

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390266

研究課題名（和文）神経筋接合分子欠損症における mRNA 病態研究と治療法開発研究

研究課題名（英文）Analysis of mRNA metabolisms and therapeutic interventions for defects in neuromuscular signal transduction

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

先天性筋無力症候群において同定をしたアセチルコリン受容体 α サブユニット遺伝子 *CHRNA1* のスプライシング変異部位にスプライシング抑制因子 hnRNP L が結合をすることを同定した。次に、先天性筋無力症候群の一型である終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症モデルマウスに対して AAV-COLQ ウィルスによるタンパク標的治療法が著効を示すことを、行動解析に加えて電気生理学的、組織化学的、生化学的に検証し報告した。

研究成果の概要（英文）：

We previously reported a splicing mutation in exon P3A of *CHRNA1*. We here identified that hnRNP L binds to the mutant site and suppresses splicing of exon P3A. We also reported that intravenous and intramuscular administration of AAV-COLQ to *Colq*^{-/-} mice improved motor functions, as well as electrophysiological, histochemical, and biochemical features.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：神経遺伝情報学

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：先天性筋無力症候群、スプライシング異常、protein-anchoring therapy

1. 研究開始当初の背景

神経筋接合部はプロトタイプシナプスとしてシナプス電気生理機構ならびにシナプス分子構築機構が古くから精力的に研究が行われてきており最も解明が行われてきたシナプスである。神経筋接合に発現をする分子の先天的な遺伝子変異による神経筋接合

部信号伝達異常は筋力低下・易疲労性・筋萎縮・顔面小奇形を特徴とする先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndromes, CMS) を惹き起こす。CMS は欠損する分子の部位により、前シナプス型、シナプス型、後シナプス型に分類される。CMS において同定をされてきた変異分子は (i) ニコチン作

動性筋アセチルコリン受容体 (muscle nicotinic acetylcholine receptor, AChR)、(ii) AChR を筋終板に集積をさせるラプシン (rapsyn)、(iii) 神経終末より放出をされ AChR クラスター形成を促進するアグリン (agrin)、(iv) Agrin のシグナルを受容し AChR クラスター形成を促進する MuSK7、(v) MuSK と協調をして AChR クラスター形成に作用をする Dok-7、(vi) 筋終板の AChR の脱分極を骨格筋全般に伝播する電位依存性筋ナトリウムチャンネル (voltage-gated muscle sodium channel, Nav1.4)、(vii) アセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase, AChE) をシナプス基底膜に係留をするコラーゲン Q (collagen Q, ColQ)、(viii) 神経終末から再取り込みをされたコリンからアセチルコリン (ACh) を再合成するコリンアセチルトランフェラーゼ (choline acetyltransferase, ChAT)、(ix) 糖タンパク合成基質 UDP-GlcNAc 合成の律速酵素 glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (GFAT) がある。

さらに、ヒトは胎生 33 週までは AChR ϵ サブユニットの代わりに AChR γ サブユニットを使う γ -AChR を神経筋接合において発現しているため、AChR γ サブユニットの先天的な遺伝子変異は fetal akinesia deformation sequence (FADS) を惹き起こす。また、AChR α サブユニットと AChR δ サブユニットの変異によっても FADS が起きることが報告されている。また、シナプス基底膜に集積し ColQ や dystroglycan をはじめとする数多くの分子との結合が知られている パールカン (perlecan) の欠損は Schwartz-Jampel 症候群の原因となる。興味深いことに agrin 受容体である LRP4 の遺伝子変異は神経筋接合部信号伝達障害ではなく、Cenani-Lenz 合指症候群 (Cenani-Lenz syndactyly syndrome) の原因となる。Lrp4 ノックアウトマウスも多指症の表現型を取ることが報告されている。

これら遺伝性疾患に加えて、神経筋接合部分子は自己免疫疾患の標的にもなり、アセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) ・筋特異的受容体チロシンキナーゼ (muscle-specific receptor tyrosine kinase, MuSK) ・ LDL receptor-related protein 4 (LRP4) に対する自己抗体は重症筋無力症の原因になる。さらに、AChR α サブユニットのプロモータ領域の SNP が若年発症の重症筋無力症の発症を 2.01 倍から 2.35 倍増加させることが報告されている。この SNP は、胸腺上皮細胞における AChR α サブユニットの発現を減弱させ、T 細胞の AChR に対する免疫寛容を成立させにくくすることにより重症筋無力症の発症確率を上げる。神経終末の P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネル

(P/Q-type voltage-gated calcium channel, VGCC) に対する自己抗体はランバート・イートン筋無力症候群 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome) を惹き起こす。同様に神経終末の電位依存性カリウムチャンネル (voltage-gated potassium channel, VGKC) に対する自己抗体は Isaac's 症候群 (神経ミオトニア, neuromyotonia) の原因となる。さらに、神経筋接合部分子を標的とする病態として、サリンや有機リン農薬などの AChE 阻害作用、蛇毒 α バンガロトキシンや植物毒クラレの AChR 阻害作用、ボツリヌス毒の SNARE 複合体阻害作用が知られている。

2. 研究の目的

(1) 先天性筋無力症候群における splicing 異常に関与する *trans*-factors の同定

研究代表者らは先天性筋無力症候群において *CHRNA1* 遺伝子 exon P3A に 23G>A 変異を同定し、この変異がスプライシング異常を惹起することを報告してきた。本研究の目的はこの変異部位に結合をする splicing *trans*-factor を同定するとともにその分子作用機構を明らかにすることである。メンデル遺伝性疾患ならびに疾患関連 SNP には本変異のようにエクソン上に存在するにも関わらずスプライシング異常を起こすことにより病態に関与するものが複数知られている一方、多くの変異のスプライシングに対する効果は見逃されている。本研究はこのようなエクソン上のスプライシング変異の一例の詳細な分子病態機構を解明することを目的とした。

(2) 先天性筋無力症候群に対するタンパク標的治療法 (protein anchoring therapy) の開発

遺伝子治療は細胞レベルの分子欠損を補正し細胞機能を正常化する有用なツールである。しかし、遺伝子を標的臓器・標的細胞にターゲティングをする効率のよい方法が存在しないために限られた疾患のみに臨床応用がなされてきた。研究代表者らはアセチルコリンエステラーゼ 12 分子と collagen Q 3 分子からなる細胞外分子 AChE/ColQ 複合体は ColQ の perlecan ならびに MuSK に結合をする能力により標的となるシナプス基底膜へ anchoring をすることを見出した。この細胞外マトリックス分子特有の機能を活用し、一部の筋細胞もしくは ectopic な筋細胞に発現をした AChE/ColQ がタンパク自身が持つ anchoring signals を用い広く神経筋接合部シナプス基底膜に係留することが期待される。そこでアデノ随伴ウイルスにヒト *COLQ* を組み込み *Colq^{-/-}* マウスに対して遺伝子治療を行い、本 protein-anchoring strategy の有効性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 先天性筋無力症候群における splicing 異常に関与する *trans*-factors の同定

① まず、結合 *trans*-factor 予測プログラム ESE finder, Rescue ESE を用いて候補分子を絞る。また、UV crosslinking 後の SDS-PAGE、及び、RNA beads を用いた affinity purification の SyproRuby staining で結合タンパクの分子量を推定し、候補分子を絞り、Western blotting により確認を行う。② 候補分子法による分子の同定が困難な時には、affinity purified product の質量分析により *trans*-factor の同定を行う。③ splicing *trans*-factor の knock-down、ならびに、過剰発現が標的遺伝子 pre-mRNA splicing に与える影響を調べる。④ MS2-coat protein と splicing *trans*-factor の fusion product を用いて、splicing *trans*-factor が変異部位に結合することを証明する。⑤ 同定された *trans*-factor のドメイン構造を調べる。

(2) 先天性筋無力症候群に対するタンパク標的治療法 (protein anchoring therapy) の開発

ヒト COLQ を AAV ベクターに組み込み、骨格筋と肝臓に親和性の高い serotype 8 capsid を用いて作成をした AAV8-COLQ ウィルス粒子を Colq ノックアウトマウスに投与し、電気生理学的検討・組織化学的検討・生化学的検討により運動障害改善効果の分子生物学的な裏づけを得る。

4. 研究成果

(1) 先天性筋無力症候群における splicing 異常に関与する *trans*-factors の同定

アセチルコリン受容体 α サブユニット遺伝子 *CHRNA1* exon P3A の 23 番目の塩基を G から A に変異をさせる 23G>A の部位に結合をする splicing *trans*-factor の同定を行なった。UV crosslinking 後の SDS-PAGE、及び、RNA affinity purification にて結合タンパクの分子量を推定し、hnRNP L を候補分子として Western blotting により確認をした。同時に 23G>A 変異は hnRNP LL の結合能を獲得することを同定した。人工的に塩基配列を置換することにより 23G>A 変異は hnRNP L との結合能を保持するにも関わらず新たに hnRNP LL 結合能を獲得するために hnRNP L と hnRNP LL の競合により hnRNP L が結合できなくなることを実証した。さらに hnRNP L と hnRNP LL のノックダウンならびに抗体によるこれら因子の吸着実験により hnRNP L は exon P3A のスキッピングを誘導し、hnRNP LL は exon P3A の認識を誘導することを実証した。さらに MS2-coat protein と hnRNP L/hnRNP LL のフュージョン遺伝子を作成することによりこれらの因子は 23G>A の部位に特異的に作用することを明らかにした。さらに hnRNP L

と hnRNP LL の各種ドメイン欠変異を導入することに hnRNP L にのみ存在する proline-rich region が hnRNP L による exon P3A スキッピングに関与することを証明した。

(2) 先天性筋無力症候群に対するタンパク標的治療法 (protein anchoring therapy) の開発

先天性筋無力症候群の一型である終板アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 欠損症は AChE をシナプス基底膜に係留する collagen Q (ColQ) 分子の先天性な欠損によっておきる。本症に対してタンパク標的治療法 (protein-anchoring therapy) の有用性の検証を行った。ヒト COLQ を AAV ベクターに組み込み、骨格筋と肝臓に親和性の高い serotype 8 capsid を用いて作成をした AAV8-COLQ ウィルス粒子を Colq ノックアウトマウスに尾静脈より投与した。電気生理学的検討にて MEPP 減衰時間の正常化、反復神経刺激における CMAP 減衰の改善、筋終板電位の正常化を認め、組織化学的検討にて観察をしたすべての神経筋接合部において AChE/ColQ 複合体の発現を認めた。さらに生化学的検討にて骨格筋 AChE/ColQ 複合体は正常の 89% まで回復をしており、その分子構成も正常化していた。さらに運動機能も正常マウスと同等まで治療後 3 週で回復し、最高 1 年半効果が持続した。次に、全身への移行が少ない AAV1-COLQ を作成し一側下肢に筋注を行い AChE/ColQ 複合体の四肢筋への分布を確認した。さらに精製 AChE/ColQ 複合体を大量に作成し Colq^{-/-}マウス臀筋に持続的に筋肉注射を行い AChE/ColQ 複合体の前肢を含む全身骨格筋への分布を確認した。タンパク分子自身が標的組織への親和性を持つ細胞外分子の特徴を生かした protein-anchoring therapy の有用性を終板 AChE 欠損症モデルマウスで実証し他の細胞外分子欠損症に応用が可能である可能性を示した。

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 11 件)

1. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K. Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Mol Ther* in press. (査読有)

2. 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* in press. (査読有)
 3. Yoshinaga H, Sakoda S, 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, 315: 15-19. (査読有)
 4. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Scientific Reports* 2012, 2: 209. (査読有)
 5. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Nishida H, Mabuchi N, Engel A G, Ohno K. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 2011, 77:1819-1826. (査読有)
 6. 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, 130:671-683. (査読有)
 7. Itoh T, Hamada N, Terazawa R, Ito M, Ohno K, Ichihara M, Nozawa Y, Ito M. Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon gamma-induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 411:143-149. (査読有)
 8. Fu Y, Masuda A, Ito M, Shinmi J, Ohno K. AG-dependent 3'-splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon. *Nucleic Acids Research* 2011, 39: 4396-4404. (査読有)
 9. Selcen D, Juel VC, Hobson-Webb LD, Smith EC, Stickler DE, Bite AV, Ohno K, Engel AG. Myasthenic syndrome caused by plectinopathy. *Neurology* 2011, 76: 327-336. (査読有)
 10. 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. (査読有)
 11. Milone M, Shen XM, Selcen D, Ohno K, Brengman J, Iannaccone ST, Harper CM, Engel AG. Myasthenic syndrome due to defects in rapsyn: Clinical and molecular findings in 39 patients. *Neurology* 2009, 73: 228-235. (査読有)
- [学会発表] (計 9 件)
1. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Hishida H, Mabuchi N, Engel AG, Ohno K. Anti-MuSK antibodies in myasthenia gravis block binding of collagen Q to MuSK expressed at the neuromuscular junction
41st Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC, USA

- Nov 15, 2011
2. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K
Protein-anchoring therapy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction
4th International Congress of Myology, Lille, France
May 9, 2011(Invited Presentation)
 3. Sugiyama A, Ito M, Nakata T, Azuma Y, Masuda A, Okumura A, Komaki H, Ohno K
Mutations at the C-terminal domain (CTD) of collagen Q (ColQ) causing acetylcholinesterase (AChE) deficiency prevent anchoring of ColQ to the neuromuscular junction (NMJ)
40th Annual Meeting, Society for Neuroscience, San Diego, USA
Nov 13-17, 2010
 4. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K
rAAV8-Mediated Protein-Anchoring Therapy for Targeting Collagen Q-Tailed Acetylcholinesterase to the Neuromuscular Junction
American Society of Gene & Cell Therapy
13th Annual Meeting, Washington DC, USA
May 17-22, 2010
 5. Ohno K
Degeneracy of splicing *cis*-elements and tolerance to disease-causing mutations
2nd GCOE International Symposium, Nagoya, Japan
Nov 26-27, 2009(Invited Presentation)
 6. Rahman MA, Masuda A, Ito M, Ohno K
A mutation on a nonfunctional exon P3A in *CHRNA1* identified in a patient with congenital myasthenic syndrome loses binding affinity for a splicing-suppressing hnRNP L and gains binding affinity for a splicing-enhancing hnRNP LL
2nd GCOE International Symposium, Nagoya, Japan
Nov 26-27, 2009
 7. Fu Y, Masuda A, Ito M, Ohno K
AG-independence of the 3' splice site determines tolerance to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon
2nd GCOE International Symposium, Nagoya, Japan
Nov 26-27, 2009
 8. Ohno K
Molecular mechanisms and regulations of congenital neuromuscular transmission defects
Université Paris Descartes Séminaire, Paris, France
Jul 6, 2009
 9. Ohno K, Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Takeda S, Krejci E
Protein anchoring therapy for endplate acetylcholinesterase deficiency
Eighth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, France
Jul 3-4, 2009
- [図書] (計 4 件)
1. Ohno K, Ito M, Engel AG. Congenital Myasthenic Syndromes – Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular

- Junction – *Myopathy*. InTech, Rijeka, in press. (査読有)
2. Engel AG, Shen X-M, Ohno K, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes. *Myasthenia gravis and myasthenic disorders 2nd ed*. Ed. by Engel AG. Oxford University Press, New York, in press.
 3. Ohno K, Engel AG. Chapter 8: Molecular defects of acetylcholine receptor subunits in congenital myasthenic syndromes. *Pharmacology of Nicotinic Acetylcholine Receptors from the Basic and Therapeutic Perspectives*. Ed. By Hugo R. Arias. Research Signpost, Kerala, 2011, pp175-186.
 4. Ohno K, Masuda A. RNA pathologies in neurological disorders. *Neurochemical Mechanisms in Disease, Advances in Neurobiology*. Ed by Abel Lajtha. Springer, New York, 2011, pp399-415.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

増田 章男 (MASUDA AKIO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10343203

伊藤 美佳子 (ITO MIKAKO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60444402

(3) 連携研究者

なし