

20000653

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 12 年度 総括・分担研究報告書

(1 / 2 冊)

主任研究者 油 谷 浩 幸

平成 13 (2001) 年 3 月

目次

I	構成員名簿	1
II	平成12年度総括研究報告書	3
III	平成12年度分担研究報告書	
	オリゴヌクレチドアレイ法 (Gene Chip) による試料解析法に関する検討 (1) 微量 RNA 試料解析法の検討	18
	東京大学先端科学技術研究センター 助教授 油谷 浩幸	
	オリゴヌクレチドアレイ法 (Gene Chip) による試料解析法に関する検討 (2) 複数検体データ処理法の検討	22
	東京大学先端科学技術研究センター 助教授 油谷 浩幸	
	発現プロファイルデータベースの構築に関する研究	26
	東京大学先端科学技術研究センター 助教授 油谷 浩幸	
	糖原病に合併する肝腫瘍における包括的遺伝子発現に関する研究	30
	浜松医科大学第一病理学教室 教授 梶村 春彦	
	炎症性腸疾患における発現遺伝子の包括的解析に関する研究	34
	横浜市立大学医学部第三内科 講師 中島 淳	
	低酸素下低比重リボ蛋白質負荷による冠動脈平滑筋における 遺伝子発現	37
	東京大学駒場オープンラボラトリー 助手 和田 洋一郎 東京大学先端科学技術研究センター 教授 児玉 龍彦	
IV	研究成果の刊行に関する一覧表	44

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 ゲノムサイエンス分野	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 分生物医学分野	教 授
分担研究者	梶村 春彦	浜松医科大学第一病理学教室	教 授
分担研究者	中島 淳	横浜市立大学医学部第三内科	講 師
分担研究者	和田 洋一郎	東京大学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
 電話 : 03-5452-5352 (直通) F A X : 03-5452-5355

E-mail: haburata-ky@umin.ac.jp (油谷) / hari-ky@umin.ac.jp (森本)

II. 平成12年度総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究研究事業）

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助教授

研究要旨 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パスウェイを見いだすこと」にある。網羅的遺伝子発現プロファイル解析法として、GeneChip (Affymetrix)による解析法あるいは長鎖オリゴヌクレオチドマイクロアレイ法を取り入れ、臨床検体あるいは病態モデル動物組織の発現プロファイル解析にも利用してきた。平成 12 年度は 3 年計画の第 2 年度として、第 1 年度に構築した遺伝子発現プロファイルのデータベースの拡充および公開用サーバーの準備を行うとともに、微量検体からの発現プロファイル解析法に関する基礎的検討やプロファイルデータ解析法の開発に着手した。また、疾患解析への応用例として、高脂血症における泡沫細胞形成、糖原病 I 型肝の肝癌合併のしくみ、炎症性腸疾患のメカニズムについて、DNA チップによる解析を進めた。今年度は炎症性腸疾患についてもモデル実験系を用いての解析にも着手した。次年度はヒト臨床検体における検討を進める予定である。

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

和田洋一郎

東京大学駒場オープンラボラトリー 助手

梶村 春彦

浜松医科大学病理学教室教授

中島 淳

横浜市立大学医学部第三内科講師

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パスウェイを見いだす。そのために、第 2 年度として、遺伝子発現プロファイルのデータベースの拡充および公開用サーバーの準備を行うとともに、微量検体からの発現プロファイル解析法に関する基礎

的検討やプロファイルデータ解析法の開発に着手した。また、解析の実例として、高脂血症における泡沫細胞形成、糖原病 I 型肝の肝癌合併のしくみ、炎症性腸疾患のメカニズムについて、DNA チップによる解析を進めた。

B. 研究方法

(1) オリゴヌクレオチドアレイ法 (GeneChip) による試料解析法に関する検討

1) 微量 RNA 試料解析法の検討

従来の標準プロトコールは cDNA の合成を行うために 1 µg の Poly(A)+RNA を鋳型に用いたが、Poly(A)+RNA を精製する際の操作においてのばらつきや RNA の分解を考えられるため、トータル RNA 5~10 µg を用いて測定を行った。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ことが多く、均一な細胞種からの解析を行うためには、より微量の検体での解析が望まれる。ヒト組織からの特定の細胞の選択的な収集にはマイクロダイセクション法を用いた。装置は Arcturus 社の LM200 を用いた。凍結した組織からマイクロトーム (Leica 社製) を用いて 5.0-7.5 µm 厚の切片を作成し、胃粘膜細胞のみを選択・収集した。キャップ上に回収された組織より RNA を Trizol (GIBCO) を用いて精製した。10~100 ng の全 RNA から T7 付加オリゴ dT プライマーにより逆転写反応を行い、合成した二本鎖 cDNA を鋳型として T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写反応を

行い、cRNA を合成した。ランダムプライマーにより cDNA を作成し、再び T7 RNA ポリメラーゼによる増幅を 2 回繰り返した。最後の *in vitro* 転写反応の際にビオチン標識 UTP および CTP で標識された cRNA を調製、断片化した後、GeneChip とハイブリダイゼーション反応を行った。終了後、フィコエリスリン標識ストレプトアビジンを用いて結合した RNA を染色し、共焦点レーザーキャナーを用いて、チップ上のプローブに結合した蛍光強度を算出した。

2) 複数検体データ処理法の検討

8 人からの正常肝組織 RNA 試料およびそれらの RNA を等量ずつプールした試料を用いて U95A アレイによる解析を行い、比較解析をおこなった。U95A アレイはほぼ既知のヒト遺伝子 12,000 個が載せられたアレイである。個々の試料 RNA から 1.25 µg ずつを混和してプール検体とした。プール検体のデータと個別解析データの平均について相関係数を求めた。また、遺伝子ごとの各プローブセルデータのなかで、同種の検体からのデータ間で共通に使用されているセルのみを用いて、発現値を算出した。互いに 2 倍以上相違する遺伝子数は発現していると考えられるおよそ 4000 遺伝子の中で 1.5 倍あるいは 2 倍以上「不一致 (discordancy)」の認められた割合について検討した。

(2) 遺伝子発現プロファイルデータベースの構築

Oracle あるいは SQL サーバーにデータベースを構築中である。さらに、個々の研究者が GeneChip データを遺伝子毎に種々の細

胞や臓器での発現レベルを一覧できるようにインターフェースを作成した。臓器別の発現データベースを構築するために、最新の Unigene 番号への更新を行い、最新のアノテーションが参照できるように統合データベース化を進めた。

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。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。ヒト肝臓由来の検体およそ 40 例について U95A アレイを用いて解析を行い、上記の標準化を行った。

発現プロファイルデータ公開サーバ これまでに得られた発現プロファイルデータについては、研究者あるいは臨床家にも理解しやすい形でデータを公開することの準備に着手した。

(3) 発現プロファイル解析

初年度において、解析発現プロファイルデータを収集したのに引き続き、今年度はさらに胎児肝、心臓、リンパ球、骨組織、精巣、血管平滑筋についての解析を行った。アレイのフォーマットが変更されたため、一部の検体については従来の FL アレイから U95A アレイによる再測定を行った。一方、モデル動物についても、ラットにおいて海馬、前頭葉、大腸、肝臓、伊東細胞、心臓、脳血管、大動脈、マウスにおいて脳、腎臓、肝臓、骨格筋、網膜組織、嗅球、小脳、胸腺、涙腺などの組織を用いてプロファイリングを行い、データベース化を進めた。

(4) 発現プロファイル解析による病態解析

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、本年度は血管内皮細胞、平滑筋における遺伝子発現プロファイル解析を行った。糖原病 I 型(von Gierke 病)については、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。炎症性腸疾患については、実験モデルマウスを用いて PPAR γ リガンドが有する治療効果も含めて発現プロファイルを解析した。

C. 研究結果

(1) 試料解析法に関する検討

1) 微量検体の解析について LCM 法により 1 万個の細胞からおよそ 100ng の RNA が回収できた。LM200 および LMD とともに RT-PCR 反応では前者が効率は良好であった。ランダムプライマーにより cDNA を作成し、T7 RNA ポリメラーゼによる増幅を繰り返した。非特異的な増幅を抑えるためにプライマー濃度や cDNA の濃度など反応条件の最適化が依然必要と考えられた。

2) 複数検体の処理について 個々の解析データの平均値とプール検体の測定値とは非常によい相関が認められた ($r^2=0.99$)。互いに 2 倍以上相違する遺伝子数は発現していると考えられたおよそ 4000 遺伝子中 1% 前後であった。このことは、GeneChip による測定値のダイナミックレンジが十分に広く、概ね線形和が成立することを意味している。個々の検体を測定することがデータの統計的有意性を高めることは勿論であ

るが、測定のコストなどを考慮した場合にはプール検体を解析することもできる。

(2) 発現プロファイルデータについて、LIMS から任意の実験と遺伝子の組み合わせについて、実験データを呼び出すことができるよう、必要な項目を自動的に抽出するミドルサーバーを Sun420R 上に構築した。発現量による並び替え (ソート)、カラー表示、他の解析ソフトへのデータ書き出しが可能であるインターフェース (Biopump®) を開発した。公開サーバーについては、これまでに得られた発現プロファイルデータについて、研究者あるいは臨床家にも理解しやすい形でデータを公開することの準備に着手した。Web ベースでアクセスし、例えば、指定した遺伝子についての臓器あるいは細胞別の発現プロファイルがみられるようなインターフェースの構築を目指している。研究室のホームページに Windows2000 Server、および InterBase データベースを導入した。またデータ公開のための動的 html サービスを構築、稼働させており、現在、公開用データの準備作業中である (<http://www2.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp>)。

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。ヒト肝臓由来の検体およそ 40 例について U95A アレイを用いて解析を行い、上記の標準化をおこない、発現頻度について良好な分布が認められた。

(3) 発現プロファイル解析

発現プロファイリングをさらに新たな臓器あるいは細胞について進めた。表 1 に示すようにヒトにおいては合計 20 種類の臓器あるいは細胞、マウスでは 17 種類、ラットは 8 種類についてデータベース化した。種々の研究に利用可能な培養細胞系についてもヒト、マウス、ラットそれぞれ 23、15、6 種類についてデータベース化した (表 2)。肝臓、精巣、脳、胎児肝については EST を含む 60,000 個の遺伝子についての発現データを取得した。

これらに加えて公共に公開されている発現データについても併せてデータベース化を進めている。

(4) 発現プロファイル解析による病態解析

1) 原発性高脂血症において観察される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、冠動脈や大動脈などにおける動脈硬化現象においては平滑筋細胞の増生とマクロファージ細胞の血管壁内遊走を認める。この現象を *in vitro* において観察し、経時的にその機序を明らかにするためにウサギ大動脈平滑筋と内皮細胞を用いて血管壁モデル培養系を構築し、種々の刺激を加えたところ、低酸素下においてのみ LDL 負荷による平滑筋細胞への脂質蓄積が生じることを見いだした。また、細胞の脂質合成や放出アッセイを行ったところ、この泡沫化には合成と放出効率の変化が関与していないことを示した。さらに oligonucleotide array によって網羅的遺伝子発現解析を行い、脂質蓄積時に発現が増加または抑制されている遺伝子群を同定し、

Northern blot によってその変化を確認したところ、脂肪細胞で特徴的とされる adipophilin などの発現が認められた。

2) 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。初年度に引き続き、GeneChip 解析によるプロファイリング解析を進めた。新規の症例を加え、新たなアレイ U95A を用いての解析を進めた。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。

3) 炎症性腸疾患の実験モデルである DSS 腸炎を用いて核内レセプターの種類 PPAR γ リガンドが腸炎に対して高い治療効果を有することを見つけ、その作用機序は種々の炎症性メディエーター遺伝子の転写抑制によることを報告した。今回の研究では、さらに GeneChip 技術を用いて遺伝子発現の変動を包括的に解析することにより PPAR γ リガンド投与により制御される遺伝子あるいは新たな疾患治療の標的遺伝子の同定を行った。新規の炎症性腸疾患治療薬 BRL49653 の作用機序として Th1 から Th2 への Biological Response Modifier(BRM)作用が今回の解析結果より考えられた。

D. 考察

従来の標準プロトコールは cDNA の合成を行うために 1 μ g の Poly(A)+RNA を鋳型に用いたが、Poly(A)+RNA を精製する際の操作においてのばらつきや RNA の分解を考えられるため、トータル RNA 5~10 μ g を用いて測定

を行った。LCM 法では採取する部分にレーザーを照射し、フィルムを溶かして細胞を採取するのに対し、LMD 法では予めフィルム上に貼り付けた組織に対してレーザーで切り取ることにより細胞を回収する。LCM 法については細胞がフィルム上に写し取れなかったり、レーザー照射によるダメージなどの問題点があるものの、LCM 法では組織検体を完全に乾燥させるため、RNA の分解が抑制される可能性が考えられた。今後さらに PCR 増幅を用いない RNA 増幅法を確立することが重要である。

組織全体から抽出した RNA を用いてプロファイリングを行った場合には、変動を示した遺伝子個々について LCM 法で採取した細胞種ごとに RT-PCR を行うことにより、発現している細胞を同定可能である。

個々の解析データの平均値とプール検体の測定値とは非常によい相関が認められた。互いに 2 倍以上相違する遺伝子数は発現していると考えられたおよそ 4000 遺伝子中 1%前後であった。このことは、GeneChip による測定値のダイナミックレンジが十分に広く、概ね線形和が成立することを意味している。個々の検体を測定することがデータの統計的有意性を高めることは勿論であるが、測定のコストなどを考慮した場合にはプール検体を解析することもできる。グループ間で共通に変動する遺伝子の検索には、混合サンプルを使用することで、各組織における個別の差を少なくし、また使用するアレイ数を減らすという効果が期待できると考えられた。

大量の発現プロファイルデータを高速に処理するためには、情報管理システム (Laboratory Information Management System, LIMS) が必要である。Affymetrix 社より LIMS が提供されているが、WindowsNT マシンをベースとした管理システムであり、高速検索には不向きであり、カスタマイズができないため、新たに Interbase を用いてミドルサーバを構築し、LIMS に保管されたデータを自動的に取りだし、任意の実験について表示させられるようなインターフェースを開発した。そして、BioPump 上でも簡単な並べ替えや検索を行うことが出来るが、既存のアレイデータの解析を行うソフトウェアで用いるためのデータファイルを出力することが出来る。

GeneChip のプローブは特定のバージョンの Unigene 番号に基づいてデザインされているが、Genbank データの更新に伴って Unigene 番号も変更されることが頻繁に行われる。また、デザイン当時は EST であった配列についてもゲノム情報の充実に伴い、遺伝子配列が決定されつつある。そこで、個々の遺伝子に関する情報の更新も必須である。デザインに用いられた Genbank の配列に対して自動的に最新の Unigene 番号を付け替えるツールも開発した。これらのデータについては発現データベースとリレーションを組んでいる。

データ公開用サーバについては、検索機能や実験間の比較を web 上で可能とすることはサーバーへの負荷を考えると研究室レベルでは実現が困難であるが、ある程度処理したデータあるいは生データの公開から進めていくことを検討中である。

原発性高脂血症に伴い泡沫細胞が血管壁に出現するが、低酸素環境下に細胞培養を行うことによって in vitro において泡沫細胞形成が観察され、CE の蓄積増加の一因と考えられた。20%酸素分圧下では LDL 負荷によって脂質代謝関連酵素遺伝子は予想通りの挙動をしめしたが、低酸素環境では、その発現レベルと脂質による抑制効果が異なっており、実際脂質染色や脂質組成分析で認められる CE の蓄積増加の一因と考えられた。さらに平滑筋を低酸素下、脂質負荷することによって、特定の細胞外マトリックス、ケモカイン、angiogenic inducer の発現が著明に増加しており、生体内で動脈硬化病変が進展するにあたって重要な役割を果たすと考えられた。さらに、従来酸化ストレスで発現が誘導されると考えられる遺伝子の誘導が同定され、その転写調節機序を解析することによって、病変進展における役割が明らかになると考えられる。

糖原病 I 型については、肝炎ウイルス感染がないにもかかわらず、しばしば肝細胞癌を合併する。GeneChip 解析により糖原病 I 型の肝臓において発現変化を来している遺伝子の同定を行った。Tls/Chop については、脂肪肉腫といった希有な腫瘍で染色体転座が報告されており、比較的病因としての特異性が高いと思われている遺伝子である。このような転座が上皮性腫瘍でおこる報告は知られていない。いっぽう transcription factor A2 は、細胞周期の G1/S 移行に重要な働きをする分子であることが知られている。したがって、腫瘍で一般に高発現していることは十分に考

えることである。次の protoporphyrinogen oxidase はヘム合成過程の酵素で、その欠損がポルフィリアの原因となり、また、肝癌の合併が知られている。しかし、その腫瘍で過剰発現している意味は不明である。S-100 calcium-binding protein は腺癌の浸潤先進部で発現したり、腫瘍が神経内分泌分化するときに発現したりするマーカーである。Acetylglucosaminidase は血清中の腫瘍マーカーであることも知られている。Collagen XV は肺や腎臓の発生期の間質に存在する。Desaturase は実験肝癌での変化が報告されているが、むしろ消失についての研究報告が多い。Cleavage and polyadenylation specific factor のヒト腫瘍化についての関連は知られていない。Transducer ERB-B も腫瘍との関連やチロシンキナーゼ情報伝達系などのかかわりがすでに調べられている。Midkine の肝癌での発現上昇はすでに報告されている。HMG protein の肝癌での発現もすでに報告はある。Rad2 は excision repair gene であるが、腫瘍での過剰発現は知られていない。G-protein の腫瘍における過剰発現は有名である。したがって、今回の知見のなかでもっとも追求すべきは、奇妙な融合遺伝子 Tls/CHOP の発現である。Chip 状のプロープ配列の情報がないので確認をする必要があるが、今回の2例はいずれも、生殖細胞系列に G-6-Pase の exon 5 の変異を含むものであり、腫瘍は Hematoxylin-eosin レベルでも淡明で、脂肪を含むものである。形態学的には脂肪肉腫における発現の意義と共通点があるのかどうか興味深い。

DSS 実験腸炎モデルの GeneChip 解析デー

タにおいては、すでにヒトの炎症性腸疾患で変化することがわかっているサイトカインや matrix metalloproteinase, GRO1 oncogene などの異常が確認された。これは今回用いた遺伝子発現の網羅的解析手法ですでに報告されている遺伝子発現異常を確認できたということであり、本法が正しいアプローチであることを示していると考えられた。一方、今回の網羅的解析で同定された新規遺伝子群について、非特異的に変化しているだけか、創薬の標的となる遺伝子かを今後吟味する必要があると考えられる。リアルタイム PCR によるサイトカインの定量解析から TNF α や IFN- γ の低下 IL-4 と IL-10 の増加が示されたことは、BRL 投与によりヘルパー T 細胞のサブセット Th1 から Th2 へサイトカインパターンが変異していると考えられた。

E. 結論

3年計画の第2年度の平成12年度においては、GeneChip 法による網羅的遺伝子発現プロファイル解析法について、複数検体を解析する際のデータ処理、微量検体からの解析技術に関する検討を行った。定量性に関してプール検体を用いても個々の検体を解析した際の平均値と良好な相関が得られ、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 LCM 法などのより些少な組織あるいは細胞からの解析法の確立が急務と考えられた。最大6万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システムの構築は必須であった。早期にデータ公開へ向けて準備している。

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は、平滑筋細胞の泡沫化に伴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、考察を行った。炎症性腸疾患モデルマウスでは PPAR γ リガンドが有する治療効果に関与する遺伝子群が同定され、腸炎抑制の標的分子同定への糸口になることが期待された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takabe W, Kodama T, Hamakubo T, Tanaka K, Suzuki T, Aburatani H, Matsukawa N, Noguchi N. Anti-atherogenic antioxidants regulate the expression and function of proteasome -type subunits in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2001 in Press
- 2) Saiura A, Mataki C, Murakami T, Umetani M, Wada Y, Kohro T, Aburatani H, Harihara Y, Hamakubo T, Yamaguchi T, Hasegawa G, Naito M, Makuuchi M, Kodama T. A comparison of gene expression in murine cardiac allografts and isografts by means dna microarray analysis1. **Transplantation.** 72(2):320-9. 2001
- 3) Akiyoshi S, Ishii M, Nemoto N, Kawabata M, Aburatani H, Miyazono K. Targets of Transcriptional Regulation by Transforming Growth Factor-beta: Expression Profile Analysis Using Oligonucleotide Arrays. **Jpn J Cancer Res.** 92(3): 257-268. 2001
- 4) Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K, Kodama T, Aburatani H. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with highly metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. **Cancer Research** 61: 889-895, 2001
- 5) Takabe W, Mataki C, Wada Y, Ishii M, Izumi A, Aburatani H, Hamakubo T, Niki E, Kodama T, Noguchi N. Gene expression induced by BO-653, Probucol and BHQ in human endothelial cells. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis** 7:223-230, 2000
- 6) Kohro T, Nakajima T, Wada Y, Sugiyama A, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Imoto I, Inazawa J, Hamakubo T, Kodama T and Emi M. Genomic structure and mapping of human orphan receptor LXR alpha: Upregulation of LXRA mRNA during monocyte to macrophage differentiation. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis** 7:145-151, 2000
- 7) Tsutsumi S, Kobune Y, Midorikawa Y and Aburatani H. Classification of Hepatocellular Carcinoma by Gene Expression Profiling Analysis. **Genome Informatics** 11: 240-241, 2000
- 8) Ge X, Yonamine S, Mi Y, Tsutsumi S, Kobune Y, Aburatani H and Iwata S. A Physics-Inspired algorithm for information visualization with application to gene expression analysis.

- Journal of the School of Engineering, The University of Tokyo**, XLVII: 89-103, 2000
- 9) Abe-Dohmae S, Suzuki S, Wada Y, Aburatani H, Vance DE., and Yokoyama S. Characterization of Apolipoprotein-Mediated HDL Generation Induced by cAMP in a Murine Macrophage Cell Line. **Biochemistry** 39(36):11092-9, 2000
- 10) Ishii M, Hashimoto Si, Tsutsumi S, Wada Y, Matsushima K, Kodama T, Aburatani H. Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in the transcript profiling analysis. **Genomics** 68(2):136-43, 2000
- 11) Murakami T, Mataki C, Nagao C, Umetani M, Wada Y, Ishii M, Tsutsumi S, Kohro T, Saiura A, Aburatani H, Hamakubo T and Kodama T. The gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor α using DNA microarray analysis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, 39-44, 2000
- 12) Mataki C, Murakami T, Umetani M, Wada Y, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Hamakubo T and Kodama T. (2000) A novel zinc finger protein mRNA in human umbilical vein endothelial cell is profoundly induced by tumor necrosis factor α . **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis** 7:97-103, 2000
- 13) Wada Y, Sugiyama A, Kohro T, Kobayashi M, Takeya M, Naito M, Kodama T. In vitro model of atherosclerosis using coculture of arterial wall cells and macrophage. **Yonsei Med J.** 41(6):740-55. 2000
- 14) Sugiyama T, Kumagai H, Morikawa Y, Wada Y, Sugiyama A, Yasuda K, Yokoi N, Tamura S, Kojima T, Nosaka T, Senba E, Kimura S, Kadowaki T, Kodama T, Kitamura T. A novel low-density lipoprotein receptor-related protein mediating cellular uptake of apolipoprotein E-enriched beta-VLDL in vitro. **Biochemistry.** 39(51):15817-25. 2000
- 15) Huang Y, Uchiyama Y, Fujimura T, Kanamori H, Doi T, Takamizawa A, Hamakubo T, **Kodama T**. A human hepatoma cell line expressing hepatitis c virus nonstructural proteins tightly regulated by tetracycline. **Biochem Biophys Res Commun** 281(3):732-40. 2001
- 16) Morikawa S, Umetani M, Nakagawa S, Yamazaki H, Suganami H, Inoue K, Kitahara M, Hamakubo T, **Kodama T**, Saito Y. Relative induction of mRNA for HMG CoA reductase and LDL receptor by five different HMG-CoA reductase inhibitors in cultured human cells. **J Atheroscler Thromb.** 7(3):138-44. 2000
- 17) Umetani M, Mataki C, Minegishi N, Yamamoto M, Hamakubo T, **Kodama T**. Function of GATA transcription factors in induction of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 by tumor necrosis factor- α . **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 21(6):917-22. 2001

- 18) Otsuki Y, Tanaka M, Yoshii S, Kawazoe N, Nakaya K and Sugimura H. Tumor metastasis suppressor nm23-H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. **Proceedings National Academy of Science, USA**, 98(8):4385-90, 2001
- 19) Nakamura T, Ozawa T, Kawasaki T, Nakamura H, Sugimura H. Glucose-6-phosphatase gene mutations in 20 Japanese adult patients with glycogen storage disease type 1a with reference to hepatic tumors. In submission
- 20) Nakajima A, Wada K, Miki H, Kubota N, Nakajima N, Terauchi Y, Ohnishi S, Kadowaki T, Blumberg RS, Nagai R, Matsuhashi N. Endogenous PPAR_α mediates anti-inflammatory activity in a model of ischemia-reperfusion injury. **Gastroenterology** 120:460-469, 2001
- 21) Matsuhashi N, Nakajima A, Watanabe K, Komeno Y, Suzuki A, Ohnishi S, Omata M, Kondo K, Usui Y, Iwadare J, Watanabe T, Nagawa H, Muto T. Tacrolimus in corticosteroid-resistant ulcerative colitis. **J Gastroenterol** 35:635-640, 2000

2. 学会発表

Cold Spring Harbor meeting "Genome sequencing and Biology" (NY, U.S.A.)

Characterization of genes involved in stomach cancer metastasis using high density oligonucleotide arrays.

油谷、筆宝、堤、石井

Gordon Research Conference / Cancer (Newport, U.S.A.)

Differential gene expression analysis of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes

筆宝、油谷

日本癌学会第59回総会 (横浜)

肝細胞癌の GeneChip による発現プロファイル解析

緑川、筆宝、松本、石井、堤、谷口、窪田、高山、児玉、幕内、油谷

胃癌の遺伝子発現プロファイル解析

谷口、筆宝、堤、与那嶺、葛、小舟、石井、町田、八代、平川、鄭、深山、油谷

第16回日本小児がん学会 (11月、大宮)

GeneChip による神経芽腫の遺伝子発現プロファイリング

石井、堤、林、花田、山本、田中、油谷

日本臨床血液学会 (11月、倉敷)

t(4;11)と t(11;19)リンパ性白血病細胞株の GeneChip を用いた遺伝子発現プロファイリング

堤、石井、竹谷、滝、杉田、油谷、林

第23回日本分子生物学会 (12月、神戸)

Comprehensive gene analysis about multicentric carcinogenesis of hepatocellular carcinoma using oligonucleotide array

緑川、堤、石井、谷口、筆宝、児玉、幕内、
油谷

胃癌の遺伝子発現プロファイル解析

筆宝、谷口、堤、油谷

伸長したポリグルタミンによって発現の変化
する遺伝子の解析

禹、於保、石井、目黒、油谷、宮下、山
田

ヒト Zn フィンガータンパク質クラスター
(19q13.4)における新規遺伝子群のクローニン
グ及び機能解析

又木、石井、堤、和田、油谷、浜窪、児玉
低酸素下低比重リポ蛋白質負荷による冠動脈
および大動脈平滑筋における遺伝子発現検討

和田洋一郎, 杉山暁, 興梠貴英, 沖本優子,
野口範子, 児玉龍彦

培養ヒト大動脈平滑筋細胞と冠動脈平滑筋細
胞における Transcriptome 比較

杉山暁, 和田洋一郎, 興梠貴英, 沖本優子,
野口範子, 児玉龍彦

プロブコールによるマクロファージ遺伝子発
現誘導パターンの検討

沖本優子, 和田洋一郎, 杉山暁, 興梠貴英,
松川苗子, 野口範子, 児玉龍彦

11th Genome Informatics Workshop (12/18-19,
恵比寿)

Classification of Hepatocellular Carcinoma by
Gene Expression Profiling Analysis.

堤、小舟、緑川、油谷

Critical Assessment of Techniques for Microarray
Data Analysis (CAMDA '00) (12/18-19, North

Carolina)

Modified multi-dimensional scaling (MDS)
algorithm for mining gene expression patterns.

Xijin Ge, Shin-ichi Yonamine, Yiming Mi,
Shuichi Tsutsumi, Yuko Kobune, Hiroyuki
Aburatani, and Shichi Iwata

The Oncogenomics Conference (1/25-27/2001,
Tucson, U.S.A.)

Classification of hepatocellular carcinoma with
gene expression profiling.

油谷

アメリカ癌学会 (3/24-28 米国 New Orleans)

緑川、堤、油谷

国際動脈硬化学会 (2000 年 6 月, ストック
ホルム)

IN VIVO COMPLEX FORMATION OF
MODIFIED ALPHA1-ANTITRYPSIN WITH
LDL.

S. Mashiba, Y. Wada, M. Takeya, A. Sugiyama, T.
Hamakubo, T. Kodama, and K. Uchida

AN IN VITRO COCULTURE MODEL OF
TRANSMIGRANT MONOCYTE AND FOAM
CELL FORMATION.

Y. Wada, A. Sugiyama, T. Kohro, K. Jinnouchi,
M. Takeya, M. Naito, T. Hamakubo and T.
Kodama

HUMAN GENES INDUCED DURING
MONOCYTE/MACROPHAGE

DIFFERENTIATION. A.Sugiyama, M. Ishii,
Y.Wada, T. Kohro, S. Tsutsumi, T. Hamakubo, T.
Kodama, S. Hashimoto, K. Matsushima, and H.
Aburatani

GENOMIC STRUCTURE OF HUMAN
ORPHAN RECEPTOR LXR ALPHA AND ITS
UPREGULATION DURING MONOCYTE TO
MACROPHAGE DIFFERENTIATION

T. Kohro, Y. Wada, T. Nakajima, M. Emi, A.
Sugiyama, M. Ishii, S. Tsutsumi, H. Aburatani, T.
Hamakubo, T. Kodama

微小循環学会 (2001年2月, 倉敷)

低酸素下低比重リポ蛋白質負荷による冠動脈
平滑筋における遺伝子発現
和田洋一郎

Frontier Science Forum, 2001年3月, 東京

動脈硬化再現モデルにおける遺伝子発現解析
和田洋一郎

第43回日本消化器病学会大会

(シンポジウム; 炎症性腸疾患の新たな治療
戦略)

炎症性腸疾患における PPAR γ の役割とそれに
基いた治療方法の指針

中島淳

Digestive Disease Week, アメリカ消化器病学
会 (於サンディエゴ) 平成12年5月

Novel anti-inflammatory pathway mediated by
PPAR γ in ischemia-reperfusion injury.

A Nakajima, K Wada, T Miki, T Kubota, N
Nakajima, M Terauchi

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 発現プロファイルを解析した臓器及び細胞

ヒト		マウス	ラット
melanocyte		脳	肝臓
心臓		脂肪組織	海馬
リンパ球		腎	前頭葉
精巣		肝	心臓
肝臓		骨格筋	脳毛細血管
胃		大腿骨	大動脈血管
副腎		網膜	Willis 動脈輪
脳（胎児）		嗅球	脈絡叢
肝臓（胎児）		小脳	
肝臓（小児）		海馬	
脳（成人）		小腸	
単球		胸腺	
マクロファージ		大腸	
		マクロファージ	
巨細胞	MGC	涙腺	
骨芽細胞		骨髄由来 Mφ	
骨細胞		心臓	
リンパ節			
冠動脈平滑筋	CASMC		
冠動脈内皮	HCAEC		
大動脈平滑筋	HASMC		

表2. 発現プロファイル解析を行った培養細胞株

	ヒト	マウス	ラット
肝芽腫	HepG2	心臓線維芽細胞	PC12
角化細胞	HaCaT	3T3-L1	心臓線維芽細胞
結膜上皮	CCL-20.2	p19 EC 細胞	伊東細胞
臍帯内皮	HUVEC	培養肝細胞	大動脈平滑筋
白血病	HL60	C2C12	F344
卵巣	IGROV-1	HT22	LEC
黒色腫	SKmel23	胃癌 Dunn	
胃癌	MKN28	胃癌 LM8	
	FL18	MEF(TSC2)	
膀胱がん	KU7	ES細胞	
Tリンパ腫	Jurkat	皮膚がん細胞 H11	
大腸癌細胞	(SW480)	皮膚がん細胞 E4	
	(OUMS23)	皮膚がん細胞 SN161	
	(FPCK1_1)	白血病細胞 M1	
	(FPCK3)	Mφ細胞 RAW	
腎癌	RCC23		
胃癌	2M		
	2MD3		
	2MLN		
大腸癌	T84		
単球由来	U937		
	THP1		
神経芽細胞腫	SH-SY5Y		

Ⅲ. 平成12年度分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究研究事業）

分担研究報告書

オリゴヌクレオチドアレイ法（GeneChip）による試料解析法に関する検討（1）

微量 RNA 試料解析法の検討

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 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ことが多く、均一な細胞種からの解析を行うためには、より微量の検体での解析が望まれる。ヒト組織からの特定の細胞の選択的な収集にはマイクロダイセクション法を用い、10~100ng の全 RNA から T7 付加オリゴ dT プライマーにより逆転写反応を行い、合成した二本鎖 cDNA を鋳型として T7 RNA ポリメラーゼを用いた in vitro 転写反応により cRNA を合成した。ランダムプライマーにより cDNA を作成し、再び T7 RNA ポリメラーゼによる増幅を 2 回繰り返した後、RT-PCR による検討および GeneChip とのハイブリダイゼーション反応を行った。非特異的な増幅がみられることがあり、プライマー濃度や酵素反応の最適化が必要と考えられた。

研究協力者

筆宝義隆 東京大学先端科学技術研究センター
一博士研究員

谷口浩和 東京大学大学院医学系大学院生

マイクロダイセクション ヒト組織からの特定の細胞の選択的な収集にはマイクロダイセクション法を用いた。装置は Arcturus 社の LM200 を用いた。対照として Leica 社の LMD 装置についても検討を行った。凍結した組織からミクロトーム（Leica 社製）を用いて 5.0-7.5 μ m 厚の切片を作成し、LM200 あるいは LMD を用いて 1,000 個から 10,000 個の胃粘膜細胞のみを選択・収集した。キャップ上に回収された組織より RNA を Trizol (GIBCO)を用いて精製した。

A. 研究目的

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ことが多く、均一な細胞種からの解析を行うためには、より微量の検体での解析が望まれる。本研究では微量 RNA についての発現プロファイル解析を目的として条件検討を行った。

T7 RNA ポリメラーゼによる増幅と Biotin 標識 10~100ng の全 RNA から T7 付加オリゴ dT プライマーにより逆転写反応を行い、合成した二本鎖 cDNA を鋳型として T7 RNA ポ

B. 研究方法