

「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であろうか？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（DMD）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肢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 α 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。我々の作成したDNAチップの有効性が確認された後、国立精神・神経センター生検筋レポジトリで保管されている生検筋を用いて、DMDを代表とする各種遺伝性筋疾患における遺伝子発現プロファイルの作成を順次行っている。

(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。（本過程で、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、特許出願申請を行った。）

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、昨年度までに約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 ($R=0.94\sim 0.98$) のある結果が得られた。また、cDNAプローブ量がtotal RNA 1~4mg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) DMD筋での遺伝子発現変化

DMD患者6名の骨格筋からcDNAプローブを作成し、健常者骨格筋及び福山型先天性筋ジストロフィー患者筋を対照として、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。また、壊死のマーカーとして免疫応答遺伝子群を、再生のマーカーとして培養筋で分化に伴って発現が増加する遺伝子群をそれぞれ用いたところ、同じDMD筋であっても、筋病理学的に筋線維壊死・再生の著明な例では、これらの遺伝子群の発現が上昇しており、一例一例での病理所見と良く一致した結果が得られた。また、対照に用いた福山型先天性筋ジストロフィーとの対比では、DMD筋の内、筋線維壊死・再生が激しかった例と同程度の壊死マーカー遺伝子群の発現上昇が見られたが、再生マーカー遺伝子群の発現は乏しく、再生での何らかの問題を示唆する結果を得た。

c) 各種遺伝性筋疾患における遺伝子発現プロファイリング

我々はDMD筋を用いての実験において、ヒト生検筋一検体での遺伝子発現解析が可能であることを確認したことから、国立精神・神経センター生検筋レポジトリーで保存されている生検筋を用いて、各種遺伝性筋疾患の遺伝子発現プロファイル作成を開始している。現在特に注目して解析を進めているのは、Ullrich型先天性筋ジストロフィー、福山型先天性筋ジストロフィー、ミオチューブラーミオパチーを代表とする先天性筋疾患である。これらの疾患は、生直後より発症する重篤な疾患であるにもかかわらず、治療法開発の糸口

すら見出されていない。我々は、遺伝子発現プロファイルを決定し、詳細な分子病態を解明することが治療法開発への基盤を作るものと考えている。これまでに、上記3疾患は異なる遺伝子発現パターンを示すことを確認している。特に、Ullrich型先天性筋ジストロフィーにおいては、細胞外マトリックス蛋白をコードする遺伝子群の転写が促進されていた。現在、この結果の意味づけを行うべく追加実験を行っている。

d) 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。興味深いことに、Akt系下流にある遺伝子群は、既にプロモーター構造が明らかになっている遺伝子に関しては全て類似したプロモーター構造を有していた。このことは、Akt系下流にある大半の遺伝子群が同様のプロモーター構造を介して転写調節を受けていることを示唆している。

(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。この結果、生検筋1例での解析が初めて可能となり、同一疾患での検体間の病理所見の差を見事に分子レベルで捉えることが出来た。さらに、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。実際にDMD筋における解析で、培養筋での分類データを用いて筋再生を評価することが可能であったことから、我々の解析方法およびこのような分類方法の正しさが証明されたと言える。また、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。

現在、DMD以外の各種遺伝性筋疾患の遺伝子発現プロファイルの決定を進めており、順次解析データが得られつつある。しかしながら、DNAチップで得られるデータは遺伝子発現調節機構の最下流にある現象を網羅的に捉えているに過ぎない。そのデータに意味を与

えるためには、その上流にある遺伝子発現調節機構のオン・オフを明らかにすることが必要と考えられる。このような状況の下、Akt系により発現が調節される遺伝子群が共通のプロモーター構造を有していることが明らかになりつつあることは、我々の解析方法の有効性を示している。今後、数多くの筋疾患での解析を進めていくと同時に、遺伝子発現調節機構の全容解明を行っていくことが重要であると考えられる。

(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

遺伝子データベース作成方法、遺伝子データベース作成装置、遺伝子データベース作成プログラム、および遺伝子データベース作成プログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体に関して、平成14年6月10日に特許出願申請を行った。

3. 研究実施体制

国立精神・神経センター神経研究所グループ

① 研究分担グループ長：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

DNAチップ研究所グループ

① 研究分担グループ長：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

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：反町 洋之

（東京大学大学院農学生命科学研究科、助教授）

② 研究項目

筋蛋白関連遺伝子のクローン化

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

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：戸田 達史（大阪大学大学院医学系研究科、教授）

② 研究項目

筋蛋白関連遺伝子のクローン化

福山型筋ジストロフィーのフクチン並びに未知遺伝子群のDNAチップ解析を担当
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：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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- 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
- Hirasawa EA, 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
- Suzuki T, Nakagawa M, Yoshikawa A, Sasagawa N, Yoshimori T, Ohsumi Y, Nishino I, Ishiura S, Nonaka I: The First Molecular Evidence That Autophagy Relates Rimmed Vacuole Formation in Chloroquine Myopathy. *J. Biochem* 131: 647-651, 2002
- Tsukahara T, Tsujino S, Arahata K: cDNA microarray analysis of gene expression in fibroblasts of patients with x-linked Emery-dreifuss muscular dystrophy. *Muscle & Nerve* 25: 898-901, 2002
- Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Oh SJ, Takahashi M, Mora M, Rrggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Lamperti C, Saitoh S, Byrne E, DeMauro S, Nonaka I, Hirano M, Nishino I: Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 58: 1773-1778, 2002
- Michele DE, Barresl R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kelley RI, Somer H, Straub V, Mathews KD, Moore SA, Campbell KP: Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418: 417-422, 2002
- Takahashi M, Yamamoto A, Takano K, Sudo A, Wada T, Goto Y, Nishino I, Saitoh S: Germline mosaicism of a novel mutation in lysosome-associated membrane

- protein-2 deficiency (Danon disease). *Ann Neurol* 52: 122-125, 2002
- Matsumura T, Goto K, Yamanaka G, Lee JH, Zhang C, Hayashi YK, Arahata K: Chromosome 4q; 10q translocations; Comparison with different ethnic populations and FSHD patients. *BMC Neurology* 2:7, 2002
 - Nishino I, Ozawa E: Muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 15: 539-544, 2002
 - Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I: Ullrich disease: Collagen VI deficiency: EM suggests a new basis for muscular weakness. *Neurology* 59: 920-923, 2002
 - Campanaro S, Romualdi C, Fanin M, Celegato B, Pacchioni B, Trevisan S, Laveder P, Pitta CD, Pegoraro E, Hayashi YK, Valle G, Angelini C, Lanfranchi G: Gene expression profiling in dysferlinopathies using a dedicated muscle microarray. *Hum Mol Genet* 11: 3283-3298, 2002
 - Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimiya J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I: Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 59: 1689-1693, 2002
 - Nishino I: Autophagic Vacuolar Myopathies. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 3: 64-69, 2003
 - Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Manya H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, Coster RV, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, Nihino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T: Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 12: 527-534, 2003
 - Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I: cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12: 595-600, 2003.
 - Driss A, Noguchi S, Amouri R, Kefi M, Sasaki T, Sugie K, Souilem S, Hayashi YK, Shimizu N, Minoshima S, Kudoh J, Hentati F, Nishino I: Fukutin-related protein gene mutated in the original kindred limb-girdle MD 21. *Neurology* 60: 1341-1344, 2003

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：1件