

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(図 2 下段、signal intensity 比 1 ± 0.11 (median \pm SD) in 常染色体, 0.78 ± 0.11 in X 染色体)。

D. 考察

1 発現プロファイル解析

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 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。

2 ゲノム解析

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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

2. 学会発表

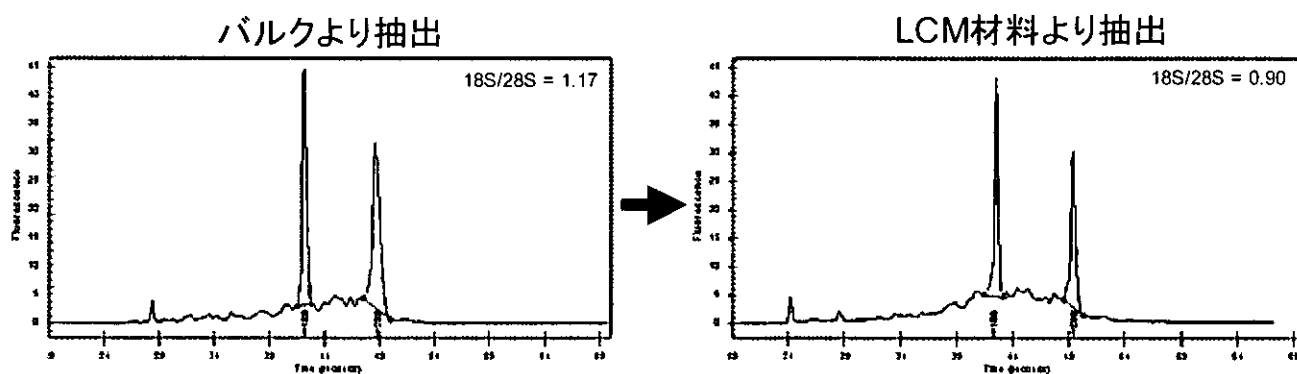
1. Cold Spring Harbor Meeting 2004 3/4-3/7
Systems Biology: Genomic Approaches to Transcriptional Regulation, Effect of gene dosage on transcriptome analysis of cancer 油谷、石川、堤

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

図1 (上段) バルク抽出と LCM 抽出による RNA quality の変化(Agilent bioanalyser による)。LCM による品質の変化はほとんど認められない。(下段) 同一肺腺癌組織における別個に2回行った LCM 検体を用いた oligonucleotide microarray のシグナルの比較。軸は対数で表示している。ここで示す例では相関係数 0.95 であった。

RNA の品質の検証



臨床肺腺癌組織の LCM による解析の再現性

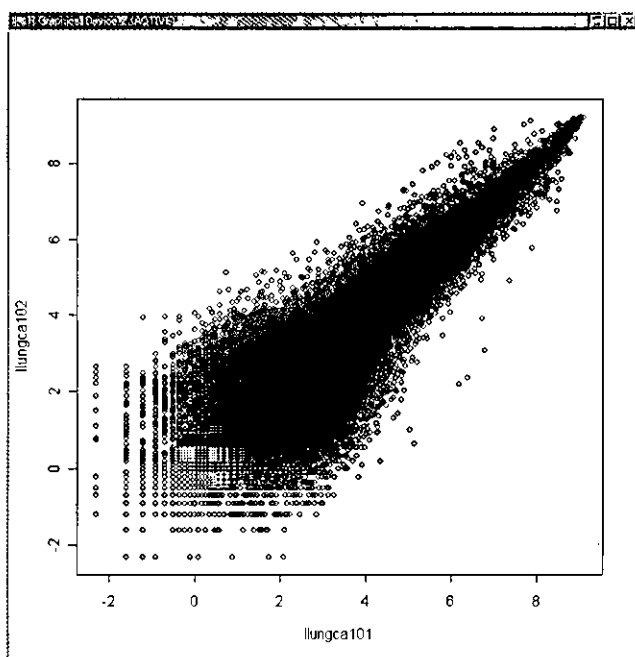
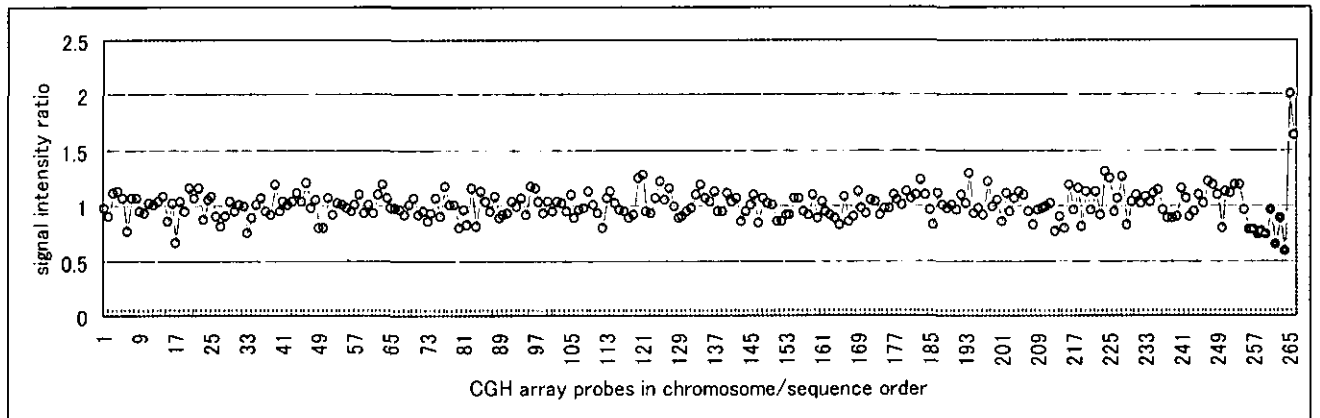
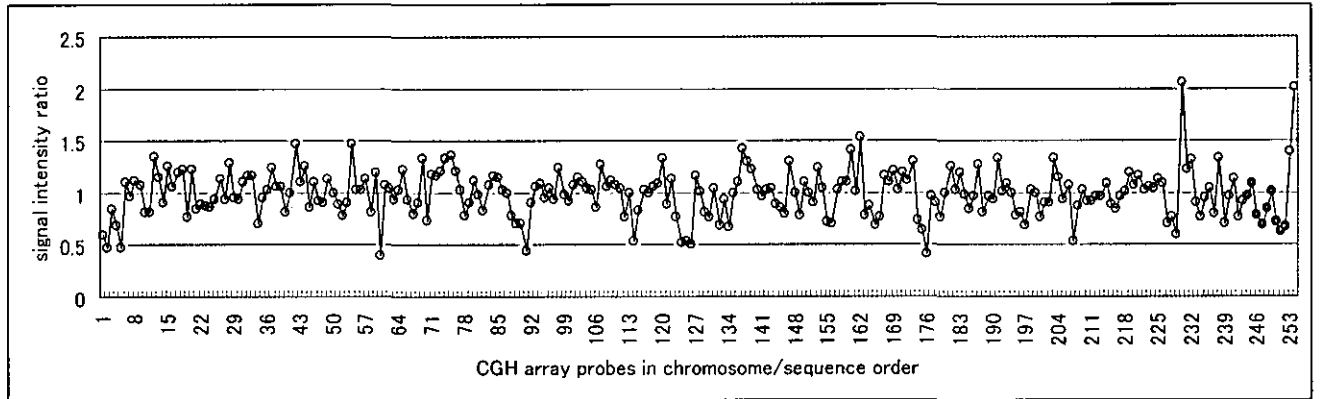


図2 CGH マイクロアレイ解析

(上段) 正常男性ゲノム DNA の phi29 polymerase による増幅産物の CGH マイクロアレイ解析 コントロールとして正常女性ゲノム DNA を用いている。Probe は染色体と配列の順に並べられており、赤は X 染色体, 黄は Y 染色体を表す。

(下段) 同じ検体を、phi29 polymerase により同様に増幅した正常女性ゲノム DNA をコントロールとしたもの。



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）
分担研究報告書

知的統合による遺伝子、蛋白質相互作用探索の研究

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

研究要旨

遺伝子発現プロファイル解析のために、絶えず更新されるゲノムおよび遺伝子の配列情報、遺伝子機能のアノテーション情報、さらには文献情報などの知識を統合化する情報処理基盤の構築を進めている。マイクロアレイ解析からの遺伝子探索を簡便にする目的で、トランスクリプトームデータベースのコンテンツを充実させ、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を収集し、データベースとして公開した。さらに共同研究者間でデータ共有するための、ユーザーアクセス管理が可能なデータベース環境を構築した。

A. 研究目的

遺伝子発現プロファイル情報あるいは、トランスクリプトーム情報は、動的な情報であるだけでなく絶えず更新されるゲノムおよび遺伝子の配列情報、さらには文献情報などの知識を統合化することによってはじめて意味付けが可能になる。そこでゲノムおよび遺伝子配列情報、遺伝子機能のアノテーション情報、さらには文献情報などの知識を統合化する情報処理基盤の構築を試みてきた。昨年は、近年、急速に研究が活発化し様々な可能性が広がってきた SVM (Support Vector Machines) に焦点をあて、遺伝子探索のためのより進んだ情報解析技術を開発してきた。ここでは、従来の実験データの整備と統合を進め、ヒトの正常臓器、ヒト正常培養細胞にしぼり疾患データを解析するための参照データとして、トランスクリプトームデータベースのコンテンツを充実させる。これらのデータをユーザーが利用しやすい形でデータベースとしてデータを公開し、広く疾患の解析に用いる基盤を提供することを目的とする。

B. 研究方法

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は Windows 環境では Internet Explore 6.0 あるいは Mac OS9 or X については Internet Explorer 5.1 以上である。

(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

遺伝子発現データベース基盤として、公開用DB及び共同研究データ共有用DBの2種類の環境を構築した。(図1)

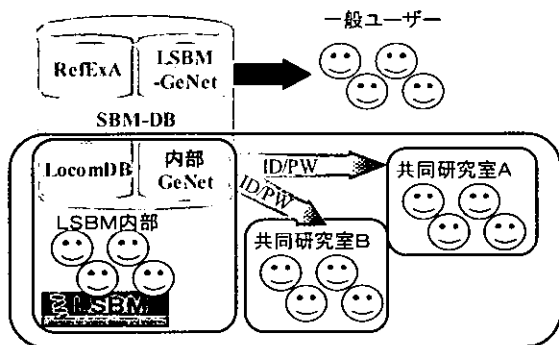


図1 SBM-DB 概念図

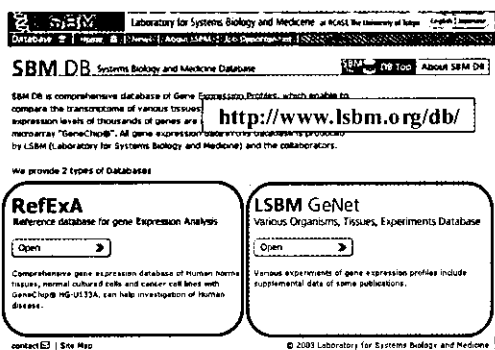


図2 公開DBへのアクセス方法

公開DBへのウェブからのアクセスは、URL> <http://www.lsbm.org/> から、図2のRefExA(Reference database for gene expression Analysis)サイトからアクセスする。正常臓器40サンプル、正常培養細胞17サンプルおよび癌細胞株23サンプル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のアクセスおよびプローブ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。検索結果の例を図3に示

す。

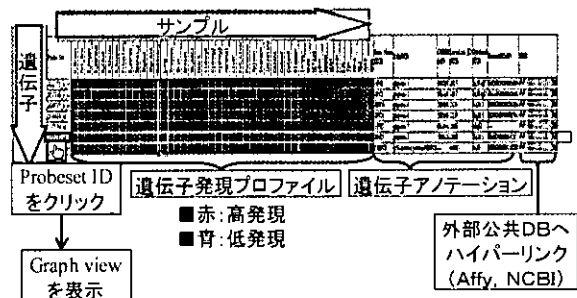


図3 パネルビューの概観

図3での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。赤が高発現値をもつサンプル、青が低発現。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。(図4)

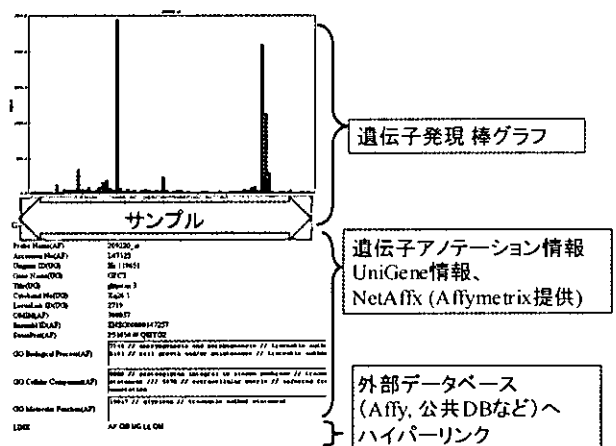


図4 グラフビューの概観

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のユーザーのみがデータを共有できる環境を構築した。

(図5)

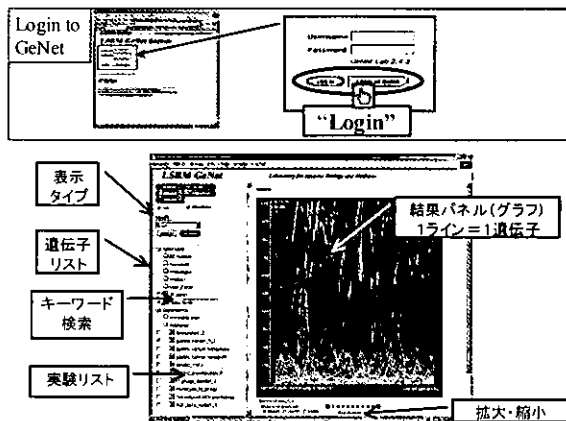


図5 データ共有システム (GeNet)

D. 考察

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、検索数でみると約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。

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、それぞれ別個に稼働しているが、こられ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。

F. 健康危険情報

情報処理技術につき特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yuichi Matsui, Akio Saiura, Yasuhiko Sugawara, Masataka Sata, Katsutoshi Naruse, Hideo Yagita, Takahide Kohro, Chikage Mataka, Akashi, Izumi, Takuhiro Yamaguchi, Takashi Minami, Toshiko Sakihama, Sigeo Ihara, Hiroyuki Aburatani, Takao Hamakubo, Tatsuhiko

- Kodama, Masatoshi Makuuchi
 "Identification of gene expression profile in tolerizing murine cardiac allograft by co-stimulatory blockade" **Physiological Genomics**, 15:199-208 (2003).
- (2) 堤修一、井原茂男、油谷浩幸 "アレイ技術とがん研究" **血液、腫瘍科**, 48: 182-189 (2004).
- (3) D. Komura, H. Nakamura, S. Tsutsumi, H. Aburatani and S. Ihara, "Multidimensional Support Vector Machines for visualization of gene expression data" **ACM Symposium on Applied Computing**, Nicosia, Cyprus, in press (2004).
- (4) D. Komura, H. Nakamura, S. Tsutsumi, H. Aburatani and S. Ihara, "Features of Gene Extraction by Nonlinear Support Vector Machines in Gene Expression Analysis", **International Conference on Genome Informatics**, 14, 322-323 (2004).
2. 学会発表
- (1) **Sigeo Ihara**, Naoko S. Nishikawa, Yoshihiro Ohta, Koji Abe, Shingo Tsuji, Shuichi Tsutsumi, Shogo Yamamoto, and Hiroyuki Aburatani, "Response Analysis in Pharmacogenomics by Literature Mining" Joint Cold Spring Harbor Laboratory/Wellcome Trust Conference, Pharmacogenomics, 1st meeting on pharmacogenomics and related applications of genomics. (Sept 24-28, Cambridge, UK)
- (2) Shuichi Tsutsumi, **Sigeo Ihara**, and Hiroyuki Aburatani "Two Distinct Gene Expression Signatures in Predicted Acute Lymphoblastic Leukemia with MLL Rearrangements" Cold Spring Harbor Laboratory Meetings, Systems Biology: Genomic Approaches to Transcriptional Regulation, (March 4-7, New York US) 2004.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 文献検索のインターフェイスに関し、特許出願の予定。
2. 実用新案登録
 なし
3. その他
 なし

特発性心筋症の解析に関する研究

分担研究者 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

研究要旨 本研究は特発性心筋症に対して行われた心臓縮小形成術（バチスタ手術）により得られた不全心筋を用いて遺伝子発現を網羅的に解析し、特発性心筋症あるいは心不全発症の分子機序を明らかにすることを目的とした。不全心で発現の低下していた主な遺伝子のうちいくつかについてはマウスモデルを作成し検討したところ、それらの遺伝子の心不全病態生理に対する関与が示唆された。本研究に用いられた網羅的な遺伝子発現の解析は信頼性があり、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。

A. 研究目的

特発性心筋症の原因は未だ不明である。本研究では、心臓縮小手術（バチスタ手術）にて得られた不全心筋を用いて網羅的な遺伝子発現解析、病理解析を行う。その結果得られた情報をもとにマウスモデルを作成し、特発性心筋症の原因遺伝子の同定を目指すとともに心不全病態生理の解明を行う。

B. 研究方法

心臓縮小手術（バチスタ手術）にて得られた不全心筋からRNAサンプルを調整し、DNA chip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。

（倫理面への配慮）

術前に、切除された心筋を研究目的に使用させていただくことが可能かどうかを患者本人に説明し承諾を得た。マウスは動物愛護の精神にのっとり、各施設の動物実験取り扱い規約に厳密に従って実験に用いた。

C. 研究結果

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EGFR、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。

D. 考察

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うると考えられた。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Akazawa, H., Komuro, I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 92:1079-1088, 2003.
- (2) Hasegawa, H., Yamamoto, R., Takano, H., Mizukami, M., Asakawa, M., Nagai, T., Komuro, I. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors prevent the development of cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *J Mol Cell Cardiol* 35:953-960, 2003.
- (3) Zou, Y., Zhu, W., Sakamoto, M., Qin, Y., Akazawa, H., Toko, H., Mizukami, M., Takeda, N., Minamino, T., Takano, H., Nagai, T., Nakai, A., Komuro, I. Heat shock transcription factor 1 protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 108: 3024-3030, 2003.
- (4) Ohtsuka, M., Takano, H., Suzuki, M., Zou, Y., Akazawa, H., Tamagawa, M., Wakimoto, K., Nakaya, H., Komuro, I. Role of Na⁺-Ca²⁺ exchanger in myocardial ischemia/reperfusion injury: evaluation using a heterozygous Na⁺-Ca²⁺ exchanger knockout mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 849-853, 2004.

2. 学会発表

- (1) 小室一成：「Cardiovascular continuumにおけるアンジオテンシンIIの役割」第67回日本循環器学会総会・学術集会、福岡、平成15年3月28日～30日。
- (2) Komuro I. The Fourth Oulu Symposium Advances in Molecular and Cellular Biology of Vasoactive Factors, Angiotensin II and cardiac hypertrophy, June 4-9, 2003, Finland.
- (3) Komuro I. XXV Annual Meeting of the International Society for Heart Research (ISHR), Oxidative stress and development of cardiac hypertrophy, June 28-July 30, 2003, USA.
- (4) Komuro I. Mini-Symposium The Biology of Cardiac Injury and Regeneration, A novel mechanisms of AT1 activation and regeneration of the heart, Nov 13-16, 2003, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

福山型筋ジストロフィーと裂手症の解析

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

研究要旨 ヒト筋特異的 DNA チップや Affymetrix マウス DNA チップを用いて福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）や裂手症の病態を解析した。その結果、FCMD では、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。また裂手症では、Fgf8 など手指の発生に関わる遺伝子の発現量が低下していた。

A 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー（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。

B 研究方法、研究結果

今回我々は 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。

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。

次に裂手症では、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。その結果、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。

(倫理面への配慮) 患者筋組織収集は、遺伝子解析に関する十分なインフォームドコンセントを文書でとった上で行った。「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1号)」を遵守した。研究対象者に対するプライバシーの保護など、人権擁護上の問題についても十分に配慮した。また、本研究は大阪大学倫理委員会による承認を得ている。

C 考察

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。

D 結論

FCMDでは、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受けず、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。

E 健康危険情報

なし

F 研究発表

Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Manya H, Jin DK,

Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, van Coster R, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, Nishino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T. Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 12:527-534, 2003

Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T, Emanuel BS. The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT-rich repeats. *Am J Hum Genet* 72:733-738, 2003

Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, Simsek E, Tunc M, Alper M, Cam M, Guven A, Fukuda Y, Kinoshita M, Kocabay K, Toda T. A new mutation of the *fukutin* gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 53:392-396, 2003

Li M, Ishikawa K, Toru S, Tomomotsu H, Takashima M, Goto J, Takiyama Y, Sasaki H, Imoto I, Inazawa J, Toda T, Kanazawa I, Mizusawa H. Physical map and haplotype analysis of 16q-linked autosomal dominant ataxia (ADCA) type III in Japan. *J Hum Genet* 48:111-118, 2003

Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Tachikawa M, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12:595-600, 2003

Nagai Y, Fujikake N, Ohno K, Higashiyama H, Popiel HA, Rahadian J, Yamaguchi M, Strittmatter WJ, Burke JR, Toda T. Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBPI in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 12:1253-1259, 2003

Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Tachikawa M, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Murakami T, Sunada Y, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T. Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 12:1449-1459,

2003

Manya H, Sakai K, Kobayashi K, Taniguchi K, Kawakita M, Toda T, Endo E. Loss-of-function of an N-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* **306**:93-97, 2003

Zhang W, Vajsar J, Cao P, Breningstall G, Diesen C, Dobyms W, Herrmann R, Lehesjoki A-E, Steinbrecher A, Talim B, Toda T, Topaloglu H, Voit T, Schachter H. Enzymatic diagnostic test for muscle-eye-brain type congenital muscular dystrophy using commercially available reagents. *Clin Biochem* **36**:339-344, 2003

Toda T, Kobayashi K, Takeda S, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Tachikawa M, Wang F, Nagai Y, Taniguchi K, Taniguchi M, Sunada Y, Terashima T, Endo T, Matsumura K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) and α -dystroglycanopathy. *Congenit Anom* **43**:97-104, 2003

Toda T, Momose Y, Murata M, Tamiya G, Yamamoto M, Hattori N, Inoko H. Toward identification of susceptibility genes for sporadic Parkinson's disease. *J Neurol* **250**:40-43, 2003

Endo T, Toda T. Glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Biol Pharm Bull* **26**:1641-1647, 2003

Toda T, Kobayashi K, Takeda S, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Tachikawa M, Wang F, Nagai Y, Taniguchi K, Taniguchi M, Sunada Y, Terashima T, Endo T, Matsumura K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. *Basic Appl Myol* (in press)

Longman C, Mercuri E, Cowan F, Allsop J, Brockington M, Jimenez-Mallebrera C, Rutherford M, Toda T, Muntoni F. Antenatal and postnatal brain magnetic resonance imaging in muscle-eye-brain disease. *Arch Neurol* (in press)

Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-

Harlin M-C, Gasser T, Krüger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J-i, Toda T, Wang J, Ioannidis JPA, Rocca WA, and the UCHL1 Global Genetics Consortium. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* (in press)

G 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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

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

要旨

本研究は、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ことを目的としている。昨年度は、各種疾患 11 症例の病変部より mRNA を採取し、結局類天疱瘡 1 例、Paget 病 2 例の GeneChip 解析に成功した。その結果、類天疱瘡では 4 つの酵素群、Paget 病では elafin をはじめ計 7 つの分子の発現亢進が認められた。今年度は各種皮膚疾患 11 症例の病変部より mRNA を採取し、結局の 6 症例解析に成功した。併せると、類天疱瘡 1 例、Paget 病 2 例、神経線維腫症 3 例、汗腺癌 1 例、健常皮膚 2 例である。現在、データを詳細に解析中である。

A. 研究目的

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。

B. 方法

1) 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、GeneChip 解析に加え、スライド方式の Amersham 社の CodeLink アレイにて、遺伝子発現パターンを比較した。

2) 解析によって得られた遺伝子発現プロファイルの違い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) さらにその発現プロファイルを表皮細胞、免疫担当細胞、線維芽細胞の培養系を用いて、再確認を行い、キーとなる新規の機序や分子を明らかにする。

C. 結果

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 例の病変部より mRNA を採取し GeneChip 解析を行った。その結果、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 解析に成功し、データを詳細に解析中である。

D. 考察

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。

E. 結論

今後もプロファイル解析を進め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も進めていきたい。

F. 健康被害

なし

G. 研究発表

Dainichi T, Tanaka M, Tsuruta N, Furue M, Noda K. Development of multiple paronychia and periungual granulation in patients medicated with gefitinib (an inhibitor of epidermal growth factor receptor). *Dermatol* in press

S Saigoh, A Tashiro, S Fujita, M Matsui, S Shibata, H Takeshita, M Furue. Successful treatment of intractable scleromyxoedema with cyclosporine A. *Dermatol* in press

Dainichi T, Koga T, Furue M, Ueda S, Isoda M. Paradoxical effect of trichloroacetic acid (TCA) on ultraviolet B-induced skin tumor formation. *J Dermatol Sci* 31:229-31 2003

Dainichi T, Ueda S, Isoda M, Koga T, Kinukawa N, Nose Y, Ishii K, Amano S, Horii I, Furue M. Chemical peeling with salicylic acid in polyethylene glycol vehicle suppresses skin tumor development in hairless mice. **Br J Dermatol** 148:906-12 2003

H Terao, T Koga, K Urabe, Y Moroi and Furue M. Plasma IL-13 levels in patients with atopic dermatitis. **J Dermatol** 30:76-77 2003

K Fujii, Y Kohno, K Sugita, M Nakamura, Y Moroi, K Urabe, M Furue, M Yamada, and T Miyashita. Mutations in the human homologue of Drosophila patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. **Hum Mutat** 21:451-452 2003

Koga T, Matusda T, Matsumoto T, Furue M. Therapeutic approaches to subcutaneous mycoses. **Am J Clin Dermatol** 4:537-543 2003

M Furue, H Terao, W Rikihisa, K Urabe, N Kinukawa, Y Nose and T Koga. Clinical dose and adverse effects of topical steroids in daily management of atopic dermatitis. **Br J Dermatol** 148:128-133 2003

T Nakahara, K Urabe, Y Moroi, K Morita, M Furue. Bepotastine besilate rapidly inhibits miteantigen induced immediate reactions in atopic dermatitis. **J Dermatol Sci** 32:237-238 2003

T Uenotsuchi, S Imafuku, M Nagata, H Kiryu, K Morita, T Koga, M Furue. Cutaneous and lingual papules as a sign of $\beta 2$ microglobulin-derived amyloidosis in a

long-term hemodialysis patient. **Eur J Dermatol** 13:393-395 2003

Uchi H, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Furue M. CX-659S, a diaminouracil derivative, indirectly inhibits the function of Langerhans cells by blocking the MEK1/2-Erk1/2 pathway in keratinocytes. **J Invest Dermatol** 120:983-989 2003

Yoshida Y, Urabe K, Mashino T, Duan H, Kiryu H, Masuda T, Koga T, Furue M. Basal cell carcinomas in association with basaloid follicular hamartoma. **Dermatol** 207:57-60 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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

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

研究要旨

初代血管内皮細胞を用いて トロンビン、TNF- α IL-1 処理による遺伝子変動をマイクロアレイにより各々時系列を追って網羅的に解析したところ、早期においては、各炎症性因子に固有の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、主に NF- κ B 経路の活性化に起因すると考えられ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、炎症性疾患に深く関与する 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。

A.研究目的

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

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 tumor necrosis factor (TNF)- α (10ng/ml) インターロイキン (IL)-1 (10ng/ml) を添加し、経時的に total RNA を回収した。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)

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

産省告知第一号) に従った。また細胞は公表、市販されているものであり、特定の個人に由来するものではなく、利害関係には相当しない。

C.研究結果

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

一ゼ経路や 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

トロンビン 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

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

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Minami T, Murakami T, Horiuchi K, Miura M, Noguchi T, Miyazaki JI, Hamakubo T, Aird WC, and Kodama T.

(2004) *J. Biol. Chem.* (in press)

2. Abid MR, Guo S, Minami T, Spokes KC, Ueki K, Skurk C, Walsh K, and Aird WC. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**:294-300
3. Minami T, Sugiyama A, Wu SQ, Abid R, Kodama T, and Aird WC. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**:41-53
4. Minami T, Kuivenhoven JA, Evans V, Kodama T, Rosenberg RD, Aird WC. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**:2041-7

2. 学会発表

1. Minami, T., Kodama, T., Rosenberg, R.D., and Aird, W.C. 4th Annual Conference on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Washington DC, May 8-10, 2003
2. Minami T, Murakami T, Noguchi T, Miyazaki JI, Hamakubo T, Aird WC, and Kodama T. XIIIth International Symposium on Atherosclerosis. Kyoto, Sep. 28-Oct. 2, 2003
3. 南 敬、児玉龍彦 第 26 回 日本分子生物学学会（口頭発表）神戸 12 月 10-13 日

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

IV 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小室一成	分子生物学、発生工学から考えた病態生理		心不全の New Concept	中外医学社	東京	2003	1-150

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Ge X, Tsustumi S, Aburatani H, Iwata S.	Reducing false positives in molecular pattern recognition.	Genome Informatics	14	34-43	2003
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 <i>MLL</i> rearrangements.	Cancer Research	63(16)	4882-7	2003
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
Yuichi Matsui, Akio Saiura, Yasuhiko Sugawara, Masataka Sata, Katsutoshi Naruse, Hideo Yagita, Takahide Kohro, Chikage Mataka, Akashi, Izumi, Takuhiro Yamaguchi, Takashi Minami, Toshiko Sakihama, Sigeo Ihara, Hiroyuki Aburatani, Takao Hamakubo, Tatsuhiko Kodama, Masatoshi Makuuchi	Identification of gene expression profile in tolerizing murine cardiac allograft by co-stimulatory blockade	Physiological Genomics	15	199-208	2003
堤修一、井原茂男、油谷浩幸	アレイ技術とがん研究	血液、腫瘍科	48	182-189	2004
D. Komura, H. Nakamura, S. Tsutsumi, H. Aburatani and S. Ihara,	Multidimensional Support Vector Machines for visualization of gene expression data	ACM Symposium on Applied Computing, Nicosia, Cyprus			in press
D. Komura, H. Nakamura, S. Tsutsumi, H. Aburatani and S. Ihara,	Features of Gene Extraction by Nonlinear Support Vector Machines in Gene Expression Analysis	International Conference on Genome Informatics	14	322-323	2004