

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590988  
 研究課題名（和文）  
 優性遺伝性非翻訳リピート病の異常スプライシング病態研究  
 研究課題名（英文）  
 Study on aberrant splicings in dominant non-coding repeat expansion disorders  
 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：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 3 つ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。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：優性遺伝性非翻訳領域リピート病、DM1、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）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中である。

(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、現在国際雑誌に投稿中である。

(4) 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、国内特許を取得した。今後更なる解析を加えて、治療実用化を目指す。

(5) DM1だけでなく、DM2, SCA10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16論文を公表した。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計16件)

- ① 松浦 徹、阿部康二. Spinocerebellar ataxia type 10. 神経内科 2010; 72: 159-164. 差読無.
- ② 松浦 徹、大野欽司. SCA10. Clinical Neuroscience 月刊 臨床神経科学 2009; 27: 66-68. 差読無.
- ③ Kurosaki T, Matsuura T, Ohno K, Ueda S. Alu-mediated acquisition of unstable ATTCT pentanucleotide repeats in the human ATXN10 gene. *Mol Biol Evol* 2009; 26:2573-2579. 差読有.
- ④ Sato N, Amino T, Kobayashi K, Asakawa S, Ishiguro T, Tsunemi T, Takahashi M, Matsuura T, et al. Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with “inserted” penta-nucleotide repeats containing (TGGAA)<sub>n</sub>. *Am J Hum Genet* 2009 85: 544-557. 差読有.
- ⑤ Almeida T, Alonso I, Martins S, Ramos EM, Azevedo L, Ohno K, Amorim A, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB, Matsuura T, et al. Ancestral Origin of the ATTCT Repeat Expansion in Spinocerebellar Ataxia Type 10 (SCA10). *PLoS One* 2009; 4:e4553. 差読有.
- ⑥ Bian Y, Masuda A, Matsuura T, Ito M, Okushin K, Engel AG, Ohno K. Tannic acid facilitates expression of the polypyrimidine tract binding protein and alleviates deleterious inclusion of *CHRNA1* exon P3A due to an hnRNP H-disrupting mutation in congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2009; 18:1229-1237. 差読有.

- ⑦ Hagerman KA, Ruan H, Edamura KN, Matsuura T, et al. The ATTCT repeats of spinocerebellar ataxia type 10 display strong nucleosome assembly which is enhanced by repeat interruptions. **Gene** 2009; 434:29-34. 差読有.
- ⑧ 松浦 徹. 遺伝性脊髄小脳変性症. *Modern Physician* 2008; 28: 1798-1802. 差読無.
- ⑨ 松浦 徹. 脊髄小脳失調症 10 型の分子遺伝学的解析. *臨床神経学* 2008; 48:1-10. 差読無.
- ⑩ Kurosaki T, \*Matsuura T, Ohno K, Ueda S. Long-range PCR for the diagnosis of spinocerebellar ataxia type 10. **Neurogenetics** 2008; 9:151-152. 差読有.
- ⑪ Saito T, Amakusa, Y, Kimura T, Yahara O, Aizawa H, Ikeda Y, Day JW, Ranum LPW, Ohno K, Matsuura T. Myotonic dystrophy type 2 in Japan: ancestral origin distinct from Caucasian families. **Neurogenetics** 2008; 9:61-63. 差読有.
- ⑫ Gao R, Matsuura T, Coolbaugh M, Zühlke C, Nakamura K, Rasmussen A, Siciliano MJ, et al. Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. **Eur J Hum Genet** 2008; 16:215-222. 差読有.
- ⑬ Gao R, Masuda A, Matsuura T, Ohno K. Human branch point consensus sequence is yUnAy. **Nucleic Acids Res** 2008; 36:2257-2267. 差読有.
- ⑭ Masuda A, Shen XM, Ito M, Matsuura T, Engel AG, Ohno K. HnRNP H enhances skipping of a nonfunctional exon P3A in *CHRNA1* and a mutation disrupting its binding causes congenital myasthenic syndrome. **Hum Mol Genet** 2008; 17:4022-4035. 差読有.
- ⑮ Ichihara M, Murakumo Y, Masuda A, Matsuura T, Asai N, Jijiwa M, Ishida M, Shinmi J, Yatsuya H, Qiao S, Takahashi M, Ohno K. Thermodynamic instability of siRNA duplex is a prerequisite for dependable prediction of siRNA activities. **Nucleic Acids Res** 2007; 35:e123. 差読有.
- ⑯ Sahashi K, Masuda A, Matsuura T, Shinmi J, Zhang Z, Takeshima Y, Matsuo M, Sobue G, Ohno K. In vitro and in silico analysis reveals an efficient algorithm to predict the splicing consequences of mutations at the 5' splice sites. **Nucleic Acids Res** 2007; 35: 5995-6003. 差読有.
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Matsuura T. “Misregulation of diacylglycerol kinase eta (DGK  $\eta$ ) splicing as a potential cause of neuropsychiatric symptoms in myotonic dystrophy type 1” 7<sup>th</sup> International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, 2009.9.9-12, Würzburg, Germany.
- ② 松浦 徹. “筋強直性ジストロフィー1型スプライシング異常の既認可薬による制御” 第18回日本人類遺伝学会総会、2009.9.23-26, 東京
- ③ 松浦 徹. “筋強直性ジストロフィー1型(DM1)の脳特異的スプライシング異常解析” 第50回日本神経学会総会、2009.5.20-22, 仙台
- ④ 松浦 徹. “脊髄小脳失調症 10 型の分子遺伝学的解析” 第49回日本神経学

会総会 2007 年度学会賞招待講演、  
2008. 5. 15—17、横浜

- ⑤ Matsuura T. “Myotonic dystrophy type 2 in Japan: distinct ancestral origin from Caucasian families”  
6<sup>th</sup> international Myotonic Dystrophy Consortium Meeting  
2007. 9. 12-15, Milan, Italy
- ⑥ 松浦 徹. 筋強直性ジストロフィー 1 型 (DM1) の網羅的 pre-mRNA スプライシング異常解析. 第 48 回日本神経学会総会、2007. 5. 16-18、名古屋

[産業財産権]

取得状況 (計 1 件)

- ① “筋強直性ジストロフィーにおけるスプライシング異常を補正する低分子化合物”  
出願人: 国立大学法人名古屋大学 発明者: 大野欽司、松浦 徹 2009. 6. 25

[その他]

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/shinkeinaika/index.htm>

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/>

## 6. 研究組織

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

大野 欽司 (OHNO KINJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 80397455

(3) 連携研究者  
なし