

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17014

研究課題名(和文) T型カルシウムチャネル異常が引き起こす神経細胞死の病態機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathological mechanism of neuronal cell death induced by abnormal T-type calcium channel

研究代表者

國井 美紗子 (KUNII, Misako)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80725200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は小児てんかん・精神発達障害患者で同定された3種類のCACNA1Gのde novo変異に対し、培養細胞を用いた電気生理学的検討を行った。既報告のあるAla961ThrとMet1531Valに加え、病的変異の可能性のあるIle1273Pheの検討を加えて解析をした。パッチクランプによる一般的な解析に加え、oscillationという現象についての実験も行った。これまでに報告のないIle1273Phe変異においては、これらの解析にて有意な差を認めなかった。Ile1273Phe変異を持つ患者は既知の変異をもつ患者にくらべ、臨床症状が軽いことを反映する結果と考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は新規変異の可能性のあるIle1273Pheをもつ症例について臨床症状、検査所見などを含め詳細に報告した。培養細胞を用いた電気生理学的検討ではIle1273Phe変異によるCa電流の異常は今回検出できなかったが、臨床症状が他の変異より軽いことを反映しているものと考えた。CACNA1G変異は、これまでに報告されている良性的てんかんや脊髄小脳変性症、小児発症の小脳萎縮症のみならず、West症候群、Rett症候群様発達障害等の幅広い疾患スペクトラムを形成している可能性を示した。これによりチャネルの変異によっておこる疾患、いわゆるチャネオパチーという疾患概念の理解がさらに進展するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found three patients with de novo heterozygous CACNA1G variants in developmental delay and early-onset epileptic encephalopathies. Two patients were found to have known pathological mutants: p.(Ala961Thr) and p.(Met1531Val). One patient was revealed to harbor a previously unreported heterozygous variant: p.(Ile1273Phe). Electrophysiological study using HEK293T cells including oscillation analysis demonstrated no significant changes of T-type Ca²⁺ currents by p.(Ile1273Phe). The clinical phenotype of patient with p.(Ile1273Phe) variant was relatively mild in terms of gross motor function, as she can walk alone at the time of writing. The effects of p.(Ile1273Phe) variant on channel function and clinical symptoms may be smaller than those of p.(Ala961Thr) and p.(Met1531Val), which accounts for the normal results shown in the current electrophysiological experiments. The pathogenicity of the p.(Ile1273Phe) variant remains unresolved.

研究分野：神経内科学

キーワード：CACNA1G variant patch-clamp VGCCs

1. 研究開始当初の背景

電位依存性カルシウムチャンネル (**Voltage-gated calcium channels: VGCCs**) は、多彩なアイソフォームを持ち、様々な細胞機能に参与する。**VGCCs** 変異は精神疾患やてんかん症候群に加え、家族性片麻痺性片頭痛などの発作性疾患、脊髄小脳変性症などの変性疾患に至るまで、広範囲にわたる神経系疾患発症と関連していることが知られている。我々の施設では、これまで収集してきた **West** 症候群および **Rett** 症候群様の発達障害など重度発達障害を呈した計 **3** 名の患者において、**T** 型 **VGCC** である **Cav3.1** をコードする **CACNA1G** の **de novo** 変異を複数同定した (**Ala961Thr**、**Met1531Val**、**Ile1273Phe**、図 1)。**T** 型 **VGCC** は脳に最も豊富に発現しているが、**CACNA1G** 異常と疾患の関連としては長らく若年性ミオクローヌステんかんを認めた例が報告されているのみ (**B Singh, et al., Hum Mutat, 2007**) であった。**2015** 年 **10** 月に常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症の責任遺伝子であることが判明 (**M Coutelier, et al., Am J Hum Genet, 2015**) したが、これらの既報告は今我々が収集した症例とは異なる変異を持ち、表現型も異なっているため、**VGCCs** 関連疾患の表現型の多様性が示唆される。**2018** 年・**2019** 年には小児発症の小脳萎縮症/小脳失調症でも **CACNA1G** 変異 (**Ala961Thr**、**Met1531Val**) が報告された (**J. Chemin, et al., Brain, 2018**; **S. Barresi, et al., Pediatr. Neurol, 2019**)。我々はその **2** つの変異に加え、病的変異の可能性のある **Ile1273Phe** の検討を加えて報告した。

2. 研究の目的

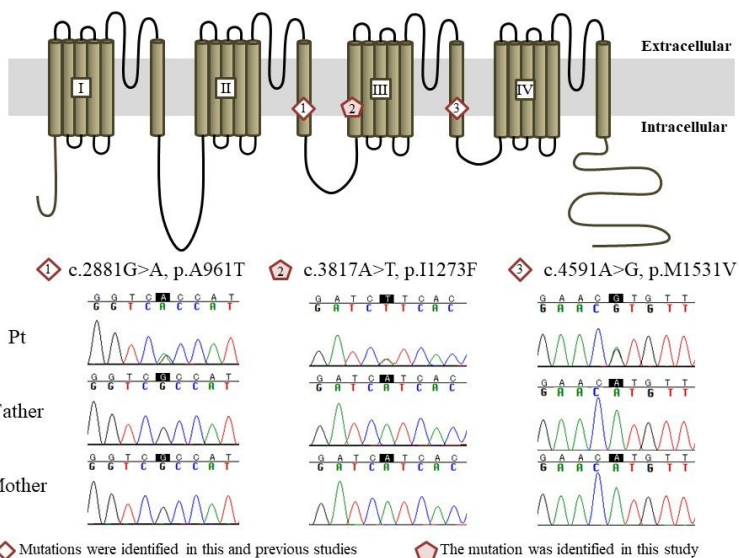
(1) パッチクランプ法を用いた **CACNA1G** 変異効果の評価

CACNA1G 変異による **Cav3.1** の機能変化について電気生理学的に検討することで、変異ごとに表現型が異なる分子基盤の解明を目指す。

(2) **CACNA1G** 変異をもつ症例の臨床的特徴の報告

本研究はてんかん、発達障害患者の遺伝子解析からスタートしており、研究開始時点で我々のみが知り得る非常に貴重な情報に基づいて計画された。本研究では、これまでに報告されている良性的てんかんや神経変性に加えて、**West** 症候群、**Rett** 症候群様発達障害など幅広い疾患スペクトラムに **VGCCs** の一種である **CACNA1G** 変異が関与することを示し、これまで原因不明であった一群の疾患の理解の促進を目指した。

図 1 **CACNA1G** の構造と **de novo** 変異



3. 研究の方法：パッチクランプ法を用いた **CACNA1G** 変異の電気生理学的検討

(1) I-V 曲線、活性化曲線

我々は **Cav3.1** と、マーカーである **DsRed** を同じ **mRNA** から別々に発現するベクター (**pIRES2 DsRed Express2** を使用) を作成し、野生型および **Mutagenesis kit** により変異を導入した変異型 **CACNA1G** を **HEK293** 細胞へ発現させた。**CACNA1G** を発現した **HEK293** 細胞を蛍光顕微鏡下で同定し、ホールセル法にて **voltage-clamp** 及び **current-clamp** 法を用いたパッチクランプ法による機能解析を行った。**-70mV** で電圧を固定し、そこから **10mV** ずつ電圧を変化させていった際の **Ca** イオンによる内向き電流を測定し **I-V** 曲線を作成した。また、各電圧に対するコンダクタンスをプロットし、活性化曲線を作成した。次に、不応期曲線を得るために段階的な脱分極パルスを与えた後の電流を測定した。

(2) リソナンス解析

I-V 曲線及び活性化曲線などのパラメータを用いた解析は既報告でも行われているが、我々はさらにリソナンス特性の変化を調べるため、オシレーションの周波数を解析する実験を行った。神経細胞は、ある特定の周波数の入力信号を増幅するリソナンス特性を持つことが知られており、**VGCCs** を含むイオンチャンネルがその特性に参与する。**CACNA1G** 変異により、増幅する周波数に変化がおこるか **HEK293** 細胞を用いて解析した。電圧を **-90mV** から

-60mVまで連続的にサインカーブ状に変動させ、0.5, 1, 2, 5, 10 HzでHEK293細胞に与えた。

4. 研究成果

(1) 症例の臨床的特徴

症例は3例とも重度発達障害を呈する女児であった。平均発症年齢は生後5.6ヶ月(3-8ヶ月)であり、全例が生後1年以内に初期症状を呈した。Ala961Thrを持つ症例はRett症候群と臨床的に診断されていた。Ile1273Phe、Met1531Valをもつ2例はてんかんの発作があり、脳波所見や臨床症状からそれぞれLennox-Gastaut症候群、West症候群と診断されていた。J. CheminらやS. BarresiらによるCACNA1G

変異の症例の報告は全例小脳萎縮を呈しているが(J. Chemin, et al., Brain, 2018; S. Barresi, et al., Pediatr. Neurol, 2019)、我々の報告ではMet1531Val症例のみしか小脳萎縮は呈しておらず、CACNA1G変異は必ずしも小脳萎縮をきたすとは限らないことが示唆された。

(2) 変異による電気生理学的特性

Ala961Thr、Met1531Val変異の電気生理学的検討では、野生型と比較しI-V曲線の左方向へのシフトが確認された。また、変異型の活性化曲線も野生型と比較し左方向へシフトしており、既報告同様、変異型は野生型より低電位で活性化しやすいプロパティを持つことが示された(図2)。我々が新規に報告したIle1273Phe変異については、これらのパラメータには変化が見られず、電気生理学的変化はとらえられなかった。オシレーションの周波数解析において、最も増幅が顕著に見られる周波数は、野生型とIle1273Pheでは5Hz、Ala961Thr、Met1531Valでは2Hzであった。Ala961Thr、Met1531Valは野生型と比較し、より低い周波数で増幅が見られることが判明した(図3)。この低い周波数でのオシレーションの変化がどのように臨床的なてんかん症状と関連しているかはまだ不明であるが、てんかん原獲得に寄与している可能性が考えられる。

以上の研究結果については、The Journal of the Neurological Sciences誌に報告した(M. Kunii, H Doi, et al., J Neurol Sci, 2020)。

<引用文献>

B. Singh et al., Mutational analysis of CACNA1G

in idiopathic generalized epilepsy, Hum. Mutat. 28 (2007) 524–525.

M. Coutelier, et al., A Recurrent Mutation in CACNA1G Alters Cav3.1 T-Type Calcium-Channel Conduction and Causes Autosomal-Dominant Cerebellar Ataxia, Am. J. Hum. Genet. (2015).

J. Chemin, et al., De novo mutation screening in childhood-onset cerebellar atrophy identifies gain-of-function mutations in the CACNA1G calcium channel gene, Brain. 141 (2018) 1998–2013.

S. Barresi, et al., Infantile-onset syndromic cerebellar ataxia and CACNA1G mutations, Pediatr. Neurol. (2019).

M. Kunii, et al., De novo CACNA1G variants in developmental delay and early-onset epileptic encephalopathies. J Neurol Sci. 15(416):117047, 2020.

図2 電気生理学的特性

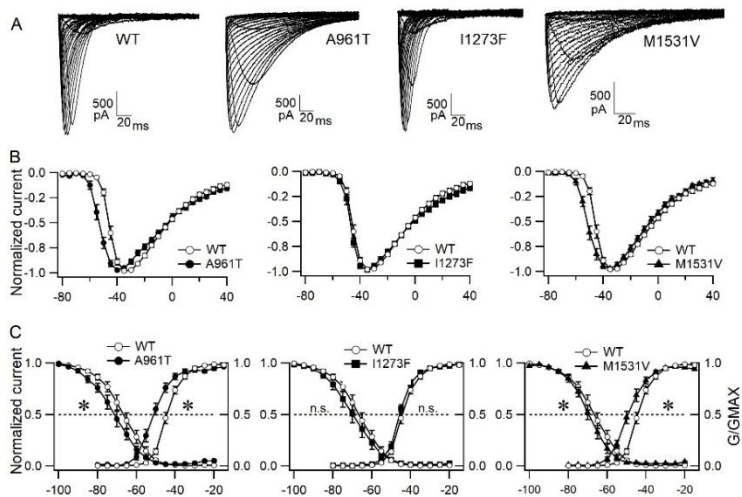
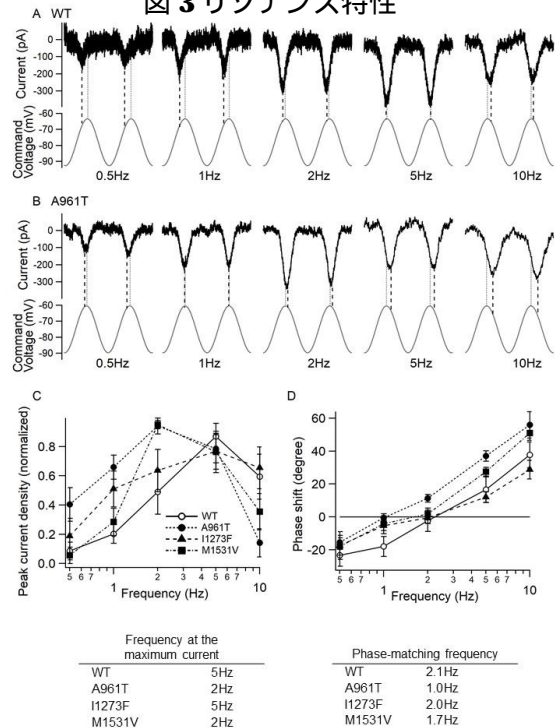


図3 リソナンス特性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hashiguchi Shunta, Doi Hiroshi, Kunii Misako et al.	4. 巻 130
2. 論文標題 Ataxic phenotype with altered CaV3.1 channel property in a mouse model for spinocerebellar ataxia 42	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 104516 ~ 104516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2019.104516	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 -
1. 著者名 Okubo Masaki, Doi Hiroshi, Fukai Ryoko, Fujita Atsushi, Mitsuhashi Satomi, Hashiguchi Shunta, Kishida Hitaru, Ueda Naohisa, Morihara Keisuke, Ogasawara Akihiro, Kawamoto Yuko, Takahashi Tatsuya, Takahashi Keita, Nakamura Haruko, Kunii Misako et al.	4. 巻 86
2. 論文標題 GGC Repeat Expansion of NOTCH2NLC in Adult Patients with Leukoencephalopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 962 ~ 968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25586	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 Hayashi Noriko, Doi Hiroshi, Kurata Yoichi, Kagawa Hiroyuki, Atobe Yoshitoshi, Funakoshi Kengo, Tada Mikiko, Katsumoto Atsuko, Tanaka Kenichi, Kunii Misako, Nakamura Haruko, Takahashi Keita, Takeuchi Hideyuki, Koyano Shigeru, Kimura Yayoi, Hirano Hisashi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 S0168-0102
2. 論文標題 Proteomic analysis of exosome-enriched fractions derived from cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 30487-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2019.10.010	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 -
1. 著者名 Yamaura Genpei, Higashiyama Yuichi, Kusama Kaori, Kunii Misako, Tanaka Kenichi, Koyano Shigeru, Nakashima Mitsuko, Tsurusaki Yoshinori, Miyake Noriko, Saitsu Hiroto, Iwahashi Yukiko, Joki Hideto, Matsumoto Naomichi, Doi Hiroshi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 58
2. 論文標題 Novel <i>VRK1</i> Mutations in a Patient with Childhood-onset Motor Neuron Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2715 ~ 2719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2126-18	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 -

1. 著者名 Nakamura Haruko, Komiya Hiroyasu, Uematsu Eri, Nakae Yoshiharu, Tanaka Kenichi, Kunii Misako, Tada Mikiko, Joki Hideto, Koyano Shigeru, Matsumoto Naomichi, Doi Hiroshi, Takeuchi Hideyuki, Tanaka Fumiaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Adult-onset vocal cord paralysis in slow-channel congenital myasthenic syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology: Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 e45 ~ e47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/CPJ.0000000000000599	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 Nakamura Haruko, Doi Hiroshi, Mitsuhashi Satomi, Miyatake Satoko, Katoh Kazutaka, Frith Martin C., Asano Tetsuya, Kudo Yosuke, Ikeda Takuya, Kubota Shun, Kunii Misako, Kitazawa Yu, Tada Mikiko, Okamoto Mitsuo, Joki Hideto, Takeuchi Hideyuki, Matsumoto Naomichi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 65
2. 論文標題 Long-read sequencing identifies the pathogenic nucleotide repeat expansion in RFC1 in a Japanese case of CANVAS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 475 ~ 480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0733-y	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 -

1. 著者名 Komiya Hiroyasu, Takeuchi Hideyuki, Ogawa Yuki, Hatooka Yuki, Takahashi Keita, Katsumoto Atsuko, Kubota Shun, Nakamura Haruko, Kunii Misako, Tada Mikiko, Doi Hiroshi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 13
2. 論文標題 CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00607-3	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 -

1. 著者名 Kunii Misako, Doi Hiroshi, Hashiguchi Shunta, Matsuishi Toyojiro, Sakai Yasunari, Iai Mizue, Okubo Masaki, Nakamura Haruko, Takahashi Keita, Katsumoto Atsuko, Tada Mikiko, Takeuchi Hideyuki, Ishikawa Taro, Miyake Noriko, Saitsu Hiroto, Matsumoto Naomichi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 416
2. 論文標題 De novo CACNA1G variants in developmental delay and early-onset epileptic encephalopathies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 117047 ~ 117047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2020.117047	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 -

1. 著者名 Doi Hiroshi, Okubo Masaki, Fukai Ryoko, Fujita Atsushi, Mitsuhashi Satomi, Takahashi Keita, Kunii Misako, Tada Mikiko, Fukuda Hiromi, Mizuguchi Takeshi, Miyatake Satoko, Miyake Noriko, Sone Jun, Sobue Gen, Takeuchi Hideyuki, Matsumoto Naomichi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 88
2. 論文標題 Reply to " GGC Repeat Expansion of NOTCH2NLC is Rare in European Leukoencephalopathy "	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 642 ~ 643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25819	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Misako Kunii
2. 発表標題 De novo CACNA1G mutations in neurodevelopmental disorders
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 Misako Kunii
2. 発表標題 The effects of identified CACNA1G mutations on channel functions in neurodevelopmental disorders
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------