー心筋におけるNaチャンネルのスプライシング異常 第52回日本神経学会学術大会 2011年5月 名古屋

穀内洋介 後藤啓五 久保田智哉 福岡敬晃 佐古田三郎 衣斐達 道勇学 佐橋功 高橋正紀 重症筋無力症(AChR-MG)を合併したNaチャンネルミオトニーの新規変異チャンネルの機能解析 第52回日本神経学会学術大会 2011年5月 名古屋

末永浩一、木村卓、Kuang-yung Lee、中森雅之、高橋正紀、松村剛、藤村晴俊、陣内研二、久保秀司、玉置(橋本)知子、Ares Jr M、Swanson M、芳川浩男 筋強直性ジストロフィー症における中枢神経スプライシング異常およびその分子機序の解明 第52回日本神経学会学術大会、2011年5月、名古屋

長野清一、荒木敏之、舘野美成子、階堂三砂子、尾方克久、有馬邦正 FALS患者検体から示唆される変異型SOD1毒性:シナプス構造緻密化の可能性 第56回日本人類遺伝学会 2011年11月10日 千葉

穀内洋介、久保田智哉、高橋正紀 ミオトニー症候群における反復刺激時の漸減現象のメカニズムについて—シミュレーションによる検討 第41回日本臨床神経生理学会・学術大会 2011年11月11日 静岡

高橋正紀、久保田智哉、穀内洋介、笠間周平、桐山敬生、佐々木良元、木下正信、後藤啓五、佐橋功 Naチャンネル異常症におけるexercise testの再評価 第41回日本臨床神経生理学会・学術大会 2011年11月11日 静岡

齋藤文典、荒木敏之 代謝型グルタミン酸受容体を介したシュワン細胞の増殖・分化制御機構 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日、横浜

若月修二、齋藤文典、荒木敏之 神経系におけるユビキチンリガーゼZNR1の機能解析 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日 横浜

高田仁実、荒木敏之 Overexpression of Sirt1 inhibits STZ-induced skeletal muscle atrophy. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月14日 横浜

富樫和也、荒木敏之 Na⁺/H⁺交換輸送体によるオートファンジーの調節 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月15日 横浜

Tokunaga S、Araki T. Wallerian degeneration slow mouse neurons are protected against cell death caused by mechanisms involving mitochondrial electron transport dysfunction. 第34回日本分子

生物学会年会 2011年12月16日 横浜

能重歩、高田真理子、鈴木幹也、谷田部可奈、
重山俊喜、本間豊、田中裕三、田村拓久、尾方克久、川井充 筋強直性ジストロフィーの初発
症状および初診時主訴. 第65回国立病院総合医
学会 2011年10月7日, 岡山

計 17件

(国際学会)

一般演題

K Charizanis, K-Y Lee, MM Scotti, G Xia, L Shiue,
MS Cline, M Ares Jr, T Kimura, MP Takahashi, H
Fujimura, K Jinnai, H Yoshikawa, MS Swanson,
Muscleblind-like 2 knockout mice: a model for
splicing alterations and neurological changes in the
DM brain. 8th International Myotonic Dystrophy
Consortium Meeting, Nov. 30 - Dec. 3, 2011, FL,
USA

T Kimura, K-Y Lee, K Suenaga, M Nakamori, Y
Tatsumi, MP Takahashi, H Fujimura, K Jinnai, H
Yoshikawa, H Du, M Ares, Jr., MS Swanson,
Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel
splicing defects in the myotonic dystrophy brain
8th International Myotonic Dystrophy Consortium
Meeting, Nov. 30 - Dec. 3, 2011, FL, USA

Kino Y, Washizu C, Kurowasa M, Oma. Y, Ishiura S,
Nukina N, Muscleblind proteins repress aberrant
protein expression derived from expanded repeats.
International Myotonic Dystrophy Consortium-8,
Clearwater, Florida USA, 11.30-12.3, 2011.

Koebis M, Kino Y, Sasagawa N, Nishino I, Ishiura S,
Mechanism of the aberrant splicing of the myomesin
1 gene in DM1. International Myotonic Dystrophy
Consortium-8, Clearwater, Florida USA, 11.30-12.3,
2011.

Oana K, Oma Y, Ishiura S, Identification of small
molecule modulators of aberrant splicing of CLCN1
in myotonic dystrophy. International Myotonic
Dystrophy Consortium-8, Clearwater, Florida USA,
11.30-12.3, 2011.

Ohsawa N, Koebis M, Ishiura S, Deletion of
Zasp-like motif of PDLIM-3/ALP is caused by
misregulated alternative splicing in DM muscle.
International Myotonic Dystrophy Consortium-8,
Clearwater, Florida USA, 11.30-12.3, 2011.

Zhao Y, Oana K, Ishiura S, PMA promotes SERCA1
normal splicing through PKC pathway. International
Myotonic Dystrophy Consortium-8, Clearwater,
Florida USA, 11.30-12.3, 2011.

Kokunai Y, Kino Y, Li M, Nakamori M, Itoh H,
Kimura T, Matsumura T, Fujimura H, Horie M,
Imoto K, Ishiura S, Swanson MS, Nukina N, Sakoda
S and Takahashi MP. Altered splicing of cardiac
sodium channel in heart muscles of myotonic
dystrophy type 1 8th International Myotonic
Dystrophy Consortium Meeting, Nov. 30 - Dec. 3,
2011, FL, USA

Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura

T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K. Protein-anchoring therapy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. 4th International Congress of Myology, Lille, France. May 9, 2011.

Masuda A, Ito M, Fujita Y, Ohno K. Genome-wide analysis of RNA-binding sites of HuR. 16th Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japan. Jun 14-18, 2011.

Ishihara N, Azuma Y, Yanagihara K, Yokoi S, Nakata T, Aso K, Ohno K, Natsume J. Glut1 deficiency syndrome with a SLC2A1 splice site mutation and normal erythrocyte glucose uptake. 12th International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada. Oct 11-15, 2011.

Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Hishida H, Mabuchi N, Engel AG, Ohno K. Anti-MuSK antibodies in myasthenia gravis block binding of collagen Q to MuSK expressed at the neuromuscular junction. 41st Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC, USA. Nov 15, 2011.

計 12件

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：

発明者：大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、三島健一、発明等の名称：「骨形成促進剤及びその用途」、特願 2011-185306 号)、出願年月日：2011年8月26日、出願人：国立大学法人名古屋大学、特許事務所番号：NU11005

“筋強直性ジストロフィー治療薬 (PCT/JP2010/06254 (WO) 出願人：国立大学法人名古屋大学 発明者：大野欽司、松浦徹 2010.7.16.

“筋強直性ジストロフィーにおけるスプライシング異常を補正する低分子化合物” (K20090047) 出願人：国立大学法人名古屋大学 発明者：大野欽司、松浦徹 2009.6.

2. 実用新案登録：

なし

3. その他：

なし

「筋チャネル病の遺伝子解析および病態解析」

分担研究者：高橋 正紀 大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学 助教

研究要旨：骨格筋チャネル病の診断指針の向上、検査指針の策定には、診断確定症例の精度の高い臨床情報・検査所見が不可欠である。診断未確定患者について積極的に遺伝子解析し変異同定を行い、その臨床情報・検査所見を収集した。あらたに見出された未報告の変異については、真の疾患変異であるかどうかを明白にし、病態を理解するため、チャネル機能の解析を行い、さらにコンピューターシミュレーションにより臨床症状との関連性を検討した。蓄積された症例の臨床情報を用い電気生理学的検査の限界を明らかにした。原因遺伝子変異の未同定割合の最も高い低カリウム性周期性四肢麻痺について、次世代シーケンサによる解析を開始した。また、新規変異のチャネル機能の解析は診断確定のみならず、病態解明、チャネルの分子機構解明にも有用であった。筋強直性ジストロフィーについては心伝導障害に関与し突然死の原因ともなりうる mRNA のスプライシング異常を同定できた。

A.研究目的

骨格筋の電氣的興奮・収縮などに不可欠なイオンチャネルの遺伝子異常が周期性四肢麻痺、ミオトニーなどの疾患の原因となることが判明した。これらは「チャネル病」と総称される疾患に含まれる。これら骨格筋チャネル病は、疾患として気づかれていない軽症例から、筋萎縮・筋力低下を呈する重症例までである。さらに、専門医であっても経験することが稀で、診断・治療などに困難を伴うことが多い。我々の 21 年度の調査から、遺伝子診断施行率が低く確定診断例が非常に少ないこと、臨床徴候（特にミオトニー症候群）に対する認識が低く見逃されている可能性のあることが浮き彫りになった。そこで、診断確定症例を増やし、臨床情報・電気生理検査所見情報を蓄積することにより、より精度の高い診断基準・検査指針の策定につなげることを目的とした。

そこで、診断未確定の骨格筋チャネル病患者について積極的に遺伝子解析を行うとともに、

精度の高い臨床情報・電気生理検査所見の蓄積を行った。さらに遺伝子解析のみでは、見出された変異が実際に疾患原因となっているかは判然としない。そこで、新規の *SCN4A* 変異については変異チャネルの電気生理学的機能解析、コンピューターシミュレーションなどを用いて、その病態の全貌を明らかにすることまでを目標とした。チャネル機能解析結果は臨床症状・電気生理検査所見を理解するうえで欠かせない基礎的情報でもある。

このようにして症例がある程度蓄積でき臨床情報が集まったことから、今年度はさらに、特に電気生理検査所見について、最近注目されている *exercise test* の有用性について再評価した。

また、既報告の原因遺伝子の検索で異常を認めない低カリウム性周期性四肢麻痺の症例が、多く認めることが判明したことから、班員である名古屋大学神経情報遺伝学の大野欽司教授の全面的な協力のもと、次世代シーケンサを用

いた候補遺伝子の探索を行うこととした。

さらに、二次性チャンネル病である筋強直性ジストロフィーについては、突然死が多いとされるが、心伝導障害の合併が多く、その一因と考えられている。異常伸長リピートを有する mRNA の存在が、MBNL や CELF といったスプライシング因子の量的変化を引き起こし、発生・分化過程に起こる種々の mRNA の選択的スプライシングに異常が生じていることが分かってきている。そこで患者心筋組織の RNA の解析を進め、心機能障害の病態を解明することも行うこととした。

B.研究方法

1. 遺伝子解析

文書にて説明のうえ、同意取得した後、患者リンパ球由来よりゲノム DNA を抽出した。臨床症状に応じ、以下の遺伝子の解析を行った。

まず、低カリウム性周期性四肢麻痺については *CACNA1S*、*SCN4A* の順に標的エクソンの解析を行い、変異未同定例では *KCNJ2* の全エクソンの解析を行った。高カリウム性周期性四肢麻痺あるいはミオトニー症候群については、症状あるいは *exercise test* などの神経生理検査結果より *SCN4A* あるいは *CLCN1* のうち可能性の高いと考えられる方から解析を開始し、必要性に応じ最終的に両者の全エクソンの塩基配列まで決定した。

2. 変異チャンネルの機能解析

遺伝子解析でこれまでに報告の無い変異が見出された場合、その変異が単なる多型であるのか、あるいは疾患関連性を有するかどうか、変異チャンネルを培養細胞に発現させ機能解析を行った。

具体的には、*mutagenesis* プライマーを用いて常法により変異 Na チャンネルの発現ベクターを作成、リン酸カルシウム法で HEK293t 細胞に発現させた。ホールセルクランプ法により Na 電

流の計測を行い、活性化、速い不活性化の電位依存性などを正常型と比較した。

ミオトニー症候群について、Cl チャンネル異常による先天性ミオトニーで反復刺激時の漸減現象が見られやすいとされるが、その理由は明らかでない。漸減現象の出現しやすさがチャンネル機能異常で説明できるかをシミュレーションを用いて検討する。Cannon が報告した細胞膜および T 管からなる筋線維の Hodgkin-Huxley モデルを、Visual Basic で記述した。実際の実験データから各チャンネルのゲーティングパラメーターを推定し、10Hz の脱分極刺激を与えた際の、動員可能な（不活化していない）Na チャンネルの割合などをシミュレートした。

3. 臨床電気生理検査所見の解析

骨格筋チャンネル異常症の原因遺伝子の推定のために *exercise test* が Fournier や有村により提唱・紹介されており、その有用性について Na チャンネル異常症に絞って検証した。原因遺伝子を確定した Na チャンネル異常症の 7 例 (R1448C 2 例、M1592V 2 例、V1293I 他 1 例ずつ計 3 例) について、*prolonged exercise test* および *short exercise test* の常温および冷却検査の結果を中心に臨床症状と所見と対比検討した。

4. 次世代シーケンサによる原因遺伝子探索

低カリウム性周期性四肢麻痺については、海外に比較し遺伝子異常の同定できない割合が多いことから、本邦特有の原因遺伝子同定を試みるべく、5 例の検体について次世代シーケンサーによるエクソームの網羅的解析を行った。

5. 筋強直性ジストロフィーの心病態の解析

心筋型ナトリウムチャンネル(NaV1.5)は、活動電位形成に関与し、その変異は QT 延長症候群、Brugada 症候群、洞不全症候群などの遺伝性不整脈の原因となることから、我々は NaV1.5 に存在する選択的スプライシングに注目し、患者

およびモデルマウスの心筋サンプルを使用し検討した。筋強直性ジストロフィー患者 4 例、疾患コントロール 5 例、正常コントロール 3 例の凍結剖検心筋より mRNA を抽出、cDNA を作成した。NaV1.5 スプライシング様式を PCR 後制限酵素切断、電気泳動にて検討し、正常群、疾患コントロール群と比較した。モデルマウスである MBNL ノックアウトマウスについても同様に検討した。

(倫理面への配慮)

患者の遺伝子に関わる研究、患者情報・組織を用いた研究については、それぞれ大阪大学ヒトゲノム研究審査委員会、大阪大学医学部・医学部附属病院の倫理委員会にて承認済みである。すべての患者から同意を文書にて得ている。研究への参加は患者の自由意思に基づくこと、同意の撤回が自由にできること、連結可能匿名化を行い個人情報保護に最大限の配慮をすることなど「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」などを遵守し行った。患者組織については、国立病院機構刀根山病院を介し、匿名化されたりサーチリソースネットワークのサンプルの供与を受けた。

C. 研究結果

1. 遺伝子解析

骨格筋チャンネル病疑いの 11 例の遺伝子解析に平成 23 年度着手した。その臨床診断の内訳は低カリウム性あるいは正カリウム性周期性四肢麻痺 5 例(5 家系)、ミオトニー症候群 5 例(3 家系)、その他 1 例であった。このうち、その他 1 例というのは特異な症状を呈したもので、現在解析中であるが、残り 10 例については解析が終了した。

周期性四肢麻痺 5 例のうち家族性のもの 2 例に *CACNA1S* の変異 p.R528H および p.R900G を見出したが、孤発例の 3 例には既知の遺伝子変異を見出せなかった。p.R900G 変異はこれまで

に知られていなかった変異であり国際誌に論文報告した、低カリウム性周期性四肢麻痺の病態にチャンネルの電位センサーの Arg(R)残基が重要な役割を果たすという仮説を補強するものであった。

ミオトニー症候群 5 例(3 家系)は先天性ミオトニーという臨床診断通り全例に *CLC1* 遺伝子の変異を見出した。すべて既報告の変異であった。なお、1 家系では両親に *CLC1* 遺伝子に別々の変異を認め、子のうち 1 名が compound heterozygote となり重症化していた例を経験した(2012 年度神経学会総会で発表の予定)。

なお、診断確定例についてはその臨床徴候・電気生理学的検査所見などを収集し、班員の首都大学東京の木下正信教授、三重大大学の佐々木良元博士との共同研究にも使用した。

2. 変異チャンネルの機能解析

AChR 受容体抗体陽性重症筋無力症に Na チャンネルミオトニーを合併した稀有な症例に、NaV1.4 新規変異チャンネル(G1292D)を同定したことから、その機能異常について電気生理学的検討を行なった。変異チャンネルをリン酸カルシウム法で培養細胞に発現させ、パッチクランプ法にて機能解析した

チャンネルの活性化の電位依存性が正常に比して変異チャンネルでは過分極側に有意にシフトしていた。いっぽう速い不活化については、電位依存性は有意には変化していなかったが、脱分極側領域でのチャンネル電流の減衰は遅延しており、軽度な異常を認めた。これらの変化は、筋細胞の興奮性を増大する方向に寄与することから、臨床症状を十分に説明しうるものであった。

漸減現象のコンピューターシミュレーションによる解析では、チャンネル機能が正常の場合には動員可能な Na チャンネルの割合の漸減がほとんど認められなかったが、Cl チャンネル異常をシミュレートした場合には常に認められた。Na チャンネル異常症ではチャンネル機能異常の違いによ

り、認める場合と認めない場合があった。Na あるいは Cl チャネルの機能異常によりミオトニー症候群における反復刺激時の漸減現象の生じやすさが説明できる可能性が示された。

3. 臨床電気生理検査所見の解析

short exercise test は、繰り返し(repeated)や冷却(cooling)を行うことで1回のみの場合より異常頻度は増加した。exercise test のパターンは既報告に比較的合致していたが、先天性パラミオトニーを呈した M1592V 変異など臨床症状が典型的でない症例で非合致例があった。骨格筋チャネル異常症における exercise test 有用性の普遍化には、より多数例でのデータ解析が必要と考えた。

4. 次世代シーケンサによる原因遺伝子探索

いくつかの検体においてイオンチャネルの変異を複数同定した。どの変異が疾患と関連するのか検討が必要である。特に、不整脈の家族歴を伴う1例では、QT 延長症候群の原因として近年報告された遺伝子に変異が見出された。周期性四肢麻痺との関連性はこれまで知られておらず、重要な知見である可能性がある。

5. 筋強直性ジストロフィーの心病態の解析

患者群にて NaV1.5 のスプライシング異常が認められたが、MBNL ノックアウトマウスでは同様の異常を認めなかった。この NaV1.5 スプライシング変異体はチャネル機能に異常をきたすことが既に明らかにされており、その機能解析結果を利用したシミュレーションを行った結果も、筋強直性ジストロフィーの心伝導障害の病態に関与している可能性を支持するものであった。

D. 考察

今年度のみで 11 例のチャネル病の遺伝子解析を行い、新規変異を含む遺伝子異常を同定し

た。全国にはまだまだまだ確定診断のできていない患者が存在することが予想される。今後、効率的な遺伝子解析、未知の変異・原因遺伝子の同定を行うことが求められる。

低カリウム性周期性四肢麻痺では欧米に比して既知の高頻度変異が認められる割合が低かったことから、班員である名古屋大学神経情報遺伝学の大野欽司教授と次世代シーケンサーによる骨格筋チャネル病の解析の試みを開始した。現在候補遺伝子の中から原因遺伝子の絞り込みを行っている。

また、新規変異の Na チャネルについては見出された変異が多型でなく、疾患の原因であり症状を説明しうるか、チャネルの機能解析、Hodgkin-Huxley モデルに基づくコンピューターシミュレーションまで行い、厳密に検証してきた。この姿勢は、遺伝子の解析のみに終わらず、チャネル病の病態解明には重要であるといえる。また、臨床的意義だけでなく、基礎研究では明らかにしえない、予想外の部位のイオンチャネルのタンパク機能も明らかにできる可能性がある。

これまでの研究で症例の臨床情報の蓄積がある程度得られたことから、臨床診断につながる電気生理学的検査の有用性について検討ができた。Fournier らにより提唱された exercise test は、成書にもそのまま掲載されているが、われわれの研究からその限界も明らかになった。今後も症例の蓄積による検証が必要である。

筋強直性ジストロフィー症は、症状は筋にとどまらず耐糖能障害、心伝導障害、高次機能障害など多彩な症状を示す全身疾患である。なかでも心伝導障害は、本症にしばしば認められる突然死の原因として重要であり、その分子機構の解明は患者予後改善に関係する治療につながる可能性がある。本症の患者心筋の mRNA の解析により、心筋型 Na チャネルの mRNA スプライシングの異常が明らかにされた。異常スプライシングの分子機構は残された課題であるが、

今後の治療の標的として重要な発見であるといえる。

E. 結論

本邦における骨格筋チャンネル病の遺伝子解析を積極的に行い、未報告の新規変異についてはチャンネル機能の解析まで行い疾患変異であることが確定した。診断未確定患者が多く存在することが想定されることから、今後はさらに効率的な遺伝子解析、イントロン領域も含めた解析が求められる。また、周期性四肢麻痺の次世代シーケンサーを用いた解析を開始でき、今後新規原因遺伝子の同定などの成果が期待される。チャンネル病の電気生理学的鑑別法には注意すべき点がある事などが明らかになった。筋強直性ジストロフィーに関しても、心病態の解明に向けて一歩進んだと言えよう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

Yoshinaga Y, Sakoda S-I, Good JM, Takahashi MP, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K, Kitamura T, Kobayashi K, Ohtsuka Y. A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J Neurol Sci.* in press

Hirano M, Kokunai Y, Nagai A, Nakamura Y, Saigoh K, Kusunoki S, Takahashi MP. A novel mutation in the calcium channel gene in a family with hypokalemic periodic paralysis. *J Neurol Sci.* 309(1-2):9-11, 2011.

Rau F, Freyermuth F, Fugier C, Villemin JP, Fischer MC, Jost B, Dembele D, Gourdon G, Nicole A, Duboc D, Wahbi K, Day JW, Fujimura H, Takahashi

MP, Auboeuf D, Dreumont N, Furling D, Charlet-Berguerand N. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol.* 18(7):840-5, 2011.

Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, Tosch V, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Kokunai Y, Tsuburaya R, de la Grange P, Dembele D, Francois V, Precigout G, Boulade-Ladame C, Hummel MC, de Munain AL, Sergeant N, Laquerrière A, Thibault C, Deryckere F, Auboeuf D, Garcia L, Zimmermann P, Udd B, Schoser B, Takahashi MP, Nishino I, Bassez G, Laporte J, Furling D, Charlet-Berguerand N. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nature Medicine* 17(6):720-5, 2011.

Kubota T, Roca X, Kimura T, Kokunai Y, Nishino I, Sakoda S, Krainer AR, and Takahashi MP. A mutation in a rare type of intron in a sodium-channel gene results in aberrant splicing and causes myotonia. *Human Mutation* 32(7):773-82, 2011.

中森雅之 高橋正紀 筋強直性ジストロフィー—異常 RNA による病態機序と新たな治療法の探索 *BRAIN and NERVE* 63(11): 1161-1168, 2011

松村剛、木村卓、穀内洋介、久保田智哉、高橋正紀、佐古田三郎 大阪府下筋強直性ジストロフィー患者の受療動向調査 *臨床神経学* 51: 677-682, 2011

久保田智哉 佐々木良元 高橋正紀 骨格筋チャンネル病—ミオトニー症候群と周期性四肢麻痺