

cDNA array を用いた浸潤型膵管癌の 遺伝子発現プロファイル

学位論文内容の要旨

背景と目的

膵癌は最も予後の悪い悪性腫瘍の一つであり、現在のところ唯一、根治の可能性を示すのは外科的切除術である。姑息手術、非手術例では1年生存率14%以下、5年生存率0~5%であるのに対し、切除例では1年生存率約50%、5年生存率10%前後であり、少なくとも一部の患者では手術によって予後が改善される。もし術後の1年生存が予測できれば、手術によって恩恵を受ける患者とそうでない患者を識別する有力な判断材料となり、患者のQOL向上や医療の効率化につながるものと考えられる。また、1年生存を左右する分子生物学的因子を同定することは膵癌の分子生物学的特徴の理解を深め、新しい治療ターゲットの開発にもつながることが期待される。本研究では、膵癌の80~90%を占め最も予後が悪い浸潤型膵管癌(ductal adenocarcinoma)を対象としてcDNA array解析を行い、1年生存例に特徴的な遺伝子発現プロファイルを同定し、これを用いて膵癌患者の予後予測を行った。また、これらの遺伝子群の背景因子を探るため、各種臨床病理学的因子についても検討を行った。

方法

2001年8月から2003年1月の間に、北海道大学附属病院、および道内関連15施設において施行された膵癌手術症例63例を対象とした。臓器摘出後直ちに腫瘍部から検体を採取し、液体窒素で瞬間的に凍結させ-80℃で保存した。このうち組織学的に浸潤型膵管癌が認められた32例についてcDNA array解析を行い、1年以上の観察期間が得られた27例について1年生存解析を行った。腫瘍組織サンプルからtotal RNAを抽出し、mRNAを精製、逆転写反応で得られたcDNAをBiotinで標識化しPCRで増幅して、癌関連遺伝子1289個を搭載したarray filterにハイブリダイズさせた。それぞれの遺伝子についてシグナル強度の数値化を行い、遺伝子発現値の平均値で全遺伝子発現値を除算して標準化し、症例間で比較検討した。まず、1年生存解析に用いた全27例の中から無作為に6例を抽出し、テストサンプルとした。残りの21例から1年生存の診断に最も有用な遺伝子セットを選別し、これをもとにテストサンプル6例の1年生存診断を行った。まずアレイデータの中から1年生存群、死亡群の2群間で $p < 0.05$ の発現差を示す遺伝子を抽出した。これらの遺伝子(初期特徴群)により、Sequential Forward Selection(SFS)法を用いて、予測に最

適な遺伝子組み合わせを求めた。その後、様々な遺伝子組み合わせモデルを作成し、k-最近隣法により Leave-One-Out-Error を評価して、誤識別率が最小のモデルを選択した。こうして得られた遺伝子セット (遺伝子診断セット) は Ensemble 学習識別器として診断に用い得る。すなわち、複数の学習器を直列に並べて動かし、前の学習器が誤識別した症例に高い重み付けを与えて学習させることを繰り返した。最後に学習を終えた識別器にその過程での誤識別率によって重みを付加した多数決を行わせ、テスト症例の識別を行わせた。この Ensemble 学習識別器を用いて、まず学習サンプル 21 例の中で交差検定を行った。次に、テストサンプル 6 例の 1 年生存を診断し、Ensemble 学習識別器の識別率を評価した。また、各臨床病理学的因子についても様々な方法で 2 群に分け、同様の遺伝子解析を行なった。各因子について、1 年生存との間で χ^2 検定を行い、1 年生存と関連の深い因子を同定した。さらに 32 症例全例を用いて 1289 個の各遺伝子について median 以上の発現値を取る症例群と、未満の発現値をとる群、それぞれの生存期間の差を一般化 Wilcoxon 検定で検定し、生存期間と関連する遺伝子を選別した。

結果

各臨床病理学的因子と 1 年生存データとの間で χ^2 検定を行ったところ、血清 CA19-9 値との間で有意な相関が見られたが、これ以外の因子では有意な相関は見られなかった。1 年生存群と死亡群の間で両側 t-検定にて発現に有意差を示す遺伝子は 47 個であった。この 47 遺伝子を初期特徴群として用い、SFS 法により 5~44 個の遺伝子からなる 39 の組み合わせで識別率 100%が達成された。この 39 組の遺伝子セットを Ensemble 学習識別器として用い、1 年生存診断を行った。学習サンプル内での交差検定では試行した 60 回全てで正解が得られた。次にテストサンプル 6 例の 1 年生存診断を行ったところ 5 例が正解、1 例は生存のところを死亡と誤診断したが、この症例では術後早期に肝転移を来していた。診断に用いた 44 個の遺伝子には、様々な範疇の遺伝子が含まれており、膵癌との関連が報告されているものは 11 個であったが、その中には *MDR1* (*multidrug-resistance 1 gene*)、*IL-13*、*p38*、*Topo I* (*DNA topoisomerase I*)などが含まれていた。先述した方法で、生存期間と関連する遺伝子 83 個を抽出した。これらの遺伝子群と 1 年生存の最適遺伝子診断セットでは 9 個の遺伝子で重複が見られた($p=0.00035$)。

考察とまとめ

膵癌に関する cDNA array 研究としては、現在まで既に多数の報告が見られるが、臨床組織サンプルの遺伝子発現プロファイルを予後を含めた種々の臨床データとつぎ合わせた報告はまだ見られない。今回申請者は膵癌の 1 年生存に特徴的な遺伝子発現プロファイルを同定し、特徴選択法を用いて予後予測に最適な遺伝子組み合わせを選別し、これをもとに術後の 1 年生存予測が可能との結果を得た。診断に用いた 44 個の遺伝子のうち膵癌との関連が報告されているものとして *MDR1* は、その発現増強および欠失が膵癌の進展、予後と相関すると報告されている。*IL-13* は膵癌細胞株に対して増殖を促すとの報告がある。*p38* は *MEK/ERK* との相互作用が膵癌の増殖に重要な役割を果たすとされ、*Topo I* は膵癌における薬剤耐性への関与が指摘されている。しかし多くは膵癌との関連が報告されていない遺伝子であった。一方、種々の臨床病理学的因子の中で、CA19-9 値のみが χ^2 検

定にて1年生存との間に有意な相関を認めた。Grade分類と1年生存の間にも弱い相関傾向が見られ、t-検定にてGrade 1対2+3間で発現差を示した119個の遺伝子のうち10個が1年生存でも有意差を示した。Gradeの分子病理学的背景は一部1年生存のそれと共通する部分があることが示唆されるが、多くは重複しておらず、未知の因子が多いことが示唆された。1年生存に有用であった遺伝子セットの分子生物学的背景を網羅的に理解するには、さらなる研究が必要である。

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 を用いた浸潤型膵管癌の 遺伝子発現プロファイル

膵癌は最も予後の悪い悪性腫瘍の一つであり、唯一根治の可能性を示す外科的切除術を施行しても1年生存率は約50%にとどまる。もし術後の1年生存が予測できれば、手術の適応を決める上で強力な判断材料となる。本研究では、膵癌の80~90%を占め最も予後が悪い浸潤型膵管癌(ductal adenocarcinoma)を対象としてcDNA array解析を行い、1年生存例に特徴的な遺伝子発現プロファイルを同定し、これを用いて膵癌患者の予後予測を行った。また、各種臨床病理学的因子についても検討を行った。

2001年8月から2003年1月の間に、北海道大学附属病院、および道内関連15施設において施行された膵癌手術症例63例を対象とした。臓器摘出後直ちに腫瘍部から検体を採取し、液体窒素で瞬間的に凍結させ-80℃で保存した。このうち組織学的に浸潤型膵管癌が認められた32例についてcDNA array解析を行い、1年以上の観察期間が得られた27例について1年生存解析を行った。腫瘍組織サンプルからtotal RNAを抽出し、mRNAを精製、逆転写反応で得られたcDNAをBiotinで標識化し、癌関連遺伝子1289個を搭載したarray filterにハイブリダイズさせた。それぞれの遺伝子について発現強度を数値化し標準化して症例間で比較検討した。まず、1年生存解析に用いた全27例の中から無作為に6例を抽出し、テストサンプルとした。残りの21例から1年生存の診断に最も有用な遺伝子セットを選別し、これをもとにテストサンプル6例の1年生存診断を行った。まずアレイデータの中から1年生存群、死亡群の2群間で $p < 0.05$ の発現差を示す遺伝子47個を抽出した。これらの遺伝子(初期特徴群)により、Sequential Forward Selection(SFS)法を用い、5~44個の遺伝子からなる39の組み合わせで1年生存識別率100%が達成された。こ

うして得られた 44 個の遺伝子を Ensemble 学習識別器として予後予測に用いた。学習サンプル内での交差検定では試行した 60 回全てで正解が得られた。次に、テストサンプル 6 例の 1 年生存を診断したが、6 例中 5 例(83.3%)で正解が得られた。各臨床病理学的因子についても様々な方法で 2 群に分け、同様の遺伝子解析を行なった。各因子について、1 年生存との間で χ^2 検定を行ったところ、有意な相関を示すのは血清 CA19-9 値のみであった。さらに 32 症例全例を用いて生存期間と関連する遺伝子 83 個を選別した。このうち 9 個が、診断に用いた遺伝子と重複した($p=0.00035$)。

膵癌に関する cDNA array 研究としては、現在まで既に多数の報告が見られるが、臨床組織サンプルの遺伝子発現プロファイルを予後とつぎ合わせた報告はまだ見られない。今回我々は膵癌の 1 年生存に特徴的な遺伝子発現プロファイルを同定し、特徴選択法を用いて予後予測に最適な遺伝子組み合わせを選別し、これをもとに術後の 1 年生存予測が可能との結果を得た。診断に用いた 44 個の遺伝子には、様々な範疇の遺伝子が含まれていたが、膵癌との関連が報告されているものは 11 個に過ぎず、多くは膵癌との関連が報告されていない遺伝子であった。1 年生存に有用であった遺伝子セットの分子生物学的背景を網羅的に理解するには、さらなる研究が必要である。

口頭発表において、吉木 敬教授より問質量と遺伝子発現との関係、各病理学的因子と遺伝子発現の相関、臨床応用法について質問があった。つづいて守内哲也教授より、CA19-9 と遺伝子発現および 1 年生存との相関についての質問があった。また加藤紘之教授より、予後と相関する組織型、リンパ節転移、腫瘍径と遺伝子発現についての質問があったがいずれの質問に対しても、申請者は主旨をよく理解し誠意ある回答をしていた。

本研究は近い将来、膵癌の診断・治療に大きく貢献することが期待され審査員一同、この成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有する者と判断した。