

機関番号：12501  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591018  
 研究課題名（和文） 筋萎縮性側索硬化症のカリウムチャンネル機能障害と神経細胞死に関する生理学的研究  
 研究課題名（英文） The neurophysiological study of the association between K<sup>+</sup> channel dysfunction and motor neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis  
 研究代表者  
 金井 数明（KANAI KAZUAKI）  
 千葉大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：10375751

## 研究成果の概要（和文）：

マウス坐骨神経での運動神経挫滅・再生モデルにおいて神経損傷からの再生過程における軸索興奮特性の変化及び軸索のイオンチャンネルの発現変化を評価し、神経再生過程でのイオンチャンネル発現変化と興奮特性の変化との関連を報告した。また運動ニューロン疾患患者における運動神経軸索興奮特性の変化や、広く神経疾患におけるイオンチャンネル異常などに関しても継続的に研究を行い、これを論文や学会のシンポジウムなどで報告した。

## 研究成果の概要（英文）：

We estimated simultaneously the changes of motor axonal excitability properties and nodal / paranodal ion channel expressions of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in the process of the Wallerian degeneration and regeneration in mice model, and reported the association among them. We also studied the nerve excitability changes in the motor neuron diseases and its associations with the disease pathophysiology, and studied the pathophysiological roles of channelopathy in some neurological disorders. The results were presented in some symposiums and conferences, and were published in some papers.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：神経生理学

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：筋萎縮性側索硬化症・チャネロパシー・神経軸索興奮特性・ナトリウムチャンネル・カリウムチャンネル・神経変性・神経保護

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）等の慢性進行性の運動ニューロン変性疾患では線維束性収縮などの運動単位の自発発射による症状が

高頻度に認められ、軸索の興奮性が増大していることが推定され、この過剰な神経興奮性は運動ニューロンの細胞死とも関連していると考えられる。これらの興奮性変化は ALS

の運動神経における代謝的な変化（変性の進行による ATP 欠乏など）やイオンチャネルの機能・発現などの変化を反映していると考えられる。イオンチャネルは様々な神経疾患の分子病態において、遺伝子変異によるものやあるいは発現量や部位の変化など様々な形で関与していることが判明しており、近年注目されている。我々はこれまでイオンチャネルの各種神経疾患の病態に果たす役割を、筋萎縮性側索硬化症（ALS）・下位運動ニューロン疾患などの神経変性疾患、糖尿病性ニューロパチーなどの末梢神経疾患や（Brain 2003、Ann Neurol 2004、Brain 2006）、てんかんなどの中枢神経疾患で明らかにしてきている（Neurology 2004）。

我々はこれまでの研究で ALS 患者の運動神経軸索における K<sup>+</sup>電流の低下や持続性 Na<sup>+</sup>電流の増大を確認し、その臨床病期との関連を報告している（Brain 2006）。また一方、我々は病末期の ALS 患者でなお生存・残存している運動神経軸索では ALS 患者での平均に比べ、一部の K<sup>+</sup>電流に増加が見られることを確認し、これが KATP チャネルの活性化によりもたらされている可能性が示唆された（Brain 2006）。

ALS におけるイオンチャネル機能変化やそれに伴う K<sup>+</sup>電流の低下・持続性 Na<sup>+</sup>電流の増大が運動ニューロン変性にどのように関与しているのか、その詳細は不明である。しかしながら、ALS の病態仮説の 1 つとしてミトコンドリア機能異常とそれに伴うエネルギー代謝異常が近年注目されている。

このような K<sup>+</sup>電流の低下や持続性 Na<sup>+</sup>電流の増大による運動神経の過剰興奮性が、不適切かつ過剰な運動神経細胞の発火を誘発し、その結果 ATP の過剰消費を招きさらにエネルギー代謝を悪化させる、という可能性があるため、注目すべきと考えられる。また実際、近年てんかんや脳梗塞などの領域で K<sup>+</sup>チャネルや Na<sup>+</sup>チャネルの modulator が神経保護薬として応用できる可能性が示唆されているが、ALS に対する現時点で唯一のエビデンスのある治療薬である riluzole は、グルタミン酸系に対する作用のほか、持続性 Na<sup>+</sup>電流の抑制作用や K<sup>+</sup>チャネルの活性化作用もあることが知られていることなどから、ALS でもまた K<sup>+</sup>チャネルなどイオンチャネルの modulator により、症状の対症療法的な改善が見込めるほか、運動ニューロンの細胞死を一部抑制できる可能性も示唆されている。

## 2. 研究の目的

今回我々は、これまでの ALS 患者の運動神経軸索興奮性変化で得られた研究成果から、ALS 患者で認められた K<sup>+</sup>電流の変化に注目し、これらが ALS 運動神経軸索における過剰興奮性を生み出し神経変性や進行期にお

ける神経生存と関連する可能性を考えた。またこれと同時に他のイオン電流、特に Na<sup>+</sup>電流の変化にも着目し、これらの変化と神経変性との関連について解析を行った。

## 3. 研究の方法

1)モデル動物における運動神経変性・再生と興奮特性の関連に関する検討

8週齢の C57/BL6J マウスを用いたマウス坐骨神経挫滅モデルにて、神経のワーラー変性・再生過程における運動神経軸索のイオンチャネル機能の生理学的変化を神経伝導検査及び軸索興奮特性検査を用いて評価を行い、組織学的変化を抗イオンチャネル抗体を用いた蛍光免疫染色法によって評価を行った。これらの評価を経時的に行うことにより、神経のワーラー変性・再生過程における運動神経軸索のイオンチャネル機能の生理学的および組織学的変化の過程について精査を行った。

2)運動ニューロン疾患患者における神経変性と神経興奮特性変化との関連に関する研究  
我々はこれまで ALS では小指外転筋（-尺骨神経支配）よりも短母指外転筋（-正中神経支配）の方が萎縮が速く進行するという“split hand syndrome”現象を報告しており、正中神経と尺骨神経の興奮特性の差がこれに影響を与えている可能性が指摘されている。これに関連し、ALS 患者における正中神経と尺骨神経の興奮特性の差を ALS 患者 14 名にて評価し、対照 14 名と比較した。

また、ALS 以外の運動ニューロン疾患として球脊髄性筋萎縮症に着目し、その軸索興奮特性の評価を行い、また LH-RH アナログ療法の結果生じる運動神経軸索興奮特性の変化を評価した。

3)神経疾患におけるイオンチャネル異常の病態の関与に関する研究

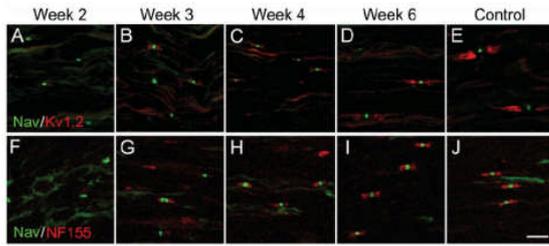
広くイオンチャネル異常症が神経疾患を惹起することに着目し、イオンチャネル遺伝子異常が関与する遺伝性てんかん症候群における遺伝子型・表現型相関に関する研究を行った。

## 4. 研究成果

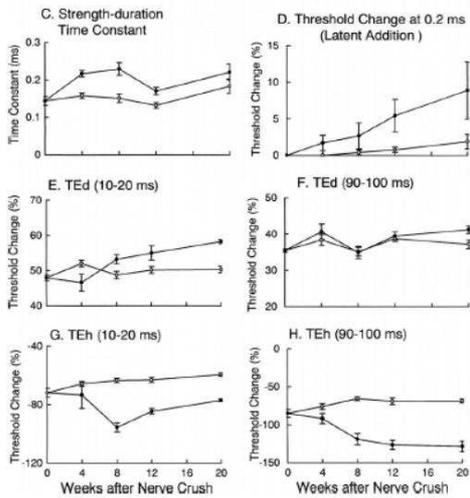
1) モデル動物における運動神経変性・再生と興奮特性の関連に関する検討

マウス坐骨神経での運動神経挫滅・再生モデルにおいて、神経損傷からの再生過程における軸索興奮特性の変化及び軸索のイオンチャネルの発現変化を経時的に測定した結果、ワーラー変性と再生過程における、1)カリウムチャネルの機能変化及びランビエ絞輪付近における分布パターンの変化、および 2)ナトリウムチャネルの発現亢進および持続性ナトリウム電流の著明な亢進、を認め

た。

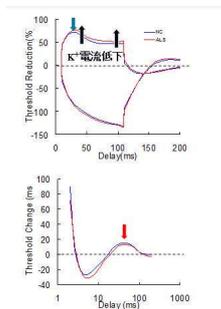


このことにより、神経損傷とその再生に伴うヒトの諸症状（筋萎縮・筋力低下・有痛性筋痙攣・しびれ・痛み）の分子生理学的基盤を明らかにし、将来のより合理的な治療法確立のために有用な情報をもたらした。またこのことにより、神経変性の過程で生じるイオンチャンネルの発現変化と興奮特性の変化の、疾患コントロールとなるデータを得た。

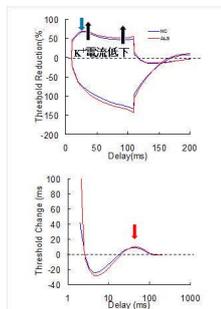


## 2) ALS 患者における神経変性と神経興奮特性変化との関連に関する研究

<正中神経>



<尺骨神経>



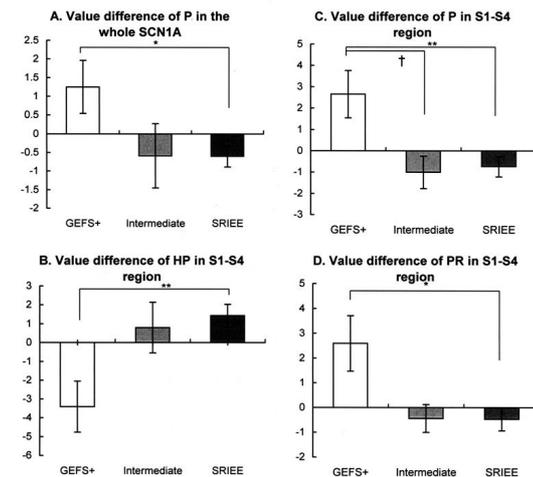
ALS 患者 14 名において正中神経と尺骨神経間の神経軸索興奮特性の差異を評価した。その結果、ALS 患者においても正中神経では尺骨神経と比較し、1) K<sup>+</sup>電流の低下、および 2) 持続性 Na<sup>+</sup>電流の増大、を認めた。こ

れらの変化はいずれも神経の興奮性増大につながる所見であり、このような神経の過剰興奮性が正中神経と尺骨神経の変性速度の差異につながっている可能性が示唆された。もしこのような興奮性の差異が神経変性の速度の差につながるのであれば、それらの補正は神経変性の抑制につながる可能性があり、今後の治療法開発に重要な示唆を与えるものと考えられる。

## 3) 神経疾患におけるイオンチャンネル異常の病態の関与に関する研究

広くイオンチャンネル異常症が神経疾患を惹起することに着目し、イオンチャンネル遺伝子異常が関与する遺伝性てんかん症候群における遺伝子型-表現型相関に関する研究を行った。

その結果、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネル遺伝子 SCN1A のミスセンス変異によって生じるアミノ酸残基置換の結果生じるアミノ酸残基の物理化学的特性変化の程度が表現型に有意な影響を及ぼすことが判明し、その程度が軽い場合には軽症型に、程度が重い場合には重症型になることが判明した。



この研究により、それまでは不明であった SCN1A のミスセンス変異に伴う遺伝性てんかん症候群における遺伝子型-表現型相関が明らかになり、遺伝カウンセリングなどの場において重要な臨床情報を提供することができるようになった。

またイオンチャンネルの機能異常の程度の差異が神経系の機能異常の差異につながることが明らかとなり、イオンチャンネル異常が神経細胞死に与える影響という観点から重要な所見を与えることとなった。

## 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 16 件)

- ① Noto Y, Kanai K, Misawa S, ..., Kuwabara S(10<sup>th</sup>). Distal motor axonal dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological science*. 査読有、302 巻、2011 年、58-62
- ② Noto Y, Shibuya K, Sato Y, **Kanai K**, ....., Kuwabara S(16<sup>th</sup>). Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: specificity, sensitivity, and a possible prognostic value. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 査読有、12 巻、2011 年、140-3
- ③ Sawai S, Misawa S, **Kanai K**, ..., Kuwabara S(11<sup>th</sup>). Altered axonal excitability properties in juvenile muscular atrophy on distal upper extremity (Hirayama disease). *Clinical Neurophysiology*. 査読有、122 巻、2011 年、205-9
- ④ Katsuno M, ...**Kanai K**(11<sup>th</sup>), et al. Efficacy and safety of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (JASMITT study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurology*. 査読有、9 巻、2010 年、875-894
- ⑤ **Kanai K**, Yoshida S, Hirose S, et al. Physicochemical property changes of amino acid residues that accompany missense mutations in SCN1A affect epilepsy phenotype severity. *Journal of Medical Genetics*. 査読有、46 巻、2009 年、671-0
- ⑥ Bae JS, Sawai S, Misawa S, **Kanai K**, Iose S, Kuwabara S. Differences in excitability properties of FDI and ADM motor axons. *Muscle and Nerve*. 査読有、39 巻、2009 年、350-4
- ⑦ Iose S, Kuwabara S, Kokubun N, ... **Kanai K** (12<sup>th</sup>), ... et al. Utility of the distal compound muscle action potential duration for diagnosis of demyelinating neuropathies. *Journal of peripheral nervous system*. 査読有、14 巻、2009 年、151-8
- ⑧ **Kanai K**, Asahina M, Arai K, ... Kuwabara S,(9<sup>th</sup>) ...et al. Preserved cardiac (123)I-MIBG uptake and lack of severe autonomic dysfunction in a PARK9 patient. *Movement Disorder*. 査読有、24 巻、2009 年、1403-4
- ⑨ **Kanai K**, Kuwabara S. Motor nerve hyperexcitability and muscle cramps in Machado-Joseph disease. *Archives of Neurology*. 査読有、139 巻、2009 年、139
- ⑩ Sonoo M, Kuwabara S, Shimizu T, et al. Utility of trapezius EMG for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. 査読有、39 巻、2009 年、63-70
- ⑪ Sawai S, **Kanai K**, Nakata M, ..., Kuwabara S (8<sup>th</sup>). Changes in excitability properties associated with axonal regeneration in human neuropathy and mouse Wallerian degeneration. *Clinical Neurophysiology*. 査読有、119 巻、2008 年、1097-105
- ⑫ Nakata M, Baba H, **Kanai K**,..., Kuwabara S (7<sup>th</sup>). Changes in Na(+) channel expression and nodal persistent Na(+) currents associated with peripheral nerve regeneration in mice. *Muscle and Nerve*. 査読有、37 巻、2008 年、721-30
- ⑬ Bae JS, Sawai S, Misawa S, **Kanai K**, Iose S, Shibuya K, Kuwabara S. Effects of age on excitability properties in human motor axons. *Clinical Neurophysiology*. 査読有、119 巻、2008 年、2282-6
- ⑭ Kuwabara S, Sonoo M, Komori T, et al. Dissociated small hand muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis: frequency, extent, and specificity. *Muscle and Nerve*. 査読有、37 巻、2008 年、426-30
- ⑮ **Kanai K**, Kuwabara S, Sawai S, et al. Genetically confirmed Huntington's disease masquerading as motor neuron disease. *Movement Disorder*. 査読有、23 巻、2008 年、748-51
- ⑯ Ning YP, **Kanai K**, Tomiyama H, ..., Kuwabara S (9<sup>th</sup>), ... et al. PARK9-linked parkinsonism in eastern Asia: mutation detection in ATP13A2 and clinical phenotype. *Neurology*. 査読有、70 巻、2008 年、1491-3

〔学会発表〕 (計 11 件) うち招待講演 計 (4) 件

- ① **Kanai K**, Shibuya K, Fujimaki Y, et al. LH-RH analogue therapy improves the abnormalities of axonal membrane excitability properties in spinal and bulbar muscular atrophy. 29<sup>th</sup> International Congress of Clinical Neurophysiology 2010 年 10 月 29 日 神戸
- ② **Kanai K**. Use of gene expression systems to study cellular effects of human

- epilepsy mutations. <招待講演> The 8th Asian and Oceanian Epilepsy Congress 2010年10月21日メルボルン(豪州)
- ③ **金井 数明**. わかりやすい軸索興奮性テスト. <招待講演> 第40回日本臨床神経生理学会学術大会2010年11月1日神戸
  - ④ **桑原 聡、金井 数明、**渋谷和幹ら. 運動神経軸索膜の興奮特性変化はALSにおける独立した予後規定因子である. 平成22年度難治性疾患克服研究事業 神経変性疾患に関する調査研究班 班会議 2010年12月17日 東京
  - ⑤ **桑原 聡、**渋谷和幹、**金井 数明**ら. 軸索イオンチャネルからみたALSの病態: 免疫組織学的検討. 平成22年度難治性疾患克服研究事業 神経変性疾患に関する調査研究班 班会議 2010年12月17日 東京
  - ⑥ **金井 数明、**渋谷 和幹、能登 祐一ら. 球脊髄性筋萎縮症と筋萎縮性側索硬化症の運動神経軸索興奮特性の比較. 第39回日本臨床神経生理学会 2009年11月20日 小倉
  - ⑦ **金井 数明**. Transcriptional channelopathy としての運動ニューロン疾患: 神経興奮性異常とイオンチャネル発現の dysregulation. <招待講演> 第39回日本臨床神経生理学会 2009年11月20日 小倉
  - ⑧ **Kazuaki Kanai**. Clinical application of genetic information in epilepsy management and establishment of individualized medicine for epilepsy. <招待講演> 第43回日本てんかん学会 2009年10月23日 弘前
  - ⑨ **桑原 聡、金井 数明、**渋谷 和幹ら. 軸索興奮性からみた筋萎縮性側索硬化症の病態: "Split hand" の発現機序. 平成21年度難治性疾患克服研究事業 神経変性疾患に関する調査研究班 2009年12月18日 東京
  - ⑩ **金井 数明、**桑原 聡、澤井 摂ら. 球脊髄性筋萎縮症における持続性 Na<sup>+</sup>コンダクタンス上昇. 第49回 日本神経学会総会. 2008.5.15 横浜
  - ⑪ **金井 数明、**桑原 聡、澤井 摂ら. 球脊髄性筋萎縮症における運動神経軸索膜の受動特性. 第38回 日本臨床神経生理学会総会 2008.11.13 神戸

[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]

特記なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金井 数明 (KANAI KAZUAKI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 10375751

### (2) 研究分担者

桑原 聡 (KUWABARA SATOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 70282481