

20123/053B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究

平成23年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成25（2013）年4月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究

平成23年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成25（2013）年4月

## 目 次

I.	総合研究報告		
	先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究	-----	1
	大野欽司（名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学教授）		
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	12
III.	研究成果の刊行物・別刷	-----	21

# 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））  
総合研究報告書

先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究

研究代表者 大野 欽司 名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学教授

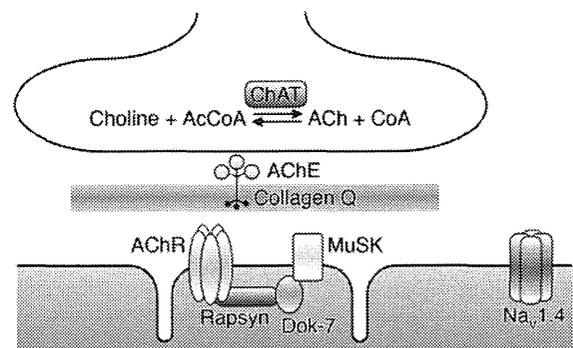
研究要旨

本研究の目的は、神経筋接合部の先天的な分子欠損症による先天性筋無力症候群(congenital myasthenic syndromes, CMS)の臨床診断・電気生理検査・遺伝子診断サービスを提供するとともにさらなる分子病態解明を行うことである。CMSは世界中から800症例以上が報告されているが平成21年度までは本邦のCMS確定診断例は2例のみであった。平成22年度の「先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究（H22-難治-一般-028）」と平成23・24年度の本研究事業により16例の新規臨床診断を行い11例において6種類の既存遺伝子に変異を同定し、1例において神経筋接合部に発現をすする新規分子に変異を同定した。また4例において病態に応じたエフェドリン療法・フルオキセチン療法を開始し効果を認めている。諸外国同様に本邦においてもCMSは未診断、もしくは、筋ジストロフィー・先天性筋症・重症筋無力症と誤診され未治療ないしは胸腺摘出術・長期免疫抑制療法など不適切な治療を受けている症例がまだ数多く存在すると推定される。またCMSには抗コリンエステラーゼ剤で症状が憎悪する病型もあり、CMSの欠損分子の同定と病態に応じた適切な治療を提供する必要がある。

上記の遺伝子変異同定研究に加えて、研究代表者・分担者らは、(i)GFPT1遺伝子変異の筋分化に対する影響、(ii)本研究事業で同定をした1種類の新規分子（神経筋接合部構造タンパク）の神経筋接合部分子との結合への影響、(iii)本邦の5種類のCOLQ変異の*in vitro*病態解析、(iii)本邦の2種類のAChR遺伝子変異の細胞表面発現解析ならびにsingle channel recording解析、(iv) CHRNA1エクソン変異のスプライシング病態解析を行った。

研究分担者

- 福留隆泰 独立行政法人国立病院機構長  
崎川棚医療センター・神経内科部長
- 奥村彰久 順天堂大学医学部小児科・小児神経学・准教授
- 小牧宏文 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・小児神経科医長



A. 研究目的

研究代表者は、CMS において、(1) 骨格筋アセチルコリンレセプター (PNAS 1995; Neuron 1995; Neuron 1996; J Neurosci 1997;

Neuron 1998; Ann Neurol 1998; Nat Neurosci 1999; Am J Hum Genet 1999; J Clin Invest 1999; J Clin Invest 2003; Hum Mol Genet 2003; Brain 2005; J Clin Invest 2008; Hum Mol Genet 2008;

*Hum Mol Genet* 2009)、(2) アセチルコリンエステラーゼを係留する collagen Q (*PNAS* 1998; *Ann Neurol* 2000; *J Biol Chem* 2004)、(3)コリンアセチルトランスフェラーゼ (*PNAS* 2001; *EMBO J* 2004)、(4) AChR を筋終板に集積させる rapsyn (*Am J Hum Genet* 2002; *Hum Mol Genet* 2003)、(5) 骨格筋ナトリウムチャンネル (*PNAS* 2004)の欠損分子病態の研究を行ってきた(*Nat Rev Neurosci* 2003)。また共同研究者福留はスローチャンネル症候群の標準的な治療法を確立した(*Neuroreport* 1998; *Neurology* 2003)。

本邦のCMS確定診断例は平成21年度までに2例のみであった。平成22年度にCMS研究班を発足させ、共同研究者の福留・奥村・小牧らを中心に新規CMS症例の臨床・電気生理学診断を行ってきた。さらに、capillary sequencer解析ならびにexome-capture resequencing解析を行い3種類の既知遺伝子ならびに2種類の新規遺伝子の変異を同定した。これら遺伝子変異は1変異を除いて本邦に特有のものであり、これらの遺伝子変異の機能解析を引き続き行っている。

## B. 研究方法

### 【CMS症例の発掘・同定研究】

診断に至っていない新たな CMS 症例を発掘する。共同研究者福留・奥村・小牧は症例の紹介を受け臨床診断・電気生理学検査を行う。患者の受診が困難な場合には臨床所見・反復神経刺激検査結果の詳細な検討を行う。遺伝子変異解析は研究代表者が行う。平成 22 年度までは臨床・電気生理学的に CMS と確定診断した症例のみ遺伝子診断解析を行ったが、平成 23 年度以降は平成 22 年度に自ら開発した exome-capture resequencing 解析ツールを用いて CMS を強く疑う症例を含めて

遺伝子変異解析を行った。

### 【GFPT1遺伝子変異の解析】

糖代謝酵素遺伝子 *GFPT1*/*GFPT1* の変異が 2011 年にイギリスから報告をされ、ほぼ同時に、本邦患者でも *GFPT1* 遺伝子変異を同定した。*GFPT1* 分子の骨格筋分化に対する影響を調べた。

### 【新規に同定をした1種類の遺伝子の変異の解析】

従来 CMS との関連が知られていなかった神経筋接合部構造タンパク質をコードする新規遺伝子に変異を同定した。この分子と他の神経筋接合部分子のタンパク質間相互作用解析を行うとともにシグナル解析を行った。

### 【COLQ遺伝子変異の分子病態研究】

共同申請者の福留・奥村・小牧らとともに CMS 3 例において同定をした 5 種類の collagen Q 遺伝子変異の解析を行った。

### 【AChR遺伝子変異の解析】

平成 22 年度に同定した本邦特有の *CHRNA1* M442T, *CHRNE* L284R 変異の AChR 細胞表面発現量への影響を FACS を用いて解析をした。さらに single channel recording により ion channel kinetics の解析を行い CMS 病型を明らかにした。

### 【CHRNA1 P3A23'G>A変異のスプライシング病態解析】

AChR  $\alpha$  subunit 遺伝子 (*CHRNA1*) のエクソン上の変異が結合を減弱させるスプライシング因子を同定し病態を明らかにした。

(倫理面への配慮)

先天性筋無力症候群の遺伝子変異解析は次世代シーケンサ解析を含めて名古屋大学医学系研究科生命倫理委員会の承認を得ている (承認日:初版 平成 20 年 3 月 3 日; 最新改訂版 平成 23 年 3 月 1 日)。平成 20 年 12 月 1 日改正の 3 省による「ヒトゲノム・遺伝子解

析研究に関する倫理指針」に従い研究を行った。

組み換え DNA 実験と動物実験は名古屋大学・長崎川棚医療センターの承認を得ている。動物実験は、カルタヘナ法、ならびに、名古屋大学・長崎川棚医療センターの動物実験指針を遵守して研究を行った。

## C. 研究結果

### (i) *COLQ* 遺伝子変異

ColQ をコードする *COLQ* 遺伝子変異を CMS 3 症例において同定した。**症例 1** は C444Y と R452C の compound heterozygote であった。**症例 2** は D447H の homozygote であった。**症例 3** は R227X と V322D の compound heterozygote であった。C444Y は研究代表者が米国 Mayo Clinic にて研究を行っている時に京都大学附属病院より紹介を受けて同定をした本邦初の CMS 関連遺伝子変異である(*Ann Neurol* 2000)。他の 4 種類の遺伝子変異は既報告にない変異であり、5 種類の *COLQ* 変異はすべて本邦特有の変異である。これら 3 症例に対して ephedrine を開始し、いずれも効果を認めている。COS 細胞への発現解析にて、**症例 3** の R227X と V322D は collagen triple helix の形成を阻害することを密度勾配超遠心分析により確認した。一方、C444Y, R452C, D447H 変異は collagen triple helix の形成を阻害しなかった。これら 3 つミスセンス変異を *COLQ* に導入し、ヒトアセチルコリンエステラーゼ(*ACHE*)遺伝子とともに COS 細胞に発現をさせ、生成された AChE-ColQ 複合体をヘパリンカラムで精製を行った。精製 AChE-ColQ 複合体を *Colq* ノックアウトマウス筋切片と incubation を行ったところ、いずれの変異 ColQ も神経筋接合部に係留されず C444Y, R452C, D447H は

ColQ の神経筋接合部への係留を阻害する変異であることが明らかになった。C444Y, R452C, D447H 変異が位置する ColQ C 末端ドメインは MuSK との結合が知られているため、精製 myc-MuSK と AChE-ColQ 複合体の結合を *in vitro* plate binding assay により定量し、変異 ColQ の MuSK への結合の阻害を実証した。さらに AAV8-*COLQ*-C444Y を作成し ColQ ノックアウトマウスに投与したところ wild-type AAV8-*COLQ* 静注と異なりマウスの運動能力の改善を認めず神経筋接合部における AChE-ColQ 複合体の係留も認めなかった。

### (ii) *CHRNA1* 遺伝子変異

AChR  $\beta$  サブユニットをコードする *CHRNA1* 遺伝子変異の heterozygous mutation M443T を **症例 4** に同定をした。無症状の父親も M443T heterozygote であり M443T は recessive mutation と想定される。しかし **症例 4** のもう一方の allele 上に遺伝子変異を同定できておらず large-scale DNA rearrangement の可能性を考えて SOLiD5500 により mate-pair sequencing を行ない *CHRNA1* 領域の large-scale indel を詳細に検討したが変異を同定できなかった。

*CHRNA1*-M443T を *CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNA1* とともに HEK293 細胞に導入し変異 AChR を細胞表面に発現をさせ  $\alpha$ -bungarotoxin 染色を行ったところ M443T-AChR は細胞表面に高発現しており、EGFP を共発現させた HEK293 細胞の FACS による解析でも M443T-AChR は正常 AChR と同程度の発現が認められた。HEK293 細胞に発現をさせた  $\beta$ M443T-AChR の single channel 解析を行ったところ  $\beta$ M443T-AChR は正常 AChR に比して channel opening time が異常に短縮をしており fast channel

mutation であることが確認をされた。

### (iii) *CHRND* 遺伝子変異

AChR  $\delta$ サブユニットをコードする *CHRND* の heterozygous mutation c.1309-1G>A を **症例 5** に同定した。無症状の父親も *CHRND* c.1309-1G>A heterozygote であり c.1309-1G>A は recessive mutation と推定される。しかし **症例 5** のもう一方の allele 上に遺伝子変異を同定できておらず **症例 4** と同様に promoter mutation, deep intronic mutation, large-scale deletion の可能性が考えられた。Large-scale DNA rearrangements を確認する目的で **症例 4** と同様に SOLiD 5500 により mate-pair sequencing を行ない *CHRND* 領域の large-scale indel を詳細に検討したが変異を同定できなかった。

### (iv) *CHRNE* 遺伝子変異

AChR  $\epsilon$ サブユニットをコードする *CHRNE* 遺伝子変異を CMS 4 症例において同定をした。**症例 6** は C591del11 homozygote であり、AChR  $\epsilon$ サブユニットは全く発現をしないことが予測をされる。AChR  $\epsilon$ サブユニットの null mutation は CMS の原因として最も頻度が高い。胎児型の AChR  $\gamma$ サブユニットが、欠損をした AChR  $\epsilon$ サブユニットの代償をすることが可能なために患者は生存が可能になることを研究代表者は以前に報告しており、**症例 6** においても胎児型  $\gamma$ -AChR が神経筋接合部に発現をしていると想定をされた。なお両親はいずれも *CHRNE* C511del11 の heterozygote であった。**症例 7** は Y242X heterozygote であり、この allele 由来の AChR  $\epsilon$ サブユニットは全く発現をしないことが予測をされた。この症例のもう一方の allele には D138D の synonymous mutation が同定された。D138D は exonic splicing enhancer を破壊する遺伝子変異である可能性を考えて変

異 minigene を HeLa 細胞に導入を行い splicing 解析を行ったが D138D は splicing に影響を与えなかった。さらに D138D は病的遺伝子変異ではない可能性も考えて **症例 4, 5** と同様に mate pair sequencing により *CHRNE* 領域の large-scale DNA rearrangements を確認したが変異を同定できなかった。**症例 8** は L284R homozygote であった。無症状の両親はいずれも L284R heterozygote であることを確認した。*CHRNE*-L284R を *CHRNA1*, *CHRNB1*, *CHRND* とともに HEK293 細胞に導入し AChR を発現させ  $\alpha$ -bungarotoxin により AChR の染色を行ったところ L284R-AChR は細胞表面に発現しておらず、EGFP を共発現させた HEK293 細胞の FACS による解析でも L284R-AChR の発現を認めなかった。**症例 9** は T264P heterozygote であった。T264P は研究代表者が世界で初めて同定を行い single channel 解析により slow channel syndrome の原因であることを同定した遺伝子変異である (*PNAS* 1995)。本邦の CMS 症例の解析にて同定をした遺伝子変異のうち T264P のみが Caucasian と共通の遺伝子変異である。この症例に対して fluoxetine (SSRI 抗うつ薬)の投与を開始し効果を認めている。

### (v) *DOK7* 遺伝子変異

*DOK7* 遺伝子における G64R, c.653-1G>C compound heterozygote 遺伝子変異を **症例 10** に同定をした。父親 c653-1C>G heterozygote、母親は G64R の heterozygote であり、**症例 10** が compound heterozygote であることを確認した。また、**症例 11** において *DOK7* 遺伝子の K207X, 952-953insA compound heterozygous 変異を同定した。

### (vi) *GFPT1* 遺伝子変異

さらに SOLiD 次世代シーケンサ解析を

症例 12 から症例 16 の 5 症例に対して行った。症例 12 において 2011 年にイギリスで新たに同定をされた新規 CMS 関連遺伝子 *GFPT1* に homozygous E84D 変異を同定した。*GFPT1* 遺伝子は glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1 (*GFPT1*) をコードしており、糖鎖修飾に重要な UDP-GlcNac 合成の律速段階酵素である。*GFPT1* の機能を薬剤により抑制することにより C2C12 筋芽細胞の筋管細胞への分化が抑制されることを明らかにした。さらに筋管細胞に分化をさせた C2C12 に lentivirus を用いて shRNA により *GFPT1* のノックダウンを行ったところ AChR の集積が抑制をされた。文部科学省「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」事業と共同をしてマウス由来 iPS を用いて *in vitro* NMJ を作成することに成功した。また、マウスプライマリー前角細胞と C2C12 筋管による *in vitro* NMJ の作成にも成功した。これらの *in vitro* NMJ 系は今後の神経筋接合部病態解析に重要なツールになることが期待をされる。

#### (vii) 新規分子 X 遺伝子変異

症例 16 において神経筋接合部の新規分子に compound heterozygous missense mutations を認めた。C2C12 筋芽細胞ならびに筋管細胞を用いて、この変異のシグナル伝達機構に対する影響を明らかにした。CMS 変異を有するドメインの別の missense mutations が全く別の骨代謝の表現系を取ることが知られている。homology modeling によりこのドメインの 3 次元構造予測をしたところ部位特異的に CMS と骨代謝の 2 種類の表現型を取ることが示唆をされた。さらに 4 種類の人工的な missense mutations をこのドメインに導入し、部位特異的な表現型の差を確認した。

#### (viii) *CHRNA1* exon P3A のスプライシング

#### 病態解析

米国の症例において AChR alpha subunit 遺伝子 *CHRNA1* の pseudoexon P3A に変異を認め、その機能解析を行い、変異は RNA 結合タンパク hnRNP L の結合を減弱し RNA 結合タンパク hnRNP LL の結合を誘導していることを明らかにした。hnRNP L の proline-rich region (PRR) は、以前に我々が報告をした別の RNA 結合タンパク PTB (Bian et al. *Hum Mol Genet* 2009, 18: 1229-1237) と結合することにより U2AF65 と U1 snRNP の pseudoexon P3A への結合を阻害することを明らかにした。hnRNP LL は PRR を有さず PTB に結合をできないためにスプライシング抑制効果がないことを明らかにした。さらに、hnRNP LL に PRR を導入することにより PTB との結合能を獲得しスプライシング抑制効果を導入できることを明らかにした。

#### D. 考察

本研究事業の先行事業を含む 3 年間に 16 症例の CMS の遺伝子変異検索を行い *COLQ* 遺伝子変異 3 例、*CHRNA1* 変異 1 例、*CHRND* 変異 1 例、*CHRNE* 変異 4 例、*DOK7* 変異 2 例、*GFPT1* 変異 1 例に加えて、1 例において新規 CMS 原因遺伝子を同定し、その機能解析を行った。

#### E. 結論

本研究事業により本邦における 16 症例の CMS の発掘を行うことができた。一般に遺伝子変異解析は臨床サービスであり研究として成立が困難である。しかし本研究事業を開始することによりまだ 16 症例のみであるが本邦にも CMS 症例が存在すること、しかも、一例を除く全例が本邦独自の遺伝子変異によるものであることが判明した。さらに CMS

症例の同定を行うとともに今回同定をした遺伝子変異の病態分子機構の解明を続ける。特に SOLiD 次世代シーケンサ解析により同定をした新規変異遺伝子は本邦から世界に向けて新しい CMS 病態を提唱できる可能性があり今後とも分子病態研究を続けていきたい。

## F. 健康危険情報

研究代表者の研究室においても、研究分担者の施設においても、特記事項はなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### (Original Article)

1. Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K. Mutations in the c-terminal domain of colq in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise colq-musk interaction. *Hum Mutat* 2013, in press.
2. Tanisawa K, Mikami E, Fuku N, Honda Y, Honda S, Ohsawa I, Ito M, Endo S, Ihara K, Ohno K, Kishimoto Y, Ishigami A, Maruyama N, Sawabe M, Iseki H, Okazaki Y, Hasegawa-Ishii S, Takei S, Shimada A, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Takeda T, Higuchi M, Tanaka M. Exome sequencing of senescence-accelerated mice (sam) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. *BMC Genomics* 2013, 14: 248.
3. Iio A, Ito M, Itoh T, Terazawa R, Fujita Y, Nozawa Y, Ohsawa I, Ohno K, Ito M. Molecular hydrogen attenuates fatty acid uptake and lipid accumulation through downregulating cd36 expression in hepg2 cells. *Med Gas Res* 2013, 3: 6.
4. Yamamoto R, Matsushita M, Kitoh H, Masuda A, Ito M, Katagiri T, Kawai T, Ishiguro N, Ohno K. Clinically applicable antianginal agents suppress osteoblastic transformation of myogenic cells and heterotopic ossifications in mice. *J Bone Miner Metab* 2013, 31: 26-33.
5. Sayeed S, Asano E, Ito S, Ohno K, Hamaguchi M, Senga T. S100a10 is required for the organization of actin stress fibers and promotion of cell spreading. *Mol Cel Biochem* 2013, 374: 105-111.
6. Yoshinaga H, Sakoda S, Good J M, Takahashi M P, 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.
7. Ito M, Hirayama M, Yamai K, Goto S, Ichihara M, Ohno K. Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas exposure, prevent 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Med Gas Res* 2012, 2:15.
8. Kurosaki T, Ueda S, Ishida T, Abe K,

- Ohno K, Matsuura T. The unstable CCTG repeat responsible for myotonic dystrophy type 2 originates from an *AluSx* element insertion into an early primate genome. *PLoS ONE* 2012, 7: e38379.
9. Ishigaki S, Masuda A, Fujioka Y, Iguchi Y, Katsuno M, Shibata A, Urano F, Sobue G, Ohno K. Position-dependent fus-rna interactions regulate alternative splicing events and transcriptions. *Sci Rep* 2012, 2: 529.
  10. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Krejci E, Engel AG. Specific binding of collagen q to the neuromuscular junction is exploited to cure congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis. *Chem Biol Interact*. Elsevier, Amsterdam, 2012, 203: pp 335-340. (査読有)
  11. Matsuura T, Minami N, Arahata H, Ohno K, Abe K, Hayashi YK, Nishino I. Myotonic dystrophy type 2 (DM2) is rare in the Japanese population. *J Hum Genet* 2012, 57:219-220.
  12. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K. Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Mol Ther* 2012, 20: 1384-1392.
  13. Yamashita Y\*, Matsuura T\*, Shinmi J, Amakusa Y, Masuda A, Ito M, Kinoshita M, Furuya H, Abe K, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. Four parameters increase the sensitivity and specificity of the exon array analysis and disclose twenty-five novel aberrantly spliced exons in myotonic dystrophy. *J Hum Genet* 2012, 57: 368-374. \*Equal contribution.
  14. 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. *Sci Rep* 2012, 2: 209.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.

19. 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. *Med Gas Res* 2011, 1:24.
20. ○ 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.
21. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Nishida H, Mabuchi N, Engel A G, Ohno K. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 2011, 77:1819-1826.
3. 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. (Review article with peer review)
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, 2012, pp175-200. (Review article with peer review)
5. 大野欽司「RNA 異常と神経疾患」Annual Review 神経 2012 :97-103, 2012.
6. 大野欽司「先天性筋無力症候群」Clinical Neuroscience 30 (6): 685-687, 2012.
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)

#### (Book Chapters)

1. Ohe K, Masuda A, Ohno K. Intronic and exonic nucleotide variations that affect rna splicing in humans. Introduction to sequence and genome analysis. *Introduction to Sequence and Genome Analysis*. iConcept Press, Hong Kong, 2012, in press.
2. ○Ohno K, Ito M, Ichihara M, and Ito M. Molecular Hydrogen as an Emerging Therapeutic Medical Gas for Neurodegenerative and Other Diseases. *Oxid Med Cell Longev* vol.2012. Hindawi Publishing Corporation, Cairo, 2012, Article ID 353152, 11 pages (Review article with peer review)
8. Ohta S, Nakao A, and Ohno K.: The 2011 Medical Molecular Hydrogen Symposium: An Inaugural Symposium of the Journal Medical Gas Research. *Med Gas Res* 2011, 1:10. (Review article with peer review)
9. 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 with peer review)

## 2. 学会発表

### (Poster Presentation)

1. Masuda A, Ito M, Fujita Y, Ohno K  
Genome-wide analysis of RNA-binding sites of HuR  
16th Annual Meeting of the RNA Society (Poster), Kyoto, Japan  
Jun 14-18, 2011
2. 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 (Poster), Montreal, Canada  
Oct 11-15, 2011
3. 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 (Poster), Washington DC, USA  
Nov 15, 2011
4. 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  
The 11th International Meeting on Cholinesterases (Poster), Kazan, Russia  
Jun 4-9, 2012
5. Kinoshita M, Kokunai Y, Kubota T, Takahashi M, Sasaki R, Ohno K, Hirose K  
EMG findings at non-myotonia and myotonia states in patients with Na channelopathies  
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan  
Jun 7-8, 2012
6. Kinoshita M, Morita S, Ohno K, Hirose K  
In myotonic dystrophy type 1 Peroxiredoxin-2 of RBC membrane protein was reduced, compared with a normal subject  
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan  
Jun 7-8, 2012
7. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito I, Andresen BS, Ohno K  
Global analysis of RNA-binding sites of CUGBP1 and MBNL1 reveal their preferential binding to 3' UTRs to regulate mRNA stability  
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan  
Jun 7-8, 2012
8. Ohkawara B, Fuse Y, Nakashima H, Ohno K  
Functional characterization of GFPT1 during myogenesis and NMJ formation  
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan

- Jun 7-8, 2012
9. Rahman MA, Ohe K, Masuda A, Ito M, Hutchinson DO, Engel AG, Ohno K  
Mutation in congenital myasthenic syndrome reveals opposite splicing regulatory effects of hnRNPs L and LL  
35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Poster), Nagoya, Japan  
Sep 18-21, 2012
  10. Masuda A, Ishigaki S, Fujioka Y, Iguchi Y, Katsuno M, Shibata A, Urano F, Sobue G, Ohno K  
Global mapping of FUS-binding sites and global profiling of FUS-mediated RNA metabolisms in the mouse brain  
62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Francisco, USA  
Nov 6, 2012
  11. Shibata A, Masuda A, Ohno K  
A comprehensive and efficient algorithm to predict splicing consequences of intronic nucleotide substitutions in the human genome  
62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Francisco, USA  
Nov 6, 2012
  12. Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Ohkuwa T, Ichihara M  
Molecular hydrogen alters signaling pathways and gene expression profiles in multiple mouse organs  
52nd Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (Poster), San Francisco, USA
- Dec 15, 2012
13. Nasrin F, Rahman MA, Ohe K, Masuda A, Ohno K  
Alternative RNA splicing regulating the molecular architecture of NMJ  
5th NAGOYA Global Retreat (Poster), Nagoya, Japan  
Feb 2, 2013
  14. Selcen D, Shen X-M, Milone M, Brengman J, Ohno K, McQuillen M, Deymeer F, Finkel R, Rowin J, Engel AG  
Investigation of 11 Patients with GFPT1-Myasthenia Reveals Clinical, Structural, and Electrophysiologic Heterogeneity  
65th American Academy of Neurology, San Diego, USA  
Mar 21, 2013
  15. Ito M, Itoh T, Ohno K, Nozawa Y  
Molecular mechanism of the inhibitory effect of hydrogen on inflammation  
90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Platform), Tokyo, Japan  
Mar 28, 2013
- (Invited Presentation)**
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. Ohno K  
Global mapping and global expression

- profiling of RNA-binding proteins that are associated with neurological and neuromuscular diseases  
35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan  
May 9, 2011
3. Ohno K  
Specific binding of collagen Q to the neuromuscular junction is exploited to cure congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis  
11th International Meeting on Cholinesterases, Kazan, Russia  
Jun 4-9, 2012
4. Ohno K  
Congenital defects of neuromuscular signal transduction  
3rd Berlin Summer School for Myology, Berlin, Germany  
Jun 18-22, 2012
5. Ohno K  
Molecular bases and therapeutic intervention of neuromuscular transmission defects  
Ninth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Tokyo, Japan  
Sep 7, 2012

6. Ohno K  
Global mapping and global expression profiling of RNA-binding proteins that are associated with neurological and neuromuscular diseases  
35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan  
Sep 18-21, 2012

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 出願年月日：2011年8月26日  
発明等の名称：骨形成促進剤及びその用途  
特願 2011-185306 号  
発明者：大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、三島健一  
出願人：国立大学法人名古屋大学  
特許事務所番号：NU11005
2. 出願年月日：2013年3月10日  
発明等の名称：骨系統疾患治療薬及びその用途  
特願 2013-047426 号  
発明者：大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、松下雅樹  
出願人：国立大学法人名古屋大学  
特許事務所番号：NU11005

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## II. 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	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ohno K, Masuda A.	RNA pathologies in neurological disorders	Blass JP	<i>Neurochemical Mechanisms in Disease (Advances in Neurobiology 1)</i>	Springer	New York	2011	1: pp399-415
Ohno K, Engel AG.	Molecular defects of acetylcholine receptor subunits in congenital myasthenic syndromes		<i>Pharmacology of Nicotinic Acetylcholine Receptors from the Basic and Therapeutic Perspectives</i>	Research Signpost	Kerala	2011	pp175-186
大野 欽司	神経筋接合部における遺伝子異常と疾患		脳と神経			2011	63(7): 669-678
大野 欽司	スプライシングシス因子の破断変異によるスプライシング異常		医学のあゆみ			2011	238(5) 485-490
Engel AG, Shen X-M, Ohno K, Sine SM.	Congenital myasthenic syndromes	Engel AG	<i>Myasthenia gravis and myasthenic disorders 2nd ed</i>	Oxford University Press	New York	2012	173-230
Ohno K, Ito M, and Engel AG.	Congenital Myasthenic Syndromes – Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction–		<i>Myopathy</i>	InTech	Rijeka	2012	175-200 (査読有)
Ohno K, Ito M, Ichihara M, and Ito M.	Molecular Hydrogen as an Emerging Therapeutic Medical Gas for Neurodegenerative and Other Diseases	Pereira MD	<i>Oxid Med Cell Longev</i>	Hindawi Publishing Corp.	New York	2012	vol.2012 ID 353152, 11 pages (査読有)
Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Krejci E, Engel AG.	Specific binding of collagen q to the neuromuscular junction is exploited to cure congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis	<i>Chem Biol Interact</i>	<i>Elsevier</i>	Amsterdam	2012	2012	203: pp 335-340 (査読有)

大野欽司	RNA 異常と神経疾患		<i>Annual Review 神経2012</i>			2012	97-103
大野欽司	先天性筋無力症候群		<i>Clinical Neuroscience</i>			2012	30 (6): 685-687
本村政勝、向野晃弘、福留隆泰	重症筋無力症	(株) 技術情報協会	希少疾患/難病の診断・治療と製品開発	(株) 技術情報協会	東京	2012	960-972
Ohe K, Masuda A, Ohno K.	Intronic and exonic nucleotide variations that affect rna splicing in humans		<i>Introduction to Sequence and Genome Analysis</i>	iConcept Press	Hong Kong	2012	in press

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
Selcen D, Juel VC, Hobson-Webb LD, Smith EC, Stickler DE, Bite AV, <u>Ohno K</u> , Engel AG.	Myasthenic Syndrome Caused by Plectinopathy	<i>Neurology</i>	76	327-336	2011
Fu Y, Masuda A, Ito M, Shinmi J, <u>Ohno K</u> .	AG-dependent 3'-splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon	<i>Nucleic Acids Research</i>	39	4396-4404	2011
Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Nishida H, Mabuchi N, Engel AG, <u>Ohno K</u> .	Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK	<i>Neurology</i>	77	1819-1826	2011
Hirayama M, Nakamura T, Watanabe H, Uchida K, Hama T, Hara T, Niimi Y, Ito M, <u>Ohno K</u> , Sobue G.	Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine correlate with hallucinations rather than motor symptoms in Parkinson's disease	<i>Parkinsonism Relat Disord</i>	17	46-49	2011
Itoh T, Hamada N, Terazawa R, Ito M, <u>Ohno K</u> , Ichihara M, Nozawa Y, Ito M.	Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon gamma-induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	411	143-149	2011
Ito M*, Ibi T*, Sahashi K, Ichihara M, Ito M, <u>Ohno K</u> . *Equal contribution	Open-label trial and randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of hydrogen-enriched water for mitochondrial and inflammatory myopathies	<i>Medical Gas Research</i>	1	24	2011
Kaneko H, Kitoh H, Matsuura T, Masuda A, Ito M, Mottes M, Rauch F, Ishiguro N, <u>Ohno K</u> .	Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in <i>GPATCH8</i>	<i>Human Genetics</i>	130	671-683	2011
Okumura A, Yamamoto T, Shimojima K, Honda Y, Abe S, Ikeno M, Shimizu T.	Refractory neonatal epilepsy with a de novo duplication of chromosome 2q24.2q24.3	<i>Epilepsia</i>	52 (7)	e66-e69	2011
Yamashita S, Okumura A, Yamamoto T, Shimojima K, Tanabe T, Shimizu T.	SCN1B is not related to benign partial epilepsy in infancy or convulsions with gastroenteritis	<i>Neuropediatrics</i>	42 (4)	135-137	2011

Liang JS, Shimojima K, Takayama R, Natsume J, Shichiji M, Hirasawa K, Imai K, Okanishi T, Mizuno S, Okumura A, Sugawara M, Ito T, Ikeda H, Takahashi Y, Oguni H, Imai K, Osawa M, Yamamoto T.	CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders	<i>Epilepsia</i>	52 (10)	1835-1842	2011
Okumura A, Komatsu M, Abe S, Kitamura T, Matsui K, Ikeno M, Shimizu T.	Amplitude-integrated electroencephalography in patients with acute encephalopathy with refractory, repetitive partial seizures	<i>Brain Dev</i>	33 (1)	77-82	2011
Okumura A, Morita M, Ikeno M, Abe S, Shimizu T.	Acute encephalopathy in a child with secondary carnitine deficiency due to pivalate-conjugated antibiotics	<i>Pediatr Infect Dis J</i>	30 (1)	92	2011
Okumura A, Kitamura Y, Abe S, Ikeno M, Shimizu T.	Transiently restricted diffusion in the corpus callosum in bacterial meningitis	<i>J Pediatr Infect Dis</i>	6 (4)	51-53	2011
Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T.	Deaths associated with pandemic (H1N1) 2009 among children, Japan, 2009-2010	<i>Emerg Infect Dis</i>	17 (11)	1993-2000	2011
Kubota T, Suzuki T, Kitase Y, Kidokoro H, Miyajima Y, Ogawa A, Natsume J, Okumura A.	Chronological diffusion-weighted imaging changes and mutism in the course of rotavirus-associated acute cerebellitis/cerebellopathy concurrent with encephalitis/encephalopathy	<i>Brain Dev</i>	33 (1)	21-27	2011
Abe S, Okumura A, Hamano S, Tanaka M, Shiihara T, Aizaki K, Tsuru T, Toribe Y, Arai H, Shimizu T.	Early infantile manifestations of incontinentia pigmenti mimicking acute encephalopathy	<i>Brain Dev</i>	33 (1)	28-34	2011
Ikeno M, Okumura A, Ito Y, Abe S, Saito M, Shimizu T.	Late-onset sensorineural hearing loss due to asymptomatic congenital cytomegalovirus infection retrospectively diagnosed by polymerase chain reaction using preserved umbilical cord	<i>Clin Pediatr</i>	50 (7)	666-668	2011