

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03561

研究課題名(和文) 神経筋接合部の正常分子構築解明と分子病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of neuromuscular junction formations in physiology and pathology

研究代表者

大野 欽司 (Ohno, Kinji)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80397455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,670,000円

研究成果の概要(和文)：神経筋接合部の正常分子構築機構(NMJ)を明らかにするとともに、先天性筋無力症候群(CMS)の分子病態を解明し、新規治療法開発につなげることを研究目的とした。Rspo2, Fgf18, Ctgfの3種類の新規NMJ構築誘導細胞外分泌分子を同定した。本邦CMS患者において同定したAGRN, DOK7, GFPT1, CHRND, CHRNG遺伝子変異の機能解析を行った。さらに、培養皿上にNMJを構築しゾニサミドがニューレギュリンの発現誘導を介してアセチルコリン受容体クラスターリングを誘導することを明らかにした。CMSに関して過去最大の442論文を引用した英文総説を執筆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子病態解析を含めたCMS研究拠点は、アメリカ3拠点(Professors. Andrew G. Engel, Ricard A. Maselli, Christopher M. Gomez)、カナダ1拠点(Prof. Hanns Lochmuller)、イギリス1拠点(Prof. David Beeson)、フランス1拠点(Prof. Sophie Nicole)があり、研究代表者らはこれらの拠点と連携してCMS研究を行っている。CMSは未診断・誤診断のことが多く診断確定・病態機構解明・治療法開発が求められている。

研究成果の概要(英文)：Specific AIMS of the current project were to elucidate the physiological molecular structures of the neuromuscular junction (NMJ) and their aberrations in congenital myasthenic syndromes (CMS) to develop novel therapeutic modalities for CMS. We identified three novel secreted molecules (Rspo2, Fgf18, and Ctgf) and their cognate receptors (Lgr5, Fgfr2, Lrp4) that are essential for the formation and the maintenance of NMJ. We identified and functionally characterized mutations in the CHRND, CHRNG, and DOK7 genes in Japanese patients with CMS. In addition, we generated in vitro NMJ and found that anti-epileptic and anti-parkinsonian drug, zonisamide, induces the clustering of acetylcholine receptors by upregulating neuregulin. We also published an extensive review article on CMS by citing as many as 442 references.

研究分野：神経遺伝情報学分野

キーワード：神経筋接合部 先天性筋無力症候群

## 1. 研究開始当初の背景

CMSは遺伝子変異によるNMJ分子異常によりNMJ信号伝達が障害される病態であり、35種類の遺伝子が同定されてきた(*Int J Mol Sci*, 24: 3730, 2023, *Expert Opin Ther Targets*, 21: 949, 2017, *Clin Exp Neuroimmunol*, 7: 246, 2016, *eLS*: DOI: 10.1002/9780470015902.a0024314, 2014)。CMSは世界中から800症例以上が報告されてきたが本邦の確定診断例は研究代表者らが2011年に遺伝診断を開始する以前は2症例のみであった。英国ではCMSは小児重症筋無力症の約6倍多いことが報告されており(*Arch Dis Child*, 99: 539, 2014)、本邦にも多くの未診断CMS症例が存在することが予想される。本研究により、正常NMJ分子構築機構を解明するとともに、CMS病態解明研究・CMS病態制御研究を進展させる。

## 2. 研究の目的

神経筋接合部(neuromuscular junction, NMJ)の正常分子構築機構を明らかにするとともに、NMJ発現分子の先天的欠損による先天性筋無力症候群(congenital myasthenic syndromes, CMS)の分子病態を解明し、新規治療法開発につなげることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 神経筋接合部(NMJ)の正常分子構築機構ならびにアセチルコリン受容体(AChR) clustering機構の解明・Ctgf欠損マウスの神経筋接合部の形態学的・超微形態学的・電気生理学的な解析を行うとともに、CTGFとその受容体LRP4のドメイン欠失変異体を用いた生化学的な解析を行いCTGFとLRP4の結合ドメインを決定した。SMN特異的、ならびに筋終板特異的にHA-tagged RPL22 (リボゾームタンパク構成分子)を発現するRiboTag mouse (*BioTechniques*, 58: 308, 2015)を作出し筋終板に特異的な遺伝子発現プロファイルをRNA-seqにより明らかにした。
- (2) 先天性筋無力症候群(CMS)病態分子機構解明とその治療法開発研究。(i) AGRNミスセンス変異の機能解析を行いドメイン欠失変異体の生化学解析・細胞生物学解析を行った。(ii) DOK7ミスセンス変異の機能解析を患者から樹立したiPS細胞を用いて形態学的・生化学的解析を行った。(iii) GFPT1ミスセンス変異の解析を変異ノックインマウスを作出し形態学的・超微形態学的・電気生理学的な解析を行った。(iv) HEK293細胞に胎児型正常(wt.)-AChRと3名のEscobar症候群でheterozygousに同定された病的バリエーション P121T-AChRを発現させ、細胞表面のAChR発現量定量、単一イオンチャンネル記録、AChRチャンネル動態解析を行った。
- (3) 新規治療法開発研究。抗てんかん薬・抗パーキンソン病薬ゾニサミドが培養細胞に対してneurite elongationを誘導し末梢神経切断モデル(*PLoS One*, 10: e0142786, 2015)、頸椎性脊髄症モデル(*Sci Rep*, 10: 13138, 2020)、感覚神経障害モデル(*Life Sci*, 263: 118577, 2020)に対して有効であることを報告してきた。NSC34神経細胞とC2C12筋管から*in vitro* NMJを構築しゾニサミドの効果を確認するとともに作用機構の解析を行った。

## 4. 研究成果

- (1) 新規 NMJ 形成誘導分子 CTGF(*Int J Mol Sci*, 22: 2455, 2021, *EMBO Rep*, 21: e48462, 2020)。Laser capture microdissection の解析にて Ctgf/Ccn2 は筋終板に 1.60-1.83 倍多く発現することを明らかにした。Ctgf/Ccn2 はマウス胎児筋終板に集積しており、胎生(E)17.5 日に発現がピークに達した。Deletion mutant を用いた免疫沈降実験にて Ctgf/Ccn2 の CT ドメインが LRP4 の第 3 $\beta$  プロペラドメインに結合することを明らかにした。*In vitro* plate-binding assay、ならびに cell surface-binding assay にて Ctgf/Ccn2 の CT ドメインが MuSK と LRP4 の結合を増強することを見出した。Ctgf/Ccn2 は agrin 処理した C2C12 筋管膜に発現する LRP4 の量を増加させるとともに LRP4 のリン酸化を促進した。同時に、Ctgf/Ccn2 は C2C12 筋管において MuSK リン酸化を亢進させアセチルコリン受容体のクラスタリングも増強した。逆にレンチウイルスによる Ctgf/Ccn2 ノックダウンにより C2C12 筋管の MuSK リン酸化が低下し、アセチルコリン受容体のクラスタリングも低下した。これらの低下を LRP4 の ectodomain がレスキューした。Ctgf/Ccn2 マウスノックアウトでは骨格筋膜に発現する LRP4 が減少し MuSK リン酸化も低下した。Ctgf/Ccn2 ノックアウトはマウスの骨格筋分化と運動ニューロン分化には弱拡大レベルでは影響を与えなかったが、共焦点顕微鏡による観察では運動神経終末の synaptophysin の軸索への異常な進展とアセチルコリン受容体クラスタの形成障害を認めた。電顕における観察でも神経終末のミトコンドリアが著減し、シナプス小胞数とアクティブゾーンの現象を認めた。反復神経刺激による微小終板電位の異常減衰を認めるとともに、微小終板電位

の頻度の顕著な低下を認めた。LRP4 は agrin 受容体として筋終板で LRP4/MuSK 共受容体を形成するとともに、神経終末にも発現し神経終末の分化に必須の分子であることが報告されているが、そのリガンドは不明である(*Neuron*, 75: 94, 2012, *Nature*, 489: 438, 2012)。Ctgf/Ccn2 は NMJ における LRP4 の retrograde signal のリガンドである可能性が示された(図 1)。筋終板特異的な遺伝子発現プロファイル(*Front Mol Neurosci*, 13: 154, 2020)。Colq1a プロモータに b-galactosidase をつなげた lentivirus を正常マウス骨格筋に注射し、既報通り Colq1a プロモータは速筋筋終板特異的に発現することを確認した。pColq1a-Cre トランスジェニックマウスを作成し、Flox により RPL22 (リボゾームタンパク構成分子)に HA-tag を付加する RiboTag mouse と交配させることにより筋終板特異的に HA-tagged RPL22 を発現させる pColq1a-Cre:RiboTag mouse を作成し、筋終板特異的な mRNA 翻訳を RNA-seq により網羅的に解析を行った(図 2)。はじめに、HA-tagged RPL22 が前脛骨筋の NMJ に濃縮されていることを確認した。抗 HA 抗体により免疫沈降した RNA の RNA-seq 解析により NMJ のマーカー遺伝子 *Chrne* と *Musk* が濃縮されていることを確認した。一方、シュワン細胞マーカー(*Sox10*, *S100b*)、血管内皮のマーカー(*Icam1*)、筋サテライト細胞マーカー(*Pax3*) はほとんど検出されなかった。GSEA によるパスウェイ解析では phosphatidylinositol signaling system と extracellular matrix receptor interaction が筋終板で濃縮されていた(図 3)。さらなるサブパスウェイ解析により、diacylglycerol kinases, phosphatidylinositol kinases, phospholipases, integrins, laminins の筋終板での濃縮が明らかになった。phosphatidylinositol signaling system の筋終板における発現亢進は従来報告されておらず NMJ 構築と維持に重要な分子が含まれている可能性が示唆された。

(2) AGRN-CMS (*JCI Insight*, 5: e132023, 2020)。Whole exome sequencing により 4 名の CMS 患者において AGRN 遺伝子変異の同定を行った。スプライシングを疑う変異に対してはミニジーンを作成しスプライシング解析を行った。ミスセンス変異に対して agrin フラグメントにミスセンス変異を導入し、*in cellulo* 解析と *in vitro* 解析を行った。4 名の CMS 患者において 6 種類の遺伝子変異を同定した。(i)に示す large-scale deletion を除いて病態を説明するための機能解析を行った。(i) g.950,567\_958,457del は 7.9 kbp の欠失で AGRN exon 1, 2 を欠失させた。(ii) c.4744G>A は AGRN exon 26 の 3' 末端塩基で p.Gly1582Arg が予測されたが、ミニジーン解析にて exon 26 のスキッピングを誘導し p.A1506SfsX6 となることを明らかにした。(iii) p.S1180L は SEA ドメインに位置する。SEA ドメインは agrin の糖化と分泌に重要なドメインである(*Hum Mol Genet*, 20: 4617, 2011)。p.S1180L は AChR クラスターリングを阻害するとともに、分泌された agrin の破壊を促進した。(iv) p.R1509W は LG1 ドメインに位置する。LG1 ドメインは ジストログリカンへの agrin の結合に重要である (*Front Mol Biosci*, 6: 18, 2019)。p.R1509W は AChR クラスターリングを阻害するとともに、MuSK リン酸化を阻害し agrin の骨格筋膜ならびに NMJ へのアンカリングを阻害し、さらに heparan sulfate への結合を阻害した。(v) p.G1675S は LG2 ドメインに位置する。LG2 ドメインは LG1 ドメインと同様に ジストログリカンへの agrin の結合に重要である (*Front Mol Biosci*, 6: 18, 2019)。また、neuron-specific exon A/y は LG2 ドメインに存在する (*J Neurochem*, 142 Suppl 2: 64, 2017)。p.G1675S は AChR クラスターリングを阻害するとともに、agrin の骨格筋膜へのアンカリングを阻害し、さらに heparin への結合を阻害した。(vi) p.Y1877D は LG3 ドメインに存在する。neuron-specific exon B/z は LG3 ドメインに存在する (*J Neurochem*, 142 Suppl 2: 64, 2017)。Exon B/z がコードするアミノ酸は agrin の LRP4 への結合を可能にする(*Genes Dev*, 26: 247, 2012)。p.Y1877D は AChR クラスターリングを阻害するとともに、MuSK リン酸化を阻害した。AGRN 変異が位置するドメインごとに異なった病態

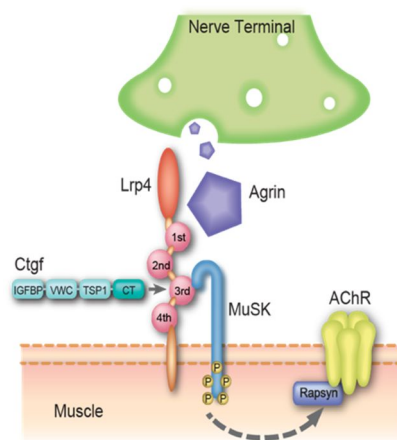


図 1. Ctgf は Lrp4 に結合し NMJ 形成を促進する

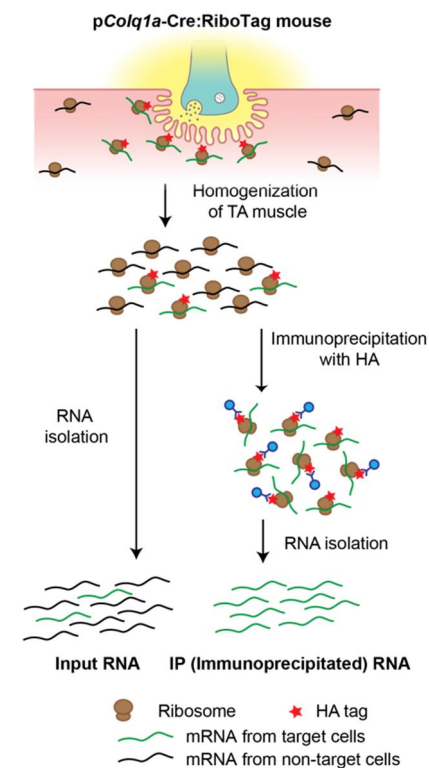


図 2. RiboTag mouse による筋終板特異的な網羅的な遺伝子発現解析

KEGG gene sets enriched in the subsynaptic nuclei of TA muscle

Name	NES	P-value	FDR (q)
phosphatidylinositol signaling system	1.511	0.000	0.086
ECM receptor interaction	1.540	0.000	0.103

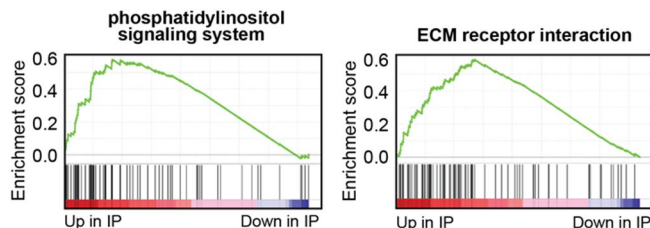


図 3. NMJ 特異的に発現する遺伝子の GSEA 解析



機序を示しており、病態機序に応じた治療戦略が可能になることが期待された。

- (3) *DOK7*-CMS 患者由来 iPS 細胞の解析 (*Hum Mol Genet*: 2022)。健常者(control)-iPS 細胞と *DOK7*-CMS 患者から樹立した *DOK7*-iPS 細胞がクローン間のばらつきによる異なった筋管分化能を有することが判明したため、*DOK7*-CMS に対して CRISPR/Cas9 による遺伝子修復を行った。患者は *DOK7* 遺伝子の p.G64R ミスセンスバリエーションと c.653-1G>C スプライスサイトバリエーションを有しており、p.G64R ミスセンスバリエーションのみの修復を行った。500 を超える *DOK7*-iPS 細胞修復クローンを解析し単一の遺伝子修復 *DOK7*-iPS 細胞クローンを得た。*DOK7*-iPS 筋管においても遺伝子修復 *DOK7*-iPS 筋管においても agrin によるアセチルコリン受容体 (AChR) 集積を確認できなかった。MyoD 誘導による

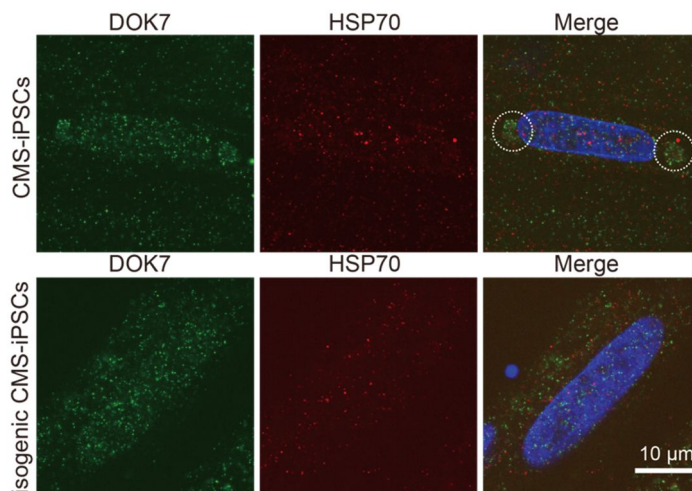


図 4. *DOK7*-iPS 細胞の核近傍の aggresomes (丸印)

iPS 筋管は C2C12 マウス筋芽細胞ならびに Hu5/KD3 ヒト筋芽細胞に比べて筋管分化能力が低く control-iPS 細胞のいずれのクローンにおいても AChR 集積を確認できていない。筋管分化能を増強する目的で C2C12 細胞の *Dok7* を CRISPR/Cas9 でノックアウトした *Dok7*-KO-C2C12 細胞を作成し、iPS 細胞と融合筋管を作製したところ、agrin による AChR 集積が可能になった。しかし、*DOK7*-iPS 細胞と遺伝子修復 *DOK7*-iPS 細胞の AChR 集積に差異を認めなかった。COS7 細胞に過剰発現した p.G64R-*DOK7* が凝集体を作り parkin, ubiquitin,  $\alpha$ -tubulin, p62 と共局在することを見出した。そこで、p.G64R-*DOK7*-iPS 細胞を精査したところ核周辺における *DOK7* 凝集を認めた(図 4)。しかし、p.G64R-*DOK7* 過剰発現 COS7 細胞と異なり HSP70 は共局在せず、p.G64R-*DOK7*-iPS 細胞による aggresome 形成は軽度であった。p.G64R は *DOK7* の PH ドメインに存在する。*DOK7* の PH ドメインで過去に報告された 4 種類のミスセンスバリエーション(p.P31T, p.A33V, p.Y71F, p.T77M)の効果を 7 種類のツールで予測したところ、多くのツールにおいて p.G64R が最も *DOK7* PH ドメインを不安定化させ、p.T77M が次の不安定化させることを示した。特に Aggrescan3D の予測性能が優れていた(*Bioinformatics*, 35: 3834, 2019)。別の遺伝子を原因とする患者由来 CMS-iPS 細胞においても aggresome の形成を確認しており iPS 細胞の解析により aggresome 形成が CMS の病態に関わっている可能性が示唆される。この aggresome を指標にして CMS に対する薬剤開発が可能であることが期待された。

- (4) *CHRNG*-CMS (Escobar 症候群)の機能解析(*Ann Clin Transl Neurol*: 2023)。3 名の Escobar 症候群はいずれも中等度の手指関節拘縮を認めたが翼状片を認めなかった。患者は *CHRNG* 遺伝子に 2 つの病的バリエーションをヘテロで有しており、P121T が共通で認められた。もう一方のバリエーションは truncation variants でありナルバリエーションであった。HEK293 細胞表面における AChR 発現の定量では P121T-AChR は正常(wt)-AChR の 80%の発現レベルであった。単一イオンチャンネル記録ではバースト持続時間が P121T-AChR は wt-AChR の 28%まで短縮していた。AChR イオンチャンネル動態解析では P121T-AChR は wt-AChR に比べてアセチルコリンの解離定数は 2.0 倍増大してただけであるがイオンチャンネルゲート定数は 44 倍減弱していた。つまり、アセチルコリンは P121T-AChR に結合

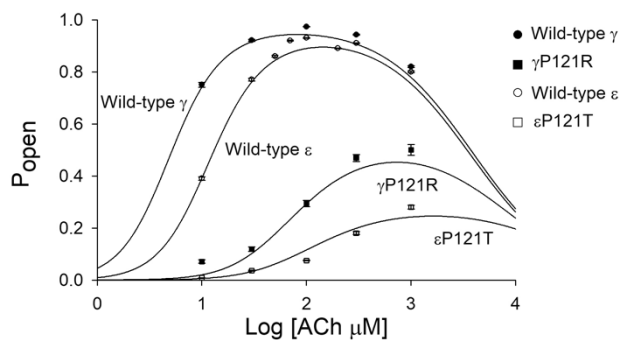


図 5. Escobar 症候群の *CHRNG* ミスセンス変異の AChR 動態解析に基づき予測されるチャンネル開口率(Popen, 実線)は実測値(シンボル)に合致する

できるもののイオンチャンネルの開口が障害されることが明らかになった。AChR チャンネル開口のアセチルコリン濃度依存性のシミュレーションにより P121T は AChR 開口確率を顕著に減少させることが明らかになり、単一イオンチャンネル記録の結果と AChR イオンチャンネル動態解析から予測される結果がほぼ一致していた。AChR チャンネル開口確率は AChR イオンチャンネル動態解析と単一イオンチャンネル記録が一致しており AChR イオンチャンネル動態解析が正しく行われたと想定した(図 5)。P121T はアセチルコリンが AChR に結合する部位に存在する。他の AChR サブユニットの病的ミスセンスバリエーションによる fast channel syndrome においても、アセチルコリン結合部位のミスセンスバリエーションがアセチルコリン解離定数ではなくイオンチャンネルゲート定数に大きな影響を与えており(*Exp Neurol*, 331: 113375, 2020, *Neurology*, 79: 449, 2012, *Neurology*, 59: 1881, 2002, *Neurology*, 54: A138, 2000, *Neuron*, 17: 157, 1996)、P121T はアセチルコリンの結合をチャンネルゲートに伝える機構の構造変化を起こすことが想定される。アセチルコリン解離定数に影響を与えるミスセンスバリエーションは胎生致死となり患者として認識されない可能性が示唆された。fast channel syndrome は 3,4-diaminopyridine, cholinesterase inhibitor,

albuterol が有効であり、治療胎児型重症筋無力症と同様に Escobar 症候群に対しても出生前治療が可能となることが期待された。

- (5) ゾニサミドによる AChR クラスタリング促進 (*Neuropharmacology*, 195: 108637, 2021)。NSC34 神経細胞の neurite elongation を指標にした既認可薬スクリーニングにより抗てんかん薬・抗パーキンソン病薬ゾニサミドが濃度依存性に NSC34 の neurite を延長させる効果があることを以前に明らかにした (*PLoS One*, 10: e0142786, 2015)。加えて、ゾニサミドは末梢神経切断マウスモデル (*PLoS One*, 10: e0142786, 2015)、頸椎症性脊髄症マウスモデル (*Sci Rep*, 10: 13138, 2020)、感覚神経障害マウスモデル (*Life Sci*, 263: 118577, 2020) に対して有効であることを明らかにしてきた。CMS では nerve sprouting により代償性に小さい NMJ が数多く作られることが患者生検筋の NMJ 解析でわかっている (*Int J Mol Sci*, 24: 3730, 2023)。ゾニサミドが nerve sprouting を促進して NMJ 信号伝達障害を改善することを期待して NSC34 神経細胞と C2C12

筋管から *in vitro* NMJ を構築しゾニサミドの効果を調べたところ、ゾニサミドは濃度依存性に AChR クラスタリングを促進することが判明した(図 6)。さらに遺伝子発現解析によりゾニサミドは *in vitro* NMJ に対してニューレギュリンの発現を誘導することにより AChR クラスタリングを誘導することを明らかにした。

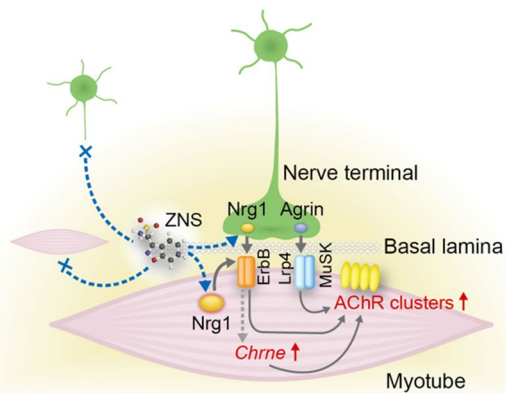


図 6. 抗てんかん薬・抗パーキンソン病薬ゾニサミド(ZNS)はニューレギュリン(Nrg1)発現を誘導することにより AChR クラスタリングを誘導する

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計25件（うち査読付論文 25件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 20件）

1. 著者名 Ohkawara Bisei, Shen XinMing, Selcen Duygu, Nazim Mohammad, Brill Vera, Tarnopolsky Mark A., Brady Lauren, Fukami Sae, Amato Anthony A., Yis Uluc, Ohno Kinji, Engel Andrew G.	4. 巻 5
2. 論文標題 Congenital myasthenic syndrome-associated agrin variants affect clustering of acetylcholine receptors in a domain-specific manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e132023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.132023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takeda Jun-ichi, Nanatsue Kentaro, Yamagishi Ryosuke, Ito Mikako, Haga Nobuhiko, Hirata Hiromi, Ogi Tomoo, Ohno Kinji	4. 巻 2
2. 論文標題 InMeRF: prediction of pathogenicity of missense variants by individual modeling for each amino acid substitution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NAR Genomics and Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 lqaa038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nargab/lqaa038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ohkawara Bisei, Kobayakawa Akinori, Kanbara Shunsuke, Hattori Takako, Kubota Satoshi, Ito Mikako, Masuda Akio, Takigawa Masaharu, Lyons Karen M, Ishiguro Naoki, Ohno Kinji	4. 巻 21
2. 論文標題 CTGF/CCN2 facilitates LRP4 mediated formation of the embryonic neuromuscular junction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e48462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201948462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kanbara Shunsuke, Ohkawara Bisei, Nakashima Hiroaki, Ohta Kyotaro, Koshimizu Hiroyuki, Inoue Taro, Tomita Hiroyuki, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Ohno Kinji	4. 巻 10
2. 論文標題 Zonisamide ameliorates progression of cervical spondylotic myelopathy in a rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13138 ~ 13138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70068-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Huang Kun, Li Jin, Ito Mikako, Takeda Jun-Ichi, Ohkawara Bisei, Ogi Tomoo, Masuda Akio, Ohno Kinji	4. 巻 13
2. 論文標題 Gene Expression Profile at the Motor Endplate of the Neuromuscular Junction of Fast-Twitch Muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 154 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2020.00154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koshimizu Hiroyuki, Ohkawara Bisei, Nakashima Hiroaki, Ota Kyotaro, Kanbara Shunsuke, Inoue Taro, Tomita Hiroyuki, Sayo Akira, Kiryu-Seo Sumiko, Konishi Hiroyuki, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Kiyama Hiroshi, Ohno Kinji	4. 巻 263
2. 論文標題 Zonisamide ameliorates neuropathic pain partly by suppressing microglial activation in the spinal cord in a mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 118577 ~ 118577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2020.118577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tawara Nozomu, Yamashita Satoshi, Takamatsu Koutaro, Yamasaki Yoshimune, Mukaino Akihiro, Nakane Shunya, Farshadyeganeh Paniz, Ohno Kinji, Ando Yukio	4. 巻 63
2. 論文標題 Efficacy of salbutamol monotherapy in slow channel congenital myasthenic syndrome caused by a novel mutation in CHRND	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Muscle & Nerve	6. 最初と最後の頁 E30 ~ E32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mus.27166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohkawara Bisei, Ito Mikako, Ohno Kinji	4. 巻 22
2. 論文標題 Secreted Signaling Molecules at the Neuromuscular Junction in Physiology and Pathology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2455 ~ 2455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Taro, Ohkawara Bisei, Bushra Samira, Kanbara Shunsuke, Nakashima Hiroaki, Koshimizu Hiroyuki, Tomita Hiroyuki, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Ohno Kinji	4. 巻 195
2. 論文標題 Zonisamide upregulates neuregulin-1 expression and enhances acetylcholine receptor clustering at the in vitro neuromuscular junction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108637 ~ 108637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2021.108637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Jun-ichi, Fukami Sae, Tamura Akira, Shibata Akihideo, Ohno Kinji	4. 巻 12
2. 論文標題 IntSplice2: Prediction of the Splicing Effects of Intronic Single-Nucleotide Variants Using LightGBM Modeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 701076 ~ 701076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2021.701076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawachi Toshihiko, Masuda Akio, Yamashita Yoshihiro, Takeda Jun ichi, Ohkawara Bisei, Ito Mikako, Ohno Kinji	4. 巻 40
2. 論文標題 Regulated splicing of large exons is linked to phase separation of vertebrate transcription factors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e107485 ~ e107485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020107485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takemoto Genta, Matsushita Masaki, Okamoto Takaaki, Ito Toshinari, Matsuura Yuki, Takashima Chieko, Chen-Yoshikawa Toyofumi Fengshi, Ebi Hiromichi, Imagama Shiro, Kitoh Hiroshi, Ohno Kinji, Hosono Yasuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Meclozine Attenuates the MARK Pathway in Mammalian Chondrocytes and Ameliorates FGF2-Induced Bone Hyperossification in Larval Zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 694018 ~ 694018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.694018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -



1. 著者名 Masuda Akio, Kawachi Toshihiko, Ohno Kinji	4. 巻 22
2. 論文標題 Rapidly Growing Protein-Centric Technologies to Extensively Identify Protein-RNA Interactions: Application to the Analysis of Co-Transcriptional RNA Processing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5312 ~ 5312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22105312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakaguchi Takefumi, Ohkawara Bisei, Kishimoto Yasuzumi, Miyamoto Kentaro, Ishizuka Shinya, Hiraiwa Hideki, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Ohno Kinji	4. 巻 50
2. 論文標題 Promethazine Downregulates Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Increases the Biomechanical Forces of the Injured Achilles Tendon in the Early Stage of Healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 1317 ~ 1327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03635465221077116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Yusuke, Hida Tetsuro, Ohkawara Bisei, Matsushita Masaki, Kobayashi Takeshi, Ishizuka Shinya, Hiraiwa Hideki, Tanaka Satoshi, Tsushima Mikito, Nakashima Hiroaki, Ito Kenyu, Imagama Shiro, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Ohno Kinji	4. 巻 592
2. 論文標題 Meclozine ameliorates skeletal muscle pathology and increases muscle forces in mdx mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 87 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koike Hiroshi, Nishida Yoshihiro, Shinomura Tamayuki, Ohkawara Bisei, Ohno Kinji, Zhuo Lisheng, Kimata Koji, Ushida Takahiro, Imagama Shiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Possible Repositioning of an Oral Anti-Osteoporotic Drug, Ipriflavone, for Treatment of Inflammatory Arthritis via Inhibitory Activity of KIAA1199, a Novel Potent Hyaluronidase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4089 ~ 4089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23084089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Kan, Nishida Yoshihiro, Hamada Shunsuke, Shimizu Koki, Sakai Tomohisa, Ohkawara Bisei, Alman Benjamin A., Enomoto Atsushi, Ikuta Kunihiro, Koike Hiroshi, Zhang Jiarui, Ohno Kinji, Imagama Shiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Efficacy of auranofin as an inhibitor of desmoid progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11918 ~ 11918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-15756-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Itaru, Matsushita Masaki, Mishima Kenichi, Kamiya Yasunari, Osawa Yusuke, Ohkawara Bisei, Ohno Kinji, Kitoh Hiroshi, Imagama Shiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Activated FGFR3 suppresses bone regeneration and bone mineralization in an ovariectomized mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 200 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-023-06318-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Shaochuan, Ohkawara Bisei, Ito Mikako, Huang Zhizhou, Zhao Fei, Nakata Tomohiko, Takeuchi Tomoya, Sakurai Hidetoshi, Komaki Hirofumi, Kamon Masayoshi, Araki Toshiyuki, Ohno Kinji	4. 巻 32
2. 論文標題 A mutation in DOK7 in congenital myasthenic syndrome forms aggresome in cultured cells, and reduces DOK7 expression and MuSK phosphorylation in patient-derived iPS cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1511 ~ 1523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddac306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mishima Kenichi, Okabe Yuka Tsukagoshi, Mizuno Masaaki, Ohno Kinji, Kitoh Hiroshi, Imagama Shiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Efficacy of soluble lansoprazole-impregnated beta-tricalcium phosphate for bone regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20550 ~ 20550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-25184-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaniya Yasunari, Matsushita Masaki, Mishima Kenichi, Ohkawara Bisei, Michigami Toshimi, Imagama Shiro, Ohno Kinji, Kitoh Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Meclozine ameliorates bone mineralization and growth plate structure in a mouse model of X-linked hypophosphatemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 39 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2022.11738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shen Xin Ming, Nakata Tomohiko, Mizuno Seiji, Imoto Issei, Selcen Duygu, Ohno Kinji, Engel Andrew G.	4. 巻 -
2. 論文標題 Impaired gating of and AChR respectively causes Escobar syndrome and fast channel myasthenia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.51756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamashita Yuri, Nakada Satoshi, Nakamura Kyoko, Sakurai Hidetoshi, Ohno Kinji, Goto Tomohide, Mabuchi Yo, Akazawa Chihiro, Hattori Nobutaka, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Derived from a Patient with Schwartz-Jampel Syndrome Revealed Distinct Hyperexcitability in the Skeletal Muscles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 814 ~ 814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11030814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bushra Samira, Lin Ying-Ni, Joudaki Atefeh, Ito Mikako, Ohkawara Bisei, Ohno Kinji, Masuda Akio	4. 巻 24
2. 論文標題 Neural Isoforms of Agrin Are Generated by Reduced PTBP1-RNA Interaction Network Spanning the Neuron-Specific Splicing Regions in AGRN	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7420 ~ 7420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24087420	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohno Kinji, Ohkawara Bisei, Shen Xin-Ming, Selcen Duygu, Engel Andrew G.	4. 巻 24
2. 論文標題 Clinical and Pathologic Features of Congenital Myasthenic Syndromes Caused by 35 Genes-A Comprehensive Review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3730 ~ 3730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043730	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計9件(うち招待講演 2件/うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Joudaki A, Takeda J, Masuda A, Ohno K
2. 発表標題 Prediction of the splicing effects of SNVs affecting the first nucleotide G of an exon
3. 学会等名 European Human Genetics Conference 2021 (Poster), Virtual Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Farshadyeganeh P, Ohkawara B, Kamon M, Araki T, Komaki H, Ohno K
2. 発表標題 Functional analysis of mutations in a glycosylation enzyme gene, GFPT1, underlying limb-girdle congenital myasthenic syndromes (CMS)
3. 学会等名 European Human Genetics Conference 2021 (Poster), Virtual Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Bushra S, Lin Y, Joudaki A, Masuda A, Ohno K.
2. 発表標題 The suppressive role for the splicing regulator, PTBP1, in the production of neuron-specific agrin isoform
3. 学会等名 American Society of Human Genetics 2021 (Poster), Virtual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohno K
2. 発表標題 Three newly identified molecules that facilitate the formation of neuromuscular junction
3. 学会等名 XIth International Symposium on Cholinergic Mechanisms, Dubrovnik, Croatia (hybrid) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ohno K
2. 発表標題 Updates on congenital myasthenic syndromes
3. 学会等名 20th Asian Oceanian Myology Center Meeting, Jakarta, Indonesia (online) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kinoshita M, Hara W, Yoshida N, Miyauchi A, Yamamoto M, Oji S, Fukaura H, Kaida K, Ohno K.
2. 発表標題 Painful muscle spasm with marked hyper-creatine kinase (CK) level after more than twenty weeks of four pregnant women with myotonic dystrophy type 1 (DM1) and a pregnant woman with paramyotonia congenita (PMC)
3. 学会等名 13th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting (Poster), Osaka, Japan (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shen XM, Nakata T, Mizuno S, Imoto I, Spilsbury PR, Swoboda KJ, Al-Mateen M, Selcen D, Ohno K, Engel AG.
2. 発表標題 Novel mutations at equivalent position in E-loops of AChR - and -subunits result in Escobar and congenital myasthenic syndrome respectively
3. 学会等名 147th American Neurology Association Annual Meeting (Poster), Chicago, IL (国際学会)
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Farshadyeganeh P, Nazim M, Ohkawara B, Masuda A, Ito M, Takeda J, Ohe K, Ohno K.
2. 発表標題 Interactions between muscle glucose homeostasis and neInteractions between muscle glucose homeostasis and neuromuscular signal transduction - Lessons learned from lack of a muscle-specific long isoform of GFPT1 -
3. 学会等名 European Human Genetics Conference 2022 (Platform), Vienna, Austria (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takemoto G, Matsushita M, Ohno K, Imagama S.
2. 発表標題 Meclozine ameliorates Fgf2-induced craniofacial bone hyperossification of larval zebrafish by attenuating MAPK pathway
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2023 Annual Meeting (Poster), Dallas, Texas, USA (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	増田 章男  (Masuda Akio)  (10343203)	名古屋大学・医学系研究科・准教授   (13901)	
研究分担者	大河原 美静  (Ohkawara Bisei)  (80589606)	名古屋大学・医学系研究科・特任准教授   (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------