

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591000

研究課題名（和文） 本邦における Dok-7 変異型先天性筋無力症候群の遺伝子診断と治療法の研究

研究課題名（英文） Genetic analysis and research on treatment of congenital myasthenic syndromes with Dok-7 mutations (Dok-7 CMS) in Japan.

研究代表者

福田 卓 (FUKUDA TAKU)

長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・助教

研究者番号：50437894

研究成果の概要（和文）：

Dok-7 は 2006 年に発見された神経筋接合部の発達上不可欠な蛋白であり、Dok-7 変異に伴う先天性筋無力症候群(CMS)が海外より報告されている。国内における Dok-7CMS の症例集積とそれによる Dok-7 遺伝子の病態への関わりへの解析、さらにそこから CMS や筋無力症全般の治療法の開発を目指すのが本研究の目的である。本疾患が疑われる症例について遺伝子解析を行ってきたが、現在のところ変異を有する患者は見つかっていない。今後も引き続き情報収集、解析を続けていく。

研究成果の概要（英文）：

Dok-7 was discovered in 2006 as a key molecule in development of neuromuscular junction, and overseas patients with congenital myasthenic syndrome with Dok-7 mutations (Dok-7 CMS) have been reported. Our purpose of this project is to find cases with Dok-7 CMS in Japan, to clarify the pathogenesis of Dok-7 CMS, and try to establish the new treatment of myasthenia. We have not found any cases of Dok-7 CMS and we continue to make effort to survey cases with Dok-7 CMS in Japan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：

(1)遺伝子診断 (2)先天性筋無力症候群 (3)Dok-7 (4)重症筋無力症 (5)神経筋接合部疾患

## 1. 研究開始当初の背景

神経筋接合部における伝達障害により筋の易疲労性が引き起こされる、いわゆる筋無力症 (myasthenia) の一群には、自己抗体を

介した免疫的機序によるもの(重症筋無力症、Lambert-Eaton 筋無力症候群)、および遺伝的異常によるものが知られており、後者は先天性筋無力症 (Congenital Myasthenic

Syndrome、CMS)と呼ばれている。Mayo clinic の Engel らのグループは CMS の原因として神経筋接合部に発現するいくつかの蛋白の変異を報告しており、例えばアセチルコリン受容体、コラーゲン Q、コリンアセチルトランスフェラーゼ、ラブシン、ナトリウムチャンネル、MuSK などの遺伝子異常が CMS を引き起こすことが明らかにされている。これらの CMS は海外では多くの症例報告があるが、本邦からはいずれのタイプについても報告はない。図 1 に示すように、MuSK は骨格筋細胞膜に存在する受容体型チロシンキナーゼであり、細胞外のアグリンと作用して活性化され、シグナル伝達を介してラブシンを活性化し、アセチルコリン受容体を神経筋接合部に集中発現(クラスタリング)させる蛋白である。MuSK 蛋白に関連した病態としては抗 MuSK 自己抗体により重症筋無力症 (Myasthenia gravis, MG)を引き起こされること (Hoch, W, et al. Nat Med 2001) が近年注目され、当施設でも本邦における MuSK 陽性 MG についての抗体検査と臨床像(胸腺腫を合併せず、眼症状に比して球麻痺症状が強く、しばしば筋萎縮が目立つこと、など)を報告してきた(本村ら、厚生労働省・免疫性神経疾患に関する調査研究班)。2006 年、細胞内部から MuSK に結合しそれを制御・活性化する、Dok-7 (Downstream of tyrosine kinase 7)という新しい蛋白が本邦の山梨らのグループ(共同研究者、Okada, et al. Science 2006)により発見され、発達段階における神経筋接合部シナプスの形成に不可欠な因子であることが示された。

欧州で実際に CMS が疑われる症例で Dok-7 遺伝子変異の検索がなされたところ、同蛋白の変異に伴う CMS(Dok-7 変異型 CMS)が多数見つかると、その臨床的特徴として 5 歳までに主に歩行障害で発症すること、眼瞼下垂や体幹や四肢近位筋の筋力低下を呈するが外眼筋麻痺がほとんどみられないこと、エフェドリンが有効な症例が多いこと、などが報告されてきた。(Beeson, D, et al. Science 2006, Palace, J, et al. Brain 2007) これまで本邦では CMS の報告はないが、1) 肢帯型筋ジストロフィーと診断されている例、2) フロッピーインファント、3) 自己抗体を認めない若年発症・家系内発症の筋無力症などの患者の中に CMS 例が埋もれている可能性が十分にある。また、Dok-7 変異型を含め CMS では、その症状の軽減のために原因遺伝子毎に異なった治療薬が効果を現すことが知られており、遺伝子診断体制の確立がきわめて重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

CMS が疑われる患者について、Dok-7 を含めた原因遺伝子異常の有無についてシー

クエンス解析を行って症例を蓄積し、臨床像や薬物治療効果を明らかにしていく。Dok-7 変異型 CMS 症例で新しい変異が見つかった場合、免疫沈降法による MuSK との相互作用の評価、筋芽細胞系への発現による形態的解析などにより変異がその機能に与える影響を評価する。

## 3. 研究の方法

- 1) 当施設の倫理委員会への、本研究計画に関する申請
- 2) 候補症例の集積 関連施設への呼びかけ、血清測定を行った従来の症例の臨床症状や家族歴の再分析を行い、候補症例を選ぶ。・家系内発症がある症例・眼筋よりも四肢に強い症状を呈している症例・重症筋無力症の自己抗体が陰性の症例・フロッピーインファントで筋無力症様症状を呈している例を中心に選択する。
- 3) 説明と同意・承諾のもとでの患者 DNA 抽出
- 4) シークエンス [Dok-7、その他主要な CMS について] 抽出された患者 DNA より PCR を行なう。シークエンスに用いるプライマーは Dok-7 に関してはオクスフォード大学のグループ (Beeson, D, et al. Science 2006) の用いたものを作成する。また、その他の主要な CMS については Engel らの発表に基づき、プライマーの作成を行う。シークエンスに関して何らかの問題が生じた場合には、PCR やシークエンサーの条件などに関して東京大学・山梨教授のグループとともに対処していく。我が国では従来の遺伝子に関して CMS のシークエンスが行われているにも関わらず報告がみられないこと、Dok-7 変異型 CMS は英国では CMS 全体の 30~40%を占めると推定されていること、よりまず Dok-7 遺伝子のシークエンス解析を行う。特に 90%以上の症例において変異が報告されている Dok-7 のエクソン 7 より解析を行い、変異が見つからない場合は、順次その他のエクソンや頻度の多い他の CMS 関連遺伝子についても解析を行っていく。
- 5) 変異遺伝子の機能解析と臨床症状の分析 Dok-7 の新しい変異が見つければ、その症例の臨床症状・神経所見について従来の CMS 症例との類似点・相違点を明確にするとともに、変異 Dok-7 蛋白の機能解析を行う。・免疫沈降法による Dok-7 の MuSK への結合能、リン酸化能など、相互作用の評価・筋芽細胞系への発現による形態的解析など

## 4. 研究成果

本疾患が疑われる症例について遺伝子解析

を行ってきたが、現在のところ、変異を有する患者は見つかっていない。小児科領域あるいは「抗体陰性の重症筋無力症」といった症例のなかに潜在的に CMS 症例が存在する可能性があり、これまでも先天性筋無力症が疑われる症例に関する情報の収集を行ってきたが、引き続き情報収集を続けていく。変異症例が見つかれば、その機能解析を行っていく方針である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

本村政勝、福田卓、吉村俊朗、他、新発見 Overview: MuSK と Dok-7、日本臨牀、査読無、66 巻、2008、1140-1148

Shen XM, Fukuda T, Ohno K, Sine SM, Engel AG. Congenital myasthenia related AChR delta subunit mutation interferes with intersubunit communication essential for channel gating. J Clin Invest. 査読有、118 巻、2008、1867-1876

本村政勝、福田卓、吉村俊朗、辻畑光宏、レセプターへの自己免疫からみた神経筋接合部障害：重症筋無力症をモデルとして、Medical Science Digest、査読無、34 巻、2008、22-25

[学会発表] (計 11 件)

徳田昌紘、中野治郎、福田卓、本村政勝、江口勝美、他、特異的チロシンキナーゼ (MuSK) 抗体の運動終板再生に与える影響、日本神経学会総会、2008. 05. 15-17

本村政勝、石飛進吾、福田卓、江口勝美、他、重症筋無力症の嚙下機能評価に関する検討、日本神経学会総会、2008. 05. 15-17

佐藤克也、福田卓、徳田昌紘、辻野彰、本村政勝、江口勝美、他、タクロリムス長期投与中に赤芽球瘍を合併した重症筋無力症の 1 例、日本神経学会九州地方会、2008. 06. 14

柘田智子、本村政勝、福田卓、辻野彰、江口勝美、他、アセチルコリン受容体・ $\alpha$ 67-76 抗体は重症筋無力症の重症度と相関する、日本神経免疫学会、2009. 3. 12-13

柘田智子、本村政勝、福田卓、辻野彰、江口勝美、他、重症筋無力症の嚙下機能評価に関

する検討、日本内科学会総会、2009. 4. 10-12

柘田智子、本村政勝、福田卓、辻野彰、江口勝美、他、重症筋無力症におけるアセチルコリン受容体・ $\alpha$ 67-76 抗体の臨床的意義、日本神経学会総会、2009. 5. 20-22

本村政勝、福田卓、辻野彰、江口勝美、他、アセチルコリン受容体・ $\alpha$ 67-76 抗体と MG 嚙下障害に関する検討、日本神経学会総会、2009. 5. 20-22

吉村俊朗、本村政勝、福田卓、辻野彰、江口勝美、他、MuSK 抗体と抗コリンエステラーゼ剤のラット運動終板形成に及ぼす影響、日本神経学会総会、2009. 5. 20-22

佐藤克也、福田卓、辻野彰、本村政勝、江口勝美、他、当科における重症筋無力症・胸腺腫に合併した赤芽球瘍 (PRCA) の 5 症例、日本神経治療学会総会、2009. 6. 11-12

Masuda T, Motomura M, Fukuda T, Eguchi K, 他、Antibodies against main immunogenic region (MIR) of the nicotinic acetylcholine receptor and ocular Myasthenia Gravis. International Congress on Neuromuscular disease. 2010. 7. 17-22

Motomura M, Fukuda T, Eguchi K, 他、Myasthenia Gravis and associated autoimmune disease; clinical features and autoantibodies. International Congress on Neuromuscular disease. 2010. 7. 17-22

[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

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/intmed-1/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

福田 卓 (Fukuda Taku)

長崎大学・大学院医歯薬総合研究課 助教  
研究者番号：50437894

##### (2) 研究分担者

本村政勝 (Motomura Masakatsu)

長崎大学・大学院医歯薬総合研究課 講師  
研究者番号：70244093

江口勝美 (Eguchi Katsumi)  
佐世保市立総合病院 院長  
研究者番号：30128160

(3)連携研究者

辻野 彰 (Tsujino Akira)  
長崎大学病院  
研究者番号：70423639

樋口 理 (Higuchi Osamu)  
東京大学医科学研究所腫瘍抑制分野  
准教授  
研究者番号：50361720

山梨裕司 (Yamanashi Yuji)  
東京大学医科学研究所腫瘍抑制分野教授  
研究者番号：40202387