

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に関しては、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 に先天性筋無力症候群のレジストリ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公開中の一般向けの病気の解説、医療従事者向けの診断・治療指針の情報を更新した。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さらなるファインチューニングを行った。

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の情報更新を行った。

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 31 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, ExAC 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 26 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。既存の 26 種類を凌駕するとともにゲノムワイドにあらゆるアミノ酸置換の予測が可能であるようにファインチューニングを行った。機械学習により作成したモデルを iMSVM (individual meta support vector machine) ウェブサービスプログラムとしてコーディングを行い、名古屋大学医学系研究科ウェブサーバー上での公開に向けた準備を行った。

(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・治療指針の更新を行った。

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 を開発した。開発には dbSNP と HGMD Pro を独立変数として用いた。HGMD Pro に含まれていない ClinVar の遺

伝子変異を用いて検証を行った。既存の 26 種類のいずれの予測ツールよりも iMSVM は感度・特異度が高いことを明らかにし、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。すべての features を用いると約 70% の SNV しかカバーできないために、2/3 の features を用いたモデルを作成し、約 95% の SNV をカバーした。

D：考察

研究者らが行ってきた CMS の分子病態研究成果を反映して難病情報センターホームページの CMS の情報を更新した。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. 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.
2. Matsushita M, Mishima K, Esaki R, Ishiguro N, Ohno K, Kitoh H. Maternal administration of mectizan for the treatment of foramen magnum stenosis

- in transgenic mice with achondroplasia. *J Neurosurg Pediatr* 2017, 19: 91-95.
3. 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* 2017, 28: 428-436. *Equal contribution.
 4. Takeda JI, Masuda A, Ohno K. Six GU-rich (6GUR) FUS-binding motifs detected by normalization of CLIP-seq by Nascent-seq. *Gene* 2017, 518: 57-64.
 5. Kishimoto Y, Ohkawara B, Sakai T, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Shukunami C, Docheva D, Ohno K. Wnt/ β -catenin signaling suppresses expressions of *Scx*, *Mkx*, and *Tnmd* in tendon-derived cells. *PLoS One*, 12: e0182051, 2017
 6. Ahsan KB, Masuda A, Rahman MA, Takeda J, Nazim M, Ohkawara B, Ito M, Ohno K. SRSF1 suppresses selection of intron-distal 5' splice site of *DOK7* intron 4 to generate functional full-length Dok-7 protein. *Sci Rep*, 7: 10446, 2017.
 7. Tabeta K, Du X, Arimatsu K, Yokoji M, Takahashi N, Amizuka N, Hasegawa T, Crozat K, Maekawa T, Miyauchi S, Matsuda Y, Ida T, Kaku M, Hoebe K, Ohno K, Yoshie H, Yamazaki K, Moresco EM, Beutler B. An ENU-induced splice site mutation of mouse *Col1a1* causing recessive osteogenesis imperfecta and revealing a novel splicing rescue. *Sci Rep*, 7: 11717, 2017.
 8. Miyamoto K, Ohkawra B, Ito M, Masuda A, Hirakawa A, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Ishiguro N, Ohno K. Fluoxetine ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling. *PLoS One*, 12: e0184388, 2017.
 9. Minato T, Maeda T, Fujisawa Y, Tsuji H, Nomoto K, Ohno K, Hirayama M. Progression of Parkinson's disease is associated with gut dysbiosis: Two-year follow-up study. *PLoS One* 2017, 12: e0187307.
 10. Kasai T, Nakatani M, Ishiguro N, Ohno K, Yamamoto N, Morita M, Yamada H, Tsuchida K, Uezumi A. Promethazine Hydrochloride Inhibits Ectopic Fat Cell Formation in Skeletal Muscle. *Am J Pathol* 2017, 187: 2627-2634.
 11. Yu Y, Lin Y, Takasaki Y, Wang C, Kimura H, Xing J, Ishizuka K, Toyama M, Kushima I, Mori D, Arioka Y, Uno Y, Shiino T, Nakamura Y, Okada T, Morikawa M, Ikeda M, Iwata N, Okahisa Y, Takaki M, Sakamoto S, Someya T, Egawa J, Usami M, Kodaira M, Yoshimi A, Oya-Ito T, Aleksic B, Ohno K, Ozaki N. Rare loss of function mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and their contributions to schizophrenia susceptibility. *Transl Psychiatry*, 2018, 8: 12.
 12. Kurahashi H, Azuma Y, Masuda A, Okuno T, Nakahara E, Imamura T, Saitoh M, Mizuguchi M, Shimizu T, Ohno K, Okumura A. MYRF is associated with encephalopathy with reversible myelin vacuolization. *Ann Neurol*, 2018, 83: 98-106.
 13. Ito K*, Ohkawara B*, Yagi H, Nakashima H, Tsushima M, Ota K, Konishi H, Masuda A, Imagawa S, Kiyama H, Ishiguro N, Ohno K. Lack of Fgf18 causes abnormal clustering of motor nerve terminals at the neuromuscular junction with reduced acetylcholine receptor clusters. *Sci Rep* 2018, 8: 434. *Equal contribution.
 14. Nishiwaki H, Ito M, Negishi S, Sobue S, Ichihara M, Ohno K. Molecular hydrogen upregulates heat shock response and collagen biosynthesis, and downregulates cell cycles - Meta-analyses of gene expression profiles. *Free Radic Res* in press.
 15. Takeuchi A, Iida K, Tsubota T, Hosokawa M, Denawa M, Ninomiya K, Ito M, Kimura H, Abe T, Kiyonari H, Ohno K, Hagiwara M. Loss of Sfpq

causes long-gene transcriptopathy in the brain. *Cell Rep*, in press

【Reviews】

1. 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, 142 Suppl 2: 64-72.
2. Ohno K, Ohkawara B, Ito M. Agrin-LRP4-MuSK signaling as a therapeutic target for myasthenia gravis and other neuromuscular disorders. *Expert Opin Ther Targets* 21: 949-958, 2017.
3. Ohno K, Masuda A, Takeda J. Rules and tools to predict the splicing effects of exonic and intronic mutations. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 9: e1451, 2018.
4. Ito M, Ohno K. Protein-anchoring therapy to target extracellular matrix proteins to their physiological destinations. *Matrix Biol*, in press.

【Chapters in Books in Japanese】

1. 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* 27(3): 97-104, 2017
2. 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
3. 大野欽司、大河原美静「ドラッグリポジション戦略による神経筋骨格系病態治療（第28階日本末梢神経学会学術集会教育研修講演1）」末梢神経 28(2): 136-141, 2017.

2：学会発表

【Presentations at Scientific Meetings】

1. Nazim M, Masuda A, Rahman MA, Nasrin F, Takeda J, Ohe K, Ohkawara B, Ito M, Ohno K. Competitive regulation of alternative splicing and alternative polyadenylation by hnRNP H and CstF64 determines acetylcholinesterase isoforms 2017 CSHL Meeting: Eukaryotic mRNA Processing (Poster), New York, New York, USA Aug 22 - 26, 2017
2. Ahsan KB, Masuda A, Rahman MA, Takeda J, Ohkawara B, Ito M, Ohno K. SRSF1 suppresses selection of intron-distal 5' splice site of DOK7 intron 4 to generate functional full-length Dok-7 protein 2017 CSHL Meeting: Eukaryotic mRNA Processing (Poster), New York, New York, USA Aug 22 - 26, 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