

201128211A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

Schwartz-Jampel症候群のわが国における診断システム確立と
モデルマウスによる病態解明と治療研究に関する研究
(H23-難治-一般-055)

平成23年度 総括・分担研究

報告書

研究代表者 平澤恵理

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究年度終了報告	--- 1
Schwartz-Jampel症候群のわが国における診断システム確立とモデルマウスによる病態解明と治療研究に関する研究	
平澤恵理	
II. 分担研究年度終了報告	--- 6
Schwartz-Jampel症候群診断方法確立に向けたパールカン遺伝子エクソーム解析	
大野欽司	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	---- 10
III. 研究成果の刊行物・別刷	---- 12

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究年度終了報告書

Schwartz-Jampel 症候群のわが国における診断システム確立と
モデルマウスによる病態解明と治療研究

研究代表者 平澤恵理 順天堂大学大学院医学研究科准教授

研究要旨

本研究の目的は、細胞外マトリックス分子パールカン欠損による軟骨異栄養性筋強直症 (Schwartz-Jampel 症候群, SJS) の臨床診断・遺伝子診断サービスを提供し、更に分子病態解明と画期的治療に向けた基礎研究へ繋ぐことである。SJS はパールカン欠損疾患であり、筋の自発持続収縮によるミオトニアと骨格病変を主症状とする。申請者らは、生体におけるパールカンの機能解明のため、遺伝子改変動物を作成し、軟骨発生にパールカンが必須であることを示し、さらにアセチルコリンエステラーゼを神経筋接合部に局在させる必須分子であることを示した。これらの研究成果により、SJS の原因遺伝子が初めて解ったが、効果的対症療法、根治療法が確立しておらず、かつ筋、骨格の症状から ADL を著しく障害する難治性疾患である。症例の発掘、診断、病態解明は不十分であり、対症療法の確立も不十分であり、治療の適正化が急がれる。診断システムの確立と治療法の開発のための研究を進めた。本疾患は幼少期発症であり、早期診断による筋緊張コントロール、二次的な骨格変形の予防は患児の発達を正常化するために、喫緊の課題である。SJS 症例の発掘・同定 我が国での診断方法の確立、独自に開発したモデルマウスによる病態解析を行なった。

A. 研究目的

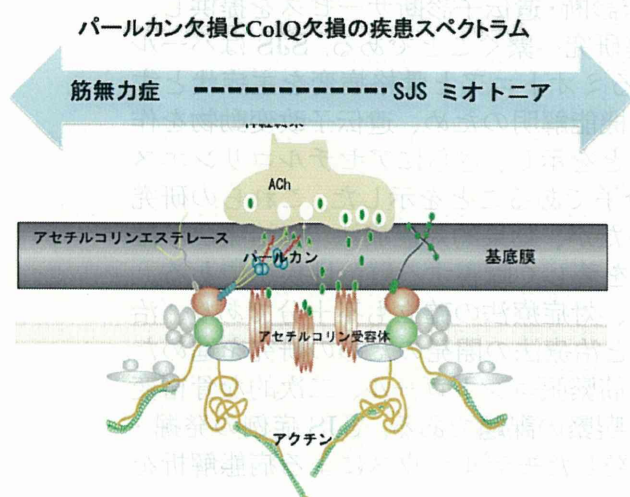
軟骨異栄養性筋強直症 (Schwartz-Jampel 症候群, SJS) はパールカン欠損疾患であり (*Nature Genetics*,2001, *Am.J.Hum Genet.*2002)、筋の自発持続収縮によるミオトニアと骨格病変を主症状とする。申請者らは、生体におけるパールカンの機能解明のため、遺伝子改変動物を作成し、軟骨発生にパールカンが必須であることを示し (*Nature Genetics*1999, &2001)、アセチルコリンエステラーゼを神経筋接合部に局在させる必須分子であることを示した (*Nature Neuroscience* 2002)。これらの研究成果により、SJS の原因遺伝子が初めて解ったが、効果的対症療法、根治療法が確立しておらず、かつ筋、骨格の症状から ADL を著しく障害する難治性疾患である。本研究の目的は、細胞外マトリックス分子パールカン欠損

による SJS の臨床診断・遺伝子診断サービスを提供し、更に分子病態解明と画期的治療に向けた基礎研究へ繋ぐことである。パールカン欠損証明による確定診断を行なっているのは、現状では、パリ大学 Nicole 博士と本邦申請者のグループであり、特に本邦での症例の発掘、診断、病態解明は不十分である。他のミオトニア症候群同様、抗てんかん薬・抗不整脈薬による対症療法が行なわれるが、経験例では効果少なく、治療の適正化が急がれる。SCN4A 変異による myotonia permanents と SJS の臨床症状、電気生理学所見が似ており鑑別を要す。これまでに文献上、抗てんかん薬等が著効した例は、パールカンの遺伝子変異が示されておらず、Na チャネルの変異例であった可能性もある。診断システム自体が確立されていないため、患者数の把握すら不詳である。

患者数が少なく研究の進みにくい疾患に対して、重点的・効率的に研究を行うことにより進行の阻止、機能回復・再生を目指した画期的な診断・治療法の開発を行い、患者のQOLの向上を図ることを目的とした。

本研究ではこれら臨床的問題点を解決し、共同申請者大野が既に ColQ 欠損疾患：先天性筋無力症候群で成功している挑戦的治療方法の実現に繋げることを目指した。両疾患は AChE の局在の障害という点で共通の病因を有し、筋無力と筋強直という異なる症状を呈しながらも一連のスペクトラムを形成する可能性があり（図1）、診断の確立と治療研究を目的とした。

図1



B. 研究方法

SJS 症例の発掘・同定 我が国での診断方法の確立 (平澤、大野)

1999年までに精神・神経センター (NCNP) 筋バクに臨床診断SJSとして登録された4例中2例はパールカン遺伝子変異が検出された。その後、パールカン遺伝子 (*HSPG2*) は巨大遺伝子であるので(mRNAで14294 bp)生検筋を使ったパールカン免疫染色で除外診断してきた。本邦症例を中心に診断システムの構築を目指すため、症例の蓄積が重要である。候補例には、臨床診断・電気生理学検査、必要であれば筋生検を行う。遺伝子変異解析は大野、タンパク質解析は平澤が行った。*HSPG2* の promoter や intron を含めて変異を検索する目的で全エキソームに加えて *HSPG2* 全領域を加えた Agilent 社 SureSelect Custom Capture を合成し ABI SOLiD4 による

resequencing を行い、*HSPG2*に加えて171種類の電位依存性イオンチャンネルを含む新規遺伝子の解析も行っている。主治医と詳細な情報交換を行い、フランス症例との比較も検討する(パリ大学 Nicole 博士と連携)。

動物モデルマウスによる病態解析・治療実験 (平澤、大野)

HSPG2 ノックアウトマウスにII型コラーゲンプロモーター下にパールカンを発現させ、軟骨以外でパールカンを欠損するマウスを作成した(研究協力者米国 NIH 山田吉彦)。ノックアウトマウスの致死性に関わる軟骨異常が修復され生存する。既に筋病理、筋電図にてSJSの臨床症状の再現を確認している。全身症状として、大血管、眼球、関節病変を検討した。また、眼輪筋収縮に対し、ボトックスの有効性を確認した。主として既存の薬剤の効果を確認するが、将来的には共同申請者大野が既に ColQ 欠損疾患：先天性筋無力症候群で成功している挑戦的治療方法 (protein anchoring therapy) の実現による根治療法に繋げる。

(倫理面への配慮)

遺伝子変異解析は順天堂大学および名古屋大学の生命倫理委員会の承認を得てヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に従い解析する。治療研究を開始する場合には、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)」に則り、順天堂大学及び名古屋大学の倫理委員会の承認を得た後に進める。組み換えDNA実験と動物実験は順天堂大学及び名古屋大学の承認を得ている。動物実験は、カルタヘナ法、ならびに、順天堂大学の動物実験委員会の承認を得て動物実験指針を遵守して研究を進める。

C. 研究結果

SJS 症例の発掘・同定 我が国での診断方法の確立 (平澤、大野)

SJSを疑う3症例に対してAgilent社SureSelect Human All Exon v2 kitを用いてエクソン領域のDNAを濃縮し、ABI SOLiD4 シークエンサにて

50 bp の塩基配列を決定した。各症例から 62.9 – 78.3 x 106 のタグを読み、各タグ 50 bp の塩基情報を持つために 3.1 – 3.9 Gbp の配列を決定した。BioScope1.3.1 を用いてヒトゲノム GChR37/hg19 にマッピングを行い 84.7% – 89.0%の塩基配列のマッピングを行った。Avadis NGSにて unreliable reads や PCR duplicates のフィルターリングを行い、default parameters を用いて SNV call を行った。

診断基準案

これまで Schwartz-Jampel 症候群 1 型とされてきたカテゴリーが、パールカン分子の遺伝子異常に起因する一疾患群を成すことが判り、この診断基準を提案する。

臨床症状

- ・ 3 歳位までに発症
- ・ 乳児期以降、低身長や眼輪筋、口輪筋収縮による特徴的な顔貌
- ・ 低身長、大関節の屈曲拘縮等の骨格異常
- ・ 自発持続収縮によるミオトニア等筋症状

検査所見

- ・ 筋電図にて、筋強直性放電 (myotonic discharge) を示す。特に、静止時に複合反復放電 (complex repetitive discharge) と称される本疾患特徴的な所見を示す。
- ・ X 線所見にて、扁平椎体、骨端、骨幹端異形成が見られるが、骨端、骨幹端異形成は大関節に限られる。

合併症

- ・ 小眼症、白内障、斜視、眼振等の眼症状
- ・ 高口蓋、低位耳介等の小奇形

鑑別診断を要する疾患

筋強直性ジストロフィー
先天性パラミオトニー
先天性筋強直症

動物モデルマウスによる病態解析・治療実験 (平澤、大野)

・ SJS では、主症状とされる筋、骨格症状以外の臓器にも多彩な全身症状が、報告されているがまだ明文化されていない。申請者らは、軟骨以外でパールカンを欠損するマウスモデルを使って成体

組織におけるパールカンの機能解明を行なっている。大動脈解離病変を示す (図 4)。現在、白内障、角膜病変、膝関節病変についての発症機構解析について、論文を投稿中、大動脈解離について論文投稿準備中である。さらに、成体神経新生についても、コントロールマウスと差異を認めているため、解析を行なっている。

・ 治療に関しては、神経筋接合部をターゲットとして蛋白ターゲット療法を準備している。パールカン分子の巨大性より、全長をターゲットさせることが難しく、蛋白融合療法の開発やドメインターゲット療法の検討が望まれる。protein レベル・RNA レベルの trans-splicing プロジェクトを検討している。

D. 考察

次世代シーケンサーによる解析を行い、過去に遺伝子変異が判明しなかった症例も診断が可能になった。しかし、現状では、臨床、電気生理、及びタンパク質レベルの解析を併せ診断することが必要と考えられた。依然、患者数は少なく、さらなる症例発掘と診断基準の充実が必須である。報告例の多いフランスとの情報交換も重要と思われた。病態解析及び治療研究にはモデルマウスを使用して進めることが適正と思われた。さらに、マウス解析の結果より、全身合併症の注意点も警告して行きたい。

今年度終了後も継続する検討課題

- ・ 症例情報の蓄積により薬物療法の適正化を計る。
- ・ 治療研究候補薬剤の動物モデルへの投与。
- ・ 挑戦的治療方法の確立・実現化の基礎研究

大野らはパールカンに結合するコラーゲン Q の欠損モデルマウスに対して AAV8-COLQ の静注を行い運動機能の正常化に成功をしている。これは、COLQ が標的組織へのターゲティングシグナルを持つ細胞外基質蛋白質であることを利用したものであり、パールカン欠損マウスにも同様の治療戦略が可能と思われる。他研究費との連携においてこの研究の成果を活かし、今後可能になるよう準備を進める。ヒト HSPG2 遺伝子を発現ベクターに組み込み HEK293 細胞に導入し、Hspg2 ノックアウトマウス骨格筋切片への *in vitro*

transplantation を行い、パールカンの標的組織へのターゲティングが可能なことを確認する。

E 結語

今年度の研究成果から、臨床的に Schwartz-Jampel 症候群と診断された 3 例の遺伝子検査を行なった。一連の疾患スペクトラムを明確にするため、更なる症例蓄積が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

書籍

1. Engel AG, Shen X-M, Ohno K, and Sine SM. Congenital myasthenic syndromes. Myasthenia gravis and myasthenic disorders 2nd ed. Ed. by Engel AG. Oxford University Press, New York, in press. (Book chapter)
2. Ohno K, Engel AG.: Chapter 8: Molecular defects of acetylcholine receptor subunits in congenital myasthenic syndromes. Pharmacology of Nicotinic Acetylcholine Receptors from the Basic and Therapeutic Perspectives. Ed. By Hugo R. Arias. Research Signpost, Kerala, 2011, pp175-186. (Review article without peer review)
3. Ohno K, Ito M, and Engel AG.: Congenital Myasthenic Syndromes – Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction – Myopathy. InTech, Rijeka, in press. (Review article with peer review)

雑誌

1. Yoshinaga H, Sakoda S, Good JM, Takahashi MP, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K, Kitamura T, Kobayashi K, Ohtsuka Y. A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. J Neurol Sci 2012 Apr 15;315(1-2):15-9.
2. Inomata T, Ebihara N, Funaki T, Matsuda A, Watanabe Y, Ning L, Xu Z, Murakami A, Arikawa-Hirasawa E. Perlecan-deficient mutation impairs corneal epithelial structure. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Mar 9;53(3):1277-84. 2012.
3. Monique Chyba, Frederic Mercier, John Rader, Vanessa Douet Eri Arikawa-Hirasawa, Youngsu Chow Kwon and Rich Kodama Dynamic mathematical modeling of

cell-fractone interactions Received on February 19, 2011 Journal of Math-for-Industry, Vol. 3 (2011A-8), pp. 79-88

4. Naoki Ichikawa-Tomikawa, Junko Ogawa, Vanessa Douet, Zhuo Xu, Yuji Kamikubo, Takashi Sakurai, Shinichi Kohsaka, Hideki Chiba, Nobutaka Hattori, Yoshihiko Yamada, and Eri Arikawa-Hirasawa Laminin a1 is essential for mouse cerebellar development *Matrix Biol.* 2011
5. Ning L, Ishijima M, Kaneko H, Kurihara H, Arikawa-Hirasawa E, Kubota M, Liu L, Xu Z, Futami I, Yusup A, Miyahara K, Xu S, Kaneko K, Kurosawa H. Correlations between both the expression levels of inflammatory mediators and growth factor in medial perimeniscal synovial tissue and the severity of medial knee osteoarthritis. *Int Orthop.* 2011 Jun;35(6):831-8.
6. Yoshinaga H, Sakoda S, Good JM, Takahashi MP, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K, Kitamura T, Kobayashi K, Ohtsuka Y. A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J Neurol Sci* 2012 Apr 15;315(1-2):15-9.
7. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K: CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Scientific Reports.* in press
8. Selcen D, Juel VC, Hobson-Webb LD, Smith EC, Stickler DE, Bite AV, Ohno K, Engel AG.: Myasthenic syndrome caused by plectinopathy. *Neurology* 2011, 76: 327-336.
9. Hirayama M, Nakamura T, Watanabe H, Uchida K, Hama T, Hara T, Niimi Y, Ito M, Ohno K, Sobue G.: Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine correlate with hallucinations rather than motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011, 17: 46-49.
10. Fu Y, Masuda A, Ito M, Shinmi J, Ohno K.: AG-dependent 3'-splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon. *Nucleic Acids Research* 2011, 39: 4396-4404.
11. Itoh T, Hamada N, Terazawa R, Ito M, Ohno K, Ichihara M, Nozawa Y, Ito M.: Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon gamma-induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 411:143-149.
12. Ito M, Ibi T, Sahashi K, Ichihara M, Ito M,

Ohno K. : Open-label trial and randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of hydrogen-enriched water for mitochondrial and inflammatory myopathies. Medical Gas Research 2011, 1:24.

13. Kaneko H, Kitoh H, Matsuura T, Masuda A, Ito M, Mottes M, Rauch F, Ishiguro N, Ohno K.: Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in *GPATCH8*. Hum Genet 2011, 130:671-683.
14. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Nishida H, Mabuchi N, Engel AG, Ohno K.: Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. Neurology 77:1819-1826.
15. Engel AG, Shen X-M, Ohno K., and Sine SM. Congenital myasthenic syndromes. Myasthenia gravis and myasthenic disorders 2nd ed. Ed. by Engel AG. Oxford University Press, New York, in press. (Book chapter)
16. Ohno K., Masuda A.: RNA pathologies in neurological disorders. Neurochemical Mechanisms in Disease, Advances in Neurobiology. Ed by Abel Lajtha. Springer, New York, 2011, pp399-415. (Review article without peer review)

2. 学会発表

1. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K. Protein-anchoring therapy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. 4th

International Congress of Myology, Lille, France. May 9, 2011.

2. Masuda A, Ito M, Fujita Y, Ohno K. Genome-wide analysis of RNA-binding sites of HuR. 16th Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japan. Jun 14-18, 2011
3. Ishihara N, Azuma Y, Yanagihara K, Yokoi S, Nakata T, Aso K, Ohno K., Natsume J. Glut1 deficiency syndrome with a SLC2A1 splice site mutation and normal erythrocyte glucose uptake. 12th International congress of human genetics, Montreal, Canada. Oct 11-15, 2011.
4. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Hishida H, Mabuchi N, Engel AG, Ohno K. Anti-MuSK antibodies in myasthenia gravis block binding of collagen Q to MuSK expressed at the neuromuscular junction. 41st Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC, USA. Nov 15, 2011.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 (特許申請)

発明者：大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、三島健一、
発明等の名称：「骨形成促進剤及びその用途」、特願
2011-185306号)、出願年月日：2011年8月26日、
出願人：国立大学法人名古屋大学、特許事務所番号：
NU11005

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Schwartz-Jampel 症候群診断方法確立に向けたパールカン遺伝子エクソーム解析研究

研究分担者 大野 欽司 名古屋大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

本研究の目的は、パールカン (*HSPG2*) 遺伝子の変異により発症する軟骨異栄養性筋強直症 (Schwartz-Jampel 症候群, SJS) の本邦での臨床診断・遺伝子診断方法の確立を目指すものである。SJS の原因遺伝子の解明後、遺伝子が巨大であること、患者数が少ないことより、効果的対症療法、根治療法が確立しておらず、症例の発掘、診断、病態解明、対症療法の確立が急がれる。エクソーム解析を用い、遺伝子診断システムの確立と治療法の開発のための研究を進めた。

A. 研究目的

軟骨異栄養性筋強直症 (Schwartz-Jampel 症候群, SJS) はパールカン欠損疾患であり (*Nature Genetics*, 2001, *Am.J.Hum Genet.* 2002)、筋の自発持続収縮によるミオトニアと骨格病変を主症状とする。本研究の目的は、細胞外マトリックス分子パールカン欠損による SJS の臨床診断・遺伝子診断サービスを提供し、更に分子病態解明と画期的治療に向けた基礎研究へ繋ぐことである。パールカン欠損証明による確定診断を行っているのは、現状では、パリ大学 Nicole 博士と本邦申請者のグループであり、特に本邦での症例の発掘、診断、病態解明は不十分である。他のミオトニア症候群同様、抗てんかん薬・抗不整脈薬による対症療法が行なわれるが、経験例では効果少なく、治療の適正化が急がれる。*SCN4A* 変異による myotonia permanents と SJS の臨床症状、電気生理学所見が似ており鑑別を要す。これまでに文献上、抗てんかん薬等が著効した例は、パールカンの遺伝子変異が示されており、Na チャネルの変異例であった可能性もある。診断システム自体が確立されていないため、患者数の把握すら不詳である。患者数が少なく研究の進みにくい疾患に対して、重点的・効率的に研究を行うことにより進行の阻止、機能回復・再生を目指した画期的な診断・

治療法の開発を行い、患者の QOL の向上を図ることを目的とした。

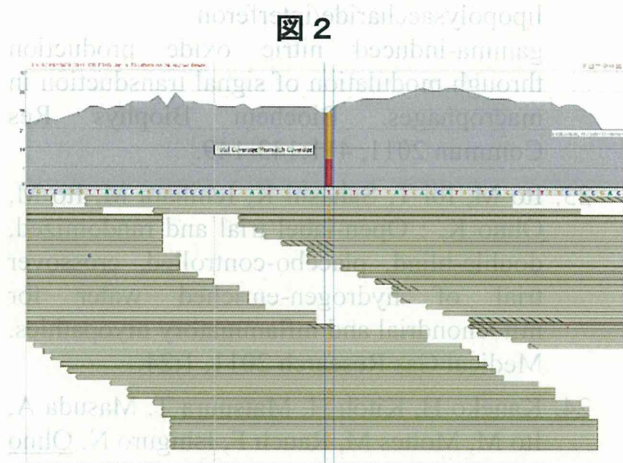
B. 研究方法

SJS 症例の発掘・同定 我が国での診断方法の確立 1999 年までに精神・神経センター (NCNP) 筋バンクに臨床診断 SJS として登録された 4 例中 2 例はパールカン遺伝子変異が検出された。その後、パールカン遺伝子 (*HSPG2*) は巨大遺伝子であるので (mRNA で 14294 bp) 生検筋を使ったパールカン免疫染色で除外診断してきた。本邦症例を中心に診断システムの構築を目指すため、症例の蓄積が重要である。候補例には、臨床診断・電気生理学検査、必要であれば筋生検を行う。遺伝子変異解析は大野、タンパク質解析は平澤が行った。*HSPG2* の promoter や intron を含めて変異を検索する目的で全エクソームに加えて *HSPG2* 全領域を加えた Agilent 社 SureSelect Custom Capture を合成し ABI SOLiD4 による resequencing を行い、*HSPG2* に加えて 171 種類の電位依存性イオンチャンネルを含む新規遺伝子の解析も行った。

C. 研究結果

SJS 症例の発掘・同定 我が国での診断方法の確立 SJS を疑う 3 症例に対して Agilent 社

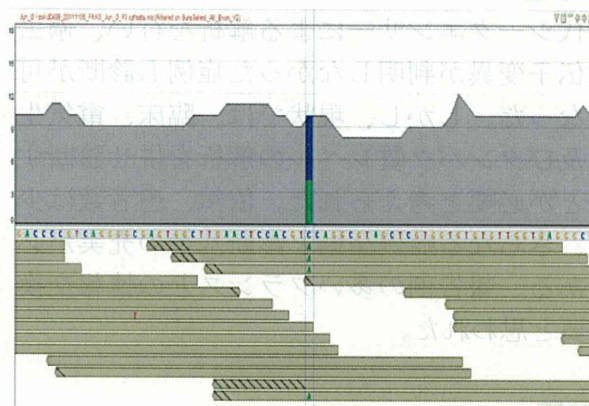
SureSelect Human All Exon v2 kit を用いてエクソン領域の DNA を濃縮し、ABI SOLiD4 シークエンサにて 50 bp の塩基配列を決定した。各症例から 62.9 – 78.3 x 10⁶ のタグを読み、各タグ 50 bp の塩基情報を持つために 3.1 – 3.9 Gbp の配列を決定した。BioScope1.3.1 を用いてヒトゲノム GChR37/hg19 にマッピングを行い 84.7% - 89.0% の塩基配列のマッピングを行った。Avadis NGS にて unreliable reads や PCR duplicates のフィルターリングを行い、default parameters を用いて SNV call を行った。症例 1 (Jun_N) において HSPG2 遺伝子に 3 種類の homozygous missense SNVs を同定したが、いずれも dbSNP135 に登録をされており、かつ 1% 以上の global minor allelic frequency (GMAF) を持つため病的意義はないと考えられた (W71S, rs2254357, GMAF = 0.475; G242V, rs2254358, GMAF = 0.476; N765S, rs989994, GMAF = 0.068)。症例 1 は別施設にて同時に行った候補遺伝子解析にて骨格筋電位依存性ナトリウムチャンネル *SCN4A* に 2077A>C (p.I693L) 変異を同定し myotonia permanens を含むナトリウムチャンネルミオトニアであることが判明した。なお、pI693L 変異は exome resequencing 解析でも heterozygous mutation であることが同定できている (図 2 exome resequencing 解析で同定された症例 1 の *SCN4A* 2077A>C 変異)。



症例 2 (Jun_O) は exome resequencing 解析でも D3954Y 変異が同定された (図 2 症例 2 の *HSPG2* D3954Y 変異)。さらに、今回の解析で症例 2 においてパールカンのドメイン III に

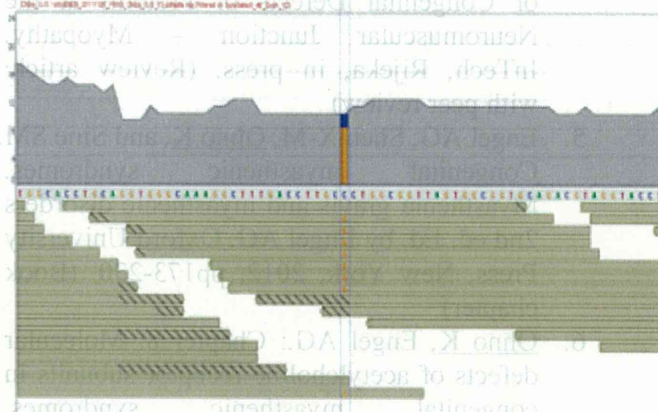
L1088P 変異を heterozygous に認めた (図 3)。家族解析により D3954Y と L1088P が heteroallelic な変異であることを確認する。

図 3



症例 3 (Chiba) においてパールカンのドメイン V に G3648R 変異を heterozygous に認めた (図 4 症例 3 の *HSPG2* G3648R 変異)。さらに、coverage は低いながら 14 カ所に heterozygous missense 変異の候補を同定し、現在、resequencing 解析を行なっている。また、2 種類の homozygous SNPs (rs1874792, rs989994) と 4 種類の heterozygous SNPs (rs2229478, rs2254357, rs2254358, rs35863848) を認めたが、これらも疾患との関連はないと想定される。

図 4



さらに、coverage は低いながら 14 カ所に heterozygous missense 変異の候補を同定し、現在、resequencing 解析を行なっている。また、2 種類の homozygous SNPs (rs1874792, rs989994) と 4 種類の heterozygous SNPs

(rs2229478, rs2254357, rs2254358, rs35863848)を認めたが、これらも疾患との関連はないと想定される。

D. 考察

次世代シーケンサーによる解析を行い、過去に遺伝子変異が判明しなかった症例も診断が可能になった。しかし、現状では、臨床、電気生理、及びタンパク質レベルの解析を併せ診断することが必要と考えられた。依然、患者数は少なく、さらなる症例発掘と診断基準の充実が必須である。報告例の多いフランスとの情報交換も重要と思われた。

E. 結語

今年度の研究成果から、臨床的に Schwartz-Jampel 症候群と診断された3例の遺伝子検査を行なった。一連の疾患スペクトラムを明確にするため、更なる症例蓄積が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

書籍

4. Ohno K, Ito M, and Engel AG.: Congenital Myasthenic Syndromes – Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction – Myopathy. InTech, Rijeka, in press. (Review article with peer review)
5. Engel AG, Shen X-M, Ohno K, and Sine SM. Congenital myasthenic syndromes. Myasthenia gravis and myasthenic disorders 2nd ed. Ed. by Engel AG. Oxford University Press, New York, 2012, pp173-230. (Book chapter)
6. Ohno K, Engel AG.: Chapter 8: Molecular defects of acetylcholine receptor subunits in congenital myasthenic syndromes. Pharmacology of Nicotinic Acetylcholine Receptors from the Basic and Therapeutic Perspectives. Ed. By Hugo R. Arias. Research Signpost, Kerala, 2011, pp175-186. (Review article without peer review)
7. Ohno K, Masuda A.: RNA pathologies in neurological disorders. Neurochemical Mechanisms in Disease, Advances in Neurobiology. Ed by Abel Lajtha. Springer,

New York, 2011, pp399-415. (Review article without peer review)

雑誌

17. Yoshinaga H, Sakoda S, Good JM, Takahashi MP, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K, Kitamura T, Kobayashi K, Ohtsuka Y. A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. J Neurol Sci 2012, 315: 15-19.
18. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K: CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. Scientific Reports 2012, 2: 209.
19. Selcen D, Juel VC, Hobson-Webb LD, Smith EC, Stickler DE, Bite AV, Ohno K, Engel AG.: Myasthenic syndrome caused by plectinopathy. Neurology 2011, 76: 327-336.
20. Hirayama M, Nakamura T, Watanabe H, Uchida K, Hama T, Hara T, Niimi Y, Ito M, Ohno K, Sobue G.: Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine correlate with hallucinations rather than motor symptoms in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 2011, 17: 46-49.
21. Fu Y, Masuda A, Ito M, Shinmi J, Ohno K.: AG-dependent 3'-splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon. Nucleic Acids Research 2011, 39: 4396-4404.
22. Itoh T, Hamada N, Terazawa R, Ito M, Ohno K, Ichihara M, Nozawa Y, Ito M.: Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon gamma-induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. Biochem Biophys Res Commun 2011, 411:143-149.
23. Ito M, Ibi T, Sahashi K, Ichihara M, Ito M, Ohno K. : Open-label trial and randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of hydrogen-enriched water for mitochondrial and inflammatory myopathies. Medical Gas Research 2011, 1:24.
24. Kaneko H, Kitoh H, Matsuura T, Masuda A, Ito M, Mottes M, Rauch F, Ishiguro N, Ohno K.: Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in *GPATCH8*. Hum Genet 2011, 130:671-683.
25. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Nishida H, Mabuchi N, Engel AG, Ohno K.:

Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 77:1819-1826.

2. 学会発表

5. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K. Protein-anchoring therapy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. 4th International Congress of Myology, Lille, France. May 9, 2011.
6. Masuda A, Ito M, Fujita Y, Ohno K. Genome-wide analysis of RNA-binding sites of HuR. 16th Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japan. Jun 14-18, 2011
7. Ishihara N, Azuma Y, Yanagihara K, Yokoi S, Nakata T, Aso K, Ohno K, Natsume J. Glut1 deficiency syndrome with a SLC2A1 splice site mutation and normal erythrocyte glucose uptake. 12th International congress of human

genetics, Montreal, Canada. Oct 11-15, 2011.

8. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Hishida H, Mabuchi N, Engel AG, Ohno K. Anti-MuSK antibodies in myasthenia gravis block binding of collagen Q to MuSK expressed at the neuromuscular junction. 41st Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC, USA. Nov 15, 2011.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得（特許申請）

発明者：大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、三島健一、発明等の名称：「骨形成促進剤及びその用途」、特願 2011-185306 号)、出願年月日：2011年8月26日、出願人：国立大学法人名古屋大学、特許事務所番号：NU11005

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の	書籍名	出版社名	出版地	出版年	頁
Engel AG, Shen X-M, et al	Congenital myasthenic syndromes. Myasthenia gravis and myasthenic disorders	Engel AG	Myasthenia gravis and myasthenic disorders 2nd ed	Oxford University Press	New York,	In press	
Ohno K, Ito M, et al	Congenital Myasthenic Syndromes – Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction		Myopathy.	InTech,	, Rijeka,	In press	
Ohno K, Masuda A. et al	RNA pathologies in neurological disorders. Neurochemical Mechanisms in Disease	Abel L Rajtha.	Pharmacology of Nicotinic Acetylcholine Receptors from the Basic and Therapeutic Pers	Springer	New York,	2011	399-415.

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshinaga H, Sakoda S, et al	A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes.	J Neurol Sci	315(1-2):	15-9	2012
Inomata T, Ebihara N, et al	Perlecan-deficient mutation impairs corneal epithelial structure.	<i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i>	53(3)	1277-84.	2012
Chyba M, Mercier F, et al	Dynamic mathematical modeling of cell-fractone interactions	<i>Journal of Math-for-Industry</i>	3 (2011A-8)	79-88	2011
Ichikawa-Tomikawa N, Ogasawara J, et al	Laminin $\alpha 1$ is essential for mouse cerebellar development	<i>Matrix Biol.</i>	311	17-28	2011
Mercier F, Arisawa E, Hirasawa E	Heparan sulfate niche for cell proliferation in the adult brain.	<i>Neurosci Lett.</i>	3510(2)	67-72	2011
Masuda A, Andersen HS et al	CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay.	Scientific Reports			2012

Selcen D, Juel VC, et al	Myasthenic syndrome caused by plectinopathy	Neurology.	76	327-336	2012
Hirayama M, Nakamura T et al	Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine correlate with hallucinations rather than motor symptoms in Parkinson's disease	Parkinsonism Relat Disord	17	46-49	2011
Fu Y, Masuda A et al	AG-dependent 3'-splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon.	Nucleic Acids Research	39	4396-4404	2011
Itoh T, Hamada N et al	Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon gamma-induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages.	Biochem Biophys Res Commun	411	143-149	2011
Ito M, Ibi T, et al	Open-label trial and randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of hydrogen-enriched water for mitochondrial and inflammatory myopathies	Medical Gas Research	1:24	1-8	2011
Kaneko H, Kishimoto H et al	Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in GPATCH8	Hum Genet	130	671-683	2011
Kawakami Y, Ito M et al	Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK	Neurology	77	1819-1826.	2011

CHAPTER 8

CONGENITAL MYASTHENIC SYNDROMES

Andrew G. Engel, M.D.^a
Shin-Ming Shen, Ph.D.^a
Kinji Ohno, M.D., Ph.D.^b
Steven M. Sine, Ph.D.^c

^aDepartment of Neurology and Neuromuscular Research Laboratory and ^cDepartment of Physiology and Biomedical Engineering, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905; ^bDivision of Neurogenetics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

Direct correspondence to Dr. Andrew Engel, Department of Neurology, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905; Fax: 507-284-5831; Phone: 507-284-5102; E-mail: age@mayo.edu.

CHAPTER OUTLINE

HISTORIC INTRODUCTION

MECHANISMS COMPROMISING THE SAFETY MARGIN OF NEUROMUSCULAR TRANSMISSION

THE CLASSIFICATION OF CONGENITAL MYASTHENIC SYNDROMES

THE INVESTIGATION OF CONGENITAL MYASTHENIC SYNDROMES

Clinical Observations

HISTORY AND EXAMINATION

THE INTRAVENOUS EDROPHONIUM TEST

EMG STUDIES

SEROLOGIC TESTS

Morphology

ROUTINE HISTOCHEMICAL STUDIES

CYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF AChE

IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF AChR AND OTHER ENDPLATE ASSOCIATED PROTEINS

ELECTRON MICROSCOPY AND ELECTRON CYTOCHEMISTRY

¹²⁵I- α -bgt Binding Sites Per Endplate

In Vitro Electrophysiology Studies

CONVENTIONAL MICROELECTRODE STUDIES

Molecular Genetic Studies

EXPRESSION STUDIES

PRESYNAPTIC CMS

CMS Caused by Defects in Choline Acetyltransferase (ChAT)

CLINICAL FEATURES

ELECTROPHYSIOLOGY

MORPHOLOGY

MOLECULAR STUDIES

TREATMENT

Paucity of Synaptic Vesicles and Reduced Quantal Release

Congenital Myasthenic Syndrome Resembling the Lambert-Eaton Syndrome

SYNAPTIC BASAL-LAMINA-ASSOCIATED CMS

Endplate Acetylcholinesterase Deficiency

CLINICAL ASPECTS

ELECTROPHYSIOLOGY FEATURES

MORPHOLOGY

PATHOPHYSIOLOGY

MOLECULAR PATHOGENESIS

DIAGNOSIS

THERAPY

Defects in β 2-Laminin

POSTSYNAPTIC CMS

CMS Caused By Mutations in AChR

Slow-Channel Syndromes

CLINICAL ASPECTS

ELECTROPHYSIOLOGY FEATURES

MORPHOLOGY
 PATHOPHYSIOLOGY
 MOLECULAR GENETIC STUDIES
 DIAGNOSIS
 THERAPY

Fast-Channel Syndromes

CLINICAL ASPECTS
 ELECTROPHYSIOLOGY FEATURES
 MORPHOLOGY
 DIAGNOSIS
 THERAPY

AChR Deficiency Caused by Recessive Mutations in AChR Subunits

CLINICAL FEATURES
 ENDPLATE STUDIES
 MOLECULAR PATHOGENESIS
 GENETIC HETEROGENEITY
 THERAPY

Escobar Syndrome

CMS Caused by Defects in Rapsyn

CLINICAL FEATURES
 ELECTROPHYSIOLOGY
 MORPHOLOGY
 MOLECULAR FEATURES
 DIAGNOSIS
 THERAPY

DEFECTS IN MECHANISMS GOVERNING ENDPLATE DEVELOPMENT AND MAINTENANCE

CMS Caused by Defect in Agrin

CMS Caused by Defects in MuSK

CMS Caused by Defects in Dok-7

CLINICAL FEATURES AND RESPONSE TO THERAPY
 MORPHOLOGY
 ELECTROPHYSIOLOGY
 MOLECULAR STUDIES

CMS Caused by Defects in the Hexosamine Biosynthetic Pathway

Sodium Channel Myasthenia

CMS Caused by Plectin Deficiency

CMS Associated with Centronuclear Myopathy (CNM)

HISTORIC INTRODUCTION

Congenital myasthenic syndromes (CMS) are neither new nor uncommon disorders. In 1937, Rothbart¹ described four brothers under the age of 2 years with a myasthenic disorder, and by 1972 Sarah Bunday² was able to collect 97 familial cases of myasthenia with onset before the age of 2 years. After the discovery of the autoimmune origin of myasthenia gravis (MG) in the 1970s and of the Lambert-Eaton syndrome in the 1980s, it became apparent that myasthenic disorders occurring in a familial or congenital setting must have a different pathogenesis.³ In the 1970s and 1980s, ultrastructural, cytochemical, and in vitro microelectrode studies of CMS patients revealed a heterogeneous group of disorders: a presynaptic syndrome associated with a paucity of synaptic vesicles and decreased evoked release of acetylcholine (ACh) quanta;⁴ a presynaptic disease caused by a defect in the resynthesis or vesicular packaging of ACh;^{5,6} synaptic acetylcholinesterase (AChE) deficiency;⁷ and two postsynaptic syndromes, one attributed to slow closure of the acetylcholine receptor (AChR) ion channel,⁸ and one associated with AChR deficiency.^{9,10}

During the past two decades, further developments resulted in better understanding of previously identified CMS and new types of CMS were discovered. The primary sequences of several genes encoding key endplate associated proteins were determined; discovery of the crystal structure of the molluscan ACh binding protein and cryoelectron microscopy investigation of the atomic structure of Torpedo AChR provided a structural models for the binding^{11,12} and pore¹² domains of the receptor; patch clamping of human intercostal muscles endplates (EPs) to allow recording and analysis of single channel currents of the AChR was accomplished;¹³ and mammalian expression systems were used for detailed analysis of the consequences of mutations in endplate associated proteins.

MECHANISMS COMPROMISING THE SAFETY MARGIN OF NEUROMUSCULAR TRANSMISSION

The postsynaptic depolarization caused by a by a single quantum of ACh released from nerve terminal gives rise to a miniature EP potential (MEPP); depolarization induced by a larger number of quanta released by a nerve impulse generates an EP potential (EPP). The amplitude of the EPP must exceed a critical threshold to activate voltage-sensitive sodium channels in and around the postsynaptic region and thereby generate a muscle fiber action potential.

Neuromuscular transmission fails and a myasthenic disorder results when the EPP fails to reach this critical threshold. The safety margin of neuromuscular transmission is defined as the difference between the amplitude of the EPP and the amplitude of the depolarization required to trigger a muscle fiber action potential.

In each CMS, the safety margin of neuromuscular transmission is compromised by one or more mechanisms. These mechanisms involve the synthesis or packaging of ACh quanta into synaptic vesicles, the Ca²⁺-dependent evoked release of ACh from the nerve terminal, and the efficiency of released quanta in generating a postsynaptic depolarization. Quantal efficiency depends on the EP geometry, the density and functional state of acetylcholinesterase (AChE) in the synaptic space, and the density, affinity for ACh, and kinetic properties of AChR.

THE CLASSIFICATION OF CONGENITAL MYASTHENIC SYNDROMES

Congenital myasthenic syndromes are classified as presynaptic, synaptic basal lamina associated, or postsynaptic according to the site of the primary defect. Table 1 presents a classification for CMS based on 306 index patients investigated at the Muscle Research Laboratory of the Mayo Clinic. In all but 3 of these patients the genetic basis of the CMS was determined. The classification is still tentative, as future studies are likely to provide further information on the

nature of presynaptic defects, some CMS are still incompletely characterized, and additional CMS are likely to be discovered. Inspection of Table 1 indicates that 80% of the CMS are postsynaptic, 14% are accounted for by EP AChE deficiency, and only 6% are presynaptic.

THE INVESTIGATION OF CONGENITAL MYASTHENIC SYNDROMES

A full understanding of how the safety margin of neuromuscular transmission is compromised in a given CMS is based on clinical, morphologic, in vitro electrophysiologic, and molecular genetic studies (Table 2). The clinical evaluation must include detailed electromyographic (EMG) and serologic studies. The morphologic evaluation should include careful examination of the fine structure of the EP. The in vitro electrophysiologic studies must be sufficiently complete so they provide information on parameters of quantal release and the factors affecting the efficiency of the released quanta. A surprising number of CMS stem from a kinetic abnormalities of the AChR. These can be recognized by examination of the decay phase of the miniature EP current (MEPC), and more accurately by patch-clamp analysis of currents flowing through single AChR channels. Since 1994, genetic analysis has become an important facet of CMS investigations.

Because only few medical centers are able to perform all or some of the above studies, mutations analysis of DNA isolated from blood or other tissues has been increasingly used to identify CMS disease genes. Targeted mutation analysis became feasible after it was realized that distinct clinical and EMG phenotypes can point to the disease gene. However, these phenotypes are often nonspecific; detection of a single or even two recessive variant in an endplate related gene of a CMS patient does not establish that the disease gene has been correctly identified, even if the mutation is not present in 200-400 normal control alleles; and in silico evaluation of the significance of a mutation is not consistently reliable or can be misleading. Given these caveats, if the clinical data provides no clues for targeted mutation analysis, one can still search mutations in endplate proteins in descending order of their currently known relative frequency in different, as shown in Table 1. Importantly, taking all CMS mutations identified in our laboratory, 53% were in subunits of AChR. Moreover, 34% of all observed mutations were low expressor mutation in the ϵ subunit whereas only 3% of the low-expressor mutations were detected in the α , β , or δ subunits of AChR.

Clinical Observations

HISTORY AND EXAMINATION

A typical clinical history for CMS is one of ocular, bulbar, or respiratory muscle symptoms worsened by crying or activity in the neonatal period; fluctuating ocular palsies and abnormal fatigability on exertion during infancy and childhood; normal or delayed motor milestones; sometimes progression of symptoms during adolescence or adult life; and negative tests for anti-antibodies directed against AChR, MuSK, and the P/Q type voltage-gated calcium channel. Some syndromes (e.g., the slow channel syndrome⁸ and familial limb-girdle myasthenia) may not present until the second or third decade of life; and in patients with choline acetyltransferase (ChAT) deficiency, the symptoms can be episodic, with severe weakness and respiratory insufficiency appearing with fever, excitement, or without known cause.^{5,6} A positive family history is consistent with the diagnosis. A negative family history does not exclude autosomal recessive inheritance, parental mosaicism for a dominant mutation, or one parent being hemizygous for a dominant gene mutated in the other parent.

On examination, the most important clue to a defect of neuromuscular transmission is increasing weakness on sustained exertion. This can be documented by observing increasing ptosis during sustained upward gaze, measuring the arm elevation time, counting the number of deep knee bends the patient can perform, or by repeated manual testing of selected muscles at short

intervals. Patients with severe involvement of the trunkal muscles, as in EP AChE deficiency or in the slow-channel syndrome, rapidly develop postural scoliosis and shift their weight from one foot to another on standing.¹⁴ Selectively severe weakness of cervical and of wrist and finger extensor muscles is found in older patients with EP AChE deficiency¹⁴ and in the slow-channel syndrome.⁸ Pupillary light reflexes are delayed in patients with EP AChE deficiency.¹⁴ Ocular muscle involvement can be absent or mild in some cases of EP AChE deficiency,¹⁴ the slow-channel syndrome,⁸ rapsyn deficiency, or limb-girdle myasthenia caused by mutations in Dok-7,¹⁵ or other genes. The tendon reflexes are preserved but are hypoactive or absent in a CMS resembling the Lambert-Eaton syndrome, in some cases of EP AChE deficiency,¹⁴ and in severe cases of the slow-channel syndrome.⁹ Table 3 lists the differential diagnoses of CMS. Most entities can be excluded by careful physical examination that reveals weakness increased by exertion and by demonstration of a decremental EMG response.

THE INTRAVENOUS EDROPHONIUM TEST

The test is negative in EP AChE deficiency and can be negative between spells of weakness in ChAT deficiency, and usually negative or inconsistently positive in the slow-channel syndrome and Dok-7 myasthenia. A negative edrophonium test does not exclude the diagnosis of a CMS; a positive test can be consistent with the diagnosis but does not differentiate it from autoimmune MG.

EMG STUDIES

Diagnosis of a CMS must be supported by a decremental EMG response at low-frequency (2-3 Hz) stimulation in at least one muscle, or by abnormal jitter and blocking during single fiber EMG. The decremental response can be absent in patients with ChAT deficiency when asymptomatic. In this case, the decremental response is elicited by 10 Hz stimulation for 5 to 10 minutes or by exercise for several minutes before stimulation.^{5,6}

In patients taking high doses of AChE inhibitors, in patients with EP AChE deficiency,^{7,14} and in the slow-channel syndrome,⁸ single nerve stimuli evoke a primary compound muscle action potential (CMAP) followed by one or more repetitive CMAPs, each separated by an interval of 5 to 8 ms. The repetitive potentials are smaller and decrement faster than the primary response at all frequencies of stimulation. Therefore, the test must be done in patients not exposed to AChE inhibitors, after a period of rest, and initially with single nerve stimuli.

Observations in the EMG laboratory can provide an objective estimate of responsiveness to AChE inhibitors or other cholinergic agents. For example, one can compare the decrement observed in a given muscle before and 30 minutes after a subcutaneous dose of neostigmine methylsulfate, or 60 to 90 minutes after an oral dose of 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP).

SEROLOGIC TESTS

A positive AChR antibody test excludes the diagnosis of a CMS but a negative antibody test does not confirm it because some patients with autoimmune MG are also seronegative. Seronegative MG can sometimes be excluded by other findings. Absence of immune deposits (IgG and complement) from the EP, or an in vitro electrophysiologic abnormality different from that in MG, is strong evidence against seronegative MG.

Morphology

ROUTINE HISTOCHEMICAL STUDIES

These may show no abnormality or only type 2 fiber atrophy. In patients with postsynaptic CMS, there is frequently type 1 fiber preponderance. Type 1 fiber preponderance is not specific but when combined with type 2 fiber atrophy it suggests the diagnosis of a postsynaptic CMS.

In patients with the slow-channel syndrome, small groups of atrophic fibers and various myopathic alterations, including tubular aggregates and vacuolar changes near the endplate, occur in severely affected muscles.⁸ Tubular aggregates also appear in one type of limb-girdle CMS.

The mean muscle fiber diameter must be determined in all muscle specimens used for MEPP measurements, as the MEPP amplitude is related by an inverse exponential function to the fiber diameter.¹⁶

CYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF AChE

EP AChE is concentrated in the basal lamina of the primary and secondary synaptic clefts.¹⁷ The light microscopic localization of AChE reveals the position and configuration of the synaptic gutter but provides no information on the pre- or postsynaptic components of the EP. When AChE is localized on fixed and teased fibers and the EP is viewed face-on, the normal synaptic gutter has an oval outline and branches like arms, resembling a pretzel. In the slow-channel syndromes, where the postsynaptic regions are destroyed by cationic overloading,^{8,9} in autoimmune MG,¹⁸ and in CMS caused by mutations that curtail AChR expression,¹⁹ the EPs are remodeled due to sprouting of terminal or ultraterminal axons and formation of new endplate regions. The AChE reaction now reveals multiple small EP regions dispersed over an extended length of the muscle fiber surface. Inaccurately, this is sometimes described as "elongation" of the EP and the axial length of the fiber surface on which AChE-positive zones are dispersed is designated as "the length of the endplate".^{18,20}

In congenital EP AChE deficiency, there is no reaction for AChE in either fresh or fixed muscle.^{7,14} When this diagnosis is suspected, AChE should be localized in the presence of 10^{-5} M iso-OMPA to inhibit any butyrylcholinesterase activity at or near the EP.

IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDIES

Immunocytochemical studies have many uses. They can (1) reveal an absence of immunoreactive AChE in EP AChE deficiency;¹⁴ (2) prove or disprove the diagnosis of autoimmune MG by showing presence or absence of immune deposits (IgG, C3, and the C5b-9 membrane attack complex) at the EP; (3) provide a qualitative estimate of the abundance of AChR,^{9,21,22} at the EP; and (4) demonstrate presence, absence, or reduced expression of other EP-specific proteins, for example, the vesicular ACh transporter, synapsin 1, and ChAT in the nerve terminal; and Dok-7,¹⁵ agrin, rapsyn,²³ plectin, Na_v1.4,²⁴ and utrophin in the postsynaptic region. Subunit-specific anti-AChR antibodies can reveal absence of the adult-type ϵ subunit and reappearance of the fetal-type γ subunit of AChR at the EPs.^{9,21} However, immunocytochemical localizations are not helpful when a mutation does not decrease expression of the mutant protein,²⁴ or when a monoclonal antibody is directed against an epitope upstream of a truncating mutation.¹⁵

ELECTRON MICROSCOPY AND ELECTRON CYTOCHEMISTRY

Electron microscopy analysis of the EP is essential in the investigation of novel CMS. The size and density of the synaptic vesicles, the size of the nerve terminal and its relation to the Schwann cell, the structure of the junctional folds, and alterations in organelles of the junctional sarcoplasm cannot be observed in any other way. Quantitative electron microscopy allows morphometric reconstruction of the endplate,²⁵ yields data for structure-function correlations, and can point to the mechanism that impairs neuromuscular transmission. For example: (1) electron microscopy is required to demonstrate the paucity of synaptic vesicles in a unique CMS associated with reduced quantal release.⁴ Without visualizing the synaptic vesicles, this disorder could be confused with the Lambert-Eaton syndrome. (2) In endplate AChE deficiency, smallness of the nerve terminals and their encasement by Schwann cells explains the decrease in quantal release by nerve impulse.^{7,14}