

遺伝性ミオパチーの次世代型統合的診断拠点形成
3. 新規原因遺伝子変異の病原性証明と疾患分子病態解明

業務主任者 野口悟 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 室長

研究要旨

孤発例の原因遺伝子解析では、次世代シーケンサーによって数十にも及ぶ遺伝子変異候補が見いだされるが、真の変異を探しだすこと、変異の病因性を証明することは、依然として難しい課題である。

□-dystroglycanopathyおよびtubular aggregate myopathy患者を対象として行った全エクソーム解析から得られた変異候補を絞り込み、効率的に変異の病因性の証明をすることを目指した。

□-dystroglycanopathyについては、*POMGNT2*遺伝子変異について解析した。*POMGNT2*遺伝子を欠失した半数体株化細胞HAP1に対して、変異または野生型*POMGNT2* cDNAを導入することで、細胞の表現型が回復出来るのかを指標に、用いた遺伝子変異の病因性を判断した。さらに、変異*POMGNT2*の酵素活性の測定、細胞内局在の解析を行った。

Tubular aggregate myopathyについては、見出したORAI1変異(Gly98Ser, Leu138Phe)のストア作動性カルシウム流入への影響を確認するため、罹患者由来の筋管細胞及び上記変異を有するORAI1を過剰発現させたHEK293細胞を用いて、細胞外Ca²⁺濃度変化に伴う細胞内Ca²⁺濃度変化を測定した。その結果、細胞外にCa²⁺を加えることで、変異ORAI1をもつ細胞では有意に細胞内Ca²⁺濃度が上昇し、ORAI1チャネルの特異的阻害剤により抑制されることを見出した。このことは、ORAI1優性変異による恒常的SOCE活性化が、Tubular aggregate形成および骨格筋障害の原因であることを示している。

A. 研究目的

次世代シーケンサー解析によって見いだされる各種変異候補の病原性証明と分子病態解明のために、機能解析の系を確立することを目的としている。今年度は、全エクソーム解析で見いだされたα-dystroglycanopathy および tubular aggregate myopathy の候補変異を評価する系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

α-dystroglycanopathy患者20名を対象とし、イルミナ社HiSeq1000にて全エクソーム解析を行お見いだされた変異候補のα-dystroglycan糖鎖への影響を評価すべく、HAP1細胞(野生型、*POMGNT2*-KO)の供与をNetherlands Cancer InstituteのDr. Brummelkampより受けた。ヒト*POMGNT2* cDNAは、ヒト

骨格筋cDNAプールからPCRにて増幅・クローニングした。PCRエラーにて生じた変異は、site-directed mutagenesisにて参照配列に矯正し、野生型cDNAを得た。変異の導入にはさらに、site-directed mutagenesisを用いた。野生型及び変異cDNAは、pLVSIN-IRES-ZsGreenにクローニングし、レンチウイルスベクタークローンを得た。レンチウイルスベクターの作製は定法を用いた。変異の病因性の評価は、HAP1生細胞を α -dystroglycanの糖鎖エピソードに対する抗体IIH6にて染色することで行った。今回用いた変異は劣性遺伝変異が予想されるため、もし、見いだされた変異が「真の変異」であり、変異タンパク質が機能を失っていた場合には、欠損細胞は変異遺伝子の導入で蛍光染色が陽性とならない。もし、変異が“多型”であって、依然として機能タンパク質が作られる場合には、蛍光染色が陽性となると考えられた。そこで、ZsGreen陽性にて遺伝子導入細胞を同定し、かつIIH6染色の回復の有無を調べることで、変異を評価した。ヒト野生型および変異myc-POMGNT2 cDNAをHele細胞に導入・発現させ、myc標識タンパク質の細胞内局在を解析した。ヒト野生型および変異myc-POMGNT2 cDNAをHEK293細胞に導入・発現させた。膜画分を調製した。1% TritonX-100にて抽出後、抽出物をMannose - -4-MU及びUDP-GlcNAcと6時間反応させた。反応生成物GlcNAc-Man - -4-MUをHPLCにて、Amide-80カラムにて分離定量した。同定した生成GlcNAc-Man - -4-MUが、 α -ヘキソサミニダーゼ消化により消失することを確認した。

Tubular aggregate myopathyを呈する18症例に対して行った全エクソーム解析により、罹患者6名のORAI1遺伝子にヘテロ接合性変異を見出した。骨格筋収縮は主に筋小胞体 (SR) から放出される

Ca²⁺濃度により制御されており、SR内のCa²⁺を一定に保つ機構としてストア作動性カルシウム流入 (store-operated Ca²⁺ entry; SOCE) と呼ばれる細胞外から細胞内へのCa²⁺流入機構が存在する。このCa²⁺流入を担うのがストア作動性Ca²⁺チャネルであり、ORAI1はその主要構成成分である。見出したORAI1変異(Gly98Ser, Leu138Phe)のSOCEへの影響を確認するため、罹患者由来の筋管細胞及び上記変異を有するORAI1を過剰発現させたHEK293細胞を用いて、細胞外Ca²⁺濃度変化に伴う細胞内Ca²⁺濃度変化を測定した。また、細胞内Ca²⁺濃度変化が細胞外からのCa²⁺流入によるものなのか、SRをはじめとする細胞内Ca²⁺貯蔵器官から放出されたものなのかを見極めるために、Mn²⁺ quenching実験を行った。

(倫理面への配慮)

すべての組み換え DNA 実験は、カルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と関係省令を遵守し、国立精神・神経センター神経研究所組み換え DNA 実験安全委員会の審査・承認(筋疾患関連遺伝子のクローニング: 26-01)を得ている。

C. 研究結果

α -dystroglycanopathy3名に *POMGNT2* 変異 c.494T>C(p.M165T) 及び c.785C>T (p.P253L) 複合ヘテロ接合変異(1名)、c.785C>T (p.P253L)ホモ接合変異(2名)を見出した。両方の変異は、ともにミスセンス変異であると推定された。また、両変異ともにグリコシルトランスフェラーゼ様ドメインに存在していた。変異が見出された患者には、きわめて軽い筋ジストロフィーを認めた。筋病理についても、わずかな壊死・再生線

維を示す、ごく軽いものであった。また、脳の形成不全などは認められなかった。

野生型 HAP1 細胞は、ラミニン上で培養することで、 α -dystroglycan は集積し、IIH6 抗体で染色された。一方、*POMGNT2*-KO 細胞では IIH6 抗体での染色は見られなかった。*POMGNT2*-KO 細胞への野生型 *POMGNT2*cDNA の導入により IIH6 抗体陽性となった。一方、p. M165T 及び p.P253L 変異 *POMGNT2* cDNA の導入では、IIH6 抗体陰性であった。Hela 細胞に導入された p. M165T 及び p.P253L 変異 *POMGNT2* は、野生型 *POMGNT2* と同様に、小胞体での局在が見られた。しかしながら、HEK293 細胞で発現させた p.M165T 及び p.P253L 変異 *POMGNT2* は、野生型 *POMGNT2* に比べ、10%以下の比活性しか検出されなかった。

罹患者由来の筋管細胞及び変異 *ORAI1* を過剰発現させた HEK293 細胞の液体培地を、 Ca^{2+} を含有していない培養液、生体内における細胞外 Ca^{2+} 濃度と同等の 2mM を含有する培養液、20mM 高濃度 Ca^{2+} を含有する培養液に変換することで、細胞内 Ca^{2+} 濃度がどのように変化するのかを経時的に測定した。細胞外に Ca^{2+} を加えることで、変異 *ORAI1* をもつ細胞では有意に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、*ORAI1* チャネルの特異的阻害剤により抑制されることを見出した。またこの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵器官から放出されたものではなく、細胞外から細胞内へ Ca^{2+} が異常流入していることによるものであることを明らかにした。以上の結果より、*ORAI1* 優性変異による恒常的 SOCE 活性化が、Tubular aggregate 形成および骨格筋障害の原因であることが示された。

D. 考察

α -dystroglycanopathy の原因遺伝子は、現在 18 種類以上が同定されている。 α -dystroglycanopathy の原因遺伝子は、糖鎖合成に関わる酵素をコードしているものが大半であり、患者で同定された変異の証明には変異遺伝子産物の酵素活性を測定する方法が一般的である。しかしながら、変異遺伝子毎に異なるアッセイ系を構築せねばならず、十分に証明されていないままに報告されることもある。また、機能が同定されていない遺伝子に関しては、証明の方法もないのが現状である。Jae らによって報告された HAP1 細胞を用いた α -dystroglycanopathy の候補遺伝子を予測、実証した方法は、理論上、すべての候補遺伝子、遺伝子変異を同じ方法にて検定しうるものである。今回、*POMGNT2* 変異に応用したが、変異 cDNA による機能回復は観察されず、当該変異が病因であることを証明することに成功した。

組み換え変異 *POMGNT2* タンパク質は、活性の低下を示し、これらの変異が病因変異であることを再び強く支持した。これまで、*POMGNT2* 変異による α -dystroglycanopathy では、症状の重い WWS の報告がある。今回見出された患者は、非常に軽い肢帯型筋ジストロフィーであるが、興味深いことに、変異タンパク質活性は低下していたものの、まったく失われているわけではなく、少量の残存活性が検出された。この活性により、 α -dystroglycan の糖鎖修飾が部分的に保持され、軽い症状を引き起こしているものと考えられた。また、遺伝子変異はグリコシルトランスフェラーゼドメインに存在したが、変異タンパク質の発現や細胞内分布には影響がなく、活性の低下のみが検出されたことと関係しているのかもしれない。以上の結果から、以前報告した *DAG1* 変異での

α -dystroglycanopathy と合わせて、HAP1 細胞を用いた変異の病因性の証明方法は、他の遺伝子変異を原因とする α -dystroglycanopathy まで、広く利用することができることが示された。今後は、変異遺伝子補完実験で、HAP1 細胞が発現する α -dystroglycan とラミニンとの結合実験など生化学的解析を行うことで、この方法の有効性を示していきたいと考えている。

これまで ORAI1 遺伝子の劣性変異により重症複合型免疫不全症が引き起こされることは知られていたが、今回優性変異により骨格筋疾患を来すという新たな知見を得た。また、ORAI1 と複合体を形成する STIM1 の優性変異でも同様に、SOCE が活性化され Tubular aggregate myopathy を発症することが報告されており、SOCE 活性による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化が骨格筋障害に関与していると推察された。以上の知見は、新規の筋疾患概念を提唱するものであり、細胞内 Ca^{2+} 動態と骨格筋障害の関連を説明する端緒となり得る。また、Tubular aggregate myopathy の病態が ORAI1 チャネルの機能獲得型変異であることを明らかにし、その特異的阻害剤が有効であるという *in vitro* での実験結果を得たことから、治療法への応用が期待される。

E. 結論

α -dystroglycanopathy および tubular aggregate myopathy を対象に、遺伝子変異の病因性の証明をおこなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Dong M, Noguchi S, Endo Y, Hayashi YK, Yoshida S, Nonaka I, Nishino I. *DAG1*

mutations associated with asymptomatic hyperCKemia and hypoglycosylation of α -dystroglycan. *Neurology*, 84, 273-279. 2015.

Uruha A, Hayashi YK, Oya Y, Mori-Yoshimura M, Kanai M, Murata M, Kawamura M, Ogata K, Matsumura T, Suzuki S, Takahashi Y, Kondo T, Kawarabayashi T, Ishii Y, Kokubun N, Yokoi S, Yasuda R, Kira JI, Mitsunashi S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I. Necklace cytoplasmic bodies in hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* jnnp-2014-309009. 2014

Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I. Dominant mutations in *ORAI1* cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Hum Mol Genet* 24, 637-648, 2014.

2. 学会発表

Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y, Miyatake S, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I: Dominant mutations in *ORAI1* cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca^{2+} channels. 19th International Congress of the World Muscle Society, Berlin, Germany (Langenbeck-Virchow-Haus), 10.8, 2014 (10.7-10.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし