

高集積組織アレイを用いた肺がんの蛋白発現データベースの 作成と臨床応用

福岡順也¹・北野晴久¹

要旨 — 分子標的治療の登場により、肺がん治療は新たな局面を迎えている。今日の医療を「オーダーメイド医療」へ近づけるためには、まず、遺伝子や蛋白の情報を収集し、網羅的解析によって膨大なデータを蓄積する必要がある。最大 1500 コアを有することができる「組織アレイ」は網羅的解析に欠かすことができない技法であり、基礎研究と臨床をつなぐトランスレーショナルな研究ツールといえる。ここでは、我々が主に使用している高集積組織アレイを中心に述べる。(肺癌. 2007;47:915-919)

索引用語 — 組織アレイ, データベース, オーダーメイド医療, バイオマーカー

High Density Tissue Microarray for Establishing Lung Cancer Expression Profiling Database and Its Clinical Application

Junya Fukuoka¹; Haruhisa Kitano¹

ABSTRACT — Recent progress of molecular targeting medicine has been changing the concepts of cancer therapy. No one doubts about the importance of accumulating molecular expression data generated by high throughput analyses for upcoming personalized therapy. Tissue microarray, which can hold up to 1500 cores in a set, is an indispensable method among those high throughput techniques and is an excellent translational tool that connects the basic research to the clinical application. We discuss the usefulness of tissue microarrays, especially high density tissue microarrays, regarding future cancer therapy. (*JJLC*. 2007;47:915-919)

KEY WORDS — Tissue microarray, Database, Individualized medicine, Biomarker

はじめに

2002 年から臨床で用いられているゲフィチニブ (イレッサ®) や 2007 年秋に認可見込みであるエルロチニブ (タルセバ®) のように、肺がんを対象とした分子標的治療が本格的にスタートし、がん治療は新たな局面を迎えている。昨今、ゲフィチニブによる肺がん治療は、固形がんにおける分子標的治療の先駆的役割を果たした。¹ このような進歩を受け、米国では、国立癌研究所 (NCI) による国家プロジェクトとして、「2015 年までにがんによる苦痛と死を撲滅する」目標を掲げている (NCI Challenge Goal 2015; Eliminating the Suffering and Death Due to Cancer ; <http://www.cancer.gov/aboutnci/2015>).²

上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子の変異はゲフィチニブの治療効果との関連が示され、³⁻⁵ 感受性予測因子として臨床で用いるようになってきている。これは、いままで行われてきたようなガイドライン重視の「レディーマード医療」を行うのではなく、腫瘍の特異性を認識して選択的な「オーダーメイド医療」を行うことの重要性

による苦痛と死を撲滅する」目標を掲げている (NCI Challenge Goal 2015; Eliminating the Suffering and Death Due to Cancer ; <http://www.cancer.gov/aboutnci/2015>).²

¹富山大学附属病院病理部。

別刷請求先：福岡順也，富山大学附属病院病理部，〒930-0194 富山県富山市杉谷 2630 (e-mail: fukuokaj@med.u-toyama.ac.jp)。

¹Laboratory of Pathology, Toyama University Hospital, Japan.

Reprints: Junya Fukuoka, Laboratory of Pathology, Toyama University Hospital, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan (e-mail: fukuokaj@med.u-toyama.ac.jp)。

© 2007 The Japan Lung Cancer Society

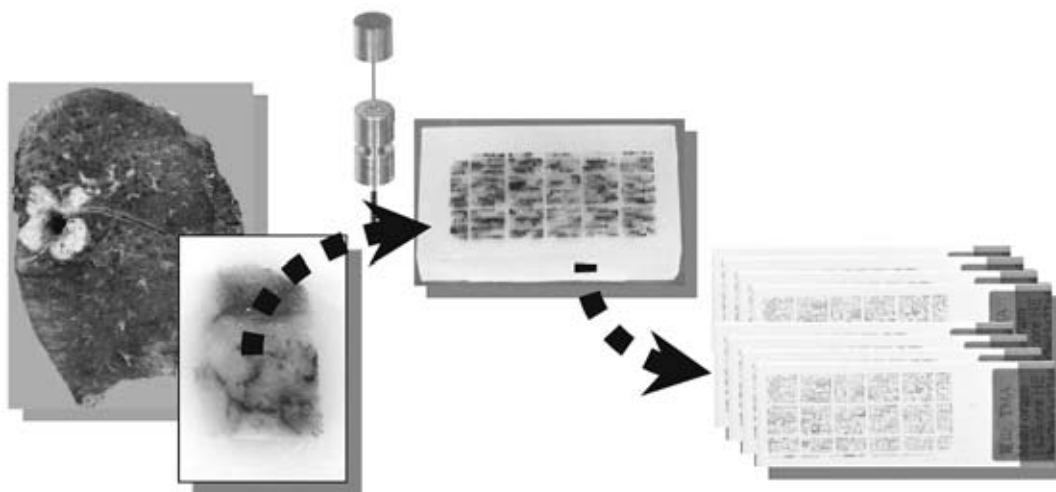


Figure 1. Tissue microarray (TMA) construction. These diagrams show the process of the TMA construction. Cylindrical tissue cores 0.6 mm in diameter are punched from a preselected region of donor paraffin blocks using a hollow needle, then transplanted to a recipient TMA block in an array fashion. Up to 1500 cores can be included in one block. Hundreds of section can be obtained from one TMA block.

を示している。⁶ 他方、分子標的治療は、従来の治療法より正常組織に対する安全性が期待されているにも関わらず、ゲフィチニブにおける間質性肺炎などの重篤な副作用が報告されており、これから解明すべき事柄も多い。がん縮小効果・副作用を改善した治療法の開発、最小限の治療法で最大の効果を得るようなプロトコルの確立、治療前の効果予測技術の進歩が望まれている。ここで、莫大な数の遺伝子における網羅的解析に大きく期待が寄せられたが、現時点においてがん治療プロトコルの確立は期待されたレベルに達していないと言わざるを得ない。これには、遺伝子の発現と生体機能の要を司る蛋白質の発現における無視できない不一致があることも一因しているであろう。組織アレイは、蛋白質の発現データを多くのコホートにおいて網羅的に取得することができる優れたツールであり、これからの肺がん治療に対して、大きく貢献するものと考えられる。

ここでは、組織アレイの特徴について述べ、今後の肺がん医療にどのように貢献することが可能であるか考察を加える。

1) 組織アレイの特徴

組織アレイは1998年にKononenらにより開発された比較的新しい研究技術である。⁷ ヒト組織は病理検査にて通常、パラフィンブロックに包埋され、永久標本として保存されており、必要に応じて数 μm 単位に薄切され、染色を行うことによって検討される。通常であれば、1個のブロックから1つの薄切スライドができ、100人分の検査を行うには、少なくとも100枚のスライドを作製、

染色検査を行う必要があった。1つのパラフィンブロックに数十から千余の検体コアを移植して検査を行う方法である組織アレイにより、時間と費用が大幅に縮小されたのに加え、数十倍から千倍余のデータが一度の検査にて取得可能となった (Figure 1)。

2) 高集積組織アレイ

組織アレイは目的によって、「高集積組織アレイ」、「大径組織アレイ」、「細胞アレイ」、「カスタム組織アレイ」と呼ばれる異なったデザインで作製される。文献にみられる組織アレイは、肺がん300例や多種のがん600例の組織アレイのように一般的な疾患症例を多数含むものが多い。コアのサイズは目的によって様々であるが、0.6 mm ϕ か2 mm ϕ が繁用されている。

我々のグループでは、一般的な疾患をカバーし、膨大なデータベースの作成を目的とするアレイとして0.6 mm ϕ を使用し、スライド数を減らし症例数を増やすことに重点を置いている。このような小さいコアを多数含むアレイが「高集積アレイ」と呼ばれており、コアの数が多いため、圧倒的な統計学的パワーを発揮する (Figure 2)。コアのサイズが小さいことから、高集積アレイは組織内における染色性のばらつきが問題視されることがあるが、通常のがんにみられる染色性のばらつき (tissue heterogeneity) は、同じ組織から採取するコア数を2~3個に増やすことでカバー可能である。⁸

3) 組織アレイとデータベース

我々は、組織アレイを用いた免疫染色や *in situ* hybridization など得られた莫大な量の画像、臨床情報、解析

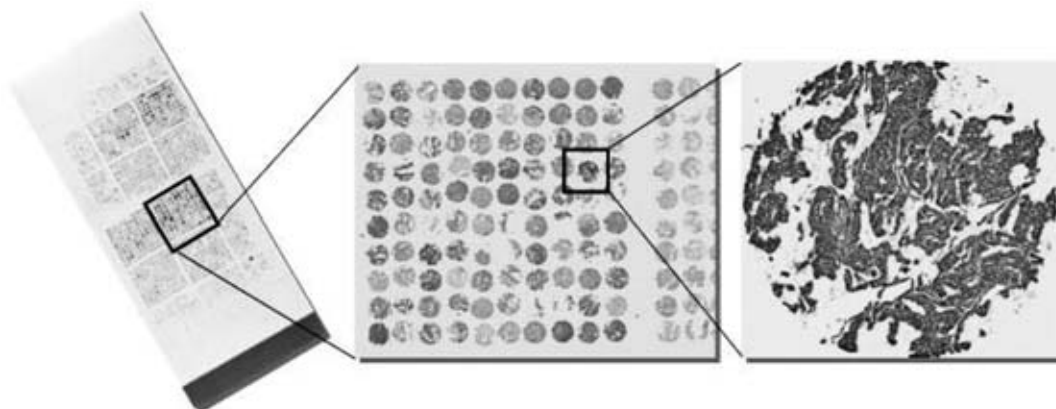


Figure 2. High density lung cancer TMA. One lung cancer TMA holds duplicated samples from the tumor, one core from normal lung in the same cases, and 25 control samples from common cancer tissues excluding lung cancer. A total of 1225 samples are included in the same TMA slide.

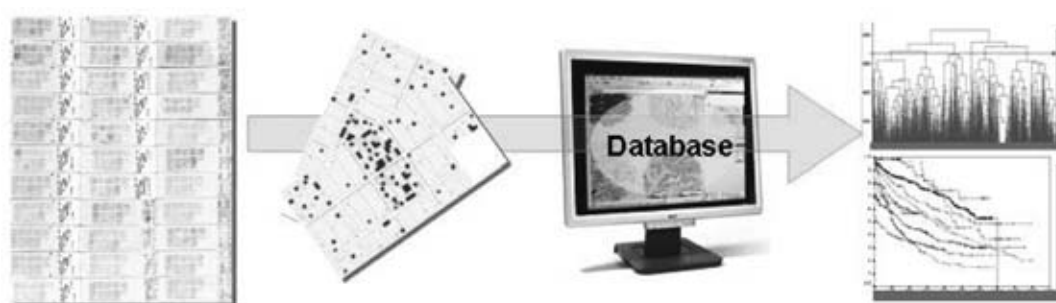


Figure 3. Image of lung cancer TMA database and its use to find biomarkers. Using our TMA containing 1150 cores from 14 common cancer types, the expression data of over 150 markers along with scanned images of those slides and clinical data of patients have been acquired. Part of the preliminary database is available at <http://www.hosp.u-toyama.ac.jp/lpathol/index.html>.

データを蓄積し、データベースを作成している (Figure 3). 臨床情報は専用のフォームに入力し、それらの項目と染色データを直結することにより、スムーズに解析が可能である。また、染色部位、分布、周辺組織の染色性のような数値に表れないデータの保存として画像データベースも重要である。臨床情報と発現データの蓄積により、後述するバイオマーカーや予後、治療決定因子を発見することができ、将来のオーダーメイド医療につながる「がん」を規定するプロファイルとなる可能性がある。

欧米では、著名な大学、医療センターを中心に各々の機関独自の組織アレイデータベースが作成されている。Table 1 に膨大なデータベースを有する北米施設の一部につきウェブページリストを挙げたので参考にされたい。

4) 組織アレイと臨床応用

A) 染色のコントロール

免疫染色は、その評価が主観的であることに加え、プ

ロトコール間や施設間による免疫染色性のばらつきを伴うことが良く知られている。こういったばらつきを補正するツールとして組織アレイが使用されている。乳がん分子標的治療薬としてトラスツズマブ (ハーセプチン®) が遺伝子工学技術により作製された。これは HER2/neu 蛋白を過剰発現している腫瘍細胞を標的として特異的に結合することにより、腫瘍細胞の増殖を阻害する単クローン抗体薬である。薬剤の投与基準として病理検体を用いた免疫染色 (HercepTest™ II®) が体外診断用医薬品として使用されている。HER2 の発現を免疫染色にて検討して臨床応用するわけであるが、上述した染色のばらつきを補正する目的で、アレイスライドがコントロールとして提供されている。

病理診断において免疫染色をはじめとする分子診断は必要不可欠な検査であるが、これらの診断を大きく左右するマーカーの染色性を精度管理するツールとして組織アレイは有用である。

Table 1. Tissue Microarray Project and Database in United States

National Cancer Institute
http://ccr.cancer.gov/tech_initiatives/tarp/default.asp
Columbia University Health Science Division
http://icg.cpmc.columbia.edu/cattorette/Protocol/Immunohistochemistry/TissueArray.html
Stanford University
http://tma.stanford.edu/tma_portal/index.shtml
Yale University School of Medicine
http://tissuearray.org/yale/
National Human Genome Research Institute
http://www.genome.gov/10000580
University of British Columbia
https://www.gpecimage.ubc.ca/tma/web/viewer.php
University of California, LA
http://www.genetics.ucla.edu/tissuearray/
MD Anderson Cancer Center
http://bioinformatics.mdanderson.org/tad.html
Johns Hopkins University
http://tmalab.jhmi.edu/index.html?SMSESSION=NO

B) バイオマーカー発見ツールとしての組織アレイ

今日、多くのバイオマーカーが発見されているが、今後この発見はさらに進むことが予想される。バイオマーカーの一部は、遺伝子アレイなどによって目的の疾患に特徴的に発現あるいは欠損することが判明した遺伝子が候補となり、候補遺伝子のプローブもしくは、生成物である蛋白質に対する抗体による染色を組織アレイに対して行うことで検証され、同定される。⁹ しかし、組織アレイのみを使用した研究から同定されたマーカーも少なくない。^{10,11} また、時には「偶発的」にマーカーが発見されることもある。¹² 偶発的なマーカーの同定には、ウエスタンブロットなどによってその蛋白質が存在することの確認や、蛋白機能の解明、古典的な病理スライドを用いた検証あるいは他のコホートでの再現性の確認などが必要となる。

C) オーダーメイド医療と組織アレイ

膨大な臨床および発現データベースが作成されれば、予後因子や、治療に反応および抵抗性を示す因子などが多数発見されるであろう。レトロスペクティブな解析によりはじき出されたこれらの因子のコンビネーションにより、がん患者にとって有効な治療方針を立てることができる。このようなデータに基づいた治療方法の選択は現時点では行われていないが、プロスペクティブな治験によってデータの有効性が証明されれば、オーダーメイド医療の糸口となる可能性がある。単一機関にて取得されるコホートにて得られたデータには偏りの生じる可能性が高いため、複数施設の共同にてデータベースを作成することが望ましい。

D) 薬剤感受性の検証

薬剤治療症例の蓄積が増えると、このデータベースを用いて、がん細胞の薬剤感受性を規定する蛋白の解析が可能となる。これにより、薬剤感受性の診断だけでなく、薬剤治療効果の向上因子、重篤な副作用を示唆する因子、新規創薬のターゲット分子などが同定されるであろう。また、新しい抗体薬を開発する際に、その抗体が症例中にどの程度病変を認識するかを調べるのが可能である。

まとめ

組織アレイは、比較的新しい研究技法であり、現在がんの治療に対して直接的に寄与するものではない。しかし、近い将来に実現するがんに対するオーダーメイド医療に欠かせない技術になると考えられる。十分なデータを集積したデータベースが「がんの個別化」を行う際に大きく貢献することに疑いはない。高集積組織アレイは手術検体からの作製が主体となる。肺がんの年間手術症例が100例を超える施設は全国で30~40程度であることから、アレイ作製に十分な組織を有する症例の収集を考えると、施設の相互協力がなければ良いデータベースの作成は困難であろう。遺伝子アレイとともに組織アレイによる十分なデータを蓄積し、オーダーメイド医療を含めた医学進歩のために、共同研究の輪を広げ、可能な限り公開と共有を心がけたい。

組織アレイが登場してまもなく10年が経ち、世界では多くの組織アレイセンターが設立されているが、日本は未だ発展途上である。日本の各施設の規模を考えれば、

個々の機関が独自のデータベースを作成するよりも大きなグループによってデータベースを作成し、共有することが望ましいと考える。公的資金の補助に加え、強いリーダーシップと施設相互の理解・協力が望まれる。

REFERENCES

1. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol*. 2003;21:2237-2246.
2. Kaiser J. War on cancer. NCI goal aims for cancer victory by 2015. *Science*. 2003;299:1297-1298.
3. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13306-13311.
4. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304:1497-1500.
5. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129-2139.
6. Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, et al. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect*. 2003;111:1411-1420.
7. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4:844-847.
8. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol*. 2001;158:1245-1251.
9. He P, Varticovski L, Bowman ED, Fukuoka J, Welsh JA, Miura K, et al. Identification of carboxypeptidase E and gamma-glutamyl hydrolase as biomarkers for pulmonary neuroendocrine tumors by cDNA microarray. *Hum Pathol*. 2004;35:1196-1209.
10. Tsurutani J, Fukuoka J, Tsurutani H, Shih JH, Hewitt SM, Travis WD, et al. Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small-cell lung cancer tumors. *J Clin Oncol*. 2006;24:306-314.
11. Fukuoka J, Fujii T, Shih JH, Dracheva T, Meerzaman D, Player A, et al. Chromatin remodeling factors and BRM/BRG1 expression as prognostic indicators in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:4314-4324.
12. Fukuoka J, Dracheva T, Shih JH, Hewitt SM, Fujii T, Kishor A, et al. Desmoglein 3 as a prognostic factor in lung cancer. *Hum Pathol*. 2007;38:276-283.