

大腸癌原発組織の遺伝子発現プロファイル解析による 異時性肝・肺転移の予測

武本昌子 奥野清隆 塩崎 均

近畿大学医学部外科学教室

抄 録

大腸癌は比較的予後良好であり、その生命予後は原発巣よりも肝・肺等の遠隔転移で規定されることが多い。従って、大腸癌異時性遠隔転移の予測因子が同定され、異時性遠隔転移の発現前に適切な補助療法を加えることが可能になれば、生命予後の改善が期待できる。本研究では異時性肝・肺転移の予測因子同定を目的としてS状結腸癌・直腸癌の原発組織に対して遺伝子プロファイル解析を行った。これまでの我々の研究方法に改善を加え、より良質なRNAを抽出し、バイアスの少ないcDNA増幅を行い、DNAチップにはAffymetrix社製のGeneChip®を用いた。その結果、大腸癌の同時性転移群・非転移群間のdifferential expression analysisでは異時性転移群・非転移群間の同解析と比較して、有意水準・発現変動倍率ともに高い遺伝子がみられ、より遺伝子変異の蓄積が大きいことが示唆された。さらに、本研究結果と既報論文の比較から、異時性肝転移の予測因子となりうる17遺伝子を同定した。異時性肺転移を選択的に予測する候補遺伝子は抽出されなかった。しかし、同時性肝転移と同時性肺転移の遺伝子発現プロファイルには明確な相違があり、両者の病態が単なる転移経路の違いだけでなく、遺伝子学的に異なる発現パターンを示すものであることが示唆された。

Key words : 遺伝子発現プロファイル解析, 大腸癌, 異時性肝転移, 異時性肺転移, 遺伝子チップ

緒 言

大腸癌症例の生命予後を決定するものは、原発巣よりも肝・肺等実質臓器への遠隔転移であることが多い。大腸癌の転移には、術前の画像診断で指摘される場合(同時性転移)と、術後のfollow-upにて指摘される場合(異時性転移)とがあるが、原発巣による検査から異時性転移を発現前に予測し、適切な補助療法を加えることができれば、生命予後の改善が大いに期待できる。

近年、網羅的遺伝子発現解析を用いて、大腸癌においても新規腫瘍マーカーの探索、化学療法・放射線治療に対する治療応答性の予測診断、転移・予後の予測診断などの研究が行われるようになった¹。しかし、現在のところ大腸癌異時性遠隔転移の予測手段は未だ確立されていない²⁻⁸。

我々はこれまで、ベンチャー企業との共同開発にて安価なDNAアレイフィルターを作製し解析を行ってきた⁹が、アレイフィルターのロット間誤差が

大きく再現性に乏しいという大きな欠点に直面した。

そこで、今回我々はより良質なtotal RNAの抽出、cDNAの増幅方法の変更、より再現性に優れているAffymetrix GeneChip®の使用など、手法の大幅な改善を行い、原発巣切除標本の遺伝子発現プロファイル解析より、異時性肝・肺転移の予測因子の同定を試みた。

方 法

1. 対象

2006年2月から2007年4月までに切除された原発性大腸癌症例のうち、同時性肝転移症例(synchronous hepatic metastasis: SH) 7例、異時性肝転移症例(metachronous hepatic metastasis: MH) 2例、肺転移を有し肝転移を有さない、即ち同時性肺転移症例(synchronous pulmonary metastasis: SP) 5例、異時性肺転移(metachronous pulmonary metastasis: MP) 1例と、対照群として年齢、性別、

表1 症例背景

症例	年齢	性別	部位	H	P	T	N	M	Stage	ly	v	His
SH1	62	F	R	2	0	a	2	0	IV	1	0	mod.
SH2	76	F	S	2	0	ss	1	0	IV	2	0	mod.
SH3	66	F	S	1	2	se	0	0	IV	1	1	well.
SH4	64	M	R	2	0	ss	2	1	IV	2	1	mod.
SH6	39	F	R	3	0	ss	2	0	IV	2	2	mod.
SH7	52	F	S	3	0	ss	0	0	IV	1	0	mod.
SH8	78	M	R	3	2	a	1	0	IV	0	0	mod.
MH1	66	M	R	0	0	ss	1	0	III a	0	0	mod.
MH2	67	M	R	0	0	mp	1	0	III a	1	0	mod.
MH3	64	M	R	0	0	mp	0	0	I	0	0	mod.
SP1	80	M	R	0	0	a	1	1	IV	1	0	mod.
SP3	56	M	R	0	0	se	1	1	IV	2	2	mod.
SP4	52	F	S	0	0	ss	0	1	IV	1	0	well.
MP1	69	M	R	0	0	ss	0	0	II	1	0	well.
MP2	53	M	R	0	0	ss	1	0	III a	0	1	mod.
none1	62	F	S	0	0	mp	0	0	I	1	0	well.
none2	70	F	S	0	0	ss	0	0	II	0	0	mod.
none3	68	F	S	0	0	ss	1	0	III a	0	0	mod.
none6	76	M	R	0	0	mp	0	0	I	0	0	well.
none7	60	M	S	0	0	mp	0	0	I	0	1	mod.

SH (synchronous hepatic metastasis) : 同時性肝転移, MH (metachronous hepatic metastasis) : 異時性肝転移, SP (synchronous pulmonary metastasis) : 同時性肺転移, MP (metachronous pulmonary metastasis) : 異時性肺転移, none : 非転移

原発部位, 壁進達度, リンパ節転移, 組織型などが類似した非転移症例 (none) 7例を用いた (表1)。後述するRNAクオリティーチェックにより不適切と判定されたものを除外し, また, 非転移症例 (none) のうち1例は異時性肝転移 (MH) を, また1例は異時性肺転移 (MP) を追跡中に発現したため, 症例番号に連続していない部分が存在する。

いずれの症例も術前に研究の目的と意義の説明を行い, 文書にて理解と同意を得ている。外科的手術にて病変を摘出した際, 直ちに癌組織から径5mmの組織片を採取し, 予め冷却しておいたマイクロチューブに移し, 液体窒素で瞬間凍結した。検体は本研究に用いるまで -80°C で凍結保存した。

2. total RNA の抽出

total RNA はRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany) にて抽出した。凍結組織片にBuffer RLT を600 μl 加えて破碎し, 15000 g \cdot 室温で3分間遠心操作した。上清を取出し, 70%エタノールを等量加え, 混和したサンプル700 μl をRNeasy mini column にアプライし, 8000 g \cdot 室温で15秒間遠心操作した。このときRNase-Free DNase Set (QIAGEN, Germany) を用いてDNase処理も行った。カラムにBuffer RW1 を350 μl 加え, 8000 g \cdot

室温で15秒間遠心操作し, DNase I mix solution 80 μl (DNase I stock solution 10 μl + Buffer RDD 70 μl) を加え, 室温にて15分間インキュベートした。Buffer RW1 を350 μl 加えて8000 g \cdot 室温で15秒間遠心操作し, Buffer RPE を500 μl 加え2回同様に遠心操作し, 洗浄した。さらに15000 g \cdot 室温で1分間遠心操作後, RNase free water 30 μl をスピンカラム・メンブレンに加え, 8000 g \cdot 室温で1分間遠心操作し, RNA を溶出した。

3. RNA クオリティーチェック

RNA のクオリティーチェックにはAgilent RNA6000 Nano LabChip[®] kit (Agilent Technologies, USA), 及びAgilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) を用いた。total RNA を約0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整し, 70°C で2分間denatureした。冷却後, Gel matrix 65 μl にRNA dye 溶液1 μl を入れ, 遮光にて13000 g \cdot 室温で10分間遠心操作した。ラボチップをスタンドに載せ, Gel-dye mix 9 μl をGマークのウェルに, Marker 5 μl をラダーマークのウェルと, 残り全てのサンプルウェル, RNA 600 ラダー1 μl をラダーマークのウェルに, サンプル1 μl を各サンプルウェルにアプライした。室温にて1分間2400 rpm で混合した後, Agilent 2100

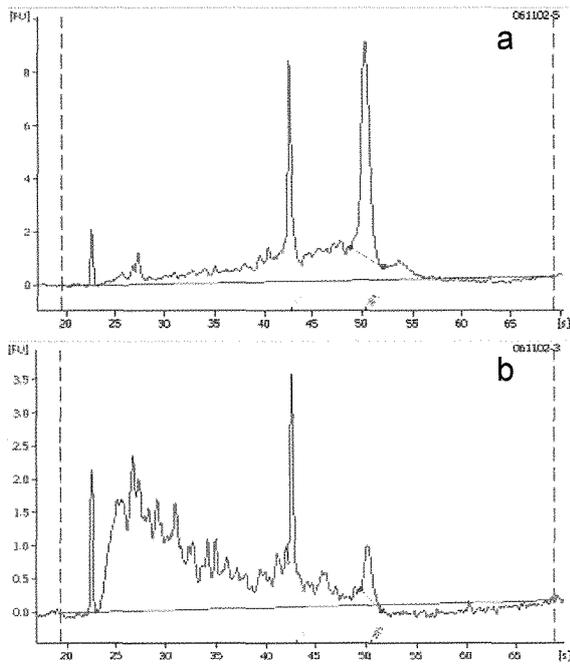


図1 Quality check の例
Quality Check の良好例 (a, RIN : 7.5) と、不良例 (b : RIN : 4.4) のエレクトロフェログラムを示す (RIN : RNA Integrity Number) a ではリボソーム RNA の18s, 28s のピークが鮮明であるが, b では28s のピークが不明瞭となっている。また低分子領域において, a ではほぼフラットとなっているが, b では発現が多くなっており, これも RNA 分解の指標となり, RIN 値に影響する。

Bioanalyzer にセットして分析を行った。分析結果において, RNA Integrity Number (RIN 値) が5.0以上のサンプルのみを解析対象とすることとした(図1)。

4. cDNA の合成

cDNA 合成には WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NuGEN Technologies, USA) を使用した。First Strand Primer Mix 2 μ l とサンプル total RNA 50 ng を加え, 水で全量を 7 μ l に合わせた後, 65°C で 2 分間インキュベートし, 4°C に冷却し, Primer Annealing を行った。First Strand Master Mix (First Strand Buffer Mix 2.5 μ l + First Strand Enzyme Mix 0.5 μ l) を 3 μ l ずつ加え混和した。4°C 1 分間, 25°C 10 分間, 42°C 10 分間, 70°C 15 分間インキュベートし, 4°C に冷却した。次に Second Strand Master Mix (Second Strand Buffer Mix 9.75 μ l + Second Strand Enzyme Mix 0.25 μ l) を 10 μ l ずつ加え混和し, 4°C 1 分間, 25°C 10 分間, 50°C 30 分間, 70°C 5 分間のインキュベートの後, 4°C に冷却した。

Agecut® RNAClean® beads を再懸濁し, 50 ng/

ul yeast tRNA を 1 ul 加えた後, ビーズを 32 μ l 加え, 混和して室温で 10 分間インキュベートし, チューブを magnet plate に 5 分間立てた。Binding Buffer を 45 μ l 除き, 70% エタノールを 200 μ l 加えて洗浄し, 30 秒間 magnet plate に立てた。エタノールを除き, 同じ洗浄をもう 2 回繰り返して, 完全に乾燥させた。

5. SPIA™ Amplification

ビーズに吸着されたままの 2 本鎖 cDNA の入ったチューブそれぞれに, SPIA™ Master Mix 160 μ l (SPIA™ Buffer Mix 80 μ l + SPIA™ Primer Mix 40 μ l + SPIA™ Enzyme Mix 40 μ l) を加え混和した。4°C 1 分間, 47°C 60 分間, 95°C 5 分間のインキュベートを行い, 4°C に冷却した後, magnet plate に 5 分間立てておき, 上澄みを回収した。SPIA™ cDNA の精製には, QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) を用いた。QIAGEN system の PB buffer 800 μ l と, 増幅した cDNA を 160 μ l 加え混和した。QIAquick® spin column をセットし, カラムに 480 μ l のサンプルを添加し, 13000 rpm で 1 分間遠心操作した。残りのサンプルも同様に処理した。80% エタノールを 700 μ l 加えて, 13000 rpm で 1 分間遠心操作する洗浄を 2 回行った。nuclease-free water を 30 μ l 加え, 5 分間室温に置いておき cDNA を溶出させた。13000 rpm で 1 分間遠心操作し, 精製された SPIA™ cDNA を得た。

6. ビオチン化ラベル

精製した SPIA™ cDNA 5 μ g を FL-Ovation cDNA Biotin Module V2 (NuGEN Technologies, USA) を用いて, 断片化及びビオチン化ラベルした。SPIA™ cDNA 5 μ g をに水を加えて total 25 μ l とし, Fragmentation Master Mix 7 μ l (Fragmentation Buffer Mix 5 μ l + Fragmentation Enzyme Mix 2 μ l) を加えて混和し, 37°C 30 分間, 95°C 2 分間インキュベートした。Labeling Master Mix 18 μ l (Labeling Buffer Mix 15 μ l + Labeling Regent 1.5 μ l + Labeling Enzyme Mix 1.5 μ l) を加え混和し, 37°C 60 分間, 70°C 10 分間のインキュベートを行い, 4°C に冷却した。さらに 99°C 2 分間の熱変性後, 45°C 5 分間インキュベートし, プレハイブリダイゼーション終了後の DNA チップにアプライした。

7. GeneChip® 発現解析

DNA チップには GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, USA) を使用し, 試薬は The GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit (Affymetrix, USA) を用いて, Affymetrix GeneChip expression analysis technical manual に準じて以降の工程を行った。サンプルを

アプライしたDNAチップはThe GeneChip® Hybridizaion Oven 640 (Affymetrix, USA) で45°C18時間ハイブリダイゼーション処理し、翌日GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix, USA) で洗浄、GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA) でスキャンを行い、GeneChip® Operating Software version 1.4 (GCOS) (Affymetrix, USA) にて得られたシグナルの数値化を行った。

8. データ解析

データ解析には、遺伝子解析ソフトウェアArrayAssist® (STRATAGENE, USA) を用い、対象遺伝子54675遺伝子をRobust Multi-chip Analysis (RMA 法) で読み込んだ。GeneChip®では25塩基のヌクレオチドからなるターゲットと相補的な配列のPerfect Match (PM) プローブと、PMの中央(13番目)の1塩基がミスマッチとなる配列のMiss Match (MM) プローブの2つのプローブで1組としている。これらPMプローブとMMプローブの蛍光強度の差を、Wilcoxon signed-rank test を用いて算出したDetection p-valueにて、P: Present ($0.00 < p < 0.04$), M: Marginal ($0.04 < p < 0.06$), A: Absent ($0.06 < p < 1.00$) の3つに判定している。今回の解析では全サンプルに対してPresent call (P-call) と判定された遺伝子だけに絞り込み、対数変換したデータにて、differential expression analysisを行った。p-valueと発現変動倍率(fold change: FC)にてさらに遺伝子を絞り込み、階層的クラスタリング解析(average法)及び、主成分解析を行った。

結 果

1. 肝転移群(同時性・異時性)の遺伝子発現プロファイル解析

同時性肝転移群(synchronous hepatic metastasis: SH)・非転移群(none)間において、differential expression analysisを行った(表2 a), p-value ($p < 0.02$)且つfold change (FC) > 1.5 のものだけで、39遺伝子存在した。さらに、 $p < 0.005$ 且つ $2.0 < FC < 3.0$ のものはかなり特徴的な遺伝子と考えられるが、3遺伝子存在し、その内2つがMT1Fで重複していたので、実際にはMT1FとFAM107Bの2遺伝子であった。 $p < 0.05$ 且つ $FC > 1.1$ のものに限ると、334遺伝子が該当した。

次に、異時性肝転移群(metachronous hepatic metastasis: MH)と非転移群(none)において、differential expression analysisを行った(表2 b)。ここでは $p < 0.02$ の遺伝子は存在しなかったが、 $p < 0.05$ 且つ $FC > 1.1$ には591遺伝子が該当した。

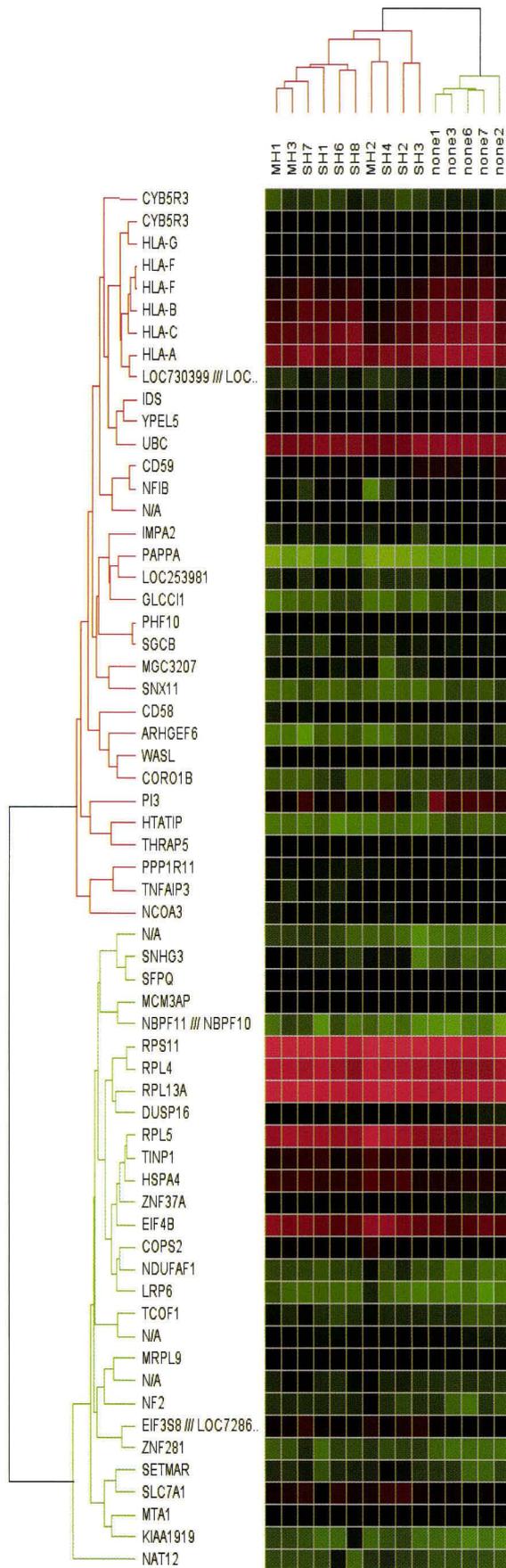
表2 a, 2 bの双方において、 $p < 0.05$ 且つ $FC > 1.1$ を満たす遺伝子数はそれぞれ334と591であったが、これらに共通する遺伝子が62遺伝子存在し、それら62遺伝子に対して階層的クラスタリング解析(average法)を施行した(図2)。その結果、肝転移群(SH+MH)と非転移群(none)が明確に区別され、肝転移群のうち異時性肝転移群(MH)は同時性肝転移群(SH)に包含される形となった。次に、表2 aにおいて $p < 0.05$ 且つ $FC > 1.1$ の334遺伝子において、非転移群(none)、同時性肝転移群(SH)、及び異時性肝転移群(MH)の3群間において、主成

表2 肝転移群に対する differential expression analysis

	p all	p<0.05	p<0.02	p<0.01	p<0.005	p<0.001
FC all	15123	335	93	22	11	0
FC>1.1	8135	334	93	22	11	0
FC>1.5	499	107	39	11	5	0
FC>2.0	67	25	14	7	3	0
FC>3.0	9	5	4	1	0	0

	p all	p<0.05	p<0.02	p<0.01	p<0.005	p<0.001
FC all	15123	592	0	0	0	0
FC>1.1	10773	591	0	0	0	0
FC>1.5	2103	361	0	0	0	0
FC>2.0	337	93	0	0	0	0
FC>3.0	33	11	0	0	0	0

a (上段) 同時性肝転移群 (SH) vs 非転移群 (none) b (下段) 異時性肝転移群 (MH) vs 非転移群 (none) p: p-value, FC: fold change



分解析を施行した(図3). その結果非転移群(none)と、肝転移群(SH+MH)は明確に区別することができた. また、異時性肝転移群(MH)のうちMH2のみ異なった動態を取ったが、残りの異時性肝転移(MH)症例は、非転移群(none)と同時性肝転移群(SH)の間に存在し、さらにstage III aのMH1より、stage IのMH3はより非転移群に近い位置に存在したことより、病期の進んだものほど同時性肝転移群(SH)に近い傾向が認められた.

2. 肺転移群(同時性・異時性)の遺伝子発現プロファイル解析

同時性肺転移群(synchronous pulmonary metastasis: SP)と非転移群(none)間において、differential expression analysisを行った(表3 a). $p < 0.02$ の遺伝子は存在しなかったが、 $p < 0.05$ 且つ $FC > 1.1$ のものは2747遺伝子みられ、同時性肝転移に対するものに比べて8倍以上の遺伝子が認められた. $p < 0.05$ 且つ $FC > 3.0$ に限定しても117遺伝子が

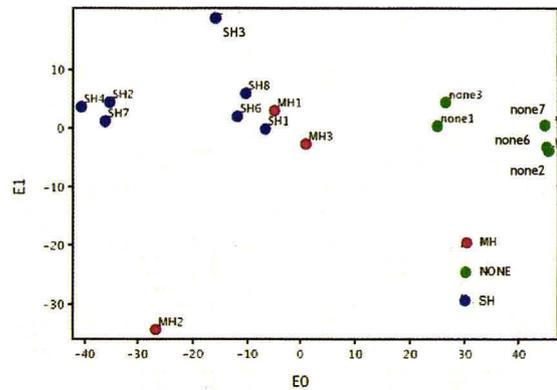


図3 肝転移に対する主成分解析

同時性肝転移群(SH)と非転移群(none)での differential expression analysis(表2 a)において $p < 0.05$ 且つ $FC > 1.1$ の334遺伝子において、非転移群(none)・同時性肝転移群(SH)・異時性肝転移群(MH)の3群間において主成分解析を施行した. 非転移群(none)と、肝転移群(SH+MH)を明確に区別することができ、MH2のみ異なった動態を取ったが、残りの異時性肝転移(MH)症例は、非転移群(none)と、同時性肝転移群(SH)の間に存在した.

図2 肝転移に対する階層的クラスタリング解析

肝転移に対する differential expression analysis(表2 a, 2 b)にて、 $p < 0.05$ かつ $FC > 1.1$ の遺伝子の内、共通する62遺伝子における階層的クラスタリング解析を行った. 肝転移群(SH+MH)と非転移群(none)は明確に区別されたが、異時性肝転移群(MH)は同時性肝転移群(SH)に含まれる形となった.

表3 肺転移群に対する differential expression analysis

	p all	p<0.05	p<0.02	p<0.01	p<0.005	p<0.001
FC all	15123	2749	0	0	0	0
FC>1.1	12048	2747	0	0	0	0
FC>1.5	4431	2131	0	0	0	0
FC>2.0	1196	825	0	0	0	0
FC>3.0	157	117	0	0	0	0

	p all	p<0.05	p<0.02	p<0.01	p<0.005	p<0.001
FC all	15123	0	0	0	0	0
FC>1.1	10858	0	0	0	0	0
FC>1.5	2742	0	0	0	0	0
FC>2.0	772	0	0	0	0	0
FC>3.0	199	0	0	0	0	0

a (上段) 同時性肺転移群 (SP) vs 非転移群 (none) b (下段) 異時性肺転移群 (MP) vs 非転移群 (none) p : p-value, FC : fold change

表4 肝転移群と肺転移群の群間比較に対する differential expression analysis

	p all	p<0.05	p<0.02	p<0.01	p<0.005	p<0.001
FC all	15123	2168	1323	0	0	0
FC>1.1	11679	2167	1323	0	0	0
FC>1.5	3564	1644	1078	0	0	0
FC>2.0	744	515	409	0	0	0
FC>3.0	79	66	58	0	0	0

同時性肝転移群 (SH) vs 同時性肺転移群 (SP) p : p-value, FC : fold change

存在した。

次に、異時性肺転移群 (metachronous pulmonary metastasis : MP) と非転移群 (none) において、differential expression analysis を行った (表 3 b)。p<0.05 を満たす遺伝子は存在せず、異時性肺転移に特徴的な遺伝子群は抽出されななかった。

表 3 において、p<0.05 且つ FC>3.0 であった 117 遺伝子に対して、階層的クラスタリング解析 (average 法) を施行した (図 4)。同時性肺転移群 (SP) と非転移群+異時性肺転移群 (none+MP) を区別することができた。しかし非転移群 (none) と異時性肺転移群 (MP) を区別することはできなかった。

次に前述の 117 遺伝子において、非転移群 (none)、同時性肺転移群 (SP)、及び異時性肺転移群 (MP) の 3 群間において主成分解析を施行した (図 5)。階層的クラスタリング解析結果と同様に、同時性肺転移群 (SP) と非転移群+異時性肺転移群 (none+MP) を区別することができた。非転移群 (none) と異時性肺転移群 (MP) を区別することはできなかったが、異時性肺転移群 (MP) は、非転移群と同時性肝転移群 (SP) の間に存在し、さらに stage III a の MP2 は stage II の MP1 より、同時性肺転移群に近い

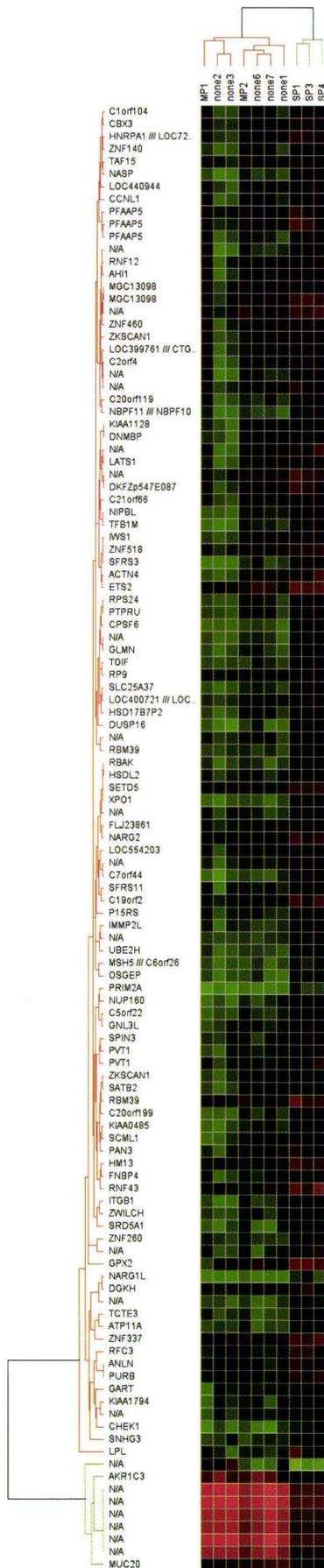
位置に存在したことより、肺転移においても病期の進行したものほど同時性肺転移群に近い傾向が認められた。

3. 肝転移と肺転移の遺伝子発現パターンに関する群間比較

同時性肝転移群 (SH) と同時性肺転移群 (SP) との間で、differential expression analysis を行った (表 4)。p<0.01 の遺伝子は認めなかったものの、p<0.02 且つ FC>3.0 という有意水準・発現変動倍率共に高いものだけで 58 遺伝子存在した。また、p<0.05 且つ FC>1.1 のものでは 2167 遺伝子が該当した。

表 4 における p<0.02 且つ FC>3.0 の 58 遺伝子に対して、階層的クラスタリング解析 (average 法) を施行した (図 6)。次に、同じ 58 遺伝子において、主成分解析を施行した (図 7)。

その結果、階層的クラスタリング解析と、主成分解析の双方において同時性肝転移群 (SH) と、同時性肺転移群 (SP) とが明確に区別することができ、肝転移と肺転移が異なる遺伝子発現パターンを呈する集団であることが示唆された。



考 察

大腸癌の原発巣と転移巣では遺伝子発現に差異があると報告もある一方¹⁰, 肝転移を有する原発巣は、肝転移を伴わない原発巣よりも肝転移巣の発現プロファイルに近いとする報告¹¹もある。しかし、原発巣の遺伝子発現プロファイルを基にするものでなければ、異時性遠隔転移の予測はできないため、本研究では原発巣のみを対象とした。

また、いわゆる右側結腸(盲腸・上行結腸・横行結腸・下行結腸)癌と比べて、左側結腸(S状結腸・直腸)癌では、遺伝子発現プロファイルが異なるとする報告もある¹²ことから、本研究では遺伝子学的背景をそろえる意味で、大腸癌の中でもS状結腸癌と直腸癌のみを対象とした。

我々の施設では、以前より大腸癌異時性遠隔転移予測のための研究を行っているが⁹, 今回の研究にお

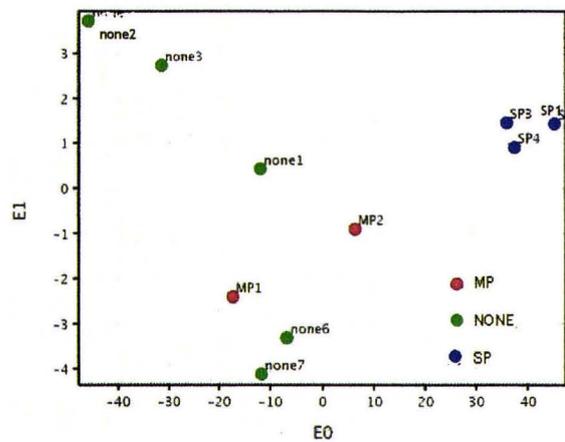
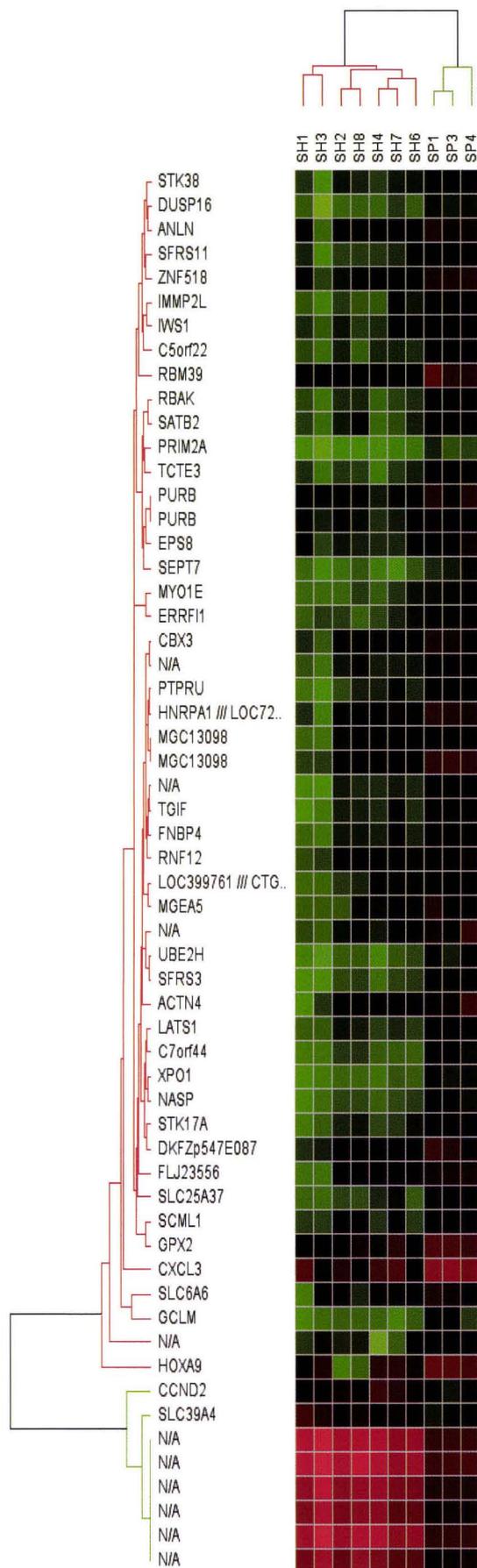


図5 肺転移に対する主成分解析

同時性肺転移群 (SP) と非転移群 (none) における differential expression analysis (表3) にて、 $p < 0.05$ 且つ $FC > 3.0$ の 117 遺伝子に対して、非転移群 (none)・同時性肺転移群 (SP)・異時性肺転移群 (MP) の 3 群間において、主成分解析を施行した。肺転移群 (SP+MP) と非転移群 (none) を明確に区別することができた。また、異時性肺転移群 (MP) は、非転移群と同時性肝転移群 (SP) の間に存在した。

図4 肺転移に対する階層的クラスタリング解析

同時性肺転移群 (SP)・非転移群 (none) 間における differential expression analysis (表3) において、 $p < 0.05$ 且つ $FC > 3.0$ の 117 遺伝子に対して、階層的クラスタリング解析 (average 法) を施行した。同時性肺転移群 (SP) と非転移群+異時性肺転移群 (none+MP) を明確に区別することができたが、異時性転移群 (MP) は非転移群 (none) に含まれる形となった。



いて、以下の3点を改良した。

S状結腸癌・直腸癌の手術において、下腸間膜動脈の血塞・切離以降、腫瘍への血流が遮断されるため、RNAのクオリティーは刻一刻と劣化する。よって、一つ目の改良点として、手術標本から抽出される total RNA のクオリティーを高めるために、標本摘出直後に検体を処理するように注意した。また、検体採取用のマイクロチューブは予め液体窒素にて冷却しておき、検体を瞬間的に凍結できるように工夫した。その結果、以前の研究と比較して、クオリティーの高い RNA を抽出することができ(図1)、RNA Integrity Number (RIN) が5.0以上のサンプルのみを解析の対象とした。

2番目の改良点として、cDNAの増幅に、WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NuGEN Technologies, USA)を用いた。このキットを用いることで、より少量の total RNA からの正確な増幅が期待でき、また通常の T7 ベースの RNA 増幅と比べて手順が煩雑でなく、また cDNA ベースの PCR ではなく、SPIA™ Amplification を行うこ

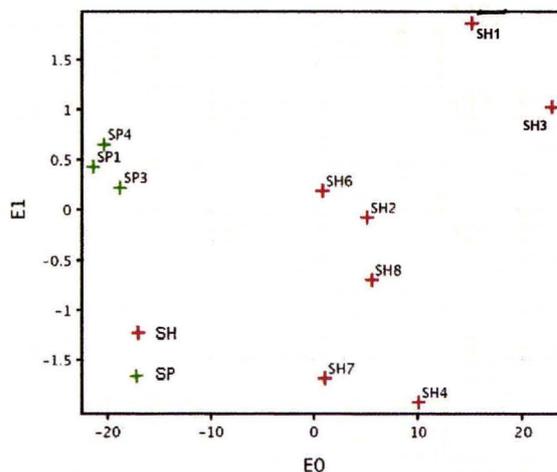


図7 肝転移と肺転移との主成分解析
同時性肝転移群 (SH) と同時性肺転移群 (SP) との間で、differential expression analysis (表4) を行い、 $p < 0.02$ 且つ $FC > 3.0$ の58遺伝子に対して、主成分解析を施行したところ、同時性肝転移群 (SH) と、同時性肺転移群 (SP) とが明確に区別することができた。

図6 肝転移と肺転移との間の階層的クラスタリング解析
同時性肝転移群 (SH) と同時性肺転移群 (SP) との間で、differential expression analysis (表4) を行い、 $p < 0.02$ 且つ $FC > 3.0$ の58遺伝子に対して、階層的クラスタリング解析 (average 法) を施行したところ、同時性肝転移群 (SH) と同時性肺転移群 (SP) を明確に区別することができた。

とでより増幅のバイアスが少ない cDNA が得られるとされている¹³。

3番目にこれまでの研究では、安価なアレイフィルターを開発してそれらを使用していたが、作製されたアレイフィルター間のロット間の製品誤差が大きく、再現性に乏しいことが欠点であった。そのため、今回は最も再現性に優れているとされる Affymetrix 社製の GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いることとした^{14,15}。GeneChip® は、他のマイクロアレイプラットフォームと比較して、チップ間の品質の安定性には定評があり、再現性及び定量性が高いという特長がある。しかし、高価であり、プローブのカスタマイズが難しい等の欠点がある。

肝転移に対する differential expression analysis の結果において、同時性肝転移群 (SH)・非転移群 (none) 間 (表 2 a) と異時性肝転移群 (MH)・非転移群 (none) 間 (表 2 b) を比較すると、前者でのみ $p < 0.02$ の遺伝子が存在した。また、 $p < 0.005$ 且つ $2.0 < FC < 3.0$ という有意水準・発現変動倍率共に非常に高いものも前者でのみ 2 遺伝子 (MT1F, FAM107B) 存在した。これら二つの遺伝子でコードされるタンパクの生物学的役割は解明されておらず、また特異抗体が市販されていないため、现阶段では蛋白レベルでの発現を確認することができない。また、大腸癌の発生・転移に関して、これらの遺伝子の役割は未だ明らかにはなっていない。

これらの結果より、異時性肝転移は同時性肝転移と比較して、より遺伝子変異の蓄積が少ないことが示唆される。異時性遠隔転移は、原発巣が切除された後に発現することから、手術時点で既に形成されていた微小転移が緩徐に増大したものと考えられる。即ち、異時性肝転移は同時性肝転移と比較して、悪性度が低いために緩徐に増大すると推測され、遺伝子変異の蓄積がより少ないことはこの悪性度の低さに関与するものと考えている。

また、これらに対する主成分分析の結果 (図 3) に示す通り、異時性肝転移群 (MH) が非転移群 (none) と同時性肝転移群 (SH) との間に存在したことも、前述の説を裏付ける結果であると考えられる。

図 2 の階層的クラスタリング解析及び、図 3 の主成分解析において、MH2 のみが、他 2 つの異時性肝転移症例と異なる動態を示した。MH2 は下部直腸癌に対して腹会陰式直腸切断術 (Miles 手術) を施行された症例であるが、家族性大腸腺腫症が確定診断されており、遺伝子発現プロファイルが他症例と異なっていたと考えられる。しかし、残り 2 例の異時

性肝転移症例は、主成分解析において、MH1 (stage III a) が MH3 (stage I) と比較して、より同時性肝転移群 (SH) に近い位置に存在した。即ち、病期の進行したものがより同時性肝転移群に近い傾向が示され、前述の悪性度の説と合致する結果であり、非常に興味深い。

また肺転移に関しても、differential expression analysis (表 3 a, 3 b) と主成分解析 (図 5) において、肝転移同様の傾向が認められ、前述の説を支持するものであると考えられる。

異時性肝・肺転移を含めた、根治切除術後の原発性大腸癌症例の生命予後予測を目的とした遺伝子発現プロファイル解析の研究結果は、これまでも多数の報告がある。

Tanaka ら² は、根治手術後 5 年以上未再発の 9 例と同時性肝転移を有する 10 例の、原発巣と正常大腸粘膜の遺伝子発現解析を行った結果、肝転移に特徴的な 27 遺伝子を抽出した。このうち、CCND2, CDK8, MDM2 の 3 つの遺伝子が今回の解析結果と合致した。

Bertucci ら³ が肝転移症例に関して抽出した 194 遺伝子のうち、RPL5, Decolin, RPL15, HSPA9B, RPL6 の 5 遺伝子が、また、Arango らが⁴ 遠隔転移による再発症例に関して抽出した 218 遺伝子では、KLF4, BCL11A, PLAUR, TXNL4A, CSNK1E, ARF1, HNRPA1, NOLC1, HSD17B8, ARPP-19, KPNB1, PPID, ATXN7, GNAI3, SFRS3, の 12 遺伝子が我々の結果と合致した。

同様に D'Arrigo ら⁵ 及び Ki ら⁶ が、肝転移予測因子として指摘したそれぞれ 37・46 遺伝子のうち、それぞれ EIF3S8, MTA1 の 2 遺伝子、IGFBP5 の 1 遺伝子が今回の解析結果と合致した。

また、Wang ら⁷ が 3 年以内の再発症例から予測因子として指摘した 23 遺伝子に対して、Barrier ら⁸ は自ら予測因子とした 30 遺伝子と比較検討した結果、後者の精度がより高かったと報告した。これら 30 遺伝子のうち、RPS11, TXN, RPS20, CALR の 4 遺伝子が我々の解析結果と合致した。

本研究での同時性肝転移群 (SH)・非転移群 (none) 間、異時性肝転移群 (MH)・非転移群 (none) 間での differential expression analysis ($p < 0.05$ 且つ $FC > 1.1$) の結果において、これらの文献と合致した遺伝子は合計 32 遺伝子であった。そのうち、同時性肝転移群 (SH)・非転移群 (none) 間では発現に差異がなく、異時性肝転移群 (MH)・非転移群 (none) 間でのみ発現が異なっていたものは、17 遺伝子存在した (表 5)。その中でも特に、 $FC > 2.0$ の 3 遺伝子 (HNRPA1, DCN, IGFBP5) 及び、二つの

文献^{4,8}と発現が合致した CALR の合計 4 遺伝子には、既に種々の悪性腫瘍やその転移との関連が報告されているものもあり、予測因子となり得る可能性が高いと考えられる。これら 17 遺伝子のうち、ARPP-19 を除く 16 遺伝子に関しては既に特異抗体が市販されており、上記の 4 遺伝子に関して、発現確認及び発現量の比較等の更なる検証を今後予定している。

heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRPA1) は表 5 の 17 遺伝子の中で最も発現変動倍率が高かった遺伝子であるが、慢性骨髄性白血病²⁹や、HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy: HAM) に関連するとする報告がみられる³⁰。しかし、大腸癌やその転移に関する報告はなされていない。

インスリン様成長因子結合タンパク 5 (insulin-like growth factor binding protein 5: IGFBP5) の遺伝子発現は乳癌¹⁶⁻¹⁸、肝細胞癌¹⁹、神経芽細胞腫²⁰等での報告がみられるが、特に乳癌ではリンパ節転移を含む予後関連因子としての報告がみられる。Li らの報告¹⁶によると、リンパ節転移陽性かつエストロゲンレセプター陰性乳癌において、IGFBP5 の過発現の乳癌症例は予後不良であるとしている。大腸癌の転移に関する報告はみられないが、p53 に依存した経路を介して細胞老化に関連しているとする報告²¹もあり、予測因子となり得る可能性も高い。

Decorin (DCN) によって指令されるタンパク質は、細胞マトリックスの小型プロテオグリカンで、結合組織の構成因子であるが、様々な腫瘍細胞の成長を抑制するといわれている。大腸癌に関しての報告はみられないが、口腔内の扁平上皮癌²⁶や、慢性リンパ球性白血病²⁷や、膵臓癌²⁸などで報告がみられる。

Calreticulin (CALR) は小胞体の管腔に存在する多機能タンパクであるが、大腸癌組織にて発現量に変化があるとする報告²²や、大腸癌の分化に関わっているとする報告²³がある。転移に関する報告はみられないが、この遺伝子には二つの文献^{4,8}での合致がみられる。また、黒色腫²⁴や、膀胱癌²⁵等の悪性疾患でも報告がみられる。

特定の癌が特定の臓器に転移する傾向は、Paget の提唱した seed and soil theory により理解されている³¹。大腸癌肝転移の転移経路は門脈行性とされているが、肺転移の経路は主に二つに分けられる。一つは、肝転移を介した二次的な肺転移の場合であるが、他方は主に下部直腸癌において、中・下直腸静脈から内腸骨静脈を介し、大循環系に入ることによって起こると旧来より考えられてきた。しかし、実際の臨床では、肺転移のみを有する結腸癌症例もしばしば経験し、今回解析対象とした症例のうち、SP4 は肺転移のみを有する S 状結腸癌症例であった。肺転移単独症例の転移経路は未だ明らかでなく、リンパ行性の可能性も報告されている³²。

表 5 異時性肝転移に特徴的な発現プロファイルのうち、他文献との合致がみられた 17 遺伝子

pvalue	FC	regulation	Gene Symbol	Gene Title	reference
0.025	3.26	down	HNRPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	4
0.025	2.25	up	DCN	decorin	3
0.025	2.13	up	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	6
0.025	1.95	down	NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	4
0.025	1.75	down	HSPA9	heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)	3
0.025	1.74	up	HSD17B8	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8	4
0.025	1.60	down	ARPP-19	cyclic AMP phosphoprotein, 19 kD	4
0.025	1.57	up	CALR	calreticulin	4, 8
0.024	1.53	down	KPNB1	karyopherin (importin) beta 1	4
0.025	1.46	down	PPID	peptidylprolyl isomerase D (cyclophilin D)	4
0.025	1.44	down	ATXN7	ataxin 7	4
0.025	1.43	down	RPL15	ribosomal protein L15	3
0.025	1.40	down	GNAI3	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	4
0.025	1.32	down	RPL6	ribosomal protein L6	3
0.025	1.26	down	TXN	Thioredoxin	8
0.025	1.23	down	MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	2
0.025	1.14	down	RPL35A	ribosomal protein L35a	8

p: p-value, FC: fold change

本研究にて、同時性肝転移群 (SH)・同時性肺転移群 (SP) 間で、differential expression analysis を行った結果は表 4 の如く、 $p < 0.02$ 且つ $FC > 3.0$ と有意水準・発現変動倍率ともに非常に高いものが 58 遺伝子存在していた。またこれら 58 遺伝子のうち、同時性肺転移群 (SP)・非転移群 (none) 間で differential expression analysis を行った結果 ($p < 0.05$ 且つ $FC > 3.0$) と 42 遺伝子が合致した一方、同時性肝転移群 (SH)・非転移群 (none) 間の differential expression analysis 結果 ($p < 0.05$ 且つ $FC > 1.1$) とは 2 遺伝子しか合致せず、残りの 14 遺伝子はどちらとも合致しなかった。肝・肺各転移の differential expression analysis において、 $p < 0.05$ 且つ $FC > 1.1$ の遺伝子は、同時性肺転移群 (SP)・非転移群 (none) 間と同時性肝転移群 (SH)・非転移群 (none) 間では遺伝子数に 8 倍以上の差が認められていたが、ここではさらに 20 倍以上の差が認められた。

さらに、それらの 58 遺伝子を用いた階層的クラスタリング解析 (図 6) 及び主成分解析 (図 7) では、共に同時性肝転移群と、同時性肺転移群を明確に区別することができた。

これらの結果より、大腸癌の肝転移と肺転移の間には、血流を含めた転移経路の相違だけでなく、肺転移のみを起こす大腸癌の遺伝子発現プロファイルは非常に特徴的であり、肝転移のみを有するものと大きく異なることが示唆された。

本研究では、異時性肺転移を選択的に予測する候補遺伝子群は抽出されなかったが、現段階では症例数が 2 例と少ないことに起因すると考えている。しかし、同時性の肺転移と肝転移で遺伝子発現が大きく異なる事実は今後の臨床応用の可能性を秘めている。大腸癌術前検索の胸腹部 CT にて、しばしば肺に腫瘤を認めることがあり、原発性肺癌か転移性肺癌かの診断に苦慮する場合がある。これまでも、遺伝子発現プロファイルからそれらを鑑別するとした報告³³があるが、今回肺転移に特徴的とされた遺伝子発現プロファイルは、今後原発性肺癌の発現パターンと比較することで、診断の一助となる可能性も考えられる。

結 論

大腸癌異時性遠隔転移の予測因子同定を目的として、S 状結腸癌・直腸癌の原発巣組織の遺伝子プロファイル解析を行った。以前の我々の研究と比較して、RNA 抽出、cDNA 増幅、DNA チップ (GeneChip[®]) の使用の 3 点で改善を加えた。その結果、大腸癌の同時性転移群・非転移群間の differential expression analysis では異時性転移群・非転移群間の同解

析と比較して、より有意水準・発現変動倍率共に高い遺伝子がみられ、より遺伝子変異の蓄積が大きいことが示唆された。また、遺伝子発現プロファイルの比較より、異時性肝転移の予測因子となりうる 17 遺伝子を同定した。異時性肺転移を選択的に予測する候補遺伝子は抽出されなかったが、同時性肝転移と同時性肺転移における遺伝子発現プロファイルの比較から、遺伝子学的に異なる発現パターンを示す集団であることが示唆された。また、新たな異時性肺転移症例の集積を待ち、予測因子の同定を試みる必要があると考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の進行にご協力いただきました株式会社メディビック中江裕樹博士、上坂美花博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. 竹政伊知朗, 渡辺 真, 池田正孝, 山本浩文, 関本貢嗣, 西村 紀, 門田守人 (2006) 大腸癌における発現遺伝子・発現タンパク質異常の体系的解析. 最新医学 61: 1799-1804
2. Tanaka O, Kawamura YJ, Konishi F, Sasaki J, Kai T, Miyakura Y, Nagai H, Tsukamoto T (2006) cDNA array analysis for prediction of hepatic metastasis of colorectal carcinoma. Surg Today 36: 608-614
3. Bertucci F, Salas S, Eysterics S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Lloriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero JR, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R (2004) Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. Oncogene 23: 1377-1391
4. Arango D, Laiho P, Kokko A, Alhopuro P, Sammal-korpi H, Salovaara R, Nicorici D, Hautaniemi S, Alazzouzi H, Mecklin JP, Järinen H, Hemminki A, Astola J, Schwartz S, Aaltonen A (2005) Gene-expression profiling predicts recurrence in Duke's C colorectal cancer. Gastroenterology 129: 874-884
5. D'Arrigo A, Belluco C, Ambrosi A, Digito M, Esposito G, Bertola A, Fabris M, Nofrate V, Mammmano E, Leon A, Nitti D, Lise M (2005) Metastatic transcriptional pattern revealed by gene expression profiling in primary colorectal carcinoma. Int J Cancer 115: 256-262
6. Ki DH, Jeung HC, Park CH, Kang SH, Lee GY, Lee WS, Kim NK, Chung HC, Rha SY (2007) Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer. Int J Cancer 121: 2005-2012
7. Wang Y, Jatke T, Zhang Y, Mutch YZ, Talantov D, Jiang J, MeLeod HL, Arkins S (2004) Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Duke's B colon cancer. J Clin Oncol 22: 1564-1571
8. Barrier A, Boelle PY, Roser F, Gregg J, Tse C, Brault D, Lacaine F, Houry S, Huguier M, Franc B, Flahault A,

- Lemoine A, Dudoit S (2006) Stage II colon cancer prognosis prediction by tumor gene expression profiling. *J Clin Oncol* 24: 4685-4691
9. 井上潔彦, 奥野清隆 (2002) cDNA アレイ情報のニューラルネットワーク解析による大腸癌肝転移の予測. *近畿大医誌* 27: 179-190
10. Lin HM, Chatterjee A, Lin YH, Anjomshoa A, Fukuzawa R, McCall JL, Reeve AE (2007) Genome wide expression profiling identifies genes associated with colorectal liver metastasis. *Oncology Reports* 17: 1541-1549
11. 竹政伊知朗, 池田正孝, 山本浩文, 関本貢嗣, 門田守人 (2007) 遺伝子発現プロファイルによる消化器癌転移推測の可能性を探る. *分子消化器病* 4: 35-40
12. Komuro K, Tada M, Tamoto E, Kawakami A, Matsumaga A, Teramoto K, Shindoh G, Takada M, Murakawa K, Kanai M, Kobayashi N, Fujiwara Y, Nishimura N, Hamada J, Ishizu A, Ikeda H, Kondo S, Katoh H, Moriuchi T, Yoshiki T (2005) Right- and left-sided colorectal cancers display distinct expression profiles and the anatomical stratification allows a high accuracy prediction of lymph node metastasis. *J Surg Res* 124: 216-224
13. Watson JD, Wang S, Von Stetina SE, Spencer WC, Levy S, Dexheimer PJ, Kurn N, Heath JD, Miller DM (2008) Complementary RNA amplification methods enhance microarray identification of transcripts expressed in the *C. elegans* nervous system. *BMC Genomics* 9: 84-96
14. 高橋泰夫, 永田俊人, 中山智祥, 石井敬基, 石川絢一, 浅井 聡 (2002) バイオインフォマティクスからみた Gene-ChipTM システム. *日薬理誌* 120: 73-84
15. Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingeras TR, Lockhart DJ (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21: 20-24
16. Li X, Cao X, Zhang W, Feng Y (2007) Expression level of insulin-like growth factor binding protein 5 mRNA is a prognostic factor breast cancer. *Cancer Sci* 98: 1592-1596
17. Butt AJ, Dickson KA, McDougall F, Baxter R (2003) Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 278: 29676-29685
18. Garner CP, Ding YC, John EM, Ingles SA, Olopade OI, Huo D, Adebemowo C, Ogundiran T, Nauhausen SL (2008) Genetic variation in IGFBP2 and IGFBP5 is associated with breast cancer in populations of African descent. *Hum Genet* 123: 247-255
19. Umemura A, Itoh Y, Itho K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanoue T, Fujita J (2008) Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47: 493-502
20. Tanno B, Cesi V, Vitali R, Sesti F, Giuffrida ML, Mancini C, Calabretta B, Raschelia G (2005) Silencing of endogenous IGFBP-5 by micro RNA interference affects proliferation, apoptosis and differentiation of neuroblastoma cells. *Cell Death Differ* 12: 213-223
21. Kim KS, Seu YB, Baek SH, Kim MJ, Kim KJ, Kim JH, Kim JR (2007) Induction of cellular senescence by insulin-like growth factor binding protein-5 through a p53-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 18: 4543-4552
22. Brunagel G, Shar U, Schoen RE, Getzenberg RH (2003) Identification of calreticulin as a nuclear matrix protein associated with human colon cancer. *J Cell Biochem* 89: 238-243
23. Toquet C, Jarry A, Bou-hanna C, Bach K, Denis MG, Mosnier JF, Laboisie CL (2007) Altered calreticulin expression in human colon cancer: maintenance of calreticulin expression is associated with mucinous differentiation. *Oncology Reports* 17: 1101-1107
24. Dissemond J, Busch M, Kothen T, Mors J, Weimann TK, Lindeke A, Goos M, Wagner SN (2004) Differential downregulation of endoplasmic reticulum-residing chaperonas calnexin and calreticulin in human metastatic melanoma. *Cancer Lett* 203: 225-231
25. Iwaki H, Kageyama S, Isono T, Wakabayashi Y, Okada Y, Yoshimura K, Terai A, Arai Y, Iwamura H, Kwakita M, Yoshiki T (2004) Diagnostic potential in bladder cancer of a panel of tumor markers (calreticulin, γ -synuclein, and catechol-O-methyltransferase) identified by proteomic analysis. *Cancer Sci* 95: 955-961
26. Banerjee AG, Bhattacharyya I, Lydiatt WM, Vishwanatha JK (2003) Aberrant expression and localization of decorin in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63: 7769-7776
27. Campo S, Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Musolino C, Calabro L, Bellomo G, Quartarone E, Calatroni A (2006) Lymphocytes from patients with early stage of B-cell chronic lymphocytic leukemia and long survival synthesize decorin. *Biochimie* 88: 1933-1939
28. Köninger J, Giese T, Mola FF, Wente MN, Esposito I, Bachem MG, Giese NA, Buchler MW, Friess H (2004) Pancreatic tumor cells influence the composition of the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 943-949
29. Iervolino A, Santilli G, Trotta R, Guerzoni C, Cesi V, Bergamaschi A, Gambacorti-Passerini C, Calabretta B, Perrotti D (2002) hnRNP A1 nucleocytoplasmic shuttling activity is required for normal myelopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis. *Mol Cell Biol* 22: 2255-2266
30. Lee SM, Dunnavant FD, Jang H, Zunt J, Levin MC (2006) Autoantibodies that recognize functional domains of hnRNP A1 implicate molecular mimicry in the pathogenesis of neurological disease. *Neurosci Lett* 401: 188-193
31. Paget S (1889) The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet* 1: 571-573
32. 池 秀之, 山口茂樹, 市川靖史, 増成秀樹, 渡会伸治, 嶋

- 田 紘 (2002) 大腸癌肺転移への経路についての検討. 癌の臨床 48 : 405-408
33. Ikeda S, Fujimori M, Shibata S, Okajima M, Ishizaki Y, Kurihara T, Miyata Y, Iseki M, Shimizu Y, Tokumoto N, Ozaki S, Asahara T (2006) Combined immunohistochemistry of β -catenin, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 is useful in discriminating primary lung adenocarcinomas from metastatic colorectal cancer. BMC Cancer 6 : 31