

Our understanding of HCV was dramatically impaired by the lack of an effective virus culture system, and the establishment of self replicating full-length HCV genomic replicon systems for genotypes 1a and 1b in human hepatoma (HuH-7) cells provided valuable insight into the mechanisms of HCV replication (6). Recently, several groups reported the production of infectious virus following transfection of HCV genotype 2a genomic RNA into HuH-7 cells (1). However, immortalized, tumor derived cell lines may obscure some aspects of HCV biology, and human primary hepatocytes are the ideal cell to examine HCV replication under more physiologic conditions. Liver epithelial cells, hepatocytes and biliary cells proliferate *in vivo* in response to regenerative stimuli, but they do not proliferate under standard culture conditions *in vitro*. Recently, Aly et al. established a cell line derived from primary hepatocytes immortalized by the expression of the E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 18 and human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) (1). This cell line, HuS-E7/DN24 (HuS), also lacks interferon regulatory factor-7 (IRF-7) (1), and it maintains a phenotype consistent with primary hepatocytes such as the continuous expression of albumin, apolipoprotein A, transferrin and E-cadherin without evidence of transformation even after prolonged culture (1).

At present, the only approved therapies for chronic HCV infection are interferon-alpha (IFN- α) with or without ribavirin, but these drugs fail to clear HCV from a significant number of patients (5). Recently our group discovered that cyclosporin A (CsA), and its non-immunosuppressive analogue, NIM811 could suppress HCV genome replication in a cell culture system (4, 16). The anti-HCV effects of CsA correlated with cyclophilin B inhibition (CyPB). CyPB, a cellular target of CsA, regulates HCV replication through its interaction with the viral RNA-dependent RNA polymerase NS5B, and CsA suppresses HCV replication by disrupting the association of CyPB with NS5B (17). CsA strongly suppressed HCV-1b replication, but its effects on HCV-2a (JFH-1) replication were less profound, indicating that different HCV genotypes may be differentially susceptible to CsA (17). However, the ability of CsA to inhibit the replication of HCV-4a, one of the most common genotypes worldwide, has not been reported.

We infected HuS immortalized primary hepatocytes with serum samples obtained from Egyptian patients with chronic HCV-4a infection and examined the ability of CsA and NIM811 to suppress viral replication. Our data indicate that HCV-4a is highly susceptible to CsA and NIM811 treatment, suggesting that these may rep-

resent new treatment options to explore in HCV-4a infected individuals.

Materials and Methods

Cells. The immortalized primary hepatocyte cell line HuS-E7/DN24 (HuS) was cultured as reported (1). The hepatoma cell line HuH-7.5 that supports infection and replication of the recombinant HCV strain JFH-1 (HCV-2a) (15) was cultured as previously described. Simian virus 40-large T antigen (Sv40-Lt) immortalized primary hepatocytes (PH5CH8) supporting infection and replication of HCV-1b genotype samples were cultured as reported (16).

Serum samples. Serum samples from Egyptian patients with chronic HCV hepatitis genotype 4a were collected in Egypt (after approval of the Medical Research Ethics Committee in Mansoura University). The virus titer in sera was determined using real-time PCR for the detection of HCV as described (8).

Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) analysis. Five-hundred nanograms of total RNA isolated from cells was reverse transcribed as previously described (1), and the 5'-untranslated region of HCV genomic RNA was quantitated using the ABI PRISM 7700 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, Calif., U.S.A.) as described previously (8). The forward and reverse primers used in this experiment were 5'-CGGGA-GAGCCATAGTGG-3' and 5'-AGTACCACAAGGC-CTTTCG-3', respectively. The fluorogenic probe was 5'-CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-3'. As an internal control, ribosomal RNA was also quantified using *TaqMan* ribosomal RNA control reagents (Applied Biosystems).

Chemicals. CsA and IFN- α were purchased from Sigma and Otsuka Pharmaceutical Co., respectively. NIM811 was generously provided by Novartis (Basel, Switzerland).

In vitro infection experiments. HuS, PH5CH8 and HuH-7.5 cells were harvested, washed, adjusted to 5×10^4 cells/ml in growth medium and cultured in 12-well plates with 1 ml media per well. After 24 hr, the culture medium was replaced with 1 ml of complete medium containing HCV. Plates were incubated at 37 C for 24 hr, and the virus-containing media was removed. The cells were then washed twice with PBS, and 1 ml of complete culture medium was added to each well. Plates were re-incubated and the cells were harvested at the indicated times for evaluation. Total RNA was extracted from infected or non-infected cells, and HCV-RNA was measured by real time RT-PCR as described (8).

HCV infection neutralization experiment. HCV infection of HuS cells was inhibited using anti-CD81 (BD-Bioscience) or anti-HCV-E2 (AP33) as previously reported (7). The mouse monoclonal antibody (MAb) AP33 recognizes the E2 glycoprotein of HCV-1A, and it neutralizes retroviral pseudoparticles (HCVpp) carrying genetically diverse HCV envelope glycoproteins, including HCV-4a-glycoproteins (9). Anti-tubulin (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.) was used as a control.

Inhibition of HCV replication. HuS cells were cultured at a concentration of 5×10^4 cells/well in 12-well plates. After 24 hr, cells were infected by adding growth medium containing HCV-4a serum (adjusted to a final virus titer of 5×10^4 copies of RNA/ml) and the

indicated concentrations of CsA, NIM811, or IFN- α . Plates were incubated at 37 C for 24 hr, and the medium was then removed, the cells were washed twice with PBS, and 1 ml of fresh medium containing CsA, NIM811, or IFN- α was added to the cells. On day 5 post-infection, the medium was removed, and the cells were washed, trypsinized and collected. Total RNA was extracted from infected or non-infected cells, and HCV-RNA was measured by real-time RT-PCR.

CsA and NIM811 toxicity test. HuS cells were cultured at a concentration of 5×10^4 cells/well in 12-well plates. Cells were untreated, or treated with 3 μ g/ml CsA or 1 μ g/ml NIM811. Every 2 days, the medium was replaced with fresh, drug-containing medium.

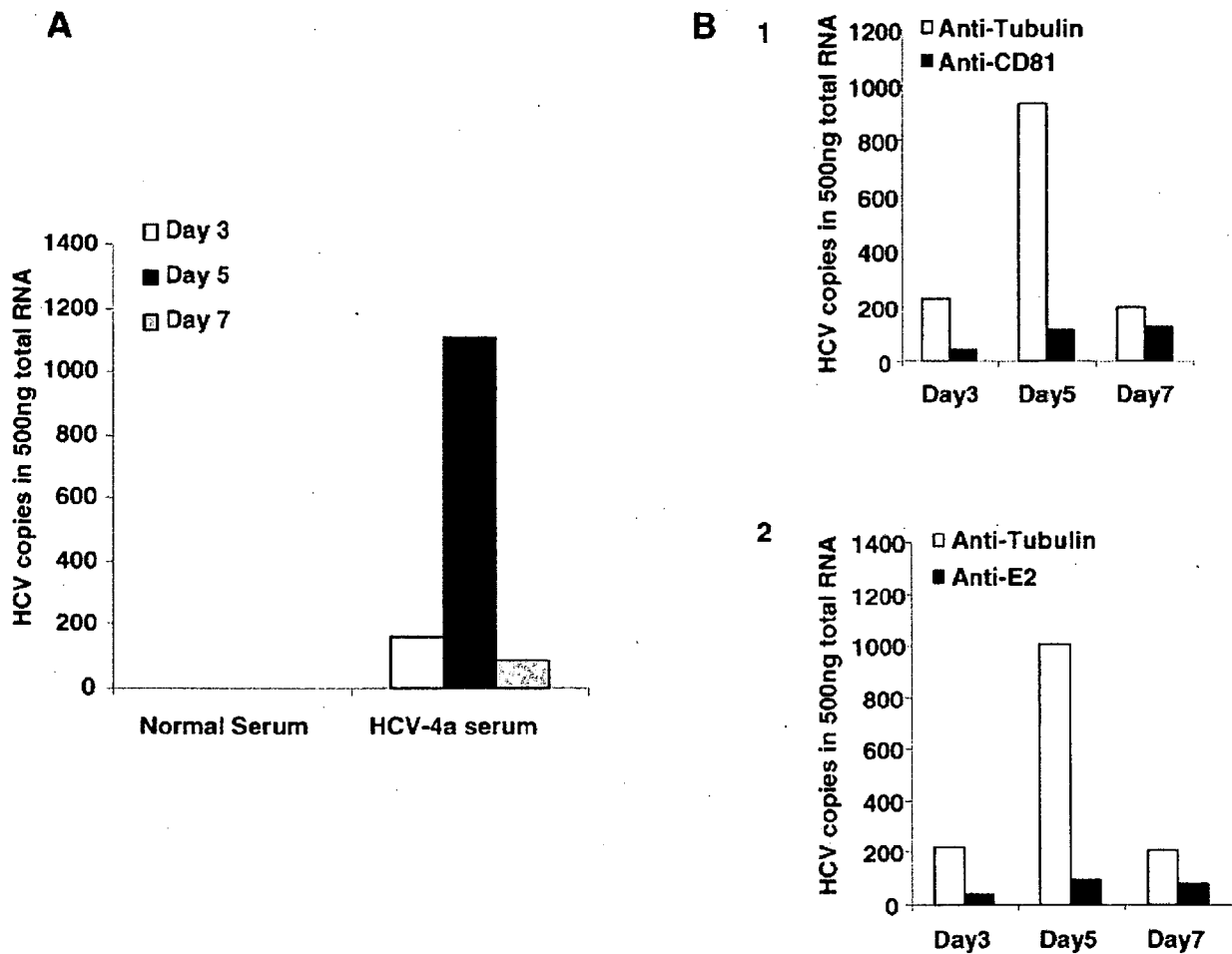


Fig. 1. Kinetics of HCV-4a replication in HuS-E7/DN24 (HuS) cells. (A) Cells were incubated with a serum sample containing HCV-4a virus for 24 hr, and the virus-containing medium was then removed, the cells were washed twice and incubated for the indicated periods of time. At 3, 5 and 7 days after infection, cells were washed again, and total RNA was extracted and used to determine the number of HCV-RNA copies after reverse transcription and real-time PCR. The results shown are the average of two independent experiments. (B) Cells were treated with anti-CD81 or anti-tubulin antibody (1), or HCV containing serum was pre-incubated with anti-E2 or anti-tubulin antibody (2). HCV-4a infection was performed and analyzed as above. The results shown are the average of two independent experiments.

Wells from each group were collected on days 1, 2, 3, 4, and 5 to examine the number of viable cells in each well after staining of the cells with trypan blue.

Results

HCV-4a Infection and Kinetics in HuS Cells in Vitro

We previously established the HuS cell line and showed that these cells were efficiently infected with HCV-1b and HCV-2b containing serum and JFH-1 (HCV-2a) concentrated medium (1). To determine whether HuS cells could support HCV-4a infection, HCV-4a containing serum was incubated with HuS cells for 24 hr, and, following washing and a change of media, the cells were harvested 3, 5, and 7 days after infection. Total RNA was extracted from the infected cells, and the amount of HCV-RNA in 500 ng total RNA was measured (Fig. 1A). As expected, after 3 days in culture the RNA extracted from non-infected HuS cells did not contain any HCV copies. However, viral RNA was detected in cells incubated with HCV-4a containing serum. The number of viral genomes detected was 164.5 ± 52 copies/500 ng of total RNA at day 3, and this peaked at $1,111 \pm 176$ copies/500 ng of total RNA at day 5. The increase from day 3 to day 5 after infection clearly indicates viral replication occurring in these cells rather than increased viral entry without replication. The number of viral genomes decreased dramatically on day 7 to 80 ± 18 copies/500

ng of total RNA. Identical results were obtained using HCV-4a genotype samples isolated from two other individuals (data not shown).

HCV-4a Infection Is Neutralized by Anti-CD81 and Anti-E2

CD81 is involved in the entry of HCV pseudoparticles and *in vitro*-synthesized JFH-1 (15). Similarly, HCV envelope protein E2 is essential for HCV cell entry and infection (7). Blocking antibodies against both CD81 and E2 inhibit viral infection in *in vitro* models. To determine if HCV-4a infection of HuS cells is analogous to previously described systems, we treated cells with either anti-CD81 (Fig. 1B-1) or anti-HCV-E2 (Fig. 1B-2) blocking antibodies. Consistent with results obtained using other HCV genotypes, antibodies against CD81 and HCV-E2 effectively reduced HCV-4a infectivity of HuS cells compared with a non-blocking anti-tubulin antibody.

HuS Cells Are More Permissive to Infection by HCV-4a than PH5CH8 and HuH-7.5 Cells

HuS cells clearly support HCV-4a infection and replication. We wished to compare the ability of different cell lines to support infection and replication of HCV-4a. HuS, PH5CH8 and HuH-7.5 cells were infected with HCV-4a serum containing 5.0×10^4 copies/ml, and the number of viral copies at 3, 5, and 7 days after infection was examined. PH5CH8 and HuH-

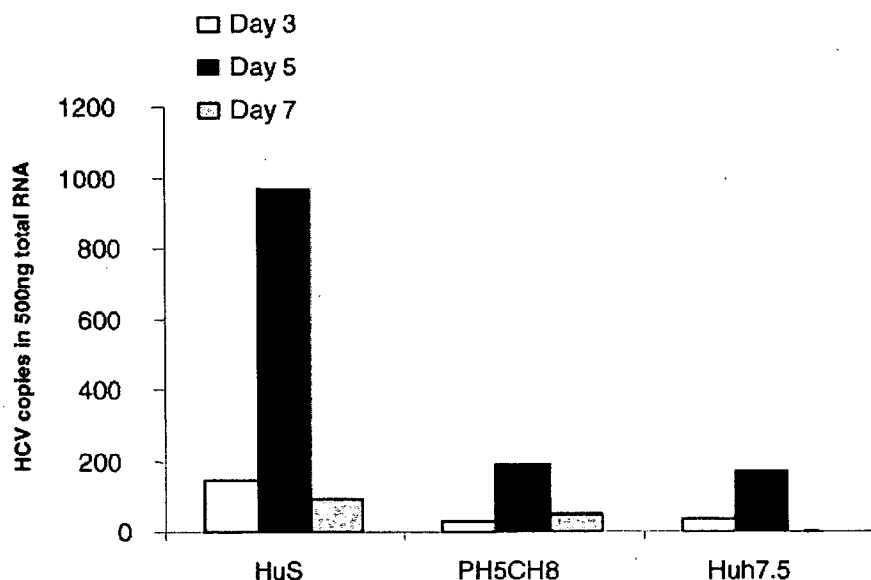


Fig. 2. HuS cells are more permissive to infection by HCV-4a than PH5CH8 and HuH-7.5 cells. HCV-4a replication was examined in HuS cells, PH5CH8 and HuH-7.5 cells. HuS, PH5CH8, and HuH-7.5 cells were infected with the same serum sample under the same conditions, and the extent of HCV genome replication was measured by real-time RT-PCR on days 3, 5, and 7 after infection. The results shown are the average of two independent experiments.

7:5 cells supported HCV-4a infection to some extent, but much less viral replication occurred in these cells (Fig. 2). Indeed, we would not detect any HCV RNA in HuH-7.5 cells 7 days after infection. Identical results were obtained using HCV-4a genotype virus isolated from two other individuals (data not shown). These data are consistent with a previous report showing increased viral infection and/or replication in HuS cells incubated with HCV genotypes 1b and 2b derived from patients' sera (1).

Inhibition of HCV-4a Replication in HuS Cells by CsA and NIM811

Having established that HuS cells support HCV-4a infection and replication similar to other HCV genotypes examined, we wished to determine if HCV-4a

was sensitive to treatment with CsA or its non-immunosuppressive derivative NIM811. Serum isolated from two different individuals was used as a source of HCV-4a for all experiments. For both samples, treatment of infected HuS cells with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CsA reduced the number of recovered viral copies by 75% at 5 days compared with untreated cells, and increasing the concentration of CsA to 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ almost completely inhibited HCV-4a replication in HuS cells (Fig. 3A). Furthermore, we were unable to detect any viral RNA in HCV-4a infected HuS cells treated with either 0.5 or 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NIM811 (Fig. 3B). For comparison, we also treated infected cells with 50 IU/ml IFN- α , and this reduced viral replication by 80–90% in HuS cells (Fig. 3C). The inhibition of HCV-4a replication by CsA or NIM811 could be due to a general cytotoxic effect, and,

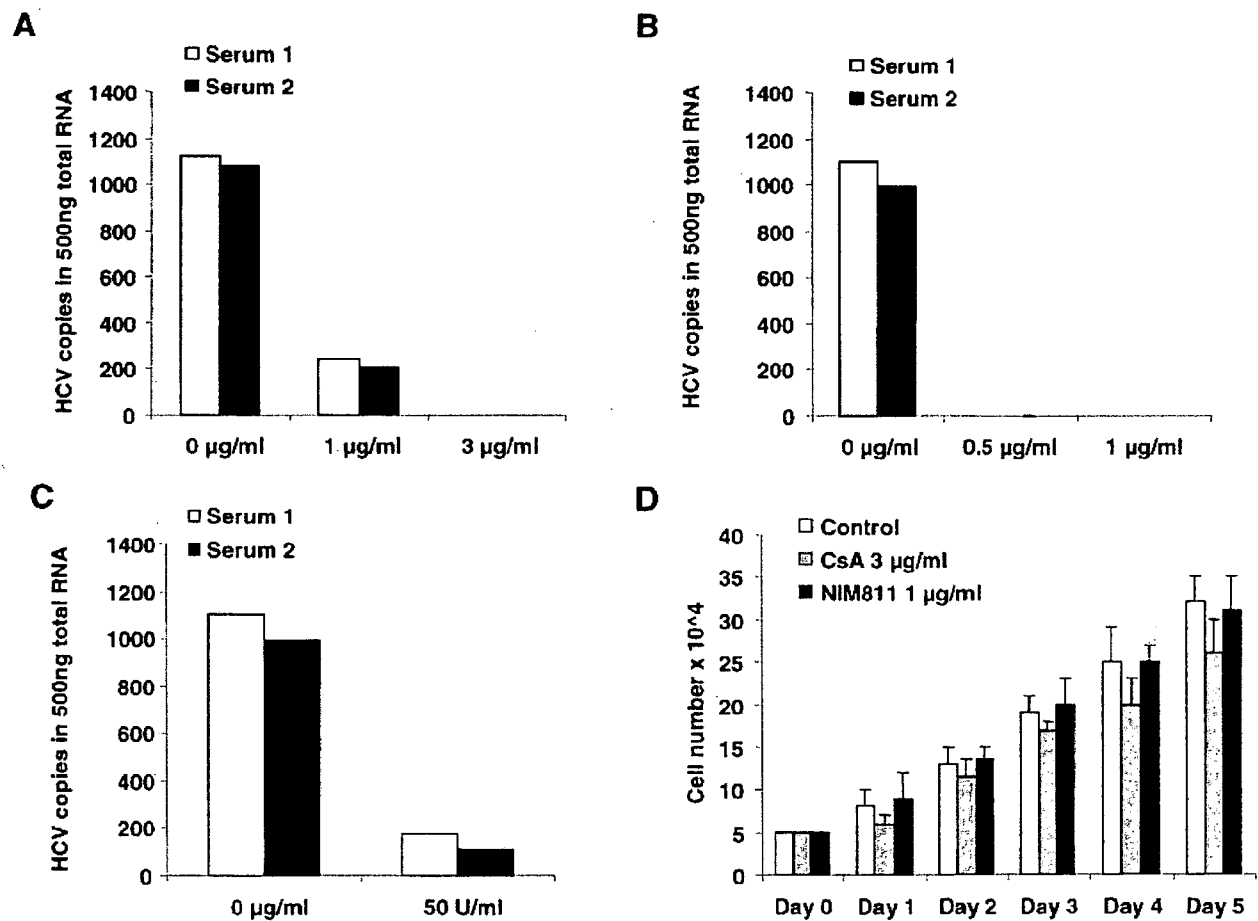


Fig. 3. Inhibition of HCV-4a replication in HuS cells by cyclosporin and NIM811. Two different serum samples containing HCV-4a were used to infect HuS cells in presence of CsA 0, 1 or 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (A), NIM811 0, 0.5 or 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (B) and IFN- α 0 or 50 IU/ml (C). Cells were incubated for 5 days and the level of HCV replication was measured by real-time RT-PCR as described in Fig. 1. The results represent the average of two independent experiments. (D) HuS cells were left untreated or treated with either 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CsA or 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NIM811 for 5 days. Cells were harvested at the indicated times, and the number of viable cells in each well was determined. The results shown are the average of 3 independent experiments.

to exclude this possibility, we cultured HuS cells with or without CsA or NIM811 for 5 days. Although HuS cell proliferation was slightly reduced by the inclusion 3 µg/ml of CsA in the culture media, it was not affected by the addition of 1 µg/ml of NIM811 compared to control untreated cells (Fig. 3D). Thus, the inhibition of HCV-4a replication by NIM811 and CsA in HuS cells appear to be due to direct anti-viral effects.

Discussion

There are six major HCV genotypes with a number of different subtypes that vary by geographic distribution and mode of transmission (12). Subtypes 1a, 1b, 2a, 2b, and 3a are distributed globally and account for the majority of HCV infections worldwide (13). HCV-4a is the predominant genotype seen in the Middle East, a region encompassing approximately 20% of the estimated 170 million HCV carriers in the world (11). HCV-4a responds poorly to interferon treatment, and individuals infected with HCV-4a are at higher risk of liver related death and the need for transplantation (19). Thus, the development of new treatments that are effective across a broader range of HCV genotypes is urgently needed.

The development of more effective antiviral therapies and an effective HCV vaccine remain the largest challenges for HCV research in the near future. However, because HCV genotype affects the outcome of antiviral therapy, it has become increasingly clear that an *in vitro* system supporting HCV-4a infection and replication is needed to develop anti-viral therapies effective against this important viral subtype. Recent studies have examined several different viral genotypes using the replicon system in HuH-7 cells, but this is the first report specifically designed to determine *in vitro* conditions compatible with HCV-4a infection and replication.

We recently established the HuS cell line, and this cell line is able to be infected *in vitro* by sera containing HCV-1b and -2b (1). In this study, we showed that HuS cells also clearly support the infection and replication of HCV-4a derived from patient serum samples. A high level of HCV-RNA was seen in these cells 5 days after infection, but this rapidly declined by day 7. The kinetics of infection observed for HCV-4a in HuS cells was similar to that observed when PH5CH8 cells were infected with HCV-1b containing plasma (16). Since the aim of this paper was to study the suppressive effect of CsA and NIM811 on HCV infection and replication, which was monitored clearly on days 3 and 5, we didn't culture the infected cells for more than 7 days. The extent of HCV-4a infection of HuS was much greater

than that for the PH5CH8 and HuH-7.5 cell lines, and these differences in permissiveness may arise from the relative amounts or activities of host cell factors required for RNA replication. Alternatively, HuS cells lack functioning IRF-7, and this likely impairs their ability to produce IFN- α . The absence IFN- α from the culture media following infection could clearly contribute to the increased replication seen in HuS cells.

There is an urgent need for improved HCV drug therapies. We previously reported that CsA suppresses HCV replication *in vitro* (16), and these effects are also seen using its non-immunosuppressive derivative NIM811. These compounds can induce multiple-log reductions in HCV-RNA levels in a replicon cell culture system using HCV-1b genotype virus (4). However, the ability of CsA to inhibit a HCV-2a genotype virus, JFH-1, was greatly reduced. In this study we examined the effects of CsA and NIM811 on HCV-4a infection and replication in HuS cells. As was seen with HCV-1b, both CsA and NIM811 strongly inhibited HCV-4a infection and replication in HuS cells. Furthermore, the inhibition by NIM811 was much greater at lower doses than that seen for CsA. These findings were similar to those previously reported for HuH-7 cells harboring a HCV-1b replicon (4).

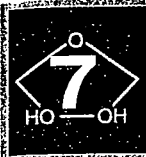
The HuS cell line is the only system described available for the study of HCV-4a infection and replication. Using this cell line, we showed that HCV-4a replication is impaired by CsA and to a greater extent by its non-immunosuppressive derivative NIM811. Despite these findings, more studies are clearly needed to determine the activity of these drugs *in vivo* as well as characterize the possible differences in the HCV-4a life-cycle.

The CsA derivative, NIM811 was kindly provided by Novartis (Basel, Switzerland). This work was supported by Grants-in-Aid for cancer research and for the second-term comprehensive 10-year strategies for cancer control from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, by Grants-in-Aid for scientific research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, by Grants-in-Aid for the research for the future program from the Japan Society for the Promotion of Science. Dr. M.A. El-Farrash (Ph.D.) was a recipient of the JSPS Invitation Fellowship Programs for Research in Japan. Dr. Hussein H. Aly is a recipient of the Japanese Gakushu Shoreihi scholarship and was partly supported by the Prof. Yassin A. El Ghaffar memorial scholarship for the improvement of liver research in Egypt.

References

- 1) Aly, H.H., Watashi, K., Hijikata, M., Kaneko, H., Takada, Y., Egawa, H., Uemoto, S., and Shimotohno, K. 2007. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes.

- J. Hepatol. **46**: 26–36
- 2) Chen, S.L., and Morgan, T.R. 2006. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int. J. Med. Sci.* **3**(2): 47–52.
 - 3) Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**: 359–362.
 - 4) Goto, K., Watashi, K., Murata, T., Hishiki, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. 2006. Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**: 879–884.
 - 5) Huang, R.H., and Hu, K.Q. 2006. A practical approach to managing patients with HCV infection. *Int. J. Med. Sci.* **3**(2): 63–68.
 - 6) Lohmann, V., Körner, F., Koch, J.O., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**: 110–113.
 - 7) McKeating, J.A., Zhang, L.Q., Logvinoff, C., Flint, M., Zhang, J., Yu, J., Butera, D., Ho, D.D., Dustin, L.B., Rice, C.M., and Balfe, P. 2004. Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J. Virol.* **78**: 8496–8505
 - 8) Murata, T., Ohshima, T., Yamaji, M., Hosaka, M., Miyanari, W., Hijikata, M., and Shimotohno, K. 2005. Suppression of HCV virus replication by TGF-beta. *Virology* **331**: 407–417.
 - 9) Owsianka, A., Tarr, A.W., Juttla, V.S., Lavillette, D., Bartosch, B., Cosset, F.L., Ball, J.K., and Patel, A.H. 2005. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **79**: 11095–11104.
 - 10) Ray, S.C., Arthur, R.R., Carella, A., Bukh, J., and Thomas, D.L. 2000. Genetic epidemiology of hepatitis C virus throughout Egypt. *J. Infect. Dis.* **182**: 698–707.
 - 11) Ramia, S., and Eid-Fares, J. 2006. Distribution of hepatitis C virus genotypes in the Middle East. *Int. J. Infect. Dis.* **10**: 272–277
 - 12) Simmonds, P., Holmes, E.C., Cha, T.A., Chan, S.W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P.L., Kolberg, J., and Urdea, M.S. 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J. Gen. Virol.* **74**: 2391–2399.
 - 13) Theodore, S.Y., and Jamal, M.M. 2006. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int. J. Med. Sci.* **3**(2): 41–46.
 - 14) Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., and Wickner, R.B. 2000. Virus taxonomy: the seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego.
 - 15) Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T.J. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**: 791–796.
 - 16) Watashi, K., Hijikata, M., Hosaka, M., Yamaji, M., and Shimotohno, K. 2003. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* **38**: 1282–1288.
 - 17) Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., and Shimotohno, K. 2005. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell* **19**: 111–122.
 - 18) WHO. 1999. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J. Viral Hepat.* **6**: 35–47.
 - 19) Zylberberg, H., Chaix, M.L., and Brechot, C. 2000. Infection with hepatitis C virus genotype 4 is associated with a poor response to interferon-alpha [Letter]. *Ann. Intern. Med.* **132**: 845–846.



マイクロアレイを用いたmiRNAの大規模発現解析

村上善基, 安田 剛

マイクロアレイ解析の概略を図1に示す。miRNA (マイクロRNA) は19~24塩基の小分子RNAでお互いに塩基配列は似ているものが多い。そこでマイクロアレイ解析を行ううえで特異性や定量性を高くするために、①解析に使用するRNAは小分子RNA分画にする、②プローブは成熟型の相補的な塩基配列をもったものを連結し(図2)、③測定する際には1つのmiRNAにつき成熟型の塩基配列をもったプローブ (PMプローブ) とその中央の1塩基を置換した塩基配列をもつプローブ (MMプローブ) を作製し、PMプローブのシグナルからMMプローブのシグナルを引き、測定対象miRNAのシグナルとし、④ハイブリダイゼーションの温度を高くした。また、この方法による高い特異性を利用して、それぞれのmiRNAについて成熟型だけでなく前駆体も同時に発現を測定できるようにした。

マイクロアレイ設計のためのmiRNA配列は、miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) より得た。

われわれがmiRNAをマイクロアレイで解析した時点では市販品が無かったため、上記のように専用のマイクロアレイを作製したが、現在では一般的な生物種であればmiRNA用のマイクロアレイを購入することができる。

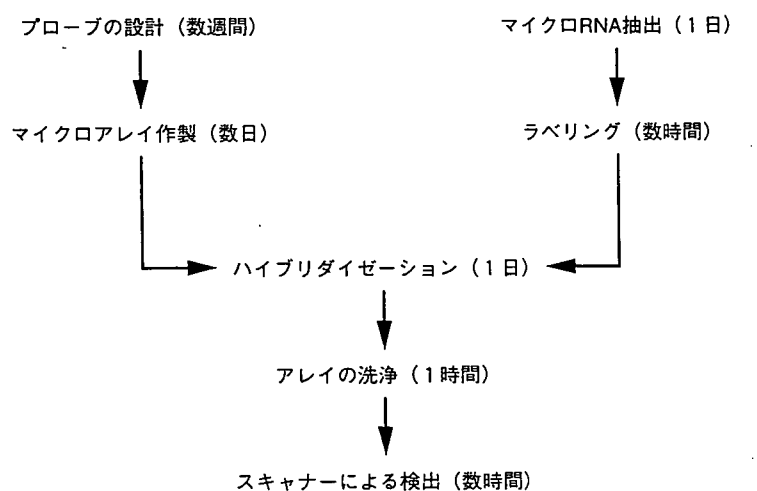


図1 マイクロアレイ解析の概略

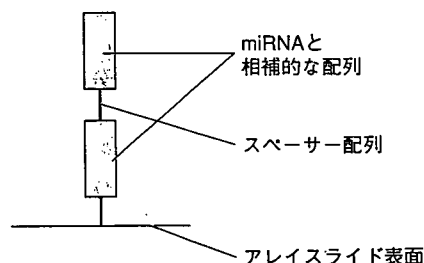


図2 プローブの設計

プローブはmiRNAと相補的な配列を2箇所含む全長60merとした。それにより、マイクロRNAのキャプチャー効率上がり、感度が上がる。またスペーサー配列 [poly A など] を挟むことにより、ハイブリダイゼーション時の立体障害の影響が少なくなり、ハイブリダイゼーション効率が上がる。miRNAと相補的な配列については、他のプローブとTm値が概ね一致するように設計した。

[1] マイクロアレイの作製

準備するもの

1) 器具・機械

- ・マイクロアレイスポッター
- ・384ウェルプレート
- ・ピペット

- ・ 500 mL ビーカー

2) 試薬

- ・ プローブ用オリゴヌクレオチド (5'末端または3'末端をアミノ化したもの)
- ・ Nuclease Free Water
- ・ Spotting Solution (東洋鋼鈹)
- ・ GeneSlide (東洋鋼鈹)
- ・ 0.1 × SSC

プロトコル

数日

① プローブ用オリゴヌクレオチドを Nuclease Free Water を用いて 50 μ M に調製する。



② 2×に調製した Spotting Solution 10 μ L と ① で 50 μ M に調製したオリゴヌクレオチドを等量混合し、スポットするために 384 ウェルプレートに移す[Ⓐ]。



③ スポッターを用いて GeneSlide にスポッティングを行う。



④ スポッティングが終わったら、少量の超純水を入れた[Ⓒ]容器にアレイを入れ、一晩放置する。超純水が直接アレイに付かないように注意する。



⑤ 約 95℃ の 0.1 × SSC 中に 15 分間浸けた後、室温の超純水で 2 回以上リンスし、完全に水分を切る。



⑥ 使用するまで室温で低湿度に保ち保管する。

Ⓐ 384 ウェルプレート内で混ぜても良いが、ウェルが小さいため混ざりにくいので注意する。

Ⓒ 湿度を高く保つため

※通常再現性のあるマイクロアレイを作製することは大変難しいので、このステップは専門の会社に外注した方がよい。

[2] RNA 抽出

準備するもの

1) 器具・機械

- ・ 滅菌した耳鼻科用の先の尖ったはさみ
- ・ 1.5 mL チューブ
- ・ 遠心分離機 (10,000 × g 以上のもの)

2) 試薬

- ・ miRVana PARIS kit (アプライドバイオシステムズ社)
- ・ 100% エタノール
- ・ Nuclease Free Water

3) 臨床検体

- 針生検組織 (18G 生検針にて 5 ~ 10 mm 程度の長さの組織) を使用する。

検体の保存は、検体採取後に 1.5 mL チューブにそのまま入れて、液体窒素で凍結し使用時まで -80°C で保存するか、RNA later (アプライドバイオシステムズ) に入れて 4°C で保存する (後者の場合数週間以内に RNA を抽出するステップに移る。 -20°C であれば 4 週間程度の保存で解析可能な RNA を抽出することができた)。

プロトコール



70分 (電気泳動を除く)

- ① Nuclease free のチューブに RNase later を 300 ~ 500 μL 程度入れておき、そこに無菌的に組織を入れる。



- ② 遠心して、上清の RNase later を除去する。

(われわれは小分子 RNA 分画抽出に、miRVana PARIS kit を使用したので、以後それを使って説明する^⑩。またバッファー等の量は組織の大きさによって変わる、ここでは針生検組織程度の大きさで使用した量を紹介する)



- ③ RNase later を除去した組織の入ったチューブに 4°C で冷やしておいた cell disruption buffer (キット) を 30 μL 程度入れる。その中で滅菌したはさみを用いて組織をできるだけ粉々にする。



- ④ cell disruption buffer を 200 μL にスケールアップし、先を滅菌はさみで切ったチップを用いてピペッティングでよく混和する。



- ⑤ 2 \times Denaturing Solution (キット) を同じ量 (上記の量であれば 200 μL) 入れ、ボルテックスで混和し、氷上で 5 分間おく。



- ⑥ 400 μL の酸性フェノールクロロホルムを入れ、ボルテックスで 1 分間混ぜる。



- ⑦ 10,000 $\times g$ 以上で 4°C 、5 分間遠心する。



- ⑧ 上相を界面を乱さないように回収し、新しい 1.5 mL チューブに入れる。



- ⑨ 回収した上相に 100% エタノールを 1/3 倍量入れ、ボルテックスする^⑩。



- ⑩ 10,000 $\times g$ 以上で 4°C 、1 分間遠心し、フィルターを 700 μL の washing solution 1 (キット) で洗浄濾過する。濾過された溶液は捨てる。



- ⑪ 500 μL の washing solution 2/3 (キット) で洗浄濾過する。濾過された溶液は捨てる。



- ⑫ もう一度⑩~⑪も繰り返す。



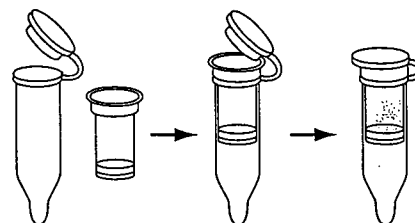
- ⑬ 余分なアルコールを除去するために、もう一度遠心のみ行う。



- ⑭ 50 μL の Nuclease Free water をフィルターに入れ、10,000 $\times g$ 以上で、 4°C 、1 分間遠心する。濾過された溶液を回収する。

⑩ メーカーのプロトコールは http://www.ambion.com/jp/techlib/prot/fm_1556.pdf。

⑩ フィルターを備え付けのチューブに装着し上相とエタノールの混合物を入れる。この時に液がふたと周囲につかないようにする。





回収量と質の確認を行う。A260/280の比で1.8~2.0が望ましい、臨床検体の場合1.6~1.8のこともあったが、最終的な測定に問題はなかった。1%アガロースゲルによる電気泳動パターンにてリボソームRNAを確認した^{†注}

最近、Agilent Technologies社から、Agilent 2100 Bioanalyzerを用いてmiRNAの品質を直接的に測定できるキッ

トが発売されたのでご参照されたい (Small RNA Kit, Agilent Technologies社)。

†注 通常、小分子RNAが分解されているかどうかを簡便に見ることはできないので、まず小分子RNAを含んだtotal RNAを抽出し、rRNAに分解がみられなければ、小分子RNAもインタクトであるという判断をした後、小分子RNA分画を得ている。

[3] ラベリング

miRNAのラベリングには、Poly Aポリメラーゼを利用する方法、白金触媒下で直接miRNAをラベリングする方法などいくつかの方法があるが、われわれは検討の結果、最も簡便で強いシグナルが得られる、白金触媒下でmiRNAを直接ラベリングする方法を用いた。この方法は核酸中のG (グアニン) を選択的にラベリングする方法であるので、miRNAによって検出感度が異なるなどの問題もある。したがって、目的に応じてラベリング方法を選択されたい。なお市販のマイクロアレイを利用する場合は、必ずその標準プロトコールに従っていただきたい。

準備するもの

1) 器具・機械

- ・ピペット
- ・1.5 mLまたは0.2 mLのチューブ
- ・遠心分離機 (10,000×g以上のもの)
- ・ブロックヒーターまたはサーマルサイクラー

2) 試薬

- ・ULYSIS Nucleic Acid Labeling Kit Alexa Fluor 546 conjugate (インビトロジェン社)
- ・ULYSIS Nucleic Acid Labeling Kit Alexa Fluor 647 conjugate (インビトロジェン社)
- ・100%エタノール
- ・70%エタノール
- ・Nuclease Free Water
- ・3M 酢酸ナトリウム (pH5.2)

プロトコール



① 溶媒置換のために、次のようにエタノール沈殿を行う。1 μgの小分子RNA分画を取り、超純水でボリュームを100 μLにして、10 μLの3M酢酸ナトリウム^②と200 μLのエタノールを加える。



② ボルテックスでよく攪拌した後、-70℃で30分間放置する。



② 酢酸アンモニウムはラベリング反応を阻害するので使用しないこと。

- ③ 4℃設定の遠心機で10,000×g, 15分間遠心する。
↓
- ④ 上清を除き, 70%エタノールでペレットを洗う。
↓
- ⑤ ペレットを乾かした後, 20 μLのLabeling Buffer (キット) を加えて再溶解する。
↓
- ⑥ 95℃で5分間インキュベートした後, ただちに氷冷して熱変性を行う。
↓
- ⑦ 5 μLのULS labeling reagent stock solution (Alexa Fluor 546 conjugateまたはAlexa Fluor 647 conjugate) を加え, よく混合した後, 90℃で10分間インキュベートし, ラベリングを行う。10分経過の後, 5分間氷冷する。
↓
- ⑧ エタノール沈殿を行い, ペレットを得る。リンスは上清から蛍光物質の色が完全に無くなるまで行う。この精製が不十分だと, ハイブリダイゼーションの結果, 非常にバックグラウンドが高くなり, 解析不能になる。
↓
- ⑨ ハイブリダイゼーションを行うまで, 遮光下, -80℃で保存しておく。

[4] ハイブリダイゼーション

準備するもの

1) 器具・機械

- ・ピペット
- ・1.5 mLまたは0.2 mLのチューブ
- ・ギャップカバーガラス (スポット面を充分カバーできるもの, 松浪ガラス社)
- ・遠心分離機 (10,000×g以上のもの)
- ・マイクロアレイハイブリチャンバー
- ・恒温水槽

2) 試薬

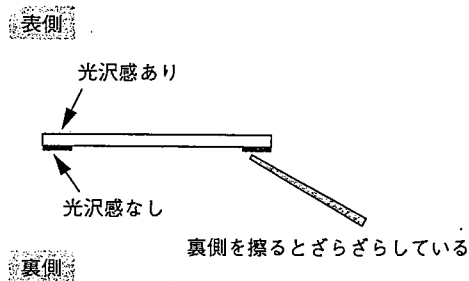
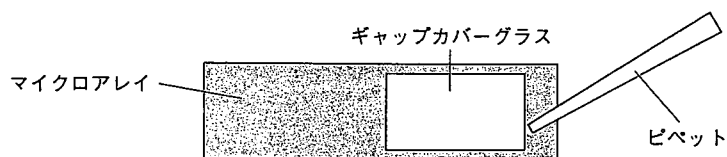
- ・Nuclease Free Water
- ・Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies社)
- ・30×SSC
- ・Triton X-102

プロトコール



- ① 恒温水槽の温度をハイブリダイゼーションの温度にセットしておく。ハイブリダイゼーションはプローブの T_m 値によるので, T_m 値に応じて設定する。原則としてハイブリダイゼーションの温度は事前に検討しておくこと。
↓

- ② ラベリング済みのペレットを5 μL のNuclease Free Waterで溶かす。
↓
- ③ 同一のアレイにハイブリダイゼーションするAlexa Flour 546でラベルされた小分子RNAとAlexa Flour 647でラベルされた小分子RNAを混ぜ、10 μL とする。
↓
- ④ 10 μL の2 \times Hybridization Buffer (キット)を加えてピペティングにてよく混ぜる。できるだけ泡立てないように注意する。
↓
- ⑤ 95 $^{\circ}\text{C}$ で3分間インキュベートした後、氷冷して熱変性を行う。
↓
- ⑥ 遠心機の最高回転数で2分間遠心し、スピンドウンするとともに生じた泡を消す。
↓
- ⑦ アレイをハイブリチャンバーにセットする。
↓
- ⑧ アレイ上にギャップカバーガラスを置き(上下に気をつける)、隙間から液を注入する(下図)この時気泡が入らないように注意する。



- ⑨ ハイブリチャンバーを閉め、恒温水槽に沈めて遮光下で16時間ハイブリダイゼーションを行う。
↓
- ⑩ ハイブリダイゼーションが終了したら、室温の洗浄バッファー1 (6 \times SSC, 0.005% Triton X-102)で10分間洗浄した後、4 $^{\circ}\text{C}$ の洗浄バッファー2 (0.1 \times SSC, 0.005% Triton X-102)で5分間洗浄する。
↓
- ⑪ マイクロアレイスキャナーでスキャンする。
↓
- ⑫ マイクロアレイ解析ソフトでデータ解析を行う。

分子消化器病

別刷

発行：株式会社 先端医学社

〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町2-17-8 KDX浜町ビル

網羅的 SNP 解析による 疾患感受性遺伝子の同定

田嶋 敦* 井ノ上逸朗*

KEY WORDS

一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP), 患者-対照関連解析, 遺伝子発現量多型

SUMMARY

全ゲノムを網羅する数十万 single nucleotide polymorphism (SNP) の体系的検索をおこなうゲノムワイドアソシエーション・スタディ (genome-wide association study : GWAS) をおこない、多因子疾患の新規感受性遺伝子の同定に成功したという報告があいついでいる。このような時代においても、SNP を用いた感受性遺伝子同定法の基本は変わることはない。その方法、考え方、問題点などについて解説するとともに、遺伝子発現量に着目した研究が SNP 解析を補完する役割を担う可能性があることについて紹介する。

はじめに

多因子疾患の遺伝解析、とくに single nucleotide polymorphism (SNP) を遺伝マーカーとした患者-対照関連解析において、全ゲノム SNP スキャンによるアソシエーション・スタディ (genome-wide association study : GWAS) の有効性が示されてきている。消化器疾患もその例外ではなく、昨年 12 月にクローン病の新規感受性遺伝子としてインターロイキン 23 レセプター (*IL23R*) が同定されたのを皮切りに、2007 年に入ってから、続々と新たな感受性変異が報告されている^{1)~4)}。このような研究の流れは、他の消化器疾患の遺伝解析にもすみやかに及ぶことが容易に予想される。

GWAS の実践面などについては、本特集の他稿に詳しく述べられているので、本稿では、SNP を用いた多因子疾患の感受性遺伝子同定法の全般について、その方法、考え方、問題点を中心に解説する。SNP はあくまでも DNA 多型のひとつであり、遺伝解析から見出された感受性変異と疾患とのかかわりについて明らかにするには、SNP によりどのような変化が引き起こされるかにつ

* TAJIMA Atsushi, INOUE Ituro / 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

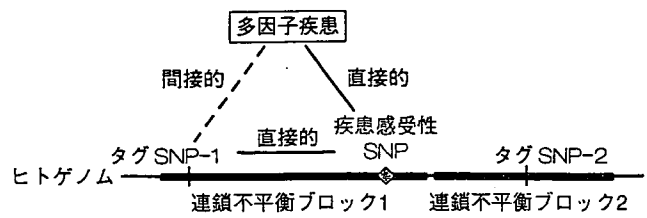
いての深い理解が必要である。SNP と遺伝子発現量多型とのかかわりについての最近の知見を紹介するとともに、疾患感受性遺伝子の同定において、遺伝子発現量あるいは発現ネットワークを対象とした研究の重要性について議論したい。

なぜ疾患感受性遺伝子同定研究に SNP が使用されるのか？

SNP は日本語では一塩基多型とよばれ、疾患感受性遺伝子同定研究における遺伝マーカーとして最も注目されている。注目されるのにはもちろん理由があり、以下のような SNP の特性・特徴が、そのよりどころとなっている。

SNP の第一の特徴は、その高密度性である。米国国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI: National Center for Biotechnology Information) がサイト管理している SNP データベース dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) には、現在、約 1,200 万のヒト SNP が登録されている。ヒトゲノムは約 30 億塩基対からなるので、SNP 密度は 1/250 (250 塩基対に 1ヶ所) である。この高密度性により、疾患発症リスクに影響するゲノム領域を詳細に絞り込むことが可能となる。

第二には、国際 HapMap プロジェクト (<http://www.hapmap.org/>) により SNP 間の遺伝的関係性が明らかにされていることがあげられる⁵⁾⁶⁾。すなわち、100 万 SNP の遺伝子型データをもとにしたヒトゲノム中の詳細なハプロタイプ地図 (同一染色体上の 2 つ以上のアレルの間の連鎖の程度に関する詳細な地図であり、連鎖しているアレルの組み合わせのことをハプロタイプとよぶ) の存在が、SNP を遺伝マーカーとした遺伝解析の利点のひとつとなっている。この点を少し詳しく説明すると、大多数の SNP は互いに独立ではなく、連鎖不平衡 (2 つ以上の変異が連鎖して存在していること) の関係にある。その関係が連続的に観察される領域のことを連鎖不平衡ブロックとよぶが、国際 HapMap プロジェクトの研究結果として、ヒトゲノム中に存在する連鎖不平衡ブロックの位置、長さに関する知見が得られたのである。これにより、ヒトゲノム中の全 SNP を解析対象とすることなく、各連鎖不平衡ブロックを代表する「タグ SNP」と



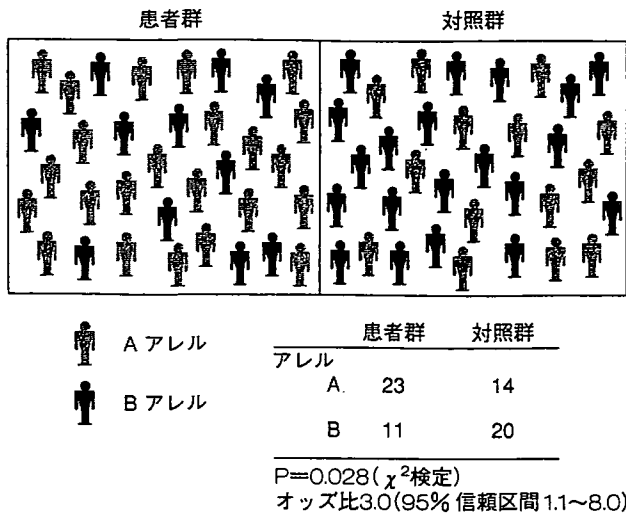
図① タグ SNP タイピングによる効率的な疾患感受性 SNP 同定
連鎖不平衡ブロックを代表するタグ SNP と疾患発症とのかかわりを統計遺伝学的に検索することにより、感受性 SNP が存在する領域の絞り込みを効率よくおこなうことができる。

よばれる比較的少数の SNP についてのみ疾患との関わりを調べればよいこととなり、研究効率が著しく上昇した。たとえば、図①に示すように、連鎖不平衡ブロック 1, 2 を代表するタグ SNP-1 および SNP-2 を調べた時に、タグ SNP-1 が疾患発症にかかわる SNP として統計学的に見出されたとする。もちろん、タグ SNP-1 が疾患感受性変異そのものである可能性もあるが、そうでない場合でも、連鎖不平衡ブロック 1 の上に真の感受性変異 (SNP) が存在する可能性が非常に高いのである。

第三には、大多数の SNP において対立遺伝子 (アレル) は 2 種類のみであり、遺伝子型決定や情報処理の観点からみると、他の DNA 多型マーカー (たとえば、マイクロサテライト DNA など) よりも取り扱いが容易であることがあげられる。このような処理の容易性が、DNA マイクロアレイとよばれる技術を応用した SNP タイピング用チップ (たとえば、GeneChip (Affymetrix 社)、Genotyping BeadChip (Illumina 社)) の開発につながり、GWAS による疾患遺伝子研究を可能ならしめたのである。SNP タイピング用チップに搭載されている SNP のリスト (種類、数) はメーカー間で異なるものの、いずれのチップにおいても、数百 ng 程度のゲノム DNA を用いて、一度に数十万ヶ所の SNP をタイピングすることができる。

SNP を用いた患者-対照関連解析から多因子疾患の感受性遺伝子を同定する

多因子疾患の感受性遺伝子同定法として現在頻用されているのは、アソシエーション・スタディ (関連解析) と罹患同胞対連鎖解析である。アソシエーション・スタ



図② SNPを用いた患者-対照関連解析の一例
この例では、2つのアレル(Aアレル、Bアレル)のうち、Aアレルが疾患発症に有意に関連する。

ディはさらに、その研究対象とするサンプルの違いから、患者-対照関連解析と家族内関連解析とに大別できる。近年、網羅的SNP解析から疾患感受性変異の同定を目指す場合、患者-対照関連解析が選択されることが非常に多い。したがって、本稿では、患者-対照関連解析について詳しく解説する。なお、家族内関連解析や罹患同胞対連鎖解析は、その統計学的検出力（有意な結果を得る期待値）こそ患者-対照関連解析のそれに及ばないものの、感受性変異の遺伝性を精査するための有用な手法である。数多くの成書、論文が出版されているので^{7,8)}、そちらの解説を参考にさせていただきたい。

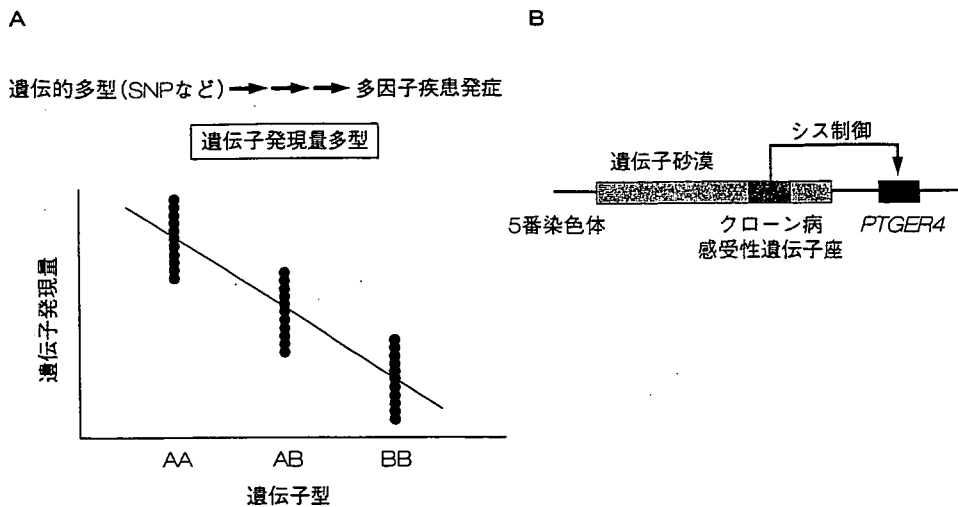
患者-対照関連解析とは、多因子疾患の罹患者集団(患者群)と、それら罹患者とは血縁関係にない未罹患者集団(対照群)とにおいて、SNPのアレル頻度(あるいは遺伝子型頻度)を統計遺伝学的に比較することである。たとえば、あるSNPにおいて2つのアレル(Aアレル、Bアレル)が存在するとする(図②)。Aアレルが疾患発症にかかわるとすると、患者群で高頻度出現することが予想され、患者、対照群間のアレル頻度差に対するχ²検定により、SNPと疾患との関連についての統計学的有意性を調べることになる。他方、疾患への関与の程度をあらわす代表的なものがオッズ比であり、図②の例では、Aアレルのオッズ比は3(=(23/11)/(14/20))となる。また、SNPと疾患とのかかわりは、SNPの遺伝子型頻度

情報にもとづいても分析することができる。たとえば、図②のようなSNPでは3種類の遺伝子型(AA, AB, BB)が観察されるので、それらの頻度分布について、患者、対照群間で比較すればよい。この場合は、遺伝子型相対リスクを尺度として、疾患への効果の大きさを見積もることとなる。このようにして、疾患と有意に関連し、かつ、その効果が大きいタグSNPを見出すことが研究の初期目標となる。前項で簡単に触れたように、疾患と有意にかかわるタグSNPを見出した後は、SNP周辺の連鎖不平衡ブロックに関する情報を参照し、真の感受性変異(SNP)を同定するための研究がなされる。

網羅的遺伝子発現解析はSNP解析を補完する研究である

近年、人類遺伝学関連領域の査読付き雑誌“*Nature Genetics*”誌など)の多くでは、複数の独立した患者-対照サンプル・セットにおいて、感受性SNPと疾患との有意な関連を明らかにすることが求められている。すなわち、多因子疾患の個別性と一般性という2つの側面のうち、一般性を重視した編集方針をとる雑誌が多数を占めているということである。複数のサンプル・セットを用いた遺伝学的検証にも耐えうる感受性SNPを見つけることができれば、対象疾患への関連という観点からは、非常に信頼できるデータを取得することができたこととなる。患者-対照関連解析としては成功とみなしてよいだろう。しかしながら、感受性SNP(あるいは感受性遺伝子)の病態生理学的役割については関連解析からは明らかにされない。SNPや遺伝子の役割を明らかにするための研究における遺伝子発現解析の重要性について、複数の視点から議論してみたい。

まずは、「はじめに」で紹介したクローン病GWASからの研究成果を振り返ってみよう。昨年から今年にかけて、少なくとも4つの遺伝子および遺伝子座において、新たな疾患感受性SNP(あるいは遺伝子)が報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。これらの研究では、既知のクローン病感受性遺伝子[たとえばNOD2遺伝子(CARD15)など]の疾患発症への有意な関連性についても再現されており、報告されている新規遺伝子も確度の高いものであると考えられる。疾患に対する先験的な知見が必要でないGWAS



図③ 中間表現型としての遺伝子発現量多型と SNP 遺伝子型との相関関係 (A) と遺伝子砂漠内に同定されたクローン病感受性遺伝子座による PTGER4 遺伝子発現のシス制御 (B)
 A: 遺伝子発現量の個人差と SNP 遺伝子型との相関についての模式図
 B: 遺伝子砂漠内に存在するクローン病感受性遺伝子座 (5 p 13.1) が、270 Kb 離れたところに位置する PTGER4 遺伝子の発現量をアレル特異的に制御する
 (Libiouille S *et al* 2007⁹⁾を元に作図)

であるからこそ、このような新規感受性遺伝子を同定できたのであるが、裏を返せば、これまで注目されていなかった遺伝子の中にも疾患感受性にかかわるものが数多く潜んでいることを暗示している。他の疾患 GWAS から新規感受性遺伝子の報告があいついでおり、したがって、このことは、クローン病のみについてあてはまるわけではない。それぞれの対象疾患に関連した組織での遺伝子発現および発現ネットワーク解析からも、疾患感受性にかかわる新規候補遺伝子や候補パスウェイを抽出することが可能であることを示している。

つぎに、多因子疾患の特性に関連して、遺伝子発現量解析の必要性を考察してみる。多因子疾患は、文字通り数多くの要因が関与して発症に至る疾患であるので、その最終的な表現型は、好ましくない中間表現型（たとえば、高インスリン濃度など）の組み合わせとみなすことができる。当然のことながら、この中間表現型自身も、遺伝的に、かつ、ある程度独立に制御されていると考えられるので、多因子疾患の理解のためには、中間表現型と遺伝的多型との関連を精査することも有効な手段のひとつである。図③ A に示すように、ヒトの遺伝子発現量を中間表現型とみなし、遺伝子発現量の個人差と遺伝的多型とのかかわりを調べる研究が注目されている⁹⁾¹⁰⁾。多

くの読者においては、SNP のアレル特異的なシス制御システムの存在、すなわち、遺伝子発現量多型を呈する遺伝子の発現量は、その遺伝子近傍にある SNP の遺伝子型と最もよく相関するという場合は理解しやすいと思われる (図③ A の例では、近傍 SNP の B アレル数に応じて遺伝子発現量の低下を認めている)。しかしながら、このような研究の結果⁹⁾¹⁰⁾、トランス制御を受けている可能性が高い遺伝子 (同一染色体の 5 Mb 以上離れた SNP、あるいは異なる染色体上の SNP の遺伝子型と発現量との相関が最も高い遺伝子) が想像以上に多いことが明らかになってきた。この知見は、遺伝子発現量を中間表現型とした関連解析も、当初考えていたよりは容易ではないことを示唆している。それ以上に重要だと思われることは、たとえば GWAS から新規感受性 SNP を見出すことができたとしても、研究対象とすべき遺伝子を必ずしも絞り込んだことにはならず、SNP 近傍遺伝子のみを対象とすればよいわけではない、ということであろう。遺伝子発現量多型の情報を加味した解析の必要性を示唆している。再度クローン病 GWAS から具体例の一つあげて、遺伝子発現解析の重要性についてまとめてみたい。

Libiouille ら⁹⁾は、クローン病の新規感受性遺伝子座として 5 p 13.1 領域を発見したが、この遺伝子座は約 1.25

Mb にわたる「遺伝子砂漠」領域 (遺伝子がまったくマップされていない領域) 内に位置していた。すなわち, DNA 塩基配列レベルでは, この遺伝子座がどのように疾患にかかわるかについての手がかりがない状況であったが, 遺伝子発現データを活用することで, この遺伝子座に近接する *PTGER4* 遺伝子 (プロスタグランジン EP 4 レセプター) の発現量多型と疾患感受性アレルとの相関を見出すことに成功し, 5p13.1 遺伝子座が *PTGER4* 遺伝子のシス制御領域である可能性を示している (図 3 B)。

遺伝子発現量の個人差は, あくまでも量的多型であり, 遺伝子の機能的変化は伴わない。しかしながら, 遺伝子発現解析を通じて, 対象とする多因子疾患についての理解を深めることは十分可能である。先験的な知見を必要としない GWAS が精力的におこなわれる時代になっても, SNP 解析から疾患関連遺伝子を同定する確率を少しでも高めるためには, 対象疾患を病態生理学的に理解する努力が必要不可欠であろう。

おわりに

多因子疾患の個別化医療システムを確立するまでには, 基礎および臨床の立場から克服すべき課題が山積しているけれども, 疾患関連遺伝子の同定は成因解明に直結するものである。システム実現のためにも, SNP 解析からの疾患関連遺伝子同定研究に与えられた役割は大きい。なお, 本稿では触れなかったが, 多因子疾患の SNP 解析における重要な研究課題として, 疾患にかかわる要因間の相互作用検出法の開発をあげることができる。新規アルゴリズムにもとづく情報学的検出法の開発がまずは肝要であろうが, これ以外にも, 遺伝子ネットワークに関する知見の蓄積も必要であろう。著者らは, 最近, ノンコーディング RNA のひとつであるマイクロ RNA を介した遺伝子ネットワークを網羅的に分析するシステムを構築しており (京都大学・村上善基先生との共同研究, 未発表), 将来的には, このシステムからの成果も要因間の相互作用を考察するうえで重要な役割を担うこと

を期待している。



文献

- 1) Duerr RH, Taylor KD, Brant SR *et al* : A genome-wide association study identifies *IL23R* as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314 : 1461-1463, 2006
- 2) Hampe J, Franke A, Rosenstiel P *et al* : A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in *ATG16L1*. *Nat Genet* 39 : 207-211, 2007
- 3) Libioulle C, Louis E, Hansoul S *et al* : Novel crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of *PTGER4*. *PLoS Genet* 3 : e58, 2007
- 4) Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD *et al* : Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 39 : 596-604, 2007
- 5) The International HapMap Consortium : The International HapMap Project. *Nature* 426 : 789-796, 2003
- 6) The International HapMap Consortium : A haplotype map of the human genome. *Nature* 437 : 1299-1320, 2005
- 7) Risch NJ : Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405 : 847-856, 2000
- 8) Gauderman WJ, Witte JS, Thomas DC : Family-based association studies. *J Natl Cancer Inst Monogr* : 31-37, 1999
- 9) Morley M, Molony CM, Weber TM *et al* : Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature* 430 : 743-747, 2004
- 10) Cheung VG, Spielman RS, Ewens KG *et al* : Mapping determinants of human gene expression by regional and genome-wide association. *Nature* 437 : 1365-1369, 2005

たじま・あつし

田嶋 敦 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

網羅的 SNP 解析, 遺伝子発現解析から多因子疾患の病因究明を目指しています。