



戦略的創造研究推進事業

研究領域「脳を守る」

研究課題

「DNAチップによる遺伝性筋疾患の
分子病態解明」

研究期間：平成11年11月1日～平成17年3月31日

研 究 代 表 者

荒畑喜一（西野一三）

国立精神・神経センター神経研究所部長

1. 研究実施の概要

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 のよう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よう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。一方でこのような多種・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。

また、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、未だに治療法が開発されていない。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からであると考え。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→筋鞘膜の脆弱化→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。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できれば、遺伝性筋疾患の分子病態を明らかにし、新たな治療戦略への基盤形成を行うことができるはずである。

以上のような背景を踏まえ、本研究では 1) 解析ツールとしてのアレイ型ヒト筋特異的 DNA チップの開発・作製、2) 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、3) 遺伝性筋疾患の遺伝子発現プロファイル作成による分子病態解析、を 3 つの柱として研究を進めてきた。

「ヒト筋 DNA チップの開発」

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 情報を全て収集し、*in silico* でクロスハイブリダイズを可能な限り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 1 枚のスライド上に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・検出法には、TSA 増感システムを採用し、 μg オーダーの total RNA 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、筋病理とも良く相関していた。

「筋細胞分化に伴う遺伝子発現のカタログ化」

ヒト骨格筋初代培養細胞の分化に伴う経時的遺伝子発現変化を全 5,760 クローンについて調べ、各遺伝子での至適クローンを同定するとともに、全 4,200 遺伝子の分化に伴う発現情報をカタログ化した。さらに、遺伝子発現情報を基にして、4,200 遺伝子を分類した。

「デュシェンヌ型筋ジストロフィーにおける解析」

開発した DNA チップの性能評価と各種筋疾患解析への応用の出発点として、最も詳しく解析進んでいるデュシェンヌ型筋ジストロフィーでの遺伝子発現変化を解析した。患者生検筋でも再現性のいいデータが得られること、各患者生検筋の病理をよく説明しうる発現データが得られることが示された。しかも、筋細胞の遺伝子発現変化だけでなく浸潤細胞の発現変化を捉えられることが示された。これにより、筋病理観察に加え、筋疾患マイクロアレイ解析での分子マーカーの発現変化を用いて、疾患筋組織の病理変化をモニターすることが可能となることが示唆された。

「各種筋ジストロフィーの解析」

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。さらに、このデータを基に各種筋疾患間での遺伝子発現レベルでの相違性と患者間での相関性を解析し、遺伝子発現変化を用いた筋疾患診断の可能性を考察した。

「シグナル伝達系の解析」

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ている IGF-1 シグナル系とマイオスタチン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筋培養細胞での解析を行った。その結果、IGF-1/PI3K-Akt シグナル伝達系に特異的に応答する遺伝子群の大半が、同様のプロモーター構造を有する筋特異的発現遺伝子であることを明らかにした。また、低濃度のマイオスタチンが培養筋分化に対して、負の制御をおこなうこと、より広範囲な筋発現遺伝子が発現阻害を受けていることが原因であることを示した。

「筋疾患治療法開発のための、治療効果評価ツールとしての DNA チップの利用」

近年、遺伝性筋疾患の治療法開発をめざした基礎実験として、遺伝子治療、幹細胞移植治療とともに、薬物治療実験が試みられ、成果が報告されている。しかし、投与薬物の標的細胞・標的シグナル経路は示されておらず、作用メカニズムは不明である。投与効果の報告がある IGF-1 の筋ジストロフィーモデルへの投与を試みた。さらに、筋病理観察と DNA チップ解析によって、投与薬物の作用機序と投与下の筋組織の動態を分子レベルでモニターすることを試みた。これらの情報は、より高い治療効果の期待される薬物の選択とともに、創薬へむけた基礎情報を提供することが期待される。

2. 研究構想

「背景」

遺伝性精神・神経・筋障害の克服へ向けた国際的研究状況は、まさに加速度的な進展が始まろうとしている。いわゆる“ポストゲノム”ないし“機能解析遺伝学”**Functional Genomics**”の時代に突入する黎明期にあると言える。取り分け、超高密度 DNA マイクロチップ (DNA チップ) の科学技術革命に根ざす新たな分子生物学の展開は、来るべき時代の疾病研究分野において、巨大な威力を発揮することが期待される。すなわち疾患の分子病態解明の根幹である、細胞内外情報伝達機構の破綻に関与する膨大な数の遺伝子の発現動態が (理論的には全てが)、DNA チップの導入によって同時に検出・相互比較され、機能予測が可能になるからである。我々は DNA チップの、疾病研究分野への有用性を確立するために、遺伝性筋疾患をモデルとして研究を行った。特に筋ジストロフィーの遺伝的・細胞生物学的・臨床医学的多様性を理解し、真に障害を克服するために、未知原因遺伝子と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した。これには、最近まで限界があった大量の遺伝子情報への迅速なアクセスが不可欠である。具体的には DNA チップの新たな開発と導入によって、筋障害機構の全体像をモニタリングし (分子レベルで把握し)、病型別・個体別・筋肉別差異の本態を明らかにすることを目指した。我々の戦略的基礎研究は、疾病の克服にとって最も重要な“分子病態”の解明を目指すものであり、次世代における効果的かつ個別的治療法 (オーダーメイドの治療戦略) への開発基盤として重要である。

「研究のねらい・着眼点」

本研究課題で取り扱う遺伝性筋疾患、取分け筋ジストロフィーの分子病態の解明に関する研究分野の今日的状況は、まさに黎明期にある。すなわち一見遺伝子の解明がほとんど完了したかに思われがちな分野であるが、実は何ら障害の本態 (分子病態) は解明されておらず、従って特異的な治療の手だてすら殆ど無いのが実状である。加えて遺伝子そのも

のも未知である疾患がなお山積している。このような理由から、飛躍的な研究のブレークスルーが強く期待されており、その成功は直ちに関連分野の研究にも大きなインパクトを与えることが予測される。ここに本研究提案の真の狙いがある。

これらの現況を真摯に見つめるとき、本研究課題を 21 世紀で克服すべき“脳を守る研究”の戦略基礎研究プロジェクトとして提案する事は極めて重要であると考えた。特に、DNA チップに見る一連の科学技術革命の成果を、いち早く遺伝性精神・神経・筋障害の研究分野に導入し（多数の遺伝子の発現状態やゲノムの変異を同時並行的に検出が可能）、筋疾患をモデルとして疾病の分子病態を真に解明する事は、次世代へ向けた効果的治療戦略の実現にとって重要である。また我が国の疾病研究水準を、国際的に指導的な立場に維持する上でも必須の条件である。

筋ジストロフィーは単一の疾患ではなく、遺伝形式、遺伝子座、罹患筋の分布などの違いによって、既に 20 を超える病型に分類されている。この数は今後さらに増える事が予測される。現在それら個々の分子細胞生物学的研究が急速に進みつつある（細胞外マトリックス—ジストログリカン—ジストロフィン機軸の研究、形質膜のサルコグリカン複合体の研究、筋形質のカルパイン 3 の研究、核膜のエメリンや核内の RNA 結合タンパク質の研究など）。しかしながら、未知遺伝子や内因性又は外因性の病態修飾因子を含めた筋障害機構の全容は、なお未解決の問題が山積している。これらを一日も早く克服して、効果的な治療法開発基盤を確立するためには、多数の遺伝子発現情報への迅速かつ効果的なアクセスが必要である。DNA チップ技術は、このような次世代の研究の要請に応えるべく誕生した新技術であり、遺伝子発現モニタリング、シーケンス、ジェノタイプング等の革命的なシステムとして、幅広い応用が今後期待されている。

「コンセプト」

DNA チップの研究は未だ未熟な段階にあり、実際に使用するためにはさらに技術開発が必要である。とくに我々は、筋組織特異的で優良な DNA チップ（筋特異的 DNA チップ“筋 DNA チップ”）の開発を目指す。筋ジストロフィーの分子病態の実体を分子医学と DNA チップ技術の手法を用いて解明し、「脳を守る」上で疾患の未知遺伝子や内因性又は外因性の病態修飾因子を含めた筋障害機構の全容を明らかにして、効果的な治療法開発基盤を確立する。

「将来展望」

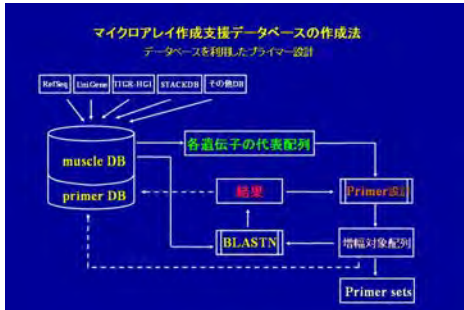
本邦の精神・神経・筋障害の研究水準が、国際的な指導的立場を維持し続けるために、DNA チップに見る一連の科学技術革命の成果を速やかに導入し、さらに独自に開発して実用化を計って行く。

3. 研究成果

3. 1 ヒト筋 DNA チップの開発

(1) 研究内容及び成果

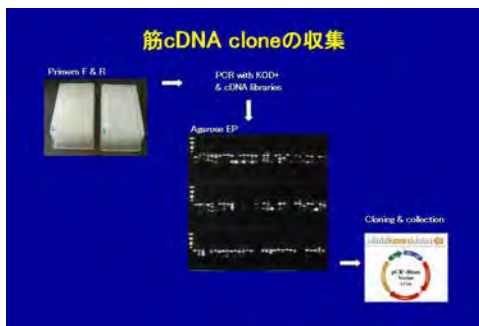
多くの遺伝性筋疾患において、原因遺伝子が次々と同定されているにもかかわらず、そ



の分子病態は十分に把握出来ているとは言えない。一方、筋疾患の診断には、歴史的に新鮮凍結固定された生検筋が用いられており、病理診断後の検体から良質の RNA が採取出来ることが期待される。このような背景から、細胞内分子病態の全容を反映する膨大なデータが一度に入手出来るトランスクリ

プトームレベルの網羅的遺伝子発現解析は、遺伝性筋疾患の詳細な分子病態を探る上で、合理的な手法と考えられる。しかし、これまでに存在する cDNA 型マイクロアレイは大量の RNA を必要とし、生検筋 1 検体での解析が不可能なため、複数検体で RNA プールを作って解析を行っていた。この方法では、平均的なデータを出すことは出来ても、検体ごとの差を捉えることは出来ない。そこで、我々は、信頼性が高く、少量のサンプルで解析が可能な独自の cDNA マイクロアレイ型 DNA チップの作製を目指した。

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



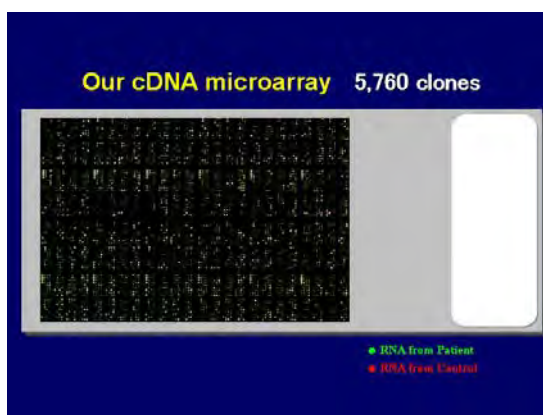
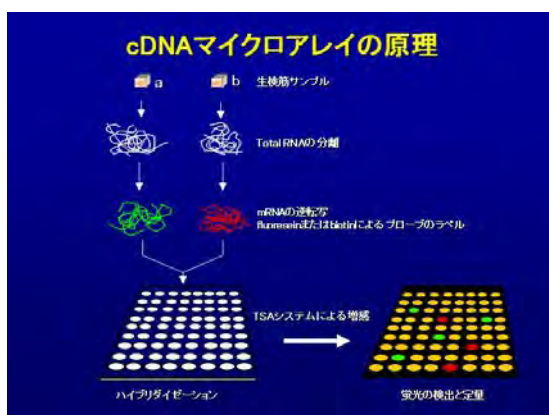
格筋・心筋に発現する既知の cDNA 情報を収集し、*in silico* でクロスハイブリダイズを出来るだけ排除したターゲット遺伝子配列候補を集めた筋発現遺伝子のデータベースを構築した。(本過程で、組織・疾患別マイクロアレイ作製支援データベースの作成法を発明し、特許出願申請を行った。) 集積した遺伝子クローンの管理のため、遺伝子名等の情報をクローンストック、ターゲットプローブストック、チップ上のスポット、解析データを通じて変更するためのソフトウェアを開発した。



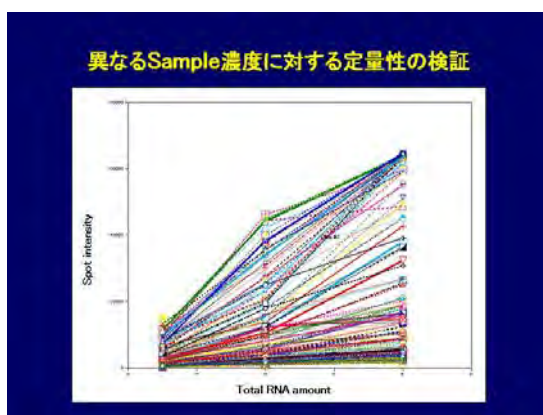
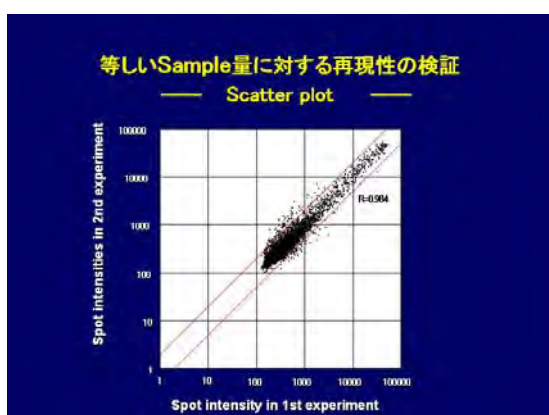
構築されたデータベースに基づいて、それぞれの cDNA に特異的な PCR プライマーをデザインし、ヒト骨格筋・心筋の cDNA をテンプレートにして

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、最終的に 5,760 のヒト筋発現 cDNA 断片を載せたチップ IV を作製した。

cDNA マイクロアレイ型 DNA チップによる解析に際しては、生検筋などの検体から良質の total RNA を抽出して mRNA の逆転写を行わせ、ラベル化プローブを作製する。我々のチップでは、2色の蛍光色素を用いているため、常にコントロールサンプルと同時にハイブリダイゼーション及びその後のスキヤニングを行うことが可能である。特に、我々は、Total RNA 抽出に際して、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製することを可能にした。また、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し、TSA 増感システムを用いることで、解析に必要な検体量を格段に少なくすることに成功し、total RNA で μg のレンジで網羅的遺伝子発現プロファイリングが可能となった。実際に、国立精神・神経センター筋レポジトリーに保存されている生検筋から RNA を抽出・精製し、3mg 以下 ($6\mu\text{m}$ 切片、100 枚) の凍結骨格筋からの網羅的遺伝子発現解析が可能となった。



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 RNA 1~ $4\mu\text{g}$ 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。

各cloneの蛍光強度と遺伝子発現順位 (ヒト骨格筋)

#	Name	Mean Exp.	SortRank2	Rank	Class	#	Name	Mean Exp.	SortRank2	Rank	Class	#	Name	Mean Exp.	SortRank2	Rank	Class	#	Name	Mean Exp.	SortRank2	Rank	Class
1	TRCS	51986.125	45	35	87	21	MTX2	34515.998	23	8	2723	181	TA5	18225.85	22	11	2624	121	TR11	18629.286	148	1	1628
2	TR	39616.895	19	3538		22	TRFLW	33628.193	89	41	1513	192	TOAP	18211.84	22	11	2624	152	CT	19296.286	148	2	2861
3	TR	39616.895	19	3538		23	TRM2	33498.229	8	38	2499	193	MT-DOZ	18243.32	18	37	2519	153	BP33A	19296.287	39	1	1185
4	TR	39616.895	19	3538		24	TRM1	33186.395	4	2118		194	TR	18206.872	18	37	2519	154	TR205	19297.845	18	13	2708
5	TR	39616.895	19	3538		25	TRM7	33039.843	7	4	2721		195	TR10	18226.4	27	3725	155	TRM7	19255.8	128	1	1964
6	TR	39616.895	19	3538		26	TRM11	32941.181	2	2189		196	TR10	18229.619	27	3725	156	TRM7	19255.8	128	1	2708	
7	TR	39616.895	19	3538		27	TRM11	32941.181	2	1928		197	ADTO	18229.619	27	3725	157	TRM7	19255.255	1878		1878	
8	TR	39616.895	19	3538		28	TRM11	32941.181	2	1542		198	TRM2	18229.619	27	3725	158	TRM7	19255.255	1878		1878	
9	TR	39616.895	19	3538		29	TRM11	32941.181	2	1172		199	TRM13	18229.619	27	3725	159	TRM7	19255.255	1878		1878	
10	TR	39616.895	19	3538		30	TRM11	32941.181	2	2328		200	ADTA1	18229.619	27	3725	160	TRM7	19255.255	1878		1878	
11	TR	39616.895	19	3538		31	TRM11	32941.181	2	1894		201	TRM11	18229.619	27	3725	161	TRM7	19255.255	1878		1878	
12	TR	39616.895	19	3538		32	TRM11	32941.181	2	1582		202	TRM11	18229.619	27	3725	162	TRM7	19255.255	1878		1878	
13	TR	39616.895	19	3538		33	TRM11	32941.181	2	154		203	TRM11	18229.619	27	3725	163	TRM7	19255.255	1878		1878	
14	TR	39616.895	19	3538		34	TRM11	32941.181	2	1894		204	TRM11	18229.619	27	3725	164	TRM7	19255.255	1878		1878	
15	TR	39616.895	19	3538		35	TRM11	32941.181	2	2248		205	TRM11	18229.619	27	3725	165	TRM7	19255.255	1878		1878	
16	TR	39616.895	19	3538		36	TRM11	32941.181	2	48		206	TRM11	18229.619	27	3725	166	TRM7	19255.255	1878		1878	
17	TR	39616.895	19	3538		37	TRM11	32941.181	2	2248		207	TRM11	18229.619	27	3725	167	TRM7	19255.255	1878		1878	
18	TR	39616.895	19	3538		38	TRM11	32941.181	2	1894		208	TRM11	18229.619	27	3725	168	TRM7	19255.255	1878		1878	
19	TR	39616.895	19	3538		39	TRM11	32941.181	2	1894		209	TRM11	18229.619	27	3725	169	TRM7	19255.255	1878		1878	
20	TR	39616.895	19	3538		40	TRM11	32941.181	2	1894		210	TRM11	18229.619	27	3725	170	TRM7	19255.255	1878		1878	
21	TR	39616.895	19	3538		41	TRM11	32941.181	2	1894		211	TRM11	18229.619	27	3725	171	TRM7	19255.255	1878		1878	
22	TR	39616.895	19	3538		42	TRM11	32941.181	2	1894		212	TRM11	18229.619	27	3725	172	TRM7	19255.255	1878		1878	
23	TR	39616.895	19	3538		43	TRM11	32941.181	2	1894		213	TRM11	18229.619	27	3725	173	TRM7	19255.255	1878		1878	
24	TR	39616.895	19	3538		44	TRM11	32941.181	2	1894		214	TRM11	18229.619	27	3725	174	TRM7	19255.255	1878		1878	
25	TR	39616.895	19	3538		45	TRM11	32941.181	2	1894		215	TRM11	18229.619	27	3725	175	TRM7	19255.255	1878		1878	
26	TR	39616.895	19	3538		46	TRM11	32941.181	2	1894		216	TRM11	18229.619	27	3725	176	TRM7	19255.255	1878		1878	
27	TR	39616.895	19	3538		47	TRM11	32941.181	2	1894		217	TRM11	18229.619	27	3725	177	TRM7	19255.255	1878		1878	
28	TR	39616.895	19	3538		48	TRM11	32941.181	2	1894		218	TRM11	18229.619	27	3725	178	TRM7	19255.255	1878		1878	
29	TR	39616.895	19	3538		49	TRM11	32941.181	2	1894		219	TRM11	18229.619	27	3725	179	TRM7	19255.255	1878		1878	
30	TR	39616.895	19	3538		50	TRM11	32941.181	2	1894		220	TRM11	18229.619	27	3725	180	TRM7	19255.255	1878		1878	
31	TR	39616.895	19	3538		51	TRM11	32941.181	2	1894		221	TRM11	18229.619	27	3725	181	TRM7	19255.255	1878		1878	
32	TR	39616.895	19	3538		52	TRM11	32941.181	2	1894		222	TRM11	18229.619	27	3725	182	TRM7	19255.255	1878		1878	
33	TR	39616.895	19	3538		53	TRM11	32941.181	2	1894		223	TRM11	18229.619	27	3725	183	TRM7	19255.255	1878		1878	
34	TR	39616.895	19	3538		54	TRM11	32941.181	2	1894		224	TRM11	18229.619	27	3725	184	TRM7	19255.255	1878		1878	
35	TR	39616.895	19	3538		55	TRM11	32941.181	2	1894		225	TRM11	18229.619	27	3725	185	TRM7	19255.255	1878		1878	
36	TR	39616.895	19	3538		56	TRM11	32941.181	2	1894		226	TRM11	18229.619	27	3725	186	TRM7	19255.255	1878		1878	
37	TR	39616.895	19	3538		57	TRM11	32941.181	2	1894		227	TRM11	18229.619	27	3725	187	TRM7	19255.255	1878		1878	
38	TR	39616.895	19	3538		58	TRM11	32941.181	2	1894		228	TRM11	18229.619	27	3725	188	TRM7	19255.255	1878		1878	
39	TR	39616.895	19	3538		59	TRM11	32941.181	2	1894		229	TRM11	18229.619	27	3725	189	TRM7	19255.255	1878		1878	
40	TR	39616.895	19	3538		60	TRM11	32941.181	2	1894		230	TRM11	18229.619	27	3725	190	TRM7	19255.255	1878		1878	
41	TR	39616.895	19	3538		61	TRM11	32941.181	2	1894		231	TRM11	18229.619	27	3725	191	TRM7	19255.255	1878		1878	
42	TR	39616.895	19	3538		62	TRM11	32941.181	2	1894		232	TRM11	18229.619	27	3725	192	TRM7	19255.255	1878		1878	
43	TR	39616.895	19	3538		63	TRM11	32941.181	2	1894		233	TRM11	18229.619	27	3725	193	TRM7	19255.255	1878		1878	
44	TR	39616.895	19	3538		64	TRM11	32941.181	2	1894		234	TRM11	18229.619	27	3725	194	TRM7	19255.255	1878		1878	
45	TR	39616.895	19	3538		65	TRM11	32941.181	2	1894		235	TRM11	18229.619	27	3725	195	TRM7	19255.255	1878		1878	
46	TR	39616.895	19	3538		66	TRM11	32941.181	2	1894		236	TRM11	18229.619	27	3725	196	TRM7	19255.255	1878		1878	
47	TR	39616.895	19	3538		67	TRM11	32941.181	2	1894		237	TRM11	18229.619	27	3725	197	TRM7	19255.255	1878		1878	
48	TR	39616.895	19	3538		68	TRM11	32941.181	2	1894		238	TRM11	18229.619	27	3725	198	TRM7	19255.255	1878		1878	
49	TR	39616.895	19	3538		69	TRM11	32941.181	2	1894		239	TRM11	18229.619	27	3725	199	TRM7	19255.255	1878		1878	
50	TR	39616.895	19	3538		70	TRM11	32941.181	2	1894		240	TRM11	18229.619	27	3725	200	TRM7	19255.255	1878		1878	

以上の結果は、我々が開発した DNA チップが、1) 再現性が高く、2) 検出感度が良好で、3) 少量の生検筋からの解析が可能であることを示している。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。

(2) 研究成果の今後期待される効果

ヒト筋 DNA チップ開発の過程で、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 (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、特許出願申請を行っている。また、我々の開発した DNA チップの商品化についての検討が行われている。

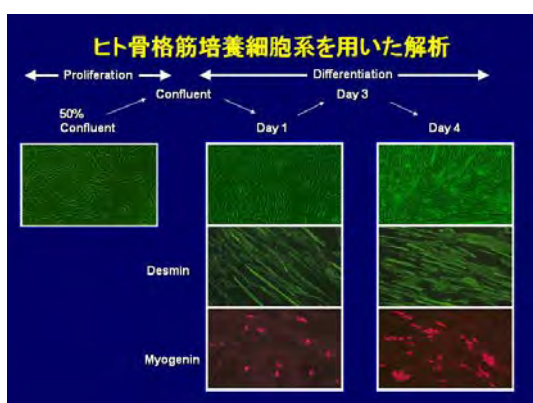
3. 2 筋細胞分化に伴う遺伝子発現のカタログ化

(1) 研究内容及び成果

ヒト筋 DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現プロファイリングを行えば、これまで知られていなかった多くの細胞内分子情報が得られることは、疑う余地もない。しかしながら、大量の生データに対して、どのような意味づけを行うのか、その手法が確立していなければ、得られたデータから、真の意味で有用な情報を得ることが出来ないことになる。特に、筋ジストロフィーを解析するに当たっては、筋ジストロフィーの定義「進行性の骨格筋の壊死・再生を主体とする遺伝性筋疾患」に基づき、壊死・再生を評価する手法を定めてお

くことが重要であると考えられる。壊死に関しては、免疫系分子をマーカーにすることが半ば確立しているが、再生に関しては、何ら定まったマーカーがなかった。

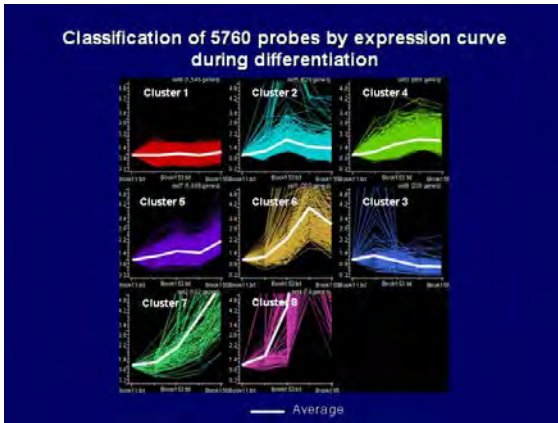
そこで、骨格筋初代培養細胞を用いて、筋管細胞への分化に伴う遺伝子発現の変化を調べてカタログ化し、そのパターンからクラスター分析を行った。これは、筋分化および筋再生に伴う遺伝子発現変化を網羅的に調べたデータが過去に存在しないこと、従って、トランスクリプトレベルの遺伝子発現解析において、再生のマーカーとなる遺伝子が同定されていないことによる。このような、マーカーを決定しておくことで、筋ジストロフィーにおける再生のプロセスを遺伝子発現レベルで評価することが可能になると考えられる。さらに、培養筋細胞は筋の最終分化が生体に比べやや劣るものの、骨格筋の直接的な解析と比較して、得られる試料量が多いこと、筋細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、細胞増殖期 2 点 (50%confluent、confluent) と、分化誘導をかけた後の分化期 3 点 (1 日目、3 日目、4 日目) の計 5 経時点で培養筋細胞から total RNA を分離した。DNA チップを用いた網羅的遺伝子解析を行い、増殖期から分化期へと各々の遺伝子の発現がどのように変化するかを全てカタログ化した。

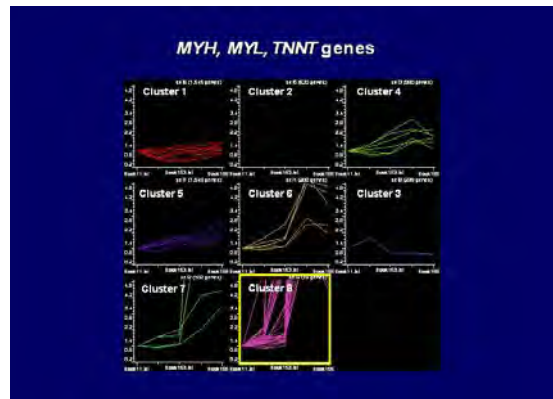
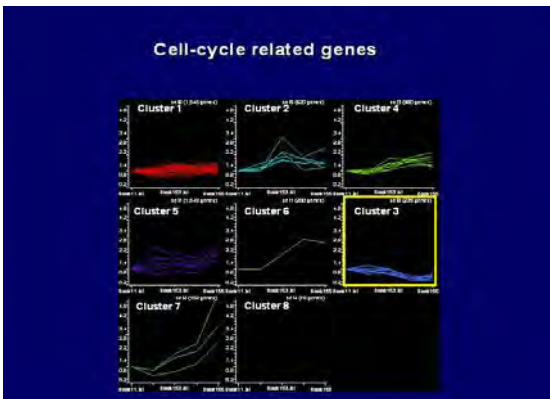
我々のチップは、ヒト骨格筋で発現している遺伝子をほぼ全てカバーしていると考えられるため、このような遺伝子発現変化を網羅的かつ経時的に調べたデータは、今後の研究の貴重な基礎的資料となることが期待される。さらに、経時的な遺伝子発現変化のパターンに基づいて、クラスター分析を行ったところ、次の 8 種類のクラスターに分類された。

- 1) 殆ど発現量が変化しない遺伝子群 (1,545 クローン)、
- 2) 増殖期に極わずかに発現が増加し、分化期に発現がやや減少するが、全体としては変化が乏しい遺伝子群 (620 クローン)、
- 3) 分化期に発現が減少する遺伝子群 (239 クローン)、
- 4) 増殖期から分化期にかけて極わずかに発現が増加する遺伝子群 (980 クローン)、
- 5) 分化期になだらかに発現が上昇する遺伝子群 (1,549 クローン)、
- 6) 分化に伴い発現が増大する遺伝子群 (200 クローン)、
- 7) 分化に伴いさらに急速に発現が増大する遺伝子群 (102 クローン)、
- 8) 分化初期に急速に発現が増大する遺伝子群 (78 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。

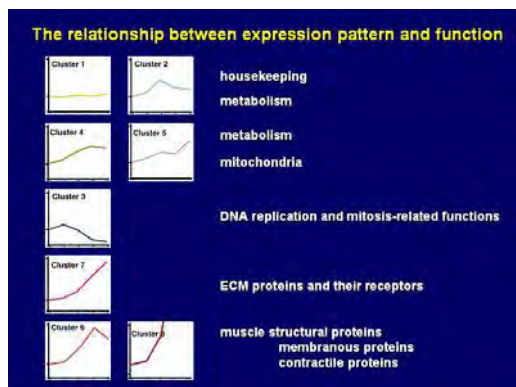


このクラスター分析による分類が、遺伝子がコードする分子の機能を反映したものであるかどうかを確認するために、どのような分子がそれぞれのクラスターに含まれているかを検討した。例えば、細胞周期に関係する遺伝子群は大半が、クラスター3に含まれていた。また、ミオシン軽鎖および重鎖遺伝子やトロポニンT遺伝子などのサルコメア

構成蛋白質は、分化期に急速に発現が増大するクラスター8に大部分が含まれていた。



これをクラスターごとに整理してみると、発現変化の少ないクラスター1および2には、ハウスキーピング遺伝子や代謝関連遺伝子が多く含まれていた。また、分化期にやや発現は増加するものの、やはり、全体としては、発現変化の少ないクラスター4および5には、ミトコンドリア関連遺伝子や代謝関連遺伝子が多数含まれていた。一方、分化期に発現が低下するパターンのクラスター3には、主に、DNA複製や有糸分裂関連遺伝子が含まれて



いた。これらの遺伝子群の機能と発現パターンは合理的な関係を示しており、このクラスター分類が妥当であることを示している。さらに、分化に伴って発現が著増するクラスター6, 7, 8には、サルコメア構成蛋白質と細胞外マトリックス関連遺伝子が主に含まれていた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

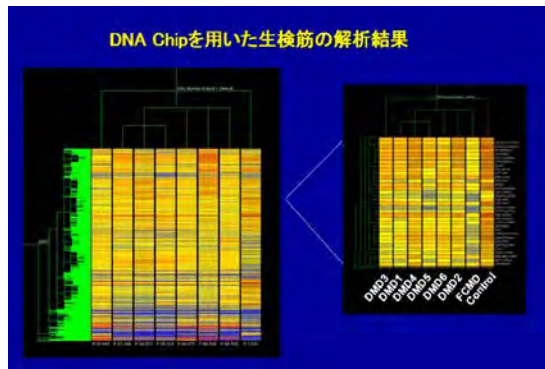
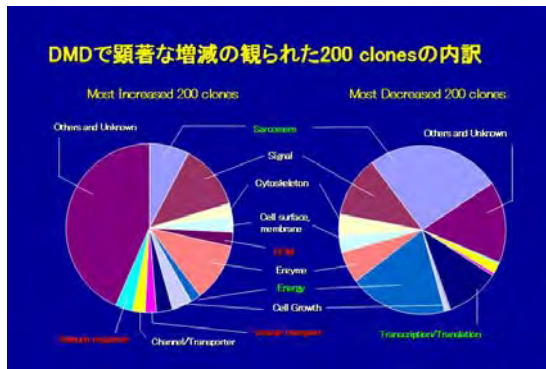
ヒト骨格筋初代培養細胞を用いて、筋管細胞への分化に伴う遺伝子発現の変化を調べ、8種類のクラスターに分類し、ターゲット遺伝子の分類の指標を得た。これまでに、網羅的に分化に伴う遺伝子発現情報をカタログ化したものはなく、今後、様々な研究への応用が期待される。

3. 3 デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者筋での遺伝子発現変化

(1) 研究内容及び成果

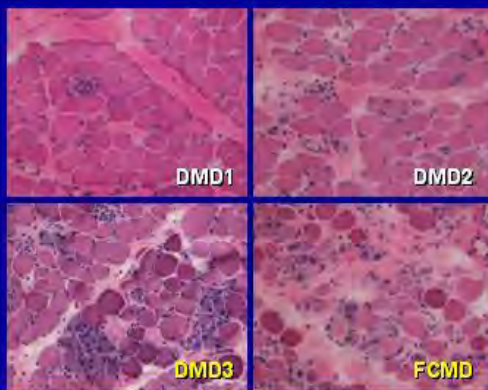
我々が独自に開発した DNA チップで、実際に疾患筋を用いた解析を行うに当たって、まず、最も頻度の高いデュシェンヌ型筋ジストロフィーを対象とした解析を行った。これは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーが歴史的に最も詳しく調べられている筋ジストロフィーであること、他のグループが既に cDNA マイクロアレイを用いた解析を行っており、その結果との比較が可能であることなどの理由による。対象としたのは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者 6 名の骨格筋で、健常者 1 名及び福山型先天性筋ジストロフィー患者 1 名の骨格筋を対照として用いた。それぞれの患者から病理学的検査目的に採取され、新鮮凍結固定が施された検体から、3. 1 で確立した方法を用いて、total RNA を抽出後 cDNA プローブを作製し、我々の開発した DNA チップ (第 3 世代のチップⅢ) にハイブリダイズさせて、網羅的遺伝子発現プロファイリングを行った。

チップに搭載した全 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。特に変化の大きかった遺伝子群について、増加・減少それぞれ 200 クローンの内訳を検討してみると、減少群の中では、サルコメア構成タンパク質、エネルギー代謝関連分子、転写・翻訳関連分子をそれぞれコードする遺伝子群が目立った。一方、増加群では、サルコメアタンパク質やシグナル関連が目立つ一方で、免疫系分子、細胞外マトリックス関連分子、小胞輸送関連分子をコードする遺伝子群は減少群には認められず、増加群にのみ特異的に認められた。これは、筋ジストロフィーにおいては、エネルギー代謝が低下し、タンパク質合成が全体として低下する一方で、壊死に伴う免疫系細胞の活性化が遺伝子発現のレベルで、反映されたものと考えられた。さらに、搭載した全遺伝子の発現パターンの近似度によるツリー表示では、患者ごとの個々の差は認められるものの、全体としては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者筋が正常筋や福山型先天性筋ジストロフィー筋とは、異なるブランチでクラスターを形成し、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者筋での特異的な遺伝子発現変化をとらえていることが示された。

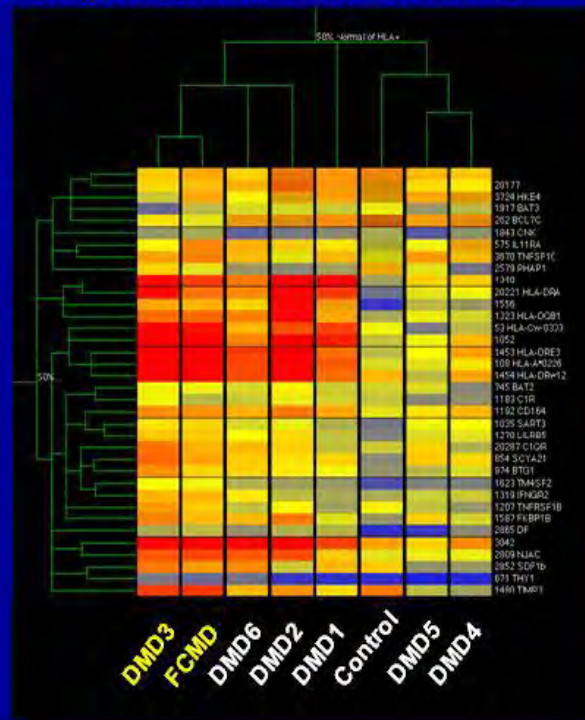


また、筋ジストロフィーは、「進行性の骨格筋の壊死・再生を主体とする遺伝性筋疾患」と定義されることから、筋線維の壊死・再生が最も重要な組織学的変化である。従って、筋ジストロフィー筋を評価する際には、壊死・再生について、遺伝子発現レベルでの何らかのマーカー分子を設定しておくことは極めて合理的である。これまでの報告では、壊死のマーカーとしては、浸潤細胞の指標として免疫系遺伝子群が用いられている。我々のチップでも同様に壊死を反映した結果を捉えることが出来るかどうかを検討するために、得られた全データの中から免疫応答遺伝子群を抽出し、発現パターンの近似度によるツリー作成を行った。その結果、デュシェンヌ型筋ジストロフィー筋では、予想された通り、遺伝子発現上昇が認められた。さらに、我々のチップでは、生検筋1検体での評価が可能なことから、同じデュシェンヌ型筋ジストロフィー筋であっても、遺伝子発現変化に差を認めた。この差が、壊死の程度を反映したものかどうかを、筋病理学的変化と比較したところ、確かに、壊死変化の強い例では、免疫応答関連遺伝子群の発現上昇が著明であった。つまり、壊死変化の強い群と比較的軽度な群とを遺伝子発現のレベルで分けることが可能であった。組織学的にも特に壊死変化の強かったDMD3においては、ツリー上、先天性の最も重篤な筋ジストロフィーである福山型先天性筋ジストロフィーと同じブランチに入っており、組織学的な壊死の程度と遺伝子発現変化から見た壊死変化の程度とがよく一致していた。

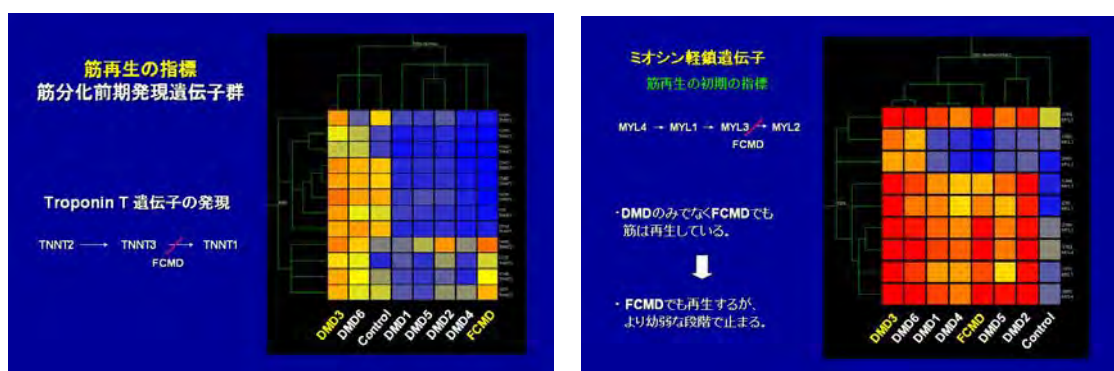
免疫応答関連遺伝子の動態：浸潤細胞の指標



壊死・再生の活発なDMD3, FCMD等で発現が高い。

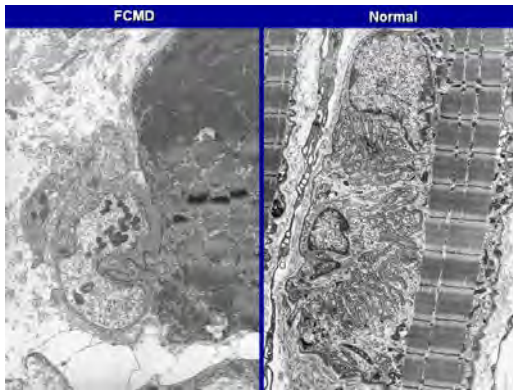


一方、筋ジストロフィーを定義づけるもう1つの要件である再生に関しては、マーカーとしては確立したものがなかった。そこで、我々は、3.2の解析で得られた情報を元に、分化に伴って発現が増加するクラスター6, 7, 8に含まれる遺伝子群をマーカーとして用いることとした。下図は、その中で、トロポニンT遺伝子のアイソフォームおよびミオシン軽鎖遺伝子のアイソフォーム遺伝子群に注目して、ツリーを描いたものである。何れにおいても、筋組織学的変化の程度とほぼ平行して、検体間に遺伝子発現の程度に差が認められた。例えば、壊死変化が最も高度でDMD3は、確かに、これらの遺伝子発現も増加が最も顕著で、ツリー表示で一番端のブランチに配置されていた。これらの事実は、培養筋の筋分化過程における遺伝子発現解析データに基づいてえられた、筋分化前期に発現のピークがあるクラスター6, 7, 8の遺伝子群が、確かに筋再生を反映しており、また、これらの遺伝子群の発現変化が、再生のマーカーとして有用であることを示している。さらに、興味深いことに、壊死の評価でDMD3とともに免疫系遺伝子群の著明な発現上昇が認められた福山型先天性筋ジストロフィー例は、ツリー表示で遺伝子発現が乏しいブランチに含まれていた。このことは、福山型先天性筋ジストロフィーにおいては、壊死変化は強いものの、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに比べて、再生が乏しい可能性を示している。また、詳細にデータを検討すると、アイソフォームの中でも、再生後期に発現が認められるはずのアイソフォームの発現上昇が、特異的に阻害されていることが分かった。例えば、トロポニンT遺伝子では、筋分化に従って、TNNT2, TNNT3, TNNT1の順に発現が認められるが、福山型先天性筋ジストロフィー例においては、前2者の発現は認められるものの、TNNT1の発現は極めて乏しかった。また、ミオシン軽鎖遺伝子においても、同様に、分化後期に発現上昇が認められるはずのMYL2の発現上昇が特異的に阻害されていた。このことは、福山型先天性筋ジストロフィーにおいては、再生のある段階までは進むものの、その先の筋分化が何らかの理由で阻害されている可能性を示唆している。



以上の結果は、我々の開発したDNAチップが、筋生検検体1検体での網羅的遺伝子解析を世界で初めて可能にし、一例ごとの遺伝子発現プロファイルの差を捉えることが可能になったこと、またその有用性を示している。また、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。組織学的にも、福山型先天性筋ジストロフィーでは、筋線維が小径で、内部の筋原線維の配列パターンに未熟性が認められる。この理由としては、様々な要因が考えられるが、我々は、福山型先天性筋ジストロフィーにおいては、神経筋接合部の構築が不良であり、secondary cleft がほぼ完全に消失していることを見出した。福山型先天性筋ジストロフィーでは、fukutin 遺伝子異常により、 α ジストログリカンの糖修飾異常が認められることが知られている。 α ジストログリカンは、神経筋接合部でも発現していることから、神経筋接合部での α ジストログリカン糖修飾異常が筋線維の未熟性と再生不良の原因となっている可能性があると考えられた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

我々の DNA チップにより、生検筋 1 検体での解析が初めて可能となり、検体間の差を遺伝子発現のレベルで捉えることが可能となった。また、この結果は、従来の筋病理学で捉えていた変化とも矛盾のないものであった。DNA チップによって得られるデータは莫大であることから、従来の筋病理学を踏襲しつつ、さらに多くの情報をもたらすものであり、新しい分子病理学とも言うべきものである。今後、各種筋疾患にこの手法を応用していくことで、更に多くの知見が得られるものと期待される。

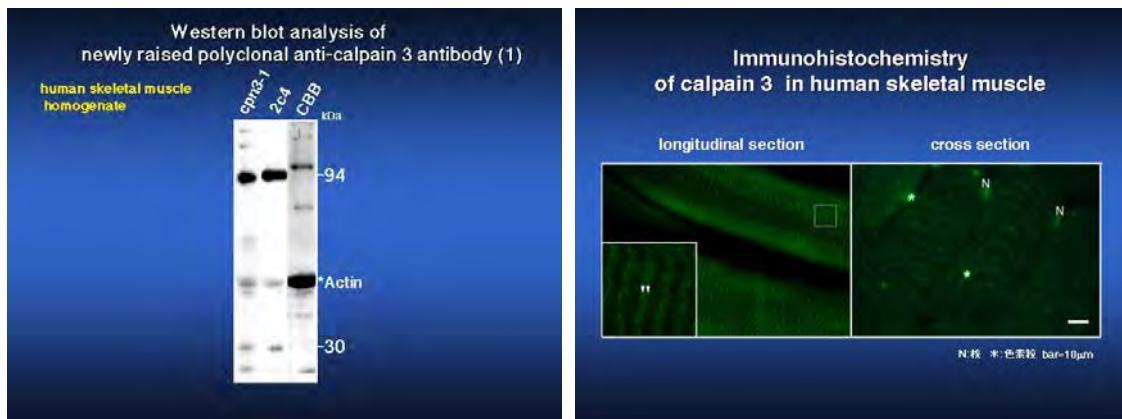
3. 4 各種遺伝性筋疾患における遺伝子発現プロファイリング

(1) 研究内容及び成果

我々はデュシェンヌ型筋ジストロフィー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行ってきた。これまでに解析を行ったのは、肢帯型筋ジストロフィー2A型、福山型先天性筋ジストロフィー、ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー、エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー、ミオチューブラーミオパチー、先天性筋強直性筋ジストロフィーなどである。以下に、代表例として、肢帯型筋ジストロフィー2A型、エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー、ミオチューブラーミオパチー、先天性筋強直性筋ジストロフィーでの研究結果を示す。

a. 肢帯型筋ジストロフィー2A型

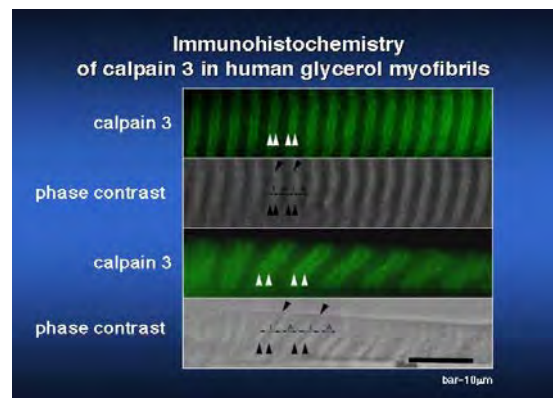
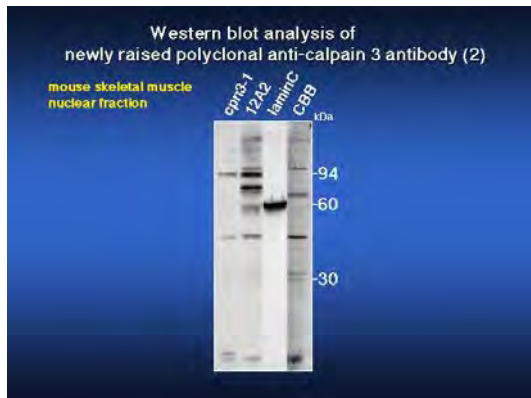
肢帯型筋ジストロフィー2A型(LGMD2A)は肢帯型筋ジストロフィーのうちで約26%と患者数の最も多い疾患である。骨格筋型カルパインcalpain3はその原因遺伝子であることがBeckmannらにより1995年に報告された。他の筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィンやサルコグリカンのような膜関連タンパク質とは異なり、calpain3は細胞質に存在するタンパク質分解酵素カルパインのホモログである。また、反町らによりcalpain3が筋原線維上でTitinにおけるN2A領域及びM-line上で結合している可能性がYeast 2-hybridでの解析から予想されている。このことから、LGMD2AはMyotilin(LGMD1A)やTCAP(Titin Capping Protein)(LGMD2G)のような筋原線維関連の分子異常により引き起こされる疾患であると分類される。したがってLGMD2Aの発症機構はジストロフィンやサルコグリカンの異常とは異なる可能性が示唆されている。しかし、calpain3が激しい自己分解能をもつために、in vivoにおける局在に関する十分な報告は今までになかった。唯一、Baghdiguianらにより免疫組織染色の報告はあるが、その報告ではcalpain3はsarcomericな分布をしているとは言い難く、また一部が核にも存在していることを示し反町らのYeast 2-hybridの結果との違いを示した。



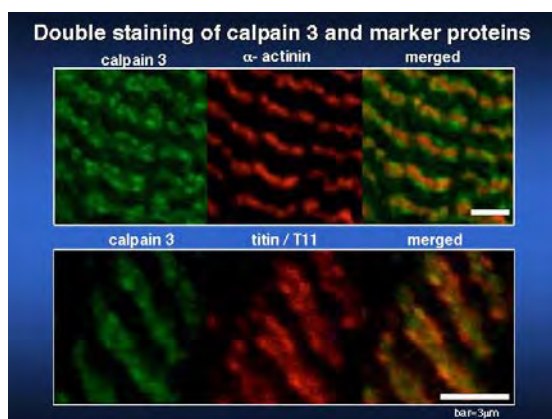
そこで、我々は、まず、calpain3のin vivoにおける局在を解析するために、新たにポリクローナル抗体を作成し、ヒト骨格筋凍結切片上でのcalpain3の局在を示した。さらに、LGMD2A患者筋に特有の変性線維でのcalpain3の局在について調べるためにまずcalpain3に対する新規抗体（N末約100残基の組み換えタンパク質に対するポリクローナル抗体）を作成し、次にこの抗体を用いてヒト正常骨格筋における局在の検討を凍結筋及びグリセリン筋を用いて行った。3つめとして、マウス骨格筋を用いた核への局在の検討、最後にLGMD2A患者筋におけるcalpain3の局在の検討を行った。まず作成した抗calpain3抗体を用いてヒト正常骨格筋ホモジェネートのウエスタンブロッティングを行って、既に報告されている94K及び30KDaの位置に二本バンドを確認した。

次にこの抗体を用いたヒト正常骨格筋の免疫染色を行ったところ、ヒト正常骨格筋の免

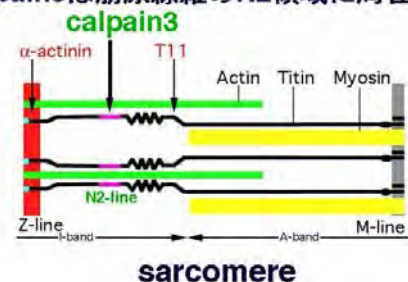
疫染色では、この抗体はlongitudinal切片上においては筋原線維をユニークな二重線パターン、cross切片上では等高線パターンで染色した。筋線維タイプによるcalpain3の発現量の違いは観察されなかったが、筋細胞核が染色されたので、核への局在を確認するためにマウス骨格筋から核画分を精製してウェスタンブロッティングの解析を行った。精製したマウス筋細胞核画分のウェスタンブロッティングの結果は、2つのエピトープの異なる抗calpain3抗体を用いて94Kの位置にバンドを検出した。この精製画分において核膜構成成分laminCは非常に濃縮されており、calpain3が核にも局在していると示唆された。



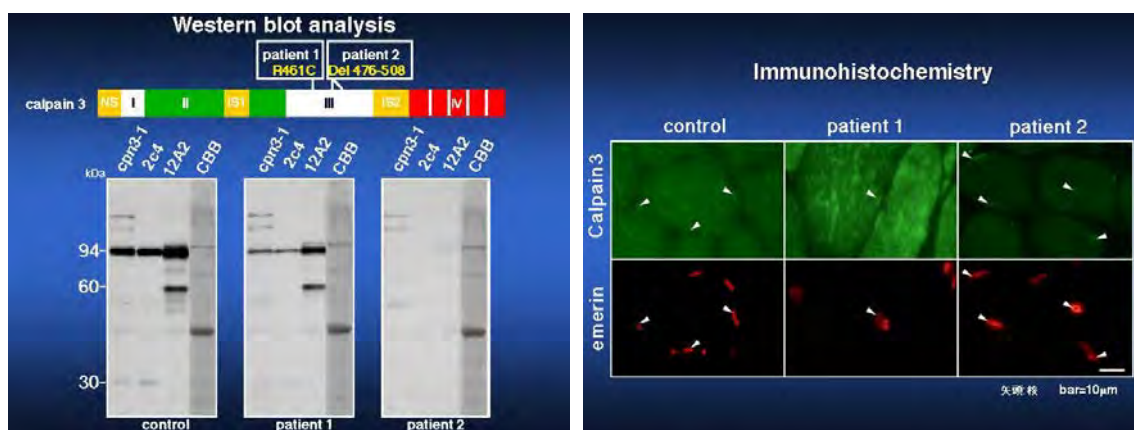
より詳細な筋線維内局在を決定するために、ヒトグリセリン筋を用いて染色を行った結果を示す。シングル筋原線維上においてcalpain3の二重線の間隔が線維の伸展の度合いに応じて広がっていることがわかった。また、calpain3の位置がI帯のA帯に近い位置に存在していた。更に筋原線維上の位置を正確に同定するためにマーカー抗体との二重共焦点染色を行った（下図左）。上の3枚の写真が α -アクチニン、下の写真がタイチンT11との二重染色の結果であり、 α -アクチニンはこのようにcalpain3の二重線の間隔に局在し、タイチンT11は、calpain3と同様に二重線パターンを示すが、重ねて見ると、calpain3の近傍よりややM-lineよりにT11が局在することがわかった。この2種類のマーカー抗体（ α -アクチニン、タイチンT11）との二重共焦点染色の結果からまとめると、calpain3がタイチン分子のN2領域に局在することを確認した。以上の結果は反町らによるYeast 2-hybridのデータと一致した。しかし同じように報告されているM-lineへの局在は見出せなかった。



calpain3は筋原線維のN2領域に局在する



さらに正常骨格筋と比較してLGMD2A患者筋におけるcalpain3の局在に変化が見られるかどうかについて検討を行った。用いた検体は2検体で、模式図に示したようにPatient1及びpatient2共にドメインIIIとよばれる領域に変異をもっている。この領域は機能がまだ明らかになっていない領域である。下にそれぞれ対応するウェスタンブロッティングの解析結果を示した。左がコントロール、右2つが患者筋ホモジェネートであり、patient1は94K及び30KDaにコントロールの約50%程度タンパク質が減少していた。一方patient2ではcalpain3はタンパク質レベルで検出できなかった。患者筋を用いた免疫染色の結果を示すと、上の段がcalpain3,下がemerinで、コントロールでは筋原線維及び核にこのように局在しているがpatient1ではコントロールと同様に両方に局在したが筋原線維の等高線パターンが不規則であり、また核では陽性のものと陰性のものがあった。またウェスタンブロッティングにおいてcalpain3が検出できなかったpatient2は、免疫染色において筋原線維には見られなかったものの、核が弱く染色されていた。



Patient1のlongitudinal sectionの免疫染色の結果から、筋原線維上でcalpain3の二重線の間隔が不規則に広がっているのを観察した。このことからpatient1の変性線維において変異calpain3が同様にtitinに結合していることがわかった。

calpain3の局在解析の結果から、筋原線維構造の変化がLGMD2Aにおける病態と密接なつながりを持つことが示唆されたが、実際にはLGMD2Aの病態は依然として不明である。そこで、我々の開発したDNAチップを用いて、LGMD2A骨格筋の網羅的遺伝子発現解析を行った。

LGMD2A骨格筋の初期病理像では筋線維の壊死・再生変化を認めるが、中後期になると、分葉線維と呼ばれる内部構造の乱れた筋線維が多数出現することが特徴である。今回の研究に用いたのは既に遺伝学的に診断が決定しているLGMD2Aの患者及び検体である。各検体のHE・NADH染色標本の観察所見に基づいて壊死・再生が多く見られるグループ(3例)、分葉線維が多く見られるグループ(4例)、両方の筋病理が見られるグループ(2例)の3つに分類し、アレイ解析を行った。実験は、1検体につき2ないし3回の測定結果を平均化した後、データ解析はGeneSpring Ver.4.2.1を用いて行った。患者-コントロール間の発現変化

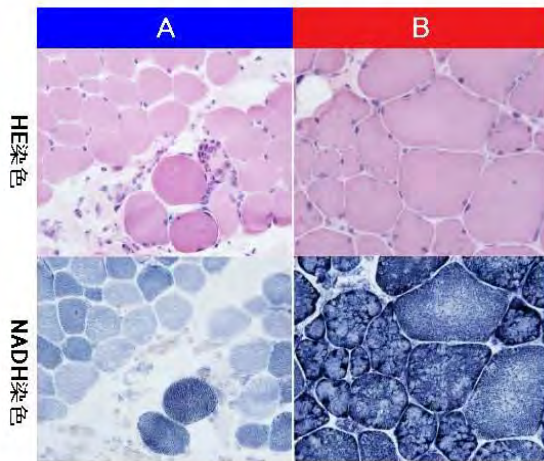
の差異はt-検定を用いて $p<0.01$ を有意性の基準とした。

アレイ解析に用いた検体の臨床情報

グループ	患者名	年齢	性別	罹病期間	壊死・再生線維	分葉線維	両上肢筋力低下
A	1	7歳	女	1年	+		なし
	2	25歳	男	5年	+		軽度
	3	40歳	男	1-2年	+		なし
B	4	49歳	男	不明		+	情報なし
	5	32歳	男	17年		+	重度
	6	56歳	男	21年		+	重度
	7	27歳	男	17年		+	重度

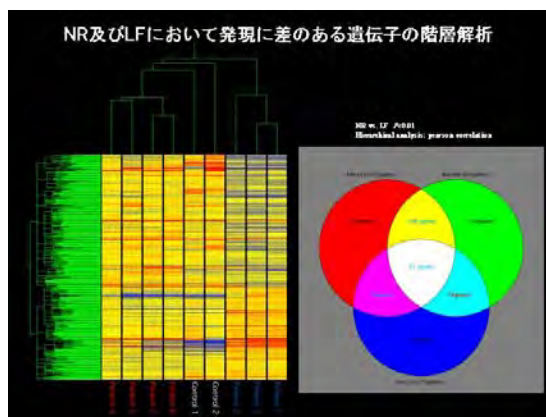
A: 壊死・再生筋線維が存在する症例(NR)
B: 分葉線維の割合が非常に多い症例(LF)

LGMD2A患者筋病理像



解析の主な目的は初期の壊死・再生変化を主体とする病態から中後期の分葉線維が多く見られる状態になるまでに有意に変化した遺伝子を同定し、そのうちコントロール検体と遺伝子発現に有意に差異のある遺伝子($p<0.01$)を選択して、LGMD2Aの患者筋の中でどのような変化が起こって分葉線維になるのかを遺伝子発現変化で説明できるかを試みた。

まず初めにグループA(NR)とグループB(LF)において遺伝子発現の差異のある455遺伝子を選択することができた($p<0.01$)。この遺伝子群で階層解析を行うとLGMD2AのグループA及びグループB、正常コントロールの3群がはっきりと分類することができる。

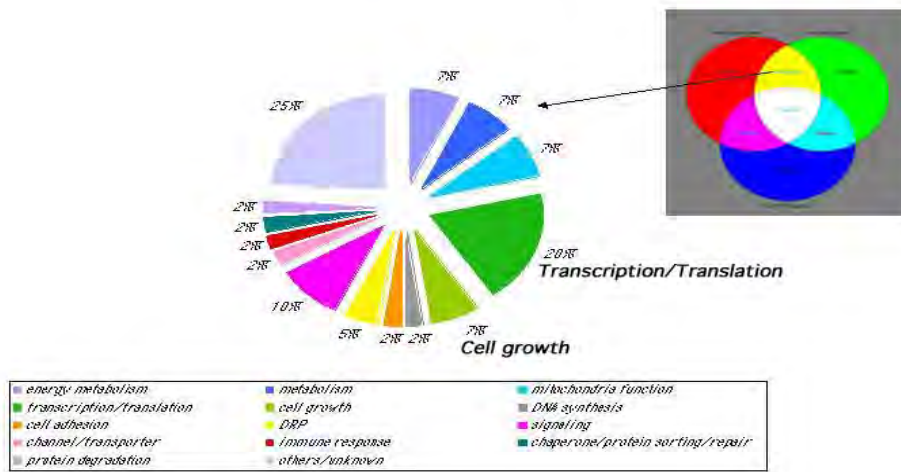


結果明らかになった。

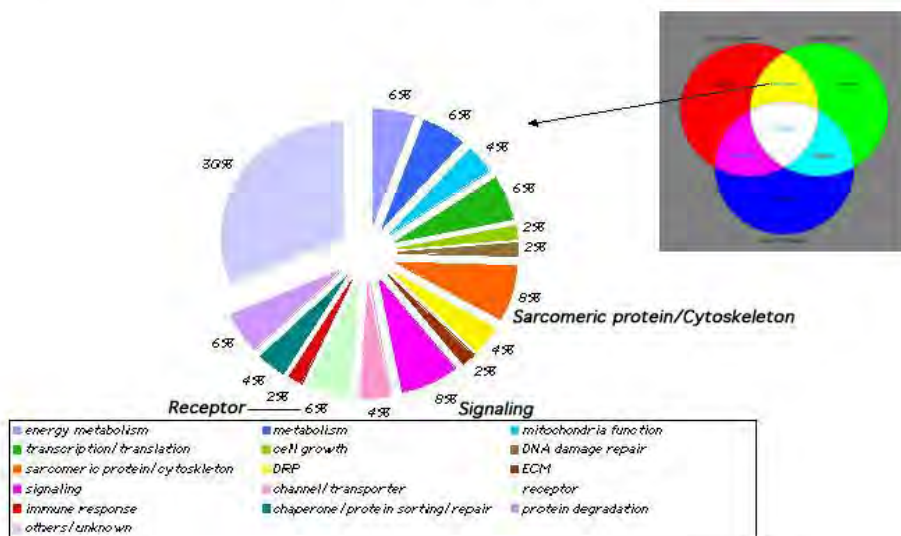
正常と比較して、有意差がありかつグループBで発現が上昇したのは60遺伝子、グループBで発現が減少したのは62遺伝子であった。これらの遺伝子の中で、正常とグループA(NR)において発現差が見られた遺伝子が93遺伝子と最も多く、LGMD2Aではその発症初期の段階において正常と比較して遺伝子発現が大きく変化することが今回のアレイ解析の結果明らかになった。

更に詳しく内訳をまとめると、発現が上昇していた遺伝子の中で高頻度だったのは転写及び翻訳に関連する遺伝子、細胞増殖に関連する遺伝子、シグナル伝達に関連する遺伝子群だった。一方、発現が減少していた遺伝子の中で高頻度だったのは、筋原線維及び細胞骨格に関連する遺伝子、レセプターあるいはシグナル伝達に関わる遺伝子群だった。初期のNR時期に多くの転写・翻訳遺伝の発現が非常に低下し、その後LF時期に少し回復する能力があることが明らかになった。一方、筋原線維などの構造蛋白質はそれらの遺伝子発現が低下するより以前に転写及び翻訳を増大させて初期の壊死・再生期に速やかに対応していると考えられた。

**NR vs. LFにおいて遺伝子発現が上昇 かつ N vs. NRの発現に有意差がある
42 genesの内訳**



**NR vs. LFにおいて遺伝子発現が減少 かつ N vs. NRの発現に有意差がある
51 genesの内訳**



特に、変化が顕著だった遺伝子についてリストにまとめると、デスミン及びTCAPなどZ-lineに関連する分子や、アクチン及びアクチンのポリメリゼーション及びデポリメリゼーションに関わる遺伝子の発現が大きく変化していることが明らかになった。例えば、アクチン(ACTA1)がNR時期に78.9倍上昇し、LF時期に6.4倍上昇している一方、アクチン線維を切断したり、プラス端に結合してアクチン線維の重合・脱重合を停止させる働きを持つゲルブリンはNR時期に発現が3分の1に減少するがLF時期に遺伝子発現が3.6倍上昇する。また、中間径フィラメントであり、筋原線維をZ-lineで固定していると考えられているデスミンはNRにおいて非常に大きく遺伝子発現が10.4倍上昇した後、中・後期のLFの時期になると発現が1.5倍上昇に抑えられていた。デスミンはZ-lineで他のタンパク質と結合していることが知られており、calpain3の機能欠失が影響を与えている可能性を示唆している。この結果は、LGMD2Aにおいて、筋線維の重要な構成成分が筋肉の再生の際に、正常通りに構築されない可能性を示唆している。このように分葉線維を多数認める筋では、サルコメアタンパク質及び細胞骨格関連遺伝子群の発現に大きな変化が認められた。この結果は、このような遺伝子群の発現変化を通じて、筋線維内部の構造にダイナミックな変化を生じて、分葉線維が形成されることを示唆していると考えられた。

**NR vs. LFにおいて遺伝子発現差が1.5倍以上変化した遺伝子のうち
正常コントロールと発現に有意差がある遺伝子リスト**

<i>Up-regulated genes</i>				<i>Down-regulated genes</i>			
Gene name	probe no.	NR vs. LF		Gene name	probe no.	NR vs. LF	
NACA	2030	+4.3		aldolaseA	2613	-5.2	
TMOD4	1268	+2.0		aldolaseA	2246	-3.9	
	675	+1.9		aldolaseA	2630	-3.2	
	1980	+1.8		Rpo12	1576	-5.0	
PCMT1	645	+1.6		ACTC	2453	-3.6	
BDX1	1300	+1.5		EF1G	109	-2.4	
GSN	1304	+10.7		ALP	1553	-2.1	
AKR1C1	3180	+2.0		MR	2881	-2.1	
IFITM2	4570	+2.0		1803	1803	-2.1	
	2375	+1.6		ACTA1	3612	-12.3	
	20311	+1.6		ACTA1	3604	-12.9	
	20029	+1.6		DES	2353	-6.8	
	1807	+3.0		DES	2045	-8.5	
PFKP	1404	+2.7		DES	85	-5.4	
PFKP	4601	+3.3		80009	80009	-8.7	
JUND	2322	+2.5		CAS	2489	-5.4	
ATP5CL1	3261	+2.5		CAS	2542	-3.2	
60S2	3600	+2.5		CKPM	1871	-4.6	
SRP14	824	+2.5		CKPM	1157	-3.6	
PBP	1087	+2.3		CKPM	214	-3.6	
BDHA	1206	+2.2		EEF1A2	524	-4.0	
EKBP4	4383	+2.0		GAPDH	1546	-3.6	
FH1	2706	+1.9		ZABP	2438	-3.0	
Dp427c	3626	+1.9		GLUT4	201	-3.0	
LMO7	2204	+1.9		PSAN	2469	-2.8	
Rac1	4173	+1.8		TCAP	4822	-2.5	
	20036	+1.8		TCAP	2834	-2.2	
	2486	+1.8		SLM1	3789	-2.5	
	1348	+1.7		20332	20332	-2.5	
	1815	+1.7		20375	20375	-2.5	
AK2A	957	+1.7		STAC3	20252	-2.4	
AK2A	1511	+1.5		e86	2773	-2.4	
MTCBP1	3907	+1.7		ABB2	3137	-2.2	
ALDH10	79	+1.6		ALTB	3996	-2.0	
p83	184	+1.6		2745	2745	-2.0	
p83	4502	+1.4		20345	20345	-1.9	
	4803	+1.0		SNT1	149	-1.6	
ANK7	4623	+1.5		CDLVIA1	3920	-1.6	
ANK7	2704	+1.5		UBCET1P5	3708	-1.7	
UF01L	3244	+1.5		498	498	-1.6	
TEF3	1915	+1.5		2467	2467	-1.6	
				LCAT	3900	-1.6	
				MYFA	699	-1.6	
				HLA-DQB	20371	-1.5	
				EBFR4	1317	-1.5	

P<0.01

加えて、シグナル伝達関連分子が非常に変化していることが明らかとなった。LIM binding domainを持つ分子がいくつか遺伝子発現が変化していることから、それらの病態に対する影響が今後の研究課題である。

b. エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィーにおける遺伝子発現解析

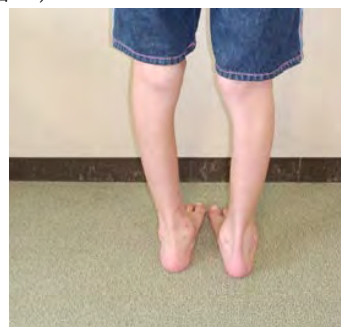
エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー (EDMD) は小児期に発症する緩徐進行性の

筋ジストロフィーで、1) 後頸部、肘関節やアキレス腱の拘縮、2) 肩甲上腕腓骨型の筋萎縮・筋力低下、3) 心伝導障害を伴う心筋症を3主徴とする疾患である。通常、2~10才の小児期に発症する。関節拘縮は他の筋ジストロフィーと異なり、筋力低下の明らかとなる前に、肘、アキレス腱、後頸部に認められるようになる。その結果、典型例では腕は半屈曲位をとり(図1)、つま先歩きとなり、頸部の屈曲が障害される。また、末期には脊椎の前屈が障害されることもある。筋力低下、筋萎縮は一般に軽く、進行も緩徐である。主に上腕二頭筋、上腕三頭筋、前脛骨筋が病初期に障害され、進行すると障害筋の分布は肩甲上腕下腿型を示すようになる(図1, 2)。腓腹筋肥大は認めない。感覚障害はみられず、知能障害の報告もない。心筋障害は、予後を左右する重要な要素である。多くの症例では筋力低下とともに10代後半から30才頃までに出現することが多いが、早期から心症状が前景となる場合もある。臨床的には徐脈、不整脈を呈し、Adams-Stokes症候群を認めることもあるが、なんら前駆症状がなく突然死をきたす頻度が極めて高く(~50%)、ペースメーカーの装着が必須となる。筋病理学的には、筋線維の壊死・再生、大小不同、中心核線維や分割線維の存在など筋ジストロフィーの所見に矛盾しない。また剖検心筋では心房、ことに右心房の拡張と壁の菲薄化、心房筋の脂肪組織への置換、心室中隔、左室後壁を中心とした線維化が認められたとの報告がある。

(図1)



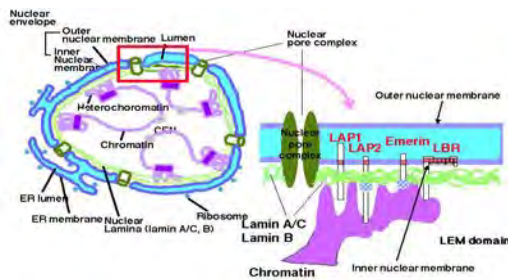
(図2)



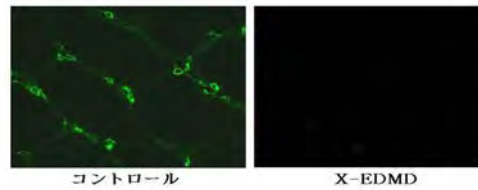
EDMDはX染色体性劣性遺伝形式をとるX-EDMDと常染色体性優性の遺伝形式をとるAD-EDMDがある。また、常染色体劣性の遺伝形式をとるEDMD(AR-EDMD)も少数ながら報告されている。EDMDの臨床症候は遺伝形式によらず共通である。

X-EDMDの原因遺伝子*EMD*はXq28に存在し、エメリンというタンパク質をコードしている。*EMD*は6つのエクソンからなる2,147 bpの遺伝子で、約1.2kbのmRNAは様々な臓器に発現しているが、特に骨格筋や心筋に強く発現している。*EMD*の変異に好発部位はなく、また変異の種類もナンセンス変異、ミスセンス変異、スプライス異常など様々である。エメリンは約34kDaのタンパク質でC末端側に膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を有している。エメリンは骨格筋、心筋、平滑筋では細胞の核二重膜の核質面に局在しているが(図3)、他の臓器では細胞質にびまん性に存在する。一方、X-EDMD患者筋(あるいは皮膚)では核膜のエメリンは欠損していることを我々は報告している(Nature Genet, 1996)(図4)。

(図 3)



(図 4)



一方、AD、および AR-EDMD の責任遺伝子としては 1q11-q23 に存在するラミン A/C 遺伝子 (*LMNA*) が知られている。*LMNA* は 12 個のエクソンからなり、その mRNA は骨格筋、心筋、胎盤に多く発現している。mRNA のスプライシングの違いによりラミン A とラミン C という 2 つのアイソフォームが産生される。ラミン A は 664 アミノ酸、ラミン C は 572 アミノ酸からなり、N 末端側の 566 個のアミノ酸は共通である。ラミン A/C は中間径フィラメントの一種で、核内膜の核質側を裏打ちする核ラミナの構成成分である (図 3)。ラミン A/C の発現は AD-EDMD 患者の骨格筋ならびに心筋でも正常者と変わりなく、またエメリンも核膜に一致して染色されることから、X-EDMD と異なり、蛋白質レベルで診断するのは困難である。

非常に興味深いことに、*LMNA* の変異は EDMD のみならず、近位筋優位の筋障害と心筋症を示す肢帯型筋ジストロフィー 1B 型 (LGMD1B)、家族性拡張型心筋症、家族性限局性脂肪異栄養症 (FPLD)、軸索ニューロパチー (Charcot-Marie-Tooth 病 2 型) や、さらには早老症など、常染色体優性および劣性の遺伝形式をとる様々な疾患を引き起こすことが知られている (表 1)。

(表 1) *LMNA* 変異による疾患

- Emery-Dreifuss muscular dystrophy (AD-EDMD; OMIM: 181350)
- Emery-Dreifuss muscular dystrophy (AR-EDMD; OMIM: 604929)
- Limb-girdle muscular dystrophy type 1B (LGMD1B; OMIM: 159001)
- Dilated cardiomyopathy (CDM1A; OMIM: 115200)
- Familial autosomal dominant partial lipodystrophy (Dunnigan variety) (FPLD; OMIM: 151660)
- Charcot-Marie-Tooth disorder type 2 (AR-CMT2, OMIM: 605588)
- Mandibuloacral dysplasia (MAD; OMIM: 248370)
- Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS; OMIM: 176670)
- Werner's syndrome (WRN; OMIM: 277700)
- Cardiocutaneous progeria syndrome (CCPS)
- Restrictive dermopathy (RD; OMIM: 27521)

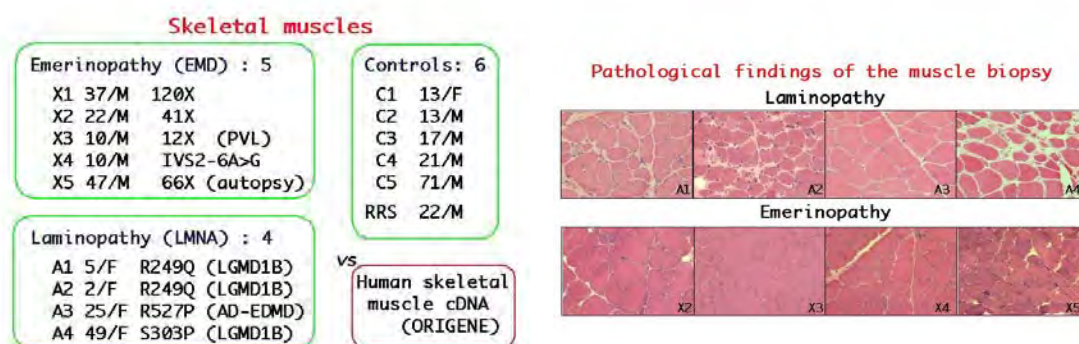
なぜ、同じ遺伝子の異常が全く異なる病像を呈する疾患を引き起こすのかは不明であり、現在その解明に力が注がれている。エメリンやラミン A/C の具体的な機能は明らかではないが、両者とも核内膜面に存在し、ラミン A とエメリンは直接結合しうること、また細胞分裂に際し両者は局在を同じくすることが報告されている。ラミン A/C はまた、ラミン結合タンパク質といった核内膜に存在する他のタンパク質やクロマチンと直接結合することから、核膜の補強に加え、分化に伴う遺伝子の発現調節をしている可能性も示唆されている。

以上のことから、エメリン、ラミンの遺伝子異常の伴う疾患群を現在、核膜病と総称している。核膜病は、先に述べたように核内膜タンパク質の異常によりきわめて多彩な臨床症状を呈することから、原因遺伝子の異常によって、他の遺伝子に発現変化が生じることが病態と深く関わっていると考えられている。従って、DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析を行うことは、核膜病の病態機序を解明する上できわめて有用な手段と考えられる。

我々は、核膜病のうち特に骨格筋病変を生じる EDMD および LGMD1B に焦点を当て、エメリノパチー、ラミノパチー、および EDMD と臨床症状の似ている強直性脊椎炎 (rigid spine syndrome; RRS) の生検骨格筋を用いて、我々の作製した DNA チップを用いて遺伝子発現変化を検討した。解析に用いたのは遺伝子変異の明らかとなっているエメリノパチー 5 例、ラミノパチー 4 例、および RRS 1 例、正常コントロール 5 例の生検筋である (図 5)。図 6 に示すように、骨格筋の病理像は正常に近いものから結合組織の増生の目立つものまで様々であった (図 6)。

(図 5)

(図 6)

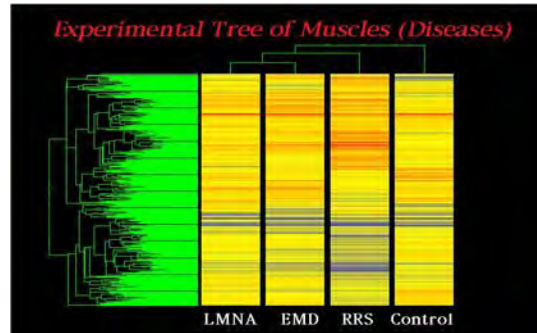
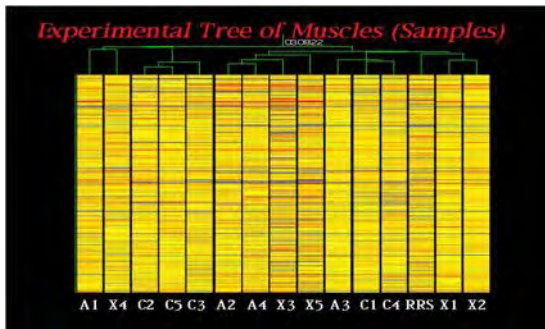


DNA チップを用いて解析した遺伝子発現変化を個々の症例ごとに比較した結果、原因遺伝子による差異よりも個体差の方が大きく、また興味深いことに筋病理像変化の程度とも明らかな相関は認められなかった (図 7)。これは、核膜病骨格筋における遺伝子発現変化はきわめて軽度であることを示唆している。しかしながら、次に原因遺伝子の違いによるグループ間での遺伝子発現変化をみた場合、エメリノパチー (EMD) とラミノパチー

(LMNA)はRRS、コントロール群と比較してよく似た発現パターンを呈していた(図8)。そこで、原因疾患群間での差異に注目し、さらなる解析を進めた。

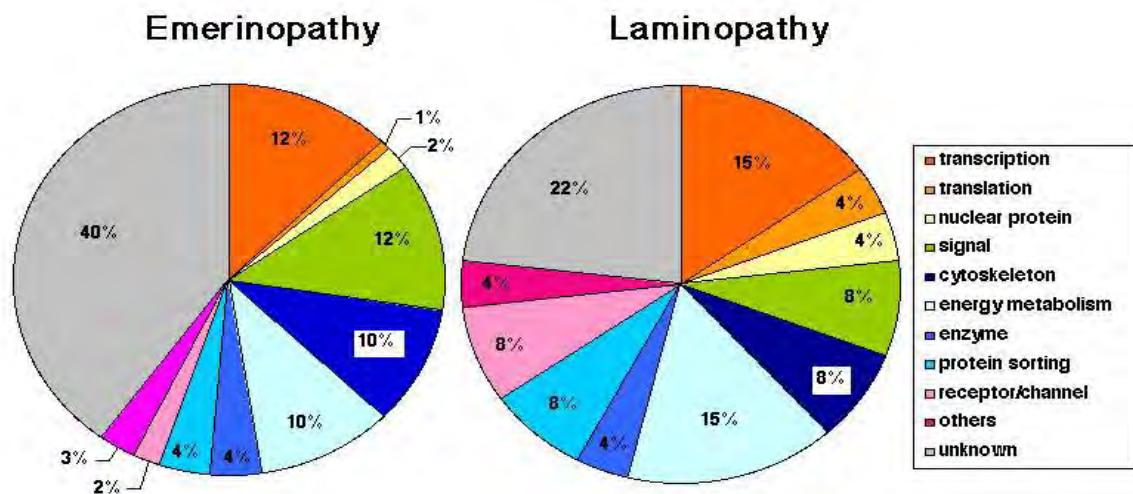
(図7)

(図8)



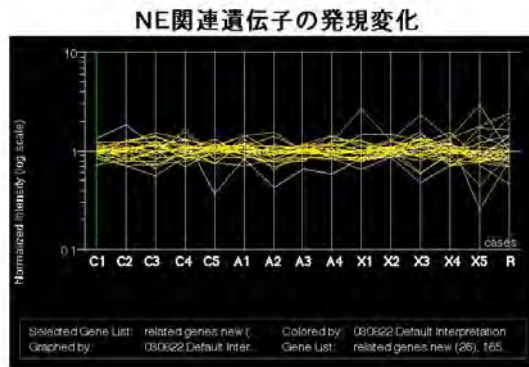
エメリノパチーとラミノパチー各々の骨格筋で有意な発現変化を示した遺伝子群を機能別に分類したところ、遺伝子の転写や翻訳に関する遺伝子など核に関連した遺伝子に多く発現変化が認められた(図9)。

(図9) Classification of significantly changed genes

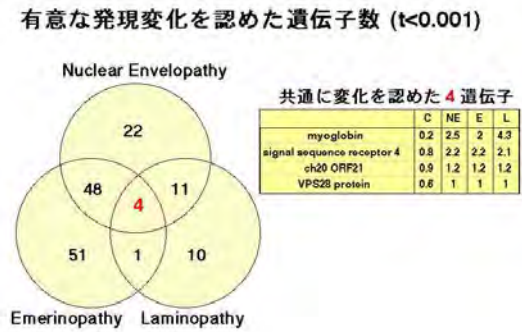


一方、エメリンやラミン、あるいはこれらと結合あるいは関連の指摘されている遺伝子群には有意な発現変化は認められなかった(図10)。また、エメリノパチー群、ラミノパチー群、核膜病群の間で共通して有意差($p < 0.05$)を持った遺伝子発現変化が認められたのはわずか4遺伝子のみで、そのうち核あるいは核膜に関連するものは含まれていなかった(図11)。

(図 10)



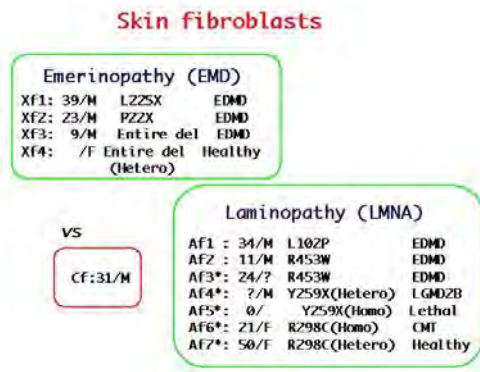
(図 11)



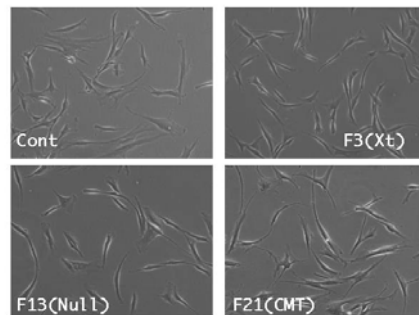
以上の結果より、骨格筋一検体毎における遺伝子発現変化は極めて軽微であり、原因遺伝子、筋病理変化に強く関連する遺伝子発現変化をみいだすことは困難であった。しかしながら、全体としてみるとエメリノパチーとラミノパチーは似た発現変化を示し、また核関連遺伝子に変化を多く見出したことより、遺伝子発現変化が核膜病の発症に関わっているものと推定された。

骨格筋における遺伝子発現変化は非常にわずかであり、また個体差も大きいと思われることから、患者培養皮膚線維芽細胞を用いた遺伝子発現解析も行った。用いた細胞はエメリノパチー4例、ラミノパチー8例から採取したもので、正常コントロール線維芽細胞をコントロールとして遺伝子の発現レベルを比較検討した(図 12)。この中には、*LMNA*に同じ遺伝子変異を認めるもの2例、ラミン A/C ナンセンス変異のホモ接合体で生後まもなく死亡した患者(フランスより供与)とその家族(ヘテロ接合体で EDMD)、ならびに常染色体劣性遺伝をとる CMT 患者の線維芽細胞も含まれている。いずれの細胞も増殖の速度に多少の差異は認められたものの、細胞の形態や生存率に大きな変化は認められなかった(図 13)。

(図 12)



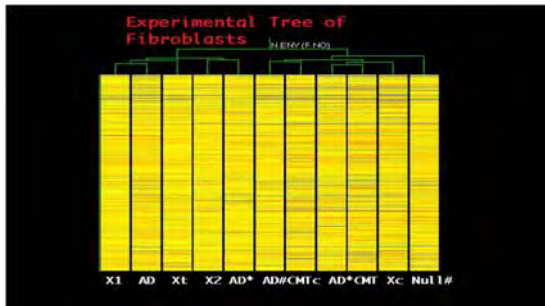
(図 13)



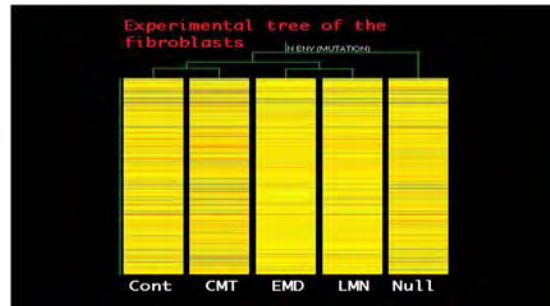
個々の細胞間での遺伝子発現解析の結果は、ラミン A/C 欠損細胞が最も異なる発現パターンを示す一方、エメリノパチーとラミノパチーの遺伝子発現パターンは、遺伝形式や臨

床表現型とに明らかな関連は見出されなかった。さらには、*LMNA* に同じ遺伝子変異を有する患者であっても、その遺伝子発現パターンは異なっていた (図 14)。また、疾患群間で比較してもラミン欠損細胞は著しく異なった発現変化を示した (図 15)。

(図 14)

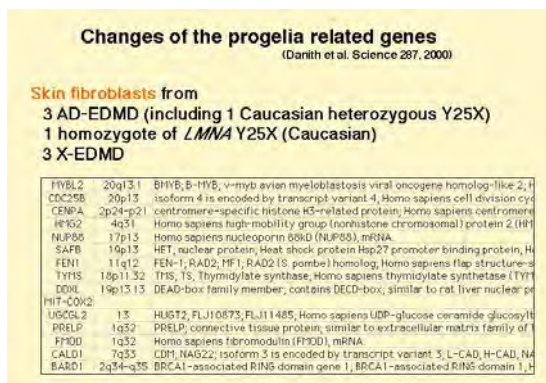


(図 15)

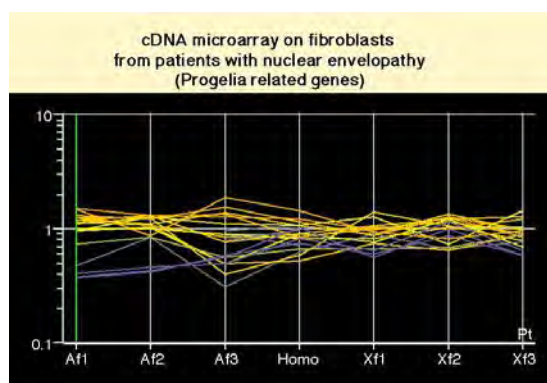


早老症は *LMNA* 異常による疾患の一つである。これまでに早老症患者において発現異常の認められた遺伝子がいくつか報告されている (Science, 2000)。我々はこれらの遺伝子について、ラミノパチー患者線維芽細胞における遺伝子発現変化を検討した。われわれの DNA チップにはこれまでに報告されている早老症関連遺伝子のうち 15 遺伝子が含まれており、これらについて発現を検討した (図 16)。その結果、いずれの遺伝子にも有意な発現変化は見出されなかった (図 17)。このことは、臨床病態が異なると遺伝子発現も変化しうることを示唆している。

(図 16)

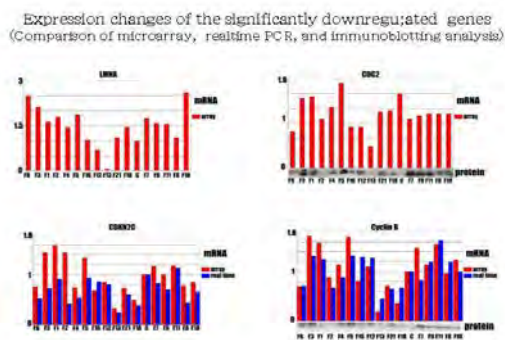


(図 17)

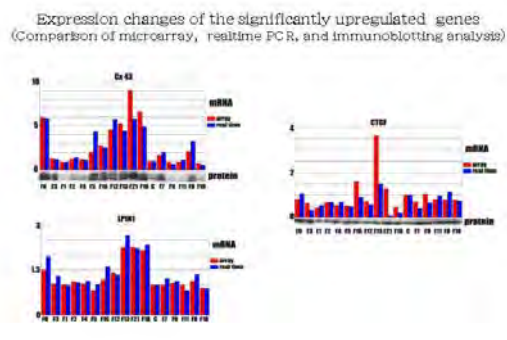


そこで、最も強い発現変化の認められたラミン A/C 欠損細胞に注目し、有意に発現変化の認められた遺伝子群を解析した。その結果、興味深いことに、有意に遺伝子発現が低下していた遺伝子群の中に、細胞周期に関連する遺伝子が複数見出された。この結果は、定量的 RT-PCR およびウエスタンブロット法によるタンパク質解析でも確認された (図 18)。また、発現上昇のみられた遺伝子群の中には、ラミノパチーで認められる臨床症状と関連の深い遺伝子がいくつか見出された (図 19)。

(図 18)



(図 19)



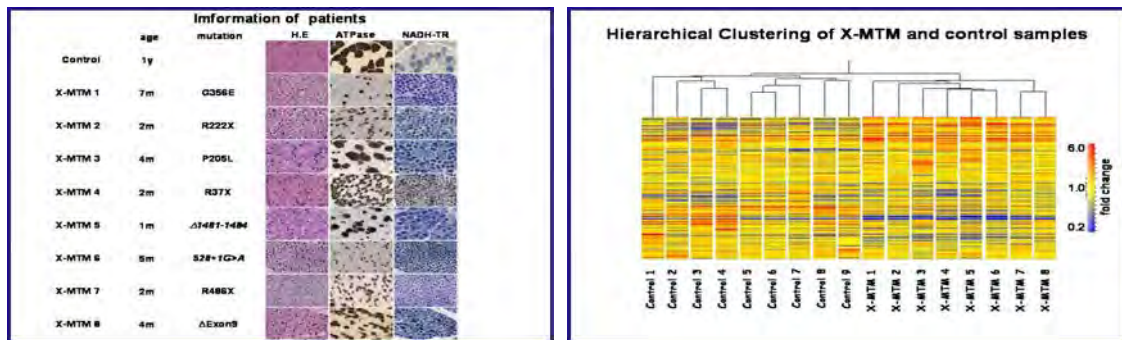
以上の結果から、核膜病患者組織（骨格筋、皮膚線維芽細胞）における遺伝子発現変化は、個々の症例でみるときわめて軽微であるが、全体像としてとらえた場合、遺伝子発現変化が病態と深く関わっていることが示唆された。特にラミン A/C の完全欠損細胞では、ラミノパチーの臨床表現型と密接に関連する遺伝子に明らかな発現変化が認められたことから、ラミン A/C の異常は、その変異の違いによって様々な遺伝子の発現に変化を生じ、その結果、様々な臨床病型を呈するものと考えられた。今後、変化の見出された遺伝子と病態との直接の関与を探っていくとともに、エメリン欠損、およびラミン欠損マウスを用いての遺伝子発現解析を加え、臨床症状と直接関わる遺伝子を見出していきたいと考えている。

c. ミオチューブラーミオパチー

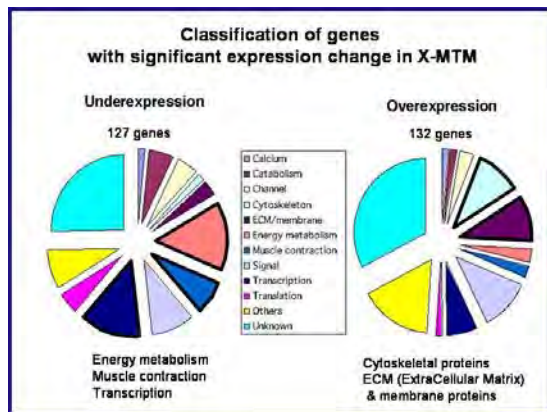
X-染色体連鎖性ミオチューブラーミオパチー (XLMTM) は、新生児期から全身の著明な筋力、筋緊張低下と、呼吸困難を伴い、ほとんど1歳までに死亡する重篤な疾患である。筋病理所見は、中心核をもつ、丸く、非常に小さな筋線維からなるのが特徴である。また、筋線維の中心部での酸化酵素活性の上昇と周辺部での低活性がある。原因遺伝子は、*MTM1* であり、phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) に対する脱リン酸化酵素 (myotubularin) をコードしている。タンパク質産物 myotubularin は細胞の葉状仮足を含む membrane ruffles に存在し、アクチン細胞骨格の安定化や、エンドサイトーシスに関与していると報告されている。また、エンドソームからリソソームへの細胞内輸送にも働いていると推測されている。しかし、はっきりと結論付けられているわけではないし、骨格筋組織、細胞で示されているわけでもない。さらに、ノックアウトマウスの解析から、XLMTM で見られる小径繊維は筋分化の阻害または遅滞によるのではなく、むしろ完成した筋線維のメンテナンスが悪く、筋萎縮によっていることが示されている。

ミオチューブラーミオパチーは、先天性であり比較的筋病理像も患者間でそろっていることから、患者間で症状の異なる進行性筋ジストロフィーに比べ、遺伝子発現解析に向いていると考えられる。実際、今回用いた患者筋は多少の差異（筋線維型の割合や筋線維はあ

るものの、コントロールとは全く異なる筋病理像を示した。本研究では、遺伝子診断された患者筋8例とほぼ同年齢のコントロール筋9例を用いて、DNAチップで発現解析した。非ハイブリダイズプローブを除いたデータを用いて、XLMTM筋とコントロール筋で階層解析を行った。その結果、下図に示すように、XLMTM筋は、コントロール筋から完全に分離され、しかも患者間の発現差異は小さい遺伝子発現プロファイルを示すことがわかった。



次に、XLMTM筋とコントロール筋との間で差異を示す遺伝子を、ANOVA解析により選び出した。259遺伝子が発現変化していた。127遺伝子が発現減少しており、132遺伝子が発現増加していた。発現減少した遺伝子はエネルギー産生・代謝関連遺伝子群と筋収縮関連タンパク質遺伝子群、タンパク質合成系遺伝子群であった。エネルギー産生・代謝関連遺伝子群には、すべての解糖系酵素とほとんどのクエン酸回路および呼吸鎖に含まれる遺伝子が含まれ、とくにグルコース代謝の減退が考えられた。さらに、筋構造タンパク質とタンパク質合成関連遺伝子の発現減少は、XLMTMで見られる筋萎縮と関連していると推察された。しかし、ユビキチンリガーゼ、プロテアソームなどの筋萎縮関連タンパク質遺伝子の発現増加は観察されなかった。一方、発現増加が見られた遺伝子には、細胞骨格タンパク質遺伝子群と細胞外マトリックス構成タンパク質遺伝子群が多く含まれていた。下右図にそれぞれに含まれる遺伝子群と発現変化を示す。細胞骨格タンパク質遺伝子では、

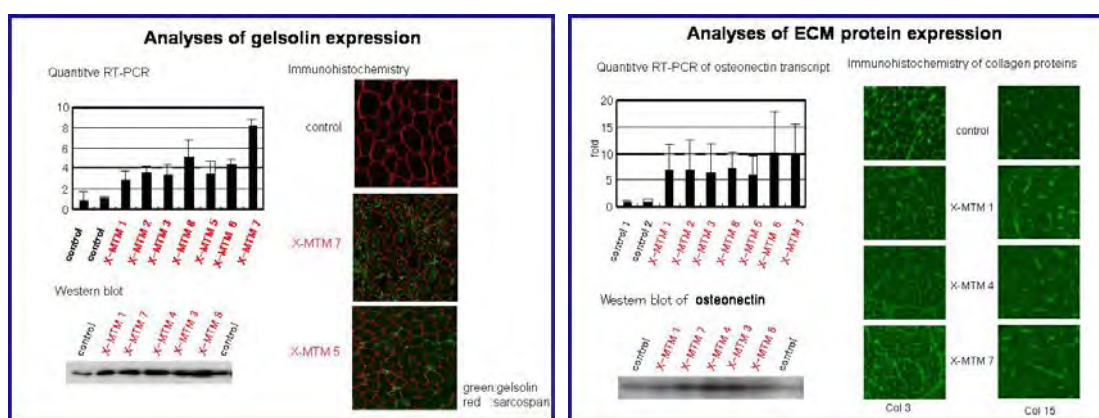


cytoskeleton-related genes				ECM-related genes			
	MTM	control	Baker		MTM	control	Baker
upregulation				upregulation			
<i>MACS</i>	7.2	1.8	4.1	<i>collagen 7A</i>	14.3	1.0	14.2
<i>cathepsin1</i>	2.3	0.6	3.5	<i>osteocalcin</i>	12.3	1.5	8.0
<i>pachin2</i>	0.8	0.2	3.1	<i>OSF-3</i>	2.0	0.4	4.6
<i>γ-actin1</i>	4.1	1.4	2.9	<i>collagen15A1</i>	31.0	7.8	4.1
<i>α-tubulin</i>	3.2	1.8	2.9	<i>lumican</i>	1.8	0.5	4.0
<i>stretin</i>	3.6	1.3	2.7	<i>dystroglycan</i>	1.1	0.5	3.9
<i>profilin1</i>	1.3	0.6	2.4	<i>ITK2A</i>	7.1	1.9	3.7
<i>nonmuscle MyHC</i>	2.5	1.0	3.4	<i>dystroglycan</i>	5.9	1.7	3.5
<i>gabap1</i>	8.8	2.9	2.4	<i>lamin R1</i>	1.4	0.5	3.0
<i>transgelin</i>	2.1	0.9	2.3	<i>telraspan2</i>	2.1	0.9	2.6
<i>α1-spectrin</i>	3.8	1.7	2.1	<i>TNMF2</i>	1.4	0.8	2.4
<i>ACTR3</i>	1.5	0.8	1.9	<i>glypican1</i>	2.8	1.3	2.2
<i>paullin</i>	1.1	0.6	1.9	<i>spondin2</i>	1.1	0.8	1.5
downregulation				downregulation			
<i>N-RAP</i>	0.6	1.2	0.5	<i>Syntenin-2</i>	0.7	2.3	0.5
<i>OCTN2</i>	0.6	0.9	0.8	<i>α-sarcoglycan</i>	0.8	2.6	0.4
				<i>PECAM1</i>	1.0	2.1	0.5
				<i>dysferlin</i>	0.6	1.0	0.6

アクチンフィラメントを切断する、またはアクチン単量体に結合するタンパク質をコードする遺伝子の多くが発現増加を示し、微小管結合または構成タンパク質をコードする遺伝

子群は発現が減少していた。細胞外マトリックス遺伝子群は、コラーゲン線維や、骨形成に関わるタンパク質をコードするものが多く含まれていた。これらは、胎生期に多く発現しているものであった。

さらに、これら細胞骨格タンパク質と細胞外マトリックスタンパク質遺伝子の発現を RT-PCR で確認するとともに、タンパク質レベルの発現とその XLMTM 筋での局在を調べた。gelsolin、osteonectin 及び collagenIII、XV の発現を調べた。RT-PCR、ウエスタンブロットにおいても、これら遺伝子とタンパク質産物の発現上昇は確認された。また、gelsolin および osteonectin の組織染色においては、高度に萎縮した筋線維内とその周りにおいて、特に強い染色が観察された。CollagenIII および XV の組織染色では、内鞘領域の増成とそこへの蓄積が見られた。



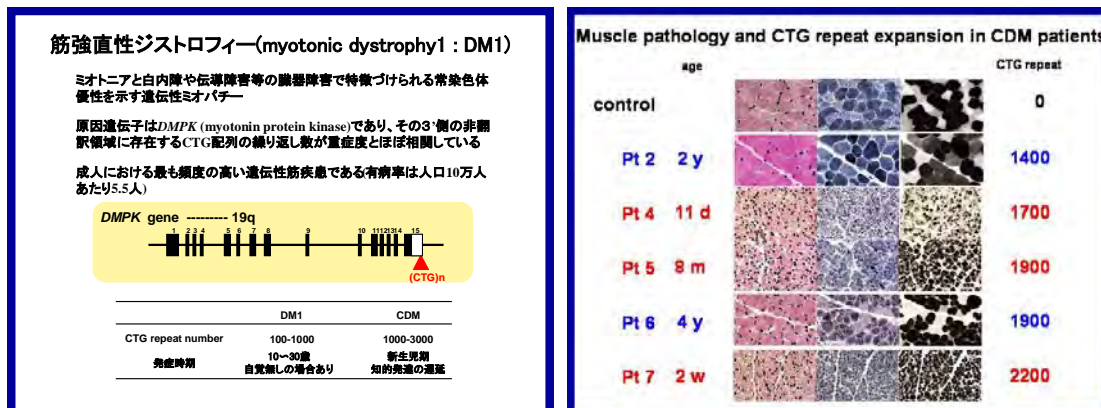
以上の結果は、筋萎縮の進行と、中心核・ミトコンドリアの筋線維中心部への局在に伴い、筋線維の内部と外部で骨格構造の大規模な再構成が起こっていることを示唆していると考えられた。myotubularin はアクチン細胞骨格と共局在していることが示されているが、XLMTM 筋において、アクチンフィラメント調節タンパク質の発現が上昇し、アクチンを含む細胞骨格の再構成が起こっていたことは興味深い。myotubularin は PI3P または PI3,4P 量の調節を通して、アクチン細胞骨格構造を安定化しているのかもしれない。今後の機能解析が待たれる。

d. 先天性筋強直性筋ジストロフィー

先天性筋強直性ジストロフィー (CDM) は、ミオトニア、筋力低下という成人型の病態に加え、骨格筋の発達遅延が主病態である疾患である。DMPK 遺伝子の 3'UTR に存在する CTG リピートの異常伸長が病因である。伸長した DMPK mRNA により、特定遺伝子のスプライシング異常や転写阻害、mRNA の輸送阻害が発症につながると提唱されている。しかし、転写阻害を起こす遺伝子、または、核からの輸送が阻害されている遺伝子の全貌は明らかとなっていない。本研究では、遺伝子診断された患者筋 5 例を用いて、DNA チップで発現解析した。

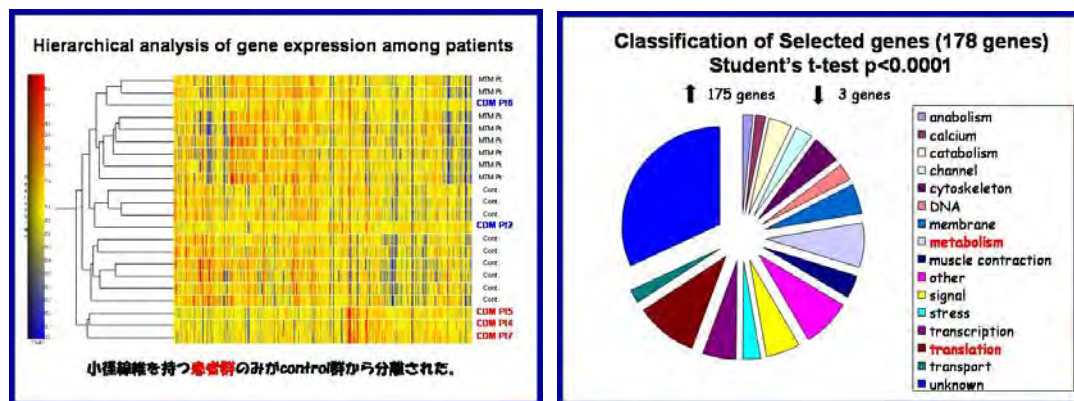
CDM 患者では DMPK の CTG リピートが 1400~2200 伸長していた。筋病理では、小径

な筋線維を示したが、CTG リピートの伸長が大きい患者でも、年齢が進むとコントロールと同様の筋線維径を示した（下図右）。



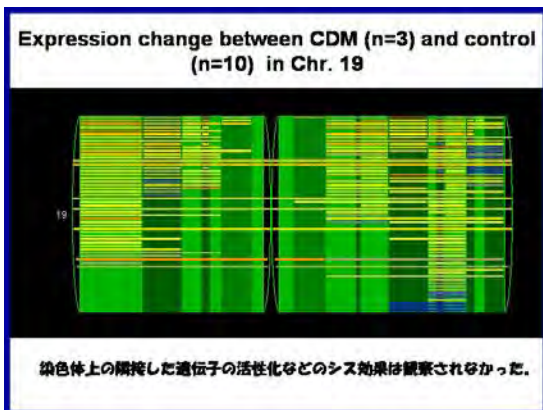
全遺伝子を用いた階層解析から、CDM 患者の遺伝子発現パターンは二つのグループに分別された。コントロールと同様の筋線維径を示す CDM 患者はコントロールや XLMTM を含むブランチに分類されたが、小径の筋線維を持つ CDM 患者は単独のグループを形成し、独特の遺伝子発現をしていることをうかがわせた(下図左)。つまり、CTG 伸長だけでなく、患者の年齢が、遺伝子発現変化と筋病理像の形成に関連していると考えられた。

次に、小径線維からなる CDM 筋とコントロール筋との間で差異を示す遺伝子を、ANOVA 解析 (Non-equal variant Student's t-test $p < 0.0001$) により選び出した。178 遺伝子が発現変化していた。発現が上昇した遺伝子の中には代謝関連遺伝子や翻訳に関連した遺伝子が多く含まれていた。



また、DMPK 遺伝子の 3'-UTR の CTG リピート伸長を原因とする DM1 では、DMPK 遺伝子の近傍に存在する遺伝子 (SIX5 など) の発現が減少していることが示されている。そこで、DMPK 遺伝子が位置する 19 染色体に存在する遺伝子の発現を調べた。下図に示すとおり、DMPK 遺伝子の近傍で、発現減少を示す遺伝子は見出せなかった。

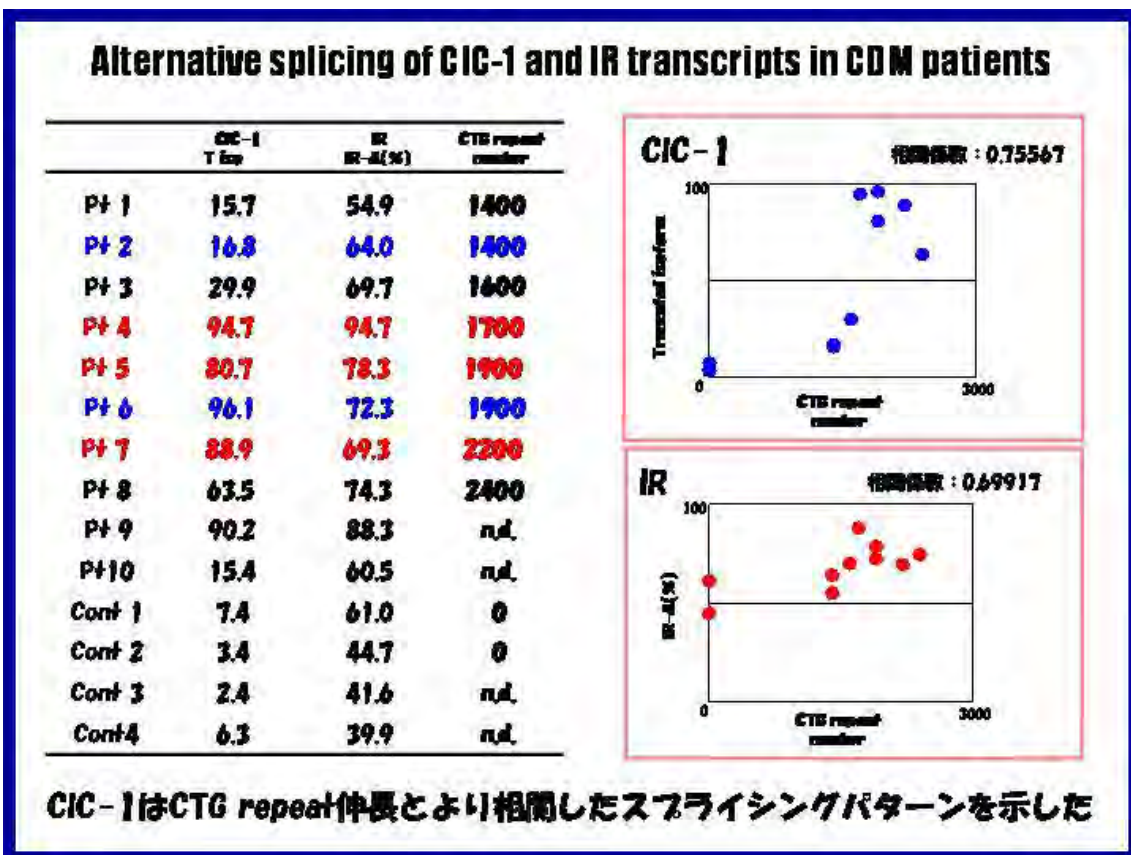
CDM における遺伝子発現変化をまとめると、筋原線維構成タンパク質遺伝子の発現低下、翻訳関連遺伝子、代謝関連遺伝子 (特に解糖系酵素遺伝子とグリコーゲン代謝遺伝子)、カルシウム結合性タンパク質遺伝子の発現上昇が見られた。また、RNA スプライシングにか



かわる LSM3, LSM4 snRNA-associated proteins などの遺伝子も発現が変化していた。

さらに、DM1 で報告されているスプライシング異常について、クロライドチャンネル遺伝子 (CLC-1)、インスリン受容体遺伝子 (IR) の選択的スプライシング異性体の出現率を調べた。その結果、CLC-1 Truncated isoform、IR A-isoform の割合はコントロールに比べ、

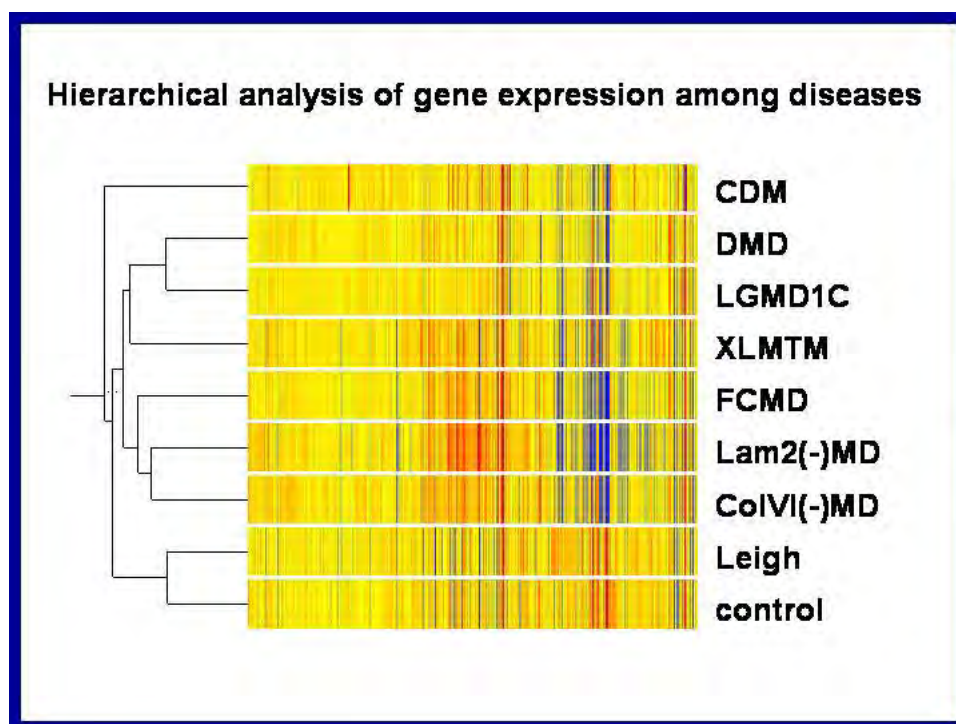
有意に増加していることが確認された。とくに、CLC-1 Truncated isoform は CTG リピートの伸長とよく相関していることがわかった。



e. 各種筋疾患間での遺伝子発現プロファイル

すべての遺伝子を用いて各種筋疾患間での遺伝子発現プロファイルを階層解析したコントロール筋と筋症状の弱い Leigh 脳症はひとつのブランチを形成し、進行性筋ジストロフィーである DMD と LGMD1C、先天性筋ジストロフィーである FCMD、Lam2(-)MD 及び CoIVI(-)MD はそれぞれ異なったブランチを構成している。また、独特の臨床症状・筋病理しめす先天性ミオパチーである XLMTM および CDM は、どのブランチにも属さない異なった発現プロファイルを示す。この結果は、臨床症状・筋病理の似た疾患は、近い発現プ

ロファイルを示すこと、これらを用いれば患者の診断にも利用可能であることを示している。しかしながら、上述の例にもあるように、すべての遺伝子の発現を用いた場合は、患者間での発現差違（個人差）を示す場合がある。そのため、すべての遺伝子プローブの中から、有用な情報を得るためのプローブを選び出す作業を進めていかなければならない。このためには、さらに、診断の確定している筋疾患の遺伝子プロファイルの解析と個人間遺伝子発現の統計的解析を進めていかなければならない。



(2) 研究成果の今後期待される効果

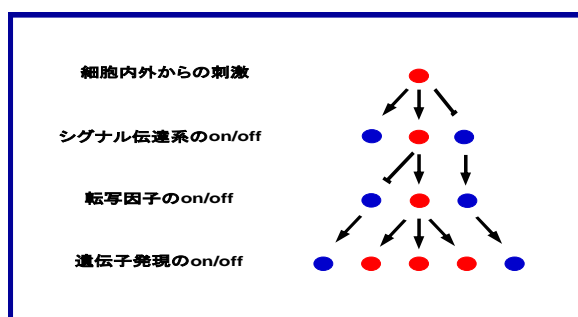
各種筋疾患の遺伝子発現プロファイルを決定していくことで、多くの疾患における代表的遺伝子発現変化がカタログ化されていくものと思われる。一方で、我々の開発した DNA チップは、一例ごとの違いを捉えることが出来るので、まさに、古典的な病理学がそうであるように、典型例の代表的所見と個々の例での **variation** とを遺伝子発現で明らかに出来るようになっていくことが期待される。

3. 5 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

(1) 研究内容及び成果

DNA チップ解析で得られるデータは膨大である。今まで述べてきたように、DNA チップで得られる個々の遺伝子の発現データは、患者筋細胞で起こっている様々な現象を説明しうる可能性がある。ところが、どうしてそのような遺伝子群の発現変化を示すのかについては情報を与えない。遺伝子発現変化から、それを制御しているメカニズムへ、そして最

も上流に存在するであろう、一連の遺伝子変化の原因となる事象へとアプローチする方法論が整備されれば、現在、全くわかっていない遺伝子異常と病態とをつなぐことが可能となる。しかしながら、そのようなボトムアップの方法論は確立されておらず、個々の遺伝子の転写制御機構のデータは集積されていない。



現在の考え方では、遺伝子発現は転写因子によりコントロールされており、さらに、転写因子の活性化はさらに上流のシグナル伝達系によって制御されている。このようなシグナル伝達系をふくむ上流の遺伝子発現調節メカニズムを把握しない限り、

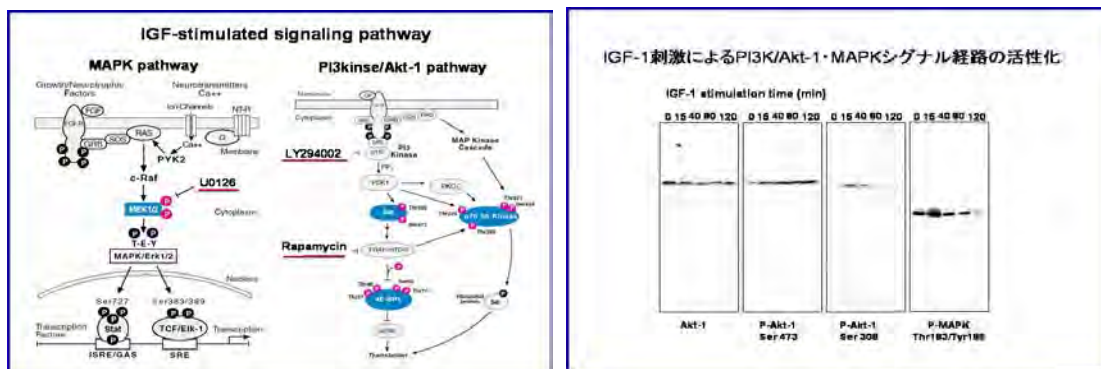
疾患筋がしめす遺伝子発現変化の意味を捉えることは本質的に困難である。

我々は、モデル系として培養細胞にある刺激を与え、シグナル伝達経路を活性化させ、それに伴う遺伝子発現変化を解析することで、つまり、トップダウンの方法を用いて、疾患筋での遺伝子発現データの理解を可能にする情報を与えられないかと考えた。

筋組織での外部刺激、シグナル経路依存的な遺伝子発現変化を解析することを目的として、モデル系として培養骨格筋細胞を用いて、IGF-1 シグナル系とマイオスタチンシグナル系に注目し、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。

a. ヒト骨格筋筋管細胞での IGF-1 シグナル伝達経路で活性化される遺伝子の同定

十分に分化させた正常ヒト骨格筋筋管細胞に対して IGF-1 刺激し、さらに下流分子への阻害剤処理を組み合わせることで、シグナル経路特異的な遺伝子発現変化を捉えることを試みた。これまでの報告から、IGF-1 は、PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 経路と MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路を活性化することが示されている。我々は、ヒト骨格筋分化細胞に対して、50 ng/ml の IGF-1 を投与した。PI3K、MAPK 経路とも 15 分をピークとして、それぞれ、Akt-1、ERK1 の一過性のリン酸化が観察され、筋管細胞でもこれらのシグナル経路が作用しうることがわかった。次に、シグナル分子特異的な阻害剤とともに投与し、PI3K および MAPK 経路のみを選択的に活性化できることを確認した。

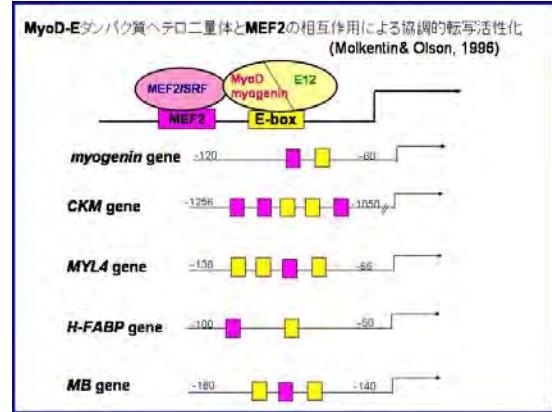
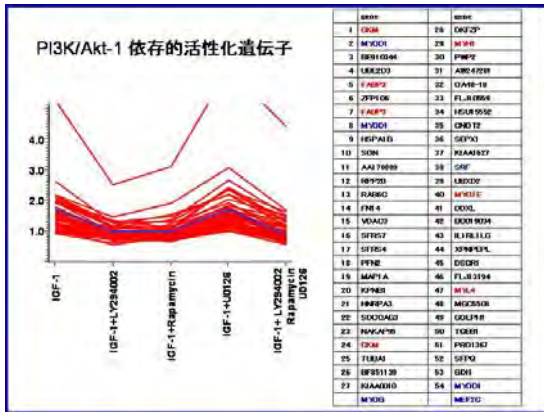


この系を用いて、IGF-1 投与及び阻害剤との共投与 1～3 時間後に、細胞から RNA を調製し DNA チップで解析した。データ解析のために、シグナル経路依存的な発現遺伝子を同定するために、次のような検索を行った。

①IGF-1 シグナルを入れたサンプルで発現上昇がみられる。②経路内のシグナル分子の阻害剤処理により発現上昇が抑制される。③他の経路の阻害剤処理では抑制されない。これら 3 つのことを満たす発現プロファイルを示す遺伝子群を網羅的に検索する。

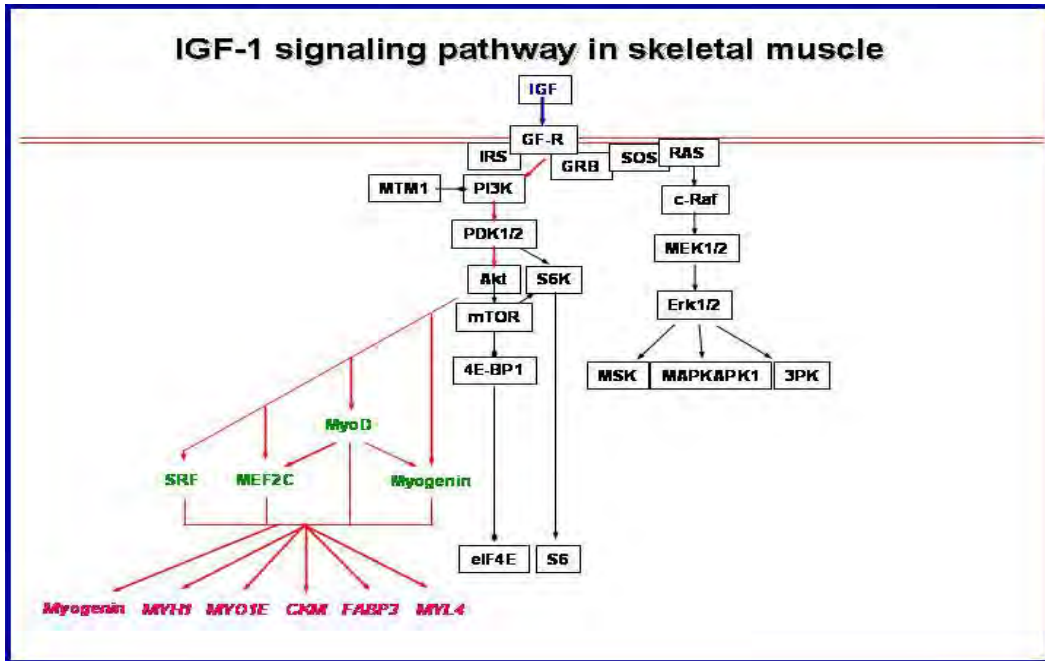
検索すべき遺伝子群の発現パターンを規定した。PI3K シグナル依存的に発現が上昇する遺伝子候補は、IGF 処理、MAPK 阻害剤 U0126 で 2 倍に発現上昇し、PI3K 阻害剤である LY294002 または mTOR 阻害剤 rapamycin で発現が変化しないと仮定した。このパターンと最も近いパターンを示す遺伝子群を、相関係数を指標に拾い出した。この方法では、しきい値を用いていないため、僅かな発現変化しか示さない遺伝子群の検索も可能であった。また、MAPK 依存的に発現が上昇する遺伝子候補の検索も同様の手法で行った。

その結果、PI3K-Akt1 経路依存的に発現が上昇する遺伝子群の上位には左下図に青字で示した筋特異的転写因子遺伝子群と赤字で示したその応答遺伝子である筋特異的構造遺伝子群が存在した。しかも、興味深いことに、これらの応答遺伝子群のプロモーターには、発現に必須である 2 つのエレメント、MEF2 ボックスと E ボックスが並んで配置されているという共通の構造を持つことがわかった。Olson らのモデルによると、骨格筋特異的発現遺伝子群の発現制御において、これら二つのエレメントにはそれぞれ、MADS 型転写因子 (MEF2 など) と b-HLH 型転写因子複合体 (MyoD、myogenin など) が結合し、さらに両方の転写因子が相互作用することで、標的遺伝子の転写を上昇させると言われている。我々の実験では、これらの転写因子遺伝子も PI3K 経路依存的に発現するグループに含まれていた。



また、このグループに含まれる他の遺伝子も、培養骨格筋分化の遺伝子変化でクラスター6、7、8に分類され、筋分化依存的に発現上昇を示すことから、このようなプロモーター構造を有している可能性が考えられた。現在プロモーター構造の解析とその制御エレメントの同定を進めている。

一方、MAPK 経路に依存的な遺伝子群も同様の手法を用いて同定することが出来た。この遺伝子群には、リン酸化酵素などシグナル分子をコードする遺伝子が多数含まれていた。これは、MAPK 経路の活性化の結果、フィードバック機構が働いたためであると考えられた。現在、遺伝子発現機構の詳細を解析している。下に、今回の解析の結果をまとめる。

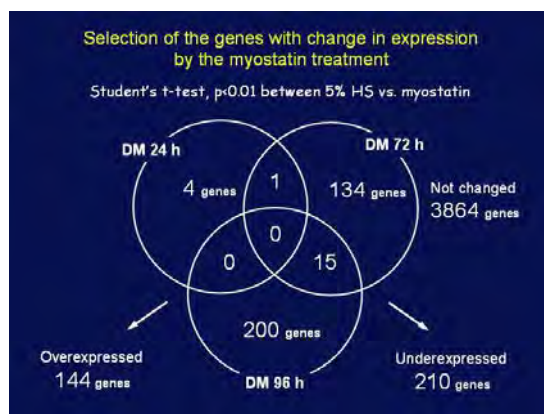
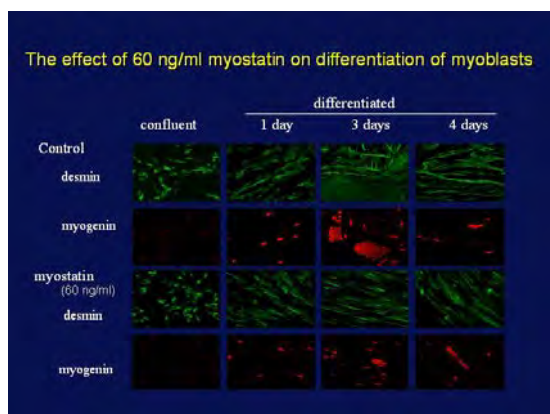


b. ヒト骨格筋細胞分化におけるマイオスタチンの役割とその応答遺伝子群の同定

マイオスタチンは、アクチビンなどと同様に TGF-β に属する成長因子タンパク質である。ウシ、マウスなどで遺伝子変異が報告されたが、これらの変異動物はいわゆる“double-muscle phenotype”と呼ばれる筋量が2倍以上増加した特徴的な表現系を示し、マイオスタチンが筋肉量を制御している因子であると考えられるにいたっている。しかしなが

ら、マイオスタチン変異動物の骨格筋増大が、筋肥大によるのか筋過形成によるのかは議論の域を出ていない。一方、*in vitro* の細胞での解析ではマイオスタチンは、筋細胞の増殖を抑えて筋管形成を阻害するとされており、筋分化後の作用についてはあまり解析されていなかった。

我々は、低濃度のマイオスタチンが筋細胞の増殖には影響しないが筋管形成を特異的に阻害できることを発見した（下図左、myogenin: 筋分化マーカー）。この筋細胞分化阻害系を用いて、経時的に遺伝子発現解析を行うことで、マイオスタチンの筋分化への効果を調べた。細胞周期関連タンパク質や筋分化特異的な転写因子の発現解析では、細胞周期関連タンパク質の発現変化はさほど観察されなかったが、CDK インヒビターp21、MyoD、myogenin 及び MEF2C など、筋分化を強く誘導する遺伝子群の発現が強く阻害されていることが観察された。これらの結果はタンパク質レベルでも確認された。マイオスタチンによって影響を受ける遺伝子の網羅的解析では、筋分化後期ほど、発現変化を示す遺伝子が多くなる傾向があった。発現が、増強する遺伝子よりも、抑制される遺伝子群がより多く含まれていた(下図右)。また、変化を示した遺伝子の筋分化でのクラスター分類では、多くがクラスター6、7、8に含まれており、MyoD、myogenin 及び MEF2C などによって制御される筋構造タンパク質遺伝子や、運動・筋の機能に関連したタンパク質遺伝子などであった。



(2) 研究成果の今後期待される効果

今まで述べてきたように、遺伝性筋疾患の遺伝子異常から、疾患筋で観察される病態形成へとつながる発症機序は全くわかっていない。疾患筋で観察される個々の遺伝子の発現変化を引き起こしている、最も上流に存在するシグナル伝達活性化を引き起こす原因となる事象の同定によって、発症機序が理解されることが期待される。しかし、その原因の同定は、現在の方法論では不可能であり、我々の行なったような地道な解析手法によってデータを蓄積していくことが、最も近道である。遺伝子発現はその制御メカニズムとペアで理解してこそ意味があるのである。このような意味で、これら一連の研究結果は遺伝性筋疾患の分子病態の把握に欠くことの出来ない情報を与えるはずである。現在すでに、ヒトゲノムの遺伝子情報がすべて明らかにされ、その遺伝情報が如何に使われるのか、に関心

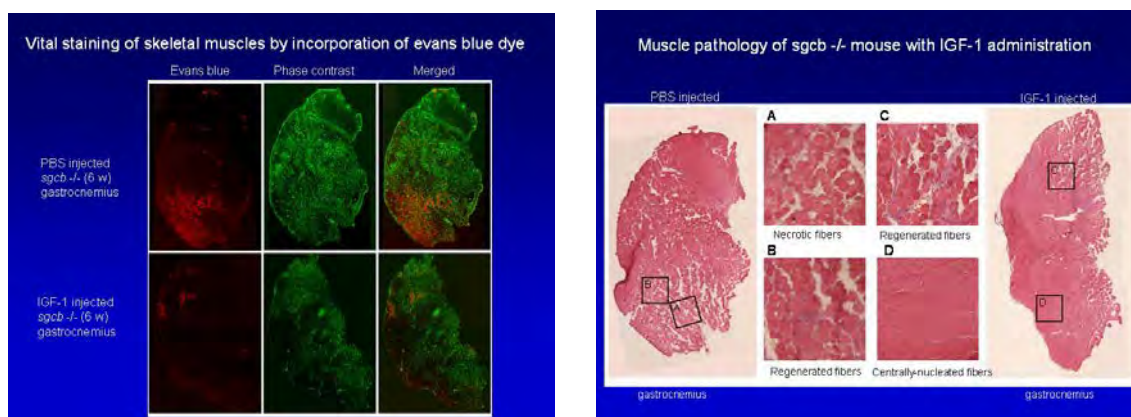
が移っている。遺伝子発現情報は、その制御機構をも含めた、動的情報でなければ意味がない。我々の研究は、基礎研究にはもちろん、加齢や糖尿病など筋組織が関係する様々な問題でも重要な情報を提供するはずである。

3. 6 筋疾患治療法開発のための、治療効果評価ツールとしての DNA チップの利用

(1) 研究内容及び成果

近年、遺伝性筋疾患の治療法開発をめざし、筋ジストロフィーモデルマウスへの薬物治療実験が試みられ、成果が報告されている。しかし、投与薬物の標的細胞・標的シグナル経路は示されておらず、作用メカニズムは不明である。最も代表的かつ有望視されているものは、成長因子 IGF-1 の投与とマイオスタチンの遮断薬の投与である。本実験では、投与効果の報告がある IGF-1 を、筋ジストロフィーモデルのひとつであるサルコグリカノパチーモデルマウス (*sgcb*^{-/-}) へ投与した。投与方法として2種類の方法を用いた。

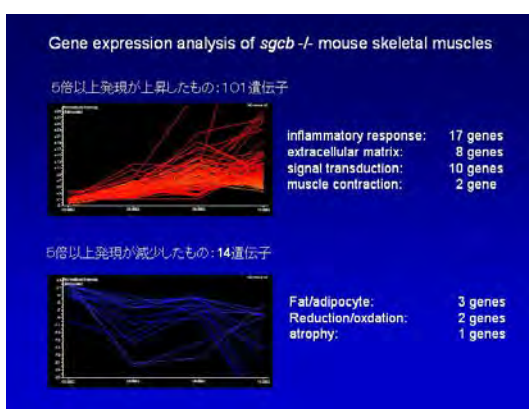
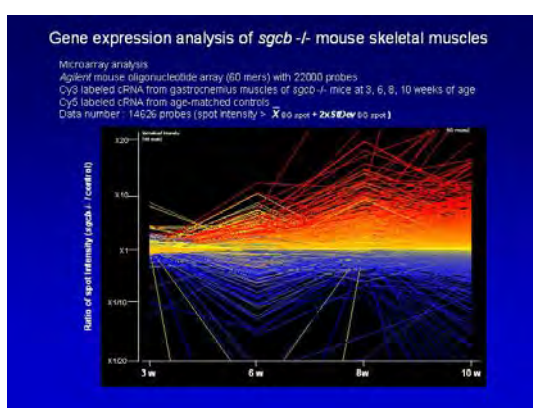
- ① 皮下注射による投与-5週令の *sgcb*^{-/-} に、ヒト IGF-1 組み換えタンパク質を 2.5mg ずつ、12 時間おきに計 7 日間投与した。コントロールとして、同容量の PBS を同腹マウスに投与した。6 日目にエバンスブルーを皮下投与し、壊死筋線維を染色した。
- ② 浸透圧ポンプによる投与-浸透圧ポンプを用いて 3 週令の *sgcb*^{-/-} に、ヒト IGF-1 組み換えタンパク質を 1 日 5mg、計 28 日間持続投与した。コントロールとして、同容量の PBS を同腹マウスに投与した。27 日目にエバンスブルーを皮下投与し、壊死筋線維を染色した。



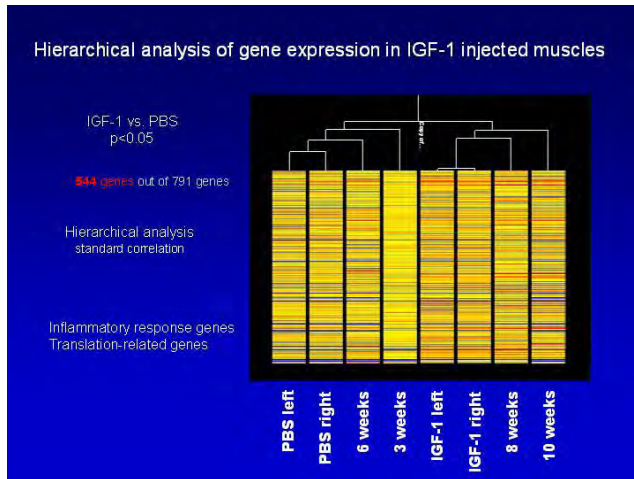
筋ジストロフィーモデルマウス *sgcb*^{-/-} は、生下時に異常はないが、3 週令から進行性の筋ジストロフィー症状を示す。6~8 週令をピークとして、筋線維は壊死・再生を繰り返す。この繰り返しによって、筋線維は次第に小径化していくとともに、数を増やす。20 週令以上のマウスでは、再生が鈍り、結合組織の増殖、脂肪置換が観察される。このようなマウスの筋ジストロフィー発症期~初期に IGF-1 投与を行なった。どちらの投与方法においても、血中で投与 IGF-1 濃度が上昇していることを確認した。さらに、体重、ぶら下がりテストにおいて、コントロールとの間に際立った差異は見出せなかった。しかしながら、上左図

(皮下投与マウス腓腹筋) に示したように、エバンスブルーで濃染される壊死線維数には明らかな違いが見出された。どちらの方法によっても、IGF-1 投与によって壊死線維数は約10%程度に減少した。この壊死線維数の減少が筋壊死抑制によるのか、筋再生促進によるのかを、筋病理観察で調べた。IGF-1 投与マウスは中心核をもつ再生線維を多く含んでおり、IGF-1 は筋ジストロフィーマウスに対して、筋再生をより促進することで、ジストロフィー症状を軽減させているのではないかと考えられた。

そこで、実際に IGF-1 投与によっていかなる変化が筋組織で起こっているのかを、DNA チップにより遺伝子発現解析した。DNA チップは Agilent 社製 mouse oligonucleotide microarray (22,000 プローブ) を用いた。まず、はじめに、sgcb^{-/-}での進行性筋ジストロフィー症状に伴う遺伝子変化を 3、6、8 及び 10 週令マウス腓腹筋で調べた。

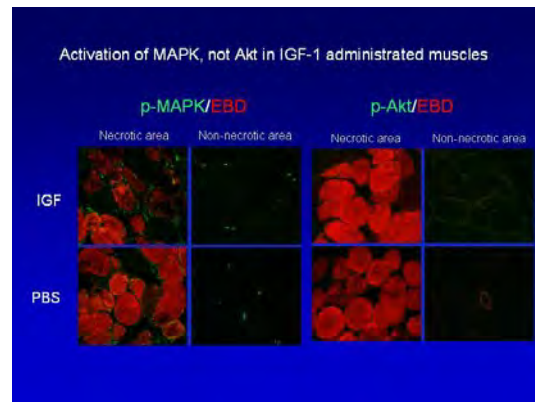
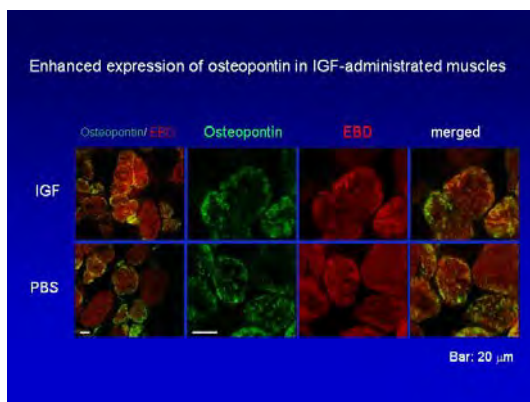


その結果、症状の進行度に応じて、たくさんの遺伝子が発現変化していくことが観察された。変化を示した遺伝子群として、炎症関連遺伝子、発生期筋構造タンパク質遺伝子、細胞外マトリックスタンパク質遺伝子が発現増加を示し、一方、代謝関連遺伝子、筋構造タンパク質遺伝子は弱いながら発現が減少した。以上の所見はヒトデュシェンヌ型筋ジストロフィーで観察された遺伝子発現プロファイルに近いものであった。5 週令から①の方法で IGF-1 投与したマウス (6 週令) 及びそのコントロールマウスの腓腹筋から RNA を抽出し、発現解析を行った。IGF-1 投与による遺伝子変化は、筋ジストロフィーにより引き起こされる遺伝子変化よりも小さいものであった。また、ANOVA テストによって、発現変化を示す遺伝子を選択した。Equal variant Student's t-test ($p < 0.05$) で、約 800 遺伝子が選択された。これらの遺伝子では、炎症関連遺伝子群、翻訳関連遺伝子などが発現増加し、筋収縮関連遺伝子群は発現が減少していた。これらの結果は、IGF-1 の筋細胞でのデータとして示された PI3K 経路の活性化による筋収縮関連遺伝子群の発現上昇とはあわないものであり、PI3K 以外のシグナル経路の活性化が考えられた。次に、変化を示した遺伝子群の変化がどの時期の *sgcb*^{-/-}マウスに近いものであるのかを、階層解析した。



その結果、6週 *sgcb*^{-/-}マウスで、IGF-1 投与により引き起こされた遺伝子発現変化は、より後期の *sgcb*^{-/-}マウス（8、10 週令）により近いものであった。このことは、IGF-1 投与により筋再生が促進されていること、より後期のマウスでは筋壊死よりも筋再生が盛んであることを反映しているものと考えられた。

それでは、いったいどの細胞が IGF-1 の標的となり、このような遺伝子変化を引き起こしたのであろうか。これを解析するため、最も発現量に変化したオステオポンチンと IGF-1 により活性化されることが予測されるリン酸化 MAPK とリン酸化 Akt-1 の筋組織内での局在と存在量の変化を調べた。オステオポンチンはエバンスブルーを取り込んでいた壊死線維内をドット状に染色した。若干ながら IGF-1 投与マウスで発現が上昇していることが確認された（下図左）。以前の報告ではオステオポンチンは壊死線維またはその周りに浸潤してきたマクロファージにより分泌されていることが報告されている。我々の結果はそれを支持するものであり、IGF-1 投与により浸潤細胞の増加が引き起こされた結果であるかもしれない。また、リン酸化 MAPK と Akt-1 の染色結果は、MAPK のみが壊死細胞の周りで、より強く染色された。それ以外の組織では MAPK、Akt-1 ともに活性化されていなかった（下図右）。



IGF-1 の反復投与により MAPK、Akt-1 が活性化されにくくなっている可能性は残るが、我々の染色結果は、このマウスの筋組織における IGF-1 の標的経路は MAPK 経路であることを示した。さらに、標的細胞は分化した筋線維ではなく、浸潤細胞または増殖筋衛星細胞ではないかと考えられた。これらの結果は DNA チップで観察された結果と矛盾しない。また、今回のマウス個体への IGF-1 投与では、ヒト骨格筋培養細胞(myotube)への IGF-1 投与において観察された筋特異的転写因子を介した筋構造遺伝子の発現上昇は確認出来な

った。筋ジストロフィー動物個体では、壊死線維近傍でMAPKカスケードの活性化により、サイトカイン産生や翻訳関連遺伝子の活性化が起こっていると考えられた。このことは、作用させる時期や組織によりIGF-1の標的細胞や標的経路が異なることを示唆している。

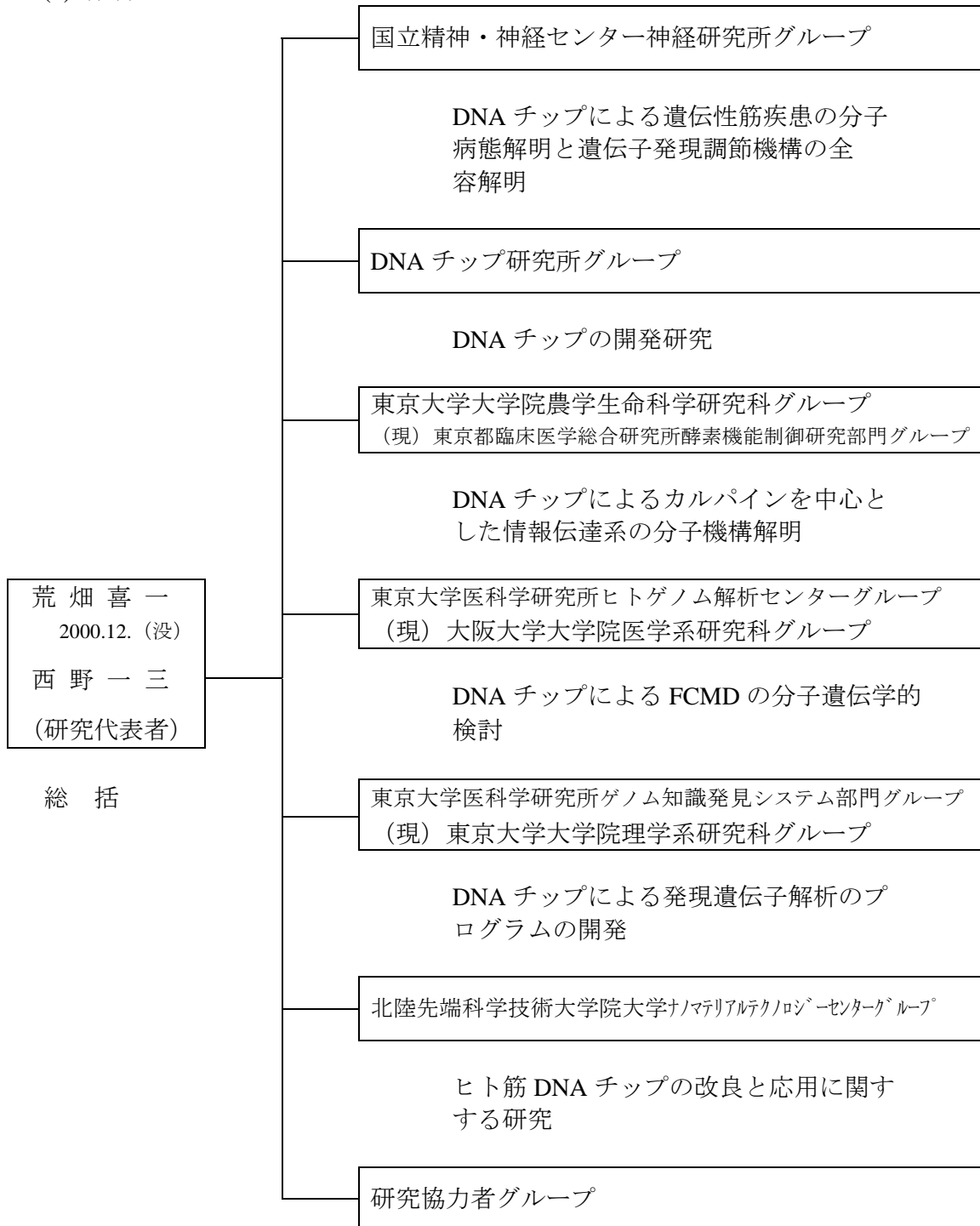
今後は、標的細胞および標的シグナル経路をはっきりと同定し、IGF-1投与効果のメカニズムを探るとともに、他の薬剤との効果の相違を解析していくことが望まれる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

筋ジストロフィーマウス個体への成長因子IGF-1投与では、骨格筋細胞系で行なった結果から予想されない結果であった。これは、マウスでは筋細胞以外の細胞の存在とそれらの細胞の筋再生過程への寄与が大きいためである。このような結果は、我々の行っている純化した細胞系での解析と応用したマウス個体での解析によって初めて示されるものであり、今後もこのように研究を進めていく必要があると考えられる。また、IGF-1投与の筋ジストロフィーへの効果は筋再生の促進であり、標的は壊死線維周囲の増殖細胞のMAPK経路であろうと推定された。この結果は、これらの細胞のMAPK経路を活性化出来れば、筋ジストロフィー症状の改善が期待できることを示しており、創薬の標的として、これらの経路をねらった、より副作用の少ない薬剤の開発が期待される。

4. 研究実施体制

(1) 体制



Michael R. Aleherr 助教授
Sara T. Einokur 助教授
Rune R. Frants 教授

(2)メンバー表

国立精神・神経センター神経研究所グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
荒畑 喜一	疾病研究第一部	部長	研究総括	H.11.11.～H.12.12.
西野 一三	〃	部長	研究総括	H.13. 8.～H.17.3.
林 由起子	〃	室長	筋ジストロフィー分子病態の解明	H.11.11.～H.17.3.
野口 悟	〃	室長	DNAチップの応用技術開発	H.12. 4.～H.17.3.
後藤加奈子	〃	センター研究員	DNA分離・遺伝子診断	H.11.11.～H.17.3.
平瀬 正樹	〃	〃	PCR 化プローブ作製	H.11.11.～H.12.3.
田川 一彦	〃	〃	筋発現遺伝子研究	H.11.11.～H.14.3.
松村 剛	〃	〃	筋発現遺伝子研究	H.11.11.～H.12.6.
山中 岳	〃	〃	筋発現遺伝子研究	H.11.11.～H.13.3.
呉 林	〃	〃	RNA 定量解析	H.11.11.～H.12.3.
古城 徹	〃	〃	臨床表現型解	H.11.11.～H.14.3.
柴田 ゆり	〃	センター研究員	DNA シークエンス解析	H.11.11.～H.13.3.
佐藤絵里子	〃	〃	チップのハイブリダイゼーション	H.11.11.～H.12.3.
永野 敦	〃	研究生	SSCP 解析・遺伝子診断	H.11.11.～H.13.3.
川邊 清一	〃	流動研究員	筋発現遺伝子研究	H.13.4.～H.14.3.
米山 祥平	〃	センター研究員	DNA シークエンス解析	H.13.4.～H.15.3.
アデル・トリス	〃	流動研究員	肢帯型ジストロフィーの病態研究	H.13.4.～H.15.3.
越阪部勝江	〃	研究事務員	チーム事務	H.13.4.～H.16.3.
杉江 和馬	〃	流動研究員	分子病理の確立と応用	H.14.4.～H.16.3.
石川 晴美	〃	〃	分子病理の確立と応用	H.14.4.～H.15.3.
金 大成	〃	〃	FSH 型筋ジストロフィーの病態研究	H.14.4.～H.15.3.
松本 浩	〃	研究員	先天性筋ジストロフィーの病態研究	H.14.4.～H.17.3.
蔡 宗璋	〃	流動研究員	代謝性筋疾患の病態研究	H.15.4.～H.16.3.
小澤 律子	〃	研究生	先天性ミハチの病態研究	H.15.4.～H.17.3.
田中 幹人	〃	流動研究員	筋疾患の細胞生物学的研究	H.16.4.～H.17.3.
T. Liewluck	〃	〃	先天性ミハチの病態研究	H.16.4.～H.17.3.
荒畑 創	〃	研究生	筋強直性ジストロフィーの病態研究	H.16.4.～H.17.3.
光村 征子	〃	CREST 研究補助員	チーム事務及び研究補助	H.11.11.～H.17.3.
小川 恵	〃	CREST 技術員	RNA 分離・精製、アレイ作製	H.11.11.～H.17.3.
藤田 雅子	〃	CREST 研究補助員	DNA チップによる遺伝子発現データ集積	H.12.4.～H.17.3.

黒川 留美	〃	CREST 研究補助員	DNA チップによる遺伝子発現データ集積	H.12.4.~H.17.3.
計良 陽子	〃	〃	遺伝子発現解析と細胞生物学的解析	H.12.4.~H.17.3.
西山 章代	〃	〃	cDNA クローンの調整	H.12.4.~H.13.3.
川原 玄理	〃	CREST 研究員	筋疾患のプロテオーム解析	H.15.4.~H.17.3.

東京都臨床医学総合研究所グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
反町 洋之	酵素機能制御研究部門	室長	cDNA クローン樹立と hTRA-3 の解析	H.11.11.~H.17.3.
小野 弥子	東京大学分子細胞生物学研究所	CREST 研究員	p94 の構造機能相関解析	H.11.11.~H.16.3.
秦 勝志	〃	大学院後期課程 学生	nCL-2,-2',-4 の生理機能解析	H.11.11.~H.16.3.
柿沼 良美	〃	CREST 研究補助員	分子生物学的研究	H.12.5.~H.13.12.

大阪大学大学院医学系研究科

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
戸田 達史	ゲノム機能分野	教授	cDNA クローン樹立と FCMD 遺伝子発現の病態解明	H.11.11.~H.17.3.
小林 千浩	〃	助手	FCMD の DNA チップによる発現遺伝子と蛋白生化学	H.11.11.~H.17.3.
倉橋 浩樹	〃	助手	FCMD の DNA チップによる遺伝子発現とマウスの解析	H.14.4.~H.17.3.
佐々木 淳子	〃	客員研究員	脳におけるフクチンの研究	H.11.11.~H.17.3.
王 凡	〃	教務補佐員	福山型筋ジストロフィーマウスの作成と解析	H.14.4.~H.17.3.
鹿野 博亀	〃	大学院後期博士課程	フクチン遺伝子発現と蛋白生化学	H.14.4.~H.16.3.
藤掛 伸宏	〃	〃	福山型筋ジストロフィーマウスの作成と解析	H.14.4.~H.16.3.
谷口真理子	〃	〃	FCMD の DNA チップによる遺伝子発現	H.14.4.~H.16.3.
武田 聖	大塚製薬 大塚 GEN 研究所	室長	福山型筋ジストロフィーマウスの作成と解析	H.14.4.~H.16.3.
立川 雅司	ゲノム機能分野	CREST 技術員	フクチン遺伝子発現と蛋白生化学	H.11.12.~H.15.3.

東京大学大学院理学系研究科

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
森下 真一	新領域創成科学研究科	助教授	発現遺伝子データのプロファイリング分析可能なソフトウェア開発担当	H.11.11.~H.17.3.
瀬々 潤	〃	東京大学大学院・後期修士課程	ソフトウェア開発補助と情報分析	H.11.12.~H.16.3.
二階堂 仁	〃	〃	ソフトウェア開発補助と情報分析	H.12.4.~H.16.3.
小笠原 準	〃	東京大学大学院・前期修士課程	データベース構築と遺伝子発現解析	H.13.4.~H.16.3.
本蔵 俊彦	〃	〃	データベース構築と遺伝子発現解析	H.13.4.~H.16.3.
山田 智之	〃	〃	データベース構築と遺伝子発現解析	H.13.4.~H.16.3.

DNA チップ研究所グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
辻本 敦美	DNAチップ研究所	シニアサイエンティスト	DNA チップの作製（条件の検討およびスポットティング）	H.11.11.~H.17.3.
松原 謙一	〃	所長	研究アドバイザー	H.11.11.~H.17.3.

北陸先端科学技術大学院大学グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
塚原 俊文	ナノマテリアルテクノロジーセンター	教授	ヒト筋DNAチップの改良と応用	H.11.11.~H.17.3.
伏見 和郎	〃	CREST 研究員	cDNA マイクロアレーの利用法の検索	H.13.4.~H.16.10.

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

なし

(2) 招聘した研究者等

なし

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表 (国内 21 件、海外 58 件)

国内

1. 荒畑喜一：ミトコンドリア脳筋症(MEM). 総合臨牀 49: 653-654, 2000.
2. 荒畑喜一：周期性四肢麻痺. 臨床医 増刊号 26: 835-836, 2000.
3. 林 由起子, 荒畑喜一：筋ジストロフィー. Year note 2001: 1473-1481, 2000.
4. 反町洋之, 小野弥子, 鈴木紘一：肢帯型筋ジストロフィー. 神経研究の進歩 44: 189-203, 2000.
5. 反町洋之：カルパインおよびそのホモグロの構造と機能. 生化学 72: 1297-1315, 2000.
6. 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.
7. 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.
8. 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 31-34, 2001.
9. 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 35-37, 2001.
10. 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 38, 2001.
11. 林 由起子：メロシン欠損症. 日本臨牀 別冊 103-106, 2001.
12. 林 由起子：Walker-Warburg 症候群(WWS). 日本臨牀 別冊 107-108, 2001.
13. 林 由起子：Santavuori 病(muscle-eye-brain disease). 日本臨牀 別冊 109-110, 2001.
14. 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 111-113, 2001.

15. 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.
16. 西野一三： 精神遅滯を伴う筋変性疾患ダノン病の解明. Vita 19：42-45, 2002.
17. 西野一三,平野道雄： MNGIEーチミジンホスホリラーゼ欠損症. 日本臨牀 60: 349-352, 2002.
18. 松本 浩,西野一三： 複合体V欠損症. 日本臨牀 60: 495-498, 2002.
19. 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.
20. 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.
21. 川原玄理, 野口 悟, 西野一三： 筋肉組織での遺伝子発現. Clinical Neuroscience 134-135, 2004

海 外

1. Tsukahara T, Tsujino S, Ogawa M, Nishiyama A, Fujita M, Kurokawa R, Hayashi YK, Arahata K: Differential gene expression analysis in Emery-Dreifuss muscular dystrophy using cDNA microarrays. *Am J Hum Genet* 67: 2227, 2000.
2. Winokur ST, Masny PS, Maarel SV, Figlewicz DA, Arahata K, Flanigan K: Expression profiling of 4q35/10q26 transcripts in FSHD using cDNA microarrays. *Am J Hum Genet* 67: 2228, 2000.
3. 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.
4. 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.
5. 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 2A. *Hum Mol Genet* 9: 1393-1402, 2000.
6. 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.
7. 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.
8. Arahata K: Muscular dystrophy. *Neuropathology* 20: S34-S41, 2000.
9. Nagano A, Arahata K: Nuclear envelope proteins and associated diseases. *Curr Opin Neuroly* 13: 533-539, 2000.

10. Toda T, Kobayashi K, Nonaka I: Congenital muscular dystrophies with special reference to the Fukuyama type. *NeuroScience News* 3: 39-45, 2000.
11. Toda T, Kobayashi K, Iida EK, Sasaki J, Nakamura Y: The Fukuyama congenital muscular dystrophy story. *Neuromuscul Disord* 10: 153-159, 2000.
12. Jong YJ, Kobayashi K, Toda T, Kondo EI, Huang SC, Shen YZ, Nonaka I, Fukuyama Y: Genetic heterogeneity in three children with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 10: 108-112, 2000.
13. Saito K, Osawa M, Wang ZP, Ikeya K, Fukuyama Y, Kondo EI, Toda T, Ohashi H, Kurosawa K, Wakai S, Kaneo K: Haplotype-phenotype correlation in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 92: 184-190, 2000.
14. Sorimachi H, Ono Y, Suzuki K: Molecular analysis of p94 and its application to diagnosis of limb girdle muscular dystrophy type 2A. *Methods Molecular Biology* 144: 75-84, 2000.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Yamanaka G, Goto K, Matsumura T, Funakoshi M, Komori T, Hayashi YK, Arahata K: Tongue atrophy in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* 57: 733-735, 2001.
24. Hirano M, Marti R, Ferreiro-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.

25. Hayashi YK, Ogawa M, Arahata K: Altered expression of α -dystroglycan in congenital muscular dystrophies. *Acta Myologica* 20: 87-91, 2001.
26. 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.
27. 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.
28. Nishino I, Yamamoto A, Sugie K, Hirano M, Nonaka I: Danon disease and related disorders. *Acta Myologica* 20: 120-124, 2001.
29. Sese J, Nikaidou H, Kawamoto S, Minesaki Y, Morishita S, Okubo K: BodyMap incorporated PCR-based expression profiling data a gene ranking system. *Nucleic Acids Res* 29: 156-158, 2001.
30. Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, Sekiguchi S, Shiga Y, Takahashi T, Onodera Y, Haginoya K, Kobayashi K, Inuma 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, Sekiguchi S, Shiga Y, Takahashi T, Onodera Y, Haginoya K, Kobayashi K, Inuma 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
 40. 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.
 41. Nishino I, Ozawa E: Muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 15: 539-544, 2002.
 42. Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I: Ullrich disease: Collagen IV deficiency: EM suggests a new basis for muscular weakness. *Neurology* 59: 920-923, 2002.
 43. 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.
 44. 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.
 45. Nishino I: Autophagic Vacuolar Myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3: 64-69, 2003.
 46. Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Many H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, Coster RV, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, Nishino 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.
 47. 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.
 48. 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.
 49. 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.
 50. 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.
 51. 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.

52. Nambu M, Kawabe K, Fukuda T, Okuno TB, Ohta S, Nonaka I, Sugie H, Nishino I: A neonatal form of glycogen storage disease type IV. *Neurology* 1: 392-394, 2003.
53. Hayashi YK: Membrane-repair machinery and muscular dystrophy. *Lancet* 362: 843-844, 2003.
54. Ishikawa H, Nonaka I, Nishino I: Negative result in search for human alpha-dystrobrevin deficiency. *Muscle Nerve* 387-388, 2003.
55. 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.
56. 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 IV in the sarcolemma. *Neurology* 62: 620-623, 2004.
57. 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.
58. Matsumoto H, Noguchi S, Sugie K, Ogawa M, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I: Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells. *J Biochem* 135, 709-712, 2004.

(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演 (国内 21件、海外 32件)

国内

1. 林 由起子, 松村 剛, 南 成祐, 埜中征哉, 荒畑喜一: 肢帯型筋ジストロフィーにおける dysferlin の免疫組織化学的検討. 第41回日本神経学会総会 松本, 5.24, 2000.
2. 塚原俊文, 荒畑喜一: ヒト cDNA microarray を用いた筋疾患の分子病理学的解析. 第2回先端技術セミナー 東京, 6.14, 2000.
3. 田川一彦, 多屋長治, 林 由起子, 脊山洋右, 米川博通, 反町洋之, 鈴木絃一, 荒畑喜一: 骨格筋特異性的カルパインである P94 の不活性変異性を発現するトランスジェニックマウスの筋疾患的な表現型. 第73回日本生化学会大会 横浜, 10.12, 2000.
4. 二井勇人, 横田一成, 前田達哉, 反町洋之, 鈴木絃一. 出芽酵母の新規塩ストレ応答経路の解析: Cpl1pとカルシニューリンによるRim101p活性化機構. 第73回日本生化学会大会 横浜, 10.12, 2000.
5. 中川和博, 秦 勝志, 阿部啓子, 反町洋之, Stefan Strobl, Wolfran Bode, 益本 創, 前田達哉, 鈴木絃一: カルパインの自己消化によって起こる構造変化と、その生理的意味の立体構造的見地からの考察. 第73回日本生化学会大会 横浜, 10.12, 2000.
6. 秦 勝志, 阿部啓子, 反町洋之, 川原裕之, 前田達哉, 鈴木絃一: 胃特異的カルパイン (nCL-2,-2')の生化学的解析. 第73回日本生化学会大会 横浜, 10.12, 2000.
7. 反町洋之: カルパイン及びそのホモログの構造・機能解析. 第73回日本生化学会大会 横

浜, 10.12, 2000.

8. 反町洋之, 小野弥子, 秦 勝志, 木村映一, 中川和博, 勝井順子, 阿部啓子, 柿沼良美, 益本 創, 入江章太, 荒畑喜一, 鈴木紘一: カルパインの構造機能相関解析から筋ジストロフィーの分子機構解明へ. 第 73 回日本生化学会大会 横浜, 10.12, 2000.
9. 反町洋之, 小野弥子, 秦 勝志, 木村映一, 中川和博, 勝井順子, 阿部啓子, 柿沼良美, 前田達哉, 鈴木紘一: 筋ジストロフィー症の分子機構におけるシグナル伝達とカルパイン. 第 23 回日本分子生物学会年会 神戸, 12.13, 2000.
10. 反町洋之: カルパイン研究—最近の進歩. 「蛋白質分解: 拡大するバイオロジーと病態」東京, 2.19, 2001.
11. 荒畑喜一 (塚原俊文): DNA チップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を知る」「脳を守る」合同シンポジウム 京都, 4.27, 2001.
12. 埜中征哉, 南 成佑, 林 由起子, 荒畑喜一: 肢帯型筋ジストロフィー研究の進歩. 第 42 回日本神経学会 東京, 5.11, 2001.
13. 林 由起子, 小川 恵, 田川一彦, 石原傳幸, 埜中征哉, 荒畑喜一: 福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)における α -ジストログリカン (α -DG) の選択的欠損. 第 42 回日本神経学会 東京, 5.11, 2001.
14. 田川一彦, 小川 恵, 山中 岳, 松村 剛, 後藤加奈子, 林由起子, 荒畑喜一: 肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)におけるミニマルチプレックスウエスタンブロット(MMW)法解析 第 42 回日本神経学会 東京, 5.11, 2001.
15. 塚原俊文: 神経特異的 SR タンパク質、NSSR 1 および 2 の単離と機能解析. 科学研究費特定領域研究(A)「脳研究の総合的推進に関する研究」班 平成 13 年度第 1 回公募班班会議 岡崎, 6.20, 2001.
16. 塚原俊文: 「遺伝子発現解析のためにはどのような cDNA microarray が必要か?」東京農工大学遺伝子実験施設第 11 回定期公開セミナー 東京, 9.13, 2001.
17. 西野一三: DNA チップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明—デュシェンヌ型筋ジストロフィーをモデルとして. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 4.25, 2002.
18. 西野一三, 野口 悟, 塚原俊文, 藤田雅子, 黒川留美, 戸田達史, 辻本敦美: 独自に開発したヒト骨格筋用 cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析 第 44 回日本神経学会総会 横浜, 5.15, 2003.
19. 西野一三: 筋再生・分化から見た遺伝性筋疾患の分子病態—独自に開発した cDNA マイクロアレイを用いて— 徳島大学分子酵素学研究センターシンポジウム, ポストゲノム時代の再生医学研究 徳島, 11.7, 2003.
20. 西野一三: 自己貧食異常を伴う筋疾患 平成 15 年度特定領域研究・第 4 回公開シンポジウム 蛋白質分解のメカニズムとバイオロジー 岡崎, 12.20, 2003.
21. 西野一三: DNA チップによる遺伝性筋疾患の分子病態解明. 独立行政法人科学技術振

興機構(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 1.23, 2004.

海 外

1. Yamanaka G, Arahata K: Unusual phenotypes of 4q35-FSHD. The Third International Conference on the Cause and Treatment of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. Lister Hill Auditorium, NIH, USA, 5.8, 2000.
2. Goto K, Arahata K: Somatic mosaicism in de novo FSHD families. The Third International Conference on the Cause and Treatment of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. Lister Hill Auditorium, NIH, USA, 5.8, 2000.
3. Matsumura T, Arahata K: Comparison with different ethnic populations for 4q;10q subtelomeric translocations: Results of the Bgl II /Bln I dosage test. The Third International Conference on the Cause and Treatment of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. Lister Hill Auditorium, NIH, USA, 5.8, 2000.
4. Kazakov V, Rudenko D, Sugita H, Goto K, Arahata K: Facioscapulohumeral muscular dystrophy, type 2(FSLD2)(the same as a facioscapulohumeral form of FSHD) in Russian families. Clinical aspects of the phenotype/genotype.Preliminary data. The Third International Conference on the Cause and Treatment of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. Lister Hill Auditorium, NIH, USA, 5.8, 2000.
5. Morishita S, Sese J: Traversing itemset lattices with statistical metric pruning. Proc. Of ACM SIGACT-SIGMOA-SIGART Symp. on Database(PODS). Dallas, USA, 5.17, 2000.
6. Arahata K, Hayashi YK, Kikuchi T, Sasaoka T, Nonaka I, Ozawa E: The benefits of animal models of muscular diseases. World Muscle Society, 5th Congress, White River, South Africa, 6.28, 2000.
7. Sorimachi H: Activity and physiological regulation of calpains. Gordon Research Conference“Proteolytic Enzyme and Inhibitors” New Hampshire, USA, 7.12, 2000.
8. Tsukahara T, Tsujino S, Ogawa M, Nishiyama A, Fujita M, Kurokawa R, Hayashi YK, Arahata K: Differential gene expression analysis in Emery-Dreifuss muscular dystrophy using cDNA microarrays. The American Society of Human Genetics 50th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 10.4, 2000.
9. Winokur ST, Masny PS, Maarel SV, Figlewicz DA, Arahata K, Flanigan K: Expression profiling of 4q35/10q26 transcripts in FSHD using cDNA microarrays. The American Society of Human Genetics 50th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 10.4, 2000.
10. Hayashi YK: New insight in the molecular pathomechanism of Fukuyama type congenital muscular dystrophy. 85th ENMC International Workshop/1st Workshop of the Myocluster project: GENRE, Naarden, The Netherlands, 10.27, 2000.
11. Hayashi YK: Protein interactions and modification in the basal lamina. 85th ENMC International Workshop/1st Workshop of the Myocluster project: GENRE, Naarden, The Netherlands, 10.28, 2000.
12. Arahata K, Minami N, Hayashi YK, Ogawa M: Limb-girdle Muscular Dystrophy (LGMD) in Japan 1st Asian and Oceanian Myology Center (AOMC) Workshop, 1.20, 2001.
13. Hayashi YK: Pathomechanism of Fukuyama type congenital muscular dystrophy. A workshop on muscular dystrophy, Perspectives to studies on myogenesis and therapeutics of

- muscular diseases in 21st century Kyoto, 3.22, 2001.
14. Tsukahara T: Development of human muscle cDNA microarray and analysis of gene expression profile. A workshop on muscular dystrophy, Perspectives to studies on myogenesis and therapeutics of muscular diseases in 21st century Kyoto, 3.22, 2001.
 15. Sorimachi H: Studies on structure and function of p94/calpain3 toward diagnosis of LGMD2A. "Therapeutics perspectives in the calpainopathies", Paris, France, 4.12, 2001.
 16. Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, Ishihara T, Nonaka I, Arahata K : α -Dystroglycan in congenital muscular dystrophy. 4th French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophy "Progress towards therapy for muscular dystrophies" Paris, French, 6.16, 2001.
 17. Nishino I: Mitochondrial encephalomyopathy due to nuclear mutations-with a special reference to mngie. AOMC 2001 Interim Meeting "Mitochondrial Myopathy and other Muscle Disorders" Chiang Mai, Thailand, 11.9, 2001.
 18. Guicheney P, Nishino I, Pepe G: Ullrich syndrome molecular study DNA and RNA analysis. 100th ENMC international Workshop Amsterdam, The Netherlands, 11.24, 2001.
 19. Pepe G, Nishino I, Guicheney P: Genotype phenotype correlation. 100th ENMC international Workshop Amsterdam, The Netherlands, 11.24, 2001.
 20. Nishino I: Post-dystrophin muscular dystrophy research. 1st Bi-Monthly Scientific Meeting, The Philippine Neurological Association. Manila, Philippines, 1.29, 2002.
 21. Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I: Ullrich disease with collagen IV deficiency suggesting a new mechanism of muscular dystrophy. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 7.8, 2002.
 22. Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Nonaka I, Oh SJ, Takahashi M, Saitoh S, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Byrne E, Lamperti C, DiMauro S, Hirano M, Nishino I: Clinicopathological features of genetically-confirmed Danon disease. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 7.11, 2002.
 23. Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Diagnostic approaches to limb-girdle muscular dystrophy. The 20th annual conference on neuromuscular diseases in childhood, Tokyo, 8.9, 2003.
 24. Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Tsukahara T, Tsujimoto A, Nishino I: New cDNA microarray for human skeletal muscles. 5th Japanese-French workshop on muscular dystrophies A challenge to knock out muscular dystrophies, Tokyo, 6.12, 2003.
 25. Hayashi YK, Noguchi S, Matsumoto H, Ogawa M, Murayama K, Nonaka I, Nishino I: Molecular analysis of alpha-dystroglycanopathy. 5th Japanese-French workshop on muscular dystrophies A challenge to knock out muscular dystrophies, Tokyo, 6.13, 2003.
 26. Nishino I, Sugie K, Ishikawa H, Noguchi S, Ogawa M, Hayashi YK, Nonaka I: Collagen VI deficiency is the second leading cause of congenital muscular dystrophy in Japan. 5th Japanese-French workshop on muscular dystrophies A challenge to knock out muscular dystrophies, Tokyo, 6.13, 2003.
 27. Nishino I: Autophagy in human muscle disease. Gordon Research Conference Autophagy in stress, development and disease, Waterville, Maine, USA, 7.26, 2003.
 28. Nishino I: Transmembrane lysosomal and enzyme lysosomal proteins and their roles in

neuromuscular disorders. XVth Congress of the International Society of Neuropathology, Turin, Italy, 9.17, 2003.

29. Nishino I: Clinical and molecular aspects of Japanese patients. Hereditary Inclusion Body Myopathy Workshop, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 11.20, 2003.
30. Nishino I: Danon disease-formerly, lysosomal glycogen storage with normal acid maltase. 3rd Asian & Oceanian myology center annual scientific meeting, Singapore, 1.9, 2004.
31. Fushimi K, Tsukahara T: Regulation of neural alternative splicing by direct binding of NSSRs to pre-mRNA. The Gordon Research Conference on POST-TRANSCRIPTIONAL GENE REGULATION, Proctor Academy, New Hampshire, USA, 8.13, 2004.
32. Nishino I, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Restoration of sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy. 11th Asian Oceanic Congress of Neurology, Singapore, 11.28, 2004.

②ポスター発表 (国内 52件、海外 20件)

国内

1. 織茂智之, 後藤加奈子, 林 由起子, 小沢英補, 埜中征哉, 荒畑喜一: 4q35-顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (F S HD) における骨格筋障害の病態機序の検討. 第41回日本神経学会総会 松本, 5.24, 2000.
2. 古城 徹, 荒畑喜一: プレクチン欠損症 (PD) の骨格筋画像と臨床所見の対比. 第41回日本神経学会総会 松本, 5.24, 2000.
3. 山中 岳, 後藤加奈子, 荒畑喜一, 船越政範, 宮島 祐: 舌萎縮を伴った顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (F S HD) の分子遺伝学的検討. 第41回日本神経学会総会 松本, 5.25, 2000.
4. 永野 敦, 後藤加奈子, 塚原俊文, 荒畑喜一, 内海裕也: Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーにおける emerin 遺伝子異常と表現型の検討. 第41回日本神経学会総会 松本, 5.25, 2000.
5. 松村 剛, 林 由起子, 山中 岳, 永野 敦, 荒畑喜一: 日本人三好ミオパチー (MM) における dysferlin の分子遺伝学的検索. 第41回日本神経学会総会 松本, 5.25, 2000.
6. 小松雅明, 大隅典子, 中村 俊, 荒畑喜一, 塚原俊文: TASR/NSSR 遺伝子の発現部位解析. 第2回日本 RNA 学会年会 東京, 8.1, 2000.
7. 塚原俊文, 辻野精一, 荒畑喜一: cDNA マイクロアレイによる Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (EDMD) 発現遺伝子の解析. 第73回日本生化学会大会 横浜, 10.13, 2000.
8. 伏見和郎, 三原浩一郎, 塚原俊文, 荒畑喜一, 玉置大器: ATBF1 と Neurogenin1 による NeuroD2 promoter の活性化とその作用機序. 第23回日本分子生物学会年会 神戸, 12.14, 2000.
9. 塚原俊文, 黒川留美, 西山章代, 藤田雅子, 荒畑喜一: ヒト筋 cDNA microarray の開発と発現遺伝子動態の解析. 第23回日本分子生物学会年会 神戸, 12.16, 2000.

10. 野口 悟, 若林-高井恵理子, 笹岡俊邦, 小沢鉄二郎: Tg マウスを用いた γ -サルコグリカンの発現期における発現の解析. 第23回日本分子生物学会年会 神戸, 12.16, 2000.
11. 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 regulates expression of muscle-specific genes. 第23回日本分子生物学会年会 神戸, 12.16, 2000.
12. 林 由起子, 小川 恵, 田川一彦, 石原傳幸, 埜中征哉, 塚原俊文, 荒畑喜一: 福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) における α ジストログリカン(α -DG)の選択的欠損. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を知る」「脳を守る」合同シンポジウム 京都, 4.28, 2001.
13. 野口 悟, 若林 高井恵理子, 笹岡俊邦, 荒畑喜一, 小沢鉄二郎: 肢帯型筋ジストロフィー原因遺伝子サルコグリカンの発現調節の解析. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を知る」「脳を守る」合同シンポジウム 京都, 4.28, 2001.
14. 反町洋之: カルパインを中心とした情報伝達系の分子機構の解明. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を知る」「脳を守る」合同シンポジウム 京都, 4.28, 2001.
15. 佐々木淳子, 立川雅司, 石川欣也, 小林千浩, 深山正久, 水澤英洋, 高嶋幸男, 中村祐輔, 戸田達史: フクチン遺伝子の脳における発現の検討. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を知る」「脳を守る」合同シンポジウム 京都, 4.28, 2001.
16. 瀬々 潤, 森下真一: 大量遺伝子発現情報の解析方法開発. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を知る」「脳を守る」合同シンポジウム 京都, 4.28, 2001.
17. 二階堂 仁, 瀬々 潤, 森下真一: 発現情報データベースの構築. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を知る」「脳を守る」合同シンポジウム 京都, 4.28, 2001.
18. 高橋俊明, 青木正志, 水野資子, 堅山真規, 近藤恵美, 中井博史, 鴻巣 武, 斎藤 博, Brown Jr. Robert H, 埜中征哉, 荒畑喜一, 糸山素人: 日本人三好型遠位型筋ジストロフィーにおける dysferlin 遺伝子変異とその臨床的特徴. 第42回日本神経学会 東京, 5.11, 2001.
19. 山中 岳, 後藤加奈子, 松村 剛, 船越政範, 荒畑喜一: 日本人顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)231例の分子遺伝学的検討. 第42回日本神経学会 東京, 5.12, 2001.
20. 松村 剛, 後藤加奈子, 山中 岳, 荒畑喜一: 東アジアでの 4q; 10q 染色体間組換えの検討と顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD). 第42回日本神経学会 東京, 5.12, 2001.
21. 斎藤明子, 平田圭子, 樋口逸郎, 中川正法, 納 光弘, 末原雅人, 荒畑喜一: 臨床的に三好型遠位型筋ジストロフィーと診断された症例の生検筋 dysferlin 染色性と臨床像の多様性に関する検討. 第42回日本神経学会 東京, 5.12, 2001.
22. 千葉陽一, 新出明代, 中野 智, 幸原伸夫, 秋口一郎, 柴崎 浩, 荒畑喜一: 常染色体劣性遠位型筋ジストロフィー (三好型) に対するダントロレン投与の試み. 第42回日本神経学会 東京, 5.12, 2001.

23. 田川一彦, 石浦章一, 反町洋之, 鈴木紘一, 林由起子: 骨格筋特異的カルパイン(p94)の基質の解析. 第74回生化学学会 京都, 10.25, 2001.
24. 吉河 歩, 塚原俊文, 笹川 昇, 石浦章一: 脱神経におけるカルパインファミリーの発現変化. 第74回生化学学会 京都, 10.25, 2001.
25. 塚原俊文, 野口 悟, 黒川留美, 藤田雅子, 立川雅司, 戸田達史, 加藤あずさ, 辻本敦美, 西野一三: 筋疾患の分子病理解析に有効なヒト cDNA マイクロアレイの開発. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 4.25, 2002.
26. 藤田雅子, 野口 悟, 塚原俊文, 黒川留美, 西野一三: 筋ジストロフィー生検筋試料を用いた遺伝子発現解析への cDNA マイクロアレイの適用. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 4.25, 2002.
27. 黒川留美, 野口 悟, 塚原俊文, 藤田雅子, 西野一三: cDNA マイクロアレイを用いた筋ジストロフィー培養骨格筋細胞での遺伝子発現の解析. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 4.25, 2002.
28. 計良陽子, 野口 悟, 南 成祐, 林 由起子, 西野一三: 骨格筋型カルパインの筋線維内局在の解析と LGMD2A 患者筋での変化. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 4.25, 2002.
29. 武田 聖, 近藤万里, 佐々木淳子, 新井 謙, 美崎佳寿子, 今村道博, 清水輝夫, 松村喜一郎, 不二門尚, 寺島俊雄, 戸田達史: フクチン欠損細胞キメラマウスの病態解析. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 4.25, 2002.
30. 小林千浩, 吉田有人, 萬谷 博, 谷口妃代美, 鹿野博亀, 三橋英代, 竹内 誠, 遠藤玉夫, 戸田達史: 福山型類縁疾患 muscle-eye-brain 病原因遺伝子としての新規糖移転酵素 POMGnT1 の同定とその意義. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 4.25, 2002.
31. 反町洋之: コネクチンを中心とした情報伝達系の分子機構の解明. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 4.25, 2002.
32. 計良陽子, 野口 悟, 南 成祐, 林 由起子, 西野一三: 骨格筋型カルパイン calpain3 の筋線維内局在の解析と LGMD2A 筋での変化. 第25回日本分子生物学会年会 横浜, 12.13, 2002.
33. 黒川留美, 野口 悟, 塚原俊文, 藤田雅子, 辻本敦美, 西野一三: 筋細胞分化に依存した遺伝子発現の網羅的解析と筋分化抑制機構. 第25回日本分子生物学会年会 横浜, 12.13, 2002.
34. 藤田雅子, 野口 悟, 塚原俊文, 黒川留美, 辻本敦美, 西野一三: 筋ジストロフィー患者筋一検体からの cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析. 第25回日本分子生物学会年会 横浜, 12.13, 2002.
35. 野口 悟, 藤田雅子, 黒川留美, 塚原俊文, 辻本敦美, 西野一三: cDNA マイクロアレイを用いた骨格筋培養細胞の IGF シグナル系に関連した遺伝子発現の解析. 第25回日本分子生物学会年会 横浜, 12.14, 2002.

36. 黒川留美, 野口 悟, 藤田雅子, 塚原俊文, 辻本敦美, 西野一三: GDF-8 による骨格筋培養細胞の分化阻害と cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京, 1.24, 2003.
37. 藤田雅子, 野口 悟, 黒川留美, 塚原俊文, 辻本敦美, 西野一三: cDNA マイクロアレイを用いた骨格筋培養細胞の IGF シグナル系に関連した遺伝子発現の解析. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京, 1.24, 2003.
38. 西野一三, 野口 悟, 計良陽子, 村山久美子, 小川 恵, 青木正志, 埜中征哉: DMRV における GNE 遺伝子変異と変異型タンパク質の生化学的解析. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京, 1.24, 2003.
39. 塚原俊文, 新井 理, 黒田康弘: 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. 科学技術事業団(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」平成 9 年度採択課題終了シンポジウム 東京, 1.24, 2003.
40. 林 由起子, 野口 悟, 藤田雅子, 黒川留美, 後藤加奈子, 塚原俊文, 西野一三: エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー(EDMD)における遺伝子発現解析. 第 44 回日本神経学会総会 横浜, 5.16, 2003.
41. 後藤加奈子, 林 由起子, 西野一三: 顔面甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)患者とその両親の遺伝子解析. 第 44 回日本神経学会総会 横浜, 5.16, 2003.
42. 石川晴美, 杉江和馬, 南 成祐, 埜中征哉, 西野一三: Ullrich 病-collagen IV の筋鞘膜特異的欠損例における検討. 第 44 回日本神経学会総会 横浜, 5.16, 2003.
43. Fushimi K, Matsushita R, Tsukahara T: Association of neural-salient serin/arginine-rich(NSSR) 1 and 2 proteins with SRP30c and TRA2 beta that regulate splicing of SMN pre-mRNA. 日本 RNA 学会 第 5 回 RNA ミーティング 神戸, 11.24. 2003.
44. 伏見和郎, 松下竜介, 塚原俊文: Characterization of C-terminal of NSSR 1 and 2 that are neuronal salient splicing regulators. 第 26 回日本分子生物学会 神戸, 12.13, 2003.
45. 野口 悟: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーにおける GNE 遺伝子変異と変異型タンパク質の生化学的解析. 第 26 回日本分子生物学会年会 神戸, 12.13, 2003.
46. 藤田雅子: cDNA マイクロアレイを用いたミオチューブラーミオパチーの遺伝子発現解析. 第 26 回日本分子生物学会年会 神戸, 12.13, 2003.
47. 黒川留美: オリゴヌクレオチドチップによる筋強直性ジストロフィーの遺伝子発現解析. 第 26 回日本分子生物学会年会 神戸, 12.13, 2003.
48. 野口 悟, 藤田雅子, 黒川留美, 西野一三: 骨格筋培養細胞系を用いた IGF 刺激応答遺伝子の発現様式. 独立行政法人科学技術振興機構(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 1.23, 2004.

49. 藤田雅子, 野口 悟, 村山久美子, 黒川留美, 西野一三: cDNA マイクロアレイを用いたミオチューブラーミオパチーの遺伝子発現解析. 独立行政法人科学技術振興機構(JST) 戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 1.23, 2004.
50. 黒川留美, 野口 悟, 南 成祐, 藤田雅子, 西野一三: オリゴヌクレオチドチップによる筋強直性ジストロフィーの遺伝子発現解析. 独立行政法人科学技術振興機構(JST) 戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 1.23, 2004.
51. 小川 恵, 野口 悟, 松本 浩, 村山久美子, 林由起子, 西野一三: 骨格筋におけるフクチン関連タンパク質群の局在. 独立行政法人科学技術振興機構(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 1.23, 2004.
52. 林 由起子, 黒川留美, 後藤加奈子, 野口 悟, 西野一三: Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー(EDMD) の遺伝子発現解析. 独立行政法人科学技術振興機構(JST)戦略的基礎研究推進事業(CREST)「脳を守る」シンポジウム 東京, 1.23, 2004.

海 外

1. Tsukahara T, Nagasawa H, Arahata K: Development of human muscle cDNA microarray and analysis of gene expression profile. A Keystone Symposium, The Impact of Genomics on Drug Discovery and Development; Hilton of Santa Fe, New Mexico, 2.4, 2001.
2. Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki A, Murayama K, Nishino I, Nonaka I, K Arahata, Brown RH Jr: The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. 6 International Congress of the World Muscle Society. Salt Lake City, USA, 9.6, 2001.
3. Hayashi YK, Goto K, Matsumura T, Yamanaka G, Arahata K: Frequency of 4q35; 10q26 subtelomeric interchromosomal exchanges-comparison with different ethnic healthy populations and Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. 6 International Congress of the World Muscle Society. Salt Lake City, USA, 9.6, 2001.
4. Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Hirano M, Nonaka I, Nishino I: Infantile autophagic vacuolar myopathy is genetically distinct from Danon disease (X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy). 6 International Congress of the World Muscle Society. Salt Lake City, USA, 9.7, 2001.
5. Nishino I, Yamamoto A, Tokonami F, Takahashi M, Chino F, Nonaka I: Two autopsy cases of Danon disease. 6 International Congress of the World Muscle Society. Salt Lake City, USA, 9.7, 2001.
6. Tsukahara T, Nagasawa H, Arahata K: Development of a cDNA microarray to study muscular dystrophy. 51th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. San Diego, USA, 10.15, 2001.
7. Hayashi YK, Tagawa K, Ogawa M, Keira Y, Goto K, Kawabe K, Nishino I: Dysferlinopathy in Japan. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases Canada, 7.10, 2002.
8. Kawabe K, Goto K, Yoneyama S, Nishino I, Hayashi YK: The dysferlin gene (DYSF) mutation analysis in Italy. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases Canada, 7.10, 2002.
9. Driss A, Noguchi S, Amouri, R, Hentati F, Nishino I: FKR (Fukutin Related Protein) Gene Mutated in Limb Girdle Muscular Dystrophy 21. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, 7.9, 2002.

10. Noguchi S, Tsukahra T, Kurokawa R, Fujita M, Hayashi YK, Goto Y, Nonaka I, Nishino I: cDNA microarray analysis of single patient with Duchenne muscular dystrophy. 52nd Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Baltimore, Maryland, USA, 10.17, 2002.
11. Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Tsukahara T, Tsujimoto A, Nishino I: Comprehensive gene expression analysis of the inhibitory effect of myostatin on skeletal myocyte differentiation. 8th International Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, 9.4, 2003.
12. Nishino I, Sugie K, Nobutoki T, Noguchi S, Nonaka I: A new X-linked autophagic vacuolar myopathy. 8th International Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, 9.4, 2003.
13. Matsumoto H, Noguchi S, Ogawa M, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I: Subcellular localization of fukutin and FKRP in muscle cells. 8th International Congress of the World Muscle Society, Szeged, Hungary, 9.5, 2003.
14. Noguchi S, Nishino I: Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. BMB Annual Meeting and 8th IUBMB Conference, Boston, USA, 6.13, 2004.
15. Matsumoto H, Hayashi YK, Matsuo T, Nakazawa T, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: The first case with congenital muscular dystrophy 1C in Japan. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.2, 2004.
16. Liewluck T, Ohsawa M, Sasaki M, Ogata K, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: ER stress-mediated apoptosis in autosomal dominant reducing body myopathy. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.2, 2004.
17. Ozawa R, Hayashi YK, Kurokawa R, Ogawa M, Goto K, Noguchi S, Nishino I: No dystrophic change in emerin deficient mice. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.2, 2004.
18. Hayashi YK, Ozawa R, Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Goto K, A Muchir, G Bonne, Nishino I: Microarray analysis of nuclear envelopathy. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.2, 2004.
19. Nishino I, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Restoration of sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy: a potential therapeutic strategy? 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.4, 2004.
20. Noguchi S, Fujita M, Uematsu F, Kurokawa R, Murayama K, Minami N, Nonaka I, Nishino I: Gene expression analyses of X-linked myotubular myopathy. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.4, 2004.

③ 著書

1. Nishino I, Hirano M, DiMauro S: LAMP-2 deficiency. Structural and Molecular Basis of Skeletal Muscle Diseases: pp142-144, 2002.
2. 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, pp1151-1168, 2002.

3. Nishino I, Hirano M, DiMauro S: LAMP-2 deficiency. Structural and Molecular Basis of Skeletal Muscle Diseases: pp142-144, 2002.
4. Nishino I: Lysosomal Membrane Disorders-LAMP-2 Deficiency. The Molecular and Genetic Basis of Neurologic and Psychiatric Disease, pp309-314, 2003.

(3)特許出願（国内 1 件、海外 0 件）

国内

H14 年度特許出願件数：1 件

発 明 者：塚原俊文・国立精神・神経センター 神経研究所
新井 理、黒田康弘・(株) インフォコム

発明の名称：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

出 願 人：科学技術振興事業団
国立精神・神経センター総長

出 願 日：平成14年6月10日

(4)新聞報道等

①新聞報道

平成14年 5月15日付 日経産業新聞

「骨格筋遺伝子」100倍の高感度で検出

②受賞

な し

(5)その他特記事項

な し

7. 結び

本研究課題は、故・荒畑喜一、国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部前部長により開始されたプロジェクトでした。本来ならば、プロジェクト途中での研究代表者の死亡の際には、プロジェクト終了を待たずに中止となることが通例であると聞いておりますが、本プロジェクトは、独自の DNA チップ作製が既に進んでいることもあり、特別な計らいにより、西野を研究代表者代理として、継続することをご許可頂きました。お陰様で、この5年間のプロジェクトによって、極めて信頼性の高いヒト骨格筋に特化した独自の cDNA マイクロアレイ型 DNA チップを完成させることが出来ました。私達が開発した DNA チップは、世界で初めて、生検筋一例での網羅的遺伝子解析を可能にしたことから、従来の筋病理との比較が初めて可能になり、また、従来の筋病理学的な所見と遺伝子発現プロファイルとが矛盾無く一致していることが明らかとなりました。筋病理学は、歴史的に筋疾患の診断・分類に際して中心的な役割を果たしてきていることから、その比較は、極めて貴重な情報をもたらします。加えて、DNA チップから得られる情報は莫大で、多くの未知の知識が埋もれていることは間違いがありません。このプロジェクトで開発された DNA チップは、これまでに確立されて来た知識を踏まえた新しい分子病理学とも呼ぶべき分野を開拓したと言えます。

一方で、当初、網羅的遺伝子解析を行えば、次々と分子病態が解明出来るものと期待していましたが、実際には、それほど話は単純でないことも明らかとなりました。その一つが、DNA チップで得られるデータは、シグナル伝達系を初めとする各種の遺伝子発現調節カスケードの最下流現象を総和的に見ているに過ぎないということです。私達は、この問題に対処すべく、シグナル伝達系の解析や、培養細胞を用いた筋分化に伴う遺伝子発現のカタログ化を試みました。多くの知見が得られましたが、細胞内現象は多様かつ膨大であり、その全容を把握するには5年では足りませんでした。今後、私達が示した DNA チップを用いたプロモータ構造の予測法などを用いて、さらに検討が必要であると思われます。本プロジェクト自体は、これで終了しますが、私達は本プロジェクトの成果を踏まえて、さらに、遺伝性筋疾患の分子病態解明を目指した研究を継続していく所存です。末筆になりましたが、杉田総括を初めとして、多くの関係者の方々から、陰に日向に、お力添えを頂き5年間を終えることが出来ました。心より、お礼申し上げます。

