

遺伝子発現の量的差異を指標とした、新規病態解析法の確立に関する研究

●村上 善則

国立がんセンター研究所

＜研究の目的と進め方＞

個体間の体質や疾患罹患性の差はゲノム塩基配列の多型の差に由来し、この差が遺伝子産物の構造や発現様式の差を介して個体の表現型を修飾すると考えられる。しかし、遺伝子産物のアミノ酸置換など構造に差を生じる多型の数は限られており、大部分の多型は遺伝子のコード領域以外に存在することから、遺伝子発現の様式や量を修飾するものと考えられる。しかし、各アレル当りの遺伝子発現量の差を定量的に解析する手法はこれまで限られていた。我々は遺伝子多型を指標として、各アレル当りの遺伝子発現量（mRNA）を高度定量的に検出する RNA Difference Plot（RDP）法を確立した。この手法を用いて、生活習慣病や遺伝性疾患において、多型、変異の遺伝子発現量に対する影響、遺伝子発現量の表現型に対する影響を明らかにしようとして試みた。

＜研究開始時の研究計画＞

1) アレル特異的遺伝子発現の高度定量的検出法の確立改良：多型を示すゲノム DNA 並びに mRNA から得た cDNA の同一断片を、同一の蛍光標識プライマーにより PCR で増幅し、塩基配列自動解析機装置を用いた SSCP 解析により分離し、増幅産物の各量比を定量する。cDNA 由来増幅産物の比をゲノム DNA 由来増幅産物の比で除することにより PCR による増幅効率の差を補正すると、標準偏差 10% 以下の高度定量的解析が可能となる。反応系の定量性を高めるとともに、より簡便で安価な反応後蛍光標識法の導入、さらには、多型を示さない分子の定量法等を開発する。

2) 種々の疾患の原因遺伝子に関する検出システムの構築：高血圧症における Angiotensinogen 遺伝子等、各種疾患の原因遺伝子に関して、日本人で多型頻度の高い cSNP を指標として mRNA の量的変化を検出する系を個別に確立する。そして、遺伝子発現の量的差異を示す遺伝子、SNP を同定して、その意義の解明を図る。

本態性高血圧症（EHT）については有意に関連する Angiotensinogen（AGT）遺伝子の RDP 解析を行う。即ち、AGT 遺伝子コドン 235 の cSNP を指標とした RDP 解析を行い、多型と遺伝子発現量、個体の表現型との相関を検討する。

3) 他の遺伝性疾患や生活習慣病の原因遺伝子に関する病態解析：原因遺伝子の変異と遺伝子発現量、表現型との相関に基づいた病態解析を行う。

4) 各アレル当りの遺伝子発現量とメチル化、遺伝子多型との関係の RDP法、Bi-sulfite-SSCP法による検索：主に培養がん細胞を用いて、遺伝子発現の解析、低下の原因を検索する。

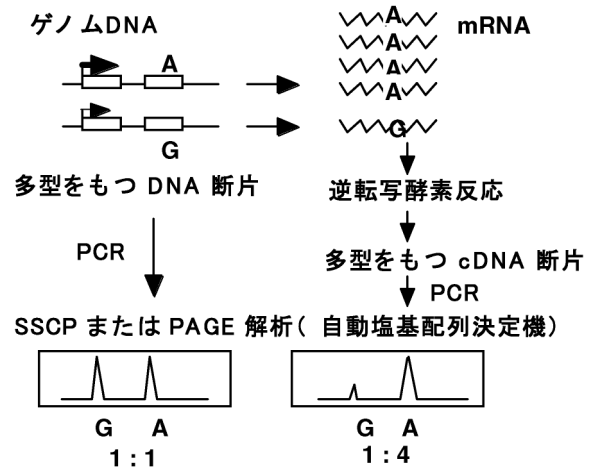


図1. RDP法の原理と方法

＜研究期間の成果＞

1) RDP法の改良：マイクロサテライト多型を含むゲノム DNA、cDNA断片を PCR で増幅し、一定条件で変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、高度定量的解析を可能とした。

2) EHTにおける AGT の RDP 解析：AGT 遺伝子のコドン 235 の cSNP を標的とした RDP 解析を行い、統計学的に EHT の罹患と相関する Threonine 型多型アレルからの AGT 遺伝子の発現量が、正常血圧者と相関する Methionine 型アレルからの発現量より有意に高い例を、M/T ヘテロ接合体の一部に見出した（旭川医科大学、羽田明教授、東京大学、井ノ上逸朗助教授との共同研究）。

3) 遺伝性疾患の原因遺伝子の発現量に基づく病態解析：原因遺伝子にミスセンス変異をもつ遺伝性疾患の家系において、変異アレル由来の mRNA 量が保因者間で差違を示し、これが同一変異をもつ個体間の表現型の差違の原因となる可能性があること、また、各アレルからの発現量がハプロタイプに依存する可能性があることを見出した（論文1）。

4) 各アレル当りの遺伝子発現量とメチル化、遺伝子多型との関係を RDP法や Bi-sulfite-SSCP法を用いて検索し、がん抑制遺伝子の同定や不活化の指標として役立てた（論文2-7）。

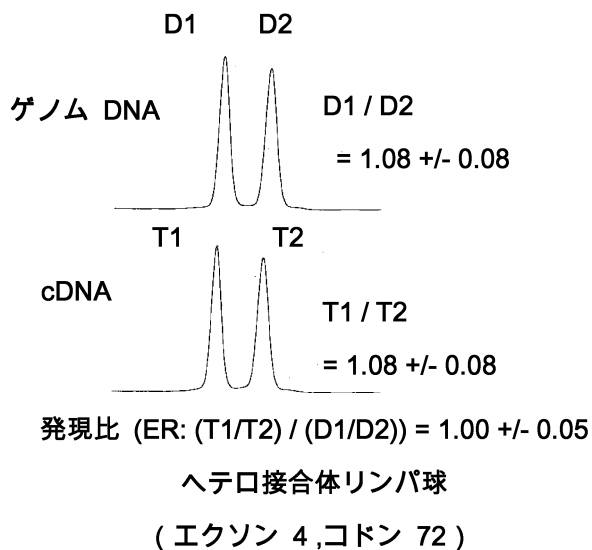


図 2. TP53 遺伝子の一塩基多型解析

〈国内外での成果の位置づけ〉

遺伝子の異常は、遺伝子産物の構造異常と発現異常とに大別されるが、従来の解析の盲点であった後者を極めて高精度に検出可能とする点に特色と意義がある。cSNP の意義、分子病態の解明のみならず、各種疾患の診断にも応用可能であるが、特に生活習慣病の関連遺伝子は、解析対象として格好のものと考えられる。従来不可能であった各アレル当りの mRNA 量の微細な変化を定量的に検出し、多型・変異と遺伝子発現量、ハプロタイプ、さらに個体の表現型を結びつけようとする視点は、国内外でも独創的、かつ時宜を得た研究である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

末梢血リンパ球以外の組織を収集することには困難が付きまとったが、同時に組織特異的な発現様式の違いを示唆する興味ある知見も得られた。

〈今後の課題〉

方法は実用化の域に達し、各アレル当りの発現量の差違が個体間で広く認められ、表現型と相関する事実も示唆され、研究の妥当性は十分に示されたと思われる。今後、広範、大規模な解析に発展させることにより、非常に独創性の高いゲノム研究を発信出来ると考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)
 - (1) Murakami, Y., Isogai, K., Tomita, H., Sakurai-Yageta, M., Maruyama, T., Hidaka, A., Nose, K., Sugano, K., Kaneko A. Detection of allelic imbalance in the gene expression of hMSH2 or RB1 in lymphocytes from pedigrees of hereditary non-polyposis colorectal cancer and retinoblastoma by an RNA difference plot. *J. Hum. Genet.*, 49:635-641, 2004.
 - (2) Fukami, T., Satoh, H., Maruyama, T., Fukuhara, H., Kuramochi, M., Takamoto, S., Momoi, T., Murakami, Y. Identification of the Tslc1 gene, a mouse orthologue of the human tumor suppressor TSLC1 gene. *Gene*, 295:7-12, 2002.
 - (3) Tamura, K., Miwa, W., Maruyama, T., Sekiya, T.,

Murakami, Y. Homozygous deletion on the chromosomal region 5q12.3 in human lines of small-cell lung cancers. *J. Hum. Genet.*, 47:348-354, 2002.

(4) Fukuhara, H., Kuramochi, M., Nobukuni, T., Fukami, T., Saino, M., Maruyama, T., Nomura, N., Sekiya, T., Murakami, Y. Isolation of the TSL1 and TSL2 genes, members of the tumor suppressor TSLC1 gene family encoding transmembrane proteins. *Oncogene*, 20:5401-5407, 2001.

(5) Kuramochi, M., Fukuhara, H., Nobukuni, T., Kanbe, T., Maruyama, T., Ghosh, H.P., Pletcher, M., Isomura, M., Onizuka, M., Kitamura, T., Sekiya, T., Reeves, R.H., Murakami, Y. TSLC1 is a tumor suppressor gene in human non-small cell lung cancer. *Nat. Genet.*, 27:427-430, 2001.

(6) Kanbe, T., Nobukuni, T., Kawasaki, H., Sekiya, T., Murakami, Y. Four single-nucleotide polymorphisms in the human BUB1 gene. *J. Hum. Genet.*, 46:150-151, 2001.

(7) Fukuhara, H., Maruyama, T., Nomura, S., Oshimura, M., Kitamura, T., Sekiya, T., Murakami, Y. Functional evidence for the presence of tumor suppressor gene on chromosome 10p15 in human prostate cancers. *Oncogene*, 20:314-319, 2001.

2) データベース/ソフトウェア
特になし

3) 特許など

1. 出願番号：特願 2001-313966 (日本)

発明者：村上善則、野村幸男

発明の名称：TSL1 遺伝子

出願人：国立がんセンター、株式会社ビー・エム・エル

出願日：2001年10月11日

2. 出願番号：特願 2001-313967 (日本)

発明者：村上善則、野村幸男

発明の名称：TSL2 遺伝子

出願人：国立がんセンター、株式会社ビー・エム・エル

出願日：2001年10月11日

3. 出願番号：No. 00122440, 1-2116 (ヨーロッパ連合19か国：AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE)

発明者：富田裕之、村川克二、宮原裕二、村上善則、関谷剛男

発明の名称：遺伝子検査方法及び遺伝子検査装置

出願人：株式会社日立製作所、国立がんセンター2000年10月13日