

総説 薬の作用機序と生体機能の分子的理解に向けて

遺伝子塩基配列決定後の研究戦略

石川 紘一¹⁾, 辻本 豪三²⁾

要約: ヒトゲノム塩基配列の読み取りがほぼ完了し、この情報をもとにした新たな研究戦略が現実のものとして模索され始めている。その最終的な目標は、ゲノムワイドのスケールで遺伝子の機能解析を行うことにより、疾病の診断および治療を安全かつ効果的に行うことにある。このため、遺伝子の発現および変異についての研究が実施に移されている。しかし、ゲノム・スケールでの研究については、従来の研究手法とは異なる点が多く、具体的な戦略についての理解は十分になされていない。そこで、第74回日本薬理学会年会のシンポジウムとして「遺伝子塩基配列決定後の研究戦略」をとりあげ、この分野において実際に研究を展開している4つのグループ [1] William O. C. M. Cookson (Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford: Asthma and atopic dermatitis: models for genetic and genomic investigations of complex genetic diseases), [2] 油谷浩幸 (東京大・先端研・ゲノムサイエンス部門: 網羅的遺伝子発現プロファイリングによる分子診断-癌ゲノミクス研究への応用), [3] 辻本豪三ら (国立小児医療センター・分子細胞薬理: ラット標準遺伝子ライブラリー DNA チップを用いた病態関連発現遺伝子の解析), [4] 浅井 聰ら (日本大・医・薬理: GeneChip™ による虚血時海馬 mRNA の発現-ポストゲノム戦略の出発点) から研究成果の報告を受け、今後の戦略について議論した。ゲノム情報に基づく研究は端緒にいたばかりであり、当面遺伝型と従来の研究成果を含めた

生体機能の表現型との関連性についての情報を蓄積することが重要であると確認された。

1. はじめに

2000年6月に、ヒトゲノム塩基配列の概要版が公表された。この結果、「生命の設計図」であるゲノム情報をどのように応用するかが現実の問題として議論され始めている。20世紀の生命科学は、一つ一つの機能性分子を対象として深化を進めてきたが、今世紀においてはゲノム情報に基づいて網羅的・統合的に展開されるものと考えられている。すなわち、塩基配列からゲノムの機能を見つけだし、その機能を生命現象の調和という観点から研究をしようとするゲノム機能科学 (functional genomics) への転換である。実際に想定されている研究は、ゲノム情報に基づいた疾病の診断であり、安全かつ効果的な治療方法の開発である。しかし、このような研究はその端緒にいたばかりであり、具体的にどのような戦略があるのかについての理解は十分とはいえない。そこで、この分野において実際に研究を展開している4つのグループから現状について報告していただき、今後の可能性についてシンポジウムを開催した。本稿は、各演者の発表に基づき提出していただいた原稿をまとめたものである。

2. Asthma and atopic dermatitis: models for genetic and genomic investigations of complex genetic diseases

William O. C. M. Cookson
(University of Oxford, Asthma Genetics Group, Wellcome Trust Centre for Human Genetics)

Real progress has been made in the understanding of the genetic basis of allergic disease. A number of candidate genes with clear effects have been identified, including TNF- α , IL13, CD14, Fc ϵ RI- β and IL-4R. Genetic linkage studies have identified regions of consistent genetic linkage on chromosomes 2, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13 and 16. The loci on chromosome 2, 7, 12 and 16 may be shared with other immune diseases such as inflam-

キーワード: ゲノム機能科学, 遺伝型と表現型,
遺伝子発現プロファイリング,
遺伝子ライブラリー,
バイオ・インフォマティクス

¹⁾ 日本大学医学部薬理学教室
(〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30)
e-mail: ishikawa@med.nihon-u.ac.jp

²⁾ 国立小児病院小児医療研究センター分子細胞薬理研究部
(〒154-8509 東京都世田谷区太子堂 3-35-31)
e-mail: gtsujimoto@nch.go.jp

原稿受領日: 2001年5月10日, 編集委員会依頼総説

matory bowel disease and rheumatoid arthritis. Single gene disorders with an atopic component also show linkage to the same regions. Hyper-IgE syndrome is linked to the chromosome 4 atopy locus, and Nether-ton's disease and familial eosinophilia is linked to chromosome 5. The MHC region on chromosome 6 is emerging as a major locus with pleiotropic effects on asthma that go beyond HLA-DR restriction of allergens. Positional cloning of asthma and atopy genes is now feasible, and gene identification from the chromosome 2 and 13 loci is well advanced in our group. In the next year, several groups will report the results of genome wide screens for linkage to atopic dermatitis, and it will be of interest to see if these identify known atopy loci or show the presence of genes specific for atopic dermatitis. Positional cloning of disease genes will be greatly helped by the completion of the human genome sequencing project and by the use of new technologies such as DNA arrays and proteomics.

ゲノム塩基配列決定後の応用として、疾患関連遺伝子の解析が重要な課題として取り上げられている。この解析により、病気の原因が明らかとなり、さらに治療のための方策も定まってくる。ところで、単一遺伝子性疾患の場合には異常遺伝子が特定できるが、「ありふれた病気 common diseases」においては複数の遺伝子が病気の発症に関わってくる。この講演においては、主として疾患感受性遺伝子の同定について述べられ、その最終的到達点として、ゲノム情報に基づく診断技術の可能性が指摘された。このため、喘息が例に取り上げられ、この疾患の表現型 (phenotype) となるマーカーとマイクロサテライトや単一ヌクレオチド多型 (SNPs) といった遺伝型 (genotype) との関連性についてノンパラメトリックな解析方法を用いて疾患関連遺伝子の座位を同定する方法が解説された。その結果、上記抄録に示されているマーカーと遺伝子座位が同定された。今後は、positional cloningなどを加えることにより、さらに遺伝子座位の絞り込みが行われることになるだろう。なお、詳細については文献(1~3)を参照にしたい。

3. 網羅的遺伝子発現プロファイリングによる分子診断—癌ゲノミクス研究への応用

油谷 浩幸

(東京大・先端研・ゲノムサイエンス部門)

細胞の癌化の過程には複数の遺伝子異常が蓄積されており、その結果、癌における遺伝子発現プロファイルには非常に多様性があることが判明してきた。個々の症例の癌細胞の遺伝子発現プロファイルや遺伝子多型情報を測定することにより、オーダーメイド医療、すなわち診断のみならず個別に最適の治療法を選択することに利用できると期

待される。

これまでに大腸癌、急性白血病、悪性リンパ腫、悪性黒色腫、乳癌など種々の腫瘍において DNA アレイを用いた発現プロファイル解析により、病理学的分類や既存の検査結果と相関して発現している遺伝子群が同定されている。遺伝子発現プロファイルが多種に分類される場合、予後や転移などの「癌の性格」と関連づけるため、種々の方法が応用されている。Bittnerらは悪性黒色腫を遺伝子発現パターンから19種に分類し、その予後や転移との関連を報告した(4)。PerouらはcDNAマイクロアレイにより乳癌の遺伝子発現プロファイル解析を行い、個々の癌のプロファイルはやはり多様であったが、化学療法の前後も同一例からの癌では類似していたとしている(5)。我々も肝細胞癌の分化度の違いに相関する遺伝子を用いて、Neighborhood解析により分類する作業を行った結果を紹介した。これらのプロファイル情報に加えて、臨床情報から得られる「癌の性格」や実験などから得た特定の遺伝子発現による作用のカスケード情報とを組み合わせる事によって、より正確に癌を理解できるようになると考えられる。検体の採取に際して癌細胞のみを選択すべくマイクロディセクション法の利用も有効であるが、微量RNAから各遺伝子の発現比を維持したままリニアに効率よく増幅する方法の開発が今後の検討課題である。

網羅的な発現解析は転写因子などの調節を受ける遺伝子群の同定に有効であり、Leeらは癌抑制遺伝子WT1の発現誘導に伴い、その発現が74倍に誘導される遺伝子として amphiregulin 遺伝子を報告した(6)。また、腫瘍部で高発現を示す新規遺伝子の同定にも有効であり、肝細胞癌および非癌部での遺伝子発現を約4万の遺伝子について比較したところ、我々も肝細胞癌において腫瘍マーカーとして知られているAFPを含む数個の遺伝子あるいはESTが顕著に増加していたことを見出したので、癌特異的抗原の探索手段として分子標的治療への手がかりとなることが期待される(未発表データ)。また、転移関連遺伝子の探索として、悪性黒色腫由来の細胞株よりヌードマウスを用いて選択した転移性の高い株とその親株について GeneChip 解析した結果、転移性の高い細胞株では RhoC 遺伝子の発現が増加していることが認められ、親株に RhoC 遺伝子を導入することにより易転移性を獲得し、ドミナント・ネガティブな RhoC 遺伝子では転移が抑制されることが示された(7)。我々もスキルス胃癌細胞株 OCUM-2M を用いて、腹腔播種およびリンパ節転移を来しやすい垂株 OCUM-2MD3, OCUM-2MLN との間のプロファイルの違いを解析し、特定の遺伝子クラスタが変化していることを見いだした(8)。易転移性などの生物学的な形質に相関する遺伝子発現の変動を効率よく解析する手

法としての有用性を示すものである。

既存の分類では同一のカテゴリーとされていた癌について、遺伝子発現パターンの違いから新たに分類でき、予後や治療効果の予測に有効であるという報告が出てきている。Alizadeh らは病理所見では様々な予後の混在する Diffuse large B-cell lymphoma の症例を cDNA マイクロアレイを用いて調べ、遺伝子発現プロファイルの類似性から “germinal centre B-like” と “activated B-like” の 2 種類に大きく亜分類し、その予後が異なるという結果を導き出した(9)。今後、症例数や解析する遺伝子数を増やしての追試が待たれる。NCI60 という 60 種類の代表的な癌細胞株パネルの発現プロファイル解析をはじめとして、発現プロファイルを用いて抗癌剤の薬理作用を体系的にデータベース化しようという試みも米国癌研究所 (NCI) の Weinstein らを中心として進められている(10~12)。

ところで、大量の発現データを解析するアルゴリズムの開発も急務である。類似の発現プロファイルを呈する遺伝子群を抽出することはクラスタ解析により可能である。癌の分類を試みる際の問題点として、発現解析した全ての遺伝子を用いて階層的なクラスタ解析を行った場合、低レベルでしか発現していないような遺伝子の測定感度外の変動や大きな遺伝子クラスタの存在の影響により、肝心な遺伝子の変化を捉えられなくなる危険性がある。解析に用いる遺伝子セットの選択が大きな課題である一方、分類のアルゴリズムについても種々の数理科学的な試みが行われており、Kohonen らの自己組織化マップや k -means 解析などの非階層的クラスタ分析あるいは SVM (support vector machine) 解析が用いられている(13)。

癌ばかりでなく、病態モデル動物や遺伝子改変動物のマイクロアレイ解析も数多く見られる。例えば、発現プロファイリングを用いて、自然発症高血圧ラット (SHR) の解析から Cd36 遺伝子の発現低下を見だし、責任遺伝子として有力であることが報告されている(14)。また Lawn らは Incyte 社の cDNA マイクロアレイを用いて、HDL コレステロールの低下を特徴とする Tangier 病患者と健康者の線維芽細胞の発現プロファイリングを行い、患者において発現低下が認められた 100 余りの遺伝子の中から、従来、遺伝連鎖解析により決定された遺伝子座 9q31 領域に存在する ABC1 遺伝子を原因遺伝子として同定した(15)。

4. ラット標準遺伝子ライブラリー DNA チップを用いた病態関連発現遺伝子の解析

辻本豪三, 勝間 進, 塩島 聡, 鈴木康仁, 伊川浩司, 西 桂, 平澤 明

(国立小児医療センター・分子細胞薬理)

「生命の設計図」であるゲノム構造がほぼ明らかとされたことにより、世界の研究者の関心は構造から塩基配列の機能をゲノムスケールで解釈するゲノム機能科学 (functional genomics) へ移行しつつあるが、遺伝子機能解析に関しては未だ汎用性のある方法論が確立していない(16, 17)。また、医学に限定して考えると、数多くの単一遺伝子疾患の原因遺伝子がポジショナルクローニングにより同定された一方、いわゆる一般的疾患といわれる多くの疾患は単一遺伝子疾患では無く、環境因子と遺伝因子の複合的機序により発症する多因子疾患であることが明らかとなっており、さらに遺伝因子は複数であることから、多因子疾患の病態解析に有効な方法論を欠く状況である。ごく最近、ゲノムテクノロジーの進展により、微量検体で発現変動している遺伝子群を解析する技術革新としてマイクロアレイ法や DNA チップが登場した。特に、その経済性、網羅性の点からマイクロアレイ法は現在飛躍的にその普及性をのばしており、その応用はヒトおよびマウス等のゲノムプロジェクトより得られつつある遺伝子情報と相まって、今後遺伝子機能解析の最有力な技術となることが期待されている。一方、薬理学において疾患モデル動物として薬効評価に従来より用いられてきている動物モデルはラットが主であり、その遺伝子解析はヒト、マウスと比して著しく遅れており、遺伝子情報に乏しい。このような背景の疾患モデル動物における体系的かつ網羅的な遺伝子発現解析が可能となれば、従来より蓄積されているラットを用いた膨大な生理、生化学薬理データを遺伝子変動と関連して有効に活用でき、そのもたらす効果は計り知れないものがある。このような背景のもと、我々はその遺伝子情報が未だ充実していない動物モデル (ラット) の各臓器別標準化 cDNA ライブラリー (注1) を作成し、このライブラリーを高密度に配置した臓器別ラット標準ライブラリー cDNA チップ

(注1) ここでいう標準化ライブラリーとは、各臓器で発現している約数万個の全発現遺伝子の種類が反映されたライブラリーの意である。通常の cDNA ライブラリーではその発現頻度が平均化されていないことから、例えば細胞骨格等の housekeeping 遺伝子 (β アクチンなど) が多数重複存在する。発現頻度を標準化することにより、多くの種類が反映された遺伝子ライブラリーを作成され、その遺伝子を用いたチップは各臓器における発現遺伝子カタログとなる。

ブを用い、数種の疾患モデルラット (IgA 腎症ラット, 自然発症高血圧ラット, II 型糖尿病など) における病態遺伝子発現の解析と既存の薬物治療により変動する発現遺伝子群を絞り込むことを目的とする研究を展開している (18)。

そのための方法論として具体的には [1] 標準ライブラリー作製: 通常の cDNA ライブラリーでは遺伝子発現が一様ではなく, 高頻度発現および中頻度発現の遺伝子で cDNA ライブラリーの約 7 割近くを占めるといわれている。そのような遺伝子ライブラリーをそのままチップ化すると発現頻度の高い遺伝子群の重複が多く, 全遺伝子種を反映しない, 非効率なものとなる。近年, その問題点を解消するため, 一度カラム等に吸着させた cDNA ライブラリーを再度その cDNA ライブラリー自身でサブトラクトする事により高頻度発現, 中頻度発現の遺伝子群の多くが取り除かれ, 逆に低頻度発現遺伝子群が保持され, 発現頻度を標準化 (ノーマライズ) したライブラリーが作成される事が発案された (例えば文献 19)。

[2] マイクロアレイによる標準化 cDNA チップ作製: 哺乳動物では発現している遺伝子は約数万, 各臓器において発現している遺伝子は約 1, 2 万と考えられている。したがって, 上記の方法論により作成された各臓器の標準化ライブラリーの内約 5,000 から 10,000 クローンをチップ化する事により, 各臓器において発現する全遺伝子群をカタログ化したチップが作成出来る。このチップを用いて各種病態, 薬物作用等の場合における各臓器における遺伝子発現の変動をモニター解析し, 病態関連遺伝子群, 治療関連遺伝子群を絞り上げることが可能となる。そのようにして絞られた候補遺伝子を塩基配列し, 遺伝子構造より機能を類推するとともにその病態生理上の意義を検討できる。

[3] 臓器別ラット標準ライブラリー cDNA チップによる疾患モデル動物における発現遺伝子解析: 上述の標準化 cDNA ライブラリーをラットの代表的な各臓器 (心臓, 腎臓, 肝臓, 肺, 血管等) および中枢神経系の各部位より作成し, 更にそのライブラリーをマイクロアレイ化したチップを作成する。作成された臓器別ラット標準ライブラリー cDNA チップを用いて, 各種病態ラットにおける臓器別遺伝子発現プロファイルを解析する。更に, 各種薬物治療等によりこれらの遺伝子群がどのような発現変動を行うか等を経時的にモニターし, 個体における発現型 (生理, 生化学パラメーター) との相関を解析する。これらの解析研究より疾患関連, 治療関連遺伝子群の絞り込み, 同定を行う。現在, 疾患ラットモデルとして考えているものとしては, IgA 腎症ラット, 自然発症高血圧ラット, II 型糖尿病モデルラットなどである (投稿中)。

以上, ポストゲノムシーケンス時代における薬理学研究の一つの方向としての我々の取り組みである「ラット標

準遺伝子ライブラリー DNA チップを用いた病態関連発現遺伝子の解析」につき概説した。マイクロアレイによる DNA チップ作成法はごく最近開発され, 未だ国際的にも試行錯誤を行っている進化しつつある技術であることから, 国内でこの革新的基盤研究をさらに発展させていくため, より多くのそして様々な分野の研究者と情報交換を行う必要性を痛感し, 申請者が中心になって, マイクロアレイ研究会 (1999 年 4 月発足) を発足し, 一日も早くより完成度の高いマイクロアレイ技術, マイクロファブリケーション技術を用いた研究の促進を目指して, 技術交換, メイリングリストによるマイクロアレイに関する様々な情報交換の他, 機器材料などの相互共同利用を含めた研究交流の促進ホームページ (<http://pharmac.nch.go.jp/array.html>) の公開を行っており, またこれらの活動の成果として, 標準プロトコル集を作成した。是非, 多くの薬理研究者との「ラット標準遺伝子ライブラリー DNA チップを用いた病態関連発現遺伝子の解析」による共同研究による共通データベースの構築並びにマイクロアレイ研究会へのご参加を期待いたします。

6. GeneChip™ による虚血時海馬 mRNA の発現—ポストゲノム戦略の出発点

浅井 聡, 永田俊人, 高橋泰夫, 石井敬基, 石川紘一
(日本大・医・薬理)

ゲノム解析研究の展開により, 種々の生物のゲノムの全塩基配列が続々と決定されてきた。また, ゲノム解析計画の最終的なターゲットともいえるヒトゲノムの全構造の解明もほぼ終了した現在, ゲノム解析からプロテオーム解析にいたる経路の中で, 遺伝子をその発現プロフィールにより, 機能分類を行なうトランスクリプトーム解析 (transcriptome analysis) の研究はますます盛んになってきている。

GeneChip™ は, フォトリソグラフィーとコンビナトリアルケミストリーの手法を利用したスポット技術が他の DNA チップとは異なっており, サンプル調製からデータ収集まで実験条件が最適化されているため, 高感度, 広いダイナミックレンジおよび再現性の高いデータの獲得が実現されているといわれ世界的に汎用されている (20, 21)。

ゲノム DNA の変異を解析するゲノム解析と, 遺伝子の発現を解析する発現解析の両者が可能であるが, 今回の我々の発表は, 遺伝子発現解析システムを用いて行った。

成熟マウスの両側総頸動脈を 20 分間結紮して血流を遮断し, 脳虚血モデルとした。その後血流を回復してから経時的 (0, 2, 6, 24 時間) に屠殺して海馬を取り出し, プロトコルに従って試料を作製し, Mu6500 Oligonucleotide DNA Probe アレーを用い, GeneChip™ システムに

より遺伝子発現解析を行った。Mu6,500 Oligonucleotide DNA Probe アレーでは、6,500 種類のゲノムを同時に解析できる。このデータをもとに、スカッタープロットを使って解析し、2, 6, 24, 各々時間後の各時点において約数百種類の遺伝子に有意の変化が認められた(22)。また、発現が増加したものと、低下したものの比率は約 3 対 1 であった。低下した遺伝子発現の判断は、0 時間の遺伝子の発現量と機械自体の検出感度に影響されると考えられるので、実際は低下した遺伝子はいくつ多いと思われる。さらに、数百にも及ぶ変化のあった遺伝子の中には、その遺伝子配列情報はわかっているが生体内における機能は未知であるものや、遺伝子配列情報のごく一部がわかっている EST (expression sequence tag) の割合が半分以上であった(1999 年末時点)。

我々は、主にラットを使って脳虚血病態の研究をしてきた。マウスの脳虚血病態は実験に用いるストレインによる病態の差が大きいこと、これに対してラットにおいては genetic background や虚血病態モデルにストレインによるばらつきが少ないことが指摘されているので、ラットを使った脳虚血病態の遺伝子解析も行なっている。しかしながら、チップ上のラットの遺伝子プローブは約 3 万 4 千種類あることから、マウスの実験結果を元に、遺伝子配列情報はわかっているが生体内における機能は未知であるものと EST の合計を推計すると、約千種類にも及ぶ脳虚血操作を行うことによって変化する遺伝子群が存在すると予想される。したがって、これら多量の病因遺伝子の候補から、いかに自分たちの研究思考にあった遺伝子群を絞り込む (gene shaving) が我々の当面の課題である。

ここで最近いわれている、いわゆるバイオインフォマティクスが重要な役割を果たすことは言うまでもない。現在一般的に行われている階層的、非階層的クラスター分類を行ったり、候補遺伝子の ORF (open reading frame) が分かれば、タンパク質の解析 (ホモロジー、モチーフ、疎水領域、グルーピング検索) を行うことが可能となろう。EST の塩基配列情報から ORF を同定することができなければ consensus 配列を用いた ORF を予想したり、RACE 法などを用いて独自に塩基配列を伸長することも考えられる。バイオインフォマティクスの情報から導かれた遺伝子候補も、その完全長を解説し、実際に転写され、その遺伝子が脳虚血操作によってタンパク質が合成されていることを検証するところまで行うことは重要ではある。しかしながら、新規のタンパク質の精製やその抗体を作成する事は時間と費用がかかることも事実である。

そこで、我々は、上記のバイオインフォマティクスを用いた絞り込みの他に、脳切片の in situ hybridization を用いることによって更なる候補遺伝子の gene shaving

を行っている。脳神経系は特に、多種多様な細胞が臓器を構成し複雑な機能を生み出しているのので、脳切片での組織学的な検討は研究を進める上で大変有効な情報となる。近年、大量の試料について高速に効率よく解析を行う自動 in situ hybridization システムが完成されつつあるので、GeneChip を用いた実験結果と遺伝子配列情報を利用して、人工的に cRNA プローブを作成して脳組織の in situ hybridization を行い、そのプローブの脳内局在化を調べることにより、多数の遺伝子のスクリーニングを行なっている。形態学的な観点から遺伝子の選別を行うので、遺伝子配列情報はわかっているが生体内における機能は未知であるものでも、遺伝子配列情報のごく一部がわかっている EST でも同様の方法でプローブ作成ができる。たとえば、パーキンソン氏病を研究していれば、ほとんどの場合、候補遺伝子は黒質-線条体にその発現がしていることを期待して研究は進められているので、in situ hybridization を行いたスクリーニングによって注目部位に発現している遺伝子群を選別することが可能となる。その結果、研究目的や創薬シーズの開発をより正しい方向に導くことができ、研究・開発にかかる労力と時間が短縮され、費用を少なくすることができ、さらに疾患に関連する遺伝子の探索、クローン化した遺伝子または EST の未知の機能の探索、ゲノム創薬などに利用することができると考えている。

6. まとめ

ヒトゲノム塩基配列決定後の医学研究については、今その端緒についたばかりである。しかし、その研究は従来のものとは全く違っている。その理由の一つは、実験技術の著しい進歩が研究戦略に先行している点である。すなわち、その解読は自動化、高速化が飛躍的に進み、短時間内に塩基配列を決定することができるようになった。また、マイクロアレイ・テクノロジーの進歩により、遺伝子の発現や変異がゲノムワイドなレベルで検出できるようにもなった。この結果、これまでの研究では考えられなかったような膨大な情報が手にはいるようになり、どのように利用するかを検討が後からついてくるという状況にある。もう一つ重要なことは、従来の研究が個体から細胞、さらに機能性タンパク質へとその対象を細分化していったのに対して、生命現象の設計図が明らかにされたことから、調和のある生命という観点から、遺伝子機能の「統合的」理解が必要となってきたことである。これは科学思想の転換ともいえる。

今回のシンポジウムでは、遺伝型 (genotype) を調べることは比較的簡単にできるようになったが、個々の遺伝子がどのような機能の発現型 (phenotype) と結びついていのかを解明することが当面の重要課題であることが確認された。その上で、ゲノムレベルでの網羅的解析から、統

合的な生体機能が理解されることになるだろう。このためには、さらに進歩したバイオインフォマティクス技術が必要とされる。そのような成果をもとにして、疾病関連遺伝子が明らかにされ、それらをマイクロアレイ上に配置した診断用チップの開発が試みられることになるだろう。また創薬に関わる実験においても、モデル動物における表現型と遺伝型との関連を明確にした上で、ゲノムワイドな解析が必要となろう。このような点から、ゲノム塩基配列決定後の研究戦略としての第一歩は、従来の研究成果として蓄積されている生理学的・生化学的反応と遺伝子のもつ機能とを正確に結びつける作業が必要であり、このためにも研究者が相互に情報を提供し、データベースを構築する必要がある。

文 献

- 1) Cookson WOCM and Moffatt MF: Genetics of asthma and allergic disease. *Hum Mol Genet* **9**, 2359-2364 (2000)
- 2) Bhattacharyya S, Leaves NI, Wiltshire S, Cox R and Cookson WOCM: A high-density genetic map of the chromosome 13q14 atopy locus. *Genomics* **70**, 286-291 (2000)
- 3) Palmer LJ and Cookson WOCM: Genomic approaches to understanding asthma. *Genome Res* **10**, 1280-1287 (2000)
- 4) Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, et al: Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* **406**, 536-540 (2000)
- 5) Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, et al: Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* **406**, 747-752 (2000)
- 6) Lee SB, Huang K, Palmer R, Truong VB, Herzlinger D, Kolguist KA, Wong J, Paulding C, Yoon SK, Gerald W, et al: The Wilms tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell* **98**, 663-673 (1999)
- 7) Clark EA, Golub TR, Lander ES and Hynes RO: Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* **406**, 532-535 (2000)
- 8) Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsumi S, Hirakawa K, Kodama T and Aburatani H: Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with highly metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res* **61**, 889-895 (2001)
- 9) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, et al: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503-511 (2000)
- 10) Ross DT, Schert U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, et al: Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* **24**, 227-235 (2000)
- 11) Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, et al: A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* **24**, 236-244 (2000)
- 12) Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES and Golub TR: Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2907-2912 (1999)
- 13) Furey TS, Cristianini N, Duffy N, Bednarski DW, Schummer M and Haussler D: Support vector machine classification and validation of cancer tissue samples using microarray expression data. *Bioinformatics* **16**, 906-914 (2000)
- 14) Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al-Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, et al: Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* **21**, 76-83 (1999)
- 15) Lawn RM, Wada DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM and Oram JF: The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* **104**, R25-31 (1999)
- 16) 21世紀の創薬科学：序文，第4章 細胞情報認識と創薬への応用。辻本豪三，田中利男編集，野口照久，石井威望監修，共立出版，東京（1998）
- 17) 辻本豪三：ゲノム機能研究プロトコール（ポストゲノム時代の実験講座 1）。辻本豪三，田中利男 編，羊土社，東京（2000）
- 18) Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Suzuki Y, Ikawa H, Takagaki K, Kaminishi Y, Murai M, Ohgi T, Yano J, et al: Functional genomic search of G-protein coupled receptors (GPCR) using microarrays with normalized cDNA library. *Methods in Enzymol* (in press)
- 19) Bonalzo MF, Lennon G and Soares MB: Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res* **6**, 791-806 (1996)
- 20) Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follett MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, et al: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotech* **14**, 1675-1680 (1996)
- 21) Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH and Lockhart DJ: Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotech* **15**, 1359-1367 (1997)
- 22) 浅井 聡，石川絃一：GeneChip™（Affymetrix 方式）による遺伝子発現解析。辻本豪三，田中利男 編，実験医学別冊，pp. 58-63，羊土社，東京（2000）

Abstract – New strategy on medical research after completion of genome sequencing. Koichi ISHIKAWA¹⁾ and Gozoh TSUJIMOTO²⁾ (¹⁾Department of Pharmacology, Nihon University School of Medicine, Tokyo 173-8610, Japan and ²⁾Department of Molecular, Cell Pharmacology, National Children's Medical Research Center, Tokyo 154-8509, Japan). *Folia Pharmacol. Jpn.* (Nippon Yakurigaku Zasshi) **118**, 170~176 (2001)

Real advances in biotechnology made it possible to complete human whole genome sequencing within a short duration. Although the genome includes a huge amount of information about biological functions and the interest is now directed to the study using genomic information, the genomic strategy is not clearly understood. The following 4 studies were therefore presented and discussed about the strategy after the completion of the genomic sequence in the 74th Annual Meeting of Japanese Pharmacological Society: 1) Asthma and atopic dermatitis: models for genetic and genomic investigations of complex genetic diseases, by W.C.O. Cookson (University of Oxford, Asthma Genetics Group, Wellcome Trust Centre for Human Genetics); 2) Molecular classification by global gene expression profiling: application on oncogenomic research, by H. Aburatani (Genome Science Division, Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo); 3) Functional genomic search of disease-related genes using microarrays with normalized rat cDNA library, by G. Tsujimoto, et al. (Department of Molecular, Cell Pharmacology, National Children's Medical Research Center: and 4) Acute ischemic change of mRNA expression in the hippocampus by GeneChip array analysis: a starting point for post-genome strategy, by S. Asai, et al. (Department of Pharmacology, Nihon University School of Medicine).

Keywords: functional genomics; genotype and phenotype; gene expression profiling; gene library; bioinformatics