

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590998
 研究課題名 (和文) ミオトニー症候群—Na チャネル病と筋強直性ジストロフィー症—
 の病態解明
 研究課題名 (英文) Investigation of the pathomechanism of myotonic syndromes -
 Na channel disorders of skeletal muscle and myotonic dystrophy
 研究代表者
 高橋 正紀 (TAKAHASHI MASANORI)
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：20359847

研究成果の概要 (和文)：ミオトニー症候群 (骨格筋 Na チャネル病および筋強直性ジストロフィー) の病態解明を行った。骨格筋 Na チャネル病については、本邦の新規変異の機能解析を電気生理学的に行い、シミュレーションにて病態を明らかにした。また世界で初めて、イントロン領域の変異によるミオトニーを同定し、分子病態を解明したことも特筆される。mRNA 病であると近年仮説されている筋強直性ジストロフィーについては、不整脈と関与する可能性のあるイオンチャネルのスプライシングの異常を心臓で見出すことができた。

研究成果の概要 (英文)：Pathomechanism of myotonic syndromes (Na channel disorders of skeletal muscle and myotonic dystrophy) were investigated. Regarding the Na channel disorders of skeletal muscle, the channel function of novel mutations identified in Japanese patients were electrophysiologically analyzed and computer simulation were performed to elucidate pathophysiological mechanism. It should be noted that we identified a first case of non-dystrophic myotonia caused by a mutation in intron and revealed its molecular mechanism. Regarding myotonic dystrophy which is recently hypothesized as “mRNA disease”, missplicing of an ion channel mRNA which might be linked to arrhythmia was identified in cardiac muscle.

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	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経内科学・電気生理学

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：筋疾患、ナトリウムチャネル、イオンチャネル、骨格筋、シミュレーション、パッチクランプ、mRNA、スプライシング

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、ミオトニー、周期性四肢麻痺、先天性筋無力症などを呈することが知られている。

ミオトニー症候群は、骨格筋の興奮性異常のひとつである筋強直現象を示す疾患の総称で、先天性ミオトニー、先天性パラミオト

ニ、高カリウム性周期性四肢麻痺、筋強直性ジストロフィーなどが含まれる。90年代の遺伝学的研究の進歩により、これら疾患の多くはチャンネルそのものの遺伝子異常によることが明らかにされ、その後の電気生理学的研究により、変異チャンネルの機能的異常がミオトニー症状に直接関与することが示されてきた。

なかでも、Na チャンネル遺伝子の異常による疾患については、チャンネルの速い不活化の異常がミオトニーを引き起こすこと、遅い不活化の障害の有無が麻痺症状の有無と関係することなどを明らかになってきた。しかしながら、まだ病態の一部が説明出来たにすぎず、不明な点がいくつもある。例えば、先天性パラミオトニーにおける、パラミオトニー現象(反復運動での増悪)や、寒冷による増悪の機序などはまだきちんと解明されていない。

いっぽう、筋強直性ジストロフィーの遺伝的原因は、チャンネルとは全く異なるリン酸化酵素(*DMPK*)遺伝子にあり、しかも非翻訳領域における CTG リピートの異常な伸長であることから、どのような機序でミオトニーという細胞膜の興奮性異常を来たすのか疑問であった。本症では Cl チャンネルの mRNA スプライシング異常が生じ、機能的なチャンネルが減少することが、ミオトニーの原因であることを我々は世界に先駆けて示してきた。

確かに本症におけるミオトニーの主たる原因は Cl チャンネルの減少であると思われるが、Cl チャンネル以外のチャンネルの異常も指摘されている。たとえば、通常の骨格筋では発現していない SK3 チャンネル(ある種の Ca 活性化型 K チャンネル)が、本症で発現することを我々は以前に示している。さらに、細胞膜ではなく筋小胞体に存在し細胞内 Ca 調節・筋収縮に重要な役割を果たす2つのタンパク、リアノジン受容体および筋小胞体カルシウムポンプ(*SERCA*)にもスプライシング異常があり、変異体が機能異常を有することも示してきている。そうなると、活動電位の発生、リアノジン受容体による筋小胞体からの Ca 遊離、細胞内 Ca 上昇による SK3 チャンネルの活性化はすべて関連しあう現象であるだけに、個々の実験データから本症の全体像を理解することが困難となってきた。

以上のように分子レベルの解析が進んでいたが、細胞レベル・組織レベルの病態の理解が十分でない状態であった。

2. 研究の目的

本研究では骨格筋 Na チャンネル病および筋強直性ジストロフィー症の病態を細胞・組織レベルで理解することを目的とした。チャネ

ルという分子レベルの解析、筋小胞体というオルガネラレベルの解析からや細胞レベルの解析結果を元に、コンピューターシミュレーションのためのモデルを確立し、病態生理の理解深めることを目指した。

3. 研究の方法

申請時の計画に基づくものは下記の(1)から(4)であるが、世界で初めてのイントロン領域の遺伝子変異によるミオトニーの症例について同定し得たこと、また筋強直性ジストロフィー症の剖検心筋を入手できたことから(5,6)を追加して行った。

(1) 変異 Na チャンネルの機能解析

これまでに報告のない新規の遺伝子変異の場合、疾患の原因であるのか単なる正常多型なのかを明らかにする必要がある。チャンネル機能に異常があり、しかも症状を説明できるような異常であれば、疾患の原因であることがほぼ証明される。

Na チャンネル発現ベクターを用い、変異導入したベクターを作成する。正常および変異チャンネルのベクターを培養細胞(HEK293細胞)にリン酸カルシウム法でマーカー(CD8発現ベクター)と共にトランスフェクションした。マーカー陽性細胞を顕微鏡下で同定し、パッチ電極を用いてホールセルクランプ法で Na 電流を記録した。膜電位をステップ状に変化させるいくつかの測定プロトコールでチャンネルの活性化、速い不活化、遅い不活化などの機能について解析した。

(2) 筋強直性ジストロフィーにおけるチャンネル発現・機能や筋小胞体機能の解析

生検筋およびモデルマウス骨格筋より RNA を抽出した。cDNA に逆転写後、各種プライマーにて cDNA を PCR 法で増幅した。アクリリアミドゲルにて電気泳動後、染色しイメージアナライザーにて定量した。また、mRNA 量を定量評価するため、TaqMan 法による、半定量的解析を行った。

(3) モデルマウスを用いた薬物投与実験

ミオトニーを増悪させる薬剤として知られているβ作動薬の塩酸リトドリンを、筋強直性ジストロフィーのモデルマウスに全身(腹腔内)投与し、臨床的变化を観察し、血清電解質やクレアチンキナーゼ値などを測定した。骨格筋組織内の種々のタンパクやそれらの mRNA 発現量の変化をウエスタンブロット法や半定量的 PCR にて検討した。

(4) 骨格筋シミュレーションモデルの開発 細胞レベルでの病態をシミュレーション

するために、Cannon らの報告を基本に、筋膜およびT管系のコンパートメントを組み合わせた Hodgkin-Huxley モデルを Visual Basic を用いて新たに構築した。正常チャンネルおよび上記(1)の変異チャンネルのデータから、チャンネルのパラメーターを推定し、シミュレーションを行った。特に実際の患者骨格筋では異常なチャンネルがどの程度発現しているのかは厳密には不明である AT-ACII イントロンの変異によるスプライシング変異体については発現量を種々に変化させてシミュレーションを行った。

(5) 骨格筋型 Na チャンネルの AT-ACII イントロンの変異による異常スプライスの機序解明

米国 Cold Spring Harbor 研究所の Adrian Krainer 博士らと共同で、我々の同定した変異についてミニジーンを用いた *in vitro* の解析を行った。また、どの snRNP の配列認識が重要であるかを明らかにするため、mRNA 認識配列を変異させた snRNP を共発現させスプライシングが正常化されるかどうかを検討した。

(6) 筋強直性ジストロフィー心筋における mRNA 異常の解析

剖検心筋およびモデルマウス心筋より RNA を抽出した。cDNA に逆転写後、各種プライマーにて cDNA を PCR 法で増幅した。制限酵素で切断後アクリルアミドゲルにて電気泳動後、染色しイメージアナライザーにて定量した。

4. 研究成果

(1) 変異 Na チャンネルの機能解析

本邦で見出された新規 Na チャンネル変異の機能解析を積極的に行った。具体的には埼玉医大症例 Q1633E 変異、鹿児島大症例 P1158L 変異、岡山大症例 I693L 変異、さらに大阪大症例の AT-ACII イントロンの変異である。

それらすべてで症状を説明しうる機能異常を見出すことができた。例えば、Q1633E 変異チャンネルでは、速い不活化の電位依存性が脱分極側にシフトし、不活化の時間経過も遅く、速い不活化が生じにくいという機能的異常が存在した。いっぽう I693L 変異では、不活性化ではなく活性化の電位依存性が過分極側にシフトしているという異常の例も認めた。大阪大症例の AT-ACII イントロンの変異でも電位依存性が過分極側にシフトしていたが、その程度はこれまでの報告にないほどの変移であった

これらの解析結果を(4)のシミュレーションの基礎データとして使用し、症状を本当に説明できるのか検討した。

(2) 筋強直性ジストロフィーにおけるチャンネル発現・機能や筋小胞体機能の解析

SK3 チャンネル mRNA が HSA-LR において増加していた。また、SK2 チャンネルのエクソン 7-8 間に 9 塩基からなる新規エクソンを同定した。このエクソンを含むアイソフォームは正常マウスにおいては脳、小脳、網膜に高率に発現していた。

(3) モデルマウスを用いた薬物投与実験

β 作動薬の塩酸リトドリンを、筋強直性ジストロフィーのモデルマウスに腹腔内投与したが、ミオトニー徴候や筋力低下は出現せず。有意な血清カリウム、クレアチンキナーゼ値の上昇を認めなかった。予期された変化が見られなかったため、骨格筋を採取・保存したのみで、mRNA などの解析は行わなかった。この予想外の結果については、ヒトとマウスという種差、あるいは疾患モデルが病態をすべては反映していないという問題などが可能性として想定される。

(4) 骨格筋シミュレーションモデルの開発

(1)で機能解析実験を行った変異の測定結果からチャンネルのゲーティングパラメーターを推定し、シミュレーションに用いた。症状を説明しうる機能異常であることが明らかになった。

特に、AT-ACII イントロンの変異によるスプライシング変異体については、機能異常が見出され、膜興奮性の亢進という臨床症状に合致する機能異常を見出したが、もし発現量が少なければ病態を説明しえない可能性がある。そこで、上記(1)の計測からチャンネルのゲーティングパラメーターを推定しシミュレーションしたところ、変異チャンネルの発現量が 15%程度であっても刺激終了後にもミオトニーに相当する活動電位の連続発火が認められ、症状に関与することが示されシミュレーションが非常に有用であった。

また、このモデルを用いミオトニー放電の出現機構についてもシミュレーションを行い T 管が寄与していることが明らかになった。

(5) 骨格筋型 Na チャンネルの AT-ACII イントロンの変異による異常スプライスの機序解明

まずミニジーンを用いた実験で、本変異が存在すると、患者骨格筋と同様にスプライシングの異常が生じることが明らかになった。さらに、スプライシング異常を正常化するには、U1 の mRNA 認識を変化させるだけでは不十分で、U6 の認識も必要であることが判明した。このように、まだ未解明な AT-AC II イントロンのスプライシング機構の一端が明らかになることもできた。

(6) 筋強直性ジストロフィー心筋における mRNA 異常の解析

心筋型ナトリウムチャンネルは QT 延長症候群、Brugada 症候群、洞不全症候群などの遺伝性不整脈の原因となることから、本症の心症状に重要である可能性が疑われた。心筋型ナトリウムチャンネルに存在する選択的スプライシングに注目し、患者およびモデルマウスの心筋サンプルを使用し検討した。すると、患者群にてスプライシング異常が認められたが、MBNL ノックアウトマウスでは同様の異常を認めなかった。

さらにこの異常チャンネルの電気生理学的機能解析の結果をコンピューターシミュレーションで検討し、実際に不整脈と関連する可能性が明らかになっている。

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)

- ① Kubota T, Roca X, Kimura T, Kokunai Y, Nishino I, Sakoda S, Krainer AR, and Takahashi MP. A mutation in a rare type of intron in a sodium-channel gene results in aberrant splicing and causes myotonia. *Human Mutation* 査読あり in press
- ② Nakamori M, Takahashi MP. The role of dystrobrevin in striated muscle. *Int. J. Molecular Sciences* 査読あり 12(3): 1660-1671, 2011
- ③ Kubota T, Kinoshita M, Sasaki R, Aoike F, Takahashi MP, Sakoda S and Hirose K. New mutation of the Na channel in severe form of potassium-aggravated myotonia. *Muscle Nerve* 査読あり 39(5):666-73. 2009

[学会発表] (計 16 件)

- ① Takahashi MP, Kubota T, Kokunai Y, Kimura T, Sakoda S. A myotonia caused by aberrant splicing of voltage-gated sodium channel due to an intronic mutation of SCN4A. 15th International Congress of the World Muscle Society 2010 年 10 月 13 日 Kumamoto Japan
- ② 骨格筋型電位依存性 Na チャンネル (NaV1.4) のスプライシング異常によるミオトニー久保田 智哉 高橋 正紀 木村 卓 穀内 洋介 佐古田 三郎

第 51 回日本神経学会総会 2010 年 5 月 21 日 東京

- ③ Kubota T, Takahashi MP, Kimura T, Sakoda S. An intronic mutation of SCN4A-associated with myotonia raises an aberrantly spliced isoform with disrupted fast inactivation. *Biophysical Society 54th Annual Meeting* 2010 年 2 月 22 日 San Francisco CA USA
- ④ 高橋正紀 イオンチャンネル遺伝子異常による骨格筋疾患—周期性四肢麻痺・ミオトニー症候群の診断と病態生理 シンポジウム 遺伝子異常と臨床神経生理 第 39 回日本臨床神経生理学会学術大会 2009 年 11 月 20 日 北九州
- ⑤ 久保田智哉、高橋正紀、佐古田三郎 Myotonic discharge 発生における T 管の役割; コンピューターシミュレーションによる検討 第 39 回日本臨床神経生理学会学術大会 2009 年 11 月 20 日 北九州
- ⑥ 久保田智哉、高橋正紀、佐古田三郎 コンピューターシミュレーションによる筋細胞膜興奮性の検討 第 50 回日本神経学会総会 2009 年 5 月 20 日 仙台
- ⑦ 穀内洋介、久保田智哉、中森雅之、木村卓、高橋正紀、佐古田三郎 筋強直性ジストロフィーモデルマウスにおける SK チャンネル発現とスプライシングの検討 第 50 回日本神経学会総会 2009 年 5 月 20 日 仙台
- ⑧ 久保田智哉、高橋正紀、迫田俊一、木下正信、佐古田三郎 ミオトニアを呈する変異 NaV1.4 チャンネル機能異常と臨床症状—コンピューターシミュレーションによる検討 第 38 回日本臨床神経生理学会学術大会 2008 年 11 月 13 日 神戸
- ⑨ 高橋正紀、中森雅之、木村卓、久保田智哉、松村剛、隅寿恵、藤村晴俊、佐古田三郎、筋強直性ジストロフィー症における α -dystrobrevin スプライシング異常 第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 16 日 横浜
- ⑩ 久保田智哉、迫田俊一、平澤恵理、杉江和馬、高橋 正紀、樋口逸郎、有村由美子、有村公良、佐古田三郎 Schwartz-Jampel 症候群と考えられていた myotonia permanens について; 新規

NaV1.4 変異チャネル P1158L の機能解析
第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月
15 日 横浜

- ⑪ Kubota T, Kinoshita M, Sasaki R, Takahashi MP, Sakoda S, Hirose K. A New Mutation of Na channel in potassium-aggravated myotonia with cyanotic attacks. The 60th Annual Meeting of the American Academy of Neurology. 2008 年 4 月 17 日 Chicago, IL USA

以上の他に 5 件

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 久保田智哉、高橋正紀、佐古田三郎 筋強直性ジストロフィー 神経疾患・診療ガイドライン—最新の診療指針— 鈴木則宏編 総合医学社 282-285, 2009

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/neurol/myweb6/Channel.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 正紀 (TAKAHASHI MASANORI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20359847

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし