



ること、また、その検証を行うことを目的とした。

乳がん 10 系、肝がん 12 系、胃がん 20 系、計 42 系のヒトがん由来培養細胞株について Atlas Human 3.6 Array (clontech) を用いて 3393 遺伝子の発現を測定し、標準化を行った後、データベース化した。抗がん剤感受性とは無関係に、これらの遺伝子発現量を変数とし、細胞株を平均連結法による階層的クラスタリングを行った結果、乳がん由来細胞株は単一のクラスターに、肝がん由来、胃がん由来細胞株も例外はあるがそれぞれ数個のクラスターに分類されることがわかった。このことから、培養細胞株は由来細胞の性質を保持しており、培養細胞株を用いても由来臓器による解析が可能であることが示唆された。

次に、抗がん剤感受性を規定する遺伝子群の予測を行った。SRB assay によって測定された増殖阻害曲線から算出された 50%増殖阻害濃度の絶対値( $|\text{Log}_{10}\text{GI}_{50}|$ )を指標として表される約 60 種の抗がん剤感受性情報と遺伝子発現情報とを Pearson の相関係数( $r$ )を用いて相関解析した。

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

$x_i$ : drug x sensitivity in each cell ( $|\log \text{GI}_{50}|$ )

$\bar{x}$ : average of drug sensitivity

$y_i$ : gene y expression level in each cell

( $\log_2$  [gene expression])

$\bar{y}$ : average of gene expression

解析対象遺伝子は 42 細胞中少なくとも 25 以上の細胞株でデータが得られており、そのうち 20 細胞株以上で発現が認められる 890 遺伝子とした。正の相関を示す遺伝子は発現量が高いほど、抗がん剤に対する感受性が高くなっており、抗がん剤感受性に関連していると予測される遺伝子である。一方、負の相関を示す遺伝子は抗がん剤耐性に関連があると予測される遺伝子である。このような解析を遺伝子と抗がん剤で約 6 万通りについて相関解析を行った。その一例として、表 1 に乳がん由来細胞株において DNA 二重鎖架橋による DNA 合成阻害を機序とする Mitomycin C (MMC) と相関のある遺伝子 ( $p < 0.05$ ) を相関係数順にソートしたリストを示す。これらの遺伝子は 1. 抗がん剤感受性を規定する遺伝子、2. 見かけ上抗がん剤感受性と連関のあるように見える遺伝子、3. False Positive Gene が含まれていると考えられる。

表 1. 乳がん由来細胞株における MitomycinC (MMC)感受性および耐性候補遺伝子リスト

GenBank は GenBank ID を r は Pearson の相関係数、p は p 値を表す。

**Sensitive**

	GenBank	r	p	description
1	M31682	0.9715	0.0003	inhibin beta-B subunit precursor (INHBB)
2	M59807	0.8384	0.0185	natural killer cells protein 4 precursor (NK4)
3	M11717	0.7507	0.0487	70-kDa heat shock protein 1 (HSP70.1; HSPA1)
4	AF075050	0.7350	0.0241	H YN88E09.1 PROTEIN
5	X69398	0.7167	0.0454	leukocyte antigen-related protein precursor (LAR)

**Resistant**

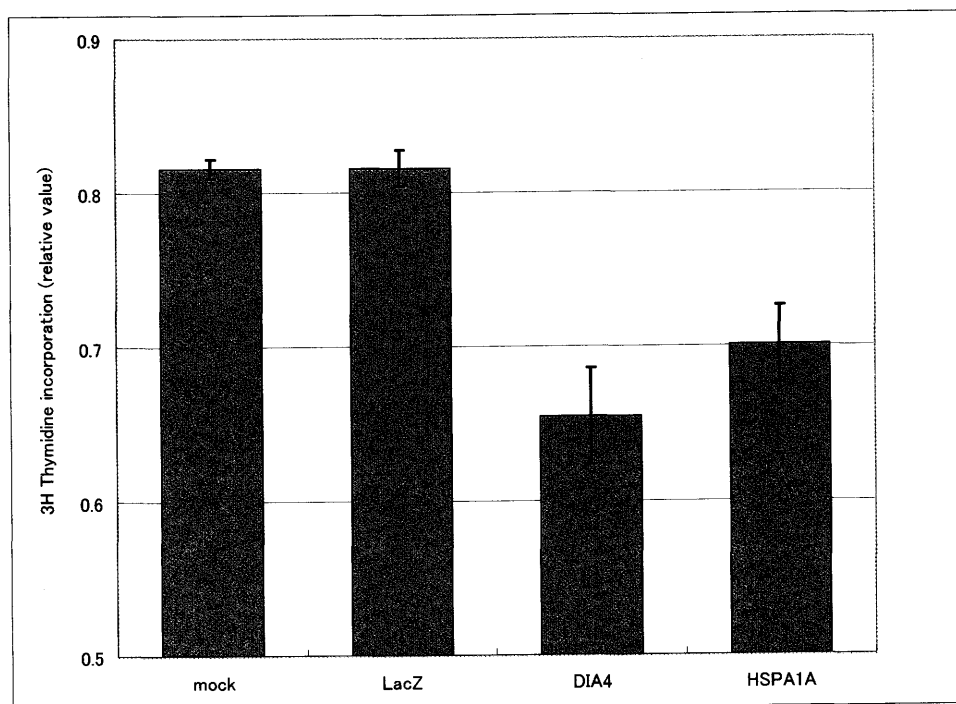
	GenBank	r	p	description
1	Y00282	-0.8820	0.0086	RIBOPHORIN II.
2	X83218	-0.8420	0.0175	OSCP
3	D50827	-0.8152	0.0255	calpain inhibitor; calpastatin (CAST)
4	D16593	-0.7759	0.0236	neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin
5	M28372	-0.7741	0.0242	cellular nucleic acid binding protein (CNBP)
6	U70671	-0.7721	0.0420	ATAXIN-2 RELATED PROTEIN
7	D49950	-0.7468	0.0333	interleukin-18 precursor (IL-18)
8	Y09689	-0.7274	0.0408	neurogranin (NRGN); RC3

相関解析で得られた抗がん剤感受性候補遺伝子の中から 1 の抗がん剤感受性を規定する遺伝子が抽出されているかどうか検討するために検証実験を行った。pcDNA3.1/myc-His A に挿入した候補遺伝子をヒト繊維肉腫細胞 HT1080 細胞に LipofectAMINE Plus 試薬を用いて導入した。導入 24 時間後に抗がん剤で 24 時間処理を行い、<sup>3</sup>H-Thymidine の取り込みを指標に抗がん剤感受性の変化を検討した。

図 1 に感受性候補遺伝子 HSPA1A(Hsp70.1)導入による 5nM MMC 処理時における MMC 感受性の変化を示した。既知の MMC 感受性遺伝子 DT-diaphorase を導入した HT1080 細胞の Thymidine 取り込みは抑制されている。このことから、抗がん剤感受性変化のスクリーニング系が構築されたことが確認できた。この系を用いて候補遺伝子導入による抗がん剤感受性変化のスクリーニングを行ったところ、コントロールである LacZ を導入した細胞は感受性の変化がみられないが、MMC 感受性候補遺伝子 HSP70.1 を導入した細胞において Thymidine 取り込みは抑制され、HSP70.1 は MMC 感受性を規定している遺伝子であることが示唆された。

図 1. 遺伝子導入による MMC 感受性変化

実験方法は本文参照。横軸に導入した遺伝子を縦軸に 5nm MMC 処理時の  $^3\text{H}$ -Thymidine 取り込み量を MMC 未処理時における  $^3\text{H}$ -Thymidine 取り込み量に対する相対値として表した。



以上の結果から、培養細胞株は遺伝子発現情報に由来臓器の特徴を反映しており、ヒトがんのモデルとして用いることができるが示唆された。また、cDNA アレイによる網羅的な遺伝子発現情報と抗がん剤感受性情報を Pearson の相関係数を用いて相関解析することにより感受性を規定すると予測された遺伝子のうち約 10%が実験的に同定されたことからこの手法は有用であり、各種の抗がん剤について同様の解析を展開することにより抗がん剤感受性を規定する遺伝子群を体系的に明らかにすることが可能と考えられる。抗がん剤の効果をその投与前に知ることであり、無用な薬剤投与が避けられ患者に対しての負担を軽減させることができると考えられる。このように本研究の成果は医療の現場に大きく貢献できる可能性を含んでいる。