

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 2 例の新規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、ウェブサービスを開始した。

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新規同定と、先天性筋無力症候群の診断基準の策定・臨床調査個人票の更新・難病指定医向けテキストの作成により、今後の病態研究への基盤整備を担うことである。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 2 年度は 2 例の新規 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) Pro に含まれるミスセンス SNV と dbSNP の minor allelic frequency > 0.01 の SNV を弁別する random forest model (InMeRF) を作成し、各種検証を行った。

(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、2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 を開発し論文発表するとともに(論文リスト 6)、ウェブサイトを公開した。ClinVar と HGMD Pro に含まれる 72,556 の病的アミノ酸置換 SNV と、dbSNP に含まれる 162,918 の MAF > 0.01 の正常アミノ酸置換 SNV からトレーニングデータセットを作成した。予測バイアスを排除する目的で同数の病的アミノ酸置換 SNV と正常アミノ酸置換 SNV を用いて 150 種類のモデルを作成した。dbNSFP ver 4.0a に含まれる 34 種類のアミノ酸置換病原性予測モデルのスコアを InMeRF モデル作成のための特徴量とした。トレーニングデータセットの 10 分割交差検証を receiver operating characteristic (ROC) curve と precision-recall (PR) curve の area-under-the-curve (AUC) で評価を行った。10 分割交差検証による 150 種類のモデルの感度は 0.933 ± 0.040 (mean and SD) であり、特異度は 0.949 ± 0.034 であった。過学習がない条件で InMeRF を評価する目的で、CADD のために作られたトレーニングデータセットを用いて InMeRF-CADD を作成した。同様に、同一の CADD トレーニングデータセットを用いて作成された 8 種類のツールとの比較を行った。CADD トレーニングデータセットと同一の SNVs を共有しない 3 種類のテスト用データセットを用いてモデルの比較を行った。ROC-AUC の比較において、InMeRF-CADD はこれら 8 種類のツールよりも優れた値を示した。

InMeRF を我々が解析を行ってきた 8 種類の遺伝子 (*DOK7*, *MUSK*, *AGRN*, *LRP4*, *CHRNE*, *COLQ*, *GFPT1*, *VANGL1*) の SNVs

に適応したところ、155 の病的 SNVs のうち 146 を正しく病的と判断し(感度 = 0.942)、125 の正常 SNVs のうち 106 を正常と判断した(特異度 = 0.848)。これらの値は検証に用いたデータセットによる値と比肩するものであった。

InMeRFWeb サービスプログラムを作成し公開した (<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/InMeRF/>)。InMeRF は、(i) GRCh37/hg19 に基づく SNV のポジション、(ii) GRCh37/hg38 に基づく SNV のポジション、(iii) HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) の遺伝子シンボル、(iv) Ensembl Transcript ID のいずれかを入力値として受け付ける。同時に全ゲノムに渡り InMeRF による予測を完了したデータセットも公開した。

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

- 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.
- 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 e24.
3. 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, 21: e49890.
 4. Ohkawara B, Shen X, Selcen D, Nazim M, Bril V, Tarnopolsky MA, Brady L, Fukami S, Amato AA, Yis U, Ohno K, Engel AG. Congenital myasthenic syndrome-associated agrin variants affect clustering of acetylcholine receptors in a domain-specific manner. *JCI Insight* 2020, 5(7):e132023.
 5. Nishiwaki H, Ito M, Ishida T, Hamaguchi T, Maeda T, Kashihara K, Tsuboi Y, Ueyama J, Shimamura T, Mori H, Kurokawa K, Katsuno M, Hirayama M, Ohno K. Meta-Analysis of Gut Dysbiosis in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2020, 35(9): 1626-1635.
 6. Takeda J, Nanatsue K, Yamagishi R, Ito M, Haga N, Hirata H, Ogi, Ohno K. InMeRF: prediction of pathogenicity of missense variants by individual modeling for each amino acid substitution. *NAR Genomics and Bioinformatics* 2020, 2(2): lqaa038.
 7. Ohkawara B*, Kobayakawa A*, Kanbara S, Hattori T, Kubota S, Ito M, Masuda A, Takigawa M, Lyons KM, Ishiguro N, Ohno K. CTGF/CCN2 facilitates LRP4-mediated formation of the embryonic neuromuscular junction. *EMBO Rep* 2020, 2020: e48462. *Equal contribution
 8. Kanbara S, Ohkawara B, Nakashima H, Ohta K, Koshimizu H, Inoue T, Tomita H, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Imagama S, Ohno K. Zonisamide ameliorates progression of cervical spondylotic myelopathy in a rat model. *Sci Rep* 2020, 10: 13138.
 9. Huang K, Li J, Ito M, Takeda J-I, Ohkawara B, Ogi T, Masuda A, Ohno K. Gene Expression Profile at the Motor Endplate of the Neuromuscular Junction of Fast-Twitch Muscle. *Front Mol Neurosci* 2020, 13: 154.
 10. Nishiwaki H, Hamaguchi T, Ito M, Ishida T, Maeda T, Kashihara K, Tsuboi Y, Ueyama J, Shimamura T, Mori H, Kurokawa K, Katsuno M, Hirayama M, Ohno K. Rapid-Eye-Movement Sleep Behavior Disorder Exhibits Similar but Distinct Gut Dysbiosis Compared to Parkinson's Disease. *mSystems* 2020, 5(6): e00797-20.
 11. Takeuchi A, Takahashi Y, Iida K, Hosokawa M, Irie K, Ito M, Brown JB, Ohno K, Nakashima K, Hagiwara M. Identification of Qk as a Glial Precursor Cell Marker that Governs the Fate Specification of Neural Stem Cells to a Glial Cell Lineage Stem. *Stem Cell Rep* 2020, 15: 883-897.
 12. Tawara, N, Yamashita S, Takamatsu K, Yamasaki Y, Mukaino A, Nakane S, Farshadyeganeh P, Ohno K, Ando Y. Efficacy of salbutamol monotherapy in slow-channel congenital myasthenic syndrome caused by a novel mutation in CHRND. *Muscle and Nerve* in press
 13. Abe K, Hirayama M, Ohno K, Shimamura T. Hierarchical non-negative matrix factorization using clinical information for microbial communities. *BMC Genomics* 2021, 22: 104.
- ## 2 : 学会発表 (招待講演)
1. 大野 欽司
「リウマチ医のための神経筋接合部病態・骨格筋病態の最新知見」
第64回日本リウマチ学会 (オンライン)、
2020年8月17日

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