

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） （脳神経外科）
森井	研・高橋	英明	
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

て Affymetrix 社 GeneChip™ にアプライし、hybridization system, Fluidicus Station (washing-staining system) および Gene Array Scanner を用いて解析をおこなった。

【結果】2例の MCNS 患者で共通して3倍以上発現増強が認められた遺伝子は、情報伝達物質、各種 ribosomal RNA やサイトカインなど27種類、また FGS 患者1例とも共通したものが14種類認められた。一方、ラット抗基底膜抗体腎炎では、2匹とも対照より6倍以上の発現強度を持つ遺伝子を解析したところ、1日目では4種類の遺伝子にのみ発現増強が認められ、それらは転写因子、免疫グロブリンC領域の他、未知の遺伝子2種類であった。3日目には38種類の遺伝子に6倍以上の発現増強が認められ、各種サイトカインやケモカイン、蛋白分解酵素や炎症性蛋白、情報伝達物質の他、未知の遺伝子5種類が認められた。7日目には15種類の遺伝子で発現増強が認められ、蛋白分解酵素や炎症性蛋白などの他、細胞外基質と思われる未知の遺伝子など4種類が認められた。

【考察】GeneChip™ を用いることにより、一度に約一万種類の発現遺伝子を定量的に検索でき、病態形成にかかわる発現遺伝子の体系的、経時的な変化の解析や、病態に関与する遺伝子の同定に極めて有用であると思われる。

### 13) 未熟卵子の体外成熟を目的としたFSH受容体遺伝子導入による遺伝子治療の基礎的検討

藤田 和之・芹川 武大(新潟大学医学部)  
永田 寛・田中 憲一(産科婦人科学教室)

【目的】未熟卵子を体外で成熟させ受精させることができれば、不妊治療に大きな進歩がもたらされるものと思われる。その方法として卵胞内での状態に近付けるために、顆粒膜細胞との共培養することが試みられているが、初代培養顆粒膜細胞は培養数日でFSH受容体(FSHR)発現が消失しその機能を失うため、効果は少ないと考えられる。そこでFSHR遺伝子を導入し発現させることにより機能を保たせた顆粒膜細胞と共培養することにより、未熟卵子を成熟させることを目的とした遺伝子治療の基礎的検討を行った。

【方法】diethylstilbestrolにて刺激した幼若雌ラットから顆粒膜細胞を採取、培養開始時および数日後に125I-FSHを用いたバイディングアッセイ法により

FSHR数を、またFSH刺激によるE2産生能を測定した。ヒトFSHR遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んだ組換えアデノウイルス(Ad-FSHR)を作成、MOI10にて顆粒膜細胞に導入し、FSHR数、E2産生能を測定した。

【成績】培養開始時の顆粒膜細胞では、FSHR数は $6071 \pm 719/\text{cell}$ であり、FSH刺激によりE2 $2865 \text{ pg/ml}$ 産生された。培養3日目のFSHR数は $2390 \pm 1011/\text{cell}$ 、E2産生は $382 \text{ pg/ml}$ と減少し、培養7日目にはFSHRはほとんど消失し、E2産生も測定感度以下となった。一方、Ad-FSHR導入顆粒膜細胞では、培養3日目でFSHR数は $6752 \pm 76/\text{cell}$ 、E2産生は $1310 \text{ pg/ml}$ と未導入細胞を比較して増加し、培養7日目においてもFSHR数が $1851 \pm 385/\text{cell}$ の発現を認め、E2産生は $365 \text{ pg/ml}$ であった。

【考察】FSHR遺伝子を初代培養顆粒膜細胞に導入することにより、減少したFSHRを再び発現させ、FSH刺激に対する反応性を回復させることができたことより、FSH導入顆粒膜細胞との共培養が、未熟卵子の体外成熟に有用であることが期待される。

### 14) Peritubular Capillary-Specific Kidney-Targeted Naked DNA Transfer by Retrograde Renal Vein Injection in Rats

丸山 弘樹・樋口 昇  
飯野 則昭・今井 直史(新潟大学)  
下条 文武(第二内科)  
平原 浩幸(同 第二外科)  
西川 祐司(秋田大学)  
宮崎 純一(第一病理)  
(大阪大学大学院  
医学研究科分子  
防御医学)

腎臓への遺伝子導入法の確立は、腎疾患の新しい治療手段として期待されている。これまで、nonviral vectors(ポリプレックス、リポプレックス)を用いて、経腎動脈的、経尿管的、経腎盂のルートから腎へアプローチする方法が開発され、糸球体、尿細管、間質線維芽細胞に遺伝子が導入された。しかし、その発現は弱く、一過性で4週間未満である。私達は、ラットの尿細管周囲毛細血管をターゲットとして、経腎静脈的アプローチにより、逆行性に左腎にnaked DNAを注射して、腎毒性を起さずに、尿細管周囲毛細血管内皮に遺伝子(pCAGGS-lacZ)を導入することに成功した。造血効果という生理活性のあるエリスロポエチン発現遺伝子(pC