

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2006～2008  
課題番号：18590080  
研究課題名（和文） 疑ウェルナー症候群の病態解明  
研究課題名（英文） Analysis of gene expression profile in Werner and questionable Werner syndromes  
研究代表者  
石垣 靖人（ISHIGAKI YASUHITO）  
金沢医科大学・付置研究所・講師  
研究者番号：20232275

## 研究成果の概要：

ウェルナー症候群（WS）は日本人に高頻度でみられる劣性遺伝疾患で早期老化症状を特徴とする。本研究では WS の網羅的な遺伝子発現解析を行うと同時に、臨床症状を示しながら細胞の分裂寿命が短縮していない亜群の早期老化症状を引き起こす原因遺伝子あるいは発現クラスターの解析を行うことによって、新しい老化の分子モデルを提案することである。培養細胞における網羅的遺伝子発現データを解析し老化プロファイルを明らかにした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,010,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：早期老化、Werner 症候群、DNA マイクロアレイ、RNAi

## 1. 研究開始当初の背景

ウェルナー症候群（WS）は日本人に高頻度でみられる劣性遺伝疾患で早期老化症状を特徴とする。本研究では WS と確定診断されていたにもかかわらず、典型的な WS 細胞とは異なり分離された培養細胞の分裂寿命が長い患者がいることを見だし、患者由来細胞の性格付けを行ってきた。この疾患患者群は便宜的に疑ウェルナー症候群（Questionable Werner's syndrome; Q-WS）と名付けられ、日本国内で細胞バンクに登録されたものを含めて少なくとも 3-4 例が発見されている。本研究の目的は、WS の網羅的

な遺伝子発現解析を行うと同時に、Q-WS の早期老化症状を引き起こす原因遺伝子あるいは発現クラスターの解析を行うことによって、新しい老化の分子モデルを提案することである。

## 2. 研究の目的

Werner 症候群患者の全身的な変化を分子レベルで網羅的に解析し、老化関連因子の検索を行うことにより発症のメカニズムに迫ることを目指した。

### 3. 研究の方法

症候群患者由来細胞を材料として網羅的な遺伝子配列および遺伝子発現解析を行った。解析手法としては Affymetrix 社の SNPs 解析用アレイ (GeneChip Human Mapping Array Sty 250K)、トランスクリプトーム解析用アレイ (GeneChip Human Genome U133 plus 2.0)、Agilent 社のマイクロ RNA 解析アレイ (Human miRNA マイクロアレイキット V2) を利用した。両者から提供されるプラットフォーム及びデータ取得ソフトウェアを適宜用いてデータの取得を行った。SNPs アレイの解析には Affymetrix 社の GTYP バージョン 4.1 および CNAT バージョン 4.0、IGB バージョン 5.0 を利用した。発現データの解析には Agilent 社の GeneSpring GX7 から 10 シリーズまでを活用して統合的な解析を進めた。発現データの統合的な解析及びパスウェイ解析については Ingenuity 社の統合データベースである Ingenuity Pathways Analysis を活用した。遺伝子ノックダウン系の開発には市販の shRNA 発現ベクターを独自に改変したものを利用して細胞内のノックダウン効率の改善を目指した。また、遺伝情報品質管理機構のひとつである、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構を特異的に抑制し発現が回復する遺伝子群を RNAi を利用した実験系でノックダウンすることにより阻害し、DNA マイクロアレイシステムでスクリーニングを行う系を作成して遺伝子検索を行った。

### 4. 研究成果

ゲノム、トランスクリプトームおよびプロテオーム解析手法を導入し、様々な実験系での活用を行うことによって統合的な解析を行うことが可能となった。これらの手法を用いて早期老化症候群のプロファイルデータベースとして蓄積することができた。蓄積された膨大なデータは今後ヒトにおける老化モデルを解析していくうえで貴重な資料として活用できることが期待され、要望に応じて他の研究グループにも提供できる。得られたデータの遺伝子のカテゴリー解析では老化、細胞周期、炎症等多様なカテゴリーに含まれる遺伝子群の発現変動が認められた。Werner 症候群と Q-WS 症候群を比較してみると、典型例では原因遺伝子である WRN の発現欠損が観察されたが、Q-WS では正常とほぼ同レベルの発現が観察された。遺伝子発現プロファイルをクラスタリングや Principle component analysis で見てみると、両者の違いは大きくないことを示唆していた。病態が類似しているために当然かもしれないが、WRN の発現の違いから考えると、Q-WS の原因遺伝子は WRN 遺伝子の機能的なパスウェイのどこかに位置するのかもしれない。

SNPs アレイによるゲノム配列の欠損検索では全く異常な部位は検出されず、ゲノム上の大きな欠失は Q-WS の原因ではないことが示唆された。トランスクリプトーム解析にナンセンス変異 mRNA の分解経路阻害を組み合わせた解析では、候補遺伝子は抽出できたが、既知のデータベースに頼った検索では絞り込むことができなかった。候補遺伝子の機能を解析するために RNAi によるノックダウン系の改良を行ってきたが、プラスミド型ベクターの利用で効果を上げることができた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Kiba T, Kintaka Y, Suzuki Y, Nakata E, Ishigaki Y, Inoue S: Ventromedial hypothalamic lesions change the expression of neuron-related genes and immune-related genes in rat liver. *Neurosci Lett*, 455:14-16 (2009): 査読有
- ② Kiba T, Kintaka Y, Suzuki Y, Nakata E, Ishigaki Y, Inoue S: Gene expression profiling in rat liver after VMH lesioning. *Exp Biol Med*, (in press) 査読有
- ③ Yamakawa J, Ishigaki Y, Takanao F, Takahashi T, Yoshida J, Moriya J, Takata T, Tatsuno T, Sasaki K, Ohta T, Takegami T, Yoshizaki F: The Kampo Medicines Orengedokuto, Bofutsushosan and Boiogito have different activities to regulate gene expressions in differentiated rat white adipocytes: Comprehensive analysis of genetic profiles. *Biol Pharm Bull*, 31:2083-2089 (2008): 査読有
- ④ Nagao A, Zhao X, Takegami T, Nakagawa H, Matsui S, Matsunaga T, Ishigaki Y: Multiple shRNA expressions in a single plasmid vector improve RNAi against the XPA gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 370:301-305 (2008): 査読有
- ⑤ Kiba T, Kintaka Y, Suzuki Y, Nakata E, Osaka T, Ishigaki Y, Inoue S: Changes of neuron-specific and apoptosis gene expression levels after ventromedial hypothalamic

- lesions in rat intestine. *Exp Biol Med*, 233:1368-1378 (2008) : 査読有
- ⑥ Takata T, Tanaka T, Yahagi N, Yahagi R, Tsuchida H, Ishigaki Y, Tomosugi N, Fushiya S, Takano F, Ohta T: The liquid culture filtrates of entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes* and its glycoprotein constituent protects against anemia in mice treated with 5-fluorouracil. *Biol Pharm Bull*, 31:1565-1573 (2008) : 査読有
- ⑦ 尾崎 守, 石垣靖人: SNPs ジェノタイプピングアレイを用いた超微細染色体構造異常検出にむけた基礎的検討—先天性多発奇形・精神発達遅延の症例の場合— *金沢医科大誌*, 33:1-12 (2008) : 査読有
- ⑧ 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 源 利成, 元雄 良治: 膵癌細胞における塩酸ゲムシタピンによるアポトーシス関連遺伝子発現の変化. *膵臓*, 22:14-20, (2007) : 査読有
- ⑨ Kiba T, Kintaka Y, Nakada E, Suzuki Y, Inoue S, Ishigaki Y: High-quality RNA extraction from rat pancreas for microarray analysis. *Pancreas*, 35:98-100 (2007) : 査読有

[学会発表] (計 19 件)

- ① 石垣靖人, 中川秀昭, 竹上 勉, 友杉直久, 後藤眞: 早期老化症候群の網羅的遺伝子発現解析. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 27 日、京都
- ② 石垣靖人: Werner 症候群におけるマイクロ RNA の網羅的解析. 第 29 回北陸臨床遺伝研究会, 2008 年 11 月 15 日、永平寺町
- ③ 尾崎 守, 石垣靖人, 柿沼宏明: SNP s アレイによる CNV 解析の基礎的検討. 北陸臨床遺伝研究会, 2008 年 11 月 15 日、永平寺町
- ④ 島崎猛夫, 石垣靖人, 中谷直喜, 中島日出夫, 友杉直久, 田中卓二, 麦 威, 川上和之, 源 利成, 元雄良治: 膵癌に対する GSK3  $\beta$  阻害剤とジェムシタピンによる治療効果: 臨床試験を目指した基礎的検討. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 29 日、名古屋
- ⑤ 竹上 勉, 村上 学, 佐藤杏子, 太田隆英, 石垣靖人: 日本脳炎ウイルス感染による宿主遺伝子発現および miRNA 動態

- への影響. 第 15 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 2008 年 10 月 25 日、岡山
- ⑥ 尾崎 守, 石垣靖人, 柿沼宏明: SNPs 検出アレイによる CNV 解析の基礎的検討. 日本人類遺伝学会, 2008 年 9 月 28 日、横浜
- ⑦ 島崎猛夫, 石垣靖人, 夏 啓勝, 中谷直喜, 中島日出夫, 友杉直久, 田中卓二, 麦 威, 川上和之, 源 俊成, 元雄良治: 膵癌の臨床試験を目指した GSK3  $\beta$  阻害剤と塩酸ゲムシタピンの併用療法に関する基礎的解析. 第 19 回日本消化器癌発生学会総会, 2008 年 8 月 28 日、別府
- ⑧ T. Takegami, M. Murakami, M. Sato, T. Ota, Y. Ishigaki : Analysis of gene expression in Japanese encephalitis virus infected cells using microarray. 15th International Congress of Virology, 2008 年 8 月 15 日、トルコ共和国イスタンブール
- ⑨ 石垣靖人, 趙霞, 栗原孝行, 和泉伸一: ヒト細胞における NMD 関連因子の免疫電顕法による解析. 第 10 回 RNA ミーティング, 2008 年 7 月 24 日、札幌
- ⑩ 竹上 勉, 村上 学, 佐藤 杏子, 太田隆英, 石垣靖人: 日本脳炎ウイルス感染に伴う宿主遺伝子発現の網羅的解析. 第 12 回神経ウイルス研究会, 2008 年 7 月 18 日、屋久島
- ⑪ 石垣靖人, 尾崎守, 柿沼宏明: SNPs 検出型 DNA マイクロアレイによる染色体解析. 第 28 回北陸先天異常研究会, 2007 年 12 月 1 日、金沢
- ⑫ T. Shimasaki, Y. Ishigaki, X. Zhao X, N. Tomosugi, T. Tanaka, W. Mai, K. Kawakami, T. Minamoto, Y. Motoo : Combined effect of gemcitabine and GSK3  $\beta$  inhibitor against human pancreas cancer: GSK3  $\beta$  as a new therapeutic molecular target. 38th Annual Meeting of the American Pancreatic Association, 2007 年 11 月 1 日、米国シカゴ
- ⑬ T. Shimasaki, Y. Ishigaki, X. Zhao, N. Tomosugi, T. Tanaka, W. Mai, K. Kawakami, T. Minamoto, Y. Motoo : Combined effect of gemcitabine and GSK3  $\beta$  inhibitor against pancreas cancer resulting in altered gene expression profiles. The Second Meeting of Asian-Oceanic Pancreatic

Association(AOPA), 2007年10月18日、神戸

- ⑭ T. Shimasaki, Y. Ishigaki, H. Nakajima, N. Tomosugi, T. Tanaka, K. Kawakami, T. Minamoto, Y. Motoo: Combined effect of gemcitabine and GSK3  $\beta$  inhibitor against human pancreas cancer: GSK3  $\beta$  as a new therapeutic target. 第66回日本癌学会学術総会、2007年10月4日、横浜
- ⑮ 島崎猛夫, 中島日出夫, 石垣靖人, 本西哲, 友杉直久, 田中卓二, 川上和之, 源利成, 元雄良治: 塩酸ゲムシダピンとGSK3  $\beta$ 阻害剤併用による膵癌細胞の増殖抑制効果とその分子機構. 第38回日本膵臓学会大会、2007年6月28日、福岡
- ⑯ Yasuhito Ishigaki: DNA microarray analysis of Werner syndrome and questionable Werner syndrome. The 1<sup>st</sup> Anglo-Japanese Werner syndrome consortium meeting. 2007年3月20日、東京
- ⑰ 石垣靖人, 趙霞, 柿沼宏明, 竹上勉, 松井忍: DNAマイクロアレイによるナンセンス変異遺伝子検出. 第27回北陸先天異常研究会学術集会、2006年11月26日、内灘
- ⑱ 石垣靖人: 遺伝疾患原因遺伝子の探索. 金沢医科大学医学会第42回学術集会、2006年7月15日、内灘
- ⑲ Y. Ishigaki, Z. Xia: DNA microarray analysis with NMD suppression in humana cells carrying nonsense mutation. 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006年6月19日、京都

[図書] (計1件)

- ① Ishigaki Y, Nagao A, Matsunaga T: Optimized gene silencing by co-expression of multiple shRNAs in a single vector. “*RNA Interference: From Biology to Clinical Application*” in *Methods in Molecular Biology Series*, Humana press, Ed by Wei-ping Min (in press)

[その他]

- ① 石垣靖人: 網羅的解析手法による疾患解析、*Ingenuity Pathways Analysis (IPA)* ユーザーミーティング、東京 (2008年8月28日、招待講演)
- ② 石垣靖人: チップテクノロジーによる疾患

解析、ポストゲノム研究フォーラム、金沢 (2007年6月28日、招待講演)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石垣 靖人 (ISHIGAKI YASUHITO)  
金沢医科大学・付置研究所・講師  
研究者番号: 20232275

### (2) 研究分担者

竹上 勉 (TAKEGAMI TSUTOMU)  
金沢医科大学・付置研究所・教授  
研究者番号: 10113490

### (3) 連携研究者

二階堂 修 (NIKAIDO OSAMU)  
金沢学院短期大学・食物栄養学科・教授  
研究者番号: 60019669

松井 忍 (MATSUI SHINOBU)  
金沢医科大学・付置研究所・教授  
研究者番号: 00064600