

学位論文題名

Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection

(cDNA マイクロアレイを用いた膵管癌の網羅的遺伝子発現プロファイルの解析—レーザーマイクロダイセクション法による高純度の癌細胞および正常膵管上皮を用いて)

学位論文内容の要旨

背景と目的

膵癌は早期診断が難しく、また進行例では集学的治療に抵抗する難治性癌である。膵癌の5年生存率は5%前後で、現状の診療の継続では治療成績の向上は望めない。したがって、新たな診断、治療法の開発に向けたゲノム解析と分子生物学の応用が期待されている。

今回我々は膵管癌の腫瘍マーカー、治療開発に有用な分子標的遺伝子の探索を目的とし、cDNA マイクロアレイ法とレーザーマイクロダイセクション法を用い、膵管癌における網羅的遺伝子発現プロファイルを解析した。膵癌における分子標的遺伝子群の検索の他、臨床病理学的因子との照合により膵癌のリンパ節転移、肝転移再発、予後に関わる遺伝子群の抽出を試みた。

方法

膵癌切除症例56例を対象とし、癌細胞の組織構造やRNAの保存状態が不良である38例を除く18例を検討に使用した。膵管癌における正確な遺伝子発現プロファイルを作製するため、レーザーマイクロダイセクション法を用い、癌組織に混在する炎症細胞や間質細胞、また正常膵組織の90%をしめる腺房細胞を除き、膵管癌細胞とその発生母地である膵管上皮細胞を選択的に採取した。高純度の癌細胞および正常膵管上皮細胞からtotalRNAを抽出し、マイクロアレイ解析に用いるのに十分なRNA量を得るためT7-based RNA増幅を二回施行、蛍光ラベルでそれぞれを標識しつつ逆転写反応を行いprobeを調整した。これらのprobeを等量混合し、競合hybridizationを行い、蛍光強度を数値化、正規化し、23040遺伝子の発現変動を解析した。50%以上の症例で発現情報が得られ、かつ50%以上でコントロール(正常膵管上皮細胞)に対して発現変動の認められる遺伝子群を抽出し、正常膵管上皮細胞に比較し膵管癌細胞において5倍以上の発現上昇を認める遺伝子群、あるいは1/5以下の発現低下を認める遺伝子群を抽出した。発現上昇遺伝子群のうち、12遺伝子の発現をRT-PCR法で確認した。またstageIV膵癌13例のうち、リンパ

節転移陽性 9 例と陰性 4 例の遺伝子発現の相違を random permutation test で検討した。同様に術後肝転移再発をきたした 5 例と局所および腹膜播種再発を主とした 6 例の遺伝子発現の相違を検討した。さらに術後 1 年未満で再発をきたした 7 例と 1 年以上無再発であった 6 例の遺伝子発現の相違を検討し、予後予測に重要な遺伝子群を選出した。

## 結果

- 1) レーザーマイクロダイセクション法による選択的細胞採取の純度に対する評価： レーザーマイクロダイセクション法により採取した正常膵管上皮細胞において、腺房細胞特異的に発現を認める膵アミラーゼ遺伝子 (*AMY1A*) の発現の比較検討を行ったところ、腺房細胞の混入率は 0.29% であり、約 99.7% の純度の正常膵管上皮細胞を取得した。
- 2) cDNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析： 23040 遺伝子のうち膵管癌に共通して発現変動する 606 遺伝子を単離した。そのうち発現上昇遺伝子として 260 遺伝子(機能未知 63 遺伝子)、発現低下遺伝子として 346 遺伝子(機能未知 134 遺伝子)を同定した。
- 3) リンパ節転移との関連： リンパ節転移陽性群と陰性群において発現量の差のある 76 遺伝子を抽出した ( $p < 0.05$ )。これらのうち 35 遺伝子がリンパ節転移陽性群で特異的に上昇していた。
- 4) 肝転移再発との関連： 肝転移再発をきたした症例群と局所および腹膜播種再発を主とした症例群において発現量の差のある 168 遺伝子を抽出した ( $p < 0.05$ )。これらのうち 60 遺伝子が肝転移再発群で特異的に上昇していた。
- 5) 予後との関連： 術後 1 年未満再発群と 1 年以上無再発群において両群で差のある遺伝子を 85 遺伝子抽出した ( $p < 0.05$ )。さらに、統計学的手法(leave-one-out cross-validation test) を用い 2 群間を最も分離することができる 30 遺伝子を選出し、これらの発現量に基づいて予後予測のスコアリングシステムを構築した。

## 考察

cDNA マイクロアレイにより、各癌種における遺伝子発現解析情報解析が行われ、診断・治療への応用をめざした分子標的候補遺伝子の単離同定が進んでいる。難治性の代表格である膵癌に対しても早期診断・新規治療薬の開発に有用な標的分子の解析によせる期待は大きい。

膵癌は癌細胞の周囲に間質細胞や炎症細胞の浸潤が著しく、腫瘍組織全体における癌細胞の含有率は 5~70% と症例によりばらつきがある。また、比較対照とする正常膵に関しては、膵組織の 90% が腺房細胞であり、膵管上皮細胞は 5% に満たない。したがって、腫瘍組織全体と正常膵全体を用いた検討では、正確な発現情報が得られない。現在までに膵癌の cDNA マイクロアレイ解析は 3 グループにより報告されているが、いまだ有力な分子標的候補遺伝子は同定されていない。今回我々は、レーザーマイクロダイセクション法による選択的細胞採取により上記の問題点を打開することに成功した。結果として 260 の発現上昇遺伝子を同定し、これらのいくつかの遺伝子は診断・治療に有用であると考えている。一方、346 の発現低下遺伝子を同定したが、いまだ膵癌への関与の報告のない癌抑制遺伝子が含まれていると考えられ、癌化の機構を解明する上で興味深い結果を得た。

臨床病理学的因子と遺伝子発現の比較により、1) リンパ節転移に関連する遺伝子群、

2) 肝転移再発と関連する遺伝子群、3) 術後再発時期に関連する遺伝子群を同定した。この中には、すでに転移浸潤、予後との関連が報告されている遺伝子も含まれていた。また転移群特異的に発現する遺伝子に関しては、転移の予測マーカーあるいは治療候補の可能性はある。さらに30遺伝子の発現量に基づいて各症例をスコア化することで、術後1年未満の再発の有無を予想するシステムを構築した。今後は、さらなるテストケースによるシステムの評価が必要と考える。

最終的には、難治性である膵癌の治療成績の向上が目標であり、今回の遺伝子発現情報をもとに、膵癌の増殖に深く関わり、また副作用を回避する観点から正常臓器で発現を認めない遺伝子をターゲットとして、分子創薬を実現したいと考える。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 加 藤 紘 之

## 学 位 論 文 題 名

### Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection

(cDNA マイクロアレイを用いた膵管癌の網羅的遺伝子発現プロファイルの解析－レーザーマイクロダイセクション法による高純度の癌細胞および正常膵管上皮を用いて)

膵癌の5年生存率は5%前後で、現状の診療の継続では治療成績の向上は望めない。したがって、新たな診断・治療法の開発に向けたゲノム解析と分子生物学の応用が期待されている。今回申請者は膵管癌の腫瘍マーカー、治療開発に有用な分子標的遺伝子の探索を目的とし、cDNA マイクロアレイ法とレーザーマイクロダイセクション法を用い、膵管癌における網羅的遺伝子発現プロファイルを解析した。膵癌における分子標的遺伝子群の検索の他、臨床病理学的因子との照合により膵癌のリンパ節転移、肝転移再発、予後に関わる遺伝子群の抽出を試みた。

対象は膵癌切除 18 症例で、レーザーマイクロダイセクション法を用い、癌組織に混在する炎症細胞や間質細胞、また正常膵組織の 90%をしめる腺房細胞を除き、膵管癌細胞とその発生母地である膵管上皮細胞を選択的に採取した。採取細胞から total RNA を抽出し、T7-based RNA 増幅を二回施行した後、蛍光ラベルでそれぞれを標識しつつ逆転写反応を行い probe を調整した。これらの probe を等量混合し、競合 hybridization を行った。蛍光強度を数値化および正規化し、23040 遺伝子の発現変動を解析した。50%以上の症例で発現情報が得られ、かつ 50%以上で正常膵管上皮細胞に対して発現変動の認められる遺伝子群を抽出した。さらに、膵管癌細胞において5倍以上の発現上昇を認める遺伝子群、あるいは 1/5 以下の発現低下を認める遺伝

子群を抽出した。また stageIV 膵癌 13 例のうち、リンパ節転移陽性 9 例と陰性 4 例の遺伝子発現の相違を random permutation test で検討した。同様に術後肝転移再発をきたした 5 例と局所および腹膜播種再発を主とした 6 例の遺伝子発現の相違を検討した。さらに術後 1 年未満で再発をきたした 7 例と 1 年以上無再発であった 6 例の遺伝子発現の相違を検討し、予後予測に重要な遺伝子群を選出した。

結果として、23040 遺伝子のうち膵管癌に共通して発現変動する 606 遺伝子を抽出した。そのうち発現上昇遺伝子として 260 遺伝子、発現低下遺伝子として 346 遺伝子を同定した。発現上昇遺伝子群のうち、12 遺伝子の発現を RT-PCR 法で確認した。この中には膜蛋白や分泌蛋白をコードする分子標的候補遺伝子が含まれていた。膵アミラーゼ遺伝子 (*AMY1A*) の発現量比の検討では、採取した正常膵管上皮細胞における腺房細胞の混入率は 0.29% であり、レーザーマイクロダイセクション法による選択的細胞採取の純度は、約 99.7% であった。

臨床病理学的因子と遺伝子発現量比の関連についての検討では、リンパ節転移陽性群と陰性群において発現量の差のある 76 遺伝子が抽出された ( $p < 0.05$ )。このうち 35 遺伝子がリンパ節転移陽性群で相対的に上昇していた。また肝転移再発をきたした症例群と局所および腹膜播種再発を主とした症例群において発現量の差のある 168 遺伝子を抽出した ( $p < 0.05$ )。このうち 60 遺伝子が肝転移再発群で相対的に上昇していた。予後との関連では、術後 1 年未満再発群と 1 年以上無再発群において両群で差のある遺伝子を 85 個抽出した ( $p < 0.05$ )。さらに、leave-one-out cross-validation test を用い 2 群間を最も良く分離できる 30 遺伝子を選出し、これらの発現量に基づいて予後予測のスコアリングシステムを構築した。

以上の結果から、多数の膵癌発現上昇遺伝子群が同定され、診断・治療のターゲットとしての有用性が示唆された。一方、発現低下遺伝子には、いまだ膵癌への関与の報告のない癌抑制遺伝子が含まれていると推察され、癌化の機構を解明する上で興味深い結果が示された。臨床病理学的因子との照合では、リンパ節転移や肝転移再発に関わる遺伝子群の探索がなされ、転移浸潤の機構を解明する上で有用な結果が示された。術後再発時期に関連する遺伝子群の発現量に基づく予後予測システムを構築した結果、術後 1 年未満の再発の有無を予想できる可能性が示された。

口頭発表において、秋田教授より、実験に必要な mRNA 量について、研究のユニーク性についての質問があった。ついで加藤教授より分子標的治療に応用可能な癌遺伝子について、臨床応用への展望についての質問があった。最後に守内教授から、コントロールサンプルの妥当性について、Real-time PCR 法との有用性の比較についての質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

膵癌における網羅的遺伝子発現プロファイルを明らかにし、予後の予測、治療へ

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。