OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Macroscopic and microscopic diversity of missplicing in the central nervous system of patients with myotonic dystrophy type 1
Author(s)	古田, 充
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/70692
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、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

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　古田　充

	（職）	氏　名
論文審査担当者		
主　査	大阪大学教授	望月秀樹
副　査	大阪大学教授	木阪恵一
副　査	大阪大学教授（副指導）	永井義隆

論文審査の結果の要旨

本論文は筋緊張型ジストロフィーI型の患者剖検脳の中枢神経系各部位において詳細にスプライシング異常の解析を行った論文である。これまでの研究では主に小脳と側頭葉で解析が行われていたところを、多数の剖検脳を用いてほかの部位にも解析を広げ、統計学的に各部位の違いについて検討した。マクロレベルで既知の制御因子による違いでは中枢神経各部位の差異を説明することができなかったため、さらに細胞層ごとにスプライシング異常の解析を進めており、小脳皮質とレーザーマイクロダイセクションを用いて細胞層ごとのスプライシング異常の差について初めて証明した。

筋緊張性ジストロフィー１型の中枢神経症状の詳発症メカニズムはよくわかっていない点が多い。剖検脳を用いた研究は貴重であり、細胞層毎の解析の重要性と実際の差異を指摘した点において今後の研究につながる重要な結果であり、学位の授与に値すると考える。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	古田　充
論文題名 Title	Macroscopic and microscopic diversity of missplicing in the central nervous system of patients with myotonic dystrophy type 1 （筋強直性ジストロフィー1型の中枢神経内での部位別・組織別のスプライシング異常の解析）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

筋緊張性ジストロフィー１型（DM1）は成人で最も頻度の高い筋ジストロフィー症であり、DMPK遺伝子の非翻訳領域にあるCTGリピートの異常伸長とそれに伴うスプライシング異常が原因の多臓器疾患である。骨格筋では異常伸長したmRNAにスプライシング制御因子であるMBNL1が補足され、もう一つのスプライシング制御因子であるCUGBP1が活性化することでスプライシング異常が起こり、チャネルなどの作用を変えることが原因と分かっている。DM1患者では認知機能低下、性格変化、睡眠時無呼吸、日中過眠などといった高次機能障害も引き起こされる。DM1患者の中枢神経では、*Mbnl2*のノックアウトマウスと少数の剖検脳を用いた研究から、MBNL2を介したスプライシング異常が重要と考えられているが、その部位ごとの違いや神経症状出現のメカニズムについてはほとんどわかっていなかった。

本研究では多数の剖検脳を用いて、スプライシング異常の中枢神経内の各部位での差異について研究し、さらにLASER capture microdissection（LCM）がDM1で細胞層別のスプライシング異常を明らかにするのに有効であるかを検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

DM1患者（n=15）とコントロール患者（n=11）の剖検検体の各部位（前頭葉、側頭葉、海馬、小脳、脊髄）からRNAを抽出し、RT-PCR法を用いて、先行研究によってMBNL2の影響を受けることが知られている遺伝子群（*ADD1, CACNA1D, CLASP2, CSNK1D, KCNMA1, LIMCH1, PPP1R12A, TANC2*）の選択的スプライシングの産物の比を求めた。前頭葉、側頭葉、海馬では検討した遺伝子の多くに遺伝子にスプライシング異常が見られたが、その程度については違いが見られた。その一方で小脳と脊髄ではDM1とコントロール間での差が見られない遺伝子が多かった。特に小脳においてはmultiple comparisonではDM1とコントロールで有意差が見られなかった。

上記の部位別の差異の原因を明らかにするために、剖検検体から*DMPK* mRNAと既知のスプライシング制御因子（MBNL1, MBNL2, CUGBP1, CUGBP2）についてそれぞれreal time PCRとウェスタン・ブロットによって定量したが、大脳と小脳間での差異を説明するような結果は得られなかった。

神経細胞は層構造が機能的に非常に重要であり、組織全体での解析では限界があると判断し、細胞層ごとに解析を行うために小脳皮質に注目した。小脳皮質は顆粒層、プルキンエ細胞層、分子層の三層を光学顕微鏡で簡単に判別できるため、LCMでそれぞれの細胞層を回収してRNAを抽出することができた。回収したRNAに対して同様にRT-PCRを行うと、顆粒層ではすべての遺伝子でスプライシング異常が認められなかったが、分子層では*CLASP2*と*ADD1*のスプライシング産物の比に有意差を認め（それぞれp=0.003, p=0.036）、とくに*CLASP2*については多重比較でも有意であった。プルキンエ細胞では*CSNK1D*がpairwise comparisonで有意差を示したが（p=0.045）、多重比較では有意とならなかった。

〔総　括(Conclusion)〕

DM1患者の中枢神経内では部位ごとにスプライシング異常の程度が大きく異なっており，本研究ではDM1の細胞層間での違いを初めて示した。LCMはDM1の中枢神経病理を考えるうえで有用なツールとなりうる。検討した遺伝子内では小脳皮質の顆粒層ではスプライシング異常を呈した遺伝子はなく、顆粒細胞ではスプライシング異常に対して保護的な機構がある可能性がある。