

学位論文題名

cDNA アレイデータから特徴選択された
遺伝子による胆道癌神経周囲浸潤の予測

学位論文内容の要旨

背景と目的

胆道癌は早期発見が難しく予後不良な癌の一つであるが、根治の可能性があれば、積極的に手術するなどの治療戦略が構築されるべきである。その手術適応は確実な予後予測のもとに決定されるべきであり、予測に役立つ分子生物学的研究が進められつつある。今日、cDNA アレイを用いた癌の遺伝子発現プロファイルの解析が可能となり、乳癌、肺癌、脳腫瘍などで患者の予後予測に有用であったと報告されている。今回、我々は1,289の癌関連遺伝子を搭載したcDNA アレイを行い、胆道癌の遺伝子発現を解析し、さらに feature subset selection algorithm に基づいた教師付き分類を行い、遺伝子発現パターンによる予後予測の可能性につき検討した。

方法

2001年6月から2003年1月の間に北海道大学腫瘍外科とその関連19施設においてインフォームドコンセントの得られた37例の切除検体から5mm角の腫瘍組織を摘出し、急速冷凍した。癌組織の存在を確認したサンプルからTotal RNA、さらにmRNAを抽出、逆転写反応を行い、さらに増幅、biotin で標識し1,289種類の癌関連遺伝子と11個のhouse-keeping gene を搭載したcDNA アレイフィルター(GeneticLab, Sapporo, Japan)上でハイブリダイゼーションを行った。遺伝子発現プロファイルとそれに関連した統計解析はプログラミング言語のMATLAB (MathWorks, Tokyo, Japan)で作製したプログラム群を用いた。今回の検討でのアレイデータの標準化は各症例の全遺伝子発現値の中間値の0.1倍から1.2倍の値をとる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を行った。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のうえ、50以上の遺伝子に発現差を認める因子に対して特徴選択を行い、診断に用いる遺伝子セットを抽出した。特徴選択には前方逐次探索法を採用し、誤識別率の算出にはleave-one-out error 交差検定法を用い、また識別器としてk最近隣法を用いた。

結果

臨床病理学的因子で判別される集団間での遺伝子発現差を認める遺伝子数は Stage 分類

では stage I (11 例)と stage II-IV (22 例)で 37 遺伝子, pT 因子では pT1-2 (19)と pT3-4 (16)で 42 遺伝子, pN 因子 (陽性 18, 陰性 19)では 51 遺伝子, 静脈侵襲 (11, 20)では 21 遺伝子, リンパ管侵襲 (17, 15)では 14 遺伝子, 神経周囲浸潤 (13, 18)では 100 遺伝子がそれぞれ有意に発現差を認めた。

リンパ節転移の予測

教師なし学習法 EM-algorithm にて 37 例中 32 例 (86%)が正しく分類された。続いて、有意差を認めた 51 遺伝子を用い、前方逐次探索法を用いた leave one out error 交差検定で 37 例を分類しうる最適遺伝子セットを抽出し、k 最近隣法により診断すると 24 から 28 遺伝子を選択することによって、リンパ節転移の有無を誤診率 5.4%で診断し得た。胆管癌 (15 例), 胆嚢癌 (11 例), 乳頭部癌 (11 例)に分けて検討するとリンパ節転移の有無に関して有意差を認め選択された遺伝子はそれぞれ, 88, 75, 74 遺伝子であり、このうち、はじめの 51 遺伝子と共通した遺伝子はそれぞれ 19, 5, 11 遺伝子であった。3 つの癌すべてに共通する遺伝子は存在しなかった。

神経周囲浸潤の予測

EM algorithm による教師なし分類では、31 例中 27 例が正しく分類された (87%)。有意差を認めた 100 遺伝子から前方逐次探索法により 46 から 60 遺伝子を選択することによって 100%神経周囲浸潤を診断することが可能であった。Stage IB 以上の症例 (陽性 13 例, 陰性 12 例)では 147 遺伝子に有意な発現差を認めた。このうち、74 遺伝子が、先に選択された 100 遺伝子と共通であった。この 147 遺伝子と 74 遺伝子から神経周囲浸潤の有無を判別する最適遺伝子セットを選択すると、それぞれ 3~118 遺伝子, 3~21 遺伝子が選択され、これらにより神経周囲浸潤は 100%の正診率で予測することが可能であった。胆管癌 (陽性 7 例, 陰性 7 例)のみでは、204 遺伝子において発現に有意差が認められ、はじめの 100 遺伝子と共通するものは 42 遺伝子であった。この 204 遺伝子と 42 遺伝子から神経周囲浸潤を予測する遺伝子を選別するとそれぞれ 4~152, 2~35 遺伝子が選択され、ともに 100%の正診率で予測可能であった。

考察とまとめ

今回申請者は、cDNA アレイによるデータの中にある全く関係のない遺伝子の存在、あるいはノイズの存在などによる解析精度の低下を避ける目的で前方逐次探索法を用いた。これにより診断に必要な遺伝子セットのみを抽出し、診断率を向上させることができた。こうして選択した遺伝子群を用いて k 最近隣法を行い、各症例の識別を行った。胆道癌の神経周囲浸潤の有無で 100 遺伝子以上に発現差が認められ、これらの遺伝子が胆道癌の浸潤度を増す遺伝子ネットワークの一員と推測された。また、神経周囲浸潤で発現差を認めたこれらの遺伝子から特徴選択を行い、遺伝子を選択することによって 100%の診断率で神経周囲浸潤を予測することが可能となった。その臨床的意義を考えると神経周囲浸潤が胆道癌にとって有意な予後不良因子であること、また、手術時切除断端における癌組織の有無が神経周囲浸潤の有無に大きく影響されることから癌組織中の遺伝子異常により、これらを予知する価値は大きい。一方、リンパ節転移の有無で 51 遺伝子に発現差を認めた

が、神経周囲浸潤に比較し、遺伝子ネットワークの変化が小さいかあるいは他の交絡因子による見かけ上の遺伝子発現差である可能性も考えられ、遺伝子発現パターンを用いたリンパ節転移診断には限界があるものと考えられた。本研究によりアレイデータを基にして神経周囲浸潤を予測することが可能となり、このことは胆道癌の治療戦略を構築する上で極めて有用性が高いと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

cDNA アレイデータから特徴選択された 遺伝子による胆道癌神経周囲浸潤の予測

胆道癌は難治癌の一つとされている。今回、申請者は胆道癌を遺伝子発現プロファイルに基づき、癌の個性化診断を行うことを目的として、cDNA アレイを行った。胆管癌 15 例、胆嚢癌 11 例、乳頭部癌 11 例の合計 37 例の胆道癌切除検体を対象とした。1,289 種類の癌関連遺伝子が搭載された array filter を用い、症例の識別には k-nearest neighbor 法に基づく leave-one-out 交差検定法を用い、診断に有用な遺伝子の抽出する特徴選択には前方逐次探索法を用いた。

結果であるが、リンパ節転移と神経周囲浸潤の有無で発現差を認める遺伝子が多く、それぞれ 51 と 100 の遺伝子が抽出された。胆道癌のリンパ節転移の有無で発現差を認めた 51 遺伝子から特徴選択を行い、leave-one-out 法による識別率を計算すると、24~28 遺伝子の組み合わせを用いることで、94.6%の正診断率で診断可能であった。また、胆管癌、胆嚢癌、乳頭部癌で、リンパ節転移の有無で発現差を認める遺伝子を抽出すると、それらすべてに共通する遺伝子はなく、胆道癌のリンパ節転移には特徴的な遺伝子の存在が考えられるが、それらはそれぞれの癌の発生部位により異なっていると考えられた。神経周囲浸潤の有無については発現差を認めた 100 遺伝子から特徴選択を行い、leave-one-out 法による識別率を計算すると、3~60 遺伝子の組み合わせを選択することで、100%の正診断率で診断可能であった。StageIB 以上の症例で検討すると神経周囲浸潤の有無で 147 遺伝子に発現差を認め、特徴選択を行い、leave-one-out 法による識別率を計算すると、100%の正診断率で診断可能であった。また、胆管癌症例のみで検討すると神経周囲浸潤の有無で 204 遺伝子に発現差を認め、同様に 100%の正診断

率で識別可能であった。癌の発生部位を限定することで、より多くの遺伝子に発現差を認めたと、これは胆嚢癌、乳頭部癌の影響が排除され、より胆管癌としての生物学的特徴を反映したものと考えられた。

以上の結果から、遺伝子発現パターンを基に胆道癌神経周囲浸潤の有無を診断することが可能であり、臨床診断への応用の可能性が示された。また、胆道癌はその発生部位により、特徴的な発現パターンを示すと考えられ、今後各部位別に検討することがより重要と考えられた。

口頭発表においては、吉木敬教授より症例数の妥当性、リンパ節のさらに詳細な病理学的検討の必要性について。つづいて守内哲也教授より最適遺伝子に含まれる遺伝子に関する質問があった。また、加藤紘之教授より胆道癌に関して予後因子と報告されている分子との関連、発生部位により抽出される遺伝子が異なる理由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。

本研究によりアレイデータを基にして神経周囲浸潤を予測することが可能であり、このことは胆道癌の治療戦略を構築する上で極めて有用性が高いと考えられ、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。