

実用的な cDNA アレイフィルターを用いた胃癌細胞株における遺伝子発現解析

北野 義徳 奥野 清隆

近畿大学医学部第1外科学教室

抄 録

細胞の性質は複雑なネットワークを介した多数の遺伝子によって規定されており、これら多数の遺伝子変化により癌の生物学的特性が生み出されていると考えられている。近年、多数の遺伝子変化を同時に捉え、総合的に解析するアプローチとして cDNA マイクロアレイが導入され、遺伝子発現解析が飛躍的に進展しつつある。われわれは、約170種の癌関連遺伝子を搭載した cDNA アレイを試作し、包括的な遺伝子発現解析から胃癌の生物学的特性の評価を試みた。細胞学的特性の明らかなヒト胃癌細胞株6種を用いて遺伝子発現パターンを解析した結果、Laurén分類における diffuse type の細胞株、intestinal type の細胞株、肝転移巣由来の細胞株のそれぞれにおいて特徴的に高発現を示す遺伝子群が抽出された。個々の結果は、従来の northern blot 法や RT-PCR 法による検討と合致しており、本法を用いた遺伝子発現解析の妥当性が確認できた。本結果から、特徴的な遺伝子発現プロファイルとして胃癌の生物学的特性を分類できる可能性が示唆され、また一連の遺伝子群における発現パターンから情報伝達経路を推定できる可能性が示唆された。本法は多数のエビデンスから総合的な解析を簡便に行えることから、実用的な手法と考えられた。データベースの集積により、疾患分類・診断手段・予後予測・治療法の選択など臨床応用が期待される。

Key words: cDNA アレイ, 遺伝子発現パターン, 胃癌細胞株, diffuse type, intestinal type

緒 言

胃癌の罹患率および死亡率は低下傾向を示しているものの、いまだ日本人において最も主要な座を占める疾患であることに変わりはない。胃癌根治術後の5年生存率をみると、stage Ia では95.6%と良好であるが、病期が進行するに従って5年生存率は低下し、stage IVでは7.6%と不良である¹。しかしながら極めて進行した段階でも長期生存する症例もあれば、早期の段階で治療されながらも再発する症例もしばしば経験されることがある。すなわち、これは臨床病理学因子だけによる癌の評価には限界があることを意味しており、胃癌の生物学的特性を規定するさらなる因子の同定が求められる。

近年の分子生物学の進歩により、癌はさまざまな癌遺伝子や癌抑制遺伝子などの遺伝子異常の蓄積により形成されていることが明らかになり、特に大腸癌では Vogelstein ら² の多段階発癌モデルが広く

認知されている。胃癌においても従来より個々の遺伝子を対象とした数多くの研究がなされ、癌の評価にさまざまな遺伝子異常の関与が示されてきた³⁻⁵。しかしながら胃癌の発生・進展のメカニズムはいまだ十分に明らかにされていない。

従来、遺伝子発現の解析法として northern blot 法やリボ核酸分解酵素 (ribonuclease: RNase) プロテクションアッセイ、逆転写 PCR (reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR) 法などで個々の遺伝子発現が評価されてきた。しかしこれらの手法で一度に解析できる遺伝子数には限界があり、多数の遺伝子が複雑なネットワークを形成しながら、細胞の性質を規定していることが明らかになりつつある今、これらの手法で癌の性質を正確に予測することは困難である。

これに対し、多数の遺伝子発現を同時に解析できる手法として近年脚光を浴びてきたのが cDNA アレイである⁶。この手法は、従来の northern blot 法

と同様、相補的な核酸同士のハイブリダイゼーションに基づく検出法であることには変わりはない。しかしながら個々の遺伝子断片(cDNA)を基板上に固定し、プローブとしてmRNAを用いるという点が、northern blot法とはいわば逆転の発想にあり、一度の実験でその遺伝子断片すべてについての発現情報を得ることができるというものである。近年、アレイ作製の技術はさらに躍進をとげ、スタンフォード大学方式のcDNAマイクロアレイ^{7,8}が発表されて以来、現時点では数千から数万もの遺伝子の検索が可能となっている。

cDNAマイクロアレイの導入により、遺伝子発現解析は飛躍的に進んだが、システムそのものに大変費用がかかる問題、得られる膨大なデータの共有を含めた処理、系統的解析の問題、さらに系自体の問題点として検出感度、定量性、再現性の問題もあり、残された課題も少なくはない。

そこでわれわれは機能の判明している遺伝子のうち、臨床医の立場から検索したい癌関連遺伝子を約170種選択し、cDNAアレイを試作した。本研究は、われわれの作製したcDNAアレイの妥当性を検討し、包括的な遺伝子発現解析から胃癌細胞株における生物学的特性の評価を試みたものである。

方 法

対象

ヒト胃癌組織由来の培養細胞株、MKN-7、MKN-28、MKN-45、MKN-74、GT3TKB(理化学研究所、筑波)、KATO-III(免疫生物研究所、藤岡)を用いた。各種胃癌細胞株の特徴を表1に示した。

培養方法

各細胞株の培養は、37°C、5% CO₂条件下でculture flask(旭テクノグラス社、船橋)を用いてcomplete medium (CM)にて行った。CMは10%牛胎児血清(FCS, HyClone社、Logan, UT, USA)

添加RPMI1640(日研生物医学研究所、京都)100 mlに対し200 mM L-glutamine液(ICN Biomedicals社、Aurora, OH, USA) 1 ml, 100 mM sodium pyruvate液(Life Technologies社、Rockville, MD, USA) 1 ml, 5×10⁻² M 2-mercaptoethanol (2ME, 和光純薬、大阪)0.1 ml, 5000 IU/ml penicillin/streptomycin混合液(ICN Biomedicals社、Aurora, OH, USA) 1 ml, 1M HEPES (ICN Biomedicals社、Aurora, OH, USA) 0.5 mlを調合して作製した。いずれの細胞株も実験に供する前に、trypan blue染色法にて生細胞率が95%以上であることを確認した。

RNA抽出とpolyA RNA精製

1×10⁷個の培養細胞に対し、acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method (AGPC法)すなわちISOGEN(和光純薬、大阪)を1 mlに加え、フェノール/クロロホルム抽出を行ったのち、イソプロパノール沈殿を行いtotal RNAを抽出した。total RNAにDNaseI処理を加えたのち、oligo(dT)固定化磁性粒子、磁性スタンドを使用したmRNA抽出キット(MagExtractor-mRNA-, TOYOBO, 敦賀)を用いて精製工程を2回繰り返す操作を行い、polyA RNAを精製した。精製液の一部から20倍希釈液を作製し、分光光度計(DUシリーズ500, ベックマン、東京)にてOD260およびOD260/280を測定した。OD260の測定値からmRNA精製液の総精製量を次式により算出した。

mRNA濃度 (ng/μl) = 測定値 × 45 × 20

mRNA総量 (ng) = mRNA濃度 (ng/μl) × 25 (μl)

なお、OD260/280は2.0以上のものを選定した。

標識cDNAの調整

mRNAを鋳型として、anchor primerを付加したoligo(dT) primer、逆転写酵素(ReverTra Ace, TOYOBO, 敦賀)を用いて逆転写反応を行い、first strand cDNAを合成した。次にdCTP, terminal

表1 各種胃癌細胞株の特徴

Cell lines	Characteristics	Lauren's classification	Tissue of origin
MKN-7	Well differentiated tubular adenocarcinoma c-erbB-2 expressing	Intestinal type	Lymph node metastasis
MKN-28	Moderately differentiated tubular adenocarcinoma	Intestinal type	Lymph node metastasis
MKN-74	Moderately differentiated tubular adenocarcinoma	Intestinal type	Liver metastasis
MKN-45	Poorly differentiated adenocarcinoma high level of CEA-producing	Diffuse type	Liver metastasis
GT3TKB	Adenocarcinoma mucocellulare scirrhosum	Diffuse type	Ascites
KATO-III	Signet-ring carcinoma	Diffuse type	Pleural effusion

deoxynucleotidyl transferase (TdT) を加えて polyC tailing を行ったのち, anchor primer を付加した oligo (dG) primer, DNA polymerase (KOD Dash, TOYOBO, 敦賀) を用いて second strand cDNA を合成した. この際 biotin-16-deoxyuridine triphosphate (biotin-dUTP, Roche Diagnostics, 東京) を加え, 標識 cDNA を調整しておき, polymerase chain reaction (PCR) により増幅させた. PCR には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) を用い, 98°C20秒, 55°C10秒, 74°C 6分を25サイクル行った. PCR 後, エタノール沈殿により PCR 反応液から未反応の dNTP を除去した.

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションを行う基板として, 正電荷ナイロンメンブレンを固定化担体としたアレイフィルター (Gene Navigator[®] cDNA array filter, TOYOBO, 敦賀) を用いた. このフィルターには表2に示した165種の癌関連遺伝子, 10種の house-keeping gene (positive control), 2種の nonmammalian gene (negative control) より精製された cDNA (300~700 bp) が10 ng ずつスポットされており, 同一スポットは duplicate に配置されている (図1). ハイブリダイゼーション緩衝液は PerfectHyb[®] (TOYOBO, 敦賀) を用い, 68°Cで30分間フィル

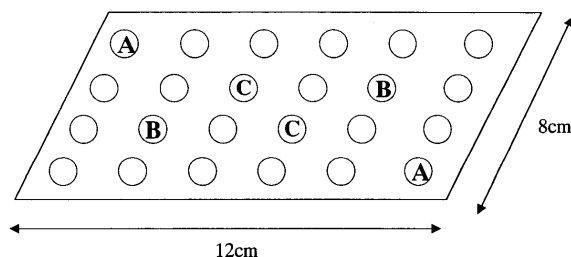


図1 Gene Navigator[®] cDNA Array Filter
12×8 cm 大のアレイフィルター上に, 356個の cDNA (丸印) がスポットされている. また同一の cDNA が duplicate に配置 (A, B, C) されており, 近接位置による相互干渉やフィルターの局所汚染などのアーチファクトの影響を最小限に抑え, 再現性を確認するのに有用な設計となっている.

ターのプレハイブリダイゼーションを行った. 100°Cで5分間の加熱および氷上3分間の冷却にてビオチン標識 cDNA を変性させたのち, 上記緩衝液中に混合し, 68°Cで16時間, フィルターとハイブリダイゼーションさせた. ハイブリダイゼーション後, wash buffer I (2×SSC, 0.1% SDS) にて68°Cで10分間の洗浄を3回行い, 続いて wash buffer II (0.1×SSC, 0.1% SDS) にて同様に洗浄を3回行った.

シグナルの検出および画像化

フィルター上のシグナルの検出は,

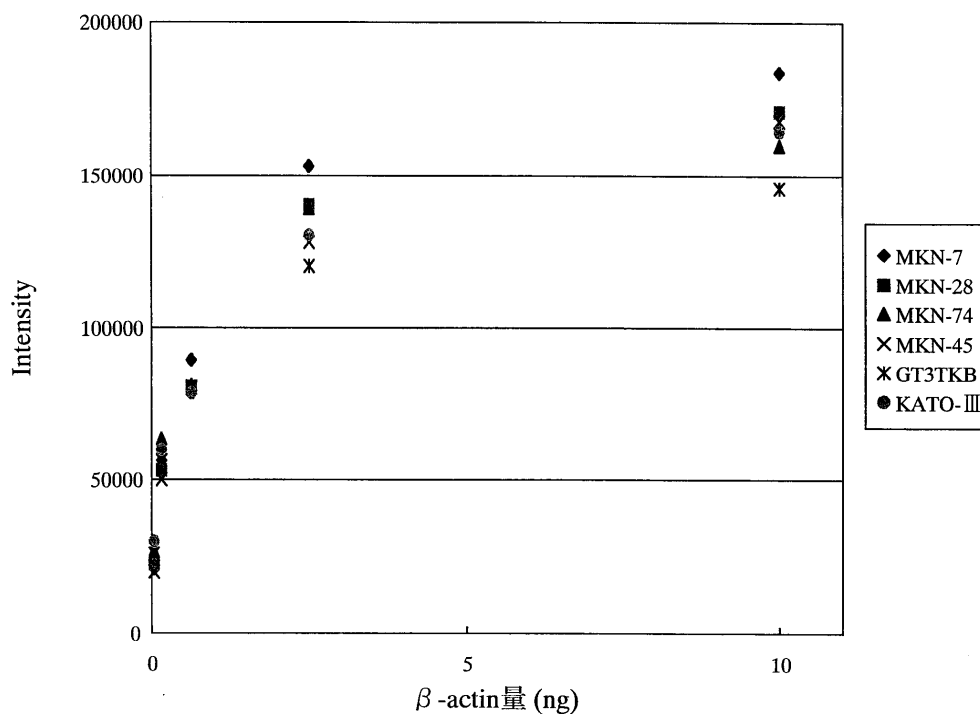


図2 β -actin 量と発現強度の相関性
 β -actin 量が2.5 ng のとき Intensity とほぼ直線性の相関が得られている.

chemiluminescence を利用した Imaging high-Chemilumi-Gene Navigator® (TOYOBO, 敦賀) を用いて行った。すなわち標的 biotin に streptavidin を結合させ、これを介して biotinylated alkaline phosphatase を結合させたものに、化学発光基質 (CDP-Star®, Roche Diagnostics, 東京) を加え、alkaline phosphatase の活性を指標に biotin を検出した。標的 biotin は、CCD カメラ型のイメージアナライザー (Flour-S MultiImager, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) に30分間露光したのち画像化された。

データ解析

画像化されたフィルター上のシグナルは、解析ソフトウェア (ImaGene® version 3.0, BioDiscovery, Inc., Los Angeles, CA, USA) を用いて数値化した。さらに各スポットのシグナル強度は、各細胞において発現量が一定と考えられる housekeeping gene のシグナル強度にて標準化した。すなわち β -actin 量とシグナル強度の相関性 (図2) より、 β -

actin 量が2.5 ng のときに示すシグナル強度を100としてデータの標準化を行い、得られた相対値から E-Gene Navigator Analysis® (GeneticLab, 札幌) により、各細胞株間の遺伝子発現強度を比較検討した。

再現性と結果表示

同一細胞株につき、少なくとも3回のDNAアレイ解析を行い、遺伝子発現パターンの再現性を確認した。ただしそれらの数値化は、各実験間の housekeeping gene に対する相対値として表示されるため、同一細胞株における平均値±標準偏差 (mean±SD) を表示することは適切でないと判断し、結果はそのうち同一対照で算出された代表的な1例を表示した。

成 績

胃癌細胞株におけるDNAアレイパターン

各細胞株より抽出した mRNA からビオチン標識 cDNA を作製し、アレイフィルター上の癌関連遺伝

表2 cDNA Array Filter (first version) に搭載された遺伝子リスト

Function	Gene Name
Tumor suppressor genes/Apoptosis	P53, p63 α , RAD51, RAD54, MDM2, DCC, Rb p107, Rb p110, Rb p130, Fas (Apo-1), GADD45, Fas ligand, TRAIL (Apo-2L), TOSO, Daxx, CAS, FADD (MORT1), TRADD, RAIDD, SIVA, RIP, RICK, FLIP, Bax, Bak, Bad, BID, Bim, Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, Mcl-1, Caspase-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, Mash 1, HIC1, MLH1, MSH2, PMS1, PMS2, NF2, VHL, ZO-1, ZO-2, Elongin A, BRCA1, BRCA2, APC
Cell cycle proteins	Cdk4, Cdk6, cyclinA, cyclinB1, cyclinD1, cyclinE, cyclinG1, Cde25A, MCM5, PCNA, Ki-67, p21 (WAF1, Cip1), p27 (Kip1), p57 (Kip2), p15Inkdb (MTP2), p16Ink4a (MTS1)
Regulatory transcription factors	c-fos, c-jun, Egr-1, STAT1, 2, 3, Smad1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, E2F1, E2F2, DP1
Growth factor/Cytokines	VEGF, PDGF α , PDGF β , TGF- α , TGF- β , IGF-II, IL-1 α , IFN- α , IP10, TARC, MIP-3 α (LARC), MIP-3 β (ELC), Mig, SLC, EGF, BLC (BCA-1), DC-CK1 (PARC, MIP-i), MDC (STCP-1)
Membrane receptors	EGFR (c-erbB2), FGFR-2 (K-sam), HER2 (ErbB-2, neu), Met, Notch1, Notch3, TGF β R II
Protein kinases	Pim-1, Pim-2, Lck, c-mos
GDP/GTP binding proteins	K-ras
Signaling intermediates	Cox-1, Cox-2, HES1, MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -15, nm23, PAI-1, PAI-2, TIMP-1, TIMP-3, UPA, UPAR, FNK (CNK, PRK), MDR1, MRP-1 (CD9), TRT (h-EST1, TERT)
Metabolic enzymes	Metallotionein, α -hexosaminase (Hexa), β -D glucuronidase
Cell adhesion proteins	ICAM-1, E-cadherin, α -catenin, β -catenin, CD44 (HCAM)
Tumor-associated antigens	MAGE-1, CEA, MUC-1
HLA antigens	HLA-A, HLA-DR (β 1), HLA-DQ
Drug resistance	Cytochrome P450 17, Cytochrome P450 3A, NAT-2
Other	GM2 activator protein, Procoagulant
Housekeeping genes	G3PDH, ALAS1, β -actin, α -tubulin, PxF protein, Ubiquitin, endonuclease G, Ribosomal protein S9, Ribosomal protein L13, Elongation factor 1- α
Non-mammalian genes	Luciferase, pUC plasmid

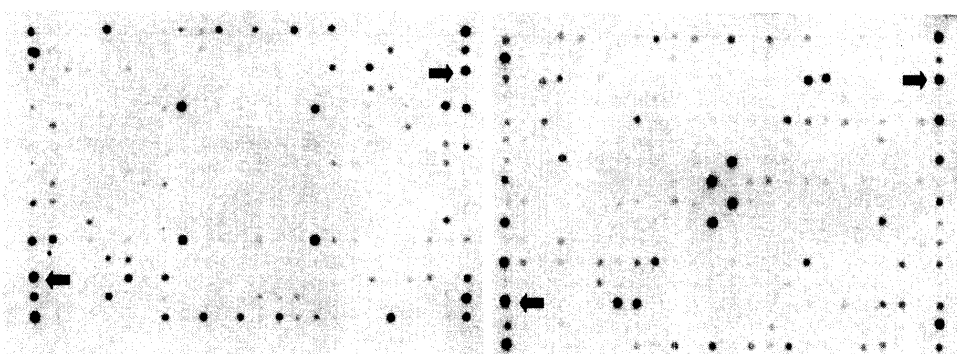


図3 胃癌細胞株におけるDNAアレイパターン
(A)はGT3TKB, (B)はMKN-74のアレイパターンを示す。矢印は2.5 ngの β -actin量が示すシグナルを表している。

表3 細胞周期関連遺伝子群の変動

Genes	GT3TKB	MKN-7	MKN-28	MKN-74	MKN-45	KATO-III
P53	1.0 ↓*	15.8	24.8	11.8	19.8	9.1
P21	1.1 ↓	8.4	8.3	9.0	29.0	8.1
cdk4	333.6 ↑**	53.2	44.3	137.8	117.2	8.3
E2F1	19.2 ↑	4.1	2.3	6.0	2.5	1.1
E2F2	26.2 ↑	3.1	3.1	3.1	5.7	1.2
cyclinE	58.6 ↑	3.6	6.3	4.1	8.8	9.6

*発現低下

**発現上昇

子断片とハイブリダイゼーションを行ったのち、イメージアナライザーにて画像化した。同一遺伝子断片をduplicateに配置したおのおののアレイパターンから再現性を確認できた実験結果のみを以下の解析に供した。6種のヒト胃癌細胞株における、165種の癌関連遺伝子の遺伝子発現解析を行った結果、細胞株間では明らかに異なったアレイパターンを示し(図3)、遺伝子発現パターンの相違が推測された。スキルス胃癌株における細胞周期関連遺伝子群の変動

スキルス胃癌は、胃癌のなかで最も生物学的悪性度が高いことで知られているが、スキルス胃癌株であるGT3TKBを用いて細胞周期を制御している遺伝子群の遺伝子発現パターンを検討した。その結果、GT3TKBでは、他の細胞株に比べてCDKインヒビターであるp53の発現の低下およびその下流遺伝子であるp21の発現低下を認めた。さらにサイクリン依存性キナーゼであるcdk4の高発現、転写因子であるE2F1, E2F2の高発現が認められた。またG1サイクリンではサイクリンEの高発現が認められた(表3)。これら一連の細胞周期制御因子の異常は、スキルス胃癌における生物学的悪性度をよく反映しており、本法の妥当性を支持する結果と考えられた。細胞学的特徴と遺伝子発現パターンの関連

各細胞株間で有意な変動を認めたもので、かつ相対的に高発現を示した遺伝子に着目すると、Lauren分類におけるdiffuse typeの細胞株で高発現を示す群、intestinal typeの細胞株で高発現を示す群、さらに肝転移巣由来の細胞株で高発現を示す群の大きく3つの群に分類された(表4~6)。

diffuse typeの胃癌細胞株で高発現を示した遺伝子群

K-samはbFGF(basic fibroblast growth factor) receptor類似の遺伝子としてKATO-IIIではじめてクローニングされた遺伝子であるが、確かにKATO-IIIをはじめとするdiffuse typeの細胞株で高発現を認めており、c-metも同様にdiffuse typeの細胞株で高発現を示した。またKi-67, c-junはGT3TKBおよびMKN-45にのみ高発現を認めた。またCEA高産生株として知られているMKN-45ではCEAが高発現を示し、さらにMUC-1, β -D-glucuronidaseの特異的な高発現が認められた。スキルス胃癌株であるGT3TKBではcyclinE, PAI-1が特異的に高発現を示した(表4)。

intestinal typeの胃癌細胞株で高発現を示した遺伝子群

intestinal typeの細胞株ではIL-1 α やIGF-IIなど、サイトカインや増殖因子の発現増強が特徴的に

表4 遺伝子発現プロファイル(1) Diffuse type の胃癌細胞株で高発現を示した遺伝子群

Function	Genes	MKN-7	MKN-28	MKN-74	Diffuse type		
					MKN-45	GT3TKB	KATO-III
Membrane receptors	K-sam	2.2	1.8	3.0	19.1	21.6	55.6
	c-met	2.3	2.2	3.0	22.5	21.4	17.9
Cell cycle proteins	Ki-67	13.3	13.7	11.1	55.4	94.8	9.9
	cyclin E	3.6	6.3	4.1	8.8	58.6	9.6
Regulatory Transcription factors	c-jun	14.4	9.4	17.8	53.8	49.5	3.0
	c-fos	3.2	3.9	4.5	48.3	1.1	4.9
Tumor associated antigens	CEA	15.5	2.6	4.1	65.1	0.7	12.1
	MUC-1	2.9	15.0	72.7	322.1	2.4	20.5
Signaling intermediates	PAI-1	5.6	1.3	2.7	8.2	48.0	0.7
Metabolic enzymes	β -D-glucuronidase	0.0	61.3	34.3	440.5	41.1	4.8

表5 遺伝子発現プロファイル(2) Intestinal type の胃癌細胞株で高発現を示した遺伝子群

Function	Genes	Intestinal type					
		MKN-7	MKN-28	MKN-74	MKN-45	GT3TKB	KATO-III
Membrane receptors	c-erbB2	15.7	1.1	2.8	2.2	0.0	0.0
Cell cycle proteins	PCNA	39.9	8.6	27.0	4.3	0.4	6.4
	cyclin B1	52.1	3.8	5.7	4.0	3.2	8.8
Growth factor/ Cytokines	IGF-II	8.4	100.1	644.4	15.1	1.0	2.4
	IL-1 α	59.3	101.7	687.5	4.1	0.9	1.5
Signaling intermediates	TIMP-1	166.8	9.9	19.1	34.4	65.2	50.0
apoptosis	caspase-2	52.5	3.5	6.1	8.5	9.5	3.0
	caspase-8	48.5	0.7	0.2	1.1	0.0	0.8
	SIVA	157.0	32.5	22.0	33.6	32.9	18.2

表6 遺伝子発現プロファイル(3) 肝転移巣由来の胃癌細胞株で高発現を示した遺伝子群

Function	Genes	MKN-7	MKN-28	Liver Metastasis		GT3TKB	KATO-III
				MKN-74	MKN-45		
Membrane receptors	Notch1	10.4	25.3	64.4	67.6	16.2	1.3
Growth factor/ cytokines	VEGF	1.5	9.1	101.3	111.8	6.9	5.5
Signaling intermediates	MMP-9	5.4	2.6	54.9	42.3	1.6	0.0
apoptosis	bax	10.7	26.3	100.9	180.2	43.2	3.7
	bcl-2	7.5	23.0	100.4	116.4	23.5	3.0
	bcl-x	0.0	29.1	61.1	61.4	13.6	6.2

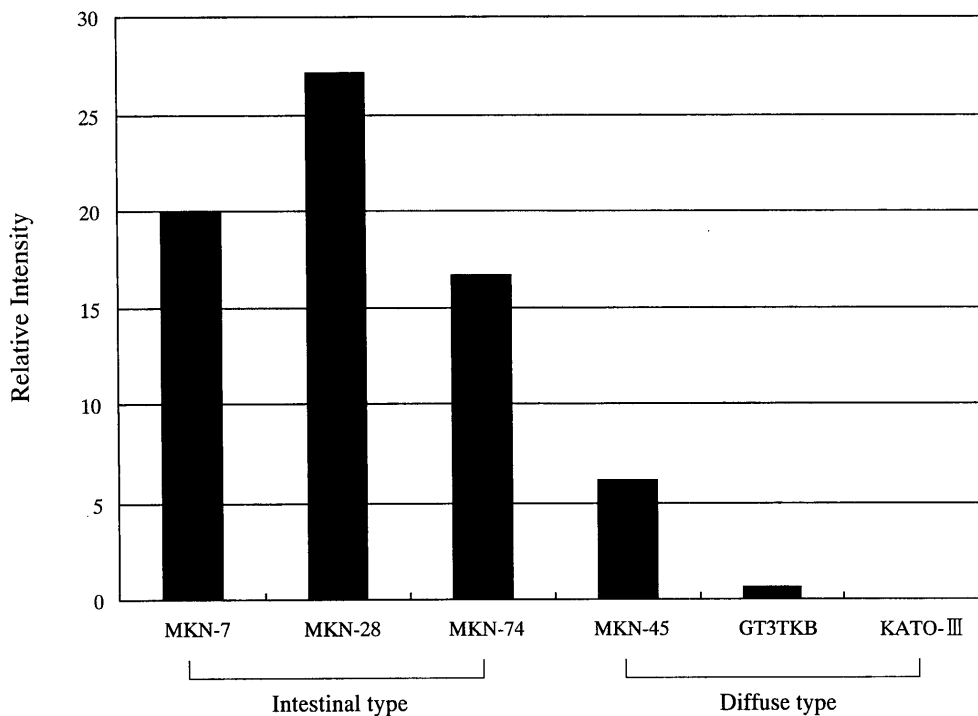


図4 E-cadherinの遺伝子発現レベル
E-cadherinの遺伝子発現レベルを β -actinの相対値として表し、各細胞株間で比較した。

認められた。6種の胃癌細胞株のなかで最も分化度が進んでいるMKN-7ではcaspase-2, caspase-8, SIVAなどapoptosis関連遺伝子群の高発現が認められた。さらに、全体として発現レベルは低いもののc-erbB2はその発現株として知られているMKN-7において選択的な高発現を示した(表5)。肝転移巣由来の胃癌細胞株で高発現を示した遺伝子群

6種の胃癌細胞株のうち、肝転移巣から樹立されたMKN-74とMKN-45においてNotch1, VEGF, MMP-9, apoptosis関連遺伝子群(bax, bcl-2, bcl-x)の高発現が認められた(表6)。

diffuse typeの胃癌細胞株におけるE-cadherinの遺伝子発現の低下

発現低下を示した遺伝子に着目すると、接着分子であるE-cadherinは、diffuse typeの細胞株において発現低下傾向を示し、特にGT3TKBおよびKATO-IIIにおいて低発現を示した(図4)。

考 察

癌の形成には複数の遺伝子異常の蓄積が関与している。しかも個々の遺伝子は複雑なネットワークを介して互いに関連しており、これらの遺伝子変化により癌細胞の生物学的特性が生み出され、悪性形質が発現し維持されていると考えられている⁹。従って

癌の生物学的特性を把握するには、多くの遺伝子変化を同時に捉え、総合的に解析するアプローチが必要であり、それに応えるべく近年cDNAマイクロアレイが導入された。われわれはファーストバージョンとして約170種の癌関連遺伝子を搭載したcDNAアレイを試作し、胃癌細胞株における包括的な遺伝子発現プロファイルの解析を行った。

個々の遺伝子はネットワークを介して種々の遺伝子群を形成しており、細胞周期も一連の遺伝子群によって制御されている。細胞周期における正と負の制御因子の遺伝子異常・発現異常によるバランスの乱れが、細胞増殖を介して癌の発生・進展に関与すると考えられている。正の制御因子であるCdk(cyclin dependent kinase)とcyclinの複合体はRb(retinoblastoma)蛋白をリン酸化し、転写因子であるE2Fを活性化させることによってG1からS期への移行が起こり、細胞が増殖する¹⁰。一方、G1/S期の細胞周期を抑制している負の制御因子がCdk inhibitorで、p53, p21, p16, p15, p27などが知られている。本研究ではスキルス胃癌株であるGT3TKBにおいてE2F familyに属するE2F1およびE2F2の相対的な高発現を認めたことから(表3)、他の細胞株に比して細胞増殖が活発なことが予想された。そこでGT3TKBにおける細胞周期関連遺伝子群の発現パターンを検討すると、p53の発現

低下により、その下流遺伝子である p21 の発現誘導が低下をきたし、その結果キナーゼ活性が抑制されず、E2F が高発現を示したものと推察された。さらに cyclinE は E2F 依存に発現することが知られており¹¹、本結果でも cyclinE の高発現が示された。このように一連の遺伝子群の挙動を同時に解析することにより、情報伝達経路を推定できる可能性が示唆された。Shim ら¹² はヒト子宮頸部癌と正常子宮頸部組織を588個の遺伝子につき解析したところ、その発現パターンから Smad が TGF- β の下流であること、MSX2 はアポトーシスと関係していることを報告した。また Wang ら¹³ は卵巣癌細胞株のエトポシド暴露に対する遺伝子変化を経時的に解析したところ、6591個の遺伝子のうち12個の遺伝子が変化を示し、エトポシドからアポトーシスに至る経路を報告した。以上の報告から、cDNA アレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析の応用により、signaling pathway を解明していくことが可能であると考えられる。

次に、6種の細胞株における各遺伝子発現レベルの比較から、有意に高発現した遺伝子に着目すると、その発現パターンから diffuse type の細胞株、intestinal type の細胞株、肝転移巣由来の細胞株の大きく3つの群に分類することができた(表4~6)。

diffuse type の細胞株で抽出された遺伝子のうち、K-sam は、チロシンキナーゼ型増殖因子レセプターである bFGF (basic fibroblast growth factor) receptor と相同性のある遺伝子であり、KATO-III で増幅している遺伝子としてクローニングされた¹⁴。臨床症例における検討では、高分化型胃癌では増幅が認められないのに対し、diffuse type の胃癌で22%¹⁵、スキルス胃癌で33%¹⁶の増幅を認めたとの報告がなされており、胃癌における組織特異性が示されている。c-met は、HGF (hepatocyte growth factor) receptor をコードする遺伝子であり、食道癌や大腸癌ではほとんど増幅を認めないのに対し、胃癌においては20~40%に増幅を認めており¹⁷、胃癌に対する特異性が示されている。組織型では高分化型腺癌で19%であるのに比べ、スキルス胃癌では39%と高率に増幅が認められている¹⁷。

CEA (carcinoembryonic antigen) はヒト大腸癌組織および胎児腸管に存在する癌特異的抗原として報告され、現在診断に最も広く利用されている。胃癌臨床症例における検討では、CEA 値の上昇は分化型胃癌の進展と密接な関係を持つ¹⁸とされているが、本研究では低分化型腺癌由来の MKN-45 において高発現が認められた。これまでの基礎的検討から、MKN-45 は CEA の高産生株であることが知ら

れており¹⁹、本結果は MKN-45 のもつ細胞学的特性を反映したものと考えられた。

一方、intestinal type の細胞株で抽出された遺伝子のうち、c-erbB2 は、EGF (epidermal cell growth factor) receptor 類似のチロシンキナーゼをコードする遺伝子であり、MKN-7 で増幅している遺伝子としてクローニングされた²⁰。臨床症例における検討では、乳癌でその増幅例の予後が不良であることが知られている²¹。胃癌においては高分化型胃癌のみに約20%の頻度で増幅が認められるとされており²²、組織特異性が示されている。Yokozaki ら²³ は Southern blot 法を用いた検討で、KATO-III における K-sam の amplification, MKN-7 における c-erbB2 の amplification, MKN-45 および KATO-III における c-met の amplification が認められたことを報告している。以上のように、従来よりよく解析されたこれら細胞株に関する報告と合致した結果が得られており、本法を用いた解析法の妥当性が確認できた。

一方、組織型の異なる MKN-74 および MKN-45 に共通して高発現を示す遺伝子も複数認められた(表6)。両細胞株は、いずれも肝転移巣から樹立された細胞株であり、母腫瘍が血行性転移を示したものであることから、これらの遺伝子変化は血行性転移あるいは肝転移の成立に関連した遺伝子変化である可能性が考えられる。

MMPs (matrix metalloproteinases) は細胞外基質の分解に関与する一群の酵素であり、なかでも本研究で抽出された MMP-9 は基底膜の主要構成成分である type IV コラーゲンに対する強い分解能を示すことから²⁴、癌の浸潤・転移に重要な役割を演じていると考えられている²⁵。Nakajima ら²⁶ の大腸癌細胞株を用いた検討では明瞭な転移性との相関が得られており、また伝野ら²⁷ は胃癌肝高転移株を用いた検討で、MMP-2 よりもむしろ MMP-9 が肝転移と関連していると述べている。

VEGF (vascular endothelial growth factor) は血管内皮細胞の増殖に最も特異的に作用すると考えられている血管新生因子の一つであり、血管新生の促進により癌の増殖や転移を引き起こすことが知られている^{28,29}。大腸癌においては、Takahashi ら²⁹ が血管密度が VEGF と相関すること、さらに予後と血管密度の強い相関性を報告し、有井ら³⁰ は northern blot 法を用いた検討で、肝転移の成立に関する因子の一つとしてとして、VEGF mRNA の過剰発現が重要であることを述べた。また胃癌においても Maeda ら³¹ が血管密度との相関、予後因子としての重要性を述べ、肝転移再発をはじめとする再発率と

の関連も指摘している。また Bcl-2 はアポトーシス抑制因子^{32,33}、Bax は Bcl-2 に拮抗するアポトーシス促進因子³⁴として知られている。さらに Bcl-2-Bax ヘテロ二量体はアポトーシスを起こさないが、Bax-Bax ホモ二量体はアポトーシスを誘導することから、アポトーシスの制御にはこのバランスが重要であるとされている³⁵。本結果では両者が同時に高発現を示した。この理由として、これらの細胞株は bcl-2 の相対的高発現によりアポトーシスを回避したか、あるいは肝転移巣という本来胃癌細胞には不適切な細胞環境のためにアポトーシスシグナルが部分的に作動したことを反映しているのではないかと考えている。

これまで高発現した遺伝子に着目してきたが、発現低下が重要な意味を持つ遺伝子の一つとして、E-cadherin の発現パターンを図 4 に示した。E-cadherin は、各種の癌組織において発現が減弱していることが明らかになり、転移や浸潤との関連が明らかにされつつある。Becker ら³⁶ は diffuse type の胃癌の 50% に E-cadherin の突然変異が認められたことを報告した。また Yonemura ら³⁷ は低分化型腺癌でその発現低下を圧倒的に多く認めたとし、腹膜播種への関与を考察している。本研究でも、diffuse type の細胞株において発現低下傾向を示し、特に GT3TKB および KATO-III において低発現を示した。MKN-45, KATO-III に関しては、Oda ら³⁸ の検討で E-cadherin 遺伝子に点突然変異を認め、細胞間接着機能が失われていることが確認されている。また Tamura ら³⁹ は RT-PCR 法による検討で、GT3TKB において E-cadherin の発現を認めなかったことを報告しており、本結果が支持された。E-cadherin は細胞間の接着分子であり、腺管構造を形成するのに重要であることを考えると、分子機能と組織型が一致した点で興味があるものと思われる。安井ら⁴⁰ は、低分化型腺癌において高頻度に認められる cadherin の異常や c-met の増幅は、おのおの担う機能により細胞間の接着不全と細胞の運動亢進を介して未分化な組織像とびまん性浸潤に関与していると述べている。さらに、高分化型腺癌と低分化型腺癌との間には、その発生・進展における分子生物学的因子の共通性と特異性が指摘されている³⁻⁵。このように本結果で示された intestinal type の細胞株と diffuse type の細胞株との遺伝子発現の相違は、癌の形態さらには生物学的特性を規定する因子となる可能性があるものと考えられる。

以上、本研究から胃癌では特定の遺伝子変化だけではなく多くの遺伝子変化が関与し、さらには相互作用も関与して多様な組織型や悪性度が決定されて

いることが示された。同時に、胃癌の持つ生物学的特性がアレイによって得られる特徴的な遺伝子発現プロファイルによって分類できる可能性が示唆された。

cDNA マイクロアレイの導入により遺伝子発現解析は飛躍的に進展しつつあるが、いくつかの問題点も残されている。cDNA アレイシステムではプローブとして mRNA を用いるため、いかにしてこのような高い complexity のプローブを検出するか、すなわち検出感度がまず問題となる。一般にフィルターを用いたアレイではバックグラウンドは低く抑えられるとされている⁴¹。われわれの用いているタイプのものである、0.1 μg の polyA RNA から 10^5 に 1 個の遺伝子まで検出可能であることが確認されており⁴²、細胞 1 個あたり数コピーの mRNA が検出可能である。次に、多数の DNA 断片を同時にハイブリダイゼーションさせるため、クロスハイブリダイゼーションが問題となる。これに対して、アレイ化されている cDNA の poly A 配列や反復配列を排除する設計をとることにより特異度を上げる工夫がなされている⁴²。

解析法に関しては、housekeeping gene のシグナル強度をデータの標準化に用いる方法を採用したが、これは発現レベルの異なる遺伝子が多数期待される場合に有効であるとされている⁴³。しかし小泉ら⁴⁴ は、一般に設定されている housekeeping gene が、サンプルによって発現量が違う可能性があること、またこれらの発現量が多すぎるため定量的な限界を超える可能性があることを指摘しており、注意が必要であると述べている。遺伝子発現の絶対量に関しては、定量性に欠けるとの指摘⁴⁵があるが、橋野ら⁴⁶ はアレイ上に十分量の DNA があるときは、定量性はある程度確保できると述べている。われわれの用いているタイプのものである 10^5 に 1 個から 10^2 に 1 個の範囲で定量性があることが確認されており⁴²、細胞 1 個あたり数コピーから数千コピーの間での遺伝子発現の増減であれば十分に検出可能であると考えられる。また同一サンプル内で遺伝子ごとの増幅効率の相違による数値の変動がみられたが、本実験系は異なるサンプル間での比較を行うものであるため、増幅効率の差が結果に及ぼす影響はさほど大きくないと考えられる。細胞株を用いた検討では、癌細胞のみから抽出した mRNA サンプルを用いることが可能であるため、癌細胞の特性を知る上では理想的であると考えられた。しかしながら従来報告と一致しないもの、あるいはこれまでに報告例がないものに関しては、今後さらなる検討で検証していく必要がある。

われわれはファーストバージョンとして試作した cDNA アレイを用いて胃癌細胞株の遺伝子発現解析を行った結果、その妥当性が確認でき、得られたプロファイルから胃癌の生物学的特性を分類できる可能性が示唆された。本法の応用により、幅広く臨床分野へ貢献できるものと考えられる。現在われわれは新たな癌関連遺伝子を加えたセカンドバージョンの cDNA アレイフィルターを用いて、癌臨床検体を対象に遺伝子発現解析をすすめており、疾患分類・診断手段・予後予測・治療法を選択などの臨床応用を試みている。しかしながら本法は多数の遺伝子変化を包括的にかつ効率よく得られるツールであるが、あくまでもファーストスクリーニングとしてのツールであることを念頭におかなければならない。今後はそこで得た多くの情報をいかに効率よく解析し、そこから絞り込んだ遺伝子と病態との関係を見出すことが重要である。またそのような候補遺伝子が抽出されれば、northern blot 法や RT-PCR 法など従来のオーソドックスな手法で裏付けることも必要であると考えられる。システムそのものあるいはアレイ自体も非常にコストがかかる問題があり、現時点では、誰もが手軽に利用するのは困難であるが、いずれこれらの解析から用途に応じた少数の遺伝子を配置したアレイが開発され、普及してコストが下がり汎用化されるものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲賜りました、近畿大学第1外科学教室 塩崎均教授に深甚なる謝意を表するとともに、ご協力頂きました同教室各兄に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第38回日本癌治療学会総会(平成12年10月, 仙台), 第73回日本胃癌学会総会(平成13年3月, 金沢)において発表した。

文 献

- Nakajima T, Yamaguchi T, eds. Multimodality therapy for gastric cancer. Tokyo: Springer-Verlag, 1999
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532
- Tahara E (1995) Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 19: 484-490
- Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E (2000) Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 35 (Suppl 12): 111-115
- Yokozaki H, Yasui W, Tahara E (2001) Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. *Int Rev Cytol* 204: 49-95
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21: 10-14
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470
- Brown PO, Botstein D (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 21: 33-37
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
- Nevins JR (1992) E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258: 424-429
- Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR (1995) Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12146-12150
- Shim C, Zhang W, Rhee CH, Lee JH (1998) Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clin Cancer Res* 4: 3045-3050
- Wang Y, Rea T, Bian J, Gray S, Sun Y (1999) Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis: application of DNA chip technology. *FEBS Lett* 445: 269-273
- Hattori Y, Odagiri H, Nakatani H, Miyagawa K, Naito K, Sakamoto H, Katoh O, Yoshida T, Sugimura T, Terada M (1990) K-sam, an amplified gene in stomach cancer, is a member of the heparin-binding growth factor receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5983-5987
- Uchino S, Hirohashi S (1996) Molecular events in gastric cancer. *Asian J Surg* 19: 207-217
- Hattori Y, Itoh H, Uchino S, Hosokawa K, Ochiai A, Ino Y, Ishii H, Sakamoto H, Yamaguchi N, Yanagihara K, Hirohashi S, Sugimura T, Terada M (1996) Immunohistochemical detection of K-sam protein in stomach cancer. *Clin Cancer Res* 2: 1373-1381
- Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E (1992) Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 227-232
- Maehara Y, Sugimachi K, Akagi M, Kakegawa T, Shimazu H, Tomita M (1990) Serum carcinoembryonic antigen level increases correlate with tumor progression in patients with differentiated gastric carcinoma following noncurative resection. *Cancer Res* 50: 3952-3955
- 鈴木利光 (1988) 胃癌 MKN45, 蛋・核・酵 33: 51-53
- Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K (1986) Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319: 230-234
- 菊池 潔, 上田政和, 藤崎真人, 渡邊昌彦, 露木 晃, 藤城保男, 北島政樹 (1992) 癌の臨床特性からみた集学的治療

- の問題点—がん遺伝子・産物の異常を中心とした—, 日外会誌 93: 948-951
22. 菊池 潔, 上田政和, 北島政樹(1999)胃癌の分子生物学. 癌と治療 26: 2139-2146
23. Yokozaki H (2000) Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan. *Pathol Int* 50: 767-777
24. Morodomi T, Ogata Y, Sasaguri Y, Morimatsu M, Nagase H (1992) Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukaemia and HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem J* 285: 603-611
25. Nakajima M, Welch DR, Belloni PN, Nicolson GL (1987) Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res* 47: 4869-4876
26. Nakajima M, Morikawa K, Fabra A, Bucana CD, Fidler IJ (1990) Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 82: 1890-1898
27. 伝野隆一, 平田公一, 八十島孝博, 穴戸隆之, 浦 英樹, 山口浩司, 水口 徹, 佐藤文彦(1998)胃癌の転移, 浸潤のメカニズム. 日消外会誌 31: 974-978
28. Melnyk O, Shuman MA, Kim KJ (1996) Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer Res* 56: 921-924
29. Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, Koura AN, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM (1997) Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg* 132: 541-546
30. 有井滋樹, 石上俊一, 森 章, 小野寺久, 今村正之(1998)大腸癌肝転移における VEGF, MMPs の意義. 日外会誌 99: 436-440
31. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M (1996) Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 77: 858-863
32. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443
33. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ (1985) Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41: 899-906
34. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619
35. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369: 321-323
36. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H (1994) E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 54: 3845-3852
37. Yonemura Y, Ninomiya I, Kaji M, Sugiyama K, Fujimura T, Tsuchihara K, Kawamura T, Miyazaki I, Endou Y, Tanaka M, Sasaki T (1995) Decreased E-cadherin expression correlates with poor survival in patients with gastric cancer. *Anal Cell Pathol* 8: 177-190
38. Oda T, Kanai Y, Oyama T, Yoshiura K, Shimoyama Y, Birchmeier W, Sugimura T, Hirohashi S (1994) E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1858-1862
39. Tamura G, Sakata K, Nishizuka S, Maesawa C, Suzuki Y, Iwaya T, Terashima M, Saito K, Satodate R (1996) Inactivation of the E-cadherin gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 87: 1153-1159
40. 安井 弥, 田原榮一(2000)胃癌の発生・進展の分子機構. 消化器科 30: 10-15
41. 橋本易周(2000)DNAアレイ技術とその応用. 臨病理 48: 948-954
42. 荒川 琢, 浅井友実, 川上文清(2001)新規なcDNAアレイシステムの開発. 組織培養工学 27: 40-43
43. Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW (1997) Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2150-2155
44. 小泉史明, 西尾和人, 西條長宏(2001)cDNAアレイ臨床応用. 最新医学56: 108-116
45. 水野洋介, 岡崎康司, 林崎良英(1999)cDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析. *Mol Med* 36: 1068-1077
46. 橋野仁一, 蜂野純一(2000)DNAマイクロアレイ. 呼吸 19: 881-887