

## 先天性筋無力症候群疾患登録システム樹立

研究分担者 大野 欽司<sup>1)</sup>

### 研究要旨

研究代表者木村らとともに、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)と打ち合わせを行い、その成果に基づき、先天性筋ジストロフィー、先天性ミオパチー、筋原線維ミオパチー、先天性筋無力症候群を含む先天性筋疾患の一カテゴリーとして先天性筋無力症候群の登録事業を 2016 年 8 月に開始した。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、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 24 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, ExAC, 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登録事業を 2016 年 8 月に開

1) 名古屋大学 医学系研究科 神経遺伝情報学

始した。

本邦の先天性筋無力症候群疑い5例のコンサルテーションを受け、4例の遺伝子変異解析を行い、現在までに1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ほぼ全症例の原因遺伝子の同定を行ってきたが、IRUD-Pなど塩基配列決定拠点の活動に伴い本報告者が関与しない先天性筋無力症候群症例が報告されるようになった。現在も9割を超える症例の解析を本報告者が行っていると予想をするが疾患登録システムを活用し、本邦の網羅的な疾患データベースの樹立が必要である。

#### E. 結論

先天性筋無力症候群の疾患登録システムを開始した。本邦における1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

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 【Original Articles】

- 1) Imai K, Kotani T, Tsuda H, Mano Y, Nakano T, Ushida T, 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 Radic Biol Med* 2016, 91: 154-163.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.

- 14) Matsushita M, Mishima K, Esaki R, Ishiguro N, Ohno K, Kito H. Maternal administration of meclozine for the treatment of foramen magnum stenosis in transgenic mice with achondroplasia. *J Neurosurg Pediatr* 2017, 19: 91-95.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Ushida T, Kotani T, Tsuda H, Imai K, Nakano T, Hirako S, Ito Y, Li H, Mano Y, Wang J, Miki R, Iwase A, Yamamoto E, 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*, in press.

#### [Chapters in Books]

- 1) Masuda A, Ohno K. Neurodegeneration-associated RNA-binding protein, FUS, regulates mRNA length. *Atlas of Science*. Ed. by Lynn C Yeoman. AoS Nordic AB, Stockholm, 2016, <http://atlasofscience.org/neurodegeneration-associated-rna-binding-protein-fus-regulates-mrna-length/> (査読有)

#### [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 J, Masuda A. Splicing regulation and dysregulation of cholinergic genes expressed at the neuromuscular junction. *J Neurochem*, in press (査読有)

#### 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 なし

#### 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