

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007 ~ 2008
課題番号：19591019
研究課題名 (和文) 筋強直性ジストロフィー症におけるリアノジン受容体機能、脳スプライシング異常の解析
研究課題名 (英文) Abnormal function of aberrantly spliced ryanodine receptor and altered splicing in myotonic dystrophy brain.
研究代表者 芳川 浩男 (YOSHIKAWA HIROO) 兵庫医科大学・医学部・教授 研究者番号:90273680

## 研究成果の概要：

筋強直性ジストロフィー患者において、以前に我々が報告したリアノジン受容体スプライシング異常が、安静時、興奮時の  $Ca^{2+}$ 代謝に異常を生じさせることを新たに見出した。脳、心筋でのスプライシング異常を解析し、心筋ではリアノジン受容体タイプ2の新規スプライシング異常、脳ではリアノジン受容体タイプ1、NMDA型グルタミン酸受容体、および  $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の新規スプライシング異常を見出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
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：筋強直性ジストロフィー、スプライシング異常、リアノジン受容体、NMDA型グルタミン酸受容体、 $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II

## 1. 研究開始当初の背景

筋強直性ジストロフィー症は成人でもっとも頻度の高い筋ジストロフィー症であり、筋強直や進行性の筋萎縮のほか、白内障、不整脈、耐糖能異常、禿頭、認知機能障害などの各種の症状を呈する全身疾患である。本疾患はある種のリン酸化酵素 (DMPK) 遺伝子の非翻訳領域でのCTGリピートの延長によっておこるが、その下流に種々のスプライシング異常があることが知られている。我々は本疾患で筋萎縮がおこるメカニズムとして細胞内  $Ca^{2+}$ 代謝異常に着目し、 $Ca^{2+}$ 代謝

に重要な役割を果たしているリアノジン受容体タイプ1 (RyR1) および小胞体  $Ca^{2+}$ ポンプのスプライシング異常を報告してきた。しかしこのスプライシング異常が筋肉での  $Ca^{2+}$ 代謝にどのように影響するかについては十分に検討されていなかった。一方本疾患で見られる不整脈、認知機能障害につながる脳、心筋でのスプライシング異常についてはいまだ不明な部分が多かった。

## 2. 研究の目的

(1) RyR1スプライシング異常の興奮収縮連

### 関に与える影響の検討

筋肉での RyR1 スプライシング異常が実際に Ca<sup>2+</sup>代謝にどのように影響を与えるかについて明らかにする。

#### (2) モデルマウス筋での RyR1 機能解析

今までの我々の研究では、HEK 細胞、マウス筋管細胞への発現によって RyR1 機能をみているが、成熟筋細胞での機能差については知られていない。筋強直性ジストロフィーモデルマウス筋でも RyR1 スプライシング異常は起こっており、この筋でどのような RyR1 機能の異常があるかを解析する。

#### (3) RyR1 受容体スプライシング部位近傍の遺伝子変異体の機能的解析

RyR1 は、悪性高熱症、セントラルコア病の原因遺伝子である。スプライシング部位の極近くにセントラルコア病の遺伝子変異が見つかっている。セントラルコア病および筋強直性ジストロフィー病態解明のため、この遺伝子変異が RyR1 の機能に与える影響を調べる。

#### (4) 筋強直性ジストロフィー患者脳、心筋での新規スプライシング異常の探索

本症でみられる認知機能障害、不整脈の病態機序を解明するため、脳、心筋での新規スプライシング異常を検索する。

### 3. 研究の方法

#### (1)

RyR1 の発現していない筋管細胞に正常および変異 RyR1 を発現させた。パッチクランプ法、および細胞内 Ca<sup>2+</sup>蛍光試薬を用いて電位変化による細胞内 Ca<sup>2+</sup>を測定した。

#### (2)

モデルマウス骨格筋より筋小胞体分画を精製し、活性依存的にリアノジンが RyR1 に結合する性質を利用したリアノジンバイディングアッセイを用いて、RyR1 の開口確率を測定した。

#### (3)

正常および変異 RyR1 を HEK293T 細胞に磷酸カルシウム法を用いて発現させる。細胞を回収、ホモジナイズ後、マイクロゾーム分画をとる。リアノジンバイディングアッセイをおこない、RyR1 の開口確率を測定する。

#### (4)

インフォームドコンセントを得て採取した剖検脳、心筋から RNA を抽出し、RT-PCR 法により、スプライシング異常を解析した。検索遺伝子としては、15 遺伝子、24 エクソンについて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1)

変異 RyR1 では、安静時の Ca<sup>2+</sup>放出は低下しており、脱分極刺激時の Ca<sup>2+</sup>放出は増加していた。スプライシング部位のごく近傍に 5 個の塩基性アミノ酸が連続している領域があり、この部分が興奮収縮連関に関与していることが、我々および他のグループによって報告されているが、スプライシング変異により興奮収縮連関の異常が起こる可能性を考えた。またこれらの Ca<sup>2+</sup>放出異常が、筋強直性ジストロフィー症での筋力低下の原因になる可能性を考えた。

#### (2)

筋強直性ジストロフィーモデルマウス筋の検討では、予想に反して、モデルマウス筋と正常マウス筋ではリアノジンバイディングアッセイで見える限り機能差は認めなかった。この原因としてはどちらのマウスでも RyR1 の二つのスプライシングアイソフォームは発現しており、その機能差をあわせたものを見ているため、違いを認めなかった可能性を考えている。しかしより詳細な検討が必要であり、今後も引き続き検討していく予定である。

#### (3)

スプライシング部位近傍のセントラルコア病の遺伝子変異体の解析では、正常 RyR1 と変異 RyR1 の間に機能的な差は認められなかった。また ATP など RyR1 の agonist に対する反応を調べたがこれについても正常と変異体の間で明らかな差異をみとめなかった。このことは、セントラルコア病の遺伝子変異であっても、通常の方法では機能的な違いを見出せない可能性を示しており、より詳細な機能的解析、あるいは薬剤などによる負荷試験の必要性を示している。今後も引き続き検討していく予定である。

#### (4)

筋強直性ジストロフィー患者の心筋ではリアノジン受容体タイプ 2 の 24+というアイソフォームがコントロールと比べ有意に増加していた。筋強直性ジストロフィー患者脳では RyR1 のエクソン 83、NMDA 型グルタミン酸受容体エクソン 5、エクソン 21 をそれぞれ含むアイソフォームがコントロールと比べ有意に増加していた。患者脳で Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II δ 9 アイソフォームがコントロールと比べ有意に増加していた (図 1)。これらのスプライシング異常を起こすメカニズム、スプライシング異常による影響なども検討中である。

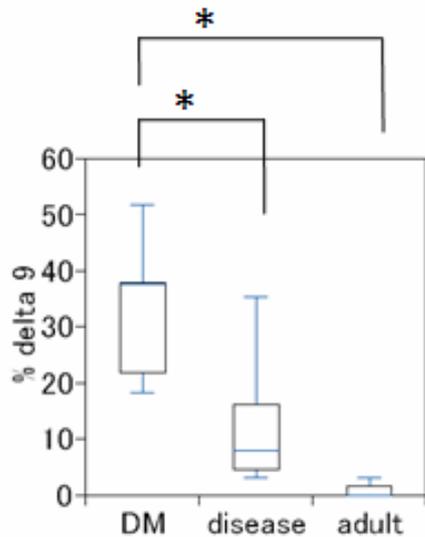


図1 筋強直性ジストロフィー症患者脳での  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II $\delta$  のスプライシング異常。筋強直性ジストロフィー患者 (DM) 群では adult 群、disease 群に比して、delta9 の割合が有意に増加していた。

#### 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 15 件)

1. Kimura T, Lueck JD, Harvey PJ, Pace SM, Ikemoto N, Casarotto MG, Dirksen RT, Dulhunty AF. Alternative splicing of RyR1 alters the efficacy of skeletal EC coupling. *Cell Calcium*, 45, 264-74, 2009, 査読有
2. Beard NA, Wei L, Cheung SN, Kimura T, Varsányi M, Dulhunty AF. Phosphorylation of skeletal muscle calsequestrin enhances its  $\text{Ca}^{2+}$  binding capacity and promotes its association with junctin. *Cell Calcium*, 44, 363-73, 2008, 査読有
3. Wei L, Abdellatif YA, Liu D, Kimura T, 以下 5 名省略. Muscle-specific GSTM2-2 on the luminal side of the sarcoplasmic reticulum modifies RyR ion channel activity. *Int J Biochem Cell Biol.*, 40, 1616-28, 2008, 査読有
4. Nakamori M, Kimura T, 以下 6 名省略. Aberrantly spliced alpha-dystrobrevin alters alpha-syntrophin binding in myotonic dystrophy type 1. *Neurology*, 70, 677-85, 2008, 査読有
5. Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, Yoshikawa H, 以下 6 名省略. Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.*, 28, 445-449, 2008, 査読有
6. Yoshihara T, Taguchi A, Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi-Taura A, Soma T, Stern DM, Yoshikawa H, 以下 4 名省略. Increasing in circulating CD34-positive cells in patients with angiographic evidence of moyamoya-like vessels. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.*, 28, 1086-89, 2008, 査読有
7. Sakae N, Yamasaki N, Tsukada T, Yamada M, Yoshikawa H, 以下 6 名省略. Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ-1 manifest hyperactivity and enhanced responsiveness to psychostimulants. *Hum Mol Genet.*, 17, 3191-203, 2008, 査読有
8. Eto M, Sumi H, Fujimura H, Yoshikawa H, Sakoda S, Pioglitazone promotes peripheral nerve remyelination after crush injury through CD36 upregulation. *J Peripher Nerv Syst.* 13, 242-8, 2008, 査読有
9. Kimura T, Pace SM, Wei L, Beard NA, Dirksen RT, Dulhunty AF. A variably spliced region in the type 1 ryanodine receptor may participate in an inter-domain interaction. *Biochem J.*, 401, 317-24, 2007, 査読有

10. Goonasekera SA, Beard NA, Groom L, Kimura T, 以下 5 名省略. Triadin binding to the C-terminal luminal loop of the ryanodine receptor is important for skeletal muscle excitation contraction coupling. *J Gen Physiol.*, 130, 365-78, 2007, 査読有
11. Nakamori M, Kimura T, Fujimura H, Takahashi MP, Sakoda S. Altered mRNA splicing of dystrophin in type 1 myotonic dystrophy. *Muscle Nerve.*, 36, 251-7, 2007, 査読有
12. Ikezoe K, Nakamori M, Furuya H, Arahata H, Kanemoto S, Kimura T, 4 名省略, Kira J. Endoplasmic reticulum stress in myotonic dystrophy type 1 muscle. *Acta Neuropathol.*, 114, 527-35, 2007, 査読有
13. Koike H, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Katsuno M, Tanaka F, Watanabe H, Doyu M, Yoshikawa H, Sobue G. Nonmyelinating Schwann cell involvement with well preserved unmyelinated axons in CMT1A. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 66:1027-1036, 2007, 査読有
14. Kida Y, Tachibana H, Takeda M, Yoshikawa H, Okita T. Recognition memory for unfamiliar faces in Parkinson's disease: Behavioral and electrophysiologic measures. *Parkinsonism and Related disorders.*, 13, 157-164, 2007, 査読有
15. 辰巳美晶、辰巳由記、芳川浩男、*inadマウス*における末梢神経病変。末梢神経 *Peripheral Nerve.*, 18, 53-60, 2007, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 高橋正紀, 中森雅之, 木村卓, 久保田智哉, 松村剛, 隅寿恵, 藤村晴俊, 佐古田三郎、筋強直性ジストロフィー症における  $\alpha$ -dystrobrevin スプライシング異常、第 49 回日本神経学会総会、平成 20 年 5 月 15-17 日、横浜

- ② 木村卓, 中森雅之, 高橋正紀, 松村剛, 藤村晴俊, 陣内研二, 芳川浩男、筋強直性ジストロフィー脳、心筋におけるスプライシング異常の検討、第 49 回日本神経学会総会、平成 20 年 5 月 15-17 日、横浜

- ③ Kimura, T., Nakamori, M., Takahashi, M. P., Yoshikawa, H., Sakoda, S., and Dulhunty, A. F., A variably spliced region of Ryanodine receptor 1 may be involved in excitation-contraction coupling., 6<sup>th</sup> International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, 平成 19 年 9 月 12-15 日, イタリア, ミラノ

- ④ 木村卓, 中森雅之, 高橋正紀, Dulhunty Angela F., 芳川浩男, 佐古田三郎、筋強直性ジストロフィー症にみられるリアノジン受容体機能異常のメカニズム、第 48 回日本神経学会総会、平成 19 年 5 月 16-18 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

芳川 浩男 (YOSHIKAWA HIROO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90273680

### (2) 研究分担者

木村 卓 (KIMURA TAKASHI)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20441264