

先天性筋無力症候群

研究分担者：大野欽司¹⁾

1) 名古屋大学医学系研究科神経遺伝情報学

研究要旨

平成 25 年度までに作成した診断基準の検証・改定を行い、先天性筋無力症候群の指定難病への登録に向けて、臨床調査個人票案（新規・継続）を作成するとともに、難病指定医向けテキストを作成し、難病情報センターウェブページの原稿を作成した。本邦の先天性筋無力症候群を発掘するためにエキソームシーケンス・全ゲノムシーケンス・サンガーシーケンス解析を行い、平成 26 年度に新たに 3 症例の診断を行った。

A：研究目的

本研究の目的は、本邦における先天性筋無力症候群のさらなる発掘と、先天性筋無力症候群の指定難病登録へ向けて診断基準の策定・臨床調査個人票の作成・難病指定医向けテキストの作成を行うことにより、今後の病態研究への基盤整備を行うことである。また、診断精度の向上を目的とした遺伝子診断の診断体制の整備も、次世代シーケンサーを用いたスクリーニングを含めて行っていく。

B：研究方法

過去の自らの分子病態研究成果と文献検索結果の解析により臨床調査個人票案（新規・継続）を作成した。同様に、難病指定医向けテキスト・難病情報センターウェブページ原稿を作成した。

本邦の先天性筋無力症候群の新規発掘のために、候補遺伝子が類推可能な場合には、候

補遺伝子の Sanger sequencing 解析を行った。候補遺伝子が不明の場合には、Otogenetics 社によりに依頼し、Agilent 社 Sure Select V5 により exome capture を行い Illumina HiSeq 2500 により x50 coverage で exome capture resequencing 解析を行った。また、2015 年 9 月以降は、Macrogen 社に依頼し、Illumina HiSeq X により x30 coverage で whole genome resequencing 解析を必要に応じて行った。

次世代シーケンサデータは exome capture resequencing も whole genome resequencing も同一パイプラインにより解析を行った。FastX-toolkit と FastQC により quality check を行い、BWA と BLAT により mapping を行い、Samtools により post-processing を行った。Samtools と VarScan により variant call を行い、VarScan により filtering を行った。AnnoVar と独自ブ

ログラムにより annotation をつけ、CMS 既報告 21 遺伝子ならびに神経筋接合部に高発現の約 100 種類の遺伝子を候補遺伝子として解析を行った。dbSNP, NHLBI ESP, 1000 genome project, HGVD, NCI60, ExAC65000, HGMD, ClinVar, COSMIC に登録をされた SNP のうち minor allelic frequency が高いものを候補原因遺伝子から除外した。

(倫理面への配慮)

本研究による遺伝子診断は名古屋大学医学系研究科生命倫理委員会ならびに遺伝子解析依頼各施設の生命倫理委員会の承認を受けた後に、患者への説明と文書による同意に基づいて行った。

C : 研究結果

先天性筋無力症候群の指定難病への登録に向けて、臨床調査個人票案(新規・継続)を作成するとともに、難病指定医向けテキストを作成し、難病情報センターウェブページの原稿を作成した。

本邦の先天性筋無力症候群性 7 例の次世代シーケンサ解析を行い、現在までに 3 例において原因遺伝子変異を同定した。2 例は COLQ 遺伝子変異による終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症であり、1 例は CHRNE 遺伝子変異によるスローチャンネル症候群であった。

D : 考察

同一施設から 6 例目の先天性筋無力症候群診断例が見出された。6 例はいずれも先天性筋無力症候群疑いでその施設に紹介をされた患者ではなく主治医が注意深い診察により臨床診断を行っている。本邦にはまだ未診断の先天性筋無力症候群例が数多くいることが示

唆される。

E : 結論

先天性筋無力症候群の指定難病への登録に向けた資料の作成を行った。3 例の先天性筋無力症候群確定診断を行った。

F : 健康危険情報

ありません。

G : 研究発表

1 : 論文発表

【Original Articles】

1. Inaguma Y, Hamada N, Tabata H, Iwamoto I, Mizuno M, Nishimura YV, Ito H, Morishita R, Suzuki M, Ohno K, Kumagai T, Nagata KI. SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *EMBO Mol Med* 2014, 6: 155 - 295.
2. Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, Ito M, Masuda A, Ito Y, Engel AG, Ohno K. LRP4 third beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014, 23: 1856-1868.
3. Nakayama T, Nakamura H, Oya Y, Kimura T, Imahuku I, Ohno K, Nishino I, Abe K, Matsuura T. Clinical and genetic analysis of the first known Asian family

- with myotonic dystrophy type 2. *J Hum Genet* 2014, 59: 129-133.
4. Kokunai Y*, Nakata T*, Furuta M*, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, Ohno K, Takahashi M. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 2014, 82: 1058-1064. *Equal contribution.
 5. Kobayashi M, Ohno T, Ihara K, Murai A, Kumazawa M, Hoshino H, Iwanaga K, Iwai H, Hamana Y, Ito M, Ohno K, Horio F. Searching for genomic region of high-fat diet-induced type 2 diabetes in mouse chromosome 2 by analysis of congenic strains. *PLoS ONE* 2014, 9: e96271.
 6. Yamashita Y*, Matsuura T*, Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita M, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity. *Neurobiol Dis* 2014, 69: 200-205. *Equal contribution.
 7. Nasrin F, Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. HnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform. *Sci Rep* 2014, 4: 6841.
 8. Azuma Y, Nakata T, Tanaka M, Shen XM, Ito M, Iwata S, Okuno T, Nomura Y, Ando N, Ishigaki K, Ohkawara B, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Sokabe M, Ohno K. Congenital myasthenic syndrome in Japan: Ethnically unique mutations in muscle nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Neuromuscular Disorders* 2015, 25: 60-69.
- 【 Chapters in Books 】**
1. Ohno K, Ohkawara B, Ito M, Engel AG. Molecular Genetics of Congenital Myasthenic Syndromes. *eLS*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2014, <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0024314]. (査読有)
- 【 Reviews 】**
1. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Ohtsuka K. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J Mol Neurosci* 2014, 53: 359-361. (査読有)
 2. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohno K. Decoding abnormal splicing code in human diseases. *J Invest Genomics* 2015, 2(1): 00016 (査読有)
- 2 : 学会発表**
- 【 Invited Presentations at Scientific Meetings 】**
1. Ohno K Maintenance of the neuromuscular junction and its aberrations in hereditary and autoimmune disorders. Guarda-Symposium 2014 on the

Molecular and Cell Biology of the Neuromuscular System, Guarda, Switzerland. Sep 1, 2014

【Presentations at Scientific Meetings】

1. Shibata A, Okuno T, Masuda A, Ohno K. P16.49-S - IntSplice: A tool to predict the effect on pre-mRNA splicing of intronic nucleotide substitutions. European Society of Human Genetics 2014 (Poster), Milan, Lombardy, Italy. May 31-June 3, 2014
2. Ohno K, Shibata A, Okuno T, Rahman MA, Azuma Y, Masuda A. IntSplice: A tool to predict aberrant splicing of an SNV at intronic positions -50 to -3. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Diego, California, USA. Oct 18-22, 2014
3. Bruun GH, Doktor TK, Brøner S, Masuda A, Palhais B, Krainer AR, Ohno K, Andresen BS. Global identification of binding sites for the splicing regulatory factors SRSF5 and hnRNPA1. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Diego, California, USA. Oct 18-22, 2014
4. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. Alternative splicing of human *MUSK* exon 10 is physiologically regulated by multiple splicing regulatory cis-elements and cognate trans-factors. RNA Biology Meeting, Cold Spring Harbor Asia Conference (Poster), Suzhou, China. Nov 10-14, 2014

5. Selcen D, Shen X-M, Ohkawara B, McEvoy K, Ohno K, Engel AG. Congenital myasthenic syndrome (CMS) caused by novel mutation in LRP4. Phenotypic heterogeneity and defects in neuromuscular transmission (NMT) identified in a second kinship. 67th Annual Meeting of the American Academy of Neurology (Poster), Washington DC, USA. Apr 18-25, 2015

H : 知的所有権の取得状況（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