

## 学 位 論 文 題 名

# EM アルゴリズムを用いた新しい感受性判定と アレイ CGH 法との統合解析による 抗癌剤感受性関連ゲノム領域の検索

## 学位論文内容の要旨

### 序論)

近年、新規抗癌剤が開発されているが、満足すべき臨床成績は未だ得られていない。個々の抗癌剤に対する感受性を予測することは、最適な治療法を行う上で重要である。CD-DST (collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test) 法は微量三次元培養法と画像解析定量法を組み合わせた *in vitro* の抗癌剤感受性試験で、少量の手術・生検材料で評価が可能、判定可能率が高いという特徴がある。本法では薬剤を投与しないコントロールの測定値 (C) と薬剤投与での測定値 (T) を測定し、両者の比である T/C の値により感受性を判定するが、高感受性と低感受性との境界値の設定につき、問題となっている。Comparative genomic hybridization (CGH) 法は染色体の欠失、増幅を全染色体に渡って解析する方法で、試料 DNA を正常染色体標本にハイブリダイズして行う。しかし、分解能が低いため、最近、マイクロアレイ技術を応用した Array CGH 法が開発された。BAC で増やした DNA 断片をスライドガラスにアレイ化し、CGH を行う方法で、従来法では検出不能であった微小な領域の変化の検出が期待でき、癌抑制遺伝子の同定が可能など多くの利点を有する。本研究では、CD-DST 法の測定を各薬剤で 3 濃度測定し EM algorithm で効果判定を行い、1 濃度測定による効果判定と比較を行った。また、EM algorithm, Array CGH で得られた結果より抗癌剤感受性に関連するゲノム領域を網羅的に解析し、感受性規定要因の包括的理解や新たな関与遺伝子候補の策定を試みた。

### 方法)

ヒト癌組織より樹立された 54 細胞株を用い、11 種類の抗癌剤に対して CD-DST 法にて抗癌剤感受性試験を行った。接触濃度は臨床通常投与量を静脈投与した場合の AUC を基に、1 倍、3 倍、10 倍の 3 濃度にて測定を行った。CD-DST 法はコラーゲン・ドロップ培養キット (新田ゼラチン) を用いて、 $1 \times 10^5$  cells/ml の細胞を含むコラーゲン・ゲルを作成し、 $30 \mu$ l/滴として 6 wells-マルチプレートに滴下、静置後、培養液を加えて 24 時間予備培養した。培地内に抗癌剤を添加し、24 時間後に抗癌剤を除去し、さらに 6 日間培養した。細胞を Neutral Red で染色した後ホルマリン固定し、画像定量処置にて定量を行った。細胞増殖の判定には、薬剤処理群の増殖率 (T) と薬剤未処理群の増殖率 (C) との相対比 T/C% を算出して評価した。CD-DST 結果から得られた 3 次元データを 5 つの正規分布の混合分布からなると仮定し、EM algorithm にて分布を解析し、それぞれの細胞株の感受性の計算値を群ごとに平均し、値が低い 2 群を感受性群、平均値が高い上位 2 群を耐性群、中間に属する 1 群は中間群とした。Array CGH には韓国 MacroGen Inc. が作成した 1440 の BAC クローンを搭載した MAC Array™ Karyo 1400 を用いた。各細胞株の DNA を抽出し、Cy 3 で標識し、

対照として sex-matched reference DNA を Cy 5 で標識し、37℃、40-72 時間の競合的ハイブリダイゼーションを行った。蛍光標識の測定には GenePix 4000A (Axon Instruments, USA) を用い、データ解析は MacroGen Inc. の Mac Viewer にて行った。統計学的処理は、プログラミング言語 MATLAB を用いて独自に製作した統計解析にて行った。

#### 結果)

CD-DST 法での結果: 1 濃度測定結果を基にした判定では、感受性ありと判定した有効率は、それぞれの抗癌剤ごとに大きく異なり、CPA・5FU は殆ど効果を示さず、逆に、GEM・TXT・TXL はかなりの細胞株に対して、感受性群に分類された。また、SN-38・VCR のように、株化細胞に対してほぼ 50% に効く抗癌剤も見られた。

CD-DST 法の EM algorithm での結果: CD-DST の 3 点濃度から得られた結果を、3 次元のデータ空間上で表すと、明らかに異なった分布が混在し、データ空間上での感受性群と耐性群との分離が難しいものとなった。3 次元データである CD-DST データを 5 つの正規分布の混合分布からなると仮定して EM algorithm にて分布解析した。高感受性、中感受性、中間群、中耐性、高耐性に分類された細胞株の率は、CDDP では順に 29.8%, 4.3%, 17.0%, 25.5%, 23.4% であった。全ての薬剤で感受性群と耐性群に複数細胞株が分類され、1 濃度での分析に見られたような大きな偏りは無かった。

染色体領域の増減と抗癌剤感受性: EM algorithm で算出した結果と Array CGH の結果より統計学的に有意に感受性と耐性に関連すると判定した染色体領域を同定した。多くの抗癌剤の感受性・耐性に関連していた染色体領域として、6p, 15q, 17p・q, 18q を認めた。一方で、CDDP: 14q22, MMC: 5q21, EPI: 9p34, GEM: 3q21-26 などのように、それぞれの抗癌剤に特異的なゲノム領域の存在が認められた。

CDDP の感受性と染色体領域の増減: 一般化線形モデル (Generalized Linear Model; GLM) を用いて、各座位での CGH 測定値と CD-DST データとの相関関係を検討し、CDDP において、耐性に従って、染色体 8q24 の増加および染色体 18q21-22 の減少が認められた。

#### 考察)

本研究では、特定の染色体領域の増幅や欠失と、抗癌剤の感受性や耐性との関連を網羅的に検証することを目的とした。CD-DST 法では、AUC に基づく 1 薬剤濃度による判定では、株化細胞に対して薬効を示さないものやほぼすべての細胞株に対して薬効を示すものが存在し、偏った結果が認められ、抗癌剤の感受性に関連した染色体領域の同定を行うには困難であった。そこで、3 濃度の接触濃度で測定を行い、EM algorithm にて薬剤感受性の群分けを行い、感受性群と耐性群の間に中間群を設け、それを除外することにより、データ空間の分離が明確となった。今回のような EM algorithm を抗癌剤感受性試験の効果判定基準に應用する解析法は本研究がはじめての報告である。本研究で抗癌剤の感受性・耐性に関連した染色体領域は 6p, 15q, 17p・q, 18q であった。6p の染色体領域内の ABC トランスポータ、17p・q 染色体領域内の TP53, BRCA1, そして 18q 染色体領域内の BCL-2 などはそれらの感受性・耐性機序に関係し、既存の方法による報告と一致した。一方、これまで抗癌剤感受性遺伝子の遺伝子座領域として報告がない 15q11-26 の増加・増幅が耐性群に認められた。また、CDDP: 14q22, EPI: 9p34, GEM: 3q21-26 などのように、それぞれの抗癌剤に特異的なゲノム領域の存在が認められ、これらの領域内に新規感受性規定因子の候補が含まれると示唆された。このように、Array CGH で一度に染色体の変化を観察することによって、多剤の抗癌剤感受性試験を行はなくても、最適な抗癌剤を選択することができ、オーダーメイド医療の実現が可能となると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 福 田 論

副 査 教 授 藤 堂 省

## 学 位 論 文 題 名

EM アルゴリズムを用いた新しい感受性判定と

アレイ CGH 法との統合解析による

抗癌剤感受性関連ゲノム領域の検索

近年、新規抗癌剤が開発されているが、満足すべき臨床成績は未だ得られていない。個々の患者に発生した癌の感受性を予測することは、最適な治療法を行う上で重要である。CD-DST (collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test) 法は *in vitro* の抗癌剤感受性試験で、薬剤を投与しないコントロールの測定値(C)と薬剤投与での測定値(T)を測定し、両者の比である T/C の値により判定するが、高感受性と低感受性との境界値の設定につき、問題となっている。Comparative genomic hybridization (CGH) 法は染色体の欠失、増幅を全染色体に渡って解析する方法で、試料 DNA を正常染色体標本にハイブリダイズして行う。最近、マイクロアレイ技術を応用した Array CGH 法が開発され、BAC で増やした DNA 断片をスライドガラスにアレイ化し、CGH を行う方法で、従来法では検出不能であった微小な領域の変化の検出が可能となっている。本研究では、ヒト癌細胞株 54 種類を対象とし、11 種類の抗癌剤各 3 濃度を CD-DST 法にて測定し、感受性を新たな判定方法 EM algorithm を用いて行った。また、癌細胞株の染色体変化を Array CGH 法で網羅的に解析し、両者の結果より抗癌剤感受性に関連している染色体領域を同定することを目的とした。CD-DST 法では、AUC に基づく 1 薬剤濃度による判定では、株化細胞に対して薬効を示さないものやほぼすべての細胞株に対して薬効を示すものが存在し、偏った結果が認められ、抗癌剤の感受性に関連した染色体領域の同定を行うには困難であった。そこで、EM algorithm にて薬剤感受性の群分けを行い、感受性群と耐性群の間に中間群を設け、それを除外することにより、データ空間の分離が明確となり、以降の解析を可能にした。本研究で、既存の報告と一至し、多くの抗癌剤の感受性・耐性に関連した染色体領域として 6p, 17p・q, 18q を同定した。一方、

これまで抗癌剤感受性遺伝子の遺伝子座領域として報告がない 15q11-26 の増加・増幅が耐性群に認められた。また、CDDP では 14q22, GEM では 3q21-26 などのように、それぞれの抗癌剤に特異的なゲノム領域の存在を同定し、これらの領域内に新規感受性規定遺伝子の候補が含まれると示唆された。公開発表後、副査の福田教授より 1)濃度設定の条件、2)臨床応用に向け、今後の展望についての質問があった。それに対して 1)濃度設定につき、基本的に CD-DST の原法に基づき、臨床通常投与量を静脈投与した場合の AUC を基に算出した濃度を基準値とし、1 倍、3 倍、10 倍の 3 濃度で測定を行ったことを説明した。2)今後の展望については、切除可能で、組織を十分に取れ、間質量の少ない癌種、そして化学療法に適応ある症例を中心に更なる臨床検討を行う必要があると回答した。藤堂教授からは、1)CDDP における染色体 15q11-26 領域内、2)GEM における染色体 3q21-26 領域内で、感受性に関連しうる遺伝子についての質問があった。それに対して、1)15q15.1 領域内に DNA 修復機構遺伝子 *RAD51* の存在、および 15q24.2 領域内に薬物関連遺伝子 *CYP1A1* の存在、2)3q22.1 領域内に DNA トポイソメラーゼ関連遺伝子 *TOPBP1* の存在が、感受性・耐性機構に関与していると考えられる、等の回答をした。また主査の秋田教授より、1)同定された染色体領域内における新規感受性規定遺伝子候補の検索、2)Array CGH 法にて臨床的に感受性予測が可能かについて質問があった。1)Array CGH では、既にシーケンスやその中に含まれる遺伝子の情報が明らかな DNA をスポットすることで、増幅の検出が増幅領域の詳細な構造や標的遺伝子候補に直結しているため、候補遺伝子の検出は一回の実験において速やかに同定でき、また今後 BAC アレイの解像度を上げ、DNA microarray などの手法との組み合わせより、信頼性の高い候補遺伝子の検出が可能と考えられる。2) Array CGH で観察される染色体領域の増減は短期間に大きく変化するものではなく、実際の臨床検体から得られた癌組織を用いて Array CGH を行い、本研究で得られた抗癌剤感受性と関連する染色体領域の増減と比較することにより、臨床応用が可能と考えられる、等の回答をした。

本研究は、EM algorithm を抗癌剤感受性試験の効果判定に応用する解析法として、初めての報告であり、また、Array CGH 法で一度に染色体の変化を観察することによって、多剤の抗癌剤感受性試験を行わずに、最適な抗癌剤を選択する方法として応用が期待される。

審査員一同は、これら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ものと判定した。