

「脳を守る」  
平成11年度採択研究代表者（代行）

西野 一三

（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

ヒト全ゲノムの解読を目前に控えた今日、解明された遺伝子情報を有効に活用することによって疾患研究は新たなパラダイムを迎えている。本研究では“ポストゲノム”ないし“機能解析遺伝学”の時代を視野に捉え、DNAチップの疾患研究分野への有用性を確立する。膨大な数量の遺伝子発現情報を可能にする超高密度DNAチップは21世紀の疾病研究を切り拓く技術革新であり、疾患の病型別・個体別・臓器別差異の本態がいきなり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。本研究では遺伝性筋疾患をモデルとして病因と病態解明の分子レベルでの解析を行うが、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。病態の鍵となる分子の同定は新たな治療指針への展望を拓き、“脳を守る”第一歩となる。

本研究プロジェクトの成否は、いかに優れた筋疾患解析用のDNAチップを開発することができるかにかかっている。即ち既知の筋疾患関連遺伝子を網羅し、なおかつ解析精度の高いDNAチップである。その実現のためにはプローブ部分からAlu、L1などの繰り返し配列、ミトコンドリアDNAやリボソームRNA、さらには相同遺伝子とのクロスハイブリダイズを極力排除する必要がある。また、プローブ長も均一であることが望ましい。我々は、この様なクライテリアに合致するcDNAクローンを大量に獲得するために、遺伝子配列情報をキーワードに従って絞り込んだ後に統合して筋発現遺伝子の仮想的ライブラリーを構築している。このライブラリーに含まれるそれぞれのシングルトンから解析のS/N比を低下させる原因となる繰り返し配列・相同配列を除いた後、増幅長が均一なプライマーセットを設計してPCRクローニングを実施している。この様な操作によってより精度の高いアレイ型DNAチップの作製が可能となり、得られる遺伝子発現情報の信頼性を増すことができる。本研究では、様々な遺伝性筋疾患における発現遺伝子の網羅的解析によって疾患特異的な遺伝子発現プロファイルを明らかにすることを目標としている。

## 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 $\alpha$ 2鎖、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、ミオトニンプロテインキナーゼ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、この様な多種多様の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のか、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明らかにできると考え、アレイ型ヒト筋特異的DNA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等より骨格筋・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。このデータベースに基づいて、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をテンプレートにしてそれぞれの増幅断片を得る。さらにこれら増幅断片をクローン化する(シーケンスで検証)。本年度は遺伝子クローニングを簡便化し、またPCR産物の精製と濃度調製を自動化するためのより効率の良いプロトコルの検討も併せて行う。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、アレイ型筋DNAチップを作製する。

一方、DNAチップを用いた遺伝子発現解析のモデル系として、患者由来細胞の樹立を行う。患者筋より得られた細胞群より筋芽細胞を単離・純化する方法を確立し、不死化を図る。

### (c) 結果と考察

#### 1. 筋DNAチップの開発

##### 1) 筋DNAチップ作製支援データベースの構築

NCBI等の既知データベースよりcDNA情報を収集して統合後、繰り返し配列や相同配列等を排除したデータベースを構築するためのソフトウェアを委託開発した。これによって、ヒト骨格筋・心筋に発現する遺伝子のデータベースを構築し、それぞれのシングルトン(バーチャルcDNA)に対してPCRプライマーを設計して情報を蓄積した。すでに7,000組以上のプライマー情報

が蓄積されている。これはヒト全遺伝子の1/5に相当する数であり、ほぼ全ての筋発現遺伝子が網羅されていると考えられた。

## 2) cDNAクローン樹立の効率化の研究

クローン化を効率的に行うため、様々な実験手法の検討を行った。上記データベースに基づいて合成したプライマーによってヒト骨格筋・心筋のcDNAライブラリーをテンプレートにPCRを行い、cDNA断片を得、それぞれの遺伝子に対する増幅断片をクローン化し、シークエンスを確認して蓄積している。これら一連の作業が効率化され、システム化された。

## 2. 筋疾患の病態に関する研究

筋疾患の病態に関する研究は開発されたDNAチップをどのような疾患モデルを用いて評価すべきか、また分子病態の解明が疾患治療の鍵となる様な筋疾患は何か、を知ることは今後の研究計画を練る上で極めて重要である。これまでに我々は、以下の疾患について注目すべき事実を得た。

1) DNAチップを用いた解析の結果、Emery-Dreifuss型筋ジストロフィーではエメリンの欠損によって、複数(20種以上)の遺伝子発現に変化が見られた。

2) 福山型筋ジストロフィー(FCMD)では骨格筋・心筋の $\alpha$ -ジストログリカンが選択的減少を示した。このことはFCMDにおける筋細胞障害過程の根幹をなすものとして注目される。FCMDの原因遺伝子産物フクチンの機能は未だ明らかでないが、 $\alpha$ -ジストログリカンとの関連が注目される。

3) 本邦における肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)の臨床的スペクトラムは、特にジスフェルリンとカルパイン3異常症の頻度が高く、両者でLGMD全体の70%を占めた。すなわち54例のLGMD中27例(50%)にジスフェルリンの免疫染色異常が、80例のLGMD中23%にカルパイン3の遺伝子変異が見られた。ちなみにサルコグリカン異常症は10%であった。

4) ジスフェルリンは膜タンパク質であるにも関わらず、数々の筋疾患において二次的な局在異常を示した。

5) LGMD2Aの原因となるカルパイン3はミオジェニンの発現に影響を与えた。

6) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの疾患候補遺伝子としてSMT7がクローニングされた。

## (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）

Endo A, Motonaga K, Arahata k , Harada K, Yamada T, Takashima S: Developmental expression of myotonic dystrophy protein kinase in brain and its relevance to clinical phenotype. *Acta Neuropathol* 100 : 513-520, 2000

Uyama E, Tsukahara T, Goto K, Kurano Y, Ogawa M, Kim YJ, Uchino, M, Arahata K : Nuclear accumulation of expanded PABP2 gene product in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve* ; 23 : 1549-1554, 2000

Tagawa K, Taya C, Hayashi YK, Nakagawa M, Ono Y, Fukuda R, Karasuyama H, Toyama-Sorimachi N, Katsui Y, Hata S, Ishiura S, Nonaka I, Seyama Y, Arahata K, Yonekawa H, Sorimachi H, Suzuki K : Myopathy phenotype of transgenic mice expressing active site-mutated inactive p94 skeletal muscle-specific calpain, the gene product responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2 A. *Hum Mol Genet* 9 : 1393-1402, 2000

Nakagawa M, Matsuzaki T, Suehara M, Kanzato N, Takashima H, Higuchi I, Matsumura T, Goto K, Arahata K, Osame M : Phenotypic variation in a large Japanese family with Miyoshi myopathy with nonsense mutation in exon 19 of *dysferlin* gene. *J Neurol Sci* 184 : 15-19, 2001

Sakaki M, Koike H, Takahashi N, Sasagawa N, Tomioka S, Arahata K, Ishiura S: Interaction between Emerin and nuclear lamins. *J Biochem* 129 : 321-327, 2001

Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y, Araishi K Wakabayashi-Takai E, Noguchi S, Sasaoka T, Ozawa E : Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet* 9, 1033- 1040, 2000.

Imamura M, Araishi K, Noguchi S, Ozawa E : A sarcoglycan-dystroglycan complex anchors DP116 and utrophin in the peripheral nervous system. *Hum Mol Genet* 9, 3091-3100, 2000.

Wakabayashi-Takai E, Noguchi S, Ozawa E : Identification of myogenesis-dependent transcriptional enhancers in promoter region of mouse g-sarcoglycan gene. *Eur J Biochem*, 268, 948-957, 2001.

Arahata K : Muscular dystrophy. *Neuropathology* 20 : S34-S41, 2000

Nagano A, Arahata K : Nuclear envelope proteins and associated diseases. *Curr Opin Neuroly* 13 : 533-539, 2000

荒畑喜一：ミトコンドリア脳筋症（MEM）*総合臨牀* 49 : 653-654, 2000

荒畑喜一：周期性四肢麻痺 *臨床医 増刊号* 26 : 835-836, 2000

林由起子、荒畑喜一：筋ジストロフィー *Year note* 2001 1473-1481, 2000

塚原俊文、荒畑喜一：筋ジストロフィー “原因遺伝子と病態の関連性” 遺伝子医学 5 : 83-88, 2001