

著者氏名	論文タイトル名	書籍名	出版年	ページ
Shiozuka M and Kimura I	Improved serum-free defined medium for proliferation and differentiation of chick primary myogenic cells	<i>Zool. Sci.</i>	2000	201-207
Arakawa M, Nakayama Y, Hara T, <u>Shiozuka M</u> , Takeda S, Kaga K, Konado S, Morita S, Kitamura T and Matsuda R	Negamycin can restore dystrophin in mdx skeletal muscle	<i>Acta Myologica</i>	2001	154-158

20020889

以降 P.35～41までは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
P.34の「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。

筋強直性ジストロフィーの分子病態と治療に関する研究

分担研究者 石浦 章一 東京大学・大学院総合文化研究科・教授

**研究要旨** 筋強直性ジストロフィーは、DM キナーゼ(DMPK)または ZNF9 遺伝子の非翻訳領域・イントロンに存在する CTG、CCTG が増幅して発病する優性遺伝性疾患である。症状の発現と分子病態の解明、そして新規治療法の開発を目的として、RNA リピート結合タンパク質 EXP/muscleblind、CUG-BP、PKR の生理機能の解明を行った。また、遺伝子変異を導入した C2C12 安定形質発現筋細胞株を用いた発現遺伝子変化の検討も行った。

A. 研究目的

筋強直性ジストロフィー(DM)に認められる全身症状(筋強直、白内障、糖尿病、精巣萎縮)が、どのようなしくみで起こるかについては、現在のところ DMPK(ZNF9) 遺伝子中の CTG(CCTG)リピート増幅からは説明がつかない。また、効果的な治療法も見つかっていない。私どもはこの現状を打破すべく、DM1 型と DM2 型に共通な因子がないか検討し、RNA リピート結合タンパク質に注目した。これは、DM が RNA 伸長を主徴とする RNA 病であるという証拠が見つかってきたためである。これらのことを明らかにすれば、DM の新しい治療法の開発につながることは確実であり、筋ジストロフィーの中でも一番患者が多い本症の解決に一步近づけることになる。

現在までに、インスリン受容体や塩素チャネルのスプライシングに関係していると言われていた CUG-BP が、実は UG ジヌクレオチドリピートに結合すること、EXP/muscleblind が CTG リピートのみならず CCTG リピートにも結合すること、PKR が二重鎖 RNA に結合することを、私たちは証明した。これは DM 研究史上全く新しいことであり、ようやくすべての DM に共通に働く因子が見つかったことになる。この標的を用いて、日本発の新しい治療法が見つかる可能性が大きくなった。

B. 研究方法

RNA 結合タンパク質である CUG-BP、EXP/muscleblind、PKR をクローニングし、酵母の three-hybrid 用のベクターに組み込んだ。また、人工的に 30 種類の RNA リピートを作製し、これも同様のベクターに組み込んだ。

タンパク質-RNA 相互作用を見る系として、表面プラズモンバイオセンサを用いた。CUG-BP は大腸菌に発現させ、His-タグを用いて均一バンドになるまで精製した。

一方、筋細胞株 C2C12 にトリプレットリピートが伸びた DMPK(CTG160)cDNA を導入した細胞を DNA チップ実験に用いた。この筋細胞株は、DM と同様、分化が遅れており、しかも酸化ストレスに対して脆弱で、アポトーシスを起こしやすいことがわかっている。また、ビタミ

C. 研究結果

1. 酵母 three-hybrid、ならびに表面プラズモンバイオセンサを用いた系で、CUG-BP が UG リピートに強く結合することが明らかになった。センサの結果から、CUG-BP と UG リピートとの結合は、 $kd=10^{-7}M$  と計算された。一方、EXP/muscleblind は three-hybrid 系で、CUG、CCUG とも結合することが明らかになった。PKR は、CUG/CAG 二重鎖 RNA のみに結合することがわかった。

2. DM のモデル細胞である DMPK(CTG160)で発現が変化する遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて検索したところ、Ensa、hsp10 など数種の遺伝子が候補に挙がった。しかし、リピートが伸びることで発現が上がるのは、Ensa、EXP、 $\alpha$ Bクリスタリンであり、ノーザンプロットで発現上昇が証明できたのは $\alpha$ Bクリスタリンのみであった。

D. 考察

筋強直性ジストロフィー(DM)1 型の原因は 1992 年に欧米の研究者によって明らかにされたが、発病のメカニズムは不明である。同様に DM2 型も 2001 年に責任遺伝子が発見されたが、両方の原因は CTG と CCTG というヌクレオチドリピートの伸長であった。実際、我が国でも多くの研究者によって病態が解明されつつあるが、DMPK の機能や CTG リピート増幅の分子的な機構については、私どもの研究室がリードしている。私たちは RNA リピート結合タンパク質 EXP/muscleblind が CUG リピートのみならず、CCUG リピートにも結合することを世界で初めて証明した。これによって、両 DM の症状が単一の因子によって説明できることが明らかになった。

E. 結論

EXP/muscleblind が DM 症状に関係する一番の因子である可能性が高まった。今後は、これを指標にした治療の開発が必要となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2002) Myotonic dystrophy protein kinase. Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine 5, 2203-2205

Suzuki, T., Nakagawa, M., Yoshikawa, A., Sasagawa, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Nishino, I., Ishiura, S. & Nonaka, I. (2002) The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy. J.Biochem. 131, 647-651

Kino, Y., Oma, Y., Takeshita, Y., Takahashi, N., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2003) Direct evidence that EXP/muscleblind interacts with CCUG tetranucleotide repeats. Basic Appl.Myol. in press

Takeshita, Y., Sasagawa, N., Usuki, F. & Ishiura, S. (2003) Decreased expression of alpha-B-crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats. Basic Appl.Myol. in press

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金  
分担研究報告書

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
笹川昇 石浦章一	非翻訳領域 トリプレット・ リピート病の発 症機構	水澤英洋	組織 培養工学	ニュー サイエン ス社	東京	2002	67-79

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Sasagawa, N. Ishiura, S.	Myotonic dystrophy protein kinase	Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine	5	2203-2205	2002
Suzuki, T. Nakagawa, M. Yoshikawa, A. Sasagawa, N. Yoshimori, T. Ohsumi, Y. Nishino, I. Ishiura, S. Nonaka, I.	The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy.	J.Biochem.	131	647-651	2002
Kino, Y. Oma, Y. Takeshita, Y. Takahashi, N. Sasagawa, N. Ishiura, S.	Direct evidence that EXP/muscleblind interacts with CCUG tetranucleotide repeats.	Basic Appl.Myol.		in press	2003
Takeshita, Y. Sasagawa, N. Usuki, F. Ishiura, S.	Decreased expression of alpha-B- crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats.	Basic Appl.Myol.		in press	2003

20020889

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
P.44の「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。