

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07515

研究課題名(和文)筋強直性ジストロフィー患者脳における肉眼的および顕微鏡的病態多様性の検討

研究課題名(英文) Macroscopic and microscopic diversity of pathogenesis in the central nervous system of patients with myotonic dystrophy type 1

研究代表者

木村 卓 (Kimura, Takashi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：20441264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋強直性ジストロフィー1型(DM1)ではCTGリピートの異常伸張によるスプライシング異常が起こる。本研究では、脳の各部位、皮質白質間におけるスプライシングの程度を調べた。多くの部位で本疾患患者脳はスプライシング異常を示したが、小脳では認められなかった。また、調べた15エクソンのうち7エクソンでスプライシング異常の程度が白質より皮質で大きかった。神経細胞体で起こっているスプライシング異常によるワーラー変性のため白質障害が起こっている可能性を想定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋強直性ジストロフィーでは、骨格筋症状のほか、記憶力低下などの中枢神経症状を伴う。今回、皮質に多くのスプライシング異常が存在することが分かった。このことは画像的に白質障害が主体であるという従来の報告と解離している。この解離を説明する仮説として「研究成果の概要」で述べたワーラー変性という機序以外に、白質で別のスプライシング異常が起こっている可能性も想定している。今後皮質、白質間でのスプライシング異常の網羅的解析を計画している。本研究は、皮質白質間の違いに注目した今までにない視点からのものであり、複雑な中枢神経障害の解明につながる。

研究成果の概要(英文)：Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is caused by CTG repeats expansion, which leads to aberrant splicing. We investigated the splicing patterns in several regions of the brain and between the grey matter (GM) and white matter (WM) in DM1 patients. Compared with disease controls, the percentage of spliced-in parameter (PSI) for most of the examined exons were significantly altered in most of the brain regions of DM1 patients, except for the cerebellum. In 7 out of the 15 examined splicing events, the level of PSI change between DM1 and ALS was significantly higher in the GM than in the WM. We hypothesize that WM lesions were caused by Wallerian degeneration due to dominant aberrant splicing of the cell body.

研究分野：中枢神経疾患

キーワード：筋強直性ジストロフィー 脳 選択的スプライシング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋強直性ジストロフィーは成人で最も頻度の高い筋ジストロフィー症である。筋力低下、筋強直症などの骨格筋症状のほか、日中過眠や記憶力低下などの中枢神経症状を伴う。これらの中枢神経症状は筋力が比較的保たれている病期よりみられ、健康関連 QOL と関連することが報告されている(Laberge L et al. Eur. Neurol. 2013)。

筋強直性ジストロフィー症は Myotonin-protein kinase 遺伝子 (DMPK) の非翻訳領域に存在する CTG リピートの異常伸長が原因である。CTG リピートから転写された CUG 伸長部分でヘアピン構造を形成する事により、DMPK-RNA の細胞質への搬出が妨害されて核内に蓄積する。CUG 伸長部分に結合するスプライシング制御蛋白 (muscleblind ファミリーの MBNL1/2 など) も共に核内に閉じ込めてしまうため、種々の遺伝子のスプライシング異常が起こる(図 1)。

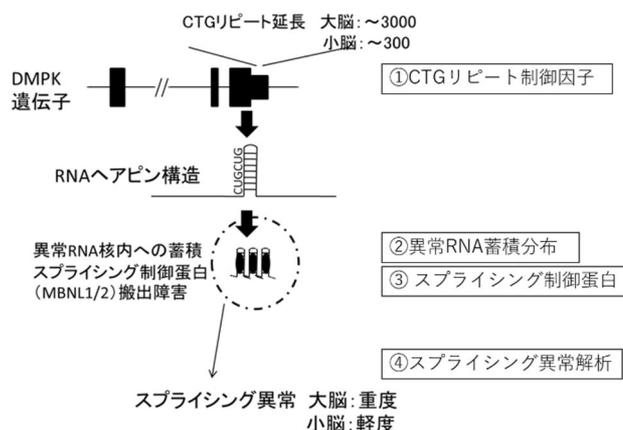


図 1 : 本症の病態および研究対象

### 2. 研究の目的

申請者らは本疾患患者脳における病態の多様性に注目した。小脳では DMPK 遺伝子の CTG リピート数が短く、CUG 伸長 RNA の核内への蓄積が少なく、スプライシング異常が起こりにくい。このような多様性を生み出すものは何か、その結果どのような病態が起こっているのかということをはっきりとすることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

DM1 患者 6 名と疾患対照として筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者 6 名の剖検脳から RNA を抽出した。胎児対照として胎児脳の RNA サンプル 2 本を用いた。前頭葉、側頭葉、海馬、小脳から RNA を抽出した。前頭葉については凍結した検体をマイクロスライサーで 20  $\mu$  m にスライスし、目視で皮質と白質に分離し RNA をそれぞれ抽出した。その RNA から cDNA を作成した。皮質・白質の分離については、それぞれに多い遺伝子の定量的 PCR を行い、皮質と白質が分かれていることを確認した。脳の各領域のスプライシングパターン、および前頭葉の皮質と白質のスプライシングパターンを調べ、エクソンの含有率を示すパーセントスプライスイン (PSI) 値を算出した。また、皮質と白質のスプライシング異常を比較するために、DM1 から ALS の PSI の平均値を差し引き、PSI 変化の平均値 (PSI) を算出した。

### 4. 研究成果

脳領域間の検討では、7 個中の 3 個のスプライシング部位で ALS と比較して DM1 は小脳を除く脳領域で PSI 値が有意に高かった。また他の 2 個の部位では全ての領域で ALS と DM1 間での PSI の有意差を認めしたが、小脳では差が少ない傾向を示していた(図 2)。残り 2 個の部位ではそれぞれ 1 領域のみで有意差を認めた。

皮質白質間での検討では、15 個中の 7 個の遺伝子で皮質の PSI が白質よりも有意に高く、

DM1 の皮質でより多くのスプライシング異常が起きていることが示唆された (図 3)。MRI を用いた研究では、DM1 の白質への影響は皮質よりも顕著であり、DM1 で T2 高信号病変が前頭葉、側頭葉の特に前側頭極、頭頂葉の白質に認められることが示されている。しかし当研究では白質よりも皮質でスプライシング異常が多かった。MBNL 遺伝子のスプライシング異常があることで、核内へ MBNL 蛋白が局在しやすくなることと RNA ヘアピン構造からの外れやすさが低下することが報告されている。また MBNL 蛋白は mRNA の輸送に関わっていることも報告されている。このことから MBNL 遺伝子のスプライシング異常により、異常スプライシングアイソフォームが軸索に運ばれにくい可能性を考えた。MRI 上で白質でより障害が強い理由として、我々は DM1 の白質病変は皮質でのスプライシング異常に伴って生じたワーラー変性による軸索損傷によるものであると考えた。

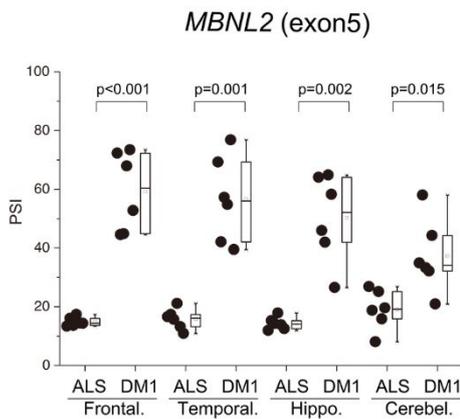


図 2 : 部位別スプライシング異常の例。前頭葉、側頭葉、海馬では有意にスプライシング異常がみられるが、小脳では見られない。Nishi, Kimura et al. PLOS ONE 2020 より改変。

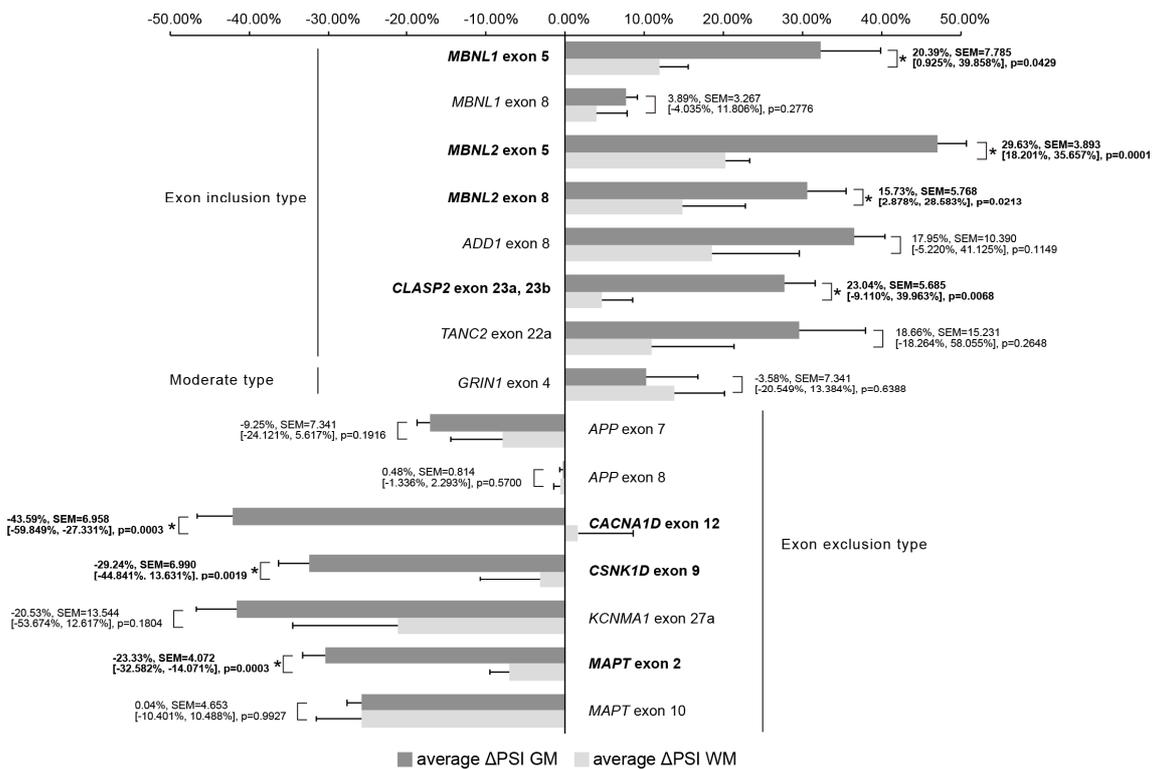


図 3 : 皮質白質間スプライシング異常の比較。調べた 15 個中の 7 個の遺伝子で皮質の PSI が白質よりも有意に高く (太字) DM1 の皮質でより多くのスプライシング異常が起きていることが示された。Nishi, Kimura et al. PLOS ONE 2020 より改変。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Nishi Masamitsu, Kimura Takashi, Igeta Masataka, Furuta Mitsuru, Suenaga Koichi, Matsumura Tsuyoshi, Fujimura Harutoshi, Jinnai Kenji, Yoshikawa Hiroo	4. 巻 15
2. 論文標題 Differences in splicing defects between the grey and white matter in myotonic dystrophy type 1 patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0224912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0224912	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nishi Masamitsu, Kimura Takashi, Furuta Mitsuru, Suenaga Koichi, Matsumura Tsuyoshi, Fujimura Harutoshi, Jinnai Kenji, Yoshikawa Hiroo
2. 発表標題 Differences In Splicing Defects Between Cortex And White Matter Of Myotonic Dystrophy Type 1 Brain
3. 学会等名 12th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西 将光, 木村 卓, 古田 充, 末永 浩一, 松村 剛, 藤村 晴俊, 陣内 研二, 芳川 浩男
2. 発表標題 Differences in splicing defects between cortex and white matter of Myotonic Dystrophy Type 1 brain
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村卓
2. 発表標題 筋強直性ジストロフィー脳におけるスプライシング異常と画像の関連
3. 学会等名 第6回筋ジストロフィーのCNS障害研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西 将光, 木村 卓, 古田 充, 未永 浩一, 松村 剛, 藤村 晴俊, 陣内 研二, 芳川 浩男
2. 発表標題 Muscleblinded-like protein 2 Splicing patterns in the brain of Myotonic Dystrophy Type 1
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 卓
2. 発表標題 筋強直性ジストロフィーのCNSにおけるスプライシング異常
3. 学会等名 第5回 筋ジストロフィーのCNS障害研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masamitsu Nishi, Takashi Kimura, Mitsuru Furuta, Koichi Suenaga, Tsuyoshi Matsumura, Harutoshi Fujimura, Kenji Jinnai, Hiroo Yoshikawa
2. 発表標題 Differences in splicing defects between cortex and white matter of Myotonic Dystrophy Type 1 brain
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masamitsu Nishi, Takashi Kimura, Mitsuru Furuta, Koichi Suenaga, Tsuyoshi Matsumura, Harutoshi Fujimura, Kenji Jinnai, Hiroo Yoshikawa
2. 発表標題 Differences In Splicing Defects Between Cortex And White Matter Of Myotonic Dystrophy Type 1 Brain
3. 学会等名 THE INTERNATIONAL MYOTONIC DYSTROPHY CONSORTIUM MEETING (IDMC-12)
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
研究 分担者	芳川 浩男  (Yoshikawa Hiroo)  (90273680)	兵庫医科大学・医学部・教授   (34519)	

	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
連携 研究者	藤村 晴俊  (Fujimura Harutoshi)  (20263246)	独立行政法人国立病院機構 刀根山病院・臨床研究部・医師   (84425)	

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
---------	---------