

# 新たな血液 RNA 診断システムの構築

研究成果活用プラザ大阪における育成研究 平成 13 年度採択課題  
「発現特化型第 2 世代 cDNA マイクロアレイ作製技術の実用化」



代表研究者：大阪大学・微生物病研究所・環境応答研究部門・  
分子遺伝研究分野・教授・野島 博

段階的サブトラクション（重差分化）法により細胞・組織特異的に転写されている cDNA（遺伝子）群を包括的に単離してきた。そのうち末梢血液細胞特異的に発現している遺伝子群（PREB）を貼り付けた DNA チップを作成し、新たな血液 RNA 診断の基盤ツールとなる製品としての商品化に成功した。

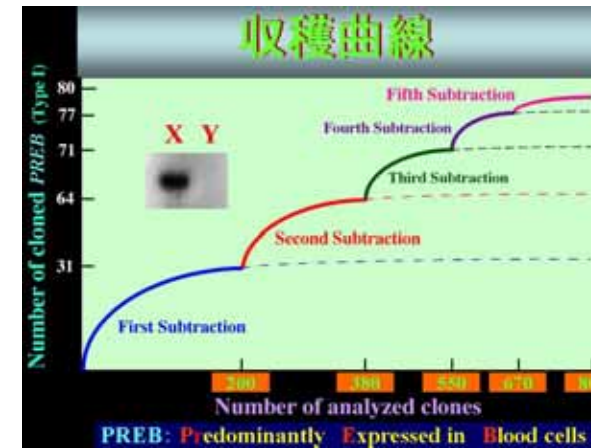


図 1；段階的サブトラクション法の原理と収穫曲線

## 研究内容、研究成果

これまでに段階的サブトラクション法という独創的な技術の開発に成功してきた。この技術を用いると 2 つの生物試料において、一方にしか存在しない mRNA（cDNA）分子を約 2 ヶ月で全てクローニングすることができる。この技術を用い、以下に列挙する各自己免疫疾患を対象とした系において細胞・組織特異的に転写誘導される発現特化型 cDNA（遺伝子）群を包括的に単離してきた。さらにそれらを貼り付けた DNA チップを作成して選択的トランスクリプトーム解析技術の基盤ツールとなる研究を進めて成果を上げてきた。

健康人の血液細胞発現特化型 cDNA 群（PREB: predominantly expressed in blood cells）の包括的単離とそれらを貼り付けた発現特化型 cDNA（遺伝子）群のマイクロアレイ作製を行った。これまでに、305 種類の PREB をクローニングし、これらを貼り付けた PREB-DNA チップをタカラバイオ（株）に技術移転することで商品化することに成功した（販売中）。

全身性エリテマトーデス（SLE）血管炎（angiitis）、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）という 3 種類の自己免疫疾患患者の末梢血細胞に特異的に（健康人に比べて）発現している cDNA（遺伝子）群を多数単離・同定することに成功してきた。3 つの疾患に共通して発現亢進している遺伝子について機能解析を進めるとともに、リアルタイム PCR により患者個々人の血液細胞における発現量と病態との関連を解析することで、病因に迫る試みを展開している。

## ■ 今後の展開、将来の展望

事業化に向けての今後の課題は現状の DNA チップの持つ以下の問題点の克服である。

蛍光色素（Cy3, Cy5）を初めとして米国が持っている特許の使用料のため試薬が高価なこと。

蛍光色素をプローブに取り込む時と DNA チップにハイブリダイズさせる時の 2 つの過程において生じる誤差が積んで効いてくるため、測定における精密な再現性を取ることが容易でないこと。

この 2 つの問題点を同時に克服できる案として、京大工学部の斎藤烈教授・岡本晃充博士らの開発した BDF プローブの採用を考えている。これは微視的な環境に応じて蛍光強度が変化する蛍光性塩基で、DNA がハイブリダイズして二重螺旋となった時にのみ蛍光を発するタイプの 4 つの塩基（A, G, C, T）に類似な BDF が準備されている。そこで、DNA チップに貼り付けたオリゴヌクレオチドの塩基としてこれら BDF を採用すれば、プローブを蛍光色素で標識する必要もなくなる。すなわち、標識むらにより生じる誤差は消滅する。BDF は湿った環境でないと能力を発揮しにくいので、通常の DNA チップは最適ではないという問題点があるが、それを解決してくれるのが、湿ったゲル状の基盤の中にオリゴヌクレオチドを埋め込むという特徴を持つ三菱レイヨン（株）の開発したジェノパールである。ジェノパールは最大で 400 個くらいの遺伝子しか搭載できないというのが欠点であるが、これはもともと数が 100 ~ 300 個程度である発現特化型遺伝子を搭載するという我々の目的には欠点どころか利点に変わる。そういうことを考えて、現在、両者を取り持ちながら共同研究開発の計画を練っているところである。

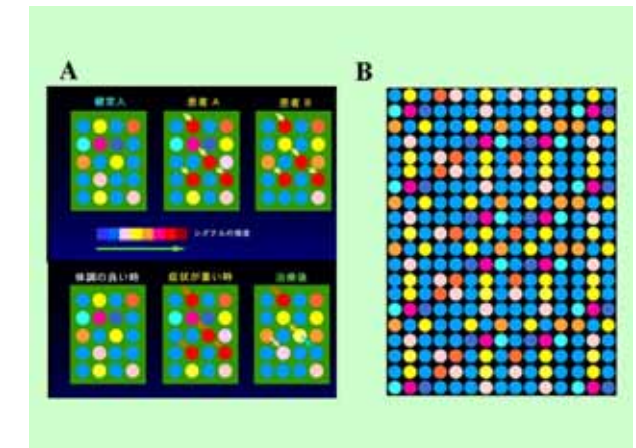


図 2；発現強度パターンの解析例。(A) 20 個のスポットで例示 (B) PREB-DNA チップでは 305 遺伝子を貼り付けている。

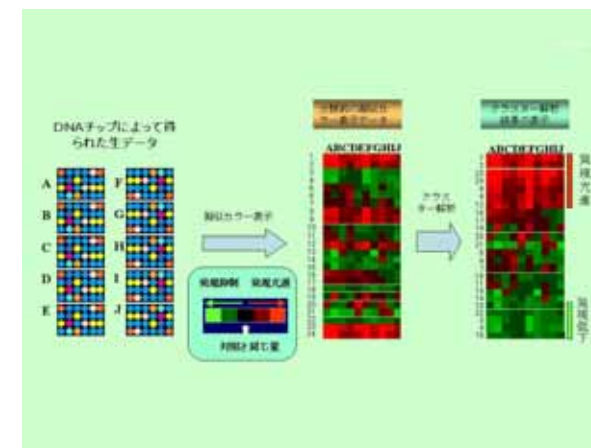


図 3：クラスター解析の原理。生のデータから得られた発現量を緑～赤の擬似カラー表示し、分布の類似したものを一群として表示する。

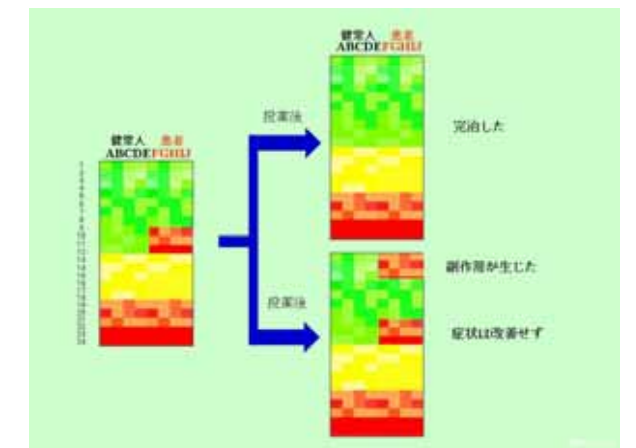


図 4：PREB-DNA チップを用いたクラスター解析による RNA 診断の例。

## ■ 研究体制

代表研究者：大阪大学・微生物病研究所・環境応答研究部門・分子遺伝研究分野・教授・野島 博

研究者：恩田弘明（科学技術振興機構）、柿原嘉人（科学技術振興機構）、  
谷川明恵（科学技術振興機構）、細井香代子（科学技術振興機構）、  
池上公美子（科学技術振興機構）、増田真希（ジーンデザイン(株)）

共同研究機関

タカラバイオ（株）、東洋紡績（株）、ジーンデザイン(株)、三菱レイヨン(株)

## ■ 研究期間

平成 14 年 1 月 ~ 平成 17 年 9 月