

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服対策研究事業

罹患組織における遺伝子発現プロファイル

解析からの病因解明に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 油 谷 浩 幸

平成 16 (2004) 年 3 月

目 次

I	構成員名簿	1
II	平成 15 年度総括研究報告書	5
III	平成 15 年度分担研究報告書	
	発現プロファイル解析からの疾病遺伝子同定に関する研究	15
	東京大学国際・産学共同研究センター教授 油谷 浩幸	
	微量臨床試料解析に関する研究	21
	東京大学国際・産学共同研究センター教授 油谷 浩幸	
	知的統合による遺伝子、蛋白質相互作用探索の研究	27
	東京大学先端科学技術研究センター教授 井原 茂男	
	特発性心筋症の解析に関する研究	31
	千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学教授 小室 一成	
	福山型筋ジストロフィーと裂手症の解析	33
	分担研究者 戸田 達史 大阪大学大学院医学系研究科 教授	
	研究協力者 谷口真理子 大阪大学大学院医学系研究科 大学院生	
	鹿野 博亀 大阪大学大学院医学系研究科 大学院生	
	難治性水疱性疾患およびその他の難治性皮膚疾患における罹患組織の 遺伝子発現プロファイルに関する研究	37
	分担研究者 古江増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学教授	
	研究協力者 師井洋一 九州大学大学院医学研究院皮膚科学講師	
	占部和敬 九州大学大学院医学研究院皮膚科学助教授	
	古賀哲也 福岡赤十字病院皮膚科部長	
	血管内皮細胞における血管疾患（血栓、動脈硬化症）誘発刺激応答に 関する研究	41
	東京大学先端科学技術研究センター助教授 南 敬	
IV	研究成果の刊行に関する一覧表	45

構成員名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	油谷 浩幸	東京大学国際・産学共同研究センター	教 授
分担研究者	井原 茂男	東京大学先端科学技術研究センター	教 授
分担研究者	小室 一成	千葉大学大学院医学系研究院 循環病態医科学	教 授
分担研究者	戸田 達史	大阪大学大学院医学系研究科	教 授
分担研究者	古江 増隆	九州大学大学院医学研究院皮膚科学	教 授
分担研究者	南 敬	東京大学先端科学技術研究センター	助教授

(事務局) 経理事務連絡担当責任者 安田 道義

東京大学生産技術研究所 経理課長

〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1

電話 : 03-5452-6041 (直通) F A X : 03-5452-6075

E-mail: haburata-ky@umin.ac.jp (油谷) / myasuda@iis.u-tokyo.ac.jp (安田)

Ⅱ 平成 15 年度総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

罹患組織における遺伝子発現プロファイル解析からの病因解明に関する研究

主任研究者 油谷浩幸 東京大学国際・産学共同研究センター 教授

研究要旨

希少性疾患は通常の遺伝解析のみによる病因解明が困難であるがゆえ、未だ原因不明であり、適切な治療法の開発も進められておらず、原因遺伝子が解明されても適切な治療標的分子の同定が必要となる。ヒト疾患は個体あるいは臓器というシステムの破綻であり、それは生体固有のフィードバック機構により必ずしやトランスクリプトーム（遺伝子転写の総体）に反映されていると推定される。本研究班では、希少性疾患について罹患組織のトランスクリプトーム解析により、病態解明あるいは治療法開発のための標的遺伝子候補を探索すべく、1) 発現プロファイルデータベースの拡充、データ交換システムの構築、2) 発現プロファイル解析技術の確立、3) 希少性疾患解析への応用に関する研究を行った。

分担研究者

油谷 浩幸	東京大学国際・産学共同研究センター・教授
井原 茂男	東京大学先端科学技術研究センター・教授
小室 一成	千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学・教授
戸田 達史	大阪大学大学院医学系研究科・教授
古江 増隆	九州大学大学院医学研究院皮膚科学・教授
南 敬	東京大学先端科学技術研究センター・助教授

ト疾患は個体あるいは臓器というシステムの破綻であり、それは生体固有のフィードバック機構により必ずしやトランスクリプトーム（遺伝子転写の総体）に反映されていると推定される。罹患組織における多数の遺伝子の発現変動を同時に正確に捉えることによる病態解明、いわば「臨床ゲノム学（clinical genomics）」の樹立が肝要である。本研究班では、希少性疾患について罹患組織のトランスクリプトーム解析により、病態解明あるいは治療法開発のための標的遺伝子候補を探索すべく下記の項目について研究を行った。

1. 発現プロファイルデータベースの拡充、データ交換

2. 微量組織からのゲノム解析技術の確立

3. 希少性疾患解析への応用

A. 研究目的

希少性疾患は通常の遺伝解析のみによる病因解明が困難であるがゆえ、未だ原因不明であり、適切な治療法の開発も進められておらず、原因遺伝子が解明されても適切な治療標的分子の同定が必要となる。ヒトゲノム計画の進展は遺伝子塩基配列や発現情報などの網羅的データを基礎として新たな作業仮説を立て検証するという研究手法を可能とした。ヒ

福山型先天性筋ジストロフィ（FCMD）、II型滑脳症を伴う常染色体劣性遺伝性神経筋疾患である。我々は以前 FCMD の原因遺伝子を同定した。その遺伝子産物であるフクチンは筋細胞膜上にある α -dystroglycan の糖鎖を修飾する酵素ではないかと推定されている。また FCMD 患者の筋線維は他の筋ジストロフ

ィーに比べ未熟である一方で、筋線維の再生は活発でないことが知られているがその詳細に関し遺伝子レベルでの変化はわかっていない。また裂手症は中指を中心に手・足の中央列が欠損する疾患であるが、その疾患モデルマウスで同定された transposon 挿入変異による影響を調べるため、周辺遺伝子の発現量解析を行った。

天疱瘡や類天疱瘡などの難治性水疱性疾患は表皮細胞の接着装置に対する自己免疫性疾患である。ステロイド内服や血漿交換療法、免疫抑制剤内服などの治療が用いられ、予後はある程度改善されてきている。しかしながら種々の治療に抵抗し死に至るケースも多い。天疱瘡ではデスモゾームを構成するデスモグレインに対する自己抗体が、類天疱瘡ではヘミデスモゾームを構成する BPAG などに対する自己抗体が産生されることは分かっているが、水疱形成を引き起こす病態については未だ不明の点が多い。本研究では、天疱瘡や類天疱瘡などの難治性水疱性疾患の罹患組織中の遺伝子発現を、種々の難治性皮膚疾患(乾癬、皮膚炎、腫瘍など)での遺伝子発現と比較検討することによって、これら難治性皮膚疾患の病態形成機序を明らかにするとともに、新たな治療法の開発に寄与したい。

初年度に高脂血症の解明について担当した和田洋一郎の異動に伴い、南敬(東大先端研)が分担研究者として加わった。原発性高脂血症では動脈硬化症の進展が臨床的な問題となる。動脈硬化、血栓症、病的血管新生等の血管疾患発症の機序を培養細胞系で構築し解明するには、流れ、炎症性因子の存在、及びこれらの刺激に応答する血管内皮細胞での遺伝子発現制御機構を綿密に再現し組み立てることが重要である。そこでまず、内皮細胞における刺激応答を包括的に理解するためマイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を進め、機序解明に呈することを目的とした。

B.研究方法

1. 遺伝子発現プロファイルデータベースの

拡充、データ交換

ヒト正常臓器あるいは細胞について、GeneChip (Affymetrix 社製) U133 アレイを用いることにより得られる、4万個の遺伝子あるいは EST についてのトランスクリプトーム実験データを収集しデータベースを構築する。データベースは、PostgreSQL 7.2.3 RDBMS (Relational DataBase Management System) 環境の上に構築した。一方、データを閲覧するためのブラウザーは Windows 環境では Internet Explorer 6.0 あるいは MacOS9 または X については Internet Explorer 5.1 以上である。

2. 微量組織からのゲノム解析技術の確立

2-1 発現プロファイル解析

転写酵素に関する検討 RNA の増幅過程において複数の IVT(in vitro transcription)酵素を変えて条件検討を行い最適化したことを以前に報告した。今回新たに、逆転写酵素として従来用いていた Invitrogen 社製 Superscript II と、新たに市販された SuperScript III との性能を比較した。

臨床試料の LCM 解析 実際に肺腺癌組織検体および膵臓癌組織検体について LCM から RNA の増幅を行い oligonucleotide microarray による発現解析を行った。解析には約 50000 種類の transcript が解析可能な Genechip HG-U133 plus 2.0 (Affymetrix 社) を用いた。微量検体からの測定であり再現性の検討を行うために、同一検体から複数回の LCM を別個に行い RNA を増幅し、マイクロアレイ解析した。

2-2 ゲノム解析

ゲノム DNA 1ng を用い 30°C overnight の isothermal reaction により何度かの増幅反応を行い、いずれにおいても約 1500ng の増幅産物を得た。増幅産物の電気泳動では増幅前と同様の長さの約 20kb のバンドを中心に数 kb までスメアを引いていた。増幅の proportionality を検定するため、増幅前のゲノム DNA をコントロールとして増幅後の DNA を、約 300 の BAC(大腸菌人工染色体

bacterial artificial chromosome)をスポットしたCGHマイクロアレイ(Vysis genosensor 300)を用いて解析した。

1. 希少性疾患解析への応用

3-1 特発性心筋症の解析に関する研究

心臓縮小手術(バチスタ手術)にて得られた不全心筋から得られたRNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果によって得られたいくつかの遺伝子についてはマウスモデルを作成し、心不全病態生理への関与を検討した。

3-1 神経筋疾患の解析

FCMDの筋組織と小児正常筋での遺伝子発現の違いを、神経センターにより独自に開発されたcDNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を用い網羅的に比較検討した。また、実験に用いたサンプルの病理画像を利用し、画像解析及びバイオインフォマティクスの統計解析方を用いて、FCMD筋に特異的な骨格筋での病態変化を遺伝子レベルで調べた。

裂手症では、AffymetrixマウスDNAチップを用いて、mutantマウス胚由来のmRNA量をwild typeと比較した。

3-1 難治性水疱性疾患およびその他の難治性皮膚疾患における罹患組織の遺伝子発現プロファイルに関する研究

天疱瘡や類天疱瘡をはじめ、コントロールとして種々の難治性皮膚疾患(乾癬、皮膚炎、腫瘍など)の病変部および健常部を採取しmRNAを得て遺伝子発現プロファイルを比較した。遺伝子発現プロファイルの変動が病態形成にどのように関与するのかを、免疫組織学的に解析し確認した。

3-1 血管内皮細胞における血管疾患(血栓、動脈硬化症)誘発刺激応答に関する研究

生理的な刺激反応を維持し、かつ安定的な供給が見込めるものとしてヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いた。Sub-confluent HUVECにトロンビン(1.5U/ml)あるいはは

tumor necrosis factor (TNF)- α (10ng/ml) インターロイキン(IL)-1 (10ng/ml)を添加後、経時的にtotal RNAを回収し、網羅的なマイクロアレイ遺伝子解析はAffymetrixの奨める方法に従い行なった。

(倫理面への配慮)

厚生労働省の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」、3省庁合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科省、厚労省・経済省告示第一号)」に従い指針に適合する倫理委員会の承認を得、各臨床機関において患者からの血液あるいは組織試料等の匿名化をはかった試料に対して得られた遺伝子発現解析実験データに対して情報処理解析を行なう。

C. 研究結果

1. 遺伝子発現プロファイルデータベースの拡充、データ交換

遺伝子発現データベース基盤として、公開DB及び共同研究データ共有DBの2種類の環境を構築した。公開DBへのウェブからのアクセスは、URL> <http://www.lsbm.org/> から、RefExA(Reference database for gene expression Analysis)サイトへアクセスする。正常臓器40、正常培養細胞17および癌細胞株23検体の遺伝子発現データをデータベースに格納し、遺伝子名、公共DBのアクセッションおよびプローブIDからの検索を可能にした。ユーザーインターフェースは簡便さ優先に構築した。

パネルビュー表示で発現値をヒートマップで表示することにより視覚的に多数検体・遺伝子を一望できるようにした。また各種の外部の公共DB(遺伝子情報DB; GenBank, UniGene, LocusLink, OMIM)へハイパーリンクを貼り、最新のより詳細な情報へのシームレスな参照を可能にした。さらにNetAffx(Affymetrix®)の提供するWebベースの詳細情報DB)や、GOなどの遺伝子機能情報へのリンクも可能にし

た。パネルビューに加え、各遺伝子に対して臓器、細胞毎の発現値が棒グラフで表示されるグラフビューを設けた。

さらに、共同研究施設間でのデータ共有を目的とした、GeNetサーバーを立ち上げ、インターネット経由で特定ユーザーのみがデータを共有できる環境を構築した。

2. 微量組織からのゲノム解析技術の確立

2-1 発現プロファイル解析

プロトコールに関する検討 LCM に用いる組織切片調整方法であるが、我々の解析によって通常の水溶性染色液を用いた染色では RNA の品質の著しい低下が観察された。これは染色段階における RNAase の活性によるものと推定し、アルコール性染色液のギムザ染色液を用いることで再現性の高い RNA の採取を可能にしたことを以前報告した。ギムザ染色液は単染色で核・細胞質のコントラストが確保でき、分染の必要がないという点で手順の短縮化を可能できる。

SuperScript III においては Superscript II に比較して IVT 後の cRNA の品質(泳動によるピーク)を変えることなく約 1.5 倍の収量が得られることがわかった。SuperScript III は Superscript II を改変して熱安定性が上がったものであり、反応温度が従来の 37 度から 50 度になったため、複雑な 2 次構造の鋳型 DNA からでも逆転写合成できることが期待される。およそ 10ng の total RNA から 50ug を超える cRNA を得ることが可能である。

臨床試料の LCM 解析 肺腺癌、膵臓癌検体のいずれも相関係数が約 0.95 という比較的高い再現性が見られ、発現解析のための十分可能な系であることが示された。ただ増幅していないサンプルに比較して、polyA からの距離が長い位置に probe が設計されている遺伝子については、LCM を行った検体では、シグナルが低い傾向が見られた。

2-2 ゲノム解析

phi29 polymerase による増幅効率は、PCR 反応による増幅から予想されるより少なかったが、ゲノムの異なる場所によってある程度

のばらつきは認められた BAC プローブのテロメアからの位置、BAC 周辺のゲノムの配列を検討した結果、テロメア周辺、および GC rich な配列では増幅効率が低いことがわかった。テロメア周辺、GC rich な配列における複雑な 2 次構造による影響が考えられたため、反応溶液に終濃度 5%, 10% の DMSO を加えて反応を行った。いずれの反応も DMSO 非添加時と変わらない増幅効率であり、泳動パターンも同様であった。CGH マイクロアレイによる解析では DMSO の添加によって GC rich な配列の増幅率の改善がみられたが、テロメア周辺の増幅効率の低下は変化しなかった。テロメアではゲノムの増幅反応が止まるため、周辺の増幅効率の低下が考えられた。そこでサンプルとコントロールの両方を phi29 polymerase により増幅して CGH マイクロアレイで解析することにより、上記の増幅効率のバイアスが安定しているかどうかを検証した。増幅した正常女性のゲノムをコントロール、増幅した正常男性のゲノムをサンプルとして用いた解析では、ゲノムの GC%, テロメアからの距離によるシグナル比の変化は見られず、X 染色体領域では男女による違いと思われるシグナル比の低下が見られた。

3. 希少性疾患解析への応用

3-1 特発性心筋症の解析に関する研究

インフォームドコンセントを得、バチスタ手術の際に切除した 50 例(内拡張型心筋症は 30 例)の不全心筋サンプルを準備した。不全心筋の DNA chip 解析では、100 前後の遺伝子においてその発現の有意な変化が明らかとなった。不全心で発現の低下していた主な遺伝子としては、心筋特異的転写因子 Csx/Nkx2.5、増殖因子受容体 FGFR や EFGR、カベオラの形成に重要な caveolin-3、抗酸化分子制御因子 HSF-1 などが確認され、発現の亢進していた主な遺伝子としては、アポトーシス促進因子 AIF が確認された。Csx/Nkx2.5 のマウスモデルの解析については以前に報告したが、その他に抑制型 caveolin-3、抑制型 EGFR の心筋特異的遺伝子発現マウスを作成し

た。その結果、前者のマウスモデルでは肥大型心筋症様の形質を呈するのに対し、後者のモデルでは、拡張型心筋症様の心不全を示した。また HSF-1 の過剰発現マウスを解析した結果、HSF-1 の発現によって心筋梗塞後リモデリングや圧負荷による心機能低下を抑制しうることが明らかとなった。

3-2 神経筋疾患の解析

FCMD 筋では Col3a1, SPARC, MGP, Lumican 等細胞外マトリックス成分及び基底膜成分の著しい発現の上昇を認めた。一方で骨格筋成分は筋再生の初期に見られる遺伝子群 (Myosin Binding Protein H, Troponin T2, ACTC) の発現の上昇が見られたにとどまった。また、FCMD の患者間の比較では加齢により発現量の変わる遺伝子は少なく、年齢を通じて一定の発現パターンを示した。さらに RT-PCR において筋成熟の最終段階で発現の上昇する遺伝子群 (MYH7, MRF4) の発現低下が見られ、また Agrin や AchR など神経性分化因子の遺伝子発現が著しく上昇していた。

裂手症モデルマウスでは Fgf8 をはじめとする上下肢の発生に関わるとされる遺伝子の発現量の低下を認めたが、裂手症の原因候補遺伝子と考えられている Dactylin の発現量には変化が認められなかった。

3-3 難治性水疱性疾患およびその他の難治性皮膚疾患における罹患組織の遺伝子発現プロファイルに関する研究

昨年度は、天疱瘡 2 例、類天疱瘡 5 例、そして疾患コントロールとして多形紅斑 1 例、黒色腫 1 例、パジェット病 2 例について解析を行った結果、類天疱瘡で kallikrein6、carboxypeptidaseA3、matrix metalloproteinase1、metallothionein1F などの酵素群の遺伝子発現が亢進しており、水疱形成への関与が考えられた。Paget 病では elafin、transmembrane 9 superfamily member2、synaptogyrin2、CYR61、TACSTD1、CD66、CEA-related cell adhesion molecule6 などの興味深い遺伝子の関与が推察された。今年度は天疱瘡 2 例、類天疱瘡 2 例、神経線維腫症 3 例、脂肪母斑 1 例、汗腺

癌 1 例、正常皮膚 2 例の mRNA を採取し、現在 6 例の GeneChip 解析データを詳細に解析中である。

3-4 血管内皮細胞における血管疾患（血栓、動脈硬化症）誘発刺激応答に関する研究

凝固炎症性因子であるトロンビンが系内に加わった場合、動脈硬化促進に寄与する intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 が誘導されるが、さらに 1, 4, 18 時間の時系列でもって詳細に解析した結果、全 8794 遺伝子のうち 74 (1 時間で 34, 4 時間で 21, 18 時間で 19) の遺伝子発現が上昇し、一方 20 の遺伝子が減少すること。この制御には転写因子群 SRF, Egr-1, NF-AT, NF- κ B, GATA を含む転写因子のカスケードが深く関わっていることを見いだした。同じく炎症性因子である TNF- α , IL-1 を系内に添加した場合、同様に ICAM-1, VCAM-1 の強い誘導が生じるが、これらの刺激のうち、TNF- α が最も強く、また長時間 VCAM-1 の誘導が励起されること、ICAM-1, VCAM-1 の発現誘導機構は大きく異なっていて、VCAM-1 誘導には NF- κ B の結合のみならず、PI3-キナーゼ、p38 MAP キナーゼ経路や GATA-2 の結合が必要でかつ二次的な転写産物が深く関わっていること（シクロヘキシミド添加に感受性があること）を新たに見いだした。

D. 考察

1. 発現プロファイルデータベースの拡充、データ交換

SBM-DBに関する統計値をみると公開DBへのアクセス数は約350/月であり、検索数で見ると約2000件/月であった。1アクセスあたり、約6検索であった。公開したデータベースとしては世界最大級であり、頻繁にアクセスがあり、公開した意義があると考えられる。

アクセスしてきたユーザからは、データの質の高さ、インターフェースの簡便さに評価が高かった。インターフェース上の問題としては、昨年度のユーザの意見を元に細部の修

正・改良を行った。できるだけ多くの情報を網羅的に画面に表示すべきというニーズと、要素を大きく表示を見やすくするという相反する要求を調整していく必要がある。ユーザからの直接の反応から、公開したデータベースの維持改良を今後とも続ける必要性がある一方で、共同研究施設間での安全かつ簡便なインターフェースによる大量の遺伝子発現データ共有環境が一層重要になっている。

2. 発現プロファイル解析技術の確立

2-1 微量組織からのゲノム解析技術の確立

プローブ配列の位置によるシグナルのばらつきを生じる現象は IVT 後の cRNA の長さに依存的であり、LCM を行った検体間でもばらつくことが予想されるため、これらの解釈、補正は今後の課題だと思われる。通常の U133 アレイはプローブ配列が PolyA 配列から 600 塩基以内にデザインされているのに対して、より近傍の 300 塩基以内にデザインされたアレイも最近開発されており、RNA の品質が低下した検体についての利用も予定している。

従来ゲノムの増幅法としては DOP-PCR (degenerative-oligonucleotide-primed PCR) をはじめ PCR を用いた増幅法が用いられてきた。これらの方法の欠点としては、PCR 反応を伴うために、ゲノムの中で GC-rich な配列、特殊な 2 次構造をとる配列は増幅しないということである。また fidelity の高い PCR 用酵素を用いると一般に増幅効率は悪い。最近ゲノムを増幅する新しい手法として MDA (Multiple Displacement Amplification) に関する報告がみられる (Dean FB ら, PNAS, 2002)。Phage phi29 より見つかった酵素である phi29 DNA polymerase は DNA 複製方向にある DNA の 2 本鎖を解離させながら合成を行う。この反応は 30°C における isothermal reaction であり PCR のような熱依存性は低い。またこの酵素の特徴として fidelity が高く ($\sim 10^{-7}$)、クローニングによるシーケンシング解析にも使うことができる。Random primer を用いた反応により、合成鎖がさらに priming され exponential amplification

が行われる。

今回の検討結果により phi29 polymerase による MDA 法により、proportionality をそれほど損なうことなく高い増幅が可能であり、そのバイアスは比較的安定していることが示された。そして比較の対象の両者を増幅にかけることにより CGH マイクロアレイのような量的解析も可能であることが示された。

3. 希少性疾患解析への応用

DNA chip を用いた網羅的遺伝子発現の解析とそれらに基づくマウスモデルの作成・解析によって、いくつかの心不全関連遺伝子が同定された。これらの遺伝子や未解析の遺伝子群については、さらにマウスモデルを用いて検証するとともに臨床的な意義を検討することによって、特発性心筋症の病態生理への関与を明らかにしようと考えられた。

FCMD は線維成分の発現が出生時より高く、筋成分の発現が低い、いわゆる線維病であると考えられた。近年、FCMD では糖鎖異常により筋細胞膜と基底膜構成成分との連結が悪いことが解明されてきており、基底膜を介した筋細胞の分化誘導が神経筋接合部形成の時期に断絶され、それ以降の筋細胞の分化過程が遅延していることが推定された。

類天疱瘡は基底膜部で発現亢進が認められた蛋白はすべて酵素群であり、本症の水疱形成と極めて関連していると推察される。Kallikrein と類天疱瘡の関連に関しては、ロシア語の文献が 1 報見受けられる。その他の遺伝子産物との解析は報告されていない。乳房外 Paget 病は、外陰部や腋窩に生じる表皮内腺癌で、最近高齢者で増加しつつある。本症においても、多くの遺伝子産物との関連が想定され、今後の解析が待たれる。

原発性高脂血症では動脈硬化症の進展が臨床的な問題となる。トロンピンは G タンパク共役型受容体である PAR-1 により、TNF- α や IL-1 は各々そのサイトカインレセプターにより活性化シグナルが中に伝わるが、時系列でもってその応答遺伝子を網羅的に解析した結果、早期においては、レセプターからの

直接的なシグナルの違いに基づくと思われる異なる遺伝子が顕著に誘導されるのに対し、4時間以降においては、これら炎症性因子において NF- κ B 経路の活性化に起因すると考えられている多くの共通の遺伝子が誘導される傾向が示唆された。しかし、ICAM-1 や VCAM-1 の誘導に着目した場合、シクロヘキシミドや PI3-キナーゼ阻害剤等の添加による応答性に顕著な違いが見いだされたことから、特に VCAM-1 においては、NF- κ B 単独の機構ではなく、二次転写反応を介する複雑な転写調節機構が存在する可能性が示唆された。

E..結論

ヒト正常臓器は40種に拡大、17種のヒト正常培養細胞および23種の癌細胞株のデータへと公開データベースを拡充した。本年度に改良を進めたユーザーインターフェースもその簡便さなどについてユーザの評価も高く、利用頻度も高いことからその有用性が示されている。本年度は、GeneChip (Affymetrix 社製) U133 アレイのデータを解析対象としたが、次年度はさらに多種のアレイ対応などにも適用可能なデータベース構築を行なう。

今後は様々な臨床データへの応用を展開していくことによって、臨床研究者がより使いやすいシステムの要件を明確化し、この分野でより先端的な研究を行なうことができる。これが達成されたとき、同時に実用にも供するシステム構築が達成できる。現在では、データベースと文献情報システムは別々に作成し、それぞれ別個に稼動しているが、これらを統合化するための技術を開発し、融合化することによって知識ベースの進んだシステム構築をめざす。

数十 ng の RNA から再現性よく 47000 遺伝子のアレイ解析を行えることが実証された。phi29 DNA polymerase を用いたゲノム DNA 増幅法により proportionality を維持したままゲノム増幅が可能であり、CGH マイクロアレイのような量的解析への応用も可能で

ある。

小室らは不全心筋を用いた網羅的な遺伝子発現解析は、特発性心筋症の原因遺伝子の同定や心不全病態生理の解明に有用である。今後解析を行う症例を増やしていくことによって、より特異的で重要な遺伝子を同定できる可能性があると考えられた。

戸田らは FCMD の解析を行い、原因遺伝子フクチンのコードするフクチン蛋白の機能喪失により、筋細胞膜の α ジストログリカンが糖鎖修飾をうけず、そのため筋基底膜成分のラミニンとの結合が弱くなるため、筋基底膜の破綻が生じる。その結果、筋細胞自体の分化異常と、線維産生過剰とが相俟って FCMD の病態を作り出していると考えられた。一方、裂手症モデルマウスで同定された transposon 挿入変異では、候補遺伝子である Dactylin の発現量には影響を与えておらず、他に position effect の影響を受けた真の原因遺伝子が存在する可能性がある。

古江らは遺伝子発現に関する難治性皮膚疾患プロファイル一覧表を作成するとともに、水疱性疾患だけでなくコントロールとして様々な皮膚疾患の解析を進める予定である。

各種血管疾患誘発因子を用いたトランスクリプトーム解析から、遺伝子応答は各種因子で個別に生じる早期の遺伝子応答や多くの共通誘導遺伝子が存在していること。このうちトロンビンは凝固に関わるのみならず、血管疾患に関わる多くの遺伝子の動的制御に重要な役割をもつことが明らかとなった。

F.健康危険情報

本年度の研究結果からは健康に害となる情報は得られていないが、発現プロファイル解析から病態のマーカーとなる遺伝子群が見出されつつある。

G.研究発表

1. 論文発表

(分担研究者の項参照)

2. 学会発表

(分担研究者の項参照)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

Ⅲ 平成 15 年度分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患研究事業）
分担研究報告書

発現プロファイル解析からの疾病遺伝子同定に関する研究

分担研究者 油谷浩幸 東京大学国際・産学共同研究センター教授

研究要旨

発現プロファイル解析は病因解明の有効な手法として期待されている。本研究においては1) アレイプラットフォームの再現性、2) 転写ネットワークからの疾病遺伝子同定について検討した。2つの異なる測定系プラットフォームによりアレイ解析結果が左右されることなく安定していることが示された。転写制御に共通に関わる転写因子を同定することにより、疾病組織における遺伝子発現プロファイルを特徴づける識別遺伝子群から疾患の原因遺伝子を探索する手法を開発した。

A. 研究目的

発現プロファイル解析を医療の現場で将来用いることを考慮した場合に、測定系のプラットフォームにより結果が左右されることなく安定することが重要である。また100枚にも及ぶ多数のアレイによる解析を検討する際に、妥当な価格と性能に加え、ハイ・スループットで施行可能なアレイを選択する必要がある。本研究では異なるアレイ間での性能の比較を行った。

遺伝子の発現は数々の転写制御タンパクによってコントロールされている。マイクロアレイによって取得した遺伝子発現プロファイルデータは、このような転写因子の制御の結果と考えることができる。一方で哺乳動物の転写制御はエンハンサなどの部位が、遺伝子の転写開始点の上流あるいは下流20kbp以上離れた配列に存在することもあり単純ではない。しかし、多くのプロモータ領域が転写開始点の近辺にあることを利用し、有意な確率で作用していると考えられる転写因子結合配列を出力するシステムを開発した。

B. 研究方法

34のヒト正常組織および細胞株からトータルRNAを採取し、CodeLinkアレイおよびGeneChipアレイによって遺伝子発現プロファ

イルを取得した。また、胃癌細胞株2M, 2MD3の細胞株についてはCodeLinkアレイについて2度同じ実験を行い、再現性を検討した。2Mおよび2MD3で遺伝子発現の変化した遺伝子17個について、リアルタイムRT-PCR用のプライマーを設計し、Bio Rad社iCycler IQにてアレイ結果の妥当性について検討した。

Affymetrix U133ABアレイ上に存在するヒトの遺伝子配列中25,668個についてRefSeq配列とヒトゲノム配列とを照合し、RefSeqの5'末端より上流1,000bpおよび下流に100bpの配列をデータベース化した。また、転写因子の結合予測はPositional Weighted Matrix法を利用し、全ての抽出配列について評価した。使用するMatrixおよび閾値はTRANSFAC 7.2のものを利用した。結果446個の転写因子結合配列Matrixに対し、それぞれの遺伝子上流配列が結合可能かを1:結合可能、0:結合しないという2値として466×25,668個の表を得た。このうち、あるアレイの遺伝子発現解析の結果、出力された遺伝子リストの中に特定の転写因子結合サイトを含む確率は超幾何分布により求めた(図1)。

(倫理面への配慮)

本研究ではアルゴリズムの開発のみであり、個人情報には取り扱わない。

C. 研究結果

CodeLink アレイの再現性について検証した結果を示す。同じ RNA 試料からアレイ実験を 2 度行った時の再現性は、発現プロファイル間で相関係数 0.996 (2M), 0.997 (2MD3) を得た。また、17 プローブについてリアルタイム PCR 法にて発現量を確認してみると、双方のアレイともに良好の相関を示している (図 2)。

転写因子結合配列同定の一例として遺伝子発現データベースを解析した肝臓に特異的発現を示す遺伝子 173 個を入力した。U133A アレイ全体で Unigene は 13,379 個となる。例えば HNF4 の結合配列はこの中で 2,138 個が合致するが、173 個のリスト中 63 個が見つかった。この確率は 5.58×10^{-11} となり、有意な確率で HNF4 が肝臓特異的に働いていることが予想される。

D. 考察

我々は遺伝子発現データベースの構築の過程で、34 臓器の RNA からの遺伝子発現プロファイルを双方のアレイにて取得している。例えば脳と肝臓での遺伝子発現の比率を双方のアレイによるプロファイルで比較すると、7067 個の遺伝子で 0.81 の相関が得られた。このため双方のアレイ技術ともに同等の性能があることが予測された。25 臓器を利用して、それぞれの組織に特異的に発現している遺伝子を抽出した結果を示す (図 3)。比較的高価な GeneChip システムに対して、CodeLink アレイは多量の枚数を同時に実験するにも労力が少なく、かつ遺伝子発現の感度が良好であるという予備実験結果を得た。

このように、CodeLink アレイは Affymetrix の GeneChip に遜色ない性能を有していると考えられる。また、CodeLink アレイは比較的廉価で洗浄・スキャンなどの実作業において複数枚を連続に行うシステムが構築されており、効率も良いと考えられる。

発現プロファイル解析から得られる多数の遺伝子リストについて、466 個の転写因子結合配列の分布から自動的に遺伝子の転写制御

領域に有意に高頻度に存在する配列を出力するシステムが構築されている。今後は、発現プロファイル解析から様々な条件で出力される遺伝子リストに対して適用して、発現パターンの変化のメカニズムを解析予定である。

E. 結論

GeneChip にて抽出した遺伝子発現のパターンは全て CodeLink で再現性よく計測できており、CodeLink アレイの信頼性を示すものと考えられる。

転写制御に共通に関わる転写因子を同定することにより、疾病組織における遺伝子発現プロファイルを特徴づける識別遺伝子群から疾患の原因遺伝子を探索する手法を開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Furuya K, Shimizu T, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T, Kirino T. Genome-wide Gene Expression Analysis for Induced Ischemic Tolerance and Delayed Neuronal Death Following Transient Global Ischemia in Rats. **J Cereb Blood Flow Metab.** 24(2):212-223. 2004
- 2) Ge X, Tsustumi S, Aburatani H, Iwata S. Reducing false positives in molecular pattern recognition. **Genome Informatics** 14:34-43, 2003
- 3) Matsui Y, Saiura A, Sugawara Y, Sata M, Naruse K, Yagita H, Kohro T, Mataka C, Izumi A, Yamaguchi T, Minami T, Sakihama T, Ihara S, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T, Makuuchi M. Identification of gene expression profile in tolerizing murine cardiac allograft by co-stimulatory blockade. **Physiol Genomics.** 2003 Sep 9 [Epub ahead of print]
- 4) Tsutsumi S, Taketani T, Nishimura K, Ge X, Taki T, Sugita K, Ishii E, Hanada R, Ohki M,

Hayashi Y and Aburatani H. Two distinct gene expression signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with *MLL* rearrangements. **Cancer Research** 63(16):4882-7, 2003

- 5) Kano M, Nishimura K, Ishikawa S, Tsutsumi S, Hirota K, Hirose M, Aburatani H. Expression Imbalance Map: A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions. **Physiol Genomics**. 13: 31-46, 2003

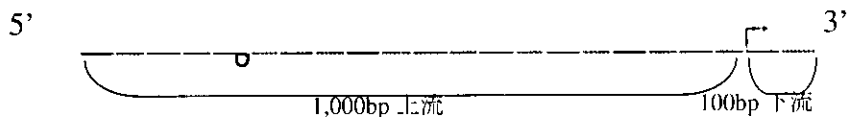
H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

2. 学会発表

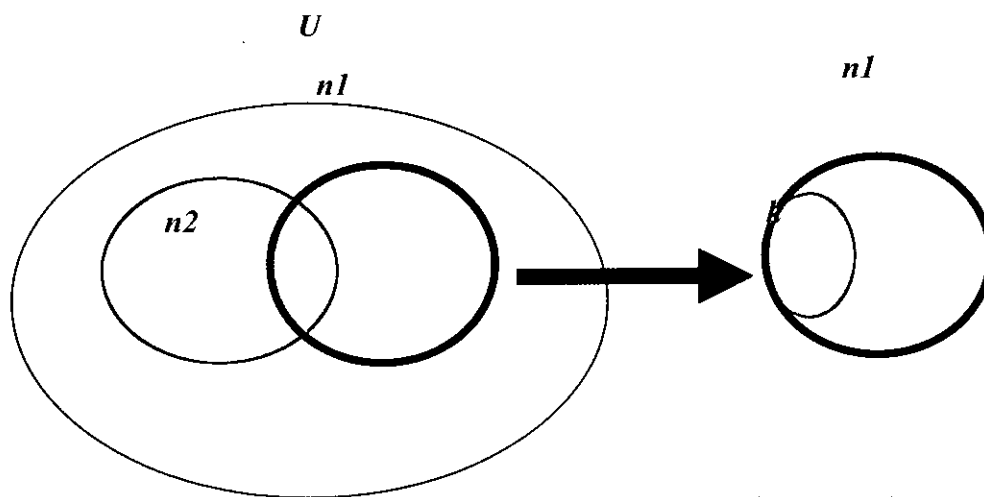
- 1) **Cold Spring Harbor Meeting 2004 3/4-3/7**
Two distinct gene expression and transcription signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with *MLL* rearrangements 堤、井原、油谷
- 2) **第65回日本血液学会総会 2003年8月**
t(1;19)およびt(12;21)の急性リンパ球性白血病の遺伝子発現プロファイル解析 堤修一、竹谷 健、西村 邦裕、滝 智彦、杉田 完爾、石井 榮一、花田 良二、大木 操、油谷 浩幸、林 泰秀
- 3) **第62回癌学会 9月25日-27日** *MLL*遺伝子再構成を有するリンパ球性白血病の遺伝子発現プロファイル解析 堤 修一、竹谷 健、西村 邦裕、葛 錫金、滝 智彦、杉田 完爾、石井 榮一、大木 操、油谷 浩幸
- 4) **第7回MCC 循環器セミナー (小樽) 9/6**
遺伝子発現解析からの疾病研究
- 5) **自治医大特別講義 (栃木) 10/15** **Clinical genomics: マイクロアレイ解析の医療への応用**
- 6) **第14回 南大阪がん研究会 (近畿大) 10/16** **マイクロアレイ解析の疾患医療への応用**
- 7) **がん治療学会シンポジウム (札幌) 10/22**
がん診断及び治療へのゲノム情報の応用
- 8) **第5回国際ゲノム会議 (横浜) 6/27**
Transcriptome to Integrated Biology

図1 転写因子結合配列の予測



Matrix 閾値計算
↓

	SP1_ELK1	USF_USF	AP2_NF1	SP1_GC_C
Hs.22612	1	0	0	1
Hs.40328	0	0	0	0
Hs.429607	1	1	1	0
Hs.6061	0	1	1	0
Hs.7946	0	0	0	0
Hs.355906	1	0	1	1
Hs.268281	0	0	0	0
Hs.33979	0	0	0	0
Hs.75428	1	0	0	1
Hs.10964	1	0	0	1



$$P = H(U, n_1, n_2, k) = 1 - \sum_{i=0}^{k-1} \frac{\binom{n_2}{i} \cdot \binom{U-n_2}{n_1-i}}{\binom{U}{n_1}}$$

図2 定量PCRとの比較

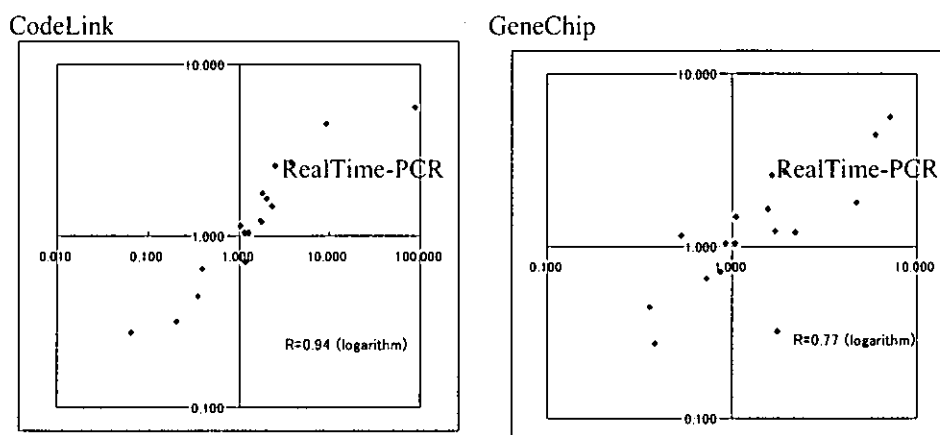
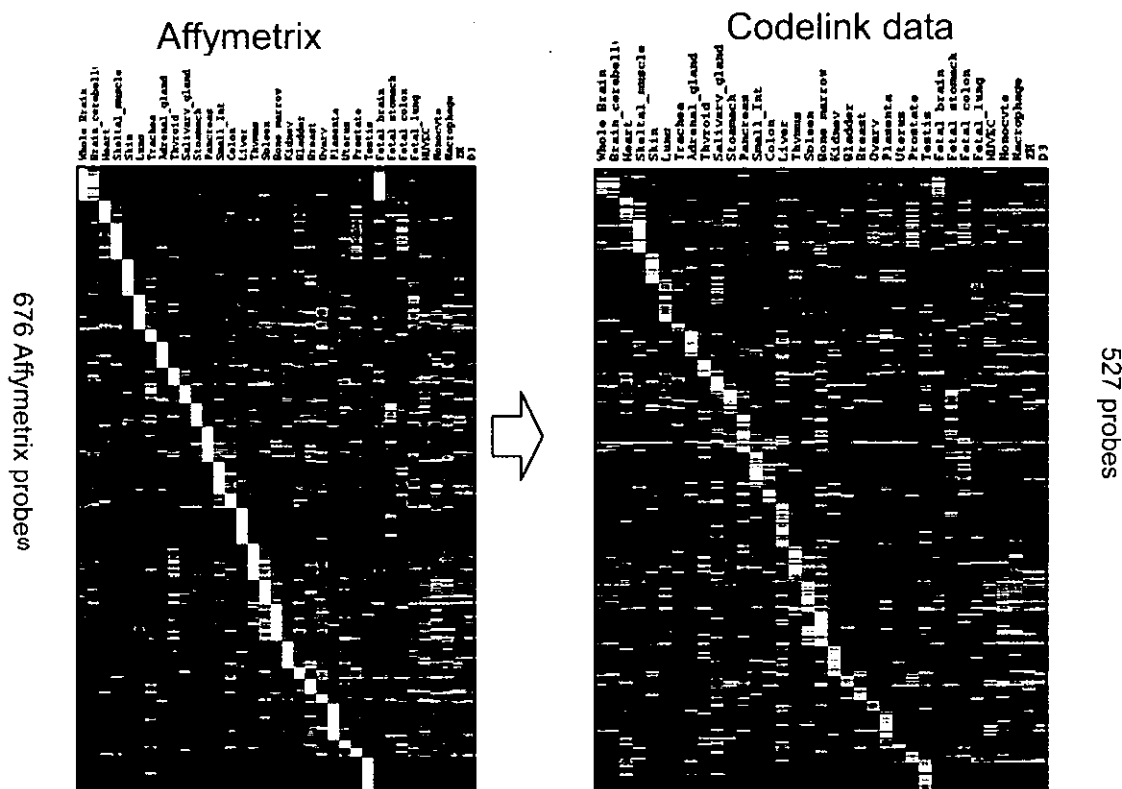


図3 組織特異的遺伝子の選定



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患研究事業）
分担研究報告書

微量臨床試料解析に関する研究

分担研究者 油谷浩幸 東京大学国際・産学共同研究センター教授

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、より微量の検体からより品質のよい RNA を十分量に増幅させることが望まれる。数十 ng の RNA から再現性よく 47000 遺伝子のアレイ解析を行えることが実証された。phi29 DNA polymerase を用いたゲノム DNA 増幅法により proportionality を維持したままゲノム増幅が可能であり、CGH マイクロアレイのような量的解析への応用も可能である。

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。本研究ではマイクロダイセクションにより均一の細胞集団より取り出した微量 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。

Laser Capture Microdissection (LCM) は、顕微鏡下でレーザーにより、薄切組織中の特定の細胞種を採取する技術である。多種多様な細胞が含まれる組織から、特定の細胞を採取することは、臨床材料においてがんの生物学的性状を明らかにする上で極めて有用である。しかしながら LCM による過程で RNA は分解を受けやすく、マイクロアレイ解析に足る品質を保持することは難しい。また、LCM で採取した細胞より得られる total RNA は数十 ng 程度であることが多く、マイクロアレイ解析を行うためには増幅する必要がある。そこで我々は、LCM を用いて臨床組織材料より高品質な RNA を採取すること、そして微量材料を増幅し、アレイ解析に至るまでの一連の実験系の樹立及び検証を進めた。

近年 RNA を対象とした網羅的発現解析に加え、ゲノム DNA も SNP タイピング解析、癌に

おける CGH マイクロアレイなど網羅的解析の解析対象となりつつある。SNP タイピング解析においては、同一検体より何度もタイピングを行うため、検体量の不足が問題になる。また CGH マイクロアレイでは微量の biopsy もしくは microdissection からの解析を視野に入れた場合、ハイブリダイセーションに必要な量が回収できない可能性が高い。これらのことを視野に入れて、微量のゲノムより配列を変えることなく (fidelity)、ゲノムのどの部分も満遍なく増幅する手法が必要となる (proportionality)。SNP タイピングにおいては特に fidelity が、CGH マイクロアレイ解析においては特に proportionality が必要となる。MDA (Multiple Displacement Amplification) 法を用いてゲノムの複雑な配列を proportional に増幅できることが期待されるが、その効果は不明であるため、我々は CGH マイクロアレイを用いて phi29 polymerase による増幅の効果を検証した。

B. 研究方法

1 発現プロファイル解析

転写酵素に関する検討 RNA の増幅過程において複数の IVT (in vitro transcription) 酵素を変えて条件検討を行い最適化したことを

以前に報告した。今回新たに、逆転写酵素として従来用いていた Invitrogen 社製 Superscript II と、新たに市販された SuperScript III との性能を比較した。

臨床試料の LCM 解析 実際に肺腺癌組織検体および膵臓癌組織検体について LCM から RNA の増幅を行い oligonucleotide microarray による発現解析を行った。解析には約 50000 種類の transcript が解析可能な Genechip HG-U133 plus 2.0 (Affymetrix 社) を用いた。微量検体からの測定であり再現性の検討を行うために、同一検体から複数回の LCM を別個に行い RNA を増幅し、マイクロアレイ解析した。

2 ゲノム解析

ゲノム DNA 1ng を用い 30°C overnight の isothermal reaction により何度かの増幅反応を行い、いずれにおいても約 1500ng の増幅産物を得た。増幅産物の電気泳動では増幅前と同様の長さの約 20kb のバンドを中心に数 kb までスメアを引いていた。増幅の proportionality を検定するため、増幅前のゲノム DNA をコントロールとして増幅後の DNA を、約 300 の BAC (大腸菌人工染色体 bacterial artificial chromosome) をスポットした CGH マイクロアレイ (Vysis genosensor 300) を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では DNA 多型の解析は含まれていない。臨床検体については腫瘍切除術の際に自治医科大学、東北大学外科学教室においてインフォームドコンセントの下に採取された。

C. 研究結果

1 発現プロファイル解析

プロトコールに関する検討 LCM に用いる組織切片調整方法であるが、我々の解析によって通常の水溶性染色液を用いた染色では RNA の品質の著しい低下が観察された。これは染色段階における RNAase の活性によるものと推定し、アルコール性染色液のギムザ染色液

を用いることで再現性の高い RNA の採取を可能にしたことを以前報告した(図 1 上段)。ギムザ染色液は単染色で核・細胞質のコントラストが確保でき、分染の必要がないという点で手順の短縮化を可能できる。

SuperScript III においては Superscript II に比較して IVT 後の cRNA の品質(泳動によるピーク)を変えることなく約 1.5 倍の収量が得られることがわかった。SuperScript III は Superscript II を改変して熱安定性が上がったものであり、反応温度が従来 37 度から 50 度になったため、複雑な 2 次構造の鋳型 DNA からでも逆転写合成できることが期待される。およそ 10ng の total RNA から 50ug を超える cRNA を得ることが可能である。

臨床試料の LCM 解析 肺腺癌、膵臓癌検体のいずれも相関係数が約 0.95 という比較的高い再現性が見られ、発現解析のための十分可能な系であることが示された(図 1 下段)。ただ増幅していないサンプルと比較して、polyA からの距離が長い位置に probe が設計されている遺伝子については、LCM を行った検体では、シグナルが低い傾向が見られた。

2 ゲノム解析

phi29 polymerase による増幅効率は、PCR 反応による増幅から予想されるより少なかったが、ゲノムの異なる場所によってある程度のばらつきは認められた(図 2 上段 signal intensity 比 1 ± 0.22 (median \pm SD) in 常染色体)。BAC プローブのテロメアからの位置、BAC 周辺のゲノムの配列を検討した結果、テロメア周辺、および GC rich な配列では増幅効率が低いことがわかった。テロメア周辺、GC rich な配列における複雑な 2 次構造による影響が考えられたため、反応溶液に終濃度 5%、10% の DMSO を加えて反応を行った。いずれの反応も DMSO 非添加時と変わらない増幅効率であり、泳動パターンも同様であった。CGH マイクロアレイによる解析では DMSO の添加によって GC rich な配列の増幅率の改善がみられたが、テロメア周辺の増幅効率の低下は変化しなかった。テロメアではゲノムの