

201128229A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成24（2012）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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成24（2012）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	-----	13
	福留隆泰（長崎川棚医療センター・神経内科部長）		
	2. Collagen Q欠損症の経時的変化	-----	15
	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	-----	19
	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	-----	23
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----	29
V.	平成23年度3班合同ワークショッププログラム	-----	203

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 年度の本研究事業が開始をされるまでの本邦の 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。我々は本研究事業の 2 年間で 16 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、1 例において神経筋接合部に発現をする新規分子 X 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 collagen Q 欠損症に対して protein anchoring therapy が著効を示すことを報告した。さらに本邦患者で同定をした collagen Q 遺伝子変異の神経筋接合部に及ぼす影響を *in vitro*, *in vivo* 実験で証明を行った。加えて、本邦のアセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) 遺伝子変異が AChR の細胞表面発現を阻害すること、ならびに、AChR のイオンチャンネルの早期閉鎖(fast channel syndrome)を起こすことを証明した。さらに神経筋接合部の新規分子の遺伝子変異が神経筋接合部の形成を阻害することを実証した。

研究分担者

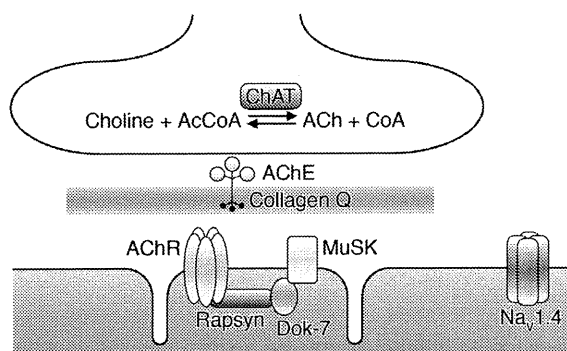
- 福留隆泰 独立行政法人国立病院機構長崎川棚医療センター・神経内科部長
- 奥村彰久 順天堂大学医学部小児科・小児神経学・准教授
- 小牧宏文 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・小児神経科医長

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な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 [1]。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*, *CHRNB1*, *CHRND*, *CHRNE*) [2-16]、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*) [17-19]、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*) [20, 21]、AChR を筋終板に集積させる rapsyn (*RAPSN*) [22, 23]、骨格筋電位依存性ナトリウムチャンネル(*SCN4A*) [24]、細胞骨格分子 plectin (*PLEC*) [25]。さらに別のグループにより 4 種類の遺伝子における変異が同定をされてきた：(i) 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*) [26, 27]、(ii) 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*) [28, 29]、(iii) MuSK のシグナルを受け取り AChR の集積につなげる Dok-7 (*DOK7*) [30-34]、(iv) タンパクの糖修飾を担う UDP-GlcNac 合成の律速段階酵素 GFPT1 (*GFPT1*) [35]。なおこれらのうち AChR [36], MuSK [25, 37], LRP4 [38]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・成人期に再増悪する例や、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[39, 40]、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期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。本研究事業開始以降2年間で16例の新規臨床診断を行い11例において既存遺伝子に変異を同定し、1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増悪する病型もあり、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。全例に対してSanger sequencing解析を行った。また5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 135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 135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。さらに3症例に対してはABI SOLiD 5500を用いて3 kbのギャップでmate pair sequencingを行い、読まれたすべての配列情報を各患者における候補遺伝子である*CHRN1*, *CHRND*, *CHRNE*のいずれかにmappingを行いギャップの異常延長・異常短縮ならびに逆位へのmappingを詳細に検討を行いlarge-scale DNA rearrangementsの検索を行った。

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。さらに、全身移行が少ない AAV1-COLQ ウィルスを後肢筋に注射により導入し ColQ タンパクの発現を前肢で観察した。加えて生成をした AChE-ColQ 複合体を後肢筋に注射した後、AChE-ColQ 複合体の前肢筋への移行係留を確認した。

本邦で同定をされた変異 ColQ の解析では、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。さらに変異 ColQ-AChE 複合体と MuSK の結合能を *in vitro* plate binding により実証した。

AChR サブユニットの遺伝子変異が HEK293 細胞表面における AChR 発現に与える影響を蛍光ラベルし α -bungarotoxin を用いて FACS により定量を行った。さらに変異 AChR のイオンチャンネル動態に与える影響を単一イオンチャンネル記録解析により行った。

神経筋接合部に発現をする新規分子 X の機能解析を agrin 誘導による AChR 集積を定量化することにより行った。

(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・遺伝子解析研究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

(i) COLQ 遺伝子変異

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 は研究代表者が

米国 Mayo Clinic にて研究を行っている時に

同定をした本邦初の CMS 関連遺伝子変異である

[18]。他の 4 種類の遺伝子変異は既報告にない

新変異であり、5 種類の COLQ 変異はすべて

本邦特有の変異である。これら 3 症例に対して

ephedrine を開始し、いずれも効果を認めている。

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、いずれも ColQ 変異も

collagen triple helix の形成を阻害しないことを

密度公開超遠心分析により確認した。さらに、

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 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 変異を ColQ

の神経筋接合部への係留を阻害することを明

らかにした。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いるため、精製

MuSK と AChE-ColQ 複合体の結合を *in vitro*

plate binding assay により定量し、変異 ColQ

の MuSK への結合の阻害を実証した。さらに

AAV8-COLQ-C444Y を作成し ColQ ノックア

ウトマウスに投与したところ wild-type

AAV8-COLQ 投与と異なりマウスの運動能力

の改善を認めず神経筋接合部における

AChE-ColQ 複合体の係留も認めなかった。

(ii) CHRNB1 遺伝子変異

AChR β サブユニットをコードする

CHRNB1 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 large-scale DNA rearrangement の可能性を考えて mate-pair sequencing を行ない *CHRNA1* 領域の large-scale indel を詳細に検討したが変異を同定できなかった。*CHRNA1*-M443T を *CHRNA1*, *CHRND*, *CHRNE* とともに HEK293 細胞に発現をさせ α -bungarotoxin 染色を行ったところ M443T-AChR は細胞表面に高発現しており、EGFP を共発現させた HEK293 細胞の FACS による解析でも M443T-AChR は正常 AChR と同程度の発現が認められた。HEK293 細胞に発現をさせた β M443T-AChR の single channel 解析を行ったところ β M443T-AChR は正常 AChR に比して channel opening time が異常に短縮しており fast channel mutation であることが確認をされた。

(iii) *CHRND* 遺伝子変異

AChR δ サブユニットをコードする *CHRND* 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 と推定される。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 の可能性が考えられる。Large-scale DNA rearrangements を確認する目的で SOLiD 5500 により mate-pair sequencing を行ない *CHRND* 領域の large-scale indel を詳細に検討したが変異を同定できなかった。

(iv) *CHRNE* 遺伝子変異

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る。AChR ϵ サブユニットの null mutation は CMS の原因として最も頻度が高い。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に患者は生存が可能になることを研究代表者は以前に報告をしており [7, 41]、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 splicing に影響を与えなかった。さらに D138D は病的遺伝子変異ではない可能性も考えて症例4、5と同様に mate pair sequencing により *CHRNE* 領域の large-scale DNA rearrangements を確認したが変異を同定できなかった。**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*, *CHRND* とともに HEK293 細胞に発現をさせ α -bungarotoxin により AChR の染色を行ったところ L284R-AChR は細胞表面に発現しておらず、EGFP を共発現させた HEK293 細胞の FACS による解析でも L284R-AChR の発現を認めなかった。**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 [2]。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 fluoxetine (SSRI) の投与を開始し効果を認めている。

(v) *DOK7* 遺伝子変異

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。また、**症例 11** において *DOK7* 遺伝子の K207X, 952-953insA compound heterozygous 変異を同定した。これらの変異 Dok-7 の機能解析を開始している。

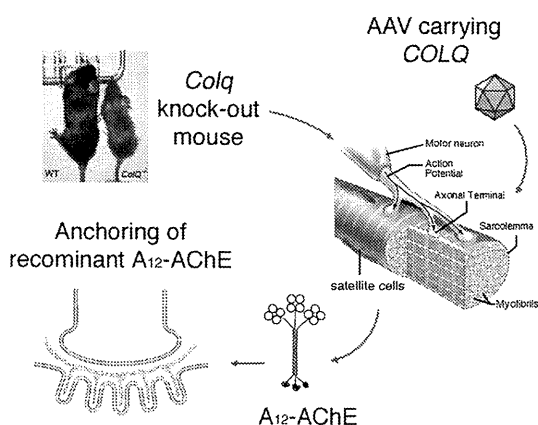
(vi) *GFPT1* 遺伝子変異

さらに SOLiD 次世代シーケンサ解析を **症例 12** から **症例 16** の 5 症例に対して行った。**症例 12** において 2011 年にイギリスで新たに同定をされた新規 CMS 関連遺伝子 *GFPT1* に homozygous E84D 変異を同定した。*GFPT1* 遺伝子は glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1 (GFPT1) をコードしており、糖鎖修飾に重要な UDP-GlcNAc 合成の律速段階酵素である。変異 GFPT1 の神経筋接合部における機能は解明されていないために、骨格筋由来培養細胞系、ならびにマウス神経筋接合部を用いて GFPT1 の神経筋接合部における機能解析を開始した。

(vii) 新規分子 X 遺伝子変異

症例 16 において神経筋接合部の新規分子に compound heterozygous missense mutations を認めた。骨格筋由来培養細胞系を用いて AChR の集積が障害されることを証明し、論文報告を準備している。

(viii) Protein-anchoring therapy



Protein-anchoring therapy による *ColQ* ノックアウトモデルマウスの治療研究では、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 細胞に発現をさせへパリン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 AChE-ColQ 複合体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 の有用性が示唆された。さらに AAV8 よりも組織間移行が低い AAV1-*COLQ* を作成し *ColQ* ノックアウトマウス後肢筋に注射し AChE-ColQ 複合体の前肢筋への係留を確認した。加えて COS 細胞に発現をさせた AChE-ColQ 複合体タンパクを精製し、*ColQ* ノックアウトマウス後肢筋に注射をしたところ AAV1-*COLQ* と同様に AChE-ColQ 複合体が前肢筋に係留した。この実験は、後肢に筋

注をした AAV1-COLQ の前肢筋へのリークではなく、AChE-ColQ 複合体がタンパクとして後肢筋から前肢筋に移動したことを直接証明しており、細胞外分子欠損に対して protein-anchoring therapy が広く応用が可能であることを示している。

D. 考察

本研究事業の2年間に16症例のCMSの遺伝子変異検索を行い COLQ 遺伝子変異3例、CHRN1 変異1例、CHRND 変異1例、CHRNE 変異4例、DOK7 変異2例、GFPT1 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 の有用性を検証した。

E. 結論

本研究事業により本邦における16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16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、一例を除く全例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ていく。

(参考文献)

1. Engel AG, Ohno K, and Sine SM. Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* 2003, 4:339-352.
2. Ohno K, Hutchinson DO, Milone M, Brengman JM, Bouzat C, Sine SM, and Engel AG. 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* 1995, 92:758-762.
3. Sine SM, Ohno K, Bouzat C, Auerbach A, Milone M, Pruitt JN, and Engel AG. Mutation of the acetylcholine receptor alpha subunit causes a slow-channel myasthenic syndrome by enhancing agonist binding affinity. *Neuron* 1995, 15:229-239.
4. Ohno K, Wang H-L, Milone M, Bren N, Brengman JM, Nakano S, Quiram P, Pruitt JN, Sine SM, and Engel AG. Congenital myasthenic syndrome caused by decreased agonist binding affinity due to a mutation in the acetylcholine receptor epsilon subunit. *Neuron* 1996, 17:157-170.
5. Milone M, Wang H-L, Ohno K, Prince R, Fukudome T, Shen X-M, Brengman JM, Griggs RC, Sine SM, and Engel AG. Mode switching kinetics produced by a naturally occurring mutation in the cytoplasmic loop of the human acetylcholine receptor epsilon subunit. *Neuron* 1998, 20:575-588.
6. Milone M, Wang HL, Ohno K, Fukudome T, Pruitt JN, Bren N, Sine SM, and Engel AG. Slow-channel myasthenic syndrome caused by enhanced activation, desensitization, and agonist binding affinity attributable to mutation in the M2 domain of the acetylcholine receptor alpha subunit. *J Neurosci* 1997, 17:5651-5665.
7. Ohno K, Anlar B, Özdirim E, Brengman JM, DeBleeker JL, and Engel AG. Myasthenic syndromes in Turkish kinships due to mutations in the acetylcholine receptor. *Ann Neurol* 1998, 44:234-241.
8. Wang H-L, Milone M, Ohno K, Shen X-M,

- Tsujino A, Batocchi AP, Tonali P, Brengman J, Engel AG, and Sine SM. Acetylcholine receptor M3 domain: stereochemical and volume contributions to channel gating. *Nat Neurosci* 1999, 2:226-233.
9. 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* 1999, 65:635-644.
 10. Quiram PA, Ohno K, Milone M, Patterson MC, Pruitt NJ, Brengman JM, Sine SM, and Engel AG. Mutation causing congenital myasthenia reveals acetylcholine receptor beta/delta subunit interaction essential for assembly. *J Clin Invest* 1999, 104:1403-1410.
 11. Shen X-M, Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Gingold M, Sine SM, and Engel AG. Mutation causing severe myasthenia reveals functional asymmetry of AChR signature cystine loops in agonist binding and gating. *J Clin Invest* 2003, 111:497-505.
 12. 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* 2008, 118:1867-1876.
 13. Ohno K, Milone M, Shen X-M, and Engel AG. A frameshifting mutation in *CHRNE* unmasks skipping of the preceding exon. *Hum Mol Genet* 2003, 12:3055-3066.
 14. Masuda A, Shen XM, Ito M, Matsuura T, Engel AG, and Ohno K. hnRNP H enhances skipping of a nonfunctional exon P3A in *CHRNA1* and a mutation disrupting its binding causes congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2008, 17:4022-4035.
 15. Bian Y, Masuda A, Matsuura T, Ito M, Okushin K, Engel AG, and Ohno K. Tannic acid facilitates expression of the polypyrimidine tract binding protein and alleviates deleterious inclusion of *CHRNA1* exon P3A due to an hnRNP H-disrupting mutation in congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2009, 18:1229-1237.
 16. 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* 2005, 128:345-355.
 17. 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* 1998, 95:9654-9659.
 18. Ohno K, Engel AG, Brengman JM, Shen X-M, Heidenrich FR, Vincent A, Milone M, Tan E, Demirci M, Walsh P, Nakano S, and Akiguchi I. The spectrum of mutations causing endplate acetylcholinesterase deficiency. *Ann Neurol* 2000, 47:162-170.
 19. 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* 2004, 279:10997-11005.
 20. Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Harper CM, Bajzer Z, Udd B, Beyring R, Robb S, Kirkham FJ, and Engel AG. Choline

- acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:2017-2022.
21. Cai Y, Cronin CN, Engel AG, Ohno K, Hersh LB, and Rodgers DW. Choline acetyltransferase structure reveals distribution of mutations that cause motor disorders. *EMBO J* 2004, 23:2047-2058.
 22. Ohno K, Engel AG, Shen X-M, Selcen D, Brengman J, Harper CM, Tsujino A, and Milone M. Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome. *Am J Hum Genet* 2002, 70:875-885.
 23. 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* 2003, 12:739-748.
 24. Tsujino A, Maertens C, Ohno K, Shen X-M, Fukuda T, Harper CM, Cannon SC, and Engel AG. Myasthenic syndrome caused by mutation of the *SCN4A* sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:7377-7382.
 25. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Nishida H, Mabuchi N, Engel AG, and Ohno K. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 2011, 77:1819-1826.
 26. Huze C, Bauche S, Richard P, Chevessier F, Goillot E, Gaudon K, Ben Ammar A, Chaboud A, Grosjean I, Lecuyer HA, Bernard V, Rouche A, Alexandri N, Kuntzer T, Fardeau M, Fournier E, Brancaccio A, Ruegg MA, Koenig J, Eymard B, Schaeffer L, and Hantai D. Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *Am J Hum Genet* 2009, 85:155-167.
 27. Bogdanik LP, and Burgess RW. A valid mouse model of AGRIN-associated congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2011, 20:4617-4633.
 28. Chevessier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, Richard P, Gaudon K, Bauche S, Prioleau C, Herbst R, Goillot E, Ioos C, Azulay JP, Attarian S, Leroy JP, Fournier E, Legay C, Schaeffer L, Koenig J, Fardeau M, Eymard B, Pouget J, and Hantai D. MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2004, 13:3229-3240.
 29. Maselli RA, Arredondo J, Cagney O, Ng JJ, Anderson JA, Williams C, Gerke BJ, Soliven B, and Wollmann RL. Mutations in MUSK causing congenital myasthenic syndrome impair MuSK-Dok-7 interaction. *Hum Mol Genet* 2010.
 30. Beeson D, Higuchi O, Palace J, Cossins J, Spearman H, Maxwell S, Newsom-Davis J, Burke G, Fawcett P, Motomura M, Muller JS, Lochmuller H, Slater C, Vincent A, and Yamanashi Y. Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science* 2006, 313:1975-1978.
 31. Selcen D, Milone M, Shen XM, Harper CM, Stans AA, Wieben ED, and Engel AG. Dok-7 myasthenia: phenotypic and molecular genetic studies in 16 patients. *Ann Neurol* 2008, 64:71-87.
 32. Muller JS, Herczegfalvi A, Vilchez JJ, Colomer J, Bachinski LL, Mihaylova V, Santos M, Schara U, Deschauer M, Shevell M, Poulin C, Dias A, Soudo A, Hietala M, Aarimaa T, Krahe R, Karcagi V, Huebner A, Beeson D, Abicht A, and Lochmuller H. Phenotypical spectrum of DOK7 mutations in congenital myasthenic syndromes.

- Brain* 2007, 130:1497-1506.
33. Palace J, Lashley D, Newsom-Davis J, Cossins J, Maxwell S, Kennett R, Jayawant S, Yamanashi Y, and Beeson D. Clinical features of the DOK7 neuromuscular junction synaptopathy. *Brain* 2007, 130:1507-1515.
 34. Vogt J, Morgan NV, Marton T, Maxwell S, Harrison BJ, Beeson D, and Maher ER. Germline mutation in DOK7 associated with fetal akinesia deformation sequence. *J Med Genet* 2009, 46:338-340.
 35. Senderek J, Muller JS, Dusl M, Strom TM, Guergueltcheva V, Diepolder I, Laval SH, Maxwell S, Cossins J, Krause S, Muelas N, Vilchez JJ, Colomer J, Mallebrera CJ, Nascimento A, Nafissi S, Kariminejad A, Nilipour Y, Bozorgmehr B, Najmabadi H, Rodolico C, Sieb JP, Steinlein OK, Schlotter B, Schoser B, Kirschner J, Herrmann R, Voit T, Oldfors A, Lindbergh C, Urtizbera A, von der Hagen M, Hubner A, Palace J, Bushby K, Straub V, Beeson D, Abicht A, and Lochmuller H. Hexosamine biosynthetic pathway mutations cause neuromuscular transmission defect. *Am J Hum Genet* 2011, 88:162-172.
 36. Farrugia ME, and Vincent A. Autoimmune mediated neuromuscular junction defects. *Curr Opin Neurol* 2010, 23:489-495.
 37. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, and Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001, 7:365-368.
 38. Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, and Yamanashi Y. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2011, 69:418-422.
 39. Burke G, Cossins J, Maxwell S, Robb S, Nicolle M, Vincent A, Newsom-Davis J, Palace J, and Beeson D. Distinct phenotypes of congenital acetylcholine receptor deficiency. *Neuromuscul Disord* 2004, 14:356-364.
 40. Vogt J, Harrison BJ, Spearman H, Cossins J, Vermeer S, ten Cate LN, Morgan NV, Beeson D, and Maher ER. Mutation analysis of CHRNA1, CHRNB1, CHRND, and RAPSN genes in multiple pterygium syndrome/fetal akinesia patients. *Am J Hum Genet* 2008, 82:222-227.
 41. Ohno K, Quiram PA, Milone M, Wang H-L, Harper MC, Pruitt JN, 2nd, Brengman JM, Pao L, Fischbeck KH, Crawford TO, Sine SM, and Engel AG. 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* 1997, 6:753-766.

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. 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* 2011, 39:

- 4396-4404.
3. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Nishida H, Mabuchi N, Engel A G, Ohno K. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 2011, 77:1819-1826.
 4. 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.
 5. 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* 2011, 411:143-149.
 6. 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* 2011, 1:24. *Equal contribution.
 7. 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, 130:671-683.
 8. 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* 2012, 2: 209.
 9. Yoshinaga H, Sakoda S, Good J M, Takahashi M P, 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* 2012, 315:15-19.
 10. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K. Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Mol Ther* in press.
 11. Yamashita Y*, Matsuura T*, Shinmi J, Amakusa Y, Masuda A, Ito M, Kinoshita M, Furuya H, Abe K, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. Four parameters increase the sensitivity and specificity of the exon array analysis and disclose twenty-five novel aberrantly spliced exons in myotonic dystrophy. *J Hum Genet* in press. *Equal contribution.
 12. 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.
 13. Kurosaki T, Ueda S, Ishida T, Abe K, Ohno K, Matsuura T. The unstable CCTG repeat responsible for myotonic dystrophy type 2 originates from an AluSx element insertion into an early primate genome. *PLoS ONE* in press.
- (Book Chapters)**
1. Ohno K, Masuda A. RNA pathologies in neurological disorders. *Neurochemical Mechanisms in Disease*. Ed. by Blass JP. *Advances in Neurobiology 1*, Series Ed. by Lajtha A. Springer, New York, 2011, pp399-415.
 2. Ohno K, Engel AG. Chapter 8: Molecular

defects of acetylcholine receptor subunits in congenital myasthenic syndromes. *Pharmacology of Nicotinic Acetylcholine Receptors from the Basic and Therapeutic Perspectives*. Ed. By Hugo R. Arias. Research Signpost, Kerala, 2011, pp175-186.

3. 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* 63(7): 669-678, 2011.
4. 大野欽司「スプライシングシス因子の破断変異によるスプライシング異常」*医学のあゆみ* 238(5) 485-490, 2011.
5. 大野欽司「RNA 異常と神経疾患」*Annual Review 神経* 2012 :97-103, 2012.
6. 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.
7. Ohno K, Ito M, and Engel AG. Congenital Myasthenic Syndromes - Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction - *Myopathy*. InTech, Rijeka, in press. (査読有)
8. Ohno K, Ito M, Ichihara M, and Ito M. Molecular Hydrogen as an Emerging Therapeutic Medical Gas for Neurodegenerative and Other Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Ed by Pereira MD. Hindawi Publishing Corp., New York, in press. (査読有)

2. 学会発表

(Poster Presentation)

1. Masuda A, Ito M, Fujita Y, Ohno K
Genome-wide analysis of RNA-binding sites of HuR
16th Annual Meeting of the RNA Society (Poster), Kyoto, Japan

Jun 14-18, 2011

2. 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 (Poster), Montreal, Canada
Oct 11-15, 2011
3. 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 (Poster), Washington DC, USA
Nov 15, 2011

(Invited Presentation)

1. 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

H. 知的所有権の取得状況

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

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

筋無力症患者が筋力低下をきたす原因の一つとして興奮収縮連関の障害が考えられている。われわれは、筋音図を用いた興奮収縮連関の評価法を考案し、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者では全例で興奮収縮連関に異常があると考えられた。興奮収縮連関を障害する分子はDGC以外にも存在すると考えられることから、先天性筋無力症をきたす分子の異常でも興奮収縮連関が障害される可能性があり、評価法としての開発と確立が望まれる。

A. 研究目的

筋無力症患者が筋力低下をきたす機序の一つとして興奮収縮連関(E-C coupling)の障害が考えられている。自己免疫性の重症筋無力症(MG)では、興奮収縮連関に関わるジヒドロピリジン受容体やリアノジン受容体に対する自己抗体が認められることがあり、興奮収縮連関が障害されている可能性が高い。興奮収縮連関の評価は従来筋張力を計測することで行われていたが、測定法や解析法が容易でなく、より簡便な計測法の開発が求められている。

B. 研究方法

筋収縮に関する機能評価法としては一般的に誘発筋電図検査(EMG)が用いられている。これは末梢神経を刺激して筋線維の脱分極活動(CMAP)を表面電極で導出するものである。一方誘発筋音図(MMG)は末梢神経を刺激して誘発される筋収縮に起因する微細振動現象を体表面から記録するもので立ち上がり潜時がCMAPよりも遅い(図1)。CMAPは筋線維の脱分極による電気反応であり、MMGは筋収縮を反映することからこの潜時差が興奮収縮連関に要する時間と考えられる(E-C coupling time: ECCT)。

われわれは、正中神経を刺激して短母子外転筋から得られるCMAPとMMGを同時記録することで興奮収縮連関に要する時間を計測し、興奮収縮連関の指標としての有用性を検討した。対象はデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)患者4名と保因者1名および正常コントロール6名で、同意が得られた患者からは遺伝子解析を行った。

(倫理面への配慮)

研究目的で筋音図記録を行うこと、通常の誘発筋電図記録と同様の手技で行えること、電気刺激に伴う痛みがあるが一過性のものである

ることなどを説明し口答で同意を得た。遺伝子検査はREMUDY登録時に行ったもので、筋音図記録の解析に用いることを口答で説明し同意を得た。

C. 研究結果

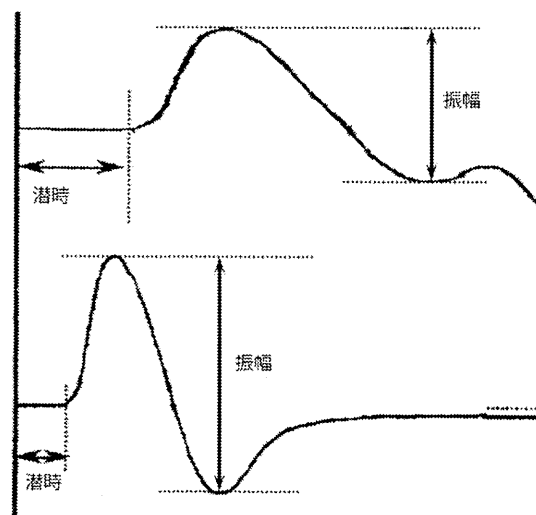


図1. 筋音図記録(上)とCMAP(下)

表1. 各例のECCT

	ジストロフィー 遺伝子変異	ECCT(msec)
Control (n=6)		3.57±0.16
DMD1 (15歳)	Not examined	5.06
DMD2	Del 44	4.73

(16歳)		
DMD3 (17歳)	Dup 48-63	6.95
DMD4 (4歳)	Del 70	4.30
DMD4 の母	Not examined	3.92

6名の正常コントロールに比べて全例でECCTが延長しており、興奮収縮連関に障害があることが考えられた。

D. 考察

DMDでは興奮収縮連関に障害があることが報告されている。Dystrophin-associated glycoprotein complex(DGC)には sarcoglycan subunits や dysferlin、dihydropyridine など E-C coupling に関わる蛋白が含まれており、DMD のモデルマウス (*mdx*-mouse) では障害された E-C coupling が IGF-I で改善される (Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Jan;294(1):C161-8) ことも報告されている。ジストロフィン遺伝子の欠失例よりも重複例で ECCT がより延長していたが、より多数例での検討が必要と考えられる。DGC 以外にも興奮収縮連関に関与する分子が存在すると考えられ、筋音図を用いた評価法の確立が求められる。

E. 結論

筋無力症患者が筋力低下をきたす原因の一つとして興奮収縮連関の障害が考えられている。先天性筋無力症の症例でも興奮収縮連関が障害される可能性があることから、評価法の開発が望まれる。

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 欠損症の経時的変化

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 欠損症自験例の経時的変化を追跡した。症例は幼児期から筋の易疲労性に気づかれ、6歳時に遺伝子解析によって heteroallelic な点変異が同定され、Collagen Q 欠損症と診断した。患児の自覚症状は一時的にエフェドリン投与にて改善したが、その後効果が明らかでなくなり自発的に内服を中止した。中止後の症状の悪化は明らかでないが、自然歴によると思われる運動耐容性の低下傾向を認めている。

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受容体 (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り、その自然歴は十分に明らかになっていない。本年度は Collagen Q 欠損症の自然歴を明らかにするために、その経時的変化を追跡調査した。

B. 症例の概要

症例：9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 日は呼吸不安定で保育器に収容された。

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に気づかれた。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、日差変動が顕著であった。反復刺激における Waning と repetitive CMAP（上腕二頭筋および僧帽筋）および AChE 阻害薬による症状の悪化を認めたため、先天性筋無力症候群を疑った。遺伝子解析の結果、*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。

C. 研究結果

Collagen Q 欠損症では、エフェドリンの有効性が報告されているため、患児に対してエフェドリンの投与を行った。当初は、自覚症状の改善を認め、著しい疲労を呈することはなくなった。しかし、神経生理学的検査では、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ず、M 波回復曲線の改善も明らかでなかった。患児は運動を好み、サッカーをして遊ぶなどの活動も楽しんでいった。

しかし、2011 年夏ごろからエフェドリン内服を怠るようになり、自発的に内服を中止してしまった。エフェドリン中止後も易疲労性に大きな変化は認めず、その後は内服薬なしで経過を観察している。身長や体重が年齢とともに増していること、周囲の友人たちの運動能力が増していることを考えると、患児の運動耐容性は相対的にはやや低下傾向であると考えられる。

D. 考察

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、当初は自覚症状の改善を認め有効であった判断したが、経時的変化から判断するとその有用性には限界があったと思われる。神経生理学的検査でも治療前後の大きな変化は無く、エフェドリンの効果は客観的にも十分証明できていない。Collagen Q 欠損症に対するエフェドリンの有用性については、多数例による検討が必要であろう。

日本人の Collagen Q 欠損症の自然歴は未だ未解明である。自験例は比較的継承例と思われ、長期間日常生活については支障がない状態を継続できている。しかし、レクリエーション活動には限界もあることが徐々に明らかになりつつあり、今後の患児

の生活の質の変化を引き続き観察し続ける必要がある。

E. 結論

Collagen Q 欠損症の経時的変化を観察した。エフェドリンは当初は自覚症状を改善したが、長期的には有効性は明らかでなかった。追跡期間の間には生活の質の大きな低下はなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okumura A, Yamamoto T, Shimojima K, Honda Y, Abe S, Ikeno M, Shimizu T. Refractory neonatal epilepsy with a de novo duplication of chromosome 2q24.2q24.3. *Epilepsia* 2011; 52 (7): e66-e69.

Yamashita S, Okumura A, Yamamoto T, Shimojima K, Tanabe T, Shimizu T. SCN1B is not related to benign partial epilepsy in infancy or convulsions with gastroenteritis. *Neuropediatrics* 2011; 42 (4): 135-137.

Liang JS, Shimojima K, Takayama R, Natsume J, Shichiji M, Hirasawa K, Imai K, Okanishi T, Mizuno S, Okumura A, Sugawara M, Ito T, Ikeda H, Takahashi Y, Oguni H, Imai K, Osawa M, Yamamoto T. CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders. *Epilepsia* 2011; 52 (10): 1835-1842.

Okumura A, Komatsu M, Abe S, Kitamura T, Matsui K, Ikeno M, Shimizu T. Amplitude-integrated electroencephalography in patients with acute encephalopathy with refractory,