

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 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 油 谷 浩 幸

平成 14 (2002) 年 3 月

目次

I	構成員名簿	1
II	平成13年度総括研究報告書	5
III	平成13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 マイクロダイセクションより採取される微量 RNA 試料解析法の検討	23
	東京大学先端科学技術研究センター 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	27
	東京大学先端科学技術研究センター 教授 油谷 浩幸	
	ヒト正常臓器の発現プロファイルの比較	35
	東京大学先端科学技術研究センター 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	43
	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	47
	横浜市立大学医学部第三内科 講師 中島 淳	
	低酸素下低比重リポ蛋白質負荷による冠動脈平滑筋における脂質蓄積	53
	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	59

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	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-tky@umin.ac.jp (油谷) / hari-tky@umin.ac.jp (森本)

II 平成 13 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 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 13 年度は 3 年計画の最終年度として、これまで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データベースおよびサーバーの整備を行うとともに、微量検体からの発現プロファイル解析法に関する詳細なプロトコールの検討、ヒト 30 臓器において取得した 4 万遺伝子の発現プロファイルデータ臓器プロファイルデータの解析をおこなった。また、疾患解析への応用例として、引き続き高脂血症における泡沫細胞形成、糖原病 I 型肝における肝癌合併のしくみ、炎症性腸疾患のメカニズムについては薬剤惹起性の腸炎モデル実験系を用いて、DNA チップデータの解析を進めた。今後、本データベースについては難病解明のための基盤的データになりうると考えられ、ゲノム情報の充実に伴って今後ともさらに拡充し広く利用されるものとした。

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
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、最終年度として、これまでに構

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データベースおよびサーバーの整備を行うとともに、微量検体からの発現プロファイル解析法に関する詳細なプロトコルの検討、ヒト 30 臓器において取得した 4 万遺伝子の発現プロファイルデータ臓器プロファイルデータの解析をおこなった。また、疾患解析への応用例として、引き続き高脂血症における泡沫細胞形成、糖原病 I 型肝における肝癌合併のしくみ、炎症性腸疾患のメカニズムについては薬剤惹起性の腸炎モデル実験系を用いて、DNA チップデータの解析を進めた。

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

マイクロダイセクションによる RNA quality の変化 ヒト組織からの特定な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。麻酔後 5 分以内で凍結したラット組織からマイクロトーム (Leica 社製) を用いて切片を作成し、固定、染色を施し、マイクロダイセクションできうる状態の切片より、total RNA を回収 (Qiagen 社製 RNeasy) し、その quality (18S 及び 28S ribosomal RNA の比) をマイクロキャピラリーを用いた電気泳動装置 (Agilent 社 bioanalyzer) を用いて検証した。まず薄切による RNA quality への影響を調べるため、厚さ (7 及び 14 μm)、肉眼による

切片の状態 (きれいに切れたものおよび鋸歯状になったもの)、及び刃角 (標準およびそれより鋭角、鈍角) の条件を変え、染色せずにそのまま RNA を回収した。

ついで染色過程に過程における RNA への影響を調べるため、7 μm に薄切した切片より 75%エタノールで固定し、20 秒という短時間で H.E に比する染色性をもつ染色液 Histogene (Acturus 社) によって染色、脱水し、切片より RNA を回収した。続いて、上記の反応を on ice で行ったもの、RNase inhibitor (1U/ μl SuperAse Ambion 社) を染色液中加入したもの、また染色過程のみ省き固定、脱水のみ行ったものより RNA を回収し評価した。

最後にマイクロダイセクションにかかる時間の影響を評価するため、上記により固定、染色、脱水した切片を常温室内で、0 分、50 分、3 時間放置した後 RNA を回収した。

微量 mRNA の増幅

原理の異なる Ambion 社、Acturus 社の kit を用い、RNA 増幅方法について検討した。Ambion 社のものは T7 RNA ポリメラーゼを用いた in vitro 転写反応を含めた増幅法であり、1 回目の増幅時には oligodT primer を用いて mRNA より cDNA が作られるが、2 回目の増幅時に random primer を用いて cRNA より cDNA を作るため、最終産物の cRNA の長さが短くなることが予想される。Arcturus 社の反応試薬は原理が多少異なると推定されるが公表されていない。28s/18s 比 2.0 の high quality total RNA 2 μg 、および (Ambion 社 kit については) 10ng、ついで 28s/18s 比 1.4 前

後の total RNA 2 μ g より増幅した。10ng からの増幅については RT 反応と in vitro 転写反応に mineral oil を用いたものも検証した。増幅産物を、Agilent 社 bioanalyzer を用いて評価した。

(2) 遺伝子発現プロファイルデータベースの構築

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、Sun 社のサーバー (R420) 上に連携データベースを作成した。イントラネットではクライアントソフトウェアを利用して、個々の研究者がすべてのプロファイルデータを利用できるようなインターフェースを作成した。時系列データなど、一連にまとまった実験結果についてはセットとして一覧できるよう改良した。

(3) 正常臓器の発現プロファイル解析

過去2年間において発現プロファイルデータを収集したのに引き続き、今年度はさらに滑膜細胞などをはじめとするヒト正常臓器の発現プロファイルの比較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 あるいは U95A アレイから U133 アレイによる再測定を行った。合計 30 臓器についてそれぞれ 40,000 遺伝子のプロファイリングを終了し、さらに 40 臓器へと拡充する予定である。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。ヒト由来およそ 40 臓器について U133 アレイを用いて解析を行い、上記の標準化に関する検討を行った。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) 微量試料解析法に関する検討

マイクロダイセクションによる RNA quality の変化

cryostat で薄切したマウス肝臓からそのまま抽出した場合、RNA の 28s/18s 比は約 1.1 であった。刃角、肉眼的切片の状態、薄切厚いずれも quality に影響が見られなかった。薄切後組織染色せずに固定、脱水のみでマイクロダイセクション可能な切片にした場合は

約 0.6, 染色液で組織染色した後, 固定, 脱水, マイクロダイセクション可能な切片にした場合は約 0.4 となり(図 1), また RNA quality の低下は on ice で行っても, RNase inhibitor を加えても大きな変化はなかった。また脱水後の切片を, 50 分室温に放置した後 RNA を回収しても影響は見られなかったが, 3 時間後に回収したものではわずかに quality の変化が見られた。

微量 mRNA の増幅

28s/18s 比 2.0 の high quality total RNA 2 μ g 開始からすると, 2 回増幅後の Ambion 社 kit の収量は mRNA を total の 1% とすると約 80000 倍の増幅, 一方 2 回増幅後の Arcturus 社 kit の収量は約 68000 倍の増幅であった。Ambion 社 kit の増幅産物のピーク値は 1 回増幅後では 1100bp, 2 回増幅後で 600bp であったが(図 2), Arcturus 社 kit の 1 回増幅, 2 回増幅後では各々 350bp, 300bp であった。一方, 同じ high quality RNA 10 ng より増幅した Ambion 社 kit の 2 回増幅後の収量は約 60000 倍の増幅であり, の 1 回増幅後のピーク値は約 500bp, 2 回増幅後のピーク値は約 350bp であった。Mineral oil を反応に加えると, ピークの長さは大きく変わらなかったが, 収量は 220000 倍に増加した。28s/18s 比 1.4 の total RNA 2 μ g より Ambion 社 kit を用いて増幅した産物は 収量は 28s/18s 比 2.0 より行ったときと変わらなかったものの, 1 回増幅後のピーク値は 600bp, 2 回増幅では 450bp と低下が見られた。

(2) 発現プロファイルデータベース

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®)を既に開発し, 利用している(図 1)。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っている。加えて, 注目している遺伝子セットを保存, 読み込みできるよう改良した。

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。

まとまった一連の遺伝子発現プロファイルデータの表示, および解析結果の表示には Silicon Genetics社のGeNet™をベースとして公開用のシステムを構築した。

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別表の通りであり, プロファイリングを行い, データベース化を進めた。

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を継続して進めた。公開サーバーについては, Web ベースでアクセスしてデータが得られるようにした。公開データは表示方法を 2 つに分けて表示するようにした。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データが得られるシステムと(図 1), 一連の

基本的解析結果を表示できるシステムの構築 (図 2) を行った。前者は <http://www2.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/dgenom/> にてデータ公開を開始している。また後者は <http://157.82.78.239/> にて公開中である。

(3) 正常組織における発現プロファイル解析

1) 標準化 ハイブリダイゼーション反応にスパイクしたコントロール遺伝子のシグナル値はほぼ揃っていたが、一部の臓器ではばらつきが生じた。類似の臓器間では全体のシグナルによる標準化でよいと考えられるが、異なる臓器間のデータの標準化は今後の課題である。

2) 臓器別データの解析

臓器の発現プロファイルによる類似性 29 臓器について発現プロファイルに基づいてクラスタ解析を行った。なお、アレイ毎に標準化を行った。脳神経系の組織はタイトなクラスタを形成し、精巣と近い関係にあった。

臓器に特異的な遺伝子 組織特異的 (tissue-specific) 遺伝子は Microarray Suite ソフトウェアによって一つの臓器でのみ “Present call”、他の臓器では “Absent call” である遺伝子を集計した。組織選択的 (tissue-selective) 遺伝子は遺伝子発現量 (signal 値) が全臓器の平均に比較して 4 S.D.以上高い遺伝子を集計した。皮膚、肝臓、精巣、胎盤には特異的発現を示す遺伝子数が多いことが認められた。

housekeeping 遺伝子 29 臓器間で発現量の C.V.値が低い遺伝子を抽出した。従来よく使われる β actin 遺伝子や G3PDH 遺伝子についてはある程度組織間での発現量にばらつきが

あることが示され、今後のアレイデータの標準化には新たに選択された遺伝子群が有用であると思われる。

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 冠状動脈において低酸素下で LDL を負荷すると、脂質染色にて陽性細胞数が増加し、cholesteryl ester の蓄積が増加した。その原因は LDL 由来の脂質取り込み増加によるものであり、生合成や、放出抑制によらないことがわかった。遺伝子発現検討により、NiemannPick C disease protein 等細胞内脂質輸送蛋白の遺伝子は、脂質負荷によってその mRNA レベルが 2 倍以上に増加した。一方、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。クラスタ分析の結果、leptin,

adipophilin, CL-100 などが誘導されることがわかり、さらにこれらはヒト病変での発現が確認された。特に leptin については転写開始点近傍の C/EBP beta が重要であることが示唆された。

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一つ PPAR γ 遺伝子自体が腸炎に伴い著明に減少することを発見した。我々はさらに治療法の実証実験として、腸炎マウスに PPAR γ 遺伝子を挿入したアデノウイルスを感染させ、腸炎の強力な抑制効果を確認する遺伝子治療を行った。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。

D. 考察

微量試料からの RNA 採取を行う際のマイクロダイセクションの過程においては、まず薄切という過程で RNA の分解が起こっていること、そしてその後のステップにおいては染色過程で切片が水相の中にいる時間が RNA の分解を最も進めているであろうこと

が示唆された。

RNA 増幅の過程では、最終産物の cRNA の quality は反応前の RNA の量、と quality に大きく依存することが判明した。また反応産物の収量には反応液の蒸発が非常に大きな影響を及ぼすことが示された。

これらの要因のうちいくつかはコントロール可能なものであり、さらなる改良の糸口となりうる。また増幅過程においては、個々の mRNA がその相対的比率を保ちながら増幅されるかについて、今後さらに検討することも必要である。

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、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。

アレイ間の標準化は大きな課題であるが、スパイクしたシグナルは一部の臓器を除いては安定しており、標準化の目安になると考えられた。スパイクコントロール遺伝子のシグナルが高値となった臓器についてはいくつかの遺伝子の RNA の絶対量を測定することにより、実験による誤差であるのか組織の RNA 量によるのかが判明すると期待される。また、従来使われている β actin 遺伝子や G3PDH 遺伝子などのコントロール遺伝子よりもばらつきが少ない遺伝子を選び出されたので、今後のアレイ解析に用いてさらに検討を加える予

定である。

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 Oracle と SUN 社のサーバー機を用いてメインサーバーとした。LIMS に保管されたデータに最新の Unigene 情報を付加したデータベースが稼動し、BioPump を利用してデータファイルを抽出することができる。これらのデータは様々なツールにより解析されるのが通常の処理過程であり、かつその結果も GeNet ベースのサーバーへ蓄積されることとなり、共用が可能である。

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。研究室でのデータ共有システムとして、多くの者が簡単にデータ検索や取得が行えることは労力の軽減の効果は大きいと考えられる。またデータが紛失する危険性を少なくするこ

とができる。加えて、互換性があり、利用しやすい GeneChip 法の結果が公開されていることは、他の多くの研究室にとって利益となると考えられる。

泡沫細胞モデルの樹立およびその遺伝子発現解析が実施された。誘導が顕著な遺伝子群が同定され、その発現は病変でも確認された。現在その転写調節解析が進行しており、本研究の目的はほぼ達成されたと考えられる。

動脈硬化に対する治療薬開発は、疾患に深く関与する遺伝子をターゲットにすることができると考えられる。したがって、本研究によって培養系において重要な遺伝子群を抽出することが可能になれば治療薬開発の有効な手法になる。

平滑筋細胞での脂質蓄積が解析可能となったことにより、ヒト動脈硬化進展の機序を詳細に観察することが可能となる。今後脂質の解析と、細胞の遺伝子発現パターンの両面から検討する予定である。また、内皮細胞やマクロファージと混合培養することによって、より生理的な疾患モデルを作成することが可能になると考えられる。

糖尿病 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 解析により糖尿病 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。TIs/Chop については、脂肪肉腫といった希少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 状のプロン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 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、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。

今回の網羅的解析結果より図らずも PPAR γ 自身が炎症に伴って著減し、それを遺伝子治療の手法を使って補充すると治療効果があることがわかった。以上の知見より今後の炎症性腸炎の治療を考えていく上で、PPAR γ を増加させる薬物の検索が重要であること、実際の治療においては予防的再燃防止に重点を置いた使用が望ましいことが示唆された。

E. 結論

3 年計画の最終年度の平成 13 年度においては、最大 6 万個の遺伝子に関する発現プロ

ファイル情報を収集すると共に、データベース開示へ向けての準備を整えた。すなわちデータベースの整備及び公開用のインターフェースの作成を行った。データベースは <http://www2.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/dgenom/> あるいは <http://157.82.78.239/> にて公開中である。

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、実際の臨床で得られる微量検体からの解析技術に関する検討を行い、微量検体からの RNA 増幅過程において、最終産物の量、quality に重量な影響を及ぼす要因がいくつか判明した。29 臓器について 40000 遺伝子の発現プロファイルデータを取得し、従来の β actin 遺伝子や G3PDH 遺伝子よりも発現量に変動が少ない「ハウスキーピング」遺伝子を同定された。多数の臨床検体からのデータを取り扱う場合には依然として測定間のデータの標準化が大きな問題であり、今後も引き続いての検討課題であると考えられた。

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は、平滑筋を低酸素下、脂質負荷することによって、ケモカインや、angiogenic inducer, 脂質代謝関連遺伝子群と同時に未知の遺伝子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はたしていると考えられた。糖尿病 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) Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, Aburatani H. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. **Cancer Research** 62(1): 233-240, 2002
- 2) Mukasa A, Ueki K, Matsumoto S, Tsutsumi S, Nishikawa R, Fujimaki T, Asai A, Kirino T, Aburatani H.: Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. *Oncogene*, in press 2002
- 3) Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Ezaki O. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR α activation and ROS production. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 282(2):G338-48. 2002
- 4) 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.** 276(44):40497-501, 2001
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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-alpha. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 21(6):917-22. 2001
- 10) Tomokiyo R, Jinnouchi K, Honda M, Wada Y, Hanada N, Hiraoka T, Suzuki H, Kodama T, Takahashi K, Takeya M. Production, characterization, and interspecies reactivities of monoclonal antibodies against human class A macrophage scavenger receptors. **Atherosclerosis.** 161(1):123-32. 2002
- 11) Mine S, Tabata T, Wada Y, Fujisaki T, Iida T, Noguchi N, Niki E, Kodama T, Tanaka Y. Oxidized low density lipoprotein-induced LFA-1-dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway. **Atherosclerosis.** 160(2):281-8. 2002
- 12) Nakamura T, Hinagata J, Tanaka T, Imanishi T, Wada Y, Kodama T, Doi T. HSP90, HSP70, and GAPDH directly interact with the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors. **Biochem Biophys Res Commun.** 290(2):858-64. 2002
- 13) Mashiba S, Wada Y, Takeya M, Sugiyama A, Hamakubo T, Nakamura A, Noguchi N, Niki E,

- Izumi A, Kobayashi M, Uchida K, Kodama T. In vivo complex formation of oxidized alpha(1)-antitrypsin and LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21(11):1801-8. 2001
- 14) 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 analysis. *Transplantation.* 72(2):320-9. 2001
- 15) Hashimoto K, Wada H, Wada Y, Kobayashi M, Izumi A, Sugiyama A, Kohro T, Hamakubo T, and Kodama T. Extensive oligonucleotide microarray transcriptome analysis of the rat cerebral artery and arachnoid tissue. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* in press 2002
- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Nakajima A, Iijima H, Neurath MF, Nagaishi T, Nieuwenhuis EE, Raychowdhury R, Glickman J, Blau DM, Russell S, Holmes KV, Blumberg RS. Activation-induced expression of carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function. *J Immunol.*, 168:1028-1035, 2002
- 5) Wada K, Nakajima A. PPAR α and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease. **Trends in Mol. Med.** 7(8): 329-33, 2001
2. 学会発表
- 第101回日本外科学会総会 (4/11-13, 仙台)
Oligonucleotide array による肝細胞癌脱分化に寄与する遺伝子発現プロファイルの解析
緑川、堤、谷口、小舟、幕内、油谷
- Cold Spring Harbor meeting "Genome sequencing and Biology" (5/9-13, CSH)
Gene expression datamining tools for cancer classification
油谷
- 第12回ヒューマンインタフェース学会研究会 (6/11, 東京)
没入型多面ディスプレイを用いた遺伝子発現

量解析に関する研究

西村 邦裕 加納 真 油谷 浩幸 広田
光一 廣瀬 通孝

情報計算法学生物学会 2001 年大会 (7/25-27、
駒場)

遺伝子発現量情報に基づくクラスタの比較と
その可視化手法に関する研究

加納, 堤, 西村, 油谷, 広田, 廣瀬
(ポスター優秀賞受賞)

肝腫瘍における遺伝子発現情報解析

堤、加納、油谷

Joint Cold Spring Harbor laboratory/ Welcome
Trust Conference 'GENOME INFORMATICS'
(8/8-12, Hinxton, UK)

Selecting relevant genes from microarray data
with multiple classes.

葛、堤、油谷、岩田

第 6 回 VR 学会 (9/19-21)

没入型多面ディスプレイを利用した時系列遺
伝子発現量解析と可視化に関する研究

西村、加納、堤、油谷、広田、廣瀬
比較マップによる遺伝子クラスタ群の可視化
加納、堤、西村、油谷、広田、廣瀬

2nd Cold Spring Harbor Meeting on
Computational Biology (9/28-30, CSH)

Visualization for comparison between gene
clustered generated from different sources

加納、堤、緑川、廣瀬、油谷

日本癌学会 (9/26-28 横浜)

シンポジウム ゲノム情報の癌関連遺伝子研
究と臨床への応用

肝腫瘍の機能ゲノム解析

油谷

DNA チップによる胃癌の遺伝子発現解析

筆宝、谷口、堤、町田、堤、鄭、深山、油
谷

原発性肝細胞癌のオリゴヌクレオチドアレイ
による包括的遺伝子解析

緑川、堤、上村、坂本、児玉、幕内、油谷
オリゴヌクレオチドアレイを用いた
Oligodendroglioma の LOH に関連した遺伝
子発現プロファイル解析

武笠、植木、浅井、油谷、桐野

マイクロアレイ解析による癌の分類において
のデータ処理

堤、緑川、加納、西村、坂本、幕内、油谷

第 13 回日本脳循環代謝学会総会 (10/18-19、
新横浜)

Sequential gene expression analysis in delayed
neuronal death and induced ischemic tolerance
following global cerebral ischemia in rats

川原、王、武笠、古屋、前田、豊田、浜窪、
油谷、児玉、桐野

第 60 回日本脳神経外科学会 (10/25、岡山)

Oligonucleotide array (GeneChip) を用いた
oligodendroglioma の LOH に関連した遺伝子
発現プロファイリング

武笠、植木、西川、藤巻、浅井、油谷、桐
野

AACR-NCI-EORTC International Conference

(10/29-11/2, Miami Beach, FL)

Molecular Targets and Cancer Therapeutics:

Discovery, Biology, and Clinical Applications

Global gene expression analysis of gastric cancer
by oligonucleotide arrays

筆宝、谷口、堤、油谷

The 4th International Workshop on Advanced
Genomics (11/13-14, 京都)

MOLECULAR PROFILING OF CANCER

油谷

第 41 回日本臨床血液学会 (11 月、神戸)

リンパ性白血病の GeneChip を用いた遺伝子
発現プロファイリング

堤、林、油谷

第 10 回日本脳腫瘍カンファランス (12/3 大
分・別府)

染色体 1p ヘテロ接合性の喪失に関連した
oligodendroglioma の遺伝子発現プロファイル
解析

武笠、植木、西川、藤巻、浅井、油谷、桐
野

第 24 回日本分子生物学会 (12/7-11、横浜)

ワークショップ「ポストシーケンス時代の染
色体分子生物学におけるデータマイニング」

ゲノム情報とトランスクリプトーム情報の統
合

油谷

シンポジウム「細胞内シグナル伝達とシグナ
ルクロストーク」

がんの発生と悪性化に関与する TGF- β シグナ
ルとシグナルクロストーク

加藤、八木、古橋、佐々木、鈴木、近藤、
石井、油谷、宮園

肝腫瘍における wnt シグナルの解析

上村、緑川、堤、谷口、筆宝、石井、油谷
スキルス胃癌細胞株における腹膜播種関連遺
伝子の網羅的発現解析

町田、筆宝、八代、谷口、油谷

腸管上皮細胞の低酸素刺激による遺伝子発現
の解析

岡、和久井、Kim、堤、中島、油谷

血管内皮細胞における TGF- β 標的遺伝子の検
索

太田、藤井、石井、宮澤、油谷、宮園

12th Genome Informatics Workshop (12/17-19、
恵比寿)

An automated system for finding seven
transmembrane helix receptors from human
genome

諏訪、佐藤、大河内、有田、松本、堤、油
谷、浅井、秋山

Visualization for comparison between gene
clusters generated from different sources

堤、加納、緑川、廣瀬、油谷

(和田)

Gordon conference, June, 2001, Kimball Union
Academy, Meriden, NH.

"Lipid accumulation of coronary artery smooth

muscle cell under hypoxic condition"

SFRR, Dec, 2001, Sydney.

"Lipid accumulation of coronary artery smooth muscle cell under hypoxic condition."

日本動脈硬化学会, 2001年6月, 東京.

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.

第74回日本生化学会大会, 2001年10月, 京都.

シンポジウム: スカベンジャーレセプターの新しい機能と病気.

日本分子生物学会, 2001年12月, 横浜.

低酸素下低比重リポ蛋白質負荷による冠動脈平滑筋の脂質蓄積.

(中島)

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

表1 発現プロファイルを解析した臓器及び細胞

FLあるいはU95アレイによる解析

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	くも膜
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
球由来 U937	THP1	神経芽細胞腫	SH-SY5Y

単