

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「DNAチップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明」
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）  
研究代表者：荒畑 喜一（国立精神・神経センター神経研究所部長）  
研究代表代行者：西野 一三（国立精神・神経センター神経研究所 部長）  
（荒畑 喜一研究代表者の急逝に伴い、平成12年12月20日以降研究代表代行者として継続して研究を実施した。）

### 主たる研究参加者

辻本 敦美（DNAチップ研究所 シニアサイエンティスト）  
反町 洋之（東京都臨床総合医学研究所 室長）  
戸田 達史（大阪大学大学院医学系研究科 教授）  
森下 真一（東京大学大学院理学系研究科 教授）  
塚原 俊文（北陸先端科学技術大学院大学 教授）

### 3. 研究内容及び成果：

これまでに、筋ジストロフィーの原因遺伝子が次々と明らかにされているにも関わらず、未だに治療が開発されていない。ヒト骨格筋特異的 DNA チップによって、細胞内の全ての遺伝子発現を一気に解析して、複雑な細胞現象を網羅的に捉えるとともに、その遺伝子発現調節機構を明らかにできれば、遺伝性筋疾患の分子病態を明らかにし、新たな治療戦略への基盤形成を行うことができると考えた。このことにより、本研究では1)解析ツールとしてのアレイ型ヒト筋特異的 DNA チップの開発・作製、2)作製したヒト筋チップを用いた筋疾患の分子病理学的解析のための方法の確立、3)遺伝性筋疾患の遺伝子発現プロファイル作成による分子病態解析、を3つの柱として研究を進めてきた。

#### 「ヒト筋 DNA チップの開発」

公開データベースより、ヒト骨格筋・心筋に発現する既知の cDNA 情報を全て収集し、*in silico* でクロスハイブリダイズを可能な限り排除したターゲット遺伝子配列候補から、ヒト骨格筋・心筋の cDNA をテンプレートにして cDNA 断片をクローン化し、5,760 クローンを1枚のスライド上に搭載するヒト骨格筋に特化した独自の大規模 DNA チップを作製した。プローブ作成・検出法には、TSA 増感システムを採用し、 $\mu\text{g}$  オーダーの total RNA からの遺伝子発現プロファイリングを初めて可能にした。作製した DNA チップは、再現性・定量性ともに高く、筋病理とも良く相関していた。

#### 「筋細胞分化に伴う遺伝子発現のカタログ化」

ヒト骨格筋初代培養細胞の分化に伴う経時的遺伝子発現変化を全 5,760 クローンについて調べ、各遺伝子での至適クローンを同定するとともに、全 4,200 遺伝子の分化に伴う発現情報をカタログ化した。さらに、遺伝子発現情報を基にして、4,200 遺伝子を分類した。

#### 「デュシェンヌ型筋ジストロフィーにおける解析」

開発した DNA チップの性能評価と各種筋疾患解析への応用の出発点として、最も詳しく解析進んでいるデュシェンヌ型筋ジストロフィーでの遺伝子発現変化を解析した。患者生検筋でも再現性のいいデータが得られること、各患者生検筋の病理をよく説明する発現データが得られることが示された。しかも、筋細胞の遺伝子発現変化だけでなく浸潤細胞の発現変化を捉えられることが示された。これにより、筋病理観察に加え、筋疾患マイクロアレイ解析での分子マーカーの発現変化を用いて、疾患筋組織の病理変化をモニターすることが可能となることが示唆された。

#### 「各種筋ジストロフィーの解析」

国立精神・神経センター筋レポジトリに保存されている各種疾患筋から RNA を抽出・精製し解

析を行い、各種疾患の発現プロファイルを得た。さらに、このデータを基に各種筋疾患間での遺伝子発現レベルでの相違性と患者間での相関性を解析し、遺伝子発現変化を用いた筋疾患診断の可能性を考察した。

#### 「シグナル伝達系の解析」

遺伝子発現を調節していると考えられるシグナル伝達系について、特に治療的応用の可能性が示唆されている IGF-1 シグナル系とマイオスタチンシグナル系に注目して、その下流遺伝子群を発現プロファイルから明らかにすべく筋培養細胞での解析を行った。その結果、IGF-1/PI3K - Akt シグナル伝達系に特異的に応答する遺伝子群の大半が、同様のプロモーター構造を有する筋特異的発現遺伝子であることを明らかにした。また、低濃度のマイオスタチンが培養筋分化に対して、負の制御をおこなうこと、より広範囲な筋発現遺伝子が発現阻害を受けていることが原因であることを示した。

#### 「筋疾患治療法開発のための、治療効果評価ツールとしての DNA チップの利用」

近年、遺伝性筋疾患の治療法開発をめざした基礎実験として、遺伝子治療、幹細胞移植治療とともに、薬物治療実験が試みられ、成果が報告されている。投与効果の報告がある IGF-1 の筋ジストロフィーモデルへの投与を試みた。さらに、筋病理観察と DNA チップ解析によって、投与薬物の作用機序と投与下の筋組織の動態を分子レベルでモニターすることを試みた。

DNA チップの開発にあたっては、DNA チップ研究所グループと塚原グループが貢献した。また、DNA チップを用いた各筋疾患の病態解析にあたっては戸田グループ、反町グループ、森下グループが協力した。

### 4. 事後評価結果

#### 4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表は海外で58報掲載されたが、本題のDNAチップに関連したものは論文にするのが難しく少数に留まった。このチームの研究は二段階に分けて行われた。第一段階ではアレイ型ヒト筋特異的なDNAチップの開発を行い、第二段階ではDNAチップを用いた筋疾患分子病態の解析と治療戦略の確立であった。第一段階でのDNAチップの開発にあたっては、5,760クローンを1枚のスライド上に搭載するヒト骨格筋に特化した独自の大規模DNAチップを作製した。このDNAチップは再現性・定量性ともに高く、かつ1検体によるデータ解析が出来るという従来にない優れた特徴が見られ、このことは高く評価される。第二段階の筋疾患分子病態の解析にあたっては大きな壁があることが分かった。つまり、DNAチップでは各種遺伝子発現調節カスケードの最下流現象を見ているに過ぎず、上流ではどのような変動が起きているのか解析出来ないのである。そのため、シグナル伝達系との関連にトライしているが、やや断片的な解析にとどまり、各種病態の全貌解析への道筋は見えていない。不幸なことに研究代表者が早期に死亡したため、後を引き継いだ西野代行が懸命に努力されたが、大きなブレークスルーに至らなかったのは残念である。今後、病態解析のツールとしてだけでなく、治療も考慮に入れたDNAチップの利用へと発展して欲しいものである。

#### 4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

DNA チップ研究所との共同開発によるアレイ型ヒト筋特異的な DNA チップを完成し、その有用性が確認されたので、外販出来る可能性が高い。有用な研究ツールを広く使用して貰うことによって、この分野の治療法開発に光をあてることを期待したい。

#### 4 - 3. その他の特記事項(受賞歴など)

なし