

— 神経内科 75(1): 65-74 2011

2. 学会発表:

一般演題

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 チャネルミオトニーの新規変異チャネルの機能解析 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

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学会・学術大会 2011年11月11日 静岡

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筋電図所見 第41回日本臨床神経生理学学会・学術大会 2011年11月11日 静岡

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

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

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:

なし

2. 実用新案登録:

なし

3. その他:

なし

「骨格筋チャネル病の遺伝子解析」

分担研究者：佐々木良元 三重大学医学部附属病院 神経内科 助教

研究要旨：骨格筋チャネル病各病型の本邦における頻度、遺伝子異常と臨床症候の関連を明らかにするために、骨格筋チャネル病が疑われた症例の遺伝子解析を行った。2011年4月～11月の8ヶ月間に3症例の遺伝子解析を行い、1例で既知の遺伝子変異を認めた。

A. 研究目的

周期性四肢麻痺や非ジストロフィー性ミオトニー症候群は、骨格筋イオンチャネル遺伝子 (*SCN4A*, *CLCN1*, *CACNA1S*) 異常が原因であることが明らかにされており、「骨格筋チャネル病」と総称される。*SCN4A* 異常は、先天性パラミオトニー、ナトリウムチャネルミオトニー、高カリウム性または低カリウム性周期性四肢麻痺、*CLCN1* 異常は先天性ミオトニー、*CACNA1S* 異常は低カリウム性周期性四肢麻痺の原因である。

本研究の目的は、骨格筋チャネル病各病型の本邦における頻度、遺伝子異常と臨床症候の関連など、本邦の現状を把握し、診断・治療の向上に役立てることである。

B. 研究方法

三重大学神経内科のホームページに、骨格筋チャネル病の遺伝子診断の募集を掲載し、全国の病院から骨格筋チャネル病の遺伝子診断を受け入れる。骨格筋チャネル病と臨床診断された患者の末梢血白血球から DNA を抽出し、原因遺伝子の各エクソンの塩基配列を PCR 直接シーケンス法により決定（遺伝子診断）し、遺伝子異常と臨床症候の関連を検討する。

（倫理面への配慮）

骨格筋チャネル病の遺伝子解析は、三重大学倫理審査委員会で承認済みである。

C. 研究結果

2011年4月～11月の8ヶ月間に3症例の遺伝子診断依頼があった。3症例の内訳は、先天性パラミオトニー2例、正カリウム性周期性四肢麻痺1例であった。

症例1（臨床診断：先天性パラミオトニー）

38歳、女性。小学1,2年生の頃から、鉄棒から手を離しにくい、飲み込みにくい、顔面を含む全身の筋のこわばりが認められた。筋のこわばりは、寒冷、空腹、急に強い力を入れた時に出現しやすかった。兄と兄の子供に同症状が認められた。診察では、筋力は正常で、筋肥大や筋萎縮はなく、叩打性および把握ミオトニーが認められ、warm-up 現象は認められなかった。血液検査では、CKは58で正常、short exercise test では waxing、cooling test で CMAP 低下が認められた。高頻度反復刺激試験で振幅は増大した。針筋電図ではミオトニー放電が認められた。*SCN4A* 解析では、p.Gly1306Val 変異が認められた。

症例2（臨床診断：先天性パラミオトニー）

13歳、女性。運動発達の遅れなし。幼少期から転びやすい、運動は苦手な疲れやすい、肩がこりやすい、筋肉痛が起こりやすいという症状

が認められた。これらの症状は、運動や寒冷で悪化した。同様の症状を持つ患者が、父方4世代にわたりみられ、常染色体優性遺伝を示唆する家族歴が認められた。診察では、筋力正常で、ふくらはぎの筋肥大が認められた。把握ミオトニーは認められなかったが、叩打性ミオトニーが認められた。CKは119と正常、針筋電図ではミオトニー放電は認められなかった。SCN4AとCLCN1解析では、すべてのエクソンに変異は認められなかった。

症例3（臨床診断：正カリウム性周期性四肢麻痺）

21歳、女性。7歳時に下肢脱力のため、自転車乗車中に転倒したことがあった。11歳頃から、30分ほど歩行すると左足、右足の順にしびれ感が出現し歩行できなることに気付いた。5-10分ほど休むと症状は改善した。母親に同症状が認められた。診察では、筋力正常で、叩打性および把握ミオトニーは認められなかった。発作時のCK, Kは正常で、筋電図ではミオトニー放電は認められなかった。CACNA1Sのエクソン4, 11, 21, 30とSCN4Aのエクソン5, 12, 13, 18, 21, 22, 23, 24に変異は認められなかった。

D. 考察

骨格筋チャンネル病が疑われた3症例で遺伝子解析を行い、先天性パラミオトニー1例で既知のp.Gly1306Val変異が認められたが、他の2例には変異が認められなかった。ただし、イントロンに変異がある可能性は否定できなかった。

遺伝子変異が認められた症例は、臨床症候、電気生理所見ともに典型的であった。遺伝子変異が認められなかった2例については、本研究班による診断基準と照らし合わせると、症例2では、針筋電図でミオトニー放電が認められなかった点が、症例3では、運動によって症状が誘発された点、感覚障害を伴っていた点、針筋電図でミオトニー放電が認められなかった点が

非典型的であった。さらに、症例2と3では、針筋電図以外の電気生理検査は施行されていない。症例2と3の診断は不明であるが、筋チャンネル病と鑑別すべき疾患がいくつかあると考えられた。

本年度は、遺伝子解析数が3症例と少なかったが、現在、2症例を解析中であり、今後、症例数が増えれば、骨格筋チャンネル病の本邦の現状を把握できることが期待される。

E. 結論

2011年4月から骨格筋チャンネル病の遺伝子解析を開始した。8ヶ月間で、3症例を解析し、1例で遺伝子変異を認めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

Astrocytic neuroprotection through induction of cytoprotective molecules; a proteomic analysis of mutant P301S tau-transgenic mouse. Yata K, Oikawa S, Sasaki R, Shindo A, Yang R, Murata M, Kanamaru K, Tomimoto H. Brain Res. 2011; 1410:12-23

PLA2G6 variant in Parkinson's disease. Tomiyama H, Yoshino H, Ogaki K, Li L, Yamashita C, Li Y, Funayama M, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Hattori N. J Hum Genet. 2011;56:401-3

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— 神経内科 75(1): 65-74 2011

2. 学会発表：

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

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：

なし

2. 実用新案登録：

なし

3. その他：

なし

「骨格筋 Na チャネロパチーの筋電図所見」

分担研究者： 木下正信 首都大学東京 健康福祉学部 教授

研究要旨：ナトリウム (Na) チャネロパチーの potassium-aggravated myotonia (PAM) 2 例および paramyotonia congenita (PMC) 3 例で通常の方法で針筋電図を施行した。PAM 例でも PMC 例でも、同様に非ミオトニア状態ではミオトニア放電を認め、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り、診断の糸口になることが考えられた。

A. 研究目的

ミオトニアは臨床的には muscle relaxation の遅延や困難さで定義されるが、myotonic dystrophy type 1 (DM1)、type 2 (DM2)のみならず Na チャネロパチーや Cl チャネロパチー (Thomsen 病、Becker 病)でも認められる¹⁾。Na チャネロパチーは voltage-gated sodium channel gene (Nav1.4)の異常に起因し、paramyotonia congenita (PMC)、potassium-aggravated myotonia (PAM)、hyperkalemic periodic paralysis (Hyper PP)、hypokalemic periodic paralysis (Hypo PP) type 2 および Hyperkalemic paralysis and paramyotonia に大別される¹⁾。

これらの疾病の中で PMC は寒冷暴露に伴う muscle stiffness や spasms とその後の筋脱力を特徴としている¹⁾。一方、PAM の臨床像は運動開始を契機にもしくはカリウム摂取により muscle stiffness や spasms の増悪を有することが特徴であり、その臨床像は軽症例から重症例まで幅が広い¹⁾。さらに、その臨床像は PMC, Thomsen 病と類似している場合もあり、臨床的にも電気生理学的にも鑑別が難しい場合がある¹⁾。このような Na チャネロパチー、とくに PAM や PMC は本邦において極めて報告が

少ないことから診断に苦慮するケースが多い。このような実情を踏まえて、PAM および PMC の臨床診断および病態にとって有益な手法の開発が不可欠であり針筋電図 (EMG) による解析を行った。

B. 研究方法

臨床症状および遺伝子検索の結果、臨床診断が確定されている Na チャネル病の PMC 3 例と PAM 2 例において、非ミオトニア時とミオトニア時の針筋電図を施行した。

我々は、果物（カリウム）摂取時、運動開始時および寒冷時に painful spasm を 4 世代にわたって有する 1 家系（図 1）を経験した。この家系は以前、Thomsen 病の 1 家系として報告されたが²⁾、臨床症状および遺伝子解析から Q1633E という遺伝子変異を有する PAM と診断できた³⁾。この家系の IV - 1 のミオトニア時、IV-2 の非ミオトニア時と寒冷暴露によるミオトニア時の EMG を施行した。さらに、寒冷暴露によりミオトニアを示す PMC 3 症例 (Thr1313Met⁴⁾、Arg1448Cys および SCN4A 遺伝子のイントロン 21 の部位に欠失 / 挿入⁵⁾において、室温時の

非ミオトニア時と寒冷ミオトニア時の EMG を施行した。

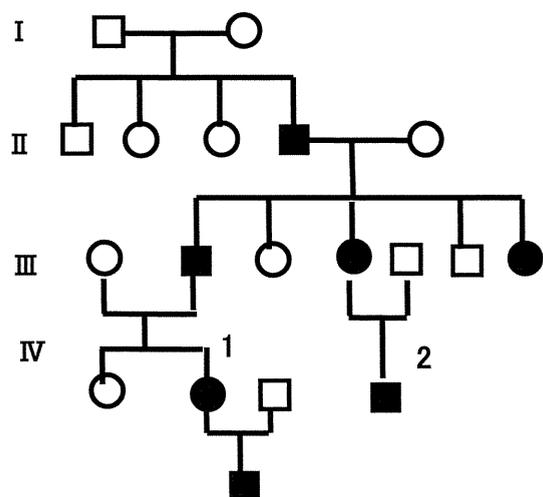


図1 Q1633E in skeletal muscle sodium channels in a Japanese family with PAM

(倫理面への配慮)

研究対象者に対して、人権擁護上の配慮を行い、研究対象者に対する不利益が及ばないこと、EMG を施行する際の危険性を排除していることを口頭および書面にて説明し、文書にて本研究への参加の同意をとって行った。

C. 研究結果

Naチャンネル病であるPAMのIV-1の症例では、左橈側手根伸筋で最大収縮時のEMG所見では針を刺入するとほぼ同時にもいわゆる持続性放電が観察された(図2)。このEMG activityは synchronous かつ rhythmic で regular pattern を示し、時に sign curve 様の electrical wave を有した(図2)。この activity の frequency は 55.6-83.3 Hz で、振幅は 2-6 mV 以上を示し、needle displacement によってEMG activity は outburst する(図2中段)。しかし、needle electrode を同じ位置に維持すると振幅は減衰するが electrical silence は認めなかった(図3)。この activity の frequency と振幅の modulation により car engine を吹かす時に喩えられる様な特徴的な sound を

有したが、classical myotonia のような waxing および waning を認めなかった⁶⁾(図2)。

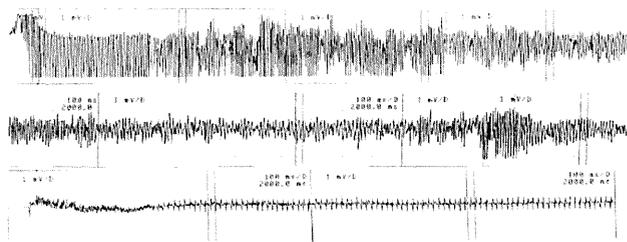


図2 PAM 症例(IV-1)の最大収縮時のミオトニア時のEMG

上段と中段の升目は 100ms、1mV で下段は 100ms、200 μ V である。上段から中断にかけて、刺入時とほぼ同時にいわゆる連続性放電を認め徐々に振幅は減衰していく。最終的には、下段に示すような fibrillation like potential を認めた。

このEMG activityは、健常人での最大収縮時や里吉病の spasm 中に観察されるパイパーリズム^{7), 8)}に類似していた。EMG の記録中 motor unit potentials (MUPs)はほとんど検出できなかった(図3)。

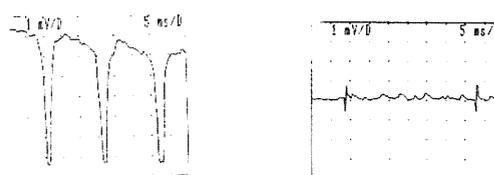


図3 図2のEMG波形の再解析

左側の升目は 5 ms、1 mV で右側は 5 ms、200 μ V である。左側は図3の連続性放電部の波形であり MUPs を認めない。右側は図3の fibrillation like potential の波形である。

このEMG activityは最終的に fibrillation like potential を示し(図2)、その potential の frequency は 29.4 もしくは 29.6 Hz、振幅 260 もしくは 280 μ V、interpotential interval は 33.5-34.0 ms で持続時間は少なくとも 2 mV 以上であった(図2)。

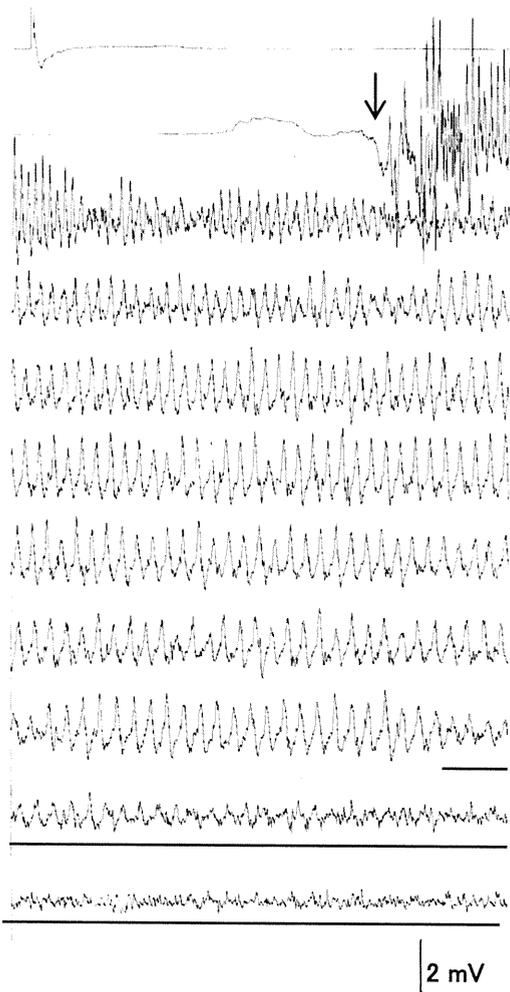


図4 PAM 症例 (IV-2) の図3の EMG 波形

升目は 50 ms、2 mV である。at rest では矢印 (↓) の部分まで electrical silence の状況を示したが、矢印 (↓) 以降はミオトニア状態 (painful spasm) で needle displacement を契機に連続性放電を認め、徐々に振幅は減衰した。

IV-2 の PAM 症例では、左上腕二頭筋 (BB) で安静時の非ミオトニアと寒冷暴露により出現した painful spasm の状態 (ミオトニア) で EMG を施行した。非ミオトニア時はミオトニア放電を認め、ミオトニア時は症例 IV-1 と同様にパイパーリズム様の EMG activity が観察された (図 4)。この EMG activity は、painful spasm のため voluntary effort が困難となり rigid state の状況で MUPs の影響がない状況の中で、矢印 (↓) のよ

うに needle displacement により誘発された (図 4)。needle electrode を同じ位置に維持すると、この EMG activity の frequency も amplitude は多少変動したが amplitude は徐々に減衰し、painful spasms を自覚しなくなった (下線部) (図 4)。この EMG activity の frequency は 61.4-85.5 Hz で、amplitude は 2-8 mV を示し amplitude は減衰するが electrical silence は認めず、classical myotonia のような waxing and waning は認めなかった⁶⁾ (図 4)。

PMC 症例 1 (Thr1313Met) では、左 BB で室温時の非ミオトニア時にはミオトニア放電を認め (図 5)、寒冷暴露による painful spasm 時には、パイパーリズム様の synchronous EMG activity が needle displacement により誘発された (図 6)。この EMG activity は rhythmic で regular pattern を示し、時に sign curve 様の electrical wave を有し、この EMG activity の frequency は約 108-140 Hz で振幅は約 1.2-4.5 mV を示した (図 6)。

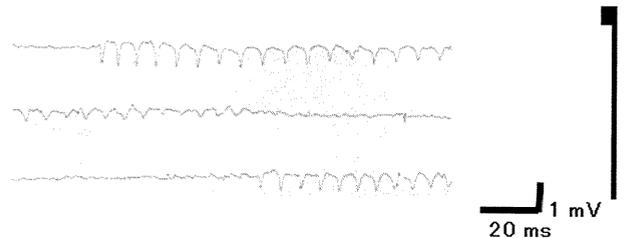


図5 PMC 症例 1 の非ミオトニア時の EMG

升目は 20 ms、1 mV である。at rest の状態で classical myotonic discharge が観察された。

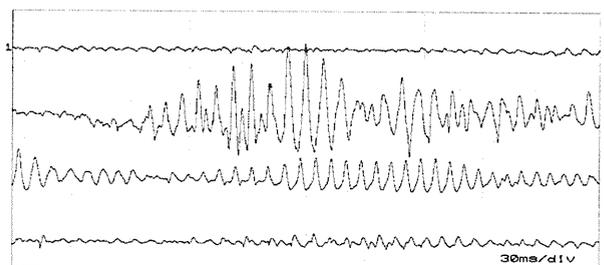


図6 PMC 症例 1 の寒冷ミオトニア時の EMG

升目は 30 ms、1 mV である。synchronous EMG activity を認め、時に sign curve 様を示す。徐々に振幅は減衰した。

PMC の症例 2 (Arg1448Cys) では、左尺側手根屈筋 (FCU) で室温時の非ミオトニア時にはミオトニア放電を認め (図 7)、寒冷暴露によるミオトニア時には、パイパーリズム様の synchronous EMG activity が needle displacement により誘発された (図 8)。この EMG activity が見かけ上は at rest に近い状況で needle displacement により誘発された。この EMG activity の frequency は、約 73.4-75.4 Hz で amplitude は 6.5 mV 以下を示した (図 8)。

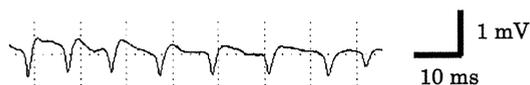


図 7 PMC 症例 2 の非ミオトニア時の EMG

升目は 10 ms、500 μ V である。at rest の状態で classical myotonic discharge が観察された。

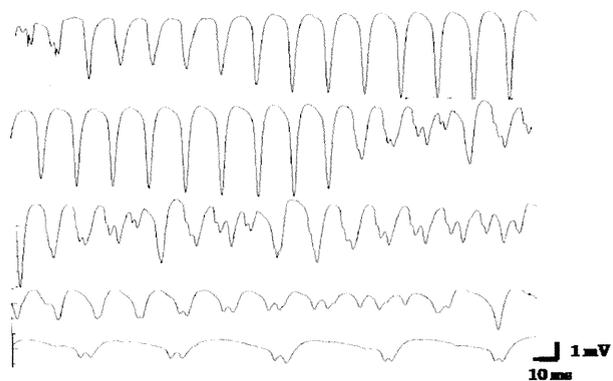


図 8 PMC 症例 2 の寒冷ミオトニア時の EMG

升目は 10 ms、1 mV である。synchronous EMG activity を認め、時に sign curve 様を示し、徐々に振幅は減衰した。

PMC の症例 3 (SCN4A 遺伝子のイントロン 21 の欠失 / 挿入) では、左 FCU で室温時の非ミオトニア時にはミオトニア放電を認め (図 9)、寒冷暴露によるミオトニア時には、パイパーリズム様の synchronous EMG activity が needle displacement により誘発された (図 10)。この EMG activity が見かけ上は at rest に近い状況で needle displacement により誘発された。この EMG activity の frequency は、約 82.8-103.4 Hz で amplitude は 5.3 mV 以下を示した (図 10)。

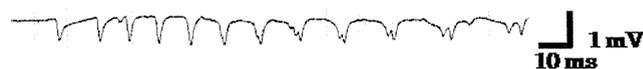


図 9 PMC 症例 3 の非ミオトニア時の EMG

升目は 10 ms、1 mV である。at rest の状態で classical myotonic discharge が観察された。

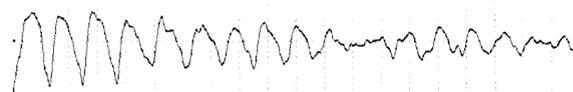
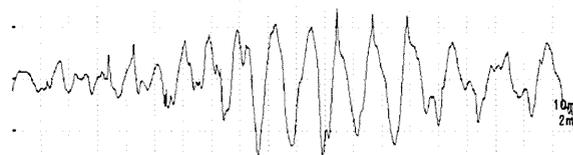


図 10 PMC 症例 3 の寒冷ミオトニア時の EMG

升目は 10 ms、2 mV である。synchronous EMG activity を認め、時に sign curve 様を示し、徐々に振幅は減衰した。

D. 考察

Na チャネルパチーは本邦において極めて報告が少ないためその診断に苦慮することが多く、臨床診断および病態にとって有益な手法の開発が不可欠である。本研究では、Na チャネルパチーの PAM および PMC の診断において、非ミオトニア時にはミオトニア放電が観察されミオトニア時には他の疾患ではほとんど観察されないパイパーリズムという特異な EMG 所見を示すことから Na チャネルパチーの診断に EMG が有益であることが明らかになった。

このミオトニア時のパイパーリズム様の EMG activity は、synchronous かつ rhythmic で regular pattern を示し、時に sign curve 様の electrical wave を示した⁷⁾。needle displacement によって、この EMG activity は増強するが、classical myotonia⁶⁾のような waxing and waning を認めず electrical silence も認めなかった。さら

に、EMG の記録中 MUPs はほとんど見られなかったことから、この EMG activity は Na チャネルの機能異常に伴う筋膜の異常な過興奮に起因することが考えられた。

この‘いわゆる持続性 EMG activity’⁵⁾は、classical myotonia⁶⁾や continuous muscle fiber activity at rest⁹⁾と鑑別が必要である。前者は、随意収縮後、針の刺入時もしくは叩打といった手法によって二相性もしくは陽性波のどちらかが高頻度に繰り返される放電が誘発され、放電頻度と振幅が waxing および waning を有し特有な音を示し、安静時には electrical silence を示すことが特徴であると定義されている⁶⁾。このような前者の定義から、今回観察されたパイパーリズム様の EMG activity と明らかに異なっている。

後者は、Issacs 症候群の EMG 所見として最初に強調されたが⁹⁾、その後、Stiff-person 症候群 (SPS) や Shwartz-Jampel 症候群 (SJS) でも報告され^{10), 11)}、neuromyotonic discharge と呼ばれている。これらの3つの症候群で見られる後者の activity は waxing および waning はなく⁹⁾⁻¹¹⁾、Issacs 症候群では針の動きや叩打によっての影響はほとんどないのに対し⁹⁾、SJS ではそれらによって増強するとされている¹¹⁾。MUPs は、Issacs 症候群では安静時には正常なものは見られないとされ⁹⁾、SPS では正常で¹⁰⁾、SJS では随意収縮時筋原性パターンを示すことが指摘されている¹¹⁾。さらに、今回観察されたパイパーリズム様の EMG の個々の activity の外観、frequency、振幅、synchronization、リズムおよび規則性が明らかに後者の activity と異なっている。

一方、パイパーリズム様の EMG は健常者の最大収縮時⁷⁾、里吉病⁸⁾および PAM の重症型の myotonia permanence で報告されている^{1), 12), 13)}。myotonia permanence の持続性 EMG activity は spontaneous に見られる点は我々の症例と異なるが、needle displacement によって EMG activity が増強したり、waxing および waning を認めず

electrical silence を示さないこと、さらに、MUPs がほとんど認められなかった点はほぼ一致している^{1), 3), 12), 13)}。これらの EMG activity の frequency は 50-80 Hz、振幅は 3 mV 以内の報告^{1), 12)}と frequency は 65 Hz、振幅は約 6.5 mV を示す報告があり¹³⁾、我々の PAM の症例の EMG activity と類似している³⁾。里吉病では、spasm 中にパイパーリズム様の EMG が観察され、needle displacement や叩打により増強し waxing および waning を認めない点は類似しているが、electrical silence を有する点で異なっている⁸⁾。さらに、その activity の frequency は 50 Hz、振幅は 4-5 mV である点も我々の PAM の症例の EMG activity と異なっている^{3), 8)}。さらに、健常者の最大収縮時に見られるパイパーリズムの frequency と振幅は、約 40-50 Hz、1-2 mV であり、我々の PAM の症例の EMG activity と異なっている^{3), 7)}。

このように PAM の中でも最も重症な myotonia permanence の症例や我々の PAM の症例もミオトニア時には、frequency が 50-80 Hz 前後、振幅 6 mV 程度のパイパーリズム様の EMG activity を示すことが明らかになった。一方、PMC では、その EMG activity の frequency は 100 Hz 以上で振幅は 4.5 mV 以下と PAM と異なる frequency を示した。いずれの病態でもパイパーリズム様の EMG activity の中には MUPs を認めないことから、Na チャネルの機能異常に伴う筋膜の異常な過興奮に起因することが推察され、脱分極の程度と frequency や振幅の関連についてのさらなる検討が必要である。しかし、PAM および PMC の非ミオトニア時に共通して見られたミオトニア放電も筋膜の異常を反映しているものと考えられ、この放電の集合もしくは fibrillation like potentials の集合したものがパイパーリズムを形成しているのかもしれない。このような筋電図波形の解析と Na チャネルopathy の遺伝子異常部位、Na チャネルの inactivation の障害程度および Na チャネルのパッチクラン

プによる脱分極の異常の程度の関連について今後の研究課題であると考えられる。

E. 結論

Na チャネロパチーの PAM や PMC では、針筋電図にて非ミオトニア状態ではミオトニア放電を認め、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り、診断の糸口になるとともに病態に深く関連していることが示唆された。

引用文献

1. Lehmann-Horn F, Rüdel R, Jurkat-Rott K. Nondystrophic myotonias and periodic paralyses. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. Myology, 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 2003: 1257-1300.
2. Maekawa K, Adachi T, Saito F, et al. One family of myotonia congenita. *Shonika Sinryou* 1970; 33: 1227-1232 (In Japanese, abstract not available).
3. Kubota, T, Kinoshita, M, Sasaki, R, et al. New mutation of the Na channel in the severe form of potassium-aggravated myotonia. *Muscle Nerve* 2009, 39: 666-673.
4. Kinoshita M, Sasaki R, Nagano T, et al. Thr 1313Met mutation in skeletal muscle sodium channels in a Japanese family with para- myotonia congenita. *Inter Med* 2003; 42: 856-861.
5. Kubota T, Roca X, Kimura T, et al. New mutation in a rare type of intron in a sodium-channel gene results in aberrant splicing and causes myotonia. *Hum Mut* 2011, 32:773-782.
6. Report of Sub-Committee of the Pavia Committee on Terminology on Electro-myography. *Bull. Amer. Ass. Electromyography Electrodiagnosis* 1967; 14: 34-36.
7. Piper H. Versuche über die Willkür- kontraktion. In Piper H, eds. *Elektrophysiologie menschlicher Muskeln*, ed. Berlin: Verlag von Julius Springer; 1912: 79-110.
8. Satoyoshi E, Yamada K. Recurrent muscle spasms of central origin. *Arch Neurol* 1967; 16: 254-264.
9. Isaacs H: A syndrome of continuous muscle-fiber activity. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1961; 61:319-325.
10. Olafson RA, Mulder DW, Howard FM. "Stiff-man" syndrome: A review of the literature, report of three additional cases and discussion of pathophysiology and therapy. *Mayo Clin* 1964; 39: 131-144.
11. Taylor RG, Layzer RB, Davis HS, et al. Continuous muscle fiber activity in the Schwartz-Jampel syndrome. *Electro-encephalogr Clin Neurophysiol* 1972, 33: 497-509.
12. Spaans F, Theunissen P, Reekers AD, et al. Schwartz-Jampel syndrome: I. Clinical, electromyographic, and histologic studies. *Muscle Nerve* 1990; 13: 516-527.
13. Colding-Jørgensen E, Duno M, and Vissing J. Autosomal dominant monosymptomatic myotonia permanens. *Neurology* 2006; 67: 153-155.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 :

なし

2. 学会発表 :

シンポジウム講演

なし

一般演題

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、平成 23 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 Na チャネロパチーの診断に有益な筋電図所見. 第 41 回日本臨床神経生理学会総会平成 23 年 11 月、静岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:

なし

2. 実用新案登録:

なし

3. その他:

なし

「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」

分担研究者： 木村 卓 兵庫医科大学 内科学講座（神経・脳卒中科） 講師

研究要旨：筋強直性ジストロフィー症での中枢神経症状（性格変化、認知症）は、そのホールマークとなる異常が見つからないことなどにより、モデルマウス作成など病態解明が十分にされていない。本症患者剖検脳、Mbnl1、Mbnl2 ノックアウトマウス脳より RNA を抽出し、exon array、RT-PCR 法でスプライシング異常を解析した。Mbnl1 ノックアウトマウス、DM 1 患者で共通する 4 個の、Mbnl2 ノックアウトマウス、DM 1 患者で共通する 12 個のスプライシング異常が認められた。脳では MBNL1、MBNL2 とともにスプライシング異常に関与しているが、MBNL2 の関与がより大きいと考えられた。これらスプライシング異常の病態への関与、治療への応用が今後の課題である。

A.研究目的

筋強直性ジストロフィー症での中枢神経症状（性格変化、認知症）は、そのホールマークとなる異常が見つからないことなどにより、モデルマウス作成など病態解明が十分にされていない。筋強直性ジストロフィー 1 型（DM1）における遺伝子異常は Myotonin-protein kinase 遺伝子（DMPK）の非翻訳領域に存在する CTG リピートの異常伸長である。これにより生じた DMPK 転写物は長くなったリピート部分でヘアピン構造を形成する事により細胞質への搬出が妨害され核内に蓄積する。この際、伸長リピート部分に結合するスプライシング制御蛋白（muscleblind ファミリーの MBNL1/2 など）を共に核内に閉じ込めてしまうため種々の遺伝子のスプライシング異常を引き起こす。したがって MBNL1 や MBNL2 などの下流にあるスプライシング調節蛋白の動態を検索する事は、本症の病態発生や治療を考える上で極めて重要になる。MBNL1 と MBNL2 の発現比較に関するこれまでの報告では、骨格筋では MBNL1 優位であり、Mbnl1 ノックアウトによって多くの筋症状が再現できる事が知られている。一方脳では、

MBNL1,MBNL2 両方が発現しており、どちらも病態に関わっていると考えられるが、その役割は十分解明されていない。今回 Mbnl1,Mbnl2 それぞれのノックアウトマウス脳のスプライシング異常を検索し、本疾患患者脳と比較検討することによって、本症で見られるスプライシング異常および、それに対する MBNL1, MBNL2 の関与を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

1 .Mbnl1,Mbnl2 ノックアウトマウス脳での解析
Swanson 教授（フロリダ大学）との共同研究でこれらのノックアウトマウス脳でのスプライシング異常を exon array を用いてスクリーニングした。得られたスプライシング異常を RT-PCR 法を用いて確認した。

2. 筋強直性ジストロフィー患者脳での検討
マウス脳解析により得られたスプライシング異常をヒト剖検脳検体で検証した。剖検脳 18 例（DM12 例, disease control9 例（MSA1 例, ALS7 例, PD 1 例））および control 成人脳 RNA4 例、胎児脳 RNA1 例を用いた。

(倫理面への配慮)

患者からの剖検検体の使用に関しては遺族に説明し、同意を得た。また剖検検体RNAの解析研究に関して、兵庫医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査専門小委員会に届出、承認を得た(承認番号: 倫ヒ 93号)。

C. 研究結果

1. Mbnl1, Mbnl2 ノックアウトマウス脳での解析
エクソンアレーによる解析では、経験的に separation score が 0.3 より大きいと、RT-PCR でスプライシング異常が検出できる可能性が高いことがわかっている。この separation score が 0.3 を超えるエクソンは、Mbnl1 ノックアウトマウスで 14 個、Mbnl2 ノックアウトマウスでは 305 個認められた。これらを RT-PCR で確認したところ、Mbnl1 ノックアウトマウスで 5 個、Mbnl2 ノックアウトマウスで 20 個のスプライシング異常を確認した(図 1)。

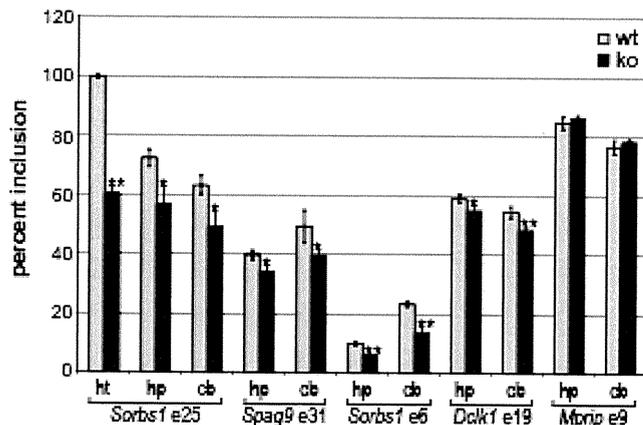


図 1 Mbnl1 ノックアウトマウス脳でのスプライシング異常。(wt: wild type; ko: knockout; ht: heart; hp: hippocampus; cb: cerebellum) ここに示した遺伝子のうち Mprnp 以外でスプライシング異常を海馬、小脳で認めた。

2. 筋強直性ジストロフィー患者脳での検討

患者脳の RT-PCR による解析では Mbnl1 ノックアウトマウスで認められた 5 個のスプライシング異常のうち 4 個のスプライシング異常を見

出した。一方の Mbnl2 ノックアウトマウスで認められた 20 個のスプライシング異常のうち 12 個のスプライシング異常を認めた(このうち 2 個は既報告)。興味深いことに Mbnl1, Mbnl2 ノックアウトマウスで見られるスプライシング異常の多くは海馬、側頭葉、小脳で同様に認められたが、ヒトの DM1 患者脳では側頭葉でのみスプライシング異常を認め、小脳では異常を認めなかった。本症で認められる DMPK 遺伝子の CTG リピート数は、細胞ごとに異なり、脳では小脳でリピート数が減少していることが報告されており、我々の検体でも確認されている。ヒト DM1 患者小脳でスプライシング異常が認められないのは、このリピート数の減少とも関与している可能性がある。

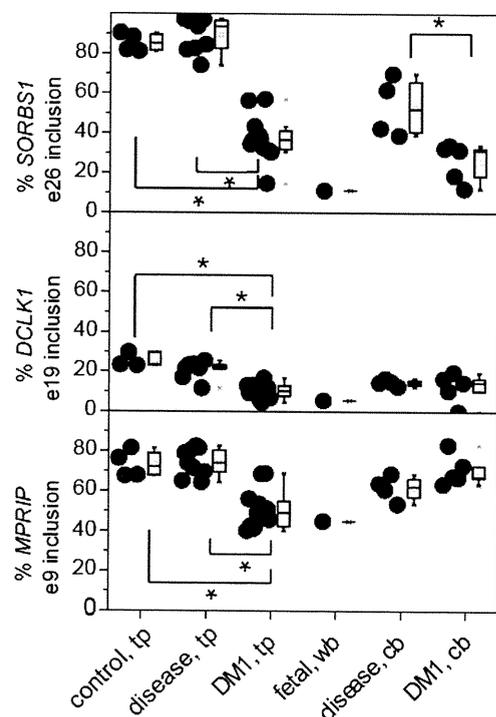


図 2 ヒト DM1 患者脳でのスプライシング異常 Mbnl1 ノックアウトマウスで認められた多くのスプライシング異常はヒト DM1 患者剖検脳でも認められた。これらスプライシング異常は全て胎児脳(fetal)でみられるのと同様のパターンであった。(tp: temporal; wb: whole brain; cb: cerebellum)

D. 考察

研究目的である DM1 脳におけるスプライシング異常の解析および、それに対する MBNL1、MBNL2 の関与については、多くのスプライシング異常が DM1 患者脳で認められること、MBNL1、MBNL2 どちらもこれらのスプライシング異常に関与しているが、Mbnl2 ノックアウトマウスでより多くのスプライシング異常が再現できることが明らかになった。本症で認められる性格変化、認知症、日中の過眠との関係は不明であるが、Mbnl1 ノックアウトマウスと DM1 患者脳でスプライシング異常が認められる CAMK2D は、概日リズムの光同期に関与することが知られている。この遺伝子のスプライシング異常が本症で認められる日中の過眠と関係する可能性がある。本研究で、MBNL1、MBNL2 を介するスプライシング異常が明らかになったことは大きな進歩であるが、今後はそれぞれのスプライシング異常がどのように病態に関与しているのかを明らかにし、それらを正常化させることで治療に結び付けていくことが今後の課題である。

E. 結論

Mbnl1、Mbnl2 ノックアウトマウス脳、DM1 患者剖検脳を解析することで、本症でみられる多くのスプライシング異常及びそれらが MBNL1、MBNL2 が核内に取り込まれることを介して起こっていることが明らかとなった。これらのスプライシング異常の病態への関与、治療への応用が今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

笠間周平, 木村卓, 梶山幸司, 武田正中, 高橋正紀, 芳川浩男 著明な高 CK 血症と軽微な眼輪筋

の筋強直を呈したナトリウムチャンネル異常症の 1 例. 臨床神経 2011;51:120-124

2. 学会発表：

一般演題

高橋正紀, 木村卓, 松村剛, 久保田智哉, 穀内洋介, 佐古田三郎 本邦のミオトニー症候群実態調査～小児神経および神経内科専門医に対するアンケート～ 第 51 回日本神経学会総会 2010 年 5 月、東京

木村卓, 松村剛, 久保田智哉, 穀内洋介, 高橋正紀, 佐古田三郎. 本邦の遺伝性周期性四肢麻痺実態調査～小児神経, 神経内科専門医に対するアンケート～. 第 51 回日本神経学会総会 2010, 5 東京

末永浩一, 木村卓, 中森雅之, 高橋正紀, 松村剛, 藤村晴俊, 陣内研二, 玉置(橋本)知子, 芳川浩男. 筋強直性ジストロフィー患者脳における CaMKII δ スプライシング異常の検討. 第 51 回日本神経学会総会 2010, 5 東京

末永浩一, 木村卓, Lee K, 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 M, Swanson MS, 芳川浩男. 筋強直性ジストロフィー症における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. 5 名古屋

Charizanis K, Lee K-Y, Scotti MM, Xia G, Shiue L, Cline MS, Ares M, Jr., Kimura T, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Swanson MS. Muscleblind-like 2 knockout mice: a model for splicing alterations and neurological changes in the DM brain. 8th international myotonic dystrophy consortium meeting (IDMC-8) 2011. 11-12 Clearwater

Kimura T, Lee K-Y, Suenaga K, Nakamori M,
Tatsumi Y, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K,
Yoshikawa H, Du H, Ares M, Jr., Swanson MS.
Muscleblind-like 1 Knockout Mice Reveal Novel
Splicing Defects in the Myotonic Dystrophy Brain.
8th international myotonic dystrophy consortium
meeting (IDMC-8) 2011. 11-12 Clearwater

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：
なし
2. 実用新案登録：
なし
3. その他：
なし

「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」

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

研究要旨：骨格筋小胞体 Ca-ATPase(SERCA1)のミスプライシングが異常になっている筋強直性ジストロフィーの分子メカニズムの解明を目的に研究を行った。新しくミスプライシング異常を起こすことが明らかになった遺伝子 PDLIM3、ABLIM1 と SERCA1 のミスプライシングメカニズムを調べた結果、後者では C キナーゼがミスプライシングに深くかかわることが明らかになった。そこで、siRNA を用いて分子種を同定した結果、C キナーゼの δ と ϵ が SERCA1 の正常型ミスプライシング増加に関与していることが分かった。

A. 研究目的

骨格筋チャネル病の1つである筋強直性ジストロフィー1型(DM1)は、塩素チャネルのミスプライシング異常による筋強直(ミオトニア)を第一の特徴とする。これは、第19染色体にあるDMPK遺伝子の3'非翻訳領域にあるCTGリピートの伸長によって、生じたCUGリピート含有RNAに特定のミスプライシング因子が結合することでミスプライシング機能異常が起こるためと考えられている。前年度では、エクソンアレイを用いて、ミスプライシング異常を起こす遺伝子を、新しくいくつか同定した。問題は、本症のQOLにもっとも重要な筋力低下に関係する遺伝子の同定である。現在までに、筋肉に発現している遺伝子で筋力低下に関わるものと考えられているものはいくつかあったが、特にトロポニンTやNaチャネルは心筋機能に関わるとされ、骨格筋についてははっきりと同定されているものはなかった。新しく見つかったmyomesin、PDLIM3、ABLIM1、前々からわかってはいたものの機能がはっきりしていなかったSERCA1などが候補に挙げられているものの、証拠は見つかっていない。

本研究では、DM で最もはっきりと同定されているミスプライシング異常を起こす骨格筋小胞体 Ca-ATPase(SERCA1)について、そのミスプライシングを制御している因子は何かという点を明らかにするために以下の実験を行った。

B. 研究方法

SERCA1 のミニジーンを作成し、HEK293 細胞にトランスフェクションして、ミスプライシング変化を PCR を用いて測定した。その他の遺伝子についても同様にミニジーンアッセイを行った。

C. 研究結果

SERCA1 のミスプライシングを変化させる薬剤を ICCB Known Bioactives400 種類の中からスクリーニングしたところ、PMA がミスプライシングを変化させることを見出した。PMA 添加後 1.5 時間では、異常型ミスプライシングが増加した。ところが、48 時間後においては、有意に正常型ミスプライシングが増加した。

PMA は C キナーゼの活性化剤として知られているため、次に C キナーゼのノックダウン実

験を行った。この目的には各種アイソフォームの siRNA が必要となる。今回の実験では、 α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 η 、 θ 、 μ 、 ν の 10 種を用いた。

その結果、48 時間後に見られる正常型 SERCA1 の増加は、 δ と ϵ の siRNA の添加によって強く抑制された。また、これ以外にも、弱く抑制されるものがあった。一方、1.5 時間後の異常型の増加については、 β II と θ に異常型増加を阻止する働きが認められた。

D. 考察

本研究により、DM におけるスプライシング異常としてはっきりと認められているものの 1 つである SERCA1 のスプライシングに C キナーゼの特別な分子種が関与していることが分かった。

現在のところ、スプライシング因子 MBNL1 は各種スプライシングを正常化させ、CUGBP1(CELF1)は異常化させるという説が主流を占めているが、SERCA1 や ABLIM1 についてはこれが成り立つ結果が得られている。

神経筋に発現しているスプライシング因子は FOX1 や PTBP1 などこれ以外にも報告されており、SERCA1 と C キナーゼの間に、どのような因子のリン酸化が関与しているのかが興味深い。

E. 結論

骨格筋チャネル病の 1 つである筋強直性ジストロフィーにおける SERCA1 のスプライシングに C キナーゼが関与していることがノックダウンの実験から明らかになった。今後は、SERCA1 のミスプライシングが筋力低下にどの程度関与しているのかを明らかにすることが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 :

Ohsawa, N., Koebis, M., Suo, S., Nishino, I. & Ishiura, S. (2011) Alternative splicing of PDLIM3/ALP, for α -actinin-associated LIM protein 3, is aberrant in persons with myotonic dystrophy.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 409, 64-69

Koebis, M., Ohsawa, N., Kino, Y., Sasagawa, N., Nishino, I. & Ishiura, S. (2011) The alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1. Genes to Cells, 16, 961-972

Sasabe, T., Futai, E. & Ishiura, S. (2011) Polypyrimidine tract-binding protein 1 regulates the alternative splicing of dopamine receptor D2. J.Neurochem. 116, 76-81

2. 学会発表 :

国際学会

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

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：
なし
2. 実用新案登録：
なし
3. その他：
なし

「本邦における DM2 調査研究」

分担研究者：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

研究要旨：筋強直性ジストロフィータイプ2 (DM2)の遺伝子変異は、ZNF9 遺伝子イントロン1上の CCTG リピート異常伸長である。DM2 はヨーロッパ系白人に認めることが多いが、本邦を含めたアジアでの実態調査は十分になされていない。DM2 の臨床症状は幅広く、その程度は DM1 に比べ遙かに軽度であることから、見過ごされている症例が少なからず存在する可能性がある。全国の神経内科関連施設から DM1 遺伝子変異を否定され、臨床的に DM2 を疑われた症例の、DM2 遺伝子診断を前年度に引き続き施行した。新規に DM2 2 家系を見出した。本邦における DM2 は稀少疾患であるものの、その実態を明らかにする臨床遺伝研究が急務である。

A.研究目的

日本の筋強直性ジストロフィーはタイプ1 (DM1) しかいないと考えられてきたが、2008年に筋強直性ジストロフィータイプ2 (DM2) も本邦に存在することを我々は初めて報告した (Saito T et al. *Neurogenetics* 2008)。

そこで、本邦における DM2 頻度、臨床症状の特徴を調査すると共に、診断・治療についての問題点を明らかにすることを目的にする。

B.研究方法

全国の神経内科関連施設より臨床的に DM2 を疑われた症例から抽出された DNA を用いて、DM2 リピートの PCR 解析、repeat-primed PCR 法を用いて DM2 遺伝子変異の有無を前年度に引き続き検索した。DM2 リピート PCR 解析で異なるリピート数を持つヘテロ症例はその時点で DM2 を除外し、単一アレルを示す症例に repeat-primed PCR 法を施行し、CCTG 伸長変異の有無を検討した。

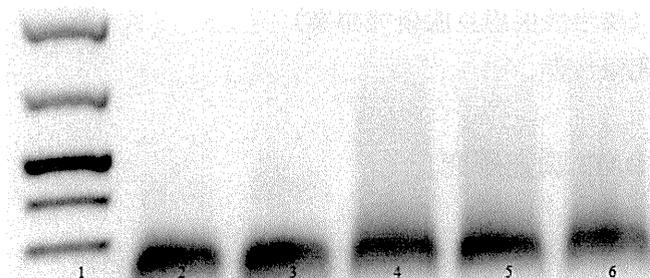
(倫理面への配慮)

遺伝子診断にあたり、各施設のヒトゲノム研究審査委員会などにて全て承認済みであった。遺伝子診断時にすべての患者から同意を文書にて取得した。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。

C.研究結果

DM1 と比較した DM2 の臨床的特徴は、その筋障害が近位筋優位であること、ミオトニア現象が経過を通じて目立たない事が多いことである。

前年度に引き続き本年度解析した 5 症例の中で 2 例の DM2 変異陽性例を見出した (下図 repeat-primed PCR)。



レーン 1: DNA サイズマーカー、レーン 2, 3: 非 DM2 症例、レーン 4, 5: 新規 DM2 症例、レーン 6: DM2 陽性コントロール。DM2 症例では特徴的な ladder を認める。

2 例の新規 DM2 症例は、それぞれ異なる家系出身であり、アジアで初の報告となった家系 (Saito T et al. *Neurogenetics* 2008) と異なるものである。

D. 考察

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。これらの日本人家系が同一祖先に由来するのか、同一祖先に由来するとされる欧米家系との異同はどうか、興味深い。

E. 結論

本邦にも DM2 の複数家系が存在している。欧米症例との臨床遺伝学的な比較検討が必要である。臨床診断の不十分さ・遺伝子診断施行率の低さもその診断を妨げている可能性があり、今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 :

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* 2011; 130:671-83.

#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* 2011; 89:121-130.

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* 2011; 33:427-432.

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* 2011 in press

2. 学会発表 :

シンポジウム講演

なし

一般演題

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 :

なし

2. 実用新案登録 :

なし

3. その他 :

なし