

cDNA アレイデータの Correlation Profiling による

肺小細胞癌細胞株での

神経内分泌関連遺伝子発現の発現機序解析

学位論文内容の要旨

緒言

肺癌は世界的にみて癌に起因する死亡のうち最も多いもののひとつである。肺癌は、臨床病理学的に主に肺小細胞癌(SCLC) と、非小細胞癌(NSCLC)に分類され、SCLC は肺癌の 15 から 20%を占める。肺小細胞癌は特徴ある組織像や他の組織型の肺癌に比べ薬剤や放射線への反応が良いことなどから、基礎的臨床的研究が盛んに行われてきているが、その予後はいまだ不良である。

SCLC は、その生物学的特性のひとつとして神経内分泌機能を示すことが知られている。なかでも ACTH, GRP, NSE, NCAM, chromogranin A などは免疫組織化学的に確認することができ、病理学的鑑別診断の助けとなる。臨床的には SCLC は約 80%の患者でペプチドホルモンなどの生理活性物質を産生するといわれ、これらの生理活性物質による随伴症状を伴うことや、まれに神経症状を伴うこともある。こうした SCLC における神経内分泌関連遺伝子の発現は起源となる細胞が Kultschitsky's 細胞 (気管支上皮に存在する好銀性細胞 argentaffine cell situated in bronchial epithelium で、神経堤由来、あるいは neurally programmed cell of epiblastic origin) であろうとされているが、Kultschitsky 細胞の由来に関しては直接の証明はない。SCLC で認められる染色体異常として第3染色体短腕の欠失が指摘されており、それが神経内分泌関連遺伝子の発現に関与するとの予測もあるが、欠失する遺伝子は未だ不明のままである。いずれにしても神経内分泌関連遺伝子発現の分子機構は全く不明のままである。

本研究においては、SCLC に特異的に発現が高い遺伝子を抽出する目的で、6系の SCLC 由来細胞株の cDNA アレイデータを6系の肺腺癌、16系の乳癌、12系の大腸癌、9系の胃癌、11系の肝細胞癌由来細胞株を含む、計54系の細胞株のアレイデータと比較した。その中の神経内分泌関連遺伝子について、遺伝子間の関係を明らかにする目的でそれら遺伝子アレイデータの細胞株パターンの分布の類似度によって神経内分泌関連遺伝子を分類、グラフィカル・モデリングを用いて解析した。このような操作により得られた関係とそれら遺伝子のプロモーター構成要素を比較することにより神経内分泌関連遺伝子発現の分子機構の解明を試みた。

実験結果

SCLC と肺線癌 (AdLC)、乳癌、大腸癌、胃癌、肝細胞癌の cDNA アレイデータを

比較し、それぞれ 98, 204, 141, 153, 138 個の遺伝子が SCLC で有意に高い発現値を示した。このうち、2 つ以上の組み合わせで発現値が高かった遺伝子 130 個を抽出し、そのうち 21 遺伝子が神経細胞に関連する遺伝子であり、主に神経伝達物質受容体、神経成長因子、ニューロペプチド、イオンチャンネル、細胞骨格・細胞接着因子に分類された。

次に、抽出した神経細胞に関連する 21 遺伝子の相関関係を分析する目的で、それぞれの遺伝子について SCLC と AdLC の比較でそれぞれの遺伝子と相関係数 0.75 以上で発現パターンが相関する遺伝子を抽出した。このうち、上述の 130 遺伝子に含まれるもののみについて隣接行列を作成し、クラスター分類を行った (Correlation Profiling)。つまり、他の 129 個の遺伝子との相関があるかないかで 21 遺伝子をグループ分けしたことになる。この結果、他の遺伝子との関連でクラスター分類した場合、各遺伝子が機能的によくまとまって分類された。次に、21 遺伝子をそれぞれの実際のアレイの発現値をもとにクラスター分類を行ったが、この結果では、遺伝子機能的にはまとまりのない分類しか得られなかった。

21 遺伝子間の関係を明らかにする目的で、これら遺伝子の実際の発現値をもとにグラフィカル・モデリングを行った結果、21 遺伝子の関係を比較的簡単なグラフで表すことができた。グラフで表された関連構造と発現値をもとにおこなったクラスター分類の結果を比較してみると、同一クラスターとして分類されたいくつかの遺伝子は、グラフ上でもそれぞれ辺でつながれており、両者は類似した結果であった。この 21 遺伝子の関連構造モデルがそれら遺伝子間の発現制御を反映しているかどうかを検討するために、それぞれの遺伝子のプロモーター領域とプロモーターに結合する転写因子を検索した結果、文献及びプロモータースキャンにてプロモーター領域と転写因子を確認できなかった 4 遺伝子以外で、1 遺伝子を除く全てに SP-1 と AP-2 が共通していた。また、グラフィカル・モデリングによる関連構造モデルを明らかに裏付ける結果は得られなかったが、Correlation Profiling によってクラスター分析した結果で同じクラスターとして分類されている遺伝子間ではプロモーター構成要素が類似していた。

考察とまとめ

本研究では、SCLC 細胞株で AdLC と比較して有意に発現が高かった遺伝子が 130 個認められ、そのうち 21 個が神経内分泌に関連する遺伝子であり、これは肺小細胞癌の生物学的特徴を示す結果といえる。また、これら 21 遺伝子のプロモーター構成要素を検討した結果、SCLC における神経関連遺伝子発現の分子機構の一つとして、Sp-1 および AP-2 の transactivation が関与することが示唆された。

21 遺伝子と 130 遺伝子の相関の有無でクラスター分類を行ったものは、21 遺伝子それぞれと発現パターンが類似する遺伝子群のうち 130 遺伝子に含まれるもののみに抽出して相関関係のあるものを 1、無いものを 0 としてクラスター分類を行っている。したがって、他の 129 遺伝子との関連の有無のみで分類したことになり、他の遺伝子との関連性が類似する遺伝子は機能的に類似したものとして分類されたと考えられる。このような Correlation Profiling (相関プロフィール解析) は、遺伝子そのものの発現データだけを元に遺伝子を分類するものではなく、遺伝子の発現値が類似しているようなグループの要素遺伝子までデータを還元し、それを遺伝子の特徴として分類することになる。本研究によって遺伝子の発現値そのものによる分析や個々の遺伝子間の関係による分析では見出せなかった遺伝子の機能や遺伝子発現の制御を行っているプロモーターの構成要素を反映する結果を得ることができた。

SCLC における神経関連遺伝子発現の分子機構の一つとして、Sp-1 および AP-2 の transactivation が関与することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

cDNA アレイデータの Correlation Profiling による

肺小細胞癌細胞株での

神経内分泌関連遺伝子発現の発現機序解析

肺小細胞癌（SCLC）は、その生物学的特性のひとつとして神経内分泌機能を示すことが知られている。なかでも ACTH, GRP, NSE, NCAM などは免疫組織化学的に確認することができ、病理学的鑑別診断の助けとなる。しかしながら、こういった SCLC での神経内分泌関連遺伝子発現の分子機構は全く不明のままである。

本研究においては、SCLC に特異的に発現が高い遺伝子を抽出する目的で、6 系の SCLC 由来細胞株の cDNA アレイデータを 6 系の肺腺癌、16 系の乳癌、12 系の大腸癌、9 系の胃癌、11 系の肝細胞癌由来細胞株のアレイデータと比較した。その中の神経内分泌関連遺伝子について、遺伝子間の関係を明らかにする目的でそれら遺伝子アレイデータの細胞株パターンの分布の類似度によって分類し、グラフィカル・モデリングを用いて解析した。このような操作により得られた関係とそれら遺伝子のプロモーター構成要素を比較することにより神経内分泌関連遺伝子発現の分子機構の解明を試みた。

SCLC と肺線癌（AdLC）、乳癌、大腸癌、胃癌、肝細胞癌の cDNA アレイデータを比較し、このうち、2 つ以上の組み合わせで発現値が高かった遺伝子 130 個を抽出し、そのうち 21 遺伝子が神経細胞に関連する遺伝子であり、主に神経伝達物質受容体、神経成長因子、ニューロペプチド、イオンチャンネル、細胞骨格・細胞接着因子に分類された。

次に、抽出した神経細胞に関連する 21 遺伝子の相関関係を分析する目的で、それぞれの遺伝子について SCLC と AdLC の比較でそれぞれの遺伝子と相関係数 0.75 以上で発現パターンが相関する遺伝子を抽出した。このうち、上述の 130 遺伝子に含まれるもののみについて隣接行列を作成し、クラスター分類を行った（Correlation Profiling）。この結果、他の遺伝子との関連でクラスター分類した場合、各遺伝子が機能的によくまとまって分類

された。次に、21 遺伝子をそれぞれの実際のアレイの発現値をもとにクラスター分類を行ったが、この結果では、遺伝子機能的にはまとまりのない分類しか得られなかった。

21 遺伝子間の関係を明らかにする目的で、これら遺伝子の実際の発現値をもとにグラフィカル・モデリングを行った結果、21 遺伝子の関係を比較的簡単なグラフで表すことができた。グラフで表された関連構造と発現値をもとにおこなったクラスター分類の結果を比較してみると、両者は類似した結果であった。神経内分泌に関連する 21 遺伝子のプロモーター領域とプロモーターに結合する転写因子を検索した結果、文献及びプロモータースキャンにてプロモーター領域と転写因子を確認できなかった 4 遺伝子以外で、1 遺伝子を除く全てに SP-1 と AP-2 が共通していた。また、Correlation Profiling によってクラスター分析した結果で同じクラスターとして分類されている遺伝子間ではプロモーター構成要素が類似していた。

21 遺伝子と 130 遺伝子の相関の有無でクラスター分類を行ったものは、他の遺伝子との関連の有無のみで分類したことになり、他の遺伝子との関連性が類似する遺伝子は機能的に類似したものとして分類されたと考えられる。このような Correlation Profiling（相関プロフィール解析）は、遺伝子そのものの発現データだけを基に遺伝子を分類するものではなく、遺伝子の発現値が類似しているようなグループの要素遺伝子にまでデータを還元し、それを遺伝子の特徴として分類することになる。本研究によって遺伝子の発現値そのものによる分析や個々の遺伝子間の関係による分析では見出せなかった遺伝子の機能や遺伝子発現の制御を行っているプロモーターの構成要素を反映する結果を得ることができた。こういった分類法は遺伝子ネットワークの解析に有用であると考えられた。

本研究では、SCLC 細胞株で AdLC と比較して有意に発現が高かった遺伝子が 130 個認められ、そのうち 21 個が神経内分泌に関連する遺伝子であり、これは肺小細胞癌の生物学的特徴を示す結果といえる。また、これら 21 遺伝子のプロモーター構成要素を検討した結果、SCLC における神経関連遺伝子発現の分子機構の一つとして、Sp-1 および AP-2 の transactivation が関与することが示唆された。

口頭発表において今村教授よりグラフィカルモデリングとクラスター分類の長所と短所、予後や病状といった臨床との関連性、他の癌での神経内分泌関連遺伝子発現の意義について質問があった。ついで加藤教授より臨床応用の可能性、Sp-1, AP-2 の癌化・増殖との関連性、SCLC と肺腺癌の相違について質問があった。また守内教授より臨床材料を使った cDNA アレイデータとの比較、Correlation Profiling の方法論、神経内分泌関連遺伝子の転写因子結合部位について質問があった。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 SCLC における神経内分泌関連遺伝子発現の解明の基礎とな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。