

「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

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TSA増感システムを採用し、生検筋1検体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、筋病理とも良く関連していた。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。ヒト骨格筋初代培養細胞で、筋細胞の分化に伴う遺伝子発現の変化を調べて5,760遺伝子の分化に伴う発現情報をカタログ化した。さらに、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について、特に治療的応用の可能性が示唆される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解析を行った。その結果、IGF-I/Aktの下流にある遺伝子群の大半が同様のプロモーター構造を有することを明らかにした。

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。本研究では、解析ツールとしてのアレイ型ヒト筋特異的DNAチップの作製と、それを用いた各種遺伝性筋疾患の分子病態解明を目的としている。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

① ヒト筋DNAチップの開発

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。) 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。

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の後、ヒト筋発現遺伝子のクローン化を行い、これまでに5,760のヒト筋発現cDNA断片を載せたチップIVを作製した。実際に、ヒト骨格筋total RNAからのcDNAプローブを使い、作製したDNAチップの有効性を検討した。

各種試薬を比較して、純度の高いプローブの作製方法について検討するとともに、解析に必要な最少検体量を明らかにした。

② 遺伝子発現解析

a) 骨格筋培養細胞の分化における遺伝子発現変化

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てカタログ化し、そのパターンからクラスター分析を行った。

b) DMD (デュシャンヌ型筋ジストロフィー) 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。

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進めている。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。

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

正常筋管細胞へのIGF-I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行った。ヒト骨格筋初代培養筋管細胞へのIGF-I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。

また、低濃度のマイオスタチンを作用させた培養骨格筋において、各種遺伝子の発現プロファイルを設定した。

(c) 結果

① ヒト筋DNAチップの開発

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 ($R=0.94\sim0.98$) 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。

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、現在までに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 遺伝子発現解析

a) 骨格筋培養細胞の分化における遺伝子発現変化

骨格筋分化に伴う遺伝子発現プロファイルの変化はクラスター分析により、8種類に分類された。この内、クラスター6, 7, 8は、細胞外マトリックス蛋白質や構造蛋白質を主に含んでおり、分化とともに急激に発現が上昇するクラスターであった。

b) DMD筋での遺伝子発現変化

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

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は異なる遺伝子発現プロファイルを示すことを確認した。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

ヒト骨格筋初代培養筋管細胞への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系の刺激により発現が上昇する遺伝子群は、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、MEF boxとE-boxが近接して存在するプロモーターを有していた。さらに、この系によって発現上昇する遺伝子群は大半が、クラスター 6, 7, 8に分類されるものであった。また、低濃度のマイオスタチンを作用させた培養骨格筋においては、MyoDおよびMEF2Cの選択的不活化とmyogeninの転写後抑制によってクラスター 6, 7, 8の遺伝子群の発現が抑制されることが明らかとなった。

(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。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、8種類のクラスターに分類し、ターゲット遺伝子の分類の指標を得た。網羅的に分化に伴う遺伝子発現情報をカタログ化したものはなく、今後、様々な研究への応用が期待される。

DMD筋を用いた解析では、一例ごとの遺伝子発現プロファイルの差を捉えるとともに、対象に用いた福山型先天性筋ジストロフィーとの比較から、福山型先天性筋ジストロフィー筋では、再生が十分に行われていないことが示唆された。この結果を検証すべく、現在、福山型先天性筋ジストロフィーの例数を増やし検討を進めている。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は異なる遺伝子発現プロファイルを示すことを確認したが、それぞれの発現プロファイルに意義付けを行うためには、更なる検討が必要である。Ullrich型先天性筋ジストロフィーにおいて確認された細胞外マトリックス蛋白質遺伝子群の転写促進に関しては、蛋白質レベルの解析も加えて検討が必要である。

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

- Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK: Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. *J Neurol Sci* 211: 23-28, 2003
- Keira Y, Noguchi S, Minami N, Hayashi YK, Nishino I. Localization of calpain 3 in human skeletal muscle and its alteration in limb-girdle muscular dystrophy 2A muscle. *J Biochem* 133: 659-664, 2003.
- Kaneda D, Sugie K, Yamamoto A, Matsumoto H, Kato T, Nonaka I, Nishino I: A novel form of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multiorgan involvement. *Neurology* 61: 128-131, 2003
- Nambu M, Kawabe K, Fukuda T, Okuno T.B, Ohta S, Nonaka I, Sugie H, Nishino I: A neonatal form of glycogen storage disease type IV. *Neurology* 61: 392-394, 2003
- Hayashi YK: Membrane-repair machinery and muscular dystrophy. *Lancet* 362: 843-844, 2003
- Ishikawa H, Nonaka I, Nishino I: Negative result in search for human alpha-dystrobrevin deficiency. *Muscle Nerve* 387-388, 2003
- Sugie K, Koori T, Yamamoto A, Ogawa M, Hirano M, Inoue K, Nonaka I, Nishino I: Characterization of Danon disease in a male patient and his affected mother. *Neuromuscul Disord* 13: 708-711, 2003
- Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Awaya A, Suzuki Y, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma. *Neurology* 62: 620-623, 2004
- Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Imazawa M, Goto Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 279: 11402-11407, 2004

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：1件