

令和元年6月10日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16128

研究課題名(和文) 電位依存性カルシウムチャンネル関連疾患の分子病態基盤の解明

研究課題名(英文) Clarification of the pathological mechanism of VGCC associated diseases

研究代表者

國井 美紗子 (Kunii, Misako)

横浜市立大学・附属病院・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患者から、3種類のCACNA1G変異を同定し、変異型及び野生型のCav3.1につき培養細胞を用いて電気生理学的挙動を検証していた。3種類のうち2種類は2018年に白人の小児患者より報告がなされ、我々の変異も病的であることが確かめられた。電流-電圧曲線やactivation curveなどの基本的な電気生理学的挙動については既報告と同様の挙動を示した。さらに既報告では検証されていなかった共振についても検討を追加した。我々の研究はCACNA1G変異による多様な病態の解明の一助となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3種類の変異のうち昨年報告された2種類は白人における症例であり、アジア人での報告はまだない。また、同一変異ではあるが臨床所見も一部既報告とは異なる部分がある。CACNA1G変異による疾患の臨床症状の多様性を示しており、さらに未報告の変異1例も含んでおり報告の意義がある。さらに、既報告で行われている一般的な電気生理学的解析のみではなく、共振という電気生理学的現象に着目し、実験を追加した。共振はこれまで各種細胞の特性を明らかにするため着目されてきたが、疾患原因となる変異をもつチャンネルでの検討はほとんどなされていない。今後のチャンネル病の解明にも有用な手法であり、有用な報告である。

研究成果の概要(英文)：We find three patients with neurodevelopmental disorders harboring de novo CACNA1G mutations. Two of three mutations were reported as childhood-onset cerebellar atrophy (Chemin et al., 2018). To investigate the effect of Cav3.1 mutations on channel function, the WT and each mutant Cav3.1 channel were expressed in HEK-293T cells, and the T-type Ca<sup>2+</sup> current was studied with the standard whole-cell patch-clamp technique. I-V curve, activation and steady-state inactivation curves, and tau kinetics were changed in these known mutations. These results were almost the same as previous report. Further, we assessed the electrical resonance of WT and mutant CaV3.1 channels. Now we are preparing for the publishing our report describing clinical phenotypes of the patients with these mutations and findings on channel function obtained by whole-cell voltage-clamp analysis.

研究分野：神経内科

キーワード：CACNA1G VGCC てんかん 発達障害 チャンネル病 パッチクランプ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内へのカルシウム(Ca)流入は主に電位依存性 Ca チャネル (Voltage-gated calcium channels: VGCCs) により調整されている。VGCCs をコードする遺伝子の変異は自閉症スペクトラム障害、統合失調症、双極性障害などの精神疾患、てんかん症候群、家族性片麻痺性片頭痛、脊髄小脳変性症など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、研究協力者である松本直通を中心に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。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てんかんと認められた例が報告されているのみ (Singh B, 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 (Coutelier M, et al., *Am J Hum Genet*, 2015) したが、これらの既報告は今回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 関連疾患の表現型は多様であることが考えられた。我々の報告により、*CACNA1G* の変異が多様な疾患に関与することが確立され、変異毎に表現型が異なる分子基盤が明らかになると考えたため研究に着手した。

### 2. 研究の目的

本研究では変異をもつ症例の臨床症状を解析し、Cav3.1 の機能変化について電気生理学的側面から検討することで、変異ごとに異なる表現型を呈する分子基盤の解明を目指した。さらに今後は薬剤スクリーニングを通じて VGCCs 関連疾患の病態修飾治療の開発を目指している。

### 3. 研究の方法

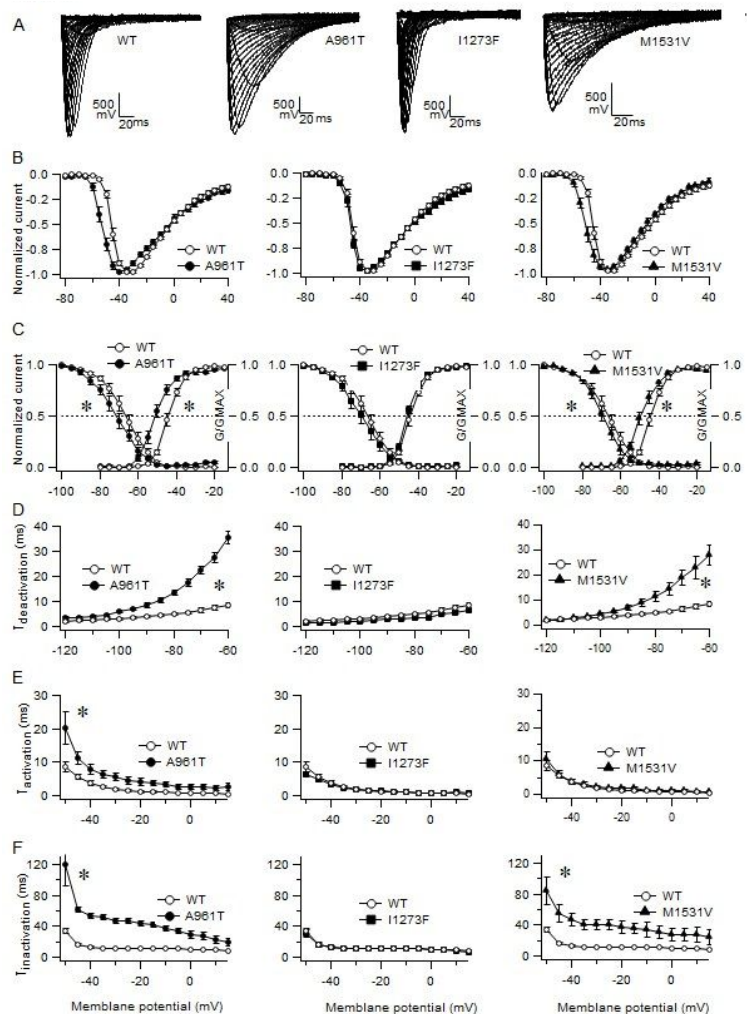
症例及びその両親から得た採血検体からゲノムを抽出し、次世代シーケンサーによるエクソーム解析を行い、*CACNA1G* 変異を同定した。さらに発症者と両親の 3 者解析をサンガー法で行い、*de novo* 変異であることを確認した。

VGCC 機能の解析については、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、*CACNA1G* を発現した細胞を蛍光顕微鏡下で同定した。この野生型および Mutagenesis kit により変異を導入した変異型 *CACNA1G* を発現した HEK293 細胞を用いてパッチクランプ法を行った。

### 4. 研究成果

我々が研究に着手した後、2018 年にフランスの小児発症の小脳萎縮症患者から Ala961Thr と Met1531Val の 2 種類の *CACNA1G* 変異が報告された (Chemin J, et al., *Brain*, 2018)。その変異は我々が同定していた 3 種類に含まれるものであった。我々の Met1531Val をもつ症例においては、臨床的に重度の精神発達遅滞とてんかんと認め小脳萎縮を伴っており、フランスの既報告と同様の症状であった。一方、Ala961Thr 症例は、既報告と異なり、臨床的に Rett 症候群と診断され画像所見上も小脳萎縮は認めていなかった。以上のことより、同一の遺伝子変異をもつ症例においても、臨床症状の多様性が示唆された。さらに、未発表である変異を持つ我々の症例においては、他の症例よりも比較的運動機能が良好に保たれていることを明らかにした。パッチクランプを用いた電気生理学的実験では、まず基本的なチャネルの挙動である電圧変化による電流の変化を解析した。-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

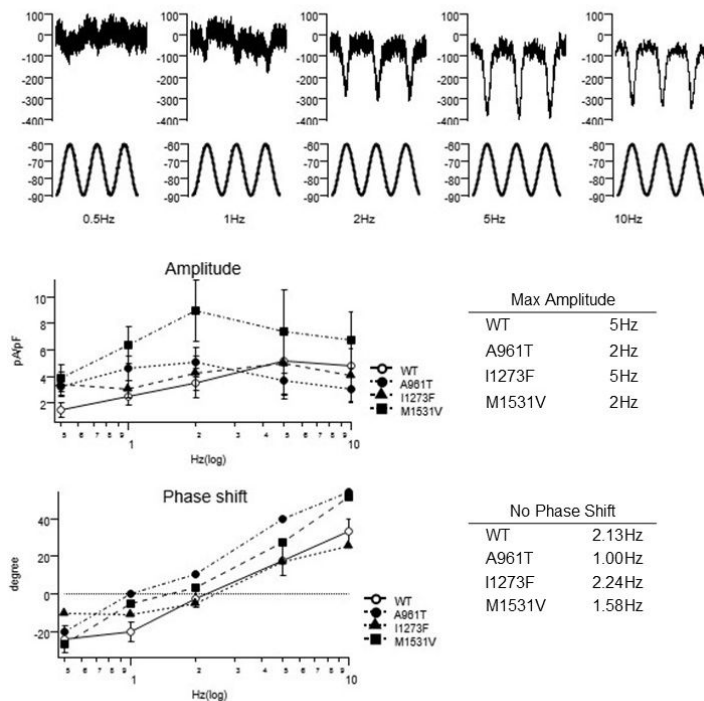
図 1



向き電流を測定し I-V 曲線を作成した。チャンネル開閉時のコンダクタンスと電圧の関係をプロットした activation / inactivation カーブや、チャンネルの開閉時間を示す tau kinetics について実験をすすめた。Ala961Thr と Met1531Val の既知変異の挙動については、既報告とほぼ同様の結果であった。すなわち I-V 曲線、activation / inactivation カーブはより低電位へシフトしており、刺激閾値の低下を示していた。また、チャンネルの開閉時間を意味する tau kinetics においても、deactivation / inactivation において遅延しており、これも活性化している時間が延長することを示していた(図 1)。一方で、未報告である Ile1273Phe 変異においては、これらの実験プロトコルでは野生型との差異が認められず、臨床症状が既報告の 2 種類の変異と比較しやや軽いことと合致する可能性が示唆された。

次に、既報告では検討されていなかった共鳴現象について実験をすすめた。共鳴現象とは、様々な細胞においてある周波数で刺激されたときに、特定の周波数に対し応答を増強する現象である。視床や小脳、大脳皮質のニューロンにおける共鳴現象には、カルシウムチャンネルが関与していることが知られているが、その現象が CACNA1G 変異よりどのような影響をつけるかを検証した報告はこれまでにない。野生型の Cav3.1 では 2.13Hz での入力刺激に対し最も共鳴したのに対し、Ala961Thr と Met1531Val は 1.0Hz、1.58Hz とそれぞれより遅い周波数に対し最も共鳴していた。Ile1273Phe については 2.24Hz とほぼ野生型と変わらない周波数であった(図 2)。

図 2



我々はアジア人で初めての CACNA1G の Ala961Thr 及び Met1531Val 変異と、これまで報告のない Ile1273Phe 変異について、臨床症状と各変異の電気生理学的挙動について解明した。特にパッチクランプを用いた解析については、通常施行される電流・電圧の関係やチャンネル開閉の tau kinetics のみならず、共鳴現象についても検討した。その結果、CACNA1G 変異はこれまでに報告のあるミオクローヌステんかん、脊髄小脳変性症、小児発症小脳萎縮症に加え、Rett 症候群や West 症候群というフェノタイプも見られることがわかった。さらに、Ala961Thr については、同一変異をもつ症例の中でも臨床症状に幅があることが判明した。我々の研究成果は現在投稿準備中であり、CACNA1G の遺伝子型・表現型相関を解明するにあたり有用な報告となりうる。

#### 引用文献

- Singh B, *et al.*, Mutational analysis of CACNA1G in idiopathic generalized epilepsy, *Hum Mutat* (28)5: 524-525, 2007
- Coutelier M, *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* (97)5: 726-737, 2015
- Chemin J, *et al.*, De novo mutation screening in childhood-onset cerebellar atrophy identifies gain-of-function mutations in the CACNA1G calcium channel gene, *Brain* 141(7): 1998-2013, 2018

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

M. Kunii, H. Doi, C. Ohba, S. Hashiguchi, N. Matsumoto, F. Tanaka et.al., Genetic analysis of adult leukoencephalopathy patients using a custom designed gene panel, *Clinical Genetics* 94(2): 232-238, 2018 査読あり

H. Doi, M. Kunii, N. Matsumoto, F. Tanaka et.al., Cerebellar ataxia-dominant phenotype

in patients with ERCC4 mutations, J Hum Genet 63(4): 417-423, 2018 査読あり

〔学会発表〕(計 2件)

M. Kunii, H. Doi, S. Hashiguchi, N. Matsumoto, F. Tanaka et al., De novo *CACNA1G* mutations in neurodevelopmental disorders, 第60回日本神経学会学術大会、2019年5月、大阪

M. Kunii, H. Doi, S. Hashiguchi, N. Matsumoto, F. Tanaka et al., The effects of identified *CACNA1G* mutations on channel functions in neurodevelopmental disorders. 第42回日本神経科学大会、2019年7月

〔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 なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田中 章景

ローマ字氏名：Tanaka Fumiaki

研究協力者氏名：松本 直通

ローマ字氏名：Matsumoto Naomichi

研究協力者氏名：土井 宏

ローマ字氏名：Doi Hiroshi

研究協力者氏名：橋口 俊太

ローマ字氏名：Hashiguchi Syunta

研究協力者氏名：大場 ちひろ

ローマ字氏名：Ohba Chihiro

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、研究者個人に帰属されます。