

筋チャンネル病の遺伝子解析および病態解析

研究分担者：高橋 正紀¹⁾

共同研究者：古田 充¹⁾、穀内洋介¹⁾、久保田智哉¹⁾、中森雅之¹⁾、
松浦 徹²⁾、木下正信³⁾、佐々木良元⁴⁾、大野欽司⁵⁾、

1) 大阪大学大学院 医学系研究科 神経内科学

2) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経内科学

3) 首都大学東京 健康福祉学部

4) 三重大学医学部附属病院 神経内科

5) 名古屋大学大学院 医学系研究科 神経遺伝情報学

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。全国から依頼された症例について遺伝子解析を行った。未報告の変異については、真に疾患変異であることを証明し病態を理解するため、チャンネル機能の電気生理学的解析を行い、コンピューターシミュレーションにより症状との関連を検討した。さらに、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ことから、周期性四肢麻痺について、次世代シーケンサによる解析を行い、新規原因遺伝子（Kir3.4 サブユニットをコードする *KCNJ5* 遺伝子）を同定した。また、iPS 細胞を用いた病態研究・治療薬スクリーニングを目指すため、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に、患者検体を提供した。

A：研究目的

骨格筋の電氣的興奮・収縮などに不可欠なイオンチャンネルの遺伝子異常が周期性四肢麻痺、ミオトニーなどの疾患の原因となることが判明した。これらは「チャンネル病」と総称される疾患に含まれる。これら骨格筋チャンネル病は、疾患として気づかれていない軽症例から、

筋萎縮・筋力低下を呈する重症例までである。さらに、専門医であっても経験することが稀で、診断・治療などに困難を伴うことが多い。我々の21年度の調査から、遺伝子診断施行率が低く確定診断例が非常に少ないこと、臨床徴候（特にミオトニー症候群）に対する認識が低く見逃されている可能性のあることが浮

き彫りになった。そこで、診断確定症例を増やし、臨床情報・電気生理検査所見を蓄積することにより、より精度の高い診断基準・検査指針の策定につなげることを目的とした。

また、特に原因となる遺伝子異常が同定されないことの多い低カリウム性周期性四肢麻痺について、次世代シーケンサによる網羅的解析を精力的に行い、原因遺伝子を同定することも目的とした。

iPS細胞を用いた病態研究・治療薬スクリーニングを目指すため、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「疾患特異的 iPS 細胞を活用した筋骨格系難病研究」班に、患者検体を提供し、疾患特異的 iPS 細胞樹立を行うことも目的とした。

B：研究方法

遺伝子および電気生理による診断確定

全国から共同研究として依頼された筋チャンネル病(周期性四肢麻痺、非ジストロフィー性ミオトニー症候群など)疑いの症例について、既知の原因遺伝子 (SCN4A, CACNA1S, CLCN1, KCNJ2, KCNJ18) についてサンガシーケンサ解析を施行した。報告のない変異が見つかった場合には、培養細胞 (HEK293) に変異チャンネルを発現させ、パッチクランプ法でチャンネルの電位依存性などの機能に異常が生じているかどうかを確認した。

新たな原因遺伝子の探索

既知の原因遺伝子に変異を認めない周期性四肢麻痺症例のうち 5 例を選び、次世代シーケンサによるエクソーム解析を行い、原因遺伝子の同定を試みた。具体的には、Sure Select Human All Exon v.2 (Agilent) でゲノム DNA から全エクソームを濃縮し、ライブ

ラリを調整した後、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遺伝子を疾患原因候補として解析した (大野欽司班員による)。

見出された変異チャンネルをツメガエル卵母細胞へ RNA を注入し発現させ、チャンネル電流を二電極膜電位固定法にて解析し、チャンネル機能の異常が認められるかどうか検討した。

疾患特異的 iPS 細胞樹立のための試料提供

低カリウム性周期性四肢麻痺および筋チャンネル病の関連疾患である筋強直性ジストロフィーについて、患者由来線維芽細胞から iPS 細胞の樹立を、国立精神神経医療研究センター 神経研究所 荒木敏之部長のもとで行った。

(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

「筋疾患患者からの人工多能性幹細胞(iPS 細

胞)樹立とそれを用いた病態解析・治療探索」 大阪大学医学部倫理審査委員会 2011年9月5日承認

「神経疾患患者からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」 大阪大学医学部倫理審査委員会 2012年4月25日承認

C: 研究結果

遺伝子診断および診断基準改訂

平成 24-25 年度の 2 年間の間に、大阪大学のみに 30 例以上の遺伝子解析を行った。

CLCN1 複合ヘテロ変異により重症化したトムゼン型先天性筋強直症（優性遺伝性）や *SCN4A*, *CLCN1* の両方に新規変異が見出された、高カリウム性周期性四肢麻痺疑い例、その他新規変異など、貴重な症例が多く見出された。研究協力者の三重大学 佐々木良元助教のもとでも遺伝子解析を行い、情報交換するとともに、両者の遺伝子変異リストを Web へ公開するなど、情報発信に努めた。

さらに、前身の「筋チャンネル病および関連疾患の診断・治療指針作成および新規治療法開発に向けた基盤整備のための研究班」によって作成された診断基準の改訂を行い、日本神経学会の承認を得た（2013年4月15日）。この診断基準も Web へ公開し、情報発信に努めた。

新たな原因遺伝子の探索

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HORT における *KCNJ2* 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。

疾患特異的 iPS 細胞樹立のための試料提供

低カリウム性周期性四肢麻痺および筋強直性ジストロフィーについて、患者由来線維芽細胞から iPS 細胞の樹立を、国立精神神経医療研究センター 神経研究所 荒木敏之部長のもとで行った。すでに分化細胞を用いた RNA などの解析を開始している。

D: 考察

チャンネル病の遺伝子解析を行い、新規変異を含む遺伝子異常を同定した。全国にはまだまだまだ確定診断のできていない患者が存在することが予想される。今後、効率的な遺伝子解析、未知の変異・原因遺伝子の同定を行うことが求められる。

周期性四肢麻痺では欧米に比して既知の変異が認められる割合が低かったことから、班員である名古屋大学の 大野欽司教授と次世代シーケンサによる解析を行った。その結果、*KCNJ5* は周期性四肢麻痺の新たな原因遺伝子と考えられた。Andersen-Tawil 症候群の原因遺伝子が構成する 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。

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「疾患特異的 iPS 細胞を活用した筋骨格系難病研究」班との連携が進んでいくことも特筆すべき成果であると考えられる。今後、薬剤スクリーニング系等の構築に活用することが期待される。

E : 結論

本邦における骨格筋チャンネル病の遺伝子解析を積極的に行い、一部はチャンネル機能の解析まで行い疾患変異であること確定した。診断未確定患者が多く存在することから、今後はさらに効率的な遺伝子解析の体制が求められる。また、周期性四肢麻痺の次世代シーケンサを用いた解析を行い、新規原因遺伝子の同定という特筆すべき成果があったが、その過程で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。また、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との共同により、今後の創薬研究につながる疾患特異的 iPS 細胞の樹立に寄与することができた。

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

Yoshinaga Y, Sakoda S-I, Good JM, Takahashi MP, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K, Kitamura T, Kobayashi K, Ohtsuka Y. A novel

mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J Neurol Sci.* 2012; 315(1-2):15-9.

Suenaga K, Lee KY, Nakamori M, Tatsumi Y, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Du H, Ares M Jr, Swanson MS, Kimura T. Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS One.* 2012;7(3):e33218.

Kokunai Y, Goto K, Kubota T, Fukuoka T, Sakoda S, Ibi T, Doyu M, Mochizuki H, Sahashi K, Takahashi MP. A sodium channel myotonia due to a novel SCN4A mutation accompanied by acquired autoimmune myasthenia gravis. *Neurosci Lett.* 2012; 519(1):67-72.

Charizanis K, Lee K-Y, Batra R, Goodwin M, Zhang C, Yuan Y, Shiue L, Cline M, Scotti MM, Xia G, Kumar A, Ashizawa T, Brent Clark H, Kimura T, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Gomes-Pereira M, Gourdon G, Sakai N, Nishino S, Ares Jr M, Darnell RB, Swanson M. Muscleblind-like 2 mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 2012; 75(3):437-50.

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ンネル遺伝子 (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 骨格筋チャンネル病の最新知見 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

(シンポジウム・招待講演)

Takahashi MP. Molecular mechanisms in myotonic syndromes. June 7, 2012, L'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC)-CNRS UMR 7104 - Inserm U 964 Illkirch フランス

Takahashi MP. RNA mis-splicing in myotonic disorders. The 9th Japanese-French Symposium for ' muscular dystrophy ' Sep 7, 2012 東京

(一般発表)

穀内 洋介, 紀 嘉浩, Li Moyi, 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, 井本 敬二, 石浦 章一, Maurice Swanson, 佐古田 三郎, 高橋 正紀, 望月 秀樹 筋強直性ジストロフィーにおける心筋型 Na チャネルのスプライシング異常と心伝導障害 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 24 日 東京 (東京国際フォーラム)

末永 浩一, 木村 卓, Kuang-Yung Lee, 中森 雅之, 高橋 正紀, 藤村 晴俊, 陣内 研二, 久保 秀司, 玉置(橋本) 知子, Manuel Ares, Maurice Swanson, 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 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 25 日 東京 (東京国際フォーラム)

佐々木良元, 高橋正紀, 穀内洋介, 平山正昭,

衣斐 達, 佐橋 功, 富本秀和 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トムゼン病 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 25 日 東京 (東京国際フォーラム)

高谷将悟, 森田ゆかり, 大崎康史, 土居義典, 瀬尾宏美, 穀内洋介, 高橋正紀 家族性低カリウム性周期性四肢麻痺 2 型の 1 例 第 106 回日本内科学会四国地方会 2012 年 6 月 2 日

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シ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)

Freyermuth F, Thibault C, Alunni V, Auboeuf D, Zimmer T, Takahashi M, Charlet-Berguerand N. SCN5A splicing alteration in heart of myotonic dystrophy patients. 7th International Conference on Unstable Microsatellites & Human Disease. June 9-14, 2012, Mont Ste Odile, Strasbourg フランス

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