

## 審査の結果の要旨

氏名 藤原 大

本論文は、肺がんのうち非小細胞肺がん、特に肺腺がんについて神経内分泌特性の面からマイクロアレイを用いて亜分類を行ったものである。肺がんは世界で最も一般的ながんであり、年間 100 万人以上、日本でも 5 万人以上が死亡している。肺がんの正確な診断を行うことは、治療を行う上で極めて重要な課題である。近年、DNA マイクロアレイ技術の進展に伴い、疾患を RNA の発現によって分類することが可能になっている。学位申請者藤原大は、肺腺がんについてマイクロアレイによる分類を行った。肺がんに関しては、従来、病理組織学的な分類が存在していた。肺がんを小細胞肺がんと非小細胞肺がんに分類するのがもっともよく知られた分類である。小細胞肺がんは神経内分泌特性をもつ肺がんである。その分類が 1999 年に更新され、新たに分類が加わったことにより議論が提起された。1999 年の World Health Organization (WHO) による肺がんの分類では神経内分泌腫瘍の概念が取り入れられた。肺がんを神経内分泌腫瘍と非神経内分泌腫瘍という概念で分類可能となった。さらに、大細胞神経内分泌がん(Large Cell Neuroendocrine Carcinoma)が分類に加わった。大細胞神経内分泌がんは、非小細胞肺がんであるにもかかわらず、神経内分泌特性をもち、高度に悪性の腫瘍であると認識される。大細胞神経内分泌がんを診断するのは熟練した病理医でも困難である場合があり、WHO 分類の更新以来検討が行われているところである。申請者らのグループは、神経内分泌腫瘍の分類についてマイクロアレイを用いて研究を行ってきており、独自の亜分類を提唱している。また、扁平上皮がんについても、マイクロアレイによって亜分類を同定した。本学位請求論文では、非小細胞肺がんの中でも肺腺がんについて、神経内分泌特性の面から分類を行っている。大細胞神経内分泌がんは診断に熟練を必要とするがんであるが、低分化の肺腺がんとの判別が困難なことが知られている。また、非小細胞肺がんの 10~20% に神経内分泌形態をもたないが、神経内分泌マーカーで染色される症例が存在することが知られており、その臨床的な意義は明らかになっていない。そのため様々な側面から検討が行われており、発現プロファイルによる分類もその一側面である。そこで、当申請者は、大細胞神経内分泌がんの診断に用いられる神経内分泌マーカーであるクロモグラニン A (Chromogranin A) とシナプトフィジン(Synaptophysin)、ASCL1 (Achaete-scute complex homolog 1 (Drosophila)) を起点として、遺伝子セット用いたマイクロアレイ分類を試みた。症例は、財団法人癌研究会附属病院で外科切除された肺がん症例 262 例(肺腺がん 171 例、扁平上皮がん 56 例、大細胞神経内分泌がん 8 例、小細胞肺がん 15 例、カルチノイド 12 例)と正常肺 30 例の総計 292 例であり、これを肺がんのデータセットとした。マイクロアレイには CHUGAI 41k アレイ(NCBI GEO GPL 962)という 40,368 プローブを搭載した cDNA マイクロアレイを用い

た。クロモグラニン A やシナプトフィジンは診断のマーカーとして著名な分子であるが、ASCL1 は、1997 年に肺における神経内分泌分化に重要であることが明らかになった転写因子である。2001 年に肺腺がんの発現プロファイルの階層クラスタリングによる解析で同定された予後不良のサブクラスで高発現していることが知られている。また、In Situ ハイブリダイゼーションによる検討では、神経内分泌腫瘍で陽性で、小細胞肺がんの陽性群は非陽性群より予後不良ということが報告されている。申請者は、まずクロモグラニン A、シナプトフィジン、ASCL1 について発現プロファイルから単プローブを抽出し、各一プローブに対して閾値を設定して分類を行い、生存解析を行った。その結果、いずれのプローブに対しても予後不良群は同定できなかつた。そこで、次に、遺伝子セットによる分類を試みた。遺伝子セットは、ある共通の意味をもった、遺伝子の集合のことである。遺伝子セットを活用して、マイクロアレイデータを解析し、生物学的な発見が行われている。遺伝子セットを作成するために、申請者は、共発現という指標を用いた。すなわち、クロモグラニン A、シナプトフィジン、ASCL1 と相関の高いプローブを 100 プローブ抽出し、共発現遺伝子セットとした。分類方法は、非負値行列分解 (Non-Negative Matrix Factorization: NMF) を用いた。非負値行列分解は、1999 年に提唱された独立成分分析の一種であり、データの部分的なパターンを認識することができる手法である。この手法は階層クラスタリングより遺伝子数に対して、正確でロバストな手法であり、自己組織化マップより安定である。コンセンサスマトリックスという手法から得られる共表現相関係数を指標とすることで分類の良さを客観的に分類可能である。3 つの遺伝子セットに対して、非負値行列分解法で分類を行ったところ、コンセンサスマトリックスからの共表現相関係数により、ASCL1 共発現遺伝子セットでは 3 分類が、クロモグラニン A とシナプトフィジンでは 2 分類が最も良い分類であることが明らかになった。それぞれの分類について生存解析を行ったところ、クロモグラニン A とシナプトフィジンの共発現遺伝子セットによる分類については生存に差がなかったが、ASCL1 共発現遺伝子セットによる分類では予後に差を認めた ( $p=0.0075$ )。ASCL1 共発現遺伝子による分類各 3 群に対して、含まれる症例を確認したところ、108 例中 42 例に扁平上皮がんを含む群、108 例中 30 例に正常肺を含む群、76 例中 13 例に小細胞肺がん 8 例に大細胞神経内分泌がん 12 例にカルチノイドを含む群であることが判明した。それぞれの群に含まれる肺腺がんは、64 例、77 例、30 例であった。ここでそれぞれの群を、SCC (扁平上皮がん) クラス、NL(正常肺)クラス、NE (神経内分泌) クラスとした。これらのクラスは、分化度、喫煙、性別に相関を認めた。NE クラスは ASCL1 を含む共発現遺伝子を高発現していた。次に、申請者は ASCL1 遺伝子セットについてさらに解析を進めた。共発現遺伝子セットとは別に、遺伝子ノックダウンによって遺伝子セットを作成した。小細胞肺がん細胞株 DMS79 に ASCL1 の 2 種類の siRNA を導入し、ASCL1 の発現を抑制した細胞から RNA を抽出し、GeneChip® U133 Plus 2.0 アレイにて発現量測定した。コントロールを ASCL1 の発現で割った値が 2 倍以上のプローブセット 91 プローブセットを抽出した。この ASCL1 ノックダウン遺伝子セットで肺がんのデータセットを

分類したところ、3群が最もよい分類となった。同様に、各群に含まれる病理組織を確認したところ、89例中14例に小細胞肺癌6例に大細胞神経内分泌がん11例にカルチノイドを含む群、117例中29例に正常肺を含む群、86例中45例に扁平上皮がんを含む群、がありそれぞれを共発現の時と同様にNEクラス、NLクラス、SCCクラスとした。3群の生存解析では予後に有意な差が得られた ( $p=0.0003$ )。2つの遺伝子セットによる分類の重複をカウントしたところ、NEクラスは13例、SCCクラスは18例、NLクラスは60例が確認された。これら重複症例をスコアリングすることにより、「ASCL1 High Class」「ASCL1 Intermediate Class」「ASCL1 Low Class」と分類した。この3群の予後に有意差が得られた ( $p=0.0007$ )。Gene Ontologyによる解析では、ASCL1共発現セットには細胞周期と神経発生に関する Ontology が含まれており、ASCL1ノックダウン遺伝子セットには神経ペプチドシグナルのパスウェイが含まれていた。最後に、申請者は、他施設のデータセットに対して2つの遺伝子セットを検証した。検証には GeneChip® U95A アレイで計測された Harvard の肺腺がんのデータセット139例を用いた。このデータセットを用いた論文ではASCL1を高発現する予後不良のサブクラスが報告されていたが、ASCL1共発現遺伝子セットではこの予後不良のサブクラスを同様に同定できた。ASCL1ノックダウン遺伝子セットによる分類では有意差がなかったものの、2つの遺伝子セットでの重複症例13例とその他の症例の群について生存解析した結果有意差を認めた ( $p=0.024$ )。以上、本学位請求論文は、非小細胞肺癌の中でも肺腺がんについて、その神経内分泌特性と臨床上の意義について明らかにした。その方法としてマイクロアレイによる発現プロファイルを活用し、ASCL1の遺伝子セットを用いて非負値行列分解を行った。その結果、「ASCL1 High Class」「ASCL1 Intermediate Class」「ASCL1 Low Class」という予後に差のある3群の亜分類を同定した。本研究は、非小細胞がん、肺腺がんの神経内分泌性に関する臨床的意義、分類を考える上で非常に意義深いものである。よって本論文は、博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる