

## 周期性四肢麻痺の新規原因遺伝子探索

研究分担者：高橋 正紀<sup>1)</sup>

共同研究者：古田 充<sup>1)</sup>、中田 智彦<sup>2)</sup>、穀内 洋介<sup>1)</sup>、坂田 宗平<sup>3)</sup>、  
木村 紘美<sup>4)</sup>、伊藤 英樹<sup>4)</sup>、相庭武司<sup>5)</sup>、吉永正夫<sup>6)</sup>、  
中森 雅之<sup>1)</sup>、久保田 智哉<sup>1)</sup>、進藤 克郎<sup>7)</sup>、清水 渉<sup>8)</sup>、  
堀江 稔<sup>4)</sup>、岡村 康司<sup>3)</sup>、望月 秀樹<sup>1)</sup>、大野 欽司<sup>2)</sup>

- 1) 大阪大学大学院 医学系研究科 神経内科学
- 2) 名古屋大学大学院 医学系研究科 神経遺伝情報学
- 3) 大阪大学大学院 医学系研究科 統合生理学
- 4) 滋賀医科大学 呼吸循環器内科学
- 5) 国立循環器病医療研究センター 不整脈科
- 6) 国立病院機構 鹿児島医療センター 小児科
- 7) 倉敷中央病院 神経内科
- 8) 日本医科大学 循環器内科

### 研究要旨

骨格筋チャンネル病の診断向上には、診断確定症例の臨床情報・検査所見蓄積が重要である。全国から依頼され遺伝子解析を行っているが、臨床診断が周期性四肢麻痺とされている症例の半数以上では、原因となる遺伝子異常が同定されない。そこで、次世代シーケンサによる解析を行ったところ、Kir3.4 サブユニットをコードする *KCNJ5* 遺伝子の変異を 1 例で同定した。さらに心臓のチャンネル病の研究者らと協力し、さらに 1 例の患者を見出した。Kir3.4 サブユニットは通常 G タンパク共役型内向き整流性 K チャネルを構成するが、ツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的解析により、G タンパク共役型ではない通常の内向き整流性 K 電流を抑制するという新たな生理作用が見出され、骨格筋の病態（麻痺）に関与することが示された。

### A：研究目的

周期性四肢麻痺の原因遺伝子として、骨格筋型 Na および Ca チャネルのほかに、内向き整流性 K チャネルサブユニット (Kir2.1,

Kir2.6) をコードする *KCNJ2* や *KCNJ18* が同定されている。なかでも *KCNJ2* の変異は、周期性四肢麻痺・不整脈・骨格奇形の 3 徴を呈する Andersen-Tawil 症候群 (ATS) の原因となる。

われわれは周期性四肢麻痺をはじめとする骨格筋チャンネル病の遺伝子診断を行っているが、これらに変異を認めない例も多いことから、新規原因遺伝子の同定を試みた。

なおその他に本年度も昨年度に引き続き、診断確定のための遺伝子解析、診断基準の整備、再生医療実現拠点ネットワークプログラム共同研究拠点への患者検体の提供なども継続して行った。それらの詳細については、平成 24-25 年度総合報告書を参照されたい。

## B：研究方法

低 K 性周期性四肢麻痺発作と心電図上 QU 延長、U 波を認め、優性遺伝と思われる不整脈の家族歴があり、ATS を疑った。既知原因遺伝子には病的変異を認めなかった。SureSelect Human All Exon v.2 でゲノムから全エクソームを濃縮、ライブラリ調整し、SOLiD4 システムで配列情報を取得した。162 のイオンチャンネル関連遺伝子を候補として解析した。Immunoblotting によって Kir3.4 タンパクが心筋・骨格筋においても発現しているかどうかを検討した。

アフリカツメガエル卵母細胞に Kir2.1, Kir3.4 の野生型あるいは変異型 cRNA を注入し、内向き整流性電流を二電極膜電位固定法で解析した。

(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・医学部附属病院倫理委員会にて承認済みである(下記一覧)。同意を文書にて得て、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。

承認状況

「神経・筋チャンネル病の遺伝子解析」 大阪大学研究倫理審査委員会 平成 16 年初版承認、2012 年 4 月 3 日最新版承認

「本邦における筋チャンネル病の実態に関する研究」 大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会 2009 年 8 月 13 日承認

## C：研究結果

低 K 性周期性四肢麻痺発作と心電図上 QU 延長、U 波を認め、優性遺伝と思われる不整脈の家族歴があり、ATS を疑った。既知原因遺伝子には病的変異を認めなかった。

エクソームキャプチャーの後、次世代シーケンサで解析し、162 のイオンチャンネル関連遺伝子を候補として検討したところ、G タンパク共役型内向き整流性 K チャンネルを構成する Kir3.4 サブユニットをコードする *KCNJ5* にミスセンス変異 (p.G387R) を認めた。

Kir3.4 タンパクが心筋・骨格筋においても発現していることを Immunoblotting によって確認した。ツメガエル卵母細胞に cRNA を注入しチャンネル電流を解析したところ、Kir2.1 との共発現では Kir3.4 は内向き整流電流を抑制し、変異タンパクでより強い抑制を認めた。

さらに、本邦における 3 つの ATS コホート (国立循環器病医療研究センター、滋賀医科大学、国立病院機構鹿児島医療センター)において *KCNJ2* に変異のない 21 例の ATS のゲノムを解析したところ 1 例に *KCNJ5* の変異を見出した。

## D : 考察

Kir3.4 サブユニットをコードする *KCNJ5* の変異はQT延長症候群の原因として報告されていた。しかしながら、Kir3.4 サブユニットはKir3.x ファミリーと4量体を形成しG蛋白共役型の内向き整流性Kチャンネルを構成し、心臓においては心副交感神経刺激による心拍低下を来すIK<sub>ACh</sub>電流を担っていることから、なぜQT延長症候群を呈するかは疑問であった。さらに、周期性四肢麻痺を呈したという報告はこれまでなかった。今回我々の見出した、変異Kir3.4サブユニットによるKir2.1電流の抑制という結果は、ATSがKir2.1をコードする*KCNJ2*の変異により生じることが知られていることとあわせ、QT延長症候群および周期性四肢麻痺という病態をうまく説明できる。

いっぽう近年*KCNJ5*の変異は原発性アルドステロン症の原因であることが報告されている。興味深いことに我々の見出したもう1例の*KCNJ5*の変異の患者は、心電図異常が見出された2年後に原発性アルドステロン症を発症している。原発性アルドステロン症は二次性の低カリウム性周期性四肢麻痺の原因であることも知られており、*KCNJ5*疾患は原発性アルドステロン症、QT延長、周期性四肢麻痺などいくつかの症状をオーバーラップし呈する可能性がある。

## E : 結論

*KCNJ5*はATSの新たな原因遺伝子と考えられた。Kir2.1に対する抑制作用は心臓・骨格筋両者の病態をうまく説明できる。また、Kir2.Xの電流量の調整というKir3.4の骨格筋における新たな生理作用が示唆された。また本研究を通じて、心臓のチャンネル病の研究者と共

同研究体制が構築されたことは、今後の研究の発展につながると考えられる。

## F : 健康危険情報

なし

## G : 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

### 1 : 論文発表

Oana K, Oma Y, Suo S, Takahashi MP, Nishino I, Takeda S, Ishiura S. Manumycin A corrects aberrant splicing of *Clcn1* in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Sci Rep.* 2013;3:2142..

Koebis M, Kiyatake T, Yamaura H, Nagano K, Higashihara M, Sonoo M, Hayashi Y, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Yanagihara D, Matsuda R, Takahashi MP, Nishino I, Ishiura S. Ultrasound-enhanced delivery of Morpholino with Bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice. *Sci Rep.* 2013 3: 2242.

Kokunai Y, Nakata T, Furuta M, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, Ohno K, Takahashi MP. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 印刷中

佐々木良元、高橋正紀、穀内洋介、平山正昭、衣斐 達、富本秀和、望月秀樹、佐橋 功 骨

格筋型塩化物イオンチャネル遺伝子  
(CLCN1)の複合ヘテロ接合体変異で重症化  
した Thomsen 病 臨床神経学 2013;53(4):  
316-319

久保田智哉 高橋正紀 骨格筋チャネル病の  
最新知見 ミオトニー症候群と周期性四肢麻  
痺を中心に 医学のあゆみ 2013;245(9):  
732-739.

高橋正紀 周期性四肢麻痺 今日の診断指針  
2014 年版 印刷中

## 2 : 学会発表

穀内洋介、紀 嘉浩、Moy Li、伊藤英樹、中  
森雅之、木村 卓、松村 剛、藤村晴俊、貫名  
信行、堀江 稔、石浦章一、Maurice Swanson、  
望月秀樹、佐古田三郎、井本敬二、Nicolas  
Charlet-Berguerand、高橋正紀 Na チャネル  
のスパライジング異常が筋強直性ジストロ  
フィーの心臓伝導障害に関与する.第 54 回日  
本神経学会学術大会 2013 年 05 月 29 日 東  
京国際フォーラム

中森雅之、Charles Thornton、高橋正紀、望  
月秀樹 トリプレットリピート病におけるリ  
ピート長の制御. 第 54 回日本神経学会学術大  
会 2013 年 05 月 30 日 東京国際フォーラ  
ム

高橋正紀、穀内洋介、中田智彦、坂田宗平、  
大崎裕亮、中森雅之、木村紘美、伊藤英樹、  
久保田智哉、進藤克郎、望月秀樹、堀江 稔、  
岡村康司、大野欽司 不整脈を伴う低カリウ  
ム性周期性四肢麻痺の新規原因遺伝子同定と  
チャネル機能解析. 第 54 回日本神経学会学

術大会 2013 年 05 月 30 日 東京国際フォ  
ーラム

中森雅之、Charles Thornton、高橋正紀、望  
月秀樹 トリプレットリピート病におけるリ  
ピート長伸長機構の解明と制御 日本人類遺  
伝学会 第 58 回大会 仙台 2013 年 11 月  
21 日

高橋正紀、穀内洋介、中田智彦、坂田宗平、  
中森雅之、木村紘美、伊藤英樹、古田 充、久  
保田智哉、進藤克郎、堀江 稔、岡村康司、望  
月秀樹、大野欽司 エクソーム解析による  
Andersen-Tawil 症候群の新規原因遺伝子同  
定と変異チャネル機能の電気生理学的解析  
日本人類遺伝学会 第 58 回大会 仙台  
2013 年 11 月 23 日

木村康義、三原雅史、古田充、中森雅之、奥  
野龍禎、高橋正紀、大野欽司、望月秀樹  
CNCNA1A 新規変異を認めた反復発作性運  
動失調症 2 型の 1 例 第 99 回日本神経学会  
近畿地方会 平成 25 年 12 月 21 日(土)

Kokunai Y, Nakamori M, Kubota T,  
Mochizuki H, Takahashi MP, Nakata T,  
Ohno K, Sakata S, Okamura Y, Kimura H,  
Itoh H, Horie M, Osaki Y, Shindo K.  
Exome sequencing analysis reveals a  
mutation of Kir3.4 in a patient with  
Andersen-Tawil syndrome. 18th  
International Congress of The World  
Muscle Society Asilomar, CA USA 2013 年  
10 月 3 日

Nakamori M, Hamanaka K, Furuta M,

Mochizuki H, Hayashi Y, Nishino I,  
Takahashi MP. Phenotype-genotype  
correlation in congenital myotonic  
dystrophy. 9th International Myotonic  
Dystrophy Consortium Meeting, Donostia  
San Sebastian, Spain 2013 年 10 月 17 日

Kokunai Y, Itoh H, Kino Y, Li M, Nakamori  
M, Kimura T, Matsumura T, Fujimura H,  
Nukina N, Mochizuki H, Sakoda S, Horie M,  
Ishiura S, Imoto K, Swanson MS, Charlet  
Berguerand N, Takahashi MP. Altered  
splicing of cardiac sodium channel might be  
responsible for cardiac conduction defects  
in myotonic dystrophy. 9th International  
Myotonic Dystrophy Consortium Meeting,  
Donostia San Sebastian, Spain 2013 年 10  
月 17 日

**H : 知的所有権の取得状況（予定を含む）**

**1 : 特許取得**

なし

**2 : 実用新案登録**

なし

**3 : その他**

なし