

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

筋強直性ジストロフィーにおける全身症状の病態解明

研究代表者 中森 雅之¹⁾
研究分担者 清水 宏²⁾

1) 山口大学 医学系研究科 臨床神経学 2) 新潟大学 脳研究所 病理学分野

研究要旨

筋強直性ジストロフィー(MyD)はDMPK遺伝子非翻訳領域のCTG繰り返し配列(リピート)の異常伸長が原因の遺伝性難治性筋疾患である。原因遺伝子より転写された、伸長したCUGリピートをもつ異常RNAの毒性により、筋障害を来す可能性が示唆されている。MyDでは、骨格筋や心筋症状だけでなく、平滑筋障害による消化管症状や、認知機能障害や性格変化、過眠など様々な中枢神経症状を呈する。こうした平滑筋症状・中枢神経症状は患者のQOLを著しく低下させるが、その機序は全く不明である。本研究では新潟大学脳研究所および山口大学医学系研究科が保有するMyD患者検体を用いて、病理学的・分子生物学的・生化学的解析を網羅的にすすめ、MyDの中枢神経病態や平滑筋障害についての重要な知見を得た。

A. 研究目的

筋強直性ジストロフィー(MyD)はDMPK遺伝子3'側非翻訳領域のCTG繰り返し配列(リピート)の異常伸長が原因の遺伝性難治性筋疾患である。原因遺伝子より転写された、伸長したCUGリピートをもつ異常RNAの毒性により、さまざまな臓器障害を来す可能性が示唆されている。特に骨格筋や心筋では、異常RNAが選択的スプライシング制御因子を障害し、CLCN1やDMD、SCN5Aといった遺伝子の選択的スプライシング調整異常を引き起こすことで、筋強直症状や筋変性、心伝導障害をきたすことが知られている。

MyDでは、骨格筋や心筋症状だけでなく、認知機能障害や性格変化、過眠など様々な中枢神経症状を呈する。こうした中枢神経症状は患者のQOLを著しく低下させるが、その機序は全く不明である。このほか、MyDでは平滑筋・内分泌器官でもさまざまな障害を引き起こし、多様な全身症状を呈するが、その病態もわかっていない。本研究ではMyD患者検体を用いて、病理学的・分子生物学

的・生化学的解析を網羅的にすすめ、MyDの中枢神経障害、平滑筋機能障害をはじめとする全身症状の病態解明を目指す。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学脳研究所および山口大学が保有するMyD患者および疾患対象群患者剖検脳組織、ならびに平滑筋組織よりDNAを抽出し、Expand™ Long Template PCR System (Merck社製)をもちいたsmall pool PCR法により異常伸長CTGリピート配列を増幅し、サザンブロットでPCR産物を検出し、リピート長を測定することで各組織でのCTGリピート不安定性を検証した。また、各組織よりRNeasy™ Plus Mini Kit (Qiagen社製)をもちいてtotal RNAを抽出し、SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (ライフテクノロジーズ社製)によりcDNAを合成した。特異的プライマー/プローブをもちいたRT-PCR法により選択的スプライシング異常の解析を、また real

time PCR 法 (TaqMan Gene Expression Assays, Thermo Fisher Scientific 社製) により遺伝子発現解析をおこなった。

また、異常伸長 CUG リピートを挿入した MyD 神経細胞モデル、平滑筋細胞モデルを作成し、異常伸長リピート発現を蛍光 in situ ハイブリダイゼーションで確認したほか、組織同様 DNA ならびに RNA を抽出し、small pool PCR 法によりリピート不安定性や、RT-PCR によるスプライシング異常の解析を行った。

なお、本研究は、山口大学医学部人医学研究等倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

MyD 患者由来脳組織、および平滑筋組織の異常伸長リピートについて、CTG リピート長のばらつき (somatic instability) が非常に大きく、顕著なリピート不安定性が認められた。これらの組織において、リピート長変動に影響をあたえる MSH2、MSH3、MSH6、PMS2、FAN1 といった DNA 修復蛋白の遺伝子発現の変化も確認した。

これまでの共同研究において新潟大学脳研究所が保有する脳検体より Laser Capture Microdissection を用いて採取した、皮質神経細胞、白質グリア細胞、脊髄運動ニューロンなど、各神経細胞系での選択的スプライシング異常の探索も継続的に行い、MyD 患者の多様な中枢神経症状に関係が示唆されるスプライシング異常も同定した。

異常伸長 CUG リピートを挿入した MyD 神経細胞モデル、平滑筋細胞モデルでは、それぞれ MyD 患者組織と同様の核内異常 RNA 凝集体が確認された。これら細胞をもちいた選択的スプライシング異常の解析により、MyD の消化管症状に関連する新たなスプライシング異常を同定した。このスプライシング異常は、MyD 患者由来平滑筋組織でも異常がみられることも確認した。

D. 考察

MyD 患者脳や平滑筋など罹患臓器でのリピート不安定性に、リピート長変動に影響をあたえる MSH2、MSH3、MSH6、PMS2、FAN1 といった DNA 修復

蛋白の遺伝子発現が影響している可能性が示唆された。また、MyD 脳、平滑筋組織において、組織特異的な選択的スプライシング異常がそれぞれの臓器障害につながることを示唆された。

E. 結論

MyD では各罹患組織により異常伸長 CTG リピート長やリピート不安定性がことなり、また組織特異的な選択的スプライシング異常が全身の多様な症状を引き起こす可能性が示された。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

- なし

2. 学会発表

- なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし