

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23659455
 研究課題名（和文） 筋強直性ジストロフィーの神経特異的スプライシング異常と治療への展開
 研究課題名（英文）
 Study on neuron-specific aberrant splicings in myotonic dystrophies
 研究代表者
 松浦 徹（MATSUURA TOHRU）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：90402560

研究成果の概要（和文）：優性遺伝性非翻訳リピート病の主要な疾患である筋強直性ジストロフィー1型（DM1）の主な病態メカニズムは、伸長 CUG を介した標的遺伝子スプライシング異常にある。Exon アレイを用いて DM1 神経筋組織における、スプライシング異常遺伝子の網羅的な解析を行った。この中で抽出された 12 個のエクソンのスプライシング異常メカニズムと、その病態メカニズムを解析した。

研究成果の概要（英文）：

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is an RNA gain-of-function disorder, in which abnormally expanded CTG repeats of *DMPK* sequester a splicing *trans*-factor MBNL1 and upregulate another splicing *trans*-factor CUGBP1. To identify a diverse array of aberrantly spliced genes, we performed the exon array analysis of DM1 muscles and brains. We analyzed by RT-PCR and found that 12 exons were aberrantly spliced. Furthermore, we studied the molecular mechanism underlying these aberrant splicings and their pathogenicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：筋強直性ジストロフィー、優性遺伝性非翻訳リピート病、スプライシング、RNA

1. 研究開始当初の背景
 優性遺伝性非翻訳リピート病の主要な疾患である筋強直性ジストロフィー1型（DM1）の

主な病態メカニズムは、伸長 CUG を介した標的遺伝子スプライシング異常にある。既に幾つかの標的遺伝子エクソンが同定されてい

るが、いまだその数は 10 余りに過ぎない。DM1 の多彩な臨床症状を考えると、更に多くの遺伝子がスプライシング異常を受けており、その病態に寄与していると考えられる。さらに、同じ優性遺伝性非翻訳リピート病として包括できる DM2, 脊髄小脳失調症 10 型 (SCA10)、脊髄小脳失調症 36 型 (SCA36) にも同様のメカニズムが存在すると思われる。

2. 研究の目的

(1) DM1 の新規異常スプライシングを同定する。(2) その異常スプライシングの分子機構を解析する。(3) それらを矯正する薬剤スクリーニングを行う。

3. 研究の方法

(1) 有効な Exon Array 解析ソフトは商用化されていないので、独自のスプライシング異常検出アルゴリズムによる Exon Array 解析ソフトの開発を行う。

(2) DM1 筋肉・脳組織を用いて、Affymetrix のプロトコールに従った Exon アレイ解析 (GeneChip Human Exon 1.0 ST Array) を施行し、網羅的に異常スプライシングを検索する。

(3) 標的遺伝子の異常スプライシングを受けるエクソンとその前後 300bp のイントロン部分を含むミニジーンを作製し、cis-element や trans 因子の解析を行う。

(4) 上記のミニジーンと遺伝子変異強発現ベクターを用いて培養細胞にトランスフェクションし異常スプライシングを再現後、960 種類の FDA 既認可薬を添加し、スプライシング異常を補正する薬剤スクリーニングを real time RT-PCR を用いて施行する。

4. 研究成果

(1) 独自のスプライシング異常検出アルゴリズムによる Exon Array 解析ソフトの開発に成

功した。国際学会で発表し、現在国際雑誌に投稿受理された (5. 主な発表論文等 ④)。

(2), (3) DM1 筋組織で 10 個の、神経組織で 2 個の新規異常スプライシングを同定した。更にその分子病態機序を解析した。国内・国際学会で発表し、一部は国際雑誌に既に投稿受理され (5. 主な発表論文等 ①)、他のものに関しては現在国際雑誌に投稿中である (図)。

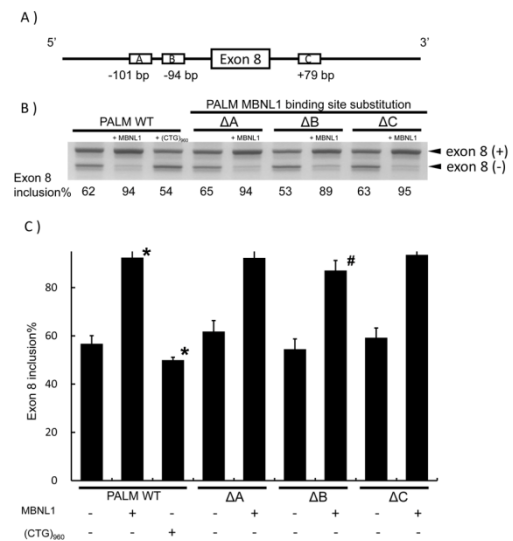


図 PALM exon8 のミニジーンを用いた異常スプライシング解析

(3) 薬剤スクリーニングの結果、異常スプライシングを矯正する薬剤を同定した。今後更なる解析を加えて、治療実用化を目指す。

(4) DM1 だけでなく、DM2, SCA10, SCA36, ALS の分子遺伝学的解析・スプライシング異常解析を行い、国内外雑誌に 8 論文を公表した。

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 8 件)
以下、全て査読あり

- ① Hernandez-Hernandez O, Guiraud-Dogan C, Sicot G, Huguet A, Luilier S, Steidl E, Saenger S, Marciniak E, Obriot H, Chevarin C, Nicole A, Revillod L, Charizanis K, Lee KY, Suzuki Y, Kimura T, Matsuura T, Cisneros B, Swanson MS, Trovero F, Buisson B, Bizot JR, Hamon M, Humez S, Bassez G, Metzger F, Buee L, Munnich A, Sergeant N, Gourdon G, Gomes-Pereira M. Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. **Brain** 2013; 136 (Pt 3):957–970.
- ② Kurosaki T, Ueda S, Ishida T, Abe K, Ohno K, Matsuura T. The unstable CCTG repeat responsible for myotonic dystrophy type 2 originates from an *AluSx* element insertion into an early primate genome. **PLoS ONE** 2012; 7: e38379.
- ③ Matsuura T, Minami N, Arahata H, Ohno K, Abe K, Hayashi YK, Nishino I. Myotonic dystrophy type 2 (DM2) is rare in the Japanese population. **J Hum Genet** 2012; 57:219-220.
- ④ #Yamashita Y, #Matsuura T (#equally contributed), Shinmi J, Amakusa Y, Masuda A, Ito M, Kinoshita M, Furuya H, Abe K, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. Four parameters increase the sensitivity and specificity of the exon array analysis and disclose twenty-five novel aberrantly spliced exons in myotonic dystrophy. **J Hum Genet** 2012; 57:368-374.
- ⑤ Morimoto N, Miyazaki K, Sato K, Kurata T, Ikeda Y, Matsuura T, Dongchon K, Ide T, Abe K. Effect of mitochondrial transcription factor A overexpression on motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis model mice. **J Neurosci Res** 2012; 90:1200-1208.
- ⑥ Ikeda Y, Nagai M, Kurata T, Yamashita T, Ohta Y, Nagotani S, Deguchi K, Takehisa Y, Shiro Y, Matsuura T, Abe K. Comparisons of acoustic function in SCA31 and other forms of ataxias. **Neurol Res** 2011; 33:427-432.
- ⑦ #Kobayashi H #Abe K #Matsuura T (#equally contributed), Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Yang LW, Okuda H, Koizumi A. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes a type of spinocerebellar ataxia (SCA36) accompanied by motor neuron involvement. **Am J Hum Genet** 2011; 89:121-130.
- ⑧ Kaneko H, Kitoh H, Matsuura T Masuda A, Ito M, Mottes M, Rauch F, Ishiguro N, Ohno K. Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in *GPATCH8*. **Hum Genet** 2011; 130:671-83.
- [学会発表] (計 2 件)
- ① Matsuura T, Kurosaki T, Muramatsu S, Shimazaki K, Ohno K, and Abe K. RNA-mediated disease mechanism of spinocerebellar ataxia type 10. 7th International Conference on Unstable

Microsatellites and Human Disease.

2012.6.9-14, Strasbourg (France)

- ② 松浦 徹、明地雄司、池田佳生、森本展年、宮崎一徳、阿部康二 小林果、小泉昭夫. 新しいALS/SCA cross road mutation AsidanのRNA病態メカニズム解析. 第53回日本神経学会学術大会、2012.5.22-25. 東京.

[その他]

ホームページ等

- ① <http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/shinkeinaika/index.htm>
- ② <http://square.umin.ac.jp/channel/sub3.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 徹 (MATSUURA TOHRU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：90402560

(2) 研究分担者

池田 佳生 (IKEDA YOSHIO)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：00282400

(3) 連携研究者

なし