

52. Suzuki Y, Sano M, Hayashida K, Ohsawa I, Ohta S, Fukuda K: Are the effects of alpha-glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract? *FEBS Lett* 2009, **583**:2157-2159.

doi:10.1186/2045-9912-1-10

**Cite this article as:** Ohta *et al.*: The 2011 Medical Molecular Hydrogen Symposium: An inaugural symposium of the journal *Medical Gas Research*. *Medical Gas Research* 2011 **1**:10.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

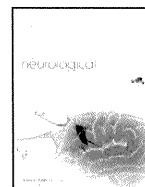
Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of the Neurological Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jns](http://www.elsevier.com/locate/jns)

## Misfolded SOD1 forms high-density molecular complexes with synaptic molecules in mutant SOD1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis cases

Toshiyuki Araki <sup>a,\*</sup>, Seiichi Nagano <sup>a</sup>, Minako Tateno <sup>a</sup>, Misako Kaido <sup>b</sup>, Katsuhisa Ogata <sup>c</sup>, Kunimasa Arima <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo, Japan

<sup>b</sup> Department of Neurology, Sakai Municipal Hospital, Sakai, Osaka, Japan

<sup>c</sup> Department of Neurology, National Hospital Organization Higashisaitama Hospital, Saitama, Japan

<sup>d</sup> Department of Laboratory Medicine, Department of Psychiatry, National Center Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 July 2011

Received in revised form 13 September 2011

Accepted 12 October 2011

Available online xxxx

#### Keywords:

Amyotrophic lateral sclerosis

L126S mutation

SOD1

Synapse

### ABSTRACT

Mutations in the *superoxide dismutase 1 (sod1)* gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS), likely due to the toxic properties of misfolded mutant SOD1 protein. Here we report identification of various synaptic molecules forming molecular complexes with misfolded SOD1 in mutant SOD1-associated FALS patient tissues as well as in cellular FALS models. In the FALS cellular model system, we found that membrane depolarization that mimics synaptic hyperactivation/excitotoxicity could cause misfolding of mutant SOD1, as well as acceleration of misfolded SOD1–synaptic protein complex formation. These results suggest that inhibition of synaptic release mechanism by association of misfolded SOD1 with synaptic molecules plays a role in the dysfunction of FALS.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal, progressive neurodegenerative disease characterized by motor neuron cell death in the brain and spinal cord, accompanied by rapid loss of muscle control and eventually complete paralysis [1,2]. Most cases of ALS are of unknown etiology, while 5–10% are familial (FALS). Although the cause of sporadic ALS remains unclear, 15%–20% of FALS patients have point mutations in cytosolic  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  superoxide dismutase (SOD1) [3]. SOD1 is an antioxidant enzyme ubiquitously expressed in the cytosol, which converts the superoxide anion radical to hydrogen peroxide. More than 115 disease-causing mutations, affecting all regions of the SOD1 gene product, have been identified.

Previous studies using transgenic animal models expressing mutated human SOD1 have shown that the disease is not caused by a loss of its dismutase activity, but by the gain of toxic properties [1]. Many mutant SOD1 proteins tend to become easily misfolded and form aggregates especially under oxidative stress [4]. Intracellular aggregates containing SOD1 were specifically detected in affected regions of both patients and animal models possessing *sod1* mutations.

In spinal cords of mutant SOD1-Tg mice, misfolded intermediates of mutant SOD1 proteins, which showed decrease in solubility and increase in size, were found prior to disease onset. These results suggest that misfolded mutant SOD1 may contribute to motor neuron-specific damage in ALS.

We have previously reported that misfolded SOD1 specifically associates with KAP3, a component of the kinesin-2 motor complex [5]. Kinesin-2 constitutes a part of kinesin superfamily of molecules that mediate anterograde axonal transport [6]. We showed that misfolded SOD1 inhibits transport of choline acetyl-transferase (ChAT), a kinesin-2 cargo, and that resultant decrease of Ach release at presynaptic terminals may play a role in motor dysfunction observed in an early stage of FALS [5]. In an effort to show association of misfolded SOD1 species with KAP3 in FALS patient tissue homogenates, we examined migration profiles of SOD1- and KAP3-immunoreactivity in density-gradient centrifugation. In addition to identify that KAP3 co-migrates with misfolded SOD1 in this experiment, we realized that this method would be suitable in screening molecules that associate with misfolded SOD1 by using FALS patient tissues.

Here we report identification of various synaptic molecules that co-migrate with misfolded SOD1 in SOD1-associated FALS patient tissues as well as in cellular FALS models. In the FALS cellular model system, we found that membrane depolarization that mimics synaptic hyperactivation/excitotoxicity could cause misfolding of mutant SOD1 molecules. These results suggest that inhibition of synaptic release mechanism by association of misfolded SOD1 with synaptic molecules plays a role in the dysfunction of FALS.

\* Corresponding author at: Department of Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawabashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan. Tel.: +81 42 341 2711; fax: +81 42 346 1746.  
E-mail address: taraki@ncnp.go.jp (T. Araki).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

FLAG-tagged human SOD1 cDNA (wild-type and a mutant bearing L126S mutation) at the carboxyl terminus were cloned into pCDNA3 and pTRE2hyg (Clontech) as previously described [5]. The integrity of each clone was verified by nucleotide-sequence analysis. The antibodies used in this study were obtained and used as previously described [5,7].

### 2.2. Autopsy specimens

The studies were performed on frozen tissues (indicated regions of the brain, spinal cord, femoral nerve, dorsal root ganglia) obtained at autopsy from 2 FALS patients (A: 71 years old, female; B: 46 years old male) who were members of a family, 2 sporadic ALS patients (61 years old, female and 67 years old, male), and 1 control patient (73 years old, male) suffered from schizophrenia. Leucine to serine substitution at codon 126 in the SOD1 gene in the two FALS cases was identified by sequence analysis. Consent for autopsy was obtained from legal representatives in accordance with the requirements of local institutional review boards.

### 2.3. Isolation of misfolded SOD1-containing protein complexes by density gradient centrifugation

The autopsy tissue samples were homogenized and the lysates were separated by Nycodenz linear density gradient centrifugation as previously described [5]. Briefly, the tissue samples were homogenized in a buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.4, 120 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.0, 1% Triton X-100, and complete protease inhibitor cocktail (Roche). The lysates were added to 3.2 ml of Nycodenz linear density gradient in 10 mM HEPES, pH 7.4 and 1 mM EDTA, pH 8.0 (initial concentration of Nycodenz was 30%). After a centrifugation at  $87,480 \times g$  for 2 hr at 4 °C, in Optima MAX-E using MLS 50 rotor (Beckman Coulter), a 160  $\mu$ l of aliquot was collected from the top to the bottom of the tube, totaling 22 fractions. Twenty microliters of each fraction was collected and analyzed by immunoblot.

### 2.4. Cell culture

NG108-15 cells (a kind gift from Dr. Akazawa in Tokyo Medical and Dental University) were stably transfected with pTRE2hyg-WT SOD1-Flag or pTRE2hyg-L126S SOD1-Flag as previously described [5]. Transgene expression in the transfected NG108-15 cells was induced by treating the cells with doxycycline per manufacturer's protocol. Differentiation of the transfected NG108-15 cells was performed as previously described for 7 days. Hyperstimulation model was generated by treating the differentiated NG108-15 cells stably expressing WT or mutant SOD1 with 100  $\mu$ M glutamate as previously described [8].

## 3. Results

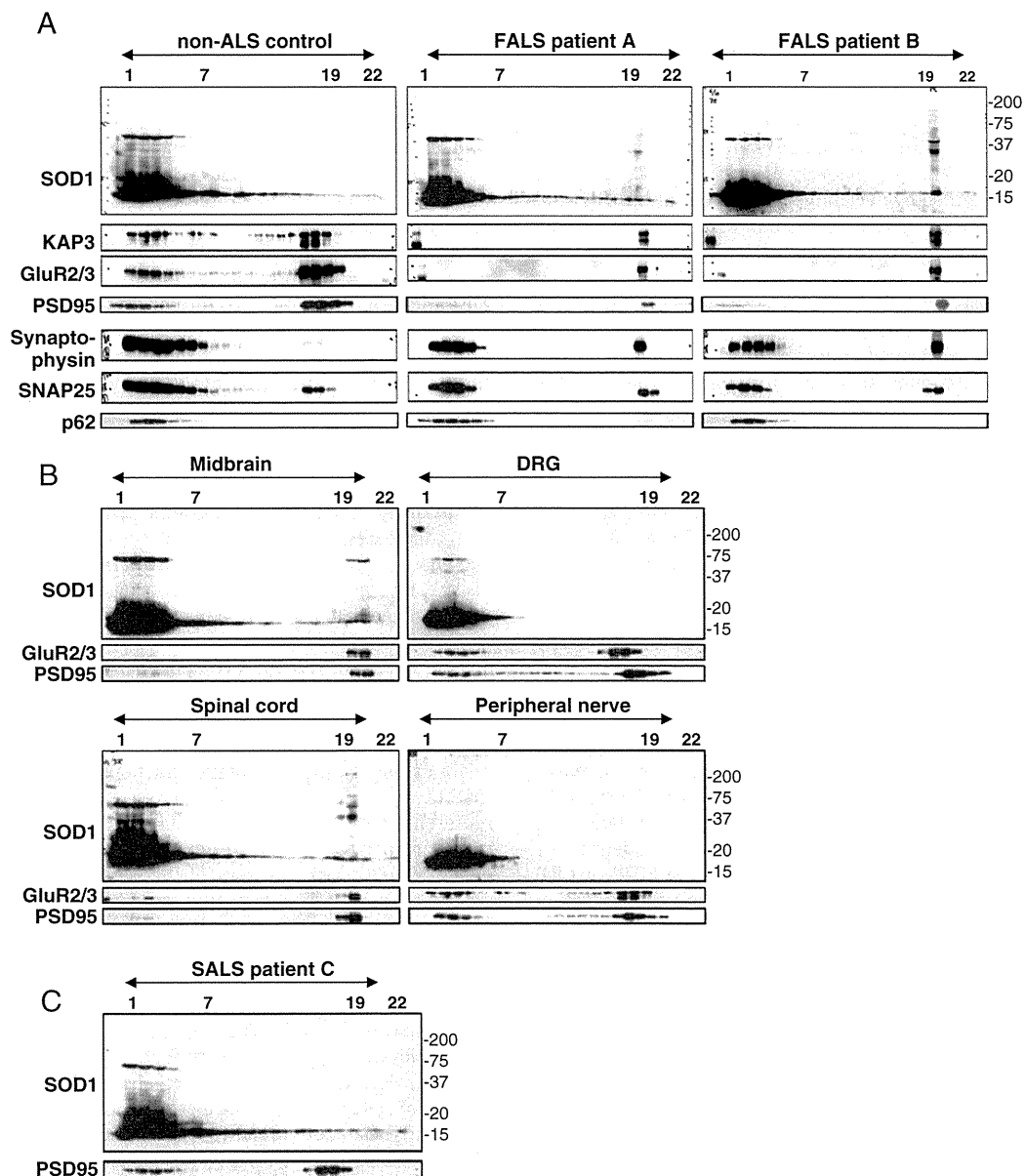
Misfolded SOD1 species observed in SOD1-associated FALS patients likely show toxic properties in cells by associating with other molecules and thereby inhibit their function [1,2]. Therefore, to gain mechanistic insights on misfolded SOD1 toxicity, it is important to identify molecules that specifically bind to misfolded SOD1. In our previous report, we found by analyzing tissue lysate from *SOD1*<sup>G93A</sup>-Tg mice in linear density gradient centrifugation that some of the molecular motor components, such as KAP3, co-migrate with misfolded SOD1, which lead us to identify direct association of misfolded SOD1 with KAP3 [5]. To extend this observation in mutant SOD1-linked human FALS cases and identify molecules that bind to misfolded SOD1 in

human FALS cases directly, we compared sedimentation of misfolded SOD1 in a linear density gradient centrifugation with that of various molecules in lysates of motor areas of FALS postmortem brain. We first examined representative molecules that compose kinesin motor complex to confirm the findings that we reported previously. Lysates of postmortem brain tissues from FALS cases bearing L129S mutation in SOD1 were subject to linear Nycodenz density gradient centrifugation analysis. Similar to what we observed in the rodent FALS model, we found that misfolded SOD1 species migrate to a heavy fraction (Fig. 1A). Among kinesin motor complex components, a fraction of KAP3 co-migrate with misfolded SOD1, which confirmed our previous observations, while immunoreactivity for p62, a nuclear protein, was not observed in the fraction in which misfolded SOD1 is observed. These results confirmed specificity of this assay and assured our previous observation that KAP3 specifically associates with misfolded SOD1 in disease affected neuronal tissues in FALS.

Next, to identify other candidate molecules that associate with misfolded SOD1, we examined migration profiles of the candidates in this analysis. We chose to examine synaptic molecules as important candidates, since inhibition of synaptic vesicle recycling has been noted in other neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease. By applying the tissue processing and density gradient analysis strategy that we used above, we analyzed brain tissue lysate from control patients and found that presynaptic molecules including SNAP-25 (a SNARE complex component), and AMPA-type glutamate receptor GluR2/3, as well as a post-synaptic molecule, PSD95 mainly migrate to low density fractions (No1–8) as well as high density fractions (No. 16–19), while synaptophysin (a synaptic vesicle protein) migrates only to the low density fractions (Fig. 1A). We presumed that the molecules that migrate to lower and higher density fractions represent "free" molecules and molecules forming structural complexes, respectively. These results suggest that the current experimental condition allows most of the synaptic molecular structures containing pre- and postsynaptic structural and signaling molecule complexes to retain their association in the lysate. Analysis of the FALS patient brain tissue lysates revealed that the pre- and post-synaptic proteins show different distribution profile in the density gradient. We found that major amount of synaptic molecules, GluR2/3, SNAP-25, and PSD-95, as well as a synaptic vesicle protein, synaptophysin, migrate to a very high density fraction (No. 19), in which misfolded SOD1 species are observed (Fig. 1A). Decreased amount of synaptic molecules located in the lower density fractions relative to the amount in No. 19 was also noted. These results suggest that, in mutated SOD1-linked FALS patients, misfolded SOD1 promotes formation of very high density molecular complex in the synaptic terminal region involving a large variety of synaptic molecules.

To examine how specific this observation is to motor regions of mutated SOD1-linked FALS cases, we performed the same analysis using tissue lysates from non-motor neuronal tissues of FALS cases and precentral gyrus of sporadic ALS (SALS) cases. We found that the distribution profiles of the pre- and post-synaptic proteins in these tissues show patterns very similar to those in control tissues (Fig. 1B, C). These results suggest that the shifted migration profile of synaptic proteins in the density gradient analysis is observed specific to FALS motor brain regions. Taken together, our data suggest that formation of high-density molecular complex containing synaptic molecules may contribute specifically to mutated SOD1-linked FALS pathogenesis.

A number of studies have supported the importance of excitotoxic mechanisms in ALS pathogenesis [9–12]. We have previously shown that decreased  $Ca^{2+}$  permeability of AMPA-type glutamate receptors expressed in motor neurons resulted in delayed onset and extended lifespan in a mouse model of mutated SOD1-linked FALS, which suggested that glutamate excitotoxicity promotes misfolding of mutated SOD1 and motor neuron death [7]. To correlate the formation of high-density molecular complex involving synaptic molecules in mutated



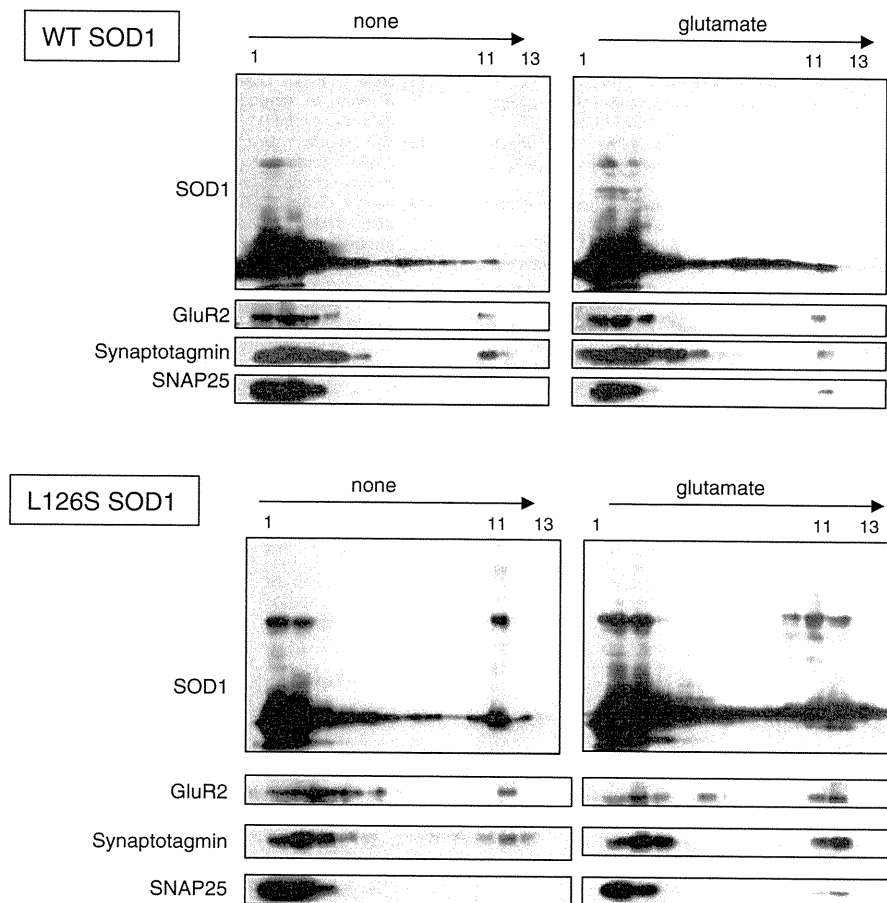
**Fig. 1.** Synaptic molecules are associated with misfolded SOD1 (SOD1(L126S)) in motor regions of mutant SOD1-associated FALS brain tissues. Fractions obtained from Nycodenz density-gradient centrifugation of lysates of precentral gyrus of cerebral cortex tissue from a non-ALS control and two mutant SOD1-associated FALS cases (both cases have L126S mutation in SOD1) (A), or indicated tissues lysates from a mutant SOD1-associated FALS brain (B), or lysate of precentral gyrus of cerebral cortex from a sporadic ALS case (C) were analyzed for the presence of indicated proteins (SOD1, KAP3, GluR2/3, PSD95, Synaptophysin, and SNAP25) by immunoblot analysis. Each lane (left to right) represents an aliquot collected from the top. Note that misfolded SOD1 species migrated around fraction No.19, together with synaptic components, only when motor regions of mutant SOD1-linked FALS brain were analyzed.

SOD1-linked FALS cases and excitotoxic mechanisms, we employed a simplified cellular FALS model that we developed previously. In this model, NG108-15 cells overexpressing FALS-related mutant SOD1 become differentiated to cholinergic neuron-like cells in response to elevated levels of cAMP and dexamethasone [5]. Misfolded SOD1 is detected in the cells by exposing the cells to oxidative stress. Here we applied glutamate to the cells to examine if hyperstimulation by glutamate causes formation of protein aggregates containing misfolded SOD1 and synaptic proteins. We found, by a density gradient centrifugation approach similar to what we used for patient tissue analysis, that increased amount of synaptotagmin, a synaptic vesicle protein, and SNAP25, a presynaptic terminal molecule, showed shifted mobility in the density gradient by applying glutamate in

culture (Fig. 2). The shifted mobility was observed together with increased levels of misfolded SOD1. We found these results in cells expressing SOD1 bearing L126 mutation identified in the FALS cases that we analyzed in the current study, but not wild-type SOD1 expressing cells (Fig. 2). These results suggested that excitotoxicity caused by glutamate can increase misfolding of mutated SOD1 and promote formation of protein aggregation involving misfolded SOD1 together with synaptic molecule.

#### 4. Discussion

In this study, we tried to identify molecules that associate with misfolded SOD1 in mutated SOD1-linked human FALS patient tissues



**Fig. 2.** Association of misfolded SOD1 with synaptic components can be induced by excitotoxic hyperstimulation. Fractions obtained from Nycodenz density-gradient centrifugation of lysates of NG108-15 cells stably expressing WT SOD1 or SOD1 bearing L126S mutation were analyzed for the presence of indicated proteins (SOD1, GluR2/3, Synaptotagmin, and SNAP25) by immunoblot analysis. Note that increased amount of misfolded SOD1 species, together with synaptic components, migrated around fraction No. 11 after hyperstimulation by glutamate.

to find that misfolded SOD1 forms very high density molecular complexes together with pre- and post-synaptic proteins in the synaptic terminal region. Surprisingly, this phenomenon seems specific to mutated SOD1-linked FALS cases, since we did not observe similar molecular complexes formed in SALS patient tissues. We further showed that membrane depolarization that mimics synaptic hyperactivation/excitotoxicity can promote formation of protein aggregates containing synaptic components. While we did observe the formation of molecular complexes containing synaptic components in our cellular FALS model, the size of the molecular complexes seemed smaller compared with those observed in patient tissue lysates. This may be due to the facts that the differentiated NG108-15 cell we used here do not form differentiated synaptic structures or synaptic contacts with neighboring cellular processes, and that the cells were exposed only to experimentally possible transient excitotoxic stresses.

We have previously shown that misfolded SOD1 associates with KAP3, a kinesin-2 motor complex component [5]. Kinesin-2 is required for anterograde axonal transport of various molecules including choline acetyltransferase [13,14], and disturbed Kinesin-2 function may therefore explain a part of early pathogenesis of mutated SOD1-linked FALS. Here we identified another pathogenic mechanism, i.e., dysfunction of synaptic molecules directly caused by mutant SOD1. While synaptic dysfunction is observed during pathogenesis of not only mutant SOD1-linked FALS but also ALS of other etiologies [1], the large molecular complex involving various synaptic components which we identified this time seems specific to mutated SOD1-linked human FALS cases. This may suggest that mutant SOD1-linked FALS

has its own unique mechanism that causes synaptic dysfunction. Thus far there have been limited numbers of reports analyzing molecular details of proteins accumulated in the synaptic region [15] and therefore further studies will be required for understanding of mechanistic diversity of synaptic pathology in ALS.

## 5. Conclusion

Here we report identification of various pre- and post-synaptic molecules forming molecular complexes with misfolded SOD1 in mutant SOD1-associated FALS patient tissues as well as in cellular FALS models. The results suggest that inhibition of synaptic release mechanism by association of misfolded SOD1 with synaptic molecules plays a role in the dysfunction of FALS.

## Acknowledgements

Some autopsy samples were obtained through the Research Resource Network project of Japan. This work was supported by grants from The Mochida Memorial Foundation for Medical and Pharmaceutical Research, Japan Foundation for Neuroscience and Mental Health, and grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

## References

- [1] Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 2006;52:39–59.

- [2] Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:710–23.
- [3] Shaw BF, Valentine JS. How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends Biochem Sci* 2007;32:78–85.
- [4] Barber SC, Mead RJ, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:1051–67.
- [5] Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T. Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. *Hum Mol Genet* 2009;18:942–55.
- [6] Hirokawa N, Takemura R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:201–14.
- [7] Tateno M, Sadakata H, Tanaka M, Itohara S, Shin RM, Miura M, et al. Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum Mol Genet* 2004;13:2183–96.
- [8] Kruman II, Pedersen WA, Springer JE, Mattson MP. ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp Neurol* 1999;160:28–39.
- [9] Gurney ME, Fleck TJ, Himes CS, Hall ED. Riluzole preserves motor function in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1998;50:62–6.
- [10] Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1995;38:73–84.
- [11] Shaw PJ, Eggett CJ. Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2000;247(Suppl. 1):117–27.
- [12] Van Damme P, Leyssen M, Callewaert G, Robberecht W, Van Den Bosch L. The AMPA receptor antagonist NBQX prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 2003;343:81–4.
- [13] Baqri R, Charan R, Schimmelpfeng K, Chavan S, Ray K. Kinesin-2 differentially regulates the anterograde axonal transports of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in *Drosophila*. *J Neurobiol* 2006;66:378–92.
- [14] Ray K, Perez SE, Yang Z, Xu J, Ritchings BW, Steller H, et al. Kinesin-II is required for axonal transport of choline acetyltransferase in *Drosophila*. *J Cell Biol* 1999;147:507–18.
- [15] Sasaki S, Takeda T, Shibata N, Kobayashi M. Alterations in subcellular localization of TDP-43 immunoreactivity in the anterior horns in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 2010;478:72–6.

## 大阪府下筋強直性ジストロフィー患者の受療動向調査

松村 剛<sup>1)\*</sup> 木村 卓<sup>2)</sup> 穀内 洋介<sup>3)</sup>  
久保田智哉<sup>3)</sup> 高橋 正紀<sup>3)</sup> 佐古田三郎<sup>1)3)</sup>

要旨：筋強直性ジストロフィー患者の受療動向を検索する目的で、大阪府下の循環器・糖尿病・産婦人科・眼科全専門医に無記名アンケートを実施し、20.7% から回答をえた。33.8% の専門医は診療経験を有し、10.1% は診断経験があり、患者が様々な科を受診していること、神経内科以外の科を先に受診する症例も多いことが確認された。周産期・周術期トラブルでの発見も多く、非専門科での診断能力向上が課題だが、診断経験を持つ医師は筋強直現象や顔貌など特徴的の症状への関心が高く、簡易スクリーニング法の開発が有効と思われた。患者の病識不足や専門医との連携困難を指摘する意見もあり、患者・医療者双方への啓発と情報共有が重要である。

(臨床神経 2011;51:677-682)

Key words：筋強直性ジストロフィー、受療動向、集学的治療、無記名アンケート

## はじめに

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) は myotonin protein kinase (DMPK) の3'非翻訳領域に存在するCTG繰返し配列の延長によって生じる triplet repeat 病の一つである<sup>1)</sup>。本症は筋ジストロフィーの中でも頻度の高いものの一つであるが、骨格筋障害に加え様々な内分泌・代謝障害、心伝導障害、若年性白内障、種々の臓器の良性・悪性腫瘍など多彩な合併症を呈する多臓器疾患である<sup>2)</sup>。このため、本症の生命予後・QOLの改善には、集学的管理が重要である。一方、われわれが以前おこなった本症患者の子宮筋腫合併検索で、骨格筋症状発現前に子宮筋腫が発見された症例が40%以上を占めていた<sup>3)</sup>ように、骨格筋障害が軽微な症例では合併症により神経内科や小児神経科などの専門科以外の科を最初に受診することも多いため、非専門科における診断能力向上と専門科への連携も重要な課題である。しかし、本邦で本症患者の医療受療動向の実態を地域レベルで検索した報告は、われわれのしらべたかぎりこれまでにない。そこで、本症患者の受療動向と医療連携に向けた課題を明らかにする目的で、本症患者の受診機会が多いと推測される循環器科、糖尿病、産婦人科、眼科について、大阪府下の各専門医に往復葉書による無記名アンケート調査を実施した。

## 対象・方法

調査票作成時点(2009年9月)の日本循環器学会、日本糖尿病学会、日本産科婦人科学会、日本眼科学会の専門医名簿に基づき、大阪府下の各専門医全員(住所不明者は除く、送付数は循環器専門医927名、糖尿病専門医357名、産婦人科専門医882名、眼科専門医915名)に、往復葉書による無記名アンケート調査をおこなった。調査期間は2009年10月から同年12月である。

質問内容は、各科共通のものとして所属機関の特性(診療所、病院：神経内科診療の有無)、卒後年数(卒後10年以下、10~20年、21年以上)、DM1診療経験の有無と経験症例数、DM1を診断した経験の有無とその数、本症をうたがう症状(筋力低下、握った手が開きにくい、顔貌、CK高値、本症の家族歴)、該当科以外に受診している診療科、DM1の診療において困った経験を挙げた。各科別の設問として、受診契機となった病態、循環器科ではペースメーカー・除細動器の適応(適応無し、条件付き、一般と同様、積極的に考慮)を、糖尿病では本症に実施する耐糖能検査(75g-oral glucose tolerance test : OGTT, homeostasis model assessment of insulin resistance : HOMA-IR, 食後血糖/インスリン, hemoglobin A1c : HbA1c)、本疾患の耐糖能異常に対する治療方針(一般の糖尿病より厳密、同様、緩やか)、本症で積極的に使用する耐糖能障害治療薬を、産婦人科では周産期合併症を挙げた。

有効回答数は循環器科172名(18.6%)、糖尿病85名

\*Corresponding author: 独立行政法人国立病院機構刀根山病院神経内科 [〒560-8552 大阪府豊中市刀根山5-1-1]

<sup>1)</sup>独立行政法人国立病院機構刀根山病院神経内科

<sup>2)</sup>兵庫医科大学内科学講座(神経・脳卒中科)

<sup>3)</sup>大阪大学大学院医学系研究科神経内科学

(受付日：2011年2月26日)

Table 1 Summary of common questionnaire.

	Cardiologist	Diabetologist	Gynecologist	Ophthalmologist
Number of objective specialists	927	357	882	915
Institutions				
Hospitals: Neurology (+)	381	149	242	233
Hospitals: Neurology (-)	258	73	179	87
Clinics	281	130	453	590
Unclassified	7	5	8	5
Number of responders	172	85	220	154
Institutions				
Hospitals: Neurology (+)	74	37	58	46
Hospitals: Neurology (-)	39	13	46	0
Clinics	59	34	108	108
No answer	0	1	0	0
Years of experience as medical specialist				
Under 10 years	7	2	21	10
11-20 years	37	29	47	58
Over 21 years	127	54	152	83
No answer	1	0	0	3
Experience to treat patients with myotonic dystrophy				
Yes	63	36	65	49
No	107	48	154	104
No answer	2	1	1	1
Experience to diagnose myotonic dystrophy				
Yes	13	16	29	6

(23.8%), 産婦人科 220 名 (25.7%), 眼科 154 名 (16.8%) であった。

統計学的検討は、各科専門医全体と回答者の所属機関比率の比較は  $\chi^2$  乗検定を、各科毎や勤務先毎など 3 群間以上の比較は Kruskal-Wallis rank test を、DM 発見経験有無など 2 群間の比較は Mann-Whitney U test をもちいておこなった。

## 結 果

### 所属機関および卒後年数

各専門医の所属先および卒後年数を Table 1 に示した。回答者の所属先比率は概ね専門医全体の所属先比率を反映していたが、眼科では神経内科診療をおこなっていない病院の勤務者からの回答が無かったため回答者と専門医全体の間有意差をみとめた ( $p < 0.001$ )。回答者の卒後年数についてはすべての科で 21 年以上が半数以上を占めたが、循環器科でその割合が高かった ( $p = 0.005$ )。

### 診療経験の有無と経験症例数

本症の診療経験は 213 名 (33.8%) の医師が有しており、診療科による有意差はなかったものの ( $p = 0.126$ ) 糖尿病専門医が 43.5% ともっとも高かった。経験症例数は 1 例が 100 名、2 例 47 名、3 例 28 名で、4 例以上は 18 名であった。施設別では神経内科診療をおこなっている病院の医師の経験率が 44.0% ともっとも高く、神経内科診療をおこなっていない病院 (39.4%)、診療所 (25.2%) の順に低下した ( $p < 0.001$ )。

### 診断経験の有無と診断症例数、本症をうたがう症状

本症を診断した経験を持つ医師は 64 名 (10.1%) あり、診

療経験を有する医師の中での割合は、循環器科 20.6%、糖尿病 43.2%、産婦人科 44.6%、眼科 12.2% で糖尿病と産婦人科が高かった ( $p < 0.001$ )。施設別では神経内科診療をおこなっている病院の医師の診断率が 15.6% ともっとも高く、神経内科診療をおこなっていない病院 (11.1%)、診療所 (6.4%) の順に低下した ( $p = 0.007$ )。本症をうたがう症状について診断経験の有る医師と無い医師で比較すると、筋強直現象 ( $p = 0.001$ )、顔貌 ( $p = 0.02$ )、CK 高値 ( $p < 0.001$ ) において、診断経験を有する群が有意に高かった (Fig. 1)。設問以外の症状として、産婦人科では先天性患児の出産 (25.1%)、眼科では若年性白内障 (28.1%) を挙げた医師が多かった。

### 当該科以外の受診科

当該科以外の受診科をわかる範囲で列挙してもらったところ、神経内科が回答者の 80.2% を占め、内科 16.6%、整形外科 6.4%、小児科 6.4% と続いたが、神経内科・小児科のどちらも受診していない患者が 17.6% あり、「困ったこと」の項目に、神経内科や小児神経科の受診を勧めても消極的とのコメントもあった。

### 各科別項目

#### 循環器科

受療疾患としては心不全 29 名、伝導障害 23 名、心房細動・粗動 11 名、洞不全症候群 8 名、期外収縮 6 名、発作性上室性頻拍 5 名、弁膜症 3 名、QT 延長症候群 2 名、虚血性心疾患 1 名であった。その他として在宅胃腸管理や呼吸不全、肺炎、糖脂質代謝異常などの非循環器疾患を挙げた医師も 12 名あった (Fig. 2A)。ペースメーカー・除細動器の適応については無回答 71 名、一般と同じが 69 名、条件付き 23 名、適応無し 5



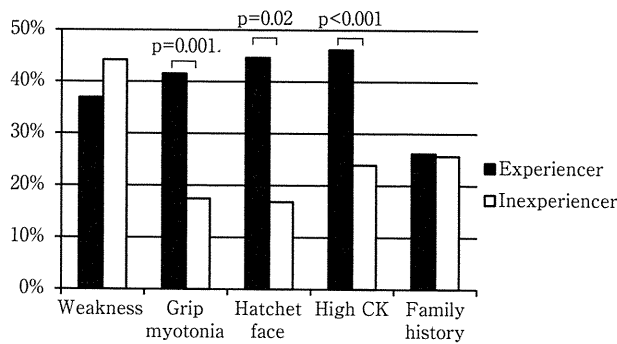


Fig. 1 Clinical signs which remind myotonic dystrophy.

Abbreviation: CK: creatine kinase

The doctors having experiences of diagnosis of DM paid more attention for grip myotonia, hatchet face and serum high CK.

名、積極的に適応4名であった。条件付きの内容としては、ADLや原疾患の予後を考慮する、原疾患の治療が優先、年齢や心機能を考慮する、致死性不整脈や完全房室ブロックの存在、心臓電気生理検査をおこなって判断する、などに加え明らかなガイドラインが無いとする意見やペースメーカーが心機能におよぼす悪影響を懸念する意見もあった。困ったこととして、本人・家族の疾患に対する受容・理解不足で治療への協力がえにくい、疾患・予後・遺伝の説明が難しい、心疾患以外の合併症管理が困難、突然死の経験がある、などのコメントがあった。

#### 糖尿病

耐糖能障害検索のための検査としては、OGTTが20名、HbA1cが18名、食後血糖・インスリンが10名、HOMA-IRが7名であったが、食後高脂血症の評価としてクッキーテストを推奨する意見もあった。耐糖能障害への治療方針としては、一般と同じが45名、より緩やかは12名でより厳密の3名より多かった。本症に優先的に使用する薬剤としては、チアゾリジン誘導体が12名と最も多く、ビグアナイド薬10名、インスリン5名、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害剤3名の順で、スルホニル尿素(SU)製剤を挙げた医師はいなかった。

#### 産婦人科

受診疾患は異常妊娠・出産が44名、不妊症9名、正常妊娠・出産4名と産科が多数を占め、婦人科疾患としては子宮筋腫16名、悪性腫瘍12名、良性腫瘍7名、子宮内膜症4名、その他3名であった(Fig. 2B)。周産期合併症を33名(15%)の医師が経験しており、羊水過多9名の他、抜管困難、呼吸器合併症、新生児仮死・管理困難が各8名、横紋筋融解症・筋痛6名、不整脈3名、その他3名が挙げられた(Fig. 3)。塩酸リトドリンによるトラブルを挙げた医師も4名あった。それ以外の困ったこととして、病識が乏しく治療に非協力的である、遺伝相談への対応が困難、切迫早産の際に使用できる薬剤が制限されること、先天性患児によりNICUのベッドが長期占有される問題や、未診断例が緊急手術で術後抜管不能となって発見された、体外受精採卵時の静脈麻酔によるトラブル、相

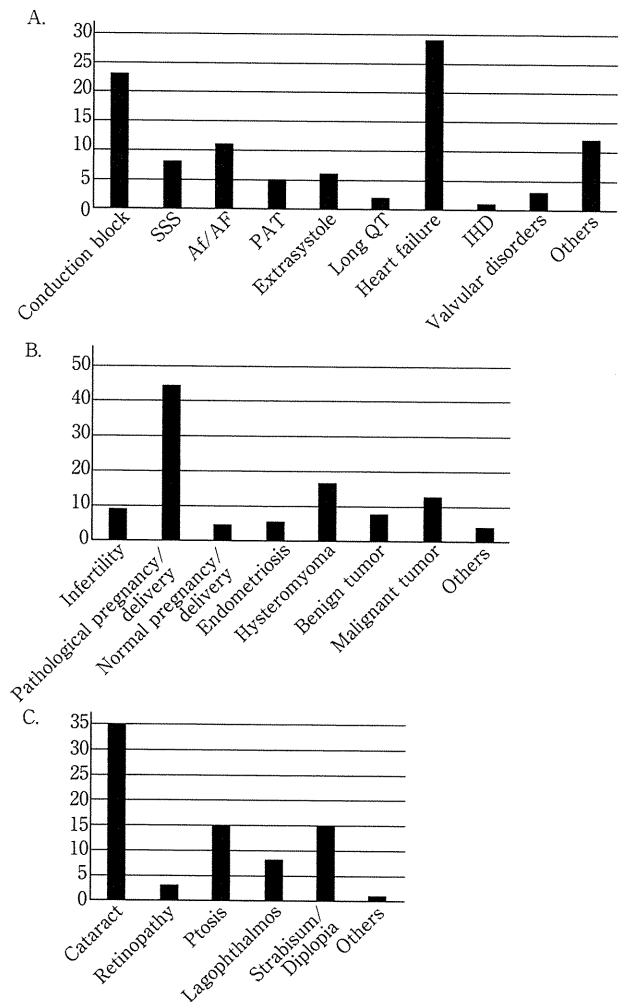


Fig. 2 The consulted disorders of myotonic dystrophy patients.

The disorders which made patients visit medical agency were asked in a multiple choice manner.

A. Cardiologist, B. Gynecologist, C. Ophthalmologist

Abbreviations: SSS: sick sinus syndrome, Af: atrial fibrillation, AF: atrial flutter, PAT: paroxysmal atrial tachycardia, IHD: ischemic heart disorders

談できる専門医が少ないなどが挙げられ、コメントの記載率は11.4%と他の科(循環器5.8%, 糖尿病0%, 眼科0.6%)にくらべ高かった。

#### 眼科

受診疾患は白内障35名、眼瞼下垂15名、斜視・複視15名、兎眼8名、網膜症3名、その他1名であった(Fig. 2C)。

#### 考 察

今回の調査では、回答率が全体で20.1%(16.8~25.7%)であったが、協力いただいた各専門医にとっては専門外の疾患に対するアンケートであったことを考慮すると、低いものではないと考える。また、眼科を除き回答者の勤務先比率は専門

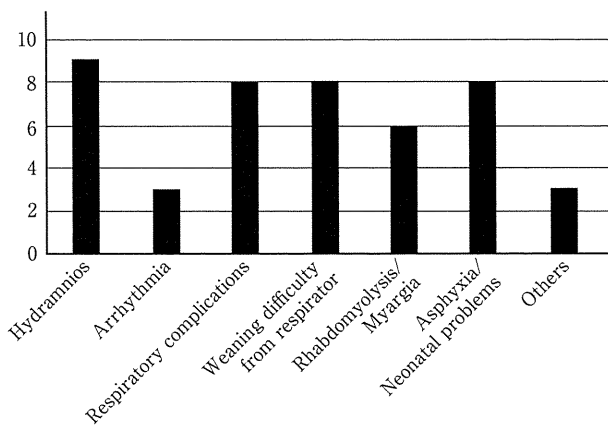


Fig. 3 Perinatal complications of myotonic dystrophy patients.

Perinatal complications were asked in a multiple choice manner. Thirty-three gynecologists had experienced perinatal complications. Among them four doctors reported troubles in using ritodrine hydrochloride.

医全体の構成を反映しており、概ね全体の傾向を反映したものであると推測する。診断経験やトラブル経験がある医師の回答率が高く、診療経験率を実際よりも高く推定している可能性も否定できないが、本症の存在に気づかずに診療されている事例も多いと推測される。

今回の調査では、各科とも30~40%程度の専門医がDM1の診療経験を有しており、DM1患者が様々な科を受診している実態が裏付けられた。DM1を診断した経験を有する医師も65名あり、神経内科や小児神経科などの専門科以外の受診を契機に発見される事例も多いことが再確認された。施設別には神経内科を有する病院に勤務している医師が診療経験・診断ともにもっとも高率であった。これは本症患者の多数が神経内科を受診していることに加え、複数の合併症を有するために総合病院を受診する機会が多いこと、神経内科医へのコンサルトで確定診断がしやすいことなどが関連すると推測される。

本症の重症度は妊娠中・出生児から症状を示す先天型から、一生涯日常生活に支障がない軽症例まで大きな幅があるため、骨格筋症状に無自覚な症例は神経内科・小児神経科よりも先に非専門科を受診する可能性が高い。本症が多臓器疾患であり集学的管理が必要であること、表現促進現象があり遺伝相談などに特別な配慮が必要であること、本症に気づかずに手術などをおこなったばあいトラブルをおこしやすいことなどから、非専門科での診断能力向上と集学的医療体制構築が重要な課題である。実際、産婦人科では周術期合併症や塩酸リトドリンをふくむ周産期・周術期トラブル、先天性患児への対応困難を契機に発見された事例が多かった。これらは、事前に診断されていれば一定の予防・対策が図れていた可能性が高い。発見経験がある医師は筋強直現象や顔貌などの特徴的的症状への関心が高く、経験のない医師は筋力低下以外への関心が低かった。このことから、本症の特徴的的症状による簡

易スクリーニング法を開発・普及させることで、診断率が向上すると期待される。

循環器科の受診契機となった疾患は、心不全がもっとも多く、伝導障害や不整脈にくらべ心不全の合併頻度が少ないとする従来の報告<sup>2)</sup>とことなる結果であった。この原因として、心不全の頻度が従来考えられているより高い可能性もあるものの、むしろ伝導障害や不整脈は多くのばあい無症状で受診率が低いのに対し、心不全の受診率が高いためではないかと推測される。また、循環器では循環器疾患以外の内科合併症や在宅医療管理のために受診している患者も多かった。糖尿病で同様の質問を設定していなかったためこの点が不明だが、診療所勤務医がホームドクターとして本症の在宅療養を支えていることも示唆された。

ペースメーカー・除細動器に対する適応は、一般よりも消極的とする医師が積極的とする医師よりも多かった。これは、本症におけるペースメーカー適応を、AHA2006年ガイドライン<sup>4)</sup>で有・無症状のIII度または高度II度房室ブロック(class I)、有・無症状の(I度をふくむ)全レベルの房室ブロック(class IIb)、本邦のJCS2006年改訂版ガイドラインで高度またはIII度房室ブロック(class I)とし、積極的にとらえていることと対照的であった。要因の一つに、筋ジストロフィーという病名による否定的イメージが懸念されるが、pacingによる心機能への悪影響を懸念する意見もあった。本症のペースメーカー・除細動器については海外で精力的に検討されている<sup>5)~8)</sup>が、本邦の実情に合わせた適応について神経内科と循環器内科の間で共通認識を形成していく必要があると思われた。一方、病識の不足から患者自身が消極的な事例も少なくなく、患者教育も重要な課題である。

糖尿病では、一般的なOGTT、HbA1cに加え、食後血糖・インスリンやHOMA-IRを挙げた医師も少なくなかった。積極的に使用する薬剤もインスリン抵抗性改善作用を有するチアゾリジン誘導体やビグアナイドが多く、SU製剤が無いなど本症のインスリン抵抗性や食後高血糖・高インスリン血症<sup>9)</sup>を意識した管理がなされていることが推測された。その一方で、治療方針は一般より緩やかとする医師が厳密とする医師より多かった。その理由については質問を設定していなかったため不明であるが、循環器と同様予後に対する悲観的意識や患者の病識の低さが影響していることが推測される。

産婦人科は正常・異常妊娠・出産がもっとも多かった。女性患者の妊娠は、先天性患児の問題だけでなく、未発症・軽症例でも症状発現・増悪することが多いこと、周産期トラブルなど様々な問題を生じやすい、不妊症での受診も多いことが推察されたが、本症患者への不妊治療の適応は慎重な配慮が必要であり、不妊症患者で本症のスクリーニングと遺伝相談をふくむ適切なカウンセリングの必要性を感じた。生殖器腫瘍<sup>3)</sup>での受診も多く、本症の医療管理における産婦人科の重要性が再確認された。周産期トラブルの経験者は、本症の経験者の過半数におよび、有効回答率やコメント記載率の高さもふくめ、産婦人科側でも対応に苦慮されている実情がうかがえた。

眼科は、白内障での受診が多数で、若年性白内障で本症の顔貌を確認してうたがうとの意見が多かった。眼瞼下垂・兔眼での受診も多かったが、本症患者で眼瞼挙上術を施行したばあい兔眼の増悪が生じうるため一定の配慮が必要と思われる。全身麻酔の機会に乏しく周術期トラブルが少ないか、困ったことへのコメントが少ないことも特徴であった。

集学的治療に向けた課題として、患者・家族の病識の問題が改めて認識された。本症の生命予後およびQOL改善のためには、種々の合併症を早期に発見し適切に管理していくことが重要である。神経内科・小児神経科は本症の集学的治療の中心的役割を果たすべきであるが、自覚症状に乏しいこと、原疾患自体の治療法がないことなどのため、患者・家族にとって積極的な受診意義を感じにくいことが推察される。今後、患者・医療者双方に向けた啓発活動が必要と思われる。

謝辞：本研究の調査にご協力いただいた、大阪府下の循環器科・糖尿病・産婦人科・眼科専門医の各先生方に深謝いたします。アンケートの発送・集計などに尽力いただいた水野水希さんに感謝します。本研究は平成21年度厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服事業「本邦における筋チャンネル病の実態に関する研究(21210301)」および平成22年度厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服事業「筋チャンネル病および関連疾患の診断・治療指針作成および新規治療法開発に向けた基盤整備のための研究(10103469)」の援助を受けておこなった。

#### 文 献

- 1) Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992;68:799-808.
- 2) Harper PS, Engelen Bv, Eymard B, et al. Myotonic dystrophy present management future therapy New York: Oxford university press; 2004.
- 3) 松村 剛, 野崎園子, 横江 勝ら. 筋強直性ジストロフィーでは子宮筋腫合併率が高い. *医療* 2002;56:472-475.
- 4) Epstein AE, DiMarco JP, Ellenbogen KA, et al. ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac Rhythm Abnormalities: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices): developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery and Society of Thoracic Surgeons. *Circulation* 2008;117:e350-408.
- 5) Hawley RJ, Collieran JA, Fletcher R, et al. Indications for Cardiac Pacemaker Implantation in Myotonic Dystrophy. *MedGenMed* 1999;E5.
- 6) Lazarus A, Varin J, Babuty D, et al. Long-term follow-up of arrhythmias in patients with myotonic dystrophy treated by pacing: a multicenter diagnostic pacemaker study. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1645-1652.
- 7) Dello Russo A, Mangiola F, Della Bella P, et al. Risk of arrhythmias in myotonic dystrophy: trial design of the RA-MYD study. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2009;10:51-58.
- 8) Laurent V, Pellieux S, Corcia P, et al. Mortality in myotonic dystrophy patients in the area of prophylactic pacing devices. *Int J Cardiol* 2011;150:54-58.
- 9) Matsumura T, Iwahashi H, Funahashi T, et al. A cross-sectional study for glucose intolerance of myotonic dystrophy. *J Neurol Sci* 2009;276:60-65.

## Abstract

**A survey of cardiologists, diabetologists, gynecologists and ophthalmologists practicing in Osaka on the medical consultation behaviors of myotonic dystrophy patients**

Tsuyoshi Matsumura, M.D.<sup>1)</sup>, Takashi Kimura, M.D.<sup>2)</sup>, Yosuke Kokunai, M.D.<sup>3)</sup>,  
Tomoya Kubota, M.D.<sup>3)</sup>, Masanori P. Takahashi, M.D.<sup>3)</sup> and Saburo Sakoda, M.D.<sup>1)3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Neurology, National Hospital Organization Toneyama National Hospital

<sup>2)</sup>Neurology, Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine

An anonymous postal survey of cardiologists, diabetologists, gynecologists, and ophthalmologists in Osaka was performed to assess the medical care-seeking behaviors of and problems associated with the medical management of patients with myotonic dystrophy (DM). The questionnaires were sent to 927 cardiologists, 357 diabetologists, 882 gynecologists, and 915 ophthalmologists. Of these, 172 cardiologists, 85 diabetologists, 220 gynecologists, and 154 ophthalmologists responded. More than 30% of responders had provided care to DM patients, and approximately 10% had experience diagnosing DM patients. These facts suggest that DM patients receive medical care from various specialists due to complications involving multiple systems and some of them visit other specialists prior to neurologists. Some patients were diagnosed after perinatal or perioperative difficulties. Therefore, it seems important to improve the ability of physicians to identify DM patients. Because specialists with experience diagnosing DM paid more attention to the characteristic features of DM, such as grip myotonia and hatchet face, a simple screening test may be useful for detecting DM. Some responders pointed out the negative attitude of DM patients toward medical care and the lack of neurologists for consultation as problems in the medical management of DM patients. Cooperation among neurologists and other specialists and education of DM patients are important to improve the medical management of DM patients.

(Clin Neurol 2011;51:677-682)

**Key words:** Myotonic dystrophy, medical consultation behavior, multidisciplinary management, anonymous questionnaire survey



## 筋強直性ジストロフィー

## — 異常 RNA による病態機序と新たな治療法の探索

## Myotonic Dystrophy: Therapeutic Approaches to RNA Toxicity

中森 雅之<sup>1,2)</sup> 高橋 正紀<sup>1)</sup>Masayuki Nakamori<sup>1,2)</sup>, Masanori P. Takahashi<sup>1)</sup>

## Abstract

Myotonic dystrophy (DM) is the most common hereditary muscle disease in adults, caused by unstable genomic expansions of simple sequence repeats. The mutant RNA transcripts containing the expanded repeat give rise to a toxic gainoffunction by perturbing splicing factors in the nucleus, leading to the misregulation of alternative pre-mRNA splicing. Although no curative treatment exists, recent advances in research and pharmaceutical technology have provided clues for therapeutic intervention in DM. Herein, we review the RNA-dominant mechanism of DM and potential therapeutic approaches for degrading or neutralizing the toxic RNA, restoring splicing factors, correcting splicing misregulation, and stabilizing the repeat.

Key words : myotonic dystrophy, splicing, MBNL1, CELF1, antisense

## はじめに

筋強直性ジストロフィー (myotonic dystrophy : DM) は、有病率が 1/8,000 人と、成人で最も頻度の高い遺伝性筋疾患であり、常染色体優性遺伝形式をとる<sup>1)</sup>。DM 患者は、筋強直 (ミオトニア) や進行性の筋力低下・筋萎縮のほか、心伝導障害、認知機能障害、白内障、内分泌機能異常など、多彩な全身症状を呈する。近年、DM の病態の主座は、遺伝子上の塩基繰り返し配列から転写される、異常 RNA であることがわかってきた。本稿では、“RNA dominant disease”としての DM の病態と、それに対して現在検討されている治療法について概説する。

## I. 筋強直性ジストロフィー (DM) の病態

本邦の DM 症例の大部分を占める筋強直性ジストロ

フィー 1 型 (DM1) は、*DMPK* 遺伝子の 3' 非翻訳領域 (3' untranslated region : 3' UTR) にある CTG3 塩基繰り返し配列の異常伸長が原因とされている<sup>2)</sup>(Fig. 1)。正常の CTG リピート長は 5~37 であるのに対し、DM1 患者の筋組織では 3,000~6,000 まで伸びている<sup>3)</sup>。一般に、CTG リピート長は症状と相関しており、リピートが長いほど発症が早くなる<sup>4)</sup>。この異常 CTG リピートは世代を経るごとに伸長する傾向があり、DM1 の母親から生まれた子では、リピート長がさらに数千以上も伸びて、先天性 DM1 と呼ばれる重症例となることがある。また同一患者の組織間でもリピート長は異なり、罹患臓器である骨格筋・心筋で特に長く、さらに年齢とともに伸長を続ける<sup>4,5)</sup>。

DM1 同様、遺伝子上の 3 塩基繰り返し配列が異常に伸長するトリプレットリピート病には、Huntington 病や球脊髄性筋萎縮症、遺伝性脊髄小脳萎縮症などもある<sup>6)</sup>。これらの疾患ではいずれも蛋白翻訳領域にある CAG リ

- 1) 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2] Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
- 2) ロチェスター大学メディカルセンター神経学 Department of Neurology, University of Rochester Medical Center

1881-6096/11/¥500/論文/JCOPY

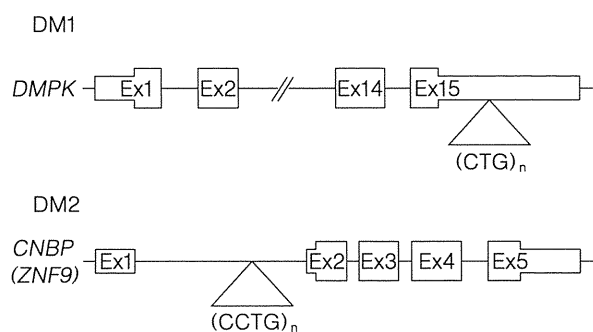


Fig. 1 DMの原因遺伝子

白の box はエクソン (Ex) を示す。細い box は非翻訳領域。DM1 では *DMPK* 遺伝子 3' 非翻訳領域に CTG リピートの、DM2 では *CNBP (ZNF9)* 遺伝子イントロン 1 上に CCTG リピートの異常伸長をみる。

リピートが伸長しており、それが原因でポリグルタミンを含む異常蛋白が生成され、疾患を引き起こすと考えられている。これに対し DM1 では、CTG リピートは非翻訳領域にあり、異常な *DMPK* 蛋白が生じる訳ではない。また、患者組織で *DMPK* は必ずしも低下しておらず、*DMPK* をまったく発現しないノックアウトマウスでも DM1 様の症状はあまりみられないことから<sup>7,8)</sup>、長らく DM1 の病態機序は不明であった。しかし、*DMPK* ではなくアクチン遺伝子の 3' 非翻訳領域に 250 CTG リピートを組み入れたモデルマウス (HSA<sup>L/R</sup>) が DM 同様ミオトニアなどの症状を呈すること<sup>9)</sup>、DM1 と類似した症状を示す DM2 の原因が *DMPK* とはまったく異なる *CNBP (ZNF9)* 遺伝子イントロン 1 上の CCTG リピートの伸長であることから<sup>10)</sup> (Fig. 1)、現在では DM は *DMPK* や *CNBP* といった蛋白自体の異常ではなく、伸長した CUG, CCUG リピートを持つ異常 RNA が病態の中心であると考えられている (RNA dominant disease)<sup>6)</sup>。

## II. DM とスプライシング異常

DM1 患者組織においては、異常伸長した CTG を持つアリル由来の異常 *DMPK* mRNA も、正常アリル由来の *DMPK* mRNA と同様に転写される。正常 *DMPK* mRNA が核外へ運ばれ蛋白に翻訳される一方、異常 *DMPK* mRNA では、伸長した CUG リピート (CUG<sup>exp</sup>) がヘアピン構造をとり、細胞質へは輸送されず核内で RNA 凝集体 (ribonuclear foci) を形成する (Fig. 2)。こうして核内に蓄積された CUG<sup>exp</sup> により、本来 CUG 配列を含む RNA に結合する能力を持つ MBNL (mus-

cleblind), CELF1 (CUGBP1) といった 2 つの蛋白群が影響を受ける<sup>11,12)</sup>。これらはともに pre-mRNA スプライシングを制御する蛋白であり、特に発達に伴う幼若型から成熟型への選択的スプライシング変換を調節している。MBNL は、その高い CUG 配列への結合力が災いして RNA 凝集体に絡めとられ、DM1 核内で正常に機能する MBNL が枯渇する<sup>13)</sup> (Fig. 2)。一方、CELF1 は RNA 凝集体とは結合しないものの、リン酸化が促進され安定化し、核内で CELF1 が増加する<sup>14)</sup>。この結果、DM1 では MBNL・CELF1 というスプライシング制御因子のアンバランスが生じ、さまざまな mRNA のスプライシング異常 (幼若型スプライシングアイソフォームの増加) が引き起こされる (Fig. 3)。

DM2 でも、異常に伸長した CCUG を含む RNA (CCUG<sup>exp</sup>) が核内に蓄積して MBNL を凝集し、DM1 と共通のスプライシング異常をきたす。このスプライシング異常は、HSA<sup>L/R</sup> マウスのみならず MBNL1 ノックアウトマウスや CELF1 過剰発現マウスでも再現されている。また、これらのマウスがミオトニアや心伝導障害を呈することからも<sup>15,16)</sup>、DM の多彩な症状は CUG<sup>exp</sup> や CCUG<sup>exp</sup> といった toxic RNA がもたらす pre-mRNA スプライシング異常によるものと考えられている。

骨格筋型クロライドチャネル (*CLCN1*) は、筋での静止膜電位維持に重要な役割を果たしている。DM ではスプライシング制御機構の異常により、エクソン 7a が挿入された幼若型スプライシング産物が増加する<sup>17)</sup>。このスプライシング産物からは正常な機能をもつ *CLCN1* が形成されず、機能するチャネル量が減少するため筋細胞膜の興奮性が高まり、ミオトニアを引き起こす。また DM ではインスリン受容体、心筋トロポニン T のスプライシング異常が報告されており、それぞれ耐糖能異常、心伝導障害の原因となる可能性が示唆されている<sup>18,19)</sup>。ほかにもリアノジン受容体、筋小胞体カルシウムポンプといった筋細胞のカルシウム恒常性を担う蛋白<sup>20)</sup>、ジストロフィン、ジストロプレビンといった筋細胞骨格蛋白など<sup>21,22)</sup>、20 あまりのスプライシング異常が DM 骨格筋や心筋、脳で見出されている (Table)。しかしながら、DM で最も重要な症状といえる進行性筋力低下・筋萎縮の原因となるスプライシング異常は確定しておらず、さまざまなスプライシング異常が複合的に関与している可能性も考えられる。

## III. DM 治療への展望

これまで DM では、Na チャネル阻害薬を中心にミオ

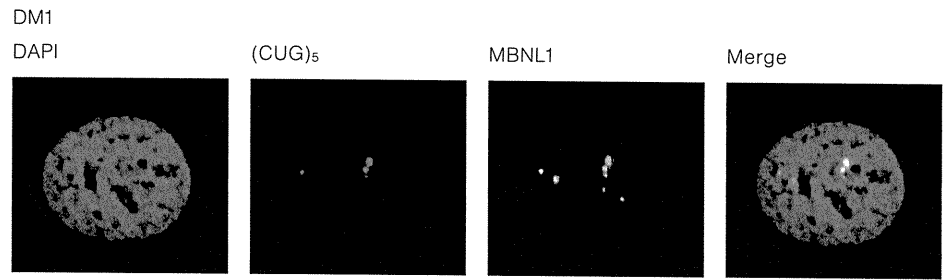


Fig. 2 DM1 および正常筋芽細胞の FISH-IF

核：青 (DAPI), CUG<sup>exp</sup> RNA：赤 (FISH), MBNL1：緑 (IF)。正常筋芽細胞では CUG<sup>exp</sup> RNA による凝集体形成はなく, MBNL1 も核内に広く分布しているが, DM1 筋芽細胞では凝集体に MBNL1 が凝集している。

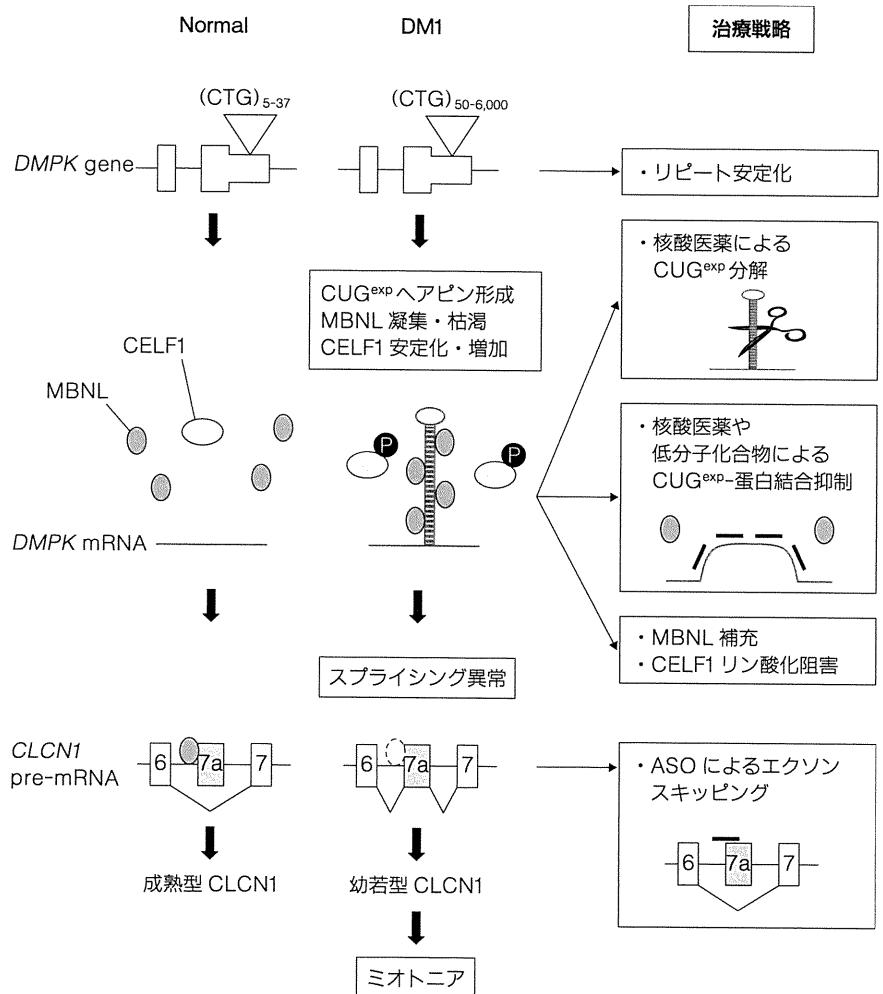
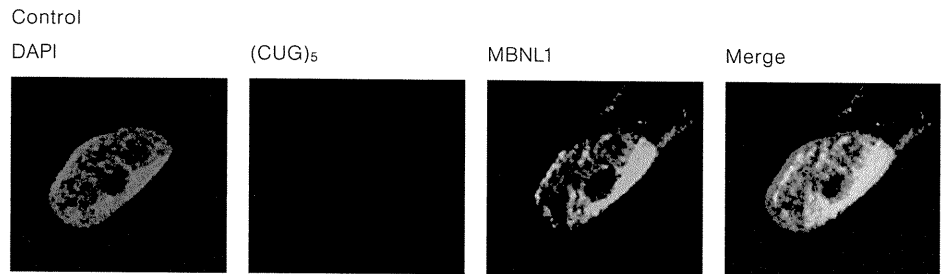


Fig. 3 DM1 における RNA dominant mechanism と治療戦略

DM1 では伸長したリピートを持つ CUG<sup>exp</sup> RNA がヘアピン構造をとり, MBNL を吸着し CELF1 を増加させる。これらスプライシング制御因子の異常により, pre-mRNA スプライシングに障害をきたし, さまざまな症状を呈する。DM2 でも, CCUG<sup>exp</sup> RNA による同様の機序が考えられている。

Table DM でみられる pre-mRNA スプライシング異常

	遺伝子	蛋白
骨格筋	<i>TNNT3</i>	骨格筋型トロポニン T
	<i>INSR</i>	インスリン受容体
	<i>CLCN1</i>	骨格筋型塩化物チャネル
	<i>MTMR1</i>	ミオチュブラリン関連蛋白
	<i>RYR1</i>	リアノジン受容体
	<i>SERCA1</i>	筋小胞体 Ca <sup>2+</sup> ポンプ
	<i>SERCA2</i>	筋小胞体 Ca <sup>2+</sup> ポンプ
	<i>LDB3</i>	LIM domain 結合蛋白
	<i>MBNL1</i>	マッスルプラインド様蛋白
	<i>MBNL2</i>	マッスルプラインド様蛋白
	<i>TTN</i>	タイチン
	<i>CAPN3</i>	カルパイン 3
	<i>FHOD1</i>	フォルミン関連蛋白
	<i>GFPT1</i>	グルタミン・フルクトース-6-リン酸トランスアミナーゼ
	<i>NRAP</i>	ネブリン関連蛋白
	<i>PDLIM3</i>	PDZ/LIM domain 蛋白
	<i>MAPT</i>	タウ蛋白
	<i>DMD</i>	ジストロフィン
	<i>DTNA</i>	ジストロブレビン
	<i>MEF2C</i>	筋細胞エンハンサー因子
心筋	<i>TNNT2</i>	心筋型トロポニン T
	<i>MTMR1</i>	ミオチュブラリン関連蛋白
	<i>KCNAB1</i>	電位依存性カリウムチャネル
	<i>LDB3</i>	LIM domain 結合蛋白
	<i>TTN</i>	タイチン
	<i>PDLIM3</i>	PDZ/LIM domain 蛋白
	<i>DMD</i>	ジストロフィン
	<i>DTNA</i>	ジストロブレビン
脳	<i>APP</i>	アミロイド前駆体蛋白
	<i>GRIN1</i>	NMDA 受容体
	<i>MAPT</i>	タウ蛋白

トニアを軽減する対症療法が行われてきた。しかし、根本的な治療はなく、多くは進行性の筋力低下による呼吸不全や心伝導障害による突然死などの転帰をとる。しかし近年、RNA dominant disease としての病態が解明され、根本的な治療として介入可能なターゲットが明らかになってきた (Fig. 3)。現在それぞれのターゲットに対するさまざまなアプローチが模索されており、以下にその方向性と臨床応用への可能性について概説する。

### 1. Toxic RNA (CUG<sup>exp</sup>) をターゲットとする治療法

前述のとおり、DM では伸長したりリピートを持つ異常 RNA が病態の根幹をなす。この異常 RNA の作用を抑制できれば、DM の症状を引き起こすスプライシング異常を網羅的に改善できるため、現在異常 RNA をターゲットとする治療アプローチが最も期待され、また研究も進んでいる。この分野で昨今進歩が著しい技術として、

アンチセンスオリゴヌクレオチド (antisense oligonucleotide: ASO) などの核酸医薬を用いた方法がある。核酸医薬はターゲットとする RNA に相補的な配列を含む短い塩基あるいは塩基対からなり、ターゲット RNA と結合することで作用を発揮する。これらは構成する塩基のさまざまな化学的修飾とそのデザインにより特性が異なり、大きく 2 通りに分類される。1 つは RNA 分解酵素 (RNase H) や RNA 干渉を利用してターゲット RNA を直接分解する作用を持つもの、もう 1 つはターゲット RNA と結合し、RNA から蛋白への翻訳やほかの蛋白との結合を抑制する作用を持つものである。

前者の作用で異常 RNA を減らすことを目的にして、Puymirat らのグループは、*DMPK* 3' UTR をターゲットとする short hairpin RNA や RNA-ASO をレトロウイルスベクターにより DM1 筋芽細胞に導入、異常 *DMPK* mRNA を最大 80% 減少させ、筋芽細胞の融合能も改善させることに成功した<sup>23,24)</sup>。また同グループは、*DMPK* 3' UTR にある cleavage site をターゲットとする hammerhead ribozyme の DM1 筋芽細胞への導入により、異常 *DMPK* mRNA と RNA 凝集体が減少することを報告した<sup>25)</sup>。しかし、これらのアプローチは動物レベルで検証されておらず、さらにリピートの伸長していない正常型 *DMPK* mRNA レベルも同時にかなり低下する。*DMPK* ノックアウトマウスでは軽度ではあるが心伝導障害などを示すことから、正常 *DMPK* 蛋白低下による影響も懸念される。

一方、後者の ASO による異常 RNA 中和作用を利用して、MBNL の凝集体への凝集を防ぐアプローチも試みられている。Wansink らのグループは 2'-O-methylphosphorothioate (CAG)<sub>7</sub> ASO が、DM 細胞モデルで RNA 凝集体を減少させることを報告した<sup>26)</sup>。また 2'-O-methylphosphorothioate (CAG)<sub>7</sub> ASO を HSA<sup>LR</sup> マウスへ筋肉内投与することで、凝集体形成の軽減と凝集体に絡めとられていた MBNL1 の核内再分布、さらにはわずかではあるが *Clcn1* などのスプライシング異常が改善することを示した。またほぼ同時期に Thornton らのグループは、(CAG)<sub>25</sub> morpholino ASO を HSA<sup>LR</sup> マウスへ筋肉内投与し、凝集体の減少と MBNL1 の核内再分布、さらに *Clcn1* のスプライシングを正常化し、ミオトニアも改善することを報告している<sup>27)</sup>。またごく最近、Furling らのグループが、DM1 筋芽細胞ではあるが、(CAG)<sub>15</sub> を持つ U7-small nuclear RNA を導入して、凝集体の減少と MBNL1 の核内再分布、一部のスプライシング異常を改善することを見出している<sup>28)</sup>。興味深いことに、これら CUG リピートをターゲットとした 3 種の



ASO は異常 *DMPK* mRNA を直接分解する特性はないものの、細胞モデル・モデルマウスともに CUG<sup>exp</sup> レベルを選択的に低下させている。詳細な機序はいまだ不明だが、CUG<sup>exp</sup> と MBNL との結合を抑制することにより CUG<sup>exp</sup> の核外輸送が促進され、細胞質での RNA decay に供される可能性や、核内での未知の RNA 変性メカニズムなどが考えられている。いずれにしても、CUG<sup>exp</sup> をターゲットとする ASO が、実際にモデルマウスでスプライシングを改善することは大変画期的であり、DM の治療法として有望ではあるが、課題も残っている。マウスで効果を示した 2'-O-methyl-phosphorothioate (CAG)<sub>7</sub>, (CAG)<sub>25</sub> morpholino は、ともに筋肉内へ有効に導入するため、電気穿孔法で強い電気刺激を加えているが、これはヒトへの適応は難しい。また、静脈などを介する ASO の全身投与も Duchenne 型筋ジストロフィーでは確立しているが、DM では Duchenne 型筋ジストロフィーほど筋変性が強くないため、筋肉への ASO の移行性が問題となる。さらに、マウスへの筋肉内投与では異常 *DMPK* mRNA に選択的な RNA レベルの減少がみられたが、全身のしかも反復投与となると、ASO が集積しやすいといわれている特に肝臓で、*DMPK* 以外で CUG 配列を持つ RNA の非特異的な発現低下(オフターゲット効果)を招き、予期せぬ副作用を引き起こす可能性も危惧される。

一方、ASO を用いずに、CUG<sup>exp</sup> と MBNL の結合を防ぐアプローチも考えられている。これまでに、Hoechst 33258 誘導体とカナマイシン誘導体、および triaminotriazine-acridine 複合体といった低分子化合物が、試験管内で CUG<sup>exp</sup> と MBNL との結合を抑制することが報告されている<sup>29-31)</sup>。しかし、これら化合物の生体への安全性は不明で、特に triaminotriazine-acridine 複合体についてはもとの化合物が強い毒性を持つため、臨床応用は困難と考えられる。そんななか、Berglund らのグループは、既に臨床で使用されている薬剤を含む 26 の化合物をスクリーニングし、ペンタミジンとネオマイシン B に CUG<sup>exp</sup>-MBNL 結合抑制作用があることを見出した<sup>32)</sup>。さらにペンタミジンが DM1 モデル細胞で凝集体形成を抑制し、HSA<sup>L/R</sup> マウスへ腹腔内投与することでスプライシング異常を改善することを報告している。ペンタミジンは、カリニ肺炎などの治療で広く用いられている薬剤であり、DM への治療に期待が持てるが、モデルマウスへはヒト標準投与量の 10 倍量を投与してもなお、*Clcn1* スプライシングを正常化しミオトニアを消失させるほどの効果はなく、また高容量投与による毒性もみられている。今後ほかの有望な化合物の同定や、CUG<sup>exp</sup> へ

の結合能、生体での安全性をさらに高めた誘導体の開発が待たれる。

## 2. スプライシング制御因子をターゲットとする治療法

DM1 では CUG<sup>exp</sup> による MBNL の枯渇と CELF1 の増加という 2 つのスプライシング制御因子の異常がみられる。これらの是正を目的に、スプライシング制御蛋白をターゲットとするアプローチも考えられている。*CLCN1* のスプライシングは MBNL により制御されている<sup>33)</sup>。HSA<sup>L/R</sup> マウスでも (CUG)<sub>250</sub> を含む RNA 凝集体に MBNL が凝集し、DM 同様 *Clcn1* のスプライシング異常とミオトニアを呈する<sup>17)</sup>。Swanson らのグループは、この HSA<sup>L/R</sup> マウスにアデノ随伴ウイルスベクターを用いて MBNL1 を過剰発現させると、*Clcn1* スプライシング異常とミオトニアが改善することを示した<sup>34)</sup>。DM でも、RNA 凝集体に蓄積し、核内で枯渇している MBNL1 を外部からウイルスベクターにより補充することで、MBNL 依存性スプライシングを正常化させる方法が検討されている。この方法の問題点は、筋肉で安定的に発現できるようにウイルスベクターシステムの改良がなお必要であることや、DM1 でみられるもう 1 つのスプライシング制御因子 CELF1 の異常と、RNA 凝集体に凝集する別の MBNL ファミリー蛋白、MBNL2 については改善できないことが挙げられる。実際、MBNL1 を過剰発現させた HSA<sup>L/R</sup> マウスでは、ミオトニアは改善するものの、筋組織のミオパチー様変化には改善がみられていない。

また、MBNL とは異なり、CUG<sup>exp</sup> に凝集しない CELF1 が DM1 で増加する機序ははっきりとわかっていない。Cooper らのグループは、CUG<sup>exp</sup> がなんらかのメカニズムで protein kinase C (PKC) を活性化し、PKC が CELF1 をリン酸化して CELF1 蛋白の半減期を伸ばすことを報告した<sup>14)</sup>。同グループが作製した 960 の CUG リピートを心特異的に発現するマウスでも、PKC の活性化、CELF1 のリン酸化および CELF1 の増加が認められ、DM1 でみられるスプライシング変化や心伝導障害もみられる<sup>14,16)</sup>。さらに、このモデルマウスに PKC 阻害薬を投与すると、CELF1 が低下し、CELF1 依存性スプライシング異常と心伝導障害が改善することが見出されている<sup>35)</sup>。PKC 阻害薬は心不全モデル動物で心機能を改善するという報告もあり<sup>35)</sup>、心障害を合併することのある DM にとっては期待が持てる。しかし、DM でみられる心障害の機序については明確でない部分もあり、また PKC 阻害薬のほかの臓器に及ぼす影響も不明である。さ

らに, DM2 では CELF1 レベルは必ずしも増加しておらず, また CELF1 依存性のスプライシング異常がほかの筋疾患モデルでも非特異的に認められることから<sup>36)</sup>, DM における CELF1 の意義については, 今一度詳細な検討が必要である。

### 3. pre-mRNA スプライシングをターゲットとする治療法

ASO には, pre-mRNA 上にあるスプライシング調節配列に結合し, mRNA のスプライシングを制御する作用もある。これを利用し, 症状につながる個々のスプライシング異常を直接治療するアプローチも試みられている。Thornton らのグループは, HSA<sup>LX</sup> マウスに *Clcn1* エクソン 7a の 5 prime splice site と 3 prime splice site をターゲットとした morpholino ASO を筋肉内投与してエクソン 7a をスキップさせ, 幼若型から成熟型へスプライシングを転換し, 正常型塩化物チャネルの発現回復とミオトニアの改善を示した<sup>37)</sup>。このように個別のスプライシング異常をターゲットとした ASO による治療も有効であるが, 前述したとおり, 全身投与での筋移行性の問題があり, また現時点では筋力低下・筋萎縮のターゲットとなるスプライシング異常が判明していない点が課題である。

### 4. リピート不安定性をターゲットとする治療法

DM1 で伸長している CTG リピート長は一定ではなく, 年齢とともに増大し, 症状の進行に関与する。従来リピートの不安定性には, DNA の複製・修復機構が関わっているとされてきたが, 近年, CTG リピートの転写機構こそが大きく影響していることが明らかとなった<sup>38)</sup>。このことは *DMPK* の転写が活発な筋組織でリピート長が長いことにも合致し, 異常 mRNA への転写が toxic RNA の産生だけでなく, リピートの伸長という面でも悪影響を及ぼしていることを意味する。一見治療のターゲットとして忘れ去られがちな CTG リピートの不安定性であるが, 前述のような治療法が臨床応用可能となり, いったん DM 症状の改善をみたとしても, 年々増大するリピートを放置すれば toxic RNA の負荷が増え, 治療効果の減弱・消失につながるおそれがある。残念ながら現在 CTG リピートを安定化すると報告されている化合物は, DNA 複製・修復機構に広汎に影響を及ぼし, 毒性も強いため長期投与には向かない<sup>39)</sup>。リピートの安定化については, 発症初期や発症前の早期介入による DM1 の進行抑制だけでなく, ほかのトリプレットリピート病へ応用することも可能であり, 引き続き安全性

の高い治療法の開発が待たれる。

## おわりに

RNA dominant disease として DM の病態が解明されつつあり, 有望な治療法の開発に向けても, 着実に, 特にここ数年大きな進歩がみられている。しかし, DM で最も重要な症状である筋力低下の原因は解明されておらず, DM1 と DM2 の病態の相違など, 今後明らかにすべき点は多い。また, 治療効果の判定に向けても, DM2 モデルマウスはもとより, DM1 の筋症状を反映するモデルマウスの開発が必要である。個別の治療アプローチについてもまだまだ課題は多々あるが, それらを克服するべくたゆまぬ努力が続けられており, 近い将来必ず DM の根本的治療が可能となる日がくると期待される。

## 文 献

- 1) Harper PS: Myotonic Dystrophy. WB Saunders Company, London, 2001
- 2) Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, et al: Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68: 799-808, 1992
- 3) López Castel A, Nakamori M, Tomé S, Chitayat D, Gourdon G, et al: Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues. *Hum Mol Genet* 20: 1-15, 2011
- 4) Ashizawa T, Dubel JR, Harati Y: Somatic instability of CTG repeat in myotonic dystrophy. *Neurology* 43: 2674-2678, 1993
- 5) Martorell L, Monckton DG, Gamez J, Johnson KJ, Gich I, et al: Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 7: 307-312, 1998
- 6) Nakamori M, Thornton C: Epigenetic changes and non-coding expanded repeats. *Neurobiol Dis* 39: 21-27, 2010
- 7) Jansen G, Groenen PJ, Bächner D, Jap PH, Coerwinkel M, et al: Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* 13: 316-324, 1996
- 8) Reddy S, Smith DBJ, Rich MM, Leferovich JM, Reilly P, et al: Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet* 13: 325-334, 1996
- 9) Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, et al: Myotonic dystrophy in transgenic mice ex-

- pressing an expanded CUG repeat. *Science* **289**: 1769-1773, 2000
- 10) Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, et al: Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* **293**: 864-867, 2001
  - 11) Kino Y, Mori D, Oma Y, Takeshita Y, Sasagawa N, et al: Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet* **13**: 495-507, 2004
  - 12) Roberts R, Timchenko NA, Miller JW, Reddy S, Caskey CT, et al: Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13221-13226, 1997
  - 13) Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, et al: Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)<sub>n</sub> expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* **19**: 4439-4448, 2000
  - 14) Kuyumcu-Martinez NM, Wang GS, Cooper TA: Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell* **28**: 68-78, 2007
  - 15) Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, Lungu C, Thornton CA, et al: A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* **302**: 1978-1980, 2003
  - 16) Wang GS, Kearney DL, De Biasi M, Taffet G, Cooper TA: Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* **117**: 2802-2811, 2007
  - 17) Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, et al: Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* **10**: 35-44, 2002
  - 18) Savkur RS, Philips AV, Cooper TA: Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* **29**: 40-47, 2001
  - 19) Philips AV, Timchenko LT, Cooper TA: Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* **280**: 737-741, 1998
  - 20) Kimura T, Nakamori M, Lueck JD, Pouliquin P, Aoike F, et al: Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* **14**: 2189-2200, 2005
  - 21) Nakamori M, Kimura T, Fujimura H, Takahashi MP, Sakoda S: Altered mRNA splicing of dystrophin in type 1 myotonic dystrophy. *Muscle Nerve* **36**: 251-257, 2007
  - 22) Nakamori M, Kimura T, Kubota T, Matsumura T, Sumi H, et al: Aberrantly spliced alpha-dystrobrevin alters alpha-syntrophin binding in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* **70**: 677-685, 2008
  - 23) Langlois MA, Boniface C, Wang G, Alluin J, Salvatera PM, et al: Cytoplasmic and nuclear retained DMPK mRNAs are targets for RNA interference in myotonic dystrophy cells. *J Biol Chem* **280**: 16949-16954, 2005
  - 24) Furling D, Doucet G, Langlois MA, Timchenko L, Belanger E, et al: Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions. *Gene Ther* **10**: 795-802, 2003
  - 25) Langlois MA, Lee NS, Rossi JJ, Puymirat J: Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol Ther* **7**: 670-680, 2003
  - 26) Mulders SA, van den Broek WJ, Wheeler TM, Croes HJ, van Kuik-Romeijn P, et al: Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 13915-13920, 2009
  - 27) Wheeler TM, Sobczak K, Lueck JD, Osborne RJ, Lin X, et al: Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science* **325**: 336-339, 2009
  - 28) Francois V, Klein AF, Beley C, Jollet A, Lemerrier C, et al: Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-snrRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 85-87, 2011
  - 29) Pushechnikov A, Lee MM, Childs-Disney JL, Sobczak K, French JM, et al: Rational design of ligands targeting triplet repeating transcripts that cause RNA dominant disease: application to myotonic muscular dystrophy type 1 and spinocerebellar ataxia type 3. *J Am Chem Soc* **131**: 9767-9779, 2009
  - 30) Lee MM, Childs-Disney JL, Pushechnikov A, French JM, Sobczak K, et al: Controlling the specificity of modularly assembled small molecules for RNA via ligand module spacing: targeting the RNAs that cause myotonic muscular dystrophy. *J Am Chem Soc* **131**: 17464-17472, 2009
  - 31) Arambula JF, Ramisetty SR, Baranger AM, Zimmerman SC: A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 16068-16073, 2009
  - 32) Warf MB, Nakamori M, Matthys CM, Thornton CA, Berglund JA: Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 18551-18556, 2009
  - 33) Kino Y, Washizu C, Oma Y, Onishi H, Nezu Y, et al: MBNL and CELF proteins regulate alternative splic-

- ing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res* **37**: 6477-6490, 2009
- 34) Kanadia RN, Shin J, Yuan Y, Beattie SG, Wheeler TM, et al: Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11748-11753, 2006
- 35) Wang GS, Kuyumcu-Martinez MN, Sarma S, Mathur N, Wehrens XH, et al: PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *J Clin Invest* **119**: 3797-3806, 2009
- 36) Orengo JP, Ward AJ, Cooper TA: Alternative splicing dysregulation secondary to skeletal muscle regeneration. *Ann Neurol* **69**: 681-690, 2011
- 37) Wheeler TM, Lueck JD, Swanson MS, Dirksen RT, Thornton CA: Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* **117**: 3952-3957, 2007
- 38) Nakamori M, Pearson CE, Thornton CA: Bidirectional transcription stimulates expansion and contraction of expanded (CTG)\*(CAG) repeats. *Hum Mol Genet* **20**: 580-588, 2011
- 39) Gomes-Pereira M, Monckton DG: Chemical modifiers of unstable expanded simple sequence repeats: what goes up, could come down. *Mutat Res* **598**: 15-34, 2006