

肺癌の転移・予後に関連するマイクロアレイ解析

稲村健太郎¹・石川雄一¹

要旨 — **目的.** ヒトゲノムプロジェクトを駆動力とするヒトゲノム解析が急速に進展している。現在、マイクロアレイを用いることにより、ほとんど全ての遺伝子を同時かつ包括的にモニタリングすることが可能となった。癌は複数の遺伝子異常の蓄積により発生する病態であり、癌の発生・進展にかかわる多数の遺伝子を体系的に解析することは必須であり、そのツールとしてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析が注目されて久しい。**結果.** 本稿では肺癌マイクロアレイ解析の変遷を肺癌の悪性度・予後に注目して紹介するとともに、我々の行ってきた解析、①肺扁平上皮癌における階層クラスタリングと non-negative matrix factorization を用いたマイクロアレイ解析、②高悪性度内分泌性腫瘍の組織学的分類と遺伝子発現プロファイル解析、③同一病変内の肺腺癌の heterogeneity と転移能の解析を紹介するとともに、肺癌の転移・予後に関連するマイクロアレイ解析について述べたい。(肺癌. 2008;48:247-253)

索引用語 — 肺癌, マイクロアレイ, 発現プロファイル, 分類, マイクロダイセクション

Microarray Analysis for Detection of Metastasis and Evaluation of Prognosis in Lung Cancers

Kentaro Inamura¹; Yuichi Ishikawa¹

ABSTRACT — **Objective.** Since the commencement of human genome projects, molecular analysis of human tissues has become much easier. Now we can monitor expression of most genes simultaneously and comprehensively using microarray technologies. It is well known that cancers develop from accumulations of multiple gene abnormalities and signal pathway alterations, and therefore we must systematically analyze many genes to elucidate the genesis and progression of tumors. **Result.** In this review article, we describe some results of comprehensive analysis of gene expression that are useful for classification of heterogeneous lung tumors and help to understand their biological natures. We introduced a new clustering technique, called non-negative matrix factorization (NMF) to subclassify squamous cell carcinoma of the lung. We also analyzed neuroendocrine tumors and found a group with very good prognosis, independent of small-cell or large-cell neuroendocrine carcinoma histologies. Further, we described recent studies on metastatic potentials of lung cancer, including our own results on metastatic signature analysis of heterogeneous lung adenocarcinomas as well as some other models of prediction of prognosis or metastasis using small numbers of genes. (*JJLC*. 2008;48:247-253)

KEY WORDS — Lung cancer, Microarray, Expression profiling, Classification, Microdissection

¹(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，〒135-8550 東京都江東区有明 3-10-6 (e-mail: ishikawa@jfcrc.or.jp)。

¹Department of Pathology, The Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research (JFCR), Japan.

Reprints: Yuichi Ishikawa, Department of Pathology, The Can-

cer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research (JFCR), 3-10-6 Ariake, Koto-ku, Tokyo 135-8550, Japan (e-mail: ishikawa@jfcrc.or.jp).

Received February 19, 2008; accepted June 12, 2008.

© 2008 The Japan Lung Cancer Society

はじめに

ヒトゲノムプロジェクトを駆動力とするヒトゲノム解析が急速に進展している。現在、マイクロアレイを用いることにより、ほとんど全ての遺伝子を同時かつ包括的にモニタリングすることが可能となった。癌は複数の遺伝子異常の蓄積により発生する病態である。癌の発生・進展にかかわる多数の遺伝子を体系的に解析することは必須であり、そのツールとしてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析が注目されて久しい。また laser capture microdissection (LCM) 法が開発され、レーザー光を用いて組織切片から目的細胞だけを捕捉することが可能となった。LCM を用いると、周囲間質を含まない癌細胞だけを選択的に採取でき、癌細胞だけの遺伝子発現レベルをすることができる。本稿では、肺癌のマイクロアレイ解析の現状を、我々の研究成果を交えて紹介したい。

肺癌におけるマイクロアレイ解析の先駆け

肺癌は病理組織像によって小細胞癌と非小細胞癌に大別され、さらに非小細胞癌は腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌に分類される。2001年の11月に、肺癌におけるマイクロアレイ解析の先駆的な研究成果がStanford大学¹とHarvard大学²のグループから同時に発表された。遺伝子発現プロファイルに基いた肺癌分類は従来から用いられていた組織学的分類と概ね一致しており、各組織型に特徴的な発現プロファイルが抽出された。小細胞癌に特徴的なマーカーとしては insulinoma-associated gene 1 (IA-1) や human achaetescute homolog 1 (hASH1) などが認識された。またこれらの神経内分泌マーカーは小細胞癌だけでなく同じく神経内分泌性腫瘍であるカルチノイドとも共通するマーカーであった。扁平上皮癌の分化マーカーとしては keratin 5 (KRT5), KRT17 や扁平上皮の分化にかかわるとされる p63 遺伝子 (TP73 L) が認識された。また、従来から指摘されていた腺癌の多様性を裏づけるかたちで、腺癌はいくつかの特徴的なサブクラスに分類された。そのうちのひとつのサブグループは IA-1 や hASH1 などの神経内分泌マーカーを特徴的に高発現していた。この神経内分泌マーカーを高発現するサブグループは他の腺癌と比べ有意に予後が悪かった。² 神経内分泌の特徴を持つ肺非小細胞癌が予後不良であるかどうかは興味深く、本報告後も免疫染色などを用いて研究が行われている。González-Aragoneses らは 162 例の肺扁平上皮癌、156 例の肺腺癌に対し免疫染色を行い、神経内分泌マーカーのひとつであるシナプトフィジン染色陽性の Stage I の扁平上皮癌、および腺癌はシナプトフィジン陰性のものより予後が悪いという報告をした。³ しかし別のグループの Ionescu らは 609 例の非小細胞癌

に対し、クロモグラニン A, シナプトフィジン, NCAM の免疫染色を行い、非小細胞癌の持つ神経内分泌特性は予後も悪くなく、臨床的特徴に乏しいという報告をしている。⁴ 今後もさらなる研究がなされるだろう。複数みられたサブグループの中には II 型肺胞上皮のマーカーを特徴的に高発現するものもあった。このサブグループでは TTF1 や surfactant protein 遺伝子が高発現していた。

肺癌転移・予後に関連するマイクロアレイ解析

上記のとおり、Stanford 大学のグループ¹ と Harvard 大学のグループ² が世界に先駆けて、マイクロアレイ解析により肺腺癌を予後に差のあるサブグループに分類した。予後不良群として認識されたひとつのサブグループは神経内分泌特性を持っていた。それ以来、マイクロアレイ解析を用いた非常に多くの研究が報告されている。

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 セットに分け、training セットで予後と最も相関する 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を試した。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。⁵ 未だ転移のない stage I の腫瘍を予後良好群と不良群に分けることができるというこの報告はインパクトのあるものだった。

Ramaswamy らは、肺癌を含む固形癌において、転移に関連する特徴的な遺伝子発現パターンが存在するという興味深い研究を報告している。⁶ 肺癌、大腸癌、乳癌など多種の腺癌を対象として、異なる症例由来の原発巣 (64 症例) と転移巣 (12 症例) の遺伝子発現プロファイルを比較検討し、128 個の転移関連遺伝子セットを抽出した。さらに、肺癌の原発巣 (62 症例) を用いて絞り込んだ 17 個の転移関連遺伝子セットを用いて、肺癌のみならず乳癌、前立腺癌といった腺癌症例でも、これら 17 遺伝子が転移に関与していることを示した。彼らは原発巣と転移巣とを比較し、転移巣に特徴的な発現パターンを抽出するだけでなく、原発巣の中にはその転移巣に特徴的な発現パターンを示す予後不良群があることを示した。この発見は「原発巣のごく一部の癌細胞がより悪性転化して転移するという」従来の考え方に疑問を投げかけ、「転移する癌の原発巣の大部分の癌細胞は、転移するポテンシャルを持っている」という新説を提唱した。しかし、これに対し Liotta と Kohn は疑問を投げかけた。⁷ Ramaswamy らの実験はサンプルを microdissection しておらず、腫瘍と間質の両方の発現プロファイルをみているため、彼らの示した転移関連遺伝子セットは癌細胞そのもの由来なのか、癌細胞に対する宿主すなわち間質

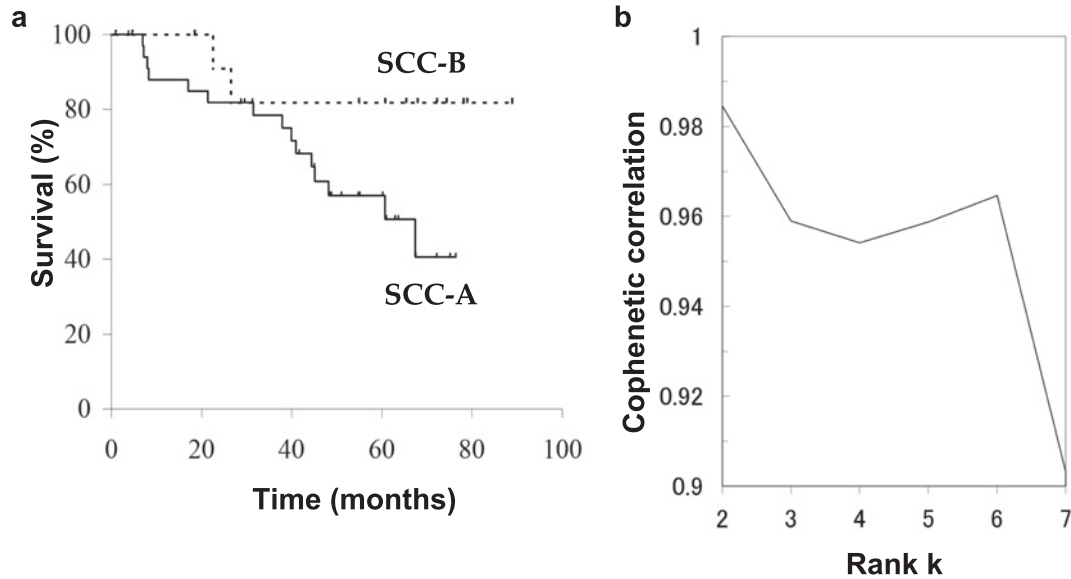


Figure 1. (a) Kaplan-Meier survival curves for the 48 SCC patients (SCC-A vs SCC-B). (b) Cophenetic correlation coefficients for the hierarchically clustered matrices.

の反応をみているのか不明瞭のままである。実際、彼らの転移関連遺伝子セットの中には間質のコラーゲン遺伝子が2つも含まれている。

多くの研究で、転移リスクによって担癌患者を分類する発現プロファイルが報告されているが、そのほとんどが retrospective な研究である。最近になって、Potti らは発現プロファイリングによって stage IA 期の肺非小細胞癌患者の転移リスクを評価できる “lung metagene model” なるものを発見し、⁸ この “lung metagene model” の prospective なランダム化臨床試験を実施しようとしている。

肺扁平上皮癌における階層クラスタリングと non-negative matrix factorization を用いたマイクロアレイ解析

肺の扁平上皮癌は、4大組織型の中では2番目に多く肺癌全体の約30%を占める。分化度などの組織学的分類が存在するが、腺癌とは異なり臨床的予後との相関は明瞭でなく、有用性は高くない。悪性度や予後と相関する臨床的に有用な分類作成が求められており、我々はマイクロアレイ解析により臨床に活用できる分類作成を試みた。⁹ 得られた遺伝子発現データの解析には従来から用いられてきた階層クラスタリングに加えて、non-negative matrix factorization (NMF) という新しいアプローチを用いた。階層クラスタリングは入力する遺伝子の選択による影響を受けやすいという欠点があるのに対し、NMFは入力する遺伝子による影響を受けにくく、さ

らにクラスタリングの定量的評価が可能であり、最近注目されている手法である。¹⁰ 階層クラスタリング、NMF (Figure 1) とともに扁平上皮癌を予後に有意な差のある2群に分類し (Figure 1a)、また共表形相関係数も $k=2$ 分類で最も高く (Figure 1b)、扁平上皮癌を2群に分類することの妥当性を定量的に示した。予後不良群で発現が高かった遺伝子には細胞増生に関与するものが多く、予後良好群で発現が高かった遺伝子には細胞機能に関与するものが目立った。

肺扁平上皮癌だけの microarray 解析のデータはほとんどない (頭頸部領域扁平上皮癌のデータの方が多) が、非小細胞癌として扱われている例は多い。最近になって、Sun らのグループは、重複せず、細胞型によらない遺伝子発現 signature を明らかにして、肺腺癌および肺扁平上皮癌の予後を推測することに成功している。¹¹ また Yanagisawa らはマイクロアレイではないが、mass spectrometry を使って、174例の非小細胞癌と27の正常肺を test セットと validation セットに分けて、予後と相関する、25の蛋白 signature を発見した。¹²

高悪性度内分泌性腫瘍の組織学的分類と遺伝子発現プロファイル

高悪性度内分泌性腫瘍 (HGNT, high-grade neuroendocrine tumor) は大細胞癌の亜型である大細胞神経内分泌癌 (LCNEC, large-cell neuroendocrine carcinoma) と小細胞癌 (SCLC, small-cell lung carcinoma) からなる。LCNEC と小細胞癌は、典型的なもの以外は組織像があ

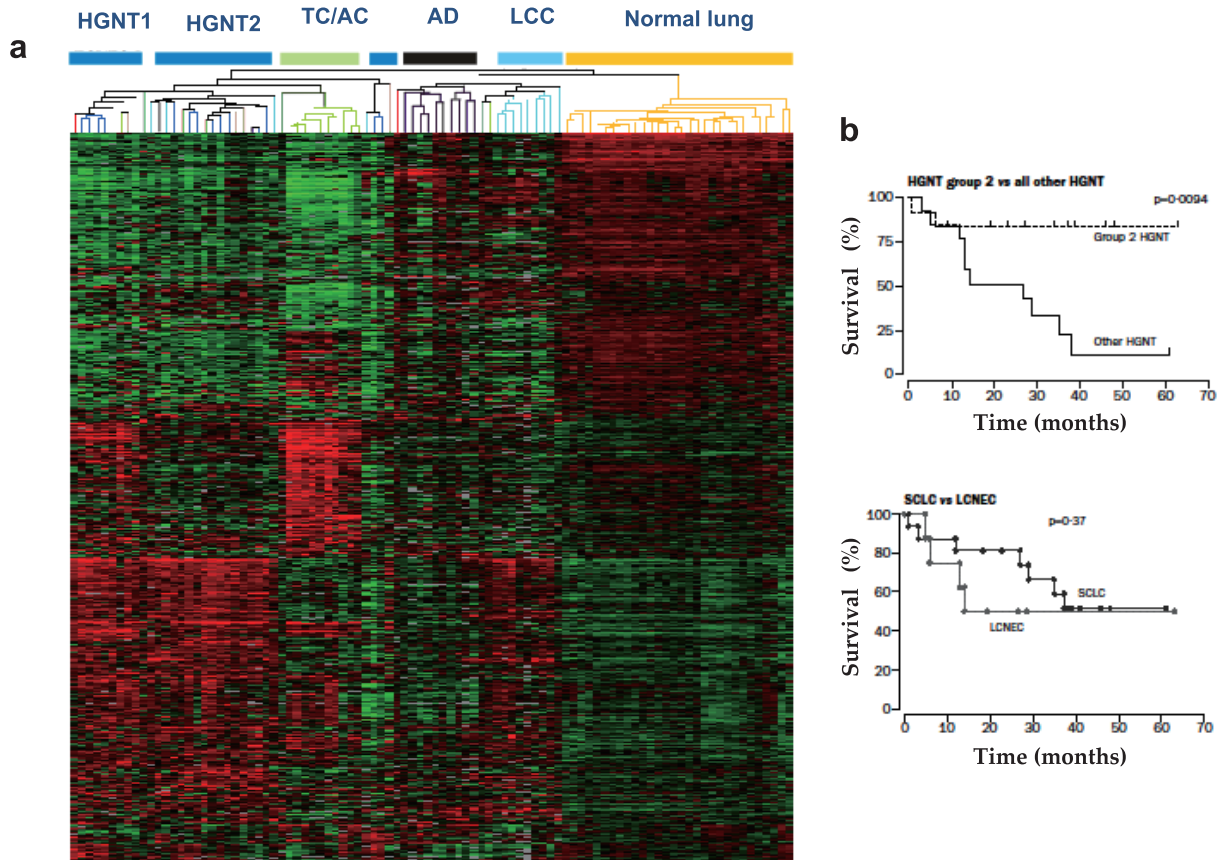


Figure 2. (a) Unsupervised hierarchical clustering of 64 lung cancer and 30 normal lung samples against 2,803 genes with expression differentially regulated in neuroendocrine tumors. HGNT, high grade neuroendocrine tumor; TC/AC, typical carcinoids/atypical carcinoids; AD, adenocarcinoma; LCC, large cell carcinoma. (b) Kaplan-Meier survival curves for patients with HGNTs in group 2 and all other HGNTs and for histopathologically diagnosed SCLC versus LCNEC. SCLC, small-cell lung carcinoma; LCNEC, large-cell neuroendocrine carcinoma.

る程度似ており、肺癌に慣れた病理医でも診断に差の出ることがある。そこで我々は、正常肺、多種の肺腫瘍を混じえてHGNTのマイクロアレイ解析を試みた。13階層クラスタリングによりカルチノイド(TC/AC, typical carcinoid/atypical carcinoid)、大細胞癌(LCC, large cell carcinoma)、腺癌(AD, adenocarcinoma)、正常肺はそれぞれ明瞭なクラスターを形成した(Figure 2a)。しかし、HGNTはLCNECとSCLCには分類され得ず、そのかわり、HGNTは小細胞癌とLCNECの分類とは独立して、予後に差のある2群のHGNTサブタイプに分かれた(Figure 2b, $P=0.0094$)。いずれのサブタイプにも、SCLCとLCNECが含まれていた。これはSCLCとLCNECに予後に差がない($P=0.37$)ことを考えると実に興味深い結果である。

同一病変内の肺腺癌の heterogeneity とリンパ節転移能

肺癌の病理組織像は多様性に富んでいる。肺癌は病理組織像によってAD, SCC, LCC, SCLCの4つに大別される。その上、同じADにも多種の亜型が存在し、同一病変内でも複数の成分を持つことが多い。例えば、病巣の大部分は線維芽細胞増生や瘢痕形成など浸潤像がみられるものでも、病巣の辺縁部では肺胞壁を這う *in situ* な成分がみられることが多い。“肺腺癌の中心部と辺縁部とは、中心部の方がより進行した癌であるか、一見そうみえるが、周辺部も悪性度は中心部と同じなのか。”この疑問に答えるために、我々は中分化腺癌の原発巣の大部分にみられる中分化腺癌成分(P: Primary)と辺縁部の高分化腺癌成分(Pw: Primary, well-differentiated)とをLCMにより取り分けて解析した(Figure 3)¹⁴。またリンパ節転移陽性群(n+)と陰性群(n-)に分け、陽

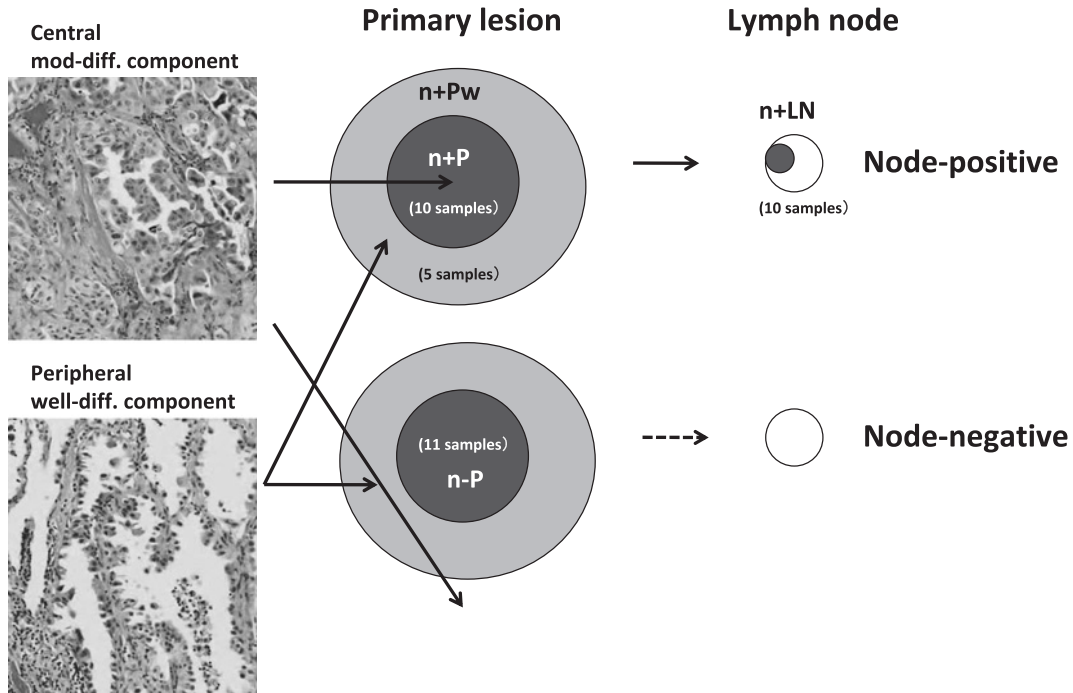


Figure 3. Schematic design of this study. n+P, node-positive primary tumor; n-P, node-negative primary tumor; n+LN, node-positive lymph node; n+Pw, well-differentiated component of the node-positive primary tumor. Representative microscopic images of primary lung adenocarcinomas used in this study are shown, consisting of moderately-differentiated components dominating large portions of the lesions and well-differentiated components evident in peripheral portions.

性群からは転移した癌細胞 (n+LN) も LCM により採取した。

まずは、リンパ節転移のある癌の原発巣と転移巣で有意な発現差のある遺伝子があるか検定した。しかし、リンパ節転移巣とその原発巣のあいだには転移に関与する遺伝子発現変化を抽出できなかった。そこでリンパ節転移のあった癌原発巣となかった癌原発巣で発現差のみられる遺伝子を抽出した。検定の結果、両者で有意に発現差のあった 75 遺伝子を抽出することができた。この 75 遺伝子の中には stage I の肺腺癌の予後と有意に相関する HOXB2 が含まれていた。¹⁵ 同定されたリンパ節転移に関与すると考えられる 75 遺伝子により全サンプルを階層クラスタリングした (Figure 4)。リンパ節転移陽性のサンプル群は原発巣、転移巣ともに独立した群を形成した。リンパ節転移陰性のサンプル群は正常肺とともにクラスターされた。すなわち、転移 signature を示す 75 遺伝子の発現からみて、リンパ節陰性群は正常肺と同じなのであり、リンパ節転移陽性群だけが、転移能を獲得していると考えられる。さらに、高分化成分も転移陽性群としてクラスターされたことから、原発巣辺縁の高分化成分でも転移能を有しているのではないかと推測される。

マイクロアレイの問題点と現状

現在、マイクロアレイは個々の研究所・病院で各々 RNA を採取し、そこから expression データを得ているが、RNA のクオリティ (RNA のクオリティは 10 分単位で落ちていく)、間質細胞のコンタミネーションとの関連 (microdissection をしているのかどうか)、さらには手術時の麻酔薬や虚血の程度、手術時間の影響までデータに影響を及ぼす可能性がある。このような因子も各施設で異なるであろうし、この差異が与える影響も無視できないだろう。これらの因子が、実際選ばれる遺伝子のオーバーラップがほとんどないことの理由のひとつである可能性がある。Ein-Dor らは頑強な予後を推測できる遺伝子セットを作るには何千もの数のサンプルが必要であると報告している。¹⁶ 百程度のサンプル数では重複遺伝子がほとんどないのも納得できる。

これらのマイクロアレイの問題点を解決する手法として Gene set enrichment analysis (GSEA) や pathway analysis といった手法が開発されている。遺伝子発現データをなんらの遺伝子についての知識なしに使用するよりも、遺伝子同士の関係など、データの高次構造を意味する方がアレイデータの意味を正しく解釈することが

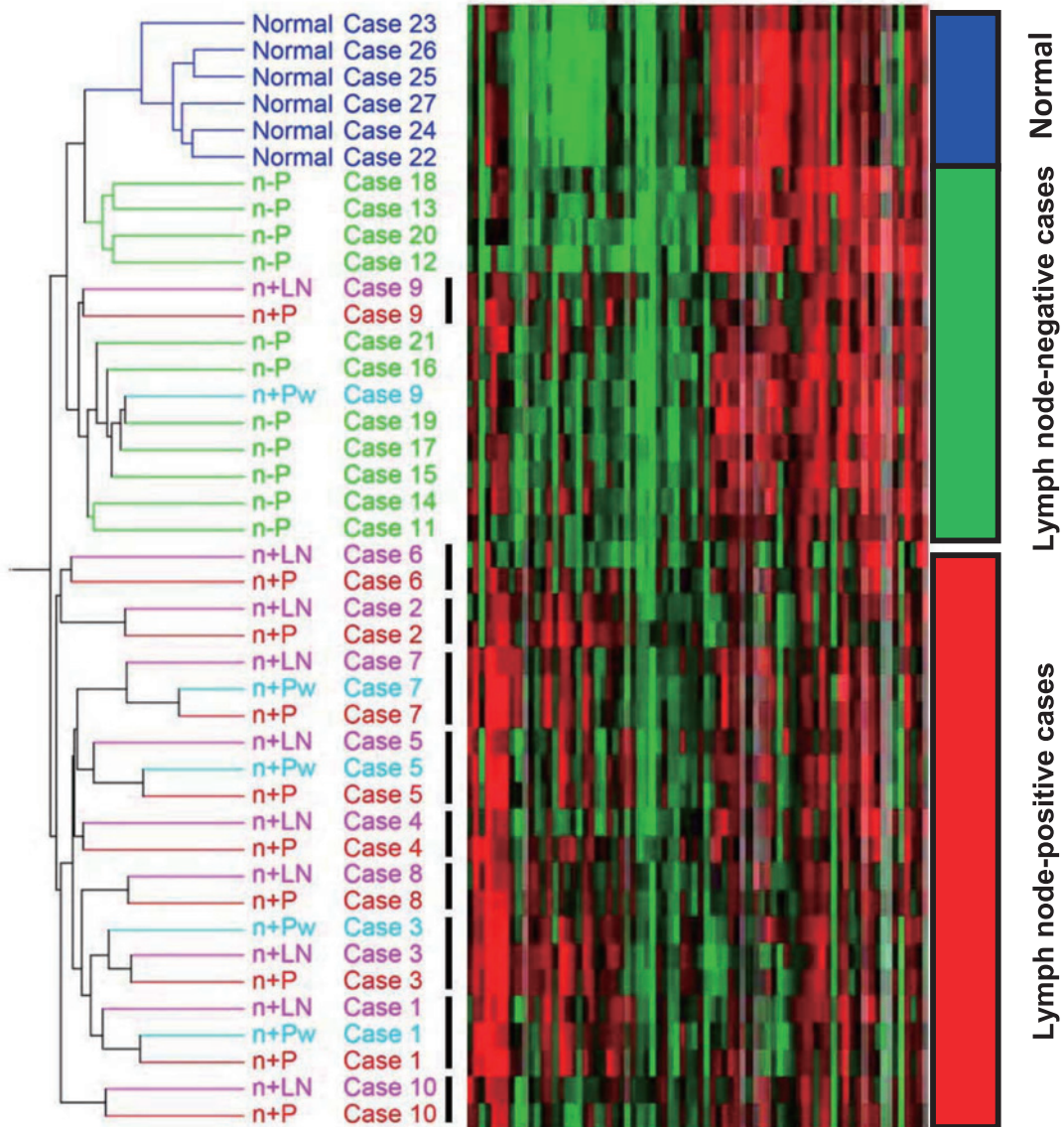


Figure 4. Hierarchical clustering for the 75 genes against 42 samples comprising 10 pairs of node-positive primary tumors (n + P; red) and node-positive lymph nodes (n + LN; pink), 11 node-negative primary tumors (n - P; green), 5 well-differentiated components of the node-positive primary tumors (n + Pw; light blue), and 6 normal tissues (Normal; blue). Remarkably, 9 of the 10 node-positive cases formed a distinct independent group. Pairs of primary and metastatic tumors clustered next to each other (bars).

できると考えられる。最近提唱された方法は GSEA と呼ばれるものである。¹⁷ GSEA では選択された発現プロファイル中に他のカテゴリーのそれに比べて、多数の既知の遺伝子間関係（ネットワーク）のうち、特に豊富に検出されるものを選択する。そうした既知の遺伝子パスウェイは機能的なパスウェイ KEGG や GenMAPP のみならず、染色体上の位置や染色体増幅の単位、あるいは以前に同定された臨床形質と関係する遺伝子 signature などに含まれる機能的遺伝子群なども含めることもあ

る。この方法の利点は遺伝子パスウェイや機能的グループで定義される機能的文脈で、遺伝子発現プロファイルをみることのできる、定量的濃縮スコアを算出できることである。

おわりに

本稿では、肺癌組織のマイクロレイ解析の具体例として、我々の行った解析を中心に紹介した。現在、多くのマイクロレイ結果が蓄積しているが、retrospective

な研究が多く、prospectiveなものほとんどない。今後は translational research により、得られた膨大な研究データから臨床応用、臨床治療へと結びつけていくことが切に望まれている。今後の展望としては、予後不良群の癌であることが、癌の expression profile からわかれば、術後化学療法を施行したり、生検の段階で予後良好群であることがわかれば、リンパ節郭清する範囲の縮小などが可能となるだろう。

REFERENCES

1. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:13784-13789.
2. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:13790-13795.
3. González-Aragoneses F, Moreno-Mata N, Cebollero-Presmanes M, García-Yuste M, Cañizares-Carretero MA, Molins-López-Rodó L, et al. Prognostic significance of synaptophysin in stage I of squamous carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2007;110:1776-1781.
4. Ionescu DN, Treaba D, Gilks CB, Leung S, Renouf D, Laskin J, et al. Non-small cell lung carcinoma with neuroendocrine differentiation—an entity of no clinical or prognostic significance. *Am J Surg Pathol*. 2007;31:26-32.
5. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2002;8:816-824.
6. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*. 2003;33:49-54.
7. Liotta LA, Kohn EC. Cancer's deadly signature. *Nat Genet*. 2003;33:10-11.
8. Potti A, Mukherjee S, Petersen R, Dressman HK, Bild A, Koontz J, et al. A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:570-580.
9. Inamura K, Fujiwara T, Hoshida Y, Isagawa T, Jones MH, Virtanen C, 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.
10. Brunet JP, Tamayo P, Golub TR, Mesirov JP. Metagenes and molecular pattern discovery using matrix factorization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:4164-4169.
11. Sun Z, Wigle DA, Yang P. Non-overlapping and non-cell-type-specific gene expression signatures predict lung cancer survival. *J Clin Oncol*. 2008;26:877-883.
12. Yanagisawa K, Tomida S, Shimada Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. A 25-signal proteomic signature and outcome for patients with resected non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99:858-867.
13. Jones MH, Virtanen C, Honjoh D, Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, 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.
14. Inamura K, Shimoji T, Ninomiya H, Hiramatsu M, Okui M, Satoh Y, et al. A metastatic signature in entire lung adenocarcinomas irrespective of morphological heterogeneity. *Hum Pathol*. 2007;38:702-709.
15. Inamura K, Togashi Y, Okui M, Ninomiya H, Hiramatsu M, Satoh Y, et al. HOXB2 as a novel prognostic indicator for stage I lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol*. 2007;2:802-807.
16. Ein-Dor L, Zuk O, Domany E. Thousands of samples are needed to generate a robust gene list for predicting outcome in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:5923-5928.
17. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. 2003;34:267-273.