

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： 障害者対策総合研究開発事業

Research and Development Grants for Comprehensive Research for  
Persons with Disabilities

研究開発課題名： 細管集合体ミオパチーの臨床情報解析とモデルマウスでの病態解析並びに治療法開発  
Analyses of clinical features and development of therapy in Tubular aggregate myopathy

研究開発担当者 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第一部

所属 役職 氏名： 室長 野口 悟

Department of Neuromuscular Research  
National Institute of Neuroscience  
National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)  
Section Chief, Satoru Noguchi

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究  
開発課題名： TAM 患者細胞内カルシウム動態、SOC 阻害薬の作用機序の解析とモデルマウス作成  
Calcium regulation and the mechanism of action of SOC inhibitors in muscle cells  
from TAM patients and production of the model mice.

研究開発分担者 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

所属 役職 氏名： 疾病研究第一部 室長 野口 悟

Department of Neuromuscular Research  
National Institute of Neuroscience  
National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)  
Section Chief, Satoru Noguchi

分担研究 TAM 患者の筋病理解析とモデルマウス表現型の解析  
開発課題名 : Pathological analyses of skeletal muscles from the TAM patients and their model mice

研究開発分担者 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所  
所属 役職 氏名 : 疾病研究第一部 部長 西野一三  
Department of Neuromuscular Research  
National Institute of Neuroscience  
National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)  
Director, Ichizo Nishino

分担研究 TAM 患者臨床情報の収集と解析  
開発課題名 : Data collection and analysis of clinical information in Tubular aggregate myopathy

研究開発分担者 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター  
所属 役職 氏名 : 病院 医長 森まどか  
Department of Neurology  
National Center Hospital  
National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)  
Medical Director, Madoka Mori

## II. 成果の概要（総括研究報告）

国立精神・神経医療研究センター病院通院患者のカルテ調査については、当科カルテスクリーニングにより、患者一名が TAM、あるいは GFPT1 遺伝子変異(2q13 c. 722\_723insG homozygous) をもつ先天性筋無力症であることを見いだした。症例は 36 歳女性、近位筋有意の筋力低下、歩行障害、3Hz 刺激の反復刺激試験で 22%の waning を呈し、ピリドスチグミン臭化物（メスチノン®）にて症状が軽快し、12 段階昇降で所要時間が 32.6%，10 回しゃがみ立ちで 41.8%の時間短縮が得られた。また月経による疲労症状の悪化を訴えていた。

大規模遺伝子解析により、*STIM1* または *ORAI1* 遺伝子に変異を持つ TAM 患者例を 6 例見出し、この 6 例について骨格筋組織の病理を解析した。TA 陽性線維はタイプ 1 線維だけの例とタイプ 2 線維だけの例と両者に見られる例とがあった。また、全例で、筋線維サイズの大小不同が観察された。また、5 例で再生線維が、全例で中心核線維など、ジストロフィック変化を示していた。この所見は、患者の血液でクレアチンキナーゼの活性の上昇と関連するものと考えられた。一方、免疫染色では、変異 *STIM1*, *ORAI1* は、SERCA 1, DHPR とともに、細管集合体に局在が見られた。このことから、TAM 患者筋で見られる筋力低下には、骨格筋の壊死、再生を伴うジストロフィックな変化が関与していると考えられた。

TAM 患者で見出された *STIM1* 遺伝子変異 S88G、H109Q、E249K、I115F、R304W、または *ORAI1* 遺伝子変異 P245T について、組み換えタンパク質を C2C12 細胞に発現させ、細胞外からの取り込みによる、細胞内

カルシウムの上昇を測定した。正常型の STIM1 に比較して、有意に細胞内カルシウム濃度が上昇した。上昇レベルは、I115F が最も高く、次に S88G、H109 であり、小胞体内ドメインに変異を持つ分子のほうが、よりチャンネル活性化効果を持つことがわかった。一方、P245T 変異をもつ ORAI1 は、G98S ほどは活性化されていなかった。STIM1E249K 変異をもつ患者骨格筋細胞で、阻害剤の効果を調べた結果、BTP2、SKF96365 とともに完全に SOC チャンネル活性を阻害した。

CRISPR/Cas9 システムを用いて、Orai1 遺伝子 G100S 変異（ヒト ORAI1G98S に相当）をもつ TAM モデルの作成を試みた。離乳出来た 31 個体のうち、4 個体が HDR を伴う KI マウスであり、7 個体が NHEJ による欠失（3 個体）または重複（4 個体）であった。生下～離乳時の外観上の異常はどのマウスにも認められなかった。C57Black へのバッククロスをしつつ、表現型の解析を行った。体重および主要な臓器重量には、明らかな違いはなかった。前脛骨筋に筋力（単収縮、強縮）の低下が認められたが、筋サイズに変化はみとめられなかった。その他の筋肉には際立った筋力低下は認めなかった。筋病理解析では、多少の大小不同があるものの、壊死、再生などのジストロフィックな変化は認められなかった。また、典型的な細管集合体の形成は認められなかった。初代培養繊維芽細胞を調製し、細胞内へのカルシウム流入を測定した結果、野生型マウス由来細胞に比べ、KI マウス由来の細胞で、カルシウムの流入上昇が観察された。

By screening of clinical information of the patients with a muscle disorder, one Tubular aggregate myopathy (TAM) or congenital myasthenic syndrome patient who harboring a homozygous c.722\_723insG mutation in GFPT1 gene. The patient was 36 year-old female and showed proximal muscle weakness, gait disturbance, waning at 22% in 3Hz repetitive nerve stimulation test. By treatment with pyridostigmine derivatives, muscle symptoms were improved as 32.6% shorter in the 12-steps stepping test and 41.6% shorter in the squatting test. She also claimed worsening of her symptoms by menstruation.

By survey of large cohort of TAM patients, we identified six patients with a mutation in the STIM1 or ORAI1. There are 3 kinds of presence of TAs in which TAs were present in only type I fibers, type II fibers or both fibers. The dystrophic changes in muscles were observed, as that fiber size variation, endomysial fibrosis and centrally-placed nuclei were observed in all cases and regenerating fibers were found in 5 cases in consistent with the slight elevation of serum creatine kinase activity. On the other hand, the immunostaining images of TA are common findings in all cases showing an accumulation of mutated STIM1 or ORAI1 together with SERCA1 and DHPR. These results suggest that muscle weakness in TAM patients may be caused by the dystrophic changes in their muscles.

The functions of STIM1 mutations, S88G, H109Q, E249K, I115F, R304W and ORAI1 mutation, P245T were evaluated. The mutants were expressed in C2C12 cells and the Ca<sup>2+</sup> entry from extracellular medium into cells were measured. We observed the constitutive extracellular Ca<sup>2+</sup> entry into cells without thapsigargin treatment by all mutations. The Ca<sup>2+</sup> elevation levels are I115F > S88G, H109Q > E249K, R304W. The mutations in SR domain would have a strong effect on the activation of SOC channels, while P245T Orai1 was not active as G98S mutant. On primary myoblasts from the patient with E249K mutation in STIM1, the SOC inhibitors, BTP2 and SKF96365, inhibited the constitutive Ca<sup>2+</sup> entry completely.

Using CRISPR/CAS9 system, we generated knockin mouse with *Orai1* G100S mutation, which corresponds to human G98S mutation. There is no apparent abnormality in knock-in at birth and body weight and organ weight were comparable to those in wild mice. The reduction in muscle contraction (both of twitch and tetanus). On muscle pathology, the fiber size variation was observed as human muscles, however the dystrophic changes and TA formation were not observed in limb muscles. Primary cultured cells from knockin mice showed the enhancement of extracellular  $Ca^{2+}$  entry. These results suggest that these knock-in mice partly reproduce the phenotypes of human TAM patients.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 8 件)

1. Noguchi S, Ogawa M, Malicdan MC, Nonaka I, Nishino I: Muscle Weakness and Fibrosis Due to Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Events in Collagen VI Deficient Congenital Muscular Dystrophy. *EBioMedicine*. 15(2017): 193-202, Feb, 2017
2. Liang WC, Tian X, You CY, Chen WZ, Kan TM, Su YN, Nishino I, Wong LC, Jong YJ: Comprehensive target capture/ next-generation sequencing as a second-tier diagnostic approach for congenital muscular dystrophy in Taiwan. *PLoS One*. 12(2): e0170517, Feb, 2017
3. Liang WC, Uruha A, Suzuki S, Murakami N, Takeshita E, Chen WZ, Jong YJ, Endo Y, Komaki H, Fujii T, Kawano Y, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Xi J, Zhu W, Zhao C, Watanabe Y, Ikemoto K, Nishikawa A, Hamanaka K, Mitsuhashi S, Suzuki N, Nishino I: Pediatric necrotizing myopathy associated with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies. *Rheumatology (Oxford)*. 56(2): 287-293, Feb, 2017
4. Lee JM, Noguchi S: Calcium Dyshomeostasis in Tubular Aggregate Myopathy. *Int J Mol Sci*. 17(11): E1952, Nov, 2016
5. Uruha A, Suzuki S, Suzuki N, Nishino I: Perifascicular necrosis in anti-synthetase syndrome beyond anti-Jo-1. *Brain*. 139(Pt 9): e50, Sep, 2016
6. Takayama K, Mitsuhashi S, Shin JY, Tanaka R, Fujii T, Tsuburaya R, Mukaida S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Japanese multiple epidermal growth factor 10 (MEGF10) myopathy with novel mutations: A phenotype-genotype correlation. *Neuromuscul Disord*. 26(9): 604-609, Sep, 2016

7. Uezumi A, Nakatani M, Ikemoto-Uezumi M, Yamamoto N, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Kasai T, Masuda S, Narita A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Fukada SI, Nishino I, Tsuchida K: Cell-Surface Protein Profiling Identifies Distinctive Markers of Progenitor Cells in Human Skeletal Muscle. *Stem Cell Reports*. 7(2): 263-278, Aug, 2016
8. Hamanaka K, Goto K, Arai M, Nagao K, Obuse C, Noguchi S, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Nishino I: Clinical, muscle pathological, and genetic features of Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy 2 (FSHD2) patients with *SMCHD1* mutations. *Neuromuscul Disord*. 26(4-5): 300-308, Apr-May, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Lee JM, Nishikawa A, Mitsuhashi S, Miyatake S, Koshimizu E, Matsumoto N, Noguchi S, Nishino I: The novel *STIM1* mutation with tubular aggregate myopathy and its pathogenicity. 21<sup>st</sup> International Congress of the World Muscle Society, Gradana, Spain (Palacio de Congresos de Granada), 10.6, 2016 (10.4-10.8) ポスター, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし

(4) 特許出願  
なし

以上