

学位論文題名

cDNA array を用いた浸潤性乳管癌における
遺伝子発現解析

学位論文内容の要旨

背景と目的

乳癌は臨床的に多様性をもっており、遠隔転移、局所再発、補助療法への反応など、多彩な臨床経過をたどる。このような多様性は個々の癌により、乳癌細胞の増殖、浸潤、転移に関連する多数の遺伝子の異常の蓄積が異なることに起因するとされる。浸潤性乳管癌は、乳頭腺管癌、充実腺管癌、硬癌の 3 型に亜分類される。これらの 3 組織亜型はその予後が異なることが知られており、生物学的悪性度が異なることは事実である。このような亜分類と関係する遺伝子は現在のところ不明であり、分子生物学的病態が異なるかどうかもまた不明である。一方、腋窩リンパ節転移の有無は乳癌において最も強力な予後因子とされ、全体的治療方針の決定に際し重要である。すなわち腋窩リンパ節転移のない乳癌患者に腋窩郭清を行うことは無駄な侵襲を加えることにつながる。近年、遺伝子異常の複合の結果生じる遺伝子ネットワークの異常を網羅的に cDNA array を用いて研究するアプローチが注目され、癌の層別化、分子病態の解明に有用な方法であることが示されてきた。本研究においては、cDNA array を用いて浸潤性乳管癌における上記の 3 つの亜分類の遺伝子発現プロファイルを解析し、分子病態上異なる特性を有するかどうかを検討した。また、腋窩リンパ節転移の有無を予測する遺伝子発現パターンを同定し、術前に腋窩リンパ節転移の有無については腫瘍細胞の転移好性を予測できるか否かを検討した。

方法

2000 年から 2002 年の間に北海道大学附属病院腫瘍外科、および関連施設において外科的切除された 90 例の浸潤性乳管癌を対象とした。浸潤性乳管癌は、乳癌取り扱い規約の組織学的分類に従い乳頭腺管癌、充実腺管癌、硬癌に亜分類した。凍結組織から mRNA を抽出、RT-PCR により cDNA を増幅、Biotin 標識を行い、1289 種の癌関連遺伝子の搭載されたアレイフィルターに hybridize した。化学発光は CDP-Star を用いた streptavidin - biotinylated alkaline phosphatase system にて行い、アレイフィルターを画像化、個々の遺伝子の発現強度の数値化を行った。データの解析に際し、まず分類したそれぞれのカテゴリーで発現に統計学的有意差を認める遺伝子を選択した。この分類について、選ばれた遺伝子発現値によるデータ空間の分離性を教師なし学習法である EM アルゴリズムにて確認し、次の解析に進んだ。不必要なノイズとしてのデータを省くため特徴選択を行い、パターン分類を行う遺伝子セットを抽出した。特徴選択に sequential

forward selection を採用し、k-nearest neighbor 法により leave-one-out 法を評価して誤識別率が最小となる遺伝子セットを検索した。

結果

1. 40 例の乳頭腺管癌，27 例の充実腺管癌，23 例の硬癌の各群間で発現に有意差のある遺伝子を抽出した。乳頭腺管癌と充実腺管癌を比較すると差異発現を示す 120 遺伝子が抽出された。同様に，乳頭腺管癌と硬癌，充実腺管癌と硬癌を比較すると差異発現を示す遺伝子としてそれぞれ 122 遺伝子，49 遺伝子が抽出された。分類の妥当性を検証するために，EM アルゴリズムによる教師なし学習を行い各組織型間の識別率を検討した。乳頭腺管癌／充実腺管癌，乳頭腺管癌／硬癌，充実腺管癌／硬癌の識別率はそれぞれ 76.1%，79.4%，88%を示し，これらの 3 つの組織亜型の分類の部分データ空間の比較的よい分離が示された。
2. 遺伝子発現プロファイルにより腋窩リンパ節転移の有無が予測可能かどうかを検討した。90 例の浸潤性乳管癌において 40 例は腋窩リンパ節転移陽性，50 例は転移陰性であった。浸潤性乳管癌全体では，腋窩リンパ節転移陽性例と陰性例を比較すると，57 遺伝子で発現が有意に異なり，これらの 57 遺伝子から sequential forward selection 法により腋窩リンパ節転移の有無を予測する最適遺伝子セットを選択すると，誤識別率が最小となる 14 ないし 17 遺伝子が抽出されたが，誤識別率は 16.7%であり比較的高い値を示した。続いて浸潤性乳管癌を各組織型に亜分類し同様の解析を進めた。乳頭腺管癌において最小の誤識別率 7.5%を得る 2 ないし 9 遺伝子により構成される 4 組の遺伝子セットが選択された。充実腺管癌においては最小の誤識別率 0%を得る 3 ないし 82 遺伝子により構成される 80 組の遺伝子セットが選択され，硬癌においては最小の誤識別率 0%を得る 5 ないし 13 遺伝子により構成される 9 組の遺伝子セットが選択された。

考察とまとめ

近年，cDNA array を用いて乳癌患者の予後予測に有用となる遺伝子発現パターンの抽出を試みる研究がさかんに報告されている。cDNA array により数千の遺伝子発現情報が一度の assay で一挙に取得できるため，遺伝子ネットワークの異常を網羅的に解析することが可能となった。cDNA array データを扱う際の問題点は，どのようにして莫大な量の情報の中から真に重要な特徴を抽出するかである。従って，ノイズの多い特徴を除去し，本質的な特徴を同定するために特徴選択法を用い，クラス識別を評価するために最も単純な識別器である k-nearest neighbor 法を用いた。本研究において，90 例の invasive ductal carcinoma を乳頭腺管癌，充実腺管癌，硬癌の 3 型に亜分類し，遺伝子発現プロファイルの相違を比較検討した。今回のデータから，invasive ductal carcinoma におけるこの 3 組織型で遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかとなり，分子病態が異なることが示唆された。しかし，特徴として選択された遺伝子は，全ヒト遺伝子の 3 ないし 4%にすぎない 1,289 個の遺伝子の中での発現差を示したものであり，3 組織型のもつ分子ネットワークの差の一部分だけを反映していることを注意しなければならない。腋窩リンパ節転移の有無は乳癌において最も強力な予後因子の 1 つとされている一方で，腋窩リンパ節転移の有無の正確な評価には外科的切除されたリンパ節の病理学的診断に依らざるをえない。しかし乳癌患者の 60~70%を占める腋窩リンパ節転移陰性例に対し腋

窩郭清を行うことは、過大な侵襲となり術後の QOL を損ねている。今回の検討により高い確率で腋窩リンパ節の有無を識別することが判明したが、腋窩郭清の適応を決定する際の有力な情報を提供するものと思われた。しかし、限られた遺伝子の中から選択された遺伝子から複雑な遺伝子ネットワークを解明するのは困難であり、乳癌細胞の浸潤能を規定する分子病態を解明するには、今回同定された遺伝子を糸口として今後さらなる検討が必要と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 絃 之
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

cDNA array を用いた浸潤性乳管癌における 遺伝子発現解析

乳癌は臨床的に多様性をもっており多彩な経過をたどる。このような多様性は個々の癌により、乳癌細胞の増殖、浸潤、転移に関連する多数の遺伝子の異常の蓄積が異なることによるとされる。浸潤性乳管癌は、乳頭腺管癌、充実腺管癌、硬癌の3型に亜分類されるが分子生物学的病態が異なるかどうかは不明である。一方、腋窩リンパ節転移の有無は乳癌において最も強力な予後因子とされ、全体的治療方針の決定に際し重要である。本研究においては、cDNA array を用いて浸潤性乳管癌における上記の3つの亜分類の遺伝子発現プロファイルを解析し、分子病態上異なる特性を有するかどうかを検討した。また、腋窩リンパ節転移の有無を予測する遺伝子発現パターンを同定し、腫瘍細胞の転移好性を予測できるか否かを検討した。

2000年から2002年の間に外科的切除された90例の浸潤性乳管癌を対象とした。浸潤性乳管癌は、乳頭腺管癌、充実腺管癌、硬癌に亜分類した。凍結組織からmRNAを抽出、RT-PCRによりcDNAを増幅、Biotin標識を行い、1289種の癌関連遺伝子の搭載されたアレイフィルターにハイブリダイズし、アレイフィルターを画像化、個々の遺伝子の発現強度の数値化を行った。データの解析に際し、まず分類したそれぞれのカテゴリーで発現に統計学的有意差を認める遺伝子を選択した。この分類について、選ばれた遺伝子発現値によるデータ空間の分離性を教師なし学習法であるEMアルゴリズムにて確認し、次の解析に進んだ。不必要なノイズとしてのデータを省くため特徴選択を行い、パターン分類を行う遺伝子セットを抽出した。特徴選択にsequential forward selectionを採用し、k-nearest neighbor法によりleave-one-out法を評価して誤識別率が最小となる遺伝子セットを検索した。

40例の乳頭腺管癌、27例の充実腺管癌、23例の硬癌の各群間で発現に有意差の

ある遺伝子を抽出した。乳頭腺管癌と充実腺管癌、乳頭腺管癌と硬癌、充実腺管癌と硬癌を比較すると差異発現を示す遺伝子としてそれぞれ 120 遺伝子, 122 遺伝子, 49 遺伝子が抽出された。EM アルゴリズムによる各組織型間の識別率は、乳頭腺管癌／充実腺管癌, 乳頭腺管癌／硬癌, 充実腺管癌／硬癌それぞれ 76.1%, 79.4%, 88% を示し、これらの 3 つの組織亜型の分類の部分データ空間の比較的よい分離が示された。

90 例の浸潤性乳管癌において 40 例は腋窩リンパ節転移陽性, 50 例は転移陰性であった。浸潤性乳管癌全体では、腋窩リンパ節転移の有無を予測する遺伝子セットを選択すると、誤識別率が最小となる 14 遺伝子が抽出されたが、誤識別率は 16.7% と比較的高い値を示した。続いて浸潤性乳管癌を各組織型に亜分類し同様の解析を進めた。乳頭腺管癌において最小の誤識別率 7.5% を得る 2 ないし 9 遺伝子により構成される 4 組の遺伝子セットが選択された。充実腺管癌においては最小の誤識別率 0% を得る 3 ないし 82 遺伝子により構成される 80 組の遺伝子セットが選択され、硬癌においては最小の誤識別率 0% を得る 5 ないし 13 遺伝子により構成される 9 組の遺伝子セットが選択された。

以上の結果から浸潤性乳管癌における 3 組織型で遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかとなり、分子病態が異なることが示唆された。さらに高い確率で腋窩リンパ節の有無を識別することが判明したが、腋窩郭清の適応を決定する際の有力な情報を提供するものと思われた。しかし、限られた遺伝子の中から選択された遺伝子から複雑な遺伝子ネットワークを解明するのは困難であり、乳癌細胞の浸潤能を規定する分子病態を解明するには、今回同定された遺伝子を糸口として今後さらなる検討が必要と考えられた。

口頭発表において、吉木教授より硬癌で抽出された遺伝子が少ないことをどのように解釈するか、リンパ節転移の病理診断が 100% 正確とは限らないため再評価する必要はないのか、アレイデータの今後の検証方法に関する質問があった。ついで守内教授より浸潤性乳管癌の 3 組織亜型が国際的に認められている分類かどうか、*ERBB2*, *ER* などの予後と関連する重要な遺伝子が抽出されなかった要因について質問があった。また加藤教授より低発現を示す遺伝子の意義、臨床応用にむけての展望について質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

浸潤性乳癌における遺伝子発現プロファイルを用いた予後の予測、治療方針決定への応用の可能性を示唆した本研究の意義は大きく、審査員一同協議の結果、本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。