

## 肺癌の分類におけるマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル

石川雄一<sup>1</sup>

**要旨** cDNA マイクロアレイ解析が登場してきてから、生物の全体像が解明されるのではないかという大きな期待がある。全ゲノムが解読され、個々の遺伝子の機能が次第に分かってくると、全発現遺伝子を網羅的に解析して、そのパターンから生物学を論ずることができるようになるかもしれない。腫瘍の分類においてもマイクロアレイへの期待は大きい。というのは、もともと病理診断というのは、腫瘍全体を見て診断するものであるからだ。本稿では、肺癌の分類にかかわる近年の研究をいくつか紹介する。4大組織型がマイクロアレイ解析でも再現され、種々のものが含まれる腺癌については、いくつかの亜型が見出された。その中には、これまでの病理組織学では見出せなかった、予後と密接に関連するものも含まれる。今後は、フィードバック機能との関係から、遺伝子発現と蛋白発現とを結びつける方向へ研究は進んで行くであろう。特に転写因子に関しては、このことは重要である。(肺癌、2004;44:201-207)

**索引用語** 肺腫瘍、マイクロアレイ、発現プロファイル、分類、病理

## Gene Expression Analysis on Lung Cancer Classification by Microarray Technology

Yuichi Ishikawa<sup>1</sup>

**ABSTRACT** cDNA microarray analysis may provide the whole features of an organism. After sequencing the whole human genome and understanding the functions of each gene, we may use expression patterns of genes to discuss biological phenomena. Also, to classify tumors, expression profiling is a very attractive method because pathological diagnosis per se is based on observations of entire features, not of particular aspects, of a tumor. In this review, several recent studies on expression profiling of lung cancers are mentioned. Four major histologies were recapitulated by expression profiling. In adenocarcinomas, which include various components, several subtypes were discovered, some of which correlated significantly with prognosis, formerly not detected by conventional histological analysis. It is expected in the future that growing interests may be taken in relations between gene and protein expression with regard to feedback mechanism, which is particularly important for transcription factors. (*JJLC*. 2004;44:201-207)

**KEY WORDS** Lung tumor, Microarray, Expression profiling, Classification, Pathology

### 1. はじめに 組織分類とマイクロアレイデータ

肺癌の分類には、これまで顕微鏡所見による病理組織学的分類が用いられてきた。一般に組織学的分類は、正常のどの組織の形態に似ているかを判断基準にしている。癌腫を二大別して腺癌と扁平上皮癌とに分類されるが、このことに何か根拠はあるのだろうか。確かに正常の上皮は、腺上皮と扁平上皮と二大別される。体を覆う

細胞を考えると、外表と消化管粘膜とは連続しており、大まかに体の内側は腺上皮、外側は扁平上皮というわけだ。しかし、顕微鏡的に一見似ていることと、その性質とは同じであろうか。観察する方法が変われば、全く異なるものに見えるということはないのだろうか。

天文学は、最初は肉眼天文学であり、星座という魅力的な体系を生み出した。望遠鏡が発明され、より暗い星も観察可能となり、星雲、星団、惑星の形が識別され、

<sup>1</sup>(財)癌研究会癌研究所病理部。

別刷請求先：石川雄一、(財)癌研究会癌研究所病理部、〒170-8455 東京都豊島区上池袋 1-37-1。

<sup>1</sup>The Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Japan.

Reprints: Yuichi Ishikawa, The Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, 1-37-1 Kami-ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 170-8455, Japan.

© 2004 The Japan Lung Cancer Society

さらに惑星の衛星も見つかった．赤方変移の観察から宇宙の膨張が推定された．つまり，星座というのは宇宙の構造なのではなく，太陽系のおかれた位置から見た星々の相対的位置にすぎなかったのである．さらに，電波，X線を観測する天文学は，可視光線による星座とは全く異なる宇宙の姿を我々に見せてくれた．方法が新しくなると，見えてくるものが大きく違ってくる．

これと同じことが腫瘍分類の世界には言えないのだろうか．肉眼的に，肺癌の種類をいくつか区別することができる．肺の末梢に起こり，中心に黒い瘢痕があり，その周囲は灰白色充実性であるが，辺縁では境界は少しぼやけているもの．肺の門部に多く，断面は白色分葉状均一で，中心に黒色の瘢痕はなく，リンパ節に多くの転移があるもの，などなど．顕微鏡で見ると，それぞれ分化型の腺癌，小細胞癌であることが分かる．肺の4種類の癌(腺癌(AC)，扁平上皮癌(SCC)，大細胞癌(LCC)，小細胞癌(SCLC))はこうして区別されてきた．電子顕微鏡の出現で，腫瘍病理学は全く変わると考えた人もいたが，結果的にはそうはならず，より細かな性質が判明したにとどまった．免疫染色の出現はどうであろうか．細胞内の蛋白を同定することで，細胞の分化傾向・機能を分類できるので，ある意味では極めて革新的な方法であると言える．形態に現れないか，現れてもわずかであるため，HE染色では認識しにくい細胞の性質に基づいて，腫瘍を分類するとどうなるであろうか．例えば，神経内分泌性の証明は，免疫染色の得意とするところである．

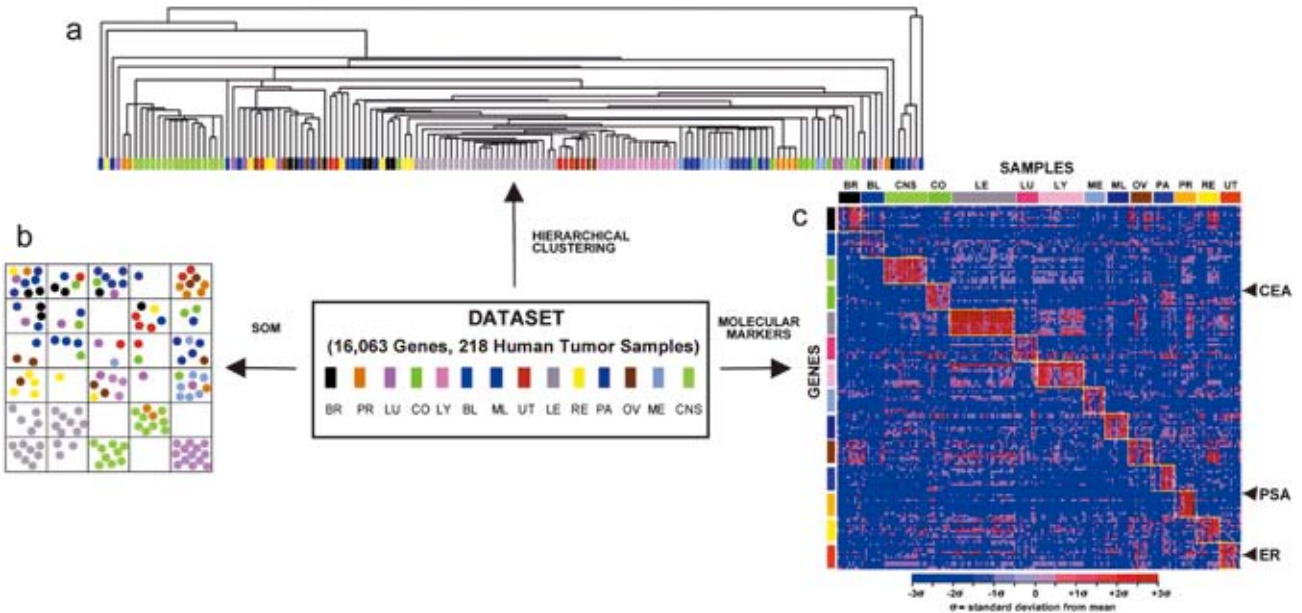
これまでは，腺上皮性，扁平上皮性を2大分化傾向としてきたが，神経内分泌性も加えた3つの分化傾向で腫瘍を分類すると，臨床的により有用であろうか．例えば，神経内分泌性を持つ腺癌は予後が悪い，などということが判明するかも知れない．

本稿では，マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルによる腫瘍分類を紹介する．腫瘍分類は主として形態に基づいてきたが，それは形態観察が腫瘍の性質を全体的に把握できるほとんど唯一の方法だったからである．マイクロアレイ解析は，形態学以外の方法として初めて，全体の性質を一挙に把握できるものとして登場してきた．全体の性質を一挙に把握したいという病理医，ひいては臨床医学者にとってマイクロアレイは非常に魅力的な方法である．

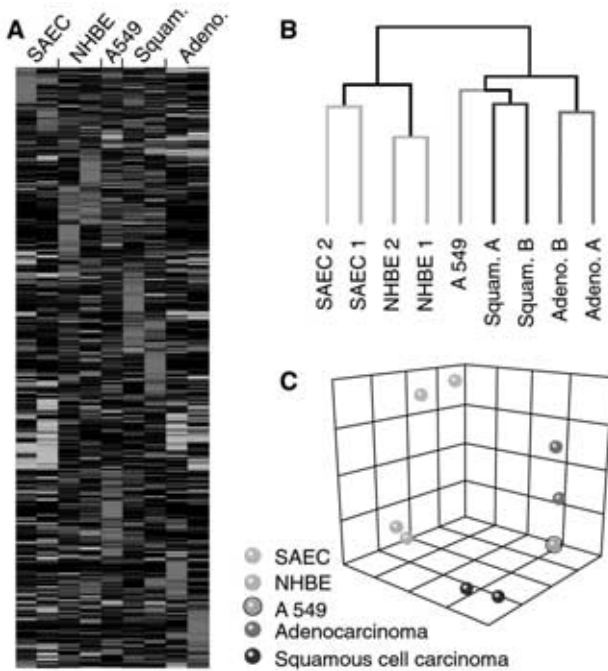
## 2. 肺癌のマイクロアレイによる分類 組織型の再現と細胞株の解析

悪性リンパ腫，乳癌，白血病などについてのマイクロアレイ解析の結果がメジャーなジャーナルに次々と発表されていた2000年頃，肺癌については，なかなか結果が発表されなかったが，2001年になると堰を切ったように出てきた．

まず，諸臓器の癌の分離であるが，MITのRamaswamyら<sup>1</sup>は，14種類の臓器にわたる218個のヒト腫瘍を用いて，遺伝子発現プロファイルによる原発臓器診断の可能性を検討した．Unsupervised 検体を既知の情報で分けな



**Figure 1.** Analyses of malignant tumors of 14 organs by hierarchical clustering, self-organizing map (SOM) and correlation between tumors and 10 genes (Ref 1) Copyright (2001) National Academy of Sciences, U.S.A.



**Figure 2.** Expression profiling and hierarchical clustering of small airway epithelial cells (SAEC), normal bronchial/tracheal epithelial cells (NHBE), squamous cell carcinomas (Squamous), adenocarcinomas (Adeno) and a cell line derived from lung adenocarcinoma (A549) [Ref 2]. As expected, adenocarcinomas, squamous cell carcinomas and normal cells were clustered together with each other. But the cell line was remote from adenocarcinoma tissues though it was derived from the histology. Copyright (2001) National Academy of Sciences, U.S.A.

い) 階層クラスタリングすると臓器別に分かれた。5×5 self-organizing map (SOM) という方法でも、大まかに臓器別に分類できた。だが、血液腫瘍や神経性腫瘍はきれいに分かれたが、通常の癌はきれいに分かれたとは言えなかった。さらに one vs. all (OVA) 分類という方法で、各臓器ごとに最も関連の強い 10 遺伝子を抽出したところ、大腸癌遺伝子には CEA が、前立腺癌では PSA が、子宮癌では estrogen receptor がそれぞれ含まれていた (Figure 1)。肺癌については本文中で言及されていないので、MIT のウェブサイトを見たところ、10 遺伝子のうち 4 個がサーファクタント蛋白関係、4 つは EST であった。さらにこの論文では、上皮系腫瘍について臓器診断の精度を高めるテストをしており、全体としては 78% の確度で臓器診断できるという。低分化癌の臓器推定は困難であったが、それは病理組織学でも同様である。

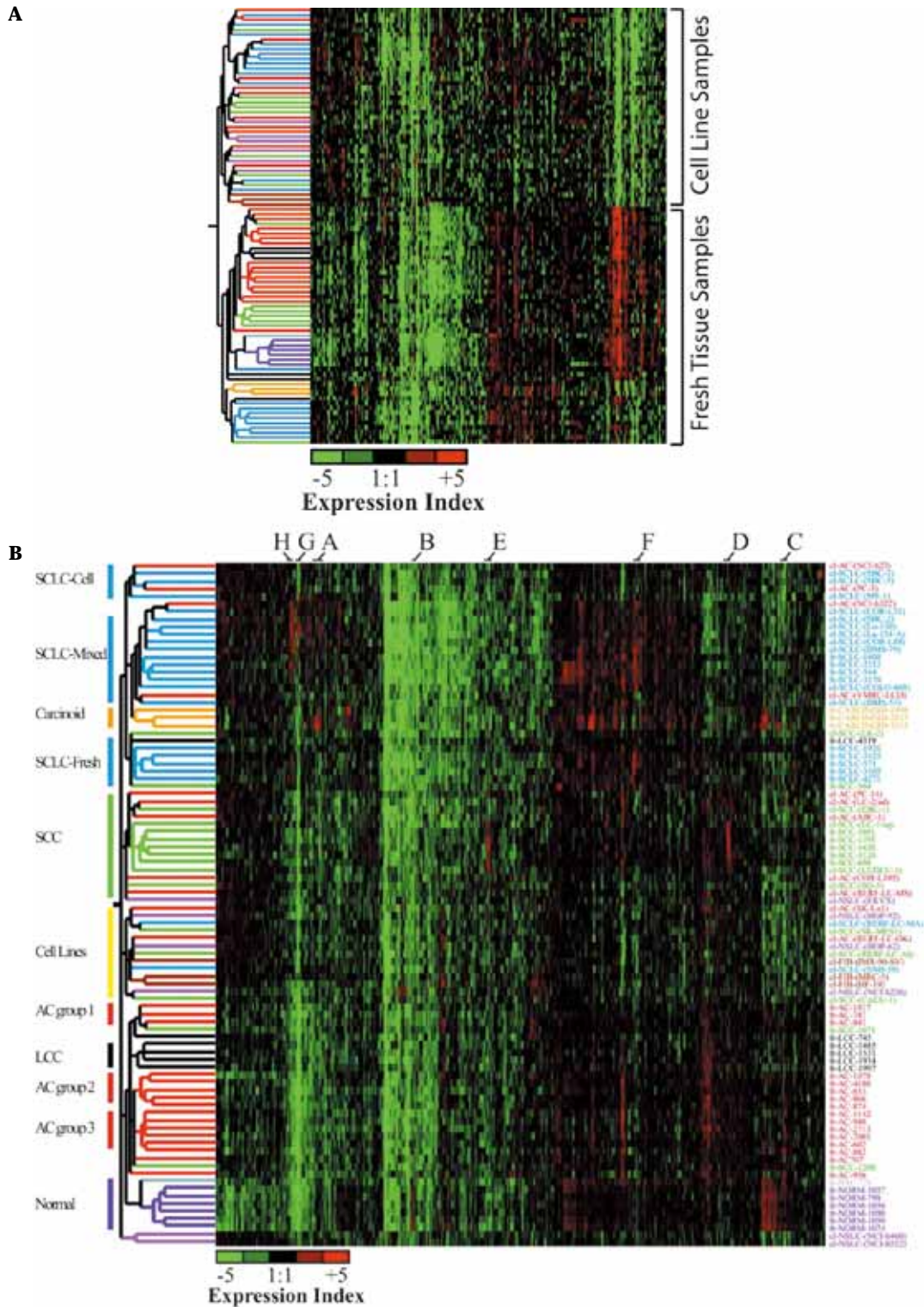
NCI の Nacht ら<sup>2</sup> は、肺の SCC 2 例、AC 2 例、AC 細胞株 1 例、および末梢気道、気管/気管支の上皮それぞれ 2 例ずつを用いて、遺伝子発現プロファイルを比較した。

Unsupervised 階層クラスタリングすると、腫瘍と正常細胞、AC と SCC はきれいに分かれた。SCC では AC に比べ、角化関係の遺伝子発現が亢進しているのは当然としても、p53 の下流にある WAF1 や 14-4-4σ が AC で抑制されていたのが特徴的であった。また、AC から樹立されたはずの A549 細胞が、AC よりも SCC に近くクラスターされたことは興味深い (Figure 2)。

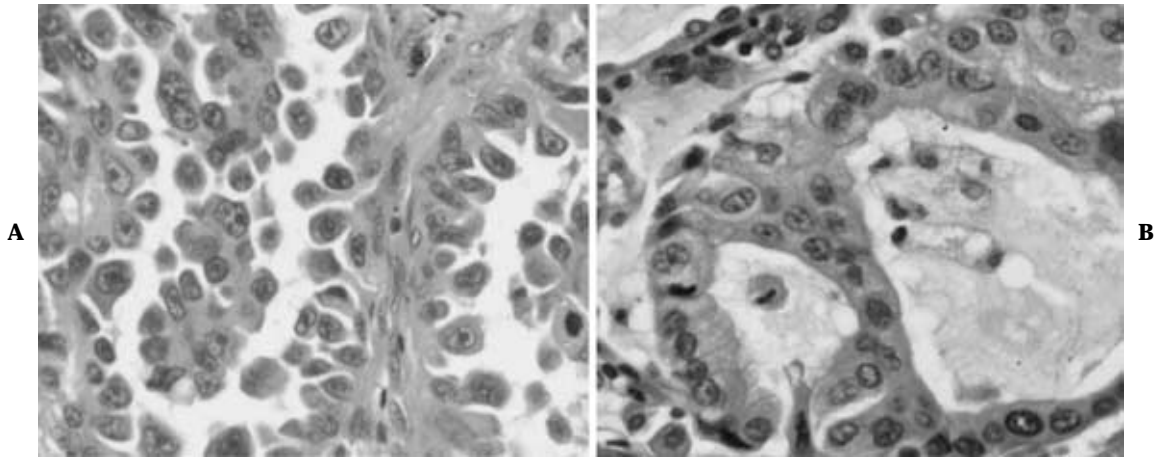
腫瘍組織と細胞株とを同時に解析して、我々は興味深い知見を得た。<sup>3</sup> まず、有効な全遺伝子を用いて行った unsupervised 階層クラスタリングでは、腫瘍組織と細胞株は画然と 2 つに分かれた (Figure 3A)。細胞株の中では、SCC と SCLC はひとまとまりになる傾向があったが、AC はまとまらず SCC や SCLC とクラスターを作る傾向があった。腫瘍組織には間質、炎症細胞といった正常細胞も多く含まれており、一方細胞株には全くそうした細胞は含まれないので、腫瘍組織と細胞株との画然としたクラスター形成は、腫瘍細胞のみの性質を反映しているとは限らない。そこで、腫瘍組織と細胞株とで発現が異なる遺伝子を除いて再度クラスタリングを行った (Figure 3B)。その結果、SCC と SCLC は腫瘍組織と細胞株とが一緒にクラスターされたものも多かったが、AC はすべての細胞株が腫瘍組織とは別にクラスターされた。細胞株は癌細胞が最も進展した状態のひとつと考えられるので、上記の事実から腫瘍の進展に関して以下のような考察を行った。すなわち、株化の過程で AC 細胞は元の腫瘍細胞とは異なった方向へ分化したか、あるいは AC としての分化を失ったと考えられる。腫瘍の進展が組織型ごとに異なっている可能性を示したものと言える。さらに、細胞株を使ったのでは、肺の AC を研究したことにならないことを意味している。

### 3. 腺癌の亜型と遺伝子発現プロファイル

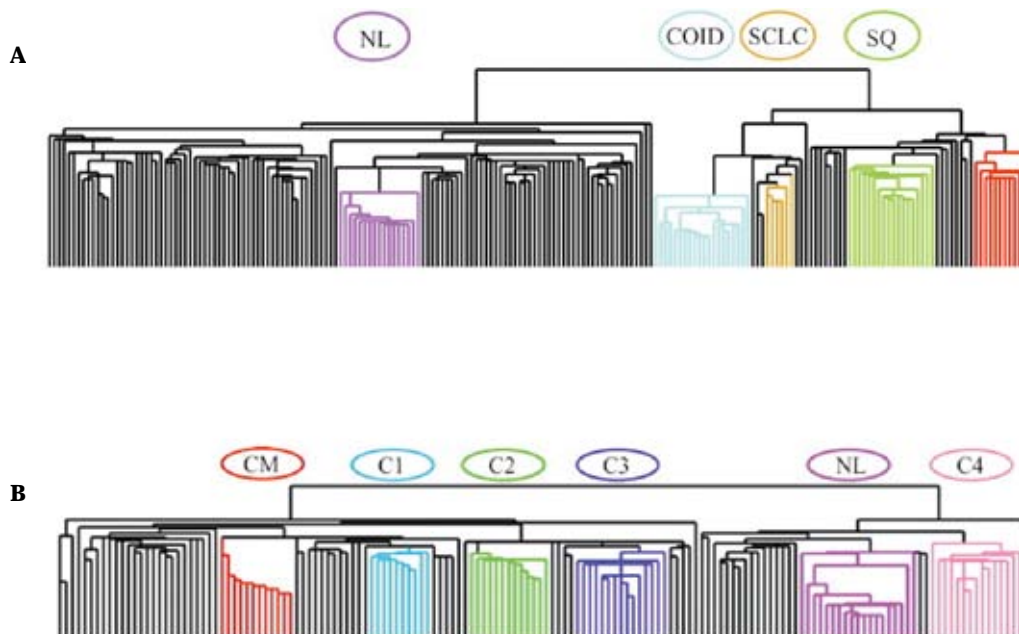
肺の腺癌は、臨床的にも生物学的にかなり雑多なものの集団であり、適切な亜型に分けて理解したり治療したりする必要があることは以前から指摘されている。筆者らは、腺癌を分化度別の亜型に分けることが重要であることを指摘してきた。AC を分化度という尺度で高分化、中分化、低分化に分けると、低分化の腺癌は高分化のものに比べ、喫煙とより関係が深く、また LOH の頻度がより高い<sup>4</sup>。p-stage I の腺癌を対象とした検索でも、分化度の組織学的診断基準をきちんとすると、中分化腺癌は高分化腺癌より有意に予後が悪い<sup>5</sup>。また、細胞型で hobnail 型、columnar 型に分けると (Figure 4) hobnail 型は非喫煙者に多く、p53 遺伝子変異頻度も 37% と低く、2/3 を喫煙と関係の薄い transition が占めるのに対し、columnar 型は喫煙者に多く、p53 遺伝子変異の頻度が 70% と高く、そのうちの半分が喫煙との関係の濃い transver-



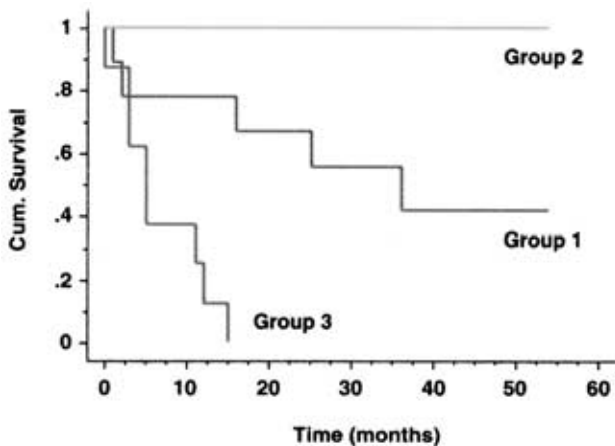
**Figure 3.** Integrated analysis of tumor tissues and cell lines ( Ref 3 ), showing completely discrete groups of the two ( **A** ) Reanalysis after excluding such genes as differently expressed in tumors and cell lines demonstrated that, although some cell lines were clustered together with tumor tissues in squamous cell carcinoma( SCC)and small cell lung carcinoma( SCLC ) tumors and cell lines were clustered completely independently in adenocarcinoma ( **B** )



**Figure 4.** Two major cell types of lung adenocarcinoma, hobnail ( **A** ) and columnar ( **B** ) types ( Ref 6 ) The hobnail type adenocarcinoma is seen often in non-smokers and the columnar type one is predominantly observed in smokers.



**Figure 5.** Hierarchical clustering of various lung tumors and suspected colon cancer metastases ( Ref 7 ) **A.** Dendrogram of all lung tumors and normal lung tissues. NL: normal lung, COID: carcinoid, SCLC: small cell lung carcinoma, SQ: squamous cell carcinoma. Black: adenocarcinoma, red: suspected metastatic carcinoma from colon. **B.** Dendrogram of adenocarcinomas and normal lung by 675 genes that were reproducible and varied widely across the samples. Four subgroups of adenocarcinoma as well as colon cancer metastasis ( CM ) and normal lung ( NL ) were identified. Proliferation-related genes were correlated with the C1 group, and neuroendocrine genes were with the C2 group. Ornithin decarboxylase 1 and surfactant genes were expressed in the C3 and C2 groups, and Type 2 pneumocyte gene expression was with the C4, C3 and NL groups. Interestingly, prognosis of the C2 group was significantly poorer than the other groups, tendency of which was similar when only stage I tumors were used. Copyright( 2001 )National Academy of Sciences, U.S.A.



**Figure 6.** Survival curves of three groups identified by hierarchical clustering of 67 adenocarcinomas (Ref 9) Copyright (2001) National Academy of Sciences, U.S.A.

sionであった。<sup>6</sup>

では、上記のような病理学的基準ではなく、純粋に遺伝子発現パターンによる腺癌の亜型分類はどのようになるのだろうか。Dana-FarberのBhattacharjeeらは、遺伝子発現プロファイルによって肺の腺癌をいくつかの亜型に分類したところ、神経内分泌性を持つものが有意に予後不良であったという<sup>7</sup>。彼らは186個の肺腫瘍と17個の正常肺組織を用いて、発現解析を行った(Figure 5)。Unsupervised階層クラスタリングにより、主要な組織型、転移性肺癌、正常肺を分別したあと、遺伝子を精選して腺癌の亜分類を試みた。その結果、大腸癌肺転移、正常肺の他に、C1~C4の4亜型を得た。増殖関連遺伝子はC1群と、神経内分泌関連の遺伝子はC2群とそれぞれ関連し、オルニチン・デカルボキシラーゼ1とサーファクタントはC3、C2群で高発現しており、2型肺胞上皮関連の遺伝子はC4、C3、正常肺組織で高発現していた。興味深いことに、C2群は、他の群よりも有意に予後が悪く、その傾向はstage Iに絞っても同様であった。つまり、腺癌の中で神経内分泌性を持つものは予後が悪いという結果であった。

さらにMichigan大学のBeerらは、86例の肺腺癌(stage Iを67個、stage IIIを19個)をtrainingセットとtestセットとに分け、trainingセットで予後と最もよく相関する遺伝子(例えば50遺伝子)を抽出し、その遺伝子セットでtestセットを高リスク群と低リスク群とに分けられるかどうか試した。その結果、stage Iの腫瘍を有意に予後に差のある2群に分けることができた<sup>8</sup>。それらの遺伝子のうち代表的なもの約30個を表に示しているが(Ref 8のTable 1)、腫瘍の増殖に関連したものが多い。以上のことは、未だリンパ節転移のないstage Iの腫

瘍を予後良好群と不良群とに分けることができることを意味しており、極めて重要である。

cDNAマイクロアレイの開発者であるStanford大学のPat Brownのグループは、67個の肺癌を組織型別に分け、さらに腺癌を3つのサブグループに分けた<sup>9</sup>。Group 2は予後良好、Group 3は予後不良であり、Group 1はその中間であった(Figure 6)。Group 1には中分化や高分化の腺癌が多く、Group 3には低分化癌が多かった。Group 2は予後良好であったが、構成はかなり雑多であった。

## 5. おわりに 遺伝子発現プロファイルの限界

本稿で紹介したのは、mRNAの測定による遺伝子発現解析である。もちろんmRNAを測っているのは、それが蛋白に翻訳され細胞内外で重要な働きをすると期待しているからである。mRNAの発現が亢進していても、蛋白発現が増加していなければなんにもならない。実際、mRNAの産生亢進とともに蛋白発現も増加しているとする論文も多い(Ref 8など)。しかし、遺伝子発現は亢進しているが、細胞内の蛋白自体は減少した状態になっているということは、本当でないのだろうか。

確かに構造蛋白や細胞膜上の受容体蛋白については、遺伝子発現と蛋白発現とが正の相関を示すであろう。しかし、転写因子についてはどうであろうか。転写因子が何らかの理由で不足しているので、遺伝子発現が亢進しているという状態、すなわち負のフィードバックがかかっている状態があっても少しも不思議ではない。このようなフィードバック機構こそ、これからの主要な研究分野になっていくであろうとする論者も少なくない<sup>10</sup>。

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析は様々な分野で応用され、多くの知識が蓄積されつつあるが、最終的には蛋白発現こそ重要なのであり、多臓器間でのmetabolome解析ができるようになって初めて、一個体全体を見据えたものになっていくのであろう。そのような総合的な生物理解には、個々の現象や物質にとらわれず、常に全体的にもものを見ていくという姿勢こそが必要なのであろう。

## REFERENCES

1. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:15149-15154.
2. Nacht M, Dracheva T, Gao Y, et al. Molecular characteristics of non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:15203-15208.
3. Virtanen C, Ishikawa Y, Honjoh D, et al. Integrated classification of lung tumors and cell lines by expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:12357-12362.
4. Ishikawa Y, Furuta R, Miyoshi T, et al. Loss of heterozy-

- gosity and the smoking index increase with decrease in differentiation of lung adenocarcinomas: etiologic implications. *Cancer lett.* 2002;187:47-51.
- 5 . 塩澤 哲, 石亀廣樹, 稲村健太郎, 他 . 予後との相関から見た肺腺癌における高分化および中分化判定基準の検討 . 日本病理学会会誌 . 2004;93:382.
  - 6 . Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, et al. Different subtypes of human lung adenocarcinoma caused by different etiological factors. *Am J Pathol.* 2000;157:2133-2141.
  - 7 . Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:13790-13795.
  - 8 . Beer DG, Kardia SLR, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 2002;8:816-824.
  - 9 . Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:13784-13789.
  - 10 . 金子 勝, 児玉龍彦 . 逆システム学 . 岩波新書 . 東京 : 岩波書店 ; 2004:1-243.