

「脳を守る」

平成11年度採択研究代表者

荒畑 喜一

(国立精神・神経センター 部長)

「DNAチップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明」

1. 研究実施の概要

超高密度DNAマイクロチップ(DNAチップ)の科学技術革新は、21世紀の疾病研究を切り拓く新戦略である。本研究では"ポストゲノムシーケンス"ないし"機能解析遺伝学"の時代を視野に捉え、DNAチップの疾病研究分野への有用性を確立する。遺伝性筋疾患をモデルとして病因と病態解明の研究を行うが、特に代表的な神経筋難病である筋ジストロフィーについて、未知原因遺伝子や病態修飾因子の探索を含めた疾患関連分子の解明を目指す。これまで限界のあった、膨大な数量の遺伝子発現情報を扱えることがDNAチップの導入によって実現する。その結果、疾患の病型別・個体別・臓器別差異の本態が一気に解明される可能性が浮上してきた。疾病克服にとって最も重要な"分子病態"の解明は、次世代における効果的かつ個別的治療戦略への開発基盤となる。

本研究プロジェクトの成否は、いかに優れたcDNAクローンを大量に獲得することができるかにかかっている。プライマーをデザインする時に、一つのクラスターは様々なESTクローンの3'や5'集まりであり、しかも一つの列としてアセンブルされていないことが挙げられる。つまり長い塩基列が得られない場合も多いということが問題になるかと思われるが、我々は3'のpoly(A) RNAを扱うことで解決する。またBODYMAPの場合、どのライブラリーから得られた遺伝子かがはっきりしているので、筋特異的な遺伝子を見つけるのには好都合である。なおAlu, L1などの繰り返し配列、ミトコンドリア、リボソーマルプロテインとマッチする部分は除去をし、ノイズレベルを極力減少させる努力は重要な問題になる。最終的にはコンピューター制御下で表面処理を施されたガラス基盤上にDNAが1 cm²上に5,000クローンスポットされるが、この方面ではDNAチップ研究所と共同研究が進められる。筋サンプルの情報はハイブリダイゼーションの後、高速レーザー ScanArray 5000 で読み取られる。

初年度にあたる平成11年度は既知遺伝子約400クローンをモデルとして、DNAチップの作製に取り組んだ(研究実施内容参照)。将来的には1?2万個揃える計画である。一方、陽性に検出されたスポットデータを、コンピューター画面上でクリッ

クした際に、自動的にcDNAのクローン情報などのデータが導出できるようなソフトの開発にも着手している。具体的には、各遺伝子の Unigene におけるHs番号もしくは accession number を識別子として、BODYMAPやUnigeneもしくは dbEST の Web にリンクを張り、快適なユーザーインターフェースを作成する事になる。データのプロファイリングと分析が可能なソフトウェア開発には、かなり情報科学的に高度なアルゴリズム設計能力が要求される分野であることから、東京大学大学院理学系研究科・理学部情報科学科研究グループとの共同研究を進めている。なお今後DNAチップ技術の確立の一端として、カリフォルニア大学の研究グループの実施しているAffymetrix超高密度DNAマイクロチップ(12 cm²に35,000個のプロープ)による解析データの比較を行う。

応用研究として、(1)未知遺伝子および修飾因子の発見努力、(2)薬剤治療の開発と評価等が重要であるが、これらの研究プロジェクトを推進するにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科グループと東京大学・医科学研究所ヒトゲノム解析センターグループとの共同研究を進めている。

我々は来るべき21世紀において、我が国の神経筋疾患の研究水準が、国際的に指導的立場を維持・発展させるために、DNAチップ戦略に見る一連の科学技術革新に速やかに対応し、さらに独自に開発して実用化を図って行くものである。これらの成果は国民の知的財産の充実・保護と研究開発システムの強化をもたらすものである。

2. 研究実施内容

(a) 研究目的

筋ジストロフィーの原因にはジストロフィン、サルコグリカン、ラミニン 2、インテグリン、ジスフェルリン、カベオリン 3 等の細胞膜・基底膜関連タンパク質のほかに、エメリン、ラミンA/C の様な核膜関連タンパク質、カルパイン 3、ミオトニン P K といった細胞質に存在する酵素群、さらにはフクチンの様な分泌性タンパク質、と極めて多岐にわたる分子が関与していることが明らかになった。しかし、この様な多種多様な分子をコードする遺伝子群の異常が、なぜ筋ジストロフィーという共通の病態像を示すか、なお未知の解決すべき疑問が山積している。我々は、正常および疾患筋組織でどのような遺伝子(群)が優位に発現し、あるいは抑制されているかについての情報を全て知ることができれば、筋ジストロフィーに共通な病態像を特徴づける遺伝子発現プロファイルを網羅的に明らかにできると考え、ヒト筋特異的cDNAチップの作製と分子病態解析を開始した。

(b) 方法

独自の筋DNAチップを作製するために NCBI より骨格筋・心筋に発現する既知のcDNA情報を収集し、筋発現遺伝子のデータベースを構築する。このデータベ

スに基づいて、それぞれのcDNAに特異的なPCRプライマーをデザインし、ヒト骨格筋・心筋のcDNAをテンプレートにRT-PCRを行い、それぞれの増幅cDNA断片を得る。さらにこれら増幅cDNA断片をクローン化する（シーケンス、制限酵素消化で検証）。次に得られた各クローンをテンプレートに、遺伝子断片を増幅・精製した後、表面処理したスライドガラス上にコンピューター制御下で高密度にスポットし、筋DNAチップを作製する。

今年度はX-染色体性劣性のEmery-Dreifuss型筋ジストロフィー（X-EDMD）を取り上げて、DNAチップシステムの運用と妥当性の検証を行う。具体的には、正常およびX-EDMD由来筋組織・皮膚線維芽細胞よりRNAを精製し、発現遺伝子の解析を行う。また、アデノウイルスに組み込んだエメリン遺伝子AxCAN-EmeをX-EDMD線維芽細胞に感染させ（対照はAxCAN-LacZ）、発現遺伝子の変化の様子を捉える。

(c) 結果と考察

我々は、384の筋特異的クローンよりなるヒト筋DNAチップを得た。各クローンには同一のベクターを用いたことによって、ベクターのアームに共通のプライマーでcDNA断片の増幅をほぼ均一に行うことができた。また、本法によってアーム部分のプロンプを用いたハイブリダイゼーションが可能となったので、作製したDNAチップの品質の検定が容易となった。

X-EDMD線維芽細胞では、正常対照に比較し41種の遺伝子の発現が上昇し、22種で低下していた（計63種の遺伝子の発現が変化）。さらにこれらの発現遺伝子の変化がエメリン欠損に特異的な現象であるか否かを検証するため、X-EDMD線維芽細胞にエメリン遺伝子を強発現させて発現遺伝子を調べたところ、発現が変化した63種の遺伝子のうち32の遺伝子がレスキューされた。従って、これら32遺伝子の発現変化はエメリン欠損に由来したものであることが強く示唆された。なお、常染色体性優性のEDMD（AD-EDMD）の原因とされるラミンA/C遺伝子発現上昇は、エメリン欠損の代償的な現象である可能性があり注目された。

(d) 結論

DNAチップによる筋発現遺伝子の網羅的解析の実現は、遺伝性筋疾患の病態研究に革命的な突破口を開くものと期待される。今後、今回作製したDNAチップを用いて、各種筋疾患に特徴的な遺伝子発現プロファイルを明らかにして行くとともに、DNAチップの大規模化を図る予定である。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Tsuchiya Y, Hase A, Ogawa M, Yorifuji H and Arahata K. Distinct regions specify the nuclear membrane targeting of emerin, the responsible protein for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Biochem* 259:859-865, 1999

Funakoshi M, Tsuchiya Y and Arahata K. Emerin and cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 9:108-114, 1999

Matsumura T, Aoki M, Nagano A, Hayashi YK, Asada C, Ogawa M, Yamanaka G, Goto K, Nakagawa M, Oka H, Sahashi K, Kouhara N, Saito Y, Brown RHJr, Nonaka I and Arahata K. Molecular genetic analysis of dysferlin in Japanese patients with Miyoshi myopathy. *Japan Acad* 75 (B):207-212, 1999

Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK, Ho MF, Arahata K and Brown RHJr. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology* 53:1119-1122, 1999

Song MD, Goto K, Lee JH, Matsumura T, Sahashi K and Arahata K. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *NeuroScience News* 3:28-33, 2000

Tsujino S and Arahata K. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuro Science News* 3:34-38, 2000

荒畑喜一：エメリー・ドレーフス型筋ジストロフィー

生体の科学 50:344-346,1999

荒畑喜一：デュシェンヌ型筋ジストロフィー

生体の科学 50:351-353,1999

松村 剛、後藤加奈子、荒畑喜一：顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー

Clinical Neuroscience 17: 1134-1137, 1999

永野 敦、荒畑喜一：Emery-Dreifuss型筋ジストロフィー

Clinical Neuroscience 17: 1149-1151, 1999

荒畑喜一：筋ジストロフィー研究の進歩

第25回日本医学会総会誌(I)p 99,1999

石原傳幸、荒畑喜一：国際シンポジウム－Overview of the LGMDs－

臨床神経学 39:1268,1999

青木正志、荒畑喜一、Robert H. Brown, Jr.：ポジショナルクローニングによる三好遠位型筋ジストロフィーの原因遺伝子 dysferlin の同定

臨床神経学 39:1272-1275,1999

荒畑喜一：筋疾患総論

小俣政男、杉本恒明 総編集、内科学（第7版）朝倉書店、東京、pp1974-1978, 1999

荒畑喜一：進行性筋ジストロフィー

小俣政男、杉本恒明 総編集、内科学（第7版）朝倉書店、東京、pp1989-2000, 1999

荒畑喜一：筋ジストロフィー

第115回日本医学会シンポジウム記録集 神経難病のup date

pp65-71, 2000

林 由起子、荒畑喜一：筋疾患

内科 84:1066-1070,1999

林 由起子、荒畑喜一：神経・筋疾患と細胞外マトリックス

小出 輝、林 利彦編、細胞外マトリックスー基礎と臨床ー愛智出版、東京、

pp450-458,2000

林 由起子、荒畑喜一：インテグリン 7欠損型先天性ミオパチー

Annual Review 神経 2000:266-270,2000

荒畑喜一：筋肉疾患

水野義邦、栗原照幸編、標準神経病学、医学書院、東京、pp6-49, 2000

松村 剛、荒畑喜一：三好型ミオパチーの免疫病理

神経内科 52:283-288,2000