

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目： Profiling of Gene Expression in Brains of Dentatorubropallidolusian Atrophy (DRPLA) Transgenic Mice Carrying Various Lengths of Expanded CAG Repeats

和 訳： 異なる CAG リピート長を持つ歯状核赤核淡蒼球レイ体萎縮症トランスジェニックマウスの脳における遺伝子発現プロファイリング

指導教官： 辻 省次 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名： 周 家毅

### 1. 序論

歯状核赤核、淡蒼球レイ体萎縮症 (dentatorubropallidolusian atrophy, DRPLA) は小脳歯状核遠心系 (歯状核赤核路) と淡蒼球遠心系 (淡蒼球レイ体路) の病変を認める常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症であり、12p13.31にある原因遺伝子 atrophin-1 の翻訳領域に存在する CAG トリプレットの異常伸長により発症する。このような CAG トリプレットの異常伸長による疾患を総称してポリグルタミン病と呼んでいる。DRPLA の基本的な臨床症状は小脳運動失調、ミオクローヌス、てんかん発作、舞踏アテトーシス、精神発達遅滞あるいは痴呆、精神症状などであり、正常では CAG リピート数は 3-36 であるが、患者においてはそれが 49-88 リピートに伸長している。DRPLA は、ポリグルタミン病に共通する特徴として、表現促進現象 (anticipation) があり、CAG トリプレットリピート長が長ければ長くなるほど、発症年齢が若くなり、臨床症状も重症であ

る。DRPLAにおける細胞障害のメカニズムとしては、ポリグルタミン鎖がTAF<sub>II</sub>130と結合することによってcyclic AMP-response element binding protein (CREB)系に関連する転写障害を来すという仮説が有力であるが、他にも、ubiquitin-proteasome系の障害、apoptosisとの関連などが言われている。DRPLAの病態機序を明らかにするために、指導教官らは異なるCAGリピート長(Q76、Q113、Q129)を持つヒトの全長のDRPLA遺伝子をシングルコピーで有するトランスジェニックマウスモデルを作成した。この動物モデルはヒトDRPLAのCAGリピート長による重症度、臨床症状または病理像をよく反映している。

本研究の目的はこのトランスジェニックマウスを使って、Affymetrix GeneChipプロブアレイで、経時的なまたCAGリピート長依存性の遺伝子発現の変化をゲノムワイドで明らかにすることである。データ解析する前にAffymetrix GeneChipプロブアレイのデータ解析においてのいくつかの問題点と解析方法を検討した上で、最良と考えられたWelle's R t-testを使って、以下のようなデザインで解析を行った。①同一系統における個体差を検定した。②4週あるいは12週においてトランスジェニック(Tg)対ノントランスジェニックマウス(NTg)の比較を行い、TgとNTgの遺伝子発現の差及びCAGリピート長に依存する変化を調べた。③TgとNTgの各系統において4週と12週を比較し、経時変化を分析した。④Tg対NTgの小脳と大脳における遺伝子発現を比較し、部位別の遺伝子発現を検討した。

## 2. 方法

4週、12週齢のQ76、Q113、Q129TgとNTgを各3匹ずつ作成し、GenotypingをおこなってTgとNTgを確認した。

各マウスをSacrificeし、小脳脚を切断して小脳を取り出した後、下丘レベルで大脳と脳幹を切離した。得られた大脳と小脳から、total RNAを抽出し、Poly A<sup>+</sup> RNAを精製して、cDNAを合成し、in vitro transcription (IVT)でBiotin-labeled cRNAを合成した。得られたcRNAの濃度を測り、cRNAのサイズと収量をチェックした。用いるtotal RNAの量は、IVT反応のlinearityが保たれる範囲内に設定した。

得られたcRNAを断片化して、Hybridization Cocktailを調製し、45°C 60rpmで16時間hybridizationしてから、アレイを洗浄、染色し、その後Scanningした。得られたデータは、Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS 5.0)で、主として比較する二群のDetection callがすべてPresentである遺伝子のみを対象とし、Welle's R t-testを使って、解析した。

### 3. 結果

解析に用いる Welle's R t-test の信頼性を確かめるため、予備実験として、12週の NTg を使って、同一個体における正常の脳と小脳の遺伝子発現を調べた。その結果、有意差が認められた遺伝子は、既にノザン解析など、別の方法でも有意差がある事が確認されており、Welle's R t-test という解析方法の信頼性が高いことが裏付けられた。

#### 1) 個体差の検定

同一系統の同じ週齢の個体3匹を比較し、Detection call の一致率は90%近く、シグナルの値の相関係数は0.98-0.99であり、個体差は非常に少ないことが分かった。

#### 2) Tg と NTg の比較及びリピート長による変化

4週でも、12週でも、Q76Tg、Q113Tg、Q129Tg と NTg との間で、有意に発現が減少及び増加している遺伝子は、脳と小脳いずれにおいても CAG リピート長が長ければ長いほど多くなり、Q129Tg では特に多かった。すべての12週の Tg は、4週の Tg と比較して、NTg と有意差のある遺伝子がより多かった。Q113Tg では、4週の時点で NTg と有意差の認められる遺伝子がほとんどないにもかかわらず、12週になると多数認められるようになることが分かった。4週においても12週においても、全体的に発現が減少している遺伝子数は、増加している遺伝子数より多く、Fold Change も大きかった。また、CAG リピート長が長ければ長いほど Fold Change が大きくなる遺伝子も見出し、その数は4週より12週の方が多かった。例えば、12週で、Q113Tg と Q129Tg の脳において、GABA<sub>A</sub> receptor subunit delta、glutamic acid decarboxylase 1 (GAD1) など GABA 系の遺伝子と preproenkephalin、somatostatin など Neuropeptide 系の遺伝子の発現レベルが低下しており、Q129Tg では fold change がもっとも大きかった。

#### 3) 経時変化

4週、12週の Q129Tg 対 NTg の発現レベルの差を経時的に調べた結果、この差が12週でより大きくなる遺伝子を見出した。例えば、Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP-5) は、4週でも12週でも脳と小脳いずれにおいても発現レベルが低下していたが、12週では Fold Change がより大きくなっていった。

#### 4) Tg 対 NTg の小脳と脳における部位別遺伝子発現変化

4週と12週の Q129Tg 対 NTg の脳と小脳における遺伝子発現プロファイルを得、脳のみ、小脳のみ、あるいは脳と小脳両方における Tg 対 NTg の発現レベルに有意差のある遺伝子が認められた。Jun oncogene は4週の小脳のみで低下していた。IGFBP-4 は、IGFBP-5 と違って、4週と12週の脳のみで発現レベルが低下していた。

#### 4. 考察

本研究における同一グループ間の call の一致率、シグナルの相関は他の研究と比較して高く、個体差は少ない。一方、NTg における大脳と小脳の発現に差がある遺伝子を、過去の研究と比較検討した結果、既知の発現パターンと合致していた。さらに、Tg において発現レベルに変化の認められた遺伝子（例えば、発現が減少していた GAGA 系、IGFBP-5 など）も、過去の研究結果と合致していた。これらは本研究の解析結果の妥当性を支持する結果と考えられる。

本研究において、DRPLA モデルマウスで、リピート長依存的、年齢依存的に変化する遺伝子を見出した。リピート長に依存して変化する遺伝子は、DRPLA における細胞の機能障害を反映している可能性がある。全体的に、発現が減少していた遺伝子は増加していた遺伝子より多く、fold change も大きいことから、DRPLA の発症に転写障害が関与しているという仮説を支持していると考えられる。更に、Jun oncogene、cyclic AMP phosphoprotein、early growth response 1 (Egr1)、TGFB inducible early growth response 1 (Tiegl)、nuclear receptor subfamily 4 group A member 1 (Nr4a1) など転写関連の遺伝子の発現も減少していた。また、部位別発現レベルの変化する遺伝子を見出した。Q129Tg の大脳で GABA 系の遺伝子の発現レベルが低下しており、DRPLA においてのてんかん発作に関与している可能性がある。

#### 5. 結論

- 1) Welle's R t-test はアレイ群間の遺伝子発現レベルの差を解析する手法として信頼性が高いことが分かった。
- 2) CAG リピートに依存して、DRPLA トランスジェニックマウスと NTg 間で、脳における発現レベルに差がある遺伝子の数が増加していた。さらに、リピート長依存的に発現レベルの変化する遺伝子が存在した。
- 3) DRPLA トランスジェニックマウスにおいて、比較的早期から（4週の時点から）脳における遺伝子発現に異常があり、発現が減少する遺伝子が比較的多かった。発現が減少する遺伝子の Fold Change も大きかった。
- 4) 経時的変化では、12週で発現レベルの変化する遺伝子数が増加し、また、変化した遺伝子の fold change も大きくなった。
- 5) DRPLA モデルマウスにおいて、部位別発現レベルの変化する遺伝子が存在した。