

200400839B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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14～16年度 総合研究報告書

主任研究者 油谷 浩 幸

平成17(2005)年3月

目 次

I 総合研究報告書

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
--	---

東京大学国際・産学共同研究センター 教授 油谷浩幸

II 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・	21
---------------------------	----

III 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・	27
-------------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総合研究報告書

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

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。ヒト正常臓器 40、初代培養細胞 17 および癌細胞株 23 種類の発現プロファイルデータを収集し、SBM-DB データベースとして公開した (www.lsbm.org)。限られた微量の臨床検体から再現性よい発現プロファイル解析法の検討、さらにはヒトゲノム中に存在する染色体コピー数変異の解析法の開発も行った。特発性心筋症、福山型筋ジストロフィー、天疱瘡や類天疱瘡などの難治性水疱性疾患などの難治性疾患は原因遺伝子は同定されてはいるが、治療法の開発にはさらなる病態解明が必要である。原因不明の病態である慢性疲労症候群については末梢血球由来 RNA の発現プロファイルから診断、病型分類を試みた。発現変動の生じているパスウェイを同定するために文献からの相互作用検索は有効であった。難治性疾患の診断や病因に関連する候補分子が同定され、免疫組織染色あるいはモデル動物を用いての検証を進めた。他の難治性疾患の原因および病態解明に発現プロファイルデータベースは大いに貢献できるものと期待され、今後も拡充を続けていく予定である。

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

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当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

マイクロアレイによるヒト全遺伝子の発現プロファイルを測定し、データベース化した。さらに異なるアレイプラットフォームによるデータベースの拡充と、知的統合による遺伝子、蛋白質相互作用探索の研究を進めた。

2. 微量組織からのゲノム解析技術の確立

微量組織からの高感度トランスクリプトーム解析技術、ゲノムタイピングマイクロアレイを用いたコピー数多型 CNP (copy number polymorphism) を解析する方法の開発を進めた。

3. 希少性疾患解析への応用

下記の難治性疾患について発現プロファイル解析から病因解明、疾患分類についての検討を行った。特発性心筋症、福山型先天性筋ジストロフィ (FCMD)、天疱瘡や類天疱瘡などの難治性水疱性疾患は希少性疾患であり、原因となる遺伝子が同定されている疾患もあるが、その病態の解明には至っていないものも多い。また、原発性高脂血症から動脈硬化症発症に至る機序についても網羅的な解析からのアプローチを行った。慢性疲労症候群 (chronic fatigue syndrome, CFS) は病因が不明であり、発現プロファイルによる診断、病因解明を試みた。

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

1-1 データベースの拡充

GeneChip (Affymetrix 社製) U133 アレイ

のデータに加えて U133Plus2 アレイ、CodeLink アレイなどのデータを取得し、多種のアレイなどにも対応可能なデータベース構築を行なった。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 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。

1-2 データ交換プラットフォームの作成

既に運用している SBM-DB において、共同研究者間でのデータの閲覧、他の実験データの参照を行いうるサーバーシステムを立ち上げた。パスワードによるアクセス管理により、未公開データについても特定疾患共同研究者と東京大学先端研間でのデータ共有を可能とした。外部の臨床研究者もサーバ上で解析、探索を行える。データ解析については、クラスタ解析、主成分分析、SVM (Support Vector machine) 法などの解析結果を提供すると共に、遺伝子に関する最新のアノテーション情報を更新する。

1-3 知的統合による遺伝子、蛋白質相互作用探索の研究

ヒト正常臓器あるいは細胞株について GeneChip (Affymetrix 社製) U133 アレイを用いたトランスクリプトーム解析実験データに対し、情報解析するためのデータベースを中心とする情報処理基盤を構築し、情報処理解析ツールを作成しつつ、技術開発を行い、検証を行う。特に、文献情報から、単に名前が同時に現れる共起性ではなく、自然言語処理を用い蛋白質名と相互作用関係を表す動詞を含んだ二項関係を抽出し、探索すべき遺伝子あるいは蛋白質の相互作用パートナーを再帰的に探索するアプローチを採用した。

2. 微量組織からのゲノム解析技術の確立

2-1 微量組織からのトランスクリプトーム解析技術の確立

転写酵素に関する検討 RNA の増幅過程に

において複数の IVT(in vitro transcription)酵素、逆転写酵素について検討した。後者について従来用いていた 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。数百塩基の鎖長を有するような cRNA の合成を行う条件設定を行った。

臨床試料の LCM 解析 生検材料などから得られる微量な RNA 検体より cRNA を増幅しマイクロアレイ解析を行う技術を確立した。具体的には、凍結保存された肺腺癌組織検体および膵臓癌組織検体について LCM (Laser Capture Microdissection)により組織 RNA を抽出、RNA の増幅を行いオリゴマイクロアレイによる発現解析を行った。解析には約 5 万種類の transcript が解析可能な Genechip HG-U133A&B あるいは plus2.0 (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 染色体コピー数の多様性解析

高密度合成オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて、CNP を精確に検出する技術開発を行った。これらの実験においては全ゲノムの一部を PCR で増幅したものを分析する工程 (Representational analysis) が含まれ、こうした過程における実験条件の差によって無視できないノイズデータを含んでしまうという欠点があった。我々はこれらの実験条件に対する補正を行うことで、染色体のゲノム DNA 量を測定する正確に測定する方法を開発し、GIM (ゲノムインバランスマップ) と名づけた。

3. 希少性疾患解析への応用

3-1 慢性疲労症候群の病因解析

2002 年から 2003 年に採取された CFS I 群 7 症例 (男性 3 例、女性 4 例)、CFS III 群 10 症例 (男性 7 例、女性 3 例)、健常者 9 例 (男性 3 例、女性 6 例) の末梢血単核球 (PBMCs)より RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。RNA の質

は 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)を用いて確認した。検体は大阪大学内科の倉恒らにより収集された。mRNA 発現解析には、CodeLink Human UniSet 1 20K Bioarray (Amersham Biosciences Corp.) に収載されている約 20000 種類のオリゴ DNA を Duplicate でスポットしたカスタムアレイを用いた。Gene Ontology 解析には Onto-express (<http://vortex.cs.wayne.edu/index.htm>)、階層的クラスター解析には GeneSpring 7.2 (Silicon Genetics) を用いた。さらに転写因子解析には TRANSFAC[®] (BIOBASE GmbH) を用いた。

3-2 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 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。

3-3 福山型筋ジストロフィーと長期記憶に関連したラット海馬遺伝子の解析

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法を用いて、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。また α -DGpathy の一疾患である LARGE 変異モデルマウス (*myd* マウス) を用い、 α -DGpathy における発現解析及び病態解析を行った。

長期記憶に関する解析では、長期記憶との関連が示唆されている LTP をラット海馬 CA 1 に誘発し経時的遺伝子発現の変化 (10 分、30 分、60 分後) を GeneChip (Affymetrix 社) にて網羅的に解析した。統計学的手法

を用いて発現変化の著しい遺伝子群の空間的、機能的解析及びパスウェイ分析を行った。

3-4 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と比較した。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。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、表皮細胞、免疫担当細胞、線維芽細胞の培養系を用いて検証を行い、新規の機序や分子を明らかにする。

3-5 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

内皮細胞、平滑筋細胞、単球からなる3次元混合培養系において生体内に近い条件を作り出し、泡沫細胞形成に関与する遺伝子群を探索し、細胞接着などの面からも遺伝子転写調節を主体とした病態解析を進めた。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。Subconfluent HUVEC にトロンピン (1.5U/ml) あるいは tumor necrosis factor (TNF)- α (10ng/ml) vascular endothelial cell growth factor (VEGF) (50ng/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。Down syndrome critical region (DSCR)-1 遺伝子の強制発現系は、自己増幅能欠損型のアデノウイルスを用いて行った。またマウスへの DSCR-1 発現も東京大学動物実験指針にのっとり、行った。

(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。なお、本研究は主に遺伝子発現解析を行うものであるが、平成16年度に実施したゲノムコピー数解析は配列レベルの解析ではないもののゲノムの多様性の解析を含んでいる。

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

1-1 データベースの拡充

申請者らが構築したシステム生物医学データベース (SBM-DB)¹をさらに拡充させ、3万個に及ぶ遺伝子発現情報について絶えず更新される配列情報、遺伝子機能アノテーションとの統合、さらに既存の文献情報による分子間ネットワーク情報の可視化を行うことにより、臨床の研究者にも検索しやすい生命情報データベースを構築した。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。公開 DB へのアクセスは 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、初代培養細胞 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を優先した。

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。

16年度にはGeneChip（Affymetrix社製）U133アレイのデータに加えてU133Plus2アレイ、CodeLinkアレイなどさらに多種のアレイなどにも対応可能なデータベース構築を行なった。U133アレイとU133Plus2アレイはプローブ配列は同一であるにも関わらず、シグナル値が相関しない例も認められた。

1-2 データ交換プラットフォームの作成

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。

1-3 知的統合による遺伝子、蛋白質相互作用探索の研究

文献データベースで最も大きく広く使われているMedlineには膨大なデータが蓄積されているのでそこに含まれている抄録600万件を利用できるようなシステムをまず構築した。一方で、入手可能なデータベースから疾患解析に必要な用語を抽出した。次に、文献から必要な情報を信頼度高く抽出し、分かりやすい形で表示する自然言語処理技術を応用した文献検索システムの構築をPCクラスター上で行った。脊椎動物に対して蛋白質・遺伝子名辞書の用語の数を二十万件にまで拡大した。相互作用を表す動詞を整備することにより、2対の蛋白質・遺伝子名の相互作用を文献から抽出することにより、疾患遺伝子探索を試みられるようにした。

2. 微量組織からのゲノム解析技術の確立

2-1 微量組織からのトランスクリプトーム解析技術の確立

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、膀胱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。

2-2 染色体コピー数多様性解析

マイクロアレイにおけるサンプルとコントロールのシグナル比を測定することにより、染色体上の最大約 10 万箇所のポイントにおいて 1 コピーの変化が見られる解像度で見ることができるようになった。染色体上の約 1 万箇所を見ることの出来るオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて男

女のゲノムより得られるシグナルを比較したところ X 染色体の本数に応じた変化が検出され 1 コピーの差でも検出可能であった。また従来の CGH アレイとの比較では、X 染色体とそれ以外の常染色体でのシグナル強度比(median±SD)を求めると、GIM 法では $0.99 \pm 0.09 / 0.63 \pm 0.08$ であるのに対して、CGH アレイでの測定では $1.00 \pm 0.09 / 0.71 \pm 0.14$ になる。したがって従来の CGH アレイよりも明確に遺伝子コピー数を識別することができた。

さらにより高密度な染色体上の約 10 万箇所を見ることの出来るオリゴヌクレオチドマイクロアレイの解析でも同様に X 染色体の本数の差が明確に検出できると同時に、一方の検体を株化されたリンパ球にすることで免疫グロブリン遺伝子の再構成による局所的なコピー数の変化も検出することができた。またそれ以外の染色体でも 100Kb 以上の領域において複数のプローブにおけるシグナル比の有意な変化が捉えられるところが数箇所みられコピー数の多型と考えられた。そのうちの一つは血球における発生、分化に関わるとされる *prominin1*(CD133) という遺伝子を含む 100Kb 超の領域であった。これらの手法によって CNP という小さなコピー数変化でも、高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いたシグナル評価法によって十分解析可能であることが示された。

3. 希少性疾患解析への応用

3-1 慢性疲労症候群の病因解析

慢性疲労症候群と健常者の遺伝子発現プロファイルは有意に異なっており、CFS I 群と III 群および健常群を識別する遺伝子として細胞接着、免疫応答、炎症反応関連の遺伝子が有意に多かった。CFS 群と健常群を識別する遺伝子には転写因子として E2F1 の結合配列を有するものが多数認められた。

3-2 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、パ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。

不全心で発現の亢進していた遺伝子である酸化酵素 *12-lipoxygenase* に注目しマウスモデルなどを用いて解析を進めた。まず培養系の実験では、*12-lipoxygenase* の活性が低酸素によって誘導されること、その活性上昇が心筋細胞のアポトーシスを誘導することを確認することができた。*12-lipoxygenase* ノックアウトでは、心筋梗塞後のアポトーシス抑制、線維化、リモデリングの縮小がみられた。

3-3 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。さらに FCMD 及び *myd* の筋線維では筋分化過程後期に発現する転写因子である *myf6* や *myosin heavy chain2,7* の発現低下をきたし、また電顕画像において、筋細胞の核及び筋線維の成熟障害を呈した。また神経筋接合部では免疫染色および電顕的観察において、著しい異常像を認め、正常ではおこる α DG の凝集も見られなかった。

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。

LTP 誘発後 10 分後より 30 分後にかけて著しい遺伝子発現の変化が見られ、それらには糖鎖修飾酵素、細胞骨格、Rab family、ECM 成分、に関連する遺伝子が特異的に関与していることが見出された。またパスウェイ分析では *c-myc* が遺伝子発現の変化のあった転写カスケードに関与している可能性が示唆された。

3-4 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 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。さらに天疱瘡 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。

興味深い遺伝子変動として 1) 乾癬における *Stat3* の発現上昇、2) ヒト乳頭腫ウイルス発癌における *P16* ならびに *hTERT* 蛋白の発現上昇、の 2 点を明らかにした。我々は high risk HPV の感染によって癌化した表皮細胞は、*p16* および *Human telomerase reverse transcriptase (hTERT)* を高発現していることを見出した。

3-5 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

血管新生関連刺激に伴う遺伝子変動の網羅的探索、時間的制御の比較解析から、これら活性化シグナルは転写カスケードを介して経時的に接着因子、増殖因子の発現誘導へと推移していくことが共通に認められた。そして特に刺激初期においては *thrombin* と *VEGF* のシグナルの共通項が大きいこと、*VEGF* 及び *thrombin* の共通の反応として転写因子 *NF-AT* の活性化が挙げられ、その活性化のネガティブフィードバック因子である *DSCR-1* が強力に誘導されてくること、また *DSCR-1* が安定に存在した状態では血管新生、炎症を含む内皮の活性化状態を顕著に抑制することが認められた。

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

1-1 データベースの拡充

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える。

GeneChip (Affymetrix 社製) U133 アレイのデータに加えて U133Plus2 アレイ、

CodeLink アレイなどさらに多種のアレイなどにも対応可能なデータベース構築を行なった。データの互換性はプローブ配列が同一の U133 アレイと U133Plus2 アレイであっても完全には保証されなかった。個々のプローブの feature サイズが小さくなり、アレイ上での配置の変更なども影響したものと考えられた。

1-2 データ交換プラットフォームの作成

アクセスしたユーザーからは、データの質の高さおよび新規性、インターフェースの簡便さ等の点において高い評価が得られた。インターフェース上の問題としては、ユーザー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。ユーザー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であると感じられた。

1-3 知的統合による遺伝子、蛋白質相互作用探索の研究

ユーザビリティの向上を考慮して再帰計算のできる文献情報処理技術を開発・改良した。相互作用の抽出のための技術として相互作用を記述する文章の鋳型を用いた抽出方法と、統計的分析に基づく抽出法を組み合わせて使い、さらに文章の鋳型を用いた抽出方法において、DIPRE アルゴリズムを応用することにより自動化を図った。さらに相互作用を表す単語のオントロジーの導入により相互作用の分類を可能とした。なお、本技術開発が網羅性に主体をおいたことにもよるが、もともとの人間が記述する文章におけるシノニムが混乱しているため正答率は、85%以下にとどまった。また本研究では様々な相互作用を扱ったが、蛋白質同士の結合で重要な bind および interact に相互作用を限定すれば、相互作用

パートナーとして蛋白質同士が物理的に相互作用する状態を表すことができる。

今後は様々な解析を積極的に行い、プログラム、データにおけるシノニムエラー、機械学習に起因するエラーを取り除き、早期公開をめざすとともに、様々な技術を融合化することによって知識ベースのより進んだシステムの構築をめざす必要がある。

2. 発現プロファイル解析技術の確立

2-1 微量組織からのトランスクリプトーム解析技術の確立

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オプションであろう。

2-2 染色体コピー数多様性解析

発現プロファイル解析から染色体コピー数変異が遺伝子発現量に相関することを明らかにし、報告してきた(緑川, 2004)。コピー数の多様性がゲノム全体にどの程度存在しており、疾患と関連するかについては不明であるが、網羅的な解析手法がまさに求められており、本研究においてゲノタイピング用に開発された短鎖オリゴヌクレオチドアレイを用いて 1 アレルの違いを定量的に検出できるアルゴリズム GIM を開発できた。CNP の頻度について多くの人種についてそれぞれ解析を進めて、HapMap プロジェクトの SNP タイピングデータとの関連についても検証していく必要があると考えられた。また CNP の同定には複数のプローブが連続的に変動することが求められるので、さらに高密度なアレイによる解析が求められる。

3. 希少性疾患解析への応用

慢性疲労症候群 (chronic fatigue syndrome, CFS) は6ヶ月以上継続的・断続的に全身倦怠感を訴える原因不明の病態であり、発現プロファイル解析から変動しているパスウェイとして免疫応答の異常の関与が示唆された。

DNAチップ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。心不全増悪因子として同定された酸化酵素 12-lipoxygenase はこれまで血球系での役割は検討されていたが、心臓における役割は知られていなかった。本研究により心筋細胞における 12-lipoxygenase が心不全の病態生理に深く関わっていることが明らかとなった。

福山型先天性筋ジストロフィ (FCMD) は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。以前 FCMD の原因遺伝子として同定した *fukutin* は筋細胞膜上の α -dystroglycan (α DG) の糖鎖修飾に関する糖転移酵素と推定されている。その一連の糖転移酵素に変異が同定されている muscle-eye-brain 病、Walker-Warburg 症候群、LARGE においても、同様の症状をきたし、 α -dystroglycano pathy (α -DGpathy) と総称される。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。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。神経筋接合部由来の筋分化シグナルが基底膜障害により不完全となり、筋線維の成熟障害を起こすことが、 α -DGpathy の重要な病態生理である可能性が FCMD の発現解析を通じて示唆された。また、ラット海馬 CA1 領域では、長期記憶成立には 10 分後、30 分後での遺伝子発現の変化が著しいこと、またその変化にはある機能的遺伝子群の変化が関与していると考えられた。

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ものの、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。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。発現プロファイル解析から見出された変動遺伝子の解析を引き続き進める予定である。乾癬表皮の核内で Stat3 が高発現していることは表皮の過増殖を引き起こす病態形成に密接に関与していると考えられた。またヒト乳頭腫ウイルス (HPV) の中の high risk 型は上皮細胞に感染すると高い発癌性を有することが知られている。HPV 感染のマイ

クローレイ解析データは p16 および hTERT の高発現は HPV 癌化のよい指標となることを示している。

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。内皮細胞の血管新生関連刺激に伴う遺伝子変動の網羅的探索、時間的制御の比較解析から、これら活性化シグナルは転写カスケードを介して経時的に接着因子、増殖因子の発現誘導へと推移していくことは共通であるが、特に早期においては thrombin と VEGF のシグナルの共通項が大きいこと。そして共通の反応として NF-AT の活性化が挙げられ、その活性化のネガティブフィードバック因子である DSCR-1 が強力に誘導されてくること。そして DSCR-1 が安定に存在した状態では血管新生、炎症を含む内皮の活性化状態を顕著に抑制する、しかも細胞内因子であることから、これが将来毒性の少ない新規な抗血管病治療法として用いられることが期待される。

E..結論

GeneChip (Affymetrix 社製) U133 アレ

イのデータに加えて U133Plus2 アレイ、CodeLink アレイなどさらに多種のアレイなどにも対応可能なデータベース構築を行なった。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。

井原らは GeneChip (Affymetrix 社製) U133 アレイのデータを解析対象とした再帰計算ができる文献情報システムを作成した。従来の文献検索ではできないようなクエリー間での相互作用パートナーの探索などに有力な手法と思われる。

高密度タイピングアレイを用いて染色体コピー数をアレル別に定量するアルゴリズム GIM を開発し、X 染色体数の異常や免疫グロブリン遺伝子座の再構成を検出することが出来た。

油谷らは慢性疲労症候群の病因解析において、末梢血球から抽出した RNA の発現プロファイルにより患者群と健常群を識別することに成功した。

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。心不全増悪因子として同定された酸化酵素 12-lipoxygenase は今後心不全治療の新たなターゲットとして同定した。

戸田らは 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うけられず、筋基底膜成分のラミニンとの結合が弱くなり、筋基底膜の破綻が生じる結果、 α ジストログリカンが機能的に作用する筋細胞膜及び神経筋接合部の分化遅延をもたらす FCMD 及び α -DGpathy の病態を作り出していることを示した。また、ラット海馬 CA1 領域では、経時的かつ網羅的遺伝子発現解析をすることで、多次元解析が可能となり、長期記憶に関連する機能的遺伝子群やそのパスウェイが抽出された。

古江らは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、様々な皮膚疾患における病態解析をさらに進めた。

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 thrombin, VEGF 刺激で共通に最も強く早期に誘導される DSCR-1 は血管内皮細胞活性化のネガティブフィードバック因子として作用し、これを安定的に発現させることによって、血管疾患（病的血管新生、動脈硬化）に関わる多くの遺伝子の発現抑制をもたらす、この因子が病的状態の緩和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

2005 年

1. Komura D, Nakamura H, Tsutsumi S, Aburatani H, Ihara S. Multidimensional support vector machines for visualization of gene expression data. *Bioinformatics* 21(4):439-44, 2005
2. Komura D, H Nakamura, S Tsutsumi, H Aburatani and S Ihara. Multidimensional Support Vector Machines for visualization of gene expression data. *Bioinformatics*. 2005 (in press)
3. Harada, M, Qin, Y, Takano, H, Minamino, T, Zou, Y, Toko, H, Ohtsuka, M, Matsuura, K, Sano, M, Nishi, J, Akazawa, H, Kunieda, T, Zhu, W, Hasegawa, H, Kunisada, K, Nagai, T, Nakaya, H, Yamauchi-Takahara, K, Komuro, I. G-CSF prevents cardiac Remodeling after

myocardial infarction by activating Jak/Stat in cardiomyocytes. *Nat Med* 11:305-311, 2005

4. Morita K, Urabe K, Moroi Y, Koga T, Nagai R, Horiuchi S, Furue M. Migration of keratinocytes is impaired on glycosylated collagen I. *Wound Repair Regen* 13:93-101, 2005
5. Kobayashi J, Inai T, Morita K, Moroi Y, Urabe K, Shibata Y, Furue M. Reciprocal regulation of permeability through a cultured keratinocyte sheet by IFN-gamma and IL-4. *Cytokine*. 7:186-9, 2005
6. Houjun Liu, Yoichi Moroi, Shinichiro Yasumoto, Hisashi Kokuba, Shinichi Imafuku, Tetsuya Koga, Teiichi Masuda, Yating Tu, Masataka Furue, Kazunori Urabe. Immunohistochemical localization of activated Stat3 and hTERT protein in psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol.* in press
7. Ge X, Yamamoto S, Tsutsumi S, Midorikawa Y, Ihara S, Wang SM, Aburatani H. Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth-of-expression in normal tissues. *Genomics* 2005, in press

2004 年

1. Midorikawa Y, Tsutsumi S, Nishimura K, Kamimura N, Kano M, Sakamoto H, Makuuchi M, Aburatani H. Distinct chromosomal bias of gene expression signatures in the progression of hepatocellular carcinoma *Cancer Res.* 64(20): 7263-70, 2004
2. Minami T, Horiuchi K, Miura M, Abid R, Takabe W, Kohro T, Ge X, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T, Aird WC. VEGF- and thrombin-induced termination factor, down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation, and angiogenesis. *J Biol Chem* 279(48): 50537-54, 2004
3. Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, Ezaki O. Skeletal muscle FOXO1

- (FKHR)-transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (slow twitch / red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem* 279(39): 41114-23, 2004
4. Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, He H, Miyahara Y, Yamashita N, Wada Y, Aburatani H, Yoshizumi M, Kozaki K, Ouchi Y. Caveolin-1, Id3a and two LIM protein genes are upregulated by estrogen in vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 75(10): 1219-29, 2004
 5. Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T. A Comparison of Differences in the Gene Expression Profiles of Phorbol 12-myristate 13-acetate Differentiated THP-1 Cells and Human Monocyte-derived Macrophage. *J Atheroscler Thromb* 11(2): 88-97, 2004
 6. Ogihara T, Asano T, Katagiri H, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Fujishiro M, Kushiyama A, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Gotoh Y, Komuro I, Fujita T. Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappaB pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia* 47(5): 794-805, 2004
 7. Takita J, Ishii M, Tsutsumi S, Tanaka Y, Kato K, Toyoda Y, Hanada R, Yamamoto K, Hayashi Y, Aburatani H. Gene expression profiling and identification of novel prognostic marker genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 40(2): 120-32, 2004
 8. Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, Midorikawa Y, Yamamoto S, Ihara S, Tokita S, Iwanari H, Ito Y, Nakano K, Nezu J, Tsunoda H, Yoshino T, Ohizumi I, Tsuchiya M, Ohnishi S, Makuuchi M, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H. Identification of Soluble Amino Terminal Fragment of Glypican-3 as a Serological Marker for Early Stage Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 64(7): 2418-2423, 2004
 9. Mukasa A, Ueki K, Ge X, Ishikawa S, Ide T, Fujimaki T, Nishikawa R, Asai A, Kirino T, Aburatani H. Selective expression of a subset of neuronal genes in oligodendroglioma with chromosome 1p loss. *Brain Pathology* 14(1): 34-42, 2004
 10. 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
 11. Kano M, Tsutsumi S, Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Kirino T, Aburatani H. A meta-clustering analysis indicates distinct pattern alteration between two series of Gene Expression profiles for induced ischemic tolerance in rats *Physiological Genomics* in press
 12. Komura D, H Nakamura, S Tsutsumi, H Aburatani and S Ihara, Incorporating prior Knowledge into clustering of gene expression profiles. *International Conference on Genome Informatics*, 15, P036 1- 2 (2004)
 13. 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)
 14. 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)
 15. Minamino, T, Miyauchi, H, Yoshida, T, Tateno, K, Komuro, I. The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: antisenesence as a novel therapeutic strategy for vascular aging. *Curr Vasc Pharmacol* 2:141-148, 2004
 16. 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
17. Longman C, Mercuri E, Cowan F, Allsop J, Brockington M, Jimenez-Mallebrera C, Kumar S, Rutherford M, Toda T, Muntoni F. Antenatal and postnatal brain magnetic resonance imaging in muscle-eye-brain disease. *Arch Neurol* 61:1301-1306, 2004
 18. Kurahashi H, Inagaki H, Yamada K, Ohye T, Taniguchi M, Emanuel BS, Toda T. Cruciform DNA structure underlies the etiology for palindrome-mediated human chromosomal translocations. *J Biol Chem* 279:35377-35383, 2004
 19. Kurahashi H, Taniguchi M, Meno C, Taniguchi Y, Takeda S, Horie M, Otani H, Toda T. Basement membrane fragility underlies embryonic lethality in fukutin-null mice. *Neurobiol Dis* (in press)
 20. Moroi Y, Yu B, Urabe K, Koga T, Nakahara T, Dainichi T, Uchi H, Furue M. Effects of MAPK inhibitors on CCR4-mediated chemotaxis against thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17). *J Dermatol Sci* 36:186-8, 2004
 21. Nakahara T, Uchi H, Urabe K, Chen Q, Furue M, Moroi Y. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* 16:1701-9, 2004
 22. Masuda T, Furue M, Matsuda T. Photocured, styrenated gelatin-based microspheres for de novo adipogenesis through corelease of basic fibroblast growth factor, insulin, and insulin-like growth factor I. *Tissue Eng* 10:523-35, 2004
 23. Fujii-Maeda S, Kajiwara K, Ikizawa K, Shinazawa M, Yu B, Koga T, Furue M, Yanagihara Y. Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J Invest Dermatol* 122:20-8, 2004
 24. Minami, T, Murakami, T, Horiuchi, K, Miura, M, Noguchi, T, Miyazaki, JI, Hamakubo, T, Aird, WC, and Kodama, T. Interaction between Hex and GATA transcription factors in vascular endothelial cells inhibits flk-1/KDR-mediated VEGF signaling. *J Biol Chem* 279, 20626-35, 2004
 25. Minami, T, Sugiyama, A, Wu, SQ, Abid, R, Kodama, T, and Aird, WC. Thrombin and Phenotype Modulation of the Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24,41-53, 2004
 26. Abid MR, Guo S, Minami T, Spokes KC, Ueki K, Skurk C, Walsh K, and Aird WC. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:294-300, 2004
- 2003 年**
1. Ge X, Tsustumi S, Aburatani H, Iwata S. Reducing false positives in molecular pattern recognition. *Genome Informatics* 14:34-43, 2003
 2. 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
 3. 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
 4. 井原茂男、堤修一、油谷浩幸. ゲノム医学. vol 3 No2 (2003-4) 205-213
 5. Akazawa, H, Komuro, I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 92:1079-1088, 2003
 6. 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
7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. Zhang W, Vajsar J, Cao P, Breningstall G, Diesen C, Dobyys 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
 12. 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 a dystroglycanopathy. *Congenit Anom* 43:97-104, 2003
 13. Endo T, Toda T. Glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Biol Pharm Bull* 26:1641-1647, 2003
 14. Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Many 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
 15. 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
 16. 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
 17. Koga T, Duan H, Urabe K, Furue M. IFN- γ -positive immunostainig in psoriatic lesional keratinocytes-reply to the comments of McKenzie and colleagues. *Eur J Dermatol*, 13, 99, 2003
 18. Minami T, Sugiyama A, Wu SQ, Abid R, Kodama T, and Aird WC. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:41-53, 2003
- 2002 年
1. Minamino T, Komuro I, et al. Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet* 360:2083-2084, 2002
 2. Toko H Komuro, I, et al. Csx/Nkx2-5 is required for homeostasis and survival of cardiac myocytes in the adult Heart. *J Biol Chem*: 277:24735-24743, 2002
 3. Yoshioka M, Kuroki S, Sasaki H, Baba K, Toda T. A variant of congenital muscular dystrophy. *Brain Dev* 24:24-29, 2002
 4. Kano H, Kobayashi K, Herrmann R,

- Tachikawa M, Manya H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa H, Toda T. Deficiency of a -dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 291:1283-1286, 2002
5. Zanoteli E, Rocha JC, Narumia LK, Fireman MA, Moura LS, Oliveira AS, Gabbai AA, Fukuda Y, Kinoshita M, Toda T. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: a case report in the Japanese population living in Brazil. *Acta Neurol Scand* 106:117-121, 2002
 6. Horie M, Kobayashi K, Takeda S, Nakamura Y, Lyons GE, Toda T. Isolation and characterization of the murine homologue of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. *Genomics* 80:482-486, 2002
 7. Kohda F, Koga T, Uchi H, Urabe K, Furue M. Histamine-induced IL-6 and IL-8 production are differentially modulated by IFN- γ and IL-4 in human keratinocytes. *J Dermatol Sci*,28,34-41, 2002
 8. Chen Q, Koga T, Uchi H, Hara H, Terao H, Moroi Y, et al. Propionibacterium acnes-induced IL-8 production may be mediated by NF-kappaB activation in human monocytes. *J Dermatol Sci*,29,97-103, 2002
 9. Yu B, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Maeda S, Yanagihara Y, et al. Differential regulation of thymus-and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ in human keratinocyte and fibroblast, *J Dermatol Sci*,30,29-36, 2002
 10. Wada, Y, Sugiyama, A, Yamamoto, T, Naito, M, Noguchi, N, Yokoyama, S, Tsujita, M, Kawabe, Y, Kobayashi, M, Izumi, A, Kohro, T, Tanaka, T, Niki, E, Hamakubo, T, and Kodama, T. Lipid accumulation in human coronary artery smooth muscle cells by LDL loading under hypoxic conditions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(10):1712-9, 2002
- ## 2. 学会発表
- ### 平成 16 年度
1. 国際疲労学会（軽井沢）2005 2/11 International Conference on Fatigue Science 2005 Gene Expression Signatures in CFS patients 油谷浩幸
 2. 東京大学国際シンポジウム（東京）2005 2/18 The University of Tokyo International Symposium – Frontiers in Drug Development Genomic Technology in Drug Development 油谷浩幸
 3. 国公立大学病院医療技術関係職員研修（東京）2004 5/21 DNAチップと病理診断 油谷浩幸
 4. 第14回難病治療研究会（東京）7/8 アレイを用いた機能ゲノム解析 油谷浩幸
 5. LSBM国際シンポジウム（東京）7/13 2nd International Symposium on New Frontiers of Systems Biology and Medicine Novel Biomarker discovery through cancer genomics 油谷浩幸
 6. マイクロアレイ研究会「次世代トランスクリプトーム解析」（東京）8/31 マイクロアレイ技術によるハイスループットバイオロジー 油谷浩幸
 7. 第55回日本皮膚科学会中部支部学術大会（金沢）9/12 特別講演「ゲノム研究は医療をどう変えるか」 油谷浩幸
 8. BioJapan2004シンポジウム「ゲノム・プロテオーム解析の癌診療へのインパクト」（東京）9/28 ゲノム解析の癌研究への応用 油谷浩幸
 9. 日本癌学会ランチョンセミナー（福岡）9/30 Molecular Karyotyping: allelic gene dosage analysis 油谷浩幸
 10. 三菱化学ヘルスケアフォーラム（東京）11/13 癌の分子診断と治療への展開 油谷浩幸
 11. Sigeo Ihara "Protein interaction networks from literature mining" American Physical Society March Meeting, (Invited) (March 21-25, 2005, Los Angeles, US).

12. Naoko S. Nishikawa, Jun'ichi, Shingo Tuji, Rikako Suzuki, Shogo Yamamoto, Hiroyuki Aburatani and Sigeo Ihara, "Analysis of Drug Response Pathways by Literature Mining Network" Cold Spring Harbor Laboratory, Pharmacogenomics, 88 (Nov 18-21, 2004, New York, US).
13. Sigeo Ihara, Naoko S. Nishikawa, Yoshihiro Ohta, Koji Abe, Shingo Tsuji, Shuichi Tsutsumi, Jun'ichi Kitakami, Shogo Yamamoto, and Hiroyuki Aburatani, "Networking Transcriptional Regulation by Literature Mining" Joint Cold Spring Harbor Laboratory/Wellcome Trust Conference, Genome Informatics, 53 (Sept 22-26, 2004, Cambridge, UK).
14. Sigeo Ihara, Naoko S. Nishikawa, Yoshihiro Ohta, Koji Abe, Shingo Tsuji, Shuichi Tsutsumi, Shogo Yamamoto, and Hiroyuki Aburatani, "Pathway Analysis in Genomics" Cold Spring Harbor Laboratory, The Biology of Genomes, 88 (May 12-16, 2004, New York, US).
15. Komuro I. Expert Workshop Asia Pacific Novel Aspects of Endothelial Dysfunction. (January 12-15, 2004, Singapore, China) Introduction of Telomere Restores Endothelial Dysfunction Associated with Aging
16. Toda T. 9th International Congress of the World Muscle Society (2004 9/1-9/4, Goeteborg, Sweden) Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in a-dystroglycanopathies.
17. Toda T. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting (2004 10/23-10/27, San Diego, USA) Gene expression profiling of the rat hippocampal CA1 slices after conditioning that induces L-LTP.
18. Minami, T., VEGF- and thrombin-induced termination factor, DSCR-1, attenuates endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis, Korea-Japan joint symposium on vascular biology (2004)
19. Minami, T, DSCR-1 attenuates the endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis, Gordon Conference, Proctor school, NH, USA (2004)
平成 15 年度
 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 油谷浩幸
 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 油谷浩幸
 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 油谷浩幸
 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 油谷浩幸
 8. 第5回国際ゲノム会議 (横浜) 6/27 Transcriptome to Integrated Biology 油谷浩幸
 9. 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)2003

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Toda T. 53rd Annual Meeting The American Society of Human Genetics (2003 11/4-11/8 Los Angeles, USA) Gene expression profiling of Fukuyama-type congenital muscular dystrophy - Neurogenic terminal maturational delay in muscle fibers.
14. 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
15. 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
16. 南 敬、児玉龍彦 第26回日本分子生物学会(口頭発表)神戸 12月10-13日

平成14年度

1. The 3rd Cherry blossom symposium. "Cancer Classification by Gene Expression Profiling." 油谷浩幸
2. 第3回 Sun Bioinformatics セミナー「トランスクリプトーム解析のための生命情報の統合 - システム生物学へ -」油谷浩幸
3. 第34回日本臨床検査自動化学会特別企画講演「システム生物学へのパラダイムシフト-トランスクリプトームからの疾病解析-」油谷浩幸
4. 第61回日本癌学会総会シンポジウム「ゲノム科学とがん研究」トランスクリプトーム解析からがんのシステム生物学へ 油谷浩幸
5. Toxicogenomics International Forum 2002, "Understanding cancer through gene expression profiling" 油谷浩幸
6. Rad-genomics「発現プロファイル解析と疾病研究」油谷浩幸
7. 学術創成研究第4回シンポジウム「高感度 DNA マイクロアレイによる遺伝子機能解析」油谷浩幸
8. "Characteristics of Support Vector Machines in Gene Expression Analysis" GIW2002, Tokyo 2002, D. Komura, S. Tsutsumi, H. Nakamura, H. Aburatani, and S. Ihara
9. "Extraction and Dynamic View of Biomolecular Interactions in Large Biomedical Text Database" Yoshihiro Ohta and Shigeo Ihara, The 10th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, Edmonton, Canada, August 3rd-7th, 2002.
10. 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
11. Komuro I. International Opinion Leaders Workshop: New Insights into the Management of Hypertension. April 26-28, 2002, Madrid, Spain.
12. Komuro I. American Heart Association 75th Scientific Sessions. PPAR in Cardiac Hypertrophy. November 17-20, 2002, Chicago, USA

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も)

含む)

1. 特許取得

(油谷浩幸)

- 特願 2002-302278 「ヒトハウスキーピング遺伝子とヒト組織特異的遺伝子」 2002.10.16
- 特願 2003-290704 「高発現遺伝子」 2003.8.8
- 特願 2004-260328 「遺伝子コピーの解析方法及び装置」 2004.9.7
- 特願 2004-366671 「発現量多様性を有する遺伝子の同定法」 2004.12.17
(井原茂男)
- 特願 2004-97914 「文献情報処理システム」 平成 16 年 3 月 30 日
(小室一成)
- 特願 2002-260665 号 「心筋梗塞および

心不全の治療薬」 2002.9.5

- 特願 2003-004959 号 「標識化抗テネイシンCモノクローナル抗体」 2003.1.10
- 特願 2004-13354 号 「細胞移植療法後の予後改善剤」 2004.1.21
(古江増隆)
- 特願 PCT/JP03/13279 「遺伝子ワクチン」 2003.10.31 出願
(南 敬)
- 特願 2004-051116 「DSCR-1 タンパク発現による血管新生抑制、及び癌抑制への応用」 2004.2.25

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし