

介されている¹¹⁾。SETはミオトニー症候群の鑑別に有用であり、臨床症状も組み合わせた改変された診断チャートが最近報告された。LETは周期性四肢麻痺の麻痺症状を再現しうる重要な検査であるが、人種により正常値が異なることも指摘されており、解釈に注意を要する(図8,9)¹²⁾。

最後に

ミオトニー症候群の病態はチャネル機能解析やシミュレーションで理解が深まった。一方、低カリウム性周期性四肢麻痺はgating pore電流の発見により病態理解は進んだが、まだ不明な点も多い。これら疾患は良性と思われているが、学校・社会生活に大きな支障をきたしていることもしばしばであり、患者の悩みは大きい。診断に苦慮することも多いが注意深く問診・診察を行い、電気生理学的検査により診断することは神経内科医に求められる仕事であり、今後いつその診断向上が望まれる。

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)の成果による。

文 献

- 1) Matthews E, Fialho D, Tan SV, et al. The non-dystrophic myotonias : molecular pathogenesis, diagnosis and treatment. *Brain* 2010 ; 133 : 9-22.
- 2) Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, 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* 2002 ; 10 : 35-44.
- 3) Cannon SC. Voltage-sensor mutations in channelopathies of skeletal muscle. *J Physiol* 2010 ; 588 : 1887-95.
- 4) Cannon SC. Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain. *Annu Rev Neurosci* 2006 ; 29 : 387-415.
- 5) Venance SL, Cannon SC, Fialho D, et al. The primary periodic paralyses : diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain* 2006 ; 129 : 8-17.
- 6) Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature* 2007 ; 446 : 76-8.
- 7) Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. Depolarization-activated gating pore current conducted by mutant sodium channels in potassium-sensitive normokalemic periodic paralysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 19980-5.
- 8) Tsujino A, Maertens C, Ohno K, et al. Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 7377-82.
- 9) Ryan DP, da Silva MR, Soong TW, et al. Mutations in potassium channel Kir2.6 cause susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 2010 ; 140 : 88-98.
- 10) Kubota T, Roca X, Kimura T, et al. A mutation in a rare type of intron in a sodium-channel gene results in aberrant splicing and causes myotonia. *Hum Mutat* 2011 ; in press.
- 11) 有村由美子, 迫田俊一, 有村公良. 筋チャネル異常症の電気生理診断は可能か. *臨床神経生理学* 2001 ; 29 : 221-7.
- 12) Tan SV, Matthews E, Barber M, et al. Refined exercise testing can aid DNA-based diagnosis in muscle channelopathies. *Ann Neurol* 2011 ; 69 : 328-40.

* * *

症例報告

著明な高CK血症と軽微な眼輪筋の筋強直を呈した ナトリウムチャンネル異常症の1例

笠間 周平¹⁾ 木村 卓¹⁾ 梶山 幸司¹⁾
武田 正中¹⁾ 高橋 正紀²⁾ 芳川 浩男^{1)*}

要旨：高CK血症にて当院を受診し、診断にいたった家族歴のない13歳男性を報告する。3歳時より運動中から運動後の下肢の疼痛、筋のこわばりを自覚。小学生時よりマラソン中、両下腿に疼痛とこわばりが出現し、走れなくなるといった症状が出現していた。収縮をくりかえすことによって生じ、寒冷で増悪する眼輪筋の筋強直症をみとめた。遺伝子検査で骨格筋型ナトリウムチャンネルのM1592Vの変異をみとめた。本変異は高カリウム性周期性四肢麻痺を呈することが多いが、本症例では明らかな麻痺発作をみとめず、先天性パラミオトニーの臨床像を呈した。ナトリウムチャンネル異常症はまれであるが、筋強直が軽微な症例も存在するため、CK高値の鑑別として本疾患をうたがうことが重要と考えられた。

(臨床神経 2011;51:120-124)

Key words：ナトリウムチャンネル異常症、先天性パラミオトニー、高CK血症

はじめに

骨格筋ナトリウムチャンネルの遺伝子異常によっておこる疾患をナトリウムチャンネル異常症と総称し、症状によって高カリウム性周期性四肢麻痺、先天性パラミオトニー、カリウム惹起性ミオトニー(ナトリウムチャンネルミオトニー)などと呼ばれている¹⁾²⁾。軽症のばあいは、見過ごされる可能性もある疾患である。今回われわれは、CK高値により医療機関を受診し、ナトリウムチャンネル異常症と診断しえた一例を経験したので文献的考察をふくめて報告する。

症 例

患者：13歳 男性

主訴：運動後の筋痛、筋のこわばり

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：親族に同様の症状なし。

現病歴：3歳時より運動中から運動後の下肢の疼痛、筋のこわばりをみとめていたため近医小児科を受診し、筋炎のうたがいがいとして無治療で経過観察されていた。小学生時よりマラソン中、両下腿に疼痛とこわばりが出現し、走れなくなるといった症状が出現。こわばりは翌日まで持続したが、一日安静にしていると自然軽快していた。2006年5月下旬、主治医の

退職にともない当院のリウマチ膠原病科を紹介された。採血の前日に激しい運動をしたり、当日筋力低下や筋痛をともなうことはなかったが、血清CK値は5月下旬に1,503U/l、6月中旬875U/l、7月上旬15,809U/lと変動した。糖原病をうたがわれ、2006年8月上旬当院の内分泌代謝内科に入院となり、神経内科併診となった。

入院時現症：身長140cm (159.2±7.75 (13歳男における平均値±標準偏差：文部科学省、平成21年度学校保健統計調査))、体重32kg (49.1±10.18 (同左))、血圧94/52mmHg、脈拍58分・整、体温36.8℃、貧血黄疸なし、胸腹部異常所見なし。

神経学的所見：意識清明。眼球運動制限、顔面神経麻痺、舌偏位、萎縮をみとめなかった。筋力低下、筋萎縮、筋肥大をみとめず。舌、母指球の叩打性筋強直症や、両手の把握性筋強直症をみとめなかった。感覚系、反射、協調運動に異常をみとめなかった。

検査所見：血算ではWBC 7,810/μl、RBC 486×10⁴/μl、Hb 12.8g/dl、Ht 39.6%、Plt 26.9×10⁴/μl、血沈はESR (1Hr) 3mm。

生化学検査ではTP 6.7g/dl、Alb 4.4g/dl、T-bil 0.7mg/dl、D-bil 0.1mg/dl、AST 22U/l、ALT 12U/l、LD 192U/l、CK 310U/l、BUN 16mg/dl、UA 5.3mg/dl、Cre 0.51mg/dl、Na 143mmol/l、K 3.9mmol/l、Cl 105mmol/l、Ca 9.3mg/dl、無機P 5.9mg/dl、T-Cho 184mg/dl、HDL-Cho 66md/dl、TG 62mg/dl

*Corresponding author: 兵庫医科大学内科学神経・脳卒中科 [〒663-8501 兵庫県西宮市武庫川町 1-1]

¹⁾兵庫医科大学内科学神経・脳卒中科

²⁾大阪大学医学部付属病院神経内科・脳卒中科

(受付日：2010年7月1日)

dl, NH₃ 32μmol/l, CRP 0.0mg/dl, FBS 82mg/dl, 乳酸 6.1 mg/dl, ビルビン酸 0.57mg/dl, アルドラーゼ 6.5IU/l, FFA 0.31mEq/l, ミオグロビン 44ng/ml, 尿中ミオグロビン <5ng/ml.

内分泌検査ではコルチゾール 27.3μg/dl, TSH 1.75μIU/ml, FT3 3.11pg/ml, FT4 1.12ng/dl.

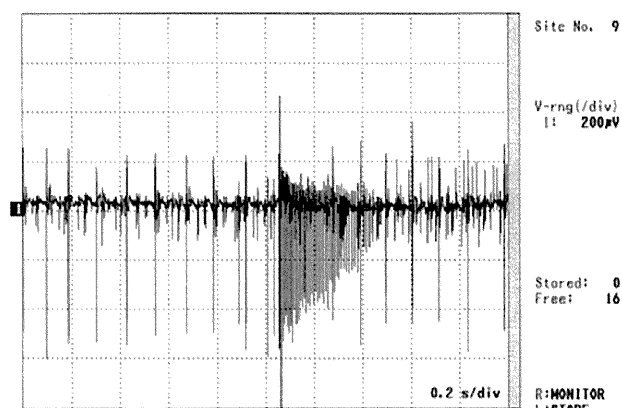


Fig. 1 Myotonic discharge in the tongue muscle of the patient.

糖原病の鑑別のためおこなった阻血下前腕運動負荷試験は正常反応であった。

胸腹部レントゲンでは異常なし, 心電図: 異常なし.

筋電図は舌, 上腕二頭筋, 大腿直筋, 前脛骨筋, 腓腹筋で施行し, 収縮波形は正常であったが, 舌において刺入時, 比較的持続時間1秒以内の短いミオトニー放電をみとめた(Fig. 1). 上腕二頭筋にて施行した筋生検では, HE染色・PAS染色やATP染色でも異常はみとめなかった.

入院後経過: 入院後, 「冬にセーターを脱ぐとき変な顔になる。」という家族の訴えがあり, 詳細に診察したところ, 通常の開閉眼ではみとめないが, 開閉眼をしばらく続けた後, 強い閉眼後に眼輪筋の筋強直症をみとめた (Fig. 2).

筋強直症の鑑別として, 有村らによる電気生理学的検査を右母指球筋にておこなった³⁾. prolonged exercise test, short exercise test, cooling test すべておこなったが, 明らかな異常をみとめなかった.

臨床的に筋強直症をみとめ, 筋生検上ジストロフィー変化をみとめないことより, 筋強直症候群の一種と考えた. 筋のこわばりが運動開始直後よりも, マラソンのような長時間の運動中に出現すること, 冬にセーターを脱ぐ時に眼輪筋の筋強直症が出現するなど寒冷で増悪することよりパラミオトニー

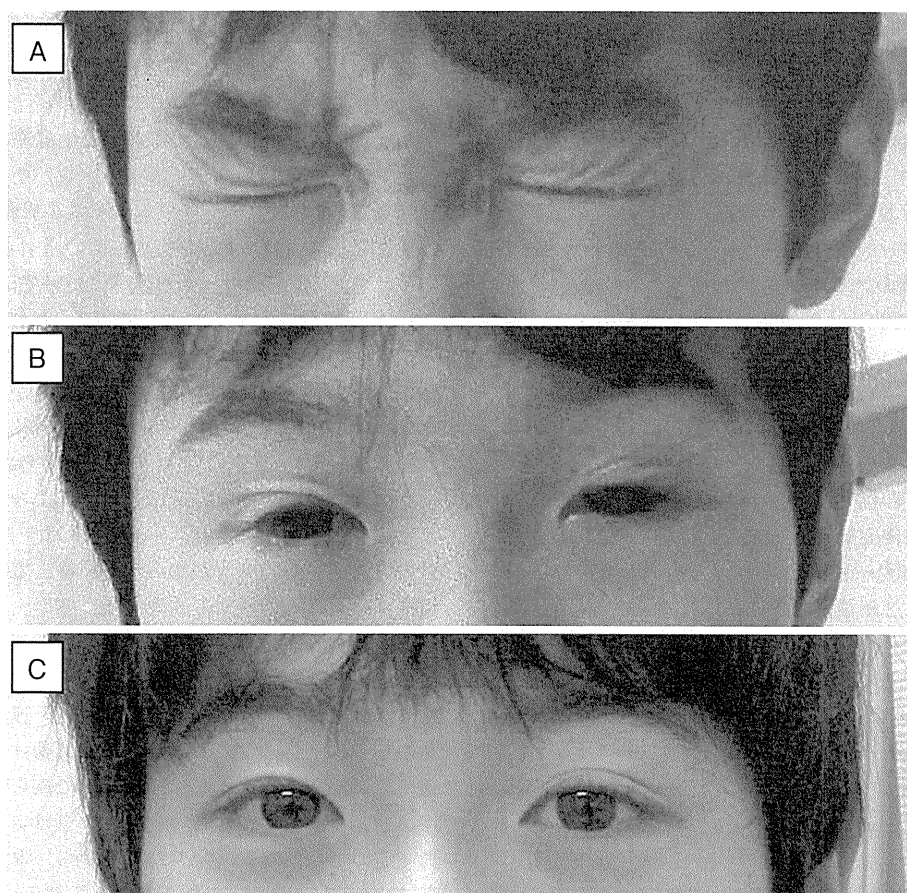


Fig. 2 Paradoxical eyelid myotonia (Paramyotonia).

The patient was asked to repeatedly close and open his eyes. Following a final forceful lid closure (A), eye opening was severely impaired (B). He could open his eyes in a few minutes (C).

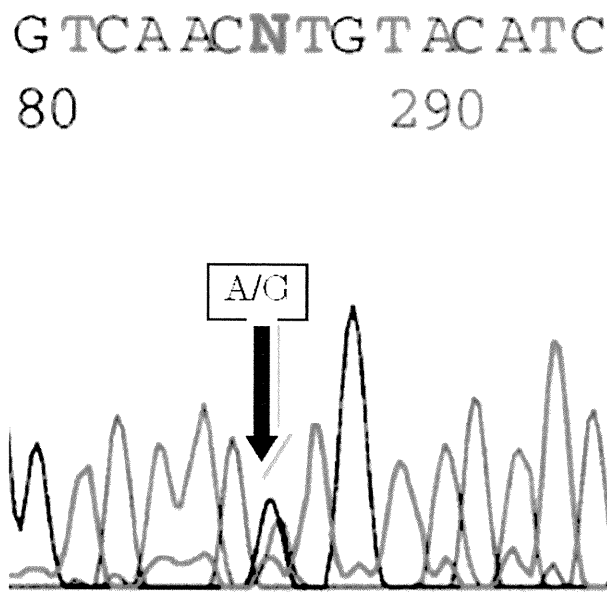


Fig. 3 A sequencing chromatogram of the PCR product from the patients' sample. Nucleotide sequence analysis shows a A-to-G transition at nucleotide position 4774.

を考えた。そこでまず本人、両親の同意をえた上でナトリウムチャンネル遺伝子異常について検索をおこなった。末梢白血球よりゲノムDNAを抽出、骨格筋型ナトリウムチャンネル遺伝子 exon22-24 について、それぞれ PCR で増幅後、cycle 法による direct sequence をおこなったところ、4774 番塩基がアデニンからグアニンへのヘテロ置換をみとめた (Fig. 3)。この変異は 1592 番アミノ酸のメチオニンからバリンへの置換を生じるものであり、すでにナトリウムチャンネル異常症をひきおこすことが報告されている。よって、本例はナトリウムチャンネル異常症と診断した。両親にも同意をえた上で同遺伝子検査をおこなったが、異常はみとめなかった。塩酸メキシレチン 150mg/日の投与をおこない、筋のこわばりなどは消失した。またマラソン中のこわばりが軽くなり、以前より順位があがった。CK 値は入院後安静のみにて正常化した。以後外来受診時の検査では、800~5,500 と明らかな誘因がないばあいでも高値で推移した。2 年後症状増悪にて当科再受診した。成長にともなうメキシレチンの相対的投与量低下と判断し、塩酸メキシレチン 300mg に増量した。その際寒冷刺激による眼輪筋の筋強直症をみとめ、パラミオトニーに矛盾しない所見であった (Fig. 4)。

考 察

本例は運動中から後の筋のこわばり、冬季の眼輪筋の筋強直症を自覚していたが、診断にはいたらず、高 CK 血症精査の過程でナトリウムチャンネル異常症と診断しえた一例である。

一般にナトリウムチャンネル異常症は 10 歳以前の発症が多いが、軽症であれば医療機関を受診しないことも考えられる。また本疾患は常染色体優性遺伝形式をとるが、本例では両親には遺伝子異常をみとめず、de novo 変異例であることが考えられた。今回のように高 CK 血症で医療機関を受診するばあいがあり、高 CK 血症の鑑別として、家族歴がない症例でも、本疾患のようなナトリウムチャンネル異常症を念頭に置き、顔面筋に好発する筋強直症の有無、周期性麻痺発作の有無などの詳細な問診および診察、筋電図などの精査をおこなうことの必要性を示したという点で貴重な症例と考えられる。

運動後の高 CK 血症、下腿のこわばりといった症状より当初 Mc Ardle 病などの糖原病をうたがったが、阻血下前腕負荷試験、筋生検で特徴的な症状なく、糖原病は否定的となった。臨床的に両手の把握性筋強直、叩打性筋強直をみとめず、舌の筋強直もみとめなかった。しかし、眼輪筋で強収縮後の筋強直をみとめた。ナトリウムチャンネル異常症では四肢筋で筋強直がめだたないばあいでも、顔面筋で筋強直をみとめることが多く、眼輪筋の筋強直症が唯一の症状であったナトリウムチャンネル異常症も報告されており¹⁾、診察時に注意深く観察することが必要と考えられた。本例においても、患者、家族は眼輪筋の筋強直症に関連した症状と自覚せず、精査の過程で明らかになった。針筋電図は眼輪筋では施行していないが、舌のみでミオトニー放電をみとめ、四肢ではみとめなかった。筋チャンネル異常症の鑑別としておこなわれている有村らの電気生理学的検査を右母指球筋でおこなったが、明らかな異常はみとめず鑑別は困難であった。

本症例では運動後に CK の著明な上昇をみとめた。先天性ミオトニーなどのクロライドチャンネルパチーでは血清 CK 正常であるのに対し、ナトリウムチャンネル異常症では、どの病型でも正常値の 5 倍から 10 倍の CK の上昇をみとめることがあるとされているが¹⁾、その機序については明らかではない。また、CK の値を記載している報告も、われわれがしらべた範囲ではなかった。本例では入院中安静にて正常値まで低下したが、外来時麻痺や筋のこわばりの自覚がないばあいでも増加していた。本疾患では、麻痺発作の有無にかかわらず、膜の易興奮性のため、CK が上昇すると考えられた。

ナトリウムチャンネルの遺伝子異常によっておこる疾患としてカリウム惹起性ミオトニー、先天性パラミオトニー、高カリウム性周期性四肢麻痺が知られている。臨床的にはそれぞれカリウム投与で増悪する筋強直症、寒冷・運動によって誘発される筋強直症およびそれに続く筋力低下、カリウム投与によっておこる筋力低下が特徴的とされる¹⁾。本例は開閉眼を続けていると出現する眼輪筋の筋強直症、運動中および翌日の筋のこわばりおよびこわばりのために動けなくなるという症状で、高カリウム性周期性四肢麻痺でみられる弛緩性麻痺とはことなると考えられる。寒冷時、マラソンなどの長時間の運動で筋のこわばりが誘発される点から、本症例における筋強直は、パラミオトニーであると考えられる。したがって本症例は、臨床的には先天性パラミオトニーの範疇に属する。M1592V 変異はナトリウムチャンネル変異の中では一般に高カ

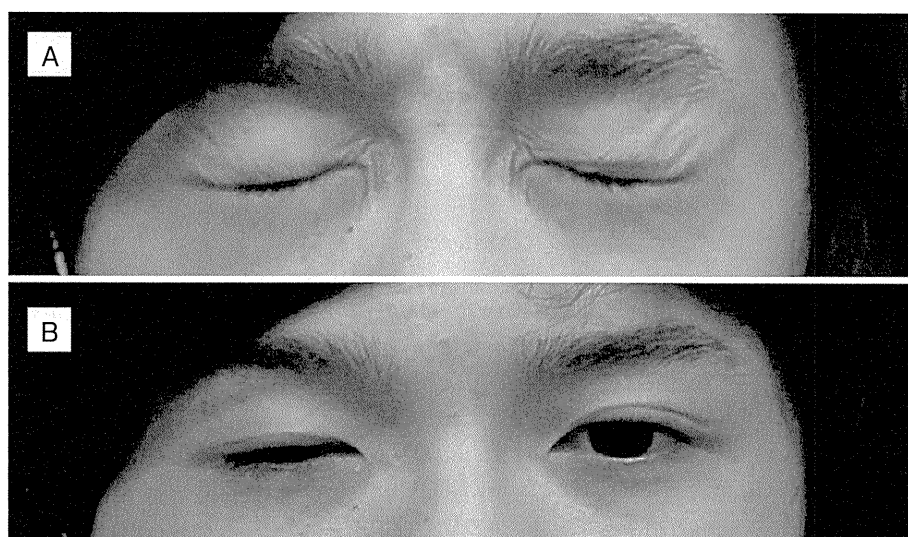


Fig. 4 Local cooling elicits myotonia. After the patient's right eye was cooled for 15 min, he was asked to repeatedly close and open his eyes. After a final strong lid closure (A), his right eye opening was slower than his left eye (B).

リウム性周期性四肢麻痺の表現型をとり、高カリウム性周期性四肢麻痺の変異のうちもっとも多いもののひとつである⁵⁾。KellyらはM1592V変異を持った大家系を報告した。症状を調査できた49人中46人で全身性麻痺発作をみとめ、そのうち38人で寒冷によってひきおこされる筋のこばりのみをみとめている。2人では寒冷によってひきおこされる筋のこばりのみで麻痺発作はみられなかった⁶⁾。このようにこの変異での表現型は多彩であり、麻痺発作をとまわらない例もあると考えられる。また他のナトリウムチャンネル変異においても、同じ変異を持つ患者間で多彩な臨床像をとることが報告されている⁷⁾⁸⁾。しかし、本例のような臨床的にパラミオトニーを呈した孤発例からM1592V変異を診断しえた報告はない。これらのことから、ナトリウムチャンネル異常症の臨床像には、ナトリウムチャンネルそのものの性質の違いだけではなく、他のチャンネルやナトリウムチャンネルを調節する細胞内環境も影響している可能性を示唆している。さらに、ナトリウムチャンネル異常症を臨床的に分類することはしばしば困難であり、連続的なスペクトラムの中で理解されるべきものである。

本例ではメキシレチン投与開始後、マラソン中に筋のこばりがおこりにくくなり、眼輪筋の筋強直症がおこりにくくなるなど効果がみられた。メキシレチンはナトリウムチャンネルの閉状態に比較し、開あるいは不活化状態での親和性が高いため、筋強直などの状態によりチャンネルを抑制することによって、筋強直症状の緩和作用を示すとされている⁹⁾。ナトリウムチャンネル異常症の症例では、幼少時よりこのような症状があり、患者は生まれながらの性質と認識し、医療機関を受診しないことも考えられる。このような症例を早期に発見、治療することにより、患者のQOLを上げることが可能である。

筋強直症の写真(Fig. 1, 4)は、患者、保護者より文書による同意をえて、掲載した。

本症例の要旨は第87回日本神経学会近畿地方会(2007年12月1日、大阪)で発表した。

謝辞：本研究は平成22年度厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「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開発に向けた基盤研究」の助成を受けておこなった。

文 献

- 1) Lehmann-Horn F, Rudel R, Jurkat-Rott K. Nondystrophic Myotonias and Periodic paralyses. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. Myology 3th ed. New York: McGraw-Hill; 2004. p. 1257-1300.
- 2) 追田俊一, 樋口逸郎. 筋疾患 Naチャンネルミオトニー. Annual Review 神経 2007;246-253.
- 3) 有村由美子, 有村公良. ミオトニア症候群と周期性四肢麻痺の神経生理学的診断. 脳の科学 2003;25:183-187.
- 4) Stunnenberg BC, Ginjaar HB, Trip J, et al. Isolated eyelid closure myotonia in two families with sodium channel myotonia. Neurogenetics 2009;11:257-260.
- 5) Miller TM, Dias da Silva MR, Miller HA, et al. Correlating phenotype and genotype in the periodic paralyses. Neurology 2004;63:1647-1655.
- 6) Kelly P, Yang WS, Costigan D, et al. Paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis associated with a met1592-to-val substitution in the skeletal muscle sodium channel alpha subunit—a large kindred with a novel phenotype. Neuromuscul Disord 1997;7:105-111.
- 7) Brancati F, Valente EM, Davies NP, et al. Severe infantile hyperkalemic periodic paralysis and paramyotonia congenita: broadening the clinical spectrum associated

with the T704M mutation in SCN4A. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1339-1341.

8) Lee SC, Kim HS, Park YE, et al. Clinical Diversity of SCN 4 A-Mutation-Associated Skeletal Muscle Sodium

Channelopathy. *J Clin Neurol* 2009;5:186-191.

9) 高橋正紀, 青池太志, 佐古田三郎. 骨格筋 Na チャネルの遅い不活性化と遺伝性筋疾患. *生体の科学* 2005;56:247-253.

Abstract

A case of muscle sodium channelopathy with markedly high value of serum creatine kinase and mild eyelid myotonia

Shuhei Kasama, M.D.¹⁾, Takashi Kimura, M.D.¹⁾, Kouji Kajiyama, M.D.¹⁾, Masanaka Takeda, M.D.¹⁾, Masanori P. Takahashi, M.D.²⁾ and Hiroo Yoshikawa, M.D.¹⁾

¹⁾Department of Internal Medicine, Division of Neurology, Hyogo College of Medicine

²⁾Department of Neurology, Osaka University Hospital

We report on a Japanese 13-year-old male without a family history of muscle disease admitted to our hospital due to an elevated serum creatine kinase. From the age of 3 he was complaining of muscle stiffness during and after exercise. At the age of 7 he experienced muscle stiffness and weakness during long-distance running, which would continue till the next day, disappearing only after resting for a day. Upon examination, we noted that repeated eyelid contractions induced myotonia that increased in the cold. Electromyography revealed myotonic discharge in the tongue muscle. Genetic analysis revealed a mutation of Nav1.4, M1592V. Although this mutation had originally been reported in families with Hyperkalemic periodic paralysis (Hyper PP), we diagnosed as paramyotonia congenita due to the symptoms of exercise and cold-induced myotonia without an attack of generalized weakness. This case suggest that sodium channelopathy is very rare, but should be considered in the differential diagnosis of an elevation of serum creatine kinase even if coexisting myotonia is only mild.

(*Clin Neurol* 2011;51:120-124)

Key words: sodium channelopathy, paramyotonia congenita, elevated serum creatine kinase

RNA結合蛋白質が引き起こす筋強直性ジストロフィー

Myotonic dystrophy and RNA-binding proteins



古戒道典(写真) 石浦章一

Michinori KOEBISU and Shoichi ISHIURA

東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系

◎筋強直性ジストロフィー(DM1)は、CTG リピートの伸長により発症する優性遺伝疾患である。伸長したリピートはさまざまな経路で症状をもたらすが、そのひとつに RNA レベルでの毒性があげられる。これまでの研究で、CUG リピートをもつ RNA は複数の RNA 結合蛋白質の挙動を変化させ、多様な RNA 代謝経路に異常をもたらすことが明らかになってきた。本稿では、そのなかで CELF ファミリーと MBNL ファミリーという2つの RNA 結合蛋白質に焦点を絞り、DM1 の病理機構のなかでどのような役割を担っているかについて概観したい。



Key word

筋強直性ジストロフィー(DM1)、選択的スプライシング、翻訳制御、mRNA分解

DM1の発症機構

筋強直性ジストロフィー(myotonic dystrophy type 1: DM1)で異常伸長がみられる CTG リピートは、DMPK 遺伝子の3'非翻訳領域(3'UTR)に存在する¹⁻⁴⁾。そのため CTG リピートの伸長は蛋白質のアミノ酸配列には直接影響しないが、伸長したリピートはその周辺のヘテロクロマチン構造を変化させたり^{5,6)}、DMPK 遺伝子の転写産物の核外搬出を阻害したりして⁷⁾、DMPK 遺伝子やその下流にある SIX5 遺伝子の発現量を抑制すると考えられている^{8,9)}。ノックアウトマウスの解析から、これらの遺伝子の発現量の低下が一部の症状を引き起こすことが示唆されており、伸長リピートによる遺伝子発現の抑制は、DM1 の病理機構の重要な側面となっている¹⁰⁻¹²⁾。一方で、多くの研究が伸長した CTG リピートが RNA レベルで毒性をもつことを示唆している。たとえば、CUG リピート RNA を発現するトランスジェニックマウス(HSA^{LR})は、ミオトニアや骨格筋の組織学的な特徴、選択的スプライシングの異常など、DM1 患者にみられる症状を再現する^{13,14)}。In situ hybridization で DM1 患者細胞のリピート RNA を検出すると CUG リピートが核内で凝集体を形成するこ

とが示され、この CUG リピートの奇妙な挙動も注目を集めてきた^{7,15)}。

さらに 2001 年には、DM1 とは異なる遺伝子座にリピートの伸長をもつ DM の家系がみつかった¹⁶⁾。この家系では、第3番染色体の ZNF9 遺伝子のエクソン1に存在する CCTG リピートが伸長している。ZNF9 遺伝子やその周辺に遺伝子座をもつ遺伝子は、DMPK 遺伝子や SIX5 遺伝子との明らかな関連はなく、このあらたな DM の発見は伸長したリピート RNA それ自身が DM の発症原因になることを強く示唆している。

伸長した CUG リピート RNA は、RNA 結合蛋白質の挙動を変化させることで毒性を発揮すると考えられている¹⁷⁾。すなわち、RNA 結合蛋白質が DM1 の病理機構の中心的役割を担っているともいえる。CUG リピート RNA に結合する蛋白質として、mucleblind-like(MBNL)と CUG-BP-ETR-3-like factors(CELF)とよばれる RNA 結合蛋白質ファミリーが見出され、DM1 の症状の発現にこれら2つの蛋白質ファミリーが重要な役割を担うことが、多数の報告で示されている(図1)。DM1 で異常となるスプライシングの多くが、これらの蛋白質によって制御されうる。

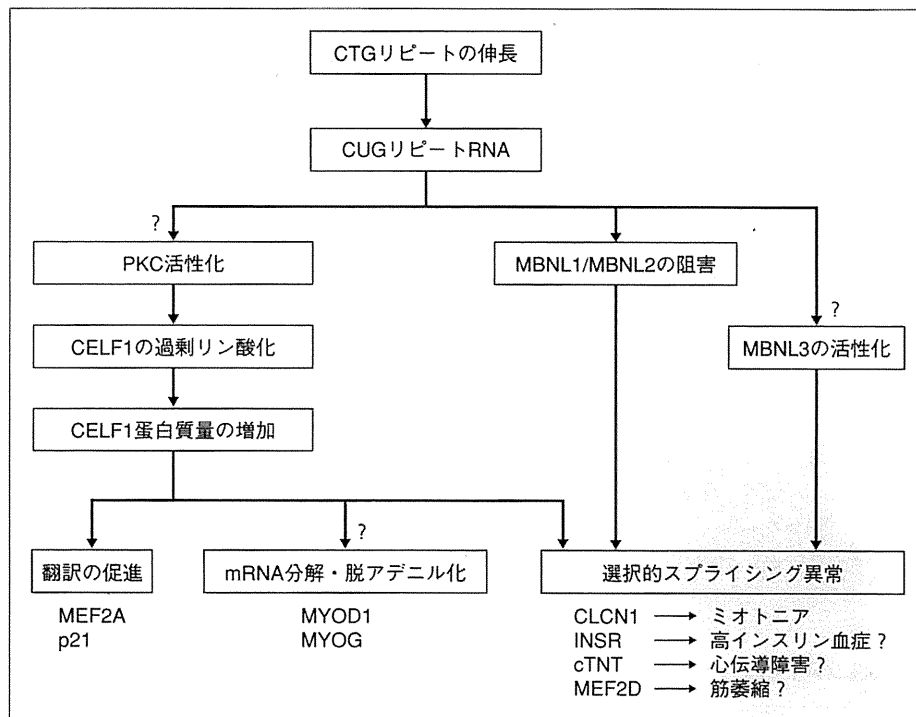


図 1 DMの発症機構モデル

本稿では MBNL, CELF ファミリーがそれぞれどのように DM1 の発症に関与しているかについて、最近の報告を踏まえて紹介したい。

● CELF1はリン酸化によって発現量が増加する

CELF ファミリーは CELF1/CUG-BP (CUG-binding protein) と CELF2/ETR-3 (embryonic lethal abnormal vision type RNA-binding protein 3) のホモログからなる RNA 結合蛋白質ファミリーであり、ヒトでは 6 つのホモログ (CELF1~CELF6) が同定されている。

CELF1 は CUG-BP という別名が示すとおり、CUG リピートに結合する蛋白質として発見された¹⁸⁾。HeLa 細胞の抽出物のなかに (CUG)₈ プローブに結合する蛋白質が見出され、CUG-BP と名づけられたのである。しかしその後の研究で、CELF1 はかならずしも CUG リピートに特異的に結合するのではないことが明らかになってきた。たとえば、当研究室の酵母 3 ハイブリッド法を用いた研究では、CELF1 は CUG リピートよりもむ

しろ UG リピートに選択的に結合することが示されている¹⁹⁾。そうした経緯をもつものの、CELF1 は DM1 の病理機構のなかで主要な因子として注目され続けている。その理由のひとつは、DM1 患者の筋組織で CELF1 蛋白質の発現量が上昇していることが観察されることである²⁰⁻²²⁾。Kuyumcu-Martinez らは、DM1 の細胞で CELF1 蛋白質が過剰にリン酸化され分解されにくくなった結果、発現量が上昇していることを示した²³⁾。また、培養細胞に CUG リピートを発現させると PKC がリン酸化により活性化し、PKC 阻害剤は CELF1 リン酸化を阻害した。しかし、リピート RNA がどのように PKC を活性化するのか、その経路については明らかになっていない。

CELF1 が注目されるもうひとつの理由は、CELF1 の過剰発現によって DM1 でみられる異常のいくつかが再現されることである。たとえば、マウスに CELF1 を過剰発現すると中心核や筋変性などの筋障害や心伝導障害を呈することから、CELF1 の発現量の上昇は骨格筋や心筋の筋障害に関与しているらしい²⁴⁻²⁷⁾。

● CELF1の活性化とDM1の発症

CELF1の発現量の上昇が筋障害をもたらす分子メカニズムについては、明確なことはわかっていない。ひとつの可能性は、筋組織の形成・維持にかかわる選択的スプライシングの異常であるが、近年、CELF1が選択的スプライシングの制御だけでなく、さまざまなRNA代謝や翻訳の制御にも関与することが明らかになってきた。

CELF1はmRNAの脱アデニル化と分解を制御するツメガエルEDEN-BP遺伝子のオルソログであり、EDEN-BP同様にmRNA寿命を制御しているらしい。Moraesらは、CELF1が寿命の短いmRNAに結合し、脱アデニル化を促進することを示した²⁸⁾。またVlasovaらは、CELF1がc-junやjunBなどの寿命の短いmRNAに結合しmRNAの分解を抑制すると報告している²⁹⁾。さらにLeeらは、RNA免疫沈降法とDNAマイクロアレイを組み合わせた方法(RNA-Chip法)でCELF1によるmRNA分解のターゲットを探索し、Myod1やMyogなどの筋特異的転写調節因子がCELF1のターゲット候補であることを同定した³⁰⁾。

一方で、CELF1は翻訳の制御にも関与することが報告されている。Timchenkoらは、CELF1を過剰発現するトランスジェニックマウスの骨格筋でp21とMef2Aの発現量が増加していることを見出した²⁴⁾。CELF1はどちらの遺伝子のmRNAにも直接結合し、結合依存的に翻訳を促進する。p21とMEF2Aはどちらも筋分化を促進する作用をもつと考えられており、これらの発現量の上昇はDM1の骨格筋でも観察されることから、DM1の発症機構を考えるにあたってとりわけ興味深い。

● MBNLファミリーはCUGリピートの機能阻害を受ける

一方、MBNLファミリーはショウジョウバエのmuscleblind遺伝子のオルソログであり、muscleblind-likeからこの名がついた。線虫からヒトに至るまで広く保存された遺伝子であり、ヒトやマウスでは3つのアイソフォーム(MBNL1、MBNL2、MBNL3)が同定されている。MBNLもCELFと同様に、CUGリピートに結合する蛋白質

としてみつかった³¹⁾。CELF1と異なり、MBNL1はCUGリピートおよびCCUGリピートと高い親和性をもち³²⁾、興味深いことに、DM1の骨格筋切片やCUGリピートを発現させた培養細胞をMBNL抗体で染色すると、MBNL1およびMBNL2がCUGリピートを形成する凝集体と共局在する像が観察される^{31,33)}。このことから、DM1患者の細胞内ではMBNLファミリー蛋白質がCUGリピートにトラップされ、本来の基質と結合できなくなることで機能が阻害されているのではないかと考えられるようになった。

MBNLの機能阻害がDM1の病理に関与するという仮説は、*Mbnl1*のノックアウトマウスの作製によって広く信じられるようになった³⁴⁾。*Mbnl1*を欠損する*Mbnl1*^{ΔE3/ΔE3}マウスは、塩素チャンネル*Clcn1*の選択的スプライシングの異常や、ミオトニア、筋線維の中心核、白内障、認知障害など、DM1患者が呈する異常を再現するのである。とくにDM1患者でみられる選択的スプライシング異常に対して、MBNL1の機能低下が重要な役割を担っているらしい。Duらは最近、DNAマイクロアレイを用いて*HSA*^{LR}マウスと*Mbnl1*^{ΔE3/ΔE3}マウスのスプライシングパターンを網羅的に探索し、この2系統のマウスが示すスプライシング異常が83%一致するという結果を得ている¹⁴⁾。またKanadiaらは、CUGリピートを発現する*HSA*^{LR}マウスに*Mbnl1*を過剰発現することで複数の選択的スプライシング異常が改善することを明らかにした³⁵⁾。これらの結果は、すくなくとも*HSA*^{LR}マウスの選択的スプライシング異常のかなりの部分が、*Mbnl1*の機能低下だけで説明できることを示している。

一方で、*Mbnl1*^{ΔE3/ΔE3}マウスは筋組織の障害をほとんど示さない。そのひとつの理由は、*Mbnl2*が*Mbnl1*の欠損を補償しているからかもしれない。実際、*Mbnl2*のノックアウトマウスも選択的スプライシングの異常や筋線維の中心核など、DM1の特徴を再現すると報告されており³⁶⁾、DM1患者や*HSA*^{LR}マウスではMBNL1とMBNL2がともにCUGリピートの凝集体にトラップされることで、より重篤な表現型が現れている可能性がある。

MBNL3に関しては最近、患者の骨格筋と心筋

で発現量が増加していることが見出された³⁷⁾。MBNL3 は、培養細胞に CUG リピートを発現させても発現量の上昇を示す。さらに、MBNL3 をマウス筋芽細胞である C2C12 に発現させると Mef2D の選択的スプライシングの制御を介して筋分化を抑制することも示された。DM1 患者における MBNL3 の発現量上昇のメカニズムや症状への寄与の解明は今後の課題であるが、MBNL1 や MBNL2 とは異なる機構で DM1 病理機構に関与する可能性が示されたのは興味深い。

● RNA結合蛋白質のバランスの異常とDM1

CELF 蛋白質と MBNL 蛋白質は、Clcn1 や心筋トロポニン T 遺伝子、インスリン受容体遺伝子などいくつかの選択的スプライシング制御において拮抗的に作用することがわかっている^{20,38-40)}。また、マウスの心臓では出生後に CELF1 の発現量が低下する一方、MBNL1 の発現量が増加することから、これらの RNA 結合蛋白質の発現量のバランスが筋の成熟を決定するというモデルも提唱されている⁴¹⁾。しかし、著者らはこれらに反する例も経験しており^{42,43)}、かならずしも拮抗説が正しいとは言いきれない。DM1 においては、CELF と MBNL のバランスの崩れが病理機構の根幹をなしている。これまでみてきたように、とくに CELF1 ではさまざまな RNA 制御機構を介して DM1 の諸症状を引き起こしている可能性があり、DM1 の多様な症状がどのような過程で生じるのか、今後さらなる解明が期待される。

文献

- 1) Brook, J. D. et al. : *Cell*, **68** : 799-808, 1992.
- 2) Aslanidis, C. et al. : *Nature*, **355** : 548-551, 1992.
- 3) Buxton, J. et al. : *Nature*, **355** : 547-548, 1992.
- 4) Harley, H. G. et al. : *Nature*, **355** : 545-546, 1992.
- 5) Steinbach, P. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, **62** : 278-285, 1998.
- 6) Otten, A. D. and Tapscott, S. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92** : 5465-5469, 1995.
- 7) Davis, B. M. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** : 7388-7393, 1997.
- 8) Thornton, C. A. et al. : *Nat. Genet.*, **16** : 407-409, 1997.
- 9) Boucher, C. A. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **4** : 1919-1925, 1995.
- 10) Reddy, S. et al. : *Nat. Genet.*, **13** : 325-335, 1996.
- 11) Sarkar, P. S. et al. : *Nat. Genet.*, **25** : 110-114, 2000.
- 12) Klesert, T. R. et al. : *Nat. Genet.*, **25** : 105-109, 2000.
- 13) Mankodi, A. et al. : *Science*, **289** : 1769-1773, 2000.
- 14) Du, H. et al. : *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17** : 187-193, 2010.
- 15) Taneja, K. L. et al. : *J. Cell Biol.*, **128** : 995-1002, 1995.
- 16) Liquori, C. L. et al. : *Science*, **293** : 864-867, 2001.
- 17) Ranum, L. P. and Cooper, T. A. : *Annu. Rev. Neurosci.*, **29** : 259-277, 2006.
- 18) Timchenko, L. T. et al. : *Nucleic Acids Res.*, **24** : 4407-4414, 1996.
- 19) Takahashi, N. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277** : 518-523, 2000.
- 20) Savkur, R. S. et al. : *Nat. Genet.*, **29** : 40-47, 2001.
- 21) Timchenko, N. A. et al. : *Mol. Cell Biol.*, **21** : 6927-6238, 2001.
- 22) Ladd, A. N. et al. : *J. Biol. Chem.*, **279** : 17756-17764, 2004.
- 23) Kuyumcu-Martinez, N. M. et al. : *Mol. Cell*, **28** : 68-78, 2007.
- 24) Timchenko, N. A. et al. : *J. Biol. Chem.*, **279** : 13129-13139, 2004.
- 25) Ho, T. H. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **14** : 1539-1547, 2005.
- 26) Koshelev, M. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **19** : 1066-1075, 2010.
- 27) Ward, A. J. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **19** : 3614-3622, 2010.
- 28) Moraes, K. C. et al. : *RNA*, **12** : 1084-1091, 2006.
- 29) Vlasova, I. A. et al. : *Mol. Cell*, **29** : 263-270, 2008.
- 30) Lee, J. E. et al. : *PLoS One*, **5** : e11201, 2010.
- 31) Miller, J. W. et al. : *EMBO J.*, **19** : 4439-4448, 2000.
- 32) Kino, Y. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **13** : 495-507, 2004.
- 33) Fardaei, M. et al. : *Nucleic Acids Res.*, **29** : 2766-2771, 2001.
- 34) Kanadia, R. N. et al. : *Science*, **302** : 1978-1980, 2003.
- 35) Kanadia, R. N. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** : 11748-11753, 2006.
- 36) Hao, M. et al. : *Dev. Dyn.*, **237** : 403-410, 2008.
- 37) Lee, K. S. et al. : *J. Biol. Chem.*, **285** : 33779-33787, 2010.
- 38) Kino, Y. et al. : *Nucleic Acids Res.*, **37** : 6477-6490, 2009.
- 39) Philips, A. V. et al. : *Science*, **280** : 737-741, 1998.
- 40) Ho, T. H. et al. : *EMBO J.*, **23** : 3103-3112, 2004.
- 41) Kalsotra, A. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105** : 20333-20338, 2008.
- 42) Koebis, M. et al. : *Genes Cells*, 2011. (in press)
- 43) Ohsawa, M. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **409** : 64-69, 2011.

神経領域のRNA病

RNA Aberrations in Neurological Disorders

大野欽司

Kinji Ohno

ヒトはおよそ22,000個の遺伝子しか有さないが、組織特異的・発達段階特異的なスプライシング制御を行うことにより10万種類以上のタンパク質の発現を可能にしている。この精巧に制御されたスプライシング機構の破綻は各種疾患の原因となり神経疾患もその例外ではない。本稿では、先天性筋無力症候群、脊髄性筋萎縮症、筋強直性ジストロフィー、アルツハイマー病、FTDP-17、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、FXTAS、Prader-Willi症候群、Rett症候群、脊髄小脳失調症8型、傍腫瘍神経症候群、筋萎縮性側索硬化症におけるスプライシング病態を概説する。



スプライシングシス因子、スプライシングトランス因子

はじめに

ヒトゲノムプロジェクトとそれに引き続き現在も精力的に行われているアノテーションプロジェクトにより我々ヒトは22,000個という限られた数の遺伝子しか有さないことが明らかになってきた。ヒトは組織特異的・発達段階特異的なスプライシング制御を行うことにより10万種類以上の多様なタンパク質の発現を可能にしている。ヒトを含む高等生物は遺伝子数を増加させることなくスプライシング制御の多様性を実現することにより進化してきた。このスプライシング機構の破綻は神経疾患を含む各種病態を引き起こすことが近年明らかになってきている^{1), 2)}。

I スプライシング制御機構

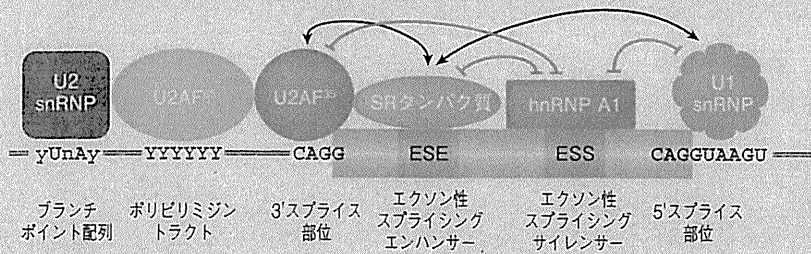
高等な真核生物ではpre-mRNA スプライシングはあまり保存されていない配列モチーフを持つスプライシングシス因子と、それを認識するスプライシングトランス因子により行われる(図1)。スプライシングシス因子には、ブランチポイント配列(branch point sequence: BPS)、ポリピリミジントラクト(polypyrimidine tract: PPT)、5'および3'スプライス部位、エクソン上またはイントロン上のスプライシングエンハンサーおよびサイレンサー(exonic/

intronic splicing enhancer/silencer: ESE, ESS/ISE, ISS)が存在する。ESEやESSはエクソン上に存在し、アミノ酸をコードすると同時にスプライシングシス因子としても働く。ISEやISSはイントロン上に存在するスプライシングシス因子であるが、配列モチーフからその存在を推察することは一般に困難である。これらシス因子を認識するスプライシングトランス因子の組織特異的・発達段階特異的な発現が時空間的に精巧に制御された遺伝子発現を可能にしている。

II スプライシングシス因子の変異によるスプライシング異常症

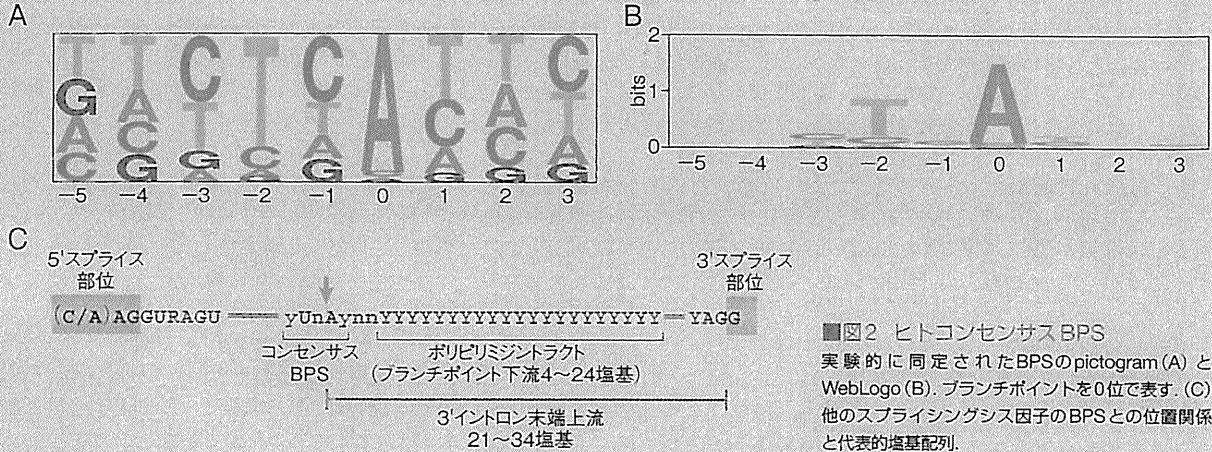
1. 5'スプライス部位の遺伝子変異

神経疾患に限らず一般に遺伝子変異によるスプライシング異常は5'スプライス部位で多く報告が行われてきた。筆者らはSD-Scoreという新規パラメータを提唱し³⁾、ウェブサービスプログラムを提供している(http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/SD_Score/sd_score.html)。SD-Scoreは9塩基からなる5'スプライス部位のヒトゲノムにおける頻度の常用対数である。ミニジーンを用いた検定により筆者らのアルゴリズムは97.1%の感度と94.7%の特異度で5'スプライス部位の遺伝子変異によるスプライシング異常を検出できることを報告した。SD-Scoreを用いてヒトゲノムに存在する189,249カ所の5'スプライス部位にあらゆる変異を導入するシミュレーションを行ったところ、エクソン-3位か



■図1 代表的なスプライシングシス因子とトランス因子

組織特異的・発達段階特異的なSRタンパク質やhnRNP A1などのスプライシングトランス因子の発現が時間的に正確な選択的スプライシングを実現する。ISEとISSは図示していないが、ESEやESSと同様の機能を持つ。



■図2 ヒトコンセンサスBPS
実験的に同定されたBPSのpictogram (A) とWebLogo (B)。ブランチポイントを0位で表す。(C) 他のスプライシングシス因子のBPSとの位置関係と代表的塩基配列。

らイントロン+6位までの1塩基置換の多くがスプライシング異常を起こす可能性が示唆され、事実、筆者らは見逃されていた4種類のスプライシング変異を同定した。

2. ヒトコンセンサスBPS

ブランチポイントを破断する遺伝子変異も数多く存在すると予想される。従来報告されてきたコンセンサスBPSは、少数の観察に基づくもの、もしくは酵母のUACUAACコンセンサス配列に類似の配列を*in silico*解析により抽出したものであった。筆者らは実験的にヒトコンセンサスBPSがyUnAyであることを見いだした⁴⁾(図2)。このコンセンサスBPSは6bitsの情報しか有さず筆者らが予想していたよりもはるかに多様性が高く、BPSの予測する有効なアルゴリズムの構築は不可能であった。

3. 異所性のAG塩基はAGスキャン機構を破壊する

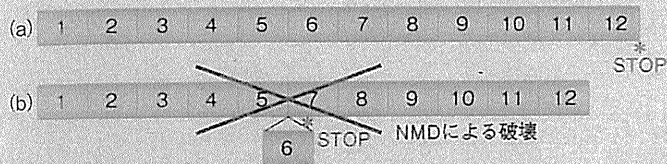
イントロン3'末端とエクソン5'末端はCAG|Gというコンセンサス配列を持つ。AGはブランチポイントよりスキャンされ、最初のAGがイントロン3'末端と認識される。

遺伝子変異によるイントロン3'末端近傍のAGの挿入はこの機構を破壊する。

4. ESEやESSを破断する遺伝子変異

Gorlovらはミスセンスの16~20%以上はESEを破断するスプライシング変異であると予測した⁵⁾。この予測値は高すぎると思われるが、一方、多くのESE/ESS破断変異が見逃されていることも事実である。ESE/ESSのコンセンサス配列の保存度は低く、いくつかの予測アルゴリズムがウェブ上で提供されている。なかでも、Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>)は、過去に報告された複数のアルゴリズムの網羅的な検索を可能にしている。しかし、ESE/ESS配列の保存度が低いために現在提供されている予測アルゴリズムはいずれも多くの偽陽性を返し、患者mRNAもしくはミニジーンによるmRNA解析が必要である。筆者らは、先天性筋無力症候群において*CHRNAE1* E154XとEF157V⁶⁾、*COLQ* E415G⁷⁾がESEを破断することを報告したが、いずれも変異タンパク質の解析で異常を検出できずにmRNA解析を行って初めてスプライシング異常を見いだした。

正常アレルmRNA



変異アレルmRNA



■ 図3 NASRE

正常*CHRNE*から正常にスプライスされた転写産物(a)とエクソン6がスキップした転写産物(b)が作られる。転写産物(b)はPTC (premature termination codon)を有するためにNMDによって破壊される。エクソン7の7塩基欠失(矢頭)により正常転写産物(c)にPTCが生じ、一方、エクソン6をスキップした転写産物(d)はリーディングフレームが回復してNMDによる破壊を受けなくなる。

5. ISEやISSを破断する遺伝子変異

イントロン上のスプライシングシス因子を破断する変異の同定はエクソン上のものよりも困難である。イントロンはエクソンよりも長く、かつ、イントロン上のシス因子を予測する適切なアルゴリズムが存在しないためである。先天性筋無力症候群において*CHRNA1* IVS3-8G>AがhnRNP Hとの結合を約100倍減弱し下流のエクソンP3Aが常にmRNAに含まれることを筆者らは報告した⁸⁾。さらに、PTB(ポリピリミジントラクト結合タンパク質)もエクソンP3Aのスプライシングを抑制するトランス因子であることを同定し、タンニン酸がPTBの発現を上昇させることによってスプライシング異常を補正することを報告した⁹⁾。

6. 離れたエクソンのスキッピング(NASRE)

単一の遺伝子変異が離れたエクソンのスキッピングを起こすことがある。先天性筋無力症候群において筆者らは*CHRNE*遺伝子のエクソン7の7塩基欠失により上流101塩基のエクソン6がスキッピングすることを見だしNASRE (nonsense-associated skipping of a remote exon)と名付けた⁶⁾(図3)。*CHRNE*エクソン6(101塩基)のスプライシングシグナル(シス因子)は弱く正常においてもスキップされるが、この異常スプライシング産物はNMD(nonsense-mediated mRNA decay)機構により破壊される。エクソン7の7塩基欠失により、エクソン6がスキップした異常スプライシング産物はNMDによる破壊を免れ、一方、正常スプライシング産物はNMDにより破壊される。NASREは他の遺伝子における離れたエクソンスキッピングの説明も可能である。

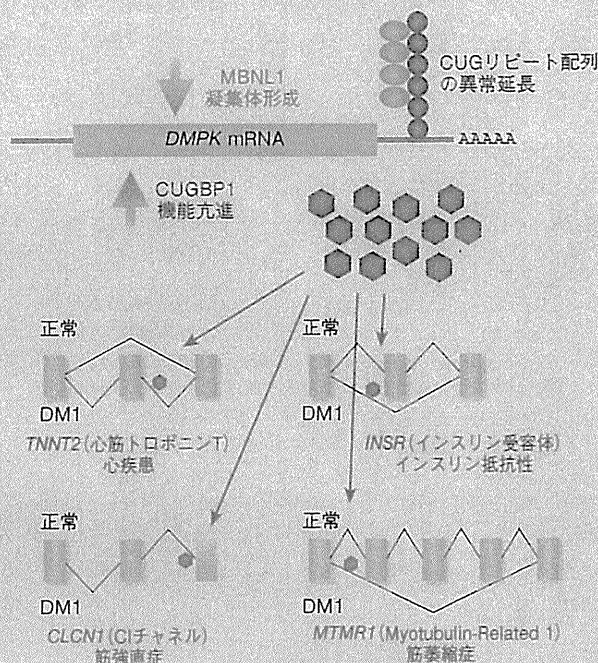
III 各種神経筋疾患におけるスプライシング異常症

1. 脊髄性筋萎縮症(SMA)

脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy; SMA)は常染色体劣性の脊髄前角細胞の変性疾患であり骨格筋萎縮と筋力低下を特徴とする。SMAは*SMN1*遺伝子の機能喪失変異によって起きる。ヒトはほとんど同じ配列を持つ*SMN1*遺伝子と*SMN2*遺伝子の両者を染色体5q13上に持つ。*SMN1*と*SMN2*はほぼ同一配列を持つが、*SMN2*はエクソン7の第6の塩基がCからTに置き換わっている。この置換によってスプライシング因子であるSF2/ASFが結合をするESEが破断される¹⁰⁾。さらに、*SMN2*はイントロン7の第100位にAからGへの置換を有するためにhnRNP A1の結合配列ができており、エクソン7のスキッピングを起こす¹¹⁾。*SMN2*エクソン7のスキッピングは治療域のバルプロ酸やサルブタモールによって補正が可能である。

2. 筋強直性ジストロフィー

筋強直性ジストロフィーは常染色体優性遺伝性疾患で筋萎縮、筋力低下、筋強直、白内障、インスリン抵抗性、性腺機能低下、心伝導障害、知能障害を特徴とする。筋強直性ジストロフィーには、*DMPK*遺伝子3'非翻訳領域(UTR)のCTGリピート配列の異常延長によるDM1(dystrophia myotonica type 1)と、*ZNF9*遺伝子イントロン1のCCTGリピート配列の異常延長によるDM2(dystrophia myotonica type 2)がある。いずれにおいてもリピート配列の異常延長がスプライシ



■図4 筋強直性ジストロフィーにおけるスプライシング異常 DM1においてはDMPK遺伝子3'UTRの異常延長したCUGリピード配列にMBNL1が結合し機能低下が起き、一方、CUGBP1の機能亢進が起き、これらスプライシングトランス因子の標的遺伝子のスプライシング異常が起きる。4種類の代表的な標的遺伝子を示す。

ングトランス因子MBNL1 (muscleblind-like 1) を核内RNA封入体に閉じ込め、PKC (protein kinase C) の活性化を介してスプライシングトランス因子CUGBP1 (CUG binding protein 1) の機能亢進を起こし、標的遺伝子のスプライシング異常を起こす¹²⁾ (図4)。

3. アルツハイマー病とFTDP-17

孤発性アルツハイマー病において、スプライシングトランス因子HMGA1aの過剰発現によりPS2遺伝子エクソン5が特異的にスキッピングする。低酸素がHMGA1a過剰発現を誘発するため、アルツハイマー病脳におけるHMGA1a過剰発現はアルツハイマー病末期の呼吸不全状態を反映しているのかもしれない。正常脳組織においてもtauタンパク質をコードするMAPTエクソン10は選択的スプライシングを受けており、エクソン10上のN279K, K280del, L284Lの3種類の遺伝子変異はスプライシングシス因子を破断もしくは増強することによりスプライシング異常を起こし、FTDP-17 (frontotemporal dementia with parkinsonism linked to

chromosome 17) を引き起こす¹³⁾。

4. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD)

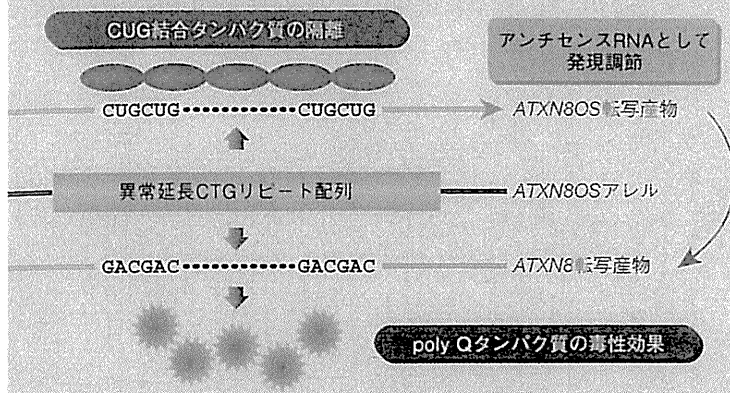
顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (facioscapulohumeral muscular dystrophy: FSHD) はDuchenne筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィーについて3番目に多い筋ジストロフィーであり、顔面、肩甲部、上腕の骨格筋が強く侵される。FSHDにおいては4qサブテロメア領域(4q35)のD4Z4と名付けられた3.3kbのリピード配列部位の異常な短縮が認められる。D4Z4の短縮によりD4Z4上流に位置するFRG1の発現が上昇し、TNNT3やMTMR1のスプライシング異常を起こす¹⁴⁾。しかし、FRG1を介したスプライシング異常は筆者らを含む複数のグループで再現ができない(未発表データおよび私信)。

5. 脆弱X関連振戦/運動失調症候群(FXTAS)

脆弱X症候群 (fragile X mental retardation syndrome) はFMRI遺伝子の5'UTRのCGGリピード配列の異常な延長により、FMRIの過剰なメチル化が起きFMRI発現が低下することによって起きる。一方、FMRIのCGGリピード配列の中等度の異常延長は動作時振戦、パーキンソン症候群、高次脳機能障害、末梢神経障害を特徴とするFXTAS (fragile X-associated tremor/ataxia syndrome) を引き起こす。FXTASではhnRNP A2やMBNL1を含むCGG結合タンパク質が異常延長したCGGリピード配列に結合し、その標的遺伝子のスプライシング異常を引き起こす¹⁵⁾。

6. Prader-Willi症候群(PWS)

PWSは肥満、筋緊張低下、筋力低下、精神発達遅延、短軀、低ゴナドトロピン性性腺機能低下、四肢短縮を特徴とする常染色体優性遺伝性疾患である。染色体15長腕近位側(15q11-q13)は正常においてはインプリンティングがされており、父もしくは母由来の単一アレルのみが発現する。発現するべき父親由来の15q11-13領域が欠損するとPWSになる。一方、ほぼ同じ領域にある発現するべき母親由来のUBE3Aが欠損するとアンゲルマン症候群になる。核小体低分子RNA (snoRNA) HBII-52がPWSの欠失領域に存在する。HBII-52はセロトニン受容体2CをコードするHTR2CエクソンVbのESSに結合し、PWSにおけるHBII-52はHTR2Cのスプライシング異常を起こし、PWSにおけるセロトニン系機能異常の原因となる¹⁶⁾。



■図5 脊髄小脳失調症8型のRNA病態
ATXN8OSの異常延長したCTGリピート配列は3
種類の病態機構を引き起こす。

7. Rett症候群

Rett症候群は自閉症、てんかん、失調性歩行、特有の常同手（てもみ動作）を特徴とするX染色体優性遺伝性疾患で、男性は胎生致死で、女性のみが罹患する。Rett症候群はメチルCpG結合タンパク質をコードするMECP2の遺伝子変異によって発症する。MeCP2はスプライシングトランス因子YB-1に結合し、YB-1の調節障害が複数の標的遺伝子のスプライシング異常を起こす¹⁷⁾。

8. 脊髄小脳失調症8型(SCA8)

脊髄小脳失調症8型 (spinocerebellar ataxia type 8 : SCA8) はポリグルタミン酸をコードしないATXN8OS遺伝子のCTA/CTGリピート配列の異常延長によって起きる。ATXN8OSはATXN8 opposite strandを意味する。異常延長したCUGリピート配列はCUGBP (CUG-binding protein) と結合し、CUGBPの機能低下を引き起こす。さらに、相補鎖にコードされたATXN8のCAGリピート配列の異常延長はポリグルタミン酸鎖をコードし神経細胞に蓄積する(図5)。それに加えATXN8OSはATXN8のアンチセンスRNAであり、ATXN8OSのCTA/CTGリピート配列の異常延長はATXN8の発現調節に影響を与える可能性が示唆される¹⁸⁾。

9. 傍腫瘍神経症候群(PND)

傍腫瘍神経症候群 (paraneoplastic neurological disorders : PND) では神経系以外の腫瘍が液性因子を分泌、もしくは、腫瘍細胞と神経細胞に共通に発現する分子に対する抗体を作ることにより様々な神経徴候を惹起する病態である。傍腫瘍性眼瞼クローヌス・ミオクローヌス症候群 (paraneoplastic ocular myoclonus ataxia : POMA) では、神経細胞特異的スプライシング因子Novaファミリーに対する自己抗体

が作られる。傍腫瘍性脳脊髄炎/感覚性ニューロパチー (paraneoplastic encephalomyelitis and sensory neuropathy : PEN/SN) では、自己抗体はHuファミリーのRNA結合タンパク質を認識する。Huはショウジョウバエのスプライシングトランス因子Elavのヒトホモログである¹⁹⁾。両病態ともスプライシングトランス因子の機能低下により標的遺伝子のスプライシング異常が起きる。

10. 筋萎縮性側索硬化症(ALS)

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は選択的な運動ニューロンの変性疾患である。TDP-43はスプライシングトランス因子であり、脆弱X症候群の原因遺伝子CFTRエクソン9のスキッピングを惹起する²⁰⁾。ALSにおいてはリン酸化されユビキチン化された異常なTDP-43が脊髄前角細胞に蓄積する。さらに、遺伝性および孤発例のALSにTDP-43遺伝子のミスセンス変異が同定されている²¹⁾。さらに、2009年にRNA結合ドメインを持つFUSの遺伝子変異がALSにおいて同定され、神経細胞の細胞質に凝集体を作ることが報告された。TDP-43やFUSのALS発症に関わる分子機構が現在精力的に研究されている²²⁾。

おわりに

単一遺伝性疾患において遺伝子変異がスプライシングシス因子を破断することによりスプライシング異常を起こす例は古くから報告されてきている。しかし、スプライシングシス因子を予測する有効なアルゴリズムが存在しないために多くのスプライシングシス因子変異が見逃されてきていると予想される。すべての遺伝子変異においてスプライシングシス因

子の破断の可能性を検討する必要がある。また、スプライシングトランス因子の調節障害が各種神経疾患において明らかになりつつある。今後、さらにこれら病態機構の解明が進むとともに、治療を目指した制御研究が進展すると期待される。

PROFILE 大野欽司

■ 名古屋大学大学院医学系研究科 神経遺伝情報学
 ■ E-mail : ohnok@med.nagoya-u.ac.jp

1983年名古屋大学医学部卒業。1992年同大学院医学系研究科修士(医学博士)。1993年米國メイヨークリニック・ポスドク・助教。2004年に帰国。現教室教授。主な研究対象は、神経筋接合部、RNAスプライシング、酸化ストレス病態。

文献

- 1) Licatalosi DD, et al: Neuron (2006) 52: 93-101
- 2) O'Rourke JR, et al: J Biol Chem (2009) 284: 7419-7423
- 3) Sahashi K, et al: Nucleic Acids Res (2007) 35: 5995-6003
- 4) Gao K, et al: Nucleic Acids Res (2008) 36: 2257-2267
- 5) Gorlov IP, et al: Am J Hum Genet (2003) 73: 1157-1161
- 6) Ohno K, et al: Hum Mol Genet (2003) 12: 3055-3066
- 7) Kimbell LM, et al: J Biol Chem (2004) 279: 10997-11005
- 8) Masuda A, et al: Hum Mol Genet (2008) 17: 4022-4035
- 9) Bian Y, et al: Hum Mol Genet (2009) 18: 1229-1237
- 10) Cartegni L, et al: Am J Hum Genet (2006) 78: 63-77
- 11) Kashima T, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2007) 104: 3426-3431
- 12) Kuyumcu-Martinez NM, et al: Mol Cell (2007) 28: 68-78
- 13) Kondo S, et al: Genes Cells (2004) 9: 121-130
- 14) Gabellini D, et al: Nature (2006) 439: 973-977
- 15) Jacquemont S, et al: Lancet Neurol (2007) 6: 45-55
- 16) Kishore S, et al: Science (2006) 311: 230-232
- 17) Young JL, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2005) 102: 17551-17558
- 18) Chen WL, et al: Brain Res (2008) 1233: 176-184
- 19) Soller M, et al: Genes Dev (2003) 17: 2526-2538
- 20) Buratti E, et al: EMBO J (2001) 20: 1774-1784
- 21) Sreedharan J, et al: Science (2008) 319: 1668-1672
- 22) Lagier-Tourenne C, et al: Cell (2009) 136: 1001-1004

特集

筋ジストロフィーの分子病態から治療へ

筋強直性ジストロフィーの成因

石 浦 章 一

筋強直性ジストロフィー(DM)は、筋強直、精巢萎縮、白内障、耐糖能異常などを特徴とする全身性疾患である。わが国の筋ジストロフィーの中では一番多い疾患で、致死ではないものの、QOLの観点からも治療法の開発が望まれている。いちばん多い1型(DM1)の責任遺伝子は第19染色体にあるDMPKで、その3'非翻訳領域にあるCTGリピートの伸長が病気の直接の原因である。また最近、筋強直性ジストロフィー2型(DM2)も発見されたが、これは第3染色体にあるZNF9遺伝子中のイントロン1にあるCCTGリピートの伸長であることが判明した¹⁾。また海外の研究結果によれば、伸長したリピートだけを発現させたマウスでも筋強直などヒトと同じ症状が見られる²⁾ことも、このリピート原因説が有力になる証拠の一つとされた。

1. スプライシングの異常

本症ではスプライシングが異常になっており、これは伸長したCUGまたはCCUGリピートRNAに特定のスプライシング因子が結合することで本来の機能が果たせなくなり、30種類近くの遺伝子のスプライシングが異常になって全身症状が出現するという「RNA機能獲得説」が唱えられている(図1)¹⁾。例えば、耐糖能の異常はインスリン受容体、ミオトニアは塩素チャネル、筋力低下は各種筋タンパク質、心筋障害はトロポニンT、精神遅滞はAPPやタウなどのスプライシングが異常になり、機能が欠けたタンパク質ができ

ることで生じると考えられている。

われわれはかつて、スプライシング因子MBNL1がDM1とDM2に見られる二つの異なる型のRNAリピート(CUGおよびCCUG)に結合することを発見したが³⁾、現在ではこのMBNL1がDMでの種々の因子のスプライシングに大きく関わっていることが明らかになっている⁴⁾。一方、Timchenkoらはもう一つのリピートRNA結合タンパク質といわれているCUG-BP1(またはCELF1とも呼ばれる)に注目し、長く伸びたCUGリピートがPKCを活性化し、リン酸化を介してCUG-BP1を安定化してスプライシング異常を導くという説を提唱している⁵⁾。われわれはCUG-BP1の機能については懐疑的で、CUG-BP1がCUGリピートに結合しにくいことから生理的寄与は少ないと考えている⁴⁾。

2. リピートRNA結合タンパク質のスプライシング機能

われわれは、塩素チャネル・インスリン受容体・トロポニンTなどの試験管内スプライシングアッセイ系を確立し、MBNL1をはじめとするRNA結合タンパク質(スプライシング調節因子)の特異性を明らかにした。ヒトのMBNLには三つのアイソフォーム、CUG-BP1には六つのアイソフォームがあり、発現量や局在を異にしていることがわかっている。代表的な塩素チャネルミニ遺伝子を用いた結果を図2に示す⁶⁾。通常の細胞では、発症の初期にエクソン7aを含む胎児型遺

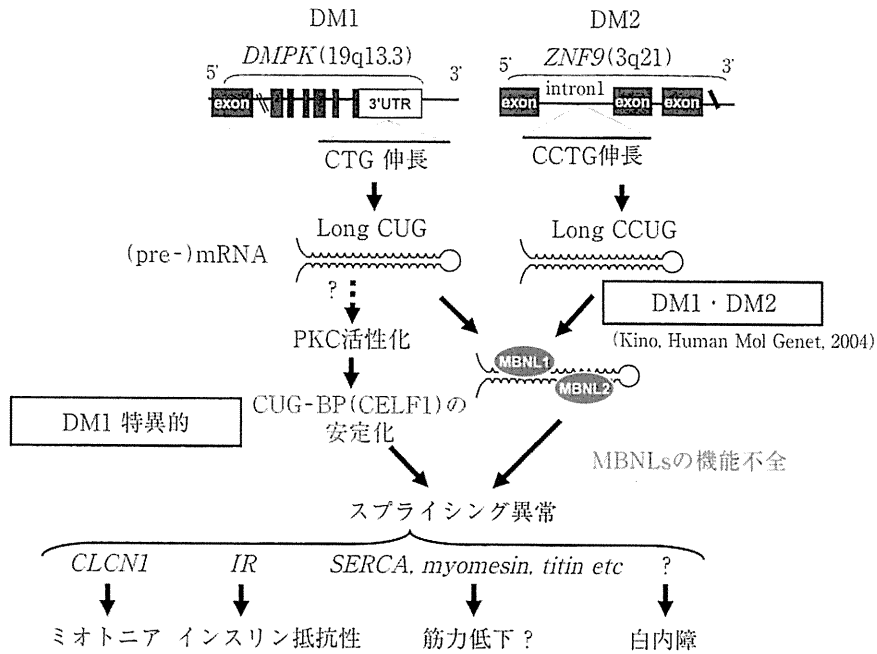


図 1 DM の発症機構

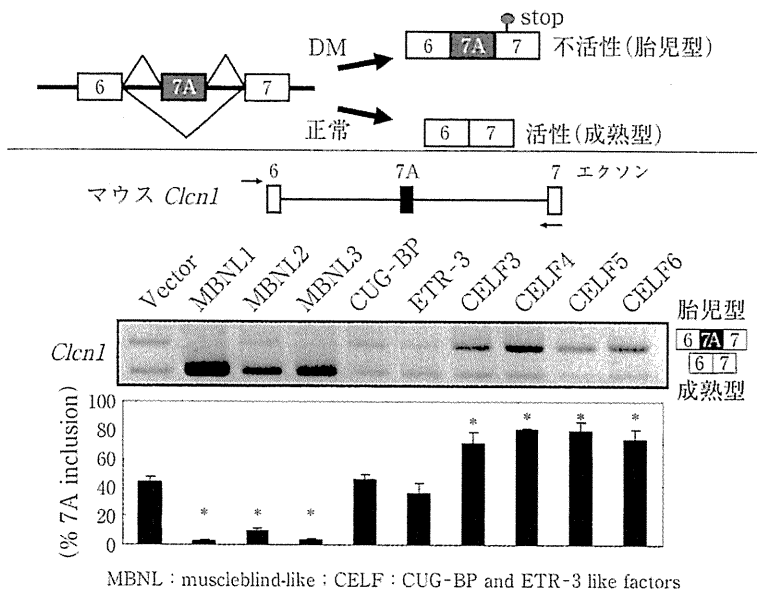


図 2 塩素チャネルのスプライシング

伝子が作られるが、発生が進むにつれてエクソン 7a を含まない成熟型の量が多くなっていく。胎児型ではエクソン 7a が付加されるために、すぐ後ろのエクソンに停止コドンが現れ、機能を持たない塩素チャネルができる。図 2 によれば、MBNL1-3 をトランスフェクトすると正常の機能を持つ成熟型が多く作られるようになり、CELF1-6 では機能を持たない胎児型が多くなる。この結果から、DM 筋では MBNL1 (骨格筋に多く発現している) の機能が十分でな

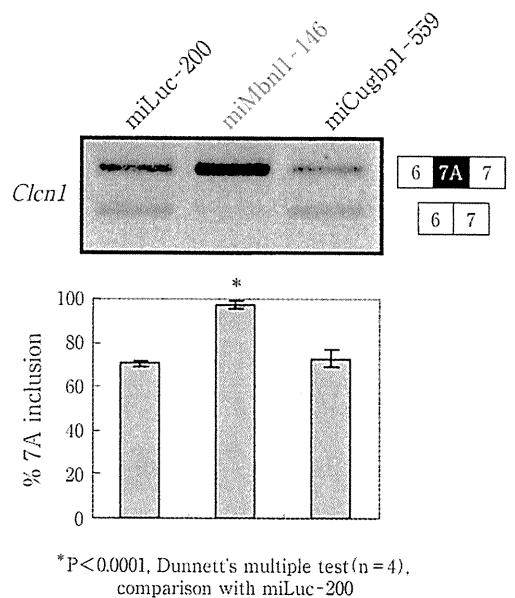


図 3 RNAi の実験

Clcn1 のスプライシングは MBNL1 によって行われていることが明らかである。

いか、または CUG-BP1 (これも筋肉に多く発現する) の機能が優先していることがわかる。また図 3 より、MBNL1 または CUG-BP1 を miRNA でノックダウンする実験より、正常筋の塩素チャネルのスプライシングには MBNL1 が働いていることがわかった。CUG-BP1 ノックダウンでは全く効果が認められなかった⁶⁾。

DM では、このような成熟型から胎児型への変

換が起こっており、一般に胎児型優位なスプライシングを行っている場合が多い。エクソン 22 を含む成熟型と含まない胎児型がある小胞体 ATP アーゼ (SERCA)、エクソン 5 を含む胎児型と含まない成熟型がある心筋トロポニン T、そしてエクソン 11 を含む成熟型と含まない胎児型があるインスリン受容体などがその例である。これらのスプライシングには、前出の MBNL、CELF ファミリーが関わっている。塩素チャンネル、SERCA、心筋トロポニン T、インスリン受容体すべてで MBNL1 と CUG-BP1 が逆に働いており、これらでは MBNL1 が成熟型の形成を、CUG-BP1 が胎児型の形成を促進する。すなわち、スプライシングに対する MBNL1 と CUG-BP1 の相反した作用が生理機能に密接に関わっていることが知られている。

3. 塩素チャンネルのスプライシングの正常化

そこで次に、MBNL1 によるスプライシング正常化を促進させるため、MBNL1 に応答する配列の探索を行った。定法どおり、欠失コンストラクトを用いて検討したところ、エクソン 7a 付近に MBNL1 応答配列があることがわかった⁶⁾。

そこで、その付近の mRNA に相補的なモルフォリノ・アンチセンス・オリゴヌクレオチドをデザインし、スプライシングがどう変わるかを検討した。対照には、アンチセンス法を初めてモデルマウスに適用した Rochester 大学の C. A. Thornton 教授が作った配列⁷⁾を使用した (図 4)。その結果、今回われわれが新しく同定した配列を用いた場合に、最大限の正常化が認められた。

4. その他の治療法

一般的に、CUG のアンチセンスを利用した方がスプライシング異常をすべて解除でき、全身症状を治療できるという考え方がある⁸⁾。しかしながら、正常遺伝子に存在する CUG 配列をノックダウンする可能性もあり、動物モデルで検証され

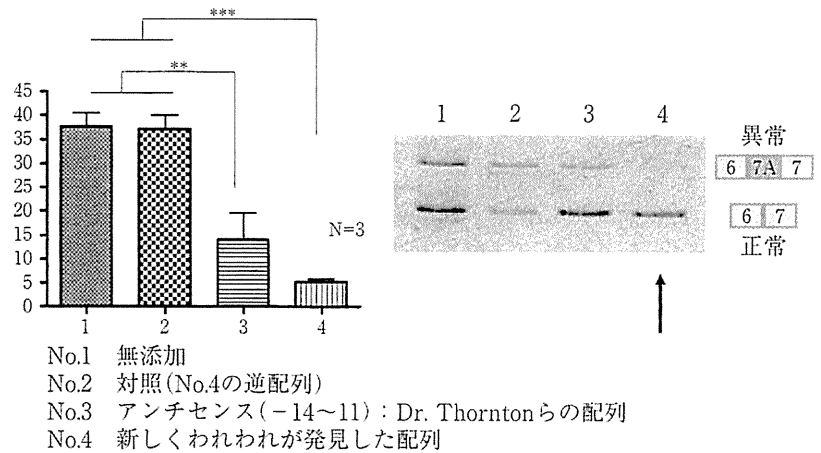


図 4 アンチセンス (モルフォリノ) による塩素チャンネルスプライシングの正常化

ているにすぎない。重要なのは DM 患者の QOL に大切な筋力低下をどう改善するかという点であり、これについてはほとんど知見が得られていない。われわれも DM 患者筋を用いたマイクロアレイにより、DM 筋で発現が変化している遺伝子を 119 個同定したが、そのどれが筋力低下に効いているかについては、まだわからない状態である。DM 筋では MBNL1 や CUG-BP1 の発現量は変わっておらず⁹⁾、これらの量の変化でスプライシング異常が起こるのではないことは確かである。今後は、この 119 個の遺伝子の解析によって筋力低下の原因がわかり、新しい治療法が確立されるのではないかと期待される。

●文献

- 1) Cho DH, Tapscott SJ : *Biochim Biophys Acta* 1772 : 195-204, 2007
- 2) Mankodi A, Logigian E, Callahan L et al : *Science* 289 : 1769-1772, 2000
- 3) Kino Y, Mori D, Oma Y et al : *Hum Mol Genet* 13 : 2004
- 4) Puscual M, Vicente M, Monferrer L et al : *Differentiation* 74 : 65-80, 2006
- 5) Schoser B, Timchenko L : *Curr Genom* 11 : 77-90, 2010
- 6) Kino Y, Washizu C, Oma Y et al : *Nucleic Acids Res* 37 : 6477-6490, 2009
- 7) Wheeler T, Lueck JD, Swanson MS et al : *J Clin Invest* 117 : 3952-3957, 2007
- 8) Wheeler T, Sobczak K, Lueck JD et al : *Science* 325 : 336-339, 2009
- 9) Nezu Y, Kino Y, Sasagawa N et al : *Neuromuscul Disord* 17 : 306-312, 2007

