



Two alternative exons can result from activation of the cryptic splice acceptor site deep within intron2 of the dystrophin gene in a patient with as yet asymptomatic...

八木, 麻理子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2825

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002825>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 1 1 】

氏 名 ・(本 籍) 八木 麻理子 (愛知県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1506号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

TWO ALTERNATIVE EXONS CAN RESULT FROM ACTIVATION OF
THE CRYPTIC SPLICE ACCEPTOR SITE DEEP WITHIN INTRON 2
OF THE DYSTROPHIN GENE IN A PATIENT WITH AS YET
ASYMPTOMATIC DYSTROPHINOPATHY

(ジストロフィン遺伝子のイントロン 2内の点変異によりスプライスアクセプターサイト
が活性化され新たな2種のエクソンが挿入された無症候性ジストロフィン異常症)

審 査 委 員

主 査 教 授 松尾 雅文

 教 授 中村 肇

 教 授 丸尾 猛

【はじめに】

Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィー(以下、DMD/BMD)は最も頻度の高い遺伝性筋疾患であり、ヒト最大の遺伝子であるジストロフィン遺伝子の変異により発症する。ジストロフィン遺伝子は X 染色体上に存在し、その長さは 3000kb に及び、14kb の 79 エクソンからなる mRNA をコードする。残り 99%以上はイントロンで、この中には 100kb 以上に及ぶものも存在する。

DMD は急速に進行し、20 歳代で死に至る重症型であり、BMD は緩徐に進行する軽症型である。欠失や重複の遺伝子異常を持つ DMD/BMD 患者の 92%は、フレームシフト説により臨床経過が予測できる。即ち、遺伝子異常によりアミノ酸読み取り枠が維持されず蛋白が合成されない場合 DMD、アミノ酸読み取り枠が維持され、正常とは異なるが蛋白が合成される場合 BMD となる。

ジストロフィン蛋白は筋細胞膜を裏打ちする蛋白で、3685 アミノ酸からなり、N 端・ロッド・シスチンリッチ・C 端の 4 領域に分類される。このうち N 端領域は 240 アミノ酸で構成され、3つのアクチン結合サイトで F アクチンと結合している。N 端領域では、ミスセンス変異であっても表現型が DMD を呈したという報告がある。これは N 端領域はジストロフィン蛋白が機能する上で重要である事を示唆している。

DMD の治療に関しては、正常のジストロフィン cDNA を導入する遺伝子治療の研究が数多くなされているが、臨床応用に至るまでさらなる研究が必要である。一方、アンチセンスオリゴ、ゲンタマイシンやネガマイシン等の抗生物質、RNA/DNA キメラオリゴ等を利用した分子療法が研究されている。これらの治療方法では適応となる遺伝子異常がそれぞれ決まっている。従って DMD/BMD の遺伝子異常を明らかにする事は、治療方法を考慮する際に必須になりつつある。

今回、我々は、無症候性ジストロフィン異常症の 1 例で、イントロン内に存在する一塩基の置換により新たに 2 種のエクソンが挿入されていることを同定したので報告する。

【症例及び方法】

<症例>

症例は 12 歳男児。家族歴に神経筋疾患を認めない。発育発達歴は正常。9 歳時、アデノイド切除術の術前検査時、CK 値の高値(2800 IU/l: 正常<169 IU/l)を指摘され、神戸大学病院へ紹介受診。受診時、筋力低下、腓腹筋仮性肥大等の臨床所見を認めないが、CK 値は 10820 IU/l と高値、筋電図検査で筋原性変化を認めた。確定診断の為に筋生検を行った。

<方法>

ジストロフィン遺伝子の解析

患者とその家族から得た末梢血からゲノムを抽出した。遺伝子の欠失・重複について検索するため、欠失好発部位のエクソンを PCR 法にて増幅した。また制限酵素 *Hind*III を用いたサザンブロット法を行った。挿入配列の周囲の変異を同定するために PCR 法で増幅し、直接塩基配列決定法を行った。

ジストロフィン mRNA の解析

リンパ球及び筋肉より抽出した mRNA を解析するために RT-PCR 法を用いた。ジストロフィン cDNA を 10 の領域に分けて PCR 法で増幅し、直接塩基配列決定法を行った。さらにエクソン 1-5 の領域を PCR 法で増幅した。

塩基配列の決定

PCR 産物を精製した後、直接、あるいはサブクローニングを行い、DNA シークエンサーを使用し塩基配列を決定した。

免疫組織学的解析

筋生検により得た筋組織について、免疫組織学的に検討した。間接的免疫蛍光染色は、それぞれ N 端領域、ロッド領域、C 端領域を認識する 3 種類のジストロフィン抗体を用いた。

【結果】

新たなエクソン配列の挿入

PCR 法、サザンブロット法によるゲノムの解析で、異常は認めなかった。リンパ球から抽出した mRNA について解析した。10 の領域に分割したうち、エクソン 1-11 を含む領域においてのみ異常な配列を認めた。そこでエクソン 1-5 の領域を増幅し、サブクローニング後に塩基配列を決定した。38 個中 31 個(81.6%)のクローンで 132 塩基が、7 個(18.4%)のクローンで 46 塩基がエクソン 2 とエクソン 3 の間に挿入されていた。筋肉から抽出した mRNA について解析を行ったところ、エクソン 2 とエクソン 3 の間に 132 塩基が挿入されたクローンを認めたが、46 塩基が挿入されたクローンは認めなかった。

イントロン 2 内の一塩基置換の同定

挿入配列はゲノムの配列上でエクソン 2 又はエクソン 3 に連続した配列ではなかった。ホモロジー検索により、挿入された 46 塩基が同じく挿入された 132 塩基の最初の 46 塩基と一致する事、また、これらの配列はイントロン 2 の一部でエクソン 2 の 5592 塩基下流、エクソン 3 の 165kb 上流の配列と完全に一致する事が判明した。46 塩基、132 塩基の挿入配列の 3'端には、共にスプライスドナーサイトとして認識される配列 GT が存在し、Shapiro's スコアはそれぞれ 0.83、0.79 であった。(ジストロフィンのエクソンにおける平均値 0.83)

さらに、挿入配列の周辺のゲノムの塩基配列を決定してみると、挿入配列の 5'端の 2 塩基上流にある T が A に置換されていた。他の配列は正常配列に完全に一致した。この置換により、挿入配列の 5'端の上流の配列は TG から AG となり、新たにスプライシングアクセプターサイトが作られた。この塩基置換により Shapiro's スコアは 0.72 から 0.88 に上昇した(平均値 0.87)。これが、本例での新たなエクソン形成の原因と決定された。

新たな 44 アミノ酸の挿入部位

132 塩基の挿入配列はアミノ酸読み取り枠を維持しており、ジストロフィン蛋白の 32 番目と 33 番目のアミノ酸の間に新たに 44 アミノ酸を挿入することとなった。N 端領域の第 1・第 2 のアクチン結合サイトはそれぞれ 18-27 番、88-116 番のアミノ酸に位置しており、挿入された 44 アミノ酸はこの間

に存在していた。

免疫組織学的解析の結果

筋生検により得た筋組織について、免疫組織学的解析を行った。N 端領域に特異的なジストロフィン抗体では染色されなかったが、ロッド領域、C 端領域では淡く断続的に染色された。新たに挿入されたアミノ酸により、N 端領域に特異的なジストロフィン抗体との結合が強く妨害されているが、他の領域では抗体が結合できる事が示唆された。

以上の結果から、イントロン 2 内の一塩基置換によりスプライシング異常が起こり、新たなエクソンが挿入され、結果として、無症候性ジストロフィン異常症を呈したと考えられた。

【考案】

ジストロフィン遺伝子のエクソン構造から大きく離れたイントロン 2 内部の点変異によって、新たに 2 種のエクソンが挿入された無症候性ジストロフィン異常症を報告した。これは、(1)イントロン内部の一塩基置換によって新たにスプライスアクセプターサイトが作られ、下流の 2 つの潜在的スプライスドナーサイトと共に活性化され、(2) 新たな 2 種のエクソンが挿入され、(3) 挿入されたアミノ酸によってジストロフィン蛋白の N 端領域の構造が破壊されたが、その機能はほとんど障害されなかった為と考えられた。

スプライシングとは、mRNA 前駆体からイントロンを除去し、隣り合ったエクソンを結合する反応である。最近、*Drosophilla Ubx* 遺伝子の巨大なイントロンのスプライシングが、小さなイントロンに区切って何度もスプライシング反応を繰り返すことで進むことが解明された。この機構がヒトに当てはまるかどうかは確定されていない。今回、170kb のイントロンの中の 46 塩基、132 塩基が mRNA に挿入されたことは、ヒトでもリスプライシング機構でイントロンの配列が除かれる可能性を示唆している。これを確認するためには更なる検討が必要である。

スプライシング異常は多くの遺伝子で同定されており、疾患の原因となる遺伝子異常の 15%を占めるとされる。多くの変異は、スプライシングサイト

やその周辺のコンセンサス配列に認められる。エクソンから遠く離れたイントロン内で、新たなエクソンが形成されるようなスプライシングサイトが作られる変異は稀であり、我々が調べた限りでは 9 例のみであった。これらは全て新たにスプライシングドナーサイトが形成されたものであり、新たにスプライシングアクセプターサイトが形成されたのは本例が初めてであった。スプライシングアクセプターサイトを形成する変異が稀なのは、スプライシングアクセプターサイトとして塩基 AG を認識する機構が複雑であるためと思われる。

本例では一塩基の置換により、2 個所のスプライシングドナーサイトが活性化された。上流のドナーサイトはリンパ球でのみ、下流のドナーサイトはリンパ球、筋肉の両方で活性化されていた。これは、2つのドナーサイトの活性化の違いは単に Shapiro's スコアによるものではないことを示した。イントロンの配列の一部がエクソンとして利用される事を、コンセンサス配列のみで考えることは不十分であることがわかる。

ジストロフィン蛋白の機能を維持する上で、N 端領域が重要であるのは、次の理由による。(1)独特なアミノ酸配列であること (2)組織特異的な選択的スプライシングの複雑なパターンを有していること (3)F-アクチンと結合すること (4)N 端領域に欠失を持つ患者が重症型であること。今回の症例では第 1・第 2 アクチン結合サイトの間に 44 アミノ酸が挿入されていたが、無症候であった。N 端領域が破壊されても、必ずしも重症型とならないことを示している。

DMD に対する遺伝子治療では、数種類のミニジーンが検討されている。どのミニジーンも、ロッド領域を短くし、N 端・C 端領域は含む構造となっている。N 端領域における異常でも症状が軽いジストロフィン異常症であることを考慮すると、この部分も削りさらに短いミニジーンを作ることができるかもしれない。

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1497 号	氏 名	八木 麻理子
論文題目	TWO ALTERNATIVE EXONS CAN RESULT FROM ACTIVATION OF THE CRYPTIC SPLICE ACCEPTOR SITE DEEP WITHIN INTRON 2 OF THE DYSTROPHIN GENE IN A PATIENT WITH AS YET ASYMPTOMATIC DYSTROPHINOPATHY ジストロフィン遺伝子のイントロン 2 内の点変異によりスプライスアクセプターサイトが活性化され新たな 2 種のエクソンが挿入された無症候性ジストロフィン異常症		
審査委員	主 査 松 尾 雅 文 副 査 中 村 隆 副 査 丸 尾 猛		
審査終了日	平成 15 年 2 月 26 日		

(要旨は 1, 000 字～2, 000 字程度)

Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィー(以下、DMD/BMD)は最も頻度の高い遺伝性筋疾患であり、ヒト最大の遺伝子であるジストロフィン遺伝子の変異により発症する。ジストロフィン遺伝子はX染色体上に存在し、その長さは3000kbに及び、14kbの79エクソンからなるmRNAをコードする。残り99%以上はイントロンで、この中には100kb以上に及ぶものも存在する。

DMDは急速に進行し、20歳代で死に至る重症型であり、BMDは緩徐に進行する軽症型である。欠失や重複の遺伝子異常を持つDMD/BMD患者の92%は、フレームシフト説により臨床経過が予測できる。即ち、遺伝子異常によりアミノ酸読み取り枠が維持されず蛋白が合成されない場合DMD、アミノ酸読み取り枠が維持され、正常とは異なるが蛋白が合成される場合BMDとなる。

本研究は、無症候性ジストロフィン異常症の1例で、イントロン内に存在する一塩基の置換により新たに2種のエクソンがmRNAに挿入されていることを同定したものである。

症例は12歳男児。家族歴に神経筋疾患を認めない。発育発達歴は正常。9歳時、アデノイド切除術の術前検査時、CK値の高値(2800 IU/l: 正常<169 IU/l)を指摘され、神戸大学病院へ紹介受診。受診時、筋力低下、腓腹筋仮性肥大等の臨床所見を認めないが、CK値は10820 IU/lと高値、筋電図検査で筋原性変化を認めた。

遺伝子解析をPCR法、サザンブロット法により行ったが、異常は認めなかった。リンパ球から抽出したmRNAについて解析した。ジストロフィンcDNAを10の領域に分割したうち、エクソン1-11を含む領域においてのみ異常な配列を認めた。そこでエクソン1-5の領域を増幅し、サブクローニング後に塩基配列を決定した。38個のクローンのうち31個(81.6%)で132塩基が、7個(18.4%)で46塩基がエクソン2とエクソン3の間に挿入されていることが判明した。筋肉から抽出したmRNAについて解析を行ったところ、エクソン2とエクソン3の間に132塩基が挿入されたクローンを認めるのみで、46塩基が挿入されたクローンは認めなかった。

挿入配列はゲノムの配列上でエクソン2又はエクソン3に連続した配列ではなかった。ホモロジー検索により、挿入された46塩基が同じく挿入された132塩基の最初の46塩基と一致する事、また、これらの配列はイントロン2の一部でエクソン2の5592塩基下流、エクソン3の165kb上流の配列と完全に一致する事が判明した。

挿入配列の周辺のゲノムの塩基配列では、挿入配列の5'端の2塩基上流にあるTがAに置換されていた。他の配列は正常配列に完全に一致した。この置換により、挿入配列の5'端の上流の配列はTGからAGとなり、新たにスプライシングアクセプターサイトが作られた。この塩基置換により新たなエクソンが形成されたことが原因と決定された。

132塩基の挿入配列はアミノ酸読み取り枠を維持しており、ジストロフィン

蛋白の32番目と33番目のアミノ酸の間に新たに44アミノ酸を挿入するものであった。以上の結果から、イントロン2内の一塩基置換によりスプライシング異常が起こり、新たなエクソンが挿入され、結果として、無症候性ジストロフィン異常症を呈したと考えられた。

本研究はジストロフィン異常症について、その分子機序について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった遺伝子のイントロン内の点変異により新たな2種のエクソンが生じ、そのうちの1種がインフレームで機能を発揮するタンパクを産生しうることについて重要な知見を得たものとして価値ある集積とみとめる。よって本研究者は博士(医学)の資格があると認める。