

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

氏 名 陈 桂英

論 文 題 目

Phenylbutazone induces expression of MBNL1 and suppresses formation of MBNL1-CUG RNA foci in a mouse model of myotonic dystrophy

(フェニルブタゾンは、筋緊張性ジストロフィーモデルマウスにおいて、MBNL1 の発現を増強し、MBNL1 と CUG 異常反復 RNA の結合を阻害する)

論文審査担当者

主査 委員
名古屋大学教授

委員
名古屋大学教授

委員
名古屋大学教授

指導教授
名古屋大学教授

附録1-2

論文審査の結果の要旨

筋強直性ジストロフィー1型 (DM1) は、異常伸長 CUG リピート RNA に RNA 結合タンパク MBNL1 が捕捉されることで、異常スプライシングが生じて発症する疾患である。現時点では根治的治療は存在しない。C2C12 細胞を用いて、RT-PCR 法により抗炎症性非ステロイド薬剤のスクリーニングを行い、MBNL1 発現上昇を促す薬剤として、Phenylbutazone (PBZ) を同定した。DM1 モデルマウス (HSA^{LR}_{250}) への PBZ 投与では、回転ホイル法で、PBZ 投与群で有意な運動能の改善を認めた。組織学的検討で、PBZ 投与群において、マウス前脛骨筋組織における *Mbn11* mRNA およびタンパク量の著明な増加を認めた。DM1 に特徴的な中心核、核内 MBNL1-CUG foci 形成、*Clcn1* 遺伝子 exon7 異常スプライシングなどの異常所見も、PBZ 投与群で有意に改善した。PBZ は MBNL1 の intron1 領域にあるエンハンサー領域のメチル化を抑制することで、MBNL1 の転写活性を亢進させていた。PBZ は、MBNL1 の発現上昇を促し、DM1 の病態を改善させる有望な治療薬候補であることが示唆された。

本研究に対し、以下の点を議論した。

- 過去の研究では、DM1 で異常が認められる RNA 結合タンパクとして、MBNL1 に加え、CUGBP1 や hnRNP H が報告されている。本研究で、PBZ による RNA 結合タンパクの発現変化について、RT-PCR 法および Western blotting 法で検討しており、PBZ は MBNL1 の発現を上昇させたが、他の RNA 結合タンパクの発現に影響を与えていない。PBZ は、MBNL1 の発現上昇を介して、DM1 病態を改善させる、と考えられた。
- PBZ が制御するメチル化領域について、実験結果から明らかとなったのは、MBNL1 のエンハンサー領域のメチル化減弱である。この領域は、筋分化とともにメチル化が増強することが知られており、MBNL1 の発現制御に重要な役割を持つと考えられる。MBNL1 のプロモーター領域のメチル化も解析を行っていたが、PBZ による変化は認められず、PBZ はエンハンサー領域特異的にメチル化制御を行うことが示唆された。
- PBZ による MBNL1 活性化のメカニズムは、2 つの経路が考えられる。培養細胞による実験では、PBZ は MBNL1 のエンハンサー領域のメチル化を抑制することにより、*Mbn11* 遺伝子の転写を亢進させていた。また、PBZ 投与マウスの組織学的検討で、DM1 モデルマウスで CUG foci 領域に凝集している MBNL1 が、PBZ 投与で核内に拡散していた。同様に、RNA-EMSA 法で、精製 MBNL1 タンパクの CUG-RNA への *in vitro* での結合が、PBZ により阻害されることが示された。以上の結果は、PBZ が MBNL1 と CUG-RNA との結合を阻害することを示唆する。PBZ は、MBNL1 の産生を加速し、かつ遊離 MBNL1 量を増加させる、という二つのメカニズムから DM1 の病態を改善させることが考えられた。

以上の理由により、本研究は博士（医学）の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

別紙2

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲第	号	氏名	陳桂英
試験担当者	主査	平田仁 大野飲司	門脇健治 八里昌	石黒直樹

(試験の結果の要旨)

主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。

1. PBZがMBNL1 および他のRNA結合タンパク発現におよぼす影響について
2. PBZによる *Mbn11* 遺伝子領域のメチル化制御について
3. PBZによる MBL1活性化のメカニズムについて

以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、神経遺伝情報学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員会議の上、合格と判断した。