

## 先天性筋無力症候群疾患登録システム樹立に向けて

研究分担者 大野 欽司<sup>1)</sup>

### 研究要旨

先天性筋無力症候群の疾患登録システム樹立に向けて研究代表者木村らと打ち合わせを行うとともに、英国における筋疾患登録拠点の TREAT-NMD の Professor Hanns Lochmuller (Chair of Experimental Myology, The John Walton Muscular Dystrophy Research Centre, MRC Centre for Neuromuscular Diseases, Institute of Genetic Medicine, Newcastle University, UK)と Professor Ulrike Schara (Paediatric Neurology, University of Essen, Germany)との打ち合わせを開始した。先天性筋無力症候群は世界で 1000 例以下、本邦において 20 例以下しか診断をされておらず orphan diseases の中でも稀な疾患のため国際共同登録システムの樹立が必須であることを確認した。

### A. 研究目的

先天性筋無力症候群の疾患登録システム樹立に向けた環境整備を行うことを目的とする。また、本邦における先天性筋無力症候群の診断精度の向上を目的とした次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断の診断体制の整備を行う。

### B. 研究方法

過去の自らの分子病態研究成果と関連文献の精読により先天性筋無力症候群の疾患登録システムの入力項目の検討を行い、木村研究代表、Prof. Hanns Lochmuller, Prof. Ulrike Schara と意見のすり合わせを行った。

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、MacroGen 社に依頼し、Illumina HiSeq X により x30 coverage で whole genome resequencing 解析を行った。

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 と独自プログラムにより 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疾患登録システムのための入力項目の素案を作成した。

本邦の先天性筋無力症候群疑い 9 例のコンサルテーションを受け、8 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。

### D. 考察

本邦の先天性筋無力症候群の 9 割を超える症例の解析を本報告者が行っており、筋ジストロフィーとは異なる

1) 名古屋大学 医学系研究科 神経遺伝情報学

疾患登録システムの樹立が必要と思われる。主治医の遺伝子解析依頼のための紹介状と疾患登録システムをリンクさせた取組、ならびに、2段階の疾患登録システムの導入の必要性を議論した。

## E. 結論

先天性筋無力症候群の疾患登録システムの樹立に向けたドラフト案の作成を行った。本邦における3例の新規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. 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. *Neuromuscul Disord* 2015, 25: 60-69.
2. Matsushita M, Hasegawa S, Kitoh H, Mori K, Ohkawara B, Yasoda A, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine promotes longitudinal skeletal growth in transgenic mice with achondroplasia carrying a gain-of-function mutation in the FGFR3 gene. *Endocrinology* 2015, 156: 548-554.
3. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. *CHCHD2* mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol* 2015, 14: 274-282.
4. Tsunoda M, Hirayama M, Tsuda T, Ohno K. Noninvasive monitoring of plasma l-dopa concentrations using sweat samples in Parkinson's disease. *Clin Chim Acta* 2015, 442: 52-55.
5. Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Iwamoto T, Qiao S, Ohkuwa T, Ichihara M. Simultaneous oral and inhalational intake of molecular hydrogen additively suppresses signaling pathways in rodents. *Mol Cell Biochem* 2015, 403: 231-241.
6. Masuda A, Takeda J, Okuno T, Okamoto T, Ohkawara B, Ito M, Ishigaki S, Sobue G, Ohno K. Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length. *Genes Dev* 2015, 29: 1045-1057.
7. Selcen D, Ohkawara B, Shen XM, McEvoy K, Ohno K, Engel AG. Impaired Synaptic Development, Maintenance, and Neuromuscular Transmission in LRP4-Related Myasthenia. *JAMA Neurol* 2015, 72: 889-896.
8. Udagawa T, Fujioka Y, Tanaka M, Honda D, Yokoi S, Riku Y, Ibi D, Nagai T, Yamada K, Watanabe H, Katsuno M, Inada T, Ohno K, Sokabe M, Okado H, Ishigaki S, Sobue G. FUS regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nat Commun* 2015, 6: 7098.
9. Fujii H, Matsubara K, Sakai K, Ito M, Ohno K, Ueda M, Yamamoto A. Dopaminergic differentiation of stem cells from human deciduous teeth and their therapeutic benefits for Parkinsonian rats. *Brain Res* 2015, 1613: 59-72.
10. Iwata S, Ito M, Nakata T, Noguchi Y, Okuno T, Ohkawara B, Masuda A, Goto T, Adachi M, Osaka H, Nonaka R, Arikawa-Hirasawa E, Ohno K. A missense mutation in domain III in HSPG2 in Schwartz-Jampel syndrome compromises secretion of perlecan into the extracellular space. *Neuromuscul Disord* 2015, 25: 667-671.
11. Rahman MA, Azuma Y, Nasrin F, Takeda J, Nazim M, Ahsan KB, Masuda A, Engel AG, Ohno K. SRSF1 and hnRNP H antagonistically regulate splicing of COLQ exon 16 in a congenital myasthenic syndrome. *Sci Rep* 2015, 5: 13208.
12. Kishimoto Y, Kato T, Ito M, Azuma Y, Fukasawa Y, Ohno K, Kojima S. Hydrogen ameliorates pulmonary hypertension in rats by anti-inflammatory and antioxidant effects. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015, 150: 645-654 e643.
13. Otsuka K, Ito M, Ohkawara B, Masuda A, Kawakami Y, Sahashi K, Nishida H, Mabuchi N, Takano A, Engel AG, Ohno K. Collagen Q and anti-MuSK

- autoantibody competitively suppress agrin/LRP4/MuSK signaling. *Sci Rep* 2015, 5: 13928.
14. Yagi H, Ohkawara B, Nakashima H, Ito K, Tsushima M, Ishii H, Noto K, Ohta K, Masuda M, Imagama S, Ishiguro N, Ohno K. Zonisamide enhances neurite elongation of primary motor neurons and facilitates peripheral nerve regeneration in vitro and in a mouse model. *PLoS One* 2015, 10: e0142786.
  15. Hasegawa S, Goto S, Tsuji H, Okuno T, Asahara T, Nomoto K, Shibata A, Fujisawa Y, Okamoto A, Ohno K, Hirayama M. Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease. *PLoS One* 2015, 10: e0142164.
  16. Imai K, Kotani T, Tsuda H, Mano Y, Nakano T, Ushida T, Hirako S, Li H, Miki R, Sumigama S, Iwase A, Hirakawa A, Ohno K, Toyokuni S, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A, Kikkawa F. Neuroprotective potential of molecular hydrogen against perinatal brain injury via suppression of activated microglia. *Free Radical Biol Med*, 2016, 91: 154-163.
  17. Mishima K, Kitoh H, Ohkawara B, Okuno T, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Lansoprazole upregulates polyubiquitination of TRAF6 and facilitates Runx2-mediated osteoblastogenesis. *EBioMedicine*, in press.
  18. Hasegawa S, Ito M, Fukami M, Hashimoto M, Hirayama M, Ohno K. Molecular hydrogen alleviates motor deficits and muscle degeneration in mdx mice. *Redox Report*, in press.
  19. Hasegawa S, Kitoh H, Ohkawara B, Mishima K, Matsushita M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Tranilast stimulates endochondral ossification by upregulating SOX9 and RUNX2 promoters. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470: 356-361.
  20. Muramatsu Y, Ito M, Oshima T, Kojima S, Ohno K. Hydrogen-rich water ameliorates bronchopulmonary dysplasia (BPD) in newborn rats. *Pediatr Pulmonol*, in press.
  21. Gao K, Wang J, Li I, Zhai Y, Ren Y, You H, Wang B, Wu X, Li J, Liu Z, Li X, Huang Y, Luo X, Hu D, Ohno K, Wang C. Polymorphisms in four genes (KCNQ1 rs151290, KLF14 rs972283, GCKR rs780094 and MTNR1B rs10830963) and their correlation with type 2 diabetes mellitus in Han Chinese in Henan Province, China. *Int J Environ Res Public Health*, in press.
  22. Shibata A, Okuno T, Rahman MA, Azuma Y, Takeda J, Masuda A, Ohno K. IntSplice: Prediction of the splicing consequences of intronic single nucleotide variations in the human genome. *J Hum Genet*, in press.
- 【Chapters in Books】**
1. Ito M, Ohno K. A hereditary mutation in Schwartz-Jampel syndrome. *Atlas of Science*. AoS Nordic AB, Stockholm, 2015, <http://atlasofscience.org/a-hereditary-mutation-in-schwartz-jampel-syndrome/> (査読有)
  2. Masuda A, Ohno K. Neurodegeneration-associated RNA-binding protein, FUS, regulates mRNA length. *Atlas of Science*. AoS Nordic AB, Stockholm, 2016, <http://atlasofscience.org/neurodegeneration-associated-rna-binding-protein-fus-regulates-mrna-length/> (査読有)
- 【Reviews】**
1. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohno K. Decoding abnormal splicing code in human diseases. *J Investig Genomics* 2015, 2: 00016. (査読有)
  2. Ichihara M, Sobue S, Ito M, Ito M, Hirayama M, Ohno K. Beneficial biological effects and the underlying mechanisms of molecular hydrogen - Comprehensive review of 321 original articles -. *Med Gas Res* 2015, 5: 12. (査読有)
  3. Rahman MA, Ohno K. Splicing aberrations in congenital myasthenic syndromes. *J Investig Genomics*, 2015, 2: 00038. (査読有)
  4. Masuda A, Takeda J, Ohno K. FUS-mediated regulation of alternative RNA processing in neurons: insights from global transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, in press (査読有)
- 【Chapters in Books in Japanese】**
1. 大野 欽司「終板アセチルコリン受容体欠損症(アセチルコリン受容体サブユニット変異)」pp402-408 日本臨牀社、大阪、2015
  2. 大野 欽司「スローチャンネル症候群、ファーストチャンネル症候群(アセチルコリン受容体サブユニット変異)」骨格筋症候群(第2版)下 (別冊日本臨牀 新領域

- 別症候群シリーズ No. 33)pp409-417 日本臨牀社、大阪、2015
3. 大野欽司「終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症 (コラーゲン Q 変異)」骨格筋症候群(第2版)下 (別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 33)pp 418-424 日本臨牀社、大阪、2015
  4. 大野欽司「発作性無呼吸を伴う先天性筋無力症候群 (コリンアセチルトランスフェラーゼ・骨格筋ナトリウムチャンネル変異)」骨格筋症候群(第2版)下 (別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 33)pp425-430 日本臨牀社、大阪、2015
  5. 大野欽司「神経筋接合部シグナル分子欠損による先天性筋無力症候群(アグリン, LRP4, MuSK, Dok-7 変異)」骨格筋症候群(第2版)下 (別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 33)pp431-435 日本臨牀社、大阪、2015.
  6. 大野欽司「構造タンパク欠損と糖化酵素欠損による先天性筋無力症候群(ラプシン、プレクチン、 $\beta$ 2 ラミニン、GFPT1, DPAGT1, ALG2, ALG4 変異)」骨格筋症候群(第2版)下 (別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 33)pp436-440 日本臨牀社、大阪、2015
2. 学会発表
- 【Invited Presentations at Scientific Meetings】**
1. Ohno K  
Physiology and hereditary/autoimmune pathology of acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction  
10th Japanese-French Workshop“New advances in treatments of neuromuscular diseases: From Basic to Applied Myology”, Paris, France  
July 2-4, 2015
  2. Ohno K  
Roles of collagen Q in MuSK antibody positive myasthenia gravis  
12th International Meeting of Cholinesterases, Alicante, Spain  
Sep 27-Oct 2, 2015
- 【Presentations at Scientific Meetings】**
1. 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  
*Neurology* 2015, 84(14): (Suppl P2): 021
  2. Selcen D, Ohkawara B, Shen X-M, McEvoy K, Ohno K, Engel AG  
LRP4 Myasthenia. Investigation of second kinship reveals impaired development and maintenance of the neuromuscular junction.  
20th International WMS Congress (Poster), Brighton, UK  
Sep 30-Oct 4, 2015  
Neuromuscular Disorders 25: ( Suppl 2) : S186–S187
  3. Sobue S, Inoue C, Hori F, Ito M, Ohno K, Ichihara M  
Molecular hydrogen is a novel antioxidant to reduce oxidative stress and attenuate disease progression through modification of cell signaling and gene expressions  
15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants (Poster), Paris, France  
June 22-24, 2015
  4. Ishihara N, Azuma Y, Nakata T, Takeuchi T, Okuno T, Ohno K, Natsume J.  
LGI2 heterozygous variant identified in a Japanese family with autosomal dominant cryptogenic West syndrome  
65th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), Baltimore, Maryland, USA  
Oct 6 - 10, 2015
  5. Bruun GH, Doktor TK, Masuda A, Krainer AR, Ohno K, Andresen BS.  
Global binding map of the splicing regulatory factor SRSF5  
65th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), Baltimore, Maryland, USA  
Oct 6 - 10, 2015
  6. Takegami Y, Ohkawara B, Seki T, Ohno K, Ishiguro N  
R-spondin2 is a critical factor for extracellular matrix production and chondrogenesis via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

ORS 2016 Annual Meeting (Poster),

Orlando, Florida, USA

Mar 5 - 8, 2016

7. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Sugiura H,  
Hasegawa S, Ishiguro N, Ohno K  
Radical therapeutic strategy for foramen magnum  
stenosis and spinal canal stenosis in achondroplasia  
ORS 2016 Annual Meeting (Platform)),  
Orlando, Florida, USA  
Mar 5 - 8, 2016
8. Kishimoto Y, Ohkawara B, Miyamoto K, Ishiguro N,  
Ohno K, Sakai T  
Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Contributes To Gene  
Expressions Related In Tendon Differentiation And  
Homeostasis  
ORS 2016 Annual Meeting (Platform)),  
Orlando, Florida, USA  
Mar 5 - 8, 2016

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

