

「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)

(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

我々は、ヒト骨格筋特異的な cDNA マイクロアレイ型 DNA チップを自ら作製し、筋ジストロフィーをはじめとする遺伝性筋疾患の分子病態の解明を目指すとともに、解析結果から分子病態に基づく治療法の開発を目指そうとしている。

本研究プロジェクトで開発を行う DNA チップは、生検筋一検体での網羅的遺伝子発現解析を世界で初めて可能にしようとするものである。この DNA チップにより、初めて一例一例の病態の違いを分子レベルで捉えることが可能となる。一例一例の違いを認めながら、データを積み重ねていくことで、疾患としての共通病態への理解がより深まると考えられる。本研究プロジェクトの DNA チップによる遺伝子発現解析は、新しい分子病理学とも呼ぶべき分野を拓くものである。

我々は、この DNA チップを用いて、筋ジストロフィーを中心とする遺伝性筋疾患の分子病態の解明、さらには、分子病態に基づく治療法の開発を目指している。そもそも、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、何故、未だに治療法が開発されないののだろうか？我々は、遺伝性筋疾患の治療開発の現状が、原因遺伝子レベルの治療を目指したものに終始しており、その他のアプローチが全く試みられていないと考える。例えば、最も良く研究が進んでいるデュシェンヌ型筋ジストロフィーでは、「ジストロフィン遺伝子異常→ジストロフィン欠損→筋鞘膜の脆弱性→筋壊死→筋再生」というシナリオが出来上がっている。しかし、筋ジストロフィーの症状や病態は、このシナリオだけで全て説明できるものではない。それは、細胞内ではもっと複雑な現象がこのシナリオに付随して起こっているからである。ところが、我々は、この細胞内の多様な現象に関して殆ど全く無知であり、原因遺伝子レベルの治療法以外の選択枝が全く無いのである。本プロジェクトは、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して、遺伝性筋疾患の分子病態を解明しようとするものである。

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 $\alpha 2$ 鎖、インテグリン、ジスフ

エルリン、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糖鎖修飾関連タンパク質、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ている。一方でこの様な多種・多様な遺伝子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については解明されていない点が多い。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、即ち分子病理像を明らかにできる。従って、本研究ではまず、解析ツールとしてのアレイ型ヒト筋特異的 DNA チップの作製を行う。また、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と遺伝性筋疾患の遺伝子発現プロファイル作成を行う。5 年間の研究を通じて、筋疾患の分子病理学的検索のためのデータベースを確立するとともに、分子病態の解明から治療法開発への基盤づくりを目指している。

(b) 方法

独自の筋DNAチップを作製するために、NCBI等の公開されたデータベースよりヒト骨格筋・心筋に発現する既知のcDNA情報を収集し、in silicoでクロスハイブリダイズを出来るだけ排除したターゲット遺伝子配列候補を集めた筋発現遺伝子のデータベースを構築し、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た。さらにこれら増幅断片をクローン化してシーケンスで検証を行った。収集されたcDNAクローンを用いて、大規模DNAチップを作製した。重要な遺伝子約500クローンについては、実験データの信頼性を高める目的で複数回スポットした。作製したDNAチップを用いて、実際にヒト骨格筋total RNAからのcDNAプローブを使い、その有効性を検討した。また、実際に国立精神・神経センター筋レポジトリーに保存されている患者筋からRNAを抽出・精製し解析を行った。また、ヒト骨格筋初代培養細胞でもその有効性を検討すべく、筋細胞の分化に伴う遺伝子発現の変化を調べた。さらに、遺伝子発現解析により得られたデータに対してより深い意味付けが可能となるように、各種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の解析を行った。

(c) 結果

1. ヒト筋 DNA チップの開発

a) 筋 DNA チップ作製支援データベースの構築と cDNA クローンの収集

独自の筋DNAチップを作製するために、NCBI等の公開されたデータベースよりヒト骨格筋・心筋に発現する既知のcDNA情報を収集し、in silicoでクロスハイブリダイズを出来るだけ排除したターゲット遺伝子配列候補を集めた筋発現遺伝子のデータベースを構築した。(本課程で、組織・疾患別マイクロアレイ作製支援データベースの作成法を発明し、特許申請準備を行った。)

構築された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た。さらにこれら増幅断片をクローン化してシーケンスで検証を行った。これまでに確立されたプロトコルに従って、ヒト筋発現遺伝子のクローン化を行い、本年度までに約 5,200 種のヒト筋発現 cDNA 断片を

クローン化し蓄積した。

b) ヒト筋 DNA チップの作製と評価

収集された cDNA クローンをを用いて、大規模 DNA チップを作製した。重要な遺伝子約 500 クローンについては、実験データの信頼性を高める目的で複数回スポットし、最終的には 5,760 スポットのチップ IV を作製した。

ヒト筋サンプルを用いるため、DNA チップ解析には高感度、高レンジの検出系が求められる。我々はプローブ作成・検出法に Perkin-Elmer 社の TSA 増感システムを採用した、ヒト骨格筋 total RNA からの cDNA プローブを使い、作成した DNA チップの有効性を検討した。同量のプローブを用いた実験では相対蛍光強度 100~100,000 のレンジで再現性 (R=0.94~0.98) のある結果が得られた。また、cDNA プローブ量が total RNA1~4mg のレンジにおいて、ターゲットスポットの蛍光強度に直線性が得られた。さらに、ヒト骨格筋 total RNA からの cDNA プローブで検出された各遺伝子ターゲットスポットの相対強度及び遺伝子発現順位は、Bortoluzzi らが示した EST database からの Transcriptional Profile、大久保らの BodyMap の骨格筋発現での結果とよく一致していた。また、複数のターゲットスポットがある遺伝子においては、各々のターゲットスポットで同様の強度が得られた。

c) 生検筋サンプルの DNA チップ解析への適用法の確立

一般に骨格筋組織からの RNA の調製は含まれる mRNA 含量がきわめて低いため、すべての臓器の中でも特に難しいとされる。さらに、生検筋サンプルは少量のため、通常の調製方法を用いることができない。これらの難点を克服するため、我々はまず RNA 調製方法の検討を行った。細胞質 RNA のみを単離する試薬を用い、さらに、半定量的 RT-PCR により RNA の定量を行うことで、純度の高いプローブを作成することが可能となった。実際に国立精神・神経センター筋レポジトリに保存されている生検筋から RNA を抽出・精製し、現在では 3mg 以下(6 μ m 切片、100 枚)の試料から解析が可能となった。

2. DNA チップ解析支援ソフトウェアの開発

a) 遺伝子クローン管理支援ソフトウェアの開発

集積した遺伝子クローンの管理のため、遺伝子名等の情報をクローンストック、プローブストック、チップ上のスポット、解析データを通じて変更するためのソフトウェアを開発した。

b) DNA チップ解析データ視覚化支援ソフトウェアの開発

DNA チップより得られた画像情報と解析データを統合し、解析データを視覚化するためのツールを開発中である。(現在は試用段階)

3. 遺伝子発現解析結果

a) 骨格筋培養細胞の分化における遺伝子発現変化と DMD 筋培養細胞での発現変化

筋ジストロフィーに伴う骨格筋での遺伝子発現変化を解析するため、より単純化された培養骨格筋細胞の系を試みた。培養筋細胞は筋の最終分化が生体に比べやや劣るものの、得られる試料量が多いこと、筋細胞だけでのより均一化された系での解析が可能となること、また筋変性・再生過程がモデル化できうること等の点で優れている。ヒト骨格筋初代培養細胞を用いて、筋管

細胞への分化に伴う遺伝子発現の変化を調べた。その結果、次の6種類に分類された。I)分化とともに漸進的に発現が上昇する遺伝子(1,314 クローン)、II)より急速に発現が上昇する遺伝子(410 クローン)、III)分化の初期に発現の極大値をもつ遺伝子(48 クローン)、IV)変化しない遺伝子(1,821 クローン)、V)増殖期に発現があり分化すると減少する遺伝子(478 クローン)、VI)増殖停止期に発現の極大値をもつ遺伝子(392 クローン)であった。この情報はターゲット遺伝子の分類の指標として使用しうる。次に5人のDMD患者筋からの初代培養細胞から増殖筋芽細胞、分化筋管細胞での遺伝子発現のプロファイリングをおこなった。特に分化後において各患者細胞で遺伝子発現変化に共通性が強かった。

b) 生検筋とDMD筋での遺伝子発現変化

DMD患者筋からcDNAプローブを作成し、健常者とDMD患者筋での遺伝子発現変化を調べた。全4,224遺伝子のうち、2倍以上に発現が上昇した遺伝子99クローン、2倍以上に下降した遺伝子406クローンであった。さらに、他の疾患(先天性筋ジストロフィーなど)筋での発現パターンとの比較では、DMD患者筋での特異的な遺伝子発現変化が示された。

c) 筋細胞内各シグナル伝達経路に関連した遺伝子発現のプロファイリング

我々は筋ジストロフィーに関連した遺伝子変化を網羅的に解析することを目的とし、筋細胞内各シグナル伝達経路からの遺伝子発現誘導のプロファイリングを行おうと考えている。現在、筋肥大または筋萎縮に関するモデルとして、Aktを介するIGFシグナル系とp21の発現を介したマイオスタチン(GDF8)シグナル系の関与が考えられている。正常筋管細胞へのIGF-1刺激、及びその下流分子への各種阻害剤処理に対する遺伝子発現変化の解析を試みた。ヒト骨格筋初代培養筋管細胞へのIGF-1刺激は各シグナル分子のリン酸化状態を解析することで、シグナル活性化経路をモニタリングした。IGF-1刺激に伴い、Akt系とMAPKで特徴的な遺伝子の発現変化が観察された。特に、報告があるように、Akt系ではグルコース代謝に関連した遺伝子発現が見られた。

(d) 考察

これまでに約5,200種のヒト筋発現cDNA断片をクローン化し、5,760スポットのチップIVを作製した。我々が開発したDNAチップは再現性が高く、また検出感度も良好で、少量の生検筋からの解析を可能にした。実際、我々のDNAチップによる解析結果は、Bortoluzziらや大久保らの示した骨格筋発現での結果とよく一致しており、また複数のターゲットスポットの各々で同様の強度が得られ、我々の開発したDNAチップの信頼性の高さが実証された。

ヒト骨格筋初代培養細胞を用いて、筋管細胞への分化に伴う遺伝子発現の変化を調べ、6種類のグループに分類し、ターゲット遺伝子の分類の指標を得た。DMD患者筋からの初代培養細胞・増殖筋芽細胞・分化筋管細胞での遺伝子発現のプロファイリングおよび健常者とDMD患者筋での遺伝子発現変化の解析からDMD患者筋での特異的な遺伝子発現変化が示された。筋細胞内のシグナル活性化経路をモニタリングした結果、IGF-1刺激に伴うAkt系とMAPKで特徴的な遺伝子の発現変化が観察されたことと併せ、DNAチップを用いた分子病理学的解析が有効であることが確かめられた。

今後、生検骨格筋サンプルと培養細胞サンプルの両者を併用することが筋ジストロフィーに伴う遺伝子発現の解析に有用であることが考えられた。

(e) 特許等

a) マイクロアレイ作製支援データベースの作成法に関する特許

2月26日、特許出願申請を行った。

b) ヒト筋 DNA チップの事業化計画

DNA Chip 研究所より、我々が開発した筋 5,000 チップを研究に支障がなくなった段階で事業化したい旨の申し入れがあった。

3. 研究実施体制

(1) 国立精神・神経センター神経研究所グループ (リーダー: 西野一三)

① 研究分担グループ長名

西野 一三 神経研究所疾病研究第一部 部長

② 研究項目

筋特異的 DNA チップの開発

筋蛋白関連遺伝子のクローン化

筋疾患関連遺伝子のクローン化

GenBank・Body Map 等の情報獲得

臨床遺伝学情報の獲得等を担当

(2) DNA チップ研究所グループ

① 研究分担グループ長名

辻本 敦美 DNA チップ研究所 シニアサイエンティスト

② 研究項目

DNA チップの作製条件の検討

DNA チップのスポットティング

発現量に差のあるクローンの調整を担当

(3) 東京大学大学院農学生命科学研究科グループ

① 研究分担グループ長名

反町 洋之 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授
応用生命化学専攻

② 研究項目

肢帯型筋ジストロフィー関連のカルパイン3を中心とした情報伝達機構の DNA チップによる分子生物学的解析を担当

(4) 大阪大学大学院医学系研究科グループ

① 研究分担グループ長名

戸田 達史 大阪大学大学院医学系研究科 教授

② 研究項目

遺伝子及びプライマー設計システムの構築と、遺伝子発現プロファイリングのデータベース構築

(5) 東京大学大学院理学系研究科グループ

① 研究分担グループ長名

森下 真一 東京大学理学部情報科学科 助教授

② 研究項目

遺伝子及びプライマー設計システムの構築と、遺伝子発現プロファイリングのデータベース構築

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

(英文)

- Sakaki M, Koike H, Takahashi N, Sasagawa N, Tomioka S, Arahata K, Ishiura S: Interaction between Emerin and Nuclear Lamins¹. J Biochem 129: 321-327, 2001
- Kim YJ, Noguchi S, Hayashi YK, Tsukahara T, Shimizu T, Arahata K: The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. Hum Mol Genet 11: 1129-1139, 2001
- Hayashi YK, Tezak Z, Momoi T, Nonaka I, Garcia CA, Hoffman EP, Arahata K: Massive muscle cell degeneration in the early stage of merosin deficient congenital muscular dystrophy. Neuromuscul Disord 11: 350-359, 2001
- Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, Noguchi S, Ishihara T, Nonaka I, Arahata K: Selective deficiency of α -dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Neurology 57: 115-121, 2001
- Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, Nonaka I, Arahata K, Brown RH Jr: The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. Hum Mol Genet 10: 1761-1766, 2001
- Yamanaka G, Goto K, Matumura T, Funakoshi M, Komori T, Hayashi YK, Arahata K: Tongue atrophy in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Neurology 57: 733-735, 2001
- Hirano M, Marti R, erreiro-Barros C, Vila MR, Tadesse S, Nishigaki Y, Nishino I, Vu TH: Defects of intergenomic communication: autosomal disorders that cause multiple deletions and depletion of mitochondrial DNA. Cell Develop Biol 12: 417-427, 2001
- Hayashi YK, Ogawa M, Arahata K: Altered expression of α -dystroglycan in congenital muscular dystrophies. Acta Myologica 20: 87-91, 2001
- Ikemoto T, Nishino I, Kawai M, Morimatsu M, Nonaka I: A new form of muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities. Muscle Nerve 24: 1710-1711, 2001

- Nonaka I, Minami N, Chae J, Murayama K, Igarashi F, Hayashi YK, Nishino I, Arahata K: Limb-girdle muscular dystrophy research in japan. *Acta Myologica* 20: 83-86, 2001
- Nishino I, Yamamoto A, Sugie K, Hirano M, Nonaka I: Danon disease and related disorders. *Acta Myologica* 20: 120-124, 2001
- Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, Sekiguchi S, Shiga Y, Takahashi T, Onodera Y, Haginoya K, Kobayashi K, Iinuma K, Nonaka I, Arahata K, Itoyama Y: Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy. *Neurology* 58: 323-325, 2002
- Nishino I, Hirano M, DiMauro S: LAMP-2 deficiency. *Structural and Molecular Basis of Skeletal Muscle Diseases*: p142-p144, 2002
- Spinazzola A, Marti R, Nishino I, Andreu AL, Naini A, Tadesse S, Pela I, Zammarchi E, Donati MA, Olive JA Jr: Altered Thymidine Metabolism Due to Defects of Thymidine Phosphorylase. *J Biol Chem* 277: 4128-4132, 2002
- Hirano M, Nishino I, DiMauro S: Mitochondrial Myopathies. *Neuromuscular Disorders in Clinical Practice*, (Katirji B, Kaminski HJ, Preston DC, Ruff RL and Shapiro BE), Butterworth Heinemann, Boston, pp 1151-1168, 2002
- Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tashikawa M, Many H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yshikawa H, Toda T: Deficiency of α -dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 1283-1286, 2002
- Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA, Govindraj P, Hassell JR, Devaney JM, Spranger J, Stevenson RE, Iannaccone S, Dalakas MC, Yamada Y: Structural and Functional Mutations of the Perlecan Gene Cause Schwartz-Jampel Syndrome, with Myotonic Myopathy and Chondrodysplasia *Am. J. Hum. Genet* 70: 1368-1375, 2002

(和文)

- 野口 悟, 田川一彦, 荒畑喜一: 進行性筋ジストロフィーの膜源説 *脳の科学* 23: 419-423, 2001
- 林 由起子: X連鎖性 Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー(X-EDMD) *日本臨牀 別冊* p31-34, 2001
- 林 由起子: 常染色体優性型 Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー(A-EDMD) *日本臨牀 別冊* p35-37, 2001
- 林 由起子: 常染色体劣性型 Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー(AR-EDMD) *日本臨牀 別冊* p38, 2001
- 林 由起子: メロシン欠損症 *日本臨牀 別冊* p103-106, 2001
- 林 由起子: Walker-Warburg 症候群(WWS) *日本臨牀 別冊* p107-108, 2001
- 林 由起子: Santavuori 病(muscle-eye-brain disease) *日本臨牀 別冊* p109-110, 2001

- 林 由起子：その他の非福山型先天性筋ジストロフィー 日本臨牀 別冊 p111-113, 2001
 - 西野一三：消化器症状を主徴とするミトコンドリア病——MNGIE 医学のあゆみ 199: 268-271, 2001
 - 西野一三：精神遅滞を伴う筋変性疾患ダノン病の解明 Vita 19:42-45, 2002
 - 西野一三、平野道雄：MNGIE—チミジンホスホリラーゼ欠損症 日本臨牀 60: 349-352, 2002
 - 松本 浩、西野一三：複合体V欠損症 日本臨牀 60: 495-498, 2002
 - 杉江和馬、西野一三：複合体VI(チトクロームc酸化酵素) 日本臨牀 60: 490-493, 2002
 - 伏見和郎、塚原俊文：脳・神経系の選択的スプライシングと神経特異的スプライシング制御タンパク質 の科学 53: 96-102, 2002
- (2) 特許出願
なし