

リメラーゼによる *in vitro* 転写反応を行い、cRNA を合成した。逆転写反応には Superscript (Gibco 社製) を用いた。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* 転写反応の際にピオチン標識 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。

RT-PCR

マイクロダイセクションにより得られた RNA の質について RT-PCR により評価を行った。遺伝子については下記のプライマーを用いて増幅を行った。

G3PD

(long:549bp)

3' CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC

5' AATGCCTCCTGCACCACCAACTGC

(short:100bp)

3' CCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGAC

5' AGGAGGGGAGATTCAGTGTGGTGGG

β -actin

(long:430bp)

5' CAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTC

3' CACGAAAGCAATGCTATCACCTC

(short:144bp)

5' CACAGGGGAGGTGATAGCATTG

3' CAAGTTGGGGACAAAAAGGG

C. 研究結果

マイクロダイセクション法による RNA 回収と増幅

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 により得られた細胞から回収された RNA を鋳型として行った 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る増幅

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。GeneChip テストアレイに対してハイブリダイゼーションを行ったが、非特異的なシグナルが高く、特異的な増幅が行われていないと考えられた。

RT-PCR

マイクロダイセクション法により得られた RNA からは RT-PCR が可能であった。LMD 法で得られた RNA に対して LCM 法により得られた RNA を鋳型とした方が、長い PCR 産物の増幅の効率がよい傾向がみられた。

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ている。

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で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。

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。

E. 結論

LCM 法から得られた RNA は RT-PCR 反応に十分使用できるものであった。微量検体が

らの発現プロファイル解析については、今後さらに再現性の高い RNA 増幅法を確立することが重要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 マイクロダイセクション RNA からの RT-PCR

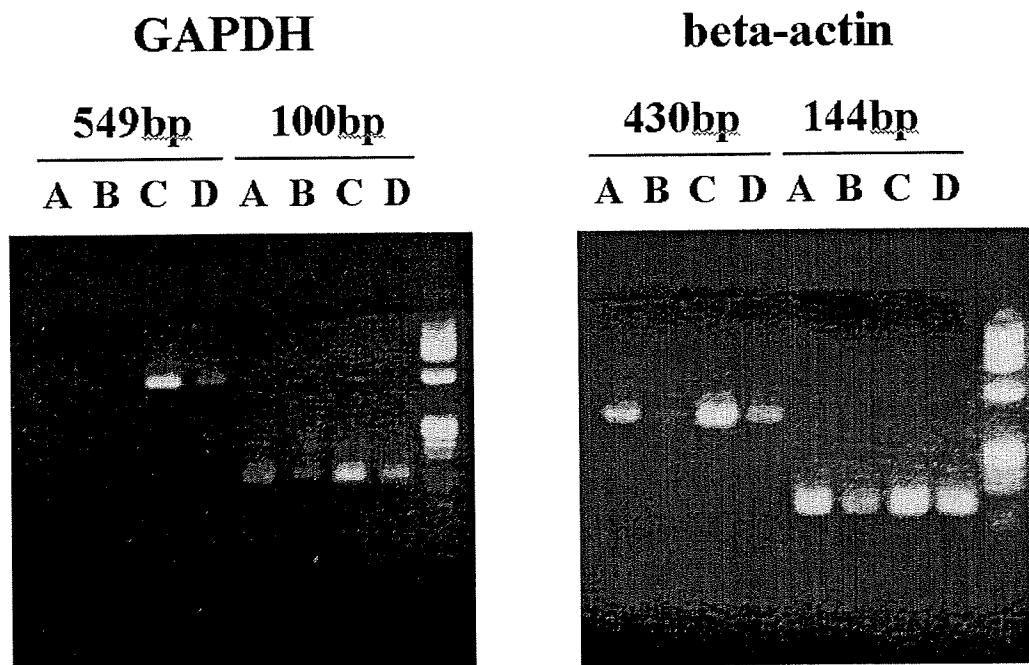
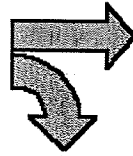


図 マイクロダイセクション法の実際

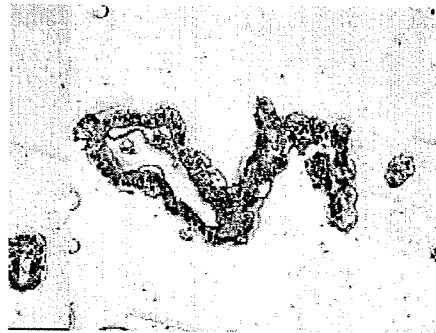
Microdissection



Before



After



Cap

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（2）

複数検体データ処理法の検討

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 臨床検体や病態モデル動物の解析においては、個体間のばらつきを考慮して複数検体を解析し、統計的にデータ値を取り扱うべきであるが、アレイ解析の費用を考慮した場合に類似の検体をプールして行った解析値と個々の解析の平均値が非常に良く相関することが判明した。多数検体の解析においてプール検体を解析することにより複数の群についての比較を行うことが出来るうえ、個体間のばらつきを平均化できる利点も認められた。

研究協力者

堤 修一 東京大学医学系大学院大学院生

A. 研究目的

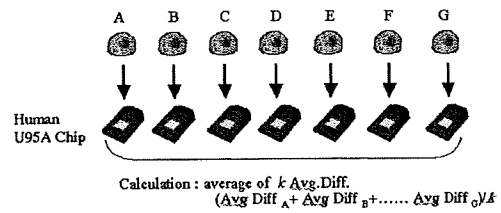
臨床検体や病態モデル動物の解析においては、個体間のばらつきを考慮して複数検体を解析し、統計的にデータ値を取り扱うことが通常である。GeneChip 解析によって得られるデータについて個別の測定値と予めプールした試料の測定値について比較検討を行う。

B. 研究方法

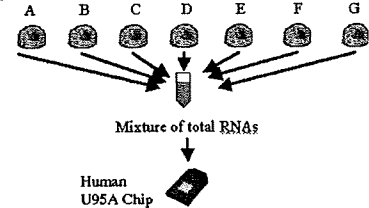
1) 複数検体データの解析

個々のサンプルの遺伝子発現データには、生体の個体差や生体内の状況から、いくつかの遺伝子の発現において変動が存在する。コントロールとしての正常組織においても同様である。個々の遺伝子発現プロファイルの差異を検索することも重要であるが、ある組織

①Average value



②Pool sample



群毎に共通して上昇または低下して発現量が異なっている遺伝子を効率よく検索することもまた重要である。

遺伝子発現プロファイルの取得には Affymetrix 社の GeneChip Human U95 Array を使用した。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 μ g 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) データの標準化

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。

C. 研究結果

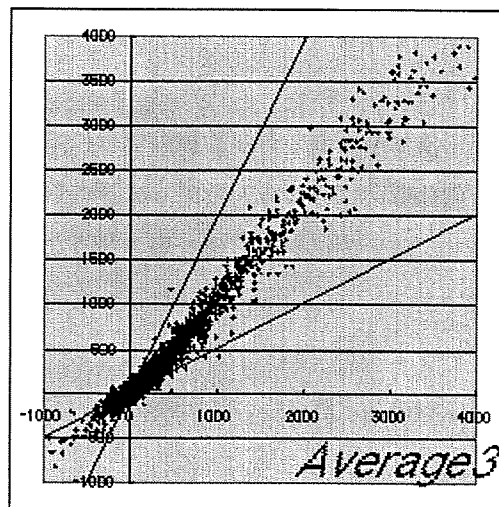
GeneChip 法では個々の遺伝子発現量を示す蛍光強度は比較の値では無く、単一の値が得られることが特徴である。

遺伝子発現を示す値は、本来同一とされる正常肝組織においてもある程度の変動が認め

られた。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、上記の標準化をおこない、発現頻度について良好な分布が認められた。

また、各群各 8 個の遺伝子発現値から遺伝子発現の平均値を計算によって出力し、発現プロファイルを作成した。そして、混合サンプルデータとの比較を行った。両者のデータの相関係数は、正常肝、肝硬変、肝細胞癌グループにおいてそれぞれ 0.992、0.987、0.985 であり、良好な相関を認めた (表)。

PL3



横軸は個々の測定値の平均、縦軸はプール検体についての測定値についてのスキャッターグラフである。

| Sample | Number of probes*1 | Number of 2 fold discordant probes*2 | Number of 3 fold discordant probes*2 |
|--------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Pool 1 | 4129 | 42 (1.0%) | 5 (0.1%) |
| Pool 2 | 3912 | 74 (1.9%) | 12 (0.3%) |
| Pool 3 | 4149 | 61 (1.5%) | 11 (0.3%) |

表 個別検体とプール検体の discordancy

D. 考察

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 ($r^2=0.992$)。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。

今後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る。

E. 結論

複数の検体をプールすることによっても個々の測定値の平均値と良く相関しており、多数の検体について数万に及ぶ多数の遺伝子を解析する際に有効と考えられる。また、個体間のばらつきを平均化できる利点もある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

GeneChip テクノロジーデイ (平成 13 年 6 月 29 日)

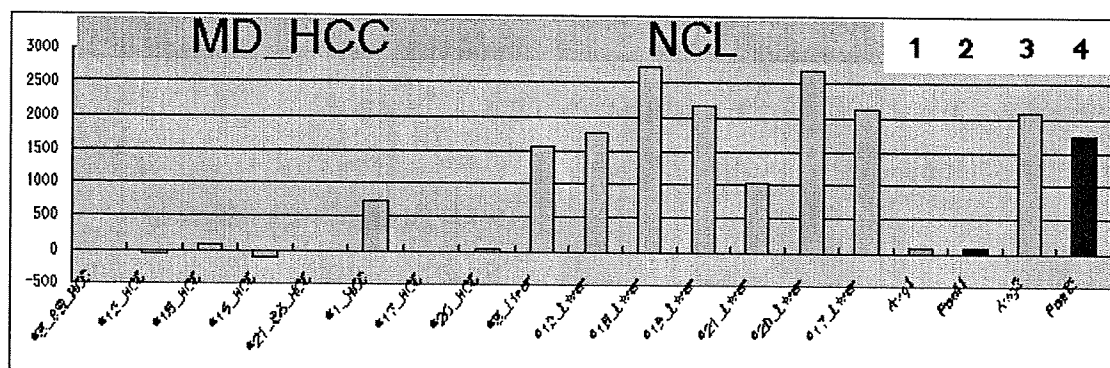
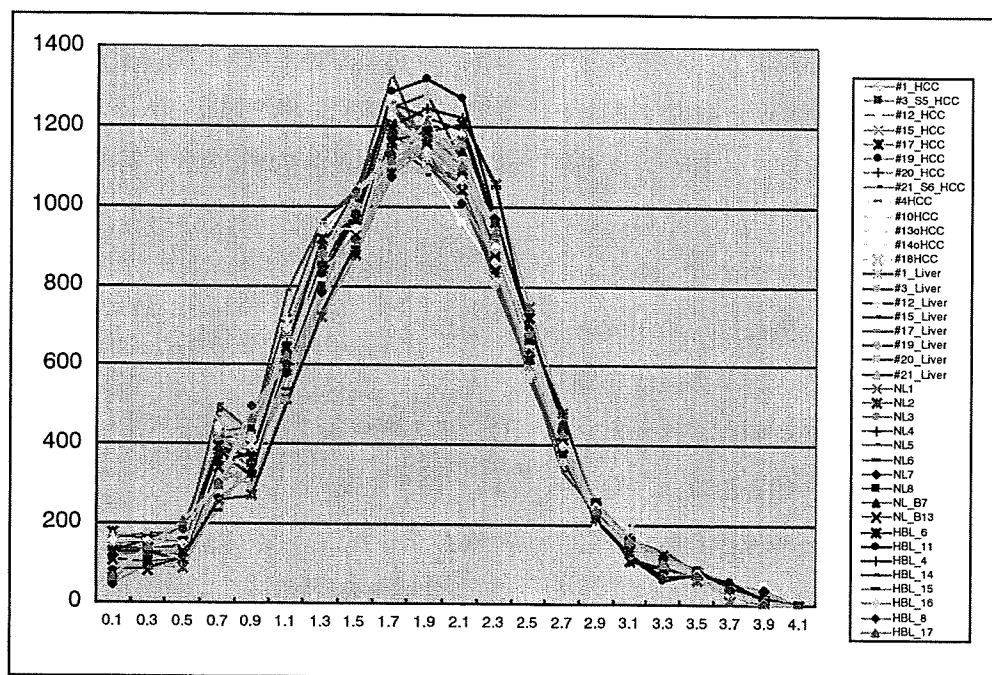
「肝癌の発現プロファイル解析」

堤修一、油谷浩幸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 各遺伝子の発現量の分布



MD_HCC 7例とNCL 7例についての解析例を示す。遺伝子コードは35526である。
 1 : MD_HCC それぞれの測定値の平均値、2 : MD_HCC プール検体の測定値、3 : NC それぞれの測定値の平均値、4 : NC プール検体の測定値

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

発現プロファイル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 ヒト、マウス、ラットの遺伝子について最新の Unigene 番号への更新や最新のアノテーションの参照ができるような統合データベース化を行い、遺伝子発現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なインターフェースを作成した。最終的にデータ公開用のサーバーを準備する。

研究協力者

堤 修一 東京大学医学系大学院大学院生

にデータベース化を進める。さらに Sun 社の 4CPU を搭載したサーバー（R420）上に InterBase データベースを稼働させ、遺伝子発現データベースを作成する。またクライアントソフトウェアを新たに開発し、イントラネットワーク内でサーバーにネットワーク経由で接続可能な複数の端末からデータ取得を可能にする。

A. 研究目的

臓器別の発現データベースを構築するために、各遺伝子ごとに最新の 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、遺伝子発現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なインターフェースを作成する。最終的にデータ公開用のサーバーを準備する。

2) 発現プロファイルデータの拡充

第2年度においても引き続き発現プロファイルデータの充実を行った。ヒトについては、FLアレイあるいはU95Aアレイを使用した。前者では約5,600、後者では約12,000の遺伝子の解析が可能である。マウスについてはU74A、ラットはU34Aアレイを用いて、それぞれ12,000、8,000遺伝子の解析を行った。

B. 研究方法

1) データベース

膨大なデータ量が得られる遺伝子発現プロファイリング解析ではデータベース上にデータを保存、取得することが必須となる。第一に Affymetrix 社により提供される LIMS システムに全データを登録した。cDNA マイクロアレイデータについては別に Oracle サーバー

3) 遺伝子発現プロファイルデータ公開用サーバー

GeneChip は単一の組織の遺伝子発現量に相当する値が得られるため、データの互換性がある。全てのアレイデータの中でコントロ

ールデータなど一部のデータについては公共に公開することでデータを他の施設と共有できるため、研究の発展に有用と考えられる。

C. 研究結果

1) データベース

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、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。クライアントソフトウェア "BioPump" では、アレイタイプ、サンプル種、プロジェクトなどの検索語を使用して全てのアレイデータからの絞り込みが可能であり、複数の端末からのデータ取得が可能となっている。また、遺伝子データベースからアレイ上に存在する EST 等をもとにしたプローブに対する情報も連結して保存されているため、特定のキーワードにより関連する遺伝子のプローブを検索も可能となる。現在、注目する遺伝子セットをインポート、保存できるよう改良を進めている (図参照)。

cDNAマイクロアレイデータの保管には三井情報開発 (株) らと共同で開発しているシステム (GenomicProfiler®) を用いた。

2) 発現プロファイルデータの拡充

新たに解析を行った試料は下記の通りであり、プロファイリングを行い、データベース化を進めた。ヒトについては従来の FL アレイから U95 A アレイへの変更が行われたため、一部データについてはデータの再解析も行った。

ヒト：胎児肝、心臓、リンパ球、骨組織、精巣、血管平滑筋

ラット：海馬、前頭葉、大腸、肝臓、伊東細胞、心臓、脳血管、大動脈

マウス：脳、腎臓、肝臓、骨格筋、網膜組織、嗅球、小脳、胸腺、涙腺

培養細胞：HL60、HepG2、PC12、MKN28

3) 遺伝子発現プロファイルデータ公開用サーバー

研究者あるいは臨床家にも理解しやすい形でデータを閲覧できるサーバーの準備に着手した。公開サーバーについては、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閲覧できるようなインターフェースの構築を目指した。現在、研究室のホームページ (<http://www2.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp>) に Windows2000 サーバー、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、稼働させている。現在、公開用データを取捨選択の作業中である。

D. 考察

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ーを構築し、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は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。

E. 結論

大量な発現プロファイルデータについての保管及び検索システムを構築した。データベース公開へむけてのシステムを検討中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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 Calorina, USA)

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, USA)

Classification of hepatocellular carcinoma with gene expression profiling.

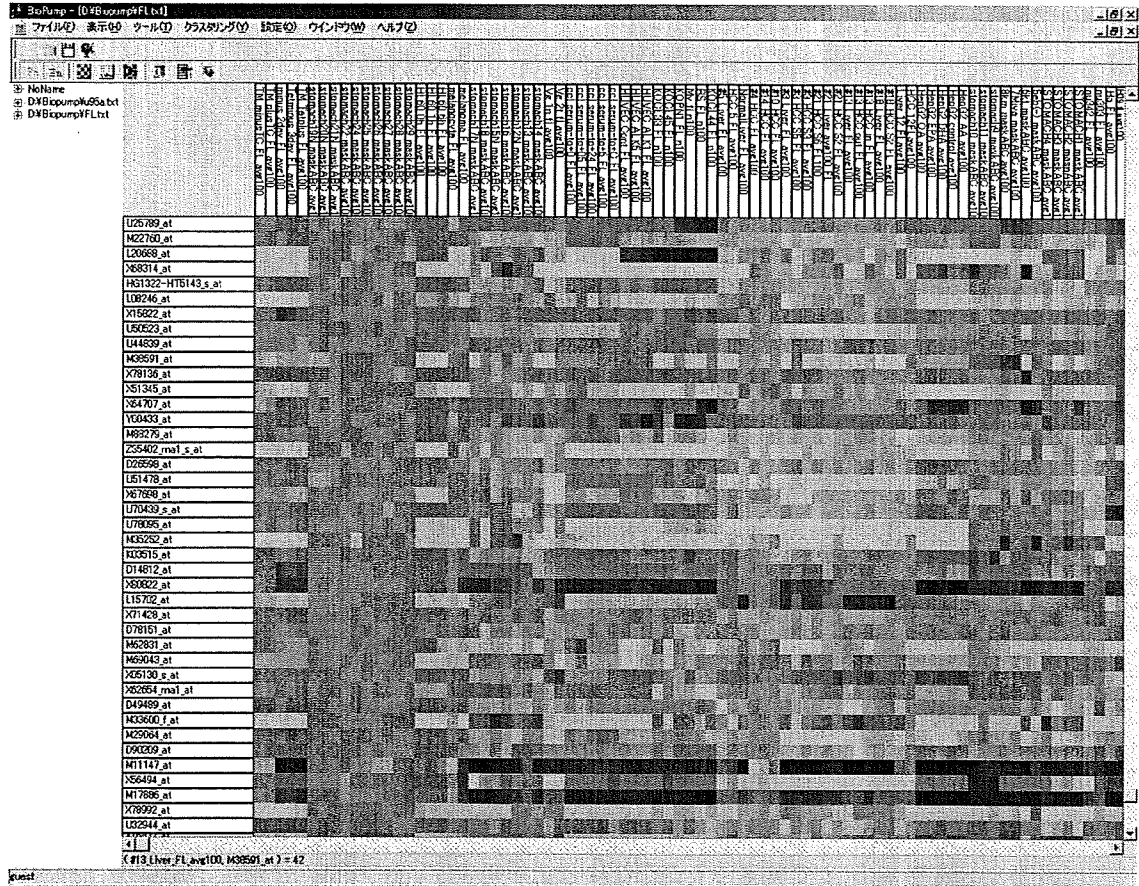
油谷

H. 知的財産権の出願・登録状況

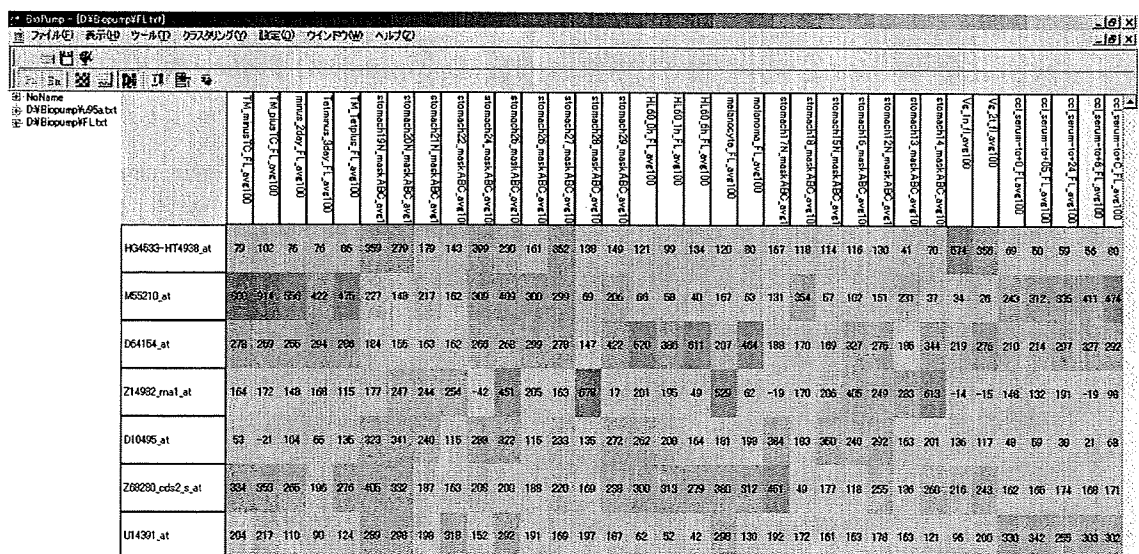
なし

図 Biopump 操作画面

1) 横軸に実験名、縦軸に遺伝子名が並べられている。赤（高い）～青（低い）のグラジエントで発現量が表示されている。



2) 発現値 (Average Difference) をセル内に表示できる。



厚生科学研究費補助金(特定疾患研究対策事業)

分担研究報告書

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

分担研究者 梶村春彦 浜松医科大学医学部教授

研究要旨 糖原病 Ia 型は、Glucose-6-phosphatase の機能欠損による常染色体劣性の遺伝性疾患で、肝臓に糖が多量に蓄積するとともに腺腫や肝細胞がんの発生が知られている。発現プロファイルの解析により糖原病にともなう肝腫瘍の発生には、従来知られていなかった分子のかかわる可能性があることが、包括的解析で始めてわかった。

A. 研究目的

糖原病 Ia 型は、Glucose-6-phosphatase の機能欠損による常染色体劣性の遺伝性疾患で、もっとも頻度の高いこの遺伝子の変異はエクソン 5 の点突然変異であり、日本人の 200 人にひとりがキャリアであるという報告もある。またこの疾患では肝臓に糖が多量に蓄積するとともに腺腫や肝細胞がんの発生が知られている。この遺伝性代謝異常疾患における遺伝子発現を包括的に解析することにより、本疾患の病態の解明や、本疾患の重篤な合併症である腫瘍発生の早期診断などに寄与することを目的とする。

B. 研究方法

臨床的に糖原病 Ia 型と診断され、遺伝子診断（本研究計画は浜松医科大学遺伝子解析研究倫理委員会にて審議の上承認されている[12-12 号]）により確定された症例に発生した肝腫瘍 2 例で腫瘍部および非腫瘍部より RNA を抽出した。Human genomeU95A Gene

chip をもちいて、そこにみられる遺伝子の発現を包括的に解析した。非腫瘍部と腫瘍部を比較し、2.5 倍の差の増加、減少のある遺伝子を検索した。また比較のため、正常肝組織およびウイルス性肝疾患を背景とする肝腫瘍についてのデータも参考にした。

C. 研究結果

Ia 型糖原病に合併した 2 例で共通して腫瘍部で増加している遺伝子には以下のものがあった。

Oncogene TIs/CHOP

Transcription elongation factorA(SII) 2

Protoporphyrinogen oxidase

S100 calcium-binding protein P

Steroidogenic acute regulatory protein related

N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase

Collagen type XV, alpha1

Fatty acid desaturase 1

Cleavage and polyadenylation specific factor 1,

160KD subunit
FLJ23602 fis
Transducer of ERBB2, 2
Midkine (neurite growth-promoting factor 2)
DKFZP566D213 protein
KIAA0186
HMG protein 4
Rad2
Guanine nucleotide binding protein (G Protein), alpha z polypeptide
さらに腫瘍部で減少していた遺伝子は以下の
ものであった。
Lectin P35
Adenylate kinase 3
Cholesterol 25-hydroxylase
Reelin
HMC class I antigen-like glycoprotein
Claudin 10
DKFZP586F1018 protein
Toll-like receptor 2
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
Kynureinase (L-kynurenine hydrolase)
Soluble carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine/GABA), member 12
Stromal cell derived factor 1
Neuregulin 1
Schawannomin interacting protein 1
cAMP responsive element binding protein-like 2
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein 1, early T-lymphocyte activation 1)
Calcium binding atopy-related autoantigen 1
Interleukin 8

Small inducible cytokine A4
StepII splicing factor SLU7
Regulator of G protein signaling 2
v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
Dermatopontin
KIAA0246
Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)
Src-like adaptor
Small inducible cytokine A5 (Rantes)
Glial growth factor 2
Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta
Transmembrane 4 superfamily member 1
Dual specificity phosphatase 5
Parathyroid hormone receptor 1
GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1

D. 考察

これらのうち特に、TIs/Chop については、脂肪肉腫といった希少な腫瘍で、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。

一方 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。

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る。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 fusion protein Tls/CHOP の発現である。Chip 状の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。

E. 結論

糖原病にともなう肝腫瘍の発生には、従来知られていなかった分子のかかわる可能性があることが、包括的解析で始めてわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshiro Otsuki, Masamitsu Tanaka, Shigeto Yoshii, Nobuko Kawazoe, Kazuyasu Nakaya and Haruhiko Sugimura. Tumor metastasis suppressor nm23-H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. Proceedings National Academy of Science, USA, 98(8):4385-90, 2001

2) Toshifumi Nakamura, Takachika Ozawa, Tsunehisa Kawasaki, Hiroshi Nakamura, Haruhiko Sugimura. Glucose-6-phosphatase gene mutations in 20 Japanese adult patients with glycogen storage disease type 1a with reference to hepatic tumors.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患研究対策事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 中島 淳 横浜市立大学医学部第三内科 講師

研究要旨 我々はマウス実験腸炎モデルにおいて核内レセプターの一つ 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てきた。今回の研究では、さらに遺伝子発現の変化を、近年急速に開発が進んでいる DNA マイクロアレイ技術を用いて PPAR γ リガンド投与により制御される遺伝子を包括的に解析し、新たな疾患の標的遺伝子の同定を試みた。

米国では既に本薬剤を用いた臨床治験が始まっているが、より副作用の少なく、かつ選択性の高い治療薬の開発のためには、疾患特異的原因遺伝子の同定に基づいた創薬が望ましいと考えられる。今後は今回の研究で同定された遺伝子群の更なる解析を行う予定である。

A. 研究目的

炎症性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎）は若年発症の慢性疾患で、寛解と増悪を繰り返すことが多い、我々はマウス実験腸炎モデルにおいて核内レセプターの一つ 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てきた。今回の研究では、PPAR γ リガンドにより制御される遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて包括的に解析し、新たな創薬の標的分子の同定を試みることを目的とした。

B. 研究方法

マウス実験腸炎モデルは、最もよく解析されている硫酸デキストラン（DSS）誘発腸炎モデルを用いた。2.5%DSS投与により誘発したマウス腸炎モデルに PPAR γ リガンドである Rosiglitazone（BRL49653）を 30mg/kg 経口投与し、各々腸管から RNA を抽出し、Affymetrix 社のオリゴヌクレオチド DNA アレイ（GeneChip）により、発現遺伝子のプ

ロファイリングを行った。GeneChip は U74 アレイをもちいた。腸炎誘導から RNA 採取の時期を検討するためと、GeneChip の解析から得た遺伝子の時間軸上の変化を調べる目的には、ABI 社の Real time PCR machine（TaqMan）を用いた。

（倫理面への配慮）

今回の研究では人の組織は扱っていない。マウスはできるだけ愛護的に扱い苦痛は最小限にするよう努力した。

C. 研究結果

DSS 投与後 1 日目、4 日目における BRL 投与非投与別の遺伝子発現のプロファイリングを図に示す。このプロファイリングでは DSS 投与により腸炎を誘発し Day1 から Day4 にかけて発現が亢進し、かつ PPAR γ リガンドの BRL49653 投与で発現が抑制される遺伝子群を選択してある。図には具体的に図に示したような変化をする遺伝子を BRL 投与で大きく変化する順に遺伝子名でリストアップ（抜粋）してある。

| | | |
|----------|--------------------------------------|-------|
| X13060 | voltage-dependent anion channel 3 | ~37.7 |
| X03505 | serum amyloid A 3 | ~31.1 |
| A1595772 | cytochrome P450 CYP2D22 | ~22.0 |
| M64086 | serine protease inhibitor 2-2 | ~16.9 |
| D44464 | uridine phosphorylase | ~15.9 |
| X60980 | thymidine kinase 1 | ~15.7 |
| X66473 | matrix metalloproteinase 13 | ~14.5 |
| X66602 | interferon-stimulated protein | ~11.2 |
| X81584 | IGFBP6 | ~10.6 |
| D44456 | proteasome subunit, beta type 9 | 10.2 |
| U89889 | hemopexin | ~9.5 |
| U49739 | myosin VI | ~9.3 |
| U19597 | cyclin-dependent kinase inhibitor 2D | ~8.8 |
| A1876446 | gamma-fibrinogen | ~8.4 |
| J04596 | GRO1 oncogene | ~8.4 |
| X00945 | serine protease inhibitor 1-6 | ~8.4 |
| M69109 | indole 2,3-dioxygenase | ~8.0 |
| M75721 | serine protease inhibitor 1-1 | ~7.8 |
| D37837 | plastin 2, L | ~7.3 |
| M19681 | small inducible cytokine A2 | ~7.1 |

(図2)

BRLで転写抑制される遺伝子のなかには、(1)炎症性メディエーター関連遺伝子、(2)腸管での水・電解質代謝に関係する遺伝子、(3)薬物代謝遺伝子、(4)癌遺伝子関連などが認められた。特にサイトカイン関連遺伝子ではTNF α やIFN- γ の低下、IL-4とIL-10の増加がRealtime PCRにて示された(図3)。

D. 考察

GeneChipのデータにおいては、DSSマウス実験腸炎ですでに人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る。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

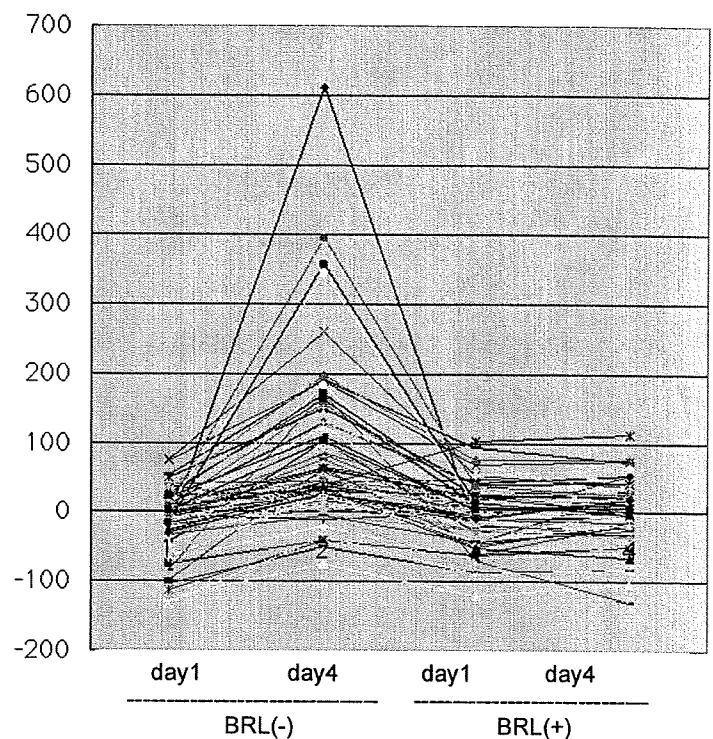
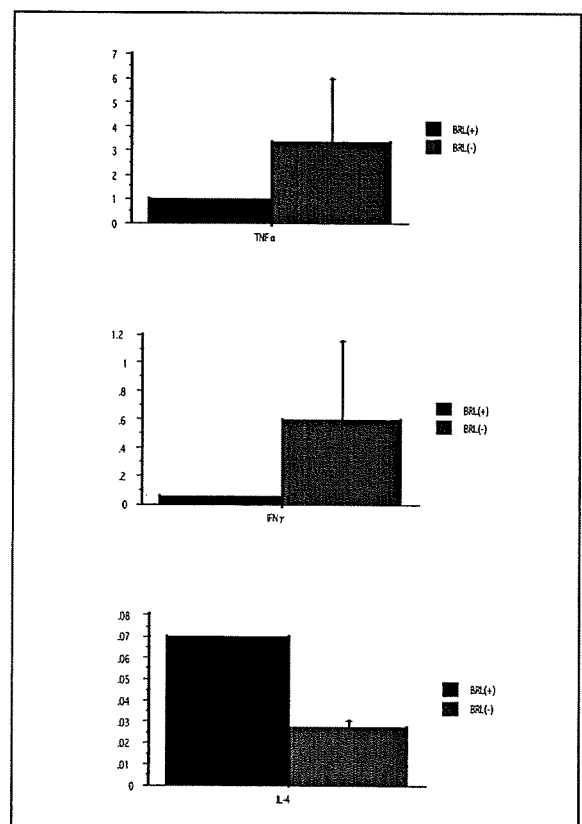


図1 BRL49653により変動する遺伝子

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。



(図3) サイトカイン遺伝子の定量解析

Realtime 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る。

E. 結語

DSS 腸炎での遺伝子発現のプロファイリングは世界に先駆けて行ったもので、今後慎重に吟味していくことが必要であるが、今回の研究で得られた標的遺伝子候補を今後さらに解析して、難病治療に有用な創薬に役立てていかなければならないと考えられる。また、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakajima A, Wada K, Miki H, Kubota N, Nakajima N, Terauchi Y, Ohnishi S, Kadowaki T, Blumberg RS, Nagai R,

Matsuhashi N. Endogenous PPAR γ mediates anti-inflammatory activity in a model of ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 2001;120:460-469

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* 2000;35:635-640.

2. 学会発表

第 43 回日本消化器病学会大会 シンポジウム
(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 の役割とそれに基づ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

厚生科学研究費補助金（特定疾患研究対策事業）

分担研究報告書

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
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
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 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たことを見いだした。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 の発現を認めた。

A. 研究目的

血管壁内における酸素分圧は文献上も実際の測定値でも、2-5%酸素分圧であった。この環境で中等度高脂血症状態を模した LDL 負荷によって、冠動脈平滑筋に生じる現象を検討したところ、cholesteryl ester の蓄積が認められた。このような動脈硬化初期病変を反映した環境で平滑筋細胞の挙動を検討するために、oligonucleotide microarray を用いて遺伝子発現パターンを解析した。

B. 研究方法

初代培養 5 代目の冠状動脈平滑筋を 2%から 20%までの種々の酸素分圧下で培養した。低比

重リポ蛋白質 (LDL) 負荷群には終濃度 3mg/ml にて LDL を添加した。72 時間後に PBS にて洗浄、total RNA を調整し、うち 5 μ g を用いて cRNA を合成し、oligonucleotide chip(GeneChip, Affymetrix, CA)にて 6500 遺伝子の発現量を比較した。同時に細胞の脂肪染色、脂質組成分析、cholesterol 合成および放出を測定した。

C. 研究結果

低酸素下で LDL を負荷すると、脂質染色にて陽性細胞数が増加し、cholesteryl ester (CE)の蓄積が増加することが HPLC によって確認された。2%酸素分圧下において、cholesterol 合成能は完全に抑制されており、細胞内にあらかじめ蓄積

されていた cholesteryl ester の放出能にも低下は認められなかった。一方遺伝子発現解析において mRNA レベルが顕著に変動する遺伝子群を同定した。このとき、SREBP や、これによって転写調節を受ける LDL 受容体、caveolin、さらにコレステロール合成経路の各酵素について転写レベルの抑制が認められた。

D. 考察

低酸素下において tenascin-C, Cyr61 など従来機能が明らかではないマトリックス成分の発現が誘導されたが、他にもマトリックス間の架橋を行う酵素も誘導されており、低酸素下で平滑筋によってマトリックスが再構築されていることを示唆している。一方 L-8 は低酸素下で LDL を負荷されると 10 倍程度の発現増加があり、好中球を中心とした白血球動員が動脈硬化初期病変で重要な役割を果たしている可能性がある。さらに、同環境において adipophilin, CL-100, osteonectin, prothymosin 等の誘導が顕著だが、これらは従来酸化ストレスによって発現が誘導される遺伝子として知られている。低酸素下での LDL 負荷によっても同様の誘導が確認されたことで、動脈硬化発症において酸化 LDL を介さない経路があることが考えられる。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kohro, T., Y. Wada, et al. (2000). Comparison of gene expression profiles between THP-1 cells differentiated with phorbol 12-myristate 13-acetate and macrophage. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis in press.*
2. Sugiyama, T., H. Kumagai, et al. (2000). A novel low-density lipoprotein receptor-related protein mediating cellular uptake of apolipoprotein E-enriched beta-VLDL in vitro. *Biochemistry* 39: 15817-15825.
3. Abe-Dohmae, S., S. Suzuki, et al. (2000). Characterization of apolipoprotein-mediated HDL generation induced by cAMP in a murine macrophage cell line. *Biochemistry* 39: 11092-11099.
4. Takabe, W., N. Noguchi, et al. (2000). Gene expression induced by BO-653, probucol and BHQ