

201317076B

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

「アンチセンスによる筋強直性ジストロフィーの治療の最適化」

に関する研究

平成 23～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 石浦 章一

平成 26 (2014) 年 4 月

目次

I. (総合) 研究報告	
筋強直性ジストロフィーの治療の最適化	
石浦 章一 1
II. (総合) 分担研究報告	
筋強直性ジストロフィーの治療の最適化	
西野 一三 4
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	
 9
IV. 研究成果の刊行物・別刷	
 15

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策研究事業）
（総合）研究報告書

アンチセンスによる筋強直性ジストロフィーの治療の最適化

総括研究者 石浦章一 東京大学大学院 総合文化研究科 教授

研究要旨

モデルマウスを用いて筋強直性ジストロフィー1型(DM1)の治療法の開発とその最適化を行った。まず、塩素チャンネル遺伝子のアンチセンスを効率よく筋肉内に導入するバブル・リポソーム法を確立した。その結果、超音波照射によりアンチセンスの筋細胞内への導入が促進され、塩素チャンネル遺伝子のスプライシングが正常化した。次に、低分子化合物によってスプライシングを正常化することに成功した。最後に、究極の治療法であるリピートに対するアンチセンスの効果も検討し、良好な結果を得た。

分担研究者：西野一三・国立精神・神経医療研究センター神経研究所・部長

A. 研究目的

筋強直性ジストロフィー1型(DM1)は筋強直、耐糖能異常、精神遅滞、精巣萎縮、白内障、などを伴う全身性症状を呈する疾患である。原因は、第19染色体にあるDMPK遺伝子の3'非翻訳領域にあるCTGリピートの伸長で、その結果、数多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考えられている。その理由は、スプライシング因子MBNL1がリピートRNAに結合し、本来のスプライシング機能が果たせないためである。

また本症は我が国の筋ジストロフィーの中では一番多く、筋力低下やミオトニアなどの治療法の開発が望まれており、QOL改善が最大の目標である。

平成23-25年度の目標は、ヒトDM1治療を見据えて、アンチセンスの効率の良い取り込み法の開発と、アンチセンス自体の改変、そして併用する低分子化合物の選択であった。

まず平成23年度は、塩素チャンネル遺伝子を用いて、スプライシングを正常化させるアンチセンス配列を同定し、それを効率良く筋肉に導入する方法の開発に力を注いだ。平成24年度には、塩

素チャンネル遺伝子のスプライシングを正常化させる低分子化合物を、化合物ライブラリーからスクリーニングし、マニユマイシンAを同定した。最後の平成25年度には、治療の最適化ということで、CTGに対するアンチセンスを修飾し、最適な投与方法を確認した。

これらは、モデル動物(CTGリピートを300含むトランスジェニックマウスHSA-LR)に導入して*in vivo*で検討した。

B. 研究方法(倫理面の配慮含む)

細胞でのスプライシングアッセイは以下のように行った。まず、塩素チャンネルのミニ遺伝子(エクソン6、7a、7でできている短い遺伝子)を用いて、エクソン7aの有無をPCRとゲル電気泳動で行った。エクソン7aを持たない正常型と、エクソン7aを含む異常型の比率は、正常筋では圧倒的に前者が多く、DM筋では後者が増加している。エクソン7a0-25をコードするモルフォリノアンチセンスオリゴを、塩素チャンネルのミニ遺伝子とともにCTG300を持つトランスジェニックマウスHSA-LRのtibialis anterior(TA)筋に1回注射した。最後の注射から2日後に、mRNAを抽出し、スプライシング頻度を測定した。

このとき、モルフォリノオリゴ(10 μ g)はバブル・リポソームとともに筋注した(全30 μ l)。その後、0-3Wの出力で超音波を0.5-3分照射し、

筋内にアンチセンスを導入した。

CTG リピートに対するアンチセンス導入に際しては、アンチセンスを vivo-モルフォリノ化して実験に用いた。

(倫理面への配慮)

今回の実験は、DM 患者生検筋からの mRNA スプライシング異常から派生した研究である。生検筋は、インフォームドコンセントを得て取得し、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を受けたものを用いた。また、動物実験については、東京大学の規定に従って行った。

C. 研究結果

(1) バブル・リポソーム法の検討

バブル・リポソームを用いるデリバリー法は比較的新しく、条件検討が必要であった。本研究では、出力、時間を変化させ、1 W の出力で超音波を 1 分間照射させることが最適条件であることが分かった。

(2) 塩素チャネル遺伝子のスプライシング正常化に関与するアンチセンス配列

いくつかの配列を検討した結果、最適なアンチセンス配列は、エクソン 7a の 0~25 に対するものであり、これを用いると細胞系では最もエクソン 7a スキッピングが起りやすくなった。アンチセンスによる内因性の塩素チャネル遺伝子のスプライシング正常化機能を PCR 法で定量した結果、異常型塩素チャネルのパーセンテージが 18% から 11% に低下した。これは対照 (正常) マウスの 10% に近い値であった。またこの時に、筋強直性ジストロフィーでスプライシング異常が指摘されている SERCA1 と Pdlim3 遺伝子の異常型スプライシングの比率は変化させなかった。以上の事実は、アンチセンスが特異的に塩素チャネル遺伝子に作用したことを示していた。

(3) アンチセンス投与による表現型の改善

エクソン 7a の 0~25 に対するアンチセンスを HSA-LR に投与したところ、ミオトニアが軽減した。動物実験で、初めて表現型改善効果が得られた。

(4) 低分子化合物のスクリーニング

塩素チャネルミニ遺伝子を用いたスプライシング系を使って、正常スプライシングを起こすとルシフェラーゼが発現するコンストラクトを作成した。この系に、Bioactive compounds400 種を添加し、光を指標に化合物を探索したところ、マニユマイシン A がスプライシングを正常化することがわかった。また、H-Ras をノックダウンするとスプライシングが正常化することから、H-Ras がこの系に関わっていることが判明した。

(5) CTG に対するアンチセンスの効果

まず長さを検討した結果、CAGCAG... と続くアンチセンス 15mer が最も効果が高かった。そこで、vivo モルフォリノ化した 15mer アンチセンスを、1 週間おきに 3 回に分けてマウスに投与したところ、塩素チャネルだけでなく SERCA1 遺伝子のスプライシングも正常化することが分かった。

D. 考察

この 3 年間の研究で、塩素チャネルスプライシングを正常化させるアンチセンスの最適配列を同定し、バブル・リポソーム法を確立してアンチセンスオリゴを効率よく導入することに成功した。加えて、低分子物質マニユマイシン A による塩素チャネルスプライシングの正常化がうまくいき、アンチセンスと併用する可能性が示唆された。

本症は、CTG 伸長に伴う各種スプライシング異常によっておこる。そこで、CTG に対するアンチセンスが、全症状を改善する可能性が考えられた。そのため、組織浸透性が良い vivo モルフォリノ誘導体を用いて治療実験を行ったところ、塩素チャネルだけではなく SERCA1 のスプライシングも正常化していた。

以上の結果は、アンチセンスによる治療の最適化という意味では、十分に目的を達したと言える。

E. 結論

筋強直性ジストロフィーのモデルである CTG

リピートを 300 含むトランスジェニックマウス HSA-LR に対して、私たちが新しく開発したアンチセンスモルフォリノオリゴ配列+バブル・リポソーム法は劇的な治療効果をもたらした。また、併用可能な低分子化合物も見つかった。今後は、CTG に対するアンチセンスの効きを高める修飾法の開発と、どれだけ低分子化合物併用の効果があるか、を検討したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ishiura, S., Kino, Y., Oma, Y., Sasagawa, N. & Nukina, N. (2011) MBNL proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *In Fifty years of neuromuscular disorder research after discovery of serum creatine kinase as a diagnostic marker of muscular dystrophy.* (Takeda, S. ed.) pp.18-25, Igaku-shoin, Tokyo, 2011.
- (2) Ohsawa, N., Koebis, M., Suo, S., Nishino, I. & Ishiura, S. (2011) Alternative splicing of PDLIM3/ALP, for α -actinin-associated LIM protein 3, is aberrant in persons with myotonic dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 64-69
- (3) Koebis, M., Ohsawa, N., Kino, Y., Sasagawa, N., Nishino, I. & Ishiura, S. (2011) The alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1. *Genes to Cells*, 16, 961-972
- (4) Zhao, Y., Koebis, M., Suo, S., Ohno, S. & Ishiura, S. (2012) Regulation of *SERCA1* alternative splicing by PMA through PKC pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 212-217
- (5) Oana, K., Oma, Y., Suo, S., Takahashi, M.P.,

Nishino, I., Takeda, S. & Ishiura, S. (2013) Manumycin A corrects aberrant splicing of *Cln1* in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Scientific Reports* 3, 2142

(6) Koebis, M., Kiyatake, T., Yamaura, H., Nagano, K., Higashihara, M., Sonoo, M., Hayashi, Y., Negishi, Y., Endo-Takahashi, Y., Yanagihara, D., Matsuda, R., Takahashi, M.P., Nishino, I. & Ishiura, S. (2013)

Ultrasound-enhanced delivery of morpholino with bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice. *Scientific Reports* 3, 2242

(7) Sasagawa, N., Koebis, M., Yonemura, Y., Mitsuhashi, H. & Ishiura, S. (2013) A high-salinity solution with calcium chloride enables RNase-free, easy plasmid isolation within 55 minutes. *BioScience Trends*, 7, 270-275

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アンチセンスによる筋強直性ジストロフィーの治療の最適化

研究分担者 西野 一三 （独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 部長

研究要旨

先天性筋強直性ジストロフィー（CDM）は、しばしば筋病理学的に先天性筋線維タイプ不均等症（CFTD）やX連鎖性ミオチューブラーミオパチー（XLMTM）と類似の所見を呈することがある。従って、CFTDの鑑別診断を十分に検討することが、先天性筋強直性ジストロフィーの正確な診断に繋がる。CFTD様の病理所見を呈する例の中に、*LMNA*遺伝子変異による例や*RYR1*複合ヘテロ接合型の例があることを見出した。従って、*LMNA*変異例や*RYR1*変異例もCDMとの鑑別を考慮すべきである。ただし、*RYR1*変異例では、顔面筋罹患や外眼筋麻痺が見られることがあり、CDMと比較してCKが低値を示していた。また、XLMTMとの鑑別においては、タイプ2C線維数とperipheral halo線維数の比率が鑑別に有用であることを明らかにした。

A. 研究目的

筋疾患が疑われる際には伝統的に筋生検が考慮されることに加えて、本邦では一部に遺伝子解析に対する慎重な考え方があることなどもあり、遺伝子診断に選考して筋生検が行われることが少なからずある。従って、筋病理から両疾患を鑑別する必要性は少なくない。我々はこれまでに、先天性筋強直性ジストロフィー（CDM）が臨床病理学的に先天性筋線維タイプ不均等症（CFTD）やX連鎖性ミオチューブラーミオパチー（XLMTM）と類似の所見を呈することを示してきた。このことは、CFTDやXLMTMとの鑑別診断を十分に検討することが、先天性筋強直性ジストロフィーの正確な診断に繋がることを示している。

そこで、1) CFTD様の病理所見を呈する例の中に核膜蛋白質A型ラミンをコードする*LMNA*遺伝子変異による例があるかどうか、2) 変異未確定でCFTD所見を呈する例の中に筋小胞体Ca⁺⁺遊離チャネルであるリアノジン受容体をコードする*RYR1*遺伝子変異例があるかどうか、3) XLMTMとCDMとの鑑別に有用な病理学的マーカーがあるかどうか、の検討

を行った。

CFTDは筋病理学的に、タイプ1線維がタイプ2線維より小径（12%以上の差）であることを特徴とする先天性ミオパチーである。臨床的には他の先天性ミオパチーと同様に筋緊張低下と筋力低下があり、多くは嚥下障害、関節拘縮、側弯症、細長い顔、高口蓋等を示す。原因遺伝子として*ACTA1*、*TPM3*、*SEPN1*の3遺伝子が知られている。しかし、悪性高熱症やセントラルコア病で認めるような筋病理所見とCFTDでは、筋病理学的に全く異なっているにも関わらず、乳幼児期に発症したCFTD類似の所見を呈する*RYR1*ミオパチーを見出したため、臨床、筋病理学的な検討を行った。

*LMNA*遺伝子は染色体1q21に存在し、その遺伝子変異は、Emery-Dreifuss型筋ジストロフィー（EDMD）、肢体型筋ジストロフィー1B型（LGMD1B）、先天性筋ジストロフィー（L-CMD）などの原因となる。EDMDは幼小児期に発症する緩徐進行性の筋ジストロフィー、病初期からの関節拘縮、心伝導障害を伴う心筋症を三主徴とする。LGMD1Bは近位筋優位の筋力低下と心伝導障害を伴う心筋症を特徴とするが、関節拘縮は明らかではない。L-CMDは乳児期

早期に発症し、重症の筋力低下と筋緊張低下、呼吸筋と頸部筋の筋力低下が目立つ。LMNAミオパチーの筋病理は筋線維の大小不同、壊死再生所見、間質結合組織の増加といった非特異的な筋ジストロフィーの特徴を示し、タイプ1線維、タイプ2線維ともに侵される。LMNAミオパチーとCFTDは筋病理学的にも臨床的にも異なっているにも関わらず、乳幼児期に発症しCFTDに類似した筋病理所見を呈するLMNAミオパチーを見出したため、臨床・筋病理学的に検討を行った。

RYR1 遺伝子は染色体 19q13 上に存在し、その蛋白質であるリアノジン受容体は、筋小胞体膜のカルシウム調整チャネルとして作用し、骨格筋の筋収縮連関に関与する。これまで、悪性高熱症患者での遺伝子変異が同定されているほか、先天性ミオパチーのなかのセントラルコア病の責任遺伝子としても知られている。近年、マルチコア病、中心核病など、他の先天性ミオパチーでの報告も散見され、先天性ミオパチーのなかで比較的多く認められる変異ではないか、とも言われている。悪性高熱症患者は日常生活では無症状であるが、誘発薬を投与されることにより発症し、一度発症すると症状は急激に悪化し死に至る。筋病理所見はほぼ正常で特有の所見は認めない。セントラルコア病は、軽度の筋力低下のほか側彎を認めるが、生命予後としては良好な疾患である。筋病理では、NADH-TR 染色で筋線維の中心部がコア様に抜け染色されない特徴的な所見がみられ、同じ *RYR1* 変異でも、その表現型は異なる。悪性高熱症やセントラルコア病で認めるような筋病理所見と CFTD では、筋病理学的に全く異なっているにも関わらず、乳幼児期に発症した CFTD 類似の所見を呈する *RYR1* ミオパチーを見出し、臨床・筋病理学的な検討を行った。

さらに、CDMとXLMTMの病理学的鑑別方法を十分に検討することによってCDMおよびXLMTMの正確な診断に寄与したいと考え、CDMとXLMTMの筋病理学的鑑別に有用なマーカーを探索するため各種組織学的検討を行った。

B. 研究方法

国立精神・神経医療研究センター骨格筋レポジトリに登録されている先天性ミオパチー症例 746 例のうち、筋病理学的に CFTD が示唆された 94 例 (CFTD 群) を対象とし、臨床像、臨床病理、遺伝学的解析を行った。また、遺伝学的に *DMPK* 遺伝子の三塩基配列伸長が示唆された 31 例 (CDM 群)、及び *MTM1* 変異の同定されている 37 例 (XLMTM 群) を対象とし、タイプ 2C 線維と peripheral halo を有する線維の割合を計算し、生検時年齢との関係を比較検討した。

(倫理面への配慮)

今回の研究は、DM 患者生検筋からの mRNA スプライシング異常から派生した研究である。国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を得た書式を用いて、検体の研究利用に対するインフォームドコンセントを取得している。

C. 研究結果

1) CFTD 群のうち 2 例に *LMNA* 遺伝子変異を見出した。一方、LMNA 群の 5 例で筋線維タイプ不均等 (FTD) が認められた。成人発症例 1 例を除く、6 例の発症年齢は 1 歳 2 ヶ月から 5 歳 (平均 2 歳 8 ヶ月) で、高口蓋や呼吸障害はなく、血清 CK 値は 915 ± 698 IU/L と全例で高値を示した。筋病理所見から計算した fiber size disproportion (%FSD) [$(\text{mean type 2 fiber diameter}) - (\text{mean type 1 fiber diameter}) / \text{mean type 2 fiber diameter} \times 100$] は $27.8 \pm 17.8\%$ で *ACTA1* 及び *TPM3* に遺伝子変異のある CFTD 9 例の %FSD ($41.3 \pm 13.5\%$) と比べ、有意差は認めなかった。

CFTD 群、LMNA 群それぞれのタイプ 1 線維とタイプ 2 線維の平均径を通常年齢における筋線維径と比較したところ、CFTD 群ではタイプ 1 線維萎縮を、LMNA 群ではタイプ 2 線維肥大を認めた。このことは、両群における FTD の成因の違いを示唆し

た。

2) CFTD 群のうち 6 例に RYR1 遺伝子変異を複合ヘテロ接合型で認めた。この 6 例の発症はいずれも生下時あるいは乳幼児期で、筋病理学的に診断されたのは 0 歳 6 ヶ月から 4 歳 (平均 1 歳 9 ヶ月) であった。出生時は、フロッピーインファントといった筋力・筋緊張低下を呈し、また呼吸障害も認め、人工呼吸器または酸素投与が行われている。しかし、その後の成長 (加齢) とともに軽快し、1 例を除いて人工呼吸器や酸素投与からの離脱が可能であった。運動発達も遅れを認めながらも、3 例で歩行獲得まで認めている。また顔面筋罹患は顕著で、外眼筋麻痺をも認めていた。血清 CK 値は、 54 ± 21 IU/L (基準値 45-163) と基準値内ではあるが低値を示した。筋病理所見から計算した fiber size disproportion (%FSD) [$(\text{mean type 2 fiber diameter}) - (\text{mean type 1 fiber diameter}) / \text{mean type 2 fiber diameter}$] $\times 100$ は $56.2 \pm 5.1\%$ であり、ほかの筋病理所見として、内在核や非典型的なコア構造を示す例も散見された。

3) CDM、XLMTM 両疾患において、タイプ 2C 線維と peripheral halo を有する筋線維の割合を計算し、筋生検時の年齢と比較した。CDM においてはタイプ 2C 線維、peripheral halo 線維共に、出生直後は高い割合を占めた。この割合は、筋生検時の年齢が高くなるに従い低下した。一方、XLMTM においては、出生直後はタイプ 2C 線維、peripheral halo 線維共に割合は少ないが、年齢が高くなるにつれて、peripheral halo 線維のみ顕著な増加を認めた。これらの結果は、両疾患における peripheral halo の成因の違いを示唆している。

D. 考察

1) LMNA 変異は筋病理所見上、CFTD と鑑別困難な例が存在する。高口蓋や呼吸障害を認めず、高 CK 血症があり、CFTD に類似した所見を呈する症例においては LMNA 遺伝子解析も考慮すべきと考えられた。

2) 今回同定し得た RYR1 複合ヘテロ接合型の

CFTD 類似例は、同様の RYR1 変異である悪性高熱症やセントラルコア病の表現型とは全く異なり、成長に伴い人工呼吸器からの離脱が可能であるなど、むしろ先天性筋強直性ジストロフィーに類似の臨床症状を示していた。筋病理上のほか、臨床症状においても類似する点があるが、顔面筋罹患や外眼筋麻痺といった臨床所見や、CK 値が低値である点は、RYR1 遺伝子を考慮すべき所見であると考えられた。

3) CDM において、特に出生直後に多数のタイプ 2C 線維を認めたのは、近年指摘されている筋線維の成熟遅延、すなわち未熟性の遷延を反映したためと推測された。一方、XLMTM においてはタイプ 2C 線維は少なく、peripheral halo が筋未熟性によるものではなく、近年の研究で明らかにされている筋構造維持の欠陥により筋障害が起こるといふ説を支持する結果であると考えられた。

E. 結論

LMNA 遺伝子変異における FTD 所見は、CFTD と異なり、タイプ 2 線維の肥大による相対的なタイプ 1 線維萎縮で成り立っていることが示唆された。RYR1 複合ヘテロ接合型の例は、先天性筋強直性ジストロフィーと筋病理学的にも臨床症状においても共通する点を認めたことから病因としては互いに近い位置にある可能性があると考えられた。CDM と XLMTM は、両疾患の疾患発症メカニズムの違いを反映して、病理学的にタイプ 2C 線維と peripheral halo を有する筋線維の割合から鑑別可能であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsunashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: *In Vivo* Characterization of Mutant Myotilins. *Am J Pathol.* 180(4):1570-1580, 2012

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, Imamura T, Araki N, Nishino I, Hayashi YK: The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM 72). PLoS Curr. 4:e5035add8caff4. ,2012

Mori-Yoshimura M, Okuma A, Oya Y, Fujimura-Kiyono C, Nakajima H, Matsuura K, Takemura A, Malicdan MC, Hayashi YK, Nonaka I, Murata M, Nishino I: Clinicopathological features of centronuclear myopathy in Japanese populations harboring mutations in dynamin 2. Clin Neurol Neurosurg. 114(6): 678-683, 2012.

Motoki T, Fukuda M, Nakano T, Matsukage S, Fukui A, Akiyoshi S, Hayashi YK, Ishii E, Nishino I: Fatal hepatic hemorrhage by peliosis hepatis in X-linked myotubular myopathy: A case report. Neuromuscul Disord. 23(11): 917-921, 2013

Liang WC, Hayashi YK, Ogawa M, Wang CH, Huang WT, Nishino I, JongYJ: Limb-girdle muscular dystrophy type 2I is not rare in Taiwan. Neuromuscul Disord. 23(8): 675-681, 2013

Koebis M, Kiyatake T, Yamaura H, Nagano K, Higashihara M, Sonoo M, Hayashi YK, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Yanagihara D, Matsuda R, Takahashi MP, Nishino I, Ishiura S: Ultrasound-enhanced delivery of Morpholino with Bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice. Sci Rep. 3: 2242, 2013

Oana K, Oma Y, Suo S, Takahashi MP, Nishino I, Takeda S, Ishiura S: Manumycin A corrects aberrant splicing of Clcn1 in myotonic dystrophy

type 1 (DM1) mice. Sci Rep. 3: 2142, 2013

Murakami N, Hayashi YK, Oto Y, Shiraishi M, Itabashi H, Kudo K, Nishino I, Nonaka I, Nagai T: Congenital generalized lipodystrophy type 4 with muscular dystrophy: Clinical and pathological manifestations in early childhood. Neuromuscul Disord. 23(5): 441-444, 2013

2. 学会発表

Ishiyama A, Hayashi YK, Kajino S, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital fiber type disproportion with myofibrillar disorganization and altered internal nuclei is caused by *RYR1* mutation. 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10.9-10.13, 2012

Ishiyama A, Hayashi YK, Kajino S, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital fiber type disproportion with myofibrillar disorganization and altered internal nuclei is caused by *RYR1* mutation. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6.6-6.8, 2012

石山昭彦, 林由起子, 小牧宏文, 齋藤貴志, 齋藤義朗, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 西野一三: 内在核と筋原線維間網の異常を有し二峰性筋線維不均等を示す先天性ミオパチーは *RYR1* 変異が原因である. 第 54 回日本小児神経学会総会, 札幌, 5.17-5.19, 2012

G. 知的所有権の取得情報

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社 名	出版地	出版年	ページ
Kanno, K., <u>Ishiura S.</u>	Genetic variants of the dopaminergic system in human and model organisms.	Inoue-Mur ayama, M. et al.	From Genes to Animal Behavior	Springer	New York	2011	227-237
<u>Ishiura S.</u> , Kino Y, Oma Y, Sasagawa N, Nukina N.	MBNL proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel <i>CLCN1</i>	Takeda, S.	Fifty years of neuromuscular disorder research after discovery of serum creatine kinase as a diagnostic marker of muscular dystrophy.	Igaku-sh oin	Tokyo	2011	18-25

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohsawa, N., Koebis, M., Suo, S., <u>Nishino, I.</u> , <u>Ishiura, S.</u>	Alternative splicing of PDLIM3/ALP, for α-actinin-associated LIM protein 3, is aberrant in persons with myotonic dystrophy.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	409	64-69	2011
Koebis, M., Ohsawa, N., Kino, Y., Sasagawa, N., <u>Nishino, I.</u> , <u>Ishiura, S.</u>	The alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1.	Genes to Cells	16	961-972	2011
Kanno, K., <u>Ishiura, S.</u>	Differential effects of the HESR/HEY transcription factor family on dopamine transporter (<i>DATI</i>) reporter gene expression via variable number of tandem repeats.	J. Neurosci. Res.	89	562-575	2011
Yonemura, Y., Futai, E., Yagishita, S., Suo, S., Tomita, T., Iwatsubo, T., <u>Ishiura, S.</u>	Comparison of presenilin 1 and presenilin 2 gamma-secretase activities using a yeast reconstitution system.	J.Biol.Chem.	286	44569-44575	2011
Asai, M., Yagishita, S., Iwata, N., Saido, T.C., <u>Ishiura, S.</u> , Maruyama, K.	An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model.	FASEB J.	25	3720-3730	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Oguro, A., Kubota, H., <u>Ishiura, S.</u> , Shimizu, M., Atomi, Y.	Protective role of the ubiquitin binding protein Tollip against the toxicity of polyglutamine-expansion proteins.	Neurosci.Lett.	503	234-239	2011
古戒道典、 <u>石浦章一</u>	RNA結合タンパク質が引き 起こす筋強直性ジストロフ イー	医学のあゆみ	238	481-484	2011
Sato, K., Tanabe, C., Yonemura, Y., Watahiki, H., Zhao, Y., Yagishita, S., Ebina, M., Suo, S., Futai, E., Murata, M., <u>Ishiura, S.</u>	Localization of mature neprilysin in lipid rafts.	J.Neurosci.Res.	90	870-877	2012
Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, <u>Nishino I.</u>	<i>In Vivo</i> Characterization of Mutant Myotilins.	Am J Pathol.	180(4)	1570-1580	2012
Zhao, Y., Koebis, M., Suo, S., Ohno, S. & <u>Ishiura, S.</u>	Regulation of <i>SERCA1</i> alternativ e splicing by PMA through PK C pathway.	Biochem.Biophys. Res.Commun.	423	212-217	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kanno, K. & <u>Ishiura, S.</u>	The androgen receptor facilitates inhibition of human <i>dopamine transporter (DAT1)</i> reporter gene expression by HESR1 and HESR2 via the variable number of tandem repeats.	Neurosci.Lett.	525	54-59	2012
Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, Imamura T, Araki N, <u>Nishino I.</u> , Hayashi YK	The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM 72).	PLoS Curr.	4	e5035add8caff4	2012
Mori-Yoshimura M, Okuma A, Oya Y, Fujimura-Kiyono C, Nakajima H, Matsuura K, Takemura A, Malicdan MC, Hayashi YK, Nonaka I, Murata M, <u>Nishino I</u>	Clinicopathological features of centronuclear myopathy in Japanese populations harboring mutations in dynamin 2.	Clin Neurol Neurosurg.	114(6)	678-683	2012
Oana, K., Oma, Y., Suo, S., Takahashi, M.P., <u>Nishino, I.</u> , Takeda, S. & <u>Ishiura, S.</u>	Manumycin A corrects aberrant splicing of <i>Cln1</i> in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice.	Scientific Reports	Scientific Reports	2142	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koebis, M., Kiyatake, T., Yamaura, H., Nagano, K., Higashihara, M., Sonoo, M., Hayashi, Y., Negishi, Y., Endo-Takahashi, Y., Yanagihara, D., Matsuda, R., Takahashi, M.P., <u>Nishino, I.</u> & <u>Ishiura, S.</u>	Ultrasound-enhanced delivery of morpholino with bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice.	Scientific Reports	3	2242	2013
Suo, S. & <u>Ishiura, S</u>	Dopamine modulates acetylcholin e release via octopamine CREB signaling in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	PLoS ONE	8	e72578	2013
Sasagawa, N., Koebis, M., Yonemura, Y., Mitsuhashi, H. & <u>Ishiura, S.</u>	A high-salinity solution with calcium chloride enables RNase-free, easy plasmid isolation within 55 minutes.	Bioscience Trends	7	270-275	2013
<u>石浦章一</u> 、 <u>小穴康介</u> 、 <u>古戒道典</u>	筋強直性ジストロフィー	臨床神経学	53	1109- 1111	2013
Motoki T, Fukuda M, Nakano T, Matsukage S, Fukui A, Akiyoshi S, Hayashi YK, Ishii E, <u>Nishino I</u>	Fatal hepatic hemorrhage by peliosis hepatis in X-linked myotubular myopathy: A case report.	Neuromuscul Disord.	23(11)	917-921	2013
Liang WC, Hayashi YK, Ogawa M, Wang CH, Huang WT, <u>Nishino I</u> , JongYJ	Limb-girdle muscular dystrophy type 2I is not rare in Taiwan.	Neuromuscul Disord.	23(8)	675-681	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Murakami N, Hayashi YK, Oto Y, Shiraishi M, Itabashi H, Kudo K, <u>Nishino I</u> , Nonaka I, Nagai T	Congenital generalized lipodystrophy type 4 with muscular dystrophy: Clinical and pathological manifestations in early childhood.	Neuromuscul Disord.	23(5)	441-444	2013
Kanno, K., Kokubo, H., Takahashi, A., Koide, T. & <u>Ishiura, S.</u>	Enhanced prepulse inhibition and low sensitivity to a dopamine agonist in <i>Hesr1</i> -knockout mice.	J.Neurosci. Res.	92	287-297	2014
Yoshida, M., Oami, E., Wang, M., <u>Ishiura, S.</u> & and Suo, S.	Non-redundant function of two highly homologous octopamine receptors in food deprivation-mediated signaling in <i>C. elegans</i> .	J.Neurosci. Res.	92	671-678	2014
大澤奈摘、趙一夢、 <u>石浦章一</u>	筋強直性ジストロフィー	周産期医学	44	237-239	2014
趙一夢、 <u>石浦章一</u>	筋強直性ジストロフィー 研究の現在	BRAIN and NER VE	66	259-264	2014

Chapter 10

Genetic Variants of the Dopaminergic System in Humans and Model Organisms

Kouta Kanno and Shoichi Ishiura

10.1 Introduction

Human personality is shaped by both genetic and environmental factors. Molecular genetics has begun to identify specific genes for quantitative traits. The first candidate genes investigated were components of the monoamine neurotransmitter pathways, such as serotonin and dopamine. The serotonergic system is involved in mood, anxiety, and aggression. Temperamental predisposition and behavior are likely to be influenced by genetic variations of serotonergic genes – i.e., serotonin-metabolizing enzymes, tryptophan hydroxylase and monoamine oxidase (MAO), catechol-*O*-methyltransferase (COMT), 14 kinds of serotonin receptor (5-hydroxytryptamine, or 5HT) and serotonin transporter (SERT).

The dopaminergic system is involved in the brain's reward system and addictive behavior. Human or animal behavior is also influenced by dopaminergic genes such as tyrosine hydroxylase (TH), dopamine receptors (DRD), and dopamine transporter (DAT). Noradrenergic and γ -aminobutyric acid (GABA)ergic genes are also involved in behavior.

It has been reported that single nucleotide polymorphisms (SNPs) and simple microsatellites in and around the coding regions of the dopamine- and serotonin-related genes – e.g., DRD3, DRD4, DAT1 (SLC6A3), TH, COMT, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), 5HT2A, MAOA, and SERT (5-HTT, SLC6A4) (D'Souza and Craig 2008) – are important factors in human neuropsychiatric disorders and behavior.

K. Kanno and S. Ishiura (✉)

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences,
The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan
e-mail: cishiura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

K. Kanno

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

and

Japan Society for Promotion of Science Research Fellow

Here, we primarily focus on the dopaminergic systems and review reports, including our recent studies, on functional *DAT1* polymorphisms.

The dopaminergic nervous system plays important roles in regulating locomotion, cognition, reward, addiction, and hormone release (Jackson and Westlind-Danielson 1994; Missale et al. 1998; Bannon et al. 2001; Uhl 2003). Dopamine and its related genes are thought to be involved in neuropsychiatric disorders and behavioral traits. The human dopamine transporter (*DAT1*) gene is involved in many dopamine-related disorders. Levels of DAT are reduced in Parkinson's disease (PD) and elevated in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), Tourette's syndrome, and major depression (Madras et al. 1998; Muller-Vahl et al. 2000; Brunswick et al. 2003; Krause et al. 2003). Additionally, several psychoactive drugs, including cocaine, amphetamine, and methylphenidate, are known to inhibit dopamine reuptake by the DAT protein (Giros et al. 1991, 1992; Giros and Caron 1993; Kilty et al. 1991; Shimada et al. 1991).

10.2 Functional Genetic Polymorphism of *DAT1*: The Variable-Number Tandem Repeat

The dopamine transporter, which is a major tuner of synaptic dopamine levels, is a 620-amino-acid protein belonging to the family of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters with 12 putative transmembrane domains and is located on axon terminals (Uhl 2003). A functional genetic polymorphism exists in part of the 3'-noncoding region included in exon 15 of the *DAT1* gene (Michelhaugh et al. 2001). As shown in Fig. 10.1, this 3'-UTR contains a 40-bp variable-number tandem repeat (VNTR) polymorphism ranging from 3 to 11 repeats, with 9 and 10 repeats being the most common alleles (Vandenbergh et al. 1992; Michelhaugh et al. 2001). We identified 6-, 7-, 9-, 10-, and 11-repeat alleles and their sequences in a Japanese population (Fuke et al. 2005) (Fig. 10.1). The repeats' unit sequences with 9 and 10 repeats were the same as those reported by Mill et al. (2005).

This VNTR polymorphism is known to be associated with many neuropsychiatric disorders such as ADHD, PD, and drug abuse (Cook et al. 1995; Vandenbergh et al. 2000; Ueno 2003; D'Souza and Craig 2008). Many genetic studies have reported significant associations between disorders and addictions with these genotypes. However, discrepancies exist among the studies, although a recent meta-analysis showed a small but significant association between the 10-repeat allele and ADHD (Yang et al. 2007).

If the VNTR is associated with these diseases, what is the mechanism? One possible answer is the different levels of DAT expression among the genotypes. In fact, modified gene expression, depending on the genotype, was observed in vivo (Heinz et al. 2000; Jacobsen et al. 2000; Martinez et al. 2001; Mill et al. 2002; D'Souza and Craig, 2008). We first demonstrated modified gene expression in vitro in Cos-7 cells using the luciferase reporter assay (Fuke et al. 2001), and since then several groups have confirmed the results in mammalian cell lines (Inoue-Murayama et al. 2002;

Neuro2A, and Cos-7 cells but did not do so in HEK293 cells (Fuke et al. 2005). Such differences could be the result of differential expression of regulating factors in each cell, but the molecular and neural bases remain unknown because no factor interacting with the VNTR has yet been characterized, although it is expected that proteins bind to the region (Michelhaugh et al. 2001).

10.3 HESR1: A Protein Binding to the 3'-UTR of DAT

To clarify the molecular mechanism of DAT gene regulation via the VNTR, we screened proteins that bound to the 3'-UTR using a yeast one-hybrid system and identified HESR1 (the *hairy/enhancer of split related transcriptional factor 1* with YRPW motif) protein as a *trans*-acting factor through the 3'-UTR of the *DAT1* gene (Fuke et al. 2005). We then showed that HESR1 bound directly to the region by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and repressed expression of the endogenous *DAT1* gene in a mammalian cell line (by RT-PCR assay) (Fuke et al. 2006).

However, it is possible that other factors affect *DAT* gene expression via the VNTR, as it is expected that more than one factor would bind to such a region (Michelhaugh et al. 2001). The HESR family genes – *HESR1*, *HESR2*, *HESR3* – were characterized as a direct transcriptional target of the Notch signaling pathway involved in neural development (Kokubo et al. 1999; Leimeister et al. 1999; Nakagawa et al. 1999, 2000; Henderson et al. 2001; Iso et al. 2001, 2003; Wang et al. 2002; Sakamoto et al. 2003).

The HESR family genes encode a basic helix–loop–helix (bHLH) domain that is essential for DNA binding, an Orange domain, and a YRPW motif. HESR proteins bind to E boxes or N boxes, which are known bHLH-binding consensus sites, and repress expression of target genes (Nakagawa et al. 2000; Iso et al. 2001, 2003). The bHLH domain sequences among the HESR family are highly conserved (Steidl et al. 2000). In fact, human HESR1 and HESR2 (Belandia et al. 2005) and mouse *Hesr1* and *Hesr2* (Kokubo et al. 2007) repress gene expression at the same genome site in reporter assay systems. Thus, not only HESR1, but also HESR2 and HESR3, may be candidate regulating factors for DAT expression via the VNTR.

10.4 HESR Family Genes: Candidate Regulating Factors for DAT Expression

Recently, we performed luciferase reporter assays to examine whether HESR2 and HESR 3 could affect DAT gene expression via the 3'-UTR including the VNTR region in human neuroblastoma SH-SY5Y cells (Kanno and Ishiura 2009). We found that HESR1 and HESR2 inhibited reporter gene expression via both the core promoter and 3'-UTR, whereas HESR3 enhanced it only via the core promoter. We did not expect the HESR family to affect the core promoter region because HESR1 was