



Title	Alternative Splicing Alterations in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Link to the Disruption of TAR DNA-Binding Protein 43 kDa Functions
Author(s)	三輪, 隆志
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101804
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"> 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	三輪 隆志
論文題名 Title	Alternative Splicing Alterations in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Link to the Disruption of TAR DNA-Binding Protein 43 kDa Functions (ALS患者で認めた選択的スプライシング変化：TDP-43機能障害との関連に注目して)
論文内容の要旨	
〔目 的(Objective)〕 筋萎縮性側索硬化症（ALS: amyotrophic lateral sclerosis）は上位・下位運動神経を侵す進行性の神経変性疾患で、正確な発症メカニズムは不明で根治療法もない。一部の遺伝例を除いたほぼ全例で、患者の運動神経細胞にTDP-43（TAR DNA-binding protein 43 kDa）の異常凝集を認める。TDP-43の遺伝子変異でもALSを発症することから、TDP-43の機能異常が病態に関わっていると考えられている。選択的スプライシングは転写時に一つの遺伝子から複数のバリエントmRNAを生成するが、TDP-43はその調整にも関わっている。選択的スプライシング異常はALS患者組織で検出されており、病態との関連も示唆されているが、病態解明や治療法開発には未だ至っていない。今回我々は、ALSの病態解明と治療法開発につなげることを目的に、患者組織から新規のスプライシング異常を検出することにした。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 ALS患者7例と健常コントロール7例の剖検脳の延髄腹側からRNAを抽出し、選択的スプライシング変化を解析ソフトでスクリーニングして、実際にReverse Transcription-PCR（RT-PCR）で確認した。選択的スプライシングは一般的に7種類に分けられる。exon skipping、intron retention、alternative 5` or 3` splicing site、のタイプは共通エキソン部分に結合するプライマーを設計してPCRし、共通エキソン間のエキソンもしくはイントロン挿入の有無で長短2種類のPCR産物を生成し、PSI(Percent spliced in)でスプライシング変化を定量した。Mutually exclusive exons、alternative promoters、alternative polyadenylation splicing、のタイプはバリエント毎に含まれる固有エキソンに結合するプライマーを設計し、qPCRで定量した。発現量の比較はGAPDH（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）を内在コントロールとしたΔCt法を使用した。また、TDP-43をノックダウンしたSH-SY5Y細胞をALSモデル細胞として使用し、患者で認めたスプライシング変化を認めるか検討した。 結果、exon skippingではTANC2のexon22b、OPA1のexon4b、MTSS2のexon7、SPAG9のexon9b、9cでスプライシング変化を認めた。DNM3のexon14、PTPRUのexon15は、ALSの4例が他のALS3例とコントロールに比べて明らかに異なっていた。これはALSのheterogeneityを反映していると思われる。CYB5R4のexon10b、NDUFA11のexon1b、KLHL7のexon1b、BRAFのexon4b、は早期終始コドンを持ち、これらのエキソンを含有するバリエントは翻訳されずに分解される。4遺伝子全てスプライシング変化を認めたので、正規バリエントの発現量もqPCRで調べたところ、CYB5R4で正規バリエントの発現量が増えていた。WASF3のexon7a、7bとDNM2のexon10a、10bはmutually exclusive exonsで、それぞれ同時に含まれることはなく別々のバリエントに含まれる。それぞれで含有するバリエントの比が異なった。Alternative promotersは2種類に分けられる。R3HCC1とCLK3は開始コドンは共通だが転写開始のエキソンが異なるバリエントを持ち、5`の非翻訳領域(5`UTR: untranslated region)が異なることからAlternative 5`UTRと言われる。APBA2とRBI1はalternative first exonタイプで、正規バリエントのエキソン間にあるエキソンから転写が開始され配列が短いバリエントを持つ。これら4つの遺伝子でスプライシング変化を認めた。TDP-43ノックダウンのSH-SY5Yでの検討ではWASF3、RBI1、OPA1、MTSS2、DNM3で患者と同様の変化を認めた。	
〔総 括(Conclusion)〕 今回我々は、ALS患者の組織から16の遺伝子で選択的スプライシングの異常を認め、これらは過去に報告が無い新規の物だった。また、5遺伝子ではTDP-43ノックダウンのALSモデル細胞で同様の変化を認めた。TANC2、OPA1、DNM2、DNM3ではバリエントの変化で神経細胞機能が変化する報告はあるが、実際に今回の変化がALSの病態にどのように作用しているかは不明のため、今後はその解析を進めて行く予定である。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 三輪 隆志				
論文審査担当者		(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	望 月 香 樹	署 名
	副 査	大阪大学教授	島 田 昌 一	署 名
	副 査	大阪大学教授	池 田 孝	署 名

論文審査の結果の要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS: amyotrophic lateral sclerosis) では、TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43 kDa) の機能異常が病態に関わっていると考えられている。TDP-43の重要な働きに選択的スプライシング調節があり、選択的スプライシング異常はALS患者組織で検出され、病態との関連が示唆されている。今回の研究は患者の剖検脳からRNAを抽出し、新規の選択的スプライシング異常を同定し、ALSの病態解明を目指したものである。本研究では患者の延髄腹側からRNAを抽出して選択的スプライシングを解析し、16の遺伝子で新規の異常を認めた。TDP-43をノックダウンした細胞では5遺伝子が同様の異常を認め、TDP-43機能異常との関連が示唆される。今回の研究は、ALSの患者組織から新規の選択的スプライシング異常を発見し、ALSの病態解明につながりうることから、学位に値するものと認める。