

遺伝子発現プロファイルによる神経系分化過程に関わる遺伝子の抽出

●加藤 菊也

大阪府立成人病センター

＜研究の目的と進め方＞

1995年にマイクロアレイ登場後、遺伝子発現の大量解析、即ち、遺伝子発現プロファイル解析がゲノム科学の一分野として脚光を浴びてきた。とくに、マイクロアレイをはじめとする遺伝子発現プロファイル解析では一度の実験で膨大なデータ生産されるために、そのデータを有効活用することにより全く新しい生物学の展開がおこるのではないかと、という期待が高まっていた。例えば、Brown と Botstein は data-driven の新しい科学、これまでの仮説とその検証に基づく科学とは異なる新しい科学の誕生だ、と唱えていた。カラフルなデータ表示方法に幻惑されていた一般の研究者も多かった。

研究代表者らのグループはこのような動きとは独自に遺伝子発現プロファイル解析の方法論について、その有用性と限界について研究を進めてきた。2つの実験対象に絞って研究を進めたが、一つはマウス小脳皮質など神経系の分化過程であり、今ひとつは人がん組織の分子分類である。マウス小脳の発生過程は、転写因子群の制御下多数の遺伝子が一斉に発現量の変化をおこす時系列での遺伝子発現変化の典型例である。そのため、生物学的解析対象の代表として選んだ。人がん組織の分子分類では、遺伝子発現プロファイルデータと臨床データとの関連から、遺伝子発現による新しい癌の分類法の構築をめざす。

この2つの問題は、統計解析の観点で大きく異なる。前者はデータマトリックスは比較的小さい（サンプル数で5から約20まで）のに対し、後者はそれに比べると大きい（サンプル数で最低100）。また、後者はその結果を実地臨床に用いるため厳密な統計解析が必要になる。本特定領域研究では神経系分化過程の研究を行ったが、遺伝子発現プロファイルの特性を理解するためには、癌の分類問題の研究が必須である。癌の研究は特定研究の範囲外であるが、遺伝子発現プロファイル全体を考察するのには重要な問題であるので、後改めて触れる。

マウス小脳皮質は厳密には多種類の神経細胞から構成されているが、概観すれば95%以上の体積を占める顆粒細胞と大型のプルキンエ細胞から構成されているといっている。プルキンエ細胞は出生時既に分裂を終了しており、生後は細胞の大きさが成長するのに対し、顆粒細胞は生後分裂増殖を繰り返す。生後第一週は増殖のピークであり、第二週は顆粒細胞の移動とシナプス形成のピークである。これらの発生過程は第3週で終了するが、電気生理学的には5週で成長が終了する。小脳皮質はRNAのほとんどが顆粒細胞由来であるので、遺伝子発現プロファイルでは顆粒細胞を解析していることになる。

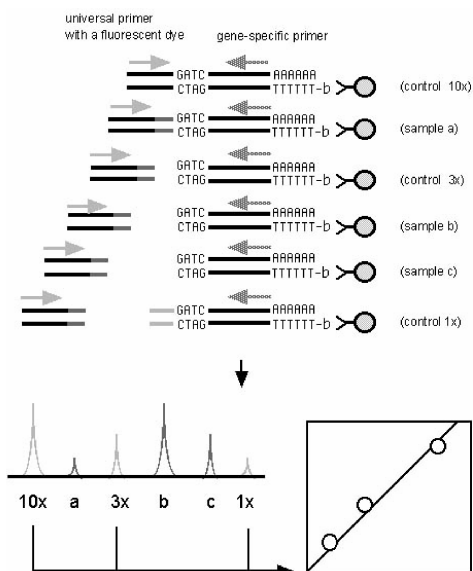
マウス小脳皮質は遺伝子発現を観察する実験系としては適しているが、分子生物学的実験を行うためには、やはり培養細胞系の法が遙かに便利である。そのため、小脳皮質の研究を補填するためにPC12を補完的な実験系として選択した。PC12はラットの副腎髄質の細胞で神経成長因子(nerve growth factor, NGF)等の刺激で神経線維を伸長する。神経細胞の分化モデルとして古典的な実験系

であるため、種はラット、マウスと異なるが、実験系として採用した。

遺伝子発現プロファイル解析技術については、先述のようにこの特定領域研究の期間はマイクロアレイが支配的な技術であった。研究代表者のグループはこれらの動向とは全く独自に定量PCRのハイスループット化に取り組んできた。その結果、アダプター付加競合PCR法(adaptor-tagged competitive PCR, ATAC-PCR)を開発し(5)、すべての遺伝子発現プロファイル解析をこの技術で行った。

ATAC-PCRは競合的定量PCR法の一つである(概略は図1参照)。個々のRNA検体由来のcDNAを制限酵素で切断後、その切断端に長さの異なるアダプターを付加する。これらのcDNAを混合後、アダプタープライマーと遺伝子特異的プライマーでPCR増幅、増幅産物を電気泳動で分離する。アダプターの長さの違いで個々のRNA検体由来の断片を分離することができ、それぞれの断片の量を比較することにより、もとのRNAでの遺伝子の発現量比を推定できる。この方法は、他のPCRで必須であった内部標準と検量線の作成という2つの煩雑なステップを必要とせず、通常のPCR反応で極めて正確な定量ができる。

図1. アダプター付加競合PCR概略



なお、本報告書の内容は下記の5年間の研究成果をまとめたものである。

平成12年度 脳皮質形成過程の遺伝子発現プロファイル解析

平成13年度 小脳皮質変異マウスの発現プロファイル解析

平成14年度 哺乳類培養細胞系を用いた高速機能解析技術の開発と応用

平成15年度 RNA絶対定量法による神経系分化過程の遺伝子発現プロファイル解析

平成16年度 遺伝子発現プロファイルによる神経系分化過程に関わる遺伝子の抽出

〈当初の研究計画〉

1) 平成12年度 脳皮質形成過程の遺伝子発現プロフィール解析

小脳皮質の各層をlaser capture microdissectionで切り出しRNAを精製後ATAC-PCRで約500個の遺伝子の発現量を測定する。また、小脳皮質に構造が類似している海馬歯状回の形成過程の遺伝子発現プロファイル解析を行う。両者の遺伝子発現プロファイルが類似しているか、否かを調べる。

2) 平成13年度 小脳皮質変異マウスの発現プロファイル解析

プルキンエ細胞欠損マウス (pcd及びnervous) の遺伝子発現プロファイル解析。それとともに標準的データ解析法の確立を行う。

3) 平成14年度 哺乳類培養細胞系を用いた機能解析技術の開発と応用

マイクロアレイを使って多数の遺伝子の導入実験を一度で行う技術 reverse transfection を導入する。そして reverse transfection をもちいて、これまでに小脳発生過程の発現プロファイル解析を行ってきた遺伝子約400個の機能解析を行う。

4) 平成15年度 RNA絶対定量法による神経系分化過程の遺伝子発現プロファイル解析

神経細胞の分化、特に神経線維の伸長現象に注目し、アダプター付加競合PCR法 (adaptor-tagged competitive PCR, ATAC-PCR) により遺伝子発現プロファイル解析を行う。ATAC-PCRを改良して、mRNAの絶対量を定量する方法を開発する。この方法を使うことにより、副腎髄質の培養細胞株であるPC12のnerve growth factorによる神経線維伸長現象の発現プロファイル (相対発現量解析) を約1,800個の遺伝子について測定し、そして、その中の一部の遺伝子について発現の絶対量定量解析を行う。

5) 平成16年度 遺伝子発現プロファイルによる神経系分化過程に関わる遺伝子の抽出

PC12細胞の神経突起伸張過程をモデルに使用して、いくつかの誘導刺激に対する分化過程の遺伝子発現プロファイル解析を行う。発現量変化の共通する遺伝子を選択することにより、それぞれの刺激特有の遺伝子発現や転写調節とは関係ない変化は、この選択過程でのごかれる、と期待できる。最終的にはこれらの遺伝子のPC12細胞神経突起伸張活性を遺伝子導入実験で検討し、予想どおり選択できているかどうか調べる必要があるであろう。

〈研究期間の成果〉

平成12年度 脳皮質形成過程の遺伝子発現プロフィール解析

小脳皮質の各層をLCMで別々に採取して、発現量を450個の遺伝子についてアダプター付加競合PCR法 (ATAC-PCR) で測定した (8)。発生期の小脳は、外顆粒層、分子層、プルキンエ細胞層、内顆粒細胞層からなる。細胞分裂能がある顆粒細胞は外顆粒細胞層に、分化して分裂増殖能もたないものは内顆粒細胞層に局在する。遺伝子の発現パターンは、だいたい解剖学的な所見と小脳全体の発現データからの推定と一致する。

約2,000個の遺伝子について、マウス海馬歯状回の生後発生過程の発現プロファイル解析を行った。歯状回の場合は発生の初期にproteasomeとリボソーム蛋白が高発現する傾向がみられた以外、小脳皮質のような顕著な機能

と発現パターンの連関は認められなかった (4)。

LCMとATAC-PCRを使うことにより顕微鏡下で観察できる構造なら遺伝子発現量を測定できるようになった。これは広範囲の分野で応用可能な技術的進展だと思われる。皮質形成の発現プロファイルは予想していたよりも多様で、より一層の検討が必要だと思われる。

平成13年度 小脳皮質変異マウスの発現プロファイル解析

突然変異体マウスの供給元であるフランスパスツール研究所のGuenet博士との協議により、13年度は、tambaleante (以下tblと略す、nervousと同じ遺伝子部位に変異がある別のマウス) とreeler について解析を行った。正常小脳を対照として合計2,547個の遺伝子の発現量をアダプター付加競合PCR法で測定した。データ解析方法は、当研究室で行っている癌分類に関する研究から、標準的な処理方法を確立することができた。本研究でも同じ手法を使用している。遺伝子発現プロファイルの解析から以下の傾向が認められた。

小脳特異的遺伝子は、だいたい減少傾向。プルキンエ細胞特異的遺伝子は、tblでほぼ完全に消失している。2) 受容体の中でGABAA alpha6 サブユニット等小脳で重要なサブユニットは減少している。3) ATPaseを除くイオンチャンネル、トランスポーターは変異マウスで増加しているものが多い。4) シナプス関連及びグリア関連の遺伝子は変化しない。従って、グリアと神経細胞の比率に大きな変化はない。5) tblでribosomal proteinが増加傾向。thyroid hormone receptorが顕著に上昇。6) tbl, reelerでtumor necrosis factor が増加。特に3) 5) 6) は予想されなかった知見であり、これらの変異体の小脳変性過程のメカニズムの解析に役立つ。例として図2に一部の遺伝子の発現を図示した。

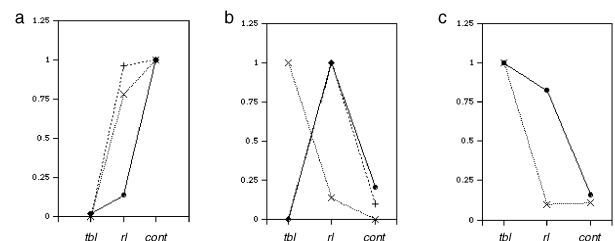


図2. 主要な遺伝子の発現パターン。tambaleante (tbl), reeler (rl), 正常小脳 (cont)。最大値を1になるようにデータ変換を施している。a) 小脳特異的遺伝子。●、GABAA 受容体alpha 6 サブユニット。X、calbindin (プルキンエ細胞特異的)。+、pcp-4 (プルキンエ細胞特異的)。b) イオンチャンネル。●、T-type calcium channel alpha subunit。X、brain Na⁺ channel II。+、Shaw-type potassium channel Kv3.3b。c) ●、tumor necrosis factor。X、甲状腺ホルモン受容体。

平成14年度 哺乳類培養細胞系を用いた機能解析技術の開発と応用

予備実験として、ハンチントン舞踏病遺伝子を導入したPC12の細胞死のプロセスの研究を行った (3)。時系列遺伝子発現データから統計的に有意な発現変動を示す遺伝子を121個同定、うち11個の活性を細胞導入実験で調べた。5個は抑制、3個は促進作用があることがわかった。適切な統計解析を用いれば機能的に意味のある遺伝子発現を選び出せることがわかった。

細胞内へのDNA導入法としてreverse transfection法及びatelocollagenを用いたtransfection法について検討し、実験法を確立した。reverse transfection法は、1枚のスライドガラス上で数千の遺伝子を発現する細胞を観察することができる。また、atelocollagen法はplasmid DNAのみでなくアデノウイルスベクターやsiRNAを安定して細胞内に導入できるバイオマテリアルとして注目されており、遺伝子導入後にそれぞれの細胞の形態変化をArrayScan II (Cellomics社)により自動的に検出・解析するシステムが確立されている。これらの方法により、一回の実験で数百の遺伝子を発現する細胞を観察し、薬剤処理など培養条件を変化させて多数の遺伝子の機能を調べることが可能になった。

分化の程度の異なる小脳顆粒細胞間で発現の変化する288個の遺伝子の全長ORFをクローニングし、atelocollagen法でPC12細胞へ導入し、NGFによる神経繊維伸張と細胞増殖促進機能を指標に機能解析を行った。なお、これら288個の遺伝子は以前LCMで回収した小脳各層の顆粒細胞RNAで遺伝子発現プロファイル解析を行った遺伝子450個に含まれている。神経伸長活性を持つ遺伝子は5個でneuronatin (Nnat), retinoblastoma 1 (Rb1), potassium channel subfamily K member 2 (TREK-1), ring finger protein 13 (Rnf13), eukaryotic translation initiation factor 4A1 (eIF4A1)である(図3)。

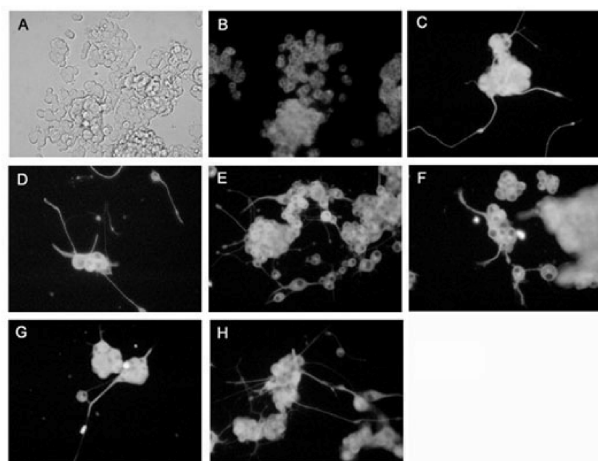


図3. 導入遺伝子による神経線維伸長活性。細胞はPC12。A,B, GFPのみ; C, NGF (対照); D, Nnat; E, Rb1; F, TREK-1; G, Rnf13; H, eIF-4A1。

また、9個の遺伝子は細胞増殖活性を持っており、それらはfibroblast growth factor inducible gene 14 (Fin14/Ddx3x), immediate early response 2 gene (Ier2/pip92/ETR101), signal-induced proliferation associated gene 1 (Sipal1/Spal1), Eph receptor A3 (Epha3/Hek/Mek4), hepatoma-derived growth factor (Hdgf), mitogen-activated protein kinase 6 (Mapk6/Erk3), and Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed gene (Fau/MNSFbeta)である。

これらの遺伝子機能解析の結果と遺伝子発現プロファイルを対応させるため、平成12年度行った小脳皮質の遺伝子発現プロファイルのデータ解析を行った。測定遺伝子は450個で、測定したRNA検体は生後4日外顆粒層外層 (EGLa)、生後4日外顆粒層内層 (EGLb)、生後4日内顆粒層 (IGL)、生後4日外顆粒層外層 (EGLa)、生後

8日外顆粒層内層 (EGLb)、生後8日内顆粒層外層 (IGLa)、生後8日内顆粒層内層 (IGLb)、生後12日外顆粒層 (EGL)、生後12日内顆粒層外層 (IGLa)、生後12日内顆粒層内層 (IGLb)、生後21日内顆粒層外層 (IGLa)、生後21日内顆粒層内層 (IGLb)の計12検体である。この450遺伝子X12検体のデータマトリックスについて多変量解析を行った。いろいろな方法を試したが、主成分分析で特徴を抽出することができた。即ち、主成分分析の第1主成分で遺伝子発現量が、第2主成分で発現パターンが抽出された。第2主成分得点により、発生の初期に発現量の多い遺伝子から後期に発現量の多い遺伝子が分離できる。図4にその結果をグラフで示した。また、このグラフにatelocollagenを使った遺伝子導入による機能解析で活性のあった遺伝子をプロットした。発生後期に活性のある遺伝子はなく、これらの遺伝子は発生過程で強く働いている可能性が示唆された。結果の詳細は文献8参照。

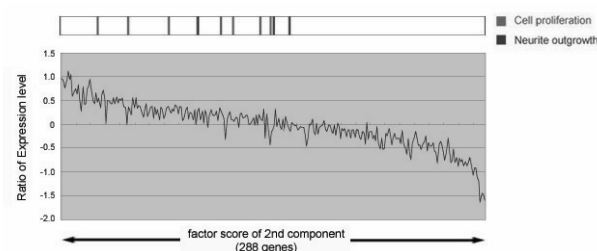


図4. マウス小脳皮質発生過程における機能発現連関。縦軸、生後8日小脳と12日/21日小脳の発現量比(対数変換済)、大きいほど発生初期野発現量が高い。横軸、第2主成分得点。グラフの上部には遺伝子導入実験で活性のあった12個の遺伝子を示している。グラフ右、即ち発生後期に発現量が高い遺伝子には活性を示したものがなかった。

平成15年度 RNA絶対定量法による神経系分化過程の遺伝子発現プロファイル解析

一連の遺伝子発現解析をアダプター付加競合PCR法 (Adaptor-tagged competitive PCR (ATAC-PCR))で行ってきたが、この方法は相対発現量を測定する方法であるため、絶対量定量のための技術改良を行った。測定したい遺伝子の3'末端断片の部分配列にpoly(A)を付加した合成DNAをつくる。この合成DNAについて2重鎖DNAへの変換、制限酵素切断、アダプター付加という ATAC-PCRの反応過程を模擬的に行うことにより内部標準を作成する。この内部標準で滴定する事により遺伝子発現量の絶対量を測定することが可能になった。この方法の概略は図5に示した。

PC12は神経成長因子などの投与で神経繊維を伸張し、神経細胞に分化するが、そのプロセスの遺伝子発現プロファイル解析を相対量発現量で行った。神経成長因子添加後1時間から14日までの間の9ポイントについて、RNAを精製、約1,800個の遺伝子の発現量を測定した。絶対量定量については、96遺伝子について、神経成長因子添加前の細胞について行った。発現量は大きく異なり、1細胞あたりの発現分子数として、0.01から13,000で、その差は106に達した。発現量の多い遺伝子としては、cyclin D2, c-Jun, k-rasなどの増殖関係の遺伝子や、alpha4-integrinやEpithelial cadherinのなどの接着分子が目立った。発現量が極めて少ない遺伝子、即ち一部の細胞でし

か発現していない遺伝子としては、interleukin 3, 6, immunoglobulin heavy-chain binding proteinなどの免疫系の遺伝子が目立つほか、caspase 8, P-cadherinなどの遺伝子があった。但し、これらの結果解釈はPC12が副腎髄質の細胞である点に留意する必要がある。

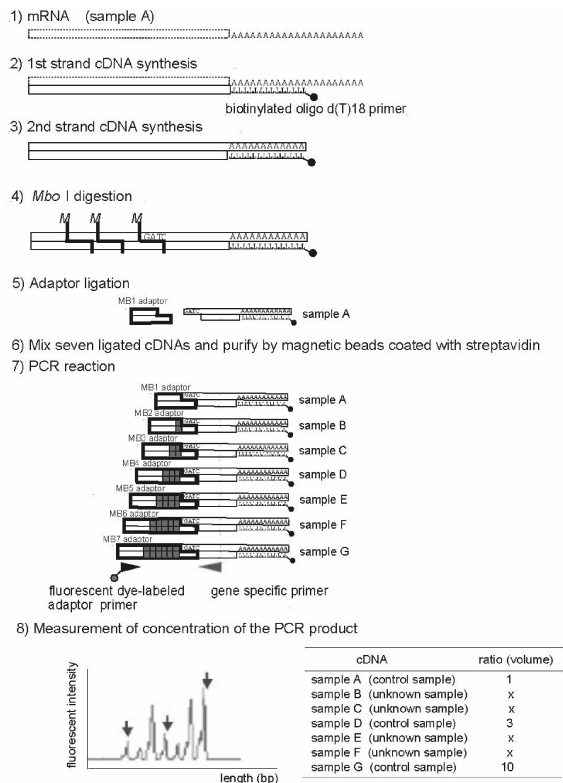


図 5. ATAC-PCR絶対量定量法の概略。

平成16年度 遺伝子発現プロファイルによる神経系分化過程に関わる遺伝子の抽出

平成14年度の遺伝子導入実験で神経線維伸長活性があった遺伝子の導入によるPC12分化過程の時系列遺伝子発現プロファイル解析を行った。導入した遺伝子はeIF4A1, NGF, Nnat, Rb1, Rnfl3, TREK1, 発現量測定したタイムポイントは導入前、0 時間、1 時間、2 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間、96 時間、164 時間、336 時間で計 66 サンプルになる。測定遺伝子数は2,304個である。164 時間と336 時間のサンプルと導入前のサンプルで遺伝子発現量が大きく異なる遺伝子を t 値を使って選択した結果、36 個の遺伝子を選ばれた。t 値の閾値は0.014、そのときのFDRは0.5であった。個々の発現パターンを詳細に調べることにより、遺伝子発現変化が共通な遺伝子を選び出した。分化前に発現量の高い遺伝子はvoltage-dependent anion channel 2, homer homolog 3, proteasome subunit RC9, latexin, N-acetylglucosaminyltransferase I, poly(rC) binding protein 1, cdc27 homologであり、分化後に発現量の高い遺伝子はmicrofibrillar-associated protein 3, cdk2B, retinoblastoma 1, insulin-like growth factor I receptor, dsh homolog 1, frizzled homolog 3であった。この解析で使った遺伝子選択の基準は厳しいものではないので、共通に発現量を変化させる遺伝子はあまり多くないと推定される。

〈国内外での成果の位置づけ〉

定量PCRを用いた遺伝子発現プロファイルは研究代表者のグループと産総研臨海副都心センターのグループのみであったため、ユニークな活動であるとして国内外の注目を集めた。但し、マイクロアレイの隆盛におされた感はいない。2003—5年になって漸くマイクロアレイの技術的限界が研究者の間で知られるようになり、定量PCRベースの遺伝子発現プロファイルの評価は今後本格的になされる、と思われる。

本特定研究での成果は、遺伝子発現プロファイルの生物学への応用の可能性を探った基礎的な成果であり、国際的に高い評価を受けているのは、癌の分子分類の研究である。癌研究については、データベース化を本特定研究で行っている (CGED, Cancer Gene Expression Database) (9, 12)。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初予定した実験計画については、肝要な点に関してはほぼ達成できた。研究過程で明らかになってきた予想外の問題は、遺伝子発現データマトリックスに内在する統計学的性質である。

遺伝子発現プロファイルはこの10年間ほどの間に現れた新しい生物学のアプローチであるが、これまでの研究でその可能性は十分検討されたと思われ、結果的には当初スタンフォード大学のグループが主張していたほど生物学全体に大きな影響を与える様なアプローチではなかったことがわかった。大きな理由は、遺伝子発現プロファイルデータの性質にある。遺伝子発現プロファイルは大量のデータを生産するが、そのデータが有益な情報を含んでいるかどうかというのは別問題である。遺伝子とサンプルからつくられるデータマトリックスの含有する情報量は数の少ない方に依存する。従って、遺伝子数が多くてもサンプル数が少ないと含まれる情報量は少ない。生物学的な研究の場合サンプル数は少なく (数個、20を超えてはほとんど無い)、データマトリックス自体から抽出できる情報はあまりない。そのために、これまでわかっている情報 (文献情報) を使って発現プロファイルを解釈するなどの操作が必要であり、データのみから新しい発見を導き出すことは極めて難しい。このことは、多次元データの持っている性質であり推理統計学の知識があればあらかじめ見えてきたことであるが、分子生物学の知識体系の中では統計学が欠落しており、研究代表者を含めて理解するのに時間がかかったのが実情である。このようなデータの性質はまだ一般にはよく知られておらず、さらなる啓蒙の必要もある、と思われる。

このような生物学的問題と比較して、癌の分類問題はデータマトリックスが大きく (研究代表者のグループでは100症例以上を用いている)、また問題を臨床情報と遺伝子発現の関連性の発見ということで定式化できるため、データマトリックス自体から明確な情報を引き出すことができた。

〈今後の課題〉

この特定領域研究の期間の研究により遺伝子発現プロファイル解析に内在する問題点については、ほぼ明らかになったと考えている。もっとも重要な点は前項で述べたようにデータマトリックスの含有する情報量が多くない点にあるが、それ以外にも解決すべき問題点があるので、順次述べる。

一つは測定技術の問題である。マイクロアレイはこれまでの研究期間で一般的には支配的な技術であったが、

ここに来てやっと技術的な問題点が一般の研究者にもしられるようになった。現在、いくつかの市販品の測定データがあまり一致しないことがわかってきており、実際に何を測定しているのか、明らかにするところから研究を再度行う必要がある、と思われる。ATAC-PCRの場合は測定原理自体には問題はないが、網羅性が低い。問題解決型の研究では、この点は問題にならないが、発現データのデータベース作成などデータを二次的に使おうとする場合には、完全な遺伝子セットが必要になる。従って、より低コストで、より網羅性の高い定量PCR法の開発が必要になる。

また、これまでの研究では組織や培養細胞などソースとなる細胞組織が多いものについて解析が行われてきた。理想的にはそれぞれの単一細胞がどのように遺伝子発現を変化させているのか、記録する必要がある。即ち、微小検体のための解析技術開発が重要課題になる、と思われる。

遺伝子発現プロファイルを使って有効な解析をするためには、サンプル数の大きいデータマトリックスでなければならないことは先に述べた。現在、癌分類問題のみこの条件を満たすデータマトリックスが得られるが、生物学的問題についても工夫すれば可能と思われる。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

(論文・プロシーディング)

1. 0111261638 Matoba, R., Kato, K., Kurooka, C., Maruyama, C., Sakakibara, Y. and Matsubara, K. Correlation between gene functions and developmental expression patterns in the mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 12 (2000) 1357-1371.
2. 0111261643 Matoba, R., Saito, S., Ueno, N., Maruyama, C., Matsubara, K. and Kato, K. Gene expression profiling of mouse postnatal cerebellar development. *Physiological Genomics* 4 (2000) 155-164.
3. 0209241821 Kita, H., Carmichael, J., Swartz, J., Muro, S., Wytenbach, A., Matsubara, K., Rubinsztein, DC. and Kato, K. Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling. *Hum Mol Genet.* 11 (2002) 2279-2287.
4. 0408161429 Saito, S., Matoba, R., Ueno, N., Matsubara, K. and Kato, K. Comparison of gene expression profiling during postnatal development of mouse dentate gyrus and cerebellum. *Physiological Genomics*, 8, (2002) 131-137.
5. 0403271410 Saito, S., Matoba, R. and Kato, K. Adapter-tagged competitive PCR (ATAC-PCR) - a high-throughput quantitative PCR method for microarray validation. *Methods*, 31 (2003) 326-331.
- 0602071839 Kato, K. Adaptor-tagged competitive PCR: study of the mammalian nervous system. *Comptes Rendus Biologies*, 326 (2003) 941-947.
6. 0408192354 Sese, J., Kurokawa, Y., Monden, M., Kato, K. and Morishita, S. Constrained clusters of gene expression profiles with pathological features. *Bioinformatics*, 20 (2004) 3137-3145.
7. 0505211625 Kita-Matsuo, H., Yukinawa, N., Matoba, R., Oba, S., Saito, S., Ishii, S. and Kato, K. Adaptor-tagged competitive PCR: Amplification bias and quantified gene expression levels. *Anal. Biochem.* 339 (2005) 15-28.
8. 0602071656 Saito, S., Matoba, R., Ueno, N., Matsubara, K. and Kato, K. Comparison of gene expression profiling during postnatal development of mouse dentate gyrus and

cerebellum. *Physiological Genomics*, 8, (2002) 131-137.

9. 0602071730 Kato, K., Yamashita, R., Matoba, R., Monden, M., Noguchi, S., Takagi, T. and Nakai, K. Cancer Gene Expression Database (CGED): a database for gene expression profiling and accompanying clinical information of human cancer tissues, *Nucleic Acids Res.*, 33 (2005) D533-D536.

(データベース)

10. 0111261700 BED (Brain EST database)
11. 0403271454 BGED (Brain Gene Expression Database)
12. 0403271527 CGED (Cancer Gene Expression Database)