

可能な凍結保存法も開発せねばならない。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文 (3)

Iwamori M, Shibagaki T, Nakata Y, Adachi S, Nomura T. Distribution of receptor glycolipids for Lactobacilli in murine digestive tract and production of antibodies cross-reactive with them by immunization of rabbits with Lactobacilli. J Biochem. 146(2):185-91, 2009.

M. Kodaira, H. Ryo, N. Kamada, K. Furukawa, N. Takahashi, H. Nakajima, T. Nomura and N. Nakamura No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. Radiat. Res. 173, 205-213, 2010.

Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rie Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, Taisei Nomura Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice. Mutat Res., 696,107-113 2010

和文 (1)

野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価 (2009 年度ワーキンググループ活動報告)。Space Utiliz Res. 26: 249-251, 2010.

2. 学会発表

英文 (3) (国際会議の招聘講演)

Taisei Nomura. Dietary Modulation to Prevent Cancer and Malformation in Mice. In: Dietary Modulation of Xenobiotics Transport and Metabolism. 3rd Asian Pacific Regional Meeting of The

International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), Bangkok, Thailand, May 10-12, 2009.

Taisei Nomura. Transgenerational health concerns from radiation in mice and humans. In: The 15th Alexander Hollaender Course; Genome-Environment Interactions and Genetic Toxicology, September 23 - 26/27, 2009, Astana, Kazakhstan.

Taisei Nomura. Differential Sensitivity of Mice and Human Tissues to Radiation Sources. In: HIBMC/PMRC Joint Meeting, Tatsuno, Hyogo, Dec. 15, 2009,.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

IV 班會議資料等

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服事業
(H21-難病-一般-166)

「難治性疾患克服のための難病研究 資源バンク開発研究」

平成 21 年度第一回班会議



平成 22 年 2 月 26 日 (金)
新大阪丸ビル新館
大阪市東淀川区

主任研究者：亀岡 洋祐 (独立行政法人医薬基盤研究所)

第1回「難治性疾患克服のための難病研究資源バンク開発研究」

第1回 班会議プログラム

2010年2月26日（金）

13:30～17:00

会場：新大阪丸ビル新館 600号室

2010年2月26日（金）

大阪府立総合医療センター

13:30-13:40

開催にあたって

亀岡洋祐（独立行政法人医薬基盤研究所 遺伝子資源研究室）

13:40-15:10

1-1 疾患関連細胞の品質評価ならびにキャラクタライズ研究

小原 有弘（独立行政法人医薬基盤研究所 細胞資源研究室）

1-2 ヒト疾患関連組織の長期継代維持と保存法研究

野村 大成（独立行政法人 医薬基盤研究所 疾患モデル動物研究プロジェクト）

1-3 疾患関連 iPS 細胞の作製

梅澤 明弘（国立成育医療センター研究所 生殖・細胞医療研究部）

15:10-15:30 休憩

15:30-17:00

2-1 アカデミア主導の新規医療開発における患者保護の重要性と基盤整備

横出 正之（京都大学医学部附属病院 探索医療センター探索医療臨床部）

2-2 難病バンクの研究倫理面での検討

増井 徹（独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部）

2-3 今年度事業の総括と報告

亀岡 洋祐（独立行政法人医薬基盤研究所 遺伝子資源研究室）

17:00-17:20

まとめ

疾患関連細胞の品質評価ならびにキャラクタライズ研究

小原 有弘

(独) 医薬基盤研究所 細胞資源研究室

本研究の目的は「難治性疾患対策研究、生体試料等の収集に関する研究」により収集された患者試料のうち、培養細胞資源に関してその品質評価・品質管理を行うとともに、細胞キャラクタライズ情報の付加を行う。

(独) 医薬基盤研究所・細胞資源研究室は国内初の公的細胞バンクとして事業を開始し、厚生労働省の細胞バンクとして創薬研究・疾患研究に供するヒト細胞資源の収集、品質管理、保管、供給を行ってきた。中でも細胞の品質管理に重点を置き、細胞のマイコプラズマ・ウイルス汚染、細胞のクロスコンタミネーションの問題に取り組んで来た。マイコプラズマ汚染の問題に関しては研究者が使用している細胞の汚染について全国調査を実施し、約3000検体を解析し、その26%が汚染していることを報告した。また、クロスコンタミネーションに関しては、細胞バンクに寄託される細胞の8%に汚染が検出されることを明らかにした。このように培養細胞を用いた研究の信頼性・クオリティー低下は非常に大きな問題となっており、国際的にも高い注目を集めている。最近では細胞使用研究における細胞品質情報を論文投稿時に提出させる投稿規程の厳格化が多くの雑誌に広まっており、正しく高品質な細胞の研究利用を意識しなければいけない状況になっている。

本研究班においては、研究者のニーズに適した細胞品質評価ならびにキャラクタライズ情報付加を検討しており、難病研究資源バンクにおいて必要な品質管理項目、キャラクタライズ項目について討論させて頂きたい。

ヒト疾患関連組織の長期継代維持と保存法研究

野村大成

(独) 医薬基盤研究所 疾患モデル動物研究プロジェクト

本研究は、難治性疾患対策のため収集された患者試料を、DNA, RNAレベルでなく、その形態、機能を生かしたままの保存法の確立、さらに、Super-SCIDマウスに継代維持を可能にすることにより、難治性疾患組織の形態・機能の長期維持をはかり、難病組織の生理機能の研究、治療研究、創薬研究を可能にする基盤を確立するのを目的とする。

ヒト悪性腫瘍の60%弱はヌードマウスおよび従来のSCIDマウスに生着、増殖することはよく知られているが、良性腫瘍や正常ヒト組織は、1-2週間で拒絶、あるいは線維化・軟骨化してしまう。1986年、Bosma から導入したC.B17-scid原種は、80%前後がLeakyで正常T細胞、B細胞が出現し、約半数が8ヵ月以内に白血病死したが、C.B17-scid/scidマウスのうち、IgM, IgGが検出限界以下のものを20代以上選択的兄妹交配することにより、Leaky、白血病死を激減させた。これにより、初めてヌードマウス等に生着したことのないヒト悪性腫瘍が急激に増殖し、自然遠隔転移すること、ヒト良性腫瘍もゆっくり増殖すること、最終的には、ヒト脳組織を除くヒト正常臓器・組織、前がん組織の長期間（～3年）の継代維持に成功した（1977年以後Super-SCIDと呼ばれる）。皮膚、甲状腺等正常組織の移植後の病理組織像はよく維持されている。また、ホルモン分泌能など機能もよく維持されていた。移植した正常ヒト皮膚に太陽紫外線類似光（UVB）を2年間照射することにより、世界で初めて、人工的にヒトがんを誘発するのに成功した。

本研究では、20年間移植・継代維持してきたヒト正常・疾患臓器・組織の解析と整理を行い、22年度以降は、未調査のヒト疾患組織の継代維持と形態・機能を生かしたままの保存を計る。難病研究バンク開発研究における総括的ヒト難治性疾患組織維持システムの基盤研究を行うことにより難病の基礎研究、治療研究、創薬研究に結びつける。

難治性疾患克服のための難病研究資源バンク開発研究

疾患関連 iPS 細胞の作製

梅澤明弘

国立成育医療センター研究所生殖・細胞医療研究部

本研究の目的は「難治性疾患対策研究、生体試料等の収集に関する研究」により収集された患者試料を集中化して品質管理を行う「難病研究資源バンク」を創設し、統合的管理・支援体制を整備して、品質管理された試料を公平に基礎研究機関に提供し、難治性疾患克服研究のより一層の効率の推進を図ることにある。頻度の低い難治性疾患については、患者試料等が集中化されなければ、多数の症例試料を必要とする疾患克服研究の実現は困難であり、患者数の多い疾患についても、個々の臨床機関の負担増や品質の不均一、相互利用の不便さ等により、基礎研究への活用が進まないことが考えられる。本研究では、医薬基盤研究所に寄託されている患者に由来する細胞を用いてiPS細胞化を行い、難病資源バンクに寄託し、研究者への分譲を可能にする。本研究における倫理面の配慮、権利関係の問題について研究グループ内で討議し、ご指導を賜りたい。

アカデミア主導の新規医療開発における

患者保護の重要性と基盤整備

横出正之

京都大学医学部附属病院探索医療センター探索医療臨床部

ポストゲノム時代を迎えて、医学研究は基盤研究段階から臨床応用への展開にむけて大きく変化をとげつつある。しかしながらこのような探索型医療を臨床現場で実施するためには、基礎研究の単なる延長ではありえず、被験者である患者の権利や安全を十分に配慮した包括的な医療システムが求められる。このような見地から京都大学医学部附属病院では生命科学研究所を臨床医学へ展開するトランスレーショナルリサーチを実践する部門として探索医療センターを平成13年4月に設置した。センター内には知財管理、薬事、進捗管理を担当する開発部、臨床試験の品質管理、データマネジメント、モニタリングを担当する検証部、診療科との連携支援、患者保護ならびにケア、補償、医療倫理の実践をおこなう臨床部の3部門が配置されている。設置当初より、センターでは治験以外の臨床試験に対しても可能な限りGCPに準じた体制でおこなう目標を立てていたが、その後平成15年の薬事法改正に伴い医師主導治験への道が開かれたのにつづき、新規医療開発にむけた先進医療ならびに高度医療評価制度が国の制度として設けられた。このようにわが国の臨床研究を取り巻く環境が大きく変化するなか、探索医療センターは準ナショナルセンターとして全国の研究者をプロジェクトリーダーとして招へいし、国内外未承認薬を用いた2件の治験をすでに終了するなど、わが国でいち早く医師主導治験・臨床試験支援体制の整備を進めてきた。この成果は橋渡し研究支援推進プログラムやスーパー特区における採択課題の支援へとつながり、さらなる発展を計画中である。トランスレーショナルリサーチはその先進性ゆえに通常医療よりもさらに高度の安全性、倫理的妥当性、診療情報の科学的検証が不可欠で、被験者となる患者の安全は何よりも重視されねばならず、このような観点も含め入れ、探索医療センターではGCPに準拠した手順書（SOP）の作成を完了している。

研究組織では試料提供者の権利保護や研究利用の倫理問題、研究者、臨床医の権利など重要課題となると考えられるが、今年度は探索医療センターにおける実績、とくにこれらの課題に関連する諸点について討論したい。

難病バンクの研究倫理面での検討

独立行政法人 医薬基盤研究所

増井徹

難病研究資源バンクの活動を考えるときに、多くの難病患者の存在がある。患者との関係は現在の政治・社会状況を考えると特有の課題をもつ。日本という国が、厚生行政の公正を保ちにくくなった現在、難病の研究を支える理性的な判断を社会に依存できるかについて不安がある。Eric Feldmanはその血友病患者の AIDS 感染問題の論文の中で、その事例なかでの患者や社会への政治的判断が示した「日本の対応」を、「社会が担うべき公正な判断」の死の事例として、取り上げ、警告している。私たちは、難病バンクの仕事を始めるにあたり、この不安定な現状を認識する必要がある。

公共性のある難病研究資源バンクの設立を目指している我々にとって、以下の問題がある。それらについて、簡単な解説を加える。

1. 「難病を社会的問題としてとらえる」ということを、どのように研究倫理審査に反映させるか？
この問題については 2 つの選択肢がある。患者団体の協力を得ることと、市民に開かれているという姿勢を貫くこと、である。前者の可能性を探る場合に、どの患者団体という問題が大きな障壁となる。我々は、市民の代表を 3 人(女性 2 名、男性 1 名)の参加を、研究倫理審査委員会に求めることで、この問題の解決を図った。
2. 難病バンクが 3 機関(医薬基盤研究所、理化学研究所、熊本大学)の共同事業となった中で、透明性と信頼を得るためにできることは何か？運営を設計する段階で、検体の利用方針を決めるところから始めることにより、問題の解決を試みた。
3. 2 の問題には 2 つの側面がある。ひとつは 3 者の利害相反の問題の解決。2 つ目は社会的側面からの透明性と信頼である。3 者の利益相反については、我々が意識的に負担を担うことにより、難病バンク全体への安定性を上げる構造を作った。それは、試料等の受け入れについて、医薬基盤研究所を通じる一元化を行うことによって、試料等の流通についての透明性と信頼を得ることを意味する。また、社会的側面としては、パンフレットの作成を行ったり、ゲノム研究に対するパンフレットの改訂、増刷を行う準備を進めている。このような側面からの補強なしには、多くの問題が解決をしないのが状態である。
4. また、これらの視点にたつて、インフォームド・コンセントを作成し、それをひな形として収集研究班へ配布する用意を進めている。

これらの方策は、平成 19 年度から私が進めているメディカルバイオリソースプロジェクトの成果を生かした対応である。

皆様のご意見、ご批判をお願いする。

難病研究資源バンク開発研究事業

平成 21 年度の事業の総括

亀岡洋祐

(独) 医薬基盤研究所 遺伝子資源研究室

本研究事業の目的は「難治性疾患対策研究、生体試料等の収集に関する研究」により収集された患者試料を集中化して品質管理を行う「難病研究資源バンク」を創設し、統合的管理・支援体制を整備して、品質管理された試料を公平に基礎研究機関に提供し、難治性疾患克服研究のより一層の効率的推進を図ることにある。平成21年6月末に事業申請の承認を受け、8ヶ月が経過しようとしている。研究計画に盛り込まれた当初予定では、疾患患者資料の収集が直ちに開始されることを想定していたが、収集研究班へのアンケート調査、また昨年9月に行われた事業説明会で各収集研究班の担当者との直接の話し合い、および直接、収集研究班担当者への訪問調査討議などを行い、患者試料収集に係る単純ではない問題点が明確となった。

一つには言うまでもなく医学研究における倫理問題の取り扱いである、各収集研究班の主任者が所属する臨床機関における倫理審査委員会への申請承認の手続きのみならず、収集研究班においては10を超える複数の臨床機関が収集研究班に参加しており、個々の臨床機関において医学研究倫理申請の手続きが必要となり、またその書式や倫理審査委員会のポリシーも統一的不是である。収集研究班の目的試料の種類も異なっており、個々の収集研究班に対して倫理申請上の必要事項など個別の対応を取らざるを得ないのが現状である。

もう一つの問題は、収集研究班といえども難治性疾患克服班研究の流れの中にあり、個々の研究班における研究利用とそれにより期待される班研究の成果を守らなければならない現実がある。また、収集研究班主任者から、必ずしも基盤研の難病資源バンクに患者試料を集中させることが最良法ではないとの指摘があり、またいくつかの収集研究班では独自に対象疾患患者試料のバンク化を図っているところもある。このバンク化は試料収集が中心であり、必ずしも試料利用の推進というスタンスにはなっていないのが現状である。

本年度事業としては、患者試料収集の具体的な見通しを立てることを目的として各収集研究班へのアンケート調査を行った。また、基盤研究所内部での難病研究資源バンク専属の医学研究倫理審査委員会の組織化のため基盤研医学研究倫理委員会の承認を受け、設立することができた。システム整備に関しては、患者試料を処理・検査・保管管理のための施設・機器の整備を行うとともに、コード管理システムの構築を行った。

事業初年度の活動の中で得られた難病研究資源バンク開発の問題点と現状と展望について討議する。

V 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Osada N, Hirata M, Tanuma R, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Kameoka Y, Hashimoto K, Takahashi I.	Collection of Macaca fascicularis cDNAs derived from bone marrow, kidney, liver, pancreas, spleen, and thymus.	BMC Res Notes.	29	2:199	2009 Sep
Miura NN, Komai M, Adachi Y, Osada N, Kameoka Y, Suzuki K, Ohno N.	IL-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice as assessed by comparison with Bruton's tyrosine kinase-deficient CBA/N mice.	J Immunol.	183(5)	3417-24	2009 Sep
Higashino A, Osada N, Suto Y, Hirata M, Kameoka Y, Takahashi I, Terao K.	Development of an integrative database with 499 novel microsatellite markers for Macaca fascicularis.	BMC Genet.	5	10:24	2009 Jun
Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T.	Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells.	Genes Cells	14(12)	1395-1404	2009
Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A.	Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS.	Exp Cell Res	315(16)	2727-2740	2009
Sumi E, Murayama T, Yokode M.	A survey of attitudes toward clinical research among physicians at Kyoto University Hospital.	BMC Medical Education	9(75)		2009

Shimada K, Murayama T, Yokode M, Kita T, Uzui H, Ueda T, Lee JD, Kishimoto C.	N-acetylcysteine reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by reducing superoxide production.	Circulation Journal	73(7)	1337-1341	2009
Sugimoto M,Arai H, Tamura Y,Murayama T,Khaengkhan P,NishioT,Ono K,Ariyasu H,Akamizu T,Ueda Y, Kita T, Harada S, Kamei K,Yokode M.	Mulberry leaf ameliorates the expression profile of adipocytokines by inhibiting oxidative stress in white adipose tissue in db/db mice.	Atherosclerosis	204(2)	388-394	2009
The International Cancer Genome Consortium	International network of cancer genome projects	Nature			2010 In Press
増井徹	バイオバンクの現状 と将来	日本臨床			2010 印刷中
Iwamori M,Shibagaki T,Nakata Y, Adachi S,omura T.	Distribution of receptor glycolipids for Lactobacilli in murine digestive tract and production of antibodies cross- reactive with them by immunization of rabbits with Lactobacilli.	J. Biochem.	146 (2)	185-191	2009
M. Kodaira, H. Ryo, N.Kamada, K. Furukawa, N. Takahashi, H. Nakajima, T. Nomura, N.Nakamura	No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors.	Radiat. Res.	173	205-213	2010
S. Adachi, Haruko Ryo, T. Hongyo, H. Nakajima, R. Tsuboi-Kikuya, Y.Tokita, F. Matsuzuka, K. Hiramatsu, K. Fujikawa, T. Itoh,T. Nomura	Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice.	Mutat. Res.	696	107-113	2010

野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介	宇宙環境の人体影響評価 (2009年度ワーキンググループ活動報告)	Space UtilizRes.	26	249-251	2010

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
増井徹	バイオバンク	玉井真理子、大谷いづみ	生命倫理	有斐閣	東京	2010 印刷中	

VI 研究成果の刊行物・別冊

Data Note

Open Access

Collection of *Macaca fascicularis* cDNAs derived from bone marrow, kidney, liver, pancreas, spleen, and thymus

Naoki Osada*¹, Makoto Hirata¹, Reiko Tanuma¹, Yutaka Suzuki², Sumio Sugano², Keiji Terao³, Jun Kusuda¹, Yosuke Kameoka¹, Katsuyuki Hashimoto¹ and Ichiro Takahashi¹

Address: ¹Department of Biomedical Resources, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan, ²Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8561, Japan and ³Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, 1 Hachimandai, Tsukuba 305-0843, Japan

Email: Naoki Osada* - nosada@nibio.go.jp; Makoto Hirata - mhirata@nibio.go.jp; Reiko Tanuma - tanumark@nibio.go.jp; Yutaka Suzuki - ysuzuki@hgc.jp; Sumio Sugano - ssugano@ims.u-tokyo.ac.jp; Keiji Terao - terao@nibio.go.jp; Jun Kusuda - jkusuda@nibio.go.jp; Yosuke Kameoka - ykameoka@nibio.go.jp; Katsuyuki Hashimoto - khashi@nih.go.jp; Ichiro Takahashi - ichiro-t@nibio.go.jp

* Corresponding author

Published: 29 September 2009

Received: 15 May 2009

BMC Research Notes 2009, 2:199 doi:10.1186/1756-0500-2-199

Accepted: 29 September 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/2/199>

© 2009 Osada et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Consolidating transcriptome data of non-human primates is essential to annotate primate genome sequences, and will facilitate research using non-human primates in the genomic era. *Macaca fascicularis* is a macaque monkey that is commonly used for biomedical and ecological research.

Findings: We constructed cDNA libraries of *Macaca fascicularis*, derived from tissues obtained from bone marrow, liver, pancreas, spleen, and thymus of a young male, and kidney of a young female. In total, 5'-end sequences of 56,856 clones were determined. Including the previously established cDNA libraries from brain and testis, we have isolated 112,587 cDNAs of *Macaca fascicularis*, which correspond to 56% of the curated human reference genes.

Conclusion: These sequences were deposited in the public sequence database as well as in-house macaque genome database <http://genebank.nibio.go.jp/qfbase/>. These data will become valuable resources for identifying functional parts of the genome of macaque monkeys in future studies.

Findings

Macaca fascicularis (cynomolgus, crab-eating, or long-tail macaque) is one of the most popular primate species used in biomedical research, and is closely related to *Macaca mulatta* (rhesus macaque). The draft sequence of the *Macaca mulatta* genome, which has an evolutionary important position, was published in 2007 [1].

Transcriptome data broadens the application of genome sequences. Compared with several millions of human transcript sequences, macaque transcriptome data has only been analyzed in a limited numbers of studies [2-6]. A complete list of macaque genes will be beneficial for performing genetic studies using macaques in the future. We aim to elucidate all the macaque transcripts that cor-

respond to human genes, which have been widely accepted as reference sequences, such as the RefSeq sequences [7].

We have published expressed sequence tag (EST) and full-length sequences, which were obtained from cDNA libraries of brain and testis of *Macaca fascicularis*, using a variety of research subjects [5,8-13]. Here, we present 5'-EST sequences from six other tissues of *Macaca fascicularis*. Bone marrow, liver, pancreas, spleen, and thymus from a 4-year-old male Malaysian *Macaca fascicularis*, and kidney from a 3-year-old female Philippine *Macaca fascicularis* were harvested. These animals are bred and reared in the Tsukuba Primate Research Center (TPRC), National Institute of Biomedical Innovation (Ibaraki, Japan). The tissues were harvested in the P2 facility in TPRC, in accordance with the guidelines of the Laboratory Biosafety Manual, World Health Organization. The libraries for kidney (QreA and QreB) and liver (QlvC) were constructed using the vector-capping method [14], and those for bone marrow (QbmaA), pancreas (QpaA), spleen (QspaA), and thymus (QthaA) were constructed using the oligo-capping method [15]. The sequences of 5'-EST were determined by Sanger sequencing using an ABI 3730 sequencer, and all vector sequences were filtered out [5]. Nucleotide calls with a quality value (QV) of less than 15 were masked as ambiguous. After the masking, the sequences were trimmed, such that they did not contain more than four ambiguous nucleotides in a 10-bp width window, and sequences shorter than 100 bp after the trimming were filtered out. After the trimming, the average sequence length was 886.9 bp.

In total, we obtained 56,856 EST sequences from the six tissues. The repeat sequences were masked by Repbase Update before the BLAST search [16]. The BLAST search (BLASTN) was performed with a cut-off value (*E*-value) of $1e-60$ against human RefSeq data [7]. Since RefSeq sequences contain partially overlapped isoforms, we constructed non-redundant RefSeq sequences based on the Entrez Gene database [17]. Hereafter, we shall refer to the non-redundant RefSeq sequences as RefSeq genes. There were 23,236 RefSeq genes, including non-coding RNAs in the human genome at the time of investigation (Release 34) [7]. Out of the newly isolated 56,856 cDNA clones, 44,603 matched to 4940 human RefSeq genes. Of the 12,253 non-RefSeq clones, 40 consisted of repeat sequences, and the other 1631 did not show any homology to human transcript sequences in public databases using a lower cutoff value ($1e-15$). Meanwhile, 23,900 EST sequences were homologous to multiple RefSeq genes with the high cutoff value ($1e-60$). The average nucleotide sequence identity between the best BLAST hit pairs was 95.26%. The nucleotide sequence identity was slightly lower than that estimated using full-length cDNA

sequences of high quality [5], and supposed to reflect some sequencing errors in the EST sequences. In some cases, the nucleotide sequence identity between the best and second best hit pairs were very close, which was probably due to gene duplications specific in the human lineage. The difference in nucleotide sequence identities between the best and second best BLAST hits were less than 0.5% in 8996 ESTs. In such cases, the best hit orthologs would not be regarded as unique orthologs of humans and macaques. In Figure 1, we classify the macaque ESTs according to the number of BLAST hits to RefSeq genes. The average nucleotide sequence identities were ordered by the rank of BLAST hits. For example, the nucleotide sequence identity in the second bin represents the identity between the second best hit pairs.

In conjunction with the previously sequenced cDNA clones, we obtained 112,587 EST sequences corresponding to 8262 human RefSeq genes, which correspond to 36% of all human RefSeq genes. When we restricted the analysis of the human RefSeq genes in the manually curated status (Reviewed or Validated status) [7], 56% (6,177/11,080) of the human RefSeq genes were covered by the macaque transcriptome.

As shown in Table 1, the number of RefSeq genes that were represented in the libraries was different in different tissues. In order to measure the unbiased transcript redun-

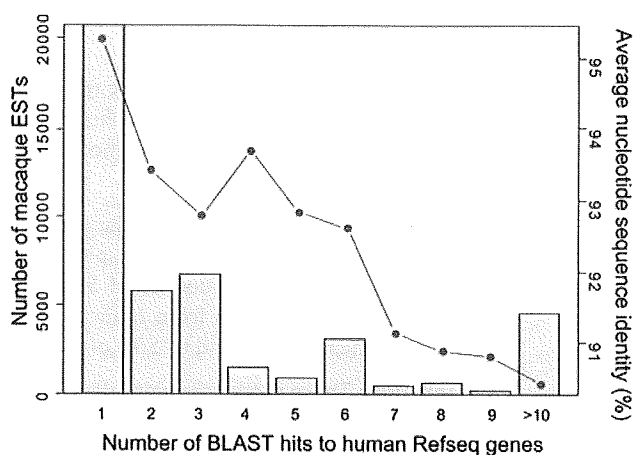


Figure 1
Number of BLAST hits (cutoff: $1e-60$) against the human RefSeq genes. The grey bars represent the number of macaque ESTs matched to the human RefSeq genes. ESTs matched more than nine RefSeq genes were combined into a single bin. The red circles and lines represent the average nucleotide sequence identity between the macaque ESTs and RefSeq genes, ordered by the rank of BLAST hits. For example, the sequence identity in the second bin represents the sequence identity between the second best hits.

Table 1: Summary of *Macaca fascicularis* cDNA libraries

Tissue	Total clones	Covered RefSeq ^d	non-RefSeq ^e	Redundancy ^f
Brain cortex ^{a, c}	28679	4035	10259	2.32
Brain stem ^{b, c}	5758	1591	2050	2.40
Cerebellum ^c	11003	2340	4179	2.32
Testis ^c	8551	1833	3300	2.36
Liver	9188	1360	3853	3.21
Kidney	9558	2495	2630	1.91
Bone marrow	9472	1366	1317	3.26
Spleen	9783	1556	1527	3.15
Thymus	9566	1295	1491	2.96
Pancreas	9289	534	1435	9.83
All	112587	8262	32269	2.14

^aBrain cortex includes parietal lobe (Qnp), temporal lobe (Qtr), occipital lobe (Qor), and frontal lobe (Qfl).

^bBrain stem includes medulla oblongata (Qmo) and the other part of brain stem (Qbs).

^cThese sequences were determined by the previous studies [8-10,12].

^dNumber of human RefSeq genes that have macaque homologs in each library.

^eThe Number of macaque cDNA clones that do not have human RefSeq homologs.

^fEstimated from randomly chosen 1000 macaque transcripts, averaged over 1000 simulations.

dancy in each tissue, we estimated the redundancy of the human RefSeq homologs in 1000 macaque transcripts in each tissue. We randomized the transcript data and selected 1000 transcripts to enumerate the human RefSeq genes covered by the transcripts. The redundancy was given by the number of transcripts (1000) divided by the number of human RefSeq genes covered by the transcripts. This procedure was repeated 1000 times for each tissue, and the average redundancy was estimated. The results are shown in the last column of Table 1. Pancreas showed the highest redundancy; while brain and testis showed low redundancy, indicating that the gene expression complexity in brain and testis is higher than that in the other tissues, as suggested previously [18]. We also found that the kidney library (QreA) had very low redundancy. It was constructed using the vector-capping method, which does not amplify the template cDNA by PCR and may reduce the redundancy of the library [14]. In order to test the effectiveness of the cloning methods, we compared the redundancy of the transcript in our liver library constructed using the vector-capping method, and the previously reported liver library constructed using the oligo-capping method [6]. The redundancy in the vector-capped liver library was 3.21 (Table 1). In contrast, the redundancy in the oligo-capped liver library was 5.19 [6], which was significantly higher than that in the vector-capped library ($P < 0.001$, permutation test).

We have developed an in-house database for the genome data of *Macaca fascicularis* (QFbase: <http://genebank.nibio.go.jp/qfbase/>) [5]. The *Macaca fascicularis* cDNA sequences described in this report were annotated and added to this database. They were also mapped on the rhesus macaque genome sequence using the BLAT program [19]. The results can be viewed in the *Macaca fascic-*

ularis genome browser <http://genebank.nibio.go.jp/cgi-bin/gbrowse/rheMac2/>, which is implemented using GBrowse software [20]. The DDBJ/EMBL/Genbank accession numbers of these sequences are DC629777-DC639249 (bone marrow), DC639249-DC648806 (kidney), DC620589-DC629776 (liver), FS362802-FS372090 (pancreas), DC848487-DC858269 (spleen), and DK575154-DK584719 (thymus).

Availability and requirements

- **Project name:** *Macaca fascicularis* cDNA sequencing project
- **Project home page:** <http://genebank.nibio.go.jp/qfbase/>
- **Operating system(s):** Platform independent
- **Programming language:** PERL
- **Other requirements:** Generic web browser
- **License:** GNU, GPL
- **Any restrictions to use by non-academics:** none

Abbreviations

EST: expressed sequence tag; QV: quality value;

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NO, KT, JK, YK, KH, and IT contributed to the design of the research. NO analyzed the data. NO and KH wrote the

manuscript. MH performed the computational analysis. RT, YK, and IT were involved in the cDNA sequencing. YS and SS constructed the oligo-capped cDNA libraries. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by a Health Science Research grant from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

References

- Gibbs RA, Rogers J, Katze MG, Bumgarner R, Weinstock GM, Mardis ER, Remington KA, Strausberg RL, Venter JC, Wilson RK, et al: **Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome.** *Science* 2007, **316**:222-234.
- Magness CL, Fellin PC, Thomas MJ, Korth MJ, Agy MB, Proll SC, Fitzgibbon M, Scherer CA, Miner DG, Katze MG, Iadonato SP: **Analysis of the Macaca mulatta transcriptome and the sequence divergence between Macaca and human.** *Genome Biol* 2005, **6**:R60.
- Chen WH, Wang XX, Lin W, He XW, Wu ZQ, Lin Y, Hu SN, Wang XN: **Analysis of 10,000 ESTs from lymphocytes of the cynomolgus monkey to improve our understanding of its immune system.** *BMC Genomics* 2006, **7**:82.
- Wallace JC, Korth MJ, Paepfer B, Proll SC, Thomas MJ, Magness CL, Iadonato SP, Nelson C, Katze MG: **High-density rhesus macaque oligonucleotide microarray design using early-stage rhesus genome sequence information and human genome annotations.** *BMC Genomics* 2007, **8**:28.
- Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tanuma R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, et al: **Large-scale analysis of Macaca fascicularis transcripts and inference of genetic divergence between M. fascicularis and M. mulatta.** *BMC Genomics* 2008, **9**:90.
- Uno Y, Suzuki Y, Wakaguri H, Sakamoto Y, Sano H, Osada N, Hashimoto K, Sugano S, Inoue I: **Expressed sequence tags from cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) liver: a systematic identification of drug-metabolizing enzymes.** *FEBS Lett* 2008, **582**:351-358.
- Pruitt KD, Tatusova T, Klimke W, Maglott DR: **NCBI Reference Sequences: current status, policy and new initiatives.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:D32-36.
- Osada N, Hida M, Kusuda J, Tanuma R, Hirata M, Hirai M, Terao K, Suzuki Y, Sugano S, Hashimoto K: **Prediction of unidentified human genes on the basis of sequence similarity to novel cDNAs from cynomolgus monkey brain.** *Genome Biol* 2002, **3**:RESEARCH0006.
- Osada N, Hida M, Kusuda J, Tanuma R, Hirata M, Suto Y, Hirai M, Terao K, Sugano S, Hashimoto K: **Cynomolgus monkey testicular cDNAs for discovery of novel human genes in the human genome sequence.** *BMC Genomics* 2002, **3**:36.
- Osada N, Hida M, Kusuda J, Tanuma R, Iseki K, Hirata M, Suto Y, Hirai M, Terao K, Suzuki Y, et al: **Assignment of 118 novel cDNAs of cynomolgus monkey brain to human chromosomes.** *Gene* 2001, **275**:31-37.
- Osada N, Hirata M, Tanuma R, Kusuda J, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Gojobori T, Shen CK, Wu CI, Hashimoto K: **Substitution rate and structural divergence of 5'UTR evolution: comparative analysis between human and cynomolgus monkey cDNAs.** *Mol Biol Evol* 2005, **22**:1976-1982.
- Osada N, Kusuda J, Hirata M, Tanuma R, Hida M, Sugano S, Hirai M, Hashimoto K: **Search for genes positively selected during primate evolution by 5'-end-sequence screening of cynomolgus monkey cDNAs.** *Genomics* 2002, **79**:657-662.
- Wang HY, Chien HC, Osada N, Hashimoto K, Sugano S, Gojobori T, Chou CK, Tsai SF, Wu CI, Shen CK: **Rate of Evolution in Brain-Expressed Genes in Humans and Other Primates.** *PLoS Biol* 2007, **5**:e13.
- Kato S, Ohtoko K, Ohtake H, Kimura T: **Vector-capping: a simple method for preparing a high-quality full-length cDNA library.** *DNA Res* 2005, **12**:53-62.
- Maruyama K, Sugano S: **Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides.** *Gene* 1994, **138**:171-174.
- Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J: **Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements.** *Cytogenet Genome Res* 2005, **110**:462-467.
- Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T: **Entrez Gene: gene-centered information at NCBI.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:D26-31.
- Chikaraishi DM, Deeb SS, Sueoka N: **Sequence complexity of nuclear RNAs in adult rat tissues.** *Cell* 1978, **13**:111-120.
- Kent WJ: **BLAT--the BLAST-like alignment tool.** *Genome Res* 2002, **12**:656-664.
- Stein LD, Mungall C, Shu S, Caudy M, Mangone M, Day A, Nickerson E, Stajich JE, Harris TW, Arva A, Lewis S: **The generic genome browser: a building block for a model organism system database.** *Genome Res* 2002, **12**:1599-1610.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



The Journal of Immunology

This information is current as of February 23, 2010

IL-10 Is a Negative Regulatory Factor of CAWS-Vasculitis in CBA/J Mice as Assessed by Comparison with Bruton's Tyrosine Kinase-Deficient CBA/N Mice

Noriko N. Miura, Motohiko Komai, Yoshiyuki Adachi, Naoki Osada, Yosuke Kameoka, Kazuo Suzuki and Naohito Ohno

J. Immunol. 2009;183;3417-3424; originally published online Aug 12, 2009;
doi:10.4049/jimmunol.0802484
<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/183/5/3417>

-
- References** This article **cites 34 articles**, 12 of which can be accessed free at: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/183/5/3417#BIBL>
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/>
- Permissions** Submit copyright permission requests at <http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/etoc.shtml>

The Journal of Immunology is published twice each month by The American Association of Immunologists, Inc., 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994. Copyright ©2009 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved. Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.

