



Heterogous dystrophin mrna produced by a novel splice acceptorsite mutation in intermediate dystrophinopathy

足立, 佳代

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2826

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002826>

※ 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 2 】

氏 名 ・(本 籍) 足立 佳代 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1507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 】

Heterogous Dystrophin mRNA Produced by a Novel Splice AcceptorSite
Mutation in Intermediate Dystrophinopathy
(中間型ジストロフィン異常症においてスプライス・アクセプターサイトの
点変異によって作りだされた複数のジストロフィン mRNA)

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】

ジストロフィン遺伝子の異常でおこる X 連鎖劣性筋ジストロフィーは男児 3500 人に 1 人おこる最も一般的な筋ジストロフィーである。重症の Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)から軽症の Becker 型筋ジストロフィー(BMD)まで重症度は様々である。DMD は小児期より進行し 12 歳までには歩行不能となる。BMD は進行は緩徐で 16 歳より歩行不能となるものからほぼ正常な生活を送る例までである。12 歳から 16 歳の間に歩行不能となる場合は中間型ジストロフィン異常症と分類されている。

Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィーの症状の重症度はジストロフィン mRNA の読み取り枠の法則によって説明することが出来る。しかしながら、読み取り枠の法則では中間型ジストロフィン異常症の分子学的背景は説明できない。

ジストロフィン遺伝子は X 染色体短腕に約 3000kb にわたって存在し、79 個のエクソンより成り、14kb の長い mRNA をコードしているため、極端に長いイントロンのスプライシングを正確に進めるため他の遺伝子よりもさらに複雑に調節されていると思われる。スプライシングのコンセンサス配列の異常はエクソンスキッピングや潜在的スプライスサイトの活性化もしくはは

両方をおこし、異常 mRNA がつくられる。このような潜在的スプライスサイトの活性化が多くの場所で生じることが他の遺伝子では多く見つかったいるがジストロフィン遺伝子では報告がない。このような報告がないのはジストロフィン pre-mRNA のスプライシングを調節する過程が高度であることを反映していると考えられる。

この論文では、ある中間型ジストロフィン異常症の症例において正常なスプライスアクセプターサイトの不活性化により 3ヶ所の潜在的スプライスサイトが活性化され、3種類のジストロフィン mRNA がつくられたことを明らかにした。さらに、それぞれの mRNA の定量をすると中間型ジストロフィン異常症には少量のインフレームのジストロフィン mRNA が存在することが分かった。

【症例】

14 歳男児。6 歳時に階段を登るのが遅いことに気付かれ、9 歳時に跛行がみられ、血液検査にて高 CK 血症が認められたことより、臨床的に DMD と診断された。筋力低下は進行したが、12 歳時には支え無しで歩行可能であり、手すりを使って階段を登ることも可能であった。13 歳時に右足首を

骨折したことを契機に車椅子の生活となり、臨床的に中間型ジストロフィン

異常症と診断された。家族歴はなく、最高の血清 CK は 8642IU/L であった。

精神発達遅滞があり、IQ は 59 であった。

【方法】

免疫組織学的解析

筋生検した筋肉を免疫組織解析した。患児と正常の筋肉をジストロフィン N 端、ロッド、C 端を認識する 3 種類の抗体を使って間接的蛍光抗体法にて解析を行った。

遺伝子変異の解析

ジストロフィン遺伝子の変異の解析の為に、症例の DNA をフェノール・クロロフォルム抽出法にて血液から抽出した。遺伝子の欠失や重複の解析にサザンブロット解析を、点変異の解析には直接シーケンス法を使用した。

リンパ球と筋肉におけるジストロフィン mRNA の解析に RT-PCR 法を用いた。ジストロフィン cDNA の全長を 10 のフラグメントにわけ、直接シーケンス法によりその配列を明らかにした。

メッセンジャー RNA の定量

3 種類のジストロフィン mRNA の定量は Cy5 でラベルした RT-PCR 産物をシーケンスゲルに電気泳動して、その蛍光強度を測定した。

【結果】

筋病理所見

光顕にて筋繊維の大小不同と中心核線維、壊死、再生繊維が認められた。ジストロフィン染色はロッド・ドメインに対しては大部分の筋繊維が淡性かつ部分的な陽性を示した。一方、C 端ならびに N 端抗体に対しては大部分の筋線維は陰性を呈し、極一部の筋線維が淡染性かつ部分的な陽性を示した。ジストロフィンのウェスタンブロット解析ではほとんどバンドは認められなかった。

mRNA 解析

サザンブロット法では遺伝子の異常は認められなかったため、ジストロフィン mRNA の解析を行った。ジストロフィン mRNA の解析においてエクソ

ン17から25までのフラグメント以外は正常であった。不明瞭な部分はエクソン19から22までのさらに小さなフラグメントに増幅した。直接シーケンス法にて不明瞭な塩基配列の結果であったため、サブクローニング後にシーケンスを行った。その結果、異なった異常配列をもった3種類の mRNA が見つかった。3種類の mRNA はエクソン20と21の間に6塩基と7塩基が挿入された mRNA とエクソン21の5'側の7塩基が欠失している mRNA であった。

DNA 解析

エクソン20と21の間に6塩基と7塩基が挿入された mRNA の挿入配列はイントロン20由来の可能性が強く示唆されたため、ゲノム DNA のジストロフィン遺伝子エクソン21を含んだ配列をシーケンスした。イントロン20の最後（ジストロフィン cDNA の2831塩基）より2番目の塩基がAからGに変わっていることがゲノムで同定された。ジストロフィン mRNA エクソン20と21の間に挿入された6塩基と7塩基はイントロン20の3'側の配列由来であることが結論づけられた。

潜在的スプライスサイトの活性化

3種類すべての mRNA が変異のあるスプライスアクセプターサイトの近くに位置している潜在的スプライスアクセプターサイトを使って作られていると考えられた。これらのサイトのシャピロのスコアは7塩基挿入、6塩基挿入、7塩基欠失の順で0.69,0.65,0.56である。もとのサイトは変異が起きたことによりこのスコアは0.83から0.62に下がっていた。したがって、3種類のジストロフィン mRNA はイントロン20もしくはエクソン21の潜在的スプライスサイトが利用されたものと判明した。

ジストロフィン

それぞれのジストロフィン mRNA においてジストロフィンの作られる可能性を検討した。7塩基欠失と7塩基挿入した mRNA ではエクソン20内にストップコドンができるため機能しない。しかしながら、6塩基挿入はアミノ酸の読み取り枠が維持されるため、ジストロフィンが作られることが期待される。6塩基 GCACGG はアラニンとアルギニンをコードする。これら2アミノ酸がジストロフィンのロッド・ドメインの5番目の繰り返し配列に位置する874と875番目のアミノ酸の間に挿入される。この2アミノ酸

長いジストロフィンにジストロフィンの機能にそれほど影響のない部分に挿入されたため、機能すると思われる。

ジストロフィン mRNA の定量

この症例の場合、アウトフレームとインフレームのジストロフィン mRNA が同定されたことより読み取り枠のルールをもとに臨床的な型を決めるのは難しい。これを分子学的に理解するためにリンパ球と筋肉のそれぞれのジストロフィン mRNA の発現を蛍光でラベルしたフォワードプライマーを用いて RT-PCR することによって定量した。増幅産物では 300 と 313bp の 2 種類のピークが検出された。それは 7 塩基欠失と 6 塩基挿入の mRNA であった。7 塩基挿入の mRNA である 314bp にピークは検出されなかった。リンパ球では 2 つのピークはほとんど等しい高さであり 2 種類のアクセプターサイトが等しく使われたことがわかった。一方、筋肉では大きいピークと小さいピークの全く異なった発現パターンが認められた。ピークの高さから mRNA の約 95% が 7 塩基欠失であり、残り 5% が 6 塩基挿入であった。筋肉の mRNA の方が臨床的な型と合致すると考えられたため、中間型ジストロフィン異常症の分子学的背景はインフレームのジストロフィン mRNA

の少量の産物によるものと結論付けられた。

【考案】

我々の結果は中間型ジストロフィーにおけるインフレーム mRNA の作成の初めての証拠を示した。将来、ジストロフィン mRNA の解析は中間型ジストロフィン異常症の分子学的背景をさらに解明していこう。

我々の知る限りでは、異なった 3 種類の潜在的スプライスサイトが活性化されることによって 3 種類のジストロフィン mRNA がつくられた初めての報告である。シャピロのスコアは潜在的スプライスサイトの決定因子ではなく、スコアより他の因子が活性化に関わっていることが示唆された。サイトの活性化のパターンは mRNA の解析でのみ明らかにされ、この解析が分子病態の解析に必須である。

次の疑問はどんな因子がジストロフィン mRNA の割合を決めるのかということである。6 塩基挿入と 7 塩基欠失の比は筋肉とリンパ球で異なっている。これはおそらく組織特異的因子によって調節されている潜在的スプライスサイトの活性化能の違いによるものか、mRNA の蛋白をコードする能力

に依存した mRNA の破壊の差によるのかもしれない。この質問に答えるためにはさらなる研究が必要である。リンパ球と筋肉との mRNA の量が異なるため、筋ジストロフィーにおいては遺伝子学的解析の為に筋肉における mRNA の発現量の解析が必要である。

現在、DMD を治療する有効な方法はない。最近、ジストロフィン mRNA をアウトオブフレームからインフレームにかえることにより、DMD から BMD に軽症化する治療が DMD の根本的治療法として注目されている。我々はスプライシング促進配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを使ってエクソン 19 内のスプライシング促進配列の機能を阻害することによりエクソン 19 のスキッピングを誘導することが出来ることを示した。今回報告した症例においてアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてエクソン 21 内の活性化された潜在的スプライスサイトを阻害すればインフレームの mRNA をつくる上流の潜在的スプライスサイトがより強く使われるようになる。将来、この手法をこの症例で試みていく予定である。

どの程度のジストロフィン mRNA がインフレームに変われば遺伝子治療の効果があらわれるのかわからない。インフレームの mRNA の量が増えるほど筋力低下の程度は軽くなると考えられる。過去の症例においてインフレ

ームのジストロフィンが 10% あれば軽症の BMD であった。この症例では筋肉において約 5% であると中間型ジストロフィン異常症にとどまる。したがって、DMD に対して遺伝子治療をする時、少なくともジストロフィン mRNA の 10% がインフレームにならなければ効果はないと思われる。

ここに我々はスプライシングコンセンサスアクセプターサイトの点変異によって 3 種類の mRNA がつくられた中間型ジストロフィン異常症の症例を報告した。インフレームのジストロフィン mRNA が筋肉の mRNA で少量つくられていたことより中間型ジストロフィン異常症の分子学的背景が同定された。

論文審査の結果の要旨

受 付 番 号	甲 第 1 4 9 8 号	氏 名	足 立 佳 代
論 文 題 目	<p>Heterogous Dystrophin mRNA Produced by a Novel Splice Acceptor Site Mutation in Intermediate Dystrophinopathy</p> <p>中間型ジストロフィン異常症においてスプライス・アクセプターサイトの点変異によってつくられた複数のジストロフィン mRNA</p>		
審 査 委 員	<p>主 査 松 尾 雅 文</p> <p>副 査 中 村 隆</p> <p>副 査 丸 尾 登</p>		
審 査 終 了 日	平成 1 5 年 2 月 1 9 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

ジストロフィン遺伝子の異常でおこる X 連鎖劣性筋ジストロフィーは男児 3500 人の 1 人におこる最も一般的な筋ジストロフィーである。重症の Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) から軽症の Becker 型筋ジストロフィー (BMD) まで重症度は様々である。DMD は小児期より進行し 12 歳までには歩行不能となる。BMD は進行は緩徐で 16 歳より歩行不能となるものからほぼ正常な生活を送る例までである。12 歳から 16 歳の間に歩行不能となる場合は中間型ジストロフィン異常症と分類されている。

Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィーの症状の重症度はジストロフィン mRNA の読み取り枠の法則によって説明することが出来る。しかしながら、この読み取り枠の法則では中間型ジストロフィン異常症の分子学的背景は説明できない。

この研究では、中間型ジストロフィン異常症の症例において正常なスプライスアクセプターサイトの不活性化により 3 ケ所の潜在的スプライスサイトが活性化され、3 種類のジストロフィン mRNA がつくられたことを明らかにした。さらに、それぞれの mRNA の定量結果から中間型ジストロフィン異常症には少量のインフレームのジストロフィン mRNA が存在することが分かった。

症例は 14 歳男児。6 歳時に階段を登るのが遅いことに気付かれ、9 歳時に跛行がみられ、血液検査にて高 CK 血症が認められた。筋力低下は進行したが、12 歳時には支え無しで歩行可能であり、手すりを使って階段を登ることも可能であった。13 歳時に右足首を骨折したことを契機に車椅子の生活となり、臨床的に中間型ジストロフィン異常症と診断された。家族歴はなく、最高の血清 CK は 8642IU/L であった。精神発達遅滞があり、IQ は 59 であった。患者筋生検組織のジストロフィン染色はロッド・ドメインに対しては大部分の筋繊維が淡性かつ部分的な陽性を示した。一方、C 端ならびに N 端抗体に対しては大部分の筋繊維は陰性を呈し、極一部の筋繊維が淡染性かつ部分的な陽性を示した。

ジストロフィン遺伝子の解析を行ったところサザンブロット法では遺伝子の異常は認められず、ジストロフィン mRNA の解析を行った。ジストロフィン mRNA の解析においてエクソン 17 から 25 までのフラグメント以外は正常であった。不明瞭な部分はエクソン 19 から 22 までのさらに小さなフラグメントとして PCR 増幅、サブクローニング後にシーケンスを行った。その結果、異なった異常配列をもった 3 種類の mRNA が見つかった。エクソン 20 と 21 の間に 6 塩基と 7 塩基が挿入された mRNA とエクソン 21 の 5' 側の 7 塩基が欠失している mRNA であった。

ゲノム DNA を用いてジストロフィン遺伝子エクソン 21 を含んだ配列をシーケンスした。イントロン 20 の最後 (ジストロフィン cDNA の 2831 塩基) より 2 番目の塩基が A から G に変わっていた。この変異はスプライシングのアクセプターサイトのコンセンサス配列である AG を GG に替える異常で、スプラ

イシング異常が2次的に生じたものと考えられた。3種類すべての mRNA が変異のあるスプライスアクセプターサイトの近くに位置している潜在的スプライスアクセプターサイトが利用されたものと判明した。

3種のジストロフィン mRNA において、7塩基欠失と7塩基挿入した mRNA ではエクソン20内にストップコドンができるためタンパクを産生できない。しかしながら、6塩基挿入の mRNA ではアミノ酸の読み取り枠が維持されるため、ジストロフィンが作られる。

筋肉のジストロフィン mRNA の発現を蛍光でラベルしたフォワードプライマーを用いて RT-PCR することによって定量した。増幅産物は300と313bpの2種類のピークとして検出された。それは7塩基欠失と6塩基挿入の mRNA であった。7塩基挿入の mRNA である314bpにピークは検出されなかった。ピークの高さから mRNA の約95%が7塩基欠失であり、残り5%が6塩基挿入であった。以上から、中間型ジストロフィン異常症の分子学的背景はインフレームのジストロフィン mRNA からの少量のジストロフィン産生によるものと結論付けられた。

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スプライシングのコンセンサス配列の異常により新たに3種の mRNA を生じ、そのうち1つのインフレームのものが機能を発揮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。