

博士論文（要約）

良性成人型家族性ミオクローヌステんかん (BAFME)
の発症機序に関する研究

松川 美穂

良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん (benign adult familial myoclonic epilepsy; BAFME)

は皮質振戦と呼ばれる細かいミオクローヌスと全般性強直間代発作を主徴とする常染色体優性遺伝性疾患である。BAFME は本邦において頻度の高い疾患であり、20–60 歳と成人期に発症し、初発症状は皮質振戦であることが多い。全般性強直発作は数年に一度と低頻度で出現し、良性の経過をたどる。光過敏性やアルコール摂取による皮質振戦の改善がみられる点が特徴とされている。本邦の BAFME 家系の解析により *SAMD12* 遺伝子（一部の家系では *TNRC6A* 遺伝子、*RAPGEF2* 遺伝子）のイントロンにおいて健常者に存在する(TTTTA)_n というリピート配列の伸長に加えてその下流または内部に(TTTCA)_n という異常伸長リピートが存在し、これが BAFME の原因であることが近年明らかになった。対照者で時に TTTTA repeat 伸長が認められることから、TTTCA repeat 配列が病態の主軸を担っていると考えられている。また、BAFME 患者剖検脳の RNA-seq では TTTCA repeat のみならず、CTTCA、GTTCA repeat で占められる short read が認められた。この解析結果から、TTTCA repeat が転写される際に何らかの修飾あるいは RNA 編集を受け、BAFME 患者の脳においてのみ UUUCA に加え CUUCA、GUUCA というモチーフからなる repeat RNA が発現していることが示唆された。

非翻訳領域のリピート伸長を原因とする代表的な疾患に *DMPK* 遺伝子の 3'非翻訳領域の CTG repeat を原因とする筋強直性ジストロフィー1 型が挙げられる。この疾患では CUG repeat が細胞核内で RNA foci と呼ばれる凝集体を形成し、それにスプライシング因子である MBNL1 などの RNA 結合タンパク質 (RBP) が捕捉され量的に低下することで塩化物チャネル (CLCN1) など

のスプライシング異常が二次的に生じ、様々な症状が引き起こされると考えられている。このように伸長 RNA そのものが疾患の発症において重要な原因となる 'RNA gain-of-function mechanism' が、BAFME においても重要である可能性を考え、病態機序について検討を行った。

BAFME 剖検脳を用いて神経細胞における RNA foci の検討を行い、BAFME 病原性リピートが RNA foci を形成していることを確認した。したがって、BAFME 病原性リピートが安定した構造をとり、何らかの RBP を捕捉して凝集体を形成する 'RNA gain-of-function mechanism' が BAFME の病態機序の中心になっている可能性が考えられた。また、*SAMD12* 遺伝子のイントロンに原因リピートを有する BAFME 患者 6 例の剖検脳を用いて、*SAMD12* 遺伝子の発現について検討を行った。Droplet digital PCR (ddPCR) による RNA 発現量の検討では、*SAMD12* transcript variant 1 の発現量については BAFME ヘテロ接合性変異群とコントロール群で有意差はなかった ($p=0.93$)。Western blot によるタンパク質発現量の検討では、BAFME ヘテロ接合性変異群ではコントロール群と比較して *SAMD12* の発現量は軽度低下していた ($p=7.4 \times 10^{-3}$)。したがって、BAFME では *SAMD12* の RNA 発現は不変または軽度低下、タンパク質発現は軽度低下していたが、これは筋強直性ジストロフィー 1 型とほぼ同様の傾向であり、BAFME においても *SAMD12* のハプロ不全 (loss of function) の病態への寄与は少ないと考えられた。

次に、免疫沈降の原理を用いて BAFME 病原性リピートに結合するタンパク質を検索し、複数の RNA 結合タンパク質を同定するとともに、RNA electrophoretic mobility shift assay (REMSA) でも validation を行った。

さらに、ヒト神経芽細胞種由来の培養細胞である SH-SY5Y 細胞において、UUUCA repeat に結合し、BAFME の病態に関与する可能性があると考えられた 2 つの RNA 結合タンパク質 A, B の発現を抑制させた場合の細胞内の RNA 発現量および alternative splicing の変化について検討した。RNA 結合タンパク質 A を knockdown した SH-SY5Y 細胞では 2 個の遺伝子について有意な発現変動が認められ、RNA 結合タンパク質 B を knockdown した SH-SY5Y 細胞では計 50 個の遺伝子について有意な発現変動がみられ、計 7 個の遺伝子についてはスプライシングの有意な変化 (FDR<0.05) を認めた。

また、BAFME 病原性リピート RNA の高次構造を推定するために各種解析を行った。BAFME 病原性リピート RNA はある準安定的な核酸構造をとっている可能性が示唆された。