

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

先天性筋無力症候群(CMS)の診断基準・重症度分類・診療の手引き等作成に供するために、平成28年8月31日に開始した神経筋疾患患者登録 Remudy の CMS レジストリーと協調して本邦における先天性筋無力症候群のさらなる新規同定を進めた。難病情報センターホームページに一般向けの病気の解説、医療従事者向けの診断・治療指針を掲載した。ミスセンス変異解析ツールを開発し、iMSVM ウェブサービスプログラムの構築を開始した。

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を行う。

B:研究方法

過去の自らの分子病態研究成果と論文精読により CMS の分子病態を探り、難病情報センターホームページに情報提供を行った。

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、whole exome sequencing (WES)

解析、whole genome sequencing (WGS) 解析を外注により行った。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 22 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。

過去に報告された 25 種類のミスセンス変異重症度予測ツールを独立変数として、Human Gene Mutation Database (HGMD) の SNV と dbSNP の minor allelic frequency > 0.01 の SNV を弁別する support vector machine モデルを作成し、leave-one-out 法により検証を行った。機械学習により作成をしたモデルを iMSVM ウェブサービスプログラムとして公開に向けた準備を開始した。

(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

難病情報センターホームページに一般向けの病気の解説、医療従事者向けの診断・治療指針を掲載した。

新規 CMS 症例ならびに過去の CMS 症例の WES 解析・WGS 解析を行い複数の新規遺伝子変異を同定した。病原性の研究を別研究プロジェクトで開始した。

ミスセンス変異の重症度予測ツール iMSVM を開発し、従来の 25 種類のいずれの予測ツールよりも感度・特異度が高いことを検証し、ウェブサービスプログラムを作成しローカル環境で検証を行った。

D: 考察

研究者らが行ってきた CMS の分子病態研究成果を含めて難病情報センターホームページでの CMS の情報公開を行うことができた。機械学習法によるミスセンス変異予

測ツールは CMS のみならず各種遺伝性疾患の病原遺伝子変異の解析に有用であることが期待される。

E: 結論

難病情報センターホームページを使った CMS の情報公開に貢献を行うとともに本邦 CMS のシーケンシング解析を進めた。同時に新規ミスセンス変異予測ツールの開発を行った。

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. Gao K, Wang J, Li L, Zhai Y, Ren Y, You H, Wang B, Wu X, Li J, Liu Z, Li X, Huang Y, Luo XP, Hu D, Ohno K, Wang C. Polymorphisms in four genes (rs151290, rs972283, rs780094 and rs10830963) and their correlation with type 2 diabetes mellitus in Han Chinese in Henan Province, China. *Int J Env Res Public Health* 2016, 13.
2. Takegami Y, Ohkawara B, Ito M, Masuda A, Nakashima H, Ishiguro N, Ohno K. R-spondin 2 facilitates differentiation of proliferating chondrocytes into hypertrophic chondrocytes by enhancing Wnt/beta-catenin signaling in endochondral ossification. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, 473: 255-264.
3. Chen G, Masuda A, Konishi H, Ohkawara B, Ito M, Kinoshita M, Kiyama H, Matsuura T, Ohno K. Phenylbutazone induces expression of

- MBNL1 and suppresses formation of MBNL1-CUG RNA foci in a mouse model of myotonic dystrophy. *Sci Rep* 2016, 6: 25317.
4. Hirayama M, Tsunoda M, Yamamoto M, Tsuda T, Ohno K. Serum tyrosine-to-phenylalanine ratio is low in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2016, 6: 423-431.
 5. Nakashima H*, Ohkawara B*, Ishigaki S, Fukudome T, Ito K, Tsushima M, Konishi H, Okuno T, Yoshimura T, Ito M, Masuda A, Sobue G, Kiyama H, Ishiguro N, Ohno K. R-spondin 2 promotes acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction via Lgr5. *Sci Rep* 2016, 6: 28512. *Equal contribution.
 6. Bruun GH, Doktor TK, Borch J-J, Masuda A, Krainer AR, Ohno K, Andresen BS. Global identification of hnRNP A1 binding sites for SSO-based splicing modulation. *BMC Biol* 2016, 14: 54.
 7. Shibata A, Okuno T, Rahman MA, Azuma Y, Takeda J, Masuda A, Selcen D, Engel AG, Ohno K. IntSplice: prediction of the splicing consequences of intronic single-nucleotide variations in the human genome. *J Hum Genet* 2016, 61: 633-640.
 8. Muramatsu Y, Ito M, Oshima T, Kojima S, Ohno K. Hydrogen-rich water ameliorates bronchopulmonary dysplasia (BPD) in newborn rats. *Pediatr Pulmonol* 2016, 51: 928-935.
 9. Lin Y, Ohkawara B, Ito M, Misawa N, Miyamoto K, Takegami Y, Masuda A, Toyokuni S, Ohno K. Molecular hydrogen suppresses activated Wnt/beta-catenin signaling. *Sci Rep* 2016, 6: 31986.
 10. Hasegawa S, Ito M, Fukami M, Hashimoto M, Hirayama M, Ohno K. Molecular hydrogen alleviates motor deficits and muscle degeneration in mdx mice. *Redox Rep* 2017, 22: 26-34.
 11. Shen X-M*, Okuno T*, Milone M, Otsuka K, Takahashi K, Komaki H, Giles E, Ohno K, Engel AG. Mutations causing slow-channel myasthenia reveal that a valine ring in the channel pore of muscle AChR is optimized for stabilizing channel gating. *Hum Mutat*, 2016, 37: 1051-1059. *Equal contribution.
 12. Matsushita M, Mishima K, Esaki R, Ishiguro N, Ohno K, Kitoh H. Maternal administration of meclozine for the treatment of foramen magnum stenosis in transgenic mice with achondroplasia. *J Neurosurg Pediatr* 2017, 19: 91-95.
 13. Ushida T, Kotani T, Tsuda H, Imai K, Nakano T, Hirako S, Ito Y, Li H, Mano Y, Wang J, Miki R, Yamamoto E, Iwase A, Bando YK, Hirayama M, Ohno K, Toyokuni S, Kikkawa F. Molecular hydrogen ameliorates several characteristics of preeclampsia in the Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) rat model. *Free Radic Biol Med* 2016, 101: 524-533.
 14. Ito M*, Ehara Y*, Li J, Inada K, Ohno

K. Protein-anchoring therapy of biglycan for *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*, in press. *Equal contribution.

15. Nazim M, Masuda A, Rahman MA, Nasrin F, Takeda JI, Ohe K, Ohkawara B, Ito M, Ohno K. Competitive regulation of alternative splicing and alternative polyadenylation by hnRNP H and CstF64 determines acetylcholinesterase isoforms. *Nucleic Acids Res*, in press.
16. Takeda J, Masuda A, Ohno K. Six GU-rich (6GUR) FUS-binding motifs detected by normalization of CLIP-seq by Nascent-seq. *Gene*, in press.

【Reviews】

1. Ohno K, Yagi H, Ohkawara B. Repositioning again of zonisamide for nerve regeneration. *Neural Regener Res* 2016, 11: 541-542. (査読有)
2. Ohno K. Is the serum creatine kinase level elevated in congenital myasthenic syndrome? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016, 87: 801. (査読有)
3. Ohno K, Ohkawara B, Ito M. Recent advances in congenital myasthenic syndromes. *Clin Exp Neuroimmunol* 2016, 7: 246-259. (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 2016, 7: 330-340. (査読有)

5. Ohno K, Otsuka K, Ito M. Roles of collagen Q in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Chem Biol Interact* 2016, 259: 266-270. (査読有)
6. Ohno K, Rahman MA, Nazim M, Nasrin F, Lin Y, Takeda JI, Masuda A. Splicing regulation and dysregulation of cholinergic genes expressed at the neuromuscular junction. *J Neurochem* 2017, in press. (査読有)

【Chapters in Books in Japanese】

1. 大野 欽司「先天性筋無力症候群」in 『筋ジストロフィー・筋疾患 最近の進歩』戸田達史監修 医学のあゆみ Vol. 259, No.1, pp. 80-86 医歯薬出版株式会社、東京、2016 (10月号)
2. 大野 欽司「疾患において破綻したスプライシング暗号を解読する」in 『Coding RNA ルネッサンス』片岡直行・前田明監修 実験医学 Vol. 34, No. 19, pp. 3133-3139 羊土社、東京、2016 (12月号)
3. 大野 欽司「先天性筋無力症候群の治療研究」in 『筋肉研究の最前線』武田伸一監修 CLINICAL CALCIUM Vol. 27, No. 3, pp. 97-104 医薬ジャーナル社、大阪、2017 (3月号)
4. 大野 欽司「先天性筋無力症候群はどのような病気ですか」in 『筋疾患』西野一三監修 神経内科 Clinical Question and Pearls 中外医学社 in press

2:学会発表

【Invited Presentations at Scientific Meetings】

1. Ohno K, Nazim M, Masuda A.
Splicing regulation of the human
acetylcholinesterase gene
XVth International Symposium on
Cholinergic Mechanisms, Marseille,
France
Oct 16-20, 2016

2. Ohno K
Molecular hydrogen as an emerging
therapeutic agent for neurological and
neuromuscular disorders
Molecular Hydrogen as Emerging
Therapeutic Agent and Its Clinical
Application,
Seoul, Korea
Sep 27, 2016

【Presentations at Scientific Meetings】

1. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K,
Sugiura H, Kitamura A, Ishiguro N,
Ohno K
Clinically Feasible Dose Of Meclozine
Promotes Bone Growth In Mouse Model
With Achondroplasia
ORS 2017 Annual Meeting (Poster),
San Diego, California, USA
Mar 19 - 22, 2017

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