

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）

希少難治性筋疾患に関する調査研究班 分担研究報告書

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、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と協調して本邦における 7 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。既存の 25 種類のミスセンス変異解析ツールを凌駕する新規ツール InMeRF を開発した。

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、令和元年度は 7 例の whole exome sequencing (WES) 解析、ならびに、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 32 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 34 種類のミスセンス変異評価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 random forest models を作成し、5-fold cross validation 法により検証を行った。

（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、7 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。

ミスセンス変異の重症度予測ツール InMeRF を開発した。開発には dbSNP と HGMD Pro を独立変数として用いた。5-fold cross validation により検証を行った。InMeRF は receiver operating characteristic (ROC) curve において 0.941 の area-under-the-curve (AUC) を達成し、既存の 25 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*, *LRP4*, *CHRNE*, *COLQ*, *GFPT1* と二分脊椎の原因となる *VANGL1* の 155 種類の病原性遺伝子変異と 125 種類の正常 SNVs を使った検証でも感度 0.942・特異度 0.848 と期待される値を示した。作成したモデルを InMeRF (individual meta random forest) 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するとともに(未公開)、論文を投稿した。

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. 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/ β -catenin signaling in chondrocytes and prevents cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis. *Sci Rep* 2019, 9: 2808.
2. Huang K, Masuda A, Chen G, Bushra S, Kamon M, Araki T, Kinoshita M, Ohkawara B, Ito M, Ohno K. Inhibition of cyclooxygenase-1 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs demethylates

MeR2 enhancer and promotes Mbnl1 transcription in myogenic cells. *Sci Rep* 2020, 10: 2558.

3. Nakazawa Y, Hara Y, Oka Y, Komine O, van den Heuvel D, Guo C, Daigaku Y, Isono M, He Y, Shimada M, Kato K, Jia N, Hashimoto S, Kotani Y, Miyoshi Y, Tanaka M, Sobue A, Mitsutake N, Suganami T, Masuda A, Ohno K, Nakada S, Mashimo T, Yamanaka K, Luijsterburg MS, Ogi T. Ubiquitination of DNA Damage-Stalled RNAPII Promotes Transcription-Coupled Repair. *Cell* 2020, 180: 1228-1244 e1224.
4. Masuda A, Kawachi T, Takeda JI, Ohkawara B, Ito M, Ohno K. tRIP-seq reveals repression of premature polyadenylation by co-transcriptional FUS-U1 snRNP assembly. *EMBO Rep* 2020: e49890.
5. Ohkawara B, Shen X-M, Selcen D, Nazim M, Bril V, Tarnopolsky MA, Brady L, Fukami S, Amato AA, Yis U, Ohno K, Engel AG. Agrin Myasthenia: Distinct effects of variants in different domains on clustering of acetylcholine receptors. *JCI Insight* in press.

【Reviews】

なし

2 : 学会発表

【Presentations at Scientific Meetings (Invited)】

なし

【Presentations at Scientific Meetings】

1. Huang K, Masuda A, Ohkawara B, Ito M, Ohno K
Inhibition of cyclooxygenase-1 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs demethylates MeR2 enhancer and promotes Mbnl1 transcription in myogenic cells
5th Annual Meeting of Japan Muscle Society (Poster), Tokyo, Japan
Aug 2-3, 2019

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