
総 説

DNA チップの眼科への応用 —基礎と臨床—

高橋 義徳¹⁾²⁾, 山下 英俊¹⁾, 木下 茂³⁾

¹⁾山形大学医学部情報構造統御学講座視覚病態学分野

²⁾金井たかはし眼科

³⁾京都府立医科大学眼科学教室

要 約

遺伝子情報の網羅的解析法として DNA チップによる解析が発展し, 我々眼科医にも新たな生物学的知見をもたらされている。DNA チップによる解析は大きく遺伝子発現解析と遺伝子型解析 (genotyping) に分けられる。遺伝子発現解析は疾病を発現遺伝子 (mRNA) の違いとして網羅的に検討することにより, 病態の解明を試みるものである。一方, 遺伝子型解析は DNA の解析であり single nucleotide polymorphism (SNP) 解析も遺伝子型

解析のひとつである。感染症における病原体のサブタイピングも遺伝子型解析であり, 検体が少ない眼科領域の感染症における病原体の検出に期待がもたれている。(日眼会誌 112: 121—126, 2008)

キーワード: DNA チップ, 遺伝子発現解析, 遺伝子型解析

A Review

DNA Microarray for Ophthalmic Research —For Basic and Clinical Research—

Yoshinori Takahashi¹⁾²⁾, Hidetoshi Yamashita¹⁾ and Shigeru Kinoshita³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology and Visual Science, Yamagata University School of Medicine

²⁾Kanai Takahashi Eye Clinic

³⁾Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Abstract

The development of DNA microchip analysis continues to progress. This development provides us with new biological knowledge. DNA microchip analysis can be divided into expression profiling and genotyping. In infectious disease, DNA microchip analysis helps us to identify the pathogen.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc
112: 121—126, 2008)

Key words: DNA microchip, Expression profiling,
Genotyping

I はじめに

近年, 生命科学の領域においても“情報の増加”, “技術の革新”は目覚ましい。“情報の増加”はゲノムプロジェクトに代表される我々の遺伝子情報の飛躍的増加として実感される。“技術の革新”は実験室を見渡すと目

にとびこんでくる新たな実験機器がそうであるように, まさに日進月歩の変化である。“情報の増加”, “技術の革新”が統合されたツールの代表が DNA チップによる解析やプロテオーム解析である。両者の特徴は網羅的解析であり, これにより新たな生物学的知見をもたらす¹⁾²⁾。

別刷請求先: 990-9585 山形市飯田西 2-2-2 山形大学医学部情報構造統御学講座視覚病態学分野 山下 英俊

(平成 19 年 4 月 25 日受付, 平成 19 年 9 月 25 日改訂受理) E-mail: hyama-tky@umin.ac.jp

Reprint requests to: Hidetoshi Yamashita, M.D. Department of Ophthalmology and Visual Science, Yamagata University School of Medicine, 2-2-2, Iida-nishi, Yamagata 990-9585, Japan

(Received April, 25, 2007 and accepted in revised form September, 25, 2007)

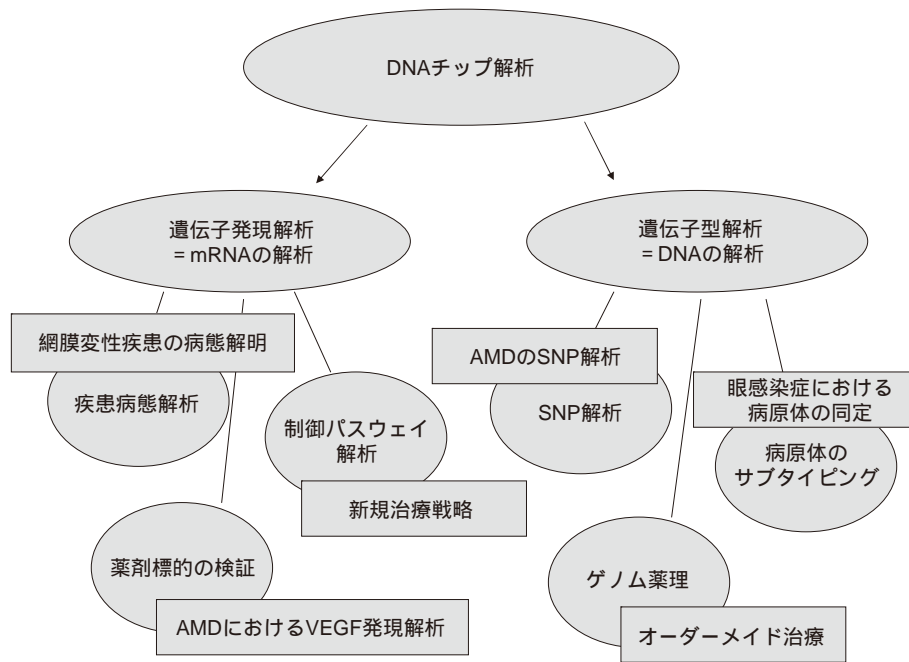


図 1 DNA チップ解析の眼科領域への応用.

AMD : 加齢黄斑変性, SNP : single nucleotide polymorphism, VEGF : 血管内皮増殖因子.

II DNA チップとは

DNA チップについては多くの総説があるので、今回はその利用について概要したい³⁾⁴⁾⁵⁾.

DNA チップによる解析は大きく遺伝子発現解析と遺伝子型解析 (genotyping) に分けられる。遺伝子発現解析は mRNA の発現解析であり、疾患病態の解明、制御パスウェイ解析、薬剤標的の検証などに用いられる。遺伝子型解析は DNA の解析であり、ゲノム全体のスキャン、SNP 解析、病原体のサブタイピング、ゲノム薬理学などに用いられる (図 1)。

III 遺伝子発現解析

我々の細胞は遺伝子情報によりその時、その場で必要な蛋白質を発現することにより正常に機能している。病的状態においては発現している蛋白質の量的、質的变化が生じている。これらを発現遺伝子 (mRNA) の違いとして網羅的に検討することにより、病態の解明を試みるのが遺伝子発現解析である。つまりトランスクリプトームの検討であり、その後の結果として現れるプロテオーム、メタボロームまでの間にも翻訳調節、翻訳後調節などの重要な調節過程を経るので一義的に病態との関連を規定することは困難ではあるが、病態を解明するための非常に多くの情報を得ることができる。その基礎研究への応用の 1 例として我々の研究について紹介する⁶⁾。

ヒアルロン (ヒアルロン酸) は N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の二糖の繰り返しからなるプロテオグリカンであり、高い保水性や弾性などの物理的な性質

を示し細胞外マトリックスの重要な構成成分である。その一方で、ヒアルロンはその物理的性質に加えて細胞表面に存在する CD44 などのレセプターを介して細胞内にシグナルを伝えることが明らかとなった。血管新生においてもヒアルロンはかかわり、興味深いことにそのかかわりは分子量により異なり、高分子のヒアルロンは血管新生に対し抑制的に働くのに対して低分子のヒアルロンオリゴは血管新生に促進的にかかわる⁷⁾。図 2 に示すように、培養マウス血管内皮細胞においてヒアルロンオリゴは細胞表面に発現する CD44 に結合することにより細胞内にシグナルを伝え、図中右のように管腔形成という分化を示す⁸⁾。生来、高分子のヒアルロンが豊富に存在する硝子体、関節腔が無血管組織であるのに対して病的状態である糖尿病網膜症、関節炎において血管新生がみられることから興味深い。一方で、図 2 に示されたヒアルロンオリゴによる血管新生過程における遺伝子発現の変化はなお多くが不明であった。そこで、ヒアルロンオリゴによる血管新生過程を解明する目的で DNA チップを用いた解析がなされた。この解析では fibroblast growth factor (FGF) 2 刺激による血管新生を陽性対照として加えることにより、ヒアルロンオリゴに特異的な遺伝子発現を検討している。この解析ではヒアルロンオリゴ刺激特異的に 179 遺伝子の発現亢進、210 遺伝子の発現低下がみられた。さらに図 3 に示すような遺伝子発現パターン解析を行ったところ、CXCL1/GRO1 がヒアルロンオリゴ特異的かつ早期に発現が亢進していたことより CXCL1/GRO1 がヒアルロンオリゴによる血管新生において重要な働きを担っ

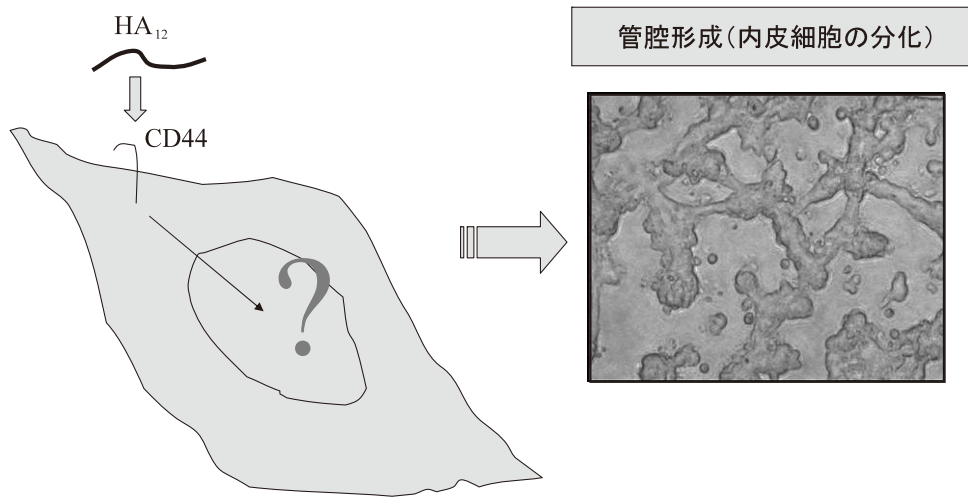


図 2 ヒアルロナンオリゴによる血管新生.

ヒアルロナンオリゴ(HA₁₂)は血管内皮細胞上に発現する CD44 を介してシグナルを伝達して図右の写真のごとく管腔形成を促進する. この CD44 を介したシグナルの下流においてどのような遺伝子発現の変化が生じ管腔形成を促進させたのかを解明するために DNA チップによる発現遺伝子の網羅的解析が行われた.

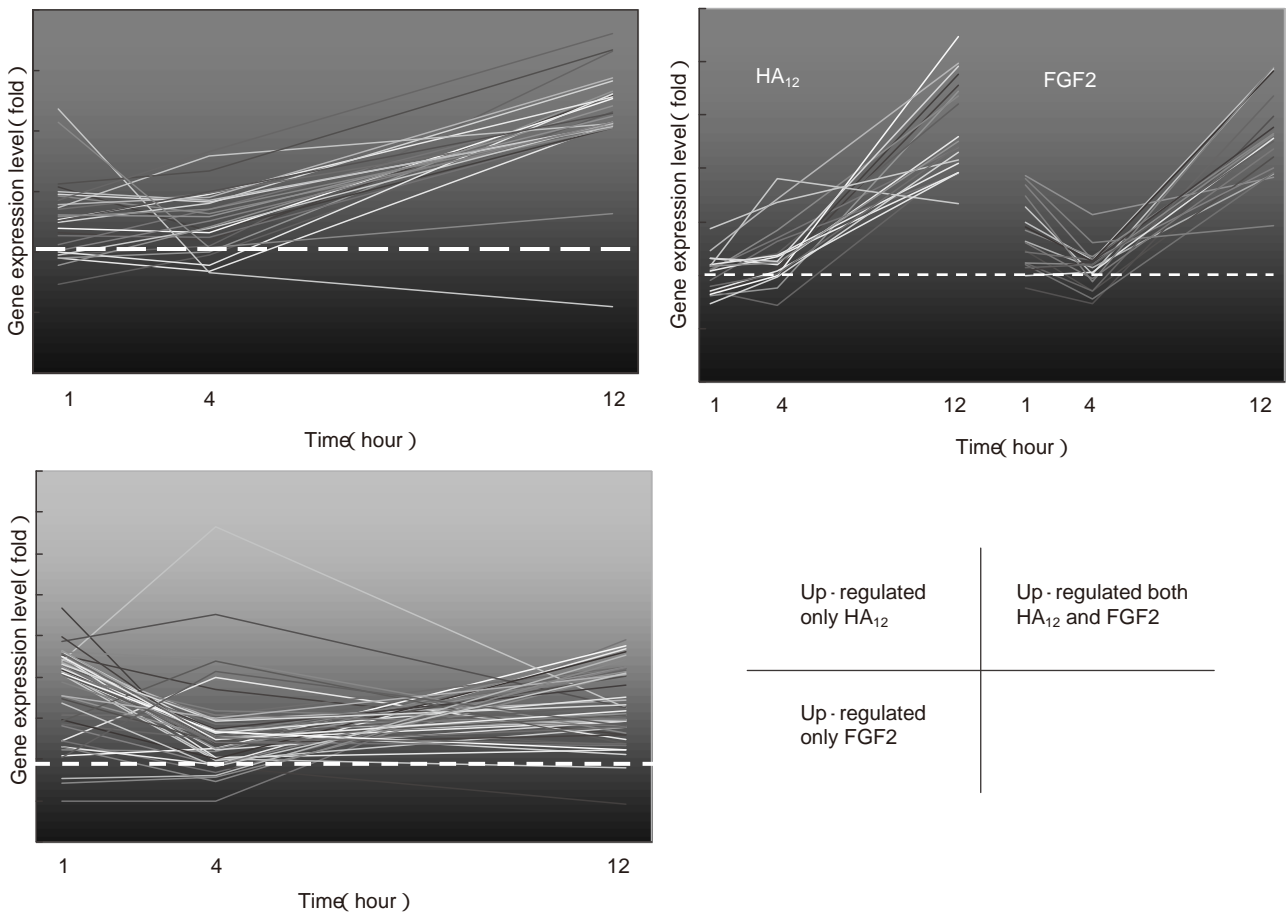


図 3 遺伝子発現パターン解析.

ヒアルロナンオリゴ刺激のみで発現が亢進した遺伝子を左上, fibroblast growth factor(FGF)2 刺激のみで発現が亢進したものを左下, ヒアルロナンオリゴおよび FGF2 刺激ともに発現が亢進していたものを右上に示した.

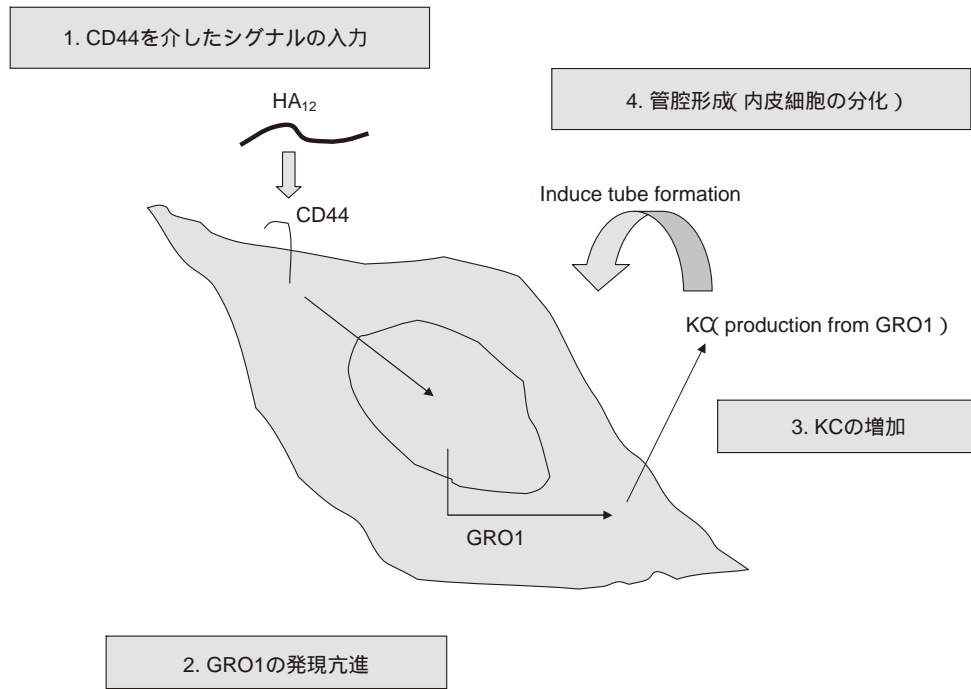


図 4 ヒアルロンオリゴによる血管新生において CXCL1/GRO1 遺伝子の働き。
ヒアルロンオリゴによる CD44 を介した管腔形成を促進作用においては CXCL1/GRO1 遺伝子の発現制御が重要である。

ているものと推測した。図 4 に我々の仮説を示した。ヒアルロンオリゴが CD44 を介して細胞内にシグナルを伝え CXCL1/GRO1 の発現が亢進し CXCL1/GRO1 がコードする蛋白質である KC が増加し内皮細胞の分化すなわち血管新生にかかわっているのではないかと推測した。この仮説を確かめるために CXCL1/GRO1 がコードする蛋白質である KC の中和抗体を投与しヒアルロンオリゴにより誘導される血管新生が抑制されるかを検討したところ、KC の中和抗体を投与することでヒアルロンオリゴにより誘導される血管新生が抑制された。一方、FGF2 により誘導される血管新生には影響はみられなかった。このことからヒアルロンオリゴが誘導する血管新生において CXCL1/GRO1 が重要な働きを担っていることが明らかになった。この解析が示すように DNA チップによる解析で特徴的なのは非常に多くの遺伝子発現情報が得られることである。この遺伝子発現情報を解析することによってターゲットとなる遺伝子・遺伝子群を特定し生物学的意味付けを加えていくことにより、複雑な病態を解明していく一助となる。

もうひとつの発現プロファイルデータの利用方法として、遺伝子発現制御ネットワークを解析する方向がある。野生株と遺伝子破壊株を用いた multi-level digraph 法などがある。本法では遺伝子発現プロファイルデータから遺伝子発現マトリックスを作成して発現に著しい変化があったものを 1、ないものを 0 としてどの遺伝子がどの遺伝子に影響したかを示すバイナリーマトリックスを作成する。バイナリーマトリックスから制御がサイク

ルとなっている部分を新たな遺伝子群と定義して、マトリックスの行列を入れ替えネットワーク構成を明らかにしていく⁹⁾。DNA チップによる遺伝子発現の情報はさまざまな条件のもとでの遺伝子発現パターン解析を可能とするため遺伝子発現制御ネットワークの解析を可能とし、疾病原因遺伝子の検索や疾病モデルの構築を可能とする。

薬剤の治療標的の研究にも DNA チップによる知見が利用される。前立腺癌の治療として血清テストステロン濃度を下げるために競合的アルドステロン受容体拮抗薬が併用される。しかし、これらの薬剤では使用により耐性が生じてホルモン不応性(HR)となることが知られている。HR 前立腺腫瘍細胞の増殖メカニズムを検討するために DNA チップによる解析が行われた¹⁰⁾。この検討によりアルドステロン受容体 mRNA のみが発現量の変化を示した。つまりアルドステロン受容体の過剰発現のみでホルモン不応性となることが示唆されたのである。実験によりアルドステロン受容体を過剰発現させることによりホルモン感受性腫瘍細胞はホルモン不応性腫瘍細胞となり、RNAi によりアルドステロン受容体をノックダウンさせることによりアンドロゲン存在下の腫瘍細胞の増殖が抑制されることが示された。さらにアルドステロン受容体の発現量が増加するだけで、アルドステロン受容体拮抗薬の存在下において腫瘍細胞が増殖可能となるかが検討された。アルドステロン受容体遺伝子を過剰発現する細胞において、アルドステロン受容体遺伝子のプロモーターに結合するコアクチベーター、コリプレッ

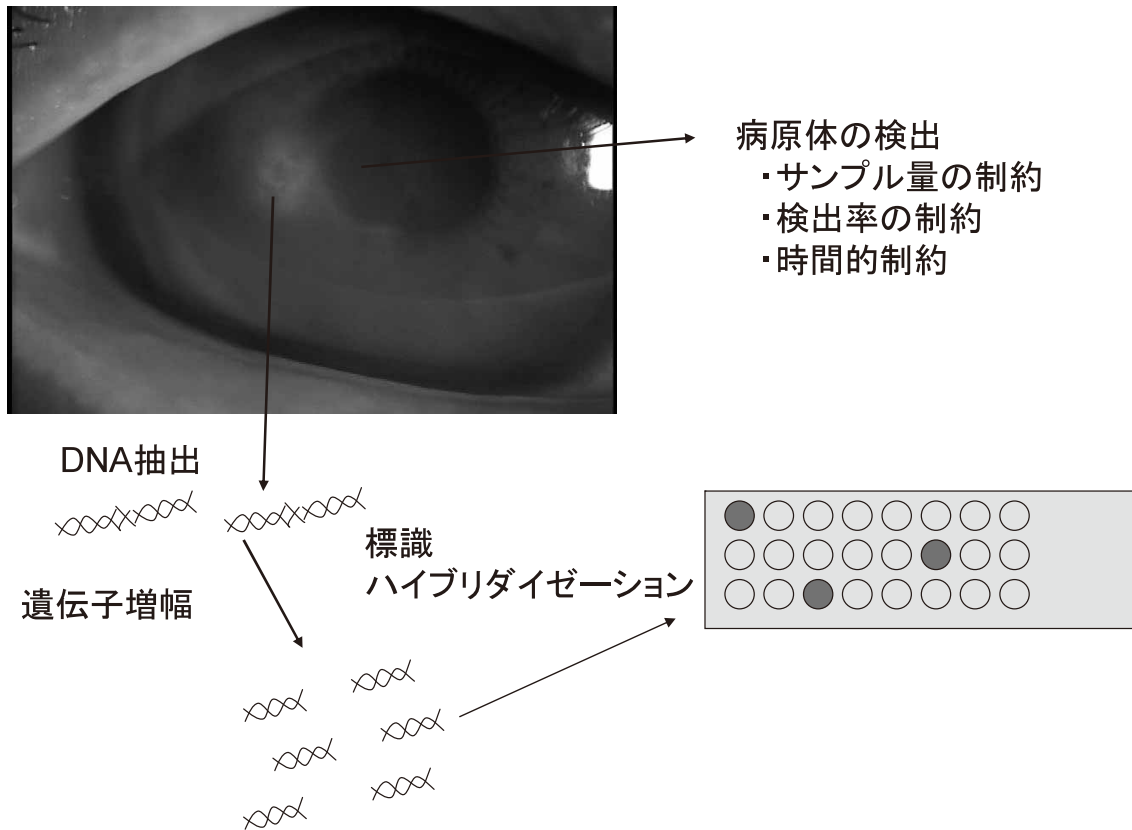


図 5 眼科領域感染症における DNA チップ応用の可能性.

従来の病原体検出法では、サンプル量の制約・検出率の制約、時間的制約が存在している。病原体遺伝子の増幅を伴った DNA チップによる病原体の網羅的解析がこれらの制限を解決する可能性がある。

サーが変化していることが明らかとなった。このことからアルドステロン受容体の発現によりアルドステロン受容体遺伝子の転写のバランスに変化が生じ、アルドステロン受容体拮抗薬による阻害効果が失われることが示唆された。したがって、ホルモン不応性前立腺癌の治療薬としてアルドステロン受容体の核移行を阻害する分子、標的遺伝子上でアルドステロン受容体転写複合体の集合を阻害する分子などの可能性が示された。

IV 遺伝子型解析 (genotyping)

DNA チップによるもう一方の解析が遺伝子型解析である。先の遺伝子発現解析が mRNA の解析であるのに対して、遺伝子型解析は DNA の解析である。single nucleotide polymorphism (SNP) 解析も遺伝子型解析のひとつである。SNP は一塩基多型ともいわれ DNA 塩基配列中の 1 つの塩基置換によるものである。変異の頻度が人口の 1 % 以上のものが SNP であり、1 % 未満であれば mutation である。SNP をマーカーとした疾患遺伝子の同定は遺伝子機能の情報の有無にかかわらず、つまりは未知の遺伝子でもゲノム全域から体系的スクリーニングが可能である特徴がある¹¹⁾。高血圧や糖尿病などの誰もが罹患する可能性のあるいわゆる common disease はいくつかの遺伝的要因と環境的要因が複雑に関連してお

り、しかもメンデル遺伝病のように遺伝的要因が強くないためその遺伝的要因の解明は困難であると考えられてきたが、SNP 解析を用いることで疾患感受性遺伝子を明らかにしようと試みられている。

眼科領域との関連で考えれば病原体のサブタイピングが遺伝子型解析の中でも身近なものかもしれない¹²⁾。感染症における DNA チップの利用は、病原体、宿主、宿主と病原体の相互作用のそれぞれ領域において発展してきている¹³⁾。病原体の検出はもちろんであるがアウトブレイクの検出¹⁴⁾、病原性そのものも検討されている。眼科領域感染症における病原体検索において問題となることは、得られるサンプルが他科と比較して極端に少ないことである。少量のサンプルから網羅的検討が可能である DNA チップの特性がこの問題を解決する可能性がある。現在はサンプルを培養し、起炎菌の同定を試みているわけであるが、培養結果を得るまでの時間的制約、サンプルが少ないための検出率の制約が存在する。ヒトおよび他の起炎菌と相同性のないゲノム領域を増幅して DNA チップを用いて検出することによりこの時間的制約、検出率の制約を解決する可能性がある。実際に DNA チップと polymerase chain reaction (PCR) 法を組み合わせることで病原体を網羅的に検出する試みが行われている¹⁵⁾ (図 5)。DNA チップを用いることにより従

来の培養法, 直接鏡検検査と比較してウイルス, 細菌, 真菌を含めた病原体の検出が同時にかつ網羅的に行うことが可能となる. 一方で DNA チップを用いた場合, その検出感度が高いがゆえに図 5 に示したシェーマのように複数の病原体が検出される可能性があり臨床所見との整合性を確認する必要がある. さらに薬剤耐性遺伝子, 毒素遺伝子を DNA チップにのせておくことで診断のみならず治療, 病態についての情報を得ることも可能であり今後の発展が期待されている.

V おわりに

DNA チップを用いた遺伝子発現解析, 遺伝子型解析は基礎研究のみならず広く臨床とかがわりをもつようになってきている. 眼科領域においても疾病の病態解明のみならずに感染性疾患における病原体の網羅的検索など我々の臨床現場に近い応用も試みられており今後の発展が期待されている.

本論文は眼科 DNA チップ研究会からの総説である.

文 献

- 1) **Young AY** : Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell* 107 : 9—15, 2000.
- 2) **Wilson AS, Hobbs BG, Speed TP, Rakoczy PE** : The microarray : potential applications for ophthalmic research. *Mol Vis* 8 : 259—270, 2002.
- 3) **Brazma A, Vilo J** : Gene expression data analysis. *FEBS Lett* 480 : 17—24, 2006.
- 4) **Churchill GA** : Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* 32 Suppl : 490—495, 2002.
- 5) **Yang YH, Speed T** : Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat Rev Genet* 3 : 579—588, 2002.
- 6) **Takahashi Y, Li L, Kamiryo M, Asteriou T, Moustakas A, Yamashita H, et al** : Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner. *J Biol Chem* 280 : 24195—24204, 2005.
- 7) **West DC, Kumar S** : Tumour-associated hyaluronan : a potential regulator of tumor angiogenesis. *Int J Radiat Biol* 60 : 55—60, 1991.
- 8) **Rahmanian M, Heldin P** : Testicular hyaluronidase induces tubular structures of endothelial cells grown in three-dimensional collagen gel through a CD44-mediated mechanism. *Int J Cancer* 97 : 601—607, 2002.
- 9) 久原 哲 : マイクロアレイ技術を用いた遺伝子発現ネットワーク同定. 北野宏明(編) : システムバイオロジーの展開. シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京, 69—76, 2001.
- 10) **Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, et al** : Molecular determinations of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 10 : 33—39, 2004.
- 11) **Kruglyak L** : Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 23 : 397, 1999.
- 12) **Loy A, Bodrossy L** : Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays. *Clinica Chimica Acta* 363 : 106—119, 2006.
- 13) **Bryant PA, Venter D, Robins-Browne D, Curtis N** : Chips with everything DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 4 : 100—111, 2004.
- 14) **Lenard EE, Takata T, Blaser MJ, Falkow S, Tompkins LS, Gaynor EC** : Use of an open-reading frame-specific *Campylobacter jejuni* DNA microarray as a new genotyping tool for studying epidemiologically related isolates. *J Infect Dis* 187 : 691—694, 2003.
- 15) 鈴木 崇, 井上幸次 : DNA マイクロアレイによる感染症診断. あたらしい眼科 21 : 1499—1500, 2004.