

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

希少性疾患における遺伝子発現変異の包括的解析の  
ための遺伝子発現データベースの構築に関する研究

平成11年度研究報告書

平成12年3月

主任研究者 油谷 浩幸

## 目 次

I. 構成員名簿	1
II. 平成 11 年度総括研究報告書	3
III. 分担研究者報告	
原発性高脂血症の細胞生物学的研究	7
東京大学先端科学技術研究センター 教授 児玉 龍彦	
遺伝子発現変異の包括的解析のための遺伝子発現データベースの構築に関する研究	11
東京大学先端科学技術研究センター 助教授 油谷 浩幸	
糖原病 I 型における遺伝子発現異常の研究	17
浜松医科大学第一病理学教室 教授 梶村 春彦	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	22

## 構成員名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	油谷 浩幸	東京大学先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス部門	助教授
分担研究者	児玉 龍彦	東京大学先端科学技術研究センター 分子生物医学	教 授
分担研究者	梶村 春彦	浜松医科大学第一病理学講座	教 授
研究協力者	軽部 征夫	東京大学先端科学技術研究センター 生体機能工学	教 授
研究協力者	松橋 信行	東京大学医学部消化器内科	助 手
研究協力者	和田洋一郎	東京大学先端科学技術研究センター 駒場オープンラボラトリー	助 手

(事務局) 経理事務連絡担当責任者 森本 亜希子

東京大学先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス部門

〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1

Tel 03-5452-5352 (直通) FAX 03-5452-5355

E-mail: [haburata-tky@umin.ac.jp](mailto:haburata-tky@umin.ac.jp) (油谷) / [hari-tky@umin.ac.jp](mailto:hari-tky@umin.ac.jp) (森本)

## Ⅱ. 平成11年度総括研究報告書

## 厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

### 総括研究報告書

#### 希少性疾患における遺伝子発現変異の包括的解析のための遺伝子発現データベースの構築に関する研究

主任研究者 油谷浩幸（東京大学先端科学技術研究センター）

研究要旨 「遺伝子発現プロファイルの臓器別データベースを整備することにより、原因不明の疾患において罹患している臓器においてその遺伝子発現を解析し、発現変動を生じている遺伝子群を包括的に捉え、治療法開発のための最適の標的となる代謝経路を見いだすこと」を目的として、遺伝子発現プロファイル解析法に関する基礎的検討と発現プロファイルのデータベース構築に着手した。本年度は本研究事業の初年度であり、胎児脳、副腎、単球、マクロファージ、胃（噴門部）、胃（幽門部）、肝臓、色素細胞、血管内皮細胞、結膜細胞株、肝癌細胞株、白血病細胞株、表皮細胞株などの 14 種類の臓器あるいは細胞の最大 30,000 個の遺伝子発現データを収集した。対象疾患としては、糖原病 I 型患者肝における遺伝子発現プロファイル解析、動脈硬化症進展に重要と考えられる泡沫細胞化病変における遺伝子発現の変動に関する検討に着手した。

#### 分担研究者

児玉龍彦 東京大学先端科学技術研究センター・  
教授

梶村春彦 浜松医科大学第一病理学教室・教授

#### 研究協力者

松島綱治 東京大学医学部衛生学教室・教授

河上裕 慶應大学医学部・教授

宮園浩平 癌研究所生化学部・部長

坪田一男 東京歯科大学市川病院眼科・教授

和田洋一郎 東京大学駒場オープンラボラトリー・助手

#### A. 研究目的

本研究班の柱とする研究目的は、「遺伝子発現プロファイルの臓器別データベースを整備することにより、原因不明の疾患において罹患している臓器においてその遺伝子発現を解析し、発現変動を生じている遺伝子群を包括的に捉え、治療法開発のための最適の標的となる代謝経路を見いだすこと」にある。網羅的遺伝子発現プロファイル解析法については、GeneChip (Affymetrix)による解析法あるいはStanford大学のBrown等により開発されたマイクロアレイ法が近年実用化されつつあり、臨床検体の解析にも利用されてきている。平成11年度は3年計画の初年度として遺伝子発現プロファイル解析法

に関する基礎的検討と発現プロファイルのデータベース構築に着手した。さらに、分担研究者においては、糖原病患者肝における遺伝子発現プロファイル解析（梶村）、動脈硬化症進展に重要と考えられる泡沫細胞化病変における遺伝子発現の変化（児玉）に関する研究にも着手した。

## B. 研究方法と結果

### 1. GeneChip (Affymetrix)による網羅的遺伝子発現プロファイル解析法に関する基礎的検討

#### 1) RNAの標識法に関する検討

同一のヒト肝から得られた Poly(A)+RNA および全 RNA から作成した biotin 標識 cRNA を用いて、Test1 アレイに対してハイブリダイゼーションを行った結果、大変よい再現性を示した。なお、使用する検体量としては 5-10<sub>g</sub> の全 RNA 試料が必要とされ、定量性を維持しつつ増幅を行う技術開発が必要であると考えられた。

#### 2) オリゴヌクレオチドアレイ法 (GeneChip) の定量性検討

オリゴヌクレオチドアレイ法の定量性について SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法との比較により検討した。SAGE 法は cDNA 由来の 10 塩基のタグの出現頻度を数えることにより、遺伝子の発現レベルを定量的に解析することができる。同一検体を用いて GeneChip 法の発現強度と SAGE 法の出現頻度との比較を行ったところ、大変よい相関が得られた。

### 2. 遺伝子発現プロファイルデータベースの構築

遺伝子発現の組織特異性については、GeneChip データとともに SAGE データを統合す

ることにより、遺伝子毎に種々の細胞や臓器での発現レベルが一覧できるようにデータベースの構築に着手した。組織特異的な遺伝子発現データベースについて、胎児脳、副腎、単球、マクロファージ、胃（噴門部）、胃（幽門部）、肝臓、色素細胞、血管内皮細胞、結膜細胞株、肝癌細胞株 HepG2、白血病細胞株 THP1、HL60、表皮細胞株 HaCaT など 14 種類の臓器あるいは細胞について、最大 30,000 個の遺伝子発現データを GeneChip 解析により収集し、Oracle サーバ下にデータベース化した。

SAGE あるいはマイクロアレイなどの発現情報データベースとの Unigene クラスタ番号によるリンク及び Unigene のバージョン変更に伴うデータベースの自動更新についてもプログラムを作成した。データの標準化はデータベース化の際の問題点であるが、類似の発現プロファイルを示す検体間での比較には、チップ全体からのシグナルの総和を一定化することによる標準化が最適と考えられた。

多数のトランスクリプトーム解析情報をクラスタ解析法について検討した。癌部と非癌部組織のプロファイルの比較には二方向のクラスタリングが有効であった。

### 3. 発現プロファイル解析による病態解析

罹患臓器から採取した検体から得られた遺伝子発現プロファイルと比較することにより、発現変動の見られる遺伝子群を責任遺伝子候補としてパネル化する。罹患組織に初期病変、進行した病変が認められる場合には、別個に解析を行うことで、より詳細に連続的な遺伝子発現の変動を捉えることが可能である。

## 1) 動脈硬化症における泡沫細胞化に関する解析

動脈硬化症進展に重要と考えられる泡沫細胞化に関して、本年度は末梢血単球からマクロファージへの分化における遺伝子発現プロファイル解析を行い、アポ E やアポ CI など脂質代謝に関連する遺伝子群など興味深い遺伝子発現変動が観察された。また、従来マクロファージ様のヒト細胞株として汎用されている THP-1 細胞についても PHA 刺激による泡沫化を試みているが、ヒトマクロファージとは遺伝子発現プロファイルがかなり異なることが示された。

## 2) 糖原病 I 型 (von Gierke 病) における遺伝子発現プロファイル異常

糖原病 I 型(von Gierke 病)は、原因遺伝子の同定がごく最近されたものの、依然として治療困難な疾患で、報告によるとキャリアーが 200 人にひとり存在するという常染色体劣性遺伝病である。本疾患は、肝腫瘍を発生することでしられ、糖原病患者に合併した肝細胞癌について非癌部あるいは非罹患者の正常肝組織との発現プロファイル解析を行い、肝発がんの機構解明を試みた。従来の Differential display 法による解析も並行して行い、比較を行った。

GeneChip 解析により非癌部と癌部についての発現プロファイルを比較した結果では、その病理組織像が中等度分化型であったことを反映して、かなり異なるものであった。一般の肝組織および肝細胞癌における発現プロファイルを合わせたクラスタ解析では、網羅的な遺伝子発現プロファイルによる癌の分子診断への応用の可能性が示された。発現プロファイルと組織学的な分化度との相関についてさらに検討が必要で

ある。糖原病については非癌部組織と高分化型肝細胞癌との類似性が示唆され、発現変化を来している遺伝子群について詳細な検討を行うとともに、複数の症例を検討することも必要である。

## C. 考察と結論

本年度において、網羅的遺伝子発現プロファイル解析法について、特に GeneChip 法に関する基礎的検討を行い、定量性に関して信頼性の高い解析法であることが示された。但し、臨床検体の解析のためにはより些少な組織あるいは細胞からの解析法の新規開発も必要と考えられた。

4 万個の遺伝子に関する発現情報が収集され、新規のデータベースの構築は必須であった。

動脈硬化症の進展に重要と考えられる泡沫細胞化に関して、遺伝子発現プロファイル解析を行い、興味深い遺伝子発現変動が観察されており、次年度以降の研究の発展が期待された。

糖原病 I 型についての発現プロファイル情報を収集した。従来の Differential display 法による解析とも同様な解析結果が得られ、GeneChip 法の高効率性、信頼性が実証された。

次年度においては対象疾患として炎症性腸疾患の発症機構についても動物モデルの解析も交えて取り組む予定である。

謝辞 研究協力者の先生方には、遺伝子発現プロファイルのデータベース化へ向けて貴重な試料やデータを御提供いただきましたことをここに深謝いたします。

### Ⅲ.分担研究者報告



## 原発性高脂血症の細胞生物学的研究

分担研究者 児玉 龍彦 東京大学先端科学技術研究センター 教授

**研究要旨** 原発性高脂血症は多因子性遺伝疾患である動脈硬化の大いなる危険因子である。動脈硬化病変で認められる泡沫細胞は、病変の進展において血管壁の変性脂質を貪食し、その無制限の貪食によって壊死に至り、血管壁局所での脂質蓄積を促進すると推測されている。泡沫細胞の形成メカニズムを明らかにするべく、ヒト単球細胞由来のマクロファージを用いて、GeneChip(Affymetrix)によってcDNA6800個の発現パターンを明らかにした。その結果、apoE や apoCIなどを始めとする脂質代謝に関連する遺伝子群に著明な発現誘導が明らかになった。これらの遺伝子群については、泡沫細胞の機能を反映している可能性も高く、動脈硬化進展において泡沫細胞が実際に果たしている役割についてさらに解析を進める。

### A. 研究目的

原発性高脂血症は多因子性遺伝疾患である動脈硬化の大いなる危険因子である。動脈硬化病変で認められる泡沫細胞については役割に不明な点が多い。病変の進展において血管壁の変性脂質を貪食し、その無制限の貪食によって壊死に至り、血管壁局所での脂質蓄積を促進すると推測されている。末梢血流中に泡沫細胞が存在したり、豊富なRNA量から盛んな蛋白合成が推測されるなど、積極的な役割を果たしている可能性がある。泡沫細胞の形成メカニズムを明らかにするべく、GM-CSF刺激により得られるヒト末梢血単球細胞由来のマクロファージを用いて、遺伝子発現プロファイル解析を行った。同時にマクロファージ系細胞株である THP-1 細胞につ

いても PMA 刺激を行うことによりマクロファージへと誘導し、同様に発現プロファイルの解析を行った。

### B. 研究方法

**試料** 単球細胞はヒト末梢血から CD14 陽性細胞として回収した。マクロファージは GM-CSF (キリン) 刺激下で培養 7 日目を用いた。また、培養ヒトマクロファージ系といわれる THP-1 細胞を PMA 刺激により分化させたマクロファージについての解析も行った。  
**RNA の調製と標識** ISOGEN (ニッポンジーン) によって total RNA を回収、さらに Oligo dT ビーズ法を用いて mRNA を調製した。1  $\mu$ g の mRNA を用いて、二本鎖 cDNA を合成し、約 2  $\mu$ g の cDNA を得る。これを鋳型として in vitro 転写反応を行い、ビオチンで標識され

た UTP および CTP で標識された約 100  $\mu$ g の RNA を調製、断片化後、GeneChip に添加し、16 時間ハイブリダイゼーションする。終了後、で標識した streptavidin を用いて結合した RNA を染色し、共焦点レーザーキャナーで読みとり、チップ上のプローブ遺伝子の発現の強度を算出した。プローブアレイには GeneChip FL アレイを用いた。

以上のようにして末梢血単球において、6800 のヒト既知遺伝子の発現プロファイルを定量した。同時に、その結果を同様の GM-CSF 刺激下で誘導されたマクロファージにおける発現プロファイルと比較することによって、泡沫細胞において高度に発現している遺伝子を同定した。

### C. 研究結果

#### 単球、マクロファージにおける遺伝子発現解析

マクロファージの遺伝子発現を検討してみたところ、所謂マーカー蛋白や、細胞運動関連の蛋白と共に、apoE や LXR, apoC-I を初めとする脂質代謝関連遺伝子の強発現が示された。

#### THP-1 における遺伝子発現解析

培養ヒトマクロファージ系といわれる THP-1 細胞の PMA 刺激での遺伝子発現は、本当のヒトの単球からマクロファージへの分化とはかなり異なっていた (表 2)。

表 2.

	THP-1	THP-1/PMA	単球	マクロファージ	
アポ E	40	1810	-234	5998	両方増加
LXR $\alpha$	-31	-8	-67	1115	マクロファージでのみ増加

図 1. 単球とマクロファージにおける遺伝子発現

横軸に単球、縦軸にマクロファージにおける遺伝子発現強度をスキャッターグラフで示す。

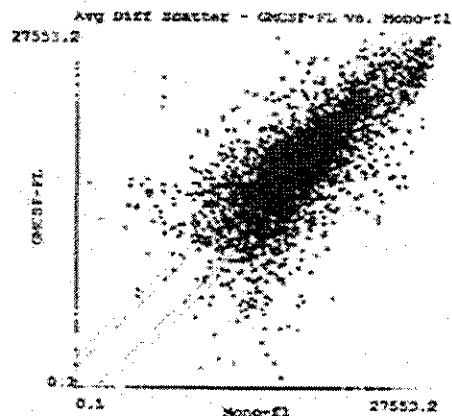


表 1. マクロファージへの分化に際して発現誘導を受ける遺伝子

順位	fold	遺伝子名
1	229.5	apolipoprotein E
2	174.5	type IV collagenase
3	95.3	cartilage GP-39 protein,
4	84.9	apolipoprotein C-I (VLDL)
5	77.3	plasma gelsolin
6	74.7	28 kDa heat shock protein
7	42.7	tartrate-resistant acid phosphatase type 5
8	41.6	chitotriosidase precursor
9	40	CD9 antigen
10	39	nuclear orphan receptor
11	38.9	NMB
12	37.7	transformation-sensitive protein
13	35.8	SPARC/osteonectin
14	34.2	alpha-2-macroglobulin
15	32	osteopontin gene, complete cds
16	29.6	cam kinase I
17	29.3	Matk
18	29	ribonuclease A (RNase A)
19	28.3	transferrin receptor
20	28.3	pro-galanin

#### D. 考察

シリコン基板上にプローブ遺伝子を高密度に付着させた DNA チップ法のうち, GeneChip (Affymetrix 社)を用いての既知遺伝子と 35,000 個の EST の網羅的遺伝子発現解析による細胞のプロファイリングが可能となった。実際, 我々はマクロファージの遺伝子発現を検討してみたところ, 所謂マクロファージのマーカー蛋白や, 細胞運動関連の蛋白と共に apoE や LXR, apoC-I を初めとする脂質代謝関連遺伝子の強発現が示された。このように本法では, 細胞本来の機能に関する遺伝子が浮き彫りにされる可能性が高く, 泡沫細胞も同様の手法で役割が明らかになると考えられた。

また, 従来マクロファージ系細胞株として脂質代謝研究に広く用いられてきた THP-1 細胞については, その発現プロファイルについて今回用いたマクロファージとはかなり異なることが明らかとされた。

#### D. 結論

ヒト単球及びマクロファージにおいて 6800 個の遺伝子の発現プロファイルを明らかにした。その結果, apoE や apoC-I などをはじめとする脂質代謝に関連する遺伝子群に著明な発現誘導が明らかになった。これらの遺伝子群については, 泡沫細胞の機能を反映している可能性も高く, 動脈硬化進展において泡沫細胞が実際に果たしている役割についてさらに解析を進める予定である。従来, マ

クロファージ研究には PMA 刺激した THP-1 細胞がモデルとされてきたが, 6800 個の遺伝子プロファイル解析では, LXR $\alpha$ の上昇がみられないなど, 正常ヒトマクロファージとはかなり異なることが証明された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takeshi Murakami, Chikage Mataka, Chizuru Nagao, Michihisa Umetani, Youichiro Wada, Masami Ishii, Shyuichi. Tsutsumi, Takahide Kohro, Akio Saiura, Hiroyuki Aburatani, Takao Hamakubo and Tatsuhiko Kodama. The gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor  $\alpha$  using DNA microarray analysis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 2000, in press
- 2) Chikage MATAKI, Takeshi MURAKAMI, Michihisa UMETANI, Youichiro WADA, Masami ISHII, Shuichi TSUTSUMI, Hiroyuki ABURATANI, Takao HAMAKUBO and Tatsuhiko KODAMA. A novel zinc finger protein mRNA in human umbilical vein endothelial cell is profoundly induced by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 2000, in press
- 3) Takahide Kohro, Toshiaki Nakajima, Yoichiroh Wada, Akira Sugiyama, Masami Ishii, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Issei Imoto, Johji

Inazawa, Takao Hamakubo, Tatsuhiko	2000年4月3日大阪
Kodama, Mitsuru Emi. GENOMIC	2) 日本動脈硬化ランチョンセミナー
STRUCTURE AND MAPPING OF HUMAN	脂質代謝調節の分子機構
ORPHAN RECEPTOR LXR ALPHA :	1999年11月25日
UPREGULATION OF LXR $\alpha$ mRNA	3) 安藤賞記念講演「ゲノム科学と人間」
DURING MONOCYTE TO MACROPHAGE	2000年3月24日 東京
DIFFERENTIATION. in submission	

2. 学会発表

- 1) 日本循環器病学会ランチョンセミナー  
「動脈硬化のトランスクリプトーム解析」

F. 知的所有権の所有状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

遺伝子発現変異の包括的解析のための遺伝子発現データベースの  
構築に関する研究

分担研究者 油谷浩幸 東京大学先端科学技術研究センター助教授

研究要旨 「遺伝子発現プロファイルの臓器別データベースを整備することにより、原因不明の疾患において罹患している臓器においてその遺伝子発現を解析し、発現変動を生じている遺伝子群を包括的に捉え、治療法開発のための最適の標的となる代謝経路を見いだすこと」を目的として、遺伝子発現プロファイル解析法に関する基礎的検討と発現プロファイルのデータベース構築に着手した。胎児脳、副腎、単球、マクロファージ、胃（噴門部）、胃（幽門部）、肝臓、色素細胞、血管内皮細胞、結膜細胞株、肝癌細胞株、白血病細胞株、表皮細胞株などの 14 種類の臓器あるいは細胞について最大 30,000 個の遺伝子発現データを収集した。

A. 研究目的

「遺伝子発現プロファイルの臓器別データベースを整備することにより、原因不明の疾患において罹患している臓器においてその遺伝子発現を解析し、発現変動を生じている遺伝子群を包括的に捉え、治療法開発のための最適の標的となる代謝経路を見いだすこと」を目的とする。網羅的遺伝子発現プロファイル解析法については、GeneChip (Affymetrix)による解析法あるいはStanford 大学の Brown 等により開発されたマイクロアレイ法が近年実用化されつつあり、臨床検体の解析にも利用されてきている。平成 11 年度は 3 年計画の初年度として遺伝子発現プロファイル解析法に関する基礎的検討と発現プロファイルのデータベース構築に着手した。

B. 研究方法

1. オリゴヌクレオチドアレイ法 (GeneChip)  
の定量性検討

RNA 試料標識法の比較 同一のヒト肝から得られた Poly(A)+RNA および全 RNA から作成した biotin 標識 cRNA を用いて、Test1 アレイに対してハイブリダイゼーションを行った。測定法の概略は下記の通りである。ISOGEN (ニッポンジーン) によって total RNA を回収、さらに Oligo dT ビーズ法を用いて mRNA を調製した。1  $\mu$ g の mRNA を用いて、二本鎖 cDNA を合成し、約 2  $\mu$ g の cDNA を得る。これを鋳型として in vitro 転写反応を行い、ビオチンで標識された UTP および CTP で標識された約 100  $\mu$ g の RNA を調製、断片化後、GeneChip に添加し、16 時間ハイブリダイゼーションする。終了後、で標識した

streptavidin を用いて結合した RNA を染色し、共焦点レーザースキャナーで読みとり、チップ上のプローブ遺伝子の発現の強度を算出した。

**定量性検討** GeneChip 法以外で mRNA 量を定量的に解析する包括的モニタリング法として SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法がある。SAGE 法は cDNA 由来の 10 塩基のタグの出現頻度を数えることにより、遺伝子の発現レベルを定量的に解析することができる。東京大学医学部衛生学教室との共同研究により、同一検体を用いての SAGE 法による解析データとの比較を行うことにより、両者の間でのデータの互換性を検討した。単球細胞はヒト末梢血から CD14 陽性細胞として回収し、マクロファージは GM-CSF (キリン) 刺激下で培養 7 日目を用いた。GeneChip 解析にはそれぞれ 1  $\mu$ g の mRNA を用いた。SAGE 解析には制限酵素 NlaIII を用いてそれぞれから 6 万個に近い tag を解読した。GeneChip 法の発現強度と SAGE 法の出現頻度について、それぞれの検体における発現強度 (absolute 解析) 及び検体間の発現変化率 (comparative 解析) についての比較を行った。

## 2. データベースの構築

GeneChip データとともに SAGE データを統合することにより、遺伝子発現の組織特異性について遺伝子毎に種々の細胞や臓器での発現レベルが一覧できるようなデータベースを構築を試みた。データベース化に際して発現プロファイルデータの標準化について検討を行った。

## 3. 発現プロファイル解析

末梢白血球は健常者ボランティアより同意の下に採取された。胃組織および肝組織は患者の同意の下に手術時に腫瘍と共に切除された非癌

部組織の一部として採取された。胎児脳及び副腎 mRNA は Clontech 社 (米国) より、HUVEC 細胞はクラボウより購入した。その他に解析に用いた細胞株は、結膜上皮細胞株 CCL (東京歯科大学)、白血病細胞株 HL-60 (ファイザー研究所)、THP-1 (東大先端研・分子生物)、上皮細胞株 HaCaT (癌研究所)、肝癌細胞株 HepG2 (国立健康栄養研究所) である。それぞれより mRNA を調製し、GeneChip FL アレイを用いて発現プロファイリングを行った。

(倫理的配慮) 新鮮なヒト血液あるいは組織についてはいずれも予め被験者より同意を得た上で採取した。

## C. 研究結果

### 1. オリゴヌクレオチドアレイ法 (GeneChip) の定量性検討

**RNA 試料標識法の比較** 同一のヒト肝から得られた Poly(A)+RNA および全 RNA から作成した biotin 標識 cRNA を用いて、Test1 アレイに対してハイブリダイゼーションを行った結果、大変よい再現性を示した (図 1)。

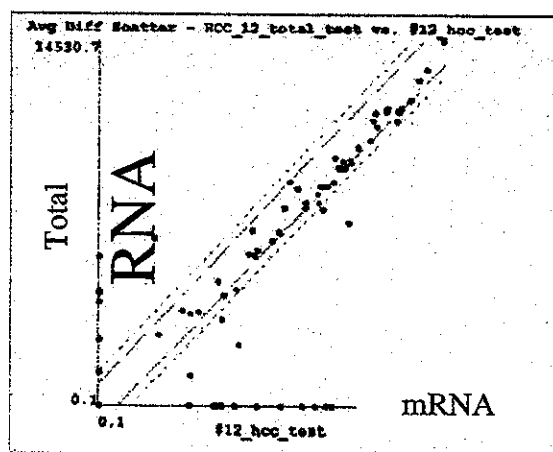


図 1. RNA 精製法による比較

横軸に mRNA、縦軸に全 RNA を用いて得られた発現強度を対数尺度で示した。

全 RNA を用いるプロトコールでは若干 cRNA の伸長が悪い印象もあるが、GeneChip 上のプローブは主に 3' 側にデザインされていることもあり、影響は少ないものと考えられた。

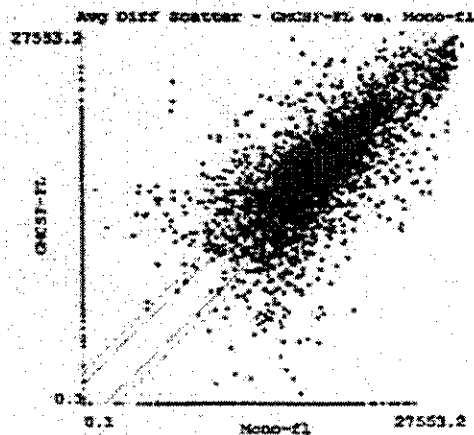
**定量性検討** ヒト単球および GM-CSF を用いて分化させたマクロファージから調製した同一の RNA を検体として、SAGE 法とオリゴ DNA チップ法の定量性についての評価した (図 2)。GeneChip 法の発現強度と SAGE 法の出現頻度との比較を行ったところ、大変よい相関が得られた。SAGE 法ではそれぞれ 6 万弱のタグの配列を決定し、GeneChip 解析ではヒト FL アレイを用いて発現プロファイルを解析したところ、単一試料からの蛍光強度 (absolute analysis) にお

いて、GeneChip による発現強度と SAGE 法による発現頻度との相関係数は  $r \approx 0.7$  とかなりよい相関が認められた (図 2)。1 つの細胞に存在する mRNA は 30 万コピーといわれ、発現量の少ない遺伝子についてはデータがばらつくのはやむを得ないと考えられた。さらに、単球からマクロファージへの分化において発現が誘導される遺伝子群について比較したところ、発現増加率上位 20 遺伝子中、14 遺伝子が共通に認められ、GeneChip 法で得られる発現強度データの定量性を示すものと考えられた (表 1)。とりわけ上位 4 遺伝子は共通であり、また、変化倍率についても近い関係が認められた。

図 2. 単球とマクロファージにおける遺伝子発現プロファイル解析

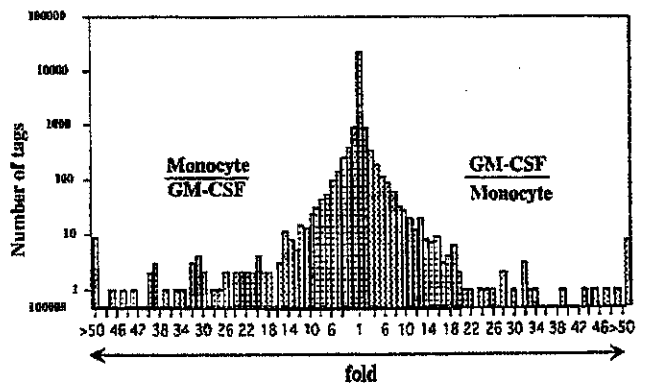
a. GeneChip 法

横軸に単球、縦軸に GM-CSF により分化誘導したマクロファージにおける発現強度を log スケールにて示す。



b. SAGE 法

左側に単球、右側に GM-CSF により分化誘導したマクロファージにおける出現頻度の倍率をヒストグラムで示す。0 回が分母になる場合には 1 回とした。



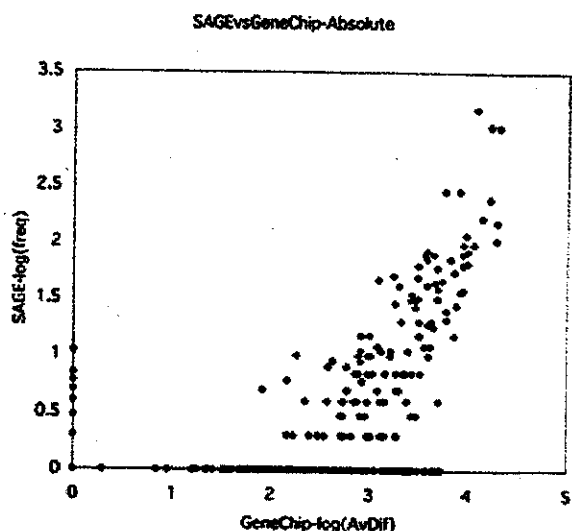


図 3. GeneChip 法と SAGE 法による発現プロファイルの比較 (absolute 解析)

横軸に GeneChip 法による発現強度、縦軸に SAGE 法によるタグの出現頻度を共に対数スケールで表示した。

表 1. 単球からマクロファージへの分化に際して誘導される遺伝子群のリスト: GeneChip 法と SAGE 法の比較

順位	fold	GeneBank	順位	fold	GeneBank
1	229.5	<u>apolipoprotein E</u>	1	288	<u>cartilage GP-39</u>
2	174.5	<u>type IV collagenase</u>	2	252	<u>apolipoprotein C-I (VLDL)</u>
3	95.3	<u>cartilage GP-39 protein</u>	3	174	<u>apolipoprotein E</u>
4	84.9	<u>apolipoprotein C-I (VLDL)</u>	4	151	<u>type IV collagenase</u>
5	77.3	<u>plasma gelsolin</u>	5	117	<u>macrophage-derived chemokine precursor</u>
6	74.7	28 kDa heat shock protein	6	72	<u>plasma gelsolin</u>
7	42.7	<u>tartrate-resistant acid phosphatase type 5</u>	7	71	<u>chitotriosidase precursor</u>
8	41.6	<u>chitotriosidase precursor</u>	8	64	<u>tartrate-resistant acid phosphatase type 5</u>
9	40	<u>CD9 antigen</u>	9	39	<u>NMB</u>
10	39	<u>nuclear orphan receptor</u>	10	39	<u>lysosomal acid lipase</u>
11	38.9	<u>NMB</u>	11	38	<u>fructose-1,6-biphosphatase (FBP1)</u>
12	37.7	<u>transformation-sensitive protein</u>	12	37	<u>retinoic acid-binding protein II</u>
13	35.8	<u>SPARC/osteonectin</u>	13	35	<u>transformation-sensitive protein</u>
14	34.2	<u>alpha-2-macroglobulin</u>	14	32	<u>CD9 antigen</u>
15	32	<u>osteopontin gene</u>	15	32	<u>osteopontin</u>
16	29.6	<u>cam kinase I</u>	16	31	<u>SPARC/osteonectin</u>
17	29.3	<u>Matk</u>	17	31	<u>alpha-2-macroglobulin</u>
18	29	<u>ribonuclease A (RNase A)</u>	18	31	<u>chromosome 17q21 mRNA clone LF113</u>
19	28.3	<u>transferrin receptor</u>	19	31	<u>LDL-phospholipase A2</u>
20	28.3	<u>pro-galanin</u>	20	30	<u>vitamin D3 25-hydroxylase</u>

## 2. データベースの構築

オリゴヌクレオチドチップ解析においては、対照検体なしに発現レベルをモニタリングで

きるので、組織間の発現量を比較しやすいと考えられた。さらに、遺伝子発現の組織特異性については、GeneChip データとともに



SAGE データを統合することにより、遺伝子毎に種々の細胞や臓器での発現レベルが一覧できるように、Unigene アドレスを用いて統合データベースの構築を進めた。データの標準化については、類似の発現プロファイルを示す検体間での比較には、チップ全体からのシグナルの総和を一定化することにより標準化した。一方、プロファイルが大きく異なる組織間での比較を行うような場合には、housekeeping 遺伝子あるいは実験者がコントロールとして用いている遺伝子など、試料間で一定の発現をしていると考えられるプローブで標準化を行う必要も考慮されたが、実際上発現量が一定であるような遺伝子セットの設定は困難であった。

### 3. 発現プロファイル解析

末梢血由来単球、GM-CSF 刺激により誘導されたマクロファージ、胃組織（噴門部、幽門部）、肝組織（健常肝、慢性肝炎、肝硬変）、HUVEC 細胞、結膜上皮細胞株 CCL、白血病細胞株 HL-60、THP-1、上皮細胞株 HaCaT、肝癌細胞株 HepG2 については、組織あるいは培養細胞より RNA を調製し、発現プロファイル解析に使用した。胎児脳、副腎については購入した Poly(A)+RNA を用いて解析を行った。

### D. 考察

現在の標準プロトコールは cDNA の合成を行うために 1  $\mu$ g の Poly(A)+RNA を鋳型に用いる。10  $\mu$ g 程度の全 RNA からでも解析に支障は無いことが示されたが、今後ヒトの組織あるいは特定の細胞種についての遺伝子発

現プロファイルを解析する際には、得られる検体量が限られるため、より少量の検体での解析が望まれる。

SAGE 法との比較では absolute 解析および comparative 解析共に良好な相関が認められ、遺伝子発現プロファイルをデータベース化してゆく上で信頼できる技術であることが示された。一方、別の実験系ではノーザンブロット法による検証も進めているが（データ発表準備中）、1/4 程度は GeneChip データと合致しないこともあり、プローブに用いた配列の見直しなども次のデザインにおいては改善されることが望まれた。

14 の組織あるいは細胞における発現プロファイルデータの収集を終了した。特定の細胞種に特異的に発現しているような遺伝子の同定を急いでいる。本年度は最大 35K チップまでが使用可能であったが、60K アレイが利用可能となり、次年度においては 60K を対象として難治性疾患の発症に関与するような遺伝子の同定につながることを期待された。

### E. 結論

GeneChip 法は遺伝子発現プロファイルをデータベース化してゆく上で信頼できる技術であることが示された。些少な臨床検体を扱うためには、プロトコールの改善も必要と考えられた。

6800 個の遺伝子について、14 種類のヒト細胞あるいは組織の発現プロファイルを収集し、データベース化した。

### F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masami Ishii, Shin-ichi Hashimoto, Shuichi Tsutsumi, Yoichiro Wada, Kouji Matsushima, Tatsuhiko Kodama and Hiroyuki Aburatani. (2000) Direct comparison of SAGE and GeneChip on quantitative accuracy in the transcript profiling analysis. *submitted*.
- 2) Takeshi Murakami, Chikage Mataka, Chizuru Nagao, Michihisa Umetani, Youichiro Wada, Masami Ishii, Shyuichi. Tsutsumi, Takahide Kohro, Akio Saiura, Hiroyuki Aburatani, Takao Hamakubo and Tatsuhiko Kodama. (2000) The gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor  $\alpha$  using DNA microarray analysis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, in press.
- 3) Chikage MATAKI, Takeshi MURAKAMI, Michihisa UMETANI, Youichiro WADA, Masami ISHII, Shuichi TSUTSUMI, Hiroyuki ABURATANI, Takao HAMAKUBO and Tatsuhiko KODAMA. (2000) A novel zinc finger protein mRNA in human umbilical vein endothelial cell is profoundly induced by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, in press
- 4) Takahide Kohro, Toshiaki Nakajima, Yoichiro Wada, Akira Sugiyama, Masami Ishii, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Issei Imoto, Johji Inazawa, Takao Hamakubo, Tatsuhiko Kodama, Mitsuru Emi. (2000) Genomic Structure and Mapping of Human Orphan Receptor LXR $\alpha$ : Up-regulation of LXR $\alpha$  mRNA during Monocyte to Macrophage Differentiation. *submitted*.
- 5) Shingo Akiyoshi, Masami Ishii, Kohei Miyazono, Hiroyuki Aburatani and Masahiro Kawabata. (2000) Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor- $\beta$ : expression profile analysis using oligonucleotide arrays. *submitted*.
- 6) Sumiko Abe-Dohmae, Shogo Suzuki,

Youichiro Wada, Hiroyuki Aburatani, Dennis E. Vance and Shinji Yokoyama. (2000) Characterization of Apolipoprotein-Mediated HDL Generation Induced by cAMP in Mouse Macrophage Cell Line Cells. *submitted*.

2. 学会発表

- 1) 第 58 回日本癌学会 1999 年 9 月  
「遺伝子発現プロファイル (トランスクリプトーム) 解析による癌研究: GeneChip による解析と SAGE 法の比較」油谷、他  
「神経細胞芽腫におけるゲノムおよびトランスクリプトーム解析」堤、油谷、ほか
- 2) 第 22 回日本分子生物学会 1999 年 12 月  
「DNA チップを用いた腹膜播種関連遺伝子の解析」筆宝、油谷、ほか  
「DNA チップによる新規創薬標的遺伝子の探索と薬剤作用の検証」油谷、他  
「遺伝子発現プロファイル (トランスクリプトーム) 解析法の比較検討: GeneChip による解析と SAGE 法の比較」石井、油谷、他
- 3) 第 50 回米国人類遺伝学会 1999 年 10 月  
Direct comparison of SAGE and GeneChip on quantitative accuracy in the transcript profiling analysis. 油谷、他

3. 講演

- 1) 第 17 回日本臨床化学会関東支部例会 1999.11.27 東京  
「遺伝子チップ技術と臨床への応用」油谷浩幸
- 2) 第 2 回「開放的融合研究国際シンポジウム」2000.1.31 東京  
「リボゾーム遺伝子と発現プロファイル解析」油谷浩幸
- 3) 理化学研究所 2000.2.10 和光  
「GeneChip による遺伝子発現解析」油谷浩幸
- 4) バイオ産業・事業の創造的開発強化研究会 2000.2.15 東京  
「ゲノム科学とバイオインフォマティクスー DNA チップ技術を中心としてー」油谷浩幸
- 5) 第 2 回ヘリックス研究所シンポジウム 2000.3.3 木更津  
「GeneChip による遺伝子発現解析」油谷浩幸

G. 知的所有権の所有状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

糖原病 I 型における遺伝子発現異常の研究

分担研究者 梶村 春彦 浜松医科大学第一病理学教室 教授

研究要旨 糖原病 I 型 (von Gierke 病) は原因遺伝子の同定はなされているが、肝腫瘍の発生の機構には不明の点が多い。「原因不明の病態において罹患している臓器においてその遺伝子発現を解析し、発現変動を生じている遺伝子群を包括的に捉え、治療法開発のための最適の標的となる代謝経路を見いだすこと」を目的として、糖原病 I 型患者の肝細胞とくにその病変部における遺伝子発現プロファイルを Differential Display 法と GeneChip 法によって探索した。Differential display 法で検出された癌特異的に増幅された DNA 断片については、今後ゲノム情報が蓄積するにつれて由来する遺伝子が明らかになることが期待される。クラスタ解析は網羅的な遺伝子発現プロファイルによる癌の分子診断への応用の可能性を示した。GeneChip 解析は包括的な遺伝子発現プロファイル解析に有効であり、分子レベルでの疾患の診断を可能にするものと期待される。

A. 研究目的

糖原病 I 型 (von Gierke 病) は、原因遺伝子 Glucose-6-Phosphatase の同定がごく最近されたものの、依然として治療困難な疾患で、報告によるとキャリアーが 200 人にひとり存在するという常染色体劣性遺伝病である。本疾患は、罹患者に肝腫瘍を発生することで知られるが、本疾患の肝組織像は、Fatty metamorphosis と Glycogen nuclei を特徴とする、淡明な肝細胞が増生している像であり、ときに腺腫、肝細胞癌の区別がつきにくいこともある。rodent の化学肝発癌の研究では、初期病変としての Clear cell focus が有名であり、糖代謝の変化は腫瘍化の機構を探る上で重要であると考えられる。従って、本疾患は稀ではあるが、肝腫瘍発生機序の解明の一助となる可能性がある。本年度は、本疾患における遺伝子発現をとくに腫瘍形成部とそうでない部分との比較、あるいは、本邦で、頻度の高

いウイルス肝炎を基盤した肝病変との比較をできるだけ、網羅的に見い出そうと試み、以下 2 つの方法をとって解析をした。

B. 研究方法

1) Differential display 法による遺伝子発現変化の解析 糖原病肝に発生した腫瘍と周辺の肝組織で発現している transcript を探索するために、DNAchip 解析よりも、以前から知られている Differential display 法を試みた。

図 1. 糖原病 I 型患者に発生した肝腫瘍



糖原病 I 型 (文献 1) に発生した肝腫瘍および周辺肝組織から、RNA を抽出、GenHunter 社の RNA image kit に従って、T12MC(M は G,A,C の degenerated) cDNA を合成し、プライマーは AP-6 をもちいた (文献 2,3 参照)。同様に HCV 陽性の肝癌、HBV 陽性の肝癌、さらに HBV 陽性の糖原病、ウイルス陰性の糖原病に発生した肝癌について同様のことをおこなった。S35 標識 dATP 存在下で、anchor にした oligo dT プライマーと arbitrary プライマーの H-AP80 で比較的ゆるい条件で PCR をかけた。PCR 増幅産物を 6% の変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動したのち、3MM ペーパーにうつして、最終的に 40cm 長のフィルムに現像し、各レーンのバンドの異同を検討した。比較的是っきりしたバンドは 4 種であり、以下そのバンドについて検討をすすめた。

2) GeneChip 解析 肝炎ウイルス陰性例について非癌部、癌部組織より調製された RNA を用いて発現プロファイル解析を行った。GeneChip FL アレイを用いて 6800 個の遺伝子の発現プロファイルデータを収集した。代表研究者である東京大学先端科学技術研究センター油谷研究室と共同して、他の肝細胞癌および肝組織の発現プロファイリングデータとの比較を行った。比較のためには、クラスタ解析を遺伝子及び試料それぞれについて二方向に行った。

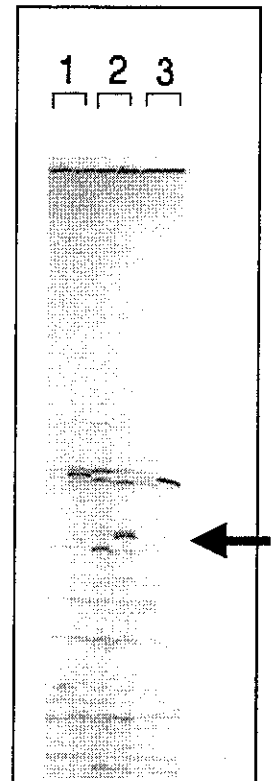
(倫理的な配慮) 肝腫瘍切除の際に得られた癌部、非癌部の組織の採取に関しては、患者の同意の下に行われた。

### C. 研究結果

1) Differential display 法による遺伝子発現変化の解析 結果として、4 種の断片が腫瘍のみでみとめられ、その塩基配列を決定し、Blast 検索

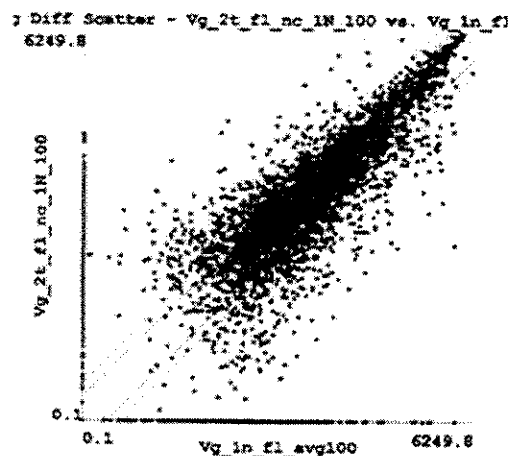
図 2 Differential display 法による遺伝子発現変異の検出

矢印のバンドが腫瘍 RNA のみで増幅されている。



をおこなったところ、一つは aldo-keto reductase であったが、残りは現時点で未知のものであった。

図 3 糖原病 I 型患者に合併した肝細胞癌組織の遺伝子発現プロファイルと周辺部非癌部組織の比較



それぞれの発現強度を対数尺度にて表示した。外側の線は 3 倍、内側は 2 倍の変化を表す。