

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19506

研究課題名(和文)細胞内RNA turnoverに着目した非コード領域リピート伸長病の病態解明

研究課題名(英文) Toward pathogenesis of noncoding repeat expansion disease focusing on RNA toxicity

研究代表者

石浦 浩之 (Ishiura, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40632849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：良性成人型家族性ミオクローヌステんかん1型(BAFME1)は、振戦様ミオクローヌスとてんかんを主徴とする常染色体優性遺伝疾患で、SAMD12のイントロン4においてTTTTAリピートの伸長並びに、TTTCAリピート伸長配列の挿入が同定された。

本研究では、RNAに注目して本疾患の検討を行い、患者剖検脳でUUUCAリピートからなるRNA fociが存在すること、患者リンパ芽球様細胞ではRNA fociは存在しないこと、abortive transcriptionを認めることを見いだした。またリピート配列をクロニングし培養細胞に強制発現させた。今後さらにRNAに注目した病態機序の解明が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、イントロンなどタンパク質に翻訳されないと考えられている領域に存在するリピート伸長変異が様々な神経筋疾患を引き起こすことが明らかとなり注目されている。このような疾患では、RNAを介した病態機序の存在が考えられる。良性成人型家族性ミオクローヌステんかんにおいても、これまでの検討からはRNAを介した機序が想定されている。今後研究の発展に伴い、さらに効果的な治療法の標的が同定されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Benign adult familial myoclonic epilepsy type 1 (BAFME1) is an autosomal dominant disease which is characterized by infrequent seizures and myoclonic tremor. The cause of the disease have been identified as TTTTA and TTTCA repeat expansion mutation in intron 4 of SAMD12. We focused on RNA-mediated pathomechanism in BAFME1 in this study. We identified RNA foci in autopsied brain in patients with BAFME1. RNA foci were not found in lymphoblastoid cell lines from patients with BAFME1. RNA-seq using autopsied brains revealed differentially expressed genes (40 downregulated and 44 upregulated). There seems no alternatively transcribed genes. In addition we found abortive transcription around the expanded repeats in SAMD12. We also cloned TTTTA, TTTCA, and TTTTA/TTTCA repeats in vectors and successfully expressed in HEK293 cells. Collectively, RNA-mediated toxicity is considered to play an important role in pathogenesis of BAFME and more investigation focusing on RNA metabolism should be paid.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：リピート伸長変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、神経筋疾患において、非コード領域のリピート伸長病が注目されている(図1)。非コード領域におけるリピート伸長病として、古くは、*DMPK*の3'UTRに存在するCTGリピート伸長による筋強直性ジストロフィーや*FMR1*の5'UTRに存在するCGGリピートの伸長による脆弱X症候群(FXS)などが知られてきたが、その後、脊髄小脳変性症の原因として、*ATXN10*のイントロンのATTCTリピート伸長による脊髄小脳変性症10型、*BEAN*のイントロンのTGGAAリピート伸長による脊髄小脳変性症31型、*NOP56*のイントロンのGGCCTGリピートによる脊髄小脳変性症36型が知られるようになっていく。2011年になり、家族性筋萎縮性側索硬化症・前頭側頭型認知症においても*C9orf72*のイントロンに存在するGGGGCCリピートが伸長していることが発見され、非コード領域のリピート配列の伸長に伴う疾患は、従来考えられていたよりも、非常に広い表現型を呈することが明らかとなった。

最近、我々の研究により、本邦に多い良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん(benign adult familial myoclonic epilepsy type 1, BAFME1型)において、新規の非コード領域のリピート伸長がその原因であることを明らかにした(Ishiura *et al.* Nat Genet 2018)。本疾患では、*SAMD12*遺伝子のイントロン4に存在するTTTTAリピートが短く存在する位置に、同一のTTTTAリピートの伸長に加え、1塩基異なったTTTCAリピート伸長して挿入されることが判明した。リピート長はてんかんの発症年齢と逆相関することもさらに病原性を強く支持する所見と考えられた。対照者においては、TTTTAリピートが伸長することはあるものの、TTTCAリピートが伸長する例はなく、TTTCAリピート伸長の病原性が疑われていた。

## 2. 研究の目的

良性成人型家族性ミオクローヌスてんかんにおけるRNAの挙動について検討を行う

## 3. 研究の方法

### (1) 剖検脳を用いたRNA fociの確認

ホルマリン固定パラフィン包埋切片をスライドグラス(マツナミクレストコートスライドグラス)に薄切を行う。ペンタナを用いて、プロテアーゼ処理、HCl処理を行った後、Cy3-(TGAAA)<sub>12</sub>プローブもしくはCy3-(TAAAA)<sub>12</sub>プローブ並びにCy3-(TTTTCA)<sub>12</sub>プローブもしくはCy3-(TTTTA)<sub>12</sub>プローブを100 μM/slidesの濃度に加え、37度で12時間のハイブリダイゼーションを行った。その後SSCバッファーで洗浄したのち、TOTO-3で核染色を行い、共焦点顕微鏡で観察を行った。BAFME1患者6例、対照者5例で検討を行った。

### (2) 培養細胞におけるRNA fociの確認

サザンプロットでリピート長の確認された、BAFME1症例から取得したリンパ芽球様細胞を培養し、スライドグラスに乾燥固定した。パラフォルムアルデヒドを用いて固定した後、上記と同様の方法でRNA fociの存在について検討した。

### (3) RNA-seqの解析

BAFME1症例の剖検脳(後頭葉、n=6)と対照例の剖検脳(後頭葉、n=8)を用いて、RiboZero GoldでrRNA等を除去した後、ランダムプライマーで逆転写を行ってライブラリを調整した。Illumina HiSeqを用いて100塩基ペアエンド法を用いてRNA-seqを施行した。TopHatを用いてアラインメントを行い、Cufflinksを用いて発現量解析を行った。アラインメントされたデータについてはIntegrative Genomic Viewerを用いて観察した。リード数はSAMtoolsを用いて解析した。

#### (4) リピート配列のクローニング

Recursive directional ligation (RDL)法を用いて、リピート配列のクローニングを行った。pUC19 ベクター骨格に、BglII, BtgZI, BsmFI サイトを付加した。BglII+BtgZI で切断したリピート+骨格の配列に、BglII+BsmFI で切断したリピート配列を ligation させることで、約 2 倍ずつリピート長を増大させることができる。Stbl3 もしくは SURE2 大腸菌株を用いてクローニングを行った。

#### (5) リピート配列の強制発現

リピート配列は、患者由来 DNA から PCR により取得し、pEGFP にクローニングを行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 剖検脳を用いた RNA foci の確認

Cy3-(TGAAA)<sub>12</sub> プロブを用いることで、BAFME1 患者全例のみで、核内に RNA foci の存在を確認した。本シグナルは DNase 処理では消失せず、RNase 処理では消失したことから、UUUCA リピートからなる RNA foci が存在するものと考えられた。アンチセンス鎖の Cy3-(TTTCA)<sub>12</sub> プロブでは、BAFME1 患者で RNA foci は見いだせなかった。同様に、Cy3-(TAAAA)<sub>12</sub> ならびに Cy3-(TTTTA)<sub>12</sub> プロブでは RNA foci を認めなかった。

#### (2) 培養細胞における RNA foci の確認

患者由来培養細胞（リンパ芽球様細胞）では RNA foci の存在を示すことは出来なかった。

#### (3) RNA-seq の解析

Cufflinks を用いた解析では、患者で発現量が減少する遺伝子（40 個）、発現量が上昇する遺伝子（44 個）を見いだしたが、明らかにてんかんの原因になるとわかるようなイオンチャネルや神経伝達物質の受容体遺伝子はふくまれていなかった。明らかにスプライス異常となる遺伝子は検出されなかった。

しかしながら、integrative genomic viewer による観察で、*SAMD12* のリピート上流のイントロンのリード数が、リピート下流のイントロンのリード数に比べて、患者で増大していることが判明し、abortive transcription が存在することが示唆された。これは、定量 RT-PCR 法を用いて確認された。

#### (4) リピート配列のクローニング

RDL 法により、TTTTA リピートならびに TTTCA リピートについては、14 リピート、24 リピート、 リピートのクローンを得ることが出来た。

#### (5) リピート配列の強制発現

患者由来の DNA を用いて long range PCR を行い、リピート伸長配列を増幅させることに成功し、本配列のクローニングを行った。クローニングの途中で短くなってしまったが、約 700 塩基の配列を得ることが出来た。本配列を pEGFP にクローニングを行い、配列について Sanger シーケンスで確認を行った。培養細胞 HEK293 に強制発現を行い、その発現量について定量 PCR ならびに GFP に対する抗体を用いたウェスタンブロットで定量することを可能にした。

BAFME1 の原因は、*SAMD12* のイントロンに存在する TTTTA ならびに TTTCA リピート伸長変異であることが判明しているが、今後病態の解明が望まれている。これまでの研究により、TTTCA が RNA へ転写されて生じた UUUCA リピートの細胞内における毒性が、本疾患の病態ではないかと考えられている。今後、細胞内のリピート RNA の挙動についてさらに詳細に検討を行っていくことが、本疾患の病態を理解し、効果的な治療標的を同定するために必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 石浦浩之	4. 巻 13
2. 論文標題 良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん(BAFME)の新知見	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Epilepsy: てんかんの総合学術誌	6. 最初と最後の頁 21-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 石浦浩之、辻省次	4. 巻 18
2. 論文標題 SAM12、TNRC6A、RAGEF2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 分子精神医学	6. 最初と最後の頁 247-249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 石浦浩之	4. 巻 267
2. 論文標題 良性成人型家族性ミオクローヌスてんかんの原因の解明	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 809-813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 松川美穂、石浦浩之、辻省次	4. 巻 91
2. 論文標題 繰り返し配列を有するRNA凝集と病態機序	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 451-457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石浦浩之
2. 発表標題 Pentanucleotide repeat expansion mutations in benign adult familial myoclonic epilepsy
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Matsukawa MK, Fujiyama A, Kakita A, Qu W, Ichikawa K, Shibata S, Mitsue A, Abe K, Koike R, Yasuda T, Sano A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S.
2. 発表標題 Expansions of intronic TTTCA and TTTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy
3. 学会等名 5th RNA metabolism in Neurological Disease Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Matsukawa MK, Qu W, Shibata S, Mitsue A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S.
2. 発表標題 Expansions of intronic TTTCA and TTTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME)
3. 学会等名 第52回日本てんかん学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石浦浩之、辻省次
2. 発表標題 ロングリードシーケンサーを用いた 遺伝性神経疾患の解明 -新規非コード領域リピート伸長病の発見-
3. 学会等名 日本人類遺伝学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishiura H
2. 発表標題 Molecular pathogenesis of benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME)
3. 学会等名 日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----