

## 消化器癌の遺伝子発現解析

柳川 錬平

東京大学医科学研究所

### Gene Expression Analysis of Human Cancer in Digestive Tract

Rempei Yanagawa

Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo

#### はじめに

東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターでは平成 10 年の冬からマイクロアレー・システムの構築に着手し、現在までに約 2 万遺伝子を搭載した独自の cDNA マイクロアレーを完成し運用している。当センターでは、この大規模な遺伝子発現解析システムを駆使して、これまで臨床検体を中心に種々の悪性腫瘍について解析を行っており、消化器癌においても、大腸癌、肝細胞癌、食道癌で、それぞれユニークな解析が行われている。

本稿では、それぞれの解析の共通項を括り出す形で、われわれのシステムの概要を紹介したのちに、実際に行われた解析の 3 つの例を提示する。

#### 1. システムの概要<sup>1-6</sup>

図 1 にマイクロアレー・システムの流れを簡略化して示す。

当センターではマイクロアレーとしてスライドに配置する cDNA をターゲットと呼び、蛍光標識した検体の方をプローブと呼んでいる。施設によっては逆に呼ぶ場合もあるが、本稿では上記のとおり統一させていただく。

さて、システムの流れは、このターゲット DNA の準備から始まる。

まず National Center for Biotechnology Information の UniGene にある配列情報からプライマーを設計し、ヒトの 12 臓器に由来するポリ A RNA (Clontech 社) を逆転写したものを鋳型にして PCR を行い、濃度をそろえてスポットしている。できあがったマイクロアレー・スライドに、プローブとしてふりかけるサンプルは、いろいろな組み合わせが考えられるが、何れ

にしても mRNA の形で準備する。微量なサンプルについては T7 ポリメラーゼによる増幅を行って必要量を確保している。これらを、それぞれ逆転写しながら蛍光色素を取り込ませて標識したプローブを混ぜ合わせ、スライド上のターゲットとハイブリダイズさせる。ハイブリダイズしたプローブの蛍光強度をレーザー光線で走査し、数値化した後に、コンピュータで解析している。

検体から mRNA を抽出する方法としては、一般に行われているホモジェナイゼーションの他に、より均一な細胞集団を集める手段として、当センターではレーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション (LCM) 法を導入している。LCM の原理は以下のとおりである。まず特殊な透過性フィルムを、染色を施した検体の切片に載せ、このフィルムを通して狙った細胞にレーザー光線を照射する。すると、照射された部分でフィルムが粘着性を発揮し、その部分の細胞だけがフィルムに接着する。フィルムが接している領域内にある、対象となる細胞すべてにレーザーを照射してからフィルムを持ち上げれば、欲しい細胞だけがフィルムに接着した状態で回収される(図 2)。ただし、LCM で得られる RNA は極めて微量であり、そのままではハイブリダイゼーションには不足である。そこで、T7 ポリメラーゼによる RNA 増幅法を併用し、必要量の RNA が得られるまで増幅する(図 3)。この方法は mRNA のポリ A の部分をのりしろにして T7 ポリメラーゼのプロモーター配列を対合させ、まず 1st ストランド cDNA、さらにプロモーター配列が付加された ds cDNA をつくったところで T7 ポリメラーゼを使い、100 倍前後のアンチセンス RNA を作り出す方法である。増幅 1 回で丸 1 日を要するものの、個々の mRNA の分子数の比率を保ちながら増幅できる点で優れており、今のところ代替法は見当たらない。

こうして、LCM で集めた約 5 万個の細胞から mRNA を抽出し、3 回ほど T7 ポリメラーゼで増幅することにより、およそ 50 マイクログラム前後の aRNA が得られている。

プローブが出来たら、いよいよハイブリダイゼーションを行う。現在われわれのラボでは Automated Slide Processor(ASP)(Amersham Pharmacia Biotech 社)を使ってハイブリダイゼーションをしている。この ASP は、電源を入れ、制御用アプリケーションを起動すれば、ハイブリダイゼーションの直前まで自動で進み、一時停止する。ここで用意しておいた蛍光プローブを専用のシリンジで注入してプログラムを続行すれば、スライドガラスの洗浄まで、ASP が自動的に処理してくれる。スタートからパイプラインの自己洗浄までの全工程に約 24 時間を要するものの、1 台当たり 12 個のチャンバーを備えており、5 台体制の当センターでは連日 40~50 枚ずつのスライドガラスが処理されている。

ASP を採用したことで、省力化の他にも、スライドガラス上の位置によるハイブリダイゼーションのムラはほぼ解決され、また、技術的な個人差についても、ほぼ均質化されている。

さて、無事にハイブリダイゼーションを終えたスライドガラスは、次にスキャナーに装填され、蛍光信号が読み取られる。読み取りが終わったものから順に画像ファイルが作成され、あらかじめコンピュータ上に定められているディレクトリに保存されていく。これらのファイルを画像処理用のアプリケーションで開き、スキャンが正常に行われていることを確認してから、赤と緑のチャンネル毎に色調を調節し、合成すると図 4 のような画像ができ上がる。ここで示される色調は中央の図の通り、発現強度の比率を反映している。ただし、この時点での色調はあくまで主観的に調整されたものなので、実際の解析にそのまま使うことはできない。そこで信号強度を数字にして、スーパーコンピュータで解析可能な形に変換する必要がある。そのために必要な作業が、数値化(通称:グリッド合わせ)である。これは、コンピュータの画面上でスポット一つ一つに赤い円(グリッド)を合わせていく、果てしなく地道な作業ではあるが、スキャンで得られた画像情報のうち、どの部分をそれぞれの遺伝子の信号強度として採用するかを決定する、極めて重要な作業でもある。こうして赤いグリッドで選択された部分の信号強度が数値化されて、スライド 1 枚当たり 4,608 行×16 列のベクトルからなる、スプレッド・シートの形に変換される。これはさすがに人力で処理するには辛い数

なので、以後の処理はスーパーコンピュータに委ねられる。コンピュータに送られた生データは、それぞれの蛍光色素の特性による見せ掛けの信号強度の差を補正するために、正規化(normalization)という処理を受ける。これは全体の遺伝子あるいはハウスキーピング遺伝子のプロットが、直線  $y=x$  上に載るように、全体の発現強度比を数学的に変換する作業である。

正規化し、さらに信号強度に対するカットオフ値を定めて信頼性の低い数字を除外する操作を、スライドガラス毎、症例毎に行い、共通して発現増大群あるいは発現減少群に含まれる遺伝子を選び出せば、これらがそれぞれの症例に共通した性質(病態)に関連する遺伝子群の候補となる。

## 2. 大腸癌の遺伝子発現解析<sup>7,8)</sup>

大腸癌で亡くなる方は日本だけで年間 35,000 人に上る。およそ 15 分に 1 人が亡くなっている計算になる。15 分早く成果を出せば 1 人多く助かる、という保証は無いが、われわれは急いでいる。さて、大腸癌の発生のメカニズムとしては、多段階発癌のモデルが一般に提唱されている。われわれはこの各ステップの間で何が起きているのかを、マイクロアレーで調べてみた。図 5 は左から正常粘膜、ポリープ、がんの、それぞれ組織像、およびマイクロアレー画像である。大きくは変わらないように見えるが、その中でいくつかの遺伝子の発現が変化していることが分る。例えば A4141 の遺伝子は正常粘膜、ポリープでは発現しているのに、癌では発現が減少している。逆に A1060 は、正常粘膜、ポリープではほとんど発現していないが、癌では高度に発現している。このような振る舞いをする遺伝子を一気にリストアップするところに、マイクロアレーの真骨頂がある。

ただし、ここで厳密な比較を行うためには、より純度の高い細胞同士で比較することが必要になる。培養細胞など的人為的な実験系と異なり、臨床検体で均質な細胞を集めることは非常に困難であったが、現在では LCM を採用することで、この問題はクリアされている。この研究においては LCM で得られた RNA を、T7 増幅法で増やし、それぞれ正常粘膜細胞を緑の Cy5、癌細胞を赤の Cy3 で標識してプローブを作成し、これをあらかじめ作っておいたマイクロアレー・スライドの上でハイブリダイゼーションさせた。同じ操作を 8 症例それぞれに行い、8 例中 5 例以上で発現が増大または減少していた遺伝子を選び出したところ、正常粘膜と癌の間で発現が変動している遺伝子の一覧表が得られた。これらの遺伝子の中から、新たな診断マ

カーあるいは治療のターゲットになりそうなものについて解析が進められつつある。

さらに大腸癌では、原発巣と転移巣の違いについてもマイクロアレーで比較してみた。

転移はいくつかのステップを経て成立するが、その前と後を比較することで、転移に関連する遺伝子が直接検出されることが期待された。しかし、この場合にも、一般的に行われているように凍結検体をそのまますり潰してしまえば、当然転移巣の周囲にある肝細胞で発現している肝臓に特異的な遺伝子群が、転移巣で発現の増大している遺伝子群として数限りなく検出されてくることが予想された。そこで、本研究においても、肝細胞の混入を可能な限り0に近づけるために、LCMは必要不可欠と考えられた。

実験は、まず LCM を用いて各病変部から癌細胞だけを回収(図6)し、抽出した RNA を T7 ポリメラーゼで3回増幅し、原発巣を Cy5 転移巣を Cy3 で標識し、プローブとした。以下の手順は前述の通りである。信号強度の弱いものを除外し、2倍以上発現していたものを発現増大群、2分の1以下であったものを発現減少群として、それぞれ抽出する作業を繰り返し、この中から10例中6例以上で発現増大群として共通して抽出されたものと、10例中5例以上で共通して発現減少していたものを、最終的な転移関連遺伝子の候補として選び出した。その結果、発現増大群として40種類、発現減少群として7種類、あわせて47種類の遺伝子が抽出された。

### 3. 肝細胞癌の遺伝子発現解析<sup>9</sup>

この研究では臨床病理学的因子と遺伝子の発現を対比して検討している。研究の動機としては、治療に向けての様々な課題をクリアするために、すでに単一もしくは少数の遺伝子による説明には限界があり、より体系的な解析が必要とされている状況があった。また、肝がんの発生には肝炎ウイルスやアフラトキシンなどの発癌物質が関与し、多くは慢性肝炎、肝硬変を経て発生すると言われており、その過程において、数々の遺伝子が関与していることが予想された。そこでマイクロアレーを用いて、関連する遺伝子を一網打尽に捕らえようとする試みがなされた。

ここでも問題になったのが、検体での遺伝子発現を何の遺伝子発現と比べたらよいか? ということである。原理的に、マイクロアレーは遺伝子の発現を相対的な比で捕らえる技術なので、常に比較の対象(比の分母)を必要とする。選択肢は大きく2つに分かれており、一つは同じ症例の非癌組織、もう一つは全症例

に共通したユニバーサル・コントロールを用いる方法である。ここでは各症例の個体差による遺伝子発現の相違を相殺し、かつ肝炎・肝硬変からの変化を捉えるために、同一患者の非癌部肝組織が選ばれた。

実験の方法論は大腸癌と共通である。LCM でそれぞれの細胞を選択的に回収し、T7 ポリメラーゼで RNA を増幅した後、癌部を赤の Cy3 非癌部を緑の Cy5 で標識し、プローブとした。ASP でハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルを、数値化および正規化し、発現が上昇しているもの、減少しているものをそれぞれ抽出した。一定の信号強度に満たないものは、信頼性が低いものと見なされ、除外された。

肝細胞癌で共通して発現増大している遺伝子の中には増殖を促進させる働きをもつものや、細胞の運動を容易にする働きをもつもの、それにアポトーシスを抑制するものが含まれていた。逆に、肝細胞癌で共通して発現の減少していた遺伝子群には、肝細胞本来の機能を担う遺伝子のほか、免疫応答、アポトーシス誘導に関わる遺伝子が含まれていた。さらに、多変量解析の1手法である、クラスター解析の手法を用いて、発現パターンの類似度を計算し、似ているもの同士が近くに集まるように並べ替えてみたのが、図7のカラー・ドット・マトリックスである。遺伝子だけでなく、症例のほうも似ているもの同士が近くに集まるように並べ替えてみたところ、大きく3つのグループに分けられた。これらが、どの臨床因子を反映しているかを知るために、それぞれ相関係数を算出したところ、肝炎ウイルスの種類と最も強く相関していることが分かった。そこで、肝炎ウイルスによって発現の異なる遺伝子を、Mann-Whitney test で抽出し、P value を 0.05 未満としたところ、19個の既知遺伝子が抽出され(図8)、しかも、これらの多くは発癌物質や、薬剤の代謝に関連する酵素をコーディングしていることが判明した。つまり、感染しているウイルスの違いで、発癌物質に対する反応が異なり、ひいては発癌機構も、治療に対する反応も、異なっている可能性が示唆された。

### 4. 食道癌の遺伝子発現解析<sup>10</sup>

この研究は、26例の食道癌患者の臨床病理学的因子を遺伝子発現プロファイルと組み合わせて、予後もしくは薬剤感受性を予測する方法を編み出し、最終的には治療方針の決定に役立てることを目標としている。

進行食道癌26例の間で、年齢・性別・ステージ・遺残腫瘍・術後の化学療法のプロトコールに差は無かったが、生存期間には大きなばらつきが見られた。そこで、これらの症例を、30カ月以上の長期生存が得られ

た症例群をグループ1,12カ月以内であった群をグループ3,これらの中間をグループ2と,生存期間によって3つのグループに分けた。これらのグループ間で発現の異なる遺伝子群を Mann-Whitney test で抽出したところ,52個の遺伝子が選ばれた。さらに,この52個の遺伝子の発現強度比に,予め算出しておいた重みをかけ,それを52個分合計したものを,その症例のスコアとして定義した(図9)また,このスコアがシスプラチンと5-FUに対する反応性を示すことから,これをドラッグ・レスポンス・スコア(DRS)と命名した。このスコアによって各症例をプロットすると,図10のようになった。ここではグループ1を青,グループ2を白,グループ3を赤,スコアリングシステムを評価するためのテストケースとして後から新たに加えた6例を黒で示す。最初の20例がスコアどおりに分かれたのは妥当な結果として,新たに加えた6例についてもこのスコアでプロットしてみたところ,5例はスコアどおりにカテゴリー分けされた。残る1例は現在30カ月未満ながら生存中であり,スコアからはグループ1に判定されるものの,生存期間が30カ月を超えるまで判定保留となっている。われわれとしては,この患者さんも長期生存されることを,切にお祈りするばかりである。

### 5. 今後の展望

以上,3つの例を挙げながら,当センターのマイクロアレイ・システムでこれまでどのような解析が行われてきたかを紹介した。最後に,これからゲノム医学を通じて患者さんたちに還元できることは何か? いくつか挙げてみる。

まず診断の点では,これまで主に形態学に依存してきた病型分類が,遺伝子の発現情報の視点から補足される可能性がある。つまり,結果としての表現形から得られた診断情報に,原因としての遺伝子発現に基づいた情報を加えることで,より病態の違いを反映した分類・診断が期待できる。さらに,前述の食道癌の例で示したとおり,予後や薬剤感受性に相関して発現が変化する遺伝子をいくつか組み合わせてスコアリングシステムを構築する試みは,治療法の選択に有力な根拠を与える点で臨床の現場に直結しており,ゲノム医学の臨床応用として最も期待される成果の一つである。

治療の点では,新たな標的分子の発見が期待される。それぞれの疾患のプロファイルを構成する遺伝子の中には,未だ機能や疾患との関係が解明されていないものも多く,疾患攻略の新たな鍵となる遺伝子のいくつかは,これら機能未知遺伝子群の中に含まれているこ

とが予想される。個々の未知遺伝子の機能については,疾患との関連の可能性の高いものから一つ一つ調べていくしか今のところ手立てが無い。しかし,遺伝子発現情報に基づいた体系的なアプローチを行うことで,発見に至る確率の向上は大いに期待される所であり,その成果の一端が,例えば新しい薬剤として医療の現場に登場する日も,それほど遠くはないものと思われる。

### 6. おわりに

ヒトゲノムのドラフトシーケンスと同時に,ヒトの遺伝子の総数は3万個前後であるとの予想が発表されている<sup>11,12</sup>。1枚のスライドガラスに3万スポットのcDNAを配置する技術は既に手の届くところにあり,1人前の遺伝子セットを一度に解析することも遠からず実現されるであろう。網羅的あるいは体系的な解析アプローチが要求されるポスト・シーケンス時代においては,数万遺伝子の発現状況を一度に解析するパフォーマンスを具有するマイクロアレイが,ますます必須の解析ツールとして重要性を高めていくことは確実と思われる。

また同時に,先天的な易罹患性や治療への反応性の指標としてSNPs(一塩基多型)の情報が蓄積されつつあり,マイクロアレイで得られる後天的な病巣での遺伝子発現の情報と相俟って,患者個人の遺伝的背景はますます詳細に把握されるようになる。そして,これらのエビデンスを踏まえることで,患者の個人差あるいは病巣の個体差に配慮した診療(オーダーメイド医療)が可能となり,ここでようやくゲノム医学は患者のもとへ還元されたことになるのであろうか。

### 文 献

1. 奥津潤一,中村祐輔:クローズアップ実験法,最新版・DNAマイクロアレイ ラボマニュアル1 DNAマイクロアレイ上に配置するcDNAの作製. 実験医学 2001; 19: 63-70.
2. 北原 治,中村祐輔:クローズアップ実験法,最新版・DNAマイクロアレイ ラボマニュアル2 マイクロアレイの作製. 実験医学 2001; 19: 395-399.
3. 北原 治,中村祐輔:クローズアップ実験法,最新版・DNAマイクロアレイ ラボマニュアル3 微量検体からのRNAの増幅ならびにプローブDNAの調整. 実験医学 2001; 19: 487-493.
4. 鬼原 史,鈴木英之,中村祐輔:クローズアップ実験法,最新版・DNAマイクロアレイ ラボマニュアル4 ハイブリダイゼーション. 実験医学 2001; 19: 779-785.
5. 柳川錬平,中村祐輔:クローズアップ実験法,最新版・DNAマイクロアレイ ラボマニュアル5 シグナル

検出と数量化. 実験医学 2001; 19: 895-899.

6. 角田達彦, 中村祐輔: クローズアップ実験法, 最新版・DNA マイクロアレイ ラボマニュアル6 遺伝子発現プロファイルの数理解析. 実験医学 2001; 19: 989-993.

7. Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, Kihara C, Ono K, Yanagawa R, Nita ME, Takagi T, Nakamura Y, Ysunoda T: Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res.* 2001; 61: 3544-3549.

8. Yanagawa R, Furukawa Y, Tsunoda T, Kitahara O, Kameda M, Murata K, Ishikawa O, Nakamura Y: Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray. *Neoplasia* (in press)

9. Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R,

Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y: Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.* 2001; 61: 2129-2137.

10. Kihara C, Tsunoda T, Tanaka T, Yamana H, Furukawa Y, Ono K, Kitahara O, Zembutsu H, Yanagawa R, Hirata K, Takagi T, Nakamura Y: Prediction of Sensitivity of Esophageal Tumors to Adjuvant Chemotherapy by cDNA Microarray Analysis of Gene-Expression Profiles. *Cancer Res.* 2001; 61: 6474-6479.

11. Lander ES, et al: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409: 860-921.

12. Venter JC, et al: The sequence of the human genome. *Science.* 2001; 291: 1304-1351.

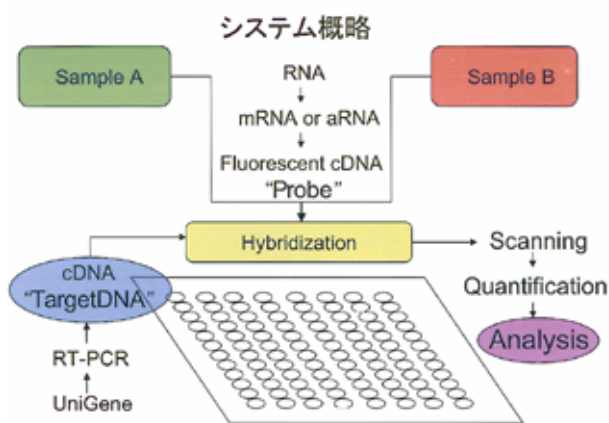


図 1

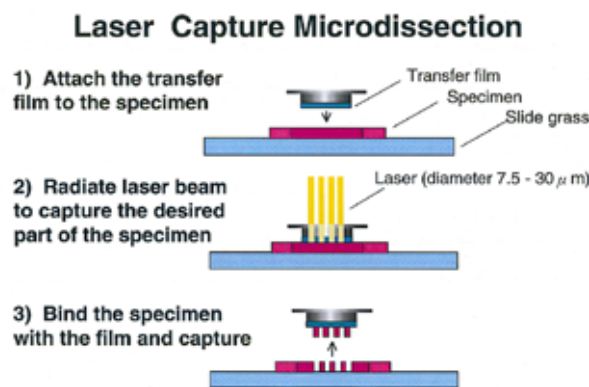


図 2

### T 7-based RNA amplification

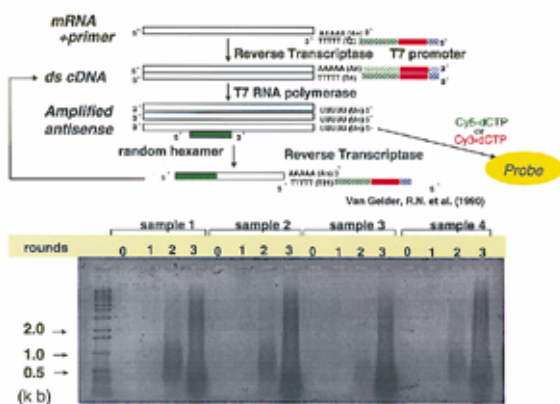


図 3

### cDNA Microarray

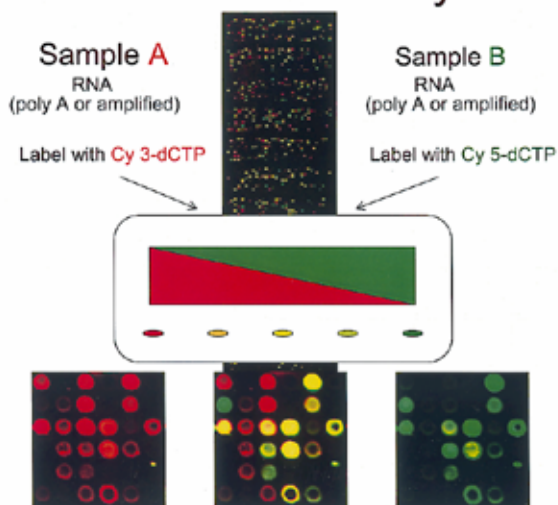


図 4

癌化に伴う遺伝子発現の変化

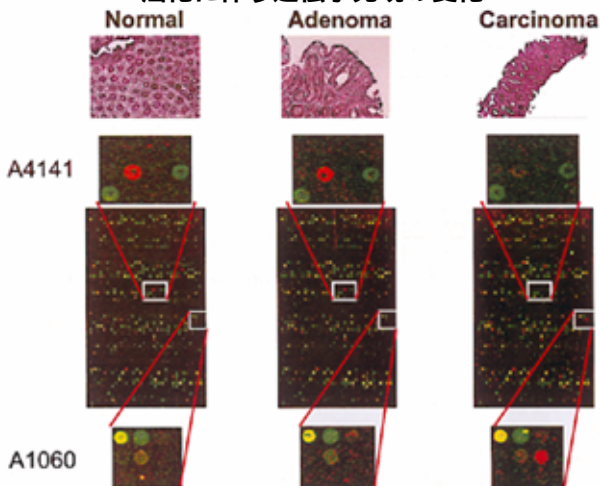


図 5

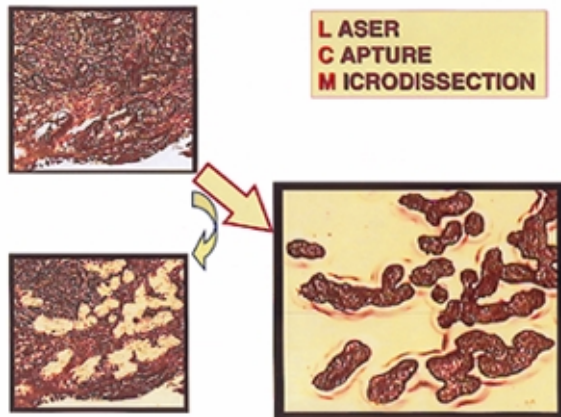


図 6

肝炎ウイルスによる遺伝子発現の違い

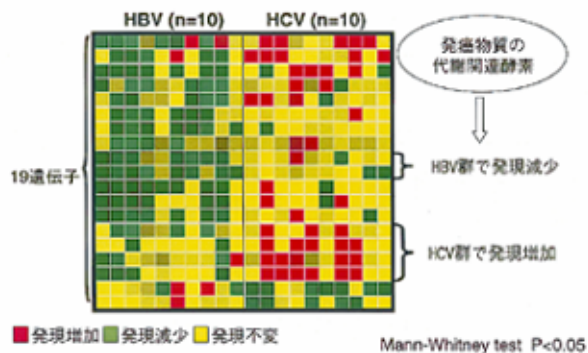


図 8

クラスター解析

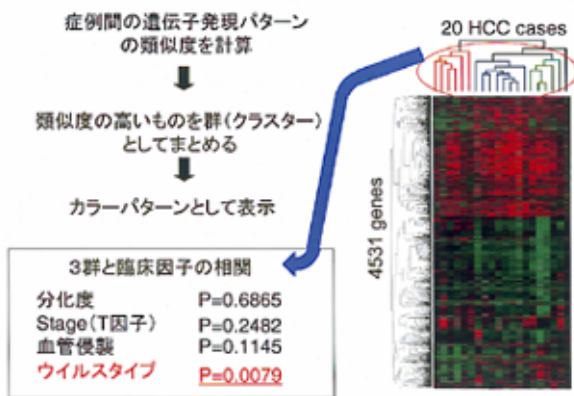


図 7

Prediction of the sensitivity to anti-cancer drug by DRS

“Drug response score (DRS)” evaluated by computational statistical analysis

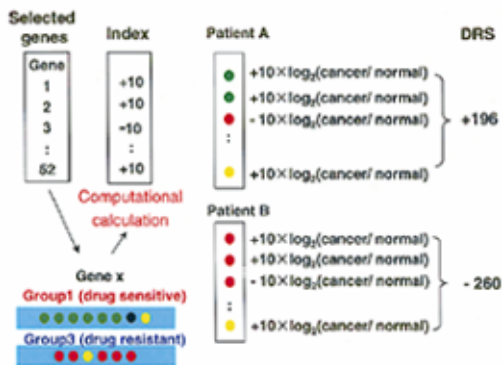


図 9

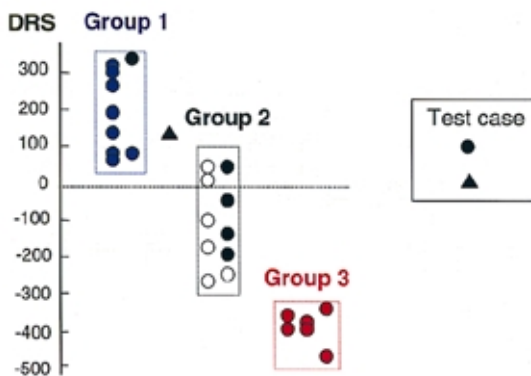


図 10

(受付: 2001年7月24日)  
(受理: 2001年8月16日)