

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09314

研究課題名(和文) 周期性四肢麻痺の新規遺伝子探索と病態解明

研究課題名(英文) Genetic and pathophysiological analysis of periodic paralyses

研究代表者

高橋 正紀 (Takahashi, Masanori)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20359847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋イオンチャネル病の中で、病態がもっとも未解明な周期性四肢麻痺を中心に、遺伝学的・病態生理学的解析を行った。家族歴を認めず遺伝性と考えられていなかった孤発性周期性四肢麻痺について、一塩基多型の解析を行い、遺伝的背景の存在を明らかにした。また、疾患原性が疑われる複数の変異を有する症例を見出し、両変異による機能異常が重症化に寄与していることを示した。同様の症例は網羅的遺伝子解析の普及により今後ますます見出される可能性が高い。これらの研究成果はレアバリエントによる症状修飾というチャネル病のあらたな病態機序を示した点で重要である。

研究成果の概要(英文)：Among skeletal muscle channelopathies, genetic and pathophysiological analyses were conducted, focusing on periodic paralysis of which pathomechanism is most poorly understood. Analysis of single nucleotide polymorphism was performed on sporadic periodic paralysis, which was not considered as hereditary due to a lack of family history, and clarified the existence of genetic background. We also found a case with multiple mutations suspected of pathogenicity and revealed that functional abnormalities due to both mutations contribute to disease severity. Similar cases are likely to be found more and more in the future due to the spread of next generation sequencing. Thus our finding, phenotypic modification by rare variant, is an important new pathological mechanism of channel disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：イオンチャネル 骨格筋 心臓 次世代シーケンサ 一塩基多型 電気生理 パッチクランプ 遺伝学的解析

1. 研究開始当初の背景

イオンチャネルの異常はその発現する種々の臓器においてさまざまな疾患を引き起こすことが明らかとなり、「チャネル病」という概念が提唱されるようになった。骨格筋においては、非ジストロフィー性ミオトニー症候群や周期性四肢麻痺が知られている。非ジストロフィー性ミオトニー症候群（先天性ミオトニーや先天性パラミオトニーなど）については、遺伝子（塩化物イオンチャネル、骨格筋型 Na チャネル）の変異が、チャネルの機能異常（電流量低下、速い不活化の異常など）を呈し、筋強直という臨床症状をきたすという病態機序がわれわれなどの研究により明白になっていた。いっぽうで周期性四肢麻痺、なかでも低カリウム性周期性四肢麻痺については原因遺伝子の同定、病態機序の解明も不十分な現状であった。

低カリウム性周期性四肢麻痺の原因遺伝子として、骨格筋型カルシウムチャネルとナトリウムチャネルが同定されている。興味深いことに、電位感受性ドメインの中核センサーであるセグメント 4 (S4) にあるアルギニン残基に、両チャネルのほとんどの変異が存在する。二つの機能の異なるチャネルにおけるこれらの変異が引き起こす共通の現象として、ゲーティングポア電流と呼ばれる、通常のイオン透過孔とは別経路による漏洩電流が示され、本症の病態にかかわっている可能性が示されていた。

2. 研究の目的

イオンチャネル病の中でも、もっとも病態が未解明な低カリウム性周期性四肢麻痺について、生理学および遺伝学的手法を用い、新たな原因遺伝子の探索、病態メカニズムの解明を行う。まず、ゲーティングポア電流が本症の病態の主因であると近年提唱されているが、その仮説を新規に同定した変異で検証する。また、新規の原因遺伝子を先般同定したことから、同一ファミリーのサブユニットの骨格筋での生理的機能を解明し、原因遺伝子となりうるかを調べる。サンガーシークエンスによる標的遺伝子の変異解析に加え、次世代シークエンスによる原因遺伝子の同定を行い、同定された変異の機能解析を行う。これらの研究により、周期性四肢麻痺の病態解明はもちろんのこと、骨格筋生理、チャネル生物物理にも貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

低カリウム性周期性四肢麻痺の新たな原因遺伝子を探索し、病態メカニズムを明らかにするため、生理学および遺伝学的手法を用いて解析した。

遺伝学的検討としては、骨格筋型 Na、Ca チャネル、Kir3.X ファミリーについてサンガー法で全エクソン領域の解析を行うとともに、次世代シークエンスによるターゲットリシークエンシングの系を構築し解析を行っ

た。

臨床的に低カリウム性周期性四肢麻痺と診断される症例のうち、2/3 以上で、これら既知原因遺伝子変異を認めない。それらの症例のほとんどが、家族歴が無く、甲状腺機能も正常である、いわゆる孤発性低カリウム性周期性四肢麻痺である。甲状腺中毒性低カリウム周期性四肢麻痺において、疾患感受性一塩基多型 (SNP) が複数報告されたことから、我々の蓄積する孤発性周期性四肢麻痺の検体についても検討した。

いっぽう生理学的解析としては、骨格筋型 Na チャネルと Cl チャネルの両者に変異を有する稀な症例を経験したことから、培養細胞に変異チャネルを発現させパッチクランプ法でチャネル機能を解析した。

遺伝性の低カリウム性周期性四肢麻痺の症例において、既知遺伝子の Arg の変異であるが、同じ塩基性アミノ酸である Lys に置換する変異を見出した。このチャネルの機能について電気生理学的解析を行った。

4. 研究成果

計画通り、病態が未解明な低カリウム性周期性四肢麻痺について、生理学・遺伝学的手法を用い、新たな原因遺伝子の探索、病態メカニズムの解明を行った。さらに、骨格筋の関連疾患や中枢神経のチャネル病についても対象を拡げ研究を行った。

遺伝学的検討としては、サンガー法による各チャネル遺伝子の解析に加え、次世代シークエンスによるターゲットリシークエンスやエクソームシークエンスの系を構築し網羅的解析を行った。遺伝性の低カリウム性周期性四肢麻痺において、既知の Arg 残基であるものの、同じ塩基性アミノ酸 (Lys) に置換する変異を見出した。電気生理学的解析により、チャネルのゲーティングポア電流の増大を認めたことから、ゲーティングポア生成のメカニズムについてあらたな知見を見出した。

非ジストロフィー性ミオトニー症候群において、複数の原因チャネル遺伝子（骨格筋型 Na チャネルと Cl チャネル）に疾患原性が疑われる変異を見出し、両変異による機能異常が相加・相乗的に重症化に寄与していることを生理学的に示した。同様の症例は網羅的遺伝子解析の普及により今後ますます見出される可能性が高く、レアバリエーションによる症状修飾というチャネル病のあらたな病態機序を示した点で重要である。

さらに、非遺伝性と考えられていた、孤発性周期性四肢麻痺において、周期性四肢麻痺の原因として知られる KCNJ2 遺伝子近傍の一塩基多型 (SNP) のマイナアレル頻度が、優位に高いことを明らかにし、遺伝的背景が存在することを明らかにした。存在部位から考えると、この SNP は、病態に直接関与する可能性が高い。

次世代シークエンスによるターゲットリ

シーケンシングの系も構築し、中枢神経系のイオンチャネル病である反復発作性運動失調症2型の新規変異を同定することができた。

いっぽう、広義のイオンチャネル病でもある筋強直性ジストロフィーの心臓伝導障害についてフランス、ドイツ、アメリカの研究者らと国際共同研究を行い、成果を論文発表することができた。剖検組織で心筋型 Na チャネルのspray異常が存在し、変異チャネルが活性化の障害を示すこと、シミュレーションにて伝導障害が生じうることで示すことができた。

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 4件)

Kato H, Kokunai Y, Dalle C, Kubota T, Madokoro Y, Yuasa H, Uchida Y, Ikeda T, Mochizuki H, Nicole S, Fontaine B, Takahashi MP, Mitake S. A case of non-dystrophic myotonia with concomitant mutations in the SCN4A and CLCN1 genes. *J Neurol Sci*. 査読あり 2016 Oct 15;369:254-8. doi: 10.1016/j.jns.2016.08.030.

Freyermuth F, Rau F, Kokunai Y, Linke T, Sellier C, Nakamori M, Kino Y, Arandel L, Jollet A, Thibault C, Philipps M, Vicaire S, Jost B, Udd B, Day JW, Duboc D, Wahbi K, Matsumura T, Fujimura H, Mochizuki H, Deryckere F, Kimura T, Nukina N, Ishiura S, Lacroix V, Campan-Fournier A, Navratil V, Chautard E, Auboeuf D, Horie M, Imoto K, Lee K-Y, Swanson MS, Lopez de Munain A, Inada S, Itoh H, Nakazawa K, Ashihara T, Wang E, Zimmer T, Furling D, Takahashi MP & Charlet-Berguerand N. Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nat Comm* 査読あり 2016 Apr 11;7:11067. doi: 10.1038/ncomms11067.

Yoshinaga H, Sakoda S, Shibata T, Akiyama T, Oka M, Yuan J-H, Takashima H, Takahashi MP, Kitamura T, Murakami N, Kobayashi K Phenotypic variability in childhood of skeletal muscle sodium channelopathies. *Pediatr Neurol*. 査読あり 2015 May;52(5):504-8. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2015.01.014

階堂三砂子、古田 充、中森雅之、湯浅

義人、高橋正紀 著明な脳波異常を伴う反復発作性運動失調症2型の一家系。臨床神経 査読あり 2016;56(4):260-264. doi: 10.5692/clinicalneuroi.cn-000854.

[学会発表](計 8件)

Nakaza M, Kubota T, Vicart S, Watanabe D, Kokubun N, Furuta M, Sternberg D, Kokunai Y, Abe T, Fontaine B, Takahashi MP. Hypokalemic periodic paralysis cases with substitutions from arginine to lysine in the voltage sensor. 62nd Annual Meeting, Biophysical Society. 2018.2.17-21, San Francisco

高橋正紀、仲座真希、北村友梨、古田 充、久保田智哉、佐々木良元 日本人コホートにおける孤発性周期性四肢麻痺の遺伝的背景 日本人類遺伝学会 第62回大会 2017年11月15-18日、神戸

Kubota T, Watanabe D, Kokubun N, Furuta M, Kokunai Y, Abe T, Takahashi M. Arginine-to-lysine mutations in the voltage sensor are associated with hypokalemic periodic paralysis The XXIII World Congress of Neurology 2017年9月19日 京都

久保田智哉、渡辺大祐、國分則人、古田充、穀内洋介、阿部達哉、高橋正紀 遺伝性低カリウム性周期性四肢麻痺の発症機序とチャネル内電位感受性ドメインの電荷との関連について 第3回日本筋学会学術集会 2017年8月4日 小平市 東京

穀内洋介、Fernande Freyermuth 芦原貴司、伊藤英樹、紀嘉浩、中森雅之、木村卓、松村剛、藤村晴俊、望月秀樹、石浦章一、Swanson Maurice、堀江稔、Denis Furling Charlet-Berguerand Nicolas、高橋正紀 Na チャネルのspray異常が筋強直性ジストロフィーの心臓伝導障害の原因となる 第2回日本筋学会学術集会 2016年8月5日 小平市 東京

高橋正紀、佐々木良元、久保田智哉、古田充、中森雅之、加藤秀紀、阿部達哉、國分則人、望月秀樹 骨格筋チャネル病の電気生理学的分類の限界について 第45回日本臨床神経生理学学会学術大会 2015年11月6日 大阪

高橋正紀、佐々木良元、久保田智哉、穀内洋介、古田充、中森雅之、望月秀樹、富本秀和、大野欽司 筋チャネル病 周

期性四肢麻痺および非ジストロフィー性ミオトニー症候群の遺伝子解析と麻痺発作重症度分類 第1回日本筋学会学術集会 2015年8月7日 小平市 東京

(4)研究協力者 ()

階堂三砂子、古田 充、中森雅之、湯浅義人、高橋正紀 著明な脳波異常を伴う反復発作性運動失調症2型(EA2)の一家系 日本神経学会第102回近畿地方会 2015年7月4日 大阪

〔図書〕(計 1件)

久保田智哉、高橋正紀 周期性四肢麻痺 水澤英洋、山口修平、園生雅弘編集、南江堂、2018、神経疾患最新の治療 2018-2020. pp.283-285

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 正紀 (Masanori Takahashi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20359847

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：