

平成30年 8月29日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461319

研究課題名(和文) 筋萎縮性側索硬化症におけるイオンチャネル障害とRNA代謝障害に関する生理学的研究

研究課題名(英文) Study of physiological background of motor axonal ion channel dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

金井 数明 (Kanai, Kazuaki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10375751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症の患者にインフォームドコンセントを得たうえで運動神経の軸索興奮性特性測定を行い、同時にALS患者から体液(血液・髄液)の採取を行った。運動神経軸索興奮性を安定的に測定できた連続50例を対象とし解析を行ったところ、持続性Na<sup>+</sup>電流の増大所見と早期からの脱分極所見は既知の危険因子とは独立に、それぞれ予後の有意な悪化に結びつくことを、既報とは独立したコホートで確認した。またさらにそれらの指標が既存の予後指標と相関することを見出した。さらにそのうちの20例を対象とし体液中のmiRNAを測定し、その結果を運動神経軸索興奮性の指標と比較した。

研究成果の概要(英文)：We performed the nerve excitability measurements in patients with amyotrophic lateral sclerosis. We confirmed that changes in some indices of nerve excitability measurements such as strength-duration time constant (SDTC) or early component of depolarizing threshold electrotonus (TEd10-30) were strong indicators of prognosis of patients with amyotrophic lateral sclerosis. We found changes in SDTC and TEd10-30 were associated with those in the already known prognostic factors. We performed the measurements of miRNA in patients with amyotrophic lateral sclerosis. We compared the results of nerve excitability measurements and of miRNA in patients with amyotrophic lateral sclerosis.

研究分野：臨床神経生理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 チャネロパチー 神経軸索興奮特性 ナトリウムチャネル 神経変性

## 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ている。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、チャネロパチーという概念が提唱されており注目されている。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で明らかにしており、特に ALS に関しては、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 (Kanai et al., Brain 2006)。この観点からすると、ALS もまた転写・翻訳レベルでのチャネロパチー、いわゆる "transcriptional channelopathy" の一種と考えることができる。

ALS では同一個人内でも正中神経支配筋の方が尺骨神経支配筋より変性が速く進行するという split hand 現象があることが知られている。この split hand 現象は、個人内では遺伝的背景は同一であるにも関わらず神経間で神経変性の進行に差が生じることになるため、その病態生理の解明は新規治療の開発につながる可能性がある。我々は K<sup>+</sup> 電流の低下や持続性 Na<sup>+</sup> 電流の増大による軸索興奮特性の変化が、Split hand 現象のような個々の神経変性の進行速度に影響を及ぼすだけでなく、ALS そのものの病勢進行にも影響を与えるのではないかという仮説を立て、これを検証するために当院における ALS 患者の疫学研究を行ったところ、各種軸索興奮特性の変化は予後に有意な影響を及ぼす事が示された。すなわち、当初の予想の通り、持続性 Na<sup>+</sup> 電流の増大所見と早期からの脱分極所見は既知の危険因子とは独立に、それぞれ予後の有意な悪化に結びつくことが判明した (Kanai et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012)。またさらに我々は解析を進め、その 2 つの指標のうち特に持続性 Na<sup>+</sup> 電流の増大所見は、ALS における症状進行の速度と相関することを見出した (投稿準備中)。

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> 電流や持続性 Na<sup>+</sup> 電流の変化が運動ニューロン変性とどのように関与しているのか、その詳細は不明である。その中で、ALS 患者運動神経で認められた K<sup>+</sup> 電流の低下や持続性 Na<sup>+</sup> 電流の増大による過剰

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、という可能性が考えられている。

一方、近年の ALS の遺伝学的研究から、家族性 ALS の責任遺伝子として RNA 代謝に関わる遺伝子が複数報告されている。このことはすなわち、ALS の分子病態に RNA 代謝障害が重要な役割を果たしている可能性を強く示唆するものである。

このことから、ALS における軸索イオンチャネル機能変化やそれに伴う K<sup>+</sup> 電流や持続性 Na<sup>+</sup> 電流の変化と運動ニューロン変性との関連についてもう一つの可能性が示唆される。すなわち、上記のごとく、ALS が転写性チャネロパチー ("transcriptional channelopathy") であるという側面を有することから、「ALS における軸索イオンチャネル機能変化やそれに伴う K<sup>+</sup> 電流や持続性 Na<sup>+</sup> 電流の変化は ALS の運動神経内で生じている RNA 代謝異常の一側面として生じている現象であり、これらのイオンチャネル機能変化を示す軸索興奮特性の諸指標が ALS の強い予後関連因子となっているのは、これらの諸指標が ALS における RNA 代謝異常の程度を反映する良いバイオマーカーであるからである」という仮説が考えられ得る。このため、ALS における軸索イオンチャネル機能変化の背後にある分子病態の探索を、特に RNA 代謝異常との関連から検討していくことは合理性があると考えられる。

前述のごとく、疫学研究で持続性 Na<sup>+</sup> 電流の増大が独立しかつ有意な予後増悪因子であることが明らかになったことを合わせて考えれば、これらの分子病態の解明は、新規治療薬の新たな作用点の発見につながる可能性があるほか、ALS 治療薬開発に有用なサロゲートマーカーの発見につながる可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

今回我々は、前述の疫学研究で得られた成果から、ALS 患者の予後に有意な影響を及ぼす、持続性 Na<sup>+</sup> 電流と fast K<sup>+</sup> 電流の指標に注目した。これらの指標は、高値群と低値群の 2 群に分けた際、ALS 患者では 2 群間で有意に予後が異なる。またこのうち特に持続性 Na<sup>+</sup> 電流の指標は ALS の症状進展速度にも影響を及ぼす。

このため、今回の研究では比較的少数の ALS 患者において運動神経軸索興奮特性検査および採血により miRNA 採取を施行する。その上で、(1) 体液 (血液・髄液) の micro RNA (miRNA) 発現の網羅的解析を行い、これを (2) 運動神経軸索興奮特性のうち持続性 Na<sup>+</sup> 電流と fast K<sup>+</sup> 電流の指標に着目しその高値群と低値群の 2 群に分け、その 2 群間で発現の差を示す miRNA を探索する。その上で、miRNA が発現に影響を与える遺伝子群などの探索を行い、その生理学的影響及び病態進

展に対する影響を解析する。  
 これにより、ALS 患者における運動神経軸索興奮特性の変化が、ALS の RNA 代謝異常の程度を表すバイオマーカーである、という仮説の検討を行う。また、運動神経軸索膜の興奮特性の変化と相関がある miRNA 発現の挙動が、運動機能の低下などの臨床症状（筋力低下・筋萎縮）の推移と実際に相関するか否かも併せて検討する。  
 これらのことにより、(1)ALS の病態生理に即した合理的な対症療法のための分子病態学的な基礎の構築を目指すこと、(2)ALS の運動神経の神経細胞死と運動神経軸索のイオンチャンネル機能変化とが RNA 代謝異常によって関連していることを明らかにし、ALS の新たな治療作用点の発見や予後の推定につながる新規疾患バイオマーカーの発見につながる可能性があるか検討すること、(3)前記(1)・(2)に基づき、ALS の新たな治療薬開発に対する有用なサロゲートマーカーとして応用可能かどうかの基礎的検討を行うこと、を目的とする。

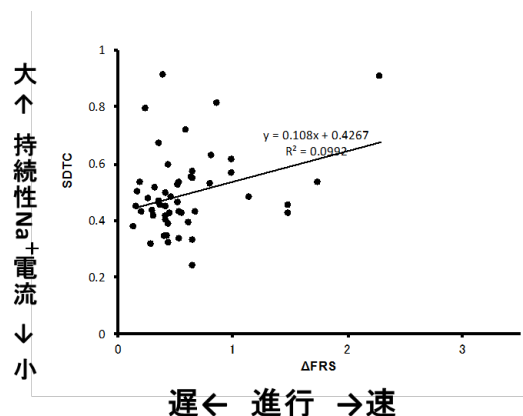
### 3 . 研究の方法

ALS 患者にインフォームドコンセントを得たうえで運動神経の軸索興奮特性測定を行い、同時に ALS 患者から体液（血液・髄液）の採取を行う。患者から得た体液から miRNA を抽出し、miRNA Array を用いて miRNA の網羅的発現解析を行う。ALS の予後と関連するとされる運動神経軸索興奮特性のうち持続性 Na + 電流と fast K+電流の指標に着目し、患者群をその高値群と低値群の 2 群に分け、その 2 群間で発現の差を示す miRNA を探索する。  
 この結果について、データベースを用いて解析を行い、特にイオンチャンネル発現の変化を生じることが推定される miRNA の探索を行う。これにより、ALS 患者における運動神経軸索興奮特性の変化が ALS 患者の予後に影響を及ぼすことに対しての分子生物学的基盤の探索を行うとともに、ALS の RNA 代謝異常の程度を表すバイオマーカーである、という仮説の分子生物学的基盤の探索と検証を行う。また、運動神経軸索膜の興奮特性の変化と相関がある miRNA 発現の挙動が、運動機能などの臨床症状（筋力低下・筋萎縮）の推移と何らかの相関するか否かも検討する。  
 これらにより、(1)ALS の病態生理に即した合理的な対症療法のための分子病態学的な基礎の構築を目指すこと、(2)ALS の運動神経の神経細胞死と運動神経軸索のイオンチャンネル機能変化とが RNA 代謝異常によって関連していることを明らかにし、ALS の新たな治療作用点の発見や予後の推定につながる新規疾患バイオマーカーの発見につながる可能性があるか検討すること、(3)前記(1)・(2)に基づき、ALS の新たな治療薬開発に対する有用なサロゲートマーカーとして応用可能かどうかの基礎的検討を行った。

また併せて ALS の診断を行う中で見出された、ALS と関連する様々な特徴ある神経疾患についても個別の研究を行い報告を行った。

### 4 . 研究成果

(1) 運動神経軸索興奮性の変化が ALS の疾患予後に与える影響の再現性の確認  
 背景のところでも述べたように、持続性 Na + 電流の増大所見と早期からの脱分極所見は既知の危険因子とは独立に、それぞれ予後の有意な悪化に結びつくことをこれまで我々は報告してきている。しかしながらこれは単一施設・1 コホートからだけの報告であり、それが再現性を持つかどうか、すなわちそもそも信頼性における予後指標なのかどうかの確認がなされていなかった。このため我々は独立したコホートにおいて、既報の結果に再現性があるかどうかについて確認を行った。対象は順天堂大学医学部附属病院を受診し ALS と診断され、かつ運動神経軸索興奮特性を安定的に測定できた連続 50 例を対象とした。その結果、既報と同様に持続性 Na + 電流の増大所見と早期からの脱分極所見はそれぞれ予後の有意な悪化に結びつくことが確認された。さらに、持続性 Na + 電流の増大所見と早期からの脱分極所見を示唆する運動神経軸索興奮特性の指標 < strength-duration time constant (SDTC) および depolarizing threshold electrotonus の早期成分(TE d10-30)> が、これまで ALS の予後と相関しその指標とすることができるとされる臨床的バイオマーカーである FRS < 発症から診断時までの ALSFRS-R のスコアの変化量を、発症から診断までの期間(月数)で割ったもの> と相関することを見出した。これにより、既報と同一の方法を用いて別施設・別コホートで再現性を確認することができたことになる。このため、運動神経の軸索興奮特性検査における持続性 Na + 電流の増大所見と早期からの脱分極所見は、ALS の予後を予測できるバイオマーカーとして働くことを再現性をもって確認した。  
 < 持続性 Na+電流が増大しているほど ALS の病勢進行は速い >



この成果は2018年の第59回日本神経学会総会で発表した。また成果についての論文公表を現在準備中である。

## (2) ALS患者における運動神経軸索興奮性の変化とmiRNA発現との関連

ALS患者にインフォームドコンセントを得たうえで運動神経の軸索興奮性特性測定を行い、同時にALS患者から体液(血液・髄液)の採取を行うことのできたALS患者のうち20名に対して、体液からmiRNAを抽出し、miRNA Arrayを用いてmiRNAの網羅的発現解析を行った。ALSの予後と関連するとされる運動神経軸索興奮特性のうち持続性Na<sup>+</sup>電流とfast K<sup>+</sup>電流の指標に着目し、患者群をその高値群と低値群の2群に分け、その2群間で発現の差を示すmiRNAを探索したほか、持続性Na<sup>+</sup>電流とfast K<sup>+</sup>電流の指標と有意な相関を示すmiRNAの探索を行った。その結果、持続性Na<sup>+</sup>電流とfast K<sup>+</sup>電流の指標の高値群と低値群の2群間で有意な差を示すものが複数検出されたほか、持続性Na<sup>+</sup>電流とfast K<sup>+</sup>電流の指標と有意な相関を示すものが複数検出された。この結果をALSにおいて報告されている既報のものと比較を行ったほか、データベースを用いて解析を行い、特にイオンチャネル発現の変化を生じるものとの関連を検討した。この成果についての学会発表及び論文公表を現在準備中である。

## (3) ALS患者診断の過程で見出された、様々な特徴ある神経疾患についての個別的研究

ALSの臨床診断の過程において、多数のALS患者の臨床診断を行った。その患者様から同意を得た上で、JaCALS研究にも参加をお願いし、臨床評価及び採血(遺伝子検査)を行った。その結果得られたJaCALSの日本人ALS患者集団において研究を行ったところ、筋の構成タンパク質をコードするTTN遺伝子の多形がALS患者群の進行の速さと関連することが見出された。この結果についてはJournal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry誌に報告が行われた。またJaCALSの日本人ALS患者集団において既知の家族性ALSの責任遺伝子のスクリーニングを行い、日本人患者集団における遺伝子変異の頻度について解析を行った。その結果についてはNeurobiology of Aging誌において報告が行われた。

ALSの臨床診断の過程において、進行性の筋力低下・筋萎縮のみならず前頭葉側頭葉型認知症やパーキンソンズムを合併した女性例を経験した。X線像にて骨病変も認められ、筋生検を行ったところ封入体筋炎の病理像が認められた。Inclusion body myopathy with Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementiaが疑われたため遺

伝子診断を行ったところ、家族性ALSや遺伝性封入体筋炎の責任遺伝子として知られるVCP遺伝子のp. R191Q変異が認められた。VCP遺伝子変異に伴う神経筋疾患としてALS、封入体筋炎、前頭葉側頭葉型認知症などはよく知られているが、パーキンソンズムの合併は非常にまれとされる。このためこの患者の臨床像・病理像などについて解析を行い、Journal of Neurology誌において報告を行った。

線維束攣縮は、特に多発することはALSに(特異的ではないものの)特徴的とされる。ALSの臨床診断の過程で、下肢に線維束攣縮と思しき不随意運動が多発する女性患者を見出した。基礎疾患としては胸腺腫合併重症筋無力症を有していた。この患者に対して針筋電図検査を施行したところ、線維束攣縮のみならずミオキミア放電の頻発を認めた。このため下肢の不随意運動は主にミオキミアであると考えられた。神経伝導検査を行ったところ、特にF波検査においてafter dischargeの頻発を認めた。インフォームドコンセントを得たうえで軸索興奮特性検査を行ったところ、運動神経軸索においてslow K<sup>+</sup>電流が著明に低下していることを示唆する所見が得られた。胸腺腫と重症筋無力症を合併していることから自己免疫的機序によって生じていることが推定されたため、自己抗体について測定を行った。その結果、傍腫瘍神経症候群で認められると報告のある抗CRMP-5抗体が見出された。CRMP-5は発生過程において神経軸索の発達に重要な働きを持つほか、成熟した神経においては軸索と髄鞘の相互作用に関連し、軸索機能の維持に働いていることが報告されている。このため抗CRMP-5抗体によって運動神経軸索と髄鞘との相互作用に障害が生じ、このため軸索の機能に障害が生じ、ランビエ絞輪部に存在するはずのslow K<sup>+</sup>チャンネルの機能異常ないし分布異常が生じ、運動神経軸索のslow K<sup>+</sup>電流が著明に低下する、という病態機序が推定された。このslow K<sup>+</sup>電流の著明低下により運動神経軸索膜の電位が低下し、このため運動神経軸索膜の興奮の閾値値が低下し、これが運動神経の過剰興奮性につながり、それが当患者で認められた著明な下肢のミオキミアと線維束攣縮、および針筋電図上のミオキミア放電と神経伝導検査のF波検査における著明なafter dischargeにつながっているものと推定された。全く同様の臨床症状を有する患者が他施設にもいることが判明し、当該施設と共同してケースシリーズ研究を行い、その成果についてClinical Neurophysiology誌において報告を行った。

## 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 9 件)

1. Yasui K, Yabe I, Yoshida K, Kanai K, Arai K, Ito M, Onodera O, Koyano S, Isozaki E, Sawai S, Adachi Y, Sasaki H, Kuwabara S, Hattori T, Sobue G, Mizusawa H, Tsuji S, Nishizawa M, Nakashima K. A 3-year cohort study of the natural history of spinocerebellar ataxia type 6 in Japan. *Orphanet J Rare Dis.* 査読有り, Vol. 9, 2014, pp.118. doi: 10.1186/s13023-014-0118-4.
2. Mitsui J, Matsukawa T, Sasaki H, Yabe I, Matsushima M, Dürr A, Brice A, ... Kanai K (32th), ..., Tsuji S. Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. *Ann Clin Transl Neurol.* 査読有り, Vol. 2, No. 4, 2015, pp. 417-26. doi: 10.1002/acn3.185.
3. Watanabe H, Atsuta N, Hirakawa A, Nakamura R, Nakatochi M, Ishigaki S, Iida A, Ikegawa S, Kubo M, Yokoi D, Watanabe H, Ito M, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Kanai K, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Kawata A, Aoki M, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G. A rapid functional decline type of amyotrophic lateral sclerosis is linked to low expression of TTN. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 査読有り, Vol. 87, No. 8, 2016, pp.851-8. Doi: 10.1136/jnnp-2015-311541.
4. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohnai G, Watanabe H, Yokoi D, Nakatochi M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALs). <Colablator Kanai K (15<sup>th</sup>)> Next-generation sequencing of 28 ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. *Neurobiol Aging.* 査読有り, Vol. 39, 2016, pp.219.e1-8. Doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.030
5. Fujimaki M, Kanai K, Funabe S, Takashi M, Yokoyama K, Li Y, Hattori N. Parkinsonism in a patient with valosin-containing protein gene mutation showing: a case report. *J Neurol.* 査読有り, Vol. 264, No. 6, 2017, pp.1284-1286. Doi: 10.1007/s00415-017-8467-2.
6. Nakazato T, Tsuji Y, Kanai K, Noto YI, Hoshino Y, Yamashiro K, Yokoyama K,

Nishioka K, Shimo Y, Watanabe O, Mizuno T, Hattori N. Isaacs syndrome: A slow potassium channelopathy caused by autoantibodies? *Clin Neurophysiol.* 査読有り, Vol. 129, No. 5, 2018, pp.956-958. Doi: 10.1016/j.clinph.2018.01.069.

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 中里 朋子, 金井 数明, 藤巻 基紀, 大山 彦光, 下 泰司, 服部 信孝. 持続性 Na<sup>+</sup>電流は筋萎縮性側索硬化症の予後に関与する. 第 56 回日本神経学会総会, 2015.
2. 中里 朋子, 金井 数明, 藤巻 基紀, 大山 彦光, 下 泰司, 服部 信孝. 筋萎縮性側索硬化症における K<sup>+</sup>電流の発症から診断までの期間に対する影響. 第 45 回日本臨床神経生理学会, 2015.
3. 金井 数明, 中里 朋子, 藤巻 基紀, 中谷 光良, 大山 彦光, 下 泰司, 服部 信孝. 筋萎縮性側索硬化症における感覚神経の軸索興奮特性. 第 45 回日本臨床神経生理学会, 2015.
4. Kanai K, Yokota T, Shibuya K, Kanouchi T, Nakazato T, Iwai Y, Misawa S, Oyama G, Shimo Y, Mikasa M, Fujimaki M, Kagamihara Y, Shimizu T, Hattori N, Kuwabara S. Increased motor axonal persistent sodium currents is associated with rapid regional spreading in amyotrophic lateral sclerosis. *The XXIII World Congress of Neurology*, 2017.
5. Nakazato T, Kanai K, Oyama G, Shimo Y, Hattori N. Greater axonal persistent sodium currents correlate with more rapid progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *The XXIII World Congress of Neurology*, 2017.

〔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

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
金井 数明 (KANAI, Kazuaki)  
順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10375751

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし