

201231053A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成25（2013）年4月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成25（2013）年4月

目 次

I.	総括研究報告		
	先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究	-----	1
	大野欽司（名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学教授）		
II.	分担研究報告		
	1. 先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究	-----	8
	福留隆泰（長崎川棚医療センター・神経内科部長）		
	2. Collagen Q欠損症の追跡調査	-----	10
	奥村彰久（順天堂大学医学部小児科・准教授）		
	3. 先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究	-----	15
	小牧宏文（（独）国立精神・神経医療研究センター・小児神経科医長）		
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	19
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----	25

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（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

本研究の目的は、神経筋接合部の先天的な分子欠損症による先天性筋無力症候群(congenital myasthenic syndromes, CMS)の臨床診断・電気生理検査・遺伝子診断サービスを提供するとともにさらなる分子病態解明を行うことである。CMSは世界中から800症例以上が報告されているが平成21年度までは本邦のCMS確定診断例は2例のみであった。平成22年度の「先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究（H22-難治-一般-028）」と平成23・24年度の本研究事業により16例の新規臨床診断を行い11例において6種類の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。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。またCMSには抗コリンエステラーゼ剤で症状が憎悪する病型もあり、CMSの欠損分子の同定と病態に応じた適切な治療を提供する必要がある。

上記の遺伝子変異同定研究に加えて、研究代表者・分担者らは、平成24年度は(i)GFPT1遺伝子変異の筋分化に対する影響、(ii)本研究事業で同定をした1種類の新規分子（神経筋接合部構造タンパク）の神経筋接合部分子との結合への影響、(iii) CHRNA1エクソン変異のスプライシング病態解析を行った。

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

2003; *Hum Mol Genet* 2003; *Brain* 2005; *J Clin Invest* 2008; *Hum Mol Genet* 2008; *Hum Mol Genet* 2009)、(2) アセチルコリンエステラーゼを係留する collagen Q (*PNAS* 1998; *Ann Neurol* 2000; *J Biol Chem* 2004)、(3)コリンアセチルトランスフェラーゼ (*PNAS* 2001; *EMBO J* 2004)、(4) AChR を筋終板に集積させる rapsyn (*Am J Hum Genet* 2002; *Hum Mol Genet* 2003)、(5) 骨格筋ナトリウムチャンネル(*PNAS* 2004)の欠損分子病態の研究を行ってきた(*Nat Rev Neurosci* 2003)。また共同研究者福留はスローチャンネル症候群の標準的な治療法を確立した(*Neuroreport* 1998; *Neurology* 2003)。

A. 研究目的

研究代表者は、CMS において、(1) 骨格筋アセチルコリンレセプター(*PNAS* 1995; *Neuron* 1995; *Neuron* 1996; *J Neurosci* 1997; *Neuron* 1998; *Ann Neurol* 1998; *Nat Neurosci* 1999; *Am J Hum Genet* 1999; *J Clin Invest* 1999; *J Clin Invest*

本邦のCMS確定診断例は平成21年度までに2

例のみであった。平成22年度にCMS研究班を発足させ、共同研究者の福留・奥村・小牧らを中心に新規CMS症例の臨床・電気生理学診断を行ってきた。さらに、capillary sequencer解析ならびにexome-capture resequencing解析を行い3種類の既知遺伝子ならびに2種類の新規遺伝子の変異を同定した。これら遺伝子変異は1変異を除いて本邦に特有のものであり、これらの遺伝子変異の機能解析を引き続き行っている。

B. 研究方法

【CMS症例の発掘・同定研究】

診断に至っていない新たな CMS 症例を発掘する。共同研究者福留・奥村・小牧は症例の紹介を受け臨床診断・電気生理学検査を行う。患者の受診が困難な場合には臨床所見・反復神経刺激検査結果の詳細な検討を行う。遺伝子変異解析は研究代表者が行う。平成 22 年度までは臨床・電気生理学的に CMS と確定診断した症例のみ遺伝子診断解析を行ったが、平成 23 年度以降は平成 22 年度に自ら開発した exome-capture resequencing 解析ツールを用いて CMS を強く疑う症例を含めて遺伝子変異解析を行った。

【GFPT1遺伝子変異の解析】

糖代謝酵素遺伝子 GFPT1/GFPT1 の変異が 2011 年にイギリスから報告をされ、ほぼ同時に、本邦患者でも GFPT1 遺伝子変異を同定した。GFPT1 分子の骨格筋分化に対する影響を調べた。

【新規に同定をした1種類の遺伝子の変異の解析】

従来 CMS との関連が知られていなかった神経筋接合部構造タンパク質をコードする新規遺伝子に変異を同定した。この分子と他の神経筋接合部分子のタンパク質間相互作用解析を行うとともにシグナル解析を行った。

【CHRNA1 P3A23'G>A変異のスプライシング病態解析】

AChR α subunit 遺伝子 (*CHRNA1*) のエクソン上の変異が結合を減弱させるスプライシング因子を同定し病態を明らかにした。

(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(承認日:初版 平成 20 年 3 月 3 日;最新改訂版 平成 23 年 3 月 1 日)。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」に従い研究を行った。

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た。

C. 研究結果

(i) 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。GFPT1 の機能を薬剤により抑制することにより C2C12 筋芽細胞の筋管細胞への分化が抑制されることを明らかにした。さらに筋管細胞に分化をさせた C2C12 に lentivirus を用いて shRNA により GFPT1 のノックダウンを行ったところ AChR の集積が抑制をされた。文部科学省「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」事業と共同をしてマウ

ス由来 iPS を用いて *in vitro* NMJ を作成することに成功した。また、マウスプライマリー前角細胞と C2C12 筋管による *in vitro* NMJ の作成にも成功した。これらの *in vitro* NMJ 系は今後の神経筋接合部病態解析に重要なツールになることが期待をされる。

(ii) 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。C2C12 筋芽細胞ならびに筋管細胞を用いて、この変異のシグナル伝達機構に対する影響を明らかにした。CMS 変異を有するドメインの別の missense mutations が全く別の骨代謝の表現系を取ることが知られている。homology modeling によりこのドメインの3次元構造予測をしたところ部位特異的に CMS と骨代謝の2種類の表現型を取ることが示唆された。さらに4種類の人工的な missense mutations をこのドメインに導入し、部位特異的な表現型の差を確認した。

(iii) *CHRNA1* exon P3A のスプライシング病態解析

米国の症例において AChR alpha subunit 遺伝子 *CHRNA1* の pseudoexon P3A に変異を認め、その機能解析を行い、変異は RNA 結合タンパク hnRNP L の結合を減弱し RNA 結合タンパク hnRNP LL の結合を誘導していることを明らかにした。hnRNP L の proline-rich region (PRR) は、以前に我々が報告をした別の RNA 結合タンパク PTB (Bian et al. *Hum Mol Genet* 2009, 18: 1229-1237) と結合することにより U2AF65 と U1 snRNP の pseudoexon P3A への結合を阻害することを明らかにした。hnRNP LL は PRR を有さず PTB に結合をできないためにスプライシング抑制効果がないことを明らかにした。さらに、hnRNP LL に PRR を導入することにより PTB との結合能を

獲得しスプライシング抑制効果を導入できることを明らかにした。

D. 考察

本研究事業の先行事業を含む3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、*CHRNA1* 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 原因遺伝子を同定し、その機能解析を行った。

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。

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)

- 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. *Sci Rep* 2012, 2: 209.
- 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* 2012, 57: 368-374. *Equal contribution.
3. 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* 2012, 20: 1384-1392.
 4. 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* 2012, 57:219-220.
 5. Ishigaki S, Masuda A, Fujioka Y, Iguchi Y, Katsuno M, Shibata A, Urano F, Sobue G, Ohno K. Position-dependent fus-rna interactions regulate alternative splicing events and transcriptions. *Sci Rep* 2012, 2: 529.
 6. 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* 2012, 7: e38379.
 7. Ito M, Hirayama M, Yamai K, Goto S, Ichihara M, Ohno K. Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas exposure, prevent 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Med Gas Res* 2012, 2:15.
 8. 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.
 9. Sayeed S, Asano E, Ito S, Ohno K, Hamaguchi M, Senga T. S100a10 is required for the organization of actin stress fibers and promotion of cell spreading. *Mol Cell Biochem* 2013, 374: 105-111.
 10. Yamamoto R, Matsushita M, Kitoh H, Masuda A, Ito M, Katagiri T, Kawai T, Ishiguro N, Ohno K. Clinically applicable antianginal agents suppress osteoblastic transformation of myogenic cells and heterotopic ossifications in mice. *J Bone Miner Metab* 2013, 31: 26-33.
 11. Iio A, Ito M, Itoh T, Terazawa R, Fujita Y, Nozawa Y, Ohsawa I, Ohno K, Ito M. Molecular hydrogen attenuates fatty acid uptake and lipid accumulation through downregulating cd36 expression in hepg2 cells. *Med Gas Res* 2013, 3: 6.
 12. Tanisawa K, Mikami E, Fuku N, Honda Y, Honda S, Ohsawa I, Ito M, Endo S, Ihara K, Ohno K, Kishimoto Y, Ishigami A, Maruyama N, Sawabe M, Iseki H, Okazaki Y, Hasegawa-Ishii S, Takei S, Shimada A, Hosokawa M,

- Mori M, Higuchi K, Takeda T, Higuchi M, Tanaka M. Exome sequencing of senescence-accelerated mice (sam) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. *BMC Genomics* 2013, 14: 248.
13. Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K. Mutations in the c-terminal domain of colq in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise colq-musk interaction. *Hum Mutat* 2013, in press.
4. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Krejci E, Engel AG. Specific binding of collagen q to the neuromuscular junction is exploited to cure congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis. *Chem Biol Interact.* Elsevier, Amsterdam, 2012, 203: pp 335-340. (査読有)
5. Ohe K, Masuda A, Ohno K. Intronic and exonic nucleotide variations that affect rna splicing in humans. *Introduction to Sequence and Genome Analysis*. iConcept Press, Hong Kong, 2012, in press.
6. 大野欽司「RNA異常と神経疾患」Annual Review 神経 2012 :97-103, 2012.
7. 大野欽司「先天性筋無力症候群」Clinical Neuroscience 30 (6): 685-687, 2012.

(Book Chapters)

1. 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, 2012, pp173-230. (Review article with peer review)
2. Ohno K, Ito M, and Engel AG. Congenital Myasthenic Syndromes – Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction – *Myopathy*. InTech, Rijeka, 2012, pp175-200. (Review article with peer review)
3. ○Ohno K, Ito M, Ichihara M, and Ito M. Molecular Hydrogen as an Emerging Therapeutic Medical Gas for Neurodegenerative and Other Diseases. *Oxid Med Cell Longev* vol.2012. Hindawi Publishing Corporation, Cairo, 2012, Article ID 353152, 11 pages (Review article with peer review)

2. 学会発表

(Poster 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
The 11th International Meeting on Cholinesterases (Poster), Kazan, Russia
Jun 4-9, 2012
2. Kinoshita M, Kokunai Y, Kubota T, Takahashi M, Sasaki R, Ohno K, Hirose K
EMG findings at non-myotonia and myotonia states in patients with Na channelopathies
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan

- Jun 7-8, 2012
3. Kinoshita M, Morita S, Ohno K, Hirose K
 In myotonic dystrophy type 1 Peroxiredoxin-2 of RBC membrane protein was reduced, compared with a normal subject
 The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan
 Jun 7-8, 2012
 4. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito I, Andresen BS, Ohno K
 Global analysis of RNA-binding sites of CUGBP1 and MBNL1 reveal their preferential binding to 3' UTRs to regulate mRNA stability
 The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan
 Jun 7-8, 2012
 5. Ohkawara B, Fuse Y, Nakashima H, Ohno K
 Functional characterization of GFPT1 during myogenesis and NMJ formation
 The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan
 Jun 7-8, 2012
 6. Rahman MA, Ohe K, Masuda A, Ito M, Hutchinson DO, Engel AG, Ohno K
 Mutation in congenital myasthenic syndrome reveals opposite splicing regulatory effects of hnRNPs L and LL
 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Poster), Nagoya, Japan
 Sep 18-21, 2012
 7. Masuda A, Ishigaki S, Fujioka Y, Iguchi Y, Katsuno M, Shibata A, Urano F, Sobue G, Ohno K
 Global mapping of FUS-binding sites and global profiling of FUS-mediated RNA metabolisms in the mouse brain
 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Francisco, USA
 Nov 6, 2012
 8. Shibata A, Masuda A, Ohno K
 A comprehensive and efficient algorithm to predict splicing consequences of intronic nucleotide substitutions in the human genome
 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Francisco, USA
 Nov 6, 2012
 9. Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Ohkuwa T, Ichihara M
 Molecular hydrogen alters signaling pathways and gene expression profiles in multiple mouse organs
 52nd Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (Poster), San Francisco, USA
 Dec 15, 2012
 10. Nasrin F, Rahman MA, Ohe K, Masuda A, Ohno K
 Alternative RNA splicing regulating the molecular architecture of NMJ
 5th NAGOYA Global Retreat (Poster), Nagoya, Japan
 Feb 2, 2013
 11. Selcen D, Shen X-M, Milone M, Brengman J, Ohno K, McQuillen M, Deymeer F, Finkel

R, Rowin J, Engel AG
Investigation of 11 Patients with
GFPT1-Myasthenia Reveals Clinical,
Structural, and Electrophysiologic
Heterogeneity
65th American Academy of Neurology, San
Diego, USA
Mar 21, 2013

12. Ito M, Itoh T, Ohno K, Nozawa Y
Molecular mechanism of the inhibitory
effect of hydrogen on inflammation
90th Annual Meeting of the Physiological
Society of Japan (Platform), Tokyo, Japan
Mar 28, 2013

(Invited Presentation)

1. Ohno K
Specific binding of collagen Q to the
neuromuscular junction is exploited to cure
congenital myasthenia and to explore bases
of myasthenia gravis
11th International Meeting on
Cholinesterases, Kazan, Russia
Jun 4-9, 2012
2. Ohno K
Congenital defects of neuromuscular signal
transduction

3rd Berlin Summer School for Myology,
Berlin, Germany
Jun 18-22, 2012

3. Ohno K
Molecular bases and therapeutic intervention
of neuromuscular transmission defects
Ninth French-Japanese Workshop on
Muscular Dystrophies, Tokyo, Japan
Sep 7, 2012
6. Ohno K
Global mapping and global expression
profiling of RNA-binding proteins that are
associated with neurological and
neuromuscular diseases
35th Annual Meeting of the Japan
Neuroscience Society, Nagoya, Japan
Sep 18-21, 2012

H. 知的所有権の取得状況

1. 出願年月日：2013年3月10日
発明等の名称：骨系統疾患治療薬及びその用途
特願 2013-047426 号
発明者：大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、松
下雅樹
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

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

Wntシグナルを活性化する因子の一つであるR-spondin2遺伝子が神経筋伝達に及ぼす作用について検討した。R-spondin2遺伝子ノックアウトマウスでは、神経筋伝達阻害が認められ、神経終末を障害することが疑われた。

A. 研究目的

Wnt シグナル経路は胚発生と癌に関連するタンパク質のネットワークとして知られている。R-spondin2遺伝子はWntシグナルを活性化する因子の一つであり、筋、骨や気管支の形成に関与することが報告されているが、神経筋伝達に及ぼす影響については明らかにされていない。当研究班ではR-spondin2遺伝子異常が神経筋伝達を阻害する可能性を示す実験結果を得ていることから、R-spondin2ノックアウトマウスの神経筋伝達に及ぼす影響について電気生理学的に解析した。

B. 研究方法

ワイルドタイプと遺伝子改変マウスをそれぞれ2-3匹用いる。エーテル麻酔科で横隔膜神経筋標本を作成し微小電極記録をおこなう。また、坐骨神経を反復刺激して前脛骨筋から複合筋活動電位（CMAP）を記録した。

（倫理面への配慮）

厚生労働省の所管する実施機関における動物実験などの実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日 厚生労働省通知)、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (文部科学省)ならびに長崎大学動物実験規則(平成 19 年 2 月 23 日 規則第 9 号)を遵守する。実験にあたり、当院の倫理委員会と動物実験委員会で討議した。

C. 研究結果

表 1. MEPP記録

	Control (n=4)	Mutant (n=4)
RMP (mV)	-46 ± 5.1	-38 ± 2.6
Amplitude (mV)	3.7 ± 1.0	3.8 ± 0.3
Frequency (/sec)	0.8 ± 0.7	0.07 ± 0.01

RMP : resting membrane potentials

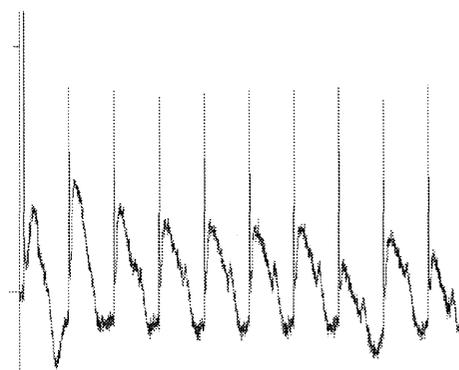


図 1. Mutantのrepetitive study

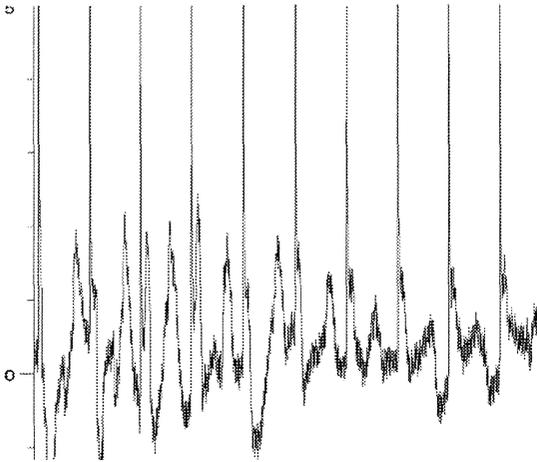


図2. Controlのrepetitive study

微小電極記録 (MEPP) では、RMPとMEPP振幅に差はなかったが、MEPPの出現頻度は遺伝子改変マウスで減少していた。神経反復刺激検査では、遺伝子改変マウスでCMAPのdecrementを認めた。

D. 考察

R-spondin2 ノックアウトマウスでは CMAPの decrement を認めることから神経筋伝達障害が疑われ、MEPP 出現頻度が減少していることから神経終末での障害が考えられる。

E. 結論

R-spondin2遺伝子はWntシグナルを活性化する因子の一つであり、筋、骨や気管支の形成に関与する以外に、神経筋伝達を阻害する可能性が疑われ、神経終末での障害が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(Book Chapters)

1. 本村政勝、向野晃弘、福留隆泰「重症筋無力症」希少疾患/難病の診断・治療と製品開発 960-972, 2012.

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（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））
分担研究報告書

Collagen Q 欠損症の追跡調査

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。中止の1年後から運動耐用性の低下が顕著となり、エフェドリンの投与を再開した。しかし、投与後3か月の時点で運動耐容性の改善を認めていない。

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チンレセプター (AChR) の開口時間が異常に延長し、結果として筋の易疲労性がもたらされる。

現在まで日本における Collagen Q 欠損症の報告は症例数が少なく、その自然歴や薬剤の効果は十分に明らかになっていない。本年度は Collagen Q 欠損症の追跡を行い、その経時的変化を調査した。

B. 症例の概要

症例：11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3358gで出生。仮死徴候は認めなかったが、出生後2~3日目は呼吸不安定で保育器に収容された。

発達歴：坐位8か月、つかまり立ち1歳過ぎ、独歩1歳6か月と軽度の運動発達遅滞を認めた。明らかな精神発達遅滞は認めない。

現病歴：3歳で保育園に入園したが、遠足や散歩などの途中で長く歩行できなくなること気づかれた。疲れてくるとお腹を突き出して体を揺らすように歩行し、頭部が下垂する姿勢をとっていた。このような症状は、30~60分ほど休憩すると回復した。眼瞼下垂は認めなかった。日内変動はないが、日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た。

患児は 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た。内服中止後 1 年ほどの期間は易疲労性に大きな変化は認めず、日常生活や学校生活には大きな支障を認めなかった。しかし、2012 年秋ごろから易疲労性が増悪するとともに、重いものを持つことができなくなるなどの筋力低下を疑う症状も出現した。体育の授業への参加が困難になり、生活の質の低下が顕著になった。患児自身が内服の再開を希望したため、2012 年 11 月にエフェドリン内服を再開した。しかし、2013 年 3 月の時点で明らかな改善を認めていない。

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。自験例は比較的軽症の症例と推測され、日常生活の支障がない状態をある程度の期間は継続できていた。しかし、10 歳を過ぎてから運動耐用性の低下に加え筋力低下が出現し始めた可能性がある。今後は、筋力の定量的な評価を行う必要があると思われる。

E. 結論

Collagen Q 欠損症の経時的変化を観察した。10 歳すぎから運動耐用性の低下が増悪するとともに筋力低下の出現が疑われ生活の質が大きく低下した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okumura A, Tsuji T, Kubota T, Ando N, Kobayashi S, Kato T, Natsume J, Hayakawa F, Shimizu T. Acute encephalopathy with 2009 pandemic flu: Comparison with seasonal flu. *Brain Dev* 2012; 34(1): 13-19.

Okumura A, Uematsu M, Imataka G, Tanaka M, Okanishi T, Kubota T, Sudo A, Tohyama J, Tsuji M, Ohmori I, Naiki M, Hiraiwa-Sofue A, Sato H, Saitoh S, Shimizu T. Acute encephalopathy in children with Dravet syndrome. *Epilepsia*. 2012; 53(1): 79-86.

Okumura A, Lee T, Ikeno M, Shimojima K, Kajino K, Inoue Y, Yoshikawa N, Suganuma H, Suzuki M, Hisata K, Shoji H, Takanashi J, James Barkovich A, Shimizu T, Yamamoto T, Hayashi M. A severe form of epidermal nevus syndrome associated with brainstem and

- cerebellar malformations and neonatal medulloblastoma. *Brain Dev* 2012; 34(10): 881-885.
- Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi J, Nagata R, Okumura A, Kashii H, Tomita S, Kumada S, Kubota M. Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *Brain Dev* 2012; 34(2): 124-127.
- Yamakawa Y, Nakazawa T, Ishida A, Saito N, Komatsu M, Matsubara T, Obinata K, Hirose S, Okumura A, Shimizu T. A boy with a severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Brain Dev* 2012; 34(2): 107-112.
- Tsubahara M, Hayashi Y, Nijima S, Yamamoto M, Kamiyo T, Murata Y, Haruna H, Okumura A, Shimizu T. Isolated growth hormone deficiency in two siblings because of paternal mosaicism for a mutation in the GH1 gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76(3): 420-424.
- Shimajima K, Okumura A, Natsume J, Aiba K, Kurahashi H, Kubota T, Yokochi K, Yamamoto T. Spinocerebellar ataxias type 27 derived from a disruption of the fibroblast growth factor 14 gene with mimicking phenotype of paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia. *Brain Dev* 2012; 34(3): 230-233.
- Sakai R, Okumura A, Marui E, Nijima S, Shimizu T. Does fever phobia cross borders? The case of Japan. *Pediatr Int* 2012; 54(1): 39-44.
- Oikawa N, Okumura A, Oyama S, Baba H, Shimizu T, Kato A. A 15-month-old boy with reduced consciousness and convulsion. *J Clin Virol* 2012; 53(4): 276-279.
- Kitamura Y, Okumura A, Hayashi M, Mori H, Takahashi S, Yanagihara K, Miyata R, Tanuma N, Mimaki T, Abe S, Shimizu T. Oxidative stress markers and phosphorus magnetic resonance spectroscopy in a patient with GLUT1 deficiency treated with modified Atkins diet. *Brain Dev* 2012; 34(5): 372-375.
- Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi J, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev* 2012; 34(5): 337-343.
- Kato T, Okumura A, Tsuji T, Emi M, Natsume J. Isolated cystic lesion of the callosal genu after traumatic brain injury. *Neuropediatrics*. 2012; 43(3): 162-163.
- Hosoki K, Ohta T, Natsume J, Imai S, Okumura A, Matsui T, Harada N, Bacino CA, Scaglia F, Jones JY, Niikawa N, Saitoh S. Clinical phenotype and candidate genes for the 5q31.3 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012; 158A(8): 1891-1896.
- Tsubahara M, Shoji H, Mori M,

Matsunaga N, Ikeno M, Hisata K, Okumura A, Shimizu T. Glucose metabolism soon after birth in very premature infants with small- and appropriate-for-gestational-age birth weights. *Early Hum Dev.* 2012; 88(9): 735-738.

Kidokoro H, Inder T, Okumura A, Watanabe K. What does cyclicality on amplitude-integrated EEG mean? *J Perinatol.* 2012; 32(8): 565-569.

Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci* 2012; 320(1-2): 145-148.

Kato T, Okumura A, Tsuji T, Hayashi S, Kito M, Natsume J. Punctate white matter lesions in a late preterm-born infant with hypoxic ischaemic encephalopathy: chronological change in magnetic resonance imaging. *Dev Med Child Neurol* 2012; 54(9): 862.

Shimajima K, Okumura A, Mori H, Abe S, Ikeno M, Shimizu T, Yamamoto T. De novo microdeletion of 5q14.3 excluding MEF2C in a patient with infantile spasms, microcephaly, and agenesis of the corpus callosum. *Am J Med Genet A.* 2012; 158A(9): 2272-2276.

Hayashi-Kurahashi N, Kidokoro H, Kubota T, Maruyama K, Kato Y, Kato T, Natsume J, Hayakawa F, Watanabe K, Okumura A. EEG for predicting early

neurodevelopment in preterm infants: an observational cohort study. *Pediatrics* 2012; 130(4): e891-897

Shimajima K, Okamoto N, Suzuki Y, Saito M, Mori M, Yamagata T, Momoi MY, Hattori H, Okano Y, Hisata K, Okumura A, Yamamoto T. Subtelomeric deletions of 1q43q44 and severe brain impairment associated with delayed myelination. *J Hum Genet* 2012; 57(9): 593-600.

Hayashi N, Okumura A, Kubota T, Tsuji T, Kidokoro H, Fukasawa T, Hayakawa F, Ando N, Natsume J. Prognostic factors in acute encephalopathy with reduced subcortical diffusion. *Brain Dev* 2012; 34(8): 632-639.

Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Natsume J. Transient reduced diffusion in the cortex in a child with prolonged febrile seizures. *Brain Dev* 2012; 34(9): 773-775.

Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; collaborating study group on influenza-associated encephalopathy in Japan. National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children. *J Med Virol* 2012; 84(8): 1151-1156.

Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; The Collaborating Study Group On Influenza-Associated Encephalopathy In Japan. Treatment of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated

encephalopathy in children. Scand J Infect Dis 2012; 44(12): 941-947.

苛原香、小牧宏文、本田涼子、奥村彰久、白石一浩、小林悠、東慶輝、中田智彦、大矢寧、佐々木征行。

本邦における先天性筋無力症候群の臨床的特徴。

脳と発達 2012; 44(6): 450-454.

2. 学会発表

奥村彰久、安倍信平、池野充、大塚宜一、清水俊明。

アトキンス食に伴う成長障害。

第 115 回日本小児科学会学術集会、福岡、2012.4.19.

Akihisa Okumura, Tetsuo Kubota, Motomasa Suzuki, Tatsuya Fukazawa, Shinpei Abe, Mitsuru Ikeno, Mariko Hosozawa, Toshiaki Shimizu, Masaharu Hayashi.

Autoimmune Encephalitis Proven by Immunohistochemical Study.

第 54 回日本小児神経学会総会、札幌、2012.5.17.

Akihisa Okumura

Neonatal EEG in determining risk to the preterm brain.

Joint congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Brisbane, Australia, 2012.6.1.

奥村彰久、池野充、久田研、東海林宏道、清水俊明。

TUBA1A 変異による滑脳症・脳室拡大・小脳低形成の 1 剖検例。

第 48 回日本周産期・新生児医学会学術集会、さいたま、2012.7.10.

Akihisa Okumura, Keiko Shimojima, Tetsuo Kubota, Shinpei Abe, Shintaro Yamashita, Katsumi Imai, Tohru

Okanishi, Hideo Enoki, Tatsuya Fukasawa, Takuya Tanabe, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki Yamamoto.

PRRT2 Mutation in Japanese Children with Benign Infantile Epilepsy.

第 46 回日本てんかん学会、東京、2012.10.11.

Akihisa Okumura, Keiko Shimojima, Tetsuo Kubota, Shinpei Abe, Shintaro Yamashita, Katsumi Imai, Tohru

Okanishi, Hideo Enoki, Tatsuya Fukasawa, Takuya Tanabe, Shino Shimada, Leanne M Dibbens, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki Yamamoto.

PRRT2 Mutation in Japanese Children with Benign Infantile Epilepsy.

The 16th Annual Meeting of American Epilepsy Society, San Diego, CA, USA, 2012.12.2.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））
分担研究報告書

先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究

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

研究要旨 先天性筋無力症候群 5 例の臨床的および電気生理学的特徴、ならびに治療法について検討した。4 例が乳児期に運動発達遅滞で発症し初発時は筋力低下、筋緊張低下が主症状であった。眼瞼下垂、眼球運動制限は新生児期発症例にのみ認められた。筋力変動は幼児期以降に明らかになった。筋力変動は間欠的または数日間持続する筋力低下を全例に認め、日内変動を呈したのは 1 例のみであった。副神経の反復神経刺激では評価した全例が減衰を示したが、正中神経、尺骨神経、後脛骨神経では筋力低下を呈していても減衰を認めない例があった。テンシロンテストでは眼瞼下垂が改善せず反復神経刺激での減衰率改善が判定に有用であった。診断まで平均 6 年を要しており診断に難渋した例が多かった。塩酸エフェドリンを投与した全例で何らかの臨床的有用性を認めた。一例で塩酸エフェドリンの副作用と思われる体重減少を認めたが、中止に至る例はなく、塩酸エフェドリンは先天性筋無力症候群の病因に関わらず有効性が期待できる薬剤であることが考えられた。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

発症時期、臨床症状、自己抗体陰性、反復神経刺激 (repetitive nerve stimulation : 以下 RNS) 減衰から CMS を疑い、遺伝子解析にて病的な変異が判明した 5 例を対象とし、診療録に基づいて臨床的特徴について検討した。

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

(倫理面への配慮)

本研究は診療録などを用いて情報収集した後方視的研究であり、倫理委員会の申請は行っていない。3, 4DAP は試薬として販売されているため、治療目的での使用にあたっては各医療機関で倫理審査会での承認と、保護者の承諾を得た。

C. 研究結果

1. 臨床的特徴

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