

## 先天性筋無力症候群

研究分担者：大野 欽司

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ーと協調して本邦における 11 例の先天性筋無力症候群疑いの解析を行った。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・治療指針の情報を確認した。ミスセンス変異解析ツールのさらなるファインチューニングを行い、公開に向けてウェブサービスプログラムを作成した。

### 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の情報の正確さ即時性の確認を行った。

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に構築した(未公開)。

(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掲載された一般向けの病気の解説、医療従事者向けの診断・治療指針の情報の正確さ即時性の確認を行った。

神経筋疾患患者登録 Remudy の先天性筋無力症候群のレジストリーへの登録を行うべく、11 例の新規 CMS 疑い症例の解析を行った。ならびに過去の CMS 症例の WES 解析・WGS 解析を行った。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。Leave-one-out cross validation により検証を行った。iMSVM は感度 0.925・特異度 0.886 を達成し、既存の 26 種類のいずれの予測ツールよりも優れていた。CMS の原因となる DOK7, MUSK, AGRN の 36 種類の病原性遺伝子変異と 69 種類の正常 SNVs を使った検証でも感度 0.889・特異度 0.870 と期待される値を示した。ウェブサービスプログラムを作成し公開に向けた準備を行った。

### D: 考察

研究者らが行ってきた CMS の分子病態研究成果を反映して難病情報センターホームページの CMS の情報の正確さ即時性を確認した。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、「NPO 法人筋無力症患者会」の協力を得て本邦 CMS のシークエ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. Takeuchi A, Iida K, Tsubota T, Hosokawa M, Denawa M, Brown JB, 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* 2018, 23: 1326-1341.
- Li J, Ito M, Ohkawara B, Masuda A, Ohno K. Differential effects of spinal motor neuron-derived and skeletal muscle-derived Rspo2 on acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction *Sci Rep* 2018, 8: 13577.
  - Okura T, Ohkawara B, Takegami Y, Ito M, Masuda A, Seki T, Ishiguro N, Ohno K. Mianserin suppresses R-spondin 2-induced activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in chondrocytes and prevents cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis. *Sci Rep* 2019, 9: 2808.

#### 【Reviews】

- Ito M, Ohno K. Protein-anchoring therapy to target extracellular matrix proteins to their physiological destinations. *Matrix Biol*, 2018, 68-69: 628-636. (査読有)

## 2 : 学会発表

### 【Presentations at Scientific Meetings (Invited)】

- Ohno K, Masuda A  
Splicing regulations in neuromuscular diseases  
11th Japanese-French Workshop on Muscular Dystrophies  
Kodaira, Tokyo  
June 14-16, 2018
- Ohno K  
Congenital myasthenic syndromes  
15th International Congress of Neuromuscular Diseases  
Vienna, Austria  
July 6-10, 2018

### 【Presentations at Scientific Meetings】

- Takeuchi A, Iida K, Hosokawa M, Denawa M, Ito M, Ohno K, Hagiwara M  
Loss of Sfpq causes long-gene transcriptopathy in the brain  
23rd Annual Meeting of the RNA Society (Platform), Alameda, California, USA  
May 29 - June 3, 2018
- Christensen LL, Doktor TK, Masuda A, Ohno K, Andresen BS  
A global binding map of hnRNP A2/B1  
23rd Annual Meeting of the RNA Society (Poster), Alameda, California, USA  
May 29 - June 3, 2018

- Osawa Y, Matsushita M, Mishima K, Ishiguro N, Ohno K, Kitoh H  
Bone formation was promoted in mouse model of distraction osteogenesis with gain-of-function mutation in fgfr3  
ORS 2018 Annual Meeting (Poster), New Orleans, Louisiana, USA  
Mar 10-13, 2018
- Kusano T, Nakatani M, Uezumi A, Ishiguro N, Ohno K, Yamada H, Tsuchida K  
Drug X inhibits heterotopic ossification by suppression of Bmp2-smad 1/5/8 signaling  
ORS 2019 Annual Meeting (Poster), Austin, Texas, USA  
Feb 2-5, 2019
- Kambara S, Ohkawara B, Koshimizu H, Imagama S, Ishiguro N, Ohno K  
Zonisamide blocked mild cervicalspondylotic myelopathy progression in chronic compression rat model  
ORS 2019 Annual Meeting (Poster), Austin, Texas, USA  
Feb 2-5, 2019

## H : 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- 特許取得  
なし
- 実用新案登録  
なし
- その他  
なし