

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07524

研究課題名(和文) 反復発作性運動失調症の新規原因遺伝子探索と病態解明

研究課題名(英文) Exploring novel causative genetic variants and the pathomechanism of Episodic ataxia

研究代表者

久保田 智哉 (KUBOTA, TOMOYA)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20573231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：反復発作性運動失調症(episodic ataxia：EA)は、めまいやふらつきなどを発作的に起こす希少遺伝性疾患である。病気の起こるしくみや治療法が確立されておらず、日本には少ないとされている。本研究を通じて、日本におけるEA症例4家系(孤発例含む)を確定診断できた。また、EAと症状が多く重なる家族性片麻痺性片頭痛の症例3家系(孤発例含む)を、確定診断できた。これらの調査を通じて、日本でのEA症例の特徴をより明らかにすることができた。また、病気のしくみを解明するのに役立つと考えられる、パッチクランプ法での変異チャネル解析法を改良することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

反復発作性運動失調症(episodic ataxia：EA)は、めまいやふらつきなどの症状を発作的に起こす病気のため、診断されずにいる患者さんが多く潜在している。特に、日本でのEA症例の少ない。今回、数例ではあるが、研究を通じて未診断のEA患者さんが診断にいたったことは、医学研究における学術的意義として重要である。病気のしくみの解明のための技術的改良がなされたことも、意義深い。また、症例の積み重ねで得られた情報により、日本でのEA症例の特徴が明らかになることで、今後、診断率の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：Episodic ataxia is a hereditary rare disease representing intermittent vertigo and/or dizziness. The pathomechanism and the therapeutic drug have not been explored yet. Especially, the number of case reports of EA in Japan has been limited. In this study, we identified a few EA cases which has been undiagnosed. In addition, a few cases of familial hemiplegic migraine, which shares some symptoms with EA, have been identified. We succeeded to elucidate some specific features of EA in Japan. Moreover, we explored a patch clamp methods to record gating pore current, which would be useful to explore the pathomechanisms of ion channel disease including EA.

研究分野：神経筋チャネル病の遺伝学的研究と、そのチャネル蛋白の機能構造に注目した治療薬探索

キーワード：運動失調 遺伝子解析 チャネル病 電位依存性イオンチャネル 電位感受性機構 電位依存性カルシウムチャネル 電位依存性カリウムチャネル

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

反復発作性運動失調症 (episodic ataxia : EA) は、間欠的な運動失調発作を呈する希少疾患である。その殆どが EA2 型 (EA2) について EA1 型 (EA1) が多いとされ、EA2 は電位依存性カルシウムチャンネル Cav2.1 をコードする *CACNA1A* 遺伝子に、EA1 は電位依存性カリウムチャンネル Kv1.1 をコードする *KCNA1* 遺伝子に変異を持つ常染色体優性遺伝形式の遺伝性疾患である。発作性に症状を呈する希少疾患であり、診断自体が困難であるため、疾患の自然歴、病態メカニズム、治療法が確立していない。特に、日本では、EA の報告例そのものが、国際的な頻度と比べても少ない。そのため、日本における EA の報告例の集積が必要とされている。また、新規の遺伝子変異が同定された場合に、その変異チャンネルの機能解析手法の確立は、病原性証明において重要である。

### 2. 研究の目的

反復発作性運動失調症 (episodic ataxia : EA) の新規原因遺伝子変異の同定および病態メカニズム解明を目指した機能解析を行うことを目的とした。

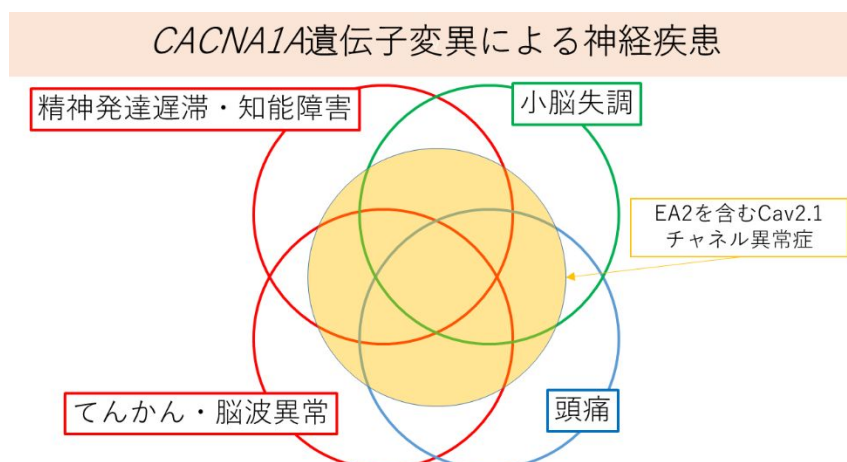
### 3. 研究の方法

(1)本邦での反復発作性運動失調症 (episodic ataxia : EA) の報告例自体が少ないため、平成 29 年度厚生労働省科学研究費“本邦における反復発作性運動失調症の実態把握調査”との連携により、本邦での EA 例の探索と遺伝子解析の体制構築を進めた。EA と臨床診断された症例で遺伝子解析がなされていない症例について、次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンス、さらには全エクソームシーケンスにより、遺伝子診断を行った。また、その臨床像についても情報収集し、解析を行った。

(2)変異チャンネルの機能異常を明らかにし、臨床像と矛盾しないことを証明することは、チャンネル病の診断において重要である。チャンネルの電位感受性ドメインに変異が見られる例が多いため、その機能異常を明らかにするために、当初、Cut open voltage clamp (COVC) 法の導入を予定していた。COVC 法開発者からの新しい増幅器購入を目指していたが、Covid-19 の世界的感染蔓延状況などの国際情勢により、供給不可能となった。そのため、代替案として従来のパッチクランプ法での電流計測を目指して、改良を進めた。

### 4. 研究成果

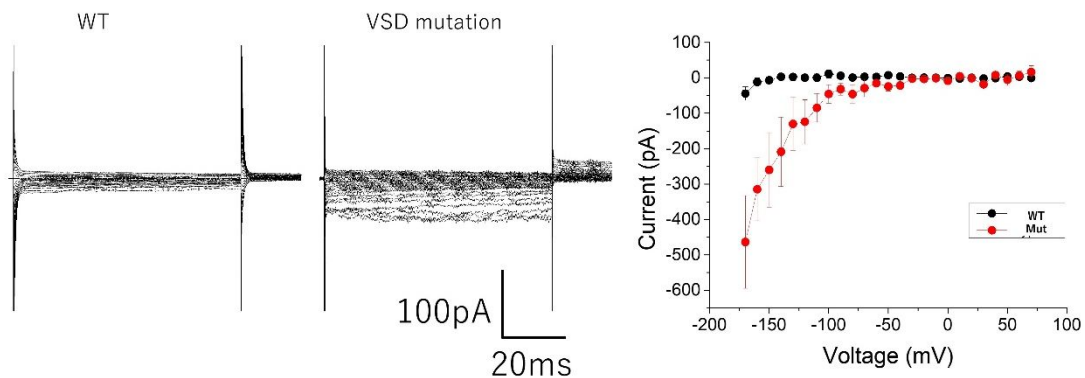
(1)特筆すべき成果として、遺伝子解析までされた本邦初の EA1 家系を見出した。また、既知の変異をもつ EA2 症例を 1 例、新規の変異をもつ EA2 症例 2 例を診断しえた。また、EA と一部共通の症状をもつ家族性片麻痺性片頭痛 (Familial hemiplegic migraine : FHM) 症例について、既知の変異をもつ症例を 1 家系 (2 例)、新規の変異を持つ症例を孤発例 1 例と 1 家系 (2 例) の計 3 例の確定診断を行った。これらの遺伝子変異確定例をもとに、EA やその Allelic disorder の特徴を解析したところ、Cav2.1 チャンネルの変異では、様々な表現型をとり、その主症状により様々な病名で診断されている傾向が見いだされた。EA の臨床像を捉えるには、その Allelic disorder にあたる他疾患の臨床診断例も含めて広く検討し、遺伝学的解析を行う必要があることが明らかとなった。



(2)上記の遺伝子変異確定診断例の中で、*ATP1A2* 遺伝子に新規変異をもつ家族性片麻痺性片頭痛 2 型 (FHM2) の家系を見出した。この家系の特徴的である点は、FHM1 や EA2 の原因となり得る *CACNA1A* 遺伝子の変異をもつ症例と持たない症例とが同一家系内に存在した点である。両者の臨床症状にも違いがみられ、*CACNA1A* 遺伝子に見られた変異の病態への役割が興味深い症例であり、英語論文として症例報告した (Kubota T, et al. Brain Dev. 2021. accepted)。

(3)ほか、神経筋チャンネル病についての病態解析研究を進め、学術論文として発表した。

(4)イオンチャンネルの電位感受性ドメインに変異をもつ変異チャンネルでは Gating pore 電流と呼ばれるわずかな異常漏洩電流が存在することが知られ、疾患の病態機序に関わっているとされている。この Gating pore 電流は、微小な電流であるため、従来、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた COVC 法を用いて計測されてきた。本研究では、パッチクランプ法での Gating pore 電流計測を目指し、既報論文の方法を参考に、トランスポゾンシステムを用いた培養細胞へのチャンネル発現の安定化を行い、培養細胞を用いたパッチクランプ法でも安定した Gating pore 電流の計測に成功した。この手法により、今後、EA 症例における変異チャンネルのより詳細な機能解析が可能となると考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horie Riho, Kubota Tomoya, Koh Jinsoo, Tanaka Rieko, Nakamura Yuichiro, Sasaki Ryogen, Ito Hidefumi, Takahashi Masanori P.	4. 巻 61
2. 論文標題 EF hand like motif mutations of Nav1.4 C terminus cause myotonic syndrome by impairing fast inactivation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Muscle & Nerve	6. 最初と最後の頁 808 ~ 814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mus.26849	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubota Tomoya, Wu Fenfen, Vicart Savine, Nakaza Maki, Sternberg Damien, Watanabe Daisuke, Furuta Mitsuru, Kokunai Yosuke, Abe Tatsuya, Kokubun Norito, Fontaine Bertrand, Cannon Stephen C, Takahashi Masanori P	4. 巻 2
2. 論文標題 Hypokalaemic periodic paralysis with a charge-retaining substitution in the voltage sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/braincomms/fcaa103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomoya Kubota, Shin Nabatame, Ruka Sato, Manami Hama, Ujiakira Nishiike, Hideki Mochizuki, Masanori P. Takahashi, Takao Takeshima	4. 巻 -
2. 論文標題 Hemiplegic migraine type 2 caused by a novel variant within the P-type ATPase motif in ATP1A2 concomitant with a CACNA1A variant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 久保田智哉, 高橋正紀, 石川欽也, 杉浦嘉泰, 高橋祐二, 水澤英洋
2. 発表標題 日本における反復発作性運動失調症の臨床像について
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀江里歩、久保田智哉、高真守、田中里江子、中村優一郎、佐々木良元、伊東秀文、高橋正紀
2. 発表標題 先天性パラミオトニーにともなう3種のC端に位置する変異ナトリウムチャネルの機能解析
3. 学会等名 第5回日本筋学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Riho Horie, Tomoya Kubota, Jinsoo Koh, Rieko Tanaka, Yuichiro Nakamura, Ryogen Sasaki, Hidefumi Ito, Masanori P. Takahashi,
2. 発表標題 EF hand-like motif mutations of Nav1.4 C-terminus impair fast inactivation associated with myotonic syndrome
3. 学会等名 64th Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保田智哉、高橋正紀、石川欽也、杉浦嘉泰、高橋祐二、水澤英洋
2. 発表標題 本邦における反復発作性運動失調症の実態把握調査研究
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoya Kubota
2. 発表標題 Functional characterization of mutations identified in skeletal muscle channelopathy in Japan. (誌上発表)
3. 学会等名 Canadian Physiological Society (CPS) - The Physiological Society of Japan (PSJ) Joint Symposium. The 97th Annual meeting of PSJ. (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

1. 久保田智哉、高橋正紀. 発作性運動失調症、反復発作性運動失調 『今日の疾患辞典』デジタル版〔Current Decision Support (CDS)〕  
URL:https://www.cds.ai/docs/detail/d09494\_indd 監修：国立精神・神経医療研究センター 水澤 英洋  
2. Tomoya Kubota, Functional characterization of SCN4A mutation identified in nondystrophic myotonia in Japan. (Invited presentation @  
University of Wisconsin, Madison, WI, USA.) July 12th, 2019.

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 正紀  (Takahashi Masanori)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授  (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------