

令和元年5月24日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19639

研究課題名(和文) Escobar症候群の分子病態解明とGFPT1先天性筋無力症候群の治療法開発研究

研究課題名(英文) Functional analysis of fetal acetylcholine receptor in patients with Escobar syndrome

研究代表者

中田 智彦 (Nakata, Tomohiko)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40773065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胎児型アセチルコリン受容体のひとつのサブユニットをコードするCHRNG遺伝子は、非致死型多発性翼状片症候群であるEscobar症候群の原因遺伝子である。本研究ではEscobar症候群の遺伝子診断、臨床像の解明、同定した変異の機能解析をおこなった。多発関節拘縮を示す2家系3人にCHRNG遺伝子変異を共通するミスセンス変異を含んだ複合ヘテロ接合性に同定した。3人とも遠位型の多発関節拘縮を持つがEscobar症候群に特徴的とされる翼状片は極軽度だった。ミスセンス変異について培養細胞を用いた発現実験およびチャネル動態解析をおこない、本変異が胎児型ファーストチャネル症候群を起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで成人型の骨格筋アセチルコリン受容体のチャネル動態異常による疾患は先天性筋無力症候群の一型として報告されているが、胎児型アセチルコリン受容体での報告はなかった。今回Escobar症候群3症例で同定した共通の遺伝子変異について胎児型アセチルコリン受容体の機能解析をおこない、発現量の低下とチャネル開口時間の異常によることを明らかにした。3症例は臨床像が類似しており、Escobar症候群で特徴的とされている翼状片が非常に軽微だった。先天性多発関節拘縮症には多数の原因があるが、翼状片が軽微であってもCHRNG変異を考える必要がある。

研究成果の概要(英文)：The nonlethal Escobar syndrome is caused by mutation in the CHRNG gene, which encodes the fetal gamma subunit of the acetylcholine receptor. We performed sequencing of CHRNG for patients with multiple joint contractures and found heterozygous mutations including one missense mutation in three patients from two families. We described clinical features and studied functional analysis using culture cells for the missense mutation. Although the clinical features of Escobar syndrome are variable but the condition is characterized by pterygia, all three patients had very mild pterygia. We conducted expression experiments and channel functional analyses using culture cells. We revealed that the mutation cause the fetal fast channel syndrome with abnormally brief opening and activity of the channel.

研究分野：小児神経学

キーワード：Escobar症候群 CHRNG 先天性筋無力症候群 アセチルコリン受容体 先天性多発関節拘縮症 非致死型翼状片症候群

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非致死性多発翼状片症候群である Escobar 症候群は、先天性の多発関節拘縮を示し翼状片を特徴とする稀な先天奇形症候群である。1978 年に Escobar らにより疾患概念が確立された。常染色体劣性遺伝形式をとり 2006 年に原因遺伝子 *CHRNG* が同定された。*CHRNG* は骨格筋アセチルコリン受容体サブユニットをコードする。骨格筋アセチルコリン受容体は 4 種類のサブユニットから成る 5 量体で、サブユニットは胎生 33 週以前に存在し、その後はサブユニットに置換される。成人型のアセチルコリン受容体の各サブユニットの先天的欠損は先天性筋無力症候群を起こす。先天性筋無力症候群は筋力低下、易疲労性を主徴とし小奇形などを合併する。関節拘縮を主徴とし、出生後に筋力低下を示さない Escobar 症候群とは症状が異なる。先天性筋無力症候群においてはこれまでに各サブユニットをコードする遺伝子変異の機能解析研究がおこなわれてきた。その結果、機能喪失変異による終板アセチルコリン受容体欠損症と、イオンチャネルの開口時間が異常短縮するファーストチャネル症候群、機能獲得変異によるイオンチャネル開口時間の異常延長であるスローチャネル症候群の 3 つの病態が判明している。神経筋接合部に存在する骨格筋アセチルコリン受容体の欠損や機能異常により筋力低下や易疲労性が説明される。一方で、*CHRNG* 変異の詳細な機能解析はなされておらず、Escobar 症候群の病態機構については不明なことが多い。さらに、胎生期のみで発現する *CHRNG* の変異が関節拘縮症を引き起こす機構について、胎内での無動による症状とされながらもそれ以上の説明はなされていない。

### 2. 研究の目的

遠位型多発関節拘縮症を示す姉弟例において全エクソーム解析の結果、Escobar 症候群の原因遺伝子である *CHRNG* にミスセンス変異 (p.Pro143Arg) とフレームシフトの複合ヘテロ変異が同定された。この姉弟例は遠位型の多発関節拘縮を示したが、Escobar 症候群に特徴的とされる翼状片については極軽微であり、当時は臨床的に Escobar 症候群と診断をつけることが困難だったため全エクソーム解析をおこなった。サブユニットが胎生期にサブユニットに置換されることから想定されるように、*CHRNG* と *CHRNE* とには相同性を認める。そこで、この姉弟例で判明したミスセンス変異について先天性筋無力症候群で判明しているアセチルコリン受容体の各サブユニットに関連した遺伝子変異を参照し精査したところ、*CHRNE* 変異を有するファーストチャネル症候群として報告をされている部位に相当していた。本研究では、この *CHRNG* 変異はイオンチャネル開口時間の異常短縮を起こすと仮説を立て、変異型遺伝子を導入した培養細胞を用いた実験をおこない仮説を証明することを目的とした。また、仮説が立証された場合には、胎児型ファーストチャネル症候群となる本症例の臨床像を明らかにすることを目的とした。さらに、可能な限り症例の集積をおこない、Escobar 症候群の遺伝学的診断、変異の機能解析、その結果である受容体の機能異常と臨床像との関連について研究することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 日本における Escobar 症候群患者の発掘、遺伝学的診断、臨床像の検討

臨床症状の特徴とされる翼状片が目立たない *CHRNG* 変異の症例が存在する。新規の Escobar 症候群患者の発掘のために国内の関連する研究会や学会で発表をおこなった。また、遠位の多発関節拘縮に対する手術療法のため整形外科を受診する機会があることを考え、手の外科の取り扱いがある近隣病院の整形外科に研究代表者が Escobar 症候群の遺伝子検査を実施している旨の案内をした。問い合わせのあった症例に対して *CHRNG* 遺伝子のシーケンスをおこなった。陽性例の臨床症状について自ら診察をおこなうか主治医へ問い合わせ臨床像をまとめた。

#### (2) *CHRNG* 変異の発現解析、チャネル動態解析

HEK293 細胞に野生型および変異型サブユニットを含むアセチルコリン受容体各サブユニットおよび EGFP を導入し細胞表面上にアセチルコリン受容体を発現させ、Alexa Fluor 647 ブンガロトキシンにより標識した。フローサイトメータ FACSCalibur を用いて分析し、EGFP 細胞陽性におけるアセチルコリン受容体陽性細胞の割合を算出した。さらに、同様の方法で細胞表面上に発現させたアセチルコリン受容体に対してパッチクランプ法を用いたイオンチャネル動態解析をおこなった。

### 4. 研究成果

(1) 紹介された症例について *CHRNG* のシーケンスをおこなった。1 例に *CHRNG* 変異を同定した。他の症例には、その後の臨床像から手指の関節拘縮を起こす Freeman-Sheldon 症候群が疑われる症例や、その後全エクソームシーケンスが予定された原因不明の重度多発関節拘縮症が含まれていた。新たに同定した *CHRNG* 変異は、母由来のミスセンス変異と父由来のナンセンス変異の複合ヘテロ接合性であり、このミスセンス変異は既に判明している姉弟例と同部位の p.Pro143Arg (c.428C>G) だった。ナンセンス変異は c.255T>A (p.Tyr85Ter) だった。姉弟例 (症例 1 と 2) と新規症例 (症例 3) の臨床症状をまとめた (表)。症状は非常に類似しており、多発関節拘縮の他、出生時の呼吸障害のために周産期のケアが必要であり、手指の屈曲拘縮に対しては母指の対立使用を目的に手術が施行されていた。眼瞼裂斜下を含め顔貌も類似していた。姉弟例は翼状片が極軽微のため Escobar 症候群を第一には疑わず全エクソーム解析をおこなった。

たが、新規症例も翼状片は軽微ながら関節拘縮の程度や顔貌が姉弟と類似していたことから *CHRNG* 変異を強く疑った。全例言語理解に遅れはないが症例 3 は発達障害を指摘されていた。その他、肘関節伸側の皮膚陥凹などが明らかになった（表）。

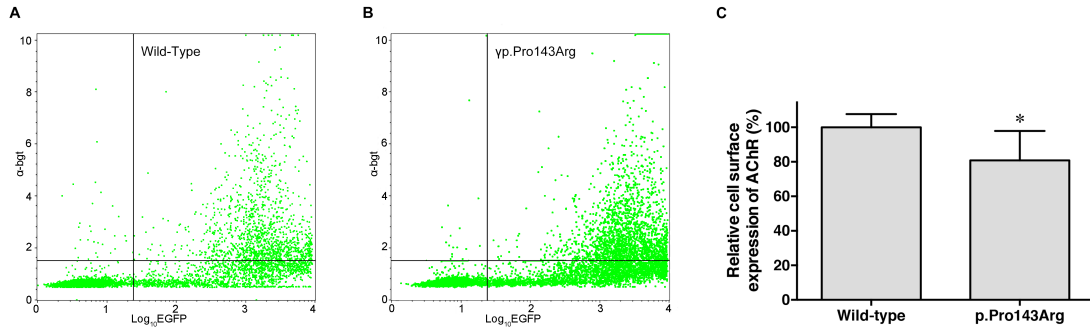
（2）p.Pro143Arg を導入したアセチルコリン受容体の HEK293 細胞表面上の発現量は野生型と比して低下の傾向を認めた。成人型アセチルコリン受容体での同部位での変異 p.Pro143Arg の結果を踏まえ発現量は低下しないとの仮説を立てており再現性を確認するため同実験を繰り返しおこなった。最終的に、35mm ディッシュで培養した細胞を 1 とした場合の検体数 8 での結果では発現量は 80% であり、対応のない 2 標本 t 検定において有意差を認めなかった（図）。チャンネル動態解析においては開口時間が異常短縮し胎児型ファーストチャンネル症候群と考えられた（Mayo clinic）。

遠位型多発関節拘縮症を来す原因遺伝子は多岐にわたり、また臨床症状に多様性があるため候補遺伝子からの遺伝子診断は容易ではない。実際に姉弟例は全エクソーム解析により変異が明らかになった。より特異的な臨床像を明らかにすることで *CHRNG* の遺伝子解析のみで診断することができれば低費用で短期間で診断が可能になる。Escobar 症候群はその定義からも翼状片を特徴としており、これまでの成書や論文での報告は著しい翼状片を認める症例からなるため、翼状片が軽微な症例が存在することを認識しておくことは重要である。翼状片が軽微であっても、周産期歴、特徴的顔貌、関節拘縮の程度など今回の 3 症例にみられた症状は診断の手掛かりになると考えられ、これらを認めた場合には *CHRNG* 変異の可能性を考える。

本研究は胎児型ファーストチャンネル症候群の初の報告となる。先天性筋無力症候群において研究されてきた骨格筋アセチルコリン受容体の機能解析研究に基づき、稀な先天性多発関節拘縮症である Escobar 症候群患者から得られた変異について病原性を確認することができた。本研究からは胎児型ファーストチャンネル症候群は、翼状片は極軽度であり、その他、関節拘縮についても比較的軽度の臨床像をとることが示唆された。今後、前述した認知可能な特異的な臨床像に基づいて *CHRNG* の積極的な遺伝子変異検索をおこない、チャンネル開口時間を短縮する別の変異型に起因する症例を集積できれば胎児型ファーストチャンネル症候群の臨床像が確立される可能性がある。また、全エクソーム解析の臨床応用が進み多発関節拘縮症における原因遺伝子検索が容易になれば *CHRNG* 変異の症例数は増加すると思われる。それらの中で胎児型のスローチャンネル症候群の存在も明らかになり臨床像が判明すれば、胎内でのアセチルコリン受容体の機能がより詳しく解明されうる。先天性多発関節拘縮症において、これまで胎内での筋の伸展や動きの減少が関節拘縮症に関与するとされている。胎児型アセチルコリン受容体の筋と神経軸索の接合への関与など、胎生期の器官形成における役割を明らかにする研究も今後の課題である。

表

|                       | 症例 1（症例 2 の兄）   | 症例 2（症例 1 の妹）          | 症例 3  |
|-----------------------|---|------------------------|---|
| 年齢・性                  | 10 歳 男児   | 7 歳 女児                 | 4 歳 男児  |
| 妊娠経過                  | 異常なし  | 異常なし                   | 異常なし  |
| 周産期                   | 横隔膜挙上   | 生後チアノーゼ<br>横隔膜挙上       | 胎児徐脈、羊水混濁                                       |
| 顔                     | 眼瞼下垂、眼瞼裂斜下<br>高口蓋、歯列不整                                    | 眼瞼下垂、眼瞼裂斜下<br>高口蓋、歯列不整 | 眼瞼下垂、眼瞼裂斜下<br>耳介低位                              |
| 手足                    | 手指屈曲拘縮  | 手指屈曲拘縮<br>内反足          | 手指屈曲拘縮<br>右内反足、左外反変形<br>左垂直距骨                   |
| 翼状片                   | 手指間にわずかな翼状片   | 手指間にわずかな翼状片            | 頸部に軽度の翼状片                                       |
| その他                   | 肘関節伸側皮膚陥凹<br>鼠径ヘルニア<br>側彎症                                | 肘・膝関節軽度伸展制限            | 肘・膝関節軽度伸展制限<br>肘関節伸側皮膚陥凹<br>停留精巣<br>感音性難聴       |
| <i>CHRNG</i><br>遺伝子解析 | c.428C>G (p.Pro143Arg)<br>c.753_754del (p.Val243Alafs*44) |                        | c.255T>A (p.Tyr85Ter)<br>c.428C>G (p.Pro143Arg) |



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計4件)

中田 智彦 他、CHRNA3変異を有する Escobar 症候群の3例、2019、第41回日本小児遺伝学会学術集会

中田 智彦 他、CHRNA3変異を有する Escobar 症候群の3例、2018年、第60回日本小児神経学会学術集会

中田 智彦 他、遺伝子異常による神経筋接合部疾患、2017年、第12回東海神経筋疾患懇話会

中田 智彦 他、先天性筋無力症候群とその周辺疾患、2016年、第49回胎児新生児神経研究会

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等なし

## 6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：夏目 淳

ローマ字氏名：(NATSUME, jun)

研究協力者氏名：城所 博之

ローマ字氏名：(KIDOKORO, hiroyuki)

研究協力者氏名：大野 欽司

ローマ字氏名：(OHNO, kinji)

研究協力者氏名：伊藤 美佳子

ローマ字氏名：(ITHO, mikako)

研究協力者氏名：水野 誠司

ローマ字氏名：(MIZUNO, seiiji)

研究協力者氏名：Andrew G. Engel

ローマ字氏名：

研究協力者氏名：Xin-Ming Shen

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。