

cDNA マイクロアレイを用いた各種病型肺癌の トランスクリプトーム解析

野村 仁¹

要旨 — **目的.** 各種病型肺癌の診断・治療あるいは予後の予測に有用な分子マーカーを同定する. **研究計画(方法).** cDNA マイクロアレイを用いて各種病型肺癌, 正常肺組織からなる臨床検体, 各種病型肺癌に由来する細胞株の遺伝子発現プロファイルを解析する. **結果.** 解析に用いる遺伝子セットから培養細胞あるいは臨床検体全般に固有な遺伝子を除去する事により病型の特徴を反映したクラスター分離が可能となった. この処理により小細胞性肺癌と扁平上皮肺癌では病態モデルとして有用な細胞株が選別された. さらに階層クラスタリングにより小細胞性肺癌とLCNECからなる神経内分泌系腫瘍は予後の異なるグループに分類された. 予後不良群で高発現の遺伝子に対する siRNA を用いて細胞増殖やアポトーシス感受性への影響を検討したが, これまでのところ有望な治療標的候補遺伝子の同定には至っていない. **結論.** 予後不良群に選択的な分子標的を見出す為にはさらに多くの候補遺伝子について検討を広げる必要があると考えられた. (肺癌. 2006;46:223-230)

索引用語 — マイクロアレイ, 小細胞性肺癌, LCNEC, 神経内分泌系腫瘍, siRNA

cDNA Microarray Analyses of Various Human Lung Cancers

Hitoshi Nomura¹

ABSTRACT — **Objective.** Identification of molecular markers useful for diagnosis, therapeutic decisions and prognostic prediction of various types of lung cancers. **Methods.** By employing a cDNA microarray technique, gene expression profiles are assessed for either clinical samples comprising normal lungs and various types of lung cancer tissues, or cell lines derived from the same disease types. **Results.** Removal of genes commonly expressed in either clinical samples or cell lines from the gene set used in the analysis facilitated clustering closely reflecting the characteristics of respective disease types. This procedure enabled the selection of several cell lines as useful disease models particularly from clusters of small cell lung cancer (SCLC) and squamous cell lung cancer. Moreover, a hierarchical clustering of high grade neuroendocrine tumors (HGNT) comprising SCLC and large cell neuroendocrine cancers (LCNEC) revealed separation of groups with different clinical outcomes. siRNAs for the genes upregulated in the poor prognostic group were constructed and assessed for their effects on proliferation and/or sensitivities to apoptotic stimuli of the SCLC cell lines, however, no promising therapeutic target has been identified, so far. **Conclusion.** A similar approach should be applied to greater numbers of candidate genes in order to discover molecular targets for the treatment of poor prognostic HGNTs. (*JJLC*. 2006;46:223-230)

KEY WORDS — Microarray, SCLC, LCNEC, HGNT, SiRNA

¹ 東京大学先端科学技術研究センターシステム生物医学.

University of Tokyo, Japan.

¹Laboratory for Systems Biology and Medicine RCAST, The

© 2006 The Japan Lung Cancer Society

緒言

肺癌の罹患率は世界的に増加傾向にありわが国に於いても1998年以来男女を併せて癌死亡率の第一位を占める状況が続いており、有効な治療法ならびに早期発見の為の診断法の開発は極めて優先度の高い課題となっている。従来、肺癌はその細胞・組織形態や発生部位の違いから病型分類が行われており、一般には小細胞性肺癌と非小細胞性肺癌に分類されさらに後者は肺腺癌、扁平上皮肺癌、大細胞性肺癌などに分類される。肺癌全症例の約40%を占めるのが肺腺癌 (Adenocarcinoma) であり悪性度において広がりを持ったヘテロな集団である。肺癌と喫煙の相関は既に立証されているが最も喫煙との関連が大きいとされているのが扁平上皮肺癌であり全症例の20~30%を占める。小細胞性肺癌も全症例の約20%を占めるが最も悪性度の高い病型で、通常発見された時点で既に遠隔転移を伴っている場合が多い。さらに小細胞性肺癌は一般に化学療法剤に対する反応性が良好である事から、手術適応になる場合は稀で通常化学療法が第一選択肢となる。小細胞性肺癌は神経内分泌系腫瘍の特徴を有しており、本来神経内分泌系組織が産生する生理活性物質を異所性に産生した結果として腫瘍随伴症候群を発症する場合が知られている。最近では小細胞性肺癌以外の肺癌でも神経内分泌系腫瘍の特徴を示す症例が知られており、WHOにより新たな病型分類としてLarge Cell Neuro-Endocrine Cancer (LCNEC) が提唱されている。従来、病型毎に異なる治療指針が経験的に決められ実施されているが各病型が悪性度に於いて広がりがある事を考えた場合に、予後や治療反応性をより正確に予測する為の客観的指標を確立する事は極めて重要である。この様な理由から我々はヒト肺癌の臨床検体を材料として個々の症例に於ける遺伝子発現プロファイルの解析を

実施した。得られた遺伝子発現プロファイルを基準とした症例のグループ分けにより、詳細な形質の違いを反映した分類が可能となる。このうち予後や治療反応性と相関するグループ分けを規定する遺伝子セットを抽出してより確度の高い予測診断が可能となるのと同時により特異かつ高感度な診断マーカーの発掘や治療標的の同定が可能になるものと期待される。

cDNA マイクロアレイシステムについて

まず最初に我々が用いたシステムの詳細を紹介する。Bio-Robotics社製のスポッター MicroGrid-II® を用いて Research Genetics社より購入したIMAGE クローンから調製したcDNA をガラススライド上にスポットした。直径110-120 ミクロンのスポットを150 ミクロン間隔で配置した29×29=841 スポットからなるサブアレイ48個 (=40,386 スポット) が一枚のスライドガラス上にプリントされている。システム構築・条件の至適化が終わった後では1チップ当たりの製造コストは約2,000円で限られた予算の範囲内で数多くの検体の解析が可能である。cDNA マイクロアレイではレファレンスRNAと検体RNAとの競合ハイブリダイゼーションによりレファレンスRNAに対する相対値として定量を行う。その為にレファレンスRNAと検体RNAを異なる蛍光色素 (Cy3 と Cy5) にて標識した後に測定を行う。実際にはレファレンス、検体RNAより逆転写、IVTによりcRNAを合成しこれをさらに逆転写して1本鎖cDNAとする事により増幅と標識を行っている。システムのバリデーションとして幾つかの遺伝子についてリアルタイムPCRによりmRNAの定量を行いアレイの結果と比較した。Figure 1は2つの異なる遺伝子、LAGYとCAPN6について両手法による結果の比較を行ったものである。全く異なる手法であるにも拘らずいずれの場合において

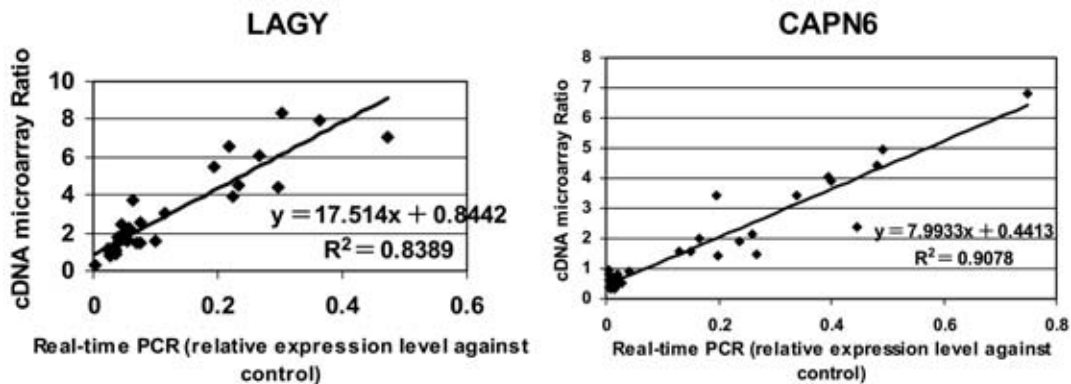


Figure 1. Correlations between results of real-time PCR and cDNA microarray (LAGY & CAPN6).

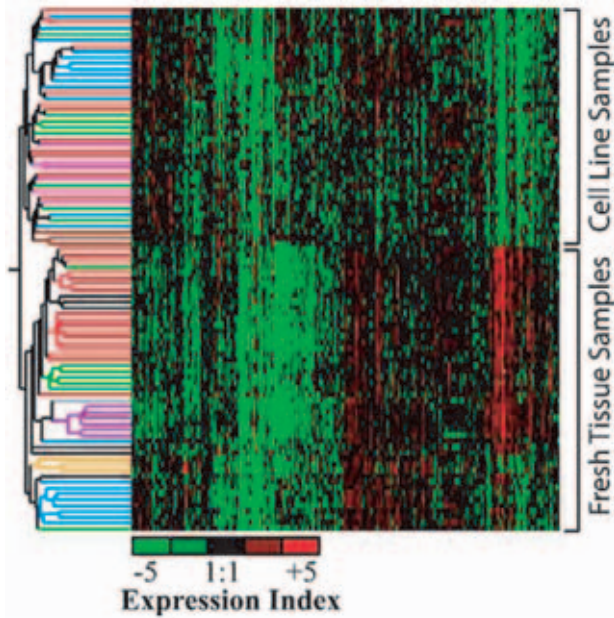


Figure 2. Fresh tissue samples and cell lines that failed to co-integrate with each other by ordinary hierarchical clustering with 6141 genes. Virtanen C, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:12357-12362 より引用.

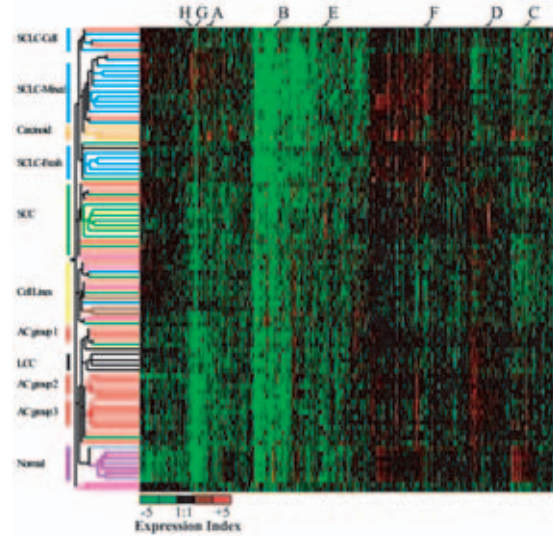


Figure 3. Fresh samples and cell lines that were successfully co-integrated with each other after removal of 2103 biased genes from the analysis. Virtanen C, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:12357-12362 より引用.

Table 1. Removal by Prefiltering of Genes Commonly Regulated Across Either All Clinical Samples or All Cell Lines Facilitated the Integration of Cell Lines with the Corresponding Clinical Samples of the Same Disease Type

	clusters			
	Small cell	Squamous	Adenocarcinoma	“Cell Line”
Small cell	11	0	0	2
Squamous	0	4	0	4
Adenocarcinoma	6	3	0	2
‘Non-small’	0	0	0	6

も高い相関 ($R^2=0.84-0.91$) が得られている。

7K アレイを用いた各種病型肺癌クラスターの分離¹

初期の検討はソリッドピンを用いた7K アレイにて実施し、プローブとしては機能が明らかな named genes を主として用いた。目的としては、従来行われている病理組織学的分類との相関、培養細胞株の由来する病型クラスターへの帰属化、そして各病型に特徴的な遺伝子発現の同定、が挙げられる。臨床検体と細胞株全てについて6141 遺伝子を用いた階層クラスタリングを行った結果 (Figure 2), ある程度病型の違いを反映したクラスター分離が可能であったものの、細胞株と臨床検体は互いに交じり合う事なく2つの大きなクラスターを形成し

た。これは細胞株と臨床検体の生育環境の違いを考えれば当然の結果であり、細胞株全般に共通した要因(2次元的な増殖, 高栄養価培地, 血清成分の存在, 高酸素分圧, など)あるいは、臨床検体全般に共通した要因(3次元的な増殖, 種々のヘテロな細胞集団との相互作用, 内分泌系, 抹消神経系の支配, など)に起因するバイアスを除去する事により個々の病型に固有の特徴を際立たせる事が可能になると考えられる。この目的の為に考案した Binary Search Algorithm を用いる事により細胞株あるいは臨床検体に共通して高発現している2103 遺伝子を抽出した。この2103 遺伝子を除いた残りの遺伝子を用いて再度階層クラスタリングを実施したところ、Figure 2に見られた細胞株と臨床検体を大別する階層は消失し、細

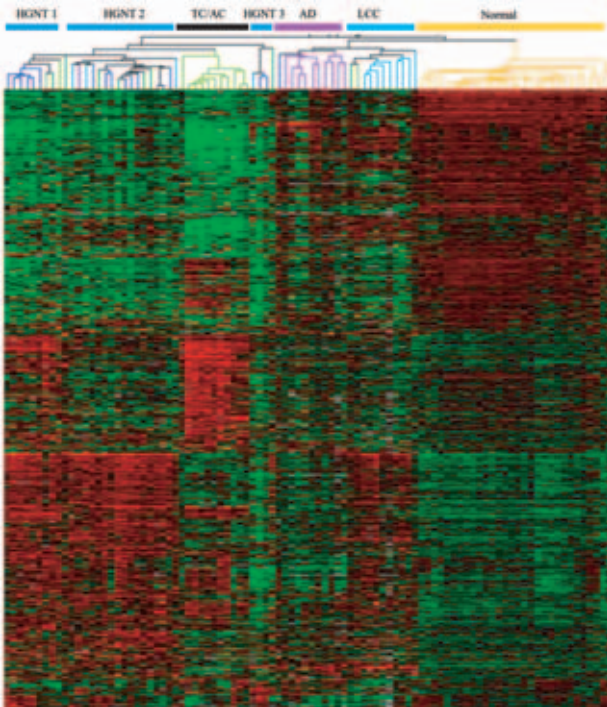


Figure 4. Hierarchical clustering separated the High Grade Neuro-endocrine Tumors into three distinct subgroups.

Jones MH, et al. *Lancet*. 2004;363:775-781 より引用.

胞株の大部分は個々の病型クラスターに帰属化された (Figure 3). 小細胞性肺癌と扁平上皮肺癌の場合に臨床検体のコアのクラスターの周囲に細胞株が集積して病型クラスターを形成している様子が見て取れる. 小細胞性肺癌の場合にはさらに臨床検体のみから成る独立したクラスターが形成されているが, この事の意味については次項に詳しく述べる. 以上の結果をまとめると, Binary Search Algorithm を用いた遺伝子のプレフィルタリングにより, 小細胞性肺癌と扁平上皮肺癌の細胞株ではそれぞれ 13 例中 11 例, 8 例中 4 例で由来する臨床検体のクラスターに正しく帰属化させる事が可能であった (Table 1). これとは対照的に肺腺癌の場合には検討した 11 例中 1 例も由来する臨床検体のクラスターに帰属化させる事ができなかった. これは, ひとつには細胞株樹立の過程で病型によっては強い選別が働いてごく一部の細胞集団だけが選択的に増幅された可能性が考えられる. 恐らく小細胞性肺癌と扁平上皮肺癌の場合は細胞株樹立過程での選別圧力が比較的軽微であった為にもとの病型の形質がよく保持されているものと考えられ, 病態モデルとして有用であると考えられた. 以上の結果から, 解析に用いる遺伝子セットを厳選して不要なバイアスを除去する事により, 1) 病型の違いを反映した良好なクラスター分離 (診断マーカーの提供), 2) 本来の病型形質を

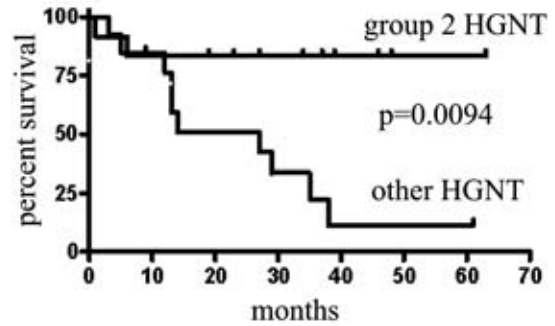


Figure 5. Kaplan-Meier survival curve. HGNT group 2 exhibited significantly better prognosis compared with other HGNT groups.

Jones MH, et al. *Lancet*. 2004;363:775-781 より引用.

維持した細胞株の選別 (疾患モデルの提供) が可能となった.

40K アレイを用いた神経・内分泌系肺癌の解析²

初期の検討で用いていたソリッドピンをスプリットピンに変更する事でスポット径を縮小し 40,386 スポットを 1 枚のスライド上に搭載した 40K アレイを作成する事に成功した. IMAGE クローンの重複度やカバー率を考慮に入れてもこの密度のアレイを用いる事でほぼヒト全遺伝子に匹敵する数のプローブについて発現情報を得る事が可能である. 今回の 40K アレイを用いた解析では, 1) 小細胞性肺癌と LCNEC の分類の分子病理学的意義の検証, 2) 予後予測の為の分子マーカーの発掘, が目的として挙げられるが, さらに 40K の IMAGE クローンの中には機能未知な遺伝子由来する EST が多数含まれている事から, 新規な診断マーカーや治療標的遺伝子の発掘が強く期待される. 解析に用いた遺伝子のフィルタリングを以下に示す. まず, 40,386 遺伝子のうち正常肺での発現値 (レファレンス RNA に対する比) の変動が小さい (0.5-2) もの 29,593 遺伝子を選別し, さらに全神経内分泌系腫瘍症例 (38) 中 3 例以上の検体で発現値の変動が大きい (0.5 未満あるいは 2 以上) もの 2,803 遺伝子を選別して解析に用いた. 階層クラスタリングの結果, (Figure 4) に示した様に 38 例の神経・内分泌系肺癌症例から 13 例のカルチノイドを除いた残りの 25 症例 (小細胞性肺癌 17 例, 8 例は LCNEC) は 3 つのクラスター (HGNT-1 から -3; HGNT は High Grade Neuro-Endocrine Tumor の略) に分離された. この 3 つのクラスターのうち HGNT-2 (13 症例) はそれ以外の HGNT 症例 (12 症例) と比較して有意 ($p=0.0094$) に予後が良好である事が Kaplan-Meier 解析の結果明らかとなった (Figure 5). 一方, 同じ 25 症例のうち LCNEC と小細胞性肺癌について Kaplan-Meier 解析を行ったところ両者間の予後に於いて

Table 2. Candidate Genes for Either Prognostic Prediction or Therapeutic Targets

Downregulation by RNAi	Overexpression
· High in poor prognostic group	· High in good prognostic group
— ASCL1 (transcription factor)	— TP53TG1
— INSM1 (transcription factor)	— LRPPRC
— TOX (transcription factor)	— FOXI1 (transcription factor)
— ELAVL4	MS4A6A
— CADPS	— HSH1
— ID4 (transcription factor)	— CTDP1
— AMOTL1	— EG1
— STXBP1	— GJA5
— IGSF4	— DDX18

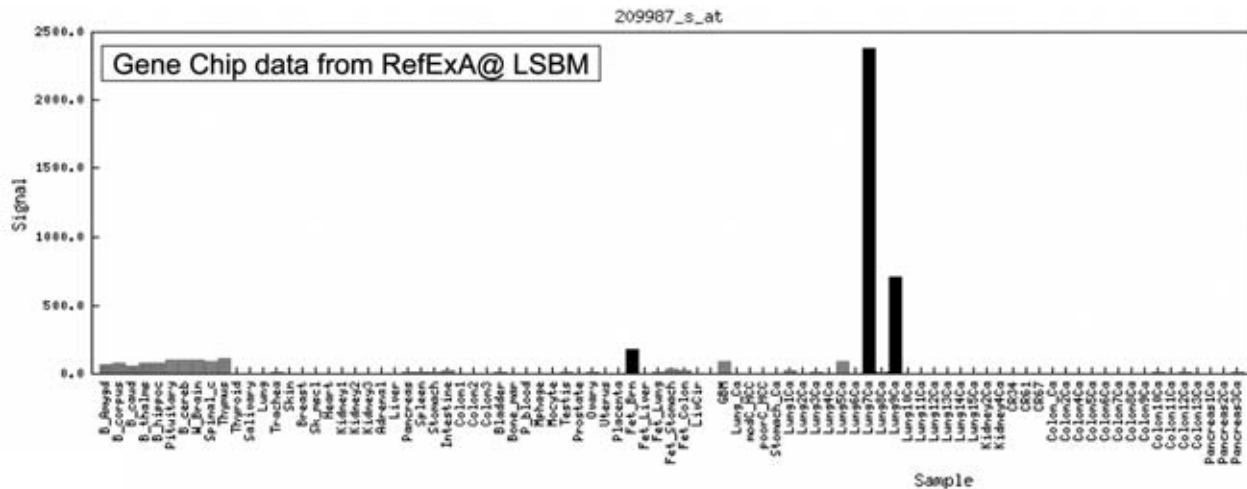


Figure 6. Gene Chip data showing highly specific expression of hASCL1 in Small Cell Lung Carcinomas.

```

>gij4757787[ref]NM_004316.1| Homo sapiens achaete-scute complex-like 1 (Drosophila) (ASCL1), mRNA
CCCSAGACCCGGCCGCAAGAGAGCGCAGCCTTAGTAGGAGAGGAACGCGAGACGCGGCAGAGCGCGTTACGCACTGACTTTTGCTG
CTGCTTCTGCTTTTTTTTTTTAGAAAACAAGAAAGGCGCCAGCGGCAGCCTCACACCGGAGCGCCACGCGAGGCTCCCGAAGCCA
ACCCGCGAAGGGAGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGCGCGTGCAGGGAGGAGAAAAGCATTTCACCTTTTTGCTCCCCTCTAA
GAAGTCTCCCGGGGATTTGTATATAATTTTTAACTCCGTCAGGGCTCCCGCTTCATATTCCTTTTTCTCTGCTGCTGCTCC
TGCACCCAGTTCTCTGTGTGCTCCCTCGCGGGCCCGCACCTCGCGTCCCGGATCGCTGATTCGCGACTCCTTGGCGCC
GCTGCGCATGGAAAGCTCTGCCAAGTAGGAGAGCGCGCGCGCGCCAGCAGCCGAGCCGAGCCGAGCCGAGCCGAGCCGAGCCG
CCCGCAGCCTGTTTTCTTGGCAGCGCCGAGCCGCGCGCGCCGCGCAGCCGCGCAGCGGCAGAGCGCGCAGAGCGCGCAGCAGCAGC
AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AGCGCCCAAGCAAGTCAAGCGACAGCGCTCGTCTTCCGCCAAGTGTGCGCTGCAAAACCGCGCTCAACTTCAGCGGCTTTGGC
TACAGCCTGCCGAGCAGCAGCGCGCGCGTGGCGCCGCAACGAGCGCGAGCGCAACCGCGTCAAGTGGTCAACTGGGCT
TTGGCACCCCTTCCGGAGCAGCTCCCAACGCGCGCGCCCAACAAGAAGATGAGTAAGGTGGAGACACTGCGCTCGCGGTCGAGTA
CATCCGCGCGCTGCAGCAGCTGCTGGACGAGCATGACGCGGTGAGCGCGCTCCAGCGAGCGCTCTGTGCCACCACATCTCC
CCCACTACTCCAACGACTTGAATCCATGGCGCGCTCGCGGCTCATCTACTCGTGGAGAGGGCTCTTACGACCCGCTCA
GGCCCGAGGAGCAGGAGCTTCTCGACTTCCCAACTGGTCTGAGGGGCTCGGCTGGTCAGGCCCTGGTGGCAATGGACTTTGG
AAGCAGGGTGTGCGACAACCTGCATCTTTAGTGTCTTTGTCAGTGGCGTTGGAGGGGGGAGAAAAGGAAAAGAAAAAG
AAGAAGAAAGAAAAGAGAAGAAAAGAAAAAGCAAAACAGTCAACCAACCCATCGCCAACTAAGCGAGGCATGCTGAGAGAC
ATGGCTTTCAGAAAACGGGAAGCGCTCAGAACAGTATCTTTGCACTCCAATCATTACGGAGATATGAAGAGCAACTGGGACCTG
AGTCAATGCGCAAAATGCAGCTTGTGTGCAAAAGCAGTGGGCTCCTGGCAGAAGGGAGCAGCAGCAGCGTATAGTAACCTCCCAT
CACCTCTAACCGCACAGCTGAAAGTCTTGTCTGGGTCCTTCACTCCCGCCCTTCTTAGAGTGCAGTCTTAGCCCTCTA
GAAACGAGTTGGTGTCTTTC
    
```

Figure 7. Position of siRNA for ASCL1 (Box: siRNAs for ASCL1-1 and ASCL1-2). *Underline: CAG repeat.

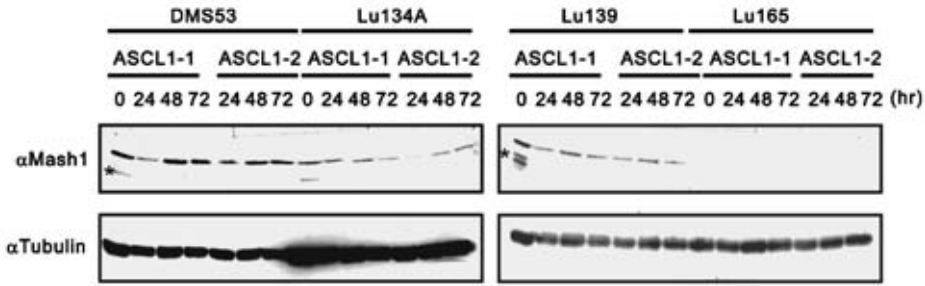


Figure 8. Both of siASCL1-1 and siASCL1-2 effectively down-regulated the endogenous ASCL1 (*) expression.

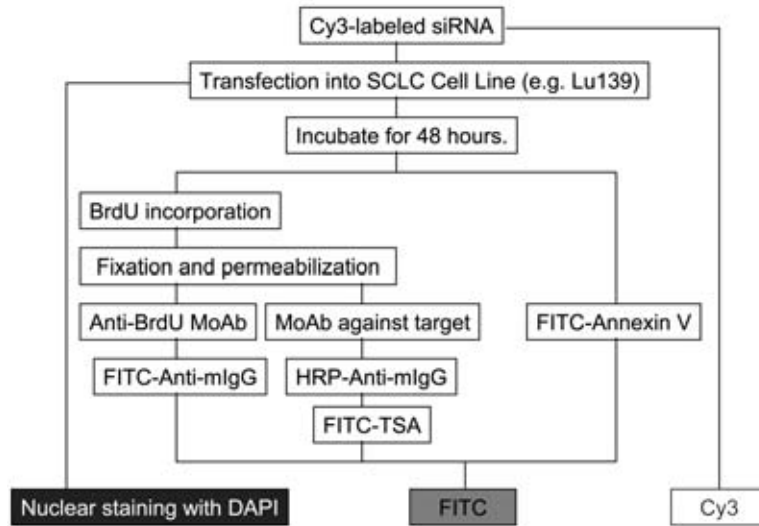


Figure 9. Scheme of tri-color functional analyses by siRNA approach.

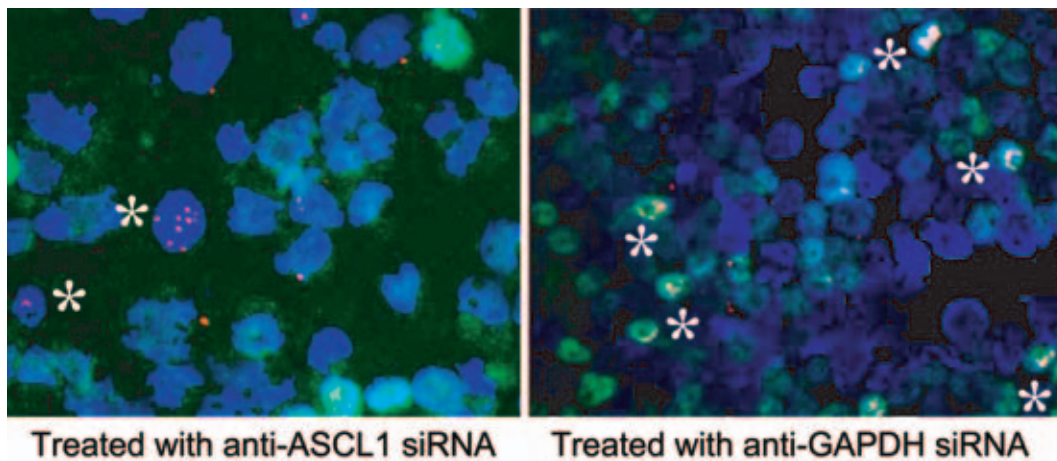


Figure 10. Specific silencing of ASCL1 by anti-ASCL1 siRNA (Lu139).

Blue: DNA staining with DAPI. Green: anti-ASCL1 immunostaining visualized with FITC-TSA. Red: Cy3 labeled siRNA (*).

て有意な差は認められなかった($p=0.37$, データ省略). さらに 11 例の小細胞性肺癌由来細胞株を加えて階層クラスタリングを実施したところ, 11 例の細胞株は全て HGNT-1 のクラスターに帰属化された(データ省略). 以上の結果から 40K アレイを用いたトランスクリプトーム解析により神経内分泌系肺癌を予後の異なる 2 群に分ける事が可能となった. 一方, LCNEC と小細胞性肺癌は予後に於いて明らかな差を認めず, またトランスクリプトームに於いても明瞭なグループに分離されない事から, 両病型間の形態学的差異に関連する形質の違いは小細胞性肺癌検体間の heterogeneity よりも小さいものと考えられ, LCNEC 分類の臨床病理学的意義についてはさらなる検討が必要であるとの結論を得た.

HGNT の予後に関連する遺伝子群からの新規な創薬標的候補遺伝子の探索

分散分析 (ANOVA) を行う事により HGNT の予後不良群と予後良好群を識別する遺伝子セット 740 遺伝子を選別した. このうちそれぞれの群で高発現している代表的な遺伝子をピックアップした (Table 2). 病態モデルとして検討に利用可能な細胞株の全てが予後不良群に帰属化された事と強制発現の発現量の制御が必ずしも容易ではなく得られた形質変化が極めて非生理的なものになってしまう危険性を考慮した結果, RNA 干渉技術を用いて小細胞性肺癌培養細胞株の形質変化を検討するのが最も好ましいとの結論に達した. 得られた候補遺伝子の中から手始めに神経内分泌系細胞の増殖・分化への関連が想定される ASCL1 について検討を行った. Figure 6 には東京大学先端科学技術研究センターシステム生物医学ラボラトリーが公開している Gene Chip データベース (RefExA) から転載した種々のヒト臓器に於ける ASCL1 遺伝子の発現を示す. ASCL1 は胎児脳と成体脳組織に於いて低レベルの発現を認める以外には顕著な発現を正常組織には認めず, 一方で小細胞性肺癌に特異的な高い発現を認める事から一見理想的な治療標的であるかの様に見える. しかしマウスに於いては成体でも ASCL1 の発現が肺に於いて報告されており³⁾, 種々の肺障害からの回復過程で前駆細胞から肺胞細胞あるいは神経内分泌系細胞への増殖分化の局面に於いて ASCL1 が重要な役割を担っている可能性が想定される. これらの事を念頭に置いて以下の検討を実施した. QIAGEN が提供している siRNA ターゲット予測プログラムを用いて Figure 7 に示した 2 箇所の 21mer 配列 (ASCL1-1 および ASCL1-2) を ORF 内にデザインして dsRNA を合成した. 抗 ASCL1 抗体 (α Mash1) を用いた Western Blotting により siRNA の効果は導入後 24 時間後から認められ少なくとも 72 時間後まで持続する事が確認された (Figure 8).

Cy3 (赤) にて蛍光標識した siRNA を用いる事により, 細胞核 (DAPI 染色: 青), BrdU 取り込みあるいは標的分子の発現 (FITC: 緑) あるいは FITC-Annexin V によるアポトーシスの評価を個々の細胞レベルで行う事が可能である (Figure 9).

Figure 10 では抗 ASCL1 抗体を用いた蛍光抗体染色により ASCL1 に対する siRNA を取り込んだ細胞では ASCL1 蛋白の発現が低下しているが対照として用いた GAPDH に対する siRNA ではこの様な効果は認められない. Table 2 に示した遺伝子からさらに INSM1, TOX, ELAVL4 について同様に siRNA を作成し, Cy3 標識した後に ASCL1 に対する siRNA と並べて評価を行った (データ省略). その結果 ASCL1 に対する siRNA の場合のみ Lu139 細胞への BrdU 取り込みに於いて弱い負の相関が認められた. FITC-Annexin V によるアポトーシスの評価では何れの siRNA を用いても大きな変化は認められなかった. Lu139 細胞は Bcl2 を高発現しているのでアポトーシス抵抗性となっている可能性が考えられる. 実際この細胞は Etoposide や Cisplatin などを用いたアポトーシス誘導に対しても極めて抵抗性である. しかし, Bcl2 の高発現は必ずしも小細胞性肺癌全般に共通した現象ではなく, 細胞株について言えば検討した半数の株でのみ発現亢進が認められている (データ省略). 同様に, 臨床検体についても約半数の小細胞性肺癌に於いて発現の亢進が認められるが先に述べた 740 遺伝子の中ではむしろ予後良好群に於いて発現亢進している遺伝子として選別されている. Preliminary な結果ではあるが上述の抗癌剤によるアポトーシス抵抗性は Bcl2 の発現が低い小細胞性肺癌細胞株に於いても同様に認められ, また Bcl2 に対する siRNA を用いた検討でもアポトーシス感受性を回復させる事には成功していない (データ省略). これらの結果は Bcl2 以外の遺伝子で小細胞性肺癌のアポトーシス抵抗性に寄与している遺伝子が存在する事を示唆しており, この遺伝子を同定して治療標的とする事が今後の新規な小細胞性肺癌治療法の開発に於いて重要な課題のひとつであると考えられる. 今回紹介した siRNA と画像解析を組み合わせた技術は個々の細胞レベルで標的候補遺伝子の機能を簡便に評価する事が可能とする事から, 上記課題の解決に於いても有効に活用されるべきと考えられた.

結 語

近年のマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析技術の普及によって, より客観的な基準に基づいた肺癌の病型診断が可能となり, 一部の病型では予後の予測にも利用可能である事が示された. マイクロアレイの一枚のスライドガラス上にヒト遺伝子全てに対応するプ

ローブが搭載され短時間の操作でそれら全ての発現レベルを数値として表示できると云うのは著しい進歩であるが、一方で得られた膨大な数値データから如何にして有用な情報を抽出するかが重要な課題となりつつある。今回紹介した Binary Search Algorithm による遺伝子セットのプレフィルタリングは、培養細胞株と臨床検体と云う全くかけ離れた検体から病型に固有な共通の形質を抽出するうえで単純ではあるが極めて有効な手法である。特に、過去に開発された化学療法剤の標的分子が所属するパスウェイ構成成分の多くはこのプレフィルタリング操作を経る事により、培養細胞株に共通する signature として除去されており、同様に我々の体内で ubiquitous に駆動しているパスウェイの構成成分は臨床検体に共通する signature として除去されている。これらの除去された遺伝子は単に病型に固有な遺伝子発現を抽出する際のノイズであるばかりでなく、それらの分子を標的とした場合に予想される広範な副作用から創薬標的として好ましくないものと云う事ができる。今回、時間の関係で紹介できなかったが、扁平上皮肺癌についても同様な解析により予後の異なる症例のクラスター分離が Inamura らにより *Oncogene* 誌⁴ に報告されているので、是非参照されたい。

謝辞：本研究は東京大学先端科学技術研究センター、(財)癌研究会・癌研究所、中外製薬(株)の3者共同研究として実施した。臨床検体および臨床病理データの採取・提供に当たって

は、稲川健太郎(敬称略、以下同)、石川雄一((財)癌研究会・癌研究所)、マイクロアレイ解析系の確立と実施は M.H. Jones, C. Virtanen, 嶋根みゆき(中外製薬(株))、データ解析は藤原大、石川俊平、油谷浩幸(東京大学先端科学技術研究センター、ゲノムサイエンス)、siRNA 関連実験は砂河孝行(東京大学先端科学技術研究センター、システム生物学)、実験補助として小林篤、加藤美緒(WDB(株))の協力を得た。また本研究の一部は科学技術振興調整費、先導的研究等の推進「ヒト疾患のシステム生物学の創成」の支援を受けて行われた。この場を借りてお礼申し上げる。

REFERENCES

1. Virtanen C, Ishikawa Y, Honjoh D, et al. Integrated classification of lung tumors and cell lines by expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:12357-12362.
2. Jones MH, Virtanen C, Honjoh D, et al. Two prognostically significant subtypes of high-grade lung neuroendocrine tumours independent of small-cell and large-cell neuroendocrine carcinomas identified by gene expression profiles. *Lancet*. 2004;363:775-781.
3. Ito T, Udaka N, Yazawa T, et al. Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development*. 2000;127:3913-3921.
4. Inamura K, Fujiwara T, Hoshida Y, et al. Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization. *Oncogene*. 2005;24:7105-7113.