

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591258

研究課題名(和文)筋強直性ジストロフィー症における中枢神経スプライシング異常の分子機序の解明

研究課題名(英文)Molecular pathogenesis of myotonic dystrophy in the central nervous system

研究代表者

木村 卓(Takashi, Kimura)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20441264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究から、筋強直性ジストロフィー患者脳におけるスプライシング異常は、スプライシング制御蛋白であるMBNL1/MBNL2の核内への蓄積によって起こり、MBNL2の関与がより大きいことが分かった。脳の各部位での比較では、前頭葉、側頭葉、海馬では同程度のスプライシング異常を認めたが、小脳ではほとんど認めなかった。CTGリピートが短いことが、スプライシング異常が小脳で起こりにくい原因の可能性もある。また小脳でDMPK蛋白の発現量が少ないことが、病理学的な異常が小脳で起こりにくいことと関係があるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We showed that nuclear sequestration of alternative splicing factors, muscleblind-like 1 (MBNL1) and MBNL2 explains splicing defects observed in human myotonic dystrophy type 1 (DM1) brain and the contribution of MBNL2 is greater than that of MBNL1. We found similar splicing defects in frontal cortex, temporal cortex, and hippocampus, but not in cerebellum from DM1 patients. It is probable that the shortest CTG repeat expansion could contribute to the lack of splicing defects in DM1 cerebellum. Also, the less expression of DMPK protein might be related with the fact that pathological abnormalities were not found in the DM1 cerebellum.

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 中枢神経症状 スプライシング異常 MBNL1/2

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最も頻度の高い筋ジストロフィー症であり、骨格筋(強直、萎縮)、心筋(伝導障害)そして脳(性格変化、認知症)などに多彩な症状を引き起こす。本症における遺伝子異常は 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である。これにより生じた DMPK 転写物は長くなったりリピート部分でヘアピン構造を形成する事により細胞質への搬出が妨害され核内に蓄積する。この際、伸長リピート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)を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を引き起こす。したがって MBNL1 や MBNL2 などの下流にあるスプライシング調節蛋白の動態を検索する事は、本症の病態発生や治療を考える上で極めて重要になる。

MBNL1 と MBNL2 の発現比較に関するこれまでの報告では、骨格筋では MBNL1 優位であり、MBNL1 ノックアウトによって多くの筋症状が再現できる事が知られている。一方脳では、MBNL1, MBNL2 両方が発現しており、どちらも病態に関わっていると考えられるが、その役割は十分解明されていない。その理由として、a)患者脳検体の入手が困難、b)病態を正確に再現するモデルマウスが未だ存在しない、c)スプライシング調節の脳各部位での多様性、が挙げられた。

2. 研究の目的(箇条書き)

(1) DM1 患者およびノックアウトマウス(MBNL1 並びに MBNL2)の脳におけるスプライシング異常プロファイルの作製
MBNL1、MBNL2 それぞれのノックアウトマウスにおけるスプライシング異常を網羅的に解析する。得られたスプライシング異常をヒト剖検脳検体で検証することにより、ヒ

ト中枢神経で起こっている新規スプライシング異常を同定するとともに、そのスプライシング異常が MBNL1/2 どちらのスプライシング制御蛋白を介して起こっているかを明らかにする。

(2) 脳各部位で MBNL1/2 蓄積などの各種パラメーターの検討

得られたスプライシング異常の部位による違いを明らかにし、違いを生み出す因子(MBNL1/2 の発現量、DMPK 転写物、蛋白)の部位による違いを検討する。

(3) スプライシング異常の培養細胞での再現、治療可能性の検討

中枢神経で認められたスプライシング異常を、上記の MBNL1/2 などのスプライシング制御因子を使って、治療できないかについても検討する。

3. 研究の方法

(1) DM1 患者およびノックアウトマウス(MBNL1 並びに MBNL2)の脳におけるスプライシング異常プロファイルの作製

我々は、Swanson 教授(University of Florida)から、MBNL1 および MBNL2 ノックアウトマウス脳での exon array を用いた新規スプライシング異常の全データを供与された。このデータを基に、どのスプライシング異常が DM1 患者脳で見られるかを検討した。

(2) 脳各部位で MBNL1/2 蓄積などの各種パラメーターの検討

上記(1)で得られたスプライシング異常の脳各部位での違いを検討した。またその違いを生じる因子を検討するため、正常マウス脳を用いて Western blot、免疫染色法により、脳の各部位での DMPK、MBNL1/2 遺伝子および蛋白の発現量を検討した。

(3) スプライシング異常の培養細胞での再現、治療可能性の検討

マウス奇形腫由来 P19 細胞は、レチノイン酸を 1 μ M 添加することによって神経系に分化させ、神経系分化における CaMK2d のスプライシングパターンを再現した。この細胞に、レンチウイルスを用いて、延長した CTG リピートを含む DMPK 遺伝子を、この細胞に発現させ、スプライシングパターンの分化による変化を観察した。さらにレンチウイルスを用いて MBNL1/2 それぞれの遺伝子を過剰発現させ、このスプライシングパターンを正常化させることができるかを検討した。

4. 研究成果

(1) DM1 患者およびノックアウトマウス (MBNL 1 並びに MBNL 2) の脳におけるスプライシング異常プロファイルの作製

DM1 患者脳・MBNL1 ノックアウトマウス脳で共通する 3 個の、DM1 患者脳・MBNL2 ノックアウトマウス脳で共通する 10 個の新規スプライシング異常を見出した(図 1)。また脳内で側頭葉と小脳ではスプライシング異常の程度が異なっていた。MBNL2 ノックアウトマウスでは DM1 患者で見られる認知機能障害、睡眠障害が認められた。

	KO mouse brain	human DM1 brain
方法	microarray	RT-PCR
MBNL1	14	3/14
MBNL2	388	10/12

図 1 各種スプライシング異常の比較。MBNL1/2 ノックアウトマウス脳からそれぞれ 14、388 のスプライシング候補遺伝子を見出し、そのうちヒト DM1 患者脳 RNA を用いた RT-PCR で 3 個、10 個のスプライシング異常を見出した。

(2) 脳各部位で MBNL1/2 蓄積などの各種パラメーターの検討

正常マウス脳、ヒト剖検脳を用いて Western blot 法により、脳の各部位での MBNL1 発現量を検討した。側頭葉、小脳、海馬で MBNL1/MBNL2 発現量に明らかな差異は認められなかった。小脳では他の部位に比べ DMPK 遺伝子の CTG リピートは明らかに減少していることが報告されており、我々の検体でも確認された。またスプライシング異常に関連する因子として MBNL1/2 の発現量を検討したが、小脳と他の部位で差を認めなかった。更に DMPK 転写物、DMPK 蛋白の発現量を検討したが、小脳で DMPK 転写物はむしろ増加(図 2)、DMPK 蛋白量の減少(図 3)が認められた。現時点でスプライシング異常の程度の差異は CTG リピート数の影響が大きいと考えられるが、DMPK 蛋白の減少も何らかの影響を及ぼしている可能性がある。

図 2 DMPK-RNA 発現量

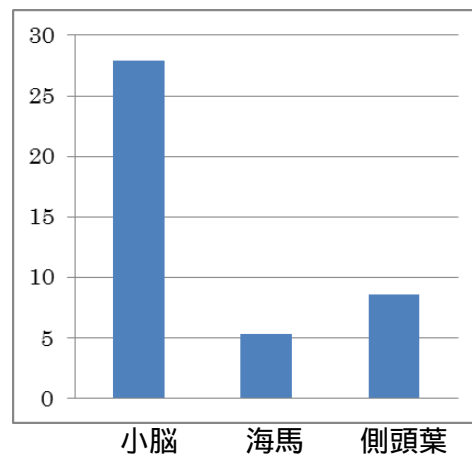
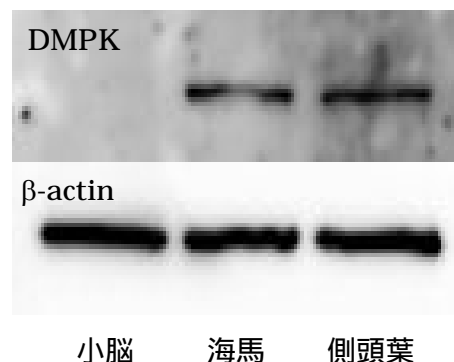


図 3 DMPK 蛋白発現量



(3) スプライシング異常の培養細胞での再現、治療可能性の検討

マウス奇形腫由来 P19 細胞神経系分化における CaMK2d のスプライシングパターンを再現することができた。我々はレンチウイルスを用いて、延長した CTG リピートを含む DMPK 遺伝子を、この細胞に発現させると、スプライシングパターンの分化による変化が見られなくなることを見出した。次にレンチウイルスを用いて MBNL1 遺伝子を過剰発現させ、スプライシングパターンを正常化させることができるかを検討したが、正常化させることはできなかった。

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 2 件)

1. Charizanis K, Lee KY, Batra R, Goodwin M, Zhang C, Yuan Y, Shiue L, Cline M, Scotti MM, Xia G, Kumar A, Ashizawa T, Clark HB, Kimura T, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Gomes-Pereira M, Gourdon G, Sakai N, Nishino S, Foster TC, Ares M, Jr., Darnell RB, Swanson MS. Muscleblind-like 2-Mediated Alternative Splicing in the Developing Brain and Dysregulation in Myotonic Dystrophy. 査読有 Neuron. 75(3): 437-50. 2012
2. Suenaga K, Lee KY, Nakamori M, Tatsumi Y, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Du H, Ares M, Jr., Swanson MS, Kimura T. Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. 査読有 PLoS One. 7(3): e33218. 2012

[学会発表](計 8 件)

1. Yosuke KOKUNAI, Hideki ITOH, Yoshihiro KINO, Moyi LI, Masayuki NAKAMORI, Takashi KIMURA, Tsuyoshi MATSUMURA, Harutoshi, FUJIMURA, Nobuyuki NUKINA, Hideki MOCHIZUKI, Saburo SAKODA, Minoru HORIE, Shouichi ICHIURA, Keiji IMOTO, Maurice SWANSON, Nicolas CHARLET BERGUERAND, Masanori TAKAHASHI. Altered Splicing of Cardiac Sodium Channel Might Be Responsible for Cardiac Conduction Defects in Myotonic Dystrophy. 9th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, San Sebastian, Spain, 2013.10.17
2. Takashi KIMURA, Koichi SUENAGA, Masayuki NAKAMORI, Tsuyoshi MATSUMURA, Masanori TAKAHASHI, Harutoshi FUJIMURA, Kenji JINNAI, Hiroo YOSHIKAWA. The distribution of splicing defects in the Myotonic Dystrophy type 1 brain. 9th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, San Sebastian, Spain, 2013.10.17
3. 末永浩一、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症における中枢神経スプライシング異常の局在性の検討 . 第 54 回日本神経学会学術大会 2013.5.29 東京
4. 末永浩一、木村卓、Kuang-Yung Lee、中森雅之、高橋正紀、藤村晴俊、陣内研二、久保秀司、玉置(橋本)知子、Manuel Ares Jr.、Maurice S. Swanson、芳川浩男、筋強直性ジストロフィー症における中枢神経スプライシング異常およびその分子機序の解明。第 53 回日本神経学会学術大会、東京、2012.5.25
5. Charizanis K, Lee K-Y, Scotti MM, Xia G, Shiue L, Cline MS, Ares M Jr,

Kimura T, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Swanson MS. Muscblind-like 2 knockout mice: a model for splicing alterations and neurological changes in the DM brain. 8th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, Clearwater, USA, 2011.12.2

6. Kimura T, Lee K-Y, Suenaga K, Nakamori M, Tatsumi Y, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Du H, Ares M Jr., Swanson MS. Muscblind-like 1 Knockout Mice Reveal Novel Splicing Defects in the Myotonic Dystrophy Brain. 8th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, Clearwater, USA, 2011.12.2

7. Kokunai Y, Kino Y, Moyi L, Itoh H, Nakamori M, Kimura T, Matsumura T, Fujimura H, Nukina N, Sakoda S, Horie M, Imoto K, Ishiura S, Swanson MS, Takahashi MP. Altered splicing of cardiac sodium channel in heart muscles of myotonic dystrophy type 1 8th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, Clearwater, USA, 2011.12.1

8. 末永浩一、木村卓、Kuang-Yung Lee、中森雅之、高橋正紀、松村到、藤村晴俊、陣内研二、久保秀司、玉置（橋本）知子、Manuel Ares Jr., Maurice S. Swanson, 芳川浩男、筋強直性ジストロフィー症における中枢神経スプライシング異常およびその分子機序の解明。第 52 回日本神経学会学術大会、名古屋、2011.5.19

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木村 卓 (KIMURA, Takashi)

兵庫医科大学・講師

研究者番号 : 20441264

(2)研究分担者

芳川 浩男 (YOSHIKAWA, Hiroo)

兵庫医科大学・教授

研究者番号 : 90273680

(3)研究分担者

久保 秀司 (KUBO, Shuji)

兵庫医科大学・准教授

研究者番号 : 10441320