

CTGリピート病としての筋強直（緊張）性ジストロフィー

古谷，博和
九州大学大学院医学研究院附属脳神経病研究施設神経内科

<https://doi.org/10.15017/7217558>

出版情報：福岡医学雑誌. 93 (8), pp.153-160, 2002-08-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



解 説

CTG リピート病としての筋強直（緊張）性ジストロフィー

九州大学大学院医学研究院附属脳神経病研究施設神経内科

古 谷 博 和

Clinical and Molecular Genetical Features of Myotonic Dystrophy

Hirokazu FURUYA, M.D.

*Department of Neurology, Neurological Institute, Graduate School of
Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan.*

1. はじめに

筋強直性ジストロフィー（筋緊張性ジストロフィー, Myotonic Dystrophy (DM)) は10万人に数人の割合で発症する成人では最も頻度の高いジストロフィーであり、現在までのところ根治的な治療法はない。最近DMはトリプレットリピート病の1種であることが判明し、そちらの面からの病態解明に注目が集まっている。本稿ではDMにおいてCTGリピートが遺伝子発現に及ぼす影響を中心として、CTGリピートの延長と疾患発症機序の概要に関して近年のDM研究の進歩も交えて述べることにする。

2. DMの臨床的・遺伝学的特徴

DMは常染色体優性の遺伝形式をとり、四肢の骨格筋、特に頸筋、四肢の遠位筋に筋萎縮と筋力低下が起こるとともに、握った手がなかなか開けないという特徴的なミオトニア現象が起こる。このため筋症状に注意が向けられがちであるが、中枢神経系を含む全身に多くの合併症を引き起こすことが特徴であり、患者さんの生命予後のためにもこれらのコントロールが重要になってくる。

DM家系の調査を行うと、世代を経るに従って発症年齢が次第に早くなり、それとともに症状が重篤化するanticipation現象が認められることは、早くから知られていた。特に母親がDM罹患患者である場合には、重症の先天性DMの子供が生まれ、出生時に呼吸管理を要することもある。このような家系からは、その後DMの患者は生まれないので、DMという病気は消えてしまうように思われるが、また別の家系から高齢発症の（つまりリピート数の短い）DM患者が出現するので、DMという疾患自体はこの世の中から消滅することはない。

長い間このようなanticipation現象は、どのような機序で起こるのか全く不明であった。しかし、今から10年ほど前にDMがリピート病であることが判明し、DMで認められる種々の現象が遺伝子レベルで説明可能になってきた²⁾。

3. トリプレットリピート病とDM

ゲノムの中で、3塩基の繰り返し配列(triplet repeat)が延長する事で疾患が発症するものをトリプレットリピート病(triplet repeat disease)といい、現在までにこの範疇に入る14種類の疾患が見出されている。トリプレットリピート病はその繰り返し配列により、それぞれの発症機序およびその臨床症状が異なっている。この中でCAGリピート病がこれまでに最も多く見つかっているが(10種類)、この疾患では延長したCAG配列は全てエクソン内に存在しており、ポリグルタミン鎖に翻訳される。最近の研究ではこのポリグルタミン鎖が神経細胞内に封入体を形成したり、アポトーシスを誘導したりすることがCAGリピート病の病因になっていると考えられている¹⁾。

一方 CTG リピート病としては、DM と脊髄小脳失調症 8 型 (SCA 8) の 2 種類が見つっている。これらの疾患では延長した CTG 配列は 3' 非翻訳領域に位置しており、延長した CTG 配列は mRNA には転写されるが、蛋白質には翻訳されない。これがどのように疾患発症にかかわってくるのかが問題となる。

臨床的に CAG リピート病と CTG リピート病を比較してみると、CAG リピート病は球脊髄性筋萎縮症を除いて症状が中枢神経系に限局するという特徴がある。これに対して CTG リピート病である DM では、筋病変に加えて白内障、知能低下、性格変化、甲状腺機能障害、肝機能障害 (脂肪肝、ICG 排泄異常)、難治性糖尿病、性腺機能低下、全身麻酔後の悪性高体温症 (malignant hyperthermia) の合併、低免疫グロブリン血症などの全身症状を高頻度に合併し、更に良性、悪性腫瘍の合併 (特に甲状腺腫瘍、卵巣腫瘍、巨大子宮筋腫など) も多いなど、全身性疾患であるという特徴を有している。

4. DMPK とその遺伝子構造

DM の場合、CTG 配列は myotonin-protein kinase (DMPK) 遺伝子の 3' 非翻訳領域に位置しており、健常な対立遺伝子ではこの繰り返し数が 5~27 であるのに対して、異常遺伝子の最小リピートは 50 以上、平均数百回にまで増加しており、特に先天性 DM では 1,000~3,000 まで著増し、他のリピート病よりも遙かに長くなっている。また、リピートの数は組織ごとに多少異なっており、腫瘍組織では延長しているとの報告もある。

DMPK 遺伝子は全長が 12 kb で、15 個のエクソンより構成され、(CTG)_n 配列は 3' 末端の第 15 エクソン内の非翻訳領域に含まれている (図 1)。DMPK は alternative splicing により数種類の蛋白に翻訳されているが、その一つは DMR-N 9 で、脳と精巣に強く発現している。もう一方の DMR-B 19 は心筋、骨格筋、平滑筋に強く発現していて c-AMP 依存性 serine/threonine protein kinase と高いホモロジーを有している。DMPK 遺伝子のクローニングとともに DMPK 発現量の定量が行われ、特異抗体による検討では、患者骨格筋の DMPK タンパク質は、正常者の約 3 分の 2 から 3 分の 1 に減少していることが確認されている。

5. アレル別の DMPK の発現

正常 DMPK 遺伝子から発現する DMPK と、異常遺伝子から発現する DMPK のどちら (あるいは両方) の発現が減少しているかを調べるためには、mRNA の定量を行えば容易に結論が出そうである。しかしリピートが延長した mRNA のノーザンブロットリングはスメア状になり、定量がなかなか困難で、一定の結論が得られなかった。そこで、DMPK 上にアミノ酸のポリモルフィズムをヘテロで有する DM 患者筋組織を用いて染色体別の DMPK mRNA を RT-PCR 法で比較したところ、両者の間に殆ど差は認められなかった (図 2)。以上の結果からリピートは双方の遺伝子に作用を及ぼしてその発現を減少させ、両方のアレル由来の DMPK が同じように減少しているのであろうと考えられた。

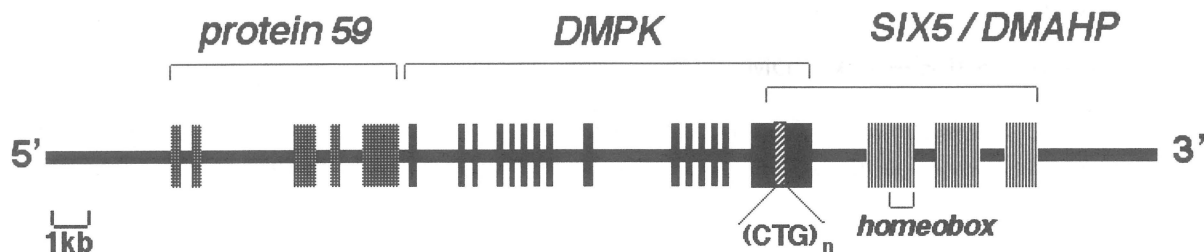


図 1 DMPK 周辺の遺伝子構造

protein 59, DMPK, SIX5/DMAHP (DM-locus associated homeobox protein) のエクソン部分, DMPK のリピート部分 (CTG)_n をそれぞれ示した。DMPK の CTG リピート部分は SIX5 のプロモーター領域にオーバーラップしている。

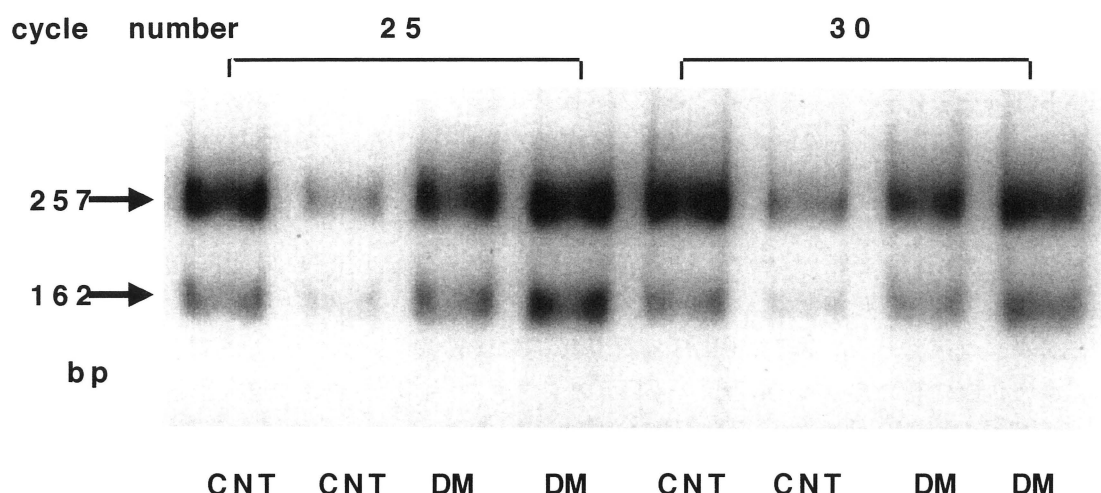


図2 RT-PCR 法による DMPK 遺伝子転写産物量の解析. DMPK エクソン上には制限酵素 *Bsr* I もしくは *Bpm* I で認識されるポリモルフィズムがある. このポリモルフィズムをヘテロで有する DM 患者さんの筋芽細胞から抽出した mRNA を RT-PCR で 25 回から 30 回増幅した後, 制限酵素 *Bsr* I で処理すると, CTG が延長した mRNA 由来のバンドが 162 bp, 正常 DMPK 遺伝子由来のバンドが 257 bp に分かれる. このバンドの濃さを濃度計 (densitometer) で比較しても, 2 本のバンドの濃度比に正常者 (CNT) との間で差は認められなかった.

6. CTG リピートと DM 発症の機序

これらの事実に基づき, 3' 非翻訳領域に存在する CTG リピートが遺伝子の発現に関与する機序については, 以下のような説が提唱され, それに基づいて種々の事実が明らかにされてきている. 現在までにそれらの説のどれが正しいか完全に確認されたわけではないが, 順次解説してゆく.

(1) DMPK 病因説

DM 患者筋細胞で DMPK の発現量が減少していることが判明したので, この蛋白が DM 特有の症状に関与しているという説が真っ先に提唱された. しかしこの説の最大の弱点は, DMPK ノックアウトマウスや, CTG リピートを DMPK 遺伝子の 3' 非翻訳領域に入れたトランスジェニックマウスが, DM に特徴的な症状を呈さないことであった.

一方, Mankodi A らは骨格筋アクチン遺伝子の 3' 非翻訳領域に CTG リピートを入れたトランスジェニックマウスを作成したところ, 電気生理的にミオトニアを呈し, 筋病理所見も DM に酷似するモデルマウスが作成されたことを報告した³⁾. このことから, 最近では筋細胞にリピートを含む mRNA が発現する事自体が DM の発症に強く関係し, リピートの上流にある DMPK 自体はそれほど重要な意味を持つわけではなく, むしろリピートの延長した mRNA を障害のある組織に発現させるプロモーターの方が重要ではないかという考えが強くなってきている.

(2) リピートを含む mRNA の周辺遺伝子へ及ぼす影響

ゲノム上で DMPK 遺伝子の周辺は密に遺伝子の存在している領域で, DMPK のすぐ 5' 上流には protein 59, 3' 下流には SIX5 (DMAHP) が位置しており, 後者のプロモーター領域は CTG リピートの位置とオーバーラップしていることがわかった (図 1). 従って, リピートの延長は下流の SIX5 遺伝子のプロモーター領域を壊し, その遺伝子の発現を抑制すると考えられる. これに基づいて SIX5 のノックアウトマウスを作成したところ, DM に最も多い合併症である白内障が発生することがわかった. このことより, CTG リピートの存在は何らかの作用で周辺に存在する遺伝子の発現に影響するのではないかと考えられるようになってきた. この説では, リピートが延長しているアレルで 3' 下流の遺伝子の発現が抑制される機序は説明できるが, DM が種々の合併症を起こすことを考えると, CTG リピートは対立遺伝子や, 同時

期に発現する遺伝子にも影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこでリピートを含む mRNA が、どのような動態を核や細胞質の中でとるのか調べる必要が出てきた。

リピート部分をプローブとして患者と正常人の筋芽細胞内での DMPK mRNA の局在を FISH 法で調べてみると、患者筋芽細胞ではシグナルは核膜の所に多く存在することが判明した。同様の実験を線維芽細胞で行ってみても、やはり通常認めるより多くのスポットが検出され、リピートを有する mRNA は核内に多く存在することがわかる(図 3 B)。CTG リピートを含む遺伝子はゲノム内に多く存在するが、コントロールではシグナルが全く認められないことから、このプローブは DMPK の mRNA 全長、もしくは分解されてリピートの所だけ残存している mRNA を検出しているとも考えられる。そこで、さらにリピートの周辺の部分をプローブとして RNA FISH を行くと、DMPK のシグナルがやや増加しているだけでなく、通常は離れた位置に認められる DMPK と SIX5 のシグナルが、DM 患者の筋芽細胞では重なって見えるものが多く認められることがわかった(図 3 C)。

以上の結果から、核内にリピートを含む mRNA が多くとどまっていることが示唆され、さらに CUG リピートと特異的に結合する CUG 結合蛋白(CUG-BP)の存在も報告されたことから、これがリピート部分に結合することにより核膜部分での mRNA の細胞質への移行に障害が生じている可能性が考えられている。

(3) リピートが延長した mRNA の同時に発現する他の遺伝子への影響

リピートを含む mRNA が遺伝子の発現を抑制する機序を調べるために、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用い、その 3' 非翻訳領域に CTG リピートを挿入したプラスミドを作成し、それを培養細胞にトランスフェクションしたところ、レポーター遺伝子の発現が抑制された(図 4 A)。同じ実験を両生類であるアフリカツメガエル卵母細胞で行っても同様の結果が得られた。ところがアフリカツメガエル受精卵にこのプラスミドを打ち込むと、このような現象は起こらなくなった(図 4 B)。卵母細胞と受精卵の間で蛋白合成能に差はなく、両者の違いは後者では発生のために細胞分裂が頻繁に起こり、核膜が一定の周期で消失することである。このことから CTG リピートを含むレポーター遺伝子の発現抑制には、核膜が重要な働きをすると考えられる。さらにこの時同時に別のレポーター遺伝子を打ち込んでみると、この遺伝子の発現も卵母細胞では抑制されることが判明した。

以上の結果から、核内にリピートが延長した mRNA が大量に存在すると、その 5' 上流の遺伝子の発現を強力に抑制するだけでなく(cis-効果)、その効果は同時に発現する他の遺伝子にも及び(trans-効果)、これらの効果には核膜が重要な働きをするのではないかと予想されている(図 5)。

(4) DM に認められる合併症の発症機序

核内に CTG リピート(mRNA では CUG リピート)の延長した mRNA が存在することが真核細胞にどのような影響を及ぼすのであろうか。DM 患者は難治性の糖尿病を合併することは良く知られているが、DM 患者のインシュリン受容体 mRNA の alternative splicing のパターンを調べてみると、正常人と異なり未熟型が多く発現していることが明らかとなった⁴⁾。DM では経口血糖降下剤やインシュリン治療に抵抗性の難治性糖尿病を合併することが多いが、未熟型のインシュリン受容体が多く発現しているとすれば、これがその病態を説明していると考えられる。同様の alternative splicing の異常は心トロポニン遺伝子でも起こっている事が確認されている。

また、DM には痴呆や性格変化などの中枢神経症状を合併することが多いが、病理学的には、中枢神経系に異常リン酸化タウ蛋白が沈着し、タウ蛋白の mRNA の splicing のパターンが正常人と異なっていることが判明している。一方、DM のモデルマウスの中枢神経にも同様のタウ蛋白の異常リン酸化や、alternative splicing の異常が起こることが確認され、リピートの延長した mRNA は核内で種々の遺伝子の発現に影響を及ぼしていることが予想されている⁵⁾。

ここで、DM で最も特徴的な症状であるミオトニアもやはり mRNA の alternative splicing の異常、つまり Cl チャンネルや、Na チャンネルに同様のことが起こって未熟な受容体が増えているためではないかと疑われたが、現在までの所明らかな異常は確認されていない。

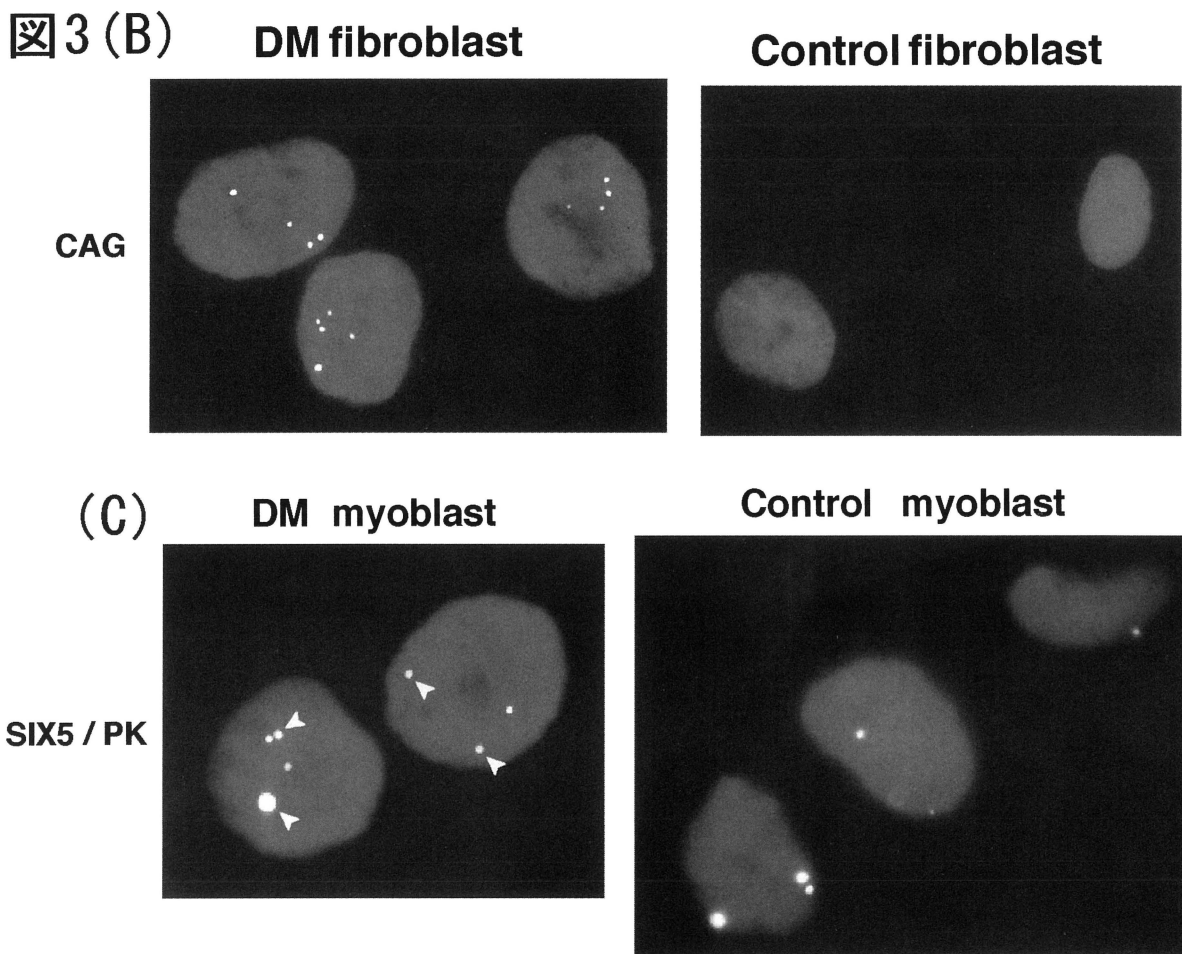
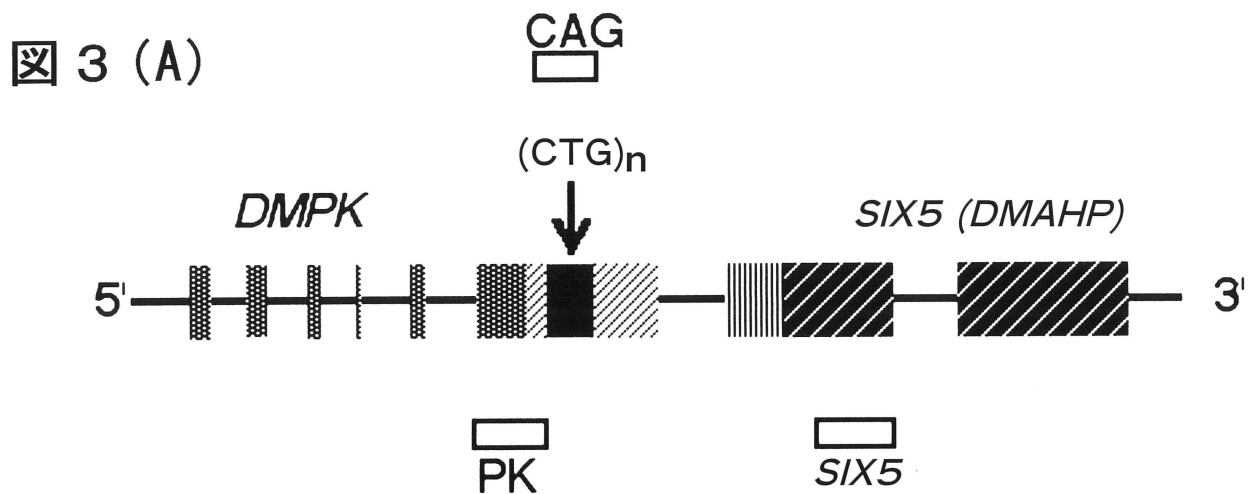
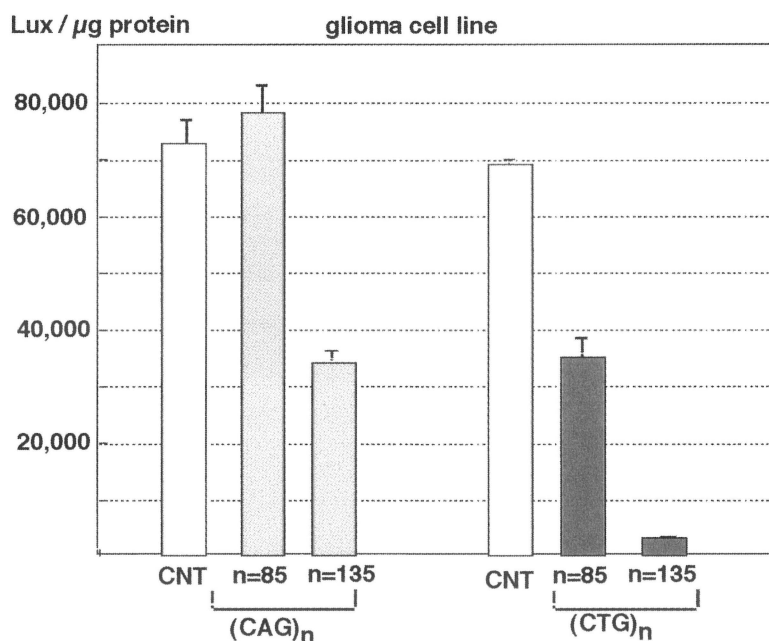


図 3 (A) RNA FISH 法のために作成したプローブの位置。CAG は (CTG)_n リピート，PK は DMPK のエクソン 15，SIX5 は SIX5 遺伝子に対する相補的なプローブの位置を意味する。
 (B) CAG プローブを用い，RNA FISH 法で DM (左) および正常コントロール (右) の線維芽細胞を染色した。コントロールでは認められないシグナルが DM サンプル核内に数多く認められる。
 (C) SIX5 および PK プローブを用い，RNA FISH 法で DM および正常コントロールの筋芽細胞を染色した。コントロールでは双方のシグナルがそれぞれ別の部位に認められるのに対して DM ではそれらが重なったシグナルが認められ(矢印)，しかもその数が多くなっている。(九州大学遺伝情報実験室 大野みずき，佐々木裕之氏の御好意による)

図 4 (A)



(B)

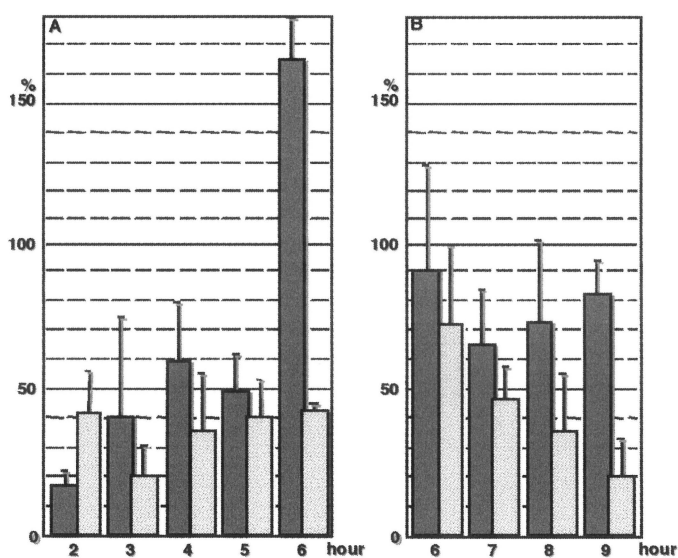


図 4 (A) レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用い、その遺伝子の 3' 末端に CAG や CTG リピートを組み込んだプラスミドを作成し、それを種々の細胞に打ち込んでルシフェラーゼ活性を測定した。CAG (□) より CTG (■) リピートで、しかもリピートのサイズが多いほどルシフェラーゼ活性が低くなる (図には神経膠腫細胞を用いたときの結果を示した)。

(B) 同じプラスミドをアフリカツメガエル卵 (A)、受精卵 (B) の核にインジェクションし、時間経過を追ってルシフェラーゼ活性を測定した。この場合、コントロールの活性を 100% とし、それに対する相対比を示している。卵では最初 CTG (■) の方が CAG (□) より発現が抑制されているが、時間経過とともに差が無くなり、6 時間ほど経過すると急激に CTG の発現が増加する。一方、受精卵ではそのような変化は起こらない (東京大学理学部 塩川光一郎先生の御好意による)。

図5

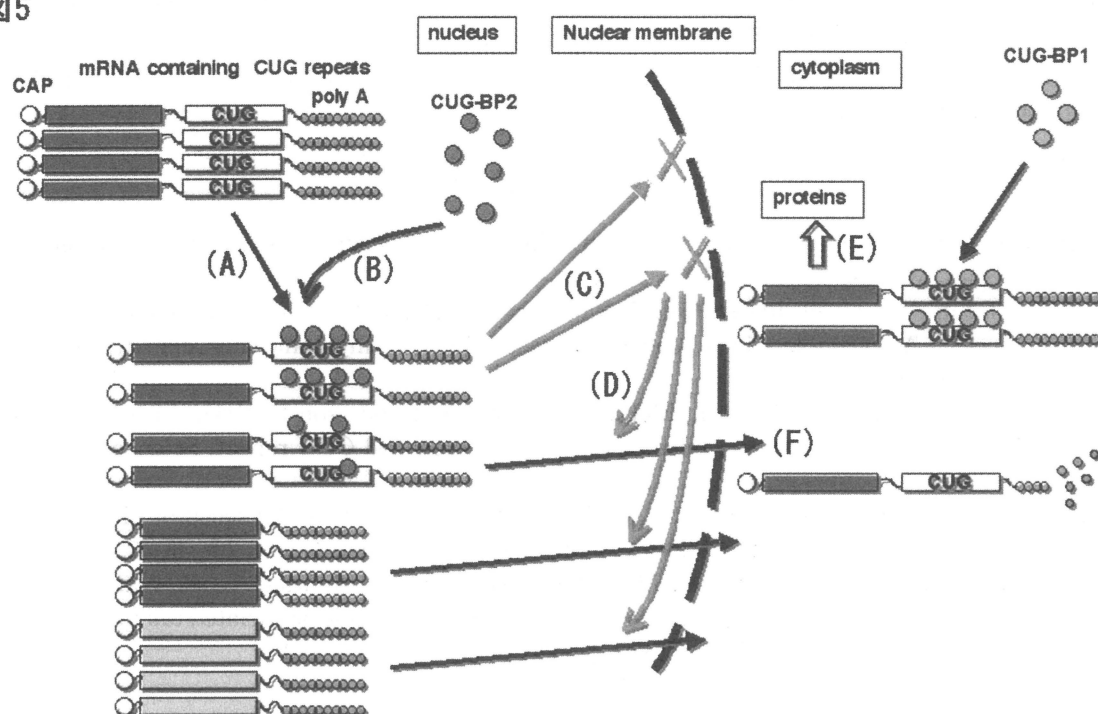


図5 CTGリピートの遺伝子発現に及ぼす影響

これまでに提唱されている仮説に基づき、核内でリピート(CUG)とリピート結合蛋白(CUG-BP)が複合体を形成し、自身および他の遺伝子の発現に及ぼす影響を模式的に示した。異常アレル由来のmRNAが核内に形成されると(A)、リピート結合蛋白がリピート部分に結合し(B)、核から細胞質への移行が核膜の所で障害される(C)、このような障害が起こることで対立アレルのみならず同時に発現する他の遺伝子の核・細胞質移行を阻害する(D)。このため蛋白の合成は正常な細胞に比べると遅れており、蛋白の合成量は下がっているが(E)、しばらく時間が経過するとこれらのmRNAは細胞質に移行し(F)、蛋白の合成は遅ればせながら開始される。

7. まとめ

以上を総合して考えると、細かい機序は不明ではあるがDMではDMPK mRNAのプロセッシング、核内での安定性、核から細胞質への輸送が核膜レベルで妨げられる可能性が示唆される。この結果、細胞質内におけるDMPKのmRNA量が減少し、タンパク質への翻訳が低下しているとともに、リピートを含むDMPK mRNAは同時期に発現している全く別の遺伝子の発現（この中には正常なDMPK遺伝子も含まれる）にも影響を及ぼすことが予想される。このように考えるとCUGリピートを含むmRNAが存在すること自体がgain of functionとしてDMの多様な症状の発現に関与していると考えることが出来る（図5）。

8. おわりに

以上3'非翻訳領域に存在するCTGリピートが、遺伝子発現に及ぼす影響についての最近の知見を述べた。CAGリピート病とCTGリピート病は、同じリピート病でありながら、臨床症状のみならず、その発症機序もかなり異なっている。これらリピート病を調べるときには、「何故リピートは延長するのか」ということと、「リピートの延長が何故病気を起こすのか」という二つの問題を解決する必要がある。本文中でも述べたが、リピートの延長したmRNAが核内に存在することで他のmRNAの発現に異常を起こす可能性が高いと考えられ、これが「リピートの延長が何故病気を起こすのか」という疑問に対する回答になっている。一方、本文中では詳しく述べなかったが、「何故リピートは延長するのか」という疑問に対する回

答も、核内に存在する異常 mRNA が、DNA 増幅時のエラーを修復する酵素の発現に異常を引き起こすのではないかと考えられているが、まだ確証を得るにはいたっていない。

このように、DM の発症機序に関してかなりのところまで判明してきたが、その正確な機序に関してはまだ不明の点が多く、今後の研究の発展が待たれる。

参 考 文 献

- 1) Christopher J, Cummings and Huda Y : Zoghbi . Fourteen and counting : unraveling trinucleotide repeat diseases. Hum. Mol. Genet. 9 : 909-916, 2000.
- 2) Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG Jr, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T and de Jong P : An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. Science 255 : 1256-1258, 1992.
- 3) Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, Henderson D, Krym M and Thornton CA : Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. Science 289 : 1769-1773, 2000.
- 4) Savkur, R. S., Philips, A. V., Cooper, T. A : Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. Nature Genet. 29 : 40-47, 2001.
- 5) Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C.-A., Wattez, A., Vermersch, P., and Delacourte, A : Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. Hum. Molec. Genet. 10 : 2143-2155, 2001.