

学位論文題名

食道癌における腫瘍増殖に伴う  
遺伝子発現プロファイルの推移

学位論文内容の要旨

背景と目的

食道癌は消化管悪性腫瘍の中でも最も予後不良であり、近年の手術手技の進歩および化学放射線治療の進歩にもかかわらず、5年生存率は依然として40~60%にとどまっている。食道癌の疾患病態をよりよく理解する、あるいは予後を予測すべくこれまで多くの研究者達によりいくつかの遺伝子が腫瘍増殖あるいはリンパ節転移のマーカーとして報告されてきた。しかし、単一の遺伝子の情報だけでは癌化、増殖、浸潤といった食道癌の疾患病態を明らかにすることは困難である。そこで申請者らはこういった個々の遺伝子のみを検索とは異なり多くの遺伝子発現値を一挙に取得できるcDNAアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析を行い、癌の分子生物学的特徴を明らかにすることを試みた。食道癌36例における遺伝子発現プロファイル解析を行い、病理組織学的因子との関連を解析することにより腫瘍の進達度に附随して発現の変化する遺伝子およびリンパ節転移に関する遺伝子を同定し、食道癌の分子生物学的特徴を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

北大医学部附属病院および北海道内の関連33施設で切除された食道癌組織のうち病理組織学的に扁平上皮癌組織が確認された36例を対象とした。今回の研究は北海道大学病院および関連病院における倫理委員会の承認を得た上でを行い、研究の趣旨を十分説明した上で同意の得られた症例を対象とした。病理組織学的因子についてはTNM分類(UICC, 第6版)を用いた。

腫瘍組織からmRNAを抽出しRT-PCRにてbiotin-16-dUTPともに増幅した。Biotinで標識されたcDNAを1289種類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させ各遺伝子の蛍光強度をコンピューターにて読みとり数値化し遺伝子発現値とした。取得した36例の遺伝子発現値を用いて、まず深達度の進行に伴い発現が増加または減少していく遺伝子を一般化線形モデルに基づいた回帰分析を用いて検索した。また、リンパ節転移の有無による遺伝子発現プロファイルの特徴を知るために、統計学的に発現値に有意差のあった遺伝子を選択した(両側t検定、 $p < 0.05$ )。さらに、選択された遺伝子が各群の特徴をよく表しているかどうかを知るために最尤推定を基盤としてデータ空間の混合分布を分離するEMアルゴリズムを用いて、教師なし学習法による分類を行った。また、別の教師なし学習法であるk-means clusteringでもデータ分布の分離性を検討した。それからリンパ節転移に関わる遺伝子群の本質的な部分を抽出するために、選択された遺伝子の中から分類に最適な遺伝子セットを同定する特徴サブセット選択を行った。特徴選択アルゴリズムにはk最近隣法を識別関数としてleave-one-out法による誤識別率を最小にする遺伝子の組み合わせを広範囲に探索できる逐次前方選択法を適用した

## 結果

一般化線形モデルに基づく回帰分析で腫瘍の増殖に伴い発現が変化する遺伝子を検索した結果、pT stage の進行により発現が増加していた遺伝子が 47 個抽出され、この中には cell adhesion protein、extracellular matrix related protein、growth/differentiation factor が含まれていた。一方、発現が減少していた遺伝子は 24 個抽出され、その中に cell cycle regulator、transcriptional factor が含まれていた。リンパ節転移に関しては、陰性例と陽性例の間で発現値に統計学的有意差を認めた 87 遺伝子を抽出した（両側 t 検定、 $t < 0.05$ ）。次に教師なし学習法の EM アルゴリズムを使用して 87 遺伝子の発現値からなるデータ分布の分離性を検証したところ 36 例中 5 例が誤って分類された（誤識別率 13.9%）。別の教師なし学習法である k-means 法による分類では 36 例中 11 例が誤って分類された（誤識別率 30.6%）。次いで特徴選択アルゴリズムによりリンパ節転移の有無を最も良く分類する特徴遺伝子を 44 個選択した。この中には cell adhesion proteins、cell membrane receptors、cell cycle regulators、intracellular signaling molecules が含まれていた。これらの遺伝子を用いて 97.2% の確率で 2 群を識別することが可能であった。

pT stage の進行とともに発現が変化する遺伝子とリンパ節転移の有無により発現値に有意差の有る遺伝子のうち 14 個が共通していた。また、71 個のうちこれら 14 個の遺伝子を除いた 57 遺伝子が pT stage の進行に特有の分子生物学的特徴を反映すると考えられた。さらに、71 遺伝子中 4 遺伝子のみがリンパ節転移の特徴を反映する遺伝子と共通していた。

## 考察

食道癌の癌化、増殖、浸潤能の獲得における複雑かつ多段階の過程には多数の遺伝子が関与している。今回の研究では深達度の進行とリンパ節転移に特徴的な遺伝子を同定した。

深達度 (pT stage) の進行に伴い発現が増加する遺伝子群は cell adhesion protein、extracellular matrix related protein、growth/differentiation factor 等、その機能も多岐にわたっていた。一方、Tstage の進行に伴い発現が低下する遺伝子には cell cycle regulator、transcriptional factor が含まれていた。これらの結果から、食道癌の早期には cell cycle regulator による tumor suppressor として作用する遺伝子の発現が保たれている一方で transcription factor がその転写活性により多岐にわたる signaling pathway を介して腫瘍増殖促進的に作用しており、進行するにつれて腫瘍の浸潤に関わる遺伝子が関与してくることが示唆された。また、リンパ節転移 (pN stage) についてはリンパ節転移陽性群において cell adhesion proteins や cell membrane receptors が高発現であり、一方 cell cycle regulators や intracellular signaling molecules が低発現であった。これらの遺伝子は細胞増殖能よりもむしろ細胞とそれを取り巻く環境との相互作用による腫瘍の細胞浸潤の特徴を表していると思われた。興味深いことにリンパ節転移に関わる分子生物学的特徴は深達度の進行に伴うそれとは異なるものであった。両因子の間でほとんどの遺伝子が共通していなかったことは、深達度とリンパ節転移は互いに異なる分子病態を呈することを示唆していた。

cDNA アレイは多数の遺伝子の発現プロフィール解析を行うことにより、癌に特有の遺伝子発現パターンを包括的に把握することを可能にさせ、未だ完全には明らかになっていない食道癌に特有の分子病態を理解する有力な手法であると考えられた。

今回、食道扁平上皮癌における腫瘍増殖、浸潤の分子生物学的特徴として選択された遺伝子は幾つか興味深い傾向を示したが、悪性度に関与する特徴のごく一部である可能性がある。しかし、さらなる研究により今回明らかになった特徴遺伝子が食道扁平上皮癌の悪性度の本質をより理解する端緒となることが期待される。

## 結語

食道扁平上皮癌 36 例で cDNA アレイ解析を行い病理組織学的因子との関連を検討した結果、食道癌の増殖、進展に関与する分子生物学的特徴が明らかになった。

# 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

## 食道癌における腫瘍増殖に伴う 遺伝子発現プロフィールの推移

食道癌は消化管悪性腫瘍の中でも最も予後不良である。これまでにいくつかの遺伝子が腫瘍増殖あるいはリンパ節転移のマーカーとして報告されてきたが、単一の遺伝子の検索だけでは食道癌の疾患病態を明らかにすることは困難である。そこで申請者らは多数の遺伝子発現値を一挙に取得できる cDNA アレイを用いた遺伝子発現プロフィール解析を行い、食道癌の分子生物学的特徴を明らかにすることを試みた。

外科的に切除された食道癌組織のうち病理組織学的に扁平上皮癌組織が確認された 36 例を対象とした。今回の研究は研究の趣旨を十分説明した上で同意の得られた症例のみを対象とした。1289 種類の癌関連遺伝子が搭載されたアレイフィルターを用いて cDNA アレイ解析を行い、取得した 36 例の遺伝子発現値と TNM 分類に基づく病理組織学的因子との関連を検討した。まず深達度 (pTstage) の進行に伴い発現が変化する遺伝子を一般化線形モデルに基づいた回帰分析を用いて検索した。また、リンパ節転移 (pNstage) における遺伝子発現パターンを知るために、t 検定を用いてリンパ節転移陽性例と陰性例で発現値に統計学的有意差のあった遺伝子を選択した。選択された遺伝子のデータ分布の分離性を検討するため EM アルゴリズムによる分類を行った。さらに、リンパ節転移に関わる遺伝子群の本質的な部分を抽出するために、特徴サブセット選択により分類に最適な遺伝子セットを選択した。特徴選択アルゴリズムには k 最近隣法を識別関数として leave-one-out 法による誤識別率を最小にする遺伝子の組み合わせを広範囲に探索できる逐次前方選択法を適用した。

一般化線形モデルに基づく回帰分析により pT stage の進行に伴い発現が増加していた遺伝子が 47 個抽出され、この中には cell adhesion protein, extracellular matrix related protein, growth/differentiation factor が含まれていた。一方、発

現が減少していた遺伝子は 24 個抽出され、その中に cell cycle regulator, transcription factor が含まれていた。リンパ節転移に関しては、陰性例と陽性例の間で発現値に統計学的有意差を認めた 87 遺伝子を抽出した (両側 t 検定,  $p < 0.05$ )。次に EM アルゴリズムを使用して 87 遺伝子の発現値からなるデータ分布の分離性を検証したところ、誤識別率が 13.9%であった。次いで特徴選択アルゴリズムによりリンパ節転移の有無を最も良く分類する遺伝子を 44 個選択した。この中には cell adhesion proteins, cell membrane receptors, cell cycle regulators, intracellular signaling molecules が含まれていた。これらの遺伝子を用いて 97.2%の確率で 2 群を識別することが可能であった。pT stage の進行とともに発現が変化する 71 遺伝子とリンパ節転移の特徴を反映する 44 遺伝子のうち 4 遺伝子のみが共通していた。

深達度の進行に伴い発現が増加あるいは低下する遺伝子を検索した結果より、食道癌の早期には cell cycle regulator による tumor suppressor として作用する遺伝子の発現が保たれている一方で transcription factor が腫瘍増殖促進的に作用しており、進行に伴い腫瘍の浸潤に関わる遺伝子が関与してくることが示唆された。また、リンパ節転移に関しては細胞増殖能よりもむしろ細胞とそれを取り巻く環境との相互作用が関与していると考えられた。興味深いことに両因子の間で共通する遺伝子が殆ど無かったことは深達度とリンパ節転移は互いに異なる分子病態を呈することを示唆していた。

今回明らかになった分子生物学的特徴が食道扁平上皮癌の悪性度の本質をより理解する端緒となると期待された。

口頭発表において吉木教授より深達度とリンパ節転移で共通する遺伝子は何であったか、間質の影響を反映する遺伝子について質問があった。ついで守内教授より間質を混じたサンプルとマイクロダイセクションを行ったサンプルでは異なる結果が得られるのか、予後は何年で評価するのが妥当かについて質問があった。さらに、加藤教授より術前の生検材料を用いた適正治療法の選択、予後予測は可能か、深達度とリンパ節転移で共通した遺伝子が少なかった理由についての質問があった。

申請者は質問内容をよく理解し誠意ある回答をしていた。

本研究は食道癌の分子病態を解明し、適切な臨床応用への道を開いた研究として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。