

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591245

研究課題名(和文) 遺伝性筋疾患の病態へのmRNA異常の関与について

研究課題名(英文) Role of abnormal RNA for the pathophysiology of hereditary muscle diseases

研究代表者

高橋 正紀(Takahashi, Masanori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20359847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：mRNA異常という観点から、遺伝性筋疾患、なかでも筋強直性ジストロフィーおよび骨格筋チャンネル異常症における病態を研究した。筋強直性ジストロフィーについては、突然死の原因として臨床的に重要である不整脈の病態機序を究明した。剖検組織においてイオンチャンネルのmRNA スプライシング異常を同定し、さらに電気生理学的解析、シミュレーションを行い不整脈との関連を明らかにした。骨格筋チャンネル異常症については、マイナーなAT-AC IIイントロンのスプライシング機構を、疾患変異をもとに明らかにした。また、骨格筋チャンネル異常症の新たな原因遺伝子を同定したことも特筆できる。

研究成果の概要(英文)：Pathomechanism of hereditary skeletal muscle diseases, especially myotonic dystrophy (DM) and channelopathies of skeletal muscle were investigated in the light of RNA abnormality. Regarding DM, the pathomechanism of arrhythmia which is clinically important as a cause of sudden death in DM, was investigated. An mRNA missplicing of ion channel was identified in DM hearts and the subsequent electrophysiological analyses and in silico simulation revealed its link with arrhythmia. Regarding the channelopathies of skeletal muscle, the molecular mechanism of the splicing of minor AT-AC II intron was investigated for the first disease mutation identified recently. It should be of note that a novel causative gene for a channelopathy of muscle was identified.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：筋強直性ジストロフィー イオンチャンネル スプライシング mRNA チャンネル病

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患の研究は、いわゆるセントラルドグマに基づき、遺伝子 (DNA) 異常により生じる翻訳産物 (タンパク) の異常を主たる対象としてこれまでなされてきた。したがって遺伝子解析は翻訳領域であるエクソンについて主に行われ、病態研究も変異タンパクの機能解析が精力的に行われてきた。いっぽう RNA については、DNA から転写された単なるコピーとしてそれほど重視されていなかった。

しかしながら、近年 mRNA スプライシングの異常が種々の遺伝性疾患の病態に関与することが明らかにされつつある。たとえば非翻訳領域であるイントロンの変異が、mRNA スプライシングの異常を生じ疾患の原因となることが示されている。さらに従来は疾患原性がないとされていた同義変異であっても、スプライス制御領域に位置したりすれば、スプライス異常を呈し疾患の原因となる例があることが示されている。

また、筋強直性ジストロフィーでは、病態機序として mRNA gain of function 仮説が提唱され、いわゆるセントラルドグマに基づく DNA 病とは異なる、RNA 病であることが明らかとなりつつある。具体的には、繰り返し塩基配列が異常に伸びた mRNA が核内に蓄積することから、スプライシング因子の量的・質的变化を引き起こし、二次的に他の多くの RNA のスプライスなどに変化が生じ、様々な症状を呈することが最近明らかになってきている。

このような背景のもと、本研究では遺伝性筋疾患なかでもイオンチャンネル病ならびに、筋強直性ジストロフィーについて RNA 異常の観点からあらたな病態を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、mRNA スプライシング機構の異常に着目し、骨格筋 Na チャネル異常症のあらたな病態を確立することを一つの目的とした。すでに我々は AT-AC11 イントロンという稀なタイプのイントロン領域の変異により、mRNA スプライシング異常が生じた骨格筋 Na チャネル異常症を見出していたことから、その病態を解明するとともに、まだ詳細が不明な AT-AC11 イントロンのスプライシング機構の一端を明らかにすることを目指した。また、RNA 病として注目されている筋強直性ジストロフィーについては、突然死の原因ともなり生命予後に最も重要な心臓伝導障害の病態を解明することを主な目的とした。

3. 研究の方法

これまでほとんど解析されていなかったイントロン領域の変異を、原因遺伝子変異の同定されていない骨格筋チャンネル病の保存ゲノム検体で検索した。スプライシング異常を呈する Na チャネル異常症を 1 例同定して

いたが、それについてはチャンネル機能など病態の解析を行った。また、この変異を導入したミニジーンを用いてスプライスの再現を行い、Na チャネル遺伝子群にみられる特殊な AT-AC11 イントロンのスプライシング機構の解明を行った。

筋強直性ジストロフィーについては、遺伝性不整脈の原因遺伝子を候補に心筋における mRNA のスプライシングを解析し、その変異チャンネルの機能を HEK 細胞の発現系でパッチクランプ法を用いて解析し、さらにコンピューターシミュレーションにより病態への関与を検討した。

4. 研究成果

イントロン領域の変異がスプライシング異常を引き起こし、ミオトニー症候群を呈した 1 例を同定しており、その分子機序について解析を行った。その結果、AT-AC11 イントロンと呼ばれる特殊なイントロンの 5' のスプライス部位の認識・決定には U1snRNP に加え、U6 snRNP の mRNA 結合が重要であることが明らかとなった。

変異が同定されていない他の検体について、イントロン領域の変異による RNA 異常を検討したが、疾患との関連性が疑われる変異は認めなかった。いっぽうで、次世代シーケンサによる網羅的解析により、周期性四肢麻痺の原因としてこれまで知られていなかった G タンパク共役型内向き整流性カリウムチャンネル遺伝子 (Kir3.4) をコードする KCNJ5 遺伝子に変異を 1 例で同定した。チャンネル機能についてアフリカツメガエル卵母細胞発現系で検討したところ、周期性四肢麻痺の原因として既知の内向き整流性カリウムチャンネル (Kir2.1) に対する電流抑制作用が認められたことから、心臓、骨格筋における病態が解明された。また、この結果は骨格筋における生理的機能が不明であった Kir3.x ファミリーについて、内向き整流性カリウム電流の量的調節というあらたな生理作用を示唆しており重要な発見である。

筋強直性ジストロフィーについては、心臓における、RNA 異常を中心とする病態を検討した。まず、心筋型 Na チャネルの mRNA スプライシング異常を見出したため、変異チャンネルを培養細胞に発現させパッチクランプ法による機能解析を行ったところ、活性化の電位依存性が脱分極側にシフトしており、いわゆる機能喪失型の変化であった。この計測結果を用い、心筋細胞興奮性のシミュレーション研究を行ったところ、QRS 幅の増大など心臓伝導障害に関与することを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

Kokunai Y, Nakata T, Furuta M, Sakata S,

Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, Ohno K, Takahashi MP. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 2014 Mar 25;82(12):1058-64. 査読有
doi: 10.1212/WNL.0000000000000239.

Koebis M, Kiyatake T, Yamaura H, Nagano K, Higashihara M, Sonoo M, Hayashi Y, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Yanagihara D, Matsuda R, Takahashi MP, Nishino I, Ishiura S. Ultrasound-enhanced delivery of Morpholino with Bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice. *Sci Rep*. 2013 Jul 22;3:2242. 査読有
doi: 10.1038/srep02242.

Oana K, Oma Y, Suo S, Takahashi MP, Nishino I, Takeda S, Ishiura S. Manumycin A corrects aberrant splicing of Cln1 in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Sci Rep*. 2013;3:2142. 査読有
doi: 10.1038/srep02142.

Charizanis K, Lee K-Y, Batra R, Goodwin M, Zhang C, Yuan Y, Shiue L, Cline M, Scotti MM, Xia G, Kumar A, Ashizawa T, Brent Clark H, Kimura T, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Gomes-Pereira M, Gourdon G, Sakai N, Nishino S, Ares Jr M, Darnell RB, Swanson M. Muscleblind-like 2 mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 2012 Aug 9;75(3):437-50. 査読有
doi:10.1016/j.neuron.2012.05.029.

Kokunai Y, Goto K, Kubota T, Fukuoka T, Sakoda S, Ibi T, Doyu M, Mochizuki H, Sahashi K, Takahashi MP. A sodium channel myotonia due to a novel SCN4A mutation accompanied by acquired autoimmune myasthenia gravis. *Neurosci Lett*. 2012 Jun 21;519(1):67-72. 査読有
doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.023. Epub 2012 May 14.

Suenaga K, Lee KY, Nakamori M, Tatsumi Y, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Du H, Ares M Jr, Swanson MS, Kimura T. Muscleblind-like 1 Knockout Mice Reveal Novel Splicing Defects in the Myotonic Dystrophy Brain. *PLoS One*. 2012;7(3):e33218. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0033218

Yoshinaga Y, Sakoda S-I, Good JM, Takahashi MP, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K, Kitamura T, Kobayashi K, Ohtsuka Y. A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J Neurol Sci*. 2012 Apr 15;315(1-2):15-9. 査読有
doi: 10.1016/j.jns.2011.12.015

Hirano M, Kokunai Y, Nagai A, Nakamura Y, Saigoh K, Kusunoki S, Takahashi MP. A novel mutation in the calcium channel gene in a family with hypokalemic periodic paralysis. *J Neurol Sci*. 2011 Oct 15;309(1-2):9-11. 査読有
doi: 10.1016/j.jns.2011.07.046

Rau F, Freyermuth F, Fugier C, Villemin JP, Fischer MC, Jost B, Dembele D, Gourdon G, Nicole A, Duboc D, Wahbi K, Day JW, Fujimura H, Takahashi MP, Auboeuf D, Dreumont N, Furling D, Charlet-Berguerand N. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Jun 19;18(7):840-5. 査読有
doi: 10.1038/nsmb.2067

Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, Tosch V, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Kokunai Y, Tsuburaya R, de la Grange P, Dembele D, Francois V, Precigout G, Boulade-Ladame C, Hummel MC, de Munain AL, Sergeant N, Laquerrière A, Thibault C, Deryckere F, Auboeuf D, Garcia L, Zimmermann P, Udd B, Schoser B, Takahashi MP, Nishino I, Bassez G, Laporte J, Furling D, Charlet-Berguerand N. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nature Medicine* 2011 Jun;17(6):720-5. 査読有
doi: 10.1038/nm.2374

Kubota T, Roca X, Kimura T, Kokunai Y, Nishino I, Sakoda S, Krainer AR, and Takahashi MP. A mutation in a rare type of intron in a sodium-channel gene results in aberrant splicing and causes myotonia. *Human Mutation* 2011 Jul;32(7):773-82. 査読有
doi: 10.1002/humu.21501

他 6 件

〔学会発表〕(計 27 件)
(招待講演)
Takahashi MP. RNA mis-splicing in myotonic disorders. The 9th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy' 2012

年9月7日 東京

Takahashi MP. Symposium - Frontiers of Neurogenetics and Neuroscience Myotonic dystrophy and RNA story. Myotonic Dystrophy Overview and the pathomechanism as an mRNA disease 第53回日本神経学会学術大会 2012年5月23日 東京(東京国際フォーラム)

(一般発表)

Kokunai Y, Itoh H, Kino Y, Li M, Nakamori M, Kimura T, Matsumura T, Fujimura H, Nukina N, Mochizuki H, Sakoda S, Horie M, Ishiura S, Imoto K, Swanson MS, Charlet Berguerand N, Takahashi MP. Altered splicing of cardiac sodium channel might be responsible for cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. 9th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, Donostia San Sebastian, Spain 2013年10月17日

他24件

〔図書〕(計 1 件)

中森雅之、高橋正紀 筋強直性ジストロフィー 筋疾患診療ハンドブック 青木正志 編集 中外医学社 176-181 2013

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/neuro1/myweb6/group04.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 正紀(TAKAHASHI Masanori)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20359847

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし