

## 8) 放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の感受性遺伝子座の解析

田村 康・斉藤 有子  
 落合 幸江・児玉 泰光 (新潟大学)  
 木南 凌 (第一生化学)  
 若菜 茂晴 (実中研)  
 丹羽 太貴 (京大放生研)

発がん感受性を与える遺伝子(群)の多くは浸透率が低く、発がんへの寄与の程度は低い。しかし、その一般性から重要な遺伝素因を形成すると考えられている。ここではマウスを用いた多因子性疾患の遺伝解析について報告する。具体的には、 $\gamma$ 線照射による発癌感受性をテーマとするが、それは系統間で異なり、BALB/c 系統は感受性を、MSM 系統は抵抗性を示す。

BALB/c 系統と MSM 系統の F1マウスを MSM 系統に戻し交配した 293 頭のマウス (N2M) に  $\gamma$  線を照射し、発症群、非発症群を対象に genome-wide の連鎖解析を行った。その結果、4 番染色体上の D4 Mit 12 近傍に BALB/c 系統に由来する放射線感受性遺伝子座の存在が示唆された (Saito et al. Oncogene, in press)。この可能性を確認するため BALB/c 系統を背景とするコンジュニックマウスを作成し、再度同様に照射実験をおこなった。その結果、D4 Mit 12/338 領域において 2 群間の平均生存期間の有意な差 ( $\chi^2$  値 9.22  $P=0.0024$ ) を認めた。そこで、現在この感受性遺伝子を単離する目的で、コンジュニックマウスを利用した詳細な感受性遺伝子座のマッピングを行っている。その現状と戦略を議論する。

## 9) PCR 検出定量システムを利用した SNPs 解析～ABI PRISM 7700の使用経験から

大竹 弘哲・小野寺 理 (新潟大学脳研究所)  
 辻 省次 (神経内科)

当施設で行っている、PCR 検出定量システムを利用した SNPs 解析について、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (以下、ABI 7700) を使用した経験から説明する。ABI 7700 では、Taqman probe という、5' 及び 3' 末端にそれぞれ異なる蛍光色素をもつオリゴヌクレオチドを用いて、PCR を行うことにより、リアルタイムで PCR を検出定量する事が出来る。また、SNP に応じて、2 種類の蛍光色素を持つ Taqman probe を設定し、一つの反応系に両方の probe を導入した assay が同時に行えるため、SNPs 解析が可能となる。このため、検索できる遺伝子多型と

しては、SNP であり、VNTR やマイクロサテライトは対象とならない。ABI 7700 を用いた SNPs 解析の利点としては、1. 実験操作が簡便であること、2. 比較的短時間で結果が得られること、3. 96検体を同時に処理できること、4. 解析が容易にできることが挙げられる。更に、その解析には、1. SNPs と、その前後 300bp 程度の塩基配列情報、2. Taqman probe と primer の design に適した塩基配列、3. Taqman probe を購入する費用が必要となり、可能であれば 4. Allele 1 と Allele 2 の homo もあると円滑なデータの解析が行える。

## 10) 疾患遺伝子のゲノム網羅的解析の立ち上げ

宮下 哲典・桑野 良三 (新潟大学)  
 遺伝子実験施設

病気に罹りやすい「個体」の疾患感受性遺伝子を探索するには、大量の遺伝子サンプリングをゲノム網羅的に解析する必要がある。しかし、疾患によって解析に必要なサンプル数やマイクロサテライトマーカー数は異なるし、大量数理解析ソフトによっても解析スループットは大きく変わると予想される。そこで、1) 質の高い臨床データの記載とサンプル収集・保存、2) 大量ゲノムの高速解析、3) 大量データの数理解析、4) 解析結果の検証と診療への反映、の連携は不可欠である。

こうした背景を踏まえ、脳疾患感受性遺伝子を探索するために、我々は上記 2) についてまず検討することにした。初期目標として 500～1000 サンプルの 1000 カ所のマイクロサテライトマーカーを解析する (50万～1000万 PCR 反応) する。相関解析にとってそのサンプル数やマイクロサテライトマーカー数は適切かどうか、解析に十分なデータの収集にどのくらいの時間を要するか、について調べる。そのため疾患の感受性遺伝子座を効率良く、迅速に、そしてゲノム網羅的に解析するための集中的・合理的なトータルシステムを構築する必要が生じた。そのための戦略として、マイクロサテライトマーカーと一塩基多型 (SNPs) を利用するゲノム網羅的解析システムを立ち上げた。このシステムの構築にあたり、次の 2 点に重点を置いた。

- 1) DNA サンプルや PCR 反応液の分注・回収をロボットに行わせ、手動による時間のロス、作業員の疲労、手間、ミスを最小限に抑える。
- 2) 全国の医療機関から送られてくる匿名化ヒト DNA をコンピューターで一括管理し、その解析

状況を定期的にまとめて抽出し考察できるようにする。

システムの試運転と使用機器の基本的な操作技術の習得を目的に、192人の末梢白血球由来ゲノム<sup>1)</sup>を用いて、その811カ所のマイクロサテライトマーカー (ABI)<sup>2)</sup>を解析した (その詳細については本研究会の福島らの発表をお聞き下さい)。ゲノムや PCR 反応液の分注は全て Biomek 2000 (Beckman Coulter) を用いた。PCR 装置は、96穴プレートが1枚あるいは384穴プレートが2枚セットできる GeneAmp PCR System 9700 (ABI) を使用した。PCR 増幅後のマイクロサテライトマーカーの分離には、16本キャピラリーの電気泳動システムを備えた。ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (ABI) (以下3100と略記) を用いた。3100によるフラグメントデータは全て BioLims データベース (ABI) にイントラネットワークを介して自動転送され保管されるシステムになっている。フラグメントの正確な遺伝子型解析には GeneMapper (ABI) を使用した。

4/9から6/29の12週間で、192ゲノム811カ所のマイクロサテライトマーカー全てのPCR (計155,712反応)、及び3100で電気泳動を終えた。1カ所のマイクロサテライトマーカーの多型解析に25ngのゲノムDNAを用いたため、1検体811カ所のマイクロサテライトマーカーを調べるのに約、20.3μgのゲノムDNAを使用したことになる。現在フラグメント解析をGeneMapperで詳細に行ない、ミス反応の割合及びサンプルDNAの品質チェック、追加マーカーのプライマー設計、分析室の作業環境の見直し、並びにSNPs解析の戦略を練って本格稼動に備えている。

本研究会では主に当施設におけるゲノム網羅的な解析システムの概略を述べ、システムのフラグメント解析までの能率を中心に紹介する。

- 1) 神経内科の弧発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者と正常コントロール群の計192ゲノム。
- 2) ヒト染色体を約5cM間隔でカバーしている。

### 11) 悪性脳腫瘍症例の遺伝子発現プロファイル解析

山中	龍也・宇塚	岳夫	(新潟大学脳研究所)	
森井	研・高橋	英明		(脳神経外科)
田中	隆一			
芥川	茂・西尾	和人	(国立がんセンター 研究所薬効試験部)	

DNA アレイ法は遺伝子を包括的に検索できる技術として登場し、ポストゲノム時代を担うものと考えられている。この技術を用いた遺伝子発現プロファイルから腫瘍の発生や進展機序が解明され、生物学的悪性度の診断や治療法に対する感受性、予後の推測に応用されるものと考えられる。脳腫瘍には数種の組織型が知られており、その組織型によって化学療法に対する感受性、予後は異なることが知られている。今回我々は、脳腫瘍から抽出した組織サンプルにおける、遺伝子発現の相違を cDNA expression array 法を用いて評価した。Oligodendroglioma, glioblastoma, 脳原発 malignant lymphoma, 比較対照として正常脳組織のサンプルを用いた。cDNA array 法を用いた解析によって、化学療法に対する感受性に関わる遺伝子群を推測できる可能性が示された。

### 12) 腎疾患における GeneChip™ による発現遺伝子の解析

坂爪	実・金子	佳賢	(新潟大学大学院 医歯学総合研究所 内部環境調節医学 講座腎臓原病分野 (第二内科))
後藤	真・黒田	毅	
齊藤	徳子・成田	一衛	
下条	文武		

【目的】腎疾患の病態形成に関与する遺伝子発現の体系的なプロファイリングを目的として、巣状糸球体硬化症 (FGS) および微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) 患者の末梢血単核球あるいはラット抗基底膜抗体腎炎の腎での発現遺伝子を Affymetrix 社製 GeneChip™ を用いて解析した。

【方法】文書による同意を得た後、FGS 患者1名、MCNS 患者2名の計3名から末梢血単核球を採取した。また抗ラット腎糸球体基底膜血清をラットに静注し、静注後1日目、3日目、7日目で各々2匹から腎を採取した。対照として、健康人末梢血単核球あるいは免疫前ウサギ血清を静注したラット腎を用いた。末梢血単核球およびラット腎から mRNA を抽出し、T7-oligo dT をプライマーとして cDNA を合成した。次に in vitro transcription 法によりビオチン化 cRNA を合成し