

の放出に関連するタンパク質、特にアポリポタンパク質とウイルスタンパク質との会合を調べた。その結果、アポリポタンパク質 E が NS5A、エンベロープタンパク質などと会合することを見いだした。

(3) 宿主因子の中で、脂肪代謝、脂肪輸送に関連するものの中から、HCV 複製を制御する因子の探索。

これまでの研究から細胞の脂肪代謝および脂肪輸送に関わる因子がウイルスの感染性の賦与に重要であることを明らかにしてきた。そこでこの機能に重要な細胞側因子を明らかにするために、脂肪輸送に関係する遺伝子の siRNA で処理し、感染性ウイルス粒子産生に影響を与えるものを探索した。これまでにアポリポタンパク質 E を siRNA で一過性にノックダウンすると感染性粒子の産生が強く抑制されることを見いだした。(2) で明らかにしたアポリポタンパク質 E とウイルスタンパク質との会合とを考慮に入れると、アポリポタンパク質 E がウイルスの感染性獲得に重要な働きをしていると考えられた。

(4) アポリポタンパク質 E とウイルス粒子の会合はウイルスの感染性に重要である。

アポリポタンパク質 E がウイルスタンパク質と会合すること、別のグループがウイルス粒子とアポリポタンパク質 E が会合する可能性を示唆していることを踏まえ、粒子とアポリポタンパク質 E との会合と感染性との関連を調べた。

まず、ウイルス粒子をアポリポタンパク質混合させた場合、会合は観察されなかった。他の実験から、ウイルス粒子との会合は細胞内で生じることが強く示唆された。

次に、アポリポタンパク質の抗体でウイルス粒子を反応させ、その後、抗体と会合したウイルス粒子を取り除いた。抗体と結合しなかったウイルス粒子には感染性が見られなかった。

以上から、感染性を示すウイルス粒子にはアポリポタンパク質 E が会合して存在することがわかった。

(5) アポリポタンパク質 E の遺伝的多型と HCV 感染性

アポリポタンパク質には遺伝的多型が存在し、これまでに3種類明らかになっている。これらの多型と HCV 感染性との関連性を調べた。アポリポタンパク質 E1, E2, E3 の各多型を発現する細胞を準備し、それに HCV を感染させた後に、そこから放出される感染性ウイルス粒子と定量した。その結果、E2 アイソフォームを産生する細胞からの感染性粒子の産生は強く抑制された。

#### D. 考察

近年、microRNA がインターフェロンシグナルの調節に関与していることが報告されているが、そのような成果を検証するには、種々の細胞を用いて種々の HCV 感染実験をすることにより可能になる。しかし現状では限られた細胞と、限られた

HCV ゲノムを用いた実験系しか得られていないので、正確な評価が難しい。この点を克服するために、新たな培養細胞を樹立した。この細胞は他の細胞に比べて HCV 感染・複製効率が低い。さらに、インターフェロンシグナル系は正常に応答している。本細胞を異なる培養条件下に置き、HCV 感染・複製が高くなる条件を検討し、3次元で培養することにより効率を高めることがわかった。この系を用いることにより、別の実験で見いだした non coding RNA の HCV 複製への機能検証が可能になり、治療剤としての開発にも有効な手段になると期待される。

HCV 感染者には糖尿病あるいは脂肪代謝異常が見られるが、これらの代謝異常がウイルス感染とどのように関連している

のかについては不明な点が多い。本研究では脂肪輸送に重要な働きをしている酵素 MTP を阻害したときの感染性粒子産生を調べ、MTP 活性が感染性粒子産生に重要な働きをしていることを明らかにした。この阻害剤処理により、細胞外へのアポリポタンパク質 B の放出、VLDL の放出が強く阻害されることから、感染性の賦与には、これらの細胞性因子が強く関わっていることが示唆された。また、アポリポタンパク質 E のノックアウト細胞でも感染性粒子産性は強く阻害されていることから、脂肪代謝機構が、ウイルス粒子の構築ばかりではなく、感染性粒子の産生にも深く関与していることが示唆された。

## E. 結論

HCV の複製および感染細胞の増殖を制御する non coding RNA の解析を容易にし、かつ、検証実験をする系として新たな培養細胞を樹立し、複製効率を高める培養方法を確立した。今後 HCV 複製を制御する non coding RNA の研究および HCV により変化する細胞側要因の解析に有用である。脂肪輸送に働く宿主因子が感染性粒子産生に重要な働きをすることを見出した。これらの宿主因子を制御する non coding RNA の解析は重要である。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K., The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9(9):1089-9710, 2007
2. Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K., Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J Biol Chem.* 282(45): 32765-32772, 2007
3. Watashi K, Shimotohno K., Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol.* 17: 245-252, 2007
4. El-Farrash MA, Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Egawa H, Shimotohno K., In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin. *Microbiol Immunol.* 2007;51(1):127-133, 2007
5. Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K., Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 46(1):26-36, 2007.
6. Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Sakamoto T, Araki H, Shimotohno K., Helper virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome. *Biochem Biophys Res Commun.* 352(1):170-176, 2007
7. Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T. *Bioorg Med Chem Lett.* 18(16):4638-4641, 2008.
8. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M. 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem Biophys Res Commun.* 379(2):330-334, 2009.

## H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 別紙2

## 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
田嶋敦、井ノ上逸朗	網羅的 SNP 解析による疾患感受性遺伝子の同定		分子消化器病	先端医学社	東京	2008	24-28
村上善基、安田剛	マイクロアレイを用いた miRNA の大規模発現解析	稲田利文、塩見春彦	RNA 実験ノート	羊土社	東京	2008	71-76
村上善基	マイクロアレイを用いた miRNA の大規模発現解析	中釜斉	細胞	ニューサイエンス社	東京	2010	6月号

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, Suzuki Y, Aoki T, <u>Murakami Y</u> , Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M.	Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development.	Pathol Int.		In press	2010
Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, <u>Murakami Y</u> , Kuroda M, Miyajima A, Kato	MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma.	Biomarkers.	14	529-38	2009

T, Ochiya T.					
Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K.	Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a(*)	<i>J Hepatology</i>	50	453-460	2009
Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M.	3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	379	330-334	2009
Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H.	Heat-shock Protein 90 Is Essential for Stabilization of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS3.	<i>J biol chem.</i>	284	6841-6846	2009
Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K.	Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor.	<i>Cancer Sci.</i>	100	1943-1950	2009
Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T.	Synthesis and evaluation of 5'-modified 2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis C virus agents.	<i>Bioorg Med Chem Lett.</i>	18	4638-4641	2008
Uno Y, Suzuki Y, Wakaguri H, Sakamoto Y, Sano H, Osada N, Hashimoto K, Sugano S, Inoue I.	Analysis of expressed sequence tags from liver in cynomolgus monkey ( <i>Macaca fascicularis</i> ): A systematic identification of drug-metabolizing enzyme genes.	<i>FEBS Lett</i>	582	351-358	2008
Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tamura R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I.	Large-scale analysis of <i>Macaca fascicularis</i> transcripts and inference of genetic divergence between <i>M. fascicularis</i> and <i>M. mulatta</i> .	<i>BMC Genomics</i>	9	90	2008
Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, and Murakami Y.	Impact of Hepatitis B Virus (HBV) X Gene Integration in Liver Tissue on Hepatocellular	<i>J hepatology</i>	48	43-50	2008

	Carcinoma Development in Serologically HBV-Negative Chronic Hepatitis C Patients.				
Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, and Inoue I.	Integration of Hepatitis B Virus DNA into the Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia ( <i>MLL4</i> ) Gene and Rearrangements of <i>MLL4</i> in Human Hepatocellular Carcinoma.	<i>Human mutation</i>	29	703-708	2008
Noguchi T, Otsubaki T, Ando I, Ogura N, Ikeda S, Shimotohno K.	Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome.	<i>Virology.</i>	375	424-432	2008
Isono O, Ohshima T, Saeki Y, Matsumoto J, Hijikata M, Tanaka K, Shimotohno K.	Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination.	<i>J Biol Chem.</i>	283	34273-34282	2008
Sekigawa T, Tajima A, Hasegawa T, Hasegawa Y, Inoue H, Sano Y, Matsune S, Kurono Y, Inoue I.	Gene-expression profiles in human nasal polyp tissues and identification of genetic susceptibility in aspirin intolerant asthma.	<i>Clin Exp Allergy</i>	39	972-981	2009
Kang E-H, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Tomoyasu Y, Watanabe M, Yamaguchi M, Park S-B, Maki K, Inoue I.	Association of the growth hormone receptor gene polymorphisms with mandibular height in a Korean population.	<i>Arch Oral Biol</i>	54	556-562	2009
Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Inoue I, Maki K.	Further evidence for an association between mandibular height and the growth hormone receptor genes in a Japanese population.	<i>Am J Orthod Dentofacial Orthop</i>	136	536-541	2009
Koike A, Nishida N, Inoue I, Tsuji S, Tokunaga K.	Genome-wide association database developed in the Japanese Integrated Database Project.	<i>J Hum Genet</i>	54	543-546	2009

Ruigrok YM, Rinkel GJ, Wijmenga C, Kasuya H, Tajima A, Takahashi T, Hata A, Inoue I, Krischek B.	Association analysis of genes involved in the maintenance of the integrity of the extracellular matrix with intracranial aneurysms in a Japanese cohort.	<i>Cerebrovasc Dis</i>	28	131-134	2009
Brookes AJ, Lehvaslaiho H, Muilu J, Shigemoto Y, Oroguchi T, Tomiki T, Mukaiyama A, Konagaya A, Kojima T, Inoue I, Kuroda M, Mizushima H, Thorisson GA, Dash D, Rajeevan H, Darlison MW, Woon M, Fredman D, Smith AV, Senger M, Naito K, Sugawara H.	The phenotype and genotype experiment object model (PaGE-OM): a robust data structure for information related to DNA variation.	<i>Hum Mutat</i>	30	968-977	2009
Nakaoka H, Inoue I.	Meta-analysis of genetic association studies: methodologies, between-study heterogeneity and winner's curse.	<i>J Hum Genet</i>	54	615-623	2009
Yoshihara K, Tajima A, Komata D, Yamamoto T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K, Fujiwara H, Kudo Y, Inoue I, Tanaka K.	Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers distinguishes novel subclasses and implicates <i>ZEB2</i> in tumor progression and prognosis.	<i>Cancer Sci</i>	100	1421-1428	2009
Yoshihara K, Tajima A, Yahata T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K, Fujiwara H, Kudo Y, Kotera K,	Gene expression profile for predicting survival in advanced-stage serous ovarian cancer across two independent databases.	<i>PLoS ONE</i>	5	e9615	2010



Masuzaki H, Tashiro H, Katabuchi H, Inoue I, Tanaka K.					
Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K	The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production	Nat Cell Biol	9 17	1089-9710 245-250	2007 2007
Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K.	Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B	J. Biol. Chem.	282	32765-32769	2007
Watashi K, Shimotohno K.	Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy	Rev Med Virol.	17	245-250	2007
Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K	Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes	J Hepatol	46	26-36	2008
Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Sakamoto T, Araki H, Shimotohno K.	Helper virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome	Biochem Biophys Res Commun.	352	170-176	2007
Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Shimotohno KW, Suzuki T, Shimizu Y, Tobata R, Hijikata M, Takaku H, Shimotohno K	Genetic Analysis of Hepatitis C Virus with Defective Genome and Its Infectivity in Vitro	Journal of Virology	83	6922-6928	2009
El-Farrash MA, Aly HH, Watashi K,	In vitro infection of immortalized primary	Microbiol Immunol	51	127-133	2007

Hijkata M, Egawa H, Shimotohno K.	hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin				
-----------------------------------	---	--	--	--	--

## 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<sup>1)~4)</sup>。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

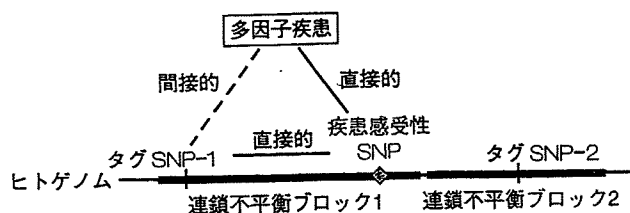
いての深い理解が必要である。SNP と遺伝子発現量多型とのかかわりについての最近の知見を紹介するとともに、疾患感受性遺伝子の同定において、遺伝子発現量あるいは発現ネットワークを対象とした研究の重要性について議論したい。

## 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<sup>56)</sup>。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関の程度に関する詳細な地図であり、連関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 つ以上の変異が連関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成果として、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



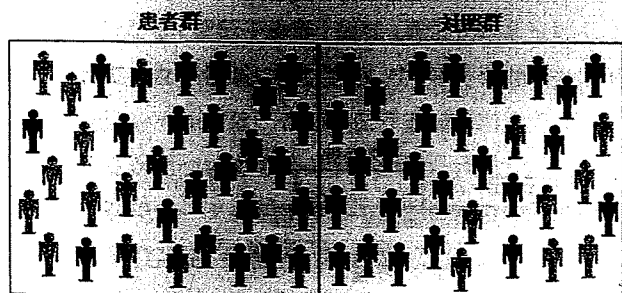
図① タグ SNP タイピングによる効率的な疾患感受性 SNP 同定  
連鎖不平衡ブロックを代表するタグ SNP と疾患発症とのかかわりを統計遺伝学的に検索することにより、感受性 SNP が存在する領域の絞り込みを効率よくおこなうことができる。

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



	患者群	対照群
A アレル	23	14
B アレル	11	20

$P=0.028(\chi^2$ 検定)  
 オッズ比3.0(95%信頼区間1.1~8.0)

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<sup>78)</sup>、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 $\chi^2$ 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(2006)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<sup>14-16)</sup>。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

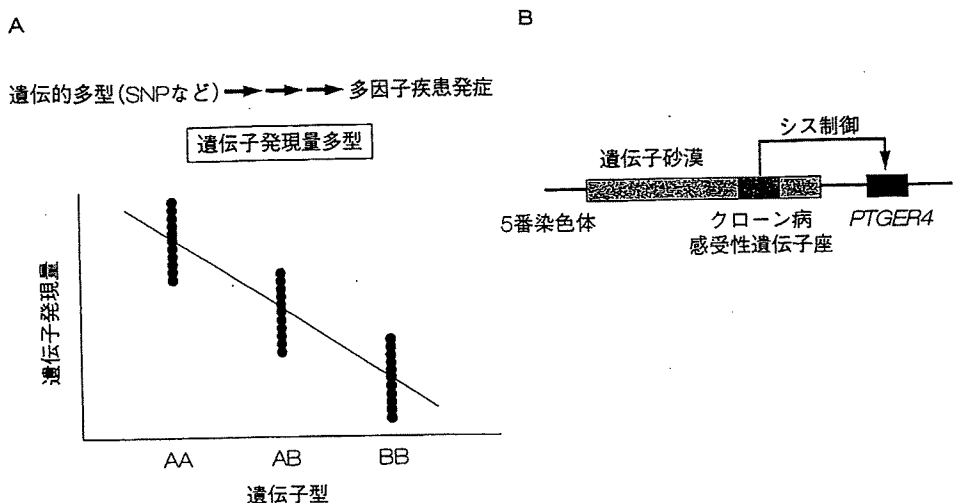


図3 中間表現型としての遺伝子発現量多型と SNP 遺伝子型との相関関係 (A) と遺伝子砂漠内に同定されたクローン病感受性遺伝子座による PTGER4 遺伝子発現のシス制御 (B)  
 A: 遺伝子発現量の個人差と SNP 遺伝子型との相関についての模式図  
 B: 遺伝子砂漠内に存在するクローン病感受性遺伝子座 (5 p 13.1) が、270 Kb 離れたところに位置する PTGER4 遺伝子の発現量をアレル特異的に制御する (Libioule S et al 2007<sup>9)</sup>を元に作図)

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 からも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<sup>9,10)</sup>。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<sup>9,10)</sup>、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。

Libioule ら<sup>9)</sup>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「遺伝子発現領域」(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3B)。

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。

# 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型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。

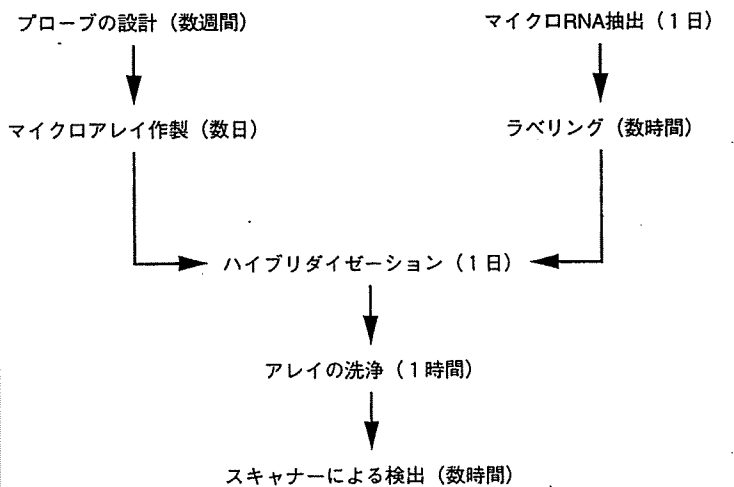


図1 マイクロアレイ解析の概略

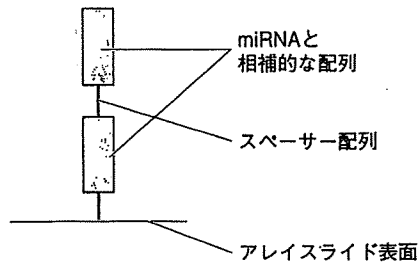


図2 プローブの設計

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が上がり、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 (東洋鋼板)
- ・ GeneSlide (東洋鋼板)
- ・ 0.1 × SSC

## プロトコール

④ 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 μM に調製する。  
↓
- ② 2×に調製した Spotting Solution 10 μL と ① で 50 μM 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<sup>Ⓐ</sup>。  
↓
- ③ スポッターを用いて GeneSlide にスポットティングを行う。  
↓
- ④ スポットティングが終わったら、少量の超純水を入れた<sup>Ⓑ</sup>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

## 生検体

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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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 $4^{\circ}\text{C}$ 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。 $-20^{\circ}\text{C}$ 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

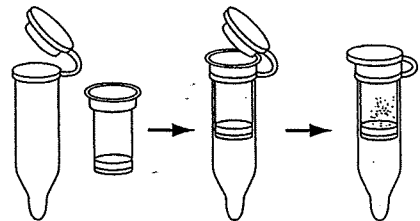


70分（電気泳動を除く）

- ① Nuclease freeのチューブにRNase laterを300～500  $\mu\text{L}$ 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<sup>⑩</sup>。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 $4^{\circ}\text{C}$ で冷やしておいたcell  
disruption buffer（キット）を30  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 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ティングでよく混和する。  
↓
- ⑤ 2× Denaturing Solution.（キット）を同じ量（上記の量であれば200  $\mu\text{L}$ ）  
入れ、ボルテックスで混和し、氷上で5分間おく。  
↓
- ⑥ 400  $\mu\text{L}$ 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 $4^{\circ}\text{C}$ 、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<sup>⑩</sup>。  
↓
- ⑩  $10,000 \times g$ 以上で $4^{\circ}\text{C}$ 、1分間遠心し、フィルターを700  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ の Nuclease Free water をフィルターに入れ、 $10,000 \times g$ 以上で、  
 $4^{\circ}\text{C}$ 、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](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。





と目録と目的を確認を行う。A260/280の値が1.8~2.0が望ましい、臨床検体の場合は1.6~1.8のこともあったが、最終的な測定に問題がなかった。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<sup>†注</sup>

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<sup>ⓐ</sup>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。



ⓐ 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。

- ⑤ 4℃設定の遠心機で10,000×g, 15分間遠心する。  
↓
- ⑥ 上清を除き, 70%エタノールでペレットを洗う。  
↓
- ⑦ 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。  
↓
- ⑧ 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。  
↓
- ⑨ 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。  
↓
- ⑩ 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。  
↓
- ⑪ 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日

- 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。  
↓